(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201039846 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099109950 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 03 月 31 日
(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/18 (2006.01)*
C12P21/08 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*
(30)優先權：2009/04/01 美國 61/211,754
2009/04/02 美國 61/166,214
(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)
美國
(72)發明人：依克林 克利斯堤 ELKINS, KRISTI (US)；波森 安佐 POLSON, ANDREW (US)；艾班斯 艾倫 EBENS, ALLEN (US)；亞當 卡麥立亞 ADAMS, CAMELIA (US)；鄭冰 ZHENG, BING (CN)；瓊杜拉 賈格R JUNUTULA, JAGATH R. (IN)；宏格 喬安 HONGO, JO-ANNE (US)；吳彥 WU, YAN (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：193 項 圖式數：31 共 540 頁

(54)名稱

抗－ＦｃＲＨ５抗體及免疫結合物及其使用方法

ANTI-FCRH5 ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF USE

(57)摘要

本發明係關於適用於治療哺乳動物之造血系統腫瘤的組合物，及使用該等組合物於該治療的方法。

嵌合抗人類FcRH5 7D11輕鏈（胺基酸）

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRSSQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKFASESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLSIN
SVESEDFADYYCQQSNSWPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:11)

圖2

嵌合抗人類FcRH5 7D11重鏈（胺基酸）

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVATITRNGGTTYYLDSVKGRFTIS
RDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARGPIYYDYGYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

圖4

(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201039846 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：099109950 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 03 月 31 日
(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/18 (2006.01)*
C12P21/08 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*
(30)優先權：2009/04/01 美國 61/211,754
2009/04/02 美國 61/166,214
(71)申請人：建南德克公司 (美國) GENENTECH, INC. (US)
美國
(72)發明人：依克林 克利斯堤 ELKINS, KRISTI (US)；波森 安佐 POLSON, ANDREW (US)；艾班斯 艾倫 EBENS, ALLEN (US)；亞當 卡麥立亞 ADAMS, CAMELIA (US)；鄭冰 ZHENG, BING (CN)；瓊杜拉 賈格R JUNUTULA, JAGATH R. (IN)；宏格 喬安 HONGO, JO-ANNE (US)；吳彥 WU, YAN (US)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：193 項 圖式數：31 共 540 頁

(54)名稱

抗－ＦｃＲＨ５抗體及免疫結合物及其使用方法

ANTI-FCRH5 ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF USE

(57)摘要

本發明係關於適用於治療哺乳動物之造血系統腫瘤的組合物，及使用該等組合物於該治療的方法。

嵌合抗人類FcRH5 7D11輕鏈（胺基酸）

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRSSQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKFASESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLSIN
SVESEDFADYYCQQSNSWPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:11)

圖2

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係針對適用於治療哺乳動物之造血系統腫瘤的相關組合物，且針對使用彼等相關組合物進行該治療之方法。

交叉引用相關申請案

本案根據Section 119(e)主張2009年4月1日申請之美國臨時申請案第61/211,754號及2009年4月2日申請之第61/166,214號之優先權及權益，該等案之全部揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

序列表之參考

本發明之申請案含有已經由EFS-Web提交且以全文引用的方式併入本文中之序列表。該於2010年3月25日創建之ASCII複本命名為GNE0351R.txt且大小為89,184位元組。

【先前技術】

在美國，惡性腫瘤(癌症)繼心臟病之後為死亡之第二主要原因(Boring等人，*CA Cancel J. Clin.* 43:7 (1993))。癌症之特徵在於源自正常組織之異常或贅生性細胞之數目增加，該等細胞增殖形成腫瘤塊；該等贅生性腫瘤細胞侵蝕相鄰組織；及產生惡性細胞，該等惡性細胞最終經由血液或淋巴系統擴散至局部淋巴結且經由稱作癌轉移之過程擴散至遠端位點。在癌性狀況下，細胞在正常細胞不能生長之條件下增殖。癌症表現在由不同程度之侵蝕性及侵襲性表徵的多種形式上。

涉及在造血(產生血液之細胞成分(諸如淋巴細胞、白血球、血小板、紅血球及自然殺手細胞)的過程)期間產生之細胞的癌症稱作造血系統癌症。可存在於血液及淋巴組織中且對免疫反應很關鍵之淋巴細胞分成兩大類淋巴細胞：B淋巴細胞(B細胞)及T淋巴細胞(T細胞)，其分別介導體液免疫及細胞介導之免疫。

B細胞在骨髓內成熟，且使骨髓在其細胞表面表現結合抗原之抗體。當天然B細胞首次遇見其膜結合抗體之特異性抗原時，細胞開始快速分裂且其子代分化成記憶B細胞及稱作「漿細胞」之效應細胞。記憶B細胞具有較長壽命且繼續表現與初始親本細胞具有相同特異性之膜結合抗體。漿細胞不產生膜結合抗體，而替代地產生可分泌形式之抗體。分泌之抗體為體液免疫之主要效應分子。

T細胞在胸腺內成熟，胸腺提供不成熟T細胞增殖及分化之環境。在T細胞成熟期間，T細胞進行基因重排，產生T細胞受體，且進行有助於確定成熟T細胞之細胞表面表型的正選擇及負選擇。成熟T細胞之特徵性細胞表面標記為CD3:T細胞受體複合物及共同受體(coreceptor)CD4或CD8之一。

在發現癌症療法之有效細胞標靶的嘗試中，研究者設法鑑別跨膜或其他膜相關多肽，相較於表現於一或多個正常非癌性細胞上，該等多肽特異性表現於一或多個特定類型之癌細胞表面上。通常，相較於表現於非癌性細胞表面上，該等膜相關多肽更大量表現於癌細胞表面上。鑑別該

等腫瘤相關之細胞表面抗原多肽獲得特異性靶向癌細胞以經由基於抗體之療法破壞的能力。在此方面，注意到基於抗體之療法已證實極有效治療特定癌症。舉例而言，HERCEPTIN®及RITUXAN®(兩者均來自Genentech Inc., South San Francisco, California)分別為已成功用於治療乳癌及非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之抗體。更特定言之，HERCEPTIN®為重組DNA衍生之人類化單株抗體，其選擇性結合於人類表皮生長因子受體2(HER2)原致癌基因之細胞外域。在25-30%原發性乳癌中觀察到HER2蛋白過度表現。RITUXAN®為遺傳工程改造之嵌合鼠類/人類單株抗體，其針對存在於正常及惡性B淋巴細胞之表面上的CD20抗原。該等抗體均在CHO細胞中重組產生。

在發現癌症療法之有效細胞標靶的其他嘗試中，研究者設法鑑別(1)一或多個特定類型之癌細胞相較於一或多個特定類型之非癌性正常細胞特異性產生之非膜相關多肽、(2)癌細胞以顯著高於一或多個正常非癌性細胞之表現量產生的多肽或(3)在癌性與非癌性狀況(例如正常前列腺與前列腺腫瘤組織)下，表現僅特異性侷限於單一組織類型(或極有限數目之不同組織類型)的多肽。該等多肽可保持位於細胞內或可為由癌細胞分泌。此外，該等多肽可不由癌細胞自身表現，而由產生及/或分泌對癌細胞具有加強或生長促進作用之多肽的細胞表現。該等分泌之多肽通常為向癌細胞提供優於正常細胞之生長優勢的蛋白質，且包括諸

如血管生成因子、細胞黏附因子、生長因子及其類似物之物質。預期鑑別該等非膜相關多肽之拮抗劑充當治療該等癌症之有效治療劑。此外，鑑別該等多肽之表現模式將會適用於診斷哺乳動物之特定癌症。

儘管哺乳動物癌症療法存在上述確定進展，但仍非常需要分別能夠偵測哺乳動物之腫瘤存在及有效抑制贅生性細胞生長的其他治療劑。因此，本發明之一目標在於鑑別多肽，即細胞膜相關、分泌之或細胞內多肽，在癌性與非癌性狀況下，該等多肽之表現僅特異性侷限於單一組織類型(或極有限數目之不同組織類型)，即造血性組織，且在於使用彼等多肽及其編碼核酸產生適用於治療性處理及/或偵測哺乳動物之造血系統癌症的相關組合物。

在B細胞惡性病症(包括B細胞淋巴瘤及骨髓瘤)中常見染色體1q21之異常，但由該等畸變靶向之基因基本未知。涉及帶1q21-q23之染色體異常是B細胞非霍奇金氏淋巴瘤與多發性骨髓瘤兩者中最常見的遺傳病變。在非霍奇金氏淋巴瘤亞型中，1q21-q23處之易位斷裂點(包括易位及複製)常報導為濾泡性及彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLCL)、邊緣區B細胞淋巴瘤及伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)中之單一染色體異常。藉由選殖骨髓瘤細胞株中t(1:14)(q21:q32)染色體易位之斷裂點鑑別兩個基因，稱作免疫球蛋白超家族受體易位相關(IRTA)1及IRTA2。IRTA2與鑑別為BXMAS1(Nakayama等人，Biochm. Biophys. Res. Commun. 285:830-7, 2001)及FcRH5(Davis等人，Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 98:9772-7, 2001)之序列一致。IRTA1與IRTA2均為相關基因(IRTA)家族之成員。

FcRH5(或IRTA2)為與Fc受體家族具有同源性之細胞表面受體。其通常表現於成熟B細胞中，且在外周淋巴器官中具有不同於FcRH4(IRTA1)之分佈。IRTA1表現於邊緣區B細胞中，而IRTA2亦表現於生髮中心中心細胞及免疫胚細胞中。IRTA2在1q21異常之多發性骨髓瘤及伯基特淋巴瘤細胞株中表現異常(參見Miller等人，Blood 99:2662-2669, 2002)。B細胞惡性病症中涉及1q21結構重排之高頻率表明IRTA1及IRTA2對於該等疾病之發病機制很關鍵(參見公開之PCT申請案第WO 01/38490號；美國公開之專利申請案第20080292632號)(亦參見Polson等人Int Immunol. 2006年9月；18(9):1363-73)。

假設表現FcRH5，宜產生FcRH5抗原之治療性抗體，當投與患者以尤其進行長期治療時，該等抗體產生極小抗原性或無抗原性。本發明滿足此需要及其他需要。本發明提供抗FcRH5抗體，其克服當前治療性組合物之侷限性，且提供將由下述實施方式顯而易見之其他優勢。

在癌症治療中，使用抗體-藥物結合物(ADC)(亦即免疫結合物)局部傳遞細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即殺滅或抑制腫瘤細胞之藥物)(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549；Wu等人(2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146；Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212；Syrigos及Epenetos (1999) Anticancer

Research 19:605-614；Niculescu-Duvaz及Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172；US 4975278)使得可向腫瘤靶向傳遞藥物部分且在其中進行細胞內積累，其中全身性投與該等未結合藥劑可能對正常細胞以及設法去除之腫瘤細胞產生不可接受程度之毒性(Baldwin等人(1986) Lancet (1986年3月15日)，第603-05頁；Thorpe, (1985)「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」，Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera等人(編)，第475-506頁)。改良治療指數(亦即ADC之最大功效及最小毒性)之努力集中於多株抗體(Rowland等人(1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87)及單株抗體(mAb)之選擇性以及藥物連接及藥物釋放特性(Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549)。抗體藥物結合物中所用之藥物部分包括細菌蛋白毒素，諸如白喉毒素；植物蛋白毒素，諸如蓖麻毒素；小分子，諸如奧瑞他汀(auristatin)、膠達納黴素(geldanamycin)(Mandler等人(2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581；Mandler等人(2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028；Mandler等人(2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、類美登素(maytansinoid) (EP 1391213；Liu等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)、刺孢黴素(calicheamicin)(Lode等人(1998) Cancer Res. 58:2928；Hinman等人(1993) Cancer Res. 53:3336-3342)、道諾黴素(daunomycin)、小紅莓(doxorubicin)、甲

