

WO 2016/024195

190

PCT/IB2015/056032

Residue name	Residue number	Accessible surface area (ASA) <A>	Buried surface area (BSA) by heavy chain (Å ²)	BSA by light chain ¹ (Å ²)	Total BSA by NOV0710 <A>	BSA / ASA (%)	Type of interaction
TYR	575	201.38	147.28	54.1	201.38	100.00	H-MC ¹ , Hydrophobic
ASN	573	128.75	116.17	4.34	120.51	93.60	H-SC ² , H-MC
ASP	574	95.9	47.31	0	47.31	91.04	Salt bridge
LYS	543	145.5	0	47.5	47.5	54.24	H-SC
VAL	577	93.73	21.59	52.36	73.95	78.90	
PRO	529	133.4	0	72.75	72.75	54.54	
SER	526	58.42	0	46.58	46.58	79.73	
SER	524	40.31	17.45	22.86	40.31	100.00	H-SC
GLN	522	108.66	29.79	0	29.79	27.42	
SER	571	28.68	0.34	24.21	24.55	85.60	
PRO	576	83.1	24.36	0	24.36	29.28	H-MC
ASP	541	33.1	0	22.1	22.1	66.93	H-SC
GLY	520	74.53	1.18	0	1.18	23.05	
VAL	569	26.11	0	16.9	16.9	64.73	
SEK	579	116.86	0	13.6	13.6	16.41	
GLN	578	116.86	13.18	0	13.18	11.28	
HIS	521	84.59	10.25	0	10.25	12.12	
LEU	527	41.01	0	10.07	10.07	24.55	
ASP	572	18.64	6.51	0	6.51	34.92	Salt bridge
PHE	525	9.03	0	5.15	5.15	57.03	
PHE	523	15.28	0.31	0	0.31	2.03	

¹Hydrogen bond by main-chain atoms; ²Hydrogen bond by side-chain atoms

Example 8: ELISA assay to validate co-crystal structure and determine binding of anti-CDH6 antibodies to wild-type and mutant CDH6 proteins.

[00415] Analysis of the CDH6 protein/NOV07 10 or /NOV07 12 crystal structures highlighted several amino acid residues (Asn573, Asp574 and Tyr575) with high buried surface values, suggesting they might be important for mediating the interaction of the antibodies with the CDH6 protein. We produced recombinant mutant CDH6 protein, replacing these residues by alanine (Table 11, SEQ ID NOs. 539, 540 and 541) and performed ELISA. 96-well Maxisorp plates (Nunc) were coated overnight at 4 °C with 1 ug/ml, 100ul/well of the appropriate recombinant human protein (CDH6 wt, CDH6-N573A, CDH6-D574A or CDH6-Y575A). All wells were then washed three times with PBS/ 0.1% Tween-20, blocked for one hour with PBS/ 1% BSA/ 0.1% Tween-20 and washed three times

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

191

with PBS/ 0.1% Tween-20. A serial dilution of anti-CDH6 antibodies was added to the relevant wells (100 nM starting concentration; 5-fold serial dilution) and plates were incubated at room temperature for two hours. Plates were washed three times with PBS/ 0.1% Tween-20 prior to the addition of a goat anti-human peroxidase linked detection antibody (Pierce, #31412, Thermo, Rockford, IL). diluted 1/10000 in PBS/ 1% BSA/ 0.1% Tween-20. Plates were incubated at room temperature for one hour before washing three times with PBS/ 0.1% Tween-20. 100 μ M TMB (3,3', 5,5' tetramethyl benzidine) substrate solution (BioFfx) was added to all wells for 6 minutes before stopping the reaction with 50 μ L 2.5% H₂SO₄. The extent of CDH6 antibody binding to each recombinant protein was determined by measuring the OD₄₅₀ using a SpectraMax plate reader (Molecular Devices). Dose response curves were analyzed using Graphpad Prism.

[00416] As shown in Figure 7, the D574A mutation abrogated binding of both NOV0710 and NOV712, confirming this residue is an essential component of a shared epitope of the two antibodies. Interestingly, the N573A mutant retains binding to NOV712 but not NOV0710, whereas the Y575A mutant retains binding to NOV0710 but not NOV0712. Of note, neither of these mutations impacted binding of the anti-CDH6 antibody NOV0720, which binds a distinct epitope (NOV0720 is the non-germlined version of NOV1132 in Figure 2) - indicating the mutants did not alter overall architecture of the proteins. These data further validate the co-crystal structures and confirm that the two antibodies feature overlapping, yet distinct epitopes.

Example 9: Preparation of antibody drug conjugates

Preparation of DM4 Conjugates by One-Step Process

[00417] An anti-CDH6 antibody, for example NOV0712, at a concentration of about 10.0 mg/mL, was mixed with DM4 (6.8-fold molar excess relative to the amount of antibody) and then with sulfo-SPDB (about 5.2-fold excess relative to the amount of antibody). The reaction was performed at 20° C in 20 mM EPPS [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid] buffer (pH 8.1) containing 10% DMA for approximately 16 hours. The reaction was quenched by adding 1 M acetic acid to adjust the pH to 5.0. After pH adjustment, the reaction mixture was filtered through a multi-layer (0.45/0.22 μ m) PVDF filter and purified and diafiltered into a 10 mM succinate buffer (pH 4.5) using Tangential Flow Filtration. An example of the instrument parameters for the Tangential Flow Filtration are listed in Table 14 below.

Table 14

Instrument parameters for the Tangential Flow Filtration

TFF Parameter	TFF Set Point
Bulk Concentration (Cb - g/L)	20

WO 2016/024195

192

PCT/IB2015/056032

TMP (psi)	12-18
Feed Flow rate (LMH)	324
Membrane Load (g/m ²)	50-150
Diavolumes	16
Diafiltration Buffer	20 mM Succinate, pH 4.5
Temperature (°C)	room temperature (20 - 25)

[00418] Conjugates obtained from the process described above were analyzed by: UV spectroscopy for cytotoxic agent loading (Maytansinoid to Antibody Ratio, MAR); SEC-HPLC for determination of conjugate monomer; and reverse-phase HPLC or hydrophobic shielded phase (Hisep)-HPLC for free maytansinoid percentage.

Preparation of ADCs with the SPDB or sulfo-SPDB linker and DM4 cytotoxic agent

[00419] Anti-CDH6 antibodies, for example, antibody NOV07 12, were combined with DM4 (6.8 and 10.2-fold molar excess) in 50 mM EPPS buffer (pH 8.1) containing -10 % DMA at 25 °C. To this mixture was added N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB, 4.0 and 6.0-fold molar excess, respectively) such that the final antibody concentration was 4 mg/mL and the final DMA content was 10%. The reaction was allowed to proceed for -16 hours at 25 °C in 50 EPPS buffer (pH 8.1). The conjugation reaction mixture was purified using a SEPHADEX™ G25 column equilibrated and eluted with 10 mM succinate, 250 mM glycine, 0.5% sucrose, 0.01% Tween 20, pH 5.5. Similar procedures were used to generate anti-CDH6-sulfo-SPDB-DM4 conjugates

[00420] Either of the above methods is useful in the conjugation of antibodies with SPDB-DM4 or sulfo-SPDB-DM4. Table 15 below provides an example of CDH6 ADCs.

Table 15

Properties of DM4-conjugated antibodies

Ab	MAR	Monomer %	Yield (%)	Free DM (%)
NOV0709	3.8	97	84	1.6
NOV0691	3.6	96	97	1.5
NOV0690	3.2	97	74	4.0
NOV0689	3.3	99	96	2.0
NOV0670	3.1	98	100	1.5
NOV0720	3.3	99	78	2.0
NOV0712	3.2	99	78	3.1
NOV0674	3.2	99	78	2.6
NOV0719	3.8	98	79	1.9

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

193

Preparation of SMCC-DM1 Conjugates by in situ Process

[00421] The anti-CDH6 antibodies can also be conjugated with SMCC-DM1 using an in situ process according to the following procedures. CDH6 antibodies were conjugated to DM1 using the sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimido methyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) linker. Stock solutions of DM1 and sulfo-SMCC heterobifunctional linker were prepared in DMA. Sulfo-SMCC and DM1 thiol were mixed together to react for 10 minutes at 25°C in DMA containing 40% v/v of aqueous 50 mM succinate buffer, 2 mM EDTA, pH 5.0, at the ratio of DM1 to linker of 1.3:1 mole equivalent and a final concentration of DM1 of 1.95 mM. The antibody was then reacted with an aliquot of the above in situ generated SMCC-DM1 so that the final conjugation conditions included 2.5 mg/mL of Ab in 50 mM EPPS, pH 8.0, 10% DMA (v/v) and a molar ratio of SMCC:Ab around 6.5. After approximately 18 hours at 25°C, the conjugation reaction mixture was purified using a SEPHADEX® G25 column equilibrated with 10 mM succinate, 250 mM glycine, 0.5% sucrose, 0.01% Tween 20, pH 5.5.

Example 10: Validation of anti-CDH6 antibody and ADC binding in a panel of CHO cell lines expressing CDH6 from human, cynomolgus, rat or mouse origins.

[00422] To validate unconjugated anti-CDH6 antibody and anti-CDH6-ADC binding to cells featuring expression of CDH6 from different species, FACS (Fluorescence Activated Cell sorting) analysis was performed on CHO cells engineered to express CDH6 from human, cynomolgus, rat and mouse origins. The generation of the CHO cell lines featuring CDH6 expression is described in Example 1; FACS methods are described in Example 3.

[00423] As shown in Figure 8, non-conjugated CDH6 antibody NOV0712 features comparable cellular binding to CDH6 from human, cynomolgus, rat and mouse origin. The NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 antibody drug conjugate features a comparable binding profile to non-conjugated NOV0712. This result indicates that the addition of a linker and payload does not interfere with binding affinity or specificity of anti-CDH6 antibodies.

Example 11: Assessment of CDH6 expression and cellular binding of CDH6-targeting antibodies and ADCs in a panel of ovarian cancer cell lines.

[00424] In preparation for evaluation of cellular activity of CDH6-targeting ADCs, the CDH6 cell surface expression levels were assessed in a panel of ovarian cancer cell lines by FACS. Specifically, a cell suspension was prepared by treating cells in culture with Accutase® Cell Dissociation Reagent (Gibco, #A1110501 Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions followed by washing the cells in FACS buffer (RPMI/1%BSA, Gibco, Grand Island, NY). Cells were resuspended in FACS buffer at 1×10^6 cells/ml and aliquoted into a 96-well round bottom plate at 100 μ i/well (Corning #CLS3360 Tewksbury, MA). Primary antibodies (anti-CDH6-PE (R&D Systems, #FAB2715P Minneapolis, MN) and control mouse IgG1 PE conjugate (R&D Systems,

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

194

#IC002P Minneapolis, MN) were diluted in FACS buffer at 5 µg/ml. Following three washes in 200µl cold FACS buffer, cells were analyzed on a BD FACS Canto II ® (BD Biosciences, San Jose, CA). Geomean of signal per sample was determined using FlowJo ® software.

[00425] OVCAR3 endogenously express high levels of CDH6. To generate an isogenic cell line with suppressed CDH6 expression, OVCAR3 were transduced with a lentiviral vector delivering a shRNA targeting CDH6 according to the manufacturer's instructions (Mission shRNA bacterial glycerol stock, #TRCN0000054117, Sigma, St. Louis, MO). OVCAR8 cells do not express CDH6 endogenously. To generate an isogenic cell line featuring CDH6 expression, OVCAR8 cells were transduced with a lentiviral construct driving expression of a human CDH6 cDNA. Specifically, the cDNA for CDH6 was purchased from Genecopoeia (#Z2028, Genecopoeia, Rockville, MA) and cloned into pLenti6.3 using Gateway® cloning according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA).

[00426] FACS analysis confirmed high levels of endogenous CDH6 expression in wild-type OVCAR3 and suppression of CDH6 in the OVCAR3 shRNACDH6 cell line. OVCAR8 cells were confirmed to be CDH6-negative, while high levels of exogenous expression of CDH6 were observed in the OVCAR8 engineered CDH6+ cells (Figure 9).

[00427] FACS analysis further confirmed specific cellular binding of generated CDH6-targeting antibodies and ADCs. As shown in Figure 10, a non-conjugated CDH6 antibody (NOV0712) features CDH6-specific binding pattern comparable to that of a sulfo-SPDB-DM4 conjugate using the same antibody and the sulfo-SPDB-DM4 linker/payload. A non-binding unconjugated IgG or ADC was included as control and found not to result in cell binding as expected. Again, indicating that the addition of a linker and payload does not interfere with affinity or specificity of anti-CDH6 antibodies.

Example 12: In vitro cellular activity of CDH6-targeting ADCs

[00428] *In vitro* cellular activity of SMCC-DM1 conjugates of a selection of anti-CDH6 antibodies was determined on a panel of cell lines comprising OVCAR3 (ovarian serous carcinoma, cultured in RPMI + 20% FCS), JHOS4 (1:1F12:DMEM+10%FBS), KNS42 (EMEM+10%FBS), NCIH661 (RPMI+10%FBS), SNU8 (RPMI+10%FBS) and OVCAR8 (RPMI+10%FBS). The OVCAR3 and NCIH661 cell lines were obtained from ATCC (#HTB-161 and #HTB-183, ATCC Manassas, VA). JHOS4 were obtained from RIKEN (#RCB 1678, RIKEN Cell Bank, RIKEN, Tsukuba, Japan). KNS42 were obtained from the Health Science Research Resources Bank HSRRB (#IFO50356, HSRRB, Osaka, Japan). SNU8 were obtained from the Korean Cell Line Bank KCLB (#00008, KCLB, Seoul, Korea). OVCAR8 were obtained from the NCI/DCTD Tumor/Cell Line Repository (NCI, Frederick, MA).

[00429] Cells in culture were counted and diluted in medium to a concentration of 1×10^5 cells/ml. 1000 cells/well were transferred to 384-well plates (Corning Costar#3707, Corning,

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

195

Tewksbury, MA). The ADC stock solution was prepared in 1.4ml Matrix tubes (Thermo, # 3790, Rockford, IL). A 10-point, 1:3 serial dilution was prepared in a 384-well deep-well plate (Brandtech Scientific Inc #701355, Essex, CT) and 25 µl were transferred per assay plate (triplicates) to yield a highest starting concentration of the ADC of 33nM. For controls, wells with cells only (=100% viability control) and cells incubated with an SMCC-DM1 conjugated non-targeting antibody (to check for non-target driven activity) were prepared. Plates were incubated for 120 h at 37°C and 5% CO₂. Cellular activity of the primary antibody/Fab-DM1 complexes was determined using CellTiter-Glo® reagent (Promega #G7571, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Viability was normalized to the cells only control and data were plotted using Tibco Spotfire (Tibco Software Inc, Palo Alto, CA)

[00430] A subset of CDH6-targeting ADCs is able to inhibit proliferation of CDH6-positive cells at concentrations (1.22 nM) that are inactive on cells that lack CDH6 expression (OVCAR8), indicating target-dependent *in vitro* cellular activity of the CDH6-ADC (Table 16).

Table 16

In vitro cellular activity of anti-CDH6 SMCC-DM1 conjugates. Table shows percent inhibition at 1.22nMADC.

Antibody	OVCAR3	JHOS4	KNS42	NCIH661	SNU8	OVCAR8
NOV0670	-29.97	-27.88	-18.63	5.14	-15.57	-23.77
NOV0672	-16.25	-22.96	-12.26	-6.14	-10.94	-16.16
NOV0674	-10.29	-11.94	-6.82	3.9	-1.42	-8.97
NOV0682	61.75	33.92	23.75	16.44	10.83	-2.17
NOV0685	-20.65	-14.67	-14.65	2.08	-0.1	-11.51
NOV0689	7.21	3.63	-3.11	-0.53	10.27	-7.29
NOV0690	84.8	50.97	56.81	14.55	18.39	-15.8
NOV0691	-1.5	-14.37	-9.23	-10.47	-2.56	-10.48
NOV0692	88.01	62.3	57.32	14.77	15.66	-10.83
NOV0693	85.73	58.08	15.17	25.87	35.56	-7.07
NOV0695	89	66.94	66.31	18.69	21.56	-7.04
NOV0699	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
NOV0705	68.57	40.35	-13.35	-3.15	6.4	-22.58
NOV0709	46.88	4.5	-4.2	5.91	-7.7	-8.34
NOV0710	90.84	69.01	56.98	38.7	42.4	6.53
NOV0712	87.62	67.56	56.82	32.46	31.35	1.68
NOV0713	-3.55	-6.22	-17.26	-9.74	7.79	-0.08
NOV0718	-3.8	-5.03	3.5	2.51	3.35	6.64
NOV0719	76.05	27.25	40.97	-9.87	3.18	-2
NOV0720	80.72	43.52	56.97	1.94	3.56	-3.9

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

196

Example 13: In vitro cellular activity of anti-CDH6 ADCs as SMCC-DM1 and SPDB-DM4 conjugates on ovarian cancer cell lines

[00431] *In vitro* cellular activity of anti-CDH6 ADCs as SMCC-DM1 and SPDB-DM4 conjugates was evaluated on a panel of ovarian cancer cell lines (Figure 11 and Table 17). To assess target-dependent and specific activity of the anti-CDH6 ADCs, isogenic cell line pairs were generated for the OVCAR3 and OVCAR8 cell lines as described in Example 11.

[00432] CDH6-targeting ADCs in both SMCC-DM1 and SPDB-DM4 formats exhibited target and dose-dependent cellular activity as indicated by inhibition of proliferation in CDH6 expressing cell lines compared to the non-expressing isogenic cell line pair and isotype control ADCs (Figure 11 and Table 17). The cellular activity assay was performed and analyzed as disclosed in Example 12.

Table 17

In vitro cellular activity of anti-CDH6 ADCs as SMCC-DM1 and SPDB-DM4 conjugates on ovarian cancer cell lines.

Compound	Linker/ Payload	OVCAR3		OVCAR3 shRNA_CDH6		OVCAR8		OVCAR8 (engineered CDH6+)	
		IP [nM]	Amax (%)	IP [nM]	Amax (%)	IP [nM]	Amax (%)	IP [nM]	Amax (%)
me-DM1	free payload	0.002	90	0.002	89	0.104	85	0.087	84
hIgG	SMCC- DM1	29.993	91	18.468	92	33	n/a	33	n/a
hIgG	SPDB- DM4	3.966	91	2.168	91	17.79	79	32.728	83
NOV0710	SMCC- DM1	1.034	101	18.52	93	33	5	0.102	94
NOV0710	SPDB- DM4	0.01	88	7.543	91	33	n/a	0.018	85
NOV0712	SMCC- DM1	0.065	88	11.249	94	33	n/a	0.015	95
NOV0712	SPDB- DM4	0.008	88	3.785	90	33	n/a	0.012	84

Example 14: In vitro cellular activity of CDH6-targeting antibodies or control IgG in either non-conjugated form or as sulfo-SPDB-DM4 antibody drug conjugate.

[00433] Cellular activity of the CDH6 antibody NOV0712 as either non-conjugated IgG or sulfo-SPDB-DM4 conjugate was assessed in a panel of ovarian cancer cell lines (see Example 11). A

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

197

non-targeting isotype control antibody in either non-conjugated form or as sulfo-SPDB-DM4 conjugate was further included. As shown in Figure 12, the CDH6-targeting antibody drug conjugate NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 exhibited target and dose-dependent cellular activity as indicated by inhibition of proliferation in CDH6 expressing cell lines (OVCAR3 and OVCAR8-CDH6+) compared to the non-expressing cell line (OVCAR8). No cellular activity was observed with non-conjugated NOV0712 antibody or a non-targeting IgG control. Marginal activity at concentrations understood to result in non-specific cytotoxicity were seen with a control IgG-sulfo-SPDB-DM4 conjugate. The cellular activity assay was performed and analyzed as disclosed in Example 9.

Example 15: In vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies as SMCC-DM1 conjugates in a xenograft mouse model of ovarian cancer.

[00434] The anti-tumor activity of a selection of anti-CDH6 ADCs were evaluated in the OVCAR-3 ovarian xenograft model. Female NOD-scid-gamma mice were implanted subcutaneously on the right flank with 1×10^6 OVCAR-3 cells containing 50% Matrigel™ (BD Biosciences) in phosphate buffer solution (PBS). The total injection volume containing cells in suspension was 200 μ l. Mice were enrolled in the study 29 days post implantation with average tumor volume of 165 mm³. After being randomly assigned to one of seven groups (n = 4/group), mice were administered a single i.v. dose of PBS (10 ml/kg), a non-target isotype control hlgG1-SMCC-DM1 (10 mg/kg), or one of five anti-CDH6-SMCC-DM1 (10 mg/kg). Tumor volumes and body weights were measured twice weekly. Each anti-CDH6-SMCC-DM1 ADC elicited an inhibitory effect upon tumor growth following a single dose of 10mg/kg, when compared to control arms (Figure 13).

[00435] The anti-tumor activity of a second selection of anti-CDH6 ADCs were evaluated in the OVCAR-3 ovarian xenograft model. Female NOD-scid-gamma mice were implanted subcutaneously on the right flank with 1×10^6 OVCAR-3 cells containing 50% Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA) in PBS. The total injection volume containing cells in suspension was 200 μ l. Mice were enrolled in the study 35 days post implantation with average tumor volume of 166 mm³. After being randomly assigned to one of seven groups (n = 4/group), mice were administered a single i.v. dose of PBS (10 ml/kg), a non-target isotype control hlgG1-SMCC-DM1 (10 mg/kg), or one of five anti-CDH6-SMCC-DM1 (10 mg/kg) plus NOV0712-SMCC-DM1 which had been dosed in the previous OVCAR3 triage. Tumor volumes and body weights were measured twice weekly. None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated (data not shown). Of the five anti-CDH6-SMCC-DM1, only NOV0690 elicited a response comparable to that of NOV0712-SMCC-DM1 (Figure 14).

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

198

Example 16: In vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies as SPDB-DM4 conjugates in a xenograft mouse model of ovarian cancer

[00436] The anti-tumor activity of a selection of anti-CDH6 ADCs were evaluated in the OVCAR-3 ovarian xenograft model. Female NOD-scid-gamma mice were implanted subcutaneously on the right flank with 1OxIO⁶ OVCAR-3 cells containing 50% Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA) in PBS. The total injection volume containing cells in suspension was 200 µl. Mice were enrolled in the study 21 days post implantation with average tumor volume of 174 mm³. After being randomly assigned to one of nine groups (n = 5/group), mice were administered a single i.v. dose of PBS, (10 ml/kg), a non-target isotype control hIgG1-SPDB-DM4 (5 mg/kg), a non-target isotype control hlgG1-SMCC-DM1 (5 mg/kg), NOV0712-SMCC-DM1 (5 mg/kg), or one of seven anti-CDH6-SPDB-DM4 (5 mg/kg). Tumor volumes and body weights were measured 1-2 times weekly. None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated at this dosage (data not shown). Of all the anti-CDH6-SPDB-DM4 agents, NOV0712-SPDB-DM4 elicited the greatest anti-tumor effect with regression 70 days post dose. NOV0710-SPDB-DM4 was the second most active anti-CDH6-SPDB-DM4 in this study (Figure 15).

Example 17: In vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies as SMCC-DM1 or SPDB-DM4 conjugates in a xenograft mouse model of ovarian cancer

[00437] The anti-tumor activity of a selection of anti-CDH6 ADC NOV07 12 in different linker-payload formats were evaluated in the OVCAR-3 ovarian xenograft model. Female NOD-scid-gamma mice were implanted subcutaneously on the right flank with 1OxIO⁶ OVCAR-3 cells containing 50% Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA) in PBS. The total injection volume containing cells in suspension was 200 µl. Mice were enrolled in the study 21 days post implantation with average tumor volume of 174 mm³. After being randomly assigned to one of five groups (n = 5/group), mice were administered a single i.v. dose of PBS, (10 ml/kg), a non-target isotype control hIgG1-SPDB-DM4 (5 mg/kg), a non-target isotype control hlgG1-SMCC-DM1 (5 mg/kg), NOV0712-SMCC-DM1 (5 mg/kg), or NOV0712-SPDB-DM4 (5 mg/kg). Tumor volumes and body weights were measured 1-2 times weekly. None of the mice showed a decrease in body weight (data not shown). Both L/P formats of NOV07 12 elicited an antitumor effect, but the SPDB-DM4 format was much more potent leading to a durable regression for over 70 days post dose (Figure 16). Pharmacokinetic sampling indicates the two agents have similar PK profiles (data not shown).

Example 18: In vivo efficacy of anti-CDH6 ADCs with different linker/payload formats in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of ovarian cancer

[00438] The anti-tumor activity of different linker payload formats of the anti-CDH6 ADC NOV0712 were evaluated in CDH6 expressing primary (patient derived) ovarian tumors xenografted

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

199

into mice. Human primary xenograft models were established by direct implantation of primary human tumor tissue subcutaneously into nu/nu nude mice. The resulting xenografts were serially passaged between 4 and 10 times prior to use in this study. Athymic nude mice were implanted with fragments of tumor approximately 27 mm³ in size, subcutaneously on the right flank. Mice were enrolled in the study 48 days post implant with a mean tumor volume of 178 mm³. After being randomized into one of eight groups (n = 5/group) Mice were administered a single i.v. dose every 14 days (Q14D), of PBS (10 ml/kg), a non-target isotype control hlgG1 linker payload format (-SMCC-DM1, -SPDB-DM4, -sulfo-SPDB-DM4), a NOV0712 linker payload format (-SMCC-DM1, -SPDB-DM4, -sulfo-SPDB-DM4) or NOV0712 as a naked antibody. All groups were dosed at 5 mg/kg. Tumor volumes and bodyweights were measured 1-2 times weekly. None of the mice showed a decrease in body weight (data not shown). NOV0712 as a naked antibody had no inhibitory effect upon tumor growth. NOV0712-SMCC-DM1 treatment did not result in regression in this model. Each cleavable format of NOV0712 resulted in regressions. NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 at 5mg/kg Q14D (single dose every 14 days) was the most potent treatment arm with durable tumor regression lasting over 150 days post first dose (Figure 17).

Example 19: In vivo efficacy of anti-CDH6 ADCs with different linker/payload formats in a xenograft mouse model of ovarian cancer

[00439] The anti-tumor activity of a selection of anti-CDH6 ADCs were evaluated in the OVCAR-3 ovarian xenograft model. Female NOD-scid-gamma mice were implanted subcutaneously on the right flank with 10x10⁶ OVCAR-3 cells containing 50% Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose CA) in PBS. The total injection volume containing cells in suspension was 200 µl. Mice were enrolled in the study 20 days post implantation with average tumor volume of 172 mm³. After being randomized into one of eight groups (n = 5/group) mice were administered a single i.v. dose of PBS (10 ml/kg), a non-target isotype control hIgG1-SPDB-DM4 (5 mg/kg), a non-target isotype control hIgG1-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg), NOV0712-SPDB-DM4 (1.25, 2.5 and 5 mg/kg), or NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 (1.25, 2.5 and 5 mg/kg). Tumor volumes and bodyweights were measured 1-2 times weekly throughout the duration of the study. None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated (data not shown). NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 was more efficacious than NOV0712-SPDB at both the 2.5 mg/kg and 5 mg/kg dose levels. A single 2.5 mg/kg dose of NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 lead to regression. A single 5 mg/kg dose of each format led to regression, but the effect of the sulfo-SPDB-DM4 dose outlasted that of the -SPDB-DM4 dose. Overall these data show the sulfo-SPDB-DM4 format is the most active format for targeting CDH6 using ADCs out of the panel assessed (Figure 18).

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

200

Example 20: In vivo efficacy of anti-CDH6 ADCs with different linker/payload formats in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of ovarian cancer

[00440] The anti-tumor activity of different linker payload formats of the anti-CDH6 ADC NOV0712 were evaluated in CDH6 expressing primary (patient derived) ovarian tumors xenografted into mice. Human primary xenograft models were established by direct implantation of primary human tumor tissue subcutaneously into nu/nu nude mice. The resulting xenografts were serially passaged between 4 and 10 times prior to use in this study. Athymic nude mice were implanted with fragments of tumor approximately 27 mm³ in size, subcutaneously on the right flank. Due to the variable latencies in the growth kinetics of the primary tumors, mice were entered into the study in a rolling fashion. Tumors were assigned to a group when upon reaching an appropriate volume, between 147 mm³ and 244 mm³ (the mean size at enrollment was 180 mm³). The first 5 mice were assigned to groups 1 through 5, the next 5 mice were assigned to groups 5 through 1, and so on until 5 groups (n=5/group) were filled. Upon enrollment each mouse was administered with an i.v. dose every 2 weeks (Q14D), of PBS(10 ml/kg), a non-target isotype control hIgG1-SMCC-DM1 (5 mg/kg), NOV0712-SMCC-DM1 (5 mg/kg), non-target isotype control hIgG1-sulfo-SPDB-DM4 (2.5 mg/kg) or NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 (2.5 mg/kg). Tumor volumes and bodyweights were measured twice weekly. None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated (data not shown). NOV0712-SMCC-DM1 5mg/kg Q14D is able to reduce tumor growth in this model. NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 2.5mg/kg Q14D is efficacious in halting tumor growth in this model for 42 days (Figure 19).

Example 21: In vivo efficacy of an anti-CDH6 ADC in a panel of patient-derived primary tumor xenograft mouse models of ovarian cancer.

[00441] The anti-tumor activity of an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) was assessed in a panel of 28 ovarian primary tumor xenograft (PTX) models in a 1x1x1 design (1PTX x 1 animal x 1 treatment). Human primary xenograft models were established by direct implantation of primary human tumor tissue subcutaneously into nu/nu nude mice. The resulting xenografts were serially passaged between 4 and 10 times prior to use in this study. Female nude mice were implanted subcutaneously in the axillary region, with a 3 x 3 x 3 mm tumor fragment using a 12 gauge trocar. Once a tumor measured 200-250 mm³ the mouse was enrolled into the study and treatment started. Upon enrollment each mouse was administered with an i.v. dose every 2 weeks (Q14D), of NOV0712-sulfo-SPDB-DM4 (5 mg/kg). None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated (data not shown). Tumor volumes and bodyweights were measured twice weekly. For visualization of anti-tumor activity, the percent tumor volume change over time was plotted using Tibco Spotfire (Tibco Software, Palo Alto, CA).

[00442] CDH6 expression in the PTX samples was assessed using immunohistochemistry (IHC) on samples from untreated PTX tumors. Specifically, at sacrifice, tumors were immediately

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

201

excised, collected into histology cassettes and fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. Cassettes were then transferred into 70% EtOH and processed and embedded in paraffin using routine histological procedures. Experimental FFPE blocks were cut at 3.5 μm as whole sections on slides. A rabbit polyclonal anti human CDH6 antibody obtained from Sigma-Aldrich (Cat # HPA007047, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) and used as the primary immunohistochemistry (IHC) antibody. The antibody was detected using Ventana Biotin-free DAB Detection Systems on the Ventana DISCOVERY XT Biomarker Platform (Tuscon, AZ).

[00443] The optimized protocol included standard exposure to Ventana Cell Conditioning #1 antigen retrieval reagent (Cat # 950-124). The primary antibody was diluted to a concentration of 1:200 in DAKO Cytomation Antibody Diluent (Cat # S0809), applied in 100 μl volume and incubated for 60 minutes at 37°C. Subsequently incubation with Ventana OmniMap prediluted HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Cat # 760-43 11) was performed for 4 minutes. The secondary antibody was then detected using the ChromoMap DAB kit (Cat # 760-159) and slides were counterstained for 4 minutes with Ventana Hematoxylin (Cat # 760-2021), followed by Ventana Bluing Reagent (Cat # 760-2037) for 4 minutes. Slides were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (95-100%), then in xylenes, followed by coverslipping. Coverslipped slides were evaluated by light microscopy and scanned by Leica/Aperio ScanScope slide scanner (Vista, CA). Scanned images of the stained slides were launched in Indica Labs HALO (Corrales, NM) opening from integrated Leica eSlide Manager/Aperio Spectrum (Vista, CA). Digital images were viewed, annotated and analyzed using Area Quantification Algorithm (Area Quantification v1.0) either with Classifier Module (CDH6 Loose Tumor 2, CDH6 Neg Tumor 2 & CDH6 Tumor & CDH6 tumor2) for tumor detection or without Classifier Module. Image analysis algorithms were used to detect any intensity.

[00444] As illustrated in Figure 20, efficacy of anti-CDH6 ADC was observed in the PTX models, particularly amongst tumor models featuring greater than twenty percent CDH6 positive tumor area by IHC. Of special note, 11/28 (39%) of the PTX models responded with complete tumor regression lasting in excess of 150 days.

Example 22: In vivo efficacy of an anti-CDH6 ADC dosed either at 2.5 mg/kg Lv. . 014D or 5 mg/kg Lv. 014D in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of renal cancer.

[00445] The anti-tumor activity of an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4, dosed either at 5mg/kg Q14D or 2.5 mg/kg, Q14D) was assessed in a renal primary tumor xenograft (PTX) model. Human primary xenograft models were established by direct implantation of primary human tumor tissue subcutaneously into nu/nu nude mice. The resulting xenografts were serially passaged between 4 and 10 times prior to use in this study. Female nude mice were implanted subcutaneously in the axillary region, with a 3 x 3 x 3 mm tumor fragment using a 12 gauge trocar. Animals were randomized into treatment groups on day 20 following tumor fragment implantation, when the average tumor volume was 195 mm³ (range 115-282 mm³). Treatments were initiated on Day 20. Anti-tumor

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

202

activity was determined on day 53 post tumor cell implant, 33 days post initiation of treatment, the last day when all animals remained on study. A non-targeting ADC was included as control for determining CDH6-specific anti-tumor activity. None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated (data not shown). As with the ovarian cancer models, efficacy of anti-CDH6 ADC was observed in renal PTX models featuring greater than twenty percent CDH6 positive tumor area by IHC. As shown in Figure 21, anti-CDH6 ADC treatment was efficacious against primary human tumors in a renal PTX model.

Example 23: In vivo efficacy of an anti-CDH6ADC dosed either at 2.5 mg/kg, 014D i.v. or 5 mg/kg i.v. 014D in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of renal cancer.

[00446] The anti-tumor activity of an anti-CDH6 ADC (NOV07 12-sulfo-SPDB-DM4) was assessed in a renal primary tumor xenograft (PTX) model. Human primary xenograft models were established by direct implantation of primary human tumor tissue subcutaneously into nu/nu mice. The resulting xenografts were serially passaged between 4 and 10 times prior to use in this study. Female nude mice were implanted subcutaneously in the axillary region, with a 3 x 3 x 3 mm tumor fragment using a 12 gauge trocar. Animals were randomized into treatment groups on day 14 following tumor fragment implantation, when the average tumor volume was 160mm³ (range 113-245 mm³). Treatments were initiated on Day 14. Anti-tumor activity was determined on day 50 post tumor cell implant. None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated (data not shown). As with the ovarian cancer models, efficacy of anti-CDH6 ADC was observed in renal PTX models featuring greater than twenty percent CDH6 positive tumor area by IHC. As shown in Figure 22, anti-CDH6 ADC treatment was efficacious against primary human tumors in a renal PTX model.

Example 24: In vivo efficacy of an anti-CDH6ADC dosed either at 2.5 mg/kg, 014D or 5 mg/kg 014D in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of renal cancer.

[00447] The anti-tumor activity of an anti-CDH6 ADC (NOV07 12-sulfo-SPDB-DM4) was assessed in a renal primary tumor xenograft (PTX) model. Human primary xenograft models were established by direct implantation of primary human tumor tissue subcutaneously into nu/nu nude mice. The resulting xenografts were serially passaged between 4 and 10 times prior to use in this study. Female nude mice were implanted subcutaneously in the axillary region, with a 3 x 3 x 3 mm tumor fragment using a 12 gauge trocar. Animals were randomized into treatment groups on day 19 following tumor fragment implantation, when the average tumor volume was 176 mm³ (range 123-267 mm³). Treatments were initiated on Day 19. Anti-tumor activity was determined on day 49 post tumor cell implant. None of the mice showed a decrease in body weight, indicating that the ADC was well tolerated (data not shown). As with the ovarian cancer models, efficacy of anti-CDH6 ADC was observed in renal PTX models featuring greater than twenty percent CDH6 positive tumor area by

WO 2016/024195

203

PCT/IB2015/056032

IHC. As shown in Figure 23, anti-CDH6 ADC treatment was efficacious against primary human tumors in a renal PTX model at both the 5 mg/kg and 2.5 mg/kg dosage.

Example 25 : Anti-CDH6 ADC in combination therapy

[00448] Anti CDH6 ADCs can be combined with small molecule inhibitors or other antibodies.. Using either the Chalice software (Zaliscus, Cambridge MA) or ComboExplorer application (Novartis, Basel CH), the response of the combination is compared to its single agents, against the widely used Loewe model for drug-with-itself dose-additivity (Lehar et al. Nat. Biotechnol. (2009) 27: 659-666; Zimmermann et al., Drug Discov. Today (2007) 12: **34⁴²**). Excess inhibition compared to additivity can be plotted as a full dose-matrix chart to visualize the drug concentrations where synergies occur. Table 18 shows several anti-CDH6 ADC/compound combinations.

[00449] Cell viability can be determined by measuring cellular ATP content using the CellTiter Glo® luminescence assay (Promega, Madison WI). One day before drug addition, 250-500 cells are plated into 384-well plates (Greiner, Monroe, NC) in 20 µl growth media. Cells are then incubated for 120 h with various concentrations of anti-CDH6 ADC (Table 18), as a single agent, single agent compounds or anti-CDH6 ADC/compound combinations before CellTiter Glo® reagent is added to each well and luminescence recorded on an Envision® plate reader (Perkin Elmer, Waltham MA). Luminescence values are used to calculate the inhibition of cell viability relative to DMSO-treated cells (0% inhibition).

Table 18

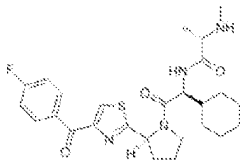
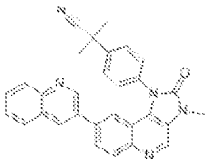
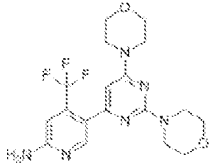
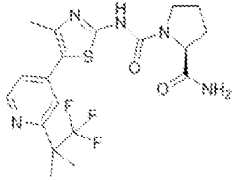
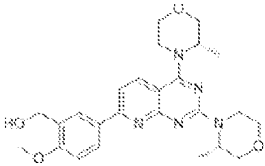
anti-CDH6ADC combinations

<u>Target of compound</u>	<u>anti-CDH6 ADC in combination with:</u>	<u>Structure</u>
RTKJ	Glivec®	Imatinib
RTKJ	Sutent®	Sunitinib

WO 2016/024195

204

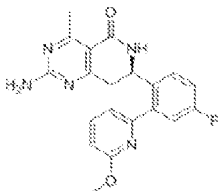
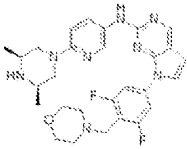
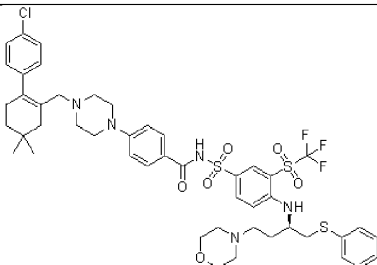
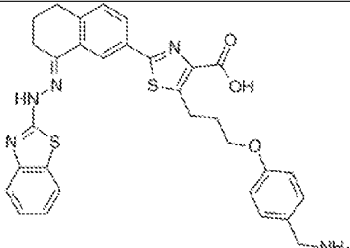
PCT/IB2015/056032

RTKi	Votrient®	pazopanib
IAPi	NVP-LCL161	
PI3K fam.	NVP-BEZ235	
pan PI3Ki	NVP-BKM120	
PI3K	NVP-BYL719	
mTORi (cat.)	NVP-CCG168	

WO 2016/024195

205

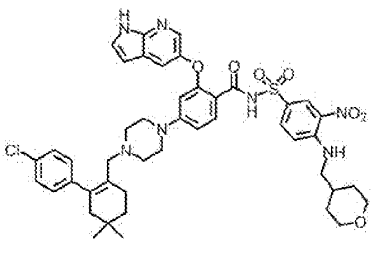
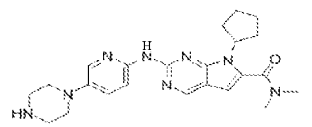
PCT/IB2015/056032

mTORi (allo.)	Afinitor®	Everolimus
HSP90i	NVP-HSP990	
JAK2	NVP-BVB808	
BCL2/BCL-XI	ABT263	
BCL-XI	WEHI-539	

WO 2016/024195

206

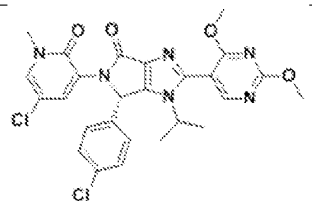
PCT/IB2015/056032

BCL2	ABT199	
HDAC	Farydak®	panobinostat
CDH4/6	NVP-LEE011	
MEK	Mekinist®	Trametinib
RAF	Tafinlar®	Dabrafenib
DNA	Paraplatin®	carboplatin

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

207

HDM2	NVP-HDM201	
Tubulin	Taxol®	paclitaxel
HER3	NVP-LJM716	anti-HER3 antibody (Garner et al., Cancer Res 2013 73(19):6024-35)

[00450] Figure 24 is an example of anti-CDH6 ADC in combination with small molecule inhibitors. SNU-8 ovarian cancer cells were grown as described in Example 12 and treated with titrations of an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) and either a Bcl2/Bcl-Xl inhibitor (ABT-263), a Bcl-Xl inhibitor (WEHI-539), an IAP inhibitor (NVP-LCL161) or a MEK inhibitor (trametinib). Potent synergy is seen with an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4) in combination with Bcl2/Bcl-Xl, Bcl-Xl, MEK and IAP inhibitors. Self-self combinations of ADC, for example, (CDH6-ADC + CDH6-ADC) or self-self combinations of a small molecule, for example, (NVP-LCL161 + NVP-LCL161) were included to distinguish dose additivity from true synergy and these scores are reported in Figure 24. As Figure 24 indicates, the CDH6-ADC plus small molecule combinations feature significantly higher Loewe Synergy Scores compared to the self-self combinations.

[00451] This data indicates that the combination of an ADC with an anti-mitotic payload (for example, sulfo-SPDB-DM4, SPDB-DM4, SMCC-DM1) or other payloads with a pro-apoptotic small molecule inhibitor (for example, ABT-261, ABT-199, WEHI-539 or IAP inhibitors like NVP-LCL161) or MAPK pathway inhibitors (i.e. trametinib) results in more effective execution of apoptosis following initial G2/M arrest or damage induced by the anti-mitotic/cytotoxic ADC payload alone.

[00452] In addition, CDH6-ADC combinations can further be assessed by in vivo combination treatment. CDH6-ADCs can synergize with immuno-modulatory agents targeting the PD/PD-L1 pathway such as Keytruda® (pembrolizumab) or Opdivo® (nivolumab). In summary, the anti-CDH6

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

208

ADCs disclosed herein can exert synergistic effects when used in combination with other molecules to lead to more options for treatment.

Example 26: CDH6 expression in tumor indications

[00453] CDH6 is over-expressed in several tumor indications including ovarian cancer, renal cancer, soft tissue cancer, CNS cancers, thyroid cancer and cholangiocarcinoma. CDH6 mRNA expression was assessed using the Affymetrix GeneChip® platform (Santa Clara, CA). Specifically, a Novartis-internal mRNA expression database comprising data on human tumor and normal tissue samples was queried using the CDH6 probeset 214803_at and the data were plotted using Tibco Spotfire (Palo Alto, CA). Each point on the graph represents an individual tumor or normal tissue sample. As illustrated in Figure 25, CDH6 features a restricted normal tissue expression and is significantly overexpressed in ovarian cancer, renal cancer, CNS cancers, soft tissue cancers and thyroid cancer and cholangiocarcinoma.

[00454] CDH6 expression was further assessed in a collection of human primary tumor samples by immuno-histochemistry using the protocol described in Example 21. As shown in Figure 26, CDH6 protein expression was observed in the majority of ovarian cancer and renal cancer samples. CDH6 expression was also frequently detected in endometrial cancer as well as cholangiocarcinoma. Interestingly, CDH6 expression within cholangiocarcinoma was enriched amongst the intra-hepatic sub-type.

[00455] It is understood that the examples and aspects described herein are for illustrative purposes only and that various modifications or changes in light thereof will be suggested to persons skilled in the art and are to be included within the spirit and purview of this application and scope of the appended claims.

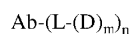
WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

209

CLAIMS**What is claimed is:**

1. An antibody drag conjugate of the formula



or a pharmaceutically acceptable salt thereof; wherein

Ab is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to an epitope of human CDH6;

L is a linker;

D is a drag moiety;

m is an integer from 1 to 8; and

n is an integer from 1 to 10.

2. The antibody drag conjugate of claim 1, wherein said n is 3 or 4.

3. The antibody drag conjugate of claim 1 or 2, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof specifically binds the extracellular domain of CDH6, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

4. The antibody drag conjugate of claim 1 or 2, wherein said antibody or antigen binding fragment specifically binds to an epitope of human CDH6 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:534.

5. The antibody drag conjugate of any of claims 1-4, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:224, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:225, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:226; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 227, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 228, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:229;

(ii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:210, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:211, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:212; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:213, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 214, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:215;

(iii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:266, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:267, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:268; and

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

210

a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 269, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:270, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 271;

(iv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:308, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:309, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:310; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:311, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:312, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:313;

(v) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 14, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 15, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 16; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 17, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 18, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 19;

(vi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:28, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:29, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:30; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:31, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:32, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:33;

(vii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:42, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:43, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:44; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:45, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:46, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:47;

(viii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:56, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:57, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:58; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:59, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:60, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:61;

(ix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:70, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:71, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:72; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:73, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:74, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:75;

(x) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:84, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:85, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:86; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:87, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 88, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 89;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

211

(xi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:98, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:99, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 100; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 101, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 102, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 103;

(xii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 112, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 113, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 114; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 115, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 116, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 117;

(xiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 126, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 127, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 128; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 129, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 130, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 131;

(xiv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 140, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 141, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 142; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 143, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 144, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 145;

(xv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 154, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 155, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 156; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 157, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 158, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 159;

(xvi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 168, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 169, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 170; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 171, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 172, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 173;

(xvii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 182, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 183, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 184; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 185, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 186, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 187;

(xviii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 196, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 197, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 198; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 199, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:200, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:201;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

212

(xix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:238, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:239, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:240; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:241, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:242, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:243;

(xx) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:252, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:253, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:254; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:255, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:256, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:257;

(xxi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:280, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:281, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:282; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:283, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:284, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:285;

(xxii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:294, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:295, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:296; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:297, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:298, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:299; or

(xxiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:322, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:323, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:324; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:325, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:326, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:327.

6. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims in which at least one amino acid within a CDR is substituted by a corresponding residue of a corresponding CDR of another anti-CDH6 antibody in Table 5 or 6.

7. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims in which one or two amino acids within a CDR have been modified, deleted or substituted.

8. The antibody drug conjugate of any of claims 1-4, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 230, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:231;

(ii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 216, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:217;

WO 2016/024195

213

PCT/IB2015/056032

- (iii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 272, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:273;
- (iv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:3 14, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:3 15;
- (v) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:20, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:21;
- (vi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 34, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:35;
- (vii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:48, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:49;
- (viii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:62, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:63;
- (ix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:76, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:77;
- (x) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:90, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:91;
- (xi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 104, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 105;
- (xii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 118, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 119;
- (xiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 132, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 133;
- (xiv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 146, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 147;
- (xv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 160, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:161;
- (xvi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 174, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 175;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

214

(xvii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 188, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 189;

(xviii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 202, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:203;

(xix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 244, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:245;

(xx) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:258, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:259;

(xxi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:286, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:287;

(xxii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:300, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:301; or

(xxiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:328, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:329.

9. The antibody drug conjugate of any of claims 1-4, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 234, and a light chain that comprises SEQ ID NO:235;

(ii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 220, and a light chain that comprises SEQ ID NO:221

(iii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 276, and a light chain that comprises SEQ ID NO:277;

(iv) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:3 18, and a light chain that comprises SEQ ID NO:3 19;

(v) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:24, and a light chain that comprises SEQ ID NO:25;

(vi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 38, and a light chain that comprises SEQ ID NO:39;

(vii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:52, and a light chain that comprises SEQ ID NO:53;

(viii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:66, and a light chain that comprises SEQ ID NO:67;

(ix) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:80, and a light chain that comprises SEQ ID NO:81;

(x) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:94, and a light chain that comprises SEQ ID NO:95;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

215

- (xi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 108, and a light chain that comprises SEQ ID NO: 109;
 - (xii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 122, and a light chain that comprises SEQ ID NO: 123;
 - (xiii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 136, and a light chain that comprises SEQ ID NO:137;
 - (xiv) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 150, and a light chain that comprises SEQ ID NO:151;
 - (xv) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 164, and a light chain that comprises SEQ ID NO: 165;
 - (xvi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 178, and a light chain that comprises SEQ ID NO:179;
 - (xvii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 192, and a light chain that comprises SEQ ID NO:193;
 - (xviii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 206, and a light chain that comprises SEQ ID NO:207;
 - (xix) a heavy chain that comprises SEQ ID NO: 248, and a light chain that comprises SEQ ID NO:249;
 - (xx) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:262, and a light chain that comprises SEQ ID NO:263;
 - (xxi) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:290, and a light chain that comprises SEQ ID NO:291;
 - (xxii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:304, and a light chain that comprises SEQ ID NO:305; or
 - (xxiii) a heavy chain that comprises SEQ ID NO:332, and a light chain that comprises SEQ ID NO:333.
10. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims that retains at least 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 or 99% identity over either the variable light or variable heavy region.
11. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human engineered antibody, a human antibody, a single chain antibody (scFv) or an antibody fragment.

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

216

12. The antibody drag conjugate of any one of claims 1-11, wherein said linker (L) is selected from the group consisting of a cleavable linker, a non-cleavable linker, a hydrophilic linker, a procharged linker and a dicarboxylic acid based linker.

13. The antibody drag conjugate of claim 12, wherein the linker is derived from a cross-linking reagent selected from the group consisting of: N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)2-sulfo-butanoate (sulfo-SPDB), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)pentanoate (SPP), N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)butanoate (SPDB), N-succinimidyl iodoacetate (SIA), N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate (SIAB), maleimide PEG NHS, N-succinimidyl 4-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylate (SMCC), N-sulfosuccinimidyl 4-(maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylate (sulfo-SMCC) or 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 17-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oate (CXI-1).

14. The antibody drag conjugate of claim 13, wherein said linker is derived from N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)2-sulfo-butanoate (sulfo-SPDB).

15. The antibody drag conjugate of any one of claims 1-14, wherein said drag moiety (D) is selected from a group consisting of: a maytansinoid, a V-ATPase inhibitor, a pro-apoptotic agent, a Bcl2 inhibitor, an MCL1 inhibitor, a HSP90 inhibitor, an IAP inhibitor, an mTor inhibitor, a microtubule stabilizer, a microtubule destabilizer, an auristatin, a dolastatin, a MetAP (methionine aminopeptidase), an inhibitor of nuclear export of proteins CRM1, a DPPIV inhibitor, proteasome inhibitors, inhibitors of phosphoryl transfer reactions in mitochondria, a protein synthesis inhibitor, a kinase inhibitor, a CDK2 inhibitor, a CDK9 inhibitor, a kinesin inhibitor, an HDAC inhibitor, a DNA damaging agent, a DNA alkylating agent, a DNA intercalator, a DNA minor groove binder and a DHFR inhibitor.

16. The antibody drag conjugate of claim 15, wherein the drag moiety is a maytansinoid.

17. The antibody drag conjugate of claim 16, wherein the maytansinoid is N(2')-deacetyl-N2-(4-mercapto-4-methyl-1-oxopentyl)-maytansine (DM4) or N(2')-deacetyl-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine (DM1).

18. The antibody drag conjugate of any of the preceding claims in combination with another therapeutic agent.

19. The antibody drag conjugate of any of the preceding claims in combination with a therapeutic agent listed in Table 18.

WO 2016/024195

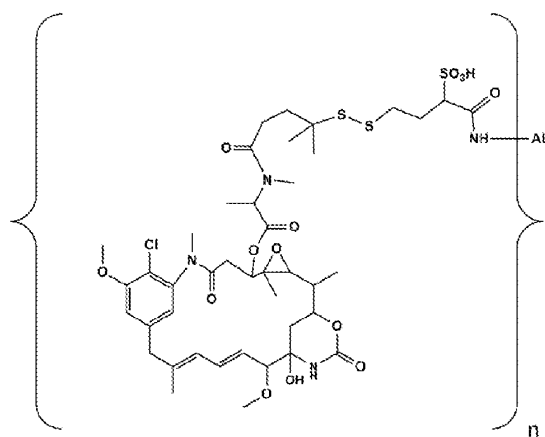
PCT/IB2015/056032

217

20. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.

21. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims in combination with an immune modulatory molecule.

22. An antibody drug conjugate of the formula:



Ab-sulfo-SPDB-DIV14

or a pharmaceutically acceptable salt thereof; wherein;

Ab is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to human CDH6, and n is an integer from 1 to 10.

23. The antibody drug conjugate of claim 22, wherein said antibody or antigen binding fragment specifically binds to an epitope of human CDH6 at (SEQ ID NO:4).

24. The antibody drug conjugate of claim 22, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof specifically binds human CDH6 at (SEQ ID NO:534).

25. The antibody drug conjugate of claim 22, wherein said Ab is an antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:224, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:225, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:226; and

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

218

a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 227, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 228, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:229;

(ii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:210, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:211, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:212; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:213, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 214, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:215;

(iii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:266, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:267, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:268; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 269, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:270, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 271;

(iv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:308, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:309, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:310; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:311, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:312, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:313;

(v) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 14, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 15, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 16; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 17, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 18, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 19;

(vi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:28, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:29, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:30; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:31, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:32, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:33;

(vii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:42, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:43, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:44; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:45, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:46, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:47;

(viii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:56, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:57, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:58; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:59, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:60, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:61;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

219

(ix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:70, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:71, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:72; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:73, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:74, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:75;

(x) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:84, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:85, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:86; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:87, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 88, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 89;

(xi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:98, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:99, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 100; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 101, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 102, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 103;

(xii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 112, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 113, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 114; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 115, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 116, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 117;

(xiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 126, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 127, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 128; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 129, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 130, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 131;

(xiv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 140, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 141, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 142; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 143, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 144, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 145;

(xv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 154, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 155, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 156; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 157, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 158, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 159;

(xvi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 168, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 169, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 170; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 171, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 172, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 173;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

220

(xvii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 182, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 183, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 184; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 185, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 186, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 187;

(xviii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 196, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 197, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 198; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 199, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 200, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 201;

(xix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 238, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 239, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 240; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 241, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 242, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 243;

(xx) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 252, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 253, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 254; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 255, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 256, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 257;

(xxi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 280, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 281, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 282; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 283, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 284, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 285;

(xxii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 294, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 295, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 296; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 297, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 298, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 299; or

(xxiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 322, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 323, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 324; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 325, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 326, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 327.

26. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims in which at least one amino acid within a CDR is substituted by a corresponding residue of a corresponding CDR of another anti-CDH6 antibody in Table 5 or 6.

WO 2016/024195

221

PCT/IB2015/056032

27. The antibody drag conjugate of any of the preceding claims in which one or two amino acids within a CDR have been modified, deleted or substituted.

28. The antibody drag conjugate of claim 22, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 230, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:231;

(ii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 216, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:217;

(iii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 272, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:273;

(iv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:314, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:315;

(v) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:20, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:21;

(vi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 34, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:35;

(vii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:48, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:49;

(viii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:62, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:63;

(ix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:76, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:77;

(x) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:90, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:91;

(xi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 104, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 105;

(xii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 118, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 119;

WO 2016/024195

222

PCT/IB2015/056032

(xiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 132, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 133;

(xiv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 146, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 147;

(xv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 160, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 161;

(xvi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 174, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 175;

(xvii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 188, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 189;

(xviii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 202, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:203;

(xix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 244, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:245;

(xx) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:258, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:259;

(xxi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:286, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:287;

(xxii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:300, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:301; or

(xxiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:328, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:329.

29. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims that retains at least 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 or 99% identity over either the variable light or variable heavy region.

30. The antibody drug conjugate of any of claims 22-29, wherein the antibody is a monoclonal antibody, a chimeric antibody, a humanized antibody, a human engineered antibody, a human antibody, a single chain antibody(scFv) or an antibody fragment.

31. The antibody drug conjugate of any of claims 22-29, wherein said n is an integer from 2 to 8.

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

223

32. The antibody drug conjugate of any of claims 22-29, wherein said n is an integer from 3 to 4.
33. The antibody drug conjugate of any of claims 22-32 in combination with another therapeutic agent.
34. The antibody drug conjugate of any of claims 22-32 in combination with a therapeutic agent listed in Table 18.
35. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.
36. The antibody drug conjugate of any of the preceding claims in combination with an immune modulatory molecule.
37. A pharmaceutical composition comprising the antibody drug conjugate of any one of claims 1-32 and a pharmaceutically acceptable carrier.
38. The pharmaceutical composition of claim 37 wherein said composition is prepared as a lyophilisate.
39. A method of treating an CDH6 positive cancer in a patient in need thereof, comprising administering to said patient the antibody drug conjugate of any of claims 1-32, or the pharmaceutical composition of claims 37-38.
40. The method of claim 39, wherein said cancer is selected from the group consisting of: ovarian cancer, renal cancer, hepatic cancer, soft tissue cancer, CNS cancers, thyroid cancer and cholangiocarcinoma.
41. The method of claim 39, wherein the antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition is administered in combination with another therapeutic agent.
42. The method of claim 39, wherein the antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition is administered in combination with a therapeutic listed in Table 18.
43. The method of claim 39, wherein the antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition is administered in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.
44. The method of claim 39, wherein the antibody drug conjugate or the pharmaceutical composition is administered in combination with an immune modulatory molecule.

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

224

45. The antibody drag conjugate of any of claims 1-32 for use as a medicament.
46. The antibody drag conjugate of any of claims 1-32, or the pharmaceutical composition of any of claims 37-38, for use in the treatment of a CDH6 positive cancer.
47. The antibody drag conjugate of claim 45 administered in combination with another therapeutic agent.
48. The antibody drag conjugate of claim 45 administered in combination with a therapeutic agent listed in Table 18.
49. The antibody drag conjugate of claim 45 in combination with a BCL2 inhibitor, a BCL-XL inhibitor, a BCL2/BCL-XL inhibitor, an IAP inhibitor or a MEK inhibitor.
50. The antibody drag conjugate of claim 45 in combination with an immune modulatory molecule.
51. A nucleic acid that encodes the antibody or antigen binding fragment of any of claims 1-30.
52. A vector comprising the nucleic acid of claim 51.
53. A host cell comprising the vector according to claim 52.
54. A process for producing an antibody or antigen binding fragment comprising cultivating the host cell of claim 53 and recovering the antibody from the culture.
55. A process for producing an anti-CDH6 antibody drag conjugate, the process comprising:
- (a) chemically linking N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)2-sulfo-butanoate (sulfo-SPDB) to a drag moiety DM-4;
 - (b) conjugating said linker-drag to the antibody recovered from the cell culture of claim 55; and
 - (c) purifying the antibody drag conjugate.
56. The antibody drag conjugate made according to claim 55 having an average maytansinoid to antibody ratio (MAR), measured with a UV spectrophotometer, about 3.5.
57. An antibody or antigen binding fragment thereof that comprises:
- (i) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:224, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:225, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:226; and
 - a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 227, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 228, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:229;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

225

(ii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:210, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:211, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:212; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:213, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 214, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:215;

(iii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:266, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:267, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:268; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 269, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:270, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 271;

(iv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:308, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:309, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:310; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:311, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:312, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:313;

(v) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 14, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 15, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 16; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 17, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 18, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 19;

(vi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:28, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:29, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:30; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:31, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:32, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:33;

(vii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:42, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:43, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:44; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:45, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:46, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:47;

(viii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:56, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:57, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:58; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:59, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:60, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:61;

(ix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:70, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:71, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:72; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:73, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:74, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:75;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

226

(x) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:84, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:85, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:86; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO:87, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 88, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 89;

(xi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:98, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:99, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 100; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO: 101, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 102, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 103;

(xii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 112, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 113, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 114; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO: 115, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 116, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 117;

(xiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 126, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 127, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 128; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO: 129, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 130, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 131;

(xiv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 140, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 141, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 142; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO: 143, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 144, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 145;

(xv) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 154, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 155, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 156; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO: 157, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 158, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 159;

(xvi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 168, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 169, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 170; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO: 171, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 172, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 173;

(xvii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 182, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 183, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 184; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDRI of SEQ ID NO: 185, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO: 186, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO: 187;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

227

(xviii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO: 196, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO: 197, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO: 198; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO: 199, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:200, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:201;

(xix) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:238, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:239, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:240; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:241, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:242, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:243;

(xx) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:252, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:253, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:254; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:255, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:256, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:257;

(xxi) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:280, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:281, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:282; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:283, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:284, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:285;

(xxii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:294, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:295, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:296; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:297, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:298, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:299; or

(xxiii) a light chain variable region that comprises (a) a LCDR1 (CDR-Complementarity Determining Region) of SEQ ID NO:322, (b) a LCDR2 of SEQ ID NO:323, (c) a LCDR3 of SEQ ID NO:324; and a heavy chain variable region that comprises: (d) a HCDR1 of SEQ ID NO:325, (e) a HCDR2 of SEQ ID NO:326, and (f) a HCDR3 of SEQ ID NO:327.

58. The antibody or antigen binding fragment thereof of claim 57 in which at least one amino acid within a CDR is substituted by a corresponding residue of a corresponding CDR of another anti-CDH6 antibody in Table 5 or 6.

59. The antibody or antigen binding fragment thereof of claim 57, wherein said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

(i) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 230, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:231;

WO 2016/024195

228

PCT/IB2015/056032

- (ii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 216, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:217;
- (iii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 272, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:273;
- (iv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:3 14, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:3 15;
- (v) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:20. and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:21;
- (vi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 34, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:35;
- (vii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:48, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:49;
- (viii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:62, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:63;
- (ix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:76, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:77;
- (x) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:90, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:91;
- (xi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 104, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 105;
- (xii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 118, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 119;
- (xiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 132, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 133;
- (xiv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 146, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 147;
- (xv) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 160, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 161 ;

WO 2016/024195

PCT/IB2015/056032

229

- (xvi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 174, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 175;
- (xvii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 188, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO: 189;
- (xviii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 202, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:203;
- (xix) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO: 244, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:245;
- (xx) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:258, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:259;
- (xxi) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:286, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:287;
- (xxii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:300, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:301; or
- (xxiii) a heavy chain variable region (vH) that comprises SEQ ID NO:328, and a light chain variable region (vL) that comprises SEQ ID NO:329.
60. A diagnostic reagent comprising the antibody or antigen binding fragment thereof of claim 57 or 59 which is labeled.
61. The diagnostic reagent of claim 60, wherein the label is selected from the group consisting of a radiolabel, a fluorophore, a chromophore, an imaging agent, and a metal ion.

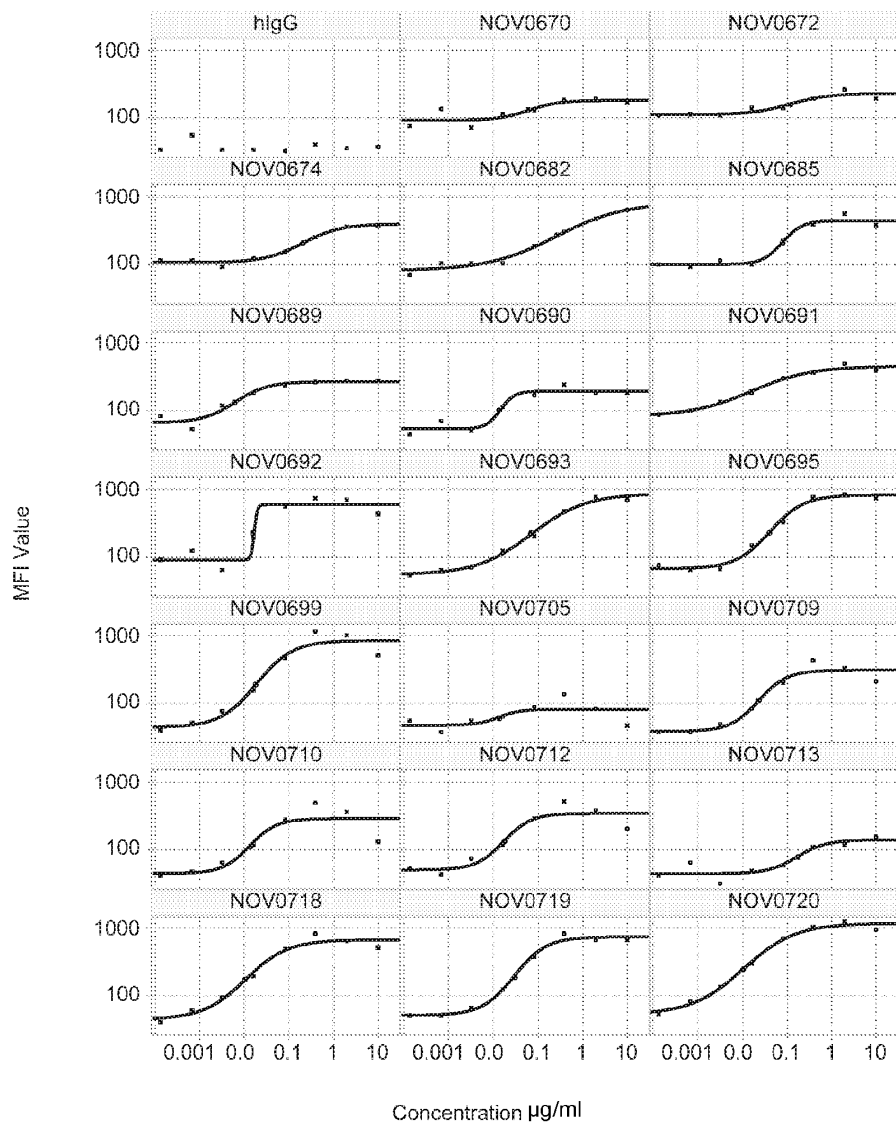
WO 2016/024195

1/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 1

Determination of cellular binding EC50 of CDH6 IgGs by FACS on OVCAR3 cells



WO 2016/024195

2/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 2

Epitope binning of anti-CDH6 antibodies using competitive binding assay on Biacore

	NOV1126	NOV1127	NOV1132	NOV0692	NOV0710	NOV0712	NOV0719
NOV1126	8.59	16.47	23.7	7.829	15	9.506	25.42
NOV1127	56.62	36.74	39.28	50.79	32.73	24.73	46.9
NOV1132	30.06	17.82	1.08	23.2	10.62	6.004	20.71
NOV0692	18.7	25.45	17.87	-2.84	8.84	5.12	13.48
NOV0710	36.93	30.92	17.84	17.89	-3.562	-3.264	16.15
NOV0712	26.66	22.38	14.3	14.14	-2.167	-1.821	11.05
NOV0719	61.59	51.5	33.65	35.53	21.94	16.48	-2.356

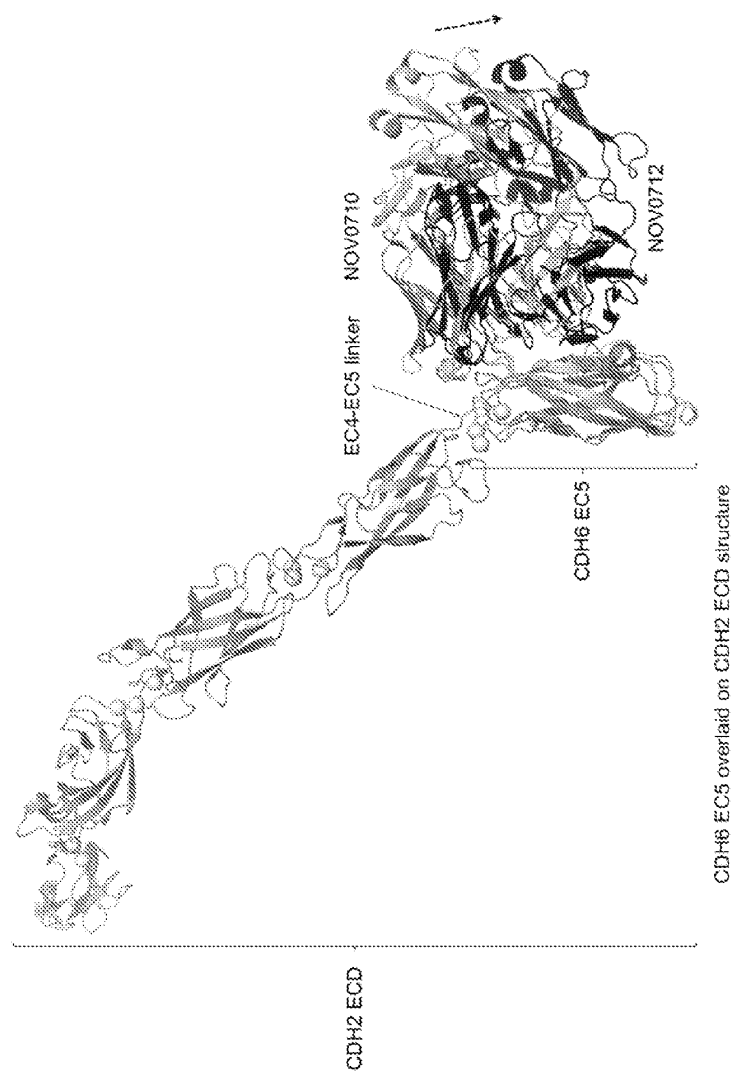
WO 2016/024195

4/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 4

Overlay of CDH6 EC5/NOV0712 and CDH6 EC5/NOV0710 complex structures onto the full-length ECD structure of CDH2 by superposition of EC5 domains.
The lighter-colored ribbon is NOV0710, the darker one is NOV0712



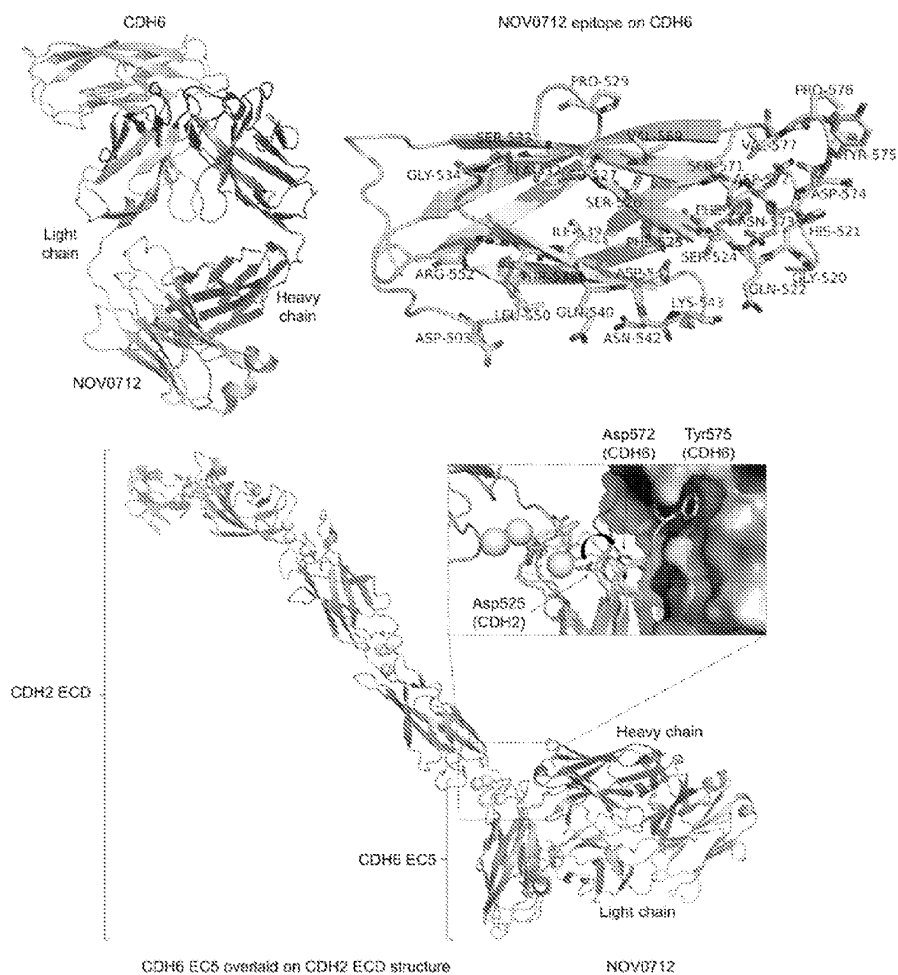
WO 2016/024195

5/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 5

Upper panel: Structure of NOV0712 binding to CDH6. Upper panel: overall structure of NOV0712 binding to CDH6 EC5 (left) and detailed view of NOV0712 epitope residues on CDH6 (right, shown as sticks and labeled). Lower panel: NOV0712 binds the majority of a Ca²⁺-binding loop in CDH6 EC5 (residues 571-579) and induces an “out” conformation of the loop



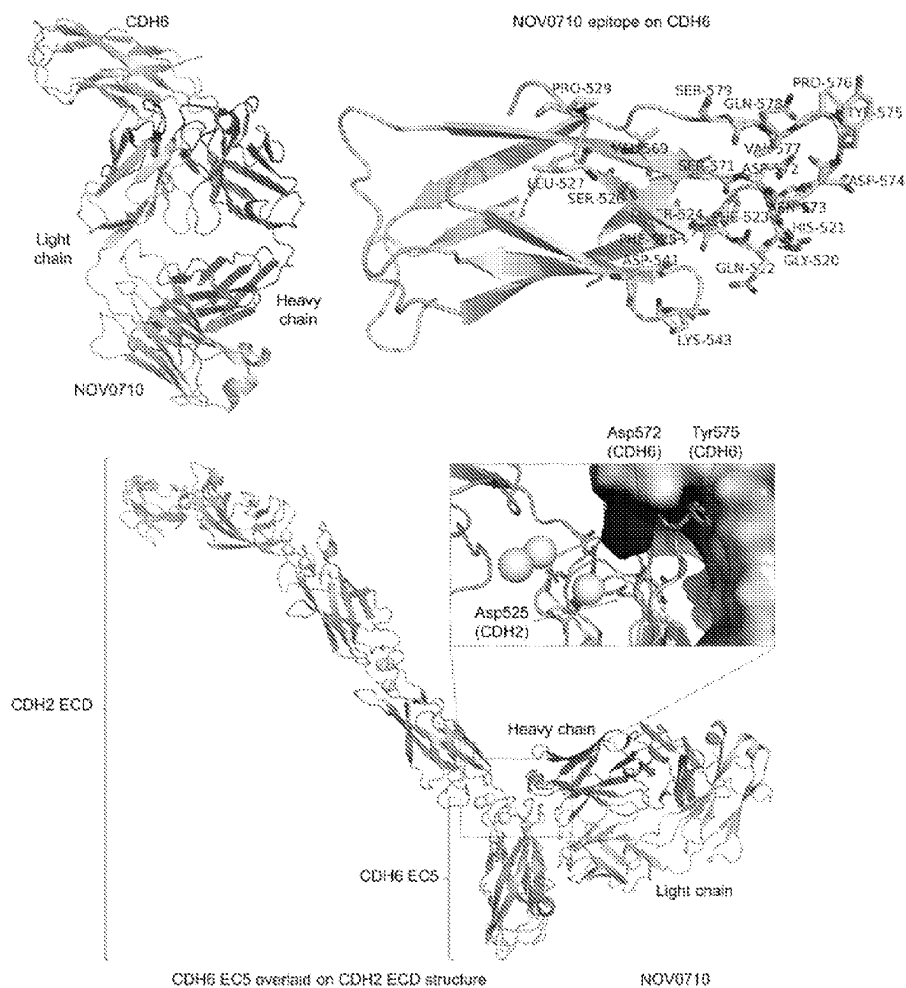
WO 2016/024195

6/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 6

Upper panel: Structure of NOV0710 binding to CDH6. Upper panel: overall structure of NOV0710 binding to CDH6 EC5 (left) and detailed view of NOV0710 epitope residues on CDH6 (right, shown as sticks and labeled). Lower panel: NOV0710 binds the majority of a Ca²⁺-binding loop in CDH6 EC5 (residues 571-579) and induces an “out” conformation of the loop



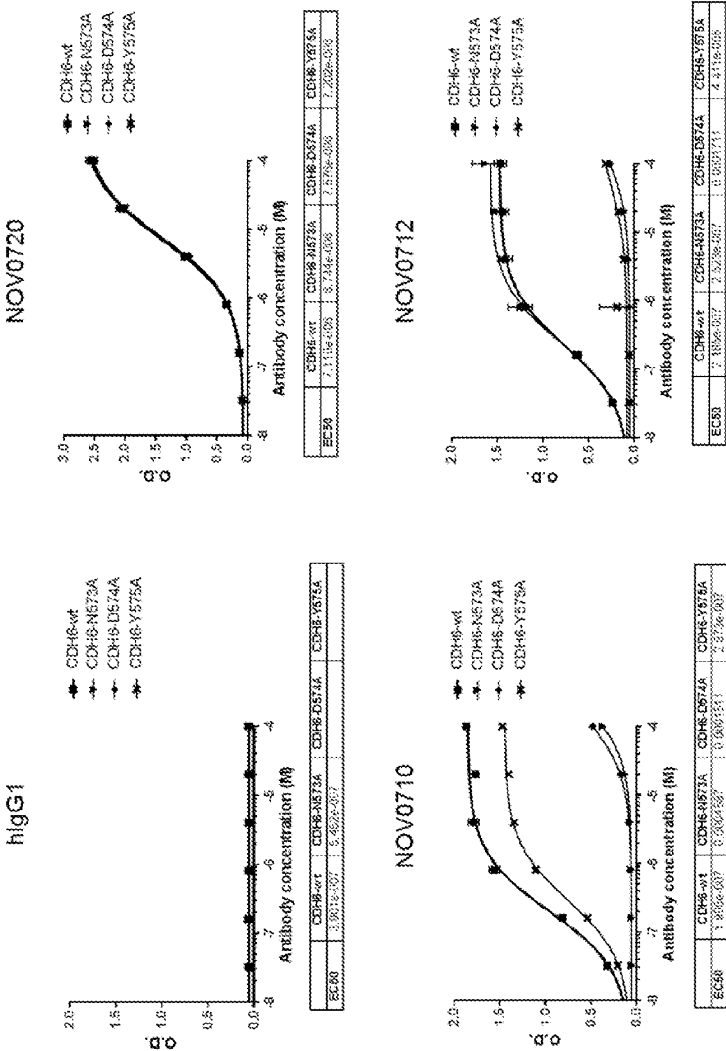
WO 2016/024195

7/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 7

ELISA assay to evaluate binding of CDH6 antibodies to wild-type and mutant forms of CDH6



