

(1a),

or a pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein:

P is hydrogen or an amino-group-protecting moiety;

B^1, at each occurrence, is independently one of N or CH;

X^1, at each occurrence, is independently one of -C(O)-NH-, $-CH_2$-NH-, -CH(OH)-CH_2-, -CH(OH)-CH(OH)-, -CH(OH)-CH_2-NH-, -CH=CH-, -C(O)CH_2-, -SO_2-NH-, -SO_2-CH_2- or -CH(OH)-CH_2-C(O)-NH-, provided that when B^1 is N, then the X^1 attached to said B^1 is -C(O)-NH-;

X^2 is one of -C(O)-NH-, -CH(OH)-CH_2-, -CH(OH)-CH(OH)-, -C(O)-CH_2-, -SO_2–NH-, -SO_2 –CH_2 - or -CH(OH)-CH_2 -C(O)-NH-;

R' is hydrogen or alkyl, or R forms together with the adjacent R^1, or when A is zero, forms together with the adjacent R^2, a nitrogen-containing mono-, bi- or tri-cyclic, saturated or partially saturated ring system having 4-14 ring members, that can be optionally substituted by one or two of keto, hydroxy, alkyl, aryl, aralkyl, alkoxy or aryloxy;

R^1, at each occurrence, is independently one of hydrogen, alkyl, cycloalkyl, aryl, a 5-10 membered saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle or –CH_2 –R^5, where the ring portion of any of said aryl, aralkyl, alkaryl or heterocycle can be optionally substituted;

R^2 is one of hydrogen, alkyl, cycloalkyl, aryl, a 5-10 membered saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle or –CH-R^5, where the ring portion of any of said aryl, aralkyl, alkaryl or heterocycle can be optionally substituted;

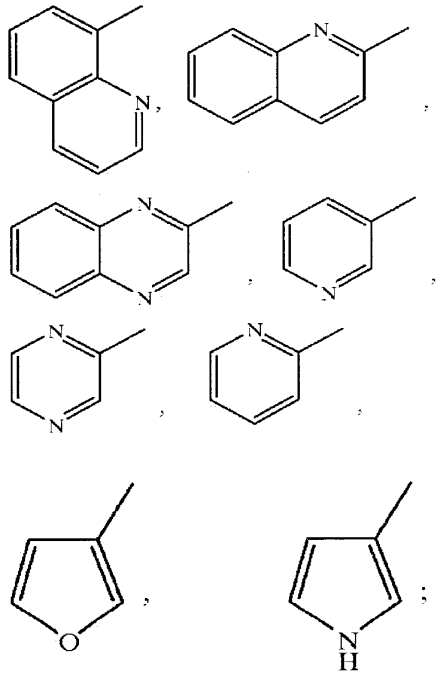
R^3 is one of hydrogen, alkyl, cycloalkyl, aryl, a 5-10 membered saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle or –CH_2-R^5, where the ring portion of any of said aryl, aralkyl, alkaryl or heterocycle can be optionally substituted;

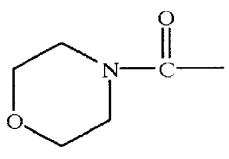
R^5, in each instance, is one of aryl, aralkyl, alkaryl, cycloalkyl, a 5-10 membered saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle or –W-R^6, where W is a chalcogen and R^6 is alkyl, where the ring portion of any of said aryl, aralkyl, alkaryl or heterocycle can be optionally substituted;

Z^1 and Z^2 are independently one of alkyl, hydroxy, alkoxy, or aryloxy, or together Z^1 and Z^2 form a moiety derived from a dihydroxy compound having at least two hydroxy groups separated by at least two connecting atoms in a chain or ring, said chain or ring comprising carbon atoms, and optionally, a heteroatom or heteroatoms which can be N, S, or O; and A is 0, 1, or 2.

In one embodiment, for formula (1a):

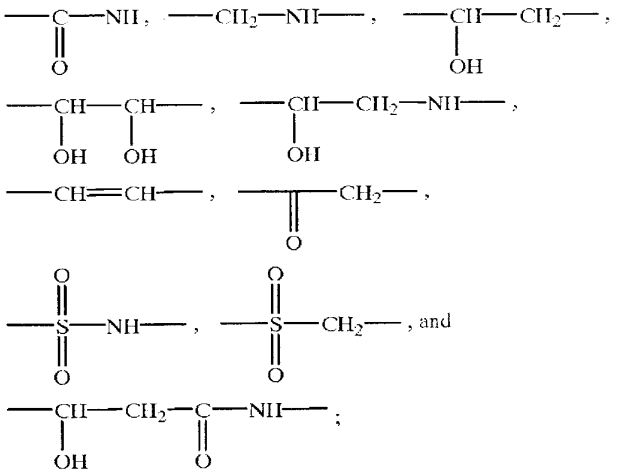
P is R' or R^7-C(=O)- or R^7-SO_2-, wherein R^7 selected from the group consisting of





or P is ;

X_2 is selected from the group consisting of



R' is hydrogen or alkyl;

R_2 and R_3 are independently selected from the group consisting of hydrogen, alkyl, cycloalkyl, aryl, heterocycle and $-CH_2-R_5$, where R_5 is aryl, aralkyl, alkaryl, cycloalkyl, heterocycle or $-Y-R_6$,

where Y is a chalcogen, and R_6 is alkyl;

Z_1 and Z_2 are independently alkyl, hydroxy, alkoxy, aryloxy, or together form a dihydroxy compound having at least two hydroxy groups separated by at least two connecting atoms in a chain or ring, said chain or ring comprising carbon atoms, and optionally, a heteroatom or heteroatoms which can be N, S, or O; and A is 0.

In another embodiment, for structural formula (1a):

P is $R_7-C(O)-$ or R_7-SO_2-, where R_7 is pyrazinyl;

X_2 is -C(O)-NH-;

R' is hydrogen or alkyl;

R_2 and R_3 are independently hydrogen, alkyl, cycloalkyl, aryl, or $-CH_2-R_5$;

R_5 in each instance, is one of aryl, aralkyl, alkaryl, cycloalkyl, or $-W-R_6$, where W is a chalcogen and R_6 is alkyl;

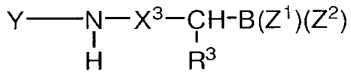
where the ring portion of any of said aryl, aralkyl, or alkaryl in R_2, R_3 and R_5 can be optionally substituted by one or two substituents independently selected from the group consisting of C_{1-6} alkyl, C_{3-8} cycloalkyl, C_{1-6} alkyl(C_{3-8})cycloalkyl, C_{2-8} alkenyl, C_{2-8}

alkynyl, cyano, amino, C_{1-6} alkylamino, di(C_{1-6})alkylamino, benzylamino, dibenzylamino, nitro, carboxy, carbo(C_{1-6})alkoxy, trifluoromethyl, halogen, C_{1-6} alkoxy, C_{6-10} aryl, C_{6-10} aryl(C_{1-6})alkyl, C_{6-10} aryl(C_{1-6})alkoxy, hydroxy, C_{1-6} alkylthio, C_{1-6} alkylsulfinyl, C_{1-6} alkylsulfonyl, C_{6-10} arylthio, C_{6-10} arylsulfinyl, C_{6-10} arylsulfonyl, C_{6-10} aryl, C_{1-6} alkyl(C_{6-10}) aryl, and halo(C_{6-10})aryl;

Z_1 and Z_2 are independently one of hydroxy, alkoxy, or aryloxy, or together Z_1 and Z_2 form a moiety derived from a dihydroxy compound having at least two hydroxy groups separated by at least two connecting atoms in a chain or ring, said chain or ring comprising carbon atoms, and optionally, a heteroatom or heteroatoms which can be N, S, or O; and

A is zero.

In one embodiment, for CDP-proteasome inhibitor conjugates described in any one of the 1st to 15th embodiments (below) wherein the proteasome inhibitor contains a boronic acid or derivative thereof, $RB(OH)_2$ or its analog is represented by formula 2a below



(2a),

or a pharmaceutically acceptable salts thereof, wherein:

Y is one of R^8 -C(O)-, R^8-SO_2 -, R^8-NH-C(O)- or R^8-O-C(O)-, where R^8 is one of alkyl, aryl, alkaryl, aralkyl, any of which can be optionally substituted, or when Y is R^8 -C(O)-or R^8-SO_2 -, then R^8 can also be an optionally substituted 5-10 membered, saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle;

X^3 is a covalent bond or -C(O)-CH_2-;

R^3 is one of hydrogen, alkyl, cycloalkyl, aryl, a 5-10 membered saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle or –CH_2 –R^5, where the ring portion of any of said aryl, aralkyl, alkaryl or heterocycle can be optionally substituted;

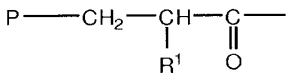
R^5, in each instance, is one of aryl, aralkyl, alkaryl, cycloalkyl, a 5-10 membered saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle or –W-R^6, where W is a chalcogen and R^6 is alkyl, where the ring portion of any of said aryl, aralkyl, alkaryl or heterocycle can be optionally substituted; and

Z^1 and Z^2 are independently alkyl, hydroxy, alkoxy, aryloxy, or together form a

moiety derived from dihydroxy compound having at least two hydroxy groups separated by at least two connecting atoms in a chain or ring, said chain or ring comprising carbon atoms, and optionally, a heteroatom or heteroatoms which can be N, S, or O;

provided that when Y is R^8-C(O)-, R^8 is other than phenyl, benzyl or C_1 –C_3 alkyl.

Alternatively, the group Y in formula (2a) above, can be as provided in formula 3a below:



(3a)

P is one of R^7-C(O)-, R^7-SO_2-, R^7-NH-C(O)- or R^7-O-C(O)-;

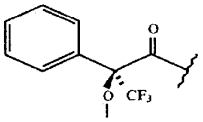
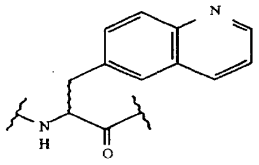
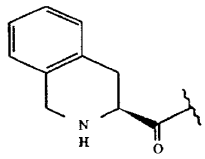
R^7 is one of alkyl, aryl, alkaryl, aralkyl, any of which can be optionally substituted, or when Y is R^7-C(O)- or R^7-SO_2-, R^7 can also be an optionally substituted 5-10 membered saturated, partially unsaturated or aromatic heterocycle; and

R^1 is defined above as for formula (1a).

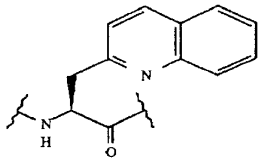
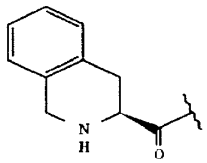
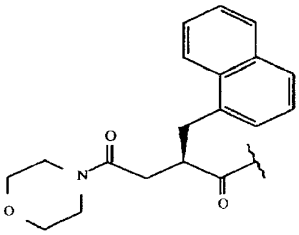
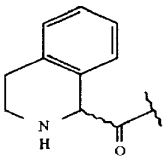
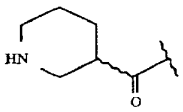
In one embodiments, compounds of formula (1a) or (2a) described above are compounds depicted in Table 1.

Table 1.

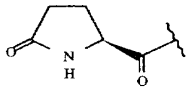
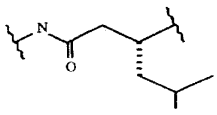
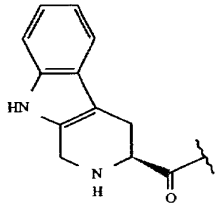
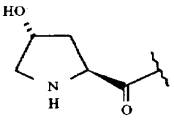
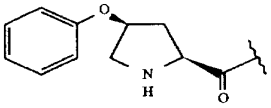
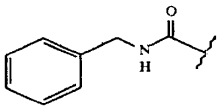
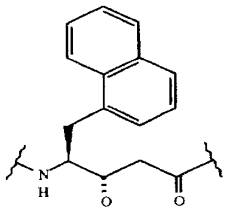
Inhibition of the 20S Proteasome by Boronic Ester and Acid Compounds
P—AA^1—AA^2—AA^3—$B(Z^1)(Z^2)$

Compound	P[a]	AA^1	AA^{2b}	AA^{3c}	Z^1, Z^2
MG-261	Cbz	L—Leu	L—Leu	L—Leu	pinane diol
MG-262	Cbz	L—Leu	L—Leu	L—Leu	$(OH)_2$
MG-264	Cbz	—	L—Leu	L—Leu	pinane diol
MG-267	Cbz	—	L—Nal	L—Leu	pinane diol
MG-268	Cbz(N—Me)	—	L—Leu	L—Leu	$(OH)_2$
MG-270	Cbz	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-272	Cbz	—	D-(2-Nal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-273	Morph	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-274	Cbz	—	L—Leu	L—Leu	$(OH)_2$
MG-278	Morph	L—Leu	L—Leu	L—Leu	$(OH)_2$
MG-282	Cbz	—	L—His	L—Leu	$(OH)_2$
MG-283	Ac	L—Leu	L—Leu	L—Leu	$(OH)_2$
MG-284		—	—	L—Leu	$(OH)_2$
MG-285	Morph	—	L—Trp	L—Leu	$(OH)_2$
MG-286	Morph	—	L—Nal	L—Leu	diethanol-amine
MG-287	Ac	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-288	Morph	—	L—Nal	D—Leu	$(OH)_2$
MG-289	Ms	—	L-(3-Pal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-290	Ac	—	L-(3-Pal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-291	Ms	—	L—Nal	L—Leu	diethanol-amine
MG-292	Morph	—		L—Leu	$(OH)_2$
MG-293	Morph	—	D—Nal	D—Leu	$(OH)_2$
MG-294	H	—	L-(3-Pal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-295	Ms	—	L—Trp	L—Leu	$(OH)_2$
MG-296	(8-Quin)-SO_2	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-297	Ts	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-298	(2-Quin)-C(O)	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-299	(2-quinoxalinyl)-C(O)	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-300	Morph	—	L-(3-Pal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-301	Ac	—	L—Trp	L—Leu	$(OH)_2$
MG-302	H	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-303	H.HCl	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-304	Ac	L—Leu	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-305	Morph	—	D—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-306	Morph	—	L—Tyr—(O-Benzyl)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-307	Morph	—	L—Tyr	L—Leu	$(OH)_2$
MG-308	Morph	—	L-(2-Nal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-309	Morph	—	L—Phe	L—Leu	$(OH)_2$
MG-310	Ac	—		L—Leu	$(OH)_2$
MG-312	Morph	—	L-(2-Pal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-313	Phenethyl-C(O)	—	—	L—Leu	$(OH)_2$

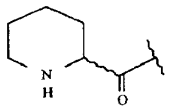
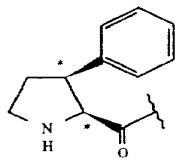
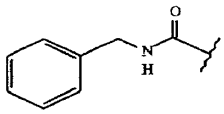
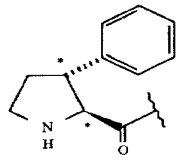
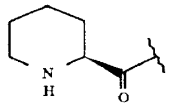
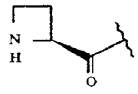
Inhibition of the 20S Proteasome by Boronic Ester and Acid Compounds
$P-AA^1-AA^2-AA^3-B(Z^1)(Z^2)$

Compound	P[a]	AA^1	AA^{2b}	AA^{3c}	Z^1, Z^2
MG-314	(2-Quin)-C(O)	—	L—Phe	L—Leu	$(OH)_2$
MG-315	Morph	—		L—Leu	$(OH)_2$
MG-316	H.HCl	—		L—Leu	$(OH)_2$
MG-317	Morph	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)(CH_3)$
MG-318	Morph	—	L—Nal	L—Leu	$(CH_3)_2$
MG-319	H.HCl	—	L—Pro	L—Leu	$(OH)_2$
MG-321	Morph	—	L—Nal	L—Phe	$(OH)_2$
MG-322	Morph	—	L-homoPhe	L—Leu	$(OH)_2$
MG-323	Ac	—	—	L—Leu	$(OH)_2$
MG-324		—	—	L—Leu	H
MG-325	(2-Quin)-C(O)	—	L-homoPhe	L—Leu	$(OH)_2$
MG-328	Bz	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-329	Cyclohexyl-C(O)	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-332	Cbz(N—Me)	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-333	H.HCl	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-334	H.HCl(N—Me)	—	L—Nal	L—Leu	$(OH)_2$
MG-336	(3-Pyr)—C(O)	—	L—Phe	L—Leu	$(OH)_2$
MG-337	H.HCl	—		L—Leu	$(OH)_2$
MG-338	(2-Quin)-C(O)	—	L-(2-Pal)	L—Leu	$(OH)_2$
MG-339	H.HCl	—		L—Leu	$(OH)_2$

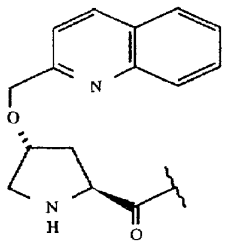
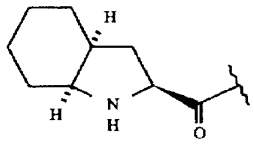
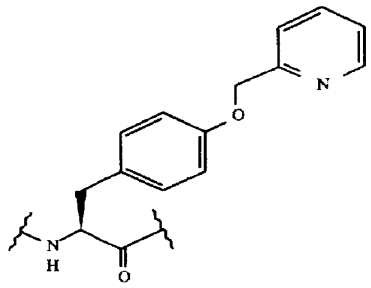
Inhibition of the 20S Proteasome by Boronic Ester and Acid Compounds
P – AA^1 – AA^2 – AA^3 – $B(Z^1)(Z^2)$

Compound	P[a]	AA^1	AA^{2b}	AA^{3c}	Z^1, Z^2
MG-340	H	—		L–Leu	$(OH)_2$
MG-341	(2-Pyz)–C(O)	—	L–Phe	L–Leu	$(OH)_2$
MG-342	Bn	—		—	$(OH)_2$
MG-343	(2-Pyr)–C(O)	—	L–Phe	L–Leu	$(OH)_2$
MG-344	Ac	—		L–Leu	$(OH)_2$
MG-345	Bz	—	L-(2-Pal)	L–Leu	$(OH)_2$
MG-346	Cyclohexyl-C(O)	—	L-(2-Pal)	L–Leu	$(OH)_2$
MG-347	(8-Quin)-SO_2	—	L-(2-Pal)	L–Leu	$(OH)_2$
MG-348	H.HCl	—		L–Leu	$(OH)_2$
MG-349	H.HCl	—		L–Leu	$(OH)_2$
MG-350		—	L–Phe	L–Leu	$(OH)_2$
MG-351	H.HCl	—	L-(2-Pal)	L–Leu	$(OH)_2$
MG-352	Phenylethyl-C(O)	—	L–Phe	L–Leu	$(OH)_2$
MG-353	Bz	—	L–Phe	L–Leu	$(OH)_2$
MG-354	(8-Quin)-SO_2	—		L–Leu	$(OH)_2$

Inhibition of the 20S Proteasome by Boronic Ester and Acid Compounds
$P-AA^1-AA^2-AA^3-B(Z^1)(Z^2)$

Compound	P[a]	AA^1	AA^{2b}	AA^{3c}	Z^1, Z^2
MG-356	Cbz	—	L-Phe	L-Leu	$(OH)_2$
MG-357	H.HCl	—		L-Leu	$(OH)_2$
MG-358	(3-Furanyl)-C(O)	—	L-Phe	L-Leu	$(OH)_2$
MG-359	H.HCl	—		L-Leu	$(OH)_2$
MG-361	(3-Pyrrolyl)-C(O)	—	L-Phe	L-Leu	$(OH)_2$
MG-362		—	—	L-Leu	$(OH)_2$
MG-363	H.HCl	—		L-Leu	$(OH)_2$
MG-364	Phenethyl-C(O)	—	—	L-Leu	$(OH)_2$
MG-366	H.HCl	—		L-Leu	$(OH)_2$
MG-368	(2-Pyz)-C(O)	—	L-(2-Pal)	L-Leu	$(OH)_2$
MG-369	H.HCl	—		L-Leu	$(OH)_2$
MG-380	(8-Quin)SO_2	—	L-Phe	L-Leu	$(OH)_2$
MG-382	(2-Pyz)-C(O)	—	L-(4-F)-Phe	L-Leu	$(OH)_2$
MG-383	(2-Pyr)-C(O)	—	L-(4-F)-Phe	L-Leu	$(OH)_2$

Inhibition of the 20S Proteasome by Boronic Ester and Acid Compounds
$P-AA^1-AA^2-AA^3-B(Z^1)(Z^2)$

Compound	P[a]	AA^1	AA^{2b}	AA^{3c}	Z^1, Z^2
MG-385	H.HCl	—		L-Leu	$(OH)_2$
MG-386	H.HCl	—		L-Leu	$(OH)_2$
MG-387	Morph	—		L-Leu	$(OH)_2$

[a]Cbz = carbobenzyloxy; MS = methylsulfonyl; Morph = 4-morpholinecarbonyl; (8-Quin)-SO_2 = 8-quinolinesulfonyl; (2-Quin)-C(O) = 2-quinolinecarbonyl; Bz = benzoyl; (2-Pyr)-C(O) = 2-pyridinecarbonyl; (3-Pyr)-C(O) = 3-pyridinecarbonyl; (2-Pyz)-C(O) = 2-pyrazinecarbonyl.
[b]Nal = β-(1-naphthyl)alanine; (2-Nal) = β-(2-naphthyl)alanine; (2-Pal) = β-(2-pyridyl)alanine; (3-Pal) = β-(3-pyridyl)alanine; homoPhe = homophenylalanine; (4-F)-Phe = (4-flurophenyl)alanine.
[c]$B(Z^1)(Z^2)$ takes the place of the carboxyl group of AA^3.

In another embodiment, compounds of formula (1a) or (2a) described above are selected from the following compounds as well as pharmaceutically acceptable salts and boronate esters thereof:

N-(4-morpholine)carbonyl-β-(1-naphthyl)-L-alanine-L-leucine boronic acid,

N-(8-quinoline)sulfonyl-β-(1-naphthyl)-L-alanine-L-leucine boronic acid,

N-(2-pyrazine)carbonyl-L-phenylalanine-L-leucine boronic acid,

L-proline-L-leucine boronic acid,

N-(2-quinoline)carbonyl-L-homophenylalanine-L-leucine boronic acid,

N-(3-pyridine)carbonyl-L-phenylalanine-L-leucine boronic acid,

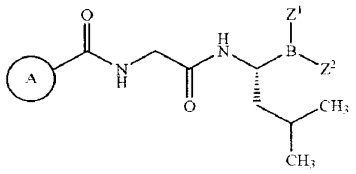
N-(3-phenylpropionyl)-L-phenylalanine-L-leucine boronic acid,

N-(4-morpholine)carbonyl-L-phenylalanine-L-leucine boronic acid,

N-(4-morpholine)carbonyl-(O-benzyl)-L-tyrosine-L-leucine boronic acid, N-(4-morpholine)carbonyl-L-tyrosine-L-leucine boronic acid, and

N-(4-morpholine)carbonyl-[O-(2-pyridylmethyl)]-L-tyrosine-L-leucine boronic acid.

In one embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugates described in any one of 1st to 15th embodiments wherein the proteasome inhibitor contains a boronic acid or derivative thereof, $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ is represented by the formula (3b):

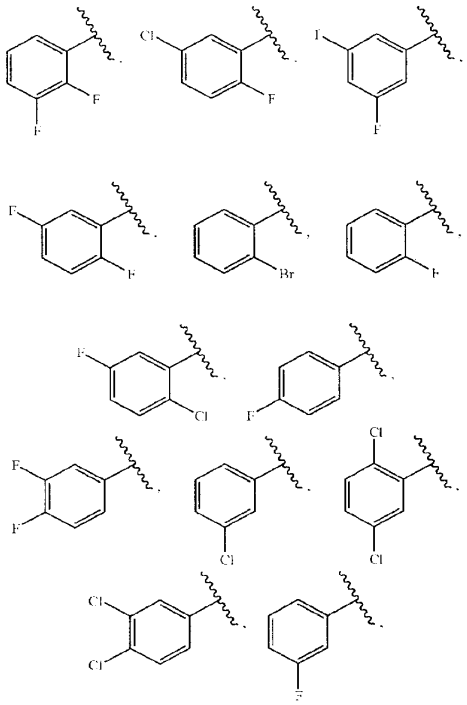


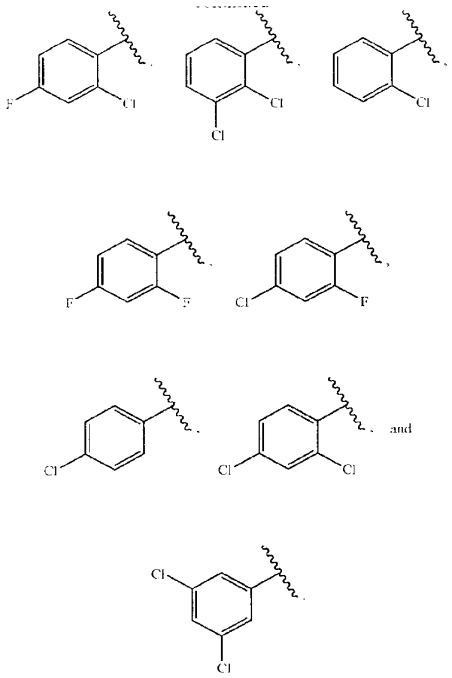
(3b)

or a pharmaceutically acceptable salt or boronic acid anhydride thereof, wherein:

Z^1 and Z^2 are each independently hydroxy, alkoxy, aryloxy, or aralkoxy; or Z^1 and Z^2 together form a moiety derived from a boronic acid completing agent; and

Ring A is selected from the group consisting of:





More specifically, compounds of formula (3b) are referred to by the following chemical names:

I-1 [(1R)-1-({[(2,3-difluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-2 [(1R)-1-({[(5-chloro-2-fluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-3 [(1R)-1-({[(3,5-difluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-4 [(1R)-1-({[(2,5-difluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-5 [(1R)-1-({[(2-bromobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-6 [(1R)-1-({[(2-fluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-7 [(1R)-1-({[(2-chloro-5-fluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-8 [(1R)-1-({[(4-fluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

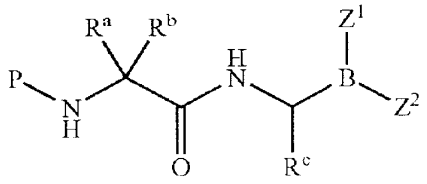
I-9 [(1R)-1-({[(3,4-difluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-10 [(1R)-1-({[(3-chlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-11 [(1R)-1-({[(2,5-dichlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid

I-12 [(1R)-1-({[(3,4-dichlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-13 [(1R)-1-({[(3-fluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-14 [(1R)-1-({[(2-chloro-4-fluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-15 [(1R)-1-({[(2,3-dichlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-16 [(1R)-1-({[(2-chlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-17 [(1R)-1-({[(2,4-difluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-18 [(1R)-1-({[(4-chloro-2-fluorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-19 [(1R)-1-({[(4-chlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-20 [(1R)-1-({[(2,4-dichlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid
I-21 [(1R)-1-({[(3,5-dichlorobenzoyl)amino]acetyl}amino)-3-methylbutyl]boronic acid.

In another embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugates described in any one of the 1st to 15th embodiments (below) wherein the proteasome inhibitor contains a boronic acid or derivative thereof, $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ is represented by formula (4a):



(4a)

or a pharmaceutically acceptable salt or boronic acid anhydride thereof, wherein:

P is hydrogen or an amino-group-blocking moiety;

R^a is a C_{1-4} aliphatic or C_{1-4} fluoroaliphatic group that is substituted with 0-1 R^A; or R^a and R^b taken together with the carbon atom to which they are attached, form a substituted or unsubstituted 3- to 6-membered cycloaliphatic group;

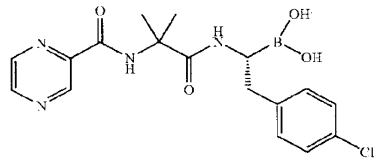
R^A is a substituted or unsubstituted aromatic or cycloaliphatic ring;

R^b is a C_{1-4} aliphatic or C_{1-4} fluoroaliphatic group; or R^a and R^b, taken together with the carbon atom to which they are attached, form a substituted or unsubstituted 3- to 6-membered cycloaliphatic group;

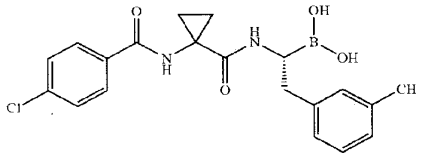
R^c is a C_{1-4} aliphatic or C_{1-4} fluoroaliphatic group that is substituted with 0-1 R^C;

R^C is a substituted or unsubstituted aromatic or cycloaliphatic ring; and Z^1 and Z^2 are each independently hydroxy, alkoxy, aryloxy, or aralkoxy; or Z^1 and Z^2 together form a moiety derived from a boronic acid complexing agent.

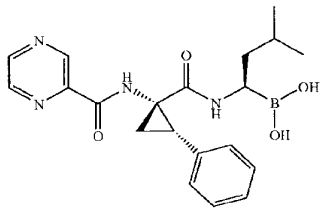
Representative examples of compounds of formula (4a), wherein Z^1 and Z^2 are each –OH are shown as the following:



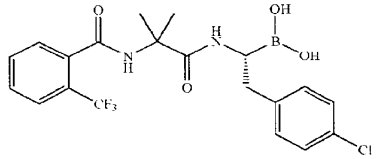
1



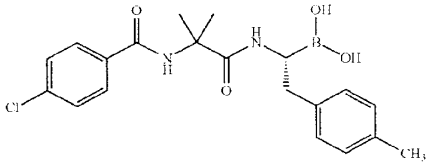
2



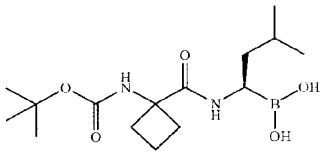
3



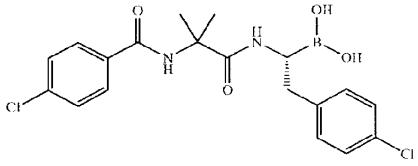
4



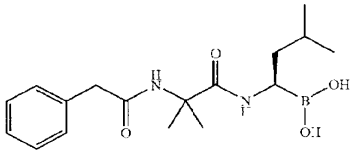
5



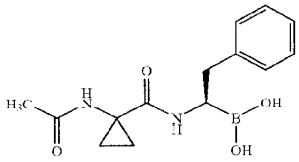
6



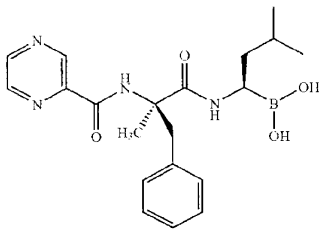
7



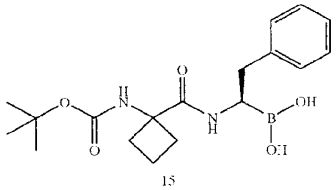
8



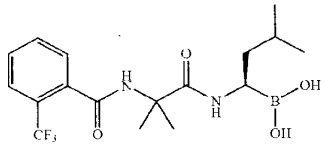
9



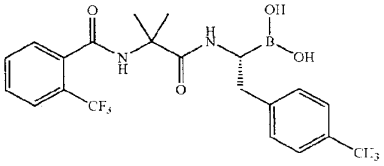
10



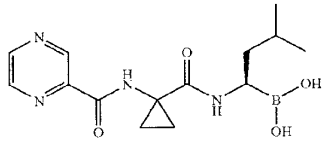
15



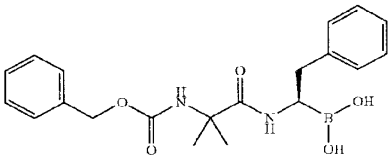
11



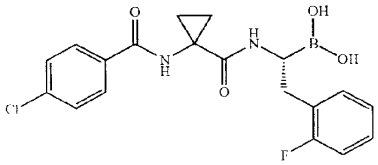
16



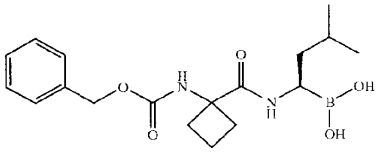
12



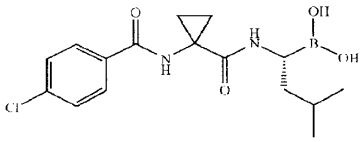
17



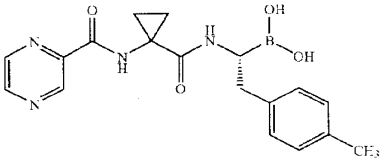
13



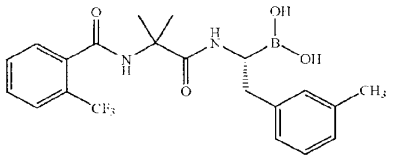
18



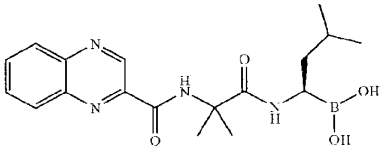
14



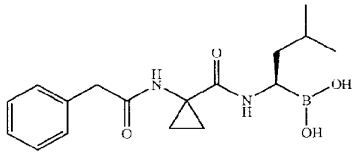
19



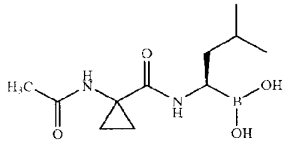
20



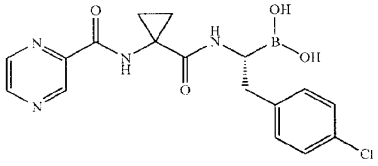
21



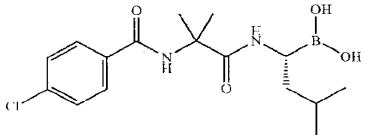
22



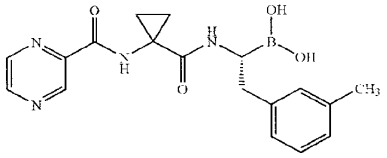
23



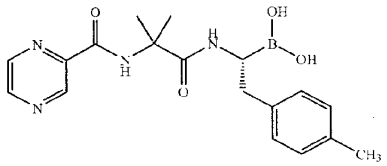
24



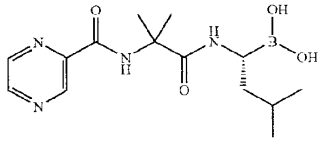
25



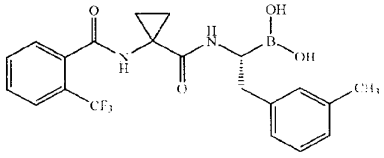
26



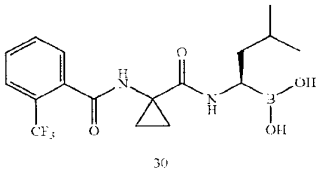
27



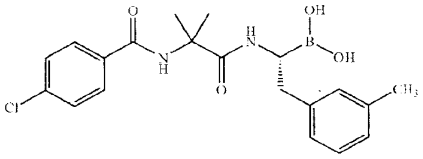
28



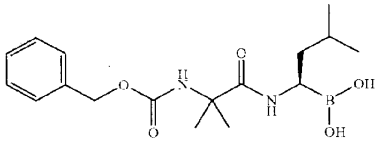
29



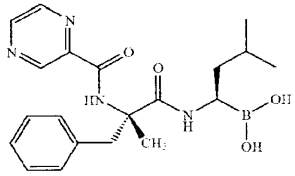
30



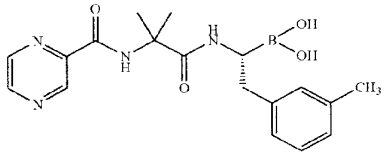
31



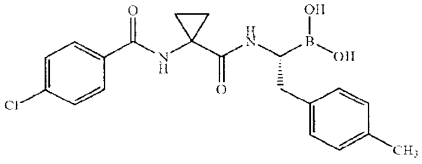
32



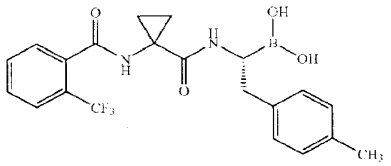
33



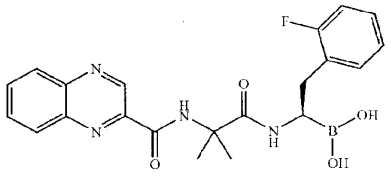
34



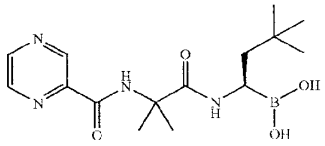
35



36

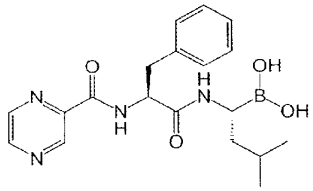


37

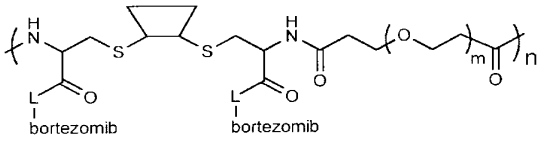


38

In preferred embodiments, the proteasome inhibitor in the CDP-proteasome inhibitor conjugate, particle or composition comprises a boronic acid containing molecule, e.g., a boronic acid containing molecule described herein, e.g., bortezomib;

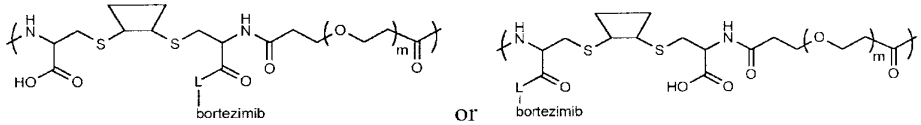


In one embodiment, the CDP-proteasome inhibitor conjugate is a CDP-bortezomib conjugate, e.g.,



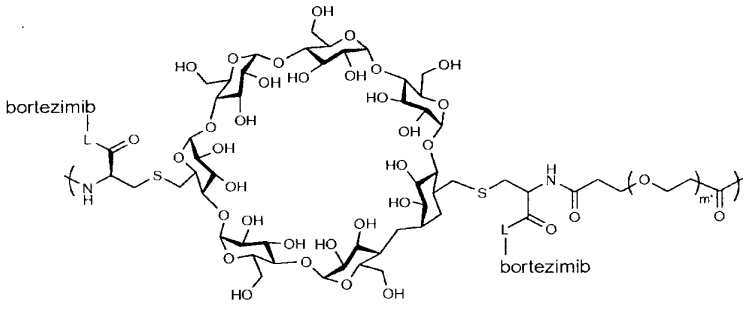
wherein  represents a cyclodextrin; n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an

integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); and "L-bortezemib" is a bortezemib-linker moiety, e.g., a bortezemib-linker moiety described herein, e.g., a bortezemib-linker moiety described in FIG. 7. In some embodiments, the CDP-proteasome inhibitor conjugate, e.g., the CDP-bortezomib conjugate, does not have complete loading, e.g., one or more binding sites, e.g., cysteine residues, are not bound to a proteasome inhibitor, e.g., a bortezomib moiety, bound with a linker described herein, e.g., the CDP-bortezemib conjugate comprises one or more subunits having the formulae provided below:



wherein  represents a cyclodextrin; m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); and "L-bortezemib" is a bortezemib-linker moiety, e.g., a bortezemib-linker moiety described herein, e.g., a bortezemib-linker moiety described in FIG. 7. In some embodiments, the CDP-proteasome inhibitor conjugate, particle or composition e.g., the CDP-bortezomib conjugate, particle or composition, comprises a mixture of fully-loaded and partially-loaded CDP-proteasome inhibitor conjugates, e.g., CDP-bortezomib conjugates.

In one embodiment, the CDP-proteasome inhibitor conjugate comprises a subunit of

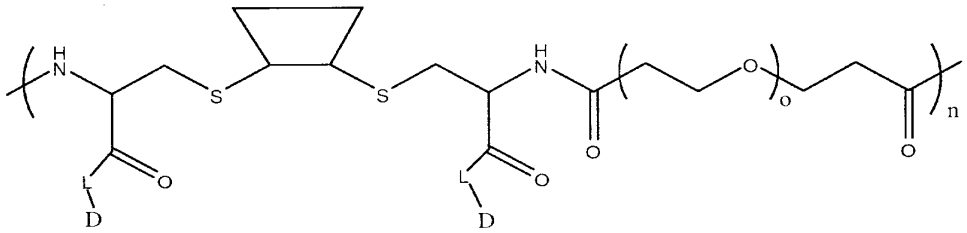


wherein m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); and "L-

bortezemib" is a bortezemib-linker moiety, e.g., a bortezemib-linker moiety described herein, e.g., a bortezemib-linker moiety described in FIG. 7.

The CDP-proteasome inhibitor conjugate (such as a boronic acid containing proteasome inhibitor) of the invention comprises a proteasome inhibitor (such as a boronic acid containing proteasome inhibitor, e.g., bortezomib) covalently linked to a CDP described herein. In one embodiment, the proteasome inhibitor is a pharmaceutically active agent, preferably comprises a boronic acid moiety or a boronic acid derivative described herein.

In the 1st embodiment, the CDP-proteasome inhibitor conjugate is formula (K) below:



wherein:

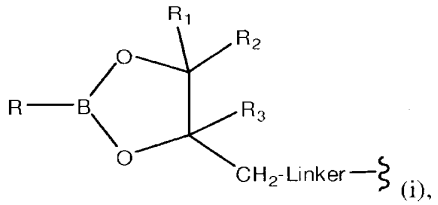
n is an integer from 1 to 100;

o is an integer from 1 to 1000;

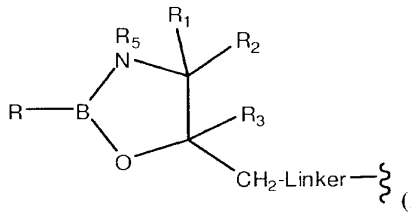
L is a linker described in Formulas (I)-(VIII); and

D is –B-R, wherein R is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above.

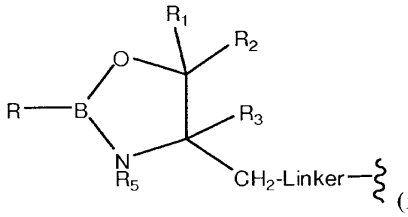
In another embodiment, the L-D moiety in formula (K) is represented by the following formula:



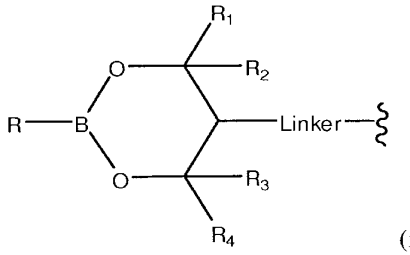
(i),


R1
R5
R2
N
R
B
R3
O
CH2-Linker

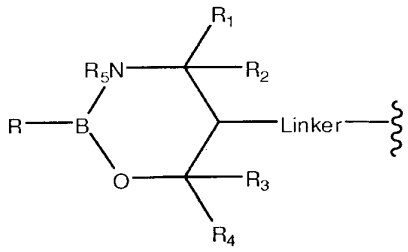
(ii),


R1
R2
O
R
B
R3
N
R5
CH2-Linker

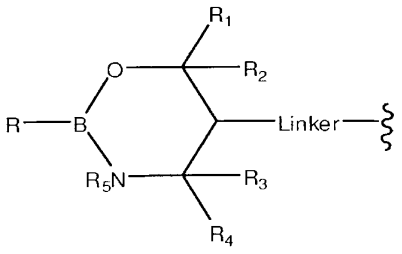
(iii),


R1
R2
O
R
B
Linker
O
R3
R4

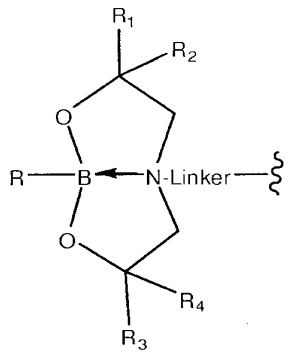
(iv),


R1
R5N
R2
R
B
Linker
O
R3
R4

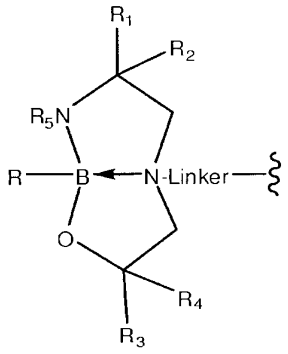
(v),


R1
O
R2
R
B
Linker
R5N
R3
R4

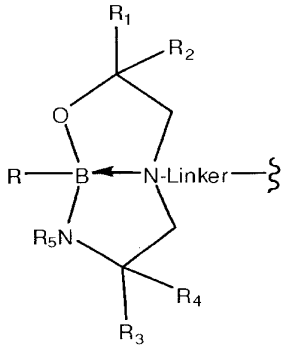
(vi),



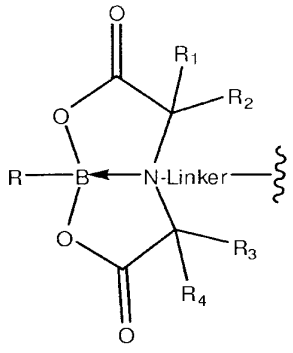
(vii),



(viii),



(ix), or



(x),

wherein:

R is the non-boronic acid moiety in R-B(OH)$_2$ or R is as described in a boronic acid derivative RB(Y)$_2$ described herein;

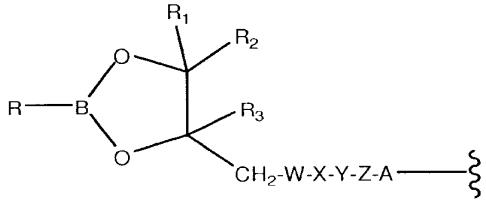
RB(OH)$_2$ is a pharmaceutically active agent, preferably a proteasome inhibitor comprising a boronic acid moiety, such as bortezomib;

RB(Y)$_2$ is a pharmaceutically active agent, preferably a proteasome inhibitor such as a proteosome inhibitor comprising a boronic acid derivative;

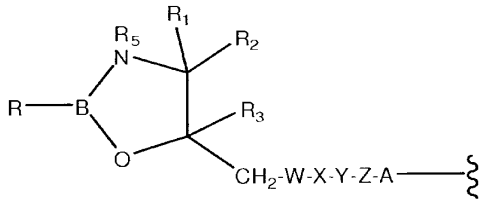
R_1, R_2, R_3, R_4 and R_5 are each independently –H or a (C_1-C_5)alkyl;

Linker is a linker group comprising an amino terminal group.

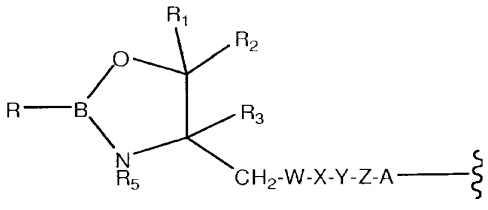
In a 2nd embodiment, for CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formulas (K), the L-D moiety is represented by a formula selected from:



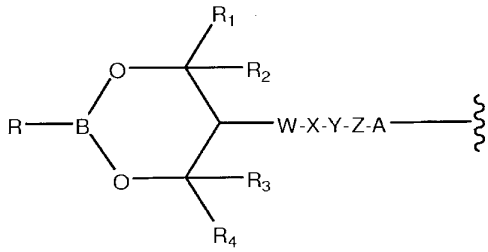
(ia),



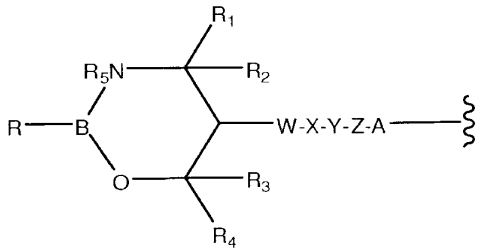
(iia),



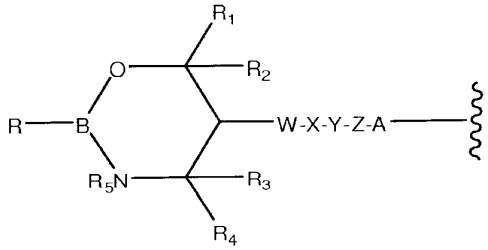
(iiia),



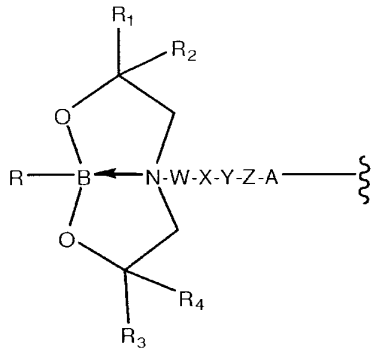
(iva),



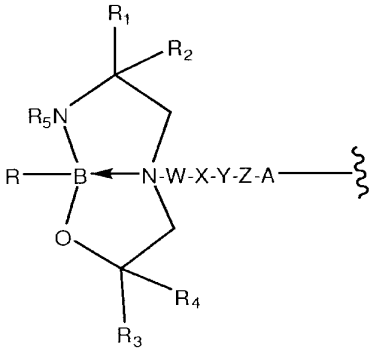
(va),



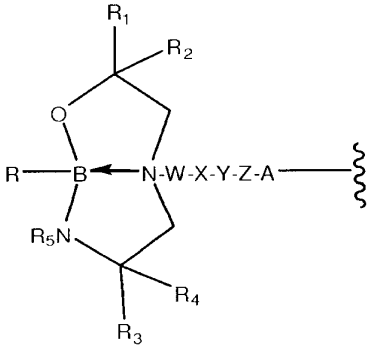
(via),



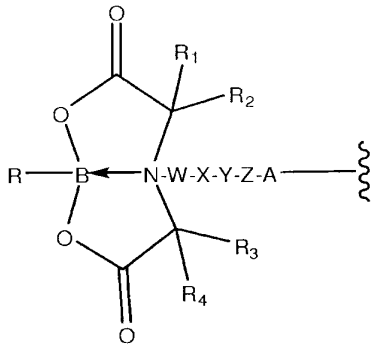
(viia),



(viiia),



(ixa), and



(xa),

wherein:

R_1, R_2, R_3, R_4 and R_5 are each independently –H or a (C_1-C_5)alkyl;

R is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above;

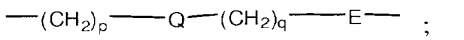
W is $-(CH_2)_m-$, -O- or $-N(R_5')-$, when the polymer-agent conjugate is represented by structural formulas (ia)-(via); or

W is $-(CH_2)_m-$, when the polymer-agent conjugate is represented by structural formulas (viia)-(xa);

X is a bond when W is $-(CH_2)_m-$ and X is –C(=O)- when W is -O-, or $-N(R_5')$;

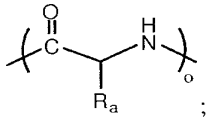
Y is a bond, -O-, or $-N(R_5')-$;

Z is represented by the following structural formula:



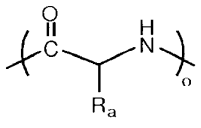
;

E is a bond, aryl (e.g., phenyl) or heteroaryl (e.g., pyridyl, furyl or furanyl, imidazolyl, benzimidazolyl, pyrimidinyl, thiophenyl or thienyl, quinolinyl, indolyl and thiazolyl);

Q is a bond, -O-, $-N(R_5')-$, $-N(R_5')-C(=O)-O-$, $-O-C(=O)-N(R_5')-$, -OC(=O)-, -C(=O)-O-, -S-S-, $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ or 

;

R_a is a side chain of a naturally occurring amino acid or an analog thereof;

A is –N(R_5')-, or A is a bond when Q is  and q is 0;

R_5' is –H or (C_1-C_6)alkyl;

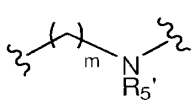
m, p, q are each an integer from 0 to 10;

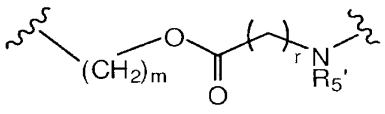
n is an integer from 1 to 10; and

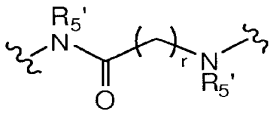
o is an integer from 1 to 10, provided when Y is -O- or –N(R_5')- and Q is -O-, -N(R_5')-, -(O-CH_2-CH_2)$_n$-, -N(R_5')-C(=O)-O-, -O-C(=O)-N(R_5')-, -OC(=O)- or -S-S-, then p is an integer from 2 to 10; when Q is -O-, –N(R_5')-, -N(R_5')-C(=O)-O-, -O-C(=O)-N(R_5')-, -OC(=O)-, -C(=O)-O-, or -S-S- and E is a bond, then q is an integer from 2 to 10; when Y is -O- or –N(R_5')-, Q and E are both a bond, then p+q ≥ 2; when W is –O- or -N(R_5')-, Y, Q and E are all bond, then p+q ≥ 1; and when W is –O- or -N(R_5')-, Y is a bond, and Q is -N(R_5')-C(=O)-O-, -O-C(=O)-N(R_5')-, -OC(=O)-, -C(=O)-O-, -S-S- or -(O-CH_2-CH_2)$_n$-, then p is an integer from 2 to 10.

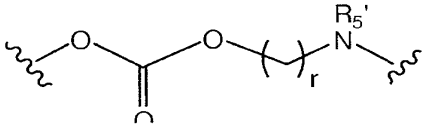
In one embodiment, Z is a bond or –(CH_2)$_r$-, wherein r is an integer from 1 to 10.

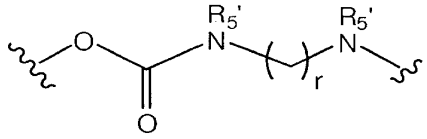
In a 3rd embodiment, for CDP-proteasome inhibitor conjugate described in the 2nd embodiment, the linker (i.e. -W-X-Y-Z-A) is represented by any one of the following formula:

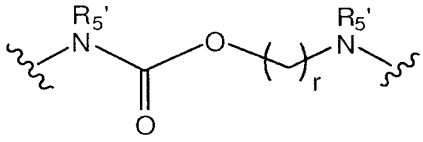
 (a);

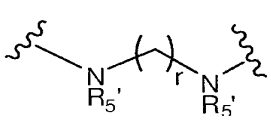
 (b);

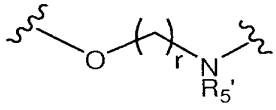
 (c);

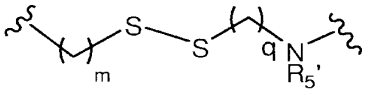
 (d);

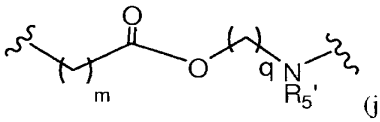

(e);

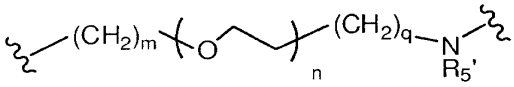

(f);

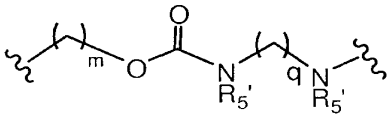

(g);

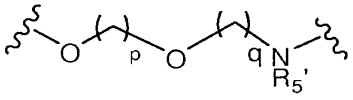

(h);

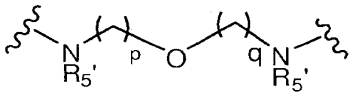

(i);

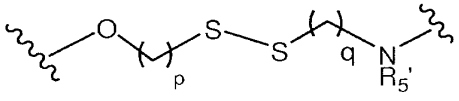

(j);

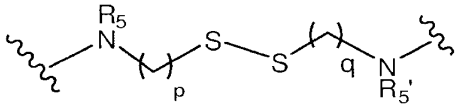

(k);


(l);

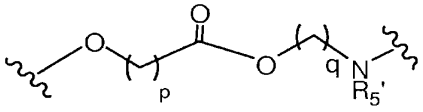

(m);


(n);

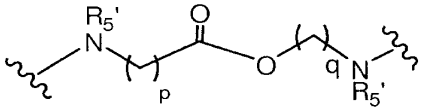

(o);



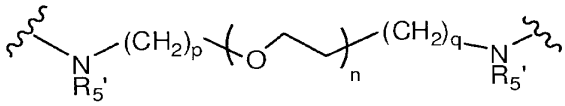
(p);



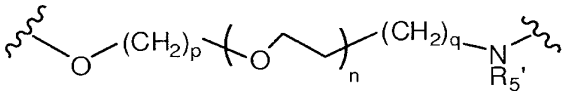
(q);



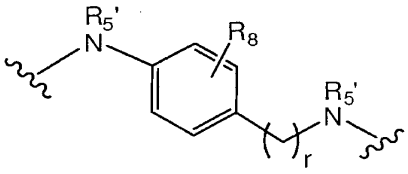
(r);



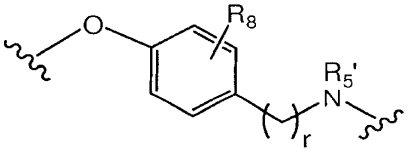
(s);



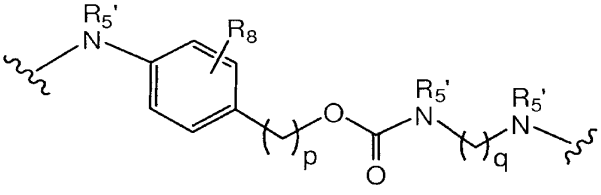
(t);



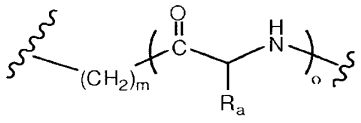
(u);



(v);



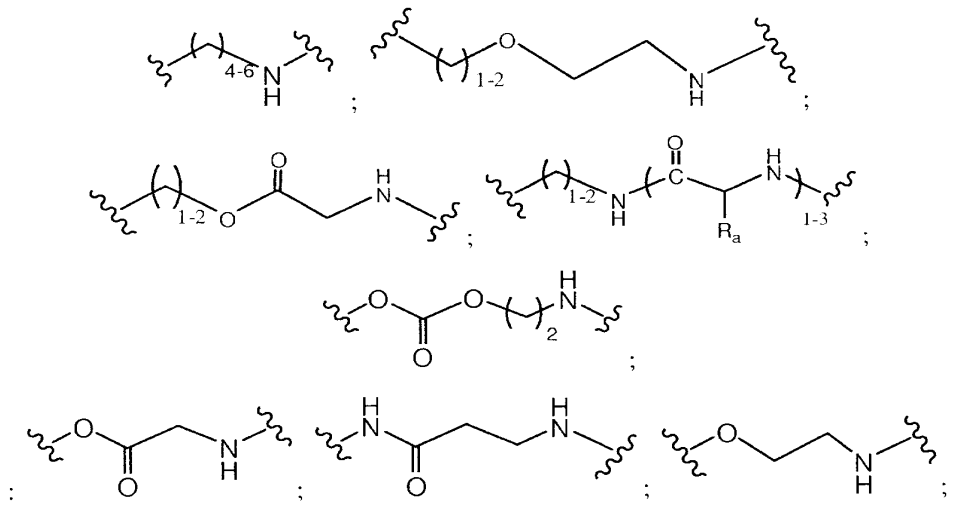
(w);

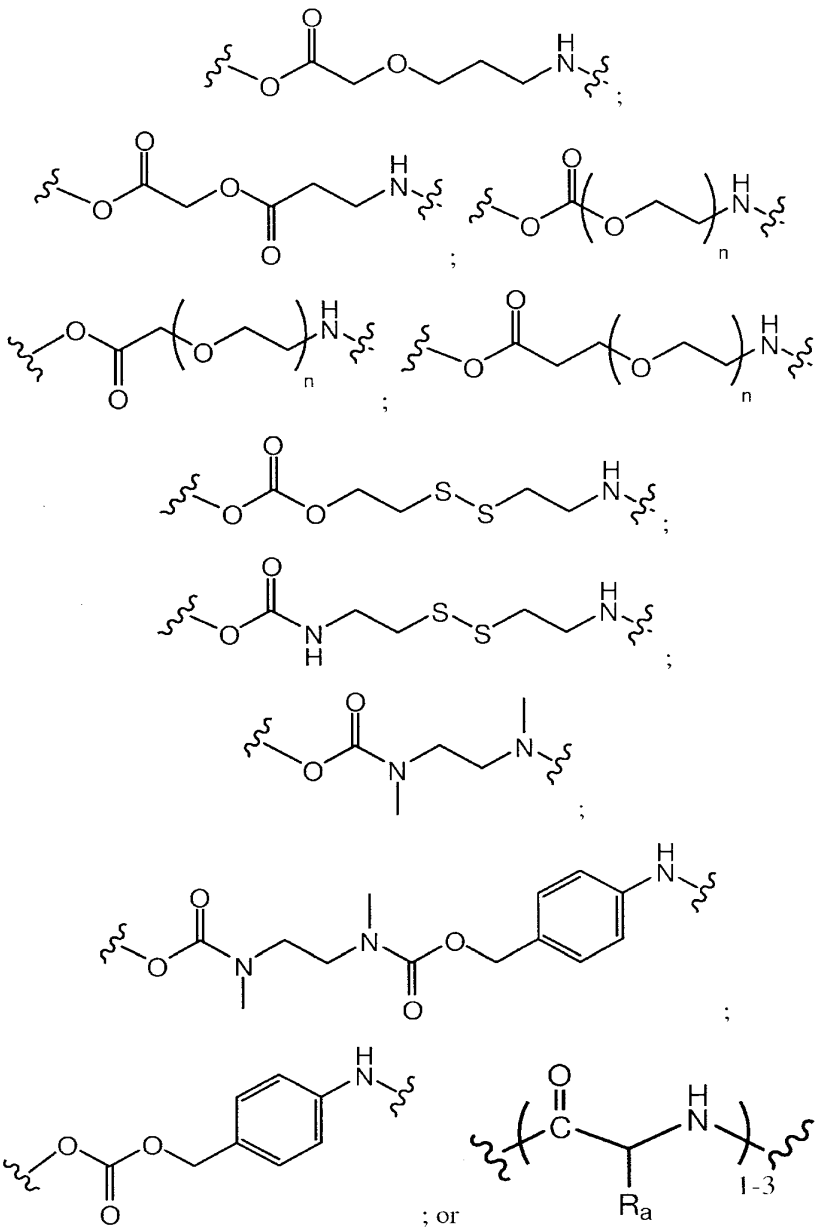


(x),

wherein R_5' is –H or (C_1-C_6)alkyl; R_a is a side chain of a naturally occurring amino acid or an analog thereof; R_8 is a substituent; n is an integer from 1 to 10; r is an integer from 1 to 10; m, p and q are each an integer from 0 to 10; and o is an integer from 1 to 10. For formulas (d)-(h), r is an integer from 2 to 10. For formulas (i), (j) and (l), q is an integer from 2 to 10. For formulas (m)-(p), p and q are each an integer from 2 to 10. For formulas (q) and (r), p is an integer from 1 to 10 and q is an integer from 2 to 10. For formulas (s) and (t), p is an integer from 2 to 10. For formula (w), q is an integer from 2 to 10. More specifically, R_8 is selected from H, halo, -CN, -NO_2, -OH, (C_1-C_6)alkyl, halo(C_1-C_6)alkyl, hydroxy(C_1-C_6)alkyl, (C_1-C_6)alkoxy, halo(C_1-C_6)alkoxy, (C_1-C_3)alkoxy(C_1-C_3)alkyl and –NR_9R_{10}; wherein R_9 and R_{10} are each independently H, (C_1-C_6)alkyl, halo(C_1-C_6)alkyl, (C_1-C_6)alkoxy, halo(C_1-C_6)alkoxy, (C_1-C_3)alkoxy(C_1-C_3)alkyl.

In a 4th embodiment, for CDP-proteasome inhibitor conjugate described in the 3rd embodiment, the linker (i.e., -W-X-Y-Z-A) is represented by any one of the following formulas:





wherein n is an integer from 2 to 5; and R_a is a side chain of a naturally occurring amino acid or an analog thereof.

In a 5th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate described in the

1st embodiment, the linker is represented by formulas (AA1), (BB1) or (CC1):

$$-(CH_2)_m-O-CH_2-O-(CH_2)_q-N(R_5)- \quad (AA1),$$

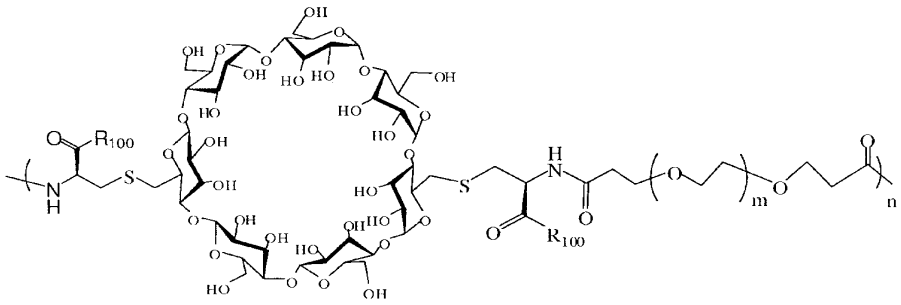
$$-(CH_2)_m-O-(CH_2)_p-O-CH_2-N(R_5)- \quad (BB1)$$

$$-(CH_2)_m-(CH_2)_p- O-CH_2-N(R_5)- \quad (CC1)$$

wherein m is an integer from 0 to 10; q is an integer from 2 to 10; p is an integer from 0 to 10 for structural formula (CC1) and p is an integer from 2 to 10 for structural formula (BB1).

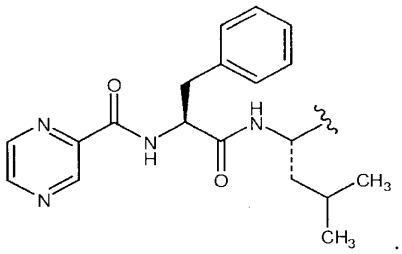
In a 6th embodiment, for CDP-proteasome inhibitor conjugate of formula (K) described in the 1st embodiment, the L-D moiety is as described in FIG. 7.

In a 7th embodiment, the CDP-proteasome inhibitor conjugate is represented by the following formula:

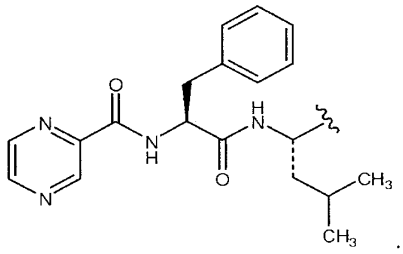


(M),

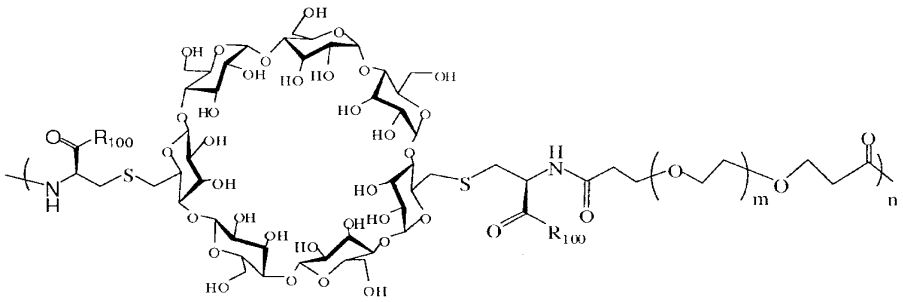
wherein n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); and R_{100} is –OH or a group comprising a –B-R moiety, wherein R is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. At least one R_{100} in the conjugate is a group comprising a –B-R moiety. Alternatively, the conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a group comprising a –B-R moiety per repeat unit. In one embodiment, at least one R_{100} in the conjugate is a group comprising a –B-R moiety and R is represented by the following structural formula:



Alternatively, the conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a group comprising a –B-R moiety per repeat unit and R is represented by the following structural formula:



In a 8th embodiment, the CDP-proteasome inhibitor conjugate is represented by formula (M):

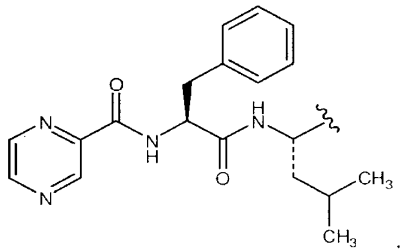


(M),

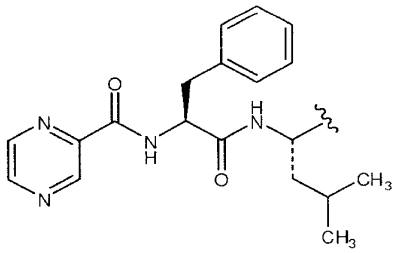
wherein n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is –OH or a group represented by a formula selected from formulas (i)-(x). At least one R_{100} group

in the conjugate is a group represented by a formula selected from formulas (i)-(x). Alternatively, the conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a formula selected from formulas (i)-(x) per repeat unit.

In a 9th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M), n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is –OH or a group represented by a formula selected from formulas (i)-(x). At least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by a formula selected from formulas (i)-(x); and R in formulas (i)-(x) is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, at least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by a formula selected from formulas (i)-(x); and R in formulas (i)-(x) is represented by the following structural formula:

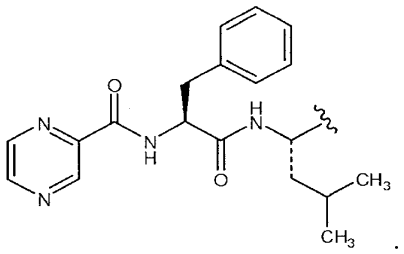


Alternatively, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a formula selected from formulas (i)-(x) per repeat unit; and R in formulas (i)-(x) is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a formula selected from formulas (i)-(x) per repeat unit; and R in formulas (i)-(x) is represented by the following structural formula:

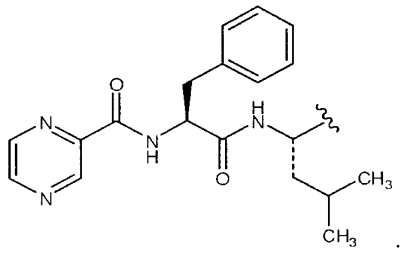


In a 10th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M), n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is –OH or a group represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa). At least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa). Alternatively, the conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa) per repeat unit.

In a 11th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M), n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is –OH or a group represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa). At least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa); and R in formulas (ia)-(xa) is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, at least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa); and R in formulas (i)-(x) is represented by the following structural formula:



Alternatively, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa) per repeat unit; and R in formulas (ia)-(xa) is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by a formula selected from formulas (ia)-(xa) per repeat unit; and R in formulas (ia)-(xa) is represented by the following structural formula:



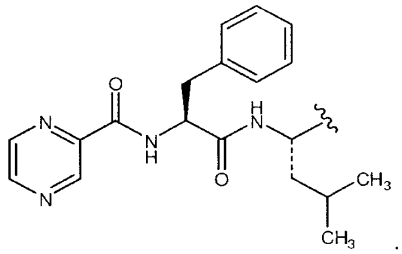
In a 12th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M), n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is –OH or a group represented by formula (ia). At least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by formula (1a) and the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from formulas (a)-(x) described in the 3rd embodiment and formulas (AA1), (BB1) and (CC1) described in the 5th embodiment.

Alternatively, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by formula (ia) per repeat unit; and the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from formulas (a)-(x) described in the 3rd embodiment and formulas (AA1), (BB1) and (CC1) described in the 5th embodiment.

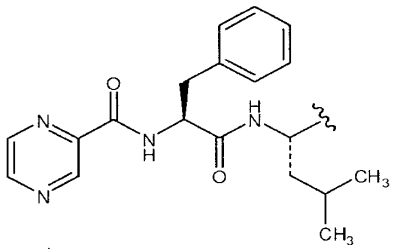
Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (iia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (iiia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment above, R_{100} is represented by formula (iva) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (va) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (via) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (viia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (viiia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (ixa) instead of formula (ia). Alternatively, in the 12th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (xa) instead of formula (ia).

In a 13th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M), n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is -OH or a group represented by (ia). At least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by (ia); the group -W-X-Y-Z-A in formula (ia) is represented by a formula selected from formulas (a)-(x) described in the 3rd embodiment and formulas (AA1), (BB1) and (CC1) described in the 5th embodiment; and R in R_{100} represented by formula (ia) is as describe in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, at least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by formula (ia); the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected

from formulas (a)-(x) described in the 3rd embodiment and formulas (AA1), (BB1) and (CC1) described in the 5th embodiment; and R in R_{100} represented by formula (ia) is represented by the following structural formula:



Alternatively, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by formula (ia) per repeat unit; the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from formulas (a)-(x) described in the 3rd embodiment and formulas (AA1), (BB1) and (CC1) described in the 5th embodiment; and R in R_{100} represented by formula (ia) is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by formula (ia) per repeat unit; the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from formulas (a)-(x) described in the 3rd embodiment and formulas (AA1), (BB1) and (CC1) described in the 5th embodiment; and R in R_{100} represented by formula (ia) is represented by the following structural formula:



Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (iia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (iiia) instead of formula (ia). Alternatively, in the

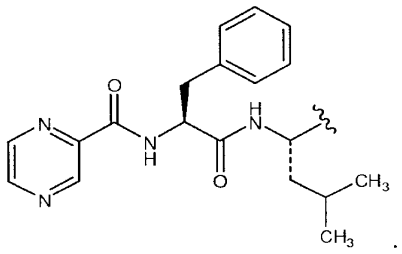
13th embodiment above, R_{100} is represented by formula (iva) instead of formula (ia). Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (va) instead of formula (ia). Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (via) instead of formula (ia). Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (viia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (viiia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (ixa) instead of formula (ia). Alternatively, in the 13th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (xa) instead of formula (ia).

In a 14th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M), n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is –OH or a group represented by formula (ia). At least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by formula (ia) and the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from the formulas described in the 4th embodiment. Alternatively, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by formula (ia) per repeat unit; and the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from the formulas described in the 4th embodiment.

Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (iia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (iiia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 14th embodiment above, R_{100} is represented by formula (iva) instead of formula (ia). Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (va) instead of formula (ia). Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (via) instead of formula (ia). Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (viia) instead of formula

(ia). Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (viiia) instead of formula (ia). Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (ixa) instead of formula (ia). Alternatively, in the 14th embodiment described above, R_{100} is represented by formula (xa) instead of formula (ia).

In a 15th embodiment, for the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M), n is an integer from 1 to 100 (e.g., n is an integer from 4 to 80, from 4 to 50, from 4 to 30 or from 4 to 20, or n is 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20); m is an integer from 1 to 1000 (e.g., m is an integer from 1 to 200, from 1 to 100, from 1 to 80, from 2 to 80, from 5 to 70, from 10 to 50, or from 20 to 40); R_{100} is –OH or a group represented by formula (ia). At least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by formula (ia); the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from the formulas described in the 4th embodiment; and R in R_{100} represented by formula (ia) is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, at least one R_{100} group in the conjugate is a group represented by formula (ia); the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from the formulas described in the 4th embodiment; and R in R_{100} represented by formulas (ia) is represented by the following structural formula:



Alternatively, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 or 2.0 R_{100} groups represented by formula (ia) per repeat unit; the group -W-X-Y-Z-A in R_{100} represented by formula (ia) is represented by a formula selected from the formulas described in the 4th embodiment; and R in R_{100} represented by formula (ia) is as described in $RB(OH)_2$ or $RB(Y)_2$ described above. More specifically, the CDP-proteasome inhibitor conjugate represented by formula (M) comprises at least 0.1, 0.2,

CA 02927832 2016-04-19

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS COMPREND PLUS D'UN TOME.

CECI EST LE TOME __1___ DE __2 __

NOTE: Pour les tomes additionels, veillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE THAN ONE VOLUME.

THIS IS VOLUME __1___ OF __2___

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

CLAIMS:

1. A cyclodextrin-containing polymer (CDP)-therapeutic agent conjugate for use in a method of treating a disease or disorder associated with an immune response in a subject, wherein the CDP-therapeutic agent conjugate is a CDP-cytotoxic agent conjugate.

2. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 1, wherein the disease or disorder associated with an immune response is an autoimmune disease.

3. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 1, wherein the disease or disorder associated with an immune response is lupus.

4. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 1, wherein the disease or disorder associated with an immune response is an inflammatory disease.

5. The CDP-therapeutic agent conjugate of any one of claims 1 to 4, wherein the CDP-cytotoxic agent conjugate is selected from the group consisting of a CDP-topoisomerase II inhibitor conjugate, a CDP-anti-metabolic agent conjugate, a CDP-anti-folate agent conjugate, a CDP-alkylating agent conjugate, a CDP-anthracycline conjugate, a CDP-anti-tumor antibiotic conjugate, and a CDP-microtubule inhibitor conjugate.

6. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 5 wherein the CDP-microtubule inhibitor conjugate is a CDP-taxane conjugate.

7. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 5, wherein the CDP-microtubule inhibitor conjugate is a CDP-epothilone conjugate.

8. The CDP-therapeutic agent conjugate of any one of claims 1 to 7, wherein the CDP-therapeutic agent conjugate is formulated for administration to the subject in combination with a second therapeutic agent.

9. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 3, wherein the CDP-therapeutic agent conjugate is formulated for administration to the subject in combination with a second therapeutic agent, wherein the second therapeutic agent is one or more of the following agents:

(a) an anti-inflammatory agent;

(b) an anti-malarial agent;

(c) an immunomodulator;

(d) an anti-coagulant; and

(e) a hormone.

10. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the anti-inflammatory agent is: aspirin, acetaminophen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, a corticosteroid, or any combination thereof.

11. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the anti-malarial agent is hydroxychloroquine, chloroquine, or any combination thereof.

12. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the immunomodulator is an immunomodulator with an intracellular target.

13. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 12, wherein the immunomodulator with an intracellular target is: an anti-metabolite, an IL-2 inhibitor, an mTor inhibitor, a TNF inhibitor, a macrolide, or any combination thereof.

14. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 13, wherein the anti-metabolite is a purine synthesis inhibitor, a pyrimidine synthesis inhibitor, or an anti-folate.

15. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the immunomodulator is an immunomodulator with a cellular receptor target.

16. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 15, wherein the immunomodulator with a cellular receptor target is: an IL-1 receptor inhibitor; an antibody which inhibits the function of the cellular receptor target, or any combination thereof.

17. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 16, wherein the antibody which inhibits the function of a cellular receptor target is an anti-CD3 antibody, an anti-CD4 antibody, an anti-CD5 antibody, an anti-CD11a antibody, anti-BLyS antibody, an anti-CD20 antibody, an anti-CD22 antibody, an anti-CD23 antibody, an anti-CD40 antibody, an anti-CD62L antibody, an anti-CD80 antibody, an anti-CD147 antibody, an anti-CD154 antibody, an anti-CAT antibody, an anti-integrin antibody, a CTLA4 antibody, an anti-IL6 receptor antibody, an anti-LFA1 antibody, an anti-IL2 antibody, or an anti-human T cell antibody.

18. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the immunomodulator is an immunomodulator with a serum target.

19. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 18, wherein the immunomodulator with a serum target is an antibody which inhibits the function of the serum target.

20. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 19, wherein the antibody which inhibits the function of the serum target is an anti-BLyS antibody, an anti-IL5 antibody, anti-IL6 antibody, and anti-interferon alpha antibody, an anti-IgE antibody, an anti-C5a antibody, an anti-TNF antibody, anti-IL10 antibody, anti-IL12 antibody, or an anti-IL13 antibody.

21. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 20, wherein the anti-BLyS antibody is belimumab.

22. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the immunomodulator is a biologic that interferes with immune cell function.

23. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the immunomodulator is a macrolide.

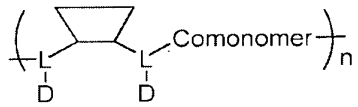
24. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the anti-coagulant is aspirin, heparin, or warfarin.

25. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 9, wherein the hormone is an androgen, a gonadotropin-hormone releasing agonist, or any combination thereof.

26. The CDP-therapeutic agent conjugate of any one of claims 1 to 25, wherein the CDP-therapeutic agent conjugate is in the form of a nanoparticle.

