9. The method of claim 1, wherein monoclonal antibody 8H9 recognizes a conformational epitope of human B7-homolog 3.

10. The method of claim 1, wherein the agent is directly or indirectly coupled to a labeling agent or a cytotoxic agent.

11. The method of claim 10, wherein the cytotoxic agent is a radioisotope.

12. The method of claim 10, wherein the labeling agent is a radioisotope.

13. The method of claim 1, wherein the composition is administered after the subject has been treated with one or more other cancer treatments.

14. The method of claim 13, wherein the other cancer treatments are selected from the group consisting of surgery, chemotherapy, and radiation.

15. The method of claim 1, wherein the tumor expresses an antigen recognized by monoclonal antibody 8H9.

16. The method of claim 1, wherein the composition is administered by a method selected from the group consisting of intravenous injection, intrathecal injection, injection by Ommaya reservoir or by spinal tap, intraparenchymal injection into the tumor or into tissues surrounding the tumor, and intraperitoneal injection.

17. The method of claim 1, wherein the agent is administered at 0.01 mg to 20 mg per injection, carrying 1 mCi to 100 mCi of 131-iodine, or biologically equivalent radioactive dosages of beta-emitters or alpha emitters.

18. The method of claim 1, wherein the agent is administered at 0.01 mg to 20 mg per injection, carrying 1 mCi to 100 mCi of 124-iodine, or biologically equivalent radioactive dosages of beta-emitters, alpha emitters or positron emitters.

19. The method of Claim 18, wherein the subject undergoes a PET/CT scan.

20. The method of claim 1, wherein the antigen recognized by monoclonal antibody 8H9 is a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO.15, or a polypeptide homolog of SEQ ID NO.15.

21. An agent for use as a medicament for improving the prognosis or prolonging the survival of a subject bearing a tumor, said agent is capable of binding to an antigen recognized by monoclonal antibody 8H9.

22. The agent of claim 21, wherein the tumor expresses an antigen recognized by monoclonal antibody 8H9.

23. The agent of claim 21, wherein the tumor is selected from the group consisting of metastatic neuroblastoma, and neuroblastoma.

24. The agent of claim 21, wherein the agent is a polypeptide comprising Complementary Determining Regions (CDRs) that have the sequences of SEQ ID NOs.1-3 or SEQ ID NOs.4-6.

25. The agent of claim 21, wherein the agent is a polypeptide comprising Complementary Determining Regions (CDRs) that have the sequences of SEQ ID NOs.1-6.

26. The agent of claim 21, wherein the agent is an antibody construct comprising Complementary Determining Regions (CDRs) of monoclonal antibody 8H9.

27. The agent of claim 26, wherein the antibody construct is a single chain antibody or an antibody-fusion construct.

28. The agent of claim 26, wherein sequences other than the CDRs are of human origin.

29. The agent of claim 26, wherein the antibody has an amino acid sequence of SEQ ID NO. 7 or 12.

30. The agent of claim 21, wherein the agent is directly or indirectly coupled to a labeling agent or a cytotoxic agent.

31. The agent of claim 30, wherein the cytotoxic agent is a radioisotope.

32. The agent of claim 21, wherein the agent is administered after the subject has been treated with one or more other cancer treatments.

33. The agent of claim 32, wherein the other cancer treatments are selected from the group consisting of surgery, chemotherapy, and radiation.

34. The agent of claim 21, wherein a composition comprising the agent is administered by a method selected from the group consisting of intravenous injection, intrathecal injection, injection by Ommaya reservoir or by spinal tap, inject intraparenchymally into the tumor or into tissues surrounding the tumor, and intraperitoneal injection.

35. The agent of claim 21, wherein the agent is administered at 0.01 mg to 20 mg per injection, carrying 1 mCi to 100 mCi of 131-iodine, or biologically equivalent radioactive dosages of beta-emitters or alpha emitters.

36. The agent of claim 22, wherein the antigen recognized by monoclonal antibody 8H9 is a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO.15, or a polypeptide homolog of SEQ ID NO.15.

37. The agent of claim 21, wherein the subject is cured of the tumor.

38. A method of screening for antibodies that have the same or similar binding specificity as monoclonal antibody 8H9, comprising the step of contacting candidate antibodies with a polypeptide comprising the sequence of SEQ ID NO.15, or a fragment thereof, wherein antibodies that bind to the polypeptide are antibodies that have the same or similar binding specificity as monoclonal antibody 8H9.

39. An antibody identified by the method of claim 38.

40. An antigen which is recognized by monoclonal antibody 8H9, wherein the antigen has about 10-99% homology to SEQ ID NO.15.

41. A method of upregulating anti-metastatic immune response in NK/T cells comprising the steps of blocking B7H3 receptors present on NK/T cells with an appropriate agent.

42. The method of claim 41 wherein the agent consists of a monoclonal antibody or monoclonal antibodies.

43. The method of claim 42 wherein the monoclonal antibody is 8H9.

44. A method for screening agents which competitively inhibit the binding of monoclonal antibody 8H9 to its target, comprising the step of contacting candidate with the target in conditions permitting the binding of the candidate and the target.

Figure 1: 8H9-scFv sequence

(SEQ ID NO.7)
(SEQ ID NO.8)
(SEQ ID NO.9)

Figure 2:

8H9scfv cDNA sequence:

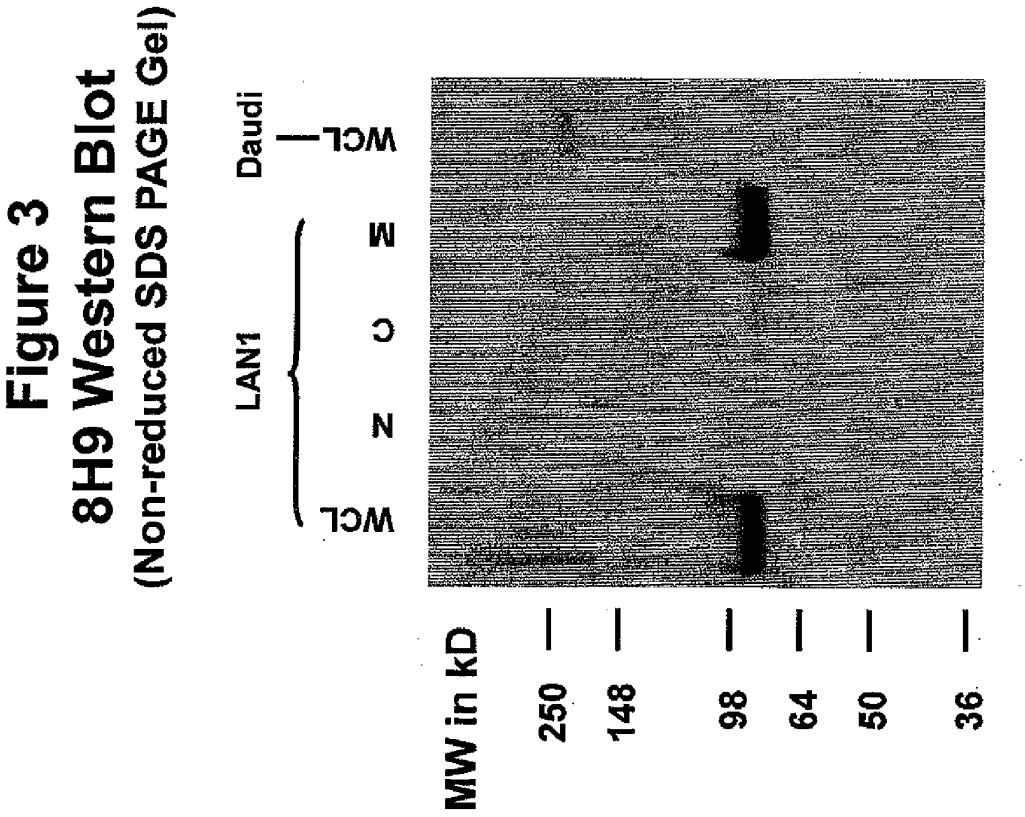
CAGGTCAAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA
ATTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAACTATGATATAAACTGGGTGAG
GCAGAGGCCTGAACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCCTGGAGATGGTA
GTACTCAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTACAGACACATCC
TCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTAT
TTCTGTGCAAGACAGACTACGGCTACCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCAGATGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGG
ATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAACCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAG
AGTCTCTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCGACTACTTACACTGGTACCA
ACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTC
TGGGATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCTCAGTAT
CAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAAATGGTCACAGCTT
TCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACAGGCGGCCGC (SEQ
ID NO.10)

8H9scfv amino acid sequence:

QVKLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGST
QYNEKFKGKATLTTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWGQGTTVTV
SSDGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPTTLSVTPGDRVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHES
PRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLE
LKQAA (SEQ ID NO.11)

Mutated 8H9 scFv with decreased normal tissue adherence

QVKLQQSGAELVEPGASVKLSCKASGYTFTNYDINWVRQRPEQGLEWIGWIFPGDGSTQ
YNEKFKGKATLTTDTSSSTAYMQLSRLTSEDSAVYFCARQTTATWFAYWGQGTTVTVS
SDGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPTTLSVTPGDQVSLSCRASQSISDYLHWYQQKSHESP
QLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTELEL
EQAA (SEQ ID NO.12)


Figure 3
8H9 Western Blot
(Non-reduced SDS PAGE Gel)
Daudi
LAN1
WCL
N
C
M
WCL
MW in kD
250
148
98
64
50
36

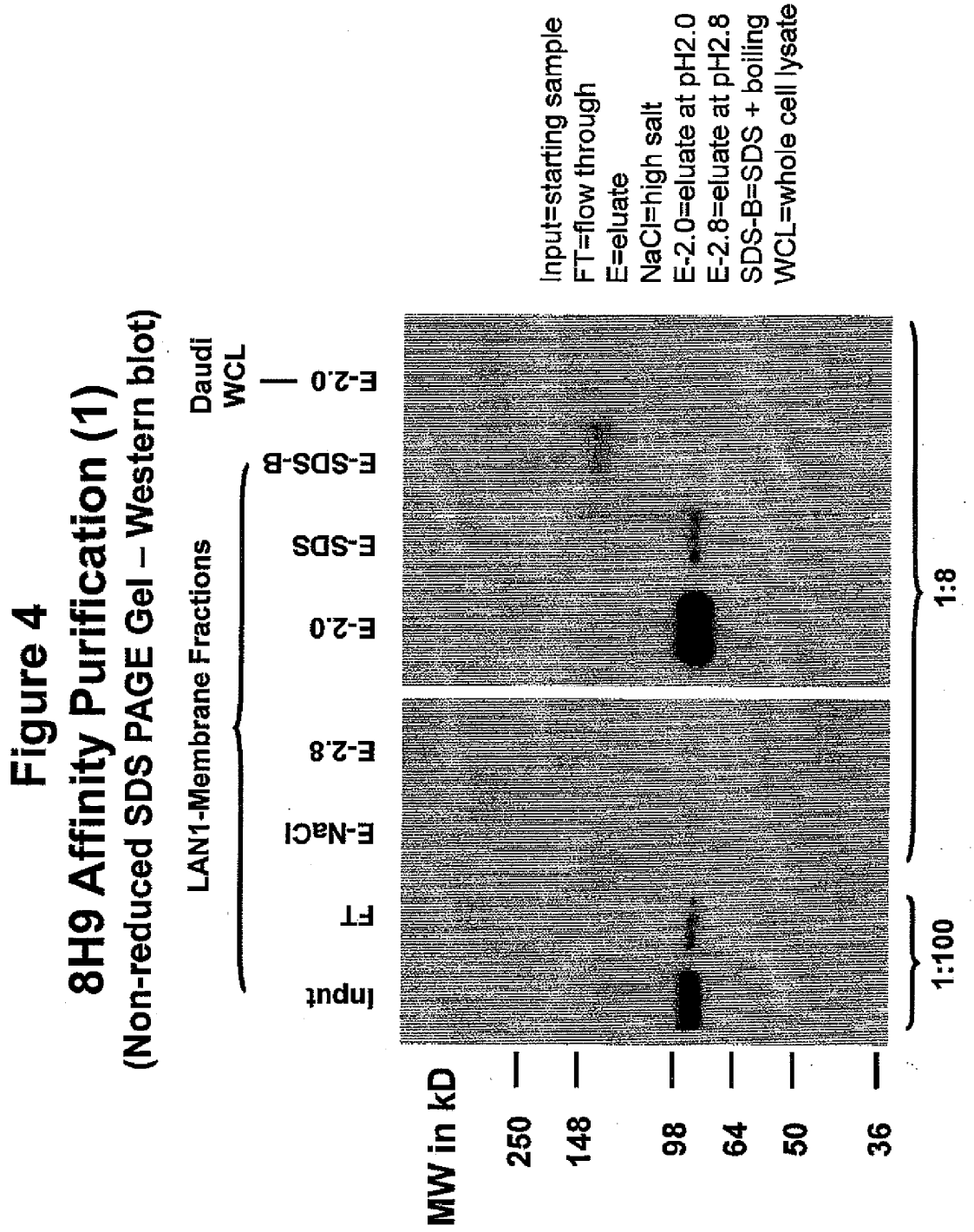
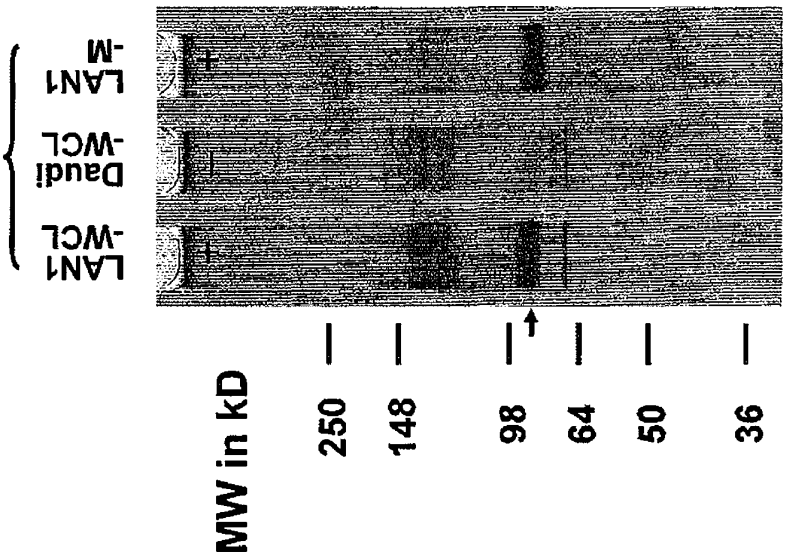

Figure 4
8H9 Affinity Purification (1)
(Non-reduced SDS PAGE Gel – Western blot)
LAN1-Membrane Fractions
Daudi WCL
Input
FT
E-NaCl
E-2.8
E-2.0
E-SDS
E-SDS-B
E-2.0
MW in kD
250
148
98
64
50
36
1:100
1:8
Input=starting sample
FT=flow through
E=eluate
NaCl=high salt
E-2.0=eluate at pH2.0
E-2.8=eluate at pH2.8
SDS-B=SDS + boiling
WCL=whole cell lysate

Figure 5
8H9 Affinity Purification (2)
(Non-reduced SDS PAGE Gel – Silver stain)



E-2.0 = eluate at pH 2.0
WCL = whole cell lysate
M = membrane preparation

Figure 6
HLA-I and B7H3 Protein Expression on K562 Cell Surface Analyzed by FACS
Histogram comparing HB95 (anti-HLA-I mAb), 8H9 (anti-B7H3 mAb), with nonspecific IgG1 mAb MOPC21

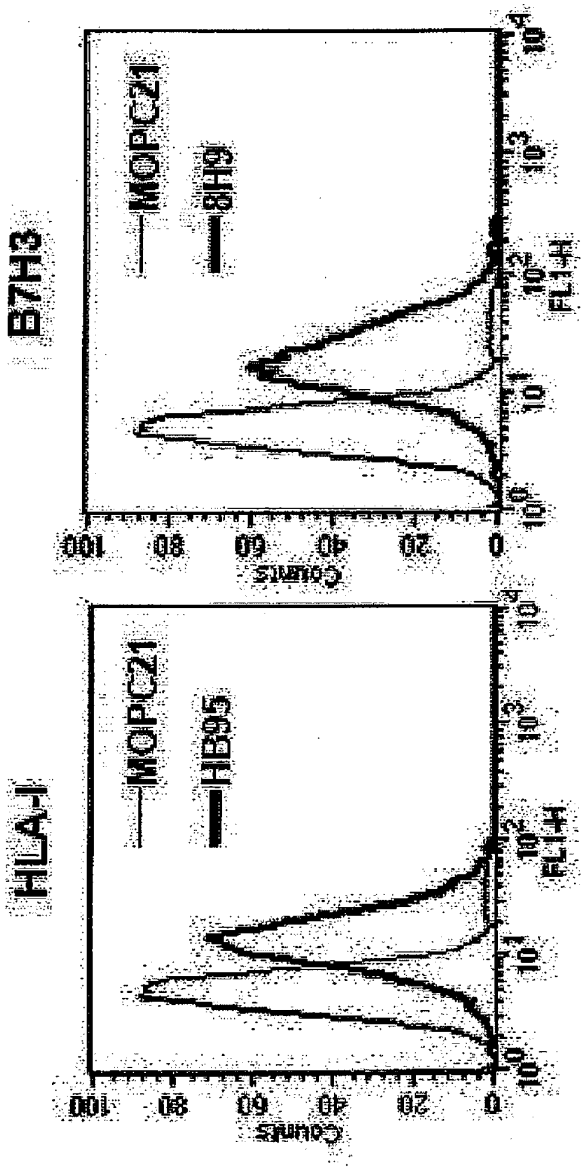


Figure 7
NK92 Cytolysis Assay
Target Cells ^{51}Cr-K592 and ^{51}Cr-HTB82
4 Hour Incubation with NK92 Effector Cells
E:T ratio as indicated

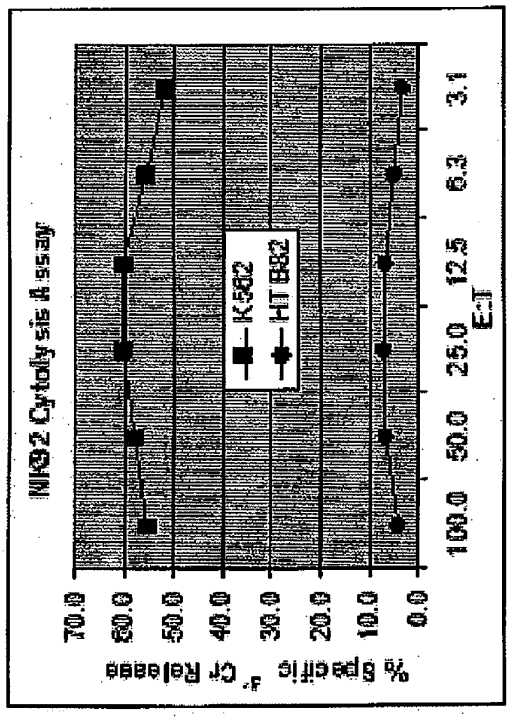


Figure 8

Cytolytic Activity of NK Cells Against HTB82 Cells: Results of Chromium Release Assay for Cell-Mediated Cytolysis

NK92MI: parental NK cells;

NK92MI/NTGLS-8H: NK92MI transduced with 8H9scFv

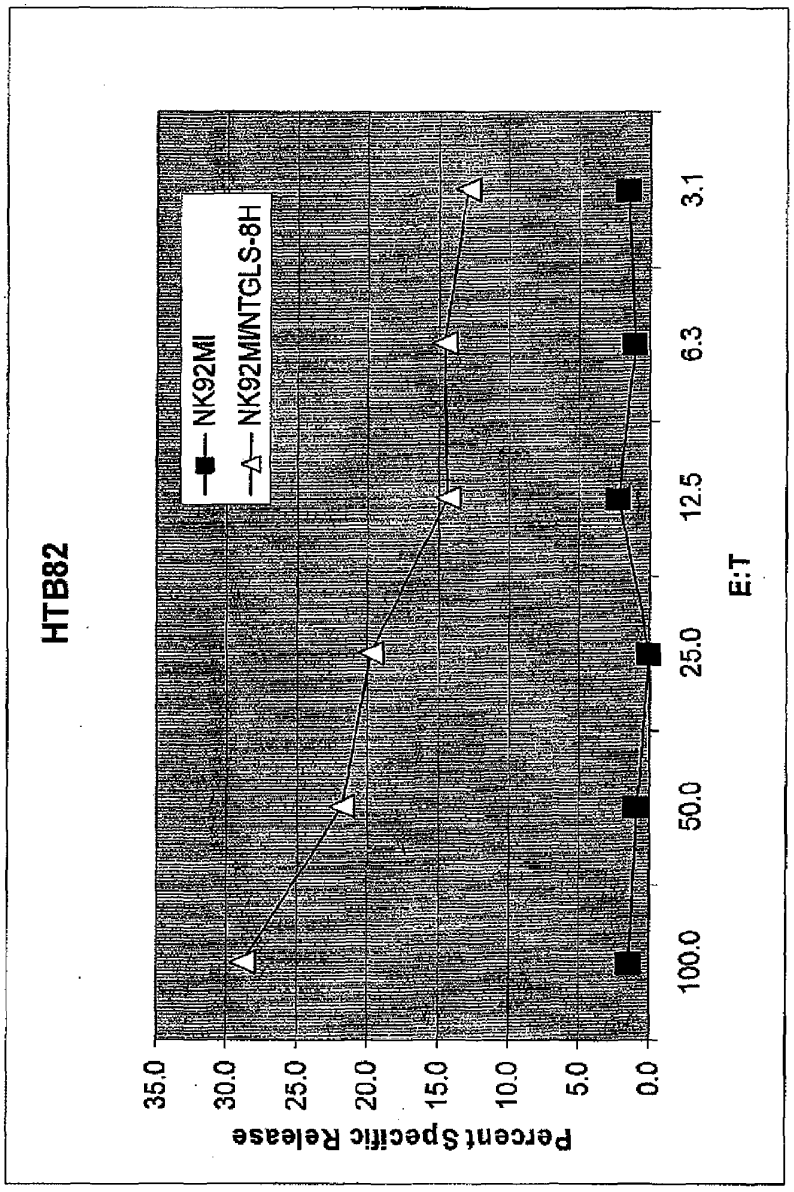
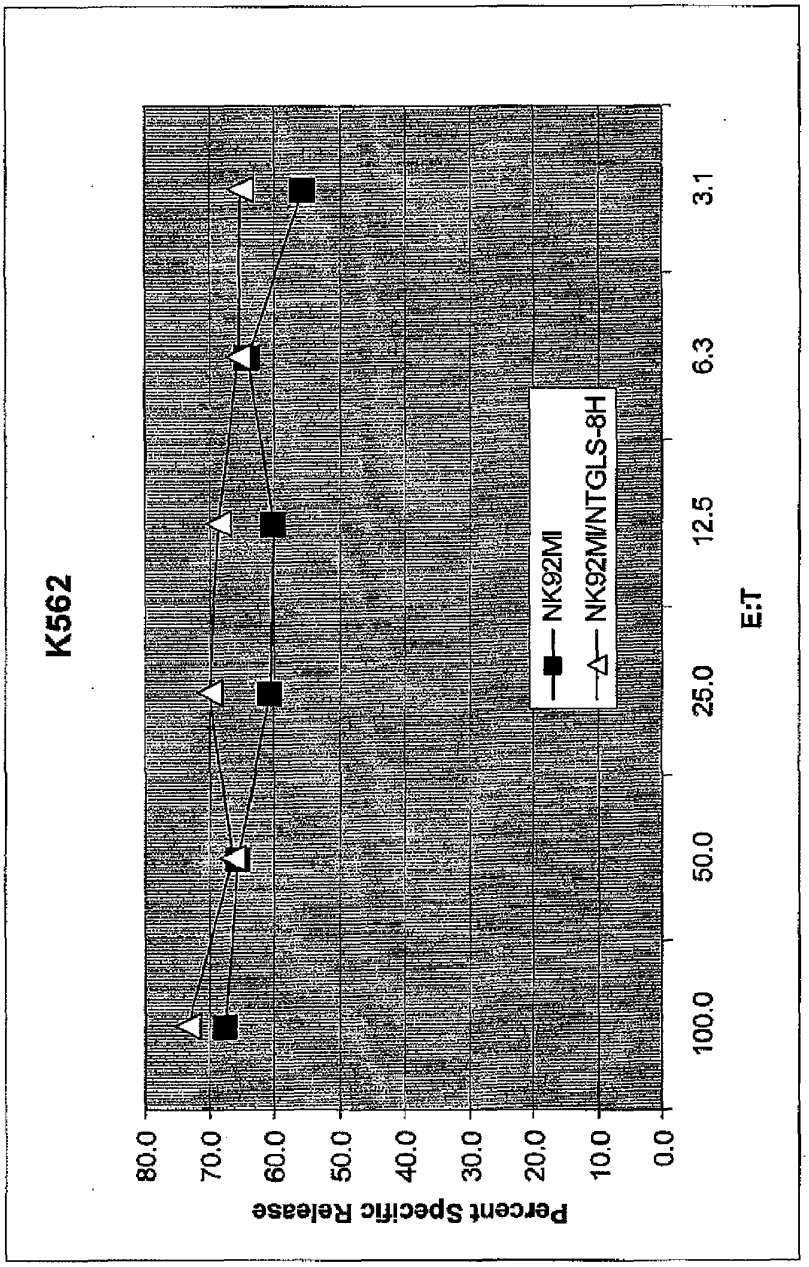


Figure 9

Cytolytic Activity of NK Cells Against K562 Cells: Results of Chromium Release Assay for Cell-Mediated Cytolysis

NK92MI: parental NK cells;
NK92MI/NTGLS-8H: NK92MI transduced with 8H9scFv



Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	40716408
Application Number:	16613203
International Application Number:	
Confirmation Number:	6337
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Tuan Tran
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0249
Receipt Date:	30-SEP-2020
Filing Date:	13-NOV-2019
Time Stamp:	14:03:35
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Transmittal Letter	098065-0249-IDS_B_Transmittal.pdf	370077 7aae2aed73edb1e5374ab37d5bf790f63878d884	no	2

Warnings:

Information:					
2	Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)	098065-0249-IDS_B_SB08.pdf	925637 915b7c24caf9e404039b4d39096228e1c88192d0	no	12
Warnings:					
Information:					
This is not an USPTO supplied IDS fillable form					
3	Foreign Reference	B69--CA_2815154A1.pdf	4064971 16d42cba4dfabe8afb50010af550c5c0f0c43775	no	75
Warnings:					
Information:					
4	Foreign Reference	B70--CA_2859255A1.pdf	15424160 66a88e34f4c3a6574ced8157ad39fe561ee248e4	no	477
Warnings:					
Information:					
5	Foreign Reference	B71--CA_2927832A1.pdf	12614352 aec446d98789bfef1b11fce54c9dd1911746ba4d	no	350
Warnings:					
Information:					
6	Foreign Reference	B72--CN_101023100A.pdf	9943348 25902cbab3590ac59f465367de9fe198f3a0fac2	no	96
Warnings:					
Information:					
7	Foreign Reference	B73--CN_101490087A.pdf	17983309 c8adbcd4d9b6765990832e38031aee61e48efc38	no	297
Warnings:					
The page size in the PDF is too large. The pages should be 8.5 x 11 or A4. If this PDF is submitted, the pages will be resized upon entry into the Image File Wrapper and may affect subsequent processing					
Information:					
8	Foreign Reference	B74--CN_102481364A.pdf	3876143 084bf5bd7b7a027fe59876bd80f1724b73ab1d80	no	46

Warnings:					
Information:					
9	Foreign Reference	B75--CN_1227499A.pdf	3311401 ec5a564b032ee2296897167dc0437cc46342d43e	no	72
Warnings:					
Information:					
10	Foreign Reference	B76--CN_1764478A.pdf	2339763 abce6a80900b99351b095adaed0378c7ef8c5827	no	40
Warnings:					
Information:					
11	Foreign Reference	B77--EP_1155702A1.pdf	4739046 0ef5c5d33529a5b78d4150a1787a1c715e3ddad4	no	34
Warnings:					
Information:					
12	Foreign Reference	B78--EP_2594589A1.pdf	6302106 deee630f66da35ac4afafeed91b95e8c745e1c4c	no	106
Warnings:					
Information:					
13	Foreign Reference	B79--EP_2799452A1.pdf	8188878 350e425e574f1548389241b58abd89ee7c2f6eab	no	244
Warnings:					
Information:					
14	Foreign Reference	B80--EP_2907824A1.pdf	10791844 9d7f81a7a970e5599475affe46fc3fe6aba98a89	no	233
Warnings:					
Information:					
15	Foreign Reference	B81--EP_2910573A1.pdf	15220246 4df6f604e621b43f495c189bdb233b829d57719d	no	215
Warnings:					
Information:					

16	Foreign Reference	B82--EP_495432A1.pdf	3397880 29a6723e014def56793d1bbaef590f507a54e2c6	no	83
Warnings:					
Information:					
17	Foreign Reference	B83--EP_737686A1.pdf	600077 41504b19a213c479fc2572b3079cffdd7181ee42	no	15
Warnings:					
Information:					
18	Foreign Reference	B84--EP_916348A1.pdf	2633244 c271aa382954649b1c47aa259e9f771b27c9ee81	no	49
Warnings:					
Information:					
19	Foreign Reference	B85--JP_2002_060351A.pdf	1500157 caafa1ffa966584d395ac3e9705df79b2e9a6bbc	no	24
Warnings:					
Information:					
20	Foreign Reference	B86--JP_2005_511627A.pdf	6622442 aa9ac92ab42fe146f2a38a893800e03ea39541f6	no	128
Warnings:					
Information:					
21	Foreign Reference	B87--JP_2006_511526A.pdf	1639929 e579de7cd0acfd599c69513d685dc8367427a8d5	no	31
Warnings:					
Information:					
22	Foreign Reference	B88--JP_2007_527872A.pdf	7865250 c305db541a52714a7b8913a78da5fa1c827ab5b9	no	217
Warnings:					
Information:					

23	Foreign Reference	B89--JP_2008_521828A.pdf	1259431 b56ce2540cf205676d8cc4cf640f4929e3170eec	no	62
Warnings:					
Information:					
24	Foreign Reference	B90--JP_2009_538629A.pdf	12321207 50571f1825bdd57acf03e2a487a1bc1db80b87d7	no	206
Warnings:					
Information:					
25	Foreign Reference	B91--JP_2010_513524A.pdf	6449379 71c75682ee8f452bb1de30f22a302fb0d428233c	no	187
Warnings:					
Information:					
26	Foreign Reference	B92--JP_2011_519864A.pdf	4122358 9573248672e1046fecc3989ecc00ccd05587cbba	no	85
Warnings:					
Information:					
27	Foreign Reference	B93--JP_2011_524001A.pdf	2805842 b8c06ff4b37ff7bc2ea26e8d7ae403555d409316	no	53
Warnings:					
Information:					
28	Foreign Reference	B94--JP_2012_100671A.pdf	24640936 4953f4a1a13bf379ecb792919170fd53f025e8dc	no	446
Warnings:					
Information:					
29	Foreign Reference	B95--JP_2012_509259A.pdf	6049014 a5efefb7ad83dacb849646942dc3d9ee7cb2acb1	no	96
Warnings:					
Information:					

30	Foreign Reference	B96--JP_2013_500253A.pdf	2199433 1d03b09c18f63d50879783d9317d3bb9ac7fd634	no	48
Warnings:					
Information:					
31	Foreign Reference	B97--JP_2013_534535A.pdf	6208404 233b9d682465113da58b963434a3ddd93a921efc	no	146
Warnings:					
Information:					
32	Foreign Reference	B98--JP_2013_534906A.pdf	16664732 3318d152b367f5722a2d512881f90e8db85b5789	no	303
Warnings:					
Information:					
33	Foreign Reference	B99--JP_2017_503784A.pdf	11928033 b2ab3f113b4683267654f70f853b1ecfc274a7ff	no	192
Warnings:					
Information:					
34	Foreign Reference	B100--JP_H05_059061A.pdf	2791084 9ae47044710e0ffb0d4850e97109ae6d6c9509e9	no	41
Warnings:					
Information:					
35	Foreign Reference	B101--JP_H08_337584A.pdf	509463 e1137d6cb19fc4797a59f358f7770d5a5ac57e2c	no	9
Warnings:					
Information:					
36	Foreign Reference	B102--JP_H10_095802A.pdf	1278851 0a2ffba4ceb74a35950cacf14131e9169d2646ab	no	25
Warnings:					
Information:					

37	Foreign Reference	B103--JP_H11_092405A.pdf	3009191 1a2080347ae761e1fa8292839c83927ca845316b	no	28
Warnings:					
Information:					
38	Foreign Reference	B104--JP_H1171280A.pdf	4034726 bcc6075a2dc561c9654a3f865bdb516c2299bff0	no	60
Warnings:					
Information:					
39	Foreign Reference	B105--KR_1020010052385A.pdf	49338 a7028d9b3329730ce04ec3b88a8f9cb5ebd05309	no	2
Warnings:					
Information:					
40	Foreign Reference	B106--KR_1020110044808A.pdf	71357 266f136dc090ff655fade5467eda1e061dc92a49	no	2
Warnings:					
Information:					
41	Foreign Reference	B107--RU_2404810C2.pdf	9174891 717099d62cc5751d3eb4c1197165a43eed3feebb	no	79
Warnings:					
Information:					
42	Foreign Reference	B108--RU_2450008C2.pdf	1514805 45709652d914dbc87613bcff11856330b362842e	no	24
Warnings:					
Information:					
43	Foreign Reference	B109--TW_1232930.pdf	15519853 4e2e6c170b7bad4b68adf6cc97ec9329b58c4140	no	65
Warnings:					
Information:					

44	Foreign Reference	B110A--TW_200817434A.pdf	20782198 bb5b44866e79e45d97bce19b1ed5216356bc2a34	no	100
Warnings:					
Information:					
45	Foreign Reference	B110B--TW_200817434A.pdf	20921056 3144bd36dec3c110e37d083f79588db8fce4947c	no	97
Warnings:					
Information:					
46	Foreign Reference	B110C--TW_200817434A.pdf	20813482 64d85fd226ebc1e3b1feac12c18fb8a6b1587fba	no	104
Warnings:					
Information:					
47	Foreign Reference	B110D--TW_200817434A.pdf	20789173 a5b68bb5e451a99f9cfc79b6e2f03b989a88fb27	no	119
Warnings:					
Information:					
48	Foreign Reference	B110E--TW_200817434A.pdf	4570664 c05bd7e30e9675c78d2287189153792ce3113ae7	no	14
Warnings:					
Information:					
49	Foreign Reference	B111--WO_00_25825A1.pdf	1552119 7d04a502ec1af5ad98fafa567ec9d90dbe5c1c19	no	64
Warnings:					
Information:					
50	Foreign Reference	B112--WO_01_00244A2.pdf	3889294 4a19737b4b6837e3e22309c539073d2cbc873f40	no	92
Warnings:					
Information:					

51	Foreign Reference	B113--WO_02_00734A1.pdf	2021868 01133a0cb1229cbd788e0b62e50b8837ad048ce6	no	42
Warnings:					
Information:					
52	Foreign Reference	B114--WO_03_013602A1.pdf	2342241 a0abce0509c52d54c7514f9e32760fc713b39c5e	no	77
Warnings:					
Information:					
53	Foreign Reference	B115--WO_03_015826A1.pdf	1264768 087d88848fc05d88661e7138587f3430866de253	no	43
Warnings:					
Information:					
54	Foreign Reference	B116--WO_03_043583A2.pdf	8897089 1a3233ca6fe98ecdbcc6977cfcf971c283e748cd	no	194
Warnings:					
Information:					
55	Foreign Reference	B117--WO_2005_112919A2.pdf	8831764 78b74d402696f97b1ca405d8082919e060382ac3	no	223
Warnings:					
Information:					
56	Foreign Reference	B118--WO_2006_065533A2.pdf	4839280 a8db4ed7b9ba1b9d6a873560e93e4f6a477c7ac4	no	104
Warnings:					
Information:					
57	Foreign Reference	B119--WO_2006_092230A2.pdf	936552 2fd9f6978564ab647c20c8c48896dfc0c3c5f4ae	no	27
Warnings:					
Information:					

58	Foreign Reference	B120--WO_2007_077028A2.pdf	8823053 f96d28e94c0195eeb306d01ffc6ce61b13b17e39	no	162
Warnings:					
Information:					
59	Foreign Reference	B121--WO_2008_100624A2.pdf	5195986 192851a1a804766e5bcb338d620bf44d47576f01	no	114
Warnings:					
Information:					
60	Foreign Reference	B122--WO_2008_116219A2.PDF	1887445 b8d51e06d419190ba991e87038f7bc9aef4196d4	no	41
Warnings:					
Information:					
		Total Files Size (in bytes):	411314620		

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111
If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.
National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371
If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.
New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office
If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Inventor Name:	Atsuko SAITO
Title:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
Application No.:	16/613,203
International Filing Date:	5/14/2018
371(c) Date:	11/13/2019
Examiner:	NOT YET ASSIGNED
Art Unit:	1643
Confirmation No.:	6337

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT UNDER 37 CFR §1.56

Commissioner:

Applicant submits herewith documents for the Examiner's consideration in accordance with 37 CFR §§1.56, 1.97 and 1.98.

Applicant respectfully requests that each listed document be considered by the Examiner and be made of record in the present application and that an initialed copy of Form PTO/SB/08 be returned in accordance with MPEP §609.

The submission of any document herewith is not an admission that such document constitutes prior art against the claims of the present application or that such document is considered material to patentability as defined in 37 CFR §1.56(b). Applicant does not waive any rights to take any action which would be appropriate to antedate or otherwise remove as a competent reference any document submitted herewith.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

CONCISE EXPLANATION OF RELEVANCE

References were previously cited in related U.S. patent applications.

English abstracts and translations are provided with foreign language documents when available.

Related patent families are referenced within the PTO/SB/08 Form, wherein the English language documents may assist the Examiner in understanding the contents of the non-English language documents.

TIMING OF THE DISCLOSURE

The listed documents are being submitted in compliance with 37 CFR §1.97(b), before the mailing date of the first Office Action on the merits.

Although Applicant believes that no fee is required, the Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be due to Deposit Account No. 19-0741.

Respectfully submitted,

Date 2020-09-30 By /Michael D. Kaminski/

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 672-5490
Facsimile: (202) 672-5399

Michael D. Kaminski
Attorney for Applicant
Registration No. 32,904

Espacenet
Patent search

Deutsch English Français
Contact
Change country

About Espacenet Other EPO online services
Search Results My patents list (0) Query history Settings Help

US2008050310 (A1)
Bibliographic data
Description
Claims
Mosaics
Original document
Cited documents
Citing documents
INPADOC legal status
INPADOC patent family

Quick help

- What is meant by high quality text as facsimile?
- What does A1, A2, A3 and B stand for after a European publication number?
- What happens if I click on "In my patents list"?
- What happens if I click on the "Register" button?
- Why are some sidebar options deactivated for certain documents?
- How can I bookmark this page?
- Why does a list of documents with the heading "Also published as" sometimes appear, and what are these documents?
- Why do I sometimes find the abstract of a corresponding document?
- What happens if I click on the red "patent translate" button?
- What is Global Dossier?

Bibliographic data: US2008050310 (A1) — 2008-02-28

In my patents list | Report data error | Print

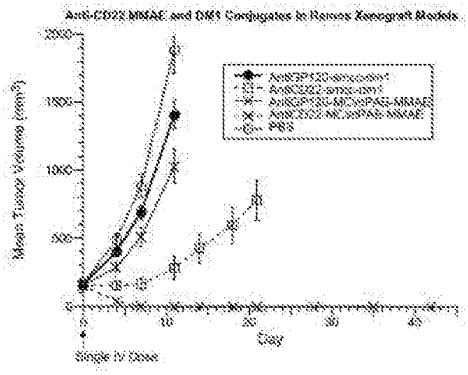
ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

Page bookmark	US2008050310 (A1) - ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR
Inventor(s):	EBENS ALLEN J JR [US]; GRAY ALANE M [US]; LIANG WEI-CHING [US]; WU YAN [US]; YU SHANG-FAN [US] ±
Applicant(s):	GENENTECH INC [US] ±
Classification:	- international: ***A61K31/345; A61K39/00; A61K9/00; A61P7/00; B65D81/24; C07H21/00; C07H21/02; C07K16/00; C07K16/42; C12N15/00; C12N15/09; C12N5/00; C12N5/06; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/563; G01N33/566***
	- cooperative: A61K39/39558; A61K45/06; A61K47/48384; A61K47/48561; A61K47/48584; C07K16/2803; C07K16/2896; C07K16/3061; C07K2317/24; C07K2317/56; C07K2317/77; C07K2317/92
Application number:	US20070754699 20070529 Global Dossier
Priority number(s):	US20070754899 20070529 ; WO2007US69889 20070529 ; US20070911829P 20070413 ; US20070908941P 20070329 ; US20060809328P 20060530
Also published as:	AR060978 (A1) AU2007266521 (A1) AU2007266521 (B2) AU2007266521 (C1) AU2010241411 (A1) → more

Abstract of US2008050310 (A1)

Translate this text into
Select language

Anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided. Methods of using anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided.



OnCusp
Ex. 1002

200817434

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：96119143

※ 申請日期：96.5.29

※IPC 分類：~~C07K~~ C07K 16/28
A61K 39/395
A61K 47/48
A61K 51/10

一、發明名稱：（中文/英文）

抗體及免疫接合物及其用途

ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

二、申 請 人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

美商建南德克公司

GENENTECH, INC.

代表人：（中文/英文）

提摩西 R 史瓦茲

SCHWARTZ, TIMOTHY R.

住居所或營業所地址：（中文/英文）

美國加州舊金山市DNA路1號

1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, U.S.A.

國 籍：（中文/英文）

美國 U.S.A.

200817434

三、發明人：（共 5 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 艾倫　J　艾班斯　二世
EBENS, ALLEN J. JR.
2. 艾蓮　M　葛雷
GRAY, ALANE M.
3. 梁偉慶
LIANG, WEI CHING
4. 彥　吳
WU, YAN
5. 于尚凡
YU, SHANG-FAN

國　籍：（中文/英文）

1. 美國　U.S.A.
2. 美國　U.S.A.
3. 中華民國　TAIWAN
4. 美國　U.S.A.
5. 中華民國　TAIWAN

200817434

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.美國；2006年05月30日；60/809,328

2.美國；2007年03月29日；60/908,941

3.美國；2007年04月13日；60/911,829

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☑ 主張專利法第三十條生物材料：

☑ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

1.食品工業發展研究所；96年08月16日；BCRC 960310

2.食品工業發展研究所；96年08月16日；BCRC 960311

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

1.美國；American Type Culture Collection (ATCC)；2006年05月26日；PTA-7620; PTA-7621

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

OnCusp
Ex. 1002

200817434

五、中文發明摘要：

本發明提供抗CD22抗體及其免疫接合物。本發明提供使用抗CD22抗體及其免疫接合物之方法。

六、英文發明摘要：

Anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided. Methods of using anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided.

200817434

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（10）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

Ab-(L-D)p

200817434

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗CD22抗體其免疫接合物。本發明進一步係關於使用抗CD22抗體及其免疫接合物之方法。

【先前技術】

淋巴細胞為在造血過程期間於骨髓中產生之眾多類型之白血細胞的一者。存在兩種主要之淋巴細胞群體：B淋巴細胞(B細胞)及T淋巴細胞(T細胞)。本文中特定關注之淋巴細胞為B細胞。

B細胞在骨髓內成熟且離開表現其細胞表面上結合抗原之抗體的骨髓。當未處理B細胞首先遭遇其膜結合抗體對其具有特異性之抗原時，該細胞開始迅速分裂且其後代分化為記憶B細胞及被稱作"漿細胞"的效應細胞。記憶B細胞具有較長壽命且以與原始母細胞相同的特異性持續表現膜結合抗體。漿細胞不產生膜結合抗體，而產生以可經分泌之形式的抗體。經分泌抗體為體液免疫之主要效應分子。

B細胞相關之病症包括(但不限於)惡性淋巴瘤(非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin's Lymphoma)，NHL)、多發性骨髓瘤及慢性淋巴球性白血病(CLL，B細胞白血病(CD5+B淋巴細胞))。非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)(主要由B淋巴細胞引起之癌症之異源群)表示所有新近診斷之癌症的約4%(Jemal, A.等人，CA-Cancer J Clin, 52: 23-47, (2002))。侵襲性NHL包含約30-40%之成人NHL(Harris, N.L.等人，Hematol. J. 1:53-66 (2001))且包括彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、

套細胞淋巴瘤(MCL)、外周T細胞淋巴瘤及多形性大細胞淋巴瘤。前線組合化學療法治癒少於一半之患有侵襲性NHL之患者，及大多數患者最終死於其疾病(Fisher, R.I. Semin. Oncol. 27(增刊12): 2-8 (2000))。

B細胞相關之病症亦包括自體免疫疾病。自體免疫疾病仍然為人類之臨床重要疾病。其名稱暗示，自體免疫疾病經由身體之自身免疫系統起作用。儘管個別類型之自體免疫疾病之病理機制不同，但一通用機制包括某些抗體(本文中被稱作自反應性抗體或自體抗體)與身體之內源性蛋白的結合。醫師及科學家已鑑別多於70種臨床上不同之自體免疫疾病，其包括類風濕性關節炎、多發性硬化症、血管炎、免疫介導之糖尿病，及狼瘡，諸如全身性紅斑狼瘡。儘管許多自體免疫疾病為罕見的(共侵襲少於200,000個體)，但該等疾病折磨數百萬美國人(估計人口之5%)，其中女性不成比例地受到大多數疾病之侵襲。該等疾病之慢性本質造成巨大的社會及經濟負擔。

靶向B細胞表面抗原之細胞毒性劑為與B細胞相關之癌症療法的重要焦點。一種此B細胞表面抗原為CD20。利妥昔單抗(Rituximab)(利妥昔單抗(Rituxan)；Genentech, Inc.(South San Francisco, CA)及IDEC Pharmaceutical Corp.(San Diego, CA))(嵌合(小鼠/人)抗CD20單株抗體)為由美國食品及藥物管理局(United States Food and Drug Administration)批准用於治療復發性或難治性低級或濾泡性NHL的第一種治療抗體(Leonard, J.P.等人，Clin. Canc.

Res. 10:5327-5334 (2004))。

其他B細胞抗原(諸如CD19、CD22及CD52)表示潛在用於治療淋巴瘤之治療目標(Grillo-Lopez A.J.等人，Curr Pharm Biotechnol, 2:301-11, (2001))。CD22為僅在分化之成熟階段表現於B細胞表面上之135-kDa B細胞-限制性唾液酸糖蛋白(Dorken, B.等人，J. Immunol. 136:4470-4479 (1986))。人類中CD22之主要形式為CD22β，其在細胞外域中含有七個免疫球蛋白總科域(圖1)(Wilson, G.L.等人，J. Exp. Med. 173:137-146 (1991))。變異體形式CD22 α缺乏免疫球蛋白總科域3及4(Stamenkovic, I.及Seed, B., Nature 345:74-77 (1990))。與人類CD22結合之配位體已展示與免疫球蛋白總科域1及2(亦被稱作抗原決定基1及2)相關(Engel, P.等人，J. Exp. Med. 181:1581-1586, 1995)。

在B細胞NHL中，CD22表現在侵襲性及無痛性群體中分別在91%至99%之範圍內(Cesano, A.等人，Blood 100:350a (2002))。CD22可充當B細胞活化複合物之組份(Sato, S.等人，Semin. Immunol. 10:287-296 (1998))且作為黏著分子(Engel, Pl等人，J. Immunol. 150:4719-4732 (1993))。CD22不足之小鼠之B細胞具有較短壽命及增強之細胞凋亡，其暗示此抗原在B細胞存活中之關鍵作用(Otipoby, K.L.等人，Nature (Lond) 384:634-637 (1996))。在與其天然配位體或抗體結合後，CD22迅速內化，其在原發性B細胞中提供有效協同刺激信號且在贅生性B細胞中提供促凋亡信號(Sato, S.等人，Immunity 5:551-562 (1996))。

抗CD22抗體已經研究作為B細胞癌症及其他B細胞增生性疾病之潛在療法。該等抗CD22抗體包括RFB4(Mansfield, E.等人，Blood 90:2020-2026 (1997))、CMC-544(DiJoseph, J.F., Blood 103:1807-1814 (2004))及LL2(Pawlak-Byczkowska, E.J.等人，Cancer Res. 49:4568-4577 (1989))。該LL2抗體(以前被稱作HPB-2)為針對CD22抗原之IgG2a小鼠單株抗體(Pawlak-Byczkowska, E.J.等人(1989)，同上文)。活體外免疫組織學評估證實LL2抗體與經測試之51個B細胞NHL樣品中50個樣品的反應性，但與其他惡性疾病或正常非淋巴組織無反應性(Pawlak-Byczkowska (1989)，同上文；Stein, R.等人，Cancer Immunol. Immunother. 37:293-298 (1993))。

抗體-藥物接合物用於局部遞送細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即在治療癌症中殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)的用途(Syrigos及Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614；Niculescu-Duvaz及Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172；美國專利4975278)容許藥物部分向腫瘤之靶向遞送，且在其中細胞內積聚，其中該等未結合藥物劑之全身性投予可對正常細胞以及尋求待消除之腫瘤細胞產生不可接受之毒性程度(Baldwin等人(1986) Lancet pp.(1986年3月15日):603-05；Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review"，在Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications中，A. Pinchera等人(編)，第475-506

頁)。因此，尋求最大效用及最小毒性。多株抗體與單株抗體已經報導適用於該等策略中(Rowland等人(1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。用於該等方法中之藥物包括道諾黴素(daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲胺喋呤(methotrexate)及長春地辛(vindesine)(Rowland等人，Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87 (1986))。抗體-毒素接合物中使用之毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素；植物毒素，諸如蓖麻毒素；小分子毒素，諸如格爾德黴素(geldanamycin)(Kerr等人(1997) Bioconjugate Chem. 8(6):781-784；Mandler等人(2000) Journal of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581；Mandler等人(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028；Mandler等人(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、美登素類物(maytansinoid)(EP 1391213；Liu等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)，以及刺孢黴素(calicheamicin)(Lode等人(1998) Cancer Res. 58:2928；Hinman等人(1993) Cancer Res. 53:3336-3342)。該等毒素可由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制作用之機制來實現其細胞毒性及細胞生長抑制效應(Meyer, D.L.及Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in Annual Reports in Medicinal Chemistry，第38卷(2003)第23章，229-237)。一些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白受體配位體接合時傾向於不具活性或具有較低活性。

200817434

ZEVALIN®(替伊莫單抗(ibritumomab tiuxetan)，Biogen/Idec)為抗體-放射性同位素接合物，其係由針對見於正常及惡性B淋巴細胞表面上之CD20抗原的鼠IgG1 κ單株抗體及由硫脲連接子-螯合劑結合之^{111}In或^{90}Y放射性同位素組成(Wiseman等人(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77；Wiseman等人(2002) Blood 99(12):4336-42；Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63；Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。儘管ZEVALIN具有對抗B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)之活性，但投藥在大多數患者中引起嚴重且長期之血球減少。由連接至刺孢黴素之hu CD33抗體組成之抗體藥物接合物MYLOTARG™(吉妥單抗(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)於2000年經批准藉由注射來治療急性骨髓白血病(Drugs of the Future (2000) 25(7):686；美國專利第4970198號；第5079233號；第5585089號；第5606040號；第5693762號；第5739116號；第5767285號；第5773001號)。由經由二硫化物連接子SPP連接至美登素類物藥物部分DM1之huC242抗體組成的抗體藥物接合物康圖單抗美坦辛(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)經開發用於治療表現CanAg抗原之癌症，諸如結腸癌、胰腺癌、胃癌及其他癌症。由連接至美登素類物藥物部分DM1之抗前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體組成之抗體藥物接合物MLN-2740(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)係處於對前列腺腫瘤之可能治療的開發中。相同美登

素類物藥物部分DM1係經由非二硫化物連接子SMCC連接至小鼠鼠單株抗體TA.1上(Chari等人(1992) Cancer Research 52:127-131)。報導此接合物比相應二硫化物連接子接合物之效力低200倍。其中認為該SMCC連接子為"非可斷裂的"。

若干短肽化合物已自海洋軟體動物截尾海兔(Dolabella auricularia)分離，且發現具有生物活性(Pettit等人(1993) Tetrahedron 49:9151；Nakamura等人(1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062；Sone等人(1995) Journal Org Chem. 60:4474)。該等化合物之類似物亦經製備，且發現一些具有生物活性(關於綜述，參見Pettit等人(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277)。舉例而言，奧利斯坦汀E(auristatin E)(US 5635483)為海洋天然產物海兔毒素10(Dolastatin 10)之合成類似物，其為藉由結合至與抗癌藥物長春新鹼(vincristine)相同之微管蛋白上之位點來抑制微管蛋白聚合之試劑(G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70:1-79)。海兔毒素10、奧利斯坦汀PE及奧利斯坦汀E為具有四個胺基酸之線性肽，該三者對海兔毒素種類之化合物及C末端醯胺為獨特的。

海兔毒素之合成類似物奧利斯坦汀肽、奧利斯坦汀E(AE)及單甲基奧利斯坦汀(MMAE)經接合至：(i)嵌合單株抗體cBR96(對癌上之路易斯Y(Lewis Y)具特異性)；(ii)cAC10，其對血液惡性疾病上之CD30具特異性(Klussman等人(2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-

773；Doronina等人(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)；"Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"；Francisco等人(2003) Blood 102(4):1458-1465；US 2004/0018194；(iii)抗CD20抗體，諸如用於治療表現CD20之癌症及免疫病症的Rituxan®(利妥昔單抗)(WO 04/032828)；(iv)用於治療結腸直腸癌症之抗EphB2抗體2H9及抗IL-8(Mao等人(2004) Cancer Research 64(3):781-788)；(v)E-選擇素抗體(Bhaskar等人(2003) Cancer Res. 63:6387-6394)；及(vi)其他抗CD30抗體(WO 03/043583)。單甲基奧利斯坦汀(MMAE)亦已接合至2H9(抵抗EphB2R之抗體，其為具有小鼠與人類之間之密切同源性之1型TM酪胺酸激酶受體)上，且過度表現於結腸直腸癌細胞中(Mao等人(2004) Cancer Res. 64:781-788)。

報導單甲基奧利斯坦汀MMAF(在C末端處具有苯丙胺酸之奧利斯坦汀E(MMAE)之變異體)(US 5767237；US 6124431)比MMAE效力低，但當接合至單株抗體時效力更大(Senter等人，Proceedings fo the American Association for Cancer Research，第45卷，文摘號623，提交於2004年3月28日)。奧利斯坦汀F苯二胺(AFP)(MMAE之苯丙胺酸變異體)係經由苯二胺間隔基由1F6之C末端連接至抗CD70 mAb，1F6上(Law等人，Proceedings of the American Association for Cancer Research第45卷，文摘號625，提交於2004年3月28日)。

200817434

抗CD22抗體-毒素接合物亦經研究作為潛在之治療化合物。舉例而言，先前報導描述針對抗CD22之含有蓖麻毒素A鏈之免疫毒素作為潛在抗癌劑(May, R.D.等人，Chemical Abstracts 106(21):168656x第35-36頁(1987)；Ghetie, M.A.等人，Cancer Research 48:2610-2617 (1988)；及Amlot, P.L.等人，Blood 82(9):2624-2633 (1993))。若毒素為放射性同位素，則LL2之人類化(CDR接枝)IgG1形式易普拉單抗(Epratuzumab)已展示關於放射性免疫接合物之治療活性的證據(Juweid, M.E.等人，Clin. Cancer Res. 5(增刊10):3292s-3303s (1999)；Griffiths, G.L.等人，J. Nucl. Med. 44:77-84 (2003)；Linden, O.等人，Clin. Cancer Res. 5(增刊10):3287s-3291s (1999))。

此項技術中存在對於用於治療各種與B細胞相關之癌症(諸如淋巴瘤(諸如非霍奇金氏淋巴瘤)及其他B細胞增生性病症)之額外藥物的需求。關於此目的尤其有用之藥物包括B細胞靶向之抗CD22抗體-藥物接合物，其具有顯著較低毒性，但仍具有有效治療功效。本發明提出該等及其他限制及過去之問題。

本申請案中任何參照案之引用並非承認該參照案為本申請案之先前技術。本文中引用之所有參照案(包括專利、專利申請案及公開案)係以引用的方式全部併入本文中。

【發明內容】

本發明提供抗CD22抗體及使用該抗CD22抗體之方法。

在一態樣中，提供一種與CD22結合之抗體，其中該抗

體包含至少一種、兩種、三種、四種、五種或六種HVR，其係選自：

(1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；

(2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；

(3)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；

(4)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1；

(5)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及

(6)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1，及(b)至少一種、兩種、三種、四種或五種HVR，其係選自：

(1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；

(2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；

(3)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；

(4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及

(6)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-L1，及(b)至少一種、兩種、三種、四種或五種HVR，其係選自：

(1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；

(2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；

(3)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3

(4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及

(6)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3，及(b)至少一種、兩種、三種、四種或五種HVR，其係選自：

(1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；

(2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；

(3)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-L1；

(4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及

(5)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)至少一種、兩種、三種、四種或五種HVR，其係選自：

(1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；

(2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；

(3)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1；

(4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及

(5)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在一實施例中，抗體包括包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1。在一實施例中，抗體進一步包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2。在一實施例中，抗體進一步包括包含SEQ NO:12之胺基酸序列之HVR-L2及包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在某些實施例中，上述抗體之任一者進一步包含選自VH亞群III一致框架及VL亞群I一致框架之至少一個框架。

在一態樣中，提供一種與CD22結合之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少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%序列一致性的重鏈可變域。在一實施例中，抗體包含SEQ ID NO:16之重鏈可變域。

在一態樣中，抗體進一步包含與SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少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%序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，抗體包含SEQ ID NO:17之輕鏈可變域。

在一態樣中，抗體進一步包含與SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少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%序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，抗體包含SEQ ID NO:18之輕鏈可變域。

在一實施例中，抗體包含與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少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%序列一致性的重鏈可變域及與SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少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%序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，抗體包含與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少

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%序列一致性的重鏈可變域及與SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少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%序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，重鏈可變域包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列，且輕鏈可變域包含SEQ ID NO:17之胺基酸序列。在一實施例中，重鏈可變域包含SEQ ID NO:16之胺基酸序列，且輕鏈可變域包含SEQ ID NO:18之胺基酸序列。

在某些實施例中，提供一種編碼上述抗體之任一者的聚核苷酸。在一實施例中，提供一種包含該聚核苷酸的載體。在一實施例中，提供一種包含該載體之宿主細胞。在一實施例中，該宿主細胞為真核細胞。在一實施例中，宿主細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。在一實施例中，提供一種製造抗CD22抗體的方法，其中該方法包含在適於表現編碼抗體之聚核苷酸的條件下培養宿主細胞，且分離該抗體。

在一態樣中，提供一種表現於細胞表面上之與CD22結合之抗體。在一實施例中，抗體在包含域1或域2或域1及域2之人類或小鼠CD22之區域內與抗原決定基結合。在一實施例中，細胞為哺乳動物細胞。在一實施例中，細胞為人類細胞。在一實施例中，細胞為癌細胞。在一實施例中，細胞為B細胞。在一實施例中，癌細胞為B細胞。

在某些實施例中，上述抗體之任一者為單株抗體。在一實施例中，抗體為選自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段之抗體片段。在一實施例中，抗體經人類化。在一實施例中，抗體為人。

在一態樣中，提供一種偵測一生物樣品中CD22之存在的方法，該方法包含在容許抗體與CD22結合之條件下使該生物樣品與上述抗體之任一者接觸，且偵測該抗體與CD22之間是否形成複合物。在一實施例中，生物樣品包含B細胞。在一實施例中，生物樣品來自經受或懷疑經受B細胞病症及/或B細胞增生性病症之哺乳動物，其中該等病症包括(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，提供一種診斷與增加之CD22表現相關之細胞增生性病症的方法，該方法包含使測試細胞與上述抗體之任一者接觸；藉由偵測抗體與CD22之結合來測定CD22之表現量；且比較測試細胞之CD22之表現量與對照細胞之CD22之表現量，與對照細胞相比測試細胞之更高CD22表現量指示存在與增加之CD22表現相關之細胞增生性病症。在一實施例中，該測試細胞為來自懷疑患有細胞增生性病症(諸如B細胞增生性病症)之患者的細胞。在一實施例中，該細胞增生性病症係選自B細胞病症，其包括

(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。在一實施例中，該方法包含測定測試細胞表面上之CD22表現量且比較測試細胞表面上之CD22表現量與對照細胞表面上之CD22表現量。

在一態樣中，提供一種診斷與表現CD22之細胞(諸如B細胞)增加相關之細胞增生性病症的方法，該方法包含使一生物樣品中之測試細胞與上述抗體之任一者接觸；藉由偵測抗體與CD22之結合來測定該樣品中與測試細胞結合之抗體的含量；且比較一對照樣品中與細胞結合之抗體的含量，其中結合抗體之含量經標準化至測試樣品及對照樣品中表現CD22之細胞之數目，且其中與對照樣品相比測試樣品中更高之結合抗體含量指示存在與表現CD22之細胞相關之細胞增生性病症。

在一態樣中，一種偵測血液或血清中可溶性CD22的方法，該方法包含使來自懷疑經受B細胞增生性病症之哺乳動物之血液或血清的測試樣品與本發明之抗CD22抗體接觸且偵測相對於來自正常哺乳動物之血液或血清之對照樣品，測試樣品中可溶性CD22的增加。在一實施例中，該偵測方法適用作診斷與哺乳動物之血液或血清中可溶性CD22之增加相關之B細胞增生性病症的方法。

在一態樣中，本發明之抗體包括經半胱胺酸改造之抗體，其中親本抗體之一或多種胺基酸經如WO 2006/034488(以引用的方式全部併入本文中)中所揭示之自由半胱胺酸胺基酸置換。抗CD22抗體之任何形式可經如此改造，亦即突變。舉例而言，親本Fab抗體片段可經改造以形成經半胱胺酸改造之Fab，其在本文中被稱作"ThioFab"。類似地，親本單株抗體可經改造以形成"ThioMab"。應瞭解單位點突變在ThioFab中產生單一經改造之半胱胺酸殘基，而歸因於IgG抗體之二聚特性，單位點突變在ThioMab中產生兩個經改造之半胱胺酸殘基。本發明之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體包括單株抗體、人類化或嵌合單株抗體，及抗體、融合多肽及優先結合與細胞相關之CD22多肽之類似物的抗原結合片段。經半胱胺酸改造之抗體可或者包含在抗體或Fab中在本文中揭示之位置處包含半胱胺酸的抗體，其是由序列設計及/或抗體之選擇產生，而未必改變親本抗體，諸如藉由噬菌體呈現抗體設計及選擇或經由輕鏈及/或重鏈框架序列及恆定區之重新設計。經半胱胺酸改造之抗體包含具有在0.6至1.0；0.7至1.0或0.8至1.0之範圍內之硫醇反應性值的一或多種自由半胱胺酸胺基酸。自由半胱胺酸胺基酸為半胱胺酸殘基，其已經改造進入親本抗體中且並非二硫橋鍵之部分。經半胱胺酸改造之抗體適用於經由(例如)順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯基在經改造半胱胺酸之位點處連接細胞毒性及/或成像化合物。與蛋白質中之任何其他胺基酸官能基(諸如離胺酸殘基之胺基或N

末端胺基)相比，Cys殘基之硫醇官能基與順丁烯二醯亞胺基團之親核反應性高約1000倍。碘乙醯基及順丁烯二醯亞胺試劑中之硫醇特異性官能基可與胺基反應，但需要較高pH值(>9.0)及較長反應時間(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

在一實施例中，本發明之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體包含在以下位置之任一者處經改造之半胱胺酸，其中該位置為輕鏈中根據Kabat等人之數字(參見Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)及重鏈中根據EU編號之數字(其包括Fc區)(參見Kabat等人(1991)，同上文)，其中在圖17A中概況描述之輕鏈恆定區開始於位置108處(Kabat編號)且在圖17B及17C中概況描述之重鏈恆定區開始於位置118處(EU編號)。位置亦可由圖17A-17C中所示之其在全長輕鏈或重鏈之胺基酸之連續編號中的位置來提及。根據本發明之一實施例，抗CD22抗體包含在LC-V205C(Kabat編號：Val 205；連續編號210，在圖17A中在彼位置處經改造為Cys)處經改造之半胱胺酸。在圖17A中輕鏈中之經改造半胱胺酸以粗體、雙底線文字展示。根據一實施例，抗CD22抗體包含在HC-A118C(EU編號：Ala 118；連續編號121，在圖17B中在彼位置處經改造為Cys)處經改造之半胱胺酸。在圖17B中重鏈中之經改造半胱胺酸以粗體、雙底線文字

展示。根據一實施例，抗CD22抗體包含在Fc-S400C(EU編號：Ser 400；連續編號403，在圖17C中在彼位置處經改造為Cys)處經改造之半胱胺酸。在圖17C中重鏈之Fc區中之經改造半胱胺酸以粗體、雙底線文字展示。在其他實施例中，重鏈(包括Fc區)之經改造半胱胺酸在以下位置(根據EU編號)之任一者處：41、88、116、118、120、171、282、375或400。因此，對於本發明之親本抗CD22抗體而言在該等位置處胺基酸中之變化為：A41C、A88C、S116C、A118C、T120C、A171C、V282C、S375C或S400C。在其他實施例中，輕鏈之經改造半胱胺酸在以下位置(根據Kabat編號)之任一者處：15、43、110、144、168、205。因此，對於本發明之親本抗CD22抗體而言在該等位置處胺基酸中之變化為：V15C、A43C、V110C、A144C、S168C或V205C。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體包含一或多種自由半胱胺酸胺基酸，其中該經半胱胺酸改造之抗CD22抗體與CD22多肽結合，且係由一包含以半胱胺酸置換親本抗CD22抗體之一或多個胺基酸殘基之方法來製備，其中該親本抗體包含選自以下序列之至少一種HVR序列：

(a) HVR-L1序列RSSQSIVHSNGNTFLE(SEQ ID NO:9)或序列RSSQSIVHSVGNTFLE(SEQ ID NO:10)(圖2B)；

(b) HVR-L2序列KVSNRFS SEQ ID NO:12(圖2B)；

(c) HVR-L3序列FQGSQFPYT(SEQ ID NO:14)(圖2B)；

(d) HVR-H1序列GYEFSRSWMN(SEQ ID NO:2)(圖2A)；

(e) HVR-H2 序列 GRIYPGDGDTNYSGKFKG(SEQ ID NO:4(圖2A)；及

(f) HVR-H3 序列 DGSSWDWYFDV(SEQ ID NO:6)(圖2A)。

在某一態樣中，本發明涉及一種經半胱胺酸改造之抗CD22抗體，其包含與如本文中所揭示之具有全長胺基酸序列之經半胱胺酸改造的抗體或如本文中所揭示之缺乏信號肽之經半胱胺酸改造的抗體胺基酸序列具有至少約80%胺基酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%胺基酸序列一致性的胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明涉及一種經分離之半胱胺酸改造的抗CD22抗體，其包含由與DNA分子之互補序列雜交之核苷酸序列編碼的胺基酸序列，其中該DNA分子編碼：(a)如本文中所揭示之具有全長胺基酸序列之經半胱胺酸改造的抗體，(b)如本文中所揭示之缺乏信號肽之經半胱胺酸改造的抗體胺基酸序列，(c)如本文中所揭示之具有或不具有信號肽之經跨膜半胱胺酸改造的抗體蛋白之細胞外域，(d)由本文中揭示之核酸序列之任一者編碼的胺基酸序列或(e)如本文中所揭示之經全長半胱胺酸改造之抗體胺基酸序列的任何其他特異性限定片段。

在一特定態樣中，本發明提供一種經分離之半胱胺酸改造之抗CD22抗體，其不具有N末端信號序列及/或不啟始

甲硫胺酸且係由如本文中所述之編碼此胺基酸序列之核苷酸序列來編碼。本文中亦描述用於製備經分離之半胱胺酸改造之抗CD22抗體的方法，其中彼等方法包含培養包含載體之宿主細胞，該方法包含在適於經半胱胺酸改造之抗體表現的條件下適當編碼核酸分子且自細胞培養物回收經半胱胺酸改造之抗體。

本發明之另一態樣提供一種經分離之半胱胺酸改造之抗CD22抗體，其經跨膜域缺失或跨膜域非活化。本文中亦描述用於製備經分離之半胱胺酸改造之抗CD22抗體的方法，其中彼等方法包含培養包含載體之宿主細胞，該方法包含在適於經半胱胺酸改造之抗體表現的條件下適當編碼核酸分子且自細胞培養物回收經半胱胺酸改造之抗體。

在其他實施例中，本發明提供經分離之抗CD22嵌合半胱胺酸改造之抗體，其包含融合於異種(非-CD22)多肽之本文中所述之經半胱胺酸改造的抗體之任一者。該等嵌合分子之實例包含融合於異種多肽之本文中所述之經半胱胺酸改造的抗體之任一者，諸如，抗原決定基標記物序列或免疫球蛋白之Fc區。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體可為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗CD22多肽抗體與其各別抗原性抗原決定基之結合的抗體。本發明之抗體視情況可接合至生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，其包括(例如)奧利斯坦汀、抗生素、放射性同位素、核分解酶或其類似物)上。本發明之抗體視情況

可於CHO細胞或細菌細胞中產生且較佳抑制其所結合之細胞之生長或增殖或誘發該細胞之死亡。出於診斷目的，本發明之抗體可經可偵測標記，連接至固體支撐物或其類似物上。

在本發明之其他實施例中，本發明提供包含編碼本文中描述之抗CD22抗體及抗CD22經半胱胺酸改造之抗體之任一者的DNA之載體。亦提供包含任何此載體之宿主細胞。舉例而言，該等宿主細胞可為CHO細胞、大腸桿菌(E. coli)細胞或酵母細胞。進一步提供一種用於製備本文中描述之多肽之任一者的方法且該方法包含在適於表現所需多肽之條件下培養宿主細胞且自細胞培養物回收所需多肽。

經半胱胺酸改造之抗體可適用於治療癌症且包括對細胞表面及跨膜受體及與腫瘤相關之抗原(TAA)具特異性的抗體。該等抗體可以裸抗體(未與藥物或標記部分接合)或抗體-藥物接合物(ADC)形式使用。本發明之經半胱胺酸改造之抗體可位點特異性且有效地與硫醇反應性試劑結合。該硫醇反應性試劑可為多官能連接子試劑、捕獲標記試劑、螢光團試劑或藥物-連接子中間物。經半胱胺酸改造之抗體可以可偵測標記標記，固定於固相載體上及/或與藥物部分接合。硫醇反應性可概括為其中具有反應性半胱胺酸胺基酸之胺基酸之取代可在以下範圍內進行的任何抗體，其中輕鏈在選自胺基酸範圍之以下範圍內：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；且重鏈在選自胺基酸範圍之以下範圍內：H-35至H-

45；H-83至H-93；H-114至H-127；及H-170至H-184，且Fc區在選自H-268至H-291；H-319至H-344；H-370至H-380；及H-395至H-405之範圍內，其中胺基酸位置之編號如WO 2006034488中所述開始於Kabat編號系統(Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)之位置1處且其後依序延伸。硫醇反應性亦可概括為抗體之某些域，諸如輕鏈恆定域(CL)及重鏈恆定域CH1、CH2及CH3。產生0.6及更高之硫醇反應性值之半胱胺酸置換可分別在完整抗體IgA、IgD、IgE、IgG及IgM之重鏈恆定域α、δ、ε、γ及μ中進行，其中該等抗體包括IgG子類：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2。該等抗體及其用途揭示於WO 2006/034488中。

本發明之經半胱胺酸改造之抗體較佳保持其野生型、親本抗體對應物之抗原結合能力。因此，經半胱胺酸改造之抗體能夠與抗原結合，較佳特異性結合。該等抗原包括(例如)與腫瘤相關之抗原(TAA)、細胞表面受體蛋白及其他細胞表面分子、跨膜蛋白、信號轉導蛋白、細胞存活調節因子、細胞增殖調節因子、與組織發展或分化相關(例如，已知或懷疑功能上有助於組織發展或分化)之分子、淋巴因子、細胞激素、細胞週期調節中涉及之分子、血管發生中涉及之分子及與血管生成相關(例如，已知或懷疑功能上有助於血管生成)之分子。與腫瘤相關之抗原可為叢集性分化因子(亦即，CD蛋白，其包括(但不限於)CD22)。

本發明之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體保持其親本抗CD22抗體對應物之抗原結合能力。因此，本發明之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體能夠與CD22抗原(包括人類抗CD22同功異型物β及/或α)結合，較佳特異性結合，其包括當該等抗原表現於細胞(其包括(不加限制)B細胞)表面上時。

本發明之抗體可與其他硫醇反應性劑接合，其中反應性基團為(例如)順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺、吡啶基二硫化物或其他硫醇反應性接合搭配物(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.在Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, 第40-55頁、第643-671頁中)。該搭配物可為細胞毒性劑(例如諸如多柔比星或百日咳毒素之毒素)、螢光團(諸如螢光染料，如螢光素或若丹明(rhodamine))、用於成像之螯合劑或放射性治療金屬、肽基或非肽基標記或偵測標記，或清除改質劑(諸如聚乙二醇之各種異構體、與第三組份結合之肽，或另一碳水化合物或親脂劑)。

在一態樣中，本發明之抗體可與任何標記部分接合，其可經由反應性部分、活化部分或反應性半胱胺酸硫醇基團

與抗體共價連接(Singh等人(2002) Anal. Biochem. 304:147-15；Harlow E.及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)。該經連接標記可用於：(i)提供可偵測信號；(ii)與第二標記相互作用以改變由第一或第二標記提供之可偵測信號，例如提供FRET(螢光共振能量轉移)；(iii)穩定與抗原或配位體之相互作用或增大與抗原或配位體之結合親和力；(iv)藉由電荷、疏水性、形狀或其他物理參數來影響遷移率，例如電泳遷移率或細胞滲透率，或(v)提供捕獲部分以調節配位體親和性、抗體/抗原結合，或離子錯合。

經標記半胱胺酸改造之抗體可適用於診斷檢定，例如，用於偵測所關注之抗原在特異性細胞、組織或血清中之表現。對於診斷應用而言，抗體通常應以可偵測部分標記。眾多標記為可用的，其通常可分為以下種類：

放射性同位素(放射性核種)，諸如^{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或^{213}Bi。經放射性同位素標記之抗體適用於受體靶向成像實驗中。使用Current Protocols in Immunology，第1卷及第2卷，Coligen等人編，Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)中描述之技術，抗體可以結合、螯合或另外錯合放射性同位素

金屬之配位體試劑標記，其中該試劑與抗體之經改造半胱胺酸硫醇具有反應性。可與金屬離子錯合之螯合配位體包括DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及TETA(Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核種可經由與本發明之抗體-藥物接合物錯合來靶向(Wu等人(2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146)。

諸如DOTA-順丁烯二醯亞胺(4-順丁烯二醯亞胺丁醯胺苄基-DOTA)之連接子試劑可遵循Axworthy等人(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807之程序，藉由胺基苄基-DOTA與經異丙基氯甲酸酯(Aldrich)活化之4-順丁烯二醯亞胺丁酸(Fluka)之反應來製備。DOTA-順丁烯二醯亞胺試劑與經半胱胺酸改造之抗體之自由半胱胺酸胺基酸反應且在抗體上提供金屬錯合配位體(Lewis等人(1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。螯合連接子標記試劑(諸如DOTA-NHS(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸單(N-羥基琥珀醯亞胺酯))為市售的(Macrocyclics, Dallas, TX)。以經放射性核種標記之抗體成像之受體靶向可藉由偵測且定量腫瘤組織中抗體之累進積聚來提供路徑活化之標記(Albert等人(1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210)。在溶酶體降解之後，經接合放射性金屬可保留在細胞內。

適用作用於成像實驗之抗體標記之金屬螯合複合物經揭示：US 5342606；US 5428155；US 5316757；US 5480990；US 5462725；US 5428139；US 5385893；US

5739294；US 5750660；US 5834456；Hnatowich等人(1983) J. Immunol. Methods 65:147-157；Meares等人(1984) Anal. Biochem. 142:68-78；Mirzadeh等人(1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65；Meares等人(1990) J. Cancer1990, Suppl. 10:21-26；Izard等人(1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350；Nikula等人(1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90；Camera等人(1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62；Kukis等人(1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110；Verel等人(2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670；Camera等人(1994) J. Nucl. Med. 21:640-646；Ruegg等人(1990) Cancer Res. 50:4221-4226；Verel等人(2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670；Lee等人(2001) Cancer Res. 61:4474-4482；Mitchell, 等人(2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112；Kobayashi等人(1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111；Miederer等人(2004) J. Nucl. Med. 45:129-137；DeNardo等人(1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90；Blend等人(2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363；Nikula等人(1999) J. Nucl. Med. 40:166-76；Kobayashi等人(1998) J. Nucl. Med. 39:829-36；Mardirossian等人(1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74；Roselli等人(1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

(b)螢光標記，諸如稀土螯合劑(銪螯合劑)，螢光素種類包括FITC、5-羧基螢光素、6-羧基螢光素；若丹明類型包

括TAMRA；丹醯基；麗絲胺(Lissamine)；花青素；藻紅蛋白；德州紅(Texas Red)；及其類似物。該等螢光標記可使用(例如)Current Protocols in Immunology(同上文)中揭示之技術與抗體接合。螢光染料及螢光標記試劑包括自Invitrogen/Molecular Probes(Eugene, OR)及Pierce Biotechnology, Inc.(Rockford, IL)市售之彼等螢光染料及螢光標記試劑。

(c)各種酶底物標記為可用的或經揭示(US 4275149)。酶通常催化可使用各種技術量測之發色底物之化學變化。舉例而言，酶可催化底物中之顏色變化，其可經分光光度測定進行量測。或者，酶可改變底物之螢光或化學發光。用於量化螢光變化之技術揭示於上文中。化學發光底物變得由化學反應電子激發且可隨後發射可量測(例如，使用一化學照度計)之光或向螢光受體供應能量。酶標記之實例包括螢光素酶(例如，螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶；US 4737456)、蟲螢光素、2,3-二氫酞嗪二酮、蘋果酸脫氫酶、尿素酶、過氧化酶(諸如辣根過氧化酶(HRP))、鹼性磷酸酯酶(AP)、β-半乳糖苷酶、葡糖澱粉酶、溶菌酶、醣氧化酶(例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸鹽脫氫酶)、雜環氧化酶(諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶)、乳過氧化酶、微過氧化酶及其類似酶。用於接合酶與抗體之技術描述於O'Sullivan等人(1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay"，於Methods in Enzym.(J. Langone

及H. Van Vunakis編)，Academic Press, New York, 73:147-166中。

酶-底物組合之實例包括(例如)：

(i)具有過氧化氫酶作為底物之辣根過氧化酶(HRP)，其中該過氧化氫酶氧化染料前驅物(例如，鄰苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基聯苯胺鹽酸鹽(TMB))；

(ii)具有磷酸對硝基苯酯作為發色底物之鹼性磷酸酯酶(AP)；及

(iii)具有發色底物(例如，對硝基苯基-β-D-半乳糖苷酶)或螢光底物4-香豆素-β-D-半乳糖苷酶之β-D-半乳糖苷酶(β-D-Gal)。

眾多其他酶-底物組合對於熟習此項技術者為可用的。關於一般概述，參見US 4275149及US 4318980。

標記可與胺基酸側鏈、經活化胺基酸側鏈、經半胱胺酸改造之抗體及其類似物間接接合。舉例而言，抗體可與生物素及上述可與抗生蛋白或抗生蛋白鏈菌素接合之三種寬泛種類之標記的任一者接合，或反之亦然。生物素與抗生蛋白鏈菌素選擇性結合且因此，標記可以此間接方式與抗體接合。或者，為達成標記與多肽變異體之間接接合，多肽變異體與小半抗原(例如，地高辛(digoxin))接合且不同類型之上述標記之一者與抗半抗原多肽變異體(例如，抗地高辛抗體)接合。因此，可達成標記與多肽變異體之間接接合(Hermanson, G. (1996)在Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego中)。

本發明之抗體可用於任何已知檢定方法中，諸如ELISA、競爭性結合檢定、直接及間接夾心檢定，及免疫沈澱檢定(Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques，第147-158頁，CRC Press, Inc.)。

偵測標記可用於定域、呈現且定量結合或識別事件。本發明之經標記抗體可偵測細胞表面受體。可偵測標記抗體之另一用途為基於珠粒之免疫捕捉方法，其包含使珠粒與螢光標記抗體接合且在結合配位體之後偵測螢光信號。類似結合偵測方法利用表面電漿共振(SPR)效應以量測且偵測抗體-抗原相互作用。

偵測標記(諸如螢光染料及化學發光染料)(Briggs等人(1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058)提供可偵測信號且通常可用於標記抗體，其較佳具有以下性質：(i)經標記抗體應產生具有低背景之極高信號以使得可在不含細胞與基於細胞之檢定中靈敏地偵測少量抗體；且(ii)經標記抗體應為光穩定的以使得可觀測、監控且記錄螢光信號，而無顯著光致漂白。對於涉及經標記抗體與膜或細胞表面(尤其活細胞)之細胞表面結合的應用而言，標記較佳(iii)具有良好水溶性以達成有效接合物濃度及偵測敏感性且(iv)對活細胞為無毒的以便不破壞該等細胞之正常代謝過程或造成過早細胞死亡。

細胞螢光強度之直接量化及螢光標記事件(例如肽-染料

接合物之細胞表面結合)之列舉可於一系統(FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.)上進行，該系統自動混合且讀取具有活細胞或珠粒之非放射性檢定(Miraglia, "Homogeneous cell-and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204)。經標記抗體之用途亦包括細胞表面受體結合檢定、免疫捕捉檢定、螢光聯結免疫吸附劑檢定(FLISA)、卡斯蛋白酶-分裂(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)、細胞凋亡(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)及細胞毒性檢定。螢光計微體積檢定技術可用於識別靶向細胞表面之分子之上調或下調(Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

藉由生物醫學及分子成像之各種方法及技術，本發明之經標記抗體適用作成像生物標記及探針，其中該等方法及技術諸如：(i)MRI(磁性共振成像)；(ii)微CT(電腦化斷層

攝影法)；(iii)SPECT(單光子發射電腦斷層攝影法)；(iv)PET(正電子發射斷層攝影法)Chen等人(2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49；(v)生物發光；(vi)螢光；及(vii)超音。免疫閃爍攝影法為一成像程序，其中經放射性物質標記之抗體經投予動物或人類患者且對其中抗體定域之體內之位點拍照片(US 6528624)。成像生物標記可經客觀量測且評估為正常生理過程、病原過程或對治療干預之藥理學反應之指示劑。生物標記可為若干類型：0型為疾病之天然歷史標記且與已知臨床因子縱向相關，例如類風濕性關節炎中滑膜炎之MRI評估；I型標記根據作用機制捕捉干預之影響，即使該機制可不與臨床結果相關；II型標記充當其中改變或信號來自其之替代端點，該生物標記預測臨床益處以"確認"靶向反應，諸如由CT量測類風濕性關節炎中之骨侵蝕。成像生物標記因此可提供關於以下方面之藥效(PD)治療資訊：(i)靶向蛋白之表現，(ii)治療劑與靶向蛋白之結合，亦即選擇率，及(iii)清除與半衰期藥物動力學資料。相對於基於實驗室之生物標記，活體內成像生物標記之優點包括：非侵襲性治療、可量化、整體評估、重複給藥及評估(亦即多個時間點)，及臨床前(小動物)至臨床(人類)結果之潛在可傳遞作用。對於一些應用而言，生物成像取代或最小化臨床前研究中動物實驗之數目。

熟知肽標記方法。參見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等人(1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York ; Lundblad, R. L.及 Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification，第I卷及第II卷，CRC Press, New York ; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche編，Walter DeGryter, Berlin and New York ; 及(Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.) ; De Leon-Rodriguez等人(2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155 ; Lewis等人(2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324 ; Li等人(2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115 ; Mier等人(2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237。

經足夠接近之兩個部分(螢光報導體及猝滅劑)標記之肽及蛋白經歷螢光共振能量轉移(FRET)。報導體基團通常為由某個波長下之光激發且向受體或猝滅劑、基團轉移能量之螢光染料，其中發射之適當斯托克位移(Stokes shift)在最大亮度下。螢光染料包括具有延伸之芳香性之分子，諸如螢光素及若丹明，及其衍生物。螢光報導體可在完整肽

中由猝滅劑部分部分地或顯著地猝滅。在肽由肽酶或蛋白酶分裂後，可量測螢光之可偵測增加(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

本發明之經標記抗體亦可用作親和性純化劑。在此方法中，使用此項技術中熟知之方法，將經標記抗體固定於諸如Sephadex樹脂或濾紙之固相上。使經固定抗體與含有待純化之抗原之樣品接觸，且其後以會移除除待純化之抗原之外的該樣品中大體上所有物質的適合溶劑洗滌載體，其中該抗原係與固定多肽變異體結合。最終，以會自多肽變異體釋放抗原之另一適合溶劑(諸如甘胺酸緩衝液，pH 5.0)洗滌載體。

標記試劑通常帶有反應性官能基，其可(i)與經半胱胺酸改造之抗體之半胱胺酸硫醇直接反應以形成經標記抗體，(ii)與連接子試劑反應以形成連接子-標記中間物，或(iii)與連接子抗體反應以形成經標記抗體。標記試劑之反應性官能基包括：順丁烯二醯亞胺、鹵乙醯基、碘乙醯胺琥珀醯亞胺酯(例如NHS、N-羥基琥珀醯亞胺)、異硫氰酸酯、磺醯氯、2,6-二氯三嗪基、五氟苯酯及胺基磷酸酯，但亦可使用其他官能基。

一例示性反應性官能基為可偵測標記(例如生物素或螢光染料)之羧基取代基之N-羥基琥珀醯亞胺酯(NHS)。標記之NHS酯可經預成形、分離、純化及/或表徵，或其可原位成形且與抗體之親核基團反應。通常，標記之羧基形式係

藉由與碳化二醯亞胺試劑(例如二環己基碳化二醯亞胺、二異丙基碳化二醯亞胺)或鎓試劑(例如TSTU(四氟硼酸O-(N-琥珀醯亞胺基)-N,N,N',N'-四甲鎓)、HBTU(六氟磷酸(O-苯幷三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎓)或HATU(六氟磷酸O-(7-氮雜苯幷三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎓))、活化劑(諸如1-羥基苯幷三唑(HOBt)及N-羥基琥珀醯亞胺)之一些組合反應來活化以得到標記之NHS酯。在某些情況下，標記及抗體可由標記之原位活化及與抗體之反應來偶合以在一步驟中形成標記-抗體接合物。其他活化及偶合試劑包括TBTU(六氟磷酸2-(1H-苯幷三唑-1-基)-1-1,3,3-四甲鎓)、TFFH(2-氟-六氟磷酸N,N',N'',N'''-四甲鎓)、PyBOP(六氟磷酸苯幷三唑-1-基-氧基-參-吡咯啶-鏻)、EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫-喹啉)、DCC(二環己基碳化二醯亞胺)；DIPCDI(二異丙基碳化二醯亞胺)、MSNT(1-(均三甲苯-2-磺醯基)-3-硝基-1H-1,2,4-三唑)，及芳基磺醯基鹵化物，例如三異丙基苯磺醯氯。

本發明之白蛋白結合肽-Fab化合物：

在一態樣中，本發明之抗體係融合於白蛋白結合蛋白上。血漿-蛋白結合可為改良短期分子之藥物動力性質之有效方式。白蛋白為血漿中最豐富之蛋白。血清白蛋白結合肽(ABP)可改變融合活性域蛋白之藥效，其包括改變組織吸收、滲透及擴散。該等藥效參數可由適當血清白蛋白結合肽序列(US 20040001827)之特異性選擇來調節。藉由噬菌體呈現篩檢來鑑別一系列白蛋白結合肽(Dennis等人.