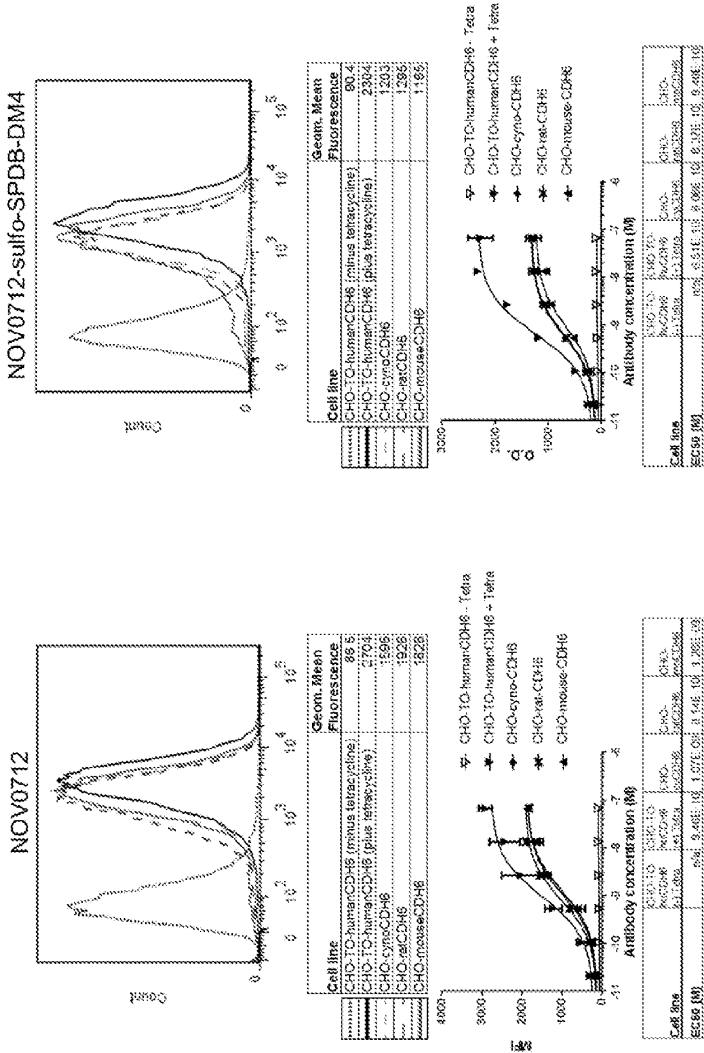
WO 2016/024195

8/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 8

Cellular binding of of CDH6-targeting antibodies in either non-conjugated form or as a sulfo-SPDB-DM4 antibody drug conjugate in a panel of CHO cell lines expressing either human, cynomolgus, rat or mouse CDH6



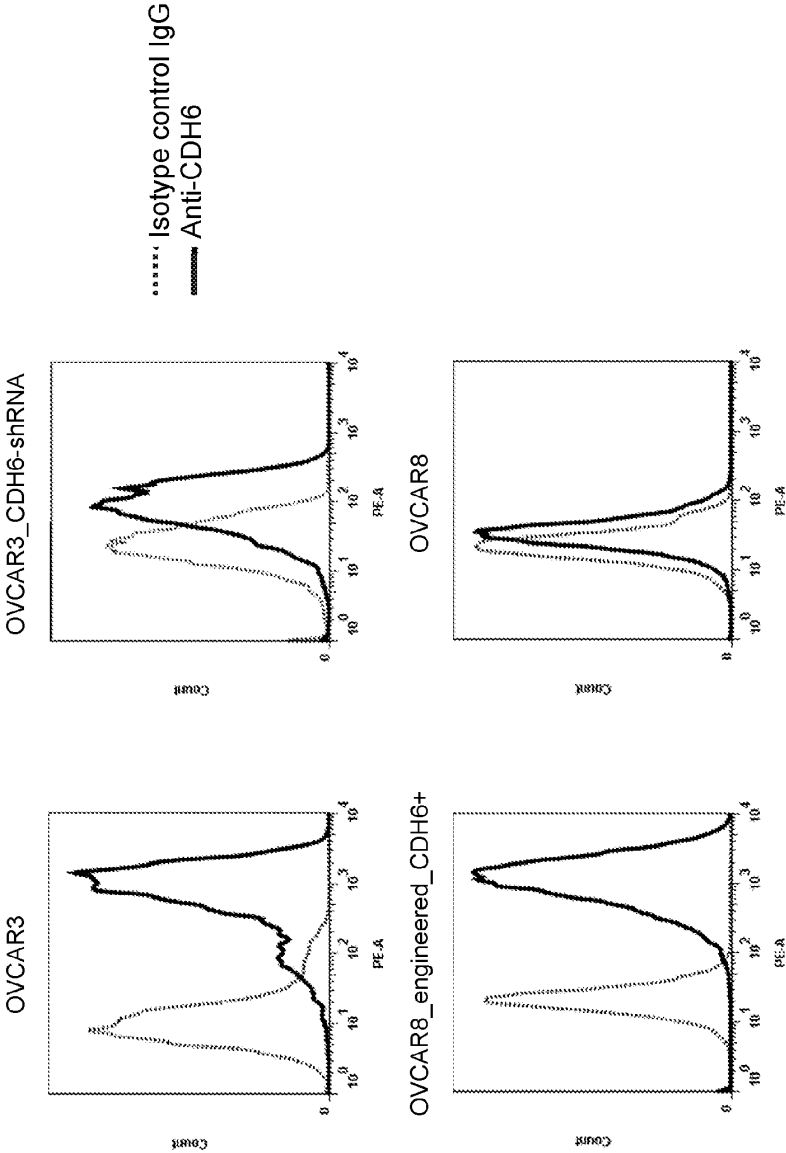
WO 2016/024195

9/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 9

FACS analysis of CDH6 expression in ovarian cancer cell lines OVCAR3, OVCAR3_CDH6_shRNA, OVCAR8 and OVCAR8_engineered_CDH6+



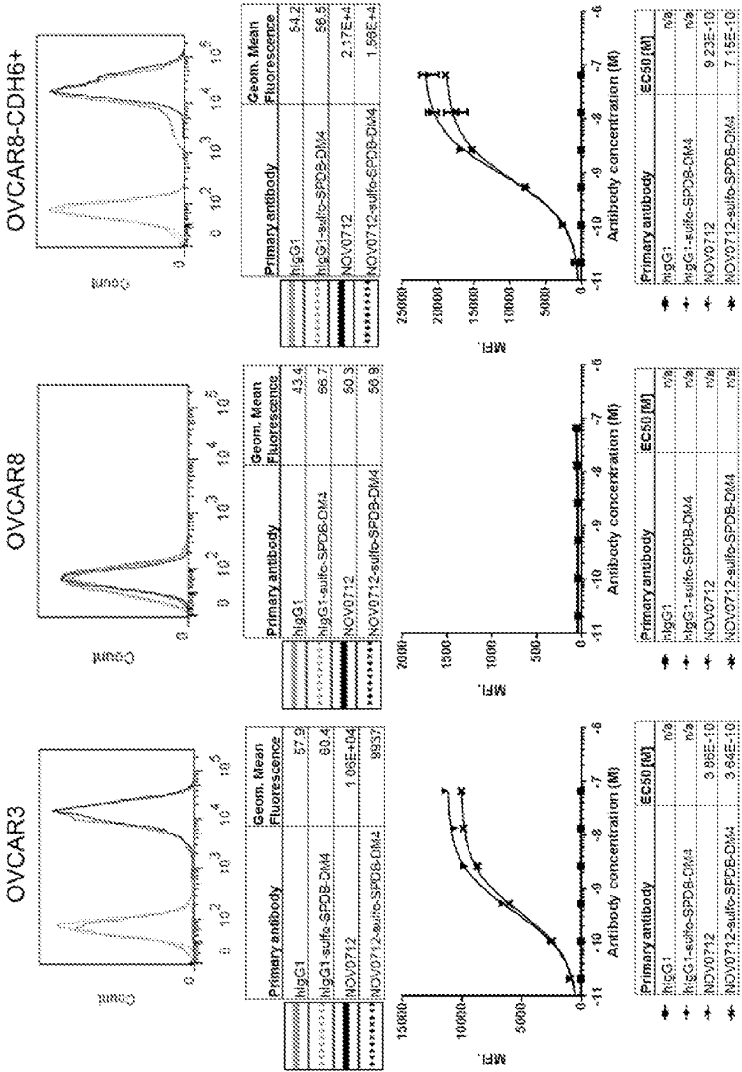
WO 2016/024195

10/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 10

Cellular binding of CDH6-targeting antibodies or control IgG in either non-conjugated form or as a sulfo-SPDB-DM4 antibody drug conjugate in a panel of ovarian cancer cell lines



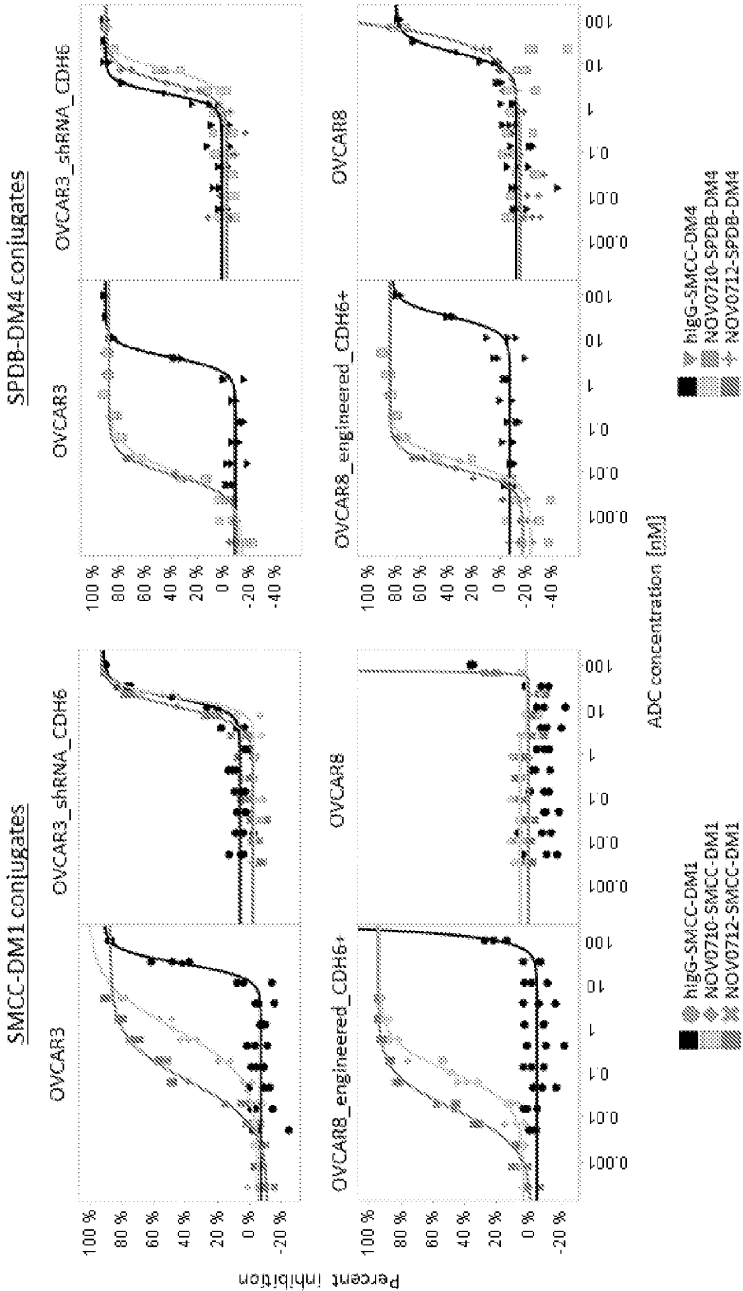
WO 2016/024195

11/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 11

In vitro cellular activity of anti-CDH6 ADCs as SMCC-DM1 and SPDB-DM4 conjugates on ovarian cancer cell lines



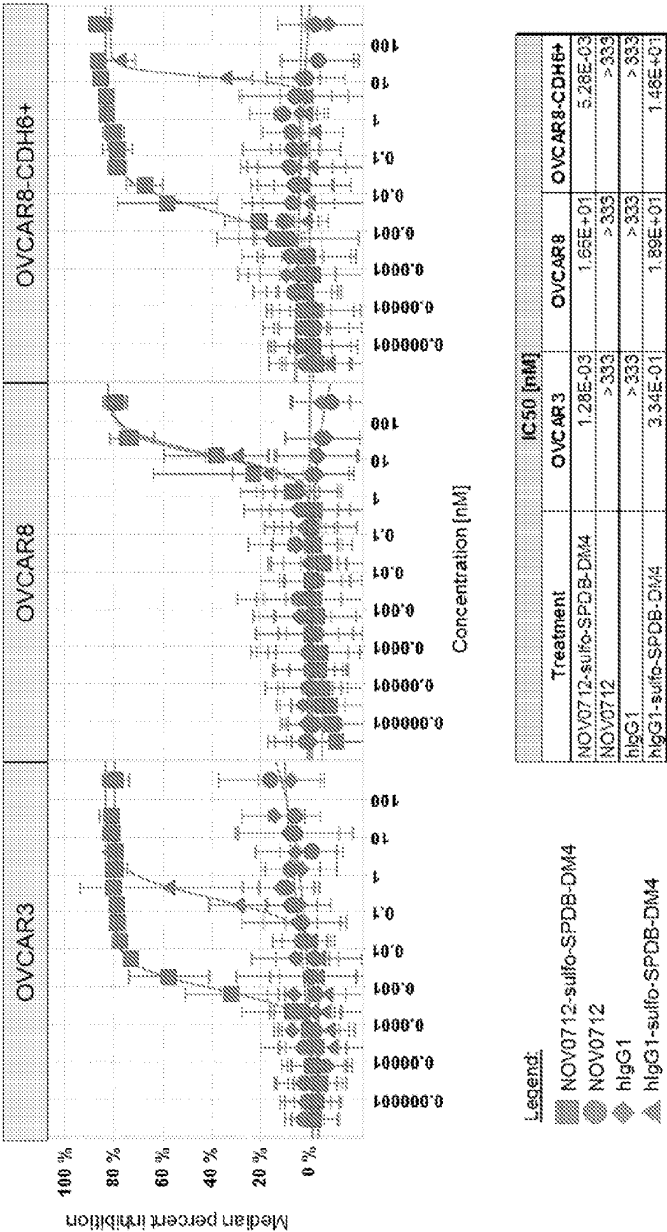
WO 2016/024195

12/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 12

In vitro cellular activity of CDH6-targeting antibodies or control IgG in either non-conjugated form or as a sulfo-SPDB-DM4 antibody drug conjugate



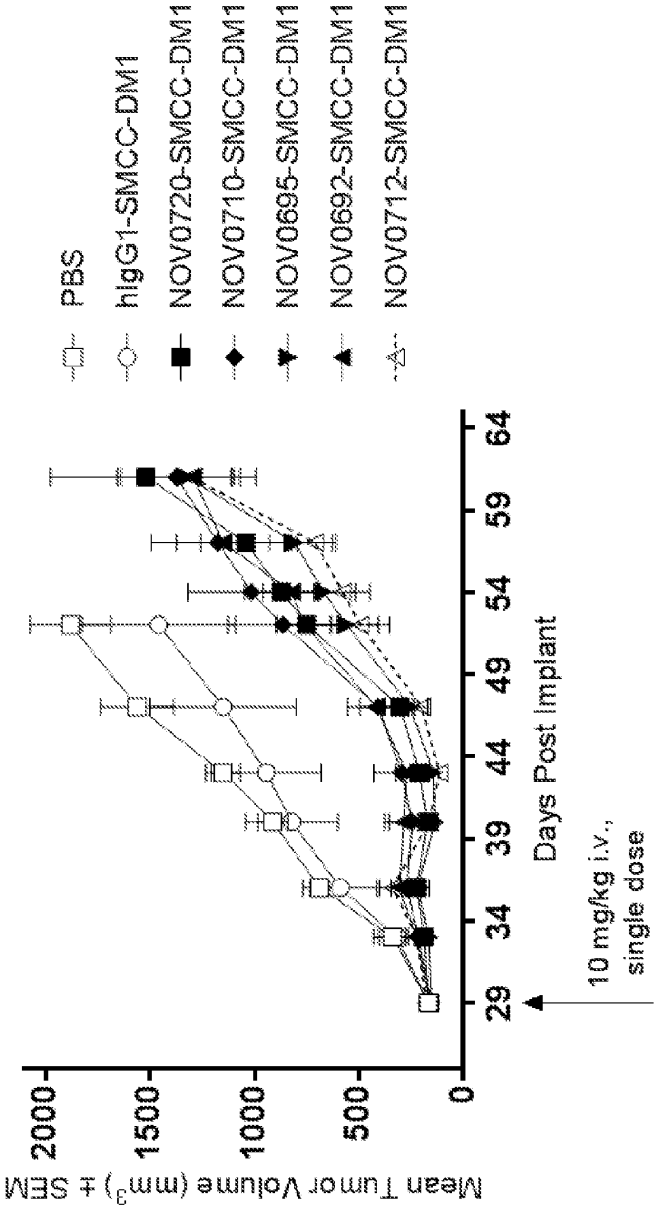
WO 2016/024195

13/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 13

In vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies as SMCC-DM1 conjugates in a xenograft mouse model of ovarian cancer



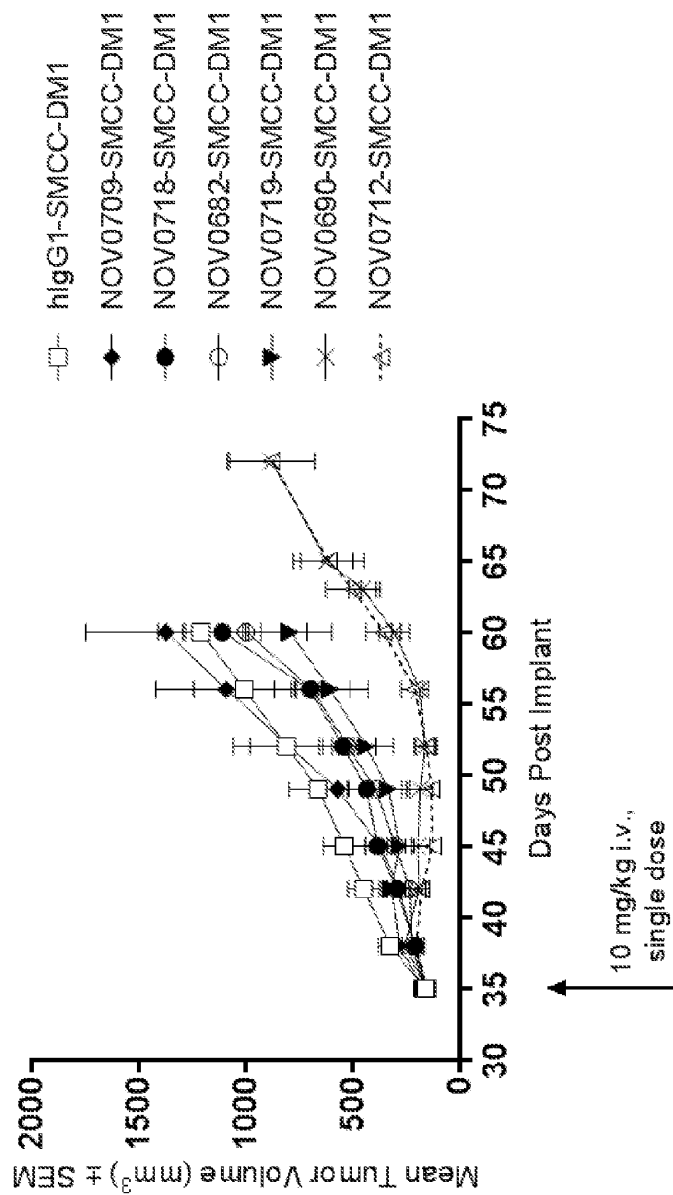
WO 2016/024195

14/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 14

In vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies as SMCC-DM1 conjugates in a xenograft mouse model of ovarian cancer



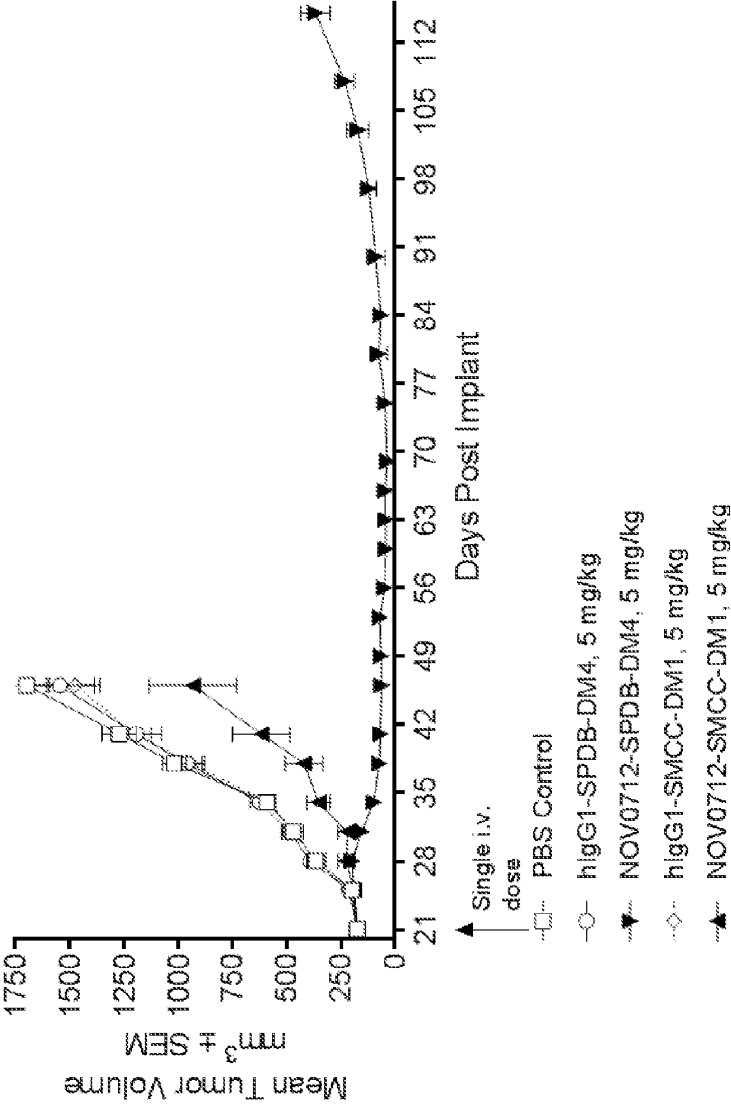
WO 2016/024195

16/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 16

In vivo efficacy of anti-CDH6 antibodies as SPDB-DM4 and SMCC-DM1 conjugates in a xenograft mouse model of ovarian cancer



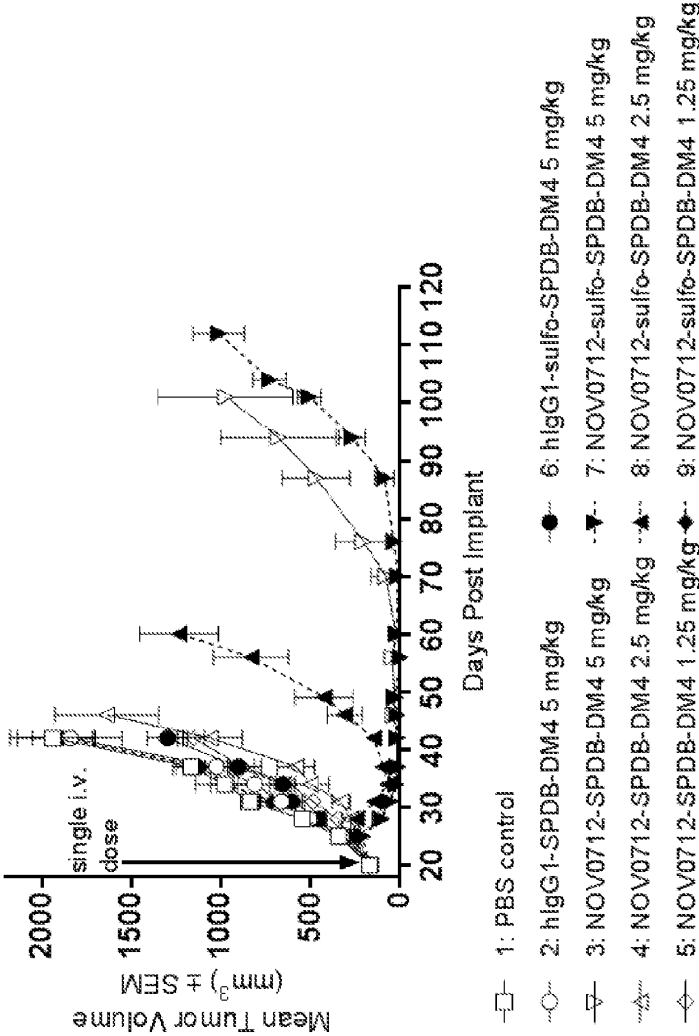
WO 2016/024195

18/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 18

In vivo efficacy of anti-CDH6 ADCs with different linker/payload formats in a xenograft mouse model of ovarian cancer



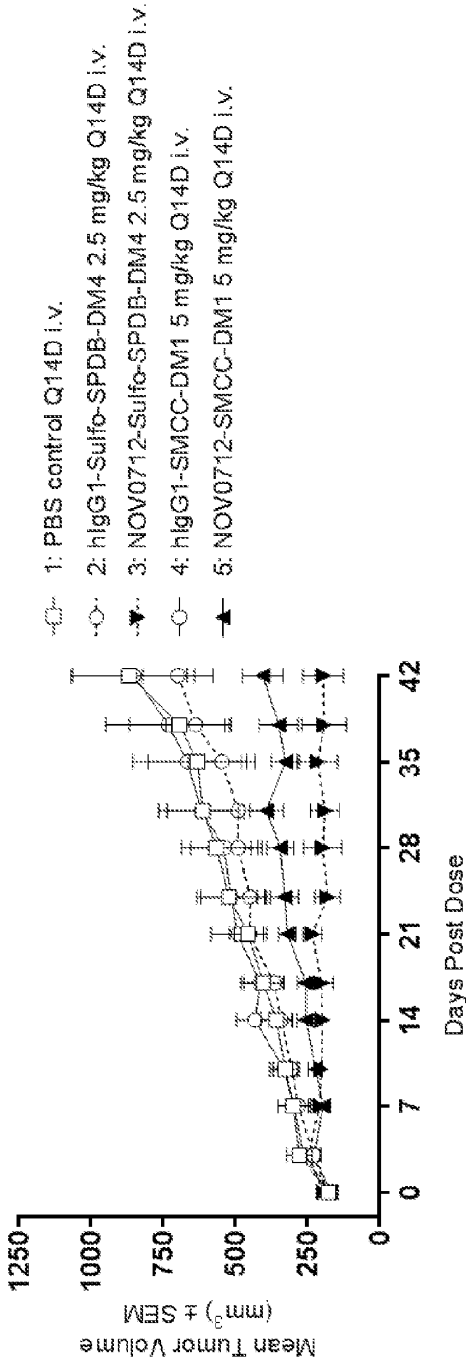
WO 2016/024195

19/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 19

In vivo efficacy of anti-CDH6 ADCs with different linker/payload formats in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of ovarian cancer (serous carcinoma)



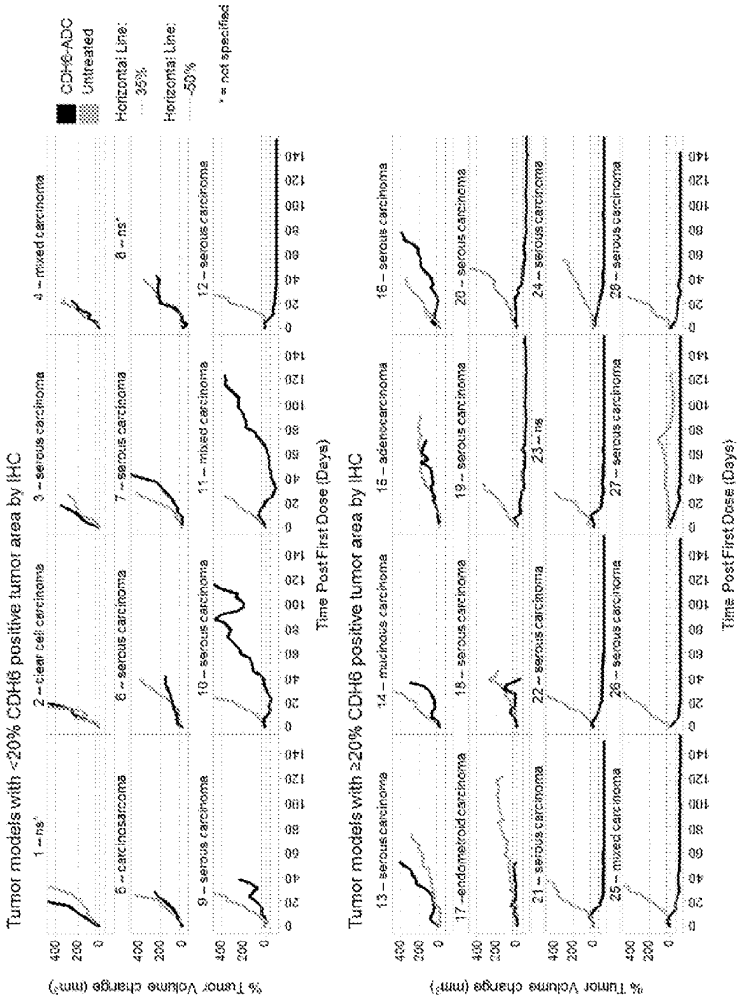
WO 2016/024195

20/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 20

In vivo efficacy of an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4, 5 mg/kg Q14D, i.v.) in a panel of patient-derived primary tumor xenograft mouse models of ovarian cancer



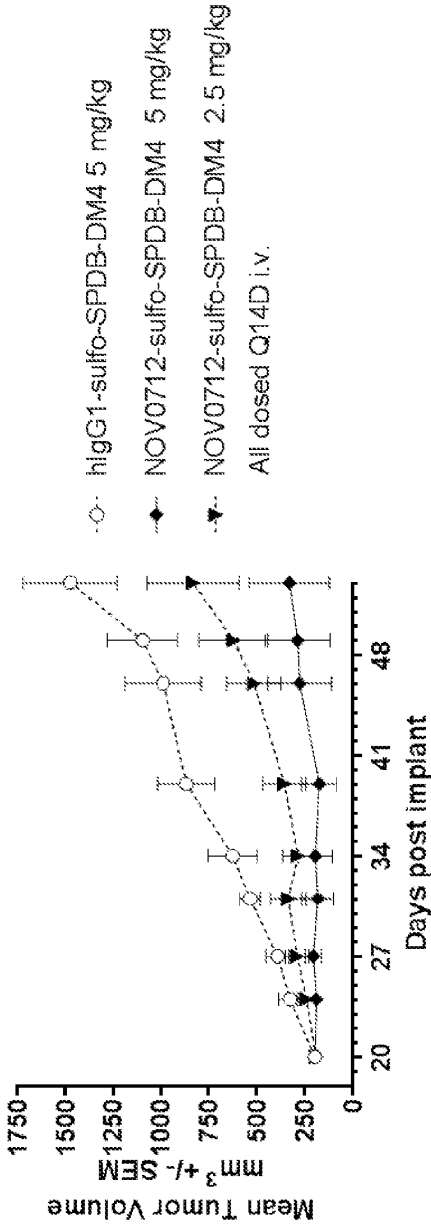
WO 2016/024195

21/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 21

In vivo efficacy of an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4), dosed either at 2.5 mg/kg, Q14D or 5 mg/kg, Q14D in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of renal cancer (renal cell carcinoma)



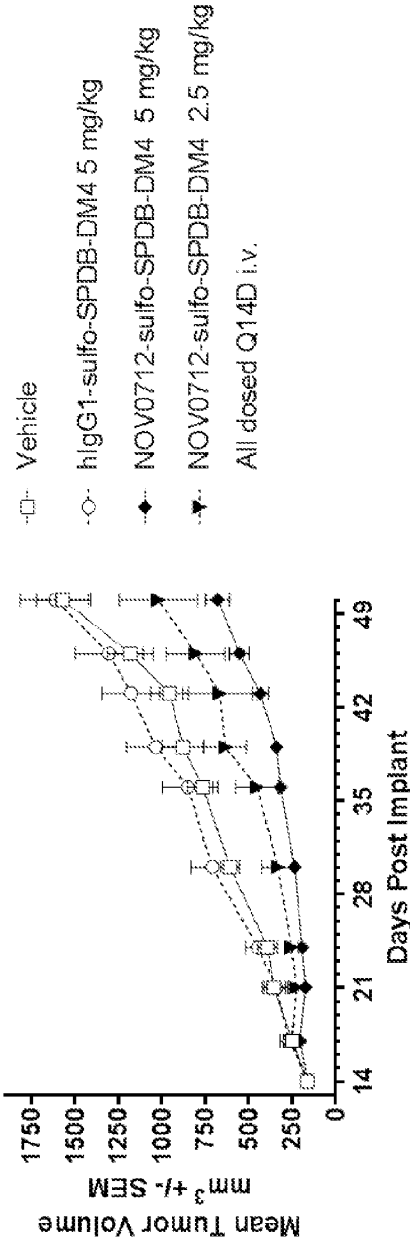
WO 2016/024195

22/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 22

In vivo efficacy of an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4), dosed either at 2.5 mg/kg, Q14D or 5 mg/kg, Q14D in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of renal cancer (metastatic lesion of renal cell carcinoma, clear cell type)



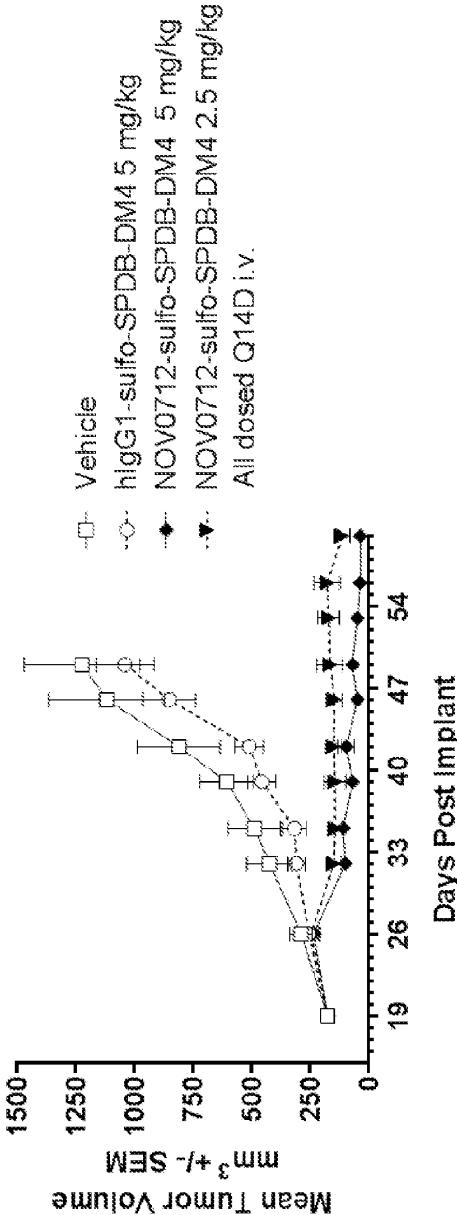
WO 2016/024195

23/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 23

In vivo efficacy of an anti-CDH6 ADC (NOV0712-sulfo-SPDB-DM4), dosed either at 2.5 mg/kg, Q14D or 5 mg/kg, Q14D in a patient-derived primary tumor xenograft mouse model of renal cancer (renal cell carcinoma, clear cell type)



WO 2016/024195

24/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 24

Evidence for combination activity of CDH6-targeting ADCs with BCL2/BCL-XL, BCL-XL, IAP and MEK inhibitors

Combination	Loewe Synergy Score	Loewe Excess Average
CDH6-ADC + CDH6-ADC	7.79	0.078
ABT-263 + ABT-263	6.04	0.055
WEHI-539 + WEHI-539	3.30	0.079
NVP-LCL161 + NVP-LCL161	0.0	-0.660
CDH6-ADC + ABT-263	41	0.364
CDH6-ADC + WEHI-539	31.3	0.316
CDH6-ADC + NVP-LCL161	17.9	0.187
CDH6-ADC + trametinib	26.9	0.258

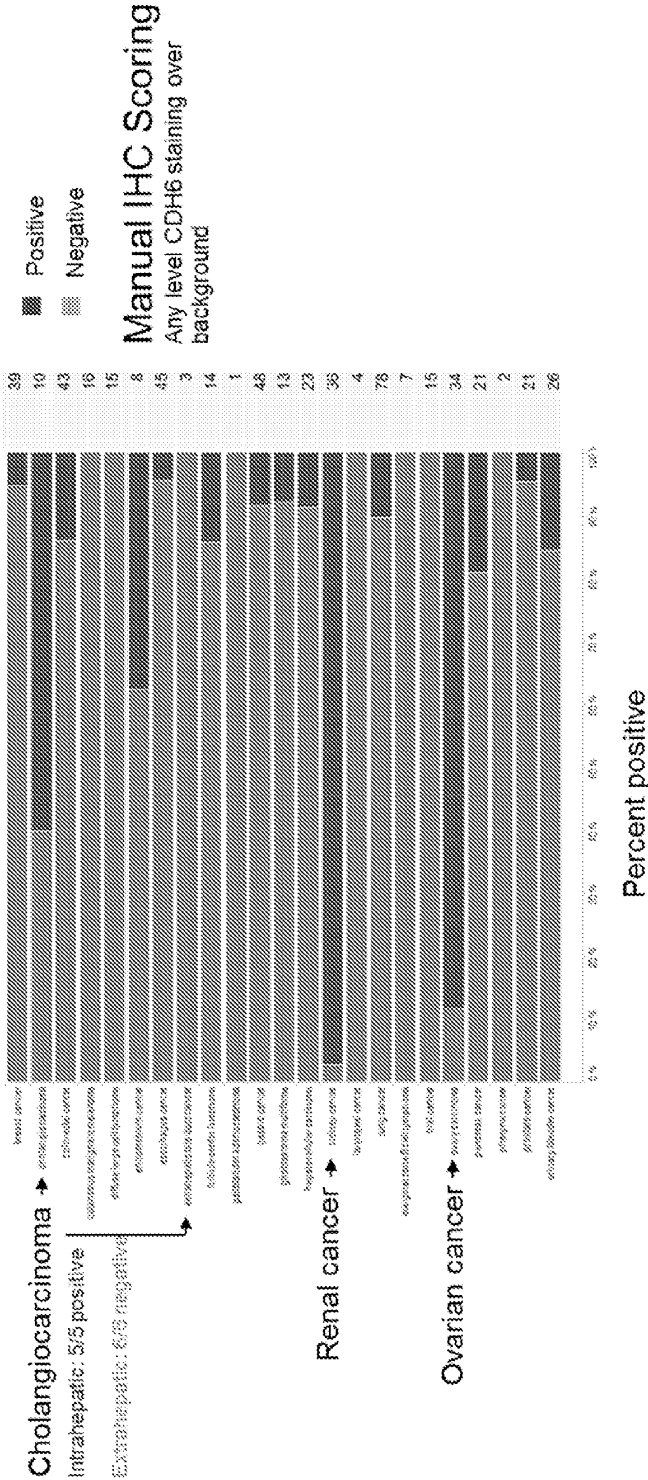
WO 2016/024195

26/26

PCT/IB2015/056032

FIGURE 26

CDH6 protein expression analysis by immuno-histochemistry (IHC) highlights ovarian cancer, renal cancer and cholangiocarcinoma as indications with frequent over-expression



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2015/056032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61K31/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K GQ1N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal , WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	wo 2005/001092 A2 (WYETH CORP [US] ; BE XIAOBING [US] ; WEI LIU [US] ; SLONIM DONNA K [US] ;) 6 January 2005 (2005-01-06) claims 1, 4 example 1 <div style="text-align: center;">----- -/-</div>	1-4,7, 10-24, 27, 29-50, 55,56
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 December 2015		12/01/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bumb, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/056032

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIMAZUI T ET AL: "Expressi on of cadherin-6 as a novel diagnosti c tool to predi ct prognosi s of pati ents with E-cadheri n-absent renal cel l carcinoma. ", CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH OCT 1998, vol . 4, no. 10, October 1998 (1998-10) , pages 2419-2424, XP002750983 , ISSN : 1078-0432 page 2420, left-hand col umn, line 8 - right-hand col umn, line 9 -----	5,6,25, 26, 51-54, 57,58, 60,61
Y	PAUL ET AL: "Cadheri n-6: : A New Prognosti c Marker for Renal Cell Carci noma", JOURNAL OF UROLOGY, LI PPINCOTT W ILLIAMS & W I LKINS, BALTIMORE, MD, US, vol . 171, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01) , pages 97-101, XP005532199 , ISSN : 0022-5347 , DOI : 10.1097/01. JU.0000101512 .47242. 79 page 97, right-hand col umn, line 8 - line 21 page 100, right-hand col umn, last paragraph -----	1-4,7 , 10-24, 27, 29-50, 55,56
Y	ROBERT Y. ZHAO ET AL: "Synthesi s and Eval uati on of Hydrophi lic Linkers for Anti body-Maytansi noi d Conjugates" , JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol . 54, no. 10, 26 May 2011 (2011-05-26) , pages 3606-3623 , XP055046274, ISSN : 0022-2623 , DOI : 10.1021/jm2002958 page 3612, left-hand col umn, line 37 page 3612, right-hand col umn, lines 24, 35-38 page 3615, left-hand col umn, lines 12-16 -----	22-24, 27,29-36
Y	VALENTINA SANCISI ET AL: "Cadherin 6 I s a New RUNX2 Target i n TGF- [beta] Si gnal l ing Pathway" , PLOS ONE, vol . 8, no. 9, 12 September 2013 (2013-09-12) , page e75489, XP55235108, DOI : 10.1371/journal .pone. 0075489 the whol e document -----	1-4,7 , 10-24, 27, 29-50, 55,56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/056032

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
wo 2005001092 A2	06-01-2005	US 2005119210 AI	02-06-2005
		US 2007092529 AI	26-04-2007
		WO 2005001092 A2	06-01-2005

To: ipdocketing@foley.com,,
From: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Cc: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Subject: Private PAIR Correspondence Notification for Customer Number 22428

Nov 12, 2021 03:53:31 AM

Dear PAIR Customer:

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109
UNITED STATES

The following USPTO patent application(s) associated with your Customer Number, 22428 , have new outgoing correspondence. This correspondence is now available for viewing in Private PAIR.

The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

Disclaimer:

The list of documents shown below is provided as a courtesy and is not part of the official file wrapper. The content of the images shown in PAIR is the official record.

Application	Document	Mailroom Date	Attorney Docket No.
16613203	CTRS	11/12/2021	098065-0249
	892	11/12/2021	098065-0249

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://sportal.uspto.gov/secure/myportal/privatepair>.

If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov with 'e-Office Action' on the subject line or call 1-866-217-9197 during the following hours:

Monday - Friday 6:00 a.m. to 12:00 a.m.

Thank you for prompt attention to this notice,

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
PATENT APPLICATION INFORMATION RETRIEVAL SYSTEM

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O.BOX 1450
ALEXANDRIA VA 22313-1451

PRESORTED
FIRST-CLASS MAIL
U.S. POSTAGE PAID
POSTEDIGITAL
NNNNN

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109



**Courtesy Reminder for
Application Serial No: 16/613,203**

Attorney Docket No: 098065-0249
Customer Number: 22428
Date of Electronic Notification: 11/12/2021

This is a courtesy reminder that new correspondence is available for this application. If you have not done so already, please review the correspondence. The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

An email notification regarding the correspondence was sent to the following email address(es) associated with your customer number:
ipdocketing@foley.com

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://ppair-my.uspto.gov/pair/PrivatePair>.
If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov or call 1-866-217-9197.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Inventor Name: Atsuko SAITO

Title: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG
CONJUGATE

Application No.: 16/613,203

International Filing Date: 5/14/2018

371(c) Date: 11/13/2019

Examiner: Robert S. Landsman

Art Unit: 1647

Confirmation No.: 6337

RESPONSE TO RESTRICTION REQUIREMENT AND SPECIES ELECTION

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Commissioner:

This communication is responsive to the Office Action dated November 12, 2021, concerning the above-referenced patent application. This response is timely filed.

In response to the restriction requirement set forth in the Office Action, Applicant hereby provisionally elects Group I, claims 1-13 and 24-28, drawn to antibodies that bind SEQ ID NO: 4. Applicant makes this election without traverse. Applicant reserves the right to pursue the non-elected group in any later filed divisional or continuation applications.

In addition to the restriction requirement, the Office Action additionally requires election of “a single antibody species defined by light chain and heavy chain CDRs 1, 2 and 3 by SEQ ID NO.” Office Action at p. 3. Applicant elects an antibody with:

Atty. Dkt. No. 098065-0249

CDRL1, CDRL2, and CDRL3 represented by SEQ ID NOs: 12, 13, and 14, respectively;
CDRH1, CDRH2, and CDRH3 represented by SEQ ID NOs: 17, 60, and 19, respectively.

An exemplary light chain comprising the foregoing CDRs is represented by SEQ ID NO: 61, and an exemplary heavy chain comprising the foregoing CDRs is represented by SEQ ID NO: 69. This election reads on claims 1-9, 13, and 24-28.

Applicant makes the foregoing election with the understanding that once the elected species is determined to be patentable, the Examiner will consider the patentability of the full scope of the claims including the currently non-elected species of glycoproteins pursuant to MPEP § 806.04.

Applicant believes the foregoing elections are full and complete, and that the elections will allow the Examiner to proceed with substantive examination. To the extent that further elections or clarifications are required, Applicant implores the Examiner to contact the undersigned directly.

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required regarding this application under 37 C.F.R. §§ 1.16-1.17, or credit any overpayment, to Deposit Account No. 19-0741. Should no proper payment be enclosed herewith, as by the credit card payment instructions in EFS-Web being incorrect or absent, resulting in a rejected or incorrect credit card transaction, the Commissioner is authorized to charge the unpaid amount to Deposit Account No. 19-0741. If any extensions of time are needed for timely acceptance of papers submitted herewith, Applicant hereby petitions for such extension under 37 C.F.R. §1.136 and authorize payment of any such extension fees to Deposit Account No. 19-0741.

Respectfully submitted,

Date January 12, 2022

By /Benjamin Berkowitz/_____

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 295-4620
Facsimile: (202) 672-5399

Benjamin A. Berkowitz
Attorney for Applicant
Registration No. 59,349

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	44729130
Application Number:	16613203
International Application Number:	
Confirmation Number:	6337
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Audrey Titus
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0249
Receipt Date:	12-JAN-2022
Filing Date:	13-NOV-2019
Time Stamp:	15:16:10
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment		no			
File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Response to Election / Restriction Filed	098065-0249_Response_to_RR_2022-01-12.pdf	115512 5799ccd9f71dc85bd8c7a3e3a568598bde225338	no	2
Warnings:					

Information:	
Total Files Size (in bytes):	115512
<p>This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.</p> <p><u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u> If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.</p> <p><u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u> If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.</p> <p><u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u> If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.</p>	



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
16/613,203	11/13/2019	Atsuko SAITO	098065-0249	6337
22428	7590	02/14/2022	EXAMINER	
FOLEY & LARDNER LLP			LANDSMAN, ROBERT S	
3000 K STREET N.W.			ART UNIT	
SUITE 600			PAPER NUMBER	
WASHINGTON, DC 20007-5109			1647	
			NOTIFICATION DATE	DELIVERY MODE
			02/14/2022	ELECTRONIC

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

The time period for reply, if any, is set in the attached communication.

Notice of the Office communication was sent electronically on above-indicated "Notification Date" to the following e-mail address(es):

ipdocketing@foley.com

U.S. Patent and Trademark Office
PTOL-326 (Rev. 11-13)

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 2

DETAILED ACTION

Notice of Pre-AIA or AIA Status

The present application, filed on or after March 16, 2013, is being examined under the first inventor to file provisions of the AIA.

1. Formal Matters

A. In the response dated 1/12/22, Applicants elected, without traverse, Group I, drawn to the indicated SEQ ID NOs. Therefore, this restriction is deemed proper and is made FINAL.

B. Claims 1-28, 53 and 54 are pending. Claims 14-23, 53 and 54 are withdrawn as being drawn to non-elected inventions. Claims 1-13 and 24-28 are the subject of this Office Action.

2. Specification

A. The use of at least the terms EnVision® (page 130, 4th line from the bottom), TripLE™ (paragraph [0230]), Vivaspin® 20 (paragraph [0234]) and Lipofectamine™ 2000 (paragraph 0235) which are trade names or marks used in commerce, has been noted in this application. The terms should be accompanied by the generic terminology; furthermore the terms should be capitalized wherever it appears or, where appropriate, include a proper symbol indicating use in commerce such as TM, SM, or ® following the terms.

Although the use of trade names and marks used in commerce (i.e., trademarks, service marks, certification marks, and collective marks) are permissible in patent applications, the proprietary nature of the marks should be respected and every effort made to prevent their use in any manner which might adversely affect their validity as commercial marks.

B. The listing of references on pages 4-5 of the specification is not a proper information disclosure statement. 37 CFR 1.98(b) requires a list of all patents, publications, or other information submitted for consideration by the Office, and MPEP § 609.04(a) states, "the list may not be incorporated into the specification but must be submitted in a separate paper." Therefore, unless the references have been cited by the examiner on form PTO-892, they have not been considered.

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 3

C. If applicable, the first line of the specification should be updated to reflect the status (e.g. “now U.S. Patent No.”, or “now abandoned”) of any parent applications. Similarly, though none could be found, any U.S. or Foreign Applications cited in the specification which have since issued should be updated with the corresponding Patent No.

D. Though no issues could be found, Applicant is advised that embedded hyperlinks and/or other forms of browser-executable code are impermissible and require deletion. The attempt to incorporate subject matter into the patent application by reference to a hyperlink and/or other forms of browser-executable code is considered to be an improper incorporation by reference. See MPEP 608.01(p), paragraph I regarding incorporation by reference. It is noted that the recitation of “www.” alone, as opposed to “<http://www>”, is also active and should not be used.

E. Though no issues could be found, when a sequence is presented in a drawing, regardless of the format or the manner of presentation of that sequence in the drawing, the sequence must still be included in the Sequence Listing and a sequence identifier (“SEQ ID NO:X”) must be used either in the drawing or in the Brief Description of the Drawings. See MPEP § 2422.02.

F. Though no issues could be found, according to 37 CFR 1.821(d) (MPEP § 2422), where the description or claims of a patent application discuss a sequence listing that is set forth in the “Sequence Listing” in accordance with paragraph (c) of this section, reference must be made to the sequence by use of the assigned identifier, in the text of the description or claims, even if the sequence is also embedded in the text of the description or claims of the patent application.

G. The specification has not been checked to the extent necessary to determine the presence of all possible minor errors. Applicants’ cooperation is requested in correcting any errors of which Applicants may become aware.

3. Claim Rejections - 35 USC § 112(a) – scope of enablement

No rejection is being made over claim 8 since it is believed that the recited regions of the light and heavy chains comprise all 6, full-length, CDRs.

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 4

4. Claim Rejections - 35 USC § 102

In the event the determination of the status of the application as subject to AIA 35 U.S.C. 102 and 103 (or as subject to pre-AIA 35 U.S.C. 102 and 103) is incorrect, any correction of the statutory basis for the rejection will not be considered a new ground of rejection if the prior art relied upon, and the rationale supporting the rejection, would be the same under either status.

The following is a quotation of the appropriate paragraphs of 35 U.S.C. 102 that form the basis for the rejections under this section made in this Office action:

A person shall be entitled to a patent unless –

(a)(1) the claimed invention was patented, described in a printed publication, or in public use, on sale, or otherwise available to the public before the effective filing date of the claimed invention.

(a)(2) the claimed invention was described in a patent issued under section 151, or in an application for patent published or deemed published under section 122(b), in which the patent or application, as the case may be, names another inventor and was effectively filed before the effective filing date of the claimed invention.

A. Claim 1, 2 and 24 are rejected under 35 U.S.C. 102(a)(1) as being anticipated by Dunne et al.

Dunne teaches monoclonal and polyclonal antibodies which bind to human CDH6 (“Materials”) and “Antibodies and Protein to Cadherin 6 Inhibit Platelet Aggregation”.

Regarding claim 1 (antibody having internalization ability), it is noted that claim 1 does not require the fragment to have internalization activity, only that it is a functional fragment of one which does. Regarding claim 2 (competitive inhibitory activity to one of the recited antibodies). For both of these claims, since the Office does not have the facilities for examining and comparing applicants' protein with the protein of the prior art, the burden is on applicant to show a novel or unobvious difference between the claimed product and the product of the prior art (i.e., that the antibody of the prior art does not possess the same material structural and functional characteristics of the claimed antibody). See *In re Best*, 562 F.2d 1252, 195 USPQ 430 (CCPA 1977) and *Ex parte Gray*, 10 USPQ 2d 1922 1923 (PTO Bd. Pat. App. & Int.). Similarly, the reference does not specifically recite any of the modifications in claim 24. However, since the antibodies were produced in sheep, it would be expected that one or more (e.g. glycosylation/processing) modifications would be expected.

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 5

- B. Claims 1, 2 and 24 are rejected under 35 U.S.C. 102(a)(1) as being anticipated by Shimazui et al. Shimazui teaches an antibody to human cadherin 6 (page 332 right column under “Antibodies”). Regarding claims 1 and 2, as discussed above for Dunne, see *In re Best*, 562 F.2d 1252, 195 USPQ 430 (CCPA 1977) and *Ex parte Gray*, 10 USPQ 2d 1922 1923 (PTO Bd. Pat. App. & Int.). Similarly, the reference does not specifically recite any of the modifications in claim 24. However, since the antibodies were produced in mice, it would be expected that one or more (e.g. glycosylation/processing) modifications would be expected.
- C. Claim 1, 2, 13 and 24 are rejected under 35 U.S.C. 102(a)(1) as being anticipated Cho et al. Cho teaches polyclonal antibodies to human CDH6 (page 84, right column, first full paragraph). Regarding claims 1 and 2, as discussed above for Dunne, see *In re Best*, 562 F.2d 1252, 195 USPQ 430 (CCPA 1977) and *Ex parte Gray*, 10 USPQ 2d 1922 1923 (PTO Bd. Pat. App. & Int.). Similarly, the reference does not specifically recite any of the modifications in claim 24. However, since the antibodies were produced in rabbits, it would be expected that one or more (e.g. glycosylation/processing) modifications would be expected.
- D. Claim 1, 2, 5, 13 and 24 are rejected under 35 U.S.C. 102(a)(1) as being anticipated Bialucha (U.S. Patent No. 9,982,045).
Paragraphs [0009] and [0016] of the published application (US2016/0046711) teaches human CDH6, which is expected to be identical to the instant human CDH6. Humanized antibodies are taught in paragraph [0016] and Fab fragments in [0359]. The specification also teaches antibodies as part of an ADC (paragraph [0022] teaches antibodies conjugated to DM4) which would be expected to internalize (paragraphs [0149] and [0380]).
Regarding claims 1 and 2, as discussed above for Dunne, see *In re Best*, 562 F.2d 1252, 195 USPQ 430 (CCPA 1977) and *Ex parte Gray*, 10 USPQ 2d 1922 1923 (PTO Bd. Pat. App. & Int.). Similarly, the reference does not specifically recite any of the modifications in claim 24. However, since the antibodies were produced in mammals [00257], it would be expected that one or more (e.g. glycosylation/processing) modifications would be expected.

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 6

5. Obviousness-Type Double Patenting

The nonstatutory double patenting rejection is based on a judicially created doctrine grounded in public policy (a policy reflected in the statute) so as to prevent the unjustified or improper timewise extension of the “right to exclude” granted by a patent and to prevent possible harassment by multiple assignees. A nonstatutory double patenting rejection is appropriate where the conflicting claims are not identical, but at least one examined application claim is not patentably distinct from the reference claim(s) because the examined application claim is either anticipated by, or would have been obvious over, the reference claim(s). See, e.g., *In re Berg*, 140 F.3d 1428, 46 USPQ2d 1226 (Fed. Cir. 1998); *In re Goodman*, 11 F.3d 1046, 29 USPQ2d 2010 (Fed. Cir. 1993); *In re Longi*, 759 F.2d 887, 225 USPQ 645 (Fed. Cir. 1985); *In re Van Ornum*, 686 F.2d 937, 214 USPQ 761 (CCPA 1982); *In re Vogel*, 422 F.2d 438, 164 USPQ 619 (CCPA 1970); *In re Thorington*, 418 F.2d 528, 163 USPQ 644 (CCPA 1969).

A timely filed terminal disclaimer in compliance with 37 CFR 1.321(c) or 1.321(d) may be used to overcome an actual or provisional rejection based on nonstatutory double patenting provided the reference application or patent either is shown to be commonly owned with the examined application, or claims an invention made as a result of activities undertaken within the scope of a joint research agreement. See MPEP § 717.02 for applications subject to examination under the first inventor to file provisions of the AIA as explained in MPEP § 2159. See MPEP § 2146 *et seq.* for applications not subject to examination under the first inventor to file provisions of the AIA. A terminal disclaimer must be signed in compliance with 37 CFR 1.321(b).

The USPTO Internet website contains terminal disclaimer forms which may be used. Please visit www.uspto.gov/patent/patents-forms. The filing date of the application in which the form is filed determines what form (e.g., PTO/SB/25, PTO/SB/26, PTO/AIA/25, or PTO/AIA/26) should be used. A web-based eTerminal Disclaimer may be filled out completely online using web-screens. An eTerminal Disclaimer that meets all requirements is auto-processed and approved immediately upon submission. For more information about eTerminal Disclaimers, refer to www.uspto.gov/patents/process/file/efs/guidance/eTD-info-1.jsp.

A. Claims 1-13 and 24-28 are rejected on the ground of nonstatutory double patenting as being unpatentable over claims 1-29 of U.S. Patent No. 11,077,202 (17/010,162). Although the claims at issue are not identical, they are not patentably distinct from each other because the patent claims are a species of the instant genus. The only essential difference being that the patent claims recite a drug conjugated to the identical antibody (ADC). However, it would have been obvious at the time of the instant invention to have conjugated a drug to the instant antibody in order to specifically target the drug to a desired cellular location for therapeutic or diagnostic purposes since antibodies can provide extraordinary targeting specificity. Furthermore, the technique of using ADCs was well-known in the art at the time of the instant invention.

B. Claims 1-13 and 24-28 are provisionally rejected on the ground of nonstatutory double patenting as being unpatentable over claims 1-65 of copending Application No. 17/293,577 (reference application). Although the claims at issue are not identical, they are not patentably distinct from each other for the reasons discussed in paragraph A, above, regarding U.S. Patent No. 11,077,202.

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 7

This is a provisional nonstatutory double patenting rejection because the patentably indistinct claims have not in fact been patented.

6. Conclusion

No claim is allowable.

Advisory information

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to ROBERT S LANDSMAN whose telephone number is 571-272-0888. The examiner can normally be reached M-F 8 AM – 6 PM (eastern).

Examiner interviews are available via telephone, in-person, and video conferencing using a USPTO supplied web-based collaboration tool. To schedule an interview, applicant is encouraged to use the USPTO Automated Interview Request (AIR) at <http://www.uspto.gov/interviewpractice>.

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Joanne Hama, can be reached at 571-272-2911. The fax phone number for the organization where this application or proceeding is assigned is 571-273-8300.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see <http://pair-direct.uspto.gov>. Should you have questions on access to the Private PAIR system, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free).

/ROBERT S LANDSMAN/
Primary Examiner, Art Unit 1647

<i>Notice of References Cited</i>	Application/Control No. 16/613,203		Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.	
	Examiner ROBERT S LANDSMAN		Art Unit 1647	Page 1 of 1

U.S. PATENT DOCUMENTS

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Name	CPC Classification	US Classification
*	A	US-9982045-B2	05-2018	Bialucha; Carl Uli	A61K31/537	1/1
	B					
	C					
	D					
	E					
	F					
	G					
	H					
	I					
	J					
	K					
	L					
	M					

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

*		Document Number Country Code-Number-Kind Code	Date MM-YYYY	Country	Name	CPC Classification
	N					
	O					
	P					
	Q					
	R					
	S					
	T					

NON-PATENT DOCUMENTS

*		Include as applicable: Author, Title Date, Publisher, Edition or Volume, Pertinent Pages)
*	U	Dunne E, et al. Arterioscler (July 2012) Thromb Vasc Biol. 32(7):1724-1731. (doi: 10.1161/ATVBAHA.112.250464)
	V	Shimazui T, et al. (2000) Eur Urol. 38:331-338
*	W	Cho EA, et al. (March 1998) Development. 125(5):803-12
	X	

*A copy of this reference is not being furnished with this Office action. (See MPEP § 707.05(a).)
Dates in MM-YYYY format are publication dates. Classifications may be US or foreign.

<i>Search Notes</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

CPC - Searched*		
Symbol	Date	Examiner
A61K47/6803, 6849; A61K31/4745; A61P35/00; C07K16/28; C07K2317/24, 40, 41, 565, 732, 76, 77	01/28/2022	RL

CPC Combination Sets - Searched*		
Symbol	Date	Examiner

US Classification - Searched*			
Class	Subclass	Date	Examiner

* See search history printout included with this form or the SEARCH NOTES box below to determine the scope of the search.

Search Notes		
Search Notes	Date	Examiner
various SEQ ID NOs - results in SCORE	01/24/2022	RL
inventor search in PALM	01/24/2022	RL
WEST - search strategy in case	01/28/2022	RL
STN - search strategy in case	01/28/2022	RL
GOOGLE - search strategy in case	01/28/2022	RL

Interference Search			
US Class/CPC Symbol	US Subclass/CPC Group	Date	Examiner

--	--

Basic Science

European
Urology

Eur Urol 2000;38:331–338

Accepted after revision: August 27, 1999

Alterations in Expression of Cadherin-6 and E-Cadherin during Kidney Development and in Renal Cell Carcinoma

Toru Shimazui^{a,b}, Jeannette Oosterwijk-Wakka^b, Hideyuki Akaza^a,
Pierre Paul Bringuier^b, Emiel Ruijter^c, Frans M.J. Debruyne^b,
Jack A. Schalken^b, Egbert Oosterwijk^b

^aDepartment of Urology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba-City, Ibaraki, Japan;

^bUrological Research Laboratory, and ^cDepartment of Pathology, University Hospital Nijmegen, The Netherlands

Key Words

Cadherin · Catenin · Invasion · Metastasis · Neoplasm · Nephron · Development

Abstract

Objectives: Cell-cell adhesion mediated by cadherins is tight and stable and preserves tissue integrity. However, during tissue remodeling, e.g., development, adhesion may be modified for morphogenic movement. Similarly, during carcinogenesis, cell-cell adhesion might alter leading to a more aggressive phenotype. Here we describe cadherin expression patterns in developing, adult, and neoplastic kidney.

Methods: Fetal kidneys were obtained from voluntary terminations of pregnancy and 43 renal cell carcinomas (RCC) and normal kidneys were obtained at nephrectomy. Frozen sections of these specimens were stained immunohistochemically using antibodies against E-cadherin (ECD), cadherin-6 (CAD6) and α -catenin (α -cat).

Results: CAD6 was expressed in lower and middle limbs of the S-shaped bodies, structures that will develop into renal proximal tubules, which also express CAD6. Similarly, ECD was expressed in the upper limb of S-shaped bodies, structures which will develop into distal and collecting tubules which also express ECD. Twenty-four out of 43 RCC (55.8%) displayed a CAD6 (+)/ECD (-)/ α -cat (+) phenotype. The other RCC had a CAD6 (+)/ECD (+)/ α -cat (+) phenotype (10/43, 23.2%), CAD6 (-)/ECD (+)/ α -cat (+) phenotype (3/43, 7.0%) or CAD6 (-)/ECD (-)/ α -cat (+) phenotype (6/43, 14.0%), respectively. On the other hand, normal, heterogeneous, or absent expression of CAD6 was seen in 19, 15, and 9 tumors, whereas in 11, 2, and 30 tumors, respectively, ECD expression was seen. Survival curves showed that abnormal CAD6 expression correlated with a poor prognosis rather than abnormal ECD expression.

Conclusions: The combination of cadherin expression appeared to be fixed relatively early during kidney organogenesis. Since almost all RCC originate from proximal tubular epithelial cells (CAD6 (+)/ECD (-)/ α -cat (+)), only 55.8% of RCC retained the original cadherin phenotype. Alterations in expression of these molecules may be a reflection of the degree of dedifferentiation from the primary organ. In addition, scoring of expression patterns including heterogeneous expression could be a useful tool to estimate the malignancy potential of the tumor.

Copyright © 2000 S. Karger AG, Basel

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2000 S. Karger AG, Basel
0302-2838/00/0383-0331 \$17.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/eur

Toru Shimazui, MD, PhD
Department of Urology, Institute of Clinical Medicine
University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai, Tsukuba-City
Ibaraki 305-8575 (Japan)
Tel./Fax +81 298 533223, E-Mail torustim@igaku.mdt.tsukuba.ac.jp

Introduction

The cadherin family of molecules is a large family of transmembrane cell-cell adhesion molecules which preserve tissue integrity in a homophilic, homotypic manner. These molecules play an important role in specific cell-cell adhesion, particularly in all processes involving tissue remodeling, e.g., cell proliferation, differentiation, morphogenesis and maintenance of multicellular structures. Cadherin molecules are generally associated with catenins, i.e., α -, β - and γ -catenin, which link cadherin to the actin-based cytoskeleton [1–3]. Cadherin-mediated cell-cell contact is tight and stable, but during tissue remodeling adhesion should be modified to allow morphogenic movement. Therefore, cadherin-mediated cell-cell adhesion might alter during organ development. Similarly, during tumor evolution, occurrence of tumor cells with altered cell-cell adhesion properties can lead to a more aggressive (metastatic) phenotype. At the onset of kidney morphogenesis, only two tissue compartments can be distinguished morphologically: the nephrogenic mesenchyme and the ureter epithelium. Differentiation requires their interaction, and as a result, nephrogenic mesenchymal cells are induced to become nephrogenic vesicles which contact terminal ampullae of the ureter epithelium. The nephrogenic vesicles will eventually grow out to become the proximal nephron segments, whereas the terminal ampullae will develop into the distal nephron segments and the collecting duct system. During this process immense tissue remodeling occurs.

The major epithelial cell adhesion molecule is E-cadherin, which is expressed in the majority of epithelial cells where it acts to preserve epithelial integrity. However, in adult kidney, proximal tubular epithelial cells do not express E-cadherin. Only cells of Bowman's capsule, the thin limb of Henle's loop, distal and collecting tubules express E-cadherin, whereas N-cadherin, which is predominantly expressed in neural cells, is present in proximal tubules [4]. Renal cell carcinoma (RCC), which comprises 90% of renal tumors, originates from proximal tubular cells. In a previous study, we have described the frequent expression of cadherin-6 in RCC cell lines at the mRNA level [5]. Cadherin-6 is the human homolog of rat K-cadherin [6], expressed in normal kidney and in RCC cell lines [5, 7]. In contrast, N-cadherin mRNA was expressed in all RCC cell lines examined. Additionally, we have observed α -catenin expression at the cell-cell borders in all nephron segments of the adult kidney [8]. This suggests the presence of cadherin-catenin complexes as functional cell adhesion complexes. Thus, we hypothesized that certain critical cad-

herins, e.g., E-cadherin and cadherin-6, might play an important role during the malignant transformation of renal tubular epithelial cells and during kidney development. In this study, we have focused our attention on the alterations of these cadherin complexes during kidney development and in the neoplastic kidney tissue.

Materials and Methods

Normal Kidney and RCC Specimens

Adult human kidney and 43 RCC specimens were obtained at nephrectomy at the Academic Hospital Nijmegen. Histological evaluations were performed on HE sections. The histological subtype and pathological stage of the tumors were determined according to the WHO classification system [9] and the TNM classification [10]. Patient follow-up periods ranged between 10 and 84 months after nephrectomy. Human fetal kidney specimens of 14 and 19 weeks gestation, as estimated from body length measurements, were obtained from voluntary terminations of pregnancy. The tissue was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until use.

Antibodies

The antibodies used in this study were as follows: monoclonal antibody (mAb) HECD-1 (Takara, Japan) for the detection of E-cadherin and a mouse polyclonal antiserum against a GST-human α -catenin fusion protein (Ma1) as described previously [11]. For cadherin-6, we have developed an anti-human cadherin-6 mouse monoclonal antibody (clone 2B6). Briefly, the purified GST fusion protein corresponding to the amino acid sequence 69–480 (nucleotide 363–1559) of human cadherin-6 was used as immunogen. Female BALB/c mice were immunized with 50 μg protein in Freund's complete adjuvant. Subsequently, animals were boosted with 50 μg protein in Freund's incomplete adjuvant. After the fourth boost, splenocytes were harvested and fused with SP2/0 cells according to general hybridoma technology. Hybridoma cultures were tested by ELISA for the presence of cells producing mouse Ig reactive with cadherin-6. Supernatants of positive cultures were tested on frozen tissue sections and subcloned. Western blot analyses were performed to confirm the mAb specificity, i.e., clone 2B6 recognized a single band of 120 kD, corresponding to cadherin-6. In addition, mouse mAb RC3 was used to delineate renal proximal tubules [12].

Immunohistochemical Staining

Four-micrometer serial frozen sections were stained using HECD-1 (diluted 1:20), 2B6 (diluted 1:500) and Ma1 (diluted 1:500) as primary antibody, followed by biotinylated anti-mouse antibody (used 1:200; Amersham) and streptavidin biotin peroxidase complex (used 1:100; Amersham). The sections were developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, containing 0.03% hydrogen peroxide, and counterstained with hematoxylin.

Evaluation of Cadherin and Catenin Expression in Developing Kidneys and RCC

In fetal kidney, morphologically defined structures, i.e., the renal vesicles, S-shaped bodies and capillary loop stage of the developing nephron were studied. Expression of cadherins and catenin in these structures was evaluated and scored as positive or negative.

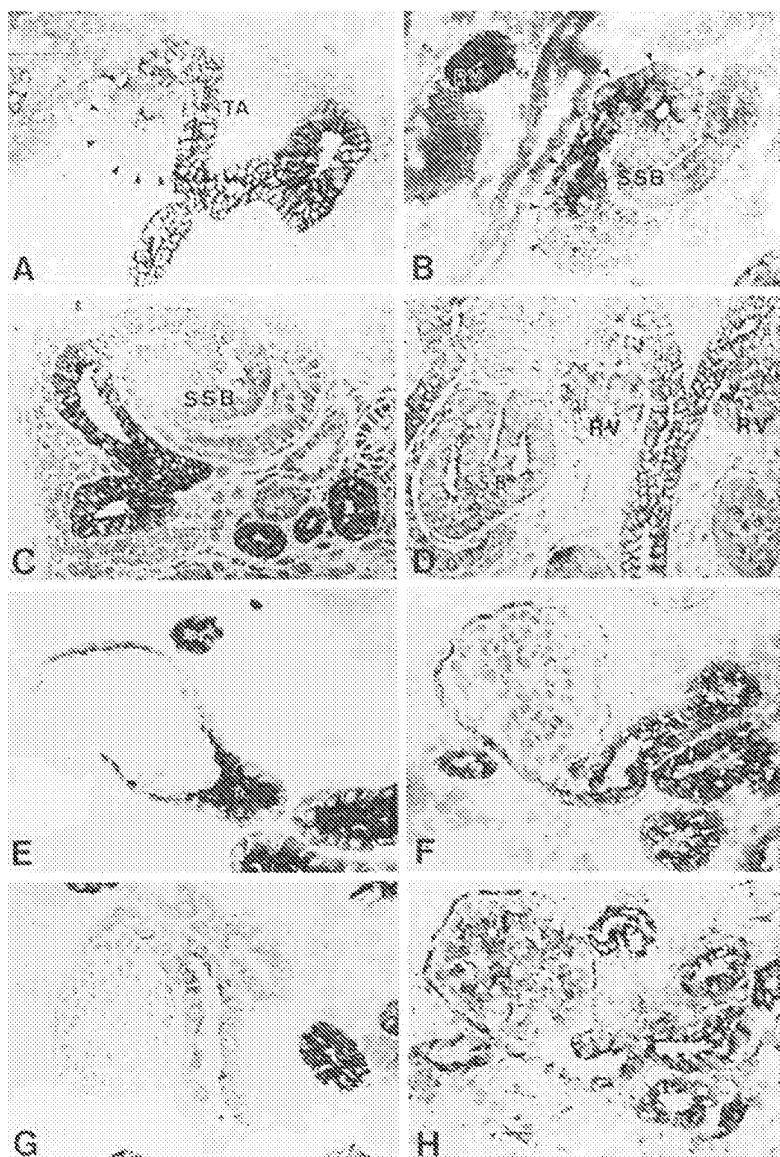


Fig. 1. Immunohistochemical staining of human fetal kidney tissue. In the renal vesicle stage and S-shaped body stage of nephron development, terminal ampullae (TA, **A**) express E-cadherin, but renal vesicles (arrows, **A**) and S-shaped bodies (SSB, **C**) are E-cadherin(-). Cadherin-6 is expressed in renal vesicles (RV) and in the lower limb up to a part of the upper limb of the S-shaped body (SSB, arrows), but absent in terminal ampullae (**B**). In the capillary loop stage, premature renal proximal tubules express RC3 (**E**) and cadherin-6 (**F**), but are E-cadherin(-) (**G**). α -Catenin is expressed in induced nephrogenic blastemal cells, in terminal ampullae, and in all developing nephron segments throughout nephron development (**D**, **H**).

To evaluate the alteration of combination in cadherin expression, expression of cadherin or catenin was scored as positive or negative, irrespective of homogeneity, i.e., homogeneous and heterogeneous staining at the cell-cell contact site was scored as positive. For clinicopathological and survival analyses, the expression pattern of cadherin or catenin was scored as normal, heterogeneous, or absent according to our previous paper [13]. Correlations between the expression pattern of these molecules and pathological parameters were evaluated using the χ^2 test. In addition, Kaplan-Meier survival curves according to the cadherin expression pattern were statistically analyzed using the log-rank test as previously reported [13].

Results

Cadherin and α -Catenin Expression in Fetal Kidney

In renal vesicles, no E-cadherin expression was detected. In contrast, a strong expression of E-cadherin was observed in terminal ampullae from which all distal nephron elements evolve (fig. 1A). Renal vesicles (induced nephrogenic blastemal cells) expressed cadherin-6 (fig. 1B). In S-shaped bodies, E-cadherin expression was restricted to the

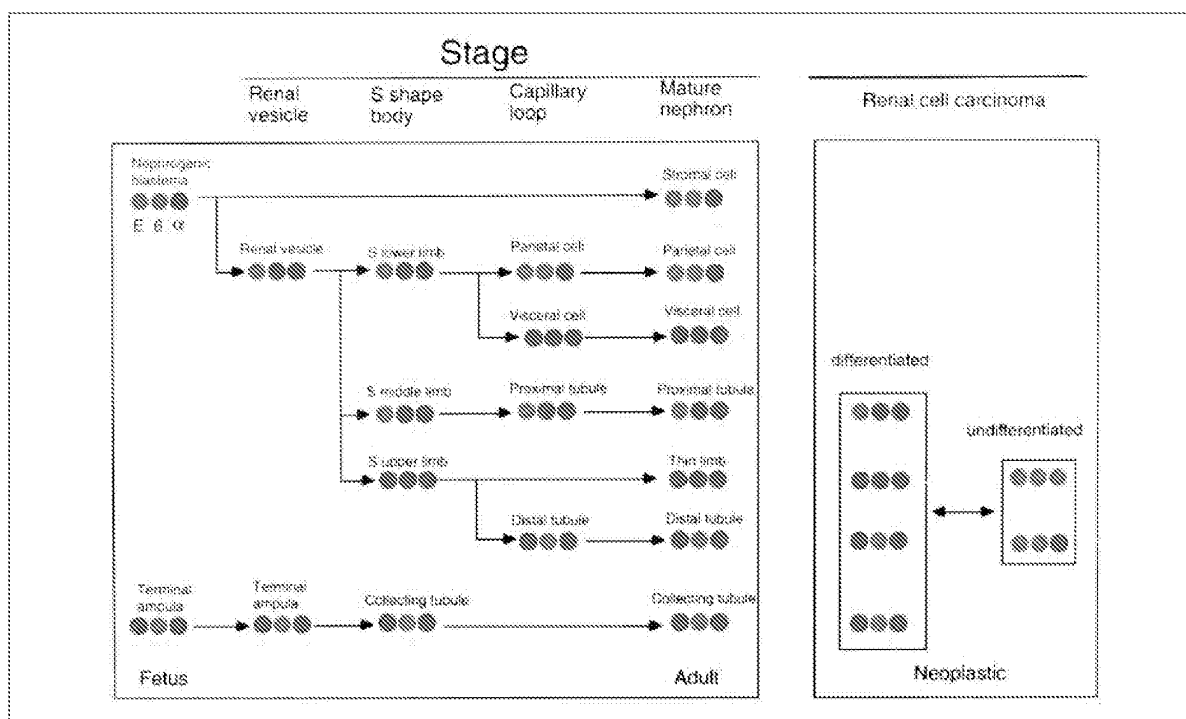


Fig. 2. Expression of E-cadherin, cadherin-6 and α -catenin during kidney development and in RCC. The expression patterns of cadherins appear to be fixed at the S-shaped body stage, i.e., at a relatively early stage of nephron development. It is hypothesized that low-grade RCC cells probably express the same molecules as the normal cells from which they are derived. In addition, an undifferentiated tumor which expresses neither E-cadherin nor cadherin-6 expresses α -catenin heterogeneously (combined positive and negative part).

upper limb, i.e., to the progenitor cells of distal tubular epithelium (fig. 1C), whereas cadherin-6 was expressed by cells in the middle limb of the S-shaped bodies, i.e. in progenitor cells of the proximal tubular epithelium (fig. 1B). At the capillary loop stage, the developing renal proximal tubular epithelium, expressing RC3 (fig. 1E), expressed cadherin-6 (fig. 1F). In contrast, developing renal distal tubules expressed E-cadherin only (fig. 1G). No dynamic changes were observed for α -catenin expression: α -catenin was expressed in induced nephrogenic blastemal cells, the first recognizable morphological structure known to evolve into the proximal part of the nephron, and in terminal ampullae, which give rise to the more distal nephron segments, and in all developing nephron segments throughout nephron development (fig. 1D, H). Figure 2 shows a schematic representation of cadherin and catenin expression during kidney development.

Cadherin and α -Catenin Expression in Adult Kidney

In normal adult kidney, E-cadherin expression was observed in distal tubules and collecting ducts (fig. 3A). In contrast, cadherin-6 expression was restricted to proximal tubular epithelium (fig. 3B). Cadherin-6 was located at epithelial cell-cell contact sites but also basolaterally (fig. 3B). The identity of the proximal tubular cells was confirmed with mAb RC3 (fig. 3D). Expression of α -catenin was observed in all segments of the nephron (fig. 3C) as previously reported [8].