27. A cyclodextrin-containing polymer (CDP)-therapeutic agent conjugate, wherein said therapeutic agent is an anti-metabolic agent.

28. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 27, wherein the CDP-therapeutic agent conjugate is formed of repeating units of the following formula:



wherein

each L is independently a linker;

each D is independently an anti-metabolic agent or is absent;

each Comonomer is independently a comonomer; and

n is at least 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 or 20;

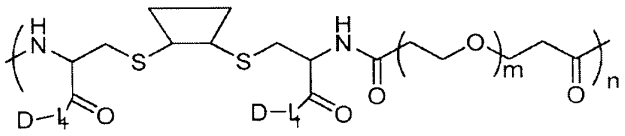
provided that the polymer comprises at least one anti-metabolic agent.

29. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 28, wherein each Comonomer is independently a comonomer comprising a polyethylene glycol chain.

30. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 28, wherein the molecular weight of each Comonomer is from about 2000 to about 5000 Da.

31. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 30, wherein the molecular weight of each Comonomer is from about 3000 to about 4000 Da.

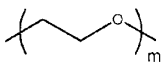
32. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 28, wherein said repeating units are of the following formula:



wherein

D and n are as defined in claim 33;

each L_1 is independently a linker, absent or, when D is absent, -OH; and

the group  has a Mw of 5,000 Da or less.

33. The CDP-therapeutic conjugate of any one of claims 27 to 32, wherein said anti-metabolic agent is an anti-folate agent.

34. The CDP-therapeutic conjugate of claim 33, wherein said anti-folate agent is pemetrexed, floxuridine or raltitrexed.

35. The CDP-therapeutic agent conjugate of claim 34, wherein said anti-folate agent is pemetrexed.

36. The CDP-therapeutic conjugate of any one of claims 27 to 32, wherein said anti-metabolic agent is a pyrimidine analog.

37. The CDP-therapeutic conjugate of claim 36, wherein said pyrimidine analog is gemcitabine, fluorouracil (5FU), capecitabine or cytarabine.

38. The CDP-therapeutic conjugate of claim 37, wherein said pyrimidine analog is gemcitabine.

39. The CDP-therapeutic conjugate of claim 37, wherein said pyrimidine analog is fluorouracil (5FU).

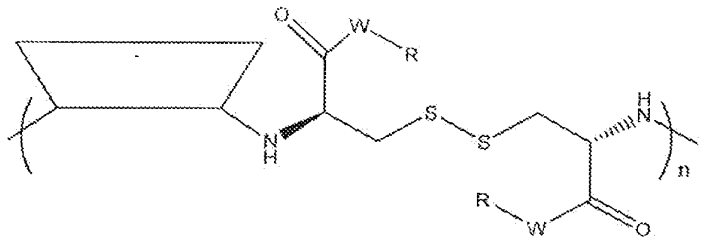
40. A pharmaceutical composition comprising a CDP-therapeutic agent conjugate of any one of claims 27 to 39 and a pharmaceutically acceptable diluent or excipient.

41. A CDP-therapeutic agent conjugate of any one of claims 27 to 39, for use in a method of treating a proliferative disorder.

42. The CDP-therapeutic agent conjugate for use of claim 41, wherein the proliferative disorder is a cancer.

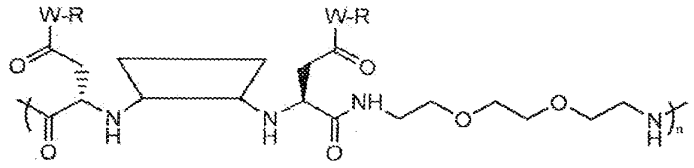
CA 02927832 2016-04-19

FIG. 1



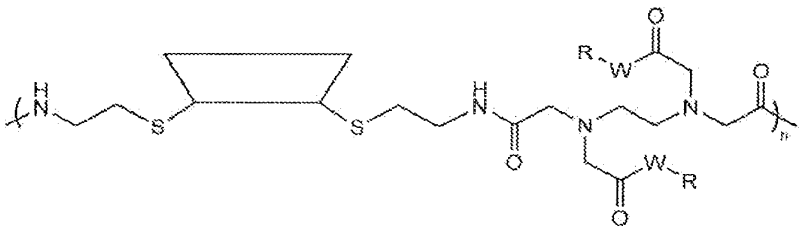
(A)

wherein n = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH; W = absent or a linker



(B)

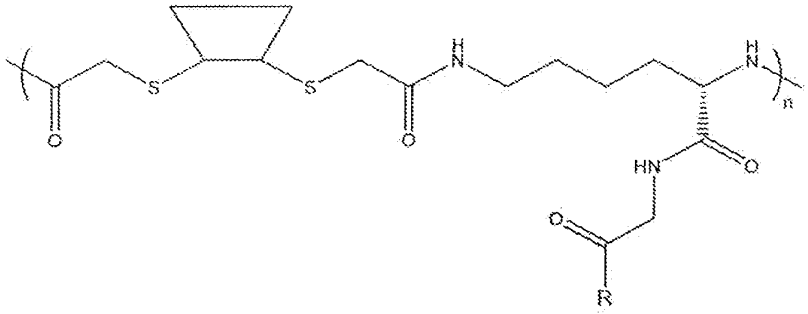
wherein n = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH; W = absent or a linker



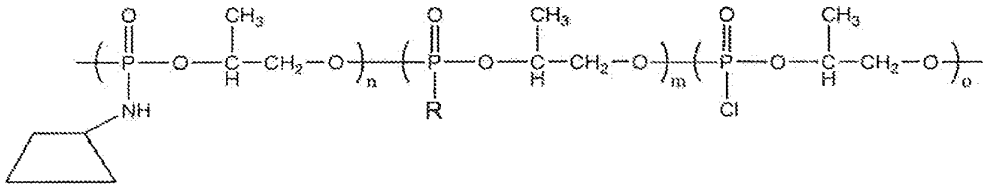
(C)

wherein n = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH; W = absent or a linker

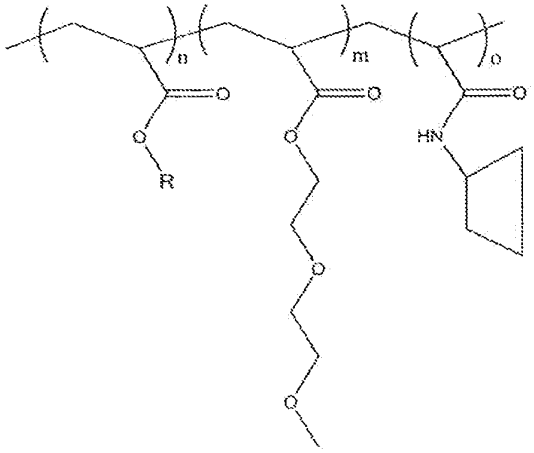
FIG. 1 (Cont'd)



(F) wherein n = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH



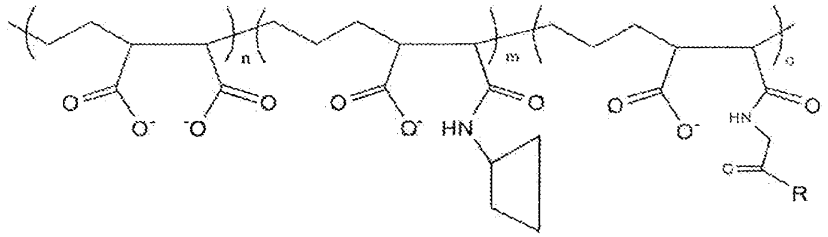
(G) wherein m, n, and o, independently, = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH



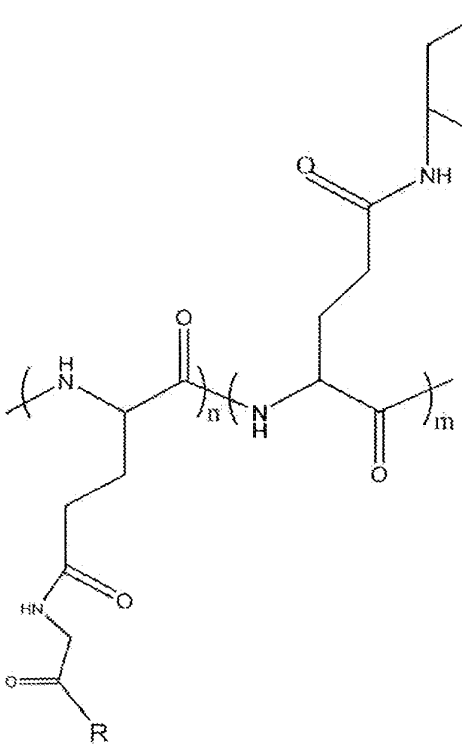
(H) wherein m, n, and o, independently, = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 1 (Cont'd)



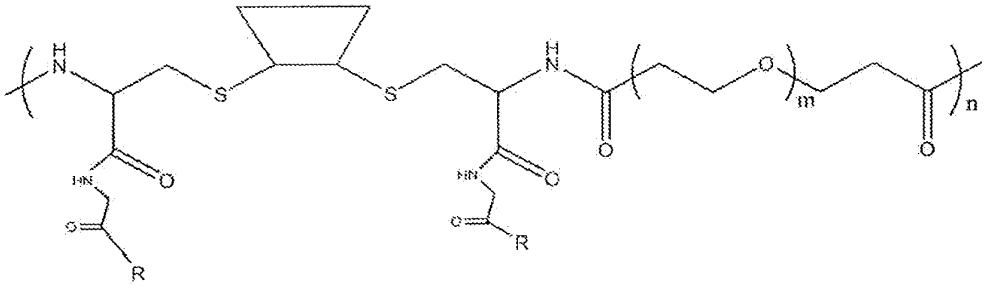
(I) wherein m, n, and o, independently, = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH



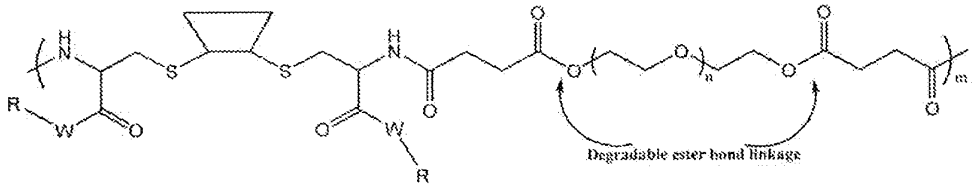
(J) wherein m and n, independently, = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 1 (Cont'd)

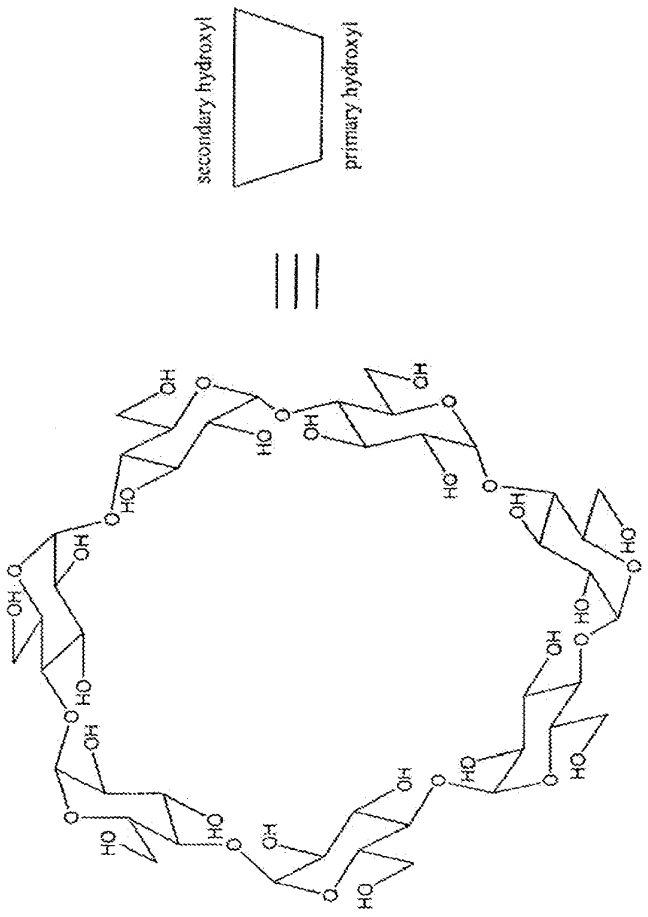


(K) wherein m and n, independently, = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH



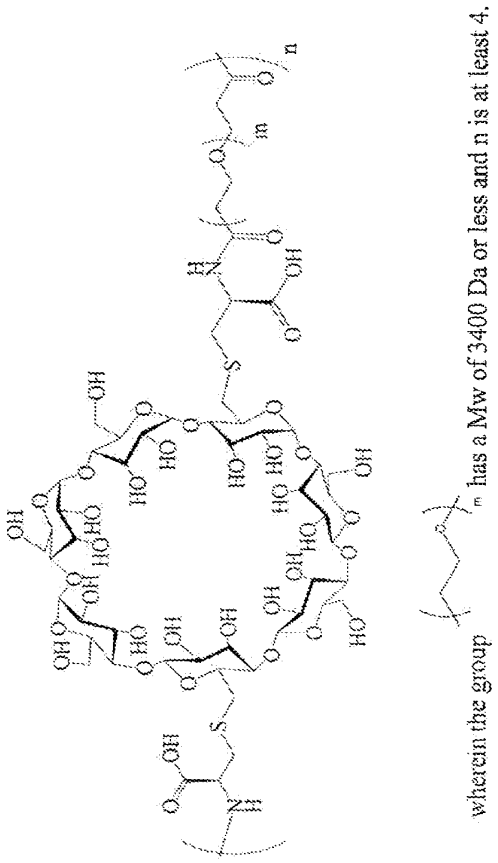
(L) wherein m and n, independently, = 1 to 1000; R = therapeutic agent or OH; W = absent or a linker

FIG. 2



CA 02927832 2016-04-19

FIG. 3



wherein the group $_m$ has a Mw of 3400 Da or less and n is at least 4.

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 4

Example	A	B	X	Taxane	Hydroxy Protecting Groups	Process for Preparation of taxane linker CDP molecules	Final Product
1.	-	-NH$(CH_2)_5$CO-	2'-OH	docetaxel	None	Process A	2'-docetaxel linked to CDP
2.	-	-NH$(CH_2)_5$CO-	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-docetaxel linked to CDP
3.	-	-NH$(CH_2)_5$CO-	2'-OH	larotaxel	None	Process A	2'-larotaxel linked to CDP
4.	-	-NH$(CH_2)_5$CO-	2'-OH	cabazitaxel	None	Process A	2'-cabazitaxel linked to CDP
5.	-	-NH$(CH_2)_5$CO-	2'-OH	paclitaxel	None	Process A	2'-paclitaxel linked to CDP
6.	-	-NH$(CH_2)_5$CO-	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-paclitaxel linked to CDP
7.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	2'-OH	docetaxel	None	Process A	2'-docetaxel linked to CDP
8.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-docetaxel linked to CDP
9.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	2'-OH	larotaxel	None	Process A	2'-larotaxel linked to CDP
10.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	2'-OH	cabazitaxel	None	Process A	2'-cabazitaxel linked to CDP
11.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	2'-OH	paclitaxel	None	Process A	2'-paclitaxel linked to CDP
12.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-paclitaxel linked to CDP
13.	-	-NH$CH_2CH_2COOCH_2CO$-	2'-OH	docetaxel	None	Process A	2'-docetaxel linked to CDP

FIG. 4 (cont'd)

Example	A	B	X	Taxane	Hydroxy Protecting Groups	Process for Preparation of taxane linker CDP molecules	Final Product
14.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-docetaxel linked to CDP
15.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	2'-OH	larotaxel	None	Process A	2'-larotaxel linked to CDP
16.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	2'-OH	cabazitaxel	None	Process A	2'-cabazitaxel linked to CDP
17.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	2'-OH	paclitaxel	None	Process A	2'-paclitaxel linked to CDP
18.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-paclitaxel linked to CDP
19.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	2'-OH	docetaxel	None	Process A	2'-docetaxel linked to CDP
20.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-docetaxel linked to CDP
21.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	2'-OH	larotaxel	None	Process A	2'-larotaxel linked to CDP
22.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	2'-OH	cabazitaxel	None	Process A	2'-cabazitaxel linked to CDP
23.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	2'-OH	paclitaxel	None	Process A	2'-paclitaxel linked to CDP
24.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-paclitaxel linked to CDP
25.	-$NH(CH_2)_2S$-	-$S(CH_2)_2NHCO$-	2'-OH	docetaxel	None	Process B	2'-docetaxel linked to CDP
26.	-$NH(CH_2)_2S$-	-$S(CH_2)_2NHCO$-	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process D	7-docetaxel linked to CDP
27.	-$NH(CH_2)_2S$-	-$S(CH_2)_2NHCO$-	2'-OH	larotaxel	None	Process B	2'-larotaxel linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 4 (cont'd)

Example	A	B	X	Taxane	Hydroxy Protecting Groups	Process for Preparation of taxane linker CDP molecules	Final Product
28.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$NHCO-	2'-OH	cabazitaxel	None	Process B	2'-cabazitaxel linked to CDP
29.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$NHCO-	2'-OH	paclitaxel	None	Process B	2'-paclitaxel linked to CDP
30.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process D	7-paclitaxel linked to CDP
31.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	2'-OH	docetaxel	None	Process A	2'-docetaxel linked to CDP
32.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-docetaxel linked to CDP
33.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	2'-OH	larotaxel	None	Process A	2'-larotaxel linked to CDP
34.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	2'-OH	cabazitaxel	None	Process A	2'-cabazitaxel linked to CDP
35.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	2'-OH	paclitaxel	None	Process A	2'-paclitaxel linked to CDP
36.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-paclitaxel linked to CDP
37.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$OCO-	2'-OH	docetaxel	None	Process B	2'-docetaxel linked to CDP
38.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$OCO-	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process D	7-docetaxel linked to CDP
39.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$OCO-	2'-OH	larotaxel	None	Process B	2'-larotaxel linked to CDP
40.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$OCO-	2'-OH	cabazitaxel	None	Process B	2'-cabazitaxel linked to CDP
41.	-NH(CH_2)$_2$S-	-S(CH_2)$_2$OCO-	2'-OH	paclitaxel	None	Process B	2'-paclitaxel linked to CDP

FIG. 4 (cont'd)

Example	A	B	X	Taxane	Hydroxy Protecting Groups	Process for Preparation of taxane linker CDP molecules	Final Product
42.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process D	7-paclitaxel linked to CDP
43.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	2'-OH	docetaxel	None	Process A	2'-docetaxel linked to CDP
44.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-docetaxel linked to CDP
45.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	2'-OH	larotaxel	None	Process A	2'-larotaxel linked to CDP
46.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	2'-OH	cabazitaxel	None	Process A	2'-cabazitaxel linked to CDP
47.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	2'-OH	paclitaxel	None	Process A	2'-paclitaxel linked to CDP
48.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-paclitaxel linked to CDP
49.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	2'-OH	docetaxel	None	Process A	2'-docetaxel linked to CDP
50.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	docetaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-docetaxel linked to CDP

FIG. 4 (cont'd)

Example	A	B	X	Taxane	Hydroxy Protecting Groups	Process for Preparation of taxane linker CDP molecules	Final Product
51.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	2'-OH	larotaxel	None	Process A	2'-larotaxel linked to CDP
52.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	2'-OH	cabazitaxel	None	Process A	2'-cabazitaxel linked to CDP
53.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	2'-OH	paclitaxel	None	Process A	2'-paclitaxel linked to CDP
54.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	paclitaxel	2' TBDMS or TROC	Process C	7-paclitaxel linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 5

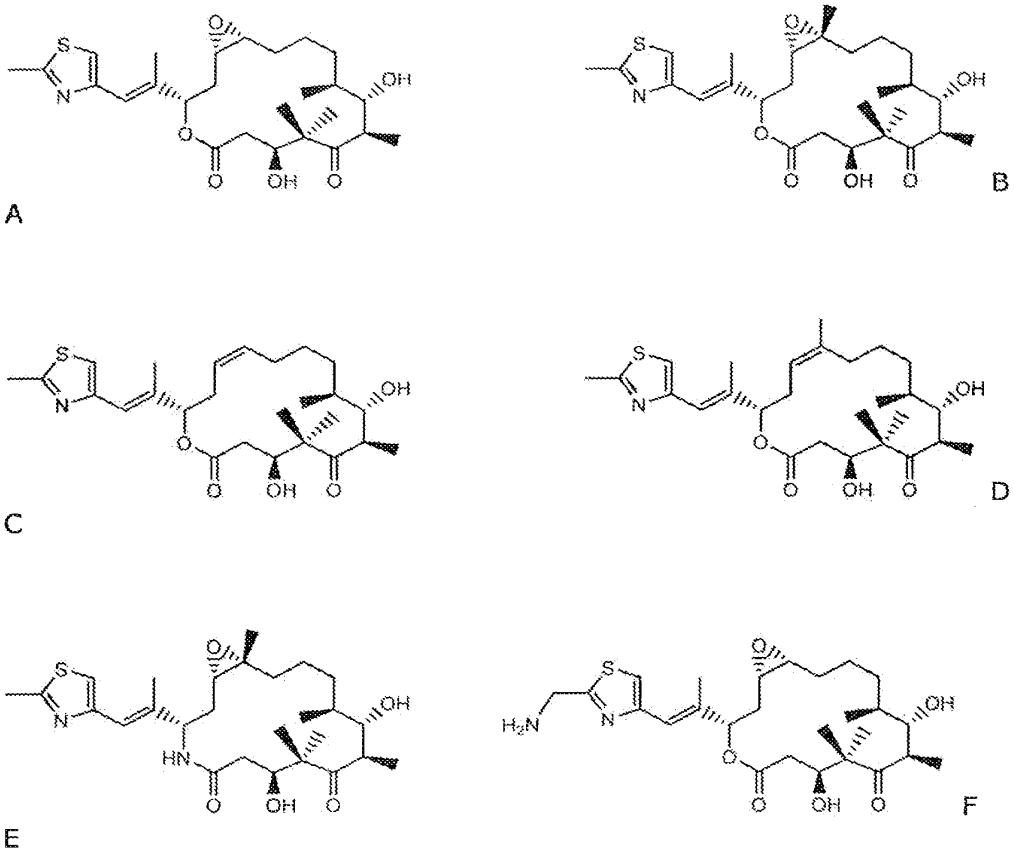
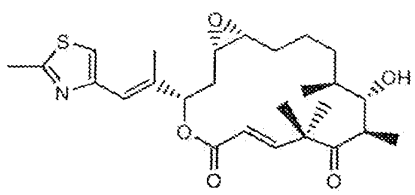
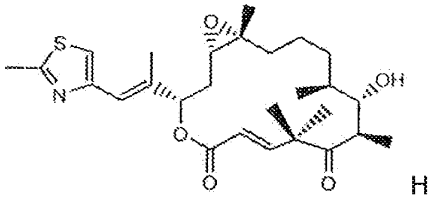


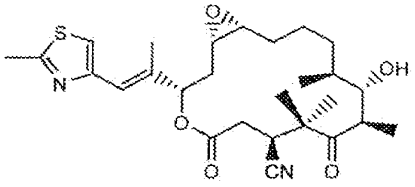
FIG. 5 (cont'd)



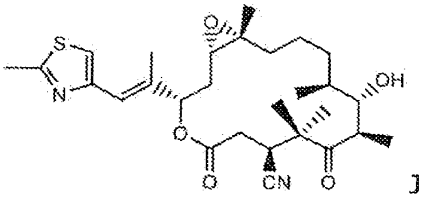
G



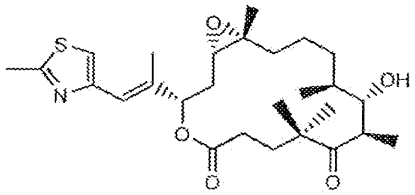
H



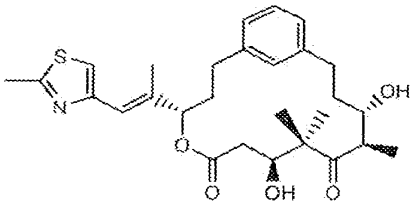
I



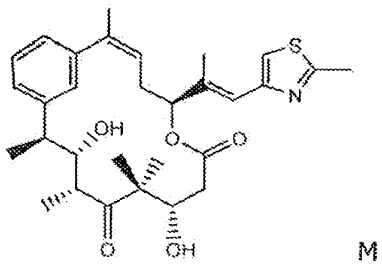
J



K



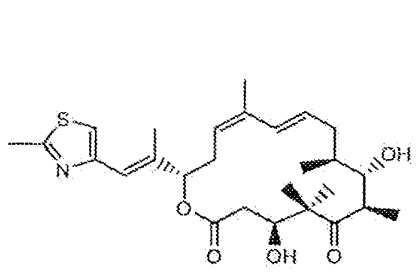
L



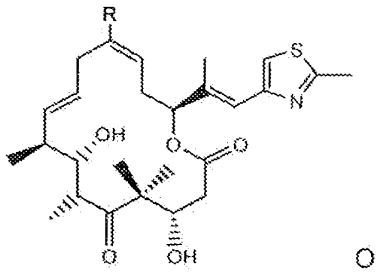
M

CA 02927832 2016-04-19

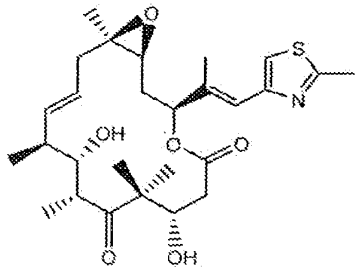
FIG. 5 (cont'd)



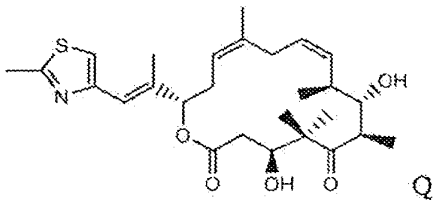
N



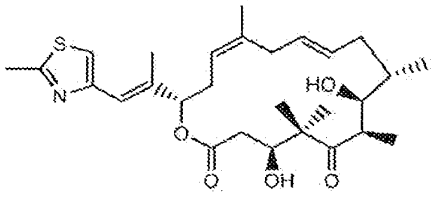
O



P



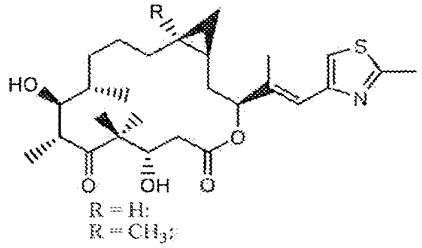
Q



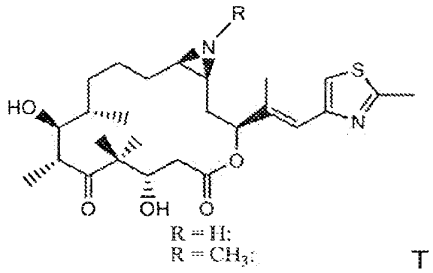
R

CA 02927832 2016-04-19

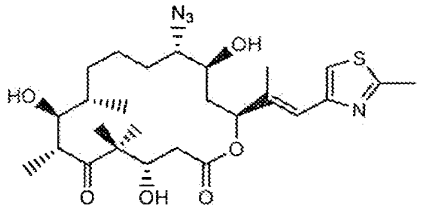
FIG. 5 (cont'd)



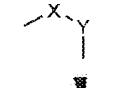
S

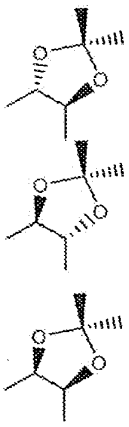


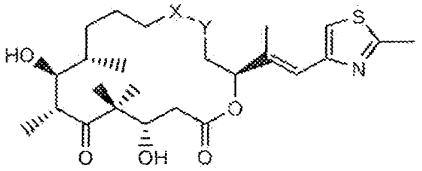
T



U



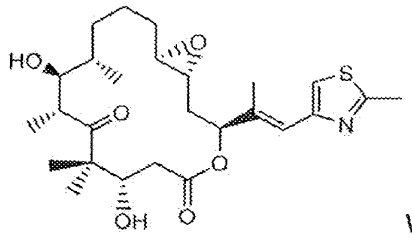




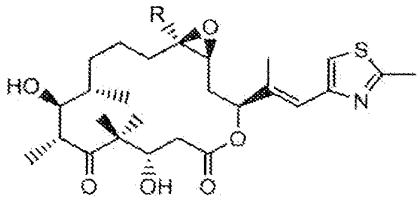
V

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 5 (cont'd)

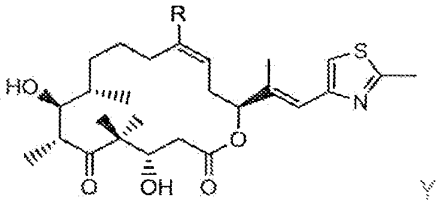


W



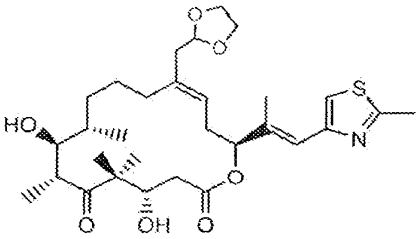
R = CH_2F, CH_2Cl, C_2H_5, n-C_3H_7

X

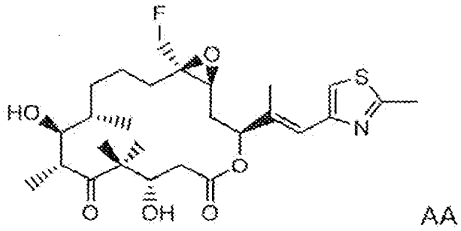


R = CH_2F, CH_2Cl, C_2H_5, n-C_3H_7

Y



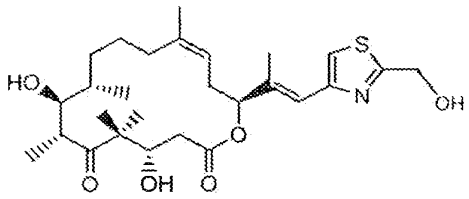
Z



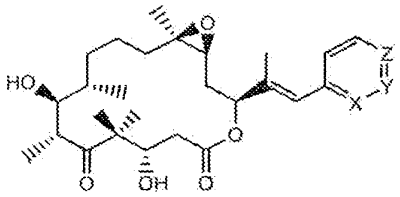
AA

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 5 (cont'd)

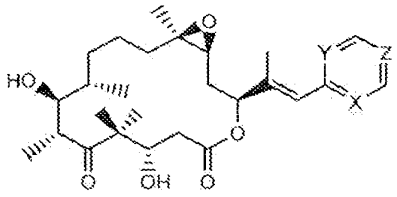


BB



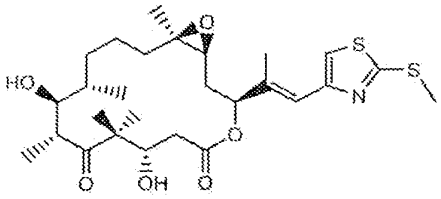
X,Y,Z = N, CH, CH;
X,Y,Z = CH, N, CH;
X,Y,Z = CH, CH, N;

CC

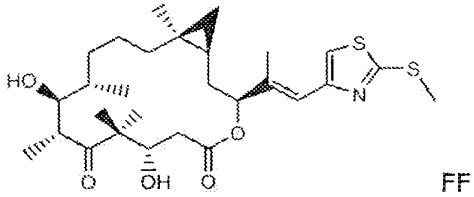


X,Y,Z = N, N, CH;
X,Y,Z = N, CH, N;
X,Y,Z = CH, CH, CH;

DD



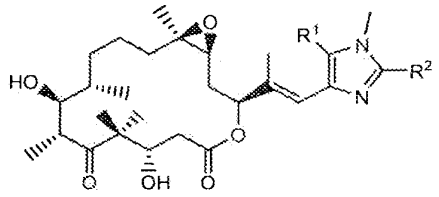
EE



FF

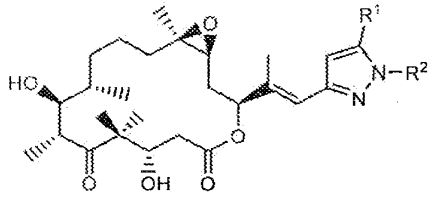
CA 02927832 2016-04-19

FIG. 5 (cont'd)



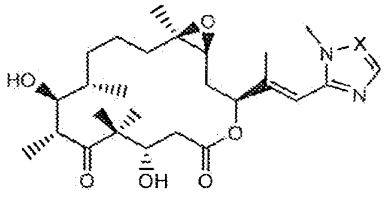
$R^1 = R^2 = H$:
$R^1 = R^2 = SMe$:

GG



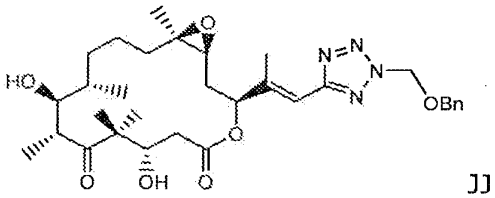
$R^1 = H, R^2 = Me$:
$R^1 = H, R^2 = Ph$:
$R^1 = SMe, R^2 = Me$:

HH

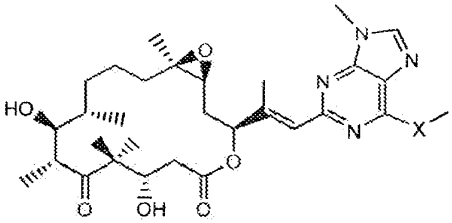


X = CH:
X = N:

II

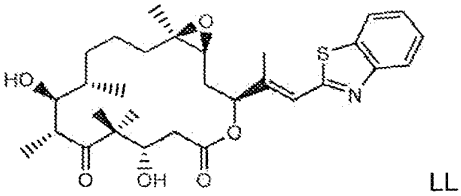


JJ



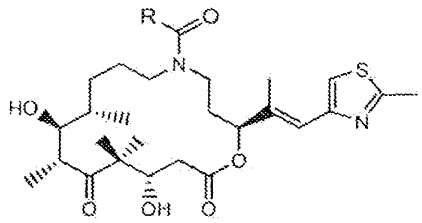
X = S:
X = O:

KK



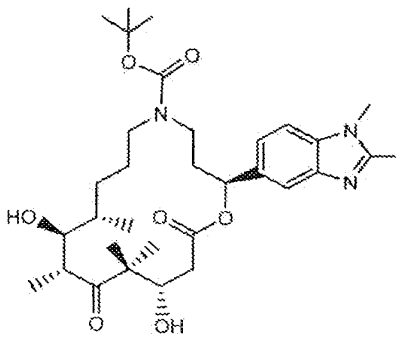
LL

FIG. 5 (cont'd)

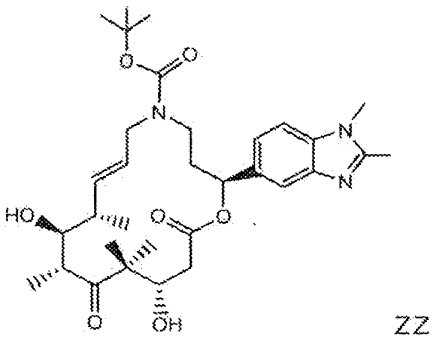


R = O-tert.-C_4H_9;
R = OCH_2Ph;
R = OC_2H_5;
R = O-iso-C_3H_7;
R = CH_3;
R = C_2H_5;
R = tert.-C_4H_9;
R = C_6H_5;

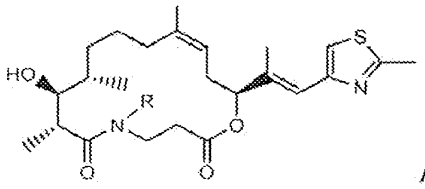
XX



YY



ZZ



AAA

FIG. 6

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
1.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
2.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	ixabepilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
3.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	ixabepilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
4.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	t-butyldimethylsilyl (TBDMS) or 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (TROC)	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
5.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
6.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
7.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
8.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
9.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	epothilone B	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
10.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	epothilone B	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
11.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
12.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
13.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
14.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
15.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
16.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	dehydelone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
17.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	dehydelone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
18.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
19.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
20.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
21.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
22.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
23.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH,	epothilone D	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
24.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	epothilone D	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
25.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
26.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
27.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
28.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
29.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
30.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH,	sagopilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
31.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	sagopilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
32.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
33.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
34.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
35.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
36.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process H	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
37.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH	BMS-310705	None	Process I	3-epothilone linked to CDP
38.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	BMS-310705	None	Process J	7-epothilone linked to CDP
39.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process K	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
40.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process L	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
41.	-	-NH(CH$_2$)$_5$CO-	7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process M	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
42.	-	$-NH(CH_2)_5CO-$	3-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process N	3-epothilone linked to CDP
43.	-	$-NH(CH_2)_5CO-$	-NH2	BMS-310705	None	Process O	Amino linked epothilone to CDP
44.	-	$-NH(CH_2)_3OCH_2CO-$	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
45.	-	$-NH(CH_2)_3OCH_2CO-$	3-OH	ixabepilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
46.	-	$-NH(CH_2)_3OCH_2CO-$	7-OH	ixabepilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
47.	-	$-NH(CH_2)_3OCH_2CO-$	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
48.	-	$-NH(CH_2)_3OCH_2CO-$	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
49.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
50.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
51.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
52.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	epothilone B	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
53.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	epothilone B	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
54.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
55.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
56.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
57.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
58.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
59.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	dehydelone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
60.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	dehydelone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
61.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
62.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
63.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
64.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
65.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
66.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	epothilone D	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
67.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	epothilone D	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
68.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
69.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
70.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
71.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
72.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
73.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	sagopilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
74.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	sagopilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
75.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
76.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
77.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
78.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
79.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process H	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
80.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH	BMS-310705	None	Process I	3-epothilone linked to CDP
81.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	7-OH	BMS-310705	None	Process J	7-epothilone linked to CDP
82.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process K	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
83.	-	-NH(CH$_2$)$_3$OCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process L	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
84.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process M	7-epothilone linked to CDP
85.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	3-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process N	3-epothilone linked to CDP
86.	-	-NH$(CH_2)_3OCH_2CO$-	-NH2	BMS-310705	None	Process O	Amino linked epothilone to CDP
87.	-	-NH$CH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
88.	-	-NH$CH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH,	ixabepilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
89.	-	-NH$CH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	ixabepilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
90.	-	-NH$CH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
91.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
92.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
93.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
94.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
95.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH,	epothilone B	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
96.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	7-OH	epothilone B	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
97.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
98.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
99.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
100.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
101.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
102.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH,	dehydelone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
103.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	dehydelone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
104.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
105.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
106.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
107.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
108.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
109.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH,	epothilone D	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
110.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	epothilone D	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
111.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
112.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
113.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
114.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
115.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
116.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH,	sagopilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
117.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	7-OH	sagopilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
118.	-	-NHCH$_2$CH$_2$COOCH$_2$CO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
119.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
120.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
121.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
122.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process H	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
123.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH,	BMS-310705	None	Process I	3-epothilone linked to CDP
124.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	BMS-310705	None	Process J	7-epothilone linked to CDP
125.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process K	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
126.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process L	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
127.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process M	7-epothilone linked to CDP
128.	-	-$NHCH_2CH_2COOCH_2CO$-	3-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process N	3-epothilone linked to CDP
129.	-	-$NH(CH_2)_3OCH_2CO$-	-NH2	BMS-310705	None	Process O	Amino linked epothilone to CDP
130.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
131.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH	ixabepilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
132.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	7-OH	ixabepilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
133.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
134.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
135.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
136.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH	ixabepilone	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
137.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
138.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH	epothilone B	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
139.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	7-OH	epothilone B	None	Process C	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
140.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
141.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
142.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	epothilone B	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
143.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	epothilone B	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
144.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
145.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	dehydelone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
146.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	dehydelone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
147.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
148.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
149.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	dehydelone	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
150.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	dehydelone	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
151.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
152.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	epothilone D	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
153.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	epothilone D	None	Process C	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
154.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
155.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
156.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	epothilone D	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
157.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	epothilone D	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
158.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
159.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	sagopilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
160.	-	- NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	sagopilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
161.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
162.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
163.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	sagopilone	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
164.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	sagopilone	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
165.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process H	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
166.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	3-OH	BMS-310705	None	Process I	3-epothilone linked to CDP
167.	-	-NHCH$_2$CH$_2$SSCH$_2$CH$_2$QCO- Q is O or NH	7-OH	BMS-310705	None	Process J	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
168.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process K	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
169.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process L	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
170.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process M	7-epothilone linked to CDP
171.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	3-OH	BMS-310705	TBDMS	Process N	3-epothilone linked to CDP
172.	-	-$NHCH_2CH_2SSCH_2CH_2QCO$- Q is O or NH	-NH2	BMS-310705	None	Process O	Amino linked epothilone to CDP
173.	- $NH(CH_2)_2S$-	-$S(CH_2)_2NHCO$-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
174.	- $NH(CH_2)_2S$-	-$S(CH_2)_2NHCO$-	3-OH	ixabepilone	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
175.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	ixabepilone	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
176.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
177.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
178.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
179.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP
180.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
181.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone B	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
182.	~ NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone B	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
183.	~ NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
184.	~ NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
185.	~ NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
186.	~ NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP
187.	~ NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
188.	~ NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	dehydelone	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
189.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	dehydelone	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
190.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
191.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
192.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
193.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP
194.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
195.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone D	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
196.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone D	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
197.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
198.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
199.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
200.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP
201.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
202.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	sagopilone	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
203.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	sagopilone	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
204.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
205.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
206.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
207.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP
208.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process CC	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
209.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	BMS-310705	None	Process DD	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
210.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	BMS-310705	None	Process EE	7-epothilone linked to CDP
211.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process FF	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
212.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process GG	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
213.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process HH	7-epothilone linked to CDP
214.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process II	3-epothilone linked to CDP
215.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$NHCO-	-NH2	BMS-310705	None	Process X	Amino linked epothilone to CDP
216.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
217.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	ixabepilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
218.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	ixabepilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
219.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
220.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
221.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
222.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	ixabepilone	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
223.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
224.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone B	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
225.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone B	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
226.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
227.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
228.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone B	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
229.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone B	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
230.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
231.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	dehydelone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
232.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	dehydelone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
233.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
234.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
235.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	dehydelone	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
236.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	dehydelone	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
237.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
238.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone D	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
239.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone D	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
240.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
241.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
242.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	epothilone D	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
243.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	epothilone D	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
244.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
245.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	sagopilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
246.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	sagopilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
247.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
248.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
249.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	7-OH	sagopilone	TBDMS	Process F	7-epothilone linked to CDP
250.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH	sagopilone	TBDMS	Process G	3-epothilone linked to CDP
251.	-	-NH(CH$_2$)$_2$SS(CH$_2$)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process H	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
252.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	BMS-310705	None	Process I	3-epothilone linked to CDP
253.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	BMS-310705	None	Process J	7-epothilone linked to CDP
254.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process K	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
255.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process L	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
256.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process M	7-epothilone linked to CDP
257.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	3-OH	BMS-310705	TBDMS	Process N	3-epothilone linked to CDP
258.	-	-NH(CH_2)$_2$SS(CH_2)$_2$NHCO-	-NH_2	BMS-310705	None	Process O	Amino linked epothilone to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
259.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
260.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	ixabepilone	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP
261.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	ixabepilone	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
262.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
263.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
264.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
265.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
266.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
267.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	epothilone B	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP
268.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	epothilone B	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
269.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
270.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
271.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
272.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
273.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
274.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	dehydelone	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP
275.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	dehydelone	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
276.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
277.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
278.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
279.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
280.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
281.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	epothilone D	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP
282.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	epothilone D	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
283.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
284.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
285.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
286.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
287.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process P	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
288.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	sagopilone	None	Process Q	3-epothilone linked to CDP
289.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	sagopilone	None	Process R	7-epothilone linked to CDP
290.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process S	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
291.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS	Process T	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
292.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process U	7-epothilone linked to CDP
293.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process V	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
294.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process CC	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
295.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	BMS-310705	None	Process DD	3-epothilone linked to CDP
296.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	BMS-310705	None	Process EE	7-epothilone linked to CDP
297.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process FF	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
298.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS	Process GG	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
299.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process HH	7-epothilone linked to CDP
300.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	3-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process II	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
301.	-NH(CH$_2$)$_2$S-	-S(CH$_2$)$_2$OCO-	-NH$_2$	BMS-310705	None	Process X	Amino linked epothilone to CDP
302.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
303.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	ixabepilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
304.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	ixabepilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
305.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
306.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
307.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
308.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
309.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
310.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	epothilone B	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
311.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	epothilone B	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
312.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
313.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
314.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
315.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process G	3- epothilone linked to CDP
316.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	dehydelone	None	Process A	Mixture of 3, 7- epothilone linked to CDP
317.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	dehydelone	None	Process B	3- epothilone linked to CDP
318.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	dehydelone	None	Process C	7- epothilone linked to CDP
319.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7- epothilone linked to CDP
320.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7- epothilone linked to CDP
321.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process F	7- epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
322.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
323.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
324.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	epothilone D	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
325.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	epothilone D	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
326.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
327.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
328.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
329.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
330.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
331.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	sagopilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
332.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	sagopilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
333.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
334.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
335.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
336.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
337.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process H	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
338.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	BMS-310705	None	Process I	3-epothilone linked to CDP
339.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	BMS-310705	None	Process J	7-epothilone linked to CDP
340.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process K	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
341.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process L	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
342.	-	-NH(CH$_2$)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process M	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
343.	-	-NH(CH_2)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	3-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process N	3-epothilone linked to CDP
344.	-	-NH(CH_2)$_n$CO- n is 1, 2, or 3	-NH_2	BMS-310705	None	Process O	Amino linked epothilone to CDP
345.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	ixabepilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
346.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	ixabepilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
347.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	ixabepilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
348.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
349.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
350.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
351.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	ixabepilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
352.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	epothilone B	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
353.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	epothilone B	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
354.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	epothilone B	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
355.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
356.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
357.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
358.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	epothilone B	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
359.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	debydelone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
360.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	dehydelone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
361.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	dehydelone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
362.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
363.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
364.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
365.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	dehydelone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
366.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	epothilone D	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
367.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	epothilone D	None	Process B	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
368.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	epothilone D	None	Process C	7-epothilone linked to CDP
369.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
370.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
371.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
372.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	epothilone D	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP
373.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	sagopilone	None	Process A	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
374.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	sagopilone	None	Process B	3-epothilone linked to CDP
375.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	sagopilone	None	Process C	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
376.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process D	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
377.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process E	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
378.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process F	7-epothilone linked to CDP
379.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	sagopilone	TBDMS or TROC	Process G	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
380.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	BMS-310705	None	Process H	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
381.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	BMS-310705	None	Process I	3-epothilone linked to CDP
382.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	BMS-310705	None	Process J	7-epothilone linked to CDP
383.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process K	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
384.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH, 7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process L	Mixture of 3, 7-epothilone linked to CDP
385.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	7-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process M	7-epothilone linked to CDP
386.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	3-OH	BMS-310705	TBDMS or TROC	Process N	3-epothilone linked to CDP
387.	-	-NHZCO- Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	$-NH_2$	BMS-310705	None	Process O	Amino linked epothilone to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
388.	-	-	$-NH_2$	BMS-310705	None	Process W	Epothilone linked directly to CDP via an amide bond
389.	-	-Linker-	7-OH where 3-O-hexanoyl remains functionalized	ixabepilone	3-O-hexanoyl	Process Y	7-epothilone linked to CDP
390.	-	-Linker-	7-OH where 3-O-hexanoyl remains functionalized	epothilone B	3-O-hexanoyl	Process Y	7-epothilone linked to CDP
391.	-	-Linker-	7-OH where 3-O-hexanoyl remains functionalized	dehydelone	3-O-hexanoyl	Process Y	7-epothilone linked to CDP
392.	-	-Linker-	7-OH where 3-O-hexanoyl remains functionalized	epothilone D	3-O-hexanoyl	Process Y	7-epothilone linked to CDP
393.	-	-Linker-	7-OH where 3-O-hexanoyl remains functionalized	sagopilone	3-O-hexanoyl	Process Y	7-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
394.	-	-Linker-	7-OH where 3-O-hexanoyl remains functionalized	BMS-310705	3-O-hexanoyl	Process AA	7-epothilone linked to CDP
395.	-	-Linker-	3-OH where 7-O-hexanoyl remains functionalized	ixabepilone	7-O-hexanoyl	Process Z	3-epothilone linked to CDP
396.	-	-Linker-	3-OH where 7-O-hexanoyl remains functionalized	epothilone B	7-O-hexanoyl	Process Z	3-epothilone linked to CDP
397.	-	-Linker-	3-OH where 7-O-hexanoyl remains functionalized	dehydelone	7-O-hexanoyl	Process Z	3-epothilone linked to CDP
398.	-	-Linker-	3-OH where 7-O-hexanoyl remains functionalized	epothilone D	7-O-hexanoyl	Process Z	3-epothilone linked to CDP
399.	-	-Linker-	3-OH where 7-O-hexanoyl remains functionalized	sagopilone	7-O-hexanoyl	Process Z	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 6 (cont'd)

Example	A	B	X	Epothilone	Hydroxy Protecting Groups	Process for Prep. of epothilone linker CDP molecules	Final Product
400.	-	-Linker-	3-OH where 7-O-hexanoyl remains functionalized	BMS-310705	7-O-hexanoyl	Process BB	3-epothilone linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 7

Example	L	Boronic Acid	Process for Preparation of boronic acid linker CDP molecules	Final Product
1.	-NH(CH$_2$)$_6$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
2.	-NH(CH$_2$)$_4$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
3.	-NH(CH$_2$)$_6$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
4.	-NH(CH$_2$)$_6$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
5.	-NH(CH$_2$)$_6$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
6.	-NH(CH$_2$)$_6$N((CH$_2$)$_2$OZ')(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
7.	-NH(CH$_2$)$_6$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
8.	-NH(CH$_2$)$_4$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
9.	-NH(CH$_2$)$_6$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
10.	-NH(CH$_2$)$_6$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
11.	-NH(CH$_2$)$_6$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
12.	-NH(CH$_2$)$_6$N((CH$_2$)$_2$OZ')(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
13.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 7 (cont'd)

Example	L	Boronic Acid	Process for Preparation of boronic acid linker CDP molecules	Final Product
14.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
15.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
16.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
17.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
18.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$N((CH$_2$)$_2$OZ')(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
19.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
20.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
21.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
22.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
23.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
24.	-NHCH$_2$CH$_2$OCH$_2$CH$_2$N((CH$_2$)$_2$OZ')(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
25.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
26.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP

FIG. 7 (cont'd)

Example	L	Boronic Acid	Process for Preparation of boronic acid linker CDP molecules	Final Product
27.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
28.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
29.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
30.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$N((CH$_2$)$_2$OZ')(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
31.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
32.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
33.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
34.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
35.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
36.	-NHCH$_2$COOCH$_2$CH$_2$N((CH$_2$)$_2$OZ')(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z'	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
37.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

FIG. 7 (cont'd)

Example	L	Boronic Acid	Process for Preparation of boronic acid linker CDP molecules	Final Product
38.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
39.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
40.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
41.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
42.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$N((CH$_2$)$_2$OZ')(CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process A	bortezomib linked to CDP
43.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')C(CH$_3$)$_2$OZ' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP

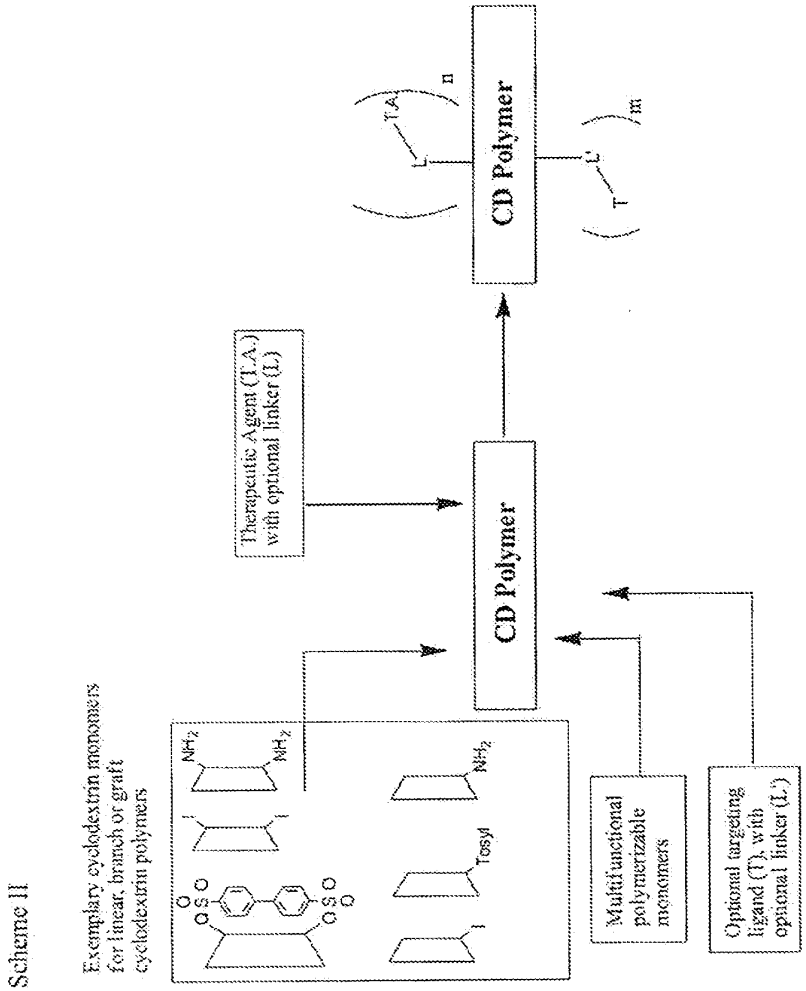
CA 02927832 2016-04-19

FIG. 7 (cont'd)

Example	L	Boronic Acid	Process for Preparation of boronic acid linker CDP molecules	Final Product
44.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$CH(CH$_2$OZ')CH$_2$OZ' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
45.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$C(CH$_3$)(OZ')CH$_2$NH(CH$_3$)Z' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
46.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CH$_2$OZ')CH$_2$CH$_2$OZ' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
47.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$N(CH$_2$CO$_2$Z')CH$_2$CO$_2$Z' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP
48.	-NHZCONHCH$_2$CH$_2$N((CH$_2$)$_2$OZ')((CH$_2$)$_2$N(CH$_3$)Z' Z is a mono, di, or tripeptide or other peptide or derivative thereof where NH and CO represent the amino and acid terminus of the amino acid or peptide	bortezomib	Process B	bortezomib linked to CDP

CA 02927832 2016-04-19

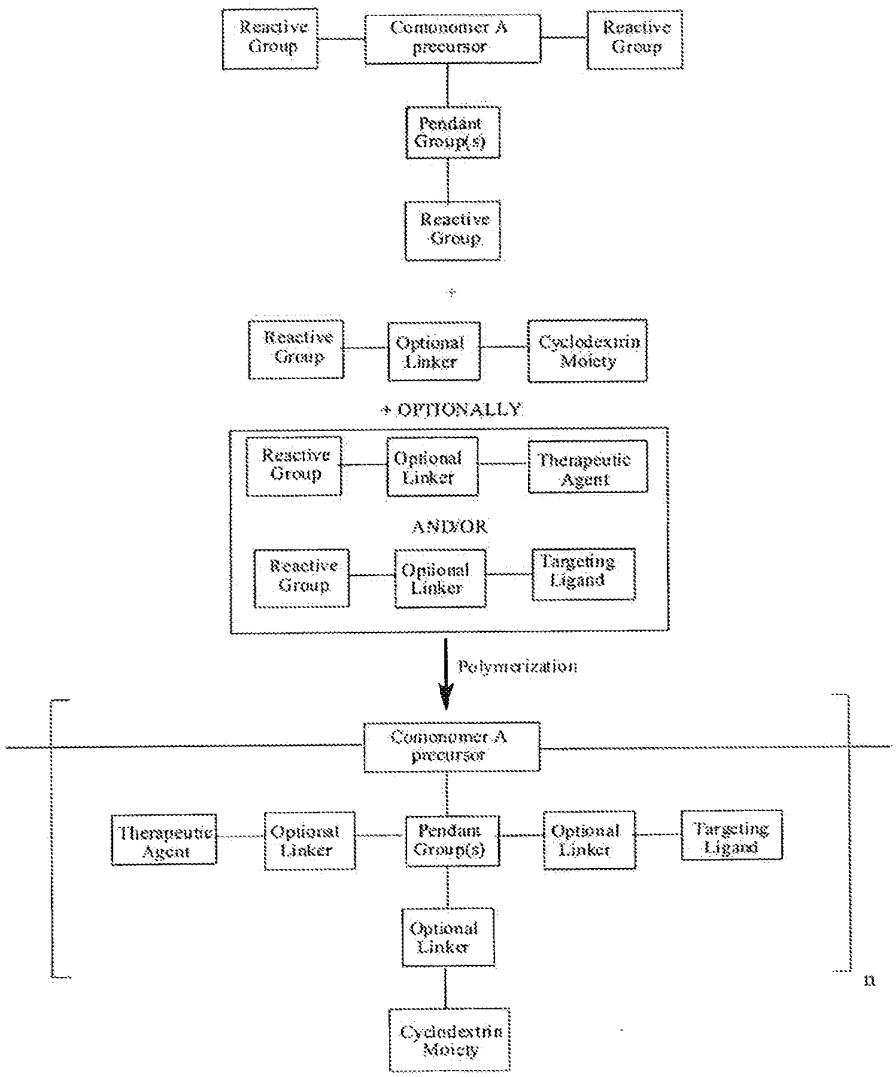
FIG. 8



CA 02927832 2016-04-19

FIG. 9

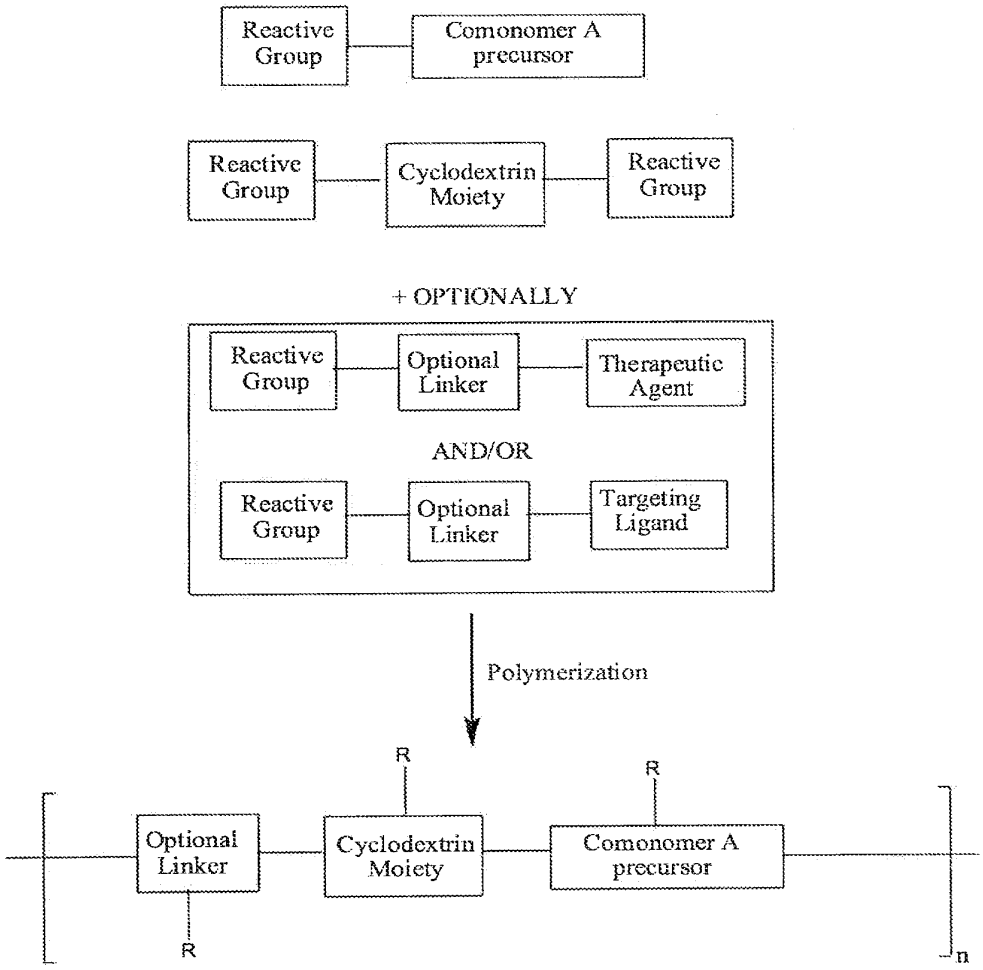
Scheme IIa: General scheme for graft cyclodextrin-containing polymers.



CA 02927832 2016-04-19

FIG. 10

Scheme IIb: General scheme of preparing linear CDPs.



Wherein R is a therapeutic agent and/or targeting ligand, either of which may be absent or present.

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/32 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580031905.4

[43] 公开日 2007 年 8 月 22 日

[11] 公开号 CN 101023100A

[22] 申请日 2005.7.15
[21] 申请号 200580031905.4
[30] 优先权
[32] 2004.7.22 [33] US [31] 60/590,202
[86] 国际申请 PCT/US2005/025084 2005.7.15
[87] 国际公布 WO2006/033700 英 2006.3.30
[85] 进入国家阶段日期 2007.3.22
[71] 申请人 健泰科生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 高涌祥 马丁·范德莱安
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 70 页 附图 23 页

[54] 发明名称

HER2 抗体组合物

[57] 摘要

本发明公开了包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其包含氨基末端前导延伸的氨基酸序列变体的组合物。还公开了包含所述组合物的药用配制剂以及所述组合物的治疗用途。

OnCusp
Ex. 1002

1. 包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其包含氨基末端前导延伸的氨基酸序列变体的组合物。

2. 权利要求 1 的组合物，其中所述氨基末端前导延伸位于所述抗体变体的轻链上。

3. 权利要求 2 的组合物，其中所述氨基末端前导延伸位于所述抗体变体的一条或两条轻链上。

4. 前述权利要求任一项的组合物，其中所述主要种类 HER2 抗体和抗体变体都是完整抗体。

5. 前述权利要求任一项的组合物，其中所述主要种类 HER2 抗体包含分别在 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区氨基酸序列。

6. 权利要求 5 的组合物，其中所述主要种类 HER2 抗体包含分别在 SEQ ID No. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列。

7. 前述权利要求任一项的组合物，其中所述组合物中约 20%或更少的抗体分子包含氨基末端前导延伸。

8. 权利要求 7 的组合物，其中所述组合物中约 1%至约 15%的抗体分子包含氨基末端前导延伸。

9. 权利要求 8 的组合物，其中根据阳离子交换分析的量化，所述组合物中约 5%至约 15%的抗体分子包含氨基末端前导延伸。

10. 前述权利要求任一项的方法，其中所述氨基末端前导延伸包含 VHS-。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述氨基末端前导延伸由 VHS-组成。

12. 前述权利要求任一项的组合物，它还包含主要种类 HER2 抗体的第二氨基酸序列变体。

13. 权利要求 12 的组合物，其中所述第二抗体变体选自在其一条或所有两条重链上包含 C-末端赖氨酸残基的抗体、脱酰胺抗体变体、和具有一个或多个氧化后甲硫氨酸残基的抗体。

14. 前述权利要求任一项的组合物，它还包含所述主要种类抗体的糖基化变体。

15. 权利要求 14 的组合物，其中所述糖基化变体选自包含附着于其 Fc

区的 G1 或 G2 寡糖结构的抗体，包含附着于其轻链的碳水化合物模块的抗体、包含未糖基化重链的抗体、和有唾液酸化寡糖结构附着于其 Fc 区的抗体。

16. 前述权利要求任一项的组合物，其中所述主要种类抗体结合 HER2 结构域 I、II 和 III 之间的连接处。

17. 在药学可接受载体中包含权利要求 1 的组合物的药用配制剂。

18. 权利要求 17 的药用配制剂，它是无菌的。

19. 包含主要种类 HER2 抗体及其氨基酸序列变体的组合物，所述主要种类 HER2 抗体包含分别在 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区序列，所述氨基酸序列变体包含附着于其一个或两个轻链可变区的 VHS-氨基末端前导延伸，其中所述组合物中约 1%至约 20%的抗体分子包含 VHS-氨基末端前导延伸。

20. 包含 SEQ ID No. 23 中的氨基酸序列的多肽或其脱酰胺和/或氧化变体。

21. 包含轻链和重链的抗体，(a) 所述轻链包含权利要求 20 的多肽，且 (b) 所述重链包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID No. 16、SEQ ID No. 24、和 SEQ ID No. 16 或 SEQ ID No. 24 的脱酰胺和/或氧化变体。

22. 在药学可接受载体中包含权利要求 21 的抗体的药用配制剂。

23. 在患者中治疗表达 HER2 的癌症的方法，包括以有效治疗癌症的量对患者施用权利要求 17 的药用配制剂。

HER2 抗体组合物

发明领域

本发明关注包含结合HER2结构域II的主要种类HER2抗体及其包含氨基末端前导延伸的氨基酸序列变体的组合物。本发明还涉及包含所述组合物的药用配制剂以及所述组合物的治疗用途。

发明背景

HER2 抗体

受体酪氨酸激酶的 HER 家族是细胞生长、分化和存活的重要介质。该受体家族包括四个独特的成员：表皮生长因子受体（EGFR、ErbB1 或 HER1）、HER2（ErbB2 或 $p185^{neu}$）、HER3（ErbB3）和 HER4（ErbB4 或 tyro2）。

由 *erb*B1 基因编码的 EGFR 已被认为是人类恶性肿瘤的病因。具体而言，在乳癌、膀胱癌、肺癌、头癌、颈癌和胃癌以及成胶质细胞瘤中已经观察到 EGFR 表达的升高。EGFR 受体表达的升高常常与 EGFR 配体，转化生长因子 α (TGF-α)的产量增加有关，这样的肿瘤细胞通过自分泌刺激途径导致受体活化。Baselga and Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64: 127-154 (1994)。针对 EGFR 或其配体 TGF-α 或 EGF 的单克隆抗体已经作为治疗此类恶性肿瘤的治疗剂进行了评估。参见例如 Baselga and Mendelsohn, 见上文; Masui *et al.*, *Cancer Research* 44: 1002-1007 (1984); 及 Wu *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95: 1897-1905 (1995)。

HER 家族的第二个成员 $p185^{neu}$ 最初被鉴定成转化基因的产物，来自经化学处理的大鼠的成神经细胞瘤。*neu* 原癌基因的活化形式产生自所编码蛋白质跨膜区中的点突变（缬氨酸变成谷氨酸）。在乳癌和卵巢癌中观察到 *neu* 的人同系物的扩增，而且这与预后不良有关（Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 (1987); Slamon *et al.*, *Science* 244: 707-712 (1989); 及美国专利 4,968,603）。迄今为止，对于人类肿瘤尚无 *neu* 原癌基因中与之类似的点突变的报道。在其它癌瘤中也已观察到 HER2 的过表达（频繁但不均一，原因在于基因扩增），包括胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰

和膀胱的癌瘤。参见 King *et al.*, *Science* 229: 974 (1985); Yokota *et al.*, *Lancet* 1: 765-767 (1986); Fukushige *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 6: 955-958 (1986); Guerin *et al.*, *Oncogene Res.* 3: 21-31 (1988); Cohen *et al.*, *Oncogene* 4: 81-88 (1989); Yonemura *et al.*, *Cancer Res.* 51: 1034 (1991); Borst *et al.*, *Gynecol. Oncol.* 38: 364 (1990); Weinere *et al.*, *Cancer Res.* 50: 421-425 (1990); Kern *et al.*, *Cancer Res.* 50: 5184 (1990); Park *et al.*, *Cancer Res.* 49: 6605 (1989); Zhau *et al.*, *Mol. Carcinog.* 3: 254-257 (1990); Aasland *et al.*, *Br. J. Cancer* 57: 358-363 (1988); Williams *et al.*, *Pathobiology* 59: 46-52 (1991); 及 McCann *et al.*, *Cancer* 65: 88-92 (1990)等。HER2 可在前列腺癌中过表达（Gu *et al.*, *Cancer Lett.* 99: 185-9 (1996); Ross *et al.*, *Hum. Pathol.* 28: 827-33 (1997); Ross *et al.*, *Cancer* 79: 2162-70 (1997); 及 Sadasivan *et al.*, *J. Urol.* 150: 126-31 (1993)）。

已经描述了针对大鼠 $p185^{neu}$ 和人 HER2 蛋白质产物的抗体。Drebin 及其同事制备了针对大鼠 *neu* 基因产物，$p185^{neu}$ 的抗体。参见例如 Drebin *et al.*, *Cell* 41: 695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198: 277-290 (1991); 及 WO94/22478。Drebin *et al.*, *Oncogene* 2: 273-277 (1988)报道了与 $p185^{neu}$ 的两个独特区域有反应性的抗体混合物对植入裸鼠的 *neu* 转化 NIH-3T3 细胞产生协同的抗肿瘤作用。还可参见 1998 年 10 月 20 日发布的美国专利 5,824,311。

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989)描述了一组 HER2 抗体的生成，并利用人乳房肿瘤细胞系 SK-BR-3 鉴定。通过 72 小时后单层细胞的结晶紫染色测定了暴露于抗体后 SK-BR-3 细胞的相对细胞增殖。利用此测定法，用称作 4D5 的抗体获得了最大抑制，它抑制细胞增殖达 56%。该组其它抗体在此测定法中以较低程度降低细胞增殖。还发现抗体 4D5 使过表达 HER2 的乳房肿瘤细胞系对 TNF-α 的细胞毒性作用变得敏感。还可参见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5,677,171。Hudziak 等人的文章中讨论的抗体还在以下文献中进行了鉴定：Fendly *et al.*, *Cancer Research* 50: 1550-1558 (1990); Kotts *et al.*, *In Vitro* 26(3): 59A (1990); Sarup *et al.*, *Growth Regulation* 1: 72-82 (1991); Shepard *et al.*, *J. Clin. Immunol.* 11(3): 117-127 (1991); Kumar *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11(2): 979-986 (1991); Lewis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 255-263 (1993); Pietras *et al.*, *Oncogene* 9: 1829-1838 (1994); Vitetta *et al.*, *Cancer Research* 54: 5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994); Scott *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:

14300-5 (1991); D'souza *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7202-7206 (1994); Lewis *et al.*, *Cancer Research* 56: 1457-1465 (1996); 及 Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997)。

鼠 HER2 抗体 4D5 的重组人源化型式（huMAb4D5-8、rhuMAb HER2、Trastuzumab 或 HERCEPTIN®; 美国专利 5,821,337）在临床上对患有 HER2 过表达的转移性乳癌并已接受广泛的早期抗癌疗法的患者起作用（Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 (1996)）。Trastuzumab 在 1998 年 9 月 25 日得到了食品和药品管理局的销售许可，可用于治疗所患肿瘤过表达 HER2 蛋白质的转移性乳癌患者。

以下文献中描述了具有各种特性的其它 HER2 抗体：Tagliabue *et al.*, *Int. J. Cancer* 47: 933-937 (1991); McKenzie *et al.*, *Oncogene* 4: 543-548 (1989); Maier *et al.*, *Cancer Res.* 51: 5361-5369 (1991); Bacus *et al.*, *Molecular Carcinogenesis* 3: 350-362 (1990); Stancovski *et al.*, *PNAS (USA)* 88: 8691-8695 (1991); Bacus *et al.*, *Cancer Research* 52: 2580-2589 (1992); Xu *et al.*, *Int. J. Cancer* 53: 401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk *et al.*, *Cancer Research* 52: 2771-2776 (1992); Hancock *et al.*, *Cancer Res.* 51: 4575-4580 (1991); Shawver *et al.*, *Cancer Res.* 54: 1367-1373 (1994); Arteaga *et al.*, *Cancer Res.* 54: 3758-3765 (1994); Harwerth *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 15160-15167 (1992); 美国专利 5,783,186; 及 Klapper *et al.*, *Oncogene* 14: 2099-2109 (1997)。

同源性筛选使得 HER 受体家族的两个其它成员得以鉴定：HER3（美国专利 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus *et al.*, *PNAS (USA)* 86: 9193-9197 (1989)）和 HER4（欧洲专利申请 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1746-1750 (1993); 及 Plowman *et al.*, *Nature* 366: 473-475 (1993)）。这两种受体均在至少有些乳癌细胞系中展示出表达升高。

通常发现 HER 受体在细胞中有多种组合，而且认为它的二聚化增加了对各种 HER 配体的细胞应答的多样性（Earp *et al.*, *Breast Cancer Research and Treatment* 35: 115-132 (1995)）。EGFR 受到 6 种不同配体的结合：表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF-α)、双调蛋白、肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)、betacellulin 和 epiregulin（Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11: 235-257 (1994)）。由单一基因的可变剪接产生的一个调蛋白蛋白质家族是 HER3 和 HER4 的配体。调蛋白家族包括 α、β 和 γ 调蛋白（Holmes *et al.*,

Science 256: 1205-1210 (1992); 美国专利 5,641,869; 及 Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997)); neu 分化因子(NDF); 神经胶质生长因子(GGF); 乙酰胆碱受体诱导活性(ARIA); 及感觉和运动神经元衍生因子(SMDF)。有关综述参见 Groenen *et al.*, *Growth Factors* 11: 235-257 (1994); Lemke, G., *Molec. & Cell. Neurosci.* 7: 247-262 (1996); 及 Lee *et al.*, *Pharm. Rev.* 47: 51-85 (1995)。最近还鉴定了另外三种 HER 配体: 神经调节蛋白-2 (NRG-2), 据报道它结合 HER3 或 HER4 (Chang *et al.*, *Nature* 387: 509-512 (1997); 及 Carraway *et al.*, *Nature* 387: 512-516 (1997)); 神经调节蛋白-3, 它结合 HER4 (Zhang *et al.*, *PNAS (USA)* 94(18): 9562-7 (1997)); 和神经调节蛋白-4, 它结合 HER4 (Harari *et al.*, *Oncogene* 18: 2681-89 (1999))。HB-EGF、betacellulin 和 epiregulin 也结合 HER4。

尽管 EGF 和 TGFα 不结合 HER2, 但是 EGF 刺激 EGFR 和 HER2 形成异二聚体, 它活化 EGFR 并导致异二聚体中 HER2 的转磷酸作用。二聚化作用和/或转磷酸作用看来活化 HER2 酪氨酸激酶。参见 Earp *et al.*, 见上文。同样, 当 HER3 与 HER2 共表达时, 形成有活性的信号复合物, 而针对 HER2 的抗体能破坏此复合物 (Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994))。此外, 在与 HER2 共表达时, HER3 对调蛋白(HRG)的亲和力提高到了较高的亲和力状态。关于 HER2-HER3 蛋白质复合物还可参见 Levi *et al.*, *Journal of Neuroscience* 15: 1329-1340 (1995); Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995); 及 Lewis *et al.*, *Cancer Res.* 56: 1457-1465 (1996)。HER4, 与 HER3 类似, 与 HER2 形成有活性的信号复合物 (Carraway and Cantley, *Cell* 78: 5-8 (1994))。

为了靶向 HER 信号途径, 将 rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, OMNITARG™) 开发成抑制 HER2 与其它 HER 受体二聚化的人源化抗体, 从而抑制配体驱动的磷酸化作用和活化作用, 及 RAS 和 AKT 途径的下游激活。在 Pertuzumab 作为治疗实体瘤的单一药剂的 I 期试验中, 用 Pertuzumab 治疗患有晚期卵巢癌的 3 名受试者。一人具有持久的部分响应, 而另一名受试者疾病稳定了 15 周。Agus *et al. Proc Am Soc Clin Oncol* 22: 192, Abstract 771 (2003)。

抗体变体组合物

美国专利 6,339,142 描述了包含抗 HER2 抗体及其一种或多种酸性变体

的混合物的 HER2 抗体组合物，其中所述酸性变体的量少于约 25%。Trastuzumab 是例示性的 HER2 抗体。

Reid 等人在充分表征的生物技术药物会议(Well Characterized Biotech Pharmaceuticals Conference)（2003 年 1 月）上呈现的海报 "Effects of Cell Culture Process Changes on Humanized Antibody Characteristics"描述了一种未命名的人源化 IgG1 抗体组合物，它由于其重链上 VHS 信号肽、N-末端谷氨酰胺和焦谷氨酸的组合而具有 N-末端异质性。

Reed 等人在 IBC 抗体生成会议(IBC Antibody Production Conference)（2002 年 2 月）上呈现的海报 "The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method" 报告了人源化抗 IgE 抗体 E25 的重链上的 VHS 延伸。

Rouse 等人在 WCBP（2004 年 1 月 6-9 日）上呈现的海报 " 'Top Down' Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Biopharmaceutical Development" 描述了一种单克隆抗体组合物，它由于其轻链上的$^{-3}$AHS 或$^{-2}$HS 信号肽残基而具有 N-末端异质性。

Jill Porter 在 IBC 会议（2000 年 9 月）上呈现的海报 "Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals" 讨论了 ZENAPAX™的晚期洗脱形式，它在其重链上具有三个额外的氨基酸残基。

发明概述

本发明关注包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其包含氨基末端前导延伸的氨基酸序列变体的组合物。

另外，本发明提供了包含主要种类 HER2 抗体及其氨基酸序列变体的混合物的组合物，所述主要种类抗体包含分别在 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区序列，而所述氨基酸序列变体包含附着于其一个或两个轻链可变区的 VHS-氨基末端前导延伸，其中组合物中约 1%至约 20%的抗体分子包含 VHS-氨基末端前导延伸。

本发明还关注包含 SEQ ID No. 23 中的氨基酸序列的多肽或其脱酰胺和/或氧化变体，以及包含轻链和重链的抗体，(a) 所述轻链包含该多肽，而(b) 所述重链包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID No. 16、SEQ ID No. 24、和 SEQ ID No. 16 或 SEQ ID No. 24 的脱酰胺和/或氧化变体。

本发明还关注在药学可接受载体中包含所述组合物的药用配制剂，以及在患者中治疗表达HER2的癌症的方法，包括以有效治疗癌症的量对患者施用所述药用配制剂。

附图简述

图1提供了HER2蛋白质结构的示意图，及其胞外域的结构域I-IV的氨基酸序列（分别是SEQ ID No. 19-22）。

图2A和2B描绘了鼠源单克隆抗体2C4的轻链可变区(V_L)（图2A）和重链可变区(V_H)（图2B）（分别是SEQ ID No. 1和2）；人源化2C4型式574的V_L和V_H结构域（分别是SEQ ID No. 3和4），及人V_L和V_H共有框架（hum κ1，轻链κ亚组I；hum III，重链亚组III）（分别是SEQ ID No. 5和6）的氨基酸序列对比。星号标示人源化2C4型式574和鼠源单克隆抗体2C4之间或人源化2C4型式574和人框架之间的差异。互补决定区(CDR)包在括号中。

图3A和3B显示了Pertuzumab轻链（SEQ ID No. 15）和重链（SEQ ID No. 16）的氨基酸序列。CDR以粗体显示。碳水化合物模块(moiety)附着于重链的Asn299。

图4A和4B显示了Pertuzumab轻链（SEQ ID No. 17）和重链的氨基酸序列，各自包含完整的氨基末端信号肽序列（SEQ ID No. 18）。

图5以图描述了2C4在HER2的异二聚体结合位点处的结合，由此阻止与活化的EGFR或HER3的异二聚化。

图6描绘了HER2/HER3与MAPK和Akt途径的偶联。

图7比较了Trastuzumab和Pertuzumab的活性。

图8A和8B显示了还原的Pertuzumab轻链（图8A）和重链（图8B）的重建质谱。

图9A和9B描绘了天然Pertuzumab（图9A）和经CPB消化的Pertuzumab（图9B）的阳离子交换层析分析。

图10显示了Pertuzumab的大小排阻层析分析。

图11A和11B显示了还原的Pertuzumab（图11A）和完整Pertuzumab（图11B）的CE-SDS-LIF分析。

图12A和12B描绘了Pertuzumab的胰蛋白酶消化肽图（图12A）和Pertuzumab的LYS-C消化肽图（图12B）。

图 13 显示了从 Pertuzumab 释放的 N-连接寡糖的 CE 分析。

图 14 显示了常常在 IgG 抗体中观察到的寡糖结构。

图 15 描绘了从 Pertuzumab 释放的中性寡糖的主动模式(positive mode) MALDI-TOF 质谱。

图 16A 和 16B 显示了 Trastuzumab 轻链（SEQ ID No. 13）和重链（SEQ ID No. 14）的氨基酸序列。

图 17A 和 17B 描绘了一种变体 Pertuzumab 轻链序列（SEQ ID No. 23）和一种变体 Pertuzumab 重链序列（SEQ ID No. 24）。

