

【發明說明書】

【中文發明名稱】

醫藥組合

【英文發明名稱】

PHARMACEUTICAL COMBINATIONS

【技術領域】

【0001】 本發明一般地係關於免疫學及分子生物學領域。更特定言之，本文提供包含針對BST1 (ADP-核糖基環化酶2)之抗體以及胞苷類似物或其醫藥學上可接受之鹽之醫藥組合；及治療經BST1 (ADP-核糖基環化酶2)表現/活性介導之疾病及/或與BST1之異常表現/活性相關之疾病的方法，該等疾病諸如癌症。

【先前技術】

【0002】 白血病及淋巴瘤屬於影響血液、骨髓及淋巴系統之一大組腫瘤；此等腫瘤稱為造血及淋巴組織之腫瘤。

【0003】 淋巴瘤係從淋巴細胞發展之一組血細胞腫瘤。徵兆及症狀包括淋巴結腫大、發熱、淋透性多汗、非刻意性體重減輕、瘙癢及連續感覺疲倦。淋巴瘤存在多種亞型：兩種主要淋巴瘤類別係霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma, HL)及非霍奇金淋巴瘤(NHL)。世界衛生組織(World Health Organization, WHO)收錄兩種其他類別的淋巴瘤類型：多發性骨髓瘤及免疫增殖性疾病。約90%的淋巴瘤係非霍奇金淋巴瘤。

【0004】 白血病係通常開始於骨髓中且會產生高數目之異常白血球的一組癌症。症狀包括出血及瘀傷問題、感覺疲倦、發熱及感染風險增加。此等症狀發生是由於缺乏正常血球。診斷典型地係藉由血液測試或骨

髓生檢。存在四種主要白血病類型：急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、急性骨髓白血病(AML)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)及慢性骨髓白血病(CML)，以及多種不太常見的類型。

【0005】 治療白血病及淋巴瘤涉及以下中之一或多者：化學療法、輻射療法、靶向療法及手術(及白血病情況下的骨髓移植)。白血病治療之成功與否視白血病類型及個人年齡而定。淋巴瘤治療結果視亞型而定，一些係可治癒的且在大多數情況下治療可延長存活。

【0006】 多種化學治療劑先前已用於治療白血病，包括潑尼松(prednisone)、長春新鹼、蔥環黴素、L-天冬醯胺酶、環磷醯胺、甲胺喋呤、6-巰基嘌呤、氟達拉濱(fludarabine)、噴司他汀(pentostatin)及克拉屈濱(cladribine)。用於治療淋巴瘤之化學治療劑包括環磷醯胺、羥基道諾黴素(hydroxydaunorubicin)(亦稱為多柔比星(doxorubicin)或阿德力黴素(adriamycin))、oncovin (長春新鹼)、潑尼松、潑尼龍(prednisolone)、博萊黴素(bleomycin)、達卡巴嗪(dacarbazine)、依託泊苷(etoposide)及丙卡巴肼(procarbazine)。

【0007】 組合化學療法涉及同時用兩種或更多種不同藥物治療患者。藥物在其機制及副作用方面不同。此最大好處係使發展成任一種藥劑之抗性的可能性降至最低。此外，藥物常常可以較低劑量使用，降低毒性。用於治療霍奇金氏病之組合療法包括MOPP (氮芥、長春新鹼、丙卡巴肼、潑尼龍)及ABVD (多柔比星、博萊黴素、長春新鹼、達卡巴嗪)。用於治療非霍奇金氏淋巴瘤之組合療法包括CHOP (環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼、潑尼龍)。考慮到已知用於治療白血病及淋巴瘤之藥物的數目，可能的藥物療法之置換及組合之數目顯然很大。此外，前述組合療法

不包括抗體。

【0008】 然而，仍需要新的對白血病及淋巴瘤之治療，且尤其需要靈驗的組合療法。

【0009】 骨髓基質抗原1 (BST1)，亦稱為ADP-核糖基環化酶2或CD157，係脂質錨定的雙功能胞外酶，其催化核糖核苷酸環化及水解。其產生能夠活化鈣釋放及蛋白質磷酸化之核苷酸第二信使環狀ADP-核糖及ADP-核糖(FEBS Lett. 1994, 356(2-3):244-8)。其能夠以旁分泌方式支持前B細胞之生長，此可能經由NAD⁺代謝物之產生(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91:5325-5329；J Biol Chem. 2005, 280:5343-5349)。

【0010】 ADP-核糖基環化酶2及其同源物CD38似乎充當受體，產生經由蘭尼鹼(ryanodine)受體誘導胞內Ca²⁺釋放之第二信使代謝物(Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 228(3):838-45)。其亦可經由CD11b整合素發揮作用以經由PI-3激酶路徑實現Ca²⁺釋放(J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2007;21(1-2):5-11)。

【0011】 WO2013/003625揭示抗BST1抗體及其用於治療各種癌症之用途。

【0012】 5-氮雜-胞苷及5-氮雜-2'-脫氧胞苷均為當前用於治療骨髓發育不良症候群之胞苷類似物。

【0013】 現已發現，(i)某些抗BST1抗體與5-氮雜-胞苷及(ii)某些抗BST1抗體與5-氮雜-2'-脫氧胞苷之組合在治療白血病及與BST1表現相關之其他癌症方面展現協同結果。

【發明內容】

【0014】 本發明提供醫藥組合，其包含(A)針對BST1之抗體及(B)胞

苷類似物或其醫藥學上可接受之鹽；及用於治療疾病之方法，該等疾病諸如BST1介導之病症，例如人類癌症，包括急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌、胰臟癌，下文稱作『本發明之疾病』。

【0015】 在一個實施例中，該醫藥組合包含：

(A)抗BST1抗體或其抗原結合部分，其與包括包含SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體競爭結合至BST1；

或分離的抗BST1抗體或其抗原結合部分，其包含：

a)重鏈可變區，其包含：

i)包含與SEQ ID NO: 10至少80%一致之序列的第一CDR；

ii)包含與SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 51至少80%一致之序列的第二CDR；

iii)包含與SEQ ID NO: 14至少80%一致之序列的第三CDR；及

b)輕鏈可變區，其包含：

i)包含與SEQ ID NO: 16至少80%一致之序列的第一CDR；

ii)包含與SEQ ID NO: 18至少80%一致之序列的第二CDR；

iii)包含與SEQ ID NO: 20至少80%一致之序列的第三CDR；

視情況其中該等以上SEQ ID NO中之任一或多者獨立地包含一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代、添加或缺失；

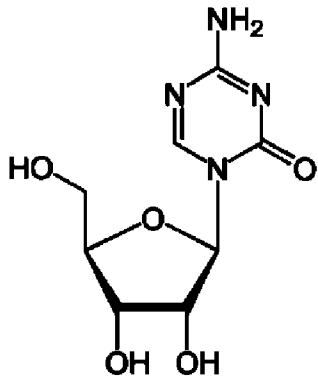
及

(B)胞苷類似物或其醫藥學上可接受之鹽，

其中該醫藥組合呈組合製劑形式用於同時、單獨或依序用途，較佳

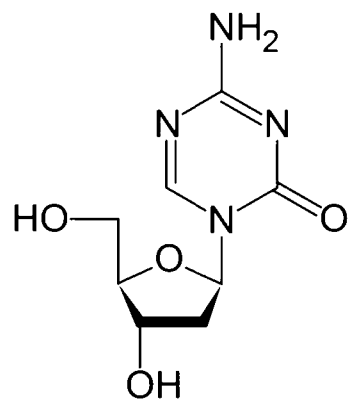
用於治療癌症。

【0016】 較佳地，該胞苷類似物係5-氮雜-胞苷或5-氮雜-2'-脫氧胞苷。5-氮雜-胞苷係胞苷之化學類似物，為DNA及RNA中之核苷。其具有結構：



5-氮雜-胞苷也以商品名Vidaza及Azadine為人所知。

【0017】 5-氮雜-2'-脫氧胞苷亦為胞苷之化學類似物。其具有結構：



5-氮雜-2'-脫氧胞苷亦稱為地西他濱(Decitabine)及以商品名Dacogen為人所知。

【0018】 由本發明抗體所識別的抗原決定基係見於SEQ ID NO: 44之多肽序列內。

【0019】 在又一實施例中，分離的抗BST1抗體擁有如SEQ ID NO: 2所代表之重鏈可變區序列及如SED ID NO: 4所代表之輕鏈可變區序列。

【0020】 在另一實施例中，分離的抗BST1抗體擁有如SEQ ID NO: 46所代表之重鏈可變區序列及如SED ID NO: 49所代表之輕鏈可變區序列。

【0021】 在一個實施例中，前述抗體中之任一者擁有Fc結構域。在一些實施例中，該Fc結構域係人類的。在其他實施例中，該Fc結構域係變異的人類Fc結構域。

【0022】 在另一實施例中，前述抗體中之任一者係單株抗體。

【0023】 在一個實施例中，前述抗體中之任一者進一步擁有共軛的試劑。在一些實施例中，共軛的試劑係細胞毒性劑。在其他實施例中，共軛的試劑係聚合物。在另一實施例中，聚合物係聚乙二醇(PEG)。在另一實施例中，PEG係PEG衍生物。

【0024】 在一個實施例中，分離的抗體係與BST1_A2競爭結合至BST1之抗體。

【0025】 所描述抗BST1抗體中之任一者可提供於醫藥組合物中。

【0026】 在另一實施例中，本發明提供一種治療或預防與BST1或與表現BST1之靶細胞相關之疾病(較佳癌症、更令人類癌症)的方法，該方法包含向有需要之受試者以同時、依序或單獨方式投與治療有效量之本發明之醫藥組合的組分(A)及(B)。

【0027】 在一些實施例中，抗體係IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型之全長抗體。

【0028】 在一些實施例中，抗體係選自：完整抗體、抗體片段、人類化抗體、單鏈抗體、免疫共軛物、去岩藻糖化抗體及雙特異性抗體。抗體片段可選自：單抗體(UniBody)、結構域抗體及奈米抗體(Nanobody)。

在一些實施例中，本發明之免疫共軛物包含治療劑。在本發明之另一態樣中，治療劑係細胞毒素或放射性同位素。

【0029】 在一些實施例中，抗體係選自：親和抗體(Affibody)、DARPin、Anticalin、Avimer、Versabody及Duocalin。

【0030】 在替代性實施例中，本發明之醫藥組合包含抗體或其抗原結合部分及醫藥學上可接受之載劑。

【0031】 在一些實施例中，本發明包含一種套組，其包含一或多種表現載體，該一或多種表現載體包含編碼結合至人類BST1上之抗原決定基的抗體或其抗原結合部分之重及/或輕鏈之分離的核酸分子；及胞苷類似物、較佳5-氮雜-胞苷或5-氮雜-2'-脫氧胞苷，或其醫藥學上可接受之鹽。

【0032】 在其他實施例中，本發明係關於本發明之醫藥組合，其用於治療或預防與表現BST1的靶細胞相關之疾病。在一些態樣中，所治療或預防之疾病係癌症、較佳人類癌症。在一些實施例中，由本發明之抗體治療或預防的疾病係本發明之疾病。

【0033】 在其他實施例中，本發明係關於本發明之醫藥組合的組分(A)及(B)之用途，其用於製備以同時、單獨或依序方式治療或預防與表現BST1的靶細胞相關之疾病之醫藥組合。在一些態樣中，所治療或預防之疾病係癌症、較佳人類癌症。

【0034】 在較佳實施例中，本發明之醫藥組合可用於治療或預防急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌及/或胰臟癌，較佳急性骨髓白血病(AML)。

【0035】 在本發明之一些態樣中，抗體或其抗原結合部分結合BST1多肽上之抗原決定基，該BST1多肽具有SEQ ID NO: 44之胺基酸序列、由包括包含SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體識別。

【0036】 本發明之其他特徵及優點將自不應解釋為限制性的以下詳細描述及實例中顯而易見。本申請案通篇引用之全部參考文獻、Genbank條目、專利及公開之專利申請案的內容明確以引用的方式併入本文。

【圖式簡單說明】

【0037】

圖1a顯示A1之重鏈CDR1區之核苷酸序列(SEQ ID NO:21)與小鼠生殖系V_H 1-80核苷酸序列之核苷酸138392-138424 (SEQ ID NO:33)的比對結果；A2之重鏈CDR1區之核苷酸序列(SEQ ID NO:22)與小鼠生殖系V_H 1-39核苷酸序列之核苷酸153362-153394 (SEQ ID NO:35)的比對結果。

圖1b顯示A1之重鏈CDR2區之核苷酸序列(SEQ ID NO:23)與小鼠生殖系V_H 1-80核苷酸序列之核苷酸138461-138511 (SEQ ID NO:34)的比對結果；A2之重鏈CDR2區之核苷酸序列(SEQ ID NO:24)與小鼠生殖系V_H 1-39核苷酸序列之核苷酸153431-153481 (SEQ ID NO:36)的比對結果。

圖2a顯示A1之輕鏈CDR1區之核苷酸序列(SEQ ID NO:27)與小鼠生殖系V_K 4-74核苷酸序列之核苷酸496-531 (SEQ ID NO:37)的比對結果；A2之輕鏈CDR1區之核苷酸序列(SEQ ID NO:28)與小鼠生殖系V_K 4-55核苷酸序列之核苷酸523-552 (SEQ ID NO:40)的比對結果。

圖2b顯示A1之輕鏈CDR2區之核苷酸序列(SEQ ID NO:29)與小鼠生殖系V_K 4-74核苷酸序列之核苷酸577-597 (SEQ ID NO:38)的比對結果；

A2之輕鏈CDR2區之核苷酸序列(SEQ ID NO:30)與小鼠生殖系V_K 4-55核苷酸序列之核苷酸598-618 (SEQ ID NO:41)的比對結果。

圖2c顯示A1之輕鏈CDR3區之核苷酸序列(SEQ ID NO:31)與小鼠生殖系V_K 4-74核苷酸序列之核苷酸691-718 (SEQ ID NO:39)的比對結果；A2之輕鏈CDR3區之核苷酸序列(SEQ ID NO:32)與小鼠生殖系V_K 4-55核苷酸序列之核苷酸715-739 (SEQ ID NO:42)的比對結果。

圖3a及3b顯示A549及H226細胞上之BST1之流式細胞分析的結果。

圖4a及4b顯示抗BST1單株抗體由A549及H226細胞內化，使用MabZAP分析法。

圖5顯示SEQ ID NO: 2之殘基21-137 (SEQ ID NO: 45)、SEQ ID NO: 2之CDR區(以粗體突出顯示)轉移至人類生殖系BF238102 VH之相應位置的人類化VH鏈(SEQ ID NO: 46)與人類生殖系BF238102 VH (SEQ ID NO: 47)之比對結果。將顯示明顯與CDR區接觸之殘基取代為相應的人類殘基。此等取代(加下劃線)在位置30、48、67、71及100處進行。

圖6顯示SEQ ID NO: 4之殘基22-128 (SEQ ID NO: 48)、SEQ ID NO: 4之CDR區(以粗體突出顯示)轉移至人類生殖系X72441 VL之相應位置的人類化VL鏈(SEQ ID NO: 49)與人類生殖系X72441 VL (SEQ ID NO: 50)之比對結果。將顯示明顯與CDR區接觸之殘基取代為相應的人類殘基。一個取代(加下劃線)在位置71處進行。

圖7顯示A2重鏈之CDR2區(SEQ ID NO: 12)與不損失抗原結合親和力之可能胺基酸取代(SEQ ID NO: 51)的比對結果。

圖8a及8b顯示BST1_A2及BST1_A2_NF在效應細胞存在下激發抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)反應。

圖9顯示K052細胞中由BST1_A2 + 5-氮雜胞苷誘導之ADCC水準。

圖10顯示SKNO1細胞中由BST1_A2 + 5-氮雜胞苷誘導之ADCC水準。

圖11顯示SKNO1細胞中由BST1_A2 + 地西他濱誘導之ADCC水準。

圖12顯示HL60細胞中由BST1_A2 + 地西他濱誘導之ADCC水準。

【實施方式】

【0038】 為可更輕易地理解本發明，首先定義某些術語。額外的定義在詳細描述中給出。

【0039】 在某些情況下，本文所描述之人類化及鼠類抗體可與來自人類以外之物種的BST1交叉反應。在某些實施例中，抗體對一或多種人類BST1具有完全特異性，且不會顯示出物種型或其他類型之非人類交叉反應性。

【0040】 術語「免疫反應」係指例如淋巴細胞、抗原呈遞細胞、吞噬細胞、粒細胞及由上述細胞或肝臟產生之可溶性大分子(包括抗體、細胞介素及補體)之作用，該作用導致選擇性損傷、破壞或自人體中消除正在入侵之病原體、受病原體感染之細胞或組織、癌細胞或在自體免疫性或病理炎症之情況下的正常人類細胞或組織。

【0041】 「信號轉導路徑」係指在信號自細胞一個部分傳輸至細胞另一部分中發揮作用之各種信號轉導分子之間的生物化學關係。如本文所用，片語「細胞表面受體」包括例如能夠接收信號及跨細胞質膜傳輸該種信號之分子及分子複合物。「細胞表面受體」之實例係BST1。

【0042】 如本文所提及，術語「抗體」至少包括免疫球蛋白之抗原結合片段(亦即「抗原結合部分」)。

【0043】「抗體」之定義包括但不限於全長抗體、抗體片段、單鏈抗體、雙特異性抗體、微型抗體(minibody)、結構域抗體、合成抗體(有時在本文中稱作「抗體模擬物」)、嵌合抗體、人類化抗體、抗體融合物(有時稱作「抗體共軛物」)及前述每一者之片段及/或衍生物。一般而言，全長抗體(有時在本文中稱作「完整抗體」)係指包含由二硫橋鍵相互連接之至少兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈的糖蛋白。各重鏈包含重鏈可變區(本文中縮寫為 V_H)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個結構域 C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3} 。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為 V_L 或 V_K)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定結構域包含一個結構域 C_L 。 V_H 區及 V_L/V_K 區可進一步再分為超變區，名為互補決定區(CDR)，其間間插有更保守之區，名為構架區(FR)。各 V_H 及 V_L/V_K 包含自胺基端至羧基端按以下順序： $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ 排列之三個CDR及四個FR。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合結構域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子(包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分($C1q$))結合。

【0044】在一個實施例中，抗體係抗體片段。特定抗體片段包括但不限於(i)由 V_L 、 V_H 、 C_L 及 C_{H1} 結構域組成之Fab片段；(ii)由 V_H 及 C_{H1} 結構域組成之Fd片段；(iii)由單一抗體之 V_L 及 V_H 結構域組成的Fv片段；(iv)由單一可變結構域組成之dAb片段；(v)分離的CDR區；(vi) $F(ab')_2$ 片段，包含兩個相連的Fab片段之雙價片段；(vii)單鏈Fv分子(scFv)，其中 V_H 結構域及 V_L 結構域由允許兩個結構域締合以形成抗原結合位點之肽連接子連接；(viii)雙特異性單鏈Fv二聚體；及(ix)「雙功能抗體(diabody)」或「三功能抗體(triabody)」，藉由基因融合所構築之多價或多特異性片段。

抗體片段可經修飾。例如，可藉由併入連接V_H及V_L結構域之二硫橋鍵使分子穩定。抗體樣式及構造之實例在Holliger及Hudson (2006) *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 及 Carter (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357以及其中引用之參考文獻中描述，該等文獻均明確地以引用的方式併入。

【0045】 本發明提供抗體類似物。該等類似物可包含多種結構，包括但不限於全長抗體、抗體片段、雙特異性抗體、微型抗體、結構域抗體、合成抗體(有時在本文中稱作「抗體模擬物」、抗體融合物、抗體共軛物及前述每一者之片段。

【0046】 在一個實施例中，免疫球蛋白包含抗體片段。特定抗體片段包括但不限於(i)由VL、VH、CL及CH1結構域組成之Fab片段；(ii)由VH及CH1結構域組成之Fd片段；(iii)由單一抗體之VL及VH結構域組成之Fv片段；(iv)由單一可變結構域組成之dAb片段；(v)分離的CDR區；(vi) F(ab')₂片段，包含兩個相連的Fab片段之雙價片段；(vii)單鏈Fv分子(scFv)，其中VH結構域及VL結構域由允許兩個結構域締合以形成抗原結合位點之肽連接子連接；(viii)雙特異性單鏈Fv二聚體；及(ix)「雙功能抗體」或「三功能抗體」，藉由基因融合所構築之多價或多特異性片段。抗體片段可經修飾。例如，可藉由併入連接VH及VL結構域之二硫橋鍵使分子穩定。抗體樣式及構造之實例在Holliger及Hudson, 2006, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 及 Carter, 2006, *Nature Reviews Immunology* 6:343-357以及其中引用之參考文獻中描述，該等文獻均明確地以引用的方式併入。

【0047】 識別之免疫球蛋白基因(例如在人類中)包括kappa (κ)、

lambda (λ)及重鏈基因座(其一起包含無數可變區基因)，及恆定區基因mu (μ)、delta (δ)、gamma (γ)、sigma (σ)及alpha (α)，其分別編碼IgM、IgD、IgG (IgG1、IgG2、IgG3及IgG4)、IgE及IgA (IgA1及IgA2)同型。本文中之抗體意在包括全長抗體及抗體片段，且可指來自任何生物之天然抗體、工程化抗體或為實驗目的、治療目的或其他目的重組產生之抗體。

【0048】 在一個實施例中，本文中揭示之抗體可為多特異性抗體，且值得注意地為雙特異性抗體，有時亦稱作「雙功能抗體」。其係與兩種(或更多種)不同抗原結合之抗體。雙功能抗體可以此項技術中已知的多種方式製備，例如化學地或自雜合融合瘤製備。在一個實施例中，抗體係微型抗體。微型抗體係最小化的抗體樣蛋白質，其包含與C_H3結構域連接之scFv。在一些情況下，scFv可與Fc區連接且可包括一些或全部的鉸鏈區。關於多特異性抗體之描述，參見Holliger及Hudson (2006) *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136及其中引用之參考文獻，該等文獻均明確地以引用的方式併入。

【0049】 如本文所用，「CDR」意指抗體可變結構域之「互補決定區」。CDR中所包括之殘基的系統鑑別已由Kabat開發(Kabat等人, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)及替代地由Chothia開發[Chothia及Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 ; Chothia等人, (1989) *Nature* 342: 877-883 ; Al-Lazikani等人, (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-948]。出於本發明目的，將CDR定義為比Chothia定義之CDR略小的殘基集。V_L CDR在本文中定義為包括在位置27-32 (CDR1)、50-56 (CDR2)及91-97 (CDR3)處之殘基，其中根據Chothia進

行編號。因為Chothia及Kabat定義之V_L CDR一致，所以此等V_L CDR位置之編號亦根據Kabat進行。V_H CDR在本文中定義為包括在位置27-33 (CDR1)、52-56 (CDR2)及95-102 (CDR3)處之殘基，其中根據Chothia進行編號。此等V_H CDR位置對應於Kabat位置27-35 (CDR1)、52-56 (CDR2)及95-102 (CDR3)。

【0050】如熟習此項技術者所瞭解，本文所揭示之CDR亦可包括變異體，例如，當將本文所揭示之CDR回復突變入不同構架區時。通常，個別變異CDR之間的核酸一致性相對於本文所述之序列係至少80%，且更典型地具有較佳增加的至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及幾乎100%之一致性。類似地，相對於本文中鑑別之結合蛋白的核酸序列，將「核酸序列一致性百分比(%)」定義為，候選序列中與抗原結合蛋白之編碼序列中之核苷酸殘基一致的核苷酸殘基之百分比。特定方法使用設置成預設參數的WU-BLAST-2之BLASTN模組，其中重疊跨度及重疊分數分別設置成1及0.125且不選擇過濾器。

【0051】通常，在編碼個別變異CDR之核苷酸序列與本文所述之核苷酸序列之間的核酸序列一致性係至少80%，且更典型地具有較佳增加的至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%及幾乎100%之一致性。

【0052】因而，「變異CDR」係如下CDR，其與本發明之親本CDR具有規定的同源性、相似性或一致性且共有生物學功能，包括但不限於親本CDR之至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或

99%的特異性及/或活性。

【0053】 儘管用於引入胺基酸序列變異之位點或區係預先確定的，但突變本身不需要預先確定。例如，為最佳化突變在既定位點之效能，可在靶密碼子或區處實施隨機突變誘發，且針對所需活性之最佳組合，篩選表現之抗原結合蛋白CDR變異體。在具有已知序列之DNA中的預定位點處進行取代突變之技術係熟知的，例如，M13引子突變誘發及PCR突變誘發。使用如本文所述之抗原結合蛋白活性分析法進行突變體之篩選。

【0054】 胺基酸取代典型地係單個殘基；插入通常在約一個(1)至約二十個(20)胺基酸殘基之級別上，但可耐受明顯更大之插入。缺失之範圍係約一個(1)至約二十個(20)胺基酸殘基，但在一些情況下缺失可大得多。

【0055】 取代、缺失、插入或其任意組合可用來獲得最終的衍生物或變異體。通常，在一些胺基酸上進行此等改變，以便使分子之改變、尤其抗原結合蛋白之免疫原性及特異性最小化。然而，在某些情況下可耐受較大改變。

【0056】 如本文所用，「Fab」或「Fab區」意指包含V_H、C_{H1}、V_L及C_L免疫球蛋白結構域之多肽。Fab可指分離的此區，或在全長抗體、抗體片段或Fab融合蛋白或如本文概述之任何其他抗體實施例的情境下之此區。

【0057】 如本文所用，「Fv」或「Fv片段」或「Fv區」意指包含單一抗體之V_L及V_H結構域的多肽。

【0058】 如本文所用，「構架」意指抗體可變結構域之不包括定義為CDR之彼等區的區。各抗體可變結構域構架可進一步再分為由CDR分隔之連續區(FR1、FR2、FR3及FR4)。

【0059】如本文所用，術語抗體之「抗原結合部分」(或簡稱為「抗體部分」)係指保留與抗原(例如BST1)特異性結合之能力之一或多種抗體片段。已顯示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段執行。術語抗體之「抗原結合部分」所涵蓋的結合片段之實例包括(i) Fab片段，由 V_L/V_K 、 V_H 、 C_L 及 C_H1 結構域組成之單價片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，包含由二硫橋鍵在鉸鏈區連接之兩個Fab片段的雙價片段；(iii)基本上為帶有部分鉸鏈區之Fab的Fab'片段(參見FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul編, 第3次補充修訂版, 1993)；(iv)由 V_H 及 C_H1 結構域組成之Fd片段；(v)由抗體單臂之 V_L 及 V_H 結構域組成的Fv片段；(vi)由 V_H 結構域組成之dAb片段[Ward等人 (1989) *Nature* 341:544-546]；(vii)分離的互補決定區(CDR)；及(viii)奈米抗體，含有單個可變結構域及兩個恆定結構域之重鏈可變區。另外，雖然Fv片段之兩個結構域 V_L/V_K 及 V_H 由獨立基因編碼，但可使用重組方法，藉由能夠使其作為單條蛋白鏈產生之合成連接子將其連接，在該單條蛋白鏈中 V_L/V_K 區及 V_H 區配對以形成單價分子(稱作單鏈Fv (scFv)；參見例如Bird等人 (1988) *Science* 242:423-426；及Huston等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋在術語抗體之「抗原結合部分」內。使用熟習此項技術者已知的習知技術，獲得此等抗體片段，且按與完整抗體相同之方式針對用途篩選該等片段。

【0060】如本文所用，「分離的抗體」意指一種抗體，其實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體(例如與BST1特異性結合之分離的抗體實質上不含特異性結合不為BST1之抗原的抗體)。然而，與BST1特異性結合之分離的抗體可對其他抗原(諸如來自其他物種之BST1分子)具有交叉反應性。另外及/或替代地，分離的抗體可實質上不含呈自然界中通常

不可見之形式的其他細胞物質及/或化學品。

【0061】 在一些實施例中，本發明之抗體係重組蛋白、分離的蛋白質或實質上純的蛋白質。「分離的」蛋白質不伴有在其天然狀態下通常與其締合之至少一些物質，例如在既定樣品中按重量計構成總蛋白之至少約5%或至少約50%。應理解，視環境而定，分離的蛋白質可按重量計構成總蛋白含量之5%至99.9%。例如，可經由使用誘導型啟動子或高表現啟動子以顯著更高濃度產生蛋白質，以便以增加的濃度水準產生該蛋白質。在重組蛋白之情況下，該定義包括在此項技術中已知的類型廣泛之不天然產生抗體的生物及/或宿主細胞中產生抗體。

【0062】 如本文所用，術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指單一分子組成之抗體分子製劑。單株抗體組合物對特定抗原決定基顯示單一結合特異性及親和力。如本文所用，「多株抗體」係指如同完整動物中之情形一樣，由幾種B-淋巴細胞純系產生的抗體。

【0063】 如本文所用，「同型」係指由重鏈恆定區基因編碼之抗體類別(例如IgM或IgG1)。

【0064】 片語「識別抗原之抗體」及「對抗原特異之抗體」在本文中與術語「與抗原特異性結合之抗體」可互換使用。

【0065】 術語「抗體衍生物」係指任何修飾形式之抗體，例如抗體與另一試劑或抗體之共軛物(通常化學連接)。例如，本發明之抗體可共軛至試劑，包括但不限於聚合物(例如PEG)、毒素、標記等，如下文更充分描述。本發明之抗體可為非人類、嵌合、人類化或全人類的。關於嵌合抗體及人類化抗體概念之描述，參見Clark等人 (2000)及其中引用之參考文獻(Clark, 2000, Immunol Today 21:397-402)。嵌合抗體包含與人類抗體

之恆定區可操作地連接的非人類抗體之可變區，例如小鼠或大鼠來源之 V_H 及 V_L 結構域(參見例如美國專利第4,816,567號)。在一較佳實施例中，本發明之抗體係人類化的。如本文所用，「人類化」抗體意指包含人類構架區(FR)及一或多個來自非人類(通常小鼠或大鼠)抗體之互補決定區(CDR)的抗體。提供CDR之非人類抗體稱作「供體」且提供構架之人類免疫球蛋白稱作「受體」。人類化原則上依賴於將供體CDR移植至受體(人類) V_L 及 V_H 構架上(美國專利第5,225,539號)。此策略稱作「CDR移植」。經常需要將選擇的受體構架殘基「回復突變」成相應的供體殘基，以再次獲得在最初移植之構築體中喪失的親和力(US 5,530,101；US 5,585,089；US 5,693,761；US 5,693,762；US 6,180,370；US 5,859,205；US 5,821,337；US 6,054,297；US 6,407,213)。人類化抗體最佳地亦將包含免疫球蛋白恆定區之至少一部分，典型地為人類免疫球蛋白之相應部分，且因此典型地將包含人類Fc區。用於人類化非人類抗體之方法係此項技術中已知的，且可基本上遵循Winter及合作者之方法進行[Jones等人 (1986) Nature 321:522-525；Riechmann等人 (1988) Nature 332:323-329；Verhoeyen等人 (1988) Science, 239:1534-1536]。人類化鼠類單株抗體之額外實例亦為此項技術中已知的，例如結合人類蛋白C(O'Connor等人, 1998, Protein Eng 11:321-8)、介白素2受體[Queen等人 (1989) Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33]及人類表皮生長因子受體2[Carter等人 (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9]之抗體。在一替代實施例中，本發明之抗體可為全人類抗體，亦即，抗體序列為完全或實質上人類的。此項技術中已知用於產生全人類抗體之許多方法，包括使用轉殖基因小鼠[Bruggemann等人 (1997) Curr Opin Biotechnol 8:455-458]

或人類抗體文庫連同選擇方法 [Griffiths 等人 (1998) Curr Opin Biotechnol 9:102-108]。

【0066】 術語「人類化抗體」意在包括源自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植至人類構架序列上之抗體。可在人類構架序列內產生額外的構架區修飾，諸如Fc結構域胺基酸修飾，如本文所述。

【0067】 術語「嵌合抗體」意指可變區序列源自一個物種且恆定區序列源自另一物種之抗體，諸如可變區序列源自小鼠抗體且恆定區序列源自人類抗體之抗體。

【0068】 術語「特異性結合」(或「免疫特異性結合」)不意在表示，抗體排他性地與其預期靶結合，但在許多實施例中情況如此；亦即，抗體與其靶「特異性結合」且與樣品、細胞或患者中之其他組分不可偵測地結合或實質上不結合。然而，在一些實施例中，若與抗體針對非靶分子之親和力相比，抗體針對其預期靶之親和力係約5倍，則該抗體「特異性結合」。適當地，不存在與非預期物質(尤其健康人或動物之天然存在的蛋白質或組織)之顯著交叉反應或交叉結合。抗體對靶分子之親和力將為其對非靶分子之親和力的例如至少約5倍，諸如10倍，諸如25倍，尤其50倍且特別地100倍或更大。在一些實施例中，抗體或其他結合劑與抗原之間的特異性結合意指至少 10^6 M^{-1} 之結合親和力。抗體可例如以至少約 10^7 M^{-1} ，諸如在約 10^8 M^{-1} 至約 10^9 M^{-1} 、約 10^9 M^{-1} 至約 10^{10} M^{-1} 或約 10^{10} M^{-1} 至約 10^{11} M^{-1} 之間的親和力結合。抗體可例如以50 nM或更小、10 nM或更小、1 nM或更小、100 pM或更小、或更佳10 pM或更小之 EC_{50} 結合。

【0069】 如本文所用，術語「實質上不結合」蛋白質或細胞意指不

結合或不以高親和力結合蛋白質或細胞，亦即以 1×10^{-6} M或更大、更佳 1×10^{-5} M或更大、更佳 1×10^{-4} M或更大、更佳 1×10^{-3} M或更大、甚至更佳 1×10^{-2} M或更大之 K_D 與蛋白質或細胞結合。

【0070】如本文所用，術語「 EC_{50} 」意指藉由定量導致50%最大反應/作用之濃度所確定的化合物之效力。可藉由Scratchard或FACS確定 EC_{50} 。