Cadherin and Catenin Expression in RCC

The combination of E-cadherin and cadherin-6 expression and the respective histological type of RCC are presented in table 1. Four different phenotypes (fig. 2) were observed: cadherin-6(+)/E-cadherin(-) (24/43), cadherin6(+)/E-cadherin(+) (10/43), cadherin-6(-)/E-cadherin(+) (3/43) and cadherin-6(-)/E-cadherin(-) (6/43) (fig. 2). Thus, ex-

Fig. 3. In normal adult kidney, renal proximal tubules do not express E-cadherin but cadherin-6 and α -catenin (**A**, **B**, **C**, respectively), delineated by immunoreactivity with RC3 monoclonal antibody (**D**). In contrast, renal distal tubules express E-cadherin (**A**) and α -catenin (**C**).

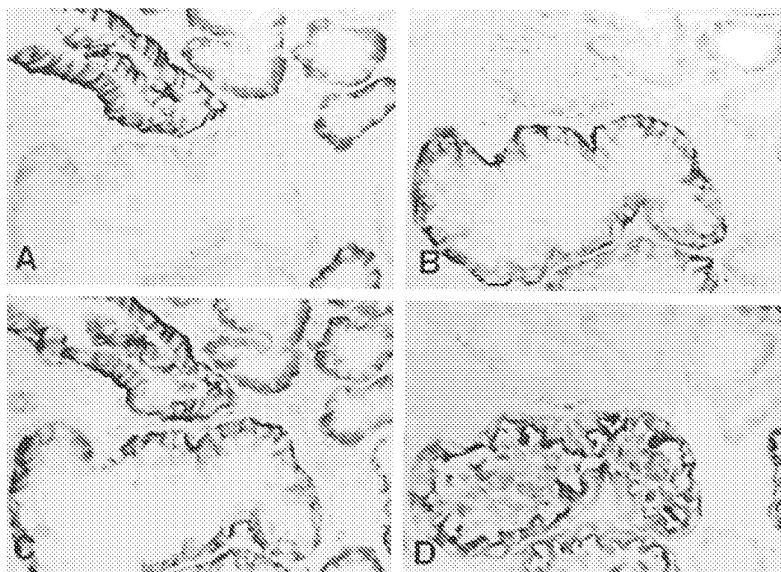
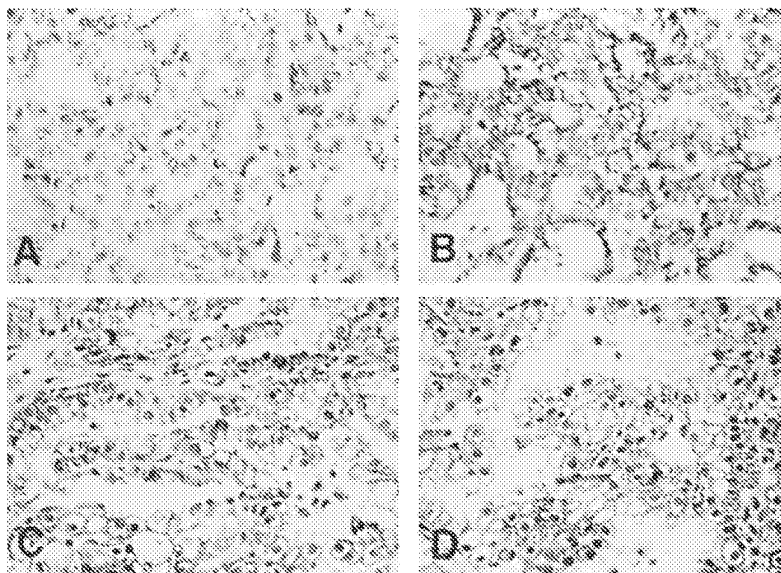


Fig. 4. In typical RCC, E-cadherin is completely absent (**A**), whereas homogeneous cadherin-6 expression can be observed at the cell-cell borders (**B**). In some cases, e.g., clear cell carcinoma grade 2, coexpression of E-cadherin (**C**) and cadherin-6 (**D**) was observed.



pression of cadherin-6 was found in 34 out of 43 samples, whereas E-cadherin expression was found in 13 out of 43 tumors. Figure 4 shows representative examples of cadherin-6(+)/E-cadherin(-) RCC (fig. 4A, B), and of RCC coexpressing E-cadherin and cadherin-6 (fig. 4C, D). No significant correlation was found between the combination of cadherin expression and the histological type of RCC (table 1). All tumors examined expressed α -catenin, including the

6 tumors in which neither E-cadherin nor cadherin-6 was detectable. It is of note that in these tumors α -catenin expression appeared heterogeneous.

Clinicopathological Analysis in Association with Aberrant Cadherin Expression in RCC

Normal, heterogeneous, or absent expression of cadherin-6 was observed in 19, 15, and 9 of 43 RCC, respec-

Table 1. Cadherin expression and histological subtype of RCC

Cadherin-6	E-cadherin(+)		E-cadherin(-)		Total
	+	-	+	-	
Alveolar type					
Clear	7	0	13	2	22
Granular	2	1	6	2	11
Mixed	0	2	4	1	7
Papillary	0	0	0	1	1
Tubular	1	0	1	0	2
Total	10	3	24	6	43

tively, whereas E-cadherin was detected in 11, 2, and 30, respectively. The expression pattern of cadherin-6 correlated better with tumor stage and grade than that of E-cadherin ($p = 0.016$ and 0.012 for cadherin-6 vs. 0.038 and 0.947 for E-cadherin). In survival curves, patients who had tumors with abnormal expression of cadherin-6 had poor survival compared with patients with normal expression of cadherin-6 ($p = 0.0009$). Although normal expression of E-cadherin seemed to be a good prognostic marker, no statistical difference was seen in survival between abnormal and normal expression of E-cadherin ($p = 0.265$). In addition, decreased cadherin-6 expression was also a poor prognostic marker in patients with E-cadherin-absent RCC ($p = 0.0008$), as reported in our previous study [13].

Discussion

In this study, we show that dramatic changes occur in cadherin/catenin expression during nephron development. However, beyond the S-shaped body stage, the first morphological structure where the fate of every component has been described [14], cadherin expression appears to be completely determined, i.e., cadherin expression seems to be fixed at an early stage of nephron development. At renal vesicle induction, radical changes occur in the phenotype of the induced metanephric blastemal cells [14]. This is also true for cadherin expression. For example, cadherin-6 expression is induced and expressed in all structures known to give rise to proximal epithelial cells whereas no expression can be observed in blastemal cells. This coincides with the expression of cytokeratin 8 and 18, cytokeratins specific for simple epithelia [14]. Thus, metanephric blastemal cells abruptly change from a mesenchymal to an epithelial phenotype.

In a recent report, Cho et al. [15] also described heterogeneous cadherin-6 expression by renal vesicles and suggested that this primitive epithelium is already patterned with respect to progenitor cell types. In contrast to our observations, these investigators observed E-cadherin in renal vesicles as well. Otherwise, our immunohistochemical observations are in complete agreement: in the S-shaped body, the cadherin expression patterns reflect the developmental fate of each region. The staining results for E-cadherin in the developing nephron are also in agreement with those of Nouwen et al. [4] who described the expression of A-CAM (N-cadherin) and L-CAM (E-cadherin) in human developing kidney. These investigators described N-cadherin expression in lower and middle limbs of the S-shaped body in fetal kidney and in proximal tubules and thin limb of Henle's loop in adult kidney. In our study, we found cadherin-6 expression in these same structures. Thus, in developing and in adult nephrons, N-cadherin and cadherin-6 appear to be coexpressed.

We noticed that proximal tubular expression of cadherin-6 and α -catenin was predominantly basolateral rather than lateral at epithelial cell-cell contact sites. Basolateral cadherin staining has also been observed by Piepenhagen et al. [16]. Currently, no explanation for this basolateral staining of cadherin-6 is obvious. Piepenhagen et al. [16] hypothesized that this staining pattern might be due to intracellular cadherin-cadherin interactions with the basal infoldings that characterize many of the cell types along the nephron. These investigators also suggested that cadherin-6 might interact with the adjacent nonepithelial cell layers.

In subsets of RCC, a tumor originating from proximal tubular epithelial cells, downregulation of cadherin-6 and upregulation of E-cadherin was observed. In the majority of RCC, cadherin-6 expression was preserved: cadherin-6 was expressed in 79.0% of RCC, whereas E-cadherin was expressed in only 30.2%. However, only 24/43 RCC displayed a cadherin-6(+)/E-cadherin(-) phenotype. Coexpression of cadherin-6 and E-cadherin was observed in 10 cases, and 3 RCC expressed E-cadherin exclusively. Additionally, 6 RCC failed to express cadherin-6 as well as E-cadherin, whereas heterogeneous α -catenin was observed. Thus, in 44% of RCC the combination of cadherin expression was dissimilar to the combination of the cells of origin. Apparently, the neoplastic transformation of proximal tubular epithelial cells leads to major alterations in expression of these critical molecules in almost half of the tumors. This contrasts with the expression of other cytoskeletal molecules in RCC, e.g., cytokeratin which is almost invariably identical to the cells of origin [14]. This dissimilarity can be explained by the different function of these different classes

of molecules: intermediate filaments are involved in the maintenance of the cellular structure, whereas cadherin molecules are involved in cell adhesion processes, i.e., organ structure. The altered cadherin expression may be a reflection of the degree of dedifferentiation from the primary organ.

In 3 RCC, exclusive expression of E-cadherin was seen. These tumors may constitute tumors originating from more distal tubular elements. The 6 tumors that failed to express cadherin-6 as well as E-cadherin, combined with heterogeneous α -catenin expression, may consist of extremely aggressive cells with high metastatic capacity, as loss of α -catenin in RCC is known to correlate with poor clinical outcome in RCC [8]. Previous studies have also reported on E-cadherin expression in RCC [8, 17]. Since more than 90% of RCC are thought to arise from renal proximal tubular cells based on their common phenotype [13, 14, 18, 19], it is not surprising that only a minority of RCC express E-cadherin. This E-cadherin expression can be explained by up-regulation of E-cadherin during kidney carcinogenesis.

In the present and a previous study, we demonstrated that normal expression of cadherin-6 was a better prognostic marker than E-cadherin in RCC patients [13]. Katagiri et al. [17] suggested a statistically significant correlation between loss of E-cadherin expression and advanced stages of RCC. In other tumor types where the progenitor cells express E-cadherin, loss of E-cadherin is considered an important step in the development of invasion or metastatic potential [21–23]. However, in view of the absence of E-cadherin expression in proximal tubular cells, absence of E-cadherin in RCC does not signify loss of E-cadherin expression, and it is difficult to envision how absence of E-cadherin is correlated with stage. Gunji et al. [24] reported that E-cadherin(+) pancreatic cancer cells more frequently metastasized to the liver than E-cadherin(–) cells, indicating that

loss of E-cadherin expression might promote detachment from the primary tumor, whereas E-cadherin expression might be helpful to attach to target organs. However, the former is clearly not the case for RCC, as a positive correlation existed between absence of E-cadherin expression and more advanced stage [17]. Considering the potential of the prognostic indicator, no significant difference in prognosis was observed between 56% of RCC with retained combination of cadherins and the other 44% of RCC (data not shown). This indicated that scoring of decreased expression including heterogeneous expression should be taken into account to estimate the malignancy potential of the tumor.

The histopathological features of RCC did not correlate with the combination of cadherin-6 and E-cadherin expression, similar to the findings of Paul et al. [25]. The current WHO pathological classification system [9] is not based on a phenotypic comparison between the tumor cells and their presumed progenitor cells. Thoenes et al. [26] described a histopathological classification system for RCC based on cell type, growth pattern and cytological grading of malignancy. With this classification system, a correlation between the combination of cadherin expression and tumor type might be possible. In further studies, it will be of great interest to compare the combination of cadherin with the Thoenes classification [26, 27].

In summary, the nephron expresses a complex set of cadherins, and the combination of cadherin expression reflects the developmental fate of each region at a relatively early stage of nephron development. During carcinogenesis, the combination of cadherin expression changes in almost 50% of RCC. In view of the critical function of these molecules, particularly with respect to cell adhesion, the precise definition of aberrant cadherin expression in RCC might eventually be helpful in defining patients at risk for recurrence.

References

- 1 Nagafuchi A, Takeichi M: Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 1988;7:3679–3684.
- 2 Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M: Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol* 1994;127:247–256.
- 3 Kawanishi J, Kato K, Sasaki K, Fujii S, Watanabe N, Niitsu Y: Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the β -catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39. *Mol Cell Biol* 1995;15:1175–1181.
- 4 Nouwen EJ, Dauwe S, Van der Biest I, De Broe ME: Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM and L-CAM in the kidney. *Kidney Int* 1993;44:147–158.
- 5 Shimazui T, Girolodi LA, Bringuiet PP, Oosterwijk E, Schalken JA: Complex cadherin expression in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3234–3237.
- 6 Xiang Y-Y, Tanaka M, Suzuki M, Igarashi H, Kiyokawa E, Naito Y, Ohtawara Y, Shen Q, Sugimura H, Kino J: Isolation of complementary DNA encoding K-cadherin, a novel rat cadherin preferentially expressed in fetal kidney and kidney carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:3034–3041.
- 7 Shimoyama Y, Gotoh M, Terasaki T, Kitajima M, Hirohashi S: Isolation of sequence analysis of human cadherin-6 complementary DNA for the full coding sequence and its expression in human carcinoma cells. *Cancer Res* 1995;55:2206–2211.
- 8 Shimazui T, Bringuiet PP, van Berkel H, Ruijter E, Akaza H, Debryne FMJ, Oosterwijk E, Schalken J: Decreased expression of α -catenin is associated with poor prognosis of patients with localized renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 1997;74:523–528.
- 9 Mostofi FK: Histological typing of kidney tumours. *International Histological Classification of Tumours, No. 25*. World Health Organization, Geneva, 1982.

- 10 International Union against Cancer TNM classification (kidney); in Sobin LH, Wittekind C (eds): TNM Classification of Malignant Tumors, ed 5. New York, Wiley, 1997, pp 180–182.
- 11 Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, Jansen CFJ, Akaza H, Koiso K, Debruyne FMJ, Bringuier PP: Prognostic value of cadherin-associated molecules (α -, β - and γ -catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res* 1996;56:4154–4158.
- 12 Oosterwijk E, Ruiter J, Wakka JC, Huiskens-vd, Meij JW, Jonas U, Fleuren G-J, Zwartendijk J, Hoedemacker Ph, Warnaar SO: Immunohistochemical analysis of monoclonal antibody to renal antigens. Application in the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1986;123:301–309.
- 13 Shimazui T, Oosterwijk E, Akaza H, Bringuier PP, Ruijter E, van Berkel H, Oosterwijk-Wakka J, van Bokhoven A, Debruyne FMJ, Schalken JA: Expression of cadherin-6 as a novel diagnostic tool to predict prognosis of patients with E-cadherin-absent renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998;4:2419–2424.
- 14 Oosterwijk E, Van Muijen GN, Oosterwijk-Wakka JC, Warnaar SO: Expression of intermediate-sized filaments in developing and adult human kidney and in renal cell carcinoma. *J Histochem Cytochem* 1990;38:385–392.
- 15 Cho EA, Patterson LT, Brookhiser WT, Mah S, Kintner C, Dressler GR: Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development. *Development* 1998;125:803–812.
- 16 Piepenhagen PA, Nelson WJ: Differential expression of cell-cell and cell-substratum adhesion protein along the kidney nephron. *Am J Physiol* 1995;269:C1433–C1449.
- 17 Katagiri A, Watanabe R, Tomita Y: E-cadherin expression in renal cell cancer and its significance in metastasis and survival. *Br J Cancer* 1995;71:376–379.
- 18 Holthofer H, Miettinen A, Paasivuo R, Lehto V-P, Linder E, Alfthan O, Virtanen I: Cellular origin and differentiation of renal carcinomas. A fluorescence microscopic study with kidneyspecific antibodies, anti-intermediate filament antibodies, and lectins. *Lab Invest* 1983;49:317–326.
- 19 Bander NH, Finstad CL, Cordon-Cardo C, Ramsawak RD, Vaughan ED Jr, Whitmore WF Jr, Oettgen HF, Melamed MR, Old LJ: Analysis of a mouse monoclonal antibody that reacts with a specific region of the human proximal tubule and subsets renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1989;49:6774–6780.
- 20 Moll R, Hage C, Thoenes W: Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: Modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Lab Invest* 1991;65:74–86.
- 21 Vleminckx K, Vakaet L Jr, Marcel M, Fiers W, van Roy F: Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991;66:107–119.
- 22 Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173–185.
- 23 Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, Mori T: Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993;53:1696–1701.
- 24 Gunji N, Oda T, Todoroki T, Kanazawa N, Kawamoto T, Yuzawa K, Scarpa A, Fukao K: Pancreatic carcinoma correlation between Ecadherin and a-catenin expression status and liver metastasis. *Cancer* 1998;82:1649–1656.
- 25 Paul R, Ewing CM, Robinson JC, Marshall FF, Johnson KR, Wheelock MJ, Isaacs WB: Cadherin-6, a cell adhesion molecule specifically expressed in the proximal renal tubule and renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:2741–2748.
- 26 Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ: Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* 1986;181:125–143.
- 27 Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, Moll R: Cytomorphological typing of renal cell carcinoma – a new approach. *Eur Urol* 1990;18 (suppl 2):6–9.

```
FILE 'MEDLINE, BIOSIS, SCISEARCH' ENTERED AT 06:00:29 ON 28 JAN 2022
L1      492 "CADHERIN 6"
L2      294 CDH6
L3      666 L1 OR L2
L4      67 L3 AND ANTIBOD?
L5      48 L4 AND PY<=2017
L6      43 L4 AND PY<=2016
L7      0 L5 AND INTERNALIZE?
L8      948 (SAITO OR HIRATA OR NAKAMURA)/AU
L9      0 L5 AND L8
```

WEST Search History for Application 16613203**Creation Date: 2022012805:47****Prior Art Searches**

Query	DB	Hits	Op.	Plur.	Thes.	Date
(A61K47/6803 or A61K31/4745 or A61K47/6849 or A61P35/00 or C07K16/28 or C07K2317/24 or C07K2317/40 or C07K2317/41 or C07K2317/565 or C07K2317/732 or C07K2317/76 or C07K2317/77).cpc.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	286821	AND	YES		01-28-2022
"cadherin 6"	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	607	AND	YES		01-28-2022
cdh6	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	788	AND	YES		01-28-2022
(cdh6) or ("cadherin 6")	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	1183	AND	YES		01-28-2022
(cdh6 or "cadherin 6") and ((A61K47/6803 or A61K31/4745 or A61K47/6849 or A61P35/00 or C07K16/28 or C07K2317/24 or C07K2317/40 or C07K2317/41 or C07K2317/565 or C07K2317/732 or C07K2317/76 or C07K2317/77).cpc.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	462	AND	YES		01-28-2022
(cdh6 or "cadherin 6") with internalize\$	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	9	AND	YES		01-28-2022

(cdh6 or "cadherin 6" with internalize\$) with antibod\$	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	9	AND	YES		01-28-2022
"cadherin 6".clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	32	AND	YES		01-28-2022
cdh6.clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	84	AND	YES		01-28-2022
(cdh6.clm.) or ("cadherin 6".clm.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	108	AND	YES		01-28-2022
(cdh6.clm. or "cadherin 6".clm.) and antibody.clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	54	AND	YES		01-28-2022
(cdh6.clm. or "cadherin 6".clm. and antibody.clm.) and internalize\$.clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	0	AND	YES		01-28-2022
(saito or hirata or nakamura).in.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	883074	AND	YES		01-28-2022
((saito or hirata or nakamura).in.) and (cdh6.clm. or "cadherin 6".clm. and antibody.clm.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB,	4	AND	YES		01-28-2022

	JPAB, DWPI					
(cdh6 or "cadherin 6" with internalize\$ with antibod\$) not ((saito or hirata or nakamura).in.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	5	AND	YES		01-28-2022
(cdh6 or "cadherin 6" with internalize\$ with antibod\$ not (saito or hirata or nakamura).in.) or ((saito or hirata or nakamura).in. and cdh6.clm. or "cadherin 6".clm. and antibody.clm.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	9	AND	YES		01-28-2022

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: February 16, 2021 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	11/13/2019
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	1	of	1	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ -Number ⁴ -Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	C1	WO-2018/185618-A1	10-11-2018	NOVARTIS AG		
	C2	WO-2018/212136-A1	11-22-2018	DAIICHI SANKYO CO LTD	Full English translations of priority JP App. 2017-096749A included.	✓+abs

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	C3	CARL U. BIALUCHA ET AL: "Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6-Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers", CANCER DISCOVERY, vol. 7, no. 9, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 1030-1045, XP055484340	
	C4	CORADA M ET AL: "Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability", BLOOD, THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 97, no. 6, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 1679-1684, XP002187985	
	C5	Extended European Search Report dated January 19, 2021 for corresponding European Patent Application No. 18802536.5	
	C6	Office Action issued on October 7, 2020 for corresponding Japanese Patent Application No. 2019-518773	✓

Examiner Signature	/ROBERT S LANDSMAN/	Date Considered	01/24/2022
--------------------	---------------------	-----------------	------------

4825-7020-1564.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: November 13, 2019 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	Not Yet Assigned
				Filing Date	Herewith
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	Not Yet Assigned
				Examiner Name	Not Yet Assigned
Sheet	1	of	2	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	A1.	2016/0297890-A1	10-13-2016	Agatsuma et al.	

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ -Number ⁴ -Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	A2.	WO-2014/057687-A1	04-17-2014	DAIICHI SANKYO CO LTD		ABS
	A3.	WO-2016/024195-A1	02-18-2016	NOVARTIS AG et al.		ABS

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	A4.	International Searching Authority, "International Search Report," issued in connection with International Patent Application No. PCT/JP2018/018572, dated August 7, 2018.	✓
	A5.	International Searching Authority, "Written Opinion," issued in connection with International Patent Application No. PCT/JP2018/018572, dated August 7, 2018.	
	A6.	SHIMOYAMA et al., "Isolation and Sequence Analysis of Human Cadherin-6 Complementary DNA for the Full Coding Sequence and Its Expression in Human Carcinoma Cells," Cancer Research, Vol. 55, May 15, 1995, pp. 2206-2211.	
	A7.	INOUE et al., "Cadherin-6 Expression Transiently Delineates Specific Rhombomeres, Other Neural Tube Subdivisions, and Neural Crest Subpopulations in Mouse Embryos," Developmental Biology, Vol. 183, 1997, pp. 183-194.	
	A8.	OSTERHOUT et al., "Cadherin-6 Mediates Axon-Target Matching in a Non-Image-Forming Visual Circuit," Neuron Report, Vol. 71, August 25, 2011, pp. 632-639.	
	A9.	CHO et al., "Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development," Development, Vol. 125, 1998, pp. 803-812.	
	A10.	MAH et al., "Kidney Development in Cadherin-6 Mutants: Delayed Mesenchyme-to-Epithelial Conversion and Loss of Nephrons," Developmental Biology, Vol. 223, 2000, pp. 38-53.	
	A11.	PAUL et al., "Cadherin-6, a Cell Adhesion Molecule Specifically Expressed in the Proximal Renal Tubule and Renal Cell Carcinoma," Cancer Research, Vol. 57, July 1, 1997, pp. 2741-2748.	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4823-8450-8844.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: November 13, 2019 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	Not Yet Assigned
				Filing Date	Herewith
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	Not Yet Assigned
				Examiner Name	Not Yet Assigned
Sheet	2	of	2	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	A12.	SHIMAZUI et al., "The Level of Cadherin-6 mRNA in Peripheral Blood Is Associated with the Site of Metastasis and with the Subsequent Occurrence of Metastases in Renal Cell Carcinoma," Cancer, Vol. 101, No. 5, September 1, 2004, pp. 963-968.	
	A13.	KOEBEL et al., "Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies," PLoS MEDICINE, Vol. 5, Issue 12, e232, December 2008, pp. 1749-1760.	
	A14.	GUGNONI et al., "Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy," Oncogene, Vol. 36, 2017, pp. 667-677.	
	A15.	POLAKIS, Paul, "Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy," Pharmacological Reviews, Vol. 68, January 2016, pp. 3-19.	
	A16.	PETERS et al., "Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics," Bioscience Reports, Vol. 35, Issue 4, August 2015, pp. 1-20.	
	A17.	GOEPPERT et al., "Cadherin-6 is a putative tumor suppressor and target of epigenetically dysregulated miR-429 in cholangiocarcinoma," Epigenetics, Vol. 11, No. 11, 2016, pp. 780-790.	
	A18.	YOKOI et al., "A Novel Target Gene, SKP2, within the 5p13 Amplicon That Is Frequently Detected in Small Cell Lung Cancers," The American Journal of Pathology, Vol. 161, Issue 1, July 2002, pp. 207-216.	

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

Examiner Signature	/ROBERT S LANDSMAN/	Date Considered	01/24/2022
---------------------------	---------------------	------------------------	------------

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	1	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	B1	5,480,968	01-02-1996	KRAUS ET AL.	
	B2	5,677,171	10-14-1997	HUDZIAK ET AL.	
	B3	5,821,337	10-13-1998	CARTER ET AL.	
	B4	5,834,476	11-10-1998	TERASAWA ET AL.	
	B5	5,837,673	11-17-1998	TSUJIHARA ET AL.	
	B6	5,892,043	04-06-1999	TSUJIHARA ET AL.	
	B7	5,968,511	10-19-1999	AKITA ET AL.	
	B8	6,214,345-B1	04-10-2001	FIRESTONE ET AL.	
	B9	6,291,671-B1	09-18-2001	INOUE ET AL.	
	B10	6,835,807-B1	12-28-2004	SUSAKI ET AL.	=B105
	B11	7,449,184-B2	11-11-2008	ALLISON ET AL.	
	B12	7,585,491-B2	09-08-2009	GOVINDAN	
	B13	7,833,979-B2	11-16-2010	SULLIVAN ET AL.	
	B14	7,837,980-B2	11-23-2010	ALLEY ET AL.	
	B15	7,999,083-B2	08-16-2011	GOVINDAN ET AL.	
	B16	8,226,945-B2	07-24-2012	EBENS ET AL.	=B106
	B17	8,268,319-B2	09-18-2012	GOVINDAN, SERENGULAM	
	B18	8,394,607-B2	03-12-2013	EBENS ET AL.	
	B19	8,425,912-B2	04-23-2013	GOVINDAN	
	B20	8,524,865-B2	09-03-2013	EBENS ET AL.	
	B21	8,741,291-B2	06-03-2014	BHAT ET AL.	
	B22	8,802,820-B2	08-12-2014	CHAMBERLAIN ET AL.	
	B23	8,907,071-B2	12-09-2014	SULLIVAN ET AL.	
	B24	8,968,741-B2	03-03-2015	EBENS ET AL.	
	B25	9,808,537-B2	11-07-2017	MASUDA ET AL.	
	B26	9,850,312-B2	12-26-2017	AGATSUMA ET AL.	
	B27	9,872,924-B2	01-23-2018	NAITO ET AL.	
	B28	10,195,288-B2	02-05-2019	MASUDA ET AL.	
	B29	10,227,417-B2	03-12-2019	AGATSUMA ET AL.	
	B30	10,383,878-B2	08-20-2019	HETTMANN ET AL.	=B99
	B31	2003/0148931-A1	08-07-2003	TAKAHASHI ET AL.	
	B32	2003/0166513-A1	09-04-2003	IMURA ET AL.	
	B33	2004/0185053-A1	09-23-2004	GOVINDAN, SERENGULAM	=B87
	B34	2005/0123536-A1	06-09-2005	LAW ET AL.	=B86
	B35	2005/0228007-A1	10-13-2005	JAGTAP ET AL.	=B88
	B36	2005/0271671-A1	12-08-2005	GRIFFITHS, GARY L.	
	B37	2005/0276812-A1	12-15-2005	EBENS, JR. ET AL.	=B107
	B38	2006/0018899-A1	01-26-2006	KAO ET AL.	=B72
	B39	2006/0193865-A1	08-31-2006	GOVINDAN, SERENGULAM	
	B40	2007/0071764-A1	03-29-2007	SULLIVAN ET AL.	=B94
	B41	2008/0050310-A1	02-28-2008	EBENS ET AL.	=B90
	B42	2008/0131363-A1	06-05-2008	GOVINDAN ET AL.	
	B43	2008/0161245-A1	07-03-2008	KRATZ ET AL.	
	B44	2008/0305044-A1	12-11-2008	MCDONAGH ET AL.	=B89
	B45	2009/0274713-A1	11-05-2009	CHARI ET AL.	=B92
	B46	2009/0286258-A1	11-19-2009	KAUR ET AL.	=B93
	B47	2009/0291093-A1	11-26-2009	GOVINDAN, SERENGULAM	
	B48	2010/0068181-A1	03-18-2010	PALIWAL ET AL.	=B91
	B49	2010/0120816-A1	05-13-2010	FONTANA ET AL.	=B108

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	2	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	B50	2011/0045587-A1	02-24-2011	SULLIVAN ET AL.	
	B51	2011/0059076-A1	03-10-2011	MCDONAGH ET AL.	=B95
	B52	2011/0070248-A1	03-24-2011	ICHIKAWA ET AL.	
	B53	2011/0229406-A1	09-22-2011	HETTMANN ET AL.	
	B54	2011/0293513-A1	12-01-2011	GOVINDAN ET AL.	
	B55	2012/0121615-A1	05-17-2012	FLYGARE ET AL.	
	B56	2012/0171201-A1	07-05-2012	SAPRA, PUJA	=B74 =B96 =B97
	B57	2012/0201809-A1	08-09-2012	BHAT ET AL.	
	B58	2012/0328634-A1	12-27-2012	GOVINDAN, SERENGULAM	
	B59	2013/0089872-A1	04-11-2013	NAKAMURA ET AL.	
	B60	2013/0123178-A1	05-16-2013	DIMARCHI ET AL.	=B98
	B61	2013/0216561-A1	08-22-2013	GOVINDAN	
	B62	2014/0004078-A1	01-02-2014	GOVINDAN, SERENGULAM	
	B63	2015/0297748-A1	10-22-2015	MASUDA ET AL.	
	B64	2015/0352224-A1	12-10-2015	NAITO ET AL.	
	B65	2016/0279259-A1	09-29-2016	MASUDA ET AL.	
	B66	2016/0287722-A1	10-06-2016	IMMUNOMEDICS, INC.	
	B67	2017/0021031-A1	01-26-2017	HETTMANN ET AL.	
	B68	2019/0151328-A1	05-23-2019	HETTMANN ET AL.	

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	B69	CA-2815154-A1	02-09-2012	U3 PHARMA GMBH DE		
	B70	CA-2859255-A1	06-20-2013	SEATTLE GENETICS, INC.		
	B71	CA-2927832-A1	11-24-2011	CERULEAN PHARMA. INC.		
	B72	CN-101023100-A	08-22-2007	GENENTECH INC	=B38	
	B73	CN-101490087-A	07-22-2009	GENENTECH INC		abs
	B74	CN-102481364-A	05-30-2012	ENZON PHARMACEUTICALS INC	=B74	
	B75	CN-1227499-A	09-01-1999	DAIICHI SEIYAKU CO		abs
	B76	CN-1764478-A	04-26-2006	IMMUNOMEDICS INC		abs
	B77	EP-1 155 702-A1	11-21-2001	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		
	B78	EP-2 594 589-A1	05-22-2013	SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY ET AL.		
	B79	EP-2 799 452-A1	11-05-2014	LIVTECH INC		
	B80	EP-2 907 824-A1	08-19-2015	DAIICHI SANKYO CO LTD		

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	3	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	B81	EP-2 910 573-A1	08-26-2015	DAIICHI SANKYO CO LTD		
	B82	EP-0 495 432-A1	07-22-1992	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.	=B100	
	B83	EP-0 737 686-A1	10-16-1996	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		
	B84	EP-0 916 348-A1	05-19-1999	DAIICHI SEIYAKU CO, DRUG DELIVERY SYSTEM INST LTD		
	B85	JP-2002-060351-A	02-26-2002	DAIICHI SANKYO		abs
	B86	JP-2005-511627-A	04-28-2005	SEATTLE GENETICS, INC.	=B34	
	B87	JP-2006-511526-A	04-06-2006	IMMUNOMEDICS, INC.	=B33	
	B88	JP-2007-527872-A	10-04-2007	INOTEK PHARMACEUTICALS CORP	=B35	
	B89	JP-2008-521828-A	06-26-2008	SEATTLE GENETICS, INC.	=B44	
	B90	JP-2009-538629-A	11-12-2009	GENETECH, INC.	=B41	
	B91	JP-2010-513524-A	04-30-2010	SCHERING CORP	=B48	
	B92	JP-2011-519864-A	07-14-2011	IMMUNOGEN INC	=B45	
	B93	JP-2011-524001-A	08-25-2011	GENENTECH INC	=B46	
	B94	JP-2012-100671-A	05-31-2012	AMGEN	=B40	
	B95	JP-2012-509259-A	04-19-2012	MERRIMACK PHARMACEUTICALS INC	=B51	
	B96	JP-2013-500253-A	01-07-2013	ENZON PHARMACEUTICALS INC	=B56	
	B97	JP-2013-534535-A	09-05-2012	COVX TECH IRELAND, LTD.	=B57	
	B98	JP-2013-534906-A	09-09-2013	INDIANA UNIV RES AND TECH CORP.	=B60	
	B99	JP-2017-503784-A	02-02-2017	DAIICHI SANKYO CO LTD ET AL.	=B30	
	B100	JP-H05-059061-A	03-09-1993	DAI ICHI SEIYAKU CO LTD	=B82	
	B101	JP-H08-337584-A	12-24-1996	DAI ICHI SEIYAKU CO LTD		abs
	B102	JP-H10-095802-A	04-14-1998	TANABE SEIYAKU CO LTD		abs
	B103	JP-H11-092405-A	04-06-1999	DAI ICHI SEIYAKU CO LTD ET AL		abs
	B104	JP-H1171280-A	03-16-1999	TANABE SEIYAKU CO LTD		abs
	B105	KR-1020010052385-A	06-25-2001	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD	=B10	
	B106	KR-1020110044808-A	04-29-2011	GENENTECH INC	=B16	
	B107	RU-2404810-C2	07-20-2008	GENENTECH INC	=B37	
	B108	RU-2450008-C2	05-10-2012	INDENA SPA	=B49	
	B109	TW-1232930	05-21-2005	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		abs
	B110	TW-200817434-A	04-16-2008	GENENTECH, INC.		abs
	B111	WO-00/25825-A1	05-11-2000	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		abs
	B112	WO-01/00244-A2	01-04-2001	GENENTECH INC		abs
	B113	WO-02/00734-A1	01-03-2002	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		abs
	B114	WO-03/013602-A1	02-20-2003	MAX PLANCK- GESELLSCHAFT ET AL.		abs
	B115	WO-03/015826-A1	02-27-2003	TANABE SEIYAKU CO		abs

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	4	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	B116	WO-03/043583-A2	05-30-2003	SEATTLE GENETICS INC		abs
	B117	WO-2005/112919-A2	12-01-2005	MEDAREX INC		abs
	B118	WO-2006/065533-A2	06-22-2006	SEATTLE GENETICS INC		abs
	B119	WO-2006/092230-A2	09-08-2006	KTB TUMORFORSCHUNGS GMBH		abs
	B120	WO-2007/077028-A2	07-12-2007	U3 PHARMA AG ET AL.		abs
	B121	WO-2008/100624-A2	08-21-2008	MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.		abs
	B122	WO-2008/116219-A2	09-25-2008	SLOAN KETTERING INST CANCER		abs
	B123	WO-2008/144891-A1	12-04-2008	ARIUS RESEARCH INC		abs
	B124	WO-2011/011474-A1	01-27-2011	ENZON PHARMACEUTICALS INC		abs
	B125	WO-2011/021397-A1	02-24-2011	UNIV CHIBA NAT UNIV CORP ET AL.		abs
	B126	WO-2011/068845-A1	06-09-2011	IMMUNOMEDICS INC		abs
	B127	WO-2011/145744-A1	11-24-2011	LIVTECH INC		abs
	B128	WO-2011/155579-A1	12-15-2011	SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY ET AL.		abs
	B129	WO-2012/019024-A2	02-09-2012	IMMUNOGEN INC ET AL.		abs
	B130	WO-2012/064733-A2	05-18-2012	MEDIMMUNE LLC ET AL.		abs
	B131	WO-2013/068946-A2	05-16-2013	RINAT NEUROSCIENCE CORP		abs
	B132	WO-2013/077458-A1	05-30-2013	LIVTECH INC		abs
	B133	WO-2013/163229-A1	10-31-2013	SEATTLE GENETICS INC		abs
	B134	WO-2013/188740-A1	12-19-2013	AMBRX INC		abs
	B135	WO-2014/061277-A1	04-24-2014	DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED		abs
	B136	WO-2014/107024-A1	07-10-2014	CELLTRION		abs
	B137	WO-2015/155998-A1	10-15-2015	DAIICHI SANKYO COMPANY LIMITED		abs
	B138	WO-97/46260-A1	12-11-1997	DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.		abs

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS				
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶	
	B139	ACCHIONE ET AL, Impact of linker and conjugation chemistry on antigen binding, Fc receptor binding and thermal stability of model antibody-drug conjugates, mAbs, 2012, pgs. 362-372 - (12 pages)		
	B140	ADAMS ET AL., "Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab," Cancer Immunol. Immunother. 55:717-727 (2006).		
	B141	ALIMANDI ET AL., "Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas," Oncogene 10:1813-1821 (1995)- 9 PAGES.		

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	5	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B142	ALLEY ET AL., "Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer," Current Opinion in Chemical Biology 14:529-537 (2010)- 9 PAGES.	
	B143	Allowance dated July 4, 2017, in Japanese Patent Application No. 2016-117096.	
	B144	Allowance issued in connection with Taiwanese Patent Application No. 104103127, dated April 11, 2018.	
	B145	Australian Intellectual Property Office, "Examination Report No. 2 for Standard Patent Application," Australian Patent Application No. 2014371934, dated September 13, 2019.	
	B146	BARGINEAR ET AL., "Trastuzumab-DM1: A Review of the Novel Immuno-Conjugate for HER2-Overexpressing Breast Cancer," The Open Breast Cancer Journal 1:25-30 (2009).	
	B147	BAROK ET AL, Trastuzumab-DM1 is highly effective in preclinical models of HER2-positive gastric cancer, Cancer Letters, 2011, Vol.306, No.2, pgs. 172-179 (9 pages)	
	B148	BASELGA ET AL., "Phase II Study of Weekly Intravenous Recombinant Humanized Anti-p185HER2 Monoclonal Antibody in Patients with HER2/neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer," J. Clin. Oncol. 14(3):737-744 (March 1996).	
	B149	BASU ET AL., "The Epithelial/Carcinoma Antigen EGP-1 Recognized by Monoclonal Antibody RS7-3G11, is Phosphorylated on Serine 303," Int. J. Cancer 62(4):472-479 (1995).	
	B150	BECK, Alain, "The Next Generation of Antibody-drug Conjugates Comes of Age," Discovery Medicine 10(53):329-339 (October 16, 2010)- 8 PAGES.	
	B151	Behrens et al, Methods for site-specific drug conjugation to antibodies, mAbs, 2014, Vol.6, No.1, pgs. 46-53.	
	B152	Blok et al., "Cytoplasmic Overexpression of HER2: a Key Factor in Colorectal Cancer", Clinical Insights: Oncology, Vol. 7, 2013 pages 41-51	
	B153	BURKE,PATRICK J et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Antibody- Drug Conjugates Comprised of Potent Campothecin Analogues , Bioconjugate Chemistry, June 17, 2009. Vol.20 No.6 Pages 1242-1250	
	B154	CALABRESE ET AL., "Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization," Cytogenet Cell Genet. 92(1-2):164-165 (2001).	
	B155	Canadian Examiner's Interview Summary issued in Canadian Patent Application No. 2885800 issued on March 28, 2017.	
	B156	Canadian Office Action dated April 13, 2018 in corresponding application No. 2939802.	
	B157	Chinese Office Action dated November 1, 2016 in corresponding application No. 201380053256.2.	✓
	B158	Chinese Office Action dated November 8, 2019 for corresponding Application No. 201580019138.9 - 4 pages.	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	6	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B159	Chinese Office Action issued to corresponding App. No. 201480071134.0 - DTD 8-20-2019 (5 pages)	
	B160	Chinese Search Report dated June 24, 2020 for corresponding Application No. 108114649	
	B161	Colombian Reconsideration Petition dated March 15, 2018 in corresponding application No. NC2016/0000187 - 36 pages	✓
	B162	COUSSENS ET AL., "Tyrosine Kinase Receptor with Extensive Homology to EGF Receptor Shares Chromosomal Location with neu Oncogene," Science 230(4730):1132-1139 (December 1985).	
	B163	D. LOO ET AL: "Development of an Fc-Enhanced Anti-B7-H3 Monoclonal Antibody with Potent Antitumor Activity", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 18, no. 14, 15 July 2012 (2012-07-15), pages 3834-3845, XP055092714, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0715	
	B164	DAMLE, Nitin K., "Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin," Expert Opin. Biol. Ther. 4(9):1445-1452 (2004)- 8 PAGES.	
	B165	DE JAGER ET AL., "DX-8951f: Summary of Phase I Clinical Trials," Ann. N.Y. Acad. Sci. 922:260-273 (2000)- 16 PAGES.	
	B166	DEFAZIO ET AL., "Expression of c-erbB Receptors, Heregulin and Oestrogen Receptor in Human Breast Cell Lines," Int. J. Cancer 87:487-498 (2000)- 12 PAGES.	
	B167	DI FIORE ET AL., "erbB-2 Is a Potent Oncogene When Overexpressed in NIH/3T3 Cells," Science 237:178-182 (July 1987).	
	B168	DOSIO et al., "Antibody-targeted leucinstatin A", Journal of Controlled Release, No. 32, (1994), pages 37-44.	
	B169	DUCRY ET AL., "Antibody – Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies," Bioconjugate Chem. 21:5-13 (2010)- 9 PAGES.	
	B170	EL SEWEDY ET AL., "Cloning of the Murine Trop2 Gene: Conservation of a PIP2-Binding Sequence in the Cytoplasmic Domain of Trop-2," Int. J. Cancer 75(2):324-330 (1998).	
	B171	International Search Report issued in International Patent Application No. PCT/JP2015/002020 mailed July 20, 2015	✓
	B172	Esteva et al., A Phase II Study of Intravenous Exatecan Mesylate (DX-8951f) Administered Daily for 5 Days Every 3 Weeks to Patients with Metastatic Breast Carcinoma, American Cancer Society, 2003, 900-907.	
	B173	European Search Report issued in corresponding application No. 15743738.5 dated August 9, 2017	
	B174	Extended European Search Report dated February 4, 2020 for corresponding Application No. 19206764.3	
	B175	Extended European Search Report dated May 10, 2017 in European Patent Application No. 14874745.4.	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	7	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B176	Extended European Search Report dated May 13, 2016, in European Patent Application No. 13847461.4.	
	B177	Extended European Search Report dated May 6, 2016, in European Patent Application No. 13845596.9.	
	B178	Extended European Search Report issued in European Patent Application No. 15776810.2 dated August 11, 2017.	
	B179	FAULK ET AL., "Antigens of human trophoblasts: A working hypothesis for their role in normal and abnormal pregnancies," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(4):1947-1951 (1978).	
	B180	FENDLY ET AL., "Characterization of Murine Monoclonal Antibodies Reactive to Either the Human Epidermal Growth Factor Receptor or HER2/neu Gene Product," Cancer Research 50:1550-1558 (1990).	
	B181	Final Office Action issued in U.S. Patent Application No. 15/221,851 mailed November 13, 2017.	
	B182	FONG ET AL., "High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer," Br. J. Cancer 99(8):1290-1295 (2008).	
	B183	FONG ET AL., "TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity," Mod. Pathol. 21(2):186-191 (2008).	
	B184	FORNARO ET AL., "Cloning of the Gene Encoding Trop-2, a Cell-Surface Glycoprotein Expressed by Human Carcinomas," Int. J. Cancer 62(5):610-618 (1995).	
	B185	FUKUSHIGE ET AL., "Localization of a Novel v-erbB-Related Gene, c-erbB-2, on Human Chromosome 17 and Its Amplification in a Gastric Cancer Cell Line," Mol. Cell. Biol. 6(3):955-958 (1986).	
	B186	Gomez-Monterrey et al., "Design, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of Acyl Derivatives of 3-Aminonaphtho[2,3-b]thiophene-4,9-dione, a Quinone-Based System," Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54(12):4077-4091, abstract.	
	B187	GRAUS-PORTA ET AL., "ERbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling," EMBO J. 16(7):1647-1655 (1997).	
	B188	GRAVALOS ET AL., "HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target," Ann. Oncol. 19:1523-1529 (2008).	
	B189	HARDWICK ET AL., "Immunohistochemical detection of p53 and c-erbB-2 in oesophageal carcinoma; no correlation with prognosis," Eur. J. Surg. Oncol. 23:30-35 (1997).	
	B190	HUDIS, M.D., Clifford A., "Trastuzumab – Mechanism of Action and Use in Clinical Practice," N. Engl. J. Med. 357(1):39-51 (2007).	
	B191	HUDZIAK ET AL., "Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7159-7163 (1987).	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	8	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B192	I. Sullivan, et al. " Osimertinib in the treatment of patients with epidermal growth factor receptor T790Mmutation-positive metastatic non-small cell lung cancer: clinical trial evidence and experience", Therapeutic Advances in Respiratory Disease, Vol. 10(6), pp.549-565, 2016 (17 pages)	
	B193	IN Office Action issued in the corresponding Indian Patent Application Ser. No. 201647013640, dated July 19, 2019.	
	B194	INOUE ET AL., "CM-Dextran-Polyalcohol-Camptothecin Conjugate: DE-310 with A Novel Carrier System and Its Preclinical Data," Polymer Drugs in the Clinical Stage, 145-153 (2003)- 9 PAGES.	
	B195	International Search Report and Written Opinion for correspondence Application No. PCT/JP2018/007152 dated April 24, 2018.	✓
	B196	International Search Report for corresponding Application No. PCT/JP2014/006421 mailed March 17, 2015.	✓
	B197	International Search Report for PCT/JP2013/006069, dated December 17, 2013.	✓
	B198	International Search Report for PCT/JP2013/006178, dated December 17, 2013.	✓
	B199	International Search Report issued in International Patent Application No. PCT/JP2015/000355 mailed April 21, 2015.	✓
	B200	Japanese Notice Of Allowance dated October 18, 2016 in corresponding application No. 2016-166850.	✓
	B201	Japanese Office Action dated December 6, 2016 in corresponding application No. 2016-540705.	✓
	B202	JOTO ET AL., "DX-8951F, A Water-Soluble Camptothecin Analog, Exhibits Potent Antitumor Activity Against a Human Lung Cancer Cell Line and its SN-38-Resistant Variant," Int. J. Cancer 72:680-686 (1997)- 7 PAGES.	
	B203	K. Yonesaka, et al., "Anti-HER3 monoclonal antibody patritumab sensitizes refractory non-small cell lung cancer to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib", Oncogene Vol.35, pp.878-886, 2016 (10 pages)	
	B204	KANG ET AL, Engineering multivalent antibodies to target heregulin-induced HER3 signaling in breast cancer cells, mAbs, 2013, Vol. 64, No.1, pgs. 15-29.	
	B205	KAPTAIN ET AL., "Her-2/neu and Breast Cancer," Diagn. Mol. Pathol. 10(3):139-152 (2001).	
	B206	KARUNAGARAN ET AL., "ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer," EMBO J. 15(2):254-264 (1996).	
	B207	KAWAKAMI ET AL - "The anti-HER3 antibody patritumab abrogates cetuximab resistance mediated by heregulin in colorectal cancer cells", Oncotarget, Vol. 5, No. 23, Dec-5-2014, 11847-11856 - 10 pages.	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	9	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B208	Kimio Yonesaka, "Anti-HER3 Antibody Patritumab Overcomes Resistance to EGFR Inhibitor in Non-small Cell Lung Cancer", The Japan Lung Cancer Society, vol. 55, pp.948-955, 2015 (8 pages)	
	B209	Korean Office Action dated May 1, 2018 in corresponding application No. 10-2016-7015961.	✓
	B210	KORKAYA ET AL., "HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion," Oncogene 27:6120-6130 (2008).	
	B211	KRAUS ET AL., "Demonstration of ligand-dependent signaling by the erbB-3 tyrosine kinase and its constitutive activation in human breast tumor cells," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2900-2904 (April 1993)- 5 PAGES.	
	B212	KRAUS ET AL., "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9193-9197 (December 1989)- 5 pages.	
	B213	KUMAZAWA ET AL., "Antitumor activity of DX-8951f: a new camptothecin derivative," Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):625-632 (1998)-8 PAGES.	
	B214	KUMAZAWA ET AL., "DE-310, a novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f: Potent antitumor activities in various murine tumor models," Cancer Sci. 95(2):168-175 (February 2004)-8 PAGES.	
	B215	KUMAZAWA ET AL., "Potent and broad antitumor effects of DX-8951f, a water-soluble camptothecin derivative, against various human tumors xenografted in nude mice," Cancer Chemother. Pharmacol. 42:210-220 (1998)- 11 PAGES.	
	B216	LINNENBACH ET AL., "Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733," Proc. Natl. Acad. Sci. 86(1):27-31 (January 1989).	
	B217	LIPINSKI ET AL., "Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies," Proc. Natl. Acad. Sci. 78(8):5147-5150 (August 1981).	
	B218	McDonagh et al., "Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment," Protein Engineering, Design & Selection, 2006, 19(7):299-307.	
	B219	MITSUMI ET AL., "A New Water-soluble Camptothecin Derivative, DX-8951f, Exhibits Potent Antitumor Activity against Human Tumors in vitro and in vivo," Jpn. J. Cancer Res. 86:776-782 (August 1995)- 7 PAGES.	
	B220	Moghaddas et al., "Whether HER2-positive non-breast cancers are candidates for treatment with Ado-trastuzumab emtansine?", J. Res. Pharm. Pract., Vol 5(4), 2016 pages 227-233	
	B221	MÜHLMANN ET AL., "TROP2 expression as prognostic marker for gastric carcinoma," J. Clin. Pathol. 62(2):152-158 (2009).	
	B222	N. MASABUCHI, "Pharmacokinetics of DE-310, a novel macromolecular carrier system for the camptothecin analog DX-8951f, in tumor-bearing mice," Pharmazie 59: 374-377 (2004).	
	B223	N.V. Sergina, et al. "Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3", Nature, Vol. 445, pp.437-441, 2007 (6 pages)	
	B224	NAIDU ET AL., "Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas," British Journal of Cancer 78(10): 1385-1390 (1998)- 6 PAGES.	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	10	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B225	NAKADA ET AL., "Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads," Bioorganic & Medical Chemistry Letters 26(6):1542-1545 (2016)- 4 PAGES.	
	B226	NING ET AL., "TROP2 expression and its correlation with tumor proliferation and angiogenesis in human gliomas," Neurol. Sci. 34(10):1745-1750 (2013).	
	B227	Non-Final Office Action issued in U.S. Patent Application No. 14/435,114 mailed July 21, 2016.	
	B228	Non-Final Office Action issued in U.S. Patent Application No. 14/436,458 mailed July 19, 2016.	
	B229	Non-Final Office Action issued in U.S. Patent Application No. 15/180,203 mailed July 25, 2016.	
	B230	Non-Final Office Action issued in U.S. Patent Application No. 15/221,851 mailed July 7, 2017.	
	B231	Non-Final Office Action issued in U.S. Patent Application No. 15/821662 mailed January 17, 2018	
	B232	Notice of Allowance issued in U.S. Patent Application No. 15/221,851 mailed June 13, 2018.	
	B233	Notice of Allowance issued in U.S. Patent Application No. 15/821662 mailed November 02, 2018.	
	B234	OCHI et al, "A possible mechanism for the long-lasting antitumor effect of the macromolecular conjugate DE-310: mediation by cellular uptake and drug release of its active camptothecin analog DX-8951," Cancer Chemotherapy and Pharmacology 55(4): 323-332 (2004).	
	B235	Office Action dated November 21, 2017 in corresponding application No. PCT/JP2017/036215.	
	B236	Office Action issued April 22, 2016, in Singapore Patent Application No. 11201502887W.	
	B237	Office Action issued in Colombian Application No. NC2016/0000187 mailed on May 9, 2017. An English translation is provided.	
	B238	Office Action issued in US Application No. 15/187,179 dated October 21, 2016.	
	B239	Office Action with Search Report dated August 29, 2017, in RU 2015113767.	
	B240	OGITANI et al., "Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity," Cancer Science, Vol. 107, 2016, pp. 1039-1046.	
	B241	OGITANI et al., "DS-8201a, A Novel HER2-Targeting ADC with a Novel DNA Topoisomerase I inhibitor, Demonstrates a Promising Antitumor Efficacy with Differentiation from T-DM1," Clinical Cancer Research, Vol. 22, No. 20, October 15, 2016, pp. 5097-5108.	

Examiner Signature		Date Considered	
---------------------------	--	------------------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	11	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B242	OGITANI et al., "Wide application of a novel topoisomerase I inhibitor-based drug conjugation technology," Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 26, 2016, 5069-5072.	
	B243	OGUMA ET AL, Validation study of a method for assaying DE-310, a macromolecular carrier conjugate containing an anti-tumor camptothecin derivative, and the free drug in tumor tissue by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, Biomedical Chromatography, 2005, Vol.19, No.1, pgs. 19-26 - (8 pages)	
	B244	OHMACHI ET AL., "Clinical Significance of TROP2 Expression in Colorectal Cancer," Clin. Cancer Res. 12(10):3057-3063 (May 15, 2006).	
	B245	Opposition dated May 3, 2017, against corresponding Colombian Patent Application No. NC2016/0000187.	✓
	B246	OTTO SOEPENBERG, "chromatographic assays for DE-310, a novel camptothecin analog, and two major enzymatic products in human matrices," Journal of Chromatography B, 799, 15-22 (2004)	
	B247	P. Janne, et al., "Phase 1 study of the Anti-HER3 Antibody Drug Conjugate U3-1402 in Metastatic or Unresectable EGFR-mutant NSCLC.", Journal of Thoracic Oncology, Vol. 12, no. 11, Supp. Supplement 2, pp. S2290, abstract no.:P3.04-013, November 2017 (3 pages)	
	B248	PLOWMAN ET AL., "Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4905-4909 (July 1990)- 5 PAGES.	
	B249	RIPANI ET AL., "Human Trop-2 is a Tumor-Associated Calcium Signal Transducer," Int. J. Cancer 76(5):671-676 (1998).	
	B250	ROWINSKY, Preclinical and Clinical Development of Exatecan(DX-8951f), Camptothecins in Cancer Therapy, 2005, pgs. 317-318 (25 pages)	
	B251	Russian Office Action dated March 5, 2019 in corresponding application No. 2016143351.	✓
	B252	Russian Office Action dated October 11, 2018 in corresponding application No. 2016123597 - 13 pages	✓
	B253	SETER ET AL., "The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma," Nature Biotechnology 30(7):631-637 (July 2012)- 7 PAGES.	
	B254	Shen et al, Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates, Nature Biotechnology, 2012, Vol. 30, pgs. 184-189.	
	B255	SHIOSE et al, "Systematic Research of Peptide Spacers Controlling Drug Release from Macromolecular Prodrug System, Carboxymethyldextran Polyalcohol-Peptide-Drug Conjugates," Bioconjugate Chem. 20(1):60-70(2009).	
	B256	Shiose et al., "Relationship between Drug Release of DE-310, Macromolecular Prodrug of DX-8951f, and Cathepsins Activity in Several Tumors," Biol. Pharm. Bull., 2007, 30(12):2365-2370.	
	B257	SIEVERS ET AL, Antibody-Drug Conjugates in Cancer Therapy, Annual Review of Medicine, 2013, Vol. 64, No.1, pgs. 15-29.	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

4845-7796-6540.1

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: September 30, 2020 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1643
				Examiner Name	NOT YET ASSIGNED
Sheet	12	of	12	Attorney Docket Number	098065-0249

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	B258	SLAMON ET AL., "Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene," Science 235:177-182 (1987).	
	B259	SLAMON ET AL., "Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer," Science 244:707-712 (1989).	
	B260	SLIWKOWSKI ET AL., "Coexpression of erbB2 and erbB3 Proteins Reconstitutes a High Affinity Receptor for Heregulin." J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665 (1994).	
	B261	SLIWKOWSKI ET AL., "Nonclinical Studies Addressing the Mechanism of Action of Trastuzumab (Herceptin)," Semin. Oncol. 26(4) Suppl. 12: 60-70 (August 1999).	
	B262	SOEPENBERG ET AL., "Phase I and Pharmacokinetic Study of DE-310 in Patients with Advanced Solid Tumors," Clin. Cancer Res. 11:703-711 (January 15, 2005)- 9 PAGES.	
	B263	STEPAN et al., "Expression of Trop2 Cell Surface Glycoprotein in Normal and Tumor Tissues: Potential Implications as a Cancer Therapeutic Target," Journal of Histochemistry & Cytochemistry Vol. 59, No. 7, pp. 701-710. {July 2011}	
	B264	Taiwanese Office Action dated July 30, 2018 in corresponding application No. 104111534.	
	B265	Taiwanese Office Action issued in Taiwanese Patent Application No. 102136742 mailed on May 15, 2017.	
	B266	TAKIGUCHI ET AL., "Antitumor Effect of DX-8951, a Novel Camptothecin Analog, on Human Pancreatic Tumor Cells and Their CPT-11-resistant Variants Cultured in vitro and Xenografted in Nude Mice," Jpn. J. Cancer Res. 88:760-769 (August 1997)- 10 PAGES.	
	B267	THOMAS M. CARDILLO, "Humanized Anti-Trop-2 IgG-SN-38 Conjugate for Effective Treatment of Diverse Epithelial Cancers: Preclinical Studies in Human Cancer Xenograft Models and Monkeys," Clinical Cancer Research 17(10): 3157-3169 (2011).	
	B268	US Notice of Allowance on US 15/187179 DTD 05/18/2017	
	B269	US Notice of Allowance on US 15/187179 DTD 08/25/2017	
	B270	VOGEL ET AL., "Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer," J. Clin. Oncol. 20(3):719-726 (February 2002).	
	B271	WANG ET AL., "Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers," Mol. Cancer Ther. 7(2):280-285 (February 2008).	
	B272	WENTE ET AL., "DE-310, a macromolecular prodrug of the topoisomerase-I-inhibitor exatecan (DX-8951), in patients with operable solid tumors," Investigational New Drugs 23:339-347 (2005) - 9 PAGES.	
	B273	YANO ET AL., "Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer," Oncol. Rep. 15:65-71 (2006).	

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

Examiner Signature	/ROBERT S LANDSMAN/	Date Considered	01/24/2022
--------------------	---------------------	-----------------	------------

1/28/22, 4:07 AM

Prior Art Web Search Printable History Generator

Web Search History

date, time	web site	search string
1/28/2022 3:59:54 AM	Google	cdh6 antibody
1/28/2022 4:06:36 AM	Google	cdh6 antibody internalization

To: ipdocketing@foley.com,,
From: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Cc: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Subject: Private PAIR Correspondence Notification for Customer Number 22428

Feb 14, 2022 04:10:28 AM

Dear PAIR Customer:

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109
UNITED STATES

The following USPTO patent application(s) associated with your Customer Number, 22428 , have new outgoing correspondence. This correspondence is now available for viewing in Private PAIR.

The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

Disclaimer:

The list of documents shown below is provided as a courtesy and is not part of the official file wrapper. The content of the images shown in PAIR is the official record.

Application	Document	Mailroom Date	Attorney Docket No.
16613203	CTNF	02/14/2022	098065-0249
	892	02/14/2022	098065-0249
	1449	02/14/2022	098065-0249
	1449	02/14/2022	098065-0249
	1449	02/14/2022	098065-0249

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://sportal.uspto.gov/secure/myportal/privatepair>.

If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov with 'e-Office Action' on the subject line or call 1-866-217-9197 during the following hours:

Monday - Friday 6:00 a.m. to 12:00 a.m.

Thank you for prompt attention to this notice,

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
PATENT APPLICATION INFORMATION RETRIEVAL SYSTEM

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: February 28, 2022 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	November 13, 2019
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1647
				Examiner Name	Robert S. LANDSMAN
Sheet	1	of	1	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	D1.	2016/0046711-A1	02-18-2016	Bialucha et al.	= CO-2017001191-A2 and WO-2016/024195-A1

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	D2.	CO-2017001191-A2	04-28-2017	NOVARTIS AG	= US-2016/0046711-A1 and WO-2016/024195-A1	
	D3.	WO-2015/098099-A1	07-02-2015	DAIICHI SANKYO CO LTD		ABS

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS				
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.		T ⁶
	D4.	Colombian Patent Office, "Office Action," issued in connection with Colombian Patent Application No. NC2019/0013020, dated November 29, 2021.		✓
	D5.	Colombian Patent Office, "Office Action," issued in connection with Colombian Patent Application No. NC2019/0013020, dated August 9, 2021.		✓
	D6.	Japanese Patent Office, "Notice of Reason(s) for Refusal," issued in connection with Japanese Patent Application No. 2021-002874, dated February 2, 2022.		✓
	D7.	Mexican Patent Office, "Office Action," issued in connection with Mexican Patent Application No. MX/a/2019/013597, dated September 17, 2021.		✓

Examiner Signature		Date Considered	
---------------------------	--	------------------------	--



Espacenet

Bibliographic data: CO20170001191 (A2) — 2017-04-28

ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES

Inventor(s): BIALUCHA CARL ULI [US]; COLLINS SCOTT [US]; DÜRR CLEMENS [CH]; HU TIANCEN [US]; JANATPOUR MARY JO [US]; MEYER MATTHEW JOHN [US] ± (BIALUCHA, Carl Uli, ; COLLINS, Scott, ; DÜRR, Clemens, ; HU, Tiancen, ; JANATPOUR, Mary Jo, ; MEYER, Matthew John)

Applicant(s): NOVARTIS AG [CH] ± (NOVARTIS AG)

Classification: - international: A61K31/00; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/28
 - cooperative: A61K31/428 (EP, US); A61K31/4738 (EP, CN, US); A61K31/519 (EP, US); A61K31/537 (EP, US); A61K31/635 (EP, US); A61K38/05 (EP, US); A61K39/395 (CN); A61K45/06 (EP, CN, KR, US); A61K47/6803 (EP, KR, US); A61K47/6849 (EP, KR, US); A61K47/6861 (EP, US); A61K47/6869 (EP, US); A61K47/6889 (EP, KR, US); A61P35/00 (EP); A61P43/00 (EP); C07K16/28 (EP, CN, KR, US); C07K16/3038 (US); C07K16/3069 (US); G01N33/57492 (KR, US); A61K2039/505 (EP, CN, KR, US); C07K2317/21 (EP, CN, US); C07K2317/33 (US); C07K2317/34 (EP, CN, KR, US); C07K2317/40 (EP, CN, KR, US); C07K2317/51 (US); C07K2317/515 (US); C07K2317/55 (EP, CN, US); C07K2317/56 (EP, CN, US); C07K2317/565 (US); C07K2317/73 (EP, CN, KR, US); C07K2317/92 (EP, CN, US); G01N2333/705 (KR, US) more

Application number: CO20170001191 20170208

Priority number(s): WO2015IB56032 20150807 ; US201462036382P 20140812

Also published as: AR104664 (A1) AU2015302959 (A1) AU2015302959 (B2)
BR112017001588 (A2) CA2954599 (A1) CL2017000170 (A1)
CN106659790 (A) CU20170014 (A7) DOP2017000045 (A)
EA201790334 (A1) ECSP17011657 (A) EP3180360 (A1)
JP2017524364 (A) KR20170040249 (A) MA40513 (A)
MX2017001946 (A) NI201700016 (A) PE20170903 (A1)
PH12017500002 (A1) SG11201700254Q (A) TN2016000577 (A1)
TW201613643 (A) US10238748 (B2) US2016046711 (A1)
US2017224836 (A1) US9982045 (B2) UY36266 (A)
WO2016024195 (A1) less

Abstract not available for CO2017001191 (A2)

Abstract of corresponding document: US2016046711 (A1)

The present invention relates to anti-CDH6 antibodies, antibody fragments, antibody drug conjugates, and their uses for the treatment of cancer.

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2015 年 7 月 2 日(02.07.2015)

(10) 国際公開番号

WO 2015/098099 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/006421
- (22) 国際出願日: 2014 年 12 月 24 日(24.12.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2013-267548 2013 年 12 月 25 日(25.12.2013) JP
- (71) 出願人: 第一三共株式会社(DAICHI SANKYO COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒1038426 東京都中央区日本橋本町三丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP); 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南 1 条西 1 7 丁目 2 9 1 番地 8 5 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 我妻 利紀(AGATSUMA, Toshinori); 〒1408710 東京都品川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP); 高橋 秀(TAKAHASHI, Shu); 〒1408710 東京都品川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP); 長谷川 淳(HASEGAWA, Jun); 〒1408710 東京都品

川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP); 岡島 大祐(OKAJIMA, Daisuke); 〒1408710 東京都品川区広町一丁目 2 番 5 8 号 第一三共株式会社内 Tokyo (JP); 濱田 洋文(HAMADA, Hirofumi); 〒0608556 北海道札幌市中央区南 1 条西 1 7 丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP); 山口 美樹(YAMAGUCHI, Miki); 〒0608556 北海道札幌市中央区南 1 条西 1 7 丁目 北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP).

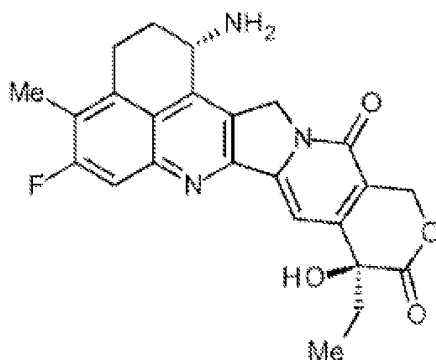
(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内 1 丁目 6 番 5 号丸の内北口ビル 2 1 階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(続表有)

(54) Title: ANTI-TROP2 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

(54) 発明の名称: 抗 TROP2 抗体-薬物コンジュゲート



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an antitumor drug that excels in antitumor effect and safety, and that has an excellent therapeutic effect. Provided is an antibody-drug conjugate characterized in that an antitumor compound represented by a formula and anti-TROP2 antibody are linked via a linker having a structure represented by the formula $-L^1-L^2-L^3-NH-(CH_2)_n-L^4-(CH_2)_m-L^5-C(=O)-$ (wherein anti-TROP2 antibody bonds with the L^1 terminal and the antitumor compound bonds with the carbonyl group of the $-(CH_2)_m-L^5-C(=O)-$ moiety using the nitrogen atom of the amino group at position 1 as the bonding site).

(57) 要約: 抗腫瘍効果と安全性面に優れる、優れた治療効果を有する抗腫瘍薬の提供。次式で示される抗腫瘍性化合物と抗 TROP2 抗体とを、次式: $-L^1-L^2-L^3-NH-(CH_2)_n-L^4-(CH_2)_m-L^5-C(=O)-$ で示される構造のリンカーを介して結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲート(抗 TROP2 抗体は L¹ の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は、1

位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、 $-(CH_2)_m-L^5-C(=O)-$ 部分のカルボニル基に結合する)を提供する。

WO 2015/098099 A1

WO 2015/098099 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー	SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
ロシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TL, TM), ユー	添付公開書類:
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,	— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
	— 明細書の別個の部分として表した記列リスト (規則 5.2(a))

WO 2015/098099

1

PCT/JP2014/006421

明 細 書

発明の名称：抗TROP2抗体－薬物コンジュゲート

技術分野

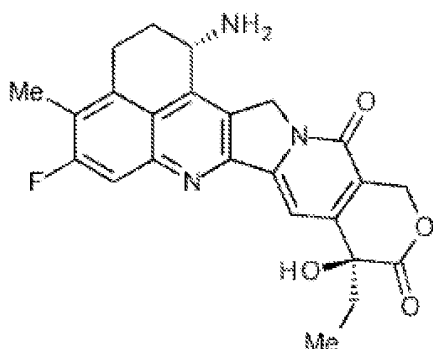
【0001】 本発明は、抗TROP2抗体と抗腫瘍性薬物とをリンカー構造部分を介して結合させた、抗腫瘍薬として有用な抗体－薬物コンジュゲートに関する。

背景技術

【0002】 癌細胞表面に発現し、かつ細胞に内在化できる抗原に結合する抗体に、細胞毒性を有する薬物を結合させた抗体－薬物コンジュゲート（Antibody-Drug Conjugate；ADC）は、癌細胞に選択的に薬物を送達できることによって、癌細胞内に薬物を蓄積させ、癌細胞を死滅させることが期待できる（非特許文献1～3参照）。ADCとして例えば、抗CD33抗体にカリチアマイシンを結合させたMylotarg（登録商標；ゲムツズマブオゾガマイシン）が急性骨髄性白血病の治療薬として認可されている。また、抗CD30抗体にオーリスタチンEを結合させたAdcetris（登録商標；ブレンツキシマブベドティン）がホジキンリンパ腫と未分化大細胞リンパ腫の治療薬として最近認可された（非特許文献4参照）。これまでに認可されたADCに含有される薬物は、DNA又はチューブリンを標的としている。

【0003】 抗腫瘍性の低分子化合物としてトポイソメラーゼⅠを阻害して抗腫瘍作用を発現する化合物であるカンプトテシン誘導体が知られている。その中で下式

【0004】 [化1]



WO 2015/098099

2

PCT/JP2014/006421

〔0005〕で示される抗腫瘍性化合物（エキサテカン、化学名：(1*S*, 9*S*)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1*H*, 12*H*-ベンゾ[*de*]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-*b*]キノリン-10, 13(9*H*, 15*H*)-ジオン）は、水溶性のカンプトテシン誘導体である（特許文献1、2）。この化合物は、現在臨床で用いられているイリノテカンとは異なり、抗腫瘍効果の発現には酵素による活性化を必要としない。また、イリノテカンの薬効本体であるSN-38や、同じく臨床で用いられているトポテカンよりもトポイソメラーゼⅠ阻害活性が強く、*in vitro*で種々の癌細胞に対して、より強い殺細胞活性を有している。特にP-glycoproteinの発現によってSN-38等に耐性を示す癌細胞に対しても効果を示した。また、マウスのヒト腫瘍皮下移植モデルでも強い抗腫瘍効果を示し、臨床試験が行われたものの上市には至っていない（非特許文献5～10参照）。エキサテカンがADCとして有効に作用するかについては明らかではなかった。

〔0006〕 DE-310は、生分解性のカルボキシメチルデキストランポリアルコールポリマーにエキサテカン、GGFGペプチドスパーサーを介して結合させた複合体である（特許文献3）。エキサテカンを高分子プロドラッグ化することによって、高い血中滞留性を保持させ、さらに腫瘍新生血管の透過性の亢進と腫瘍組織滞留性を利用して、受動的に腫瘍部位への指向性を高めたものである。DE-310は、酵素によるペプチドスパーサーの切断によって、活性本体であるエキサテカン、及びグリシンがアミノ基に結合しているエキサテカンが持続的に遊離され、その結果薬物動態が改善される。非臨床試験における種々の腫瘍の評価モデルにおいて、DE-310は、ここに含まれるエキサテカンの総量がエキサテカン単剤の投与時よりも減少しているのにも拘らず、単剤の投与時よりもより高い有効性を示した。DE-310に関しては臨床試験が実施されて有効例も確認され、活性本体が正常組織よりも腫瘍に集積することが確認されたとの報告がある一方、ヒトにおける腫瘍へのDE-310及び活性本体の集積は正常組織への集積と大差なく、ヒトでは受動的なターゲティングは見られなかったとの報告もある（非特許文献11～14参照）。結果としてDE-31

WO 2015/098099

3

PCT/JP2014/006421

も上市には至らず、エキサテカンがこの様なターゲティングを指向した薬物として有効に機能するかについては明らかではなかった。

[0007] DE-310の関連化合物として、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ で示される構造部分を-GGFG-スパーサーとエキサテカンの間に挿入し、 $-\text{GGFG}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{C}(=\text{O})-$ をスパーサー構造とする複合体も知られているが（特許文献4）、同複合体の抗腫瘍効果については全く知られていない。

[0008] ヒトTROP2 (TACSTD2: tumor-associated calcium signal transducer 2, GA733-1, EGP-1, MIS1; 以下、hTROP2と表記する) は、323アミノ酸残基からなる1回膜貫通型の1型細胞膜蛋白質である。以前より、ヒト栄養膜細胞 (trophoblasts) と癌細胞に共通する、免疫抵抗性に関与する細胞膜蛋白質の存在（非特許文献15）が示唆されていたが、ヒト絨毛癌細胞株の細胞膜蛋白質に対するモノクローナル抗体（162-25, 3, 162-46, 2）により認識される抗原分子が特定され、ヒト栄養膜細胞に発現する分子の一つとしてTROP2と命名された（非特許文献16）。後に同じ分子が他の研究者によって発見され、胃癌細胞株を免疫して得られたマウスモノクローナル抗体GA733によって認識される腫瘍抗原GA733-1（非特許文献17）、非小細胞肺癌細胞免疫によって得られたマウスモノクローナル抗体RS7-3G11により認識される上皮糖蛋白質（EGP-1; 非特許文献18）とも呼ばれたが、1995年にTROP2遺伝子がクローニングされ、これらが同一の分子であることが確認された（非特許文献19）。hTROP2のDNA配列及びアミノ酸配列は公的データベース上に公開されており、例えばNM_002353, NP_002344 (NCBI) 等のアクセッション番号により参照可能である。

hTROP2遺伝子は約50%の相同性を持つヒトTrop-1 (EpCAM, EGP-2, TACSTD1) と共にTACSTD遺伝子ファミリーを構成している（非特許文献21）。hTROP2蛋白質は、N末端26アミノ酸残基から成るシグナル配列、248アミノ酸残基から成る細胞外ドメ

WO 2015/098099

4

PCT/JP2014/006421

イン、23アミノ酸残基から成る細胞膜貫通ドメイン、26アミノ酸残基から成る細胞内ドメインで構成されている。細胞外ドメインには4つのN結合型糖鎖付加部位があり、見かけ上の分子量は理論計算値35キログルトンより10キログルトン前後増加することが知られている（非特許文献19）。

これまでhTROP2の生理学的リガンドは同定されておらず、分子機能は明らかにされていないが、腫瘍細胞においてカルシウムシグナルを伝達することが示され（非特許文献20）、またCa²⁺依存性キナーゼであるプロテインキナーゼCにより細胞内セリン303残基がリン酸化されること（非特許文献18）や、細胞内ドメインにPI3結合配列を有することから、腫瘍細胞におけるシグナル伝達機能が示唆されている（非特許文献22）。

臨床検体を用いた免疫組織化学解析により、hTROP2は種々の上皮細胞癌種において過剰発現していること、かつ、正常組織においてはいくつかの組織の上皮細胞での発現に限られ、その発現量も腫瘍組織と比較して低いことが示されている（非特許文献23～27）。またhTrop2の発現は大腸癌（非特許文献23）、胃癌（非特許文献24）、膵臓癌（非特許文献25）、口腔癌（非特許文献26）、グリオーマ（非特許文献27）において予後不良と相関することも報告されている。

さらに大腸癌細胞を用いたモデルから、hTROP2の発現が腫瘍細胞の足場非依存的細胞増殖及び免疫不全マウスでの腫瘍形成に関与していることが報告されている（非特許文献28）。

[0009] この様な癌との関連性を示唆する情報から、これまでに複数の抗hTROP2抗体が樹立され、その抗腫瘍効果が検討されている。この中にはコンジュゲート化されていない抗体単独でヌードマウス異種移植モデルにおける抗腫瘍活性を示すもの（特許文献5～8）の他、抗体と抗細胞薬剤とのADCとして抗腫瘍活性を示すもの（特許文献9～12）等が開示されている。しかしながら、それらの活性の強さや適用範囲はまだ十分ではなく、hTROP2を治療標的とする未充足医療ニーズが存在している。

先行技術文献

WO 2015/098099

5

PCT/JP2014/006421

特許文献

- [0010] 特許文献1：特開平5－59061号公報
特許文献2：特開平8－337584号公報
特許文献3：國際公開第1997/46260号
特許文献4：國際公開第2000/25825号
特許文献5：國際公開第2008/144891号
特許文献6：國際公開第2011/145744号
特許文献7：國際公開第2011/155579号
特許文献8：國際公開第2013/077458号
特許文献9：國際公開第2003/074566号
特許文献10：國際公開第2011/068845号
特許文献11：國際公開第2013/068946号
特許文献12：米國特許第7999083号明細書

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.
非特許文献2：Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.
非特許文献3：Damle N.K., Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.
非特許文献4：Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30, 631-637.
非特許文献5：Kumazawa, E., Tohgo, A., Exp. Opin. Invest. Drugs (1998) 7, 625-632.
非特許文献6：Mitsui, I., et al., Jpn J. Cancer Res. (1995) 86, 776-786.
非特許文献7：Takiguchi, S., et al., Jpn J. Cancer Res. (1997) 88, 750-769.
非特許文献8：Joto, N. et al., Int J Cancer (1997) 72, 680-686.

WO 2015/098099

6

PCT/JP2014/006421

- 非特許文献9: Kumazawa, E. et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1998) 42, 210-220.
- 非特許文献10: De Jager, R., et al., *Ann N Y Acad Sci* (2000) 922, 260-273.
- 非特許文献11: Inoue, K. et al., *Polymer Drugs in the Clinical Stage*, Edited by Maeda et al. (2003) 145-153.
- 非特許文献12: Kumazawa, E. et al., *Cancer Sci* (2004) 95, 168-175.
- 非特許文献13: Soepenberg, O. et al., *Clinical Cancer Research*, (2005) 11, 703-711.
- 非特許文献14: Wente M. N. et al., *Investigational New Drugs* (2005) 23, 339-347.
- 非特許文献15: Faulk WP, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75(4), 1947-1951 (1978).
- 非特許文献16: Lipinski M, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78(8), 5147-5150 (1981).
- 非特許文献17: Linnenbach A J, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86(1), 27-31 (1989).
- 非特許文献18: Basu A, et al., *Int. J. Cancer*, 62(4), 472-479 (1995).
- 非特許文献19: Fornaro M, et al., *Int. J. Cancer*, 62(5), 610-618 (1995).
- 非特許文献20: Ripani E, et al., *Int. J. Cancer*, 76(5), 671-676 (1998).
- 非特許文献21: Calabrese G, et al., *Cell Genet.*, 92(1-2), 164-165 (2001).
- 非特許文献22: El Sewedy T, et al., *Int. J. Cancer*, 75(2), 324-330 (1998).
- 非特許文献23: Ohmachi T, et al., *Clin. Cancer Res.*, 12(10), 3057-3063 (2006).