(2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043；WO 01/45746)。本發明之化合物包括ABP序列，其係由以下文獻教示：(i)Dennis等人(2002) J Biol Chem. 277:35035-35043在表III及表IV處，第35038頁；(ii)US 20040001827在[0076] SEQ ID NOS: 9-22處；及(iii)WO 01/45746在第12-13頁，所有該等文獻係以引用的方式併入本文中。白蛋白結合(ABP)-Fab係以1:1化學計量比(1 ABP/1 Fab)將白蛋白結合肽融合於Fab重鏈之C末端來改造。展示該等ABP-Fab與白蛋白之締合使兔及小鼠中抗體之半衰期增加大於25倍。上述反應性Cys殘基因此可經引入該等ABP-Fab中且用於與細胞毒性藥物位點特異性接合，接著進行活體內動物研究。

例示性白蛋白結合肽序列包括(但不限於)SEQ ID NOS:42-46中列出之胺基酸序列：

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

抗體-藥物接合物

在另一態樣中，本發明提供免疫接合物或抗體-藥物接合物(ADC)，其包含與細胞毒性劑(諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如，細菌、真菌、植物或動物

來源之酶活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即，放射接合物))接合之抗體。在另一態樣中，本發明進一步提供使用該等免疫接合物之方法。在一態樣中，免疫接合物包含與細胞毒性劑或可偵測劑共價連接之上述抗CD22抗體之任一者。

抗體-藥物接合物用於局部遞送細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即在治療癌症中殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)的用途(Syrigos及Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614；Niculescu-Duvaz及Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172；美國專利4,975,278)容許藥物部分向腫瘤之靶向遞送，且在其中細胞內積聚，其中該等未結合藥物劑之全身性投予可對正常細胞以及尋求待消除之腫瘤細胞產生不可接受之毒性程度(Baldwin等人(1986) Lancet pp.(1986年3月15日):603-05；Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review"，在Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications中，A. Pinchera等人(編)，第475-506頁)。因此，尋求最大效用及最小毒性。多株抗體與單株抗體已經報導適用於該等策略中(Rowland等人(1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)。用於該等方法中之藥物包括道諾黴素、多柔比星、甲胺喋呤及長春地辛(Rowland等人(1986)同上文)。抗體-毒素接合物中使用之毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素；植物毒素，諸如蓖麻毒素；小分子毒素，諸如格爾德黴素

(Mandler 等人 (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581；Mandler等人(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028；Mandler 等人 (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、美登素類物 (EP 1391213；Liu等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)，及刺孢黴素(Lode等人(1998) Cancer Res. 58:2928；Hinman等人(1993) Cancer Res. 53:3336-3342)。該等毒素可由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制作用之機制來實現其細胞毒性及細胞生長抑制效應。一些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白受體配位體接合時傾向於不具活性或具有較低活性。

ZEVALIN®(替伊莫單抗，Biogen/Idec)為抗體-放射性同位素接合物，其係由針對見於正常及惡性B淋巴細胞表面上之CD20抗原的鼠IgG1 κ單株抗體及由硫脲連接子-螯合劑結合之^{111}In或^{90}Y放射性同位素組成(Wiseman等人(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77；Wiseman等人(2002) Blood 99(12):4336-42；Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63；Witzig 等人 (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。儘管ZEVALIN具有對抗B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)之活性，但投藥在大多數患者中引起嚴重且長期之血球減少。由連接至刺孢黴素之hu CD33抗體組成之抗體藥物接合物MYLOTARG™(吉妥單抗，Wyeth Pharmaceuticals)於2000年經批准藉由注射來治療急性骨髓白血病(Drugs of the Future (2000) 25(7):686；美國專利第

4970198號；第5079233號；第5585089號；第5606040號；第5693762號；第5739116號；第5767285號；第5773001號)。由經由二硫化物連接子SPP連接至美登素類物藥物部分DM1之huC242抗體組成的抗體藥物接合物康圖單抗美坦辛(Immunogen, Inc.)發展進入用於治療表現CanAg之癌症(諸如結腸癌、胰腺癌、胃癌及其他癌症)之II階段試驗中。由連接至美登素類物藥物部分DM1之抗前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體組成之抗體藥物接合物MLN-2740(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)係處於對前列腺腫瘤之可能治療的開發中。將奧利斯坦汀肽、奧利斯坦汀E(AE)及單甲基奧利斯坦汀(MMAE)(海兔毒素之合成類似物)與嵌合單株抗體cBR96(對癌上之路易斯Y具特異性)及cAC10(對血液惡性疾病上之CD30具特異性)結合(Doronina等人(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)且用於治療開發中。

可用於產生免疫接合物之化學治療劑描述於本文中。可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒素A鏈、相思子毒素A鏈、蒴蓮根毒蛋白(modeccin)A鏈、帚麴菌素(α-sarcin)、桐油樹蛋白(Aleurites fordii protein)、康乃馨蛋白(dianthin protein)、垂商陸蛋白(Phytolaca americana protein)(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、麻楓樹蛋白(curcin)、巴豆素(crotin)、肥皂草(sapaonaria officinalis)

抑制劑、天堂果蛋白(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素(tricothecene)。參見(例如)1993年10月28日公開之WO 93/21232。多種放射性核種可用於產生放射性接合抗體。實例包括^{212}Bi、^{131}I、^{131}In、^{90}Y及^{186}Re。抗體與細胞毒性劑之接合物係使用多種雙官能蛋白偶合劑來製造，該等蛋白偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亞胺硫烷(IT)、亞胺酸酯(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人(1987) Science, 238:1098中所述來製備。經碳-14-標記之1-異硫氰酸基苄基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於接合放射性核苷酸與抗體(WO 94/11026)之例示性螯合劑。

本文中亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素(諸如刺孢黴素、美登素類物、海兔毒素、奧利斯坦汀、單端孢菌毒素(trichothecene)及CC1065，及具有毒素活性之該等毒素之衍生物)的接合物。

美登素及美登素類物(maytansinoids)

在一些實施例中，免疫接合物包含與一或多個美登素類

物分子接合之本發明之抗體(全長或片段)。

美登素類物為藉由抑制微管蛋白聚合而起作用之有絲分裂抑制劑。美登素首先係自東非灌木齒葉美登木(east African shrub Maytenus serrata)分離(美國專利第3896111號)。隨後，發現某些微生物類亦產生美登素類物，諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於(例如)美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號；及第4,371,533號。

美登素類物藥物部分為抗體藥物接合物中吸引人之藥物部分，因為其：(i)相對易於由醱酵產物之醱酵或化學修飾、衍生來製備，(ii)可以適於經由非二硫化物連接子與抗體接合之官能基衍生，(iii)在血漿中穩定，且(iv)有效抗多種腫瘤細胞株。

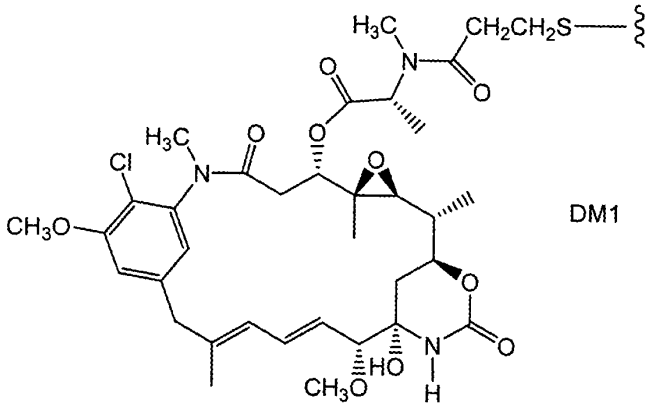
適用作美登素類物藥物部分之美登素化合物在此項技術中為熟知的，且可根據已知方法自天然來源分離，使用遺傳工程技術製備(參見Yu等人(2002) PNAS 99:7968-7973)，或美登醇及美登醇類似物係根據已知方法來合成製備。

例示性美登素類物藥物部分包括具有經修飾芳環之彼等

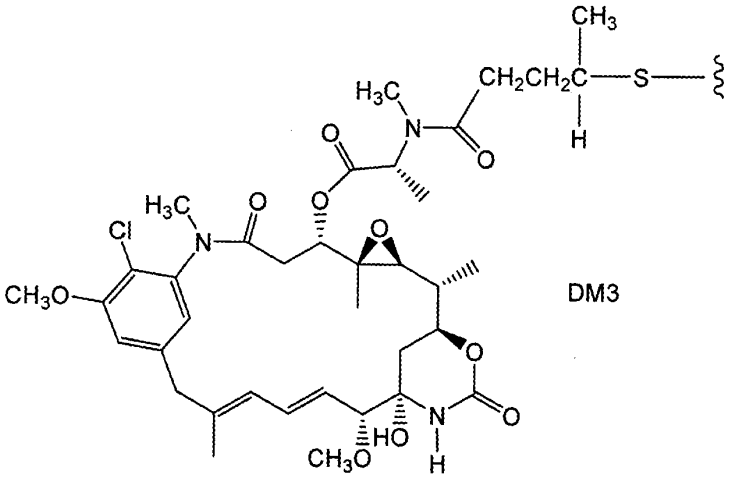
藥物部分，諸如：C-19-去氯(US 4256746)(藉由胺沙托辛(ansamytocin)P2之氫化鋰鋁還原來製備)；C-20-羥基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美國專利第4361650號及第4307016號)(藉由使用鏈黴菌(Streptomyces)或放線菌(Actinomyces)之去甲基作用或使用LAH之去氯作用來製備)；及C-20-去甲氧基、C-20-醯氧基(-OCOR)、+/-去氯(美國專利第4,294,757號)(藉由使用醯基氯之醯化來製備)，及在其他位置處具有修飾之彼等藥物部分。

例示性美登素類物藥物部分亦包括具有修飾之彼等藥物部分，諸如：C-9-SH(US 4424219)(藉由美登醇與H_2S或P_2S_5反應來製備)；C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH_2OR)(US 4331598)；C-14-羥基甲基或醯氧基甲基(CH_2OH或CH_2OAc)(US 4450254)(由Nocardia製備)；C-15-羥基/醯氧基(US 4364866)(由鏈黴菌藉由美登醇之轉化來製備)；C-15-甲氧基(美國專利第4313946號及第4315929號)(自Trewia nudlflora分離)；C-18-N-去甲基(美國專利第4362663號及第4322348號)(由鏈黴菌藉由美登醇之去甲基作用來製備)；及4,5-去氧基(US 4371533)(藉由美登醇之三氯化鈦/LAH還原來製備)。

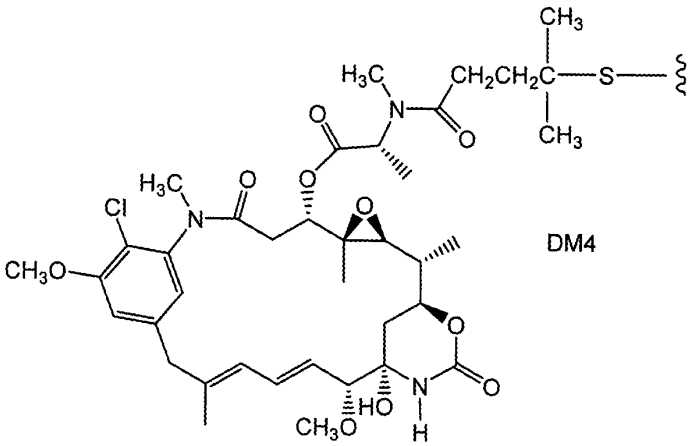
美登素類物藥物部分之例示性實施例包括：DM1；DM3；及DM4，其具有以下結構：



DM1



DM3

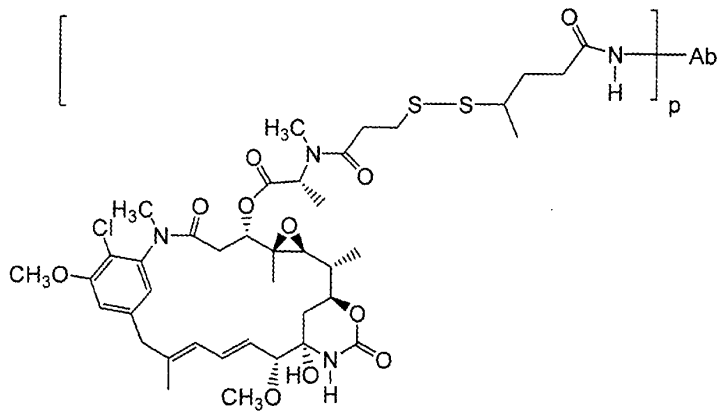


DM4

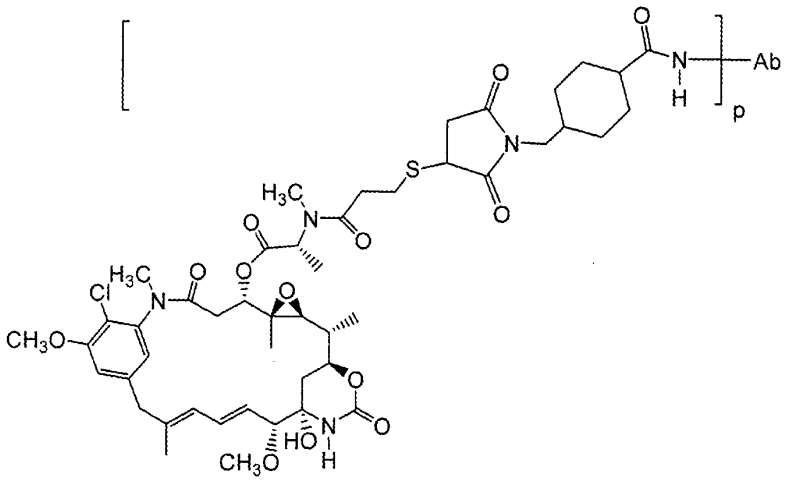
其中波浪線指示藥物之硫原子與抗體藥物接合物之連接子(L)之共價連接。已報導藉由SMCC連接至DM1之

HERCEPTIN®(曲妥珠單抗(trastuzumab)，抗HER2抗體)(WO 2005/037992，其係以引用的方式全部明確併入本文中)。本發明之抗體藥物接合物可根據其中揭示之程序來製備。

其他例示性美登素類物抗體藥物接合物具有以下結構及縮寫，(其中Ab為抗體且p為1至約8)：

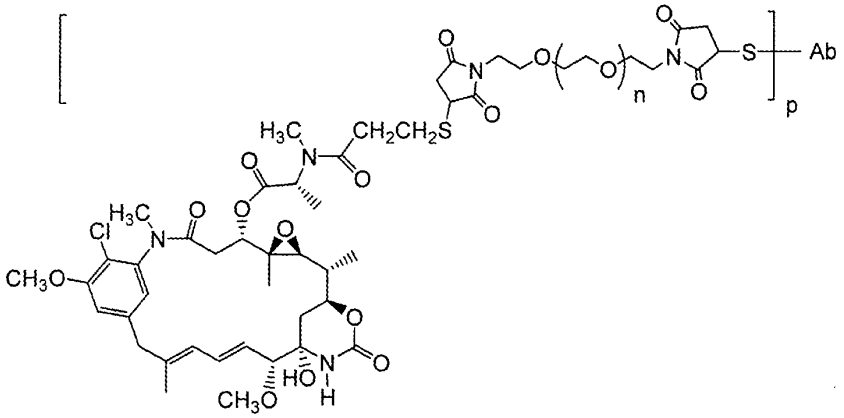


Ab-SPP-DM1



Ab-SMCC-DM1

其中DM1係經由BMPEO連接子與抗體之硫醇基團連接之例示性抗體藥物接合物具有以下結構及縮寫：



其中Ab為抗體；n為0、1或2；且p為1、2、3或4。

含有美登素類物之免疫接合物、製造其之方法，及其治療用途揭示於(例如)美國專利第5,208,020號；第5,416,064號；第6,441,163號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其之揭示內容因此係以引用的方式明確併入本文中。Liu等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)描述包含連接至針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242之美登素類物(稱為DM1)的免疫接合物。已發現接合物對於所培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性，且其在活體內腫瘤生長檢定中展示抗腫瘤活性。Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)描述免疫接合物，其中美登素類物係經由二硫化物連接子與結合至人類結腸癌細胞株上之抗原的鼠抗體A7接合，或與結合HER-2/neu致癌基因之另一鼠單株抗體TA.1結合。於每個細胞表現3×10^5個HER-2表面抗原之人類乳癌細胞株SK-BR-3上活體外測試TA.1-美登素類物接合物的細胞毒性。藥物接合物達成與游離美登素類物藥物類似之細胞毒性程度，該細胞毒性程度可藉由增加每個抗體分子之美登素類物分子之數目而增加。A7-美登素類物接合物在

小鼠中展示低全身性細胞毒性。

抗CD22抗體-美登素類物接合物係藉由將抗體與美登素類物分子化學連接而不伴有抗體或美登素類物分子之生物活性的顯著減低來製備。參見(例如)美國專利第5,208,020號(該專利之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中)。平均每個抗體分子結合3-4個美登素類物分子已展示增強靶向細胞的細胞毒性之效用，而對抗體之功能或溶解性並無不利影響，儘管預期在使用裸抗體時甚至一分子毒素/抗體即可增強細胞毒性。美登素類物在此項技術中為熟知的且可藉由已知技術或自天然來源分離來合成。適當美登素類物揭示於(例如)美國專利第5,208,020號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。較佳美登素類物為美登醇及在美登醇分子之芳環或其他位置處經修飾的美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

存在許多此項技術中已知之連接基團用於製造抗體-美登素類物接合物，其包括(例如)美國專利第5208020號、第6441163號或歐洲專利0 425 235 B1、Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)，及US 2005/0169933 A1中揭示之彼等連接基團，該等文獻之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。包含連接子組份SMCC之抗體-美登素類物接合物可根據2005年5月31日申請之美國專利申請案第11/141344號"Antibody Drug Conjugates and Methods"中所述來製備。如上述專利中所揭示，連接基包括二硫化物基團、硫醚基團、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩

定基團或酯酶不穩定基團。額外連接基團已於本文中描述且例示說明。

抗體與美登素類物之接合物可使用多種雙官能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫烷(IT)、亞胺酸酯(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。尤其較佳之偶合劑包括N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)(Carlsson等人，Biochem. J. 173:723-737 (1978))及N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)以提供二硫鍵。

可視連接類型將連接子連接於美登素類物分子之各種位置處。舉例而言，可使用習知偶合技術藉由與羥基反應形成酯鍵。反應可發生於具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置處。在一較佳實施例中，鍵係形成於美登醇或美登醇類似物之C-3位置處。

在一實施例中，本發明之抗體之任一者(全長或片段)係與一或多個美登素類物分子接合。在免疫接合物之一實施例中，細胞毒性劑D為美登素類物DM1。在免疫接合物之

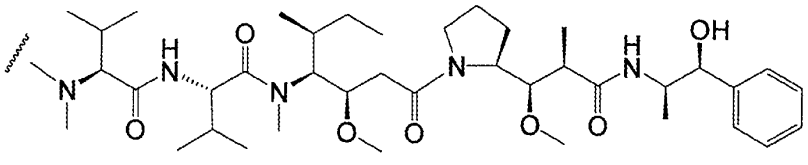
一實施例中，連接子為SMCC。在一實施例中，抗體-連接子-藥物接合物為如本文中所揭示之抗CD22抗體，DM1細胞毒性劑係經由SMCC連接子共價連接至該抗CD22抗體。

奧利斯坦汀及海兔毒素

在一些實施例中，免疫接合物包含與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物、奧利斯坦汀接合之本發明之抗體(美國專利第5635483號；第5780588號)。海兔毒素及奧利斯坦汀已展示干涉微管動力學、GTP水解及核及細胞分裂(Woyke等人(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5663149)及抗真菌活性(Pettit等人(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。海兔毒素或奧利斯坦汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端連接至抗體上(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦汀實施例包括連接單甲基奧利斯坦汀藥物部分DE及DF之N末端，其揭示於"Senter等人，Proceedings of the American Association for Cancer Research，第45卷，文摘號623，提交於2004年3月28日"中，該文獻之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。

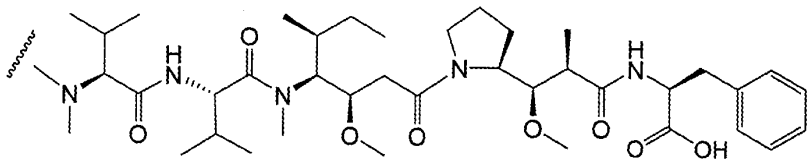
一例示性奧利斯坦汀實施例為MMAE(其中波浪線指示與抗體藥物接合物之連接子(L)之共價連接)。



MMAE

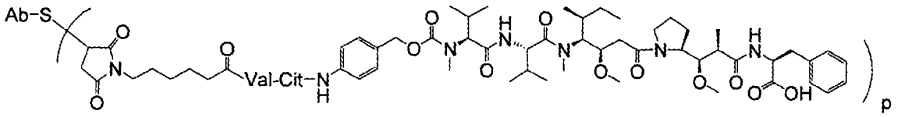
200817434

另一例示性奧利斯坦汀實施例為MMAF，(其中波浪線指示與抗體藥物接合物之連接子(L)之共價連接)(US 2005/0238649)：

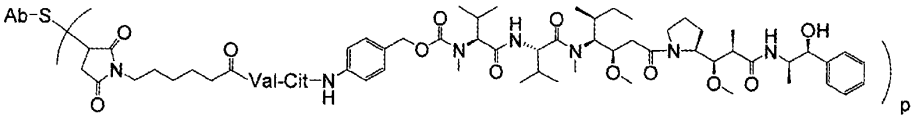


MMAF

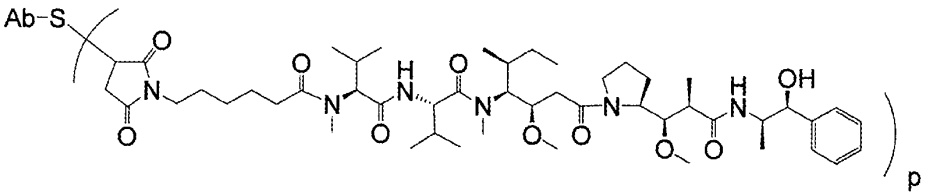
包含MMAE或MMAF及各種連接子組份(在本文中進一步描述)之其他例示性實施例具有以下結構及縮寫(其中Ab意謂抗體且p為1至約8)：



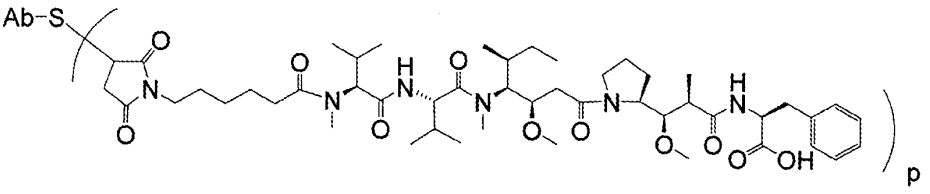
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

通常，基於肽之藥物部分可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。該等肽鍵可(例如)根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參看E. Schröder及K. Lübke, "The Peptides"，第1卷，第76-136頁，1965, Academic Press)來製備。奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分可根據以下文獻之方法來製備：US 5635483；US 5780588；Pettit等人(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit等人(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R.等人，Synthesis, 1996, 719-725；Pettit等人(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784。

刺孢黴素

在其他實施例中，免疫接合物包含與一或多個刺孢黴素分子接合之本發明之抗體。抗生素之刺孢黴素家族能夠在亞皮莫耳濃度下產生雙鏈DNA斷裂。對於製備刺孢黴素家族之接合物而言，參見美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號、第5,877,296號(均歸屬於American Cyanamid Company)。可使用之刺孢黴素之結構類似物包括(但不限於)γ_1^I、α_2^I、α_3^I、N-乙醯基-γ_1^I、PSAG及θ^I_1(Hinman等人，Cancer Research 53:3336-3342 (1993)；Lode等人，Cancer Research 58:2925-2928 (1998)及歸屬於American Cyanamid之上述美國專利)。可與抗體接合之另一抗腫瘤藥物為QFA，其為抗葉酸劑。刺孢黴素

與QFA皆具有細胞內作用位點且不易於跨過質膜。因此，該等藥劑經由抗體介導之內化作用進行細胞吸收極大增強其細胞毒性作用。

其他細胞毒性劑

可與本發明之抗體接合之其他抗腫瘤劑包括BCNU、鏈脲佐菌素(streptozoticin)、長春新鹼及5-氟尿嘧啶(美國專利第5,053,394號、第5,770,710號中所述之共同稱為LL-E33288複合物的藥劑家族)，以及埃斯波黴素(esperamicin)(美國專利5,877,296)。

可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌)、蓖麻毒素A鏈、相思子毒素A鏈、蒴蓮根毒蛋白A鏈、帚麴菌素、桐油樹蛋白、康乃馨蛋白、垂商陸蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻楓樹蛋白、巴豆素、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制劑、天堂果蛋白、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素。參見(例如)1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明進一步涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如，核糖核酸酶或DNA內切酶，諸如脫氧核糖核酸酶；DN酶)之間所形成的免疫接合物。

為選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高放射性原子。多種放射性同位素可用於產生放射接合之抗體。實例包括At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及Lu之放射性同位素。當將接合物用於偵測時，其可包含

用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如tc^{99m}或I^{123}；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱作磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123(此外)、碘-131、銦-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釓、錳或鐵。

可以已知方式將放射性標記或其他標記併入接合物中。舉例而言，肽可經生物合成或可藉由使用適當胺基酸前驅物由化學胺基酸合成(其涉及(例如)以氟-19替代氫)來合成。諸如tc^{99m}或I^{123}、Re^{186}、Re^{188}及In^{111}之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釔-90可經由離胺酸殘基連接。可使用IODOGEN方法(Fraker等人(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)併入碘-123。"Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)詳細地描述其他方法。

抗體與細胞毒性劑之接合物可使用多種雙官能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫烷(IT)、亞胺酸酯(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，Science, 238 : 1098 (1987)中所

述來製備。碳14標記之1-異硫代氰基苄基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於使放射性核苷酸與抗體接合之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。連接子可為促進細胞中之細胞毒性藥物釋放的"可裂解連接子"。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫化物之連接子(Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

本發明之化合物明確涵蓋(但不限於)由以下交叉連接子試劑製備之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及sulfo-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基碸)苯甲酸酯)，其為市售的(例如，來自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。參見2003-2004 Applications Handbook and Catalog，第467-498頁。

製備抗體藥物接合物：

在本發明之抗體藥物接合物(ADC)中，抗體(Ab)係經由連接子(L)與一或多個藥物部分(D)接合，例如每個抗體約1至約20個藥物部分。式I之ADC可使用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑，藉由若干途徑來製備，其包括：(1)抗體之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成Ab-L，接著與藥物部分D反應；及(2)藥物部分

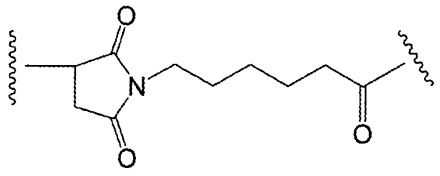
之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成D-L，接著與抗體之親核基團反應。用於製備ADC之額外方法描述於本文中。

$$Ab-(L-D)_p \qquad \text{式I}$$

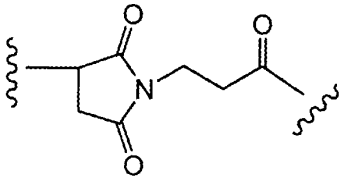
連接子可由一或多種連接子組份組成。例示性連接子組份包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基("MC")、順丁烯二醯亞胺基丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe")、對胺基苄氧基羰基("PAB")、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯("SPP")、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯("SMCC")及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯("SIAB")。額外連接子組份在此項技術為已知的且一些描述於本文中。

在一些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接子組份包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組份之胺基酸殘基包括彼等天然存在者，以及少數胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸連接子組份可經設計且藉由特定酶(例如，與腫瘤相關之蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D，或纖溶酶蛋白酶)使其對於酶裂解之選擇率最佳化。

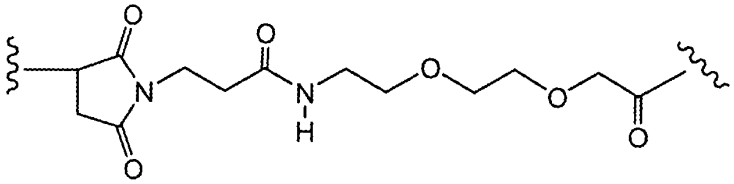
例示性連接子組份之結構展示於下文中(其中波浪線指示與ADC之其他組份共價連接之位點)：



MC

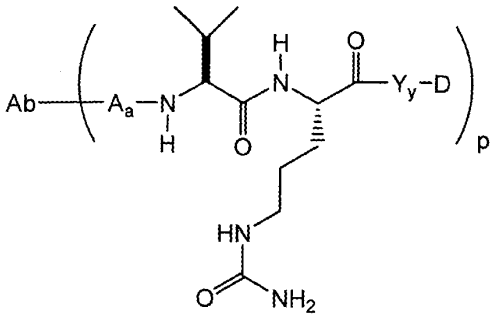


MP

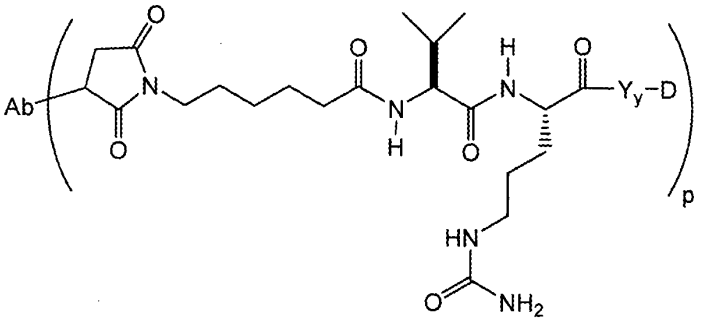


MPEG

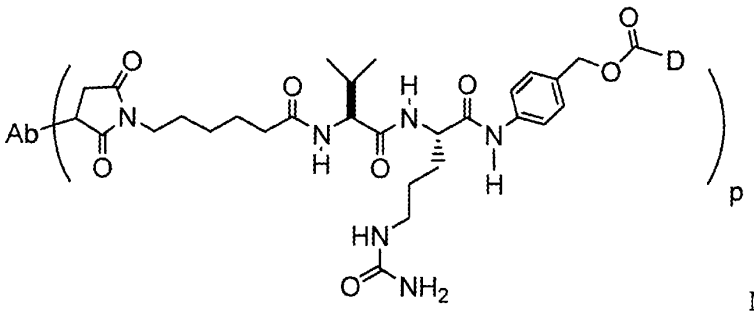
額外例示性連接子組份及縮寫包括(其中抗體(Ab)及連接子經描述，且p為1至約8)：



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

抗體上之親核基團包括(但不限於)：(i)N末端胺基，(ii)側鏈胺基，例如離胺酸，(iii)側鏈硫醇基團，例如半胱胺酸，及(iv)糖羥基或胺基，其中該抗體經糖基化。胺、硫醇及羥基為親核的且能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵，該等連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。某些抗體具有可還原之鏈內二硫化物，亦即半胱胺酸橋。可藉由以諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑處理而使抗體具有與連接子試劑接合之反應性。因此，理論上每一半胱胺酸橋應形成兩個反應性硫醇親核試劑。可經由離胺酸與2-亞胺硫烷(Traut氏試劑)之反應將額外親核基團引入抗體中，從而使胺轉化為硫醇。可藉由引入一個、兩個、三個、四個或四個以上半胱胺酸殘基將反應性硫醇基團引入抗體(或其片段)中(例如，製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之突變體抗體)。

本發明之抗體藥物接合物亦可藉由修飾抗體以引入可與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應之親電子部分來製

備。糖基化抗體之糖可經(例如)過碘酸鹽氧化試劑氧化以形成醛或酮基，其可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應。所得亞胺希夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定鍵，或可經(例如)硼氫化物試劑還原以形成穩定胺鍵。在一實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏過碘酸鈉之反應可在蛋白中產生可與藥物上之適當基團反應的羰基(醛基及酮基)(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白可與偏過碘酸鈉反應，其使得產生醛替代第一胺基酸(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146；US 5362852)。此醛可與藥物部分或連接子親核試劑反應。

同樣，藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵之胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡腙(thiosemicarbazone)、肼羧酸酯及芳基醯肼基團，該等連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。

在另一態樣中，抗體具有可經化學修飾以引入一或多個氫硫基之一或多個離胺酸殘基。該抗體單元經由氫硫基之硫原子與連接子單元鍵結。可用於修飾離胺酸之試劑包括(但不限於)S-乙醯基硫乙酸N-琥珀醯亞胺酯(SATA)及2-亞

胺硫咪鹽酸鹽(Traut氏試劑)。

在另一實施例中，抗體可具有可經化學修飾以具有一或多個氫硫基之一或多個碳水化合物基團。如本文中所揭示，該抗體單元經由氫硫基之硫原子與連接子單元(諸如Stretcher單元)鍵結。

在另一實施例中，抗體可具有一或多個碳水化合物基團，其可經氧化以提供醛基(-CHO)(參見(例如)Laguzza等人，J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55)。相應醛可與Stretcher上之反應性位點形成鍵。可與抗體上之羰基反應之Stretcher上的反應性位點包括(但不限於)肼及羥胺。用於連接或締合藥物單元之關於蛋白質修飾之其他方案描述於Coligan等人，Current Protocols in Protein Science，第2卷，John Wiley & Sons (2002)中，其係以引用的方式併入本文中。

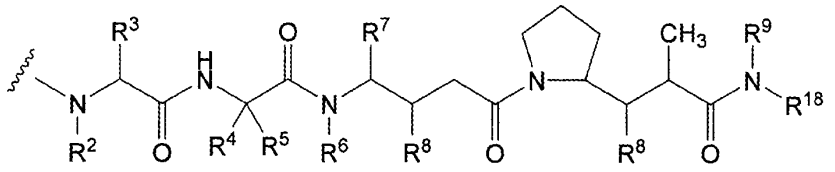
用於接合連接子-藥物部分與細胞靶向蛋白(諸如抗體、免疫球蛋白或其片段)之方法見於(例如)US 5,208,020；US 6,441,163；WO 2005037992；WO 2005081711；及WO 2006/034488中，所有該等文獻係以引用的方式全部明確併入本文中。

或者，包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白可(例如)藉由重組技術或肽合成製得。DNA之長度可包含編碼彼此相鄰或由編碼連接子肽之區域分隔(該分隔不破壞接合物之所需性質)之接合物的兩個部分之各別區域。

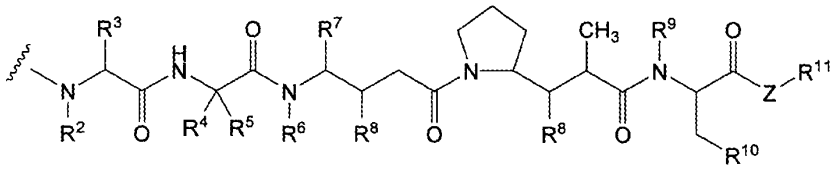
在另一實施例中，抗體可與"受體"(諸如抗生蛋白鏈菌

素)接合以用於腫瘤預靶向中，其中將抗體-受體接合物投予患者，接著使用清除劑自循環中移除未結合之接合物，且隨後投予與細胞毒性劑(例如，放射性核苷酸)接合之"配位體"(例如，抗生蛋白)。

在免疫接合物之一實施例中，細胞毒性劑D為式D_E或D_F之奧利斯坦汀



D_E



D_F

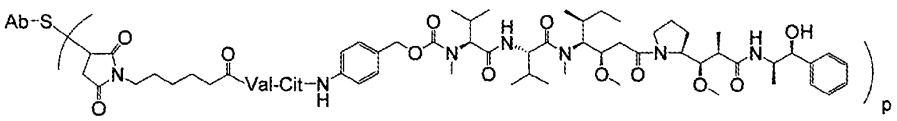
且其中R^2與R^6各自為甲基，R^3與R^4各自為異丙基，R^7為第二丁基，R^8各自獨立地選自CH_3、O-CH_3、OH及H；R^9為H；R^{10}為芳基；Z為-O-或-NH-；R^{11}為H、C_1-C_8烷基，或$-(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3；且R^{18}為$-C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-芳基；且

(d) p在約1至8之範圍內。

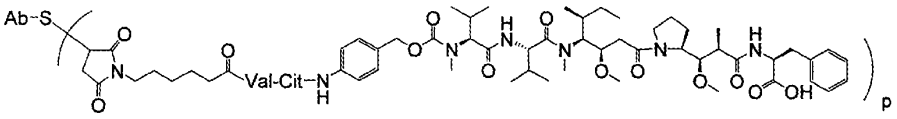
以下實施例進一步提供上述免疫接合物之任一者。在一實施例中，免疫接合物具有活體外或活體內殺細胞活性。在一實施例中，連接子係經由抗體上之硫醇基連接至抗體上。在一實施例中，連接子可由蛋白酶裂解。在一實施例中，連接子包含val-cit二肽。在一實施例中，連接子包含對胺基苄基單元。在一實施例中，該對胺基苄基單元係置

於藥物與連接子中之蛋白酶裂解位點之間。在一實施例中，對胺基苄基單元為對胺基苄氧基羰基(PAB)。在一實施例中，連接子包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基。在一實施例中，6-順丁烯二醯亞胺基己醯基置於抗體與連接子中之蛋白酶裂解位點之間。上述實施例可單獨或與另一實施例任意組合存在。

在一實施例中，藥物係選自MMAE及MMAF。在一實施例中，免疫接合物具有式



其中Ab為上述抗CD22抗體之任一者，S為硫原子，且p在2至5之範圍內。在一實施例中，免疫接合物具有式



其中Ab為上述抗CD22抗體之任一者，S為硫原子，且p在約1至約6、約2至約5、約2至約6、約2至約4、約2至約3、約3至約4、約3至約5、約3至約6，或約4至約6之範圍內。

標記抗體成像方法：

在本發明之另一實施例中，經半胱胺酸改造之抗體可經具有用於具有診斷、藥效及治療應用之成像實驗之放射性核種、螢光染料、生物發光引發物質部分、化學發光引發物質部分、酶及其他偵測標記的半胱胺酸硫醇標記。一般

而言，經標記之經半胱胺酸改造之抗體(亦即"生物標記"或"探針")係藉由注射、灌注或口服攝取投予活有機體(例如人類、齧齒動物或其他小動物)、灌注器官或組織樣品。隨時間過程偵測探針之分布且由影像來表示。

製造物品：

在本發明之另一實施例中，提供一種含有用於治療上述病症之物質的製造物品或"套組"。該製造物品包含一容器及一插入於該容器上或與該容器相關聯之標籤或封裝說明書。適合容器包括(例如)瓶、小瓶、注射器、發泡包裝等。該等容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)成形。容器保持可有效治療病狀之抗體-藥物接合物(ADC)組合物且可具有一無菌入口(例如該容器可為具有一可由一皮下注射針刺穿之塞之靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一活性劑為ADC。標籤或內頁說明書指示該組合物係用於治療所選病狀，諸如癌症。另外或其他，製造物品可進一步包含一第二(或第三)容器，該容器包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如用於注射之抑菌水(BWFI)、硫酸鹽緩衝之鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括自商業及使用者之立場需要之其他物質，該等物質包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

醫藥組合物：

在一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含上述免疫接合物之任一者及醫藥學上可接受之載劑。在一態樣中，提供一種治療B細胞增生性病症之方法，其中該方法包含向

個體投予醫藥組合物。在一實施例中，該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。在一實施例中，該細胞增生性病症與細胞表面上增加之CD22表現相關。

在一態樣中，提供一種抑制細胞增殖之方法，其中該方法包含在容許免疫接合物與CD22結合之條件下使細胞暴露於上述免疫接合物之任一者中。在一實施例中，B細胞為腫瘤細胞。在一實施例中，該腫瘤細胞為經受或懷疑經受B細胞增生性病症之哺乳動物之B細胞，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤，該細胞為異種移植物。在一實施例中，該暴露在活體外發生。在一實施例中，該暴露在活體內發生。

在一態樣中，提供一種使用本發明之抗CD22抗體之方法以檢定一經受白血病或淋巴瘤之哺乳動物中之血清可溶性CD22以診斷B細胞白血病或B細胞淋巴瘤，其量測該疾病之臨床進展或衰退，或評估腫瘤負擔或復發。使用抗CD22 RFB4抗體PE38(綠膿桿菌外毒素A片段38)毒素接合

物(參見Kreitman, R.J.等人，NEJM 345:241-247 (2001))之該等方法揭示於US 20050244828(Kreitman, R.J.等人，其之全部內容係以引用的方式併入本文中)中。

【實施方式】

本發明提供與CD22結合之經分離抗體。進一步提供包含抗CD22抗體的免疫接合物。進一步提供經半胱胺酸改造之抗CD22抗體及其免疫接合物。本發明之抗體及免疫接合物適用於(例如)診斷或治療與改變之表現(例如，增加之CD22表現)相關的病症。在某些實施例中，本發明之抗體或免疫接合物適於診斷或治療細胞增生性病症，諸如腫瘤或癌症。在某些實施例中，本發明之抗體或免疫接合物適於偵測CD22，例如，表現於細胞表面上之CD22。

提供編碼抗CD22抗體之聚核苷酸。提供包含編碼抗CD22抗體之聚核苷酸的載體，且提供包含該等載體之宿主細胞。亦提供包括包含本發明之聚核苷酸、抗CD22抗體或免疫接合物之任一者或多者之醫藥調配物的組合物。

通用技術

本文中描述或參考之技術及程序一般為吾人充分瞭解且常使用熟習此項技術者習知之方法來使用，諸如以下文獻中描述之廣泛利用之方法：Sambrook等人，**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等人編，(2003))；系列**Methods in Enzymology** (Academic

Press, Inc.): **Pcr 2: A Practical Approach** (M. J. MacPherson, B. D. Hames及G. R. Taylor編，(1995)), Harlow及Lane編，(1988) **Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture** (R. I. Freshney編，(1987))；**Oligonucleotide Synthesis** (M. J. Gait編，1984)；**Methods in Molecular Biology**, Humana Press；**Cell Biology: A Laboratory Notebook** (J. E. Cellis編，1998) Academic Press；**Animal Cell Culture** (R. I. Freshney)編，(1987)；**Introduction to Cell and Tissue Culture** (J. P. Mather及P. E. Roberts, 1998) Plenum Press；**Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures** (A. Doyle, J. B. Griffiths及D. G. Newell編，1993-8)J. Wiley and Sons；**Handbook of Experimental Immunology** (D. M. Weir及C. C. Blackwell編)；**Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells** (J. M. Miller及M. P. Calos編，1987)；**PCR: The Polymerase Chain Reaction,** (Mullis等人編，1994)；**Current Protocols in Immunology** (J. E. Coligan等人編，1991)；**Short Protocols in Molecular Biology** (Wiley及Sons, 1999)；**Immunobiology** (C. A. Janeway及P. Travers, 1997)；**Antibodies** (P. Finch, 1997)；**Antibodies: A Practical Approach** (D. Catty.編，IRL Press, 1988-1989)；**Monoclonal Antibodies: A Practical Approach** (P. Shepherd及C. Dean編，Oxford University Press, 2000)；**Using Antibodies: A Laboratory**

Manual (E. Harlow及D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999))；**The Antibodies** (M. Zanetti及J. D. Capra編，Harwood Academic Publishers, 1995)；及 **Cancer: Principles and Practice of Oncology** (V. T. DeVita等人編，J. B. Lippincott Company, 1993)。

定義及縮寫

定義

"經分離"抗體為已經識別且自其天然環境之組份中分離及/或回收的抗體。其天然環境之污染物組份為會干擾該抗體之研究、診斷或治療用途的物質，且可包括酶、激素及其他蛋白或非蛋白溶質。在一些實施例中，如由(例如)Lowry方法所測定，抗體(1)經純化至大於抗體之95重量%，且在一些實施例中，經純化至大於99重量%；(2)藉由使用(例如)一自旋杯式序列分析儀經純化至足以獲得N末端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度，或(3)在還原性或非還原性條件下使用(例如)庫馬斯藍(Coomassie blue)或銀染色經純化至均質(根據SDS-PAGE)。因為抗體天然環境之至少一種組份將不存在，所以經分離之抗體包括在重組細胞內之原位抗體。然而，經分離抗體通常將藉由至少一個純化步驟來製備。

"經分離"核酸分子為(例如)在其天然環境中自其通常締合之至少一種其他核酸分子分離的核酸分子。經分離核酸分子進一步包括包含於通常表現核酸分子之細胞中之核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或與其天然染色體位

置不同之染色體位置處。

"經純化"意謂分子係以包含其之樣品之至少95重量%或至少98重量%的濃度存在於樣品中。

如本文中所使用，術語"大體上類似"或"大體上相同"表示兩個數值之間足夠高程度的相似性(例如，一數值與本發明之抗體相關而另一數值與參考/比較抗體相關)，以使得熟習此項技術者會認為在藉由該等值(例如Kd值)所量測之生物特徵之範圍內兩值之間的差異具有很小或沒有生物學及/或統計學意義。隨參考/比較值而變化的該兩個值之間的差異(例如)小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%及/或小於約10%。

如本文中所使用，短語"大體上降低"或"大體上不同"表示兩個數值(通常一數值與一分子相關且另一數值與參考/比較分子相關)之間具有足夠高程度的差異，以使得熟習此項技術者會認為在藉由該等值(例如，Kd值)所量測之生物特徵之範圍內該兩個值之間的差異具有統計學意義。隨參考分子/比較分子之值而變化的該兩個值之間的差異(例如)大於約10%、大於約20%、大於約30%、大於約40%及/或大於約50%。

如本文中所使用，術語"載體"意欲指能夠轉運其所連接之另一核酸分子之核酸分子。一類載體為"質體"，其係指其中可連接額外DNA區段之環形雙鏈DNA。另一類載體為噬菌體載體。另一類載體為病毒載體，其中額外DNA區段可連接至該病毒基因組中。某些載體能夠在其經引入之宿

主細胞中自主複製(例如，具有複製之細菌起源之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其它載體(例如，非游離型哺乳動物載體)可在引入該宿主細胞之後整合至宿主細胞之基因組中，且進而連同宿主基因組一起經複製。此外，某些載體能夠指導其可操作性連接之基因之表現。該等載體在本文中稱作"重組表現載體"(或僅"表現載體")。一般而言，用於重組DNA技術中之表現載體常為質體之形式。在本說明書中，"質體"與"載體"可互換使用，因為質體為最常用之載體形式。

如本文中可互換使用之"聚核苷酸"或"核酸"係指任何長度之核苷酸之聚合物，且包括DNA及RNA。該等核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基，及/或其類似物，或可藉由DNA或RNA聚合酶或藉由合成反應併入聚合物中之任何基質。聚核苷酸可包含經修飾核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。存在時，可在組裝聚合物之前或之後進行核苷酸結構之修飾。核苷酸序列可由非核苷酸組份中斷。聚核苷酸可包含在合成之後進行之修飾，諸如與標記接合。其他類型之修飾包括(例如)"帽子"；一或多個天然存在核苷酸經類似物取代；核苷酸間修飾，諸如具有不帶電荷之鍵者(例如，膦酸甲酯、磷酸三酯、磷醯胺酸、胺基甲酸酯等)及具有帶電荷之鍵者(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、含有附屬部分者(諸如蛋白(例如，核酸酶、毒素、抗體、信號肽、ply-L-離胺酸等))、具有插層劑者(例如吖啶、補骨脂素等)、含有螯合

劑者(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)、含有烷化劑者、具有經修飾之鍵者(例如α變旋異構核酸等);以及聚核苷酸之未經修飾形式。此外,通常存在於糖中之任何羥基均可經(例如)膦酸酯基、磷酸酯基置換,經標準保護基團保護,或經活化以製備與額外核苷酸連接之額外鍵,或可與固體或半固體支撐物接合。5'及3'末端OH可經磷酸化或經胺或具有1至20個碳原子之有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生為標準保護基團。聚核苷酸亦可含有此項技術中通常已知之核糖或脫氧核糖之類似形式,包括(例如)2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、α-變旋異構糖、差向異構糖(諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖(lyxose))、哌喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、非環狀類似物及基本核苷類似物(諸如甲基核糖苷)。一或多種磷酸二酯鍵可經替代連接基團置換。該等替代連接基團包括(但不限於)其中磷酸酯經P(O)S("硫代酯")、P(S)S("二硫代酯")、(O)NR_2("醯胺化物")、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH_2("甲縮醛")置換之實施例,其中R或R'各自獨立地為H或視情形含有醚(-O-)鍵之經取代或未經取代烷基(1-20個C)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基(araldyl)。聚核苷酸中之所有鍵無需相同。前述描述適用於本文所提及之所有聚核苷酸,其包括RNA及DNA。

如本文中所使用之"寡核苷酸"通常係指長度通常(但非必需)小於約200個核苷酸之短的、通常為單鏈、通常合成之聚核苷酸。術語"寡核苷酸"及"聚核苷酸"並不相互排除。

上文關於聚核苷酸之描述同樣且完全適用於寡核苷酸。

關於參考多肽序列之"胺基酸序列一致性百分比(%)"經定義為在比對序列且(若需要)引入缺口後(以達成最大序列一致性百分比且不將任何保守性取代視作序列一致性之部分)，與參考多肽序列中胺基酸殘基相同之候選序列中胺基酸殘基的百分比。為測定胺基酸序列一致性百分比之目的的比對可以此項技術內之多種方式達成，例如使用公用電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可測定用於比對序列之適當參數，其包括為獲得所比較之序列之全長的最大比對所需之任何算法。然而，出於本文中之目的，胺基酸序列一致性%值係使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生。該ALIGN-2序列比較電腦程式之作者為Genentech, Inc.，且原始碼已以使用者文件向美國版權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559申請，其中其係以美國版權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式係公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可由原始碼編譯。ALIGN-2程式應經編譯用於一UNIX操作系統上，較佳數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且並未改變。

在其中ALIGN-2用於胺基酸序列比較之情況下，給定胺基酸序列A與給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%(其或者可表示為具有或包含與給定胺基酸序列B具有某%胺基酸序列一致性的給定胺基酸序列A)計算如下：

100乘以分數X/Y

其中X為在A與B之彼程式比對中由序列比對程式ALIGN-2記為相同匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應瞭解在胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度時，A與B之胺基酸序列一致性%應不等於B與A之胺基酸序列一致性%。除非另外特定說明，否則本文中使用之所有胺基酸序列一致性%值係使用ALIGN-2電腦程式如前一段落中所述來獲得。

本文中"B細胞表面標記"或"B細胞表面抗原"為可以與其結合之拮抗劑靶向之表現於B細胞表面上的抗原，其中該拮抗劑包括(但不限於)B細胞表面抗原或能夠拮抗配位體與天然存在B細胞抗原之結合之B細胞表面抗原的可溶形式之抗體。例示性B細胞表面標記包括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及CD86白血球表面標記(關於描述，參見The Leukocyte Antigen Facts Book，第2版，1997，Barclay等人編，Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)。其他B細胞表面標記包括RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、BAFF、BLyS、Btig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA及239287。與哺乳動物之其他非B細胞組織相比，

特別關注之B細胞表面標記優先表現於B細胞上且可表現於前驅B細胞與成熟B細胞上。

如本文中所使用，術語"CD22"係指來自任何脊椎動物(除非另外指示，否則其包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類、獼猴(cyno))及齧齒動物(例如，小鼠及大鼠))來源之任何天然CD22。該術語涵蓋"全長"、未經處理之CD22以及由在細胞中處理產生之任何形式之CD22。該術語亦涵蓋CD22之天然存在變異體，例如，剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物。CD22之主要同功異型物(CD22β)包含847個胺基酸及細胞外域中之七個類免疫球蛋白區(參見Wilson, G.L.等人，J. Exp. Med. 173:137-146 (1991))。次要同功異型物CD22α包含647個胺基酸且在細胞外域中缺乏類免疫球蛋白域3及4(參見Stamenkovic, I.及Seed, B., Nature 345:74-77(1990)及Wilson等人(1991)，同上文)。CD22 β之胺基酸序列描述於圖1B中，其中加底線部分為細胞外域(ECD)且斜體部分指示自CD22 α細胞外域序列失去之胺基酸。圖1C描述CD22α之胺基酸序列，其中ECD加底線。胺基酸1至胺基酸21之胺基酸序列表示自蛋白質之成熟形式分裂之信號序列。在一實施例中，CD22表現於細胞表面上，諸如正常B細胞或腫瘤B細胞表面上。圖1D描述來自獼猴之CD22之胺基酸序列。

"抗體"(Ab)及"免疫球蛋白"(Ig)為具有類似結構特徵之糖蛋白。儘管抗體顯示與特異性抗原之結合特異性，但免疫球蛋白包括通常缺乏抗原特異性之抗體與其他類抗體分

200817434

子。後一種多肽係(例如)由淋巴系統以低含量產生且由骨髓瘤以增加之含量產生。

術語"抗體"及"免疫球蛋白"就最廣泛之含義而言可互換使用，且包括單株抗體(例如，全長或完整單株抗體)、多株抗體、單價抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體，只要其展現所需生物學活性即可)，且亦可包括某些抗體片段(如本文中更詳細地描述)。抗體可為嵌合抗體、人類抗體、人類化抗體及/或親和力成熟抗體。

術語"抗CD22抗體"或"與CD22結合之抗體"係指能夠在足夠親和力下結合CD22以使得抗體適用作靶向CD22之診斷劑及/或治療劑的抗體。抗CD22抗體與無關之非CD22蛋白之結合程度較佳小於如由(例如)一放射免疫測定(RIA)所量測之抗體與CD22之結合的約10%。在某些實施例中，與CD22結合之抗體具有≤1 μM、≤100 nM、≤10 nM、≤1 nM或≤0.1 nM的解離常數(Kd)。在某些實施例中，抗CD22抗體與保留於來自不同物種之CD22內之CD22的抗原決定基結合。

抗體之"可變區"或"可變域"係指該抗體之重鏈或輕鏈之胺基末端域。重鏈之可變域可被稱作"VH"。輕鏈之可變域可被稱作"VL"。該等域通常為抗體之最可變部分且含有抗原結合位點。

術語"可變"係指抗體間可變域之某些部分的序列廣泛不同且該等部分用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。然而，該可變性並非均勻分布於抗體之整個可變域

上。其集中於被稱作互補判定區(CDR)或輕鏈與重鏈可變域兩者中之高變區(HVR)的三個區段。可變域之更高度保守部分稱作框架區(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個FR區，FR區很大程度上採用β片層組態，其藉由3個形成環連接且在某些情況下形成部分β片層結構的CDR來連接。各鏈中之CDR係由FR區以緊密接近之方式固持在一起，且來自其他鏈之CDR有助於形成抗體之抗原結合位點(參看Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恆定域不直接包括於抗體與抗原之結合中，但顯示各種效應物功能，例如使抗體具有抗體依賴性細胞毒性。

來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)之"輕鏈"基於其恆定域之胺基酸序列可歸類為兩種明顯不同類型(稱作κ及λ)之一者。

視其重鏈之恆定域之胺基酸序列而定，可將抗體(免疫球蛋白)分為不同種類。存在五種主要種類之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且若干該等種類可進一步分為亞類(同型)，例如，IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1及IgA_2。對應於不同種類之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別被稱作α、δ、ε、γ及μ。不同種類之免疫球蛋白之亞單位結構及三維組態為熟知的且通常描述於(例如)Abbas等人，Cellular and Mol. Immunology，第4版(2000)中。抗體可為藉由抗體與一或多個其他蛋白或肽共價或非共價締合

所形成之較大融合分子的部分。

術語"全長抗體"、"完整抗體"及"整個抗體"在本文中可互換使用，其係指呈其大體上完整形式之抗體，而並非如下文所定義之抗體片段。該等術語尤其係指具有含有Fc區之重鏈的抗體。

"抗體片段"僅包含完整抗體的一部分，其中該部分保留當存在於完整抗體中時通常與彼部分相關的至少一種且多達大部分或所有功能。在一實施例中，抗體片段包含完整抗體之抗原結合位點且因此保留結合抗原之能力。在另一實施例中，抗體片段(例如包含Fc區者)保留當存在於完整抗體中時通常與Fc區相關之至少一種生物功能，諸如FcRn結合、抗體半衰期調節、ADCC功能及補體結合。在一實施例中，抗體片段為具有大體上與完整抗體類似之活體內半衰期的單價抗體。舉例而言，此抗體片段可包含於與能夠賦予該片段以活體內穩定性之Fc序列連接的抗原結合臂上。

由木瓜酵素消化抗體產生各具有單一抗原結合位點之兩個相同的抗原結合片段(被稱為"Fab"片段)，及殘餘"Fc"片段，其名稱反映其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原組合位點且仍能夠交聯抗原之$F(ab')_2$片段。

"Fv"為含有完整抗原結合位點之最小抗體片段。在一實施例中，兩鏈Fv種類係由緊密、非共價締合之一重鏈可變域及一輕鏈可變域之二聚體組成。在單鏈Fv(scFv)種類中，一重鏈可變域與一輕鏈可變域可藉由可撓性肽連接子

共價連接，以使得輕鏈與重鏈可以與兩鏈Fv種類中的結構類似之"二聚"結構締合。各可變域之三個CDR在此組態中相互作用以界定VH-VL二聚體表面上之抗原結合位點。總之，六個CDR賦予抗體以抗原結合特異性。然而，甚至單一可變域(或半數僅包含三個抗原特異性CDR的Fv)亦具有識別且結合抗原之能力，儘管其與抗原之結合親和力比整個結合位點之親和力低。

Fab片段含有重鏈可變域及輕鏈可變域且亦含有輕鏈恆定域及第一重鏈恆定域(CH1)。Fab'片段藉由在重鏈CH1域之羧基末端添加一些包括來自抗體鉸鏈區之一或多個半胱胺酸的殘基而與Fab片段不同。Fab'-SH為本文中關於其中恆定域之半胱胺酸殘基具有游離硫醇基之Fab'的名稱。$F(ab')_2$抗體片段最初以Fab'片段對之形式產生，其間具有鉸鏈半胱胺酸。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之VH域及VL域，其中該等域存在於單一多肽鏈中。通常，scFv多肽進一步包含介於VH域與VL域之間的多肽連接子，其使得scFv能夠形成抗原結合所需之結構。關於scFv之概述，參見Pluckthun，於The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)中。

術語"雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含連接至同一多肽鏈(VH-VL)內之輕鏈可變域(VL)的重鏈可變域(VH)。藉由使用過短而使得同一

鏈上之兩個域之間無法配對的連接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體可為二價或雙特異性的。雙功能抗體更完全地描述於(例如)EP 404,097；WO 93/1161；Hudson等人(2003) Nat. Med. 9:129-134；及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)中。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人(2003) Nat. Med. 9:129-134中。

如本文中所使用之術語"單株抗體"係指自大體上同種抗體的群體(意即構成群體之個別抗體除可少量存在之可能突變(例如，天然存在突變)之外為相同的)獲得之抗體。因此，修飾語"單株"指示抗體並非作為離散抗體之混合物的特性。在某些實施例中，此單株抗體通常包括包含結合標靶之多肽序列的抗體，其中該標靶結合多肽序列係藉由包括自複數個多肽序列選擇單一標靶結合多肽序列的方法來獲得。舉例而言，選擇過程可為自複數個純系選擇唯一純系，諸如一池融合瘤純系、噬菌體純系或重組DNA純系。應瞭解可進一步改變所選標靶結合序列以(例如)改良對標靶之親和力，人類化該標靶結合序列，改良其在細胞培養中之產量，降低其在活體內之免疫原性，產生多特異性抗體等，且包含已改變之標靶結合序列的抗體亦為本發明之單株抗體。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。除其特異性之外，單株抗體製劑之優勢在於其通常未受其他免疫球蛋白污染。

修飾語"單株"指示抗體獲自大體上同種抗體群體的特性，且不應理解為要求由任何特殊方法來製造該抗體。舉例而言，根據本發明待使用之單株抗體可由若干技術製造，該等技術包括(例如)融合瘤法(例如，Kohler等人，Nature, 256: 495 (1975)；Harlow等人，Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版，1988)；Hammerling等人，在Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier, N.Y., 1981)中)；重組DNA法(參見(例如)美國專利第4,816,567號)；噬菌體呈現技術(參見(例如)Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)；Marks等人，J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)；Sidhu等人，J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)；Lee等人，J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004)；及Lee等人，J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004))；及在動物中產生具有部分或全部編碼人類免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白部位或基因之人類抗體或類人類抗體的技術(參見(例如)WO 98/24893；WO 96/34096；WO 96/33735；WO 91/10741；Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature 362: 255-258 (1993)；Bruggemann等人，Year in Immunol. 7:33 (1993)；美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,661,016號；Marks等

人，Bio. Technology 10: 779-783 (1992)；Lonberg等人，Nature 368: 856-859 (1994)；Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)；Fishwild等人，Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)及Lonberg及Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995))。

本文中之單株抗體特定包括"嵌合"抗體，其中一部分重鏈及/或輕鏈與來源於特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體中的相應序列相同或同源，而該(該等)鏈之其餘部分與來源於另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體中的相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現所需生物學活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。

"人類化"形式之非人類(例如鼠)抗體為含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在一實施例中，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體高變區之殘基經具有所需特異性、親和性及/或能力之來自非人類物種(供體抗體)(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)之高變區的殘基置換。在某些情況下，人類免疫球蛋白之框架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含未見於受體抗體或供體抗體中之殘基。可進行該等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體應包含至少一個且通常兩個可變域之大體上所有序

列，其中所有或大體上所有高變環與非人類免疫球蛋白之彼等相對應，且所有或大體上所有FR為人類免疫球蛋白序列之彼等序列。人類化抗體視情況亦應包含至少一部分免疫球蛋白恆定區(Fc)，其通常為人類免疫球蛋白之恆定區。其他細節參見Jones等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，Nature 332:323-329 (1988)；及Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。亦參見以下概述文章及其中引用之文獻：Vaswani及Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

"人類抗體"為具有與由人類產生及/或已使用如本文中所揭示之用於製造人類抗體之任何技術製得的抗體之胺基酸序列相應之胺基酸序列的抗體。此關於人類抗體之定義特定排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

術語"高變區"、"HVR"或"HV"在本文中使用時係指序列高變且/或形成結構上界定之環的抗體可變域之區域。一般而言，抗體包含六個高變區；三個在VH(H1、H2、H3)中，且三個在VL(L1、L2、L3)中。在天然抗體中，H3及L3顯示六個高變區之最大差異，且尤其咸信H3在賦予抗體優良特異性中起獨特作用。Xu等人.(2000) Immunity 13:37-45；Johnson及Wu (2003)在Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo編，Human Press, Totowa, NJ)中。實際上，僅由重鏈組成之天然存在駱駝種系抗體在不存在輕

鏈之情況下為官能性且穩定的。Hamers-Casterman等人. (1993) Nature 363:446-448；Sheriff等人.(1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736。

本文中使用且涵蓋許多關於高變區之描繪。Kabat互補判定區(CDR)係基於序列變異性且最常使用(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。而Chothia指出結構環之位置(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高變區表示Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷，且由Oxford Molecular之AbM抗體模型化軟體使用。"接觸"高變區係基於對可用複合晶體結構之分析。來自該等高變區中之每一者之殘基如下所示。

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
----	-----	---	--------	-------
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	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
	(Kabat編號)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia編號)			
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

高變區可包含"延伸之高變區"，如下：VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97或89-96(L3)及VH中之26-35(H1)、50-65或49-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。可變域殘基係根據Kabat等人(同上文)關於該等定義中之每一者編號。本發明之抗CD22 10F4抗體之HVR-H1及HVR-H2高變區為使用Kabat編號之H26-H35及H49-H65。

"框架"或"FR"殘基為除如本文中所定義之高變區殘基之外的彼等可變域殘基。

術語"如Kabat中之可變域殘基編號"或"如Kabat中之胺基酸位置編號"及其變化形式係指用於Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中編譯抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有與可變域之FR或HVR的縮短或插入其中相對應之較少或額外胺基酸。舉例而言，重鏈可變域可在H2之殘基52後包括單一胺基酸插入(根據Kabat之殘基52a)且在重鏈FR殘基82後插入殘基(例如根據Kabat之殘基82a、82b及82c等)。對於給定抗體，殘基之Kabat編號可藉由將抗體序列之同源性區域與"標準"Kabat編號序列比對來確定。

"自由半胱胺酸胺基酸"係指經改造進入親本抗體中之半胱胺酸胺基酸殘基具有硫醇官能基(-SH)，且未經配對(或相反)為分子內或分子間二硫橋鍵之部分。

術語"硫醇反應性值"為自由半胱胺酸胺基酸之反應性之定量表徵。硫醇反應性值為經半胱胺酸改造之抗體中與硫醇反應性試劑反應且轉變為1之最大值之自由半胱胺酸胺基酸的百分比。舉例而言，經半胱胺酸改造之抗體上之自由半胱胺酸胺基酸以100%產率與硫醇反應性試劑(諸如生物素-順丁烯二醯亞胺試劑)反應以形成經生物素標記之抗體，其具有1.0之硫醇反應性值。經改造進入相同或不同親本抗體中之另一半胱胺酸胺基酸以80%產率與硫醇反應性試劑反應，其具有0.8之硫醇反應性值。經改造進入相同或不同親本抗體中之另一半胱胺酸胺基酸完全不能與硫醇反應性試劑反應，其具有0之硫醇反應性值。特定半胱胺酸之硫醇反應性值之測定可藉由ELISA檢定、質譜、液相層析、自動放射照相術或其他定量分析測試進行。容許捕捉經半胱胺酸改造之抗體並比較且定量半胱胺酸反應性的硫醇反應性試劑包括生物素-PEO-順丁烯二醯亞胺((+)-生物素基-3-順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基-3,6-二氧雜辛二胺，Oda等人(2001) Nature Biotechnology 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.)、生物素-BMCC、PEO-碘乙醯基生物素、碘乙醯基-LC-生物素及生物素-HPDP(Pierce Biotechnology, Inc.)，及Nα-(3-順丁烯二醯亞胺基丙醯基)生物胞素(MPB, Molecular Probes, Eugene, OR)。經結合生物素、雙官能及多官能連接子試劑之其他商業來源包括Molecular Probes, Eugene, OR及Sigma, St. Louis, MO。

"親本抗體"為包含一或多個胺基酸殘基經一或多個半胱

胺酸殘基置換之胺基酸序列的抗體。該親本抗體可包含天然或野生型序列。相對於抗體之其他天然、野生型或經修飾形式，親本抗體可具有預先存在之胺基酸序列修飾(諸如添加、缺失及/或取代)。親本抗體可針對所關注之靶向抗原，例如生物學上重要之多肽。亦涵蓋針對非多肽抗原之抗體(諸如與腫瘤相關之糖脂抗原；參見US 5091178)。

以下縮寫在本文中使用且具有指示之定義：BME為β-巯基乙醇，Boc為N-(第三丁氧羰基)，cit為瓜胺酸(2-胺基-5-脲基戊酸)，dap為多拉普因(dolaproine)，DCC為1,3-二環己基碳化二醯亞胺，DCM為二氯甲烷，DEA為二乙胺，DEAD為偶氮二甲酸二乙酯，DEPC為磷醯基氰酸二乙酯，DIAD為偶氮二甲酸二異丙酯，DIEA為N,N-二異丙基乙胺，dil為多拉異白胺酸(dolaisoleucine)，DMA為二甲基乙醯胺，DMAP為4-二甲基胺基吡啶，DME為乙二醇二甲醚(或1,2-二甲氧基乙烷)，DMF為N,N-二甲基甲醯胺，DMSO為二甲亞碸，doe為dolaphenine(α-(噻唑基)苯乙基胺基)，dov為N,N-二甲基纈胺酸，DTNB為5,5'-二硫基雙(2-硝基苯甲酸)，DTPA為二伸乙基三胺五乙酸，DTT為二硫蘇糖醇，EDCI為1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二醯亞胺鹽酸鹽，EEDQ為2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉，ES-MS為電噴質譜分析，EtOAc為乙酸乙酯，Fmoc為N-(9-芴基甲氧基羰基)，gly為甘胺酸，HATU為六氟磷酸O-(7-氮雜苯幷三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎓，HOBt為1-羥基苯幷三唑，HPLC為高壓液相層析，ile為異白胺酸，lys為離胺

酸，MeCN(CH_3CN)為乙腈，MeOH為甲醇，Mtr為4-大茴香基二苯基甲基(或4-甲氧基三苯甲基)，nor為(1S,2R)-(+)-去甲麻黃鹼，PAB為對胺基苄基胺甲醯基，PBS為磷酸鹽緩衝之鹽水(pH 7)，PEG為聚乙二醇，Ph為苯基，Pnp為對硝基苯基，MC為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基，phe為L-苯丙胺酸，PyBrop為溴基參吡咯啶基鏻六氟磷酸鹽，SEC為尺寸排阻層析，Su為琥珀醯亞胺，TFA為三氟乙酸，TLC為薄層層析，UV為紫外線，且val為纈胺酸。

"親和力成熟"之抗體為在其一或多個HVR中具有一或多種變化之抗體，與不具有彼等變化之親本抗體相比，該等變化使得抗體對抗原之親和性得以改良。在一實施例中，親和力成熟抗體對靶向抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳(picomolar)之親和力。親和力成熟抗體係藉由此項技術中已知之程序產生。Marks等人，Bio/Technology 10:779-783 (1992)描述由VH及VL域改組引起之親和力成熟。HVR及/或框架殘基之隨機突變係由以下文獻描述：Barbas等人，Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，Gene 169:147-155 (1995)；Yelton等人，J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

"阻斷"抗體或"拮抗劑"抗體為抑制或降低其所結合之抗原之生物活性的抗體。某些阻斷抗體或拮抗劑抗體大體上或完全抑制抗原之生物活性。

如本文中所使用，"促效劑"抗體為模擬所關注多肽之至少一種功能活性的抗體。

抗體"效應功能"係指可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變異Fc區)之彼等生物活性，且其隨抗體同型而改變。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調；及B細胞活化。

"Fc受體"或"FcR"描述與抗體之Fc區結合的受體。在一些實施例中，FcR為天然人類FcR。在一些實施例中，FcR為結合IgG抗體(γ受體)者且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII亞類之受體，其包括對偶基因變異體及或者彼等受體之剪接形式。FcγRII受體包括FcγRIIA("活化受體")及FcγRIIB("抑制受體")，其具有不同之處主要在於其細胞質域的類似胺基酸序列。活化受體FcγRIIA在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體FcγRIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)。(參見Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997))。FcR概述於Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)；Capel等人，Immunomethods 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)中。在本文中術語"FcR"涵蓋包括彼等欲在未來識別者之其他FcR。

術語"Fc受體"或"FcR"亦包括新生兒受體FcRn，其負責

200817434

將親本IgG轉移至胎兒(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994))且調節免疫球蛋白之恆定性。量測與FcRn結合之方法為已知的(參見(例如)Ghetie 1997, Hinton 2004)。可於(例如)表現人類FcRn之轉殖基因小鼠或經轉染人類細胞株或投予Fc變異體多肽之靈長類動物中檢定人類FcRn高親和力結合多肽在活體內之人類FcRn結合及血清半衰期。

WO 00/42072(Presta)描述與FcR具有改良或減小之結合的抗體變異體。彼專利公開案之內容係特定地以引用的方式併入本文中。亦參見Shields等人，J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。

"人類效應細胞"為表現一或多種FcR且執行效應功能之白血球。在某些實施例中，該等細胞表現至少FcγRIII且執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球。該等效應細胞可自天然來源(例如，血液)分離。

"抗體依賴性細胞介導細胞毒性"或"ADCC"係指其中經分泌Ig結合至存在於某些細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)上使得該等細胞毒性效應細胞與攜帶抗原之靶向細胞特異性結合且隨後以細胞毒素殺死靶向細胞的細胞毒性形式。介導ADCC、NK細胞之初級細胞僅表現FcγRIII，然而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。關於造血細胞之FcR表現

概述於Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)第464頁表3中。為評估所關注分子之ADCC活性，可進行諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或Presta美國專利第6,737,056號中所述之活體外ADCC檢定。用於該等檢定之有用效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。另外或其他，諸如Clynes等人. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中所揭示，可在活體內(例如，在一動物模型中)評估所關注分子之ADCC活性。

"補體依賴性細胞毒性"或"CDC"係指靶向細胞在補體存在下之溶解。經典補體路徑之活化係藉由將補體系統之第一組份(C1q)結合至與其同源抗原結合之抗體(適當亞類之抗體)而啟始。為評定補體活化，可例如按照Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述進行CDC檢定。

具有改變之Fc區胺基酸序列及增加或降低之C1q結合能力的多肽變異體描述於美國專利第6,194,551 B1號及WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容係特定地以引用的方式併入本文中。亦參見Idusogie等人，J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

術語"包含Fc區之多肽"係指包含Fc區之多肽，諸如抗體或免疫黏附素。可(例如)在多肽純化期間或藉由重組設計編碼多肽之核酸來移除Fc區之C末端離胺酸(根據EU編號系統之殘基447)。因此，包含根據本發明之具有Fc區之多

肽的組合物可包含具有K447之多肽，其中所有K447經移除之多肽，或具有K447殘基之多肽與不具有K447殘基之多肽的混合物。

用於本文中之"受體人類框架"為包含來源於人類免疫球蛋白框架或人類一致框架之VL或VH框架之胺基酸序列的框架。"來源於"人類免疫球蛋白框架或人類一致框架之受體人類框架可包含其相同的胺基酸序列，或其可含有預先存在之胺基酸序列變化。在一些實施例中，預先存在之胺基酸變化的數目為10或更小，9或更小，8或更小，7或更小，6或更小，5或更小，4或更小，3或更小，或2或更小。若預先存在之胺基酸變化存在於VH中，則彼等變化較佳僅發生在71H、73H及78H之三個、兩個或一個位置處；舉例而言，在彼等位置處之胺基酸殘基可為71A、73T及/或78A。在一實施例中，VL受體人類框架與VL人類免疫球蛋白框架序列或人類一致框架序列之序列相同。

"人類一致框架"為在人類免疫球蛋白VL或VH框架序列之選擇中表示最普遍存在之胺基酸殘基的框架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之亞群。一般而言，序列之亞群為如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中之亞群。在一實施例中，VL之亞群為如Kabat等人前述之亞群κ I。在一實施例中，VH之亞群為如Kabat等人前述之亞群III。

"VH亞群III一致框架"包含獲自Kabat等人前述之可變域重鏈亞群III之胺基酸序列的一致序列。在一實施例中，該VH亞群III一致框架胺基酸序列包含以下序列之每一者之至少一部分或全部：

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亞群I一致框架"包含獲自Kabat等人前述之可變域輕鏈κ亞群I之胺基酸序列的一致序列。在一實施例中，該VH亞群I一致框架胺基酸序列包含以下序列之每一者之至少一部分或全部：

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)。

"分泌信號序列"或"信號序列"係指可用於指導所關注之新近合成蛋白質穿過細胞膜(通常為原核生物之內膜或內膜與外膜兩者)之編碼短信號肽的核酸序列。因而，所關注之蛋白質(諸如免疫球蛋白)輕鏈或重鏈多肽經分泌入原核宿主細胞之周質中或培養基中。由分泌信號序列編碼之信號肽可與宿主細胞為內源性的，或其可為外源性的，其

包括待表現之多肽原生之信號肽。分泌信號序列通常存在於待表現之多肽的胺基末端處，且通常自細胞質在多肽之生物合成與分泌期間酶性移除。因此，信號肽通常不存在於成熟蛋白產物中。

"結合親和力"通常係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間之非共價相互作用的總和強度。除非另外指示，否則如本文所使用之"結合親和力"係指反映結合對(例如，抗體與抗原)成員之間之1:1相互作用的內在結合親和力。分子X與其搭配物Y之親和力通常可由解離常數(Kd)表示。親和力可由此項技術中已知之常用方法(包括本文中所述之彼等方法)來量測。低親和力抗體通常與抗原緩慢結合且傾向於快速解離，而高親和力抗體通常與抗原結合較快且傾向於保持較長之結合。此項技術中已知量測結合親和力之多種方法，該等方法中之任一者均可用於本發明之目的。下文描述特定說明性實施例。

在一實施例中，藉由如以下檢定所述之用所關注抗體及其抗原之Fab形式進行之放射性標記抗原結合檢定(RIA)來量測根據本發明之"Kd"或"Kd值"。在存在連續滴定未經標記之抗原的情況下，使Fab與最小濃度的經(^{125}I)標記之抗原平衡，隨後以經抗Fab抗體塗覆的培養盤捕捉結合之抗原，藉此來量測Fab對抗原之溶液結合親和力(Chen等人(1999) J. Mol Biol 293:865-881)。為確立檢定條件，以於50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 μg/ml捕捉抗Fab抗體(Cappel Labs)塗覆微量滴定盤(Dynex)隔夜，且隨後在室溫(約

23℃)下用於PBS中之2%(w/v)牛血清白蛋白阻斷2至5小時。在無吸附劑之滴定盤(Nunc #269620)中，使100 pM或26 pM [^{125}I]抗原與連續稀釋之所關注Fab混合(例如，與Presta等人(1997) Cancer Res. 57:4593-4599中之抗VEGF抗體Fab-12之評定相符)。隨後將所關注之Fab培養隔夜；然而，培養可持續一段較長時期(例如約65小時)以確保達到平衡。此後，在室溫下將混合物轉移至捕捉培養盤(capture plate)中進行培養(例如，歷經1小時)。隨後移除溶液且以於PBS中之0.1% Tween-20洗滌該培養盤8次。當盤乾燥後，每孔添加150 µl閃爍體(MicroScint-20; Packard)，且將盤於一Topcount γ計數器(Packard)上計數10分鐘。選擇提供小於或等於20%最大結合之濃度的各Fab以用於競爭性結合檢定。