胺喋呤(methotrexate)及長春地辛(vindesine)(Rowland等人(1986)(前述))。藥物部分可影響細胞毒性及細胞生長抑制機制，包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制。一些細胞毒性藥當結合於大抗體或蛋白質受體配位體時趨向於無活性或活性降低。

奧瑞他汀肽、奧瑞他汀E(AE)及單甲基奧瑞他汀(monomethylauristatin，MMAE)、多拉司他汀(dolastatin)之合成類似物(WO 02/088172)作為藥物部分結合於：(i)嵌合單株抗體cBR96(對癌瘤上之路易斯Y具有特異性(Lewis Y))；(ii)對血液惡性病症上之CD30具有特異性的cAC10(Klussman等人(2004)，Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773；Doronina等人(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784；Francisco等人(2003) Blood 102(4):1458-1465；US 2004/0018194)；(iii)抗CD20抗體(諸如利妥昔單抗(rituxan)(WO 04/032828))以治療表現CD20之癌症及免疫病症；(iv)抗EphB2R抗體2H9以治療結腸直腸癌(Mao等人(2004) Cancer Research 64(3):781-788)；(v)E-選擇素抗體(Bhaskar等人(2003) Cancer Res. 63:6387-6394)；(vi)曲妥珠單抗(trastuzumab)(HERCEPTIN®，US 2005/0238649)及(vi)抗CD30抗體(WO 03/043583)。奧瑞他汀E之變異體揭示於US 5767237及US 6124431中。結合於單株抗體之單甲基奧瑞他汀E揭示於Senter等人2004年3月28日提交之Proceedings of the American Association for Cancer Research, 第45卷，摘要編號623中。奧瑞他汀類似物MMAE及MMAF

已結合於各種抗體(US 2005/0238649)。

使藥物部分與抗體連接(亦即經由共價鍵連接)之習知方式一般產生分子之非均質混合物，其中藥物部分在抗體之多個位點連接。舉例而言，細胞毒性藥通常經由抗體之通常多個離胺酸殘基結合於抗體，產生非均質抗體-藥物結合混合物。視反應條件而定，非均質混合物通常含有抗體與0至約8個或更多個所連接藥物部分之分佈。另外，可能非均質混合物存在於藥物部分與抗體之比率為特定整數之結合物的各亞群內，其中藥物部分在抗體之多個位點連接。分析及製備方法可能不足以分離及表徵由結合反應產生之非均質混合物中的抗體-藥物結合物質分子。抗體為大型複雜且結構上多樣之生物分子，其通常具有多個反應性官能基。其與連接子試劑及藥物-連接子中間物之反應性取決於諸如pH值、濃度、鹽濃度及共溶劑之因素。此外，多步結合過程可能不可重現，因為難以控制反應條件及表徵反應物及中間物。

不同於在接近pH 7時質子化且親核性降低之大多數胺，半胱胺酸硫氫基在中性pH下具有反應性。因為游離硫氫基(RSH，氫硫基)相對具有反應性，故具有半胱胺酸殘基之蛋白質通常以其氧化形式以二硫基連接之寡聚體形式存在或具有內部橋接之二硫基。細胞外蛋白質一般不具有游離硫氫基(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, 第55頁)。相較於抗體胺或羥基，抗體半胱胺酸硫氫基一般對親電子結

合試劑更具反應性(亦即更具親核性)。已藉由遺傳工程改造技術將半胱胺酸殘基引入蛋白質中而與配位體形成共價連接或形成新分子內二硫鍵(Better等人(1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650；Bernhard等人(1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132；Greenwood等人(1994) Therapeutic Immunology 1:247-255；Tu等人(1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867；Kanno等人(2000) J. of Biotechnology, 76:207-214；Chmura等人(2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484；US 6248564)。然而，藉由使蛋白質之各個胺基酸殘基突變成半胱胺酸胺基酸工程改造半胱胺酸硫氫基具有潛在問題，尤其在未配對(游離Cys)殘基或相對易於進行反應或氧化之殘基的情況下。在蛋白質之濃溶液(無論大腸桿菌之周質、培養物上清液或部分或完全純化之蛋白質)中，蛋白質表面上之未配對Cys殘基可配對且氧化形成分子間二硫基，且因此形成蛋白質二聚體或多聚體。經由二硫鍵形成二聚體使新Cys對於與藥物、配位體或其他標記結合不具反應性。此外，若蛋白質在新工程改造之Cys與現有Cys殘基之間氧化形成分子內二硫鍵，則兩種Cys硫氫基均不可用於活性位點參與及相互作用。此外，可因摺疊異常或使三級結構喪失使蛋白質無活性或不具特異性(Zhang等人(2002) Anal. Biochem. 311:1-9)。

經半胱胺酸工程改造之抗體已設計為FAB抗體片段(thioFab)形式，且表現為全長IgG單株(thioMab)抗體(Junutula, J.R.等人(2008) J Immunol Methods 332:41-52；

US 2007/0092940，其內容以引用的方式併入本文中)。ThioFab及ThioMab抗體經由連接子在新引入之半胱胺酸硫氫基處與硫氫基反應性連接子試劑及藥物-連接子試劑結合以製備抗體藥物結合物(Thio ADC)。

本文所引用之所有參考文獻(包括專利申請案及公開案)均以全文引用的方式併入本文中。

【發明內容】

本發明提供抗FcRH5抗體或其功能片段及其用於治療造血系統腫瘤之方法。

在一態樣中，本發明提供一種較佳特異性結合於任何上述或下述多肽的抗體。視情況，抗體為單株抗體、抗體片段(包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$及Fv片段)、雙功能抗體、單域抗體、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗FcRH5多肽抗體結合於其各別抗原性抗原決定基的抗體。本發明之抗體可視情況結合於生長抑制劑或細胞毒性劑，諸如毒素(包括例如奧瑞他汀、類美登素、多拉司他汀衍生物或刺孢黴素)、抗生素、放射性同位素、核分解酶或其類似物。本發明之抗體可視情況在CHO細胞或細菌細胞中產生，且較佳誘發其所結合之細胞死亡。出於偵測目的，本發明之抗體可進行可偵測地標記、連接於固體支撐物或進行類似處理。

在一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之單價親和力(例如Fab片段形式之抗體對FcRH5之親和力)或二價形式親和力(例如IgG片段形式之

抗體對FcRH5之親和力)分別實質上等同於、低於或大於鼠類抗體之單價親和力或二價形式親和力(例如Fab片段或IgG片段形式之鼠類抗體對FcRH5之親和力)或嵌合抗體之單價親和力或二價形式親和力(例如Fab片段或IgG片段形式之嵌合抗體對FcRH5之親和力)，該鼠類或嵌合抗體包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO:20)中所述之輕鏈及重鏈可變域序列，由該等序列組成或基本上由該等序列組成。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.4 nM、0.2 nM或0.5 nM。

在一態樣中，提供一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自由以下組成之群的HVR：

(i) 包含序列KASQNVGSNVA(SEQ ID NO: 28)之HVR-L1；

(ii) 包含序列SASYRYS(SEQ ID NO: 29)之HVR-L2；

(iii) 包含序列QQYKTWT(SEQ ID NO: 30)之HVR-L3；

(iv) 包含序列GYTFTNYGMN(SEQ ID NO: 37)之HVR-H1；

(v) 包含序列NTYTGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO: 38)之HVR-H2；及

(vi) 包含序列ARRSIPYYYAMDY(SEQ ID NO: 39)之HVR-H3。在一實施例中，HVR-H1殘基編號9在變異HVR-H1中

為I。在另一實施例中，抗體包含具有SEQ ID NO: 38之序列的HVR-H2。在另一實施例中，構架序列之至少一部分為人類共同構架序列。在另一實施例中，抗體包含人類κ亞群1共同構架序列。在另一實施例中，抗體包含重鏈人類亞群III共同構架序列。在另一實施例中，構架序列包含位置11、12、13、18、19、20、75、78、82、8=2a、83及/或34處之取代。在另一實施例中，取代為L11V、V12K、V13K、L18V、R19K、L20V、K75V、V78A、N82I、N82aS、R83K及/或M34I。在另一實施例中，構架序列包含位置12、13、34及/或78處之取代。在另一實施例中，取代為V12K、V13K、M34I及/或V78A。

在另一實施例中，抗體包含與選自SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，抗體包含與選自SEQ ID NO: 21之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。在另一實施例中，抗體包含與選自SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的輕鏈可變域。

在另一實施例中，抗體包含與選自SEQ ID NO: 21之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。在另一實施例中，抗體包含與選自SEQ ID NO: 22之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。在另一實施例中，抗體包含與選自SEQ ID NO: 23之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。

在一實施例中，抗體包含含有一個、兩個、三個或四個

選自SEQ ID NO: 33、34、35及36之構架胺基酸序列的重鏈可變域。在其他實施例中，抗體包含含有一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO: 24、25、26、27及28之構架胺基酸序列的輕鏈可變域。在另一實施例中，抗體包含含有一個、兩個、三個或四個構架胺基酸序列的重鏈可變域，該等構架胺基酸序列與選自SEQ ID NO: 33、34、35及36之胺基酸具有至少90%胺基酸序列一致性。在其他實施例中，抗體包含含有一個、兩個、三個或四個構架胺基酸序列的輕鏈可變域，該等構架胺基酸序列與選自SEQ ID NO: 24、25、26、27及28之胺基酸具有至少90%胺基酸序列一致性。

在一態樣中，提供一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含至少一個變異HVR，其中該變異HVR序列包含對SEQ ID NO: 28、29、30、37、38或39中所述序列之至少一個殘基的修飾。在另一實施例中，修飾為取代、插入或缺失。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對人類FcRH5之單價親和力實質上等同於鼠類抗體之單價親和力，該鼠類抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述之輕鏈及重鏈可變序列。

在一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對人類FcRH5之單價親和力為大於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變

序列之鼠類或嵌合抗體之單價親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對人類FcRH5之單價親和力為小於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類或嵌合抗體之單價親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60倍。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力實質上等同於鼠類抗體之二價形式親和力，且該鼠類抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述之輕鏈及重鏈可變序列。

在一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為大於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類或嵌合抗體之二價形式親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

在另一態樣中，本發明提供人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為小於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類或嵌合抗體之二價形式親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60

倍。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.4 nM。在一實施例中，抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.4 nM +/-.04。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.2 nM。在一實施例中，抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.2 nM +/-.02。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.5 nM。在一實施例中，抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.5 nM +/-.01。

在所有態樣中，結合親和力表示為Kd值。在另一態樣中，結合親和力藉由Biacore或放射免疫分析法測量。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該人類化抗體在結合於細胞毒性劑時抑制腫瘤細胞生長。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該人類化抗體在結合於細胞毒性劑時抑制腫瘤細胞生長。

在一實施例中，人類化抗體與嵌合抗體均為單價或二價抗體。在另一實施例中，人類化抗體與嵌合抗體包含連接於Fc區之單一Fab區。

在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含含有圖12中所述之HVR1-HC、HVR2-HC及/或HVR3-HC序列(SEQ ID NO: 37-39)的重鏈可變域。在一實施例中，可變域包含圖12中所述之FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC及/或FR4-HC序列(SEQ ID NO: 33-36)。在另一實施例中，抗體包含圖12中所述之CH1及/或Fc序列(SEQ ID NO: 40及/或41)。