【0071】如本文所用，術語「 K_{assoc} 」或「 K_a 」意指特定抗體-抗原相互作用之締合速率，而如本文所用，術語「 K_{dis} 」或「 K_d 」意指特定抗體-抗原相互作用之解離速率。如本文所用，術語「 K_D 」意指親和力常數，其自 K_d 對 K_a 之比率(亦即 K_d/K_a)獲得，且表示為莫耳濃度(M)。可使用此項技術中充分確立之方法確定抗體之 K_D 值。一種用於確定抗體之 K_D 的較佳方法係使用表面電漿子共振法，較佳使用生物傳感器系統諸如Biacore[®]系統。

【0072】如本文所用，用於IgG抗體之術語「高親和力」係指抗體針對靶抗原具有 1×10^{-7} M或更小、更佳 5×10^{-8} M或更小、甚至更佳 1×10^{-8} M或更小、甚至更佳 5×10^{-9} M或更小、且甚至更佳 1×10^{-9} M或更小之 K_D 。然而，「高親和力」結合可隨其他抗體同型而變動。例如，用於IgM同型之「高親和力」結合係指抗體具有 10^{-6} M或更小、更佳 10^{-7} M或更小、甚至更佳 10^{-8} M或更小之 K_D 。

【0073】術語「抗原決定基」或「抗原決定子」係指免疫球蛋白或抗體所特異性結合至之抗原上的位點。抗原決定基可由連續胺基酸或因蛋白質之三級摺疊而並列的非連續胺基酸形成。由連續胺基酸形成之抗原決定基典型地在曝露於變性溶劑時保留，而因三級摺疊形成之抗原決定基典

型地在用變性溶劑處理時喪失。抗原決定基典型地包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個處於獨特空間構形之胺基酸。確定抗原決定基之空間構形的方法包括此項技術中之技術及本文所述之技術，例如x射線晶體學及2-維核磁共振[參見例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷, G. E. Morris編(1996)]。

【0074】 因此，本發明亦包括醫藥組合，其包含結合(亦即識別)與BST1_A2相同之抗原決定基的抗體。與相同抗原決定基結合之抗體可藉由其與參考抗體以統計學顯著的方式交叉競爭靶抗原(亦即競爭性抑制參考抗體與靶抗原之結合)之能力來鑑別。例如，若抗體與一致或結構上相似的抗原決定基(例如重疊抗原決定基)或空間上接近的抗原決定基結合，則可出現競爭性抑制，該等空間上接近的抗原決定基在結合時在抗體之間造成位阻。

【0075】 可使用測試之免疫球蛋白抑制參考抗體與共同抗原之特異性結合的例行分析法來確定競爭性抑制。眾多類型的競爭性結合分析法係已知的，例如：固相直接或間接放射免疫分析法(RIA)、固相直接或間接酶免疫分析法(EIA)、夾心競爭分析法[參見Stahl等人 (1983) Methods in Enzymology 9:242]；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA [參見Kirkland等人 (1986) J. Immunol. 137:3614]；固相直接標記的分析法、固相直接標記的夾心分析法[參見Harlow及Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press]；使用I-125標記之固相直接標記RIA [參見Morel等人 (1988) Mol. Immunol. 25(1):7)]；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA [Cheung等人 (1990) Virology 176:546]；及直接標記的RIA

[Moldenhauer等人 (1990) Scand. J. Immunol. 32:77]。典型地，該種分析法涉及使用與具有未標記之測試免疫球蛋白及標記之參考免疫球蛋白的固體表面或細胞結合之純化抗原。藉由測定在測試免疫球蛋白存在下與固體表面或細胞結合之標記的量，量測競爭性抑制。通常，測試免疫球蛋白過量存在。通常，當競爭性抗體過量存在時，其將抑制參考抗體與共同抗原之特異性結合至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。

【0076】 其他技術包括例如抗原決定基定位方法，諸如抗原:抗體複合物晶體之x射線分析，其提供抗原決定基之原子解析度。其他方法監測抗體與抗原片段或抗原之突變變型的結合，其中經常將因抗原序列內之胺基酸殘基修飾所致的結合喪失視為抗原決定基組分之指標。此外，亦可使用用於抗原決定基定位之計算組合方法。此等方法依賴於目的抗體自組合噬菌體呈現肽文庫中親和分離特定短肽之能力。隨後將該等肽視為用於確定與用來篩選肽文庫之抗體相對應的抗原決定基之先導。為進行抗原決定基定位，亦開發已顯示能夠定位構形不連續抗原決定基之計算算法。

【0077】 如本文所用，術語「受試者」包括任何人類或非人類動物。術語「非人類動物」包括全部脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、羊、犬、貓、馬、乳牛、雞、兩棲動物、爬行動物等。

【0078】 本發明之多個態樣在以下子部分進一步詳細描述。

【0079】 本發明係關於醫藥組合，其包含如本文所定義之組分(A)及(B)，其中該醫藥組合呈組合製劑形式用於同時、單獨或依序用途。組分(A)係關於如本文所定義之抗BST1抗體。組分(B)係關於胞苷類似物或

其醫藥學上可接受之鹽。

【0080】

抗BST1抗體

本發明之醫藥組合的抗體特徵為抗體之特定功能特徵或特性。例如，抗體與人類BST1特異性結合。較佳地，本發明之抗體以高親和力例如以 8×10^{-7} M或更小、甚至更典型地 1×10^{-8} M或更小之 K_D 與BST1結合。抗BST1抗體較佳顯示出一或多種以下特徵，其中抗體顯示出兩種特定用途：

以50 nM或更小、10 nM或更小、1 nM或更小、100 pM或更小、或更佳10 pM或更小之 EC_{50} 與人類BST1結合；

與表現BST1之人類細胞結合。

【0081】 在一個實施例中，抗體較佳與BST1中存在之抗原抗原決定基結合，該抗原決定基不存在於其他蛋白質中。較佳地，抗體不與相關蛋白質結合，例如，抗體基本上不與其他細胞黏附分子結合。在一個實施例中，抗體可內化入表現BST1之細胞。評價抗體內化作用之標準分析法係此項技術中已知的，包括例如MabZap或HumZap內化分析法。

【0082】 評價抗體針對BST1之結合能力的標準分析法可在蛋白質水準或細胞水準上進行且為此項技術中已知的，包括例如ELISA、西方墨點法(Western blots)、RIA、Biacore[®]分析法及流式細胞分析。在實施例中詳述適合的分析法。亦可藉由此項技術中已知的標準分析法，諸如藉由Biacore[®]系統分析評估抗體之結合動力學(例如結合親和力)。為評估與Raji或Daudi B細胞腫瘤細胞之結合，Raji細胞(ATCC保藏號CCL-86)或Daudi細胞(ATCC保藏號CCL-213)可自公眾可獲得的來源諸如美國菌種保

存中心(American Type Culture Collection)獲得，且用於標準分析法(諸如流式細胞分析)。

【0083】

單株抗體

本發明之醫藥組合之較佳抗體係如實例1-4中所描述而分離且結構表徵的單株抗體BST1_A2及其變異體。BST1_A2之V_H胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 2中。BST1_A2之V_K胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 4中。

【0084】 鑒於此抗體可結合至BST1，V_H及V_K序列可變異以產生其他抗BST1結合分子。該等變異抗體之BST1結合可使用上文及實例中所描述的結合分析法(例如ELISA)測試。

【0085】 因此，在一個態樣中，該醫藥組合包含抗體，其包含：包含SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列的重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列的輕鏈可變區，其中該抗體特異性結合至BST1、較佳人類BST1。

【0086】 本文所揭示之抗體的CDR區係使用Kabat系統描繪[Kabat, E. A.等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版，美國衛生及公眾服務部(US Department of Health and Human Services), NIH出版號91-3242]。

【0087】 抗體結合至BST1之能力可使用上文及實例中所描述的結合分析法(例如ELISA、Biacore[®]分析)測試。

【0088】 在另一較佳實施例中，該抗體具有：

包含SEQ ID NO: 10之重鏈可變區CDR1；

包含SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 51之重鏈可變區CDR2；

包含SEQ ID NO: 14之重鏈可變區CDR3；

包含SEQ ID NO: 16之輕鏈可變區CDR1；

包含SEQ ID NO: 18之輕鏈可變區CDR2；及

包含SEQ ID NO: 20之輕鏈可變區CDR3。

【0089】 此項技術中熟知，CDR3結構域，獨立於CDR1及/或CDR2結構域，可單獨決定抗體對相應抗原之結合特異性，且可基於共同CDR3序列可預測地產生具有相同結合特異性之多種抗體。參見例如Klimka等人 (2000) *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (描述僅使用鼠類抗CD30抗體Ki-4之重鏈可變結構域CDR3產生人類化抗CD30抗體)；Beiboer等人 (2000) *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (描述僅使用親本鼠類MOC-31抗EGP-2抗體之重鏈CDR3序列的重組上皮糖蛋白-2 (EGP-2)抗體)；Rader等人 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8910-8915 (描述使用鼠類抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗體LM609之重鏈及輕鏈可變CDR3結構域的一組人類化抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 抗體，其中各成員抗體在CDR3結構域外部包含獨特序列且能夠以與親本鼠類抗體同樣高或更高的親和力結合與親本鼠類抗體相同之抗原決定基)；Barbas等人 (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (揭示CDR3結構域為抗原結合提供最顯著貢獻)；Barbas等人 (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:2529-2533 (描述將針對人類胎盤DNA之三種Fab (SI-1、SI-40及SI-32)的重鏈CDR3序列移植至抗破傷風類毒素Fab之重鏈上並置換現有重鏈CDR3，且證實該CDR3結構域單獨賦予結合特異性)；及Ditzel等人 (1996) *J. Immunol.* 157:739-749 (描述移植研究，其中僅將親本多特異性Fab LNA3之重鏈CDR3轉移至單特異性IgG結合破傷風類毒素之Fab p313抗體的重鏈即足以保留親本Fab之結合特異性)。此等參考文獻中之每

一者均特此以引用的方式完整地併入。

【0090】 因此，本發明提供醫藥組合，其包括包含一或多個重鏈及/或輕鏈CDR3結構域之單株抗體，該等CDR3結構域來自衍生於人類或非人類動物之抗體，其中該單株抗體能夠與BST1特異性結合。在某些態樣內，單株抗體包含一或多個重鏈及/或輕鏈CDR3結構域，該CDR3結構域來自非人類抗體諸如小鼠或大鼠抗體，其中該單株抗體能夠與BST1特異性結合。在一些實施例內，包含來自非人類抗體之一或多個重鏈及/或輕鏈CDR3結構域的該等本發明抗體(a)能夠與相應的親本非人類抗體競爭結合；(b)保留相應的親本非人類抗體之功能特徵；(c)結合與相應的親本非人類抗體相同之抗原決定基；及/或(d)具有與相應的親本非人類抗體相似之結合親和力。

【0091】 在其他態樣內，本發明提供醫藥組合，其包括包含一或多個重鏈及/或輕鏈CDR3結構域之單株抗體，該等CDR3結構域來自人類抗體，諸如自非人類動物獲得的人類抗體，其中該人類抗體能夠與BST1特異性結合。在其他態樣內，單株抗體包含一或多個重鏈及/或輕鏈CDR3結構域，該CDR3結構域來自第一人類抗體，諸如自非人類動物獲得之人類抗體，其中第一人類抗體能夠與BST1特異性結合，且其中來自第一人類抗體之CDR3結構域置換對BST1缺少結合特異性之人類抗體中的CDR3結構域，以產生能夠與BST1特異性結合之第二人類抗體。在一些實施例內，包含來自第一人類抗體之一或多個重鏈及/或輕鏈CDR3結構域的該等本發明抗體(a)能夠與相應的親本第一人類抗體競爭結合；(b)保留相應的親本第一人類抗體之功能特徵；(c)結合與相應的親本第一人類抗體相同之抗原決定基；及/或(d)具有與相應的親本第一人類抗體相似之結合親和

力。

【0092】

具有特定生殖系序列之抗體

在本發明之某些實施例中，抗體包含來自特定生殖系重鏈免疫球蛋白基因之重鏈可變區及/或來自特定生殖系輕鏈免疫球蛋白基因之輕鏈可變區。

【0093】 例如，在一較佳實施例中，本發明提供醫藥組合，其包含分離的單株抗體或其抗原結合部分，該分離的單株抗體或其抗原結合部分包含作為鼠類V_H 1-39基因、鼠類V_H 1-80基因或鼠類V_H 69-1基因之產物或源自鼠類V_H 1-39基因、鼠類V_H 1-80基因或鼠類V_H 69-1基因的重鏈可變區，其中該抗體與BST1特異性結合。在又一較佳實施例中，本發明提供醫藥組合，其包含分離的單株抗體或其抗原結合部分，該分離的單株抗體或其抗原結合部分包含作為鼠類V_K 4-55基因、鼠類V_K 4-74基因或鼠類V_K 44-1基因之產物或源自鼠類V_K 4-55基因、鼠類V_K 4-74基因或鼠類V_K 44-1基因的輕鏈可變區，其中該抗體與BST1特異性結合。

【0094】 在又一較佳實施例中，本發明提供包含分離的單株抗體或其抗原結合部分之醫藥組合，其中該抗體：

【0095】 包含作為鼠類V_H 1-39基因(該基因包括SEQ ID NO: 35及36中所闡述之核苷酸序列)之產物或源自鼠類V_H 1-39基因的重鏈可變區；包含作為鼠類V_K 4-55基因(該基因包括SEQ ID NO: 40、41及42中所闡述之核苷酸序列)之產物或源自鼠類V_K 4-55基因的輕鏈可變區；且與BST1、較佳人類BST1特異性結合。具有V_H 1-39及V_K 4-55基因(具有上文描述之序列)的抗體之實例係BST1_A2。

【0096】 在又一較佳實施例中，本發明提供醫藥組合，其包含分離的單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體：

【0097】 包含作為鼠類V_H 1-80基因(該基因包括SEQ ID NO: 33及34中所闡述之核苷酸序列)之產物或源自鼠類V_H 1-80基因的重鏈可變區；包含作為鼠類V_K 4-74基因(該基因包括SEQ ID NO: 37、38及39中所闡述之核苷酸序列)之產物或源自鼠類V_K 4-74基因的輕鏈可變區；且與BST1、較佳人類BST1特異性結合。具有V_H 1-80及V_K 4-74基因(具有上文描述之序列)的抗體之實例係BST1_A1。

【0098】 在又一較佳實施例中，本發明提供醫藥組合，其包含分離的單株抗體或其抗原結合部分，其中該抗體：

【0099】 包含作為鼠類V_H 69-1基因(該基因包括SEQ ID NO: 68及69中所闡述之核苷酸序列)之產物或源自鼠類V_H 69-1基因的重鏈可變區；包含作為鼠類V_K 44-1基因(該基因包括SEQ ID NO: 70、71及72中所闡述之核苷酸序列)之產物或源自鼠類V_K 44-1基因的輕鏈可變區；且與BST1、較佳人類BST1特異性結合。具有V_H及V_K基因(具有上文描述之序列)的抗體之實例係BST1_A3。

【0100】 如本文所用，若抗體之可變區自使用鼠類生殖系免疫球蛋白基因之系統獲得，則抗體包含作為特定生殖系序列「之產物」或「源自」特定生殖系序列的重鏈或輕鏈可變區。該等系統包括，用目的抗原篩選噬菌體上呈現之鼠類免疫球蛋白基因文庫。因此可藉由以下方式鑑別作為鼠類生殖系免疫球蛋白序列「之產物」或「源自」鼠類生殖系免疫球蛋白序列的抗體：將抗體之核苷酸或胺基酸序列與鼠類生殖系免疫球蛋白之核苷酸或胺基酸序列比較，且選出在序列方面與抗體之序列最接近(亦即

最大一致性%)的鼠類生殖系免疫球蛋白序列。作為特定鼠類生殖系免疫球蛋白序列「之產物」或「源自」特定鼠類生殖系免疫球蛋白序列的抗體與該生殖系序列相比，可含有胺基酸差異，例如因天然存在之體細胞突變或人為引入之定點突變所致的胺基酸差異。然而，選擇的抗體典型地在胺基酸序列上與鼠類生殖系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列至少90%一致，且含有與其他物種之生殖系免疫球蛋白胺基酸序列(例如人類生殖系序列)相比時，將該抗體鑑別為鼠類的胺基酸殘基。在某些情況下，抗體可在胺基酸序列上與生殖系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。典型地，源自特定鼠類生殖系序列之抗體與鼠類生殖系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列相比，顯示不多於10個胺基酸的差異。在某些情況下，抗體與生殖系免疫球蛋白基因所編碼之胺基酸序列相比，可顯示不多於5個、或甚至不多於4、3、2或1個胺基酸的差異。

【0101】

同源抗體

在本發明之又一實施例中，抗體包含重鏈及輕鏈可變區，該等可變區包含與本文所述之較佳抗體(例如BST1_A2)的胺基酸序列同源之胺基酸序列，且其中該等抗體保留親本抗BST1抗體之期望的功能特性。

【0102】 例如，本發明提供醫藥組合，其包括包含重鏈可變區及輕鏈可變區之分離的單株抗體或其抗原結合部分，其中該重鏈可變區包含與SEQ ID NO: 2之胺基酸序列至少80%一致的胺基酸序列；該輕鏈可變區包含與SEQ ID NO: 4之胺基酸序列至少80%一致的胺基酸序列；且抗體與人類BST1結合。該等抗體可以50 nM或更小、10 nM或更小、1 nM或

更小、100 pM或更小、或更佳10 pM或更小之EC₅₀與人類BST1結合。

【0103】 抗體亦可與用人類BST1轉染之CHO細胞結合。

【0104】 在多種實施例中，抗體可為例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

【0105】 在其他實施例中，V_H及/或V_K胺基酸序列可與上文所闡述之序列85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源。可藉由以下方式獲得具有與上文所闡述序列之V_H及V_K區高度一致(亦即80%或更大)的V_H及V_K區之抗體：突變誘發(例如定點或PCR介導之突變誘發)編碼SEQ ID NO: 6及8之核酸分子，隨後使用本文所述之功能分析法，針對保留之功能測試編碼之改變的抗體。

【0106】 兩個序列之間的一致性百分比係該等序列所共有之一致位置的數目之函數(亦即同源性% =一致位置數目/總位置數目×100)，考慮為最佳比對兩個序列而需要引入的空隙之數目及各空隙之長度。可使用如下文非限制性實例中所述之數學算法，完成兩個序列之間的序列之比較及一致性百分比之確定。

【0107】 可利用已併入ALIGN程式(2.0版)之E. Meyers及W. Miller算法[Comput. Appl. Biosci. (1988) 4:11-17]，使用PAM120加權餘數表、12之空隙長度罰分，4之空隙罰分，確定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比。此外，可使用已併入GCG套裝軟體(在<http://www.gcg.com>可獲得)之GAP程式中的Needleman及Wunsch [J. Mol. Biol. (1970) 48:444-453]算法，使用Blossum 62矩陣或PAM250矩陣，及16、14、12、10、8、6或4之空隙權重，及1、2、3、4、5或6之長度權重，確定兩個胺基酸序列之間的一致性百分比。

【0108】 另外或替代地，可進一步使用本發明之蛋白質序列作為「查詢序列」以針對公共資料庫進行搜尋，以例如鑑別相關序列。該等搜尋可使用Altschul等人 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10之XBLAST程式(2.0版)進行。可用XBLAST程式、記分= 50、字長= 3進行BLAST蛋白質搜尋，以獲得與本發明之抗體分子同源的胺基酸序列。為獲得帶空隙之比對(出於比較目的)，可如Altschul等人 (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402所述，使用有空隙之BLAST。當使用BLAST及有空隙之BLAST程式時，可使用各別程式(例如XBLAST及NBLAST)之預設參數。參見www.ncbi.nlm.nih.gov。

【0109】

具有保守修飾之抗體

在某些實施例中，本發明之抗體包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3序列；及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3序列，其中此等CDR序列中之一或多者包含基於本文所述較佳抗體(亦即BST1_A2)的指定胺基酸序列，或其保守修飾，且其中該等抗體保留抗BST1抗體之期望的功能特性。因此，本發明提供一種醫藥組合，該醫藥組合包含分離的單株抗體或其抗原結合部分，該分離的單株抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區，該重鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3序列；及輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含CDR1、CDR2及CDR3序列，其中：重鏈可變區CDR3序列包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列及其保守修飾；輕鏈可變區CDR3序列包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列及其保守修飾；且該抗體以50 nM或更小、10 nM或更小、1 nM或更小、100 pM或更小、或更佳10 pM或更小之EC₅₀與人類BST1結合。

【0110】 抗體亦可與用人類BST1轉染之CHO細胞結合。

【0111】 在一較佳實施例中，重鏈可變區CDR2序列包含SEQ ID NO: 12或51之胺基酸序列及其保守修飾；且輕鏈可變區CDR2序列包含SEQ ID NO: 18之胺基酸序列及其保守修飾。在另一較佳實施例中，重鏈可變區CDR1序列包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列及其保守修飾；且輕鏈可變區CDR1序列包含SEQ ID NO: 16之胺基酸序列及其保守修飾。在另一較佳實施例中，重鏈可變區CDR3序列包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列及其保守修飾；且輕鏈可變區CDR3序列包含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列及其保守修飾。

【0112】 在多種實施例中，抗體可為例如人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。

【0113】 如本文所用，術語「保守序列修飾」意指不顯著影響或改變含有胺基酸序列之抗體的結合特徵之胺基酸修飾。該等保守修飾包括胺基酸取代、添加及缺失。可藉由此項技術中已知的標準技術，諸如定點突變誘發及PCR介導之突變誘發向本發明之抗體引入修飾。保守胺基酸取代係胺基酸殘基經具有相似側鏈的胺基酸殘基置換的胺基酸取代。此項技術中已定義具有相似側鏈的胺基酸殘基之家族。此等家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電荷極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 β -分支側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。因而，可將本文所揭示之抗體的CDR區內之一或多個胺

基酸殘基置換為來自相同側鏈家族之其他胺基酸殘基，且可使用本文所述之功能分析法，針對保留的功能測試改變的抗體。

【0114】 SEQ ID NO: 10之重鏈CDR1序列可包含一或多個保守序列修飾，諸如一個、兩個、三個、四個、五個或更多個胺基酸取代、添加或缺失；SEQ ID NO: 16之輕鏈CDR1序列可包含一或多個保守序列修飾，諸如一個、兩個、三個、四個、五個或更多個胺基酸取代、添加或缺失；SEQ ID NO: 12或51中所示之重鏈CDR2序列可包含一或多個保守序列修飾，諸如一個、兩個、三個、四個、五個或更多個胺基酸取代、添加或缺失；SEQ ID NO: 18中所示之輕鏈CDR2序列可包含一或多個保守序列修飾，諸如一個、兩個、三個、四個、五個或更多個胺基酸取代、添加或缺失；SEQ ID NO: 14中所示之重鏈CDR3序列可包含一或多個保守序列修飾，諸如一個、兩個、三個、四個、五個或更多個胺基酸取代、添加或缺失；及/或SEQ ID NO: 20中所示之輕鏈CDR3序列可包含一或多個保守序列修飾，諸如一個、兩個、三個、四個、五個或更多個胺基酸取代、添加或缺失。

【0115】

結合與本發明抗BST1抗體相同之抗原決定基的抗體

在另一實施例中，本發明提供一種醫藥組合，其包含與BST1_A2結合人類BST1上之相同抗原決定基的抗體(亦即具有與BST1_A2交叉競爭與BST1之結合的能力之抗體)。

【0116】 該等交叉競爭性抗體可基於其在標準BST1結合分析法中與BST1_A2交叉競爭之能力來進行鑑別。例如，BIAcore分析、ELISA分析法或流式細胞術可用以展示與BST1_A2之交叉競爭。測試抗體抑制

BST1_A2與人類BST1結合之能力表明，測試抗體可與BST1_A2競爭與人類BST1之結合且因此結合人類BST1_A2上之相同抗原決定基。

【0117】

工程化及修飾的抗體

可使用具有本文所揭示之一或多個V_H及/或V_L序列的抗體(其可用作起始材料來工程化修飾的抗體)來製備本文所揭示之抗體，與起始抗體相比，該修飾的抗體可具有改變之特性。可藉由修飾一或兩個可變區(亦即V_H及/或V_L)內，例如一或多個CDR區內及/或一或多個構架區內之一或多個胺基酸，將抗體工程化。另外或替代地，可藉由修飾恆定區內之殘基(例如以改變抗體之效應功能)，將抗體工程化。

【0118】 在某些實施例中，CDR移植可用以將抗體之可變區工程化。抗體主要經由位於六個重鏈及輕鏈互補決定區(CDR)中之胺基酸殘基與靶抗原相互作用。出於此原因，個別抗體之間CDR內之胺基酸序列比CDR外之序列更多樣。因為CDR序列負責大部分的抗體-抗原相互作用，所以有可能藉由構築表現載體來表現模擬天然存在之特定抗體的特性之重組抗體，其中該等表現載體包括來自該天然存在之特定抗體的CDR序列，該等CDR序列移植至來自具有不同特性之不同抗體的構架序列上(參見例如Riechmann, L.等人 (1998) Nature 332: 323-327；Jones, P.等人 (1986) Nature 321:522-525；Queen, C.等人 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:10029-10033；Winter之美國專利第5,225,539號；及Queen等人之美國專利第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號及第6,180,370號)。

【0119】 因此，抗體可含有單株抗體BST1_A2之V_H及V_K CDR序

列，又可含有與此抗體不同之構架序列。

【0120】該等構架序列可自包括生殖系抗體基因序列之公共DNA資料庫或公佈之參考文獻中獲得。例如，鼠類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列可在IMGT (國際ImMunoGeneTics)鼠類生殖系序列資料庫(可在超文字傳送協定//www.imgt.cines.fr/?獲得)中以及在Kabat, E. A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版，美國衛生及公眾服務部，NIH出版號91-3242中找到；其中之每一者的內容明確地以引用的方式併入本文。作為另一實例，鼠類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列可在Genbank資料庫中找到。

【0121】使用熟習此項技術者熟知的稱作有空隙之BLAST的序列相似性搜尋方法之一[Altschul等人 (1997) Nucleic Acids Research 25:3389-3402]，將抗體蛋白質序列針對彙編之蛋白質序列資料庫進行比較。BLAST係一種試探性算法，其中抗體序列與資料庫序列之間的統計學顯著比對可能含有所比對字之高計分片段對(HSP)。記分無法藉由擴展或修剪而提高之片段對稱作命中(hit)。簡言之，轉譯資料庫中之核苷酸序列，且保留FR1至FR3構架區之間且包括FR1至FR3構架區的區。資料庫序列具有98個殘基之平均長度。移除在蛋白質之整個長度範圍內精確匹配的重複序列。使用程式blastp，預設標準參數(低複雜性過濾器例外，其關閉)及取代矩陣BLOSUM62、用於產生序列匹配的前5個命中之過濾器，進行蛋白質之BLAST搜尋。轉譯全部六個構架中之核苷酸序列，且將資料庫序列之匹配區段中無終止密碼子的構架視為潛在命中。此進而使用BLAST程式tblastx來證實，該tblastx轉譯全部六個構架中之抗體序列，且將彼等轉譯與資料庫中全部六個構架內動態轉譯之核苷酸序列相比較。

【0122】 一致性係在整個序列長度範圍內抗體序列與蛋白質資料庫之間的精確胺基酸匹配。陽性(一致性+取代匹配)不為一致，但存在由BLOSUM62取代矩陣指導之胺基酸取代。若抗體序列以相同一致性匹配兩個資料庫序列，則將具有最多陽性之命中確定為匹配性序列命中。

【0123】 用於本文所揭示之抗體的較佳構架序列係如下序列，其在結構上與選擇的本發明抗體所使用之構架序列相似，例如，與本發明之較佳單株抗體所使用的V_H 1-80構架序列、V_H 1-39構架序列、V_K 4-74構架序列及/或V_K 4-55構架序列相似。可將V_H CDR1、CDR2及CDR3序列及V_K CDR1、CDR2及CDR3序列移植至如下構架區上，該等構架區之序列與構架序列源自之生殖系免疫球蛋白基因中存在的序列一致，或可將該等CDR序列移植至與生殖系序列相比含有一或多個突變之構架區上。例如，已發現在某些情況下，使構架區內之殘基突變有益於維持或增強抗體之抗原結合能力(參見例如，Queen等人之美國專利第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號及第6,180,370號)。

【0124】 另一類型之可變區修飾係使V_H及/或V_K CDR1區、CDR2區及/或CDR3區內之胺基酸殘基突變，以改良目的抗體之一或多種結合特性(例如親和力)。可進行定點突變誘發或PCR介導之突變誘發以引入突變，且可在如本文所述及實例中提供的活體外或活體內分析法中評價對抗體結合或其他目的功能特性之影響。在一些實施例中，引入保守修飾(如上文所討論)。替代地，可進行非保守修飾。突變可為胺基酸取代、添加或缺失，但較佳為取代。另外，典型地改變CDR區內的不多於一個、兩個、三個、四個或五個殘基，但如熟習此項技術者所理解，其他區域(例如構架區)內之變異體可更大。

【0125】 本發明之工程化抗體包括例如為改良抗體特性而對 V_H 及/ V_K 內之構架殘基進行修飾的抗體。典型地，進行該等構架修飾以降低抗體之免疫原性。例如，一種方法係將一或多個構架殘基「回復突變」成相應的生殖系序列。更特定言之，已經歷體細胞突變之抗體可含有與該抗體所源自之生殖系序列不同的構架殘基。可藉由將抗體構架序列與該抗體所源自之生殖系序列比較而鑑別該等殘基。

【0126】 另一類型之構架修飾涉及，使構架區內、或甚至一或多個CDR區內之一或多個殘基突變，以移除T細胞抗原決定基，從而降低抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱作「去免疫化」且在美國專利公開案第2003/0153043號中更詳細地描述。

【0127】 除了在構架區或CDR區內進行修飾之外或作為替代，抗體可進行工程化以在Fc區內包括修飾，典型地旨在改變抗體之一或多種功能特性，諸如血清半衰期、補體固定、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞的細胞毒性。另外，抗體可進行化學修飾(例如可將一或多個化學部分與抗體連接)或進行修飾以改變其糖基化，此再次旨在改變抗體之一或多種功能特性。下文進一步詳細描述此等實施例中之每一者。Fc區中殘基之編號係Kabat之EU索引的編號。

【0128】 在一個實施例中，修飾 C_H1 之鉸鏈區，以便改變(例如增加或減少)鉸鏈區中半胱胺酸殘基之數目。此方法在美國專利第5,677,425號中進一步描述。改變 C_H1 之鉸鏈區中半胱胺酸殘基的數目，以便例如促進輕鏈及重鏈之組裝或提高或降低抗體之穩定性。

【0129】 在另一實施例中，將抗體之Fc鉸鏈區突變以減少抗體之生物學半衰期。更特定言之，將一或多種胺基酸突變引入Fc-鉸鏈片段之

C_H2-C_H3結構域界面區，以便相對於天然Fc-鉸鏈結構域SpA結合，抗體具有削弱的葡萄球菌蛋白A (SpA)結合。此方法在美國專利第6,165,745號中進一步詳細描述。

【0130】 在另一實施例中，將抗體修飾以增加其生物學半衰期。多種方法係可能的。例如，可引入一或多個以下突變：T252L、T254S、T256F，如美國專利第6,277,375號中所述。替代地，為增加生物學半衰期，可在C_H1或C_L區內改變抗體以含有救助受體(salvage receptor)結合抗原決定基，該救助受體結合抗原決定基取自IgG之Fc區的C_H2結構域之兩個環，如美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

【0131】 在另一實施例中，將抗體產生為單抗體，如以引用的方式完整併入本文的WO2007/059782中所述。

【0132】 在又其他實施例中，藉由以下方式改變Fc區：將至少一個胺基酸殘基置換為不同胺基酸殘基以改變抗體之效應功能。例如，可將選自胺基酸殘基234、235、236、237、297、318、320及322之一或多個胺基酸置換為不同胺基酸殘基，以便抗體具有改變的效應配體親和力，但保留親本抗體之抗原結合能力。親和力改變之效應配體可為例如Fc受體或補體之C1組分。此方法在美國專利第5,624,821號及第5,648,260號中進一步詳細描述。

【0133】 在另一實例中，可將選自胺基酸殘基329、331及322之一或多個胺基酸置換為不同胺基酸殘基，以便抗體具有改變的C1q結合及/或降低或消除的補體依賴性細胞毒性(CDC)。此方法在美國專利第6,194,551號中進一步詳細描述。

【0134】 在另一實例中，改變胺基酸位置231及239內之一或多個胺

基酸殘基，以改變抗體固定補體之能力。此方法在PCT公開案WO 94/29351中進一步描述。

【0135】在又一實例中，藉由修飾以下位置處之一或多個胺基酸：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439，來修飾Fc區以增加抗體介導抗體依賴性細胞的細胞毒性(ADCC)之能力及/或以增加抗體對Fc γ 受體之親和力。此方法在Presta之PCT公開案WO 00/42072中進一步描述。另外，已定位人類IgG1上Fc γ R1、Fc γ R2、Fc γ R3及FcRn之結合位點，且已描述具有改良之結合的變異體(參見Shields, R.L.等人 (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。已顯示，在位置256、290、298、333、334及339處之特定突變改良與Fc γ R3之結合。另外，以下組合突變體顯示改良Fc γ R3結合：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A及S298A/E333A/K334A。其他的ADCC變異體例如在WO2006/019447中描述。

【0136】在又一實例中，修飾Fc區以增加抗體之半衰期，通常藉由增加與FcRn受體之結合來實現，如例如PCT/US2008/088053、US 7,371,826、US 7,670,600及WO 97/34631中所描述。在另一實施例中，修飾抗體以增加其生物學半衰期。多種方法係可能的。例如，可引入一個或多個以下突變：T252L、T254S、T256F，如Ward之美國專利第6,277,375

號中所述。替代地，為增加生物學半衰期，可在C_H1或C_L區內改變抗體以含有救助受體結合抗原決定基，該救助受體結合抗原決定基取自IgG之Fc區的C_H2結構域之兩個環，如美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

【0137】 在又一實施例中，修飾抗體之糖基化。例如，可產生無糖基化之抗體(亦即缺少糖基化之抗體)。可改變糖基化以便例如增加抗體對抗原之親和力。該等碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來完成。例如，可產生一或多個胺基酸取代，該等胺基酸取代導致消除一或多個可變區構架糖基化位點，從而消除在該位點處之糖基化。該無糖基化可增加抗體對抗原之親和力。該種方法在Co等人之美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中進一步詳細描述，且可藉由移除位置297處之天冬醯胺實現。