根據另一實施例，藉由在25℃下使用一BIAcoreTM-2000或一BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)且使用表面電漿共振檢定以~10個反應單元(RU)之固定抗原CM5晶片來量測Kd或Kd值。簡言之，根據供應商之說明書以N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感應器晶片(CM5, BIAcore Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋至5 µg/ml(~0.2 µM)，接著以每分鐘5 µl之流動速率進行注射以達成約10個反應單元(RU)之偶合蛋白。在注射抗原後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測而言，在25℃下以每分鐘約25 µl之流

動速率將兩倍連續稀釋之Fab(0.78 nM至500 nM)注射於具有0.05% Tween 20(PBST)之PBS中。使用一簡單一對一朗繆耳結合模型(Langmuir binding model)(BIAcore評價軟體3.2版)藉由同時擬合締合及解離感應圖來計算締合速率(kon)及解離速率(koff)。以比率koff/kon來計算平衡解離常數(Kd)。參見(例如)Chen, Y.等人(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881。若根據上述表面電漿共振檢定締合速率大於10^6 M^{-1} s^{-1}，則可在如由一光譜儀(諸如一裝備有流動塞之分光光度計(Aviv Instruments)或一具有經攪拌比色管之8000系列SLM-Aminco光譜光度計(ThermoSpectronic))量測之增大濃度的抗原存在下，藉由使用量測螢光發射強度之增加或降低的螢光猝滅技術(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)於25℃下測定於PBS中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)(pH 7.2)的締合速率。

根據本發明之"締合速率"或"k_{on}"亦可如上所述使用一BIAcoreTM-2000或一BIAcoreTM-3000系統(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)來測定。

"病症"為會受益於以本發明之物質/分子或方法治療之任何病狀或疾病。此包括慢性及急性病症，其包括使哺乳動物具有罹患所論述之病症之傾向的彼等病理病狀。本文中待治療之病症之非限制性實例包括癌症，諸如B細胞增生性病症及/或B細胞腫瘤，例如，淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性

白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

術語"細胞增生性病症"及"增生性病症"係指與某種程度之異常細胞增殖相關之病症。在一實施例中，細胞增生性病症為癌症。

如本文中所使用之"腫瘤"係指所有贅生性細胞生長及增殖(無論惡性或良性)，及所有癌前及癌細胞及組織。如本文中所提及之術語"癌症"、"癌的"、"細胞增生性病症"、"增生性病症"及"腫瘤"並不相互排除。

術語"癌症"及"癌的"係指或描述哺乳動物之生理學病狀，其特徵通常在於不受調節之細胞生長/增殖。癌症之實例包括(但不限於)癌性B細胞增生性病症，B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。其他癌症病狀包括(例如)癌瘤、淋巴瘤(例如，霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤)、母細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(squamous cell cancer)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸道癌、胰腺癌、神經膠母細胞瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、涎腺癌、腎癌、肝

癌(liver cancer)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病及其他淋巴增生性病症，及各種類型之頭頸癌。

本文中"B細胞惡性疾病"包括非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)，其包括低度惡性/濾泡性NHL、小淋巴球性(SL)NHL、中度惡性/濾泡性NHL、中度惡性彌漫性NHL、高度惡性免疫母細胞NHL、高度惡性淋巴母細胞NHL、高度惡性小無裂細胞NHL、腫塊性病變NHL、套細胞淋巴瘤、與AIDS相關之淋巴瘤，及瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、淋巴細胞為主型霍奇金氏病(LPHD)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、無痛性NHL(其包括復發性無痛性NHL及利妥昔單抗難治性無痛性NHL)；白血病，其包括急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、毛細胞白血病、慢性骨髓母細胞白血病；套細胞淋巴瘤；及其他血液科惡性疾病。該等惡性疾病可經針對B細胞表面標記(諸如CD22)之抗體來治療。本文中涵蓋藉由投予針對B細胞表面標記(諸如CD22)之抗體且包括投予未接合("裸")抗體或與如本文中所揭示之細胞毒性劑接合之抗體來治療的該等疾病。本文中亦涵蓋藉由組合療法來治療之該等疾病，該組合療法包括同時或連續投予與另一抗體或抗體藥物接合物、另一細胞毒性劑、輻射或其他治療組合之本發明之抗CD22抗體或抗CD22抗體藥物接合物。在本發明之例示性治療方法中，本發明之抗CD22抗

體係與抗CD20抗體、免疫球蛋白或其CD20結合片段組合一起或依序投予。抗CD20抗體可為裸抗體或抗體藥物接合物。在一組合療法之實施例中，抗CD22抗體為本發明之抗體且該抗CD20抗體為Rituxan®(利妥昔單抗)。

如本文中所使用，術語"非霍奇金氏淋巴瘤"或"NHL"係指除霍奇金氏淋巴瘤之外的淋巴系統癌症。通常可藉由在霍奇金氏淋巴瘤中存在Reed-Sternberg細胞且在非霍奇金氏淋巴瘤中不存在該等細胞來區分霍奇金氏淋巴瘤與非霍奇金氏淋巴瘤。本文中所使用之術語涵蓋之非霍奇金氏淋巴瘤的實例包括熟習此項技術者(例如，腫瘤學家或病理學家)根據此項技術中已知之分類流程會鑑別為此之任何非霍奇金氏淋巴瘤，該分類流程諸如Color Atlas of Clinical Hematology(第3版)，A. Victor Hoffbrand及John E. Pettit(編)(Harcourt Publishers Ltd., 2000)中所述之修訂歐美淋巴瘤(REAL)流程。尤其參見圖11.57、11.58及11.59中之清單。更特定實例包括(但不限於)復發性或難治性NHL、前線低度惡性NHL、III/IV階段NHL、抗化學療法NHL、前驅B淋巴母細胞白血病及/或淋巴瘤、小淋巴球性淋巴瘤、B細胞慢性淋巴球性白血病及/或前淋巴球性白血病及/或小淋巴球性淋巴瘤、B細胞前淋巴球性淋巴瘤、免疫細胞瘤及/或淋巴漿細胞淋巴瘤、淋巴漿細胞淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤、結外邊緣區-MALT淋巴瘤、結邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病、血漿細胞瘤及/或漿細胞骨髓瘤、低度惡性/濾泡性淋巴瘤、中度

惡性/濾泡性NHL、套細胞淋巴瘤、濾泡中心淋巴瘤(濾泡性)、中度惡性彌漫性NHL、彌漫性大B細胞淋巴瘤、侵襲性NHL(其包括侵襲性前線NHL及侵襲性復發性NHL)、復發後或自體幹細胞移植難治癒之NHL、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、高度惡性免疫母細胞NHL、高度惡性淋巴母細胞NHL、高度惡性小無裂細胞NHL、腫塊性病變NHL、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、前驅(周邊)大顆粒淋巴球性白血病、蕈樣真菌病及/或Sezary症候群、皮膚(skin)(皮膚(cutaneous))淋巴瘤、多形性大細胞淋巴瘤、血管中心型淋巴瘤。

本文中之"自體免疫疾病"為由個體自身組織或器官產生且針對之疾病或病症，或其共分離系(co-segregate)或症狀或由其產生之病狀。在許多該等自體免疫及發炎性病症中，可存在許多臨床及實驗室標記，包括(但不限於)高加馬球蛋白血症、高含量自體抗體、抗原-抗體複合物於組織中沈積、受益於皮質類固醇或免疫抑制治療，且淋巴細胞於受影響之組織中聚集。並非對關於B細胞介導之自體免疫疾病之任一理論的限制，咸信B細胞經由大量機械路徑在人類自體免疫疾病中展示致病效應，該等機械路徑包括自體抗體產生、免疫複合物形成、樹枝狀及T-細胞活化、細胞激素合成、直接趨化因子釋放，且為異位新淋巴生成提供場所。在自體免疫疾病之病理學中，該等路徑之每一者可在不同程度上參與。

"自體免疫疾病"可為器官特異性疾病(亦即，免疫反應特

異性針對器官系統，諸如內分泌系統、造血系統、皮膚、心肺系統、胃腸及肝系統、腎系統、甲狀腺、耳、神經肌肉系統、中樞神經系統等)或可影響多個器官系統之全身性疾病(例如，全身性紅斑狼瘡(SLE)、類風濕性關節炎、多肌炎等)。較佳該等疾病包括自體免疫風濕病症(諸如，類風濕性關節炎、Sjögren症候群、硬皮病、狼瘡(諸如SLE及狼瘡腎炎)、多肌炎/皮肌炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗體症候群及牛皮癬性關節炎)、自體免疫胃腸及肝病症(諸如，發炎性腸道疾病(例如，潰瘍性結腸炎及克隆氏病(Crohn's disease))、自體免疫胃炎及惡性貧血、自體免疫肝炎、原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎及乳糜瀉)、血管炎(諸如，ANCA陰性血管炎及ANCA相關性血管炎，其包括徹奇-斯全司血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、韋格納肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)及顯微鏡下多血管炎)、自體免疫神經病症(諸如，多發性硬化症、眼陣攣-肌陣攣症候群、重症肌無力、視神經脊髓炎、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)及自體免疫多發性神經病)、腎病(諸如，絲球體腎炎、古柏氏症候群(Goodpasture's syndrome)及伯格病(Berger's disease))、自體免疫皮膚病症(諸如，牛皮癬、風疹、蕁麻疹、尋常天疱瘡、大皰性類天疱瘡及皮膚紅斑狼瘡)、血液科病症(諸如，血小板減少性紫癜、血栓性血小板減少性紫癜、輸血後紫癜及自體免疫溶血性貧血)、動脈粥樣硬化、葡萄膜炎、自體免疫聽力疾病(諸

如，內耳疾病及聽力損傷)、白塞氏病(Behcet's disease)、雷諾氏症候群(Raynaud's syndrome)、器官移植及自體免疫內分泌失調症(諸如，與糖尿病相關之自體免疫疾病，諸如胰島素依賴性糖尿病(IDDM)、艾迪森氏病(Addison's disease)及自體免疫甲狀腺病(例如，葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)及甲狀腺炎))。更佳該等疾病包括(例如)類風濕性關節炎、潰瘍性結腸炎、ANCA相關之血管炎、狼瘡、多發性硬化症、Sjögren症候群、葛瑞夫茲氏病、IDDM、惡性貧血、甲狀腺炎及絲球體腎炎。

如本文中所定義之其他自體免疫疾病之特定實例(其在某些情況下涵蓋以上列舉之彼等疾病)包括(但不限於)關節炎(急性及慢性類風濕性關節炎，其包括幼年發作類風濕性關節炎及其他階段，諸如類風濕性滑膜炎、痛風或痛風性關節炎、急性免疫關節炎、慢性發炎性關節炎、退化性關節炎、II型膠原誘發之關節炎、傳染性關節炎、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、增生性關節炎、牛皮癬性關節炎、史提爾氏病(Still's disease)、脊椎關節炎、骨關節炎、慢性漸進性關節炎、畸形性關節炎、慢性原發性多發性關節炎、反應性關節炎、更年期關節炎、雌激素缺乏性關節炎及強直性脊椎炎/類風濕性脊椎炎)、自體免疫淋巴增生性疾病、發炎性過度增生性皮膚病、牛皮癬(諸如斑塊牛皮癬、點狀牛皮癬、膿皰型牛皮癬及指甲牛皮癬)、異位性皮膚炎(包括異位性疾病，諸如枯草熱及Job症候群)、皮炎(其包括接觸性皮炎、慢性接觸性皮炎、剝落性皮炎、過

敏性皮炎、過敏性接觸性皮炎、蕁麻疹、疱疹樣皮炎、錢幣狀皮炎、脂溢性皮炎、非特異性皮炎、原發性刺激性接觸性皮炎及異位性皮炎)、x性聯遺傳高IgM症候群、過敏性眼內發炎疾病、風疹(諸如慢性過敏性風疹及慢性特發性風疹，其包括慢性自體免疫性風疹)、肌炎、多肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮壞死溶解、硬皮病(包括全身性硬皮病)、硬化症(諸如全身性硬化症、多發性硬化症(MS)(諸如脊髓-視力MS、原發性進行性MS(PPMS)及復發型多發性MS(RRMS))、進行性全身性硬化症、動脈粥樣硬化、動脈硬化、播散型硬化症、共濟失調性硬化症)、視神經脊髓炎(NMO)、發炎性腸道疾病(IBD)(例如，克隆氏病、自體免疫介導之胃腸疾病、胃腸炎症、結腸炎(諸如潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis)、潰瘍性結腸炎(colitis ulcerosa)、顯微鏡下結腸炎、膠原性結腸炎、疣狀結腸炎、壞死性小腸結腸炎及透壁性結腸炎)，及自體免疫發炎性腸道疾病)、腸道炎症、壞疽性膿皮病、結節性紅斑、原發性硬化性膽管炎、呼吸窘迫症候群(包括成人或急性呼吸窘迫症候群(ARDS))、腦膜炎、葡萄膜全部或部分發炎、虹膜炎、脈絡膜炎、自體免疫性血液病、移植物抗宿主病、血管性水腫(諸如遺傳性血管性水腫)、腦神經損傷(如在腦膜炎中)、妊娠疱疹、妊娠類天疱瘡、陰囊搔癢症、自體免疫性卵巢早衰、歸因於自體免疫病狀之突發性耳聾、IgE介導之疾病(諸如過敏症及過敏性及異位性鼻炎)、腦炎(諸如拉茲穆森腦炎(Rasmussen's encephalitis)

及邊緣性及/或腦幹腦炎)、葡萄膜炎(諸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽腫性葡萄膜炎、非肉芽腫性葡萄膜炎、晶狀體抗原性葡萄膜炎、後葡萄膜炎，或自體免疫性葡萄膜炎)、具有及不具有腎病症候群之絲球體腎炎(GN)(諸如慢性或急性絲球體腎炎，諸如原發性GN、免疫介導之GN、膜性GN(膜性腎病)、特發性膜性GN或特發性膜性腎病、膜狀或膜性增生性GN(MPGN)，其包括I型及II型及迅速進行性GN(RPGN)、增生性腎炎)、自體免疫性多腺體內分泌衰竭、龜頭炎(包括漿細胞性侷限性龜頭炎)、龜頭包皮炎、環形離心性紅斑、持久性色素障礙性紅斑、多形性紅斑、環狀肉芽腫、光澤苔癬、慢性萎縮性苔癬樣皮炎、慢性單純性苔癬、小棘苔蘚、扁平苔癬、板層狀魚鱗病、表皮松解性角化過度症、癌前角化病、壞疽性膿皮病、過敏性病狀及反應、食物過敏、藥物過敏、昆蟲過敏、罕見過敏性病症(諸如肥大細胞增多症、過敏性反應)、濕疹(包括過敏性或異位性濕疹、皮膚缺乏性濕疹、出汗障礙性濕疹及水泡性掌蹠濕疹)、哮喘(諸如支氣管哮喘(asthma bronchiale)、支氣管哮喘(bronchial asthma)及自體免疫性哮喘)、涉及T細胞滲透及慢性發炎性反應之病狀、抗外來抗原(諸如懷孕期間之胎兒A-B-O血液群)之免疫反應、慢性肺發炎疾病、自體免疫性心肌炎、白血球黏著不足、狼瘡(其包括狼瘡腎炎、狼瘡腦炎、嬰兒狼瘡、非腎狼瘡、腎外狼瘡、盤狀狼瘡及盤狀紅斑狼瘡、脫髮狼瘡、SLE(諸如皮膚SLE或亞急性皮膚SLE)、新生兒狼瘡症

候群(NLE)及播散性紅斑狼瘡)、幼年發作(I型)糖尿病(其包括嬰兒IDDM、成年發作糖尿病(II型糖尿病)、自體免疫性糖尿病、特發性尿崩症、糖尿病性視網膜病、糖尿病性腎病、糖尿病性結腸炎、糖尿病性大動脈病症、與藉由細胞激素及T-淋巴細胞介導之急性及遲發性過敏反應相關的免疫反應、結核病、肉狀瘤病、肉芽腫病(包括淋巴瘤樣肉芽腫病、粒性白血球缺乏症)、血管炎(包括大血管血管炎)，諸如風濕性多肌痛及巨細胞(高安氏(Takayasu's))動脈炎)；中血管血管炎，諸如川崎病(Kawasaki's disease)及多發性結節性動脈炎/結節性動脈周圍炎、免疫血管炎、CNS血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、壞死性血管炎(諸如類纖維蛋白壞死性血管炎及全身性壞死性血管炎)、ANCA陰性血管炎，及ANCA相關血管炎(諸如徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)(CSS)、韋格納肉芽腫病及顯微鏡下多血管炎)、顳動脈炎、再生障礙性貧血、自體免疫性再生障礙性貧血、庫姆陽性貧血(Coombs positive anemia)、先天性純紅血球再生障礙性貧血、溶血性貧血或免疫性溶血性貧血(包括自體免疫性溶血性貧血)(AIHA)、惡性貧血(pernicious anemia)(惡性貧血(anemia perniciosa))、艾迪森氏病、純紅血球貧血或發育不全(PRCA)、因子VIII不足、A型血友病、自體免疫性嗜中性球減少症、血球減少症(諸如泛血球減少症、白血球減少症)、涉及白血球血球滲出之疾病、CNS發炎性病症、阿茲海默氏病、帕金森氏病、多器官損傷症候群(諸如敗

200817434

血症、外傷或出血之彼等繼發症)、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎小球基底膜疾病、抗磷脂抗體症候群、運動神經炎、過敏性神經炎、貝西氏病/症候群(Behçet's disease/syndrome)、凱瑟曼症候群(Castleman's syndrome)、古柏氏症候群、雷諾氏症候群、Sjögren症候群、史蒂芬-瓊森症候群(Stevens-Johnson syndrome)、類天疱瘡或天疱瘡(諸如大皰性類天疱瘡、瘢痕(黏膜))類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常天疱瘡、副腫瘤性天疱瘡、落葉性天疱瘡、天疱瘡黏膜類天疱瘡及紅斑性天疱瘡、後天性大皰性表皮松解、眼睛炎症(較佳過敏性眼睛炎症(諸如過敏性結膜炎))、線性IgA大皰性疾病、自體免疫誘發之結膜炎、自體免疫多內分泌病、萊特爾氏病(Reiter's disease)或症候群、歸因於自體免疫病狀之熱損傷、子癇前症、免疫複合物病症(諸如免疫複合物性腎炎)、抗體介導之腎炎、神經發炎性病症、多發性神經病、慢性神經病(諸如IgM多發性神經病或IgM介導之神經病)、血小板減少症(例如，如由心肌梗塞患者所發展)(包括血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、輸血後紫癜(PTP)、肝素誘發之血小板減少症及自體免疫或免疫介導之血小板減少症，其包括(例如)特發性血小板減少性紫癜(ITP)(包括慢性或急性ITP))、鞏膜炎(諸如特發性角膜鞏膜炎、表層鞏膜炎)、睾丸及卵巢之自體免疫疾病(包括自體免疫性睾丸炎及卵巢炎)、原發性甲狀腺功能低下、副甲狀腺機能減退症、自體免疫內分泌疾病(包括甲狀腺炎(諸如自體免疫甲狀腺炎、橋本氏病

200817434

(Hashimoto's disease)、慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis))，或亞急性甲狀腺炎)、自體免疫性甲狀腺病、特發性甲狀腺功能低下、格雷氏病(Grave's disease)、格雷氏眼病(Grave's eye disease)(眼病或與甲狀腺相關之眼病)、多腺症候群(諸如自體免疫多腺症候群，例如，I型(或多腺內分泌病症候群))、副腫瘤症候群(包括神經副腫瘤症候群，諸如Lambert Eaton肌無力症候群或Eaton-Lambert症候群、僵體症候群(stiff man syndrome)或僵人症候群(stiff-person syndrome)、腦脊髓炎(諸如過敏性腦脊髓炎及實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)、重症肌無力(諸如胸腺瘤相關之重症肌無力、小腦退化、神經肌強直、眼陣攣或眼陣攣-肌陣攣症候群(OMS)及感官神經病)、多灶性運動神經病、席漢氏症候群(sheehan's syndrome))、自體免疫肝炎、慢性肝炎、狼瘡樣肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動型肝炎或自體免疫慢性活動型肝炎、肺炎(諸如淋巴間質性肺炎(LIP)、阻塞性細支氣管炎(非移植)對NSIP)、古立安-白瑞症候群(Guillain Barré syndrome)、伯格病(IgA腎病)、特發性IgA腎病、線性IgA皮膚病、急性發熱性嗜中性皮病、角質層下膿皰性皮膚病、暫時性棘層松解性皮病、肝硬化症(諸如原發性膽汁性肝硬化及肺硬化)、自體免疫性腸病症候群、乳糜瀉、口炎性腹瀉(麩質性腸病)、難治性口炎性腹瀉、特發性口炎性腹瀉、冷球蛋白血症(諸如混合型冷球蛋白血症)、肌肉萎縮性側索硬化(ALS；盧伽雷病(Lou Gehrig's disease))、冠狀動脈病、自

體免疫耳病(諸如自體免疫內耳疾病(AIED)、自體免疫聽力損失)、多軟骨炎(諸如難治性或復發或復發性多軟骨炎)、肺泡蛋白沈積症、角膜炎(諸如Cogan氏症候群/非梅毒性間質性角膜炎)、貝爾氏麻痺(Bell's palsy)、Sweet病/症候群、自體免疫性紅斑痤瘡、帶狀疱疹相關之疼痛、澱粉樣變性病、非癌性淋巴球增多症、原發性淋巴球增多症(其包括單株B細胞淋巴球增多症(例如，良性單株丙種球蛋白症及未確定意義之單株丙種球蛋白病，MGUS))、周圍神經病、副腫瘤症候群、離子通道病(諸如癲癇症、偏頭痛、心律不整、肌肉病症、耳聾、失明、週期性麻痺及CNS之離子通道病)、自閉症、發炎性肌病變、局部或區段性或局部區段性腎絲球硬化症(FSGS)、內分泌眼病、葡萄膜視網膜炎、脈絡膜視網膜炎、自體免疫性肝病、肌肉纖維疼痛、多發性內分泌衰竭、施密特症候群(Schmidt's syndrome)、腎上腺炎、胃萎縮、初老期癡呆、脫髓鞘疾病(諸如自體免疫性脫髓鞘疾病及慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病)、心肌梗塞後症候群(Dressler's syndrome)、斑禿、頭髮全禿、CREST症候群(石灰沈著症、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、食道蠕動異常、肢端硬化及毛細管擴張症)、男性及女性自體免疫性不孕症(例如，歸因於抗精子抗體)、混合結締組織病、南美錐蟲病(Chagas' disease)、風濕熱(rheumatic fever)、反覆流產、農民肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、飼鳥者肺、過敏性肉芽腫性脈管

200817434

炎、良性淋巴球性脈管炎、阿爾波特氏症候群(Alport's syndrome)、肺泡炎(諸如過敏性肺泡炎及纖維化肺泡炎)、間質性肺病、輸血反應、麻瘋、瘧疾、寄生性疾病(諸如利什曼病(leishmaniasis)、錐體蟲病(kypanosomiasis)、血吸蟲病、蛔蟲症)、麴菌病、Sampter症候群、類風濕塵肺症候群(Caplan's syndrome)、登革熱、心內膜炎、心內膜心肌纖維化、彌漫性間質性肺纖維化、間質性肺纖維化、纖維性縱隔炎、肺纖維化、特發性肺纖維化、囊腫性纖維化、眼內炎、持久性隆起性紅斑、胎兒紅血球母細胞增多症、嗜酸性筋膜炎、蘇爾曼症候群(Shulman's syndrome)、費爾蒂症候群(Felty's syndrome)、絲蟲病、睫狀體炎(諸如慢性睫狀體炎、異色性睫狀體炎、虹膜睫狀體炎(急性或慢性)或Fuch睫狀體炎)、亨偌-絲奇恩賴紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、SCID、後天性免疫不全症候群(AIDS)、埃可病毒(echovirus)感染、膿毒病(全身性發炎性反應症候群(SIRS))、內毒素血症、胰腺炎、橋本病甲亢(thyroxicosis)、小病毒感染、風疹病毒感染、疫苗接種後症候群、先天性風疹感染、E-B病毒感染(Epstein-Barr virus infection)、腮腺炎、埃文症候群(Evan's syndrome)、自體免疫性腺衰竭、西德納姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)、鏈球菌感染後腎炎、血栓閉塞性脈管炎(thromboangitis ubiterans)、甲狀腺毒症、脊髓癆、脈絡膜炎、巨細胞多肌痛、慢性過敏性肺炎、結膜炎(諸如春季

200817434

結膜炎、乾燥性角膜結膜炎及流行性角膜結膜炎)、特發性腎臟症候群、輕微病變性腎病、良性家族性及局部缺血-再灌注損傷、移植器官再灌注、視網膜自體免疫疾病、關節炎症、支氣管炎、慢性阻塞性氣管/肺病、矽肺病、口瘡、口瘡性口炎、動脈硬化性病症(腦血管機能不全)(諸如動脈硬化性腦病及動脈硬化性視網膜病)、不形成精子症(aspermiogenese)、自體免疫性溶血、伯克氏病(Boeck's disease)、冷球蛋白血症、掌腱膜攣縮症、晶狀體過敏性眼內炎、過敏性腸炎、麻瘋結節性紅斑、特發性面神經麻痺、慢性疲勞症候群、風濕熱(febris rheumatica)、哈麗二氏病(Hamman-Rich's disease)、知覺神經聽力損失、突發性血紅蛋白尿病、性腺機能減退、區域性回腸炎、白血球減少症、傳染性單核細胞增多症、橫斷性脊髓炎、原發性特發性黏液水腫、腎病、交感性眼炎(交感神經眼炎)、新生兒眼炎、視神經炎、肉芽腫性睾丸炎、胰腺炎、急性多神經根炎、壞疽性膿皮病、奎汶氏甲狀腺炎(Quervain's thyreoiditis)、後天性脾萎縮、非惡性胸腺瘤、淋巴樣濾泡性胸腺炎、白斑病、中毒性休克症候群、食物中毒、涉及T細胞滲透之病狀、白血球黏著不足、與藉由細胞激素及T-淋巴細胞介導之急性及遲發性過敏反應相關之免疫反應、涉及白血球血球滲出之疾病、多發性器官損傷症候群、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎小球基底膜疾病、自體免疫性多內分泌病、卵巢炎、原發性黏液水腫、自體免疫性萎縮性胃炎、風濕性疾病、混合結締

組織病、腎病症候群、胰島炎、多內分泌腺衰竭、自體免疫多腺症(包括I型多腺症、成人發作特發性副甲狀腺低能症(AOIH)、心肌症(諸如擴張型心肌症、後天性大皰性表皮松解(EBA))、血色素沈著症、心肌炎、腎病症候群、原發性硬化性膽管炎、化膿性的或非化膿性竇炎、急性或慢性竇炎、篩竇炎、額竇炎、上頜竇炎或蝶竇炎、過敏性竇炎、嗜伊紅血球相關之病症(諸如嗜伊紅血球增多症)、肺滲透嗜伊紅血球增多症、嗜伊紅血球增多肌痛症候群、呂弗勒氏症候群(Loffler's syndrome)、慢性嗜酸細胞性肺炎、熱帶肺嗜伊紅血球增多症、支氣管肺炎麴菌病、麴菌腫或含有嗜伊紅血球之肉芽瘤、過敏反應、脊椎關節病、血清反應陰性之脊椎關節炎、多內分泌腺自體免疫疾病、硬化性膽管炎、鞏膜、鞏膜外、慢性皮膚黏膜念珠菌症、布魯頓氏症候群(Bruton's syndrome)、嬰兒暫時性低丙種球蛋白血症、Wiskott-Aldrich症候群、共濟失調性毛細管擴張症候群、血管擴張、與膠原病相關之自體免疫病症、風濕病(諸如慢性關節風濕病)、淋巴腺炎、血壓反應降低、血管功能障礙、組織損傷、心血管局部缺血、痛覺過敏、腎局部缺血、大腦局部缺血及伴隨之血管形成疾病、過敏性過敏病症、血管球性腎炎、再灌注損傷、缺血性再灌注病症、心肌或其它組織之再灌注損傷、淋巴瘤性氣管支氣管炎、發炎性皮膚病、具有急性發炎性成份之皮膚病、多發性器官衰竭、大皰性疾病、腎皮質壞死、急性化膿性腦膜炎或其它中樞神經系統發炎性病症、眼睛及眼眶

200817434

發炎性病症、顆粒球輸血相關之症候群、細胞激素誘發之毒性、發作性睡病、急性嚴重炎症、慢性難醫治之炎症、腎盂炎、動脈內膜增生、消化性潰瘍、瓣炎及子宮內膜異位)。本文中涵蓋藉由投予與B細胞表面標記(諸如CD22)結合之抗體且包括投予未接合("裸")抗體或與如本文中所揭示之細胞毒性劑接合之抗體來治療的該等疾病。本文中亦涵蓋藉由組合療法來治療之該等疾病，該組合療法包括同時或連續投予與另一抗體或抗體藥物接合物、另一細胞毒性劑、輻射或其他治療組合之本發明之抗CD22抗體或抗CD22抗體藥物接合物。

如本文中所使用，"治療"係指試圖改變待治療個體或細胞之自然過程的臨床干預，且可用於預防或在臨床病理學過程中進行。所需之治療效果包括預防疾病發作或復發、減輕症狀、減少疾病之任何直接或間接病理性後果、預防轉移、降低疾病進展速率、改善或減緩疾病狀態、及緩解或改良之預後。在一些實施例中，本發明之抗體係用於延遲疾病或病症之發展或減緩疾病或病症之進展。

"個體"為脊椎動物。在某些實施例中，脊椎動物為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家畜(諸如母牛)、競技類動物(sport animals)、寵物(諸如貓、犬及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。在某些實施例中，哺乳動物為人類。

"有效量"係指可有效達成所需治療或預防結果所需之劑量及時間之量。

本發明之物質/分子之"治療有效量"可根據諸如疾病狀

態、個體之年齡、性別及體重，及物質/分子在個體中引起所需反應之能力等因素而改變。治療有效量涵蓋治療有益之作用勝過物質/分子之任何有毒或有害作用的量。"預防有效量"係指可有效達成所需預防結果所需之劑量及時間之量。因為預防劑量係在疾病之前或疾病早期用於個體，所以預防有效量通常(但非必需)小於治療有效量。

如本文中使用之術語"細胞毒性劑"係指一種抑制或防止細胞功能及/或造成細胞死亡或破壞之物質。該術語意欲包括放射活性同位素(例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及Lu之放射活性同位素)、化學治療劑(例如甲胺喋呤、阿黴素(adriamicin)、長春花生物鹼(vinca alkaloids)(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin))，或其它插入劑、酶及其片段(諸如核分解酶)、抗生素，及毒素(諸如小分子毒素，或細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，包括其片段及/或變異體)、毒素、生長抑制劑、藥物部分，及下文所揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。其它細胞毒性劑描述於下文中。殺腫瘤劑引起腫瘤細胞之破壞。

"毒素"為能夠對細胞之生長或增殖產生有害作用之任何物質。

"化學治療劑"為可用於治療癌症之化學化合物。化學治

200817434

療劑之實例包括烷基化劑，諸如噻替哌(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺(cyclosphosphamide)；磺酸烷酯，諸如硫酸布他卡因(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、麥曲多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基三聚氰胺(methylamelamine)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine)；乙醯生(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；δ-9-四氫大麻酚(曲大麻酚(dronabinol)，MARINOL®)；β-拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓撲替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康(irinotecan)，CAMPTOSAR®)、乙醯喜樹鹼、斯可波萊辛(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚抑素(bryostatin)；克利他汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素；多卡黴素(duocarmycin)(包括合成類似物，KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；潘卡替他汀(pancratistatin)；沙科地辛(sarcodictyin)；斯潘他汀

(spongistatin)；氮芥子氣(nitrogen mustard)，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、鋁磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、氧化氮芥鹽酸鹽(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖、新恩比興(novembichin)、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥子氣(uracil mustard)；硝基脲(nitrosurea)類，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimnustine)；抗生素類，諸如烯二炔抗生素(enediyne antibiotic)(例如，刺孢黴素，尤其刺孢黴素γlI及刺孢黴素ωI1)(參看(例如)Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))；地尼黴素(dynemicin)，(包括地尼黴素A(dynemicin A)；伊斯帕黴素(esperamicin)；以及新製癌菌素發色團(neocarzinostatin chromophore)及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)，阿克萊諾黴素(aclacinomysin)、放線菌素(actinomycin)、奧瑟黴素(authramycin)、氮雜絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡洛比星(carabicin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素D(dactinomycin)、道諾黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-甘白胺酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin)(包括嗎啉基-多柔

200817434

比星、氰基嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及脫氧多柔比星(deoxydoxorubicin))、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、博替羅黴素(potfiromycin)、嘌黴素(puromycin)、奎拉黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈佐星(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-硫唑嘧啶、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷(dideoxyuridine)、脫氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾內酯(testolactone)；抗腎上腺素，諸如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑(folic acid

replenisher)，諸如夫羅林酸(frolinic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；5-乙炔尿嘧啶(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；貝曲布辛(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；伊達曲仙(edatraxate)；德弗法明(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；伊弗尼辛(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；艾普塞隆(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎵；羥基尿素；香菇多糖(lentinan)；洛尼達寧(lonidainine)；美登素類物，諸如美登素及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫吡丹莫(mopidanmol)；尼曲伊寧(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；比柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2"-三氯三乙胺；單端孢黴烯族毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、漆斑菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露糖醇(mitobronitol)；二溴衛矛

醇 (mitolactol)；哌泊溴烷 (pipobroman)；瓜西托辛 (gacytosine)；阿糖苷 (arabinoside)("Ara-C")；噻替派 (thiotepa)；紫杉醇 (taxoid) 類，例如 TAXOL® 紫杉醇 (paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™ Cremophor-free、紫杉醇之白蛋白改造之奈米粒子調配物 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) 及 TAXOTERE® 多西他賽 (doxetaxel) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；氯萊布辛 (chloranbucil)；吉西他賓 (gemcitabine)(GEMZAR®)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑 (cisplatin) 及卡鉑 (carboplatin)；長春鹼 (VELBAN®)；鉑；依託泊苷 (VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌；長春新鹼 (ONCOVIN®)；奧賽力鉑 (oxaliplatin)；洛克沃新 (leucovovin)；長春瑞賓 (vinorelbine)(NAVELBINE®)；諾凡特龍 (novantrone)；依達曲沙 (edatrexate)；道諾黴素；胺基喋呤 (aminopterin)；伊班膦酸鹽 (ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸 (difluoromethylornithine(DMFO))；類視色素 (retinoid)，諸如視黃酸；卡西他賓 (capecitabine)(XELODA®)；上述物質中任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及兩種或兩種以上上述物質之組合，諸如 CHOP(環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及潑尼龍 (prednisolone) 之組合療法的縮寫)，及 FOLFOX(具有與 5-FU 及洛克沃新組合之奧賽力鉑 (ELOXATIN™) 之治療方案的縮寫)。

200817434

此定義亦包括抗激素劑，其用於調節、降低、阻斷或抑制可促進癌症生長之激素的作用且其通常為全身性或整個身體治療之形式。其可為激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括(例如)他莫昔芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、EVISTA®雷諾昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、克沃昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗孕酮；雌激素受體下調劑(ERD)；用於抑制或使卵巢停止工作之藥劑，例如，黃體生成激素釋放激素(LHRH)促效劑，諸如LUPRON®及ELIGARD®乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸布舍瑞林(buserelin acetate)及曲特瑞林(tripterelin)；其它抗雄激素劑，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及抑制調節腎上腺中雌激素產生之芳香酶的芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特(aminoglutethimide)、MEGASE®乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、弗米斯坦(formestanie)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏羅唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®安美達錠(anastrozole)。另外，此化學治療劑定義包括雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如，BONEFOS®或OSTAC®)、DIDROCAL®依替膦酸鹽(etidronate)、NE-58095、ZOMETA®唑來膦酸/唑來膦酸鹽

(zoledronic acid/zoledronate)、FOSAMAX®阿侖膦酸鹽(alendronate)、AREDIA®帕米膦酸鹽(pamidronate)、SKELID®替魯膦酸鹽(tiludronate)或ACTONEL®利塞膦酸鹽(risedronate)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(1,3-二氧戊環胞嘧啶核苷類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制與異常細胞增殖關聯之信號傳輸路徑中之基因表現者，諸如PKC-α、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，諸如THERATOPE®疫苗及基因療法疫苗(例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗)；LURTOTECAN®拓撲異構酶1抑制劑；ABARELIX® rmRH；拉帕替尼二甲苯磺酸鹽(lapatinib ditosylate)(ErbB-2及EGFR雙重酪胺酸激酶小分子抑制劑，亦稱為GW572016)；及上述物質中任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

本文使用之"生長抑制劑"係指抑制活體外或活體內之細胞(諸如表現CD22之細胞)生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S相之細胞(諸如表現CD22之細胞)百分比者。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(在除S相之外的位置)之藥劑，諸如誘導G1停滯及M相停滯之藥劑。經典M相阻斷劑包括長春蔓(長春新鹼及長春鹼)、紫杉烷(taxane)及II型拓撲異構酶抑制劑，諸如多柔比星、表柔比星、道諾黴素、依託泊苷及博萊黴素。使G1停滯之彼等藥劑亦溢出進入S相停滯中，例如，DNA烷基化劑，諸如他莫昔芬、潑尼松(prednisone)、達卡巴嗪、氮芥、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。其他資訊可見

200817434

於The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel編，第1章，Murakami等人(WB Saunders: Philadelphia, 1995)之標題為"Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"，尤其第13頁中。紫杉烷(紫杉醇及多烯紫杉醇(docetaxel))為均來源於紫杉樹之抗癌藥物。來源於歐洲紫杉之多烯紫杉醇(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)為紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。紫杉醇及多烯紫杉醇促進由微管蛋白二聚體組裝微管且藉由防止解聚合來穩定微管，其使得抑制細胞中之有絲分裂。

術語"細胞內代謝物"係指由關於抗體-藥物接合物(ADC)之代謝過程或細胞內反應產生之化合物。該代謝過程或反應可為酶性過程，諸如ADC之肽連接子的蛋白水解分裂，或諸如脲、酯或醯胺之官能基的水解。細胞內代謝物包括(但不限於)在進入、擴散、吸收或傳送進入細胞之後已經受細胞內分裂之抗體及游離藥物。

術語"細胞內地分裂"及"細胞內分裂"係指關於抗體-藥物接合物(ADC)之代謝過程或細胞內反應，藉此藥物部分(D)與抗體(Ab)之間之共價連接(亦即連接子)斷裂，其使得游離藥物與細胞內之抗體分離。因而ADC之分裂部分為細胞內代謝物。

術語"生物可用性"係指經投予患者之給定量之藥物之系統可用性(亦即，血液/血漿含量)。生物可用性為指示由投予劑型達到一般循環之藥物之時間(速率)與總量(程度)兩

200817434

者的量測之絕對術語。

術語"細胞毒性活性"係指抗體-藥物接合物或抗體-藥物接合物之細胞內代謝物的殺死細胞、抑制細胞生長或生長抑制作用。細胞毒性活性可以IC_{50}值來表示，其為在半數細胞存活時每單位體積之濃度(莫耳濃度或質量濃度)。

"烷基"為含有正常、第二、第三或環狀碳原子之C1-C18烴。實例為甲基(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，異丙基，$-CH(CH_3)_2$)、1-丁基(n-Bu，正丁基，$-CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-甲基-1-丙基(i-Bu，異丁基，$-CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基(s-Bu，第二丁基，$-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu，第三丁基，$-C(CH_3)_3$)、1-戊基(正戊基，$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、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($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$。

如在本文中使用之術語"C_1-C_8烷基"係指具有1至8個碳原子之直鏈或支鏈、飽和或不飽和烴。代表性"C_1-C_8烷基"包

括(但不限於)-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基、-正辛基、-正壬基及-正癸基；而支鏈C_1-C_8烷基包括(但不限於)-異丙基、-第二丁基、-異丁基、-第三丁基、-異戊基、2-甲基丁基，不飽和C_1-C_8烷基包括(但不限於)-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-異丁烯基、-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-己基、2-己基、3-己基、-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、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、異戊基、新戊基、正己基、異己基、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、異庚基、正辛基及異辛基。C_1-C_8烷基可未經取代或經一或多個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-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、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-N(R')$_2$及-CN；其中R'各自獨立地選自H、-C_1-C_8烷基及芳基。

"烯基"為具有至少一個不飽和位點(亦即碳-碳sp^2雙鍵)之含有正常、第二、第三或環狀碳原子的C2-C18烴。實例包

200817434

括(但不限於)：伸乙基或乙烯基(-CH=CH_2)、烯丙基(-CH_2CH=CH_2)、環戊烯基(-C_5H_7)及5-己烯基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$CH=CH_2)。

"炔基"為具有至少一個不飽和位點(亦即碳-碳sp參鍵)之含有正常、第二、第三或環狀碳原子的C2-C18烴。實例包括(但不限於)：乙炔基(-C≡CH)及炔丙基(-CH_2C≡CH)。

"伸烷基"係指具有1-18個碳原子且具有藉由自母體烷基之相同或兩個不同碳原子上移除兩個氫原子產生之兩個單價基團中心的飽和、支鏈或直鏈或環狀烴基。典型伸烷基包括(但不限於)：亞甲基(-CH_2-)、1,2-乙基(-CH_2CH_2-)、1,3-丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)、1,4-丁基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-)及其類似基團。

"C_1-C_{10}伸烷基"為式-$(CH_2)_{1-10}$-之直鏈、飽和烴基。C_1-C_{10}伸烷基之實例包括亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸丁基、伸戊基、伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基及伸癸基。

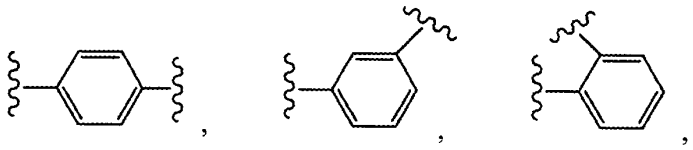
"伸烯基"係指具有2-18個碳原子且具有藉由自母體烯基之相同或兩個不同碳原子上移除兩個氫原子產生之兩個單價基團中心的不飽和、支鏈或直鏈或環狀烴基。典型伸烯基包括(但不限於)：1,2-伸乙基(-CH=CH-)。

"伸炔基"係指具有2-18個碳原子且具有藉由自母體炔基之相同或兩個不同碳原子上移除兩個氫原子產生之兩個單價基團中心的不飽和、支鏈或直鏈或環狀烴基。典型伸炔基包括(但不限於)：乙炔基(-C≡C-)、炔丙基(-CH_2C≡C-)及

4-戊炔基(-$CH_2CH_2CH_2C{\equiv}C$-)。

"芳基"係指碳環狀芳族基團。芳基之實例包括(但不限於)苯基、萘基及蒽基。碳環狀芳族基團或雜環狀芳族基團可未經取代或經一或多個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-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'、-$S(O)_2R'$、-S(O)R'、-OH、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$及-CN；其中R'各自獨立地選自H、-C_1-C_8烷基及芳基。

"伸芳基"為具有兩個共價鍵且可為如以下結構中所示之鄰位、間位或對位構型之芳基：



其中苯基可未經取代或經至多四個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-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'、-$S(O)_2R'$、-S(O)R'、-OH、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$及-CN；其中R'各自獨立地選自H、-C_1-C_8烷基及芳基。

"芳烷基"係指其中與碳原子(通常末端或sp^3碳原子)鍵結之氫原子之一者經芳基置換的非環狀烷基。典型芳烷基包括(但不限於)苄基、2-苯基乙-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘甲醯苄基、

2-萘甲醯苯基乙-1-基及其類似基團。芳烷基含6至20個碳原子，例如芳烷基之烷基部分(包括烷基、烯基或炔基)為1至6個碳原子且芳基部分為5至14個碳原子。

"雜芳烷基"係指其中與碳原子(通常末端或sp^3碳原子)鍵結之氫原子之一者經雜芳基置換的非環狀烷基。典型雜芳烷基包括(但不限於)2-苯幷咪唑基甲基、2-呋喃基乙基及其類似基團。雜芳烷基包含6至20個碳原子，例如雜芳烷基之烷基部分(包括烷基、烯基或炔基)為1至6個碳原子且雜芳基部分為5至14個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子。雜芳烷基之雜芳基部分可為具有3至7個環成員之單環(2至6個碳原子)或具有7至10個環成員之雙環(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。

"經取代烷基"、"經取代芳基"及"經取代芳烷基"分別意謂其中一或多個氫原子各自獨立地經取代基置換的烷基、芳基及芳烷基。典型取代基包括(但不限於)-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X各自獨立地為鹵素：F、Cl、Br或I；且R各自獨立地為-H、C_2-C_{18}烷

200817434

基、C_6-C_{20}芳基、C_3-C_{14}雜環、保護基或前藥部分。如上所述之伸烷基、伸烯基及伸炔基亦可類似經取代。

"雜芳基"及"雜環"係指其中一或多個環原子為雜原子(例如氮、氧及硫)之環系統。雜環基包含1至20個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子。雜環可為具有3至7個環成員之單環(2至6個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)或具有7至10個環成員之雙環(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。

雜環描述於Paquette, Leo A.；"Principles of Modern Heterocyclic Chemistry"(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1章、第3章、第4章、第6章、第7章及第9章；"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs"(John Wiley & Sons, New York, 1950迄今)，尤其第13卷、第14卷、第16卷、第19卷及第28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566中。

雜環之實例包括(舉例而言且不加限制)：吡啶基、二氫吡啶基、四氫吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氫噻吩基、硫氧化之四氫噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯幷呋喃基、硫代萘基、吲哚基、吲哚烯基、喹啉基、異喹啉基、苯幷咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯啶基、2-吡咯啶酮基、吡咯啉基、四氫呋喃基、雙四氫呋喃基、四氫哌喃基、雙四氫哌喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹

啉基、吖辛因基、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、哌喃基、異苯幷呋喃基、吭烯基、吲基、啡噁噻基、2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、噠嗪基、吲嗪基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、呔嗪基、嗦啶基、喹喏啉基、喹唑啉基、啐喏啉基、喋啶基、4aH-咔唑基、咔唑基、β-咔啉基、啡啶基、吖啶基、嘧啶基、啡啉基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋吖基、啡噁嗪基、異吭基、吭基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡唑啶基、吡唑啉基、哌嗪基、吲哚啉基、異吲哚啉基、喔啶基、嗎啉基、噁唑啶基、苯幷三唑基、苯幷異噁唑基、羥吲哚基、苯幷噁唑啉基及靛紅基(isatinoyl)。

舉例而言且不加限制，碳鍵結雜環係鍵結於吡啶之2、3、4、5或6位；噠嗪之3、4、5或6位；嘧啶之2、4、5或6位；吡嗪之2、3、5或6位；呋喃、四氫呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之2、3、4或5位；噁唑、咪唑或噻唑之2、4或5位；異噁唑、吡唑或異噻唑之3、4或5位；氮丙啶之2或3位；吖環丁烷之2、3或4位；喹啉之2、3、4、5、6、7或8位；或異喹啉之1、3、4、5、6、7或8位上。碳鍵結雜環更通常包括2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、3-噠嗪基、4-噠嗪基、5-噠嗪基、6-噠嗪基、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。

舉例而言且不加限制，氮鍵結雜環係鍵結於氮丙啶、吖環丁烷、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啶、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、吲哚啉、1H-吲唑之1位；異吲哚或異吲哚啉之2位；嗎啉之4位；及咔唑或β咔啉之9位上。氮鍵結雜環更通常包括1-氮丙啶基、1-吖丁啶基、1-吡咯基、1-咪唑基、1-吡唑基及1-哌啶基。

"C_3-C_8雜環"係指其中環碳原子之一至四者獨立地經選自由O、S及N組成之群之雜原子置換的芳族或非芳族C_3-C_8碳環。C_3-C_8雜環之代表性實例包括(但不限於)苯幷呋喃基、苯幷噻吩、吲哚基、苯幷吡唑基、香豆素基、異喹啉基、吡咯基、噻吩基、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、噠嗪基、異噻唑基、異噁唑基及四唑基。C_3-C_8雜環可未經取代或經至多7個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-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、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$及-CN；其中R'各自獨立地選自H、-C_1-C_8烷基及芳基。

"C_3-C_8雜環基"係指其中雜環基之氫原子之一者經一鍵置換的如上定義之C_3-C_8雜環基。C_3-C_8雜環基可未經取代或經至多6個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'

200817434

、-C(O)NH_2、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')$_2$、-NHC(O)R'、-S(O)$_2$R'、-S(O)R'、-OH、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-N(R')$_2$及-CN；其中R'各自獨立地選自H、-C_1-C_8烷基及芳基。

"碳環"意謂具有3至7個碳原子(作為單環)或7至12個碳原子(作為雙環)之飽和或不飽和環。單環狀碳環具有3至6個環原子，更通常5或6個環原子。雙環狀碳環具有7至12個環原子(例如排列為雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統)，或9或10個環原子(排列為雙環[5,6]或[6,6]系統)。單環狀碳環之實例包括環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環庚基及環辛基。

"C_3-C_8碳環"為3員、4員、5員、6員、7員或8員飽和或不飽和非芳族碳環狀環。代表性C_3-C_8碳環包括(但不限於)-環丙基、-環丁基、-環戊基、-環戊二烯基、-環己基、-環己烯基、-1,3-環己二烯基、-1,4-環己二烯基、-環庚基、-1,3-環庚二烯基、-1,3,5-環庚三烯基、-環辛基及-環辛二烯基。C_3-C_8碳環基團可未經取代或經一或多個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-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、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-N(R')$_2$及-CN；其中R'各自獨立地選自H、-C_1-C_8烷基及芳基。

"C_3-C_8碳環基"係指碳環基團之氫原子之其中一者經一鍵置換的如上所定義之C_3-C_8碳環基團。

"連接子"係指包含將抗體與藥物部分共價連接之原子之共價鍵或鏈的化學部分。在各種實施例中，連接子包括二價基團(諸如烷二基、芳二基、雜芳二基)、部分(諸如：-$(CR_2)_nO(CR_2)_n$-)、烷氧基之重複單元(例如聚伸乙基氧基、PEG、聚亞甲基氧基)及烷胺基之重複單元(例如聚伸乙基胺基、Jeffamine™)；及二酸酯及醯胺，其包括琥珀酸酯、琥珀醯胺、二羥乙酸酯、丙二酸酯及己醯胺。

術語"對掌性"係指具有鏡像搭配物之不重疊性質之分子，而術語"非對掌性"係指在其鏡像搭配物上可重疊之分子。

術語"立體異構體"係指具有相同化學結構，但原子或基團空間排列不同之化合物。

"非對映異構體"係指具有兩個或兩個以上對掌性中心之立體異構體且其之分子並非彼此之鏡像。非對映異構體具有不同之物理性質，例如熔點、沸點、光譜性質及反應性。非對映異構體之混合物可在高離析分析程序(諸如電泳及層析法)下分離。

"對映異構體"係指為彼此之不重疊鏡像之化合物的兩種立體異構體。

本文中使用之立體化學定義及慣例通常遵循S. P. Parker編，McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；及Eliel, E.及Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York。許多有機化合物以光

學活性形式存在，亦即，其具有旋轉平面偏振光之平面的能力。在描述光學活性化合物時，字首D及L，或R及S係用於表示分子關於其對掌性中心之絕對構型。字首d及l或(+)及(-)係用於表示化合物使平面偏振光旋轉之符號，其中(-)或l意謂化合物為左旋。具有字首(+)或d之化合物為右旋。對於給定化學結構，除了該等立體異構體為彼此之鏡像之外，其為相同的。特定立體異構體亦可稱作對映異構體，且該等異構體之混合物通常被稱作對映異構混合物。對映異構體之50:50混合物被稱作外消旋混合物或外消旋體，在化學反應或過程中已無立體選擇或立體特異性時其可存在。術語"外消旋混合物"及"外消旋體"係指缺乏光學活性之兩種對映異構物質之等莫耳混合物。

"離去基"係指可經另一官能基取代之官能基。某些離去基在此項技術中為已知的，且實例包括(但不限於)鹵離子(例如，氯離子、溴離子、碘離子)、甲烷磺醯基(甲磺醯基)、對甲苯磺醯基(甲苯磺醯基)、三氟甲基磺醯基(三氟甲磺酸酯基)及三氟甲基磺酸酯基。

縮寫

連接子組份：

MC=6-順丁烯二醯亞胺基己醯基

Val-Cit或"vc"=纈胺酸-瓜胺酸(蛋白酶可分裂連接子中之例示性二肽)

瓜胺酸=2-胺基-5-脲基戊酸

PAB=對胺基苄氧羰基("自供"連接子組份之實例)

Me-Val-Cit=N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸(其中連接子肽鍵已經修飾以防止其由組織蛋白酶B分裂)

MC(PEG)6-OH=順丁烯二醯亞胺基己醯基-聚乙二醇(可與抗體半胱胺酸連接)。

SPP=N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯

SPDP=丙酸N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)酯

SMCC=環己烷-1-羧酸琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)酯

IT=亞胺硫烷

細胞毒性藥物：

MMAE=單甲基奧利斯坦汀E(MW 718)

MMAF=在藥物之C末端具有苯丙胺酸之奧利斯坦汀E(MMAE)的變異體(MW 731.5)

MMAF-DMAEA=在C-末端苯丙胺酸之醯胺鍵中具有DMAEA(二甲基胺基乙基胺)之MMAF(MW 801.5)

MMAF-TEG=具有酯化為苯丙胺酸之四乙二醇之MMAF

MMAF-NtBu=以醯胺形式連接至MMAF之C末端的N-第三丁基

DM1=N(2')-脫乙醯基-N(2')-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素

DM3=N(2')-脫乙醯基-N2-(4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素

DM4=N(2')-脫乙醯基-N2-(4-巰基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素

其他縮寫如下：AE為奧利斯坦汀E，Boc為N-(第三丁氧

羰基)，cit為瓜胺酸，dap為多拉普因(dolaproine)，DCC為1,3-二環己基碳化二醯亞胺，DCM為二氯甲烷，DEA為二乙胺，DEAD為偶氮二甲酸二乙酯，DEPC為磷醯基氰酸二乙酯，DIAD為偶氮二甲酸二異丙酯，DIEA為N,N-二異丙基乙胺，dil為多拉異白胺酸(dolaisoleucine)，DMA為二甲基乙醯胺，DMAP為4-二甲基胺基吡啶，DME為乙二醇二甲醚(或1,2-二甲氧基乙烷)，DMF為N,N-二甲基甲醯胺，DMSO為二甲亞碸，doe為dolaphenine(α-(噻唑基)苯乙基胺基)，dov為N,N-二甲基纈胺酸，DTNB為5,5'-二硫基雙(2-硝基苯甲酸)，DTPA為二伸乙基三胺五乙酸，DTT為二硫蘇糖醇，EDCI為1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二醯亞胺鹽酸鹽，EEDQ為2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉，ES-MS為電噴質譜分析，EtOAc為乙酸乙酯，Fmoc為N-(9-芴基甲氧基羰基)，gly為甘胺酸，HATU為六氟磷酸O-(7-氮雜苯幷三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎓，HOBt為1-羥基苯幷三唑，HPLC為高壓液相層析，ile為異白胺酸，lys為離胺酸，MeCN(CH_3CN)為乙腈，MeOH為甲醇，Mtr為4-大茴香基二苯基甲基(或4-甲氧基三苯甲基)，nor為(1S，2R)-(+)-去甲麻黃鹼，PBS為磷酸鹽緩衝之鹽水(pH 7.4)，PEG為聚乙二醇，Ph為苯基，Pnp為對硝基苯基，MC為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基，phe為L-苯丙胺酸，PyBrop為溴基參吡咯啶基鏻六氟磷酸鹽，SEC為尺寸排阻層析，Su為琥珀醯亞胺，TFA為三氟乙酸，TLC為薄層層析，UV為紫外線，且val為纈胺酸。

組合物及製造該等組合物之方法

本發明提供與CD22結合之抗體。提供包含抗CD22抗體之免疫接合物。本發明之抗體及免疫接合物適用於(例如)診斷或治療與改變之表現(例如，增加之CD22表現)相關的病症。在某些實施例中，本發明之抗體或免疫接合物適用於診斷或治療細胞增生性病症，諸如癌症。

抗CD22抗體

在一態樣中，本發明提供與CD22結合之抗體。在一些實施例中，提供與人類及獼猴(cyno)CD22之成熟形式結合之抗體。在一此實施例中，人類CD22之成熟形式具有SEQ ID NO:27之胺基酸序列。成熟、主要人類同功異型物具有包含7個類Ig域之細胞外域及SEQ ID NO:28之胺基酸序列。在另一實施例中，缺乏細胞外域3及4之人類CD22之次要同功異型物具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列。次要同功異型物之細胞外域之胺基酸序列為SEQ ID NO:30。獼猴CD22具有SEQ ID NO:31之胺基酸序列。在一些實施例中，CD22之抗體與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合。在一些實施例中，與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合的抗體抑制細胞生長。在一些實施例中，抗CD22抗體與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合且抑制細胞增殖。在某些實施例中，抗CD22抗體與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合且誘發細胞死亡。在一些實施例中，抗CD22抗體與表現於癌細胞表面上之CD22之成熟形式結合。在一些實施例中，相對於同一組

織來源之正常細胞，抗CD22抗體與表現於癌細胞表面上之CD22之成熟形式結合。在一些實施例中，抗CD22抗體與細胞毒素或可偵測標記接合且在細胞表面上與CD22結合。在一些實施例中，抗體-毒素接合物抑制細胞生長。在一些實施例中，抗體-可偵測標記接合物使得在其表面上表現CD22之細胞在活體外或活體內可偵測。

在一態樣中，抗CD22抗體為單株抗體。在一態樣中，抗CD22抗體為抗體片段，例如，Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段。在一態樣中，抗CD22抗體為嵌合、人類化或人類抗體。在一態樣中，本文中描述之抗CD22抗體之任一者經純化。

本文中提供來源於噬菌體庫之例示性單株抗體。用於篩檢該庫之抗原為具有SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:30之胺基酸序列(對應於CD22之細胞外域(ECD)β及α)之序列的多肽。由庫篩檢產生之抗體為親和力成熟的。

在一態樣中，提供用於與CD22結合之與鼠10F4.4.1、人類化10F4v1及v3及鼠5E8.1.8競爭的單株抗體。亦提供與鼠10F4.4.1、人類化10F4v1及v3及鼠5E8.1.8相同之抗原決定基結合的單株抗體。

在本發明之一態樣中，提供編碼抗CD22抗體之聚核苷酸。在某些實施例中，提供包含編碼抗CD22抗體之聚核苷酸的載體。在某些實施例中，提供包含該等載體之宿主細胞。在本發明之另一態樣中，提供包含抗CD22抗體或編碼抗CD22抗體之聚核苷酸的組合物。在某些實施例

中，本發明之組合物為用於治療細胞增生性病症(諸如本文中列舉之彼等病症)之醫藥調配物。

抗體投予及調配物

在一實施例中，本發明之抗CD22抗體或抗CD22抗體藥物接合物(包括(但不限於)本發明之抗CD22 thiomab藥物接合物)係與B細胞表面抗原之拮抗劑組合投予。與一或多種其他治療劑"組合"投藥包括同時(共同)投藥及以任何次序連續投藥。在一實施例中，投藥為連續或依序投藥。在另一實施例中，投藥為以同一調配物同時、共同或一起投藥。在一實施例中，B細胞表面抗原拮抗劑為其抗體或抗原結合片段。在一實施例中，B細胞表面拮抗劑為抗體藥物接合物。

本文中調配物可含有待治療之特定病症所需之一種以上活性化合物，較佳具有不彼此不利影響之互補活性的彼等活性化合物。舉例而言，除抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或CD22結合寡肽之外，另一抗體，例如與CD22多肽上之不同抗原決定基結合之第二抗CD22抗體，或與不同B細胞表面抗原結合之第二抗體，或諸如影響特定癌症之生長之生長因子的一些其他標靶之抗體，可需要包括於一調配物中。另外或其他，組合物可進一步包含化學治療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或心臟保護劑。該等分子適合地以可有效用於意欲目的之量組合存在。

目前，視癌症之階段而定，癌症治療包括以下療法之一

種或組合：移除癌組織之手術、放射線療法及化學療法。在不耐受化學療法井之毒性及副作用之老年患者中及在其中放射線療法具有有限有效性之轉移性疾病中，抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽療法可為尤其合意的。在疾病之初始診斷後或在復發期間，本發明之腫瘤靶向抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽適用於減輕表現CD22之癌症。對於治療應用而言，抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽可單獨或以與(例如)激素、抗血管生成劑或放射標記化合物或與手術、冷凍療法及/或放射線療法之組合療法使用。抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽治療可連續、在習知療法之前或之後與其他形式之習知療法一起施用。在用於治療或減輕癌症之本發明之方法中，在以前述化學治療劑之一或多者治療的同時，癌症患者可經投予抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽。抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽應與治療有效劑量之化學治療劑一起投予。在另一實施例中，抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽係與化學療法一起投予以增強化學治療劑之活性及功效。Physicians' Desk Reference(PDR)揭示已用於治療各種癌症之該等試劑之劑量。治療有效之該等前述化學治療藥物之給藥方案及劑量應視待治療之特定癌症、疾病之程度及熟習此項技術之醫師熟知之其他因素而定且可由醫師來確定。

在一特定實施例中，包含與細胞毒性劑接合之抗CD22

200817434

抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽的接合物經投予患者。與CD22蛋白結合之免疫接合物係由細胞內化，其使得免疫接合物殺死與其結合之癌症細胞的治療功效增大。在一實施例中，細胞毒性劑靶向或干擾癌細胞中之核酸。細胞毒性劑之實例經上文描述且包括奧利斯坦汀、美登素類物、刺孢黴素、核糖核酸酶及DNA核酸內切酶，或其生物活性衍生物。

抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽或其毒素接合物係根據已知方法(諸如靜脈內投藥(例如，以單次輸液或經一段時期連續輸液之形式)，由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑液內、鞘內、口服、局部或吸入途徑)投予人類患者。抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽之靜脈內或皮下投藥為較佳的。

其他治療方案可與抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽之投予組合。組合投藥包括使用單獨調配物或單一醫藥調配物之共同投藥，及以任一次序之連續投藥，其中較佳存在一段時期，此時兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。此組合療法較佳產生協同治療效果。

亦可需要將抗CD22抗體或抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽之投予與特定癌症相關之針對另一腫瘤抗原或B細胞表面抗原之抗體的投予組合。

在另一實施例中，本發明之治療性治療方法包括抗CD22抗體(或抗體)、抗CD22抗體藥物接合物(類)或寡肽(類)及一或多種化學治療劑或生長抑制劑之組合投予，其

200817434

包括共同投予不同化學治療劑之混合液。化學治療劑包括雌莫司汀磷酸鹽、潑尼莫司汀、順鉑、5-氟尿嘧啶、美法侖、環磷醯胺、羥基脲及羥基脲紫杉烷(諸如紫杉醇及多西他賽)及/或蒽環黴素抗生素，以及藥劑組合，諸如(但不限於)CHOP或FOLFOX。可根據製造商之指示或按照熟練行醫者經驗確定來使用該等化學治療劑之製劑及給藥時程。該化學療法之製劑及給藥時程亦描述於Chemotherapy Service，M.C. Perry編，Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中。

抗體係藉由任何適當方式投予，包括非經腸、局部、皮下、腹膜內、肺內、鼻內及/或病灶內投藥。非經腸輸液包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。亦涵蓋鞘內投藥(參見(例如)美國專利申請案第2002/0009444號，Grillo-Lopez, A，關於CD20抗體之鞘內遞送)。較佳經靜脈內或皮下給藥。

第二藥物可與治療劑抗體或免疫黏附素之初始暴露及/或後來暴露一起投予，該組合投藥包括使用單獨調配物或單一醫藥調配物之共同投藥，及以任一次序之連續投藥，其中較佳存在一段時期，此時兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。

儘管治療劑抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物、免疫黏附素或其他生物劑可以單一藥劑形式投予以治療自體免疫疾病，但通常治療劑抗體或免疫黏附素應與一或多種第二藥物組合。舉例而言，對於RA及其他自體免疫疾病

而言，抗體、免疫黏附素或其他生物藥物較佳與以下各物組合：上文定義部分中列舉之免疫抑制劑、化學治療劑、BAFF拮抗劑、整合素拮抗劑或抗體及/或細胞激素之任一或多者；改善疾病之抗類風濕藥物(DMARD)之一或多者，諸如羥基氯喹、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、甲胺喋呤、來氟米特(leflunomide)、硫唑嘌呤、D-青黴胺、Gold(口服)、Gold(肌肉內)、二甲胺四環素、環孢黴素(cyclosporine)；葡萄球菌蛋白A免疫吸附；靜脈內免疫球蛋白(IVIG)；非類固醇消炎藥(NSAID)；糖皮質激素(例如經由關節注射)；皮質類固醇(例如甲潑尼龍及/或潑尼龍)；葉酸鹽；抗腫瘤壞死因子(TNF)拮抗劑，例如依那西普(etanercept)/ENBREL™、英利昔單抗(infliximab)/REMICADE™、D2E7(Knoll)或CDP-870(Celltech)；IL-1R拮抗劑(例如Kineret)；1L-10拮抗劑(例如Ilodecakin)；凝血調節劑(例如WinRho)；IL-6拮抗劑/抗TNF(CBP 1011)；CD40拮抗劑(例如IDEC 131)；Ig-Fc受體拮抗劑(MDX33)；免疫調節劑(例如撒利多胺(thalidomide)或ImmuDyn)；抗CD5抗體(例如H5g1.1)；巨噬細胞抑制劑(例如MDX 33)；協同刺激阻斷劑(例如BMS 188667或Tolerimab)；補體抑制劑(例如h5G1.1、3E10或抗衰變加速因子(DAF)抗體)；IL-2拮抗劑(zxSMART)；EGFR抑制劑(參見上文定義)；酪胺酸激酶抑制劑(參見上文定義)；抗血管生成劑(例如VEGF抗體，諸如貝法滋美(bevacizumab))；CD22抗體，諸如LL2或易普拉單抗(LYMPHOCIDE®；Immunomedics)(其

包括易普拉單抗Y-90(Juweid等人，Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s(1995)))、Abiogen之CD22抗體(Abiogen, Italy)、CMC 544(Wyeth/Celltech)、combotox(UT Soutwestern)、BL22(NIH)及LympoScan Tc99(Immunomedics)；EpCAM抗體，諸如17-1A(PANOREX®)；∀v∃3抗體(例如VITAXIN®；Medimmune)；CD37抗體，諸如TRU 016(Trubion)；IL-21抗體(Zymogenetics/Novo Nordisk)；抗B細胞抗體(Impheron)；靶向B細胞之MAb(Immunogen/Aventis)；1D09C3(Morphosys/GPC)；LymphoRad 131(HGS)；Lym-1抗體Y-90(USC)；LIF 226(Enhanced Lifesci.)；BAFF抗體(例如，WO 03/33658)；BAFF受體抗體(例如，WO 02/24909)；BR3抗體；Blys抗體，諸如貝利單抗(belimumab)；LYMPHOSCD22-B™；抗Lym-1 Oncolym(USC/Peregrine)；ISF 154(UCSD/Roche/Tragen)；gomiliximа(Idec 152；Biogen Idec)；IL-6受體抗體，諸如阿利珠單抗(atlizumab)(ACTEMRA™；Chugai/Roche)；IL-15抗體，諸如HuMax-Il-15(Genmab/Amgen)；趨化因子受體抗體，諸如CCR2抗體(例如MLN1202；Millieneum)；抗補體抗體，諸如C5抗體(例如艾庫珠單抗(eculizumab)，5G1.1；Alexion)；人類免疫球蛋白之口服調配物(例如IgPO；蛋白質療法)；IL-12抗體，諸如ABT-874(CAT/Abbott)；特奈裏單抗(Teneliximab)(BMS-224818)；B細胞疫苗；DN-BAFF(Xencor)；CRx-119(CombinatoRx)；Amgen之BAFF

拮抗劑；Pentostatin(Pfizer)；IC-485(ICOS)；趨化因子拮抗劑，諸如T-487(Tularik)或Reticulose(AVR-118)；SCO-323(SCIOS)；整合素拮抗劑683699、Tanabe、NGD-2001-1(Neurogen)；SCIO-469(SCIOS)；BIRB-796(Boehringer Ingelheim)；VX702、VX850(Vertex)；白三烯素(Leukotriene)B-4拮抗劑(諸如amelubunt(N-(乙氧羰基)-4-[3-[4-[1-(4-羥苯基)-1-甲基乙基]苯氧基甲基]苄氧基]苯羰醯亞胺醯胺)、BIIL-284；BI)；微管調節劑(Paxceed；Angiotech)；蛋白酶抑制劑(MBS561392；BMS)；AGIX-4207(Atherogenics)；ISIS-104838(ISIS/Elan)；MFG-IRAP(Univ. Pitt.)；IL-1 Trap(RGN-303；Regeneron/Novartis)；奧瑞維金(oprelvekin)(Wyeth)；依維莫司(everolimus)(Certican；Novartis)；Amevive(Biogen Idec)；ORG-39141(Organon)；FK-506(Fujisawa)；及IL-2拮抗劑(tacrolimus；Fujisawa)。

例示性抗CD22抗體之詳細描述如下：

1.抗CD22抗體之特定實施例

在一態樣中，本發明提供一種包含至少一種、兩種、三種、四種、五種或六種HVR之抗體，該等抗體係選自(a)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之任一者之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及(f)包含選自SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3。

在一態樣中，本發明提供一種包含至少一種、至少兩種或所有三種VH HVR序列之抗CD22抗體，其中該等序列係選自：(a)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及包含選自SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及包含選自SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；及包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包含至少一種、至少兩種

200817434

或所有三種VL HVR序列之抗CD22抗體，其中該等序列係選自：(a)包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及(c)包含選自SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-L1的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:19-23之胺基酸序列之HVR-L1的抗CD22抗體。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由V置換(N28V胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:10)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由A置換(N28A胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:19)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由Q置換(N28Q胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:20)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由S置換(N28S胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:21)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由D置換(N28D胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:22)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由I置換(N28I胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:23)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之胺基酸序列之任一者的HVR-

200817434

L1之抗CD22抗體。在一態樣中，HVR-L1為SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23之任一者且在位置N30處之胺基酸(在位置30處之天冬醯胺酸)係由A置換(N30A胺基酸改變)。在一態樣中，HVR-L1為SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23之任一者且在位置N30處之胺基酸(在位置30處之天冬醯胺酸)係由Q置換(N30Q胺基酸改變)。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。在一些實施例中，CD22抗體進一步包含(a)包含SEQ ID NO:2之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之HVR-H2。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2。在一些實施例中，CD22抗體進一步包含(a)包含SEQ ID NO:2之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之HVR-H2。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)包含選自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22及23之胺基酸序列之HVR-L1。在一些實施例中，CD22抗體進一步包含(a)包含SEQ ID NO:2之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之HVR-H2。在一些實施例中，SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23之胺基酸序列包含N30A或N30Q胺基酸改變。在一些實施例中，CD22抗體進一步包括包含SEQ ID NO:12之胺基

酸序列之HVR-L2。在一些實施例中，CD22抗體進一步包括包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含：(a)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含選自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之胺基酸序列之HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。在一些實施例中，本發明進一步提供選定為HVR-L1之胺基酸序列SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23係藉由N30A或N30Q胺基酸改變來修飾。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:16之重鏈可變域之抗CD22抗體(參見圖2A，h10F4v1)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:17之輕鏈可變域之抗CD22抗體(參見圖2B，h10F4v1)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:18之輕鏈可變域之抗CD22抗體(參見圖2B，h10F4v3)。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:34之重鏈之抗CD22抗體(參見圖2A，m10F4)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:35之輕鏈之抗CD22抗體(參見圖2B，m10F4)。

在一態樣中，本發明提供一種包含1、2、3、4、5或6個藉由以ATCC沈積之融合瘤產生之抗體10F4.4.1的HVR序列

200817434

且具有寄存編號PTA-7621之抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包含1、2、3、4、5或6個藉由以ATCC沈積之融合瘤產生之抗體5E8.1.8的HVR序列且具有寄存編號PTA-7620之抗CD22抗體。

抗CD22抗體可包含任何適合框架可變域序列，其限制條件為抗體保持結合CD22之能力。舉例而言，在一些實施例中，本發明之抗CD22抗體包含人類亞群III重鏈框架一致序列。在該等抗體之一實施例中，重鏈框架一致序列包含在位置71、73及/或78處之取代。在該等抗體之一實施例中，位置71為A，位置73為T，及/或位置78為A。在一實施例中，該等抗體包含huMAb4D5-8之重鏈可變域框架序列，例如，SEQ ID NO:1、3、5、7(分別為FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4)。huMAb4D5-8在商業上稱作HERCEPTIN® 抗HER2抗體，Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA；在美國專利第6,407,213號及第5,821,337號及Lee等人，J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93中亦提及。在一此實施例中，該等抗體進一步包含人類I輕鏈框架一致序列。在一此實施例中，該等抗體包含huMAb4D5-8之輕鏈可變域框架序列，例如SEQ ID NO:8、1、13、15(分別為FR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-L4)。

在一實施例中，抗CD22抗體包括包含框架序列之重鏈可變域及高變區，其中該框架序列分別包含FR-H1-FR-H4序列SEQ ID NO:1、3、5及7；HVR H1包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列；且

HVR-H3包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列。在一實施例中，抗CD22抗體包括包含框架序列之輕鏈可變域及高變區，其中該框架序列分別包含SEQ ID NO:8、11、13及15之FR-L1-FR-L4序列；HVR-L1包含選自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22及23之胺基酸序列，其中SEQ ID NO:9-10或19-23之任一者可包含N30A或N30Q胺基酸改變；HVR-L2包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列；且HVR-L3包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在該等抗體之一實施例中，重鏈可變域包含SEQ ID NO:16且輕鏈可變域包含SEQ ID NO:17或18。

在一些實施例中，本發明提供一種包含重鏈可變域之抗CD22抗體，其中該重鏈可變域包含與胺基酸序列SEQ ID NO:16具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、插入或缺失，但包含彼胺基酸序列之抗體保持與CD22結合之能力。在一些實施例中，在序列SEQ ID NO:16中，總共1至10個胺基酸已經取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插入或缺失發生於HVR外之區域中(亦即，在FR中)。在一些實施例中，抗CD22抗體包括包含選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變域。

在一些實施例中，本發明提供一種包含如下所述之重鏈

可變域之抗CD22抗體。

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殘基加底線)。

在一些實施例中，重鏈HVR及FR序列包含以下：

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)

在一些實施例中，本發明提供一種包含如下所述之輕鏈可變域之抗CD22抗體。

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殘基加底線且位置N28為粗體類型)

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殘基加底線且位置N28V為粗體類型)。

在一些實施例中，輕鏈HVR序列包含以下：

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)。

在一些實施例中，輕鏈FR序列包含以下：

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)。

在一態樣中，本發明提供一種包含輕鏈可變域之抗CD22抗體，其中該輕鏈可變域包含與選自SEQ ID NO:17或18之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、添加或缺失，但包含彼胺基酸序列之抗體保持與CD22結合之能力。在一些實施例中，在選自SEQ ID NO:17或18之序列中，總共1至10個胺基酸已經取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插入或缺失發生於HVR外之區域中(亦即，在FR中)。在一些實施例中，抗CD22抗體包括包含選自SEQ ID

200817434

NO:17或18之胺基酸序列之輕鏈可變域。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含與選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列的重鏈可變域；及(b)包含與選自SEQ ID NO:17或18之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的輕鏈可變域。在一些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、添加或缺失，但包含彼胺基酸序列之抗體保持與CD22結合之能力。在一些實施例中，在參照序列中，總共1至10個胺基酸已經取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插入或缺失發生於HVR外之區域中(亦即，在FR中)。在一些實施例中，抗CD22抗體包括包含選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變域及包含選自SEQ ID NO:18之胺基酸序列之輕鏈可變域。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)選自圖2A中展示之彼等VH HVR之一種、兩種或三種VH HVR及/或(b)選自圖2B中展示之彼等VL HVR之一種、兩種或三種VL HVR。在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含選自圖2A中展示之彼等重鏈可變域之重鏈可變域及選自圖2B中展示之彼等輕鏈可變域之輕鏈可變域。

在一態樣中，本發明之抗CD22抗體包含1、2、3、4、5

200817434

或6個藉由以ATCC沈積之融合瘤產生且具有寄存編號PTA-7620之5E8.1.8抗體的高變區。

2.抗體片段

本發明涵蓋抗體片段。抗體片段可藉由傳統方式(諸如酶消化)或藉由重組技術產生。在某些情形下，使用抗體片段而非使用整個抗體具有優勢。較小尺寸之片段容許迅速清除，且可產生對實體腫瘤接近之改良。關於某些抗體片段之概述，參見Hudson等人(2003) Nat. Med. 9:129-134。

已開發各種技術用於製備抗體片段。傳統上，該等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化產生(參見(例如)Morimoto等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；及Brennan等人，Science, 229:81 (1985))。然而，現可藉由重組宿主細胞直接產生該等片段。Fab、Fv及ScFv抗體片段均可表現於大腸桿菌中且由大腸桿菌分泌，因而易於產生大量該等片段。可自上文所論述之抗體噬菌體庫中分離抗體片段。或者，可直接自大腸桿菌回收Fab'-SH片段且使其化學偶合以形成$F(ab')_2$片段(Carter等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根據另一方法，可直接自重組宿主細胞培養物中分離$F(ab')_2$片段。包含補救受體結合抗原決定基殘基之具有增加之活體內半衰期的Fab及$F(ab')_2$片段描述於美國專利第5,869,046號中。熟練技術者應顯而易見用於製備抗體片段之其他技術。在某些實施例中，抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參見WO

93/16185；美國專利第5,571,894號；及第5,587,458號。Fv及scFv為具有缺乏恆定區之完整結合位點之唯一物質；因此，在活體內用途中，其可適用於降低之非特異性結合。可建構scFv融合蛋白以在scFv之胺基或羧基末端處產生效應蛋白之融合。參見Antibody Engineering，Borrebaeck編，同上文。抗體片段亦可為"線性抗體"，例如，如美國專利第5,641,870號中所述。該等線性抗體可為單特異性或雙特異性。

3.人類化抗體

本發明涵蓋人類化抗體。此項技術中已知用於人類化非人類抗體之各種方法。舉例而言，人類化抗體可具有一或多個自非人類來源引入其中之胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基通常被稱作"引入"殘基，其通常取自"引入"可變域。人類化本質上可藉由取代人類抗體之相應序列之高變區序列，遵循Winter及合作者之方法(Jones等人(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323-327；Verhoeyen等人(1988) *Science* 239:1534-1536)來進行。因此，該等"人類化"抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號)，其中大體上小於完整人類可變域之序列已經來自非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為其中一些高變區殘基及可能一些FR殘基經來自齧齒動物抗體中類似位點之殘基取代的人類抗體。

用於製造人類化抗體之人類可變域(輕鏈與重鏈兩者)之選擇對於降低抗原性而言可為重要的。根據所謂"最適合"

方法，針對全部已知人類可變域序列庫篩檢齧齒動物抗體之可變域序列。隨後將最接近齧齒動物之序列之人類序列理解為人類化抗體之人類框架(Sims等人(1993) *J. Immunol.* 151:2296；Chothia等人(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901)。另一方法使用來源於特定輕鏈或重鏈亞群之所有人類抗體之一致序列的特定框架。相同框架可用於若干不同之人類化抗體(Carter等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285；Presta等人(1993) *J. Immunol.*, 151:2623)。

另外，通常需要經人類化而保持對抗原之高親和力及其它有利生物學特性的抗體。為達成此目的，根據一方法，藉由使用親本序列及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種概念上之人類化產物的方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常為可用的且為熟習此項技術者所熟知。電腦程式為可用的，其說明且顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構。該等顯示之檢查容許分析殘基在候選免疫球蛋白序列機能中之可能作用，意即分析影響候選免疫球蛋白與其抗原結合之能力的殘基。以此方式，可選擇FR殘基，且將FR殘基與受體組合且輸入序列中使得達成所需抗體特性(諸如增加之對該(等)靶向抗原之親和力)。通常，高變區殘基係直接且大體上涉及影響抗原結合。

4.人類抗體

可藉由將選自人類來源之噬菌體呈現庫之Fv純系可變域序列與如上所述之已知人類恆定域序列組合來建構本發明

之人類抗CD22抗體。或者，可藉由融合瘤法來製造本發明之人類單株抗CD22抗體。用於製備人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株已由以下文獻描述，例如，Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)；Brodeur等人，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications，第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及Boerner等人，J. Immunol., 147: 86 (1991)。

現在有可能產生經免疫化後能夠在不存在內源性免疫球蛋白產生之情況下產生人類抗體之完全譜系的轉殖基因動物(例如小鼠)。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變體小鼠中抗體重鏈連接區(JH)基因的純合子缺失導致對於內源性抗體產生之完全抑制。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系突變體小鼠中將會在抗原激發後引起人類抗體之產生。參見(例如)Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362: 255 (1993)；Bruggermann等人，Year in Immunol., 7: 33 (1993)。

亦可使用基因改組以自非人類(例如齧齒動物)抗體得到人類抗體，其中該人類抗體具有與初始非人類抗體相似之親和力及特異性。根據此方法(亦稱為"抗原決定基印記")，以人類V域基因譜系置換藉由如本文中所述之噬菌體呈現技術獲得的非人類抗體片段之重鏈或輕鏈可變區，從而產生非人類鏈/人類鏈scFv或Fab嵌合體之群體。以抗原進行

選擇導致非人類鏈/人類鏈嵌合scFv或Fab之分離，其中該人類鏈恢復在移除原代噬菌體呈現純系中之相應非人類鏈時損壞的抗原結合位點，亦即抗原決定基決定(印記)對於人類鏈搭配物之選擇。當重複該過程以置換剩餘非人類鏈時，獲得人類抗體(參見1993年4月1日公開之PCT WO 93/06213)。與藉由CDR移植進行之非人類抗體之傳統人類化不同，此技術提供不具有非人類來源之FR或CDR殘基的完整人類抗體。

5.雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩種不同抗原具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，雙特異性抗體為人類或人類化抗體。在某些實施例中，該結合特異性之一者係對於CD22且另一者係對於任何其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可與CD22之兩種不同之抗原決定基結合。雙特異性抗體亦可用以將細胞毒性劑限定於表現CD22之細胞中。該等抗體具有一CD22結合臂及一結合細胞毒性劑(諸如，沙泊寧(saporin)、抗干擾素-α、長春花生物鹼、蓖麻毒素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。可製備呈全長抗體或抗體片段形式之雙特異性抗體(例如，$F(ab')_2$雙特異性抗體)。

此項技術中已知用於製造雙特異性抗體之方法。傳統上，雙特異性抗體之重組製備係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中該兩個重鏈具有不同之特異性(Milstein及Cuello, Nature, 305: 537 (1983))。由於免疫球