在另一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含含有圖12中所述之HVR1-LC、HVR2-LC及/或HVR3-LC序列(SEQ ID NO: 28-30)的輕鏈可變域。在一實施例中，可變域包含圖12中所述之FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC及/或FR4-LC序列(SEQ ID NO: 24-27)。在另一實施例中，抗體包含圖12中所述之CL1序列(SEQ ID NO: 31)。

在一態樣中，本發明提供一種多肽，其包含圖11中所述之序列(SEQ ID NO: 21)。在另一態樣中，本發明提供一種多肽，其包含圖9中所述之序列(SEQ ID NO: 19)。在另一態樣中，本發明提供一種多肽，其包含圖11中所述之序列(SEQ ID NO: 22)。在另一態樣中，本發明提供一種多肽，其包含圖11中所述之序列(SEQ ID NO: 23)。

在另一態樣中，本發明提供一種藉由以下方法製備之抗體：(a)培養表現包含本文所述之重鏈可變域及本文所述之輕鏈可變域之抗體的細胞；及(b)自該所培養細胞分離該抗體。

在另一態樣中，本發明提供一種包含本文所述之重鏈可變域及本文所述之輕鏈可變域的抗體。在一實施例中，抗

體為單價抗體且包含Fc區。

在一態樣中，本發明提供一種編碼本文所述之抗體的聚核苷酸。在一實施例中，本發明提供一種包含該聚核苷酸之載體。在另一實施例中，本發明提供一種包含該載體之宿主細胞。

在一態樣中，本發明包括一種經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體，其包含一或多個游離半胱胺酸胺基酸及選自SEQ ID NO: 251-298之序列。經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體可結合於FcRH5多肽。經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體可藉由包含用半胱胺酸置換親本抗FcRH5抗體之一或多個胺基酸殘基的方法製備。

在一態樣中，本發明包括一種經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體，其包含一或多個游離半胱胺酸胺基酸，其中該經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體結合於FcRH5多肽，且藉由包含用半胱胺酸置換親本抗FcRH5抗體之一或多個胺基酸殘基的方法製備，其中該親本抗體包含至少一個選自以下之HVR序列：

(i) 包含序列KASQNVGSNVA(SEQ ID NO: 28)之HVR-L1；

(ii) 包含序列SASYRYS(SEQ ID NO: 29)之HVR-L2；

(iii) 包含序列QQYKTWT(SEQ ID NO: 30)之HVR-L3；

(iv) 包含序列GYTFTNYGMN(SEQ ID NO: 37)之HVR-H1；

(v) 包含序列NTYTGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO: 38)之

HVR-H2；及

(vi)包含序列ARRSIPYYYAMDY(SEQ ID NO: 39)之HVR-H3。

經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體可為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗FcRH5多肽抗體結合於其各別抗原性抗原決定基的抗體。本發明之抗體可視情況結合於生長抑制劑或細胞毒性劑，諸如毒素(包括例如奧瑞他汀或類美登素)。本發明之抗體可視情況在CHO細胞或細菌細胞中產生，且較佳抑制其所結合之細胞生長或增殖或誘發該細胞之死亡。出於診斷目的，本發明之抗體可進行可偵測地標記、連接於固體支撐物或進行類似處理。

在一態樣中，本發明提供製備本發明抗體之方法。舉例而言，本發明提供一種製備FcRH5抗體(如本文所定義其包括全長抗體及其片段)之方法，該方法包含在適合之宿主細胞中表現編碼該抗體(或其片段)之本發明重組載體，及回收該抗體。

在另一態樣中，本發明提供一種能夠結合於表現FcRH5之第一細胞及表現細胞表面標靶抗原之第二細胞的雙特異性抗體。在一實施例中，第二細胞為T細胞。在一實施例中，細胞表面標靶抗原為CD3。在某些實施例中，雙特異性抗體為腔內突起抗體。在一實施例中，雙特異性抗體為無糖基化抗體。在一實施例中，雙特異性抗體在大腸桿菌(*Escherichia coli*)宿主細胞中產生。在一實施例中，雙特

異性抗體缺乏一或多個Fc效應功能。在一實施例中，雙特異性抗體缺乏ADCC活性。

在一態樣中，本發明為一種醫藥調配物，其包含本發明之抗體或本發明之抗體-藥物結合物及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

在一態樣中，本發明提供一種製品，其包含容器；及該容器內所包含之組合物，其中該組合物包含一或多種本發明FcRH5抗體。

在一態樣中，本發明提供一種套組，其包含含有組合物的第一容器，該組合物包含一或多種本發明FcRH5抗體；及含有緩衝劑之第二容器。

在一態樣中，本發明提供本發明FcRH5抗體之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。

在一態樣中，本發明提供本發明製品之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。

在一態樣中，本發明提供本發明套組之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。

在一態樣中，本發明提供一種抑制表現FcRH5之細胞生長的方法，該方法包含使該細胞與本發明之抗體接觸，從而抑制該細胞之生長。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療性處理患有包含表現FcRH5之細胞的癌性腫瘤之哺乳動物的方法，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之本發明抗體，從而有效治療該哺乳動物。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療或預防與FcRH5表現增加相關之細胞增殖病症的方法，該方法包含向需要該治療之個體投與有效量之本發明抗體，從而有效治療或預防該細胞增殖病症。在一實施例中，該增殖病症為癌症。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種抑制細胞生長之方法，其中該細胞之生長至少部分依賴於FcRH5之生長加強作用，該方法包含使該細胞與有效量之本發明抗體接觸，從而抑制該細胞之生長。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療性處理哺乳動物之腫瘤的方法，其中該腫瘤之生長至少部分依賴於FcRH5之生長加強作用，該方法包含使該細胞與有效量之本發明抗體接觸，從而有效治療該腫瘤。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含向患者投與包含本文所述之免疫結合物，可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑的醫藥調配物。

在一態樣中，本發明提供一種抑制B細胞增殖之方法，其包含在允許包含本發明抗體之免疫結合物結合於FcRH5的條件下使細胞暴露於該免疫結合物。

本發明之方法可另外包含其他處理步驟。舉例而言，在一實施例中，方法另外包含以下步驟，其中使靶向細胞及/或組織(例如癌細胞)暴露於輻射治療或化學治療劑。

在一態樣中，本發明提供包含投與有效量之抗FcRH5抗體以及有效量之另一治療劑(諸如抗血管生成劑、另一抗體、化學治療劑、細胞毒性劑、免疫抑制劑、前藥、細胞激素、細胞毒性放射療法、皮質類固醇、抗嘔吐劑、癌症疫苗、止痛劑或生長抑制劑)的方法。舉例而言，抗FcRH5抗體或免疫結合物與抗癌劑或抗血管生成劑組合使用以治療各種贅生性或非贅生性病狀。在特定實施例中，抗FcRH5抗體與以下組合使用：Velcade®(硼替佐米(bortezomib))、Revlimid®(來那度胺(lenalidomide))、他莫昔芬(tamoxifen)、來曲唑(letrozole)、依西美坦(exemestane)、阿那曲唑(anastrozole)、伊立替康(irinotecan)、西妥昔單抗(cetuximab)、氟維司群(fulvestrant)、長春瑞濱(vinorelbine)、貝伐單抗(bevacizumab)、長春新鹼(vincristine)、順鉑(cisplatin)、吉西他濱(gemcitabine)、甲胺喋呤、長春鹼(vinblastine)、卡波鉑(carboplatin)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西他賽(docetaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、5-氟尿嘧啶、小紅莓、硼替佐米、來那度胺、地塞米松(dexamethasone)、美法侖(melphalin)、潑尼松(prednisone)、長春新鹼、沙力

度胺(thalidomide)。

視欲治療之特定癌症適應症而定，本發明之組合療法可與其他治療劑(諸如化學治療劑)或其他療法(諸如放射療法或手術)組合。多種已知化學治療劑可用於本發明之組合療法。較佳使用治療特定適應症之彼等標準化學治療劑。欲用於組合中之各治療劑之劑量或頻率較佳等同於或小於當在無其他藥劑的情況下使用時相應藥劑之劑量或頻率。

在另一態樣中，本發明提供任何本文所述之抗FcRH5抗體，其中該抗FcRH5抗體包含可偵測標記。

在一態樣中，本發明提供一種判定懷疑含有FcRH5之樣品中FcRH5之存在的方法，該方法包含使該樣品暴露於本發明之抗體，及測定該抗體與該樣品中FcRH5之結合，其中該抗體與該樣品中FcRH5之結合指示該樣品中該蛋白質之存在。

在一態樣中，本發明提供一種診斷與表現FcRH5之細胞(諸如B細胞)增加相關之細胞增殖病症的方法，該方法包含使生物樣品中之測試細胞與任何上述抗體接觸；藉由偵測抗體與FcRH5之結合測定結合於該樣品中之測試細胞的抗體含量；及比較結合於對照樣品中之細胞的抗體含量，其中結合之抗體含量校正為測試及對照樣品中表現FcRH5之細胞數，且其中測試樣品中結合之抗體相較於對照樣品的高含量表明存在與表現FcRH5之細胞相關的細胞增殖病症。在一態樣中，本發明提供一種偵測血液或血清中可溶性FcRH5之方法，該方法包含使來自懷疑患有B細胞增殖

病症之哺乳動物的血液或血清的測試樣品與本發明之抗FcRH5抗體接觸，及偵測測試樣品中可溶性FcRH5相對於來自正常哺乳動物之血液或血清的對照樣品的增加。

在一態樣中，本發明提供一種使本發明之抗體結合於表現FcRH5之細胞的方法，該方法包含使該細胞與本發明之抗體接觸。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

【實施方式】

本發明提供鑑別適用於治療哺乳動物之造血系統腫瘤的組合物的方法、組合物、套組及製品，且提供使用彼等相關組合物進行該治療之方法。

本文提供該等方法、組合物、套組及製品之詳情。

I. 通用技術

除非另外表明，否則本發明之實踐將採用分子生物學(包括重組技術)、微生物學、細胞生物學、生物化學及免疫學之習知技術，該等技術在此項技術之技能範疇內。該等技術在以下文獻中充分說明：諸如「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第二版(Sambrook等人，1989)；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait編，1984)；「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney編，1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)；「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubel等人編，1987，且定期更新)；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis等人編，1994)；「A Practical Guide to Molecular Cloning」

(Perbal Bernard V., 1988)；「Phage Display: A Laboratory Manual」(Barbas等人，2001)。

II. 定義

為說明本說明書，將使用以下定義，且適當時以單數形式使用之術語應亦包括複數形式，且反之亦然。倘若所述任何定義與以引用的方式併入本文中之任何文件相抵觸，則以下述定義為準。

本文之「B細胞表面標記」或「B細胞表面抗原」為表現於B細胞表面上之抗原，其可用與其結合之拮抗劑(包括(但不限於)B細胞表面抗原或B細胞表面抗原之可溶形式的抗體，該等抗體能夠拮抗配位體結合於天然存在之B細胞抗原)靶向。例示性B細胞表面標記包括CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85及CD86白血球表面標記(關於說明，參見The Leukocyte Antigen Facts Book, 第2版。1997, Barclay等人編，Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)。其他B細胞表面標記包括RP105、FcRH2、B-細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、BAFF、BLyS、Btig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA及239287。相較於哺乳動物之其他非B細胞組織，備受關注之B細胞表面標記優先表現於B細胞上，且可表