优选实施方案的详述

I. 定义

术语“主要种类抗体”在本文中指组合物中这样的抗体氨基酸序列结构，它是该组合物中在数量上最主要的抗体分子。优选的是，主要种类抗体是 HER2 抗体，诸如结合 HER2 结构域 II 的抗体、比 Trastuzumab 更有效的抑制 HER 二聚化的抗体、和/或结合 HER2 的异二聚体结合位点的抗体。本文中主要种类抗体的优选实施方案是包含 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区氨基酸序列的抗体，且最优选包含 SEQ ID No. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列（Pertuzumab）。

“氨基酸序列变体”抗体在本文中指具有与主要种类抗体不同的氨基酸序列的抗体。通常，氨基酸序列变体将与主要种类抗体具有至少约 70%的同源性，而且优选的是，它们将是与主要种类抗体至少约 80%，且更优选至少约 90%同源。氨基酸序列变体在主要种类抗体氨基酸序列内部或邻近的某些位置具有替代、删除和/或添加。本文中氨基酸序列变体的例子包括酸性变体（如脱酰胺抗体变体）、碱性变体、在其一条或两条轻链上具有氨基末端前导延伸（如 VHS-）的抗体，在其一条或两条重链上具有 C-末端赖氨酸残基的抗体、具有一个或多个氧化后甲硫氨酸残基的抗体等，且包括重链和/或轻链氨基酸序列变异的组合。本文中特别感兴趣的抗体变体是在其一条或两条轻链上包含氨基末端前导延伸的抗体，任选相对于主要种类抗体还包含其它氨基酸序列和/或糖基化差异。

“糖基化变体”抗体在本文中指有一个或多个碳水化合物模块附着于它的抗体，所述碳水化合物与附着于主要种类抗体的一个或多个碳水化合物模

块不同。本文中糖基化变体的例子包括有 G1 或 G2 寡糖结构代替 G0 寡糖结构附着于其 Fc 区的抗体、有一个或多个碳水化合物模块附着于其一条或两条轻链的抗体、没有碳水化合物模块附着于其一条或两条重链的抗体等，以及这些糖基化改变的组合。

若抗体具有 Fc 区，则本文中诸如图 14 所示的寡糖结构可附着于抗体的一条或两条重链，如位于残基 299。对于 Pertuzumab，G0 是最主要的寡糖结构，而在 Pertuzumab 组合物中发现其它寡糖结构，诸如 G0-F、G-1、Man5、Man6、G1-1、G1(1-6)、G1(1-3)和 G2 的量较少。

除非另有说明，“G1 寡糖结构”在本文中包括 G1(1-6)和 G1(1-3)结构。

“氨基末端前导延伸”在本文中指在抗体的任何一条或多条重链或轻链的氨基末端存在的氨基末端前导序列的一个或多个氨基酸残基。例示性的氨基末端前导延伸包含三个氨基酸残基、VHS 或由其组成，它们存在于抗体变体的一条或所有两条轻链上。

“脱酰胺”抗体指其中一个或多个天冬酰胺残基衍生成例如天冬氨酸、琥珀酰亚胺或异天冬氨酸的抗体。

“同源性”定义为在必要时对比序列和引入缺口以获取最大百分比同一性后，氨基酸序列变体中相同残基的百分比。用于对比的方法和计算机程序在本领域是众所周知的。一种这样的计算机程序是“Align 2”，由 Genentech, Inc.创作，已经在 1991 年 12 月 10 日与用户文档(user documentation)一起提交给美国版权局（Washington, DC 20559）。

为了本文的目的，“阳离子交换分析”指根据电荷差异利用阳离子交换剂将包含两种或多种化合物的组合物分开的任何方法。阳离子交换剂通常包含共价结合的，带负电荷的基团。优选的是，本文中的阳离子交换剂是弱阳离子交换剂和/或包含羧酸盐/酯官能团，诸如 Dionex 出售的 PROPAC WCX-10™阳离子交换柱。

“HER 受体”是属于 HER 受体家族的受体蛋白质酪氨酸激酶，包括 EGFR、HER2、HER3 和 HER4 受体及未来将鉴定的此家族其它成员。HER 受体通常将包含胞外结构域，它可结合 HER 配体；亲脂性跨膜结构域；保守的胞内酪氨酸激酶结构域；和含有几个可被磷酸化的酪氨酸残基的羧基末端信号结构域。优选的是，HER 受体是天然序列人 HER 受体。

HER2 的胞外域包含 4 个结构域：结构域 I（大约第 1-195 位氨基酸残基）、

结构域 II（大约第 196-319 位氨基酸残基）、结构域 III（大约第 320-488 位氨基酸残基）和结构域 IV（大约第 489-630 位氨基酸残基）（残基编号不包括信号肽）。参见 Garrett *et al.*, *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003); Cho *et al.*, *Nature* 421: 756-760 (2003); Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004); 或 Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 1746-1750 (1993)。还可参见本文图 1。

术语 "ErbB1"、"HER1"、"表皮生长因子受体" 和 "EGFR" 在本文中可互换使用，指例如 Carpenter *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 56: 881-914 (1987)中公开的 EGFR，包括其天然存在的突变体形式（如 Humphrey *et al.*, *PNAS (USA)* 87: 4207-4211 (1990)中的删除突变体 EGFR）。*erb*B1 指编码 EGFR 蛋白质产物的基因。

表述"ErbB2"和"HER2"在本文中可互换使用，指例如 Semba *et al.*, *PNAS (USA)* 82: 6497-6501 (1985)和 Yamamoto *et al.*, *Nature* 319: 230-234 (1986)中描述的人 HER2 蛋白（Genebank 编号 X03363）。术语"*erb*B2"指编码人 ErbB2 的基因，而 "*neu*" 指编码大鼠 p185^{neu} 的基因。优选的 HER2 是天然序列人 HER2。

"ErbB3" 和 "HER3" 指例如美国专利 5,183,884 和 5,480,968 及 Kraus *et al.*, *PNAS (USA)* 86: 9193-9197 (1989)中公开的受体多肽。

术语"ErbB4"和"HER4"在本文中指例如欧洲专利申请 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1746-1750 (1993); 及 Plowman *et al.*, *Nature* 366: 473-475 (1993)中公开的受体多肽，包括其同种型(isoform)，例如 1999 年 4 月 22 日出版的 WO99/19488 中所公开的。

"HER 配体" 指结合和/或活化 HER 受体的多肽。本文中特别感兴趣的 HER 配体是天然序列人 HER 配体，诸如表皮生长因子(EGF)（Savage *et al.*, *J. Biol. Chem.* 247: 7612-7621 (1972)）；转化生长因子 α (TGF-α)（Marquardt *et al.*, *Science* 223: 1079-1082 (1984)）；双调蛋白，又称为施旺细胞瘤(schwannoma)或角质形成细胞自分泌生长因子（Shoyab *et al.*, *Science* 243: 1074-1076 (1989); Kimura *et al.*, *Nature* 348: 257-260 (1990); 及 Cook *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 11: 2547-2557 (1991)）；betacellulin（Shing *et al.*, *Science* 259: 1604-1607 (1993); 及 Sasada *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1173 (1993)）；肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)（Higashiyama *et al.*, *Science* 251: 936-939

(1991)); epiregulin (Toyoda *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 7495-7500 (1995); 及 Komurasaki *et al.*, *Oncogene* 15: 2841-2848 (1997)); α调蛋白 (见下文); 神经调节蛋白-2 (NRG-2) (Carraway *et al.*, *Nature* 387: 512-516 (1997)); 神经调节蛋白-3 (NRG-3) (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9562-9567 (1997)); 神经调节蛋白-4 (NRG-4) (Harari *et al.*, *Oncogene* 18: 2681-89 (1999)); 或 cripto (CR-1) (Kannan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272(6): 3330-3335 (1997))。结合 EGFR 的 HER 配体包括 EGF、TGF-α、双调蛋白、betacellulin、HB-EGF 和 epiregulin。结合 HER3 的 HER 配体包括调蛋白。能够结合 HER4 的 HER 配体包括 betacellulin、epiregulin、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4 和调蛋白。

"调蛋白" (HRG)在用于本文时指由调蛋白基因编码的多肽，如美国专利 5,641,869 或 Marchionni *et al.*, *Nature* 362: 312-318 (1993)中所公开的。调蛋白的例子包括调蛋白-α、调蛋白-β1、调蛋白-β2 和调蛋白-β3 (Holmes *et al.*, *Science* 256: 1205-1210 (1992); 及美国专利 5,641,869); *neu* 分化因子 (NDF) (Peles *et al.*, *Cell* 69: 205-216 (1992)); 乙酰胆碱受体诱导活性(ARIA) (Falls *et al.*, *Cell* 72: 801-815 (1993)); 神经胶质生长因子(GGF) (Marchionni *et al.*, *Nature* 362: 312-318 (1993)); 感觉和运动神经元衍生因子(SMDF) (Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 14523-14532 (1995)); γ-调蛋白 (Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997))。此术语包括天然序列 HRG 多肽的生物学活性片段和/或氨基酸序列变体，诸如其 EGF 样结构域片段 (如 $HRG\beta1_{177-244}$)。

"HER 二聚体" 在本文中指包含至少两个不同 HER 受体的非共价结合二聚体。当表达两种或多种 HER 受体的细胞暴露于 HER 配体时可能形成此类复合物，可通过免疫沉淀进行分离并通过 SDS-PAGE 进行分析，如例如 Sliwkowski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994)中所述。此类 HER 二聚体的例子包括 EGFR-HER2、HER2-HER3 和 HER3-HER4 异二聚体。此外，HER 二聚体可包含与诸如 HER3、HER4 或 EGFR 等不同 HER 受体组合的两个或多个 HER2 受体。其它蛋白质，诸如细胞因子受体亚基(如 gp130) 可与所述二聚体结合。

HER2 上的 "异二聚体结合位点" 指 HER2 胞外域中在与 EGFR、HER3 或 HER4 形成二聚体时，接触 EGFR、HER3 或 HER4 胞外域中某区域或与 EGFR、HER3 或 HER4 胞外域中某区域形成介面的区域。已发现所述区域

在 HER2 的结构域 II 中。Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)。

"HER 活化"或"HER2 活化"指任一种或多种 HER 受体或 HER2 受体的活化或磷酸化作用。一般而言，HER 活化导致信号转导（例如由 HER 受体胞内激酶结构域引起的，磷酸化 HER 受体或底物多肽中的酪氨酸残基）。HER 活化可由结合包含目的 HER 受体的 HER 二聚体的 HER 配体介导。结合 HER 二聚体的 HER 配体可活化二聚体中一种或多种 HER 受体的激酶结构域，从而导致一种或多种 HER 受体中酪氨酸残基的磷酸化作用和/或其它底物多肽中酪氨酸残基的磷酸化作用，诸如 Akt 或 MAPK 胞内激酶。

术语"抗体"在本文中使用最广的含义，具体覆盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体（如双特异性抗体）、及抗体片段，只要它们展现所需生物学活性。

术语"单克隆抗体"在用于本文时指由一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同和/或结合相同表位，除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的可能变体外，诸如本文描述的那些抗体。与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制品不同，每种单克隆抗体针对抗原上的同一决定簇。除了它们的特异性以外，单克隆抗体的优越性体现在它们未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语"单克隆"指示由基本上同质的抗体群获得的抗体的特征，并不解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如，依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975)描述的杂交瘤方法来制备，或者可通过重组 DNA 方法来制备（参见例如美国专利 4,816,567）。"单克隆抗体"还可使用例如 Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991)和 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991)中描述的技术从噬菌体抗体库分离。

单克隆抗体在本文中具体包括"嵌合"抗体，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现所需生物学活性（美国专利 4,816,567; 及 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984)）。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物（如旧大陆猴类(Old World Monkey)、猿等）的可变区抗原结合序列和人恒定区序列的"灵长类化(primatized)"抗体。

"抗体片段"包含完整抗体的一部分，优选包含其抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、$F(ab')_2$ 和 Fv 片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；及由抗体片段形成的多特异性抗体。

"完整抗体"指包含抗原结合可变区以及轻链恒定区（C_L）和重链恒定区 C_H1、C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定区可以是天然序列恒定区（如人天然序列恒定区）或其氨基酸序列变体。优选的是，完整抗体具有一项或多项效应物功能，且包含附着于其一条或两条重链的寡糖结构。

抗体"效应物功能"指那些可归于抗体 Fc 区（天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区）的生物学活性。抗体效应物功能的例子包括 C1q 结合；补体依赖性细胞毒性；Fc 受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体（如 B 细胞受体；BCR）的下调等。

根据完整抗体的重链恒定区的氨基酸序列，可将其归入不同的"类"(class)。完整抗体有五种主要的类别：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中有些可进一步分为"亚类"(subclass)（同种型），如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将与不同抗体类别对应的重链恒定区分别称作 α、δ、ε、γ 和 μ。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

"抗体依赖性细胞介导的细胞毒性"和"ADCC"指由细胞介导的反应，其中表达 Fc 受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞（如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）识别靶细胞上结合的抗体，随后引起靶细胞溶解。介导 ADCC 的主要细胞，NK 细胞，只表达 FcγRIII，而单核细胞表达 FcγRI、FcγRII 和 FcγRIII。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)中第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性，可进行体外 ADCC 测定法，诸如美国专利 5,500,362 或 5,821,337 中所描述的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外，可在体内评估目的分子的 ADCC 活性，例如在动物模型中，诸如 Clynes *et al.*, *PNAS(USA)* 95: 652-656 (1998)中所公开的。

"人效应细胞"指表达一种或多种 FcR 并行使效应物功能的白细胞。优选的是，该细胞至少表达 FcγRIII 并执行 ADCC 效应物功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞，优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从其天然来源中分离，例如血液或 PBMC，正如本文所述。

术语“Fc 受体”和“FcR”用于描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外，优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合的 FcR（γ 受体），包括 FcγRI、FcγRII 和 FcγRIII 亚类的受体，包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。FcγRII 受体包括 FcγRIIA（“活化受体”）和 FcγRIIB（“抑制受体”），它们具有相似的氨基酸序列，区别主要在于其胞质域。活化受体 FcγRIIA 在其胞质域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 FcγRIIB 在其胞质域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)（参见综述 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)）。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); 及 de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-341 (1995)）。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR，包括未来将会鉴定的 FcR。该术语还包括新生儿受体，FcRn，它负责将母体的 IgG 转移给胎儿（Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976)和 Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)）。

“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体时分子溶解靶物的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分(C1q)结合与关联抗原复合的分子（如抗体）起始的。为了评估补体激活，可进行 CDC 测定法，例如 Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)中所描述的。

“天然抗体”通常是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接，而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链中有所变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变区(V_H)，接着是多个恒定区。每条轻链在一端具有一个可变区(V_L)，而另一端是一个恒定区。轻链的恒定区与重链的第一恒定区排列在一起，而轻链的可变区与重链的可变区排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。

术语“可变的”指可变区中的某些部分在抗体序列中差异广泛且用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而，变异性并非均匀分布于抗体的整个可变区。它集中于轻链和重链可变区中称作高变区的三个区段。可变区中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各自包含四个 FR，它们大多采取 β-折叠构象，通过形成环状连接且在

有些情况中形成β-折叠结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起，并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成（参见Kabat等人，《*Sequences of Proteins of Immunological Interest*》，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991）。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合，但展现多种效应物功能，诸如抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基（例如轻链可变区中的残基24-34（L1）、50-56（L2）和89-97（L3）及重链可变区中的31-35（H1）、50-65（H2）和95-102（H3）；Kabat等人，《*Sequences of Proteins of Immunological Interest*》，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991）和/或那些来自“高变环”的残基（例如轻链可变区中的残基26-32（L1）、50-52（L2）和91-96（L3）及重链可变区中的26-32（H1）、53-55（H2）和96-101（H3）；Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)）。“框架区”或“FR”残基指本文定义的高变区残基以外的可变区残基。

用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，各自具有一个抗原结合位点，和一个残余“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个$F(ab')_2$片段，它具有两个抗原结合位点，并且仍能够交联抗原。

“Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密、非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。正是在这种构造中，各个可变区的三个高变区相互作用而在V_H-V_L二聚体表面确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单个可变区（或只包含对抗原特异的三个高变区的半个Fv）也具有识别和结合抗原的能力，尽管亲和力低于完整结合位点。

Fab片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab'片段因在重链CH1结构域的羧基末端增加了少数残基而与Fab片段有所不同，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定区的半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的Fab'的称谓。$F(ab')_2$抗体片段最初是作为成对Fab'片段生成的，在Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗

体片段的其它化学偶联。

来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”，根据其恒定区的氨基酸序列，可归入两种截然不同类型中的一种，称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域，其中这些结构域存在于一条多肽链上。优选的是，该 Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头，使得 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun，在《*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*》中，第 113 卷，Rosenburg 和 Moore 编，Springer-Verlag，New York，269-315，1994。HER2 抗体 scFv 片段描述于 WO93/16185；美国专利 5,571,894；和美国专利 5,587,458。

术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段，该片段在同一条多肽链（V_H-V_L）中包含相连的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对，迫使结构域与另一条链的互补结构域配对，并产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的描述于例如 EP 404,097；WO 93/11161；和 Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。

非人（如啮齿类）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常，人源化抗体将包含基本上不少于至少一个、通常两个如下可变区，其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有的 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。任选的是，人源化抗体还将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区(Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); 及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)。

人源化 HER2 抗体包括 huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8

或 Trastuzumab（HERCEPTIN®），如美国专利 5,821,337 的表 3 中所述，明确收入本文作为参考；人源化 520C9（WO93/21319）和人源化 2C4 抗体，如本文所述。

为了本文的目的，“Trastuzumab”、“HERCEPTIN®”和“huMAb4D5-8”指包含分别在 SEQ ID No. 13 和 14 中的轻链和重链氨基酸序列的抗体。

在本文中，“Pertuzumab”、“OMNITARG™”和“rhuMAb 2C4”指包含分别在 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区氨基酸序列的抗体。若 Pertuzumab 是完整抗体，则它优选包含分别在 SEQ ID No. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列。

“裸抗体”指未偶联异源分子，诸如细胞毒性模块或放射性标记物的抗体（如本文所定义的）。

“分离的”抗体指已经由其天然环境的一种成分鉴别和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染成分指将会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中，将抗体纯化至(1) 根据 Lowry 法的测定，抗体重量超过 95%，最优选重量超过 99%，(2) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度，或(3) 通过使用考马斯蓝或优选银染的还原或非还原条件下的 SDS-PAGE 达到同质。既然抗体的天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而，分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

“比 Trastuzumab 更有效的抑制 HER 二聚化的”HER2 抗体指比 Trastuzumab 更有效（例如有效性提高至少约 2 倍）的减少或消除 HER 二聚体的抗体。优选的是，这样的抗体至少大约像选自下组的抗体那样有效的抑制 HER 二聚化：鼠单克隆抗体 2C4、鼠单克隆抗体 2C4 的 Fab 片段、完整的 Pertuzumab、和 Pertuzumab 的 Fab 片段。可直接通过研究 HER 二聚体，或者通过评估由 HER 二聚化引起的 HER 活化或下游信号传导，和/或通过评估抗体-HER2 结合位点等来评估对 HER 二聚化的抑制。用于筛选有能力比 Trastuzumab 更有效的抑制 HER 二聚化的抗体的测定法见 Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)和 WO01/00245（Adams *et al.*）。只是作为例示，可通过评估例如下列各项来分析对 HER 二聚化的抑制：对 HER 二聚体形成的抑制（参见例如 Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)的附图 1A-B 和

WO01/00245）；表达 HER 二聚体的细胞中 HER 配体活化的降低（例如 WO01/00245 和 Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)的附图 2A-B）；对 HER 配体结合表达 HER 二聚体的细胞的阻断（例如 WO01/00245 和 Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)的附图 2E）；在存在（或缺乏）HER 配体时对表达 HER 二聚体的癌细胞（如 MCF7、MDA-MD-134、ZR-75-1、MD-MB-175、T-47D 细胞）的细胞生长的抑制（例如 WO01/00245 和 Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)的附图 3A-D）；对下游信号传导的抑制（例如对 HRG 依赖性 AKT 磷酸化的抑制或对 HRG 或 TGFα 依赖性 MAPK 磷酸化的抑制）（参见例如 WO01/00245 和 Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)的附图 2C-D）。还可通过研究抗体-HER2 结合位点来评估抗体是否抑制 HER 二聚化，例如通过评估与 HER2 结合的抗体的结构或模型，诸如晶体结构（参见例如 Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)）。

HER2 抗体可比 Trastuzumab 更有效（例如有效性提高至少 2 倍）的“抑制 HRG 依赖性 AKT 磷酸化”和/或抑制“HRG 或 TGFα 依赖性 MAPK 磷酸化”（参见例如 Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)和 WO01/00245）。

HER2 抗体可以是“不抑制 HER2 胞外域切割”的抗体（Molina *et al.*, *Cancer Res.* 61: 4744-4749 (2001)）。

“结合 HER2 的异二聚体结合位点的”HER2 抗体结合结构域 II 中的残基（且任选还结合 HER2 的胞外域以外的其它结构域，诸如结构域 I 和 III 中的残基），且至少在一定程度上能在空间上阻碍 HER2-EGFR、HER2-HER3 或 HER2-HER4 异二聚体的形成。Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)表征了存放在 RCSB 蛋白质数据库（ID Code IS78）的 HER2-Pertuzumab 晶体结构，举例说明了结合 HER2 的异二聚体结合位点的例示性抗体。

“结合 HER2 结构域 II 的”抗体结合结构域 II 中的残基和任选 HER2 的其它结构域，诸如结构域 I 和 III 中的残基。优选的是，结合结构域 II 的抗体结合 HER2 结构域 I、II 和 III 之间的连接处。

“生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞，尤其是表达 HER 的癌细胞生长的化合物或组合物。因此，生长抑制剂可以是显著降低 S 期的表达 HER 细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进（处于 S 期以外的位置）的药剂，诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花生物碱类（长春新碱和长春碱）、紫杉醇、和

拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博来霉素。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞，例如 DNA 烷化剂诸如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、双氯乙基甲胺、顺铂、甲氨喋呤、5-氟尿嘧啶和 ara-C。其它信息可参见在《*The Molecular Basis of Cancer*》中，Mendelsohn 和 Israel 编，第 1 章，题为 "Cell cycle regulation, oncogenes, and antieioplastic drugs"，Murakaini 等人，WB Saunders，Philadelphia，1995，尤其是第 13 页。

"生长抑制性" 抗体的例子是那些结合 HER2 并抑制过表达 HER2 的癌细胞生长的抗体。优选的生长抑制性 HER2 抗体在约 0.5-30μg/ml 的抗体浓度对细胞培养中 SK-BR-3 乳房肿瘤细胞的生长抑制大于 20%，优选大于 50%（例如从约 50%至约 100%），其中生长抑制是在 SK-BR-3 细胞暴露于抗体后 6 天测定的（参见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5,677,171）。该专利及下文中更详细的描述了 SK-BR-3 细胞生长抑制测定法。优选的生长抑制性抗体是鼠单克隆抗体 4D5 的人源化变体，例如 Trastuzumab。

"诱导凋亡" 的抗体指那些根据膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂和/或膜囊形成（称作凋亡小体）的测定，诱导程序性细胞死亡的抗体。所述细胞通常是过表达 HER2 受体的细胞。优选的是，所述细胞是肿瘤细胞，例如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰或膀胱细胞。在体外，所述细胞可以是 SK-BR-3、BT474、Calu3 细胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。有多种方法可用于评估与凋亡有关的细胞事件。例如，可通过膜联蛋白结合来测量磷脂酰丝氨酸(PS)易位；可通过 DNA 梯化(laddering)来评估 DNA 断裂；而可通过亚二倍体细胞的任何增加来评估伴随着 DNA 断裂的核/染色质浓缩。优选的是，诱导凋亡的抗体是在使用 BT474 细胞的膜联蛋白结合测定法（见下文）中导致对膜联蛋白结合的诱导相对于未处理细胞提高约 2 至 50 倍，优选约 5 至 50 倍，最优选约 10 至 50 倍的抗体。诱导凋亡的 HER2 抗体的例子是 7C2 和 7F3。

"表位 2C4" 指 HER2 胞外域中抗体 2C4 所结合的区域。为了筛选结合 2C4 表位的抗体，可进行常规的交叉阻断测定法，诸如《*Antibodies, A Laboratory Manual*》，Cold Spring Harbor Laboratory，Ed Harlow 和 David Lane，1988 中所描述的。或者，可使用本领域知道的方法进行表位作图以评估抗体是否结合 HER2 的 2C4 表位，和/或可研究抗体-HER2 结构（Franklin

et al., *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)）以了解抗体结合 HER2 的哪个/些结构域。表位 2C4 包含来自 HER2 胞外域中结构域 II 的残基。2C4 和 Pertuzumab 在结构域 I、II 和 III 的连接处结合 HER2 的胞外域。Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)。

“表位 4D5”指 HER2 胞外域中抗体 4D5（ATCC CRL 10463）和 Trastuzumab 所结合的区域。此表位接近 HER2 的跨膜域，且在 HER2 的结构域 IV 之内。为了筛选结合 4D5 表位的抗体，可进行常规的交叉阻断测定法，诸如《*Antibodies, A Laboratory Manual*》，Cold Spring Harbor Laboratory，Ed Harlow 和 David Lane，1988 中所描述的。或者，可进行表位作图以评估抗体是否结合 HER2 的 4D5 表位（例如大约第 529 位残基至大约第 625 位残基区域内的任何一个或多个残基，含；见图 1）。

“表位 7C2/7F3”指 HER2 胞外域的结构域 I 内 N 末端处 7C2 和/或 7F3 抗体（各自保藏于 ATCC，见下文）所结合的区域。为了筛选结合 7C2/7F3 表位的抗体，可进行常规的交叉阻断测定法，诸如《*Antibodies, A Laboratory Manual*》，Cold Spring Harbor Laboratory，Ed Harlow 和 David Lane，1988 中所描述的。或者，可进行表位作图以确定抗体是否结合 HER2 上的 7C2/7F3 表位（例如图 1 中 HER2 的大约第 22 位残基至大约第 53 位残基区域内的任何一个或多个残基）。

“治疗”指治疗性处理和预防性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有疾病的受试者以及要预防疾病的受试者。因此，本文中待治疗的患者可能已经诊断为患有疾病或者可能有患上疾病的倾向性或易感性。

术语“癌症”和“癌的”指的是或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理状况。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤（包括髓母细胞瘤和视网膜母细胞瘤）、肉瘤（包括脂肪肉瘤和滑膜细胞肉瘤）、神经内分泌肿瘤（包括类癌瘤、胃泌素瘤和胰岛细胞癌）、间皮瘤、施旺细胞瘤（包括听神经瘤）、脑膜瘤、腺癌、黑素瘤、和白血病或淋巴样恶性肿瘤。这些癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌（如上皮鳞状细胞癌）、肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞癌、腹膜的癌症、肝细胞癌症、胃癌包括胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、乳癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝的癌、肛门

癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、胆管肿瘤、及头和颈癌。

术语“有效量”指在患者中有效治疗疾病的药物量。若疾病是癌症，则药物的有效量可减少癌细胞的数目；缩小肿瘤的尺寸；抑制（即减缓到一定程度和优选阻止）癌细胞浸润到周围器官中；抑制（即减缓到一定程度和优选阻止）肿瘤转移；在某种程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上减轻一种或多种与癌症有关的症状。在药物可阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上，它可以是抑制细胞的和/或细胞毒性的。有效量可延长无进展存活，导致客观响应（包括部分响应，PR 或完全响应，CR），增加总体存活时间，和/或改善癌症的一种或多种症状。

“表达 HER2 的癌症”是包含在其细胞表面存在 HER2 蛋白质的细胞的癌症。

“过表达”HER 受体的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比，在其细胞表面具有显著更高水平的 HER 受体诸如 HER2 的癌症。这样的过表达可以是由基因扩增或者转录或翻译增加引起的。可在诊断或预后测定法中通过评估细胞表面上存在的 HER 蛋白质水平的增加（例如通过免疫组化测定法，IHC）来确定 HER 受体的过表达。或者/另外，可测量细胞中编码 HER 的核酸的水平，例如通过荧光原位杂交（FISH；参见 1998 年 10 月公布的 WO98/45479）、Southern 印迹或聚合酶链式反应(PCR)技术，诸如实时定量 PCR (RT-PCR)。还可通过测量生物学流体诸如血清中的脱落抗原（例如 HER 胞外域）来研究 HER 受体过表达（参见例如 1990 年 6 月 12 日发布的美国专利 4,933,294；1991 年 4 月 18 日发布的 WO91/05264；1995 年 3 月 28 日发布的美国专利 5,401,638；及 Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)）。除了上述测定法之外，熟练技术人员还可利用多种体内测定法。例如，可将患者体内细胞暴露于任选用可检测标记物例如放射性同位素标记的抗体，并且可评估抗体与患者体内细胞的结合，例如通过外部扫描放射性或通过分析取自事先已暴露于所述抗体的患者的活组织检查切片。

相反，“不过表达 HER2 受体”的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比，不表达高于正常水平的 HER2 受体的癌症。

“过表达”HER 配体的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比，产生显著更高水平的该配体的癌症。这样的过表达可以是由基因扩增或者转录或翻译增加引起的。可通过评估患者体内，例如肿瘤活组织检查切片中所述配体

（或编码它的核酸）的水平，或者通过各种诊断测定法诸如 IHC、FISH、Southern 印迹、PCR 或上文所述体内测定法在诊断上确定 HER 配体的过表达。

术语“胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意欲包括放射性同位素（如 At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}和 Lu 的放射性同位素）、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，包括其片段和/或变体。

“化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类，诸如噻替哌(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide)（CYTOXAN®）；烷基磺酸酯类，诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶类，诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa)；乙撑亚胺类(ethylenimine)和甲基蜜胺类(methylamelamine)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(trietylenephosphoramide)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine)；番荔枝内酯类(acetogenin)（尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)）；δ-9-四氢大麻酚（曲大麻酚(dronabinol)，MARINOL®）；β-拉帕醌(lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙素类(colchicine)；白桦脂酸(betulinic acid)；喜树碱(camptothecin)（包括合成类似物拓扑替康(topotecan)（HYCAMTIN®）、CPT-11（伊立替康(irinotecan)，CAMPTOSAR®）、乙酰喜树碱、东莨菪素(scopolectin)和 9-氨基喜树碱）；苔藓抑素(bryostatin)；callystatin；CC-1065（包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物）；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；隐藻素类(cryptophycin)（特别是隐藻素 1 和隐藻素 8）；多拉司他丁(dolastatin)；duocarmycin（包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1）；艾榴塞洛素(eleutherobin)；pancratistatin；sarcodictyin；海绵抑素(spongistatin)；氮芥类，诸如氯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、松龙苯芥(prednimustine)、曲磷胺

(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；硝基脲类，诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine)；抗生素类，诸如烯二炔类(enediyne)抗生素（如加利车霉素(calicheamicin)，尤其是加利车霉素γ1I和加利车霉素ωI1（参见例如 Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.* 33: 183-186 (1994)）；蒽环类(dynemicin)抗生素，包括 dynemicin A；埃斯波霉素(esperamicin)；以及新抑癌菌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团）、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C (cactinomycin)、carabicin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D (dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)（包括 ADRIAMYCIN®、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂（DOXIL®）、脂质体多柔比星 TLC D-99（MYOCET®）、PEG化脂质体多柔比星（CAELYX®）和脱氧多柔比星）、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、依达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)诸如丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培来霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代谢物类，诸如甲氨喋呤、吉西他滨(gemcitabine)（GEMZAR®）、替加氟(tegafur)（UFTORAL®）、卡培他滨(capecitabine)（XELODA®）、epothilone 和 5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨喋呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、多西氟尿啶(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；抗肾上腺类，诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、曼托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；叶酸补充剂，诸如亚叶酸；醋葡内酯

(aceglatone)；醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；氨基酮戊酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；氨苯吖啶(amsacrine)；bestrabucil；比生群(bisantrene)；依达曲沙(edatraxate)；defofamine；地美可辛(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；依洛尼塞(elfornithine)；醋酸羟吡咔唑(elliptinium acetate)；依托格鲁(etoglucid)；硝酸镓；羟脲；香菇多糖(lentinan)；氯尼达明(lonidamine)；美登木素生物碱类(maytansinoids)，诸如美登素(maytansine)和美登醇(maytansinol)；安丝菌素(ansamitocin)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌达醇(mopidamol)；二胺硝吖啶(nitracrine)；喷司他丁(pentostatin)；蛋氨氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基酰肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多糖复合物（JHS Natural Products，Eugene，OR）；雷佐生(razoxane)；根霉素(rhizoxin)；西索菲兰(sizofiran)；锗螺胺(spirogermanium)；细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亚胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；单端孢菌素类(trichothecene)（尤其是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine)）；乌拉坦(urethan)；达卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴卫矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；gacytosine；阿糖胞苷(arabinoside)（“Ara-C”）；噻替哌；类紫杉醇(taxoid)，例如紫杉醇(paclitaxel)（TAXOL®）、紫杉醇的清蛋白改造纳米颗粒剂型（ABRAXANE™）和多西他塞(doxetaxel)（TAXOTERE®）；苯丁酸氮芥(chloranbucil)；6-硫鸟嘌呤；巯基嘌呤；甲氨喋呤；铂剂，诸如顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂；阻止微管蛋白聚合形成微管的长春花生物碱类(vincas)，包括长春碱(vinblastine)（VELBAN®）、长春新碱(vincristine)（ONCOVIN®）、长春地辛(vindesine)（ELDISINE®、FILDESIN®）和长春瑞宾(vinorelbine)（NAVELBINE®）；依托泊苷(etoposide)（VP-16）；异磷酰胺(ifosfamide)；米托蒽醌(mitoxantrone)；亚叶酸(leucovovin)；诺安托(novantrone)；依达曲沙(edatrexate)；柔红霉素(daunomycin)；氨基蝶呤；伊拜膦酸盐(ibandronate)；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；类维A酸，诸如视黄酸，包括贝沙罗汀(bexarotene)（TARGRETIN®）；二碳磷酸盐类(bisphosphonate)，诸如氯膦酸盐(clodronate)（例如BONEFOS®或OSTAC®）、etidronate（DIDROCAL®）、NE-58095、唑来膦酸(zoledronic acid)/唑来膦酸盐/酯(zoledronate)（ZOMETA®）、阿仑膦

酸盐/酯(alendronate)（FOSAMAX®）、pamidronate（AREDIA®）、替鲁膦酸盐/酯(tiludronate)（SKELID®）或利塞膦酸盐/酯(risedronate)（ACTONEL®）；曲沙他滨(troxacitabine)（1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物）；反义寡核苷酸，特别是那些抑制涉及粘着性细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸，诸如例如PKC-α、Ralf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R)；疫苗，诸如THERATOPE®疫苗和基因疗法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗；拓扑异构酶1抑制剂（如LURTOTECAN®）；rmRH（ABARELIX®）；BAY439006（sorafenib; Bayer）；SU-11248（Pfizer）；哌立福辛(perifosine)，COX-2抑制剂（如塞来考昔(celecoxib)或艾托考昔(etoricoxib)），蛋白体抑制剂（如PS341）；bortezomib（VELCADE®）；CCI-779；tipifarnib（R11577）；orafenib，ABT510；Bcl-2抑制剂，诸如oblimersen sodium（GENASENSE®）；pixantrone；EGFR抑制剂（见下文定义）；酪氨酸激酶抑制剂（见下文定义）；及上述任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物；以及上述两种或多种的组合，诸如CHOP（环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写）和FOLFOX（奥沙利铂(ELOXATIN™)联合5-FU和亚叶酸(leucovovin)的治疗方案的缩写）。

该定义还包括作用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂，诸如具有混合的激动剂/拮抗剂特性(profile)的抗雌激素类，包括他莫昔芬(tamoxifen)（NOLVADEX®）、4-羟基他莫昔芬、托瑞米芬(toremifene)（FARESTON®）、艾多昔芬(idoxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、雷洛昔芬(raloxifene)（EVISTA®）、曲沃昔芬(trioxifene)、keoxifene，及选择性雌激素受体调节剂(SERM)，诸如SERM3；没有激动剂特性的纯粹的抗雌激素，诸如氟维司群(fulvestrant)（FASLODEX®）和EM800（此类药剂可阻断雌激素受体(ER)二聚化，抑制DNA结合，提高ER周转，和/或遏制ER水平）；芳香酶抑制剂，包括类固醇芳香酶抑制剂，诸如福美坦(formestane)和依西美坦(exemestane)（AROMASIN®），及非类固醇芳香酶抑制剂，诸如阿那曲唑(anastrozole)（ARIMIDEX®）、来曲唑(letrozole)（FEMARA®）和氨鲁米特(aminoglutethimide)，及其它芳香酶抑制剂，包括伏罗唑(vorozole)（RIVISOR®）、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)（MEGASE®）、法倔唑(fadrozole)、咪唑(imidazole)；lutenizing hormone释放激素激动剂，包括亮丙瑞林(leuprolide)（LUPRON®和ELIGARD®）、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞

林(buserelin)和曲普瑞林(triptorelin)；性类固醇类，包括孕激素，诸如醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)和醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate)，雌激素，诸如乙烯雌酚(diethylstilbestrol)和倍美力(premarin)，及雄激素/类维 A 酸，诸如氟甲睾酮(fluoxymesterone)、所有反式维 A 酸(transretionic acid)和芬维 A 胺(fenretinide)；奥那司酮(onapristone)；抗孕酮类；雌激素受体下调调节剂(ERD)；抗雄激素类，诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡米特(bicalutamide)；睾内酯(testolactone)；及上述任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物；以及两种或多种上述物质的组合。

在用于本文时，术语“EGFR 靶向药物”指结合 EGFR 并任选抑制 EGFR 活化的治疗剂。此类药剂的例子包括结合 EGFR 的抗体和小分子。结合 EGFR 的抗体的例子包括 MAb 579（ATCC CRL HB 8506）、MAb 455（ATCC CRL HB 8507）、MAb 225（ATCC CRL 8508）、MAb 528（ATCC CRL 8509）（参见 Mendelsohn 等人的美国专利 4,943,533 及其变体，诸如嵌合化 225（C225 或 Cetuximab; ERBUTIX®）和重构人 225（H225）（参见 Imclone Systems Inc. 的 WO 96/40210）；IMC-11F8，完全人的 EGFR 靶向抗体（Imclone）；结合 II 型突变体 EGFR 的抗体（美国专利 5,212,290）；结合 EGFR 的人源化和嵌合抗体，如美国专利 5,891,996 中所述；及结合 EGFR 的人抗体，诸如 ABX-EGF 或 Panitumumab（参见 Abgenix/Amgen 的 WO 98/50433）；EMD 55900（Stragliotto *et al.*, *Eur. J. Cancer* 32A: 636-640 (1996)）；EMD7200（matuzumab），针对 EGFR 且与 EGF 和 TGF-α 竞争 EGFR 结合的人源化 EGFR 抗体（EMD/Merck）；人 EGFR 抗体，HuMax-EGFR（GenMab）；称为 E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3 和 E7.6.3 和 US 6,235,883 中描述的完全人的抗体；MDX-447（Medarex Inc.）；及 mAb 806 或人源化 mAb 806（Jones *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(29): 30375-30384 (2004)）。抗 EGFR 抗体可与胞毒剂偶联，由此产生免疫偶联物（参见例如 EP 659,439 A2，Merck Patent GmbH）。EGFR 拮抗剂包括小分子，诸如美国专利 5,616,582、5,457,105、5,475,001、5,654,307、5,679,683、6,084,095、6,265,410、6,455,534、6,521,620、6,596,726、6,713,484、5,770,599、6,140,332、5,866,572、6,399,602、6,344,459、6,602,863、6,391,874、6,344,455、5,760,041、6,002,008 和 5,747,498 以及 PCT 出版物 WO98/14451、WO98/50038、WO99/09016 和 WO99/24037 中描述的化合物。具体的小分子 EGFR 拮抗剂包括 OSI-774（CP-358774, erlotinib,

TARCEVA®, Genentech/OSI Pharmaceuticals）; PD 183805（CI 1033, 2-propenamide, N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[3-(4-吗啉基)丙氧基]-6-喹唑啉基]-, 二盐酸化物, Pfizer Inc.）; ZD1839, gefitinib（IRESSA™, 4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉代丙氧基)喹唑啉, AstraZeneca）; ZM 105180((6-氨基-4-(3-甲基苯基-氨基)-喹唑啉, Zeneca）; BIBX-1382（N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-哌啶-4-基)-嘧啶并[5,4-d]嘧啶-2,8-二胺, Boehringer Ingelheim）; PKI-166（(R)-4-[4-[(1-苯基乙基)氨基]-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-酚）; (R)-6-(4-羟基苯基)-4-[(1-苯基乙基)氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶）; CL-387785（N-[4-[(3-溴苯基)氨基]-6-喹唑啉基]-2-丁炔酰胺(butynamide)）; EKB-569（N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-3-氰基-7-乙氧基-6-喹啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺(butenamide), Wyeth）; AG1478（Sugen）; AG1571（SU 5271; Sugen）; 双重 EGFR/HER2 酪氨酸激酶抑制剂, 诸如 lapatinib（GW 572016 或 N-[3-氯-4-[(3-氟苯基)甲氧基]苯基]6[5[[[2-甲基磺酰基]乙基]氨基]甲基]-2-呋喃基]-4-喹唑啉胺(quinazolinamine); Glaxo-SmithKline）或氰基胍喹唑啉(cyanoguanidine quinazoline)和氰基脒喹唑胺(cyanoamidine quinazolamine)衍生物。

"酪氨酸激酶抑制剂"指抑制酪氨酸激酶诸如 HER 受体的酪氨酸激酶活性的分子。这样的抑制剂的例子包括上一段中提到的 EGFR 靶向药物; 小分子 HER2 酪氨酸激酶抑制剂, 诸如可从 Takeda 购买的 TAK165; CP-724,714, 一种口服 ErbB2 受体酪氨酸激酶选择性抑制剂（Pfizer and OSI）; 优先结合 EGFR 但抑制 HER2 和 EGFR 过表达细胞的双重 HER 抑制剂, 诸如 EKB-569（可从 Wyeth 购买）; lapatinib(GW572016; 可从 Glaxo-SmithKline 购买), 一种口服 HER2 和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂; PKI-166（可从 Novartis 购买）; 泛 HER (pan-HER)抑制剂, 诸如 canertinib（CI-1033; Pharmacia）; Raf-1 抑制剂, 诸如可从 ISIS Pharmaceuticals 购买的, 抑制 Raf-1 信号传导的反义剂 ISIS-5132; 非 HER 靶向 TK 抑制剂, 诸如可从 Glaxo 购买的 Imatinib mesylate（GLEEVAC™）; MAPK 胞外调控激酶 I 抑制剂 CI-1040（可从 Pharmacia 购买）; 喹唑啉类, 诸如 PD 153035, 4-(3-氯苯胺基)喹唑啉; 吡啶并嘧啶类; 嘧啶并嘧啶类; 吡咯并嘧啶类, 诸如 CGP 59326、CGP 60261 和 CGP 62706; 吡唑并嘧啶类, 4-(苯氨基)-7H-吡咯[2,3-d]嘧啶; 姜黄素（二阿魏酰甲烷, 4,5-双(4-氟苯胺基)-酞亚胺）; 含硝基噻吩模块的 tyrphostines; PD-0183805

（Warner-Lambert）；反义分子（例如那些结合 HER 编码核酸的反义分子）；喹喔啉类（美国专利 5,804,396）；tryphostins（美国专利 5,804,396）；ZD6474（Astra Zeneca）；PTK-787（Novartis/Schering AG）；泛 HER 抑制剂，诸如 CI-1033（Pfizer）；Affinitac（ISIS 3521；Isis/Lilly）；Imatinib mesylate（Gleevec；Novartis）；PKI 166（Novartis）；GW2016（Glaxo SmithKline）；CI-1033（Pfizer）；EKB-569（Wyeth）；Semaxinib（Sugen）；ZD6474（AstraZeneca）；PTK-787（Novartis/Schering AG）；INC-1C11（Imclone）；氰基胍喹唑啉和氰基脒喹唑胺衍生物；或任何如下专利出版物中所记载的：美国专利 5,804,396；WO 99/09016（American Cyanimid）；WO 98/43960（American Cyanamid）；WO 97/38983（Warner Lambert）；WO 99/06378（Warner Lambert）；WO 99/06396（Warner Lambert）；WO 96/30347（Pfizer, Inc.）；WO 96/33978（Zeneca）；WO 96/3397（Zeneca）；WO 96/33980（Zeneca）；及 US 2005/0101617。

“抗血管生成剂”指阻断或在某种程度上干扰血管发育的化合物。抗血管生成因子可以是例如结合涉及促进血管生成的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。在本文中优选的抗血管生成因子是结合血管内皮生长因子(VEGF)的抗体，诸如 Bevacizumab（AVASTIN®）。

术语“细胞因子”指由一种细胞群释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。这样的细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素，诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素、和牛生长激素；甲状旁腺素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松驰素；松驰素原；糖蛋白激素类，诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH)；肝生长因子；成纤维细胞生长因子；促乳素；胎盘催乳激素；肿瘤坏死因子-α 和-β；穆勒氏(Mullerian)抑制性物质；小鼠促性腺激素相关肽；抑制素；激活素(activin)；血管内皮生长因子；整联蛋白；血小板生成素(TPO)；神经生长因子，诸如 NGF-β；血小板衍生生长因子；转化生长因子(TGF)，诸如 TGF-α 和 TGF-β；胰岛素样生长因子-I 和-II；促红细胞生成素(EPO)；骨诱导因子(osteoinductive factor)；干扰素，诸如干扰素-α、-β 和-γ；集落刺激因子(CSF)，诸如巨噬细胞 CSF (M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞 CSF (GM-CSF)和粒细胞 CSF (G-CSF)；白介素(IL)，诸如 IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；肿瘤坏死因子，诸如 TNF-α 或 TNF-β；及其它多肽因子，包括 LIF 和 kit 配体(KL)。在用于

本文时，术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

II. HER2 抗体变体组合物

本发明至少部分关注某些 HER2 抗体组合物。优选的是，所述 HER2 抗体（主要种类 HER2 抗体及其抗体变体其中任一或二者兼之）是结合 HER2 结构域 II，比 Trastuzumab 更有效的抑制 HER 二聚化，和/或结合 HER2 的异二聚体结合位点的抗体。本文中主要种类抗体的优选实施方案是包含 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区氨基酸序列，且最优选包含 SEQ ID No. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列（Pertuzumab）的抗体。

本文中的组合物包含主要种类 HER2 抗体及其包含氨基末端前导延伸的氨基酸序列变体的混合物。优选的是，所述氨基末端前导延伸位于抗体变体的轻链上（例如位于抗体变体的一条或两条轻链上）。所述主要种类 HER2 抗体或抗体变体可以是完整抗体或抗体片段（如 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段），但优选二者都是完整抗体。

本文中的抗体变体在其任何一条或多条重链或轻链上包含氨基末端前导延伸。优选的是，所述氨基末端前导延伸位于抗体的一条或两条轻链上。所述氨基末端前导延伸优选包含 VHS-或由其组成。

组合物中氨基末端前导延伸的存在可通过多种分析技术来检测，包括但不限于 N-末端序列分析、电荷异质性的测定法（例如阳离子交换层析或毛细管区带电泳）、质谱等。组合物中抗体变体的量通常在如下范围内，从构成用于检测变体的任何测定法（优选阳离子交换分析）的检测下限的量至少于主要种类抗体量的量。通常，组合物中约 20%或更少（例如从约 1%至约 15%，例如从 5%至约 15%，且优选从约 8%至约 12%）的抗体分子包含氨基末端前导延伸。这样的百分比量优选通过阳离子交换分析来测定。

除了氨基末端前导延伸变体以外，还设想了主要种类抗体和/或变体的氨基酸序列改变，包括但不限于在其一条或所有两条重链上包含 C-末端赖氨酸残基的抗体（这样的抗体变体可以以约 1%至约 20%的量存在）、脱酰胺抗体变体（例如其中 Pertuzumab 一条或两条重链上的 Asn386 和/或 Asn391 脱酰胺）、具有一个或多个氧化后甲硫氨酸残基的抗体（例如包含氧化后 met-254 的 Pertuzumab）等。

此外，主要种类抗体或变体还可包含糖基化变异，其非限制性例子包括包含附着于其 Fc 区的 G1 或 G2 寡糖结构的抗体、包含附着于其轻链的碳水化合物模块的抗体（例如一个或多个碳水化合物模块，诸如葡萄糖或半乳糖附着于抗体的一条或两条轻链，例如附着于一个或多个赖氨酸残基）、包含一条或两条非糖基化重链的抗体、或包含附着于其一条或两条重链的唾液酸化寡糖的抗体等。

本发明还关注包含 SEQ ID No. 23 中的氨基酸序列的多肽或其脱酰胺和/或氧化变体。另外，本发明提供了包含一条或两条轻链的抗体，其中两条轻链其中任一或二者兼之包含 SEQ ID No. 23 中的氨基酸序列。所述抗体还包含一条或两条重链，其中两条重链其中任一或二者兼之包含 SEQ ID No. 16 或 SEQ ID No. 24 中的氨基酸序列（或其脱酰胺和/或氧化变体）。

组合物可从表达 HER2 抗体的基因工程细胞系回收，例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系，或者可通过肽合成来制备。

III. HER2 抗体的生成

下文描述了用于生成依照本发明使用的抗体的例示性技术。用于生成抗体的 HER2 抗原可以是例如可溶形式的 HER2 胞外域或其含有所需表位的部分。或者，在其细胞表面表达 HER2 的细胞（例如经转化而过表达 HER2 的 NIH-3T3 细胞；或癌细胞系，诸如 SK-BR-3 细胞，参见 Stancovski *et al.*, *PNAS (USA)* 88: 8691-8695 (1991)）可用于生成抗体。可用于生成抗体的其它形式 HER2 对于本领域技术人员是显而易见的。

(i) 多克隆抗体

多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来生成。使用双功能或衍生化试剂，例如马来酰亚胺苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯（通过半胱氨酸残基偶联）、N-羟基琥珀酰亚胺（通过赖氨酸残基）、戊二醛、琥珀酸酐、$SOCl_2$ 或 $R^1N=C=NR$，其中 R 和 R^1 是不同的烃基，将相关抗原与在待免疫的物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的，例如匙孔戽血蓝蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

通过将例如 100μg 或 5μg 蛋白质或偶联物（分别用于兔或小鼠）与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混和，并将该溶液皮内注射于多个部位，由此将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。一个月后，通过多个部位的皮

下注射，用弗氏完全佐剂中肽或偶联物初始量的 1/5-1/10 对动物进行强化。7-14 天后，采集动物的血液，并测定血清的抗体滴度。对动物进行强化直到滴度达到稳定。优选的是，将动物用相同抗原但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行强化。偶联物还可在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物来制备。同样，适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

(ii) 单克隆抗体

单克隆抗体是从一群基本上同质的抗体获得的，即构成群体的各个抗体相同和/或结合相同表位，除了单克隆抗体生产过程中可能产生的可能突变外，诸如本文所述那些变体。因此，修饰语“单克隆”表示抗体的特征，即不是分立抗体的混合物。

例如，单克隆抗体可通过最初由 Kohler *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975)描述的杂交瘤方法来制备，或者可通过重组 DNA 方法来制备（美国专利 4,816,567）。

在杂交瘤方法中，如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物，诸如仓鼠，以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞，所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者，可以在体外免疫淋巴细胞。然后，使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，以形成杂交瘤细胞（Goding，《*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*》，59-103，Academic Press，1986）。

将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养，所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如，如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT)，则用于杂交瘤的培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷（HAT 培养基），这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些细胞中，优选的骨髓瘤细胞系是鼠源骨髓瘤系，诸如那些可从 Salk Institute Cell Distribution Center（San Diege，California，USA）获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的衍生系，及可从 American Type Culture Collection（Rockville，Maryland，USA）获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述（Kozbor, *J. Immunol.*

133: 3001 (1984)；及 Brodeur 等人，《*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*》，51-63，Marcel Dekker, Inc.，New York，1987）。

可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是，通过免疫沉淀或通过体外结合测定法，诸如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)，测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson *et al.*, *Anal. Biochem.* 107: 220 (1980)的 Scatchard 分析来测定。

在鉴定得到生成具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后，所述克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆，并通过标准方法进行培养（Goding，《*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*》，59-103，Academic Press，1986）。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外，杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

可通过常规抗体纯化流程，诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析，将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

编码单克隆抗体的 DNA 易于通过常规流程分离并测序（例如使用能够特异性结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针）。以杂交瘤细胞作为所述 DNA 的优选来源。一旦分离，可将 DNA 置于表达载体中，然后将该表达载体转染到宿主细胞中，诸如不另外产生抗体蛋白质的大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞，以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述性论文包括 Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.* 5: 256-262 (1993)和 Plückthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992)。

在另一个实施方案中，可从使用 McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990)所述技术构建的噬菌体抗体库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991)和 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991)分别描述了使用噬菌体文库分离鼠源和人源抗体。后续出版物描述了通过链改组（Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)），以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略（Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993)），生成高亲和力（nM 范围）的人源抗

体。因此，这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

还可以修饰 DNA，例如通过替代即用人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源鼠源序列（美国专利 4,816,567；及 Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851 (1984)），或通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。

通常，用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定区，或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变区，以产生嵌合二价抗体，它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点及对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

(iii) 人源化抗体

本领域已经描述了用于将非人抗体人源化的方法。优选的是，人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基，它们通常取自“输入”可变区。人源化可基本上依照 Winter 及其同事的方法进行（Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-1536 (1988)），通过用高变区序列替代相应的人抗体序列。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体（美国专利 4,816,567），其中本质上少于整个人可变区用来自非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

用于制备人源化抗体的人可变区的选择，包括轻链和重链，对于降低抗原性非常重要。依照所谓的“最适(best-fit)”方法，用啮齿类抗体可变区序列对已知的人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架区(FR)（Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901 (1987)）。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体（Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2623 (1993)）。

更为重要的是，抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的，依照一种优选的方法，通过使用亲本和人源

化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的，且为本领域熟练技术人员所熟悉。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用，即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样，可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合，从而获得所需抗体特征，诸如对靶抗原的亲和力提高。通常，高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

WO01/00245 描述了结合 HER2 并阻断 HER 受体的配体活化的例示性人源化 HER2 抗体的生成。本文中特别感兴趣的人源化抗体基本上像完整鼠单克隆抗体 2C4（或其 Fab 片段）一样有效的阻断 EGF、TGF-α 和/或 HRG 介导的 MAPK 激活，和/或基本上像完整鼠单克隆抗体 2C4（或其 Fab 片段）一样有效的结合 HER2。本文中的人源化抗体可例如包含掺入人重链可变区的非人高变区残基，而且还可在选自 69H、71H 和 73H 的位置包含框架区(FR)替代，采用的是 Kabat 等人，《*Sequences of Proteins of Immunological Interest*》，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1991 中给出的可变区编号系统。在一个实施方案中，人源化抗体在 69H、71H 和 73H 的两个或所有位置包含 FR 替代。

本文中的例示性目的人源化抗体包含重链可变区互补决定残基 GFTFTDYTMX，其中 X 优选是 D 或 S（SEQ ID NO: 7）；DVNPNSGGSIYNQRFKG（SEQ ID NO: 8）；和/或 NLGPSFYFDY（SEQ ID NO: 9），任选包含那些 CDR 残基的氨基酸修饰，例如其中修饰基本上保持或改善抗体的亲和力。例如，目的抗体变体可在上述重链可变区 CDR 序列中具有约 1 个至约 7 个或者约 5 个氨基酸替代。这样的抗体变体可通过亲和力成熟来制备，例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO: 4 中的重链可变区氨基酸序列。

例如，除了前一段落中的那些重链可变区 CDR 残基之外，人源化抗体还可包含轻链可变区互补决定残基 KASQDVSIGVA（SEQ ID NO: 10）；SASYX^{1}X^{2}X^3，其中 X^1 优选是 R 或 L，X^2 优选是 Y 或 E，而 X^3 优选是 T 或 S（SEQ ID NO: 11）；和/或 QQYYIYPYT（SEQ ID NO: 12）。这样的人源化抗体任选包含上述 CDR 残基的氨基酸修饰，例如其中修饰基本上保持或改

善抗体的亲和力。例如，目的抗体变体可在上述轻链可变区 CDR 序列中具有约 1 个至约 7 个或者约 5 个氨基酸替代。这样的抗体变体可通过亲和力成熟来制备，例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO: 3 中的轻链可变区氨基酸序列。

本申请还设想了亲和力成熟的抗体，它结合 HER2 并阻断 HER 受体的配体活化。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体，例如包含轻链和/或重链可变区序列分别为 SEQ ID NO: 3 和 4 的抗体（即变体 574）。亲和力成熟的抗体优选以高于完整鼠 2C4 或完整变体 574 的亲和力结合 HER2 受体（例如根据采用 HER2 胞外域(ECD) ELISA 的评估，例如亲和力提高约 2 倍或约 4 倍至约 100 倍或约 1000 倍）。例示性的用于替代的重链可变区 CDR 残基包括 H28、H30、H34、H35、H64、H96、H99，或者两个或多个的组合（例如这些残基中的 2、3、4、5、6 或 7 个）。用于改变的轻链可变区 CDR 残基的例子包括 L28、L50、L53、L56、L91、L92、L93、L94、L96、L97，或者两个或多个的组合（例如这些残基中的 2 至 3、4、5 或直到约 10 个）。

还设想了各种形式的人源化抗体或亲和力成熟的抗体。例如，人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是抗体片段，诸如 Fab，它任选与一种或多种胞毒剂偶联以产生免疫偶联物。或者，人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是完整抗体，诸如完整的 IgG1 抗体。

(iv) 人抗体

作为人源化的替代方法，可生成人抗体。例如，现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成人抗体完整全集的转基因动物（如小鼠）。例如，已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见例如 Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.* 7: 33 (1993); 及美国专利 5,591,669、5,589,369 和 5,545,807。

或者，噬菌体展示技术（McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-553 (1990)）可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)区基因全集生成人抗体和抗体片段。依照这种技术，将抗体 V 区基因克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因的读码框中，并在噬菌体颗粒表面上展示

为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝，以抗体的功能特性为基础进行的选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。因此，噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行；有关综述参见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991)从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库分离得到大量不同的抗噁唑酮抗体。可本质上依照 Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991)或 Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993)所述技术，由未免疫人供体构建 V 基因全集，并分离针对大量不同抗原（包括自身抗原）的抗体。还可参见美国专利 5,565,332 和 5,573,905。

还可通过体外激活 B 细胞（参见美国专利 5,567,610 和 5,229,275）来生成人抗体。

1998 年 6 月 30 日发布的美国专利 5,772,997 和 1997 年 1 月 3 日出版的 WO 97/00271 中描述了人 HER2 抗体。

(v) 抗体片段

已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上，通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段（参见例如 Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992)及 Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985)）。然而，现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如，可从上文讨论的噬菌体抗体库分离抗体片段。或者，可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段，并通过化学方法偶联形成 $F(ab')_2$ 片段（Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)）。依照另一种方法，可直接从重组宿主细胞培养物分离 $F(ab')_2$ 片段。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员是显而易见的。在其它实施方案中，选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 WO 93/16185；美国专利 5,571,894；和美国专利 5,587,458。抗体片段还可以是“线性抗体”，例如如美国专利 5,641,870 中所述。所述线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

(vi) 双特异性抗体

双特异性抗体指对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可结合 HER2 蛋白质的两种不同表位。其它此类抗体可将

HER2 结合位点与 EGFR、HER3 和/或 HER4 的结合位点进行组合。或者，HER2 臂可与结合白细胞上触发分子诸如 T 细胞受体分子（如 CD2 或 CD3）或 IgG 的 Fc 受体(FcγR)，诸如 FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）和 FcγRIII（CD16）的臂组合，使得细胞防御机制聚焦于 HER2 表达细胞。双特异性抗体还可用于将胞毒剂定位于表达 HER2 的细胞。这些抗体拥有 HER2 结合臂及结合胞毒剂（如肥皂草毒蛋白、抗干扰素-α、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原）的臂。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段（如 $F(ab')_2$ 双特异性抗体）。

WO 96/16673 描述了一种双特异性 HER2/FcγRIII 抗体，而美国专利 5,837,234 公开了一种双特异性 HER2/FcγRI 抗体 IDM1（Osidem）。WO 98/02463 显示了一种双特异性 HER2/Fcα 抗体。美国专利 5,821,337 教导了一种双特异性 HER2/CD3 抗体。MDX-210 是一种双特异性 HER2-FcγRIII 抗体。

用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生成基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达，其中两种链具有不同的特异性（Millstein *et al.*, *Nature* 305: 537-539 (1983)）。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤（四源杂交瘤(quadroma)）生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦，且产物产量低。WO 93/08829 及 Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991)中公开了类似的流程。

依照一种不同的方法，将具有所需结合特异性（抗体-抗原结合位点）的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选使用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区。优选的是，在至少一种融合物中具有包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及，如果需要，免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体，并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中，这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而，在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时，有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个载体。

在该方法的一个优选实施方案中，双特异性抗体由一个臂上具有第一结

合特异性的杂合免疫球蛋白重链，和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对（提供第二结合特异性）构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半个双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径，因此发现这种不对称结构便于将所需双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法公开于 WO 94/04690。关于生成双特异性抗体的其它细节参见例如 Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986)。

依照美国专利 5,731,168 中描述的另一种方法，可改造一对抗体分子之间的界面，将从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分 C_H3 抗体恒定区。在该方法中，将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链（如酪氨酸或色氨酸）替换。通过用较小氨基酸侧链（如丙氨酸或苏氨酸）替换大氨基酸侧链，在第二抗体分子的界面上产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如，异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联，另一种抗体与生物素偶联。例如，此类抗体建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980)，和用于治疗 HIV 感染（WO 91/00360、WO 92/200373 和 EP 03089）。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的，并且连同许多交联技术一起公开于美国专利 4,676,980。

文献中还描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如，可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985)描述了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 $F(ab')_2$ 片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原，以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将 Fab'-TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab'-硫醇，并与等摩尔量的另一种 Fab'-TNB 衍生物混合，以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

最近的进展使得从大肠杆菌中直接回收 Fab'-SH 片段变得更加容易，这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992)描述了生成完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。每个 Fab' 片段由大肠杆菌分开分泌，并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗

体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达 HER2 受体的细胞和正常人 T 细胞，以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳房肿瘤靶的溶解活性。

还描述了从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如，已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab'部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原而形成单体，然后重新氧化而形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由 Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)描述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的轻链可变区(V_L)和重链可变区(V_H)，所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此，迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对，由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152: 5368 (1994)。

设想了具有超过两个效价的抗体。例如，可制备三特异性抗体。Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

(vii) 其它氨基酸序列修饰

设想了本文所述 HER2 抗体的氨基酸序列修饰。例如，可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过将适当的核苷酸改变引入 HER2 抗体核酸或者通过肽合成来制备 HER2 抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如 HER2 抗体氨基酸序列中的残基删除和/或插入和/或替代。只要最终的构建物具有所需特性，可进行删除、插入和替代的任何组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可改变 HER2 抗体的翻译后加工，诸如改变糖基化位点的数目或位置。

可用于鉴定HER2抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种方法称作“丙氨酸扫描突变”，如 Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989)所述。这里，鉴定了一个或一组靶残基（例如带电荷的残基，诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸），并用中性或带负电荷的氨基酸（最优选丙氨酸或聚丙氨酸）替代，以影响氨基酸与 HER2 抗原的相互作用。然后通过在或对替代位点引入更多或其它变体，推敲那些对替代显示功能敏感性的氨基酸位置。因此，虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定

的，但是突变本身的性质不需要预先决定。例如，为了分析在指定位点处的突变的后果，在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描诱变或随机突变，并对所表达的 HER2 抗体变体筛选所需活性。

氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-末端的融合，长度范围从一个残基至包含上百或更多残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N-末端甲硫氨酰残基的 HER2 抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。HER2 抗体分子的其它插入变体包括在 HER2 抗体的 N-或 C-末端融合酶（例如用于 ADEPT）或提高抗体血清半衰期的多肽。

另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在 HER2 抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替换。最感兴趣进行替代诱变的位点包括高变区或 CDR，但也考虑了 FR 或 Fc 区改变。保守替代在表 1 中显示在标题“优选替代”下。如果此类替代导致生物学活性的改变，那么可以引入表 1 中称为“例示替代”的更实质性改变，或如下文中关于氨基酸种类的进一步描述，并筛选产物。

表 1

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

对抗体生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或

螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性，可将氨基酸如下分组（A. L. Lehninger，在《*Biochemistry*》中，第 2 版，73-75，Worth Publishers，New York，1975）：

(1) 非极性的：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 不带电荷的、极性的：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性的：Asp (D)、Glu (E)

(4) 碱性的：Lys (K)、Arg (R)、His(H)

或者，根据共同的侧链特性，可将天然存在残基如下分组：

(1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

(2) 中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

(3) 酸性的：Asp、Glu;

(4) 碱性的：His、Lys、Arg;

(5) 影响链取向的残基：Gly、Pro;

(6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员交换另一个类别的。

任何不涉及保持 HER2 抗体正确构象的半胱氨酸残基也可替代，通常用丝氨酸，以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反，可向抗体中添加半胱氨酸键以改善其稳定性（特别是当抗体是抗体片段诸如 Fv 片段时）。

特别优选的一类替代变体牵涉替代亲本抗体（如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法牵涉使用噬菌体展示的亲和力成熟。简而言之，将数个高变区位点（例如 6-7 个位点）突变，在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上，作为与各个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性（例如结合亲和力）。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外，分析抗原-抗体复合物的晶体结构，以鉴定抗体和人 HER2 之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候

选位点。一旦产生这样的变体，如本文所述对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

抗体的另一类氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化样式。改变意味着删除在抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块，和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

抗体的糖基化通常或是 N-连接的或是 O-连接的。N-连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸（其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸）是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。因此，多肽中这些三肽序列其中任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸，最常见的是丝氨酸或苏氨酸，但也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利的完成（用于 N-连接的糖基化位点）。所述改变还可通过向原始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行（用于 O-连接的糖基化位点）。

若抗体包含 Fc 区，则可改变附着其上的任何寡糖结构。例如，美国专利申请 US 2003/0157108 A1（Presta,L.）中描述了有缺乏岩藻糖的成熟碳水化合物结构附着于抗体 Fc 区的抗体。还可参见 US 2004/0093621 A1（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.）。WO 03/011878（Jean-Mairet 等人）和美国专利 6,602,684（Umana 等人）中提到了在附着于抗体 Fc 区的寡糖结构中有等分 N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)的抗体。WO 97/30087（Patel 等人）中报告了在附着于抗体 Fc 区的寡糖结构中有至少一个半乳糖残基的抗体。关于有更改碳水化合物附着于其 Fc 区的抗体还可参见 WO 98/58964（Raju,S.）和 WO 99/22764（Raju,S.）。本文还设想了包含有此类碳水化合物结构附着于 Fc 区一条或两条重链上的主要种类抗体的抗体组合物

编码HER2抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然存在氨基酸序列变体的情况中），或者通过对早期制备的变体或非变体型式的 HER2 抗体进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

(viii) 筛选具有期望特性的抗体

上文已经描述了用于生成抗体的技术。如果需要，还可以选择具有某些生物学特征的抗体。

为了鉴定阻断 HER 受体的配体活化的抗体，可测定抗体阻断 HER 配体结合表达 HER 受体（例如偶联另一种 HER 受体，该 HER 受体与目的 HER 受体形成 HER 异寡聚体）的细胞的能力。例如，可将天然表达或者经转染而表达 HER 异寡聚体的 HER 受体的细胞与抗体一起温育，然后暴露于经标记的 HER 配体。然后可评估 HER2 抗体阻断配体结合 HER 异寡聚体中的 HER 受体的能力。

例如，可以基本上如 WO01/00245 中所述，以 24 孔板的形式在冰上使用单层 MCF7 培养物进行 HER2 抗体对 HRG 结合 MCF7 乳房肿瘤细胞系的抑制。可将 HER2 单克隆抗体添加到各个孔中并温育 30 分钟。然后可加入 ^{125}I 标记的 rHRGβ1$_{177-224}$（25pm），并可继续温育 4-16 小时。可绘制剂量-应答曲线，并可计算目的抗体的 IC_{50} 值。在一个实施方案中，阻断 HER 受体的配体活化的抗体在此测定法中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC_{50} 为约 50nM 或更低，更优选 10nM 或更低。当抗体是抗体片段诸如 Fab 片段时，在此测定法中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC_{50} 可以是例如约 100nM 或更低，更优选 50nM 或更低。

或者/另外，可评估 HER2 抗体阻断 HER 异寡聚体中存在的 HER 受体的 HER 配体刺激的酪氨酸磷酸化的能力。例如，可将内源表达或者经转染而表达 HER 受体的细胞与抗体一起温育，然后使用抗磷酸酪氨酸单克隆（任选偶联有可检测标记物）测定 HER 配体依赖性酪氨酸磷酸化活性。美国专利 5,766,863 中描述的激酶受体活化测定法也可用于测定 HER 受体活化和抗体对该活性的阻断。

在一个实施方案中，可以基本上如 WO01/00245 中所述，筛选在 MCF7 细胞中抑制 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的抗体。例如，可将 MCF7 细胞铺到 24 孔板中，并将 HER2 的单克隆抗体加入每个孔中，于室温温育 30 分钟；然后可向每个孔中加入 rHRGβ1$_{177-244}$ 至终浓度 0.2nM，并可继续温育 8 分钟。从每个孔中吸走培养基，通过加入 100μl SDS 样品缓冲液（5% SDS, 25mM DTT, 25mM Tris-HCl, pH 6.8）来终止反应。可在 4-12%梯度凝胶（Novex）上对每一份样品（25μl）进行电泳，然后通过电泳转移到聚偏二氟乙烯膜上。可对抗磷酸酪氨酸（以 1μg/ml）免疫印迹显影，并通过反射密度法(reflectance

densitometry)量化 Mr 约 180,000 的主要反应性条带的强度。在此测定法中，所选抗体优选将 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化显著抑制至对照的约 0-35%。可绘制通过反射密度法测定的对 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的抑制作用的剂量-应答曲线，并可计算目的抗体的 IC_{50}。在一个实施方案中，阻断 HER 受体的配体活化的抗体在此测定法中抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 刺激的 IC_{50} 为约 50nM 或更低，更优选 10nM 或更低。当抗体是抗体片段诸如 Fab 片段时，在此测定法中抑制 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的 IC_{50} 可以是例如约 100nM 或更低，更优选 50nM 或更低。

还可评估抗体对 MDA-MB-175 细胞的生长抑制作用，例如基本上如 Schaefer *et al.*, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997)中所述。依照此测定法，可将 MDA-MB-175 细胞用 HER2 单克隆抗体（10μg/mL）处理 4 天，并用结晶紫染色。与 HER2 抗体的温育对此细胞系显示的生长抑制作用可能与使用单克隆抗体 2C4 相似。在还有一个实施方案中，外源 HRG 不会显著逆转这种抑制作用。优选的是，无论是否存在外源 HRG，该抗体将能够以大于单克隆抗体 4D5 的程度（并且任选以大于单克隆抗体 7F3 的程度）抑制 MDA-MB-175 细胞的细胞增殖。

在一个实施方案中，根据免疫共沉淀实验的测定，诸如 WO01/00245 中所述，目的 HER2 抗体可在 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中阻断调蛋白依赖性的 HER2 与 HER3 结合，实质上比单克隆抗体 4D5 更有效，且优选实质上比单克隆抗体 7F3 更有效。

为了鉴定生长抑制性 HER2 抗体，可筛选抑制过表达 HER2 的癌细胞生长的抗体。在一个实施方案中，在约 0.5-30μg/ml 的抗体浓度，所选生长抑制性抗体能够将细胞培养中的 SK-BR-3 细胞生长抑制约 20-100%，优选约 50-100%。为了鉴定这样的抗体，可进行美国专利 5,677,171 中描述的 SK-BR-3 测定法。依照此测定法，在添加了 10%胎牛血清、谷氨酰胺和青霉素链霉素的，F12 和 DMEM 培养基的 1:1 混合液中培养 SK-BR-3 细胞。以 20,000 个细胞将 SK-BR-3 细胞铺入 35mm 细胞培养皿（2ml/35mm 培养皿）。每个培养皿加入 0.5-30μg/ml HER2 抗体。6 天后，使用电子 COULTER™细胞计数器对细胞数计数，与未处理细胞比较。可选择那些将 SK-BR-3 细胞生长抑制约 20-100%或约 50-100%的抗体作为生长抑制性抗体。关于用于筛选生长抑制性抗体，诸如 4D5 和 3E8 的测定法，参见美国专利 5,677,171。

为了选择诱导凋亡的抗体，可利用使用 BT474 细胞的膜联蛋白结合测定法。如前一段落所讨论的，在培养皿中培养和接种 BT474 细胞。然后除去培养基，只用新鲜培养基或者含有 10μg/ml 单克隆抗体的培养基替换。在 3 天温育期后，用 PBS 洗涤细胞单层，通过胰蛋白酶消化脱离。然后如上文关于细胞死亡测定法所讨论的，离心细胞，重悬于 Ca^{2+}结合缓冲液中，并等分到试管中。然后往试管中加入经标记的膜联蛋白（如膜联蛋白 V-FTIC）（1μg/ml）。可使用 FACSCAN™流式细胞计数仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件（Becton Dickinson）来分析样品。选择那些相对于对照诱导统计学显著水平的膜联蛋白结合的抗体作为诱导凋亡的抗体。除了膜联蛋白结合测定法，还可利用使用 BT474 细胞的 DNA 染色测定法。为了进行此测定法，将已经如前面两段所述用目的抗体处理过的 BT474 细胞与 9μg/ml HOECHST 33342™于 37℃温育 2 小时，然后使用 MODFIT LT™软件（Verity Software House）在 EPICS ELITE™流式细胞计数仪（Coulter Corporation）上进行分析。可选择在此测定法中诱导的凋亡细胞百分比变化比未处理细胞高 2 倍或更高（优选 3 倍或更高）（直到 100%凋亡细胞）的抗体作为促凋亡(pro-apoptotic)抗体。用于筛选诱导凋亡抗体诸如 7C2 和 7F3 的测定法参见 WO98/17797。

为了筛选结合 HER2 上目的抗体所结合的表位的抗体，可进行常规交叉阻断测定法，诸如《*Antibodies, A Laboratory Manual*》，Cold Spring Harbor Laboratory，Ed Harlow 和 David Lane，1988 中所述，以评估所述抗体是否交叉阻断诸如 2C4 或 Pertuzumab 等抗体与 HER2 的结合。或者/另外，可通过本领域已知的方法进行表位作图，且/或可研究抗体-HER2 结构（Franklin *et al.*, *Cancer Cell* 5: 317-328 (2004)）以了解抗体结合 HER2 的哪个/哪些结构域。

(ix) 免疫偶联物

本发明还涉及包含偶联有胞毒剂的抗体的免疫偶联物，所述胞毒剂诸如化疗剂、毒素（如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，包括其片段和/或变体）或放射性同位素（即放射偶联物）。

上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素的偶联物，诸如加利车霉素、美登素（美国专利 5,208,020）、单端孢菌毒素和 CC1065。

在本发明的一个优选实施方案中，将抗体与一个或多个美登素分子偶联（例如每个抗体分子偶联约 1 个至约 10 个美登素分子）。例如可将美登素转变为 May-SS-Me，后者可还原为 May-SH3 并与经修饰抗体反应（Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)）以产生美登木素生物碱-抗体免疫偶联物。

另一种目的免疫偶联物包含偶联有一个或多个加利车霉素分子的 HER2 抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I、α_2^I、α_3^I、N-乙酰基-γ_1^I、PSAG 和 θ^I_1（Hinman *et al.*, *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993)和 Lode *et al.*, *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998)）。还可参见美国专利 5,714,586; 5,712,374; 5,264,586; 和 5,773,001，明确收入本文作为参考。

可使用的酶活毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链（来自铜绿假单孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*)）、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素(modeccin) A 链、α-帚曲毒素(sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolaca Americana*)毒蛋白（PAPI、PAPII 和 PAP-S）、苦瓜(momordica charantia)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotin)、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制物、白树毒素(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌毒素(tricothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日出版的 WO 93/21232。

本发明还设想了抗体与具有核酸水解活性的化合物（如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶诸如脱氧核糖核酸酶; DNA 酶）之间形成的免疫偶联物。

有多种放射性同位素可用于生成放射偶联 HER2 抗体。例子包括 At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32} 和 Lu 的放射性同位素。

可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和胞毒剂的偶联物，诸如 3-(2-吡啶基二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基）环己胺-1-羧酸琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚胺二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对重氮苯甲酰基)己二胺）、二异氰酸酯（诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯）、和双活性氟化合物（诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）的双功能衍生物。例如，可如 Vitetta

et al., *Science* 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、二甲基接头或含二硫化物接头（Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992)）。

或者，可例如通过重组技术或肽合成来制备包含 HER2 抗体和胞毒剂的融合蛋白。

在另一个实施方案中，可将抗体与“受体”（诸如链霉亲合素）偶联，用于肿瘤的预定位，其中对患者施用抗体-受体偶联物，随后使用清除剂从循环中除去未结合的偶联物，然后施用与胞毒剂（如放射性核苷酸）偶联的“配体”（例如亲合素）。

(xi) 其它抗体修饰

本文还设想了抗体的其它修饰。例如，可将抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种连接，例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯，或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。还可将抗体包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊）、在胶状药物传递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于《*Remington's Pharmaceutical Sciences*》，第 16 版，Osol,A.编，1980。

可能希望在效应物功能方面修饰本发明的抗体，例如增强抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可通过在抗体 Fc 区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者/另外，可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基，从而使得在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)。参见 Caron *et al.*, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992)和 Shopes,B., *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff *et al.*, *Cancer Research* 53: 2560-2565 (1993)中描述的异双功能交联剂来制备。或者，抗体可改造成具有双重 Fc 区，由此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989)。

WO 00/42072（Presta,L.）描述了在存在人效应细胞时具有改进的 ADCC 功能的抗体，其中所述抗体在其 Fc 区中包含氨基酸替代。优选的是，具有改进的 ADCC 的抗体在 Fc 区的位置 298、333 和/或 334 包含替代。优选的是，改变的 Fc 区是在一个、两个或三个这些位置处包含替代或由其组成的人 IgG1 Fc 区。

WO 99/51642、美国专利 6,194,551 B1、美国专利 6,242,195 B1、美国专利 6,528,624 B1 和美国专利 6,538,124（Idusogie 等人）中描述了具有改变的 C1q 结合和/和补体依赖性细胞毒性(CDC)的抗体。这些抗体在其 Fc 区的氨基酸位置 270、322、326、327、329、313、333 和/或 334 其中一个或多个处包含氨基酸替代。

为了提高抗体的血清半衰期，可如例如美国专利 5,739,277 中所述将补救受体结合表位掺入抗体（尤其是抗体片段）。在用于本文时，术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子（如 IgG_1、IgG_2、IgG_3 或 IgG_4）Fc 区中负责提高 IgG 分子体内血清半衰期的表位。WO00/42072（Presta,L.）中还描述了在其 Fc 区中具有替代且血清半衰期延长的抗体。