200817434

蛋白重鏈及輕鏈之隨機分類，該等融合瘤(四體瘤(quadroma))產生10種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。通常藉由親和層析步驟進行之恰當分子的純化相當繁瑣，且產物產率低。類似程序揭示於1993年5月13日公開之WO 93/08829及Traunecker等人，EMBO J., 10:3655 (1991)中。

根據不同方法，將具有所需結合特異性之抗體可變域(抗體-抗原結合位點)融合於免疫球蛋白恆定域序列中。融合(例如)係與包含鉸鏈區、CH2及CH3區之至少部分之免疫球蛋白重鏈恆定域一起進行的。在某些實施例中，含有輕鏈結合所必需之位點之第一重鏈恆定區(CH1)係存在於至少一種融合體中。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及(必要時)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入獨立表現載體中，且使其共轉染至適當宿主有機體中。在建構時使用不等比率之三種多肽鏈來提供最佳產率之實施例中，此在三種多肽片段的相互比例之調節中提供極大靈活性。然而，當以相等比率之至少兩種多肽鏈表現產生高產率或當該等比率並非特別重要時，有可能將兩種或所有三種多肽鏈之編碼序列插入一表現載體中。

在此方法之一實施例中，雙特異性抗體係由一臂中具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈及另一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)組成。已發現由於免疫球蛋白輕鏈僅存在於一半雙特異性分子中提供一簡便之分離方式，因此此不對稱結構會促進所需雙特異

性化合物與不需之免疫球蛋白鏈組合之分離。此方法揭示於WO 94/04690中。關於產生雙特異性抗體之其他細節，參見(例如)Suresh等人，Methods in Enzymology, 121:210 (1986)。

根據另一方法，可設計一對抗體分子之間之界面以使自重組細胞培養物回收之異二聚體的百分比最大化。該界面包含抗體恆定域之至少一部分C_H3域。以此方法，以較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換來自第一抗體分子界面之一或多個小胺基酸側鏈。藉由用小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而於第二抗體分子之界面上產生具有與大側鏈相同或類似的尺寸之補償性"空穴"。此提供一種使異二聚體之產量增加超過其它不需之最終產物(諸如均二聚體)的機制。

雙特異性抗體包括交聯或"雜接合物"抗體。舉例而言，雜接合物中抗體之一者可與抗生蛋白偶合，其它抗體與生物素偶合。例如，已建議該等抗體將免疫系統細胞靶向不需之細胞(美國專利第4,676,980號)，且用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373及EP 03089)。可使用任何便利之交聯方法來製造雜接合物抗體。適合交聯劑在此項技術中為熟知的，且揭示於美國專利第4,676,980號以及大量交聯技術中。

自抗體片段產生雙特異性抗體的技術已描述於文獻中。舉例而言，可使用化學鍵來製備雙特異性抗體。Brennan等人，Science, 229:81 (1985)描述其中完整抗體經蛋白水

200817434

解分裂以產生$F(ab')_2$片段之程序。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下還原該等片段以穩定鄰近二硫醇且防止分子間二硫化物形成。隨後，將所產生之Fab'片段轉化為硫代硝基苯甲酸鹽(TNB)衍生物。隨後藉由用巯基乙胺還原將一種Fab'-TNB衍生物再轉化為Fab'-硫醇，且使其與等莫耳量之另一種Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作用於選擇性固定酶之試劑。

近來之發展已促進自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段，該等片段可經化學偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)描述完全人類化雙特異性抗體$F(ab')_2$分子之產生。各Fab'片段係由大腸桿菌單獨地分泌且經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。因此所形成之雙特異性抗體能夠與過度表現HER2受體之細胞及正常人類T細胞結合，且亦觸發人類細胞毒性淋巴細胞對人類乳房腫瘤標靶之溶解活性。

亦已描述直接由重組細胞培養物製造且分離雙特異性抗體片段之各種技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈(leucine zipper)製備雙特異性抗體。Kostelny等人，J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽與兩種不同抗體之Fab'部分連接。在鉸鏈區還原抗體均二聚體以形成單體，且隨後使其再氧化以形成抗體異二聚體。此方法亦可用於產生抗體均二聚體。Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)所述之"雙功能抗體"技術已提供一種

200817434

用於製造雙特異性抗體片段之替代性機制。該等片段包含藉由連接子連接至輕鏈可變域(VL)上之重鏈可變域(VH)，該連接子過短而使得同一鏈上之兩個域之間無法配對。因此，迫使一個片段之VH及VL域與另一片段之互補VL及VH域配對，進而形成兩個抗原結合位點。亦已報導藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體來製造雙特異性抗體片段之另一種策略。參見Gruber等人，J. Immunol., 152:5368 (1994)。

涵蓋大於二價之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人，J. Immunol. 147:60 (1991)。

6.多價抗體

可藉由表現與抗體結合之抗原的細胞比二價抗體更快地內化(及/或異化)多價抗體。本發明之抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點之多價抗體(其與IgM種類之抗體不同)(例如四價抗體)，該等多價抗體可易於由編碼抗體多肽鏈之核酸的重組表現來製備。多價抗體可包含二聚化域及三個或三個以上抗原結合位點。在某些實施例中，該二聚化域包含一Fc區或一鉸鏈區(或由一Fc區或一鉸鏈區組成)。在此情形下，抗體將包含一Fc區及在該Fc區之胺基末端之三個或三個以上抗原結合位點。在某些實施例中，多價抗體包含3個至約8個抗原結合位點(或由3個至約8個抗原結合位點組成)。在一此實施例中，多價抗體包含4個抗原結合位點(或由4個抗原結合位點組成)。多價抗體包含至少一個多肽鏈(例如，兩個多肽鏈)，其中該(等)多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域。舉例而言，該(等)多肽鏈可

200817434

包含VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc，其中VD1為一第一可變域，VD2為一第二可變域，Fc為Fc區之一多肽鏈，X1及X2表示胺基酸或多肽，且n為0或1。舉例而言，該(等)多肽鏈可包含：VH-CH1-可撓性連接子-VH-CH1-Fc區鏈；或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文中多價抗體可進一步包含至少兩個(例如，四個)輕鏈可變域多肽。本文中多價抗體可(例如)包含約兩個至約八個輕鏈可變域多肽。本文中所涵蓋之輕鏈可變域多肽包含一輕鏈可變域且視情形進一步包含一CL域。

7.單域抗體

在一些實施例中，本發明之抗體為單域抗體。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的單一多肽鏈。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見(例如)美國專利第6,248,516 B1號)。在一實施例中，單域抗體係由抗體之重鏈可變域之全部或一部分組成。

8.抗體變異體

在一些實施例中，涵蓋本文所述之抗體的胺基酸序列修飾。舉例而言，可需要改良抗體之結合親和力及/或其它生物學特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當變化引入編碼抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。該等修飾包括(例如)在抗體之胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以達成最終構築體，其限制條件為該最終構築體具有所需特

性。可在製造序列時將胺基酸變化引入標的抗體胺基酸序列中。

如Cunningham及Wells (1989) Science, 244:1081-1085所述，用於鑑別作為突變誘發之較佳位置之抗體的某些殘基或區域之有用方法被稱作"丙胺酸掃描突變誘發"。在本文中，殘基或靶向殘基之基團經鑑別(例如，帶電荷之殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且由中性或帶負電荷之胺基酸(例如，丙胺酸或聚丙胺酸)置換以實現胺基酸與抗原之相互作用。隨後藉由在取代位點處引入另外或其它變異體或引入另外或其它變異體作為取代位點來改進證實對取代功能性敏感之彼等胺基酸位置。因此，儘管已預定引入胺基酸序列變化之位點，但突變本身之性質無需預定。舉例而言，為分析指定位點處突變之效能，在靶向密碼子或區域處進行ala掃描或隨機突變誘發，且對所表現之免疫球蛋白篩檢所需活性。

胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有100或更多殘基之多肽範圍內的胺基及/或羧基末端融合，以及單一或多個胺基酸殘基之序列間插入。末端插入之實例包括具有N末端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其它插入變異體包括抗體之N末端或C末端與酶(例如，用於ADEPT)或多肽之融合，其增加抗體之血清半衰期。

在某些實施例中，本發明之抗體經改變以增大或減小抗體糖基化之程度。多肽之糖基化作用通常為N-連接型或O-連接型。N-連接型係指碳水化合物部分附著於天冬醯胺酸

殘基之側鏈上。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸之外的任何胺基酸)為用於使碳水化合物部分酶連接至天冬醯胺酸側鏈之識別序列。因此，多肽中該等三肽序列之任一者之存在產生潛在之糖基化位點。O-連接糖基化係指糖N-乙醯基胺基半乳糖、半乳糖或木糖中之一者連接至羥胺酸上，最普遍為絲胺酸或蘇胺酸，儘管亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

藉由改變胺基酸序列以使得上述三肽序列之一或多者(關於N-連接糖基化位點)產生或移除可便利地實現抗體之糖基化位點之添加或缺失。該改變亦可藉由原始抗體之序列之一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基(關於O-連接糖基化位點)的添加、缺失或取代來進行。

若抗體包含Fc區，則可改變與其連接之碳水化合物。舉例而言，在美國專利申請案第US 2003/0157108(Presta, L.)號中描述具有與抗體之Fc區連接之缺少海藻糖的成熟碳水化合物結構之抗體。亦參見US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。Jean-Mairet等人之WO 2003/011878及Umana等人之美國專利第6,602,684號中提及在與抗體之Fc區連接之碳水化合物中具有平分N-乙醯半乳胺糖(GlcNAc)之抗體。Patel等人之WO 1997/30087中報導在與抗體之Fc區連接之寡糖中具有至少一個半乳糖殘基的抗體。亦參見關於具有與其Fc區連接之經改變碳水化合物之抗體的WO 1998/58964(Raju, S.)及WO 1999/22764(Raju,

S.)。亦參見關於具有經修飾糖基化之抗原結合分子之US 2005/0123546(Umana等人)。

在某些實施例中，糖基化變異體包含一Fc區，其中與該Fc區連接之碳水化合物結構缺少海藻糖。該等變異體具有改良之ADCC功能。視情況而言，Fc區進一步包含進一步改良ADCC之其中一或多個胺基酸取代，例如在Fc區之位置298、333及/或334處(殘基之Eu編號)之取代。與"海藻糖基化不足"或"海藻糖缺乏"抗體有關之公開案的實例包括：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等人，J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。產生海藻糖基化不足抗體之細胞株之實例包括蛋白海藻糖基化不足之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；及WO 2004/056312 A1, Adams等人，尤其實例11)，及基因剔除細胞株，諸如α-1,6-海藻糖基轉移酶基因、FUT8、基因剔除CHO細胞(Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87:614 (2004))。

在一實施例中，抗體經改變以改良其血清半衰期。例

200817434

如，如US 5739277中所述，為增加抗體之血清半衰期，吾人可將補救受體結合抗原決定基併入抗體(尤其抗體片段)中。如本文中所使用，術語"補救受體結合抗原決定基"係指負責增加IgG分子之活體內血清半衰期之IgG分子的Fc區之抗原決定基(例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)(US 2003/0190311；US 6821505；US 6165745；US 5624821；US 5648260；US 6165745；US 5834597)。

另一類變異體為胺基酸取代變異體。該等變異體在抗體分子中具有至少一個經不同殘基置換之胺基酸殘基。所關注之取代突變誘發位點包括高變區，但亦涵蓋FR改變。保守性取代物係以標題"較佳取代物"展示於表1中。若該等取代物產生生物活性之合意改變，則可引入於表1中命名為"例示性取代物"或下文中關於胺基酸種類之進一步描述的更多實質變化且篩檢產物。

表1

原始殘基	例示性取代物	較佳取代物
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；甘白胺酸	Leu

200817434

原始殘基	例示性取代物	較佳取代物
Leu(L)	甘白胺酸；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；甘白胺酸	Leu

抗體生物特性之大體上修飾係藉由選擇對維持以下作用的影響顯著不同之取代而達成：(a)取代區域中的多肽骨架之結構，例如呈片狀或螺旋狀構形；(b)在靶向位點處分子之電荷或疏水性；或(c)側鏈體積。胺基酸可根據其側鏈性質之類似性來分組(在A. L. Lehninger，Biochemistry中，第2版，第73-75頁，Worth Publishers, New York (1975))：

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

(2)不帶電極性：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)

(3)酸性：Asp(D)、Glu(E)

(4)鹼性：Lys(K)、Arg(R)、His(H)

或者，天然存在殘基可根據常見側鏈性質分為以下群組：

(1)疏水性：甘白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

200817434

(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3)酸性：Asp、Glu；

(4)鹼性：His、Lys、Arg；

(5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將需要該等種類中之一者之成員與另一種類交換。亦可將該等經取代殘基引入保守性取代位點或剩餘(非保守性)位點中。

一類取代變異體涉及取代親本抗體(例如，人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，相對於自其產生之親本抗體，選擇用於進一步研發之所得變異體應具有改進(例如，改良)生物學特性。一用於產生該等取代變異體之便利方式涉及使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，使若干高變區位點(例如，6-7個位點)突變以於各位點處產生所有可能之胺基酸取代。當融合於包裝於各絲狀噬菌體顆粒內之至少部分噬菌體鞘蛋白(例如，M13之基因III產物)時，呈現由該等顆粒因此產生之抗體。隨後對噬菌體呈現變異體篩檢其生物活性(例如結合親和力)。為識別用於修飾之候選高變區位點，可進行掃描突變誘發(丙胺酸掃描)以鑑別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。另外或其它，其可有益於分析抗原-抗體複合物之結晶結構以識別抗體與抗原之間的接觸點。該等接觸殘基及相鄰殘基為根據此項技術中已知之技術(包括本文中詳細描述者)之取代候選物。在產生該等變異體後，使用此項技術

中已知之技術(包括本文中所述者)使變異體群體經受篩檢，且可在一或多個相關檢定中選擇具有優良特性之抗體以用於進一步發展。

編碼抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子係由此項技術中已知之多種方法來製備。該等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在胺基酸序列變異體之情況下)或藉由早期製備之抗體之變異體或非變異體形式的寡核苷酸介導(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及盒式突變誘發來製備。

可需要將一或多個胺基酸修飾引入本發明之抗體之Fc區中，進而產生Fc區變異體。該Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置處(包括鉸鏈半胱胺酸之位置)包含胺基酸修飾(例如，取代)之人類Fc區序列(例如，人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

根據此描述及此項技術之教示，預期在一些實施例中，與野生型對應物抗體相比，例如在Fc區中，本發明之抗體可包含一或多種變化。然而，該等抗體將保持與其野生型對應物相比治療效用所需之大體上相同特性。舉例而言，例如，如WO 99/51642中所述，認為某些改變可在Fc區中進行，其會產生改變(亦即，改良或減小)之C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。亦參見關於Fc區變異體之其他實例之Duncan及Winter，Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO 94/29351。WO 00/42072(Presta)及WO 2004/056312

(Lowman)描述具有與FcR改良或減小之結合之抗體變異體。該等專利公開案之內容係以引用的方式特定併入本文中。亦參見Shields等人，J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。具有增加之半衰期及改良之與新生兒Fc受體(FcRn)之結合的抗體描述於US 2005/0014934 A1(Hinton等人)中，其中該抗體負責將母體IgG轉移至胎兒中(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994))。該等抗體包含一其中具有一或多個取代之Fc區，其改良Fc區與FcRn之結合。具有改變之Fc區胺基酸序列及增加或降低之C1q結合能力之多肽變異體描述於美國專利第6,194,551B1號、WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容係以引用的方式特定併入本文中。亦參見Idusogie等人，J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

在一態樣中，本發明提供在包含Fc區之Fc多肽之界面中包含修飾之抗體，其中該等修飾便利及/或促進異二聚化。該等修飾包含將隆凸引入第一Fc多肽中且將空穴引入第二Fc多肽中，其中該隆凸可定位於該空穴中以促進第一與第二Fc多肽之複合。用於產生具有該等修飾之抗體的方法已為此項技術中所知，例如，如美國專利第5,731,168號中所述。

9.抗體衍生物

本發明之抗體可經進一步修飾以含有此項技術中已知且易於獲得之額外非蛋白部分。較佳地，適用於抗體衍生作用之部分為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例

包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啶酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)，及葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯啶酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚乙氧基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。歸因於其在水中之穩定性，在製造時聚乙二醇丙醛可具有優勢。聚合物可為任何分子量，且可為分枝或未分枝的。與抗體連接之聚合物之數目可改變，且若連接一個以上聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特殊特性或功能、抗體衍生物是否將用於指定條件下之療法中等考慮而確定。

在另一實施例中，提供可藉由曝露至輻射中而選擇性加熱之抗體與非蛋白部分之接合物。在一實施例中，該非蛋白部分為碳奈米管(Kam等人，Proc. Natl. Acad. Sci. 102:11600-11605 (2005))。輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)對一般細胞無害之波長，但該波長將非蛋白部分加熱至殺死臨近抗體-非蛋白部分之細胞的溫度。

製造抗體之某些方法

1.某些基於融合瘤之方法

本發明之抗CD22單株抗體可使用融合瘤方法(最初由Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)描述)製得，或可藉由重組DNA方法製得(美國專利第4,816,567號)。

在融合瘤法中，使小鼠或其它適當宿主動物(諸如倉鼠)免疫以誘發淋巴細胞，該淋巴細胞產生或能夠產生將與用於免疫之蛋白特異性結合的抗體。CD22抗體通常藉由在動物體內多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射CD22及佐劑而產生。CD22可使用此項技術中熟知之方法來製備，其中一些係於本文進一步描述。舉例而言，CD22可經重組製備。在一實施例中，以含有融合於免疫球蛋白重鏈之Fc區之CD22的細胞外部分之CD22衍生物使動物免疫。在一實施例中，以CD22-IgG1融合蛋白使動物免疫。在一實施例中，以於具有單磷醯脂質A(MPL)/海藻糖二黴菌酸酯(TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)之溶液中之CD22的免疫原性衍生物使動物免疫，且在多個位點處皮內注射該溶液。兩週後激發動物。7至14天後對動物放血，且檢定血清之抗CD22效價。激發動物直至效價平穩。

或者，可使淋巴細胞於活體外免疫。隨後使用諸如聚乙二醇之適合融合劑將淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合以形成融合瘤細胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice，第59-103頁(Academic Press, 1986))。

使如此製備之融合瘤細胞於適合培養基(例如，含有一或多種抑制未融合親本骨髓瘤細胞生長或存活之物質的培養基)中接種且生長。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺少酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤培養基通常會包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷

(HAT培養基)，該等物質阻礙HGPRT不足之細胞的成長。

在某些實施例中，骨髓瘤細胞為有效融合，藉由所選擇之產生抗體之細胞支持抗體之穩定高含量產生，且對諸如HAT培養基之培養基敏感的彼等骨髓瘤細胞。例示性骨髓瘤細胞包括(但不限於)鼠骨髓瘤株，諸如由獲自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤及獲自American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA之SP-2或X63-Ag8-653細胞衍生的彼等骨髓瘤細胞。人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株亦已經描述用於製備人類單株抗體(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)；Brodeur等人，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications，第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

融合瘤細胞生長於其中之培養基經檢定用於製備與CD22結合之單株抗體。由融合瘤細胞產生之單株抗體之結合特異性較佳係藉由免疫沈澱或藉由活體外結合檢定(諸如放射免疫檢定(RIA)或酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA))來測定。單株抗體之結合親和力可(例如)由Munson等人，Anal. Biochem., 107:220 (1980)之Scatchard分析來測定。

當融合瘤細胞經鑑別產生所要特異性、親和性及/或活性之抗體後，可藉由限制性稀釋程序對純系進行次選殖且使其在標準方法下生長(Goding, Monoclonal Antibodies:

Principles and Practice，第59-103頁(Academic Press, 1986))。用於此目的之適合培養基包括(例如)D-MEM或RPMI-1640培養基。另外，融合瘤細胞可作為動物體內之腹水性腫瘤於活體內生長。藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白A-Sepharose、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析)將由次純系分泌之單株抗體與培養基、腹水液體或血清適當分離。

2.某些庫篩檢方法

可藉由使用組合庫以篩檢具有所需活性之抗體來製備本發明之抗CD22抗體。舉例而言，此項技術中已知用於產生噬菌體呈現庫且篩檢具有所需結合特性之該等抗體庫的多種方法。該等方法通常描述於Hoogenboom等人(2001)在Methods in Molecular Biology 178:1-37中(O'Brien等人編，Human Press, Totowa, NJ)，且在某些實施例中，描述於Lee等人(2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093中。

原則上，藉由篩檢呈現融合於噬菌體鞘蛋白中之抗體可變區之各種片段(Fv)的含有噬菌體之噬菌體庫來選擇合成抗體純系。該等噬菌體庫係藉由對所需抗原進行親和層析而篩選得到。表現能夠與所需抗原結合之Fv片段的純系係經抗原吸附，且因此與庫中之非結合性純系分離。隨後由抗原溶離結合純系，且可藉由額外之抗原吸附/溶離循環進一步富集該等結合純系。可藉由以下步驟獲得本發明之任何抗CD22抗體：設計適合抗原篩檢程序以選定所關注之噬菌體純系，接著使用Kabat等人，Sequences of

200817434

Proteins of Immunological Interest，第五版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷中描述之來自所關注噬菌體純系之Fv序列及適合恆定區(Fc)序列來建構全長抗CD22抗體純系。

在某些實施例中，抗體之抗原結合域係由約110個胺基酸之兩個可變(V)區形成，該兩個可變區各來自輕鏈(VL)及重鏈(VH)，二者皆呈現三個高變環(HVR)或互補判定區(CDR)。如Winter等人，Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)中所述，可變域可於噬菌體上功能性地呈現為其中VH及VL經由短、可撓性肽共價連接之單鏈Fv(ScFv)片段，或呈現為其中各自融合於恆定域且非共價相互作用之Fab片段。如本文中所使用，編碼噬菌體純系之scFv及編碼噬菌體純系之Fab統稱為"Fv噬菌體純系"或"Fv純系"。

可藉由聚合酶鏈反應(PCR)單獨地選殖VH及VL基因譜系且將其隨機重組於噬菌體庫中，隨後可如Winter等人，Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)中所述尋求該等噬菌體文庫之抗原結合純系。來自已免疫來源之庫無需建構融合瘤即提供對免疫原具高親和力之抗體。或者，如Griffiths等人，EMBO J, 12:725-734 (1993)中所述，可選殖天然譜系以在無任何免疫作用之情形下提供對抗各種非自體抗原以及自體抗原之人類抗體的單一來源。最終，如Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)中所述，亦可藉由自幹細胞選殖未經重排之V基因片段且使用含有隨機序列之PCR引子來編碼高度可變之CDR3區且

實現活體外重排而合成性製得天然庫。

在某些實施例中，使用絲狀噬菌體以藉由融合於微量鞘蛋白pIII來呈現抗體片段。抗體片段可呈現為單鏈Fv片段，其中VH與VL域係藉由可撓性多肽間隔基連接於同一多肽鏈上，例如如Marks等人，J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)中所述；或呈現為Fab片段，其中一鏈融合於pIII上且另一鏈分泌進入細菌性宿主細胞周質內，其中藉由置換野生型鞘蛋白之一部分組裝變得呈現於噬菌體表面上的Fab鞘蛋白結構，例如如Hoogenboom等人，Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137(1991)中所述。

一般而言，編碼抗體基因片段之核酸係獲自收集自人類或動物之免疫細胞。若需要偏利於抗CD22純系之庫，則以CD22使受檢者免疫以產生抗體反應，且回收脾細胞及/或循環B細胞其它周邊血液淋巴細胞(PBL)用於庫建構。在一較佳實施例中，偏重於抗CD22純系之人類抗體基因片段庫可藉由在攜有功能性人類免疫球蛋白基因陣列(且缺乏功能性內源性抗體產生系統)之轉殖基因小鼠中產生抗CD22抗體反應以使得CD22免疫引起B細胞產生抗CD22之人類抗體來獲得。製造人類抗體之轉殖基因小鼠之產生描述於下文中。

可藉由用以分離表現CD22特異性膜結合抗體之B細胞之適合篩檢程序，例如藉由使用CD22親和層析法之細胞分離或將細胞吸附於螢光染料標記之CD22上，接著流式活化細胞檢選(FACS)而獲得抗CD22反應細胞群體之額外富

集。

或者，使用來自未經免疫供體之脾細胞及/或B細胞或其它PBL提供可能抗體譜系的更佳代表，且亦容許使用其中CD22不具有抗原性的任何動物(人類或非人類)物種來建構抗體庫。對於併入活體外抗體基因建構中之庫而言，收集來自受檢者之幹細胞以提供編碼未經重排之抗體基因區段的核酸。所關注免疫細胞可自多種動物物種獲得，諸如人類、小鼠、大鼠、兔類、狼(lupine)、犬科、貓科、豬、牛、馬及鳥類物種等。

自所關注之細胞回收編碼抗體可變基因區段(包括VH及VL區段)的核酸並使其擴增。在重排VH及VL基因庫之情況下，如Orlandi等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)中所述，所需DNA可藉由將基因組DNA或mRNA與淋巴細胞分離，接著與匹配重排VH及VL基因之5'及3'端之引子進行聚合酶鏈反應(PCR)來獲得，進而得到用於表現之多種V基因譜系。如Orlandi等人(1989)及Ward等人，Nature, 341: 544-546 (1989)中所述，V基因可自cDNA及基因組DNA擴增，其中在編碼成熟V-域之外顯子之5'端處之後置引子及前置因子基於J區段內。然而，關於自cDNA擴增，如Jones等人，Biotechnol., 9: 88-89 (1991)中所述，後置引子亦可基於前導外顯子中，且如Sastry等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)中所述，前置引子在恆定區內。為使互補最大化，如Orlandi等人(1989)或Sastry等人(1989)中所述，簡幷可併

入引子中。在某些實施例中，例如如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)之方法中所述或如Orum等人，Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)之方法中所述，藉由使用靶向各V基因家族之PCR引子使庫多樣性最大化以擴增免疫細胞核酸樣品中存在之所有可用VH及VL排列。關於將擴增DNA選殖入表現載體中，稀有限制位點可在一端處作為標記物(如Orlandi等人(1989)中所述)或藉由以標記引子之進一步PCR擴增(如Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)中所述)引入PCR引子中。

合成性重排之V基因譜系可於活體外來源於V基因區段。大部分人類VH基因區段已經選殖並測序(報導於Tomlinson等人，J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)中)，且繪圖(報導於Matsuda等人，Nature Genet., 3: 88-94 (1993)中)；如Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)中所述，該等選殖區段(包括H1及H2環之所有主要構形)可用於產生具有編碼多種序列及長度之H3環之PCR引子的多種VH基因譜系。如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)中所述，亦可得到其中所有序列多樣性集中於單一長度之長H3環的VH譜系。人類Vκ及Vλ區段已經選殖且測序(報導於Williams及Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)中)且可用於產生合成輕鏈譜系。基於VH及VL折疊及L3及H3長度之範圍的合成V基因譜系應編碼相當大結構多樣性的抗體。在擴增編碼V基因之DNA後，可根據Hoogenboom及Winter,

J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)之方法於活體外重排生殖系V基因區段。

可藉由以若干方式將VH及VL基因譜系組合在一起而建構抗體片段之譜系。各譜系可於不同載體中產生，且該等載體在活體外重組(例如，如Hogrefe等人，Gene, 128: 119-126 (1993)中所述)，或藉由組合注射(例如，Waterhouse等人，Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)中所述之loxP系統)在活體內重組。活體內重組方法利用Fab片段之兩鏈性質來克服有關由大腸桿菌轉化效率強加之庫大小的侷限。天然VH及VL譜系係經單獨選殖，一者選殖入噬菌粒(phagemid)中且另一者選殖入噬菌體載體中。隨後，藉由噬菌體感染含有噬菌粒之細菌而使兩種庫組合，以使得每一細胞含有不同組合且庫大小僅受所存在之細胞數目(約10^{12}個純系)限制。兩種載體皆含有活體內重組信號以使得VH及VL基因重組於單一複製子上且共同包裹於噬菌體病毒粒子中。該等巨型庫提供大量具有良好親和力(K_d^{-1}為約10^{-8} M)之不同抗體。

或者，譜系可依序選殖入同一載體中，例如如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)中所述；或藉由PCR裝配在一起且隨後選殖，例如如Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)中所述。亦可使用PCR裝配來使VH及VL DNA與編碼可撓性肽間隔基之DNA連接在一起以形成單鏈Fv(scFv)譜系。在另一技術中，如Embleton等人，Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)中所

述，使用"細胞內PCR裝配"以藉由PCR使VH及VL基因組合於淋巴細胞內且隨後選殖連接基因之譜系。

如Winter等人(1994)(同上文)所述，由天然庫產生之抗體(天然或合成)可具有適度親和力(K_d^{-1}為約10^6至10^7 M^{-1})，但亦可藉由建構次級庫且從中進行再選擇而於活體外模擬親和力成熟。舉例而言，可藉由使用Hawkins等人，J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)之方法中或Gram等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)之方法中之易誤聚合酶(報導於Leung等人，Technique, 1: 11-15 (1989)中)在活體外隨機產生突變。另外，亦可(例如)用載運跨越所關注CDR之隨機序列的引子使用PCR在所選個別Fv純系中隨機突變一或多個CDR且篩檢具有較高親和力之純系，藉此進行親和力成熟。WO 9607754(於1996年3月14日公開)描述一種用於誘導免疫球蛋白輕鏈之互補判定區突變誘發以建立輕鏈基因庫的方法。另一有效方法係使藉由噬菌體呈現選擇之VH或VL域與獲自未經免疫之供體之天然存在V域變異體的譜系重組，且於若干回合的鏈改組中篩檢具有較高親和力者，如Marks等人，Biotechnol., 10:779-783 (1992)中所述。此技術容許具有約10^{-9} M或更小之親和力之抗體及抗體片段的產生。

可由此項技術中已知之各種技術來實現庫之篩檢。舉例而言，CD22可用於塗覆吸附板之孔，其表現於附著於吸附板上之宿主細胞上或用於細胞分類中，或接合至生物素上以捕捉經抗生蛋白鏈菌素塗覆之珠粒，或用於篩選噬菌

體呈現庫之任何其他方法中。

在適用於使噬菌體粒子之至少一部分與吸附劑結合之條件下將噬菌體庫樣品與固定CD22接觸。通常，選定條件(包括pH值、離子強度、溫度及其類似條件)以模擬生理條件。將與固相結合之噬菌體洗滌且隨後由酸溶離，例如如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)中所述；或由鹼溶離，例如如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)中所述；或藉由CD22抗原競爭溶離，例如以與Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)之抗原競爭方法類似之程序。噬菌體在單個選擇回合中可富集20-1,000倍。此外，富集之噬菌體可於細菌培養物中生長且經受其他回合之選擇。

選擇效率視許多因素而定，包括洗滌期間之解離動力學及單一噬菌體上之多個抗體片段是否能同時與抗原接合。可藉由使用短時間洗滌、多價噬菌體呈現及於固相中之高抗原塗覆密度而保留具有快速解離動力學(及弱結合親和力)之抗體。高密度不僅經由多價相互作用穩定噬菌體，且亦易使已解離之噬菌體再結合。可藉由使用長時間洗滌及單價噬菌體呈現(如Bass等人，Proteins, 8: 309-314 (1990)及WO 92/09690中所述)及低抗原塗覆密度(如Marks等人，Biotechnol., 10: 779-783 (1992)中所述)來促進具有慢解離動力學(及良好結合親和力)之抗體之選擇。

有可能在對CD22具有不同親和力之噬菌體抗體(即使具有略微不同之親和力)之間進行選擇。然而，所選抗體之

隨機突變(例如，如以一些親和力成熟技術進行的突變)可能產生多種突變體，其中大部分與抗原結合，且較少部分具有較高親和力。經由限制CD22，可淘汰稀有高親和力噬菌體。為保持所有較高親和力突變體，可將噬菌體以過量經生物素標記之CD22培養，但其中經生物素標記之CD22具有比CD22之標靶莫耳濃度親和力常數低之莫耳濃度的濃度。隨後可由經抗生蛋白鏈菌素塗覆之順磁珠粒捕捉高親和力結合之噬菌體。此"平衡捕捉"容許根據抗體之結合親和力選擇抗體，其中敏感性容許具有僅兩倍高之親和力的突變體純系與具有較低親和力之大量過量噬菌體分離。亦可操控用於洗滌與固相結合之噬菌體的條件以基於解離動力學相區分。

抗CD22純系可根據活性選擇。在某些實施例中，本發明提供與天然表現CD22之活細胞結合的抗CD22抗體。在一實施例中，本發明提供阻斷CD22配位體與CD22之間之結合但不阻斷CD22配位體與第二蛋白之間之結合的抗CD22抗體。對應於該等抗CD22抗體的Fv純系可藉由如下步驟選擇：(1)如上所述自噬菌體庫中分離抗CD22純系，且視情況藉由在適當細菌宿主中培養該群體來擴增噬菌體純系之分離群體；(2)針對分別需要阻斷活性及非阻斷活性來選擇CD22及第二蛋白；(3)將抗CD22噬菌體純系吸附於固定CD22上；(4)使用過量第二蛋白溶離可識別與第二蛋白之結合決定子重疊或共用之CD22結合決定子的任何不需純系；及(5)溶離步驟(4)之後仍保持吸附的純系。視情

況，可藉由將本文中所述之選擇程序重複一或多次而進一步富集具有所需阻斷/非阻斷特性之純系。

使用習知程序(例如藉由使用經設計以自融合瘤或噬菌體DNA模板特異性擴增所關注之重鏈及輕鏈編碼區的寡核苷酸引子)易於將編碼本發明之融合瘤衍生之單株抗體或噬菌體呈現Fv純系的DNA分離且測序。分離後可將DNA置於表現載體中，隨後將該等表現載體轉染至不會另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以於重組宿主細胞中獲得所需單株抗體之合成。關於編碼抗體之DNA之細菌中重組表現之評論文章包括Skerra等人，Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)及Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992)。

編碼本發明之Fv純系之DNA可與編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之已知DNA序列(例如適當DNA序列可獲自Kabat等人(同上文))組合以形成編碼全長或部分長度之重鏈及/或輕鏈的純系。應瞭解，為達成此目的可使用任何同型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區)，且該等恆定區可獲自任何人類或動物物種。如本文中所使用之定義"嵌合"抗體及"雜交"抗體中包括來源於一動物(諸如人類)物種之可變域DNA且隨後融合於另一動物物種之恆定區DNA中以形成"雜交"編碼序列(全長重鏈及/或輕鏈)的Fv純系。在某些實施例中，來源於人類可變DNA之Fv純系係融合於人類恆定區DNA中以形成全長或部分長度之人類重鏈及/或

輕鏈的編碼序列。

編碼本發明之來源於融合瘤之抗CD22抗體的DNA亦可(例如)藉由用人類重鏈恆定域及輕鏈恆定域之編碼序列取代獲自融合瘤純系的同源鼠序列來經修飾(例如，用Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)之方法)。可藉由共價連接至免疫球蛋白編碼序列全部或非免疫球蛋白多肽之編碼序列之部分來進一步修飾編碼融合瘤或Fv純系衍生之抗體或片段的DNA。以此方式，製備具有本發明之Fv純系或融合瘤純系衍生之抗體的結合特異性之"嵌合"或"雜交"抗體。

3. 載體、宿主細胞及重組方法

為重組產生本發明之抗體，將編碼該抗體之核酸分離且插入可複製載體中以用於進一步選殖(DNA之擴增)或表現。編碼該抗體之DNA易於分離，且易於使用習知程序(例如，藉由使用能夠與編碼該抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)來測序。多種載體均可用。載體之選擇部分地視所使用之宿主細胞而定。一般而言，宿主細胞為原核或真核(通常為哺乳動物)來源。應瞭解，為達成此目的可使用任何同型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區)，且該等恆定區可獲自任何人類或動物物種。

使用原核宿主細胞產生抗體：

載體建構

可使用標準重組技術獲得編碼本發明之抗體之多肽組份

的聚核苷酸序列。可自產生抗體之細胞(諸如融合瘤細胞)中分離所需聚核苷酸序列並進行測序。或者，可使用核苷酸合成器或PCR技術合成聚核苷酸。在獲得編碼多肽之序列後，將其插入能夠在原核宿主中複製並表現異源聚核苷酸之重組載體中。出於本發明之目的可使用可用且為此項技術中所知之多種載體。對於適當載體之選擇將主要視插入載體中之核酸分子的尺寸及經載體轉化之特定宿主細胞而定。各載體視其功能(異源聚核苷酸之擴增或表現，或二者)及其與其所滯留之特定宿主細胞的相容性而含有各種組份。載體組份通常包括(但不限於)：複製起點、選擇標記基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源核酸插入子及轉錄終止序列。

一般而言，使用與該等宿主有關之含有複製子及來源於與宿主細胞相容之物種之控制序列的質體載體。該載體一般具有複製位點，以及能夠於經轉型細胞中提供表型選擇之標記序列。舉例而言，大腸桿菌通常使用pBR322(來源於大腸桿菌物質之質體)轉型。pBR322含有編碼安比西林(ampicillin)(Amp)及四環素(Tet)抗性之基因且因此提供易於識別經轉型細胞之方法。pBR322、其衍生物或其他微生物質體或噬菌體亦可含有或經修飾以含有啟動子，其可由微生物有機體用於表現內源性蛋白。用於表現特定抗體之pBR322衍生物之實例詳細描述於Carter等人，美國專利第5,648,237號中。

另外，與該等宿主有關之含有複製子及可與宿主微生物

相容之控制序列的噬菌體載體亦可用作轉化載體。舉例而言，諸如λGEM.TM.-11之噬菌體可用於製造可用於轉型易感宿主細胞(諸如大腸桿菌LE392)之重組載體。

本發明之表現載體可包含兩種或兩種以上編碼每一多肽組份之啟動子-順反子對。啟動子為位於調節其表現之順反子上游(5')之未經轉譯調節序列。原核啟動子通常分為兩類，亦即誘導型及組成型。誘導型啟動子為在其回應培養條件改變(例如養分之存在與否或溫度之改變)之控制下啟始順反子之轉錄量增加的啟動子。

大量由多種潛在宿主細胞所識別之啟動子已為吾人所熟知。藉由經由限制酶消化自源DNA移除所選擇之啟動子且將所分離之啟動子序列插入本發明之載體中可使該啟動子可操作性連接至編碼輕鏈或重鏈之順反子DNA上。天然啟動子序列與多種異源啟動子可用於引導靶向基因之擴增及/或表現。在一些實施例中，因與天然靶向多肽啟動子相比，異源啟動子通常容許所表現之靶向基因較快地轉錄且具有較高產量而得以利用。

適於與原核宿主一起使用之啟動子包括PhoA啟動子、β-半乳糖苷酶及乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統及雜合啟動子(諸如tac或trc啟動子)。然而，在細菌中起作用之其它啟動子(諸如其它已知之細菌或噬菌體啟動子)亦適用。其核苷酸序列已公開，藉此熟練工人能夠使用連接子或轉接器將其可操作性連接至編碼標靶輕鏈及重鏈之順反子上(Siebenlist等人(1980) Cell 20: 269)以提供任何所需限

制位點。

在本發明之一態樣中，重組載體內之每一順反子均包含引導所表現之多肽跨膜轉位之分泌型信號序列組份。一般而言，信號序列可為載體之組份，或其可為插入載體中之靶向多肽DNA的部分。出於本發明之目的選擇之信號序列應為由宿主細胞識別且加工(亦即，由信號肽酶裂解)者。對於不識別且加工異源多肽之天然信號序列的原核宿主細胞而言，信號序列係經(例如)選自由以下物質組成之群之原核信號序列取代：鹼性磷酸酶、青黴素酶(penicillinase)、Ipp或熱穩定腸毒素II(STII)前導序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP。在本發明之一實施例中，用於表現系統之兩種順反子中之信號序列為STII信號序列或其變異體。

在另一態樣中，根據本發明之免疫球蛋白的製備可發生於宿主細胞之細胞質中，且因此無需每一順反子內均存在分泌型信號序列。就此點而言，免疫球蛋白之輕鏈及重鏈係在細胞質內經表現、折疊且組裝以形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例如，大腸桿菌trxB-菌株)提供易於形成二硫鍵之細胞質條件，藉此容許適當折疊且組裝所表現之蛋白次單元。Proba及Pluckthun, Gene, 159:203 (1995)。

亦可藉由使用其中可調節所表現之多肽組份之數量比率以最大化所分泌及經適當組裝之本發明之抗體產量的表現系統來產生本發明之抗體。此調節至少部分係藉由同時調節多肽組份之轉譯強度來實現。

用於調節轉譯強度之一技術揭示於Simmons等人，美國

專利第5,840,523號中。其在順反子內利用轉譯起始區(TIR)之變異體。對於給定TIR而言，可產生具有多種轉譯強度之一系列胺基酸或核酸序列變異體，藉此提供一種用於關於特定鏈之所需表現量來調節此因素之便利方式。TIR變異體可藉由習知突變誘發技術產生，其產生可改變胺基酸序列之密碼子改變。在某些實施例中，核苷酸序列之改變為沉默的。TIR之變化可包括(例如)Shine-Dalgarno序列之數目或間隔之變化，以及信號序列之變化。一種用於產生突變體信號序列之方法係在編碼序列之開始處產生"密碼子庫(codon bank)"，而不改變信號序列之胺基酸序列(亦即，改變為沉默的)。此可藉由改變每一密碼子之第三個核苷酸位置來實現；另外，一些胺基酸(諸如白胺酸、絲胺酸及精胺酸)具有多個第一及第二位置，此可增加用於製造該庫之複雜性。此突變誘發方法詳細描述於Yansura等人(1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158中。

在一實施例中，對於其中每一順反子產生具有多種TIR強度之一組載體。此有限組提供對於在各種TIR強度組合下每一鏈之表現量以及所需抗體產物之產量的比較。如Simmons等人，美國專利第5,840,523號中詳細描述，TIR強度可藉由量化報導體基因之表現量來測定。根據轉譯強度比較，所需個別TIR經選定以組合於本發明之表現載體構築體中。

適於表現本發明之抗體之原核宿主細胞包括古細菌

(Archaebacteria)及真細菌(Eubacteria)，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性有機體。有用細菌之實例包括埃希氏菌(Escherichia)(例如，大腸桿菌)、桿菌(Bacilli)(諸如枯草桿菌(B. subtilis))、腸內菌(Enterobacteria)、假單胞菌屬(Pseudomonas species)(例如綠膿桿菌)、鼠傷寒沙門桿菌(Salmonella typhimurium)、黏質沙雷氏菌(Serratia marcescens)、克雷伯氏菌(Klebsiella)、變形桿菌屬(Proteus)、志賀桿菌屬(Shigella)、根瘤菌(Rhizobia)、透明顫菌(Vitreoscilla)或副球菌(Paracoccus)。在一實施例中，使用革蘭氏陰性細胞。在一實施例中，大腸桿菌細胞係用作本發明之宿主。大腸桿菌菌株之實例包括菌株W3110(Bachmann, Cellular and Molecular Biology，第2卷(Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987)，第1190-1219頁；ATCC Deposit第27,325號)及其衍生物，其包括具有基因型W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR之菌株33D3(美國專利第5,639,635)。其他菌株及其衍生物(諸如大腸桿菌294(ATCC 31,446)、大腸桿菌B、大腸桿菌λ 1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌RV308(ATCC 31,608))亦為適合的。該等實例為說明性而非限制性的。用於建構任何上述具有已定義基因型之細菌之衍生物的方法已為此項技術中已知，且描述於(例如)Bass等人，Proteins, 8:309-314 (1990)中。通常需要考慮複製子在細菌細胞中之可複製性來選擇適當細菌。舉例而言，當使用熟知質體(諸如pBR322、

pBR325、pACYC177或pKN410)來供應複製子時，大腸桿菌、紅色桿菌屬(Serratia)或沙門氏菌(Salmonella)屬可適用作宿主。通常宿主細胞應分泌極少量蛋白水解酶，且可需要將額外蛋白酶抑制劑併入細胞培養物中。

抗體製備

將宿主細胞以上述表現載體轉型且培養於經適當修飾之習知營養培養基中以用於誘導啟動子、選擇轉化株或擴增編碼所需序列之基因。

轉型意謂將DNA引入原核宿主中以使得DNA可作為染色體外成分或由染色體要素複製。視所使用之宿主細胞而定，使用適於該等細胞之標準技術進行轉型。使用氯化鈣進行之鈣處理通常用於含有大體上細胞壁障壁之細菌細胞。另一轉型方法使用聚乙二醇/DMSO。所使用之另一技術為電穿孔。

用於產生本發明之多肽之原核細胞係生長於此項技術中已知且適於培養所選擇之宿主細胞的培養基中。適合培養基之實例包括加有必需養分補充物之luria肉湯(LB)。在一些實施例中，培養基亦含有基於表現載體之建構而選擇之選擇劑，以選擇性地容許含有表現載體之原核細胞之生長。舉例而言，將安比西林添加至表現安比西林抗性基因之細胞的生長培養基中。

亦可包括單獨或作為與另一補充物或基質(諸如複合氮源)之混合物以適當濃度引入的除碳、氮及無機磷酸鹽來源之外的任何必需補充物。培養基視情況可含有一或多種

選自由以下物質組成之群的還原劑：麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、硫乙醇酸酯、二硫赤藻糖醇及二硫蘇糖醇。

原核宿主細胞係在適合溫度下培養。在某些實施例中，對於大腸桿菌生長而言，生長溫度在約20℃至約39℃之範圍內；約25℃至約37℃之範圍內；或約30℃。主要視宿主有機體而定，培養基之pH值可為在約5至約9之範圍內之任何pH值。在某些實施例中，對於大腸桿菌而言，pH值為約6.8至約7.4，或約7.0。

若將誘導型啟動子用於本發明之表現載體中，則在適於活化啟動子之條件下誘導蛋白表現。在本發明之一態樣中，使用PhoA啟動子來控制多肽之轉錄。因此，將經轉型宿主細胞培養於磷酸鹽限制性培養基中用以誘導。在某些實施例中，該磷酸鹽限制性培養基為C.R.A.P培養基(參見(例如) Simmons等人，J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147)。如此項技術中已知，可根據所使用之載體構築體來使用多種其它誘導子。

在一實施例中，將本發明之經表現多肽分泌入宿主細胞間質中且自其回收。蛋白回收通常涉及一般藉由如滲透壓衝擊、超音波處理或溶解之該等方式來分裂微生物。細胞經分裂後，可藉由離心或過濾來移除細胞碎片或整個細胞。可(例如)藉由親和樹脂層析來進一步純化蛋白。或者，可將蛋白轉運至培養基中並於其中進行分離。可將細胞自培養物中移出，並將培養物上層清液過濾且濃縮以進一步純化所產生之蛋白。可進一步分離所表現之多肽且使

用諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)及西方墨點檢定之通常已知的方法加以識別。

在本發明之一態樣中，抗體製備係由醱酵法大量進行。各種大規模饋料分批醱酵程序可用於產生重組蛋白。大規模醱酵具有至少1,000公升之容量，且在某些實施例中為約1,000至100,000公升之容量。該等醱酵槽使用攪拌葉輪以分配氧及營養物，尤其葡萄糖(較佳碳/能源)。小規模醱酵通常係指在不大於約100公升之體積容量且可在約1公升至約100公升範圍內的醱酵槽中醱酵。

在醱酵過程中，通常在細胞已於適當條件下生長至所需密度(例如，OD550為約180至220)後啟始對蛋白表現之誘導，在此階段內細胞處於穩定期早期。如此項技術中已知且如上所述，可根據所使用之載體構築體來使用多種誘導子。可於誘導前使細胞生長較短時期。儘管可使用較長或較短之誘導時間，但細胞通常經誘導約12至50小時。

為改良本發明之多肽之產量及品質，可改變多種醱酵條件。舉例而言，為改良對於所分泌之抗體多肽之適當組裝及折疊，過度表現伴隨蛋白之額外載體可用於共轉型宿主原核細胞，其中該等伴隨蛋白諸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及/或DsbG)或FkpA(具有伴隨活性之肽基脯胺醯順反異構酶)。已證實伴隨蛋白會促進細菌宿主細胞中所產生之異源蛋白之適當折疊及溶解性。Chen等人(1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605；Georgiou等人，美國專利第6,083,715號；Georgiou等人，美國專利第

200817434

6,027,888號；Bothmann及Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105；Ramm及Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113；Arie等人(2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

為最小化經表現異源蛋白(尤其對於蛋白水解敏感者)之蛋白水解，缺失蛋白水解酶之某些宿主菌株可用於本發明。舉例而言，宿主細胞菌株可經修飾以實現編碼已知細菌蛋白酶(諸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其組合)之基因的基因突變。一些缺乏大腸桿菌蛋白酶之菌株為可用的且描述於(例如)Joly等人(1998)，同上文；Georgiou等人，美國專利第5,264,365號；Georgiou等人，美國專利第5,508,192號；Hara等人，Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)中。

在一實施例中，將缺乏蛋白水解酶且經過度表現一或多種伴隨蛋白之質體轉型的大腸桿菌菌株用作本發明之表現系統中的宿主細胞。

抗體純化

在一實施例中，本文中所製備之抗體蛋白經進一步純化以獲得大體上均質之製劑以用於其它檢定及用途。可使用此項方法中已知之標準蛋白純化方法。以下程序為例示性適合純化程序：免疫親和性或離子交換管柱分餾、乙醇沈澱、逆相HPLC、矽石或陽離子交換樹脂(諸如DEAE)層析、層析聚焦、SDS-PAGE、硫酸銨沈澱及使用(例如)Sephadex G-75之凝膠過濾。

在一態樣中，將固定於固相上之蛋白A用於本發明之抗體產物的免疫親和純化。蛋白A為來自金黃色葡萄球菌(Staphylococcus aureas)之41kD細胞壁蛋白，其以高親和力與抗體之Fc區結合。Lindmark等人(1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。蛋白A所固定之固相可為一包含一玻璃或矽石表面之管柱，或一受控孔玻璃管柱或一矽酸管柱。在一些應用中，管柱經諸如甘油之試劑塗覆以有可能防止污染物之非特異性附著。

作為純化之第一步驟，可將如上所述自細胞培養物衍生之製劑塗覆於固定蛋白A之固相上以容許所關注之抗體與蛋白A的特異性結合。隨後可將固相洗滌以移除與該固相非特異性結合之污染物。最後，藉由溶離自固相回收所關注之抗體。

使用真核宿主細胞產生抗體：

適用於真核宿主細胞之載體通常包括以下非限制性組份之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、強化子組份、啟動子及轉錄終止序列。

信號序列組份

適用於真核宿主細胞中之載體亦可含有在所關注成熟蛋白或多肽之N末端具有特定裂解位點的信號序列或其它多肽。所選擇之異源信號序列可為由宿主細胞識別且加工(亦即，由信號肽酶裂解)之異源信號序列。在哺乳動物細胞表現中，哺乳動物信號序列以及病毒分泌引導子(例如，單純疱疹gD信號)均可用。此前驅物區之DNA係於閱

讀框架內連接至編碼抗體之DNA上。

複製起點

通常，哺乳動物表現載體無需複製起點組份。舉例而言，由於SV40起點含有早期啟動子，故通常僅可使用該起點。

選擇基因組份

表現及選殖載體可含有選擇基因，亦稱為可選標記。典型選擇基因編碼蛋白，其(a)賦予對於抗生素或其它毒素(例如，安比西林、新黴素、甲胺喋呤或四環素)之抗性；(b)補充營養缺陷(若相關)；或(c)供應自複合培養基不可獲得之關鍵養分。

選擇流程之一實例利用藥物來停滯宿主細胞之生長。經異源基因成功轉型之彼等細胞產生賦予藥物抗性之蛋白且因此在選擇方案中存活。該等顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及濕黴素(hygromycin)。

哺乳動物細胞之適合可選標記之另一實例係能識別可吸收抗體核酸之細胞者，諸如DHFR、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及金屬硫蛋白-II(較佳為靈長類動物金屬硫蛋白基因)、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

舉例而言，在一些實施例中，首先藉由在含有甲胺喋呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基上培養所有轉化株來識別經DHFR選擇基因轉化之細胞。在一些實施例中，當使用野生型DHFR時，適當宿主細胞為缺乏DHFR活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如ATCC CRL-9096)。

或者，可藉由在含有用於可選標記(諸如胺基糖苷抗生素，例如康黴素(kanamycin)、新黴素或G418)之選擇劑的培養基中進行細胞生長來選擇經編碼抗體、野生型DHFR蛋白及另一可選標記(諸如胺基糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))之DNA序列轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內源性DHFR之野生型宿主)。參見美國專利第4,965,199號。

啟動子組份

表現及選殖載體通常含有由宿主有機體識別且可操作性連接至編碼所關注多肽(例如，抗體)之核酸的啟動子。已知真核細胞之啟動子序列。舉例而言，幾乎所有真核基因均具有位於轉錄起始位點上游約25至30個鹼基處的富AT區。另一序列測得自多種基因之轉錄起點上游的70至80個鹼基為CNCAAT區，其中N可為任何核苷酸。大部分真核基因之3'末端為AATAAA序列，其可為用於將聚A尾添加至編碼序列之3'末端的信號。在某些實施例中，任何或所有該等序列可經適當插入真核表現載體中。

自哺乳動物宿主細胞中載體之轉錄係(例如)藉由獲自病毒(諸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、細胞巨大病毒、反轉錄病毒、B型肝炎病毒及猿病毒40(SV40))基因組之啟動子；異源哺乳動物啟動子，例如肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子；熱休克啟動子控制，其限制條件為該等啟動子與宿主細胞系統相容。

便利地獲得作為SV40限制片段之SV40病毒之早期及晚

期啟動子，其亦含有SV40病毒複製起點。便利地獲得作為HindIII E限制片段之人類細胞巨化病毒之即刻早期啟動子。使用牛乳頭狀瘤病毒作為載體於哺乳動物宿主中表現DNA之系統揭示於美國專利第4,419,446號中。對於此系統之修飾描述於美國專利第4,601,978號中。亦參見Reyes等人，Nature 297:598-601 (1982)，其描述在來自單純疱疹病毒之胸苷激酶啟動子之控制下人類β-干擾素cDNA於小鼠細胞中之表現。或者，可將勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)之長末端重複用作啟動子。

強化子元件組份

藉由更高級真核細胞轉錄編碼本發明之抗體的DNA通常係藉由將強化子序列插入載體中而增加。現已知來自哺乳動物基因(球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、α-胎蛋白及胰島素)之多種強化子序列。然而，吾人通常會使用來自真核細胞病毒之強化子。實例包括複製起點(bp 100-270)後側上之SV40強化子、細胞巨化病毒早期啟動子強化子、複製起點後側之多形瘤強化子及腺病毒強化子。亦參見描述用於活化真核啟動子之強化子組份的Yaniv, Nature 297:17-18(1982)。可將強化子剪接至載體中編碼抗體多肽之序列的5'或3'位置處，但其通常位於啟動子之5'位點處。

轉錄終止組份

用於真核宿主細胞中之表現載體亦可含有終止轉錄且穩定mRNA所必需之序列。該等序列通常可獲自真核或病毒DNA或cDNA之5'(及有時3')非轉譯區。該等區含有轉錄為

編碼抗體之mRNA之未經轉譯部分的多聚腺嘌呤化片段之核苷酸區段。一種有用之轉錄終止組份為牛生長激素多聚腺嘌呤化區。參見WO 94/11026及其中所揭示之表現載體。

宿主細胞之選擇及轉型

在本文中之載體中用於選殖或表現DNA之適合宿主細胞包括本文中所述之高級真核生物細胞，其包括脊椎動物宿主細胞。使脊椎動物細胞在培養物(組織培養物)中增殖已成為一種常規程序。有用之哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7、ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎細胞株(經次選殖生長於懸浮培養物中之293或293細胞，Graham等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO，Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠塞托利細胞(sertoli cell)(TM4，Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；美洲綠猴腎細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2)；犬科腎細胞(MDCK、ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2、HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562、ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝細胞瘤細胞株(Hep G2)。

用上述用於產生抗體之表現或選殖載體使宿主細胞轉型，並將其培養於經適當修飾之習知營養培養基中以用於誘導啟動子、選擇轉化株或擴增編碼所需序列之基因。

培養宿主細胞

可將用於製備本發明之抗體之宿主細胞培養於多種培養基中。諸如Ham's F10(Sigma)、最低要求培養基((MEM)，(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及杜貝卡氏經修飾依格培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)((DMEM)，Sigma)之市售培養基適於培養宿主細胞)。另外，該等培養基之任一者描述於Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)；Barnes等人，Anal. Biochem. 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號；或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195中；或美國專利Re. 30,985可用作宿主細胞之培養基。任何該等培養基均可視需要補充激素及/或其它生長因子(諸如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™藥物)、示蹤元素(定義為通常以在微莫耳範圍內之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能源。亦可包括熟習此項技術者會已知之適當濃度之任何其他補充。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似條件)為經選定用於表現之宿主細胞先前所使用之彼等條件，且對一般熟練技工應為顯而易見的。

抗體之純化

當使用重組技術時，抗體可於細胞內產生或直接分泌於培養基中。若抗體於細胞內產生作為第一步驟，則(例如)可藉由離心或超濾來移除宿主細胞或已溶解片段之微粒碎片。若抗體分泌於培養基中，則首先可使用一市售蛋白濃縮過濾器(例如，一Amicon或Millipore Pellicon超濾裝置)來濃縮來自該等表現系統之上層清液。任何前述步驟中均可包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以阻止外來污染物之生長。

由細胞製備之抗體組合物可使用(例如)羥基磷灰石層析、凝膠電泳法、透析及親和層析來純化，其中親和層析為便利技術。蛋白A作為親和力配位體之適應性視抗體中存在之任何免疫球蛋白Fc域的種類及同型而定。可用蛋白A來純化基於人類γ1、γ2或γ4重鏈之抗體(Lindmark等人，J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。推薦蛋白G用於所有小鼠同型及人類γ3(Guss等人，EMBO J. 5:15671575 (1986))。親和力配位體所連接之基質可為瓊脂糖，但可用其他基質。諸如受控微孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯之機械穩定基質容許比瓊脂糖可達到更快之流動速率及更短之加工時間。若抗體包含CH3域，則Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)可用於純化。視待回收之抗體而定，亦可使用用於蛋白純化之其它技術，諸如離子交換管柱分餾、乙醇沈澱、逆相HPLC、矽石層析、陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)上進行之肝素

SEPHAROSE™層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

在任何初步純化步驟後，包含所關注抗體及污染物之混合物可經受進一步純化，例如，藉由使用pH值介於約2.5-4.5之間的溶離緩衝液較佳在低鹽濃度(例如，約0-0.25 M鹽)下進行的低pH值疏水性相互作用層析進行純化。

一般而言，此項技術中已良好建立用於研究、測試及臨床用途中之用於製備抗體的各種方法，其與上述方法一致及/或熟習此項技術者認為其適用於所關注之特定抗體。

免疫接合物

本發明亦提供免疫接合物(可互換稱作"抗體-藥物接合物"或"ADC")，其包含與一或多種細胞毒性劑(諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如，細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即，放射接合物))接合之本發明之抗CD22抗體的任一者。

在某些實施例中，免疫接合物包含抗CD22抗體及化學治療劑或其他毒素。適用於產生免疫接合物之化學治療劑描述於本文中(例如，上文)。酶活性毒素及其片段亦可使用且描述於本文中。

在某些實施例中，免疫接合物包含抗CD22抗體及一或多種小分子毒素，其包括(但不限於)具有細胞毒性活性之諸如刺孢黴素、美登素類物、海兔毒素、奧利斯坦汀、單端孢菌毒素及CC1065之小分子藥物及該等藥物之衍生物。該等免疫接合物之實例更詳細地論述於下文中。

200817434

1.例示性免疫接合物-抗體藥物接合物

本發明之免疫接合物(或"抗體-藥物接合物"("ADC"))可為下文之式I，其中抗CD22抗體係經由可選連接子(L)與一或多種藥物部分(D)接合(亦即，共價連接)

$$Ab-(L-D)_p \qquad \text{式I}$$

相應地，抗CD22抗體可直接或經由連接子與藥物接合。在式I中，p為每抗體藥物部分之平均數目，其可在(例如)每抗體約1個至約20個藥物部分之範圍內，且在某些實施例中，在每抗體1個至約8個藥物部分之範圍內。

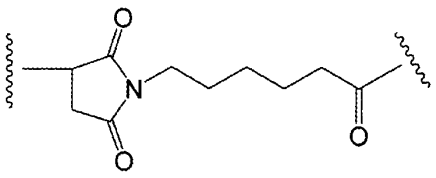
例示性連接子

本文中揭示例示性連接子及藥物部分。連接子可包含一或多個連接子組份。例示性連接子組份包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基("MC")、順丁烯二醯亞胺基丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit"或"vc")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe")、對胺基苄氧羰基("PAB")、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯("SPP")、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯("SMCC")及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯("SIAB")。此項技術中已知各種連接子組份，其中一些描述於下。

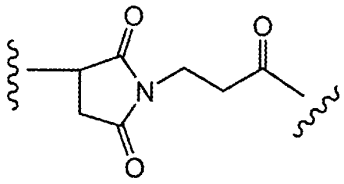
連接子可為"可分裂連接子"，其便利細胞中藥物之釋放。舉例而言，可使用酸不穩定連接子(例如，腙)、蛋白酶敏感性(例如，肽酶敏感性)連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫化物之連接子(Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

200817434

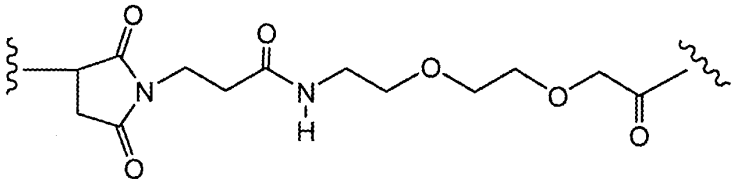
在一些實施例中，連接子組份可包含將抗體與另一連接子組份或藥物部分連接之"伸展單元"。例示性伸展單元展示於下(其中波浪線指示與抗體共價連接之位點)：



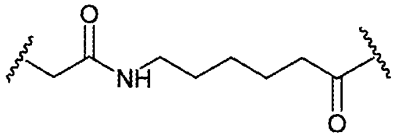
MC



MP



MPEG



。

在一些實施例中，連接子組份可包含胺基酸單元。在一此實施例中，該胺基酸單元容許連接子由蛋白酶裂解，進而在暴露於細胞內蛋白酶(諸如溶酶體酶)後便利藥物自免疫接合物中釋放。參見(例如)Doronina等人(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784。例示性胺基酸單元包括(但不限於)二肽、三肽、四肽及五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)；苯丙胺酸-離胺酸(fk或phe-lys)；或N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸

200817434

(Me-val-cit)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。胺基酸單元可包含彼等天然存在胺基酸殘基，以及少數胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸單元可經設計且優化其對於由特定酶(例如，與腫瘤相關之蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D，或纖溶酶蛋白酶)酶裂解之選擇性。

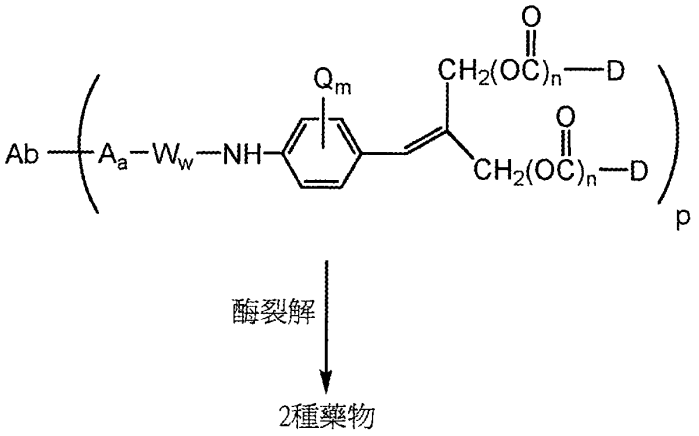
在一些實施例中，連接子組份可包含直接或藉助於伸展單元及/或胺基酸單元將抗體與藥物部分連接之"間隔基"單元。間隔基單元可為"自供"或"非自供"。"非自供"間隔基單元為其中在ADC之酶(例如，蛋白水解)分裂後部分或所有間隔基單元保持與藥物部分結合之間隔基單元。非自供間隔基單元之實例包括(但不限於)甘胺酸間隔基單元及甘胺酸-甘胺酸間隔基單元。亦涵蓋易於發生序列特異性酶裂解之肽間隔基的其他組合。舉例而言，由與腫瘤細胞相關之蛋白酶進行之含有甘胺酸-甘胺酸間隔基單元的ADC之酶裂解會使得甘胺酸-甘胺酸-藥物部分自ADC之剩餘物中釋放。在一此實施例中，該甘胺酸-甘胺酸-藥物部分隨後在腫瘤細胞中經受一單獨水解步驟，因此使甘胺酸-甘胺酸間隔基單元自藥物部分裂解。

"自供"間隔基單元容許在不具有單獨水解步驟之情況下藥物部分之釋放。在某些實施例中，連接子之間隔基單元包含對胺基苄基單元。在一此實施例中，對胺基苄醇係經由醯胺鍵與胺基酸單元連接，且苄醇與細胞毒性劑之間產

生胺基甲酸酯、胺基甲酸甲酯或碳酸酯。參見(例如)Hamann等人(2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103。在一實施例中，間隔基單元為對胺基苄氧羰基(PAB)。在某些實施例中，對胺基苄基單元之伸苯基部分係經Qm取代，其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為在0-4之範圍內之整數。自供間隔基單元之實例進一步包括(但不限於)與對胺基苄醇電子上類似之芳族化合物(參見(例如)US 2005/0256030 A1)，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)及鄰胺基苄基縮醛或對胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔基，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁醯胺(Rodrigues等人，Chemistry Biology, 1995, 2, 223)；適當經取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(Storm等人，J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815)；及2-胺基苯基丙醯胺(Amsberry等人，J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)。在甘胺酸之a-位置處經取代之含胺藥物的消除(Kingsbury等人，J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)亦為適用於ADC中之自供間隔基之實例。

在一實施例中，間隔基單元為如下所述之分枝雙(羥基甲基)苯乙烯(BHMS)單元，其可用於併入且釋放多種藥物。

200817434



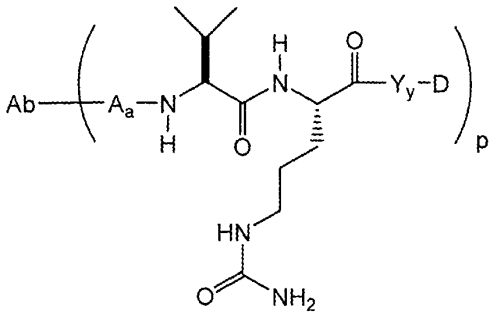
其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為在0-4之範圍內之整數；n為0或1；且p在1至約20之範圍內。

連接子可包含上述連接子組份之任一或多者。在某些實施例中，連接子係以以下ADC式II展示於括號中

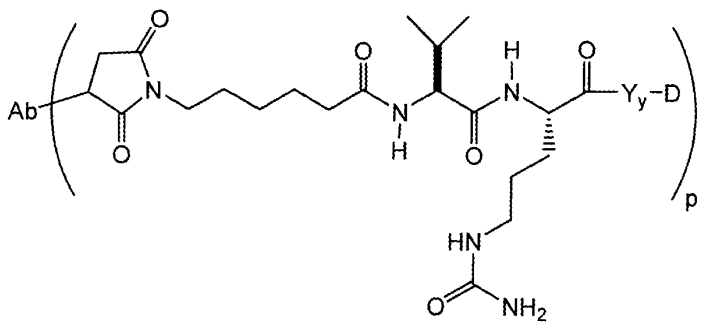
$$Ab-([Aa-Ww-Yy]-D)_p \qquad \text{式II}$$

其中A為伸展單元，且a為0至1之整數；W為胺基酸單元，且w為0至12之整數；Y為間隔基單元，且y為0、1或2；且Ab、D及p係如上文關於式I所定義。該等連接子之例示性實施例描述於US 20050238649 A1中，其係以引用的方式明確併入本文中。

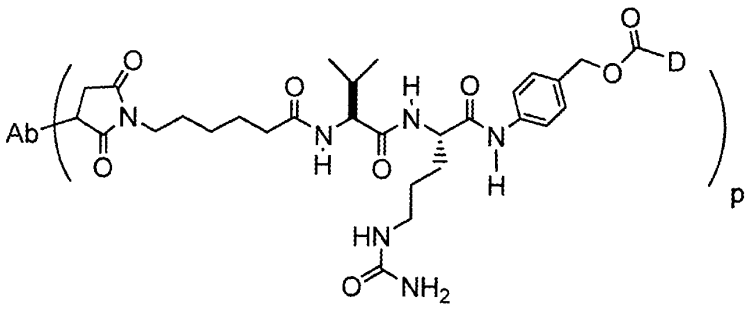
例示性連接子組份及其組合展示於以下式II之ADC之上下文中：



Val-Cit或VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

包括伸展單元、間隔基及胺基酸單元之連接子組份可藉由此項技術中已知之方法來合成，諸如US 2005-0238649 A1中描述之彼等方法。

例示性藥物部分

美登素及美登素類物

在一些實施例中，免疫接合物包含與一或多個美登素類物分子接合之本發明之抗體。美登素類物為藉由抑制微管蛋白聚合起作用之有絲分裂抑制劑。美登素首先係自東非灌木齒葉美登木(east African shrub Maytenus serrata)分離(美國專利第3896111號)。隨後，發現某些微生物亦產生美登素類物，諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於(例如)美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746

號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號；及第4,371,533號中。

美登素類物藥物部分為抗體-藥物接合物中有吸引力之藥物部分，因為其：(i)相對易於由醱酵或醱酵產物之化學修飾或衍生來製備；(ii)易於由適於經由非二硫化物連接子與抗體接合之官能基衍生；(iii)在血漿中穩定；且(iv)可有效抗多種腫瘤細胞株。

適用作美登素類物藥物部分之美登素化合物在此項技術中為已知的且可根據已知方法自天然來源分離或使用遺傳工程技術產生(參見Yu等人(2002) PNAS 99:7968-7973)。美登醇及美登醇類似物亦可根據已知方法來合成製備。

如本文中所揭示，美登素類物藥物部分之例示性實施例包括：DM1；DM3；及DM4。

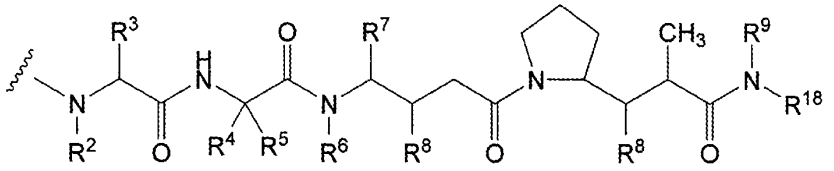
奧利斯坦汀及海兔毒素

在一些實施例中，免疫接合物包含與海兔毒素或海兔毒素肽類似物或衍生物(例如，奧利斯坦汀)接合之本發明之抗體(美國專利第5635483號；第5780588號)。已展示海兔毒素及奧利斯坦汀干擾微管動力學、GTP水解及核及細胞分裂(Woyke等人(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)且具有抗癌(美國專利第5663149號)及抗

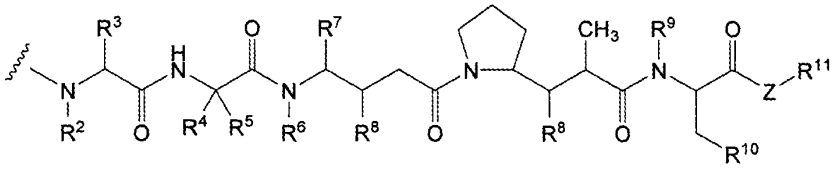
真菌活性(Pettit等人(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。海兔毒素或奧利斯坦汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端與抗體連接(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦汀實施例包括N末端連接之單甲基奧利斯坦汀藥物部分DE及DF，其揭示於2004年3月28日提交之Senter等人，Proceedings of the American Association for Cancer Research，第45卷，文摘號623，其之揭示內容係以引用的方式全部明確併入本文中。

肽藥物部分可選自以下之式D_E及D_F：



D_E



D_F

其中D_E及D_F之波浪線指示抗體或抗體-連接子組份之共價連接位點，且在各位置獨立：

R^2係選自H及C_1-C_8烷基；

R^3係選自H、C_1-C_8烷基、C_3-C_8碳環、芳基、C_1-C_8烷基-芳基、C_1-C_8烷基-(C_3-C_8碳環)、C_3-C_8雜環及C_1-C_8烷基-(C_3-C_8雜環)；

R^4係選自H、C_1-C_8烷基、C_3-C_8碳環、芳基、C_1-C_8烷基-芳基、C_1-C_8烷基-(C_3-C_8碳環)、C_3-C_8雜環及C_1-C_8烷基-

(C_3-C_8雜環)；

R^5係選自H及甲基；

或R^4及R^5共同形成碳環環且具有式-$(CR^aR^b)_n$-，其中R^a及R^b係獨立地選自H、C_1-C_8烷基及C_3-C_8碳環且n係選自2、3、4、5及6；

R^6係選自H及C_1-C_8烷基；

R^7係選自H、C_1-C_8烷基、C_3-C_8碳環、芳基、C_1-C_8烷基-芳基、C_1-C_8烷基-(C_3-C_8碳環)、C_3-C_8雜環及C_1-C_8烷基-(C_3-C_8雜環)；

R^8係各自獨立地選自H、OH、C_1-C_8烷基、C_3-C_8碳環及O-(C_1-C_8烷基)；

R^9係選自H及C_1-C_8烷基；

R^{10}係選自芳基或C_3-C_8雜環；

Z為O、S、NH或NR^{12}，其中R^{12}為C_1-C_8烷基；

R^{11}係選自H、C_1-C_{20}烷基、芳基、C_3-C_8雜環、-$(R^{13}O)_m$-R^{14}或-$(R^{13}O)_m$-$CH(R^{15})_2$；

m為在1-1000之範圍內之整數；

R^{13}為C_2-C_8烷基；

R^{14}為H或C_1-C_8烷基；

R^{15}之每一出現獨立地為H、COOH、-$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$、-$(CH_2)_n$-SO_3H或-$(CH_2)_n$-SO_3-C_1-C_8烷基；

R^{16}之每一出現獨立地為H、C_1-C_8烷基或-$(CH_2)_n$-COOH；

R^{18}係選自-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-芳基、-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-(C_3-C_8雜

環)及-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-(C_3-C_8碳環)；及

n為在0至6之範圍內之整數。

在一實施例中，R^3、R^4及R^7獨立地為異丙基或第二丁基且R^5為-H或甲基。在一例示性實施例中，R^3及R^4各自為異丙基，R^5為-H，且R^7為第二丁基。

在另一實施例中，R^2及R^6各自為甲基，且R^9為-H。

在另一實施例中，R^8之每一出現為-OCH_3。

在一例示性實施例中，R^3及R^4各自為異丙基，R^2及R^6各自為甲基，R^5為-H，R^7為第二丁基，R^8之每一出現為-OCH_3，且R^9為-H。

在一實施例中，Z為-O-或-NH-。

在一實施例中，R^{10}為芳基。

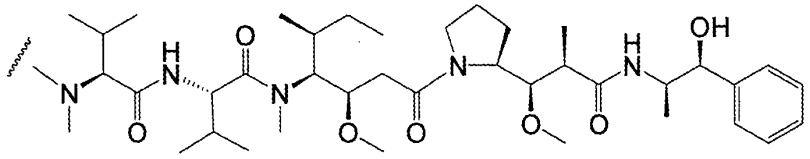
在一例示性實施例中，R^{10}為-苯基。

在一例示性實施例中，當Z為-O-時，R^{11}為-H、甲基或第三丁基。

在一實施例中，當Z為-NH時，R^{11}為-$CH(R^{15})_2$，其中R^{15}為-$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$，且R^{16}為-C_1-C_8烷基或-$(CH_2)_n$-COOH。

在另一實施例中，當Z為-NH時，R^{11}為-$CH(R^{15})_2$，其中R^{15}為-$(CH_2)_n$-SO_3H。

式D_E之例示性奧利斯坦汀實施例為MMAE，其中波浪線指示與抗體-藥物接合物之連接子(L)之共價連接：

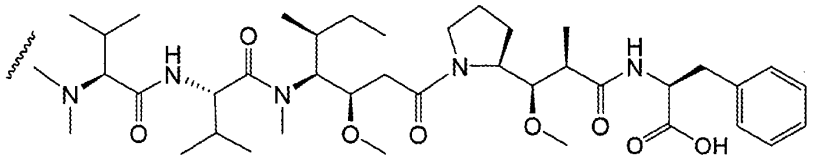


MMAE

式D_F之例示性奧利斯坦汀實施例為MMAF，其中波浪線

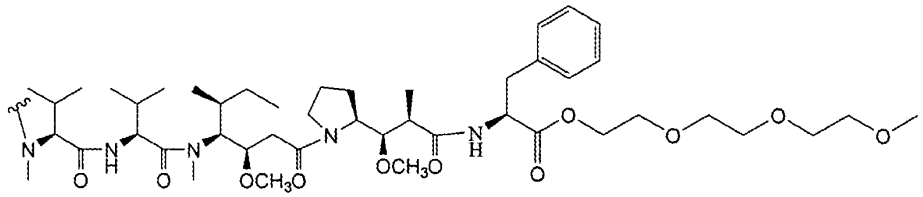
200817434

指示與抗體-藥物接合物之連接子(L)之共價連接(參見US 2005/0238649及Doronina等人(2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124)：

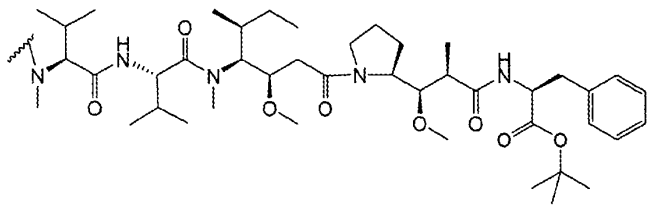


MMAF

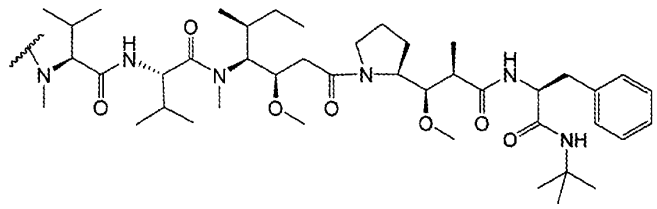
其他藥物部分包括以下MMAF衍生物，其中波浪線指示與抗體-藥物接合物之連接子(L)之共價連接：



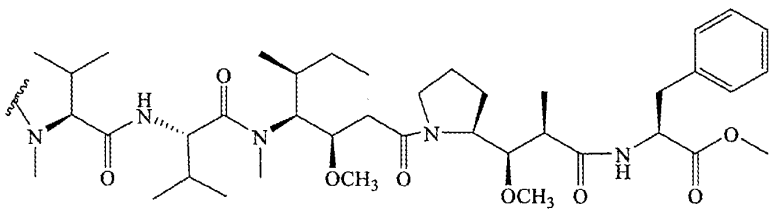
,



,

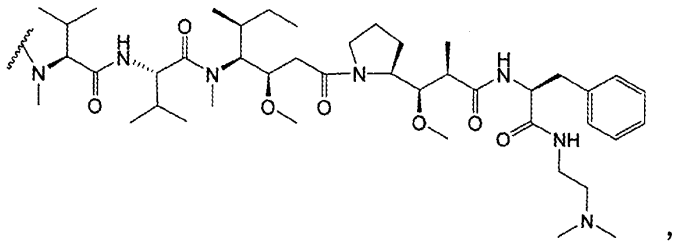


,

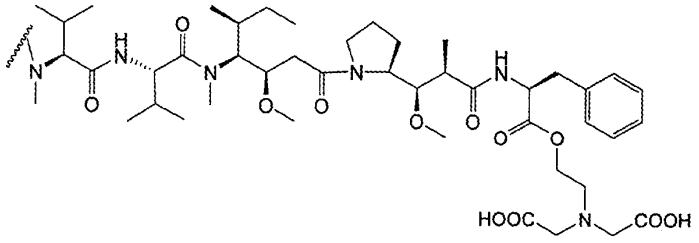


,

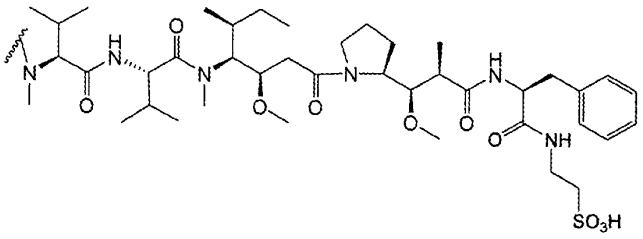
200817434



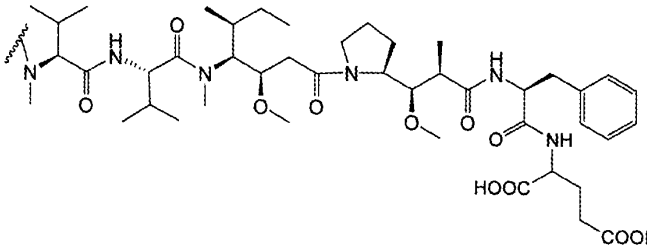
，



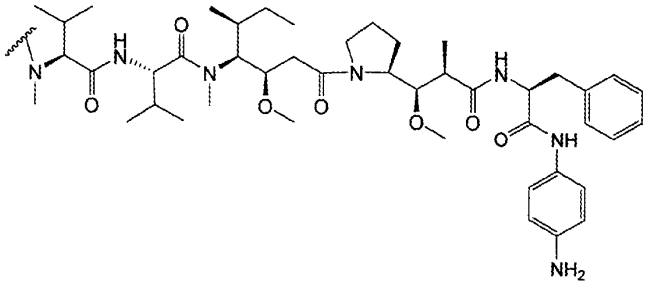
，



，



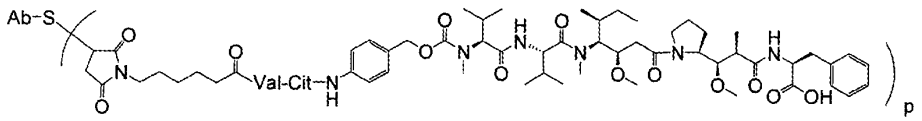
，及



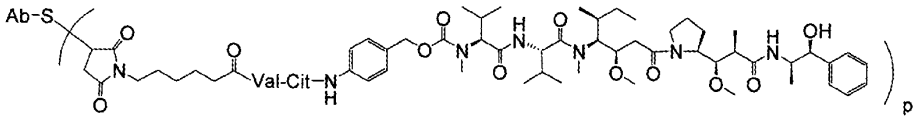
在一態樣中，如上所示之包括(但不限於)三乙二醇酯(TEG)之親水性基團可在R^{11}處與藥物部分連接。不受任何

特定理論限制，親水性基團有助於藥物部分之內化及非黏聚。

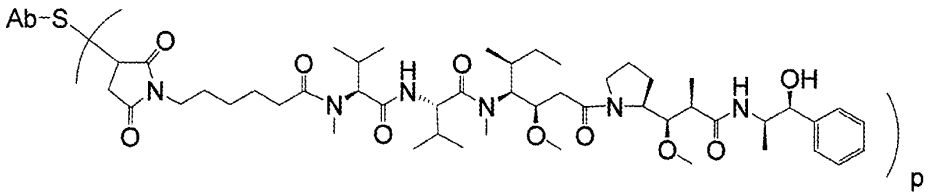
包含奧利斯坦汀/海兔毒素或其衍生物之式I之ADC的例示性實施例描述於US 2005-0238649 A1及Doronina等人(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124中，其係以引用的方式明確併入本文中。包含MMAE或MMAF及各種連接子組份之式I之ADC的例示性實施例具有以下結構及縮寫(其中"Ab"為抗體；p為1至約8，"Val-Cit"為纈胺酸-瓜胺酸二肽；且"S"為硫原子)：



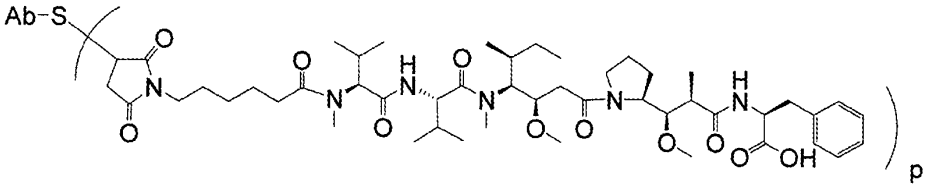
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

包含MMAF及各種連接子組份之式I之ADC的例示性實施

例進一步包括Ab-MC-PAB-MMAF及Ab-PAB-MMAF。有趣地，已展示包含藉由不可蛋白水解分裂之連接子與抗體連接之MMAF的免疫接合物具有與包含藉由可蛋白水解分裂連接子與抗體連接之MMAF的免疫接合物相當的活性。參見，Doronina等人(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124。在該等情況下，認為藥物釋放藉由細胞中抗體降解來實現。Id.