WO 2015/098099

7

PCT/JP2014/006421

非特許文献24 : Muhlmann G, et al., J. Clin. Pathol., 62(2), 152-158 (2009).

非特許文献25 : Fong D, et al., Br. J. Cancer, 99(8), 1290-1295 (2008).

非特許文献26 : Fong D, et al., Mod. Pathol., 21(2), 186-191 (2008).

非特許文献27 : Ning S, et al., Neurol. Sci., 34(10), 1745-1750 (2013).

非特許文献28 : Wang J, et al., Mol. Cancer Ther., 7(2), 280-285 (2008).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- 【0012】 抗体による腫瘍の治療においては、抗体が抗原を認識して腫瘍細胞に結合しても抗腫瘍効果が十分でない場合が観察されることもあり、より効果の高い抗腫瘍抗体が必要とされる場合がある。また、抗腫瘍性の低分子化合物においては、抗腫瘍効果に優れていても副作用や毒性面等、安全性上の問題を有するものが多く、安全性をより高めてより優れた治療効果を獲得することが課題となっている。すなわち、本発明は、抗腫瘍効果と安全性面に優れる、優れた治療効果を有する抗腫瘍薬を獲得して提供することが課題である。

課題を解決するための手段

- 【0013】 本発明者らは、抗TROP2抗体が腫瘍細胞を標的にできる抗体であること、すなわち、腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、或は腫瘍細胞に内在化できる特性等を備えた抗体であることから、抗腫瘍性化合物であるエキサテカン、リンカー構造部分を介して同抗体に結合させた抗体-薬物コンジュゲートに変換することによって、同抗体を利用した細胞障害性が獲得できること、さらに抗腫瘍性化合物を腫瘍細胞により確実に移動させて当該化合物の抗腫瘍効果を腫瘍細胞で特異的に発揮させることができ、したがって抗腫瘍効果の確実な発揮とともに抗腫瘍性化合物の投与量を当該化合物の単体投与時よりも減少させることができること、さらにはこれらによって通常細胞への抗腫瘍性化合物の影響を緩和させることができること、すなわちこれらによってより高い安全性を達成できること、が可能と考

WO 2015/098099

8

PCT/JP2014/006421

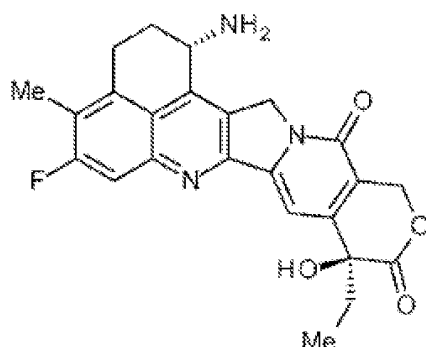
えた。

このために本発明者らは特定の構造のリンカーを創出し、このリンカーを介して抗TRO2抗体とエキサテカンとを結合させた抗体-薬物コンジュゲートを獲得することに成功し、同コンジュゲートが優れた抗腫瘍効果を発揮することを見出して本発明を完成させたのである。

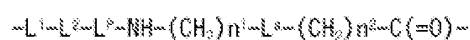
[0014] すなわち本願発明は、

〔1〕次式

[化2]



で示される抗腫瘍性化合物と抗TRO2抗体とを次式：



で示される構造のリンカーを介して、抗TRO2抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合によって結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲートに関するものである。

[0015] ここで、抗TRO2抗体はL¹の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は、1位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、-(CH₂)^{n²}-C(=O)-部分のカルボニル基に結合する。

式中、n¹は、0から6の整数を示し、

n²は、0から5の整数を示し、

L¹は、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH₂)^{n³}-C(=O)-を示し、

ここで、n³は、2から8の整数を示し、

L²は、-NH-(CH₂CH₂-O)^{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)-又は単結合を示し、

WO 2015/098099

9

PCT/JP2014/006421

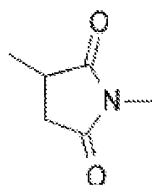
ここで、 n は、1 から 6 の整数を示し、

L^* は、2 から 7 個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^* は、 $-O-$ 又は単結合を示し、

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

[化3]



で示される構造であり、このものの3位で抗TROP2抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

[0016] さらに本願発明は以下の各々に関するものでもある。

〔2〕 L^* のペプチド残基が、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるペプチド残基である〔1〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔3〕 L^* が、以下の群から選ばれるペプチド残基である〔1〕又は〔2〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート：

$-GGF-$ 、

$-DGGF-$ 、

$-(D-)D-GGF-$ 、

$-EGGF-$ 、

$-GGFG-$ 、

$-SGGF-$ 、

$-KGGF-$ 、

$-DGGFG-$ 、

$-GGFGG-$ 、

$-DDGGFG-$ 、

$-KDGGFG-$ 、及び

WO 2015/098099

10

PCT/JP2014/006421

-GGFGGGF-;

ここで『(D-)D』はD-アスパラギン酸を示す。

〔4〕 L^2 が、4個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である〔1〕又は〔2〕に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔5〕 L^2 が、テトラペプチド残基の~GGFG~である〔1〕から〔4〕のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔0017〕〔6〕 n^3 が2から5の整数であって、 L^2 が単結合である〔1〕から〔5〕のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔7〕 n^3 が2から5の整数であって、 L^2 が $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ であり、 n^4 が2又は4である〔1〕から〔5〕のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔8〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^2-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、4から7原子の鎖長を有する部分構造である〔1〕から〔7〕のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔9〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^2-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、5又は6原子の鎖長を有する部分構造である〔1〕から〔7〕のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔10〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^2-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、
 $-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、又は
 $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ である〔1〕から〔9〕のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

〔11〕 $-NH-(CH_2)n^1-L^2-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、
 $-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、
 $-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、又は

WO 2015/098099

11

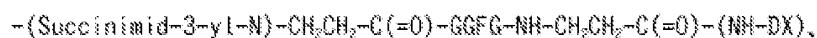
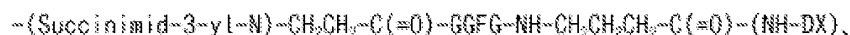
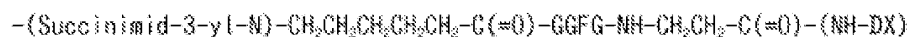
PCT/JP2014/006421



である [1] から [9] のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート

。

[0018] [12] $-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n^1-\text{L}^4-(\text{CH}_2)_n^2-\text{C}(=\text{O})-$ に薬物を結合させた薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる 1 種の薬物-リンカー構造である [1] から [9] のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート：



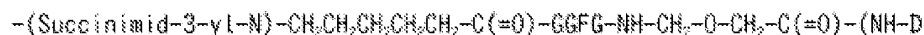
、



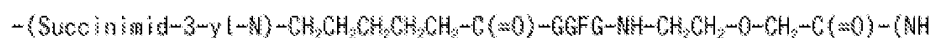
),



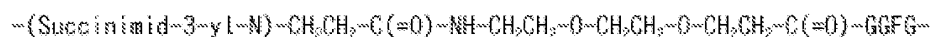
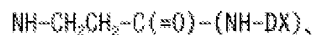
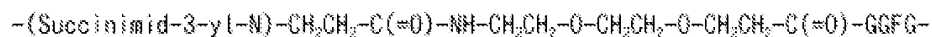
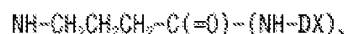
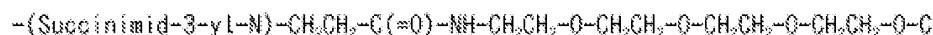
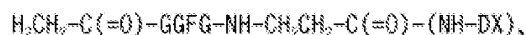
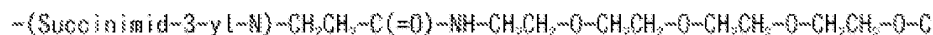
NH-DX),



X),



-DX),



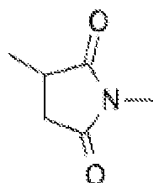
[0019] ここで、 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

WO 2015/098099

12

PCT/JP2014/006421

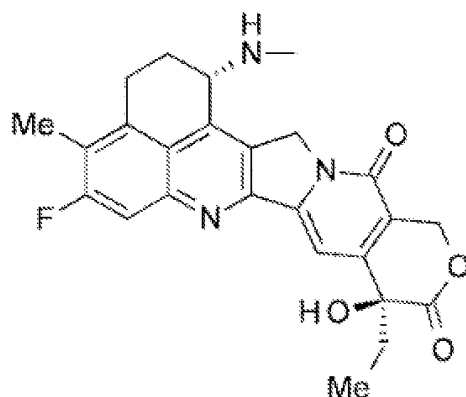
[化4]



で示される構造であり、このものの3位で抗TROP2抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

~(NH-DX)は次式：

[化5]



で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

~GGFG~は、~Gly-Gly-Phe-Gly~のテトラペプチド残基を示す。

[0020] [13] -L¹-L²-L³-NH-(CH₂)ⁿ¹-L⁴-(CH₂)ⁿ²-C(=O)-に薬物を結合させた薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物-リンカー構造である[1]から[9]のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート：

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

WO 2015/098099

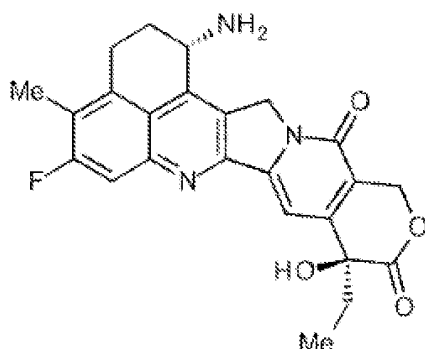
13

PCT/JP2014/006421

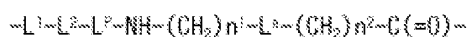
[0021] ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-、-(NH-DX)、及び-GGFG-は、上記の通りである。

[0022] [14] 次式

[化6]



で示される抗腫瘍性化合物と抗TROP2抗体とを次式：



で示される構造のリンカーを介して、抗TROP2抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲート。

ここで、抗TROP2抗体はL¹の末端において結合し、抗腫瘍性化合物は-(CH₂)_{n²}-C(=O)-部分のカルボニル基に結合する。

式中、n¹は、0から6の整数を示し、

n²は、0から5の整数を示し、

L¹は、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH₂)_{n³}-C(=O)-を示し、

ここで、n³は、2から8の整数を示し、

L²は、-NH-(CH₂CH₂-O)_{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)-又は単結合を示し、

ここで、n⁴は、1から6の整数を示し、

L³は、-GGFG-のテトラペプチド残基を示し、

L⁴は、-O-又は単結合を示し、

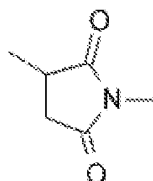
-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

WO 2015/098099

14

PCT/JP2014/006421

[化7]



で示される構造であり、このものの3位で抗TRO2抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

[0023] [15] n^1 が3であり、 n^2 が0であり、 n^3 が2であり、 L^2 が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であって、 n^4 が2であり、 L^3 が単結合であるか、

n^1 が1であり、 n^2 が1であり、 n^3 が5であり、 L^2 が単結合であり、 L^3 が $-\text{O}-$ であるか、又は

n^1 が2であり、 n^2 が1であり、 n^3 が5であり、 L^2 が単結合であり、 L^3 が $-\text{O}-$ である[14]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[16] n^3 が2又は5であって、 L^2 が単結合である[14]又は[15]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[17] n^3 が2又は5であって、 L^2 が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})n^4-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であり、 n^4 が2又は4である[14]又は[15]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[18] $-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^2-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$ が、

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、

$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、又は

$-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

である[14]から[17]のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[0024] [19] $-L^1-L^2-L^3-\text{NH}-(\text{CH}_2)n^1-L^4-(\text{CH}_2)n^2-\text{C}(=\text{O})-$ に薬物を結合させた薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物-リンカー構造である[14]から[18]のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート：

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、

WO 2015/098099

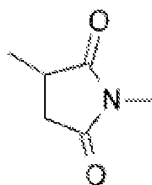
15

PCT/JP2014/006421

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$ 、
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$;

[0025] ここで、 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

[化8]



で示される構造であり、このものの3位で抗TRO P 2抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

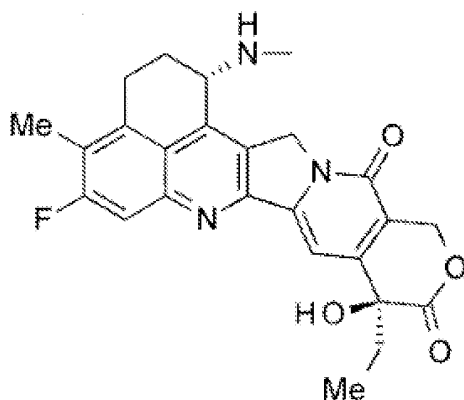
$-(\text{NH-DX})$ は次式：

WO 2015/098099

16

PCT/JP2014/006421

[化9]



で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基を示す。

- [0026] [20] $-L^1-L^2-L^3-NH-(CH_2)_n-L^4-(CH_2)_n-C(=O)-$ に薬物を結合させた薬物—リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物—リンカー構造である[14]から[18]のいずれか一項に記載の抗体—薬物コンジュゲート：
- (Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、
- (Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 、
- (Succinimid-3-yl-N)- $CH_2CH_2-C(=O)-NH-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2-C(=O)-GGFG-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-(NH-DX)$ 。

ここで、-(Succinimid-3-yl-N)-、-(NH-DX)及び-GGFG-は、上記の通りである。

- [0027] [21] 選択された1種の薬物—リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1から10個の範囲である[1]から[20]のいずれか一項に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

[22] 選択された1種の薬物—リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2から8個の範囲である[1]から[20]のいずれか一項に記載の抗体—薬物コンジュゲート。

WO 2015/098099

17

PCT/JP2014/006421

〔23〕選択された1種の薬物－リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である〔1〕から〔20〕のいずれかーに記載の抗体－薬物コンジュゲート。

〔0028〕〔24〕〔1〕から〔23〕のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

〔25〕〔1〕から〔23〕のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

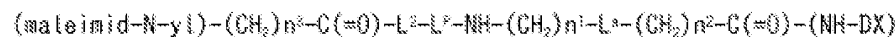
〔26〕肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、脾癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、頭頸部癌、又は食道癌に適用するための〔25〕に記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

〔27〕〔1〕から〔23〕のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

〔28〕肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、脾癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、頭頸部癌、又は食道癌に適用するための〔27〕に記載の医薬組成物。

〔29〕〔1〕から〔23〕のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

〔0029〕〔30〕次式で示される化合物：



を抗TRO2抗体又はその反応性誘導体と反応させ、該抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させる方法によって薬物－リンカー部分を該抗体に結合させることを特徴とする抗体－薬物コンジュゲートの製造方法。

〔0030〕 式中、 n^3 は、整数の2から8を示し、

L^2 は、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 又は単結合を示し、

ここで、 n^4 は、1から6の整数を示し、

WO 2015/098099

18

PCT/JP2014/006421

L¹は、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれる2から7個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

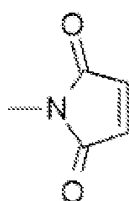
n¹は、0から6の整数を示し、

n²は、0から5の整数を示し、

L²は、-O-又は単結合を示し、

(maleimid-N-yl)-は、次式

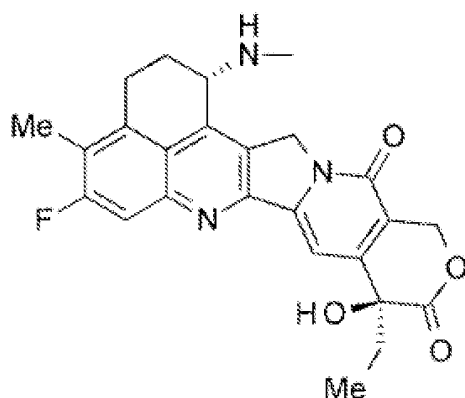
[化10]



で示される、窒素原子が結合部位となっている基である。

-(NH-DX)は、次式

[化11]



で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

[0031] [31] 薬物-リンカー部分を抗TRO2抗体に結合させる方法が、該抗体を還元処理して反応性誘導体に変換する方法である[30]に記載の製造方法。

[0032] [32] 選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数

WO 2015/098099

19

PCT/JP2014/006421

が1から10個の範囲である〔30〕又は〔31〕に記載の製造方法。

〔33〕選択された1種の薬物—リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2から8個の範囲である〔30〕又は〔31〕に記載の製造方法。

〔34〕選択された1種の薬物—リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である〔30〕又は〔31〕に記載の製造方法。

〔35〕〔30〕から〔34〕のいずれかの製造方法によって得られる抗体—薬物コンジュゲート。

〔0033〕〔36〕抗TROP2抗体を還元条件で処理した後に以下の群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、該抗体のヒンジ部のスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体—薬物コンジュゲート：

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)
)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

WO 2015/098099

20

PCT/JP2014/006421

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)
 、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH
₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GG
 FG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂
 -C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH
₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GG
 FG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂
 -C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH
₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GG
 FG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂
 -C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH
₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、
 (maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GG
 FG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、及び

WO 2015/098099

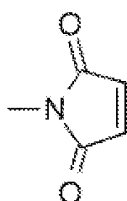
21

PCT/JP2014/006421

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-
-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

[0034] ここで、(maleimid-N-yl)-は、次式

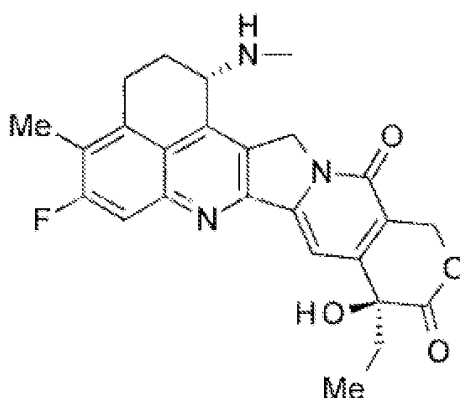
[化12]



で示される、窒素原子が結合部位となっている基である。

-(NH-DX)は、次式

[化13]



で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基を示す。

[0035] [37] 抗TROP2抗体を還元条件で処理した後に以下の群から選ばれる化合物を反応させることを特徴とする、該抗体のヒンジ部のスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて得られる抗体-薬物コンジュゲート：

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH
CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

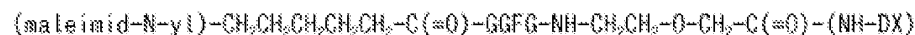
(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

WO 2015/098099

22

PCT/JP2014/006421

及び



。

ここで、(maleimid-N-yl)-、-(NH-DX)、及び-GGFG-は、上記の通りである

。

[0036] [38] 選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1から10個の範囲である[36]又は[37]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[39] 選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が2から8個の範囲である[36]又は[37]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

[40] 選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である[36]又は[37]に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

発明の効果

[0037] 特定の構造のリンカーを介して抗腫瘍性化合物エキサテカンを結合させた抗TRO2抗体-薬物コンジュゲートによって、優れた抗腫瘍効果及び安全性を達成することができる。

図面の簡単な説明

[0038] [図1] c T I N A 1 抗体重鎖のヌクレオチド配列（配列番号7）及びアミノ酸配列（配列番号8）を示す。

[図2] c T I N A 1 抗体軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号9）及びアミノ酸配列（配列番号10）を示す。

[図3] h T I N A 1 - H 1 重鎖のヌクレオチド配列（配列番号11）及びアミノ酸配列（配列番号12）を示す。

[図4] h T I N A 1 - H 2 重鎖のヌクレオチド配列（配列番号13）及びアミノ酸配列（配列番号14）を示す。

[図5] h T I N A 1 - H 3 重鎖のヌクレオチド配列（配列番号15）及びアミ

WO 2015/098099

23

PCT/JP2014/006421

ノ酸配列（配列番号16）を示す。

[図6] h T I N A 1 - L 1 軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号17）及びアミノ酸配列（配列番号18）を示す。

[図7] h T I N A 1 - L 2 軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号19）及びアミノ酸配列（配列番号20）を示す。

[図8] h T I N A 1 - L 3 軽鎖のヌクレオチド配列（配列番号21）及びアミノ酸配列（配列番号22）を示す。

[図9] T I N A 1 抗体のCDRH1のアミノ酸配列（配列番号23）、CDRH2のアミノ酸配列（配列番号24）、CDRH3のアミノ酸配列（配列番号25）、CDRL1のアミノ酸配列（配列番号26）、CDRL2のアミノ酸配列（配列番号27）、及びCDRL3のアミノ酸配列（配列番号28）を示す。

[図10] 抗CD9抗体、抗CD46抗体、抗CD55抗体、抗CD59抗体、抗CD71抗体、抗CD73抗体、抗CD147抗体、抗CD276抗体、抗E p C A M抗体、抗E G F R抗体、及び抗T R O P 2抗体（T I N A 1抗体）の細胞内在化能を示す。

[図11] 抗CD59抗体、抗CD71抗体、抗E G F R抗体、抗E p C A M抗体、及び抗T R O P 2抗体（T I N A 1抗体）の細胞内在化能を示す。

[図12] 各種抗T R O P 2抗体の細胞内在化能を示す。

[図13] 抗体-薬物コンジュゲート（1）、（6）、又は（12）が、ヒト大腸癌細胞株C O L O 2 0 5皮下移植B A L B / c - n u / n uマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図14] 抗体-薬物コンジュゲート（1）、（6）、又は（12）が、ヒト膵臓癌細胞株B x P C - 3皮下移植B A L B / c - n u / n uマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図15] 抗体-薬物コンジュゲート（1）、（6）、又は（12）が、ヒト膵臓癌細胞株C a p a n - 1皮下移植B A L B / c - n u / n uマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

WO 2015/098099

24

PCT/JP2014/006421

[図16]抗体－薬物コンジュゲート（２）、（５）、（７）、又は（１０）が、ヒト大腸癌細胞株COLO205皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図17]抗体－薬物コンジュゲート（２）、（５）、（７）、又は（１０）が、ヒト膵臓癌細胞株BxPC－3皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図18]抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、又は（９）が、ヒト大腸癌細胞株COLO205皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図19]抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、又は（９）が、ヒト膵臓癌細胞株BxPC－3皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図20]抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、又は（９）が、ヒト卵巣癌細胞株NIH：OVCAR－3皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図21]抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、又は（９）が、ヒト胃癌細胞株NCI－N87皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図22]抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、又は（９）が、ヒト肺癌細胞株NCI－H292皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図23]抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、又は（９）が、ヒト咽頭癌細胞株FaDu皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図24]抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、又は（９）が、ヒト膵臓腺癌細胞株CFPAC－1皮下移植BALB／c－nu／nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図25]抗体－薬物コンジュゲート（８）又は（１３）が、ヒト膵臓腺癌細胞

WO 2015/098099

25

PCT/JP2014/006421

株CFPAC-1皮下移植BALB/c-nu/nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図26]抗体-薬物コンジュゲート(8)又は(13)が、ヒト膵臓腺癌細胞株HPAC皮下移植BALB/c-nu/nuマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

[図27]抗体-薬物コンジュゲート(8)又は(13)が、ヒト食道癌組織皮下移植NOD-scidマウスに対して示す抗腫瘍効果を示す。

発明を実施するための形態

[0039] 以下、本発明を実施するための好適な形態について図面を参照しながら説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0040] 本発明の抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートは、抗TROP2抗体に、リンカー構造部分を介して抗腫瘍性化合物を結合させた抗腫瘍性薬物であり、以下に詳細に説明する。

[0041] [抗体]

本発明の抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートに使用される抗TROP2抗体は、いずれの種に由来してもよいが、好ましくは、ヒト、ラット、マウス、及びウサギを例示できる。ヒト以外の種に由来する場合は、周知の技術を用いて、キメラ化又はヒト化することが好ましい。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。

抗TROP2抗体は腫瘍細胞を標的にできる抗体であり、すなわち腫瘍細胞を認識できる特性、腫瘍細胞に結合できる特性、そして腫瘍細胞内に取り込まれて内在化する特性等を備えており、抗腫瘍活性を有する化合物を、リンカーを介して結合させて抗体-薬物コンジュゲートとすることができる。

抗体の腫瘍細胞への結合性は、フローサイトメトリーを用いて確認することができる。腫瘍細胞内への抗体の取り込みの確認方法としては、(1)治

WO 2015/098099

26

PCT/JP2014/006421

療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた抗体を蛍光顕微鏡で可視化するアッセイ（Cell Death and Differentiation (2008) 15, 751-761）、（２）治療抗体に結合する二次抗体（蛍光標識）を用いて細胞内に取り込まれた蛍光量を測定するアッセイ（Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, December 2004）、又は（３）治療抗体に結合するイムノトキシンを用いて、細胞内に取り込まれると毒素が放出されて細胞増殖が抑制されるというMab-ZAPアッセイ（Bio Techniques 28:162-165, January 2000）等を挙げることができる。なお、イムノトキシンとしては、ジフテリヤ毒素の触媒領域とプロテインGとのリコンビナント複合蛋白質も使用可能である。

抗体－薬物コンジュゲートは抗腫瘍効果を発揮する化合物を結合させてあるので、抗体自体が抗腫瘍効果を有することは、好ましいが、必須ではない。抗腫瘍性化合物の細胞障害性を腫瘍細胞において特異的・選択的に発揮させる目的からは、抗体が内在化して腫瘍細胞内に移行する性質のあることが重要であり、好ましい。

【0042】 抗TROP2抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、抗原となるポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原の由来はヒトに限定されず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来する抗原を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種抗原に結合する抗体とヒト抗原との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature(1975)256, p.495-497; Kennet, R.ed., Monoclonal Antibodies, p.365-367, Plenum Press, N.Y.(1980)）に従って、抗原に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

なお、抗原は抗原蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。具体的には、抗原遺伝子を

WO 2015/098099

27

PCT/JP2014/006421

発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現した抗原を精製すればよい。上記の遺伝子操作による抗原発現細胞、或は抗原を発現している細胞株、を動物に免疫する方法を用いることによって抗体を取得できる。

抗TROP2抗体は、公知の手段によって取得することができる。

[0043] 本発明で利用できる抗TROP2抗体は、特に制限はないが、例えば、本願の配列表で示されたアミノ酸配列で特定されるものを好適に使用することができる。本発明において使用されるTROP2抗体としては、以下の特性を有するものが望ましい。

(1) 以下の特性を有することを特徴とする抗体；

(a) TROP2に特異的に結合する

(b) TROP2と結合することによってTROP2発現細胞に内在化する活性を有する

(2) TROP2がヒトTROP2である上記(1)に記載の抗体。

(3) 重鎖における相補性決定領域として配列番号23に記載のアミノ酸配列からなるCDRH1、配列番号24に記載のアミノ酸配列からなるCDRH2、及び配列番号25に記載のアミノ酸配列からなるCDRH3、並びに軽鎖における相補性決定領域として配列番号26に記載のアミノ酸配列からなるCDRL1、配列番号27に記載のアミノ酸配列からなるCDRL2、及び配列番号28に記載のアミノ酸配列からなるCDRL3を有する上記(1)又は(2)に記載の抗体。

(4) 定常領域がヒト由来定常領域である上記(1)乃至(3)のいずれかに記載の抗体。

(5) ヒト化されている上記(1)乃至(4)のいずれかに記載の抗体。

(6) (a) 配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列、(b) 配列番号14においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列、(c) 配列番号16においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列、(d) (a)乃至(c)の配列に対して少なくとも

も95%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び(e)(a)乃至(c)の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域、並びに(f)配列番号18においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列、(g)配列番号20においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列、(h)配列番号22においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列、(i)(f)乃至(h)の配列に対して少なくとも95%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び(j)(f)乃至(h)の配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなる群から選択されたアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、を有する上記(5)に記載の抗体。

(7)配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号22においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号22においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号16においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミ

WO 2015/098099

29

PCT/JP2014/006421

ノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号 16 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号 20 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、並びに配列番号 16 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号 22 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域からなる群から選択される重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を有する上記（6）に記載の抗体。

（8）配列番号 12 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号 20 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域、並びに配列番号 16 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖の可変領域及び配列番号 22 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖の可変領域からなる群から選択される重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を有する上記（7）に記載の抗体。

（9）配列番号 12 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号 12 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 20 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号 12 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖

(10) 配列番号12に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号18
に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号12に記載のアミノ酸配列か
らなる重鎖及び配列番号20に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号
12に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号22に記載のアミノ酸
配列からなる軽鎖、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配
列番号18に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号14に記載のアミ
ノ酸配列からなる重鎖及び配列番号20に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖
、配列番号14に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号22に記載
のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号16に記載のアミノ酸配列からなる
重鎖及び配列番号18に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号16に
記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号20に記載のアミノ酸配列か

WO 2015/098099

31

PCT/JP2014/006421

らなる軽鎖、並びに配列番号 16 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 22 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖からなる上記 (6) 又は (7) に記載の抗体。

(11) 配列番号 12 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 20 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖、並びに配列番号 16 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 22 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる群から選択される重鎖及び軽鎖からなる上記 (8) に記載の抗体。

(12) 重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失している上記 (1) 乃至 (11) のいずれかに記載の抗体。

(13) 上記 (1) 乃至 (12) のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養する工程及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体を採取する工程を含む当該抗体の製造方法によって得られる抗体。

[0044] 以下に、本発明において使用される抗 TROP2 抗体について説明する。

本明細書において、「癌」と「腫瘍」は同じ意味に用いている。

本明細書において、「遺伝子」という語には、DNA のみならずその mRNA、cDNA、及びその cRNA も含まれる。

本明細書において、「ポリヌクレオチド」という語は核酸と同じ意味で用いており、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、及びプライマーも含まれる。

本明細においては、「ポリペプチド」と「蛋白質」は区別せずに用いてい

WO 2015/098099

32

PCT/JP2014/006421

る。

本明細書において、「細胞」には、動物個体内の細胞、培養細胞も含んでいる。

本明細書において、「TROP2」は、TROP2蛋白質と同じ意味で用いている。

本明細書における「CDR」とは、相補性決定領域 (CDR: Complementarity determining region) を意味する。抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所のCDRがあることが知られている。CDRは、超可変領域 (hypervariable domain) とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、それぞれ3ヶ所に分離している。本明細書中においては、抗体のCDRについて、重鎖のCDRを重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖のCDRを軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

本発明において、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、市販のハイブリダイゼーション溶液ExpressHyb Hybridization Solution (クロンテック社製) 中、68℃でハイブリダイズすること、又はDNAを固定したフィルターを用いて0.7-1.0MのNaCl存在下、68℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1-2倍濃度のSSC溶液 (1倍濃度SSCとは150mM NaCl、15mMクエン酸ナトリウムからなる) を用い、68℃で洗浄することによって同定することができる条件又はそれと同等の条件でハイブリダイズすることをいう。

[0045] 1. TROP2

TROP2は、ヒト栄養膜細胞 (trophoblasts) に発現する

WO 2015/098099

33

PCT/JP2014/006421

TACSTDファミリーのひとつであり、ヒト栄養膜細胞と癌細胞に共通する免疫抵抗性に関与する、1回膜貫通型の1型細胞膜蛋白質である。

本発明で用いるTROP2蛋白質は、ヒト、非ヒト哺乳動物（ラット、マウス等）のTROP2発現細胞から直接精製して使用するか、或は当該細胞の細胞膜画分を調製して使用することができ、また、TROP2を*in vitro*にて合成する、或は遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。遺伝子操作では、具体的には、TROP2 cDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含む溶液中で合成する、或は他の原核生物、又は真核生物の宿主細胞を形質転換させることによってTROP2を発現させることによって、該蛋白質を得ることが出来る。また、前記の遺伝子操作によるTROP2発現細胞、或はTROP2を発現している細胞株をTROP2蛋白質として使用することも可能である。

TROP2のDNA配列及びアミノ酸配列は公的データベース上に公開されており、例えばNM_002353, NP_002344 (NCBI)等のアクセッション番号により参照可能である。

また、上記TROP2のアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が置換、欠失及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、当該蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質もTROP2に含まれる。

ヒトTROP2蛋白質は、N末端26アミノ酸残基から成るシグナル配列、248アミノ酸残基から成る細胞外ドメイン、23アミノ酸残基から成る細胞膜貫通ドメイン、26アミノ酸残基から成る細胞内ドメインで構成されている。

[0046] 2. 抗TROP2抗体の製造

本発明のTROP2に対する抗体は、この分野で通常実施される方法を用いて、TROP2又はTROP2のアミノ酸配列から選択される任意のポリペプチドを動物に免疫し、生体内に産生される抗体を採取、精製することによって得ることができる。抗原となるTROP2の生物種はヒトに限定され

WO 2015/098099

34

PCT/JP2014/006421

ず、マウス、ラット等のヒト以外の動物に由来するTROP2を動物に免疫することもできる。この場合には、取得された異種TROP2に結合する抗体とヒトTROP2との交差性を試験することによって、ヒトの疾患に適用可能な抗体を選別できる。

また、公知の方法（例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; Kennet, R., ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)）に従って、TROP2に対する抗体を産生する抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることによってハイブリドーマを樹立し、モノクローナル抗体を得ることもできる。

なお、抗原となるTROP2はTROP2遺伝子を遺伝子操作によって宿主細胞に発現させることによって得ることができる。

具体的には、TROP2遺伝子を発現可能なベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して該遺伝子を発現させ、発現したTROP2を精製すればよい。

また、上記の遺伝子操作によるTROP2発現細胞、或はTROP2を発現している細胞株をTROP2蛋白質として使用することも可能である。以下、具体的にTROP2に対する抗体の取得方法を説明する。

[0047] (1) 抗原の調製

抗TROP2抗体を作製するための抗原としては、TROP2又はその少なくとも6個の連続した部分アミノ酸配列からなるポリペプチド、或はこれらに任意のアミノ酸配列や担体が付加された誘導体を挙げることができる。

TROP2は、ヒトの腫瘍組織或は腫瘍細胞から直接精製して使用することができ、また、TROP2をin vitroにて合成する、或は遺伝子操作によって宿主細胞に産生させることによって得ることができる。

遺伝子操作では、具体的には、TROP2のcDNAを発現可能なベクターに組み込んだ後、転写と翻訳に必要な酵素、基質及びエネルギー物質を含

WO 2015/098099

35

PCT/JP2014/006421

む溶液中で合成する、或は他の原核生物又は真核生物の宿主細胞を形質転換してTROP2を発現させることによって、抗原を得ることができる。

また、膜蛋白質であるTROP2の細胞外領域と抗体の定常領域とを連結した融合蛋白質を適切な宿主・ベクター系において発現させることによって、分泌蛋白質として抗原を得ることも可能である。

TROP2のcDNAは例えば、TROP2のcDNAを発現しているcDNAライブラリーを鋳型として、TROP2 cDNAを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という；Saito, R., K., et al., Science (1988) 239, p. 487-489 参照）を行う、いわゆるPCR法によって取得することができる。

ポリペプチドのin vitro合成としては、例えばロシュ・ダイアグノスティックス社製のラビッドトランスレーションシステム（RTS）を挙げることができるが、これに限定されることはない。

原核細胞の宿主としては、例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）や枯草菌（*Bacillus subtilis*）等を挙げることができる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質転換させるには、宿主と適合し得る種由来のレプリコンすなわち複製起点と、調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞を形質転換させる。また、ベクターとしては、形質転換細胞に表現形質（表現型）の選択性を付与することができる配列を有するものが好ましい。

真核細胞の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182、ATCC CRL-1650；ATCC: American Type Culture Collection）、マウス線維芽細胞NIH3T3（ATCC No. CRL-1658）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞、ATCC CCL-61）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Urlaub, G

WO 2015/098099

36

PCT/JP2014/006421

、 and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, p. 4126-4220) 等がよく用いられているが、これらに限定されない。

上記の様にして得られる形質転換体は、この分野で通常実施される方法に従って培養することができ、該培養によって細胞内又は細胞外に目的のポリペプチドが産生される。

該培養に用いられる培地は、当業者であれば採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択することができ、大腸菌であれば、例えば、LB培地に必要に応じて、アンピシリン等の抗生物質やIPMGを添加して用いることができる。

上記培養によって、形質転換体の細胞内又は細胞外に産生される組換え蛋白質は、該蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法によって分離・精製することができる。

該方法としては、具体的には例えば、通常の蛋白質沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。

また、発現させる組換え蛋白質に6残基からなるヒスチジンタグを繋げることによって、ニッケルアフィニティークラムで効率的に精製することができる。或は、発現させる組換え蛋白質にIgGのFc領域を繋げることによって、プロテインAカラムで効率的に精製することができる。

上記方法を組合せることによって容易に高収率、高純度で目的とするポリペプチドを大量に製造できる。

上記に述べた形質転換体自体を抗原として使用することも可能である。また、TROP2を発現する細胞株を抗原として使用することも可能である。この様な細胞株としては、ヒト化肺癌株NCI-H322、PC14、NCI-H2122、又はLCAM1、ヒト前立腺癌株PC3、ヒト脾臓癌株

WO 2015/098099

37

PCT/JP2014/006421

B x P C - 3、C a p a n - 1、又は P K - 1、ヒト卵巣癌株 S K O V 3 並びにヒト大腸癌株 C O L O 2 0 5 を挙げるができるが、T R O P 2 を発現する限り、これらの細胞株に限定されることはない。

[0048] (2) 抗 T R O P 2 モノクローナル抗体の製造

T R O P 2 と特異的に結合する抗体の例として、T R O P 2 と特異的に結合するモノクローナル抗体を挙げるができるが、その取得方法は、以下に記載する通りである。

モノクローナル抗体の製造にあたっては、一般に下記の様な作業工程が必要である。

すなわち、

- (a) 抗原として使用する生体高分子の精製、又は抗原発現細胞の調製、
 - (b) 抗原を動物に注射することによって免疫した後に血液を採取し、その抗体価を検定して脾臓摘出の時期を決定してから、抗体産生細胞を調製する工程、
 - (c) 骨髓腫細胞（以下「ミエローマ」という）の調製、
 - (d) 抗体産生細胞とミエローマとの細胞融合、
 - (e) 目的とする抗体を産生するハイブリドーマ群の選別、
 - (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）、
 - (g) 場合によっては、モノクローナル抗体を大量に製造するためのハイブリドーマの培養、又はハイブリドーマを移植した動物の飼育、
 - (h) この様にして製造されたモノクローナル抗体の生理活性、及びその結合特異性の検討、或は標識試薬としての特性の検定
- 等である。

以下、モノクローナル抗体の作製法を上記工程に沿って詳述するが、該抗体の作製法はこれに制限されず、例えば脾細胞以外の抗体産生細胞及びミエローマを使用することもできる。

[0049] (a) 抗原の精製

抗原としては、前記した様な方法で調製した T R O P 2 又はその一部を使

WO 2015/098099

38

PCT/JP2014/006421

用することができる。

また、TROP2発現組換え体細胞によって調製した膜画分、又はTROP2発現組換え体細胞自身、さらに、当業者に周知の方法を用いて化学合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを抗原として使用することもできる。

さらに、TROP2発現細胞株を抗原として使用することもできる。

[0050] (b) 抗体産生細胞の調製

工程(a)で得られた抗原と、フロインドの完全又は不完全アジュバント、或はカリミョウバンの様な助剤とを混合し、免疫原として実験動物に免疫する。この他に、抗原発現細胞を免疫原として実験動物に免疫する方法もある。実験動物は公知のハイブリドーマ作製法で用いられる動物を支障なく使用することができる。具体的には、例えばマウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ等を使用することができる。ただし、抽出した抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞の入手容易性等の観点から、マウス又はラットを被免疫動物とするのが好ましい。

また、実際に使用するマウス及びラットの系統には特に制限はなく、マウスの場合には、例えば各系統A、AKR、BALB/c、BDP、BA、CE、C3H、57BL、C57BL、C57L、DBA、FL、HTH、HT1、LP、NZB、NZW、RF、R111、SJL、SWR、WB、129等が、またラットの場合には、例えば、Wistar、Low、Lewis、Sprague、Dawley、ACI、BN、Fischer等を用いることができる。

これらのマウス及びラットは例えば日本クレア株式会社、日本チャールス・リバー株式会社等の実験動物飼育販売業者より入手することができる。

被免疫動物としては、後述のミエローマ細胞との融合適合性を勘案すれば、マウスではBALB/c系統が、ラットではWistar及びLow系統が特に好ましい。

また、抗原のヒトとマウスでの相同性を考慮し、自己抗体を除去する生体機構を低下させたマウス、すなわち自己免疫疾患マウスを用いることも好ま

WO 2015/098099

39

PCT/JP2014/006421

しい。

なお、これらのマウス又はラットの免疫時の週齢は、好ましくは5～12週齢、さらに好ましくは6～8週齢である。

TROP2又はこの組換え体によって動物を免疫するには、例えば、Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology Vol. I, II, III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964)等に詳しく記載されている公知の方法を用いることができる。

これらの免疫法のうち、本発明において好適な方法を具体的に示せば、例えば以下の通りである。

すなわち、まず、抗原である膜蛋白質画分、又は抗原を発現させた細胞を動物の皮内又は腹腔内に投与する。ただし、免疫効率を高めるためには両者の併用が好ましく、前半は皮内投与を行い、後半又は最終回のみ腹腔内投与を行うと、特に免疫効率を高めることができる。

抗原の投与スケジュールは、被免疫動物の種類、個体差等によって異なるが、一般には、抗原投与回数3～6回、投与間隔2～6週間が好ましく、投与回数3～4回、投与間隔2～4週間がさらに好ましい。

また、抗原の投与量は、動物の種類、個体差等によって異なるが、一般には0.05～5mg、好ましくは0.1～0.5mg程度とする。

追加免疫は、以上の通りの抗原投与の1～6週間後、好ましくは1～4週間後、さらに好ましくは1～3週間後に行う。免疫原が細胞の場合には、 1×10^6 乃至 1×10^7 個の細胞を使用する。

なお、追加免疫を行う際の抗原投与量は、動物の種類、大きさ等によって異なるが、一般に、例えばマウスの場合には0.05～5mg、好ましくは

WO 2015/098099

40

PCT/JP2014/006421

0.1～0.5 mg、さらに好ましくは0.1～0.2 mg程度とする。免疫原が細胞の場合には、 1×10^6 乃至 1×10^7 個の細胞を使用する。

上記追加免疫から1～10日後、好ましくは2～5日後、さらに好ましくは2～3日後に被免疫動物から抗体産生細胞を含む脾臓細胞又はリンパ球を無菌的に取り出す。その際に抗体価を測定し、抗体価が十分高くなった動物を抗体産生細胞の供給源として用いれば、以後の操作の効率を高めることができる。

ここで用いられる抗体価の測定法としては、例えば、RIA法又はELISA法を挙げることができるがこれらの方法に制限されない。本発明における抗体価の測定は、例えばELISA法によれば、以下に記載する様な手順によって行うことができる。

まず、精製又は部分精製した抗原をELISA用96穴プレート等の固相表面に吸着させ、さらに抗原が吸着していない固相表面を抗原と無関係な蛋白質、例えばウシ血清アルブミン(BSA)によって覆い、該表面を洗浄後、第一抗体として段階希釈した試料(例えばマウス血清)に接触させ、上記抗原に試料中の抗体を結合させる。

さらに第二抗体として酵素標識されたマウス抗体に対する抗体を加えてマウス抗体に結合させ、洗浄後該酵素の基質を加え、基質分解に基づく発色による吸光度の変化等を測定することによって、抗体価を算出する。

被免疫動物の脾臓細胞又はリンパ球からの抗体産生細胞の分離は、公知の方法(例えば、Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495; Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, p. 511; Milstein et al., Nature (1977), 266, p. 550; Walsh, Nature, (1977) 266, p. 495)に従って行うことができる。例えば、脾臓細胞の場合には、脾臓を細切して細胞をステンレスメッシュで濾過した後、イーグル最小必須培地(MEM)に浮遊させて抗体産生細胞を分離する一般的な方法を採用することができる。

WO 2015/098099

41

PCT/JP2014/006421

[0051] (c) 骨髄腫細胞（以下、「ミエローマ」という）の調製

細胞融合に用いるミエローマ細胞には特段の制限はなく、公知の細胞株から適宜選択して用いることができる。ただし、融合細胞からハイブリドーマを選択する際の利便性を考慮して、その選択手続が確立しているHGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 欠損株を用いるのが好ましい。

すなわち、マウス由来のX63-Ag8 (X63)、NS1-ANS/1 (NS1)、P3X63-Ag8, U1 (P3U1)、X63-Ag8, 653 (X63, 653)、SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MPC11-45, 6TG1, 7 (45, 6TG)、FO, S149/5XXO, BU, 1等、ラット由来の210, RSY3, Ag, 1, 2, 3 (Y3)等、ヒト由来のU266AR (SKO-007)、GM1500-GTG-A12 (GM1500)、UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2)、8226AR/NIP4-1 (NP41)等である。これらのHGPRT欠損株は例えば、ATCC等から入手することができる。

これらの細胞株は、適当な培地、例えば8-アザグアニン培地 (RPMI-1640培地にグルタミン、2-メルカプトエタノール、ゲンタマイシン及びウシ胎児血清（以下「FBS」という）を加えた培地に8-アザグアニンを加えた培地）、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; IMDM)、又はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM) で継代培養するが、細胞融合の3乃至4日前に正常培地（例えば、10% FCSを含むASF104培地（味の素株式会社製））で継代培養し、融合当日に 2×10^7 以上の細胞数を確保しておく。

[0052] (d) 細胞融合

抗体産生細胞とミエローマ細胞との融合は、公知の方法 (Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunol

WO 2015/098099

42

PCT/JP2014/006421

ogy Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987); Kabat, E. A. and Mayer, M. M., Experimental Immunochimistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964) 等) に従い、細胞の生存率を極度に低下させない程度の条件下で適宜実施することができる。

その様な方法として、例えば、ポリエチレングリコール等の高濃度ポリマー溶液中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを混合する化学的方法、電気的刺激を利用する物理的方法等を用いることができる。このうち、上記化学的方法の具体例を示せば以下の通りである。

すなわち、高濃度ポリマー溶液としてポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量1500～6000、好ましくは2000～4000のポリエチレングリコール溶液中で、30～40℃、好ましくは35～38℃の温度で抗体産生細胞とミエローマ細胞とを1～10分間、好ましくは5～8分間混合する。

【0053】 (e) ハイブリドーマ群の選択

上記細胞融合によって得られるハイブリドーマの選択方法は特に制限はないが、通常HAT（ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン）選択法（Kohler et al., Nature (1975) 256, p. 495; Milstein et al., Nature (1977) 266, p. 550）が用いられる。

この方法は、アミノプテリンで生存し得ないHGPRT欠損株のミエローマ細胞を用いてハイブリドーマを得る場合に有効である。すなわち、未融合細胞及びハイブリドーマをHAT培地で培養することによって、アミノプテリンに対する耐性を持ち合わせたハイブリドーマのみを選択的に残存させ、かつ増殖させることができる。

【0054】 (f) 単一細胞クローンへの分割（クローニング）

WO 2015/098099

43

PCT/JP2014/006421

ハイブリドーマのクローニング法としては、例えばメチルセルロース法、軟アガロース法、限界希釈法等の公知の方法を用いることができる（例えば Barbara, B. M. and Stanley, M. S. : Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980) 参照）。これらの方法のうち、特にメチルセルロース法等の三次元培養法が好適である。例えば、細胞融合によって形成されたハイブリドーマ群を ClonaCellTM-HY Selection Medium D (StemCell Technologies 社製 #03804) 等のメチルセルロース培地に懸濁して培養し、形成されたハイブリドーマコロニーを回収することでモノクローナルハイブリドーマの取得が可能である。回収された各ハイブリドーマコロニーを培養し、得られたハイブリドーマ培養上清中に安定して抗体価の認められたものを TROP2 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

[0055] この様にして樹立されたハイブリドーマ株の例としては、TROP2 ハイブリドーマ T1NA1 を挙げることができる。なお、本明細書中においては、TROP2 ハイブリドーマ T1NA1 が産生する抗体を、「T1NA1 抗体」又は単に「T1NA1」と記載する。

T1NA1 抗体の重鎖可変領域は、配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する。また、T1NA1 抗体の軽鎖可変領域は、配列表の配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を有する。

[0056] (g) ハイブリドーマの培養によるモノクローナル抗体の調製

この様にして選択されたハイブリドーマは、これを培養することによって、モノクローナル抗体を効率よく得ることができるが、培養に先立ち、目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることが望ましい。

このスクリーニングにはそれ自体既知の方法が採用できる。

本発明における抗体価の測定は、例えば上記 (b) の項目で説明した EL

WO 2015/098099

44

PCT/JP2014/006421

ISA法によって行うことができる。

以上の方法によって得たハイブリドーマは、液体窒素中又は -80°C 以下の冷凍庫中に凍結状態で保存することができる。

クローニングを完了したハイブリドーマは、培地をHT培地から正常培地に換えて培養される。

大量培養は、大型培養瓶を用いた回転培養、或はスピナー培養で行われる。この大量培養における上清から、ゲル濾過等、当業者に周知の方法を用いて精製することによって、本発明の蛋白質に特異的に結合するモノクローナル抗体を得ることができる。

また、同系統のマウス（例えば、上記のBALB/c）、或はNu/Nuマウスの腹腔内にハイブリドーマを注射し、該ハイブリドーマを増殖させることによって、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることができる。

腹腔内に投与する場合には、事前（3～7日前）に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane; プリスタン）等の鉱物油を投与すると、より多量の腹水が得られる。

例えば、ハイブリドーマと同系統のマウスの腹腔内に予め免疫抑制剤を注射し、T細胞を不活性化した後、20日後に $10^5 \sim 10^7$ 個のハイブリドーマ・クローン細胞を、血清を含まない培地中に浮遊（0.5 ml）させて腹腔内に投与し、通常腹部が膨満し、腹水がたまったところでマウスより腹水を採取する。この方法によって、培養液中に比べて約100倍以上の濃度のモノクローナル抗体が得られる。

上記方法によって得たモノクローナル抗体は、例えばWeir, D. M.; Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978)に記載されている方法で精製することができる。

WO 2015/098099

45

PCT/JP2014/006421

かくして得られるモノクローナル抗体は、TROP2に対して高い抗原特異性を有する。

[0057] (h) モノクローナル抗体の検定

かくして得られたモノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスの決定は以下の様に行うことができる。

まず、同定法としてはオクテルロニー (Ouchterlony) 法、ELISA法、又はRIA法を挙げることができる。

オクテルロニー法は簡便ではあるが、モノクローナル抗体の濃度が低い場合には濃縮操作が必要である。

一方、ELISA法又はRIA法を用いた場合は、培養上清をそのまま抗原吸着固相と反応させ、さらに第二次抗体として各種イムノグロブリンアイソタイプ、サブクラスに対応する抗体を用いることによって、モノクローナル抗体のアイソタイプ、サブクラスを同定することが可能である。

また、さらに簡便な方法として、市販の同定用のキット（例えば、マウスタイパーキット；バイオラッド社製）等を利用することもできる。

さらに、蛋白質の定量は、フォーリンロウリー法及び280nmにおける吸光度（1.4 (OD280) = イムノグロブリン1mg/ml）より算出する方法によって行うことができる。

さらに、(2)の(a)乃至(h)の工程を再度実施して別途に独立してモノクローナル抗体を取得した場合においても、TINA1抗体と同等の細胞傷害活性を有する抗体を取得することが可能である。この様な抗体の一例として、TINA1抗体と同一のエピトープに結合する抗体を挙げることができる。新たに作製されたモノクローナル抗体が、TINA1抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該モノクローナル抗体がTINA1抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、TINA1抗体のTROP2に対する結合に対して該モノクローナル抗体が競合する（即ち、該モノクローナル抗体がTINA1抗体とTROP2の結合を妨げる）ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又

WO 2015/098099

46

PCT/JP2014/006421

は構造が決定されていなくても、該モノクローナル抗体が抗TROP2抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該モノクローナル抗体がTINA1抗体と同等の抗原結合能又は生物活性を有していることが強く期待される。

[0058] (3) その他の抗体

本発明の抗体には、上記TROP2に対するモノクローナル抗体に加え、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト化(Humanized)抗体、ヒト抗体等も含まれる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体としては、抗体の可変領域と定常領域が互いに異種である抗体、例えばマウス又はラット由来抗体の可変領域をヒト由来の定常領域に接合したキメラ抗体を挙げることができる(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984) 参照)。

ヒト化抗体としては、相補性決定領域(CDR)のみをヒト由来の抗体に組み込んだ抗体(Nature (1986) 321, p. 522-525 参照)、CDR移植法によって、CDRの配列に加えて一部のフレームワークのアミノ酸残基もヒト抗体に移植した抗体(国際公開第90/07861号)を挙げることができる。

但し、TINA1抗体由来のヒト化抗体としては、TINA1抗体の6種全てのCDR配列を保持する限り、特定のヒト化抗体に限定されることはない。なお、TINA1抗体の重鎖可変領域は、配列表の配列番号23に示されるアミノ酸配列からなるCDRH1(TAGMQ)、配列番号24に示されるアミノ酸配列からなるCDRH2(WINTHSGVPKYAEDFKG)、及び配列番号25に示されるアミノ酸配列からなるCDRH3(SGFGSSYWYFDV)を保有している。また、TINA1抗体の軽鎖可変領域は、配列表の配列番号26に示されるアミノ酸配列からなるCDRL1(KASQDVSTAVA)、配列番号27に示されるアミノ酸配列からな

WO 2015/098099

47

PCT/JP2014/006421

るCDRL2 (SASYRYT)、及び配列番号28に示されるアミノ酸配列からなるCDRL3 (QQHYITPLT)を保有している。

[0059] マウス抗体TINA1のヒト化抗体の実例としては、(1)配列表の配列番号12、14、又は16の20乃至140番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、(2)上記(1)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び(3)上記(1)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列のいずれか一つからなる重鎖可変領域を含む重鎖、並びに(4)配列番号18、20、又は22の21乃至129番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列、(5)上記(4)のアミノ酸配列に対して少なくとも95%以上の相同性を有するアミノ酸配列、及び(6)上記(4)のアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列のいずれか一つからなる軽鎖可変領域を含む軽鎖の任意の組合せを挙げることができる。

なお、本明細書における「数個」とは、1乃至10個、1乃至9個、1乃至8個、1乃至7個、1乃至6個、1乃至5個、1乃至4個、1乃至3個、又は1若しくは2個を意味する。

[0060] また、本明細書におけるアミノ酸の置換としては保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。好適なアミノ酸グループは、以下の通りである：酸性グループ＝アスパラギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リシン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；非常電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次の通りである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかるアミノ酸置換は元のアミノ酸配列

WO 2015/098099

48

PCT/JP2014/006421

を有する物質の特性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

[0061] 上記の重鎖及び軽鎖の好適な組合せの抗体としては、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号22においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号22においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号16においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号16においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、並びに配列番号16においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号22においてアミノ酸番号2

WO 2015/098099

49

PCT/JP2014/006421

1乃至129に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

- [0062] さらに好適な組合せの抗体としては、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至470に記載目のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号22においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至470に記載目のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号14においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号22においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号16においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号18においてアミノ酸番号21乃至234番目のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号16においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号20においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、並びに配列番号16においてアミノ酸番号20乃至470に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号22においてアミノ酸番号21乃至234に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体を挙げることができる。
- [0063] 優れた好適な組み合わせとしては、配列番号12においてアミノ酸番号20乃至140に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列

WO 2015/098099

50

PCT/JP2014/006421

番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号 20 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体、並びに配列番号 16 においてアミノ酸番号 20 乃至 140 に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する重鎖及び配列番号 22 においてアミノ酸番号 21 乃至 129 に記載のアミノ酸配列からなる可変領域を有する軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0064] また、別の好適な組合せとしては、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 20 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 22 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 14 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 14 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 20 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 14 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 22 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 20 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、並びに配列番号 16 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 22 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

[0065] 優れた好適な組み合わせとしては、配列番号 12 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 において

WO 2015/098099

51

PCT/JP2014/006421

アミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 20 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、並びに配列番号 16 においてアミノ酸番号 20 乃至 470 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 22 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

〔0066〕 さらに優れた好適な組合せとしては、配列番号 12 においてアミノ酸番号 20 乃至 469 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 469 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 18 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、配列番号 14 においてアミノ酸番号 20 乃至 469 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 20 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体、並びに配列番号 16 においてアミノ酸番号 20 乃至 469 に記載のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号 22 においてアミノ酸番号 21 乃至 234 に記載のアミノ酸配列からなる軽鎖からなる抗体を挙げることができる。

〔0067〕 上記の重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列と高い相同性を示す配列を組み合わせることによって、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。このような相同性は、一般的には 80% 以上の相同性であり、好ましくは 90% 以上の相同性であり、より好ましくは 95% 以上の相同性であり、最も好ましくは 99% 以上の相同性である。また、重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列に 1 乃至数個のアミノ酸残基が置換、欠失又は付

WO 2015/098099

52

PCT/JP2014/006421

加されたアミノ酸配列を組み合わせることによっても、上記の各抗体と同等の生物活性を有する抗体を選択することが可能である。

[0068] 二種類のアミノ酸配列間の相同性は、Blast algorithm version 2.2.2 (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaeffer, 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) のデフォルトパラメーターを使用することによって決定することができる。Blast algorithmは、インターネットでwww.ncbi.nlm.nih.gov/blastにアクセスすることによっても使用することができる。

[0069] なお、配列表の配列番号12、14、又は16に示される重鎖アミノ酸配列中で、1乃至19番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、20乃至140番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、141乃至470番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号12の配列は図3に、配列番号14の配列は図4に、配列番号16の配列は図5に各々記載されている。

また、配列表の配列番号18、20、又は22に示される軽鎖アミノ酸配列中で、1乃至20番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列はシグナル配列であり、21乃至129番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は可変領域であり、130乃至234番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列は定常領域である。配列番号18の配列は図6に、配列番号20の配列は図7に、配列番号22の配列は図8に各々記載されている。

[0070] 本発明の抗体としては、さらに、TROP2に結合する、ヒト抗体を挙げることができる。抗TROP2ヒト抗体とは、ヒト染色体由来の抗体の遺伝

WO 2015/098099

53

PCT/JP2014/006421

子配列のみを有するヒト抗体を意味する。抗TROP2ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒト染色体断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法 (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等を参照。) によって取得することができる。

【0071】 この様なヒト抗体産生マウスは、具体的には、内在性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が破壊され、代わりに酵母人工染色体 (Yeast artificial chromosome, YAC) ベクター等を介してヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子座が導入された遺伝子組み換え動物として、ノックアウト動物及びトランスジェニック動物の作製及びこれらの動物同士を掛け合わせることによって作り出すことができる。

また、遺伝子組換え技術によって、その様なヒト抗体の重鎖及び軽鎖の各々をコードするcDNA、好ましくは該cDNAを含むベクターによって真核細胞を形質転換し、遺伝子組換えヒトモノクローナル抗体を産生する形質転換細胞を培養することによって、この抗体を培養上清中から得ることもできる。

ここで、宿主としては例えば真核細胞、好ましくはCHO細胞、リンパ球やミエローマ等の哺乳動物細胞を用いることができる。

【0072】 また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法 (Wormstone, I. M. et al., *Inv*

estigative 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等参照。)も知られている。

例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105–1116) を用いることができる。

抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。

抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによってヒト抗体を取得することができる (国際公開第92/01047号、同92/20791号、同93/06213号、同93/11236号、同93/19172号、同95/01438号、同95/15388号; Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433–455; Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p. 1105–1116)。

新たに作製されたヒト抗体が、TINA1抗体の結合する部分ペプチド又は部分立体構造に結合すれば、該ヒト抗体がTINA1抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。また、TINA1抗体のTROP2に対する結合に対して該ヒト抗体が競合する (すなわち、該ヒト抗体が、TINA1抗体とTROP2の結合を妨げる) ことを確認することによって、具体的なエピトープの配列又は構造が決定されていなくても、該ヒト抗体

WO 2015/098099

55

PCT/JP2014/006421

がT I N A 1抗体と同一のエピトープに結合すると判定することができる。エピトープが同一であることが確認された場合、該ヒト抗体がT I N A 1抗体と同等の生物活性を有していることが強く期待される。

以上の方法によって得られたキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体は、公知の方法等によって抗原に対する結合性を評価し、好適な抗体を選抜することができる。

【0073】 抗体の性質を比較する際の別の指標の一例としては、抗体の安定性を挙げることができる。示差走査熱量計（DSC）は、蛋白の相対的構造安定性のよい指標となる熱変性中点（ T_m ）を素早く、また正確に測定することができる装置である。DSCを用いて T_m 値を測定し、その値を比較することによって、熱安定性の違いを比較することができる。抗体の保存安定性は、抗体の熱安定性との相関を示すことが知られており（L o r i B u r t o n, et. al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, p. 265-273）、熱安定性を指標に、好適な抗体を選抜することができる。抗体を選抜するための他の指標としては、適切な宿主細胞における収量が高いこと、及び水溶液中での凝集性が低いことを挙げることができる。例えば収量の最も高い抗体が最も高い熱安定性を示すとは限らないので、以上に述べた指標に基づいて総合的に判断して、ヒトへの投与に最も適した抗体を選抜する必要がある。

【0074】 本発明の抗体には抗体の修飾体も含まれる。当該修飾体とは、本発明の抗体に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N-結合又はO-結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、N-結合又はO-結合への糖鎖付加、N末又はC末のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによってN末にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可

WO 2015/098099

56

PCT/JP2014/006421

能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティ標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体の修飾物は、抗体の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

[0075] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際公開第1999/54342号、同2000/61739号、同2002/31140号等が知られているが、これらに限定されるものではない。本発明の抗体には当該糖鎖修飾を調節された抗体も含まれる。

抗体遺伝子を一旦単離した後、適当な宿主に導入して抗体を作製する場合には、適当な宿主と発現ベクターの組み合わせを使用することができる。抗体遺伝子の具体例としては、本明細書に記載された抗体の重鎖配列をコードする遺伝子、及び軽鎖配列をコードする遺伝子を組み合わせたものを挙げることができる。宿主細胞を形質転換する際には、重鎖配列遺伝子と軽鎖配列遺伝子は、同一の発現ベクターに挿入されていることが可能であり、又別々の発現ベクターに挿入されていることも可能である。

真核細胞を宿主として使用する場合、動物細胞、植物細胞や、真核微生物を用いることができる。特に動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、サルの細胞であるCOS細胞（Gluzman, Y. Cell (1981) 23, p. 175-182、ATCC CRL-1650）、マウス線維芽細胞NIH3T3（ATCC No. CRL-1658）やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞（CHO細胞、ATCC CCL-61）のジヒドロ葉酸還元酵素欠損株（Urlaub, G. and Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1980) 77, p. 4126-4220）を挙げることができる。

原核細胞を使用する場合は、例えば、大腸菌、枯草菌を挙げることができる。

WO 2015/098099

57

PCT/JP2014/006421

これらの細胞に目的とする抗体遺伝子を形質転換によって導入し、形質転換された細胞をin vitroで培養することによって抗体が得られる。当該培養においては抗体の配列によって収量が異なる場合があり、同等な結合活性を持つ抗体の中から収量を指標に医薬としての生産が容易なものを選別することが可能である。よって、本発明の抗体には、上記形質転換された宿主細胞を培養する工程、及び当該工程で得られた培養物から目的の抗体又は当該抗体の機能性断片を採取する工程を含むことを特徴とする当該抗体の製造方法によって得られる抗体も含まれる。

〔0076〕 なお、哺乳類培養細胞で生産される抗体の重鎖のカルボキシル末端のリシン残基が欠失することが知られており（Journal of Chromatography A, 705:129-134（1995））、また、同じく重鎖カルボキシル末端のグリシン、リシンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化されることが知られている（Analytical Biochemistry, 360:75-83（2007））。しかし、これらの重鎖配列の欠失及び修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞障害作用等）には影響を及ぼさない。したがって、本発明に係る抗体には、当該修飾を受けた抗体及び当該抗体の機能性断片も含まれ、重鎖カルボキシル末端において1又は2のアミノ酸が欠失した欠失体、及びアミド化された当該欠失体（例えば、カルボキシル末端部位のプロリン残基がアミド化された重鎖）等も包含される。但し、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体を構成する2本の重鎖は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であってもよいし、いずれか二種を組み合わせたものであってもよい。各欠失体の量比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の双方でカルボキシル末端のひとつのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

WO 2015/098099

58

PCT/JP2014/006421

。

〔0077〕 本発明の抗体のアイソタイプとしては、例えばIgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）等を挙げることができるが、好ましくはIgG1又はIgG2を挙げることができる。

〔0078〕 抗体の生物活性としては、一般的には抗原結合活性、抗原と結合することによって該抗原を発現する細胞に内在化する活性、抗原の活性を中和する活性、抗原の活性を増強する活性、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（CDC）活性及び抗体依存性細胞媒介食作用（ADCP）を挙げることができるが、本発明に係る抗体が有する機能は、TROP2に対する結合活性であり、好ましくはTROP2と結合することによってTROP2発現細胞に内在化する活性である。さらに、本発明の抗体は、細胞内在化活性に加えて、ADCC活性、CDC活性及び/又はADCP活性を併せ持っているもよい。

〔0079〕 得られた抗体は、均一にまで精製することができる。抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えばカラムクロマトグラフィー、フィルター濾過、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる（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)）が、これらに限定されるものではない。

クロマトグラフィーとしては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマト

WO 2015/098099

59

PCT/JP2014/006421

グラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等を挙げることができる。

これらのクロマトグラフィーは、HPLCやFPLC等の液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムを挙げることができる。例えばプロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (ファルマシア)等を挙げることができる。

また抗原を固定化した担体を用いて、抗原への結合性を利用して抗体を精製することも可能である。

【0080】〔抗腫瘍性化合物〕

本発明の抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートに結合される抗腫瘍性化合物について述べる。本発明で使用される抗腫瘍性化合物としては、抗腫瘍効果を有する化合物であって、リンカー構造に結合できる置換基、部分構造を有するものであれば特に制限はない。抗腫瘍性化合物は、リンカーの一部又は全部が腫瘍細胞内で切断されて抗腫瘍性化合物部分が遊離して抗腫瘍効果が発現される。リンカーが薬物との結合部分で切断されれば抗腫瘍性化合物が未修飾の構造で遊離され、その本来の抗腫瘍効果が発揮される。

本発明で使用される抗腫瘍性化合物として、カンプトテシン誘導体であるエキサテカン ((1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオン ; 次式 :)

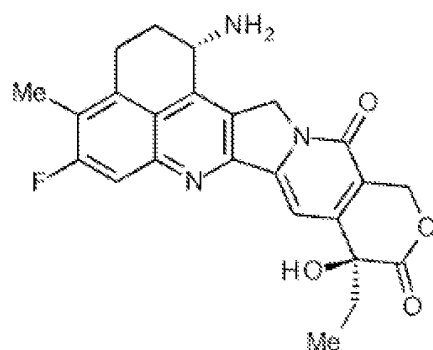
【0081】

WO 2015/098099

60

PCT/JP2014/006421

[化14]



〔0082〕を好適に使用することができる。このエキサテカンは、優れた抗腫瘍活性を有しているものの、抗腫瘍薬として市販されるには至っていない。同化合物は、公知の方法で容易に取得でき、1位のアミノ基をリンカー構造への結合部位として好適に使用することができる。また、エキサテカンはリンカーの一部が結合した状態で腫瘍細胞内で遊離される場合もあるが、このような構造であっても優れた抗腫瘍効果が発揮される優れた化合物である。

エキサテカンはカンプトテシン構造を有するので、酸性水性媒体中（例えばpH3程度）ではラクトン環が形成された構造（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH10程度）ではラクトン環が開環した構造（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環構造及び開環構造に対応するエキサテカン残基を導入した薬物コンジュゲートであっても同等の抗腫瘍効果が期待され、いずれの状態のものも本発明の範囲に包含されることはいふまでもない。

〔0083〕 他の抗腫瘍性化合物として例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン又はその誘導体）、タキソール又はその誘導体、その他のカンプトテシン又はその誘導体（特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤）等を挙げることができる。

〔0084〕 抗体－薬物コンジュゲートにおいて、抗体1分子への薬物の結合数は、その有効性、安全性に影響する重要因子である。抗体－薬物コンジュゲートの

WO 2015/098099

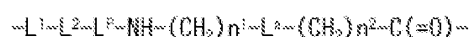
61

PCT/JP2014/006421

製造は、薬物の結合数が一定の数となるよう、反応させる原料・試薬の使用量等の反応条件を規定して実施されるが、低分子化合物の化学反応とは異なり、抗体－薬物コンジュゲートは異なる数の薬物が結合した混合物として得られるのが通常である。抗体1分子への薬物の結合数は平均値、すなわち、平均薬物結合数として特定され、表記される。本発明でも原則として断りのない限り、すなわち、異なる薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲート混合物に含まれる特定の薬物結合数をもつ抗体－薬物コンジュゲートを示す場合を除き、薬物の結合数は平均値を意味する。抗体分子へのエキサテカンの結合数はコントロール可能であり、1抗体あたりの薬物平均結合数として、1から10個程度のエキサテカン結合させることができるが、好ましくは2から8個であり、より好ましくは3から8個である。なお、当業者であれば本願の実施例の記載から抗体に必要な数の薬物を結合させる反応を設計することができ、エキサテカンの結合数をコントロールした抗体－薬物コンジュゲートを取得することができる。

[0085] [リンカー構造]

本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートにおいて抗腫瘍性化合物を抗TROP2抗体に結合させるリンカー構造について述べる。当該リンカーは、次式：

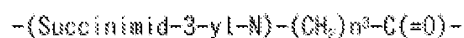


の構造を有しており、抗体は L^1 の末端（ L^2 が結合するのとは反対側の末端）で結合し、抗腫瘍性化合物は $L^4 \sim (CH_2)^{n^2} \sim C(=O) \sim$ 部分のカルボニル基で結合する。

n^1 は、0から6の整数を示すが、好ましくは1から5の整数であり、より好ましくは1から3である。

[0086] 1. L^1

L^1 は、



の構造で示される。

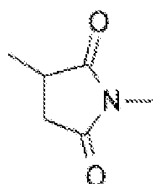
WO 2015/098099

62

PCT/JP2014/006421

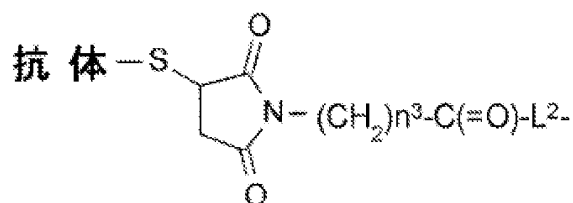
ここで、 n^3 は、2から8の整数であり、『-(Succinimid-3-yl-N)-』は、次式

[0087] [化15]



[0088] で示される構造を有する。この部分構造における3位が抗TRO P 2抗体への結合部位である。この3位での該抗体との結合は、チオエーテルを形成して結合することが特徴である。この構造部分の1位の窒素原子は、この構造が含まれるリンカー内に存在するメチレンの炭素原子と結合する。すなわち、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH₂) n^3 -C(=O)-L²-は次式で示される構造である（ここで、「抗体-S-」は抗体由来である。）。

[0089] [化16]



[0090] 式中、 n^3 は、2から8の整数であるが、好ましくは2から5である。

[0091] L²の具体例としては、

- (Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-、
 - (Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、
 - (Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、
 - (Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-
 等を挙げることができる。

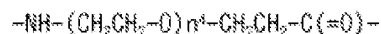
[0092] 2. L²

L²は、

WO 2015/098099

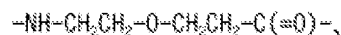
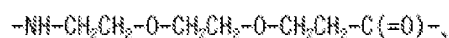
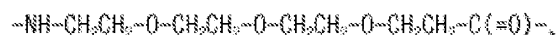
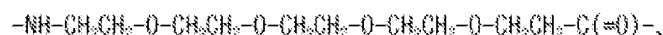
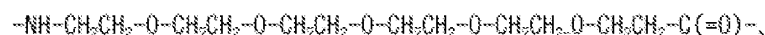
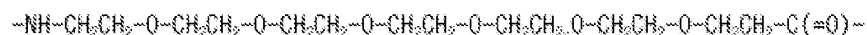
63

PCT/JP2014/006421



で示される構造であるが、L²は存在しなくともよく、この場合L²は単結合となる。また、nは、1から6の整数であり、好ましくは2から4である。L²は末端のアミノ基でL¹に結合し、反対の末端のカルボニル基でL³と結合する。

[0093] L²の具体例としては、



等を挙げることができる。

[0094] 3. L³

L³は、2から7個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である。すなわち、2から7個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチドの残基によって構成される。L³は、N末端においてL²に結合し、C末端においてリンカーのNH-(CH₂)ⁿ¹-L¹-(CH₂)ⁿ²-C(=O)-部分のアミノ基に結合する。

[0095] L³を構成するアミノ酸は特に限定されることはないが、例えば、L-又はD-アミノ酸であり、好ましくはL-アミノ酸である。また、α-アミノ酸の他、β-アラニン、ε-アミノカプロン酸、γ-アミノ酪酸等の構造のアミノ酸であってもよく、さらには例えばN-メチル化されたアミノ酸等の非天然型のアミノ酸であってもよい。

L³のアミノ酸配列は、特に限定されないが、構成するアミノ酸として、フェニルアラニン (Phe ; F)、チロシン (Tyr ; Y)、ロイシン (Leu ; L)、グリシン (Gly ; G)、アラニン (Ala ; A)、バリン (Val ; V)、リシン (Lys ; K)、シトルリン (Cit)、セリン (Ser ; S)、グルタミン酸 (Glu ; E)、アスパラギン酸 (Asp ; D) 等を挙げることができる。

これらのうちで好ましくは、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシ

WO 2015/098099

64

PCT/JP2014/006421

ン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸を挙げることができる。アミノ酸の種類によって、薬物遊離のパターンをコントロールすることができる。アミノ酸の数は、2から7個でよい。

[0096] L¹の具体例として、

~GGF-、
 ~DGGF-、
 ~-(D-)-D-GGF-、
 ~EGGF-、
 ~GGFG-、
 ~SGGF-、
 ~KGGF-、
 ~DGGFG-、
 ~GGFGG-、
 ~DDGGFG-、
 ~KDGGFG-、
 ~GGFGGGF-

を挙げることができる。上記の『(D-)-D』はD-アスパラギン酸を意味する。本発明の抗体-薬物コンジュゲートの特に好ましいL¹として、~GGFG-のテトラペプチド残基を挙げることができる。

[0097] 4. L²-(CH₂)ⁿ²-C(=O)-

L²-(CH₂)ⁿ²-C(=O)-におけるL²は、-O-の構造であるか、又は単結合である。n²は、0から5の整数であるが、好ましくは0から3であり、より好ましくは0または1である。

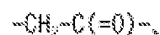
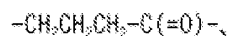
L²-(CH₂)ⁿ²-C(=O)-としては以下の構造のものを挙げることができる。

~O-CH₂-C(=O)-、
 ~O-CH₂CH₂-C(=O)-、
 ~O-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、
 ~O-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、

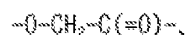
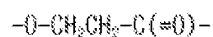
WO 2015/098099

65

PCT/JP2014/006421

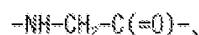
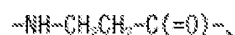
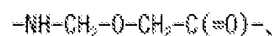
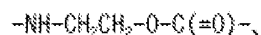
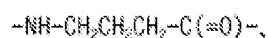
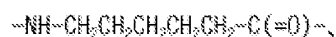


これらのうちでは、



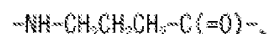
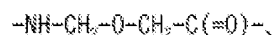
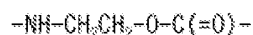
である場合か、 L^a が単結合で n^a が0である場合が好ましい。

[0098] リンカーの $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ で示される構造の具体例として、



等を挙げることができる。

[0099] より好ましくは、



である。

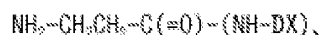
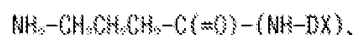
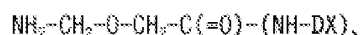
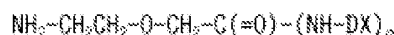
[0100] リンカーの $-NH-(CH_2)n^1-L^a-(CH_2)n^2-C(=O)-$ は、鎖長として4から7原子の鎖長であるものが好ましいが、さらに好ましくは5又は6原子の鎖長を有するものである。

WO 2015/098099

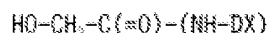
66

PCT/JP2014/006421

〔0101〕 本発明の抗TRO2抗体-薬物コンジュゲートは、腫瘍細胞内に移動した後にはリンカー部分が切断され、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^1-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ で示される構造の薬物誘導体が遊離して抗腫瘍作用を発現すると考えられる。本発明の抗体-薬物コンジュゲートから遊離されて抗腫瘍効果を発現する抗腫瘍性誘導体としては、先に挙げたリンカーの $-(\text{NH}-\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^1-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ で示される構造の末端がアミノ基となった構造部分を有する抗腫瘍性誘導体を挙げるができるが、特に好ましいものは次のものである。

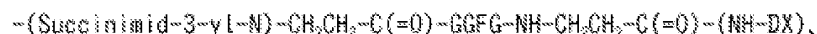
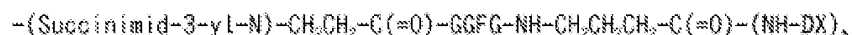
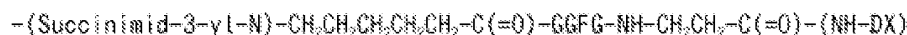


なお、 $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ の場合は同分子内にあるアミナール構造が不安定であるため、さらに自己分解して

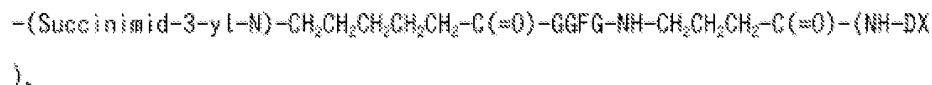


が遊離されることが確認された。これらの化合物は本発明の抗体-薬物コンジュゲートの製造中間体としても好適に用いることができる。

〔0102〕 薬物をエキサテカンとする本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおいては、下記の構造の薬物-リンカー構造部分 $[-\text{L}^1-\text{L}^2-\text{L}^3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{L}^4-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})]$ を抗体に結合させたものが好ましい。これらの薬物-リンカー構造部分は、1抗体あたりの平均結合数として、1から10を結合させればよいが、好ましくは2から8であり、より好ましくは3から8である。



、



WO 2015/098099

67

PCT/JP2014/006421

NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

これらのうちでより好ましくは、次のものである。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

さらに、好ましくは、次のものである。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

WO 2015/098099

68

PCT/JP2014/006421

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

〔0103〕 本発明の抗体-薬物コンジュゲートにおいて、抗TROP2抗体と薬物とを結合するリンカー構造は、これまで述べたリンカー各部において示した好ましい構造のものを結合することで好ましいリンカーを構築することができる。この様なリンカー構造として以下の構造のものを好適に使用することができる。なお構造の左端が抗体との結合部位であり、右端が薬物との結合部位である。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-。

これらのうちでより好ましくは、次のものである。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-、

WO 2015/098099

69

PCT/JP2014/006421

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-$
 $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$.