【0138】 另外或替代地，可產生抗體，該抗體具有改變的糖基化類型，諸如具有減少之岩藻糖基殘基數目的低岩藻糖基化抗體或具有增加之二分GlcNac結構的抗體。在此項技術中，此有時稱作「工程化糖型」。該等改變的糖基化模式已據證實可增加抗體之ADCC能力。該等碳水化合物修飾通常可以兩種方式完成；例如，在一些實施例中，在具有改變的糖基化機制之宿主細胞中表現抗體。此項技術中已描述具有改變的糖基化機制之細胞且其可用作表現本發明重組抗體之宿主細胞，從而產生具有改變的糖基化之抗體。參考POTELLIGENT®技術。例如，細胞株Ms704、Ms705及Ms709缺少岩藻糖基轉移酶基因FUT8 ($\alpha(1,6)$ 岩藻糖基轉移酶)，以便在Ms704、Ms705及Ms709細胞株中表現之抗體在其碳水化合物上缺少岩藻糖。藉由使用兩種置換載體在CHO/DG44細胞中靶向破壞FUT8基

因而產生Ms704、Ms705及Ms709 FUT8^{-/-}細胞株[參見美國專利公開案第2004/0110704號、美國專利第7,517,670號及Yamane-Ohnuki等人 (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614-22]。作為另一實例，Hanai等人之EP 1,176,195描述具有功能上破壞之FUT8基因的細胞株，該FUT8基因編碼岩藻糖基轉移酶，以便在該種細胞株中表現之抗體因減少或消除 α 1,6鍵相關酶而顯示出低岩藻糖基化。Hanai等人亦描述如下細胞株，其具有添加岩藻糖至與抗體之Fc區結合的N-乙醯葡萄糖胺的低酶活性或不具有該酶活性，例如大鼠骨髓瘤細胞株YB2/0 (ATCC CRL 1662)。替代地，可使用糖基化路徑酶之小分子抑制劑製備工程化糖型，尤其進行無岩藻糖化[參見例如Rothman等人 (1989) *Mol. Immunol.* 26(12):113-1123；Elbein (1991) *FASEB J.* 5:3055；PCT/US2009/042610；及美國專利第7,700,321號]。PCT公開案WO 03/035835描述一種變異CHO細胞株，Lec13細胞，該細胞株具有降低的連接岩藻糖至Asn(297)-連接之碳水化合物的能力，此亦導致在該宿主細胞中表現之抗體的低岩藻糖基化[亦參見Shields, R.L.等人 (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740]。PCT公開案WO 99/54342描述經工程化以表現修飾糖蛋白之糖基轉移酶(例如 β (1,4)-N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶III (GnTIII))的細胞株，以便在工程化的細胞株中表現之抗體顯示出增加的二分GlcNac結構，此導致抗體之增加的ADCC活性[亦參見Umana等人 (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180]。

【0139】 替代地，可使用岩藻糖苷酶裂解抗體之岩藻糖殘基。例如，岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶自抗體移除岩藻糖基殘基[Tarentino, A.L.等人 (1975) *Biochem.* 14:5516-23]。

【0140】 本發明涵蓋的本文中抗體之另一修飾係聚乙二醇化。抗體

可進行聚乙二醇化以例如增加抗體之生物學(例如血清)半衰期。為使抗體聚乙二醇化，典型地使抗體或其片段與聚乙二醇(PEG)諸如PEG之活性酯或醛衍生物在一或多個PEG基團變得與抗體或抗體片段連接之條件下反應。較佳地，可經由與反應性PEG分子(或類似的反應性水溶性聚合物)之醯化反應或烷化反應實施聚乙二醇化。如本文所用，術語「聚乙二醇」意欲包括，已用以衍生化其他蛋白質的任何形式之PEG，諸如單(C1-C10)烷氧基或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。在某些實施例中，待聚乙二醇化之抗體係無糖基化之抗體。使蛋白質聚乙二醇化之方法係此項技術中已知的且可適用於本發明之抗體。參見例如EP 0154316及EP 0401384。

【0141】 在另外的實施例中，抗體可包含標記。「標記的」在本文中意指，化合物連接有至少一種元素、同位素或化學化合物。一般而言，標記分成三類：a)同位素標記，其可為放射性同位素或重同位素；b)磁力的、電學的、熱學的標記；及c)有色或發光染料；但標記亦可包括酶及顆粒，諸如磁性顆粒。較佳標記包括但不限於螢光鐳系元素錯合物(包括鎳及鉍之錯合物)；及螢光標記，包括但不限於量子點、螢光素、若丹明(rhodamine)、四甲基若丹明、伊紅、赤蘚紅、香豆素、甲基-香豆素、芘、Malacite綠、芘、螢光黃(Lucifer Yellow)、Cascade藍、德克薩斯紅(Texas Red)、Alexa染料、Cy染料及在Richard P. Haugland之Molecular Probes Handbook第6版中描述的其他標記，該文獻明確地以引用的方式併入本文。

【0142】

連接子

本發明提供醫藥組合，其包含抗體經化學連接子與搭配物連接之抗體-搭配物共軛物。在一些實施例中，連接子係肽基連接子；其他連接子包括胍連接子及二硫橋鍵連接子。除連接子與搭配物連接之外，本發明亦提供可裂解之連接子臂，該等連接子臂適宜連接基本上任何分子物種。在本文中藉由參考本發明之連接子臂與治療性部分的連接來例舉連接子臂態樣。然而，對於熟習此項技術者顯而易見，連接子可連接至多樣的物種，包括但不限於診斷劑、分析劑、生物分子、靶向劑、可偵測標記及其類似物。

【0143】 肽基連接子及其他連接子在抗體-搭配物共軛物中之用途描述於美國臨時專利申請案第 60/295,196 號、第 60/295,259 號、第 60/295,342 號、第 60/304,908 號、第 60/572,667 號、第 60/661,174 號、第 60/669,871 號、第 60/720,499 號、第 60/730,804 號及第 60/735,657 號及美國專利申請案第 10/160,972 號、第 10/161,234 號、第 11/134,685 號、第 11/134,826 號及第 11/398,854 號以及美國專利第 6,989,452 號及 PCT 專利申請案第 PCT/US2006/37793 號中，該等文獻均以引用的方式併入本文。另外的連接子描述於美國專利第 6,214,345 號；美國專利申請案 2003/0096743；及美國專利申請案 2003/0130189；de Groot 等人, J. Med. Chem. 42, 5277 (1999)；de Groot 等人, J. Org. Chem. 43, 3093 (2000)；de Groot 等人, J. Med. Chem. 66, 8815, (2001)；WO 02/083180；Carl 等人, J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981)；Dubowchik 等人, Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998)；及美國臨時專利申請案第 60/891,028 號中。

【0144】 在一個態樣中，本發明涉及可用於將靶向基團與治療劑及

標誌物連接之連接子。在另一態樣中，本發明提供賦予給化合物穩定性、降低其等活體內毒性或另外有利地影響其等藥物代謝動力學、生物可用性及/或藥效動力學之連接子。通常較佳地，在該等實施例中，一旦將藥物遞送至其作用位點，該連接子會經裂解而釋放出活性藥物。因而，在一個實施例中，連接子係無痕的，以便一旦自治療劑或標誌物移除(諸如在活化期間)，不留下存在連接子之痕跡。在另一實施例中，連接子之特徵在於，其在靶細胞中或其附近的位點處(諸如在治療作用或標誌物活性之位點處)裂解的能力。該裂解本質上可為酶促的。此特徵有助於減少治療劑或標誌物之全身性活化，從而降低毒性及全身副作用。用於酶促裂解之較佳可裂解基團包括肽鍵、酯鍵及二硫橋鍵。在其他實施例中，該等連接子對pH敏感且可透由pH的變化進行裂解。

【0145】 本發明之一態樣係控制連接子裂解之速度的能力。通常需要迅速裂解之連接子。然而，在一些實施例中，更緩慢裂解之連接子係較佳的。例如，在持續釋放製劑中或在含有快速釋放組分及緩慢釋放組分之製劑中，提供更緩慢裂解之連接子可能為有用的。WO 02/096910提供幾種具有胍連接子之特定配體-藥物複合物。然而，沒有辦法視所需要的環化速率而「調節」連接子組成，且所描述之特定化合物以更緩慢速率(與許多藥物-連接子共軛物之較佳速率相比)自藥物裂解配體。相比之下，胍連接子可提供一系列環化速率(自極快至極慢)，因而允許基於所需的環化速率選擇特定胍連接子。

【0146】 例如，可用裂解時產生單個5員環之胍連接子實現極快環化。使用如下胍連接子實現向細胞靶向遞送細胞毒性劑之較佳環化速率，該等胍連接子在裂解時產生兩個5員環或單個6員環(其由在偕位(geminal

position)具有兩個甲基之連接子產生)。已顯示，與在偕位不具有兩個甲基之單個6員環相比，偕二甲基效應使環化反應速率加速。此係由於應力在環中得到緩解所致。然而，取代基有時可減緩反應，而非使加速反應。阻滯之原因經常可歸因於位阻。例如，與偕碳為 CH_2 時相比，偕二甲基取代允許發生快得多的環化反應。

【0147】 然而，重要的為注意到，在一些實施例中，更緩慢裂解之連接子可為較佳的。例如，在持續釋放製劑中或在含有快速釋放組分及緩慢釋放組分之製劑中，提供更緩慢裂解之連接子可為有用的。在某些實施例中，使用肼連接子實現慢環化速率，該肼連接子在裂解時產生單個6員環(無偕二甲基取代)或產生單個7員環。該等連接子亦用於使治療劑或標誌物在循環時穩定化，防止降解。此特徵提供顯著益處，因為該穩定化導致延長連接之試劑或標誌物的循環半衰期。連接子亦用於減弱連接之試劑或標誌物的活性，以便共軛物在循環時為相對良性的且在期望的作用位點活化後具有期望的作用，例如具有毒性。對於治療劑共軛物，連接子之此特徵用於改良試劑之治療指數。

【0148】 較佳地，選擇穩定化基團以限制治療劑或標誌物被可能存在於血液或非靶組織中之酶清除及代謝，且進一步選擇其以限制試劑或標誌物轉運至細胞中。穩定化基團用於阻斷試劑或標誌物之降解，且亦可用於提供試劑或標誌物之其他物理特徵。穩定化基團亦可提高試劑或標誌物在以調配或非調配形式儲存期間的穩定性。

【0149】 理想地，若穩定化基團在藉由以下方式測試時保護試劑或標誌物免遭降解：在人類血液中於 37°C 儲存試劑或標誌物2小時，且在既定分析條件下導致試劑或標誌物被人類血液中存在之酶裂解少於20%、較

佳少於10%、更佳少於5%且甚至更佳少於2%，則穩定化基團可用來使治療劑或標誌物穩定化。本發明亦關於含有此等連接子之共軛物。更特定言之，本發明係關於可用於治療疾病、尤其用於癌症化療的前藥之用途。具體而言，本文所述之連接子的使用提供如下前藥，其相比於結構相似之前藥，顯示高的作用特異性、降低的毒性及提高的血液中穩定性。如本文所述之本發明連接子可在搭配物分子內之多個位置處存在。

【0150】 因而，提供一種連接子，該連接子可含有多種基團中之任一者作為其鏈之部分，該等基團在活體內(例如在血流中)以相對於缺少該等基團之構築體而言增強的速率裂解。亦提供連接子臂與治療劑及診斷劑之共軛物。連接子可用於形成治療劑之前藥類似物，且可用於將治療劑或診斷劑可逆地連接於靶向劑、可偵測標記或固體支撐物。連接子可併入包括細胞毒素之複合物。

【0151】 前藥與抗體之連接可產生優於細胞毒性藥物之習知抗體共軛物的額外安全優勢。前藥之活化可藉由腫瘤細胞內及幾種正常組織(包括血漿)中之酯酶實現。已顯示，人類中相關酯酶活性之水準與在大鼠及非人類靈長類動物中觀測到之水準極其相似，但低於在小鼠中觀測到之水準。前藥之活化亦可藉由葡糖醛酸糖苷酶之裂解實現。除可裂解肽、胍或二硫橋鍵基團之外，視情況在細胞毒素與靶向劑之間引入一或多種自我分解型連接子基團。此等連接子基團亦可描述為間隔基團且含有至少兩個反應性官能基。典型地，間隔基團之一個化學官能基與治療劑(例如細胞毒素)之化學官能基鍵合，而間隔基團之另一化學官能基用來與靶向劑或可裂解連接子之化學官能基鍵合。間隔基團之化學官能基之實例包括羥基、巯基、羰基、羧基、胺基、酮基及巰基。

【0152】 自我分解型連接子通常為經取代或未經取代之烷基、經取代或未經取代之芳基、經取代或未經取代之雜芳基、或經取代或未經取代之雜烷基。在一個實施例中，烷基或芳基可包含1至20個碳原子。其亦可包含聚乙二醇部分。

【0153】 例示性間隔基團包括例如6-氨基己醇、6-巰基己醇、10-羥基癸酸、甘氨酸及其他胺基酸、1,6-己二醇、 β -丙氨酸、2-氨基乙醇、半胱胺(2-氨基乙硫醇)、5-氨基戊酸、6-氨基己酸、3-順丁烯二醯亞胺苯甲酸、苯酐、 α -取代之苯酐、羰基、動物酯、核酸、肽及其類似物。

【0154】 間隔子可用於向細胞毒素-靶向劑複合物中引入額外的分子質量及化學官能基。通常，額外的質量及官能基將影響複合物之血清半衰期及其他特性。因而，經由仔細選擇間隔基團，可產生具有一系列血清半衰期之細胞毒素複合物。

【0155】 當存在多個間隔子時，可使用相同或不同的間隔子。

【0156】 可使用額外的連接子部分，其較佳向利用含有該部分之連接子的共軛物賦予增加之溶解度或降低之聚集特性，或調節共軛物之水解速率，該等連接子不必為自我分解型的。在一個實施例中，連接部分係經取代之烷基、未經取代之烷基、經取代之芳基、未經取代之芳基、經取代之雜烷基、或未經取代之雜烷基，其中之任一者可為直鏈的、分支鏈的或環狀的。取代可為例如低級(C_1 - C_6)烷基、烷氧基、烷硫基、烷胺基或二烷胺基。在某些實施例中，連接子包含非環狀部分。在另一實施例中，連接子包含任何帶正電荷或帶負電荷之胺基酸聚合物，諸如聚離胺酸或聚精胺酸。連接子可包含聚合物，諸如聚乙二醇部分。另外，連接子可包含例如聚合物組分及小化學部分。在一較佳實施例中，該等連接子包含聚乙二

醇(PEG)部分。

【0157】 PEG部分可具有1與50個單元之間的長度。較佳地，PEG具有1-12個重複單元、更佳3-12個重複單元、更佳2-6重複單元、或甚至更佳3-5個重複單元、且最佳4個重複單元。連接子可完全由PEG部分組成，或其亦可含有額外的經取代或未經取代之烷基或雜烷基。有用的為，合併PEG作為該部分之一部分以增強複合物之水溶性。另外，PEG部分降低在藥物與抗體共軛期間可能發生的聚集之程度。

【0158】 關於細胞毒素類型、連接子以及使治療劑與抗體共軛之其他方法的進一步論述，亦參見 Gangwar 等人之名為「Cytotoxic Compounds And Conjugates」的PCT公開案WO 2007/059404；Saito, G. 等人, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215；Trail, P.A.等人 (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337；Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212；Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763；Pastan, I.及Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091；Senter, P.D.及Springer, C.J. (2001) Adv. Drag Deliv. Rev. 53:247-264，該等文獻中之每一者以引用的方式完整併入本文。

【0159】

搭配物分子

醫藥組合可包括與搭配物分子諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射性毒素共軛之抗體。該等共軛物在本文中亦稱作「免疫共軛物」。包括一或多種細胞毒素之免疫共軛物稱作「免疫毒素」。細胞毒素或細胞毒性劑包括有害於(例如殺死)細胞之任何試劑。

【0160】 本發明之搭配物分子之實例包括紫杉醇、細胞遲緩素B、

短桿菌肽D、溴化乙錠、吐根鹼、絲裂黴素、依託泊苷、替尼泊苷、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、多柔比星、道諾黴素、二羥基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神黴素、放線菌素D、1-脫氫鞣固酮、糖皮質激素、普魯卡因、四卡因、利多卡因、普萘洛爾及嘌呤黴素及其類似物或同源物。搭配物分子之實例亦包括例如抗代謝物(例如甲胺喋呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、達卡巴嗪)、烷化劑(例如氮芥、噻替派、氮芥苯丁酸、美法侖、卡莫司汀(BSNU)及洛莫司汀(CCNU)、環磷醯胺、白消安、二溴甘露醇、鏈佐黴素、絲裂黴素C及順-二氯二胺鉑(II) (DDP) 順鉑)、蒽環黴素(例如道諾黴素(daunorubicin)(以前稱道諾黴素(daunorubicin))及多柔比星)、抗生素(例如更生黴素(以前稱放線菌素)、博萊黴素、光神黴素及安黴黴素(AMC))以及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。

【0161】 可與較佳抗體共軛之搭配物分子的其他較佳實例包括多卡黴素(duocarmycin)、卡奇黴素、美登素及奧瑞斯他汀(auristatin)，及其衍生物。卡奇黴素抗體共軛物之實例係可商業獲得的(Mylotarg®；American Home Products)。

【0162】 搭配物分子之較佳實例係CC-1065及多卡黴素。CC-1065在1981年由Upjohn公司首次自澤耳鏈黴菌(*Streptomyces zelensis*)分離(Hanka等人, J. Antibiot. 31: 1211 (1978)；Martin等人, J. Antibiot. 33: 902 (1980)；Martin等人, J. Antibiot. 34: 1119 (1981))且發現其在活體外及在實驗動物中均具有強力抗腫瘤及抗微生物活性(Li等人, Cancer Res. 42: 999 (1982))。CC-1065與雙股B-DNA在小溝內結合(Swenson等人, Cancer Res. 42: 2821 (1982))，序列偏好性為5'-d(A/GNTTA)-3'及5'-

d(AAAAA)-3'，且藉由分子中存在的其CPI左手單元烷化3'-腺嘌呤之N3位置(Hurley等人, Science 226: 843 (1984))。

【0163】 儘管其強力且廣泛的抗腫瘤活性，但CC-1065不能用於人類中，因為其在實驗動物中造成遲發性死亡。CC-1065及多卡黴素之許多類似物及衍生物係此項技術中已知的。已綜述對許多該等化合物之結構、合成及特性的研究。參見例如Boger等人, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996)；及Boger等人, Chem. Rev. 97: 787 (1997)。Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd之一個組已製備許多CC-1065衍生物。參見例如美國專利第5,101,038號、第5,641,780號、第5,187,186號、第5,070,092號、第5,703,080號、第5,070,092號、第5,641,780號、第5,101,038號及第5,084,468號；及公佈的PCT申請案WO 96/10405及公佈的歐洲申請案0 537 575 A1。Upjohn公司(Pharmacia Upjohn)亦在積極製備CC-1065之衍生物。參見例如美國專利第5,739,350號、第4,978,757號、第5,332,837號及第4,912,227號。

【0164】

抗體物理特性

本文所揭示之抗體可進一步特徵為抗BST1抗體之多種物理特性。各種分析法可用於基於此等物理特性偵測及/或區分不同類別之抗體。

【0165】 在一些實施例中，本文所揭示之抗體可在輕鏈或重鏈可變區中含有一或多個糖基化位點。一或多個糖基化位點在可變區中之存在可導致抗體之免疫原性增加或抗體pK之改變(由於改變的抗原結合)[Marshall 等人 (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702；Gala FA 及 Morrison SL (2004) J Immunol 172:5489-94；Wallick等人 (1988) J Exp

Med 168:1099-109 ; Spiro RG (2002) Glycobiology 12:43R-56R ; Parekh等人 (1985) Nature 316:452-7 ; Mimura等人 (2000) Mol Immunol 37:697-706]。已知曉，糖基化在含有N-X-S/T序列之基元處發生。可使用糖墨點分析法(glycoblot assay)測試可變區糖基化，該糖墨點分析法裂解抗體以產生Fab，且隨後使用量測過碘酸鹽氧化及希夫鹼(Schiff base)形成之分析法測試糖基化。替代地，可使用Dionex輕層析法(Dionex-LC)測試可變區糖基化，該Dionex輕層析法將來自Fab之醣裂解成單醣並分析個別醣之含量。在一些情況下，較佳具有不含可變區糖基化之抗BST1抗體。可藉由選擇在可變區中不含有糖基化基元之抗體或藉由使用此項技術中熟知的標準技術突變糖基化基元內之殘基，實現此點。

【0166】 在一較佳實施例中，本文所揭示之抗體不含有天冬醯胺異構位點。脫醯胺化或異天冬胺酸作用可分別在N-G或D-G序列上發生。脫醯胺化或異天冬胺酸作用導致產生異天冬胺酸，此由於在側鏈羧基端而非主鏈外產生扭結結構而降低抗體之穩定性。可使用等量分析法量測異天冬胺酸之產生，該等量分析法使用逆相HPLC測試異天冬胺酸。

【0167】 各抗體具有獨特等電點(pI)，但抗體通常將落在6與9.5之間的pH範圍內。IgG1抗體之pI典型地落在7-9.5之pH範圍內且IgG4抗體之pI典型地落在6-8之pH範圍內。抗體可具有此範圍之外的pI。雖然作用通常未知，但存在猜想：具有在正常範圍之外的pI之抗體在活體內條件下可能具有一定解摺疊及不穩定性。可使用毛細管等電聚焦分析法測試等電點，該分析法產生pH梯度且可利用雷射對焦以增加準確度[Janini等人 (2002) Electrophoresis 23:1605-11 ; Ma等人 (2001) Chromatographia 53:S75-89 ; Hunt等人 (1998) J Chromatogr A 800:355-67]。在一些情況

下，較佳具有含有落在正常範圍內之pI值的抗BST1抗體。可藉由選擇pI處於正常範圍內之抗體或藉由使用此項技術中熟知的標準技術突變帶電荷之表面殘基，實現此點。

【0168】 各抗體具有指示熱穩定性之熔融溫度[Krishnamurthy R及Manning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71]。較高之熱穩定性指示較大之活體內總體抗體穩定性。可使用多種技術諸如差示掃描量熱法量測抗體之熔點[Chen等人 (2003) Pharm Res 20:1952-60；Ghirlando等人 (1999) Immunol Lett 68:47-52]。T_{M1}指示抗體開始解摺疊之溫度。T_{M2}指示抗體完成解摺疊之溫度。通常，較佳地，本文所揭示之抗體的T_{M1}大於60℃，較佳大於65℃，甚至更佳大於70℃。替代地，可利用圓二色性量測抗體之熱穩定性[Murray等人 (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9]。

【0169】 在一較佳實施例中，選擇不快速降解之抗體。可使用毛細管電泳法(CE)及MALDI-MS量測抗BST1抗體之片段化，如此項技術中公知的[Alexander AJ及Hughes DE (1995) Anal. Chem. 67:3626-32]。

【0170】 在另一較佳實施例中，選擇具有最小聚集效應之抗體。聚集可導致觸發不希望的免疫反應及/或改變的或不利的藥物代謝動力學特性。通常，可接受具有25%或更少、較佳20%或更少、甚至更佳15%或更少、甚至更佳10%或更少、且甚至更佳5%或更少之聚集的抗體。可藉由此項技術中熟知的用於鑑別單體、二聚體、三聚體或多聚體之幾項技術量測聚集，該等技術包括尺寸排阻管柱(SEC)高效液相層析法(HPLC)及光散射法。

【0171】

工程化抗體之方法

如上文所討論，具有本文所揭示之V_H及V_K序列的抗BST1抗體可用來藉由修飾V_H及/或V_K序列或與其連接之恆定區而產生新的抗BST1抗體。因而，較佳抗BST1抗體(例如BST1_A2)之結構特徵用來產生保留較佳抗體之至少一種功能特性(諸如與人類BST1結合)的結構上相關之抗BST1抗體。例如，可將BST1_A2之一或多個CDR區或其突變與已知的構架區及/或其他CDR重組地組合，以產生另外的重組工程化之抗BST1抗體，如上文所討論的。其他類型之修飾包括在先前章節中描述之彼等。用於工程化方法之起始材料係本文所提供之一或多個V_H及/或V_K序列或其一或多個CDR區。為產生工程化抗體，不需要實際地製備(亦即表現為蛋白質)具有本文所提供之一或多個V_H及/或V_K序列或其一或多個CDR區的抗體。相反地，使用序列中所含之資訊作為初始材料以產生源自原始序列之「第二代」序列，且隨後製備「第二代」序列且將其表現為蛋白質。

【0172】 標準分子生物學技術可用來製備並表現改變的抗體序列。

【0173】 較佳地，由改變的抗體序列編碼之抗體係如下抗體，其保留本文所述之抗BST1抗體的一種、一些或全部功能特性，該等功能特性包括但不限於：(a)以 1×10^{-7} M或更小之K_D與人類BST1結合；(b)與用BST1轉染之人類CHO細胞結合。

【0174】 可使用此項技術中可獲得的及/或本文所述的標準分析法，諸如實例中所述之彼等(例如流式細胞術、結合分析法)評估改變的抗體之功能特性。

【0175】 可沿著全部或部分的抗BST1抗體編碼序列隨機地或選擇性地引入突變，且可針對如本文所述之結合活性及/或其他功能特性，對所得到之修飾的抗BST1抗體進行篩選。此項技術中已描述突變方法。例

如，PCT公開案WO 02/092780描述使用飽和突變誘發、合成連接組裝或其組合產生並篩選抗體突變之方法。替代地，PCT公開案WO 03/074679描述使用計算篩選方法最佳化抗體之物理化學特性的方法。

【0176】

編碼抗體之核酸分子

亦揭示編碼本文所揭示之抗體的核酸分子。該等核酸可存在於完整細胞中，存在於細胞溶解物中，或可呈部分純化或實質上純的形式。當藉由標準技術(包括鹼/SDS處理、CsCl顯帶、管柱層析、瓊脂糖凝膠電泳)及此項技術中熟知的其他技術，與其他細胞組分或其他雜質(例如其他細胞核酸或蛋白質)分離純化時，核酸係「分離的」或「變得實質上純的」。參見F. Ausubel等人編 (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, N. Y.。此等核酸可為例如DNA或RNA且可含有或可不含有內含子序列。在一較佳實施例中，核酸係cDNA分子。

【0177】 可使用標準分子生物學技術獲得編碼本文所揭示之抗體的核酸。對於由融合瘤表現之抗體，可藉由標準PCR擴增或cDNA選殖技術獲得cDNA，該等cDNA編碼由融合瘤產生之抗體的輕鏈及重鏈。對於自免疫球蛋白基因文庫(例如使用噬菌體呈現技術)獲得之抗體，可自該文庫回收編碼抗體之核酸。

【0178】 較佳核酸分子係編碼BST1_A2單株抗體之V_H及V_K序列的彼等。編碼BST1_A2之V_H序列的DNA序列在SEQ ID NO: 6中顯示。編碼BST1_A2之V_K序列的DNA序列在SEQ ID NO: 8中顯示。

【0179】 其他較佳核酸係與SEQ ID NO: 6及8中所示的序列之一具

有至少80%序列一致性，諸如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性的核酸，該等核酸編碼較佳抗體或其抗原結合部分。

【0180】 兩個核酸序列之間的一致性百分比係序列中核苷酸一致的位置之數目，考慮為最佳比對兩個序列而需要引入的空隙之數目及各空隙之長度。兩個序列之間的序列之比較及一致性百分比之計算可利用數學算法實現，諸如上文所描述之Meyers及Miller算法或Altschul之XBLAST程式。

【0181】 此外，本發明之較佳核酸包含SEQ ID NO: 6及8中所示之核酸序列之一或多個編碼CDR的部分。在此實施例中，核酸可編碼BST1_A2之重鏈及輕鏈CDR1、CDR2及/或CDR3序列。

【0182】 與SEQ ID NO: 6及8 (V_H及V_K序列)之該種編碼CDR的部分具有至少80%、諸如至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性之核酸亦為本發明之較佳核酸。該等核酸可在非CDR編碼區中及/或在CDR編碼區中與SEQ ID NO: 6及8之相應部分不同。在差異處於CDR編碼區中之情況下，與BST1_A2之相應CDR序列相比，由該核酸編碼之核酸CDR區典型地含有如本文所定義之一或多個保守序列修飾。

【0183】 一旦獲得編碼V_H及V_K區段之DNA片段，即可藉由標準重組DNA技術進一步操縱此等DNA片段，例如以將可變區基因轉化成全長抗體鏈基因、轉化成Fab片段基因、或轉化成scFv基因。在此等操縱中，將編碼V_K或V_H之DNA片段與編碼另一蛋白質(諸如抗體恆定區或可撓性連接子)之另一DNA片段可操作地連接。如此環境下所用，術語「可操作地連接」意指，兩個DNA片段如此連接，使得由此兩個DNA片段編碼之胺

基酸序列仍保持同框。

【0184】 編碼 V_H 區之分離DNA可藉由將編碼 V_H 之DNA與編碼重鏈恆定區(C_H1 、 C_H2 及 C_H3)之另一DNA分子可操作地連接而轉化成全長重鏈基因。鼠類重鏈恆定區基因之序列係此項技術中已知的[參見例如 Kabat, E. A. 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美國衛生及公眾服務部, NIH出版號91-3242], 且可藉由標準PCR擴增獲得包含此等區之DNA片段。重鏈恆定區可為IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區, 但最佳為IgG1或IgG4恆定區。對於Fab片段重鏈基因, 可將編碼 V_H 之DNA與僅編碼重鏈 C_H1 恆定區之另一DNA分子可操作地連接。

【0185】 編碼 V_L/V_K 區之分離DNA可藉由將編碼 V_L 之DNA與編碼輕鏈恆定區 C_L 之另一DNA分子可操作地連接而轉化成全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。鼠類輕鏈恆定區基因之序列係此項技術中已知的[參見例如 Kabat, E. A. 等人 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美國衛生及公眾服務部, NIH出版號91-3242], 且可藉由標準PCR擴增獲得包含此等區之DNA片段。在較佳實施例中, 輕鏈恆定區可為 κ 或 λ 恆定區。

【0186】 為產生scFv基因, 將編碼 V_H 及編碼 V_L/V_K 之DNA片段與編碼可撓性連接子(例如編碼胺基酸序列 $(Gly_4-Ser)_3$)之另一片段可操作地連接, 以便 V_H 及 V_L/V_K 序列可表現為具有由可撓性連接子連接之 V_L/V_K 及 V_H 區的連續單鏈蛋白[參見例如 Bird等人 (1988) Science 242:423-426; Huston等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty等人 (1990) Nature 348:552-554]。

【0187】

單株抗體之產生

BST1或其片段或衍生物可用作免疫原以產生免疫特異性結合該種免疫原之抗體。該等免疫原可藉由任何便利的手段分離。熟習此項技術者理解，許多方法可用於抗體之產生，例如如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Harlow及David Lane編, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y.中所述。熟習此項技術者亦理解，亦可藉由各種工序自遺傳資訊製備模擬抗體之結合片段或Fab片段 [*Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebaeck, C. 編), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)]。

【0188】 可產生針對BST1之特定結構域的抗體。可使用BST1之親水片段作為產生抗體之免疫原。

【0189】 在產生抗體時，可藉由此項技術中已知的技術，例如ELISA (酶聯免疫吸附分析法)實現對所需抗體之篩選。例如，為選擇識別BST1之特定結構域的抗體，可針對結合含有該種結構域之BST1片段的產物，分析產生的融合瘤。為選擇特異性結合第一BST1同源物但不特異性結合於(或以較小親合力結合於)第二BST1同源物之抗體，可基於對第一BST1同源物之陽性結合及對第二BST1同源物的結合之不存在(或對其結合之減少)進行選擇。類似地，為選擇特異性結合BST1但不特異性結合於(或以較小親合力結合於)相同蛋白質之不同同功異型物(諸如具有與BST1相同的核心肽之不同糖型)之抗體，可基於對BST1之陽性結合及對不同同功異型物(例如不同糖型)的結合之不存在(或對其的結合之減少)進行選擇。

【0190】 因而，揭示如下抗體(諸如單株抗體)，與BST1之不同同功異型物(例如糖型)相比，其以更大的親和力(例如至少2倍，諸如至少5倍、尤其至少10倍更大的親和力)與BST1結合。

【0191】 可在本文中使用之多株抗體係源自經免疫之動物的血清之異源抗體分子群體。亦可使用未分化免疫血清。此項技術中已知的多種工序可用於產生針對BST1、BST1片段、BST1相關多肽或BST1相關多肽之片段的多株抗體。例如，一種方式係純化目的多肽或使用例如此項技術中熟知的固相肽合成方法合成目的多肽。參見例如 *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher編, *Meth. Enzymol.* 第182卷 (1990)；*Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields編, *Meth. Enzymol.* 第289卷 (1997)；Kiso等人, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 38: 1192-99, 1990；Mostafavi等人, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1: 255-60, 1995；Fujiwara等人, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 44: 1326-31, 1996。選擇的多肽隨後可用來藉由注射而對各種宿主動物進行免疫以產生多株或單株抗體，該等宿主動物包括但不限於兔、小鼠、大鼠等。視宿主物種而定，可使用各種佐劑(亦即免疫刺激劑)來增強免疫反應，該等佐劑包括但不限於弗氏完全佐劑或不完全佐劑、無機凝膠諸如氫氧化鋁、表面活性物質諸如溶血卵磷脂、普洛尼克多元醇(pluronic polyol)、聚陰離子、肽、油乳液、匙孔螺血氫蛋白、二硝基酚及佐劑諸如卡介苗(*bacille Calmette-Guerin*, BCG)或短棒狀桿菌(*Corynebacterium parvum*)。其他佐劑亦為此項技術中熟知的。