还设想了具有三个或更多（优选四个）功能性抗原结合位点的改造抗体（美国专利申请 US 2002/0004587 A1，Miller 等人）。

本文公开的 HER2 抗体还可配制成脂质体。可通过本领域已知的方法来制备包含抗体的脂质体，诸如 Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030 (1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 及 1997 年 10 月 23 日出版的 WO 97/38731 中所述。美国专利 5,013,556 中公开了循环时间延长的脂质体。

特别有用的脂质体可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物通过反相蒸发法生成。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器，以产生具有所需直径的脂质体。可如 Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982)中所述，将本发明抗体的 Fab'片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂。参见 Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19): 1484 (1989)。

IV. 药用配制剂

制备本发明组合物的治疗用配制剂，即将组合物与任选的药学可接受的

载体、赋形剂或稳定剂混合（《*Remington's Pharmaceutical Sciences*》，第 16 版，Osol,A.编，1980），以冻干配制剂或水溶液的形式贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的，还包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵；氯化己烷双胺；苯扎氯铵、苯索氯铵；酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯，诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐相反离子，诸如钠；金属复合物（如 Zn-蛋白质复合物）；和/或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。WO 97/04801 中描述了冻干 HER2 抗体配制剂。

本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种活性化合物，优选那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。例如，可能还希望在配制剂中提供结合 EGFR、HER2（例如结合 HER2 上不同表位的抗体）、HER3、HER4 或血管内皮生长因子(VEGF)的抗体。或者/另外，配制剂中还可包含化疗剂、胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、EGFR 靶向药物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂和/或心脏保护剂。此类分子适于以有效用于所需目的的量而联合存在。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中，例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊、在胶状药物传递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于《*Remington's Pharmaceutical Sciences*》，第 16 版，Osol,A.编，1980。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质以定型产品的形式存在，如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)）、聚交酯（美国专利 3,773,919）、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ-乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如

LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

V. 筛选接受治疗的患者

依照本发明的一个优选实施方案，为治疗选择的患者具有展示 HER（且优选 HER2）活化的肿瘤或其它细胞或组织。在一个实施方案中，癌细胞或其它测试细胞中 HER（或 HER2）活化的程度显著超过同一组织类型的非癌性或正常细胞中该受体的活化水平。这样的过度活化可能是由于癌细胞中 HER 受体过表达和/或可用于活化 HER 受体的 HER 配体高于正常水平造成的。这样的过度活化可能引起癌细胞的恶性状态和/或是由癌细胞的恶性状态引起的。在有些实施方案中，将对癌症进行诊断或预后测定法以确定是否存在导致所述 HER 受体过度活化的 HER 受体扩增和/或过表达。或者/另外，可对癌症进行诊断或预后测定法以确定癌中是否存在造成所述受体过度活化的 HER 配体扩增和/或过表达。在此类癌症的子集中，所述受体的过度活化可能是由自分泌刺激途径造成的。下文将更为详细的描述用于测定 HER 活化的多种例示性测定法。

(i) HER 二聚体

可对样品评估 HER 二聚体的存在，如指示 HER 或 HER2 活化。可使用本领域已知的任何方法来检测 HER2 二聚体，诸如 EGFR-HER2、HER2-HER3。下文描述了数种优选方法。这些方法检测非共价蛋白质-蛋白质相互作用或者另外指示目的蛋白质之间的接近性。

可使用基于免疫亲和的方法，诸如免疫沉淀或 ELISA 来检测 HER 二聚体。在一个实施方案中，用 HER2 抗体免疫沉淀来自肿瘤细胞的包含 HER2 的复合物，然后通过免疫印迹对所得免疫沉淀物探查 EGFR 或 HER3 的存在。在另一个实施方案中，可将 EGFR 或 HER3 抗体用于免疫沉淀步骤，然后用 HER2 抗体探查免疫沉淀物。在又一个实施方案中，可用对 EGFR、HER3、EGFR/HER2 复合物或 HER2/HER3 复合物特异的 HER 配体来沉淀复合物，然后探查 HER2 的存在。例如，可将配体与亲合素偶联，并用生物素柱纯化复合物。

在其它实施方案中，诸如 ELISA 或抗体“夹心(sandwich)”型测定法中，将 HER2 的抗体固定在固相支持物上，接触肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物，洗涤，然后暴露于针对 EGFR 或 HER3 的抗体。后一种抗体的结合，可直接检测或者通过偶联有可检测标记物的二抗来检测，指示异二聚体的存在。在某些实施方案中，固定 EGFR 或 HER3 抗体，将 HER2 抗体用于检测步骤。在其它实施方案中，可使用 HER 配体，替换或联合 HER 抗体。

化学或紫外交联也可用于共价连接活细胞表面的二聚体。Hunter *et al.*, *Biochem. J.* 320: 847-53。化学交联剂的例子包括二硫代双(琥珀酰亚胺基)丙酸酯(DSP)和 3,3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基)丙酸酯(DTSSP)。在一个实施方案中，通过 SDS-PAGE 分析来自化学交联肿瘤细胞的细胞提取物，并用 EGFR 和/或 HER3 的抗体进行免疫印迹。适当分子量的超位移带(supershifted band)最有可能代表 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体，因为 HER2 是 EGFR 和 HER3 的优选二聚化配偶。此结果可通过后续使用 HER2 抗体的免疫印迹得以证实。

荧光共振能量转移(FRET)也可用于检测 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体。根据能量从供体荧光团向受体荧光团的转移，FRET 检测体内和体外的蛋白质构象改变和蛋白质-蛋白质相互作用。Selvin, *Nat. Struct. Biol.* 7: 730-34 (2000)。只有在供体荧光团足够接近受体荧光团时才发生能量转移。在典型的 FRET 实验中，用不同荧光探针标记两个蛋白质或单一蛋白质上的两个位点。用指定波长的入射光将探针之一，供体探针激发至较高的能量状态。然后供体探针将其能量传递给第二种探针，受体探针，导致供体的荧光强度下降，而受体的荧光发射增加。为了测量能量转移的程度，将用供体和受体探针标记的样品中的供体强度与只用供体探针标记的样品中它的强度进行比较。任选的是，比较供体/受体以及只有受体的样品中受体的强度。合适的探针是本领域已知的，包括例如膜渗入染料，诸如荧光素和罗丹明；有机染料，诸如花青染料；以及镧系元素原子。Selvin，见上文。检测和测量能量转移的方法和仪器也是本领域已知的。Selvin，见上文。

适于检测和测量个体细胞中蛋白质-蛋白质相互作用的基于 FRET 的技术也是本领域已知的。例如，可使用供体光漂白荧光共振能力转移(pbFRET)显微术和荧光寿命成像显微术(FLIM)来检测细胞表面受体的二聚化。Selvin, 见上文; Gadella & Jovin, *J. Cell Biol.* 129: 1543-58 (1995)。在一个实施方案

中，将 pbFRET 用于“悬浮液中”或“原位”细胞以检测和测量 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体的形成，如 Nagy *et al.*, *Cytometry* 32: 120-131 (1998) 中所述。这些技术测量由于能量转移而造成的供体荧光寿命的缩短。在一个具体的实施方案中，可使用流式细胞术 Foerster 型 FRET 技术(FCET)来研究 EGFR-HER2 和 HER2-HER3 二聚化，如 Nagy *et al.*, 见上文; 及 Brockhoff *et al.*, *Cytometry* 44: 338-48 (2001)中所述。

优选将 FRET 与标准免疫组化标记技术联合使用。Kenworthy, *Methods* 24: 289-96 (2001)。例如，可将偶联有合适荧光染料的抗体作为探针用于标记两种不同的蛋白质。如果蛋白质彼此接近，则所述荧光染料起到 FRET 的供体和受体的作用。通过标准方法检测能量转移。可通过流式细胞术手段或者通过数字显微镜检术系统诸如与电荷耦合器件(CCD)相机偶联的共聚焦显微镜检术或宽视野荧光显微镜检术来检测能量转移。

在本发明的一个实施方案中，用两种不同荧光团直接标记 HER2 抗体及或是 EGFR 或是 HER3 抗体，例如如 Nagy *et al.*, 见上文中所述。使肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物接触差异标记的抗体，它们在存在 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体时起到 FRET 的供体和受体的作用。或者，将未标记的针对 HER2 及或是 EGFR 或是 HER3 的抗体连同差异标记的二抗一起用作供体和受体。参见例如 Brockhoff *et al.*, 见上文。检测能量转移并确定二聚体的存在，如果在极接近处发现标记物的话。

在其它实施方案中，荧光标记对 HER2 及或是 EGFR 或是 HER3 特异的 HER 受体配体并用于 FRET 研究。

在本发明的其它实施方案中，通过使用标准的直接或间接的免疫荧光技术和共聚焦激光扫描显微术得出的 HER2 与或是 EGFR 或是 HER3 的共定位，证明了肿瘤细胞表面上二聚体的存在。或者，用激光扫描成像(LSI)以高通量的形式诸如微孔板检测抗体结合以及 HER2 与或是 EGFR 或是 HER3 的共定位，如 Zuck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11122-27 (1999)中所述。

在其它实施方案中，通过鉴定依赖于二聚体组分接近的酶活性来确定 EGFR-HER2 和/或 HER2-HER3 二聚体的存在。将 HER2 抗体与一种酶偶联，而将 EGFR 或 HER3 抗体与第二种酶偶联。加入第一种酶的第一种底物，且该反应产生第二种酶的第二种底物。这导致与另一种分子的反应，从而产生可检测的化合物，诸如染料。另一种化学药品的存在破坏第二种底物，从而

阻止与第二种酶的反应，除非第一种和第二种酶以及因此两种抗体极其接近。在一个具体的实施方案中，使肿瘤细胞或细胞裂解物接触偶联有葡萄糖氧化酶的 HER2 抗体以及偶联有辣根过氧化物酶的 HER3 或 HER1 抗体。向反应中加入葡萄糖以及染料前体，诸如 DAB，以及过氧化氢酶。通过 DAB 染色后的显色来确定二聚体的存在。

还可使用基于 eTag™测定体系（Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA）的方法来检测二聚体，如例如 2001 年 12 月 6 日公开的美国专利申请 2001/0049105 中所述，将其全文明确收入本文作为参考。eTag™或“电泳标签”包含可检测报导物模块，诸如荧光基团。它还可包含“迁移率修饰物”，基本上由具有独特电泳迁移率的模块组成。这些模块容许在规定的电泳条件诸如毛细管电泳(CE)下从复杂混合物中分离并检测 eTag™。将 eTag™中含有报导物模块和任选的迁移率修饰物的部分通过可切割连接基团与第一靶结合模块连接以产生第一结合化合物。第一靶结合模块特异性识别特定的第一靶物，诸如核酸或蛋白质。第一靶结合模块不受任何形式的限制，它可以是例如多核苷酸或多肽。优选的是，第一靶结合模块是抗体或抗体片段。或者，第一靶结合模块可以是 HER 受体配体或其有结合能力的片段。

连接基团优选包含可切割模块，诸如酶底物，或者可在规定条件下断裂的任何化学键。当第一靶结合模块与其靶物结合时，引入和/或活化裂解剂，连接基团遭到切断，由此释放 eTag™中含有报导物模块和迁移率修饰物的部分。因此，“游离”eTag™的出现指示靶结合模块与其靶物的结合。

优选的是，第二结合化合物包含裂解剂和特异性识别第二靶物的第二靶结合模块。第二靶结合模块也不受任何方式的限制，它可以是例如抗体或抗体片段或 HER 受体配体或有结合能力的配体片段。裂解剂是这样的，它在第一结合化合物和第二结合化合物极其接近的情况下将只切割连接基团。

在本发明的一个实施方案中，第一结合化合物包含 eTag™，其中 HER2 的抗体担当第一靶结合模块。第二结合化合物包含与能切割 eTag™连接基团的裂解剂连接的 EGFR 或 HER3 抗体。优选的是，所述裂解剂必须活化才能切割连接基团。使肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物接触结合 HER2 的 eTag™以及结合细胞表面上的 EGFR 或 HER3 的经修饰 EGFR 或 HER3 抗体。如果需要，优选除去未结合的结合化合物并活化裂解剂。如果存在 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体，由于裂解剂接近连接基团，裂解剂将切割连接基团并

释放 eTag™。然后可通过本领域已知的任何方法来检测游离 eTag™，诸如毛细管电泳。

在一个实施方案中，所述裂解剂是作用于连接基团的可活化化学药品。例如，所述裂解剂可通过使样品暴露于光照而活化。

在另一个实施方案中，使用 EGFR 或 HER3 抗体作为第一靶结合模块来构建 eTag™，而第二结合化合物则从 HER2 抗体来构建。

在又一个实施方案中，使用与其对二聚体中任一 HER 受体的结合相比，特异或优先结合二聚体的抗体或其它试剂来检测 HER 二聚体。

(ii) HER2 磷酸化

如前一节所论述的，用 EGFR、HER2 或 HER3 抗体免疫沉淀后，可任选进行二聚体的功能性测定法，作为免疫印迹的替换或补充。在一个实施方案中，用 HER3 抗体免疫沉淀后测定免疫沉淀物中的受体酪氨酸激酶活性。因为 HER3 不具有内在的酪氨酸激酶活性，所以免疫沉淀物中存在酪氨酸激酶活性指示 HER3 最有可能与 HER2 相结合。Graus-Porta *et al.*, *EMBO J.* 16: 1647-55 (1997); Klapper *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4995-5000 (1999)。此结果可通过用 HER2 抗体进行免疫印迹得到证实。在另一个实施方案中，用 HER2 抗体免疫沉淀后测定 EGFR 受体酪氨酸激酶活性。在此测定法中，使免疫沉淀物接触放射性 ATP 和模拟 EGFR 对 HER2 的转磷酸作用的体内位点的肽底物。所述肽的磷酸化指示共沉淀及由此 EGFR 与 HER2 的二聚化。受体酪氨酸激酶活性测定法是本领域众所周知的，包括检测靶底物磷酸化的测定法，例如用磷酸酪氨酸抗体，以及检测相关信号转导途径诸如 MAPK 途径激活的测定法。

可通过一种或多种 HER 受体诸如 HER (HER2)受体的免疫沉淀和 Western 印迹分析来评估 HER 受体的磷酸化。例如，使用抗磷酸酪氨酸抗体来检测免疫沉淀的 HER 受体中磷酸化酪氨酸残基，通过凝胶上存在磷酸-HER2 带确定为阳性。抗磷酸酪氨酸抗体可购自 Pan Vera（Madison, WI）、Invitrogen 的子公司、Chemicon International Inc.（Temecula, CA）或 Upstate Biotechnology（Lake Placid, NY）。通过缺乏该条带而确定为阴性。

在另一个实施方案中，使用磷酸特异性 HER2 抗体（克隆 PN2A; Thor *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 18(18): 3230-3239 (2000)）通过免疫组化来评估 HER (HER2)受体的磷酸化。

用于检测 HER 受体磷酸化的其它方法包括但不限于 KIRA ELISA(美国专利 5,766,863; 5,891,650; 5,914,237; 6,025,145; 和 6,287,784)、质谱(比较磷酸化和未磷酸化 HER2 的大小)、以及使用 HER(例如 HER2)抗体和磷酸特异性或磷酸酪氨酸特异性抗体二者的 e 标签接近性测定法(例如使用购自 Aclara BioSciences(Mountain View, CA)的 eTag™测定试剂盒)。有关 eTag 测定法的细节见上文。

还可在细胞阵列中使用磷酸特异性抗体来检测细胞样品中信号转导蛋白的磷酸化状态(US 2003/0190689)。

(iii) HER2 配体

可依照已知流程来测定肿瘤中或与肿瘤有关的 HER 配体诸如 TGF-α 的水平。这样的测定法可检测待测样品中的蛋白质和/或编码它的核酸。在一个实施方案中,可使用免疫组化(IHC)来测定肿瘤中的 HER 配体水平;参阅例如 Scher *et al.*, *Clin. Cancer Research* 1: 545-550 (1995)。或者/另外,可评估待测样品中 HER 配体编码核酸的水平;例如通过 FISH、Southern 印迹或 PCR 技术。

(iv) 非 HER2 过表达癌症

尽管癌症的特征可以是 HER2 受体的过表达,但本申请还提供了用于治疗不认为是 HER2 过表达的癌症的方法。

为了测定癌症中的 HER2 表达,可利用多种诊断/预后测定法。在一个实施方案中,可通过 IHC 来分析 HER2 过表达,例如使用 HERCEPTEST® (Dako)。可将来自肿瘤活组织检查的石蜡包埋组织切片进行 IHC 测定法并遵循如下 HER2 蛋白质染色强度标准:

得分 0: 未观察到染色或者在少于 10%的肿瘤细胞中观察到膜染色。

得分 1+: 在超过 10%的肿瘤细胞中检测到微弱的/刚刚可察觉的膜染色。所述细胞只在其部分膜上有染色。

得分 2+: 在超过 10%的肿瘤细胞中观察到微弱至中等的完全膜染色。

得分 3+: 在超过 10%的肿瘤细胞中观察到中等至强烈的完全膜染色。

那些 HER2 过表达评估得分 0 或 1+的肿瘤可鉴定为未过表达 HER2,而那些得分 2+或 3+的肿瘤可鉴定为过表达 HER2。

过表达 HER2 的肿瘤可根据对应于每个细胞表达的 HER2 分子拷贝数的免疫组化得分进行定级,并且可通过生化方法测定:

0 = 0-10,000 个拷贝/细胞，

1+ = 至少约 200,000 个拷贝/细胞，

2+ = 至少约 500,000 个拷贝/细胞，

3+ = 至少约 2,000,000 个拷贝/细胞。

导致酪氨酸激酶的配体依赖性活化的3+水平的HER2过表达(Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159-7163 (1987))发生于约30%的乳癌中，而且在这些患者中，无复发存活和总体存活减少（Slamon *et al.*, *Science* 244: 707-712 (1989); Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 (1987))。或者/另外，可对福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织进行 FISH 测定法诸如 INFORM™（由 Ventana, Arizona 销售）或 PATHVISION™(Vysis, Illinois)以测定肿瘤中 HER2 过表达的程度（如果有的话）。

在一个实施方案中，所述癌症将是表达（且可以是过表达）EGFR 的癌症，可对所述表达进行评估，作为用于评估如上所述 HER2 表达的方法。

还可利用体内诊断测定法来评估 HER 受体或 HER 配体过表达或扩增，例如通过施用结合待检测分子且标记有可检测标记物（如放射性同位素）的分子（诸如抗体），然后对患者进行外部扫描以定位所述标记物。

VI. 使用 HER2 抗体的治疗

依照本发明，设想了 HER2 抗体可用于治疗癌症。所述癌症通常将包含 HER2 表达细胞，使得本文的 HER2 抗体能够结合所述癌细胞。上文定义部分列出了可用本发明组合物治疗的癌症。

还设想了 HER2 抗体可用于治疗各种非恶性疾病或紊乱，诸如自身免疫性疾病（如银屑病）；子宫内膜异位；硬皮病；再狭窄；息肉，诸如结肠息肉、鼻息肉或胃肠息肉；纤维腺瘤；呼吸疾病；胆囊炎；神经纤维瘤病；多囊性肾病；炎性疾病；皮肤紊乱，包括银屑病和皮炎；脉管疾病；牵涉脉管上皮细胞异常增殖的状况；胃肠溃疡；门内特里埃氏(Menetrier)病，分泌型腺瘤或蛋白质流失综合征(protein loss syndrome)；肾紊乱；血管生成性紊乱；眼病，诸如年龄相关黄斑变性、假定的眼组织胞浆菌病综合症(presumed ocular histoplasmosis syndrome)、来自增殖性糖尿病性视网膜病、视网膜血管形成、糖尿病性视网膜病或年龄相关的黄斑变性的视网膜新血管形成；骨相关病理学，诸如骨关节炎、佝偻病和骨质疏松；脑缺血事件后的损伤；纤维

变性或水肿(edema)疾病、诸如肝硬化、肺纤维化、carcoidosis、throiditis、系统性高粘滞综合症、奥斯勒-韦伯-朗迪(Osler-Weber-Rendu)病、慢性阻塞性肺病，或者烧伤、外伤、辐射、中风、组织缺氧或缺血后的水肿；皮肤的超敏反应；糖尿病性视网膜病变和糖尿病性肾病；格-巴二氏(Guillain-Barre)综合征；移植物抗宿主病或移植排斥；佩吉特氏(Paget)病；骨或关节发炎；光老化（例如由 UV 照射人皮肤引起的）；良性前列腺肥大；某些微生物感染，包括选自腺病毒、汉坦病毒(hantaviruses)、布氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）、耶尔森氏菌属（*Yersinia spp.*）和百日咳博德特氏菌（*Bordetella pertussis*）的微生物病原体；由血小板聚集引起的血栓；生殖疾患，诸如子宫内膜异位、卵巢过刺激综合征、先兆子痫、功能障碍性子宫出血或月经频多；滑膜炎；粥样斑；急性和慢性肾病（包括增生性肾小球肾炎和糖尿病诱发的肾病）；湿疹；肥厚性瘢痕形成；内毒素性休克和真菌感染；家族性腺瘤息肉病；神经变性疾病（如阿尔茨海默氏(Alzheimer)病、AIDS 相关痴呆、帕金森氏(Parkinson)病、肌萎缩侧索硬化、视网膜色素变性、脊髓性肌萎缩和小脑变性）；骨髓发育异常综合症(myelodysplastic syndrome)；再生障碍性贫血；缺血性损伤；肺、肾或肝的纤维化；T 细胞介导的超敏性疾病；婴儿肥厚性幽门狭窄；泌尿阻塞综合症；银屑病关节炎；和桥本氏(Hasimoto)甲状腺炎。本文疗法优选的非恶性适应症包括银屑病、子宫内膜异位、硬皮病、脉管疾病（如再狭窄、动脉粥样硬化、冠状动脉病或高血压）、结肠息肉、纤维腺瘤或呼吸疾病（如哮喘、慢性支气管炎、支气管扩张或囊性纤维化）。

使用 HER2 抗体的治疗将导致疾病的体征或症状改善。例如，若所治疗疾病是癌症，则此类疗法可导致存活（总体存活和/或无进展存活）有所提高和/或可导致客观临床响应（部分的或完全的）。

优选的是，所施用组合物中的 HER2 抗体是裸抗体。然而，所施用的 HER2 抗体可偶联胞毒剂。优选的是，免疫偶联物和/或其所结合的 HER2 蛋白质受到细胞的内在化，导致免疫偶联物杀伤其所结合的癌细胞的治疗功效提高。在一个优选的实施方案中，胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。此类胞毒剂的例子包括美登木素生物碱、加利车霉素、核糖核酸酶和 DNA 内切核酸酶。

依照已知方法对人类患者施用 HER2 抗体，诸如静脉内施用，例如推注或一段时间的连续输注，通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、

滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径。优选静脉内施用抗体组合物。

对于疾病的预防或治疗，HER2 抗体的适当剂量将取决于如上定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和进程、施用 HER2 抗体是为了预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对 HER2 抗体的响应、及主治医师的判断。适当的在某一时间或者通过一系列治疗对患者施用 HER2 抗体。根据疾病的类型和严重程度，对患者施用的初始候选剂量是约 1μg/kg 至 50mg/kg（如 0.1-20mg/kg）HER2 抗体，无论是通过例如一次或多次分开的施用，或者通过连续输注。在一个实施方案中，HER2 抗体的初始输注时间可长于后续输注时间，例如初始输注为约 90 分钟，而后续输注为约 30 分钟（如果初始输注耐受良好的话）。优选的 HER2 抗体剂量将在约 0.05mg/kg 至约 10mg/kg 的范围内。因此，可对患者施用约 0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg 或 10mg/kg（或其任意组合）的一剂或多剂。这样的剂量可间歇施用，例如每周或每三周（例如使得患者接受约 2 剂至约 20 剂，例如约 6 剂 HER2 抗体）。可首先施用较高的加载剂量，后续较低的一剂或多剂。在一个实施方案中，首先以约 840mg 的加载剂量施用 HER2 抗体，然后大约每三周施用约 420mg。在另一个实施方案中，大约每 3 周以 1050mg 的一剂施用 HER2 抗体。

其它治疗剂可与 HER2 抗体联合。这样的联合施用包括使用分开的配制剂或单一的药用配制剂的共施用或同时施用，以及任一次序的连续施用，其中优选有一段时间所有两种（或多种）活性剂同时发挥其生物学活性。因此，可在施用 HER2 抗体之前或之后施用其它治疗剂。在此实施方案中，至少一次其它治疗剂的施用和至少一次 HER2 抗体的施用之间的计时优选为约 1 个月或更短，且最优选约 2 周或更短。或者，以单一的配制剂或分开的配制剂同时对患者施用其它治疗剂和 HER2 抗体。

可与 HER2 抗体联合的其它治疗剂的例子包括以下任一种或多种：化疗剂，诸如抗代谢物，如吉西他滨；第二种不同的 HER2 抗体（例如生长抑制性 HER2 抗体诸如 Trastuzumab 或诱导 HER2 过表达细胞凋亡的 HER2 抗体诸如 7C2、7F3 或其人源化变体）；靶向另一种肿瘤相关抗原诸如 EGFR、HER3、HER4 的第二种抗体；抗激素化合物，例如抗雌激素化合物诸如他莫昔芬，或芳香酶抑制剂；心脏保护剂（以预防或减轻与治疗有关的任何心肌功能障碍）；细胞因子；EGFR 靶向药物（诸如 TARCEVA®、IRESSA®或

Cetuximab); 抗血管生成剂（尤其是 Genentech 销售的 Bevacizumab，商标为 AVASTIN™）; 酪氨酸激酶抑制剂; COX 抑制剂（例如 COX-1 或 COX-2 抑制剂）; 非类固醇抗炎药，Celecoxib（CELEBREX®）; 法呢基转移酶抑制剂（例如可从 Johnson and Johnson 购买的 Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777 或可从 Schering-Plough 购买的 Lonafarnib SCH66336）; 结合癌胚蛋白 CA 125 的抗体，诸如 Oregovomab（MoAb B43.13）; HER2 疫苗（诸如 Pharmexia 的 HER2 Auto Vac 疫苗，或 Dendreon 的 APC8024 蛋白质疫苗，或 GSK/Corixa 的 HER2 肽疫苗）; 其它 HER 靶向疗法（如 trastuzumab、cetuximab、gefitinib、erlotinib、CI1033、GW2016 等）; Raf 和/或 ras 抑制剂（参见例如 WO 2003/86467）; Doxil; 托泊替康(Topetecan); 紫杉烷; GW572016; TLK286; EMD-7200; 治疗恶心的药物，诸如血清素拮抗剂、类固醇或苯并二氮卓类(benzodiazepien); 预防或治疗皮疹的药物或标准痤疮疗法，包括局部或口服抗生素; 降体温药物，诸如醋氨酚(acetaminophen)、苯海拉明(diphenhydramine)或哌替啶(meperidine); 造血生长因子，等等。

任何上述共施用药剂的合适剂量就是那些目前所使用的剂量，并且可由于该药剂与 HER2 抗体的联合作用（协同作用）而降低。联合 HER2 抗体组合物和其它治疗剂的治疗可对患者产生协同的、或者大于累加的治疗效益。

如果施用化疗剂，通常以对此已知的剂量施用，或者任选由于所述药物的联合作用或可归于施用化疗剂的不良副作用而降低。所述化疗剂的制备和给药方案可依照制造商的说明书进行或由熟练从业人员根据经验确定。所述化疗的制备和给药方案还可参阅《Chemotherapy Service》, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)。

除了上述治疗方案，还可对患者进行手术去除癌细胞和/或放疗。

VI. 材料保藏

以下杂交瘤细胞系已保藏于美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection, ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA）:

抗体名称	ATCC 编号	保藏日期
7C2	ATCC HB-12215	1996 年 10 月 17 日
7F3	ATCC HB-12216	1996 年 10 月 17 日
4D5	ATCC CRL 10463	1990 年 5 月 24 日

2C4	ATCC HB-12697	1999 年 4 月 8 日

下面的非限制性实施例例示了本发明的更多细节。说明书中所有引用文献的内容均明确收入本文作为参考。

实施例

PERTUZUMAB 组合物的鉴定

Pertuzumab 是在人 IgG1( )框架基础上产生的重组人源化单克隆抗体。它包含两条重链（448 个残基）和两条轻链（214 个残基）。两条重链由两个链间二硫键连接，且各轻链通过一个链间二硫键附着于重链。在 Pertuzumab 的 Fc 区中在两条重链的 Asn-299 处有一个 N-连接糖基化位点。Pertuzumab 与 HERCEPTIN® （Trastuzumab）的不同在于轻链（12 个氨基酸差异）和重链（30 个氨基酸差异）的表位结合区。由于这些差异，Pertuzumab 结合 HER2 受体上完全不同的表位。Pertuzumab 与人上皮细胞上 HER2 受体的结合阻止了它与 HER 受体家族的其它成员形成复合物（Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)）。通过阻断复合物的形成，Pertuzumab 阻止了所述复合物的配体（例如 EGF 和 heregulin）的生长刺激作用。体外实验证明了 Pertuzumab 和 Pertuzumab-Fab 都抑制 heregulin (HRG)与 MCF7 细胞的结合，并且 HRG 刺激的 HER2-HER3 复合物的磷酸化作用可被 Pertuzumab 和 Pertuzumab-Fab 二者所抑制（Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)）。此外，发现 Pertuzumab 和 Pertuzumab 的聚乙二醇衍生化 Fab 在体内对肿瘤生长的抑制作用在鼠前列腺癌异种移植模型中是相当的（Agus *et al.*, *Cancer Cell* 2: 127-137 (2002)）。这些资料表明所述抗体的 Fc 区不是抑制肿瘤生长所必需的，而且二价性和 Fc 介导的效应物功能也不是体内或体外生物学活性所必需的。

分析了以下由重组改造的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞表达的样品：

样品	制备过程	规模
参照材料	I 期	400 L
Lot S9802A	II 期	2000 L
工艺开发材料（第 1、2、3、5 和 6 轮）	包括 III 期在内的临床开发程序	400 L

注：由于第 2 天 100 L 接种体培养发生污染，所以未能获得 400 L 第 4 轮的数据。

N-末端序列分析

采用标准 Edman 降解法进行 N-末端序列分析，参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料的结果分别显示于表 2A、表 2B 和表 2C。在所有样品中都观察到预期的轻链和重链 N-末端序列（图 3A 和图 3B）。在 5 种样品中还观察到对应与在预期 N-末端序列之前有三个附加氨基酸 Val-His-Ser (VHS)的轻链对应的附加小序列。VHS 序列是分泌时从蛋白质上去除的信号肽的一部分。信号肽的可变切割导致 Pertuzumab N-末端的 VHS 延伸。在先前为 I/II 期临床研究生产的材料中，约 2%-4%的 Pertuzumab 分子两条轻链有一条含有 N-末端 VHS 序列。不过，这些材料中有 N-末端 VHS 序列的轻链水平（各轻链的 1%-2%）太低了，以至于不能在 N-末端序列分析中检测到。在 5 份工艺开发样品中，此轻链种类的水平稍微高于约 4%-5%的 N-末端分析的检测极限。这 5 份工艺开发样品的 N-末端测序数据与阳离子交换层析结果一致，它显示了这 5 份工艺开发样品中约 9%的 Pertuzumab 分子有一条轻链含有 VHS 延伸（参阅下文的阳离子交换层析(CEC)）。

没有检测到其它序列（检测极限估计是 3%），表明缺乏内部切割位点。

质谱分析

用二硫苏糖醇还原 Pertuzumab 样品，并使用 PE SCIEX API 3000™质谱仪通过电喷射-离子化质谱(ESI-MS)进行分析以证实重链和轻链的质量与它们的预期序列一致。图 8A 和图 8B 中比较了参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料的重建质谱。对于所有三种材料而言，观察到的轻链质量（23,524 Da）都与从其序列预测的值一致。在 23,685 Da 和 23,847 Da（分别比轻链质量高 161 和 323 Da）观察到另外两个较小的峰。第一个峰（23,685 Da）可能源自轻链的糖化(glycation)。第二个峰（23,847 Da）在 400 升规模工艺开发材料中可更清楚的观察到。此峰大概来自具有 Val-His-Ser 延伸的轻链（参见上文的 N-末端序列分析及阳离子交换层析分析）或具有两个糖化位点的轻链。

观察到几个相应于不同形式重链的质量。主要的重链种类具有 50,532 Da 的质量，源自由残基 1-448 组成且具有 G0 寡糖结构的重链。观察到的其它形式包括含有残基 1-448 且具有 G1 或 G2 寡糖结构的重链（图 8B）。

通过阳离子交换层析和毛细管区带电泳评估的电荷异质性

采用阳离子交换层析(CEC)来评估 Pertuzumab 中的电荷异质性。使用 DIONEX™阳离子交换柱（PROPAC WCX-10™, 4 mm x 250 mm）以 pH 6.0, 20mM MES 缓冲液和浅 NaCl 梯度分析用羧肽酶 B (CPB)处理之前和之后的样品。层析图谱的比较显示于图 9A（CPB 处理之前）和图 9B（CPB 处理之后）。在所有三个批次中观察到多个峰。为了达到鉴定目的，将层析图谱分成 6 个区（在图 9A 和 9B 中标以 A 至 F）。6 个区的相对峰面积列于表 3A 和表 3B。Lot S9802A 和 400 升规模工艺开发材料中酸性变体的量（区域 A 中）高于参照材料中此变体的量。与参照材料相比，Lot S9802A 和 400 升规模工艺开发材料中区域 C 和 D 中的碱性变体有所减少，所述碱性变体已显示出含有在一条（C 区）或所有两条（D 区）重链上有 C-末端赖氨酸残基的 Pertuzumab。CPB 处理后，具有一个或两个重链 C-末端赖氨酸的 Pertuzumab 分子转变成 B 区中的主要种类，而在 C 区和 D 区中不再检测到。CPB 处理后 C 区中只剩下一个小峰，它的同一性尚未测定。E 区中的碱性变体，据显示源自一条轻链含有 VHS 延伸的 Pertuzumab 分子，它在 400 升规模工艺开发材料中的含量（9%-10%）高于参照材料和 Lot S9802A 中的含量（4%）。F 区中的碱性变体显示出是在一条轻链上含有 N-末端 VHS 延伸且在一条重链上含有 C-末端赖氨酸的 Pertuzumab。由于酸性和碱性变体的水平较高，B 区中主要种类在 400 升规模工艺开发材料中的含量比在参照材料或 Lot S9802A 中的含量低。

除了阳离子交换层析之外，采用毛细管区带电泳(CZE)来检查 Pertuzumab 中的电荷异质性。通过用 CZE 分析个别收集的 CEC 级分，鉴定了 CZE 峰并与 CEC 中观察到的那些峰联系起来。对于分析的所有材料，通过 CZE 和 CEC 测定的电荷变体的相对量是相当的。

根据基于细胞的抗增殖测定法，不同 CEC 级分中 Pertuzumab 电荷变体的生物学活性看起来是相同的。因此，Pertuzumab 中的电荷异质性预计不会影响它的功效。400 升规模工艺开发材料中的生物学活性与参照材料和 Lot S9802A 中的生物学活性是相当的（参见生物学活性和表 4）。

分子排阻层析

采用分子排阻层析(SEC)来测定 Pertuzumab 的聚集程度。在 TOSOHAAS

TSK G3000SWXL™柱（7.8 mm x 300 mm）上分析样品。使用等度洗脱（100mM 磷酸钾, pH 6.8, 0.5 mL/分钟）并在 280nm 监测紫外(UV)吸光度。参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料的 SEC 资料显示于图 10。在分析的所有材料中，根据峰面积，单体一贯高于 99.6%，而聚集体则低于 0.3%。

CE-SDS-LIF 分析

还可采用具有激光诱导荧光的毛细管电泳-十二烷基硫酸钠分析(CE-SDS-LIF)来评估 Pertuzumab 样品的纯度。对于还原(reduction)和未还原的参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料，观察到相似的电泳图谱（图 11A 和 11B）。从还原材料的电泳图谱测定的非糖基化重链水平在 2.6%和 4.3%之间（就总的重链而言）。通过 CE-SDS-LIF 分析测定的这些样品（未还原的）中聚集体的量与 SEC 的结果一致。在这些样品的 CE-SDS-LIF 分析中没有发现重要产物片段或其它杂质的迹象。CE-SDS-LIF 数据表明 400 升规模工艺开发材料的杂质图谱与参照材料和 Lot S9802A 的杂质图谱相似。

SDS-PAGE 分析

进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析（4%-20% T 凝胶（Daiichi Pure Chemicals Co., 东京, 日本）及 SYPRORUBY™染色）来比较参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模工艺开发材料的还原和完整样品。在 400 升规模工艺开发材料中没有观察到新的条带，再次表明 400 升规模工艺开发材料中的总杂质图谱与参照材料和 Lot S9802A 中的相似。

胰蛋白酶和 LYS-C 消化肽图分析

进行胰蛋白酶和 Lys-C 消化肽图分析来检查和比较参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模工艺开发材料中 Pertuzumab 的一级结构。用胰蛋白酶消化还原的和 S-羧甲基化的 Pertuzumab 的等分试样，用内切蛋白酶 Lys-C 消化还原的和亚硫酸解(sulfitolyzed)的 Pertuzumab 等分试样。使用 VYDAC C-18™柱（4.6 mm x 250 mm）以 0%-60%的乙腈梯度通过反相层析分离胰蛋白酶消化产物。监测 214nm 的吸光度，并使用 THERMO FINNIGAN LCQ™

通过 ESI-MS 测定肽质量。使用 ZORBAX C-8™柱（4.6 mm x 150 mm）以 0%-100%异丙醇(IPA)梯度通过反相层析分离 Lys-C 消化产物。监测 214nm 的吸光度，并使用 THERMO FINNIGAN LCQ™通过 ESI-MS 测定肽质量。

图 12A 和图 12B 中分别比较了参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料的胰蛋白酶和 Lys-C 消化肽图。所有三种材料的胰蛋白酶和 Lys-C 消化图谱都是基本上相同的。通过 LC-MS 鉴定了大多数肽并与预期肽质量相符。观察到的胰蛋白酶消化肽鉴定为重链残基的 97.1%（436/449）和轻链残基的 95.8%（205/214）。在 Lys-C 图中，重链和轻链的序列覆盖率分别为 98.4%（442/449）和 70.6%（151/214）。通过 LC-MS 发现在胰蛋白酶消化肽图中具有 VHS 延伸的 N-末端肽与不含 VHS 延伸的 N-末端肽共洗脱。在肽图中没有检测到显著量的脱酰胺或氧化肽。

生物学活性

Pertuzumab 的生物学活性是通过测量其抑制人乳癌细胞系 MDA-MB-175-VII 增殖的能力而测定的。对 5 份 400 升规模工艺开发样品获得的百分比比活（表 4）在 90%-96%的范围内，与参照材料（定义为 100%）和 Lot S9802A（在分析证书中报告的是 98%）的活性相似。正如所预期的，电荷异质性不影响 Pertuzumab 的功效。所有材料都具有相当的抗增殖活性。

N-连接寡糖分析

重链的质量异质性部分源自 Asn-299 处的糖基化。为了评估寡糖的异质性，用 PNG 酶 F 将 Pertuzumab 样品消化过夜以释放 N-连接聚糖。然后将释放的聚糖用荧光团 9-氨基-1,4,6-三磺酸盐(APTS)加以衍生。通过毛细管电泳(CE)（Beckman P/ACE 5500 CE，配备 Beckman 的涂层毛细管）分离各种聚糖形式并通过荧光检测进行量化。

从参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料释放的中性寡糖的 CE 分析电泳图谱显示于图 13。作为参考，图 14 中包括了通常在人 IgG1 抗体中找到的寡糖结构以及所使用命名法的概要。表 5 总结了所有材料中寡糖的相对量。

具有 G0 和 G1 结构的寡糖是主要的聚糖。在电泳图谱中还观察到源自其它寡糖结构的峰。这些结构包括 G2、G0-F、G-1、Man5 和 G1-1（或 Man6）

糖型(glycoform)。另外，还解析了异构体(isoform)。所有材料中观察到的聚糖分布是相似的(表 5)。不过，与参照材料和 400 升规模工艺开发材料相比，II 期材料(Lot S9802A)具有较小量的 G0 结构聚糖而具有更多的 G1 结构聚糖。尽管聚糖分布有差异，但所有材料都具有相似的生物学活性。另外，聚糖异质性的变化对于 Pertuzumab 对 FcRn(表 6)或 Fcγ 受体(表 7)的结合亲和力没有显著影响(参阅 FcRn 受体和 Fcγ 受体结合测定法)。

还通过 MALDI-TOF 质谱(MALDI-TOF/MS)分析了释放的中性寡糖。图 15 比较了从参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料释放的中性寡糖的 MALDI-TOF 谱。由 MALDI-TOF/MS 分析获得的聚糖结构和分布与 CE 结果一致。

毛细管等电聚焦分析

采用毛细管等电聚焦(cIEF)来测定参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模第 1 轮工艺开发材料中 Pertuzumab 的 pI(等电点)。尽管在 CEC 分析中观察到这些材料中不同带电荷种类的相对量稍有差异，但发现在所有样品中主要种类的 pI 都是 8.7。

游离巯基分析

采用 Ellman 氏分析法对参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模工艺开发材料测试游离硫醇(未配对的半胱氨酸残基)。在所有测试材料中游离硫醇水平都低于检测限度(约 0.05 摩尔游离硫醇/每摩尔蛋白质)。

FcRn 受体结合测定法

采用与 Shields *et al.*, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604 (2001)中所述相似的 ELISA 测定法比较来自参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模工艺开发材料的 Pertuzumab 的 FcRn 受体结合亲和力。使用参照材料作为此测定法中的标准品。

首先用 NEUTRAVADIN™(Pierce, Rockford, IL)将 MAXISORP™ 96 孔微孔板(Nunc, Roskilde, Denmark)在 4℃包被过夜。然后将生物素化的人 FcRn 以 2μg/mL 加到板中并保温 1 小时。将 11 份两倍连续稀释的 Pertuzumab 样品(3.1-3200 ng/mL)加到板中并保温 2 小时。通过添加过氧化物酶标记

的山羊 $F(ab')_2$ 抗人 IgG $F(ab')_2$（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA）并使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)（Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD）作为底物来检测结合的 Pertuzumab。在 TITERTEK MULTISKAN™（MCC/340）读数仪（ICN, Costa Mesa, CA）上读取 450nm 的吸光度。还以第二种 ELISA 形式评估 Pertuzumab 的 FcRn 结合亲和力，其中将 HER2-ECD 包被到板上。向板中加入连续稀释的 Pertuzumab 样品并保温 2 小时。洗板并加入 2mg/mL 生物素化人 FcRn。用链霉亲合素-HRP 并以 TMB 作为底物来检测结合的 FcRn。

测定标准品（即参照材料）在滴定曲线中点的吸光度(mid-OD)及标准品和样品在此 mid-OD 处的对应浓度。通过用标准品的 mid-OD 浓度除样品的 mid-OD 浓度来计算相对结合亲和力。

表 6 列出了由这两种 ELISA 形式获得的相对 FcRn 结合亲和力。来自这两种不同 ELISA 形式的数据是相当的。尽管不同 Pertuzumab 材料中的聚糖分布是不同的，但这些材料的 FcRn 结合亲和力是相当的，表明 Pertuzumab 中的聚糖异质性对它的 FcRn 结合亲和力没有明显影响。

Fcγ 受体结合测定法

通过依照 Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001)并作修改的 ELISA 测定法来评估 Pertuzumab 对人 Fcγ 受体(Fc(R)的结合。

单体 IgG 可结合高亲和力的 FcγRIa (CD64)；不过，低亲和力的受体（FcγRIIa (CD32A)、FcγRIIb (CD32B)和 FcγRIIIa (CD16)）需要多聚体 IgG 才能有显著结合。因此，对于低亲和力受体结合测定法，在测定前通过将各样品（200mg/mL）与山羊抗人 κ 链（400mg/mL；ICN Biomedical, Irvine, CA）混合来形成 Pertuzumab 的多聚体。人 FcγR 表达具成 Gly/His6/GST (甘氨酸/6 组氨酸/谷胱甘肽-s-转移酶)的受体 α 链胞外域的重组融合蛋白。用抗 GST 包被的、牛血清清蛋白(BSA)封闭的测定板捕捉 FcγR。向板中加入受体（100mL，0.25mg/mL）并保温 1 小时。加入连续稀释的 Pertuzumab 样品（100mL），FcγRIa 用单体而低亲和力 FcγR 用多聚体，并将板保温 2 小时。通过添加辣根过氧化物酶缀合的山羊抗人 $F(ab')_2$（Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA）并使用 TMB 作为底物来检测结合的 Pertuzumab。通过非线性回归分析以四参数模型（KaleidaGraph, Synergy

Software, Reading, PA)测定 Pertuzumab 结合 FcγR 的 EC_{50} 值。使用 RITUXAN® （Lot C2B81298-2）作为对照抗体。

表 7 总结了 Pertuzumab 结合 FcγR 的 EC_{50} 值。结果显示参照材料、Lot S9802A 和 400 升规模工艺开发材料对 FcγR 具有相当的结合亲和力。这些结果表明 Pertuzumab 中的聚糖异质性对它的 FcγR 结合亲和力没有显著影响。

表 2A

Pertuzumab 参照材料的 N-末端序列分析

（在各个循环中观察到的残基 nmol 数）

	循环											
残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.01	0.02	0.04	0.04	0.05	0.06	0.07	0.09	0.09	0.10	0.11
ARG	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.05	0.06
ASN	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.06	0.07
ASP	0.48	0.08	0.03	0.04	0.04	0.04	0.05	0.07	0.07	0.08	0.09	0.10
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	**0.92**	0.13	0.04	0.46	0.13	0.07	0.08	0.08	0.08	0.09
GLU	**0.49**	0.05	0.13	0.08	0.03	**0.51**	0.12	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08
GLY	0.01	0.01	0.03	0.03	0.05	0.05	0.05	**0.30**	**0.35**	**0.36**	0.13	0.09
HIS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
ILE	0.00	0.48	0.05	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04
LEU	0.00	0.03	0.04	**0.43**	0.11	0.08	0.09	0.11	0.12	0.13	**0.62**	0.26
LYS	0.00	0.00	0.03	0.00	0.05	0.06	0.07	0.08	0.08	0.09	0.00	0.12
MET	0.00	0.00	0.00	0.53	0.07	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02
PHE	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.08
PRO	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.04	0.05	0.32	0.13	0.09	0.09	0.10
SER	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.07	**0.56**	0.16	0.30	0.33	0.18	0.39
THR	0.00	0.01	0.00	0.04	0.33	0.12	0.07	0.07	0.08	0.09	0.10	0.10
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
TYR	0.01	0.01	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.08	0.09	0.10	0.11	0.13
VAL	0.01	**0.51**	0.08	0.10	**0.53**	0.15	0.11	0.12	0.14	0.15	0.16	**0.51**
轻链	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
重链	**GLU**	**VAL**	**GLN**	**LEU**	**VAL**	**GLU**	**SER**	**GLY**	**GLY**	**GLY**	**LEU**	**VAL**

注：给出了各个循环中观察到的苯基乙内酰硫脲(phenylthiohydantoin)氨基酸残基的纳摩尔数。来自重链的残基以粗体标示，来自轻链的残基以下划线标示。上样量为约 0.5nmol 蛋白质，相当于轻链和重链各 1.0nmol。在序列分析中没有观察到半胱氨酸(CYS)。

表 2B

Pertuzumab Lot S9802A 的 N-末端序列分析

（在各个循环中观察到的残基 nmol 数）

	循环											
残基	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.01	0.03	0.04	0.06	0.06	0.08	0.09	0.11	0.12	0.14	0.14
ARG	0.01	0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.08
ASN	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
ASP	0.61	0.12	0.04	0.05	0.05	0.06	0.07	0.09	0.09	0.10	0.11	0.13
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	**1.11**	0.22	0.06	0.55	0.19	0.10	0.11	0.11	0.11	0.12
GLU	**0.61**	0.09	0.15	0.05	0.04	**0.61**	0.19	0.10	0.09	0.10	0.10	0.11
GLY	0.01	0.01	0.04	0.04	0.06	0.06	0.07	**0.37**	**0.44**	**0.46**	0.19	0.13
HIS	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
ILE	0.00	0.56	0.10	0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.05	0.06
LEU	0.00	0.04	0.05	**0.51**	0.17	0.11	0.12	0.14	0.15	0.17	**0.78**	0.37
LYS	0.00	0.00	0.04	0.00	0.06	0.08	0.09	0.10	0.11	0.12	0.00	0.16
MET	0.00	0.00	0.01	0.61	0.12	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03
PHE	0.00	0.01	0.03	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.09	0.10
PRO	0.00	0.01	0.02	0.03	0.05	0.06	0.06	0.37	0.18	0.12	0.12	0.13
SER	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.08	**0.63**	0.24	0.36	0.41	0.24	0.35
THR	0.00	0.01	0.00	0.05	0.39	0.17	0.10	0.10	0.11	0.12	0.13	0.14
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
TYR	0.16	0.07	0.05	0.06	0.07	0.08	0.10	0.10	0.12	0.13	0.14	0.16
VAL	0.02	**0.58**	0.13	0.12	**0.62**	0.22	0.15	0.16	0.18	0.20	0.21	**0.62**
轻链	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
重链	**GLU**	**VAL**	**GLN**	**LEU**	**VAL**	**GLU**	**SER**	**GLY**	**GLY**	**GLY**	**LEU**	**VAL**

注：给出了各个循环中观察到的苯基乙内酰硫脲(phenylthiohydantoin)氨基酸残基的纳摩尔数。来自重链的残基以粗体标示，来自轻链的残基以下划线标示。上样量为约 0.5nmol 蛋白质，相当于轻链和重链各 1.0nmol。在序列分析中没有观察到半胱氨酸(CYS)。

表2C

Pertuzumab 400 升规模第 1 轮的 N-末端序列分析（在各个循环中观察到的残基 nmol 数）

残基	循环											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALA	0.01	0.02	0.03	0.05	0.06	0.06	0.08	0.10	0.11	0.13	0.14	0.14
ARG	0.03	0.05	0.07	0.09	0.17	0.15	0.20	0.23	0.24	0.29	0.30	0.33
ASN	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.03	0.04	0.06	0.07	0.08	0.09	0.09
ASP	0.89	0.08	0.05	0.11	0.08	0.09	0.11	0.15	0.14	0.16	0.18	0.19
CYS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GLN	0.00	0.01	**1.17**	0.11	0.05	0.60	0.12	0.09	0.14	0.12	0.11	0.12
GLU	**0.68**	0.05	0.19	0.04	0.04	**0.62**	0.15	0.10	0.10	0.11	0.11	0.12
GLY	0.01	0.01	0.05	0.04	0.03	0.07	0.07	**0.37**	**0.42**	**0.44**	0.16	0.13
HIS	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03
ILE	0.03	0.56	0.03	0.02	0.07	0.04	0.03	0.04	0.05	0.06	0.05	0.06
LEU	0.00	0.04	0.05	**0.61**	0.15	0.12	0.13	0.15	0.16	0.18	**0.79**	0.31
LYS	0.00	0.00	0.04	0.05	0.08	0.09	0.10	0.12	0.14	0.15	0.17	0.19
MET	0.00	0.00	0.01	0.55	0.04	0.02	0.05	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03
PHE	0.00	0.01	0.03	0.03	0.05	0.05	0.07	0.08	0.08	0.09	0.10	0.11
PRO	0.00	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.07	0.41	0.14	0.11	0.13	0.14
SER	0.01	0.02	0.07	0.06	0.08	0.10	**0.76**	0.21	0.43	**0.48**	0.23	0.42
THR	0.00	0.01	0.00	0.06	0.57	0.18	0.12	0.16	0.16	0.17	0.18	0.19
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03
TYR	0.00	0.02	0.04	0.06	0.07	0.08	0.10	0.11	0.13	0.14	0.15	0.17
VAL	0.04	**0.65**	0.10	0.13	**0.62**	0.19	0.15	0.17	0.19	0.21	0.22	**0.62**
轻链	ASP	ILE	GLN	MET	THR	GLN	SER	PRO	SER	SER	LEU	SER
重链	**GLU**	**VAL**	**GLN**	**LEU**	**VAL**	**GLU**	**SER**	**GLY**	**GLY**	**GLY**	**LEU**	**VAL**
VHS-轻链	*VAL*	*HIS*	*SER*	*ASP*	*ILE*	*GLN*	*MET*	*THR*	*GLN*	*SER*	*PRO*	*SER*

注：给出了各个循环中观察到的苯基乙内酰硫脲(phenylthiohydantoin)氨基酸残基的纳摩尔数。来自重链的残基以粗体标示，来自轻链的残基以下划线标示。来自额外 VHS-轻链序列的残基以斜体标示。上样量为约 0.5nmol 蛋白质，相当于轻链和重链各 1.0nmol。在序列分析中没有观察到半胱氨酸(CYS)。

表3A

天然 Pertuzumab 的阳离子交换层析分析（%峰面积）

样品	离子交换变体峰					
	A	B	C	D	E	F
参照材料	19	73	19	3	3	0.4
S9802A	20	68	5	2	4	0.2
400升规模第1轮	16	65	5	2	10	0.9
400升规模第2轮	15	67	5	2	9	0.6
400升规模第3轮	15	67	6	2	10	0.6
400升规模第5轮	15	67	5	2	9	0.5
400升规模第6轮	13	63	9	3	9	0.6

注：由于第 2 天 100L 接种体培养发生污染，所以未能获得 400L 第 4 轮的数据。

表 3B

CPB 消化的 Pertuzumab 的阳离子交换层析分析（%峰面积）

样品	离子交换变体峰					
	A	B	C	D	E	F
参照材料	11	78	4	ND	4	ND
S9802A	20	71	3	ND	4	ND
400 升规模第 1 轮	17	68	3	ND	10	ND
400 升规模第 2 轮	15	71	3	ND	9	ND
400 升规模第 3 轮	15	71	3	ND	10	ND
400 升规模第 5 轮	17	70	3	ND	9	ND
400 升规模第 6 轮	16	71	3	ND	9	ND

注：级分 A 至 F 的定义见图 9B。所有数值四舍五入成两个有效数字。由于四舍五入，任一行相加的总数可能不是 100%。由于第 2 天 100L 接种体培养发生污染，所以未能获得 400L 第 4 轮的数据。

ND=未检测或者不可积分。

表 4

通过基于细胞的抗增殖测定法评估的 Pertuzumab 比活

材料	比活（%）	%CV
参照材料	100[a]	—
S9802A	96[b]	10
400 升规模第 1 轮	96[c]	18
400 升规模第 2 轮	90[c]	11
400 升规模第 3 轮	86[c]	17
400 升规模第 5 轮	96[c]	3
400 升规模第 6 轮	95[c]	3

注：由于第 2 天 100L 接种体培养发生污染，所以未能获得 400L 第 4 轮的数据。

[a]根据定义，参照材料的比活是 100%。

[b]Lot S9802A 的报告值。

[c]三次测定的平均值。

表 5

通过 CE 测定的 Pertuzumab 中的寡糖结构分布

样品	%G0-F	%G-1	%Man5	%G0	%Man6 +%G1-1	%G1[a]	%G2
参照材料	1	4	1	71	2	19	2
S9802A	1	4	1	62	2	27	3
400 升规模第 1 轮	2	6	1	73	3	15	2
400 升规模第 2 轮	1	6	1	77	2	13	1
400 升规模第 3 轮	2	6	1	74	4	14	1
400 升规模第 5 轮	1	5	1	71	2	18	1
400 升规模第 6 轮	1	5	1	71	3	18	1

注：由于第 2 天 100L 接种体培养发生污染，所以未获得 400L 第 4 轮的数据。

[a]两种 G1 异构体的总和。

表 6

Pertuzumab 对 FcRn 的相对结合亲和力

样品	相对结合亲和力 NeutrAvidin 包被形式	相对结合亲和力 Her2ECD 包被形式
参照材料(标准品)	1.00	1.00
S9802A	1.34	1.30
400升规模第1轮	1.54	1.22
400升规模第2轮	1.09	1.31
400升规模第3轮	1.14	1.42
400升规模第5轮	1.22	1.36
400升规模第6轮	1.06	1.29

注:由于第2天100L接种体培养发生污染,所以未获得400L第4轮的数据。

[a] 测定了标准品(即参照材料)在滴定曲线中点的吸光度(mid-OD)及标准品和样品在此 mid-OD 处的对应浓度。用标准品的 mid-OD 浓度除样品的 mid-OD浓度得到相对结合亲和力。

表 7

Pertuzumab 结合 Fcγ 受体的 EC_{50} 值

样品	EC_{50} (μg/mL) FcγR Ia 平均值	FcγR Ia SD	FcγRIIa 平均值	FcγRIIa SD	FcγRIIb 平均值	FcγRIIb SD	FcγRIIIa (F158) 平均值	FcγRIIIa (F158) SD	FcγRIIIa (V158) 平均值	FcγRIIIa (V158) SD
参照材料	0.0061	0.0014	5.6	1.8	57	17	14.0	1.4	1.8	0.1
S9802A	0.0076	0.0020	5.4	1.9	45	17	7.8	0.3	1.1	0.1
400升规模第1轮	0.0079	0.0013	5.4	1.5	70	25	8.4	0.9	1.2	0.1
400升规模第2轮	0.0074	0.0016	5.8	1.6	54	15	10.4	0.7	1.4	0.2
400升规模第3轮	0.0075	0.0015	5.5	1.1	54	10	8.2	0.9	1.2	0.1
400升规模第5轮	0.0076	0.0011	6.1	2.7	59	12	10.9	1.5	1.4	0.2
400升规模第6轮	0.0080	0.0005	6.2	1.9	44	1	10.3	0.9	1.4	0.2

注: 平均值和标准偏差(SD)获自多轮测定(N=4)。

FcγRIIIa 受体有两种型式: F158 和 V158。

由于第2天100L接种体培养发生污染,所以未获得400L第4轮的数据。

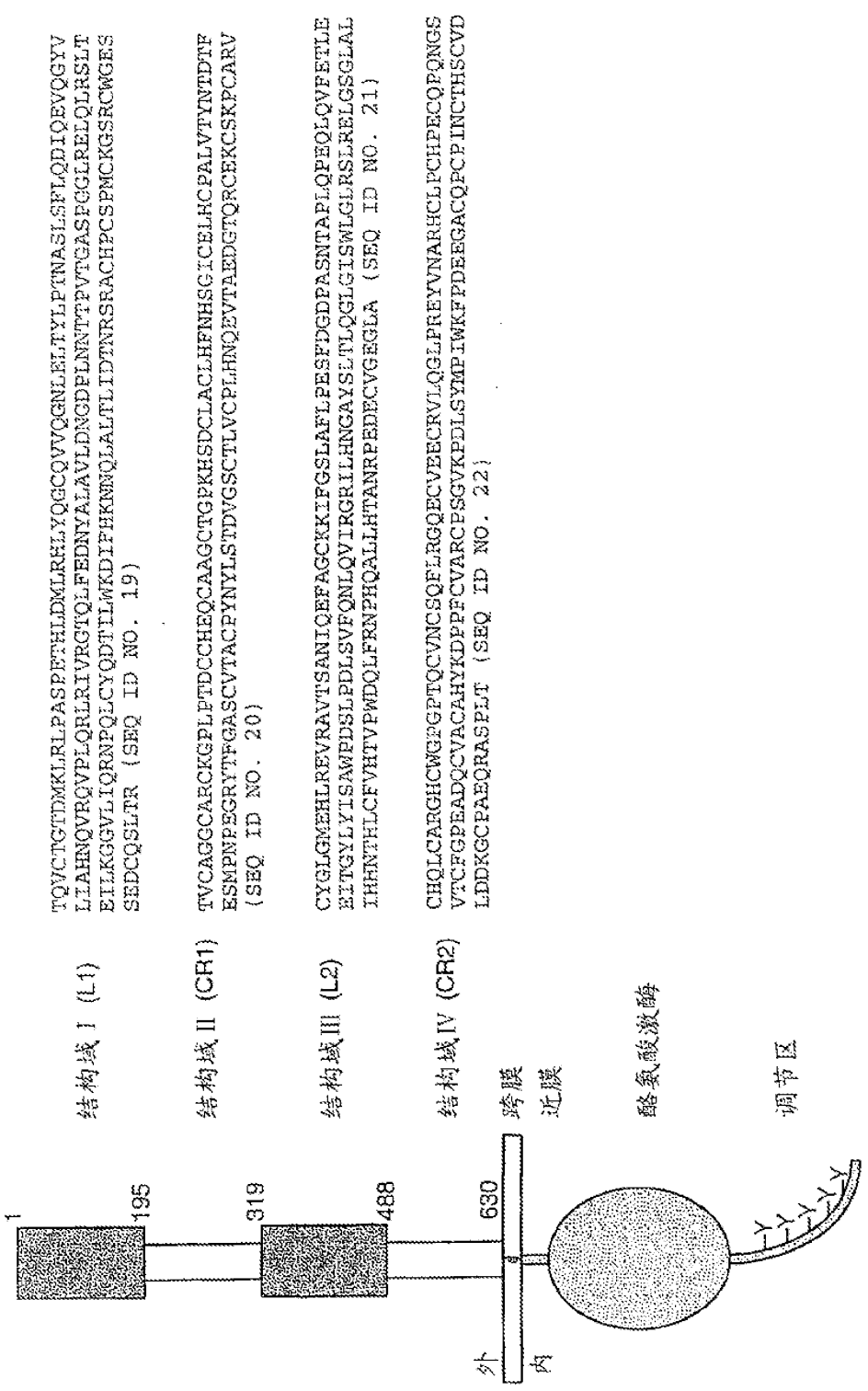

结构域 I (L1)
TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYV
LIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLT
EILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGES
SEDCQSLTR (SEQ ID NO. 19)
结构域 II (CR1)
TVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTF
ESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARV
(SEQ ID NO. 20)
结构域III (L2)
CYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLE
EITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLAL
IHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLA (SEQ ID NO. 21)
结构域IV (CR2)
CHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGS
VTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVD
LDDKGCPAEQRASPLT (SEQ ID NO. 22)
1
195
319
488
630
跨膜
近膜
酪氨酸激酶
调节区
外
内

图 1

轻链可变区

```
                  10        20          30          40
2C4      DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDVSIGVA] WYQQRP
          **    **** *      *                      *
574      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDVSIGVA] WYQQKP
                                  *   ** ***
hum κI   DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQSISNYLA] WYQQKP

                  50          60         70         80
2C4      GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA
          **                  *  *          *    * *
574      GKAPKLLIY [SASYRYT] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
                   * *****
hum κI   GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

                  90         100
2C4      EDLAVYYC [QQYYIYPYT] FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)
           * *                 *   *
574      EDFATYYC [QQYYIYPYT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)
                     *** *
hum κI   EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)
```

图 2A

重链可变区

```
                  10        20          30          40
2C4      EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS [GFTFTDYTMD] WVKQS
           **  **  *  * ***  *                    * *
574      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFTDYTMD] WVRQA
                                     ** * *
hum III  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA

                  50 a      60          70         80
2C4      HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] KASLTVDRSSRIVYM
          *  *   **                    *** *    **** *
574      PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] RFTLSVDRSKNTLYL
                   ****** *** ****       * * *
hum III  PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNSKNTLYL

                  abc 90         100ab        110
2C4      ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)
          ***  **                                  **
574      QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)
                           ********
hum III  QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:6)
```

图 2B

Pertuzumab的轻链氨基酸序列

```
1         10        20        30        40        50        60
|         |         |         |         |         |         |
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS

          70        80        90        100       110       120
          |         |         |         |         |         |
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

                  130       140       150       160       170       180
                  |         |         |         |         |         |
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT

                  190       200       210
                  |         |         |
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

图 3A

Pertuzumab的重链氨基酸序列

```
1         10        20        30        40        50        60
|         |         |         |         |         |         |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY

          70        80        90        100       110       120
          |         |         |         |         |         |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSA

                  130       140       150       160       170       180
                  |         |         |         |         |         |
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

                  190       200       210       220       230       240
                  |         |         |         |         |         |
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

                  250       260       270       280       290       300
                  |         |         |         |         |         |*
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS

                  310       320       330       340       350       360
                  |         |         |         |         |         |
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM

                  370       380       390       400       410       420
                  |         |         |         |         |         |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