現於前驅B細胞與成熟B細胞上。

除非另外表明，否則本文所用之術語「FcRH5」係指來自任何脊椎動物來源之任何天然FcRH5，該脊椎動物來源包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類、獼猴(cynomologus monkey)(cyno))及齧齒動物(例如小鼠及大鼠)。人類FcRH5在本文中亦稱作「TAHO18」或「PRO85143」(SEQ ID NO: 2)，且由在本文中亦稱作「DNA340394」之核苷酸序列(SEQ ID NO: 1)編碼。獼猴FcRH5在本文中亦稱作「cyno FcRH5」。術語「FcRH5」涵蓋「全長」、未處理FcRH5以及由細胞中處理產生之FcRH5的任何形式。該術語亦涵蓋天然存在之FcRH5之變異體，例如拼接變異體、對偶基因變異體及同功異型物。本文所述之FcRH5多肽可自多種來源(諸如人類組織類型或另一來源)分離或藉由重組或合成方法製備。「天然序列FcRH5多肽」包含具有與源自自然界之相應FcRH5多肽相同之胺基酸序列的多肽。該等天然序列FcRH5多肽可自自然界分離或可由重組或合成方式產生。術語「天然序列FcRH5多肽」特別涵蓋特定FcRH5多肽(例如細胞外域序列)的天然存在截短或分泌形式、該多肽之天然存在之變異形式(例如替代性拼接形式)及天然存在之對偶基因變異體。在本發明之某些實施例中，本文所揭示之天然序列FcRH5多肽為包含附圖所示全長胺基酸序列的成熟或全長天然序列多肽。起始及終止密碼子(若表明)在圖式中以粗體展示且加有下劃線。附圖中以「N」指示之核酸殘基為任何核酸殘

基。然而，儘管附圖所揭示之FcRH5多肽展示為以甲硫胺酸殘基(在本文之圖式中稱作胺基酸位置1)起始，但可設想且有可能位於圖式中胺基酸位置1之上游或下游的其他甲硫胺酸殘基可用作FcRH5多肽之起始胺基酸殘基。

「mu7D11」或「MA7D11」或「鼠類FcRH5 (7D11)抗體」或「鼠類抗FcRH5 (7D11)抗體」在本文中用於特指以下鼠類抗FcRH5單株抗體，其中該鼠類抗FcRH5單株抗體包含圖9之SEQ ID NO: 18之輕鏈可變域及圖10之SEQ ID NO: 20之重鏈可變域。鼠類抗FcRH5單株抗體可購自市售來源。

「ch13G9」或「chMAFcRH5 (13G9)」或「嵌合MAFcRH5 (13G9)抗體」在本文中用於特指以下嵌合抗人類FcRH5 (13G)抗體，其中該嵌合抗FcRH5抗體包含SEQ ID NO: 之輕鏈(圖6)，其包含人類IgG1之輕鏈恆定域。嵌合抗FcRH5 (13G9)抗體另外包含SEQ ID NO: 之重鏈(圖8)，其包含人類IgG1之恆定域。

「抗cynoFcRH5」或「抗cyno FcRH5」在本文中用於指結合於cyno FcRH5之抗體。

「13G9移植物」或「移植13G9之『人類化』抗體」或「hu13G9移植物」在本文中用於特指藉由將鼠類13G9抗FcRH5抗體(MA7D11)之高變區移植於具有R71A、N73T及L78A之受者人類共同VL κ I(huKI)及人類亞群III共同VH(huIII)(Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 89:4285 (1992))(參見實例部分1及圖9-12)中產生的移植物。

「hu13G9」或「hu13G9 v1」或「hu13G9 v3」或「hu13G9 v8」在本文中用於特指人類化13G9抗體。

本文所用之對胺基酸殘基/位置之「修飾」係指相較於起始胺基酸序列，主要胺基酸序列的變化，其中該變化由涉及該等胺基酸殘基/位置之序列變化產生。舉例而言，典型修飾包括用另一胺基酸取代該殘基(或在該位置取代該殘基)(例如保守性或非保守性取代)、鄰近於該殘基/位置插入一或多個(一般少於5個或3個)胺基酸及缺失該殘基/位置。「胺基酸取代」或其變化係指用不同胺基酸殘基置換預定(起始)胺基酸序列中之現有胺基酸殘基。一般而言且較佳，相較於包含起始(或「野生型」)胺基酸序列的多肽，修飾使變異多肽之至少一種物理生物化學活性改變。舉例而言，在抗體情況下，改變之物理生物化學活性可為對標靶分子之結合親和力、結合能力及/或結合作用。

術語「抗體」在最廣泛意義上使用且特別涵蓋例如單一抗FcRH5單株抗體(包括促效劑、拮抗劑、中和抗體、全長或完整單株抗體)；由至少兩個完整抗體形成的具有多抗原決定基特異性之抗FcRH5抗體組合物、多株抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體，只要其展現所需生物活性即可)；單鏈抗FcRH5抗體及抗FcRH5抗體之片段(參見下文)，包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$及Fv片段；雙功能抗體、單域抗體(sdAb)，只要其展現所需生物或免疫活性即可。術語「免疫球蛋白」(Ig)可與本文之抗體互換使用。抗體可為人類、人類化及/或親和力成熟抗體。

術語「抗FcRH5抗體」或「結合於FcRH5之抗體」係指抗體能夠以足夠親和力結合FcRH5以使得抗體適用作靶向FcRH5中之診斷劑及/或治療劑。舉例而言，如放射免疫分析法(RIA)所測量，抗FcRH5抗體結合於不相關非FcRH5蛋白之程度較佳為抗體結合於FcRH5之不到約10%。在某些實施例中，結合於FcRH5之抗體的解離常數(Kd)≤1 μM、≤100 nM、≤10 nM、≤1 nM或≤0.1 nM。在某些實施例中，抗FcRH5抗體結合於FcRH5之在不同物種之FcRH5中保守的抗原決定基。

「分離之抗體」為已鑑別且自自然環境之組分分離及/或回收的抗體。其自然環境之污染組分為將會干擾抗體之治療用途的物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在較佳實施例中，抗體將被純化：(1)至如由勞立法(Lowry method)所測定之大於95重量%抗體，且最佳大於99重量%；(2)至足以藉由使用旋杯式定序儀獲得N末端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度；或(3)至藉由SDS-PAGE在還原或非還原條件下使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳銀染色得知之均質性。分離之抗體包括重組細胞內之原位抗體，此係因為抗體之自然環境中之至少一個組分將不會存在。然而，通常將藉由至少一個純化步驟來製備分離之抗體。

基本4鏈抗體單元為雜四聚醣蛋白，其由兩條相同之輕(L)鏈及兩條相同之重(H)鏈構成(IgM抗體由基本雜四聚體單元以及另一稱作J鏈之多肽5鏈組成，且因此含有10個抗

原結合位點，而分泌之IgA抗體可聚合形成多價組合，其包含2-5個基本4鏈單元以及J鏈)。在IgG之情況下，4鏈單元一般為約150,000道爾頓(dalton)。各L鏈藉由一個共價二硫鍵連接於H鏈，而兩條H鏈視H鏈同型而定藉由一或多個二硫鍵彼此連接。各H鏈及L鏈亦具有規則間隔之鏈內二硫橋。各H鏈在N末端具有一個可變域(V_H)，繼而三個恆定域(C_H)(對於各α及γ鏈)及四個C_H域(對於μ及ε同型)。各L鏈在N末端具有一個可變域(V_L)，繼而在其另一末端具有一個恆定域(C_L)。V_L與V_H對準，且C_L與重鏈之第一恆定域(C_H1)對準。咸信特定胺基酸殘基在輕鏈與重鏈可變域之間形成界面。V_H與V_L一起配對形成單一抗原結合位點。關於不同類別抗體之結構及特性，例如參見**Basic and Clinical Immunology**, 第8版，Daniel P. Stites, Abba I. Terr及Tristram G. Parslow (編)，Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第71頁及第6章。

來自任何脊椎動物物種之L鏈可基於其恆定域之胺基酸序列而歸屬於兩個明顯不同之類型(稱作κ及λ)中之一。視其重鏈(C_H)恆定域之胺基酸序列而定，免疫球蛋白可歸屬於不同類別或同型。存在五類免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其分別具有稱作α、δ、ε、γ及μ之重鏈。γ及α類基於C_H序列及功能之相對微小差異進一步分成亞類，例如，人類表現以下亞類：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。

抗體之「可變區」或「可變域」係指抗體重鏈或輕鏈之

胺基末端域。重鏈可變域可稱作「VH」。輕鏈可變域可稱作「VL」。該等域一般為抗體之最可變部分且含有抗原結合位點。

術語「可變」係指抗體中可變域之某些區段的序列廣泛不同。V域介導抗原結合且限定特定抗體對其特定抗原之特異性。然而，可變性並非均勻分佈於跨越可變域之110個胺基酸上。實情為，V區由相對不變之15-30個胺基酸的延伸片段(稱作構架區「FR」)組成，該等延伸片段經具有極大可變性之長度各為9-12個胺基酸的較短區(稱作「高變區」)分隔。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個主要採用β-摺疊構型且藉由三個高變區連接之FR，該三個高變區形成連接β-摺疊結構且在一些情況下形成β-摺疊結構之一部分的環。各鏈中之高變區藉由FR緊密近接地結合在一起，且與另一鏈之高變區一起促使形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人**Sequences of Proteins of Immunological Interest**, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恆定域並不直接參與抗體與抗原之結合，但展現出各種效應功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。

「完整」抗體為包含抗原結合位點以及C_L及至少重鏈恆定域(C_H1、C_H2及C_H3)之抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。完整抗體較佳具有一或多種效應功能。

出於本文之目的之「裸抗體」為尚未結合於細胞毒性部

分或放射性標記的抗體。

「抗體片段」包含完整抗體之一部分，較佳完整抗體之抗原結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$及Fv片段；雙功能抗體；線性抗體(參見美國專利第5,641,870號，實例2；Zapata等人**Protein Eng.** 8(10): 1057-1062 [1995])；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多特異性抗體。在一實施例中，抗體片段包含完整抗體之抗原結合位點且從而保留結合抗原之能力。

木瓜蛋白酶消化抗體產生兩個稱作「Fab」片段之相同抗原結合片段，及殘餘「Fc」片段，該名稱反映易於結晶之能力。Fab片段由完整L鏈以及H鏈可變區域(V_H)及一條重鏈之第一恆定域(C_H1)組成。各Fab片段對於抗原結合為單價，亦即其具有單一抗原結合位點。胃蛋白酶處理抗體產生單一大$F(ab')_2$片段，其大致對應於兩個具有二價抗原結合活性之經二硫基連接之Fab片段且仍能夠交聯抗原。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於C_H1域之羧基末端具有少數其他殘基，包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸。Fab'-SH為本文中Fab'的名稱，其中恆定域之半胱胺酸殘基具有游離硫氫基。$F(ab')_2$抗體片段最初係以之間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對形式產生。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

Fc片段包含兩條H鏈之藉由二硫基結合在一起的羧基末端部分。抗體之效應功能由Fc區中之序列決定，該區亦為存在於某些細胞類型上之Fc受體(FcR)識別之部分。

「Fv」為含有完整抗原識別及結合位點之最小抗體片段。此片段由一個重鏈可變區域與一個輕鏈可變區域緊密非共價結合之二聚體組成。在單鏈Fv(scFv)物質中，一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域可藉由可撓性肽連接子共價連接，以使輕鏈與重鏈可以類似於雙鏈Fv物質中之「二聚」結構結合。此兩個域摺疊產生六個高變環(H鏈及L鏈各3個環)，其提供用於抗原結合之胺基酸殘基，且賦予抗體抗原結合特異性。然而，即使單一可變域(或僅包含特異於抗原之三個CDR的一半Fv)亦具有識別及結合抗原之能力，但親和力低於完整結合位點。