【0192】 為製備針對BST1之單株抗體(mAb)，可使用藉由培養的連續細胞株產生抗體分子之任何技術。例如，最初由Kohler及Milstein開發

之融合瘤技術(1975, *Nature* 256:495-497)、以及三體瘤(trioma)技術、人類B細胞融合瘤技術[Kozbor等人 (1983) *Immunology Today* 4:72]及產生人類單株抗體之EBV-融合瘤技術[Cole等人 (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁]。該等抗體可屬於任何免疫球蛋白類別，包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亞類。可在活體外或在活體內培養產生單株抗體之融合瘤。可利用已知技術在無菌動物中產生單株抗體(PCT/US90/02545，其以引用的方式併入本文)。

【0193】 製備融合瘤之較佳動物系統係鼠類系統。在小鼠中產生融合瘤係一項充分確立之方法。用於分離經免疫之脾細胞以便融合的免疫方案及技術係此項技術中已知的。融合搭配物(例如鼠類骨髓瘤細胞)及融合工序亦為已知的。

【0194】 單株抗體包括但不限於人類單株抗體及嵌合單株抗體(例如人類-小鼠嵌合體)。

【0195】 可基於如上文所述製備之非人類單株抗體的序列，製備嵌合抗體或人類化抗體。編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白之DNA可自目的非人類融合瘤獲得且可使用標準分子生物學技術進行工程化以含有非鼠類(例如人類)免疫球蛋白序列。例如，為產生嵌合抗體，可使用此項技術中已知的方法，將鼠類可變區與人類恆定區連接(參見例如Cabilly等人之美國專利第4,816,567號)。為產生人類化抗體，可使用此項技術中已知的方法，將鼠類CDR區插入人類構架中(參見例如Winter之美國專利第5,225,539號以及Queen等人之美國專利第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號及第6,180,370號)。

【0196】 亦可使用轉殖基因或轉染色體小鼠產生全人類抗體，其中該等小鼠不能表現內源免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因，但可表現人類重鏈及輕鏈基因。轉殖基因小鼠以正常方式用選擇的抗原(例如BST1之全部或部分)免疫。可使用習知融合瘤技術獲得針對抗原之單株抗體。由轉殖基因小鼠攜帶之人類免疫球蛋白轉殖基因在B細胞分化期間重排，且隨後經歷類別轉換及體細胞突變。因而，使用該種技術，有可能產生治療上有用之IgG、IgA、IgM及IgE抗體。此等轉殖基因及轉染色體小鼠包括HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.)及KM Mouse[®]品系之小鼠。HuMAb Mouse[®]品系 (Medarex[®], Inc.) 在 Lonberg 及 Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93)中描述。關於產生人類抗體及人類單株抗體之此技術及用於產生該等抗體之方案的詳細討論，參見例如美國專利5,625,126、美國專利5,633,425、美國專利5,569,825、美國專利5,661,016、及美國專利5,545,806。KM Mouse[®]品系係指攜帶人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉染色體之小鼠，且在Ishida等人之PCT公開案WO 02/43478中詳述。

【0197】 另外，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉殖基因動物系統係此項技術中可獲得的且可用來產生本發明之抗BST1抗體。例如，可使用稱作Xenomouse之替代性轉殖基因系統(Amgen, Inc.)；該等小鼠在例如Kucherlapati等人之美國專利第5,939,598號、第6,075,181號、第6,114,598號、第6,150,584號及第6,162,963號中描述。

【0198】 可使用稱作「導向選擇」之技術產生識別所選擇抗原決定基之全人類抗體。在此方法中，將選擇的非人類單株抗體(例如小鼠抗體)用來指導識別相同抗原決定基之全人類抗體的選擇[Jespers等人 (1994) Biotechnology 12:899-903]。

【0199】 另外，表現人類免疫球蛋白基因之替代性轉染色體動物系統係此項技術中可獲得的且可用來產生抗BST1抗體。例如，可使用稱作「TC小鼠」之攜帶人類重鏈轉染色體及人類輕鏈轉染色體的小鼠；該等小鼠在Tomizuka等人 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中描述。另外，攜帶人類重鏈及輕鏈轉染色體之乳牛已在此項技術中得到描述 [Kuroiwa等人 (2002) Nature Biotechnology 20:889-894及PCT公開案第WO2002/092812號]且可用來產生抗BST1抗體。

【0200】 亦可使用SCID小鼠製備本發明之人類單株抗體，已在該等SCID小鼠中重構人類免疫細胞，以便在免疫後可產生人類抗體反應。該等小鼠在例如美國專利第5,476,994號及第3,698,767號中描述。

【0201】 可藉由下述來產生本文所揭示之抗體：使用噬菌體呈現技術以針對與所選靶之結合產生及篩選多肽文庫[參見例如Cwirla等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990；Devlin等人, Science 249, 404-6, 1990；Scott及Smith, Science 249, 386-88, 1990；及Ladner等人, 美國專利第5,571,698號]。噬菌體呈現法之基本概念係在編碼待篩選多肽之DNA與該多肽之間建立物理締合。此物理締合由噬菌體粒子提供，該噬菌體粒子將多肽呈現為包圍編碼該多肽之噬菌體基因組之衣殼的一部分。在多肽與其遺傳物質之間建立物理締合允許同時大規模篩選數目極大的攜帶不同多肽之噬菌體。呈現對靶具有親和力之多肽的噬菌體與該靶結合，且藉由針對該靶之親和力篩選來富集此等噬菌體。可自此等噬菌體之各別基因組確定自其呈現之多肽的身分。使用此等方法，隨後可藉由習知手段大量合成鑑別為對所要靶具有結合親和力之多肽。參見例如美國專利第6,057,098號，該專利完整併入本文，包括全部的表、圖及申請專利範

圍。特定言之，該噬菌體可用來呈現自抗體庫或組合抗體文庫(例如人類或鼠類)表現之抗原結合結構域。可用抗原(例如使用標記的抗原或與固體表面或珠結合或捕捉至固體表面或珠之抗原)選擇或鑑別表現結合目的抗原的抗原結合結構域之噬菌體。此等方法中所用之噬菌體典型地為絲狀噬菌體，該絲狀噬菌體包括自噬菌體表現之fd及M13結合結構域，以及與噬菌體基因III或基因VIII蛋白重組融合之Fab、Fv或二硫橋鍵穩定的Fv抗體結構域。可用來產生本發明抗體之噬菌體呈現法包括在Brinkman等人(1995) J. Immunol. Methods 182:41-50；Ames等人(1995) J. Immunol. Methods 184:177-186；Kettleborough等人, Eur. J. Immunol. 24:952-958(1994)；Persic等人(1997) Gene 187 9-18；Burton等人(1994) Advances in Immunology 57:191-280；PCT申請案第PCT/GB91/01134號；PCT公開案WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401；以及美國專利第5,698,426號、第5,223,409號、第5,403,484號、第5,580,717號、第5,427,908號、第5,750,753號、第5,821,047號、第5,571,698號、第5,427,908號、第5,516,637號、第5,780,225號、第5,658,727號、第5,733,743號及第5,969,108號所揭示之彼等；該等文獻中之每一者以引用的方式完整地併入本文。

【0202】如以上參考文獻中所述，在噬菌體選擇後，可分離來自噬菌體之抗體編碼區且將其用來產生完整抗體(包括人類抗體)或任何其他所需的抗原結合片段且在任何所需的宿主中表現，該宿主包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌，例如如下文詳細描述。例如，亦可使用此項技術中已知的方法，諸如在PCT公開案第WO 92/22324號；

Mullinax 等人 (1992) BioTechniques 12(6):864-869 ; 及 Sawai 等人 (1995) AJRI 34:26-34 ; 及 Better 等人 (1988) Science 240:1041-1043 (該等參考文獻以引用的方式完整併入) 中所揭示之彼等，利用重組產生 Fab、Fab' 及 F(ab')₂ 片段之技術。

【0203】 可用來產生單鏈 Fv 及抗體之技術之實例包括在美國專利 4,946,778 及 5,258,498 ; Huston 等人 (1991), Methods in Enzymology 203:46-88 ; Shu 等人 (1993) PNAS 90:7995-7999 ; 及 Skerra 等人 (1988) Science 240:1038-1040 中描述之彼等。

【0204】 本發明提供抗 BST1 免疫球蛋白分子之功能活性片段、衍生物或類似物。功能活性意指，片段、衍生物或類似物能夠激發抗-抗個體基因型抗體(亦即三級抗體(tertiary antibody))，該等抗-抗個體基因型抗體識別由該片段、衍生物或類似物所源自之抗體識別的相同抗原。具體而言，在一特定實施例中，免疫球蛋白分子之個體基因型的抗原性可藉由缺失特異性識別抗原之 CDR 序列 C 末端的構架及 CDR 序列來增強。為確定何等 CDR 序列結合抗原，可藉由此項技術中已知的任何結合分析方法，在結合分析法中使用含有 CDR 序列之合成肽以及抗原。

【0205】 亦揭示抗體片段，諸如但不限於 F(ab')₂ 片段及 Fab 片段。可藉由已知技術產生識別特定抗原決定基之抗體片段。F(ab')₂ 片段由可變區、輕鏈恆定區及重鏈之 C_H1 結構域組成且藉由胃蛋白酶消化抗體分子來產生。Fab 片段藉由還原 F(ab')₂ 片段之二硫橋鍵而產生。亦揭示本文所揭示之抗體的重鏈及輕鏈二聚體，或其任何最小片段，諸如 Fv 或單鏈抗體(SCA) [例如如美國專利 4,946,778 ; Bird, (1988) Science 242:423-42 ; Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 ; 及 Ward 等

人 (1989) *Nature* 334:544-5中所述]，或具有與本發明抗體相同之特異性的任何其他分子。藉由用胺基酸橋連接Fv區之重鏈及輕鏈片段以產生單鏈多肽，來形成單鏈抗體。可使用在大腸桿菌中組裝功能性Fv片段之技術 [Skerra等人 (1988) *Science* 242:1038-1041]。

【0206】亦揭示本文所揭示之免疫球蛋白(或其功能活性片段)的融合蛋白，例如其中免疫球蛋白經由共價鍵(例如肽鍵)在N末端或C末端與不為免疫球蛋白之另一蛋白質(或其部分，較佳該蛋白質之至少10、20或50個胺基酸的部分)的胺基酸序列融合。較佳地，免疫球蛋白或其片段在恆定結構域之N末端與另一蛋白質共價連接。如上文所述，該等融合蛋白可促進純化、增加活體內半衰期及促進抗原跨上皮障壁遞送至免疫系統。

【0207】本文所揭示之免疫球蛋白包括經修飾之類似物及衍生物，亦即藉由共價連接任何類型之分子來進行修飾，只要該共價連接不損害免疫特異性結合。例如，但不作為限制，免疫球蛋白之衍生物及類似物包括已例如藉由糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、由已知保護/阻斷基團進行的衍生化、蛋白酶裂解、與細胞配體或其他蛋白質的連接等進一步修飾之衍生物及類似物。可藉由已知技術實施眾多化學修飾中之任一者，包括但不限於特異性化學裂解、乙醯化、甲醯化等。另外，類似物或衍生物可含有一或多種非經典胺基酸。

【0208】

小鼠之免疫

小鼠可用BST1抗原及/或重組BST1之純化或富集的製劑或表現BST1之細胞進行免疫。較佳地，當首次輸注時，小鼠係6-16週齡。例如，BST1抗原之純化或重組製劑(100 µg)可用來腹膜內免疫小鼠。

【0209】 採用各種抗原之累積性經驗已顯示，用弗氏完全佐劑中之抗原腹膜內(IP)免疫時，小鼠產生反應。然而，發現不為弗氏佐劑之佐劑亦有效。此外，發現完整細胞在佐劑不存在時具有高度免疫原性。可在免疫方案過程期間監測免疫反應，藉由後眼眶採血獲得血漿樣品。可藉由ELISA(如下文所描述)篩選血漿，以測試令人滿意的滴度。可用抗原連續3日靜脈內增強免疫小鼠，5天後處死小鼠並取出脾臟。在一個實施例中，可使用A/J小鼠品系(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.)。

【0210】

產生單株抗體之轉染瘤的生成

如此項技術中所熟知，可在宿主細胞轉染瘤中，使用例如重組DNA技術及基因轉染方法之組合，產生本文所揭示之抗體[例如Morrison, S. (1985) Science 229:1202]。

【0211】 例如，為表現抗體或其抗體片段，可藉由標準分子生物學技術(例如使用表現目的抗體之融合瘤的PCR擴增或cDNA選殖)獲得編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNA，且可將該等DNA插入表現載體中，以便基因與轉錄及轉譯控制序列可操作地連接。在此背景下，術語「可操作地連接」意指，將抗體基因連接入載體，以便載體內之轉錄及轉譯控制序列執行其調節抗體基因轉錄及轉譯之預期功能。選擇表現載體及表現控制序列以與所用表現宿主細胞相容。

【0212】 可用兩種表現載體共轉染宿主細胞，第一載體編碼重鏈衍生之多肽，且第二載體編碼輕鏈衍生之多肽。兩種載體可含有使得重鏈及輕鏈多肽能夠等同表現之相同可選標記。替代地，可使用編碼重鏈及輕鏈多肽二者之單個載體。在該等情況下，輕鏈應置於重鏈之前以避免過量之

有毒游離重鏈[Proudfoot (1986) Nature 322:52 ; Kohler (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197]。重鏈及輕鏈之編碼序列可包含cDNA或基因組DNA。

【0213】可藉由標準方法將抗體基因插入表現載體(例如連接抗體基因片段及載體上之互補限制性位點，或若不存在限制性位點，則使末端連接平鈍)。本文所述之抗體的輕鏈及重鏈可變區可藉由以下方式用來產生任何抗體同型之全長抗體基因：將其插入已編碼所需同型之重鏈恆定區及輕鏈恆定區的表現載體中，以便V_H區段與載體內之C_H區段可操作地連接且V_K區段與載體內之C_L區段可操作地連接。另外或替代地，重組表現載體可編碼促進抗體鏈自宿主細胞分泌之信號肽。可將抗體鏈基因選殖入載體，使得信號肽與抗體鏈基因之胺基末端同框連接。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源信號肽(亦即來自非免疫球蛋白之蛋白質的信號肽)。

【0214】除抗體鏈基因之外，本文所揭示之重組表現載體亦可攜帶控制抗體鏈基因在宿主細胞中表現之調節序列。術語「調節序列」意在包括啟動子、增強子及其他控制抗體鏈基因轉錄或轉譯之表現控制元件(例如聚腺苷酸化信號)。該等調節序列例如在Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))中描述。熟習此項技術者理解，表現載體之設計，包括調節序列之選擇，可視諸如以下之因素而定：待轉型之宿主細胞的選擇、所需的蛋白質之表現量等。用於哺乳動物宿主細胞表現之較佳調節序列包括引導哺乳動物細胞中高蛋白質表現量之病毒元件，諸如衍生自巨細胞病毒(CMV)、猿猴病毒40 (SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多瘤病毒之啟動子及/或增強子。替代地，可使用非病毒調節

序列，諸如泛素啟動子或 β -血球蛋白啟動子。另外，調節元件包含不同來源之序列，諸如SR α 啟動子系統，其含有來自SV40早期啟動子及人類T細胞白血病病毒1型之長末端重複序列的序列[Takebe, Y.等人 (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472]。

【0215】除抗體鏈基因及調節序列之外，本文所揭示之重組表現載體亦可攜帶其他序列，諸如調節載體在宿主細胞中之複製的序列(例如複製起點)及可選標記基因。可選標記基因促進選擇已導入載體之宿主細胞(參見例如美國專利第4,399,216號、第4,634,665號及第5,179,017號，均屬於Axel等人)。例如，可選標記基因典型地對已導入載體之宿主細胞賦予針對藥物(諸如G418、潮黴素或甲胺喋呤)之抗性。較佳可選標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(在dhfr-宿主細胞中連同甲胺喋呤選擇/擴增一起使用)及neo基因(用於G418選擇)。

【0216】為表現輕鏈及重鏈，藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染入宿主細胞。術語「轉染」之各種形式意在包括常用於向原核或真核宿主細胞引入外源DNA之各種技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。雖然理論上有可能在原核或真核宿主細胞中表現本文所揭示之抗體，但最佳在真核細胞中且最佳在哺乳動物宿主細胞中表現抗體，因為該等真核細胞且尤其哺乳動物細胞比原核細胞更有可能組裝並分泌正確摺疊且免疫學活性的抗體。已報導抗體基因之原核表現不能有效產生高產量之活性抗體[Boss, M. A.及Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13]。

【0217】用於表現本文所揭示之重組抗體的較佳哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO) (連同載體諸如來自人類巨細胞病毒之主要

中間早期基因啟動子元件) [Foecking等人, 1986, Gene 45:101 ; Cockett等人 (1990) BioTechnology 8:2]、在Urlaub及Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中描述之dhfr-CHO細胞(其與DHFR可選標記一起使用, 例如如R. J. Kaufman及P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621中所述)、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞及SP2細胞。特定言之, 為與NSO骨髓瘤細胞一起使用, 另一較佳表現系統係在WO 87/04462 (Wilson)、WO 89/01036 (Bebbington)及EP 338,841 (Bebbington)所揭示之GS基因表現系統。

【0218】 各種宿主表現載體系統可用來表現本文所揭示之抗體分子。該等宿主-表現系統代表可藉以產生且隨後純化目的編碼序列之載體, 而且代表在用適當核苷酸編碼序列轉型或轉染時可原位表現本文所揭示之抗體分子的細胞。其包括但不限於用含有抗體編碼序列之重組噬菌體DNA、質體DNA或黏質體DNA表現載體轉型的微生物諸如細菌(例如大腸桿菌、枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)); 用含有抗體編碼序列之重組酵母表現載體轉型的酵母(例如酵母屬(*Saccharomyces*)、畢赤酵母屬(*Pichia*)); 用含有抗體編碼序列之重組病毒表現載體(例如桿狀病毒)感染的昆蟲細胞系統; 用含有抗體編碼序列之重組病毒表現載體(例如花椰菜花葉病毒, CaMV; 菸草花葉病毒, TMV)感染或用含有抗體編碼序列之重組質體表現載體(例如Ti質體)轉型的植物細胞系統; 或攜帶重組表現構築體之哺乳動物細胞系統(例如COS、CHO、BHK、293、3T3細胞), 該等重組表現構築體含有源自哺乳動物細胞基因組之啟動子(例如金屬硫蛋白啟動子)或源自哺乳動物病毒之啟動子(例如腺病毒晚期啟動子; 痘苗病毒7.5 K啟動子)。

【0219】在細菌系統中，可根據表現之抗體分子的預期用途有利地選擇許多表現載體。例如，當意在大量產生該種蛋白質例如以用於產生包含抗體分子之醫藥組合時，可能需要引導易於純化的融合蛋白產物之高水準表現的載體。該等載體包括但不限於大腸桿菌表現載體 pUR278 (Ruther等人 (1983) EMBO J. 2:1791)，其中抗體編碼序列可與lac Z編碼區同框地個別連接入載體中，從而產生融合蛋白；pIN載體 [Inouye及Inouye (1985) Nucleic Acids Res. 13:3101-3109；Van Heeke及Schuster (1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509]；且相似的pGEX載體亦可用於將外來多肽與麩胱甘肽S-轉移酶(GST)一起表現為融合蛋白。通常，該等融合蛋白係可溶的且可藉由吸附並與基質麩胱甘肽-瓊脂糖珠結合，隨後在游離麩胱甘肽存在下溶離，自溶解之細胞中輕易地純化。pGEX載體經設計以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位點，以便選殖的靶基因產物可自GST部分釋放。

【0220】在一昆蟲系統中，使用苜蓿銀紋夜蛾 (*Autographa californica*)核多角體病毒(AcNPV)作為表現外來基因之載體。該病毒在草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞中生長。可將抗體編碼序列個別地選殖至該病毒之非必需區(例如多角體蛋白基因)中並置於AcNPV啟動子(例如多角體蛋白啟動子)之控制下。在哺乳動物宿主細胞中，可利用許多基於病毒之表現系統(例如腺病毒表現系統)。

【0221】如上文所討論，可選擇如下宿主細胞品系，其以期望的特定方式調節插入序列之表現或修飾及加工基因產物。蛋白質產物之該等修飾(例如糖基化)及加工(例如裂解)對蛋白質之功能可為重要的。

【0222】為長期、高產量產生重組抗體，穩定表現係較佳的。例

如，可藉由以下方式產生穩定表現目的抗體之細胞株：用包含抗體之核苷酸序列及可選標記(例如新黴素或潮黴素)之核苷酸序列的表現載體轉染細胞，且針對可選標記之表現進行選擇。該等工程化的細胞株尤其適用於篩選及評價與抗體分子直接或間接相互作用之化合物。

【0223】 可藉由載體擴增來增加抗體分子之表現量[關於綜述，參見 Bebbington及Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, 第3卷 (Academic Press, New York, 1987)]。當表現抗體之載體系統中的標記可擴增時，宿主細胞培養物中存在的抑制劑之水準的提高將增加標記基因之複本數。由於擴增區與抗體基因締合，所以抗體之產生亦將增加 [Crouse等人, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257]。

【0224】 當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞時，藉由以下方式來產生抗體：培養宿主細胞足以允許抗體在宿主細胞中表現或更佳允許抗體分泌入生長宿主細胞之培養基中的一段時間。在重組地表現抗體分子後，可藉由此項技術中已知的用於純化抗體分子之任何方法來純化其，例如藉由層析(例如離子交換層析、親和層析諸如採用蛋白A或特定抗原、及篩分管柱層析)、離心、差異性溶解，或藉由用於純化蛋白質之任何其他標準技術來純化。

【0225】 替代地，可藉由利用對表現之融合蛋白特異的抗體，輕易地純化任何融合蛋白。例如，由Janknecht等人描述之系統允許容易地純化人類細胞株中表現之未變性的融合蛋白[Janknecht等人, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-897]。在此系統中，將目的基因次選殖至痘苗病毒重組質體中，以便基因之開放閱讀框與由六個組胺酸殘基組成之

胺基端標籤以轉譯方式融合。該標籤充當融合蛋白之基質結合結構域。將來自經重組痘苗病毒感染之細胞的提取物負載至 Ni^{2+} 氨基乙酸-瓊脂糖管柱上，且用含有咪唑之緩衝液選擇性地溶離加組胺酸標籤之蛋白質。

【0226】

與抗原結合之抗體的表徵

隨後可藉由以下方式選擇由此等方法產生之抗體：首先篩選與純化的目的多肽之親和力及特異性，且需要時將結果與抗體與需要自結合排除的多肽之親和力及特異性相比較。可藉由例如標準ELISA測試抗體與BST1之結合。篩選方法可包括在微量滴定盤之單獨孔中固定純化的多肽。隨後將含有潛在抗體或抗體組之溶液置於各別微量滴定孔中且培育約30分鐘至2小時。隨後洗滌微量滴定孔，且將標記的二級抗體(例如，若生成的抗體係小鼠抗體，則為與鹼性磷酸酶共軛之抗小鼠抗體)添加至各孔且培育約30分鐘，且隨後洗滌。將受質添加至各孔，且當針對固定多肽之抗體存在時，將出現顏色反應。

【0227】 隨後可在所選的分析設計中，進一步分析如此鑑別之抗體的親和力及特異性。在開發針對靶蛋白之免疫分析法時，純化的靶蛋白充當標準，用該標準判斷使用所選抗體之免疫分析法的敏感度及特異性。因為各種抗體之結合親和力可能不同、某些抗體對(例如在夾心分析法中)可能在空間上彼此干擾等，所以抗體之分析效能可能為比抗體之絕對親和力及特異性更重要的量度。

【0228】 熟習此項技術者將認識到，在產生抗體或結合片段且篩選及選擇各種多肽之親和力及特異性時，可採用許多方法，但此等方法不改變本發明之範疇。

【0229】 為確定選擇的抗BST1單株抗體是否與獨特抗原決定基結合，可使用市售試劑(Pierce, Rockford, IL)將各抗體生物素化。可使用經BST1塗佈之ELISA盤進行競爭研究，該等競爭研究使用未標記的單株抗體及生物素化的單株抗體。可用抗生蛋白鏈菌素-鹼性磷酸酶探針偵測生物素化的mAb之結合。

【0230】 為確定純化的抗體之同型，可使用對特定同型抗體特異之試劑進行同型ELISA。

【0231】 可藉由西方墨點法進一步測試抗BST1抗體與BST1抗原之反應性。簡言之，可製備BST1並使其經歷十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳。在電泳後，將分離的抗原轉移至硝酸纖維素膜，用10%胎牛血清阻斷，且用待測試之單株抗體探測。

【0232】 本文所揭示之抗體的結合特異性亦可藉由監測(例如藉由流式細胞術監測)抗體與表現BST1之細胞的結合來測定。典型地，細胞株，諸如CHO細胞株，可用編碼BST1之表現載體轉染。轉染的蛋白質可包含標籤(諸如myc-標籤)，較佳處於N末端，以便使用針對該標籤之抗體進行偵測。可藉由將經轉染之細胞與抗體一起培育且偵測結合的抗體，來測定抗體與BST1之結合。可將抗體與經轉染之蛋白質上之標籤的結合用作陽性對照。

【0233】 可藉由以下方式進一步研究抗體針對BST1之特異性：使用用於測定與BST1之結合的相同方法，確定抗體是否與其他蛋白質(諸如Eph家族之另一成員)結合。

【0234】

免疫共軛物

醫藥組合可包含與治療性部分諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射性毒素共軛之抗**BST1**抗體或其片段。該等共軛物在本文中稱作「免疫共軛物」。包括一或多種細胞毒素之免疫共軛物稱作「免疫毒素」。細胞毒素或細胞毒性劑包括有害於(例如殺死)細胞之任何試劑。實例包括紫杉醇、細胞遲緩素**B**、短桿菌肽**D**、溴化乙錠、吐根鹼、絲裂黴素、依託泊苷、替尼泊苷、長春新鹼、長春鹼、秋水仙鹼、多柔比星、道諾黴素、二羥基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神黴素、放線菌素**D**、1-脫氫鞣固酮、糖皮質激素、普魯卡因、四卡因、利多卡因、普萘洛爾及嘌呤黴素及其類似物或同源物。治療劑亦包括例如抗代謝物(例如甲胺喋呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、達卡巴嗪)、烷化劑(例如氮芥、噻替派、氮芥苯丁酸、美法侖、卡莫司汀(**BSNU**)及洛莫司汀(**CCNU**)、環磷醯胺、白消安、二溴甘露醇、鏈佐黴素、絲裂黴素**C**及順-二氯二胺鉑(II) (**DDP**)順鉑)、蒽環黴素(例如道諾黴素(**daunorubicin**)) (以前稱道諾黴素(**daunorubicin**))及多柔比星)、抗生素(例如更生黴素(以前稱放線菌素**D**)、博萊黴素、光神黴素及安黴黴素(**AMC**))以及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。

【0235】 可與醫藥組合中之抗體共軛的治療性細胞毒素之其他較佳實例包括多卡黴素、卡奇黴素、美登素及奧瑞斯他汀及其衍生物。卡奇黴素抗體共軛物之一實例係可商業獲得的(**Mylotarg**[®] ; **American Home Products**)。

【0236】 細胞毒素可使用此項技術中可獲得的連接子技術與抗體共軛。已用來將細胞毒素與抗體共軛的連接子類型之實例包括但不限於胺、硫醚、酯、二硫橋鍵及含肽之連接子。可選擇例如對溶酶體區室內之低

pH之裂解敏感或對蛋白酶(諸如腫瘤組織中優先表現之蛋白酶諸如組織蛋白酶(例如組織蛋白酶B、C、D))之裂解敏感的連接子。

【0237】細胞毒素之實例例如描述於美國專利第6,989,452號、第7,087,600號及第7,129,261號，及PCT申請案第PCT/US2002/17210號、第PCT/US2005/017804號、第PCT/US2006/37793號、第PCT/US2006/060050號、第PCT/US2006/060711號、第WO2006/110476號，及美國專利申請案第60/891,028號中，其全部以引用的方式完整併入本文。關於細胞毒素類型、連接子及用於使治療劑與抗體共軛之方法的進一步討論，亦參見Saito, G.等人 (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215；Trail, P.A.等人 (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337；Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3: 207-212；Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763；Pastan, I.及Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091；Senter, P.D.及Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

【0238】抗體亦可與放射性同位素共軛以產生細胞毒性放射藥物，亦稱作放射免疫共軛物。可與抗體共軛用於診斷或治療性用途之放射性同位素之實例包括但不限於碘131、銾111、釷90及鐳177。此項技術中確立用於製備放射免疫共軛物之方法。放射免疫共軛物之實例係可商業獲得的，包括 Zevalin[®] (IDEC Pharmaceuticals) 及 Bexxar[®] (Corixa Pharmaceuticals)，且相似的方法可用來製備利用本文所揭示之抗體的放射免疫共軛物。

【0239】本文所揭示之抗體共軛物可用來調節既定生物學反應，且藥物部分不應解釋為限於經典的化學治療劑。例如，藥物部分可為擁有所

需生物學活性之蛋白質或多肽。該等蛋白質可包括例如酶活性毒素或其活性片段，諸如相思子毒素、蓖麻毒素A、假單胞菌外毒素或白喉毒素；蛋白質，諸如腫瘤壞死因子或干擾素- γ ；或生物學反應調節劑，諸如淋巴介素、介白素-1（「IL-1」）、介白素-2（「IL-2」）、介白素-6（「IL-6」）、粒細胞巨噬細胞群落刺激因子（「GM-CSF」）、粒細胞群落刺激因子（「G-CSF」）或其他生長因子。

【0240】 用於將該治療性部分與抗體共軛之技術係熟知的，參見例如Arnon等人，「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」， Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld等人（編），第243-56頁（Alan R. Liss, Inc. 1985）；Hellstrom等人，「Antibodies For Drug Delivery」， Controlled Drug Delivery（第2版）， Robinson等人（編），第623-53頁（Marcel Dekker, Inc. 1987）；Thorpe，「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」， Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera等人（編），第475-506頁（1985）；「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」， Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin等人（編），第303-16頁（Academic Press 1985）；及Thorpe等人， Immunol. Rev., 62:119-58（1982）。

【0241】

雙特異性分子

在另一態樣中，可使用包含抗BST1抗體或其片段之雙特異性分子。

抗體或其抗原結合部分可進行衍生化或連接至另一功能分子，例如另一肽或蛋白質(例如另一抗體或針對受體之配體)以產生與至少兩個不同結合位點或靶分子結合之雙特異性分子。實際上，本文所揭示之抗體可進行衍生化或連接至多於一種其他功能分子以產生與多於兩個不同結合位點及/或靶分子結合之多特異性分子；該等多特異性分子亦意欲包括在如本文所用之術語「雙特異性分子」中。為產生雙特異性分子，可將抗體功能性連接(例如藉由化學偶聯、遺傳融合、非共價締合或其他方式)至一或多種其他結合分子，諸如另一抗體、抗體片段、肽或結合模擬物，以便產生雙特異性分子。

【0242】 因此，本發明包括雙特異性分子，該等雙特異性分子包含針對第一靶抗原決定基(亦即BST1)之至少一個第一結合特異性及針對第二靶抗原決定基之第二結合特異性。第二靶抗原決定基可在與第一結合特異性所結合之靶蛋白相同的靶蛋白上存在；或第二靶抗原決定基可在與第一結合特異性所結合之靶蛋白不同的靶蛋白上存在。第二靶抗原決定基可在與第一靶抗原決定基(亦即BST1)相同之細胞上存在；或第二靶抗原決定基可在不由呈現第一靶抗原決定基之細胞呈現的靶上存在。如本文所用，術語『結合特異性』係指包含至少一個抗體可變結構域之部分。

【0243】 在本發明之一個實施例中，第二靶抗原決定基係Fc受體，例如人類FcγRI (CD64)或人類Fcα受體(CD89)。因此，本發明包括能夠結合至表現FcγR或FcαR之效應細胞(例如單核細胞、巨噬細胞或多形核細胞(PMN))並結合至表現BST1之靶細胞的雙特異性分子。此等雙特異性分子將表現BST1之細胞靶向效應細胞並觸發Fc受體介導之效應細胞活性，諸如吞噬表現BST1之細胞、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、細胞

介素釋放或生成超氧陰離子。

【0244】 在本發明之另一實施例中，第二靶抗原決定基係CD3或CD5。因此，本發明包括能夠結合至表現CD3或CD5之效應細胞(例如表現CD3或CD5之細胞毒T細胞)並結合至表現BST1之靶細胞的雙特異性分子。此等雙特異性分子將表現BST1之細胞靶向效應細胞並觸發CD3或CD5介導之效應細胞活性，諸如T細胞純系擴增及T細胞細胞毒性。在此實施例中，雙特異性抗體可具有總計兩個或三個抗體可變結構域，其中雙特異性抗體之第一部分能夠藉由特異性結合至位於人類免疫效應細胞上之效應抗原而募集人類免疫效應細胞之活性，其中該效應抗原係人類CD3或CD5抗原，該第一部分由一個抗體可變結構域組成，且雙特異性抗體之第二部分能夠特異性結合至不為效應抗原之靶抗原(例如BST1)，該靶抗原位於不為該人類免疫效應細胞之靶細胞上，且該第二部分包含一或兩個抗體可變結構域。

【0245】 在本發明之其中雙特異性分子具有多特異性的一實施例中，除了抗Fc結合特異性或抗CD3或CD5結合特異性及抗BST1結合特異性之外，分子可進一步包括第三結合特異性。在一個實施例中，第三結合特異性係抗增強因子(EF)部分，例如與參與細胞毒性活性之表面蛋白結合並因而增加針對靶細胞之免疫反應的分子。「抗增強因子部分」可為與既定分子(例如抗原或受體)結合且因而導致增強結合決定子對Fc受體或靶細胞抗原之作用的抗體、功能性抗體片段或配體。「抗增強因子部分」可結合Fc受體或靶細胞抗原。替代地，抗增強因子部分可與如下實體結合，該實體不同於第一及第二結合特異性所結合之實體。例如，抗增強因子部分可結合細胞毒性T細胞(例如經由CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、

CD40、ICAM-1或導致針對靶細胞之免疫反應增加的其他免疫細胞)。

【0246】 在一個實施例中，雙特異性分子包含至少一種抗體或其抗體片段(包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb或單鏈Fv)作為結合特異性。抗體亦可為輕鏈或重鏈二聚體或其任何最小片段諸如Fv或單鏈構築體，如美國專利第4,946,778號中所述，該專利之內容明確地以引用的方式併入。