                  430       440       448
                  |         |         |
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
```

图 3B

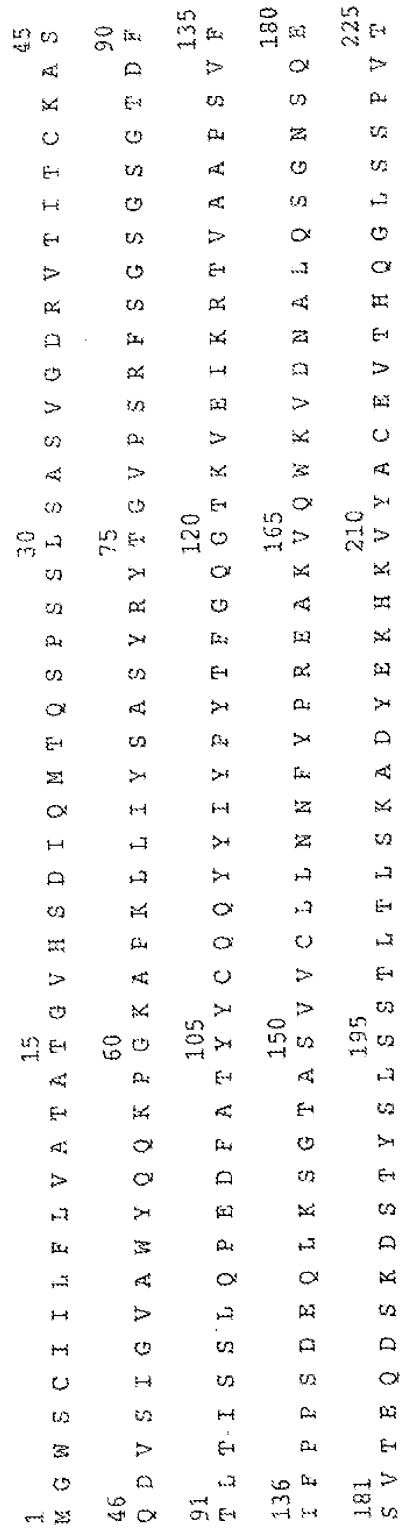

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S
46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F
91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F
136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E
181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T
226 K S F N R G E C (SEQ ID NO. 17)
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
195
210
225
233

图 4A

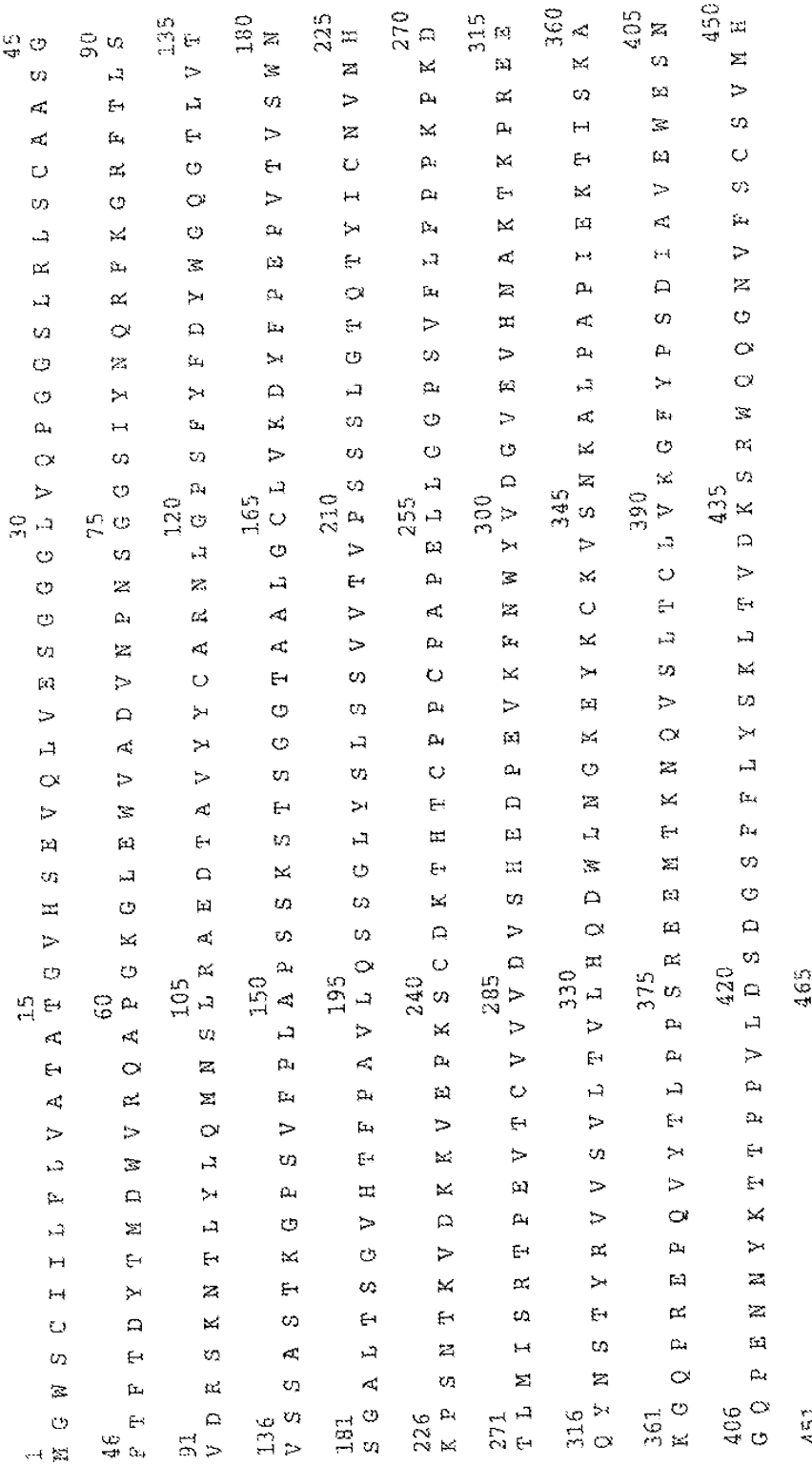

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G
46 P T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S
91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T
136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H
226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D
271 T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E
316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A
361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H
451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO. 18)
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
195
210
225
240
255
270
285
300
315
330
345
360
375
390
405
420
435
450
465

图 4B

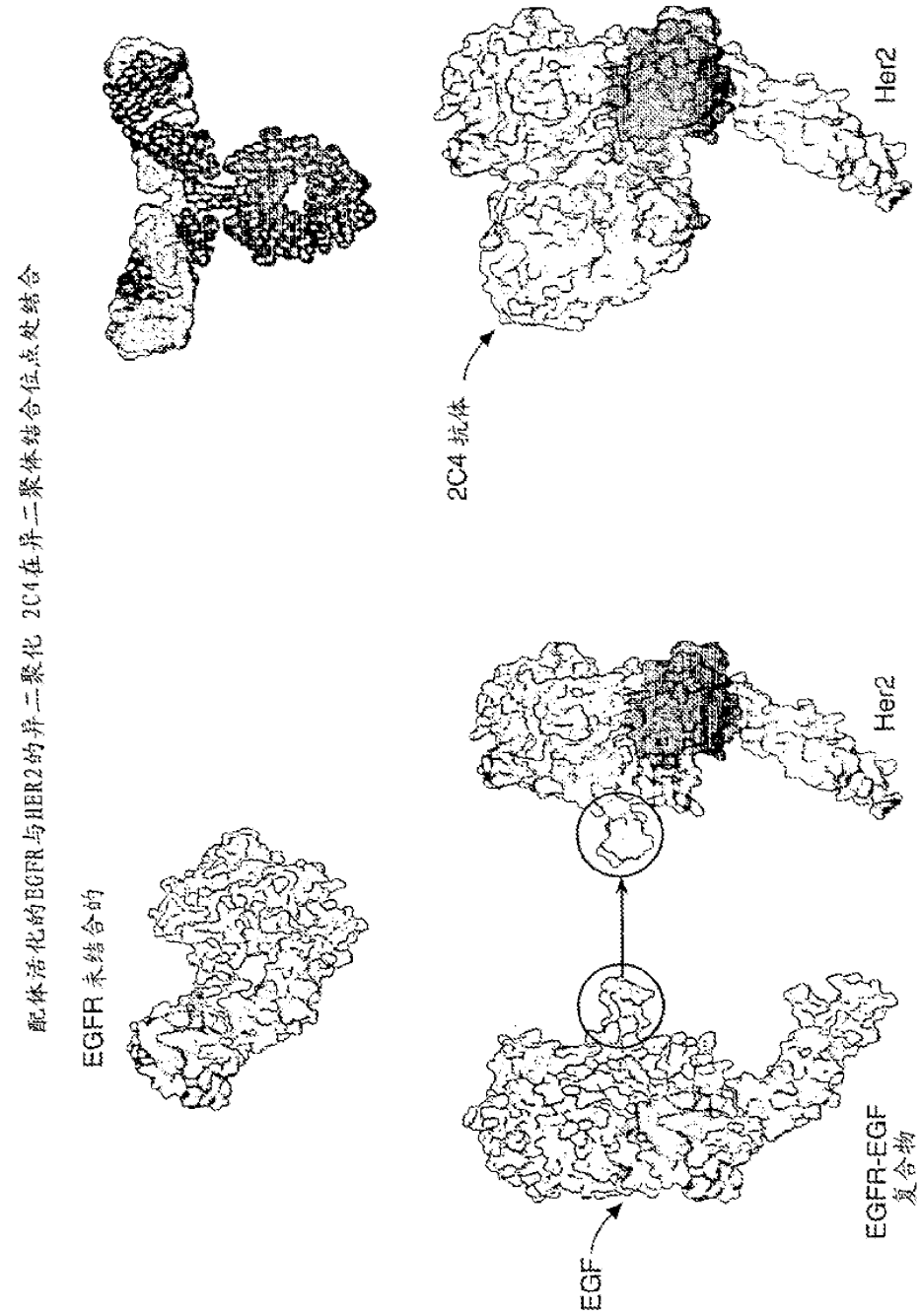

配体活化的EGFR与HER2的异二聚化 2C4在异二聚体结合位点处结合
EGFR 未结合的
2C4 抗体
Her2
EGF
EGFR-EGF
复合物
Her2

图 5

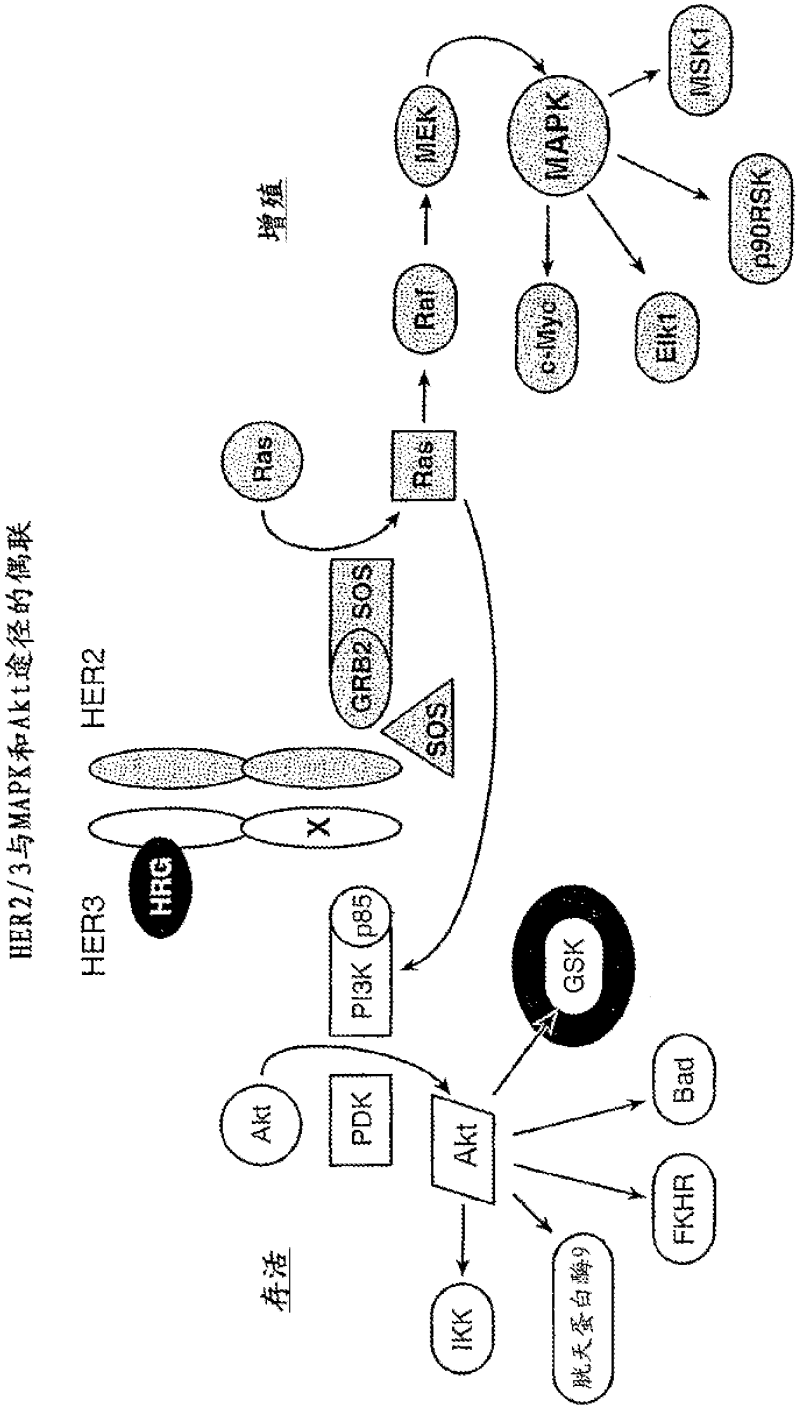
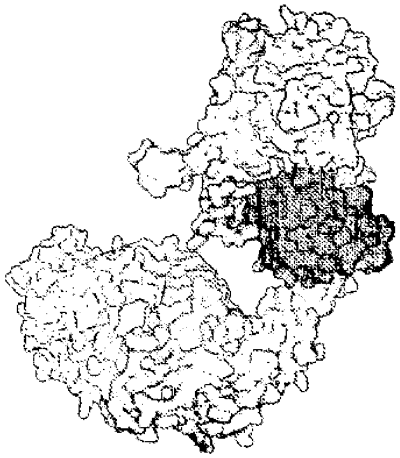

HER2/3与MAPK和Akt途径的偶联
HER3
HER2
HRG
X
SOS
GRB2
SOS
Ras
Ras
Raf
MEK
MAPK
MSK1
p90RSK
c-Myc
Elk1
增殖
PI3K
p85
GSK
Akt
PDK
Akt
Bad
FKHR
IKK
胱天蛋白酶9
存活

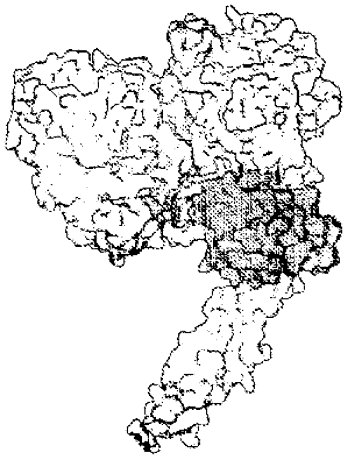
图 6

Trastuzumab
Herceptin



- 在IV中JM附近结合
- 防止受体脱落
- 适度影响受体下调
- 对HER2作为共同受体的角色有轻微影响

Pertuzumab
Omnitarg



- 在II中二聚化界面处结合
- 不能防止受体脱落
- 适度影响受体下调
- 对HER2作为共同受体的角色有较大影响

图 7

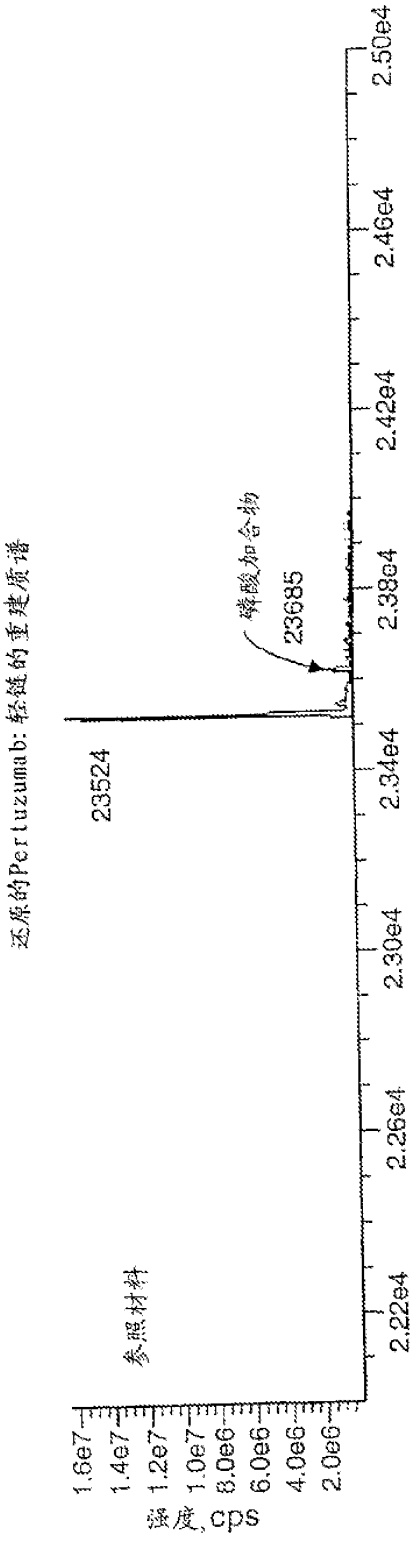

还原的Pertuzumab: 轻链的重建质谱
参照材料
23524
磷酸加合物
23685
强度, cps
质量, amu
1.6e7
1.4e7
1.2e7
1.0e7
8.0e6
6.0e6
4.0e6
2.0e6
2.22e4
2.26e4
2.30e4
2.34e4
2.38e4
2.42e4
2.46e4
2.50e4

图 8A-1

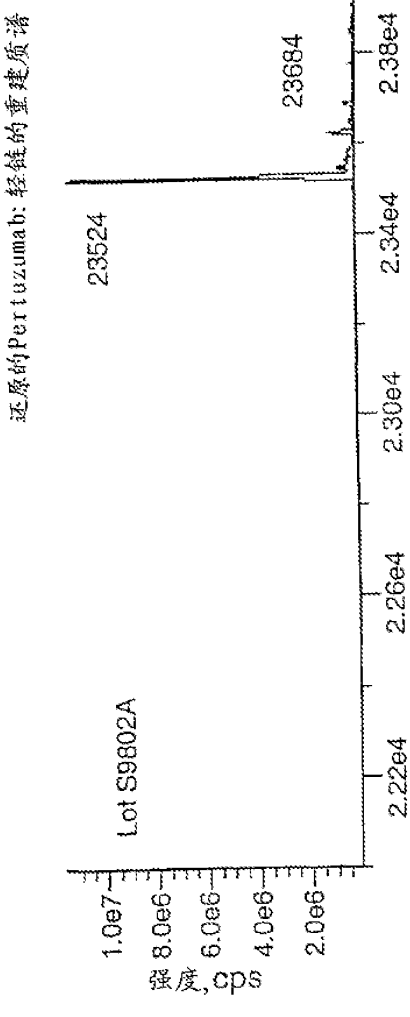

还原的Pertuzumab: 轻链的重建质谱
Lot S9802A
23524
23684
强度, cps
质量, amu
1.0e7
8.0e6
6.0e6
4.0e6
2.0e6
2.22e4
2.26e4
2.30e4
2.34e4
2.38e4
2.42e4
2.46e4
2.50e4

图 8A-2

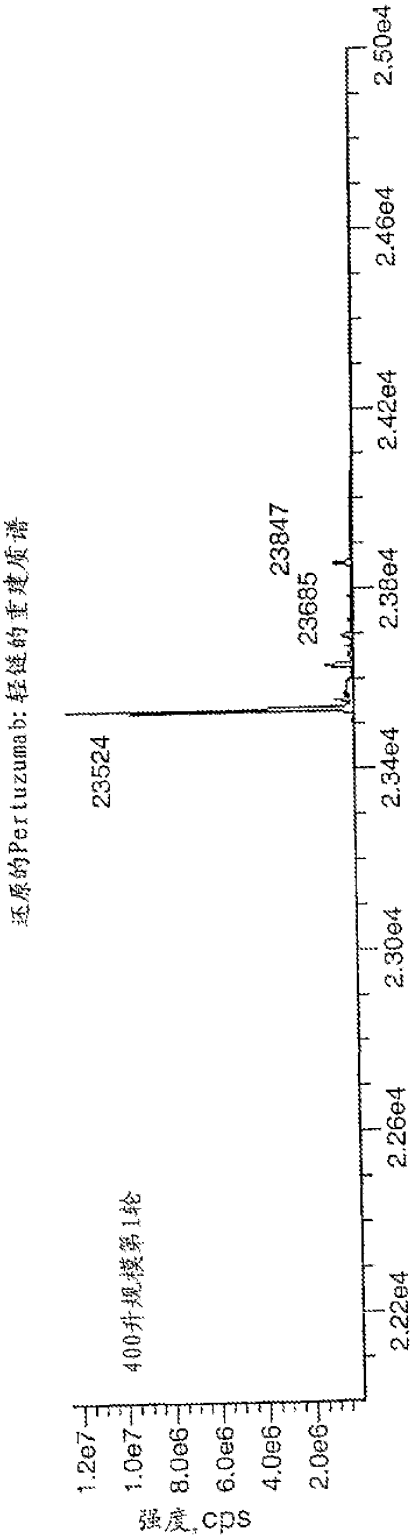

还原的Pertuzumab: 轻链的重建质谱
400升规模第1轮
强度, cps
1.2e7
1.0e7
8.0e6
6.0e6
4.0e6
2.0e6
23524
23685
23847
2.22e4
2.26e4
2.30e4
2.34e4
2.38e4
2.42e4
2.46e4
2.50e4
质量, amu

图 8A-3

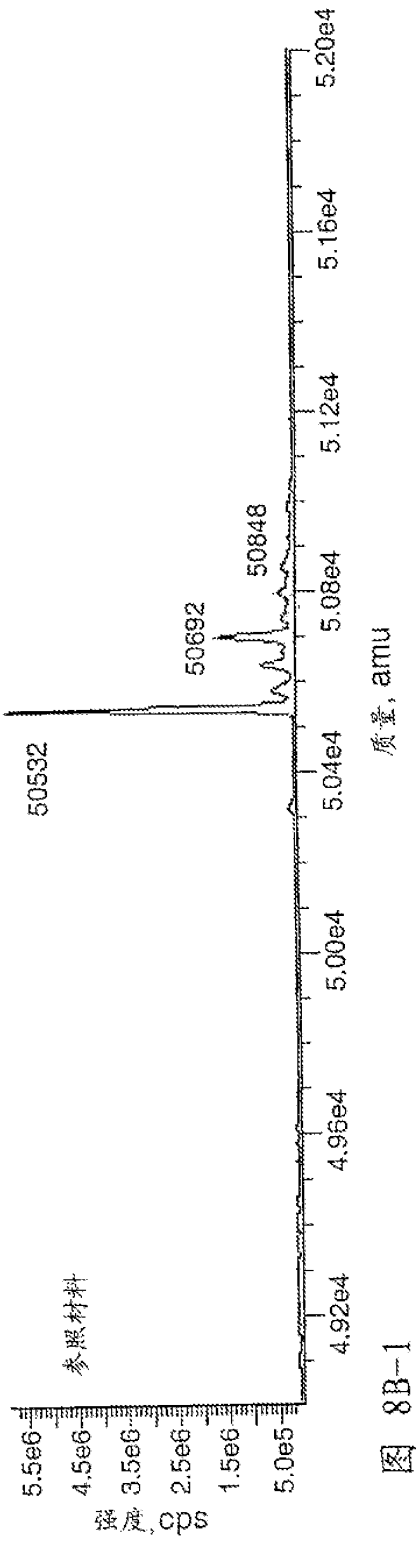

还原的Pertuzumab: 重链的重建质谱
参照材料
强度, cps
5.5e6
4.5e6
3.5e6
2.5e6
1.5e6
5.0e5
50532
50692
50848
4.92e4
4.96e4
5.00e4
5.04e4
5.08e4
5.12e4
5.16e4
5.20e4
质量, amu

图 8B-1

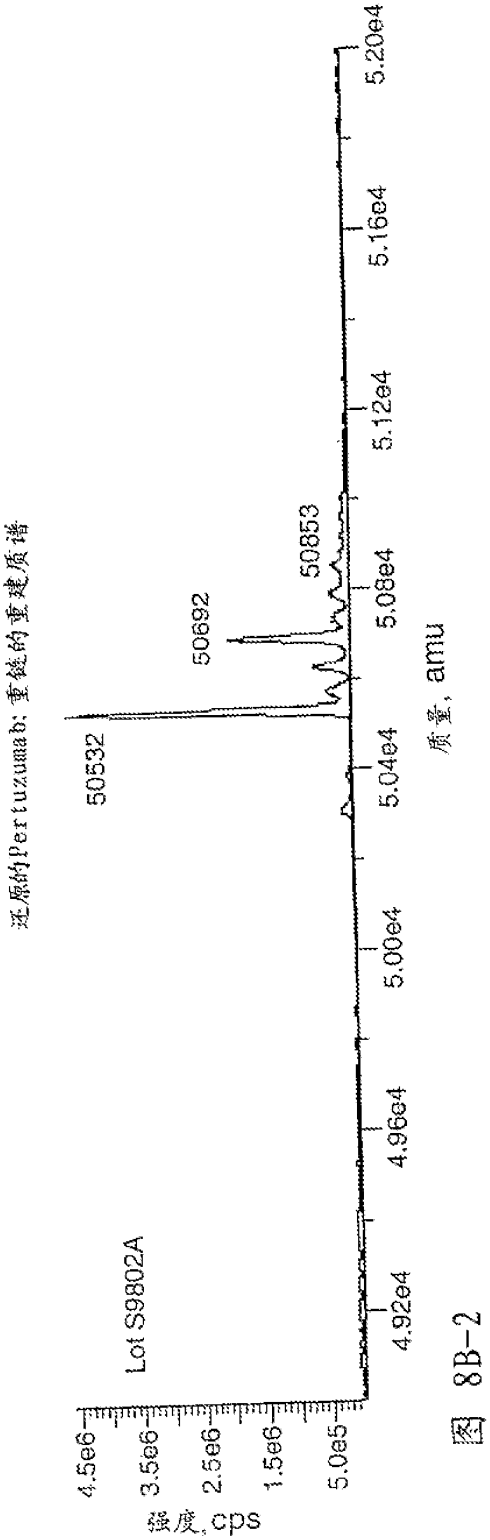

还原的Pertuzumab: 重链的重建质谱
Lot S9802A
50532
50692
50853
4.5e6
3.5e6
2.5e6
1.5e6
5.0e5
4.92e4
4.96e4
5.00e4
5.04e4
5.08e4
5.12e4
5.16e4
5.20e4
质量, amu
强度, cps

图 8B-2

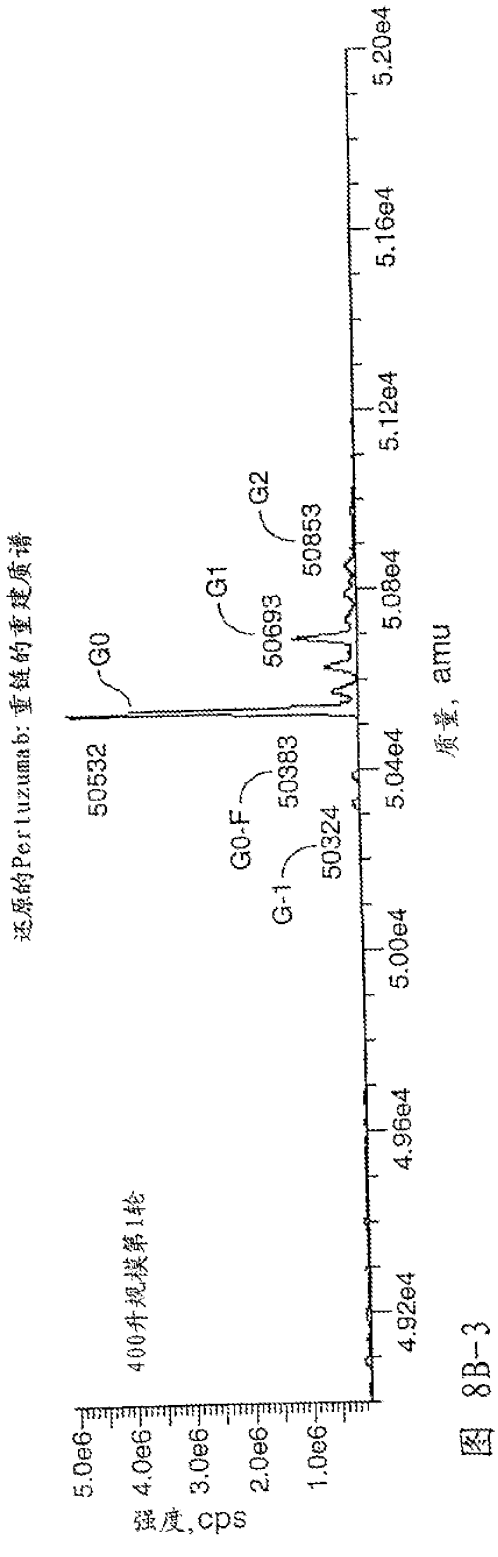

还原的Pertuzumab: 重链的重建质谱
400升规模第1轮
G0
G1
G2
G0-F
G-1
50532
50693
50853
50383
50324
5.0e6
4.0e6
3.0e6
2.0e6
1.0e6
4.92e4
4.96e4
5.00e4
5.04e4
5.08e4
5.12e4
5.16e4
5.20e4
质量, amu
强度, cps

图 8B-3

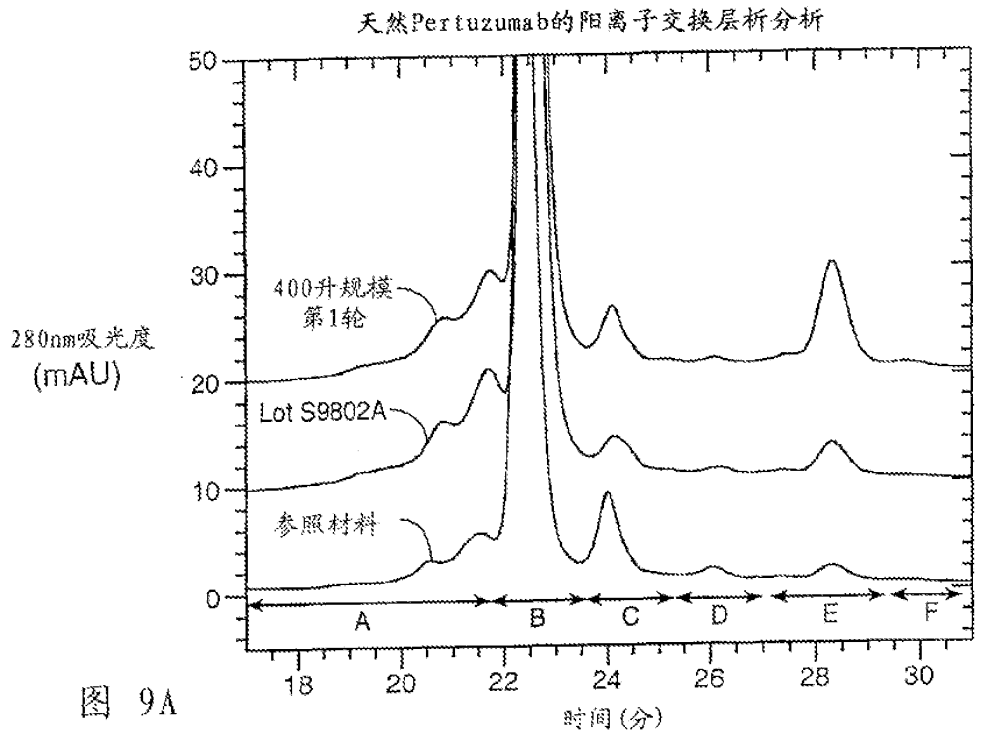

天然Pertuzumab的阳离子交换层析分析
280nm吸光度
(mAU)
400升规模
第1轮
Lot S9802A
参照材料
A
B
C
D
E
F
时间(分)

图 9A

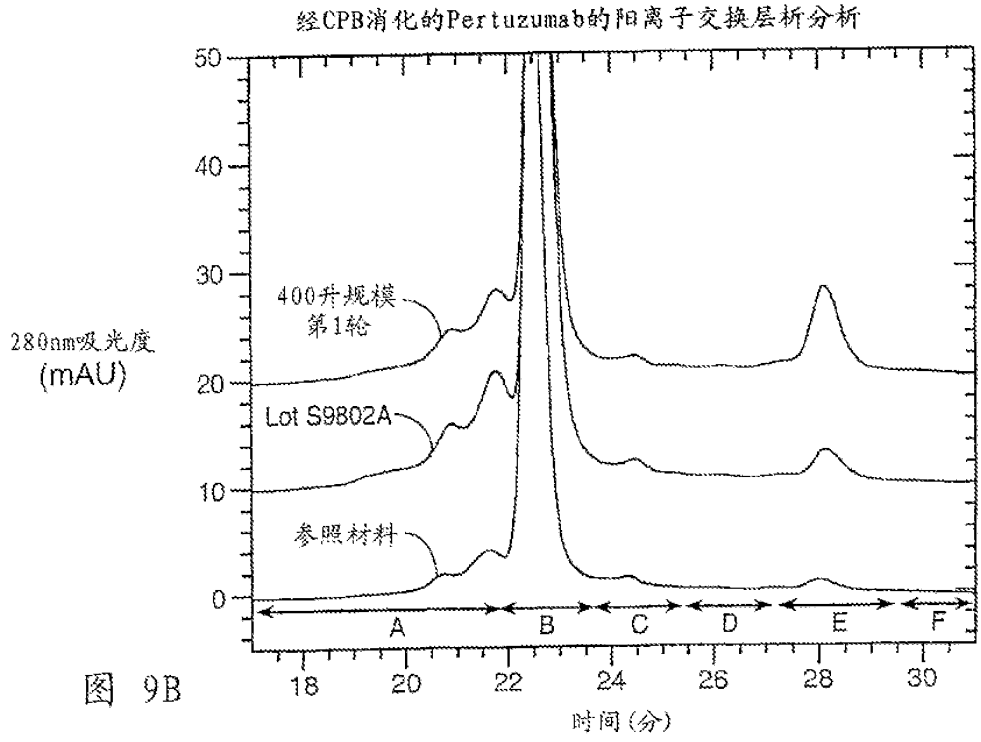

经CPB消化的Pertuzumab的阳离子交换层析分析
280nm吸光度
(mAU)
400升规模
第1轮
Lot S9802A
参照材料
A
B
C
D
E
F
时间(分)

图 9B

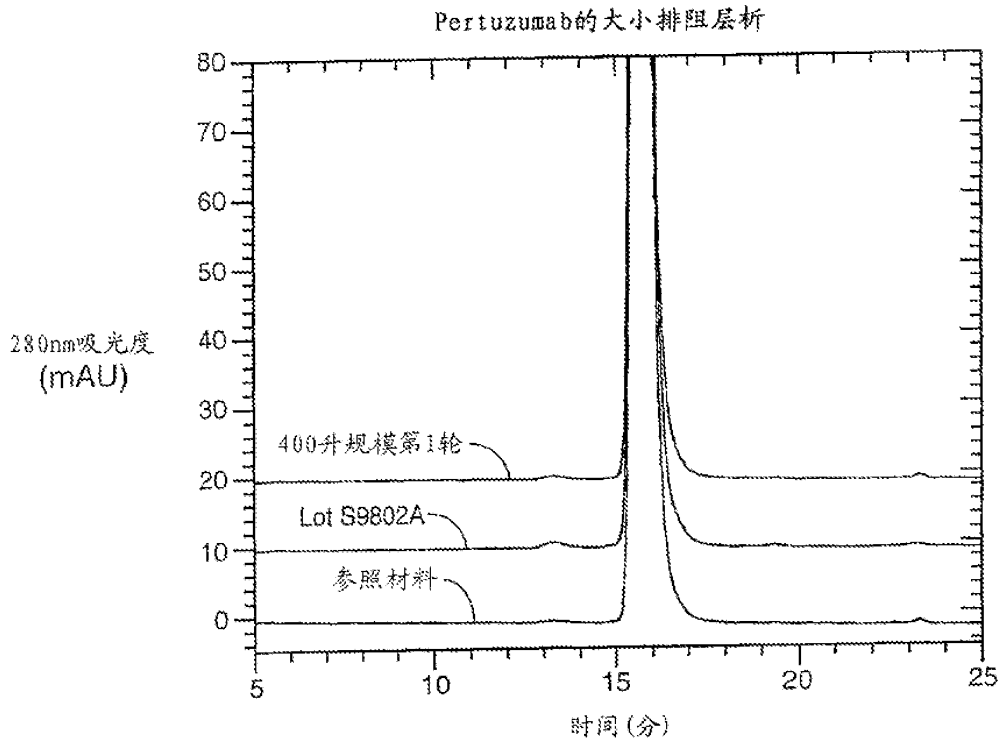

Pertuzumab的大小排阻层析
280nm吸光度
(mAU)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
400升规模第1轮
Lot S9802A
参照材料
5
10
15
20
25
时间(分)

图 10

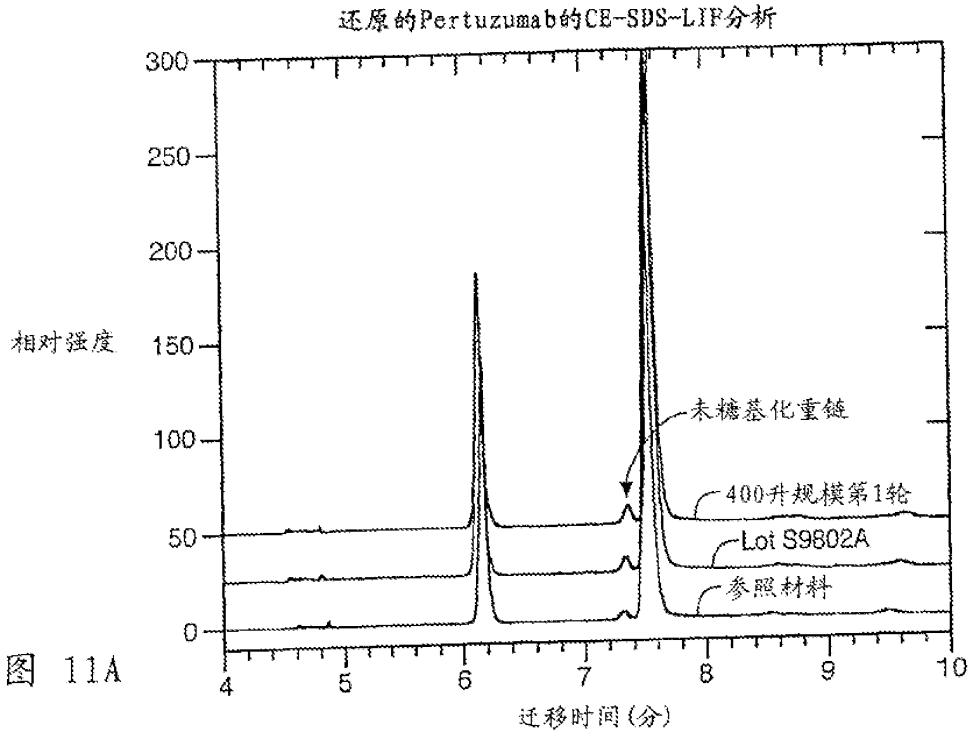

还原的Pertuzumab的CE-SDS-LIF分析
相对强度
300
250
200
150
100
50
0
4
5
6
7
8
9
10
迁移时间(分)
未糖基化重链
400升规模第1轮
Lot S9602A
参照材料

图 11A

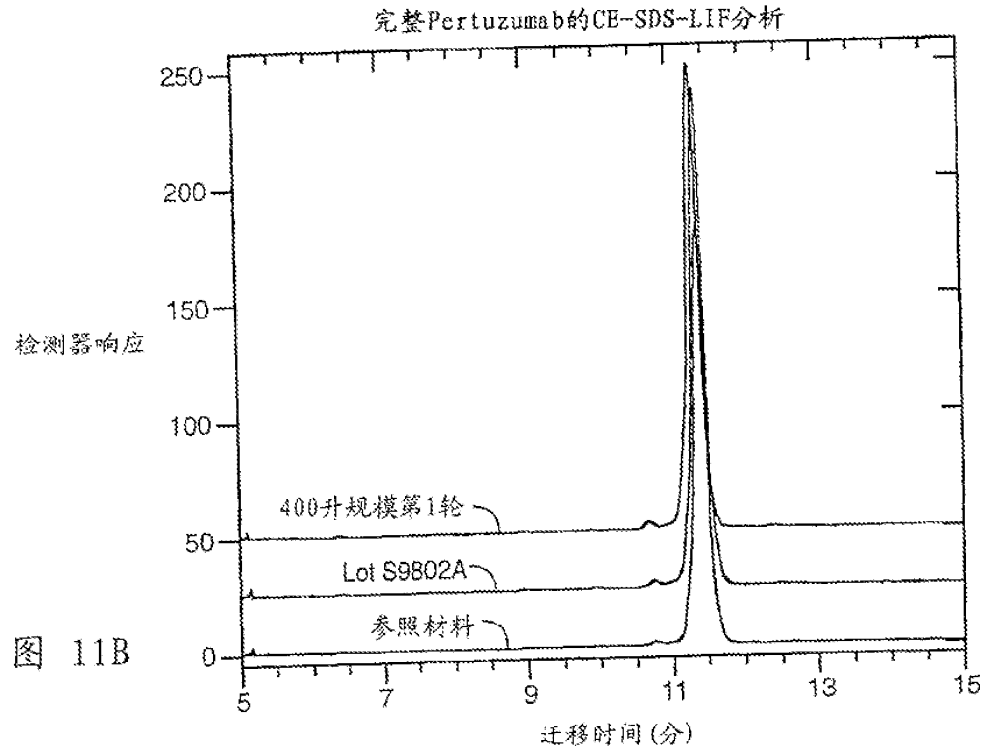

完整Pertuzumab的CE-SDS-LIF分析
检测器响应
250
200
150
100
50
0
5
7
9
11
13
15
迁移时间(分)
400升规模第1轮
Lot S9802A
参照材料

图 11B

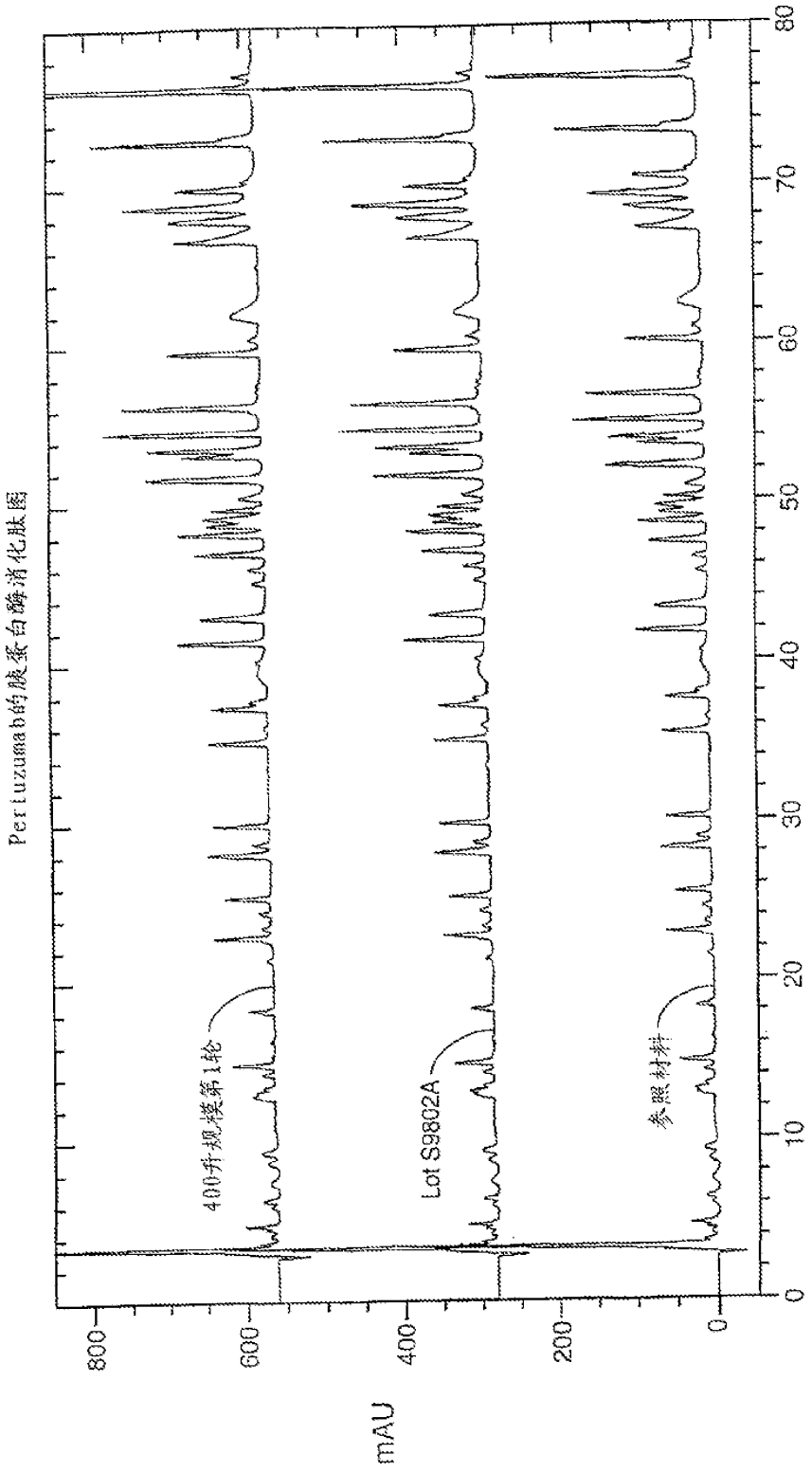

Pertuzumab的胰蛋白酶消化肽图
400升规模第1轮
Lot S9802A
参照材料
mAU
时间(分)
0
200
400
600
800
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图 12A

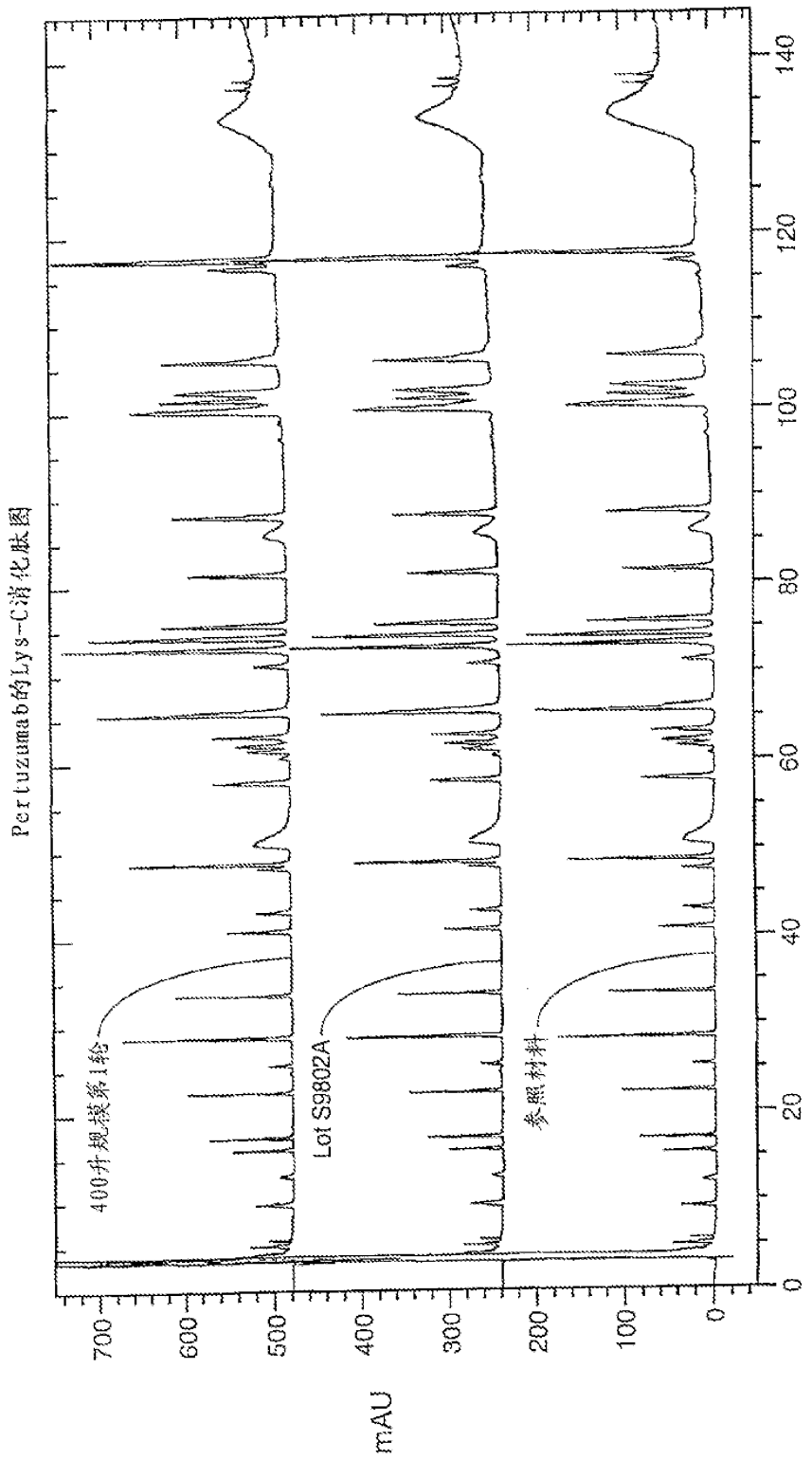

Pertuzumab的Lys-C消化肽图
400升规模第1轮
Lot S9802A
参照材料
mAU
700
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
120
140
时间(分)

图 12B

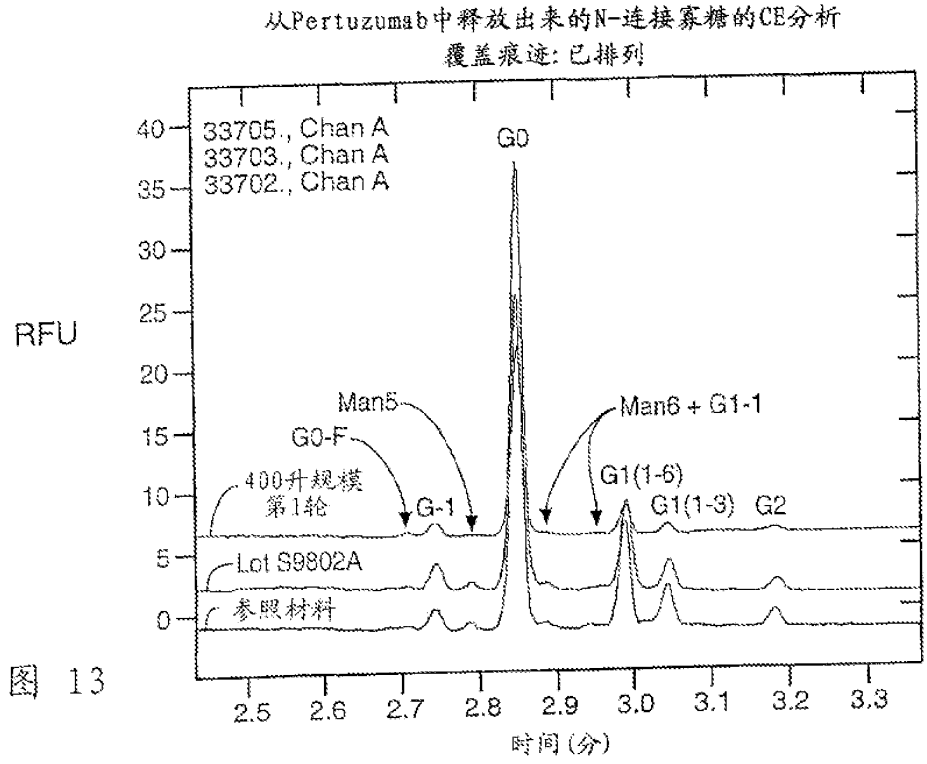

从Pertuzumab中释放出来的N-连接寡糖的CE分析
覆盖痕迹: 已排列
33705., Chan A
33703., Chan A
33702., Chan A
G0
Man5
G0-F
G-1
400升规模
第1轮
Man6 + G1-1
G1(1-6)
G1(1-3)
G2
Lot S9802A
参照材料
RFU
40
35
30
25
20
15
10
5
0
2.5
2.6
2.7
2.8
2.9
3.0
3.1
3.2
3.3
时间(分)

图 13

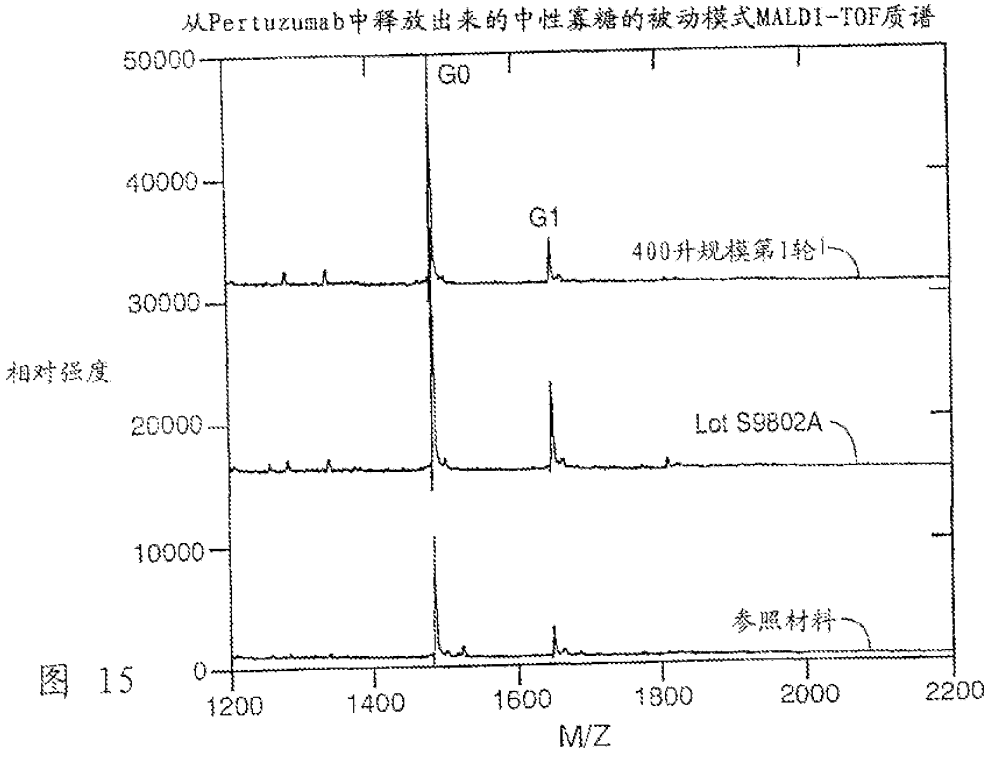

从Pertuzumab中释放出来的中性寡糖的被动模式MALDI-TOF质谱
G0
G1
400升规模第1轮
Lot S9802A
参照材料
相对强度
50000
40000
30000
20000
10000
0
1200
1400
1600
1800
2000
2200
M/Z

图 15

常常在IgG抗体中观察到的寡糖结构

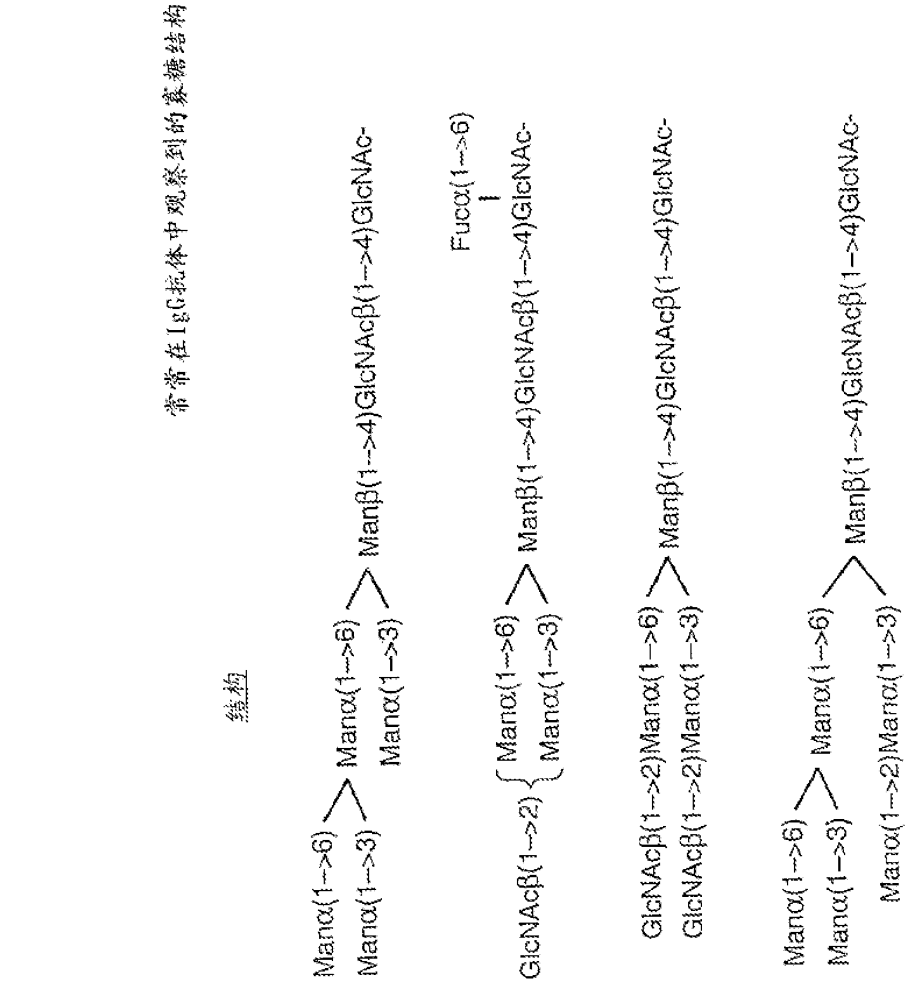


图 14A

常常在IgG抗体中观察到的寡糖结构

结构	缩写	质量
Fucα(1-->6) | Galβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->6) Manα(1-->3)Manβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->4)GlcNAc-	G1-1	1423
Fucα(1-->6) | GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->6) GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->3)Manβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->4)GlcNAc-	G0	1463
Fucα(1-->6) | Galβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->6) GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->3)Manβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->4)GlcNAc-	G1 (1-6)	1626
Fucα(1-->6) | GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->6) Galβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->3)Manβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->4)GlcNAc-	G1 (1-3)	1626
Fucα(1-->6) | Galβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->6) Galβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->2)Manα(1-->3)Manβ(1-->4)GlcNAcβ(1-->4)GlcNAc-	G2	1788

此图中显示的分子量对应于 $(M+Na)^+$ 值

图 14B

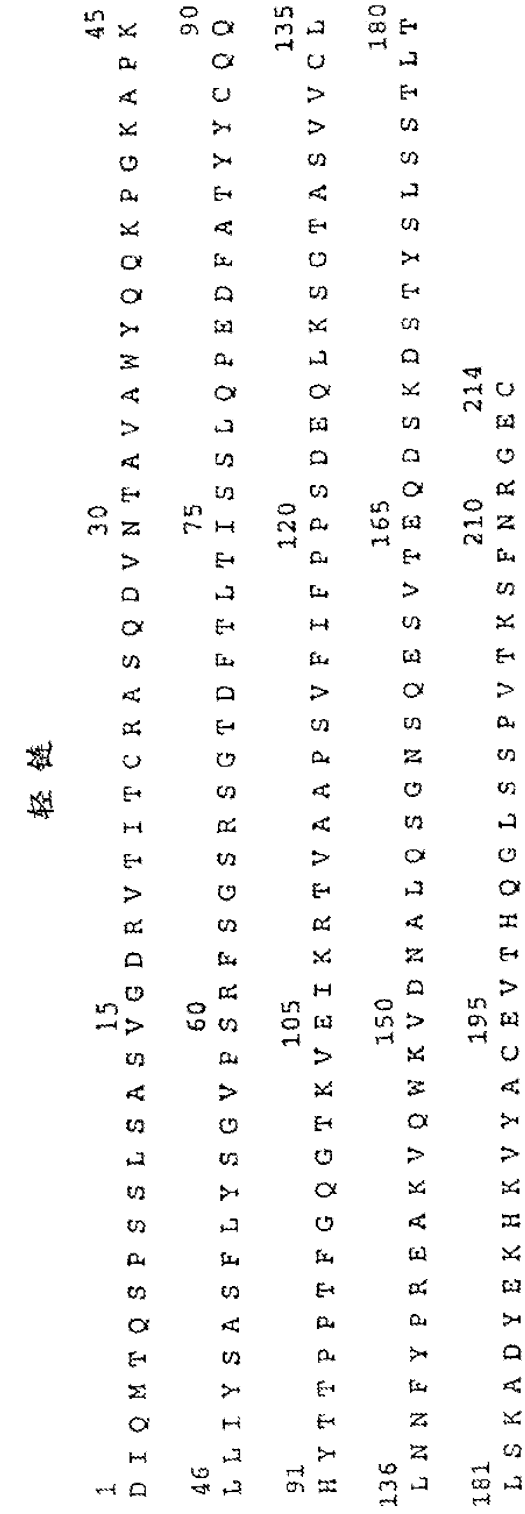

轻链
1
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K
15
30
45
46
L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
60
75
90
91
H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
105
120
135
136
L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
150
165
180
181
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
195
210
214

图 16A

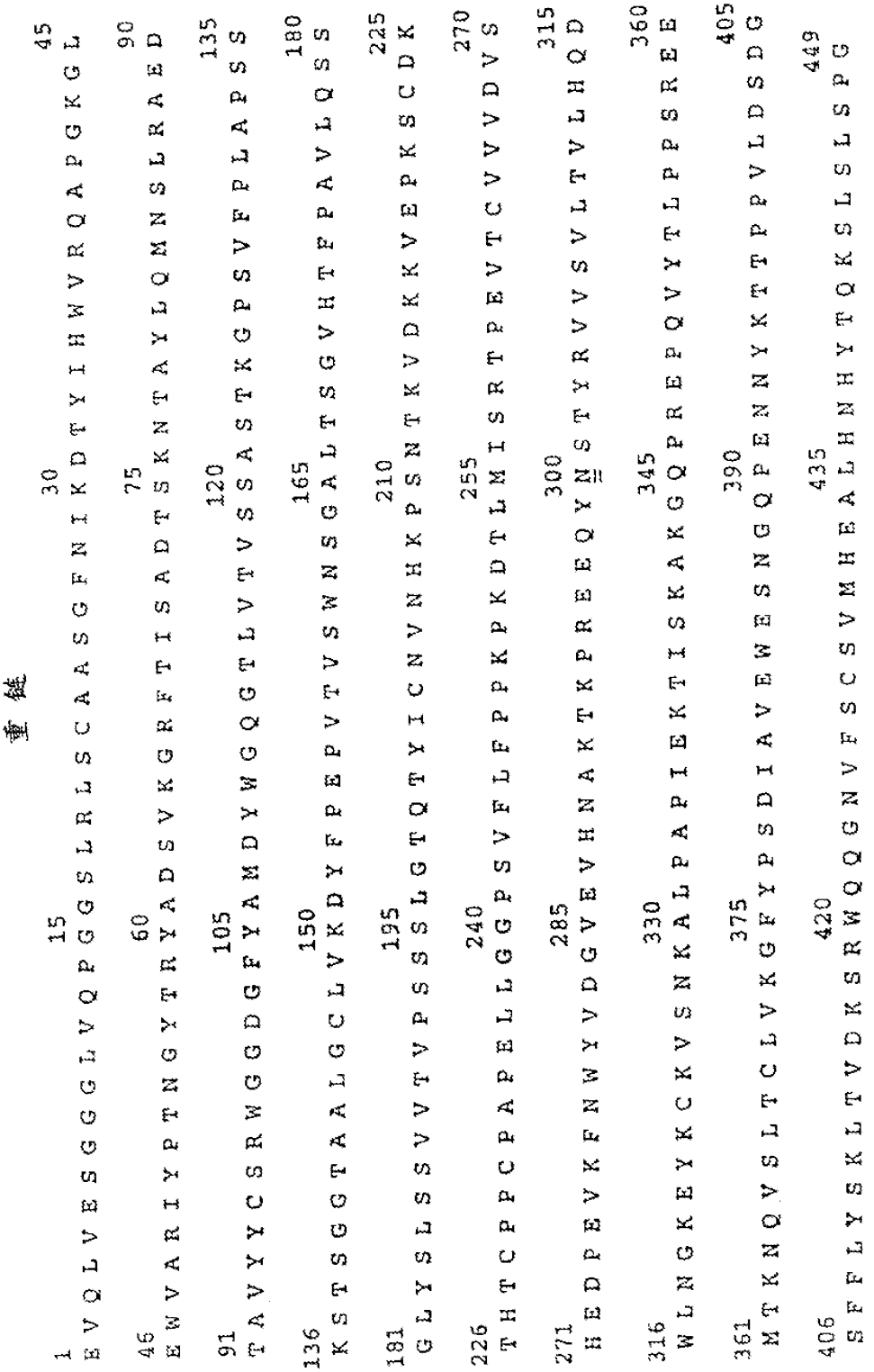

重链
1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L
15
30
45
46 E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D
60
75
90
91 T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S
105
120
135
136 K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
150
165
180
181 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K
195
210
225
226 T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S
240
255
270
271 H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
285
300
315
316 W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
330
345
360
361 M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
375
390
405
406 S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G

图 16B

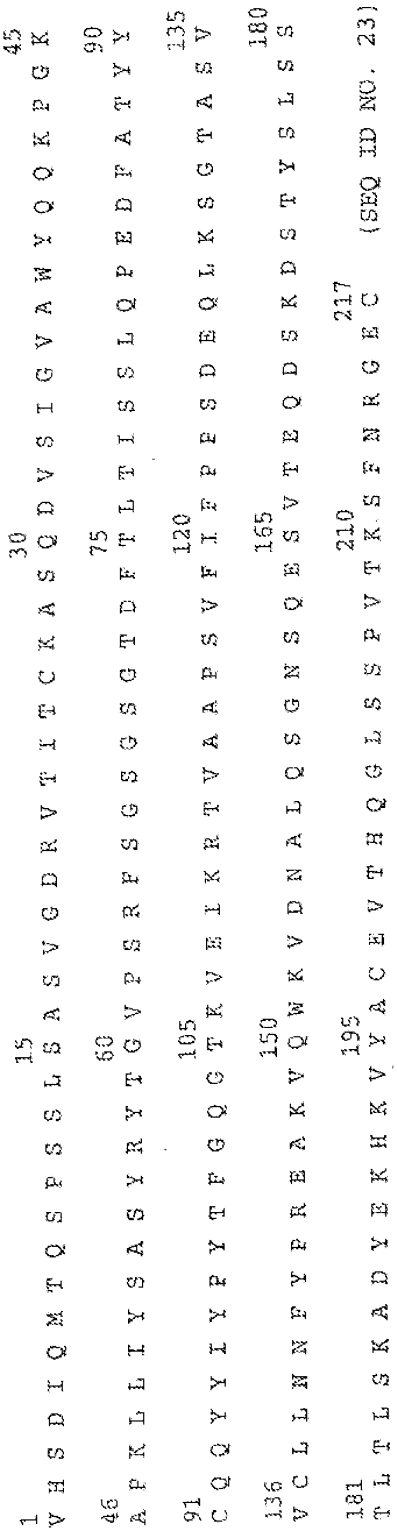
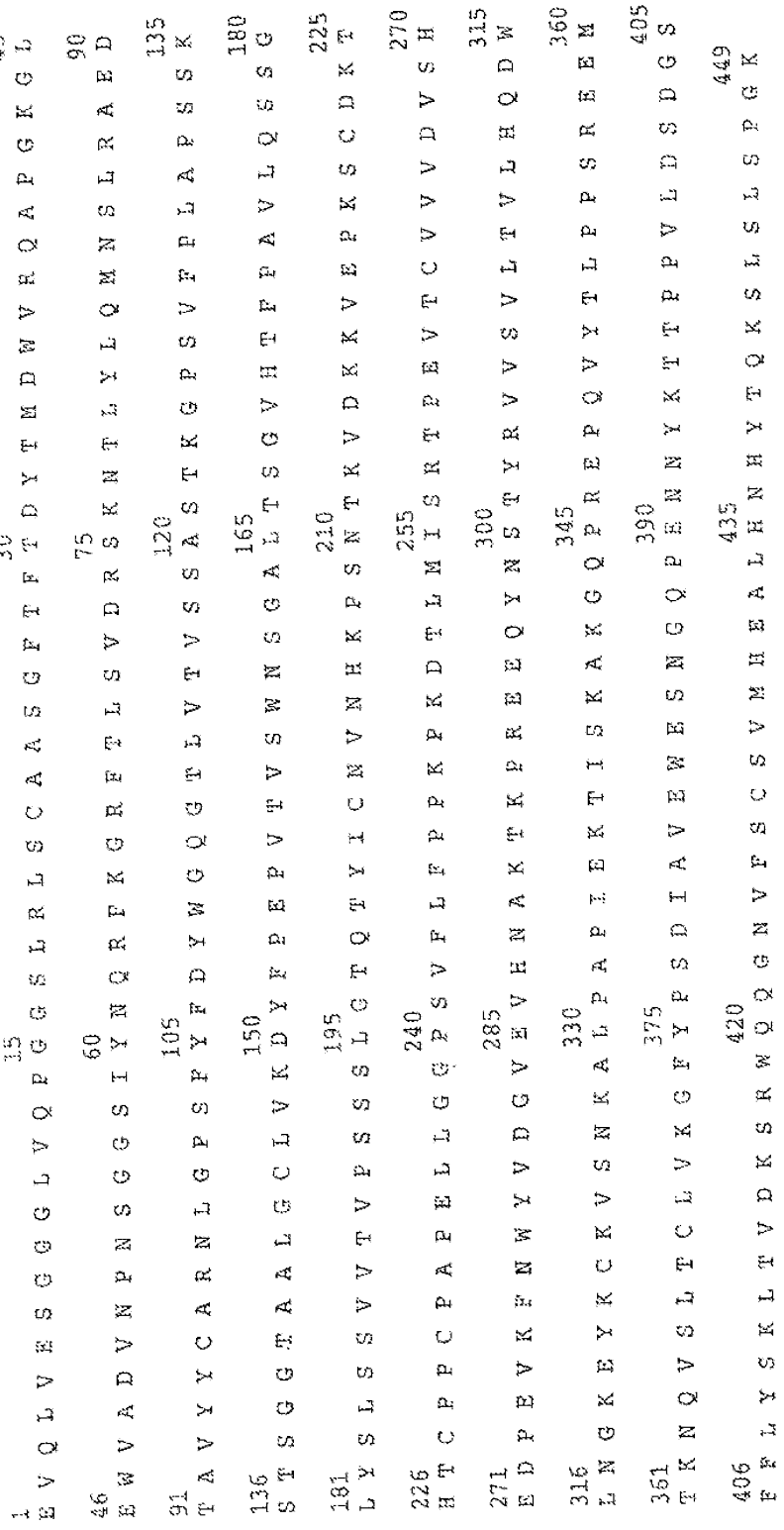

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K
46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y
91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S
181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (SEQ ID NO. 23)

图 17A



(SEQ ID NO. 24)

图 17B

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780026117.5

[43] 公开日 2009 年 7 月 22 日

[11] 公开号 CN 101490087A

[22] 申请日 2007.5.29
[21] 申请号 200780026117.5
[30] 优先权
[32] 2006. 5.30 [33] US [31] 60/809,328
[32] 2007. 3.29 [33] US [31] 60/908,941
[32] 2007. 4.13 [33] US [31] 60/911,829
[86] 国际申请 PCT/US2007/069889 2007.5.29
[87] 国际公布 WO2007/140371 英 2007.12.6
[85] 进入国家阶段日期 2009.1.9
[71] 申请人 健泰科生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 小艾伦·J·埃本斯
阿兰·M·格雷 梁伟庆 吴 雁
于尚凡
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴

权利要求书 19 页 说明书 208 页 序列表 38 页
附图 31 页

[54] 发明名称

抗体和免疫偶联物及其用途

[57] 摘要

提供了抗 CD22 抗体及其免疫偶联物。 提供了使用抗 CD22 抗体及其免疫偶联物的方法。

1. 一种结合CD22的抗体，其中该抗体包含：(a) HVR-L1，其包含选自SEQ ID NO:9、10、19-23、32和33的氨基酸序列，和(b) 至少一种、两种、三种、四种或五种HVR，其选自
(1) HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；
(2) HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；
(3) HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列；
(4) HVR-L2，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；和
(5) HVR-L3，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。
2. 权利要求1的抗体，该抗体包含HVR-L1，其包含符合共有序列SEQ ID NO:10的氨基酸序列。
3. 权利要求2的抗体，该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
4. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:9，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
5. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:19，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
6. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:20，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
7. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:21，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

8. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:22，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
9. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:23，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
10. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:32，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
11. 权利要求1的抗体，其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:33，且该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；和HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
12. 权利要求1的抗体，该抗体进一步包含至少一种框架，其选自VH亚组III共有框架和VL亚组I共有框架。
13. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含重链可变域，其与选自SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
14. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含轻链可变域，其与选自SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
15. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含轻链可变域，其与选自SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
16. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含重链可变域，其包含一种、两种、三种或四种选自SEQ ID NO:1、3、5和7的框架氨基酸序列。
17. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含轻链可变域，其包含一种、两种、三种或四种选自SEQ ID NO:8、11、13和15的框架氨基酸序列。
18. 权利要求13的抗体，该抗体进一步包含轻链可变域，其与选自SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
19. 权利要求13的抗体，该抗体进一步包含轻链可变域，其与选自SEQ ID

NO:18的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。

20. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含重链，其与选自SEQ ID NO:88的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
21. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含轻链，其与选自SEQ ID NO:87的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
22. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含具有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链和具有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的轻链。
23. 一种结合CD22的抗体，其中该抗体包含重链可变域，其与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
24. 权利要求23的抗体，该抗体进一步包含轻链可变域，其与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
25. 权利要求23的抗体，该抗体进一步包含轻链可变域，其与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。
26. 权利要求1的抗体，其中该抗体包含一种、两种、三种、四种、五种或六种来自杂交瘤ATCC编号PTA-7621 (10F4.4.1)所产生的抗体的HVR。
27. 一种抗体，该抗体包含一种、两种、三种、四种、五种或六种来自杂交瘤ATCC编号PTA-7620 (5E8.1.8)所产生的抗体的HVR。
28. 权利要求1的抗体，其中该抗体是人源化的。
29. 权利要求23的抗体，其中该抗体是人源化的。
30. 权利要求1的抗体，其中所述CD22是哺乳动物CD22。
31. 权利要求30的抗体，其中所述CD22选自啮齿类CD22和灵长类CD22。
32. 权利要求31的抗体，其中所述CD22是人CD22。
33. 权利要求23的抗体，其中所述CD22是哺乳动物CD22。
34. 权利要求33的抗体，其中所述CD22选自啮齿类CD22和灵长类CD22。
35. 权利要求34的抗体，其中所述CD22是人CD22。
36. 一种编码权利要求1的抗体的多核苷酸。
37. 一种编码权利要求23的抗体的多核苷酸。
38. 一种包含权利要求36的多核苷酸的载体。
39. 一种包含权利要求37的多核苷酸的载体。
40. 一种包含权利要求38的载体的宿主细胞。
41. 一种包含权利要求39的载体的宿主细胞。

42. 权利要求40的宿主细胞，其中该宿主细胞是真核的。
43. 权利要求42的宿主细胞，其中该宿主细胞是CHO细胞。
44. 权利要求41的宿主细胞，其中该宿主细胞是真核的。
45. 权利要求44的宿主细胞，其中该宿主细胞是CHO细胞。
46. 一种制备抗CD22抗体的方法，其中该方法包括：a) 在适于表达编码该抗体的多核苷酸的条件下培养权利要求38的宿主细胞，和b) 分离该抗体。
47. 一种制备抗CD22抗体的方法，其中该方法包括：a) 在适于表达编码该抗体的多核苷酸的条件下培养权利要求39的宿主细胞，和b) 分离该抗体。
48. 权利要求28的抗体，其中所述CD22是在细胞表面上表达的。
49. 权利要求48的抗体，其中所述细胞是B细胞。
50. 权利要求29的抗体，其中所述CD22是在细胞表面上表达的。
51. 权利要求50的抗体，其中所述细胞是B细胞。
52. 权利要求1的抗体，其中该抗体结合CD22中SEQ ID NO:27的第22-240位氨基酸的区域内的表位。
53. 权利要求23的抗体，其中该抗体结合CD22中SEQ ID NO:27的第22-240位氨基酸的区域内的表位。
54. 权利要求49的抗体，其中所述B细胞与B细胞增殖性病症有关。
55. 权利要求54的抗体，其中所述B细胞增殖性病症是癌症。
56. 权利要求54的抗体，其中所述B细胞增殖性病症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。
57. 权利要求51的抗体，其中所述B细胞与B细胞增殖性病症有关。
58. 权利要求57的抗体，其中所述B细胞增殖性疾病是癌症。
59. 权利要求57的抗体，其中所述B细胞增殖性病症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白

血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

60. 权利要求1的抗体，其中该抗体是单克隆抗体。

61. 权利要求60的抗体，其中该抗体是抗体片段，其选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段。

62. 权利要求60的抗体，其中该抗体是人源化的。

63. 权利要求60的抗体，其中该抗体是人的。

64. 权利要求23的抗体，其中该抗体是单克隆抗体。

65. 权利要求64的抗体，其中该抗体是抗体片段，其选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段。

66. 权利要求64的抗体，其中该抗体是人源化的。

67. 权利要求64的抗体，其中该抗体是人的。

68. 权利要求1的抗体，其中该抗体与选自下组的抗体结合相同的表位：ATCC PTA-7621 (10F4.4.1)；ATCC PTA-7620 (5E8.1.8)；及包含SEQ ID NO:88的重链序列和SEQ ID NO:87的轻链序列的抗体。

69. 权利要求23的抗体，其中该抗体与选自下组的抗体结合相同的表位：ATCC PTA-7621 (10F4.4.1)；ATCC PTA-7620 (5E8.1.8)；及包含SEQ ID NO:88的重链序列和SEQ ID NO:87的轻链序列的抗体。

70. 一种检测CD22在生物学样品中存在的方法，该方法包括：使该生物学样品与权利要求1的抗体在容许该抗体结合至CD22的条件下接触，和检测该抗体和CD22之间是否形成复合物。

71. 权利要求70的方法，其中所述生物学样品来自怀疑患有B细胞增殖性病症的患者。

72. 权利要求71的方法，其中所述B细胞增殖性病症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

73. 一种检测CD22在生物学样品中存在的方法，该方法包括：使该生物学样品与权利要求23的抗体在容许该抗体结合至CD22的条件下接触，和检测该抗体和CD22之间是否形成复合物。

74. 权利要求73的方法，其中所述生物学样品来自怀疑患有B细胞增殖性病

症的患者。

75. 权利要求74的方法，其中所述B细胞增殖性病症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

76. 一种免疫偶联物，其包含共价附着至细胞毒剂的权利要求1的抗体。

77. 一种免疫偶联物，其包含共价附着至细胞毒剂的权利要求23的抗体。

78. 权利要求76的免疫偶联物，其中所述细胞毒剂选自毒素、化疗剂、药物模块、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

79. 权利要求78的免疫偶联物，该免疫偶联物具有通式Ab-(L-D)p，其中：

(a) Ab是权利要求1的抗体；

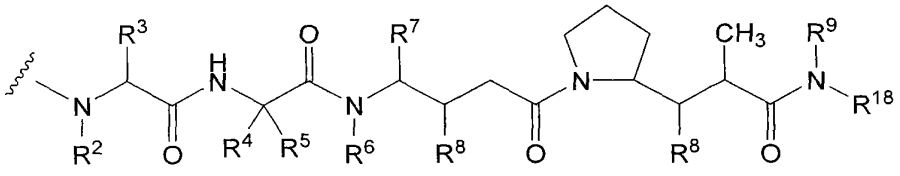
(b) L是接头；

(c) D是药物模块。

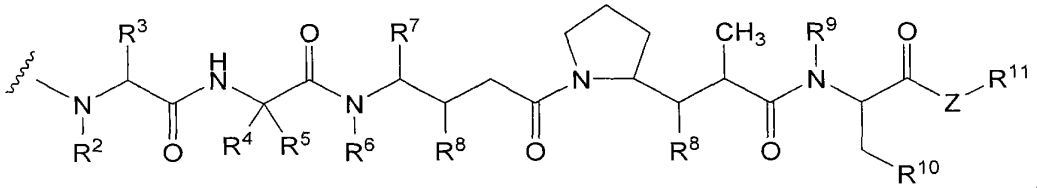
80. 权利要求79的免疫偶联物，其中L选自：6-马来酰亚氨基己酰基(MC)、马来酰亚氨基丙酰基(MP)、缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)、对氨基苄氧羰基(PAB)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。

81. 权利要求79的免疫偶联物，其中D选自auristatin和多拉司他汀。

82. 权利要求81的免疫偶联物，其中D是通式D_E或D_F的药物模块：



D_E



D_F

且其中R^2和R^6各自是甲基；R^3和R^4各自是异丙基；R^7是仲丁基；各个R^8独立地选自CH_3、O-CH_3、OH和H；R^9是H；R^{10}是芳基；Z是–O–

或–NH–; R^{11}是H、C_1-C_8烃基或–$(CH_2)_2$–O–$(CH_2)_2$–O–$(CH_2)_2$–O–CH_3; 和R^{18}是–$C(R^8)_2$–$C(R^8)_2$–芳基; 和

(d) p的范围为大约1至8。

83. 权利要求76的免疫偶联物，其具有体外或体内细胞杀伤活性。

84. 权利要求79的免疫偶联物，其中所述接头是经所述抗体上的硫醇基团附着至该抗体的。

85. 权利要求79的免疫偶联物，其中所述接头是蛋白酶可切割的。

86. 权利要求80的免疫偶联物，其中所述接头包含val-cit二肽。

87. 权利要求79的免疫偶联物，其中所述接头包含对氨基苄基单元。

88. 权利要求80的免疫偶联物，其中所述接头包含6-马来酰亚氨基己酰基。

89. 权利要求82的免疫偶联物，其中所述药物选自MMAE和MMAF。

90. 权利要求89的免疫偶联物，其中所述药物是MMAE。

91. 权利要求89的免疫偶联物，其中所述药物是MMAF。

92. 权利要求77的免疫偶联物，其中所述细胞毒剂选自毒素、化疗剂、药物模块、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

93. 权利要求92的免疫偶联物，该免疫偶联物具有通式Ab-(L-D)p，其中:

(a) Ab是权利要求23的抗体;

(b) L是接头;

(c) D是药物模块。

94. 权利要求93的免疫偶联物，其中L选自: 6-马来酰亚氨基己酰基(MC)、马来酰亚氨基丙酰基(MP)、缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(ala-phe)、对氨基苄氧羰基(PAB)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。

95. 权利要求93的免疫偶联物，其中所述接头L是蛋白酶可切割的。

96. 权利要求94的免疫偶联物，其中L包含val-cit二肽。

97. 权利要求93的免疫偶联物，其中L包含对氨基苄基单元。

98. 权利要求97的免疫偶联物，其中该对氨基苄基单元是对氨基苄氧羰基(PAB)。

99. 权利要求94的免疫偶联物，其中L包含6-马来酰亚氨基己酰基(MC)。

100. 权利要求94的免疫偶联物，其中所述接头包含6-马来酰亚氨基己酰基和

对氨基苄氧羰基。

101. 权利要求79的免疫偶联物，其中该免疫偶联物具有通式Ab-(L-MMAE)p，其中L是接头，且p的范围为2至5。

102. 权利要求101的免疫偶联物，其中L包含val-cit。

103. 权利要求101的免疫偶联物，其中L包含MC。

104. 权利要求101的免疫偶联物，其中L包含PAB。

105. 权利要求101的免疫偶联物，其中L包含MC-PAB。

106. 权利要求93的免疫偶联物，其中该免疫偶联物具有通式Ab-(L-MMAE)p，其中L是接头，且p的范围为2至5。

107. 权利要求106的免疫偶联物，其中L包含val-cit。

108. 权利要求106的免疫偶联物，其中L包含MC。

109. 权利要求106的免疫偶联物，其中L包含PAB。

110. 权利要求106的免疫偶联物，其中L包含MC-PAB。

111. 权利要求79的免疫偶联物，其中该免疫偶联物具有通式Ab-(L-MMAF)p，其中L是接头，且p的范围为2至5。

112. 权利要求111的免疫偶联物，其中L包含val-cit。

113. 权利要求111的免疫偶联物，其中L包含MC。

114. 权利要求111的免疫偶联物，其中L包含PAB。

115. 权利要求111的免疫偶联物，其中L包含MC-PAB。

116. 权利要求93的免疫偶联物，其中该免疫偶联物具有通式Ab-(L-MMAF)p，其中L是接头，且p的范围为2至5。

117. 权利要求116的免疫偶联物，其中L包含val-cit。

118. 权利要求116的免疫偶联物，其中L包含MC。

119. 权利要求116的免疫偶联物，其中L包含PAB。

120. 权利要求116的免疫偶联物，其中L包含MC-PAB。

121. 权利要求79的免疫偶联物，其中D是美登木素生物碱。

122. 权利要求121的免疫偶联物，其中D选自DM1、DM3和DM4。

123. 权利要求121的免疫偶联物，其具有体外或体内细胞杀伤活性。

124. 权利要求121的免疫偶联物，其中所述接头是经所述抗体上的硫醇基团附着至该抗体的。

125. 权利要求121的免疫偶联物，其中所述接头L选自N-琥珀酰亚氨基4-(2-

吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。

126. 权利要求122的免疫偶联物，其中所述药物是DM1。

127. 权利要求122的免疫偶联物，其中L包含SPP。

128. 权利要求122的免疫偶联物，其中L包含SMCC。

129. 权利要求122的免疫偶联物，其中p为2-4。

130. 权利要求122的免疫偶联物，其中p为3-4。

131. 权利要求93的免疫偶联物，其中D是美登木素生物碱。

132. 权利要求131的免疫偶联物，其中D选自DM1、DM3和DM4。

133. 权利要求131的免疫偶联物，其具有体外或体内细胞杀伤活性。

134. 权利要求131的免疫偶联物，其中所述接头是经所述抗体上的硫醇基团附着至该抗体的。

135. 权利要求131的免疫偶联物，其中所述接头L选自N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)-环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB)。

136. 权利要求132的免疫偶联物，其中所述药物是DM1。

137. 权利要求136的免疫偶联物，其中L包含SPP。

138. 权利要求136的免疫偶联物，其中L包含SMCC。

139. 权利要求136的免疫偶联物，其中p为2-4。

140. 权利要求136的免疫偶联物，其中p为3-4。

141. 一种药物组合物，其包含权利要求79的免疫偶联物和药学可接受载体。

142. 一种治疗B细胞增殖性病症的方法，包括给个体施用有效量的权利要求141的药物组合物。

143. 权利要求142的方法，其中所述B细胞增殖性病症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

144. 一种药物组合物，其包含权利要求93的免疫偶联物和药学可接受载体。

145. 一种治疗B细胞增殖性病症的方法，包括给个体施用有效量的权利要求144的药物组合物。

146. 权利要求145的方法，其中所述B细胞增殖性病症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

147. 一种药物组合物，其包含权利要求76、77、78或92的免疫偶联物和药学可接受载体。

148. 一种治疗B细胞增殖性病症的方法，包括给个体施用有效量的权利要求147的药物组合物。

149. 权利要求148的方法，其中所述B细胞增殖性病症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

150. 一种抑制B细胞增殖的方法，包括使细胞暴露于权利要求79的免疫偶联物，该暴露在容许该免疫偶联物结合至CD22的条件下进行。

151. 权利要求150的方法，其中所述B细胞增殖与选自下组的病症有关：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

152. 权利要求150的方法，其中所述B细胞是异种移植物。

153. 权利要求150的方法，其中所述暴露在体外发生。

154. 权利要求150的方法，其中所述暴露在体内发生。

155. 权利要求1的抗体，其中该抗体是包含一个或多个具有在0.6至1.0范围内的硫醇反应性值的游离半胱氨酸氨基酸的半胱氨酸改造抗体，其中该半胱氨酸改造抗体是通过包括用半胱氨酸替代亲本抗体的一个或多个氨基酸残基的方法制备的。

156. 权利要求155的半胱氨酸改造抗体，其中该半胱氨酸改造抗体比亲本抗

体更能与硫醇反应性试剂起反应。

157. 权利要求155的半胱氨酸改造抗体，其中所述方法进一步包括通过使半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性试剂起反应来测定该半胱氨酸改造抗体的硫醇反应性；其中该半胱氨酸改造抗体比亲本抗体更能与硫醇反应性试剂起反应。

158. 权利要求155的半胱氨酸改造抗体，其中所述一个或多个游离半胱氨酸氨基酸残基是位于轻链中的。

159. 权利要求155的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是免疫偶联物，其包含共价附着至细胞毒剂的半胱氨酸改造抗体。

160. 权利要求159的半胱氨酸改造抗体，其中所述细胞毒剂选自毒素、化疗剂、药物模块、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

161. 权利要求155的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至捕获标记物、检测标记物或固体支持物的。

162. 权利要求161的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至生物素捕获标记物的。

163. 权利要求161的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至荧光染料检测标记物的。

164. 权利要求163的半胱氨酸改造抗体，其中所述荧光染料选自荧光素类、罗丹明类、丹酰、丽丝胺、花青、藻红蛋白、德克萨斯红和它们的类似物。

165. 权利要求161的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至放射性核素检测标记物的，所述放射性核素检测标记物选自^{3}H、^{11}C、^{14}C、^{18}F、^{32}P、^{35}S、^{64}Cu、^{68}Ga、^{86}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{133}Xe、^{177}Lu、^{211}At和^{213}Bi。

166. 权利要求161的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是通过螯合配体共价附着至检测标记物的。

167. 权利要求166的半胱氨酸改造抗体，其中所述螯合配体选自DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA和TETA。

168. 权利要求23的抗体，其中该抗体是包含一个或多个具有在0.6至1.0范围内的硫醇反应性值的游离半胱氨酸氨基酸的半胱氨酸改造抗体，其中该半胱氨酸改造抗体是通过包括用半胱氨酸替代亲本抗体的一个或多个

氨基酸残基的方法制备的。

169. 权利要求168的半胱氨酸改造抗体，其中该半胱氨酸改造抗体比亲本抗体更能与硫醇反应性试剂起反应。

170. 权利要求168的半胱氨酸改造抗体，其中所述方法进一步包括通过使半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性试剂起反应来测定该半胱氨酸改造抗体的硫醇反应性；其中该半胱氨酸改造抗体比亲本抗体更能与硫醇反应性试剂起反应。

171. 权利要求168的半胱氨酸改造抗体，其中所述一个或多个游离半胱氨酸氨基酸残基是位于轻链中的。

172. 权利要求168的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是免疫偶联物，其包含共价附着至细胞毒剂的该半胱氨酸改造抗体。

173. 权利要求172的半胱氨酸改造抗体，其中所述细胞毒剂选自毒素、化疗剂、药物模块、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

174. 权利要求168的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至捕获标记物、检测标记物或固体支持物的。

175. 权利要求174的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至生物素捕获标记物的。

176. 权利要求174的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至荧光染料检测标记物的。

177. 权利要求176的半胱氨酸改造抗体，其中所述荧光染料选自荧光素类、罗丹明类、丹酰、丽丝胺、花青、藻红蛋白、德克萨斯红和它们的类似物。

178. 权利要求174的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是共价附着至放射性核素检测标记物的，所述放射性核素检测标记物选自^{3}H、^{11}C、^{14}C、^{18}F、^{32}P、^{35}S、^{64}Cu、^{68}Ga、^{86}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{133}Xe、^{177}Lu、^{211}At和^{213}Bi。

179. 权利要求178的半胱氨酸改造抗体，其中该抗体是通过螯合配体共价附着至检测标记物的。

180. 权利要求179的半胱氨酸改造抗体，其中所述螯合配体选自DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA和TETA。

181. 权利要求93的免疫偶联物，其中所述接头是经所述抗体上的硫醇基团附

着至该抗体的。

182. 权利要求1的抗体，其包含清蛋白结合肽。

183. 权利要求182的抗体，其中所述清蛋白结合肽选自SEQ ID NO:42-46。

184. 权利要求23的抗体，其包含清蛋白结合肽。

185. 权利要求184的抗体，其中所述清蛋白结合肽选自SEQ ID NO:42-46。

186. 权利要求1的抗体，其中该抗体进一步包含在一个或多个选自下组的位置上的半胱氨酸：依照Kabat编号规则的轻链第15位、第43位、第110位、第144位、第168位和第205位和依照EU编号规则的重链第41位、第88位、第115位、第118位、第120位、第171位、第172位、第282位、第375位和第400位。

187. 权利要求186的抗体，其中半胱氨酸位于轻链第205位。

188. 权利要求186的抗体，其中半胱氨酸位于重链第118位。

189. 权利要求186的抗体，其中半胱氨酸位于重链第400位。

190. 权利要求186的抗体，其中该抗体选自单克隆抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、人抗体和人源化抗体。

191. 权利要求186的抗体，其是抗体片段。

192. 权利要求191的抗体，其中所述抗体片段是Fab片段。

193. 权利要求186的抗体，其选自嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

194. 权利要求186的抗体，其是在细菌中产生的。

195. 权利要求186的抗体，其是在CHO细胞中产生的。

196. 一种测定CD22蛋白在怀疑含所述蛋白质的样品中存在的方法，所述方法包括使所述样品暴露于权利要求186的抗体，和测定所述抗体对所述样品中的所述CD22蛋白的结合，其中所述抗体对所述蛋白质的结合表明所述样品中存在所述蛋白质。

197. 权利要求196的方法，其中所述样品包含怀疑表达所述CD22蛋白的细胞。

198. 权利要求196的方法，其中所述细胞是B细胞。

199. 权利要求196的方法，其中所述抗体是共价附着至标记物的，所述标记物选自荧光染料、放射性同位素、生物素或金属螯合配体。

200. 一种药物配制剂，其包含权利要求186的抗CD22抗体，和药学可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

201. 权利要求186的抗体，其中该抗体是共价附着至auristatin或美登木素生物碱药物模块的，由此形成抗体-药物偶联物。

202. 权利要求201的抗体-药物偶联物，其包含抗体(Ab)，和auristatin或美登木素生物碱药物模块(D)，其中所述半胱氨酸改造抗体是通过接头模块(L)经一个或多个游离半胱氨酸氨基酸附着至D的；该化合物具有通式I:

$$Ab–(L–D)_p \qquad \mathbf{I}$$

其中p是1、2、3或4。

203. 权利要求201的抗体-药物偶联物化合物，其中p是2。

204. 权利要求201的抗体-药物偶联物化合物，其中L具有通式:

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

其中:

A是延伸物单元，其共价附着至半胱氨酸改造抗体(Ab)的半胱氨酸硫醇;

a是0或1;

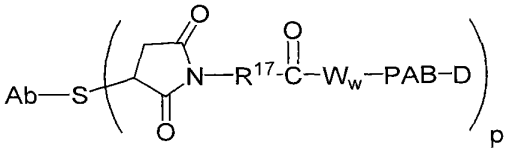
各个W独立地是氨基酸单元;

w是范围为0至12的整数;

Y是间隔物单元，其共价附着至所述药物模块；和

y是0、1或2。

205. 权利要求204的抗体-药物偶联物化合物，其具有通式:

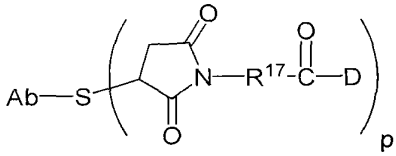


其中PAB是对氨基苄基氨基甲酰，且R^{17}是选自$(CH_2)_r$、C_3-C_8碳环基、O–$(CH_2)_r$、亚芳基、$(CH_2)_r$–亚芳基、–亚芳基–$(CH_2)_r$–、$(CH_2)_r$–(C_3-C_8碳环基)、(C_3-C_8碳环基)–$(CH_2)_r$、C_3-C_8杂环基、$(CH_2)_r$–(C_3-C_8杂环基)、–(C_3-C_8杂环基)–$(CH_2)_r$–、–$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$–、–$(CH_2CH_2O)_r$–、–$(CH_2CH_2O)_r$–CH_2–、–$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–、–$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–、–$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–、–$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–、和–$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$–的二价基；其中$R^b$是H、$C_1$-$C_6$烃基、苯基或苄基；且r独立地是范围为1至10的整数。

206. 权利要求204的抗体-药物偶联物化合物，其中W_w是缬氨酸-瓜氨酸。

207. 权利要求204的抗体-药物偶联物化合物，其中R^{17}是$(CH_2)_5$或$(CH_2)_2$。

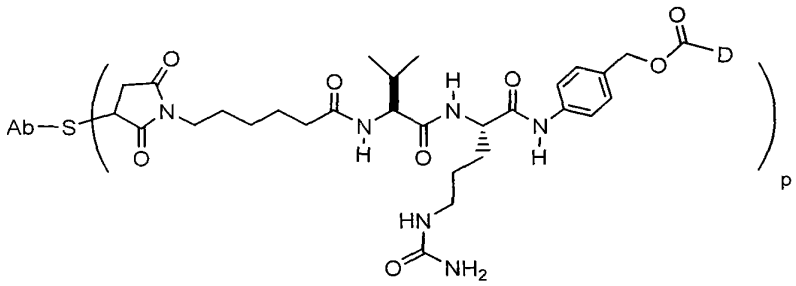
208. 权利要求204的抗体-药物偶联物化合物，其具有通式:



。

209. 权利要求208的抗体-药物偶联物化合物，其中R^{17}是$(CH_2)_5$或$(CH_2)_2$。

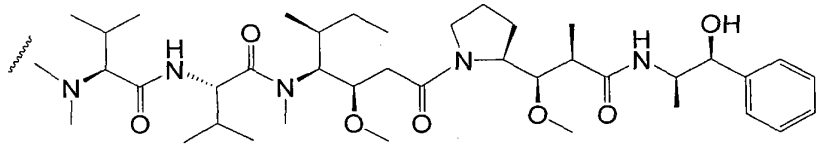
210. 权利要求204的抗体-药物偶联物化合物，其具有通式:



。

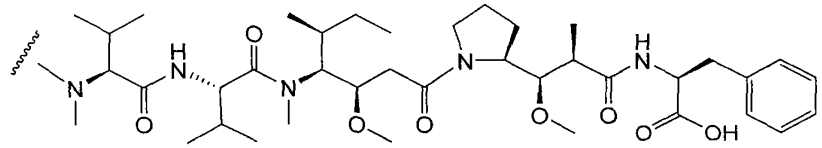
211. 权利要求202的抗体-药物偶联物化合物，其中L是SMCC、SPP或BMPEO。

212. 权利要求202的抗体-药物偶联物化合物，其中D是MMAE，其具有如下结构:



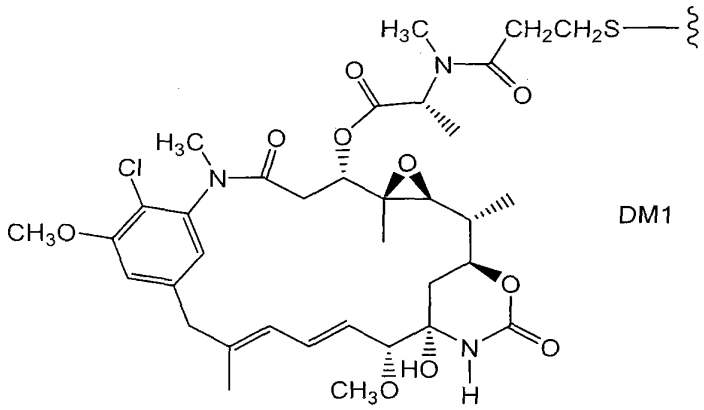
其中波浪线指出对接头L的附着位点。

213. 权利要求202的抗体-药物偶联物化合物，其中D是MMAF，其具有如下结构:



其中波浪线指出对接头L的附着位点。

214. 权利要求202的抗体-药物偶联物化合物，其中D是DM1，其具有如下结构:



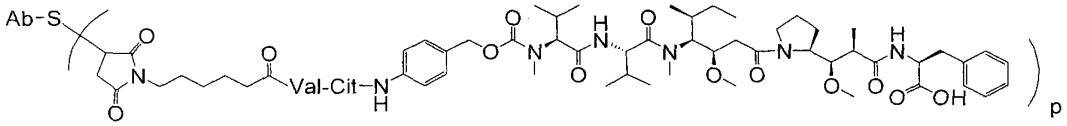
DM1

其中波浪线指出对接头L的附着位点。

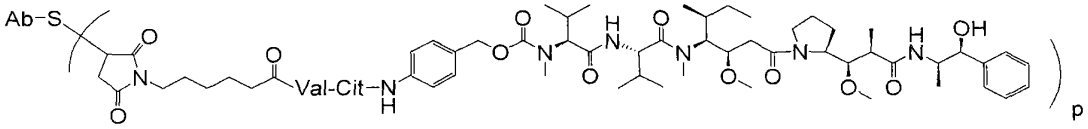
215. 权利要求201的抗体-药物偶联物化合物，其中亲本抗CD22抗体选自单克隆抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体和抗体片段。

216. 权利要求201的抗体-药物偶联物化合物，其中所述抗体片段是Fab片段。

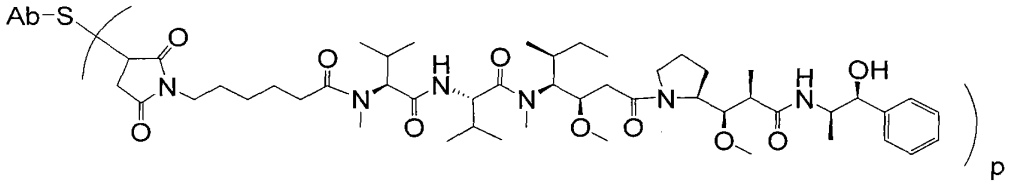
217. 一种抗体-药物偶联物化合物，其选自下列结构：



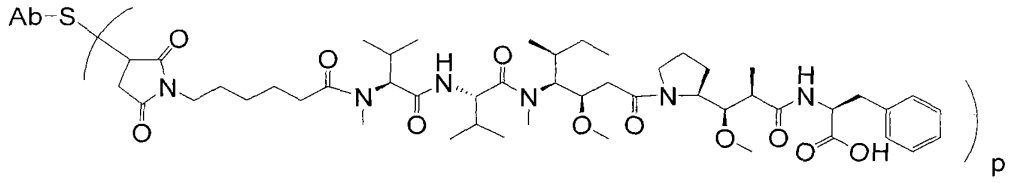
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



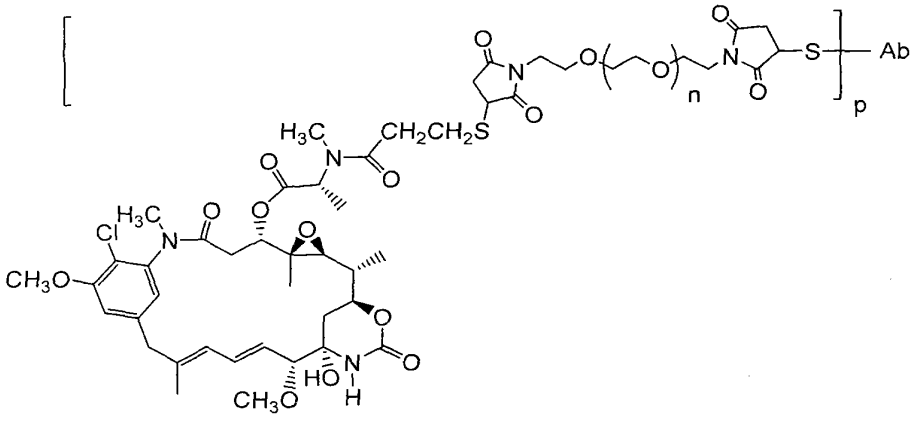
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

其中Val是缬氨酸；Cit是瓜氨酸；p是1、2、3或4；且Ab是权利要求186的抗CD22抗体。

218. 权利要求201的抗体-药物偶联物，其中所述auristatin是MMAE或MMAF。

219. 权利要求202的抗体-药物偶联物，其中L是MC-val-cit-PAB或MC。

220. 一种用于检测B细胞的测定法，包括：

(1) 使细胞暴露于权利要求199的抗体-药物偶联物化合物；和

(2) 测定该抗体-药物偶联物化合物对该细胞的结合程度。

221. 一种抑制细胞增殖的方法，包括用权利要求201的抗体-药物偶联物化合物处理细胞培养基中的哺乳动物癌性B细胞，由此抑制癌性B细胞的增殖。

222. 一种药物配制剂，其包含权利要求201的抗体-药物偶联物，和药学可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

223. 一种治疗癌症的方法，包括给患者施用权利要求222的药物配制剂。

224. 权利要求223的方法，其中所述癌症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞

淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

225. 权利要求223的方法，其中给患者施用细胞毒剂与抗体-药物偶联物化合物的组合。

226. 一种制品，其包含:

权利要求220的药物配制剂;

容器；和

包装插页或标签，其表明该化合物可用于治疗以CD22多肽过表达为特征的癌症。

227. 权利要求226的制品，其中所述癌症选自：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

228. 一种用于制备抗体-药物偶联物化合物的方法，该抗体-药物偶联物化合物包含权利要求186的抗CD22抗体(Ab)，和auristatin或美登木素生物碱药物模块(D)，其中该抗体是通过接头模块(L)经一个或多个改造的半胱氨酸氨基酸附着至D的；该化合物具有通式I:

$$Ab-(L-D)_p \qquad \mathbf{I}$$

其中p是1、2、3或4；该方法包括下列步骤:

(a) 使该抗体的改造的半胱氨酸基团与接头试剂起反应以形成抗体-接头中间体Ab-L；和

(b) 使Ab-L与活化的药物模块D起反应；由此形成抗体-药物偶联物;

或包括下列步骤:

(c) 使药物模块的亲核基团与接头试剂起反应以形成药物-接头中间体D-L；和

(d) 使D-L与该抗体的改造的半胱氨酸基团起反应；由此形成抗体-药物偶联物。

229. 权利要求228的方法，进一步包括在中国仓鼠卵巢（CHO）细胞中表达所述抗体的步骤。

230. 权利要求229的方法，进一步包括用还原剂处理所表达抗体的步骤。

231. 权利要求230的方法，其中所述还原剂选自TCEP和DTT。

232. 权利要求230的方法，进一步包括在用还原剂处理后用氧化剂处理所表达抗体的步骤。

233. 权利要求232的方法，其中所述氧化剂选自硫酸铜、脱氢抗坏血酸和空气。

234. 权利要求186的抗体，其中该抗体包含选自SEQ ID NO:88、92和93的重链序列。

235. 权利要求186的抗体，其中该抗体包含选自SEQ ID NO:87和91的轻链序列。

236. 权利要求186的抗体，其中该抗体包含SEQ ID NO:87的轻链序列和SEQ ID NO:92的重链序列。

237. 权利要求186的抗体，其中该抗体包含SEQ ID NO:87的轻链序列和SEQ ID NO:93的重链序列。

238. 权利要求186的抗体，其中该抗体包含SEQ ID NO:91的轻链序列和SEQ ID NO:88的重链序列。

抗体和免疫偶联物及其用途

本申请是依据37 CFR 1.53(b)款提交的非临时申请，依据35 USC 119(e)款要求2006年5月30日提交的美国临时申请流水号60/809,328、2007年3月29日提交的60/908,941和2007年4月13日提交的60/911,829的优先权，将这些申请的全部内容完整收入本文作为参考。

发明领域

本发明涉及抗CD22抗体及其免疫偶联物。本发明进一步涉及使用抗CD22抗体及其免疫偶联物的方法。

发明背景

淋巴细胞是造血过程中在骨髓中生成的许多类型白血球之一。有两大类淋巴细胞：B淋巴细胞（B细胞）和T淋巴细胞（T细胞）。本文中特别感兴趣的淋巴细胞是B细胞。

B细胞在骨髓内成熟，然后离开骨髓并在其细胞表面上表达抗原结合抗体。当幼稚B细胞初次遭遇其膜结合抗体对之特异性的抗原时，该细胞开始快速分裂且其后代分化成记忆B细胞和称作“浆细胞”的效应细胞。记忆B细胞具有较长的寿命并继续表达与最初的亲本细胞具有相同特异性的膜结合抗体。浆细胞不生成膜结合抗体，但改为生成可分泌形式的抗体。分泌型抗体是体液免疫的主要效应分子。

B细胞相关病症包括但不限于恶性淋巴瘤（非何杰金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin's lymphomas, NHL)）、多发性骨髓瘤和慢性淋巴细胞性白血病（CLL，B细胞白血病（CD5+ B淋巴细胞））。非何杰金氏淋巴瘤(NHL)（主要源自B淋巴细胞的不同种类的一组癌症）代表所有新诊断癌症中的大约4% (Jemal, A.等, CA-Cancer J Clin, 52: 23-47, (2002))。攻击性NHL占据成人NHL的大约30-40% (Harris, N.L.等, Hematol. J. 1:53-66 (2001))，并包括弥散性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、外周T细胞淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤。一线组合化疗治愈不到一半的攻击性NHL患者，而大多数患者

最终死于他们所患疾病(Fisher, R.I., Semin. Oncol. 27(suppl 12): 2-8 (2000))。

B细胞相关病症还包括自身免疫性疾病。自身免疫性疾病仍然是临床上重要的人类疾病。顾名思义，自身免疫性疾病通过身体自己的免疫系统起作用。虽然自身免疫性疾病的各个类型间病理学机制不同，但是一种普遍的机制涉及某些抗体（本文中称为自身反应性抗体或自身抗体）对身体的内源性蛋白质的结合。内科医生和科学家已经鉴定了超过70种临床上不同的自身免疫性疾病，包括类风湿性关节炎、多发性硬化、血管炎、免疫介导的糖尿病、和狼疮（诸如系统性红斑狼疮）。虽然许多自身免疫性疾病是罕见的（影响不到200,000个体），总的来说，这些疾病折磨着数百万美国人（估计占5%的人口），其中大多数疾病不成比例地影响着妇女。这些疾病的慢性特性导致极大的社会和财政负担。

靶向B细胞表面抗原的细胞毒剂是B细胞相关癌症疗法的重要焦点。这样的一种B细胞表面抗原是CD20。利妥昔单抗(Rituximab) (Rituxan; Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)和IDEC Pharmaceutical Corp. (San Diego, CA))（一种嵌合（小鼠/人）抗CD20单克隆抗体）是由美国食品和药品管理局批准的第一种用于治疗复发性或顽固性低级或滤泡性NHL的治疗性抗体(Leonard, J.P.等, Clin. Canc. Res. 10:5327-5334 (2004))。

其它B细胞抗原（诸如CD19、CD22和CD52）代表潜在用于治疗淋巴瘤的治疗剂的靶物(Grillo-Lopez A.J.等, Curr Pharm Biotechnol, 2:301-11 (2001))。CD22是仅在分化的成熟期在B细胞表面上表达的135 kDa B细胞限定的(B-cell-restricted)唾液酸糖蛋白(Dorken, B. 等, J. Immunol. 136:4470-4479 (1986))。CD22在人中的最主要形式是CD22β，其含有胞外结构域中的7个免疫球蛋白超家族结构域（图1）(Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991))。一种变体形式即CD22α缺乏免疫球蛋白超家族结构域3和4 (Stamenkovic, I.和Seed, B., Nature 345:74-77 (1990))。已经显示了对人CD22的配体结合与免疫球蛋白超家族结构域1和2（也称为表位1和2）有关(Engel, P.等, J. Exp. Med. 181:1581-1586 (1995))。

在B细胞NHL中，CD22表达在攻击性和无痛性群体中的范围分别从91%至99% (Cesano, A.等, Blood 100:350a (2002))。CD22不仅可充当B细胞活化复合体的成分(Sato, S.等, Semin. Immunol. 10:287-296 (1998))还可充当粘着分子(Engel, P.等, J. Immunol. 150:4719-4732 (1993))。CD22缺陷小鼠的B细胞具

有较短的寿命和增强的凋亡，这表明该抗原在B细胞存活中起关键作用(Otipoby, K.L.等, Nature (Lond) 384:634-637 (1996))。在与其天然配体或抗体结合后，CD22被快速地内在化，这在初级B细胞中提供有力的共刺激信号并在赘生性B细胞中提供促凋亡信号(proapoptotic signal) (Sato, S.等, Immunity 5:551-562 (1996))。

已经研究了抗CD22抗体作为用于B细胞癌症和其它B细胞增殖性疾病的潜在疗法。此类抗CD22抗体包括RFB4 (Mansfield, E.等, Blood 90:2020-2026 (1997))、CMC-544 (DiJoseph, J.F., Blood 103:1807-1814 (2004))和LL2 (Pawlak-Byczkowska, E.J.等, Cancer Res. 49:4568-4577 (1989))。LL2抗体（以前称为HPB-2）是针对CD22抗原的IgG2a小鼠单克隆抗体(Pawlak-Byczkowska, E.J.等 (1989), 见上文)。体外免疫组织学评估证明了LL2抗体对51个所测试的B细胞NHL标本中的50个有反应性，但对其它恶性肿瘤或正常非淋巴样组织没有反应性(Pawlak-Byczkowska (1989), 见上文; Stein, R.等, Cancer Immunol. Immunother. 37:293-298 (1993))。

抗体-药物偶联物用于局部投递细胞毒剂或细胞抑制剂（即在癌症治疗中杀死或抑制肿瘤细胞的药物）的应用(Syrigos和Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz和Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; 美国专利4975278))容许将药物模块靶向投递至肿瘤并在其中进行胞内蓄积，在那里系统施用这些未偶联的药物可导致在试图消除肿瘤细胞的同时也对正常细胞产生了不可接受的毒性水平(Baldwin等 (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", 于Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera等编, pp. 475-506)。由此寻求最高的功效与最低的毒性。已经报道多克隆抗体和单克隆抗体在这些策略中都是有用的(Rowland等 (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。用于这些方法的药物包括柔红霉素、多柔比星、甲氨蝶呤和长春地辛(Rowland等, Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87 (1986))。用于抗体-毒素偶联物的毒素包括细菌毒素（诸如白喉毒素）、植物毒素（诸如蓖麻毒蛋白）、小分子毒素（诸如格尔德霉素）(Kerr等 (1997) Bioconjugate Chem. 8(6):781-784; Mandler等 (2000) Journal of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler等 (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler 等 (2002)

Bioconjugate Chem. 13:786-791)、美登木素生物碱(EP 1391213; Liu等 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)和加利车霉素(Lode等 (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman等 (1993) Cancer Res. 53:3336-3342)。毒素可以通过包括微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制在内的机制实现其细胞毒性和细胞抑制性效果(Meyer, D.L.和Senter, P.D., "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy", 于Annual Reports in Medicinal Chemistry, 卷38 (2003) 章23, 页229-237)。有些细胞毒性药物在偶联至大的抗体或蛋白质受体配体时趋于失活或活性降低。

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec)是由针对在正常和恶性B淋巴细胞表面上发现的CD20抗原的鼠IgG1 κ单克隆抗体与^{111}In或^{90}Y放射性同位素通过硫脲接头-螯合剂相结合而构成的抗体-放射性同位素偶联物(Wiseman等 (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman等 (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig等 (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig等 (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。尽管ZEVALIN具有针对B细胞非非何杰金氏淋巴瘤(NHL)的活性，然而施药在大多数患者中导致严重且持久的血细胞减少。MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals)（由hu CD33抗体与加利车霉素连接而构成的抗体-药物偶联物）在2000年批准用于经注射治疗急性骨髓性白血病(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 美国专利No. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001)。Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.)（由huC242抗体与美登木素生物碱药物模块DM1经二硫化物接头SPP连接而构成的抗体-药物偶联物）正开发用于治疗表达CanAg抗原的癌症，诸如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌。MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)（由抗前列腺特异膜抗原(PSMA)单克隆抗体与美登木素生物碱药物模块DM1连接而构成的抗体-药物偶联物）正在开发用于前列腺肿瘤的潜在治疗。相同的美登木素生物碱药物模块DM1经非二硫化物接头SMCC与小鼠鼠单克隆抗体TA.1连接(Chari等 (1992) Cancer Research 52:127-131)。据报道，该偶联物的效力比相应的二硫化物接头偶联物的效力低200倍。其中认为SMCC接头是"不可切割的"。

已经从海洋软体动物耳状截尾海兔（*Dolabella auricularia*）中分离出数种短肽化合物，并发现它们具有生物学活性(Pettit等 (1993) Tetrahedron

49:9151; Nakamura等 (1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062; Sone等 (1995) Journal Org Chem. 60:4474)。还制备出这些化合物的类似物，并且发现有些具有生物学活性(对于综述，参见Pettit等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277)。例如，auristatin E (US 5635483)是海洋天然产物多拉司他汀10（一种通过结合至微管蛋白上与抗癌药长春新碱相同的位点来抑制微管蛋白聚合的药剂(G. R. Pettit (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70:1-79)）的合成类似物。多拉司他汀10、auristatin PE和auristatin E是具有四个氨基酸（其中三个对于多拉司他汀类化合物是独特的）和C末端酰胺的线性肽。

将auristatin肽，auristain E (AE)和monomethylauristatin (MMAE)，多拉司他汀的合成类似物偶联至：(i) 嵌合单克隆抗体cBR96（对癌瘤上的Lewis Y特异性的）；(ii) 对血液学恶性肿瘤上的CD30特异性的cAC10 (Klussman等 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina等 (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco等 (2003) Blood 102(4):1458-1465; US 2004/0018194)；(iii) 抗CD20抗体，诸如Rituxan®（利妥昔单抗）(WO 04/032828)，用于治疗表达CD20的癌症和免疫病症；(iv) 抗EphB2抗体2H9和抗IL-8，用于治疗结肠直肠癌(Mao等 (2004) Cancer Research 64(3):781-788)；(v) E-选择蛋白抗体(Bhaskar等 (2003) Cancer Res. 63:6387-6394)；和(vi) 其它抗CD30抗体(WO 03/043583)。还已经将monomethylauristatin (MMAE)偶联至2H9，即一种针对EphB2R的抗体，EphB2R是小鼠和人之间具有密切同源性的1型TM酪氨酸激酶受体，而且在结肠直肠癌细胞中过表达(Mao等 (2004) Cancer Res. 64:781-788)。

已经报道monomethylauristatin MMAF（一种在C末端具有苯丙氨酸的auristatin E (MMAE)变体）(US 5767237; US 6124431)比MMAE具有更低的效力，但在偶联至单克隆抗体时具有更高的效力(Senter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 卷45, 摘要号623, 2004年3月28日)。将Auristatin F苯二胺(AFP)(MMAE的一种苯丙氨酸变体)连接至抗CD70单克隆抗体1F6，经1F6的C末端通过苯二胺间隔物来实现(Law等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 卷45, 摘要号625, 2004年3月28日)。

还已经研究了抗CD22抗体-毒素偶联物作为潜在的治疗性化合物。例如，

早期报道描述了针对抗CD22的含有篦麻毒蛋白A链的免疫毒素作为潜在的抗癌剂(May, R.D.等, Chemical Abstracts 106(21):168656x pages 35-36 (1987); Ghetie, M.A.等, Cancer Research 48:2610-2617 (1988); 及Amlot, P.L.等, Blood 82(9):2624-2633 (1993))。若毒素是放射性同位素，Epratuzumab即LL2的人源化（CDR嫁接的）IgG1型式已经显示了放射性免疫偶联物的治疗活性的证据(Juweid, M.E.等, Clin. Cancer Res. 5 (Suppl 10):3292s-3303s (1999); Griffiths, G.L.等, J. Nucl. Med. 44:77-84 (2003); Linden, O.等, Clin. Cancer Res. 5(suppl 10):3287s-3291s (1999))。

本领域中需要别的药物以治疗各种B细胞相关癌症，诸如淋巴瘤，诸如非何杰金氏淋巴瘤和其它B细胞增殖性病症。对于该目的特别有用的药物包括靶向B细胞的抗CD22抗体-药物偶联物，其具有显著更低的毒性，但仍具有有用的治疗功效。本发明解决了过去的这些和其它限制和问题。

本申请中的任何参考文献的叙述不是承认该参考文献是本申请的现有技术。将本文中所引用的所有参考文献（包括专利、专利申请和出版物）完整收入本文作为参考。

发明概述

本发明提供了抗CD22抗体及其使用方法。

在一个方面，提供了一种结合CD22的抗体，其中该抗体包含至少一种、两种、三种、四种、五种或六种HVR，其选自：

(1) HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；

(2) HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；

(3) HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列；

(4) HVR-L1，其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列；

(5) HVR-L2，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；和

(6) HVR-L3，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

在另一个方面，结合CD22的抗体包含：(a) HVR-L1，其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，和(b) 至少一种、两种、三种、四种或五种HVR，其选自：

(1) HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；

(2) HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；

(3) HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列；

(4) HVR-L2，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；和

(5) HVR-L3，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

在另一个方面，结合CD22的抗体包含：(a) HVR-L1，其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，和(b) 至少一种、两种、三种、四种或五种HVR，其选自：

(1) HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；

(2) HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；

(3) HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列；

(4) HVR-L2，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；和

(5) HVR-L3，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

在另一个方面，结合CD22的抗体包含：(a) HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列，和(b) 至少一种、两种、三种、四种或五种HVR，其选自：

(1) HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；

(2) HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；

(3) HVR-L1，其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列；

(4) HVR-L2，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；和

(5) HVR-L3，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

在另一个方面，结合CD22的抗体包含：(a) HVR-H3，其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列，和(b) 至少一种、两种、三种、四种或五种HVR，其选自：

(1) HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；

(2) HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；

(3) HVR-L1，其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列；

(4) HVR-L2，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；和

(5) HVR-L3，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

在一个实施方案中，该抗体包含HVR-L1，其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一个实施方案中，该抗体进一步包含：HVR-H1，其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；和HVR-H2，其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在一个实施方案中，该抗体进一步包含：HVR-L2，其包含SEQ NO:12的氨基酸序列；和HVR-L3，其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

在某些实施方案中，任何上述抗体进一步包含至少一种框架，其选自VH亚组III共有框架和VL亚组I共有框架。

在一个方面，提供了一种结合CD22的抗体，其中该抗体包含重链可变

域，其与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性。在一个实施方案中，该抗体包含SEQ ID NO:16的重链可变域。

在一个方面，该抗体进一步包含轻链可变域，其与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性。在一个实施方案中，该抗体包含SEQ ID NO:17的轻链可变域。

在一个方面，该抗体进一步包含轻链可变域，其与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、或至少99%的序列同一性。在一个实施方案中，该抗体包含SEQ ID NO:18的轻链可变域。

在一个实施方案中，该抗体包含：重链可变域，其与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性；和轻链可变域，其与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。在一个实施方案中，该抗体包含：重链可变域，其与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性；和轻链可变域，其与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。在一个实施方案中，重链可变域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列，且轻链可变域包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在一个实施方案中，重链可变域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列，且轻链可变域包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。

在某些实施方案中，提供了编码任何上述抗体的多核苷酸。在一个实施方案中，提供了包含该多核苷酸的载体。在一个实施方案中，提供了包含该载体的宿主细胞。在一个实施方案中，该宿主细胞是真核的。在一个实施方案中，该宿主细胞是中国仓鼠卵巢（CHO）细胞。在一个实施方案中，提供了制备抗CD22抗体的方法，其中该方法包括在适于表达编码该抗体的多核苷酸的条件下培养该宿主细胞，和分离该抗体。

在一个方面，提供了一种结合细胞表面上所表达的CD22的抗体。在一个实施方案中，该抗体结合人或鼠CD22中包含结构域1或结构域2或结构域1和2的区域内的表位。在一个实施方案中，该细胞是哺乳动物细胞。在一个实施方案中，该细胞是人细胞。在一个实施方案中，该细胞是癌细胞。在一个实施方案中，该细胞是B细胞。在一个实施方案中，该癌细胞是B细胞。

在某些实施方案中，任何上述抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中，该抗体是抗体片段，其选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段。在一个实施方案中，该抗体是人源化的。在一个实施方案中，该抗体是人的。

在一个方面，提供了一种检测CD22在生物学样品中存在的方法，该方法包括将该生物学样品与任何上述抗体在容许该抗体结合CD22的条件下接触，和检测该抗体和CD22之间是否形成复合物。在一个实施方案中，该生物学样品包含B细胞。在一个实施方案中，该生物学样品来自经历或怀疑经历B细胞病症和/或B细胞增殖性病症的哺乳动物，该病症包括但不限于淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。

在一个方面，提供了一种诊断与CD22表达升高有关的细胞增殖性病症的方法，该方法包括将测试细胞与任何上述抗体接触；通过检测该抗体对CD22的结合来测定CD22的表达水平；和比较该测试细胞的CD22表达水平和对照细胞的CD22表达水平，其中测试细胞的CD22表达水平高于对照细胞的CD22表达水平表明存在与CD22表达升高有关的细胞增殖性病症。在一个实施方案中，该测试细胞是来自怀疑患有细胞增殖性病症（诸如B细胞增殖性病症）的患者的细胞。在一个实施方案中，该细胞增殖性病症选自B细胞病症，包括但不限于淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和套细胞淋巴瘤。在一个实施方案中，该方法包括测定该测试细胞表面上的CD22表达水平，和比较测试细胞表面上的CD22表达水平与对照细胞表面上的CD22表达水平。

在一个方面，提供了一种诊断与表达CD22的细胞（诸如B细胞）增加有

关的细胞增殖性病症的方法，该方法包括将生物学样品中的测试细胞与任何上述抗体接触；通过检测该抗体对CD22的结合来测定结合至该样品中测试细胞的抗体的水平；和比较结合至对照样品中细胞的抗体的水平，其中将所结合的抗体的水平相对于测试和对照样品中表达CD22的细胞数进行标准化，且其中测试样品中所结合的抗体的水平高于对照样品中所结合的抗体的水平表明存在与表达CD22的细胞有关的细胞增殖性病症。

在一个方面，提供了一种检测血液或血清中的可溶性CD22的方法，该方法包括将来自怀疑经历B细胞增殖性病症的哺乳动物的血液或血清测试样品与本发明的抗CD22抗体接触，和检测测试样品中可溶性CD22相对于来自正常哺乳动物的血液或血清的对照样品中可溶性CD22的升高。在一个实施方案中，该检测方法可用作一种诊断与哺乳动物血液或血清中可溶性CD22升高有关的B细胞增殖性病症的方法。

在一个方面，本发明的抗体包括半胱氨酸改造抗体，其中用游离半胱氨酸氨基酸替代亲本抗体的一个或多个氨基酸，正如WO2006/034488中所披露的（完整收入本文作为参考）。可以对任何形式的抗CD22抗体进行如此改造，即突变。例如，可以改造亲本Fab抗体片段以形成半胱氨酸改造的Fab，在本文中称为“ThioFab”。类似地，可以改造亲本单克隆抗体以形成“ThioMab”。应当注意，单位点突变在ThioFab中产生单个改造的半胱氨酸残基，而单位点突变在ThioMab中产生两个改造的半胱氨酸残基，由于IgG抗体的二聚体特性。本发明的半胱氨酸改造抗CD22抗体包括单克隆抗体，人源化的或嵌合的单克隆抗体，及抗体的抗原结合片段、融合多肽和类似物，其优先结合细胞相关CD22多肽(cell-associated CD22 polypeptide)。或者，半胱氨酸改造抗体可以包括下述抗体，其在抗体或Fab中在本文中所公开的位置包含半胱氨酸，该抗体由抗体的序列设计和/或选择产生，而不必改变亲本抗体，诸如通过噬菌体展示抗体设计和选择或经由轻链和/或重链框架序列和恒定区的重新设计。半胱氨酸改造抗体包含一个或多个游离半胱氨酸氨基酸，其具有范围为0.6至1.0；0.7至1.0；或0.8至1.0的硫醇反应性值。游离的半胱氨酸氨基酸指已经被改造入亲本抗体且不是二硫桥的一部分的半胱氨酸残基。半胱氨酸改造抗体可用于在改造的半胱氨酸位点附着细胞毒性化合物和/或成像化合物，例如经由马来酰亚胺或卤代乙酰基。Cys残基的硫醇官能度对马来酰亚胺基团的亲核反应性比蛋白质中任何其它氨基酸官能度（诸如赖氨酸残基

的氨基或N末端氨基）高大约1000倍。碘代乙酰基和马来酰亚胺试剂中的硫醇特异性官能度可以与胺基团起反应，但需要较高的pH (>9.0)和较长的反应时间 (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

在一个实施方案中，本发明的半胱氨酸改造抗CD22抗体包含任何一个如下位置的改造的半胱氨酸，其中该位置是轻链中依照Kabat等的编号（参见Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）和重链（包括Fc区）中依照EU编号方式（参见Kabat等 (1991), 见上文）的编号，其中通过在图17A中划下划线来描述的轻链恒定区开始于第108位（Kabat编号方式），且通过在图17B和17C中划下划线来描述的重链恒定区开始于第118位（EU编号方式）。该位置还可以通过其在图17A-17C中所示全长轻链或重链的氨基酸顺序编号方式中的位置来提到。依照本发明的一个实施方案，抗CD22抗体包含LC-V205C处的改造的半胱氨酸（Kabat编号: Val 205; 图17A中顺序编号210，在那个位置改造成Cys）。在图17A中以粗体、双下划线文本显示了轻链中改造的半胱氨酸。依照一个实施方案，抗CD22抗体包含HC-A118C处的改造的半胱氨酸（EU编号: Ala 118; 图17B中顺序编号121，在那个位置改造成Cys）。在图17B中以粗体、双下划线文本显示了重链中改造的半胱氨酸。依照一个实施方案，抗CD22抗体包含Fc-S400C处的改造的半胱氨酸(EU编号: Ser 400; 图17C中顺序编号403，在那个位置改造成Cys)。在图17C中以粗体、双下划线文本显示了重链Fc区中的改造的半胱氨酸。在其它实施方案中，重链（包括Fc区）的改造的半胱氨酸位于任何一个下列位置（依照EU编号方式）: 41、88、116、118、120、171、282、375或400。如此，本发明的亲本抗CD22抗体在这些位置上的氨基酸改变是: A41C、A88C、S116C、A118C、T120C、A171C、V282C、S375C或S400C。在其它实施方案中，轻链的改造的半胱氨酸位于任何一个下列位置(依照Kabat编号方式): 15、43、110、144、168、205。如此，本发明的亲本抗CD22抗体在这些位置上的氨基酸改变是: V15C、A43C、V110C、A144C、S168C或V205C。

半胱氨酸改造抗CD22抗体包含一个或多个游离的半胱氨酸氨基酸，其中该半胱氨酸改造抗CD22抗体结合CD22多肽，且是通过包括用半胱氨酸替代亲本抗CD22抗体的一个或多个氨基酸残基的方法来制备的，其中该亲本

抗体包含至少一种HVR序列，其选自：

(a) HVR-L1 序 列 RSSQSIVHSNGNTFLE (SEQ ID NO:9) 或 序 列 RSSQSIVHSVGNTFLE (SEQ ID NO:10)（图2B）；

(b) HVR-L2序列KVSNRFS (SEQ ID NO:12)（图2B）；

(c) HVR-L3序列FQGSQFPYT (SEQ ID NO:14)（图2B）；

(d) HVR-H1序列GYEFSRSWMN (SEQ ID NO:2)（图2A）；

(e) HVR-H2序列GRIYPGDGDTNYSGKFKG (SEQ ID NO:4)（图2A）；和

(f) HVR-H3序列DGSSWDWYFDV (SEQ ID NO:6)（图2A）。

在某个方面中，本发明涉及一种半胱氨酸改造抗CD22抗体，其包含与具有如本文中所公开的全长氨基酸序列的半胱氨酸改造抗体具有至少约80%氨基酸序列同一性，或者至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列；或缺乏如本文中所公开的信号肽的半胱氨酸改造抗体。

在又一个方面中，本发明涉及一种分离的半胱氨酸改造抗CD22抗体，其包含由如下核苷酸序列所编码的氨基酸序列，该核苷酸序列能与编码下列各项的DNA分子的互补链发生杂交：(a)半胱氨酸改造抗体，其具有如本文中所公开的全长氨基酸序列，(b)半胱氨酸改造抗体氨基酸序列，其缺乏如本文中所公开的信号肽，(c)跨膜的半胱氨酸改造抗体蛋白的胞外结构域，其带有或不带有如本文中所公开的信号肽，(d)由任何在本文中所公开的核酸序列所编码的氨基酸序列，或(e)如本文中所公开的全长的半胱氨酸改造抗体氨基酸序列的任何其它明确限定的片段。

在一个具体的方面中，本发明提供了一种分离的半胱氨酸改造抗CD22抗体，其不带有N末端信号序列和/或不带有起始甲硫氨酸，并且是由编码如本文中所描述的氨基酸序列的核苷酸序列所编码的。其产生方法在本文中也有描述，其中那些方法包括在适于表达半胱氨酸改造抗体的条件下培养包含含有合适的编码核酸分子的载体的宿主细胞和从该细胞培养物中回收半胱氨酸改造抗体。

本发明的另一个方面提供了一种分离的半胱氨酸改造抗CD22抗体，其或是跨膜结构域删除的或是跨膜结构域失活的。其产生方法在本文中也有描述，其中那些方法包括在适于表达半胱氨酸改造抗体的条件下培养包含含有