「單鏈Fv」(亦簡寫為「sFv」或「scFv」)為包含連接於單一多肽鏈中之V_H及V_L抗體域的抗體片段。sFv多肽較佳在V_H與V_L域之間另外包含使sFv能夠形成抗原結合所需結構之多肽連接子。關於sFv之評述，參見Pluckthun, **The Pharmacology of Monoclonal Antibodies**，第113卷，Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)；Borrebaeck 1995(下述)。

術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點的抗體片段，該等片段包含在同一多肽鏈(VH-VL)中連接於輕鏈可變域(VL)的重鏈可變域(VH)。藉由在V_H域與V_L域之間用短連接子(約5-10個殘基)構築sFv片段(參見前段)使得V域鏈間而非鏈內配對來製備小抗體片段，產生二價片段(亦即具有兩個抗原結合位點之片段)。雙功能抗體可為二價抗體或雙特異性抗體。雙特異性雙功能抗體為兩個「交

又」sFv片段之雜二聚體，其中兩個抗體之V_H域及V_L域存在於不同多肽鏈上。雙功能抗體更全面地描述於例如EP 404,097；WO 93/01161；Hudson等人*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)；及Hollinger等人Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)中。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人*Nat. Med.* 9:129-134 (2003)中。

如本文所使用之術語「單株抗體」係指獲自一群實質上均質之抗體的抗體，亦即構成該群之個別抗體除可少量存在之可能天然存在之突變以外為相同的。單株抗體為針對單一抗原位點之高度特異性抗體。此外，與包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相比，各單株抗體針對抗原上之單一決定子。除其特異性以外，單株抗體之有利之處在於其可經合成而未被其他抗體污染。修飾語「單株」不應理解為需要藉由任何特定方法產生抗體。舉例而言，適用於本發明之單株抗體可藉由最先由Kohler等人**Nature**, 256:495 (1975)描述之融合瘤方法來製備，或可使用重組DNA方法在細菌、真核動物或植物細胞中製備(例如參見美國專利第4,816,567號)。「單株抗體」亦可例如使用Clackson等人**Nature**, 352:624-628 (1991)及Marks等人，**J. Mol. Biol.**, 222:581-597 (1991)中所述之技術自噬菌體抗體庫(libraries)分離。

本文之單株抗體包括「嵌合」抗體，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體類別或亞類之抗體的相應序列一致或同源，而該(等)鏈之其餘部分與源

自另一物種或屬於另一抗體類別或亞類之抗體的相應序列一致或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現出所需生物活性即可(參見美國專利第4,816,567號；及Morrison等人 **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81:6851-6855 (1984))。本文所關注之嵌合抗體包括包含源自非人類靈長類動物(例如舊大陸猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等)之可變域抗原結合序列及人類恆定區序列的「靈長類化」抗體。

非人類(例如齧齒動物)抗體之「人類化」形式為含有源自非人類抗體之最小序列的嵌合抗體。人類化抗體大部分為以下人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中接受者之高變區殘基經來自非人種(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)高變區(供者抗體)之具有所需抗體特異性、親和力及能力的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含不存在於接受者抗體或供者抗體中之殘基。進行該等修飾以進一步改進抗體之效能。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常為人類免疫球蛋白之恆定區(Fc)之至少一部分。更多詳情參見Jones等人 **Nature** 321:522-525 (1986)；Riechmann等人 **Nature** 332:323-329 (1988)；及Presta, **Curr. Op. Struct. Biol.** 2:593-596 (1992)。亦參見

以下評述文章及其中所引用之參考文獻：Vaswani及Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma and Immunol.*, 1:105-115 (1998)；Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross, *Curr. Op. Biotech.*, 5:428-433 (1994)。

「Thio」當在本文中用於指抗體時係指經半胱胺酸工程改造之抗體，而「hu」當在本文中用於指抗體時係指人類化抗體。

「人類抗體」為胺基酸序列對應於人類所產生之抗體的胺基酸序列及/或已使用本文所揭示之製備人類抗體之任何技術所製備的抗體。此人類抗體之定義特別排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。人類抗體可使用此項技術中已知之不同技術(包括噬菌體呈現庫)產生。Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人*J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。亦可用於製備人類單株抗體之方法描述於Cole等人*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁 (1985)；Boerner等人*J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)中。亦參見Dijk及van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)。可藉由向轉殖基因動物投與抗原來製備人類抗體，其中該轉殖基因動物經修飾以回應於抗原攻毒產生該等抗體，但其內源基因座已失能，例如經免疫異種移植小鼠(xenomice)(關於XENOMOUSE™技術例如參見美國專利第6,075,181號及第6,150,584號)。關於經由人類B細胞融合瘤技術產生之人類抗體亦例如參見Li等人*Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)。

術語「高變區」、「HVR」或「HV」當在本文中使用時係指抗體可變域中序列高變及/或形成結構明確之環的區域。一般而言，抗體包含六個高變區；三個在VH(H1、H2、H3)中且三個在VL(L1、L2、L3)中。本文中使用且涵蓋多種高變區描繪。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且最常使用(Kabat等人*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia另外指出結構環之位置(Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。當使用Kabat編號規定編號時，視環長度而定，Chothia CDR-H1環之末端在H32與H34之間變化(此係因為Kabat編號方案將插入物放置於H35A及H35B處；若35A與35B均不存在，則環在32處封端；若僅存在35A，則環在33處封端；若35A與35B均存在，則環在34處封端)。AbM高變區表示Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷，且由Oxford Molecular之AbM antibody模擬軟體使用。「接觸」高變區係基於對可用複雜晶體結構之分析。該等高變區各自之殘基如下所示。

環	Kabat	AbM	Chothia	接觸
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96

H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
	(Kabat編號)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
	(Chothia編號)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

高變區可包含如下「延伸之高變區」：VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97(L3)，及VH中之26-35B(H1)、50-65、47-65或49-65(H2)及VH中之93-102、94-102或95-102(H3)。可變域殘基係根據Kabat等人(前述)編號以用於各個該等定義。

「構架」或「FR」殘基為除本文中所定義之高變區殘基以外的彼等可變域殘基。

術語「如Kabat中之可變域殘基編號」或「如Kabat中之胺基酸位置編號」及其變化係指Kabat等人Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中編譯抗體時用於重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用該編號系統，實際的線性胺基酸序列可含有更少或額外胺基酸，對應於縮短可變域之FR或CDR或插入可變域之FR或CDR中。舉例而言，重鏈可變域可包括H2之殘基52之後的單個胺基酸插入物(根據Kabat之殘基52a)及重鏈FR殘基82之後插入之殘基(例如根據Kabat之殘基82a、82b及82c等)。可藉由將既定抗體之序列同源區與

「標準」Kabat編號序列比對而確定該抗體之殘基的Kabat編號。

當提及可變域中之殘基(大致為輕鏈之殘基1-107及重鏈之殘基1-113)時通常使用Kabat編號系統(例如Kabat等人*Sequences of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。當提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時一般使用「EU編號系統」或「EU索引」(例如Kabat等人(前述)中所報導之EU索引)。「如Kabat中之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。除非另外說明，否則在本文中提及抗體可變域中之殘基編號意謂藉由Kabat編號系統進行之殘基編號。除非另外說明，否則在本文中提及抗體恆定域中之殘基編號意謂藉由EU編號系統進行之殘基編號(例如參見美國臨時申請案第60/640,323號，EU編號圖)。

「親和力成熟」抗體為一或多個HVR中具有一或多個可使抗體對抗原之親和力改良之變化的抗體(相較於不具有彼等變化之親本抗體)。較佳親和力成熟抗體將對標靶抗原具有奈莫耳(nanomolar)或甚至皮莫耳(picomolar)親和力。可藉由此項技術中已知之程序產生親和力成熟抗體。Marks等人*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組達成之親和力成熟。HVR及/或構架殘基之隨機突變誘發描述於Barbas等人*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；

Jackson等人*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)中。

「阻斷」抗體或「拮抗」抗體為抑制或降低所結合之抗原生物活性的抗體。較佳阻斷抗體或拮抗抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。

如本文所使用之「促效抗體」為模擬所關注多肽之至少一種功能活性的抗體。

「物種依賴性抗體」(例如哺乳動物抗人類IgE抗體)為對來自第一哺乳動物物種之抗原相較於對來自第二哺乳動物物種之該抗原之同源物具有較強結合親和力的抗體。通常，物種依賴性抗體「特異性結合」於人類抗原(亦即結合親和力(Kd)值為不超過約1×10^{-7} M，較佳不超過約1×10^{-8}，且最佳不超過約1×10^{-9} M)，但對來自第二非人類哺乳動物物種之該抗原之同源物的結合親和力為其對人類抗原之結合親和力的至少約1/50或至少約1/500或至少約1/1000。物種依賴性抗體可為如上所定義之各種抗體中之任一者，但較佳為人類化或人類抗體。

「結合親和力」通常係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)間之非共價相互作用的強度總和。除非另外表明，否則如本文所用之「結合親和力」係指反映結合對成員(例如抗體與抗原)之間1:1相互作用的固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之親和力一般可由解離常數(Kd)表示。親和力可藉由此項技術中已知之通用方法(包括本文所述方法)測量。低親和力抗體一般緩慢地

結合抗原且趨向於易於解離，而高親和力抗體一般較快地結合抗原且趨向於保持較長時間結合。此項技術中已知多種測量結合親和力之方法，該等方法中之任一者均可用於本發明之目的。下文將描述特定說明性實施例。

「或更佳」當在本文中用於指結合親和力時係指分子與其結合搭配物之間的更強結合。「或更佳」當在本文中用於指更強結合時由較小Kd數值表示。舉例而言，若抗體對抗原之親和力為「.6 nM或更佳」，則該抗體對該抗原之親和力為<.6 nM，亦即.59 nM、.58 nM、.57 nM等，或小於.6 nM之任何值。

在一實施例中，如藉由在滴定系列之未標記抗原存在下用最小濃度之(^{125}I)標記之抗原平衡Fab、隨後用塗有抗Fab抗體之板捕捉結合之抗原來測量Fab對抗原之溶液結合親和力的以下分析法所述，藉由用Fab型式之所關注抗體及其抗原執行經放射性標記之抗原結合分析法(RIA)來測量本發明之「Kd」或「Kd值」(Chen等人(1999) *J. Mol Biol* 293:865-881)。為建立分析條件，用50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 μg/ml捕捉抗Fab抗體(Cappel Labs)塗佈微量滴定板(Dynex)隔夜，且隨後在室溫下(約23℃)用PBS中之2%(w/v)牛血清白蛋白阻斷2至5小時。在無吸附板(Nunc #269620)中，將100 pM或26 pM [^{125}I]-抗原與所關注Fab之連續稀釋液混合(例如與抗VEGF抗體Fab-12之評定相一致，Presta等人(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599)。隨後培育所關注之Fab隔夜；然而，培育可持續更長時段(例如約

65小時)以確保達到平衡。此後，將混合物轉移至捕捉板在室溫下培育(例如1小時)。隨後移除溶液且用PBS中之0.1% Tween-20洗滌培養板八次。在培養板已乾燥時，每孔添加150 μl之閃爍體(MicroScint-20; Packard)，且在Topcount γ計數器(Packard)上對培養板計數十分鐘。選擇獲得小於或等於20%最大結合的各Fab濃度用於競爭性結合分析法。

根據另一實施例，使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，使用表面電漿共振分析法，在25℃下，用約10個反應單位(RU)之經固定抗原CM5晶片測量Kd或Kd值。簡言之，根據供應商之說明書，用*N*-乙基-*N'*-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及*N*-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧基甲基化之聚葡萄糖生物感應器晶片(CM5, BIAcore, Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)稀釋抗原至5 μg/ml(約0.2 μM)，隨後以5 μl/min之流速注射，獲得約10個反應單位(RU)之偶合蛋白。注射抗原之後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學測量，在25℃下用約25 μl/min之流速注射於含0.05% Tween 20(PBST)之PBS中的Fab之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(one-to-one Langmuir binding model, BIAcore Evaluation軟體3.2型)藉由同時擬合締合及解離感應圖計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。平衡解離常數(Kd)以比率k_{off}/k_{on}計算。例如參見Chen, Y.等人(1999) *J. Mol Biol* 293:865-