通常，基於肽之藥物部分可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。該等肽鍵可(例如)根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參見E. Schröder及K. Lübke, "The Peptides"，第1卷，第76-136頁，1965, Academic Press)來製備。奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分可根據以下文獻中之方法來製備：US 2005-0238649 A1；美國專利第5635483號；美國專利第5780588號；Pettit等人(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465；Pettit等人(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277；Pettit, G.R.等人，Synthesis, 1996, 719-725；Pettit等人(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863；及Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784。

詳言之，式D_F之奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分(諸如MMAF及其衍生物)可使用US 2005-0238649 A1及Doronina等人(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124中描述之方法來製備。式D_E之奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分(諸如MMAE及其衍生物)可使用Doronina等人(2003) Nat.

Biotech. 21:778-784中描述之方法來製備。藥物-連接子部分MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF及MC-vc-PAB-MMAE可由常規方法(例如，如Doronina等人(2003) Nat. Biotech. 21:778-784及專利申請公開案第US 2005/0238649 A1號中所述)便利地合成，且隨後與所關注之抗體接合。

藥物裝載

藥物裝載係由p表示且為式I之分子中每抗體之藥物部分的平均數目。藥物裝載可在每抗體1至20個藥物部分(D)之範圍內。式I之ADC包括與範圍為1至20個之藥物部分接合之抗體的集合。在由接合反應製備ADC時每抗體藥物部分之平均數目可藉由習知方法(諸如質譜、ELISA檢定及HPLC)來表徵。亦可測定以p計之ADC之定量分布。在一些情況下，自具有其他藥物裝載之ADC進行之其中p為確定值的均質ADC之分離、純化及表徵可藉由諸如逆相HPLC或電泳之方法達成。

對於一些抗體-藥物接合物而言，p可由抗體上連接點之數目限制。舉例而言，當連接為半胱胺酸硫醇時，如在上文之例示性實施例中，抗體可僅具有一或若干半胱胺酸硫醇基團，或可僅具有一或若干足夠反應性硫醇基團，連接子可經由該等基團連接。在某些實施例中，較高藥物裝載(例如p>5)可造成凝集、不溶性、毒性或某些抗體-藥物接合物之細胞滲透性的損失。在某些實施例中，本發明之ADC之藥物裝載在1至約8；約2至約6；約3至約5；約3至

約4；約3.1至約3.9；約3.2至約3.8；約3.2至約3.7；約3.2至約3.6；約3.3至約3.8；或約3.3至約3.7之範圍內。實際上，已展示對於某些ADC而言，每抗體藥物部分之最佳比率可小於8，且可為約2至約5。參見US 2005-0238649 A1(係以引用的方式全部併入本文中)。

在某些實施例中，少於理論最大值之藥物部分在接合反應期間與抗體接合。如下所述，抗體可含有(例如)不與藥物-連接子中間物或連接子試劑反應之離胺酸殘基。僅大部分反應性離胺酸基團可與胺-反應性連接子試劑反應。一般而言，抗體不含可與藥物部分連接之許多游離及反應性半胱胺酸硫醇基團；實際上抗體中之大部分半胱胺酸硫醇殘基以二硫橋鍵存在。在某些實施例中，抗體可在部分或完全還原條件下經諸如二硫蘇糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)之還原劑還原以產生反應性半胱胺酸硫醇基團。在某些實施例中，抗體經受變性條件以展現反應性親核基團(諸如離胺酸或半胱胺酸)。

ADC之裝載量(藥物/抗體比)可以不同方式控制，例如，藉由：(i)限制藥物-連接子中間物或連接子試劑相對於抗體之莫耳過量；(ii)限制接合反應時間或溫度；(iii)部分或限制半胱胺酸硫醇修飾之還原性條件；(iv)由重組技術設計抗體之胺基酸序列以使得半胱胺酸殘基之數目及位置經修飾以控制連接子-藥物連接之數目及/或位置(諸如如本文中所揭示製備及WO 2006/034488(係以引用的方式全部併入本文中)中之thioMab或thioFab)。

應瞭解若一個以上親核基團與藥物-連接子中間物或連接子試劑、接著藥物部分試劑反應，則所得產物為具有一或多個與抗體連接之藥物部分之分布的ADC化合物之混合物。每抗體之藥物之平均數目可藉由雙重ELISA抗體檢定由混合物計算，該檢定對抗體具有特異性且對藥物具有特異性。個別ADC分子可藉由質譜於混合物中鑑別且藉由HPLC(例如疏水性相互作用層析)分離(參見(例如)Hamblett, K.J.等人，"Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate"，文摘號624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting，2004年3月27-31日，Proceedings of the AACR，第45卷，2004年3月；Alley, S.C.等人，"Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates"，文摘號627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting，2004年3月27-31日，Proceedings of the AACR，第45卷，2004年3月)。在某些實施例中，可藉由電泳或層析將具有單一裝載值之均質ADC與接合混合物分離。

製備免疫接合物之某些方法

式I之ADC可使用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑由若干途徑來製備，其包括：(1)抗體之親核基團與二價連接子試劑反應經由共價鍵形成Ab-L，接著與藥物部分D反應；及(2)藥物部分之親核基團與二價連接子試劑反應經由共價鍵形成D-L，接著與抗體之親核基團

反應。經由後者之途徑製備式I之ADC之例示性方法描述於US 20050238649 A1中，其係以引用的方式明確併入本文中。

抗體上之親核基團包括(但不限於)：(i)N末端胺基；(ii)側鏈胺基，例如離胺酸；(iii)側鏈硫醇基，例如半胱胺酸；及(iv)糖羥基或胺基，其中該抗體經糖基化。胺、硫醇及羥基為親核的且能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵，該等連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。某些抗體具有可還原之鏈內二硫化物，亦即半胱胺酸橋。可藉由以諸如DTT(二硫蘇糖醇)或三羰基乙基膦(TCEP)之還原劑處理以使得抗體經完全或部分還原而使抗體具有與連接子試劑接合之反應性。因此，理論上每一半胱胺酸橋應形成兩個反應性硫醇親核試劑。或者，可經由離胺酸殘基之修飾，例如，藉由離胺酸殘基與2-亞胺硫烷(Traut氏試劑)之反應將氫硫基引入抗體中，使胺轉化為硫醇。可藉由引入一個、兩個、三個、四個或四個以上半胱胺酸殘基(例如，藉由製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之變異體抗體)將反應性硫醇基團引入抗體中。

本發明之抗體-藥物接合物亦可藉由抗體上之親電子基團(諸如醛或酮羰基)與連接子試劑或藥物上之親核基團之間反應來製備。連接子試劑上有用之親核基團包括(但不

限於)醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡腙、肼羧酸酯及芳基醯肼。在一個實施例中，抗體經修飾以引入能夠與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應的親電子部分。在另一個實施例中，糖基化抗體之糖可以例如過碘酸鹽氧化試劑氧化以形成醛或酮基，其可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應。所得亞胺希夫(Schiff)鹼基團可形成穩定鍵，或可以例如硼氫化物試劑還原以形成穩定胺鍵。在一個實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏過碘酸鈉反應可在抗體中產生羰基(醛基及酮基)，其可與藥物上之適當基團反應(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一個實施例中，含有N端絲胺酸或蘇胺酸殘基之抗體可與偏過碘酸鈉反應，產生一種醛替代第一胺基酸(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146；US 5362852)。此醛可與藥物部分或連接子親核劑反應。

藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡腙、肼羧酸酯及芳基醯肼基團，能夠與包括下列之連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。

本發明之化合物明確涵蓋(但不限於)以下列交聯試劑製備之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及sulfo-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基碸)苯甲酸酯)，其為市售可得(例如來自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A；參見2003-2004 Applications Handbook and Catalog，第467-498頁)。

包含抗體及細胞毒性劑之免疫接合物亦可使用下列多種雙官能蛋白偶合劑來製造：諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫喃(thiolane)(IT)、亞胺酸酯(imidoesters)(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對-疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(諸如雙-(對-重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，Science, 238:1098 (1987)中所述來製備。碳-14-標記之1-異硫氰酸基(cyanato)苄基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為一個用於接合放射性核苷酸與抗體之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

或者，包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白可(例如)藉由重組技術或肽合成製得。重組DNA分子可包含彼此相鄰或

200817434

由編碼連接子肽之區域分隔(其不破壞接合物之所需性質)的編碼接合物之抗體及細胞毒性部分之區域。

在另一實施例中，抗體可與"受體"(諸如抗生蛋白鏈菌素)接合以用於腫瘤預靶向中，其中將抗體-受體接合物投予患者，接著使用清除劑自循環中移除未結合之接合物，且隨後投予與細胞毒性劑(例如，放射性核苷酸)接合之"配位體"(例如，抗生蛋白)。

2.例示性免疫接合物–Thio-抗體藥物接合物

製備經半胱胺酸改造之抗CD22抗體

編碼本發明之親本抗CD22抗體及經半胱胺酸改造之抗CD22抗體之胺基酸序列變異體的DNA係藉由多種方法來製備，其包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在胺基酸序列變異體之情況下)；藉由先前製備之編碼多肽之DNA的定點(或寡核苷酸介導之)突變誘發(Carter (1985)等人，Nucleic Acids Res. 13:4431-4443；Ho等人(1989) Gene (Amst.) 77:51-59；Kunkel等人(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488；Liu等人(1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)、PCR突變誘發(Higuchi, (1990)在PCR Protocols中，第177-183頁，Academic Press；Ito等人(1991) Gene 102:67-70；Bernhard等人(1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132；及Vallette等人(1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733)及盒式突變誘發(Wells等人(1985) Gene 34:315-323)來製備。突變誘發方案、套組及試劑為市售的，例如QuikChange®多定點突變誘發套組(Stratagene, La

Jolla, CA)。單一突變亦係由基於PCR之突變誘發使用雙鏈質體DNA作為模板藉由寡核苷酸定向突變誘發產生(Sambrook及Russel，(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual，第3版；Zoller等人(1983) Methods Enzymol. 100:468-500；Zoller, M.J.及Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500)。重組抗體之變異體亦可藉由限制片段操縱或合成寡核苷酸之重疊延伸PCR來建構。誘變引子編碼半胱胺酸密碼子置換。標準突變誘發技術可用於產生編碼該等經突變半胱胺酸改造之抗體之DNA(Sambrook等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；及Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

噬菌體呈現技術(McCafferty等人(1990) Nature 348:552-553)可用於在活體外自未免疫供體之免疫球蛋白可變(V)域基因譜系產生抗CD22人類抗體及抗體片段。根據此技術，抗體V域基因於框內選殖至絲狀噬菌體(諸如M13或fd)的主要或次要鞘蛋白基因內，且呈現為噬菌體粒子表面上之功能性抗體片段。因為絲狀粒子含有噬菌體基因組之單鏈DNA複本，所以基於抗體功能性特性之選擇亦引起編碼展示彼等特性之抗體之基因的選擇。因此，噬菌體模擬B細胞之一些性質(Johnson等人(1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571；Clackson等人(1991) Nature,

352:624-628；Marks等人(1991) J. Mol. Biol. 222:581-597；Griffith等人(1993) EMBO J. 12:725-734；US 5565332；US 5573905；US 5567610；US 5229275)。

抗CD22抗體可使用已知寡肽合成方法來化學合成或可使用重組技術來製備且純化。適當胺基酸序列或其部分可使用固相技術由直接肽合成產生(Stewart等人，**Solid-Phase Peptide Synthesis**, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA；Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154)。活體外蛋白合成可使用手動技術或自動控制來進行。自動固相合成可(例如)使用t-BOC或經Fmoc保護之胺基酸且使用製造商之指示使用一應用生物系統肽合成儀(Applied Biosystems Peptide Synthesizer)(Foster City, CA)來實現。抗CD22抗體或CD22多肽之各個部分可使用化學或酶方法分別化學合成且組合以產生所需抗CD22抗體或CD22多肽。

已研發出製備抗體片段之多種技術。傳統上，該等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化得到(Morimoto等人(1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117；及Brennan等人(1985) Science, 229:81)，或直接由重組宿主細胞產生。Fab、Fv及ScFv抗CD22抗體片段均可表現於大腸桿菌中且由大腸桿菌分泌，因而易於產生大量該等片段。可自上文所論述之抗體噬菌體庫中分離抗體片段。或者，可直接自大腸桿菌回收Fab'-SH片段且使其化學偶合以形成$F(ab')_2$片段(Carter等人(1992) Bio/Technology

10:163-167)，或直接自重組宿主細胞培養物中分離。抗CD22抗體可為(scFv)單鏈Fv片段(WO 93/16185；US 5571894；US. 5587458)。抗CD22抗體片段亦可為"線性抗體"(US 5641870)。該等線性抗體片段可為單特異性或雙特異性的。

下文之描述主要係關於藉由以含有編碼抗CD22抗體之核酸之載體培養經轉化或轉染的細胞來製備抗CD22抗體。編碼抗CD22抗體之DNA可獲自由組織製備之cDNA庫，認為該組織具有抗CD22抗體mRNA且以可偵測含量表現其。因此，人類抗CD22抗體或CD22多肽DNA可便利地獲自由人類組織製備的cDNA庫。編碼抗CD22抗體之基因亦可獲自基因組庫或由已知合成程序(例如，自動核酸合成)獲得。

本發明之設計、選擇及製備方法使得對親電子官能基具有反應性之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體成為可能。該等方法進一步使抗體接合物化合物(諸如在指定、經設計、選擇性位點處具有藥物分子之抗體-藥物接合物(ADC)化合物)成為可能。抗體表面上之反應性半胱胺酸殘基容許經由硫醇反應性基團(諸如順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯基)特異性接合藥物部分。Cys殘基之硫醇官能基與順丁烯二醯亞胺基團之親核反應性與蛋白質中之任何其他胺基酸官能基(諸如離胺酸殘基之胺基或N末端胺基)相比高約1000倍。碘乙醯基及順丁烯二醯亞胺試劑中之硫醇特異性官能基可與胺基反應，但需要較高pH值(>9.0)及較長反應時間

200817434

(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。可藉由標準Ellman檢定來評估蛋白質中游離硫醇之量。免疫球蛋白M為二硫化物鍵聯之五聚物之實例，而免疫球蛋白G為具有將亞單元結合起來之內部二硫橋鍵之蛋白的實例。在諸如此之蛋白中，需要以諸如二硫蘇糖醇(DTT)或硒醇之試劑還原二硫鍵(Singh等人(2002) Anal. Biochem. 304:147-156)以產生反應性游離硫醇。此方法可使得抗體三級結構及抗原結合特異性喪失。

Pheselector(用於選擇反應性硫醇之噬菌體ELISA)檢定容許偵測以ELISA噬菌體形式之抗體中反應性半胱胺酸基團之存在，藉此輔助設計經半胱胺酸改造之抗體(WO 2006/034488)。將該經半胱胺酸改造之抗體塗覆於孔表面上，接著以噬菌體粒子培養，添加經HRP標記之二級抗體，且進行吸光度偵測。呈現於噬菌體上之突變蛋白可以迅速、堅固及高產量方式篩檢。經半胱胺酸改造之抗體之庫可經製備且使用同一方法經受結合選擇以鑑別自抗體或其他蛋白之隨機蛋白-噬菌體庫併入之游離Cys的適當反應性位點。此技術包括使呈現於噬菌體上之半胱胺酸突變蛋白與亦具有硫醇反應性之親和力試劑或報導體基團反應。

PHESELECTOR檢定容許篩檢抗體中之反應性硫醇基團。由此方法來鑑別A121C變異體為例示性的。整個Fab分子可經有效搜索以鑑別更多具有反應性硫醇基團之ThioFab變異體。參數分數表面可接近性係用於確定且定

量溶劑對多肽中胺基酸殘基之可接近性。表面可接近性可表示為溶劑分子(例如水)可接觸之表面積($Å^2$)。水之佔用空間近似為一1.4 Å半徑之球體。軟體可免費獲得或可作為結晶學程式之CCP4 Suite經許可(CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom之秘書，傳真：(+44) 1925 603825，或藉由網路：www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)，其使用算法以計算具有已知x射線結晶學衍生之座標之蛋白的每一胺基酸之表面可接近性("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763)。進行表面可接近性計算之兩個例示性軟體模組為基於B. Lee及F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400之算法之"AREAIMOL"及"SURFACE"。AREAIMOL將蛋白之溶劑可接近表面定義為當其繞蛋白之凡得瓦爾(Van der Waals)表面旋轉時探針球體(表示一溶劑分子)之中心點。AREAIMOL藉由在每一原子周圍延伸之球體上產生表面點(以距原子中心等於原子與探針半徑之和的距離)且消除位於與鄰近原子相關之相等球體內之彼等表面點來計算溶劑可接近之表面積。AREAIMOL在PDB座標文件中測得原子之溶劑可接近面積，且概述殘基、鏈及整個分子之可接近面積。個別原子之可接近面積(或面積差異)可讀取為假PDB輸出文件。AREAIMOL假定每一元素之單一半徑，且僅識別有限數目之不同元素。

AREAIMOL及SURFACE報導絕對可接近性，亦即平方埃(Å)之數目。分數表面可接近性係參照多肽內胺基酸相

關之標準狀態來計算。該參照狀態為三肽Gly-X-Gly，其中X為所關注之胺基酸，且該參照狀態應為"延伸"構形，亦即如同β鏈中之彼等構形。延伸之構形最大化X之可接近性。將經計算可接近面積除以Gly-X-Gly三肽參照狀態之可接近面積且報導商，其為分數可接近性。可接近性百分比為分數可接近性乘以100。計算表面可接近性之另一例示性算法係基於程式xsae(Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)之SOLV模組，其根據多肽之X射線座標計算胺基酸殘基與水球之分數可接近性。可使用可用晶體結構資訊來計算抗體中每一胺基酸之分數表面可接近性(Eigenbrot等人(1993) J Mol Biol. 229:969-995)。

編碼經半胱胺酸改造之抗體之DNA易於使用習知程序來分離且測序(例如，藉由使用能夠與編碼鼠抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合之寡核苷酸探針)。融合瘤細胞充當此DNA之來源。一旦經分離，即可將DNA置於表現載體中，隨後將其轉染入不另外產生抗體蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或其他哺乳動物宿主細胞，諸如骨髓瘤細胞)中(US 5807715；US 2005/0048572；US 2004/0229310)，以在重組宿主細胞中獲得單株抗體之合成。

在設計及選擇後，具有經設計、高反應性未配對Cys殘基之經半胱胺酸改造之抗體(例如ThioFab)可藉由以下步驟來產生：(i)表現於細菌(例如大腸桿菌)系統(Skerra等人(1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262；Plückthun

(1992) Immunol. Revs. 130:151-188)或哺乳動物細胞培養物系統(WO 01/00245)(例如中國倉鼠卵巢細胞(CHO))中；及(ii)使用常見蛋白純化技術來純化(Lowman等人(1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988)。

經設計Cys硫醇基團與親電子連接子試劑及藥物-連接子中間物反應以形成經半胱胺酸改造之抗體藥物接合物及其他經標記半胱胺酸改造之抗體。經半胱胺酸改造之抗體之Cys殘基與存在於親本抗體中之Cys殘基配對且形成鏈間及鏈內二硫鍵，其不具有任何反應性硫醇基團(除非經還原劑處理)且不與親電子連接子試劑或藥物-連接子中間物反應。新近經設計Cys殘基可保持未配對且能夠與親電子連接子試劑或藥物-連接子中間物(諸如藥物-順丁烯二醯亞胺)反應，亦即與其接合。例示性藥物-連接子中間物包括：MC-MMAE、MC-MMAF、MC-vc-PAB-MMAE及MC-vc-PAB-MMAF。重鏈及輕鏈之經設計Cys殘基之結構位置係根據依序編號系統來編號。此依序編號系統與起始於N末端之Kabat編號系統(Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)相關，其與Kabat編號流程(底列)之不同之處在於由a、b、c指示插入。使用Kabat編號系統，實際線性胺基酸序列可含有對應於縮短或插入可變域之FR或CDR中之少量或額外胺基酸。經半胱胺酸改造之重鏈變異體位點係藉由依序編號及Kabat編號流程來鑑別。

在一實施例中，經半胱胺酸改造之抗CD22抗體係藉由以下方法來製備，其包含：

(a)由半胱胺酸來置換親本抗CD22抗體之一或多個胺基酸殘基；且

(b)藉由使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應來測定經半胱胺酸改造之抗CD22抗體之硫醇反應性。

經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應可比親本抗體與硫醇反應性試劑反應之反應性更強。

自由半胱胺酸胺基酸殘基可位於重鏈或輕鏈中，或位於恆定域或可變域中。抗體片段(例如Fab)亦可藉由置換抗體片段之胺基酸經設計具有一或多個半胱胺酸胺基酸，以形成經半胱胺酸改造之抗體片段。

本發明之另一實施例提供一種製備(製造)經半胱胺酸改造之抗CD22抗體的方法，其包含：

(a)將一或多種半胱胺酸胺基酸引入親本抗CD22抗體中以產生經半胱胺酸改造之抗CD22抗體；且

(b)以硫醇反應性試劑測定經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性；

其中經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應比親本抗體與硫醇反應性試劑反應之反應性更強。

製備經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(a)可包含：

(i)誘變編碼經半胱胺酸改造之抗體之核酸序列；

(ii)表現經半胱胺酸改造之抗體；且

(iii)分離且純化經半胱胺酸改造之抗體。

製備經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)可包含在選自噬菌體或噬菌粒粒子之病毒粒子上表現經半胱胺酸改造之抗體。

製備經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)亦可包含：

(i)使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇-反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體；且

(ii)量測經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體與捕捉培養基之結合。

本發明之另一實施例為用高反應性、未配對半胱胺酸胺基酸篩檢經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性的方法，其包含：

(a) 將一或多種半胱胺酸胺基酸引入親本抗體中以產生經半胱胺酸改造之抗體；

(b) 使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇-反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體；且

(c) 量測經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體與捕捉培養基之結合；且

(d) 以硫醇反應性試劑測定經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性。

篩檢經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(a)可包含：

(i) 誘變編碼經半胱胺酸改造之抗體之核酸序列；

(ii) 表現經半胱胺酸改造之抗體；且

(iii)分離且純化經半胱胺酸改造之抗體。

篩檢經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)可包含在選自噬菌體或噬菌粒粒子之病毒粒子上表現經半胱胺酸改造之抗體。

篩檢經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)亦可包含：

(i) 使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇-反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體；且

(ii) 量測經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體與捕捉培養基之結合。

抗CD22 10F4 IgG變異體之半胱胺酸改造

藉由本文中描述之半胱胺酸改造方法在重鏈118(EU編號)(等於依序編號之重鏈位置121)位點處將半胱胺酸引入全長、嵌合親本單株抗CD22抗體中。

親本抗體"std抗CD22 Hu 10F4v3 Fc"(重鏈序列：SEQ ID NO:88，輕鏈序列：SEQ ID NO:87，圖5B)經半胱胺酸改造以得到"A118C thio hu抗CD22 10F4v3"(重鏈序列：SEQ ID NO:92，輕鏈序列：SEQ ID NO:91，圖17)、"S400C thio hu抗CD22 10F4v3"(重鏈序列：SEQ ID NO:93，輕鏈序列：SEQ ID NO:91，圖17)或"V205C thio抗CD22 10F4v3"(重鏈序列：SEQ ID NO:88，輕鏈序列：SEQ ID NO:91，圖5B及圖17)。

該等經半胱胺酸改造之單株抗體藉由在含有1 mM半胱胺酸之培養基中瞬間醱酵而表現於CHO(中國倉鼠卵巢)細胞中。

經標記之半胱胺酸改造之抗CD22抗體

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體可與硫醇反應性試劑位點特異性且有效地偶合。硫醇反應性試劑可為多官能連接子試劑、捕捉物，亦即親和力、標記試劑(例如生物素-連接子試劑)、偵測標記(例如螢光團試劑)、固相固定試劑(例如SEPHAROSE™、聚苯乙烯或玻璃)，或藥物-連接子中間物。硫醇反應性試劑之一實例為N-乙基順丁烯二醯亞胺(NEM)。在一例示性實施例中，ThioFab與生物素-連接子試劑反應提供生物素化ThioFab，可根據其來偵測且量測經改造半胱胺酸殘基之存在及反應性。ThioFab與多官能連接子試劑反應提供具有官能化連接子之ThioFab，其可進一步與藥物部分試劑或其他標記反應。ThioFab與藥物-連接子中間物反應提供ThioFab藥物接合物。

本文中描述之例示性方法一般可經由本文中描述之設計應用及篩檢步驟應用於抗體之鑑別及製備，且更一般地可應用於其他蛋白。

此方法可應用於其他硫醇反應性試劑之接合，其中反應性基團為(例如)順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺、吡啶基二硫化物或其他硫醇-反應性接合搭配物(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. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego，第40-55頁，第643-671頁)。硫醇反應性試劑可為藥物部分、螢光團(諸如如螢光素或若丹明之螢光染料)、用於成像之螯合劑或放射性治療金屬、肽基或非肽基標記或偵測標記，或清除改質劑(諸如聚乙二醇之各種異構體)、與第三組份結合之肽，或另一碳水化合物或親脂劑。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體的用途

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體及其接合物可用作治療劑及/或診斷劑。本發明進一步提供預防、控制、治療或改善與B細胞相關之病症相關之一或多種症狀的方法。詳言之，本發明提供預防、控制、治療或改善與細胞增生性病症相關之一或多種症狀的方法，其中該等病症諸如癌症，例如淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。本發明進一步提供診斷CD22相關之病症或傾向於發展此病症的方法，以及鑑別抗體及優先結合與B細胞相關之CD22多肽之抗體的抗原結合片段之方法。

本發明之另一實施例係針對經半胱胺酸改造之抗CD22抗體用於製備藥物的用途，該藥物適用於治療回應B細胞相關之病症的病狀。

200817434

經半胱胺酸改造之抗體藥物接合物(Thio-抗體藥物接合物)

本發明之另一態樣為抗體-藥物接合物化合物，其包含經半胱胺酸改造之抗CD22抗體(Ab)及奧利斯坦汀藥物部分(D)，其中該經半胱胺酸改造之抗體係由連接子部分(L)經由一或多個自由半胱胺酸胺基酸與D連接；該化合物具有式I：

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

其中p為1、2、3或4；且其中經半胱胺酸改造之抗體係藉由一方法來製備，該方法包含由一或多個自由半胱胺酸胺基酸來置換一或多個親本抗CD22抗體之胺基酸殘基。

圖10展示經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物(ADC)之實施例，其中奧利斯坦汀藥物部分係與輕鏈(LC-ADC)；重鏈(HC-ADC)；及Fc區(Fc-ADC)中之經改造半胱胺酸基團連接。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物之潛在優勢包括改良之安全性(較大治療指數)；改良之PK參數；保持抗體鏈間二硫鍵，其可穩定接合物且保持其活性結合構形；限定藥物接合之位點；及自經半胱胺酸改造之抗體與藥物-連接子試劑接合製備經半胱胺酸改造之抗體藥物接合物產生更均質產物。

連接子

"連接子"、"連接子單元"或"連接"意謂包含將抗體與藥物部分共價連接之原子之共價鍵或鏈的化學部分。在各種

實施例中，連接子指定為L。"連接子"(L)為可用於將一或多個藥物部分(D)與抗體單元(Ab)連接以形成式I抗體-藥物接合物(ADC)的雙官能或多官能部分。抗體-藥物接合物(ADC)可使用具有結合藥物及抗體之反應性官能基之連接子來便利地製備。經半胱胺酸改造之抗體(Ab)之半胱胺酸硫醇可與連接子試劑、藥物部分或藥物-連接子中間物之親電子官能基形成鍵。

在一態樣中，連接子具有一反應性位點，其具有對抗體上存在之親核半胱胺酸具反應性之親電子基團。抗體之半胱胺酸硫醇與連接子上之親電子基團反應且與連接子形成共價鍵。有用之親電子基團包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺基及鹵乙醯胺基。

連接子包括二價基團(諸如烷二基、伸芳基、伸雜芳基)、部分(諸如：$-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$)、烷氧基之重複單元(例如聚伸乙基氧基、PEG、聚亞甲基氧基)及烷胺基之重複單元(例如聚伸乙基胺基、Jeffamine™)；及二酸酯及醯胺，其包括琥珀酸酯、琥珀醯胺、二羥乙酸酯、丙二酸酯及己醯胺。

根據Klussman等人(2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773第766頁之接合方法且根據實例x之方案，經半胱胺酸改造之抗體與具有親電子官能基(諸如順丁烯二醯亞胺或α-鹵羰基)之連接子試劑或藥物-連接子中間物反應。

連接子可由一或多種連接子組份組成。例示性連接子組

份包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基("MC")、順丁烯二醯亞胺基丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit"或"vc")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe"或"af")、對胺基苄氧羰基("PAB")、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯("SPP")、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯("SMCC")、(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯("SIAB")、作為一或多個重複單元之伸乙基氧基-CH_2CH_2O-("EO"或"PEO")。額外連接子組份在此項技術中為已知的且一些描述於本文中。

在一實施例中，ADC之連接子L具有下式：

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

其中：

-A-為與抗體(Ab)之半胱胺酸硫醇共價連接之伸展單元；

a為0或1；

-W-各自獨立地為胺基酸單元；

w獨立地為在0至12之範圍內之整數；

-Y-為與藥物部分共價連接之間隔基單元；且

y為0、1或2。

伸展單元

存在時，伸展單元(-A-)能夠將抗體單元與胺基酸單元(-W-)連接。就此而論，抗體(Ab)具有可與伸展單元之官能基形成鍵之官能基。可天然或經由化學操作存在於抗體

上之有用官能基包括(但不限於)氫硫基(-SH)、胺基、羥基、羧基、碳水化合物之變旋異構羥基及羧基。在一態樣中，抗體官能基為氫硫基或胺基。氫硫基可藉由還原抗體之分子內二硫鍵來產生。或者，氫硫基可使用2-亞胺硫烷(Traut氏試劑)或另一產生氫硫基之試劑藉由抗體之離胺酸部分之胺基的反應來產生。在一實施例中，抗體(Ab)具有可與伸展單元之親電子官能基形成鍵的自由半胱胺酸硫醇基團。式I接合物之例示性伸展單元由式II及III描述，其中Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上所定義，且R^{17}為選自以下基團之二價基團：$(CH_2)_r$、C_3-C_8碳環基、O-$(CH_2)_r$、伸芳基、$(CH_2)_r$-伸芳基、-伸芳基-$(CH_2)_r$-、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8碳環基)、(C_3-C_8碳環基)-$(CH_2)_r$、C_3-C_8雜環基、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8雜環基)、-(C_3-C_8雜環基)-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_r$C(O)$NR^b(CH_2)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、-$(CH_2)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-及-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)$NR^b(CH_2)_r$-；其中R^b為H、C_1-C_6烷基、苯基或苄基；且r獨立地為在1-10之範圍內之整數。

伸芳基包括藉由自芳族環系統移除兩個氫原子獲得之具有6-20個碳原子之二價芳族烴基。典型伸芳基包括(但不限於)衍生自苯、經取代苯、萘、蒽、聯苯及其類似物之基團。

雜環基包括其中一或多個環原子為雜原子(例如氮、氧及硫)之環系統。雜環基包含1至20個碳原子及1至3個選自

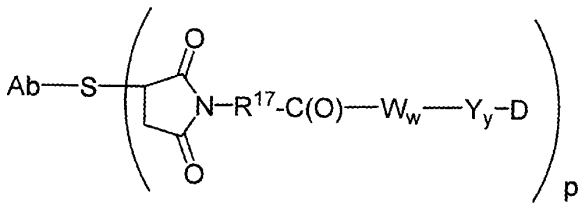
N、O、P及S之雜原子。雜環可為具有3至7個環成員(2至6個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之單環或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之雙環，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。雜環描述於Paquette, Leo A.；"Principles of Modern Heterocyclic Chemistry"(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1章、第3章、第4章、第6章、第7章及第9章；"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs"(John Wiley & Sons, New York, 1950迄今)，尤其第13卷、第14卷、第16卷、第19卷及第28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566中。

雜環之實例包括(舉例而言且不加限制)：吡啶基、二氫吡啶基、四氫吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氫噻吩基、硫氧化之四氫噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯幷呋喃基、硫代萘基、吲哚基、吲哚烯基、喹啉基、異喹啉基、苯幷咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯啶基、2-吡咯啶酮基、吡咯啉基、四氫呋喃基、雙四氫呋喃基、四氫哌喃基、雙四氫哌喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹啉基、吖辛因基、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、哌喃基、異苯幷呋喃基、吭烯基、吩基、啡噁噻基、2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、噠嗪基、吲嗪基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、呔嗪基、喋啶

基、喹喏啉基、喹唑啉基、啐喏啉基、喋啶基、4Ah-咔唑基、咔唑基、β-咔啉基、啡啶基、吖啶基、嘧啶基、啡啉基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋吖基、啡噁嗪基、異吲哚基、吲哚基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡唑啶基、吡唑啉基、哌嗪基、吲哚啉基、異吲哚啉基、哌啶基、嗎啉基、噁唑啶基、苯幷三唑基、苯幷異噁唑基、羟吲哚基、苯幷噁唑啉基及靛紅基。

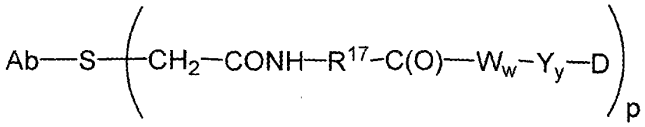
碳環基包括具有3至7個碳原子(作為單環)或7至12個碳原子(作為雙環)之飽和或不飽和環。單環狀碳環具有3至6個環原子，更通常具有5或6個環原子。雙環狀碳環具有7至12個環原子(例如排列為雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統)，或9或10個環原子(排列為雙環[5,6]或[6,6]系統)。單環狀碳環之實例包括環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環庚基及環辛基。

自式I ADC之所有例示性實施例(諸如II-VI)應瞭解即使未明確指示，視經改造半胱胺酸殘基之數目而定，1至4個藥物部分係與抗體連接(p=1-4)。



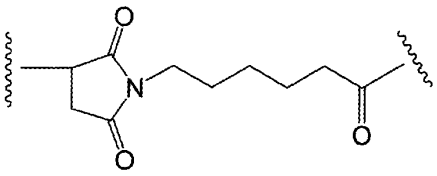
II

200817434



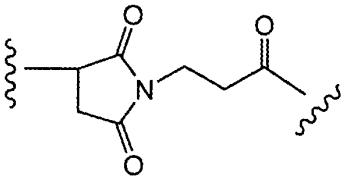
III

說明性式II伸展單元係衍生自順丁烯二醯亞胺基-己醯基(MC)，其中R^{17}為$-(CH_2)_5-$：



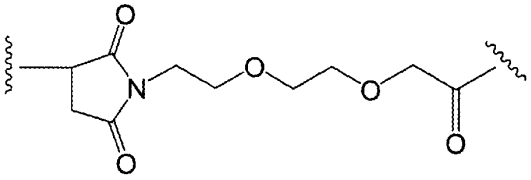
MC

式II之說明性伸展單元係衍生自順丁烯二醯亞胺基-丙醯基(MP)，其中R^{17}為$-(CH_2)_2-$：

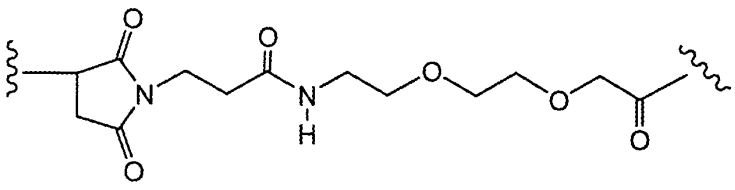


MP

式II之另一說明性伸展單元，其中R^{17}為$-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$且r為2：

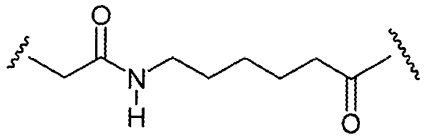


式II之另一說明性伸展單元，其中R^{17}為$-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$，其中$R^b$為H且r各自為2：

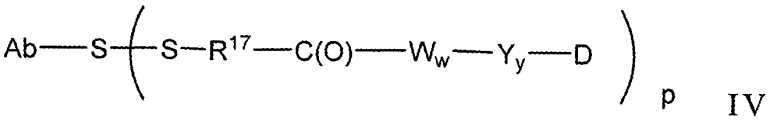


MPEG

式III之說明性伸展單元，其中R^{17}為$-(CH_2)_5-$：

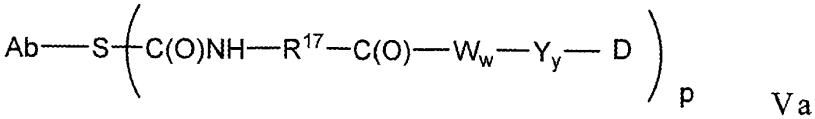


在另一實施例中，伸展單元係經由抗體之經改造半胱胺酸硫原子與伸展單元之硫原子之間的二硫鍵與經半胱胺酸改造之抗CD22抗體連接。此實施例之代表性伸展單元係由式IV描述，其中R^{17}、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上文所定義。

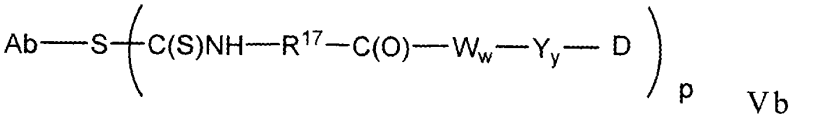


IV

在另一實施例中，伸展單元之反應性基團含有可與抗體之自由半胱胺酸硫醇形成鍵的硫醇-反應性官能基。硫醇反應官能基之實例包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺、α-鹵乙醯基、活性酯(諸如琥珀醯亞胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯)、酐、酸氯化物、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性伸展單元係由式Va及Vb描述，其中-R^{17}-、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上文所定義；



Va



Vb

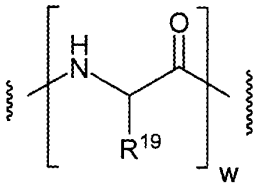
在另一實施例中，連接子可為經由分枝、多官能連接子部分將一種以上藥物部分與抗體共價連接之樹枝狀類型連

接子(Sun等人(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun等人(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768；King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)。樹枝狀連接子可增大藥物與抗體之莫耳比，亦即裝載量，其與ADC之效力相關。因此，若經半胱胺酸改造之抗體僅帶有一反應性半胱胺酸硫醇基團，則大量藥物部分可經由樹枝狀連接子連接。

胺基酸單元

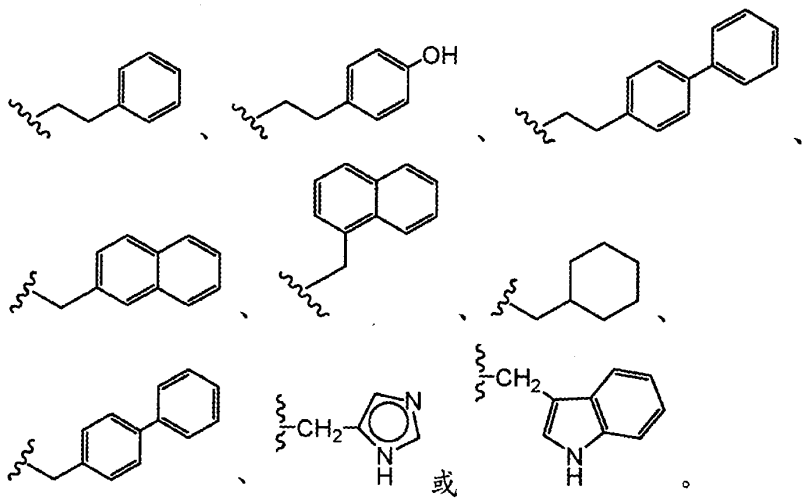
連接子可包含胺基酸殘基。胺基酸單元(-W_w-)(存在時)將抗體(Ab)與本發明之經半胱胺酸改造之抗體-藥物接合物(ADC)的藥物部分(D)連接。

-W_w-為二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。包含胺基酸單元之胺基酸殘基包括彼等天然存在者，以及少數胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。-W-單元各自獨立地具有以下方括號中指示之式，且w為在0至12之範圍內之整數：



其中R^{19}為氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苄基、對羥基苄基、-CH_2OH、-$CH(OH)CH_3$、-$CH_2CH_2SCH_3$

、-CH_2CONH_2、-CH_2COOH、-$CH_2CH_2CONH_2$、-CH_2CH_2COOH、-$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、-$(CH_2)_3NH_2$、-$(CH_2)_3NHCOCH_3$、-$(CH_2)_3NHCHO$、-$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、-$(CH_2)_4NH_2$、-$(CH_2)_4NHCOCH_3$、-$(CH_2)_4NHCHO$、-$(CH_2)_3NHCONH_2$、-$(CH_2)_4NHCONH_2$、-$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基、



或。

當R^{19}並非氫時，R^{19}所連接之碳原子為對掌性的。R^{19}所連接之每一碳原子獨立地為(S)或(R)構型，或外消旋混合物。胺基酸單元因此可為對映異構純、外消旋或非對映異構。

例示性-W_w-胺基酸單元包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組份之胺基酸殘基包括彼等天然存在者，以及少數胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，

諸如瓜胺酸。

胺基酸單元可由一或多種酶(包括與腫瘤相關之蛋白酶)酶裂解以釋放藥物部分(-D)，在一實施例中其在釋放後在活體內質子化以提供藥物(D)。胺基酸連接子組份可經設計且藉由特定酶(例如，與腫瘤相關之蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D，或纖溶酶蛋白酶)使其對於酶裂解之選擇率最佳化。

間隔基單元

當胺基酸單元存在時(w=1-12)，間隔基單元(-Y_y-)(存在時)(y=1或2)將胺基酸單元(-W_w-)與藥物部分(D)連接。另一方面，當胺基酸單元不存在時，間隔基單元將伸展單元與藥物部分連接。當胺基酸單元與伸展單元均不存在時(w, y=0)，間隔基單元亦將藥物部分與抗體單元連接。間隔基單元通常為兩類：自供及非自供。非自供間隔基單元為在胺基酸單元自抗體-藥物接合物或藥物部分-連接子分裂、尤其酶性分裂之後，其中部分或所有間隔基單元保持與藥物部分結合之間隔基單元。當含有甘胺酸-甘胺酸間隔基單元或甘胺酸間隔基單元之ADC經由與腫瘤細胞相關之蛋白酶、與癌症細胞相關之蛋白酶或與淋巴細胞相關之蛋白酶經歷酶性分裂時，甘胺酸-甘胺酸-藥物部分或甘胺酸-藥物部分係與Ab-A_a-W_w-分裂。在一實施例中，獨立水解反應發生於靶向細胞內，其使甘胺酸-藥物部分鍵斷裂且釋放藥物。

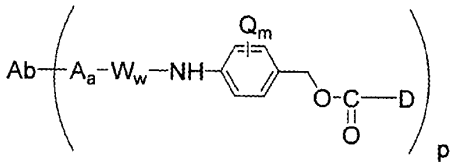
在另一實施例中，-Y_y-為對胺基苄基胺甲醯基(PAB)單

元，其之伸苯基部分經Q_m取代，其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為在0-4之範圍內之整數。

非自供間隔基單元(-Y-)之例示性實施例為：-Gly-Gly-；-Gly-；-Ala-Phe-；-Val-Cit-。

在一實施例中，提供藥物部分-連接子或ADC(其中不存在間隔基單元(y=0))，或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

或者，含有自供間隔基單元之ADC可釋放-D。在一實施例中，-Y-為經由PAB基團之胺基氮原子與-W_w-連接，且經由碳酸酯基、胺基甲酸酯基或醚基與-D直接連接之PAB基團，其中該ADC具有例示性結構：

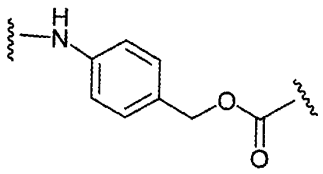


其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為在0-4之範圍內之整數；且p在1至4之範圍內。

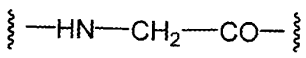
自供間隔基之其他實例包括(但不限於)與PAB基團電子上類似之芳族化合物，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、雜環狀PAB類似物(US 2005/0256030)、β-葡萄糖苷酸(WO 2007/011968)及鄰胺基苄基縮醛或對胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔基，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁醯胺(Rodrigues等人(1995) Chemistry Biology

2:223)；適當經取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(Storm等人(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)；及2-胺基苯基丙醯胺(Amsberry等人(1990) J. Org. Chem. 55:5867)。在甘胺酸處經取代之含胺藥物的消除(Kingsbury等人(1984) J. Med. Chem. 27:1447)亦為適用於ADC中之自供間隔基之實例。

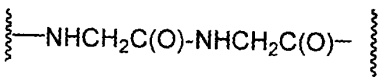
例示性間隔基單元(-Y_y-)係由式X-XII來表示：



X



XI



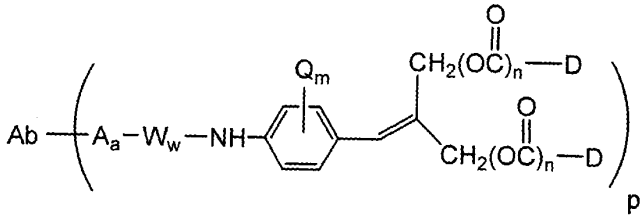
XII

樹枝狀連接子

在另一實施例中，連接子L可為經由分枝、多官能連接子部分將一種以上藥物部分與抗體共價連接之樹枝狀類型連接子(Sun等人(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun等人(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹枝狀連接子可增大藥物與抗體之莫耳比，亦即裝載量，其與ADC之效力相關。因此，若經半胱胺酸改造之抗體僅帶有一反應性半胱胺酸硫醇基團，則大量藥物部分可經由樹枝狀連接子連接。分枝、樹枝狀連接子之例示性實施例包括2,6-雙(羥基

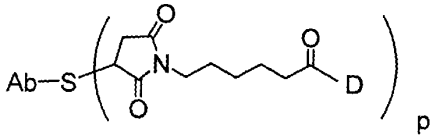
甲基)-對甲酚及2,4,6-參(羥基甲基)-酚樹狀體單元(WO 2004/01993；Szalai等人(2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689；Shamis等人(2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731；Amir等人(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499)。

在一實施例中，間隔基單元為分枝雙(羥基甲基)苯乙烯(BHMS)，其可用於併入且釋放多種藥物，其具有以下結構：

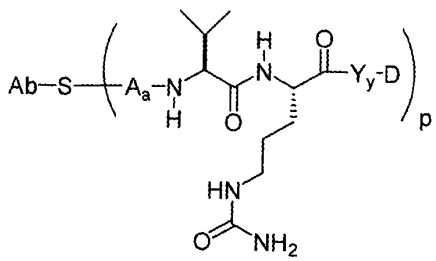


其包含2-(4-胺基亞苄基)丙烷-1,3-二醇樹狀體單元(WO 2004/043493；de Groot等人(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494)，其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為在0-4之範圍內之整數；n為0或1；且p在1至4之範圍內。

式I抗體-藥物接合物化合物之例示性實施例包括XIIIa(MC)、XIIIb(val-cit)、XIIIc(MC-val-cit)及XIIId(MC-val-cit-PAB)：

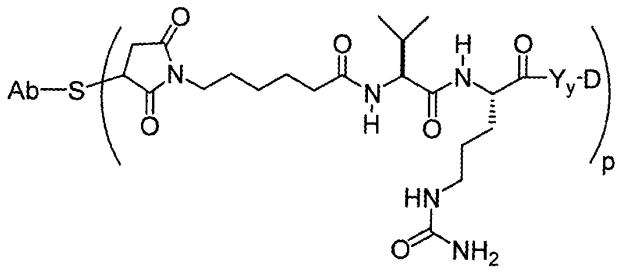


XIIIa

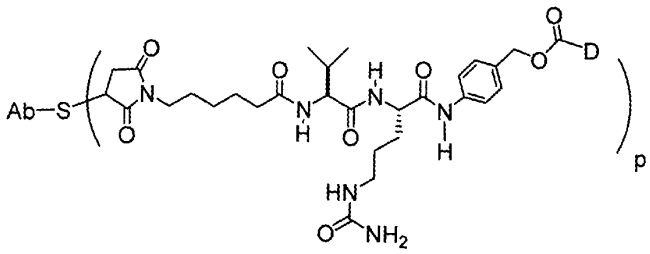


XIIIb

200817434

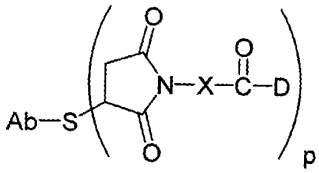


XIIIc

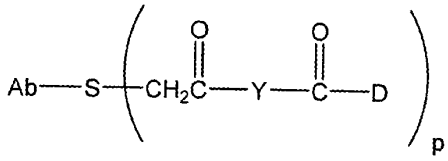


XIIId

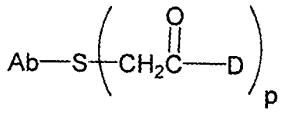
式Ia抗體-藥物接合物化合物之其他例示性實施例包括XIVa-e：



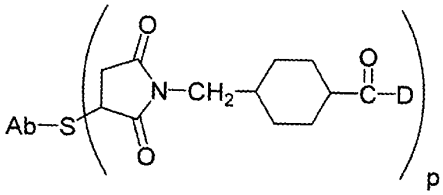
XIVa



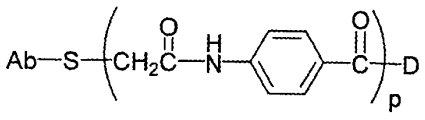
XIVb



XIVc

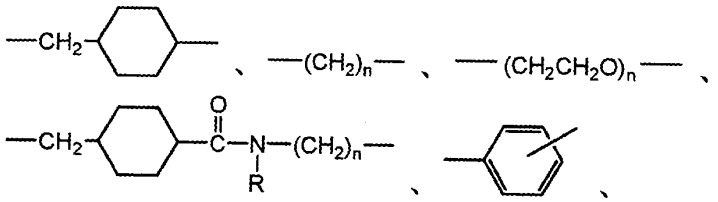


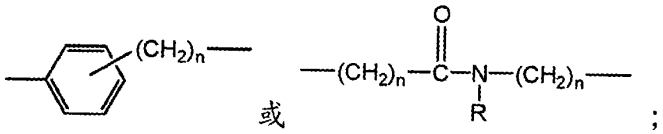
XIVd



XIVe

其中X為：

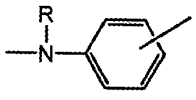




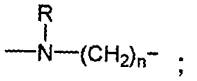
或

；

Y為：



或



；

且R獨立地為H或C_1-C_6烷基；且n為1至12。

在另一實施例中，連接子具有反應性官能基，其具有對抗體上存在之親電子基團具反應性之親核基團。抗體上之有用親電子基團包括(但不限於)醛及酮羰基。連接子之親核基團之雜原子可與抗體上之親電子基團反應且與抗體單元形成共價鍵。連接子上之有用親核基團包括(但不限於)醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡腙、肼羧酸酯及芳基醯肼。抗體上之親電子基團提供用於與連接子連接之便利位點。

通常，肽類型連接子可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵而製備。該等肽鍵可(例如)根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(E. Schröder及K. Lübke (1965) "The Peptides"，第1卷，第76-136頁，Academic

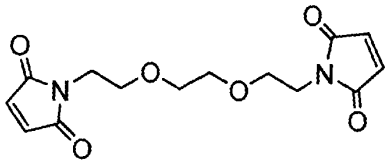
Press)來製備。連接子中間物可以包括間隔基、伸展單元及胺基酸單元之反應之任何組合或次序來裝配。間隔基、伸展單元及胺基酸單元可使用自然界中之親電子基團、親核基團或自由基之反應性官能基。反應性官能基包括(但不限於)羧基、羥基、對硝基苯基碳酸酯基、異硫氰酸酯基，及離去基(諸如O-甲磺醯基、O-甲苯磺醯基、-Cl、-Br、-I)；或順丁烯二醯亞胺。

在另一實施例中，連接子可經調節溶解性或反應性之基團取代。舉例而言，視用於製備ADC之合成路線而定，諸如磺酸酯基($-SO_3^-$)或銨基之帶電荷取代基可增大試劑之水溶性且促進連接子試劑與抗體或藥物部分之偶合反應，或促進具有D或D-L(藥物-連接子中間物)之Ab-L(抗體-連接子中間物)與Ab之偶合反應。

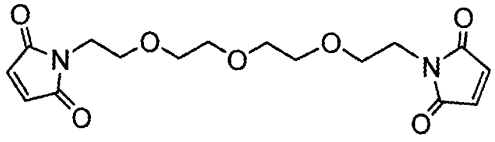
連接子試劑

抗體與奧利斯坦汀之接合物可使用多種雙官能連接子試劑製得，該等連接子試劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫烷(IT)、亞胺酸酯(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

抗體藥物接合物亦可用以下連接子試劑來製備：BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC及sulfo-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基碸)苯甲酸酯)，且包括雙順丁烯二醯亞胺試劑：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、$BM(PEO)_3$及$BM(PEO)_4$，其係購自Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723，國際+815-968-0747。雙順丁烯二醯亞胺試劑容許以連續或同時方式將經半胱胺酸改造之抗體之硫醇基團與含硫醇之藥物部分、標記或連接子中間物連接。對經半胱胺酸改造之抗體、藥物部分、標記或連接子中間物之硫醇基團具有反應性之除順丁烯二醯亞胺之外的其他官能基包括碘乙醯胺、溴乙醯胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、異氰酸酯及異硫氰酸酯。



$BM(PEO)_3$

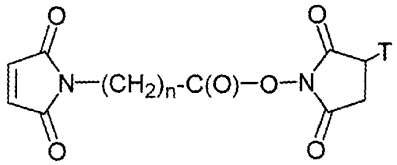


$BM(PEO)_4$

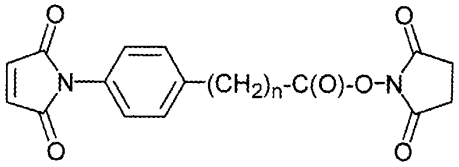
有用之連接子試劑亦可經由諸如Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)之其他商業來源獲得，或根據以下文獻中描述之程序合成：Toki等人(2002) J. Org. Chem.

67:1866-1872；Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355；Frisch 等人 (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186；US 6214345；WO 02/088172；US 2003130189；US 2003096743；WO 03/026577；WO 03/043583；及 WO 04/032828。

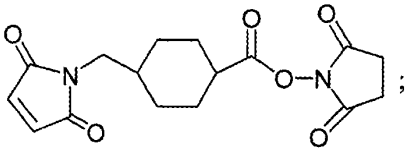
可藉由使以下連接子試劑與胺基酸單元之N末端反應將式(IIIa)之伸展單元引入連接子中：



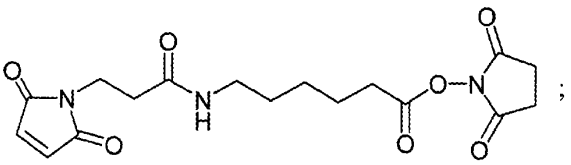
其中n為在1-10之範圍內之整數且T為-H或-SO_3Na；



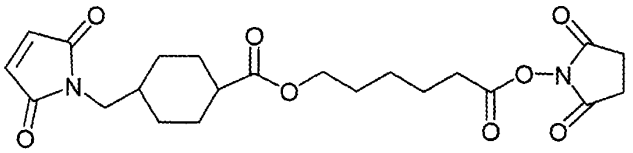
其中n為在0-3之範圍內之整數；



；

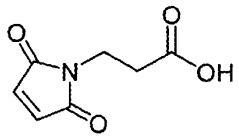


；



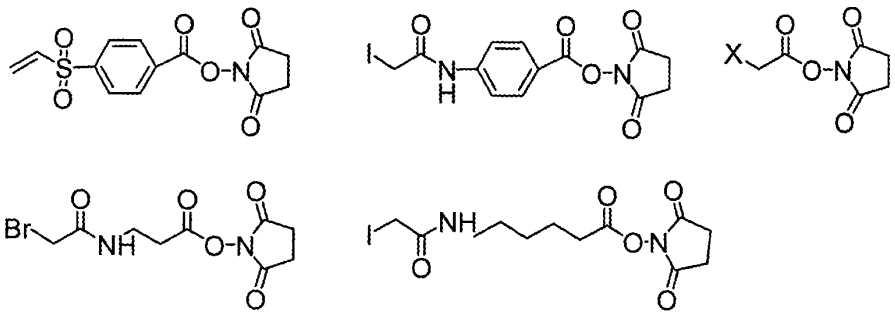
；及

200817434



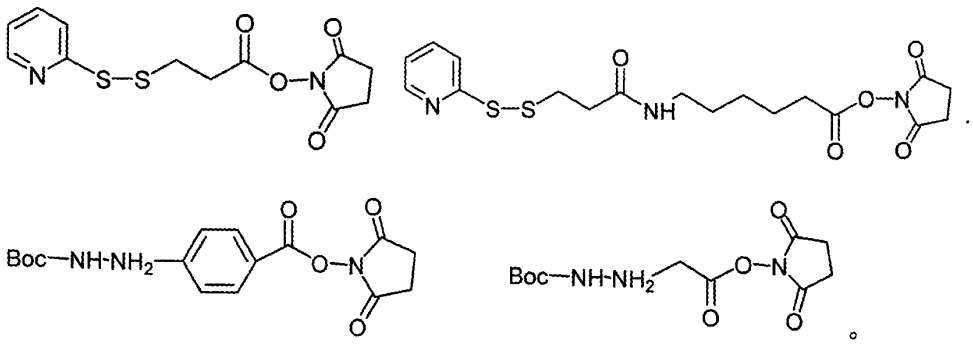
。

可藉由使以下雙官能試劑與胺基酸單元之N末端反應將伸展單元引入連接子中：



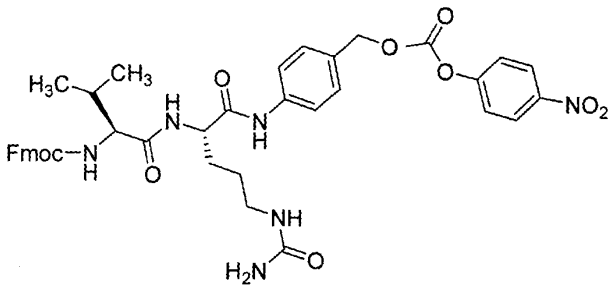
其中X為Br或I。

亦可藉由使以下雙官能試劑與胺基酸單元之N末端反應將式之伸展單元引入連接子中：

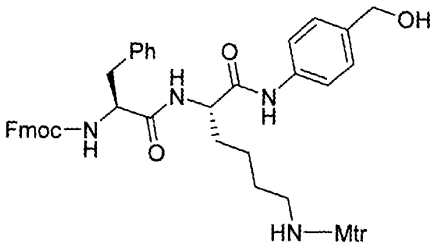


具有順丁烯二醯亞胺伸展單元及對胺基苄基胺甲醯基(PAB)自供間隔基之例示性纈胺酸-瓜胺酸(val-cit或vc)二肽連接子試劑具有以下結構：

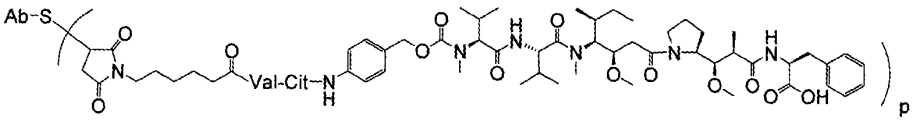
200817434



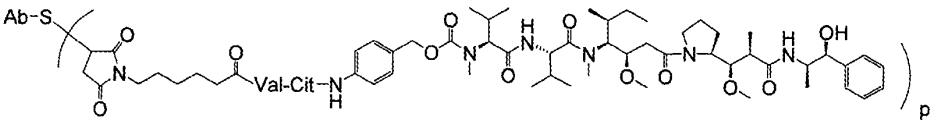
具有順丁烯二醯亞胺伸展單元及PAB自供間隔基單元之例示性phe-lys(Mtr，單4-甲氧基三苯甲基)二肽連接子試劑可根據Dubowchik等人(1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60來製備，且其具有以下結構：



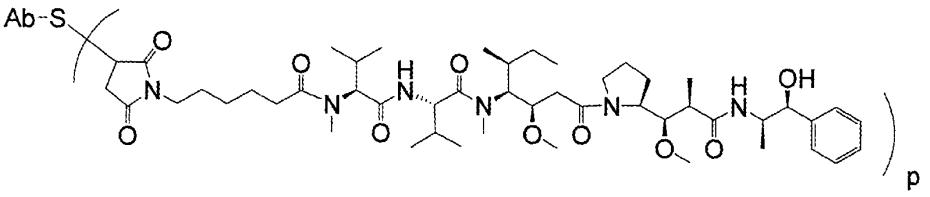
本發明之例示性抗體-藥物接合物化合物包括：



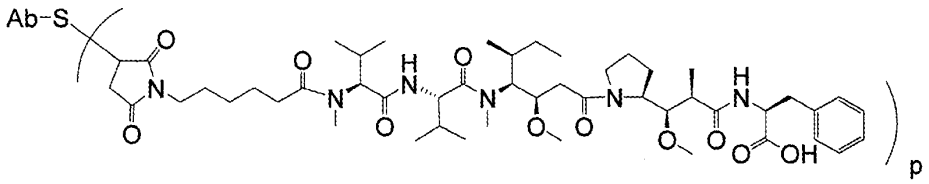
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

其中Val為纈胺酸；Cit為瓜胺酸；p為1、2、3或4；且Ab為經半胱胺酸改造之抗CD22抗體。

製備經半胱胺酸改造之抗CD22抗體-藥物接合物

式I之ADC可使用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑，藉由若干途徑來製備，其包括：(1)經半胱胺酸改造之抗體之半胱胺酸基團與連接子試劑反應以經由共價鍵形成抗體-連接子中間物Ab-L，接著與活化藥物部分D反應；及(2)藥物部分之親核基團與連接子試劑反應以經由共價鍵形成藥物-連接子中間物D-L，接著與經半胱胺酸改造之抗體之半胱胺酸基團反應。接合方法(1)及(2)可與多種經半胱胺酸改造之抗體、藥物部分及連接子一起用於製備式I之抗體-藥物接合物。

抗體半胱胺酸硫醇基團為親核性且能夠與連接子試劑及藥物-連接子中間物上之親電子基團反應以形成共價鍵，該連接子試劑及藥物-連接子中間物包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團；及(iv)二硫化物，其包括經由硫化物交換之吡啶基二硫化物。藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反

應以形成共價鍵之胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡腙、肼羧酸酯及芳基醯肼基團。

藉由以諸如DTT(Cleland試劑，二硫蘇糖醇)或TCEP(參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽；Getz等人(1999) Anal. Biochem，第273:73-80卷；Soltec Ventures, Beverly, MA)之還原劑處理，接著再氧化以再形成鏈間及鏈內二硫鍵可使經半胱胺酸改造之抗體具有與連接子試劑接合之反應性(實例x)。舉例而言，表現於CHO細胞中之全長、經半胱胺酸改造之單株抗體(ThioMab)在37℃下經50倍過量之TCEP還原3小時以還原可在新近引入半胱胺酸殘基與培養基中存在之半胱胺酸之間形成的半胱胺酸加合物中之二硫鍵。將經還原ThioMab稀釋且負載於於10 mM乙酸鈉(pH 5)中之HiTrap S管柱上，且以含有0.3 M氯化鈉之PBS溶離。在室溫下在親本Mab中存在之半胱胺酸殘基與稀(200 nM)硫酸銅($CuSO_4$)水溶液之間再建立二硫鍵隔夜。或者，脫氫抗壞血酸(DHAA)為在半胱胺酸加合物之還原性分裂之後再建立經半胱胺酸改造之抗體之鏈內二硫化物基團的有效氧化劑。可使用此項技術中已知之其他氧化劑(oxidant)(亦即氧化劑(oxidizing agent))及氧化條件。周圍空氣氧化亦為有效的。此溫和、部分再氧化步驟高保真性地有效形成鏈內二硫化物且保持新近引入半胱胺酸殘基之硫醇基團。添加、混合約10倍過量之藥物-連接子中間物(例如MC-vc-PAB-MMAE)，且使其在室溫下靜置約1小時以實現接合且形成10F4v3抗CD22抗體-藥物接合物。將接合混合物經凝膠過

濾且負載且經由一HiTrap S管柱溶離以移除過量藥物-連接子中間物及其他雜質。

圖12展示製備自細胞接合培養物表現之經半胱胺酸改造之抗體的一般方法。當細胞培養基含有半胱胺酸時，二硫化物加合物可在新近引入之半胱胺酸胺基酸與來自培養基之半胱胺酸之間形成。如圖12中例示性ThioMab(左)中之圓形所述，該等半胱胺酸加合物應經還原以產生具有接合反應性之經半胱胺酸改造之抗體。半胱胺酸加合物大概以及各種鏈間二硫鍵經諸如TCEP之還原劑還原性分裂以得到抗體之還原形式。在部分氧化條件下藉由硫酸銅、DHAA或暴露於周圍氧中在配對半胱胺酸殘基之間再形成鏈間二硫鍵。新近引入、經改造且未配對半胱胺酸殘基保持可用於與連接子試劑或藥物-連接子中間物反應以形成本發明之抗體接合物。表現於哺乳動物細胞株中之ThioMab使得Cys加合物經由-S-S-鍵形成與經改造Cys外部接合。因此如實例x中所述將經純化ThioMab經還原及再氧化程序處理以產生反應性ThioMab。該等ThioMab係用於與含有細胞毒性藥物、螢光團及其他標記之順丁烯二醯亞胺接合。

篩檢方法

本發明之另一實施例係針對一種測定懷疑含有CD22多肽之樣品中該CD22多肽之存在的方法，其中該方法包含使該樣品暴露於經半胱胺酸改造之抗CD22抗體，或與CD22多肽結合之其抗體藥物接合物中，且測定經半胱胺

酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物與樣品中CD22多肽之結合，其中該結合之存在指示樣品中存在CD22多肽。視情況，樣品可含有懷疑表現CD22多肽之細胞(其可為癌細胞)。該方法中使用之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物視情況可經偵測標記，附著於固體支撐物或其類似物上。

本發明之另一實施例係針對一種診斷一哺乳動物中腫瘤之存在的方法，其中該方法包含(a)使包含獲自該哺乳動物之組織細胞之測試樣品與經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或與CD22多肽結合之其抗體藥物接合物接觸，及(b)偵測經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物與該測試樣品中CD22多肽之間複合物的形成，其中該複合物的形成指示哺乳動物中存在腫瘤。視情況，經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物經可偵測標記，附著於固體支撐物或其類似物上，及/或組織細胞之測試樣品係獲自懷疑具有癌性腫瘤之個體。

抗體-藥物接合物之代謝物

本文中描述之ADC化合物之活體內代謝產物亦處於本發明之範疇內，在一定程度上該等產物為新穎的且不比先前技術明顯。該等產物可來源於(例如)經投予化合物之氧化、還原、水解、醯胺化、酯化、酶性分裂及其類似反應。因此，本發明包括由一方法製備之新穎且不明顯化合物，該方法包含使本發明之化合物與一哺乳動物接觸足以產生其代謝產物之一段時期。

代謝產物通常係由以下步驟來鑑別：製備經放射性標記(例如^{14}C或^{3}H)ADC；將其以可偵測劑量(例如大於約0.5 mg/kg)非經腸投予動物(諸如大鼠、小鼠、天竺鼠、猴)或人；容許足夠時間使代謝發生(通常約30秒至30小時)；且將其轉化產物與尿、血液或其他生物樣品分離。因為其經標記，所以該等產物易於分離(其他係藉由使用能夠與存活於代謝物中之抗原決定基結合之抗體來分離)。以習知方式(例如由MS、LC/MS或NMR分析)來測定代謝物結構。一般而言，代謝物之分析係以與熟習此項技術者熟知之習知藥物代謝研究相同的方法進行。只要轉化產物不另外在活體內出現，其即適用於治療給藥本發明之ADC化合物的診斷檢定。

醫藥調配物

投予抗體-藥物接合物(包括Thio-抗體藥物接合物)

本發明之抗體-藥物接合物(ADC)(包括thio-抗體藥物接合物(TDC))可由適於待治療之病狀之任何途徑投予。該ADC通常應經非經腸投藥，亦即輸液、皮下、肌肉內、靜脈內、皮內、鞘內及硬膜外投藥。

對於治療該等癌症而言，在一實施例中，抗體-藥物接合物係經由靜脈內輸液投予。經由輸液投予之劑量在每次給藥約1 μg/m^{2}至約10,000 μg/m^{2}之範圍內，通常為每週一次給藥，總共一次、兩次、三次或四次給藥。或者，劑量範圍為約1 μg/m^{2}至約1000 μg/m^2、約1 μg/m^{2}至約800 μg/m^2、約1 μg/m^{2}至約600 μg/m^2、約1 μg/m^{2}至約400

μg/m^2、約10 μg/m^{2}至約500 μg/m^2、約10 μg/m^{2}至約300 μg/m^2、約10 μg/m^{2}至約200 μg/m^2，及約1 μg/m^{2}至約200 μg/m^2。劑量可經每日一次、每週一次、每週多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每週一次、每月一次或間歇投予以減輕或緩和疾病症狀。可以所揭示之間隔之任一者持續投藥直至待治療之淋巴瘤、白血病之腫瘤或症狀消退。可在達成症狀消退或減輕後持續投藥，其中該消退或減輕係由該持續投藥延長。

本發明係提供一種減輕自體免疫疾病之方法，其包含向患有自體免疫疾病之患者投予治療有效量之前述實施例之任一者的人類化10F4抗體-藥物接合物。在較佳實施例中，抗體係經靜脈內或皮下投藥。抗體-藥物接合物係以在每次給藥約1 μg/m^{2}至約100 mg/m^{2}之範圍內之劑量經靜脈內投藥，且在一特定實施例中，劑量為1 μg/m^{2}至約500 μg/m^2。劑量可經每日一次、每週一次、每週多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每週一次、每月一次或間歇投予以減輕或緩和疾病症狀。可以所揭示之間隔之任一者持續投藥直至待治療之自體免疫疾病之症狀減輕或緩和。可在達成症狀減輕或緩和後持續投藥，其中該緩和或減輕係由該持續投藥延長。

本發明亦提供一種治療B細胞病症之方法，其包含向患有B細胞病症(諸如B細胞增生性病症(其包括(但不限於)淋巴瘤及白血病))或自體免疫疾病之患者投予治療有效量之前述實施例之任一者的人類化10F4抗體，該抗體未與細胞

毒性分子或可偵測分子接合。抗體通常應以約1 μg/m^{2}至約1000 mg/m^{2}之劑量範圍投予。

在一態樣中，本發明進一步提供醫藥調配物，其包含至少一種本發明之抗CD22抗體及/或至少一種其免疫接合物及/或至少一種本發明之抗CD22抗體-藥物接合物。在一些實施例中，醫藥調配物包含1)抗CD22抗體及/或抗CD22抗體-藥物接合物及/或其免疫接合物，及2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥調配物包含1)抗CD22抗體及/或其免疫接合物，及視情況，2)至少一種額外治療劑。

包含本發明之抗體或免疫接合物或本發明之抗體-藥物接合物之醫藥調配物係藉由將具有所需純度之抗體或抗體-藥物接合物與可選生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編(1980))混合經製備且以水溶液或凍乾或其他乾燥調配物之形式儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸及其它有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲烴銨、苄索氯銨；酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬

醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其它碳水化合物，其包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉離子；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。用於活體內投藥之醫藥調配物通常為無菌的。此藉由經由無菌過濾膜過濾來容易地實現。

亦可將活性成份截留於(例如)藉由凝聚技術或界面聚合而製備之微膠囊(例如，分別為羥甲基纖維素或明膠-微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)、膠狀藥物遞送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)或巨乳液中。該等技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編(1980)中。

亦可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適當實例包括含有本發明之抗體或免疫接合物之固體疏水性聚合物的半滲透基質，該等基質為成形物品之形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(2-羥基乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸及γ乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林構成的可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。儘管聚合物(諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸)使分子釋

放大於100天，但某些水凝膠釋放蛋白歷時更短時期。當經封裝抗體或免疫接合物在體內保持一段長時間時，其可因在37℃下暴露於濕氣中而變性或凝集，其導致生物活性喪失及免疫原性之可能改變。視所涉及之機制而定，可為穩定性而設計合理策略。舉例而言，若發現凝集機制為經由硫基-二硫化物互換形成分子間S-S鍵，則穩定化可藉由改質氫硫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加物且開發特定聚合物基質組合物而達成。

抗體-藥物接合物治療

其涵蓋本發明之抗體-藥物接合物(ADC)可用於治療多種疾病或病症，例如其特徵在於腫瘤抗原之過度表現。例示性病狀或高度增生性病症包括良性或惡性腫瘤；白血病及淋巴惡性疾病。其他病症包括神經元、神經膠、星形膠質細胞、下丘腦、腺、巨噬細胞、上皮、基質、囊胚腔、發炎性、血管生成及免疫(包括自體免疫)病症。

於動物模型及基於細胞之檢定中鑑別之ADC化合物可於生長腫瘤之高級靈長類動物及人類臨床試驗中進一步測試。人類臨床試驗可經設計以測試本發明之抗CD22單株抗體或免疫接合物在經受B細胞增生性病症之患者中的功效，其中該B細胞增生性病症包括(不加限制)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)

及套細胞淋巴瘤。臨床試驗可經設計以評估與已知治療方案(諸如涉及已知化學治療劑及/或細胞毒性劑之放射及/或化學療法)組合之ADC之功效。

一般而言，待治療之疾病或病症為高度增生性疾病，諸如B細胞增生性病症及/或B細胞癌症。本文中待治療之癌症之實例包括(但不限於)選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤之B細胞增生性病症。

癌症可包含表現CD22之細胞，以使得本發明之ADC能夠與癌細胞結合。為測定癌症中之CD22表現，可用各種診斷/預後性檢定。在一實施例中，可由IHC來分析CD22過度表現。來自腫瘤活組織檢查之嵌入石蠟之組織部分可經受IHC檢定且符合關於染色程度之CD22蛋白染色強度標準，且其中研究腫瘤細胞之比例。

出於預防或治療疾病之目的，ADC之適當劑量應取決於如上所定義之待治療之疾病類型，疾病之嚴重性及過程，分子係出於預防抑或是治療之目的經投藥，先前之療法，患者之病史及對抗體之反應，及主治醫師之判斷。分子合適地一次或經一系列治療投予患者。視疾病之類型及嚴重性而定，無論(例如)藉由一或多次單獨投藥或藉由連續輸液，約1 μg/kg至15 mg/kg(例如0.1-20 mg/kg)之分子為向患

者投藥之初始候選劑量。視上文所提及之因素而定，典型每日劑量可在約1 μg/kg至100 mg/kg或更高劑量之範圍內。待投予患者之ADC之例示性劑量在患者體重之約0.1 mg/kg至約10 mg/kg之範圍內。

對於在若干天或更長時間內重複投藥而言，視病狀而定，治療持續直至發生所需疾病症狀之抑制。例示性給藥方案包含投予約4 mg/kg之初始負載劑量之抗體，接著投予約2 mg/kg之每週維持劑量的抗ErbB2抗體。其他給藥方案可為有用的。藉由習知技術及檢定易於監測此療法之進展。

組合療法

本發明之抗體-藥物接合物(ADC)可組合於醫藥組合調配物中，或以組合療法組合於給藥方案中，其中第二化合物具有抗癌特性。醫藥組合調配物或給藥方案之該第二化合物較佳具有與該組合之ADC互補之活性以使得其不有害地彼此影響。

第二化合物可為化學治療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或心臟保護劑。該等分子適合地以可有效用於意欲目的之量組合存在。含有本發明之ADC之醫藥組合物亦可具有治療有效量之化學治療劑，諸如微管蛋白形成抑制劑、拓撲異構酶抑制劑或DNA黏合劑。

在一態樣中，第一化合物為本發明之抗CD22 ADC且第二化合物為抗CD20抗體(裸抗體或ADC)。在一實施例中，

第二化合物為抗CD20抗體利妥昔單抗(Rituxan®)或2H7(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)。適用於具有本發明之抗CD22 ADC之組合免疫療法的另一抗體包括(不加限制)抗VEGF(例如，Avastin®)。

其他治療方案可與投予根據本發明鑑別之抗癌劑組合，其包括(不加限制)放射性療法及/或骨髓及周邊血液移植物，及/或細胞毒性劑、化學治療劑或生長抑制劑。在該等實施例之一者中，化學治療劑為藥劑或藥劑組合，諸如，環磷醯胺、羥基道諾黴素、阿黴素(adriamycin)、多柔比星(doxorubicin)、長春新鹼(Oncovin™)、潑尼龍、CHOP、CVP或COP；或免疫治療劑，諸如抗CD20(例如，Rituxan®)或抗VEGF(例如，Avastin®)。組合療法可以同時或連續方案投予。當連續投藥時，組合可分兩次或兩次以上投藥進行投予。組合投藥包括使用單獨調配物或單一醫藥調配物之共同投藥，及以任意次序之連續投藥，其中較佳存在一段週期，此時兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。

在一實施例中，以ADC進行之治療包括本文中鑑別之抗癌劑與一或多種化學治療劑或生長抑制劑之組合投藥，其包括共同投予不同化學治療劑之混合液。化學治療劑包括紫杉烷(諸如紫杉醇及多烯紫杉醇)及/或蒽環黴素(anthracycline)抗生素。可根據製造商之指示或按照熟練行醫者經驗確定來使用該等化學治療劑之製劑及給藥時程。該化學療法之製劑及給藥時程亦描述於

"Chemotherapy Service"，(1992) M.C. Perry編，Williams & Wilkins, Baltimore, Md中。

上述共同投予藥劑之任一者之適合劑量為目前使用之彼等劑量且可歸因於新近鑑別藥劑及其他化學治療劑或治療之組合作用(協同作用)而降低。

組合療法可提供"協同作用"且證明為"協同的"，亦即當一起使用活性成份時達成之效應大於分別使用該等化合物產生之效應之和。當活性成份(1)於組合、單位劑量調配物中共同調配且同時投予或遞送；(2)以單獨調配物交替或平行遞送；或(3)由一些其他方案遞送時，可獲得協同效應。當以交替療法遞送時，當化合物經依序投予或遞送(例如藉由於單獨注射器中不同注射)時，可獲得協同效應，一般而言，在交替療法中，每一活性成份之有效劑量係依序(亦即連續)投予，而在組合療法中，兩種或兩種以上活性成份之有效劑量係共同投予。

抗體-藥物接合物之代謝物

本文中描述之ADC化合物之活體內代謝產物亦處於本發明之範疇內，在一定程度上該等產物為新穎的且不比先前技術明顯。該等產物可來源於(例如)經投予化合物之氧化、還原、水解、醯胺化、酯化、酶性分裂及其類似反應。因此，本發明包括由一方法製備之新穎且不明顯化合物，該方法包含使本發明之化合物與一哺乳動物接觸足以產生其代謝產物之一段時期。

代謝產物通常係由以下步驟來鑑別：製備經放射性標記

(例如14C或3H)ADC；將其以可偵測劑量(例如大於約0.5 mg/kg)非經腸投予動物(諸如大鼠、小鼠、天竺鼠、猴)或人；容許足夠時間使代謝發生(通常約30秒至30小時)；且將其轉化產物與尿、血液或其他生物樣品分離。因為其經標記，所以該等產物易於分離(其他係藉由使用能夠與存活於代謝物中之抗原決定基結合之抗體來分離)。以習知方式(例如由MS、LC/MS或NMR分析)來測定代謝物結構。一般而言，代謝物之分析係以與熟習此項技術者熟知之習知藥物代謝研究相同的方法進行。只要轉化產物不另外在活體內出現，其即適用於治療給藥本發明之ADC化合物的診斷檢定。

使用抗CD22抗體及免疫接合物之其他方法

診斷方法及偵測方法

在一態樣中，本發明之抗CD22抗體及免疫接合物適用於偵測生物樣品中CD22之存在。如本文中所使用之術語"偵測"涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織。在某些實施例中，該等組織包括相對於其他組織以較高含量表現CD22之正常及/或癌組織，例如，B細胞及/或B細胞相關之組織。

在一態樣中，本發明提供一種偵測生物樣品中CD22之存在的方法。在某些實施例中，該方法包含在容許抗CD22抗體與CD22結合之條件下使該生物樣品與抗CD22抗體接觸，且偵測該抗CD22抗體與CD22之間是否形成複合物。