合适的编码核酸分子的载体的宿主细胞和从该细胞培养物中回收半胱氨酸改造抗体。

在其它实施方案中，本发明提供了分离的抗CD22嵌合半胱氨酸改造抗体，其包含与异源（非CD22）多肽融合的任何本文所述半胱氨酸改造抗体。此类嵌合分子的例子包括与异源多肽（诸如例如表位标签序列或免疫球蛋白Fc区）融合的任何本文所述半胱氨酸改造抗体。

半胱氨酸改造抗CD22抗体可以是单克隆抗体、抗体片段、嵌合抗体、人源化抗体、单链抗体、或竞争性抑制抗CD22多肽抗体与其相应抗原表位结合的抗体。本发明的抗体可以任选地偶联至生长抑制剂或细胞毒剂，诸如毒素，包括例如auristatin、抗生素、放射性同位素、核溶酶等。本发明的抗体可以任选地在CHO细胞或细菌细胞中产生，且优选地抑制它们所结合的细胞的生长或增殖或诱导与它们所结合的细胞的死亡。为了诊断目的，本发明的抗体可以带上可检测标记物、附着至固体支持物、等等。

在本发明的其它实施方案中，本发明提供了包含编码任何本文所述抗CD22抗体和抗CD22半胱氨酸改造抗体的DNA的载体。还提供了包含任何此类载体的宿主细胞。举例而言，宿主细胞可以是CHO细胞、大肠杆菌细胞或酵母细胞。用于产生任何本文所述多肽的方法有进一步的提供，且包括在适于表达期望多肽的条件下培养宿主细胞和从该细胞培养物中回收期望多肽。

半胱氨酸改造抗体可用于治疗癌症，并包括对细胞表面和跨膜受体及肿瘤相关抗原(TAA)特异性的抗体。此类抗体可以以裸抗体（未偶联至药物或标记物模块）或抗体-药物偶联物(ADC)的形式使用。本发明的半胱氨酸改造抗体可以位点特异性地且高效地偶联有硫醇反应性试剂。该硫醇反应性试剂可以是多功能接头试剂、捕获标记物试剂、荧光团试剂或药物-接头中间体。半胱氨酸改造抗体可以用可检测标记物标记，固定化在固相支持物上和/或与药物模块偶联。可以将硫醇反应性普及至任何抗体，其中可以用反应性半胱氨酸氨基酸进行氨基酸替代，这发生在轻链中选自下列氨基酸范围的范围内：L-10至L-20；L-38至L-48；L-105至L-115；L-139至L-149；L-163至L-173，及重链中选自下列氨基酸范围的范围内：H-35至H-45；H-83至H-93；H-114至H-127；和H-170至H-184，及Fc区中选自下组的范围内：H-268至H-291；H-319至H-344；H-370至H-380；和H-395至H-405，其中氨基酸位置的编号方式开始于Kabat编号系统(Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)的第1位并在其后顺序延续，正如WO2006034488中所披露的。还可以将硫醇反应性普及至抗体的某些结构域，诸如轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域（CH1、CH2和CH3）。可以进行导致0.6和更高的硫醇反应性值的半胱氨酸替代，这分别发生在完整抗体：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM（包括IgG亚类：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，IgA1和IgA2）的重链恒定域α、δ、ε、γ和μ中。此类抗体及其用途在WO2006/034488中有披露。

本发明的半胱氨酸改造抗体优选地保留它们野生型、亲本抗体对应物的抗原结合能力。如此，半胱氨酸改造抗体能够结合（优选特异性地）抗原。此类抗原包括例如肿瘤相关抗原(TAA)、细胞表面受体蛋白和其它细胞表面分子、跨膜蛋白、信号传导蛋白、细胞存活调节因子、细胞增殖调节因子、与组织发育或分化有关的（例如已知或怀疑在功能上促进的）分子、淋巴因子、细胞因子、牵涉细胞周期调控的分子、牵涉脉管发生(vasculogenesis)的分子、和与血管发生(angiogenesis)有关的（例如已知或怀疑在功能上促进的）分子。肿瘤相关抗原可以是簇分化因子(cluster differentiation factor)（即CD蛋白，包括但不限于CD22）。本发明的半胱氨酸改造抗CD22抗体保留它们亲本抗CD22抗体对应物的抗原结合能力。如此，本发明的半胱氨酸改造抗CD22抗体能够结合（优选特异性地）CD22抗原，包括人抗CD22同种型β和/或α，包括在细胞（包括但不限于B细胞）表面表达此类抗原时。

本发明的抗体可以偶联至其它硫醇反应性试剂，其中该反应性基团是例如马来酰亚胺、碘乙酰胺、吡啶基二硫化物(pyridyl disulfide)或其它硫醇反应性偶联配偶(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. 于Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。该配偶可以是细胞毒剂（例如毒素，诸如多柔比星或百日咳毒素）、荧光团（诸如荧光染料，像荧光素或罗丹明）、用于成像或放射性治疗金属的螯合剂、肽基或非肽基标记物或检测标签、或清除调节剂(clearance-modifying agent)（诸如聚乙二醇的各种异构体）、与第三成分结合的肽、或另一种碳水化合物或亲脂剂。

在一个方面，本发明的抗体可以与任何标记物模块偶联，所述标记物模块可以通过反应性模块、活化的模块或反应性半胱氨酸硫醇基团共价附着至抗体(Singh等 (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E.和Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 第2版, CRC Press, Boca Raton, FL)。所附着的标记物可以发挥下列功能: (i)提供可检测信号; (ii)与第二标记物相互作用以修饰由第一或第二标记物所提供的可检测信号，例如以给出FRET(荧光共振能量转移); (iii)稳定与抗原或配体的相互作用或提高与抗原或配体结合的亲和力; (iv)通过电荷、疏水性、形状或其它物理参数来影响迁移率，例如电泳迁移率或细胞通透性; 或(v)提供捕获模块以调控配体亲和力、抗体/抗原结合或离子络合。

经过标记的半胱氨酸改造抗体可以用于诊断测定法，例如用于在特定细胞、组织或血清中检测感兴趣抗原的表达。为了诊断应用，典型地用可检测模块标记抗体。许多标记物是可获得的，一般可将它们分组成下列种类:

放射性同位素(放射性核素)，诸如3H、11C、14C、18F、32P、35S、64Cu、68Ga、86Y、99Tc、111In、123I、124I、125I、131I、133Xe、177Lu、211At或213Bi。放射性同位素标记的抗体可用于受体靶向的成像实验。使用Current Protocols in Immunology, 卷1和2, Coligen等编, Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)中记载的技术，可以用结合、螯合或以其它方式络合放射性同位素金属的配体试剂来标记该抗体，其中该试剂与该抗体的改造的半胱氨酸硫醇具有反应性。可以络合金属离子的螯合配体包括DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA和TETA (Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核素可以通过与本发明的抗体-药物偶联物络合来靶向(Wu等 (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146)。

接头试剂，诸如DOTA-马来酰亚胺(4-马来酰亚氨基丁酰亚氨基苄基-DOTA)(4-maleimidobutyramidobenzyl-DOTA)可以通过氨基苄基-DOTA与用氯甲酸异丙酯(isopropylchloroformate) (Aldrich)活化的4-马来酰亚氨基丁酸(Fluka)反应来制备，其遵循Axworthy等 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807)的规程。DOTA-马来酰亚胺试剂与半胱氨酸改造抗体的游离半胱氨酸氨基酸起反应，并在该抗体上提供金属络合配体(Lewis等 (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。螯合接头标记试剂，诸如DOTA-NHS(1,4,7,10-四

氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸单(N-羟基琥珀酰亚胺酯))(1,4,7,10-tetra azacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid mono (N-hydroxysuccinimideester))是商品化的(Macrocyclics, Dallas, TX)。用放射性核素标记的抗体进行的受体靶物成像可以通过检测和定量抗体在肿瘤组织中的逐渐积累来提供途径活化的标志(Albert等 (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210)。在溶酶体降解后，所偶联的放射性金属可以保留在细胞内。

适合作为用于成像实验的抗体标记物的金属-螯剂复合体披露于：US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich等 (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157; Meares等 (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh 等 (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares 等 (1990) J. Cancer1990, Suppl. 10:21-26; Izard等 (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula等 (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis等 (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Camera等 (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646; Ruegg 等 (1990) Cancer Res. 50:4221-4226; Verel 等 (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Lee等 (2001) Cancer Res. 61:4474-4482; Mitchell等 (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112; Kobayashi等 (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer 等 (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137; DeNardo等 (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend 等 (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula等 (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76; Kobayashi等 (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36; Mardirossian等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli 等 (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

(b) 荧光标记物，诸如稀土螯合物，铕螯合物；荧光素类，包括FITC、5-羧基荧光素、6-羧基荧光素；罗丹明类，包括TAMRA；丹酰；丽丝胺；花青；藻红蛋白；德克萨斯红；和它们的类似物。使用例如Current Protocols in Immunology（见上文）中披露的技术，可以将荧光标记物偶联至抗体。荧光染料和荧光标记物试剂包括可购自Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR)和Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)的那些。

(c) 各种酶-底物标记物是可获得的或有披露的(US 4275149)。该酶一般

催化显色底物的化学改变，其可以采用各种技术来测量。例如，该酶可以催化底物的颜色变化，其可以用分光光度法来测量。或者，该酶可以改变底物的荧光或化学发光。用于定量荧光变化的技术在上文有描述。化学发光底物通过化学反应而成为电子激发的，然后可以发射可测量的光（例如使用化学发光计）或给荧光受体贡献能量。酶标记物的例子包括萤光素酶（例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶；US 4737456）、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、脲酶、过氧化物酶，诸如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶（例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）、杂环氧化酶（诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶）、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。用于将酶偶联至抗体的技术披露于：O'Sullivan等 (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", 于Methods in Enzym. (J. Langone和H. Van Vunakis编), Academic Press, New York, 73:147-166。

酶-底物组合的例子包括例如：

(i) 辣根过氧化物酶(HRP)与作为底物的过氧化氢，其中该过氧化氢氧化染料前体（例如邻苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐(TMB)）；

(ii) 碱性磷酸酶(AP)与作为显色底物的对硝基苯基磷酸酯；和

(iii) β-D-半乳糖苷酶(β-D-Gal)与显色底物（例如对硝基苯基-β-D-半乳糖苷酶）或荧光底物4-甲基伞形基-β-D-半乳糖苷）。

许多其它的酶-底物组合对本领域技术人员而言是可获得的。一般综述参见US 4275149和US 4318980。

标记物可以间接地与氨基酸侧链、活化的氨基酸侧链、半胱氨酸改造抗体等偶联。例如，抗体可以与生物素偶联，并且任何上述三大类标记物可以与亲合素或链霉亲合素偶联，反之亦然。生物素选择性结合链霉亲合素，如此，标记物可以以该间接方式与抗体偶联。或者，为了实现标记物与多肽变体的间接偶联，多肽变体与小的半抗原（例如地高辛）偶联，并且上述不同类型的标记物之一与抗半抗原多肽变体（例如抗地高辛抗体）偶联。如此，可以实现标记物与多肽变体的间接偶联(Hermanson, G. (1996) 于Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego)。

可以在任何已知的测定方法中使用本发明的抗体，诸如ELISA、竞争性结合测定法、直接和间接三明治式测定法或夹心式测定法、和免疫沉淀测定

法(Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.)。

检测标记物可用于对结合或识别事件进行定位、显现和定量。经过标记的本发明抗体可检测细胞表面受体。经过可检测标记的抗体的另一种用途是基于珠子的免疫捕获方法，其包括将珠子与荧光标记的抗体偶联，和在配体结合后检测荧光信号。类似的结合检测方法学利用表面等离振子共振(SPR)效应来测量和检测抗体-抗原相互作用。

检测标记物(诸如荧光染料和化学发光染料)(Briggs等 (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids", J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058)提供可检测的信号，并且一般可用于标记抗体，优先具有下列性质：(i)经过标记的抗体应产生很高的信号但低的背景，使得在无细胞测定法和基于细胞的测定法中都能灵敏地检测出少量的抗体；和(ii)经过标记的抗体应是光稳定的，使得可以观察、监测和记录荧光信号，但没有显著的光漂白。对于涉及经标记抗体对膜或细胞表面（尤其是活细胞）的细胞表面结合的应用，标记物优选地(iii)具有优良的水溶性以实现有效的偶联物浓度和检测灵敏度，且(iv)对活细胞是无毒性的，免得破坏细胞的正常代谢过程或引起过早的细胞死亡。

可以在用活细胞或珠子自动实施混合和读取(mix-and-read)、非放射性测定法的系统(FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.)上进行细胞荧光强度的直接定量和荧光标记事件（例如肽-染料偶联物的细胞表面结合）的点查(Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204)。经过标记的抗体的用途还包括细胞表面受体结合测定法、免疫捕获测定法、荧光连接的免疫吸附测定法(FLISA)、胱天蛋白酶切割(Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23; US 6372907)、凋亡(Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51)和细胞毒性测定法。可以使用荧光计量微体积测定法(fluorometric microvolume assay)技术鉴定由靶向细胞表面的分子所引起的上

调或下调(Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

经过标记的本发明抗体可通过生物医学和分子成像的各种方法和技术用作成像生物标志物和探针，诸如：(i) MRI（磁共振成像）；(ii) microCT（计算机化断层成像）；(iii) SPECT（单光子发射计算机化断层成像）；(iv) PET（正电子发射断层成像）Chen等 (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49；(v)生物发光；(vi)荧光；和(vii)超声。免疫闪烁照相术是一种成像规程，其中给动物或人患者施用用放射性物质标记的抗体，并拍摄身体中该抗体定位的部位的照片(US 6528624)。可以将成像生物标志物作为正常生物学过程、病理学过程、或对治疗性干涉的药理学应答的指示客观地测量并评估。生物标志物可以是数种类型：类型0是疾病的天然历史标志物，并与已知临床指标（例如类风湿性关节炎中滑膜炎症的MRI评估）纵向相关；类型I标志物捕获依照作用机制(mechanism-of-action)的干涉效应，即使该机制可能与临床结果无关；类型II标志物充当代用终点(surrogate endpoint)，其中该生物标志物的改变或来自该生物标志物的信号预示临床益处以“证实”靶向应答，诸如通过CT在类风湿性关节炎中测量到的骨侵蚀。如此，成像生物标志物可以提供关于下列各项的药效学(PD)治疗信息：(i)靶蛋白的表达，(ii)治疗剂对靶蛋白的结合，即选择性，和(iii)清除和半衰期药动学数据。体内成像生物标志物相对于基于实验室的生物标志物的优点包括：非侵入性处理(non-invasive treatment)，可定量，全身评估，重复定量给药和评估（即多个时间点），及从临床前结果（小动物）结果至临床结果（人）的潜在可转换效应。对于一些应用，生物成像代替或最少化临床前研究中动物实验的数目。

肽标记方法是公知的。参见Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer等 (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work和E. Work编) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L.和Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, 卷I和II, CRC Press, New York;

Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche编, Walter DeGryter, Berlin和New York; 及 Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez等 (2004) Chem.Eur. J. 10:1149-1155; Lewis等 (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li等 (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier等 (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237。

用两种模块即荧光报道物和淬灭剂标记的肽和蛋白质在足够接近时经历荧光共振能量转移(FRET)。报道物基团典型地是荧光染料，其由某个波长的光激发并转移能量给受体或淬灭剂基团，其具有合适的斯托克司频移(Stokes shift)以在最高亮度发光。荧光染料包括具有延伸芳香性的分子，诸如荧光素和罗丹明及其衍生物。荧光报道物可以由完整肽中的淬灭剂模块部分地或显著地淬灭。在肽酶或蛋白酶切割肽后，可以测量可检测的荧光增加(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

经过标记的本发明抗体还可以用作亲和纯化剂。在该方法中，使用本领域公知的方法将经过标记的抗体固定化在固相（诸如Sephadex树脂或滤纸）上。使固定化的抗体与含有待纯化抗原的样品接触，其后用合适的溶剂清洗支持物，这会清除该样品中除待纯化抗原（其结合至固定化的多肽变体）以外的基本上所有材料。最后，用另一种合适的溶剂（诸如甘氨酸缓冲液，pH 5.0）清洗支持物，这会从多肽变体中释放抗原。

标记试剂典型地具有反应性官能度，其可以(i)与半胱氨酸改造抗体的半胱氨酸硫醇直接反应以形成经过标记的抗体，(ii)与接头试剂反应以形成接头-标记物中间体，或(iii)与接头抗体反应以形成经过标记的抗体。标记试剂的反应性官能度包括：马来酰亚胺、卤乙酰基、碘乙酰胺琥珀酰亚氨基酯（例如NHS，N-羟基琥珀酰亚胺）、异硫氰酸、磺酰氯、2,6-二氯三嗪基、五氟苯基酯、和亚磷酰胺，尽管还可以使用其它官能团。

例示性的反应性官能团是可检测标记物（例如生物素或荧光染料）的羧基取代基的N-羟基琥珀酰亚氨基酯(NHS)。可以预制、分离、纯化和/或表征该标记物的NHS酯，或者可以使其原位形成，并与抗体的亲核基团起反应。典型地，将羧基形式的标记物通过与碳二亚胺试剂（例如二环己基碳二亚胺、二异丙基碳二亚胺）、或脲阳离子试剂（例如TSTU（O-(N-琥珀酰亚氨

基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟化硼盐)、HBTU((O-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐)或HATU((O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐)、活化剂(诸如1-羟基苯并三唑(HOBt)和N-羟基琥珀酰亚胺)的一些组合起反应而活化以给出该标记物的NHS酯。在一些情况中,可以通过标记物的原位活化和与抗体反应来偶联标记物和抗体以在一个步骤中形成标记物-抗体偶联物。其它活化和偶联试剂包括TBTU (2-(1H-苯并三唑-1-基)-1-1,3,3-四甲基脲六氟磷酸盐)、TFFH (N,N',N",N'"-四甲基脲2-氟-六氟磷酸盐)、PyBOP (苯并三唑-1-基-氧代-三吡咯烷膦六氟磷酸盐)、EEDQ (2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢-喹啉)、DCC (二环己基碳二亚胺)、DIPCDI (二异丙基碳二亚胺)、MSNT (1-(均三甲基苯-2-磺酰)-3-硝基-1H-1,2,4-三唑和芳基磺酰卤化物,例如三异丙基苯磺酰氯。

本发明的清蛋白结合肽-Fab化合物

在一个方面,本发明的抗体融合至清蛋白结合蛋白。血浆蛋白结合可以是改善短命分子的药动学性质的有效手段。清蛋白是血浆中最丰富的蛋白质。血清清蛋白结合肽(ABP)可以改变所融合的活性结构域蛋白质的药效学,包括改变组织摄取、渗透和扩散。可以通过合适的血清清蛋白结合肽序列的具体选择来调控这些药效学参数(US 20040001827)。通过噬菌体展示筛选鉴定了一系列清蛋白结合肽(Dennis等 (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746)。本发明的化合物包括由下列文献所教导的ABP序列: (i) Dennis等 (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 表III和IV,第35038页; (ii) US 20040001827 段[0076] SEQ ID NOS: 9-22; 和(iii) WO 01/45746,第12-13页,都收入本文作为参考。通过以1:1化学计量比(1 ABP / 1 Fab)将清蛋白结合肽融合至Fab重链的C末端来改造清蛋白结合(ABP)-Fab。显示了这些ABP-Fab与清蛋白的结合使抗体在家兔和小鼠中的半衰期增加了25倍多。因此,可以将上述反应性Cys残基导入这些ABP-Fab,并用于与细胞毒性药物的位点特异性偶联,接着是体内动物研究。

例示性的清蛋白结合肽序列包括但不限于SEQ ID NO:42-46中列出的氨基酸序列:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO:42

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:43
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:44
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO:45
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO:46

抗体-药物偶联物

在另一个方面，本发明提供了包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物或抗体-药物偶联物(ADC)，所述细胞毒剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段）或放射性同位素（即放射偶联物）。在另一个方面，本发明还提供了使用免疫偶联物的方法。在一个方面，免疫偶联物包含共价附着至细胞毒剂或可检测试剂的任何上述抗CD22抗体。

抗体-药物偶联物在癌症治疗中用于局部投递细胞毒剂或细胞抑制剂（即杀死或抑制肿瘤细胞的药物）的用途(Syrigos和Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz和Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; US 4,975,278)容许将药物模块靶向投递至肿瘤，并在那儿进行细胞内积累，而系统施用这些未经偶联的药物试剂在试图消除的肿瘤细胞以外可导致不可接受的对正常细胞的毒性水平(Baldwin等 (1986) Lancet (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", 于Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (A. Pinchera等编) pp. 475-506)。由此寻求最大功效及最小毒性。多克隆抗体和单克隆抗体皆有报道可用于这些策略(Rowland等 (1986) Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87)。这些方法中所使用的药物包括道诺霉素(daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)和长春地辛(vindesine)(Rowland等 (1986) 见上文)。抗体-毒素偶联物中所使用的毒素包括细菌毒素诸如白喉毒素、植物毒素诸如蓖麻毒蛋白、小分子毒素诸如格尔德霉素(geldanamycin)(Mandler等 (2000) Jour.. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler等 (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler等 (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、美登木素生物碱(EP 1391213; Liu等 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、和加利车霉素(Lode等 (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman等 (1993) Cancer

Res. 53:3336-3342)。毒素可通过包括微管蛋白结合、DNA结合或拓扑异构酶抑制在内的机制发挥其细胞毒性和细胞抑制性效应。有些细胞毒性药物在与大的抗体或蛋白质受体配体偶联时趋于失活或活性降低。

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec)是由针对在正常和恶性B淋巴细胞表面上发现的CD20抗原的鼠IgG1 κ单克隆抗体与通过硫脲接头-螯合剂所结合的^{111}In或^{90}Y放射性同位素构成的抗体-放射性同位素偶联物(Wiseman等 (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman等 (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig等 (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig等 (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。尽管ZEVALIN具有针对B细胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL)的活性，然而施药在大多数患者中导致严重且持久的血细胞减少。MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals)，即由hu CD33抗体与加利车霉素连接而构成的抗体-药物偶联物，在2000年批准用于经注射治疗急性骨髓性白血病(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 美国专利No. 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001)。Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.)，即由huC242抗体经二硫化物接头SPP与美登木素生物碱药物部分DM1连接而构成的抗体-药物偶联物，正在进入用于治疗表达CanAg的癌症诸如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌的II期试验。MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)，即由抗前列腺特异膜抗原(PSMA)单克隆抗体与美登木素生物碱药物部分DM1连接而构成的抗体-药物偶联物，在开发用于前列腺肿瘤的潜在治疗。将多拉司他汀(dolastatin)的合成类似物auristatin肽，auristatin E (AE)和单甲基auristatin (MMAE)与嵌合单克隆抗体cBR96（对癌瘤上的Lewis Y特异）和cAC10（对血液学恶性肿瘤上的CD30特异）偶联(Doronina等 (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)，且正在进行治疗性开发。

本文中描述了可用于生成免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链（来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)）、蓖麻毒蛋白(ricin) A链、相思豆毒蛋白(abrin) A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin) A链、α-帚曲霉素(sarcin)、油桐(Aleutites fordii)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)毒蛋白（PAPI、PAPII和PAP-S）、苦瓜(Momordica charantia)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotin)、肥皂草(sapaonaria officinalis)

抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见例如1993年10月28日公布的WO 93/21232。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。例子包括^{212}Bi、^{131}I、^{131}In、^{90}Y、和^{186}Re。抗体和细胞毒剂的偶联物使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备，诸如N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，亚氨基硫烷(IT)，亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异硫氰酸酯（诸如甲苯2,6-二异氰酸酯）、和双活性氟化合物（诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯）的双功能衍生物。例如，可如Vitetta等 (1987) Science, 238:1098中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂(WO94/11026)。

本文还涵盖抗体和一种或多种小分子毒素（诸如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱(maytansinoid)、多拉司他汀(dolastatin)、auristatin、单端孢霉素(trichothecene)和CC1065及这些毒素具有毒素活性的片段）的偶联物。

(1) 美登素和美登木素生物碱

在有些实施方案中，免疫偶联物包含偶联有一个或多个美登木素生物碱分子的本发明抗体（全长抗体或抗体片段）。

美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白多聚化来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初从东非灌木齿叶美登木（Maytenus serrata）分离得到（美国专利No. 3,896,111）。随后发现某些微生物也生成美登木素生物碱，诸如美登醇和C-3美登醇酯（美国专利No. 4,151,042）。例如下列美国专利公开了合成美登醇及其衍生物和类似物：4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 及4,371,533。

美登木素生物碱药物模块是有吸引力的抗体-药物偶联物中药物模块，因为它们：(i)相对易于通过发酵或发酵产物的化学修饰、衍生化来制备；(ii)易于用适于通过非二硫化物接头偶联抗体的官能团衍生化；(iii)在血浆中稳

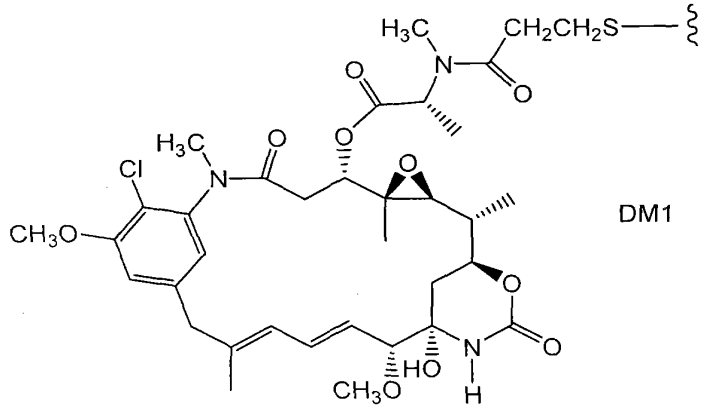
定；且(iv)有效针对多种肿瘤细胞系。

适于用作美登木素生物碱药物模块的美登素化合物是本领域公知的，而且可以依照已知方法从天然来源分离，使用遗传工程技术生产(参见Yu等(2002) PNAS 99:7968-7973)，或者美登醇和美登醇类似物也可以依照已知方法合成制备。

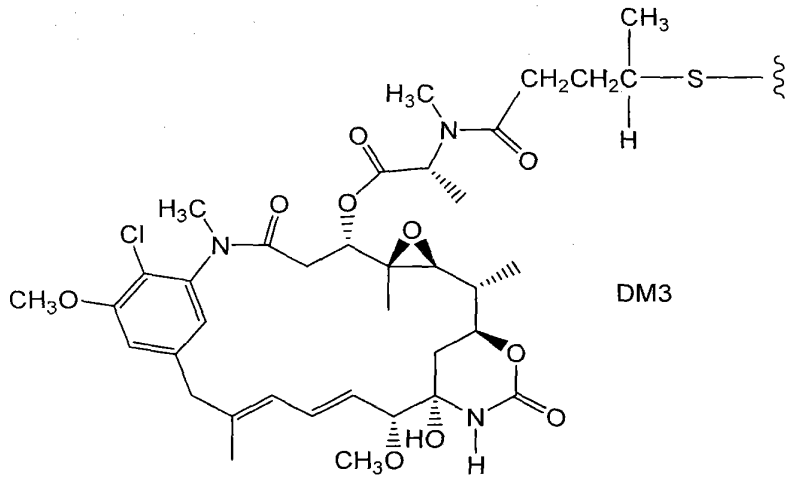
例示性的美登木素生物碱药物模块包括那些具有修饰的芳香环的，诸如：C-19-脱氯(US 4256746)（通过安丝菌素(ansamytocin) P2的氢化铝锂还原来制备）；C-20-羟基（或C-20-脱甲基）+/-C-19-脱氯(美国专利No. 4361650和4307016)（通过使用链霉菌或放线菌的脱甲基化或使用LAH的脱氯化来制备）；及C-20-脱甲氧基, C-20-酰氧基(-OCOR), +/-脱氯(美国专利No. 4,294,757)（通过使用酰氯的酰化来制备），以及那些在其它位置具有修饰的。

例示性的美登木素生物碱药物模块还包括那些具有修饰的，诸如：C-9-SH (US 4424219)（通过美登醇与H_2S或P_2S_5的反应来制备）；C-14-烷氧基甲基（脱甲氧基/CH_2OR）(US 4331598)；C-14-羟甲基或酰氧甲基（CH_2OH或CH_2OAc）(US 4450254)(自诺卡氏菌制备)；C-15-羟基/酰氧基(US 4364866)（通过链霉菌对美登醇的转化来制备）；C-15-甲氧基(美国专利No. 4313946和4315929)（自*Trewia nudlflora*分离）；C-18-N-脱甲基(美国专利No. 4362663和4322348)（通过链霉菌对美登醇的脱甲基化来制备）；及4,5-脱氧(US 4371533)（通过美登醇的三氯化钛/LAH还原来制备）。

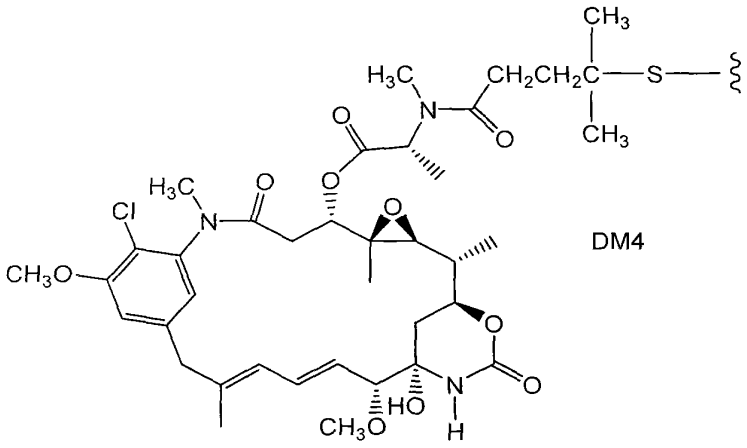
美登木素生物碱药物模块的例示性实施方案包括具有如下结构的DM1、DM3和DM4:



DM1



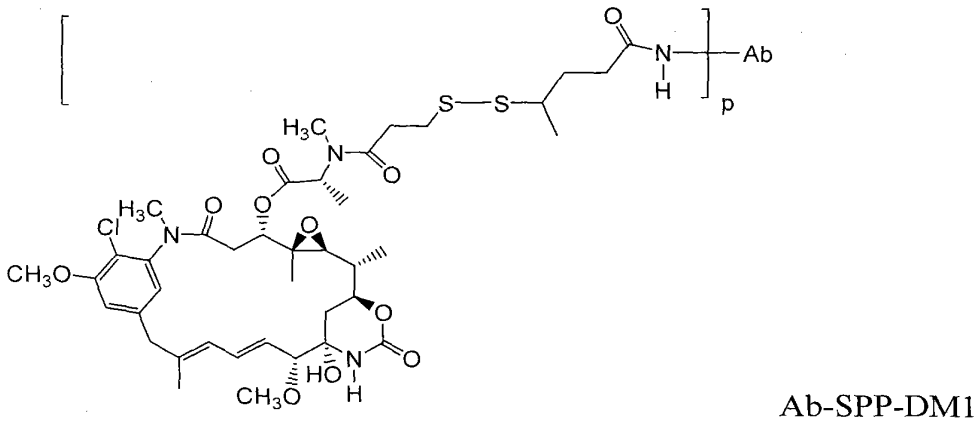
DM3



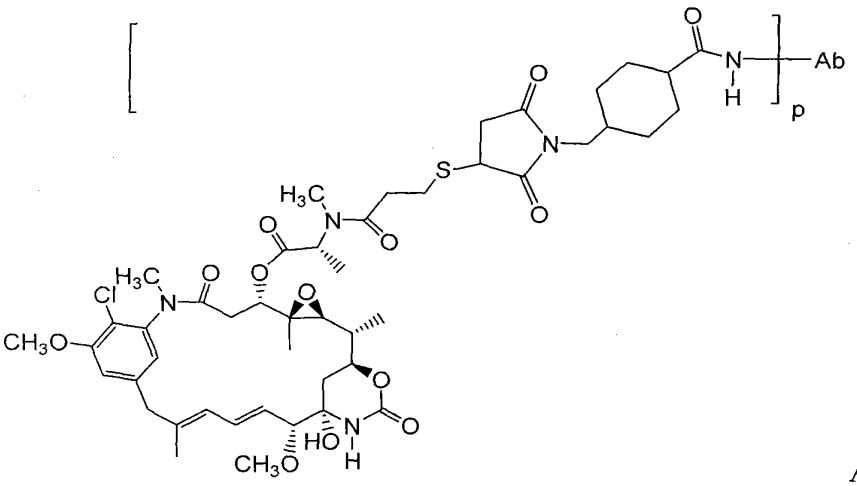
DM4

其中波形线指示药物的硫原子对抗体-药物偶联物的接头(L)的共价附着。HERCEPTIN® (trastuzumab，抗HER2抗体)经SMCC连接DM1已有报道(WO 2005/037992，明确地完整收入本文作为参考)。本发明的抗体-药物偶联物可以依照其中披露的规程来制备。

其它例示性的美登木素生物碱抗体-药物偶联物具有如下结构和缩写（其中Ab是抗体，而p是1到大约8）：

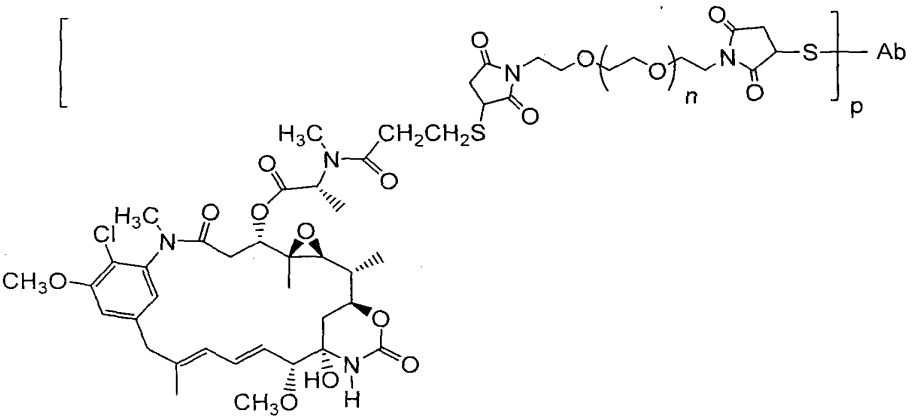


Ab-SPP-DM1



Ab-SMCC-DM1

其中DM1经BMPEO接头连接抗体硫醇基的例示性抗体-药物偶联物具有如下结构和缩写:



其中Ab是抗体; n是0、1、或2; 而p是1、2、3、或4。

例如下列专利公开了包含美登木素生物碱的免疫偶联物及其制备方法和治疗用途: 美国专利No. 5,208,020; 5,416,064; 6,441,163; 及欧洲专利EP 0

425 235 B1，明确将其公开内容收入本文作为参考。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)记载了包含与针对人结肠直肠癌的单克隆抗体C242连接的称为DM1的美登木素生物碱的免疫偶联物。发现该偶联物具有针对培养的结肠癌细胞的高度细胞毒性，而且在体内肿瘤生长测定法中显示出抗肿瘤活性。Chari等, Cancer Research 52: 127-131 (1992)记载了其中美登木素生物碱经二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上抗原的鼠抗体A7或结合HER-2/neu癌基因的另一种鼠单克隆抗体TA.1偶联的免疫偶联物。在体外在人乳腺癌细胞系SK-BR-3上测试了TA.1-美登木素生物碱偶联物的细胞毒性，该细胞系每个细胞表达$3x10^5$个HER-2表面抗原。药物偶联物达到了程度与游离美登木素生物碱药物相似的细胞毒性，这可通过增加每个抗体分子所偶联的美登木素生物碱分子数目来提高。A7-美登木素生物碱偶联物在小鼠中显示低系统性细胞毒性。

抗CD22抗体-美登木素生物碱偶联物通过将抗体与美登木素生物碱分子化学连接且不显著削弱抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性来制备。参见例如美国专利No. 5,208,020，明确将其公开内容收入本文作为参考。每个抗体分子偶联平均3-4个美登木素生物碱分子在增强针对靶细胞的细胞毒性中显示功效，且对抗体的功能或溶解度没有负面影响，尽管预计甚至每个抗体偶联一分子毒素也将较之裸抗体的使用增强细胞毒性。美登木素生物碱在本领域是众所周知的，而且可通过已知技术合成或从天然来源分离。例如美国专利No. 5,208,020和上文提及的其它专利及非专利发表物中公开了合适的美登木素生物碱。优选的美登木素生物碱是美登醇和美登醇分子的芳香环或其它位置经过修饰的美登醇类似物，诸如各种美登醇酯。

本领域知道许多连接基团可用于制备抗体-美登木素生物碱偶联物，包括例如美国专利No. 5,208,020; 6441163; 或欧洲专利0 425 235 B1; Chari等, Cancer Research 52: 127-131 (1992); 及US 2005/0169933 A1中所公开的，明确将其公开内容收入本文作为参考。包含接头构件SMCC的抗体-美登木素生物碱偶联物可以如2005年5月31日提交的美国专利申请No. 11/141344, "Antibody Drug Conjugates and Methods"中所披露的来制备。接头基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团，正如上文所述专利中所公开的。本文中描述和例示了别的接头基团。

可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和美登木素生物碱的偶联物，诸如N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)，亚氨基硫烷(IT)，亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异氰酸酯（诸如甲苯2,6-二异氰酸酯）、和双活性氟化合物（诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯）的双功能衍生物。特别优选的偶联剂包括N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)（Carlsson等, Biochem. J. 173: 723-737 (1978)）和N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)，由此提供二硫键连接。

根据连接的类型，可将接头附着于美登木素生物碱分子的多个位置。例如，可使用常规偶联技术通过与羟基的反应来形成酯键。反应可发生在具有羟基的C-3位置、经羟甲基修饰的C-14位置、经羟基修饰的C-15位置、和具有羟基的C-20位置。在一个优选的实施方案中，在美登醇或美登醇类似物的C-3位置形成连接。

在一个实施方案中，任何本发明抗体（全长抗体或抗体片段）偶联有一个或多个美登木素生物碱分子。在免疫偶联物的一个实施方案中，所述细胞毒剂D是美登木素生物碱DM1。在免疫偶联物的一个实施方案中，所述接头是SMCC。在一个实施方案中，所述抗体-接头-药物偶联物是经SMCC接头共价偶联的本文所披露的抗CD22抗体和DM1细胞毒剂。

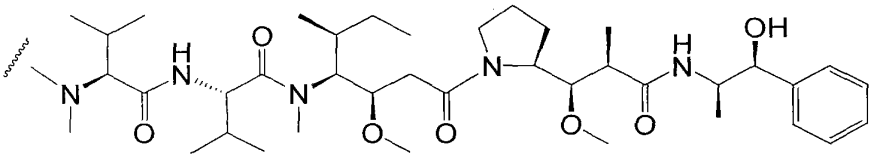
Auristatin和多拉司他汀

在有些实施方案中，免疫偶联物包含与多拉司他汀(dolastatin)或多拉司他汀肽类似物和衍生物auristatin(美国专利No. 5,635,483; 5,780,588)偶联的本发明抗体。多拉司他汀和auristatin已经显示出干扰微管动力学、GTP水解、及核和细胞分裂(Woyke等 (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5663149)和抗真菌活性(Pettit等 (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。多拉司他汀或auristatin药物模块可经由肽药物模块的N（氨基）末端或C（羧基）末端附着于抗体(WO 02/088172)。

例示性的auristatin实施方案包括N-末端连接的单甲基auristatin药物模块DE和DF，披露于Senter等, Proceedings of the American Association for Cancer

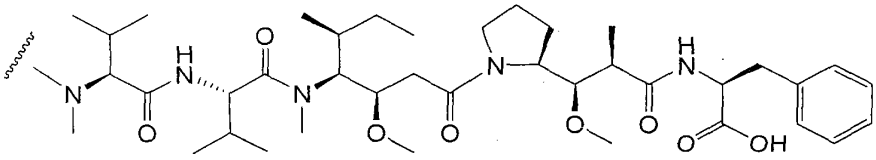
Research, 卷45, 摘要号623, 2004年3月28日，明确将其公开内容完整收入本文作为参考。

一种例示性auristatin实施方案是MMAE，其中波形线指示共价附着至抗体-药物偶联物的接头(L):



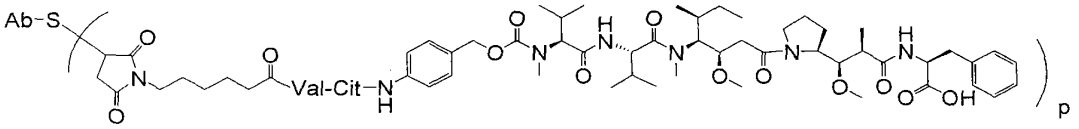
MMAE

另一种例示性auristatin实施方案是MMAF，其中波形线指示共价附着至抗体-药物偶联物的接头(L) (US 2005/0238649):

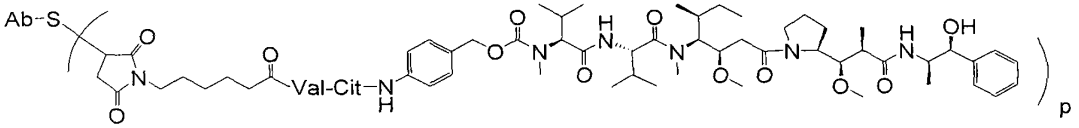


MMAF

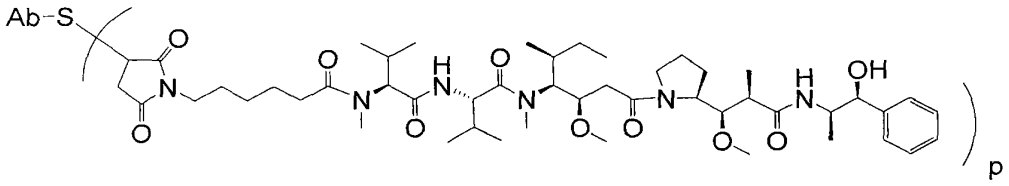
包含MMAE或MMAF及各种接头构件（本文有进一步描述）的别的例示性实施方案具有如下结构和缩写（其中Ab是抗体；而p是1到大约8）:



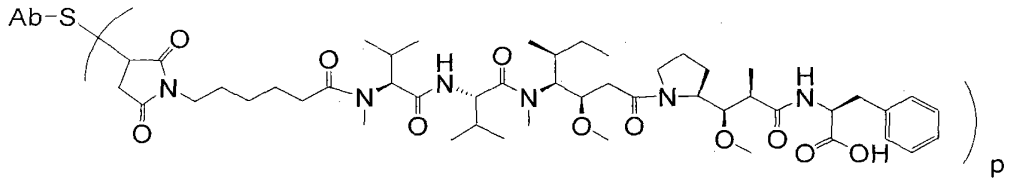
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

典型的是，基于肽的药物模块可通过在两个或多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备。此类肽键可依照例如肽化学领域众所周知的液相合成法来制备(参见E. Schröder和K. Lübke, "The Peptides", 卷1, pp 76-136, 1965, Academic Press)。auristatin/多拉司他汀药物模块可依照以下文献中的方法来制备：US 5635483; US 5780588; Pettit等 (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit等 (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R.等 *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit等 (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 5:859-863; 及Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784。

加利车霉素

在其它实施方案中，免疫偶联物包含偶联有一个或多个加利车霉素分子的本发明抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度生成双链DNA断裂。关于加利车霉素家族偶联物的制备参见美国专利5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 5,877,296（都是美国Cyanamid公司的）。可用的加利车霉素结构类似物包括但不限于γ_1^I、α_2^I、α_3^I、N-乙酰基-γ_1^I、PSAG和θ^I_1（Hinman等, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993); Lode等, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998); 及上述美国Cyanamid公司的美国专利）。可以与抗体偶联的另一种抗肿瘤药物是QFA，它是一种抗叶酸药物。加利车霉素和QFA都具有胞内作用位点，且不易穿过质膜。因此，这些试剂经由抗体介导的内在化的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒效应。

其它细胞毒剂

可以与本发明抗体偶联的其它抗肿瘤剂包括BCNU、链佐星(streptozoicin)、长春新碱(vincristine)、5-氟尿嘧啶、美国专利5,053,394、5,770,710中记载的统称为LL-E33288复合物的试剂家族、及埃斯波霉素(esperamicin)（美国专利No. 5,877,296）。

可用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链（来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)）、蓖麻毒蛋

白(ricin) A链、相思豆毒蛋白(abrin) A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin) A链、α-帚曲霉素(sarcin)、油桐(Aleutites fordii)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(Phytolaca americana)毒蛋白（PAPI、PAPII和PAP-S）、苦瓜(Momordica charantia)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotin)、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见例如1993年10月28日公布的WO 93/21232。

本发明还涵盖抗体和具有核酸降解活性的化合物（例如核糖核酸酶或DNA内切核酸酶，诸如脱氧核糖核酸酶；DNA酶）之间形成的免疫偶联物。

为了选择性破坏肿瘤，抗体可包含高度放射性原子。多种放射性同位素可用于生成放射偶联抗体。例子包括At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}和Lu的放射性同位素。在将偶联物用于检测时，可包含放射性原子用于闪烁照相研究，例如tc^{99m}或I^{123}，或是包含自旋标记物用于核磁共振(NMR)成像（也称为磁共振成像，MRI），诸如同样是碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

可以已知方式将放射性标记物或其它标记物掺入偶联物。例如，可生物合成肽，或是通过化学氨基酸合成法合成肽，其中使用涉及例如氟-19代替氢的合适氨基酸前体。可以经肽中的半胱氨酸残基来附着标记物，诸如tc^{99m}或I^{123}、Re^{186}、Re^{188}和In^{111}。可以经赖氨酸残基来附着钇-90。IODOGEN法（Fraker等 (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57）可用于掺入碘-123。《Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy》（Chatal, CRC Press, 1989）详细记载了其它方法。

可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的偶联物，诸如N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)，亚氨基硫烷(IT)，亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异硫氰酸酯（诸如甲苯2,6-二异氰酸酯）、和双活性氟化合物（诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯）的双功能衍生物。例如，可以如Vitetta等, *Science* 238:1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸

(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见WO94/11026。接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari等，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美国专利No. 5,208,020)。

本发明的化合物明确涵盖但不限于用如下交联试剂制备的ADC: BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC、sulfo-SMPB、和SVSB（琥珀酰亚氨基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯），它们可通过商业途径获得（例如Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A）。参见2003-2004年度应用手册和产品目录(2003-2004 Applications Handbook and Catalog)第467-498页。

抗体-药物偶联物的制备

在本发明的抗体-药物偶联物(ADC)中，抗体(Ab)经接头(L)偶联有一个或多个药物模块(D)，例如大约1个到大约20个药物模块每个抗体。可以采用本领域技术人员知道的有机化学反应、条件和试剂通过数种路径来制备通式I的ADC，包括：(1)抗体的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应形成Ab-L，接着与药物模块D反应；和(2)药物模块的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应形成D-L，接着与抗体的亲核基团反应。本文中描述了用于制备ADC的别的方法。

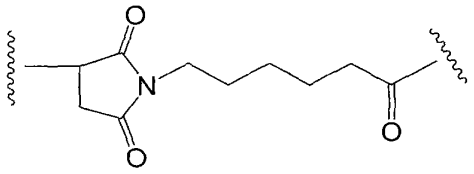
$$Ab–(L–D)_p \qquad \text{式I}$$

接头可以由一种或多种接头构件构成。例示性的接头构件包括6-马来酰亚氨基己酰基(“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1羧酸酯(“SMCC”)、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。本领域知道别的接头构件，本文也描述了一些。

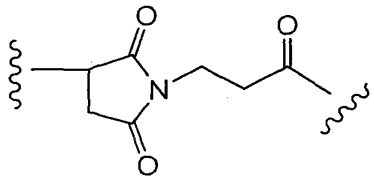
在有些实施方案中，接头可包含氨基酸残基。例示性的氨基酸接头构件包括二肽、三肽、四肽、或五肽。例示性的二肽包括：缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)；丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。例示性的三肽包括：甘氨酸-缬氨酸

-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。构成氨基酸接头构件的氨基酸残基可以包括天然存在的氨基酸残基，以及次要氨基酸和非天然存在氨基酸类似物，诸如瓜氨酸。氨基酸接头构件可以在它们对特定酶（例如肿瘤相关蛋白酶，组织蛋白酶B、C和D，或血浆蛋白酶）的酶促切割的选择性方面进行设计和优化。

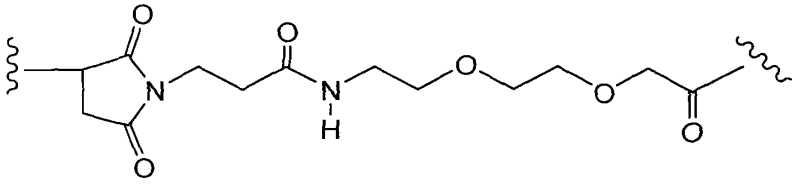
例示性接头构件结构如下所示（其中波形线指示ADC其它构件共价附着的位点）：



MC

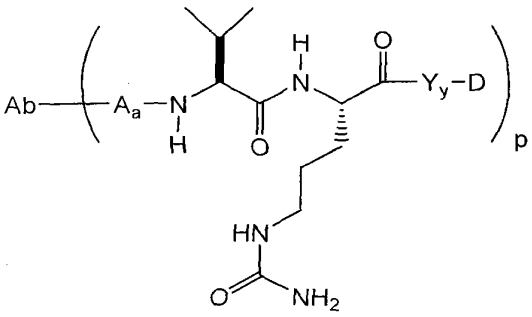


MP

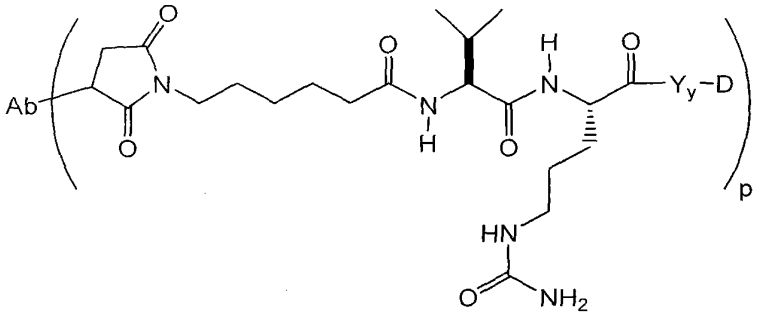


MPEG

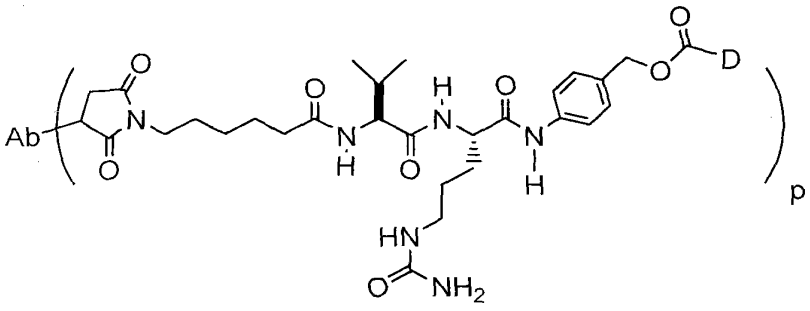
别的例示性接头构件和缩写包括（其中描绘了抗体(Ab)和接头，而p是1到大约8）：



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

抗体的亲核基团包括但不限于：(i) N末端胺基；(ii) 侧链胺基，例如赖氨酸；(iii) 侧链硫醇基，例如半胱氨酸；和(iv) 糖基化抗体中糖的羟基或氨基。胺、硫醇、和羟基是亲核的，能够与接头模块上的亲电子基团反应而形成共价键，而接头试剂包括：(i) 活性酯类，诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物；(ii) 烃基和苄基卤化物，诸如卤代乙酰胺；(iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫键，即半胱氨酸桥。可通过还原剂诸如DTT（二硫苏糖醇）处理，从而具有与接头试剂偶联的反应性。每个半胱氨酸桥理论上将形成两个反应性硫醇亲核体。可将额外亲核基团引入抗体，经由使赖氨酸残基与2-亚氨基硫烷（Traut氏试剂）起反应，导致胺转变为硫醇。可以通过导入一个、两个、三个、四个、或更多个半胱氨酸残基（例如通过制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的突变型抗体）而将反应性硫醇基导入抗体（或其片段）。

还可通过修饰抗体以导入能与接头试剂或药物上的亲核取代基起反应的亲电子模块来生成本发明的抗体-药物偶联物。可以用例如高碘酸盐氧化剂氧化糖基化抗体的糖，从而形成可与接头试剂或药物模块的胺基团反应的醛或酮基团。所得亚胺Schiff碱基可形成稳定的连接，或者可以用例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中，糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可以在蛋白质中生成羰基

（醛和酮），它能与药物上的适宜基团反应(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中，包含N-末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可以与偏高碘酸钠反应，导致在第一个氨基酸处生成醛(Geoghegan和Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852)。此类醛能与药物模块或接头亲核体反应。

类似的，药物模块上的亲核基团包括但不限于：胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯、和芳基酰肼基团，它们能够与接头模块上的亲电子基团反应而形成共价键，而接头试剂包括：(i) 活性酯类，诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物；(ii) 烃基和苄基卤化物，诸如卤代乙酰胺；(iii) 醛类、酮类、羧基、和马来酰亚胺基团。

在又一个方面，抗体具有一个或多个赖氨酸残基，其可以化学修饰以引入一个或多个硫氢基。所述抗体单元与接头单元经硫氢基的硫原子成键。可用于修饰赖氨酸的试剂包括但不限于N-琥珀酰亚氨基S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)和盐酸2-亚氨基硫烷（Traut氏试剂）。

在另一个实施方案中，抗体可以具有一个或多个碳水化合物基团，其可以化学修饰以具有一个或多个硫氢基。所述抗体单元与接头单元（诸如延伸物单元）经硫氢基的硫原子成键，如本文中所公开的。

在又一个实施方案中，抗体可以具有一个或多个碳水化合物基团，其可以氧化以提供醛基(-CHO)（参见例如Laguzza,等, J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55）。相应的醛可以与延伸物上的反应性位点形成键。延伸物上可以与抗体上的羰基起反应的反应性位点包括但不限于肼和羟胺。用于修饰蛋白质以附着或结合药物单元的其它方案记载于Coligan等, Current Protocols in Protein Science, 卷2, John Wiley & Sons (2002)，收入本文作为参考。

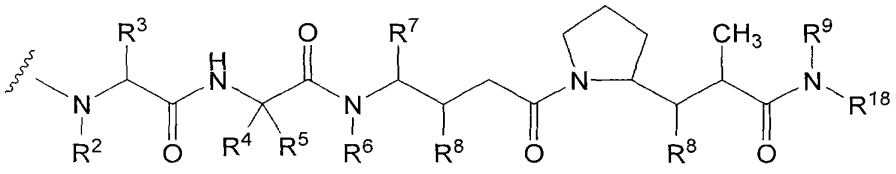
用于将接头-药物模块偶联至细胞靶向蛋白质（诸如抗体、免疫清蛋白或其片段）的方法可见于例如US5,208,020; US6,441,163; WO2005037992; WO2005081711; 和WO2006/034488，都明确地完整收入本文作为参考。

或者，可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。DNA的长度可以包含各自编码偶联物的两部分的区域，彼此或是毗邻或是由编码接头肽的区域分开，该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

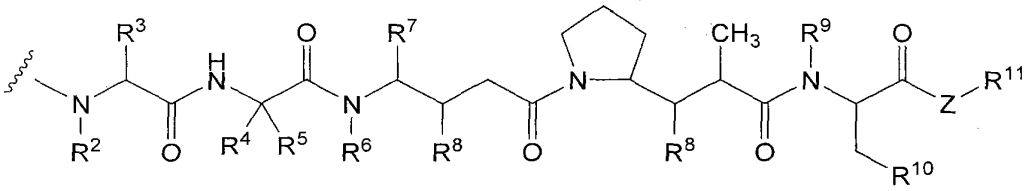
在又一个实施方案中，可以将抗体与“受体”（诸如链霉亲合素）偶联从而用于肿瘤预先靶向，其中对患者施用抗体-受体偶联物，接着使用清除

剂由循环中清除未结合的偶联物，然后施用与细胞毒剂（例如放射性核苷酸）偶联的“配体”（例如亲合素）。

在免疫偶联物的一个实施方案中，所述细胞毒剂D是式D_E或D_F的auristatin



D_E



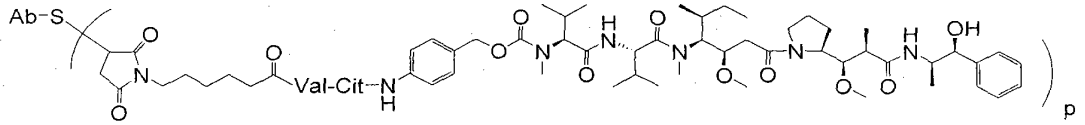
D_F

且其中R^2和R^6各自是甲基；R^3和R^4各自是异丙基；R^7是仲丁基；各个R^8独立地选自CH_3、O-CH_3、OH、和H；R^9是H；R^{10}是芳基；Z是–O–或–NH–；R^{11}是H、C_1-C_8烃基、或–$(CH_2)_2$–O–$(CH_2)_2$–O–$(CH_2)_2$–O–CH_3；且R^{18}是–$C(R^8)_2$–$C(R^8)_2$–芳基；且

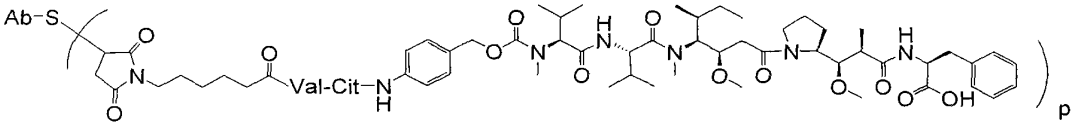
(d) p的范围为大约1至8。

关于任何上述免疫偶联物，进一步提供了以下实施方案。在一个实施方案中，免疫偶联物具有体外或体内细胞杀伤活性。在一个实施方案中，所述接头经抗体上的硫醇基团附着于抗体。在一个实施方案中，所述接头是蛋白酶可切割的（即能够被蛋白酶切割的）。在一个实施方案中，所述接头包含val-cit二肽。在一个实施方案中，所述接头包含对氨基苄基单元。在一个实施方案中，所述对氨基苄基单元部署在药物与接头中的蛋白酶切割位点之间。在一个实施方案中，所述对氨基苄基单元是对氨基苄氧羰基(PAB)。在一个实施方案中，所述接头包含6-马来酰亚氨基己酰基。在一个实施方案中，所述6-马来酰亚氨基己酰基部署在抗体与接头中的蛋白酶切割位点之间。上述实施方案可以单独的或彼此任意组合的发生。

在一个实施方案中，所述药物选自MMAE和MMAF。在一个实施方案中，所述免疫偶联物具有通式



其中Ab是任何上述抗CD22抗体，S是硫原子，而p的范围是自2至5。在一个实施方案中，所述免疫偶联物具有通式



其中Ab是任何上述抗CD22抗体，S是硫原子，而p的范围是自大约1至大约6、自大约2至大约5、自大约2至大约6、自大约2至大约4、自大约2至大约3、自大约3至大约4、自大约3至大约5、自大约3至大约6、或自大约4至大约6。

经标记抗体成像方法

在本发明的另一个实施方案中，可以用放射性核素、荧光染料、生物发光触发性底物模块、化学发光触发性底物模块、酶和其它检测标记物通过半胱氨酸硫醇来标记半胱氨酸改造抗体以用于具有诊断、药效学和治疗应用的成像实验。一般而言，通过注射、输注或口服摄入给活的生物体（例如人、啮齿类动物或其它小动物），灌注器官或组织样品施用经过标记的半胱氨酸改造抗体，即“生物标志物”或“探针”。在一段时间上检测探针的分布并由影像显示。

制品

在本发明的另一个实施方案中，提供了包含可用于治疗上文所述病症的物质的制品或“试剂盒”。所述制品包括容器和容器上的或与容器相关的标签或包装插页。合适的容器包括例如药瓶、药管、注射器、泡罩包装、等。所述容器可以用多种材料制成，诸如玻璃或塑料。所述容器装有有效治疗所述疾患的抗体-药物偶联物(ADC)组合物，可以具有无菌存取口（例如所述容器可以是带有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或药瓶）。所述组合物中的至少一种活性药剂是ADC。标签或包装插页指明该组合物用于治疗所选疾患，诸如癌症。或者/另外，所述制品可进一步包括第二（或第三）容器，其中装有药学可接受的缓冲液，诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、

林格氏(Ringer)溶液和右旋糖溶液。它可进一步包括从商业和用户立场出发需要的其它物质，包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针头、和注射器。

药用组合物

一方面，提供了包含任何上述免疫偶联物和药学可接受载体的药用组合物。一方面，提供了治疗B细胞增殖性病症的方法，其中所述方法包括给个体施用所述药用组合物。在一个实施方案中，所述B细胞增殖性病症选自淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。在一个实施方案中，所述细胞增殖性病症与细胞表面上CD22表达升高有关。

一方面，提供了抑制细胞增殖的方法，其中所述方法包括在容许免疫偶联物结合CD22的条件下使细胞暴露于任何上述免疫偶联物。在一个实施方案中，所述B细胞是肿瘤细胞。在一个实施方案中，所述肿瘤细胞是发生或怀疑发生选自下组的B细胞增殖性病症的哺乳动物的B细胞：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤，所述细胞是异种移植物。在一个实施方案中，所述暴露发生于体外。在一个实施方案中，所述暴露发生于体内。

一方面，提供了使用本发明的抗CD22抗体的方法，其用以测定发生白血病或淋巴瘤的哺乳动物中的血清可溶性CD22以诊断B细胞白血病或B细胞淋巴瘤、测量疾病的临床进展或消退、或评估肿瘤负荷或复发。此类方法披露于US 20050244828 (Kreitman, R.J.等，将其完整内容收入本文作为参考)，其中使用抗CD22 RFB4抗体－PE38（假单胞菌外毒素A片段38）毒素偶联物(Kreitman, R.J.等, NEJM 345:241-247 (2001))。

附图简述

图1A-1D：**图1A**是CD22的示图，其指明β同种型的胞外结构域的7个免疫球蛋白样结构域。α同种型缺乏结构域3和4。“TM”指跨膜结构域。**图1B**描

绘了β形式的CD22的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。α形式的CD22缺乏以斜体所示的氨基酸（编码胞外结构域的结构域3和4）。该蛋白质成熟形式的胞外结构域划有下划线(SEQ ID NO:28)。氨基酸1-21描绘了从该成熟形式切除的信号序列。**图1C**是CD22α的氨基酸序列(SEQ ID NO:29)。CD22α的ECD划有下划线(SEQ ID NO:30)。**图1D**是来自猕猴(cyno)的CD22的氨基酸序列(SEQ ID NO:31)。猕猴CD22的最初19个氨基酸是信号序列。

图2A-2B: **图2A**描绘了本发明的鼠10F4抗CD22抗体(h10F)与人源化10F4型式1抗体(h10F4v1)及人亚组III序列的重链可变域氨基酸序列比对。给HVR划上方框(HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3)。包夹HVR的序列是框架序列(FR-H1至FR-H4)。依照Kabat编号方式给序列编号。关于划了方框的HVR指明了Kabat、Chothia和接触CDR。**图2B描绘**了本发明的鼠10F4抗CD22抗体(h10F4)与人源化10F4型式1抗体(h10F4v1)及人κI序列的轻链可变域氨基酸序列比对。人源化10F4抗体的型式2和3 (h10F4v2和h10F4v3)在分泌的成熟形式上具有相同的氨基酸序列。抗体h10F4v2和h10F4v3与h10F4v1在HVR-L1的第28位氨基酸上不同(N28V)。给HVR划上方框。FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4序列包夹HVR (HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3)。依照Kabat编号方式给序列编号。关于划了方框的HVR指明了Kabat、Chothia和接触CDR。

图3A和3B显示了用于实施本发明的例示性的受体人重链可变域(VH)共有框架序列，其具有如下序列标识符，其中按FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4的顺序列出了FR SEQ ID NO:

- 人VH亚组I共有框架“A”减去Kabat CDR (SEQ ID NO:26, 47, 48, 7)。
- 人VH亚组I共有框架“B”、“C”和“D”减去延伸的高变区(SEQ ID NO:50、51、52、7; SEQ ID NO:50、51、52、7; 和SEQ ID NO:50、51、53、7)。
- 人VH亚组II共有框架“A”减去Kabat CDR (SEQ ID NO:54、55、56、7)。
- 人VH亚组II共有框架“B”、“C”和“D”减去延伸的高变区(SEQ ID NO:57、58、56、7; SEQ ID NOs:57、58、59、7; 和SEQ ID NO:57、58、60、7)。
- 人VH亚组III共有框架“A”减去Kabat CDR (SEQ ID NO: 61、62、63、7)。
- 人VH亚组III共有框架“B”、“C”和“D”减去延伸的高变区(SEQ ID NO: 64、65、63、7; SEQ ID NO: 64、65、66、7; 和SEQ ID NO: 64、65、67、7)。
- 人VH受体1框架“A”减去Kabat CDR (SEQ ID NO: 68、62、69、7)。

- 人VH受体框架"B"和"C"减去延伸的高变区(SEQ ID NO:64、65、69、7;和SEQ ID NO:64、65、70、7)。
- 人VH受体2框架"A"减去Kabat CDR (SEQ ID NO:68、62、71、7)。
- 人VH受体2框架"B"、"C"和"D"减去延伸的高变区(SEQ ID NO:64、65、71、7; SEQ ID NOs:64、65、72、7; 和SEQ ID NO:64、65、73、7)。

图4A和4B显示了用于实施本发明的例示性的受体人轻链可变域(VL)共有框架序列，其具有如下序列标识符:

- 人VLκ亚组I-1共有框架(κv1-1): SEQ ID NO:74、75、76、77
- 人VLκ亚组I共有框架(κv1): SEQ ID NO:74、78、76、77
- 人VLκ亚组II共有框架(κv2): SEQ ID NO:49、79、80、77
- 人VLκ亚组III共有框架(κv3): SEQ ID NO:81、82、83、77
- 人VLκ亚组IV共有框架(κv4): SEQ ID NO: 84、85、86、77

图5A和5B: 图5A描绘了天然序列人IgG Fc区序列，人IgG1（非A同种异型，SEQ ID NO:38; 和A同种异型，其中SEQ ID NO:38内的氨基酸序列SREEM变成SRDEL）、人IgG2 (SEQ ID NO:39)、人IgG3 (SEQ ID NO:40)和人IgG4 (SEQ ID NO:41)的比对，其中用星号标示序列间差异。序列上方的数字代表EU编号系统。还显示了例示性的κ恒定区。**图5B**描绘了人源化抗CD22抗体10F4v2，同种型IgG1的轻链和重链的全长氨基酸序列（可变区和恒定区）。划有下划线的部分描绘恒定域。

图6A-6D显示了测量CD22 ADC在淋巴瘤细胞系中功效的各种决定因素的测定法的结果。**图6A**表明较高的细胞表面CD22水平与较低的抗CD22-MCC-DM1 IC50（较高的功效）相关。**图6B**表明抗CD22-MCC-DM1内在化增加与较低的抗CD22-MCC-DM1 IC50相关。**图6C**表明细胞对游离药物的内在敏感性增加与较低的抗CD22-MCC-DM1 IC50相关。**图6D**是显微照片，其显示荧光标记的抗CD22抗体在结合至细胞表面上的CD22后的内在化。

图7A-7B: 图7A是异种移植物模型中体内肿瘤体积缩小的曲线图，其显示了给具有人B细胞肿瘤的SCID小鼠施用抗CD22抗体mu10F4-smcc-DM1和hu10F4v1-smcc-DM1显著降低了肿瘤体积。药物负载是大约4和4.6，参见表4。**图7B**是类似研究的曲线图，但药物负载略微低些，为大约2.9和3.0（参见表5），并且将mu10F4-smcc-DM1和hu10F4v2-smcc-DM1功效与对照抗体和未偶联的mu10F4进行了比较。**图7C**是异种移植物模型中体内肿瘤降低的曲线图，

其中如表6中所示的那样施用抗CD22-spp-DM1。

图8A和8B： **图8A**是给Ramos细胞异种移植物施用的抗CD22抗体5E8.1.8-smcc-DM1和RFB4-smcc-DM1的曲线图。**图8B**是给BJAB-luc异种移植物施用的抗CD22抗体5E8.1.8-smcc-DM1和RFB4-smcc-DM1的曲线图。

图9的曲线图显示了在施用处于低的、中等的和高的药物负载的抗CD22(RFB4)-smcc-DM1后随时间对肿瘤体积的相对影响。

图10的曲线图显示了在Ramos异种移植物中施用抗CD22(RFB4)-MC-vcPAB-MMAF或抗CD22(RFB4)-MC-MMAF后随时间对肿瘤体积的相对影响。

图11的曲线图显示了在施用抗CD22(RFB4)-smcc-DM1或-MCvcPAB-MMAE后随时间对肿瘤体积的相对影响。

图12的曲线图显示了在施用MMAF或DM1免疫偶联物形式的人源化抗CD22 10F4变体（如表12中所披露的）后随时间对肿瘤体积的相对影响。

图13A-13C的曲线图显示了在不同B细胞淋巴瘤异种移植物模型：SuDHL-4（图13A）、DoHH2（图13B）和Granta-519（图13C）中施用抗CD22-smcc-DM1或抗CD22-MC-MMAF后随时间对肿瘤体积的相对影响。

图14显示了为表位绘图而删除的CD22结构域的示图（如实施例中所述的）。将结构域编号为1-7。“TM”指跨膜结构域。

图15显示了半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物(ADC)的描绘，其中将药物模块附着至轻链(LC-ADC)、重链(HC-ADC)和Fc区(Fc-ADC)中改造的半胱氨酸基团。

图16显示了下列步骤：(i)用还原剂TCEP（盐酸三（2-羧基乙基）膦）(*tris*(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)还原半胱氨酸改造抗CD22抗体(ThioMab)中的半胱氨酸二硫化物加合物及链间和链内二硫化物；(ii)用dhAA（脱氢抗坏血酸）部分地氧化，即再氧化以再形成链间和链内二硫化物；和(iii)将再氧化后的抗体与药物-接头中间体偶联以形成半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物(ADC)。

图17A-17C描绘了本发明抗CD22半胱氨酸改造抗体的氨基酸序列，其中改变轻链或重链或Fc区以在所选择的氨基酸位置上改造半胱氨酸。**图17A**描绘了抗CD22 10F4变体轻链的氨基酸序列，其中将Kabat第205位缬氨酸（顺序位置缬氨酸210）变为半胱氨酸。**图17B**描绘了抗CD22 10F4变体重链的氨

基酸序列，其中将EU第118位丙氨酸（顺序位置丙氨酸121）变为半胱氨酸。**图17C**描绘了抗CD22 10F4变体Fc区的氨基酸序列，其中将EU第400位丝氨酸（顺序位置丝氨酸403）变为半胱氨酸。在各幅图中，以粗体文本与双下划线方式显示了改变的氨基酸。单下划线指出恒定区。可变区没有加下划线。

图18A-18E的FACS图示表明：对于LC、HC和Fc thiomab变体以及所示的不同药物偶联物，本发明抗CD22 thiomab药物偶联物(TDC)对BJAB-lucs细胞表面上所表达的CD22的结合是相似的。

图19的曲线图标绘了用不同抗CD22 TDC处理的异种移植物模型中平均肿瘤体积随时间的变化，其由于改造的半胱氨酸的位置(LC、HC或Fc)和/或药物偶联物(MMAF或MMAE)而改变。用抗CD22 TDC即10F4-LC-V210C-MCvcPAB-MMAE和抗CD22 10F4-HC-A121C-MCvcPAB-MMAE处理的异种移植物模型显示了研究期间肿瘤体积的下降。

图20A的曲线图标绘了CB17 SCID小鼠中人套细胞淋巴瘤Granta-519异种移植物中平均肿瘤体积随时间的改变，所述CB17 SCID小鼠用与不同接头药物模块偶联的重链A118C抗CD22 TDC处理和/或以不同剂量施用，如所示的。看来抗CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC是本实验的测试药剂中最有效的。**图20B**的曲线图标绘了CB17 SCID小鼠中滤泡性淋巴瘤DOHH2异种移植物中平均肿瘤体积随时间的改变，所述CB17 SCID小鼠用相同的重链A118C抗CD22 TDC处理，但在更高的剂量。看来抗CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC是本实验的测试药剂中最有效的。**图20C**是来自DOHH2异种移植物研究的小鼠中百分比体重改变的图示，其显示本研究的最初14天期间体重没有显著的改变。

图21A和21B的柱状图显示了第0天和第5天血清ASTM（天冬氨酸转氨酶）（**图21A**）和血清嗜中性细胞（**图21B**）的变化，其中施用了包含可切割的和不可切割的接头的ADC。

图22A和22B的曲线图显示了服用10、20和30 mg/kg抗CD22 MMAF（**图22A**）和抗CD22 DM1（**图22B**）的猕猴中外周B细胞（$CD20^+$细胞）的消减。

图23A和23B的曲线图显示了在10、20和30mg/kg抗CD22 MMAF（**图23A**）和抗CD22 DM1（**图23B**）时，$CD4^+$淋巴细胞没有显著的改变。

图24A和24B显示了猕猴扁桃体的组织学样品，其中生发中心B细胞的消

减（在媒介对照中是明显的）（**图24A**）在来自服用10mg/kg hu10F4v3-SMCC-DM1的动物的扁桃体样品中消减了。

图25A的图示指出从中为研究而采集的组织样品的脾滤泡区域，该组织样品显示了抗CD22 ADC使猕猴静息组织中的B细胞免于伤害(spare)。猕猴脾滤泡生发中心中正在分裂的细胞在来自服用10mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF的动物的猕猴脾的正在分裂生发细胞中消减了（**图25B和25C**）。非分裂的幼稚B细胞在相同条件下没有消减（**图25D和25E**）。

本发明实施方案的详述

提供了能结合CD22的分离的抗体。还提供了包含抗CD22抗体的免疫偶联物。还提供了经过半胱氨酸改造的抗CD22抗体及其免疫偶联物。本发明的抗体和免疫偶联物可用于例如与CD22表达改变（例如升高）有关的病症的诊断或治疗。在某些实施方案中，本发明的抗体或免疫偶联物可用于细胞增殖性病症（诸如肿瘤或癌症）的诊断或治疗。在某些实施方案中，本发明的抗体或免疫偶联物可用于CD22（例如细胞表面上所表达的CD22）的检测。

提供了编码抗CD22抗体的多核苷酸。提供了包含编码抗CD22抗体的多核苷酸的载体，并提供了包含此类载体的宿主细胞。还提供了包含本发明的多核苷酸、抗CD22抗体、或免疫偶联物中的任何一种或多种的组合物（包括药物配制剂）。

通用技术

本文中所描述或提到的技术和规程一般得到了本领域技术人员的充分理解，而且通常利用常规方法得以采用，诸如例如下列文献中所记载的广泛应用的方法：Sambrook等，Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel等编, 2003); 丛书Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames和G. R. Taylor编, 1995), Harlow和Lane编 (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney编, 1987); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait编, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis编,

1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney 编, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather和P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths 和 D. G. Newell 编, 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir和C. C. Blackwell编); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller和M. P. Calos编, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等 编, 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan等编, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway和P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty编, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd和C. Dean编, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow和D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti和J. D. Capra编, Harwood Academic Publishers, 1995); 及Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita等编, J.B. Lippincott Company, 1993)。

定义和缩写

定义

"分离的"抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染物成分指会干扰该抗体的研究、诊断或治疗用途的物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在有些实施方案中，将抗体纯化至(1)根据例如Lowry法的测定，抗体重量超过95%，而在有些实施方案中，重量超过99%，(2)足以通过使用例如转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度，或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用例如考马斯蓝或银染色，达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而，分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

"分离的"核酸分子指与例如该核酸分子的天然来源中通常与之关联的至少一种其它核酸分子分开的核酸分子。分离的核酸分子进一步包括包含在正常情况下表达该核酸分子的细胞中的核酸分子，但是所述核酸分子是以染

色体外形式存在的或在染色体上的定位不同于其天然染色体定位。

“纯化的”意味着分子以至少95%（以重量计）、或至少98%（以包含它的样品的重量计）的浓度存在于样品中。

短语“基本上相似”或“基本上相同”在用于本文时表示两个数值（例如，一个与本发明的抗体有关而另一个与参照/比较抗体有关）之间足够高的相似程度，以致本领域技术人员会认为在用所述数值（例如Kd值）所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有很小的或没有生物学和/或统计学显著性。作为参照/比较值的函数，所述两个数值之间的差异例如小于约50%，小于约40%，小于约30%，小于约20%，和/或小于约10%。

短语“实质性降低”或“实质性不同”在用于本文时表示两个数值（通常一个与某分子有关而另一个与参照/比较分子有关）之间足够高的差异程度，以致本领域技术人员会认为在用所述数值（例如Kd值）所测量的生物学特性背景内两个数值之间的差异具有统计学显著性。作为参照/比较分子该数值的函数，所述两个数值之间的差异例如大于约10%，大于约20%，大于约30%，大于约40%，和/或大于约50%。

术语“载体”在用于本文时意指能够运输与其连接的其它核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”，指其中可连接别的DNA区段的环状双链DNA。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体，其中可将别的DNA区段连接入病毒基因组。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其它载体（例如非附加型哺乳动物载体）可以在导入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组，由此随着宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导与其可操作连接的基因表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”，或简称为“表达载体”。通常，在重组DNA技术中有用的表达载体常常是质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是载体的最常用形式。

“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用，指任何长度的核苷酸聚合物，包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物，或者是可通过DNA或RNA聚合酶或者通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可包含经过修饰的核苷酸，诸如甲基化核苷酸及其类似物。如果有的话，对核苷酸结构的修饰可以在装配聚合物之前或之后进行。核苷酸序列可以由非核苷酸组分中断。多核

苷酸可以在合成后包含修饰，诸如偶联至标记物。其它类型的修饰包括例如“帽”、将一个或多个天然存在的核苷酸用类似物替代、核苷酸间修饰诸如例如具有不带电荷连接（例如膦酸甲酯、磷酸三酯、磷酰胺酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯等）和具有带电荷连接（例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等）的修饰、含有悬垂模块(pendant moiety)诸如例如蛋白质（例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚L-赖氨酸等）的修饰、具有嵌入剂（例如吖啶、补骨脂素等）的修饰、含有螯合剂（例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等）的修饰、含有烷化剂的修饰、具有经修饰连接（例如α端基异构核酸(anomeric nucleic acid)等）的修饰、以及未修饰形式的多核苷酸。另外，通常存在于糖类中的任何羟基可以用例如膦酸(phosphonate)基团、磷酸(phosphate)基团替换，用标准保护基团保护，或活化以制备与别的核苷酸的别的连接，或者可偶联至固体或半固体支持物。5'和3'末端OH可磷酸化或者用胺或1-20个碳原子的有机加帽基团模块取代。其它羟基也可衍生成标准保护基团。多核苷酸还可含有本领域普遍知道的核糖或脱氧核糖糖类的类似物形式，包括例如2'-氧-甲基-、2'-氧-烯丙基-、2'-氟-或2'-叠氮-核糖，碳环糖类似物，α-端基异构糖，差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖，无环类似物及碱性(basic)核苷类似物诸如甲基核糖核苷。可用备选连接基团替换一个或多个磷酸二酯连接。这些备选连接基团包括但不限于以下实施方案，其中磷酸酯用P(O)S（“硫代酸酯”(thioate)）、P(S)S（“二硫代酸酯”(dithioate)）、(O)NR_2（“酰胺酯”(amidate)）、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH_2（“甲缩醛”(formacetal)）替代，其中R或R'各自独立为H或者取代或未取代的烃基（1-20个C），任选含有醚(-O-)连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烃基(araldyl)。并非多核苷酸中的所有连接都必需是相同的。前述描述适用于本文中提及的所有多核苷酸，包括RNA和DNA。

“寡核苷酸”在用于本文时一般指短的多核苷酸，一般是单链，一般是合成的，长度一般但不是必需小于约200个核苷酸。术语“寡核苷酸”与“多核苷酸”并不互相排斥。上文关于多核苷酸的描述平等且完全适用于寡核苷酸。

关于参考多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为比对序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后，且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时，候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基相

同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的比对可以本领域技术范围内的多种方式进行，例如使用公众可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定用于比对序列的适宜参数，包括对所比较序列全长获得最大比对所需的任何算法。然而，为了本发明的目的，%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2获得的。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司编写，源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(US Copyright Office, Washington D.C., 20559)，并以美国版权注册号TXU510087注册。公众可自Genentech公司(South San Francisco, California)得到ALIGN-2程序，或者可以自源代码编译。ALIGN2程序应当编译成在UNIX操作系统(优选数码UNIX V4.0D上）使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变。