881。若藉由上述表面電漿共振分析法獲得之締合速率超過10^6 M^{-1} S^{-1}，則可藉由使用螢光淬滅技術測定締合速率，如光譜儀(諸如具有攪拌式紅色比色管之止流裝備型光譜儀(Aviv Instruments)或8000系列SLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic))所測量，該螢光淬滅技術測量25℃下，在濃度增加之抗原存在下，PBS(pH 7.2)中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)之螢光發射強度(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)的增加或減少。

本發明之「締合速率」或「k_{on}」亦可如上所述用上述相同表面電漿共振技術使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)測定。

如本文所用之短語「實質上類似」或「實質上相同」表示兩個數值之間足夠高的類似程度(一般一數值與本發明之抗體相關且另一數值與參考/對比抗體相關)，使得熟習此項技術者認為兩個值之間的差異在由該等值(例如Kd值)所估量之生物學特徵情形內具有極小生物學及/或統計顯著性或無生物學及/或統計顯著性。該兩個值之間的差異隨參考/對比抗體之值變化較佳小於約50%，較佳小於約40%，較佳小於約30%，較佳小於約20%，較佳小於約10%。

如本文所用之短語「實質上減少」或「實質上不同」表示兩個數值之間足夠高之差異程度(一般一數值與本發明之抗體相關且另一數值與參考/對比抗體相關)，使得熟習此項技術者認為兩個值之間的差異在由該等值(例如Kd

值，HAMA反應)所估量之生物學特徵情形內具有統計顯著性。該兩個值之間的差異隨參考/對比抗體之值變化較佳大於約10%，較佳大於約20%，較佳大於約30%，較佳大於約40%，較佳大於約50%。

「抗原」為抗體可選擇性結合之預定抗原。標靶抗原可為多肽、碳水化合物、核酸、脂質、半抗原或另一天然存在或合成之化合物。標靶抗原較佳為多肽。

出於本文之目的之「受者人類構架」為包含源自人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之VL或VH構架之胺基酸序列的構架。「源自」人類免疫球蛋白構架或人類共同構架之受者人類構架可包含其相同胺基酸序列或其可含有原有胺基酸序列變化。若存在原有胺基酸變化，則較佳存在不超過5個且較佳4個或更少或3個或更少原有胺基酸變化。若VH中存在原有胺基酸變化，則彼等變化較佳僅存在於位置71H、73H及78H中之三處、兩處或一處；例如彼等位置處之胺基酸殘基可為71A、73T及/或78A。在一實施例中，VL受者人類構架的序列與VL人類免疫球蛋白構架序列或人類共同構架序列一致。

「人類共同構架」為代表在人類免疫球蛋白VL或VH構架序列之選擇中最常存在之胺基酸殘基的構架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列的選擇係自可變域序列之亞群進行。一般而言，該序列之亞群為如Kabat等人中之亞群。在一實施例中，對於VL，亞群為如Kabat等人中之亞群κI。在一實施例中，對於VH，亞群為如Kabat等人

中之亞群III。

「VH亞群III共同構架」包含獲自Kabat等人之可變重鏈亞群III中胺基酸序列的共同序列。在一實施例中，VH亞群III共同構架胺基酸序列包含各以下序列之至少一部分或全部：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(SEQ ID NO: 14)-H1-WVRQAPGKGLEWV(SEQ ID NO: 15)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC(SEQ ID NO: 16)-H3-WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO: 17)。

「VL亞群I共同構架」包含獲自Kabat等人之可變輕鏈κ亞群I之胺基酸序列的共同序列。在一實施例中，VL亞群I共同構架胺基酸序列包含各以下序列之至少一部分或全部：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 43)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 44)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 45)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 46)。

「未修飾之人類構架」為具有與受者人類構架相同之胺基酸序列的人類構架，例如受者人類構架中無人類胺基酸取代為非人類胺基酸。

出於本文之目的之「改變之高變區」為包含一或多個(例如1至約16個)胺基酸取代的高變區。

出於本文之目的之「未修飾之高變區」為與獲得其之非人類抗體具有相同胺基酸序列的高變區，亦即其中無一或多個胺基酸取代的高變區。

「結合」所關注抗原(例如腫瘤相關之多肽抗原標靶)之

抗體為以足夠親和力結合抗原以使抗體適用作靶向表現該抗原之細胞或組織之治療劑且不與其他蛋白質顯著交叉反應的抗體。在該等實施例中，如螢光活化細胞分選(FACS)分析或放射免疫沈澱(RIA)所測定，抗體與「非標靶」蛋白之結合程度應為抗體與其特定標靶蛋白之結合的不到約10%。對於抗體與標靶分子之結合，術語「特異性結合」或「特異性結合於」或「特異於」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基意謂顯著不同於非特異性相互作用的結合。特異性結合可例如藉由測定相較於對照分子(其一般為具有類似結構且不具有結合活性的分子)之結合的分子之結合來測量。舉例而言，特異性結合可藉由用類似於標靶之對照分子(例如過量非標記標靶)競爭來測定。在此情況下，若經標記標靶與探針之結合受過量未標記標靶競爭性抑制，則表明特異性結合。本文所用之術語「特異性結合」或「特異性結合於」或「特異於」特定多肽或特定多肽標靶上之抗原決定基可例如由對該標靶之Kd為至少約10^{-4} M、或者至少約10^{-5} M、或者至少約10^{-6} M、或者至少約10^{-7} M、或者至少約10^{-8} M、或者至少約10^{-9} M、或者至少約10^{-10} M、或者至少約10^{-11} M、或者至少約10^{-12} M或更大的分子展現。在一實施例中，術語「特異性結合」係指如下結合：其中分子結合於特定多肽或特定多肽上之抗原決定基而不會實質上結合於任何其他多肽或多肽抗原決定基。

「抑制表現FcRH5多肽之腫瘤細胞的生長」的抗體或

「生長抑制性」抗體為引起表現或過度表現適當FcRH5多肽之癌細胞可測量之生長抑制的抗體。FcRH5多肽可為表現於癌細胞表面上之跨膜多肽或可為癌細胞產生及分泌之多肽。相較於適當對照組，較佳生長抑制性抗FcRH5抗體使表現FcRH5之腫瘤細胞的生長抑制大於20%，較佳約20%至約50%，且甚至更佳大於50%(例如約50%至約100%)，該對照組通常為未用測試抗體處理之腫瘤細胞。在一實施例中，在約0.1至30 μg/ml或約0.5 nM至200 nM之抗體濃度下細胞培養物中可測量到生長抑制，其中在使腫瘤細胞暴露於抗體之後1-10日測得生長抑制。活體內腫瘤細胞之生長抑制可以多種方式測定，諸如下文實驗性實例部分中所述之方式。若投與每公斤體重約1 μg至每公斤體重約100 mg抗FcRH5抗體在首次投與抗體約5日至3個月內、較佳約5日至30日內使腫瘤尺寸或腫瘤細胞增殖減少，則該抗體在活體內具有生長抑制性。

「誘發細胞凋亡」之抗體為如藉由磷脂結合蛋白V之結合、DNA之斷裂、細胞萎縮、內質網之膨脹、細胞破碎及/或膜囊(稱作細胞凋亡體)之形成所確定誘發漸進式細胞死亡的抗體。細胞通常為過度表現FcRH5多肽之細胞。細胞較佳為腫瘤細胞，例如造血細胞，諸如B細胞、T細胞、嗜鹼性球、嗜伊紅血球、嗜中性白血球、單核細胞、血小板或紅血球。各種方法可用於評估與細胞凋亡相關之細胞事件。舉例而言，可藉由磷脂結合蛋白結合來測量磷脂醯絲胺酸(PS)易位；可經由DNA梯(DNA laddering)評估DNA斷

裂；且可藉由亞二倍體細胞之任何增加評估核/染色質濃縮以及DNA斷裂。較佳地，誘發細胞凋亡之抗體為在磷脂結合蛋白結合分析法中導致磷脂結合蛋白結合之誘發相對於未處理之細胞為約2至50倍、較佳約5至50倍且最佳約10至50倍的抗體。

「誘發細胞死亡」之抗體為使活細胞變為非活細胞之抗體。細胞為表現FcRH5多肽且具有特異性表現或過度表現FcRH5多肽之細胞類型的細胞。細胞可為特定細胞類型之癌性或正常細胞。FcRH5多肽可為表現於癌細胞表面上之跨膜多肽或可為癌細胞產生及分泌之多肽。細胞可為癌細胞，例如B細胞或T細胞。活體外細胞死亡可在無補體及免疫效應細胞的情況下測定以區別抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)或補體依賴性細胞毒性(CDC)誘發之細胞死亡。因此，可使用熱滅活血清(亦即在無補體的情況下)及在無免疫效應細胞的情況下執行細胞死亡分析法。為判定抗體是否能夠誘發細胞死亡，可相對於未處理細胞評定膜完整性之喪失，膜完整性之喪失係藉由碘化丙錠(PI)、錐蟲藍(trypan blue)(參見Moore等人**Cytotechnology** 17:1-11 (1995))或7AAD之吸收來評估。較佳誘發細胞死亡之抗體為在PI吸收分析法中誘發BT474細胞中PI吸收的抗體。

抗體「效應功能」係指彼等可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變異Fc區)且隨抗體同型而變化的生物活性。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞

毒性(ADCC)；吞噬作用；下調細胞表面受體(諸如B細胞受體)；及B細胞活化。

本文之術語「Fc區」係用於定義免疫球蛋白重鏈之C末端區，包括天然序列Fc區及變異Fc區。儘管免疫球蛋白重鏈Fc區之邊界可能變化，但人類IgG重鏈Fc區通常定義為自Cys226位置處胺基酸殘基或自Pro230延伸至其羧基末端。Fc區之C末端離胺酸(根據EU編號系統之殘基447)例如可在抗體產生或純化期間或藉由重組工程改造編碼抗體重鏈之核酸而移除。因此，完整抗體之組合物可包含移除所有K447殘基之抗體群、未移除K447殘基之抗體群及具有有無K447殘基之抗體混合物的抗體群。

「功能性Fc區」具有天然序列Fc區之「效應功能」。例示性「效應功能」包括C1q結合；CDC；Fc受體結合；ADCC；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)下調等。該等效應功能一般需要Fc區與結合域(例如抗體可變域)組合且可使用例如本文定義中所揭示之各種分析法評定。

「天然序列Fc區」包含與存在於自然界中之Fc區的胺基酸序列一致的胺基酸序列。天然序列人類Fc區包括天然序列人類IgG1 Fc區(非A及A異型)；天然序列人類IgG2 Fc區；天然序列人類IgG3 Fc區；及天然序列人類IgG4 Fc區以及其天然存在之變異體。