在一態樣中，本發明提供一種診斷與增加之CD22表現相關之病症的方法。在某些實施例中，該方法包含使測試細胞與抗CD22抗體接觸；藉由偵測抗CD22抗體與CD22之結合測定測試細胞之CD22之表現量(定量或定性)；且比較測試細胞之CD22之表現量與對照細胞(例如，與測試細胞相同組織來源之正常細胞或以相當於此正常細胞之量表現CD22之細胞)之CD22之表現量，其中與對照細胞相比測試細胞之較高CD22表現量指示存在與增加之CD22表現相關之病症。在某些實施例中，測試細胞係獲自懷疑患有與增加之CD22表現相關之病症的個體。在某些實施例中，病症為細胞增生性病症，諸如癌症或腫瘤。

可使用本發明之抗體診斷之例示性細胞增生性病症包括B細胞病症及/或B細胞增生性病症，其包括(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在某些實施例中，診斷或偵測方法(諸如上文中描述之彼等方法)包含偵測抗CD22抗體與CD22之結合，其中該CD22表現於細胞表面上或獲自於其表面上表現細胞之CD22之膜製劑中。在某些實施例中，該方法包含在容許抗CD22抗體與CD22結合之條件下使細胞與抗CD22抗體接觸，且偵測該抗CD22抗體與細胞表面上之CD22之間是否

形成複合物。用於偵測抗CD22抗體與於細胞表面上表現CD22之CD22之結合的例示性檢定為"FACS"檢定。

某些其他方法可用於偵測抗CD22抗體與CD22之結合。該等方法包括(但不限於)此項技術中熟知之抗原結合檢定，諸如西方墨點法、放射免疫檢定、ELISA(酶聯結免疫吸附劑檢定)、"夾層"免疫檢定、免疫沈澱檢定、螢光免疫檢定、蛋白A免疫檢定及免疫組織化學(IHC)。

在某些實施例中，抗CD22抗體經標記。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色團、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及間接(例如，經由酶反應或分子相互作用)偵測之部分(諸如酶或配位體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素^{32}P、^{14}C、^{125}I、^{3}H及^{131}I；螢光團，諸如稀土螯合劑或螢光素及其衍生物；若丹明及其衍生物；丹醯基；傘酮；螢光素酶，例如，螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化物酶(HRP)；鹼性磷酸酶；β-半乳糖酶；葡萄糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸鹽脫氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與使用過氧化氫以氧化染料前驅物之酶(諸如HRP、乳過氧化物酶或微過氧化物酶)偶合；生物素/抗生蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基及其類似物。

在某些實施例中，抗CD22抗體係固定於不溶性基質上。固定需要將抗CD22抗體與保持自由溶解之任何CD22

分離。此通常係藉由在檢定程序之前如藉由吸附至不溶於水之基質或表面上(Bennich等人，U.S. 3,720,760)或藉由共價偶合(例如，使用戊二醛交聯)使抗CD22抗體不溶，或在抗CD22抗體與CD22之間形成複合物後(例如)由免疫沈澱使抗CD22抗體不溶來實現。

診斷或偵測之上述實施例之任一者可使用本發明之免疫接合物替代抗CD22抗體或除抗CD22抗體之外使用本發明之免疫接合物來進行。

治療方法

本發明之抗體或免疫接合物可用於(例如)活體外、離體及活體內治療方法中。在一態樣中，本發明提供在活體內或活體外抑制細胞生長或增殖的方法，該方法包含在容許免疫接合物與CD22結合之條件下使細胞暴露於抗CD22抗體或其免疫接合物中。"抑制細胞生長或增殖"意謂使細胞之生長或增殖降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，且包括減少細胞死亡。在某些實施例中，細胞為腫瘤細胞。在某些實施例中，細胞為B細胞。在某些實施例中，細胞為(例如)如本文中所例示之異種移植物。

在一態樣中，本發明之抗體或免疫接合物係用於治療或預防B細胞增生性病症。在某些實施例中，細胞增生性病症係與增加之CD22表現及/或活性相關。舉例而言，在某些實施例中，B細胞增生性病症係與B細胞表面上增加之CD22表現相關。在某些實施例中，B細胞增生性病症為腫

瘤或癌症。由本發明之抗體或免疫接合物治療之B細胞增生性病症的實例包括(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供治療B細胞增生性病症之方法，其包含向個體投予有效量之抗CD22抗體或其免疫接合物。在某些實施例中，一種治療B細胞增生性病症之方法包含向個體投予有效量之醫藥調配物，其包含抗CD22抗體或抗CD22免疫接合物及視情況至少一種額外治療劑(諸如下文提供之彼等)。在某些實施例中，一種治療細胞增生性病症之方法包含向個體投予有效量之醫藥調配物，其包含1)包含抗CD22抗體及細胞毒性劑之免疫接合物；及視情況，2)至少一種額外治療劑，諸如下文提供之彼等。

在一態樣中，至少一些本發明之抗體或免疫接合物可與來自除人類之外之物種的CD22結合。因此，本發明之抗體或免疫接合物可用於(例如)在含有CD22之細胞培養物中、在具有與本發明之抗體或免疫接合物交叉反應之CD22的人類或其他哺乳動物(例如黑猩猩、狒狒、絨猿、獼猴及恆河猴、豬或小鼠)中結合CD22。在一實施例中，抗CD22抗體或免疫接合物可用於藉由使抗體或免疫接合物與CD22接觸以形成抗體或免疫接合物-抗原複合物以使得免疫接合物之經接合細胞毒素接近細胞內部來靶向B細

胞上之CD22。在一實施例中，CD22為人類CD22。

在一實施例中，抗CD22抗體或免疫接合物可用於一在患有與增加之CD22表現及/或活性相關之病症的個體中結合CD22之方法，該方法包含向該個體投予抗體或免疫接合物以使得個體中之CD22經結合。在一實施例中，該經結合抗體或免疫接合物係內化於表現CD22之B細胞中。在一實施例中，CD22為人類CD22，且個體為人類個體。或者，個體可為表現與抗CD22抗體結合之CD22之哺乳動物。此外個體可為CD22已引入其中之哺乳動物(例如，藉由投予CD22或藉由表現編碼CD22之轉殖基因)。

抗CD22抗體或免疫接合物可出於治療目的投予人類。此外，可出於獸醫目的將抗CD22抗體或免疫接合物投予表現與抗體交叉反應之CD22的非人類哺乳動物(例如，靈長類動物、豬、大鼠或小鼠)或將其作為人類疾病之動物模型。就後者而言，該等動物模型可適用於評估本發明之抗體或免疫接合物之治療功效(例如，投藥劑量及時程之測試)。

本發明之抗體或免疫接合物可單獨或與其它組合物組合用於療法中。舉例而言，本發明之抗體或免疫接合物可與至少一種額外治療劑及/或佐劑共同投予。在某些實施例中，額外治療劑為細胞毒性劑、化學治療劑或生長抑制劑。在該等實施例之一者中，化學治療劑為藥劑或藥劑組合，諸如，環磷醯胺、羥基道諾黴素、阿黴素(adriamycin)、多柔比星(doxorubicin)、長春新鹼(Oncovin™)、潑尼龍、

CHOP、CVP或COP；或免疫治療劑，諸如抗CD20(例如，Rituxan®)或抗VEGF(例如，Avastin®)，其中該組合療法適用於治療癌症及/或B細胞病症，諸如B細胞增生性病症，其包括淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

上文指出之該等組合療法涵蓋組合投藥(其中兩種或兩種以上治療劑包括於同一或單獨調配物中)，及單獨投藥，在此情況下，投予本發明之抗體或免疫接合物可發生於投予額外治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後。本發明之抗體或免疫接合物亦可與輻射療法組合使用。

本發明之抗體或免疫接合物(及任何額外治療劑或佐劑)可藉由任何適合方式投予，其包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內，且若有必要用於局部治療，則可於病灶內投藥。非經腸輸液包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。另外，抗體或免疫接合物亦適於藉由脈動輸液(pulse infusion)、尤其以遞減劑量之抗體或免疫接合物投予。部分地視投藥之短期或長期性而定，可藉由任何適合途徑(例如，藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。

本發明之抗體或免疫接合物應以與良好醫藥規範相符之方式經調配、給藥及投藥。在此情形下需考慮之因素包括

待治療之特定病症、待治療之特定哺乳動物、個體患者之臨床病狀、病症之病因、藥劑之遞送位點、投藥方法、投藥時程及醫藥從業者已知之其它因素。抗體或免疫接合物並非必需但視情形與一或多種當前用於預防或治療所論及之病症之藥劑一起調配。該等其它藥劑之有效量視存在於調配物中之抗體或免疫接合物的量、病症或治療之類型及上文所論述之其它因素而定。該等藥劑通常係以與本文中所述相同之劑量及投藥途徑使用，或為本文中所述劑量之約1%至99%，或以經驗/臨床上所確定之任何適當劑量及任何適當途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明之抗體或免疫接合物之適當劑量(當單獨使用或與一或多種其他額外治療劑(諸如化學治療劑)組合使用時)將視待治療之疾病類型、抗體或免疫接合物之類型、疾病之嚴重性及過程、是否出於預防或治療目的而投予抗體或免疫接合物、先前療法、患者臨床病史及對抗體或免疫接合物之反應及主治醫師之判斷而定。抗體或免疫接合物適於一次或經一系列治療投予患者。視疾病類型及嚴重性而定，約1 μg/kg至100 mg/kg(例如，0.1 mg/kg-20 mg/kg)之抗體或免疫接合物可為(例如)藉由一或多次單獨投藥或藉由連續輸液而投予患者之初始候選劑量。視上文所提及之因素而定，典型每日劑量可在約1 μg/kg至100 mg/kg或更高劑量之範圍內。對於經若干天或更長時間重複投藥而言，視病狀而定，通常會持續治療直至出現對於疾病症狀之所需抑制。抗體或免疫接合物之一

例示性劑量應在約0.05 mg/kg至約10 mg/kg之範圍內。因此，約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg或10 mg/kg之一或多種劑量(或其任何組合)之抗體或免疫接合物可投予患者。該等劑量可間歇投予，例如每週或每三週(例如，使得患者接收約兩個劑量至約二十個劑量或(例如)約六個劑量之抗體或免疫接合物)。可投予較高之初始負載劑量，接著一或多種較低劑量。例示性給藥方案包含投予約4 mg/kg之初始負載劑量之抗體，接著投予約2 mg/kg之每週維持劑量的抗體。然而，其它給藥方案亦可用。藉由習知技術及檢定易於監測此療法之進展。

檢定

本發明之抗CD22抗體及免疫接合物可由此項技術中已知之各種檢定來表徵其物理/化學性質及/或生物活性。

活性檢定

在一態樣中，提供用於鑑別具有生物活性之抗CD22抗體或其免疫接合物的檢定。生物活性可包括(例如)抑制細胞生長或增殖之能力(例如，"殺死細胞"活性)，或誘發細胞死亡(其包括漸進式細胞死亡(細胞凋亡))之能力。亦提供在活體內及/或活體外具有此生物活性之抗體或免疫接合物。

在某些實施例中，在活體外測試抗CD22抗體或其免疫接合物抑制細胞生長或增殖之能力。此項技術中熟知關於細胞生長或增殖之抑制作用的檢定。由本文中描述之"殺死細胞"檢定例示之關於細胞增殖之某些檢定量測細胞生

存力。一種此檢定為CellTiter-Glo™發光細胞生存力檢定，其係購自Promega(Madison, WI)。彼檢定根據存在之ATP之定量測定培養物中活細胞之數目，其為代謝活細胞之指示。參見Crouch等人(1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88，美國專利第6602677號。該檢定可以96孔或384孔形式進行，其使其可進行自動高產量篩檢(HTS)。參見Cree等人(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404。檢定程序包括直接向培養細胞中添加單一試劑(CellTiter-Glo®試劑)。此引起細胞溶解及由螢光素酶反應產生之發光信號的產生。該發光信號與存在之ATP量成正比，該ATP量與培養物中存在之活細胞之數目直接成正比。資料可由照度計或CCD攝影機成像裝置記錄。發光輸出表示為相對光單位(RLU)。

關於細胞增殖之另一檢定為"MTT"檢定，其為量測溴化3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鹽藉由粒線體還原酶氧化為甲臢之比色檢定。如CellTiter-Glo™檢定一樣，此檢定指示細胞培養物中存在之代謝活性細胞的數目。參見(例如)Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63，及Zhang等人(2005) Cancer Res. 65:3877-3882。

在一態樣中，在活體外測試抗CD22抗體誘發細胞死亡之能力。此項技術中熟知關於誘發細胞死亡之檢定。在一些實施例中，該等檢定量測(例如)如由碘化丙啶(PI)、錐蟲藍(參見Moore等人(1995) Cytotechnology, 17:1-11)或7AAD之吸收所指示之膜完整性的喪失。在一例示性PI吸收檢定中，細胞係培養於杜貝卡氏經修飾依格培養基(D-

MEM)中：經10%熱滅活FBS(Hyclone)及2 mM L-麩醯胺酸補充之Ham's F-12(50:50)。因此，檢定係在不存在補體及免疫效應細胞之情況下進行。在100×20 mm盤中以每盤3×10^6之密度使細胞接種且使其附著隔夜。將培養基移除且以單獨之新鮮培養基或含有各種濃度之抗體或免疫接合物的培養基替代。將該等細胞培養3天之時期。處理之後，將單層以PBS洗滌且藉由胰蛋白酶化作用脫離。隨後將細胞在4℃下以1200 rpm離心5分鐘，將小球再懸浮於3 ml冷Ca^{2+}結合緩衝液(10 mM Hepes(pH 7.4)、140 mM NaCl、2.5 mM $CaCl_2$)中且等分入35 mm濾器封蓋之12×75 mm管(每管1 ml，每處理群3個管)中以移除細胞塊。管隨後接收PI(10 μg/ml)。使用一FACSCAN™流式細胞儀及FACSCONVERT™ CellQuest軟體(Becton Dickinson)分析樣品。如由PI吸收所測定誘發統計學上顯著量之細胞死亡的抗體或免疫接合物因此經鑑別。

在一態樣中，在活體外測試抗CD22抗體或免疫接合物誘發細胞凋亡(漸進式細胞死亡)之能力。關於誘發細胞凋亡之抗體或免疫接合物的例示性檢定為膜聯蛋白(annexin)結合檢定。在一例示性annexin結合檢定中，細胞係於如前述段落中所論述之盤中培養且接種。將培養基移除且以單獨之新鮮培養基或含有0.001 μg/ml至10 μg/ml之抗體或免疫接合物的培養基替代。在三天之培養時期後，將單層以PBS洗滌且藉由胰蛋白酶化作用脫離。隨後將細胞離心，再懸浮於Ca^{2+}結合緩衝液中，且等分入如前述段落中所論

述之管中。管隨後接收經標記annexin(例如annexin V-FITC)(1 μg/ml)。使用一FACSCAN™流式細胞儀及FACSCONVERT™ CellQuest軟體(BD Biosciences)分析樣品。相對於對照物誘發統計學上顯著量之annexin結合的抗體或免疫接合物因此經鑑別。關於誘發細胞凋亡之抗體或免疫接合物之另一例示性檢定為用於偵測基因組DNA之核小體間降解的組蛋白DNA ELISA比色檢定。該檢定可使用(例如)細胞死亡偵測ELISA套組(Roche, Palo Alto, CA)進行。

適用於上述活體外檢定之任一者之細胞包括天然表現CD22或已經改造以表現CD22之細胞或細胞株。該等細胞包括相對於同一組織來源之正常細胞過度表現CD22之腫瘤細胞。該等細胞亦包括表現CD22之細胞株(包括腫瘤細胞株)及未正常表現CD22但已經編碼CD22之核酸轉染的細胞株。

在一態樣中，在活體內測試抗CD22抗體或其免疫接合物抑制細胞生長或增殖之能力。在某些實施例中，在活體內測試抗CD22抗體或其免疫接合物抑制腫瘤生長之能力。活體內模型系統(諸如異種移植物模型)可用於該測試。在一例示性異種移植物系統中，將人類腫瘤細胞引入經適當免疫折衷之非人類動物(例如，一SCID小鼠)中。將本發明之抗體或免疫接合物投予動物。量測抗體或免疫接合物抑制或降低腫瘤生長之能力。在上述異種移植物系統之某些實施例中，人類腫瘤細胞為來自人類患者之腫瘤細

胞。用於製備異種移植物模型之該等細胞包括人類白血病及淋巴瘤細胞株，其包括(不加限制)BJAB-luc細胞(經螢光素酶報導體基因轉染之EBV陰性伯基特淋巴瘤細胞株)、Ramos細胞(ATCC, Manassas, VA, CRL-1923)、Raji細胞(ATCC, Manassas, VA, CCL-86)、SuDHL-4細胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、DoHH2細胞(參見Kluin-Neilemans, H.C.等人，Leukemia 5:221-224 (1991)及Kluin-Neilemans, H.C. 等人，Leukemia 8:1385-1391 (1994))、Granta-519細胞(參見Jadayel, D.M. 等人，Leukemia 11(1):64-72 (1997))。在某些實施例中，人類腫瘤細胞係藉由皮下注射或藉由移植入一適合位點(諸如一乳房脂肪墊)中而引入一經適當免疫折衷之非人類動物中。

結合檢定及其他檢定

在一態樣中，測試抗CD22抗體之抗原結合活性。舉例而言，在某些實施例中，測試抗CD22抗體與表現於細胞表面上之CD22結合之能力。一FACS檢定可用於此測試。

在一態樣中，競爭檢定可用於鑑別與鼠10F4.4.1抗體、人類化10F4v1抗體、人類化10F4v3抗體及/或鼠5E8.1.8抗體競爭結合CD22之單株抗體。在某些實施例中，此競爭抗體結合至由鼠10F4.4.1抗體、人類化10F4v1抗體、人類化10F4v3抗體及/或鼠5E8.1.8抗體結合之相同抗原決定基(例如，線性或構形抗原決定基)上。例示性競爭檢定包括(但不限於)常規檢定，諸如Harlow及Lane (1988)

Antibodies: A Laboratory Manual，第14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)中提供之彼等檢定。用於定位抗體所結合之抗原決定基之詳細例示性方法提供於Methods in Molecular Biology中Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," 第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中。據稱若每一者阻止另一者之結合50%或更多，則兩種抗體與相同抗原決定基結合。

在一例示性競爭檢定中，經固定CD22係於溶液中培養，該溶液包含與CD22結合之第一經標記抗體(例如，鼠10F4.4.1抗體、人類化10F4v1抗體、人類化10F4v3抗體及/或鼠5E8.1.8抗體)及待測試其與該第一抗體競爭結合CD22之能力的第二未經標記抗體。該第二抗體可存在於融合瘤上層清液中。作為對照，將經固定CD22培養於包含第一經標記抗體但不包含第二未經標記抗體之溶液中。在容許第一抗體與CD22結合之條件下培養後，移除過量未結合抗體，且量測與固定CD22相關之標記之量。若相對於對照樣品，測試樣品中與固定CD22相關之標記之量大體上減少，則其指示第二抗體與第一抗體競爭結合CD22。在某些實施例中，固定CD22存在於細胞表面上或獲自於其表面上表現CD22之細胞之膜製劑中。

在一態樣中，經純化抗CD22抗體可進一步藉由一系列檢定來表徵，該等檢定包括(但不限於)N末端測序、胺基酸分析、不變性尺寸排阻高壓液相層析(non-denaturing size exclusion high pressure liquid chromatography)

(HPLC)、質譜、離子交換層析及木瓜酵素消化。

在一實施例中，本發明涵蓋一種已變化之抗體，其具有一些但並非所有效應功能，此使其成為其中抗體在活體內之半衰期為重要的而某些效應功能(諸如補體及ADCC)卻並非必需或有害之多種應用中合乎需要之候選抗體。在某些實施例中，量測抗體之Fc活性以確保僅所需特性得以保持。可進行活體外及/或活體內細胞毒性檢定以確定CDC及/或ADCC活性之降低/減小。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合檢定以確保抗體缺乏FcγR結合(由此可能缺乏ADCC活性)，但仍保持FcRn結合能力。介導ADCC、NK細胞之初級細胞僅表現Fc(RIII，而單核細胞表現Fc(RI、Fc(RII及Fc(RIII。造血細胞上之FcR表現概述於Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)第464頁表3中。評估所關注分子之ADCC活性之活體外檢定的實例描述於美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中。用於該等檢定之有用效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，所關注分子之ADCC活性可在活體內評估，例如，於諸如Clynes等人，PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中揭示之動物模型中。亦可進行C1q結合檢定以確定抗體無法與C1q結合且因此缺乏CDC活性。為評估補體活化，可進行(例如)如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述之CDC檢定。亦可使用此項技術中已知之方法進行FcRn結合及活體內清除/半衰期測定。

200817434

實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應瞭解可基於上文所提供之一般描述來實施各種其它實施例。

實例1：製備鼠抗人類CD22單株抗體

製備能夠特異性結合人類CD22之鼠單株抗體。於Ribi佐劑中以經純化缺乏域3及4之人類CD22 his-8標記之細胞外域(SEQ ID NO:30(ECD)加在C末端之序列GRAHHHHHHHH)或包含域1-7之CD22 his-8標記之細胞外域(SEQ ID NO:28(ECD)加上述His序列標記)對六週齡BALB/c母小鼠在其足墊內免疫。在初始免疫後一週及三週時以相同方式進行隨後注射。在最終注射三天後，將腹股溝及腿彎部淋巴結移除且彙集，且藉由使組織穿過鋼紗網來製得單一細胞懸浮液。以4:1比率將細胞與小鼠骨髓瘤(諸如P3X63-Ag8.653(ATCC CRL 1580))融合於含有50% w/v聚乙二醇4000之高葡萄糖(DMEM)中)。隨後將經融合細胞以每孔2×105之密度塗於96孔組織培養盤中。24小時後添加HAT選擇性培養基(次黃嘌呤/胺基喋呤/胸苷，Sigma, #H0262)。在融合15天後，使用酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA)對生長細胞之上層清液測試對人類CD22具特異性之抗體的存在。

根據展示抗體與人類CD22特異性結合之基於細胞之檢定及培養盤檢定選擇鼠抗人類CD22 10F4.4.1(mu 10F4)及5E8.1.8(mu 5E8)單株抗體用於進一步研究。該等檢定描述於以下段落中。

基於ELISA之檢定：根據ELISA進行之抗CD22抗體篩檢係如下進行，其中所有培養係在室溫下進行。將測試培養盤(Nunc Immunoplate)以於50 mM碳酸鈉緩衝液(pH 9.6)中之經純化CD22塗覆2小時，隨後以於經磷酸鹽緩衝之鹽水(PBS)中之0.5%牛血清白蛋白阻斷30分鐘，隨後以含有0.05% Tween 20(PBST)之PBS洗滌四次。添加測試抗體上層清液且在震盪下將其培養兩小時，隨後以PBST洗滌四次。藉由添加每孔100 µl含有10 mg鄰伸苯基二胺二鹽酸鹽(Sigma, #P8287)之溶液及10 µl於25 ml磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液(pH 5.0)中之30%過氧化氫溶液，且培養15分鐘來培育該等培養盤。藉由添加每孔100 µl之2.5 M硫酸來終止反應。藉由在490 nm之吸光度下於一自動ELISA板讀取器中讀取培養盤來獲得資料。

實例2：用於分析抗人類CD22單株抗體(MAb)之基於FACS的檢定

在4℃下以於100 µl FACS緩衝液(0.1 % BSA，10 mM疊氮化鈉於PBS中，pH 7.4)中之抗CD22融合瘤上層清液將於其表面上表現人類CD22之CHO細胞培養30分鐘，接著以FACS緩衝液洗滌一次。藉由在4℃下以與山羊或兔抗小鼠IgG(Accurate Chem. Co., Westbury, NY)(對於鼠測試抗體而言)或山羊或兔抗人類IgG(對於人類化抗體而言)接合之多株FITC將抗體/細胞混合物之等分試樣培養30分鐘，接著以FACS緩衝液洗滌三次來測定抗CD22結合之量。

實例3：製備人類化抗CD22抗體

200817434

產生人類化10F4抗體，其中高變區(HVR)胺基酸殘基(可互換稱作互補判定區或CDR)係經由定點突變誘發(Kunkel等人，Methods Enzymol. (1987), 154:367-382)修飾以得到兩種變異體，人類化10F4v1及人類化10F4v2(在本文中亦分別被稱作"10F4v1"、"hu10F4v1"、"10F4v2"或"hu10F4v2")。在本文中揭示之一些研究中所使用之第三形式人類化10F4v3("10F4v3"或"hu10Fv3")具有與hu10F4v2之成熟蛋白相同之輕鏈及重鏈胺基酸序列，但在用於蛋白表現之載體中包含不同信號序列。

如本文中所揭示進行鼠10F4抗體之人類化。簡言之，將鼠10F4之輕鏈及重鏈之高變區選殖入經修飾一致框架序列中以產生圖2A及圖2B中所示之輕鏈及重鏈可變區胺基酸序列。可用作本發明之抗體之框架序列的替代性輕鏈及重鏈框架序列展示於圖3及圖4中。

大體上如Lee等人，*J. Mol. Biol.* 340:1073-93 (2004)中所述，在*pho*A啟動子之控制下具有兩個開放閱讀框架之單價Fab-g3呈現載體(pV0350-2B)噬菌粒係用於10F4抗體之人類化中。第一開放閱讀框架包含融合於受體輕鏈序列之VL及CH1域中之關於蛋白分泌之大腸桿菌熱穩定STII信號序列。第二開放閱讀框架包含融合於受體重鏈序列之VH及CH1域、接著截斷次要噬菌體鞘蛋白P3中的STII信號序列。

將來自鼠10F4之VH及VL域(分別為SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90)分別與人類亞群III一致VH(huIII)域(SEQ ID

NO:24)及人類一致κI(huK1)域(SEQ ID NO:25)比對。將鼠抗人類CD22 MAb 10F4之高變區之胺基酸序列(HVR，在本文中可互換稱作互補判定區(CDR))插入如下一致框架序列中。將mu 10F4抗體之輕鏈HVR(HVR-L1(Kabat位置24-34)、HVR-L2(Kabat位置50-56)及HVR-L3(Kabat位置89-97))改造為人類κ I(huKI)一致序列抗體框架以產生人類化10F4v1輕鏈(SEQ ID NO:17，圖2B)。mu 10F4抗體之重鏈HVR(HVR-H1(Kabat位置26-35)、HVR-H2(Kabat位置49-65)及HVR-H3(Kabat位置95-102))經改造為經修飾人類亞群III(humIII)一致VH域，其在三個位置：R71A、N73T及L78A處與humIII序列不同，其係用於(參見Carter等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992))產生人類化10F4v1重鏈可變區(SEQ ID NO:16，圖2A)。對於每一高變區使用單獨寡核苷酸藉由Kunkel突變誘發來進行HVR之遺傳工程使其進入受體框架中。由標準DNA測序技術來測定每一純系之序列。圖2A及圖2B中展示之高變區及框架區係根據Kabat編號(Kabat等人(1991)，同上文)進行編號。對輕鏈及重鏈測序且huKI、humIII、鼠10F4、人類化10F4v1及人類化10F4v2之可變區(包括HVR及框架區(FR))之胺基酸序列展示於圖2A及圖2B中。人類化10F4v3抗體具有與10F4v2相同之胺基酸序列。

編碼抗體、抗體片段、VL域或VH域之胺基酸序列變異體的核酸分子係由此項技術中已知之多種方法來製備。該等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在胺基酸

序列變異體之情況下)或藉由早期製備之抗體、抗體片段、VL域或VH域之變異體或非變異體形式的寡核苷酸介導(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及盒式突變誘發來製備。舉例而言，對於使用Kunkel方法經變異體胺基酸取代之胺基酸而言，可藉由於VH及視情況於一或多種CDR中靶向VL可接近胺基酸位置來產生庫。參見(例如)Kunkel等人，Methods Enzymol. (1987), 154:367-382及其中之實例。隨機序列之產生亦描述於以下實例中。

寡核苷酸之序列包括本發明之多肽之CDR(HVR)或FR區中特定位置之一或多個指定密碼子組。密碼子組為用於編碼所需變異體胺基酸之一組不同核苷酸三重態序列。根據IUB碼，如下文所示，可使用符號來表示密碼子組以指示特定核苷酸或核苷酸之等莫耳混合物。

IUB碼

G鳥嘌呤

A腺嘌呤

T胸嘧啶

C胞嘧啶

R(A或G)

Y(C或T)

M(A或C)

K(G或T)

S(C或G)

W(A或T)

H(A或C或T)

B(C或G或T)

V(A或C或G)

D(A或G或T)

N(A或C或G或T)

舉例而言，在密碼子組DVK中，D可為核苷酸A或G或T；V可為A或G或C；且K可為G或T。此密碼子組可表示18種不同密碼子且可編碼胺基酸Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly及Cys。

可使用標準方法來合成寡核苷酸或引子組。可(例如)藉由固相合成來合成一組寡核苷酸，其含有表示由密碼子組提供之核苷酸三重態之所有可能組合且應編碼所需胺基酸基團的序列。此項技術中熟知在特定位置具有選定核苷酸"簡幷"之寡核苷酸的合成。具有特定密碼子組之該等核苷酸組可使用商業核酸合成器(獲自(例如)Applied Biosystems, Foster City, CA)來合成，或可購得(例如，自Life Technologies, Rockville, MD)。因此，具有特定密碼子組之一組經合成寡核苷酸通常應包括具有不同序列之複數個寡核苷酸，由密碼子組建立之差異在整個序列內。如根據本發明所使用，寡核苷酸具有容許可變域核酸模板雜交之序列且亦可包括用於選殖目的之限制酶位點。

在一方法中，編碼變異體胺基酸之核酸序列可由寡核苷酸介導之突變誘發來產生。如Zoller等人，1987, Nucleic Acids Res. 10:6487-6504中所述，此項技術中熟知此技

術。簡言之，編碼變異體胺基酸之核酸序列係藉由將編碼所需密碼子組之寡核苷酸與DNA模板雜交而產生，其中該模板為單鏈形式之含有可變區核酸模板序列之質體。雜交後，DNA聚合酶係用於合成該模板之整個第二互補鏈，其因此應併入寡核苷酸引子中且應含有如由寡核苷酸組所提供之密碼子組。

一般而言，使用長度為至少25個核苷酸之寡核苷酸。最佳寡核苷酸應具有與編碼突變之核苷酸之任一側上的模板完全互補的12至15個核苷酸。此確保寡核苷酸會與單鏈DNA模板分子適當雜交。寡核苷酸易於使用此項技術中已知之技術(諸如由Crea等人，Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)所述之技術)來合成。

DNA模板係由衍生自噬菌體M13載體之彼等載體(市售M13mp18及M13mp19載體為適合的)，或如Viera等人，Meth. Enzymol., 153:3 (1987)所述含有單鏈噬菌體複製起點的彼等載體來產生。因此，經突變之DNA可插入該等載體之一者中以產生單鏈模板。該單鏈模板之產生描述於上文Sambrook等人之4.21-4.41部分中。

為改變天然DNA序列，寡核苷酸係在適合雜交條件下與單鏈模板雜交。隨後使用寡核苷酸作為合成引子，添加DNA聚合酶(通常T7 DNA聚合酶或DNA聚合酶I之Klenow片段)以合成模板之互補鏈。如此形成異源雙鏈分子以使得一DNA鏈編碼基因1之突變形式，且另一鏈(原始模板)編碼基因1之天然、未改變序列。隨後將此異源雙鏈分子

轉化入適合宿主細胞(通常原核生物，諸如大腸桿菌JM101)中。在使該等細胞生長之後，將其塗於瓊脂糖培養盤上且使用經32-磷酸鹽放射性標記之寡核苷酸引子篩檢以鑑別含有突變DNA之菌落。

上文剛剛描述之方法可經修改以使得產生其中質體之兩個鏈均含有突變之同源雙鏈分子。該等修改如下：將單鏈寡核苷酸黏接至如上所述之單鏈模板上。將三種脫氧核糖核苷酸、脫氧核糖腺苷(dATP)、脫氧核糖鳥苷(dGTP)及脫氧核糖胸苷(dTT)之混合物與被稱作dCTP-(aS)之經修飾硫代脫氧核糖胞嘧啶(其可獲自Amersham)組合。將此混合物添加至模板-寡核苷酸複合物中。在將DNA聚合酶添加至此混合物中之後，產生除突變鹼基之外與模板相同之DNA鏈。另外，此新DNA鏈應含有dCTP-(aS)而非dCTP，其用於保護其不發生限制性核酸內切酶消化。在雙鏈異源雙鏈之模板鏈經適當限制酶切斷後，該模板鏈可晚於含有待誘變之位點之區域經ExoIII核酸酶或另一適當核酸酶消化。隨後終止反應以留下僅為部分單鏈之分子。隨後在所有四種脫氧核糖核苷酸三磷酸鹽、ATP及DNA連接酶存在下使用DNA聚合酶來形成完全雙鏈DNA同源雙鏈。此同源雙鏈分子隨後可轉化入適合宿主細胞中。

如先前所示，寡核苷酸組之序列足夠長以與模板核酸雜交且亦可(但非必需)含有限制位點。DNA模板可由來源於噬菌體M13載體或如Viera等人((1987) Meth. Enzymol., 153:3)所述之含有單鏈噬菌體複製起點之載體的彼等載體

產生。因此，待突變之DNA應插入該等載體之一者中以產生單鏈模板。該單鏈模板之產生描述於上文Sambrook等人之4.21-4.41部分中。

根據另一方法，可藉由提供上游及下游寡核苷酸組來產生庫，每一組具有複數個具有不同序列之寡核苷酸，該等不同序列係由在該等寡核苷酸之序列內提供之密碼子組建立。上游及下游寡核苷酸組以及可變域模板核酸序列可用於聚合酶鏈反應中以產生PCR產物之"庫"。因為該等PCR產物可使用已建立分子生物學技術與其他相關或不相關核酸序列(例如，病毒鞘蛋白及二聚化域)融合，所以其可被稱作"核酸盒"。

寡核苷酸組可用於使用可變域核酸模板序列作為模板以產生核酸盒之聚合酶鏈反應中。該可變域核酸模板序列可為含有靶向核酸序列(亦即，編碼為取代靶向之胺基酸之核酸序列)之重免疫球蛋白鏈的任何部分。可變區核酸模板序列為具有第一核酸鏈及互補第二核酸鏈之雙鏈DNA分子的一部分。可變域核酸模板序列含有至少一部分可變域且具有至少一個CDR。在一些情況下，可變域核酸模板序列含有一個以上CDR。可變域核酸模板序列之上游部分及下游部分可經靶向以與上游寡核苷酸組及下游寡核苷酸組之成員雜交。

上游引子組之第一寡核苷酸可與第一核酸鏈雜交且下游引子組之第二寡核苷酸可與第二核酸鏈雜交。寡核苷酸引子可包括一或多個密碼子組且經設計以與一部分可變區核

酸模板序列雜交。使用該等寡核苷酸可將兩個或兩個以上密碼子組在PCR之後引入PCR產物(亦即，核酸盒)中。與編碼抗體可變域之核酸序列區雜交的寡核苷酸引子包括編碼靶向胺基酸取代之CDR殘基的部分。

上游及下游寡核苷酸組亦可經合成以在寡核苷酸序列內包括限制位點。該等限制位點可有助於將核酸盒(亦即，PCR反應產物)插入具有額外抗體序列之表現載體中。在一實施例中，該等限制位點經設計以便利核酸盒之選殖而不引入外來核酸序列或移除原始CDR或框架核酸序列。

核酸盒可經選殖入用於表現一部分或整個含有經由PCR反應產生之靶向胺基酸取代之輕鏈或重鏈序列的任何適合載體中。根據本發明中詳述之方法，核酸盒經選殖入容許產生一部分或整個與病毒鞘蛋白之全部或一部分融合(亦即，產生融合蛋白)之輕鏈或重鏈序列的載體中且呈現於粒子或細胞之表面上。儘管若干類型之載體為可用的且可用於實施本發明，但噬菌粒載體為本文中使用之較佳載體，因為其可相對簡易地建構，且可易於擴增。噬菌粒載體通常含有多種組份，其包括啟動子、信號序列、表現型選擇基因、複製位點起點及一般技術者已知之其他必要組份。

當特定變異體胺基酸組合待表現時，核酸盒含有能夠編碼重鏈或輕鏈可變域之全部或一部分且能夠編碼變異體胺基酸組合的序列。為製備含有該等變異體胺基酸或變異體胺基酸之組合之抗體，如在庫中，核酸盒可插入含有額外

抗體序列之表現載體中，例如輕鏈及重鏈可變區之可變域或恆定域之全部或部分。該等額外抗體序列亦可與其他核酸序列(諸如編碼病毒鞘蛋白之序列)融合且因此容許產生融合蛋白。

實例4：可變區序列測定

鼠及人類化10F4單株抗體之核酸及胺基酸序列係經由標準程序來測定。使用RNeasy ® Mini Kit(Qiagen, Germany)自產生小鼠抗人類CD22 10F4.4.1單株抗體之融合瘤細胞萃取全部RNA。使用具有簡幷引子之RT-PCR擴增輕鏈可變域(VL)及重鏈可變域(VH)。正向引子對抗體之VL及VH域之N末端胺基酸序列具特異性。輕鏈及重鏈反向引子分別經設計以黏接至輕鏈恆定域(CL)及重鏈恆定域1(CH1)中之區域，其在物種之間為高保守性的。將擴增VH及VL選殖入pRK哺乳動物細胞表現載體中(Shields等人，J. Biol. Chem. 276:659-04 (2000))。使用常規測序方法來確定插入子之聚核苷酸序列。鼠嵌合10F4及人類化10F4v1及人類化10F4v2輕鏈及重鏈可變區之胺基酸序列展示於圖2A及圖2B中。

人類化10F4v1在HVR-L1位置28(N28)(SEQ ID NO:9)處經進一步修飾(參見圖2B)。在彼位置上之天冬醯胺酸殘基經纈胺酸殘基(N28V)置換以產生hu10F4v2及hu10F4v3變異體之HVR-L1(SEQ ID NO:10)，其展示改良之結合親和力。該等變異體包含成熟抗體之相同可變域及恆定域序列且不同之處僅在於在本發明之成熟抗體中未發現信號序

200817434

列。

在hu10F4v1之HVR-L1高變區(參見圖2B)之胺基酸Asn28(N28)及/或Asn30(N30)之一者或兩者處產生額外胺基酸序列修飾。因為N28及N30為去胺作用之可能位點，所以在該等位點上測試到胺基酸變化。舉例而言，在位置28(N28)處之天冬醯胺酸或者經A、Q、S、D、V或I置換，且在位置30(N30)處之天冬醯胺酸或者經A或Q置換。根據本發明之HVR-L1域中之胺基酸序列變化以及藉由使用標準程序於一噬菌體ELISA檢定中之競爭分析測試之其結合親和力(IC50)提供於表2中。

表2

hu 10F4v1抗體之取代變異體

胺基酸變化於HVR-L1中圖2B	HVR-L1 SEQ ID NO	結合親和力(nM)
無變化(N28，N30)	9	8
N28A，N30	19	8
N28Q，N30	20	7.3
N28S，N30	21	12
N28D，N30	22	12
N28V，N30	10	7.3
N28I，N30	23	9.8
N28，N30A	32	7.7
N28，N30Q	33	10

為產生人類化10F4抗體之全長人類IgG1形式，重鏈及輕鏈分別經次選殖入前述pRK質體中(Gorman, C.M.等人(1990), DNA Protein Eng. Tech. 2: 3)。適當重鏈及輕鏈質體(視所需序列變化而定)係使用高效程序(Graham等人，

同上文及Gorman, C.M., Science 221: 551)經共轉染入經腺病毒轉化之人類胚胎腎細胞株(稱作293)中(Graham, F.L.等人(1977), J. Gen. Virol. 36: 59)。將培養基變為不含血清且每日收集培養基多達5天。使用蛋白A-瓊脂糖CL-4B(Pharmacia)自彙集上層清液純化抗體。藉由G25凝膠過濾將溶離抗體緩衝交換入PBS中，使用一Centriprep-30或Centricon-100(Millipore)藉由超濾將其濃縮且儲存於4℃下。使用全IgG-結合ELISA測定抗體濃度。

根據本發明之例示性重鏈IgG1恆定域描述於圖5A中。一例示性人類輕鏈κ恆定域包含(例如)RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:37)。h10F4v2之全長胺基酸序列展示於圖5B中，其中輕鏈及重鏈之恆定區係由底線指示。h10F4v1、v2及v3抗體為IgG1同型。

表徵抗CD22抗體

實例5：抗原決定部位定位：

根據以下程序測定10F4.4.1及5E8.1.8抗體所結合之CD22之抗原決定基。主要CD22同功異型物(CD22β)之缺乏各種七個類免疫球蛋白域之CD22序列經選殖且轉化入細胞中以穩定表現。舉例而言，缺乏域1(Δ1)、域2(Δ2)或域3及4(Δ3,4)之CD22變異體經選殖、轉化入CHO細胞中，且表現於細胞上。對照細胞表現CD22β。使用Stratagene

QuikChange XL™試劑套組進行缺失。藉由胺基酸22-138之缺失來進行域1之缺失；藉由胺基酸139-242之缺失來進行域2之缺失；且缺失域3及4係用作次要同功異型物CD22α(胺基酸241-417之缺失)。所有胺基酸數目係指由Wilson, G.L.等人作出之全長前驅物CD22β之編號，(參見圖1，於Wilson, G.L.等人，J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)中)。圖14為缺失域之圖。使用同型對照物藉由流式細胞儀測定結合。使用山羊抗小鼠IgG Alexa 488偵測10F4.4.1之結合。使用生物素化山羊抗小鼠IgG加抗生蛋白鏈菌素PE偵測5E8.1.8之結合。在不存在特定ECD域之情況下對鼠10F4.4.1或鼠5E8.1.8抗體之結合的有害影響指示抗體與彼等域結合。鼠10F4.4.1及5E8.1.8展示在該等條件下相同之結合特性。不與缺乏域1或域2之CD22結合，且與包含域1及2但缺乏域3及4之CD22結合。使用此方法，測定在自SEQ ID NO:27之胺基酸22至胺基酸240之序列內，10F4.4.1及5E8.1.8與人類CD22之域1及2結合(參見Wilson, G.L.等人(1991)，同上文)。

實例6：對可溶性抗原之結合親和力的表徵

使用一BIACORE® 3000系統(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)藉由表面電漿共振量測來測定鼠及人類化10F4抗體對於可溶性CD22細胞外域(ECD)的結合親和力。簡言之，根據供應商之指示以*N*-乙基-*N'*-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDC)及*N*-羥基琥珀醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感應器晶片(CM5, Biacore Inc.)。以用10

mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋至5 μg/ml之抗CD22 IgG1抗體10F4(鼠或人類化)塗覆該等經活化晶片，隨後以每分鐘5 μl之流動速率注射以達成約500個回應單元(RU)之偶合抗體。其次，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測而言，在25℃下以每分鐘30 μl之流動速率將兩倍連續稀釋之人類CD22-β-ECD-His標記之可溶性抗原(約500 nM至約7.8 nM)注射入具有0.05% Tween 20之PBS中。使用一簡單一對一朗繆耳結合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIAevaluation軟體版本3.2)來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。以比率k_{off}/k_{on}來計算平衡解離常數(Kd)。抗CD22抗體RFB4係用作對照物(Chemicon International, Inc., Temecula, CA，目錄號CBL147)。此實驗之結果展示於以下表2中。

表2

對可溶性人類CD22之抗CD22結合親和力

(BIACORE®分析)

純系	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd(nM)
鼠10F4	0.19	2.8	15
嵌合10F4	0.26	4.2	16
人類化10F4v1	0.18	3.5	19
人類化10F4v2	0.32	2.5	7.8
對照物RFB4	0.33	1.4	4.2

實例7：對細胞表面抗原之結合親和力的表徵

使用競爭檢定來研究鼠10F4.4.1及人類化10F4v1及10F4v2對於表現於CHO細胞表面上之人類及獼猴

(cyno)CD22的結合親和力。簡言之，CHO細胞穩定表現全長人類CD22(SEQ ID NO:27)或獼猴(cyno)CD22(SEQ ID NO:31)。抗CD22抗體(鼠或人類化10F4v1或v2)經Iodogen®[^{125}I]試劑碘化至約10 μCi/μg之特異活性。使用連續稀釋、未經標記之抗CD22抗體進行基於細胞之競爭性結合檢定。在4℃下使抗體與細胞結合4小時。根據利用一非線性曲線擬合程式進行之標準史卡查分析(Scatchard analysis)來測定抗體之結合親和力K_D(參見(例如)Munson等人，Anal Biochem, 107: 220-239, 1980)。此實驗之結果展示於以下表3中。

表3

對於人類及獼猴CD22之10F4 MAb結合親和力

抗體	人類CD22 Kd(nM)	獼猴CD22 Kd(nM)
Mu 10F4.4.1	2.4	2.3
Hu 10F4v1*	1.1、1.7	1.4、1.8
Hu 10F4v2	1.6	2.1

*重複檢定

結果指示鼠及人類化10F4與表現於CHO細胞表面上之人類及獼猴CD22結合具有約相等之親和力。

實例8：製備抗CD22抗體藥物接合物

抗CD22 ADC係藉由使抗CD22抗體RFB4、鼠5E8、鼠10F4、人類化10F4v1、人類化thioMAb 10F4v1(thio-10F4v1)、人類化10F4v2及人類化10F4v3與以下藥物-連接子部分：spp-DM1、smcc-DM1、MC-vc-PAB-MMAE；MC-

200817434

vc-PAB-MMAF；MC-MMAE及MC-MMAF接合來製備，其中藥物及連接子部分揭示於本文中以及2004年2月5日公開之WO 2004/010957及2005年9月9日公開之WO 2006/034488中(該等專利申請案之每一者係以引用的方式全部併入本文中)。在接合之前，根據WO 2004/010957中描述之方法使用標準方法以TCEP部分還原抗體。根據Doronina等人(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784及US 2005/0238649 A1中描述之方法使用標準方法將部分還原之抗體與上述藥物-連接子部分接合。簡言之，將部分還原之抗體與藥物連接子部分組合以容許該等部分與半胱胺酸殘基之接合。中止接合反應，且純化ADC。由HPLC測定每一ADC之藥物負載量(每抗體藥物部分之平均數目)。用於製備ADC之其他有用之連接子包括(不加限制)BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC，及sulfo-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基碸)苯甲酸酯)，且包括雙順丁烯二醯亞胺試劑：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、$BM(PEO)_3$及$BM(PEO)_4$。

抗CD22 ADC亦係藉由接合至抗體之離胺酸殘基上來製備。使用(例如)如本文中所揭示之Traut氏試劑(Pierce Chemical Co.)將抗體之離胺酸轉變為氫硫基。所得氫硫基對用於製備ADC之連接子或連接子藥物分子具有反應性。或者，ADC係藉由使抗CD22抗體上之離胺酸與連接子

SPP(4-(2'-吡啶基二硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯)反應來製備，其中該連接子可已連接至藥物分子上或可隨後與藥物分子(諸如美登素類物)反應。舉例而言，抗體係藉由與SPP反應，接著與如Wang, L.等人，Protein Science 14:2436-2446 (2005)中所揭示之f接合而經修飾，其中該文獻係以引用的方式全部併入本文中。抗CD22抗體上之離胺酸殘基亦可在pH 7-9下與連接子SMCC(Pierce Chemical Co.)反應以使得SMCC之胺-反應性N-羥基琥珀醯亞胺(NHS酯)與抗體形成穩定醯胺鍵。SMCC之氫硫基-反應性順丁烯二醯亞胺基係在pH 6.5-7.5下與DM1之氫硫基反應(參見Pierce Chemical Co., piercenet.com)以形成ADC。離胺酸或半胱胺酸殘基係與連接子-藥物反應以產生包含每抗體約1-8個連接子藥物分子或者每抗體1-6個、1-4個、1-3個或1-2個連接子藥物分子之平均藥物負載量的ADC。

ADC抗CD22(RFB4)-SMCC-DM1及抗GP120-SMCC-DM1係根據此方法來製備，其中RFB4-smcc-DM1係在低(1.95)、中等(3.7)及高(6.75)藥物負載量下製備。抗GP120-smcc-DM1係在高(6.1)藥物負載量下製備。如下文之實例9及表9中所示，展示該等ADC在活體內為有效的。

實例9：抗CD22抗體藥物接合物之功效

功效決定子之活體外研究。

測定淋巴瘤細胞株中之抗CD22 ADC(或TDC)功效決定子。已知表現於B細胞表面上之CD22在與其配位體或抗體結合後經內化(Sato, S.等人，Immunity 5:551-562 (1996))。

為測試CD22之B細胞表面表現量及/或CD22之內化是否以及如何影響功效，進行以下活體外研究。

人類CD22在多個淋巴瘤細胞株上之表面表現。將19個於其表面上表現不同量CD22之淋巴瘤細胞株培養且以對數相生長收集。將細胞再次懸浮於含有100 μg/ml每一正常小鼠IgG及正常人類IgG之FACS洗滌緩衝液(PBS；0.5%牛血清白蛋白；0.1%疊氮化鈉)中且保持於冰上。於冰上以抗huCD22 APC(mIgG1，純系RFB4, Southern Biotech #9361-11)或鼠IgG1 APC同型(BD Pharmingen #555751)將每100 μl約1×10^6個細胞染色30分鐘。將死細胞以7-AAD (BD Pharmingen #559925)染色。於一BD FacsCalibur™流式細胞儀上獲得資料且用FlowJo™軟體對其進行分析。藉由如上述培養淋巴瘤細胞，以對數相收集經培養細胞且於96孔板中以每孔90 μl培養基接種5,000細胞來測定hu10F4v3-SMCC-DM1或每一游離藥物(DM1、MMAF或MMAE)之IC50測定。ADC及游離藥物在偵測範圍內經連續稀釋(ADC開始為300 μg/ml，或游離藥物開始為90 nM，且稀釋至大體上零檢定標靶)。將10 μl經稀釋ADC或游離藥物之等分試樣添加至含有細胞之複製孔中且在37℃下培養3天。向每一孔中添加100 μl CellTiter Glo™且將其培養30分鐘。偵測化學發光且使用Prism™軟體分析資料。結果展示於圖6A中，其中高表面CD22量與hu10F4v3-SMCC-DM1之低IC50(較高功效)相關。圖6C指示在細胞對游離藥物之固有敏感性與ADC之IC50之間存在較強相關性。

hu10F4v3-SMCC-DM1之內化係由FACS檢定來測定。簡言之，在hu10F4v3-SMCC-DM1存在下藉由標準FACS技術以CD22-FITC(RFB4)對淋巴瘤細胞染色且將其於冰上培養20-30分鐘。在初始染色之後，為測定細胞表面上之CD22含量，將細胞以冷RPMI/10% FBS培養基洗滌且添加200 µl預熱RPMI/10% FBS且在37℃下將其培養15分鐘。添加80 µl染色緩衝液及20 µl熱滅活正常小鼠血清(HI NMS)，接著於冰上培養15分鐘。添加抗DM1-Alexa-647，於冰上培養20-30分鐘且在FACS分析之前將細胞洗滌且以200 µl PBS/1%聚甲醛固定。在初始染色之後，為測定CD22之表面及內部染色，將細胞以冷RPMI/10% FBS洗滌，添加預熱RPMI/10% FBS且在37℃下將該等細胞培養15分鐘。隨後將細胞以FACS洗滌液洗滌且在室溫下以Fix試劑A(Dako™ #k2311)固定15分鐘，且以Fix試劑B(Dako™)重複該步驟。添加染色緩衝液及HI NMS且於冰上將細胞混合物培養15分鐘。添加Fix試劑B，接著添加抗DM1-Alexa-647且在室溫下培養20-30分鐘。以FACS洗滌液洗滌細胞且將其固定於PBS/1%聚甲醛中。使用一BD FacsCalibur™流式細胞儀對每一細胞混合物(表面、表面內化後及內部染色)進行FACS分析且以FlowJo™軟體進行分析。結果展示於圖6B中，其中高內化DM1量與低IC50(高功效)相關；及圖6D中，其中內化DM1係由螢光顯微鏡呈現。

活體內功效研究

為測試毒素接合或未經接合抗CD22單株抗體在活體內

減小腫瘤體積之能力的功效，使用以下方案。

以2 × 10^7個人類B細胞淋巴瘤細胞株在側腹對各SCID小鼠皮下接種。該等人類細胞株包括人類伯基特淋巴瘤細胞株Daudi、Ramos及Raji細胞(獲自American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)，及包括U-698-M細胞及Su-DHL-4細胞之其他B細胞株(獲自DSMZ, Braunschweig, Germany；Su-DHL-4細胞係經螢光素酶報導體基因轉染)、DoHH2細胞(Kluin-Neilemans, H.C. (1991)，同上文)及Granta-519(套細胞淋巴瘤細胞，Jadayel, D.M.等人，Leukemia 11(1):64-72 (1997))，及BJAB-luc細胞(表現報導體基因螢光素酶之BJAB人類B細胞類淋巴母細胞株)。當腫瘤達到介於100-200 mm^3之間之平均腫瘤體積時，將小鼠分組，且藉由靜脈內注射如以下表4-16中所示之毒素-接合抗體或未經接合抗體於第0天治療。

抗CD22美登素藥物接合物減小B細胞腫瘤體積

以每隻小鼠0.2 ml體積之2×10^7個BJAB-luc細胞在側腹對65隻SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3時，將小鼠隨機分組為各9隻小鼠之四組且提供以下表4中指示之抗CD22抗體或對照抗體之單一靜脈內治療(經由尾部血管)。

200817434

表 4

活體內腫瘤體積減小

抗體投藥

經投予之抗體	TI	PR	CR	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu g/m^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3.0	200	4.6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3.4	200	4.0
hu10F4v1	9/9	0	0	3.4	---	---

"TI"-在每一組之最後時間點之腫瘤發生率；分子係指帶有腫瘤之動物之數目且分母係指動物總數。"PR"係指具有自其初始體積消退50-99%之腫瘤之動物的數目。"CR"係指獲得完全康復之動物之數目。

在抗體注射後對每一治療組之平均腫瘤體積監控32天。以測徑規進行腫瘤量測。藉由與對照物及未經接合抗體比較來測定毒素接合之抗CD22抗體之功效。結果展示於圖7A中。相對於未經接合抗CD22抗體及非特異性對照抗體而言，鼠及人類化10F4v1-smcc-DM1單株抗體顯著減緩腫瘤生長。

使用與上述相同之方案，藉由比較如以下表5中所示之毒素接合之人類化10F4v2與毒素接合之鼠及裸人類化抗體來進行檢定。

表 5

活體內腫瘤體積減小

抗體投藥

經投予之抗體	TI	PR	CR	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu g/m^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4.7	200	2.9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4.5	200	3.0
hu10F4v2	9/9	0	0	4.5	---	---

"TI"-在每一組之最後時間點之腫瘤發生率；分子係指研究組中帶有腫瘤之動物之數目且分母係指動物總數。"PR"係指具有自其初始體積消退50-99%之腫瘤之動物的數目。"CR"係指獲得完全康復之動物之數目。

在抗體注射後對每一治療組之平均腫瘤體積監控32天。以測徑規進行腫瘤量測。藉由與對照物及未經接合抗體比較來測定毒素接合之抗CD22抗體之功效。結果展示於圖7B中。相對於未經接合抗CD22抗體及非特異性對照抗體而言，鼠10F4-smcc-DM1及人類化10F4v2-smcc-DM1單株抗體顯著減緩腫瘤生長。

抗CD22抗體係根據本文中所揭示之接合方法經由spp連接子或smcc連接子與DM1接合。裸抗CD20抗體係用作陽性對照物且毒素接合物抗HER2-spp-DM1及抗HER2-smcc-

DM1係用作陰性對照物。以每隻小鼠0.2 ml體積之2×10^7個BJAB-luc細胞在側腹對80隻SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3時，將小鼠隨機分組為各10隻小鼠之六組且進行測試或對照抗體之靜脈內注射。每一週重複一次給藥，總共三次給藥。參見表6。

表6

活體內腫瘤體積減小

抗體投藥

經投予之抗體	劑量Ab(mg/kg)	劑量DM1(μg/m^2)
抗Her2-spp-DM1 *	4	214
抗Her2-smcc-DM1 **	6.9	405
抗CD22-spp-DM1 *	5	214
抗CD22-spp-DM1	2.5	107
抗CD22-smcc-DM1 **	10	405
裸抗CD22	10	---

*匹配藥物負載量

**匹配藥物負載量

每週兩次監控平均腫瘤體積歷時3週且隨後每週一次其後共歷時8週。腫瘤體積隨時間之變化(圖7C)展示以214 μg/m^2及107 μg/m^2 DM1給藥之抗CD22-spp-DM1及以405 μg/m^2給藥之抗CD22-smcc-DM1在BJAB-luc異種移植物腫瘤中展示強烈且可比較之抗腫瘤活性。所有抗CD22 ADC群展示完全反應。

抗CD22抗體RFB4、5E8及7A2係根據本文中所揭示之接

合方法經由smcc連接子與DM1接合。毒素接合物抗HER2-smcc-DM1(在本文中可互換稱作HER-smcc-DM1或HER2-smcc-DM1)係用作陰性對照物。

在SCID小鼠中研究該等抗體減小各種異種移植物中之腫瘤體積的能力。用於在小鼠中產生異種移植物腫瘤之人類B細胞淋巴瘤細胞株為Ramos細胞及BJAB-luc細胞。對於每一異種移植物而言，以每隻小鼠0.1 ml體積之5×10^6個人類B細胞淋巴瘤Ramos細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射(或以0.2 ml之2×10^7個BJAB-luc細胞)。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。將每一組之DM1藥物裝載量標準化為200 $\mu g/m^2$以提供投予DM1之劑量。每週兩次監控平均腫瘤體積歷時4週。結果展示於以下表7及表8中且分別繪製於圖8A及圖8B中。

表7

活體內腫瘤體積減小，Ramos異種移植物

抗體投藥

經投予之抗體	劑量Ab(mg/kg)	劑量DM1($\mu g/m^2$)
抗HER2-smcc-DM1	4.2	200
抗CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200
抗CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200

表 8

活體內腫瘤體積減小，BJAB-luc異種移植物

抗體投藥

經投予之抗體	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu g/m^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗HER2-smcc-DM1	4.2	200	3.2
抗CD22 (7A2)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200	4.25

該等結果展示相對於對照抗體或裸抗CD22抗體，抗CD22-smcc-DM1抗體藥物接合物顯著減小Ramos及BJAB-luc異種移植物中之B細胞腫瘤體積。

研究抗體藥物負載量(在抗體群體中每一抗體所接合之藥物分子的平均數目)對於抗CD22-smcc-DM1抗體藥物接合物減小BJAB-luc SCID小鼠異種移植物中腫瘤體積之能力的影響。以每隻小鼠0.2 ml體積之2×10^7個BJAB-luc細胞在側腹對140隻SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3時，將小鼠隨機分組為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供進行測試或對照抗體之單一靜脈內注射。將具有相對低、中等或高藥物負載量(分別為每一抗體1.95、3.7或6.75個接合DM1分子的平均藥物負載量)之抗CD22(RFB4)-smcc-DM1群體作為測試抗體投予。裸RFB4抗體及抗GP120-smcc-DM1(高藥物負載量)為對照物。抗體藥物接合物(測試及對照)之劑量經標準化為5 mg/kg蛋白量之劑量。連接子接合物與抗

體之連接係經由離胺酸殘基。參見表9。

表9

活體內腫瘤體積減小，BJAB-luc異種移植物

抗CD22(RFB4)-smcc-DM1投藥

經投予之抗體	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu g/m^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗CD22(RFB4)(裸抗體)	10	--	--
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1(低)	5	144	1.95
抗CD22(RFB4) -smcc-DM1(中等)	5	273	3.7
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1(高)	5	497	6.75
抗GP120-smcc-DM1(高)	5	449	6.1

當以匹配蛋白量(5 mg/kg)給藥時，負載高藥物負載量(每抗體分子6.75個DM1分子)之抗CD22(RFB4)-smcc-DM1比具有3.7之中等負載量之抗體藥物接合物略微更能減小腫瘤體積，而具有低藥物負載量之抗體藥物接合物的影響與對照接合物或裸抗體無差別。結果繪製於圖9中。

抗CD22奧利斯坦汀藥物接合物減小B細胞腫瘤體積

研究抗CD22奧利斯坦汀MMAF藥物接合物對小鼠異種移植物中腫瘤體積的影響。抗CD22(RFB4)及對照抗體抗GP120係根據本文中所揭示之方法經由MC-vcPAB連接子或MC連接子與MMAF接合。以每隻小鼠0.2 ml體積之5×10^6個Ramos細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3

時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。經投予小鼠之藥物劑量、藥物負載量(藥物比率)及抗體劑量展示於表10中。

表10

活體內腫瘤體積減小，Ramos異種移植物

抗CD22(RFB4) MMAF接合物投藥

經投予之抗體	劑量MMAF ($\mu g/m^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6.6	4.2
抗CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6.9	4.0
抗GP120-MCvcPAB-MMAF	405	5.8	4.8
抗GP120-MC-MMAF	405	5.9	4.7

抗CD22-MC-MMAF在Ramos RA1異種移植物中展示與抗CD22-MC-vc-PAB-MMAF相當之活性。結果繪製於圖10中。

研究抗CD22奧利斯坦汀MMAE及DM1藥物接合物對小鼠異種移植物中腫瘤體積之影響。抗CD22(RFB4)及對照抗體抗GP120係根據本文中所揭示之方法經由MC-vcPAB連接子或MC連接子與MMAE接合或經由smcc連接子與DM1接合。以每隻小鼠0.1 ml體積之5×10^6個Ramos細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。投予PBS作為對照。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。經投予小鼠之藥物劑量、藥

物負載量(藥物比率)及抗體劑量展示於表11中。

表11

活體內腫瘤體積減小，Ramos異種移植物

抗CD22(RFB4) MMAE及DM1接合物投藥

經投予之抗體	劑量MMAE或DM1(μg/m^2)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗GP120-smcc-DM1	405	6.7	4.1
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	405	6.5	4.25
抗GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6.0	4.7
抗CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6.3	4.5
PBS	--	--	--

抗CD22-MCvcPAB-MMAE在Ramos RA1異種移植物中展示有效抗腫瘤活性。與抗CD22-smcc-DM1相比，抗CD22-MCvcPAB-MMAE展示出色活性。ADC對照物抗GP120-MCvcPAB-MMAE未展示顯著活性。結果繪製於圖11中。

研究抗CD22奧利斯坦汀MMAF及DM1藥物接合物對小鼠異種移植物中腫瘤體積之影響。抗CD22 hu10F4v2-MC-MMAF、hu10F4v2-smcc-DM1及thio-10F4v1-MC-MMAF經投予且比較對於腫瘤體積之影響。對照抗體為抗Her2-MC-MMAF及抗Her2-smcc-DM1。以每隻小鼠0.2 ml體積之2×10^7個BJAB-luc細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^{3}時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提

200817434

供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。如本文中所揭示，"Thio"係指thioMab，其中連接子-藥物部分係經由抗體上之經半胱胺酸改造之位點與抗體接合。經投予小鼠之藥物劑量、藥物負載量(藥物比率)及抗體劑量展示於表12中。

表12

活體內腫瘤體積減小，BJAB-luc異種移植物

Hu10F4 MMAF及DM1接合物投藥

經投予之抗體	劑量MMAF或DM1(μg/m^2)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗Her2-MC-MMAF	100	1.1	6.3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2.0	3.4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1.0	3.4
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4.6	1.5
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2.3	1.5
抗Her2-smcc-DM1	200	4.2	3.2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4.5	3.0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2.3	3.0

Hu10F4v2 ADC在BJAB-luc異種移植物中展示有效抗腫瘤活性。結果繪製於圖12中。

使用於上述實驗中所揭示之程序，研究不同劑量之hu10F4v3-smcc-DM1及-MC-MMAF ADC在不同異種移植物中之功效。如上文中所揭示來製備SuDHL4-luc之異種移植物、DoHH2及Granta-519異種移植物。當腫瘤尺寸達到100-200 mm^{3}時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。經投予小鼠之藥物劑量、藥物負載量(藥物比率)及抗體劑量展

OnCusp
Ex. 1002

示於表13A-13C中且結果展示於圖13A-13C中。

表13A

活體內腫瘤體積減小，

Hu10F4v3 MMAF及DM1接合物投藥

在SuDHL-4-luc異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或DM1(μg/m^2)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13.6	2.9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6.8	2.9
抗Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.3	3.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.0

表13B

活體內腫瘤體積減小，

Hu10F4v3 MMAF及DM1接合物投藥

在DoHH2異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或DM1(μg/m^2)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11.8	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
抗Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.1	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
裸hu10F4v3	--	13.1	--

200817434

表 13C

活體內腫瘤體積減小，

Hu10F4v3 MMAF及DM1接合物投藥

在Granta-519異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或DM1(μg/m^2)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	300	5.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2.9	3.35
抗Her2-MC-MMAF	300	4.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3.3	3.04
裸hu10F4v3	--	6.6	--

抗CD22 hu10F4v3-smcc-DM1及-MC-MMAF ADC在測試之所有異種移植物模型中展示有效腫瘤減小。

實例10：製備經半胱胺酸改造之抗CD22抗體

如本文中所揭示進行製備經半胱胺酸改造之抗CD22抗體。藉由本文中揭示之方法誘變具有與10F4v2相同之可變區及恆定區序列(輕鏈，SEQ ID NO:87；及重鏈，SEQ ID NO:88，圖5B)之編碼10F4v3抗體的DNA以修飾該輕鏈、該重鏈或該重鏈之Fc區。將編碼輕鏈之DNA誘變以在如圖17A中所示之輕鏈(人類化抗體10F4v3 thiomab之輕鏈SEQ ID NO:91)中之Kabat位置205(依序位置210)處將半胱胺酸替代為纈胺酸。將編碼重鏈之DNA誘變以在如圖17B中所示之重鏈(人類化抗體10F4v3 thiomab之重鏈SEQ ID

NO:92)中之EU位置118(依序位置121)處將半胱胺酸替代為丙胺酸。將Fc區誘變以在如圖17C中所示之重鏈Fc區(重鏈SEQ ID NO:93)中之EU位置400(依序位置403)處將半胱胺酸替代為絲胺酸。

藉由還原及再氧化製備用於接合之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體

將表現於CHO細胞中之全長、經半胱胺酸改造之抗CD22單株抗體(ThioMab)在約pH 8.0下溶解於500 mM硼酸鈉及500 mM氯化鈉中且在37℃下以約50-100倍過量之1 mM TCEP(參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽；Getz等人(1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)還原約1-2小時。將經還原ThioMab稀釋且負載於一於10 mM乙酸鈉(pH 5)中之HiTrap S管柱上，且以含有0.3 M氯化鈉之PBS溶離。將經溶離之還原ThioMab在pH 7下以2 mM脫氫抗壞血酸(dhAA)處理3小時，或在室溫下以2 mM硫酸銅($CuSO_4$)水溶液處理隔夜。周圍空氣氧化亦可為有效的。藉由經Sephadex G25樹脂溶離交換緩衝液且以具有1 mM DTPA之PBS將其溶離。根據280 nm下溶液之吸光度來測定經還原抗體之濃度且藉由使硫醇與DTNB(Aldrich, Milwaukee, WI)反應並確定412 nm下之吸光度來確定硫醇濃度，藉此來檢核硫醇/Ab值。

實例11：藉由經半胱胺酸改造之抗CD22抗體與藥物-連接子中間物之接合來製備經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物

在實例10之還原及再氧化程序後，將經半胱胺酸改造之抗CD22抗體溶解於PBS(經磷酸鹽緩衝之鹽水)緩衝液中且於冰上冷凍。將具有硫醇-反應性官能基(諸如順丁烯二醯亞胺基)之相對於經改造半胱胺酸而言每抗體約1.5莫耳當量之奧利斯坦汀藥物連接子中間物(諸如MC-MMAE(順丁烯二醯亞胺基己醯基-單甲基奧利斯坦汀E)、MC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE或MC-val-cit-PAB-MMAF)溶解於DMSO中，稀釋於乙腈及水中，且添加至於PBS中之冷凍還原、再氧化抗體中。在約一小時後，添加過量順丁烯二醯亞胺以中止反應且對任何未反應抗體硫醇基團封端。藉由離心超濾濃縮反應混合物且將經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物藉由經由於PBS中之G25樹脂溶離而純化且去鹽，在無菌條件下經由0.2 μm過濾器過濾，且冷凍儲存。

如下進行hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab-BMPEO-DM1之製備。由雙順丁烯二醯亞胺基試劑BM(PEO)4(Pierce Chemical)對hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab上之自由半胱胺酸進行修飾，在抗體表面上留下未反應之順丁烯二醯亞胺基。此係藉由以下步驟來實現：將BM(PEO)4溶解於50%乙醇/水混合物中至10 mM之濃度；且向濃度為約1.6 mg/ml(10微莫耳濃度)之於經磷酸鹽緩衝之鹽水中含有hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab之溶液中添加十倍莫耳過量之BM(PEO)4；且使其反應1小時。於具有150 mM NaCl緩衝液之30 mM檸檬酸鹽(pH 6)中藉由凝膠過濾(HiTrap

200817434

column, Pharmacia)移除過量BM(PEO)4。將適當10倍莫耳過量之溶解於二甲基乙醯胺(DMA)中之DM1添加至hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab-BMPEO中間物中。亦可使用二甲基甲醯胺(DMF)以溶解藥物部分試劑。使反應混合物反應隔夜，隨後藉由凝膠過濾或透析入PBS中以移除未反應之藥物。於PBS中於S200管柱上凝膠過濾係用於移除高分子量聚集體且供應經純化之hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab-BMPEO-DM1。

由相同方案製備對照物HC (A118C) MAb-MC-MMAF、對照物HC ThioMAb-MC-MMAF、對照物HCThioMAb-MCvcPAB-MMAE及對照物HC ThioMab-BMPEO-DM1。

由上述程序製備且測試以下經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物：

由A118C thio hu 10F4v3與MC-MMAF接合得到之thio hu thio-HC-10F4v3-MC-MMAF；

由A118C thio hu 10F4v3與MC-val-cit-PAB-MMAE接合得到之thio hu thio-HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE；

由A118C thio hu HC-10F4v3與bmpeo-DM1接合得到之thio hu HC-10F4v3-bmpeo-DM1；

由V205C thio hu LC-10F4v3與MC-val-cit-PAB-MMAE接合得到之thio hu LC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE；及

由S400C thio hu Fc-10F4v3與MC-val-cit-PAB-MMAE接合得到之thio hu Fc-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE。

實例12：經半胱胺酸改造之ThioMAb藥物接合物對細胞

表面抗原之結合親和力的表徵

藉由FACS分析來測定thio hu 10F4v3藥物接合物對表現於BJAB-lucs細胞上之CD22的結合親和力。簡言之，使於100 μl中之約1×10^6個細胞與不同量之以下抗CD22 ThioMAb藥物接合物之一者接觸：thio hu LC(V205C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu Fc(S400C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu HC(A118C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu HC(A118C) 10F4v3-MC-MMAF或thio hu HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1(分別參見圖18A-18E)。使用生物素化山羊抗huFc加抗生蛋白鏈菌素-PE偵測結合至細胞表面上之抗CD22抗體。圖18A-18E之圖指示抗原結合約與所測試之所有thiomab藥物接合物相同。

實例13：藉由抗CD22 ThioMab藥物接合物來檢定活體內腫瘤體積減小

根據本文實例9中揭示之程序測試根據實例11製備之thiomab藥物接合物在異種移植物模型中減小B細胞腫瘤體積的能力。在第0天以以下表14中所示之劑量向具有Granta-519細胞異種移植物腫瘤之SCID小鼠中投予對照物及抗CD22人類化10F4v3 thiomab藥物接合物。該對照HC(A118C) thiomab為抗HER2 4D5抗體。

表14

活體內腫瘤體積減小，

Thio Hu10F4v3 MMAE及MMAF接合物投藥

在Granta-519異種移植物中

200817434

經投予之抗體	劑量MMAF或DM1(μg/m^2)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
Thio對照HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.99	1.65
Thio對照HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.33	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.41	1.95
Thio 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3.76	1.8
Thio 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6

此實驗之結果展示於圖19中。以表14中所示之劑量投予thio 10F4v3-LC-(V205C)-MCvcPAB-MMAE及thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thiomab藥物接合物在研究期間引起平均腫瘤體積之減小。

使用相同方案於CB17 SCID小鼠中之Granta-519異種移植物中測試額外thiomab藥物接合物，但測試不同藥物劑量。對照抗體或對照thiomab為抗HER2 4D5抗體或HC(A118C) thiomab。結果展示於以下表15中。

表15

活體內腫瘤體積減小，

Thio Hu10F4v3 MMAE、MMAF及DM1接合物投藥

在Granta-519異種移植物中

200817434

經投予之抗體	劑量MMAF或DM1(μg/m^2)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3.2	3.1
Thio對照HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio對照HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	6.5	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2.7	1.9
Thio對照HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.1	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	75	2.6	1.95

此實驗之結果展示於圖20A中。以150 μg/m^{2}及75 μg/m^{2}投予thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thiomab藥物接合物在研究期間引起平均腫瘤體積之減小。在相同研究中，對每一劑量組測定前7天中的體重變化百分比。圖20B中繪製之結果指示投予該等thiomab藥物接合物在此時期內未造成體重損失。

在類似研究中，使用與上述實例中所揭示相同之異種移植物研究方案，改變TDC及投藥劑量，在CB17 SCID小鼠

之濾泡性淋巴瘤DOHH2異種移植物中研究TDC之功效。TDC及劑量展示於以下表16中。

表16

活體內腫瘤體積減小，

Thio Hu10F4v3 MMAE、MMAF及DM1接合物投藥

在DOHH2異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或DM1($\mu g/m^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6.4	3.1
Thio對照HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	21.9	1.79
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio對照HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	26.0	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21.4	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10.7	1.9
Thio對照HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.4	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10.2	1.95

圖20C為繪製在經相同重鏈A118C抗CD22 TDC治療之CB17 SCID小鼠中在濾泡性淋巴瘤DOHH2異種移植物中平均腫瘤體積隨時間變化的圖，但為比表16中所示更高之劑量。在此研究中抗CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC似乎為最有效之測試劑。然而，在此實驗中在增加之劑量下，在抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE

對照物中注意到一些功效。此活性可能歸因於在循環中自ADC中釋放藥物。抗CD22 hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF及-BMPEO-DM1測試劑展示中間功效，且與該等連接子增加之穩定性相一致，未結合抗HER2對照物展示很小活性。圖20D為自DOHH2異種移植物研究之小鼠體重變化百分比之圖，其展示在該研究之前14天內無顯著體重變化。

實例14：在大鼠及獼猴中抗CD22藥物接合物之安全性

hu10F4抗CD22抗體與獼猴(cyno)CD22交叉反應具有與人類CD22相當之親和力。hu10F4抗CD22抗體不可與大鼠CD22交叉反應。因此，分別在大鼠及獼猴中評估抗CD22藥物接合物之標靶獨立性及標靶依賴性安全性及毒性。

大鼠中之安全性及毒性

關於大鼠中之安全性及毒性研究，進行兩個研究。在一研究中，在第1天以hu10F4v3-SMCC-DM1、-SPP-DM1、-MC-vc-PAB-MMAE或-MC-MMAF接合物對大鼠靜脈內給藥，其中該藥物係經由可分裂連接子(-vc-或-spp-)或不可分裂連接子(MC或SMCC(亦被稱作MCC))連接。投予媒劑作為對照物。在第5天收集血液樣品用於藥物動力學分析，且在第12天(在驗屍時)收集血液樣品。每週進行至少三次臨床觀測及體重記錄。監控血清AST(天冬胺酸胺基轉移酶)作為毒性之指示。在投予20 mg/kg hu10F4v3-vcMMAE及包含可分裂連接子之hu10F4v3-SPP-DM1之大鼠中，第5天時血清AST含量相對於第0天有所增加(圖21A)。在投予20 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF或hu10F4v3-

MCC-DM1之大鼠中，第5天時嗜中性白血球含量相對於第0天有所增加(不可分裂之連接子，圖21B)。在投予hu10F4v3-vc-MMAE或hu10F4v3-SPP-DM1之大鼠中，第5天時嗜中性白血球含量相對於第0天有所降低。在投予包含可分裂連接子之ADC之大鼠中增加之血清AST及減少之嗜中性白血球指示該等ADC毒性增大。

在相同大鼠研究中，在第1天時對每組六隻動物投予20 mg/kg、40 mg/kg或60 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF或hu10F4v3-SMCC-DM1且監控12天。在投予hu10F4v3-MC-MMAF之動物中，未觀測到以下指示：體重降低、血清肝酶增加、血小板減少或嗜中性白血球減少。在投予hu10F4v3-SMCC-DM1之大鼠中，在40 mg/kg及60 mg/kg之劑量下觀測到體重之可逆降低及血清肝酶之可逆增加，而在60 mg/kg劑量下觀測到嗜中性白血球之可逆減少及血小板之瞬間減少。

在獼猴中之安全性及毒性

為評估抗CD22 ADC在靈長類動物模型中之安全性及毒性，將30隻獼猴指派為以下治療組：媒劑對照組(6隻動物)；以2 mg/m^2、4 mg/m^{2}及6 mg/m^{2}藥物劑量之劑量的hu10F4v3-SMCC-DM1(等於0 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg及30 mg/kg抗體劑量；每劑量組4隻動物)；以2 mg/m^2、4 mg/m^{2}及6 mg/m^{2}劑量之hu10F4v3-MC-MMAF(每劑量組4隻動物)。在第1天及第22天對動物靜脈內給藥。評估動物之體重變化、食物消耗及病理學指數。收集血液樣品且對其

檢定以評估毒性、藥效及抗藥物抗體效果。在第25天及第43天時各對每一組中之半數動物實施安樂死且收集組織樣品。

在任一ADC群中未觀測到顯著體重變化。根據相關技術中熟知之標準方法來檢定血清肝酶AST(天冬胺酸轉胺酶)、ALT(轉胺酶)及GGT(γ-麩胺醯轉肽酶)之含量。儘管在DM1組中評估ALT，而在MMAF組中評估AST及GGT，但在以30 mg/kg任一ADC投藥之動物中觀測到血清肝酶之可逆增加。在DM1組中在以20 mg/kg之劑量之4隻動物的兩者及以30 mg/kg之劑量之4隻動物的四者中，坐骨神經退化為最低限度至輕微的。在MMAF組中在以30 mg/kg之劑量之4隻動物的一者中坐骨神經退化為最低限度的。用顯微鏡觀測來自各種器官之組織。在30 mg/kg MMAF組中四隻動物之兩者具有未知意義之肺損傷，而在DM1組中未觀測到任一此動物。

藉由於在第0天及第22天對其投藥之獼猴中經43天量測血液中之$CD20^+$細胞含量來測定由hu10F4v3-MC-MMAF及-SMCC-DM1 ADC造成之周邊B細胞減少。藉由使用經螢光標記之抗CD20抗體之FACS來檢定在研究期間週期性收集之血液。如圖22A(MMAF組)及圖22B(DM1組)中所示，抗CD22 MMAF及DM1 ADC耗盡獼猴周邊B細胞。如圖23A及圖23B中所示，對於其他淋巴細胞群體未觀測到MMAF或DM1 ADC之顯著影響，其中其展示在同一時期內$CD4^+$細胞未顯著減少。

如圖24A及圖24B中之顯微照片所示，相對於對照物，在獼猴扁桃體樣品中Hu10F4v3-SMCC-DM1減少生髮中心B細胞。在圖24A中用圓形表示例示性生髮中心。如圖24B中所示，在10 mg/kg劑量下觀測到生髮中心B細胞之完全消蝕。在相同條件下投予hu10F4v3-MC-MMAF ADC後獲得相同結果。

以10 mg/kg給藥之Hu10F4v3-MC-MMAF自獼猴之脾濾泡生髮中心減少分裂之B細胞。參見圖25A中之圖及圖25B及25C中之組織顯微照片。當在相同條件下測試hu10F4v3-SMCC-DM1 ADC時獲得相同結果。在使用Ki-67染色之圖25B中生髮中心呈現為黑暗區域，且在圖25D中當以經可偵測標記之抗IgD染色時，生髮中心呈現為由黑暗區域環繞之未染色區域。歸因於由抗10F4v3-MC-MMAF造成之生髮中心B細胞減少之生髮中心損失展示於圖25C及圖25E中。因此，該等抗有絲分裂藥物對增生性B細胞群體具有影響。

以下融合瘤已由American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA (ATCC)寄存：

細胞株	ATCC寄存編號	寄存日期
融合瘤10F4.4.1	PTA-7621	2006年5月26日
融合瘤5E8.1.8	PTA-7620	2006年5月26日

該等寄存物係按照國際承認用於專利程序的微生物保存布達佩斯條約(Budapest Treaty on the International

Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure)及其條例(布達佩斯條約)之規定製造。此確保活寄存物自寄存日期起維持30年。該等細胞株應按照布達佩斯條約之條款由ATCC有效製造，且經受Genentech, Inc.與ATCC之間的協議，其確保在有關美國專利發布後或在任何美國或外國專利申請案對公眾開放後(無論哪個首先出現)該等細胞株對於公眾之永久及自由可用性，且確保根據35 USC §122及依照其之委員規則(包括特別關於886 OG 638之37 CFR §1.14)由其授權之美國專利商標局委員(U.S. Commissioner of Patents and Trademarks)確定之一者對細胞株的可用性。

本申請案之受讓人已同意若當經寄存細胞株在適合條件下培養時丟失或破壞，則其應即時通知以相同細胞株樣品替代。經寄存細胞株之可用性不應理解為在違背由任何政府權威根據其專利法授予之權利的情況下實施本發明的許可。

儘管已出於清楚理解之目的以說明及實例之方式相當詳細地描述前述發明，但不應認為該等描述及實例限制本發明之範疇。本文中所引用之所有專利及科學文獻之解釋內容係以引用的方式全部明確併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1A-1D：**圖1A**為指示β同功異型物之細胞外域之七個類免疫球蛋白域的CD22之圖。α同功異型物缺乏域3及4。"TM"係指跨膜域。**圖1B描述**CD22之β形式之胺基酸序列

(SEQ ID NO:27)。CD22之α形式缺乏以斜體展示之胺基酸(編碼細胞外域之域3及4)。蛋白質之成熟形式之細胞外域加底線(SEQ ID NO:28)。胺基酸1-21描述自成熟形式斷裂之信號序列。**圖1C**為CD22α之胺基酸序列(SEQ ID NO:29)。CD22α之ECD加底線(SEQ ID NO:30)。**圖1D**為來自獼猴(cyno)之CD22之胺基酸序列(SEQ ID NO:31)。獼猴CD22之前19個胺基酸為信號序列。