さらに、好ましくは、次のものを挙げることができる。

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$.

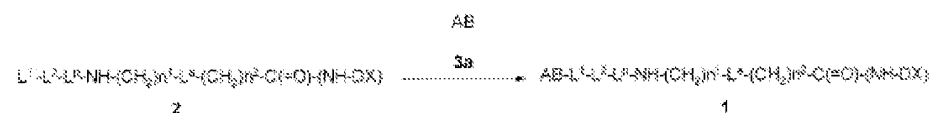
[0104] [製造方法]

次に、本発明の抗体-薬物コンジュゲート或はその製造中間体の代表的な製造方法について説明する。なお、以下において、化合物を示すために、各反応式中に示される化合物の番号を用いる。すなわち、『式(1)の化合物』、『化合物(1)』等と称する。またこれ以外の番号の化合物についても同様に記載する。

[0105] 1. 製造方法 1

式(1)で示される、チオエーテルを介して抗体と薬物-リンカー構造が結合している抗体-薬物コンジュゲートは、例えば下記の方法によって製造することができる。

[0106] [化17]



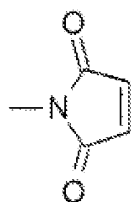
[0107] [式中、ABは、スルフヒドリル基を有する抗体を示し、L¹は、L¹で示されるリンカー構造において、リンカー末端がマレイミジル基(次式)

WO 2015/098099

70

PCT/JP2014/006421

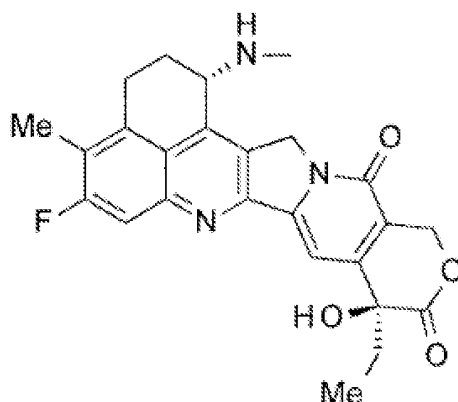
[0108] [化18]



[0109] となった構造（ここで、窒素原子が結合部位となっている）を示すが、具体的には、I'のうちの-(Succinimid-3-yl-N)-(CH₂)_n-C(=O)-において-(Succinimid-3-yl-N)-部分がマレイミジル基となった基を示す。また、-(NH-DX)は次式

:

[0110] [化19]



[0111] で示される構造であり、エキサデカンの1位のアミノ基の水素原子1個が除かれて生成する基を示す。]

[0112] なお、上記の反応式において、式(1)の化合物では、薬物からリンカー末端までの構造部分1個が1個の抗体に対して結合した構造として解釈され得るが、これは説明のための便宜的な記載であって、実際には当該構造部分が抗体分子1個に対して複数個が結合している場合が多い。この状況は以下の製造方法の説明においても同様である。

[0113] 後述する方法によって入手しうる化合物(2)と、スルフヒドリル基を有する抗体(3a)を反応させることによって、抗体-薬物コンジュゲート(1

WO 2015/098099

71

PCT/JP2014/006421

）を製造することができる。

スルフヒドリル基を有する抗体（3a）は、当業者周知の方法で得ることができる（Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp.56-136, pp.456-493, Academic Press(1996)）。例えば、Traut's 試薬を抗体のアミノ基に作用させる；N-サクシンイミジル S-アセチルチオアルカノエート類を抗体のアミノ基に作用させた後、ヒドロキシルアミンを作用させる；N-サクシンイミジル 3-（ピリジルジチオ）プロピオネートを作用させた後、還元剤を作用させる；ジチオトレイトール、2-メルカプトエタノール、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP）等の還元剤を抗体に作用させて抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元してスルフヒドリル基を生成させる；等の方法を挙げることができるがこれらに限定されることはない。

具体的には、還元剤としてTCEPを、抗体内ヒンジ部ジスルフィド1個当たりに対して0.3乃至3モル当量用い、キレート剤を含む緩衝液中で、抗体と反応させることで、抗体内ヒンジ部ジスルフィドが部分的又は完全に還元された抗体を得ることができる。キレート剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）やジエチレントリアミン5酢酸（DTPA）等を挙げることができる。これらを1mM乃至20mMの濃度で用いればよい。緩衝液としては、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム溶液等を用いることができる。具体的には、抗体は4℃乃至37℃で1乃至4時間TCEPと反応させることで部分的又は完全に還元されたスルフヒドリル基を有する抗体（3a）を得ることが出来る。

ここでスルフヒドリル基を薬物-リンカー部分に付加させる反応を実施することでチオエーテル結合によって薬物-リンカー部分を結合させることができる。

スルフヒドリル基を有する抗体（3a）1個あたり、2乃至20モル当量の化合物（2）を使用して、抗体1個当たり2個乃至8個の薬物が結合した抗体-薬物コンジュゲート（1）を製造することができる。具体的には、スル

WO 2015/098099

72

PCT/JP2014/006421

フヒドリル基を有する抗体（3a）を含む緩衝液に、化合物（2）を溶解させた溶液を加えて反応させればよい。ここで、緩衝液としては、酢酸ナトリウム溶液、リン酸ナトリウムやホウ酸ナトリウム等を用いればよい。反応時のpHは5乃至9であり、より好適にはpH7付近で反応させればよい。化合物（2）を溶解させる溶媒としては、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルアセトアミド（DMA）、N-メチル-2-ピリドン（NMP）等の有機溶媒を用いることができる。

化合物（2）を溶解させた有機溶媒溶液を、スルフヒドリル基を有する抗体（3a）を含む緩衝液に1乃至20%v/vを加えて反応させればよい。反応温度は、0乃至37℃、より好適には10乃至25℃であり、反応時間は、0.5乃至2時間である。反応は、未反応の化合物（2）の反応性をチオール含有試薬によって失活させることによって終了できる。チオール含有試薬は例えば、システインまたはN-アセチル-L-システイン（NAC）である。より具体的には、NACを、用いた化合物（2）に対して、1乃至2モル当量加え、室温で10乃至30分インキュベートすることにより反応を終了できる。

製造した抗体-薬物コンジュゲート（1）は、以下の共通操作によって濃縮、バッファー交換、精製、抗体濃度及び抗体-分子あたりの薬物平均結合数の測定を行い、抗体-薬物コンジュゲート（1）の同定を行うことができる。

〔0114〕 共通操作A：抗体又は抗体-薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Amicon Ultra (50,000 MWCO, Millipore Corporation) の容器内に抗体又は抗体-薬物コンジュゲート溶液を入れ、遠心機 (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.) を用いた遠心操作 (2000G乃至3800Gで5乃至20分間遠心) にて、抗体又は抗体-薬物コンジュゲート溶液を濃縮した。

共通操作B：抗体の濃度測定

WO 2015/098099

73

PCT/JP2014/006421

UV測定器 (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、メーカー規定の方法に従い、抗体濃度の測定を行った。その際に、抗体ごとに異なる280nm吸光係数 ($1.3 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 乃至 $1.8 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いた。

共通操作C-1：抗体のバッファー交換

Sephadex G-25担体を使用したNAP-25カラム (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム (137 mM) 及びエチレンジアミン四酢酸 (EDTA, 5 mM) を含むリン酸緩衝液 (10 mM , pH 6.0; 本明細書でPBS 6.0/EDTAと称する) にて平衡化させた。このNAP-25カラム一本につき、抗体水溶液 2.5 mL をのせた後、PBS 6.0/EDTA 3.5 mL で溶出させた画分 (3.5 mL) を分取した。この画分を共通操作Aによって濃縮し、共通操作Bを用いて抗体濃度の測定を行った後に、PBS 6.0/EDTAを用いて 10 mg/mL に抗体濃度を調整した。

共通操作C-2：抗体のバッファー交換

Sephadex G-25担体を使用したNAP-25カラム (Cat. No. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) を、メーカー規定の方法に従い、塩化ナトリウム (50 mM) 及びEDTA (2 mM) を含むリン酸緩衝液 (50 mM , pH 6.5; 本明細書でPBS 6.5/EDTAと称する) にて平衡化させた。このNAP-25カラム一本につき、抗体水溶液 2.5 mL をのせた後、PBS 6.5/EDTA 3.5 mL で溶出させた画分 (3.5 mL) を分取した。この画分を共通操作Aによって濃縮し、共通操作Bを用いて抗体濃度の測定を行った後に、PBS 6.5/EDTAを用いて 20 mg/mL に抗体濃度を調整した。

共通操作D：抗体-薬物コンジュゲートの精製

市販のリン酸緩衝液 (PBS 7.4, Cat. No. 10010-023

WO 2015/098099

74

PCT/JP2014/006421

、Invitrogen)、塩化ナトリウム(137mM)を含むリン酸ナトリウム緩衝液(10mM, pH6.0; 本明細書でPBS6.0と称する)又はSorbitol(5%)を含む酢酸緩衝液(10mM, pH5.5; 本明細書でABSと称する)のいずれかの緩衝液でNAP-25カラムを平衡化させた。このNAP-25カラムに、抗体-薬物コンジュゲート反応水溶液(約1.5mL)をのせ、メーカー規定の量の緩衝液で溶出させることで、抗体画分を分取した。この分取画分を再びNAP-25カラムにのせ、緩衝液で溶出させるゲルろ過精製操作を計2乃至3回繰り返すことで、未結合の薬物リンカーや低分子化合物(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP)、N-アセチル-L-システイン(NAC)、ジメチルスルホキシド)を除いた抗体-薬物コンジュゲートを得た。

共通操作E: 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定(1)

抗体-薬物コンジュゲートにおける結合薬物濃度は、抗体-薬物コンジュゲート水溶液の280nm及び370nmの二波長におけるUV吸光度を測定した後に下記の計算を行うことで、算出することができる。

ある波長における全吸光度は系内に存在する全ての吸収化学種の吸光度の和に等しい(吸光度の加算性)ことから、抗体と薬物のコンジュゲーション前後において、抗体及び薬物のモル吸光係数に変化がないと仮定すると、抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度及び薬物濃度は、下記の関係式で示される。

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

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \varepsilon_{D,370} C_D + \varepsilon_{A,370} C_A \quad \text{式(1')}$$

ここで、 A_{280} は280nmにおける抗体-薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、 A_{370} は370nmにおける抗体-薬物コンジュゲート水溶液の吸光度を示し、 $A_{A,280}$ は280nmにおける抗体の吸光度を示し、 $A_{A,370}$ は370nmにおける抗体の吸光度を示し、 $A_{D,280}$ は280nmにおけるコンジュゲート前駆体の吸光度を示し、 $A_{D,370}$ は370nmにおけるコンジュゲート前駆体の

WO 2015/098099

75

PCT/JP2014/006421

吸光度を示し、 $\epsilon_{A,280}$ は280nmにおける抗体のモル吸光係数を示し、 $\epsilon_{A,370}$ は370nmにおける抗体のモル吸光係数を示し、 $\epsilon_{B,280}$ は280nmにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、 $\epsilon_{B,370}$ は370nmにおけるコンジュゲート前駆体のモル吸光係数を示し、 C_A は抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度を示し、 C_B は抗体-薬物コンジュゲートにおける薬物濃度を示す。

ここで、 $\epsilon_{A,280}$ 、 $\epsilon_{A,370}$ 、 $\epsilon_{B,280}$ 、 $\epsilon_{B,370}$ は、事前に用意した値（計算推定値又は化合物のUV測定から得られた実測値）が用いられる。例えば、 $\epsilon_{A,280}$ は、抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法（Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423）によって推定することが出来る。 $\epsilon_{A,370}$ は、通常、ゼロである。 $\epsilon_{B,280}$ 及び $\epsilon_{B,370}$ は、用いるコンジュゲート前駆体があるモル濃度に溶解させた溶液の吸光度を測定することで、ランベルト・ベールの法則（吸光度＝モル濃度×モル吸光係数×セル光路長）によって、得ることができる。抗体-薬物コンジュゲート水溶液の A_{280} 及び A_{370} を測定し、これらの値を式（1）及び（1'）に代入して連立方程式を解くことによって、 C_A 及び C_B を求めることができる。さらに C_B を C_A で除することで1抗体あたりの薬物平均結合数が求められることができる。

〔0115〕 共通操作F：抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定（2）

抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、前述の共通操作Eに加え、以下の方法を用いる高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析によっても求めることができる。

〔F-1、HPLC分析用サンプルの調製（抗体-薬物コンジュゲートの還元）〕

抗体-薬物コンジュゲート溶液（約1mg/mL、60μL）をジチオトレイトール（DTT）水溶液（100mM、15μL）と混合する。混合物を37℃で30分インキュベートすることで、抗体-薬物コンジュゲートのL鎖及びH鎖間のジスルフィド結合を切断したサンプルを、HPLC分析に

WO 2015/098099

76

PCT/JP2014/006421

用いる。

[F-2. HPLC分析]

HPLC分析を、下記の測定条件にて行う。

HPLCシステム：Agilent 1290 HPLCシステム (Agilent Technologies)

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：280nm)

カラム：PLRP-S (2.1×50mm、8 μ m、1000Å；Agilent Technologies、P/N PL1912-1802)

カラム温度：80℃

移動相A：0.04%トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液

移動相B：0.04%TFAを含むアセトニトリル溶液

グラジエントプログラム：29%→36% (0分→12.5分)、36%→42% (12.5→15分)、42%→29% (15分→15.1分)、29%→29% (15.1分→25分)

サンプル注入量：15 μ L

[F-3. データ解析]

[F-3-1] 薬物の結合していない抗体のL鎖 (L_0) 及びH鎖 (H_0) に対して、薬物の結合したL鎖 (薬物が一つ結合したL鎖： L_1) 及びH鎖 (薬物が一つ結合したH鎖： H_1 、薬物が二つ結合したH鎖： H_2 、薬物が三つ結合したH鎖： H_3) は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増して保持時間が大きくなることから、 L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、 H_2 、 H_3 の順に溶出される。 L_0 及び H_0 との保持時間比較により検出ピークを L_0 、 L_1 、 H_0 、 H_1 、 H_2 、 H_3 のいずれかに割り当てることができる。

[F-3-2] 薬物リンカーにUV吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、L鎖、H鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。

[9116]

WO 2015/098099

77

PCT/JP2014/006421

[数1]

L鎖ピーク面積補正值 (L_i)

= ピーク面積

$$\times \frac{L \text{ 鎖のモル吸光係数}}{L \text{ 鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0117] [数2]

H鎖ピーク面積補正值 (H_i)

= ピーク面積

$$\times \frac{H \text{ 鎖のモル吸光係数}}{H \text{ 鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0118] ここで、各抗体におけるL鎖及びH鎖のモル吸光係数 (280nm) は、既知の計算方法 (Protein Science, 1995, vol.4, 2411-2423) によって、各抗体のL鎖及びH鎖のアミノ酸配列から推定される値を用いることができる。hTINAの場合、そのアミノ酸配列に従って、L鎖のモル吸光係数として34690を、H鎖のモル吸光係数として95000を推定値として用いた。また、薬物リンカーのモル吸光係数 (280nm) は、各薬物リンカーをメルカプトエタノール又はN-アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数 (280nm) を用いた。

〔F-3-3〕 ピーク面積補正值合計に対する各鎖ピーク面積比 (%) を下式に従って計算する。

[0119] [数3]

$$L \text{ 鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$H \text{ 鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

$A_{Li}, A_{Hi} : L, H$ 各々のピーク面積補正值

[0120] 〔F-3-4〕 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬

WO 2015/098099

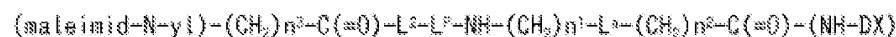
78

PCT/JP2014/006421

物平均結合数を、下式に従って計算する。

薬物平均結合数 = $(L_0 \text{ピーク面積比} \times 0 + L_1 \text{ピーク面積比} \times 1 + H_0 \text{ピーク面積比} \times 0 + H_1 \text{ピーク面積比} \times 1 + H_2 \text{ピーク面積比} \times 2 + H_3 \text{ピーク面積比} \times 3) / 100 \times 2$

〔0121〕 製造方法 1 における式 (2) で示される化合物は次式：



で示される化合物である。

式中、

n^3 は、整数の 2 から 8 を示し、

L^2 は、 $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 又は単結合を示し、

ここで、 n^4 は、1 から 6 の整数を示し、

L^3 は、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれる 2 から 7 個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

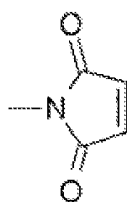
n^1 は、0 から 6 の整数を示し、

n^2 は、0 から 5 の整数を示し、

L^4 は、 $-\text{O}-$ 又は単結合を示し、

$(\text{maleimid-N-yl})-$ は、次式

〔0122〕〔化20〕



〔0123〕で示される、マレイミジル基 (2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl基)

であって、窒素原子が結合部位となっている基であり、

$-(\text{NH-DX})$ は、次式

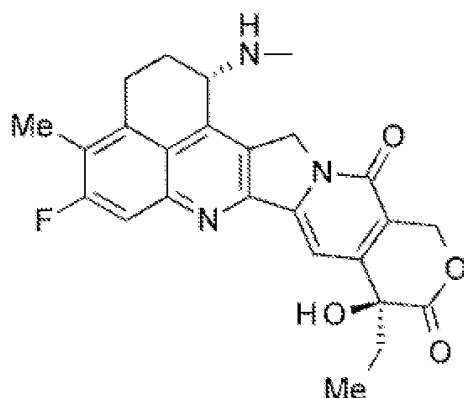
〔0124〕

WO 2015/098099

79

PCT/JP2014/006421

[化21]



〔0125〕で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基である。

〔0126〕 L^1 は、単結合であるか、 $-NH-(CH_2CH_2-O)n^1-CH_2CH_2-C(=O)-$ である場合には n^1 が整数の2から4であることが製造中間体として好ましい。

L^1 のペプチド残基としては、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるペプチド残基である化合物が製造中間体として好ましい。このようなペプチド残基のうち、 L^1 が4個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である化合物が製造中間体として好ましい。より具体的には、 L^1 が $-GGFG-$ のテトラペプチド残基である化合物が製造中間体として好ましい。

〔0127〕 また、 $-NH-(CH_2)n^1-L^1-(CH_2)n^2-$ としては、 $-NH-CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、又は $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ である化合物が製造中間体として好ましく、より好ましくは、 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、又は $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ である化合物である。

〔0128〕 さらに、式(2)で示される化合物は、 n^2 が整数の2から5であり、 L^2 が単結合であり、 $-NH-(CH_2)n^1-L^2-(CH_2)n^2-$ が、 $-NH-CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、又は $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ である化合物が製造中間体として好ましい。より好ましくは、 $-NH-(CH_2)n^1-L^2-(CH_2)n^2-$ が、 $-NH-CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-NH-CH_2-O-CH_2-$ 、又は $-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-$ である化合物である。さらに、 n^2 が、整数の2又は5である化合物が好まし

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

,

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)

,

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-

WO 2015/098099

81

PCT/JP2014/006421

)、

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)

、

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

【0131】 上記の製造中間体化合物の群から選ばれる薬物—リンカー化合物を、抗TRO P 2抗体又はその反応性誘導体と反応させることによって抗TRO P 2抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分においてチオエーテル結合を形成させて本発明の抗TRO P 2抗体—薬物コンジュゲートを製造することができる。この場合、抗TRO P 2抗体の反応性誘導体を使用することが好ましく、特に抗TRO P 2抗体を還元処理して得られる反応性誘導体为好ましい。

【0132】 以下のものが製造中間体としてより好ましい化合物である。

(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、(maleimid-N-yl)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

WO 2015/098099

82

PCT/JP2014/006421

$(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $),$
 $(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$
 $(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $,$
 $(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$
 $(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$
 $(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}).$

【0133】 また、上記の中間体化合物群の中では次式：

$(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$
 $(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX}),$
 又は
 $(\text{maleimid-N-yl})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$

で示される化合物がさらに好ましい化合物である。

【0134】 なお、コンジュゲートの量を確保するために、同様な条件で作製して得られた平均薬物数が同程度の複数のコンジュゲート（例えば±1程度）を混合して新たなロットにすることができる。その場合、平均薬物数は混合前の平均薬物数の間に収まる。

【0135】 2. 製造方法2

先の製造方法で使用した中間体である式（2）で示される化合物及びそれらの薬理上許容される塩は例えば下記の方法によって製造することができる。

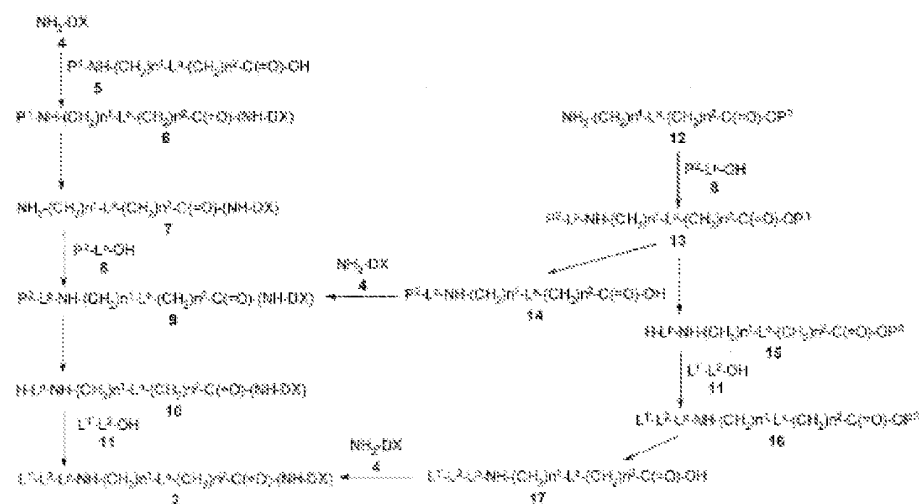
【0136】

WO 2015/098099

83

PCT/JP2014/006421

[化22]



【0137】 [式中、L' は末端マレイミジル基を示し、P¹、P²及びP³は保護基を示す。]

【0138】 カルボン酸（5）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、NH₂-DX（4）またはその薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（6）を製造することができる。NH₂-DX（4）は、エキサテカン（化学名：(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオン）を示す。

この反応は、ペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよい。活性エステルには各種のものがあるが、例えばp-ニトロフェノール等のフェノール類、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール或はN-ヒドロキシスクシンイミド等とカルボン酸（5）をN, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド或は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩等の縮合剤を用いて反応させれば製造できる。また、活性エステルは、カルボン酸（5）とペンタフルオロフェニルトリフルオロアセテート等との反応；カルボン酸（5）と1-ベンゾトリアゾリルオキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスファイトとの反応；カルボン酸（5）とシアノホスホン酸ジエチルとの反応（塩入法）；カルボン酸（5）とトリフ

WO 2015/098099

84

PCT/JP2014/006421

エニルホスフィン及び2, 2'-ジピリジルジスルフィドとの反応（向山法）；カルボン酸（5）と4-（4, 6-ジメトキシ-1, 3, 5-トリアジン-2-イル）-4-メチルモルホリニウムクロライド（DMTMM）等のトリアジン誘導体との反応；等によっても製造することができる。また、カルボン酸（5）を塩基存在下に塩化チオニル、オキザリルクロリド等の酸ハロゲン化物で処理することによって製造できる酸ハライド法等によって反応を行うこともできる。

上記の様に得たカルボン酸（5）の活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物を化合物（4）と適当な塩基存在下に不活性な溶媒中で-78℃～150℃の反応温度で反応させることによって化合物（6）を製造することができる。なお、「不活性な溶媒」とはその溶媒が採用された反応において実施される目的とされた反応を阻害することのない溶媒を意味する。

【0139】 上記の各工程に用いる具体的な塩基としては、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、ナトリウムエトキシド、カリウムブトキシド、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水素化ナトリウム、水素化カリウム等の、アルカリ金属又はアルカリ土類金属の炭酸塩、アルコキシド、水酸化物、又は水素化物；*n*-ブチルリチウム等のアルキルリチウム、又はリチウムジイソプロピルアミドの様なジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基；リチウムビス（トリメチルシリル）アミド等のビスシリルアミンの有機金属塩基；さらにはピリジン、2, 6-ルチジン、コリジン、4-ジメチルアミノピリジン、トリエチルアミン、*N*-メチルモルホリン、ジイソプロピルエチルアミン、ジアザビシクロ[5, 4, 0]ウンデクー-7-エン（DBU）等の三級アミン或は含窒素複素環化合物等の有機塩基等を挙げることができる。

【0140】 本反応に用いる不活性な溶媒としては、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素系溶媒；テトラヒドロフラン、1, 2-ジメトキシエタン、ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；*N*, *N*-ジメチルホルムアミド、*N*, *N*-ジメチルアセトアミド、*N*-メチルピロリジン-2-オン等のアミド系溶媒；を挙

WO 2015/098099

85

PCT/JP2014/006421

げることができる。これらに加えて場合によってはジメチルスルホキシド、スルホラン等のスルホキシド系溶媒；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン系溶媒；メタノール、エタノール等のアルコール系の溶媒等を使用することも可能である。さらにはこれ等を混合して使用することもできる。

[0141] 化合物（6）の末端アミノ基の保護基^{P1}としては、*tert*-ブチルオキシカルボニル基や9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等、ペプチド合成に通常用いられているアミノ基の保護基を用いることができる。他のアミノ基の保護基としては、アセチル基等のアルカノイル基；メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等のアルコキシカルボニル基；パラメトキシベンジルオキシカルボニル基、パラ（又はオルト）ニトロベンジルオキシカルボニル基等のアリールメトキシカルボニル基；ベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；ベンゾイル基等のアロイル基；2，4-ジニトロベンゼンスルホニル基、オルトニトロベンゼンスルホニル基等のアリールスルホニル基；を挙げることができる。保護基^{P1}は、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよい。

得られた化合物（6）の末端アミノ基の保護基^{P1}を脱保護させることによって化合物（7）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

N末端を^{P2}で保護したペプチドカルボン酸（8）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、得られた化合物（7）に反応させることによって、化合物（9）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（8）と化合物（7）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（6）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。保護基^{P2}は、化合物（6）の保護基で述べたものから適宜選択して使用すればよく、アミノ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよい。また、ペプチド合成に通常用いられている様に、ペプチドカルボン酸（8）を構成するアミノ酸又はペプチドを順次反応と脱保護を繰り返し、伸長させて化合物（9）を製造することもできる。

WO 2015/098099

86

PCT/JP2014/006421

得られた化合物（９）のアミノ基の保護基 P^2 を脱保護させることによって化合物（１０）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

カルボン酸（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、得られた化合物（１０）に反応させることによって、化合物（２）又はを製造することができる。カルボン酸（１１）と化合物（１０）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0142] 化合物（９）は例えば下記の方法でも製造することができる。

N末端を P^2 で保護したペプチドカルボン酸（８）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、カルボキシ基を P^3 で保護したアミン化合物（１２）と反応させることによって化合物（１３）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（８）と化合物（１２）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

化合物（１３）のアミノ基の保護基 P^2 は、通常用いられる保護基で保護されてよい。

具体的には水酸基の保護基としては、メトキシメチル基等のアルコキシメチル基；ベンジル基、４－メトキシベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；アセチル基等のアルカノイル基；ベンゾイル基等のアロイル基；*tert*-ブチルジフェニルシリル基等のシリル基；等を挙げることができる。カルボキシ基は、メチル基、エチル基、*tert*-ブチル基等のアルキル基、アリル基、又はベンジル基等のアリールメチル基とのエステル等として保護することができる。アミノ基は、*tert*-ブチルオキシカルボニル基、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基等のアルキルオキシカルボニル基；アリルオキシカルボニル基、又は９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、パラメトキシベンジルオキシカルボニル基、パラ（又はオルト）ニトロベンジルオキシカルボニル

WO 2015/098099

87

PCT/JP2014/006421

ル基等のアリールメトキシカルボニル基；のほか、アセチル基等のアルカノイル基；ベンジル基、トリフェニルメチル基等のアリールメチル基；ベンゾイル基等のアロイル基；2，4－ジニトロベンゼンスルホニル基、オルトニトロベンゼンスルホニル基等のアリールスルホニル基；等を挙げることができる。

カルボキシ基の保護基 P^2 としては、有機合成化学、中でもペプチド合成においてカルボキシ基の保護基として通常用いられている保護基を使用すればよく、具体的にはメチル基、エチル基、*tert*-ブチル等のアルキルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル等であり上記の保護基から適宜選択して使用すればよい。この場合に、アミノ基の保護基とカルボキシ基の保護基が異なる方法又は条件で除去できることが好ましい。例えば P^2 が*tert*-ブチルオキシカルボニル基であり、 P^1 がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基はアミノ基とカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて上述したものから選択すればよく、それらの保護基の切断に際してもその保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（13）のカルボキシ基の保護基 P^2 を脱保護させることによって化合物（14）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

得られた化合物（14）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（4）と反応させることによって化合物（9）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（6）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0143] 化合物（2）は、例えば下記の方法でも製造することができる。

化合物（13）のアミノ基の保護基 P^1 を脱保護させることによって化合物（15）を製造することができる。この脱保護は、その保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。

WO 2015/098099

88

PCT/JP2014/006421

カルボン酸誘導体（１１）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、得られた化合物（１５）と反応させることによって化合物（１６）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（１１）と化合物（１５）のアミド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（１６）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（１７）を製造することができる。この脱保護は、化合物（１４）の製造におけるカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

化合物（１７）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（４）と反応させることによって化合物（２）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

[0144] ３．製造方法３

中間体の式（２）で示される化合物は下記の方法によっても製造することもできる。

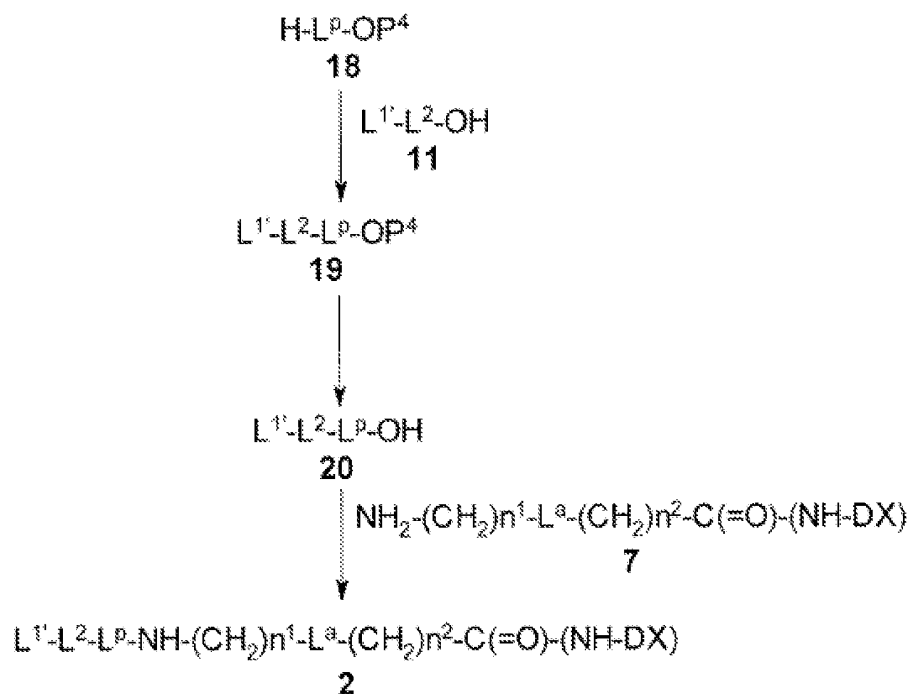
[0145]

WO 2015/098099

89

PCT/JP2014/006421

[化23]



[0146] [式中、 $\text{L}^{\text{1'}}$ は末端がマレイミジル基に変換された構造の L^{1} であり、 P^4 は保護基を示す。]

[0147] 化合物（11）を活性エステル、混合酸無水物等に誘導し、塩基存在下、 C 末端を P^4 で保護したペプチドカルボン酸（18）と反応させることによって化合物（19）を製造することができる。ペプチドカルボン酸（18）と化合物（11）のペプチド結合を形成する反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は、化合物（6）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。化合物（18）のカルボキシ基の保護基 P^4 は先に述べた保護基から適宜選択して使用すればよい。

得られた化合物（19）のカルボキシ基の保護基を脱保護させることによって化合物（20）を製造することができる。この脱保護は、化合物（14）の製造におけるカルボキシ基の脱保護と同様に行うことができる。

得られた化合物（20）を活性エステル、又は混合酸無水物等に誘導し、

WO 2015/098099

90

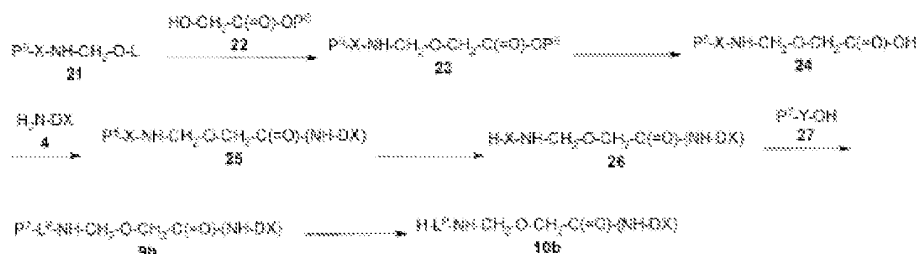
PCT/JP2014/006421

化合物（７）に反応させることによって、化合物（２）を製造することができる。この反応はペプチド合成に通常用いる反応試薬や条件を準用すればよく、反応条件や試薬、塩基、及び不活性な溶媒は化合物（６）の合成で述べたものから適宜選択して使用すればよい。

【0148】 ４．製造方法４

以下に、製造方法２に記載の製造中間体（１０）のうち、 $n^1=1$ 、 $L^1=0$ の化合物（１０ｂ）の製造方法について詳述する。式（１０ｂ）で示される化合物、その塩又はそれらの溶媒和物は、例えば下記の方法で製造することができる。

【0149】 [化24]



【0150】 [式中、 L^1 は前記と同じものを示し、 L はアシル基であって、アセチル基等のアルカノイル基若しくはベンゾイル基等のアロイル基であるか、又は水素原子等を示し、 X 及び Y は１から３個のアミノ酸からなるオリゴペプチドを、 P^5 及び P^7 はアミノ基の保護基を、 P^6 はカルボキシ基の保護基を示す。]

【0151】 式（２１）で示される化合物は、特開２００２－６０３５１号公報に記載される手法や文献（J. Org. Chem., 51巻, 3196頁, 1986年）記載の方法、又はその方法を応用し、必要に応じて保護基の除去や官能基変換を行うことによって、製造することができる。この他、末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチドの酸アミドをアルデヒド又はケトンと処理することによって得ることができる。

化合物（２１）を、不活性な溶媒中、酸または塩基存在下で冷却下から室温の温度条件で水酸基を有する化合物（２２）と反応させることによって、化合物（２３）を製造することができる。

ここで使用できる酸としては例えば、フッ化水素酸、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、ホウ酸等の無機酸；酢酸、クエン酸、パラトルエンスルホン酸、メタンスルホン酸等の有機酸；テトラフルオロボレート、塩化亜鉛、塩化スズ、塩化アルミニウム、塩化鉄等のルイス酸；等を挙げることができる。これらのうちではスルホン酸類、特にパラトルエンスルホン酸が好ましい。さらに塩基としては、既に述べられた塩基の中から適宜選択して使用すればよく、特にカリウム *tert*-ブトキシド等のアルカリ金属アルコキシド；水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物；水素化ナトリウム、水素化カリウム等のアルカリ金属水素化物；リチウム *ジ*イソプロピルアミド等のジアルキルアミノリチウムに代表される有機金属塩基；リチウム *ビス*（トリメチルシリル）アミド等のビスシリルアミンの有機金属塩基；等が好ましい。反応に用いる溶媒としては、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン等のエーテル系溶媒；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素系溶媒；等が用いられる。上記の溶媒は水との混合物としてもよい。また、P⁵に例示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はない。代表的なものとして製造方法2で記載したアミノ基の保護基を挙げることができるが、本反応中においてP⁵に例示されるアミノ基の保護基が切断される場合がある。その場合には、必要に応じて適当なアミノ基の保護試薬と適宜反応させて再度保護基を導入すればよい。

化合物（24）は、化合物（23）の保護基P⁶を除去することによって製造することができる。ここで、P⁶として例示されるカルボキシ基の保護基としては、製造方法2に代表的なものが記載されており、ここから適宜選択することができる。化合物（23）においては、アミノ基の保護基P⁵とカルボキシ基の保護基P⁶が異なる方法又は条件で除去できる保護基であることが望ましい。例えば、P⁵が9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基であり、P⁶がベンジル基である組み合わせ等を代表的なものとして挙げることができる。それらの保護基は、アミノ基及びカルボキシ基を保護する化合物の性質等に応じて選択すればよく、それらの保護基の除去に際してもその保護基に応じた試薬

WO 2015/098699

92

PCT/JP2014/006421

や条件を選択すればよい。

カルボン酸（24）を活性エステル、混合酸無水物、又は酸ハロゲン化物等に誘導し、塩基存在下、化合物（4）又はその薬理上許容される塩と反応させることによって化合物（25）を製造し、得られた化合物（25）の保護基 P^1 を除去することによって化合物（26）を製造することができる。化合物（4）とカルボン酸（24）との反応及び保護基 P^1 を除去する反応では、製造方法2で述べた試薬や反応条件と同様のものを用いればよい。

化合物（26）と末端アミノ基が保護されたアミノ酸又はアミノ基が保護されたオリゴペプチド（27）を反応させることによって化合物（9b）を製造し、得られた化合物（9b）の保護基 P^1 を除去することによって化合物（10b）を製造することができる。 P^1 として示されるアミノ基の保護基としては、通常、アミノ基の保護に用いられる基であれば特に制限はなく、代表的なものとして製造方法2で記載したアミノ基の保護基を挙げることができ、その除去に際しても保護基に応じた試薬や条件を選択すればよい。化合物（26）と化合物（27）との反応では、ペプチド合成に通常使用される反応試薬や条件を準用すればよい。上記の方法で製造した化合物（10b）は、上述の製造方法に従って本発明化合物（1）に導くことができる。

〔0152〕 本発明の抗TRO P2抗体-薬物コンジュゲートは、大気中に放置したり、又は再結晶する等して精製することにより、水分を吸収し、吸着水が付着したり、水和物になる場合があり、その様な水を含む化合物及び塩も本発明に包含される。

また、本発明には、種々の放射性または非放射性同位体でラベルされた化合物も包含される。本発明の抗体-薬物コンジュゲートを構成する原子の1以上に、原子同位体の非天然割合も含有し得る。原子同位体としては、例えば、重水素（ ^3H ）、トリチウム（ ^3H ）、ヨウ素-125（ ^{125}I ）または炭素-14（ ^{14}C ）等を挙げることができる。また、本発明化合物は、例えば、トリチウム（ ^3H ）、ヨウ素-125（ ^{125}I ）または炭素-14（ ^{14}C ）等の放射性同位体で放射性標識され得る。放射性標識された化合物は、治療または予防剤、研究試薬、例

WO 2015/098099

93

PCT/JP2014/006421

えば、アッセイ試薬、及び診断剤、例えば、インビボ画像診断剤として有用である。本発明の抗体－薬物コンジュゲートの全ての同位体変異種は、放射性であると否とを問わず、本発明の範囲に包含される。

〔0153〕〔医薬〕

本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートは、癌細胞に対して細胞傷害活性を示すことから、医薬として、特に癌に対する治療剤及び/又は予防剤として使用することができる。

すなわち本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートは、癌治療の主要な治療法である化学療法のための薬剤として選択して使用することができ、その結果として、癌細胞の成長を遅らせ、増殖を抑え、さらには癌細胞を破壊することができる。これ等によって、癌患者において、癌による症状からの解放や、QOLの改善を達成でき、癌患者の生命を保って治療効果が達成される。癌細胞の破壊には至らない場合であっても、癌細胞の増殖の抑制やコントロールによって癌患者においてより高いQOLを達成しつつより長期の生存を達成させることができる。

本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートは、薬物単独での使用の他、アジュバント療法において他の療法と組み合わせる薬剤としても使用でき、外科手術や、放射線療法、ホルモン療法等と組み合わせることができる。さらにはネオアジュバント療法における薬物療法の薬剤として使用することもできる。

以上のような治療的使用の他、抗体の抗原への結合性によって微細な転移癌細胞に結合して癌細胞の増殖を押さえ、さらには破壊する効果も期待することができる。すなわち、特に原発性の癌細胞においてTROP2の発現が確認されたときに本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートを投与することによって癌転移の抑制や、予防効果を期待することができる。例えば、転移過程で体液中にある癌細胞を抑制、破壊する効果や、いずれかの組織に着床した直後の微細な癌細胞に対する抑制、破壊等の効果が期待できる。また、特に外科的な癌の除去後における癌転移の抑制、予防効果が期待でき

WO 2015/098099

94

PCT/JP2014/006421

、これらによって癌の転移抑制効果が期待できる。

本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートは、患者に対しては全身療法として全身的に投与する他、癌組織に局所的に投与して治療効果を期待することができる。

〔0154〕 本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートが適用される癌の種類としては、肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膵癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、頭頸部癌、食道癌等を挙げることができるが、治療対象となる癌細胞において抗体－薬物コンジュゲート中の抗体が認識できるタンパクを発現している癌細胞であればこれらには限定されることはない。

〔0155〕 本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートは、哺乳動物に対して好適に投与することができるが、より好ましくはヒトである。

〔0156〕 本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートが含まれる医薬組成物において使用される物質としては、投与量や投与濃度において、この分野において通常使用される製剤添加物その他から適宜選択して適用することができる。

〔0157〕 本発明の抗TROP2抗体－薬物コンジュゲートは、1種以上の薬学的に適合性の成分を含む薬学的組成物として投与され得る。例えば、上記薬学的組成物は、代表的には、1種以上の薬学的キャリア（例えば、滅菌した液体）を含む。ここで液体には、例えば、水及び油（石油、動物起源、植物起源又は合成起源の油）が含まれる。油は、例えば、ラッカセイ油、大豆油、鮭油、ゴマ油等であってよい。水は、上記薬学的組成物が静脈内投与される場合に、より代表的なキャリアである。食塩水溶液、ならびにデキストロース水溶液及びグリセロール水溶液もまた、液体キャリアとして、特に、注射用溶液のために使用され得る。適切な薬学的賦形剤は、当該分野で公知である。上記組成物はまた、所望であれば、微量の湿潤剤又は乳化剤、或はpH緩衝化剤を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Scie

WO 2015/098699

95

PCT/JP2014/006421

n c e s」に記載される。その処方は、投与の態様に対応する。

〔0158〕 種々の送達システムが公知であり、本発明の抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートを投与するために使用され得る。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び皮下の経路を挙げることができるが、これらに限定されることはない。投与は、例えば、注入またはボーラス注射によるものであり得る。特定の好ましい実施形態において、上記リガンド薬物結合体の投与は、注入によるものである。非経口的投与は、好ましい投与経路である。

〔0159〕 代表的実施形態において、上記薬学的組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として、常習的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌の等張性の水性緩衝液中の溶液である。必要である場合、上記医薬はまた、可溶化剤及び注射部位での疼痛を和らげるための局所麻酔剤（例えば、リグノカイン）を含み得る。一般に、上記成分は、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェ等に密封してシールされた容器中の乾燥凍結乾燥粉末または無水の濃縮物として、別個に、または単位剤形中で一緒に混合して、のいずれかで供給される。上記医薬が注入によって投与される形態である場合、それは、例えば、滅菌の製薬グレードの水または食塩水を含む注入ボトルで投薬され得る。上記医薬が注射によって投与される場合、注射用滅菌水または食塩水のアンプルは、例えば、上記成分が投与前に混合され得るように、提供され得る。

〔0160〕 本発明の医薬組成物は、本願の抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートのみを含む医薬組成物であってもよいし、抗TROP2抗体-薬物コンジュゲート及び少なくとも一つのこれ以外の癌治療剤を含む医薬組成物であってもよい。本発明の抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートは、他の癌治療剤と共に投与することもでき、これによって抗癌効果を増強させることができる。この様な目的で使用される他の抗癌剤は、抗体-薬物コンジュゲートと同時に、別々に、或は連続して個体に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。この様な癌治療剤として、abraxane、

WO 2015/098099

96

PCT/JP2014/006421

paclitaxel、cisplatin、gemcitabine、irinotecan (CPT-11)、paclitaxel、pemetrexed、sorafenib、vinblastin又は国際公開第2003/038043号に記載の薬剤、更にLH-RHアナログ（リュープロレリン、ゴセレリン等）、エストラムスチン・フォスフェイト、エストロジェン拮抗薬（タモキシフェン、ラロキシフェン等）、アロマターゼ阻害剤（アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン等）等を挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。

【0161】 この様な医薬組成物は、選択された組成と必要な純度を持つ製剤として、凍結乾燥製剤或は液状製剤として製剤化すればよい。凍結乾燥製剤として製剤化する際には、この分野において使用される適当な製剤添加物が含まれる製剤であってもよい。また液剤においても同様にして、この分野において使用される各種の製剤添加物を含む液状製剤として製剤化することができる。

【0162】 医薬組成物の組成及び濃度は投与方法によっても変化するが、本発明の医薬組成物に含まれる抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートは、抗体-薬物コンジュゲートの抗原に対する親和性、すなわち、抗原に対する解離定数（ K_d 値）の点において、親和性が高い（ K_d 値が低い）ほど、少量の投与量であっても薬効を発揮させることができる。したがって、抗体-薬物コンジュゲートの投与量の決定に当たっては、抗体-薬物コンジュゲートと抗原との親和性の状況に基づいて投与量を設定することもできる。本発明の抗体-薬物コンジュゲートをヒトに対して投与する際には、例えば、約0.001～100mg/kgを1回或は1～180日間に1回の間隔で複数回投与すればよい。

実施例

【0163】 以下に示す実施例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、これらはいかなる意味においても限定的に解釈されるものではない。また、本明細書において、特に記載のない試薬、溶媒及び出発材料は、市販の供給源から容易に入手可能である。

WO 2015/098099

97

PCT/JP2014/006421

[0164] [実施例1：マウスの免疫とハイブリドーマの取得]

1-1) マウス免疫に用いる細胞の準備

5×10^6 個のNCI-H322細胞（ヒト非小細胞肺癌細胞株、ATCC CRL-5806; ATCC: American Type Culture Collection）をRPMI-1640（Roswell Park Memorial Institute-1640）培地（10ml）で5日間培養後に回収し、PBS（リン酸緩衝生理食塩水）で2回洗浄し、PBS（500 μ l）中に再懸濁した。

[0165] 1-2) マウスへの免疫

BALB/cマウス（6週齢）に対し、1回目の免疫はNCI-H322細胞（ 1×10^7 個）を腹腔内へ免疫した。2～5回目は1週間間隔で 1×10^6 個のNCI-H322細胞を腹腔内へ免疫した。6回目の最終免疫では、NCI-H322細胞を 1×10^6 細胞/200 μ l PBSで尾静脈ならびに腹腔内へそれぞれ免疫した。脾臓細胞は最終免疫から3日後に摘出した。

[0166] 1-3) 免疫したマウスの脾臓細胞の準備

免疫済みマウスの脾臓を摘出し、すりつぶしてRPMI 1640 10%FBS（ウシ胎児血清）（+）培地に懸濁した。細胞懸濁液をセルストレイナー（100 μ m、BD Falcon社）に通した後、1500rpmで5分間、室温にて遠心して上清を廃棄した。Tris-NH₄Cl溶液（20mM Tris-HCl pH7.5, 0.83%NH₄Cl; 10mL）を加え、室温で5分間処理した。細胞懸濁液にRPMI 1640FBS（+）培地（10ml）を加え、セルストレイナーに通した後、1500rpmで5分間、室温にて遠心した。上清を廃棄し、脾臓細胞をRPMI 1640 FBS（-）培地（10ml）で再懸濁した。

[0167] 1-4) ミエローマ細胞の準備

P3U1細胞（マウスミエローマ細胞株）を回収し、1500rpmで5分間、室温にて遠心した。P3U1細胞にEDTA（0.02%）溶液（10ml）を加え、37℃で5分間処理した。P3U1細胞懸濁液を1500

WO 2015/098099

98

PCT/JP2014/006421

rpmで5分間、室温にて遠心した。上清を廃棄し、RPMI 1640 FBS（－）培地（10mL）で再懸濁した。

[0168] 1－5）細胞融合

脾臓細胞とミエローマ細胞を5：1になるように混合し、遠心分離（1200rpm、5分間）した。得られた沈殿画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、ポリエチレングリコール4000（PEG4000；1mL）を約1分かけて徐々に加えた。その後該細胞液に1分毎にRPMI培地（1mL）を数回加えた後、RPMI培地を加えて全量を50mLとした。該細胞懸濁液を遠心分離（900rpm、5分間）し、得られた沈殿画分の細胞をゆるやかにほぐした後、HAT培地（10%ウシ胎児血清及びHAT Media Supplementを加えたMI1640培地；100mL）中にゆるやかに懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200μL／ウェルずつ分注し、37℃、5%CO₂のインキュベーター中で、50%コンフルエントとなるまで培養した。

[0169] 1－6）変異型アデノウイルスウイルスFZ33でのハイブリドーマのスクリーニング

NCI-H322細胞を、96ウェルプレートに5×10³細胞／ウェルで播種し、37℃で48時間培養した。細胞を150μL／ウェルのPBSで2回洗浄し、各ウェルに対して、各ハイブリドーマ培養上清（50μL）を加え4℃で1時間反応させた。150μL／ウェルのPBSで2回洗浄し、アデノウイルスA×3CAZ3-FZ33（抗体に結合するようにZ33ファイバーが改変されたβ-ガラクトシダーゼ発現アデノウイルス（米国特許出願公開第2012/0237518号明細書を参照））を3×10⁶vp／100μL（1×10³vp／細胞）の濃度になるようにRPMI1640（－）培地で希釈し、この希釈溶液を100μL／ウェルで加えた。4℃で1時間反応後、150μL／ウェルのPBSで2回洗浄した。RPMI1640 FBS（＋）培地を100μL／ウェルで加えて37℃で24時間培養した。Galacto-Light Plus Reporter Gen

WO 2015/098099

99

PCT/JP2014/006421

e Assay System (Applied Biosystems社) を使用した β -Galレポーター遺伝子アッセイで処理したNCI-H322細胞を200 μ l/ウェルのPBSで洗浄し、Lysis Solutionを50 μ l/ウェルで加えて室温で10分間静置した。この細胞溶解液(10 μ L)をGalacton-Plus Galacto Reaction Buffer Diluentで100倍に希釈し、White microwell SH 96 well plate (Nunc社)に加えて室温で1時間反応させた。Accelerator IIを150 μ l/ウェルで加え、マルチラベルカウンターWallac 1420ARV Osx (Perkin Elmer社)を用いて化学発光を5秒間測定し、1秒あたりの平均値をRLU(発光量)として、NCI-H322細胞へのウイルス感染量を表した。この様に行ったハイブリドーマ群のスクリーニングにおいて、測定値(RLU)が群全体(最小値1383RLU、平均値10914RLU、最大値78746RLU)の中で、5000RLU以上のクローンを選抜した。まず、1次スクリーニングとして、一回の細胞融合で得られた960ウェルのハイブリドーマウェルのうち81ウェルの陽性ウェルを選抜した。さらに、確認スクリーニングとして、1次スクリーニングと同様の手法により、デュプリケート(duplicate)でアッセイを行って、両方の測定値が5000RLU以上のウェルを陽性とし、1次スクリーニングで得られた81ウェルから52ウェルの陽性ウェルを選抜した。選抜したクローンは2~4回サブクロニングを行い、モノクローナルなハイブリドーマ細胞株44株を樹立した。

[0170] [実施例2：ハイブリドーマからの抗体の精製]

プリスタン(Pristane; 2, 6, 10, 14-テトラメチルベンタデカン; 0.5ml)を腹腔内投与して予め2週間飼育した8~10週齢のマウス又はヌードマウスに、実施例1で得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射した。さらに10~21日してハイブリドーマを腹水癌化させた後に腹水を採取した。得られた腹水を遠心分離して図形

WO 2015/098099

100

PCT/JP2014/006421

分を除去後、40～50%硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインG-カラムによる精製を行い、IgG又はIgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とした。

[0171] [実施例3：ハイブリドーマの産生する抗体の結合する抗原の同定]

実施例2において調製されたハイブリドーマの産生する抗体の一つであるTINA1について抗原の同定を行った。

[0172] 3-1) ビオチンラベルした細胞表面蛋白質のTINA1抗体を用いた免疫沈降

5×10⁶個のNCI-H322細胞を回収し、PBSで3回洗浄した。EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (PIERCE社) を0.1mg/mlの濃度でPBSに懸濁した。NCI-H322細胞をBiotin/PBS溶液中、室温で30分間ローテートした後に100mMグリシン/PBS溶液(25ml)で2回洗浄し、その後、PBS(25ml)で3回洗浄した。洗浄後の細胞を溶解バッファー(150mM NaCl、50mM Tris-HCl pH7.6、1%NP-40 + Protease inhibitor, Complete EDTA free (Roche社) 1粒/50ml; 2ml)中に再懸濁し、4℃で30分間処理した。Protein G Sepharose (Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare社))のバッファーを溶解バッファーに置換して得られたProtein G Sepharose/溶解バッファー(50%スラリー; 30μl)を細胞溶解液に加え、4℃で1時間ローテートした後に4℃で5分間遠心し、上清を回収した。この上清にTINA1抗体(3μg)を加え、4℃で1時間ローテートした後にProtein G Sepharose/溶解バッファー(50%スラリー; 60μl)を加え、4℃で2時間ローテートした。溶解バッファー(1ml)でProtein G Sepharoseを6回洗浄した後に1×SDSサンプルバッファー/5% 2-ME (2-メルカプトエタノール) buffer (62.5mM Tris-HCl (

WO 2015/098099

101

PCT/JP2014/006421

25℃でpH6.8)、2% (w/v) SDS、10% glycerol 及び0.01% (w/v) phenol red) に再懸濁した。100℃で5分間懸濁液を処理した後、溶液を回収し、SDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) のためのサンプルとした。

[0173] 3-2) SDS-PAGE及びウエスタンブロッティング

3-1) で調製したSDS-PAGEサンプルをReady Gels J 5-20% (BioRad社) を用いて20mAで泳動した後、ゲルよりメンブレンへ0.1mA/cm²でブロッティングした。メンブレンをPBS-T (PBS (-) -0.05% Tween20) で5分間洗浄した後、1時間ブロッキングを行った。メンブレンをPBS-Tで5分間3回洗浄した後にStreptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Amersham社; PBS-Tで2000倍に希釈して使用) と1時間反応させた。メンブレンをPBS-Tで10分間4回洗浄した後に、ECL western blotting detection reagents (Amersham社) 及びHyperfilm ECL (Amersham社) を用いて目的のバンドを検出した。実施例3-1) の手順によりビオチンラベルしたNCI-H322細胞を、既に質量分析によって抗原がTROP2であることが確定しているKC17A3抗体及びTINA1抗体で免疫沈降して得られた免疫沈降物を、それぞれDTT非添加或はDTT添加でSDS-PAGE及びウエスタンブロッティングにより解析した。KC17A3抗体とTINA1抗体を用いたいずれの場合においても、DTT非添加では分子量46kDaのバンドが、DTTを添加したサンプルでは分子量37kDaのバンドが検出された。

[0174] 3-3) FACS解析

バンドパターンからTINA1抗体の抗原がTROP2であることが予測できたため、質量分析を行わずにcDNAの遺伝子導入による強制発現解析を行った。FACS解析の結果、ヒトTROP2発現CHOK1細胞ではTINA1抗体は強陽性反応を示したため、TINA1抗体の抗原はTROP

WO 2015/098099

102

PCT/JP2014/006421

2であることが示された。また、肺癌細胞株PC14、肺癌細胞株NCI-H322、肺癌細胞株NCI-H2122、肺癌細胞株LCAM1、肺癌細胞株LC2/ad、膵癌細胞株MIPaCa2、膵癌細胞株PK-1、前立腺癌細胞株PC3、大腸癌細胞株HCT116、メラノーマ細胞株A375、卵巣癌細胞株SKOV3、造血系腫瘍細胞株RPMI8226、造血系腫瘍細胞株K562、PBMC（ヒト末梢血単核細胞）及びヒト血小板を使用して同様なFACS解析を行った。調査した肺癌細胞株はいずれもTROP2陽性であり、肺癌以外の細胞株ではPC3、PK1、SKOV3が陽性であった。一方、正常血液細胞はいずれも陰性であった。

【0175】 [実施例4：抗体内在化活性の測定]

4-1) 抗体内在化活性評価系

抗体の内在化及びイムノトキシン活性の測定を目的にリコンビナント複合蛋白質であるDT3Cを作製した。このDT3Cは、ジフテリア毒素（DT）の触媒領域とプロテインGの抗体結合領域を3個兼ね備えた蛋白質である。DT3Cは抗体のFc部分に特異的に結合し安定で、細胞内へ取り込まれると蛋白質合成阻害により細胞死を誘導する。この系を用いることで抗体の内在化とイムノトキシンによる殺細胞効果を同時に観察することができる（Yanaguchi, M., Hamada, H., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 454 (2014) 600-603）。

【0176】 4-2) DT3Cによる内在化ならびにイムノトキシン活性の評価

96well Plateに4 μ g/mLのDT3C（25 μ L）を加え、さらに実施例1又はこれに準じた方法で取得された11種のハイブリドーマの培養上清（25 μ L）を加え、室温で30分インキュベーションした。なお、TINA1抗体産生ハイブリドーマ以外のハイブリドーマが産生する抗体の認識する抗原は、CD9、CD46、CD55、CD59、CD71、CD73、CD147、CD276、EpCAM、又はEGFRであることを予め確認した。2 $\times$ 10⁴個/mL（20% Low IgG FBS加RPMI1640培地）のNCI-H322細胞（50 μ L）を播種し、室温

WO 2015/098099

103

PCT/JP2014/006421

で30分インキュベーションした後、37℃ CO₂インキュベータで3日間培養した。培養後に上清を除き、10%WST-10%FBS-RPMI 1640 (100 μL)を加え、37℃ CO₂インキュベータ内で1時間インキュベーションし、生細胞数をマイクロプレートリーダー (OD₄₅₀~OD₅₅₀, infinite 200、テカンジャパン株式会社)で測定した。評価したハイブリドーマ細胞の培養上清の中で、CD59、CD71、EGFR、EpCAM、及びTROP2に対する抗体で強い内在化ならびにイムノトキシン活性が認められた (図10)。

[0177] 4-3) CD59、CD71、EGFR、EpCAM、及びTROP2に対する抗体での内在化ならびにイムノトキシン活性の相違

96well platにDT3C (0, 0.004, 0.04, 0.4, 4, 40 μg/mL)希釈溶液 (25 μL)を加え、各抗体 (40 μg/mL; 25 μL)を加え、室温で30分インキュベーションした。さらに、2×10⁴個/mL (20%Low IgGFBS加RPMI 1640培地)のNCI-H322細胞 (50 μL)を播種し、室温で30分インキュベーションした後、37℃ CO₂インキュベータで3日間培養した。培養後に上清を除き、10%WST-1加10%FBS-RPMI 1640 (100 μL)を加え、37℃ CO₂インキュベータ内で1時間インキュベーションし、生細胞数をプレートリーダー (OD₄₅₀~OD₅₅₀)で測定した。評価した抗体の中で、TROP2に対する抗体であるTINA1の内在化ならびにイムノトキシン活性が最も強かった (図11)。

[0178] 4-4) 抗TROP2抗体の各クローンにおける内在化ならびにイムノトキシン活性の相違

実施例1又はこれに準じて取得されたTINA1 (免疫原:肺癌株NCI-H322)、KCL7A3、及びKCL2D6 (免疫原:脾臓癌株KCL-MOH1)、Pr1E11及びPr8H10 (免疫原:前立腺癌株Pc-1)、NY16及びNY17 (免疫原:脾臓癌株PK-1)並びに市販の77220 (R&D System)の各抗TROP2抗体の内在化ならびに

WO 2015/098099

104

PCT/JP2014/006421

イムノトキシン活性について実施例4-3)と同様に評価した。その結果、8種の抗TROP2抗体の中でTINA1抗体が最も強い活性を有していた(図12)。

[0179] [実施例5: TINA1抗体遺伝子の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定とキメラTINA1(以下cTINA1)抗体の作製]
5-1) TINA1抗体遺伝子の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列の決定

5-1-1) TINA1抗体産生ハイブリドーマからのmRNAの調製

TINA1抗体の可変領域を含むcDNAを増幅するため、TINA1抗体産生ハイブリドーマよりmRNA Isolation kit (Roche applied science社)を用いてmRNAを調製した。

[0180] 5-1-2) cDNA (5'-RACE-Ready cDNA)の合成
cDNA (5'-RACE-Ready cDNA)の合成は実施例5-1-1)で調製したmRNA (100ng)とSMARTer RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社)を用いて実施した。

[0181] 5-1-3) 5'-RACE PCRによるTINA1抗体の重鎖可変領域を含むcDNAの増幅と配列の決定

重鎖遺伝子の可変領域のcDNAをPCRで増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属)、及び5'-AGAGTTCCAGGTCAAGGTCACTGGCTCAGG-3' (配列番号33: プライマー mG2aVR2)の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。UPMはSMARTer RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社)に付属のものを使用し、mG2aVR2はデータベースのマウス重鎖 (IgG2a)の定常領域の配列から設計した。

このプライマーの組み合わせと、実施例5-1-2)で合成したcDNA

WO 2015/098099

105

PCT/JP2014/006421

(5' - RACE - Ready cDNA) を鋳型とした 5' - RACE PCR により TINA1 抗体の重鎖の可変領域を含む cDNA を増幅した。PCR は、Polymerase として KOD-plus (TOYOBO 社) を用い、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社) のマニュアルに従い、タッチダウン PCR プログラムで実施した。

5' - RACE PCR で増幅した重鎖の可変領域を含む cDNA を MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN 社) を用いて精製後、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen 社) を用いてクローニングし、クローニングした重鎖の可変領域を含む cDNA のヌクレオチド配列のシーケンス解析を実施した。シーケンスプライマーとして、データベースのマウス重鎖の定常領域の配列から設計した上記プライマー mG2aVR2、及び NUP (Nested Universal Primer A: SMARTer RACE cDNA Amplification Kit に付属) を用いた。

シーケンス解析は遺伝子配列解析装置 (「ABI PRISM 3700 DNA Analyzer」或は「Applied Biosystems 3730xl Analyzer」、Applied Biosystems 社) を用いて実施し、シーケンス反応は、Gene Amp 9700 (Applied Biosystems 社) を用いた。

決定された TINA1 抗体の重鎖の可変領域をコードする cDNA のヌクレオチド配列を配列表の配列番号 1 に示し、アミノ酸配列を配列番号 2 に示した。

[0182] 5-1-4) 5' - RACE PCR による TINA1 抗体の軽鎖可変領域を含む cDNA の増幅と配列の決定

TINA1 抗体の軽鎖遺伝子の可変領域の cDNA を PCR で増幅するためのプライマーとして、UPM (Universal Primer A

WO 2015/098099

106

PCT/JP2014/006421

Mix: SMARTer RACE cDNA Amplification Kitに付属) 及び5' -AGTCCAACTGTTTCAGGACGC CATTTTGTCTG-3' (配列番号34:プライマー mKVR2) の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた。UPMはSMARTer RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社) に付属のものを使用し、mKVR2はデータベースのマウス軽鎖の定常領域の配列から設計した。

このプライマーの組み合わせと、実施例5-1-2) で合成したcDNA (5' -RACE-Ready cDNA) を鋳型とした5' -RACE PCRによりTINA1抗体の軽鎖の可変領域を含むcDNAを増幅した。PCRは、PolymeraseとしてKOD-plus- (TOYOBO社) を用い、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH社) のマニュアルに従い、タッチダウンPCRプログラムで実施した。

5' -RACE PCRで増幅した軽鎖の可変領域を含むcDNAをMinElute PCR Purification Kit (QIAGEN社) を用いて精製後、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社) を用いてクローニングし、クローニングした軽鎖の可変領域を含むcDNAのヌクレオチド配列のシーケンス解析を実施した。

シーケンスプライマーとして、データベースのマウス軽鎖の定常領域の配列から設計した上記プライマーmKVR2及びNUPを用いた。

シーケンス解析及びシーケンス反応には、上述の装置を用いた。

決定されたTINA1抗体の軽鎖の可変領域をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列表の配列番号3に示し、アミノ酸配列を配列番号4に示した。

[0183] 5-2) cTINA1抗体の作製

5-2-1) キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターpCMA-LKの構築

WO 2015/098099

107

PCT/JP2014/006421

プラスミドp cDNA3, 3-TOPO/LacZ (Invitrogen社)を制限酵素XbaI及びPmeIで消化して得られる約5.4 kbのフラグメントと、配列番号5に示すヒト κ 鎖分泌シグナル及びヒト κ 鎖定常領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を、In-Fusion Advantage PCRクローニングキット (CLONTECH社)を用いて結合して、p cDNA3, 3/LKを作製した。

p cDNA3, 3/LKを鋳型として、下記プライマーセットでPCRを行い、得られた約3.8 kbのフラグメントをリン酸化後セルフライゲーションすることによりCMVプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、及びヒト κ 鎖定常領域を持つ、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターpCMA-LKを構築した。

プライマーセット

5' -tataccgctcgacctctagctagagcttggc-
3' (配列番号35:プライマー 3, 3-F1)

5' -gctatggcagggcctgccgccccgacgttg-
3' (配列番号36:プライマー 3, 3-R1)

[0184] 5-2-2) キメラ及びヒト化抗体IgG1タイプ重鎖発現ベクターpCMA-G1の構築

pCMA-LKをXbaI及びPmeIで消化して κ 鎖分泌シグナル及びヒト κ 鎖定常領域を取り除いたDNA断片と、配列番号6に示すヒト重鎖シグナル配列及びヒトIgG1定常領域のアミノ酸をコードするDNA配列を含むDNA断片を、In-Fusion Advantage PCRクローニングキット (CLONTECH社)を用いて結合して、CMVプロモーターの下流にシグナル配列、クローニングサイト、ヒトIgG1重鎖定常領域をもつキメラ及びヒト化抗体IgG1タイプ重鎖発現ベクターpCMA-G1を構築した。

[0185] 5-2-3) cTINA1抗体重鎖発現ベクターの構築

実施例5-1-3)で得られたTINA1抗体の重鎖の可変領域を含むc

WO 2015/098099

108

PCT/JP2014/006421

DNAをテンプレートとして、KOD-Plus- (TOYOBO社) と下記のプライマーセットで重鎖の可変領域をコードするcDNAを含むDNA断片を増幅し、キメラ及びヒト化IgG1タイプ重鎖発現ベクターpCMA-G1を制限酵素BspIで切断した箇所にIn-Fusion HD PCRクローニングキット (CLONTECH社) を用いて挿入することにより、cTINA1抗体重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-G1/cTINA1」と命名した。cTINA1抗体重鎖のヌクレオチド配列を配列番号7に示し、アミノ酸配列を配列番号8に示した。配列番号7のヌクレオチド配列及び配列番号8のアミノ酸配列は、図1にも記載されている。

cTINA1抗体重鎖用プライマーセット

5' -CCAGATGGGTGCTGAGCCAGATCCAGTTGGT
GCAGTCTGGACCTGAG-3' (配列番号37: プライマー TINA1H-F)

5' -CTTGGTGGAGGCTGAGCTGACGGTGACCGCG
GTCCCTGCGCCCCAGAC-3' (配列番号38: プライマー TINA1H-R)

[0186] 5-2-4) cTINA1抗体軽鎖発現ベクターの構築

実施例5-1-4) で得られたTINA1抗体の軽鎖の可変領域を含むcDNAをテンプレートとして、KOD-Plus- (TOYOBO社) と下記のプライマーセットで軽鎖の可変領域をコードするcDNAを含むDNA断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現汎用ベクターpCMA-LKを制限酵素BsiWIで切断した箇所にIn-Fusion HD PCRクローニングキット (CLONTECH社) を用いて挿入することにより、cTINA1抗体の軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-LK/cTINA1」と命名した。cTINA1抗体の軽鎖のヌクレオチド配列を配列表の配列番号9に示し、アミノ酸配列を配列番号10に示した。配列番号9のヌクレオチド配列及び配列番号10のアミノ酸配

WO 2015/098099

109

PCT/JP2014/006421

列は、図2にも記載されている。

cTINA1抗体軽鎖用プライマーセット

5' -ATCTCCGGCGCGTACGGCGACATTGTGATGA
CCCAGTCTCACAAATTC-3' (配列番号39:プライマー
TINA1L-F)

5' -GGAGGGGGCGGGCCACAGCCCGTTTCAGCTCC
AGCTTGGTCCCAGC-3' (配列番号40:プライマー TINA
A1L-R)

[0187] 5-2-5) cTINA1抗体の小スケール生産

FreeStyle 293F細胞 (Invitrogen社) はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。

対数増殖期の 1×10^7 個のFreeStyle 293F細胞 (Invitrogen社) をFreeStyle293 expression medium (Invitrogen社) で9.6mLに希釈した後に、30mL Square Storage Bottle (Nalgene社) に播種し、37℃、8%CO₂インキュベーター内で90rpmで一時間振とう培養した。Polyethyleneimine (Polyscience #24765; 30μg) をOpti-Pro SFM (Invitrogen社; 200μL) に溶解し、次にPureLink HiPure Plasmidキット (Invitrogen社) を用いて調製した軽鎖発現ベクター (6μg) 及び重鎖発現ベクター (4μg) をOpti-Pro SFM (Invitrogen社; 200μL) に添加した。Polyethyleneimine/Opti-Pro SFM混合液 (200μL) に、発現ベクター/Opti-Pro SFM混合液 (200μL) を加え穏やかに攪拌し、さらに5分間放置した後にFreeStyle 293F細胞に添加した。37℃、8%CO₂インキュベーターで7日間、90rpmで振とう培養して得られた培養上清をMinisart-Plus filter (Sartorius社) でろ過して評価用のサンプルとした

WO 2015/098099

110

PCT/JP2014/006421

。

pCMA-G1/cTINA1とpCMA-LK/cTINA1との組合せによって取得されたヒトキメラTINA1抗体を「cTINA1抗体」と命名した。

[0188] [実施例6：マウス抗TROP2モノクローナル抗体のヒト化抗体の設計]

6-1) TINA1のヒト化バージョンの設計

6-1-1) TINA1の可変領域の分子モデリング

TINA1の可変領域の分子モデリングは、相溶性モデリングとして公知の方法 (Methods in Enzymology, 203, 121-153 (1991)) によって実行された。Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)) に登録されるヒト免疫グロブリンの可変領域の1次配列 (X線結晶構造から誘導される三次元構造が入手可能) を、先に決定されたTINA1の可変領域と比較した。結果として、1ZEAが、TINA1の重鎖の可変領域に対して同様にフレームワーク中に欠損がある抗体の中で、最も高い配列相溶性を有するとして選択された。また、3IU4が、TINA1の軽鎖の可変領域に対して最も高い配列相溶性を有するとして選択された。フレームワーク領域の三次元構造は、TINA1の重鎖及び軽鎖に対応する1ZEA及び3IU4の座標を組み合わせて、「フレームワークモデル」を得ることによって作製された。次いで、それぞれのCDRについての代表的なコンホメーションがフレームワークモデルに組み込まれた。

最後に、エネルギーの点でTINA1の可変領域の可能性のある分子モデルを得るために、不利な原子間接触を除くためのエネルギー計算を行った。上記手順を、市販の蛋白質立体構造解析プログラムDiscovery Studio (Accelrys, Inc.) を用いて行った。

[0189] 6-1-2) ヒト化TINA1に対するアミノ酸配列の設計

ヒト化TINA1抗体の構築を、CDRグラフトイング (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989

WO 2015/098099

111

PCT/JP2014/006421

))として公知の方法によって行った。アクセプター抗体は、フレームワーク領域内のアミノ酸相同性に基づいて選択された。TINA1のフレームワーク領域の配列を、抗体のアミノ酸配列のKabatデータベース(Nuc. Acid Res., 29, 205-206(2001))の全てのヒトフレームワークと比較し、結果として、HuPR1A3抗体がフレームワーク領域についての74%の配列相同性に起因して、アクセプターとして選択された。HuPR1A3についてのフレームワーク領域のアミノ酸残基を、TINA1についてのアミノ酸残基と整列させ、異なるアミノ酸が使用される位置を同定した。これらの残基の位置は、上で構築されたTINA1の三次元モデルを使用して分析され、そしてアクセプター上にグラフティングされるべきドナー残基が、Queen et. al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989))によって与えられる基準によって選択された。選択されたいくつかのドナー残基をアクセプター抗体に移入することによって、ヒト化TINA1配列を以下の実施例に記載される様に構築した。

[0190] 6-2) TINA1重鎖のヒト化

6-2-1) hTINA1-H1タイプ重鎖:

配列表の配列番号8に示されるTINA1重鎖のアミノ酸番号21(イソロイシン)をバリンに、アミノ酸番号28(プロリン)をアラニンに、アミノ酸番号30(ロイシン)をバリンに、アミノ酸番号35(グルタミン酸)をアラニンに、アミノ酸番号36(スレオニン)をセリンに、アミノ酸番号38(アルギニン)をリシンに、アミノ酸番号39(イソロイシン)をバリンに、アミノ酸番号57(グルタミン)をアルギニンに、アミノ酸番号58(リシン)をグルタミンに、アミノ酸番号59(メチオニン)をアラニンに、アミノ酸番号62(リシン)をグルタミンに、アミノ酸番号65(リシン)をグルタミン酸に、アミノ酸番号67(イソロイシン)をメチオニンに、アミノ酸番号87(フェニルアラニン)をバリンに、アミノ酸番号88(アラニン)をスレオニンに、アミノ酸番号89(フェニルアラニン)をイソロ

WO 2015/098099

112

PCT/JP2014/006421

イシんに、アミノ酸番号91（ロイシン）をアラニンに、アミノ酸番号92（グルタミン酸）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号95（アラニン）をスレオニンに、アミノ酸番号102（イソロイシン）をロイシンに、アミノ酸番号104（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号107（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号111（スレオニン）をアラニンに、アミノ酸番号112（スレオニン）をバリンに、アミノ酸番号114（フェニルアラニン）をチロシンに、アミノ酸番号132（アラニン）をグルタミンに、アミノ酸番号135（アラニン）をロイシンに、置き換えることを伴い設計されたヒト化TINA1重鎖を「hTINA1-H1タイプ重鎖」と命名した。

hTINA1-H1タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号12に記載されている。配列番号12のアミノ酸配列の1乃至19番目のアミノ酸残基からなる配列、20乃至140番目のアミノ酸残基からなる配列、141乃至470番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号12のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号11に記載されている。配列番号11のヌクレオチド配列の1乃至57番目のヌクレオチドからなる配列、58乃至420番目のヌクレオチドからなる配列、421乃至1410番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号11のヌクレオチド配列及び配列番号12のアミノ酸配列は、図3にも記載されている。

【0191】 6-2-2) hTINA1-H2タイプ重鎖：

配列表の配列番号8に示されるTINA1重鎖のアミノ酸番号21（イソロイシン）をバリンに、アミノ酸番号28（プロリン）をアラニンに、アミノ酸番号30（ロイシン）をバリンに、アミノ酸番号35（グルタミン酸）をアラニンに、アミノ酸番号36（スレオニン）をセリンに、アミノ酸番号38（アルギニン）をリシンに、アミノ酸番号39（イソロイシン）をバリンに、アミノ酸番号57（グルタミン）をアルギニンに、アミノ酸番号58

WO 2015/098099

113

PCT/JP2014/006421

(リシン)をグルタミンに、アミノ酸番号59(メチオニン)をアラニンに、アミノ酸番号62(リシン)をグルタミンに、アミノ酸番号65(リシン)をグルタミン酸に、アミノ酸番号67(イソロイシン)をメチオニンに、アミノ酸番号87(フェニルアラニン)をバリンに、アミノ酸番号88(アラニン)をスレオニンに、アミノ酸番号89(フェニルアラニン)をイソロイシンに、アミノ酸番号92(グルタミン酸)をアスパラギン酸に、アミノ酸番号95(アラニン)をスレオニンに、アミノ酸番号102(イソロイシン)をロイシンに、アミノ酸番号104(アスパラギン)をセリンに、アミノ酸番号107(アスパラギン)をセリンに、アミノ酸番号111(スレオニン)をアラニンに、アミノ酸番号112(スレオニン)をバリンに、アミノ酸番号114(フェニルアラニン)をチロシンに、アミノ酸番号132(アラニン)をグルタミンに、アミノ酸番号135(アラニン)をロイシンに、置き換えることを伴い設計されたヒト化TINA1重鎖を「hTINA1-H2タイプ重鎖」と命名した。

hTINA1-H2タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号14に記載されている。配列番号14のアミノ酸配列の1乃至19番目のアミノ酸残基からなる配列、20乃至140番目のアミノ酸残基からなる配列、141乃至470番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号14のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号13に記載されている。配列番号13のヌクレオチド配列の1乃至57番目のヌクレオチドからなる配列、58乃至420番目のヌクレオチドからなる配列、421乃至1410番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号13のヌクレオチド配列及び配列番号14のアミノ酸配列は、図4にも記載されている。

[0192] 6-2-3) hTINA1-H3タイプ重鎖：

配列表の配列番号8に示されるTINA1重鎖のアミノ酸番号28(プロリン)をアラニンに、アミノ酸番号30(ロイシン)をバリンに、アミノ酸

WO 2015/098099

114

PCT/JP2014/006421

番号36（スレオニン）をセリンに、アミノ酸番号38（アルギニン）をロイシンに、アミノ酸番号39（イソロイシン）をバリンに、アミノ酸番号58（リシン）をグルタミンに、アミノ酸番号65（リシン）をグルタミン酸に、アミノ酸番号67（イソロイシン）をメチオニンに、アミノ酸番号87（フェニルアラニン）をバリンに、アミノ酸番号88（アラニン）をスレオニンに、アミノ酸番号92（グルタミン酸）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号95（アラニン）をスレオニンに、アミノ酸番号102（イソロイシン）をロイシンに、アミノ酸番号104（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号107（アスパラギン）をセリンに、アミノ酸番号111（スレオニン）をアラニンに、アミノ酸番号112（スレオニン）をバリンに、アミノ酸番号114（フェニルアラニン）をチロシンに、アミノ酸番号132（アラニン）をグルタミンに、アミノ酸番号135（アラニン）をロイシンに、置き換えることを伴い設計されたヒト化TINA1重鎖を「hTINA1-H3タイプ重鎖」と命名した。

hTINA1-H3タイプ重鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号16に記載されている。配列番号16のアミノ酸配列の1乃至19番目のアミノ酸残基からなる配列、20乃至140番目のアミノ酸残基からなる配列、141乃至470番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域、重鎖定常領域に相当する。配列番号16のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号15に記載されている。配列番号15のヌクレオチド配列の1乃至57番目のヌクレオチドからなる配列、58乃至420番目のヌクレオチドからなる配列、421乃至1410番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、重鎖可変領域配列、重鎖定常領域配列をコードしている。配列番号15のヌクレオチド配列及び配列番号16のアミノ酸配列は、図5にも記載されている。