「變異Fc區」包含由於至少一個胺基酸修飾、較佳一或多個胺基酸取代而不同於天然序列Fc區之胺基酸序列。較

佳地，相較於天然序列Fc區或親本多肽之Fc區，變異Fc區具有至少一個胺基酸取代，例如在天然序列Fc區中或在親本多肽之Fc區中具有約一個至約十個胺基酸取代，且較佳約一個至約五個胺基酸取代。本文之變異Fc區較佳與天然序列Fc區及/或親本多肽Fc區具有至少約80%之同源性，且最佳與其具有至少約90%之同源性，更佳與其具有至少約95%之同源性。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種細胞毒性形式，其中所分泌之結合於某些細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上所存在Fc受體(FcR)的Ig使得該等細胞毒性效應細胞能夠特異性結合於具有抗原之標靶細胞且隨後用細胞毒素殺滅該標靶細胞。抗體「裝備」該等細胞毒性細胞，且絕對為該殺滅所需。介導ADCC之初級細胞NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現概括於Ravetch and Kinet, **Annu. Rev. Immunol.** 9:457-92 (1991)之第464頁之表3中。為評定所關注分子的ADCC活性，可執行活體外ADCC分析法，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中所述之分析法。該等分析法之有用效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，例如可在動物模型(諸如Clynes等人(USA) 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型)中活體內評定所關注分子之ADCC活性。

「Fc受體」或「FcR」描述結合於抗體Fc區之受體。較

佳FcR為天然序列人類FcR。此外，較佳FcR為結合IgG抗體的FcR(γ受體)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII亞類之受體，包括此等受體之對偶基因變異體及替代性拼接形式。FcγRII受體包括FcγRIIA(「活化受體」)及FcγRIIB(「抑制受體」)，其具有類似胺基酸序列，主要在其細胞質域不同。活化受體FcγRIIA在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體FcγRIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)。(參見Daëron, **Annu. Rev. Immunol.** 15:203-234 (1997)中之評述)。FcR評述於Ravetch及Kinet, **Annu. Rev. Immunol.** 9:457-492 (1991)；Capel等人**Immunomethods** 4:25-34 (1994)；及de Haas等人**J. Lab. Clin. Med.** 126:330-41 (1995)中。本文之術語「FcR」涵蓋其他FcR，包括有待於將來鑑別出之FcR。該術語亦包括新生兒受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人**J. Immunol.** 117:587 (1976)及Kim等人**J. Immunol.** 24:249 (1994))。

舉例而言可在表現人類FcRn之轉殖基因小鼠或經轉染人類細胞株中、或在投與具有變異Fc區之多肽的靈長類動物中分析活體內與人類FcRn之結合及人類FcRn高親和力結合多肽之血清半衰期。WO 2000/42072(Presta)描述與FcR之結合經改良或削弱之抗體變異體。亦例如參見Shields等人*J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)。

「人類效應細胞」為表現一或多個FcR且執行效應功能之白血球。該等細胞較佳至少表現FcγRIII且執行ADCC效

應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球；其中PBMC及NK細胞較佳。效應細胞可自天然來源(例如血液)分離。

「補體依賴性細胞毒性」或「CDC」係指在補體存在下標靶細胞溶解。經典補體路徑之活化係藉由補體系統之第一組分(C1q)結合於與其同源抗原結合之(適當亞類)抗體而起始。為評定補體活化，可執行例如如Gazzano-Santoro等人**J. Immunol. Methods** 202:163 (1996)中所述之CDC分析法。具有改變之Fc區胺基酸序列的多肽變異體(具有變異Fc區之多肽)及增強或降低之C1q結合能力的多肽變異體描述於例如美國專利第6,194,551 B1號及WO 1999/51642中。亦例如參見Idusogie等人*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

術語「含Fc區抗體」係指包含Fc區之抗體。Fc區之C末端離胺酸(根據EU編號系統之殘基447)例如可在抗體純化期間或藉由重組工程改造編碼抗體之核酸而移除。因此，本發明之包含具有Fc區之抗體的組合物可包含具有K447之抗體、移除所有K447之抗體或有無K447殘基之抗體混合物。

FcRH5多肽「細胞外域」或「ECD」係指一種FcRH5多肽形式，其基本上不含跨膜及細胞質域。通常，FcRH5多肽ECD應具有小於1%之該等跨膜及/或細胞質域，且較佳應具有小於0.5%之該等域。應瞭解，對本發明之FcRH5多

肽鑑別出的任何跨膜域係根據此項技術中常規用於鑑別此類疏水域之標準鑑別。跨膜域之精確邊界可能改變，但在如本文最初鑑別之域的任一末端很可能改變不超過約5個胺基酸。因此，視情況，FcRH5多肽之細胞外域在如實例或說明書中所鑑別出之跨膜域/細胞外域邊界之任一側可含有約5個或更少胺基酸，且本發明涵蓋該等有或無相關信號肽之多肽及編碼該等多肽之核酸。

本文所揭示FcRH5多肽之「信號肽」的近似位置可展示於本說明書及/或附圖中。然而，請注意，信號肽之C末端邊界可能改變，但在如本文最初鑑別之信號肽C末端邊界之任一側很可能改變不超過約5個胺基酸，其中信號肽之C末端邊界可根據此項技術中常規用於鑑別此類胺基酸序列成分的標準鑑別(例如Nielsen等人**Prot. Eng.** 10:1-6 (1997)及von Heinje等人**Nucl. Acids. Res.** 14:4683-4690 (1986))。此外，亦應認識到，在一些情況下，所分泌多肽之信號序列的裂解並不完全均勻，產生一種以上所分泌物質。本發明涵蓋此等成熟多肽，其中信號肽在如本文所鑑別信號肽之C末端邊界的任一側裂解不超過約5個胺基酸，及編碼該等多肽之聚核苷酸。

「FcRH5多肽變異體」意謂如本文所定義之與以下具有至少約80%胺基酸序列一致性的FcRH5多肽、較佳活性FcRH5多肽：本文所揭示之全長天然序列FcRH5多肽序列、本文所揭示之無信號肽的FcRH5多肽序列、本文所揭示之有或無信號肽的FcRH5多肽細胞外域或本文所揭示之

全長FcRH5多肽序列的任何其他片段(諸如僅代表全長FcRH5多肽之完整編碼序列之一部分的核酸所編碼的片段)。該等FcRH5多肽變異體包括例如在全長天然胺基酸序列之N末端或C末端添加或缺失一或多個胺基酸殘基的FcRH5多肽。通常，FcRH5多肽變異體應與以下具有至少約80%胺基酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%胺基酸序列一致性：本文所揭示之全長天然序列FcRH5多肽序列、本文所揭示之無信號肽的FcRH5多肽序列、本文所揭示之有或無信號肽的FcRH5多肽細胞外域或本文所揭示之全長FcRH5多肽序列的任何其他特別確定之片段。通常，FcRH5變異多肽之長度為至少約10個胺基酸，或者長度為至少約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600個胺基酸或更多。視情況，FcRH5變異多肽相較於天然FcRH5多肽序列應具有不超過一個保守性胺基酸取代，或相較於天然FcRH5多肽序列具有不超過2、3、4、5、6、7、8、9或10個保守性胺基酸取代。

相對於肽或多肽序列(亦即本文所鑑別之FcRH5多肽序

列)之「胺基酸序列一致性百分比(%)」係定義為在序列比對及(若必要)引入間隙以達成最大序列一致性百分比，且不將任何保守性取代視為序列一致性之一部分之後，候選序列中與特定肽或多肽序列(亦即FcRH5多肽序列)中胺基酸殘基一致之胺基酸殘基的百分比。為測定胺基酸序列一致性百分比，可以此項技術中熟知之各種方式進行比對，例如使用公用電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於測量比對之適當參數，包括達成所比較序列全長範圍內之最大比對所需的任何算法。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生胺基酸序列一致性%值，其中下表1中提供ALIGN-2程式之完整原始碼。該ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.設計，且下表1中所示之原始碼已以美國版權局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)之使用者文件(user documentation)申請，其中其以美國版權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California或可自下表1中所提供之原始碼編譯。ALIGN-2程式應編譯用於UNIX操作系統，較佳數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設定且不改變。

在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情況下，既定胺基酸序列A與既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%(其或者可表達為具有或包含與既定胺基酸序列B之特定胺基酸序列一致性%的既定胺基酸序列A)如下計算：

100乘以分數X/Y

其中X為由序列比對程式ALIGN-2在該程式之A與B比對中評定為一致匹配的胺基酸殘基數，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應瞭解，若胺基酸序列A之長度不同於胺基酸序列B之長度，則A與B之胺基酸序列一致性%將不等於B與A之胺基酸序列一致性%。

「FcRH5變異聚核苷酸」或「FcRH5變異核酸序列」意謂編碼如本文所定義之FcRH5多肽、較佳活性FcRH5多肽且與編碼以下之核苷酸序列具有至少約80%核酸序列一致性的核酸分子：本文所揭示之全長天然序列FcRH5多肽序列、本文所揭示之無信號肽的全長天然序列FcRH5多肽序列、本文所揭示之有或無信號肽的FcRH5多肽細胞外域或本文所揭示之全長FcRH5多肽序列之任何其他片段(諸如僅代表全長FcRH5多肽之完整編碼序列之一部分的核酸所編碼的片段)。通常，FcRH5變異聚核苷酸應與編碼以下之核酸序列具有至少約80%核酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%核酸序列一致性：本文所揭示之全長天然序列FcRH5多肽序列、本文所揭示之無信號肽的全長天然序列FcRH5多肽序列、本文所揭示之有或無信號序列的FcRH5多肽細胞外域或本文所揭示之全長FcRH5多肽序列之任何其他片段。變異體不涵蓋天然核苷酸序列。

通常，FcRH5變異聚核苷酸長度為至少約5個核苷酸，

或者長度為至少約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1110、1120、1130、1140、1150、1160、1170、1180、1190、1200、1210、1220、1230、1240、1250、1260、1270、1280、1290或1300個核苷酸，其中在此情形下術語「約」意謂已引用核苷酸序列長度加上或減去該已引用長度之10%。

相對於本文所鑑別之編碼FcRH5之核酸序列的「核酸序列一致性百分比(%)」係定義為在序列比對及(若必要)引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，候選序列中與所關注FcRH5核酸序列中之核苷酸一致的核苷酸的百分比。為測定核酸序列一致性百分比，可以此項技術中熟知之各

種方式進行比對，例如使用公用電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)軟體。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生核酸序列一致性%值，其中下表1中提供ALIGN-2程式之完整原始碼。該ALIGN-2序列比較電腦程式由Genentech, Inc.設計，且下表1中所示之原始碼已以美國版權局(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559)之使用者文件申請，其中其以美國版權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式可公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California或可自下表1中所提供之原始碼編譯。ALIGN-2程式應編譯用於UNIX操作系統，較佳數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數由ALIGN-2程式設定且不改變。

在採用ALIGN-2進行核酸序列比較之情況下，既定核酸序列C與既定核酸序列D之核酸序列一致性%(其或者可表達為具有或包含與既定核酸序列D之特定核酸序列一致性%的既定核酸序列C)如下計算：

100乘以分數W/Z

其中W為由序列比對程式ALIGN-2在該程式之C與D比對中評定為一致匹配的核苷酸數，且其中Z為D中核苷酸之總數。應瞭解，若核酸序列C之長度不同於核酸序列D之長度，則C與D之核酸序列一致性%將不等於D與C之核酸序列一致性%。除非另外特別說明，否則如剛好前一段使用ALIGN-2電腦程式所述獲得本文所用之所有核酸序列一致性%值。

在其他實施例中，FcRH5變異聚核苷酸為編碼FcRH5多肽且能夠較佳在嚴格雜交及洗滌條件下與編碼本文所揭示之全長FcRH5多肽的核苷酸序列雜交的核酸分子。FcRH5變異多肽可為FcRH5變異聚核苷酸所編碼之多肽。