圖2A-2B：**圖2A**描述經人類化10F4形式1抗體(h10F4v1)比對且經人類亞群III序列比對之本發明之鼠10F4抗CD22抗體(m10F4)的重鏈可變區之胺基酸序列。HVR經方框框住(HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3)。將HVR括在一起之序列為框架序列(FR-H1至FR-H4)。該等序列係根據Kabat編號進行編號。Kabat、Chothia及contact CDR指示在經框住之HVR周圍。**圖2B**描述經人類化10F4形式1抗體(h10F4v1)比對且經人類κ I序列比對之本發明之鼠10F4抗CD22抗體(m10F4)的輕鏈可變區之胺基酸序列。人類化10F4抗體形式2及3(h10F4v2及h10F4v3)具有關於分泌成熟形式之相同胺基酸序列。在HVR-L1之胺基酸28(N28V)處，抗體h10F4v2及h10F4v3與h10F4v1不同。該等HVR經框住。FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4序列將HVR括在一起(HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3)。該等序列係根據Kabat編號進行編號。Kabat、Chothia及contact CDR指示在經框住之HVR周圍。

圖3A及3B展示具有如下序列識別號之適用於實施本發

明之例示性受體人類重鏈可變區(VH)一致框架序列，其中FR SEQ ID NO係以FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4之次序列出：

人類VH亞群I一致框架"A"減去Kabat CDR(SEQ ID NO:26、47、48、7)。

人類VH亞群I一致框架"B"、"C"及"D"減去延伸之高變區(SEQ ID NO:50、51、52、7；SEQ ID NO:50、51、52、7；及SEQ ID NO:50、51、53、7)。

人類VH亞群II一致框架"A"減去Kabat CDR(SEQ ID NO:54、55、56、7)。

人類VH亞群II一致框架"B"、"C"及"D"減去延伸之高變區(SEQ ID NO:57、58、56、7；SEQ ID NO:57、58、59、7；及SEQ ID NO:57、58、60、7)。

人類VH亞群III一致框架"A"減去Kabat CDR(SEQ ID NO:61、62、63、7)。

人類VH亞群III一致框架"B"、"C"及"D"減去延伸之高變區(SEQ ID NO:64、65、63、7；SEQ ID NO:64、65、66、7；及SEQ ID NO:64、65、67、7)。

人類VH受體1框架"A"減去Kabat CDR(SEQ ID NO:68、62、69、7)。

人類VH受體框架"B"及"C"減去延伸之高變區(SEQ ID NO:64、65、69、7；及SEQ ID NO:64、65、70、7)。

人類VH受體2框架"A"減去Kabat CDR(SEQ ID NO:68、62、71、7)。

200817434

人類VH受體2框架"B"、"C"及"D"減去延伸之高變區(SEQ ID NO:64、65、71、7；SEQ ID NO:64、65、72、7；及SEQ ID NO:64、65、73、7)。

圖4A及4B展示適用於實施本發明之例示性受體人類輕鏈可變區(VL)一致框架序列，其具有如下序列識別號：

人類VL κ亞群I-1一致框架(κv1-1)：SEQ ID NO:74、75、76、77

人類VL κ亞群I一致框架(κv1)：SEQ ID NO:74、78、76、77

人類VL κ亞群II一致框架(κv2)：SEQ ID NO:49、79、80、77

人類VL κ亞群III一致框架(κv3)：SEQ ID NO:81、82、83、77

人類VL κ亞群IV一致框架(κv4)：SEQ ID NO:84、85、86、77

圖5A及5B：**圖5A**描述天然序列人類IgG Fc區序列humIgG1(非A異型，SEQ ID NO:38；及A異型，其中SEQ ID NO:38內之胺基酸序列SREEM變為SRDEL)、humIgG2(SEQ ID NO:39)、humIgG3(SEQ ID NO:40)及humIgG4(SEQ ID NO:41)之比對，其中該等序列之間之差異係以星號標註。序列上方之數字表示EU編號系統。亦展示一例示性κ恆定區。**圖5B**描述人類化抗CD22抗體10F4v2、同型IgG1之輕鏈及重鏈之全長胺基酸序列(可變區及恆定區)。加底線部分描述恆定域。

200817434

圖6A-6D展示量測淋巴瘤細胞株中CD22 ADC功效之各種決定子之檢定的結果。**圖6A**指示較高細胞表面CD22含量係與較低抗CD22-MCC-DM1 IC50(較高功效)相關。**圖6B**指示抗CD22-MCC-DM1之增加之內化與較低之抗CD22-MCC-DM1 IC50相關。**圖6C**指示細胞對游離藥物之增加之固有敏感性與較低抗CD22-MCC-DM1 IC50相關。**圖6D**為展示在與細胞表面上之CD22結合後螢光標記抗CD22抗體之內化的顯微照片。

圖7A-7C：**圖7A**為一異種移植物模型中活體內腫瘤體積縮減之圖，其展示向具有人類B細胞腫瘤之SCID小鼠投予抗CD22抗體mu10F4-smcc-DM1及hu10F4v1-smcc-DM1顯著減小腫瘤體積。藥物裝載為約4及4.6，參看表4。**圖7B**為一類似研究之圖，但藥物裝載略微較低，為約2.9及3.0(參看表5)，且mu10F4-smcc-DM1及hu10F4v2-smcc-DM1功效係與對照抗體及未接合mu10F4進行比較。**圖7C**為一異種移植物模型中活體內腫瘤體積縮減之圖，其中抗CD22-spp-DM1係如表6中所示經投予。

圖8A及8B：**圖8A**為一投予Ramos細胞異種移植物之抗CD22抗體5E8.1.8-smcc-DM1及RFB4-smcc-DM1之圖。**圖8B**為一投予BJAB-luc異種移植物之抗CD22抗體5E8.1.8-smcc-DM1及RFB4-smcc-DM1之圖。

圖9為一展示在投予低藥物裝載、中等藥物裝載及高藥物裝載之抗CD22(RFB4)-smcc-DM1之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

200817434

圖 10 為一展示在 Ramos 異種移植物中投予抗 CD22(RFB4)-MC-vcPAB-MMAF 或抗 CD22(RFB4)-MC-MMAF 之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 11 為一展示在投予抗 CD22(RFB4)-smcc-DM1 或 -MCvcPAB-MMAE 之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 12 為一展示在投予人類化抗 CD22 10F4 變異體作為如表 12 中所揭示之 MMAF 或 DM1 免疫接合物之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 13A-13C 為展示在不同 B 細胞淋巴瘤異種移植物模型 SuDHL-4(圖 13A)、DoHH2(圖 13B)及 Granta-519(圖 13C)投予抗 CD22-smcc-DM1 或抗 CD22-MC-MMAF 之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 14 展示如實例中所述缺失抗原決定部位定位之 CD22 域的圖。該等域編號為 1-7。"TM"係指跨膜域。

圖 15 展示經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體藥物接合物(ADC)之繪圖，其中藥物部分係連接於以下區中之經改造半胱胺酸基團上：輕鏈(LC-ADC)；重鏈(HC-ADC)；及 Fc 區(Fc-ADC)。

圖 16 展示以下步驟：(i)以還原劑 TCEP(參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽)還原半胱胺酸二硫化物加合物及經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體(ThioMab)中之鏈間及鏈內二硫化物；(ii)以 dhAA(脫氫抗壞血酸)部分氧化(亦即再氧化)以再形成鏈間及鏈內二硫化物；及(iii)將再氧化抗體與藥物-連接子中間

物接合以形成經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物(ADC)。

圖17A-17C描述本發明之抗CD22經半胱胺酸改造之抗體的胺基酸序列，其中輕鏈或重鏈或Fc區經改變以在所選胺基酸位置處改造半胱胺酸。圖17A描述抗CD22 10F4變異體輕鏈之胺基酸序列，其中在Kabat位置205處之纈胺酸(依序位置纈胺酸210)經改變為半胱胺酸。圖17B描述抗CD22 10F4變異體重鏈之胺基酸序列，其中在EU位置118處之丙胺酸(依序位置丙胺酸121)經改變為半胱胺酸。圖17C描述抗CD22 10F4變異體Fc區之胺基酸序列，其中在EU位置400處之絲胺酸(依序位置絲胺酸403)經改變為半胱胺酸。在每一圖中，經改變之胺基酸以具有雙底線之粗體文字展示。單一底線指示恆定區。可變區無底線。

圖18A-18E為指示本發明之抗CD22 thiomab藥物接合物(TDC)結合至表現於BJAB-lucs細胞表面上之CD22之結合類似於LC、HC及Fc thiomab變異體以及所示不同藥物接合物的FACS圖。

圖19為一繪製經不同抗CD22 TDC治療之異種移植物模型中平均腫瘤體積隨時間變化之圖，其由經改造半胱胺酸(LC、HC或Fc)之位置及/或由藥物接合物(MMAF或MMAE)改變，在研究期間經抗CD22 TDC 10F4-LC-V210C-MCvcPAB-MMAE及抗CD22 10F4-HC-A121C-MCvcPAB-MMAE治療之異種移植物模型展示腫瘤體積減小。

圖20A為繪製在經與不同連接子藥物部分接合及/或以所

示不同劑量投予之重鏈A118C抗CD22 TDC治療之CB17 SCID小鼠中在人類套細胞淋巴瘤Granta-519異種移植物中平均腫瘤體積隨時間變化的圖。在此實驗中抗CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC似乎為最有效之測試劑。**圖20B**為繪製在經相同但更高劑量之重鏈A118C抗CD22 TDC治療之CB17 SCID小鼠中在濾泡性淋巴瘤DOHH2異種移植物中平均腫瘤體積隨時間變化的圖。在此實驗中抗CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC似乎為最有效之測試劑。**圖20C**為自DOHH2異種移植物研究之小鼠中體重變化百分比之圖，其展示在研究之前14天中體重無明顯變化。

圖21A及21B為展示在第0天及第5天血清AST(天冬胺酸轉胺酶)(**圖21A**)及血清嗜中性白血球(**圖21B**)變化之條形圖，其中投予包含可裂解及不可裂解連接子之ADC。

圖22A及22B為展示以10 mg/kg、20 mg/kg及30 mg/kg抗CD22 MMAF(**圖22A**)及抗CD22 DM1(**圖22B**)給藥之獼猴中周邊B細胞(CD20$^+$細胞)之耗減的圖。

圖23A及23B為展示在10 mg/kg、20 mg/kg及30 mg/kg抗CD22 MMAF(**圖23A**)及抗CD22 DM1(**圖23B**)下CD4$^+$淋巴細胞無顯著變化的圖。

圖24A及24B展示獼猴扁桃體組織之組織學樣品，其中生髮中心B細胞之耗減(在媒劑對照中顯而易見(**圖24A**))係於來自一以10 mg/kg hu10F4v3-SMCC-DM1給藥之動物之扁桃體樣品中耗減。

200817434

圖25A為組織樣品取自其用於研究之脾濾泡之區域的圖，其中其展示抗CD22 ADC共用獼猴靜止組織中之B細胞。獼猴脾濾泡生髮中心中之分裂細胞係於來自以10 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF給藥之動物之獼猴脾的分裂生髮細胞中耗減(**圖25B及25C**)。在相同條件下未分裂天然B細胞未耗減(**圖25D及25E**)。

200817434

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 抗體及免疫接合物及其用途

<130> P2262R1

<140> 096119143
<141> 2007-05-29

<150> US 60/911,829
<151> 2007-04-13

<150> US 60/908,941
<151> 2007-03-29

<150> US 60/809,328
<151> 2006-05-30

<160> 93

<210> 1
<211> 25
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 2
Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 3
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 4
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 5

200817434

<211> 30
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 5
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 6
Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe Asp Val
5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 7
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 9
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 10
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 11
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 12
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 13
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 14
Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 15
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 16

<211> 120
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 19
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 20
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 21
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

200817434

<400> 22
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 23
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 27
<211> 847
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp

200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
260 265 270

Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser
275 280 285

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
290 295 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
305 310 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly
365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His
380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys
410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser
440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro
455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser
485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val
500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln
545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp

200817434

575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe
620 625 630

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg
635 640 645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu
815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 28
<211> 660
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28
Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
1 5 10 15

Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
35 40 45

Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
50 55 60

Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly

65 70 75

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
80 85 90

Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu
95 100 105

Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
110 115 120

Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu
125 130 135

Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
140 145 150

Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
155 160 165

Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
170 175 180

Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile
185 190 195

Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn
200 205 210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys Leu Glu Ile
215 220 225

Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp Ser Val
230 235 240

Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr Thr
245 250 255

Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr
260 265 270

Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys
275 280 285

Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu
290 295 300

Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val
305 310 315

Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe
320 325 330

Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp
335 340 345

Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val
350 355 360

His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys
365 370 375

Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala
380 385 390

Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile
395 400 405

Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser
410 415 420

Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp
425 430 435

Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys

200817434

440 445 450

Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Arg
455 460 465

Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val
470 475 480

Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu
485 490 495

Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe
500 505 510

Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn
515 520 525

Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile
530 535 540

Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser
545 550 555

Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr
560 565 570

Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val
575 580 585

Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn
590 595 600

Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser
605 610 615

Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val
620 625 630

Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly
635 640 645

Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro
650 655 660

<210> 29
<211> 647
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn

125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser
260 265 270

Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp
275 280 285

Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp
290 295 300

Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser
305 310 315

Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp
320 325 330

Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly
335 340 345

Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys
350 355 360

Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys
365 370 375

Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly
380 385 390

Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser
395 400 405

Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg
410 415 420

Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala
425 430 435

Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr
440 445 450

Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln
455 460 465

Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr
470 475 480

Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu
485 490 495

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

500 505 510

Val Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala
515 520 525

Ile Cys Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser
530 535 540

Gln Gln Gly Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val
545 550 555

Arg Asn Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His
560 565 570

Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr
575 580 585

Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp
590 595 600

Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp
605 610 615

Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Thr Met
620 625 630

Arg Thr Ser Phe Gln Ile Phe Gln Lys Met Arg Gly Phe Ile Thr
635 640 645

Gln Ser

<210> 30
<211> 483
<212> PRT
<213> 黑猩猩

<400> 30
Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
1 5 10 15

Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
35 40 45

Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
50 55 60

Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
65 70 75

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
80 85 90

Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu
95 100 105

Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
110 115 120

Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu
125 130 135

Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
140 145 150

Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
155 160 165

Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
170 175 180

Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile

185 190 195

Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn
200 205 210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Pro Pro Lys Lys Val Thr
215 220 225

Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val
230 235 240

Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg
245 250 255

Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly
260 265 270

Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala
275 280 285

Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala
290 295 300

Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile
305 310 315

Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln
320 325 330

Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp
335 340 345

Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe
350 355 360

Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val
365 370 375

Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu
380 385 390

Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly
395 400 405

Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser
410 415 420

Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn
425 430 435

Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro
440 445 450

Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn
455 460 465

Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr
470 475 480

Tyr Ser Pro

<210> 31
<211> 846
<212> PRT
<213> 黑猩猩

<400> 31
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Ala
1 5 10 15

Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Ile Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg

35 40 45

Val Leu Asp Gly Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro
50 55 60

Glu Tyr Asn Gln Asn Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr
65 70 75

Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val
80 85 90

Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile Asn Asn Asn Cys Thr Leu Ser Ile
95 100 105

His Pro Val His Val Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met
110 115 120

Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val
125 130 135

Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Arg Ile Gln Leu Pro Pro Lys Leu
140 145 150

Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser
155 160 165

Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Ala
170 175 180

Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Leu Thr Ser Leu Ser Thr Lys
185 190 195

Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser
200 205 210

His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Glu Leu His Asp Val Asp Gly
215 220 225

Lys Val Leu Ser Glu Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr
230 235 240

Pro Lys Leu Thr Ile Glu Val Thr Pro Asn Glu Thr Ile Val Arg
245 250 255

Lys Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Lys Val Asn Ser Ser Asn
260 265 270

Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Asp Ile Pro Leu
275 280 285

Lys Glu Gln Asn Thr Leu Met Leu Thr Leu His Glu Val Thr Lys
290 295 300

Ser Gln Thr Gly Thr Tyr Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly
305 310 315

Pro Ala Thr Ser Glu Lys Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro
320 325 330

Glu Pro Ser Arg Val Gln Ile Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly
335 340 345

Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro
350 355 360

Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Val Gln Gly Arg
365 370 375

Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile Leu Pro Trp His Ala
380 385 390

Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Ile Gly Glu
395 400 405

Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys

200817434

410 415 420

Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu Gly Asp
425 430 435

Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile Val
440 445 450

Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser
455 460 465

Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala
470 475 480

Val Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
485 490 495

Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg
500 505 510

Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Leu Val Ser
515 520 525

Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe
530 535 540

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu
545 550 555

Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys
560 565 570

Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr
575 580 585

Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser
590 595 600

Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys Thr Ala Ile Leu Thr Cys
605 610 615

Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser Tyr Ala Trp Phe Asp
620 625 630

Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg Met Leu Arg Leu
635 640 645

Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly
650 655 660

Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr Leu Thr
665 670 675

Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val Gly
680 685 690

Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Met Cys Gly Phe
695 700 705

Lys Val Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu
710 715 720

Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
725 730 735

Val Arg Arg Thr Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys
740 745 750

Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Ala Thr Leu Arg
755 760 765

Phe Pro Glu Thr Asn Thr Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Thr Ser
770 775 780

Glu Leu Gln Arg Leu Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr

200817434

785 790 795

Ser Val Leu Gln Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile
800 805 810

Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile
815 820 825

Gln Phe Gly Phe Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp
830 835 840

Tyr Val Ile Val Lys His
845

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 32
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 33
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 34
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 35
Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

<210> 36
<211> 847
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly

170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
260 265 270

Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser
275 280 285

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
290 295 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
305 310 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly
365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His
380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys
410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser
440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro
455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser
485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val
500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln

200817434

545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp
575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe
620 625 630

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg
635 640 645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu
815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 37
<211> 42
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
20 25 30

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys

35 40

<210> 38
<211> 218
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
215

<210> 39
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
20 25 30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
35 40 45

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75

Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

80 85 90

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
95 100 105

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
110 115 120

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
125 130 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
140 145 150

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
155 160 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
170 175 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
185 190 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
200 205 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
215

<210> 40
<211> 217
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
35 40 45

Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
65 70 75

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
80 85 90

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
95 100 105

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
110 115 120

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
125 130 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
140 145 150

Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
155 160 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
170 175 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys
185 190 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser

200 205 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
215

<210> 41
<211> 218
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41
Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Thr Tyr Gln Lys
200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
215

<210> 42
<211> 30
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 42
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
1 5 10 15

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 43
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 44
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 45
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 46
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47
Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 49
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 50
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 10

<210> 52
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 55

<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 59
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 62
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
5 10

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 63
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 64
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 65
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 66
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

200817434

1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 70
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser

<210> 71
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 72
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

200817434

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 76
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 78
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 10

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 80
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 81
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 82
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 83
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 86

200817434

<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

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

Tyr Cys

<210> 87
<211> 219
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 87
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 88
<211> 450
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223> 序列經合成

200817434

<400> 88

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
             20                  25                  30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
             35                  40                  45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
             50                  55                  60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
             80                  85                  90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
             95                 100                 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            110                 115                 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
            125                 130                 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
            140                 145                 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
            155                 160                 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
            170                 175                 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            185                 190                 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
            200                 205                 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
            215                 220                 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
            230                 235                 240

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

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

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

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            305                 310                 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
            320                 325                 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
            335                 340                 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
            350                 355                 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
```

200817434

365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

<210> 89
<211> 120
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 89
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 90
<211> 112
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 90
Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val

80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

<210> 91
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 91
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 92
<211> 450
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 92
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser

```
                  20                  25                  30
Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
                  35                  40                  45
Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
                  50                  55                  60
Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
                  65                  70                  75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                  80                  85                  90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
                  95                 100                 105
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                 110                 115                 120
Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
                 125                 130                 135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                 140                 145                 150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                 155                 160                 165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                 170                 175                 180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
                 185                 190                 195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
                 200                 205                 210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
                 215                 220                 225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                 245                 250                 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
                 260                 265                 270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
                 275                 280                 285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
                 290                 295                 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
                 305                 310                 315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
                 320                 325                 330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
                 335                 340                 345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
                 350                 355                 360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
                 365                 370                 375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
                 380                 385                 390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
```

395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

<210> 93
<211> 450
<212> PRT
<213>人造序列

<220>
<223>序列經合成

<400> 93
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

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

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

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

200817434

275 280 285

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly
395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

200817434

十、申請專利範圍：

1. 一種與CD22結合之抗體，其中該抗體包含(a)HVR-L1，包含選自SEQ ID NO: 9、10、19-23、32及33之胺基酸序列，及(b)至少一種、兩種、三種、四種或五種HVR，其係選自：

   (1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；

   (2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；

   (3)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；

   (4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及

   (5)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

2. 如請求項1之抗體，其包括HVR-L1包含符合SEQ ID NO:10之一致序列之胺基酸序列。

3. 如請求項2之抗體，其進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

4. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:9，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

5. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:19，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

6. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:20，

且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

7. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:21，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

8. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:22，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

9. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:23，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

10. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:32，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

11. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:33，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。

12. 如請求項1之抗體，其進一步包含至少一種框架選自VH

亞群III一致框架及VL亞群I一致框架。

13. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個重鏈可變域與選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

14. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

15. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

16. 如請求項1之抗體，其中該抗體包括一個重鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO:1、3、5及7之框架胺基酸序列。

17. 如請求項1之抗體，其中該抗體包括一個輕鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO:8、11、13及15之框架胺基酸序列。

18. 如請求項13之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

19. 如請求項13之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

20. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個重鏈與選自SEQ ID NO:88之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

200817434

21. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈與選自SEQ ID NO:87之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

22. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個重鏈具有該SEQ ID NO:88之胺基酸序列及一個輕鏈具有該SEQ ID NO:87之胺基酸序列。

23. 一種與CD22結合之抗體，其中該抗體包含一個重鏈可變域與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

24. 如請求項23之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

25. 如請求項23之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

26. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個、兩個、三個、四個、五個或六個HVR來自由融合瘤ATCC寄存編號PTA-7621(10F4.4.1)所產生之抗體。

27. 一種抗體，其包含一個、兩個、三個、四個、五個或六個HVR來自由融合瘤ATCC寄存編號PTA-7620(5E8. 1.8)所產生之抗體。

28. 如請求項1之抗體，其中該抗體經人類化。

29. 如請求項23之抗體，其中該抗體經人類化。

30. 如請求項1之抗體，其中該CD22為哺乳動物CD22。

31. 如請求項30之抗體，其中該CD22係選自齧齒動物CD22及靈長類動物CD22。

32. 如請求項31之抗體，其中該CD22為人類CD22。

200817434

33. 如請求項23之抗體，其中該CD22為哺乳動物CD22。

34. 如請求項33之抗體，其中該CD22係選自齧齒動物CD22及靈長類動物CD22。

35. 如請求項34之抗體，其中該CD22為人類CD22。

36. 一種編碼如請求項1之抗體之聚核苷酸。

37. 一種編碼如請求項23之抗體之聚核苷酸。

38. 一種載體，其包含如請求項36之聚核苷酸。

39. 一種載體，其包含如請求項37之聚核苷酸。

40. 一種宿主細胞，其包含如請求項38之載體。

41. 一種宿主細胞，其包含如請求項39之載體。

42. 如請求項40之宿主細胞，其中該宿主細胞為真核細胞。

43. 如請求項42之宿主細胞，其中該宿主細胞為CHO細胞。

44. 如請求項41之宿主細胞，其中該宿主細胞為真核細胞。

45. 如請求項44之宿主細胞，其中該宿主細胞為CHO細胞。

46. 一種製造抗CD22抗體之方法，其中該方法包含a)在適於表現編碼該抗體之聚核苷酸的條件下培養如請求項38之宿主細胞，及b)分離該抗體。

47. 一種製造抗CD22抗體之方法，其中該方法包含a)在適於表現編碼該抗體之聚核苷酸的條件下培養如請求項39之宿主細胞，及b)分離該抗體。

48. 如請求項28之抗體，其中該CD22係表現於細胞表面上。

49. 如請求項48之抗體，其中該細胞為B細胞。

50. 如請求項29之抗體，其中該CD22係表現於細胞表面上。

51. 如請求項50之抗體，其中該CD22為B細胞。

200817434

52. 如請求項1之抗體，其中該抗體與CD22之一個區域SEQ ID NO:27之胺基酸22-240內的一個抗原決定基(epitope)結合。

53. 如請求項23之抗體，其中該抗體與CD22之一個區域SEQ ID NO:27之胺基酸22-240內的一個抗原決定基結合。

54. 如請求項49之抗體，其中該B細胞係與B細胞增生性病症相關。

55. 如請求項54之抗體，其中該B細胞增生性病症為癌症。

56. 如請求項54之抗體，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hogkins lymphoma)(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性(indolent) NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞(mantle cell)淋巴瘤。

57. 如請求項51之抗體，其中該B細胞係與B細胞增生性病症相關。

58. 如請求項57之抗體，其中該B細胞增生性病症為癌症。

59. 如請求項57之抗體，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

60. 如請求項1之抗體，其中該抗體為單株抗體。

61. 如請求項60之抗體，其中該抗體為抗體片段選自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段。

62. 如請求項60之抗體，其中該抗體經人類化。

63. 如請求項60之抗體，其中該抗體為人類者。

64. 如請求項23之抗體，其中該抗體為單株抗體。

65. 如請求項64之抗體，其中該抗體為抗體片段選自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段。

66. 如請求項64之抗體，其中該抗體經人類化。

67. 如請求項64之抗體，其中該抗體為人類者。

68. 如請求項1之抗體，其中該抗體結合至與選自以下之抗體結合之相同抗原決定基：ATCC PTA-7621(10F4.4.1)；ATCC PTA-7620 (5E8.1.8)；及包含SEQ ID NO:88之重鏈序列及SEQ ID NO:87之輕鏈序列的抗體。

69. 如請求項23之抗體，其中該抗體結合至與選自以下之抗體結合之相同抗原決定基：ATCC PTA-7621(10F4.4.1)；ATCC PTA-7620 (5E8.1.8)；及包含SEQ ID NO:88之重鏈序列及SEQ ID NO:87之輕鏈序列的抗體。

70. 一種偵測一個生物樣品中CD22存在的方法，該方法包含使該生物樣品與如請求項1之抗體在容許該抗體與CD22結合之條件下接觸，及偵測在該抗體與CD22之間是否形成複合物。

71. 如請求項70之方法，其中該生物樣品係來自一個懷疑患有B細胞增生性病症之患者。

72. 如請求項71之方法，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

73. 一種偵測一個生物樣品中CD22存在的方法，該方法包含使該生物樣品與如請求項23之抗體在容許該抗體與CD22結合之條件下接觸，及偵測在該抗體與CD22之間是否形成複合物。

74. 如請求項73之方法，其中該生物樣品係來自一個懷疑患有B細胞增生性病症之患者。

75. 如請求項74之方法，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

76. 一種免疫接合物，其包含如請求項1之抗體與細胞毒性劑共價連接。

77. 一種免疫接合物，其包含如請求項23之抗體與細胞毒性劑共價連接。

78. 如請求項76之免疫接合物，其中該細胞毒性劑係選自毒素、化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素

及核分解(nucleolytic)酶。

79. 如請求項78之免疫接合物，該免疫接合物具有式Ab-(L-D)p，其中：

(a) Ab為如請求項1之抗體；

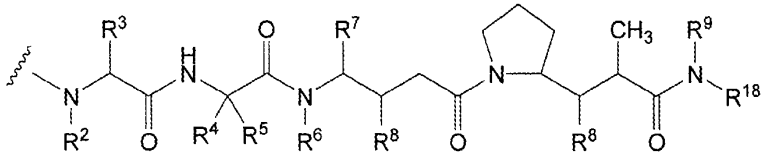
(b) L為連接子；

(c) D為藥物部分。

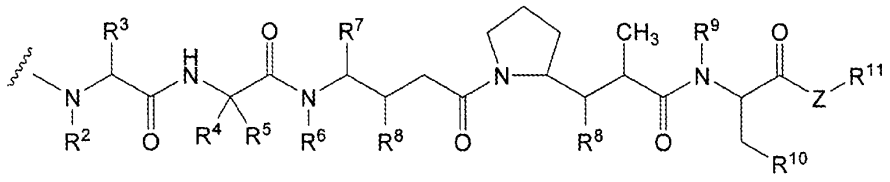
80. 如請求項79之免疫接合物，其中L係選自6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(MP)、纈胺酸-瓜胺酸(val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(ala-phe)、對-胺基苄氧羰基(PAB)、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯(SPP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯(SMCC)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(SIAB)。

81. 如請求項79之免疫接合物，其中D係選自奧利斯坦汀(auristatin)及海兔毒素(dolastatin)。

82. 如請求項81之免疫接合物，其中D為式D_E或D_F之藥物部分：



D_E



D_F

其中R^2及R^6各自為甲基，R^3及R^4各自為異丙基，

200817434

R^7為第二丁基，R^8各自獨立地選自CH_3、O-CH_3、OH及H；R^9為H；R^{10}為芳基；Z為-O-或-NH-；R^{11}為H、C_1-C_8烷基或-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3；R^{18}為-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-芳基；及

(d) p在約1至8之範圍內。

83. 如請求項76之免疫接合物，其具有活體外或活體內殺細胞活性。

84. 如請求項79之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。

85. 如請求項79之免疫接合物，其中該連接子可由蛋白酶分裂。

86. 如請求項80之免疫接合物，其中該連接子包含val-cit二肽。

87. 如請求項79之免疫接合物，其中該連接子包含對-胺基苄基單元。

88. 如請求項80之免疫接合物，其中該連接子包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基。

89. 如請求項82之免疫接合物，其中該藥物係選自MMAE及MMAF。

90. 如請求項89之免疫接合物，其中該藥物為MMAE。

91. 如請求項89之免疫接合物，其中該藥物為MMAF。

92. 如請求項77之免疫接合物，其中該細胞毒性劑係選自毒素、化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素及核分解酶。

93. 如請求項92之免疫接合物，該免疫接合物具有式Ab-(L-D)p，其中：

(a) Ab為如請求項23之抗體；

(b) L為連接子；

(c) D為藥物部分。

94. 如請求項93之免疫接合物，其中L係選自6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(MP)、纈胺酸-瓜胺酸(val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(ala-phe)、對-胺基苄氧羰基(PAB)、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯(SPP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯(SMCC)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(SIAB)。

95. 如請求項93之免疫接合物，其中該連接子L可由蛋白酶分裂。

96. 如請求項94之免疫接合物，其中L包含val-cit二肽。

97. 如請求項93之免疫接合物，其中L包含對-胺基苄基單元。

98. 如請求項97之免疫接合物，其中該對-胺基苄基單元為對-胺基苄氧羰基(PAB)。

99. 如請求項94之免疫接合物，其中L包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。

100. 如請求項94之免疫接合物，其中該連接子包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基及對-胺基苄氧羰基。

101. 如請求項79之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAE)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

102.如請求項101之免疫接合物，其中L包含val-cit。

103.如請求項101之免疫接合物，其中L包含MC。

104.如請求項101之免疫接合物，其中L包含PAB。

105.如請求項101之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。

106.如請求項93之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAE)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

107.如請求項106之免疫接合物，其中L包含val-cit。

108.如請求項106之免疫接合物，其中L包含MC。

109.如請求項106之免疫接合物，其中L包含PAB。

110.如請求項106之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。

111.如請求項79之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAF)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

112.如請求項111之免疫接合物，其中L包含val-cit。

113.如請求項111之免疫接合物，其中L包含MC。

114.如請求項111之免疫接合物，其中L包含PAB。

115.如請求項111之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。

116.如請求項93之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAF)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

117.如請求項116之免疫接合物，其中L包含val-cit。

200817434

118.如請求項116之免疫接合物，其中L包含MC。

119.如請求項116之免疫接合物，其中L包含PAB。

120.如請求項116之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。

121.如請求項79之免疫接合物，其中D為美登素類物(maytansinoid)。

122.如請求項121之免疫接合物，其中D係選自DM1、DM3及DM4。

123.如請求項121之免疫接合物，其具有活體外或活體內殺細胞活性。

124.如請求項121之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。

125.如請求項121之免疫接合物，其中該連接子L係選自4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯(SPP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯(SMCC)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(SIAB)。

126.如請求項122之免疫接合物，其中該藥物為DM1。

127.如請求項122之免疫接合物，其中L包含SPP。

128.如請求項122之免疫接合物，其中L包含SMCC。

129.如請求項122之免疫接合物，其中p為2-4。

130.如請求項122之免疫接合物，其中p為3-4。

131.如請求項93之免疫接合物，其中D為美登素類物。

132.如請求項131之免疫接合物，其中D係選自DM1、DM3及DM4。

133.如請求項131之免疫接合物，其具有活體外或活體內殺細

胞活性。

134. 如請求項131之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。

135. 如請求項131之免疫接合物，其中該連接子L係選自4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯(SPP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯(SMCC)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯(SIAB)。

136. 如請求項132之免疫接合物，其中該藥物為DM1。

137. 如請求項136之免疫接合物，其中L包含SPP。

138. 如請求項136之免疫接合物，其中L包含SMCC。

139. 如請求項136之免疫接合物，其中p為2-4。

140. 如請求項136之免疫接合物，其中p為3-4。

141. 一種醫藥組合物，其包含如請求項79之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。

142. 一種如請求項141之醫藥組合物用於製造藥物的用途，其中該藥物係用於治療B細胞增生性病症。

143. 如請求項142之用途，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

144. 一種醫藥組合物，其包含如請求項93之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。

145. 一種如請求項144之醫藥組合物用於製造藥物的用途，其中該藥物係用於治療B細胞增生性病症。

146. 如請求項145之用途，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

147. 一種醫藥組合物，其包含如請求項76、77、78及92之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。

148. 一種如請求項147之醫藥組合物用於製造藥物的用途，其中該藥物係用於治療B細胞增生性病症。

149. 如請求項148之用途，其中該B細胞增生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

150. 一種抑制B細胞增殖之活體外方法，其包含使細胞暴露於如請求項79之免疫接合物在容許該免疫接合物與CD22結合之條件下。

151. 如請求項150之方法，其中該B細胞增殖係與選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無

200817434

痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤之病症相關。

152. 如請求項150之方法，其中該B細胞為異種移植物。

153. 一種如請求項79之免疫接合物用於製造抑制B細胞增殖之藥物的用途，其中該細胞係在容許該免疫接合物與CD22結合之條件下暴露於該藥物。

154. 如請求項1之抗體，其中該抗體為經半胱胺酸改造(engineered)之抗體，其包含一或多個自由半胱胺酸胺基酸具有硫醇反應性值在0.6至1.0之範圍內，其中該經半胱胺酸改造之抗體係藉由一種包含以半胱胺酸置換親本(parent)抗體之一或多個胺基酸殘基的方法來製備。

155. 如請求項154之抗體，其中該經半胱胺酸改造之抗體與硫基反應性試劑之反應性比該親本抗體強。

156. 如請求項154之抗體，其中該方法進一步包含藉由該經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應來測定該經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性；

其中該經半胱胺酸改造之抗體與該硫醇反應性試劑之反應性比該親本抗體強。

157. 如請求項154之抗體，其中該一或多個自由半胱胺酸胺基酸殘基係位於輕鏈中。

158. 如請求項154之抗體，其中該抗體為一種包含該經半胱胺酸改造之抗體共價連接至細胞毒性劑之免疫接合物。

159. 如請求項158之抗體，其中該細胞毒性劑係選自毒素、

200817434

化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素及核分解酶。

160. 如請求項154之抗體，其中該抗體係共價連接至一個捕捉標記、偵測標記或固體支撐物。

161. 如請求項160之抗體，其中該抗體係共價連接至一個生物素捕捉標記上。

162. 如請求項160之抗體，其中該抗體係共價連接至一個螢光染料偵測標記上。

163. 如請求項162之抗體，其中該螢光染料係選自螢光素類、若丹明(rhodamine)類、丹醯基、麗絲胺(Lissamine)、花青素、藻紅蛋白、德州紅(Texas Red)及其類似物。

164. 如請求項160之抗體，其中該抗體係共價連接至一個放射性核種偵測標記上，該偵測標記選自^{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及^{213}Bi。

165. 如請求項160之抗體，其中該抗體係由一個螯合配位體共價連接至一個偵測標記上。

166. 如請求項165之抗體，其中該螯合配位體係選自DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及TETA。

167. 如請求項23之抗體，其中該抗體為經半胱胺酸改造之抗體，其包含一或多個自由半胱胺酸胺基酸具有硫醇反應性值在0.6至1.0之範圍內，其中該經半胱胺酸改造之抗體係藉由一種包含以半胱胺酸置換親本抗體之一或多個胺基酸殘基的方法來製備。

200817434

168. 如請求項167之抗體，其中該經半胱胺酸改造之抗體與硫基反應性試劑之反應性比該親本抗體強。

169. 如請求項167之抗體，其中該方法進一步包含藉由該經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應來測定該經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性；

其中該經半胱胺酸改造之抗體與該硫醇反應性試劑之反應性比該親本抗體強。

170. 如請求項167之抗體，其中該一或多個自由半胱胺酸胺基酸殘基係位於輕鏈中。

171. 如請求項167之抗體，其中該抗體為一種包含該經半胱胺酸改造之抗體共價連接至細胞毒性劑之免疫接合物。

172. 如請求項171之抗體，其中該細胞毒性劑係選自毒素、化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素及核分解酶。

173. 如請求項167之抗體，其中該抗體係共價連接至一個捕捉標記、偵測標記或固體支撐物上。

174. 如請求項173之抗體，其中該抗體係共價連接至一個生物素捕捉標記上。

175. 如請求項173之抗體，其中該抗體係共價連接至一個螢光染料偵測標記上。

176. 如請求項175之抗體，其中該螢光染料係選自螢光素類、若丹明類、丹醯基、麗絲胺、花青素、藻紅蛋白、德州紅及其類似物。

177. 如請求項173之抗體，其中該抗體係共價連接至一個放

射性核種偵測標記上，該偵測標記選自^{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及^{213}Bi。

178. 如請求項177之抗體，其中該抗體係由一個螯合配位體共價連接至一個偵測標記上。

179. 如請求項178之抗體，其中該螯合配位體係選自DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及TETA。

180. 如請求項93之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。

181. 如請求項1之抗體，其包含一種白蛋白結合肽。

182. 如請求項181之抗體，其中該白蛋白結合肽係選自SEQ ID NO:42-46。

183. 如請求項23之抗體，其包含一種白蛋白結合肽。

184. 如請求項183之抗體，其中該白蛋白結合肽係選自SEQ ID NO:42-46。

185. 如請求項1之抗體，其中該抗體進一步包含一個半胱胺酸在一或多個選自根據Kabat編號協定之輕鏈之15、43、110、144、168及205位置及根據EU編號協定之重鏈之41、88、115、118、120、171、172、282、375及400位置。

186. 如請求項185之抗體，其中半胱胺酸在該輕鏈之位置205。

187. 如請求項185之抗體，其中半胱胺酸在該重鏈之位置118。

188. 如請求項185之抗體，其中半胱胺酸在該重鏈之位置400。

189. 如請求項185之抗體，其中該抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗體及人類化抗體。

190. 如請求項185之抗體，其為抗體片段。

191. 如請求項190之抗體，其中該抗體片段為Fab片段。

192. 如請求項185之抗體，其係選自嵌合抗體、人類抗體或人類化抗體。

193. 如請求項185之抗體，其係於細菌中產生。

194. 如請求項185之抗體，其係於CHO細胞中產生。

195. 一種用於測定一個懷疑含有CD22蛋白之樣品中該CD22蛋白存在的方法，該方法包含使該樣品暴露於如請求項185之抗體中及測定該抗體與該樣品中該CD22蛋白之結合，其中該抗體與該蛋白之結合指示該樣品中存在該蛋白。

196. 如請求項195之方法，其中該樣品包含一種懷疑表現該CD22蛋白之細胞。

197. 如請求項195之方法，其中該細胞為B細胞。

198. 如請求項195之方法，其中該抗體係與一個選自螢光染料、放射性同位素、生物素或金屬錯合配位體之標記共價連接。

199. 一種醫藥調配物，其包含如請求項185之抗CD22抗體，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

200. 如請求項185之抗體，其中該抗體係與奧利斯坦汀或美

200817434

登素類物藥物部分共價連接，藉以形成抗體-藥物接合物。

201. 一種抗體-藥物接合物，其包含如請求項1之抗體(Ab)，及奧利斯坦汀或美登素類物藥物部分(D)，其中該經半胱胺酸改造之抗體係藉由連接子部分(L)經由一或多個自由半胱胺酸胺基酸與D連接；該接合物具有式I：

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

其中p為1、2、3或4。

202. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中p為2。

203. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中L具有式：

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

其中：

A為一個伸展(strecher)單元，與該經半胱胺酸改造之抗體(Ab)之一個半胱胺酸硫醇共價連接；

a為0或1；

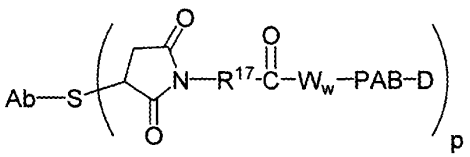
W各自獨立地為一個胺基酸單元；

w為一個在0至12之範圍內之整數；

Y為一個間隔基單元，與該藥物部分共價連接；及

y為0、1或2。

204. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其具有式：



其中PAB為對-胺基苄基胺甲醯基，R^{17}為選自以下之

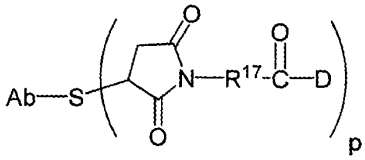
200817434

二價基團：$(CH_2)_r$、C_3-C_8碳環基、O-$(CH_2)_r$、伸芳基、$(CH_2)_r$-伸芳基、-伸芳基-$(CH_2)_r$-、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8碳環基)、(C_3-C_8碳環基)-$(CH_2)_r$、C_3-C_8雜環基、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8雜環基)、-(C_3-C_8雜環基)-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_r$C(O)$NR^b(CH_2)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、-$(CH_2)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)$NR^b(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-及-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)$NR^b(CH_2)_r$-；其中R^b為H、C_1-C_6烷基、苯基或苄基；r獨立地為一個在1至10之範圍內之整數。

205. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其中W_w為纈胺酸-瓜胺酸。

206. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其中R^{17}為$(CH_2)_5$或$(CH_2)_2$。

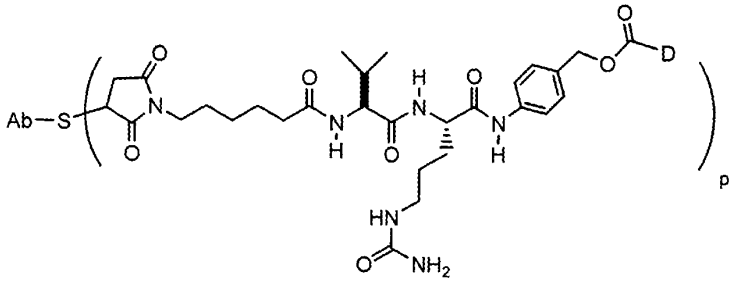
207. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其具有式：



。

208. 如請求項207之抗體-藥物接合物，其中R^{17}為$(CH_2)_5$或$(CH_2)_2$。

209. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其具有式：

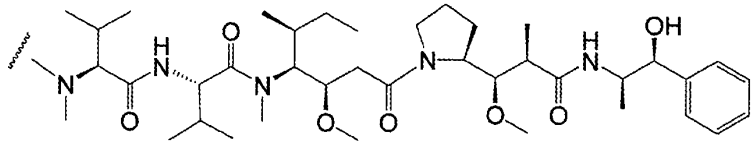


。

200817434

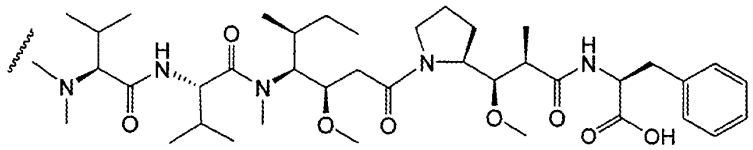
210. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中L為SMCC、SPP或BMPEO。

211. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中D為MMAE，其具有以下結構：



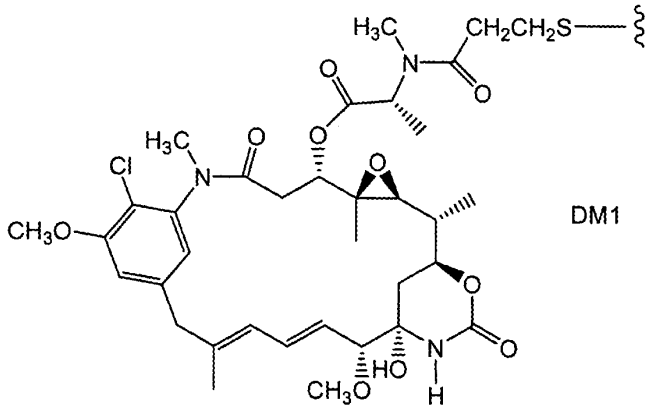
其中波浪線指示與該連接子L之連接位點。

212. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中D為MMAF，其具有以下結構：



其中波浪線指示與該連接子L之連接位點。

213. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中D為DM1，其具有以下結構：



DM1

其中波浪線指示與該連接子L之連接位點。

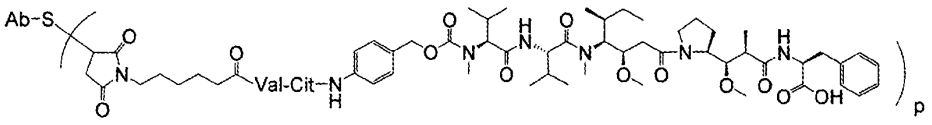
214. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中該親本抗CD22抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗

200817434

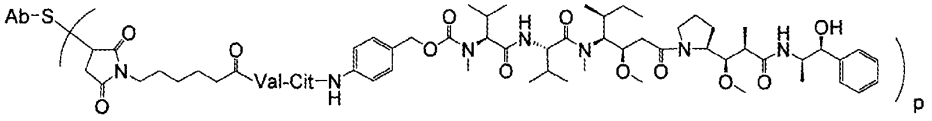
體、人類化抗體、及抗體片段。

215. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中該抗體片段為Fab片段。

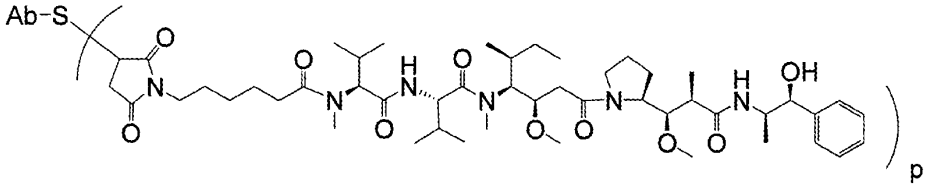
216. 一種抗體-藥物接合物，其選自以下結構：



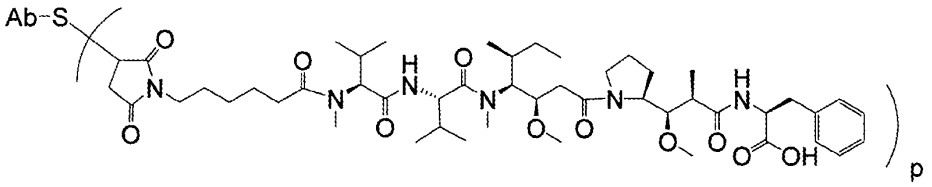
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

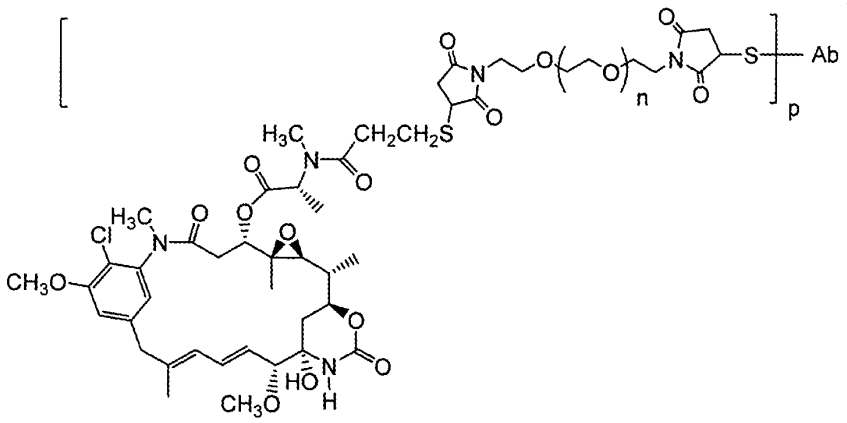


Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

200817434



Ab-BMPEO-DM1

其中Val為纈胺酸；Cit為瓜胺酸；p為1、2、3或4；Ab為如請求項185之抗CD22抗體。

217. 如請求項200之抗體，其中該奧利斯坦汀為MMAE或MMAF。

218. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中L為MC-val-cit-PAB或MC。

219. 一種用於偵測B細胞之檢定，其包含：

(a) 使細胞暴露於如請求項202之抗體-藥物接合物中；及

(b) 測定該抗體-藥物接合物與該等細胞結合之程度。

220. 一種用於抑制細胞增殖的方法，其包含以如請求項201之抗體-藥物接合物處理細胞培養基中之哺乳動物癌性B細胞，藉以抑制該等癌性B細胞之增殖。

221. 一種醫藥調配物，其包含如請求項201之抗體-藥物接合物，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

222. 一種如請求項221之醫藥調配物用於製造藥物的用途，其中該藥物係用於治療癌症。

200817434

223. 如請求項222之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

224. 如請求項222之用途，其中患者係經投予一種細胞毒性劑與該抗體-藥物接合物化合物組合。

225. 一種製造物品，其包含

如請求項221之醫藥調配物；

一個容器；及

一封裝插頁或標籤，其指示該化合物可用於治療特徵為CD22多肽過度表現的癌症。

226. 如請求項225之製造物品，其中該癌症係選自由以下組成之群：淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

227. 一種用於製造抗體-藥物接合物化合物之方法，該化合物包含如請求項185之抗CD22抗體(Ab)及奧利斯坦汀或美登素類物藥物部分(D)，其中該抗體係藉由連接子部分(L)經由一或多個經改造之半胱胺酸胺基酸與D連接；該化合物具有式I：

200817434

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

其中p為1、2、3或4；該方法包含以下步驟：

(a) 使該抗體之一個經改造之半胱胺酸基團與一種連接子試劑反應以形成抗體-連接子中間物Ab-L；及

(b) 使Ab-L與一種活化之藥物部分D反應；藉以形成該抗體-藥物接合物；

或包含以下步驟：

(c) 使一種藥物部分之一個親核基團與一種連接子試劑反應以形成藥物-連接子中間物D-L；及

(d) 使D-L與該抗體之一個經改造之半胱胺酸基團反應；藉以形成該抗體-藥物接合物。

228. 如請求項227之方法，其進一步包含在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中表現該抗體之步驟。

229. 如請求項228之方法，其進一步包含以一種還原劑處理該表現抗體之步驟。

230. 如請求項229之方法，其中該還原劑係選自TCEP及DTT。

231. 如請求項229之方法，其進一步包含在以該還原劑處理後，以一種氧化劑處理該表現抗體之步驟。

232. 如請求項231之方法，其中該氧化劑係選自硫酸銅、脫氫抗壞血酸、及空氣。

233. 如請求項185之抗體，其中該抗體包含一個重鏈序列選自SEQ ID NO:88、92或93之任一者。

234. 如請求項185之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈序列選

自SEQ ID NO:87或91。

235. 如請求項185之抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:87之輕鏈序列及SEQ ID NO:92之重鏈序列。

236. 如請求項185之抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:87之輕鏈序列及SEQ ID NO:93之重鏈序列。

237. 如請求項185之抗體，其中該抗體包含SEQ ID NO:91之輕鏈序列及SEQ ID NO:88之重鏈序列。

200817434

十一、圖式：

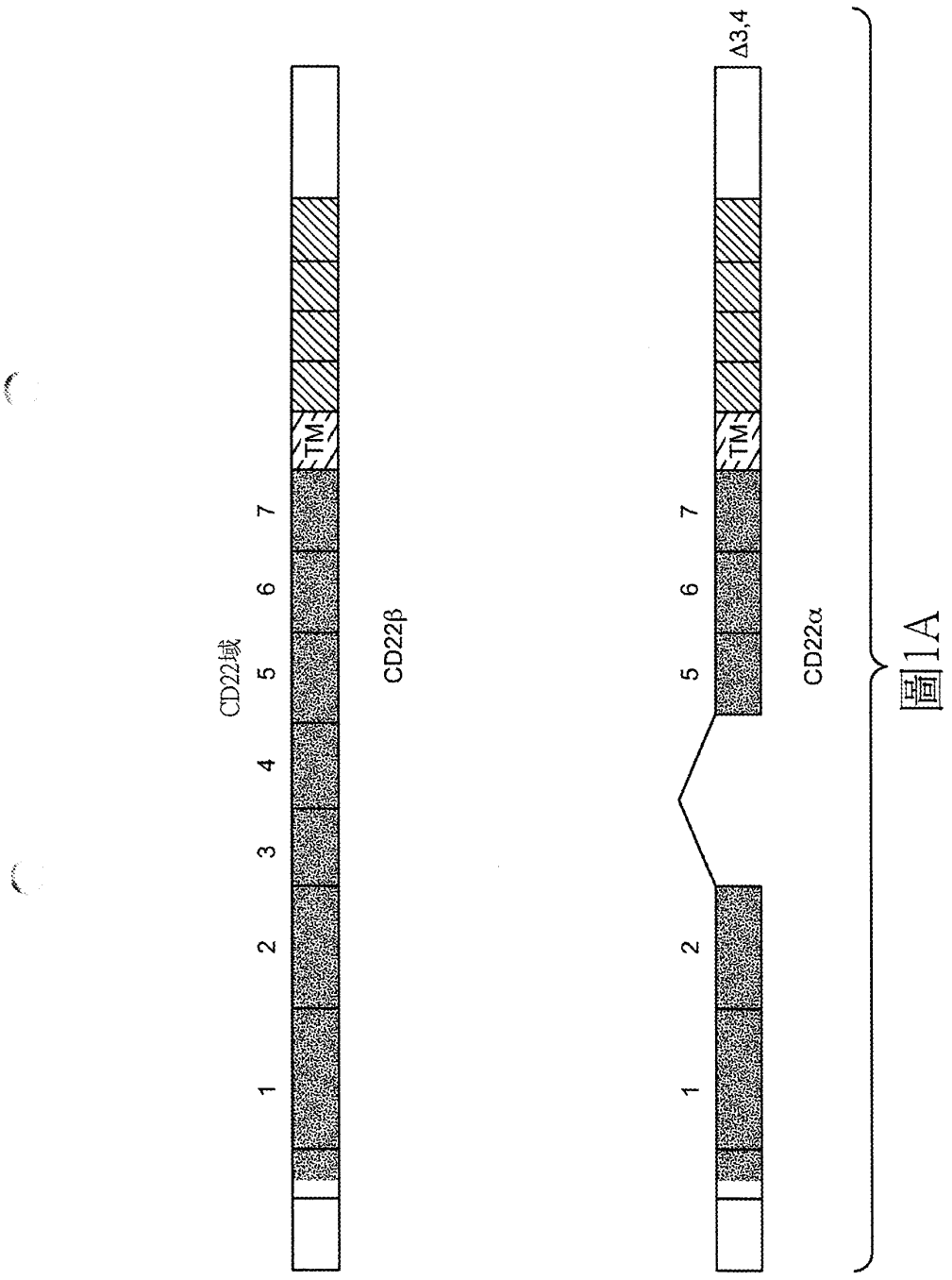


圖1A

200817434

```
  1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlt cllnfscygy piqlqwlleg
181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 tpkleikvtp sdaivregds vtmtcevsss npeyttvswl kdgtslkkqn tftlnlrevt
301 kdqsgkyccq vsndvgpgrs eevflqvqya pepstvqilh spavegsqve flcmslanpl
361 ptnytwyhng kemqgrteek vhipkilpwh agtyscvaen ilgtgqrgpg aeldvqyppk
421 kvttviqnpm piregdtvtl scnynssnps vtryewkphg aweepslgvl kiqnvgwdnt
481 tiacarcnsw cswaspvaln vqyaprdvrv rkikplseih sgnsvslqcd fssshpkevq
541 ffweknqrll gkesqlnfds ispedagsys cwvnnsiqqt askawtlevl yaprrlrvsm
601 spgdqvmegk satltcesda nppvshytwf dwnnqslphh sqklrlepvk vqhsgaywcq
661 gtnsvgkgrs plstltvyys petigrrvav glgsclaili laicglklqr rwkrtqsqqg
721 lqenssgqsf fvrnkkvrra plsegphslg cynpmmedgi syttlrfpem niprtgdaes
781 semqrpprtc ddtvtysalh krqvgdyenv ipdfpedegi hyseliqfgv gerpqaqenv
841 dyvilkh  (SEQ ID NO: 27)
```

圖1B

```
  1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlt cllnfscygy piqlqwlleg
181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 ppkkvttviq npmpiregdt vtlscnynss npsvtryewk phgaweepsl gvlkiqnvgw
301 dnttiacaac nswcswaspv alnvqyaprd vrvrkikpls eihsgnsvsl qcdfssshpk
361 evqffwekng rllgkesqln fdsispedag syscwvnnsi gqtaskawtl evlyaprrlr
421 vsmspgdqvm egksatltce sdanppvshy twfdwnnqsl pyhsqklrle pvkvqhsgay
481 wcqgtnsvgk grsplstltv yyspetigrr vavglgscla ililaicglk lqrrwkrtqs
541 qqglqenssg qsffvrnkkv rraplsegph slgcynpmme dgisyttlrf pemniprtgd
601 aessemqrpp pdcddtvtys alhkrqvgtm rtsfqifqkm rgfitqs  (SEQ ID NO:29)
```

圖1C

```
MHLLGPWLLLLEYLAFSDS SKWNIEHPGTIYAWEGACIWVPCTYRVLDGA
LETFILFHNPEYNQNMSKFEGTRLYESTKDGKVPSGQKRVQFLGNKINNNC
TLSIHPVHVNDSGQLGLRMVSKTEKWMERIHLNVSERPFPPRIQLPPKLQE
SQEVTLTCLLNFSCYGYQIQLQWLLEGAPMRQAAVTLTSLSTKSVFTRSEL
KFSPQWSHHGKIVTCELHDVDGKVLSEDTVQLNVKHTPKLTIEVTPNETIV
RKGDSVTMTCKVNSSNPEYTTVSWLKDDIPLKEQNTLMLTLHEVTKSQTGT
YCCRVSNDVGPATSEKVFLQVQYAPEPSRVQISQSPAVEGSEVNFLCISPA
NPLPTNYTWYHNGKEVQGRTEKQFQIQKILPWHAGTYSCVAENILGIGERG
PGTELDVQYPPKKVTMVIENPTPIREGDTVTLSCNYSSSNPIVNHYEWRPR
GAWEEPSLGVLKIQNIGWNNTAVACAACNNWCSWASPVTLNVLYAPRGVRV
RKIKPLSEIHSGNLVSLQCDFSSSHPKEVQFFWEKNGSLLGKESQLNFDSI
SPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSQGNQVMEGKTA
ILTCESDANPPVYSYAWFDWNNQSLPYSGRMLRLEPVKVQHSGAYWCQGTN
RVGKGHSPLITLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCLAILILAMCGFKVQRRWKR
TQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRTPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYATL
RFPETNTPRTGDAETSELQRLPPDCDDTVTYSVLQKRQVGDYENVIPDFPE
DEGIHYSELIQFGFGERPQAQENVDYVIVKH  (SEQ ID NO:31)
```

圖1D

200817434

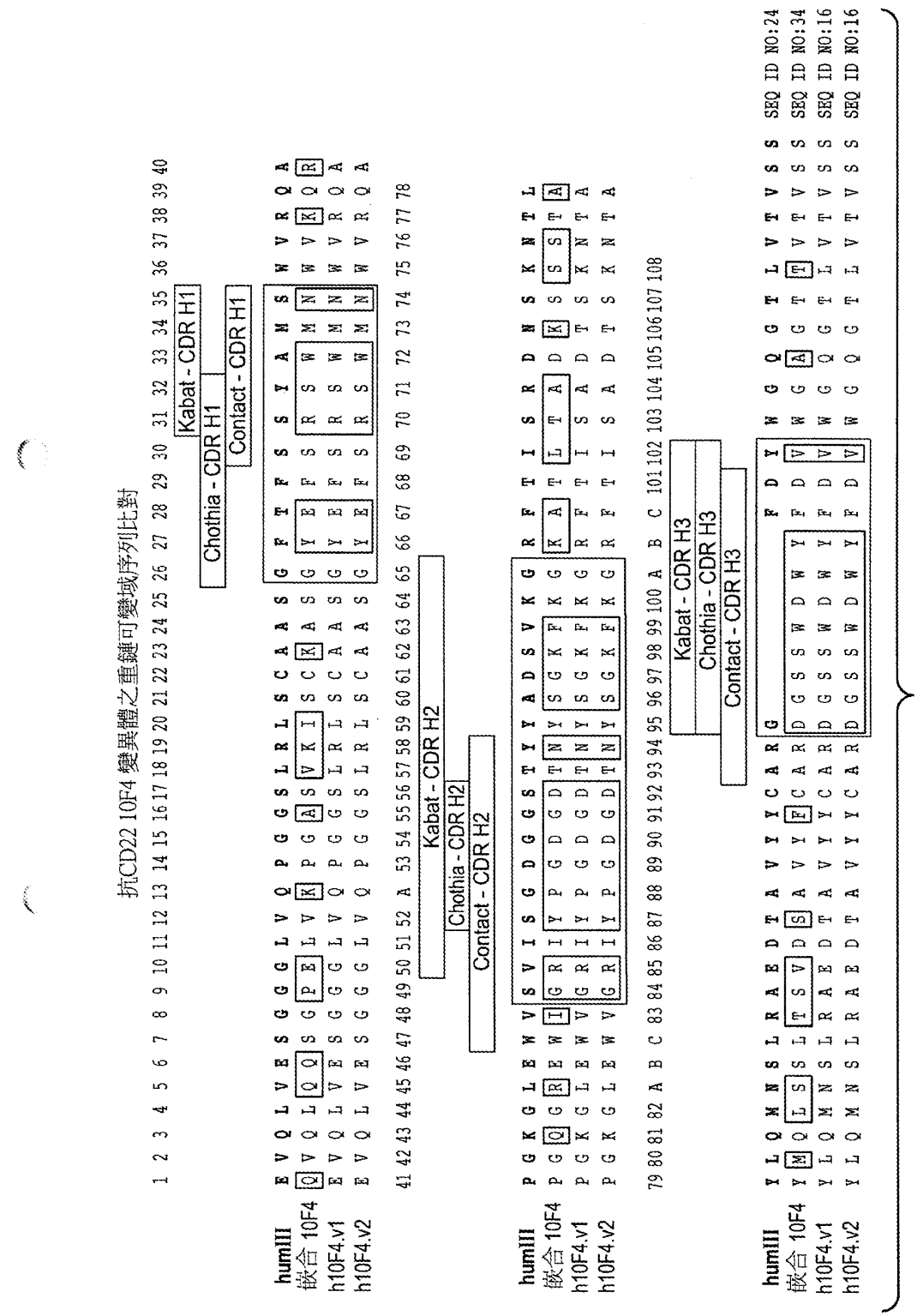


圖2A

200817434

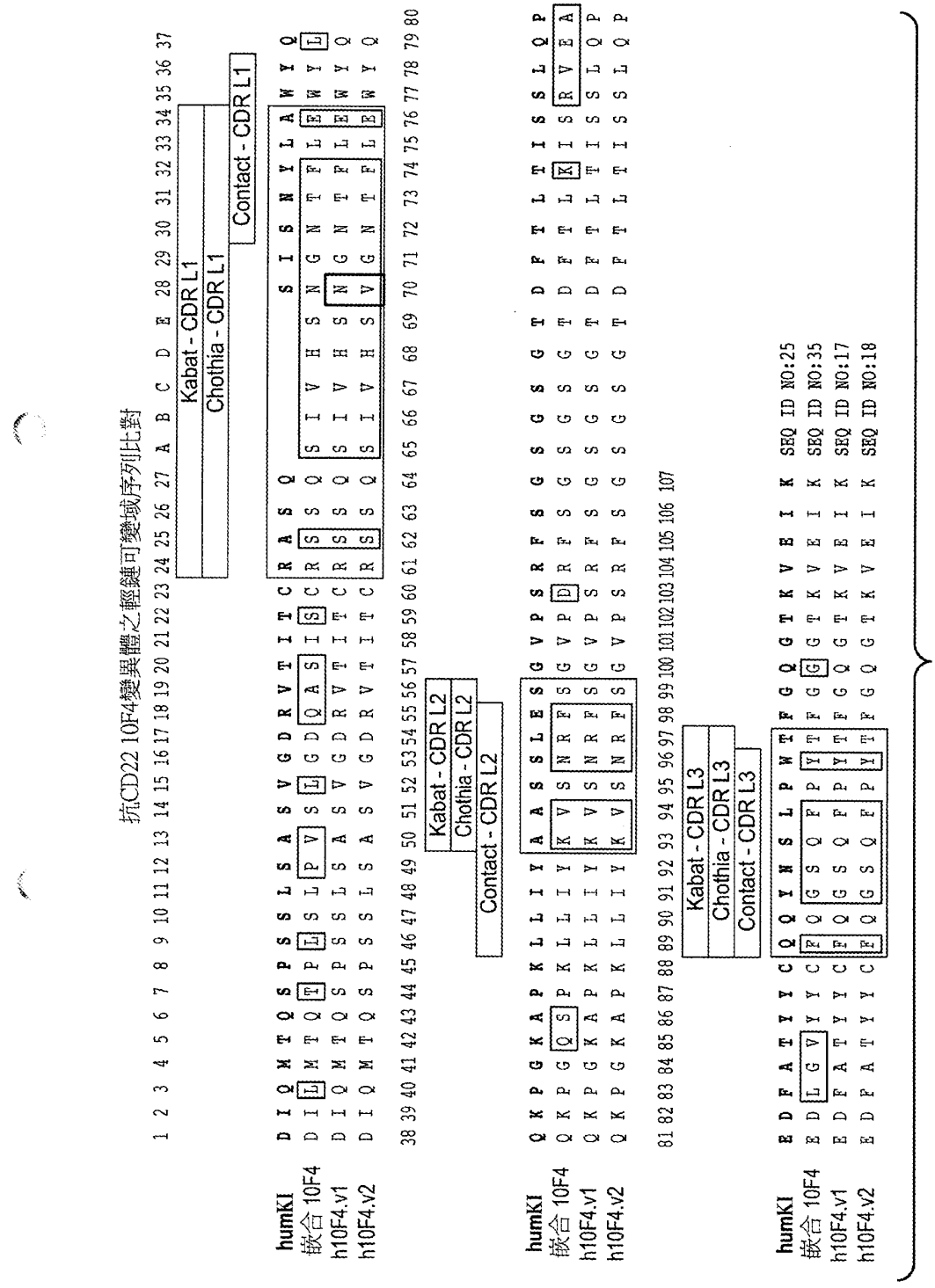


圖2B

200817434

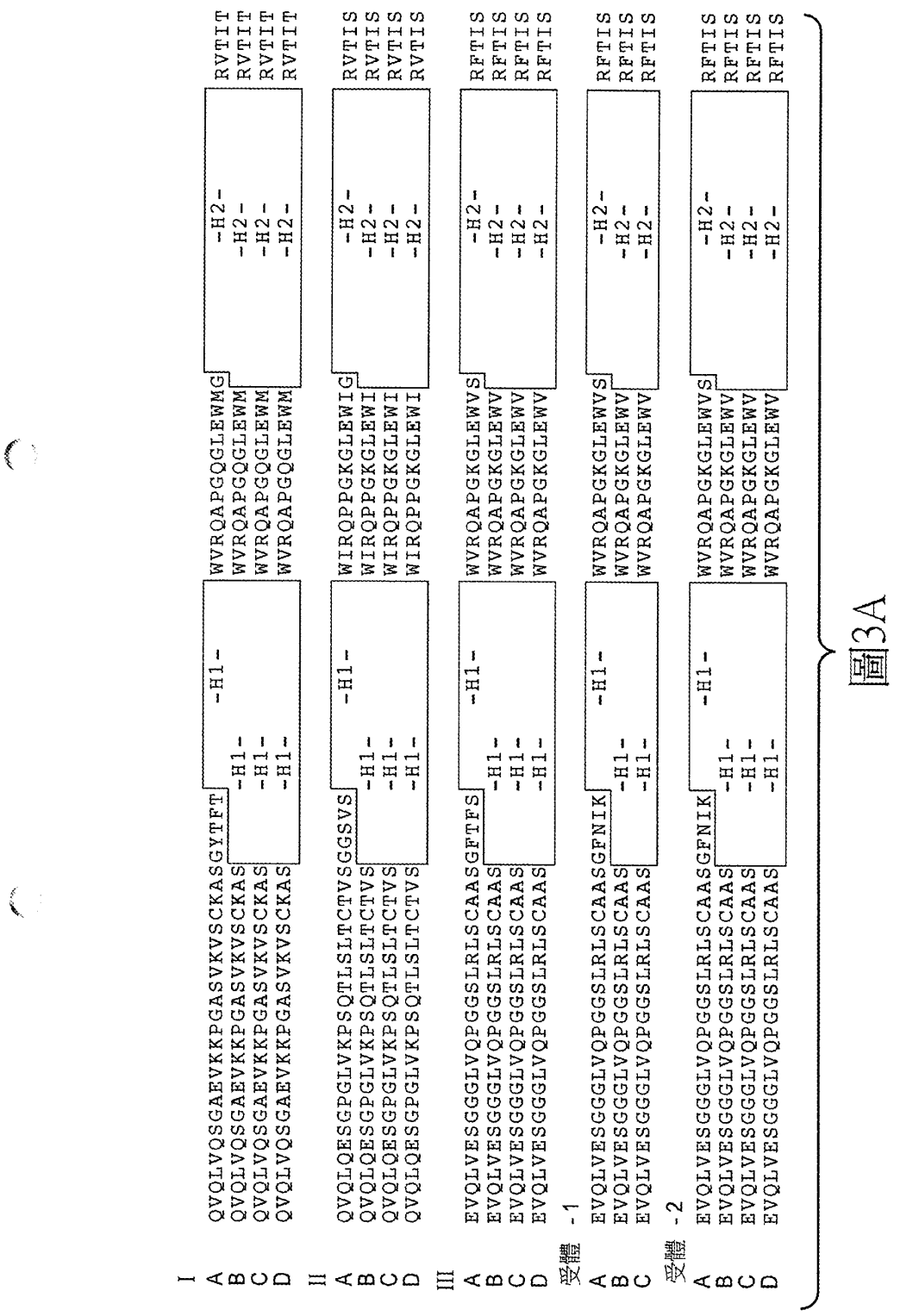


圖3A

200817434

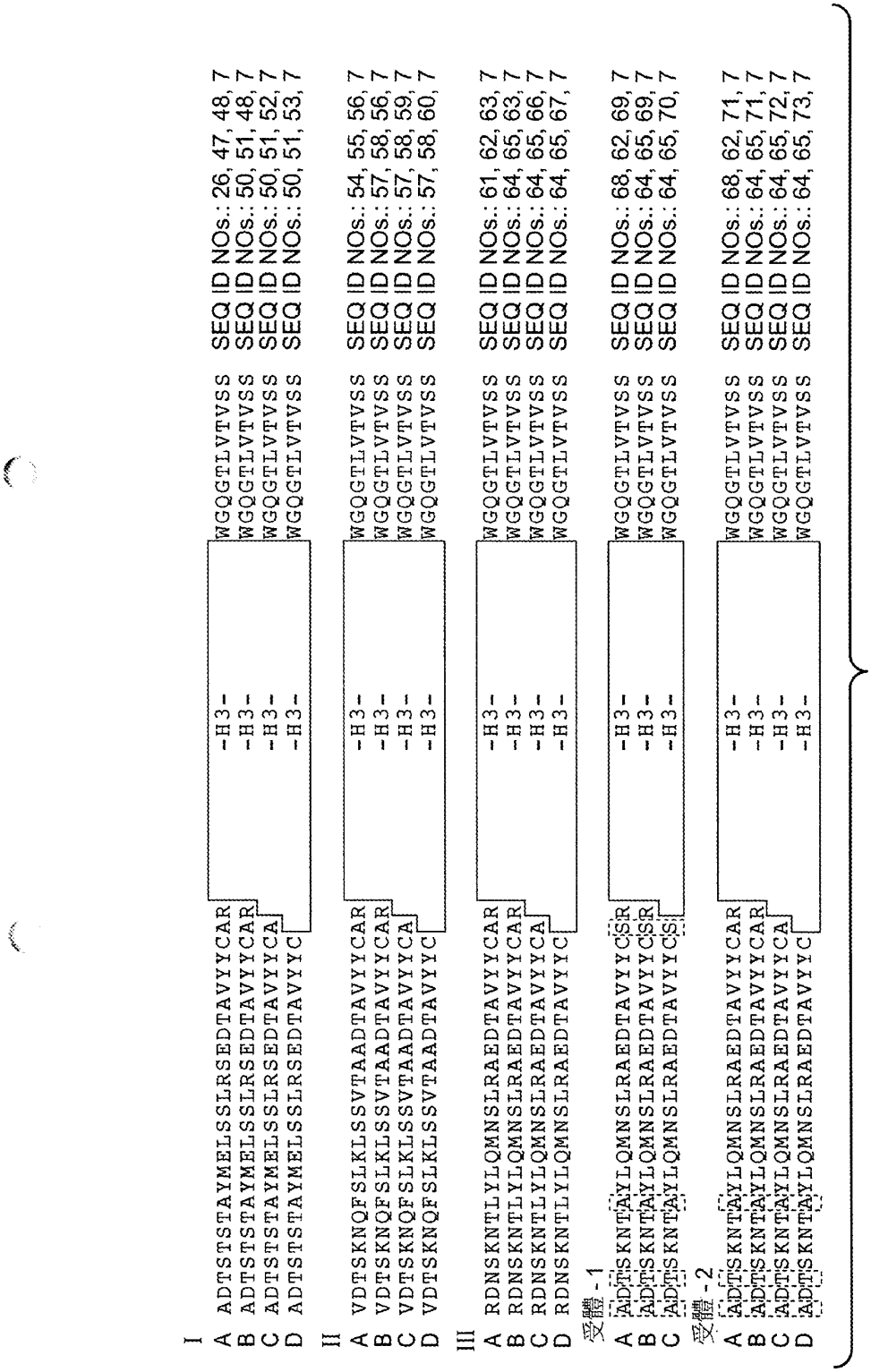


圖3B

200817434

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA

kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP

kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

圖4A

kv1 EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 74, 75, 76, 77

kv1 EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 74, 78, 76, 77

kv2 EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 49, 79, 80, 77

kv3 EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 81, 82, 83, 77

kv4 EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 84, 85, 86, 77

圖4B

```
          230       240       250       260       270
humIgG1     PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
humIgG2     PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
humIgG3     PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV
humIgG4     PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
               ****                                  *     * *

          280       290       300       310       320
humIgG1     DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG2     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
humIgG3     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG4     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
                           *   *         *                   *

          330       340       350       360       370
humIgG1     APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
                                          D L
humIgG2     APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG3     APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG4     SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
            **        *                 *

          380       390       400       410       420
humIgG1     EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
humIgG2     EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
humIgG3     EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH
humIgG4     EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
                 *        *    *            *           *   *