在采用ALIGN-2来比较氨基酸序列的情况中，给定氨基酸序列A相对于(to)、与(with)、或针对(against)给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性（或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A）如下计算:

分数X/Y 乘 100

其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基数，且其中Y是B中的氨基酸残基总数。可以领会，若氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等，则A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有具体说明，本文中所使用的所有%氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述，使用ALIGN-2计算机程序获得的。

“B细胞表面标志物”或“B细胞表面抗原”在本文中指在B细胞表面上表达的抗原，可以用能结合它的拮抗剂来靶向它，所述拮抗剂包括但不限于针对B细胞表面抗原或可溶形式B细胞表面抗原、能够拮抗配体对天然存在B细胞抗原的结合的抗体。例示性的B细胞表面标志物包括CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85和CD86白细胞表面标志物（有关说明参见The Leukocyte Antigen Facts Book, 第2版, 1997, Barclay等编, Academic Press,

Harcourt Brace & Co., New York)。其它B细胞表面标志物包括RP105、FcRH2、B细胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、BAFF、BLys、Btig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA、和239287。特别感兴趣的B细胞表面标志物是在B细胞上较之哺乳动物的其它非B细胞组织优先表达的，而且可以是在前体B细胞和成熟B细胞二者上都表达的。

术语“CD22”在用于本文时指来自任何脊椎动物来源（包括哺乳动物，诸如灵长类动物（例如人类、猕猴(cyno)）和啮齿类动物（例如小鼠和大鼠））的任何天然CD22，除非另有说明。该术语涵盖“全长的”、未加工的CD22，以及因细胞中的加工而产生的任何形式CD22。该术语还涵盖CD22的天然存在变体，例如剪接变体、等位变体和同等型(isoform)。CD22的主要同等型（CD22β）包含847个氨基酸且在胞外结构域中包含7个免疫球蛋白样区（参见Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)）。次要同等型（CD22α）包含647个氨基酸且在胞外结构域中缺少免疫球蛋白样结构域3和4（参见Stamenkovic, I.和Seed, B., Nature 345:74-77 (1990)及Wilson等 (1991), 见上文）。CD22β的氨基酸序列描绘于图1B，其中标有下划线的部分是胞外结构域(ECD)，而标为斜体的部分是从CD22α胞外结构域序列缺失的氨基酸。图1C描绘了CD22α的氨基酸序列，其中ECD标有下划线。自氨基酸1至氨基酸21的氨基酸序列代表从成熟形式蛋白质切除的信号序列。在一个实施方案中，CD22在细胞表面上表达，诸如在正常B细胞或肿瘤B细胞的表面上表达。图1D描绘了来自猕猴的CD22的氨基酸序列。

“抗体”(Ab)和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相似结构特征的糖蛋白。虽然抗体展现出对特定抗原的结合特异性，但是免疫球蛋白包括抗体和一般缺乏抗原特异性的其它抗体样分子二者。后一类多肽例如由淋巴系统以低水平生成而由骨髓瘤以升高的水平生成。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”以最广义互换使用，包括单克隆抗体（例如全长或完整单克隆抗体）、多克隆抗体、单价抗体、多价抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体，只要它们展现出期望的生物学活性），而且还可以包括某些抗体片段（如本文中更为详细描述的）。抗体可以是嵌合的、人的、人源化的和/或亲和力成熟的。

术语“抗CD22抗体”或“结合CD22的抗体”指能够以足够亲和力结合

CD22，使得该抗体可用作靶向CD22的治疗剂和/或诊断剂的抗体。优选的是，抗CD22抗体结合无关、非CD22蛋白的程度小于抗体对CD22结合的约10%，根据例如放射免疫测定法(RIA)的测量。在某些实施方案中，结合CD22的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、或≤0.1nM的解离常数(Kd)。在某些实施方案中，抗CD22抗体结合在来自不同物种的CD22间保守的CD22表位。

抗体的“可变区”或“可变域”指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变域可以称为“VH”。轻链的可变域可以称为“VL”。这些结构域一般是抗体的最易变部分且包含抗原结合位点。

术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体序列间差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而，变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作互补决定区(CDR)或高变区(HVR)的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR，它们大多采取β-折叠片构象，通过三个形成环状连接且在有些情况中形成β-折叠片结构一部分的CDR连接。每条链中的CDR通过FR非常接近的保持在一起，并与另一条链的CDR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应器功能，诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性中抗体的参与。

根据其恒定域的氨基酸序列，来自任何脊椎动物物种的抗体（免疫球蛋白）的“轻链”可归入两种截然不同的型中的一种，称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

根据其重链恒定域的氨基酸序列，抗体（免疫球蛋白）可归入不同的类。免疫球蛋白有五大类：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中有些可进一步分为亚类（同种型），例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。将与不同类的免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作α、δ、ε、γ和μ。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的，一般性描述于例如Abbas等，Cellular and Mol. Immunology，第4版 (2000)。抗体可以是抗体与一种或多种其它蛋白质或肽共价或非共价关联而形成的更大融合分子的一部分。

术语“全长抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用，指基本上完整形式的抗体而非如下文所定义的抗体片段。该术语具体指重链包含Fc区的抗

体。

“抗体片段”只包含完整抗体的一部分，其中所述部分保留该部分存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项、多至大多数或所有功能。在一个实施方案中，抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点，如此保留结合抗原的能力。在另一个实施方案中，抗体片段，例如包含Fc区的抗体片段，保留通常与Fc区存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项生物学功能，诸如FcRn结合、抗体半衰期调控、ADCC功能和补体结合。在一个实施方案中，抗体片段是体内半衰期与完整抗体基本上相似的单价抗体。例如，此类抗体片段可包含一个抗原结合臂且该抗原结合臂与能够赋予该片段以体内稳定性的Fc序列相连。

用木瓜蛋白酶消化抗体产生：两个相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，各自具有一个抗原结合位点；及一个剩余的“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个$F(ab')_2$片段，它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

“Fv”是包含完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中，双链Fv种类由紧密、非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。在单链Fv (scFv)种类中，一个重链可变域和一个轻链可变域可以通过柔性肽接头共价相连接，使得轻链和重链在与双链Fv种类类似的“二聚体”结构中相结合。正是在这种构造中，每个可变域的三个CDR相互作用而在V_H-V_L二聚体表面上限定了一个抗原结合位点。六个CDR一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单个可变域（或是只包含对抗原特异性的三个CDR的半个Fv）也具有识别和结合抗原的能力，只是亲和力低于完整结合位点。

Fab片段包含重链可变域和轻链可变域，而且还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于重链CH1结构域的羧基末端增加了少数残基，包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带游离硫醇基的Fab'的称谓。$F(ab')_2$抗体片段最初是作为在成对Fab'片段之间有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段生成的。还知道抗体片段的其它化学偶联形式。

“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域，其中这些结构域存在于一条多肽链上。一般而言，scFv多肽在V_H与V_L结构域之间进一步包含多肽接头，其使得scFv能够形成结合抗原的期望结构。关于scFv的综述参见

Pluckthun，于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，卷113，Rosenburg和Moore编，Springer-Verlag，New York，第269-315页，1994。

术语"双抗体"指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段，该片段在同一条多肽链（V_H-V_L）中包含相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对，迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对，从而产生两个抗原结合位点。双抗体可以是二价的或双特异性的。双抗体更完整的记载于例如EP 404,097; WO93/1161; Hudson等 (2003) Nat. Med. 9:129-134; 及Hollinger等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)。三抗体(triabody)和四抗体(tetrabody)也记载于Hudson等 (2003) *Nat. Med.* 9:129-134。

术语"单克隆抗体"在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的突变形式外，例如天然存在的突变形式。如此，修饰语"单克隆"表明抗体不是不同的抗体的混合物的特征。在某些实施方案中，此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体，其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。例如，选择过程可以是从众多克隆诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的集合中选择独特克隆。应当理解，所选择的靶物结合序列可进一步改变，例如为了提高对靶物的亲和力、将靶物结合序列人源化、提高其在细胞培养物中的产量、降低其在体内的免疫原性、创建多特异性抗体等，而且包含改变后的靶物结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性外，单克隆抗体制备物的优势在于它们通常未受到其它免疫球蛋白的污染。

修饰语"单克隆"表明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征，不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如，将依照本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术来生成，包括例如杂交瘤法(例如Kohler等，Nature 256:495 (1975); Harlow等，Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版，1988; Hammerling等，于：Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, 563-681, Elsevier, N.Y., 1981)、重组DNA法(参见例如美国专利No. 4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如Clackson等，

Nature 352:624-628 (1991); Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992); Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及Lee等, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004))、及用于在具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中生成人或人样抗体的技术(参见例如WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; WO 91/10741; Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann等, Year in Immuno. 7:33 (1993); 美国专利No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks等, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-813 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnol. 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14:826 (1996); 及Lonberg和Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995))。

单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及此类抗体的片段，只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No. 4,816,567及Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。

非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在一个实施方案中，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和/或能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类动物的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。可以进行这些修饰以进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域，其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones等，*Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature 332:323-329 (1988); 及Presta, Curr.

Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。还可参见以下综述及其引用的参考文献: Vaswani和Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); 及Hurle和Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

"人抗体"指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成人抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

术语"高变区"、"HVR"或"HV"在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。通常，抗体包含六个高变区: 三个在VH中（H1、H2、H3），三个在VL中（L1、L2、L3）。在天然抗体中，H3和L3展示这六个高变区的最大多样性，而且认为特别是H3在赋予抗体以精密特异性中发挥独特作用。Xu等 (2000) Immunity 13:37-45; Johnson和Wu (2003) 于: Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo编, Human Press, Totowa, NJ)。事实上，仅由重链组成的天然存在camelid抗体在缺乏轻链时是有功能的且稳定的。Hamers-Casterman等 (1993) Nature 363:446-448; Sheriff等 (1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736。

本文中使用且涵盖许多高变区的叙述。Kabat互补决定区(CDR)是以序列变异性为基础的，而且是最常用的(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia改为指结构环的位置(Chothia和Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高变区代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷，而且得到Oxford Molecular的AbM抗体建模软件的使用。"接触"高变区是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些高变区中每一个的残基。

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
---	---	---	---	---
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B (Kabat编号方式)	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B

H1	H31-H35 (Chothia编号方式)	H26-H35	H26-H32	H30-H35
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

高变区可包括如下“延伸的高变区”：VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2)和89-97或89-96 (L3)及VH中的26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2)和93-102、94-102或95-102 (H3)。对于这些定义中的每一个，可变域残基是依照Kabat等，见上文编号的。本发明的抗CD22 10F4抗体的HVR-H1和HVR-H2高变区是使用Kabat编号方式的H26-H35和H49-H65。

“框架”或“FR”残基指可变域中除本文中所定义的高变区残基外的那些残基。

术语“如Kabat中的可变域残基编号方式”或“如Kabat中的氨基酸位置编号方式”及其变化形式指Kabat等，《Sequences of Proteins of Immunological Interest》，第5版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD (1991)中用于抗体重链可变域或轻链可变域编辑的编号系统。使用此编号系统，实际的线性氨基酸序列可以包含较少的或另外的氨基酸，对应于可变域FR或HVR的缩短或插入。例如，重链可变域可以包含H2残基52后的单一氨基酸插入（依照Kabat的残基52a）和重链FR残基82后的插入残基（例如依照Kabat的残基82a、82b和82c等）。给定抗体的Kabat残基编号方式可以通过将抗体序列与“标准”Kabat编号序列比对同源区来确定。

“游离半胱氨酸”指已经工程改造入亲本抗体的、具有硫醇官能团(-SH)的、且没有配对或以其它方式成为分子内或分子间二硫桥一部分的半胱氨酸残基。

术语“硫醇反应性值”是游离半胱氨酸氨基酸的反应性的定量表征。硫醇反应性值指经过半胱氨酸改造的抗体中与硫醇反应性试剂反应的游离半胱氨酸氨基酸的百分比，且换算成最大值1。例如，经过半胱氨酸改造的抗体上与硫醇反应性试剂（诸如生物素-马来酰亚胺试剂）以100%产率反应（以形成生物素标记的抗体）的游离半胱氨酸氨基酸具有1.0的硫醇反应性值。已工程改造入相同或不同亲本抗体、与硫醇反应性试剂以80%产率反应的另一个半胱氨酸氨基酸具有0.8的硫醇反应性值。已工程改造入相同或不同亲本抗体、完全不能与硫醇反应性试剂反应的另一个半胱氨酸氨基酸具有0的硫醇

反应性值。特定半胱氨酸的硫醇反应性值的测定可以通过ELISA测定法、质谱、液相层析、放射自显影、或其它定量分析测试来进行。容许捕捉经过半胱氨酸改造的抗体及比较和定量半胱氨酸反应性的硫醇反应性试剂包括生物素-PEO-马来酰亚胺((+)-生物素基-3-马来酰亚氨基丙酰氨基-3,6-二噁辛烷二胺((+)-biotinyl-3-maleimidopropionamidyl-3,6-dioxaoctaine diamine), Oda等(2001) Nature Biotechnology 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.)、生物素-BMCC、PEO-吲哚乙酰基生物素、吲哚乙酰基-LC-生物素、和生物素-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.)、及Nα-(3-马来酰亚氨基丙酰基)生物胞素(MPB, Molecular Probes, Eugene, OR)。生物素化、双功能和多功能接头试剂的其它商业来源包括Molecular Probes (Eugene, OR)和Sigma (St. Louis, MO)。

“亲本抗体”指包含其中一个或多个氨基酸残基有待用一个或多个半胱氨酸残基替换的氨基酸序列的抗体。亲本抗体可以包含天然的或野生型的序列。亲本抗体可具有相对于其它天然的、野生型的、或修饰形式的抗体而言的现有氨基酸序列修饰（诸如添加、删除和/或替代）。亲本抗体可以针对感兴趣的靶抗原，例如生物学重要的多肽。还涵盖针对非多肽抗原（诸如肿瘤相关糖脂抗原；参见US 5091178）的抗体。

下列缩写在本文中有使用，而且具有所规定的定义: BME指β-巯基乙醇，Boc指N-(叔丁氧羰基)，cit指瓜氨酸（2-氨基-5-脲基戊酸），dap指dolaproine，DCC指1,3-二环己基碳二亚胺，DCM指二氯甲烷，DEA指二乙胺，DEAD指偶氮二羧酸二乙酯，DEPC指氰基磷酸二乙酯(diethylphosphorylcyanidate)，DIAD指偶氮二羧酸二异丙酯，DIEA指N,N-二异丙基乙胺，dil指多拉异亮氨酸(dolaisoleucine)，DMA指二甲基乙酰胺，DMAP指4-二甲基氨基吡啶，DME指乙二醇二甲醚（或1,2-二甲氧基乙烷），DMF指N,N-二甲基甲酰胺，DMSO指二甲亚砜，doe指dolaphenine，dov指N,N-二甲基缬氨酸，DTNB指5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)，DTPA指二乙烯三胺五乙酸，DTT指二硫苏糖醇，EDCI指盐酸1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺，EEDQ指2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉，ES-MS指电喷射质谱，EtOAc指乙酸乙酯，Fmoc指N-(9-芴基甲氧羰基)，gly指甘氨酸，HATU指六氟磷酸O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲，HOBt指1-羟基苯并三唑，HPLC指高压液相层析，ile指异亮氨酸，lys指赖氨酸，MeCN (CH_3CN)指乙腈，MeOH指甲醇，Mtr指4-茴香基二苯基甲基（或4-甲氧基三苯甲基），nor指(1S，2R)-(+)-去甲麻黄

碱，PAB指对氨基苄基氨基甲酰基，PBS指磷酸盐缓冲盐水(pH 7)，PEG指聚乙二醇，Ph指苯基，Pnp指对硝基苯基，MC指6-马来酰亚氨基己酰基，phe指L-苯丙氨酸，PyBrop指六氟磷酸溴tris-吡咯烷膦，SEC指大小排阻层析，Su指琥珀酰亚胺，TFA指三氟乙酸，TLC指薄层层析，UV指紫外线，而val指缬氨酸。

“亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个HVR中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。在一个实施方案，亲和力成熟的抗体具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知规程来生成。Marks等, Bio/Technology 10:779-783 (1992)记载了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了HVR和/或框架残基的随机诱变: Barbas等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schier等, Gene 169:147-155 (1995); Yelton 等 , J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson 等 , J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 及Hawkins等, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

“阻断性”抗体或“拮抗性”抗体指抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。某些阻断性抗体或拮抗性抗体实质或完全抑制抗原的生物学活性。

“激动性抗体”在用于本文时指模拟感兴趣多肽的至少一项功能性活性的抗体。

抗体“效应器功能”指那些可归于抗体Fc区（天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区）且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括: C1q结合和补体依赖性细胞毒性; Fc受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体（例如B细胞受体）下调; 和B细胞活化。

“Fc受体”或“FcR”描述结合抗体Fc区的受体。在有些实施方案中，FcR是天然人FcR。在有些实施方案中，FcR是结合IgG抗体的FcR（γ受体），包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体，包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA（“活化受体”）和FcγRIIB（“抑制受体”），它们具有相似的氨基酸序列，区别主要在于其胞质结构域。活化受体FcγRIIA在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见

Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997))。FcR的综述参见Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及de Haas等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-341 (1995)。术语"FcR"在本文中涵盖其它FcR, 包括那些未来将会鉴定的。

术语"Fc受体"或"FcR"还包括新生儿受体, FcRn, 其负责将母体IgG转移给胎儿(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等, J. Immunol. 24:249 (1994))和调节免疫球蛋白的体内稳态。测量对FcRn的结合的方法是已知的(参见例如Ghetie 1997, Hinton 2004)。可以测定人FcRn高亲和力结合多肽对人FcRn的体内结合和血清半衰期, 例如在表达人FcRn的转基因小鼠或经转染人细胞系中, 或者在施用了Fc变体多肽的灵长类动物中。

WO00/42072 (Presta)记载了对FcR的结合得到改进或消除的抗体变体。将该专利出版物的内容明确收入本文作为参考。还可参见Shields等, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)。

"人效应细胞"指表达一种或多种FcR并行使效应器功能的白细胞。在某些实施方案中, 该细胞至少表达FcγRIII并行使ADCC效应器功能。介导ADCC的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性细胞。效应细胞可以自其天然来源分离, 例如血液。

"抗体依赖性细胞介导的细胞毒性"或"ADCC"指其中结合到某些细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)上的分泌型Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞, 随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。介导ADCC的主要细胞, NK细胞, 只表达FcγRIII, 而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估感兴趣分子的ADCC活性, 可进行体外ADCC测定法, 诸如美国专利No. 5,500,362或5,821,337或Presta美国专利No. 6,737,056中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外, 可在体内评估感兴趣分子的ADCC活性, 例如在动物模型中, 诸如Clynes等, PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中所披露的。

"补体依赖性细胞毒性"或"CDC"指存在补体时对靶细胞的溶解。经

典补体途径的激活是由补体系统第一组分(C1q)与结合至关联抗原的抗体（适宜亚类的）结合起始的。为了评估补体激活，可进行CDC测定法，例如如Gazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所记载的。

具有改变的Fc区氨基酸序列及提高的或降低的C1q结合能力的多肽变体记载于美国专利No. 6,194,551B1和WO99/51642。将那些专利出版物的内容明确收入本文作为参考。还可参见Idusogie等, J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

术语“含Fc区多肽”指包含Fc区的多肽，诸如抗体或免疫粘附素。Fc区的C-末端赖氨酸（依照EU编号系统的残基447）可以消除，例如在纯化多肽的过程中或者通过重组改造编码多肽的核酸。因而，依照本发明包含具有Fc区的多肽的组合物可包含都具有K447的多肽、都消除了K447的多肽、或具有与没有K447残基的多肽的混合物。

就本文目的而言，“受体人框架”是包含衍生自人免疫球蛋白框架或人共有框架的VL或VH框架之氨基酸序列的框架。“衍生自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含与之相同的氨基酸序列，或者可包含预先存在的氨基酸序列变化。在有些实施方案中，预先存在的氨基酸变化的数目是10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少、或者2个或更少。当VH中存在预先存在的氨基酸变化时，优选那些变化只存在于71H、73H和78H中的三个、两个或一个位置；例如，位于那些位置的氨基酸残基可以是71A、73T和/或78A。在一个实施方案中，VL受体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

“人共有框架”指代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列选集中最常见的氨基酸残基的框架。通常，人免疫球蛋白VL或VH序列选集来自可变域序列亚组。通常，序列亚组是如Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中的亚组。在一个实施方案中，对于VL，亚组是如Kabat等，见上文中的亚组κI。在一个实施方案中，对于VH，亚组是如Kabat等，见上文中的亚组III。

“VH亚组III共有框架”包含从Kabat等，见上文的可变重链亚组III中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中，VH亚组III共有框架氨基

酸序列包含下列各序列的至少一部分或整个:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, SEQ ID NO:1) -HVR-H1- WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, SEQ ID NO:3) -HVR-H2- RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (FR-H3, SEQ ID NO:5) -HVR-H3- WGQGTLVTVSS (FR-H4, SEQ ID NO:7)。

“VL亚组I共有框架”包含从Kabat等，见上文的可变轻链κ亚组I中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中，VL亚组I共有框架氨基酸序列包含下列各序列的至少一部分或整个:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, SEQ ID NO:8) -HVR-L1- WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, SEQ ID NO:11) -HVR-L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (FR-L3, SEQ ID NO:13) -HVR-L3- FGQGTKVEIK (FR-L4, SEQ ID NO:15)。

“分泌信号序列”或“信号序列”指编码可用于指导新合成的感兴趣蛋白质穿过细胞膜的短信号肽的核酸序列，所述细胞膜通常指原核生物的内膜或者内膜和外膜二者。如此，感兴趣蛋白质诸如免疫球蛋白轻链或重链多肽分泌进入原核宿主细胞的周质或者进入培养基。由分泌信号序列编码的信号肽对宿主细胞可以是内源的，或者它们可以是外源的，包括对待表达多肽是天然的信号肽。分泌信号序列通常存在于待表达多肽的氨基末端，而且通常在多肽的生物合成和从细胞质分泌出去之间酶促切除。如此，信号肽通常不存在于成熟蛋白质产物中。

“结合亲和力”通常指分子（例如抗体）的单一结合位点与其结合配偶（例如抗原）之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明，在用于本文时，“结合亲和力”指反映结合对的成员（例如抗体与抗原）之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶Y的亲和力通常可用解离常数(Kd)来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量，包括本文中所描述的。低亲和力抗体通常缓慢的结合抗原且趋于容易解离，而高亲和力抗体通常更快速的结合抗原且趋于保持更长时间的结合。本领域知道测量结合亲和力的多种方法，其中任一种都可用于本发明的目的。下文描述了具体的示例性实施方案。

在一个实施方案中，依照本发明的“Kd”或“Kd值”是通过如下测定法所述使用Fab型式的感兴趣抗体及其抗原进行的放射性标记抗原结合测定法(RIA)

来测量的：通过在存在未标记抗原的滴定系列的条件下，用最小浓度的（^{125}I）标记抗原平衡Fab，然后用抗Fab抗体包被的平板捕捉结合的抗原来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(Chen,等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999))。为了确定测定条件，用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml捕捉用抗Fab抗体(Cappel Labs)包被微量滴定板(Dynex)过夜，随后用PBS中的2% (w/v)牛血清清蛋白在室温（约23°C）封闭2-5小时。在非吸附平板(Nunc #269620)中，将100pM或26pM [^{125}I]-抗原与连续稀释的感兴趣Fab混合（例如与Presta等, Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)中抗VEGF抗体，Fab-12的评估一致）。然后将感兴趣Fab保温过夜；不过，保温可持续更长时间（例如约65个小时）以保证达到平衡。此后，将混合物转移至捕捉板以进行室温保温（例如1小时）。然后除去溶液，并用含0.1% Tween-20的PBS洗板8次。平板干燥后，加入150μl/孔闪烁液(MicroScint-20; Packard)，然后在Topcount伽马计数器(Packard)上对平板计数10分钟。选择各Fab给出小于或等于最大结合之20%的浓度用于竞争性结合测定法。

依照另一实施方案，Kd或Kd值是通过表面等离振子共振测定法使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)测量的。简而言之，依照供应商的说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。用10mM乙酸钠pH 4.8将抗原稀释至5μg/ml（约0.2μM），然后以5μl/分钟的流速注入至获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后，注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量，在25°C以约25μl/分钟的流速注入在含0.05% Tween-20的PBS (PBST)中两倍连续稀释的Fab（0.78nM至500nM）。使用简单一对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software version 3.2)通过同时拟合结合和解离传感图来计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)以比率k_{off}/k_{on}计算。参见例如Chen, Y.,等, J Mol Biol 293: 865-881 (1999)。如果根据上文表面等离振子共振测定法，结合速率超过10^6 M^{-1} s^{-1}，那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定，即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(a stop-flow equipped spectrophometer)(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量，在存在浓度渐增的抗原的条件

下，测量PBS, pH 7.2中的20nM抗抗原抗体（Fab形式）在25°C的荧光发射强度（激发=295nm；发射=340nm，16nm带通）的升高或降低。

依照本发明的“结合速率”（on-rate, rate of association, association rate）或“k_{on}”也可如上所述使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000系统(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)来测定。

“病症”指任何会受益于使用本发明物质/分子或方法的治疗的疾患或疾病。这包括慢性和急性病症，包括那些使哺乳动物倾向于所讨论病症的病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性例子包括癌性疾患，诸如B细胞增殖性病症和/或B细胞肿瘤，例如淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。

术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中，细胞增殖性病症指癌症。

“肿瘤”在用于本文时指所有赘生性细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述哺乳动物中典型特征为细胞生长/增殖不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌性B细胞增殖性病症。B细胞增殖性病症，其选自淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。其它癌症疾患包括例如癌瘤、淋巴瘤（例如何杰金氏淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤）、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病和其它淋巴增殖性病症、及各种类型的头颈癌。

“B细胞恶性肿瘤”在本文中包括非何杰金氏淋巴瘤(NHL)，其包括低级/滤泡性NHL、小淋巴细胞性(SL) NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小无核裂细胞NHL、贮积病NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、淋巴细胞为主型的何杰金氏病(LPHD)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、无痛性NHL（包括复发性无痛性NHL和利妥昔单抗不应性无痛性NHL）；白血病，其包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病、慢性成髓细胞白血病；套细胞淋巴瘤；和其它血液学恶性肿瘤。此类恶性肿瘤可以用针对B细胞表面标志物（诸如CD22）的抗体来治疗。此类疾病涵盖在本文中，以通过施用针对B细胞表面标志物（诸如CD22）的抗体来治疗，包括施用未偶联的抗体（“裸抗体”）或偶联有细胞毒剂的抗体，正如本文中所公开的。此类疾病还涵盖在本文中，以通过包括本发明的抗CD22抗体或抗CD22抗体-药物偶联物联合另一抗体或抗体-药物偶联物、另一细胞毒剂、放射或其它治疗的联合疗法（同时施用或顺次施用）来治疗。在本发明的例示性治疗方法中，联合施用本发明的抗CD22抗体及抗CD20抗体、免疫球蛋白、或其CD20结合片段，或是一起施用或是顺次施用。所述抗CD20抗体可以是裸抗体或抗体-药物偶联物。在联合疗法的一个实施方案中，所述抗CD22抗体是本发明的抗体，而所述抗CD20抗体是Rituxan®（利妥昔单抗，即rituximab）。

术语“非何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤”或“NHL”在用于本文时指何杰金氏淋巴瘤以外的淋巴系统癌症。通常可通过何杰金氏淋巴瘤中存在里-施(Reed-Sternberg)细胞而非何杰金氏淋巴瘤中不存在所述细胞将何杰金氏淋巴瘤与非何杰金氏淋巴瘤区分开来。非何杰金氏淋巴瘤在该术语用于本文时所涵盖的例子包括本领域技术人员（例如肿瘤学家或病理学家）依照本领域已知的分类表将鉴定为此类的任何淋巴瘤，诸如*Color Atlas of Clinical Hematology*, 第3版, Victor A. Hoffbrand和John E. Pettit编, Harcourt Publishers Ltd., 2000中记载的Revised European-American Lymphoma (REAL) scheme(欧美淋巴瘤修正表)。具体参见图11.57、11.58和11.59中的表。更具体例子包括但不限于复发性或顽固性NHL、前线(front line)低级NHL、阶段III/IV NHL、化疗耐受性NHL、前体B成淋巴细胞性白血病和/或淋巴瘤、小淋巴细胞性淋

巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞性白血病和/或前淋巴细胞性白血病和/或小淋巴细胞性淋巴瘤、B细胞前淋巴细胞性淋巴瘤、免疫细胞瘤和/或淋巴浆细胞性(lymphoplasmacytic)淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、节外边缘区(extranodal marginal zone) - MALT淋巴瘤、节边缘区(nodal marginal zone)淋巴瘤、毛细胞白血病、浆细胞瘤和/或浆细胞骨髓瘤、低级/滤泡淋巴瘤、中级/滤泡NHL、套细胞淋巴瘤、滤泡中心淋巴瘤（滤泡的）、中级弥漫性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤、攻击性(agressive) NHL（包括攻击性前线NHL和攻击性复发性NHL）、自体干细胞移植后复发性或顽固性NHL、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、高级成免疫细胞NHL、高级成淋巴细胞NHL、高级小无核裂细胞NHL、贮积病(bulky disease) NHL、伯基特氏(Burkitt)淋巴瘤、前体（外周）大粒状淋巴细胞性白血病、蕈样肉芽肿病和/或塞扎里(Sezary)综合征、皮肤（表皮）淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤。

“自身免疫病”在本文中指源于且针对个体自身组织或器官的疾病或病症或其共分离(co-segregate)或表现或由其导致的状况。在这些自身免疫性和炎性病症的许多中，可以存在许多临床和实验室标志物，包括但不限于：高丙种球蛋白血症、高水平自身抗体、组织中抗原-抗体复合物沉积、得益于皮质类固醇或免疫抑制治疗、及受侵害组织中的淋巴样细胞集合体。不限于任意一种有关B细胞介导的自身免疫病的理论，认为B细胞通过众多机械论途径在人自身免疫病中表现出致病作用，包括自身抗体产生、免疫复合物形成、树突细胞和T细胞活化、细胞因子合成、直接趋化因子释放和提供用于异位新淋巴生成的巢。这些途径中的每一种可以以不同程度参与自身免疫病的病理学。

自身免疫病可以为器官特异性疾病（即免疫应答特异性针对一种器官系统，诸如内分泌系统、造血系统、皮肤、心肺系统、胃肠和肝系统、肾系统、甲状腺、耳、神经肌肉系统、中枢神经系统等）或可以影响多器官系统的系统性疾病（例如系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎、多肌炎等）。优选的此类疾病包括自身免疫性风湿病学病症（诸如例如类风湿性关节炎、斯耶格伦氏综合征(Sjögren's syndrome)、硬皮病、狼疮（诸如SLE和狼疮肾炎）、多肌炎/皮肌炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗体综合征、和银屑病关节炎）、自身免疫性胃肠和肝病症（诸如例如炎性肠病（例如溃疡性结肠炎和克罗恩氏

病(Crohn's disease))、自身免疫性胃炎和恶性贫血、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、和乳糜泻)、血管炎(诸如例如ANCA阴性血管炎和ANCA相关血管炎，包括丘施二氏血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、和微观多脉管炎)、自身免疫性神经病学病症(诸如例如多发性硬化、视性眼阵挛肌阵挛综合征、重症肌无力、视神经脊髓炎、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿耳茨海默氏病(Alzheimer's disease)、和自身免疫性多神经病)、肾病症(诸如例如肾小球肾炎、古德帕斯丘氏综合征(Goodpasture's syndrome)、和贝格尔氏病(Berger's disease))、自身免疫性皮肤病学病症(诸如例如银屑病、荨麻疹、hives、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮、和皮肤红斑狼疮)、血液学病症(诸如例如血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜、输血后紫癜、和自身免疫性溶血性贫血)、动脉粥样硬化、葡萄膜炎、自身免疫性听觉疾病(诸如例如内耳病和听力损失)、贝切特氏病(Behcet's disease)、雷诺氏综合征(Raynaud's syndrome)、器官移植、和自身免疫性内分泌病症(诸如例如糖尿病相关自身免疫病诸如胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、阿狄森氏病(Addison's disease)、和自身免疫性甲状腺病(例如格雷夫斯氏病(Graves' disease)和甲状腺炎))。更优选的此类疾病包括例如类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、ANCA相关血管炎、狼疮、多发性硬化、斯耶格伦氏综合征、格雷夫斯氏病、IDDM、恶性贫血、甲状腺炎、和肾小球肾炎。

本文中所定义的其它自身免疫性疾病的具体例子(在有些情况中涵盖上文所列举的那些)包括但不限于关节炎(急性的和慢性的，类风湿性关节炎，包括幼发型类风湿性关节炎和关节炎的各个阶段诸如类风湿性滑膜炎、痛风或痛风性关节炎、急性免疫性关节炎、慢性炎性关节炎、退行性关节炎、II型胶原诱发的关节炎、感染性关节炎、莱姆(Lyme)关节炎、增生性关节炎、银屑病性关节炎、斯提耳氏(Still)病、脊椎关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎、变形性关节炎、慢性原发性多关节炎、反应性关节炎、绝经期关节炎、雌激素消减性关节炎、和强直性脊柱炎/类风湿性脊椎炎)，自身免疫性淋巴细胞增生性疾病，炎性过度增殖性皮肤病，银屑病诸如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和指甲银屑病，特应性包括特应性疾病诸如干草热和乔布氏(Job)综合征，皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、剥脱性皮炎、变应性皮炎、变应性接触性皮炎、荨麻疹、疱疹样皮炎、钱币状皮炎、

脂溢性皮炎、非特异性皮炎、原发性刺激性接触性皮炎和特应性皮炎，x连锁的高IgM综合征，变应性眼内炎性疾病，荨麻疹诸如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹（包括慢性自身免疫性荨麻疹），肌炎，多肌炎/皮肌炎，青少年型皮肌炎，中毒性表皮坏死松解症，硬皮病（包括系统性硬皮病），硬化诸如系统性硬化、多发性硬化(MS)诸如脊髓-眼(spino-optical) MS、原发性进行性MS (PPMS)和复发性消退性(relapsing remitting) MS (RRMS)、进行性系统性硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、播散性硬化、共济失调性(ataxic)硬化，视神经脊髓炎(NMO)，炎性肠病(IBD)（例如克罗恩氏(Crohn)病、自身免疫介导的胃肠病、胃肠炎症、结肠炎诸如溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, colitis ulcerosa)、微观结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎、和自身免疫性炎性肠病），肠炎，坏疽性脓皮症，结节性红斑，原发性硬化性胆管炎，呼吸窘迫综合征包括成人型或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)，脑膜炎，整个或部分葡萄膜的炎症，虹膜炎，脉络膜炎，自身免疫性血液学病症，移植物抗宿主疾病，血管性水肿诸如遗传性血管性水肿，脑神经损伤像脑膜炎中的，妊娠疱疹，妊娠性类天疱疮，阴囊瘙癣(pruritis scroti)，自身免疫性早熟性卵巢衰竭，因自身免疫性疾患引起的突发性听觉丧失，IgE介导的疾病诸如过敏反应和变应性和特应性鼻炎，脑炎诸如拉斯默森氏(Rasmussen)脑炎和边缘系和/或脑干脑炎，葡萄膜炎（诸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎，具有和没有肾病综合征的肾小球肾炎(GN)诸如慢性或急性肾小球肾炎诸如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN（膜性肾病）、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜增殖性或膜性增殖性GN (MPGN)（包括I型和II型）、和急进性GN (RPGN)，增殖性肾炎，自身免疫性多腺体内分泌衰竭，龟头炎包括浆细胞性局限性龟头炎，龟头包皮炎，离心性环状红斑，持久性色素异常性红斑，多形性红斑，环状肉芽肿，光泽苔藓，硬化萎缩性苔藓，慢性单纯苔藓，小棘苔藓，扁平苔藓，片层状鱼鳞癣，表皮松解性角化过度，恶变前角化，坏疽性脓皮症，变应性疾患和应答，食物过敏，药物过敏，昆虫过敏，罕见的过敏性病症诸如肥大细胞增生病，过敏反应，湿疹包括变应性或特应性湿疹、干性湿疹、汗疱和水泡性掌跖湿疹(vesicular palmoplantar eczema)，哮喘诸如支气管哮喘(asthma bronchiale, bronchial asthma)和自身免疫性哮喘，涉及T细胞浸润和慢

性炎性应答的疾患，针对外来抗原诸如妊娠期间胎儿A-B-O血型的免疫反应，慢性肺部炎性疾病，自身免疫性心肌炎，白细胞粘附缺陷，狼疮包括狼疮肾炎、狼疮脑炎、儿科狼疮、非肾狼疮、肾外狼疮、盘状狼疮和盘状红斑狼疮、狼疮脱发、SLE（诸如皮肤SLE或亚急性皮肤SLE）、新生儿狼疮综合征(NLE)、和播散性红斑狼疮，幼发型（I型）糖尿病包括儿科IDDM，成人期发作的糖尿病（II型糖尿病），自身免疫性糖尿病，特发性尿崩症，糖尿病视网膜病变，糖尿病肾病，糖尿病结肠炎，糖尿病大动脉病症，与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏感性有关的免疫应答，结核病，结节病，肉芽肿病包括淋巴瘤样肉芽肿病、粒细胞缺乏，血管炎病（包括大血管血管炎（诸如风湿性多肌痛和巨细胞（高安氏(Takayasu)）动脉炎）、中血管血管炎（诸如川崎氏(Kawasaki)病和结节性多动脉炎/结节性动脉周围炎）、免疫血管炎、CNS血管炎、皮肤性血管炎、超敏感性血管炎、坏死性血管炎（诸如类纤维蛋白坏死性血管炎和系统性坏死性血管炎）、ANCA阴性血管炎、和ANCA相关血管炎诸如丘-施二氏(Churg-Strauss)综合征(CSS)，韦格纳氏(Wegener)肉芽肿病、和微观多脉管炎），颞动脉炎，再生障碍性贫血，自身免疫性再生障碍性贫血，库姆斯(Coombs)阳性贫血，戴-布二氏(Diamond Blackfan)贫血，溶血性贫血或免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)，恶性贫血(pernicious anemia, anemia perniciosa)，阿狄森氏(Addison)病，单纯红细胞性贫血或再生障碍(PRCA)，因子VIII缺乏，血友病A，自身免疫性嗜中性粒细胞减少症，细胞减少症诸如全血细胞减少症，白细胞减少症，涉及白细胞渗出的疾病，CNS炎性病症，阿耳茨海默氏(Alzheimer)病，帕金森氏(Parkinson)病，多器官损伤综合征诸如那些脓毒症、外伤或出血继发的，抗原-抗体复合物介导的疾病，抗肾小球基底膜病，抗磷脂抗体综合征，运动神经炎，变应性神经炎，贝切特氏(Behçet)病/综合征，卡斯尔曼氏(Castleman)综合征，古德帕斯丘氏(Goodpasture)综合征，雷诺氏(Reynaud)综合征，斯耶格伦氏(Sjögren)综合征，史-约二氏(Stevens-Johnson)综合征，类天疱疮或天疱疮诸如大疱性类天疱疮、瘢痕性（粘膜）类天疱疮、皮肤类天疱疮、寻常型天疱疮、副肿瘤性天疱疮、落叶型天疱疮、粘膜类天疱疮型天疱疮和红斑性天疱疮，获得性大疱性表皮松解症，眼部炎症（优选变应性眼部炎症，诸如变应性结膜炎、线性IgA大疱性疾病、自身免疫诱发的结膜炎症），自身免疫性多内分泌病，莱特氏(Reiter)病或综合征，由自身免疫性疾患引起的热伤，

先兆子痫，免疫复合物病症诸如免疫复合物肾炎，抗体介导的肾炎，神经炎性病症，多神经病，慢性神经病诸如IgM多神经病或IgM介导的神经病，血小板减少症（例如心肌梗死患者发生的）包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、输血后紫癜(PTP)、肝素诱发的血小板减少症、和自身免疫或免疫介导的血小板减少症(包括例如特发性血小板减少性紫癜(ITP)包括慢性或急性ITP)，巩膜炎诸如特发性角膜-巩膜炎、巩膜外层炎，睾丸和卵巢的自身免疫病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎，原发性甲状腺功能减退症，甲状旁腺功能减退，自身免疫性内分泌病包括甲状腺炎（诸如自身免疫性甲状腺炎、桥本氏(Hashimoto)病、慢性甲状腺炎（桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎）或亚急性甲状腺炎）、自身免疫性甲状腺病、特发性甲状腺功能减退症、格雷夫斯氏(Graves)病，格雷夫斯氏眼病(Grave's eye disease)（眼病或甲状腺相关眼病），多腺性综合征诸如自身免疫性多腺体综合征例如I型（或多腺性内分泌病综合征），瘤外综合征包括神经学瘤外综合征诸如兰伯特-伊顿(Lambert-Eaton)肌无力综合征或伊顿-兰伯特(Lambert-Eaton)综合征，僵体或僵人综合征，脑脊髓炎诸如变应性脑脊髓炎(allergic encephalomyelitis, encephalomyelitis allergica)和实验性变应性脑脊髓炎(EAE)，重症肌无力诸如胸腺瘤相关重症肌无力，小脑变性，神经性肌强直，视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)，和感觉神经病，多病灶运动神经病，席汉氏(Sheehan)综合征，自身免疫性肝炎、慢性肝炎、类狼疮肝炎、巨细胞性肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎，肺炎诸如淋巴样间质性肺炎(LIP)，梗阻性细支气管炎（非移植物）对NSIP，格-巴二氏(Guillain-Barré)综合征，贝格尔氏(Berger)病（IgA肾病），特发性IgA肾病，线性IgA皮肤病，急性热性嗜中性白细胞皮肤病，角质层下脓疱皮肤病，一过性棘层松解性皮肤病，硬化诸如原发性胆汁性肝硬化和肺硬变，自身免疫性肠病综合征，乳糜泻，腹腔或腹部疾病，口炎性腹泻（麸质肠病），顽固性口炎性腹泻，特发性口炎性腹泻，冷球蛋白血症诸如混合型冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化(ALS)（卢 格里克氏(Lou Gehrig)病），冠状动脉病，自身免疫性耳病诸如自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性听觉丧失，多软骨炎诸如顽固性或复发的或复发性多软骨炎，肺泡蛋白沉着症，角膜炎诸如寇甘氏(Cogan)综合征/非梅毒性间质性角膜炎，贝耳氏(Bell)麻痹，斯威特氏(Sweet)病/综合征，自身免疫性酒糟鼻，带状疱疹相关疼痛，淀粉样变，非癌性淋巴细胞增多，原发性

淋巴细胞增多包括单克隆B细胞淋巴细胞增多（例如良性单克隆丙种球蛋白病和性质未确定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)），周围神经病，瘤外综合征，通道病诸如癫痫、偏头痛、心率失常、肌肉病症、失聪、失明、周期性瘫痪和CNS的通道病，孤独症，炎性肌病，局灶性或节段性或局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)，内分泌性眼病，葡萄膜视网膜炎，脉络膜视网膜炎，自身免疫性肝脏病学病症，纤维肌痛，多发性内分泌衰竭，施密特氏(Schmidt)综合征，肾上腺炎，胃萎缩，早老性痴呆，脱髓鞘病诸如自身免疫性脱髓鞘病和慢性炎性脱髓鞘性多神经病，德雷斯勒氏(Dressler)综合征，斑秃，全秃，CREST综合征（钙质沉着症、雷诺氏(Raynaud)现象、食道运动功能障碍、指端硬化和毛细管扩张），男性和女性自身免疫性不孕不育例如由于抗精虫抗体的，混合性结缔组织病，恰加斯氏(Chagas)病，风湿热，习惯性流产，农民肺，多形红斑，心脏切开术后综合征，柯兴氏(Cushing)综合征，养鸟者肺，变应性肉芽肿性血管炎，良性淋巴细胞性血管炎，阿尔波特氏(Alport)综合征，肺泡炎诸如变应性肺泡炎和纤维化肺泡炎，间质性肺病，输血反应，麻风，疟疾，寄生虫病诸如利什曼病、锥虫病(kypanosomiasis)、血吸虫病、蛔虫病，曲霉病，Sampter氏综合征，卡普兰氏(Caplan)综合征，登革，心内膜炎，心内膜心肌纤维化，弥漫性肺间质纤维化，间质性肺纤维化，纤维性纵隔炎，肺纤维化，特发性肺纤维化，囊性纤维化，眼内炎，持久隆起性红斑，胎儿成红细胞增多症，嗜曙红细胞性筋膜炎(faciitis)、舒尔曼氏(Shulman)综合征，费尔提氏(Felty)综合征，flariasis，睫状体炎诸如慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、虹膜睫状体炎（急性或慢性）、或Fuch氏睫状体炎，亨诺-许兰二氏(Henoch-Schonlein)紫癜，人免疫缺陷病毒(HIV)感染，SCID，获得性免疫缺陷综合征(AIDS)，艾柯病毒感染，脓毒症（系统性炎性应答综合征(SIRS)），内毒素血症，胰腺炎，甲状腺毒症(thyroxicosis)，细小病毒感染，风疹病毒感染，种痘后综合征，先天性风疹感染，爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒感染，腮腺炎，埃文斯(Evans)综合征，自身免疫性性腺衰竭，西登哈姆氏(Sydenham)舞蹈病，链球菌后肾炎，闭塞性血栓血管炎(thromboangitis ubiterans)，甲状腺毒症，脊髓痨，脉络膜炎，巨细胞性多肌痛，慢性超敏感性肺炎，结膜炎，诸如春季卡他、干燥性角膜结膜炎、和流行性角膜结膜炎，特发性肾炎综合征，微小病变肾病，良性家族性和缺血-再灌注损伤，移植器官再灌注，视网膜自身免疫，关节炎症，支气管炎，慢性阻塞性气道/肺部

疾病，硅沉着病，口疮，口疮性口炎，动脉硬化性病症（大脑血管功能不全）诸如动脉硬化性脑病和动脉硬化性视网膜病，无精子发生(aspermiogenese)，自身免疫性溶血，伯克氏(Boeck)病，冷球蛋白血症，杜普伊特伦氏(Dupuytren)挛缩，晶体过敏性眼内炎(endophthalmia phacoanaphylactica)，变应性小肠炎(enteritis allergica)，麻风节结性红斑，特发性面瘫，慢性疲乏综合征，风湿热(febris rheumatica)，哈-里二氏(Hamman-Rich)病，感觉神经性听觉丧失，阵发性血红蛋白尿(haemoglobinuria paroxysmatica)，性腺功能减退，局限性回肠炎(ileitis regionalis)，白细胞减少症，传染性单核细胞增多症，横贯性(traverse)脊髓炎，原发性特发性粘液水肿，肾病，交感性眼炎(ophthalmia symphatica) (sympathetic ophthalmitis)，新生儿眼炎，视神经炎，肉芽肿性睾丸炎(orchitis granulomatosa)，胰腺炎，急性多神经根炎，坏疽性脓皮症，奎尔万氏(Quervain)甲状腺炎，获得性脾萎缩，非恶性胸腺瘤，淋巴滤泡性胸腺炎，白癜风，中毒性休克综合征，食物中毒，涉及T细胞浸润的疾患，白细胞粘附缺陷，与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏感性有关的免疫应答，涉及白细胞渗出的疾病，多器官损伤综合征，抗原-抗体复合物介导的疾病，抗肾小球基底膜病，自身免疫性多内分泌病，卵巢炎，原发性粘液水肿，自身免疫性萎缩性胃炎，风湿病，混合性结缔组织病，肾病综合征，胰岛炎，多内分泌衰竭，自身免疫性多腺性综合征，包括多腺性综合征I型，成人期发作的特发性甲状旁腺功能减退(AOIH)，心肌病诸如扩张型心肌病，获得性大疱性表皮松解(epidermolisis bullosa acquisita, EBA)，血色素沉着，心肌炎，肾病综合征，原发性硬化性胆管炎，化脓性或非化脓性鼻窦炎，急性或慢性鼻窦炎，筛窦炎，额窦炎，上颌窦炎或蝶窦炎，变应性鼻窦炎，嗜曙红细胞相关病症诸如嗜曙红细胞增多症、肺嗜曙红细胞增多性浸润、嗜曙红细胞增多-肌痛综合征、吕弗勒氏(Loffler)综合征、慢性嗜曙红细胞性肺炎、热带肺嗜曙红细胞增多、支气管肺曲霉病、曲霉肿、或含有嗜曙红细胞的肉芽肿，过敏反应，脊椎关节病，血清阴性脊椎关节炎病，多内分泌自身免疫病，硬化性胆管炎，巩膜、巩膜外层、慢性粘膜皮肤假丝酵母病，布鲁顿氏(Bruton)综合征，婴儿期一过性低丙种球蛋白血症，威斯科特-奥尔德里齐(Wiskott-Aldrich)综合征，共济失调性毛细管扩张综合征，血管扩张，与以下各项有关的自身免疫性病症：胶原病、风湿病诸如慢性关节风湿病、淋巴结炎、血压应答降低(reduction in blood pressure response)、血管功能障

碍、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、肾缺血、脑缺血和伴随血管化的疾病，变应性超敏感性病症，肾小球肾炎病，再灌注损伤，缺血再灌注病症，心肌或其它组织的再灌注损伤，淋巴瘤气管支气管炎，炎性皮肤病，具有急性炎性成分的皮肤病，多器官衰竭，大疱病，肾皮质坏死，急性化脓性脑膜炎或其它中枢神经系统炎性病症，眼和眶炎性病症，粒细胞输血相关综合征，细胞因子诱发的中毒，发作性睡病，急性重度炎症，慢性顽固性炎症，肾盂炎，动脉内增生，消化性溃疡，心瓣炎，和子宫内膜异位症。此类疾病涵盖在本文中，以通过施用结合B细胞表面标志物（诸如CD22）的抗体来治疗，包括施用未偶联的抗体（“裸抗体”）或偶联有细胞毒剂的抗体，正如本文中所公开的。此类疾病还涵盖在本文中，以通过包括本发明的抗CD22抗体或抗CD22抗体-药物偶联物联合另一抗体或抗体-药物偶联物、另一细胞毒剂、放射或其它治疗的联合疗法（同时施用或顺次施用）来治疗。

在用于本文时，“治疗”（及变化形式，诸如“处理”或“处置”）指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预，可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防转移、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在有些实施方案中，本发明的抗体用于延迟疾病或病症的发生，或用于减缓疾病或病症的进展。

“个体”指脊椎动物。在某些实施方案中，脊椎动物指哺乳动物。哺乳动物包括，但不限于，牲畜（诸如牛）、运动用动物、宠物（诸如猫、犬、和马）、灵长类动物、小鼠和大鼠。在某些实施方案中，哺乳动物指人。

“有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的治疗或预防效果的量。

本发明的物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还涵盖该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量将低于治疗有效量。

术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。该术语意图包括：放射性同位素，例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、

Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}和Lu的放射性同位素；化疗剂，例如甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱类(vinca alkaloids)（长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)）、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素(mitomycin) C、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂；酶及其片段，诸如核溶酶；抗生素；和毒素，诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，包括其片段和/或变体；毒素；生长抑制剂；药物模块；及下文披露的各种抗肿瘤药或抗癌药。下文记载了其它细胞毒剂。杀肿瘤药引起肿瘤细胞的破坏。

“毒素”指能够对细胞的生长或增殖产生有害效果的任何物质。

“化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类(alkylating agents)，诸如塞替派(thiotepa)和CYTOXAN®环磷酰胺(cyclophosphamide)；磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates)，诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶类(aziridines)，诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedepa)和乌瑞替派(uredepa)；乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramide)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine)；番荔枝内酯类(acetogenin)（尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)）；δ-9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)（屈大麻酚(dronabinol)，MARINOL®）；β-拉帕醌(lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙素类(colchicines)；白桦脂酸(betulinic acid)；喜树碱(camptothecin)（包括合成类似物托泊替康(topotecan)（HYCAMTIN®）、CPT-11（伊立替康(irinotecan)，CAMPTOSAR®）、乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和9-氨基喜树碱）；苔藓抑素(bryostatin)；callystatin；CC-1065（包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物）；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；替尼泊苷(teniposide)；隐藻素类(cryptophycins)（特别是隐藻素1和隐藻素8）；多拉司他汀(dolastatin)；duocarmycin（包括合成类似物，KW-2189和CB1-TM1）；艾榴塞洛素(eleutherobin)；pancratistatin；sarcodictyin；海绵抑素(spongistatin)；氮芥类(nitrogen mustards)，诸如苯丁酸氮芥

(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亚硝脲类(nitrosoureas)，诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine)；抗生素类，诸如烯二炔类抗生素(enediyne)（例如加利车霉素(calicheamicin)，尤其是加利车霉素γ1I和加利车霉素ωI1（参见例如Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994)）；蒽环类抗生素(dynemicin)，包括dynemicin A；埃斯波霉素(esperamicin)；以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团）、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(anthramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C (cactinomycin)、carabicin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D (dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin)（包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星）、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代谢物类，诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤类似物，诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine)；嘧啶类似物，诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素类，诸如卡鲁睾酮(calusterone)、

丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone)；抗肾上腺类，诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；叶酸补充剂，诸如亚叶酸(folinic acid)；醋葡醛内酯(aceglatone)；醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；bestrabucil；比生群(bisantrene)；依达曲沙(edatraxate)；地磷酰胺(defosfamide)；地美可辛(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；elfornithine；依利醋铵(elliptinium acetate)；埃坡霉素(epothilone)；依托格鲁(etoglucid)；硝酸镓；羟脲(hydroxyurea)；香菇多糖(lentinan)；氯尼达明(lonidamine)；美登木素生物碱(maytansinoids)，诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌达醇(mopidamol)；二胺硝吖啶(nitracrine)；喷司他丁(pentostatin)；蛋氨氮芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基酰肼(ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多糖复合物（JHS Natural Products, Eugene, OR）；雷佐生(razoxane)；根霉素(rhizoxin)；西索菲兰(sizofiran)；螺旋锗(spirogermanium)；细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亚胺醌(triaziquone)；2,2',2"-三氯三乙胺；单端孢菌素类(trichothecenes)（尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin) A、杆孢菌素(roridin) A和蛇行菌素(anguidin)）；乌拉坦(urethan)；长春地辛(vindesine)（ELDISINE®, FILDESIN®）；达卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴卫矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；gacytosine；阿糖胞苷(arabinoside)（“Ara-C”）；塞替派(thiotepa)；类紫杉醇(taxoids)，例如TAXOL®帕利他塞(paclitaxel)（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、ABRAXANE™不含克列莫佛(Cremophor)，清蛋白改造的纳米颗粒剂型帕利他塞（American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois）和TAXOTERE®多西他塞(docetaxel)（Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France）；苯丁酸氮芥(chlorambucil)；吉西他滨(gemcitabine)（GEMZAR®）；6-硫鸟嘌呤(thioguanine)；巯基嘌呤(mercaptopurine)；甲氨蝶呤(methotrexate)；铂类似物，诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin)；长春碱(vinblastine)（VELBAN®）；铂；依托泊苷(etoposide)（VP-16）；异环磷酰胺(ifosfamide)；米托蒽醌(mitoxantrone)；长春新碱(vincristine)（ONCOVIN®）；奥沙利铂(oxaliplatin)；

亚叶酸(leucovorin)；长春瑞滨(vinorelbine)（NAVELBINE®）；能灭瘤(novantrone)；依达曲沙(edatrexate)；道诺霉素(daunomycin)；氨基蝶呤(aminopterin)；伊本膦酸盐(ibandronate)；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；类视黄酸(retinoids)，诸如视黄酸(retinoic acid)；卡培他滨(capecitabine)（XELODA®）；任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物；以及两种或多种上述物质的组合，诸如CHOP（环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写）和FOLFOX（奥沙利铂（ELOXATIN™）联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写）。

该定义还包括起调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果作用的抗激素剂，且常常是系统或全身治疗的形式。它们自身可以是激素。例子包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂类(SERM)，包括例如他莫昔芬(tamoxifen)（包括NOLVADEX®他莫昔芬）、EVISTA®雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗孕酮类；雌激素受体下调剂类(ERD)；起抑制或关闭卵巢作用的药剂，例如促黄体生成激素释放激素(LHRH)激动剂，诸如LUPRON®和ELIGARD®醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林(buserelin acetate)和曲普瑞林(triptorelin)；抗雄激素类，诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡米特(bicalutamide)；及抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂，诸如例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美坦(formestane)、法倔唑(fadrozole)、RIVISOR®伏氯唑(vorozole)、FEMARA®来曲唑(letrozole)和ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole)。另外，化疗剂的这种定义包括二膦酸盐类(bisphosphonates)，诸如氯膦酸盐(clodronate)（例如BONEFOS®或OSTAC®）、DIDROCAL®依替膦酸盐(etidronate)、NE-58095、ZOMETA®唑来膦酸/唑来膦酸盐(zoledronic acid/zoledronate)、FOSAMAX®阿伦膦酸盐(alendronate)、AREDIA®帕米膦酸盐(pamidronate)、SKELID®替鲁膦酸盐(tiludronate)或ACTONEL®利塞膦酸盐(risedronate)；以及曲沙他滨(troxacitabine)（1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物）；反义寡核苷酸，特别是那些抑制牵涉异常(abherant)细胞增殖的信号传导途经中的基因表达的反义寡

核苷酸，诸如例如PKC-α、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R)；疫苗，诸如THERATOPE®疫苗和基因疗法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗；LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂；ABARELIX®rmRH；lapatinib ditosylate（ErbB-2和EGFR双重酪氨酸激酶小分子抑制剂，也称为GW572016）；及任何上述物质的药学可接受的盐、酸或衍生物。

“生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞（诸如表达CD22的细胞）生长的化合物或组合物。因此，生长抑制剂可以是显著降低处于S期的细胞（诸如表达CD22的细胞）百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进（处于S期以外的位置）的药剂，诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类(vincas)（长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine)）、紫杉烷类(taxanes)、和拓扑异构酶II抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞G1的药剂也溢出进入S期停滞，例如DNA烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和ara-C。更多信息可参见The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn和Israel编，第1章，题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antieioplastic drugs”，Murakaini等，WB Saunders，Philadelphia, 1995，尤其是第13页。紫杉烷类（帕利他塞(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel)）是衍生自紫杉树的抗癌药。衍生自欧洲紫杉的多西他赛(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)是帕利他塞(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。帕利他塞和多西他赛促进由微管蛋白二聚体装配成微管并通过防止解聚使微管稳定，导致对细胞中有丝分裂的抑制。

术语“胞内代谢物”指由细胞内对抗体-药物偶联物(ADC)的代谢过程或反应产生的化合物。所述代谢过程或反应可以是酶促过程，诸如ADC的肽接头的蛋白水解切割、或官能团诸如腙、酯或酰胺的水解。胞内代谢物包括但不限于在进入、扩散、摄取或转运进入细胞后经历胞内切割的抗体和游离药物。

术语“胞内切割的”和“胞内切割”指细胞内对抗体-药物偶联物(ADC)的代谢过程或反应，由此药物模块(D)与抗体(Ab)之间的共价附着，即接头被

打断，导致细胞内游离药物与抗体解离。ADC被切割的模块因而是胞内代谢物。

术语“生物利用度”指施用于患者的给定量的药物的系统利用度（即血液/血浆水平）。生物利用度是表明药物从所施用的剂量形式到达大循环的时间（速率）和总量（程度）二者度量的绝对项。

术语“细胞毒活性”指抗体-药物偶联物或抗体-药物偶联物的胞内代谢物的细胞杀伤、细胞抑制、或生长抑制效果。细胞毒活性可以表述为IC_{50}值，即半数细胞存活时每单位体积的浓度（摩尔或质量）。

“烃基”或“烷基”指含正、仲、叔或环碳原子的C1-C18烃（碳氢化合物）。例子有甲基(Me, $-CH_3$)、乙基(Et, $-CH_2CH_3$)、1-丙基(n-Pr, 正丙基, $-CH_2CH_2CH_3$)、2-丙基(i-Pr, 异丙基, $-CH(CH_3)_2$)、1-丁基(n-Bu, 正丁基, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-甲基-1-丙基(i-Bu, 异丁基, $-CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基(s-Bu, 仲丁基, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu, 叔丁基, $-C(CH_3)_3$)、1-戊基(n-戊基, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-戊基($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-戊基($-CH(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-2-丁基($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-丁基($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$)、3-甲基-1-丁基($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$)、2-甲基-1-丁基($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)、1-己基($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-己基($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$)、3-己基($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$)、2-甲基-2-戊基($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-戊基($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$)、4-甲基-2-戊基($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$)、3-甲基-3-戊基($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-3-戊基($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$)、2,3-二甲基-2-丁基($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$)、3,3-二甲基-2-丁基($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$)。