[0193] 6-3) TINA1軽鎖のヒト化

6-3-1) hTINA1-L1タイプ軽鎖:

配列表の配列番号10に示されるTINA1軽鎖のアミノ酸番号23（バ

WO 2015/098099

115

PCT/JP2014/006421

リン)をグルタミンに、アミノ酸番号28(ヒスチジン)をプロリンに、アミノ酸番号29(リシン)をセリンに、アミノ酸番号30(フェニルアラニン)をセリンに、アミノ酸番号31(メチオニン)をロイシンに、アミノ酸番号33(スレオニン)をアラニンに、アミノ酸番号40(セリン)をスレオニンに、アミノ酸番号62(グルタミン)をリシンに、アミノ酸番号63(セリン)をアラニンに、アミノ酸番号80(アスパラギン酸)をセリンに、アミノ酸番号83(スレオニン)をセリンに、アミノ酸番号90(アラニン)をアスパラギン酸に、アミノ酸番号93(フェニルアラニン)をロイシンに、アミノ酸番号98(バリン)をロイシンに、アミノ酸番号100(アラニン)をプロリンに、アミノ酸番号103(ロイシン)をフェニルアラニンに、アミノ酸番号120(アラニン)をグルタミンに、アミノ酸番号126(ロイシン)をイソロイシンに、アミノ酸番号129(アラニン)をスレオニンに、置き換えることを伴い設計されたヒト化TINA1軽鎖を「hTINA1-L1タイプ軽鎖」と命名した。

hTINA1-L1タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号18に記載されている。配列番号18のアミノ酸配列の1乃至20番目のアミノ酸残基からなる配列、21乃至129番目のアミノ酸残基からなる配列、130乃至234番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号18のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号17に記載されている。配列番号17のヌクレオチド配列の1乃至60番目のヌクレオチドからなる配列、61乃至387番目のヌクレオチドからなる配列、388乃至702番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号17のヌクレオチド配列及び配列番号18のアミノ酸配列は、図6にも記載されている。

[0194] 6-3-2) hTINA1-L2タイプ軽鎖:

配列表の配列番号10に示されるTINA1軽鎖のアミノ酸番号28(ヒスチジン)をプロリンに、アミノ酸番号29(リシン)をセリンに、アミノ

WO 2015/098099

116

PCT/JP2014/006421

酸番号30（フェニルアラニン）をセリンに、アミノ酸番号31（メチオニン）をロイシンに、アミノ酸番号33（スレオニン）をアラニンに、アミノ酸番号40（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号62（グルタミン）をリシンに、アミノ酸番号63（セリン）をアラニンに、アミノ酸番号80（アスパラギン酸）をセリンに、アミノ酸番号83（スレオニン）をセリンに、アミノ酸番号90（アラニン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号93（フェニルアラニン）をロイシンに、アミノ酸番号98（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号100（アラニン）をプロリンに、アミノ酸番号103（ロイシン）をフェニルアラニンに、アミノ酸番号120（アラニン）をグルタミンに、アミノ酸番号126（ロイシン）をイソロイシンに、アミノ酸番号129（アラニン）をスレオニンに、置き換えることを伴い設計されたヒト化TINA1軽鎖を「hTINA1-L2タイプ軽鎖」と命名した。

hTINA1-L2タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号20に記載されている。配列番号20のアミノ酸配列の1乃至20番目のアミノ酸残基からなる配列、21乃至129番目のアミノ酸残基からなる配列、130乃至234番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号20のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号19に記載されている。配列番号19のヌクレオチド配列の1乃至60番目のヌクレオチドからなる配列、61乃至387番目のヌクレオチドからなる配列、388乃至702番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号19のヌクレオチド配列及び配列番号20のアミノ酸配列は、図7にも記載されている。

【0195】 6-3-3) hTINA1-L3タイプ軽鎖：

配列表の配列番号10に示されるTINA1軽鎖のアミノ酸番号28（ヒスチジン）をプロリンに、アミノ酸番号29（リシン）をセリンに、アミノ酸番号30（フェニルアラニン）をセリンに、アミノ酸番号31（メチオニン）をロイシンに、アミノ酸番号33（スレオニン）をアラニンに、アミノ

WO 2015/098099

117

PCT/JP2014/006421

酸番号40（セリン）をスレオニンに、アミノ酸番号62（グルタミン）をリシンに、アミノ酸番号63（セリン）をグルタミンに、アミノ酸番号80（アスパラギン酸）をセリンに、アミノ酸番号83（スレオニン）をセリンに、アミノ酸番号90（アラニン）をアスパラギン酸に、アミノ酸番号93（フェニルアラニン）をロイシンに、アミノ酸番号98（バリン）をロイシンに、アミノ酸番号100（アラニン）をプロリンに、アミノ酸番号103（ロイシン）をフェニルアラニンに、アミノ酸番号120（アラニン）をグルタミンに、アミノ酸番号126（ロイシン）をイソロイシンに、アミノ酸番号129（アラニン）をスレオニンに、置き換えることを伴い設計されたヒト化TINA1軽鎖を「hTINA1-L3タイプ軽鎖」と命名した。

hTINA1-L3タイプ軽鎖のアミノ酸配列は、配列表の配列番号22に記載されている。配列番号22のアミノ酸配列の1乃至20番目のアミノ酸残基からなる配列、21乃至129番目のアミノ酸残基からなる配列、130乃至234番目のアミノ酸残基からなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域、軽鎖定常領域に相当する。配列番号22のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、配列表の配列番号21に記載されている。配列番号21のヌクレオチド配列の1乃至60番目のヌクレオチドからなる配列、61乃至387番目のヌクレオチドからなる配列、388乃至702番目のヌクレオチドからなる配列が、それぞれシグナル配列、軽鎖可変領域配列、軽鎖定常領域配列をコードしている。配列番号21のヌクレオチド配列及び配列番号22のアミノ酸配列は、図8にも記載されている。

[0196] [実施例7：hTINA1抗体発現ベクターの構築と抗体の生産]

7-1) hTINA1の重鎖発現ベクターの構築

7-1-1) hTINA1-H1発現ベクターの構築

配列表の配列番号11に示すhTINA1-H1のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至437に示されるhTINA1-H1の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した（GENEART社 人工遺伝子合成サービス）。合成したDNA断片をテンプレートとして、KO

WO 2015/098099

118

PCT/JP2014/006421

D-Plus- (TOYOBO社) と下記のプライマーセットでhTINA1-H1の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体IgG1タイプ重鎖発現ベクターpCMA-G1を制限酵素B1pIで切断した箇所にIn-Fusion HD PCRクローニングキット (CLONTECH社) を用いて挿入することによりhTINA1-H1発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-G1/hTINA1-H1」と命名した。

プライマーセット

5' - agctcccagatgggtgctgagc-3' (配列番号41: プライマー EG-Inf-F)

5' - gggcccttggtggaggctgagc-3' (配列番号42: プライマー EG1-Inf-R)

[0197] 7-1-2) hTINA1-H2発現ベクターの構築

配列表の配列番号13に示すhTINA1-H2のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至437に示されるhTINA1-H2の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成し (GENEART社 人工遺伝子合成サービス)、実施例7-1-1) と同様の方法でhTINA1-H2発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-G1/hTINA1-H2」と命名した。

[0198] 7-1-3) hTINA1-H3発現ベクターの構築

配列表の配列番号15に示すhTINA1-H3のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至437に示されるhTINA1-H3の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成し (GENEART社 人工遺伝子合成サービス)、実施例7-1-1) と同様の方法でhTINA1-H3発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-G1/hTINA1-H3」と命名した。

[0199] 7-2) hTINA1の軽鎖発現ベクターの構築

7-2-1) hTINA1-L1発現ベクターの構築

WO 2015/098099

119

PCT/JP2014/006421

配列表の配列番号17に示すhTINA1-L1のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号38乃至402に示されるhTINA1-L1の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成した（GENEART社 人工遺伝子合成サービス）。合成したDNA断片をテンプレートとして、KOD-Plus（TOYOBO社）と下記のプライマーセットでhTINA1-L1の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を増幅し、キメラ及びヒト化抗体軽鎖発現ベクターpCMA-LKを制限酵素BsiWIで切断した箇所にIn-Fusion HD PCRクローニングキット（CLONTECH社）を用いて挿入することによりhTINA1-L1発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-LK/hTINA1-L1」と命名した。

プライマーセット

5'-ctgtggatctccggcgcgctacggc-3'（配列番号43：プライマー CM-LKF）

5'-ggagggggcgggccaccgtaacg-3'（配列番号44：プライマー

KCL-Inf-R）

[0200] 7-2-2) hTINA1-L2発現ベクターの構築

配列表の配列番号19に示すhTINA1-L2のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号38乃至402に示されるhTINA1-L2の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成し（GENEART社 人工遺伝子合成サービス）、実施例7-2-1）と同様の方法でhTINA1-L2発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-LK/hTINA1-L2」と命名した。

[0201] 7-2-3) hTINA1-L3発現ベクターの構築

配列表の配列番号21に示すhTINA1-L3のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号38乃至402に示されるhTINA1-L3の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成し（GENEART社 人工

WO 2015/098099

120

PCT/JP2014/006421

遺伝子合成サービス)、実施例7-2-1)と同様の方法でhTINA1-L3発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-LK/hTINA1-L3」と命名した。

[0202] 7-3) hTINA1抗体の生産と精製

7-3-1) hTINA1抗体の小スケール生産

実施例5-2-5)と同様の方法で生産した。

pCMA-G1/hTINA1-H1とpCMA-LK/hTINA1-L1との組合せによって取得されたhTINA1抗体を「hTINA1-H1L1」、pCMA-G1/hTINA1-H2とpCMA-LK/hTINA1-L1との組合せによって取得されたhTINA1抗体を「hTINA1-H2L1」、pCMA-G1/hTINA1-H2とpCMA-LK/hTINA1-L2との組合せによって取得されたhTINA1抗体を「hTINA1-H2L2」、及びpCMA-G1/hTINA1-H3とpCMA-LK/hTINA1-L3との組合せによって取得されたhTINA1抗体を「hTINA1-H3L3」と命名した。

[0203] 7-3-2) hTINA1抗体の生産

hTINA1-H1L1、hTINA1-H2L1、hTINA1-H2L2、及びhTINA1-H3L3を以下の方法で生産した。

FreeStyle 293F細胞(Invitrogen社)はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期の 1.2×10^6 個のFreeStyle 293F細胞(Invitrogen社)を3L Fernbach Erlenmeyer Flask(CORNING社)に播種し、FreeStyle293 expression medium(Invitrogen社)で希釈して 1.0×10^6 細胞/mlに調製した後に、37℃、8%CO₂インキュベーター内で90rpmで一時間振とう培養した。Polyethyleneimine(Polyscience #24765;3.6mg)をOpti-Pro SFM(Invitrogen社;20ml)に溶解し、次にPureLink HiPure Pl

WO 2015/098099

121

PCT/JP2014/006421

asmidキット (Invitrogen社) を用いて調製した軽鎖発現ベクター (0.8 mg) 及び重鎖発現ベクター (0.4 mg) をOpti-Pro SFM (Invitrogen社; 20 ml) に添加した。Polyethyleneimine/Opti-Pro SFM混合液 (20 ml) に、発現ベクター/Opti-Pro SFM混合液 (20 ml) を加えて穏やかに攪拌し、さらに5分間放置した後にFreeStyle 293 F細胞に添加した。37℃、8%CO₂インキュベーターで7日間、90 rpmで振とう培養して得られた培養上清をDisposable Capsule Filter (ADVANTEC #CCS-045-E1H) でろ過した。

[0204] 7-3-3) hTINA1抗体の精製

上記7-3-2) で得られた培養上清から抗体を、rProteinAアフィニティークロマトグラフィー (4-6℃) とセラミックハイドロキシアパタイト (室温) の2段階工程で精製した。rProteinAアフィニティークロマトグラフィー精製後とセラミックハイドロキシアパタイト精製後のバッファー置換工程は4-6℃で実施した。最初に、培養上清を、PBSで平衡化したMabSelect SuRe (GE Healthcare Bioscience社製、HiTrapカラム) にアブライした。培養上清がカラムに全て入った後、カラム容量2倍以上のPBSでカラムを洗浄した。次に2Mアルギニン塩酸塩溶液 (pH4.0) で溶出し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析 (Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) によりPBSに置換した後、5mMリン酸ナトリウム/50mM MES/pH7.0のバッファーで5倍希釈した抗体溶液を、5mM NaPi/50mM MES/30mM NaCl/pH7.0のバッファーで平衡化されたセラミックハイドロキシアパタイトカラム (日本バイオラッド、Bio-Scale CHTType-1 Hydroxyapatite Column) にアブライした。塩化ナトリウムによる直線的濃度勾配溶出を実施

WO 2015/098099

122

PCT/JP2014/006421

し、抗体の含まれる画分を集めた。その画分を透析（Thermo Scientific社、Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette）によりHBSor（25mM ヒスチジン／5% ソルビトール、pH6.0）への液置換を行った。最後にCentrifugal UF Filter Device VIVASPIN20（分画分子量UF10K, Sartorius社、4℃）にて濃縮し、IgG濃度を20mg／ml以上に調整し精製サンプルとした。

【0205】 [参考例1：hRS7抗体発現ベクターの作製と抗体の生産]

hRS7抗体は、国際公開第2003/074566号に記載されている軽鎖、及び重鎖のアミノ酸配列をもとに作製した。

1-1) hRS7抗体重鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号29に示すhRS7抗体重鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号36乃至437に示されるhRS7抗体重鎖の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成し（GENEART社 人工遺伝子合成サービス）、実施例7-1-1)と同様の方法でhRS7抗体重鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-G1/hRS7」と命名した。hRS7抗体重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号30に示した。

【0206】 1-2) hRS7抗体軽鎖発現ベクターの構築

配列表の配列番号31に示すhRS7抗体軽鎖のヌクレオチド配列のヌクレオチド番号38乃至402に示されるhRS7抗体軽鎖の可変領域をコードするDNA配列を含むDNA断片を合成し（GENEART社 人工遺伝子合成サービス）、実施例7-2-1)と同様の方法でhRS7抗体軽鎖発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを「pCMA-LK/hRS7」と命名した。hRS7抗体重鎖のアミノ酸配列を配列表の配列番号32に示した。

【0207】 1-3) hRS7抗体の生産と精製

1-3-1) hRS7抗体の生産

WO 2015/098099

123

PCT/JP2014/006421

hRS7抗体はpCMA-G1/hRS7とpCMA-LK/hRS7との組合せにより実施例7-3-2)と同様の方法で生産した。

[0208] 1-3-2) hRS7抗体の精製

上記1-3-1)で得られた培養上清から実施例7-3-3)と同様の方法で精製した。

[0209] [実施例8: hTINA1抗体及びhRS7抗体の抗原結合能の測定]

8-1) 小スケール生産の抗体(培養上清)を用いた抗原結合能の測定

抗体と抗原(Recombinant Human TROP-2 Fc chimera)との解離定数測定は、Biacore 3000(GEヘルスケアバイオサイエンス(株))を使用し、固定化した抗ヒトIgG(Fab)抗体に抗体をリガンドとして捕捉(キャプチャー)し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒトIgG(Fab)抗体(Human Fab capture kit, GEヘルスケアバイオサイエンス(株))は、センサーチップCM5(BIAcore, Inc.)へアミンカップリング法にて約2000RU共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとしてHBS-EP+(10mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Surfactant P20)を用いた。抗ヒトIgG(Fab)抗体を固定化したチップ上に、抗体を含む培養上清を約80秒間添加した後、抗原の希釈系列溶液(1-1000nM)を流速30μl/分で300秒間添加し、引き続き600秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、20%DMSOを含む10mM Gly-HCl pH1.5を流速10μl/分で60秒間添加した。データの解析には、分析ソフトウェア(BIAevaluation software, version 4.1)のBivalent結合モデルを用いて、結合速度定数 k_{on} 、解離速度定数 k_{off} 及び解離定数(KD; $KD=k_{off}/k_{on}$)を算出した。

[0210]

WO 2015/098099

124

PCT/JP2014/006421

[表1]

	名称	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	6.3E-08
2	hTINA1-H2L1	6.9E-08
3	hTINA1-H2L2	7.1E-08
4	hTINA1-H3L3	5.8E-08
5	cTINA1	5.6E-08

抗体サンプルとして培養上清を用いた結合活性

[0211] 8-2) 精製抗体を用いた抗原結合能の測定

抗体と抗原 (Recombinant Human TROP-2 Fc chimera) との解離定数測定は、Biacore 3000 (GEヘルスケアバイオサイエンス (株)) を使用し、固定化した抗ヒトIgG (Fab) 抗体に抗体をリガンドとして捕捉 (キャプチャー) し、抗原をアナライトとして測定するキャプチャー法にて行った。抗ヒトIgG (Fab) 抗体 (Human Fab capture kit, GEヘルスケアバイオサイエンス (株)) は、センサーチップCM5 (BIAcore, Inc.) ヘアミンカップリング法にて約2000RU共有結合させた。リファレンスセルにも同様に固定化した。ランニングバッファーとしてHBS-EP + (10mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Surfactant P20) を用いた。抗ヒトIgG (Fab) 抗体を固定化したチップ上に、抗体を約1分間添加した後、抗原の希釈系列溶液 (1-1000nM) を流速30μl/分で300秒間添加し、引き続き600秒間の解離相をモニターした。再生溶液として、ランニングバッファーにて希釈した25mM NaOHを流速100μl/分

WO 2015/098099

125

PCT/JP2014/006421

で3秒間、2回添加した。データの解析は、上記方法により行った。

[0212] [表2]

	名称	KD (M)
1	hTINA1-H1L1	2.7E-08
2	hTINA1-H2L1	3.0E-08
3	hTINA1-H2L2	2.7E-08
4	hTINA1-H3L3	1.5E-08
5	hRS7	3.0E-10

抗体サンプルとして精製抗体を用いた結合活性測定

[0213] [実施例9：hTINA1-H1L1 ADCの作製（1）]

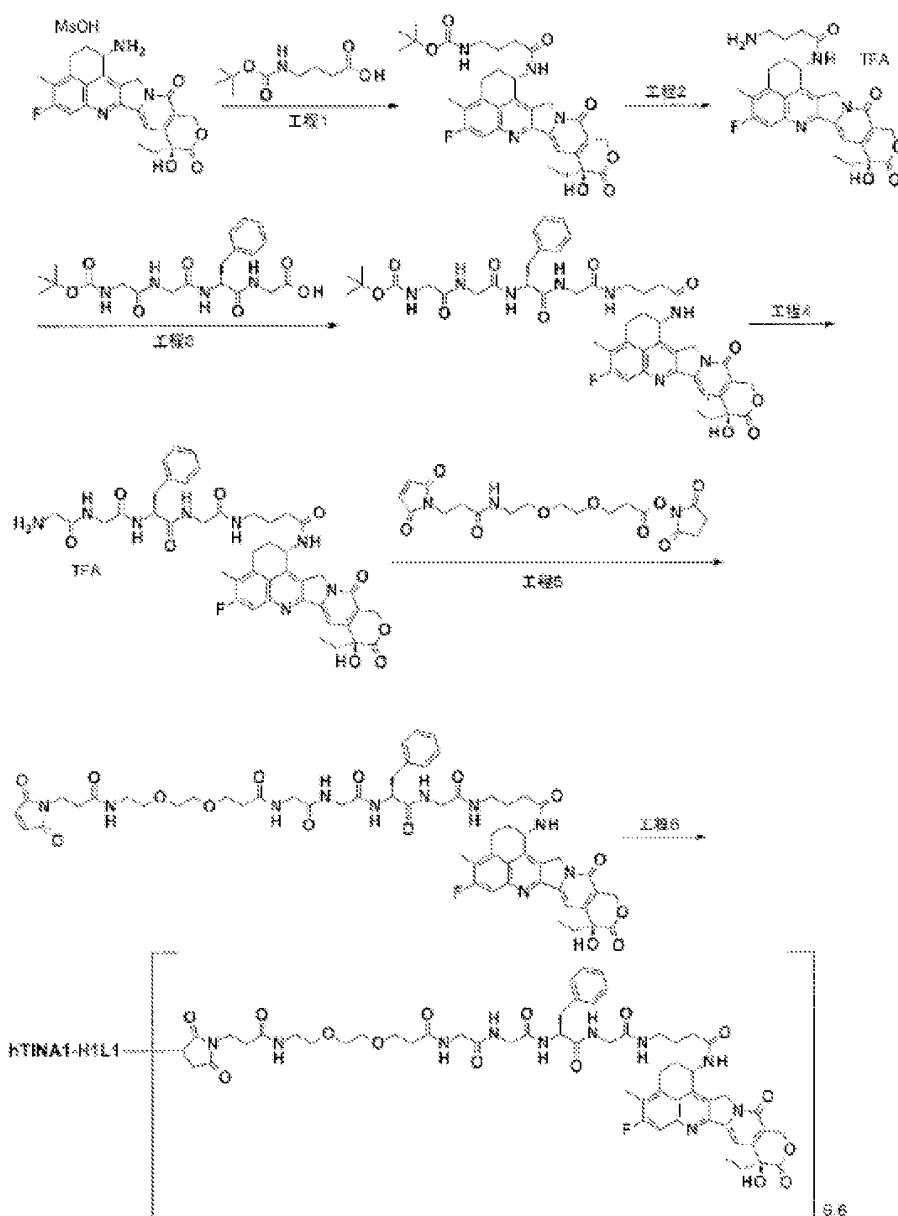
[0214]

WO 2015/098099

126

PCT/JP2014/006421

[化25]



[0215] 工程1: *tert*-ブチル (4- { [(1*S*, 9*S*) -9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1*H*, 12*H*-ベンゾ[*d,e*]ピラ

WO 2015/098099

127

PCT/JP2014/006421

ノ〔3′, 4′ : 6, 7〕インドリジノ〔1, 2-b〕キノリン-1-イル
] アミノ)-4-オキソブチル) カーバメート

4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ブタン酸(0.237g、
1.13mmol)をジクロロメタン(10mL)に溶解し、N-ヒドロキ
シスクシンイミド(0.130g、1.13mmol)、及び1-エチル-
3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(0.216g
、1.13mmol)を加えて1時間攪拌した。エキサデカンのメシル酸塩
(0.500g、0.94mmol)、及びトリエチルアミン(0.157
mL、1.13mmol)を加えたN,N-ジメチルホルムアミド溶液(1
0mL)に滴下し、室温にて一日間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた
残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔クロロホルム〜クロロホル
ム:メタノール=8:2(v/v)〕にて精製し、標記化合物(0.595
g、定量的)を得た。

¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 0.87(3H, t, J=7.2Hz), 1.31(9H, s), 1.58(1H, t, J=7.2Hz), 1.66(2H, t, J=7.2Hz), 1.89-1.82(2H, m), 2.12-2.21(3H, m), 2.39(3H, s), 2.92(2H, t, J=6.5Hz), 3.17(2H, s), 5.16(1H, d, J=19.2Hz), 5.24(1H, d, J=18.8Hz), 5.42(2H, s), 5.59-5.55(1H, m), 6.53(1H, s), 6.78(1H, t, J=6.3Hz), 7.30(1H, s), 7.79(1H, d, J=11.0Hz), 8.40(1H, d, J=8.6Hz).

MS(APCI) m/z: 621 (M+H)⁺.

[0216] 工程2: 4-アミノ-N-[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-
9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10,
13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ〔3′,
4′ : 6, 7〕インドリジノ〔1, 2-b〕キノリン-1-イル〕ブタンア

WO 2015/098099

128

PCT/JP2014/006421

ミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程1で得た化合物(0.388g、0.61mmol)をジクロロメタン(9mL)に溶解した。トリフルオロ酢酸(9mL)を加えて4時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔クロロホルム〜クロロホルム：メタノール：水＝7：3：1（v/v/v）の分配有機層〕にて精製し、標記化合物(0.343g、定量的)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 1.79–1.92 (4H, m), 2.10–2.17 (2H, m), 2.27 (2H, t, $J=7.0\text{Hz}$), 2.40 (3H, s), 2.80–2.86 (2H, m), 3.15–3.20 (2H, m), 5.15 (1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.26 (1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.42 (2H, s), 5.54–5.61 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.32 (1H, s), 7.72 (3H, brs), 7.82 (1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 8.54 (1H, d, $J=8.6\text{Hz}$).

MS (APCI) m/z : 521 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[0217] 工程3: N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-(4-{[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-4-オキソブチル)グリシンアミド

N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシルグリシル-L-フェニルアラニルグリシン(0.081g、0.19mmol)をジクロロメタン(3mL)に溶解し、N-ヒドロキシスクシンイミド(0.021g、0.19mmol)及び、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(0.036g、0.19mmol)を加えて3.5時間攪

WO 2015/098099

129

PCT/JP2014/006421

拌した。その反応溶液を上記工程2で得た化合物(0.080g、0.15mmol)を加えたN,N-ジメチルホルムアミド溶液(1.5mL)に滴下し、室温にて4時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔クロロホルム〜クロロホルム：メタノール＝8：2(v/v)〕にて精製し、標記化合物(0.106g、73%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.36 (9H, s), 1.71 (2H, m), 1.86 (2H, t, $J=7.8\text{Hz}$), 2.15–2.19 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.77 (1H, dd, $J=12.7, 8.8\text{Hz}$), 3.02 (1H, dd, $J=14.1, 4.7\text{Hz}$), 3.08–3.11 (2H, m), 3.16–3.19 (2H, m), 3.54 (2H, d, $J=5.9\text{Hz}$), 3.57–3.77 (4H, m), 4.46–4.48 (1H, m), 5.16 (1H, d, $J=19.2\text{Hz}$), 5.25 (1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.42 (2H, s), 5.55–5.60 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.00 (1H, t, $J=6.3\text{Hz}$), 7.17–7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.71 (1H, t, $J=5.7\text{Hz}$), 7.80 (1H, d, $J=11.0\text{Hz}$), 7.92 (1H, t, $J=5.7\text{Hz}$), 8.15 (1H, d, $J=8.2\text{Hz}$), 8.27 (1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 8.46 (1H, d, $J=8.2\text{Hz}$).

MS (APCI) m/z : 939 (M+H) $^+$.

[0218] 工程4: グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-(4-{[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-4-オキソブチル)グリシンアミドトリフルオロ酢酸塩

WO 2015/098099

130

PCT/JP2014/006421

上記工程3で得た化合物(1.97g、2.10mmol)をジクロロメタン(7mL)に溶解した。トリフルオロ酢酸(7mL)を加えて1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、トルエンを加えて共沸し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔クロロホルム〜クロロホルム：メタノール：水＝7：3：1(v/v/v)の分配有機層〕にて精製し、標記化合物(1.97g、99%)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.71–1.73 (2H, m), 1.82–1.90 (2H, m), 2.12–2.20 (4H, m), 2.40 (3H, s), 2.75 (1H, dd, $J=13.7, 9.4\text{Hz}$), 3.03–3.09 (3H, m), 3.18–3.19 (2H, m), 3.58–3.60 (2H, m), 3.64 (1H, d, $J=5.9\text{Hz}$), 3.69 (1H, d, $J=5.9\text{Hz}$), 3.72 (1H, d, $J=5.5\text{Hz}$), 3.87 (1H, dd, $J=16.8, 5.9\text{Hz}$), 4.50–4.56 (1H, m), 5.16 (1H, d, $J=19.2\text{Hz}$), 5.25 (1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.42 (2H, s), 5.55–5.60 (1H, m), 7.17–7.27 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.78–7.81 (2H, m), 7.95–7.97 (3H, m), 8.33–8.35 (2H, m), 8.48–8.51 (2H, m).

MS (APCI) m/z : 839 (M+H) $^+$.

[0219] 工程5: N-{3-[2-(2-{[3-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)プロパノイル]アミノ}エトキシ)エトキシ]プロパノイル}グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-(4-{[(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-4-オキソブチル)グリシンアミド

WO 2015/098099

131

PCT/JP2014/006421

上記工程4で得た化合物(100mg, 0.119mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(1.20mL)溶液に、ジイソプロピルエチルアミン(20.8 μ L, 0.119mmol)、3-(2-(2-(3-マレイニミドプロパンアミド)エトキシ)エトキシ)プロパン酸N-スクシンイミジル(50.7mg, 0.119mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[クロロホルム〜クロロホルム:メタノール=5:1(v/v)]にて精製し、標記化合物(66.5mg, 48%)を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ : 0.85 (3H, t, $J=7.4\text{Hz}$), 1.65–1.74 (2H, m), 1.77–1.90 (2H, m), 2.07–2.19 (4H, m), 2.30 (2H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 2.33–2.36 (2H, m), 2.38 (3H, s), 2.76 (1H, dd, $J=13.7, 9.8\text{Hz}$), 2.96–3.18 (9H, m), 3.42–3.44 (4H, m), 3.53–3.76 (10H, m), 4.43 (1H, td, $J=8.6, 4.7\text{Hz}$), 5.14 (1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.23 (1H, d, $J=18.8\text{Hz}$), 5.38 (1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 5.42 (1H, d, $J=17.2\text{Hz}$), 5.52–5.58 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.98 (2H, s), 7.12–7.17 (1H, m), 7.18–7.25 (4H, m), 7.29 (1H, s), 7.69 (1H, t, $J=5.5\text{Hz}$), 7.78 (1H, d, $J=11.3\text{Hz}$), 7.98–8.03 (2H, m), 8.11 (1H, d, $J=7.8\text{Hz}$), 8.16 (1H, t, $J=5.7\text{Hz}$), 8.23 (1H, t, $J=5.9\text{Hz}$), 8.44 (1H, d, $J=9.0\text{Hz}$).

MS (APCI) m/z : 1149 ($M+H$) $^+$.

[0220] 工程6: 抗体-薬物コンジュゲート(1)

抗体の還元: 実施例7にて作製したhTINA1-H1L1を、製造方法1に記載した共通操作B(280nm吸光係数として1.54を使用)及び

WO 2015/098099

132

PCT/JP2014/006421

Cを用いて、PBS 6.0/EDTAにて10 mg/mLに調製した。本溶液（10.0 mL）を50 mLチューブに採取し、10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.317 mL；抗体一分子に対して4.6 当量）及び1 Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.500 mL）を加えた。本溶液のpHが7.4 ± 0.1 内であることを確認した後に、37℃で1時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を常温水浴で10分間インキュベートした後にジメチルスルホキシド（0.567 mL）を添加した。次いで上記工程5で得た化合物の10 mMジメチルスルホキシド溶液（0.635 mL；抗体一分子に対して9.2 当量）を加え、チューブローテーター（MTR-103、アズワン株式会社）を用いて室温で40分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co., LLC）水溶液（0.127 mL；抗体一分子に対して18.4 当量）を加え、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を35.0 mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E（ $\epsilon_{D, 280} = 4964$ （実測値）、 $\epsilon_{D, 370} = 18982$ （実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.70 mg/mL、抗体収量：94.5 mg（95%）、共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：6.6

。

[0221] [実施例10：hTINA1-HIL1 ADCの作製（2）]

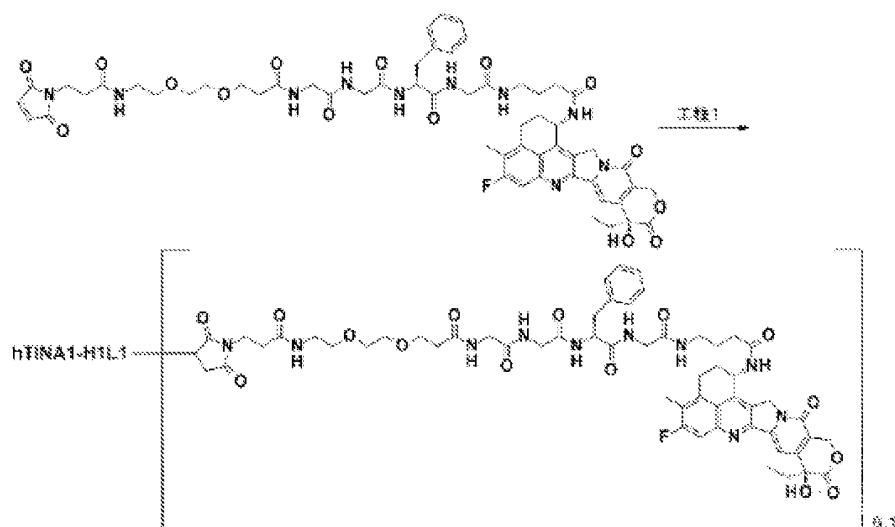
[0222]

WO 2015/098099

133

PCT/JP2014/006421

[化26]



[0223] 工程1：抗体－薬物コンジュゲート（2）

抗体の還元：実施例7にて作製したhTINA1-H1L1を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.54を使用）及びCを用いて、PBS6.0/EDTAにて10mg/mLに調製した。本溶液（2.00mL）を4mLチューブに採取し、10mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0690mL；抗体一分子に対して5.0当量）及び1Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.100mL）を加えた。本溶液のpHが7.4±0.1内であることを確認した後に、37℃で1時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃水浴で10分間インキュベートした後に実施例9工程5で得た化合物の10mMジメチルスルホキシド溶液（0.127mL；抗体一分子に対して9.2当量）を加え、15℃水浴にて1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC（Sigma-Aldrich Co., LLC）水溶液（0.0190mL；抗体一分子に対して13.8当量）を

WO 2015/098099

134

PCT/JP2014/006421

加え、チューブローテーターを用いて室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

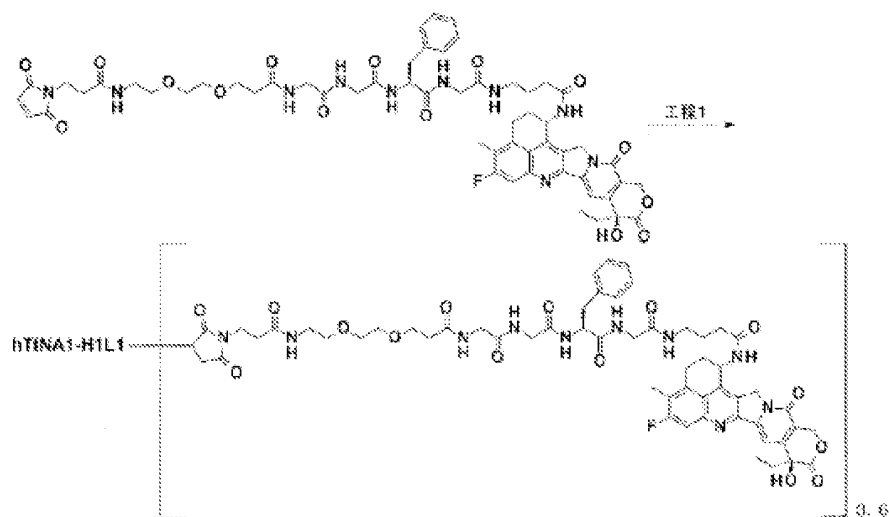
精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を9.00 mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E ($\varepsilon_{D, 280} = 4964$ (実測値)、 $\varepsilon_{D, 370} = 18982$ (実測値))を使用して、下記の実測値を得た。

抗体濃度：2.08 mg/mL、抗体収量：18.7 mg (94%)、共通操作Eにて測定された抗体1分子あたりの薬物平均結合数 (n)：6.1。

[0224] [実施例11：hTINA1-H1L1 ADCの作製 (3)]

[0225] [化27]



[0226] 工程1：抗体-薬物コンジュゲート (3)

抗体の還元：実施例7にて作製したhTINA1-H1L1を、製造方法1に記載した共通操作B (280 nm吸光係数として1.54を使用) 及びCを用いて、PBS 6.0/EDTAにて10 mg/mLに調製した。本溶液 (5.0 mL) を15 mL容器に採取し、攪拌下1 Mリン酸水素二カリウ

WO 2015/098099

135

PCT/JP2014/006421

Δ水溶液 (Nacalai Tesque, Inc.; 0.0813 mL) を加えた後、37℃で10分間攪拌した。攪拌下10 mM TCEP (東京化成工業株式会社) 水溶液 (0.0745 mL; 抗体一分子に対して2.3 当量) を加えた後、本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認し、37℃で1時間攪拌することによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃水浴で10分間攪拌した後に実施例9工程5で得た化合物の10 mMジメチルスルホキシド溶液 (0.162 mL; 抗体一分子に対して5.0 当量) をゆっくり滴下しながら加え、15℃水浴にて1時間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co., LLC) 水溶液 (0.0418 mL; 抗体一分子に対して12.9 当量) を加え、室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を21.0 mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E及びF ($\epsilon_{D, 280} = 4964$ (実測値)、 $\epsilon_{D, 370} = 18982$ (実測値) を使用) を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.19 mg/mL, 抗体収量：46.0 mg (92%), 共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：3.6; 共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：3.6。

[0227] [実施例12：hTINA1-HIL1 ADCの作製(4)]

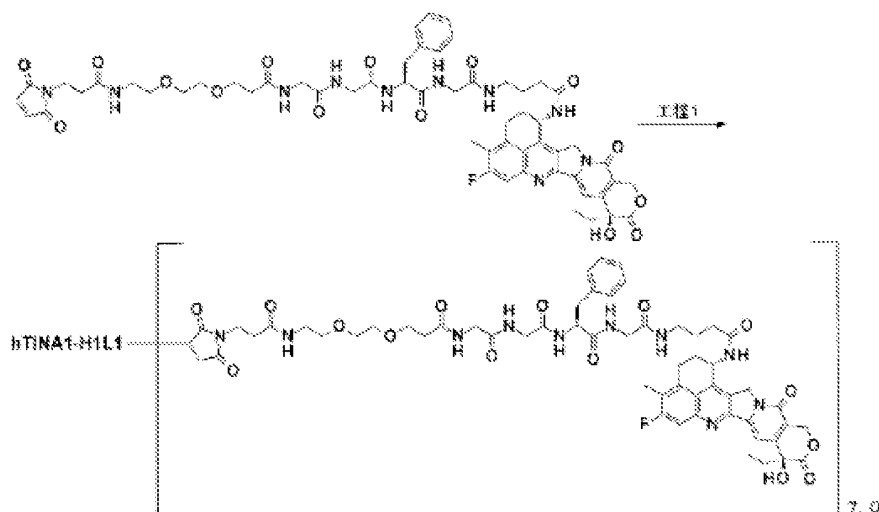
[0228]

WO 2015/098099

136

PCT/JP2014/006421

[化28]



〔0229〕 工程1：抗体－薬物コンジュゲート（4）

抗体の還元：実施例7にて作製したhTINA1-H1L1を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.54を使用）及びCを用いて、PBS6.0/EDTAにて10.0mg/mLに調製した。本溶液（5.00mL）を15mL容器に採取し、攪拌下1Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0813mL）を加えた後、37℃で10分間攪拌した。攪拌下10mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.162mL；抗体一分子に対して5.0当量）を加えた後、本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認し、37℃で1時間攪拌することによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃水浴で10分間攪拌した後に実施例9工程5で得た化合物の10mMジメチルスルホキシド溶液（0.389mL；抗体一分子に対して12.0当量）をゆっくり滴下しながら加え、15℃水浴にて1時間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC（Sigma-Aldrich Co

WO 2015/098099

137

PCT/JP2014/006421

、LLC）水溶液（0.0418 mL；抗体一分子に対して12.9当量）を加え、室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

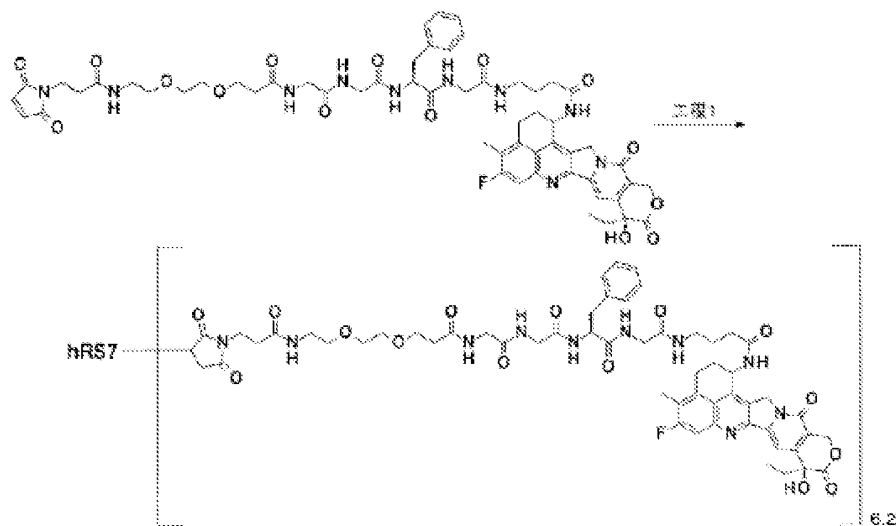
精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を21.0 mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E及びF（ $\epsilon_{D, 260} = 4964$ （実測値）、 $\epsilon_{D, 370} = 18982$ （実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.19 mg/mL、抗体収量：46.0 mg（92%）、共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：7.0；共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：7.0。

[0230] [参考例13：hRS7 ADCの作製（5）]

[0231] [化29]



[0232] 工程1：抗体-薬物コンジュゲート（5）

抗体の還元：参考例1にて作製したhRS7を、製造方法1に記載した共通操作B（280 nm吸光係数として1.56を使用）及びCを用いて、PBS 6.0/EDTAにて10 mg/mLに調製した。本溶液（2.0 mL

WO 2015/098099

138

PCT/JP2014/006421

）を4 mLチューブに採取し、10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0690 mL；抗体一分子に対して5.0当量）及び1 Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.100 mL）を加えた。本溶液のpHが7.4±0.1内であることを確認した後に、37℃で1時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃水浴で10分間インキュベートした後に実施例9工程5で得た化合物の10 mMジメチルスルホキシド溶液（0.127 mL；抗体一分子に対して9.2当量）を加え、15℃水浴にて1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co., LLC）水溶液（0.0190 mL；抗体一分子に対して13.8当量）を加え、チューブローターを用いて室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を9.00 mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E（ $\epsilon_{D, 230} = 4964$ （実測値）、 $\epsilon_{D, 370} = 18982$ （実測値）を使用）を使用して、下記の実測値を得た。

抗体濃度：2.04 mg/mL，抗体収量：18.4 mg（92%），共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：6.2。

[0233] [実施例14：hTINA1-HIL1 ADCの作製（6）]

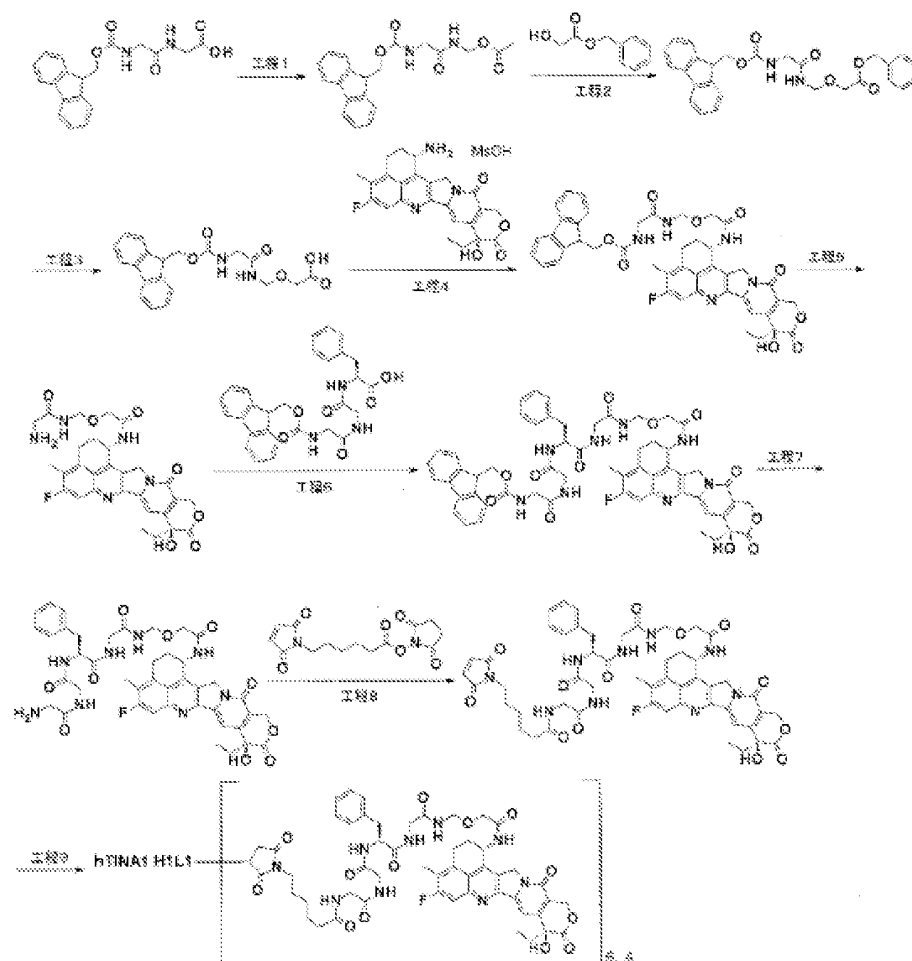
[0234]

WO 2015/098099

139

PCT/JP2014/006421

[化30]



〔0235〕 工程1：（（N－〔（9H－フルオレン－9－イルメトキシ）カルボニル〕グリシル）アミノ）メチルアセテート

N－9－フルオレニルメトキシカルボニルグリシルグリシン（4.33g, 12.2mmol）、テトラヒドロフラン（120ml）、及びトルエン（40.0ml）からなる混合物に、ピリジン（1.16ml, 14.7mmol）及び四酢酸鉛（6.84g, 14.7mmol）を加え、5時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却した後、不溶物をセライト濾過によって除き、減圧下濃縮した。得られた残留物を酢酸エチルに溶解し、水及び飽和食

WO 2015/098099

140

PCT/JP2014/006421

塩水で洗浄後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去した後、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサン：酢酸エチル＝9：1（v/v）～酢酸エチル〕にて精製し、標記化合物（3.00 g, 67%）を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.07 (3H, s), 3.90 (2H, d, $J=5.1$ Hz), 4.23 (1H, t, $J=7.0$ Hz), 4.46 (2H, d, $J=6.6$ Hz), 5.26 (2H, d, $J=7.0$ Hz), 5.32 (1H, brs), 6.96 (1H, brs), 7.32 (2H, t, $J=7.3$ Hz), 7.41 (2H, t, $J=7.3$ Hz), 7.59 (2H, d, $J=7.3$ Hz), 7.77 (2H, d, $J=7.3$ Hz).

[0236] 工程2：ベンジル [(N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル]グリシル)アミノ)メトキシ]アセテート

上記工程1で得た化合物（3.68 g, 10.0 mmol）及びベンジルグリコレート（4.99 g, 30.0 mmol）のテトラヒドロフラン（40.0 mL）溶液に、カリウム *tert*-ブトキシド（2.24 g, 20.0 mmol）を0℃で加え、室温にて15分間攪拌した。反応溶液に酢酸エチル、水を0℃で加え、酢酸エチル、クロロホルムで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をジオキサン（40.0 mL）、水（10.0 mL）に溶解し、炭酸水素ナトリウム（1.01 g, 12.0 mmol）、クロロギ酸9-フルオレニルメチル（2.59 g, 10.0 mmol）を加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔ヘキサン：酢酸エチル＝100：0（v/v）～0：100〕にて精製し、無色油状の標記化合物（1.88 g, 40%）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.84 (2H, d, $J=5.1$ Hz).

WO 2015/098099

141

PCT/JP2014/006421

5 Hz), 4.24 (3H, t, $J=6.5$ Hz), 4.49 (2H, d, $J=6.7$ Hz), 4.88 (2H, d, $J=6.7$ Hz), 5.15–5.27 (1H, m), 5.19 (2H, s), 6.74 (1H, brs), 7.31–7.39 (7H, m), 7.43 (2H, t, $J=7.4$ Hz), 7.61 (2H, d, $J=7.4$ Hz), 7.79 (2H, d, $J=7.4$ Hz).

[0237] 工程3: [({N- [(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] グリシル} アミノ) メトキシ] 酢酸

上記工程2で得た化合物 (1.88 g, 3.96 mmol) をエタノール (40.0 mL)、酢酸エチル (20.0 mL) に溶解した。パラジウム炭素触媒 (376 mg) を加え、水素雰囲気下、室温にて2時間攪拌した。不溶物をセライト濾過によって除き、溶媒を減圧留去し、標記化合物 (1.52 g、定量的) を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.62 (2H, d, $J=6.3$ Hz), 3.97 (2H, s), 4.18–4.32 (3H, m), 4.60 (2H, d, $J=6.7$ Hz), 7.29–7.46 (4H, m), 7.58 (1H, t, $J=5.9$ Hz), 7.72 (2H, d, $J=7.4$ Hz), 7.90 (2H, d, $J=7.4$ Hz), 8.71 (1H, t, $J=6.5$ Hz).

[0238] 工程4: 9H-フルオレン-9-イルメチル (2- { [(2- { [(1S, 9S) -9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ [de] ピラノ [3', 4': 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-1-イル] アミノ) -2-オキソエトキシ) メチル] アミノ) -2-オキソエチル) カーバメート

氷冷下、エキサデカンのメシル酸塩 (0.283 g, 0.533 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (61.4 mg, 0.533 mmol)、及び上記工程3で得た化合物 (0.205 g, 0.533 mmol) のN

WO 2015/098099

142

PCT/JP2014/006421

、N-ジメチルホルムアミド（10.0 mL）溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（92.9 μ L, 0.533 mmol）及びN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（0.143 g, 0.693 mmol）を加え、室温にて3日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔クロロホルム〜クロロホルム：メタノール：水＝7：3：1（v/v/v）の分配有機層〕にて精製し、標記化合物（0.352 g, 82%）を淡茶色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ （400 MHz, DMSO- d_6 ） δ ：0.81（3H, t, $J=7.4$ Hz）, 1.73–1.87（2H, m）, 2.06–2.20（2H, m）, 2.34（3H, s）, 3.01–3.23（2H, m）, 3.58（2H, d, $J=6.7$ Hz）, 3.98（2H, s）, 4.13–4.25（3H, m）, 4.60（2H, d, $J=6.7$ Hz）, 5.09–5.22（2H, m）, 5.32–5.42（2H, m）, 5.50–5.59（1H, m）, 6.49（1H, s）, 7.24–7.30（3H, m）, 7.36（2H, t, $J=7.4$ Hz）, 7.53（1H, t, $J=6.3$ Hz）, 7.66（2H, d, $J=7.4$ Hz）, 7.75（1H, d, $J=11.0$ Hz）, 7.84（2H, d, $J=7.4$ Hz）, 8.47（1H, d, $J=8.6$ Hz）, 8.77（1H, t, $J=6.7$ Hz）。
MS（ESI） m/z ：802（ $M+H$ ） $^+$ 。

【0239】工程5：N-〔（2-〔〔（1S, 9S）-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル〕アミノ〕-2-オキソエトキシ）メチル〕グリシンアミド

上記工程4で得た化合物（0.881 g, 1.10 mmol）のN,N-ジメチルホルムアミド（11.0 mL）溶液に、ピペリジン（1.1 mL）を加え、室温で2日間撹拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わずに次の反応に用いた。

WO 2015/098099

143

PCT/JP2014/006421

[0240] 工程6：N-〔(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル〕グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-〔(2-〔[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-1-イル]アミノ)-2-オキソエトキシ)メチル〕グリシンアミド

氷冷下、上記工程5で得た混合物 (0.439 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド (0.101 g, 0.878 mmol)、及びN-〔(9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル〕グリシルグリシル-L-フェニルアラニン (特開2002-60351号公報; 0.440 g, 0.878 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (50.0 mL) 溶液に、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (0.181 g, 0.878 mmol) を加え、室温にて4日間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔クロロホルム〜クロロホルム：メタノール=9：1 (v/v)〕にて精製し、標記化合物 (0.269 g, 58%) を淡橙色固体として得た。

MS (ESI) m/z : 1063 (M+H)⁺,

[0241] 工程7：グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-〔(2-〔[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ [de] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-1-イル]アミノ)-2-オキソエトキシ)メチル〕グリシンアミド

上記工程6で得た化合物 (0.269 g, 0.253 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (4.00 mL) 溶液に、ピペリジン (0.251 mL, 2.53 mmol) を加え、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、標記化合物を含む混合物を得た。本混合物は、これ以上の精製は行わず

WO 2015/098099

144

PCT/JP2014/006421

に次の反応に用いた。

〔0242〕工程8：N-〔6-（2，5-ジオキソ-2，5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル）ヘキサノイル〕グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-〔（2-〔（（1S，9S）-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10，13-ジオキソ-2，3，9，10，13，15-ヘキサヒドロ-1H，12H-ベンゾ〔d,e〕ピラノ〔3'，4'：6，7〕インドリジノ〔1，2-b〕キノリン-1-イル〕アミノ）-2-オキソエトキシ）メチル〕グリシンアミド

上記工程7で得た化合物（0.253mmol）のN，N-ジメチルホルムアミド（10.0mL）溶液に、6-マレイミドヘキサン酸N-スクシンイミジル（0.156g，0.506mmol）を加え、室温で3日間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー〔クロロホルム〜クロロホルム：メタノール=9：1（v/v）〕にて精製し、標記化合物（0.100g，38%）を淡黄色固体として得た。

¹H-NMR（400MHz，DMSO-d₆）δ：0.83（3H，t，J=7.2Hz），1.09-1.21（2H，m），1.33-1.47（4H，m），1.75-1.90（2H，m），2.00-2.23（4H，m），2.36（3H，s），2.69-2.81（1H，m），2.94-3.03（1H，m），3.06-3.22（2H，m），3.23-3.74（6H，m），3.98（2H，s），4.39-4.50（1H，m），4.60（2H，d，J=6.7Hz），5.17（2H，s），5.39（2H，s），5.53-5.61（1H，m），6.50（1H，s），6.96（2H，s），7.11-7.24（5H，m），7.28（1H，s），7.75（1H，d，J=11.0Hz），7.97（1H，t，J=5.7Hz），8.03（1H，t，J=5.9Hz），8.09（1H，d，J=7.8Hz），8.27（1H，t，J=6.5Hz），8.48（1H，d，J=9.0Hz），8.60（1H，t，J=6.5Hz）。

WO 2015/098099

145

PCT/JP2014/006421

MS (ESI) m/z : 1034 (M+H)⁺,

〔0243〕 工程 9：抗体－薬物コンジュゲート (6)

抗体の還元：実施例 7 にて作製した hTINA1-HIL1 を、製造方法 1 に記載した共通操作 B (280 nm 吸光係数として 1.54 を使用) 及び C を用いて、PBS 6.0/EDTA にて 10 mg/mL に調製した。本溶液 (10.0 mL) を 50 mL チューブに採取し、10 mM TCEP (東京化成工業株式会社) 水溶液 (0.317 mL; 抗体一分子に対して 4.6 当量) 及び 1 M リン酸水素ニカリウム水溶液 (Nacalai Tesque, Inc.; 0.500 mL) を加えた。本溶液の pH が 7.4 ± 0.1 内であることを確認した後に、37℃で 1 時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を常温水浴で 10 分間インキュベートした後にジメチルスルホキシド (0.567 mL) を添加した。次いで上記工程 8 で得た化合物の 10 mM ジメチルスルホキシド溶液 (0.635 mL; 抗体一分子に対して 9.2 当量) を加え、チューブローテーターを用いて室温で 40 分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC (Sigma-Aldrich Co., LLC) 水溶液 (0.127 mL; 抗体一分子に対して 18.4 当量) を加え、さらに室温にて 20 分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法 1 に記載した共通操作 D による精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を 35.0 mL 得た。

特性評価：製造方法 1 に記載した共通操作 E ($\epsilon_{D, 280} = 5178$ (実測値)、 $\epsilon_{D, 370} = 20217$ (実測値) を使用) を使用して、下記の実測値を得た。

抗体濃度：2.70 mg/mL, 抗体収量：94.5 mg (95%), 共通操作 E にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：6.4。

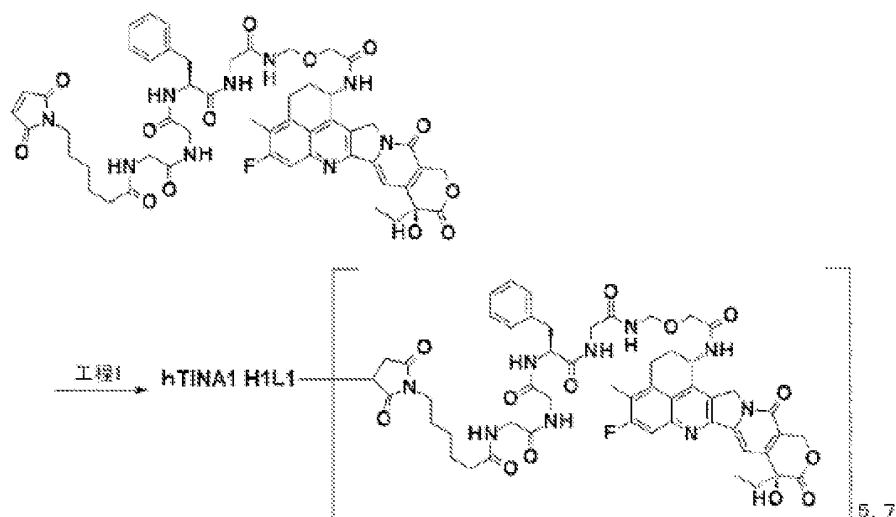
〔0244〕 〔実施例 15：hTINA1-HIL1 ADC の作製 (7)〕

WO 2015/098099

146

PCT/JP2014/006421

[0245] [化31]



[0246] 工程 1：抗体－薬物コンジュゲート（7）

抗体の還元：実施例 7 にて作製した hTINA1-H1L1 を、製造方法 1 に記載した共通操作 B（280 nm 吸光係数として 1.54 を使用）及び C を用いて、PBS 6.0/EDTA にて 10 mg/mL に調製した。本溶液（2.0 mL）を 4 mL チューブに採取し、10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0690 mL；抗体一分子に対して 5.0 当量）及び 1 M リン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0299 mL）を加えた。本溶液の pH が 7.0 ± 0.1 内であることを確認した後に、37℃で 1 時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を 15℃水浴で 10 分間インキュベートした後に実施例 14 工程 8 で得た化合物の 10 mM ジメチルスルホキシド溶液（0.127 mL；抗体一分子に対して 9.2 当量）を加え、15℃水浴にて 1 時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co., LLC）水溶液（0.0190 mL；抗体一分子に対して 13.8 当量）

WO 2015/098099

147

PCT/JP2014/006421

を加え、チューブローテーターを用いて室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

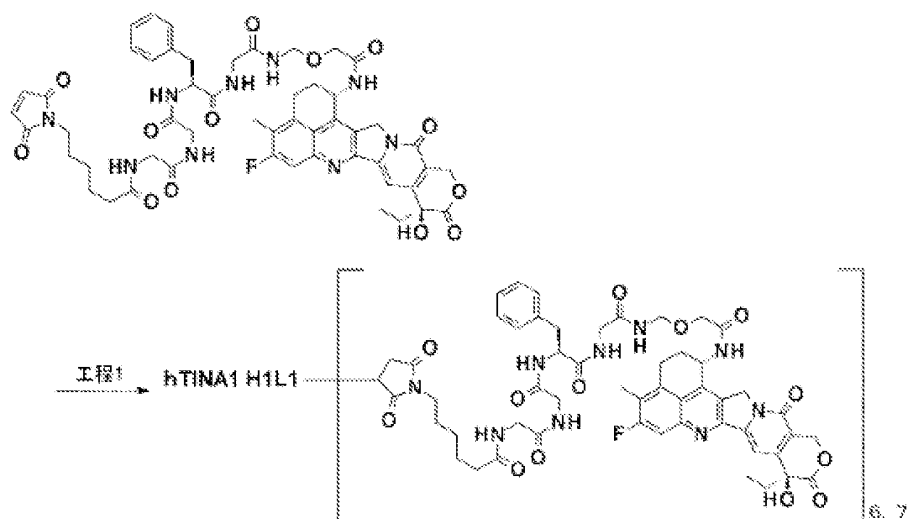
精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を9.00mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E ($\varepsilon_{D, 280} = 5178$ (実測値)、 $\varepsilon_{D, 370} = 20217$ (実測値))を使用して、下記の実測値を得た。

抗体濃度：2.04mg/mL、抗体収量：18.4mg (92%)、共通操作Eにて測定された抗体1分子あたりの薬物平均結合数 (n)：5.7。

[0247] [実施例16：hTINA1-H1L1 ADCの作製 (8)]

[0248] [化32]



[0249] 工程1：抗体-薬物コンジュゲート (8)

抗体の還元：実施例7にて作製したhTINA1-H1L1を、製造方法1に記載した共通操作B (280nm吸光係数として1.54を使用) 及びCを用いて、PBS 6.0/EDTAにて10mg/mLに調製した。本溶液 (30.0mL) を100mL容器に採取し、攪拌下1Mリン酸水素ニカ

WO 2015/098099

148

PCT/JP2014/006421

リウム水溶液 (Nacalai Tesque, Inc.; 0.4875 mL) を加えた後、37℃で10分間攪拌した。攪拌下10mM TCEP (東京化成工業株式会社) 水溶液 (0.9721 mL; 抗体一分子に対して5.0当量) を加えた後、本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認し、37℃で1時間攪拌することによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃水浴で10分間攪拌した後に実施例14工程8で得た化合物の10mMジメチルスルホキシド溶液 (2.33 mL; 抗体一分子に対して12.0当量) をゆっくり滴下しながら加え、15℃水浴にて1時間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC (Sigma-Aldrich Co., LLC) 水溶液 (0.251 mL; 抗体一分子に対して12.9当量) を加え、室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を98.0 mL得た。その後、製造方法1に記載した共通操作Aによる濃縮操作を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を17.5 mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E及びF ($\epsilon_{D, 280} = 5178$ (実測値)、 $\epsilon_{D, 370} = 20217$ (実測値) を使用) を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：14.6 mg/mL, 抗体収量：256 mg (85%)、共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：6.7；共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：7.0。

[0250] [実施例17：hTINA1-HIL1 ADCの作製 (9)]

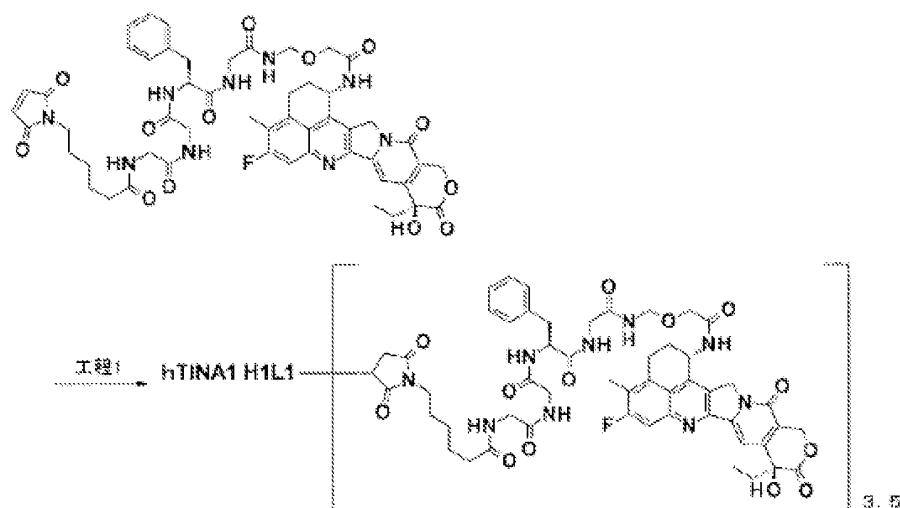
[0251]

WO 2015/098099

149

PCT/JP2014/006421

[化33]



[0252] 工程1：抗体－薬物コンジュゲート（9）

抗体の還元：実施例7にて作製したhTINA1-H1L1を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.54を使用）及びCを用いて、PBS6.0/EDTAにて10mg/mLに調製した。本溶液（5.0mL）を15mL容器に採取し、攪拌下1Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0813mL）を加えた後、37℃で10分間攪拌した。攪拌下10mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0778mL；抗体一分子に対して2.4当量）を加えた後、本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認し、37℃で1時間攪拌することによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃水浴で10分間攪拌した後に実施例14工程8で得た化合物の10mMジメチルスルホキシド溶液（0.162mL；抗体一分子に対して5.0当量）をゆっくり滴下しながら加え、15℃水浴にて1時間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC（Sigma-Aldrich Co

WO 2015/098099

150

PCT/JP2014/006421

、LLC)水溶液(0.0418mL;抗体一分子に対して12.9当量)を加え、室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

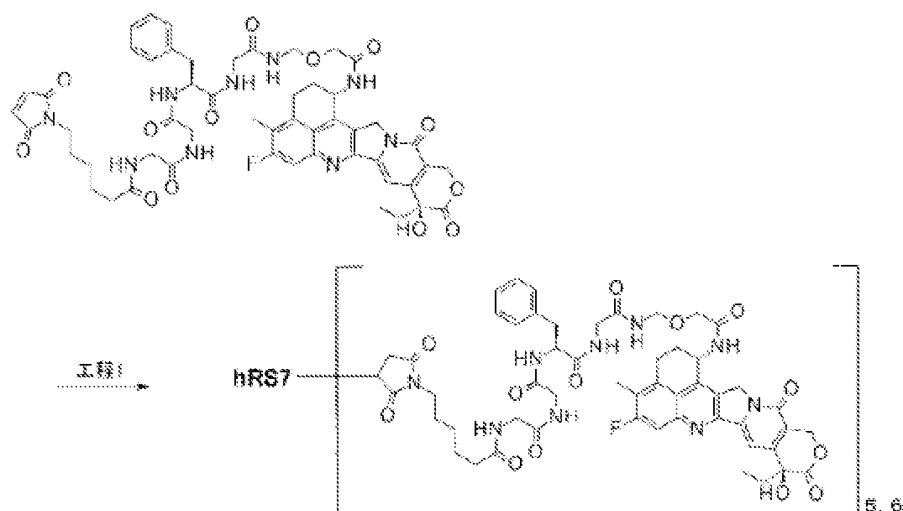
精製:上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を21.0mL得た。

特性評価:製造方法1に記載した共通操作E及びF($\epsilon_{D,260}=5178$ (実測値)、 $\epsilon_{D,370}=20217$ (実測値)を使用)を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度:2.26mg/mL, 抗体収量:47.5mg(95%), 共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n):3.5; 共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n):3.6。

[0253] [参考例18:hRS7 ADCの作製(10)]

[0254] [化34]



[0255] 工程1:抗体-薬物コンジュゲート(10)

抗体の還元:参考例1にて作製したhRS7を、製造方法1に記載した共通操作B(280nm吸光係数として1.56を使用)及びCを用いて、PBS6.0/EDTAにて10mg/mLに調製した。本溶液(2.0mL

WO 2015/098099

151

PCT/JP2014/006421

）を4 mLチューブに採取し、10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0690 mL；抗体一分子に対して5.0当量）及び1 Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0299 mL）を加えた。本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認した後に、37℃で1時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃水浴で10分間インキュベートした後に実施例14工程8で得た化合物の10 mMジメチルスルホキシド溶液（0.1269 mL；抗体一分子に対して9.2当量）を加え、15℃水浴にて1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co., LLC）水溶液（0.0190 mL；抗体一分子に対して13.8当量）を加え、チューブローテーターを用いて室温で20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法1に記載した共通操作Dによる精製を行い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を9.00 mL得た。

特性評価：製造方法1に記載した共通操作E（ $\epsilon_{D, 230} = 5178$ （実測値）、 $\epsilon_{D, 370} = 20217$ （実測値）を使用）を使用して、下記の実測値を得た。

抗体濃度：2.07 mg/mL，抗体収量：18.6 mg（93%），共通操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：5.6。

[0256] [実施例19：hTINA1-HIL1 ADCの作製（11）]

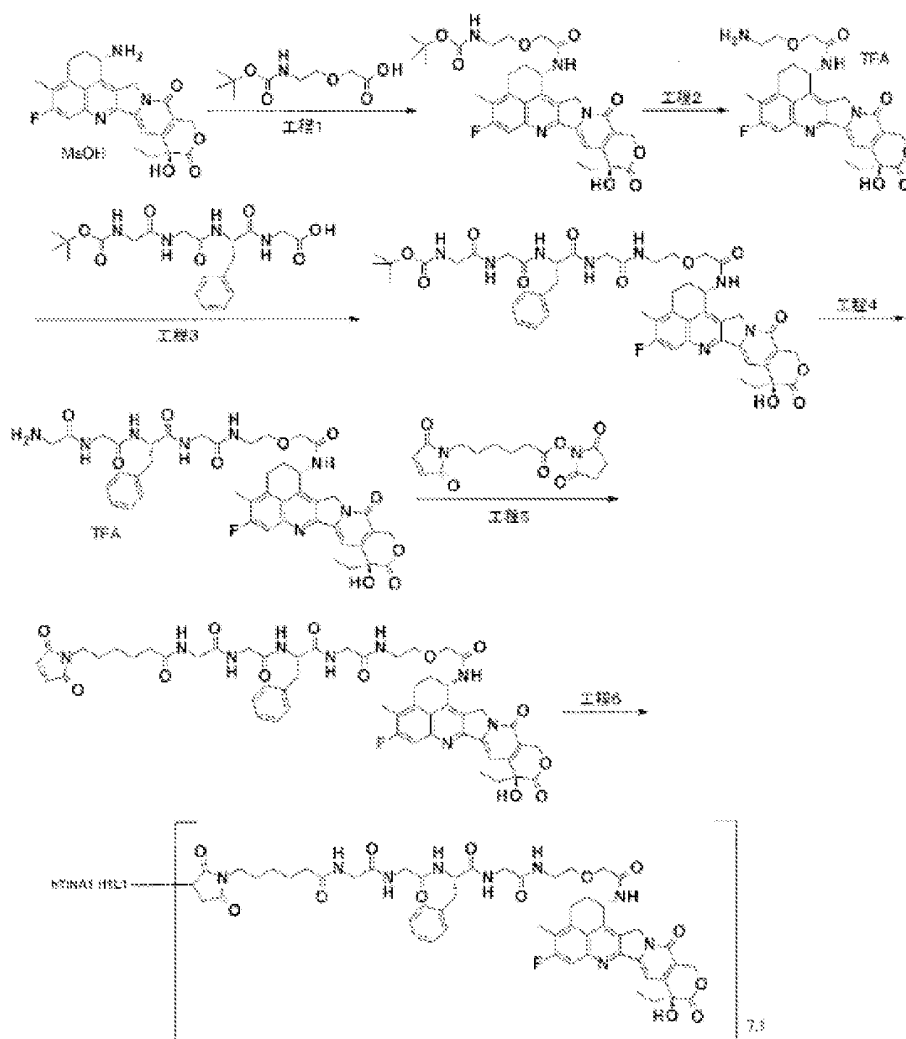
[0257]

WO 2015/098099

152

PCT/JP2014/006421

[化35]



【0258】 工程1：tert-ブチル [2-(2-{[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-2-オキソエトキシ)エチル]カーバメート

エキサテカンのメシル酸塩 (3.10 g, 5.47 mol) を、4-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)ブタン酸の代わりに {2-[(ter

WO 2015/098099

153

PCT/JP2014/006421

トキシカルボニル) アミノ] エトキシ) 酢酸 (J. Med. Chem., 1992年, 35巻, 2928頁; 1.55g, 6.01mmol) を用いて、実施例1の工程1と同様に反応させ、標記化合物 (2.56g, 73%) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.26 (9H, s), 1.81–1.91 (2H, m), 2.13–2.22 (2H, m), 2.40 (3H, s), 3.08–3.26 (4H, m), 3.43–3.53 (2H, m), 4.00 (1H, d, $J=15.1\text{Hz}$), 4.05 (1H, d, $J=15.1\text{Hz}$), 5.14 (1H, d, $J=18.7\text{Hz}$), 5.22 (1H, d, $J=18.7\text{Hz}$), 5.40 (1H, d, $J=16.6\text{Hz}$), 5.44 (1H, d, $J=16.6\text{Hz}$), 5.59–5.66 (1H, m), 6.53 (1H, s), 6.86 (1H, t, $J=5.4\text{Hz}$), 7.31 (1H, s), 7.79 (1H, d, $J=10.9\text{Hz}$), 8.49 (1H, d, $J=9.1\text{Hz}$).

MS (APCI) m/z : 637 ($M+H$) $^+$.

[0259] 工程2: 2-(2-アミノエトキシ)-N-[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-1-イル]アセトアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程1で得た化合物 (1.50g, 2.36mol) を、実施例1の工程2と同様に反応させ、標記化合物 (1.50g, 定量的) を淡黄色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 0.87 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$), 1.81–1.92 (2H, m), 2.15–2.23 (2H, m), 2.41 (3H, s), 3.05 (2H, t, $J=5.1\text{Hz}$), 3.15–3.23 (2H, m), 3.71 (2H, t, $J=5.1\text{Hz}$).

WO 2015/098099

154

PCT/JP2014/006421

), 4.10 (2H, s), 5.19 (1H, d, $J=18.7$ Hz), 5.24 (1H, d, $J=18.7$ Hz), 5.43 (2H, s), 5.58–5.66 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.33 (1H, s), 7.73–7.84 (4H, m), 8.55 (1H, d, $J=9.1$ Hz).

MS (APCI) m/z : 537 (M+H)⁺.

[0260] 工程3: N-(tert-ブトキシカルボニル)グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[2-(2-[[[1S, 9S]-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]アミノ)-2-オキソエトキシ)エチル]グリシンアミド

上記工程2で得た化合物(554mg, 0.85mmol)を、実施例1の工程3と同様に反応させ、標記化合物(775mg, 95%)を得た。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ : 0.85 (3H, t, $J=7.3$ Hz), 1.36 (9H, s), 1.78–1.89 (2H, m), 2.13–2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd, $J=13.4, 9.8$ Hz), 2.95 (1H, dd, $J=13.4, 4.3$ Hz), 3.09–3.23 (1H, m), 3.23–3.32 (2H, m), 3.40–3.62 (8H, m), 3.73 (1H, dd, $J=16.5, 5.5$ Hz), 4.03 (2H, s), 4.39–4.47 (1H, m), 5.17 (1H, d, $J=18.9$ Hz), 5.25 (1H, d, $J=18.9$ Hz), 5.41 (1H, d, $J=16.8$ Hz), 5.45 (1H, d, $J=16.8$ Hz), 5.57–5.64 (1H, m), 6.54 (1H, s), 6.99 (1H, t, $J=5.8$ Hz), 7.13–7.26 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.76–7.82 (2H, m), 7.90 (1H, t, $J=5.2$ Hz), 8.13 (1H, d, $J=7.9$ Hz), 8.27 (1H, t, $J=5.8$ Hz), 8.49 (

WO 2015/098099

155

PCT/JP2014/006421

1 H, d, J=8.5 Hz),

MS (APCI) m/z : 955 (M+H)⁺.

[0261] 工程4 : グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[2-(2-{[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[de]ピラノ[3', 4':6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-2-オキソエトキシ)エチル]グリシンアミドトリフルオロ酢酸塩

上記工程3で得た化合物(630mg, 0.659mmol)を、実施例1の工程4と同様に反応させ、標記化合物(588mg, 92%)を得た。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ : 0.86 (3H, t, J=7.3Hz), 1.79-1.90 (2H, m), 2.13-2.22 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.71 (1H, dd, J=13.4, 10.1Hz), 2.99 (1H, dd, J=13.4, 4.3Hz), 3.09-3.23 (1H, m), 3.24-3.32 (3H, m), 3.41-3.71 (7H, m), 3.86 (1H, dd, J=16.8, 5.8Hz), 4.04 (2H, s), 4.52 (1H, td, J=9.0, 4.1Hz), 5.17 (1H, d, J=18.9Hz), 5.25 (1H, d, J=18.9Hz), 5.41 (1H, d, J=16.5Hz), 5.45 (1H, d, J=16.5Hz), 5.56-5.65 (1H, m), 6.55 (1H, s), 7.13-7.26 (5H, m), 7.32 (1H, s), 7.80 (1H, d, J=11.0Hz), 7.87-8.01 (4H, m), 8.29-8.36 (2H, m), 8.46-8.55 (2H, m),

MS (APCI) m/z : 855 (M+H)⁺.

[0262] 工程5 : N-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[2-(2-{[(1S, 9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒ

WO 2015/098099

156

PCT/JP2014/006421

ドロキシ-4-メチル-10, 13-ジオキソ-2, 3, 9, 10, 13, 15-ヘキサヒドロ-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-1-イル]アミノ)-2-オキソエトキシ)エチル]グリシンアミド

上記工程4で得た化合物(240mg, 0.247mmol)を、ジイソプロピルエチルアミンの代わりにトリエチルアミン(31.4μL, 0.22mmol)を、3-(2-(2-(3-マレインイミドプロパンアミド)エトキシ)エトキシ)プロパン酸N-スクシンイミジルの代わりに6-マレイミドヘキサン酸N-スクシンイミジル(95.3mg, 0.31mmol)を用いて、実施例1の工程5と同様に反応させ、標記化合物(162mg, 62%)を得た。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ: 0.86 (3H, t, J=7.6Hz), 1.13-1.22 (2H, m), 1.40-1.51 (4H, m), 1.78-1.90 (2H, m), 2.09 (2H, t, J=7.6Hz), 2.14-2.21 (2H, m), 2.39 (3H, s), 2.74 (1H, dd, J=13.6, 9.7Hz), 2.96 (1H, dd, J=13.6, 4.5Hz), 3.08-3.24 (1H, m), 3.24-3.30 (1H, m), 3.33-3.40 (4H, m), 3.47-3.68 (7H, m), 3.72 (1H, dd, J=16.6, 5.7Hz), 4.03 (2H, s), 4.42 (1H, td, J=8.6, 4.2Hz), 5.17 (1H, d, J=18.7Hz), 5.25 (1H, d, J=18.7Hz), 5.40 (1H, d, J=17.2Hz), 5.44 (1H, d, J=17.2Hz), 5.57-5.64 (1H, m), 6.52 (1H, s), 6.99 (2H, s), 7.13-7.25 (5H, m), 7.31 (1H, s), 7.74-7.81 (2H, m), 7.99 (1H, t, J=5.7Hz), 8.03-8.11 (2H, m), 8.22 (1H, t, J=5.7Hz), 8.47 (1H, d, J=9.1Hz).
MS (APCI) m/z: 1048 (M+H)⁺.