【0247】 在一個實施例中，針對Fcγ受體之結合特異性由單株抗體提供，該單株抗體之結合不被人類免疫球蛋白G (IgG)阻斷。如本文所用，術語「IgG受體」係指位於染色體1上之8個γ-鏈基因中的任一者。此等基因編碼總計12種跨膜或可溶性受體同功異型物，其分成三個Fcγ受體類別：FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)及FcγRIII (CD16)。在一個較佳實施例中，Fcγ受體係人類高親和力FcγRI。人類FcγRI係一種72 kDa分子，其對單體IgG顯示高親和力(10^8 - 10^9 M⁻¹)。

【0248】 某些較佳抗Fcγ單株抗體之產生及表徵描述於PCT公開案WO 88/00052及美國專利第4,954,617號中，該等文獻之教示內容以引用的方式完整併入本文。此等抗體與FcγRI、FcγRII或FcγRIII之抗原決定基在如下位點結合，該位點不同於受體之Fcγ結合位點，且因此，其結合實質上不被生理學水準之IgG所阻斷。可用於本發明中之特定抗FcγRI抗體係mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62及mAb 197。產生mAb 32之融合瘤可自美國菌種保存中心獲得，ATCC寄存號HB9469。在其他實施例中，抗Fcγ受體抗體係人類化形式的單株抗體22 (H22)。H22抗體之產生及表徵在Graziano, R.F.等人 (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002及PCT公開案WO 94/10332中描述。產生H22抗體之細胞株以名稱

HA022CL1保藏於美國菌種保存中心並具有寄存號CRL 11177。

【0249】 在又其他較佳實施例中，針對Fc受體之結合特異性由結合至人類IgA受體(例如Fc- α 受體[Fc α RI (CD89)])之抗體提供，該抗體之結合較佳不被人類免疫球蛋白A (IgA)阻斷。術語「IgA受體」意在包括位於染色體19上之一個 α -基因(Fc α RI)的基因產物。已知此基因編碼55至110 kDa之幾種交替剪接的跨膜同功異型物。Fc α RI (CD89)以組成性方式在單核細胞/巨噬細胞、嗜酸性粒細胞及嗜中性粒細胞上表現，但不在非效應細胞群體上表現。Fc α RI對IgA1及IgA2具有中等親和力(約 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)，該親和力在曝露於細胞介素諸如G-CSF或GM-CSF時增加[Morton, H.C.等人 (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440]。已描述4種Fc α RI-特異性單株抗體，其被鑑別為A3、A59、A62及A77，其在IgA配體結合結構域外部結合Fc α RI [Monteiro, R.C.等人 (1992) *J. Immunol.* 148:1764]。

【0250】 Fc α RI及Fc γ RI係用於本發明雙特異性分子中之較佳觸發受體，因為其(1)主要表現在免疫效應細胞(例如單核細胞、PMN、巨噬細胞及樹突細胞)上；(2)以高水準表現(例如5,000-100,000每細胞)；(3)係細胞毒性活性(例如ADCC、吞噬)之介體；且(4)介導靶向其之抗原(包括自身抗原)的增強之抗原呈遞。

【0251】 可用於雙特異性分子中之抗體係鼠類、人類、嵌合及人類化單株抗體。

【0252】 可藉由使用此項技術中已知的方法，將成分結合特異性例如抗-FcR、抗-CD3、抗-CD5及抗-BST1結合特異性共軛而製備本發明之雙特異性分子。例如，各雙特異性分子之結合特異性可單獨地產生且隨後

彼此共軛。當結合特異性係蛋白質或肽時，各種偶聯劑或交聯劑可用於共價共軛。交聯劑之實例包括蛋白A、碳化二亞胺、N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代雙(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、鄰亞苯基雙順丁烯二醯亞胺(oPDM)、N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)及磺基丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC) [參見例如 Karpovsky 等人 (1984) J. Exp. Med. 160:1686 ; Liu, MA等人 (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648]。其他方法包括在Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. 第78期, 118-132 ; Brennan 等人 (1985) Science 229:81-83 ; 及 Glennie 等人 (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375中描述之彼等。較佳共軛劑係SATA及磺基-SMCC，二者均可自Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)獲得。

【0253】已藉由將雙重結合工程化入全長抗體樣形式，針對雙特異性獲得另外的雙價結構(Wu 等人，2007, Nature Biotechnology 25[11]:1290-1297 ; USSN12/477,711 ; Michaelson 等人，2009, mAbs 1[2]:128-141 ; PCT/US2008/074693 ; Zuo 等人，2000, Protein Engineering 13[5]:361-367 ; USSN09/865,198 ; Shen等人，2006, J Biol Chem 281[16]:10706-10714 ; Lu 等人，2005, J Biol Chem 280[20]:19665-19672 ; PCT/US2005/025472 ; 該等文獻明確地以引用的方式併入本文)。

【0254】當結合特異性係抗體時，其可藉由兩個重鏈之C末端鉸鏈區的巰基鍵合而共軛。在一尤其較佳實施例中，在共軛之前修飾鉸鏈區以含有奇數個巰基殘基，較佳1個巰基殘基。

【0255】替代地，兩種結合特異性可在相同的載體中編碼且在相同

的宿主細胞中表現及組裝。此方法在下述情況下尤其有用，其中雙特異性分子係mAb x mAb、mAb x Fab、Fab x F(ab')₂或配體x Fab融合蛋白。雙特異性分子可為包含一個單鏈抗體及結合決定子之單鏈分子或包含兩個結合決定子之單鏈雙特異性分子。雙特異性分子可包含至少兩個單鏈分子。用於製備雙特異性分子之方法例如在美國專利第5,260,203號、第5,455,030號、第4,881,175號、第5,132,405號、第5,091,513號、第5,476,786號、第5,013,653號、第5,258,498號及第5,482,858號中描述，該等專利均明確地以引用的方式併入本文。

【0256】 可藉由例如酶聯免疫吸附分析法(ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、FACS分析、生物分析法(例如生長抑制)或西方墨點分析法證實雙特異性分子與其特異性靶之結合。通常，藉由使用特異於目的複合物之經標記試劑(例如抗體)，此等分析法中之每一者偵測特定目的蛋白質-抗體複合物之存在。例如，可使用例如識別抗體-FcR複合物並與其特異性結合之酶聯抗體或抗體片段偵測FcR-抗體複合物。替代地，可使用多種其他免疫分析法中之任一者偵測複合物。例如，抗體可進行放射性標記且用於放射免疫分析法(RIA)中(參見例如Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986年3月，該文獻以引用的方式併入本文)。可藉由手段諸如使用 γ 計數器或閃爍計數器或藉由放射自顯影術偵測放射性同位素。

【0257】

抗體片段及抗體模擬物

本發明之醫藥組合不限於傳統抗體且可經由使用抗體片段及抗體模

擬物來實踐。如下文所詳述，現已開發多種抗體片段及抗體模擬技術且其係此項技術內廣泛已知的。儘管許多此等技術諸如結構域抗體、奈米抗體及單抗體利用傳統抗體結構之片段或其他修飾，但亦存在替代性技術，諸如採用如下結合結構之親和抗體、DARPin、Anticalin、Avimer及Versabody，該等結合結構雖然模擬傳統抗體結合，但自不同機理產生且經由不同機理發揮功能。

【0258】 結構域抗體(dAb)係抗體之最小功能性結合單元，對應於人類抗體重鏈(V_H)或輕鏈(V_L)之可變區。結構域抗體具有大約13 kDa之分子量。Domantis已開發一系列龐大且高度功能性的完全人類V_H及V_L dAb文庫(各文庫中超過100億個不同序列)，且使用此等文庫來選擇對治療性靶特異之dAb。與許多習知抗體相反，結構域抗體在細菌、酵母及哺乳動物細胞系統中表現良好。結構域抗體及其產生方法之其他細節可藉由參考美國專利第6,291,158號、第6,582,915號、第6,593,081號、第6,172,197號、第6,696,245號；美國系列號2004/0110941；歐洲專利申請案第1433846號及歐洲專利0368684及0616640；WO05/035572、WO04/101790、WO04/081026、WO04/058821、WO04/003019及WO03/002609而獲得，該等文獻中之每一者以引用的方式完整併入本文。

【0259】 奈米抗體係抗體衍生之治療性蛋白質，其含有天然存在之重鏈抗體的獨特結構性及功能性特性。此等重鏈抗體含有單個可變結構域(VHH)及兩個恆定結構域(C_H2及C_H3)。重要地，選殖及分離的VHH結構域係具有原始重鏈抗體之完整抗原結合能力的極其穩定之多肽。奈米抗體與人類抗體之V_H結構域具有高度同源性且可進一步人類化，而無活性之

任何喪失。重要地，奈米抗體具有低免疫原性潛力，此已在採用奈米抗體先導化合物之靈長類動物研究中得以證實。

【0260】 奈米抗體組合習知抗體之優點與小分子藥物之重要特徵。如同習知抗體，奈米抗體顯示對其靶之高度靶特異性、高親和力以及低固有毒性。然而，如同小分子藥物，其可抑制酶並輕易地接近受體裂隙。另外，奈米抗體極端穩定，可藉由不為注射之手段投與(參見例如WO 04/041867，其以引用的方式完整併入本文)且易於製備。奈米抗體之其他優點包括識別由於其小尺寸而不常見或隱藏的抗原決定基、歸因於其獨特3維結構而以高親和力及選擇性結合至蛋白質靶之腔或活性位點內、藥物形式靈活性、半衰期之可調節性、以及開發藥物之容易性及速度。

【0261】 奈米抗體由單基因編碼且在幾乎全部的原核及真核宿主，例如大腸桿菌(參見例如US 6,765,087，其以引用的方式完整併入本文)、黴菌(例如麴黴屬(*Aspergillus*)或木黴屬(*Trichoderma*))及酵母(例如酵母屬、克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)、漢遜酵母屬(*Hansenula*)或畢赤酵母屬)(參見例如US 6,838,254，其以的引用方式完整併入本文)中高效產生。生產工藝係可縮放的，且已產生多公斤量之奈米抗體。由於相比於習知抗體，奈米抗體顯示出優越穩定性，故可將其調配為貨架期長的即用型溶液。

【0262】 奈米選殖方法(參見例如WO 06/079372，其以引用的方式完整併入本文)係一種基於B-細胞之自動化高通量選擇，針對所要靶產生奈米抗體的專有方法，且可在本發明之情形下使用。

【0263】 單抗體係另一抗體片段技術，然而此技術基於IgG4抗體之鉸鏈區的移除。鉸鏈區之缺失產生尺寸基本上為傳統IgG4抗體之一半且

具有單價結合區而非IgG4抗體雙價結合區的分子。亦熟知的為，IgG4抗體具有惰性且因而不與免疫系統相互作用，此對於治療不希望有免疫反應之疾病可為有利的，且此優點傳遞至單抗體上。例如，單抗體可起作用以抑制或沉默而非殺傷其所結合之細胞。另外，與癌細胞結合之單抗體不刺激其增殖。另外，因為單抗體之尺寸為傳統IgG4抗體的約一半，所以其可在較大實體瘤上顯示更好的分佈，並產生潛在有利的功效。單抗體以類似於完整IgG4抗體之速率自身體中清除且能夠以類似於完整抗體之親和力與其抗原結合。單抗體之其他細節可藉由參考專利公開案WO2007/059782獲得，該文獻以引用的方式完整併入本文。

【0264】 親和抗體分子代表基於58個胺基酸殘基之蛋白質結構域的一類新親和蛋白，該58個胺基酸殘基之蛋白質結構域源自葡萄球菌蛋白A之結合IgG的結構域之一。已將此三螺旋束結構域用作構築組合噬菌體文庫之骨架，可使用噬菌體呈現技術，自該等噬菌體文庫中選擇靶向所需分子之親和抗體變異體[Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, (1997) 『 Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain 』, Nat Biotechnol 15:772-7 ; Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA (2002) 『 Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A 』, Eur J Biochem. 269:2647-55]。親和抗體分子之簡單穩健結構連同其低分子量(6 kDa)使得其適合類型廣泛的應用，例如用作偵測試劑[Ronmark J. 等人 (2002) 『 Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli 』 J Immunol Methods 261:199-211]及用於抑制受體

相互作用 [Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA (2003) 『Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering』 Protein Eng 16:691-7]。親和抗體及其產生方法之其他細節可藉由參考美國專利第5831012號獲得，該專利以引用的方式完整併入本文。

【0265】標記的親和抗體亦可用於成像應用中，用於確定同功異型物之豐度。

【0266】DARPin (設計的錨蛋白重複序列蛋白)係已經開發用來探索非抗體多肽之結合能力的抗體模擬物DRP (設計的重複序列蛋白)技術之一個實例。重複序列蛋白諸如錨蛋白或富白胺酸重複序列蛋白係泛素化結合分子，其不同於抗體，在胞內及胞外存在。其獨特模組式架構以重複結構單元(重複序列)為特徵，該等重複結構單元堆疊在一起，形成呈現可變的及模組式的靶結合表面之延長重複序列結構域。基於此模組性，可產生具有高度多樣化的結合特異性之多肽組合文庫。此策略包括呈現可變表面殘基之自我相容性重複序列的共有設計及將其隨機組裝成重複序列結構域。

【0267】DARPin可在細菌表現系統中以極高產率產生，且其屬於已知的最穩定蛋白質。已選擇針對寬範圍之靶蛋白的高度特異性高親和力的DARPin，該等靶蛋白包括人類受體、細胞介素、激酶、人類蛋白酶、病毒及膜蛋白。可獲得具有單位數奈莫耳至皮莫耳範圍內之親和力的DARPin。

【0268】DARPin已用於廣泛類型之應用中，包括ELISA、夾心ELISA、流式細胞分析(FACS)、免疫組織化學(IHC)、晶片應用、親和純

化或西方墨點法。亦已證明DARPin在胞內區室中具有高度活性，例如作為與綠色螢光蛋白(GFP)融合之胞內標記蛋白。DARPin進一步用來以pM範圍之 IC_{50} 抑制病毒進入。DARPin不僅理想地阻斷蛋白質-蛋白質相互作用，而且抑制酶。已成功地抑制蛋白酶、激酶及轉運蛋白，最常為立體異位抑制模式。在腫瘤上極快速且特異的富集及極有利的腫瘤與血液比使得DARPin尤其適用於活體內診斷學或治療方法。

【0269】 關於DARPin及其他DRP技術之額外資訊可在美國專利申請公開案第2004/0132028號及國際專利公開案第WO 02/20565號中找到，該等公開案均以引用的方式完整地併入本文。

【0270】 Anticalin係另一抗體模擬物技術。然而，在此情況下，結合特異性源自脂質運載蛋白(lipocalin)，在人類組織及體液中天然及大量表現之低分子量蛋白質家族。脂質運載蛋白已演化成在活體內執行一系列與生理轉運及儲存化學敏感或不溶性化合物相關之功能。脂質運載蛋白具有穩健的固有結構，其包含高度保守之 β -桶，該 β -桶在蛋白質之一端支撐4個環。此等環形成結合袋之入口，且分子之此部分中的構形差異解釋個別脂質運載蛋白之間結合特異性之變化。

【0271】 儘管保守 β -摺疊構架支撐之高變環的總體結構類似於免疫球蛋白，但脂質運載蛋白就尺寸而言與抗體明顯不同，由160-180個胺基酸之單個多肽鏈組成，該單個多肽鏈略大於單個免疫球蛋白結構域。

【0272】 將脂質運載蛋白選殖且使其環經歷工程化以產生Anticalin。已產生結構上多樣的Anticalin之文庫，且Anticalin呈現允許選擇並篩選結合功能，隨後表現及產生可溶性蛋白用於在原核或真核系統中進行進一步分析。研究已成功證實：可形成如下Anticalin，其對幾乎任

何人類靶蛋白係特異的，可將其分離，且可獲得奈莫耳或更高範圍之結合親和力。

【0273】亦可將 Anticalin 編製為雙重靶向蛋白，亦即所謂的 Duocalin。Duocalin 以使用標準製備製程易於產生的一種單體蛋白質結合兩個單獨的治療靶，同時保留靶特異性及親和力，無論其兩個結合結構域之結構取向如何。

【0274】在已知涉及多於單個病原因素之疾病中，經由單個分子調節多個靶係尤其有利的。另外，二價或多價結合形式諸如 Duocalin 在以下方面具有明顯潛力：靶向疾病中之細胞表面分子、介導對信號轉導路徑之促效效應或經由結合細胞表面受體且使其簇集而誘導增強的內化作用。另外，Duocalin 之高固有穩定性與單體 Anticalin 相當，從而為 Duocalin 提供靈活的調配及遞送潛力。

【0275】關於 Anticalin 之額外資訊可在美國專利第 7,250,297 號及國際專利公開案第 WO 99/16873 號中找到，該等文獻均以引用的方式完整地併入本文。

【0276】可用於本發明情形下之另一抗體模擬物技術係 Avimer。Avimer 藉由活體外外顯子改組及噬菌體呈現而自一個龐大的人類胞外受體結構域家族中演化，從而產生具有結合特性及抑制特性之多結構域蛋白質。已顯示，多個獨立的結合結構域之連接產生親合力且與習知單抗原決定基結合蛋白相比，導致改良之親和性及特異性。其他潛在優點包括在大腸桿菌中簡單且高效地產生多靶特異性分子、改良之熱穩定性及對蛋白酶之抗性。已獲得針對多種靶之具有低於奈莫耳之親和力的 Avimer。

【0277】關於 Avimer 之額外資訊可在美國專利申請公開案第

2006/0286603 號、第 2006/0234299 號、第 2006/0223114 號、第 2006/0177831 號、第 2006/0008844 號、第 2005/0221384 號、第 2005/0164301 號、第 2005/0089932 號、第 2005/0053973 號、第 2005/0048512 號、第 2004/0175756 號中找到，該等文獻均以引用的方式完整地併入本文。

【0278】 Versabody 係可用於本發明情形下之另一抗體模擬物技術。Versabody 係半胱胺酸 >15% 之 3-5 kDa 小蛋白質，其形成置換典型蛋白質具有的疏水核心之高二硫橋鍵密度骨架。用少數二硫橋鍵置換大量疏水性胺基酸(包含疏水核心)產生更小、親水性更大(更少的聚集及非特異性結合)、對蛋白酶及熱之抗性更大且具有更低 T 細胞抗原決定基密度的蛋白質，因為對 MHC 呈遞作出最大貢獻之殘基係疏水性的。眾所周知全部 4 種此等特性均影響免疫原性，且預期其一起引起免疫原性之巨大降低。

【0279】 Versabody 之靈感來自水蛭、蛇、蜘蛛、蠍子、蝸牛及海葵產生的可注射天然生物藥物，已知該等藥物顯示出乎意料低的免疫原性。自選擇的天然蛋白質家族開始，藉由設計及篩選，使尺寸、疏水性、蛋白水解抗原加工及抗原決定基密度最小化至遠低於可注射天然蛋白均值之程度。

【0280】 鑒於 Versabody 之結構，此等抗體模擬物提供通用樣式，該通用樣式包括多價態、多特異性、多樣的半衰期機制、組織靶向模組及不存在抗體 Fc 區。另外，Versabody 在大腸桿菌中以高產率產生，且因為其親水性及小尺寸，Versabody 係高度可溶的且可調配成高濃度。Versabody 具有出乎意料的熱穩定性(其可被蒸煮)並提供延長的存放期。

【0281】 關於 Versabody 之額外資訊，可在美國專利申請公開案第

2007/0191272號中找到，該文獻以引用的方式完整地併入本文。

【0282】 上文提供之抗體片段及抗體模擬物技術的詳細描述不意欲為可用於本說明書上下文中的全部技術之全面清單。例如且非限制性地，可在本發明之情形下使用多項額外技術，包括基於多肽之替代性技術，諸如Qui等人 (2007) *Nature Biotechnology* 25(8):921-929中所概述之互補決定區融合法，該文獻以引用的方式完整地併入本文；以及基於核酸之技術，諸如在美國專利第5,789,157號、第5,864,026號、第5,712,375號、第5,763,566號、第6,013,443號、第6,376,474號、第6,613,526號、第6,114,120號、第6,261,774號及第6,387,620號中描述之RNA適體技術，該等文獻均以引用的方式併入本文。

【0283】

醫藥組合物

本發明之醫藥組合呈組合製劑形式用於同時、單獨或依序用途。類似地，在本發明之方法中，該醫藥組合之組分(A)及(B)可向患者以同時、單獨或依序方式投與。

【0284】 術語「組合製劑」包括固定組合及非固定組合兩者。術語「固定組合」意謂，活性成分(例如組分(A)及(B))呈單一實體或劑量形式。換言之，活性成分存在於單一組合物或調配物中。術語「非固定組合」意謂，活性成分(例如組分(A)及(B))存在於不同實體或劑量中(例如呈單獨組合物或調配物形式)，例如呈分裝部分之套組形式。獨立組分(A)及(B)(於其所要組合物或調配物中)隨後可在相同時間點或在不同時間點以單獨或依序方式投與。

【0285】 在投與係依序方式時，投與第二組分之延遲不應導致會減

損使用該組合所產生之作用的益處。因此，在一個實施例中，依序治療涉及在11天之時間段內投與該組合之各組分。在另一實施例中，此時間段係10天。在另一實施例中，此時間段係9天。在另一實施例中，此時間段係8天。在另一實施例中，此時間段係7天。在另一實施例中，此時間段係在6天內。在另一實施例中，此時間段係在5天內。在另一實施例中，此時間段係在4天內。在另一實施例中，此時間段係在3天內。在另一實施例中，此時間段係在2天內。在另一實施例中，此時間段係在24小時內。在另一實施例中，此時間段係在12小時內。

【0286】 組分(A)及(B)可以任何次序投與，例如先投與組分(A)及隨後投與組分(B)；或先投與組分(B)及隨後投與組分(A)。

【0287】 組合製劑中待投與的組分(A)與組分(B)之總量之比率可變化，例如以便應對待治療患者亞群之需要或個別患者之需要，該等不同需要是因為患者之年齡、性別、體重等。

【0288】 存在於單一組合物或單獨組合物中之組分(A)及(B)可獨立地與一或多種醫藥學上可接受之載劑一起調配。本發明之醫藥組合亦可包括至少一種其他抗腫瘤劑或抗炎劑或免疫抑制劑。可用於組合療法中的治療劑之實例在下文在關於本文所揭示之抗體之用途的章節中更詳細地描述。

【0289】 該等組合可包括一種本文所揭示之抗體或雙特異性分子或(例如兩種或更多種不同的)本文所揭示之抗體或雙特異性分子的組合。例如，本發明之醫藥組合可包含與靶抗原上不同抗原決定基結合或具有互補活性之抗體(或雙特異性分子)的組合。

【0290】 本發明之醫藥組合亦可在組合療法中投與，亦即與其他試

劑組合。例如，組合療法可包括與至少一種其他的抗腫瘤劑或抗炎劑或免疫抑制劑組合之本發明抗體。在下文關於本發明抗體用途之章節中，更詳細描述可在組合療法中使用的治療劑之實例。

【0291】 如本文所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括生理上相容的任何及全部溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑及其類似物。較佳地，載劑適用於靜脈內、肌內、皮下、非經腸、脊髓或表皮投與(例如藉由注射或輸注)。視投與途徑而定，活性化合物，亦即抗體、免疫共軛物或雙特異性分子，可包覆於保護該化合物免遭可能使化合物失活之酸及其他天然條件之作用的材料內。

【0292】 本發明之組分(A)及(B)可包括一或多種醫藥學上可接受之鹽。「醫藥學上可接受之鹽」係指保留母化合物之所要生物活性且不引起任何不希望之毒理作用之鹽[參見例如Berge, S.M.等人 (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19]。該等鹽之實例包括酸加成鹽及鹼加成鹽。酸加成鹽包括衍生自無毒無機酸，諸如氫氯酸、硝酸、磷酸、硫酸、氫溴酸、氫碘酸、亞磷酸及其類似無機酸；以及衍生自無毒有機酸，諸如脂族一元及二元羧酸、苯基取代之鏈烷酸、羥基鏈烷酸、芳族酸、脂族及芳族磺酸及其類似有機酸之酸加成鹽。鹼加成鹽包括衍生自鹼土金屬，諸如鈉、鉀、鎂、鈣及其類似鹼土金屬；以及衍生自無毒有機胺，諸如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普魯卡因、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、普魯卡因及其類似有機胺之鹼加成鹽。

【0293】 本發明之醫藥組合亦可在組分(A)及/或組分(B)中包括醫藥學上可接受之抗氧化劑。醫藥學上可接受之抗氧化劑之實例包括：(1)水溶性抗氧化劑，諸如抗壞血酸、鹽酸半胱胺酸、硫酸氫鈉、偏亞硫酸氫

鈉、亞硫酸鈉及其類似物；(2)油溶性抗氧化劑，諸如棕櫚酸抗壞血酸酯、丁基化羥基苯甲醚(BHA)、丁基化羥基甲苯(BHT)、卵磷脂、沒食子酸丙酯、 α -生育酚及其類似物；及(3)金屬螯合劑，諸如檸檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸及其類似物。

【0294】可在本發明之醫藥組合物(組分(A)及/或(B))中使用的適含水性及非水性載劑之實例包括水、乙醇、多元醇(諸如甘油、丙二醇、聚乙二醇及其類似物)及其適合混合物、植物油(諸如橄欖油)及可注射的有機酯(諸如油酸乙酯)。可例如藉由使用包衣材料諸如卵磷脂、在分散液之情況下藉由維持所需要之粒度、及藉由使用界面活性劑，來維持適當的流動性。

【0295】此等組合(組分(A)及/或(B))亦可含有佐劑，諸如防腐劑、潤濕劑、乳化劑及分散劑。可藉由同前的滅菌工序及藉由納入多種抗細菌劑及抗真菌劑(例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其類似物)確保防止微生物存在。亦可能希望的為，將等張劑(諸如糖、氯化鈉及其類似物)納入組合物。此外，可藉由納入延遲吸收之試劑(諸如單硬脂酸鋁及明膠)來實現可注射醫藥形式之延長吸收。

【0296】醫藥學上可接受之載劑包括無菌水溶液或分散液及用於現場製備無菌可注射溶液或分散液之無菌粉末。用於醫藥學上活性物質之該等介質及試劑的用途係此項技術中已知的。除了與活性化合物不相容之情況之外，涵蓋任何習知介質或試劑在本發明醫藥組合中之用途。亦可將補充性活性化合物併入組合物中。

【0297】治療性組合典型地必須為無菌的，且在製備及儲存條件下係穩定的。組合(組分(A)及/或(B))可調配為溶液、微乳液、脂質體或適合

高藥物濃度之其他有序結構。載劑可為溶劑或分散介質，其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇及液體聚乙二醇及其類似物)及其適合混合物。可例如藉由使用包衣諸如卵磷脂、在分散液之情況下藉由維持所需要之粒度及藉由使用界面活性劑，來維持適當流動性。在許多情況下，將較佳在組合物中包括等張劑，例如糖、多元醇諸如甘露醇、山梨醇或氯化鈉。可藉由在組合物中包括延遲吸收之試劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)來實現可注射醫藥組合物之延長吸收。

【0298】 可藉由將活性化合物以所需要之量連同上文所列舉的成分之一或組合(根據需要)併入適當溶劑中，隨後無菌微過濾，而製備無菌可注射溶液。通常，藉由將活性化合物併入無菌媒劑中來製備分散液，該無菌媒劑含有基礎分散介質及所需要之其他成分(來自上文所列舉之成分)。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末的情況下，較佳製備方法係真空乾燥法及冷凍乾燥(凍乾)法，該等方法產生活性成分外加來自其先前無菌過濾之溶液中的任何其他所需成分之粉末。

【0299】 可與載劑材料組合以產生單一劑型的活性成分之量將視待治療之受試者及特定投與模式而變動。可與載劑材料組合以產生單一劑型的活性成分之量通常為產生治療效果的組合物之量。一般而言，以100%計，此量可為與醫藥學上可接受之載劑組合的約0.01%至約99%之活性成分，較佳約0.1%至約70%、最佳約1%至約30%之活性成分。

【0300】 調整(組分(A)及/或(B)之)給藥方案以提供所要的最佳反應(例如協同組合、治療反應)。例如，可投與單次大丸劑，可隨時間推移投與幾個分開的劑量，或可如治療情況之需要所示，按比例減少或增加劑量。尤其有利的為，以單位劑型調配非經腸組合物以易於劑量之投與及均

勻性。如本文所用，單位劑型係指適合作為用於待治療受試者之單一劑量的物理離散單位；各單位含有預定量之活性化合物，該預定量經計算與所需要之醫藥載劑結合產生所要治療效果。本發明單位劑型之規格由以下決定且直接視以下而定：(a)活性化合物之獨特特徵及待實現之特定治療效果，及(b)調配該種活性化合物用於治療個體敏感性之技術內的固有限制。

【0301】較佳地，組分(A)及(B)之組合係協同組合。技術人員應理解，協同組合係組合之效應大於個別組分之效應總和的組合。協同作用可使用Chou-Talalay組合指數(CI)定量(參見「Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses」, Zhao L等人 Clin Cancer Res. (2004) 12月1日;10(23):7994-8004；及「Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design」, Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ., J. Natl. Cancer Inst. (1994) 10月19日;86(20):1517-24)。此組合指數(CI)方法係基於由質量作用定律之中值效應原理得出的多藥物效應方程式。此提供強協同作用($CI < 0.3$)、協同作用($CI = 0.3-0.9$)、累加效應($CI = 0.9-1.1$)或拮抗作用/無效益($CI > 1.1$)之定量定義，且其向用於藥物組合之自動化模擬的電腦軟體提供算法。其考慮各藥物單獨及其組合的效力(D(m)值)及劑量效應曲線之形狀(m值)。Chou-Talalay組合指數(CI)可使用Synergy R套件估算(參見「Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies」, Chou TC. Leuk. Lymphoma.