术语“C_1-C_8烃基”在用于本文时指具有1-8个碳原子的直链或分支的、饱和的或不饱和的烃。代表性的“C_1-C_8烃基”包括但不限于-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基、-正辛基、-正壬基和-正癸基；而分支的C_1-C_8烃基包括但不限于-异丙基、-仲丁基、-异丁基、-叔丁基、-异戊基、2-甲基丁基，不饱和的C_1-C_8烃基包括但不限于-乙烯基、-丙烯基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-异丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基、-3-

甲基-1-丁炔基。甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2,3,4-三甲基戊基、3-甲基己基、2,2-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、3,5-二甲基己基、2,4-二甲基戊基、2-甲基庚基、3-甲基庚基、正庚基、异庚基、正辛基、和异辛基。C_1-C_8烃基基团可以是未取代的，或者是被一个或多个下述基团取代的，包括但不限于-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH_2、-C(O)NHR'、-C(O)$N(R')_2$、-NHC(O)R'、-SO_3R'、-$S(O)_2$R'、-S(O)R'、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$和-CN；其中每个R'独立选自H、-C_1-C_8烃基和芳基。

“烯基”指有至少一个不饱和位点即碳-碳，sp^2双键的含正、仲、叔或环碳原子的C2-C18烃。例子包括但不限于：次乙基或乙烯基(-CH=CH_2)、丙烯基(-CH_2CH=CH_2)、环戊烯基(-C_5H_7)、和5-己烯基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$CH=CH_2)。

“炔基”指有至少一个不饱和位点即碳-碳，sp三键的含正、仲、叔或环碳原子的C2-C18烃。例子包括但不限于：乙炔基(-C≡CH)和丙炔基(-CH_2C≡CH)。

“亚烷基(Alkylene)”指1-18个碳原子且具有两个单价基心(radical center)（通过从亲本烷烃的同一碳原子或两个不同碳原子除去两个氢原子而衍生的）的饱和的、分支的或直链的或环状的烃基。典型的亚烃基包括但不限于：亚甲基(-CH_2-)、1,2-乙基(-CH_2CH_2-)、1,3-丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)、1,4-丁基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-)等等。

“C_1-C_{10}亚烷基”指通式-$(CH_2)_{1-10}$-的直链、饱和烃基。C_1-C_{10}亚烷基的例子包括亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基和亚癸基。

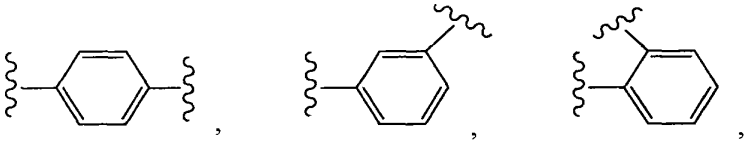
“亚烯基”指2-18个碳原子且具有两个单价基心(radical center)（通过从亲本烯烃的同一碳原子或两个不同碳原子除去两个氢原子而衍生的）的不饱和的、分支的或直链的或环状的烃基。典型的亚烯基包括但不限于：1,2-亚乙烯基(-CH=CH-)。

“亚炔基”指2-18个碳原子且具有两个单价基心(radical center)（通过从亲本炔烃的同一碳原子或两个不同碳原子除去两个氢原子而衍生的）的不饱

和的、分支的或直链的或环状的烃基。典型的亚炔基包括但不限于：亚乙炔基(-C≡C-)、亚丙炔基(-CH_2C≡C-)、和亚4-戊炔基(-$CH_2CH_2CH_2$C≡C-)。

“芳基”指碳环芳基。芳基的例子包括但不限于苯基、萘基、和蒽基。碳环芳基或杂环芳基可以是未取代的，或者是被一个或多个下述基团取代的，包括但不限于-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH_2 、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)$_2$、-NHC(O)R’、-S(O)$_2$R’、-S(O)R’、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R’)、-N(R’)$_2$和-CN；其中每个R’独立选自H、-C_1-C_8烃基和芳基。

“亚芳基”指具有两个共价键且可以是邻位、间位或对位构型的芳基，如下述结构所示：



其中苯基可以是未取代的，或者是被至多四个下述基团取代的，包括但不限于-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH_2、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)$_2$、-NHC(O)R’、-S(O)$_2$R’、-S(O)R’、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R’)、-N(R’)$_2$和-CN；其中每个R’独立选自H、-C_1-C_8烃基和芳基。

“芳基烃基”指键合至碳原子（通常是末端或sp^3碳原子）的氢原子之一被芳基取代的非环烃基。典型的芳基烃基包括但不限于苄基、2-苯基乙烷-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙烷-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘并苄基、2-萘并苯基乙烷-1-基等等。芳基烃基包含6-20个碳原子，例如芳基烃基的烃基模块（包括烷基、烯基或炔基）是1-6个碳原子，芳基模块是5-14个碳原子。

“杂芳基烃基”指键合至碳原子（通常是末端或sp^3碳原子）的氢原子之一被杂芳基取代的非环烃基。典型的杂芳基烃基包括但不限于2-苯并咪唑基甲基、2-呋喃基乙基等等。杂芳基烃基包含6-20个碳原子，例如杂芳基烃基的烃基模块（包括烷基、烯基或炔基）是1-6个碳原子，杂芳基模块是5-14个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子。杂芳基烃基的杂芳基模块可以是具有3-7个环成员（2-6个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子）的单环或具有7-10个环成员（4-9个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子）的

双环，例如双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]体系。

“取代的烃基”、“取代的芳基”、和“取代的芳基烃基”分别指其中一个或多个氢原子各自独立被取代基取代的烃基、芳基、和芳基烃基。典型的取代基包括但不限于-X、-R、$-O^-$、-OR、-SR、$-S^-$、$-NR_2$、$-NR_3$、=NR、$-CX_3$、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、$-NO_2$、$=N_2$、$-N_3$、NC(=O)R、-C(=O)R、$-C(=O)NR_2$、$-SO_3^-$、$-SO_3H$、$-S(=O)_2R$、$-OS(=O)_2OR$、$-S(=O)_2NR$、-S(=O)R、$-OP(=O)(OR)_2$、$-P(=O)(OR)_2$、$-PO^-_3$、$-PO_3H_2$、-C(=O)R、-C(=O)X、-C(=S)R、$-CO_2R$、$-CO_2^-$、-C(=S)OR、-C(=O)SR、-C(=S)SR、$-C(=O)NR_2$、$-C(=S)NR_2$、$-C(=NR)NR_2$，其中每个X独立为卤素：F、Cl、Br、或I；且每个R独立为-H、C_2-C_{18}烃基、C_6-C_{20}芳基、C_3-C_{14}杂环、保护基团或前体药物模块。上文所述亚烃基/亚烷基、亚烯基、和亚炔基也可以被类似的取代。

“杂芳基”和“杂环”指其中一个或多个环原子是杂原子（例如氮、氧和硫）的环体系。杂环基包含1-20个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子。杂环可以是具有3-7个环成员（2-6个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子）的单环或具有7-10个环成员（4-9个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子）的双环，例如双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]体系。

杂环记载于Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), 特别是第1, 3, 4, 6, 7, 和9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950至今), 特别是第13, 14, 16, 19和28卷; 及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566。

举例而言，杂环的例子包括但不限于吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基（哌啶基）、噻唑基、四氢噻吩基(tetrahydrothiophenyl)、硫氧化的四氢噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、硫萘基（thianaphthalenyl）、吲哚基、indolenyl、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、吡咯啉基、四氢呋喃基、双-四氢呋喃基、四氢吡喃基、双-四氢吡喃基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、吖辛因基(azocinyl)、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒽基、吡喃基、异苯并呋喃基、色烯基、呫吨基、酚噁噻基(phenoxathinyl)、2H-吡咯基、异噻唑基、异噁唑基、吡嗪基、哒嗪基、吲嗪基、异吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑

基、嘌呤基(purinyl)、4H-喹嗪基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、喋啶基、4aH-咔唑基、咔唑基、β-咔啉基、菲啶基、吖啶基、嘧啶基、菲咯啉基、酚嗪基、酚噻嗪基、吩咱基、酚噁嗪基、异色满基、色满基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、奎宁环基、吗啉基、噁唑烷基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、羟吲哚基、苯并噁唑啉基、和靛红酰基(isatinoyl)。

举例而言而非限制，碳键合的杂环键合于吡啶的2、3、4、5、或6位，哒嗪的3、4、5、或6位，嘧啶的2、4、5、或6位，吡嗪的2、3、5、或6位，呋喃、四氢呋喃、噻吩(thiofuran)、噻吩(thiophene)、吡咯或四氢吡咯的2、3、4、或5位，噁唑、咪唑或噻唑的2、4、或5位，异噁唑、吡唑或异噻唑的3、4、或5位，吖丙啶的2或3位，吖丁啶的2、3、或4位，喹啉的2、3、4、5、6、7、或8位，或异喹啉的1、3、4、5、6、7、或8位。还要更典型的是，碳键合的杂环包括2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、3-哒嗪基、4-哒嗪基、5-哒嗪基、6-哒嗪基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗪基、3-吡嗪基、5-吡嗪基、6-吡嗪基、2-噻唑基、4-噻唑基、或5-噻唑基。

举例而言而非限制，氮键合的杂环键合于吖丙啶、吖丁啶、吡咯、吡咯烷、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啉、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、二氢吲哚、1H-吲唑的1位，异吲哚或异二氢吲哚的2位，吗啉的4位，及咔唑或β-咔啉的9位。还要更典型的是，氮键合的杂环包括1-aziridyl、1-azetedyl、1-吡咯基、1-咪唑基、1-吡唑基、和1-哌啶基。

“C_3-C_8杂环”指其中1-4个环碳原子独立地被选自O、S和N的杂原子取代的芳香族或非芳香族C_3-C_8碳环。C_3-C_8杂环的代表性例子包括但不限于苯并呋喃基、苯并噻吩(benzothiophene)、吲哚基、苯并吡唑基、香豆素基、异喹啉基、吡咯基、硫苯基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、哒嗪基、异噻唑基、异噁唑基、和四唑基。C_3-C_8杂环可以是未取代的，或者是被至多7个下述基团取代的，包括但不限于-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH_2、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)$_2$、-NHC(O)R’、-S(O)$_2$R’、-S(O)R’、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R’)、-N(R’)$_2$和-CN；其中每个R’

独立选自H、-C_1-C_8烃基和芳基。

“C_3-C_8杂环基/C_3-C_8杂环并”指其中杂环基团的氢原子之一被键取代的上文定义的C_3-C_8杂环基团。C_3-C_8杂环基可以是未取代的，或者是被至多6个下述基团取代的，包括但不限于-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH_2、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)$_2$、-NHC(O)R’、-S(O)$_2$R’、-S(O)R’、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R’)、-N(R’)$_2$和-CN；其中每个R’独立选自H、-C_1-C_8烃基和芳基。

“碳环”指饱和的或不饱和的环，作为单环具有3-7个碳原子，作为双环具有7-12个碳原子。单环碳环具有3-6个环原子，还要更典型的是5或6个环原子。双环碳环具有7-12个环原子，例如排列成双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]体系，或者具有9或10个环原子，排列成双环[5,6]或[6,6]体系。单环碳环的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环庚基、和环辛基。

“C_3-C_8碳环”指3、4、5、6、7或8个成员的饱和的或不饱和的非芳香族碳环。代表性的C_3-C_8碳环包括但不限于-环丙基、-环丁基、-环戊基、-环戊二烯基、-环己基、-环己烯基、-1,3-环己二烯基、-1,4-环己二烯基、-环庚基、-1,3-环庚二烯基、-1,3,5-环庚三烯基、-环辛基、和-环辛二烯基。C_3-C_8碳环基团可以是未取代的，或者是被一个或多个下述基团取代的，包括但不限于-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-芳基、-C(O)R’、-OC(O)R’、-C(O)OR’、-C(O)NH_2、-C(O)NHR’、-C(O)N(R’)$_2$、-NHC(O)R’、-S(O)$_2$R’、-S(O)R’、-OH、-卤素、-N_3、-NH_2、-NH(R’)、-N(R’)$_2$和-CN；其中每个R’独立选自H、-C_1-C_8烃基和芳基。

“C_3-C_8碳环基/C_3-C_8碳环并”指其中碳环基团的氢原子之一被键取代的上文定义的C_3-C_8碳环基团。

“接头”指包含使抗体共价附着于药物模块的共价键或原子链的化学模块。在各个实施方案中，接头包括：二价基，诸如亚烃基(alkyldiyl)、亚芳基、亚杂芳基，诸如-(CR_2)$_n$O(CR_2)$_n$-、烃氧基重复单元（例如聚亚乙基氧基(polyethyleneoxy)、PEG、聚亚甲基氧基(polymethyleneoxy)）和烃氨基（例如聚乙烯氨基，Jeffamine™）等模块；及二酸酯和酰胺类，包括琥珀酸酯、琥珀酰胺、二乙醇酸酯、丙二酸酯和己酰胺。

术语“手性”指分子具有镜像对映体不可重叠的特性，而术语“非手性”指分子可重叠于其镜像对映体上。

术语“立体异构体”指具有相同的化学结构，但是在原子或基团的空间排列方面有所不同的化合物。

“非对映异构体”指具有两个或多个手性中心且其分子彼此不为镜像对映体的空间异构体。非对映体具有不同的物理特性，例如熔点、沸点、光谱特征、和反应性。非对映异构体的混合物可以在高分辨力的分析规程下分开，诸如电泳和层析。

“对映异构体”指化合物的彼此为不可重叠镜像的两种空间异构体。

本文中使用的立体化学的定义和规则一般遵循S. P. Parker编，McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 及Eliel, E.和Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compunds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York。许多有机化合物以旋光形式存在，即它们有能力旋转平面偏振光的平面。在描述旋光化合物时，前缀D和L或R和S用于表示分子关于其手性中心的绝对构型。前缀d和l或(+)和(-)用于表示化合物对平面偏振光的旋转的标记，其中(-)或l指化合物是左旋的。以(+)或d为前缀的化合物是右旋的。对于指定的化学结构，这些立体异构体是相同的，只是它们互为镜像。特定的立体异构体还可称作对映体，此类异构体的混合物通常称作对映混合物。对映体的50:50混合物称作外消旋混合物或外消旋物，它们可以在没有立体选择性或立体特异性的化学反应或方法中存在。术语“外消旋混合物”和“外消旋物”指两种对映体等摩尔混合从而没有旋光性的混合物。

“离去基团”指可以被另一官能团取代的官能团。某些离去基团是本领域公知的，例子包括但不限于卤化物（例如氯化物、溴化物、碘化物）、甲基磺酰基（甲磺酰基）、对甲苯磺酰基（甲苯磺酰基）、三氟甲基磺酰基(triflate)、和三氟甲基磺酸根。

缩写

接头组件:

MC = 6-马来酰亚氨基己酰基

Val-Cit或“vc” = 缬氨酸-瓜氨酸（蛋白酶可切割接头中的例示二肽）

瓜氨酸 = 2-氨基-5-脲基戊酸

PAB = 对氨基苄氧羰基（“自我牺牲”接头组件的例示）

Me-Val-Cit = N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸（其中接头肽键已经修饰以防止其受到组织蛋白酶B的切割）

MC(PEG)6-OH = 马来酰亚氨基己酰基-聚乙二醇（可附着于抗体半胱氨酸）

SPP = N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯

SPDP = N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯

SMCC = 琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯

IT = 亚氨基硫烷

细胞毒性药物:

MMAE = 单甲基auristatin E (MW 718)

MMAF = auristatin E (MMAE)的变体，其在药物的C-末端处有苯丙氨酸(MW 731.5)

MMAF-DMAEA = 有DMAEA（二甲基氨基乙胺）以酰胺连接至C-末端苯丙氨酸的MMAF (MW 801.5)

MMAF-TEG = 有四乙二醇酯化至苯丙氨酸的MMAF

MMAF-NtBu = N-叔丁基作为酰胺附着于MMAF的C-末端

DM1 = N(2')-脱乙酰基-N(2')-(3-巯基-1-氧丙基)-美登素

DM3 = N(2')-脱乙酰基-N2-(4-巯基-1-氧戊基)-美登素

DM4 = N(2')-脱乙酰基-N2-(4-巯基-4-甲基-1-氧戊基)-美登素

别的缩写如下：AE指auristatin E；Boc指N-(叔丁氧羰基)；cit指瓜氨酸；dap指dolaproine；DCC指1,3-二环己基碳二亚胺；DCM指二氯甲烷；DEA指二乙胺；DEAD指偶氮二羧酸二乙酯；DEPC指氰基磷酸二乙酯；DIAD指偶氮二羧酸二异丙酯；DIEA指N,N-二异丙基乙胺；dil指dolaisoleucine；DMA指二甲基乙酰胺；DMAP指4-二甲基氨基吡啶；DME指乙二醇二甲基醚（或1,2-二甲氧基乙烷）；DMF指N,N-二甲基甲酰胺；DMSO指二甲基亚砜；doe指dolaphenine；dov指N,N-二甲基缬氨酸；DTNB指5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)；DTPA指二乙烯三胺五乙酸；DTT指二硫苏糖醇；EDCI指盐酸1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺；EEDQ指2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氢喹啉；ES-MS指电喷雾质谱；EtOAc指乙酸乙酯；Fmoc指N-(9-芴基甲氧羰基)；gly指甘氨酸；HATU指O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯；HOBt指1-羟基苯并三唑；HPLC指高压液相层析；ile指异亮氨酸；lys指

赖氨酸；MeCN (CH_3CN)指乙腈；MeOH指甲醇；Mtr指4-茴香基联苯基甲基（或4-甲氧基三苯甲基）；nor指(1S;2R)-(+)-去甲麻黄碱；PBS指磷酸盐缓冲盐水(pH 7.4)；PEG指聚乙二醇；Ph指苯基；Pnp指对硝基苯基；MC指6-马来酰亚氨基己酰基；phe指L-苯丙氨酸；PyBrop指溴三吡咯烷膦六氟磷酸酯；SEC指大小排阻层析；Su指琥珀酰亚胺；TFA指三氟乙酸；TLC指薄层层析；UV指紫外线；而val指缬氨酸。

组合物及其制备方法

提供了结合CD22的抗体。提供了包含抗CD22抗体的免疫偶联物。本发明的抗体和免疫偶联物对于例如与CD22表达改变（例如升高）有关的病症的诊断或治疗是有用的。在某些实施方案中，本发明的抗体或免疫偶联物对于细胞增殖性病症（诸如癌症）的诊断或治疗是有用的。

抗CD22抗体

一方面，本发明提供了结合CD22的抗体。在有些实施方案中，提供了结合成熟形式的人和猕猴(cyno) CD22的抗体。在一个此类实施方案中，成熟形式的人CD22具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列。成熟的、主要的人同等型(isoform)具有如下的胞外结构域，其包含七个Ig样结构域和SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在另一个实施方案中，次要的人CD22同等型缺少胞外结构域3和4，且具有SEQ ID NO: 29的氨基酸序列。次要同等型的胞外结构域的氨基酸序列为SEQ ID NO:30。猕猴CD22具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在有些实施方案中，针对CD22的抗体结合在细胞表面上表达的成熟形式的CD22。在有些实施方案中，结合在细胞表面上表达的成熟形式的CD22的抗体抑制细胞的生长。在有些实施方案中，抗CD22抗体结合在细胞表面上表达的成熟形式的CD22且抑制细胞增殖。在某些实施方案中，抗CD22抗体结合在细胞表面上表达的成熟形式的CD22且诱导细胞死亡。在有些实施方案中，抗CD22抗体结合在癌细胞表面上表达的成熟形式的CD22。在有些实施方案中，抗CD22抗体结合在癌细胞表面上相对于同一组织起源的正常细胞过表达的成熟形式的CD22。在有些实施方案中，抗CD22抗体偶联至细胞毒素或可检测标记物且结合细胞表面上的CD22。在有些实施方案中，抗体--毒素偶联物抑制细胞的生长。在有些实施方案中，抗体-可检测标记物偶联物使得在其表面上表达CD22的细胞在体外或在体内可检测。

一方面，抗CD22抗体是单克隆抗体。一方面，抗CD22抗体是抗体片段，例如Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、或$(Fab')_2$片段。一方面，抗CD22抗体是嵌合抗体、人源化抗体、或人抗体。一方面，任何本文所述抗CD22抗体是纯化的。

本文中提供了例示性的衍生自噬菌体文库的单克隆抗体。用于筛选文库的抗原是具有SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:30的氨基酸序列的多肽，所述氨基酸序列对应于CD22β和α的胞外结构域(ECD)。源自文库筛选的抗体是亲和力成熟的。

一方面，提供了与鼠10F4.4.1、人源化10F4v1和v3、及鼠5E8.1.8竞争CD22结合的单克隆抗体。还提供了与鼠10F4.4.1、人源化10F4v1和v3、及鼠5E8.1.8结合相同表位的单克隆抗体。

在本发明的一个方面，提供了编码抗CD22抗体的多核苷酸。在某些实施方案中，提供了包含编码抗CD22抗体的多核苷酸的载体。在某些实施方案中，提供了包含此类载体的宿主细胞。在本发明的另一个方面，提供了包含抗CD22抗体或编码抗CD22抗体的多核苷酸的组合物。在某些实施方案中，本发明的组合物是用于治疗细胞增殖性病症（诸如本文所列举的那些）的药物配制剂。

抗体施用和配制剂

在一个实施方案中，本发明的抗CD22抗体或抗CD22抗体-药物偶联物（包括但不限于本发明的抗CD22 thiomab-药物偶联物）与B细胞表面抗原的拮抗剂联合施用。与一种或多种别的治疗剂“联合”施用包括同时（并发）和任意次序的序贯施用。在一个实施方案中，所述施用是序贯的或顺次的。在另一个实施方案中，所述施用是在同一配制剂中一起的、并发的、或同时的。在一个实施方案中，所述B细胞表面抗原拮抗剂是抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中，所述B细胞表面拮抗剂是抗体-药物偶联物。

本文中的配制剂可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种活性化合物，优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。例如，在抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或CD22结合寡肽之外，可能希望在一种配制剂中包含别的抗体，例如结合CD22多肽上不同表位的第二抗CD22抗体、或结合不同B细胞表面抗原的第二抗体、或针对一些其它靶物（诸如影响特定癌症生长的生长因子）的抗体。或者/另外，所述组合物可进一步包含化疗剂、细胞毒

剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、和/或心脏保护剂。合适的是，此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

现在，根据癌症的分级，癌症的治疗牵涉下列疗法中的一种或组合：手术去除癌性组织，放疗和化疗。抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽疗法对于不能很好承受化疗的毒性和副作用的老年患者和放疗具有有限效用的转移性疾病可能是尤其想要的。本发明的靶向肿瘤的抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽可用于在疾病的最初诊断时或在复发期间减轻表达CD22的癌症。对于治疗性应用，可单独使用抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽，或者用于与例如激素、抗血管发生原(antiangiogen)或放射性标记的化合物，或者与手术、冷冻疗法和/或放疗的联合疗法。抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽的治疗可与其它形式的常规疗法联合施用，与常规疗法连续、在之前或之后。在本发明治疗或减轻癌症的方法中，可给癌症患者施用抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽并联合一种或多种前述化疗剂的治疗。将抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽与治疗有效剂量的化疗剂一起施用。在另一个实施方案中，联合化疗施用抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽以提高化疗剂的活性和功效。Physicians' Desk Reference (PDR)公开了已经在多种癌症的治疗中使用的这些药剂的剂量。这些前述化疗药物在治疗上有效的剂量给药方案和剂量将取决于所治疗的具体癌症、疾病的程度、及有本领域技术的内科医师所熟悉的其它因素，且可以由内科医师确定。

在一个具体的实施方案中，将包含与细胞毒剂偶联的抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽的偶联物施用于患者。优选的是，与CD22蛋白质结合的免疫偶联物由细胞内在化，导致免疫偶联物在杀死其所结合的癌细胞方面的治疗功效提高。在一个实施方案中，细胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。细胞毒剂的例子上文已有描述，包括auristatin、美登木素生物碱、加利车霉素、核糖核酸酶和DNA内切核酸酶、或其生物学活性衍生物。

将抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽或其毒素偶联物依照已知方法施用给人类患者，诸如静脉内施用，例如作为推注或一段时间的连续输注，通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径。优选静脉内或皮下施用抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽。

抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽的施用可联合其它治疗方案。联合施用包括使用分开的配制剂或单一的药用配制剂的共施用，及任意次序的序贯施用，其中优选有一段时间所有两种（或多种）活性剂同时发挥其生物学活性。优选的是，此类联合疗法导致协同治疗效果。

可能还期望将一种或多种抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽的施用与针对与特定癌症有关的另一种肿瘤抗原或B细胞表面抗原的抗体的施用联合。

在另一个实施方案中，本发明的治疗性处理方法牵涉（一种或多种）抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物或寡肽与一种或多种化疗剂或生长抑制剂的联合施用，包括不同化疗剂的鸡尾酒或混合物(cocktail)的共施用。化疗剂包括磷酸雌莫司汀(estramustine phosphate)、泼尼莫司汀(prednimustine)、顺铂、5-氟尿嘧啶、美法仑(melphalan)、环磷酰胺、羟脲和羟脲紫杉烷(hydroxyureataxane)（诸如帕利他塞(paclitaxel)和多西他塞(doxetaxel)）和/或蒽环类(anthracycline)抗生素，以及药剂组合，诸如但不限于CHOP或FOLFOX。此类化疗剂的制剂和剂量给药方案可依照制造商的说明书使用或由熟练从业人员凭经验确定。此类化疗的准备和剂量给药方案还可参阅Chemotherapy Service, M.C. Perry编, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)。

所述抗体以任何合适方式施用，包括胃肠外、表面、皮下、腹膜内、肺内、鼻内和/或损伤内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。还涵盖膜内或鞘内施用（参阅例如美国专利申请No. 2002/0009444, Grillo-Lopez, A，关于CD20抗体的鞘内投递）。优选的是，静脉内或皮下给予剂量给药。

可以与治疗性抗体或免疫粘附素的初始暴露和/或后续暴露一起施用第二药物，此类联合施用包括使用分开的配制剂或单一的药用配制剂的共施用，及任意顺序的序贯施用，其中优选有一段时间所有两种（或多种）活性剂同时发挥其生物学活性。

尽管治疗性抗CD22抗体、抗CD22抗体-药物偶联物、免疫粘附素或其它生物制品可以作为单一药剂施用以治疗自身免疫病，一般而言，所述治疗性抗体或免疫粘附素会联合一种或多种第二药物。例如，对于RA和其它自身免疫病，所述抗体、免疫粘附素、或其它生物制品药物优选联合任一种或多

种上文定义部分所列举的免疫抑制剂、化疗剂、BAFF拮抗剂、整联蛋白拮抗剂或抗体、和/或细胞因子；任一种或多种减轻病情的抗风湿药(DMARD)，诸如羟氯喹(hydroxycloroquine)、柳氮磺吡啶、甲氨蝶呤、来氟米特、硫唑嘌呤、D-青霉胺、金（口服）、金（肌肉内）、米诺环素、环孢霉素；葡萄球菌蛋白A免疫吸附；静脉内免疫球蛋白(IVIG)；非类固醇抗炎药(NSAID)；糖皮质激素（例如经关节注射）；皮质类固醇（例如甲泼尼龙和/或泼尼松）；叶酸；抗肿瘤坏死因子(TNF)拮抗剂，例如依那西普/ENBREL™、英夫利昔单抗/REMICADE™、D2E7 (Knoll)或CDP-870 (Celltech)；IL-1R拮抗剂（例如Kineret）；1L-10拮抗剂（例如伊洛白介素(Ilodecakin)）；血液凝结调控物（例如WinRho）；IL-6拮抗剂/抗TNF (CBP 1011)；CD40拮抗剂（例如IDEC 131）；Ig-Fc受体拮抗剂(MDX33)；免疫调控物（例如沙利度胺或ImmuDyn）；抗CD5抗体（例如H5g1.1）；巨噬细胞抑制剂（例如MDX 33）；共刺激性阻断物(costimulatory blocker)（例如BMS 188667或Tolerimab）；补体抑制剂（例如h5G1.1、3E10或抗衰变加速因子(DAF)抗体）；IL-2拮抗剂(zxSMART)；EGFR抑制剂（见上文定义）；酪氨酸激酶抑制剂（见上文定义）；抗血管发生剂（例如VEGF抗体，诸如贝伐单抗）；CD22抗体，诸如LL2或依帕珠单抗(epratuzumab, LYMPHOCIDE®; Immunomedics)，包括依帕珠单抗Y-90 (Juweid等 Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s (1995))、Abiogen的CD22抗体(Abiogen, Italy)、CMC 544 (Wyeth/Celltech)、combotox (UT Soutwestern)、BL22 (NIH)、和LympoScan Tc99 (Immunomedics)；EpCAM抗体，诸如17-1A (PANOREX®)；αvβ3抗体（例如VITAXIN®; Medimmune）；CD37抗体，诸如TRU 016 (Trubion)；IL-21抗体(Zymogenetics/Novo Nordisk)；抗B细胞抗体(Impheron)；B细胞靶向MAb (Immunogen/Aventis)；1D09C3 (Morphosys/GPC)；LymphoRad 131 (HGS)；Lym-1抗体Y-90 (USC)；LIF 226 (Enhanced Lifesci.)；BAFF抗体(例如WO 03/33658)；BAFF受体抗体(例如WO 02/24909)；BR3抗体；Blys抗体，诸如belimumab；LYMPHOSCD22 -B™；抗Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine)；ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen)；gomiliximа (Idec 152; Biogen Idec)；IL-6受体抗体，诸如atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche)；IL-15抗体，诸如HuMax-Il-15 (Genmab/Amgen)；趋化因子受体抗体，诸如CCR2抗体（例如MLN1202; Millieneum）；抗补体抗体，诸如C5抗体（例如eculizumab, 5G1.1; Alexion）；

人免疫球蛋白的口服配制剂（例如IgPO; Protein Therapeutics）; IL-12抗体，诸如ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818); B细胞疫苗; DN-BAFF (Xencor); CRx-119 (CombinatoRx); Amgen的BAFF拮抗剂; 喷司他丁(Pfizer); IC-485 (ICOS); 趋化因子拮抗剂，诸如T-487 (Tularik)或Reticulose (AVR-118); SCO-323 (SCIOS); 整联蛋白拮抗剂683699、Tanabe、NGD-2001-1 (Neurogen); SCIO-469 (SCIOS); BIRB-796 (Boehringer Ingelheim); VX702, VX850 (Vertex); 白三烯B-4拮抗剂（诸如amelubunt, BIIL-284; BI）; 微管调控物(Paxceed; Angiotech); 蛋白酶抑制剂(MBS561392; BMS); AGIX-4207 (Atherogenics); ISIS-104838 (ISIS/Elan); MFG-IRAP (Univ. Pitt.); IL-1 Trap (RGN-303; Regeneron/Novartis); 奥普瑞白介素(oprelvekin, Wyeth); 依维莫司(everolimus, Certican; Novartis); Amevive (Biogen Idec); ORG-39141 (Organon); FK-506 (Fujisawa); 及IL-2拮抗剂（他克莫司(tacrolimus); Fujisawa）。

例示性抗CD22抗体的详细描述如下:

1. 抗CD22抗体的具体实施方案

一方面，本发明提供了包含至少一种、两种、三种、四种、五种、或六种选自下组的HVR的抗体: (a) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之任一的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2; 和(f) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

一方面，本发明提供了包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下组的VH HVR序列的抗CD22抗体: (a) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-H3。一方面，本发明提供了所含HVR-H1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的抗CD22抗体。一方面，本发明提供了所含HVR-H2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的抗CD22抗体。一方面，本发明提供了所含HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的抗CD22抗体。

一方面，本发明提供了所含HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6的氨基酸序列且所含HVR-H1包含选自SEQ ID NO:2的氨基酸序列的抗CD22抗体。

一方面，本发明提供了所含HVR-H3包含选自SEQ ID NO:6的氨基酸序

列且所含HVR-H2包含选自SEQ ID NO:4的氨基酸序列的抗CD22抗体。

一方面，本发明提供了所含HVR-H1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列且所含HVR-H2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的抗CD22抗体。

一方面，本发明提供了所含HVR-H1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列、所含HVR-H2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列、且所含HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的抗CD22抗体。

一方面，本发明提供了包含至少一种、至少两种、或所有三种选自下组的VL HVR序列的抗CD22抗体：(a) 包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-L1；(b) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2；和(c) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。一方面，本发明提供了所含HVR-L1包含选自SEQ ID NO:9的氨基酸序列的抗CD22抗体。一方面，本发明提供了所含HVR-L1包含选自SEQ ID NO:10的氨基酸序列的抗CD22抗体。一方面，本发明提供了所含HVR-L1包含选自SEQ ID NO:19-23的氨基酸序列的抗CD22抗体。一方面，所述HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，其中N28用V替换（N28V氨基酸变化，生成SEQ ID NO:10）。一方面，所述HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，其中N28用A替换（N28A氨基酸变化，生成SEQ ID NO:19）。一方面，所述HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，其中N28用Q替换（N28Q氨基酸变化，生成SEQ ID NO:20）。一方面，所述HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，其中N28用S替换（N28S氨基酸变化，生成SEQ ID NO:21）。一方面，所述HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，其中N28用D替换（N28D氨基酸变化，生成SEQ ID NO:22）。一方面，所述HVR-L1包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列，其中N28用I替换（N28I氨基酸变化，生成SEQ ID NO:23）。一方面，本发明提供了所含HVR-L1包含SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之任一的氨基酸序列的抗CD22抗体。一方面，所述HVR-L1是SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、或23之任一，且氨基酸位置N30（第30位天冬酰胺）用A替换（N30A氨基酸变化）。一方面，所述HVR-L1是SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、或23之任一，且氨基酸位置N30（第30位天冬酰胺）用Q替换（N30Q氨基酸变化）。

一方面，本发明提供了(a) 所含HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列且(b) 所含HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的抗CD22抗体。在有些实施方案中，所述CD22抗体进一步包含(a) 包含SEQ ID NO:2的HVR-H1和

包含SEQ ID NO:4的HVR-H2。

一方面，本发明提供了 (a) 所含HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列且(b) 所含HVR-L2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的抗CD22抗体。在有些实施方案中，所述CD22抗体进一步包含(a) 包含SEQ ID NO:2的HVR-H1和包含SEQ ID NO:4的HVR-H2。

一方面，本发明提供了(a) 所含HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列且(b) 所含HVR-L1包含选自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、和23的氨基酸序列的抗CD22抗体。在有些实施方案中，所述CD22抗体进一步包含(a)包含SEQ ID NO:2的HVR-H1和包含SEQ ID NO:4的HVR-H2。在有些实施方案中，SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、或23的氨基酸序列包含N30A或N30Q氨基酸变化。在有些实施方案中，所述CD22抗体进一步包含包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L2。在有些实施方案中，所述CD22抗体进一步包含包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

一方面，本发明提供了(a) 所含HVR-H1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；(b) 所含HVR-H2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；(c) 所含HVR-H3包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列；(d) 所含HVR-L1包含选自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23的氨基酸序列；(e) 所含HVR-L2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；和(f) 所含HVR-L3包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的抗CD22抗体。在有些实施方案中，本发明进一步提供了选作HVR-L1的氨基酸序列SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、或23通过N30A或N30Q氨基酸变化得到修饰。

一方面，本发明提供了所含重链可变域包含SEQ ID NO:16的抗CD22抗体（见图2A, h10F4v1）。一方面，本发明提供了所含轻链可变域包含SEQ ID NO:17的抗CD22抗体（见图2B, h10F4v1）。一方面，本发明提供了所含轻链可变域包含SEQ ID NO:18的抗CD22抗体（见图2B, h10F4v3）。

一方面，本发明提供了所含重链包含SEQ ID NO:34的抗CD22抗体（见图2A, m10F4）。一方面，本发明提供了所含轻链包含SEQ ID NO:35的抗CD22抗体（见图2B, m10F4）。

一方面，本发明提供了包含保藏于ATCC且编号PTA-7621的杂交瘤所生成的抗体10F4.4.1的1、2、3、4、5、或6种HVR序列的抗CD22抗体。

一方面，本发明提供了包含保藏于ATCC且编号PTA-7620的杂交瘤所生

成的抗体5E8.1.8的1、2、3、4、5、或6种HVR序列的抗CD22抗体。

抗CD22抗体可包含任何合适的框架可变域序列，只要该抗体保留结合CD22的能力。例如，在有些实施方案中，本发明的抗CD22抗体包含人亚组III重链框架共有序列。在这些抗体的一个实施方案中，所述重链框架共有序列包含第71、73和/或78位的替代。在这些抗体的一个实施方案中，第71位是A，第73位是T，和/或第78位是A。在一个实施方案中，这些抗体包含huMAb4D5-8的重链可变域框架序列，例如SEQ ID NO:1、3、5、7（分别是FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4）。huMAb4D5-8在商业上称为HERCEPTIN® 抗HER2抗体(Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA)；在美国专利No. 6,407,213 & 5,821,337及Lee等, J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93中也有提到。在一个此类实施方案中，这些抗体进一步包含人(κ) I轻链框架共有序列。在一个此类实施方案中，这些抗体包含huMAb4D5-8的轻链可变域框架序列，例如SEQ ID NO:8、1、13、15（分别是FR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-L4）。

在一个实施方案中，抗CD22抗体包含包含框架序列和高变区的重链可变域，其中所述框架序列包含分别为SEQ ID NO:1、3、5、和7的FR-H1至FR-H4序列；所述HVR H1包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；所述HVR-H2包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；而所述HVR-H3 包含选自SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一个实施方案中，抗CD22抗体包含包含框架序列和高变区的轻链可变域，其中所述框架序列包含分别为SEQ ID NO:8、11、13、和15的FR-L1至FR-L4；所述HVR-L1包含选自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、和23的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:9-10或19-23之任一可包含N30A或N30Q氨基酸变化；所述HVR-L2包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列；而所述HVR-L3包含选自SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在这些抗体的一个实施方案中，所述重链可变域包含SEQ ID NO:16且所述轻链可变域包含SEQ ID NO:17或18。

在有些实施方案中，本发明提供了所含重链可变域包含与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列的抗CD22抗体。在有些实施方案中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列相对于参比序列包含替代、插入、或删除，但是包含该氨基酸序列的抗体保留结合CD22的能力。在有些实施方案中，在序列SEQ ID NO:16中替代、插入、或删除了总共1-10个氨基酸。在有些实施方案

中，所述替代、插入、或删除存在于HVR以外的区域（即在FR中）。在有些实施方案中，抗CD22抗体包含包含选自SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链可变域。

在有些实施方案中，本发明提供了包含如下所示重链可变域的抗CD22抗体。

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (SEQ ID NO:16) （HVR残基标有下划线）。

在有些实施方案中，所述重链HVR和FR序列包含如下序列：

HVR-H1 (Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn, SEQ ID NO:2)

HVR-H2 (Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly, SEQ ID NO:4)

HVR-H3 (Asp Gly Ser Ser Trp Asp Try Tyr Phe Asp Tyr, SEQ ID NO:6)

FR-H1 (Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser, SEQ ID NO:1)

FR-H2 (Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val, SEQ ID NO:3)

FR-H3 (Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg, SEQ ID NO:5)

FR-H4 (Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser, SEQ ID NO:7)。

在有些实施方案中，本发明提供了包含如下所示轻链可变域的抗CD22抗体。

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln

Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108 (SEQ ID NO:17) （HVR残基标有下划线，而且位置N28以粗体标示）

或

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108 (SEQ ID NO:18) （HVR残基标有下划线，而且位置N28V以粗体标示）。

在有些实施方案中，所述轻链HVR序列包含如下序列：

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:9)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:10)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:19)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:20)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:21)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:22)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:23)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:32)

HVR-L1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:33)

HVR-L2 (Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser, SEQ ID NO:12)

HVR-L3 (Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr, SEQ ID NO:14)。

在有些实施方案中，所述轻链FR序列包含如下序列：

FR-L1 (Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys, SEQ ID NO:8)

FR-L2 (Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr, SEQ ID NO:11)

FR-L3 (Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, SEQ ID NO:13)

FR-L4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg, SEQ ID NO:15)。

一方面，本发明提供了所含轻链可变域包含与选自SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列的抗CD22抗体。在有些实施方案中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列相对于参比序列包含替代、添加、或删除，但是包含该氨基酸序列的抗体保留结合CD22的能力。在有些实施方案中，在选自SEQ ID NO:17或18的序列中替代、插入、或删除了总共1-10个氨基酸。在有些实施方案中，所述替代、插入、或删除存在于HVR以外的区域（即在FR中）。在有些实施方案中，抗CD22抗体包含包含选自SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列的轻链可变域。

一方面，本发明提供了(a)所含重链可变域包含与选自SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列；且(b)所含轻链可变域包含与选自SEQ ID NO:17或18的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列的抗CD22抗体。在有些实施方案中，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列相对于参比序列包含替代、添加、或删除，但是包含该氨基酸序列的抗体保留结合CD22的能力。在有些实施方案中，在参比序列中替代、插入、或删除了总共1-10个氨基酸。在有些实施方案中，所述替代、插入、或删除存在于HVR以外的区域（即在FR中）。在有些实施方案中，抗CD22抗体包含包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链可变域和包含选自SEQ ID NO:18的氨基酸序列的轻链可变域。

一方面，本发明提供了包含(a)一种、两种、或三种选自图2A所示VH VHR的VH HVR和/或(b)一种、两种、或三种选自图2B所示VL VHR的VL HVR的抗CD22抗体。一方面，本发明提供了包含选自图2A所示重链可变域的重链可变域和选自图2B所示轻链可变域的轻链可变域的抗CD22抗体。

一方面，本发明的抗CD22抗体包含保藏于ATCC且编号PTA-7620的杂交瘤所生成的5E8.1.8抗体的1、2、3、4、5、或6种高变区。

2. 抗体片段

本发明涵盖抗体片段。抗体片段可以通过传统手段来生成，诸如酶促消化，或者通过重组技术来生成。在某些情况中，使用抗体片段有优势，而不是完整抗体。片段的较小尺寸容许快速清除，而且可导致更易于接近实体瘤。某些抗体片段的综述参见Hudson等 (2003) Nat. Med. 9:129-134。

已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上，通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 及 Brennan 等 , Science 229:81 (1985))。然而，现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。Fab、Fv和scFv抗体片段都可在大肠杆菌中表达及由大肠杆菌分泌，如此容许容易的生成大量的这些片段。可从上文讨论的噬菌体抗体库中分离抗体片段。或者，可直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段并化学偶联以形成$F(ab')_2$片段(Carter等, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。依照另一种方法，可直接从重组宿主细胞培养物分离$F(ab')_2$片段。包含补救受体结合表位残基、具有延长的体内半衰期的Fab和$F(ab')_2$片段记载于美国专利No. 5,869,046。用于生成抗体片段的其它技术对于熟练从业人员将是显而易见的。在某些实施方案中，抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185; 美国专利No. 5,571,894; 及5,587,458。Fv和scFv是具有完整结合位点、缺少恒定区的唯一类型; 如此，它们可能适于在体内使用时降低非特异性结合。可构建scFv融合蛋白以生成效应器蛋白质在scFv的氨基或羧基末端的融合。参见Antibody Engineering, Borrebaeck编，见上文。抗体片段还可以是“线性抗体”，例如如美国专利No. 5,641,870中所记载的。此类线性抗体可以是单特异性的或双特异性的。

3. 人源化抗体

本发明涵盖人源化抗体。本领域知道用于人源化非人抗体的多种方法。例如，人源化抗体可具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非

人氨基酸残基常常称为"输入"残基，它们通常取自"输入"可变域。基本上可遵循Winter及其同事的方法进行人源化（Jones等, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann等, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen等, Science 239: 1534-1536 (1988)），即用（非人）高变区序列替代人抗体的对应序列。因此，此类"人源化"抗体是嵌合抗体（美国专利No. 4,816,567），其中显著少于完整的人可变域用非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体通常是如下人抗体，其中有些高变区残基和可能的有些FR残基用啮齿类抗体类似位点的残基替代。

用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变域的选择对于降低抗原性可能是重要的。依照所谓的"最适(best-fit)"方法，用啮齿类抗体的可变域序列对已知人可变域序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架（Sims等, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987)）。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。相同框架可用于数种不同的人源化抗体（Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Presta等, J. Immunol. 151: 2623 (1993)）。

一般还希望的是，抗体在人源化后保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了达到此目的，依照一种方法，通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。通常可获得免疫球蛋白三维模型，这是本领域技术人员所熟悉的。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些显示图像能分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用，即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样，可以从受体序列和输入序列中选出FR残基并组合，从而得到期望的抗体特征，诸如对靶抗原的亲和力升高。一般而言，高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

4. 人抗体

本发明的人抗CD22抗体可以通过如上所述联合选自人衍生噬菌体展示库的Fv克隆可变域序列与已知的人恒定域序列来构建。或者，可以通过杂交瘤方法来生成本发明的人单克隆抗CD22抗体。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系已有记载，例如Kozbor, J. Immunol., 133:

3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及Boerner等, J. Immunol., 147: 86 (1991).

例如，现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成人抗体完整全集的转基因动物（例如小鼠）。例如，已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见例如Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann等, Year in Immunol. 7:33 (1993)。

基因改组也可用于自非人（例如啮齿类）抗体衍生人抗体，其中人抗体具有与起始非人抗体相似的亲和力和特异性。依照此方法，它也称为“表位印记” (epitope imprinting)，如本文所述通过噬菌体展示技术得到的非人抗体片段的重链或轻链可变域用人V结构域基因全集替换，产生非人链/人链scFv或Fab嵌合物群。用抗原进行的选择导致如下非人链/人链嵌合scFv或Fab的分离，其中人链在一级噬菌体展示克隆中消除相应的非人链后恢复了抗原结合位点，即表位决定（印记，imprint）人链配偶的选择。在重复该过程以替换剩余非人链时，得到人抗体（参见PCT WO 93/06213，公布于1993年4月1日）。与传统的通过CDR移植进行的非人抗体的人源化不同，此技术提供完全人的抗体，它们不含非人起源的FR或CDR残基。

5. 双特异性抗体

双特异性抗体指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中，双特异性抗体是人抗体或人源化抗体。在某些实施方案中，结合特异性之一针对CD22，结合特异性之另一针对任何其它抗原。在某些实施方案中，双特异性抗体可结合CD22的两种不同表位。双特异性抗体还可用于将细胞毒剂定位于表达CD22的细胞。这些抗体拥有CD22结合臂和结合细胞毒剂（诸如例如肥皂草毒蛋白、抗干扰素-α、长春花生物碱类、蓖麻毒蛋白A链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原）的臂。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段（例如$F(ab')_2$双特异性抗体）。

用于构建双特异性抗体的方法是本领域已知的。在传统上，双特异性抗体的重组生产基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达，其中两种重链具有

不同的特异性(Millstein和Cuello, Nature 305:537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤（四源杂交瘤(quadroma)）生成10种不同抗体分子的潜在混合物，其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产量低。类似的规程披露于WO 93/08829, 公布于1993年5月13日及Traunecker等, EMBO J. 10:3655 (1991)。

依照一种不同的方法，将具有期望结合特异性（抗体-抗原结合位点）的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。例如，与包含至少部分铰链、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定域进行融合。在某些实施方案中，在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和，在需要时，免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体，并共转染入合适的宿主生物体。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中，这为调整三种多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。然而，在至少两种多肽链以相同比例表达导致高产量时或在该比例没有特别意义时，有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体。

在该方法的一个实施方案中，双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链，和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对（提供第二结合特异性）构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半个双特异性分子中的存在提供了便利的分离途径，因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于WO 94/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如Suresh等, Methods in Enzymology 121:210 (1986)。

依照另一种方法，可改造一对抗体分子间的界面，以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。界面包含至少部分抗体恒定域C_H3结构域。在该方法中，将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链（例如酪氨酸或色氨酸）替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）替换，在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如，异源偶联物中的一

种抗体可以与亲合素偶联，另一种抗体与生物素偶联。例如，此类抗体已经建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利No. 4,676,980)，及用于治疗HIV感染(WO 91/00360, WO 92/00373和EP 03089)。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的，连同许多交联技术一起披露于美国专利No. 4,676,980。

文献中还记载了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如，可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等, Science 229:81 (1985)记载了通过蛋白水解切割完整抗体以生成$F(ab')_2$片段的规程。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下（用以稳定邻近的二硫醇和防止分子间二硫键的形成）还原。然后将产生的Fab'片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将Fab'-TNB衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成Fab'-硫醇，并与等摩尔量的另一种Fab'-TNB衍生物混合，以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

最新的进展便于从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段，这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)记载了完全人源化的双特异性抗体$F(ab')_2$分子的生成。由大肠杆菌分开分泌每种Fab'片段，并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达HER2受体的细胞和正常人T细胞，以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺肿瘤靶物的溶解活性。

还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如，已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的Fab'部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体，然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链恒定域(V_H)和轻链恒定域(V_L)，所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此，迫使一个片段上的V_H和V_L结构域与另一个片段上的互补V_L和V_H结构域配对，由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链Fv (sFv)二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)。

涵盖具有超过两个效价的抗体。例如，可制备三特异性抗体。Tutt等, J. Immunol. 147:60 (1991)。

6. 多价抗体

多价抗体可以比二价抗体更快的受到表达该抗体所结合抗原的细胞的内在化（和/或异化）。本发明的抗体可以是可容易地通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达而生成的、具有三个或更多抗原结合位点（例如四价抗体）的多价抗体（IgM类别以外的）。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多抗原结合位点。在某些实施方案中，二聚化结构域包含（或由其组成）Fc区或铰链区。在这种情况中，抗体将包含Fc区及Fc区氨基末端的三个或更多抗原结合位点。在某些实施方案中，多价抗体包含（或由其组成）三个至大约八个抗原结合位点。在一个这样的实施方案中，多价抗体包含（或由其组成）四个抗原结合位点。多价抗体包含至少一条多肽链（例如两条多肽链），其中所述多肽链包含两个或更多可变域。例如，多肽链可包含VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc，其中VD1是第一可变域，VD2是第二可变域，Fc是Fc区的一条多肽链，X1和X2代表氨基酸或多肽，而n是0或1。例如，多肽链可包含：VH-CH1-柔性接头-VH-CH1-Fc区链；或VH-CH1-VH-CH1-Fc区链。本文中的多价抗体可进一步包含至少两条（例如四条）轻链可变域多肽。本文中的多价抗体可包含例如约两条至约八条轻链可变域多肽。本文所涵盖的轻链可变域多肽包含轻链可变域，且任选进一步包含CL结构域。

7. 单域抗体

在有些实施方案中，本发明的抗体是单域抗体(single-domain antibody)。单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或者整个或部分轻链可变域的单一多肽链。在某些实施方案中，单域抗体是人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利No. 6,248,516 B1)。在一个实施方案中，单域抗体由抗体的整个或部分重链可变域组成。

8. 抗体变体

在有些实施方案中，涵盖本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如，可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以是通过将适宜的变化引入编码抗体的核苷酸序列或通过肽合成制备的。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。可进行任何删除、插入和替代组合以获得最终的构建物，倘若最终的构建物具有期

望的特征。可在制备序列时将氨基酸改变引入受试抗体的氨基酸序列。

可用于鉴定抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的方法有“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)中所述。这里，鉴定一个残基或一组靶残基（例如带电荷的残基，诸如arg、asp、his、lys、和glu）并用中性或带负电荷的氨基酸（例如丙氨酸或多丙氨酸）替代，以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在或对替代位点引入更多或其它变体，推敲对替代展示功能敏感性的氨基酸位置。由此，尽管用于引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的，然而突变本身的本质不必预先决定。例如，为了分析指定位点处突变的后果，在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变，并对所表达的免疫球蛋白筛选期望的活性。

氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端的融合，长度范围由一个残基至包含一百或更多残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括将抗体的N或C端与酶（例如用于ADEPT）或延长抗体血清半衰期的多肽融合。

在某些实施方案中，本发明的抗体发生了改变以提高或降低抗体糖基化的程度。多肽的糖基化典型的或是N-连接的或是O-连接的。N-连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸（其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸）是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此，多肽中这两种三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸，最常见的是丝氨酸或苏氨酸，但也可使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

向抗体中添加或删除糖基化位点可通过改变氨基酸序列从而创建或消除一个或多个上述三肽序列而便利地完成（用于N-连接的糖基化位点）。所述改变还可通过向原始抗体的序列中添加、删除、或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行（用于O-连接的糖基化位点）。

若抗体包含Fc区，则可改变附着其上的碳水化合物。例如，美国专利申请号US 2003/0157108 (Presta,L.)中记载了有缺乏岩藻糖的成熟碳水化合物结构附着于抗体Fc区的抗体。还可参见US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)。WO 2003/011878 (Jean-Mairet等)和美国专利No. 6,602,684 (Umana

等)中提到了在附着于抗体Fc区的碳水化合物中有等分N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)的抗体。WO 1997/30087 (Patel等)中报告了在附着于抗体Fc区的寡糖中有至少一个半乳糖残基的抗体。关于有更改碳水化合物附着于其Fc区的抗体还可参见WO 1998/58964 (Raju,S.)和WO 1999/22764 (Raju,S.)。关于具有改良糖基化的抗原结合分子还可参见US 2005/0123546 (Umana等)。

在某些实施方案中，糖基化变体包含Fc区，其中附着于Fc区的碳水化合物结构缺乏岩藻糖。此类变体具有改进的ADCC功能。任选的是，Fc区还包含进一步改进ADCC的一个或多个氨基酸替代，例如Fc区位置298、333和/或334处的替代（Eu残基编号方式）。涉及“脱岩藻糖型”或“岩藻糖缺乏型”抗体的出版物的例子包括：US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; Okazaki等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。生成脱岩藻糖化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 美国专利申请号US 2003/0157108 A1, Presta, L; 及WO 2004/056312 A1, Adams等, 尤其是实施例11)和敲除细胞系，诸如α-1,6-岩藻糖转移酶基因FUT8敲除的CHO细胞(Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))。

在一个实施方案中，抗体进行了改变以改进其血清半衰期。为了延长抗体的血清本申请，可以将补救受体结合位点掺入抗体（尤其是抗体片段），如例如US 5739277中所记载的。在用于本文时，术语“补救受体结合表位”指IgG分子（例如IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4）Fc区中负责延长IgG分子体内血清半衰期的表位（US 2003/0190311; US6821505; US 6165745; US 5624821; US 5648260; US 6165745;US 5834 597）。

另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替代。进行替代诱变的感兴趣位点包括高变区，但是也涵盖FR改变。表1中“优选替代”栏显示了保守替代。如果此类替代导致期望的生物学活性变化，那么可导入表1中称为“例示替代”的更实质变化，或如下文参照氨基酸分类进一步所述，并筛选产物。

表1

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

对抗体生物学特性的实质性修饰可通过选择对维持以下方面的效果差异显著的替代来实现：(a) 替代区域中多肽主链的结构，例如（折叠）片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性，可将氨基酸如下分组(A. L. Lehninger, 于Biochemistry, 第2版, pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))：

(1) 非极性的：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 不带电荷的、极性的：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn

(N)、Gln (Q)

(3) 酸性的：Asp (D)、Glu (E)

(4) 碱性的：Lys (K)、Arg (R)、His(H)

或者，根据共同的侧链特性，天然存在残基可如下分组：

(1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

(2) 中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

(3) 酸性的：Asp、Glu;

(4) 碱性的：His、Lys、Arg;

(5) 影响链取向的残基：Gly、Pro;

(6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

非保守替代需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。此类替代残基还可以导入保守替代位点，或导入剩余（非保守）位点。

一类替代变体涉及替代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改变的（例如改进的）生物学特性。用于生成此类替代变体的一种便利方法涉及使用噬菌体展示的亲和力成熟。简而言之，将数个高变区位点（例如6-7个位点）突变，在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此生成的抗体展示在丝状噬菌体颗粒上，作为与各个颗粒内包装的噬菌体外壳蛋白（例如M13基因III产物）至少一部分的融合物。然后对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性（例如结合亲和力）。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行扫描诱变（例如丙氨酸扫描）以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外，分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本领域已知的技术（包括本文详述的技术）进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体，使用本领域已知的技术（包括本文所述的技术）对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域知道的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然存在氨基酸序列变体的情况中），或者通过对较早制备的变体或非变体型式的抗体进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

可能希望在本发明抗体的Fc区中引入一处或多处氨基酸修饰，由此生成

Fc区变体。Fc区变体可包括在一个或多个氨基酸位置（包括铰链半胱氨酸）包含氨基酸修饰（例如替代）的人Fc区序列（例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区）。

依照此描述和本领域的教导，涵盖在有些实施方案中，本发明的抗体与野生型对应抗体相比可在例如Fc区中包含一处或多处改变。与它们的野生型对应物相比，这些抗体仍将基本上保留治疗功效所需要的相同特性。例如，认为可以在Fc区中进行会导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性（CDC）改变（即或是增强或是削弱）的某些改变，例如WO99/51642中所述。还可参见关注Fc区变体其它例子的Duncan和Winter, Nature 322: 738-40 (1988); 美国专利No. 5,648,260; 美国专利No. 5,624,821; 及WO94/29351。WO00/42072 (Presta)和WO 2004/056312 (Lowman)记载了对FcR的结合提高或降低的抗体变体。在此明确收入这些专利出版物的内容作为参考。还可参见Shields等 J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。半衰期延长且对新生儿Fc受体(FcRn)（它负责将母体IgG转移给胎儿）(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等, J. Immunol. 24:249 (1994)) 的结合改良的抗体记载于US2005/0014934A1 (Hinton等)。这些抗体包含具有一处或多处改进Fc区与FcRn结合的替代的Fc。具有改变的Fc区氨基酸序列且C1q结合能力升高或降低的多肽变体记载于美国专利No. 6,194,551B1, WO99/51642。在此明确收入这些专利出版物的内容作为参考。还可参见Idusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

一方面，本发明提供了在包含Fc区的Fc多肽的界面中包含修饰的抗体，其中所述修饰便于和/或促进二聚化。这些修饰包括在第一Fc多肽中导入隆起(protuberance)和在第二Fc多肽中导入空腔(cavity)，其中所述隆起可位于所述空腔中，从而促进第一与第二Fc多肽的复合。生成具有这些修饰的抗体的方法是本领域已知的，例如记载于美国专利No. 5,731,168。

9. 抗体衍生物

可进一步修饰本发明的抗体以包含本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质模块。优选的是，适于抗体衍生化的模块是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸（均聚物或随机共聚物）、右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/

环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇（如甘油）、聚乙烯醇、及其混合物。由于其在水中的稳定性，聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量，而且可以是分支的或不分支的。附着于抗体的聚合物数目可以变化，而且如果附着了超过一个聚合物，那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言，可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型，包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

在另一个实施方案中，提供了抗体与可通过暴露于辐射而选择性加热的非蛋白质性质模块的偶联物。在一个实施方案中，该非蛋白质性质模块是碳纳米管(Kam等, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005))。辐射可以是任何波长的，包括但不限于对普通细胞无害但将非蛋白质性质模块加热至接近抗体-非蛋白质性质模块的细胞被杀死的温度的波长。

制备抗体的某些方法

1. 某些基于杂交瘤的方法

本发明的抗CD22单克隆抗体可使用最初由Kohler等，Nature 256:495 (1975)记载的杂交瘤方法来制备，或者可以通过重组DNA方法(美国专利No. 4,816,567)来制备。

在杂交瘤方法中，免疫小鼠或其它适宜的宿主动物，诸如仓鼠，以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞，所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。针对CD22的抗体一般通过在动物中多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射CD22和佐剂来生成。CD22可以使用本领域众所周知的方法来制备，其中有些方法在本文中有进一步描述。例如，CD22可以重组生产。在一个实施方案中，将动物用包含CD22胞外部分且其融合至免疫球蛋白重链Fc部分的CD22衍生物免疫。在一个实施方案中，将动物用CD22-IgG1融合蛋白免疫。在一个实施方案中，将动物用在单磷酰脂质A (MPL)/海藻糖dicrynomycolate (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)的溶液中的CD22免疫原性衍生物进行免疫，溶液皮内注射于多个部位。2周后，对动物进行加强免疫。7-14天后，对动物采血，并对血清测定抗CD22滴度。对动物进行加强免疫，直到滴度达到平台(plateaus)。

或者，可以在体外免疫淋巴细胞。然后，使用合适的融合剂诸如聚乙二