WO 2015/098099

157

PCT/JP2014/006421

〔0263〕 工程 6：抗体－薬物コンジュゲート（11）

抗体の還元：実施例 7 にて作製した hTINA1-H1L1 を、製造方法 1 に記載した共通操作 B（280 nm 吸光係数として 1.54 を使用）及び C を用いて、PBS 6.0/EDTA にて 10 mg/mL に調製した。本溶液（3.0 mL）を 15 mL 容器に採取し、攪拌下 1 M リン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.; 0.0488 mL）を加えた後、37℃で 10 分間攪拌した。攪拌下 10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0972 mL；抗体一分子に対して 5.0 当量）を加えた後、本溶液の pH が 7.0 ± 0.1 内であることを確認し、37℃で 1 時間攪拌することによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を 15℃水浴で 10 分間攪拌した後に実施例 11a 工程 8 で得た化合物の 10 mM ジメチルスルホキシド溶液（0.2333 mL；抗体一分子に対して 12.0 当量）をゆっくり滴下しながら加え、15℃水浴にて 1 時間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co., LLC）水溶液（0.0251 mL；抗体一分子に対して 12.9 当量）を加え、室温で 20 分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

精製：上記溶液を、製造方法 1 に記載した共通操作 D による精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲートを含有する溶液を 1.4 mL 得た。

特性評価：製造方法 1 に記載した共通操作 E 及び F（ $\epsilon_{D, 280} = 5193$ （実測値）、 $\epsilon_{D, 370} = 20347$ （実測値）を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.93 mg/mL，抗体収量：27.0 mg（90%），共通操作 E にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：7.1；共通操作 F にて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：7.0。

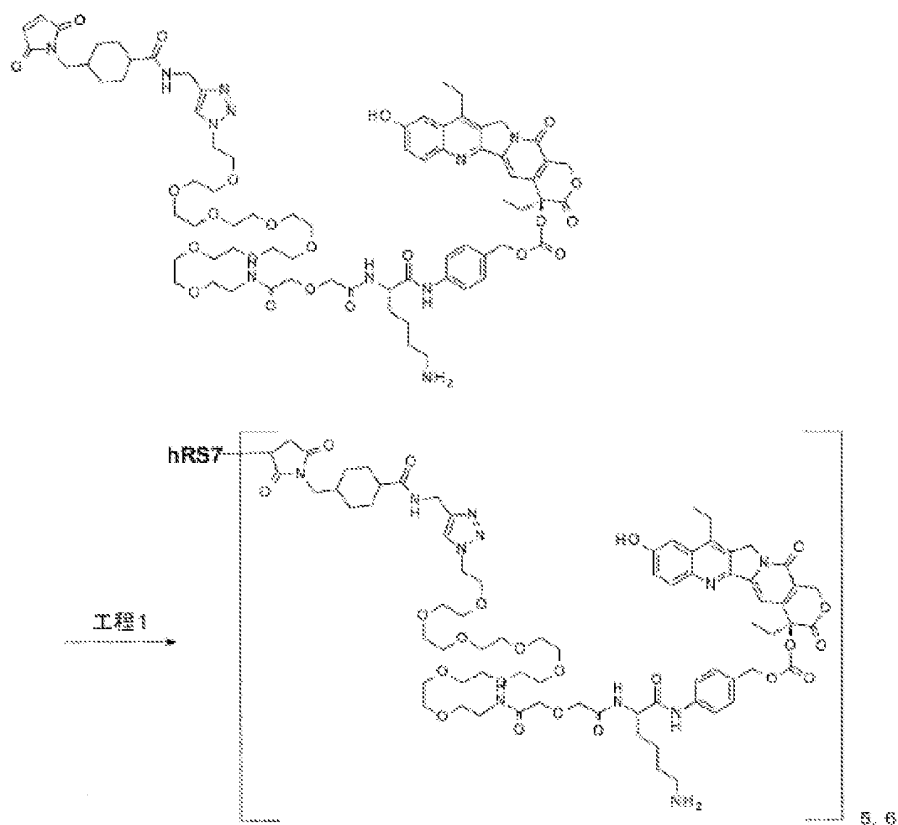
〔0264〕〔参考例 2：hRS7-CL2A-SN38 の作製（12）〕

WO 2015/098099

158

PCT/JP2014/006421

[0265] [化36]



[0266] 工程 1 : 抗体-薬物コンジュゲート (12)

抗体の還元：参考例 1 にて作製した hRS7 を、製造方法 1 に記載した共通操作 B（280 nm 吸光係数として 1.54 を使用）及び C を用いて、PBS 6.0/EDTA にて 10 mg/mL に調製した。本溶液（10.0 mL）を 50 mL チューブに採取し、10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.317 mL；抗体一分子に対して 4.6 当量）及び 1 M リン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.500 mL）を加えた。本溶液の pH が 7.4 ± 0.1 内であることを確認した後に、37℃で 1 時間インキュベートすることによって、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

WO 2015/098099

159

PCT/JP2014/006421

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を常温水浴で10分間インキュベートした後にジメチルスルホキシド（0.567 mL）を添加した。次いで、米国特許公開第2011/0293513号明細書に従って合成したCL2A-SN38の10 mMジメチルスルホキシド溶液（0.635 mL；抗体一分子に対して9.2当量）を加え、チューブローテーターを用いて室温で40分間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co. LLC）水溶液（0.127 mL；抗体一分子に対して18.4当量）を加え、さらに室温にて20分間攪拌し、薬物リンカーの反応を停止させた。

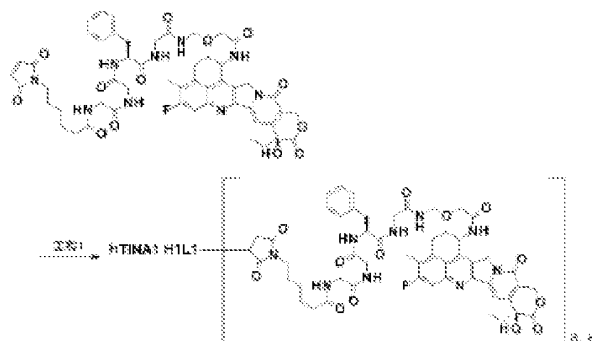
精製：上記反応溶液について、製造方法1—共通操作Dに記載したゲルろ過精製操作を2回繰り返し、次いでポリソルベート80（0.01%）を含有する25 mMトレハロース溶液にて同様にNAP-25カラムによるゲルろ過精製操作を1回行った後に得られる溶出液（35 mL）を凍結乾燥操作した。

特性評価：凍結乾燥前の溶出液について製造方法1に記載した共通操作Eを使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：2.78 mg/mL，抗体収量：97.3 mg（97%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：5.6

[0267] [実施例20：hTINA1-H1L1 ADCの作製（13）]

[0268] [化37]



[0269] 工程1：抗体—薬物コンジュゲート（13）

WO 2015/098099

160

PCT/JP2014/006421

抗体の還元：実施例7にて作製したhTINA1-H1L1を、製造方法1に記載した共通操作B（280nm吸光係数として1.54を使用）及びCを用いて、媒体をPBS6.0/EDTAに置換し、10mg/mLの抗体濃度に調製した。本溶液（100mL）をポリカーボネート製の250mL三角フラスコ容器に入れ、マグネティックスターラー攪拌下、室温で1Mリン酸水素二カリウム水溶液（1.4mL）を加えた後、10mM TCEP水溶液（1.62mL；抗体一分子に対して2.5当量）を加えた。本溶液のpHが7.0±0.1内であることを確認した後に、攪拌を停止し、37℃で2時間インキュベートすることにより、抗体内ヒンジ部のジスルフィド結合を還元した。

抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃に冷却後、攪拌下、DMSO（3.24mL）をゆっくり滴下して加えた。次いで、実施例14工程8の化合物を10mM含むDMSO溶液（1.76mL；抗体一分子に対して5.0当量）をゆっくり滴下して加えた。この溶液を15℃にて、1時間攪拌し、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、攪拌下、100mM NAC水溶液（0.324mL；抗体一分子に対して5.0当量）を加え、さらに室温で20分間インキュベートし、未反応の薬物リンカーの反応性を停止させた。

精製：攪拌下、上記溶液に20%酢酸水（約0.52mL）とABS（100mL）をゆっくり加え、本溶液のpHを5.5±0.1にした。この溶液を精密ろ過（0.45μm、PVDF膜）することにより白濁物を除いて、ろ液を約200mL得た。このろ液に対して、限外ろ過膜（メルク株式会社、Pellicon XL Cassette、Ultracell 30kDa）、チューブポンプ（米国コールパーマー社マスターフレックスポンプ model 77521-40、ポンプヘッド model 7518-00）及びチューブ（米国コールパーマー社マスターフレックスチューブ L/S16）で構成された限外ろ過装置を用い、限外ろ過精製を行った。すなわち、反応液に精製緩衝液としてABS（計1600mL）を滴下し

WO 2015/098099

161

PCT/JP2014/006421

ながら、限外ろ過精製を行うことで、未結合の薬物リンカー及び他の低分子
量試薬を除去するとともに緩衝液をABSへ置換し、さらに濃縮まで行った。
得られた精製溶液に対して、精密ろ過（0.22 μ m、PVDF膜）を行
い、標記抗体-薬物コンジュゲートを含有する溶液を88 mL得た。

特性評価：共通操作Eと共通操作F（ $\epsilon_{D, 280} = 5178$ 、 $\epsilon_{D, 370} = 20217$ を使用）を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：9.96 mg/mL、抗体収量：876 mg（88%）、共通
操作Eにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：3.8；
共通操作Fにて測定された抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：3.
8。

〔0270〕〔実施例21：ADCの抗腫瘍効果の評価〕

21-a) ADCの抗腫瘍効果（1）

マウス：5-6週齢の雌BALB/c-nu/nuマウス（日本チャール
ス・リバー株式会社）を実験使用前にSPF条件下で4-7日間馴化した。
マウスには滅菌した固形飼料（FR-2, Funabashi Farms
Co., Ltd）を給餌し、滅菌した水道水（5-15 ppm次亜塩素酸
ナトリウム溶液を添加して調製）を与えた。

測定、計算式：全ての研究において、腫瘍の長径及び短径を電子式デジ
タルキャリパー（CD-15C, Mitutoyo Corp.）で1週間に
2回測定し、腫瘍体積（mm³）を計算した。計算式は以下に示す通り。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2$$

〔0271〕 抗体-薬物コンジュゲートは全て生理食塩水（株式会社大塚製薬工場）で
希釈し、10 mL/kgの液量を尾静脈内投与した。ATCCから購入した
ヒト大腸癌細胞株COLO205を生理食塩水に懸濁した 2×10^5 cells
を雌BALB/c-nu/nuマウスの右側腹部に皮下移植し（Day 0）、
Day 7に無作為に群分けを実施した。抗体-薬物コンジュゲート（1）、
（6）、（12）をDay 7、14、21に全て10 mg/kgの用量
で尾静脈内投与した。陰性対照として薬物を結合していないhTINA1-

WO 2015/098099

162

PCT/JP2014/006421

H1L1抗体及びhRS7抗体を25mg/kgの用量で同様に投与した。抗体-薬物コンジュゲート(1)、(6)の投与によって腫瘍体積が抗体-薬物コンジュゲート(12)の投与に比べて著しく減少し、いずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図13)。なお、図中、横軸は日数、縦軸は腫瘍体積を示す。

[0272] 21-b) ADCの抗腫瘍効果(2)

ATCCから購入したヒト膵臓腺癌細胞株Bx-PC3を雌BALB/c-nu/nuマウスに移植し、更に固形継代した腫瘍片を雌BALB/c-nu/nuマウス右側腹部に皮下移植して(Day0)、Day16に無作為に群分けを実施した。抗体-薬物コンジュゲート(1)、(6)、(12)をDay16、23、30に全て10mg/kgの用量で尾静脈内投与した。陰性対照として薬物を結合していないhTINA1-H1L1抗体及びhRS7抗体を25mg/kgの用量で同様に投与した。抗体-薬物コンジュゲート(1)、(6)の投与によって腫瘍体積が抗体-薬物コンジュゲート(12)の投与に比べて著しく減少し、いずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図14)。

[0273] 21-c) ADCの抗腫瘍効果(3)

ATCCから購入したヒト膵臓腺癌細胞株Capan-1を雌BALB/c-nu/nuマウスに移植し、更に固形継代した腫瘍片を雌BALB/c-nu/nuマウス右側腹部に皮下移植して(Day0)、Day18に無作為に群分けを実施した。抗体-薬物コンジュゲート(1)、(6)、(12)をDay18、25、32に全て10mg/kgの用量で尾静脈内投与した。陰性対照として薬物を結合していないhTINA1-H1L1抗体及びhRS7抗体を25mg/kgの用量で同様に投与した。抗体-薬物コンジュゲート(1)、(6)の投与によって腫瘍体積が抗体-薬物コンジュゲート(12)の投与に比べて著しく減少し、いずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図15)。

[0274] 21-d) ADCの抗腫瘍効果(4)

WO 2015/098099

163

PCT/JP2014/006421

実施例21-a)と同様にCOLO205を雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し(Day0)、Day11に無作為に群分けを実施した。Day11、18、25に抗体-薬物コンジュゲート(2)、(5)を全て10mg/kg、抗体-薬物コンジュゲート(7)、(10)を全て3mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(2)、(5)、(7)、(10)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図16)。

[0275] 21-e) ADCの抗腫瘍効果(5)

実施例21-b)と同様にBx-PC3を雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し(Day0)、Day25に無作為に群分けを実施した。抗体-薬物コンジュゲート(2)、(5)、(7)、(10)をDay25、32に全て3mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(2)、(5)、(7)、(10)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図17)。

[0276] 21-f) ADCの抗腫瘍効果(6)

実施例21-a)と同様にCOLO205を雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し(Day0)、Day9に無作為に群分けを実施した。Day9、16に抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)を全て10mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図18)。

[0277] 21-g) ADCの抗腫瘍効果(7)

実施例21-b)と同様にBx-PC3を雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し(Day0)、Day21に無作為に群分けを実施した。Day21、28に抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)を全て3mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図19)。

WO 2015/098099

164

PCT/JP2014/006421

[0278] 21-h) ADCの抗腫瘍効果(8)

ATCCから購入したヒト卵巣癌細胞株NIH:OVCAR-3 8×10^6 cellsをMatrigel (Becton, Dickinson and Company) に懸濁し、雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し (Day 0)、Day 25に無作為に群分けを実施した。Day 25に抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)を全て3 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した (図20)。

[0279] 21-i) ADCの抗腫瘍効果(9)

ATCCから購入したヒト胃癌細胞株NCI-N87 1×10^7 cellsを生理食塩水に懸濁し、雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し (Day 0)、Day 6に無作為に群分けを実施した。Day 6に抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)を全て3 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した (図21)。

[0280] 21-j) ADCの抗腫瘍効果(10)

ATCCから購入したヒト肺癌細胞株NCI-H292 5×10^6 cellsを生理食塩水に懸濁し、雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し (Day 0)、Day 9に無作為に群分けを実施した。Day 9に抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)を全て3 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(3)、(4)、(8)、(9)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した (図22)。

[0281] 21-k) ADCの抗腫瘍効果(11)

ATCCから購入したヒト咽頭癌細胞株FaDu 3×10^6 cellsを生理食塩水に懸濁し、雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し (Day 0)、Day 11に無作為に群分けを実施した。Day 11に抗体-薬

WO 2015/098099

165

PCT/JP2014/006421

物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、（９）を全て 3 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、（９）の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した（図２３）。

[0282] 21-1) ADCの抗腫瘍効果（12）

ATCCから購入したヒト膵臓腺癌細胞株CFPAC-1 4×10^6 cellsを生理食塩水に懸濁し、雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し（Day 0）、Day 14に無作為に群分けを実施した。Day 14に抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、（９）を全て 3 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。抗体－薬物コンジュゲート（３）、（４）、（８）、（９）の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した（図２４）。

[0283] 21-m) ADCの抗腫瘍効果（13）

実施例21-1と同様に、CFPAC-1を雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し（Day 0）、Day 14に無作為に群分けを実施した。Day 14に抗体－薬物コンジュゲート（８）、（13）を全て 1 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。抗体－薬物コンジュゲート（８）、（13）の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した（図２５）。

[0284] 21-n) ADCの抗腫瘍効果（14）

ATCCから購入したヒト膵臓腺癌細胞株HPAC 3×10^6 cellsを生理食塩水に懸濁して雌BALB/c-nu/nuマウスに皮下移植し（Day 0）、Day 12に無作為に群分けを実施した。Day 12に抗体－薬物コンジュゲート（８）、（13）を全て 3 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。抗体－薬物コンジュゲート（８）、（13）の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した（図２６）。

[0285] 21-o) ADCの抗腫瘍効果（15）

公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団から入手したヒト食道癌組織をNOGマウス（公益財団法人 実験動物中央研究所）の皮下に移植し増殖させて得た腫瘍片を、さらに雌NOD-scidマウス（日本チャールス・

WO 2015/098099

166

PCT/JP2014/006421

リバー株式会社)に皮下移植し(Day 0)、Day 27に無作為に群分けを実施した。Day 27に抗体-薬物コンジュゲート(8)、(13)を全て3mg/kgの用量で尾静脈内投与した。抗体-薬物コンジュゲート(8)、(13)の投与によっていずれも腫瘍増殖抑制効果を発揮した(図27)。

[0286] [実施例22:ADCの抗細胞効果の評価]

TROP2抗原陽性細胞株であるBxPC3、NCI-H292、NIH:OVCAR-3、CFPAC-1、FaDu、ヒト肺腺癌細胞株Calu-3(ATCC)、ヒト卵巣癌細胞株CaOV3(ATCC)、及びTROP2抗原陰性細胞株であるヒト肺癌細胞株Calu-6(ATCC)、ヒト皮膚黒色腫細胞株A375(ATCC)を各ADCの抗細胞効果の評価に使用した。BxPC3及びNCI-H292は10%ウシ胎児血清(Moregate)を含むRPMI1640 Medium(Gibco)で、NIH:OVCAR-3は20%ウシ胎児血清及び0.01mg/mL Insulin(Invitrogen)を含むRPMI1640 Mediumで、CFPAC-1は10%ウシ胎児血清を含むIscove's Modified Dulbecco's Medium(Gibco)で、FaDu、Calu-3及びCalu-6は10%ウシ胎児血清を含むEagle's Minimum Essential Medium(ATCC)で、CaOV3及びA375は10%ウシ胎児血清を含むDulbecco's Modified Eagle Medium(Gibco)で、それぞれ 2×10^5 cells/mLに調製し、96穴細胞培養用マイクロプレートに90μLずつ播種した。更にRPMI1640 Mediumで100nM、20nM、4nM、0.8nM、0.16nM、0.032nM、0.0064nMに希釈した抗体-薬物コンジュゲート(4)、(8)もしくは比較のためRPMI1640 Mediumを10μLずつ添加して、37℃、5%CO₂下で6日間培養した。培養後、マイクロプレートをインキュベーターから取り出し、室温で30分間静置した。培養液と等量のC

WO 2015/098099

167

PCT/JP2014/006421

CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を添加し、プレートミキサーで 10 分間攪拌して細胞を溶解後にプレートリーダーで発光量を計測した。

6日間培養後の細胞増殖阻害率は次式で算出した。

細胞増殖阻害率 (%) = $a \div b \times 100$

a : 6日間培養後の検体添加ウェルの平均値 - 培養開始時の検体未添加ウェルの平均値

b : 6日間培養後の培地添加ウェルの平均値 - 培養開始時の検体未添加ウェルの平均値

また GI_{50} 値は次式で算出した。

$GI_{50} \text{ (nM)} = \text{antilog} \left((50 - f) \times (\text{LOG}_{10} (d) - \text{LOG}_{10} (c)) \div (f - e) + \text{LOG}_{10} (d) \right)$

c : 検体濃度 c

d : 検体濃度 d

e : 検体濃度 c における細胞増殖阻害率

f : 検体濃度 d における細胞増殖阻害率

c、d は細胞増殖阻害率 50% を挟む 2 点で $c > d$ 。

[0287] 抗体-薬物コンジュゲート (4) 及び (8) は、TROP2 抗原陽性細胞株である BxPC3、NCI-H292、NIH:OVCA8-3、CFPAC-1、FaDu、Calu-3、CaOV3 に対して、 $GI_{50} < 1$ (nM) の抗細胞効果を示した。一方、TROP2 抗原陰性細胞株である Calu-6、A375 に対しては抗細胞効果を示さなかった (> 100 (nM))。

配列表フリーテキスト

[0288] 配列番号 1 : TINA1 抗体の重鎖の可変領域をコードする cDNA のヌクレオチド配列

配列番号 2 : TINA1 抗体の重鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号 3 : TINA1 抗体の軽鎖の可変領域をコードする cDNA のヌク

WO 2015/098099

168

PCT/JP2014/006421

レオチド配列

配列番号4：T I N A 1 抗体の軽鎖の可変領域のアミノ酸配列

配列番号5：ヒト κ 鎖分泌シグナル及びヒト κ 鎖定常領域をコードするヌク

レオチド配列

配列番号6：ヒト重鎖分泌シグナル及びヒト I g G 1 定常領域をコードする

ヌクレオチド配列

配列番号7：c T I N A 1 抗体重鎖のヌクレオチド配列

配列番号8：c T I N A 1 抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号9：c T I N A 1 抗体軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号10：c T I N A 1 抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号11：h T I N A 1 - H 1 のヌクレオチド配列

配列番号12：h T I N A 1 - H 1 のアミノ酸配列

配列番号13：h T I N A 1 - H 2 のヌクレオチド配列

配列番号14：h T I N A 1 - H 2 のアミノ酸配列

配列番号15：h T I N A 1 - H 3 のヌクレオチド配列

配列番号16：h T I N A 1 - H 3 のアミノ酸配列

配列番号17：h T I N A 1 - L 1 のヌクレオチド配列

配列番号18：h T I N A 1 - L 1 のアミノ酸配列

配列番号19：h T I N A 1 - L 2 のヌクレオチド配列

配列番号20：h T I N A 1 - L 2 のアミノ酸配列

配列番号21：h T I N A 1 - L 3 のヌクレオチド配列

配列番号22：h T I N A 1 - L 3 のアミノ酸配列

配列番号23：T I N A 1 抗体のCDRH1のアミノ酸配列

配列番号24：T I N A 1 抗体のCDRH2のアミノ酸配列

配列番号25：T I N A 1 抗体のCDRH3のアミノ酸配列

配列番号26：T I N A 1 抗体のCDRL1のアミノ酸配列

配列番号27：T I N A 1 抗体のCDRL2のアミノ酸配列

配列番号28：T I N A 1 抗体のCDRL3のアミノ酸配列

WO 2015/098699

169

PCT/JP2014/006421

配列番号29 : hRS7抗体重鎖のヌクレオチド配列

配列番号30 : hRS7抗体重鎖のアミノ酸配列

配列番号31 : hRS7抗体軽鎖のヌクレオチド配列

配列番号32 : hRS7抗体軽鎖のアミノ酸配列

配列番号33 : プライマー mG2aVR2

配列番号34 : プライマー mKVR2

配列番号35 : プライマー 3.3-F1

配列番号36 : プライマー 3.3-R1

配列番号37 : プライマー TINAIH-F

配列番号38 : プライマー TINAIH-R

配列番号39 : プライマー TINAIL-F

配列番号40 : プライマー TINAIL-R

配列番号41 : プライマー EG-Inf-F

配列番号42 : プライマー EG1-Inf-R

配列番号43 : プライマー CM-LKF

配列番号44 : プライマー KCL-Inf-R

WO 2015/098099

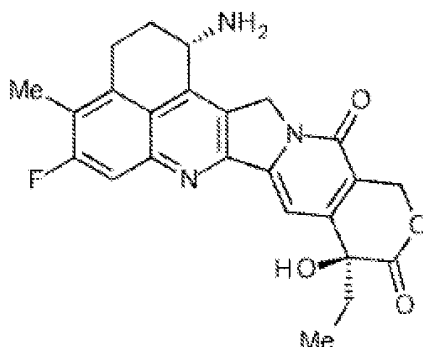
170

PCT/JP2014/006421

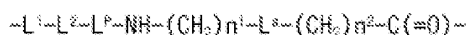
請求の範囲

〔請求項1〕 次式

〔化1〕



で示される抗腫瘍性化合物と抗TROP2抗体とを次式：



で示される構造のリンカーを介して、抗TROP2抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合によって結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲート。

（ここで、抗TROP2抗体は、 L^1 の末端において結合する。抗腫瘍性化合物は、1位のアミノ基の窒素原子を結合部位として、 $-(CH_2)n^2-C(=O)-$ 部分のカルボニル基に結合する。

式中、 n^1 は、0から6の整数を示し、

n^2 は、0から5の整数を示し、

L^1 は、 $-(Succinimid-3-yl-N)-(CH_2)n^3-C(=O)-$ を示し、

ここで、 n^3 は、2から8の整数を示し、

L^2 は、 $\sim NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)\sim$ 又は単結合を示し、

ここで、 n^4 は、1から6の整数を示し

L^3 は、2から7個のアミノ酸で構成されるペプチド残基を示し、

L^4 は、 $\sim O\sim$ 又は単結合を示し、

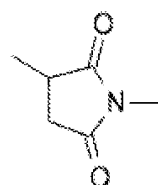
$-(Succinimid-3-yl-N)-$ は次式：

WO 2015/098099

171

PCT/JP2014/006421

[化2]



で示される構造であり、このものの3位で抗TROP2抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。)

【請求項2】 L¹のペプチド残基が、フェニルアラニン、グリシン、バリン、リシン、シトルリン、セリン、グルタミン酸、アスパラギン酸から選ばれるアミノ酸からなるペプチド残基である請求項1記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項3】 L¹が、以下の群から選ばれるペプチド残基である請求項1又は2に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

-GGF-,
-DGGF-,
-(D-)D-GGF-,
-EGGF-,
-GGFG-,
-SGGF-,
-KGGF-,
-DGGFG-,
-GGFGG-,
-DDGGFG-,
-KDGGFG-,
-GGFGGGF- ;

(ここで『(D-)D』はD-アスパラギン酸を示す。)

【請求項4】 L¹が、4個のアミノ酸で構成されるペプチド残基である請求項1又

WO 2015/098099

172

PCT/JP2014/006421

は2に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項5】 L^1 が、テトラペプチド残基の-GGFG-である請求項1～4のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項6】 n^3 が2から5の整数であって、 L^2 が単結合である請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項7】 n^3 が2から5の整数であって、 L^2 が $-NH-(CH_2CH_2-O)n^4-CH_2CH_2-C(=O)-$ であり、 n^4 が2又は4である請求項1～5のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項8】 $-NH-(CH_2)n^1-L^1-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、4から7原子の鎖長を有する部分構造である請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項9】 $-NH-(CH_2)n^1-L^1-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、5又は6原子の鎖長を有する部分構造である請求項1～7のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項10】 $-NH-(CH_2)n^1-L^1-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、以下のいずれかである請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

$-NH-CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 。

【請求項11】 $-NH-(CH_2)n^1-L^1-(CH_2)n^2-C(=O)-$ が、以下のいずれかである請求項10に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

$-NH-CH_2CH_2CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 、

$-NH-CH_2CH_2-O-CH_2-C(=O)-$ 。

【請求項12】 $-L^1-L^2-L^3-NH-(CH_2)n^1-L^4-(CH_2)n^2-C(=O)-$ に薬物を結合させた薬物-

WO 2015/098099

173

PCT/JP2014/006421

リンカー構造部分が、次の群から選ばれる 1 種の薬物－リンカー構造である請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

$-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$
 $\times$
 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH-DX})$;

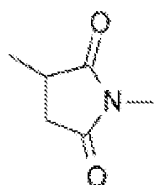
(ここで、 $-(\text{Succinimid-3-yl-N})-$ は次式：

WO 2015/098099

174

PCT/JP2014/006421

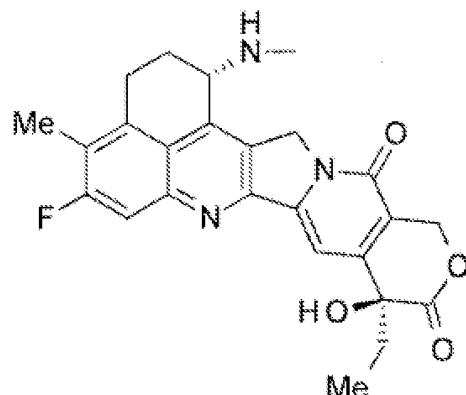
[化3]



で示される構造であり、このものの3位で抗TROP2抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。

-(NH-DX)は次式：

[化4]



で示される、1位のアミノ基の窒素原子が結合部位となっている基を示す。

-GGFG-は、-Gly-Gly-Phe-Gly-のテトラペプチド残基を示す。）

[請求項13]

前記薬物-リンカー構造部分が、次の群から選ばれる1種の薬物-リンカー構造である請求項12に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX)、

WO 2015/098099

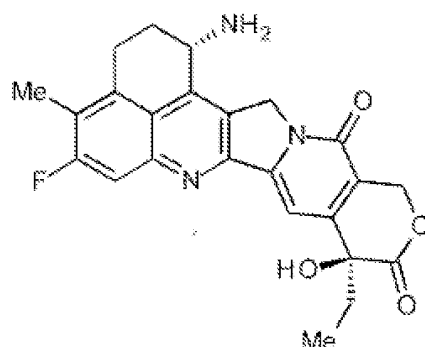
175

PCT/JP2014/006421

-(Succinimid-3-yl-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX)。

[請求項14] 次式

[化5]



で示される抗腫瘍性化合物と抗TROP2抗体とを次式：

$$-L^1-L^2-L^3-NH-(CH_2)_{n^1}-L^4-(CH_2)_{n^2}-C(=O)-$$

で示される構造のリンカーを介して、抗TROP2抗体のヒンジ部に存在するジスルフィド結合部分において形成させたチオエーテル結合を介して結合させたことを特徴とする抗体-薬物コンジュゲート。

(ここで、抗TROP2抗体はL¹の末端において結合する。抗腫瘍性化合物は-(CH₂)_{n²}-C(=O)-部分のカルボニル基に結合する。

式中、n¹は、0から6の整数を示し、

n²は、0から5の整数を示し、

L¹は、-(Succinimid-3-yl-N)-(CH₂)_{n³}-C(=O)-を示し、

ここで、n³は、2から8の整数を示し、

L²は、-NH-(CH₂CH₂-O)_{n⁴}-CH₂CH₂-C(=O)-又は単結合を示し、

ここで、n⁴は、1から6の整数を示し、

L³は、-GGFG-のテトラペプチド残基を示し、

L⁴は、~O~又は単結合を示し、

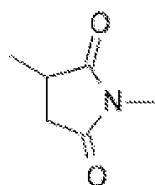
-(Succinimid-3-yl-N)-は次式：

WO 2015/098099

176

PCT/JP2014/006421

[化6]



で示される構造であり、このものの3位で抗TROP2抗体と結合し、1位の窒素原子上でこれを含むリンカー構造内のメチレン基と結合する。)

- 【請求項15】 n^1 が3であり、 n^2 が0であり、 n^3 が2であり、 L^2 が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であって、 n^4 が2であり、 L^3 が単結合であるか、 n^1 が1であり、 n^2 が1であり、 n^3 が5であり、 L^2 が単結合であり、 L^3 が $-\text{O}-$ であるか、又は
 n^1 が2であり、 n^2 が1であり、 n^3 が5であり、 L^2 が単結合であり、 L^3 が $-\text{O}-$ である、請求項14に記載の抗体-薬物コンジュゲート。
- 【請求項16】 n^3 が2又は5であって、 L^2 が単結合である請求項14又は15に記載の抗体-薬物コンジュゲート。
- 【請求項17】 n^3 が2又は5であって、 L^2 が $-\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})^{n^4}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ であり、 n^4 が2又は4である請求項14又は15に記載の抗体-薬物コンジュゲート。
- 【請求項18】 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)^{n^1}-L^1-(\text{CH}_2)^{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$ が、以下のいずれかである請求項14～17のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。
 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 、
 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ 。
- 【請求項19】 選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が1から10個の範囲である請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体-薬物コンジュゲート。
- 【請求項20】 選択された1種の薬物-リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数

WO 2015/098699

177

PCT/JP2014/006421

が2から8個の範囲である請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項21】 選択された1種の薬物－リンカー構造の1抗体あたりの平均結合数が3から8個の範囲である請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項22】 請求項1～21のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する医薬。

【請求項23】 請求項1～21のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を含有する抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

【請求項24】 肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、頭頸部癌、又は食道癌に適用するための請求項23記載の抗腫瘍薬及び/又は抗癌薬。

【請求項25】 請求項1～21のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を活性成分とし、薬学的に許容される製剤成分とを含有する医薬組成物。

【請求項26】 肺癌、腎癌、尿路上皮癌、大腸癌、前立腺癌、多形神経膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、メラノーマ、肝癌、膀胱癌、胃癌、子宮頸癌、頭頸部癌、又は食道癌に適用するための請求項25記載の医薬組成物。

【請求項27】 請求項1～21のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲート、その塩、又はそれらの水和物を投与することを特徴とする腫瘍及び/又は癌の治療方法。

1/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

【図1】

配列番号 7 : c T I N A 1 抗体重鎖のヌクレオチド配列

atgaaacacotgtggttcttccctcctgctggtggcagctcccagatgggtgctgagccagatccag
 ttggtgcagctctggacctgagctgaagaagcctggagagacagtcaggatctcctgcaaggcttct
 gggatataccttcacaaactgctggaatgcagtggtgcaaaagatgccaggaaagggttgaagtgg
 attggctggataaacacccactctggagtgccaaatlgtgcagaagacttcaagggaagggttgcc
 ttctcttggaaaacctctgccagcactgcataatttacagataagccacctcaaaaatgaggacacg
 actaogtaattctgtgcagatcggggttcggtagtagctactggtaacttcgatgtctggggcgca
 gggacccgggtcaccgtcagctcagcctccaccaaggggcccaagggtcttccccctggcacccctcc
 tccaaagagcacctctggcgccacagccgcctgggctgcttggtcaaggactacttccccgaaccc
 gtgacgctgagctggaactcaggcccccctgacccagcggtgcacacccctccccgctgtcctgcag
 tccctcaggactctactccctcagccagcggtggtgcacgctgcctccagcagcttgggcacccagacc
 tacatctgcaacgtgaatcacaaagccagcaacaccaaagggtggacaagagaggttgagcccaaatct
 tgtgacaaaactcacacatgccacccctgccagcaactgaactcctggggggacccctcagttctc
 ctcttccccccaaaaacccsaggacacccctcatgatctcccggaacccctgaggtcacatgcgtgggtg
 gtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcct
 aatgcacaagacaaagcccccgggagggagcagtaacaacagcaagtaacgggtggtcagcgtctccac
 gtctgcacccaggactggtgaatggcaaggagtagcaagtgaagggtctccaacaagccctccca
 gccccatcgagaaaacccctctccaaagccaaaggccagccccgggaaccacaggtgtacacccctg
 cccccatccccggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgacctgctggtcaaaggcttctat
 cccagggacatcgccgtggagtggtggagagcaatggccagcccgagaacaaactacaagaccacccct
 cccgltgtggactccgacggctccttcttctctctacagcaagctcaacgltggacaagagcaggtgg
 cagcaggggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcctgagggtcttgccacaaccactacaccacagaag
 agcctctccctgtctccggccaa

シグナル配列 (1-57)、可変領域 (58-420)、定常領域 (421-1410)

配列番号 8 : c T I N A 1 抗体重鎖のアミノ酸配列

MXHLWPELLLVAAAPRWVLSQIQLVQSCPELKKPCETVRIECKASGYTFTTAGMQWVQKMPGKGLKWIGWINT
 HSCVPKYASDFKGRFAFULETSASTAYLQISNLKNEDTTYFCARGGFGSYWYFDVWCACTAVTVSSASTK
 GPSVFFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFFSPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL
 GTQTYILCNVNAHPSNTYKVDKAVEFKSCDKTRTCPPCPAPELLGGPSVFLAPPRFKUTLMIKSTIEVEVCVVVD
 VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTEREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYRCKVSNKALPAPIEKTIIS
 KAKGQPRAPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFFVLDSDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQGNVFPSCSVMIHALHNHYTQKSLSLSPGK

シグナル配列 (1-19)、可変領域 (20-140)、定常領域 (141-470)

2/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

【図2】

配列番号9：c T I N A 1抗体軽鎖のヌクレオチド配列

atgggtgctgcagaccacaggtgttcatctccctgctgctgtggatctccggcgcgtacggcgacatt
 gtgatgacccagtcctacaaattcatgtccacatcagtaggagacagggtcagcatcacctgcaag
 gccagtcaggatgtgagtactgctgtagccctgglatcaacagaaaccaggacaaatctcctaaactg
 ctgatttactcggcatccacccgctacactggagtcacctgattcactggcagtgatctggg
 acggcttctcactttcaccatcagcagtgctgcaggctgaagacctggcagtttatttactgtcagcaa
 cattaatattactccgctcacgttcgggtgctgggaaccaagctggagctgaaacgggctgtggccgcc
 cctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcgggcacccgctccgtgggtgtgc
 ctgctgaataacttctaccccagagagggccsaggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagtc
 gggaactcccaggagagcgtgacccgagcaggacagcaaggacagcaacctacagcctgagcagcacc
 ctgacctgagcaaaagccgactacgagaagcaccaaggtgtacgctgagaggtgacccaccagggc
 ctgagctcccccgctcaccagagcttcaacaggggggagtgct

シグナル配列（1-60）、可変領域（61-387）、定常領域（388-702）

配列番号10：c T I N A 1抗体軽鎖のアミノ酸配列

MVLQTVQVPISELLWISGAYGDIYMTQSHKFMSTSVGDRVSLTCKAGQDVSTAVAWVQKPGQSPKLLIYSAE
 YHYTCVPRDFTGSSGTATFTTISVQAECLAVFYCQQHYITPLTFGASTKLELKRVAVAEESVFIIPPSSDQ
 LKSGTASVYCLNNFYPRKAVQWQVDMALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTKADYEKKHVVYACEV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列（1-26）、可変領域（27-129）、定常領域（130-234）

3/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

【図3】

配列番号 11 : hTINA1-H1 のヌクレオチド配列

atgaaacacctggtggttcttctctcctgctggtggcaggtccacagatgggtgctgagccaggctgagctggtg
 cagctctggcgccggaagtgaagaacccaggcgccagcgtgaaggctgctgcaaggccagcggctacaccttt
 accacccggccggcctgcaagtgggtgcccaggtctctggacagggcctggatggatggatcacaacc
 cacagcgcgctgcccacaaatagcccgaggacttcaagggcagagtgaccatcagcgccgacaccagcaccctc
 acagcctacctgcagctgagcagcctgaagtcggaggacacccggctctactactgcccaggaagcggttctc
 ggacgagcctaattggtacttggacgtgtggggccaggccacccctcgtgacgtcagctcagcctccaccag
 ggcccagcgctcttcccccctggcaccctctctccaagagcacctctggggggcagcagccgctgggtgctg
 gtcagggaactacttcccgaacccgtgacccgtgagcttggaactcaggcgccctgaccagcgcgctgcaacc
 ttcccccgtgtcctgcagctctcagggaactactcctcagcagcgtggtgacccgtgcccctcagcagcgttg
 ggaccccagcctacatctgtcaacgtgaatcacagccacgcaaccccaagggtggacaagagagltgagccc
 aactcttgtgacaaaaactcacacatgcccaccctgcccagcaccctgaactcctgsgggggacccctcagttctc
 ctcttcccccccaaaacccaaggacacccctcatgatctcccggaacccctgaggtcacatgctggtggtggac
 gtgagccacgagagacccctgaggtcaagttcaactggtgaggtggacggcgtggggtgataatgccagaca
 aagccccgggaggagcagctacaacagcacgtacccgggtggtcagcgtctctcaccgtctctgcacccaggactg
 ctgaatggcaggaggtacaagtgcagggtctccaacaaagccctccagcccccatcagagaaaccatctcc
 aaagccaaaggccagcccccgggaacccacaggtgttacacccctgcccacatcccccggaggagctgaccaaagac
 caggtcagcctgacctgctgggtcaaaggctctctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatggc
 cagcccgagaaacaaactacaagacacccctcccgctgctggactccgaaggctcctctctctctacagcaag
 ctccacgtggacaagagagaggtggcagcagggcaacgctctctcatctctccgtgatgcagaggtctctgcac
 aaccactacacccagagagagctctctccctgtctcccggaacaa

シグナル配列 (1-57)、可変領域 (58-420)、定常領域 (421-1410)

配列番号 12 : hTINA1-H1 のアミノ酸配列

MKHIMFFLLVAAAPRWVLSQVQLVQSGAEVSKPGASVKVDCAASGYTFETAGNQWVRQAPGGGLENNMEWINT
 HSGVPKYAEDEFKGRVTISADTSTSTAYLQLSSLKSEDTAVVYFCARSGFUSEYWFYDVWGQDTLVTVSSASTK
 CPSEVFELAPGSKSTSGGTAAALCCLVKDYFPPFPVTVSWNSGALTSGVITTPAVLQSSGLYSISSVVTVFSSSL
 GTQTYYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHFTCPFCPAPELLCGPSVFLFPPKPRDTLMISRIPEVTCVVVD
 VSHEDPSVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIIS
 KAKCGQPREPKVYITLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGPYPSPDFAVENWESNQCPENNYKTPPVLDSGSEFLYSK
 LTVDKERNQGGNVPSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSPGK

シグナル配列 (1-19)、可変領域 (20-140)、定常領域 (141-470)

4/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

【図4】

配列番号 13 : hTINA1-H2 のヌクレオチド配列

atgaaacacactgttggttcttctctctgtcgtgggtggcagctcccagatgggtgctgagccagggtgcagctgggtg
 cagctctggggccgaagtgaaagaaaccaggcgcacagcgtgaagggtgtcctgcaggccagcggctacaccttt
 accacccgcccgaatgcagtggttgccacaggctcctcggacaggccctggaaatggatgggctggatcaacacc
 cacagcggcgttgcccaaatcgcgcggaggacttcaagggcagagtgaccatcagcctggacacccagcactcc
 accgcctacactgcagctgagcagcctgaagtcaggaggacacccgcgtgtactactgcgcacgaagcggtctc
 ygcagcagctcactggtaacttcgacgtgtggggccacaggccacccctcgtgacccgtcagctcagcctccaccaag
 ggcccaagcgtcttcccccctggcaccctcctccagagcactctggcggcacagccgcctgggctgctgtg
 gcaaggacacttcccccgaacccgtgacccgtgagctggaaactcaggcgccttgacacagcgggtgcacacc
 tcccccgtgtctctgcagcactcaggacctcactcctcagcagcgtgggtgacccgtgcccaccagcagcttg
 ggaccccagacctacactctgcacacgtgaatcacaaagccacgcaacaccaaaggctggacaaagaggttgagcc
 aaatcttgtgacaaaaactccacactgcacacccctgcacagcactgaaactcctgggggggaacccctcagctctc
 ctcttcccccacaaaaaccccaaggacacccctcctgatctcccggaacccctgaggtcacatgctgggtgtggac
 gtgagccacaggaacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcccagaca
 aagcccccggggaggagcagtaaacacgacgtaacgggtgggtcagcgtcctcaccgctcctgcacacaggcactgg
 ctgcaatggcaggaggtacaaagtgcnaaggtctccaaacaaagccctcccaagcccccacatcgagaaaaacatctcc
 aaagccaaaaggccagcccccgggaacccacaggtgtacacccctgcacccatcccgggaggagatgacccaggaac
 caggtcagcctgacctgctgtgtcaaaaggtctctatccagcagacatcgccgtggagtgaggagacatggc
 cagcccgaggaacaaactacaagacccacccctcccgctgctggaactccgacggcactcttcttctctccacagcaag
 ctcaacgggggacaaagagcaggtggcagcagggcacaagctcttctcaagctccgtgcatgaggtctctgcac
 aaccactacaccccgaagagccctctccctgtctcccggaac

シグナル配列 (1-57)、可変領域 (58-420)、定常領域 (421-1410)

配列番号 14 : hTINA1-H2 のアミノ酸配列

MEHLNFFLLVLAAPRWVLSQVQLVCSGAEVKKKPGASVKVSCKASGYTFPTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWI
 HSGVPKFAEOPKGRVTISLDISTSTAYLQLSSLKSEDTAVVYCARSGTGSYWFDFVNGGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPESKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVFVPSSEL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDRVPEKSCDTHTCTPPCPAPELLSGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSHEDPEVKFNNYV DGVENVNAKTKPKRKQYRSTYRVVSVLTVLHQDWLNCKEYKKCKVSNKKALPAPIENTIS
 KAKGQPREPQVYVLPAPRFEEMTKNQVSLTCLVSGTYPSSDIAVENESNGQPENNYKETFPVLIQSDGSFYL
 LTVDKSRWQOGNVEFSCSVMRHALNNHYTQKSLSLSPCK

シグナル配列 (1-19)、可変領域 (20-140)、定常領域 (141-470)

5/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

【図5】

配列番号15：hTINA1-H3のヌクレオチド配列

atgaaacacootgtggttcttctctctgctgggtggcagccccagatggggtgctgagccagatccagctgggtg
cagtctggcgccgaagtgaagaaacccggcgagagcgtgaaggtgtcttgcacggccagcggctacacotct
accacggcggtcatgcagtggttgacgagatgcctggcgaaggcctgggaatggatggctgggtacacacc
cacagcggttgccccaaatagccggaggacttcaagggcagagtgaccttcagcctggacaccagcaectcc
accgcttaacggcagctgagcagcctgaagtcaggagacacggcggcttactactgcggcagaagcgggttc
ggcagcagctactggtaotlogacgtgtggggccaggccacccctcgtgacccgtcagctcagcctccaccaag
ggcccaagcgtcttccccctggcaccctctctccagagacactctggcgggcacagccggcctgggtgctgctg
gtcgaaggactacttccccgaacccgtgacccgtgagctgggaactcaggcgccctgacccagcggcgtgcacac
ttccccggctctctgcagctcttcacggactctactccctcagcagcgctgggtgacccgtgcccctccagcagcttg
ggcaccacagacctacatctgcacagtggaatcacaaagccacgacacacacaggttggcacaagagagttgagcgc
aaatcttggtagacaaaactcacacatgccccccctgcccagcactgaaactcctggggggacccctcagttctc
ctcttccccccaaaaccccaaggacacccctcagatctccgggacccctgaggttcaatgctggtggtggac
gtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcatantgccacgaca
aagcccggggaggagcagtaacacagcaggtacccgggtggtcagcgtctcctccctgacccaggaactgg
ctgcatgggaaggagtcacagtgcaaggctctccacacaaagccctccacagcccccacacagagaaacacatctcc
aaagccaaaggccagcccccgggaacccacaggtgtacacccctgccccatccggggaggagatgaccaaagaac
caggtcagcctgaactgcctgggtcaaggcttctctatccagggacatgcctgtgagtgaggagacantggc
cagcccgagacacaaactacaaagacacccctccctggttggaactccgaaggctctctctctctacagcaag
ctcaccgtgagacaaagagcaggtggcagcagggcaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcac
aacccactacacccagaagagccctctccctgctctccggcaca

シグナル配列（1-57）、可変領域（58-420）、定常領域（421-1410）

配列番号16：hTINA1-H3のアミノ酸配列

MKHLWFFLLLVAAPEKSVLSQIQLVQSCAEVEKPCESVKVSCNAGSYTFTTAGMQWVQQMPGKGLKRWMCWINT
HSGVPKYAEDEFKGRVTFSLTSTSTAYLQLSSLRSEDTAVYYCARSGFGSSYWFYFDVWGGQGLTVTVSSASTK
GPSVFFLAPSSKSTSGUTRAALGCLVKDYFPEPVYVSWNSGALTSCVHTPPAVLQSSCLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYLGNVNHKPSNTRVDKRVHPSCKTHTCFPCPAPELLGGFSSVFLFPPKPEDTLMISRTEPVTCVVVD
VSHEDPEVNFNWYVDGVSEVENAKTSPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQFPREFQVYTLFPPSRREMTKNQVSLTCLVSGFYPSDTAVEWEKNGQFENNYKTTTPVLESDGCSFFLYSK
LTVKSRWQQCNVFSQSVHREALNHYTQKSLGLSPGK

シグナル配列（1-19）、可変領域（20-140）、定常領域（141-470）

6/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

【図6】

配列番号 17 : h T I N A 1 - L 1 のヌクレオチド配列

atggttgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgtgtggatctcoggcgcgtaaggcgacatccagatg
 aaccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgcacatcacatgcaggccagccaggac
 gtgtccacagccgtggcctgglatcagcagaagccctggcaaggccccaagctgctgatctacagcgccagc
 taacggtacacaggcgctggccagcagattttctggcagcggctccggcacagacttcaacctgcaatcagc
 agcctgcagcccgaggacttcggcgtgtactactgtccagcagcactacatcaccctccctgacotttggccag
 ggcaaccaagctggaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcatcttccccctccgacgagcag
 ctgaagtcgggcacccgctccgtggtgtgctgtgataaacttctacccacagagaggccaaggtgcagtgg
 aaggtggacaacgcccctgcagtcgggaactccacggagagcgctgacccagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagccctgagcagcaccctgagcagcaagccgactacgagaagcacaagctgtacgctgcagcgtg
 aaccacacaggccctgagctccccctgcacaaagagcttcaacaggggggagtggt

シグナル配列 (1-60)、可変領域 (61-387)、定常領域 (388-702)

配列番号 18 : h T I N A 1 - L 1 のアミノ酸配列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGVNVTITCKASQDVSTAVAWYQKPKAPKLLIYSAS
 YRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAYVYCCQNHITPLITFGQSTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVYCLLNNFYPREAKVQWKNVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYERKHKVYACRV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列 (1-20)、可変領域 (21-129)、定常領域 (130-234)

【図7】

配列番号 19 : h T I N A 1 - L 2 のヌクレオチド配列

atgggtgctgcagaccaggtgttcatctccctgctgtgtggatctcoggcgcgtaaggcgacatcgtgatg
 aaccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggcgacagagtgcacatcacatgcaggccagccaggac
 gtgtccacagccgtggcctgggtatcagcagaagccctggcaaggccccaagctgctgatctacagcgccagc
 taacggtacacaggcgctggccagcagattttctggcagcggctccggcacagacttcaacctgcaatcagc
 agcctgcagcccgaggacttcggcgtgtactactgtccagragcactacatcaccctccctgacotttggccag
 ggcaccaagcttggaaatcaagcgtacggtggccgccccctccgtgttcatcttccccctccgacgagcag
 ctgaagtcgggcacccgctccgtggtgtgtgctgtgataaacttctacccacagagaggccaaggtgcagtgg
 aaggtggacaacgcccctgcagtcgggaactccacggagagcgctgacccagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagccctgagcagcaccctgacccctgagcagaagccgactacgagaagcacaagctgtacgctgcagcgtg
 aaccacacaggccctgagctccccctgcacaaagagcttcaacaggggggagtggt

シグナル配列 (1-60)、可変領域 (61-387)、定常領域 (388-702)

配列番号 20 : h T I N A 1 - L 2 のアミノ酸配列

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGVNVTITCKASQDVSTAVAWYQKPKAPKLLIYSAS
 YRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAYVYCCQNHITPLITFGQSTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVYCLLNNFYPREAKVQWKNVDNALQSGMSQSSVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYERKHKVYACRV
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

シグナル配列 (1-20)、可変領域 (21-129)、定常領域 (130-234)

7/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

[図8]

配列番号 21 : hTINA1-L3 のヌクレオチド配列

atggtgctgcagaccaggtgttcacatccctgctgctgtggatctccggcgggtacggcgacatcgtgatg
 acccagagccctagcagcctgagcgcacagcgtggggcgcacaggtgacccatcccatgcaaggccagccaggac
 gtgtccacagccgtggcctggtatcagcagaagcccggaagcagcccaagctgctgatctacagcgcacagc
 taccggtacacccggcgtgcccagcagattttctggcagcggctccggcaccgacattaccctgacaatcagc
 agcctgcagcccgaggacttcggcgtgtactacggcagcagcactacatccaccccccctgacotttggccag
 ggcaccaaagctggaaatcaagcgtacgggtggcggcccccctccgtgttcattcttccccccctccgacgagcag
 ctgaagtccggcaccgcctccgtggtgtgcctgctgaataacttctacccacagagaggccaaggtgcaqlgg
 aaggtggacaacgcctgcagtcggggaactccaggcgagcgtgacccgagcaggacagcaaggacagcacc
 tacagcctgagcagcaccctgacccctgagcaaacgcgcactacgagaagcacagggtgtacgctgcagaggtg
 acccaccagggccctgaggtcccccgtacacacagagcttccacaggggggaggggt
 シグナル配列 (1-60)、可変領域 (61-387)、定常領域 (388-702)

配列番号 22 : hTINA1-L3 のアミノ酸配列

hVLTQVPLISLLWISCAVGDENVMTQSPSSLSASVCGQRTLTCKASQDVSTAVAWYQKPKGQPKLLIYSAS
 YRYTGVPGRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFAVYYCQGHYITPLIFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
 LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
 THQCLSPVTKSFNRGEC

シグナル配列 (1-20)、可変領域 (21-129)、定常領域 (130-234)

[図9]

配列番号 23 : TINA1 抗体のCDRH1 のアミノ酸配列
 TAGMQ

配列番号 24 : TINA1 抗体のCDRH2 のアミノ酸配列
 WINTHSGVPKYAEDFKG

配列番号 25 : TINA1 抗体のCDRH3 のアミノ酸配列
 SGFGSSYWYFDV

配列番号 26 : TINA1 抗体のCDRL1 のアミノ酸配列
 KASQDVSTAVA

配列番号 27 : TINA1 抗体のCDRL2 のアミノ酸配列
 SASRYT

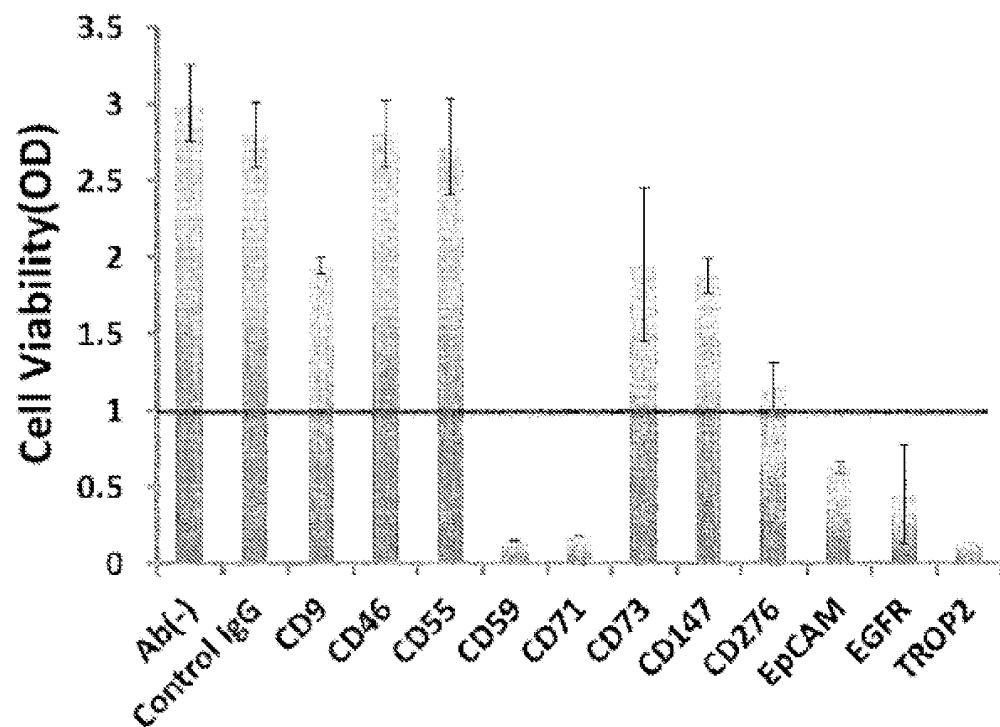
配列番号 28 : TINA1 抗体のCDRL3 のアミノ酸配列
 QQHYITPLT

8/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

[圖10]

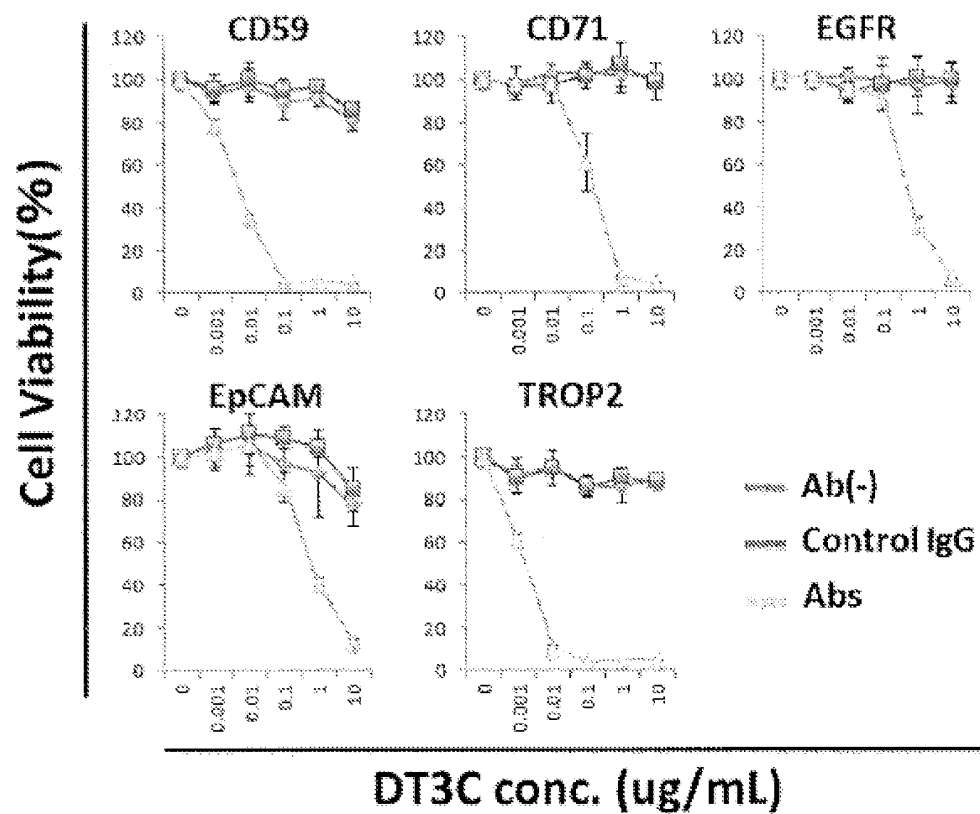


9/15

WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

[図11]

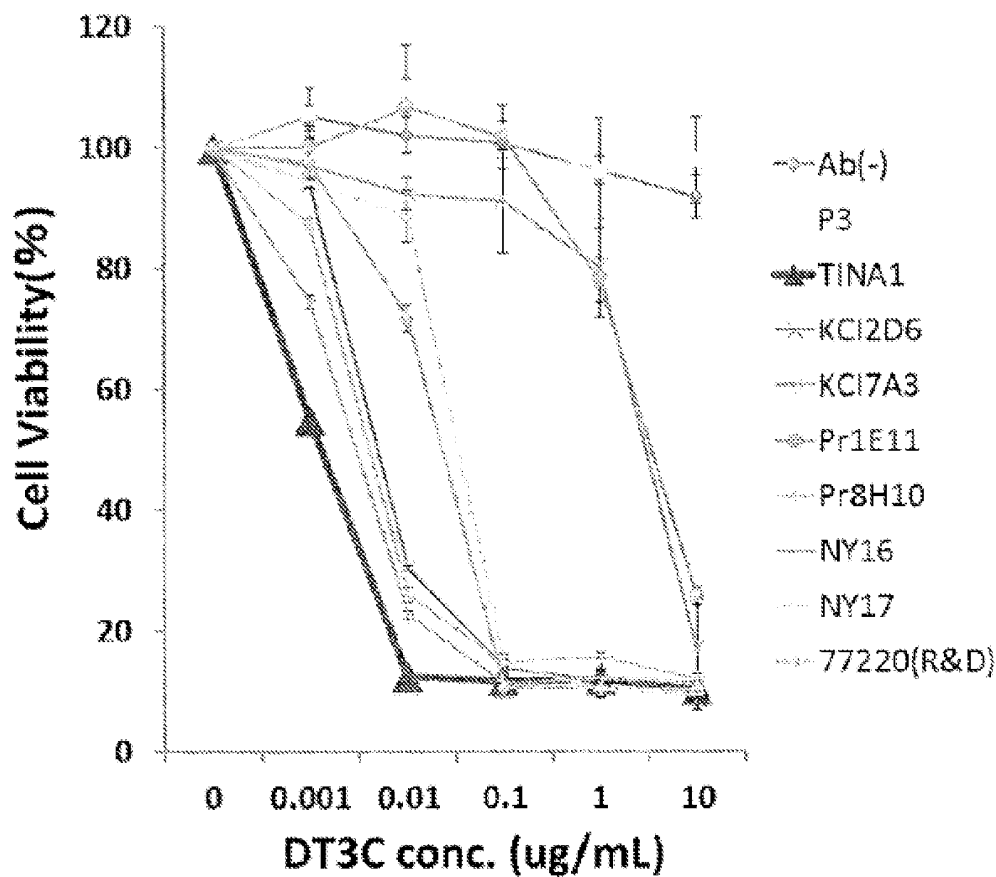


10/15

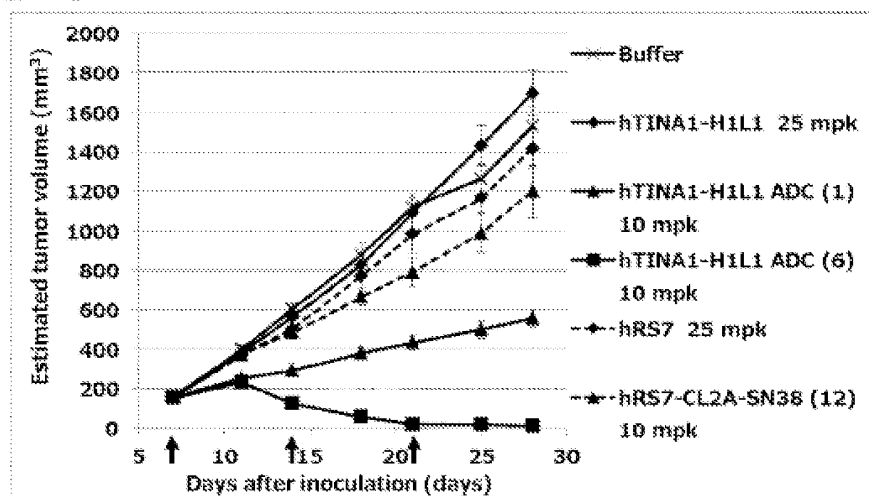
WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

[圖12]



[圖13]

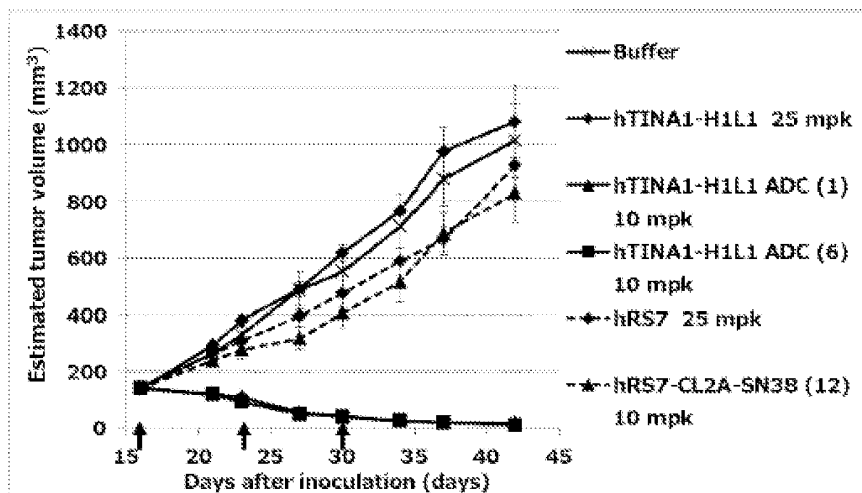


11/15

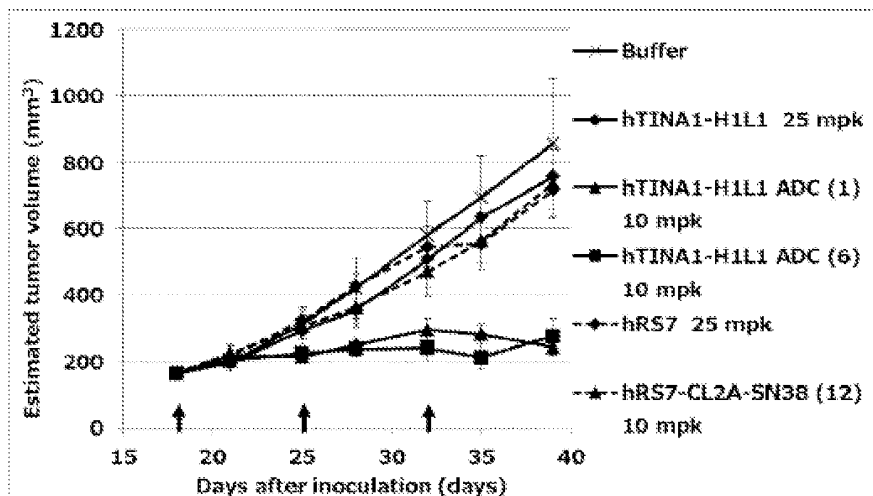
WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

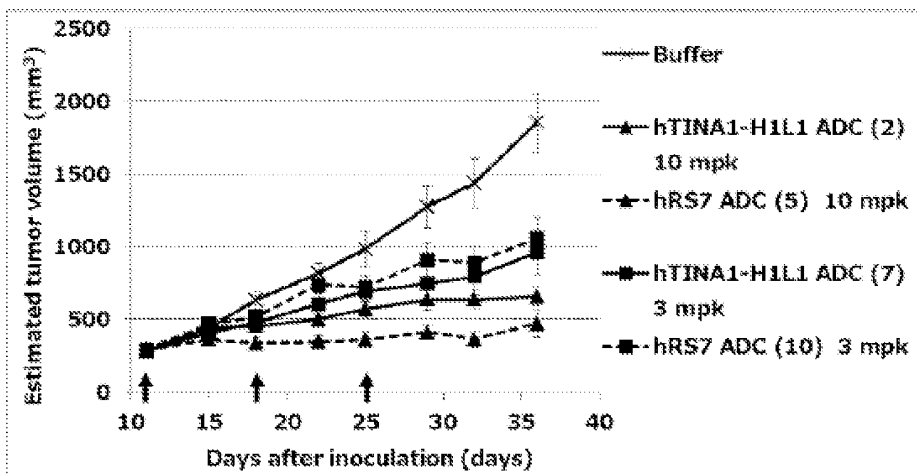
[14]



[15]



[16]

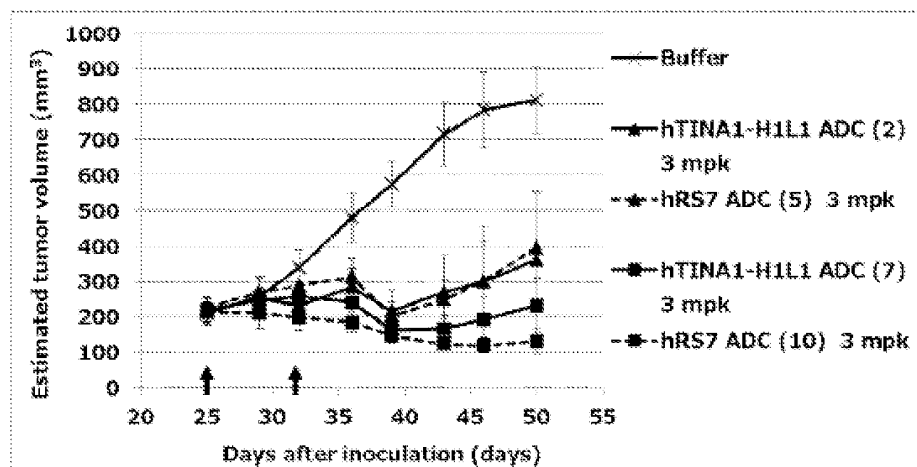


12/15

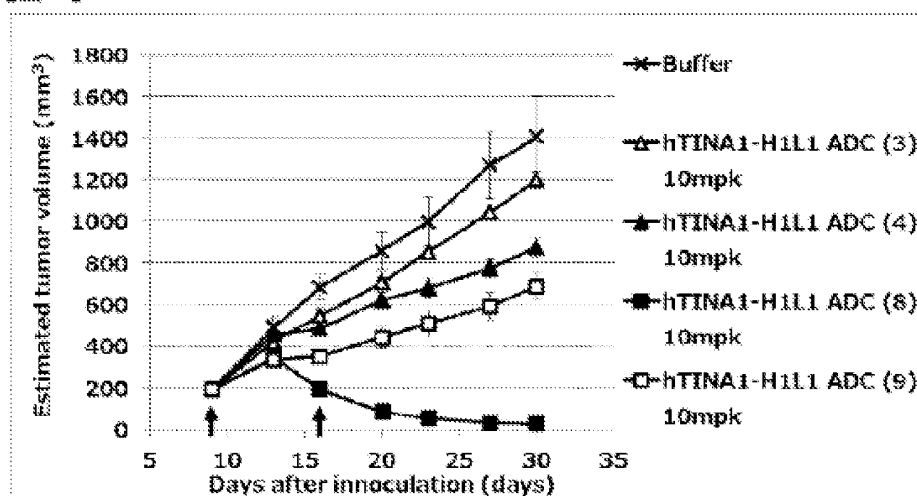
WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

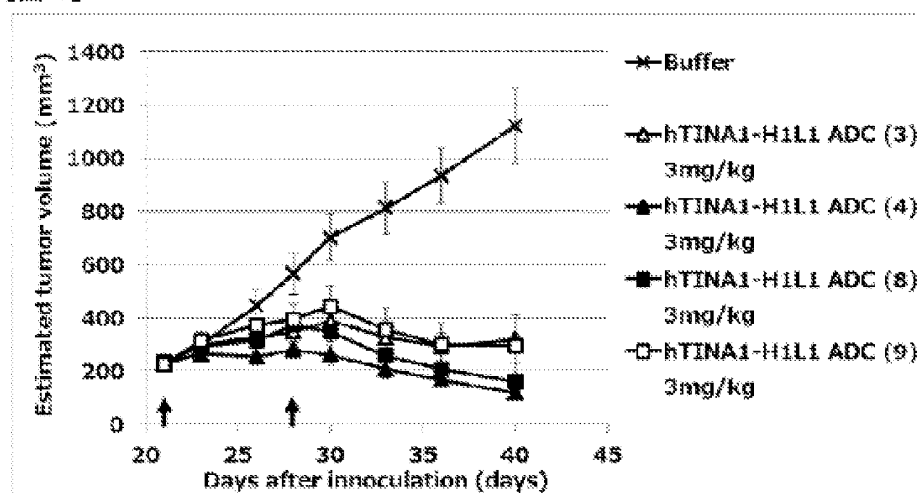
[図17]



[図18]



[図19]

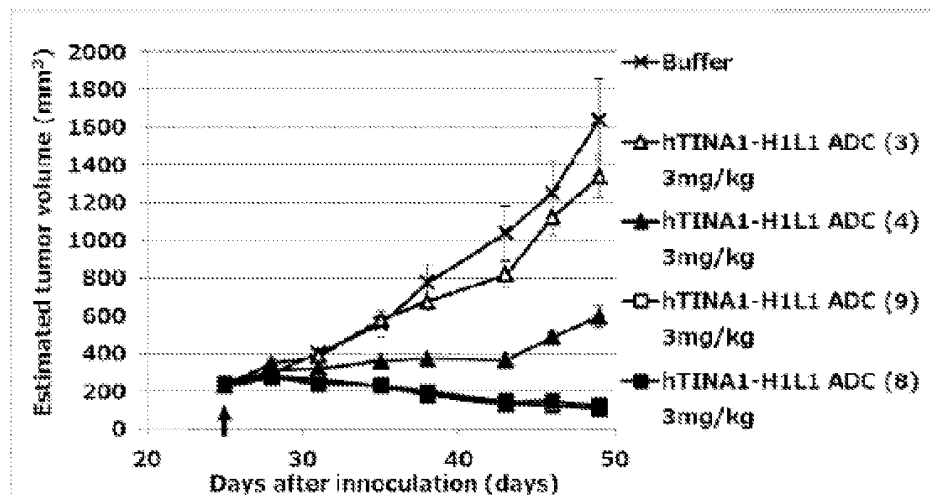


13/15

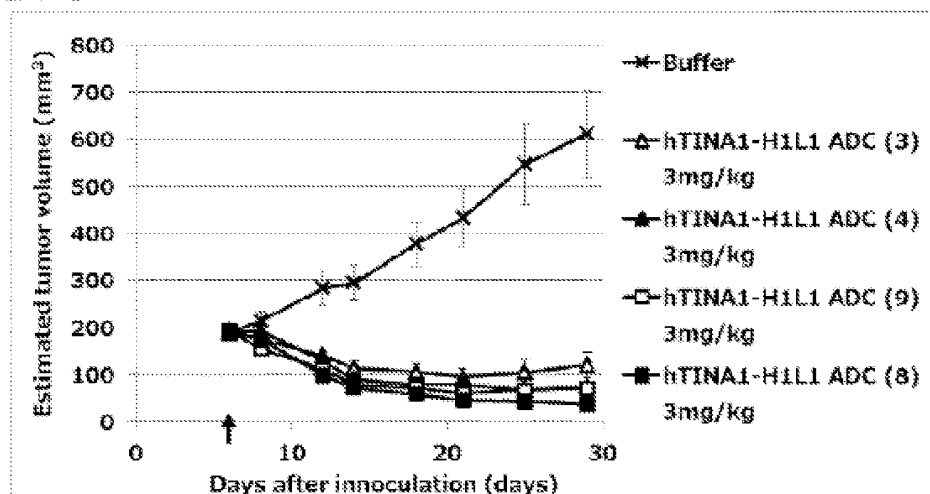
WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

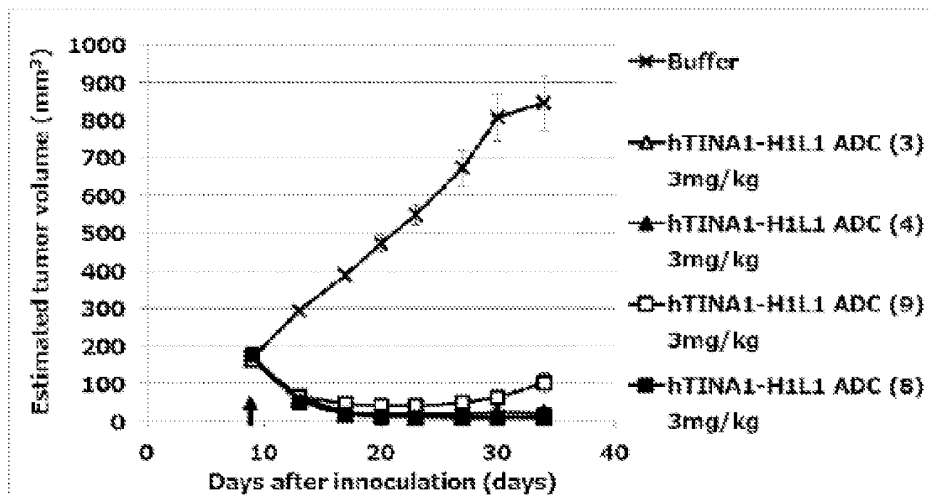
[図20]



[図21]



[図22]

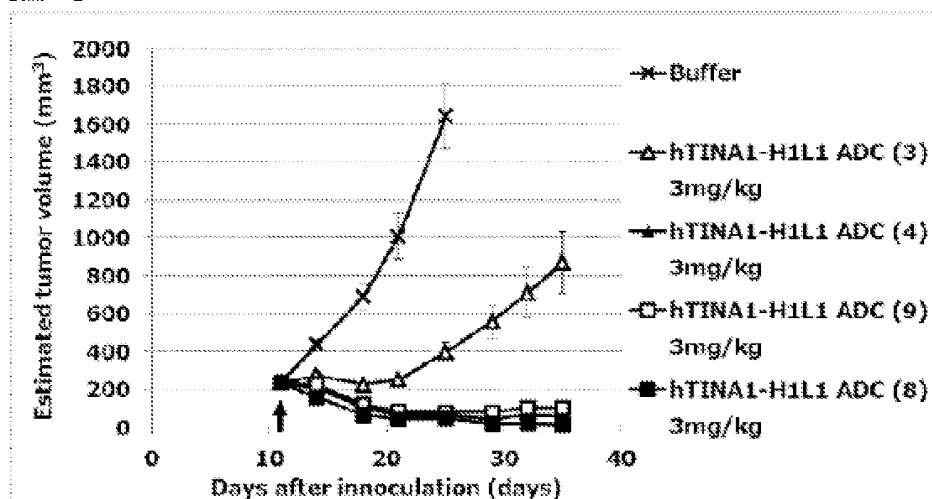


14/15

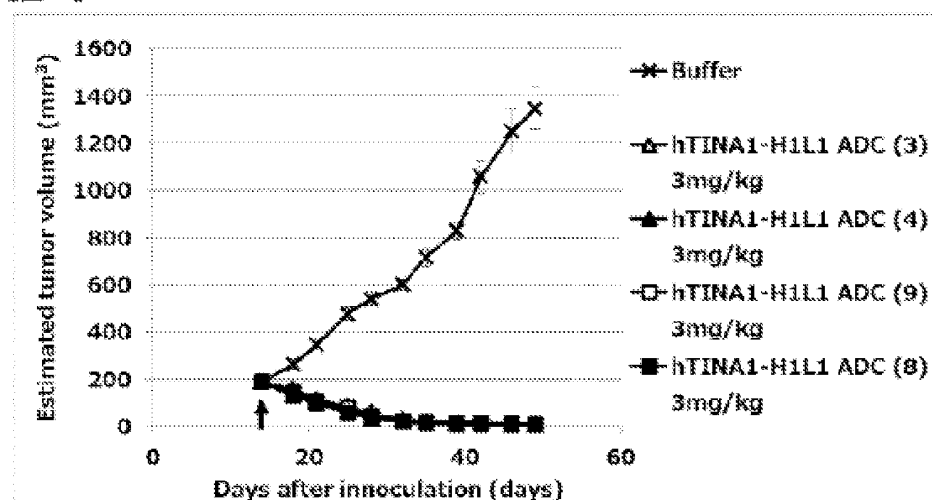
WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

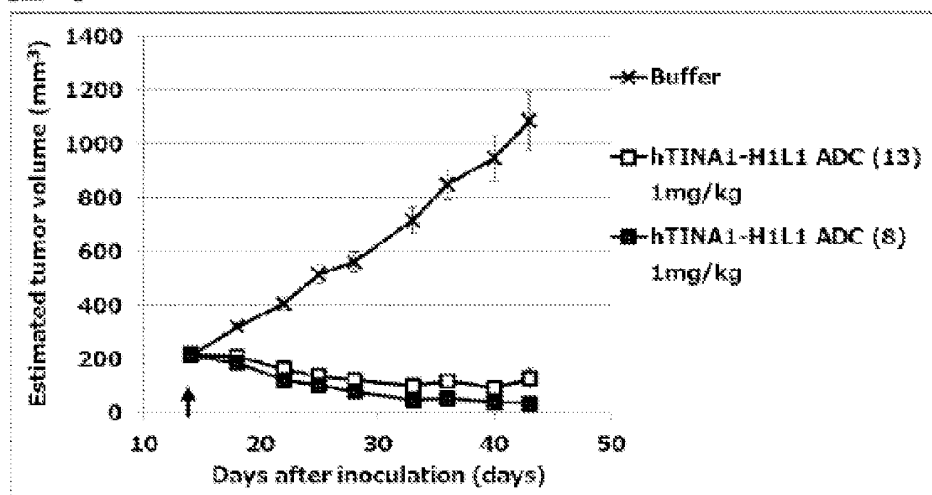
[23]