(2008);49(11):2059-2080及其中之參考文獻，其均明確以引用的方式併入本文中)。組合之CI可在適合細胞株中，例如在K052細胞中，例如在實例9中使用之條件下測試。

【0302】 較佳地，本發明之醫藥組合係Chou-Talalay組合指數(CI)小於0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3或0.2之協同組合。較佳地，CI係0.1-0.5、0.1-0.3或0.1-0.2。

【0303】 詳言之，提供一種治療患者之癌症的方法，其包含向有需要之患者同時、依序或單獨投與治療有效協同量之本發明之醫藥組合的組分(A)及(B)。亦提供一種本發明之醫藥組合，其用於治療癌症，其中向患者同時、單獨或依序投與協同量之組分(A)及(B)以便治療癌症。較佳地，組分(A)及(B)之量係向患者投與以便提供上文所揭示之血漿濃度。

【0304】 亦提供本發明之醫藥組合的協同量之組分(A)及(B)之用途，其用於製備用於同時、單獨或依序用於治療癌症之醫藥組合。亦提供一種本發明之協同醫藥組合，其用於療法中或用作藥劑。

【0305】 對於抗體投與，劑量係約0.0001至100 mg/kg且更常見地0.01至5 mg/kg宿主體重。例如，劑量可為0.3 mg/kg體重、1 mg/kg體重、3 mg/kg體重、5 mg/kg體重或10 mg/kg體重或在1-10 mg/kg之範圍內。例示性治療方案需要投與每週一次、每兩週一次、每三週一次、每四週一次、每月一次、每3個月一次或每3至6個月一次。本發明抗BST1抗體之較佳給藥方案包括經由靜脈內投與的1 mg/kg體重或3 mg/kg體重，使用以下給藥時程之一給予抗體：(i)每四週持續六個劑量，隨後每三個月；(ii)每三週；(iii) 3 mg/kg體重一次，隨後每三週1 mg/kg體重。

【0306】 在一些實施例中，抗BST1抗體(例如BST1_A2)劑量經調

整以實現0.005至50 $\mu\text{g/ml}$ 、例如0.01至10 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿抗體濃度。較佳地，抗BST1抗體(例如BST1_A2)劑量經調整以實現0.01至0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1至1.0 $\mu\text{g/ml}$ 或1.0至10 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿抗體濃度。

【0307】 在一些實施例中，胞苷類似物(例如5-氮雜胞苷)劑量經調整以實現0.05至5 μM 、例如0.1至2 μM 之血漿濃度。較佳地，胞苷類似物劑量經調整以實現0.1至0.5 μM 、0.5至1.0 μM 或1.0至2.0 μM 之血漿濃度。

【0308】 在一些實施例中，胞苷類似物(例如地西他濱)劑量經調整以實現0.05至5 μM 、例如0.1至2 μM 之血漿濃度。較佳地，胞苷類似物劑量經調整以實現0.1至0.5 μM 、0.5至1.0 μM 或1.0至2.0 μM 之血漿濃度。

【0309】 胞苷類似物(例如5-氮雜胞苷或地西他濱)或其醫藥學上可接受之鹽可與以下中之一或多者一起投與：環磷醯胺、羥基道諾黴素、安可平及潑尼松或潑尼龍(亦即CHOP療法)。

【0310】 在一些方法中，同時投與具有不同結合特異性之兩種或更多種單株抗體，在此情況下，投與之各抗體的劑量落在所指示之範圍內。通常多次投與抗體。單個劑量之間的時間間隔可為例如每週、每月、每三個月或每年。時間間隔亦可為不規則的，如藉由量測患者中針對靶抗原之抗體的血液水準所指示。在一些方法中，調整劑量以實現約1-1000 $\mu\text{g/ml}$ 、且在一些方法中約25-300 $\mu\text{g/ml}$ 之血漿抗體濃度。

【0311】 替代地，各組分可以持續釋放製劑形式投與，在此情況下需要較低頻率的投與。劑量及頻率視抗體在患者中之半衰期而變化。通常，人類抗體顯示最長的半衰期，隨後為人類化抗體、嵌合抗體及非人類抗體。投與之劑量及頻率可視治療為預防性的抑或治療性的而變動。在預

防性應用中，相對低之劑量以相對不頻繁之時間間隔在長的時間範圍內投與。一些患者繼續接受治療持續其餘生。在治療性應用中，有時需要相對短之時間間隔的相對高之劑量，直至疾病之進展減少或終止，且較佳直至患者顯示出部分或完全的疾病症狀改善。此後，可向患者投與預防性方案。

【0312】 可變動活性成分在本發明醫藥組合中之實際劑量水準，以獲得如下的活性成分之量，該量對於特定患者、組合物及投與模式，有效實現期望的治療反應，而對患者無毒。所選劑量水準視多種藥物代謝動力學因素而定，該等因素包括所用本發明特定組合或其酯、鹽或醯胺的活性、投與途徑、投與時間、所用的特定化合物之排泄速率、治療持續時間、與所用特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或材料、所治療之患者的年齡、性別、體重、狀況、總體健康及既往醫史以及醫學技術中熟知的類似因素。

【0313】 抗BST1抗體之「治療有效劑量」較佳導致降低疾病症狀之嚴重性，增加無疾病症狀期之頻率及持續時間，或預防因疾病侵襲所致的受損或致殘。例如，為治療BST1介導之腫瘤，相對於未經治療之受試者，「治療有效劑量」較佳抑制細胞生長或腫瘤生長至少約20%、更佳至少約40%、甚至更佳至少約60%且仍更佳至少約80%。可在預示人類腫瘤中之功效的動物模型系統中評估化合物抑制腫瘤生長之能力。替代地，可藉由檢查化合物抑制細胞生長之能力來評估組合物之此特性，該抑制可藉由技術人員已知的分析法活體外量測。治療有效量之治療性化合物可減小腫瘤尺寸或以其他方式改善受試者之症狀。一般熟習此項技術者能夠基於因素諸如受試者之大小、受試者症狀之嚴重性及選擇的特定組合物或投與

途徑，確定該等量。

【0314】 本發明之組分(A)及(B)可使用此項技術中已知的多種方法中之一或多者，經由一或多種投與途徑投與；該等途徑對於組分(A)及(B)可為相同或不同。如技術人員所理解，投與的途徑及/或模式將視所要結果而變化。抗體之較佳投與途徑包括靜脈內、肌內、皮內、腹膜內、皮下、脊髓或其他非經腸投與途徑，例如藉由注射或輸注。較佳地，醫藥組合靜脈內投與。

【0315】 如本文所用，片語「非經腸投與」意指不為經腸及局部投與之投與模式，通常藉由注射投與，且包括但不限於靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、被膜下、蛛網膜下、椎管內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。

【0316】 替代地，組分(A)及(B)可經由非非經腸途徑，諸如局部、表皮或黏膜投與途徑，例如鼻內、口服、陰道、直腸、舌下或局部地投與。

【0317】 組分(A)及(B)可連同保護化合物免於快速釋放之載劑一起製備，諸如控釋製劑，包括植入物、經皮貼片及微囊化遞送系統。可使用生物可降解、生物相容性聚合物，諸如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。用於製備該等製劑之多種方法已被授予專利權或為熟習此項技術者一般已知[參見例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978) J.R. Robinson 編著, Marcel Dekker, Inc., N.Y]。

【0318】 可用此項技術中已知的醫療裝置一起或分開投與醫藥組合。例如，在一較佳實施例中，本發明之醫藥組合可用無針皮下注射裝置

諸如美國專利第5,399,163號、第5,383,851號、第5,312,335號、第5,064,413號、第4,941,880號、第4,790,824號或第4,596,556號所揭示之裝置投與。可用於本發明之熟知植入物及模組之實例包括：美國專利第4,487,603號，其揭示用於以受控速率分配藥物之可植入式微量輸注泵；美國專利第4,486,194號，其揭示用於經皮膚投與藥物之治療裝置；美國專利第4,447,233號，其揭示用於以精確輸注速率遞送藥物之藥物輸注泵；美國專利第4,447,224號，其揭示用於連續遞送藥物之可變流量的可植入式輸注裝置；美國專利第4,439,196號，其揭示具有多腔區室之滲透性藥物遞送系統；及美國專利第4,475,196號，其揭示滲透性藥物遞送系統。此等專利以引用的方式併入本文。許多其他的此類植入物、遞送系統及模組係熟習此項技術者已知的。

【0319】在某些實施例中，可調配本文所揭示之單株抗體以確保在活體內之適當分佈。例如，血腦障壁(BBB)排除許多高度親水的化合物。為確保治療性化合物穿過BBB (若希望)，可將其例如調配在脂質體中。關於製備脂質體之方法，參見例如美國專利4,522,811、5,374,548及5,399,331。脂質體可包含一或多個被選擇性轉運至特定細胞或器官中之部分，從而增強靶向性藥物遞送[參見例如V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685]。例示性靶向部分包括葉酸或生物素(參見例如美國專利5,416,016)；甘露糖苷[Umezawa等人 (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]；抗體[P.G. Bloeman等人 (1995) FEBS Lett. 357:140；M. Owais等人 (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]；界面活性蛋白A受體[Briscoe等人 (1995) Am. J. Physiol. 1233:134]；p120 [Schreier等人 (1994) J. Biol. Chem. 269:9090]；亦參

見 K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123 ; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273 。

【0320】

用途及方法

本文所揭示之醫藥組合及方法具有許多活體內治療用途，包括治療BST1介導之疾病。

【0321】 在一些實施例中，此等組合可(例如活體內)投與至受試者以治療多種病症。如本文所用，術語「受試者」意在包括人類及非人類動物。非人類動物包括全部脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、羊、犬、貓、乳牛、馬、雞、兩棲動物及爬行動物。較佳受試者包括具有由BST1活性介導之病症的人類患者。該等方法尤其適用於治療具有與異常BST1表現相關之病症的人類患者。當針對BST1之抗體與另一試劑一起投與時，兩者可以任何順序或同時投與。

【0322】 另外，鑒於BST1在腫瘤細胞上之表現，本發明之醫藥組合可用來治療患有以下疾病之受試者：致腫瘤性疾病，例如特徵在於存在表現BST1之腫瘤細胞的疾病，包括例如急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌及胰臟癌。已證實BST1在抗體結合時內化，如下文實例5中所示，因此使得本發明之抗體可用於任何酬載作用機制例如ADC方法、放射免疫共軛物或ADEPT方法中。

【0323】 在一個實施例中，組合可用來抑制或阻斷BST1功能，此轉而可與某些疾病症狀之預防或改善關聯，從而提示BST1作為該疾病之介體。此可藉由使樣品及對照樣品與抗BST1抗體在允許抗體與BST1之間

形成複合物之條件下接觸來實現。在樣品及對照中偵測且比較抗體與BST1之間形成的任何複合物。

【0324】 在另一實施例中，可針對與活體外治療用途相關之結合活性，初步測試本文所揭示之包含抗體(例如單株抗體、多特異性及雙特異性分子及組合物)的組合。例如，可使用以下實例中描述之流式細胞分析法測試本發明之醫藥組合。

【0325】 本文所揭示之包含抗體(例如單株抗體、多特異性及雙特異性分子、免疫共軛物及組合物)的組合在治療BST1相關疾病中具有額外用途。例如，包含單株抗體、多特異性或雙特異性分子及免疫共軛物之組合可用來在活體內或在活體外激發一或多種以下生物學活性：抑制表現BST1之細胞的生長及/或殺傷表現BST1之細胞；在人類效應細胞存在下介導對表現BST1之細胞的吞噬或ADCC，或阻斷BST1配體與BST1結合。

【0326】 在一特定實施例中，將包含抗體(例如單株抗體、多特異性及雙特異性分子及組合物)之組合在活體內用於治療或預防多種BST1相關疾病。BST1相關疾病之實例尤其包括體現急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌及胰臟癌之人類癌症組織。

【0327】 活體內投與本發明之醫藥組合的組分(A)及(B)(例如，單株抗體、多特異性及雙特異性分子或免疫共軛物)的適合途徑係此項技術中熟知的且可由一般熟習此項技術者選擇。例如，醫藥組合可藉由注射(例如靜脈內或皮下)投與。所用分子之適合劑量將視受試者之年齡及體重以及抗體及胞苷類似物組合物之濃度及/或配方而定。

【0328】 本發明之醫藥組合可與一或多種其他治療劑例如細胞毒性劑、放射毒性劑或免疫抑制劑一起共投與。抗體可與試劑連接(作為免疫複合物)或可與試劑分開投與。在後一種情況下(分開投與)，抗體可在試劑之前、之後或與其同時投與或可與其他已知的療法(例如抗癌療法，例如輻射)共投與。該等治療劑尤其包括本身僅在對患者有毒或亞毒性之水準上有效的抗腫瘤劑，諸如多柔比星(阿德力黴素(adriamycin))、順鉑、硫酸博萊黴素、卡莫司汀、氮芥苯丁酸及環磷醯胺羥基脲。將順鉑以100 mg/kg劑量每4週靜脈內投與1次，且將阿德力黴素以60-75 mg/ml劑量每21日靜脈內投與1次。

【0329】 適合與本發明醫藥組合共投與之其他試劑包括用於治療癌症(例如急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌或胰臟癌)之其他試劑，諸如Avastin[®]、5FU及吉西他濱。

【0330】 本文所揭示之抗BST1抗體或其抗原結合片段與化療劑(例如胞苷類似物)的共投與提供經由對人類腫瘤細胞產生細胞毒性效應之不同機制起作用的兩種抗癌劑。該共投與可解決因腫瘤細胞形成藥物抗性或其抗原性變化(此可導致腫瘤細胞對抗體無反應)所致的問題。

【0331】 靶特異性效應細胞，例如與本文所揭示之組合(例如包含單株抗體、多特異性及雙特異性分子)連接的效應細胞，亦可用作治療劑。用於靶向之效應細胞可為人類白細胞，諸如巨噬細胞、嗜中性粒細胞或單核細胞。其他細胞包括嗜酸性粒細胞、天然殺傷細胞及其他攜帶IgG或IgA受體之細胞。若需要，則效應細胞可自待治療之受試者獲得。靶特異性效應細胞可作為生理學上可接受之溶液中的細胞懸浮液投與。投與的細

胞之數目可為大約 10^8 - 10^9 ，但將視治療目的而變動。通常，該量將足以在靶細胞(例如表現BST1之腫瘤細胞)處獲得定位且藉由例如吞噬影響細胞殺傷。投與途徑亦可變動。

【0332】 採用靶特異性效應細胞之療法可與用於移除靶向細胞之其他技術聯合進行。例如，使用本發明醫藥組合(例如包含單株抗體、多特異性或雙特異性分子)及/或以此等組合武裝之效應細胞的抗腫瘤療法可與化療法聯合使用。另外，組合免疫療法可用來將兩個不同的細胞毒性效應子群體引向腫瘤細胞排斥。例如，與抗Fc- γ RI或抗CD3連接之抗BST1抗體可與IgG或IgA受體特異性結合劑聯合使用。

【0333】 本文所揭示之雙特異性及多特異性分子亦可用來調節效應細胞上之Fc γ R或Fc γ R水準，諸如藉由對細胞表面上之受體封端及消除細胞表面上之受體。抗Fc受體之混合物亦可用於此目的。

【0334】 具有補體結合位點(諸如來自結合補體之IgG1、IgG-2或IgG-3或IgM的部分)之本發明醫藥組合(例如包含單株抗體、多特異性或雙特異性分子及免疫共軛物)亦可在補體存在下使用。在一個實施例中，用本文所揭示之結合劑及適當效應細胞離體處理包含靶細胞之細胞群體可藉由添加補體或含有補體之血清進行補充。可藉由結合補體蛋白來改良對包被有本發明結合劑之靶細胞的吞噬。在另一實施例中，包被有本文所揭示之組合物(例如單株抗體、多特異性及雙特異性分子)的靶細胞亦可由補體溶解。在又一實施例中，本發明之組合不活化補體。

【0335】 本發明之醫藥組合(例如包含單株抗體、多特異性或雙特異性分子或免疫共軛物)亦可與補體一起投與。在某些實施例中，本發明提供包含抗體、多特異性或雙特異性分子以及血清或補體之醫藥組合。當補

體緊鄰於抗體、多特異性或雙特異性分子存在時，此等組合物可為有利的。替代地，本文所揭示之抗體、多特異性或雙特異性分子以及補體或血清可單獨投與。

【0336】亦處於本發明之範疇內的為，包含本發明醫藥組合(例如包含單株抗體、雙特異性或多特異性分子或免疫共軛物)及使用說明書的套組。套組可進一步含有一或多種額外的試劑，諸如免疫抑制試劑、細胞毒性劑或放射毒性劑，或一或多種額外的本文所揭示之抗體(例如具有與BST1抗原中區別於第一抗體之抗原決定基結合的互補活性之抗體)。

【0337】因此，可向用本發明醫藥組合治療之患者額外地投與(在投與本文所揭示之抗體之前、同時或之後)增強或增進抗體治療效果之另一治療劑(除了胞苷類似物之外)，諸如細胞毒性劑或放射毒性劑。

【0338】在其他實施例中，可額外地用調節(例如增強或抑制) Fc γ 或Fc γ 受體之表現或活性的試劑治療受試者，例如用細胞介素治療受試者。在用多特異性分子治療期間投與之較佳細胞介素包括粒細胞群落刺激因子(G-CSF)、粒細胞-巨噬細胞群落刺激因子(GM-CSF)、干擾素- γ (IFN- γ)及腫瘤壞死因子(TNF)。

【0339】本發明之醫藥組合(例如包含抗體、多特異性或雙特異性分子)亦可用來靶向表現Fc γ R或BST1之細胞，例如用於標記該等細胞。對於該用途，結合劑可與可被偵測之分子連接。因此，本發明提供用於離體或活體外定位表現Fc受體(諸如Fc γ R)或BST1之細胞的方法。可偵測標記可為例如放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子。

【0340】在其他實施例中，本發明提供用於治療受試者中的BST1介導之病症之方法，該病症例如為人類癌症及人類炎性疾病，包括本發明

之疾病。

【0341】 在又一實施例中，藉由將化合物(例如治療劑、標記、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制劑等)與抗體連接，本文所揭示之包含免疫共軛物的本發明醫藥組合可用來將該等化合物靶向具有BST1細胞表面受體之細胞。例如，抗BST1抗體可共軛至美國專利第6,281,354號及第6,548,530號、美國專利公開案第2003/0050331號、第2003/0064984號、第2003/0073852號及第2004/0087497號中描述或WO 03/022806中公開之任何毒素化合物。因而，本發明提供離體或活體內定位表現BST1之細胞的方法(例如採用可偵測標記，諸如放射性同位素、螢光化合物、酶或酶輔因子)。替代地，免疫共軛物可藉由將細胞毒素或放射性毒素靶向BST1，用來殺傷具有BST1細胞表面受體之細胞。

【0342】 本說明書中引用之全部參考文獻，包括但不限於全部論文、公開案、專利、專利申請案、演講辭、本文、報導、手稿、手冊、書籍、網際網路告示、雜誌文章、期刊、產品資料頁及其類似物，在此以引用的方式完整併入本說明書。對本文中之參考文獻的討論僅意在概述其作者所作出之陳述，而不承認任何參考文獻構成先前技術，且申請人保留對所引用參考文獻之精確性及關聯性提出異議的權利。

【0343】 雖然出於清楚理解之目的，已藉由例示及實例詳細描述前述發明，但一般熟習此項技術者在本發明教示下將易於理解，可對本發明作出某些變化及修改，而不脫離所附申請專利範圍之精神或範疇。

【0344】 本發明藉由不應視為進一步限制性的以下實例進一步說明。

【0345】

實例1：噬菌體呈現文庫之構築

由BST1之胺基酸29-292組成的重組蛋白(SEQ ID NO:44)藉由標準重組方法以真核方式合成且用作免疫用抗原。

【0346】

免疫及mRNA分離

如下構築用於鑑別BST1結合分子之噬菌體呈現文庫。A/J小鼠(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.)用重組BST1抗原(胞外結構域)進行腹膜內免疫，在第0日使用弗氏完全佐劑中之100 µg蛋白質且在第28日使用100 µg抗原。經由穿刺後眼眶竇獲得小鼠之測試血液。若藉由測試滴度，藉由ELISA使用經由中性抗生物素蛋白(Reacti-Bind™)固定之生物素化BST1抗原(經NeutrAvidin(TM)塗佈之聚苯乙烯盤，Pierce, Rockford, Ill.)認為此等滴度高，則在第70日、第71日及第72日用100 µg蛋白質對小鼠進行增強免疫，隨後在第77日處死小鼠並進行脾切除術。若認為抗體之滴度不令人滿意，則在第56日用100 µg抗原對小鼠增強免疫且在第63日取測試血液。若獲得令人滿意之滴度，則在第98日、第99日及第100日用100 µg抗原對動物增強免疫且在第105日收穫脾臟。

【0347】 在層流通風櫥中收穫脾臟並將其轉移至皮式培養皿，剪下並棄去脂肪及結締組織。在1.0 ml溶液D、25.0 g 硫氰酸胍(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)、29.3 ml無菌水、1.76 ml 0.75 M檸檬酸鈉pH 7.0、2.64 ml 10% sarkosyl (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)、0.36 ml 2-巰基乙醇(Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)存在下，用來自無菌5 cc注射器之柱塞迅速搗碎脾臟。將此脾臟懸浮液用18號針抽吸直至全部細胞溶解，且將黏性溶液轉移至微量離心管。皮式培養皿用100 µl溶液

D洗滌以回收任何剩餘的脾臟。此懸浮液隨後經22號針抽吸額外5-10次。

【0348】 將樣品在兩個微量離心管之間平均分配且按順序添加以下溶液，且在每次添加後藉由顛倒混合：50 μ l 2 M乙酸鈉pH 4.0、0.5 ml水-飽和苯酚(Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)，100 μ l氯仿/異戊醇49:1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)。將溶液渦旋混合10秒並在冰上培育15分鐘。在2-8°C以14 krpm離心20分鐘後，將水相轉移至一個新管。添加等體積之水飽和苯酚:氯仿:異戊醇(50:49:1)，並將該管渦旋混合10秒。在冰上培育15分鐘後，將樣品在2-8°C離心20分鐘，並將水相轉移至一個新管且用等體積異丙醇在-20°C沈澱最少30分鐘。在4°C以14 krpm離心20分鐘後，吸棄上清液，將管短暫離心且自RNA集結粒移除全部痕量的液體。

【0349】 將RNA集結粒各自溶解於300 μ l溶液D中，合併且用等體積異丙醇在-20°C沈澱最短30分鐘。將樣品在4°C以14 krpm離心20分鐘，如前吸棄上清液，且樣品用100 μ l冰冷的70%乙醇沖洗。將樣品再次在4°C以14 krpm離心20分鐘，吸棄70%乙醇溶液，且將RNA集結粒真空乾燥。將集結粒再懸浮於100 μ l無菌的焦碳酸二乙酯處理之水中。使用吸光度1.0對應於濃度40 μ g/ml，藉由A260測定濃度。RNA儲存在-80°C。

【0350】

互補DNA (cDNA)之製備

直接使用如上文所述的自小鼠脾臟純化之總RNA作為製備cDNA之模板。將RNA (50 μ g)用無菌水稀釋至100 μ L，且添加10 μ L 130 ng/ μ L寡聚dT12 (在Applied Biosystems 392型號DNA合成儀上合成)。將樣品在70°C加熱10分鐘，隨後在冰上冷卻。在冰上添加40 μ L 5*第一股緩衝液

(Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.)，連同 20 μ L 0.1 M 二硫蘇糖醇 (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.)、10 μ L 20 mM 脫氧核苷三磷酸(dNTP, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)及 10 μ L 水。隨後將樣品在 37 $^{\circ}$ C 培育 2 分鐘。添加 10 μ L 逆轉錄酶 (SuperscriptTM II, Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.)，且在 37 $^{\circ}$ C 繼續培育 1 小時。cDNA 產物直接用於聚合酶鏈反應(PCR)。

【0351】

藉由PCR擴增抗體基因

為使用PCR擴增實質上全部的H及L鏈基因，選擇與實質上全部公開的序列對應之引子。因為H及L之胺基端的核苷酸序列含有巨大的多樣性，所以合成33個寡核苷酸以充當H鏈之5'引子，並合成29個寡核苷酸以充當 κ L鏈之5'引子，如US 6,555,310中所描述。各鏈之恆定區核苷酸序列僅需要用於H鏈之一個3'引子及用於 κ L鏈之一個3'引子。

【0352】 對於各引子對，採用以下組分執行 50 μ L 反應：50 μ mol 5' 引子，50 μ mol 3' 引子，0.25 μ L Taq DNA 聚合酶(5單位/ μ L, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)，3 μ L cDNA (如前述製備的)，5 μ L 2 mM dNTP，5 μ L 含 $MgCl_2$ 之 10* Taq DNA 聚合酶緩衝液(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)及 H_2O 至 50 μ L。使用 GeneAmp(R) 9600 熱循環儀(Perkin Elmer, Foster City, Calif.)，按以下熱循環程式進行擴增：94 $^{\circ}$ C 1分鐘；30個循環的94 $^{\circ}$ C 20秒；55 $^{\circ}$ C 30秒；及72 $^{\circ}$ C 30秒；72 $^{\circ}$ C 6分鐘；4 $^{\circ}$ C。

【0353】 PCR過程之dsDNA產物隨後經受僅使用3'引子之非對稱PCR，以實質上僅產生靶基因之反義股。對於各dsDNA產物，採用以下

組分執行100 μ L反應：200 μ mol 3'引子，2 μ L ds-DNA產物，0.5 μ L Taq DNA聚合酶，10 μ L 2 mM dNTP，10 μ L含MgCl₂之10**Taq* DNA聚合酶緩衝液(Boehringer Mannheim，Indianapolis，Ind.)及H₂O至100 μ L。如上文描述的相同PCR程式用來擴增單股(ss)-DNA。

【0354】

藉由高效液相層析純化單股DNA及單股DNA之激酶激活

藉由添加2.5體積乙醇及0.2體積7.5 M乙酸銨及在-20℃培育至少30分鐘，乙醇沈澱H鏈ss-PCR產物及L鏈單股PCR產物。藉由在Eppendorf離心機中以14 krpm在2-8℃離心10分鐘，使DNA集結。小心地吸出上清液，並將管再次短暫離心。用移液器移除最後一滴上清液。將DNA以中溫真空乾燥10分鐘。將H鏈產物彙集於210 μ L水中且將L鏈產物單獨彙集於210 μ L水中。藉由使用Hewlett Packard 1090 HPLC及Gen-Pak™ FAX陰離子交換管柱(Millipore Corp., Milford, Mass.)的高效液相層析(HPLC)純化單股DNA。表1中顯示用來純化單股DNA之梯度，且烘箱溫度係60℃。在260 nm監測吸光度。以0.5分鐘級分收集自HPLC溶離之單股DNA。將含有單股DNA之級分如上文所述進行乙醇沈澱、集結及乾燥。將乾燥的DNA集結粒彙集於200 μ L無菌水中。

【0355】

表1-用於純化ss-DNA之HPLC梯度

時間(分鐘)	%A	%B	%C	流速(ml/min)
0	70	30	0	0.75
2	40	60	0	0.75
17	15	85	0	0.75
18	0	100	0	0.75
23	0	100	0	0.75
24	0	0	100	0.75

28	0	0	100	0.75
29	0	100	0	0.75
34	0	100	0	0.75
35	70	30	0	0.75

緩衝液A係25 mM Tris ， 1 mM EDTA ， pH 8.0

緩衝液B係25 mM Tris ， 1 mM EDTA ， 1 M NaCl ， pH 8.0

緩衝液C係40 mm磷酸

【0356】 在製備時將單股DNA 5'-磷酸化以便突變誘發。將24 μL 10*激酶緩衝液(United States Biochemical, Cleveland, Ohio)、10.4 μL 10 mM腺苷-5'-三磷酸(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)及2 μL 聚核苷酸激酶(30單位/μL, United States Biochemical, Cleveland, Ohio)添加至各樣品，且將管在37℃培育1小時。藉由在70℃培育管10分鐘而終止反應。藉由用Tris平衡苯酚(pH>8.0，United States Biochemical, Cleveland, Ohio):氯仿:異戊醇(50:49:1)萃取1次並用氯仿:異戊醇(49:1)萃取1次，純化DNA。在萃取後，如上文所述，將DNA乙醇沈澱並集結。將DNA集結粒乾燥，隨後溶解於50 μL無菌水中。使用33 μg/ml對應於吸光度1.0，藉由在260 nm量測DNA等分試樣之吸光度測定濃度。樣品儲存在-20℃。

【0357】

製備在生成脾臟抗體噬菌體文庫中使用之尿嘧啶模板

將1 ml大腸桿菌CJ236 (BioRAD, Hercules, Calif.)隔夜培養物添加至250 ml帶擋板的搖瓶中之50 ml 2*YT。使培養物在37℃生長至OD₆₀₀=0.6，用10 μl 1/100稀釋的BS45載體噬菌體儲備液接種(US 6,555,310中描述的)且繼續生長6小時。將大約40 ml培養物在4℃以12 krpm離心15分鐘。將上清液(30 ml)轉移至新離心管並在添加15 μl 10

mg/ml RNaseA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)後於室溫培育15分鐘。藉由添加7.5 ml 20%聚乙二醇8000 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.)/3.5 M乙酸銨(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)並在冰上培育30分鐘，使噬菌體沈澱。將樣品在2-8℃以12 krpm離心15分鐘。小心地棄去上清液，且將管短暫離心以移除全部痕量的上清液。將集結粒再懸浮於400 µl高鹽緩衝液(300 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA)中並轉移至1.5 ml管。

【0358】 噬菌體儲備液用等體積的平衡苯酚:氯仿:異戊醇(50:49:1)反覆萃取直至見不到痕量的白色界面，且隨後用等體積的氯仿:異戊醇(49:1)萃取。將DNA用2.5體積乙醇及1/5體積7.5 M乙酸銨沈澱且在-20℃培育30分鐘。將DNA在4℃以14 krpm離心10分鐘，將集結粒用冷70%乙醇洗滌1次並真空乾燥。將尿嘧啶模板DNA溶解於30 µl無菌水中，且使用吸光度1.0對應於濃度40 µg/ml，藉由A260測定濃度。將模板用無菌水稀釋至250 ng/µL，等分並儲存在-20℃。

【0359】

突變誘發具有ss-DNA之尿嘧啶模板並電穿孔至大腸桿菌中以產生抗體噬菌體文庫

藉由將單股重鏈及輕鏈基因同時引入至噬菌體呈現載體尿嘧啶模板上，生成抗體噬菌體呈現文庫。藉由以下方式以2 µg規模進行典型突變誘發：在0.2 ml PCR反應管中混合以下組分：8 µl (250 ng/µL)尿嘧啶模板，8 µl 10*黏接緩衝液(200 mM Tris pH 7.0, 20 mM MgCl₂, 500 mM NaCl)，3.33 µl激酶激活之單股重鏈插入物(100 ng/µL)，3.1 µl激酶激活之單股輕鏈插入物(100 ng/µL)及無菌水至80 µl。DNA在GeneAmp(R)

9600熱循環儀中使用以下熱曲線黏接：在94°C 20秒，85°C 60秒，經30分鐘自85°C遞減至55°C，在55°C保持15分鐘。在該程式完成後，將DNA轉移至冰上。藉由添加8 µl 10*合成緩衝液(5 mM各dNTP，10 mM ATP，100 mM Tris pH 7.4，50 mM MgCl₂，20 mM DTT)，8 µL T4 DNA連接酶(1 U/µL，Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)，8 µL稀釋的T7 DNA聚合酶(1 U/µL，New England BioLabs, Beverly, Mass.)並在37°C培育30分鐘，實施延長/連接。用300 µl突變誘發終止緩衝液(10 mM Tris pH 8.0，10 mM EDTA)終止反應。突變誘發DNA用平衡苯酚(pH>8):氯仿:異戊醇(50:49:1)萃取一次，用氯仿:異戊醇(49:1)萃取一次，且將DNA在-20°C乙醇沈澱至少30分鐘。將DNA集結且如上文所述，小心地移除上清液。將樣品再次短暫離心且用移液器移除全部痕量的乙醇。將集結粒真空乾燥。使DNA再懸浮於4 µl無菌水中。

【0360】 使用電穿孔法，將1 µl突變誘發DNA (500 ng)轉移至40 µl電勝任大腸桿菌DH12S (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.)中。將轉型的細胞與大約1.0 ml隔夜XL-1細胞混合，該等隔夜XL-1細胞用2*YT培養液稀釋至60%初始體積。隨後將此混合物轉移至15 ml無菌培養管且添加9 ml頂層瓊脂，用於塗佈在150 mm LB瓊脂盤上。將盤在37°C培育4小時並隨後轉移至20°C隔夜。藉由用10 ml 2*YT自此等盤溶離下噬菌體，離心去除碎片並取上清液，而取得首輪抗體噬菌體。此等樣品係用於選擇針對BST1之抗體的抗體噬菌體呈現文庫。藉由在LB瓊脂盤上塗佈10 µl 10⁻⁴稀釋之懸浮細胞，隨後在37°C培育盤隔夜，來量測電穿孔之效率。藉由將10⁻⁴稀釋盤上空斑之數目乘以10⁶，計算出效率。在此等條件下，文庫電穿孔效率典型地大於1×10⁷個噬菌體。

【0361】**藉由電穿孔轉型大腸桿菌**

在冰上融化電勝任大腸桿菌細胞。藉由溫和地上下抽吸細胞2-3次，使DNA與40 μ L此等細胞混合，小心勿引入氣泡。將細胞轉移至已在冰上冷卻之Gene Pulser比色管(0.2 cm間隙，BioRAD, Hercules, Calif.)，再次小心勿在轉移時引入氣泡。將比色管置於大腸桿菌脈衝發生器(BioRAD, Hercules, Calif.)中且根據製備商之推薦，用設定在1.88 kV之電壓進行電穿孔。將轉型的樣品立即再懸浮於1 ml 2*YT培養液或400 μ L 2*YT/600 μ L隔夜XL-1細胞之1 ml混合物中且如程式所述般進行處理。

【0362】**塗佈用抗體噬菌體呈現載體突變誘發反應轉型之M13噬菌體或細胞**

將噬菌體樣品添加至200 μ L大腸桿菌XL1-Blue隔夜培養物(當在100 mm LB瓊脂盤上塗佈時)，或添加至600 μ L隔夜細胞(當在無菌15 ml培養管中在150 mm盤上塗佈時)。在添加LB頂層瓊脂(對於100 mm盤，3 ml頂層瓊脂；或對於150 mm盤，9 ml頂層瓊脂；頂層瓊脂儲存在55°C(參見附錄A1，Sambrook等人，同前文獻))後，使混合物均勻分佈在已預溫(37°C-55°C)以移除瓊脂表面上任何過量水分之LB瓊脂盤上。將盤在室溫冷卻直至頂層瓊脂固化。將盤反扣且如所指示在37°C培育。

【0363】**製備生物素化之ADP-核糖基環化酶2及生物素化之抗體**

將濃縮的重組BST1抗原(全長胞外結構域)充分透析入BBS (20 mM 硼酸鹽，150 mM NaCl，0.1% NaN₃，pH 8.0)中。在透析後，使1 mg BST1 (1 mg/ml 於BBS中)與15倍莫耳過量之生物素-XX-NHS酯

(Molecular Probes, Eugene, Oreg., DMSO中40 mM之儲備溶液)反應。將反應物在室溫培育90分鐘並隨後用最終濃度20 mM之牛磺酸(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)淬滅。生物素化反應混合物隨後在2-8°C針對BBS透析。在透析後，將生物素化之BST1稀釋於淘洗緩衝液(40 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mg/ml BSA, 0.1% Tween 20, pH 7.5)中，等分且儲存在-80°C直至需要。

【0364】 利用位於重鏈羧基端處之游離半胱胺酸，使抗體與3-(N-順丁烯二醯亞胺基丙醯基)生物素(Molecular Probes, Eugene, Oreg.)反應。藉由添加DTT至最終濃度1 mM，使抗體在室溫還原30分鐘。使還原的抗體通過Sephadex G50脫鹽管柱，該脫鹽管柱在50 mM磷酸鉀，10 mM硼酸，150 mM NaCl，pH 7.0中平衡。添加3-(N-順丁烯二醯亞胺基丙醯基)-生物素至最終濃度1 mM，並允許反應在室溫繼續進行60分鐘。隨後將樣品針對BBS充分透析並儲存在2-8°C。

【0365】

製備抗生物素蛋白磁性乳膠

徹底地再懸浮磁性乳膠(Estapor, 10%固體, Bangs Laboratories, Fishers, Ind.)且以2 ml等分至15 ml錐形管中。將磁性乳膠懸浮於12 ml蒸餾水中且使用磁體(PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.)，與溶液分離10分鐘。在用磁體維持磁性乳膠之分離的同時，使用10 ml無菌移液器小心地移除液體。此洗滌過程重複額外3次。在最後一次洗滌後，使乳膠再懸浮於2 ml蒸餾水中。在一單獨的50 ml錐形管中，將10 mg抗生物素蛋白-HS (中性抗生物素蛋白, Pierce, Rockford, Ill.)溶解於18 ml 40 mM Tris, 0.15 M氯化鈉, pH 7.5 (TBS)中。在渦旋混合下，添加2 ml經

洗滌之磁性乳膠至稀釋的抗生物素蛋白-HS，且將混合物混合額外30秒。將此混合物在45°C培育2小時，每隔30分鐘震盪。如上文所述，利用磁體使抗生物素蛋白磁性乳膠與溶液分離且用20 ml BBS洗滌3次。在最後一次洗滌後，使乳膠再懸浮於10 ml BBS中，且儲存在4°C。

【0366】 緊鄰使用之前，將抗生物素蛋白磁性乳膠在淘洗緩衝液(40 mM Tris，150 mM NaCl，20 mg/ml BSA，0.1% Tween 20，pH 7.5)中平衡。將淘洗實驗所需之抗生物素蛋白磁性乳膠(200 µl/樣品)添加至無菌15 ml離心管且用淘洗緩衝液補足至10 ml。將管置於磁體上10分鐘以使乳膠分離。如上文所述，用10 ml無菌移液器小心地移除溶液。將磁性乳膠再懸浮於10 ml淘洗緩衝液中以開始第二次洗滌。用淘洗緩衝液洗滌磁性乳膠總計3次。在最後一次洗滌後，使乳膠再懸浮於淘洗緩衝液中至起始體積。