          430       440
humIgG1     EALHNHYTQKSLSLSPGK  SEQ ID NO.: 38
humIgG2     EALHNHYTQKSLSLSPGK  SEQ ID NO.: 39
humIgG3     EALHNRFTQKSLSLSPGK  SEQ ID NO.: 40
humIgG4     EALHNHYTQKSLSLSLGK  SEQ ID NO.: 41
                 **        *
```

Kappa輕鏈恆定區一致序列:
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 37

圖5A

抗CD22 h10F4v2輕鏈
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:87)

抗CD22 h10F4v2重鏈
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)

圖5B

200817434

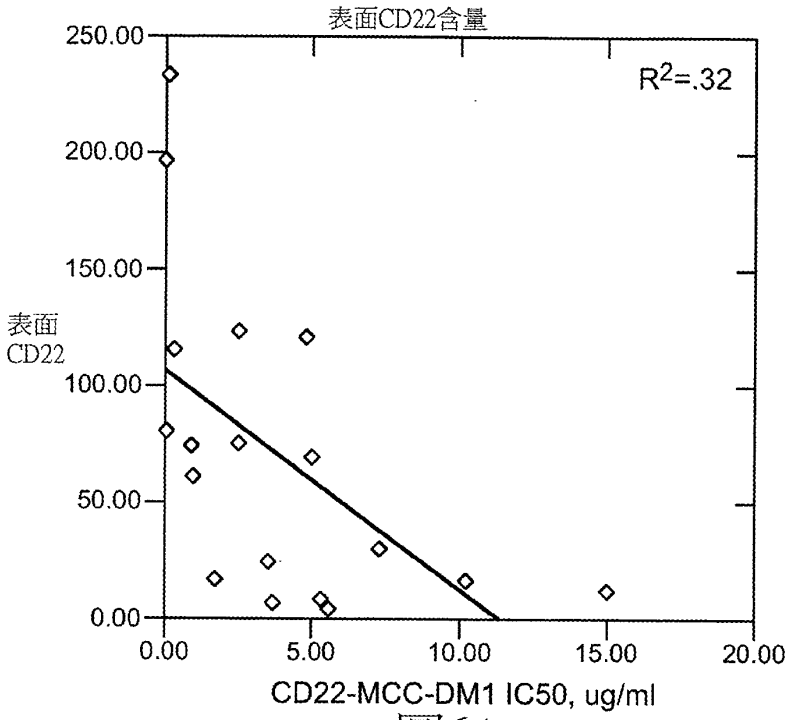


圖6A

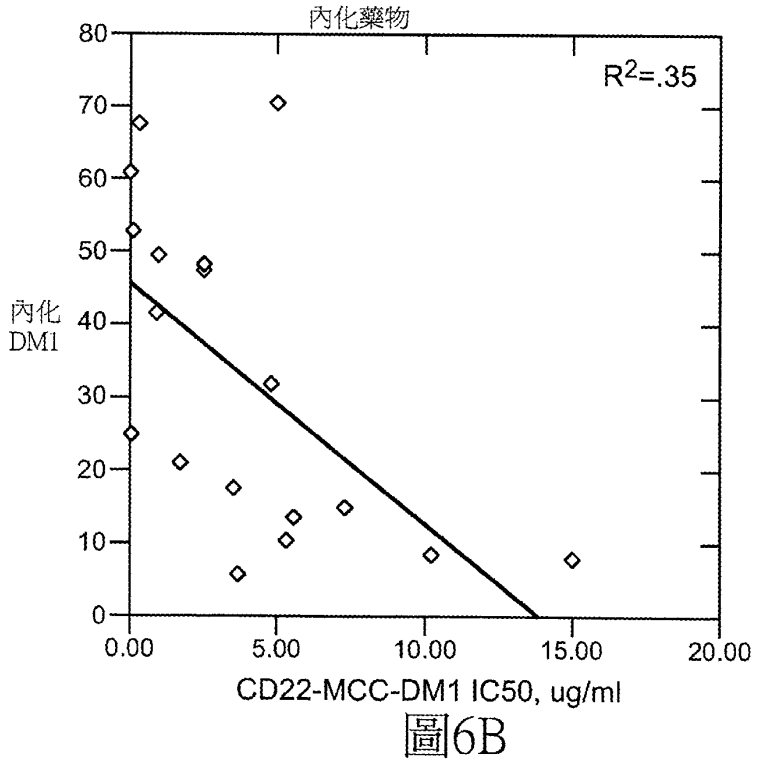


圖6B

200817434

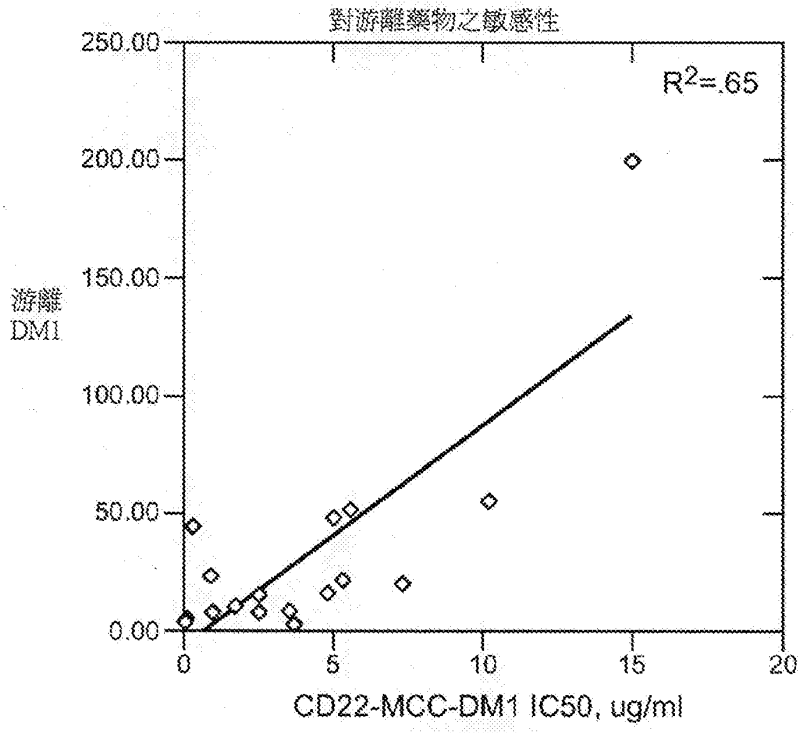


圖6C

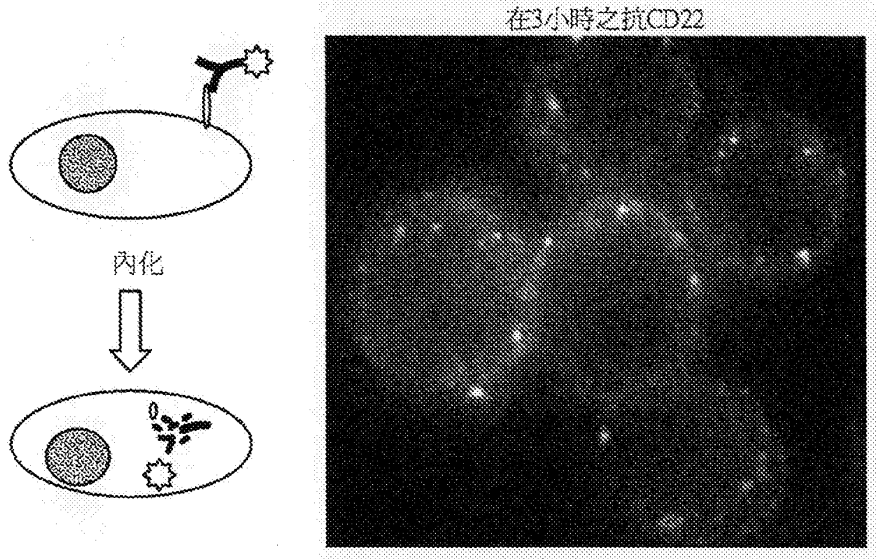


圖6D

200817434

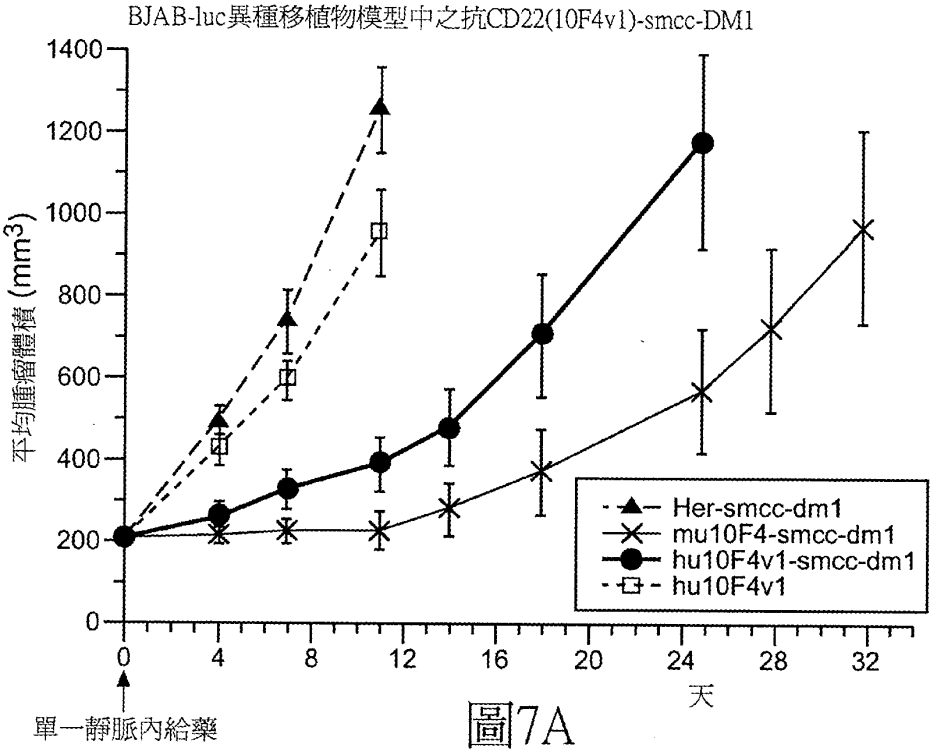


圖7A

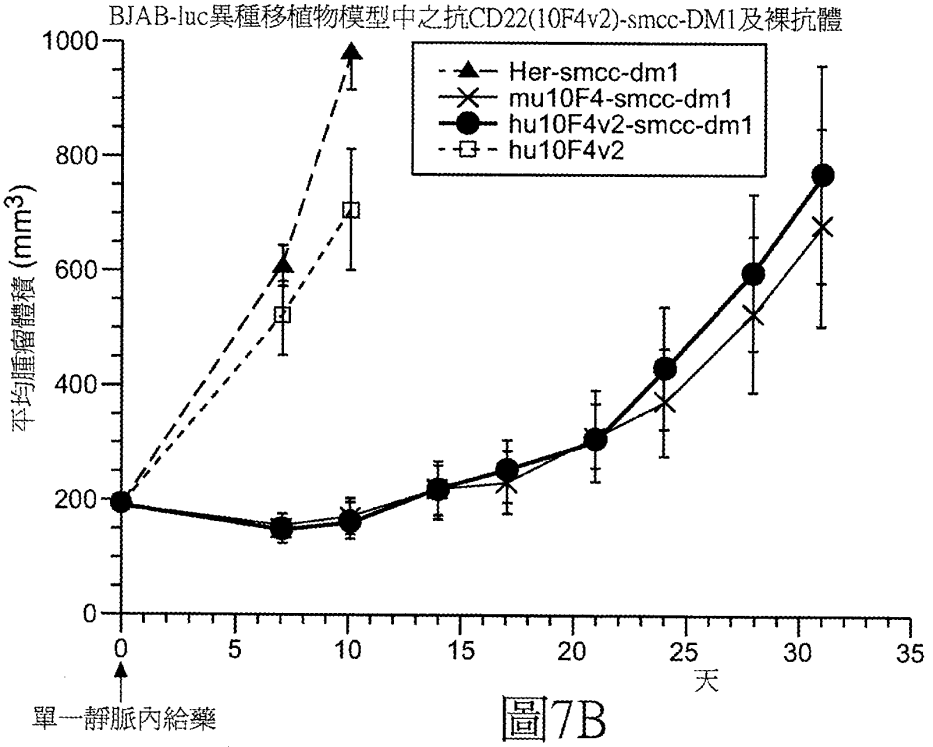


圖7B

200817434

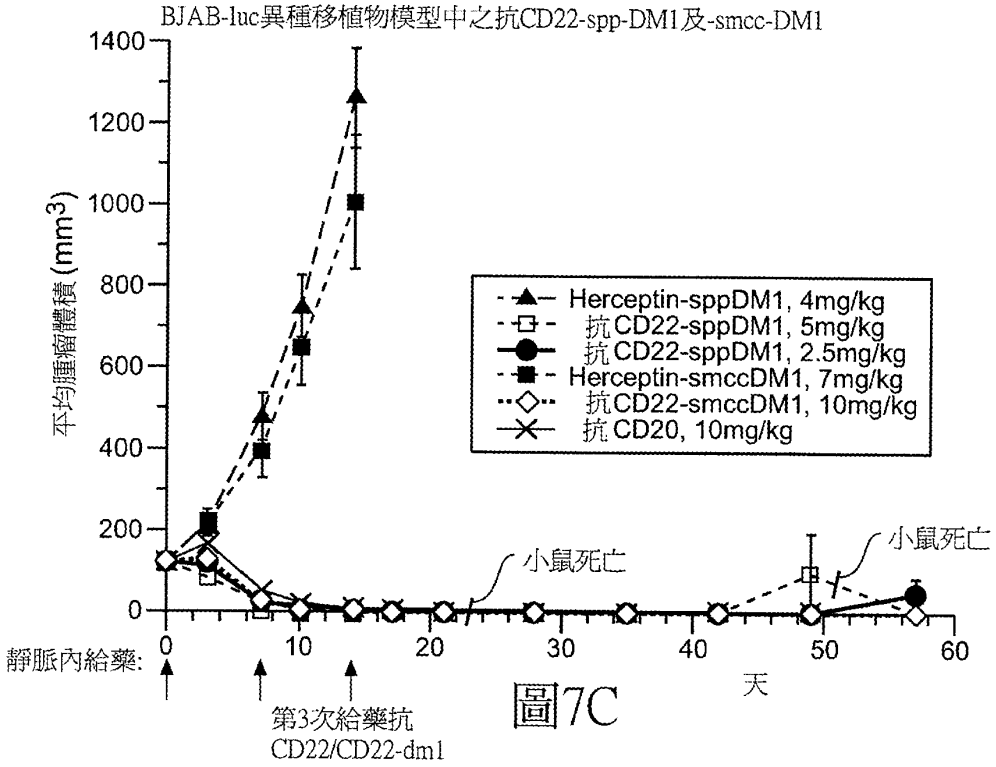


圖7C

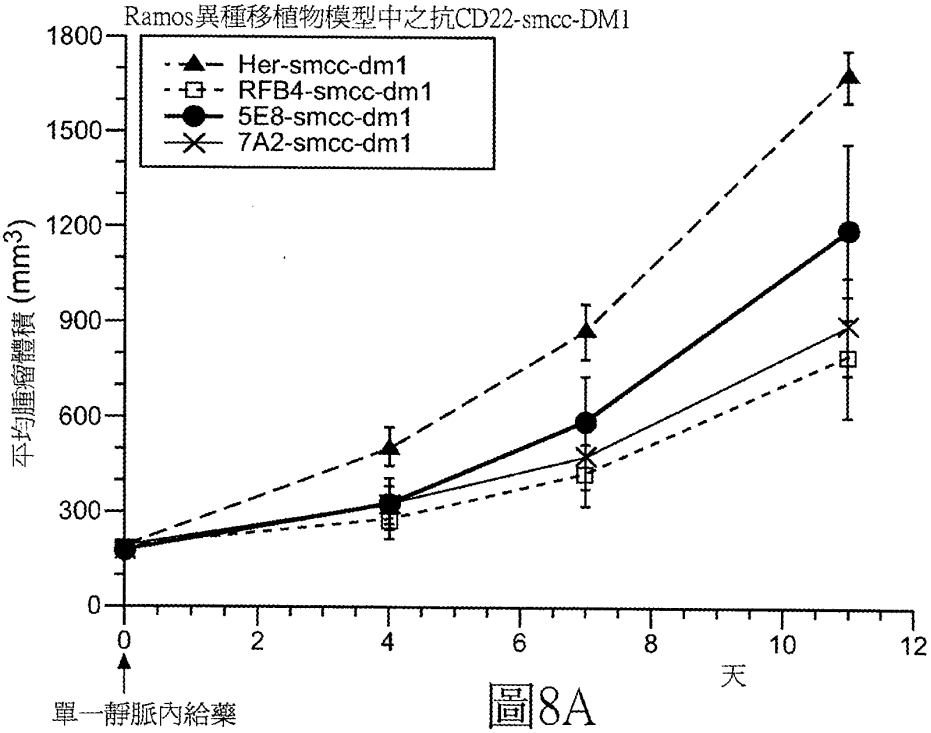


圖8A

200817434

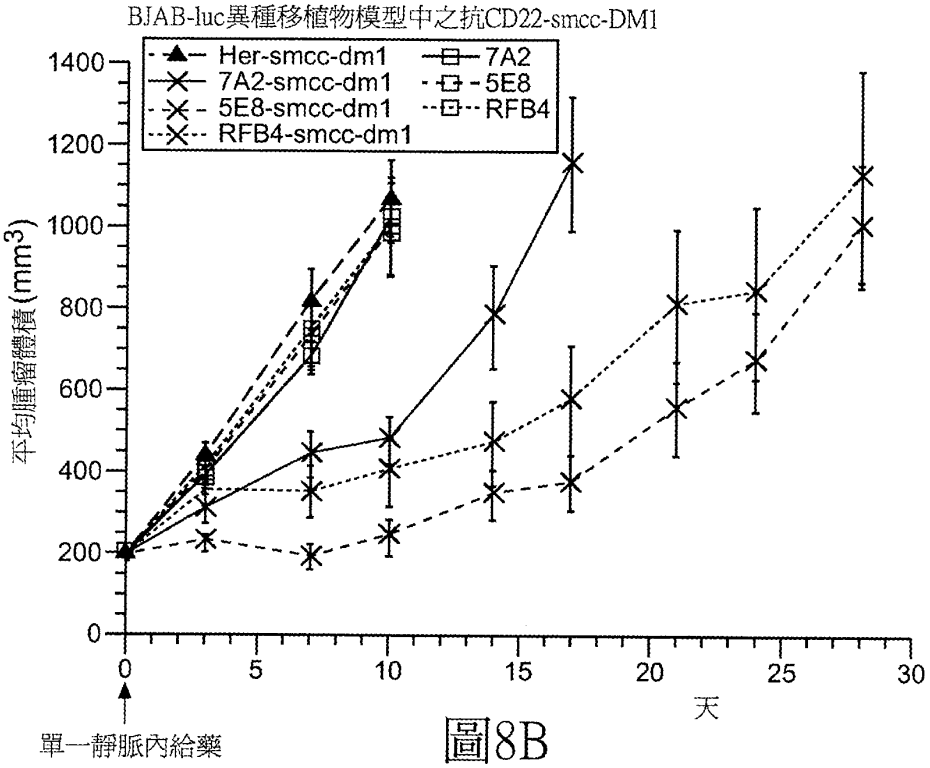


圖8B

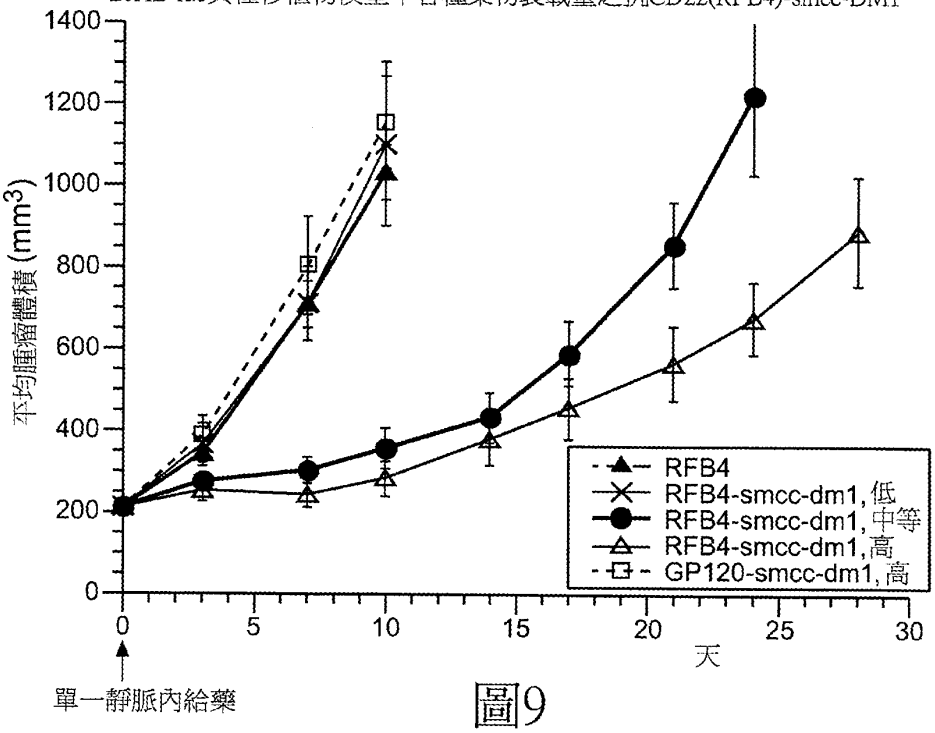


圖9

200817434

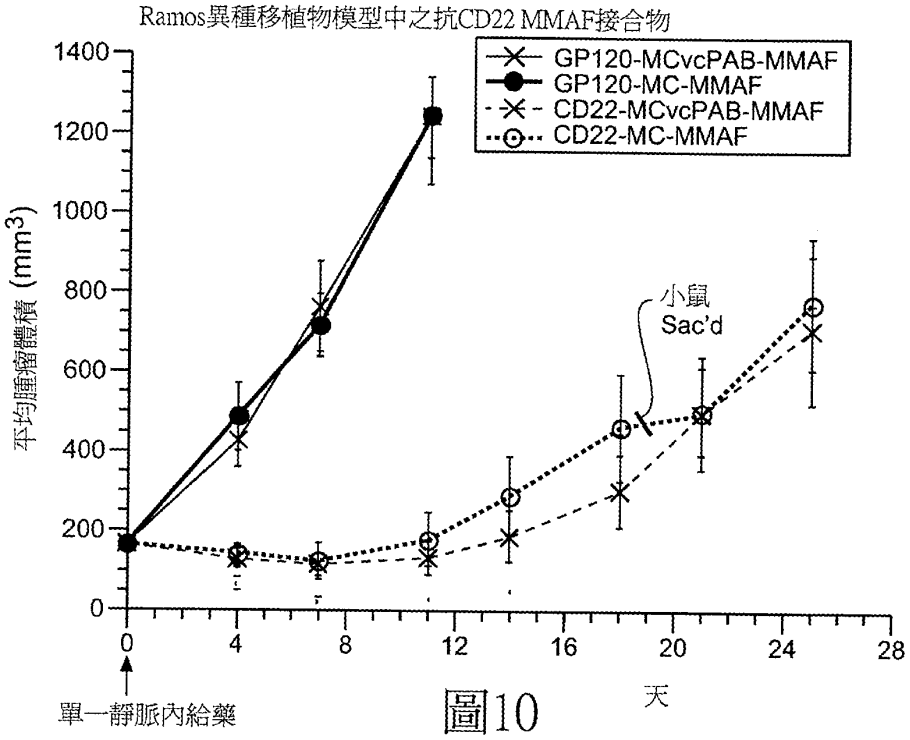


圖10

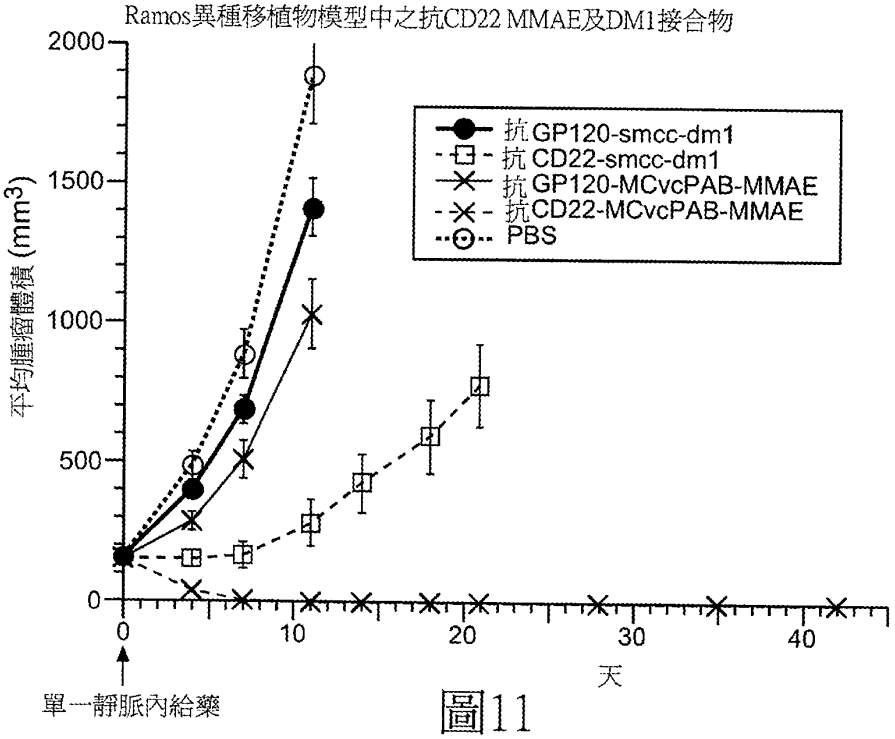


圖11

200817434

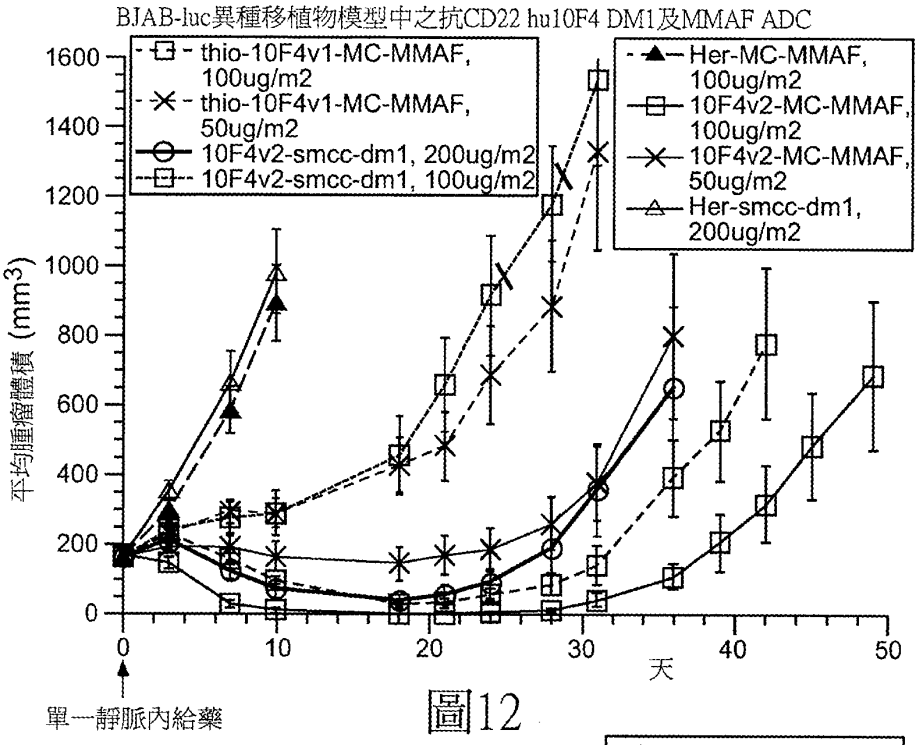


圖12

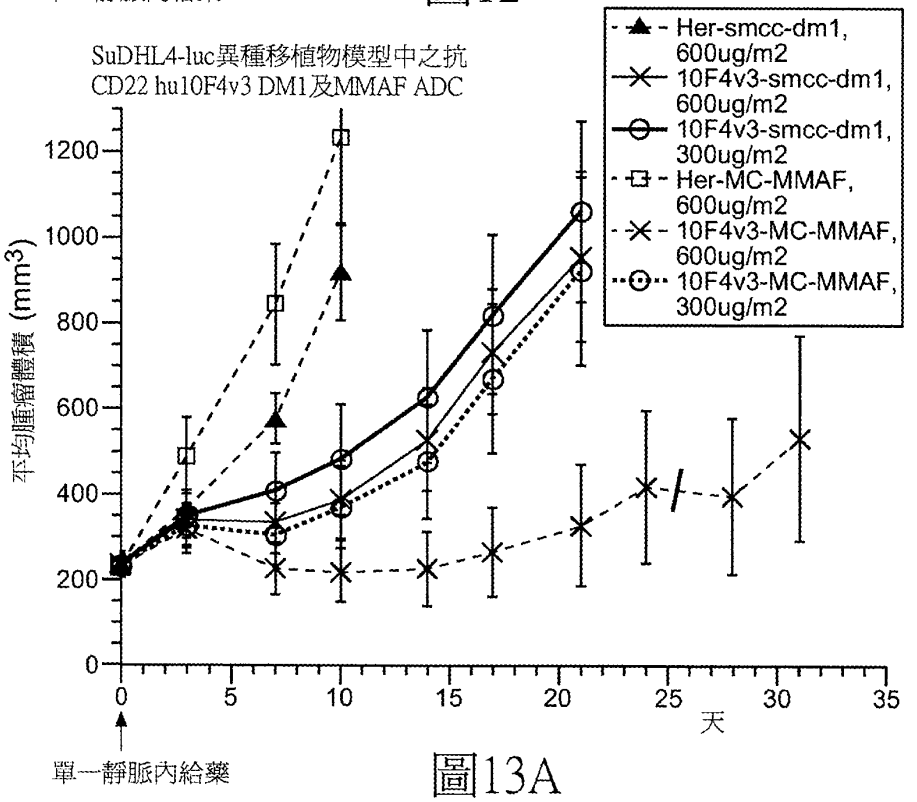


圖13A

200817434

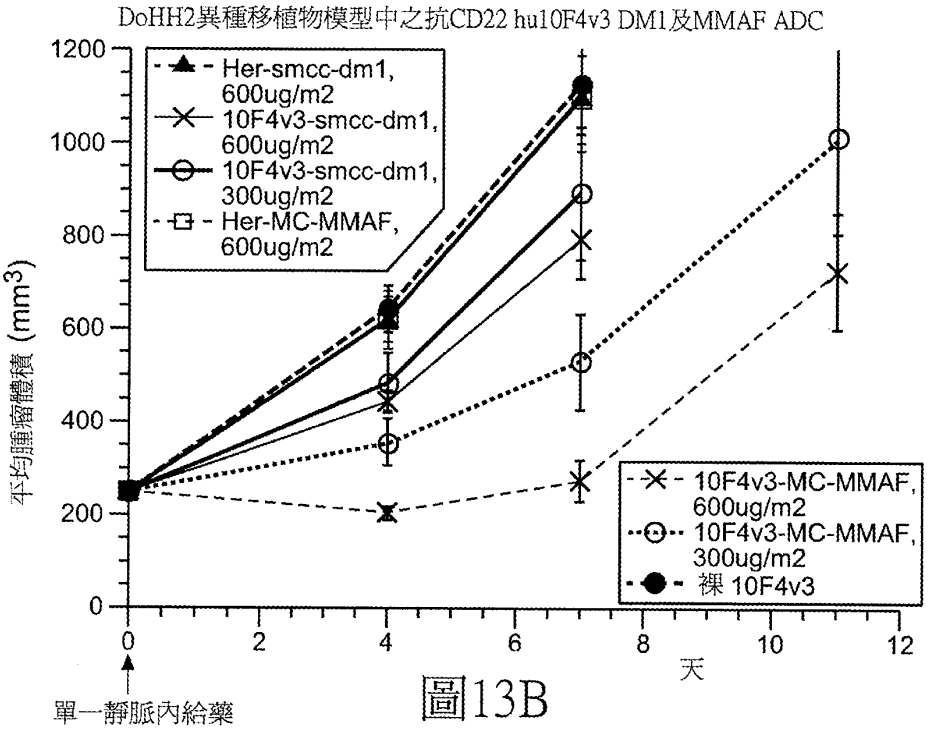


圖13B

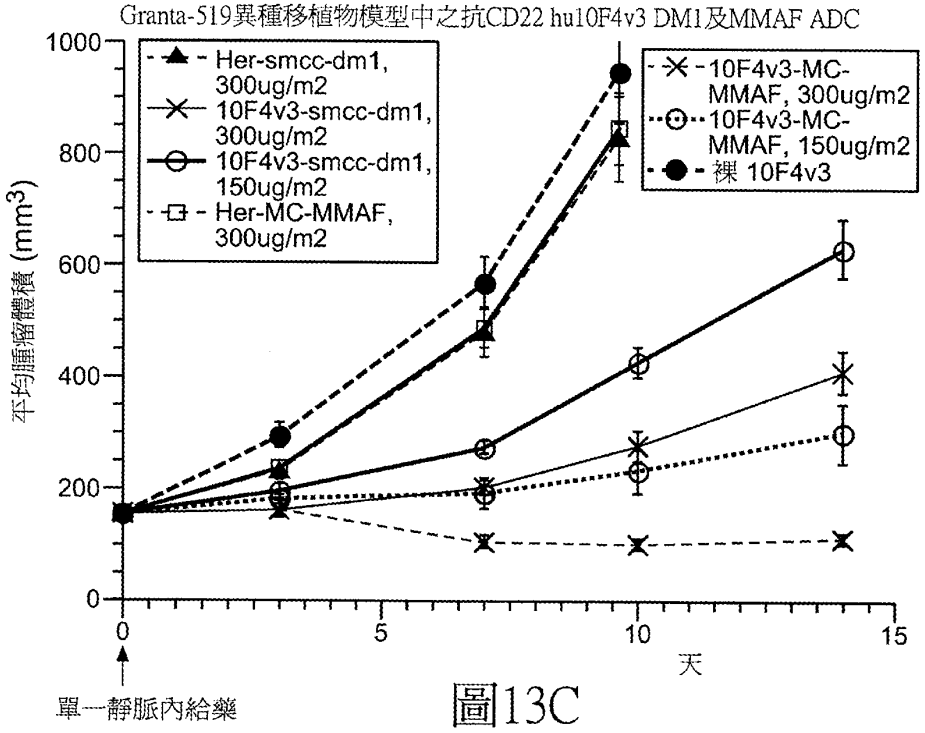


圖13C

200817434

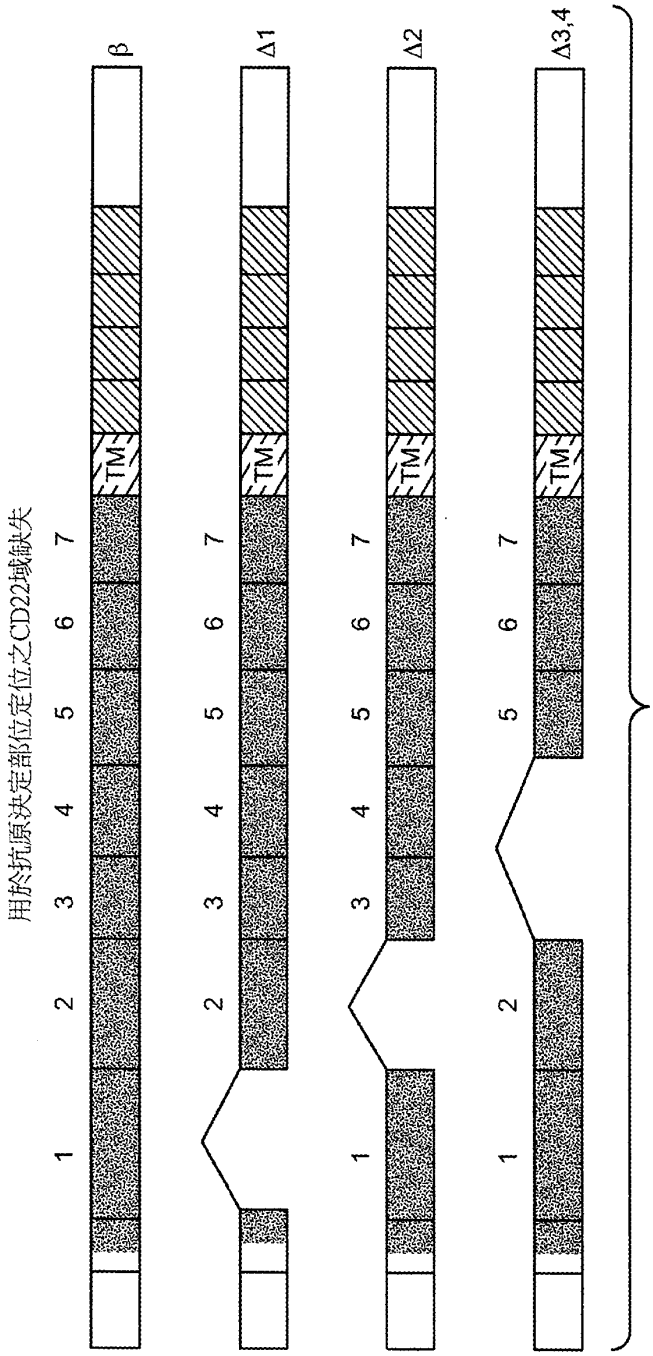


圖14

200817434

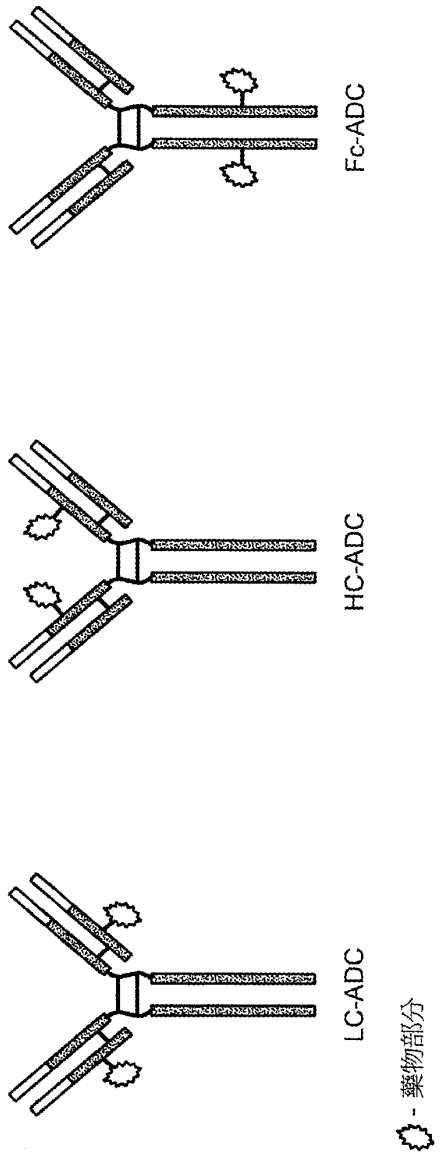


圖15

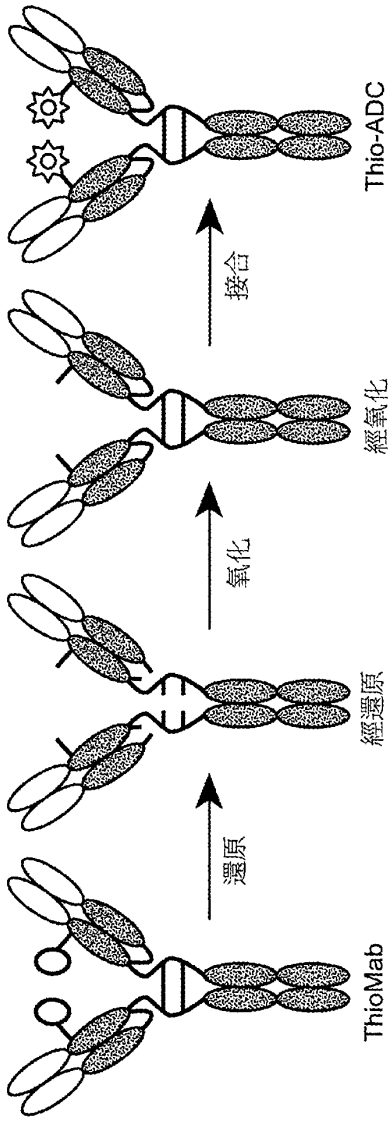


圖16

200817434

經抗CD22 V205C h10F4v3半胱胺酸改造之輕鏈
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:91)

圖17A

經抗CD22 A118C h10F4v3半胱胺酸改造之重鏈
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:92)

圖17B

經抗CD22 S400C h10F4v3半胱胺酸改造之Fc區
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)

圖17C

200817434

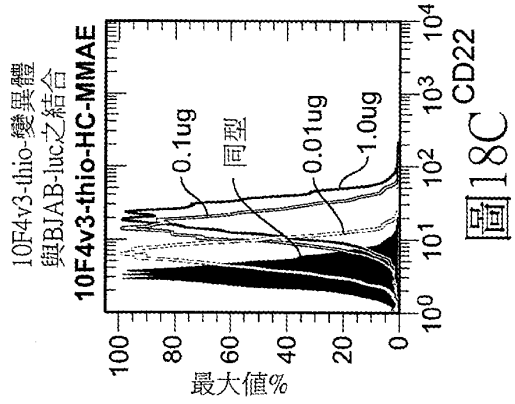


圖18C

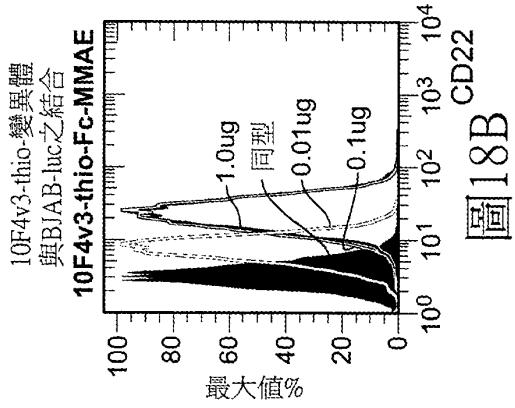


圖18B

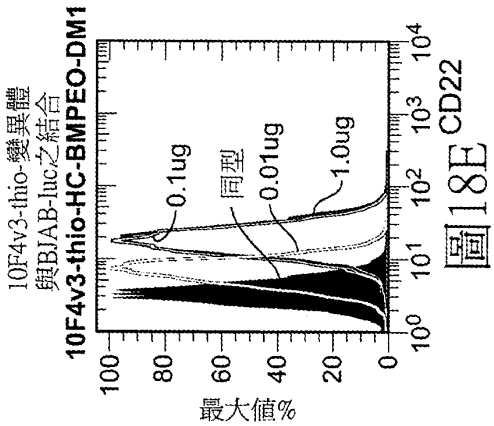


圖18E

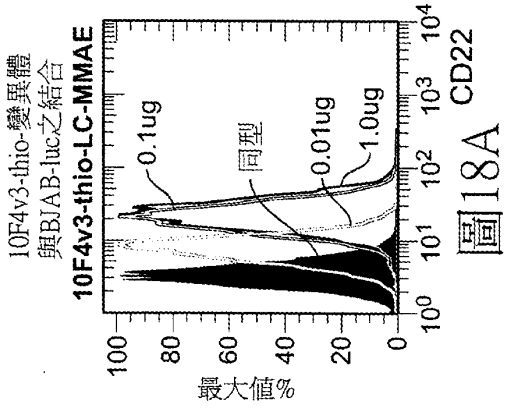


圖18A

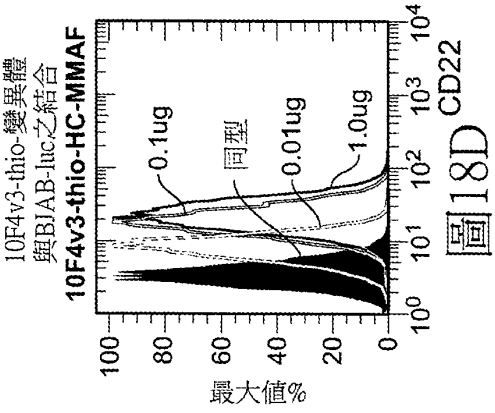


圖18D

200817434

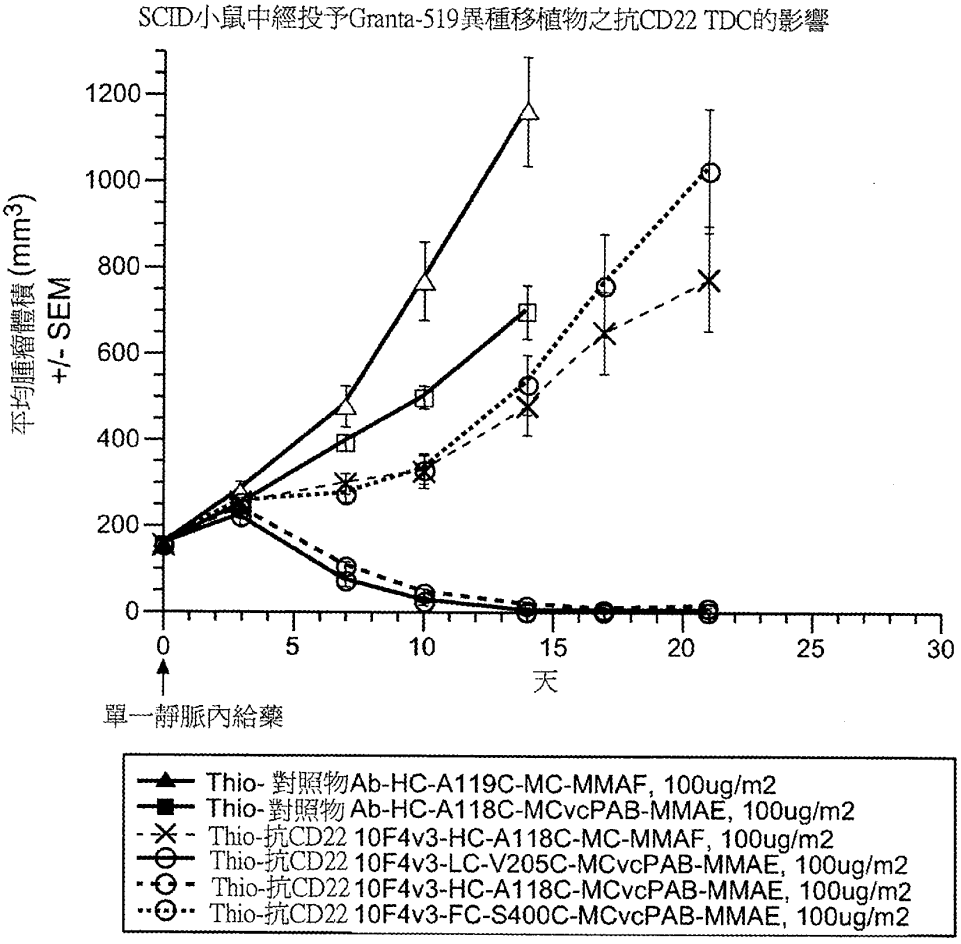


圖19

200817434

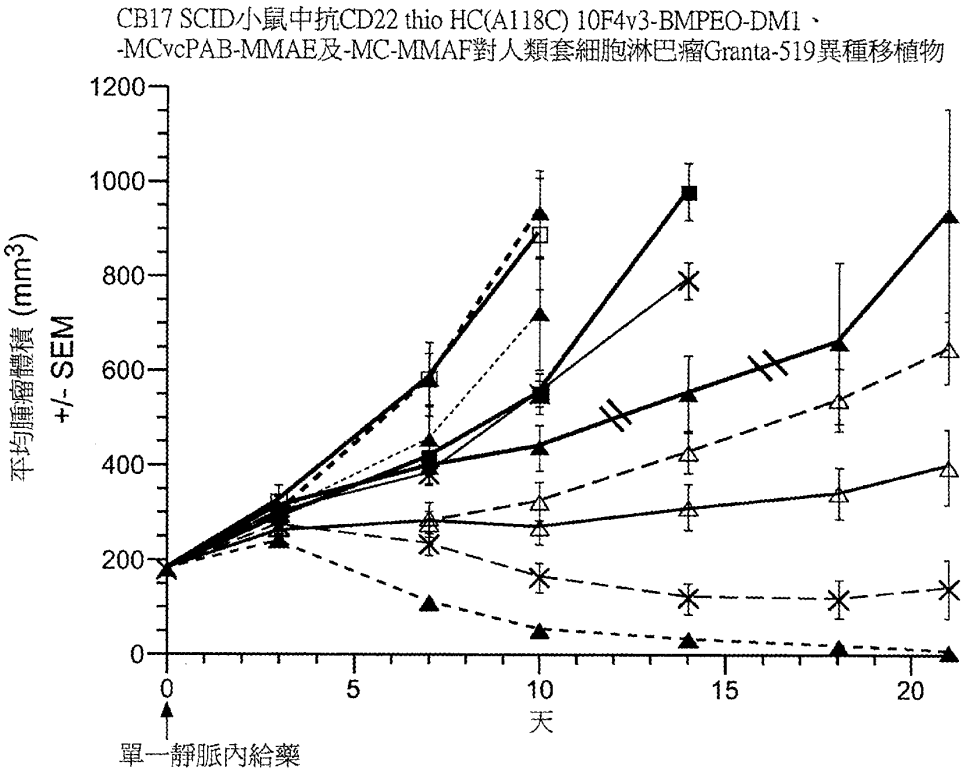


圖20A

200817434

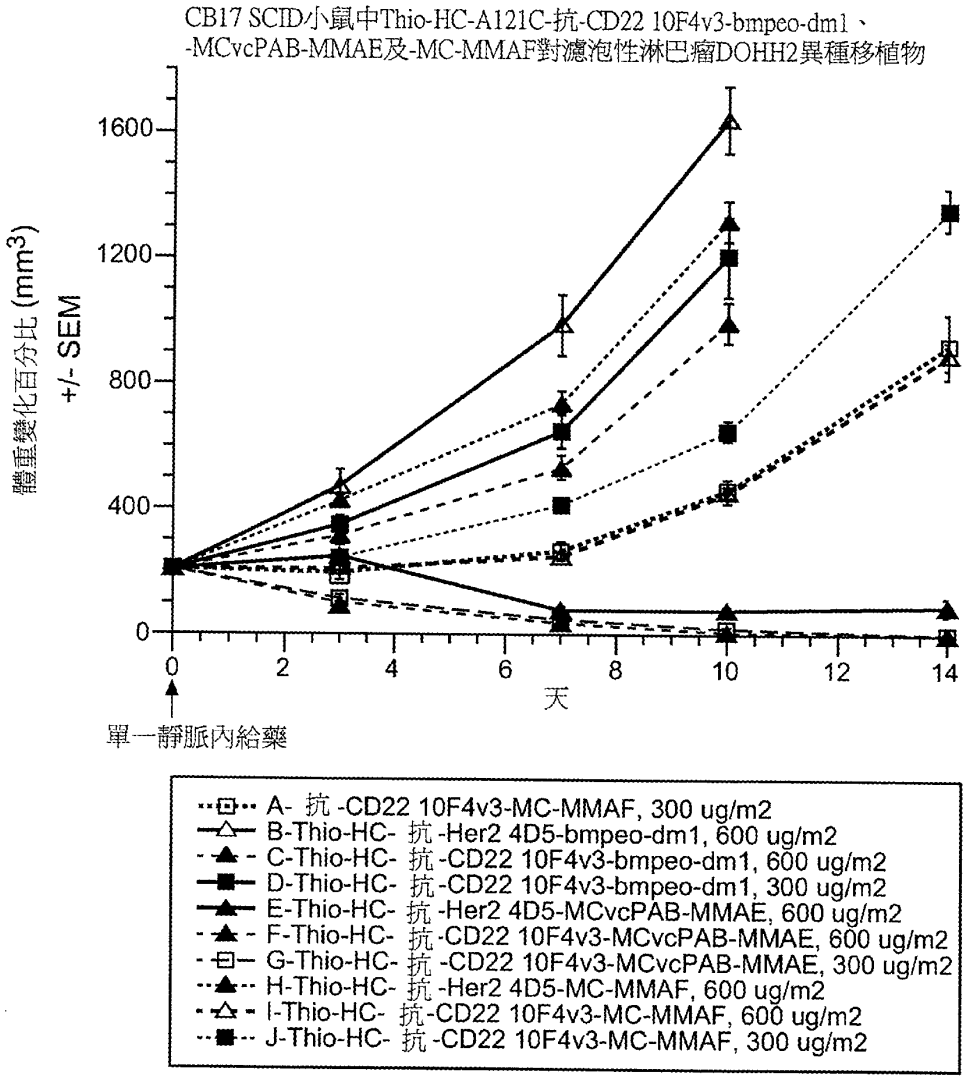


圖20B

200817434

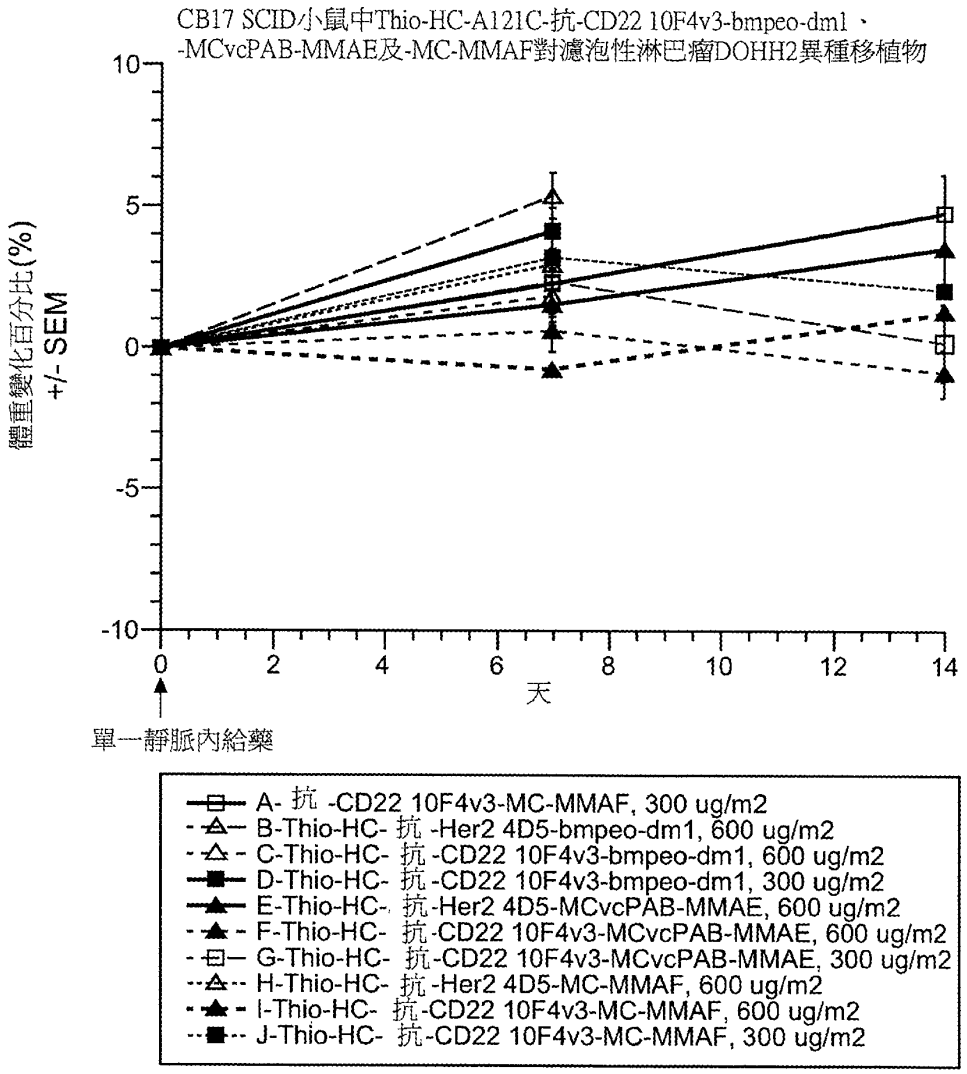


圖20C

200817434

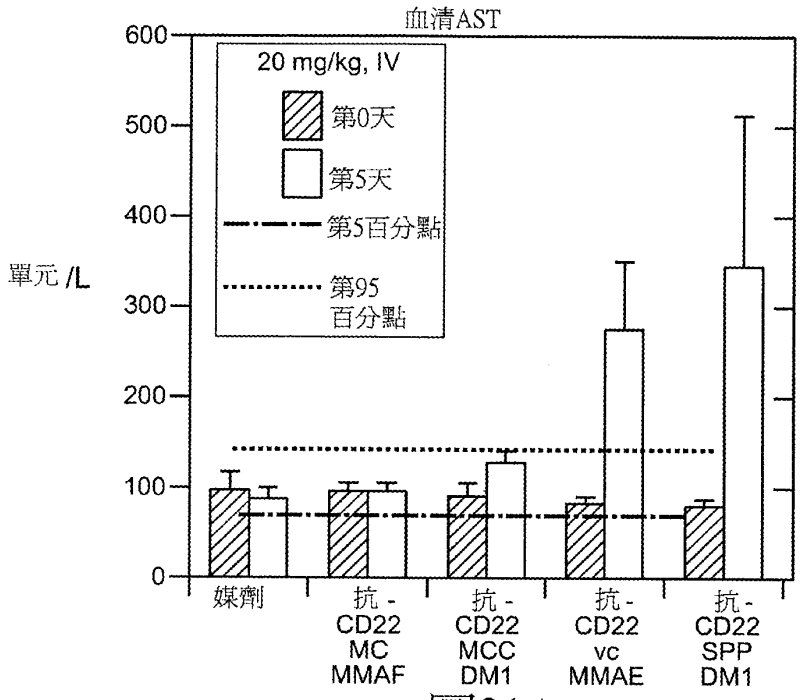


圖21A

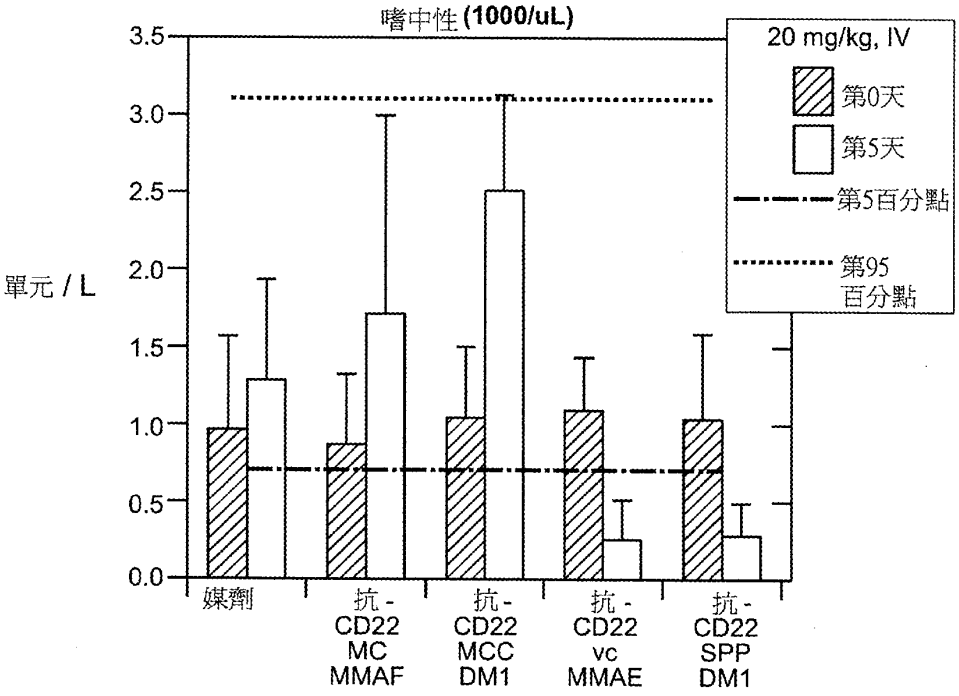


圖21B

200817434

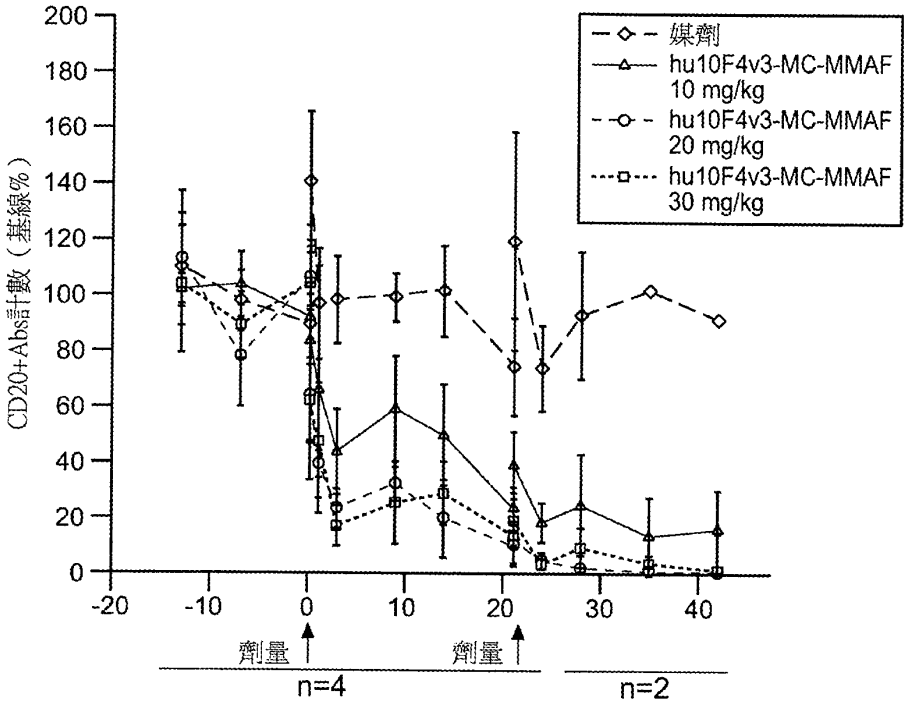


圖22A

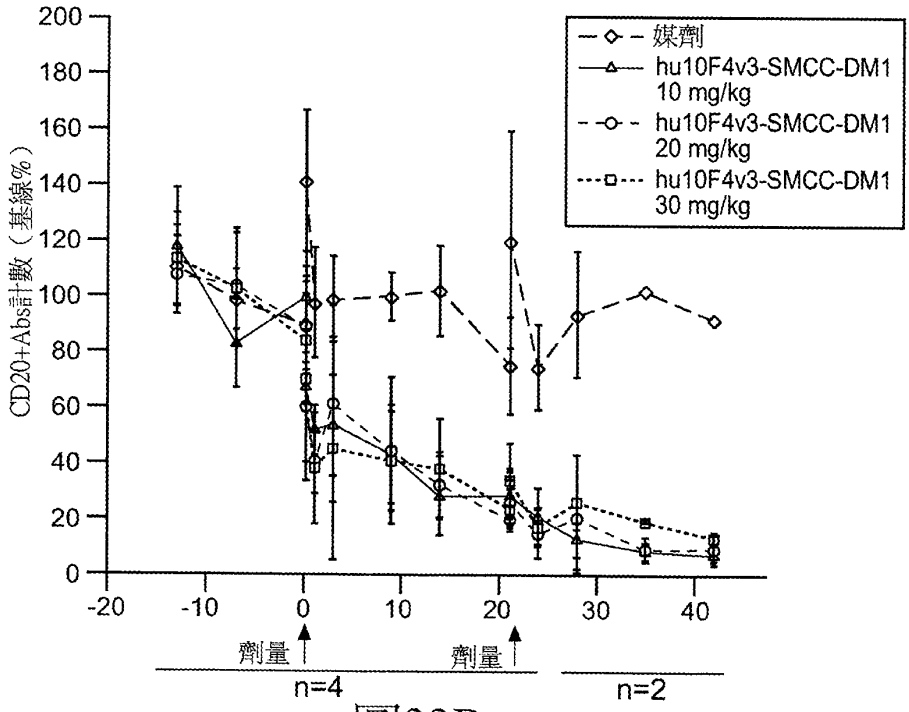


圖22B

200817434

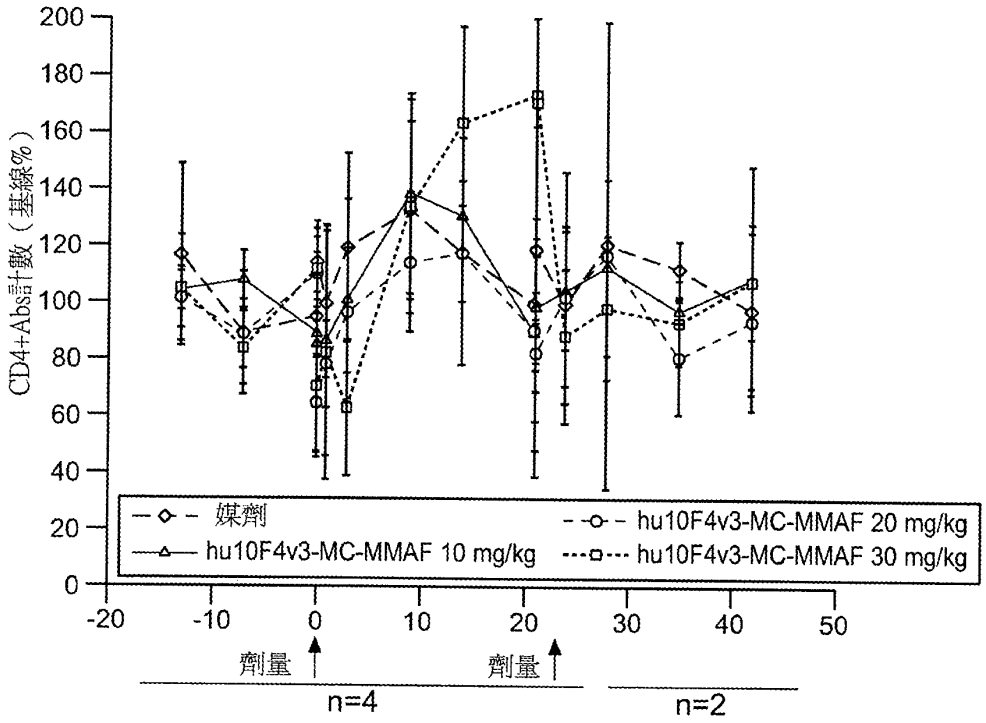


圖23A

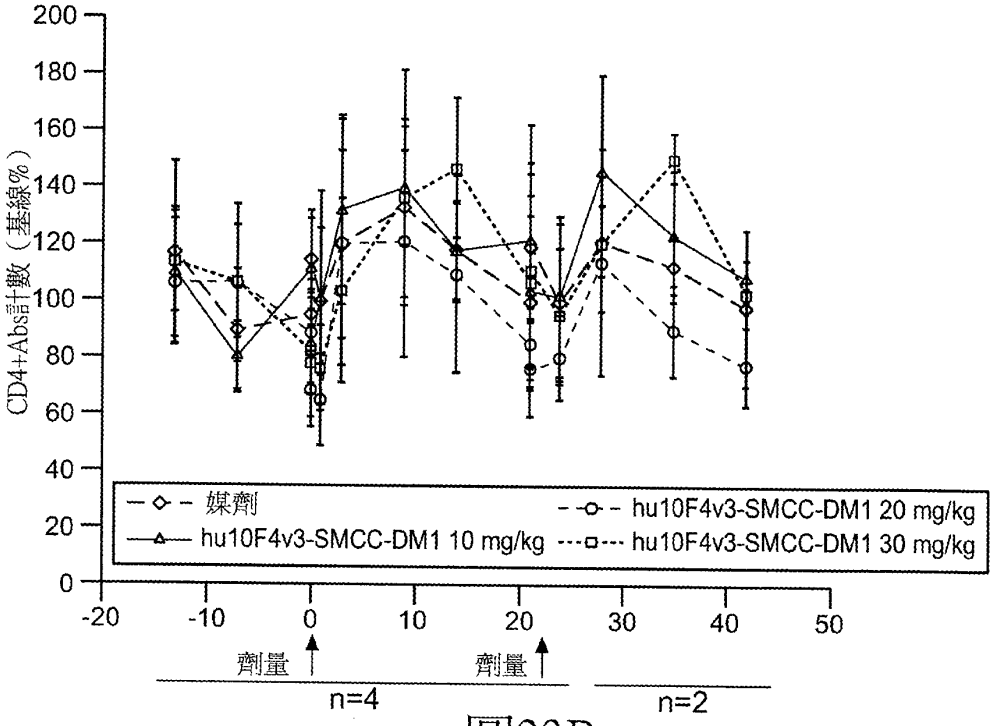


圖23B

200817434

媒劑對照物扁桃體

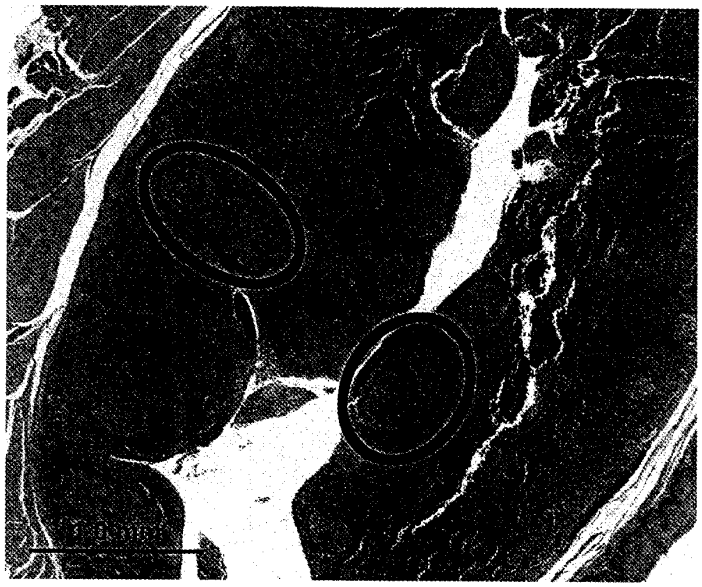


圖24A

hu10F4v3-SMCC-DM1扁桃體



圖24B

200817434

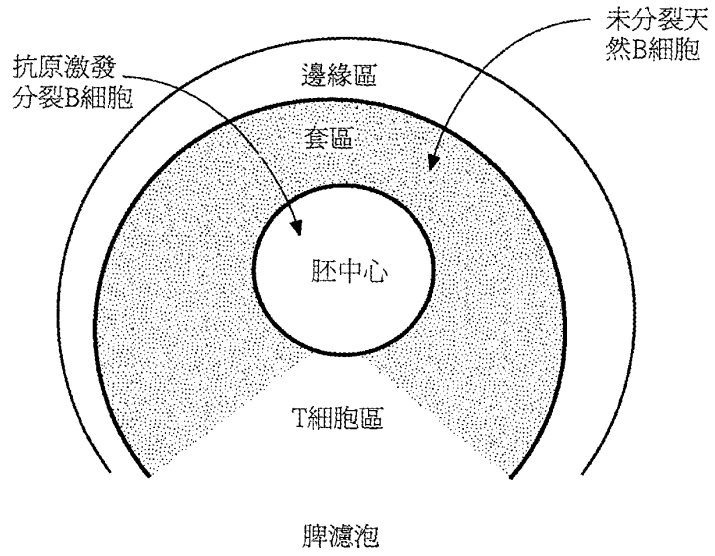
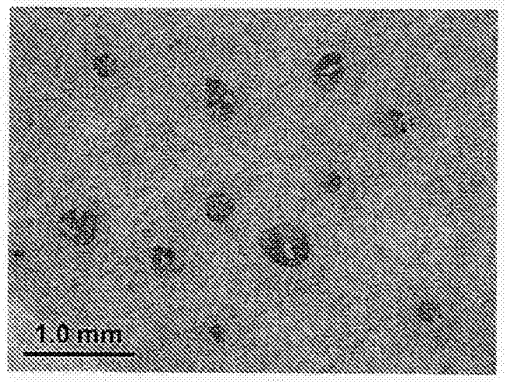


圖25A

200817434

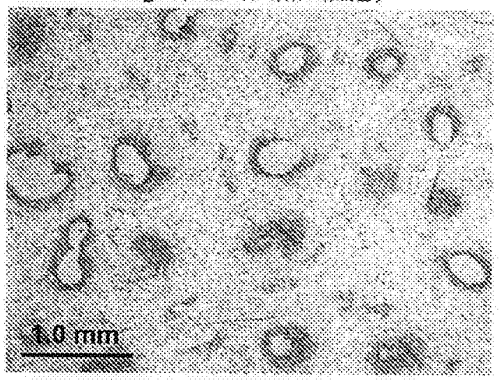
Ki-67染色（分裂細胞）



媒劑

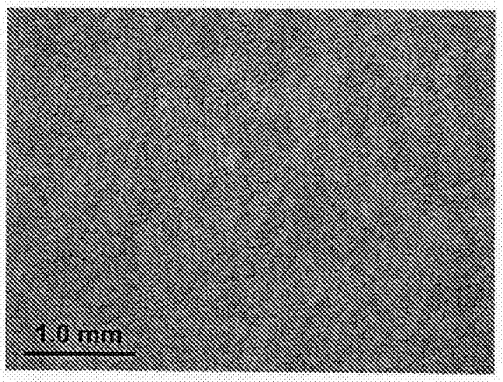
圖25B

抗IgD染色（天然B細胞）



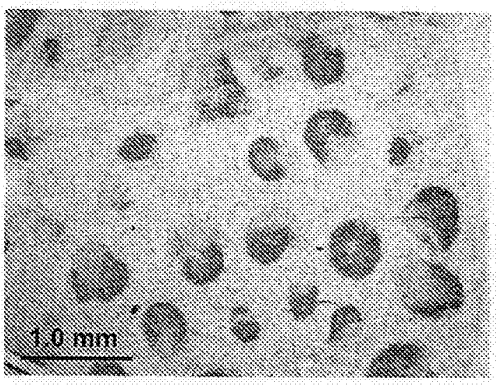
媒劑

圖25D



抗-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

圖25C



抗-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

圖25E

PATENT APPLICATION FEE DETERMINATION RECORD

Substitute for Form PTO-875

Application or Docket Number: 16/613,203

APPLICATION AS FILED - PART I

FOR	(Column 1) NUMBER FILED	(Column 2) NUMBER EXTRA	SMALL ENTITY RATE($)	SMALL ENTITY FEE($)	OR	OTHER THAN SMALL ENTITY RATE($)	OTHER THAN SMALL ENTITY FEE($)
BASIC FEE (37 CFR 1.16(a), (b), or (c))	N/A	N/A	N/A			N/A	320
SEARCH FEE (37 CFR 1.16(k), (i), or (m))	N/A	N/A	N/A			N/A	540
EXAMINATION FEE (37 CFR 1.16(o), (p), or (q))	N/A	N/A	N/A			N/A	800
TOTAL CLAIMS (37 CFR 1.16(i))	54 minus 20 =	* 34			OR	x 100 =	3400
INDEPENDENT CLAIMS (37 CFR 1.16(h))	1 minus 3 =	*				x 480 =	0.00
APPLICATION SIZE FEE (37 CFR 1.16(s))	If the specification and drawings exceed 100 sheets of paper, the application size fee due is $310 ($155 for small entity) for each additional 50 sheets or fraction thereof. See 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) and 37 CFR 1.16(s).						840
MULTIPLE DEPENDENT CLAIM PRESENT (37 CFR 1.16(j))							0.00
* If the difference in column 1 is less than zero, enter "0" in column 2.			TOTAL			TOTAL	5900

APPLICATION AS AMENDED - PART II

		(Column 1) CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		(Column 2) HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR	(Column 3) PRESENT EXTRA	SMALL ENTITY RATE($)	SMALL ENTITY ADDITIONAL FEE($)	OR	OTHER THAN SMALL ENTITY RATE($)	OTHER THAN SMALL ENTITY ADDITIONAL FEE($)
AMENDMENT A	Total (37 CFR 1.16(i))	*	Minus	**	=	x =		OR	x =	
	Independent (37 CFR 1.16(h))	*	Minus	***	=	x =		OR	x =	
	Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))									
	FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))							OR		
						TOTAL ADD'L FEE		OR	TOTAL ADD'L FEE	

		(Column 1) CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT		(Column 2) HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR	(Column 3) PRESENT EXTRA	RATE($)	ADDITIONAL FEE($)	OR	RATE($)	ADDITIONAL FEE($)
AMENDMENT B	Total (37 CFR 1.16(i))	*	Minus	**	=	x =		OR	x =	
	Independent (37 CFR 1.16(h))	*	Minus	***	=	x =		OR	x =	
	Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))									
	FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))							OR		
						TOTAL ADD'L FEE		OR	TOTAL ADD'L FEE	

* If the entry in column 1 is less than the entry in column 2, write "0" in column 3.
** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 20, enter "20".
*** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 3, enter "3".
The "Highest Number Previously Paid For" (Total or Independent) is the highest found in the appropriate box in column 1.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

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

U.S. APPLICATION NO.	FIRST NAMED INVENTOR	ATTY. DOCKET NO.
16/613,203	Atsuko SAITO	098065-0249

22428
FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109

INTERNATIONAL APPLICATION NO.	
PCT/JP2018/018572	
I.A. FILING DATE	PRIORITY DATE
05/14/2018	05/15/2017

CONFIRMATION NO. 6337
371 ACCEPTANCE LETTER

OC00000012041576 2

Date Mailed: 10/07/2020

NOTICE OF ACCEPTANCE OF APPLICATION UNDER 35 U.S.C 371 AND 37 CFR 1.495

The applicant is hereby advised that the United States Patent and Trademark Office, in its capacity as a Designated / Elected Office (37 CFR 1.495), has ACCEPTED the above identified international application for national patentability examination in the United States Patent and Trademark Office.

The United States Application Number assigned to the application is shown above. A Filing Receipt will be issued for the present application in due course. **THE DATE APPEARING ON THE FILING RECEIPT AS THE "FILING DATE or 371(c) DATE" IS THE DATE ON WHICH THE LAST OF THE 35 U.S.C. 371 (c)(1) and (c)(2) REQUIREMENTS HAS BEEN RECEIVED IN THE OFFICE. THIS DATE IS SHOWN BELOW.** The filing date of the above identified application is the international filing date of the international application (Article 11(3) and 35 U.S.C. 363)

11/13/2019
DATE OF RECEIPT OF 35 U.S.C.
371(c)(1) and (c)(2) REQUIREMENTS

The following items have been received:

- Copy of the International Application filed on 11/13/2019
- Copy of the International Search Report filed on 11/13/2019
- Preliminary Amendments filed on 11/13/2019
- Information Disclosure Statements filed on 11/13/2019
- Inventor's Oath or Declaration filed on 11/14/2019
- U.S. Basic National Fees filed on 11/13/2019
- Assignment filed on 11/14/2019
- Authorize Access to Search Results filed on 11/13/2019
- Priority Documents filed on 11/13/2019
- Power of Attorney filed on 11/14/2019
- Specification filed on 11/13/2019
- Claims filed on 11/13/2019
- Abstracts filed on 11/13/2019
- Drawings filed on 11/13/2019
- Authorization to Permit Access filed on 11/13/2019
- Application Data Sheet (37 CFR 1.76) filed on 11/13/2019

Applicant is reminded that any communications to the United States Patent and Trademark Office must be mailed to the address given in the heading and include the U.S. application no. shown above (37 CFR 1.5)

LAMONT M HUNTER

Telephone: (571) 272-0308



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

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

APPLICATION NUMBER	FILING or 371(c) DATE	GRP ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY.DOCKET.NO	TOT CLAIMS	IND CLAIMS
16/613,203	11/13/2019	1643	5920	098065-0249	54	1

CONFIRMATION NO. 6337

UPDATED FILING RECEIPT

22428
FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109



Date Mailed: 10/07/2020

Receipt is acknowledged of this non-provisional utility patent application. The application will be taken up for examination in due course. Applicant will be notified as to the results of the examination. Any correspondence concerning the application must include the following identification information: the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF FIRST INVENTOR, and TITLE OF INVENTION. Fees transmitted by check or draft are subject to collection.

Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. If an error is noted on this Filing Receipt, please submit a written request for a corrected Filing Receipt, including a properly marked-up ADS showing the changes with strike-through for deletions and underlining for additions. If you received a "Notice to File Missing Parts" or other Notice requiring a response for this application, please submit any request for correction to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections provided that the request is grantable.

Inventor(s)

Atsuko SAITO, Tokyo, JAPAN;
Tsuyoshi HIRATA, Tokyo, JAPAN;
Kensuke NAKAMURA, Tokyo, JAPAN;

Applicant(s)

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, Tokyo, JAPAN;

Assignment For Published Patent Application

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, Tokyo, JAPAN

Power of Attorney: The patent practitioners associated with Customer Number 22428

Domestic Priority data as claimed by applicant

This application is a 371 of PCT/JP2018/018572 05/14/2018

Foreign Applications (You may be eligible to benefit from the **Patent Prosecution Highway** program at the USPTO. Please see http://www.uspto.gov for more information.)
JAPAN 2017-096749 05/15/2017

Permission to Access Application via Priority Document Exchange: Yes

Permission to Access Search Results: Yes

Applicant may provide or rescind an authorization for access using Form PTO/SB/39 or Form PTO/SB/69 as appropriate.

If Required, Foreign Filing License Granted: 02/24/2020

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is **US 16/613,203**

Projected Publication Date: Not Applicable

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

Title

ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

Preliminary Class

424

Statement under 37 CFR 1.55 or 1.78 for AIA (First Inventor to File) Transition Applications: No

PROTECTING YOUR INVENTION OUTSIDE THE UNITED STATES

Since the rights granted by a U.S. patent extend only throughout the territory of the United States and have no effect in a foreign country, an inventor who wishes patent protection in another country must apply for a patent in a specific country or in regional patent offices. Applicants may wish to consider the filing of an international application under the Patent Cooperation Treaty (PCT). An international (PCT) application generally has the same effect as a regular national patent application in each PCT-member country. The PCT process **simplifies** the filing of patent applications on the same invention in member countries, but **does not result** in a grant of "an international patent" and does not eliminate the need of applicants to file additional documents and fees in countries where patent protection is desired.

Almost every country has its own patent law, and a person desiring a patent in a particular country must make an application for patent in that country in accordance with its particular laws. Since the laws of many countries differ in various respects from the patent law of the United States, applicants are advised to seek guidance from specific foreign countries to ensure that patent rights are not lost prematurely.

Applicants also are advised that in the case of inventions made in the United States, the Director of the USPTO must issue a license before applicants can apply for a patent in a foreign country. The filing of a U.S. patent application serves as a request for a foreign filing license. The application's filing receipt contains further information and guidance as to the status of applicant's license for foreign filing.

Applicants may wish to consult the USPTO booklet, "General Information Concerning Patents" (specifically, the section entitled "Treaties and Foreign Patents") for more information on timeframes and deadlines for filing foreign patent applications. The guide is available either by contacting the USPTO Contact Center at 800-786-9199, or it can be viewed on the USPTO website at http://www.uspto.gov/web/offices/pac/doc/general/index.html.

For information on preventing theft of your intellectual property (patents, trademarks and copyrights), you may wish to consult the U.S. Government website, http://www.stopfakes.gov. Part of a Department of Commerce initiative, this website includes self-help "toolkits" giving innovators guidance on how to protect intellectual property in specific

countries such as China, Korea and Mexico. For questions regarding patent enforcement issues, applicants may call the U.S. Government hotline at 1-866-999-HALT (1-866-999-4258).

LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER

Title 35, United States Code, Section 184

Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15

GRANTED

The applicant has been granted a license under 35 U.S.C. 184, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier license has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license, unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s) filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies, particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)); the Bureau of Industry and Security, Department of Commerce (15 CFR parts 730-774); the Office of Foreign AssetsControl, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

NOT GRANTED

No license under 35 U.S.C. 184 has been granted at this time, if the phrase "IF REQUIRED, FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form. Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12, if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has lapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U.S.C. 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).

SelectUSA

The United States represents the largest, most dynamic marketplace in the world and is an unparalleled location for business investment, innovation, and commercialization of new technologies. The U.S. offers tremendous resources and advantages for those who invest and manufacture goods here. Through SelectUSA, our nation works to promote and facilitate business investment. SelectUSA provides information assistance to the international investor community; serves as an ombudsman for existing and potential investors; advocates on behalf of U.S. cities, states, and regions competing for global investment; and counsels U.S. economic development organizations on investment attraction best practices. To learn more about why the United States is the best country in the world to develop

technology, manufacture products, deliver services, and grow your business, visit http://www.SelectUSA.gov or call +1-202-482-6800.

PTO/SB/08 (modified)

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

U.S. PATENT DOCUMENTS

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

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS

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

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

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

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS

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

Examiner Signature		Date Considered	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 October 2018 (11.10.2018)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2018/185618 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 47/68 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2018/052151

(22) International Filing Date:
28 March 2018 (28.03.2018)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
62/480,972 03 April 2017 (03.04.2017) US

(71) Applicant: **NOVARTIS AG** [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(72) Inventors: **ANTONAKOS, Brandon Peter**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **BIALUCHA, Carl Uli**; Novartis Institutes for BioMedical, Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US). **COLLINS, Scott**; 46 Presidents Lane, Qunicy, Massachusetts 02169 (US). **KNEE, Deborah A.**; Novartis Institute for Functional Genomics, Inc., dba Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 10675 John Jay Hopkins Drive, San Diego, California 92121 (US). **SHARP, Fiona Alexandra**; Novartis Institutes for BioMedical Research, Inc., 250 Massachusetts Avenue, Cambridge, Massachusetts 02139 (US).

(74) Agent: **NOVARTIS AG**; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

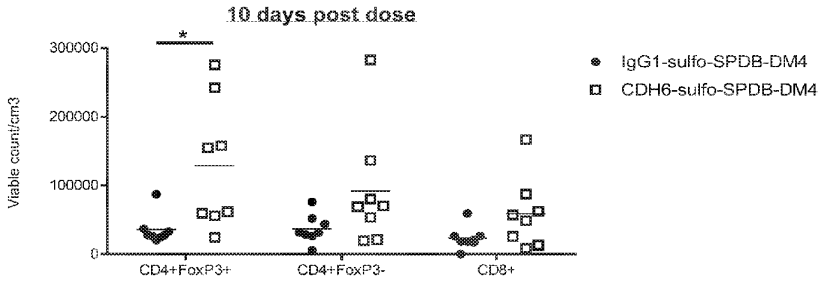
(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:
— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

(54) **Title:** ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES AND ANTI-GITR ANTIBODY COMBINATIONS AND METHODS OF TREATMENT

FIGURE 4

T_{regs} increase following CDH6 ADC treatment in the renal tumor mouse model



(57) **Abstract:** The present invention relates to anti-CDH6 ADCs in combination with an anti-GITR antibody, and their uses for the treatment of cancer.

[Continued on next page]

WO 2018/185618 A1

WO 2018/185618 A1

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*
— *in black and white; the international application as filed contained color or greyscale and is available for download from PATENTSCOPE*

ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES AND ANTI-GITR ANTIBODY COMBINATIONS AND METHODS OF TREATMENT

FIELD

[0001] The present disclosure is directed to the combination of antibody drug conjugates (ADC) in combination with anti-GITR agonist antibodies and their uses for the treatment of cancer.

BACKGROUND

[0002] Cadherin-6 (CDH6) is a member of the cadherin superfamily of calcium-dependent cell-cell adhesion molecules. Aside from their role in mechanical adhesion, cadherins are involved in a diverse array of cellular processes relating to tissue morphogenesis (Halbleib and Nelson Genes Dev. 2006; 20(23):3199-3214). This superfamily is classified into classical, desmosomal, and protocadherin groups with classical cadherins subdivided into Type 1 and Type II (Sotomayor et al., Trends Cell Biol. 2014; 34(9):524-536)). CDH6 is a type II, classical cadherin, first described as K-cadherin, which was found to be preferentially expressed in fetal kidney and kidney carcinoma (Xiang et al., Cancer Res. 1994; 54(11):3034-3041; Paul et al., Cancer Res. 1997; 57(13):2741-2748), serous ovarian carcinoma (Kobel et al., PLoS Med. 2008 5(12):e232), as well as during normal renal development (Cho et al., Development 1998; 125(5):803-812; Mah et al., Dev. Biol. 2000; 223(1):38-53).

[0003] Antibody drug conjugates ("ADCs") have been used for the local delivery of cytotoxic agents in the treatment of cancer (see *e.g.*, Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 2005; 5:543-549). ADCs allow targeted delivery of the drug moiety where maximum efficacy with minimal toxicity may be achieved. In addition to inducing tumor cell death, it has been demonstrated that ADCs delivering microtubule-disrupting payloads can induce a pro-inflammatory tumor microenvironment and promote anti-tumor immunity (Gerber et al., Biochem.Pharma. 2016; 102:(1-6).

[0004] Glucocorticoid-induced TNFR-related protein ("GITR") is a member of the Tumor Necrosis Factor Superfamily (TNFRSF) constitutively expressed on regulatory T cells (Tregs) and at low levels on naïve and memory T cells. GITR is a bi-functional molecule capable of driving the expansion of CD8+ T effector (Teff) memory cell populations, while promoting the loss or inhibition of Tregs (Knee et al., Eur. J. Cancer 2016; 67:1-10). Herein, we disclose the discovery of a unique mechanism of action, wherein administration of an ADC induces GITR upregulation on Tregs, and a synergistic combination of a CDH6-targeting ADC and agonistic GITR antibody induces greater anti-tumor activity.

SUMMARY

[0005] A combination comprising: a) an anti-CDH6 antibody drug conjugate of the formula:

$$Ab\text{-}(L\text{-}(D)_m)_n$$

or a pharmaceutically acceptable salt thereof; wherein Ab is an antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to an epitope of human CDH6;
L is a linker;
D is a drug moiety, wherein the drug moiety is N(2')-deacetyl-N2-(4- mercapto-4-methyl- 1 -oxopentyl)-maytansine (DM4) or N(2')- deacetyl-N(2')-(3-mercapto-l-oxopropyl)-maytansine (DM1) ;
m is an integer from 1 to 8; and
n is an integer from 1 to 10; and

b) an anti-GITR agonist antibody or antigen binding fragment thereof.

[0006] The combination, wherein in the antibody drug conjugate said n is 3 or 4.

[0007] The combination, wherein in said antibody drug conjugate said antibody or antigen binding fragment thereof comprises:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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