[24]



[25]

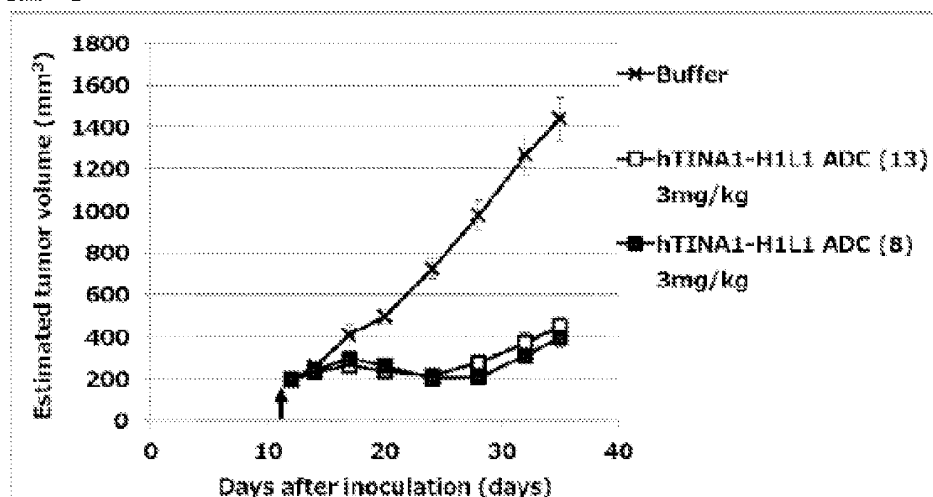


15/15

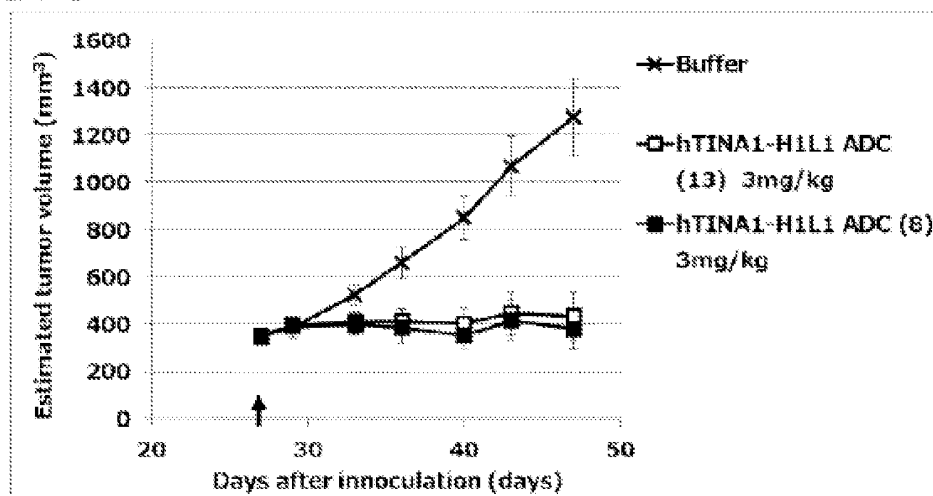
WO 2015/098099

PCT/JP2014/006421

[図26]



[図27]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/006421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)1, A61K31/4745(2006.01)1, A61K39/395(2006.01)1,
A61K47/48(2006.01)1, A61P35/00(2006.01)1, C12N15/09(2006.01)1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/28, A61K31/4745, A61K39/395, A61K47/48, A61P35/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kohai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0293513 A1 (IMMUNOMEDICS, INC.), 01 December 2011 (01.12.2011), claim 1; drawings & JP 2009-531325 A & JP 5314590 B2 & JP 2008-538747 A & JP 2008-542194 A & JP 4955652 B2 & JP 5011277 B2 & JP 2009-514813 A & JP 2009-517337 A & JP 5231231 B2 & JP 5498018 B2 & JP 2009-519931 A & JP 5090366 B2 & JP 2006-511526 A & JP 4959136 B2 & JP 2011-500842 A & JP 2014-129395 A & JP 5577559 B2 & JP 2011-517684 A & JP 2011-530836 A & JP 2013-503184 A & JP 2013-503200 A & US 2010/0104589 A1 & US 2008/0166363 A1 & US 2006/0193865 A1 & US 2004/0185083 A1 & US 2011/0305631 A1 & US 2012/0082617 A1 & US 2013/0090458 A1	1-26



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See parent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 March 2015 (02.03.15)Date of mailing of the international search report
17 March 2015 (17.03.15)Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/006421

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& US 2013/0177526 A1 & US 2014/0286860 A1 & US 2011/0070156 A1 & US 2014/0044640 A1 & US 2012/0328564 A1 & US 2009/0291093 A1 & US 2013/0216561 A1 & US 2006/0228300 A1 & US 2009/0060862 A1 & US 2009/0202487 A1 & US 2010/0221210 A1 & US 2010/0261865 A1 & US 2011/0008251 A1 & US 2011/0076233 A1 & US 2011/0143417 A1 & US 2011/0256053 A1 & US 2011/0300066 A1 & US 2012/0082685 A1 & US 2012/0093769 A1 & US 2012/0196346 A1 & US 2011/0318306 A1 & US 2012/0237442 A1 & US 2013/0039861 A1 & US 2013/0078183 A1 & US 2013/0143296 A1 & US 2013/0177532 A1 & US 2013/0280250 A1 & US 2013/0295005 A1 & US 2014/0086832 A1 & US 2007/0086942 A1 & US 2007/0140966 A1 & US 2009/0269277 A1 & US 2010/0068137 A1 & US 2010/0216662 A1 & US 2011/0189083 A1 & US 2011/0195020 A1 & US 2013/0095033 A1 & US 2014/0037543 A1 & US 2014/0294722 A & US 2011/0165072 A1 & US 2014/0112864 A1 & US 2011/0064754 A1 & EP 2271389 A1 & EP 2396036 A1 & EP 1874824 A1 & EP 1937851 A1 & EP 2674440 A2 & EP 2197468 A1 & EP 2331134 A1 & EP 2473187 A1 & EP 2509630 1A & EP 2635300 A1 & EP 2764362 A1 & EP 2496236 A1	& US 2014/0059067 A1 & US 2014/0328752 A1 & US 2013/0209356 A1 & US 2010/0015046 A1 & US 2014/0099258 A1 & US 2012/0328634 A1 & US 2014/0004078 A1 & US 2006/0228357 A1 & US 2009/0191225 A1 & US 2010/0189689 A1 & US 2010/0233779 A1 & US 2010/0266496 A1 & US 2011/0020273 A1 & US 2011/0123436 A1 & US 2011/0158905 A1 & US 2011/0274704 A1 & US 2012/0009149 A1 & US 2012/0040431 A1 & US 2011/0300105 A1 & US 2011/0236352 A1 & US 2012/0223032 A1 & US 2012/0276100 A1 & US 2013/0072659 A1 & US 2013/0109073 A1 & US 2013/0171064 A1 & US 2013/0217091 A1 & US 2013/0289244 A1 & US 2014/0038261 A1 & US 2014/0161766 A1 & US 2007/0087001 A1 & US 2009/0202433 A1 & US 2009/0304580 A1 & US 2010/0189641 A1 & US 2011/0110851 A1 & US 2011/0189268 A1 & US 2012/0276608 A1 & US 2013/0164816 A1 & US 2014/0045242 A1 & US 2013/0136718 A1 & US 2012/0141375 A1 & US 2014/0227179 A1 & EP 2506881 A1 & EP 1994057 A1 & EP 1874358 A1 & EP 1937724 A1 & EP 1939993 A1 & EP 1572242 A1 & EP 2271364 A1 & EP 2473186 A1 & EP 2509629 A1 & EP 2605788 A1 & EP 2806887 A1 & EP 2416807 A1 & EP 2785382 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/006421

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& WO 2011/068845 A1 & WO 2007/112193 A2 & WO 2006/107617 A2 & WO 2007/046893 A2 & WO 2007/078270 A2 & WO 2009/055653 A1 & WO 2010/017500 A2 & WO 2011/026026 A1 & WO 2011/072124 A1 & WO 2012/061546 A1 & WO 2013/052484 A1 & WO 2011/056721 A2 & WO 2014/165506 A1	& WO 2009/100194 A2 & WO 2010/093395 A1 & WO 2006/107786 A2 & WO 2007/047609 A2 & WO 2004/084622 A1 & WO 2009/126558 A1 & WO 2011/025904 A1 & WO 2011/072114 A1 & WO 2012/024223 A2 & WO 2013/112801 A1 & WO 2010/117984 A1 & WO 2013/082254 A1
Y	Ikue MITSUI et al., A New Water-soluble Camptothecin Derivative, DX-8951f, Exhibits Potent Antitumor Activity against Human Tumors in vitro and in vivo, Jpn. J. Cancer Res., 1995, 86, p.776-782	1-26
Y	JP 2009-538629 A (Genentech, Inc.), 12 November 2009 (12.11.2009), paragraphs [0267] to [0281] & JP 2013-56896 A & US 2011/0142859 A1 & US 2013/0171170 A1 & EP 2032606 A1 & EP 2447282 A2	1-26 & US 2008/0050310 A1 & US 2012/0329094 A1 & US 2014/0127197 A1 & EP 2446904 A2 & WO 2007/140371 A2
Y	JP 2008-521828 A (Seattle Genetics, Inc.), 26 June 2008 (26.06.2008), claims 19 to 21; paragraphs [0137] to [0148] & US 2008/0305044 A1 & WO 2006/065833 A2	1-26 & EP 1817341 A1
Y	JP 2005-511627 A (Seattle Genetics, Inc.), 28 April 2005 (28.04.2005), paragraphs [0159] to [0206] & US 2005/0123536 A1 & WO 2003/043583 A2	1-26 & EP 1482972 A1
Y	WO 2000/025825 A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 May 2000 (11.05.2000), table 1; page 23 & US 2004/0192644 A1 & EP 1155702 A1	1-26 & US 6811996 B1 & EP 1619210 A1
Y	JP 2012-100671 A (Amgen Inc.), 31 May 2012 (31.05.2012), paragraphs [0187], [0188] & JP 2008-539506 A & US 2007/0071764 A1 & EP 1896080 A1	1-26 & JP 5087536 B2 & US 2011/0045587 A1 & WO 2006/116156 A2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/006421

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-534906 A (Indiana University Research & Technology Corp.), 09 September 2013 (09.09.2013), paragraph [0226] & US 2013/0123178 A1 & EP 2569000 A1 & WO 2011/143209 A1	1-26
P, A	WO 2014/061277 A1 (Daiichi Sankyo Co., Ltd.), 24 April 2014 (24.04.2014), entire text & TW 201420118 A	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JF2014/006421

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 27 pertains to a method for treatment of the human body or animal body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2014/006421	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28(2006.01)1, A61K31/4745(2006.01)1, A61K39/395(2006.01)1, A61K47/48(2006.01)1, A61P35/00(2006.01)1, C12N15/09(2006.01)1			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28, A61K31/4745, A61K39/395, A61K47/48, A61P35/00, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAsus/REGISTRY/REELINE/EMBASE/BIOIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	US 2011/0293513 A1 (IMMUNOMEDICS, INC.) 2011.12.01, 請求項1、 図面 & JP 2009-531325 A & JP 5314590 B2 & JP 2008-538747 A & JP 2008-542194 A & JP 4955652 B2 & JP 5011277 B2 & JP 2009-514813 A & JP 2009-517337 A & JP 5231231 B2 & JP 5498018 B2 & JP 2009-519931 A & JP 5090366 B2 & JP 2006-511526 A & JP 4959136 B2 & JP 2011-500842 A & JP 2014-129395 A & JP 5577558 B2 & JP 2011-517684 A & JP 2011-530536 A & JP 2013-503184 A & JP 2013-503200 A & US 2010/0104589 A1 & US 2008/0166363 A1 & US	1-26	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「B」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 02.03.2015		国際調査報告の発送日 17.03.2015	
国際調査機関の名称及びあて 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松浦 安紀子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 3338

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2014/006421
C (続き)。 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	2006/0193865 A1 & US 2004/0185053 A1 & US 2011/0305631 A1 & US 2012/0082617 A1 & US 2013/0090458 A1 & US 2013/0177526 A1 & US 2014/0058067 A1 & US 2014/0286860 A1 & US 2014/0328732 A1 & US 2011/0070156 A1 & US 2013/0209356 A1 & US 2014/0044640 A1 & US 2010/0015046 A1 & US 2012/0328564 A1 & US 2014/0099258 A1 & US 2009/0291093 A1 & US 2012/0328634 A1 & US 2013/0216561 A1 & US 2014/0004078 A1 & US 2006/0228300 A1 & US 2006/0228357 A1 & US 2009/0060862 A1 & US 2009/0191225 A1 & US 2009/0202487 A1 & US 2010/0189689 A1 & US 2010/0221210 A1 & US 2010/0233779 A1 & US 2010/0261885 A1 & US 2010/0266496 A1 & US 2011/0008251 A1 & US 2011/0020273 A1 & US 2011/0076233 A1 & US 2011/0123436 A1 & US 2011/0143417 A1 & US 2011/0158905 A1 & US 2011/0256053 A1 & US 2011/0274704 A1 & US 2011/0300066 A1 & US 2012/0009149 A1 & US 2012/0082685 A1 & US 2012/0040431 A1 & US 2012/0093769 A1 & US 2011/0300105 A1 & US 2012/0196346 A1 & US 2011/0236352 A1 & US 2011/0318306 A1 & US 2012/0225032 A1 & US 2012/0237442 A1 & US 2012/0276100 A1 & US 2013/0039861 A1 & US 2013/0072659 A1 & US 2013/0078183 A1 & US 2013/0109073 A1 & US 2013/0143296 A1 & US 2013/0171064 A1 & US 2013/0177532 A1 & US 2013/0217091 A1 & US 2013/0280250 A1 & US 2013/0289244 A1 & US 2013/0295005 A1 & US 2014/0038261 A1 & US 2014/0086832 A1 & US 2014/0161766 A1 & US 2007/0086942 A1 & US 2007/0087001 A1 & US 2007/0140966 A1 & US 2009/0202433 A1 & US 2009/0269277 A1 & US 2009/0304580 A1 & US 2010/0068137 A1 & US 2010/0189641 A1 & US 2010/0216662 A1 & US 2011/0110851 A1 & US 2011/0189083 A1 & US 2011/0189268 A1 & US 2011/0195020 A1 & US 2012/0276608 A1 & US 2013/0095033 A1 & US 2013/0164816 A1 & US 2014/0037543 A1 & US 2014/0045242 A1 & US 2014/0294722 A & US 2013/0136718 A1 & US 2011/0165072 A1 & US 2012/0141375 A1 & US 2014/0112864 A1 & US 2014/0227179 A1 & US 2011/0064754 A1 & EP 2506881 A1 & EP 2271359 A1 & EP 1994057 A1 & EP 2396036 A1 & EP 1874358 A1 & EP 1874824 A1 & EP 1937724 A1 & EP 1937851 A1 & EP 1959993 A1 & EP 2674440 A2 & EP 1572242 A1 & EP 2197468 A1 & EP 2271364 A1 & EP 2331134 A1 & EP 2473186 A1 & EP 2473187 A1 & EP 2509629 A1 & EP 2509630 1A & EP 2605788 A1 & EP 2635300 A1 & EP 2806887 A1 & EP 2764362 A1 & EP 2416807 A1 & EP 2496256 A1 & EP 2785382 A1 & WO 2011/068845 A1 & WO 2009/100194 A2 & WO 2007/112193 A2 & WO 2010/093395 A1 & WO 2006/107617 A2 & WO 2006/107786 A2 & WO 2007/046893 A2 & WO 2007/047609 A2 & WO 2007/075270 A2 & WO 2004/054622 A1 & WO 2009/055653 A1 & WO 2009/126558 A1 & WO 2010/017500 A2 & WO 2011/025904 A1 & WO 2011/026026 A1 & WO 2011/072114 A1 & WO	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2014/006421
C (続き)。 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	2011/072124 A1 & WO 2012/024223 A2 & WO 2012/061548 A1 & WO 2013/112801 A1 & WO 2013/052484 A1 & WO 2010/117984 A1 & WO 2011/056721 A2 & WO 2013/082254 A1 & WO 2014/165506 A1	
Y	Ikuo MITSUI et al., A New Water-soluble Camptothecin Derivative, DX-8951f, Exhibits Potent Antitumor Activity against Human Tumors in vitro and in vivo, Jpn. J. Cancer Res., 1995, 86, p. 776-782	1-26
Y	JP 2009-538629 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2009.11.12, [O 2 6 7] - [O 2 8 1] & JP 2013-56896 A & US 2008/0050310 A1 & US 2011/0142859 A1 & US 2012/0329094 A1 & US 2013/0171170 A1 & US 2014/0127197 A1 & EP 2032606 A1 & EP 2446904 A2 & EP 2447282 A2 & WO 2007/140371 A2	1-26
Y	JP 2008-521828 A (シアトル ジェネティックス, インコーポレーテッド) 2008.06.26, 請求項 1 9 - 2 1, [O 1 3 7] - [O 1 4 5] & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A1 & WO 2006/065533 A2	1-26
Y	JP 2005-511627 A (シアトル ジェネティックス, インコーポレーテッド) 2005.04.28, [O 1 5 9] - [O 2 0 6] & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A1 & WO 2003/043583 A2	1-26
Y	WO 2000/025825 A1 (第一製薬株式会社) 2000.05.11, 表 1、第 2 3 頁 & US 2004/0192644 A1 & US 6811996 B1 & EP 1155702 A1 & EP 1619210 A1	1-26
Y	JP 2012-100671 A (アムジエン・インコーポレーテッド) 2012.05.31, [O 1 8 7], [O 1 8 8] & JP 2008-538506 A & JP 5087536 B2 & US 2007/0071764 A1 & US 2011/0045587 A1 & EP 1896080 A1 & WO 2006/116156 A2	1-26
Y	JP 2013-534906 A (インディアナ ユニバーシティー リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション) 2013.09.09, [O 2 2 6] & US 2013/0123178 A1 & EP 2569000 A1 & WO 2011/143209 A1	1-26
P, A	WO 2014/061277 A1 (第一三共株式会社) 2014.04.24, 全文 & TW 201420118 A	1-26

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2014/006421

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(g)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項27は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部ののみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続表（2））（2009年7月）

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Office Action **No. 12715** of **August 9, 2021**

Patent Application No. NC2019/0013020

in the name of

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

Title: "**ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE**"

.....

As a result of the patentability examination carried out on the application indicated in the reference, in accordance with the provisions of article 45 of Decision 486 of 2000, this Office has found that the subject matter of the application does not meet certain requirements established in the Decision, based on the following aspects:

1. Amendments filed (Art 34 D486)

The amendments filed on November 22, 2019 under file No. NC2019/0013071 are accepted because they meet the legal requirements.

2. Subject matter of the invention

For purposes of the patentability examination, claims 1 to 49 filed under No. NC2019/0013071 on November 22, 2019, will be studied.

.....

3. From the patent application

3.1 Claims (Art. 30 D486)

- Claims 1 to 13 and 24 to 48 are not clear because they claim an antibody, an antibody-drug conjugate or a composition thereof without stating that said antibody binds to a fragment of the extracellular domain of CDH6, said mention

Confidential



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

is considered an essential functional reference of the molecule. The applicant is suggested to include said reference in the preamble of the claims.

- Claims 1 and 2 are not clear and are not supported by the specification because, they claim an antibody binding to SEQ ID NO: 4, without referring to its structural technical characteristics, instead they include the expressions: "*having internalization ability that permits cellular uptake, or a functional fragment of the antibody (...)*" or "*having competitive inhibitory activity, for binding to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4, against at least any one antibody selected from the group consisting of the following antibodies (1) to (5) (...)*", which are considered results to be achieved and do not define the antibody, since they contemplate any present or future structural alternative that reaches this end notwithstanding that the application has not explored every antibody that binds to the SEQ ID NO: 4. The applicant is suggested to restrict the claim to a reasonable generalization of the antibody molecules that are explored in the application, this is achieved by including the structural technical characteristics of the molecules contemplated in the scope of the claim that correspond to the amino acid sequences for the six complementarity determining regions (CDRs) or the variable regions of light and heavy chain.
- Claim 6 is not clear because it refers to an antibody binding to SEQ ID NO: 4 whose structure may comprise "a sequence identity of *at least 95%*" or a deletion, substitution or addition of one or more amino acids in the framework regions; however, said structural characterization is imprecise and prevents establishing the structure of the claimed variants. It is suggested to avoid referring to structures by means of identity percentages or structural modifications that do not recite the position and identity of the modified amino acid with respect to a reference sequence and to indicate instead the complete sequences of the claimed variants, in accordance with what is disclosed in the specification.
- Claims 21 and 22 are not clear because they claim several objects in the same claim since they refer to "*Host cells*" that can comprise eukaryotic cells and that

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

contain the vector encoding the antibody. The applicant is reminded that a single product must be referred to per claim, therefore, it is suggested to refer to a cell line.

- Claims 24 and 40 are not clear because they refer to multiple chemical modifications on the light or heavy chains of the antibody, without referring to the amino acid and its position with respect to a reference sequence. The applicant is suggested to adequately refer to chemical modifications.
- Claim 25 is unclear because it refers to the removal of "*one or more*" amino acids from the carboxyl end of the antibody heavy chain. Said expression is imprecise because it prevents establishing the molecule's resulting structure and can even contemplate the elimination of essential functional regions of the molecule. The applicant is suggested to replace the indicated expression with a precise term or a specific range.
- Claims 47 and 48 are not clear because they refer to a composition but they mention the expressions: "*wherein the tumor is a tumor expressing CDH6*" or "*wherein the tumor is renal cell carcinoma (...)*" that do not correspond to technical characteristics of the composition, but rather refer to the use of the same in the treatment of a condition and thus implicitly refer to non-patentable matter. It is suggested that the applicant deletes the reference to characteristics related to non-patentable subject matter from the claims.
- Claim 49 is not clear because it refers to a method for producing an antibody-drug conjugate comprising the step of reacting an antibody or functional fragment obtained by the production method of claim 23 with a drug linker compound; however, it is not permissible to define the molecule by its production process, when it can be structurally characterized. The applicant is suggested to indicate the structure of the antibody contemplated in the method and to eliminate any reference that attempts to characterize it by its production process.

3.1 Specification (Art. 28 D486, literal (e))

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 68 24

The specification does not disclose the invention sufficiently enough for one of ordinary skill in the art to be able to execute it (or reproduced it) because it claims antibodies binding to SEQ ID NO: 4 comprising any structure; However, the application only discloses technical tests for five antibodies and each of their humanized and chimeric variants against the extracellular domain 3 of CDH6 (SEQ ID NO: 4) comprising: (a) a CDRL1 SEQ ID NO: 12, a CDRL2 SEQ ID NO: 13, a CDRL3 SEQ ID NO: 14, a CDRH1 SEQ ID NO: 17, a CDRH2 SEQ ID NO: 18 and a CDRH3 SEQ ID NO: 19; (b) a CDRL1 SEQ ID NO: 22, a CDRL2 SEQ ID NO: 23, a CDRL3 SEQ ID NO: 24, a CDRH1 SEQ ID NO: 27, a CDRH2 SEQ ID NO: 28 and a CDRH3 SEQ ID NO: 29; (c) a CDRL1 SEQ ID NO: 32, a CDRL2 SEQ ID NO: 33, a CDRL3 SEQ ID NO: 34, a CDRH1 SEQ ID NO: 37, a CDRH2 SEQ ID NO: 38 and a CDRH3 SEQ ID NO: 39; (d) a CDRL1 SEQ ID NO: 42, a CDRL2 SEQ ID NO: 43, a CDRL3 SEQ ID NO: 44, a CDRH1 SEQ ID NO: 47, a CDRH2 SEQ ID NO: 48 and a CDRH3 SEQ ID NO: 49 or (e) a CDRL1 SEQ ID NO: 12, a CDRL2 SEQ ID NO: 13, a CDRL3 SEQ ID NO: 14, a CDRH1 SEQ ID NO: 17, a CDRH2 SEQ ID NO: 60 and a CDRH3 SEQ ID NO: 19 (p. 113 to 161).

4. Unity of invention (Art. 25 D486)

The application lacks unity of invention because it claims more than one inventive group without the presence of new and inventive characteristics or technical elements common to all inventions, the foregoing, taking into account that the common concept, which is an anti-CDH6 antibody, is disclosed in the state of the art, specifically in document WO2016024195 which refers to anti-CDH6 antibodies, antibody fragments and drug-conjugated antibodies (Page 1, Abstract).

Therefore, this invention presents different inventive technical concepts as follows:

- **Inventive Group 1:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof that binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 12, a CDRL2 SEQ ID NO: 13, a CDRL3 SEQ ID NO: 14, a CDRH1 SEQ ID NO: 17, a CDRH2 SEQ ID NO: 18 and a CDRH3 SEQ ID NO: 19, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 68 24

comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 5, 13 to 15, 20 to 36 and 40 to 49 partially).

- **Inventive Group 2:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof that binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 22, a CDRL2 SEQ ID NO: 23, a CDRL3 SEQ ID NO: 24, a CDRH1 SEQ ID NO: 27, a CDRH2 SEQ ID NO: 28 and a CDRH3 SEQ ID NO: 29, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 5, 13 to 15, 20 to 36 and 40 to 49 partially).
- **Inventive Group 3:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof that binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 32, a CDRL2 SEQ ID NO: 33, a CDRL3 SEQ ID NO: 34, a CDRH1 SEQ ID NO: 37, a CDRH2 SEQ ID NO: 38 and a CDRH3 SEQ ID NO: 39, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 5, 13 to 15, 20 to 36 and 40 to 49 partially).
- **Inventive Group 4:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof that binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 42, a CDRL2 SEQ ID NO: 43, a CDRL3 SEQ ID NO: 44, a CDRH1 SEQ ID NO: 47, a CDRH2 SEQ ID NO: 48 and a CDRH3 SEQ ID NO: 49, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate and

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

a method for producing the conjugate (Claims 1 to 5, 13 to 15, 20 to 36 and 40 to 49 partially).

- **Inventive Group 5:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof that binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 12, a CDRL2 SEQ ID NO: 13, a CDRL3 SEQ ID NO: 14, a CDRH1 SEQ ID NO: 17, a CDRH2 SEQ ID NO: 60 and a CDRH3 SEQ ID NO: 19, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 49 Partially).

It is suggested to restrict the subject matter to be patented to a single common inventive concept taking care of specifying the technological advance over the state of the art. This is achieved, among other ways, by defining the essential characteristics of the invention and showing the other particular characteristics as dependent, but without prejudice to the conciseness of the new independent and dependent claims.

The applicant can also request one or more divisional applications according to the inventive groups, this of course, without expanding the initial object of the invention.

In case of selecting an inventive group different from the one studied by this Office, the applicant is clarified that the fee for a new patentability examination must be paid, as long as the maximum number of studies allowed and/or the maximum period established for request them are not exceeded.

Therefore, the search for the state of the art and the examination of patentability will be carried out for inventive group 1.

5. Determination of the State of the Art

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

The state of the art was determined based on the filing date of the priority application: February 10, 2017, and the following document was found to anticipate the subject matter of this application:

No.	Document	Title	Publication date
D1	WO2016024195	"Anti-CDH6 antibody drug conjugates"	February 18, 2016

Document D1¹ discloses anti-CDH6 antibodies, antibody fragments, drug-conjugated antibodies and their associated methods (Page 1, Abstract).

6. Patentability Examination (Art. 14 D486)

6.1 Novelty (Art. 16 D486)

Claim 1 consist of divulges "*An antibody specifically binding to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 and having internalization ability that permits cellular uptake, or a functional fragment of the antibody*" (File No. NC2019/0013071 of November 22, 2019).

Table 1. Comparison of the essential characteristics, with those of the state of the art:

Essential technical characteristics	D1
An antibody specifically binding to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4	An antibody conjugated to a drug wherein the antibody or binding fragment thereof binds to the extracellular domain of CDH6 comprising SEQ ID NO: 4 (Page 209, Cl. 3)

According to the table above, the essential characteristics of the antibody of claim 1 had been previously disclosed in document D1 which teaches, an antibody conjugated to a drug wherein the antibody or binding fragment thereof binds to the extracellular domain of CDH6 comprising SEQ ID NO: 4 (Page 209, Cl. 3). The extracellular domain of CDH6 (SEQ ID NO: 4) of document D1 comprises among its residues 215 to 330 with

¹<https://patents.google.com/patent/WO2016024195A1/en?q=WO2016024195>

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

100% identity and coverage SEQ ID NO: 4 of the application as evidenced in Alignment No. 1. Therefore, the claimed subject-matter is not new.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SEQ ID NO 4                -----PQSTVQFKTFESSPPGTPIGRIKAS      25
WO2016024195_4            VVIQARLWGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNFPKFPQSTVQFKTFESSPPGTPIGRIKAS      240
                               *****

SEQ ID NO 4                DADVGENAEIEYSITDGEGLDMFELVITDQETQEGIIITVKLLDFEKKKVVTLKVEASNPY      35
WO2016024195_4            DADVGENAEIEYSITDGEGLDMFELVITDQETQEGIIITVKLLDFEKKKVVTLKVEASNPY      300
                               *****

SEQ ID NO 4                VEPRFLYLGPFRKLSATVPIVVEDVDDEPPVF-----      115
WO2016024195_4            VEPRFLYLGPFRKLSATVPIVVEDVDDEPPVF-----      360
                               *****

```

Alignment N ° 1: Between SEQ ID NO: 4 of the application and SEQ ID NO: 4 corresponding to the extracellular domain of CDH6 of document D1 (WO2016024195_4).

Additionally, document D1 refers to antibodies that bind to the same epitope as the antibodies described in Tables 5 and 6, which can be identified by their ability to cross-compete with other CDH6-binding antibodies in binding assays (P. 70, Para. [0241]).

Dependent claim 2 does not meet the novelty requirement either.

7. Conclusion regarding novelty and/or inventive step

The patentability requirements of the instant application are affected as follows:

No.	Document	Affected claims	Affected requirement
D1	WO2016024195	1 and 2	Novelty



**REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

Señor
DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

TÍTULO DE LA SOLICITUD: "ANTICUERPO ANTI-CDH6 Y CONJUGADO FARMACO-ANTICUERPO ANTICDH6"

NÚMERO DE SOLICITUD INTERNACIONAL: PCT/JP2018/018572.

FECHA DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL: 14 de mayo de 2018.

PRIORIDAD: JP 2017-096749 15 de mayo de 2017.

Como resultado del examen de patentabilidad realizado a la solicitud indicada en la referencia, atendiendo a lo consagrado en el artículo 45 de la Decisión 486 de 2000, se le comunica que esta Dirección ha encontrado que la materia objeto de solicitud no cumple con algunos requisitos establecidos en la Decisión, con fundamento en los siguientes aspectos:

1. Modificaciones presentadas (Art. 34 Decisión 486)

Se aceptan las modificaciones radicadas el 22 de noviembre de 2019, bajo el número NC2019/0013071, por ajustarse a los requisitos legales.

2. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada al momento de realizar el examen de patentabilidad consagrado en el artículo 45 de la Decisión 486. Por lo tanto, se estudiarán las reivindicaciones 1 a 49 del radicado N° NC2019/0013071 del 22 de noviembre de 2019.

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de obtener fármacos de objetivo molecular anticancerígenos altamente selectivos con efectos tóxicos reducidos sobre células normales y baja reactividad adversa.

Para resolver este problema técnico, la solicitud en estudio proporciona un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular 3 (en la presente descripción, también referido como EC3) de CDH6 con actividad de internalización excesivamente alta contra células que expresan CDH6 y un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC).

3. De la solicitud de patente

3.1. Reivindicaciones (Art. 30 Decisión 486)

- Las reivindicaciones 1 a 13 y 24 a 48 no son claras porque, reclaman un anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco o una composición que los comprende sin referir que, dicho anticuerpo se une a un fragmento del dominio extracelular de CDH6, dicha mención se considera una referencia funcional esencial de la molécula. Se sugiere al solicitante incluir dicha referencia en el preámbulo de las reivindicaciones.

Página 1 de 8

Señor contactenos, para hacer seguimiento a su solicitud, la entidad le ofrece los siguientes canales:
www.sci.gov.co - Teléfono en Bogotá: 9820490 - Línea gratuita a nivel nacional: 0800981786
Dirección: Cra. 15 # 27 - 6to. piso 1, 3, 4, 6, 8, 7 y 10, Bogotá D.C. - Colombia
Teléfono: (57) 9820490 - E-mail: contactenos@sci.gov.co

 **¡Iniciamos con el compromiso!**
Al usar menos papel contribuimos con el medio ambiente.



**El futuro
es de todos**

**Superintendencia
de Industria y Comercio**



Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

- Las reivindicaciones 1 y 2 no son claras y no se encuentran sustentadas en la descripción porque, reclaman un anticuerpo de unión a la SEQ ID NO: 4, sin referir sus características técnicas estructurales, en su lugar incluyen las expresiones: *"que tiene capacidad de internalización que permite captación celular (...)"* o *"tiene actividad inhibidora competitiva, para unirse a la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 4, contra por lo menos cualquier anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de los siguientes anticuerpos (1) a (5) (...)"* que se consideran resultados a alcanzar y no definen al anticuerpo, puesto que contemplan cualquier alternativa estructural presente o futura que llegue a dicho fin, siendo que, la solicitud no ha explorado cualquier anticuerpo que se una a la SEQ ID NO: 4. Se sugiere al solicitante restringir la reivindicación a una razonable generalización de las moléculas de anticuerpos explorados en la solicitud, esto se logra, incluyendo las características técnicas estructurales de las moléculas contempladas en el alcance de la reivindicación que corresponden a las secuencias de aminoácidos para las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR's) o las regiones variables de cadena ligera y pesada.
- La reivindicación 6 no es clara porque, se refiere a un anticuerpo de unión a la SEQ ID NO: 4 cuya estructura puede comprender *"por lo menos 95%"* de identidad o eliminaciones, sustituciones o adición de uno o varios aminoácidos en las regiones marco; no obstante, dicha caracterización estructural es imprecisa e impide establecer la estructura de las variantes reclamadas. Se sugiere evitar referir estructuras mediante porcentajes de identidad o modificaciones estructurales que no refieran la posición y el aminoácido modificado con respecto a las secuencias de referencia y señalar en su lugar las secuencias completas de las variantes reclamadas, de acuerdo con lo divulgado en la descripción.
- Las reivindicaciones 21 y 22 no son claras porque, reclaman varios objetos en una misma reivindicación ya que, se refieren a *"células huésped"* que pueden comprender células eucariotas y que contienen el vector codificante del anticuerpo. Se recuerda al solicitante que debe referirse un único producto por reivindicación por lo que, se sugiere hacer referencia a una línea celular.
- Las reivindicaciones 24 y 40 no son claras porque, se refieren a múltiples modificaciones químicas sobre las cadenas ligera o pesada del anticuerpo, sin referir el aminoácido y su posición con respecto a las secuencias de referencia. Se sugiere al solicitante referir adecuadamente las modificaciones químicas.
- La reivindicación 25 no es clara porque, se refiere a la eliminación de *"uno o más"* aminoácidos del terminal carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo. La señalada expresión es imprecisa porque, impide establecer la estructura resultante de la molécula y puede contemplar incluso la eliminación de regiones funcionales esenciales de la molécula. Se sugiere al solicitante sustituir la expresión señalada por un término preciso o un rango concreto.
- Las reivindicaciones 47 y 48 no son claras porque, se refieren a una composición, pero mencionan las expresiones: *"en donde el tumor es un tumor que expresa CDH6"* o *"en donde el tumor es carcinoma de célula renal (...)"* que no corresponden a características técnicas de la composición, sino que, se refieren al uso de la misma en el tratamiento de una afección y hacen referencia de manera implícita materia no patentable. Se sugiere al solicitante eliminar la referencia a características relativas a materia no patentable de las reivindicaciones.

Página 2 de 8

Señale claramente, para hacer seguimiento a su solicitud, la entidad de oficinas reguladoras donde:
www.asi.gov.co - Teléfono en Bogotá: 5925400 - Línea gratuita a nivel nacional: 0800010165
 Dirección: Cra. 15 # 27 - Of. para: 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 10, Bogotá D.C. - Colombia
 Teléfono: (57) 1 6877000 - e-mail: contactenos@asi.gov.co

Fundación para el Desarrollo Sostenible.
 al usar menos papel contribuyes con el medio ambiente

El futuro
es de todosGobierno
de Colombia



Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

- La reivindicación 49 no es clara porque, se refiere a un método para producir un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el paso de, hacer reaccionar un anticuerpo o fragmento funcional obtenido por el método de producción de la reivindicación 23 con un compuesto enlazador de fármaco; no obstante, no es permisible definir la molécula por su proceso de producción, toda vez que, puede ser caracterizada estructuralmente. Se sugiere al solicitante señalar la estructura del anticuerpo contemplado en el método y eliminar cualquier referencia que pretenda caracterizarlo por su proceso de producción.

3.2. Descripción (Art. 28 Decisión 486 literal (e))

La descripción no divulga la invención de manera suficientemente completa para que la persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla (o reproducirla) porque, se reclaman anticuerpos de unión a la SEQ ID NO: 4 que comprenden cualquier estructura; sin embargo, la solicitud únicamente evidencia pruebas técnicas para cinco anticuerpos y cada una de sus variantes humanizadas y quiméricas contra el dominio extracelular 3 de CDH6 (SEQ ID NO: 4) que comprenden: (a) una CDRL1 SEQ ID NO: 12, una CDRL2 SEQ ID NO: 13, una CDRL3 SEQ ID NO: 14, una CDRH1 SEQ ID NO: 17, una CDRH2 SEQ ID NO: 18 y una CDRH3 SEQ ID NO: 19; (b) una CDRL1 SEQ ID NO: 22, una CDRL2 SEQ ID NO: 23, una CDRL3 SEQ ID NO: 24, una CDRH1 SEQ ID NO: 27, una CDRH2 SEQ ID NO: 28 y una CDRH3 SEQ ID NO: 29; (c) una CDRL1 SEQ ID NO: 32, una CDRL2 SEQ ID NO: 33, una CDRL3 SEQ ID NO: 34, una CDRH1 SEQ ID NO: 37, una CDRH2 SEQ ID NO: 38 y una CDRH3 SEQ ID NO: 39; (d) una CDRL1 SEQ ID NO: 42, una CDRL2 SEQ ID NO: 43, una CDRL3 SEQ ID NO: 44, una CDRH1 SEQ ID NO: 47, una CDRH2 SEQ ID NO: 48 y una CDRH3 SEQ ID NO: 49 o (e) una CDRL1 SEQ ID NO: 12, una CDRL2 SEQ ID NO: 13, una CDRL3 SEQ ID NO: 14, una CDRH1 SEQ ID NO: 17, una CDRH2 SEQ ID NO: 60 y una CDRH3 SEQ ID NO: 19 (Págs. 113 a 161).

4. Unidad de invención (Art. 25 Decisión 486)

La solicitud carece de unidad de invención, debido a que reclama más de un grupo inventivo sin la presencia de características o elementos técnicos nuevos e inventivos que son comunes a todas las invenciones, lo anterior, teniendo en cuenta que el concepto común es anticuerpo anti-CDH6 y se encuentra divulgado en el estado de la técnica, específicamente en el documento WO2016024195 que se refiere a anticuerpos anti-CDH6, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos conjugados a fármacos (Pág. 1, Resumen).

Por lo tanto, esta invención presenta diferentes conceptos técnicos inventivos así:

- **Grupo inventivo 1:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 12, una CDRL2 SEQ ID NO: 13, una CDRL3 SEQ ID NO: 14, una CDRH1 SEQ ID NO: 17, una CDRH2 SEQ ID NO: 18 y una CDRH3 SEQ ID NO: 19, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 5, 13 a 15, 20 a 36 y 40 a 49 parcialmente).



El futuro
es de todos

Gobierno
de Colombia



Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

- **Grupo inventivo 2:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 22, una CDRL2 SEQ ID NO: 23, una CDRL3 SEQ ID NO: 24, una CDRH1 SEQ ID NO: 27, una CDRH2 SEQ ID NO: 28 y una CDRH3 SEQ ID NO: 29, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 5, 13 a 15, 20 a 36 y 40 a 49 parcialmente).
- **Grupo inventivo 3:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 32, una CDRL2 SEQ ID NO: 33, una CDRL3 SEQ ID NO: 34, una CDRH1 SEQ ID NO: 37, una CDRH2 SEQ ID NO: 38 y una CDRH3 SEQ ID NO: 39, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 5, 13 a 15, 20 a 36 y 40 a 49 parcialmente).
- **Grupo inventivo 4:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 42, una CDRL2 SEQ ID NO: 43, una CDRL3 SEQ ID NO: 44, una CDRH1 SEQ ID NO: 47, una CDRH2 SEQ ID NO: 48 y una CDRH3 SEQ ID NO: 49, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 5, 13 a 15, 20 a 36 y 40 a 49 parcialmente).
- **Grupo inventivo 5:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 12, una CDRL2 SEQ ID NO: 13, una CDRL3 SEQ ID NO: 14, una CDRH1 SEQ ID NO: 17, una CDRH2 SEQ ID NO: 60 y una CDRH3 SEQ ID NO: 19, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 49 parcialmente).

Se sugiere restringir la materia a patentar en un solo concepto común inventivo especificando el avance tecnológico sobre el estado de la técnica. Esto se logra, entre otras formas, definiendo las características esenciales de la invención y mostrando las otras características particulares como dependientes, pero sin perjuicio de la concisión de las nuevas reivindicaciones tanto independientes como dependientes.

El solicitante también puede solicitar una o más divisionales de acuerdo con los grupos inventivos, esto claro, sin ampliar el objeto inicial de la invención.

En caso de seleccionar un grupo inventivo diferente al estudiado por esta Oficina, se le aclara al solicitante que debe realizar el pago del examen de patentabilidad, siempre y

El futuro
es de todosGobierno
de Colombia



Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

cuando, no se exceda el número máximo de estudios permitidos y/o el plazo máximo establecido para solicitarlos.

Por consiguiente, la búsqueda del estado de la técnica y el examen de patentabilidad serán realizados para el grupo inventivo 1.

5. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha para determinar el estado de la técnica es el 15 de mayo de 2017 que corresponde a la fecha de presentación de la solicitud de prioridad.

Consultadas las fuentes de información con que se cuenta, se encontró el siguiente documento que anticipa el objeto de esta solicitud:

Item	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	WO2016024195	"Anti-CDH6 antibody drug conjugates"	18 de febrero de 2016

El documento D1¹ divulga anticuerpos anti-CDH6, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos conjugados a fármacos y sus métodos asociados (Pág. 1, Resumen).

6. Examen de Patentabilidad (Art. 14 Decisión 486)

6.1. Novedad (Art 16 Decisión 486)

La reivindicación 1 consiste en: *"Un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 4 y que tiene capacidad de internalización que permite captación celular, o un fragmento funcional del anticuerpo."* (Radicación N° NC2019/0013071 del 22 de noviembre de 2019).

Tabla 1. Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica

Características esenciales	D1
Un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID NO: 4	Un anticuerpo conjugado a un fármaco en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une al dominio extracelular de CDH6 que comprende la SEQ ID NO: 4 (Pág. 209, Reiv. 3)

De acuerdo con la tabla anterior, las características esenciales del anticuerpo de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1 que enseña, un anticuerpo conjugado a un fármaco en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une al dominio extracelular de CDH6 que comprende la SEQ ID NO: 4 (Pág. 209, Reiv. 3). El dominio extracelular de CDH6 (SEQ ID NO: 4) del documento D1 comprende entre sus residuos 215 a 330 con un 100% de identidad y cobertura la SEQ ID NO: 4 de la solicitud como se evidencia en el Alineamiento N° 1. Por lo tanto, la materia reivindicada no es nueva.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

SEQ ID NO 4	-----PQSTYQFKTFESSPPGTPISRIKAS	25
WO2016024195_4	VVIQAKDMGGQAGSLGTTIVNITLVNNDNPRFPQSTYQFKTFESSPPGTPISRIKAS	246

SEQ ID NO 4	DADVGENAEIETYSITDGEGLNFTVITDQETQEGIIIVVWELLOPEKKNVYILKVEASNPY	55
WO2016024195_4	DADVGENAEIETYSITDGEGLNFTVITDQETQEGIIIVVWELLOPEKKNVYILKVEASNPY	305

¹<https://patents.google.com/patent/WO2016024195A1/en?q=WO2016024195>



El futuro es de todos

Superintendencia de Industria y Comercio



Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

SEQ ID NO 4 VEPRFLYLGSPKDSATVRIVVEVDDEPPVF----- 115
 WO2016024195_4 VEPRFLYLGSPKDSATVRIVVEVDDEPPVFSKLAVILQIPEDAQINTTIGSVTAQDPRAA 360

Alineamiento N°1: Entre la SEQ ID NO: 4 de la solicitud y el dominio extracelular de CDH6 SEQ ID NO: 4 del documento D1 (WO2016024195_4).

Adicionalmente, el documento D1 se refiere a anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos descritos en las Tablas 5 y 6, que pueden ser identificados por su habilidad de competir de manera cruzada con otros anticuerpos de unión a CDH6 en ensayos de unión (Pág. 70, Parr. [0241]).

La reivindicación dependiente 2 tampoco cumple con el requisito de novedad.

7. Conclusión con respecto a novedad y/o nivel inventivo

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO2016024195	1 y 2	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de 2000, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Si como respuesta a este requerimiento, el solicitante modifica el capítulo reivindicatorio, deberá observar las instrucciones contenidas en el numeral 1.2.2.1.1., del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única de esta Superintendencia. De igual forma, deberá tener presente que de conformidad con el literal a) del numeral 1.2.2.5.1. de la norma ibidem, será necesario acreditar el pago de la tasa por concepto de modificación a solicitudes en trámites, de conformidad con el valor establecido en la resolución de tasas vigentes.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 6.2 del Capítulo Sexto del Título I de la Circular Única, informándoles que contra el mismo no procede recurso alguno en actuación administrativa.

Edna Marcela Ramírez Orozco
DIRECTORA DE NUEVAS CREACIONES



Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

INFORME DE BÚSQUEDA EXAMEN DE PATENTABILIDAD

Solicitud No. NC2019/0013020		Examen de patentabilidad						
		1°	X	2°		3°		Revoca
Solicitud Internacional No. PCT/JP2018/018572		Fecha solicitud internacional: (DD/MM/AÑO) 14 de mayo de 2018						
Fecha de determinación estado de la técnica (DD/MM/AÑO) 15/05/2017				Prioridad X		Presentación		
Solicitante DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED								
Reivindicaciones que no son objeto de búsqueda por:								
Art. 14	-	Art. 15	-	Art. 20	-	Art. 25 (Falta de unidad de invención)	6 a 12, 16 a 19 y 37 a 39	
CRITERIOS DE BÚSQUEDA								
Reivindicaciones objeto de búsqueda				1 a 5, 13 a 15, 20 a 36 y 40 a 49				
Palabras clave utilizadas				ANTIBODIES, CDH6, CADHERIN-6, ADC, ANTIBODY DRUG CONJUGATE				
Clasificaciones utilizadas para la búsqueda				CIP: C12N 15/13, A61K 9/00, A61K 31/4745, A61K 39/395, A61P 13/12, A61P 15/08, A61P 35/00, A61P 43/00, C07K 16/28, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12P 21/08				
DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES (Documentos patente, Literatura no patente (LNP): Artículos, catálogos, etc.)								
Informes de búsqueda / Bases de datos consultadas	N° de solicitud de patente / N° de patente / Autor LNP(*)	Fecha de Publicación / Presentación (DD/MM/AAAA)	Reivindicaciones / Secuencias afectadas	Citas relevantes del estado de la técnica	Categoría del documento citado(*)			
SIPI	CO NC20170001191	08/02/2017	-	-	A			
ISA EPO KR JP	WO2014057687	17/04/2014	-	-	A			
	US2016297890	13/01/2016	-	-	A			
	WO2016024195	18/02/2016	1 y 2 SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 4 (100%) (Pág. 209, Reiv. 3). (Pág. 70, Párr. [0241])	X			
	WO2018185618	11/10/2018	-	-	A			
	WO2014057687	17/04/2014	-	-	A			
	Corada, M., Bialucha, C. U.,	15/03/2001 09/2017	- -	- -	A			
PatentLens	US20160046711	17/02/2016	SEQ ID NO: 4	SEQ ID 4 (100%)	A			
(*) Cita completa literatura no patente (LNP)								
Apellido, A. A. (Fecha). Título del artículo. Nombre de la revista. Volumen(Número), pp-pp.		Corada, M., Liao, F., Lindgren, M., Lampugnani, M. G., Breviano, F., Frank, R., Muller, W. A., Hicklin, D. J., Bohlen, P., & Dejana, E. (2001). Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. Blood, 97(6), 1679-1684. https://doi.org/10.1182/blood.v97.6.1679						
o Apellido, A. A. (Fecha). Título del artículo. Nombre de la revista. Recuperado de http://xxxxxx .		Bialucha, C. U., Collins, S. D., Li, X., Saxena, P., Zhang, X., Durr, C., Lafont, B., Prieur, P., Shim, Y., Mosher, R., Lee, D., Ostrom, L., Hu, T., Bilic, S., Rajic, I. L., Capka, V., Jiang, W., Wagner, J. P., Elliott, G., Veloso, A., ... Lees, E. (2017). Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6-Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers. Cancer discovery, 7(9), 1030-1045. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1414						
(*) Categorías de documentos citados								



El futuro
es de todos

Gobierno
de Colombia



Oficio N° 12715 de 9 de agosto de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

<p>“A” Documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” Solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” Documento citado para llamar la atención sobre por ejemplo, dudas acerca de una reivindicación de prioridad o para determinar la fecha de publicación de otra cita, siempre van acompañados de una explicación, por la cual se citan.</p> <p>“O” Documento del tipo actos de confidencia, este tipo de documentos siempre estará acompañado por otra letra que indique la pertinencia del documento, por ejemplo, O,X, O,Y o bien O,A.</p> <p>“P” Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” Documento publicado en fecha posterior a la de presentación o la de prioridad de la solicitud internacional y no entra en conflicto con dicha solicitud, pero puede ser útil para la mejor comprensión del principio o teoría en que se basa la invención, o para demostrar que el razonamiento o los hechos en los que se basa dicha invención son incorrectos.</p> <p>“X” Documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento sistemáticamente considerado.</p> <p>“Y” Documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p>
Fecha del reporte de búsqueda: 30/06/2021	
Examinador: PAULA ANDREA MORENO GONZALEZ	



Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Office Action **No. 18722** of **November 29, 2021**

Patent Application No. NC2019/0013020

in the name of

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

Title: "**ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE**"

As a result of the patentability examination carried out on the above referenced application, in accordance with the provisions of Article 45 of Decision 486 of 2000 (D486), this Office has found that the subject matter of the application does not meet certain requirements established in the Decision, based on the following aspects:

1. Filed amendments (Art. 34 D486)

The amendments filed on October 30, 2021, are accepted since they meet the legal requirements.

3. Of the patent application

3.1 Claims (Art. 30 Decision 486)

- Claim 4 is unclear since it refers to an antibody binding to the extracellular domain of CDH6 whose light and heavy chain variable regions may comprise sequence identity of "*at least 95% or more*", deletions, substitutions, or addition of one or more amino acids in the framework regions; however, this structural characterization is imprecise and prevents from establishing the structure of the claimed variants. The applicant is reminded that claims must be self-sufficient and must precisely refer to the structure of the claimed molecules, therefore, it is suggested to replace the expressions relating to percentages of identity or relating

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

to structural modifications which do not recite to the position and identity of the modified amino acid in relation to the reference sequence and, to point out instead, to the complete sequences of the claimed variants, as disclosed in the description.

- Claims 13 to 17 are clear¹ because, their preamble refers to a polynucleotide, however said molecule is characterized as comprising "*polynucleotides*" or "*a polynucleotide*", which corresponds to a cacophony and is incoherent since it is intended to characterize an object through its self-reference, and not, through its essential technical characteristics which correspond to its complete nucleotide sequence; on the contrary, the claim recites as technical elements the coding amino acid sequences which characterize another object (the antibody) and not to the polynucleotide. It is suggested to the applicant to improve the wording of the claim and to include the appropriate technical characteristics corresponding to the molecules referred to in the preamble.
- Claims 22 and 38 are not clear since they refer to multiple chemical modifications on the light or heavy chains of the antibody, without referring to the amino acid and its position with respect to the reference sequences where they are carried out. The applicant is reminded that the claims must be self-sufficient and must include all the technical features in a precise manner so, it is suggested to properly reference the chemical modifications.
- Claim 25 is unclear because it refers to the removal of "*one or more*" amino acids from the carboxyl terminus of the heavy chain of the antibody. The indicated expression is imprecise since it prevents establishing the resulting structure of the molecule and may even contemplate the elimination of essential functional regions of the molecule. It is suggested to the applicant to replace the indicated expression by a precise term or a specific range.
- Claim 26 is not clear and presents errors dependency because, it refers to a sugar chain modification according to claims 1 to 11 and 22 to 25, but claims 1 to 11, 21 and 23 to 25 do not refer to any sugar, or modified sugar, therefore, the recited

¹ Possible typo. Should read unclear.

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

expression is not consistent with the subject matter of the claims from which it depends. The applicant is suggested to make the necessary corrections and/or clarifications.

- Claim 34 is not clear and presents dependency errors, since it appears for the first time immediately after claim 31 but its numbering should correspond to claim 32; likewise, the text associated with this clause is presented as dependent on claims 29 to 33, which is incorrect since claims 32 and 33 are subsequent. The applicant is suggested to make the necessary corrections and/or clarifications.
- Claims 33 to 35, 38, 39 and 43 present dependency errors since, they are referred to as dependent of claim 32 but, said clause, has not been included in the claiming chapter. The applicant is suggested to make the necessary corrections and clarifications.
- Claims 35 to 38 and 65 to 77 are concise² because they are redundant and refer to the same antibody-drug conjugate or the same composition, through the same technical features already referred to in claims 27, 33, 34 and 39 to 44 on which they directly or indirectly depend. It is suggested to the applicant to unify the claims that refer to the same objects by means of the same technical features.

4. Unit of invention (Art. 25 Decision 486)

The application lacks unity of invention because it claims more than one inventive group without the presence of new and inventive features or technical elements that are common to all the inventions, considering that the common concept is an antibody which binds to the extracellular domain of CDH6 that is disclosed in the prior art, specifically in WO2016024195, which relates to an antibody conjugated to a drug wherein the antibody or binding fragment thereof binds to the extracellular domain of CDH6 comprising SEQ ID NO: 4 (Page 209, Claim 3).

² Possible typo. Should read not concise.

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Therefore, this invention presents different inventive technical concepts as follows:

- **Inventive Group 1:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof which binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 4: 12, one CDRL2 SEQ ID NO: 13, one CDRL3 SEQ ID NO: 14, one CDRH1 SEQ ID NO: 17, one CDRH2 SEQ ID NO: 18 and one CDRH3 SEQ ID NO: 19, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate, and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 3, 11 to 13, 18 to 34, 38 to 45 and 66 to 77 in part).
- **Inventive Group 2:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof which binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 22, one CDRL2 SEQ ID NO: 23, one CDRL3 SEQ ID NO: 24, one CDRH1 SEQ ID NO: 27, one CDRH2 SEQ ID NO: 28 and one CDRH3 SEQ ID NO: 29, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate, and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 3, 11 to 13, 18 to 34, 38 to 45 and 66 to 77 in part).
- **Inventive Group 3:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof which binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 4: 32, one CDRL2 SEQ ID NO: 33, one CDRL3 SEQ ID NO: 34, one CDRH1 SEQ ID NO: 37, one CDRH2 SEQ ID NO: 38 and one CDRH3 SEQ ID NO: 39, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate, and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 3, 11 to 13, 18 to 34, 38 to 45 and 66 to 77 in part).
- **Inventive Group 4:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof which binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 4: 42, one CDRL2 SEQ ID NO: 43, one CDRL3 SEQ ID NO: 44, one CDRH1 SEQ ID NO: 47, one CDRH2 SEQ ID NO: 48 and one CDRH3 SEQ ID NO: 49, a polynucleotide encoding said antibody,

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate, and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 3, 11 to 13, 18 to 34, 38 to 45 and 66 to 77 in part).

- **Inventive Group 5:** An anti-CDH6 antibody or a functional fragment thereof which binds to SEQ ID NO: 4 and comprises a CDRL1 SEQ ID NO: 4: 12, one CDRL2 SEQ ID NO: 13, one CDRL3 SEQ ID NO: 14, one CDRH1 SEQ ID NO: 17, one CDRH2 SEQ ID NO: 60 and one CDRH3 SEQ ID NO: 19, a polynucleotide encoding said antibody, an expression vector comprising the polynucleotide, a cell line comprising the vector, a method for producing the antibody, an antibody-drug conjugate comprising the antibody, a composition comprising the conjugate, and a method for producing the conjugate (Claims 1 to 3, 11 to 13, 18 to 34, 38 to 45 and 66 to 77 in part, 4 to 10, 14 to 17, 35 to 37 and 46 to 65 fully).

It is suggested to restrict the subject matter to be patented to a single common inventive concept specifying the technological advance over the state of the art. This is achieved, among other ways, by defining the essential features of the invention and showing the other particular features as dependent, but without prejudice to the conciseness of the new claims both independent and dependent.

The applicant may also apply for one or more divisional claims according to the inventive groups, of course, without broadening the initial subject matter of the invention.

In case of selecting an inventive group different from the one studied by this Office, the applicant is advised that the payment of the patentability examination must be made, provided that the maximum number of studies allowed and/or the maximum term established to apply for them is not exceeded.

Accordingly, prior art search and patentability examination will be performed for inventive group 1.

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

5. Determination of the State of the Art

The state of the art was determined based on the filing date of the priority application: May 15, 2017, and having consulted the source of information available to date, no documents were found to anticipate the subject matter of this application as claimed:

6. Response to applicant's arguments

Arguments regarding objections under article 30

The applicant states: *"(...) the new claim set characterizes the antibody in terms of specific combinations of 6 CDRs which are essential for specific binding to CDH6, whereas the objected-to claim refers to an alternative embodiment of said antibody, wherein the antibody comprises a light chain variable region which may comprise a sequence identity of at least 95% or more with the sequence of a frame region different from each CDRs sequence in SEQ ID NO:63 and 67. Accordingly, the aforementioned variations are not part of the essential CDRs of the antibody but may occur in alternative embodiments of the antibody of the invention. Therefore, in view of the amendments made to the claim specification and the clarifications presented herein, it is respectfully requested to reconsider and withdraw the objection. (...)*

(...) It is noted, that from the combinations of CDRs disclosed by the present application, a person of the trade is able to carry out modifications to the heavy chain or the light chain of the antibody such as N-bond glycosylation, O-bond glycosylation, N-terminal processing, C-terminal processing, deamidation, aspartic acid isomerization, methionine oxidation, addition of a methionine residue to the N-terminus, amidation of a proline residue, conversion of N-terminal glutamine or N-terminal glutamic acid to pyroglutamic acid, and a deletion of one or two amino acids from the carboxyl terminus, without it being necessary to specify additional structural features to the sequences of the CDRs claimed here. Furthermore, it is noted that the mentioned deletions correspond to the elimination of one or two amino acids from the carboxyl terminus, so they do not affect the CDRs of the antibody.

Confidencial



Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Thus, in view of the amendments introduced in this opportunity and the clarifications presented here, it is possible to state that the new claim defines the subject matter to be protected by the patent in a clear and concise manner, and at the same time it is entirely supported by the description, thus complying with the requirements of Article 30 of Decision 486".

It is clarified that, the objections due to lack of clarity are maintained for claim 4 and for claims 22 and 40 because, although the anti-CDH6 antibody is characterized by specific sequence options for its six complementarity determining regions (CDRs), the objected claims refer to modalities in which modifications are present which are not precisely characterized in the claims, since such modification are not define by means of their positions and the modified amino acids or their variant sequences according to what is disclosed in the description.

Likewise, given that the claims chapter contemplates new clauses that had not been initially considered, objections are raised due to lack of clarity, conciseness, and support, since there are inconsistencies in the wording, in the dependence and multiple claims claiming the same subject matter.

Arguments regarding objections under article 25.

The applicant argues that: *"(...) the antibodies obtained by the inventors of the present application are humanized anti-CDH6 antibodies exhibiting different binding properties than the antibodies described in WO 2016/024195, namely, all of the antibodies bind to a specific CDH6 epitope with high affinity, and all of the claimed antibodies mediate cellular uptake. These features are not common to all CDH6 antibodies known in the prior art before the filing of the present application.*

Therefore, it is possible to state that the claimed antibodies form an inventive group which shares new and inventive technical features or elements common to all the inventions, thus complying with the requirements under Article 25 of Decision 486."

It is clarified that the binding properties of an antibody cannot be considered an essential technical characteristic of the molecule, since they correspond to a result to

Confidencial

**Clarke +
Modet**Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
119221 Bogotá, Colombia
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

be achieved that can be reached through multiple present or future structural alternatives; therefore, it is not possible to recognize such properties as an essential technical characteristic common to the claimed molecules. According to the above, the technical characteristics of the molecule correspond to its binding antigen and its sequences for the antigen binding complementarity determining regions (CDRs).

When searching in the state of the art, the prior art document WO2016024195 was found, which discloses antibodies binding to the extracellular domain of CDH6, thus, such functional feature is not new and cannot be considered to be a common concept among the claimed molecules; therefore, five groups of antibodies are identified which do not share structural essential technical features common among them and, consequently, the objection for lack of unity of invention is maintained for the claim chapter filed on October 30, 2021.



REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Oficio N° 18722 de 29 de noviembre de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

Señor
DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED

TÍTULO DE LA SOLICITUD: "ANTICUERPO ANTI-CDH6 Y CONJUGADO FARMACO-ANTICUERPO ANTICDH6"

NÚMERO DE SOLICITUD INTERNACIONAL: PCT/JP2018/018572.

FECHA DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL: 14 de mayo de 2018.

PRIORIDAD: JP 2017-096749 15 de mayo de 2017.

Como resultado del examen de patentabilidad realizado a la solicitud indicada en la referencia, atendiendo a lo consagrado en el artículo 45 de la Decisión 486 de 2000, se le comunica que esta Dirección ha encontrado que la materia objeto de solicitud no cumple con algunos requisitos establecidos en la Decisión, con fundamento en los siguientes aspectos:

1. Modificaciones presentadas (Art. 34 Decisión 486)

Se aceptan las modificaciones radicadas 30 de octubre de 2021, bajo el número NC2019/0013020, por ajustarse a los requisitos legales.

2. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada al momento de realizar el examen de patentabilidad consagrado en el artículo 45 de la Decisión 486. Por lo tanto, se estudiarán las reivindicaciones 1 a 77 del radicado N° NC2019/0013020 del 30 de octubre de 2021.

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de obtener fármacos de objetivo molecular anticancerígenos altamente selectivos con efectos tóxicos reducidos sobre células normales y baja reactividad adversa.

Para resolver este problema técnico, la solicitud en estudio proporciona un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular 3 (EC3) de CDH6 con actividad de internalización excesivamente alta contra células que expresan CDH6 y un conjugado de anticuerpo fármaco (ADC).

3. De la solicitud de patente

3.1. Reivindicaciones (Art. 30 Decisión 486)

- La reivindicación 4 no es clara porque, se refiere a un anticuerpo de unión al dominio extracelular de CDH6 cuyas regiones variables de cadena ligera y pesada pueden comprender "por lo menos 95% o más" de identidad, eliminaciones, sustituciones o adición de uno o varios aminoácidos en las regiones marco; no obstante, dicha caracterización estructural es imprecisa e impide establecer la estructura de las variantes reclamadas. Se recuerda al solicitante que las reivindicaciones deben ser autosuficientes y deben referir de manera precisa la

Página 1 de 8

Señor Ciudadano, para mayor seguridad y en su beneficio, la entidad le ofrece los siguientes canales de interacción: • Teléfono en Bogotá 601 562 154 50 • Línea gratuita a nivel nacional 01 800 91 120 105 Dirección: Ciro 13 # 27 - 60 buses 1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, Bogotá D.C., Colombia
Teléfonos: 601 562 154 50 • e-mail: contacto@sic.gov.co

 Nuestra apertura fundamental
al usar mejores prácticas tecnológicas con nuestros ambientes



**El futuro
es de todos**

**Industria
y Comercio**



Oficio N° 18722 de 29 de noviembre de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

estructura de las moléculas contempladas, por lo que, se sugiere sustituir las expresiones relativas a porcentajes de identidad o relativas a modificaciones estructurales que no refieran la posición y el aminoácido modificado con respecto a las secuencias de referencia y, señalar en su lugar, las secuencias completas de las variantes reclamadas, de acuerdo con lo divulgado en la descripción.

- Las reivindicaciones 13 a 17 son claras porque, su preámbulo se refiere a un polinucleótido, no obstante dicha molécula se caracteriza por comprender "polinucleótidos" o "un polinucleótido", lo cual corresponde a una cacofonía y es incoherente puesto que, se pretende caracterizar un objeto mediante su autorreferencia, y no, mediante sus características técnicas esenciales que corresponden a su secuencia completa de nucleótidos; por el contrario, la reivindicación refiere como elementos técnicos las secuencias de aminoácidos codificadas que caracterizan a otro objeto (el anticuerpo) y no al polinucleótido. Se sugiere al solicitante mejorar la redacción de la reivindicación e incluir las características técnicas apropiadas que correspondan a las moléculas referidas en el preámbulo.
- Las reivindicaciones 22 y 38 no son claras porque, se refieren a múltiples modificaciones químicas sobre las cadenas ligera o pesada del anticuerpo, sin referir el aminoácido y su posición con respecto a las secuencias de referencia en donde se llevan a cabo. Se recuerda al solicitante que las reivindicaciones deben ser autosuficientes y deben incluir todas las características técnicas de manera precisa por lo que, se sugiere referir adecuadamente las modificaciones químicas.
- La reivindicación 25 no es clara porque, se refiere a la eliminación de "uno o más" aminoácidos del terminal carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo. La señalada expresión es imprecisa porque, impide establecer la estructura resultante de la molécula y puede contemplar incluso la eliminación de regiones funcionales esenciales de la molécula. Se sugiere al solicitante sustituir la expresión señalada por un término preciso o un rango concreto.
- La reivindicación 26 no es clara y presenta errores de dependencia porque, se refiere a una modificación de cadena de azúcar de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 y 22 a 25, pero, las reivindicaciones 1 a 11, 21 y 23 a 25 no se refieren a ningún azúcar, o azúcar modificado, por lo que, no es coherente la expresión señalada con el objeto referido en las reivindicaciones de las cuales depende. Se sugiere al solicitante hacer las correcciones y/o aclaraciones necesarias.
- La reivindicación 34 no es clara y presenta errores de dependencia, puesto que, se encuentra repetida en el capítulo descriptivo ya que, aparece por primera vez inmediatamente después de la reivindicación 31 y entonces su numeración no corresponde con el consecutivo que debería corresponder a la reivindicación 32; así mismo, el texto asociado a esta cláusula se presenta como dependiente de las reivindicaciones 29 a 33, lo cual es incorrecto puesto que, las reivindicaciones 32 y 33 son posteriores. Se sugiere al solicitante hacer las correcciones y/o aclaraciones necesarias.
- Las reivindicaciones 33 a 35, 38, 39 y 43 presentan errores de dependencia puesto que, se refieren como dependientes de la reivindicación 32 pero, dicha cláusula,



Oficio N° 18722 de 29 de noviembre de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

no ha sido incluida en el capítulo reivindicatorio. Se sugiere al solicitante realizar las correcciones y aclaraciones necesarias.

- Las reivindicaciones 35 a 38 y 65 a 77 son concisas porque, son redundantes y se refieren al mismo conjugado de anticuerpo-fármaco o a la misma composición, mediante las mismas características técnicas ya referidas en las reivindicaciones 27, 33, 34 y 39 a 44 de las cuales dependen directa o indirectamente. Se sugiere al solicitante unificar las reivindicaciones que se refieran a los mismos objetos mediante las mismas características técnicas.

4. Unidad de invención (Art. 25 Decisión 486)

La solicitud carece de unidad de invención, debido a que reclama más de un grupo inventivo sin la presencia de características o elementos técnicos nuevos e inventivos que son comunes a todas las invenciones, lo anterior, teniendo en cuenta que el concepto común es anticuerpo que se une al dominio extracelular de CDH6 y se encuentra divulgado en el estado de la técnica, específicamente en el documento WO2016024195 que se refiere a un anticuerpo conjugado a un fármaco en donde el anticuerpo o fragmento de unión del mismo se une al dominio extracelular de CDH6 que comprende la SEQ ID NO: 4 (Pág. 209, Reiv. 3).

Por lo tanto, esta invención presenta diferentes conceptos técnicos inventivos así:

- **Grupo inventivo 1:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 12, una CDRL2 SEQ ID NO: 13, una CDRL3 SEQ ID NO: 14, una CDRH1 SEQ ID NO: 17, una CDRH2 SEQ ID NO: 18 y una CDRH3 SEQ ID NO: 19, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 3, 11 a 13, 18 a 34, 38 a 45 y 66 a 77 parcialmente).
- **Grupo inventivo 2:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 22, una CDRL2 SEQ ID NO: 23, una CDRL3 SEQ ID NO: 24, una CDRH1 SEQ ID NO: 27, una CDRH2 SEQ ID NO: 28 y una CDRH3 SEQ ID NO: 29, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 3, 11 a 13, 18 a 34, 38 a 45 y 66 a 77 parcialmente).
- **Grupo inventivo 3:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 32, una CDRL2 SEQ ID NO: 33, una CDRL3 SEQ ID NO: 34, una CDRH1 SEQ ID NO: 37, una CDRH2 SEQ ID NO: 38 y una CDRH3 SEQ ID NO: 39, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una



Oficio N° 18722 de 29 de noviembre de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 3, 11 a 13, 18 a 34, 38 a 45 y 66 a 77 parcialmente).

- **Grupo inventivo 4:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 42, una CDRL2 SEQ ID NO: 43, una CDRL3 SEQ ID NO: 44, una CDRH1 SEQ ID NO: 47, una CDRH2 SEQ ID NO: 48 y una CDRH3 SEQ ID NO: 49, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 3, 11 a 13, 18 a 34, 38 a 45 y 66 a 77 parcialmente).
- **Grupo inventivo 5:** Un anticuerpo anti-CDH6 o un fragmento funcional de este que se une a la SEQ ID NO: 4 y comprende una CDRL1 SEQ ID NO: 12, una CDRL2 SEQ ID NO: 13, una CDRL3 SEQ ID NO: 14, una CDRH1 SEQ ID NO: 17, una CDRH2 SEQ ID NO: 60 y una CDRH3 SEQ ID NO: 19, un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo, un vector de expresión que comprende el polinucleótido, una línea celular que comprende el vector, un método para producir el anticuerpo, un conjugado de anticuerpo fármaco que comprende el anticuerpo, una composición que comprende el conjugado y un método para producir el conjugado (Reivindicaciones 1 a 3, 11 a 13, 18 a 34, 38 a 45 y 66 a 77 parcialmente, 4 a 10, 14 a 17, 35 a 37 y 46 a 65 totalmente).

Se sugiere restringir la materia a patentar en un solo concepto común inventivo especificando el avance tecnológico sobre el estado de la técnica. Esto se logra, entre otras formas, definiendo las características esenciales de la invención y mostrando las otras características particulares como dependientes, pero sin perjuicio de la concisión de las nuevas reivindicaciones tanto independientes como dependientes.

El solicitante también puede solicitar una o más divisionales de acuerdo con los grupos inventivos, esto claro, sin ampliar el objeto inicial de la invención.

En caso de seleccionar un grupo inventivo diferente al estudiado por esta Oficina, se le aclara al solicitante que debe realizar el pago del examen de patentabilidad, siempre y cuando, no se exceda el número máximo de estudios permitidos y/o el plazo máximo establecido para solicitarlos.

Por consiguiente, la búsqueda del estado de la técnica y el examen de patentabilidad serán realizados para el grupo inventivo 1.

5. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha para determinar el estado de la técnica es el 15 de mayo de 2017, que corresponde a la fecha de presentación de la solicitud de prioridad. Sin embargo, consultadas las fuentes de información con las que se cuenta hasta la fecha, no se encontraron documentos que anticipen el objeto de la solicitud tal y como se encuentra reivindicado.

6. Respuesta a los argumentos del solicitante

Argumentos respecto a las objeciones por artículo 30.

Página 4 de 8





Oficio N° 18722 de 29 de noviembre de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

El solicitante señala que: "(...) en el nuevo pliego reivindicatorio se caracteriza el anticuerpo en términos de combinaciones específicas de 6 CDRs que son esenciales para la unión específica a CDH6, mientras que la reivindicación objetada hace referencia a una modalidad alternativa de dicho anticuerpo, en la que el anticuerpo comprende una región variable de cadena liviana que puede comprender una identidad de secuencia de por lo menos 95% o más con la secuencia de una región marco diferente a la de cada secuencia CDRs en las SEQ ID NO:63 y 67. En consecuencia, las variaciones mencionadas no hacen parte de los CDRs esenciales del anticuerpo pero pueden ocurrir en modalidades alternativas del anticuerpo de la invención. Por lo tanto, en vista de las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio y las aclaraciones aquí presentadas, se solicita respetuosamente reconsiderar y retirar la objeción. (...)

(...) Se hace notar, que a partir de las combinaciones de CDRs divulgados por la presente solicitud, una persona del oficio se encuentra en capacidad de llevar a cabo modificaciones en la cadena pesada o la cadena liviana del anticuerpo tales como glicosilación de enlace N, glicosilación de enlace O, procesamiento de terminal N, procesamiento de terminal C, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un residuo de metionina al terminal N, amidación de un residuo de prolina, conversión de glutamina de terminal N o ácido glutámico de terminal N a ácido piroglutámico, y una eliminación de uno o dos aminoácidos del terminal carboxilo, sin que para ello sea necesario especificar características estructurales adicionales a las secuencias de los CDRs aquí reclamadas. Además, se hace notar que las eliminaciones mencionadas corresponden a la eliminación de uno o dos aminoácidos del terminal carboxilo, por lo que no afectan los CDRs del anticuerpo.

Así, en vista de las modificaciones introducidas en esta oportunidad y las aclaraciones aquí presentadas, es posible manifestar que el nuevo pliego reivindicatorio define la materia que se desea proteger mediante la patente de manera clara y concisa, y a la vez se encuentra enteramente sustentado por la descripción, cumpliendo así con los requerimientos del artículo 30 de la Decisión 486."

Se aclara que, las objeciones por falta de claridad se mantienen para la reivindicación 4 y para las reivindicaciones 22 y 40 lo anterior porque, si bien, el anticuerpo anti-CDH6 se caracteriza por opciones de secuencias específicas para sus seis regiones determinantes de complementariedad (CDR's), las reivindicaciones objetadas se refieren a modalidades en las cuales se presentan modificaciones que no son caracterizadas de manera precisa en las reivindicaciones, ya que, no se refieren mediante sus posiciones y los aminoácidos modificados o sus secuencias variantes de acuerdo con lo divulgado en la descripción.

Así mismo, dado que el capítulo reivindicatorio contempla nuevas cláusulas que no habían sido consideradas inicialmente, se incorporan objeciones por falta de claridad concisión y sustento, ya que, se evidencian incoherencias en la redacción, en la dependencia y múltiples reivindicaciones que reclaman la misma materia.

Argumentos respecto a las objeciones por artículo 25.

El solicitante sostiene que: "(...) los anticuerpos obtenidos por los inventores de la presente solicitud son anticuerpos anti-CDH6 humanizados que exhiben propiedades de unión diferentes a las de los anticuerpos descritos en el documento WO 2016/024195, a saber, todos los anticuerpos se unen a un epítipo específico de CDH6 con una alta afinidad, y todos los anticuerpos reivindicados median la captación celular. Estas son



Oficio N° 18722 de 29 de noviembre de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

características que no son comunes a todos los anticuerpos CDH6 conocidos en el estado de la técnica antes de la presentación de la presente solicitud.

Por lo tanto, es posible afirmar que los anticuerpos reclamados conforman un grupo inventivo que comparte características o elementos técnicos nuevos e inventivos que son comunes a todas las invenciones, cumpliendo así con los requerimientos según el Artículo 25 de la Decisión 486."

Se aclara que, las propiedades de unión de un anticuerpo no pueden considerarse una característica técnica esencial de la molécula, toda vez que, corresponden a un resultado a alcanzar al que puede llegarse a través de múltiples alternativas estructurales presentes o futuras; por lo anterior, no es posible reconocer dichas propiedades como una característica técnica esencial común a las moléculas reclamadas. De acuerdo con lo anterior, las características técnicas de la molécula corresponden a su antígeno de unión y sus secuencias para las regiones determinantes de complementariedad de unión al antígeno (CDR's).

Al realizar la búsqueda en el estado en la técnica, se encuentra la anterioridad WO2016024195 que divulga anticuerpos de unión al dominio extracelular de CDH6, por lo que, dicha característica funcional no es nueva y no puede considerarse un concepto común entre las moléculas reclamadas; por lo tanto, se identifican cinco grupos de anticuerpos que no comparten características técnicas esenciales estructurales comunes entre sí y, en consecuencia, la objeción por falta de unidad de invención se mantiene para el capítulo reivindicatorio radicado el 30 de octubre de 2021.

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de 2000, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Si como respuesta a este requerimiento, el solicitante modifica el capítulo reivindicatorio, deberá observar las instrucciones contenidas en el numeral 1.2.2.1.1., del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única de esta Superintendencia. De igual forma, deberá tener presente que de conformidad con el literal a) del numeral 1.2.2.5.1. de la norma ibidem, será necesario acreditar el pago de la tasa por concepto de modificación a solicitudes en trámites, de conformidad con el valor establecido en la resolución de tasas vigentes.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 6.2 del Capítulo Sexto del Título I de la Circular Única, informándoles que contra el mismo no procede recurso alguno en actuación administrativa.

Edna Marcela Ramirez Orozco
DIRECTORA DE NUEVAS CREACIONES

Página 6 de 8

Señor ciudadano, para hacer cumplimiento a lo anterior, se anexa la copia del siguiente documento:
 Documento: "Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio" - Línea gratuita a nivel nacional al 8000 100 100
 Ciudadanos: + 571 507 10 100 - se-mail: contacto@superintendencia.gov.co

Proteger nuestro patrimonio ambiental.
 Usar menos papel contribuye con el medio ambiente.