【0367】

實例2：選擇針對BST1抗原之重組多株抗體

如實例1中所述，自產生自高免疫小鼠之噬菌體呈現文庫中選擇與BST1特異性結合之結合試劑。

【0368】

淘洗

如實例1中所述，使用BS45尿嘧啶模板製備首輪抗體噬菌體。進行突變誘發DNA之電穿孔，產生源自不同免疫小鼠之噬菌體樣品。為在重組多株文庫中產生更大的多樣性，單獨淘洗各噬菌體樣品。

【0369】 在用生物素化之BST1抗原進行第一輪功能性淘洗之前，藉由用7F11-磁性乳膠淘洗，自抗體噬菌體文庫中選擇在其表面上呈現重

鏈及輕鏈之噬菌體(如US 6,555,310之實例21及22中所述)。原則上如US 6,555,310之實例16中所述，對此等富集的文庫進行功能性淘洗。具體而言，將10 μL 1×10^{-6} M生物素化之BST1抗原添加至噬菌體樣品(BST1之最終濃度大約 1×10^{-8} M)，且允許混合物在2-8°C平衡隔夜。

【0370】 在達至平衡後，將樣品用抗生物素蛋白磁性乳膠淘洗以捕捉與BST1結合之抗體噬菌體。平衡之抗生物素蛋白磁性乳膠(實例1)(每份樣品200 μL 乳膠)在室溫與噬菌體一起培育10分鐘。在10分鐘後，將大約9 ml淘洗緩衝液添加至各噬菌體樣品，且使用磁體使磁性乳膠與溶液分離。在10分鐘分離後，使用10 ml無菌移液器小心地移除未結合之噬菌體。隨後將磁性乳膠再懸浮於10 ml淘洗緩衝液中以開始第二次洗滌。如上文所述，將乳膠洗滌總計3次。對於各洗滌，使管與磁體接觸10分鐘以使得未結合之噬菌體與磁性乳膠分離。在第三次洗滌後，使磁性乳膠再懸浮於1 ml淘洗緩衝液中且轉移至1.5 mL管。隨後收集對應於各樣品之全部體積的磁性乳膠並使其再懸浮於200 μL 2*YT中且如實例1中所述，塗佈在150 mm LB盤上以擴增結合之噬菌體。將盤在37°C培育4小時，隨後在20°C隔夜。

【0371】 將用以擴增結合之噬菌體的150 mm盤用來產生下一輪抗體噬菌體。在隔夜培育後，藉由抽吸10 mL 2*YT培養基至菌苔(lawn)上且在室溫溫和地震盪盤20分鐘，自150 mm盤溶離第二輪抗體噬菌體。隨後將噬菌體樣品轉移至帶塞式密封蓋之15 ml拋棄式無菌離心管，且藉由以3500 rpm離心該管15分鐘，將來自LB盤之碎片集結。隨後轉移含有第二輪抗體噬菌體之上清液至新管。

【0372】 藉由在15 ml拋棄式無菌離心管中將100 μL 各噬菌體儲備

液稀釋入900 μ L淘洗緩衝液，建立第二輪功能性淘洗。隨後如關於第一輪淘洗所述，將生物素化之BST1抗原添加至各樣品，且將噬菌體樣品在室溫培育1小時。隨後如上文所述，用抗生物素蛋白磁性乳膠淘洗噬菌體樣品。此時藉由在100 mm LB瓊脂盤上塗佈各乳膠樣之等分試樣(以測定 κ 陽性百分比)，監測淘洗之進程。將來自各淘洗之大部分乳膠(99%)塗佈在150 mm LB瓊脂盤上以擴增與乳膠結合之噬菌體。將100 mm LB瓊脂盤在37°C培育6-7小時，此後將盤轉移至室溫，且將硝酸纖維素濾膜(孔徑0.45 mm，BA85 Protran，Schleicher及Schuel, Keene, N.H.)上覆至空斑上。

【0373】 帶有硝酸纖維素濾膜之盤在室溫培育隔夜且隨後用山羊抗小鼠 κ 鹼性磷酸酶共軛物顯色，以測定 κ 陽性百分比，如下文描述的。群體中具有較低 κ 陽性百分比(<70%)之噬菌體樣品經歷一輪採用7F11-磁性乳膠之淘洗，隨後使用大約 2×10^{-9} M的生物素化之BST1抗原，在2-8°C進行第三輪功能淘洗隔夜。亦監測此輪淘洗之 κ 陽性。彙集 κ 陽性百分比大於80%之個別噬菌體樣品且使其經受最終輪次的在2-8°C、 5×10^{-9} M下之淘洗隔夜。將來自此第四輪次之功能性淘洗的溶離之噬菌體內所含有的BST1抗體基因次選殖至表現載體pBRncoH3中。

【0374】 總體上，如US 6,555,310之實例18中所述，進行次選殖過程。在次選殖後，將表現載體電穿孔至DH10B細胞中且混合物在含有1%甘油及10 μ g/ml四環素之2*YT中生長隔夜。在四環素存在下進行第二輪生長及選擇後，將細胞之等分試樣冷凍在-80°C，作為生產BST1多株抗體之來源。藉由在含有10 μ g/ml四環素之LB瓊脂盤上塗佈多株混合物之樣品並篩選識別BST1之抗體，自此等多株混合物中選出單株抗體。

【0375】

表現及純化針對ADP-核糖基環化酶2之重組抗體

在設定為37°C，300 rpm之Innova 4330培養震盪器(New Brunswick Scientific, Edison, N.J.)中，自-70°C細胞庫隔夜產生搖瓶接種物。接種物用來接種含有成分確定的培養基[Pack等人 (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277]之20 L醱酵罐(Applikon, Foster City, Calif.)，該成分確定的培養基補充有3 g/L L-白胺酸、3 g/L L-異白胺酸、12 g/L酪蛋白消化物(Difco, Detroit, Mich.)、12.5 g/L甘油及10 µg/ml四環素。將醱酵罐中之溫度、pH及溶解氧分別控制在26°C、6.0-6.8及25%飽和度。藉由添加聚丙二醇(Dow, Midland, Mich.)來控制泡沫。以分批補料模式添加甘油至醱酵罐。藉由在晚對數生長期期間添加L(+)-阿拉伯糖(Sigma, St. Louis, Mo.)至2 g/L，誘導Fab表現。藉由在UV-1201分光光度計(Shimadzu, Columbia, Md.)中在600 nm處之光密度，量測細胞密度。在操作終止並調節pH至6.0後，使培養物以17,000 psi通過M-210B-EH微流化器(Microfluidics, Newton, Mass.) 2次。細胞之高壓均化釋放Fab至培養上清液中。

【0376】純化之第一步驟係膨脹床固定化金屬親和層析(EB-IMAC)。將0.1 M NiCl₂充入Streamline™螯合樹脂(Pharmacia, Piscataway, N.J.)且隨後使其在以上行方向流動之50 mM乙酸鹽、200 mM NaCl、10 mM咪唑、0.01% NaN₃，pH 6.0緩衝液中膨脹及平衡。儲備溶液用於使得培養物勻漿達至10 mM咪唑，此後，在平衡緩衝液中稀釋培養物勻漿兩倍或更多倍，以降低濕固體含量至按重量計小於5%。隨後將培養物勻漿裝載至以表觀速度300 cm/hr、上行方向流動的Streamline管

柱上。細胞碎片未受阻地通過，但藉助鎳與Fab重鏈上之六組胺酸標籤之間的高親和力相互作用捕捉Fab。在洗滌後，將膨脹床轉換成填充床且Fab用以下行方向流動的20 mM硼酸鹽、150 mM NaCl、200 mM咪唑、0.01% NaN₃，pH 8.0緩衝液溶離。

【0377】純化之第二步驟使用離子交換層析(IEC)。Q Sepharose FastFlow樹脂(Pharmacia, Piscataway, N.J.)在20 mM硼酸鹽、37.5 mM NaCl、0.01% NaN₃，pH 8.0中平衡。來自EB-IMAC步驟之Fab溶離彙集物在20 mM硼酸鹽、0.01% NaN₃，pH 8.0中稀釋4倍並裝載至IEC管柱上。在洗滌後，Fab用37.5-200 mM NaCl鹽梯度溶離。在彙集之前，使用Xcell II™ SDS-PAGE系統(Novex, San Diego, Calif.)評估溶離級分之純度。最後，將Fab彙集物濃縮及滲濾入20 mM硼酸鹽、150 mM NaCl、0.01% NaN₃，pH 8.0緩衝液中用於儲存。此在配備10,000 MWCO盒之Sartocon Slice™系統(Sartorius, Bohemia, N.Y.)中實現。最終純化產率典型地為50%。藉由在280 nm處之UV吸光度量測純化的Fab之濃度，假定吸光度1.6對應於1 mg/ml溶液。

【0378】

實例3：藉由流式細胞分析測定的單株抗體對BST1之特異性

藉由流式細胞術測試實例2中所選擇的針對BST1之抗體之特異性。為測試抗體與細胞表面BST1蛋白結合之能力，將抗體與表現BST1之細胞(分別來自人類肺腺癌及人類肺鱗狀癌之A549及H226)一起培育。將細胞在FACS緩衝液(DPBS，2% FBS)中洗滌，離心並再懸浮於100 µl稀釋的初級BST1抗體(亦稀釋於FACS緩衝液中)中。將抗體-A549複合物在冰上培育60分鐘且隨後如上文所述，用FACS緩衝液洗滌兩次。將細胞-抗體集

結粒再懸浮於100 μ l稀釋的二級抗體(亦稀釋於FACS緩衝液中)內並在冰上培育60分鐘。將集結粒如先前般洗滌並再懸浮於200 μ l FACS緩衝液中。將樣品裝載至BD FACScanto II流式細胞儀上，且使用BD FACSDiva軟體分析資料。

【0379】

結果

流式細胞分析之結果顯示，命名為BST1_A1、BST1_A2及BST_A3之4種單株抗體有效地與細胞表面人類BST1結合。圖3a顯示BST1_A1及BST1_A2兩者分別與A549及H226細胞上之BST1的結合特異性。圖3b顯示BST1_A3與A549及H226細胞上之BST1的結合特異性。結果顯示，彼等抗體針對A549及H226上BST1之強結合。

【0380】

實例4：針對BST1之單株抗體的結構表徵

使用標準PCR技術獲得編碼BST1_A2及BST1_A1單株抗體之重鏈及輕鏈可變區的cDNA序列，且使用標準DNA測序技術，對此等cDNA序列測序。

【0381】 可突變誘發抗體序列，以在一或多個殘基處回復突變成生殖系殘基。

【0382】 BST1_A2之重鏈可變區的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 6及2。

【0383】 BST1_A2之輕鏈可變區的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 8及4。

【0384】 BST_A2之重鏈的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO:

73及74。BST_A2之輕鏈的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 75及76。

【0385】 BST1_A2重鏈免疫球蛋白序列與已知鼠類生殖系免疫球蛋白重鏈序列之比較顯示，BST1_A2重鏈利用來自鼠類生殖系V_H 1-39之V_H區段。使用確定CDR區之Kabat系統進一步分析BST1_A2 V_H序列顯示，重鏈CDR1區、CDR2區及CDR3區分別闡明如SEQ ID NO: 10、12及14中所示。在圖1a及1b中顯示BST1_A2 CDR1及CDR2 V_H序列與生殖系V_H 1-39序列之比對。

【0386】 BST1_A2輕鏈免疫球蛋白序列與已知鼠類生殖系免疫球蛋白輕鏈序列之比較顯示，BST1_A2輕鏈利用來自鼠類生殖系V_K 4-55之V_K區段。使用確定CDR區之Kabat系統進一步分析BST1_A2 V_K序列顯示，輕鏈CDR1區、CDR2區及CDR3區分別闡明如SEQ ID NO: 16、18及20中所示。在圖2a、2b及2c中顯示BST1_A2 CDR1、CDR2及CDR3 V_K序列與生殖系V_K 4-55序列之比對。

【0387】 BST1_A1之重鏈可變區的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 5及1。

【0388】 BST1_A1之輕鏈可變區的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 7及3。

【0389】 BST1_A1重鏈免疫球蛋白序列與已知鼠類生殖系免疫球蛋白重鏈序列之比較顯示，BST1_A1重鏈利用來自鼠類生殖系V_H 1-80之V_H區段。使用確定CDR區之Kabat系統進一步分析BST1_A1 V_H序列顯示，重鏈CDR1區、CDR2區及CDR3區分別闡明如SEQ ID NO: 9、11及13中所示。在圖1a及1b中顯示BST1_A1 CDR1及CDR2 V_H序列與生殖系V_H 1-

80序列之比對。

【0390】 BST1_A1輕鏈免疫球蛋白序列與已知鼠類生殖系免疫球蛋白輕鏈序列之比較顯示，BST1_A1輕鏈利用來自鼠類生殖系V_K 4-74之V_K區段。使用確定CDR區之Kabat系統進一步分析BST1_A1 V_K序列顯示，輕鏈CDR1區、CDR2區及CDR3區分別闡明如SEQ ID NO: 15、17及19中所示。在圖2a、2b及2c中顯示BST1_A1 CDR1、CDR2及CDR3 V_K序列與生殖系V_K 4-74序列之比對。

【0391】 BST1_A3之重鏈可變區的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 54及52。

【0392】 BST1_A3之輕鏈可變區的核苷酸及胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 55及53。

【0393】 BST1_A3重鏈免疫球蛋白序列與已知鼠類生殖系免疫球蛋白重鏈序列之比較顯示，BST1_A3重鏈利用來自鼠類V_H生殖系69-1之V_H區段。使用確定CDR區之Kabat系統進一步分析BST1_A3 V_H序列顯示，重鏈CDR1區、CDR2區及CDR3區分別闡明如SEQ ID NO: 56、57及58中所示。在圖1a及1b中顯示BST1_A3 CDR1及CDR2 V_H序列與鼠類V_H生殖系69-1序列之比對。

【0394】 BST1_A3輕鏈免疫球蛋白序列與已知鼠類生殖系免疫球蛋白輕鏈序列之比較顯示，BST1_A3輕鏈利用來自鼠類V_K生殖系44-1之V_K區段。使用確定CDR區之Kabat系統進一步分析BST1_A3 V_K序列顯示，輕鏈CDR1區、CDR2區及CDR3區分別闡明如SEQ ID NO: 59、60及61中所示。在圖2a、2b及2c中顯示BST1_A3 CDR1、CDR2及CDR3 V_K序列與鼠類V_K生殖系44-1序列之比對。

【0395】

實例5：BST1_A1及BST1_A2在A549及H226細胞中之內化及MabZAP

使用MabZap分析法研究H226及A549對BST1_A1及BST1_A2之內化。MabZAP分析法顯示，抗BST1單株抗體經由結合與毒素皂草素共軛之抗人類IgG二級抗體而內化。(Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100)。首先，BST1 Fab與細胞之表面結合。隨後，MabZAP抗體與初級抗體結合。隨後，MabZAP複合物由細胞內化。皂草素進入細胞，導致蛋白質合成抑制及最終細胞死亡。

【0396】 如下實施MabZAP分析法。將各細胞以 5×10^3 個細胞/孔之密度接種。將抗BST1單株抗體或同型對照人類IgG連續稀釋，隨後添加至細胞並在25°C培育15分鐘。隨後添加MabZAP且在37°C培育72小時。藉由CellTiter-Glo[®]發光細胞生存力分析(Luminescent Cell Viability Assay)套組(Promega, G7571)偵測盤中之細胞生存力，且使用Promega Glomax讀取並分析盤。細胞死亡與抗BST1單株抗體之濃度成正比。圖4a及4b顯示，與抗人類IgG同型對照抗體相比，抗BST1單株抗體BST1_A1及BST1_A2有效地由H226及A549細胞內化。

【0397】

實例6：BST1 A2之人類化

為設計BST1_A2 V_H及V_L之人類化序列，使用三維模型鑑別對於CDR結構之形成重要的構架胺基酸。亦自GenBank資料庫中選擇與BST1_A2具有高度同源性之人類V_H及V_L序列。將CDR序列連同鑑別之構架胺基酸殘基一起自BST1_A2移植至人類構架序列(圖5-7)。

【0398】

實例7：抗BST1 mAbs介導之抗體依賴性細胞的細胞毒性

首先，將25 μ l親本及非岩藻糖化之抗BST1抗體(BST1_A2及BST1_A2_NF)以10 nm/L至0.1 nm/L之濃度添加至v底96孔盤的含有50 μ l表現BST1之A549及U937細胞的單獨孔。隨後添加25 μ l效應細胞至該等孔以產生10:1及25:1之最終效應子:靶(E:T)比率。隨後以1000 rpm將盤溫和地離心2分鐘，此後將其在37°C，5% CO₂培育箱中培育4小時。在培育後3小時，將10 μ l溶解溶液添加至僅含有表現BST1之細胞的各孔，以量測最大LDH釋放，及添加至僅含有培養基之一組孔用於體積校正對照。

【0399】 在培育後，以1000 rpm將細胞溫和地離心2分鐘，此後將50 μ l上清液轉移至平底96孔盤。使用自Promega可獲得的CytoTox96®非放射性細胞毒性分析法(目錄號：G1780)，根據製備商說明書使套組組分重構並隨後將50 μ l受質混合物添加至各孔。隨後覆蓋盤且在25°C避光靜置培育30分鐘。此後，向各孔添加50 μ l終止溶液且使用varioskan盤讀數儀記錄在490 nm處之吸光度。

【0400】 使用已知經由ADCC激發細胞殺傷之抗體作為陽性對照並使用人類IgG1同型對照作為陰性對照，結果顯示，BST1_A2及BST1_A2_NF能夠在表現BST1之A549及U937細胞上激發ADCC。已顯示，在表現BST1之A549細胞上，BST1_A2_NF在10 nmol/L下具有大約45%之殺傷(圖8a)。已顯示，在表現BST1之U937細胞上，BST1_A2在1 nmol/L下具有大約20%之殺傷，且已顯示，BST1_A2_NF在1 nmol/L下具有大約45%之殺傷(圖8b)。

【0401】

實例8：在AML患者中藉由流式細胞分析測定的單株抗體對BST1之特異

性

藉由流式細胞分析，測試BST_A2與來自AML患者的淋巴母細胞結合之能力。自20位AML患者獲取血液。使用如實例3中所述之工序，已顯示，BST_A2與大約80%的AML患者之AML母細胞結合。

【0402】

實例9：由BST1_A2抗體與5-氮雜胞苷(AZA)誘導之ADCC

將K052細胞(AML細胞株Fab M2)及PBMC分別用0.5或0.1 μM 5-氮雜胞苷(AZA)預處理48小時及24小時，且隨後與十倍稀釋之BST1_A2抗體(10至0.01 μg/ml)一起培育4小時。量測LDH釋放以偵測細胞溶解(Promega套組)。結果顯示於圖9中。該圖代表在單獨的或與AZA組合的BST1_A2抗體存在下之ADCC百分比。

【0403】 將SKNO1細胞(AML細胞株Fab M2)及PBMC分別用2或0.5 μM 5-氮雜胞苷(AZA)預處理48小時及24小時，且隨後與十倍稀釋之BST1_A2抗體(10至0.01 μg/ml)一起培育4小時。量測LDH釋放以偵測細胞溶解(Promega套組)。結果顯示於圖10中。該圖代表在單獨的或與AZA組合的BST1_A2抗體存在下之ADCC百分比。

【0404】 下表顯示BST1_A2抗體與5-氮雜胞苷之間呈不同組合比率時用Chou及Talalay方法(Calculusyn軟體)計算的組合指數。

【0405】 (CI<1：協同作用；CI = 1：累加效應；CI>1：拮抗作用)。顯示高水準協同。

藥物	組合指數(CI)			
	SKNO-1細胞		K052細胞	
BST1_A2 (μg/ml)	BST1_A2 +2 μM AZA	BST1_A2 + 0.5 μM AZA	BST1_A2 + 0.5 μM AZA	BST1_A2 + 0.1 μM AZA
10	0.975	0.062	0.197	0.130

1	0.334	0.035	0.003	0.036
0.1	0.196	0.080	0.064	0.036
0.01	0.182	0.438	0.740	0.643

【0406】

實例10：由BST1_A2抗體與地西他濱(DEC)誘導之ADCC

將SKNO1細胞(AML細胞株Fab M2)及PBMC分別用2或0.5 μM地西他濱(DEC)預處理48小時及24小時，且隨後與十倍稀釋之BST1_A2抗體(10至0.01 μg/ml)一起培育4小時。量測LDH釋放以偵測細胞溶解(Promega套組)。結果顯示於圖11中。該圖代表在單獨的或與DEC組合的BST1_A2存在下之ADCC百分比。

【0407】 將HL-60細胞(AML細胞株Fab M2/M3)及PBMC分別用0.5或2 μM地西他濱(DEC)預處理48小時及24小時，且隨後與十倍稀釋之BST1_A2抗體(10至0.01 μg/ml)一起培育4小時。量測LDH釋放以偵測細胞溶解(Promega套組)。結果顯示於圖12中。該圖代表在單獨的或與DEC組合的BST1_A2抗體存在下之ADCC百分比。

【0408】 下表顯示BST1_A2抗體與地西他濱之間呈不同組合比率時用Chou及Talalay方法(Calculusyn軟體)計算的組合指數。

【0409】 (CI<1：協同作用；CI = 1：累加效應；CI>1：拮抗作用)。顯示高水準協同。

藥物	組合指數(CI)			
	SKNO-1細胞		HL60細胞	
BST1_A2 (μg/ml)	BST1_A2 +2 μM DEC	BST1_A2 + 0.5 μM DEC	BST1_A2 + 0.5 μM DEC	BST1_A2 + 0.1 μM DEC
10	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
1	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
0.1	na	na	<0.001	<0.001
0.01	<0.001	na	na	0.1

【0410】

序列

SEQ ID NO	描述	序列
1	aa VH_A1	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVKLQQSGAELVRPGSS VKISCKASGYAFSNSWINWVKQRPGQGLEWIGQIYPGD YDTNYNGKFKGKATLTADYSSSTAYMQLNSLTSEDSAV YFCARGGSIYYGNLGFFDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCHHHHHHH
2	aa VH_A2	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQAYLQQSGPELVKAGAS VKMSCKASGYSFIEYTINWVKQSHGKSLEWIGNIDPYY GTTYYNQMFTGKATLTVQSSNTAYMQLKSLTSEDSAV YFCARGSAWFPYWGQGLVTVSAAKTPPSVYPLAPG SAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCHHHHHHH
3	aa VK_A1	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEMVLTQSPAIMSTSLG ERVMTCTASSRVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSN LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCHQY HRSPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTCLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNES
4	aa VK_A2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMSASPG EKVTMTCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNL ASGVPPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADATYYCQQWS NYPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTCLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVK SFNRNES
5	nt VH_A1	acgctttgtacatggagaaaataaagtgaacaaagcactattgcactggcactctacc gctcttatttaccctgtggcaaaagcccaggtgaagcttcagcagtcgggggctgagc

		<p>tggtgaggcctgggtcctcagtgaaagtctcctgcaaggcttctggctacgcattcagta actcctggataaactgggtgaagcagaggcctggacagggctttagtgattggaca gattatcctggagattatgatactaactacaatggaaaattcaagggtaaagccacact gactgcagactactcctccagcacagcctacatgcagctcaacagcctaacatctgag gactctgcggctctatttctgtgcaagggggggatcgatctactatggtaacctcgggttct tcgatgtctggggcgcagggaccacggtcaccgtctcctcagccaaaacgacacccc catctgtctatccactggcccctggatctgctgccccaaactaactccatggtgacctgg gatgcctgggtcaagggctatttccctgagccagtgcagtgacctggaactctggatcc ctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagcttgacctctacactctgagc agctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacgttg cccaccggccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtgcccagggattgtcatc atcacatcacatcaactaattgacagcttatcatcgatangct</p>
6	nt VH_A2	<p>aaaacctggcggttaccacgcttgtacatggagaaaataaagtgaacaaagcacta ttgactggcactcttaccgctcttatttaccctgtggcaaaagcccaggttatctaca gcagctctggacctgagctgggtgaaggctggcgcttcagtgaagatgtctgcaaggctt ctggttactcattcattgagtacaccataaactgggtgaaacagagccatggaaagagc cttgagtggattggaaatattgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgttcacg ggcaaggccacattgactgtagaccaatctccaacactgcctacatgcagctcaagag cctgacatctgaggactctgcagctctatttctgtgcaagaggctccgcctggttccttact ggggccaggggactctagtcactgtctctgcagccaaaacgacacccccatctgtctat ccactggcccctggatctgctgccccaaactaactccatggtgacctgggatgcctggt caagggctatttccctgagccagtgcagtgacctggaactctggatccctgtccagcg gtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctgacctctacactctgagcagctcagtga ctgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacctgcaacgttgcccaccggg ccagcagcaccaaggtggacaagaaaattgtgcccagggattgtcatcatcacatca ccatcaactaattgacagcttatcatcgat</p>
7	nt VK_A1	<p>gttttttggatggagtgaacgatgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgtt attactcgtgcccacccagccatggccgaaatggttctcaccagctcaccgcaatcat gtctacatctctaggggaacgggtcaccatgacctgcactgccagctcacgtgtaagt ccagttacttgactggtaccagcagaagccaggatcctccccaaactctggattata gtacatccaacctggcttctggagtcccagctcgttcagtggcagtggtctgggacc tcttactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccacc agtatcatcgttccccgtacacgttcggagggggggaccaagctggaaataaaacggg ctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggag gtgcctcagtcgtgtcttctgaacaactctaccccaaagacatcaatgtcaagtga</p>

		agattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgctcctgaacagttggactgatcaggacag caaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacgttgaccaaggacgagtatga acgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccattgtca agagcttcaacaggaatgagtccttaagtgattagctaattctagaacg
8	nt VK_A2	actcttactgtttctccatacccggttttttgatggagtgaacgatgaaatacctattgc ctacggcagccgctggattgttattactcgctgcccaccagccatggccgacatcgtt atgtctcagtcctcagcaatcatgtctgcctcaggggagaaggtcacatgacctg cagtgccagctcaagtgttaacttacatgtactggaccagcagaagccaggatcctccc ccagactcctgatttatgacacatccaacctggcttctggagtcctgttcgcttcagtgg cagtgggtctgggacctcttactcttcacaatcagccgaatggaggctgaagatactg ccacttattactgccagcagtgaggtaattaccactcacgttcggtgctgggaccaag ctggagctgaaacgggctgatgtgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtga gcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttctgaacaacttctacccaaaga catcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgctcctgaacagtt ggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacgttga ccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatc aacttcaccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtccttaagtgattagctaattctag aacgcgtcacttggcactggccgctcgttta
9	aa VH_CDR1_A1	GYAFSNSWINW
10	aa VH_CDR1_A2	GYSFIEYTINW
11	aa VH_CDR2_A1	GQIYPGDYDTNYNGKFK
12	aa VH_CDR2_A2	GNIDPYYGTTYYNQMFT
13	aa VH_CDR3_A1	ARGGSIYYGNLGFDDV
14	aa VH_CDR3_A2	ARGSAWFPY
15	aa VK_CDR1_A1	TASSRVSSSYLH
16	aa VK_CDR1_A2	SASSSVTYMY
17	aa VK_CDR2_A1	STSNLAS
18	aa VK_CDR2_A2	DTSNLAS
19	aa VK_CDR3_A1	HQYHRSPYT
20	aa VK_CDR3_A2	QQWSNYPLT
21	nt VH_CDR1_A1	ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
22	nt VH_CDR1_A2	ggttactcattcattgagtacaccataaactgg
23	nt VH_CDR2_A1	ggacagatttactcctggagattatgatactaactacaatggaaaattcaag
24	nt VH_CDR2_A2	ggaaatattgatccttattatggaaccattattacaatcagatgttcacg
25	nt VH_CDR3_A1	gcaaggggggggatcgtactatggtaacctcgggttcttcgatgtc

26	nt VH_CDR3_A2	gcaagaggctccgcctggttccttac
27	nt VK_CDR1_A1	actgccagctcacgtgtaagttccagttactgcac
28	nt VK_CDR1_A2	agtgccagctcaagtgtaacttacatgtac
29	nt VK_CDR2_A1	agtacatccaacctggcttct
30	nt VK_CDR2_A2	gacacatccaacctggcttct
31	nt VK_CDR3_A1	caccagtatcatcggtccccgtacacg
32	nt VK_CDR3_A2	cagcagtggagtaattaccactcacg
33	IGHV1-80*01 (Genebank : AC160990 鼠) nt 138392-138424	ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg
34	IGHV1-80*01 (Genebank : AC160990 鼠) nt 138461-138511	ggacagatttatcctggagatggtgatactaactacaacggaaagtcaag
35	IGHV1-39*01 (Genebank : AC079181 鼠) nt 153362-153394	ggttactcattcactgactacaacatgaactgg
36	IGHV1-39*01 (Genebank : AC079181 鼠) nt 153431-153481	ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagtcaag
37	IGKV4-74*01 (Genebank : AJ231217 鼠) nt 496-531	actgccagctcaagtgtaagttccagttactgcac
38	IGKV4-74*01 (Genebank : AJ231217 鼠) nt 577-597	agcacatccaacctggcttct
39	IGKV4-74*01 (Genebank : AJ231217 鼠) nt 691-718	caccagtatcatcggtccccacca

40	IGKV4-55*01 (Genebank : AJ231225鼠) nt 523-552	agtgccagctcaagtgttaagttacatgtac
41	IGKV4-55*01 (Genebank : AJ231225鼠) nt 598-618	gacacatccaacctggcttct
42	IGKV4-55*01 (Genebank : AJ231225鼠) nt 715-739	cagcagtggagtagttaccaccca
43	ADP-核糖基環化酶 2 (CD157 ; BST1)	MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLLLLAAGGARARWRGE G TSAHLRDIFLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFK VALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHL LVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGL DYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIYQSKDSSGVIHVM LNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIWVMHEI GGPNVESC GEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVK LLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQRAGLI IPLFLVLASRTQL
44	ADP-核糖基環化酶 2 (CD157 ; BST1) 之aa 29-292	GARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSPEQRNK NCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRD KSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLS WCRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIYQ SKDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEK ITRIEIWVMHEIGGPNVESC GEGSMKVLEKRLKDMGFQ YSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRK
45	A2VH (SEQ ID No:2之胺基酸21- 137)	QAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTINWV KQSHGKSLEWIGNIDPYYGTTYYNQMFTGKATLTVDQ SSNTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARGSAWFPYWGQGTL VTVSA
46	VH1-人類化VH_A2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFIEYTINWVR QAPGQGLEWIGNIDPYYGTTYYNQMFTGRATLTVDTSI STAYMELSRLRSDDTAVYYCARGSAWFPYWGQGTLVT

		VSS
47	BF238102 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTXXXXXW VRQAPGQGLEWMGXXXXXXXXXXXXXXXXXXRVTLT RDTISITAYMELSRLRSDDTAVYYCARXXXXXXXXXWG QGTLVPVSS
48	A2VL (SEQ ID No:4 之胺基酸22-128)	DIVMSQSPAISASPGEKVTMTCSAS- SSVTYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVVPRFSGS GSGTSYSLTISRMEAEDTATYYCQQWSNYPLTFGAGTK LELK
49	VL1-人類化VK_A2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS- SSVTYMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLASGVPSRFSGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSNYPLTFGQGDK VEIK
50	X72441 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCXXXXXXXXXXXXWYQ QKPGKAPKLLIYXXXXXXXXXGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCXXXXXXXXXXFGQGDKVEIK
51	VH1_CDR2	NIDPYYGTTYNQMFQ
52	aa VH_A3	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQSRAELVMPGAS VKMSCKTSGYTFSDYWVHWVRQRPQGLEWIGRIDG SDTFNDYSQKFKGRATLTVDSSSTVYMQLSLTSSEDA VYYCARGGLLQYWGGQTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPG SAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVH TFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVHPASST KVDKKIVPRDCHHHHHH
53	aa VK_A3	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIQLTQSPASLSASVG ETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKGKSPQLLVYNTKTL GEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHY GTPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASV VCFLNNFYPKDINKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNES
54	nt VH_A3	gtgaaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggcaaaag cccaggtccagctgcagcagctctagggtgaactgtgatgcctggggcttcagtga gatgtcctgcaagacttctggctacacattctctgactactgggtacactgggtgaggca gaggcctggacaaggccttgagtggatcggagcgattgatggtctgatacttttaatga

		ctacagtcagaagttaagggcagggccacattgactgtagacgaatcctccagcaca gtctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaagg ggggggccttcttcagtactggggccaaggcaccactctcacagtcctcagccaaaa cgacacccccatctgtctatccactggccccctggatctgctgccc aaactaactccatgg tgacctgggatgcctggtaagggctatttcctgagccagtgcagtgacctggaac tctggatccctgtccagcgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagtcctgaccttac actctgagcagctcagtgactgtccctccagcacctggcccagcgagaccgtcacct gcaacgttgcccaccggccagcagcaccaagggtggacaagaaaattgtgccagg gattgtcatcatcaccatcaccatcaactaa
55	nt VK_A3	atgaaatacctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgtgccc aaccagcc atggccgacattcagctgaccagctctccagcctccctatctgcactctgtgggagaaact gtcaccatcacatgtcgagcaagtga aaacatttacagttatttagcatggtatcagcag aaacagggaaaaatctcctcagctcctggctataatacaaaaaccttaggagaaggtgt gccatcaagggttcagtggcagtggtatgggcacacaattttctctgaagatcaacagcc tgcagcctgaagattttgggagttattactgtcaacatcattatggtactccattcacgttcg gctcggggacaaaagttggaaataaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatctc ccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttctgaacaac ttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatgg cgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcag cacctcacgttgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgagggcc actcacaagacatcaacttcccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtcttaa
56	aa VH_CDR1_A3	GYTFSDYWVHW
57	aa VH_CDR2_A3	GAIDGSDTFNDYSQKFK
58	aa VH_CDR3_A3	ARGGLLQY
59	aa VK_CDR1_A3	RASENIYSYLA
60	aa VK_CDR2_A3	NTKTLGE
61	aa VK_CDR3_A3	QHHYGTPT
62	nt VH_CDR1_A3	ggctacacattctctgactactgggtacactgg
63	nt VH_CDR2_A3	ggagcgattgatggttctgatacttttaatgactacagtcagaagtttaag
64	nt VH_CDR3_A3	gcaagggggggccttcttcagtac
65	nt VK_CDR1_A3	cgagcaagtga aaacatttacagttatttagca
66	nt VK_CDR2_A3	aatacaaaaaccttaggagaa
67	nt VK_CDR3_A3	caacatcattatggtactccattcacg
68	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggctacaccttaccagctactggatgcactgg

69	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggagagattgatccttctgatagttatactaactacaatcaaaagttcaag
70	IGKV12-44*01 (AJ235955)	cgagcaagtgagaatatattacagttatttagca
71	IGKV12-44*01 (AJ235955)	aatgcaaaaaccttagcagaa
72	IGKV12-44*01 (AJ235955)	caacatcattatggtactcctcc
73	nt H_A2	CAAGTCCAACCTGGTTCAATCTGGTGCTGAGGTTAAGA AGCCTGGTGCCTCTGTGAAGGTGTCATGTAAAGCATC TGGGTACAGCTTCATCGAGTACACCATTAATTGGGTC CGCCAAGCTCCTGGCCAGGGACTGGAGTGGATCGGC AATATCGATCCCTACTACGGGACCACATACTACAATCA AATGTTCACTGGCAGAGCCACCCTGACCGTCGACAC AAGCATATCTACAGCCTATATGGAGCTCAGCCGCCTG CGGTCTGACGACACCGCTGTGTATTACTGCGCTCGGG GAAGTGCTTGGTTCCCATATTGGGGTTCAGGGAACCCT CGTTACAGTCTCCTCAGCTTCAACCAAAGGCCCCAGT GTCTTCCCTCTGGCCCCTTCCAGTAAGTCTACCAGCG GCGGCACTGCCGCCCTGGGCTGTCTCGTCAAAGACT ACTTCCCTGAACCCGTGACAGTGTCTTGGAACAGCG GCGCACTGACAAGCGGGGTGCACACATTTCCCGCCG TCCTGCAATCCTCCGGACTGTACAGCCTCTCAAGTGT GGTGACTGTCCCATCCTCCTCCCTCGGGACCCAGACA TATATATGCAATGTGAACCATAAGCCCAGCAACACCA AGGTCGATAAGAAGGTGGAACCTAAAAGTTGCGATA AGACTCATACATGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAACT GCTGGGAGGACCTTCTGTCTTCCTGTTCCCTCCCAAG CCCAAAGATACCCTGATGATATCCCGCACACCAGAAG TGACATGTGTTGTTGTCGATGTCTCTCACGAGGACCC TGAAGTGAAGTTTAATTGGTATGTGGACGGGGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAACCTCGCGAAGAGCA GTACAACCTCCACATACCGCGTGGTGAGTGTGCTCACC GTTCTCCATCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTATA AGTGTAAGGTGAGCAACAAAGCTCTGCCAGCACCCA

		<p>TAGAGAAAAC TATTAGCAAAGCTAAGGGCCAGCCTC GCGAGCCACAGGTGTATACCCTCCCTCCTAGTCGCGA GGAAATGACTAAGAACCAGGTTTCCCTGACATGCCTC GTCAAGGGATTCTATCCTAGCGATATTGCCGTCGAATG GGAGTCCAATGGCCAGCCCGAGAACA ACTACAAGAC CACACCTCCTGTCCTCGACTCTGACGGATCCTTCTTT CTCTATAGCAAGCTGACCGTTGACAAAAGCAGGTGG CAACAGGGTAACGTGTTTTTCATGCTCTGTGATGCACG AAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGA GCCTGTCCCCTGGCAA</p>
74	aa H_A2	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFIEYTINWVR QAPGQGLEWIGNIDPYYGTTYYNQMFTGRATLTVDTSI STAYMELSR LRSDDTAVYYCARGSAWFPYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
75	nt L_A2	<p>GACATTCAGATGACCCAATCACCAAGCAGTCTGTCAG CCAGTGTTGGGGATCGCGTGACCATAACATGCTCTGC ATCCTCTAGTGTGACTTACATGTACTGGTACCAACAG AAGCCCGGGAAAGCCCCAAAGCTCCTGATCTATGAC ACTAGCAACCTGGCTAGTGGAGTCCCCAGCCGGTTTT CCGGTTCAGGCTCAGGGACTGACTATACTCTCACTAT TTCATCTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACTTATTATT GTCAGCAATGGAGCAATTACCCACTGACCTTTGGGCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGAGAACTGTTGCTGC TCCCTCCGTGTT CATCTTCCCACCAAGCGATGAGCAG CTGAAATCCGGGACAGCCTCTGTGGTGTGTCTCCTGA ACAACTTCTATCCTCGGGAGGCAAAGGTCCAGTGGA AAGTCGATAATGCCCTCCAGAGTGGCAACTCACAAG</p>

		AAAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAAGATAGTACAT ATAGCCTCAGCAGTACACTGACCCTGAGCAAAGCCG ATTATGAGAAACATAAGGTGTACGCTTGCGAGGTCAC CCACCAGGGCCTGTCCAGTCCAGTGACTAAGAGCTTT AATAGAGGTGAGTGT
76	aa L_A2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQK PGKAPKLLIYDTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ PEDFATYYCQQWSNYPLTFGQGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【序列表】

<110> 德商柏林化學股份公司
<120> 醫藥組合
<130> 489.412.133779/05
<160> 76
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 253
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 1
Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15
Pro Val Ala Lys Ala Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu
20 25 30
Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45
Ala Phe Ser Asn Ser Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Tyr Asp Thr Asn
65 70 75 80
Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Tyr Ser
85 90 95
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110
Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Gly Asn Leu
115 120 125
Gly Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135 140
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala
145 150 155 160
Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
165 170 175
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
180 185 190

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

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val
210 215 220

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

Ile Val Pro Arg Asp Cys His His His His His His His
245 250

<210> 2
<211> 246
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 2

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15

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

Val Lys Ala Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

Ser Phe Ile Glu Tyr Thr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys
50 55 60

Ser Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Asn Gln Met Phe Thr Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser
85 90 95

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

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

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

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
145 150 155 160

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

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

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
195 200 205

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
210 215 220

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys His
225 230 235 240

His His His His His His
245

<210> 3
<211> 237
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

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

Met Ser Thr Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
35 40 45

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

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

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
100 105 110

Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

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

Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser
165 170 175

Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys
180 185 190

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

Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
210 215 220

Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
225 230 235

<210> 4
<211> 235
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

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

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

Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
115 120 125

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

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
165 170 175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

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

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
210 215 220

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
225 230 235

<210> 5
<211> 811
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (808)..(808)
<223> n條a、c、g或t

<400> 5
acgctttgta catggagaaa ataaagtga acaaagcact attgcactgg cactcttacc 60
gctcttattt acccctgtgg caaaagccca ggigaagctt cagcagtcgg gggtgagct 120
ggtgaggcct ggggtccctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctacg cattcagtaa 180
ctcctggata aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat 240
ttatcctgga gattatgata ctaactacaa tggaaaattc aagggtazag ccacactgac 300
tgcagactac tctccagca cagcctacat gcagctcaac agcctaacat ctgaggactc 360
tgcgggtctat ttctgtgcaa gggggggatc gatctactat ggtaacctcg gggtcttoga 420
tgtctggggc gcagggacca cggtcaccgt ctcttcagcc aaaacgacac ccccatctgt 480
ctateccatg gcccttgat ctgctgccc aactaacctc atggtgacct tgggatgcct 540
ggtaaggggc tatttccctg agccagtga agtgacctgg aactctggat cctgtccag 600
cgggtgtcac accttcccag ctgtcctgca gtctgacctc tacactctga gcagctcagt 660
gactgtcccc tccagcact ggcccagcga gaccgtcacc tgcaacgttg cccacccggc 720
cagcagcacc aaggtggaca agaaaattgt gcccagggat tgtcatcatc accatcacca 780
tcactaattg acagcttatc atcgatangc t 811

<210> 6
<211> 803
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 6

aaaacccctgg cgttacccac gctttgtaca tggagaaaat aaagtgaac aaagcactat	60
tgcactggca ctcttaccgc tcttatttac ccctgtggca aaagcccagg cttatctaca	120
gcagtcctgga cctgagctgg tgaaggctgg cgcttcagtg aagatgtcct gcaaggcttc	180
tggttactca ttcattgagt acaccataaa ctgggtgaaa cagagccatg gaaagagcct	240
tgagtggatt ggaaatatig atccttatta tggaaacct tattacaatc agatgttcac	300
gggcaaggcc acattgactg tagaccaatc ttccaacact gcctacatgc agctcaagag	360
cctgacatct gaggactctg cagtctatct ctgtgcaaga ggctccgcct ggtttcctta	420
ctggggccag gggactctag tcactgtctc tgcagccaaa acgacacccc catctgtcta	480
tccactggcc cctggatctg ctgcccnaac taactccatg gtgacctgg galgcctggt	540
caagggtat ttccctgagc cagtgcagtg gacctggaac tctggatccc tgtccagcgg	600
tgtgcacacc ttcccagctg tcttcgagtc tgacctctac actctgagca gctcagtgac	660
tgtccctcc agcacctggc ccagcgagac cgtcacctgc aacgttgccc acccggccag	720
cagcaccaag gtggacaaga aaattgtgcc cagggtattgt catcatcacc atcaccatca	780
ctaattgaca gcttatcatc gat	803

<210> 7
<211> 759
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 7	
gtttttttgg atggagtga aacgatgaaat acctattgcc tacggcagcc gctggattgt	60
tattactcgc tgcaccaacca gccatggccg aaatggttct caccagctct ccagcaatca	120
tgtctacatc tctaggggaa cgggtcacca tgacctgcac tgccagctca cgtgtaagtt	180
ccagttactt gcactggtag cagcagaagc caggatcctc ccccaaacctc tggatttata	240
gtacatccaa cctggcttct ggagtcccag ctgccttcag tggcagtggt tctgggacct	300
cttactctct cacaatcagc agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgccacc	360
agtatcatcg ttccccgtac acgttcggag gggggaccac gctggaataa aaacgggctg	420
atgtgcacc aactgtatcc atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggagggtg	480
cctcagtcgt gtgtctcttg aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtgggaaga	540
ttgatggcag tgaacgacaa aatggcgctc tgaacagttg gactgatcag gacagcaag	600
acagcaccta cagcatgagc agcacctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata	660
acagctatac ctgtgaggcc actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca	720
acaggaatga gtcttaagtg attagctaatt tctagaacg	759

<210> 8
<211> 804
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 8
actctctact gtttctccat acccgttttt ttggatggag tgaacgaig aaatacctat 60
tgcctacggc agccgctgga ttgttattac tcgctgccca accagccaig gccgacatcg 120
ttatgtctca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggic accaigacct 180
gcagtgccag ctcaagtgtg acttacatgt actggtacca gcagaagcca ggatcctccc 240
ccagactcct gatttatgac acatccaacc tggcttctgg agtccctggt cgcctcagtg 300
gcagtgggtc tgggacctct tactctctca caatcagccg aatggaggct gaagatactg 360
ccacttatta ctgccagcag tggagtaatt acccactcac gttcggtgct gggaccaagc 420
tggagctgaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat ctccaccaca tccagtgagc 480
agttaacatc tggaggtgcc tcagtctgtg gcttcttgaa caacttctac cccaaagaca 540
tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg aacagttaga 600
ctgatcagga cagcaaagac agcaactaca gcatgagcag caccctcagc ttgaccaagg 660
acgaglatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca tcaacttcac 720
ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt cttaagtgat tagctaatc tagaacgcgt 780
cacttggcac tggccgtcgt tttta 804

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 9
Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Ser Trp Ile Asn Trp
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 10
Gly Tyr Ser Phe Ile Glu Tyr Thr Ile Asn Trp
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 11
Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Tyr Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
1 5 10 15

Lys

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 12

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Gln Met Phe
1 5 10 15

Thr

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 13

Ala Arg Gly Gly Ser Ile Tyr Tyr Gly Asn Leu Gly Phe Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 14

Ala Arg Gly Ser Ala Trp Phe Pro Tyr
1 5

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 15

Thr Ala Ser Ser Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 16

Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 17

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 18

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 19

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 20

Gln Gln Trp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 21
ggctacgcat tcagtaactc ctggataaac tgg 33

<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 22
ggttactcat tcattgagta caccataaac tgg 33

<210> 23
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 23
ggacagattt atcctggaga ttatgatact aactacaatg gaaaattcaa g 51

<210> 24
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 24	
ggaataatg atccttatta tggaaccact tattacaac agatgttcac g	51
<210> 25	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 25	
gcaagggggg gatcgatcta ctatggtaac ctgggttct tcgatgc	48
<210> 26	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 26	
gcaagaggct ccgcctgggtt tccttac	27
<210> 27	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 27	
actgccagct cacgtgtaag ttccagttac ttgcac	36
<210> 28	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 28	
agtgccagct caagtgtaac ttacatgtac	30
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 29	
agtacatcca acctggttc t	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 30	
gacacatcca acctggttc t	21
<210> 31	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 31	
caccagtac atcggtcccc gtacacg	27

<210>	32	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	32	
	cagcagtgga gtaattaccc actcacg	27
<210>	33	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	33	
	ggctacgcat tcagtagcta ctggatgaac tgg	33
<210>	34	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	34	
	ggacagattt atcctggaga tggtagatact aactacaacg gaaagttcaa g	51
<210>	35	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	35	
	ggttactcat tcaactgacta caacatgaac tgg	33
<210>	36	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	36	
	ggagtaaita atcctaacta tggtagatact agctacaatc agaagttcaa g	51
<210>	37	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	37	
	actgccagct caagtgtgag ttccagttac ttgcac	36
<210>	38	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	38	
	agcacatcca acctggcttc t	21
<210>	39	
<211>	25	
<212>	DNA	

<213>	小家鼠														
<400>	39														
	caccagtatc atcgttcccc accca	25													
<210>	40														
<211>	30														
<212>	DNA														
<213>	小家鼠														
<400>	40														
	agtgccagct caagtgttaag ttacatgtac	30													
<210>	41														
<211>	21														
<212>	DNA														
<213>	小家鼠														
<400>	41														
	gacacatcca acctggttc t	21													
<210>	42														
<211>	25														
<212>	DNA														
<213>	小家鼠														
<400>	42														
	cagcagtggg gtagttaccc accca	25													
<210>	43														
<211>	318														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	43														
Met	Ala	Ala	Gln	Gly	Cys	Ala	Ala	Ser	Arg	Leu	Leu	Gln	Leu	Leu	Leu
1			5					10					15		
Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala	Arg	Ala	
		20					25					30			
Arg	Trp	Arg	Gly	Glu	Gly	Thr	Ser	Ala	His	Leu	Arg	Asp	Ile	Phe	Leu
		35					40					45			
Gly	Arg	Cys	Ala	Glu	Tyr	Arg	Ala	Leu	Leu	Ser	Pro	Glu	Gln	Arg	Asn
		50				55					60				
Lys	Asn	Cys	Thr	Ala	Ile	Trp	Glu	Ala	Phe	Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Lys
65					70					75				80	
Asp	Pro	Cys	Ser	Val	Leu	Pro	Ser	Asp	Tyr	Asp	Leu	Phe	Ile	Asn	Leu
				85					90					95	
Ser	Arg	His	Ser	Ile	Pro	Arg	Asp	Lys	Ser	Leu	Phe	Trp	Glu	Asn	Ser
			100					105						110	

His Leu Leu Val Asn Ser Phe Ala Asp Asn Thr Arg Arg Phe Met Pro
115 120 125

Leu Ser Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ala Asp Phe Leu Ser Trp Cys
130 135 140

Arg Gln Lys Asn Asp Ser Gly Leu Asp Tyr Gln Ser Cys Pro Thr Ser
145 150 155 160

Glu Asp Cys Glu Asn Asn Pro Val Asp Ser Phe Trp Lys Arg Ala Ser
165 170 175

Ile Gln Tyr Ser Lys Asp Ser Ser Gly Val Ile His Val Met Leu Asn
180 185 190

Gly Ser Glu Pro Thr Gly Ala Tyr Pro Ile Lys Gly Phe Phe Ala Asp
195 200 205

Tyr Glu Ile Pro Asn Leu Gln Lys Glu Lys Ile Thr Arg Ile Glu Ile
210 215 220

Trp Val Met His Glu Ile Gly Gly Pro Asn Val Glu Ser Cys Gly Glu
225 230 235 240

Gly Ser Met Lys Val Leu Glu Lys Arg Leu Lys Asp Met Gly Phe Gln
245 250 255

Tyr Ser Cys Ile Asn Asp Tyr Arg Pro Val Lys Leu Leu Gln Cys Val
260 265 270

Asp His Ser Thr His Pro Asp Cys Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ala
275 280 285

Thr Gln Arg Lys Ala Pro Ser Leu Tyr Thr Glu Gln Arg Ala Gly Leu
290 295 300

Ile Ile Pro Leu Phe Leu Val Leu Ala Ser Arg Thr Gln Leu
305 310 315

<210> 44
<211> 264
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Gly Ala Arg Ala Arg Trp Arg Gly Glu Gly Thr Ser Ala His Leu Arg
1 5 10 15

Asp Ile Phe Leu Gly Arg Cys Ala Glu Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Pro
20 25 30

Glu Gln Arg Asn Lys Asn Cys Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Lys Val
35 40 45

Ala Leu Asp Lys Asp Pro Cys Ser Val Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Leu
50 55 60

Phe Ile Asn Leu Ser Arg His Ser Ile Pro Arg Asp Lys Ser Leu Phe
65 70 75 80

Trp Glu Asn Ser His Leu Leu Val Asn Ser Phe Ala Asp Asn Thr Arg
85 90 95

Arg Phe Met Pro Leu Ser Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ala Asp Phe
100 105 110

Leu Ser Trp Cys Arg Gln Lys Asn Asp Ser Gly Leu Asp Tyr Gln Ser
115 120 125

Cys Pro Thr Ser Glu Asp Cys Glu Asn Asn Pro Val Asp Ser Phe Trp
130 135 140

Lys Arg Ala Ser Ile Gln Tyr Ser Lys Asp Ser Ser Gly Val Ile His
145 150 155 160

Val Met Leu Asn Gly Ser Glu Pro Thr Gly Ala Tyr Pro Ile Lys Gly
165 170 175

Phe Phe Ala Asp Tyr Glu Ile Pro Asn Leu Gln Lys Glu Lys Ile Thr
180 185 190

Arg Ile Glu Ile Trp Val Met His Glu Ile Gly Gly Pro Asn Val Glu
195 200 205

Ser Cys Gly Glu Gly Ser Met Lys Val Leu Glu Lys Arg Leu Lys Asp
210 215 220

Met Gly Phe Gln Tyr Ser Cys Ile Asn Asp Tyr Arg Pro Val Lys Leu
225 230 235 240

Leu Gln Cys Val Asp His Ser Thr His Pro Asp Cys Ala Leu Lys Ser
245 250 255

Ala Ala Ala Ala Thr Gln Arg Lys
260

<210> 45
<211> 116
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 45

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Ala Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60
Thr Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ala
115

<210> 46
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人
<400> 46

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Glu Tyr
20 25 30
Thr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60
Thr Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ser Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 47
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(35)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(66)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)..(106)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 47

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50 55 60

Xaa Xaa Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Pro Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 48

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 49
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(34)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(56)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (89)..(97)
<223> Xaa可為任何天然存在之胺基酸

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 51
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Gln Met Phe Gln
1 5 10 15

<210> 52
<211> 245
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 52

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr
1 5 10 15

Pro Val Ala Lys Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Ala Glu Leu
20 25 30

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

Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Val His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln
50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Gly Ser Asp Thr Phe Asn Asp
65 70 75 80

Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Glu Ser
85 90 95

Ser Ser Thr Val Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Leu Leu Gln Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val
130 135 140

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr
145 150 155 160

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

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

Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser
195 200 205

Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
210 215 220

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys His His
225 230 235 240

His His His His His
245

<210> 53
<211> 236
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 53
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30
Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45
Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys
50 55 60
Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Gly Glu Gly Val
65 70 75 80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys
85 90 95
Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His
100 105 110
His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
130 135 140
Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn
145 150 155 160
Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu
165 170 175
Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190
Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr
195 200 205
Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr
210 215 220
Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Ser
225 230 235
<210> 54
<211> 738
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 54
gtgaaacaaa gcactattgc actggcactc ttaccgctct tatttaccoc tgtggcaaaa 60
gcccagggtcc agctgcagca gtctagggct gaacttgtga tgccatgggc ttccagtgaag 120
atgtccctgca agacttctgg ctacacattc tctgactact gggtagactg ggtgaggcag 180
aggccctggac aaggccctga gtggatcgga gcgattgatg gttctgatac ttttaatgac 240
tacagtcaga agtttaaggg cagggccaca ttgactgtag acgaatccic cagcacagtc 300
tacatgcaac tcagcagcct gacatctgag gactctgcgg tctattactg tgcaaggggg 360
ggcctctctc agtactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc caaaacgaca 420
ccccatctg tctatccact ggccccctga tctgctgccc aaactaactc catggtgacc 480
ctgggatgcc tggtaaggg ctatttccct gagccagtga cagtgcctg gaactctgga 540
tccctgtcca gcggtgtgca caccctccca gctgtcctgc agtctgacct ctacactctg 600
agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt 660
gcccacccgg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggga ttgcatcat 720
caccatcacc atcactaa 738

<210> 55
<211> 711
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 55
atgaaatacc tattgectac ggcagccgct ggattgttat tactcgctgc ccaaccagcc 60
atggccgaca ttcagctgac ccagttctca gctccctat ctgcactgtg gggagaaact 120
gtcaccatca catgtcgagc aagtgaana acattacagtt atttagcatg gtatcagcag 180
aaacagggaa aatctctca gctcctggc tataatacaa aaaccttagg agaagggtgtg 240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatcgggc acacaatttt ctctgaagat caacagcctg 300
cagcctgaag attttgggag ttattactgt caacatcatt atgggtactcc attcacgttc 360
ggctcgggga caaagttgga aataaaacgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc 420
ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga ggtgcctcag tctgtgtctt ctgaacaac 480
ttctacccca aagacatcaa tgtcaagtgg aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc 540
gtctgaaca gttagactga tcaggacagc aaagacagca cctacagcat gagcagcacc 600
ctcagcttga ccaaggacga gtatgaacga cataacagct atacctgtga ggccactcac 660
aagacatcaa ctccaccat tgtcaagagc ttcaacagga atgagttta a 711

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 56
Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Val His Trp

<400>

Gly A

1

<400>

Alto A

1

<400>

1000

1

<400>

Apr. Th.

1

<400>

C1 = H3

1

<400> 62	
ggctacacat tcctcgacta ctgggtacac tgg	33
<210> 63	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 63	
ggagcgattg atggttctga tacttttaat gactacagtc agaagttaa g	51
<210> 64	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 64	
gcaagggggg gccttcttca gtac	24
<210> 65	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 65	
cgagcaagtg aaaacattta cagttattta gca	33
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 66	
aatacaaaaa ccttaggaga a	21
<210> 67	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 67	
caacatcatt atggtactcc attcacg	27
<210> 68	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 68	
ggctaacct tcaccageta ctggatgcac tgg	33
<210> 69	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 小家鼠	
<400> 69	
ggagagattg atccttctga tagttatact aactacaatc aaaagttcaa g	51

<210>	70	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	70	
cgagcaagtg agaatatitca cagttattitca gca		33
<210>	71	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	71	
aatgcaaaaa ccttagcaga a		21
<210>	72	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	小家鼠	
<400>	72	
caacatcatt atggtactcc tcc		23
<210>	73	
<211>	1338	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人類化重鏈	
<400>	73	
caagtccaac tggttcaatc tggltgctgag gtttaagaagc ctgggtgcctc tgtgaagggtg		60
tcatgtaaag catctgggta cagcttcatac gagtacacca ttaattgggt ccgccaagct		120
cctggccagg gactggagtg gatcggcaat atcgatccct actacgggac cacatactac		180
aatcaaattgt tcaactggcag agccaccctg accgtcgaca caagcatatc tacagcctat		240
atggagctca gccgcctgcg gtctgacgac accgtgtgtg attactgcgc tcggggaagt		300
gcttggttcc catattgggg tcagggaacc ctcgttacag tctcctcagc tleaaccaa		360
ggccccagtg tcttccctct ggccccctcc agtaagtcta ccagcggcgg cactgccgcc		420
ctgggctgtc tcgtcaaaga ctacttccct gaaccctgta cagtgtcttg gaacagcggc		480
gcactgacaa gcggggtgca cacatttccc gccgtcctgc aatcctccgg actgtacagc		540
ctctcaagtg tgggtgactgt cccatccctc tccctcggga ccagacata tatatgcaat		600
gtgaaccata agcccagcaa caccaaggtc gataagaagg tggaacctaa aagttgcgat		660
aagactcata catgtcctcc atgccctgcc cctgaactgc tgggaggacc ttctgtcttc		720
ctgttccctc ccaagcccaa agataccctg atgatatccc gcacaccaga agtgacatgt		780
gttgttgctg atgtctctca cgaggacctt gaagtgaaagt ttaattggta tgtggacggg		840
gtggaagtgc acaacgccaa gaccaaacct cgcgaagagc agtacaactc cacataccgc		900
gtggtgagtg tgctcaccgt tctccatcag gactggctga atggcaagga gtataagtg		960

aaggtagca acaaagctct gccagcacc ccagagaaaa ctattagcaa agctaagggc 1020
cagcctcgcg agccacaggt gtataccctc cctcctagtc gcgaggaaat gactaagaac 1080
caggtttccc tgacatgcct cgtcaaggga ttctatccta gcgatatgc cgtcgaatgg 1140
gagtcgaalg gccagcccca gaacaaciac aagaccacac ctctctgctt cgactctgac 1200
ggatccctct ttctctatag caagctgacc gtgacaaaa gcaggaggca acagggtaac 1260
gtgttttcat gctctgtgat gcacgaagcc ctgcacaatc actacacaca gaagtccttg 1320
agccctgtccc ctggcaaa 1338

<210> 74
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化重鏈

<400> 74

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Glu Tyr
20 25 30

Thr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

	165		170		175
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
	180				190
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile
	195				200
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val
	210				215
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
	225				230
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
				245	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
			260		
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
		275			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
	290				295
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
	305				310
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
			325		
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
			340		
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
		355			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
	370				375
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
	385				390
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
				405	
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
			420		

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 75
<211> 639
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化輕鏈

<400> 75
gacattcaga tgacccaatc accaagcagt ctgtcagcca gtgttgggga tcgctgacc 60
ataacatgct ctgcatcctc tagtgtgact tacatgtact ggtaccaaca gaagcccggg 120
aaagccccaa agctcctgat ctatgacact agcaacctgg ctagtggagt cccagccgg 180
ttttccggtt caggctcagg gactgactat actctcacta tticactctt gcagcctgag 240
gactttgcc a cttattattg tcagcaatgg agcaattacc cactgacctt tgggcagggc 300
accaaggigg aaatcaagag aactgttgct gctccctccg tgttcatctt cccaccaagc 360
gatgagcagc tgaatccgg gacagcctct gtggtgtgtc tctgaacaa ctctatcct 420
cgggaggcaa aggtccagt gaaagtcgat aatgccctcc agagtggcaa ctcaacaaga 480
agcgtgactg aacaggactc caaagatagt acatatagcc tcagcagtac actgacctg 540
agcaaagccg attatgagaa acataagggtg tacgcttgcg aggtcaccca ccagggcctg 600
tccagtcag tgactaagag ctttaataga ggtgagtgt 639

<210> 76
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化輕鏈

<400> 76
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr

[illegible]



201907952

【發明摘要】

【中文發明名稱】

醫藥組合

【英文發明名稱】

PHARMACEUTICAL COMBINATIONS

【中文】

本發明係關於包含針對BST1 (ADP-核糖基環化酶2)之抗體以及胞苷類似物或其醫藥學上可接受之鹽之醫藥組合；及治療經BST1 (ADP-核糖基環化酶2)表現/活性介導之疾病及/或與BST1異常表現/活性相關之疾病的方法，該等疾病諸如癌症。

【英文】

The invention relates to pharmaceutical combinations comprising antibodies against BST1 (ADP-ribosyl cyclase 2) together with a cytidine analogue or a pharmaceutically-acceptable salt thereof, and methods for the treatment of diseases, such as cancers mediated by BST1 (ADP-ribosyl cyclase 2) expression/activity and/or associated with abnormal expression/activity of BST1.

【指定代表圖】

圖9

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種醫藥組合，其包含：

(A) (i)抗BST1抗體或其抗原結合部分，其與包括包含SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列之重鏈可變區及包含SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列之輕鏈可變區的抗體競爭結合至BST1；

或

(ii)抗BST1抗體或其抗原結合部分，該抗體或部分包含：

a)包含以下之重鏈可變區：

i)包含SEQ ID NO: 10之第一vhCDR；

ii)包含選自SEQ ID NO: 12及SEQ ID NO: 51之序列的第二vhCDR；及

iii)包含SEQ ID NO: 14之第三vhCDR；及

b)包含以下之輕鏈可變區：

i)包含SEQ ID NO: 16之第一vlCDR；

ii)包含SEQ ID NO: 18之第二vlCDR；及

iii)包含SEQ ID NO: 20之第三vlCDR；

視情況地，其中該等以上SEQ ID NO中之任一或多者獨立地包含一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸取代、添加或缺失；

及

(B) 胞苷類似物或其醫藥學上可接受之鹽，

其中該醫藥組合呈組合製劑形式用於同時、單獨或依序用途。

【第2項】

如請求項1之醫藥組合，其中該用途係用於治療癌症。

【第3項】

如請求項1或2之醫藥組合，其中該胞苷類似物係5-氮雜-胞苷或5-氮雜-2'-脫氧胞苷。

【第4項】

如請求項1至3中任一項之醫藥組合，其中SEQ ID NO: 10、12、51、14、16、18或20中之任一或多者獨立地包含一個、兩個、三個、四個或五個保守胺基酸取代。

【第5項】

如請求項4之醫藥組合，其中SEQ ID NO: 10、12、51、14、16、18或20中之任一或多者獨立地包含一個或兩個保守胺基酸取代。

【第6項】

如請求項1至5中任一項之醫藥組合，其中該抗BST1抗體或其抗原結合部分包含：

(a)與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 46具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%胺基酸序列一致性之重鏈可變區，及

(b)與SEQ ID NO: 4或SEQ ID NO: 49具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%胺基酸序列一致性之輕鏈可變區。

【第7項】

如請求項1至6中任一項之醫藥組合，其中該抗BST1抗體包含：

(a)與SEQ ID NO: 74具有至少80%、85%、90%、95%、99%或100%胺基酸序列一致性之重鏈，及

(b)與SEQ ID NO: 76具有至少80%、85%、90%、95%、99%或

100%胺基酸序列一致性之輕鏈。

【第8項】

如請求項1至7中任一項之醫藥組合，其中該抗BST1抗體係人類IgG1單株抗體。

【第9項】

如請求項1至8中任一項之醫藥組合，其中該抗BST1抗體誘導抗體依賴性細胞介導的細胞毒性(ADCC)、補體依賴性細胞毒性(CDC)及/或T細胞細胞毒性，較佳地ADCC。

【第10項】

如請求項9之醫藥組合，其中該抗BST1抗體係經工程化抗體，該抗體對Fc受體具有經增加之結合及/或對ADCC具有經增加之效力，較佳地其中該抗體係經無岩藻糖化或去岩藻糖化。

【第11項】

如請求項1至10中任一項之醫藥組合，其中該抗體係雙特異性抗體或多特異性抗體，該抗體可特異性結合至包含BST1之第一抗原及選自由CD3抗原及CD5抗原組成之群之第二抗原。

【第12項】

如請求項1至11中任一項之醫藥組合，其中(A)及/或(B)另外包含一或多種醫藥學上可接受之稀釋劑、賦形劑或載劑。

【第13項】

如請求項1至12中任一項之醫藥組合，其中該醫藥組合呈組合製劑形式用於以同時、單獨或依序方式治療急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌及

胰臟癌，較佳地急性骨髓白血病(AML)。

【第14項】

如請求項1至13中任一項之醫藥組合，其進一步包含藉由向需要該治療之患者投與(A)及(B)治療該患者癌症的說明書。

【第15項】

一種套組，其包含：

(i) 如請求項1或4至7中任一項所定義之抗BST1抗體或其抗原結合部分；及

(ii) 胞苷類似物、較佳5-氮雜-胞苷或5-氮雜-2'-脫氧胞苷，或其醫藥學上可接受之鹽。

【第16項】

一種治療患者之癌症之方法，其包含向有需要之患者以同時、依序或單獨方式投與治療有效量之如請求項1至13中任一項之醫藥組合的組分(A)及(B)。

【第17項】

如請求項16之方法，其中該抗BST1抗體或抗原結合部分係經無岩藻糖化或去岩藻糖化。

【第18項】

如請求項16或17之方法，其中該癌症係急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌及胰臟癌，較佳地急性骨髓白血病(AML)。

【第19項】

如請求項1至13中任一項之醫藥組合，其用於治療癌症，其中組分

(A)及(B)係以同時、單獨或依序方式向病患投與以用於治療該癌症。

【第20項】

如請求項19使用之醫藥組合，其中該抗BST1抗體或抗原結合部分係經無岩藻糖化或去岩藻糖化。

【第21項】

如請求項19或20使用之醫藥組合，其中該癌症係急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌及胰臟癌，較佳地急性骨髓白血病(AML)。

【第22項】

一種如請求項1至13中任一項所定義之醫藥組合之組分(A)及(B)的用途，其用於製備以同時、單獨或依序方式治療癌症之醫藥組合。

【第23項】

如請求項22之用途，其中該抗BST1抗體或抗原結合部分係經無岩藻糖化或去岩藻糖化。

【第24項】

如請求項22或23之用途，其中該癌症係急性骨髓白血病(AML)、B細胞慢性淋巴細胞性白血病、乳癌、結腸直腸癌、腎癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌及胰臟癌，較佳地急性骨髓白血病(AML)。

【第25項】

如請求項1至13中任一項之醫藥組合，其用於療法中或用作藥劑。