當關於編碼FcRH5多肽之核酸使用時，術語「全長編碼區」係指編碼本發明之全長FcRH5多肽的核苷酸序列(在附圖中，其通常展示於起始密碼子與終止密碼子之間(包括起始密碼子及終止密碼子))。當關於ATCC寄存之核酸使用時，術語「全長編碼區」係指寄存於ATCC的插入載體中之編碼FcRH5多肽之cDNA部分(在附圖(起始密碼子及終止密碼子在圖式中為粗體且加有下劃線)中其通常展示於起始密碼子與終止密碼子之間(包括起始密碼子及終止密碼子))。

當用於描述本文所揭示之各種FcRH5多肽時，「分離之」意謂已鑑別且自自然環境之組分分離及/或回收的多肽。其自然環境之污染組分為通常將會干擾多肽之治療用途的物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在較佳實施例中，多肽將被純化：(1)至足以藉由使用旋杯式定序儀獲得N末端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度；或(2)至藉由SDS-PAGE在非還原或還原條件下使用考馬斯藍或較佳銀染色得知之均質性。分離之多肽包括重組細胞內之原位多肽，此係因為FcRH5多肽自然環境中之至少一個組分將不會存在。然而，通常將藉由至少一個純化步驟來製備分離之多肽。

「分離之」編碼FcRH5多肽之核酸或編碼另一多肽之核酸為已鑑別且與至少一種污染核酸分子分離的核酸分子，在編碼多肽之核酸的天然來源中，其通常與該至少一種污染核酸分子結合。分離之編碼多肽之核酸分子不為自然界中其所存在之形式或不處於自然界中其所存在之環境中。因此，分離之編碼多肽之核酸分子不同於天然細胞中所存在之編碼多肽之特定核酸分子。然而，分離之編碼多肽之核酸分子包括通常表現該多肽之細胞中所含的編碼多肽的核酸分子，其中例如核酸分子處於不同於天然細胞中之染色體位置。

術語「控制序列」係指在特定宿主生物體中表現可操作地連接之編碼序列所需的DNA序列。適合於原核生物之控制序列例如包括啟動子，視情況存在之操縱子序列及核糖體結合位點。已知真核細胞利用啟動子、聚腺苷酸化信號及增強子。

當使核酸與另一核酸序列呈一種功能關係時，其經「可操作地連接」。舉例而言，若前序列或分泌前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前蛋白，則其可操作地連接於該多肽之DNA；若啟動子或增強子影響編碼序列之轉錄，則其可操作地連接於該序列；或若核糖體結合位點定位成可有助於轉譯，則其可操作地連接於編碼序列。一般而言，「可操作地連接」意謂所連接之DNA序列為相鄰的，且在分泌前導序列的情況下為相鄰的且在閱讀相(reading phase)中。然而，增強子不必為相鄰的。藉由在適當限制

性位點處接合來連接。若該等位點不存在，則根據習知實踐使用合成之寡核苷酸接頭(adaptor)或連接子。

雜交反應之「嚴格度」可易於由一般技術者確定，且一般為視探針長度、洗滌溫度及鹽濃度而定的經驗計算值。一般而言，較長探針需要較高溫度進行適當黏接，而較短探針需要較低溫度。雜交一般取決於變性DNA當互補股存在於低於其熔融溫度之環境中時再黏接之能力。探針與可雜交序列之間的所需同源性程度愈高，可使用之相對溫度愈高。因此可見，較高相對溫度將趨向於使反應條件更嚴格，而較低溫度則趨向於使反應條件不太嚴格。雜交反應嚴格度之其他詳情及說明參見Ausubel等人**Current Protocols in Molecular Biology**, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

如本文所定義之「嚴格條件」或「高嚴格度條件」可由以下條件鑑別：(1)採用低離子強度及高溫進行洗滌，例如0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉，在50℃下；(2)雜交期間在42℃下採用變性劑(諸如甲醯胺，例如50%(v/v)甲醯胺)以及0.1%牛血清白蛋白/0.1%聚蔗糖(Ficoll)/0.1%聚乙烯吡咯啶酮/50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)以及750 mM氯化鈉、75 mM檸檬酸鈉；或(3)在42℃下在採用50%甲醯胺、5×SSC(0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5×登哈特氏溶液(Denhardt's solution)、經音波處理鮭魚精子DNA(50 μg/ml)、0.1% SDS及10%硫酸聚葡萄糖之溶液中

雜交隔夜，且在42℃下用0.2×SSC(氯化鈉/檸檬酸鈉)洗滌10分鐘，繼而在55℃下用由含EDTA之0.1×SSC組成的高嚴格度洗滌液洗滌10分鐘。

「中等嚴格條件」可如Sambrook等人**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989所述鑑別，且包括使用相較於上述洗滌溶液及雜交條件(例如溫度、離子強度及%SDS)不太嚴格之洗滌溶液及雜交條件。中等嚴格條件之一實例為在37℃下在包含以下之溶液中培育隔夜：20%甲醯胺、5×SSC(150 mM NaCl、15 mM檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5×登哈特氏溶液、10%硫酸葡聚糖及20 mg/ml變性經剪切鮭魚精子DNA，繼而在約37-50℃下用1×SSC洗滌濾膜。熟習此項技術者將瞭解如何視需要調節溫度、離子強度等以適應諸如探針長度及其類似因素的因素。

術語「經標記抗原決定基」當在本文中使用時係指包含融合於「標籤多肽」的FcRH5多肽或抗FcRH5抗體的嵌合多肽。標籤多肽具有足夠殘基以提供如下抗原決定基，其中可針對該抗原決定基製備抗體，然而仍足夠短以使其不會干擾其所融合之多肽的活性。標籤多肽較佳亦極其獨特，使得抗體實質上不會與其他抗原決定基交叉反應。適合之標籤多肽一般具有至少六個胺基酸殘基，且通常約8個至50個胺基酸殘基(較佳約10個至20個胺基酸殘基)。

出於本文之目的之「活性的」或「活性」係指FcRH5多肽之形式保留天然或天然存在之FcRH5的生物及/或免疫活

性，其中「生物」活性係指由天然或天然存在之FcRH5引起的生物學功能(抑制或刺激)，而非針對天然或天然存在之FcRH5所具有之抗原性抗原決定基誘發抗體產生之能力，且「免疫學」活性係指針對天然或天然存在之FcRH5所具有之抗原性抗原決定基誘發抗體產生之能力。

術語「拮抗劑」在最廣泛意義上使用，且包括部分或完全阻斷、抑制或中和天然FcRH5多肽之生物活性的任何分子。以類似之方式，術語「促效劑」在最廣泛意義上使用，且包括模擬天然FcRH5多肽之生物活性的任何分子。適合之促效劑或拮抗劑分子特別包括促效或拮抗抗體或抗體片段、天然FcRH5多肽之片段或胺基酸序列變異體、肽、反義寡核苷酸、小有機分子等。鑑別FcRH5多肽之促效劑或拮抗劑的方法可包含使FcRH5多肽與候選促效劑或拮抗劑分子接觸，及測量通常與FcRH5多肽相關之一或多個生物活性的可偵測變化。

「純化之」意謂分子以含有其之樣品的至少95重量%或至少98重量%之濃度存在於該樣品中。

「分離之」核酸分子為如下核酸分子，其與例如在其自然環境中通常所結合之至少一種其他核酸分子分離。分離之核酸分子另外包括在通常表現該核酸分子之細胞中所含的核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於不同於其天然染色體位置之染色體位置處。

本文所用之術語「載體」意欲指能夠輸送所連接之另一核酸的核酸分子。一類載體為「質體」，其係指可接合其

他DNA區段之環狀雙股DNA。另一類載體為噬菌體載體。另一類載體為病毒載體，其中其他DNA區段可接合於病毒基因組中。某些載體能夠於引入其之宿主細胞中自主複製(例如具有細菌複製起點之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其他載體(例如非游離型哺乳動物載體)可在引入宿主細胞之後整合於宿主細胞基因組中且從而與宿主基因組一起複製。此外，某些載體能夠引導與其操作性連接之基因的表現。該等載體在本文中稱作「重組表現載體」(或簡稱為「重組載體」)。一般而言，可用於重組DNA技術中之表現載體通常為質體之形式。由於質體為載體之最常用形式，故在本說明書中，「質體」與「載體」可互換使用。

如本文中可互換使用之「聚核苷酸」或「核酸」係指任何長度之核苷酸之聚合物且包括DNA及RNA。核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼基及/或其類似物，或可藉由DNA或RNA聚合酶或藉由合成反應併入聚合物中之任何受質。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。若存在，則可在組裝聚合物之前或之後對核苷酸結構進行修飾。核苷酸之序列中可間雜有非核苷酸組分。聚核苷酸可在合成之後諸如藉由與標記結合而進一步修飾。其他類型之修飾包括例如，一或多種天然存在之核苷酸用類似物「帽」取代；核苷酸間修飾，諸如具有不帶電鍵(例如膦酸甲酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯(phosphoamidate)、胺基甲酸酯等)之修飾及具

有帶電鍵(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)之修飾、含有懸垂部分(諸如蛋白質(例如核酸酶、毒素、抗體、信號肽、ply-L-離胺酸等)之修飾、具有嵌入劑(例如吖啶、補骨脂素(psoralen)等)之修飾、含有螯合劑(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)之修飾、含有烷化劑之修飾、具有經修飾之鍵(例如α變旋異構核酸等)之修飾以及聚核苷酸之未修飾形式。此外，通常存在於糖中之任何羥基均可例如經膦酸酯基、磷酸酯基置換，經標準保護基保護或經活化以製備與其他核苷酸之其他鍵；或可與固體或半固體支撐物結合。5'及3'末端OH可經磷酸化或經具有1至20個碳原子之胺或有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生為標準保護基。聚核苷酸亦可含有此項技術中一般已知之核糖或去氧核糖的類似形式，其包括例如2'-O-甲基-核糖、2'-O-烯丙基-核糖、2'-氟-核糖或2'-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、α-變旋異構糖、差向異構糖(諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖、哌喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖)、非環狀類似物及鹼性核苷類似物(諸如甲基核糖苷)。一或多個磷酸二酯鍵可經替代性鍵基團置換。此等替代性鍵基團包括(但不限於)磷酸酯經P(O)S(「硫代酸酯」)、P(S)S(「二硫代酸酯」)、(O)NR_2(「醯胺化物」)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH_2(「甲縮醛」)置換的實施例，其中各R或R'獨立地為H或視情況含有醚(-O-)鍵、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基(araldyl)之經取代或未經取代的烷基(1-20 C)。無需聚核苷酸中之所有鍵均一致。

上述描述適用於本文中所提及之所有聚核苷酸，包括RNA及DNA。

如本文所用之「寡核苷酸」一般係指一般單股、一般合成之短聚核苷酸，其長度一般(但未必)小於約200個核苷酸。術語「寡核苷酸」及「聚核苷酸」並不互相排斥。上文對於聚核苷酸之描述同樣且完全適用於寡核苷酸。

術語「癌症」及「癌性」係指或描述哺乳動物中通常以不受調控之細胞生長為特徵之生理狀況。癌症之實例包括(但不限於)造血系統癌症或血液相關之癌症，諸如淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴惡性病症，以及脾之癌症及淋巴結之癌症，以及癌瘤、胚細胞瘤及肉瘤。癌症之更特定實例包括B細胞相關之癌症，包括例如高度、中度及低度淋巴瘤(包括B細胞淋巴瘤，諸如黏膜相關淋巴組織B細胞淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、套細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、小淋巴細胞性淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、彌漫性大細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)，及T細胞淋巴瘤)及白血病(包括繼發性白血病、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)(諸如B細胞白血病(CD5+ B淋巴細胞))、骨髓性白血病(諸如急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病)、淋巴細胞性白血病(諸如急性淋巴母細胞白血病(ALL))及脊髓發育不良)及其他血液及/或B細胞或T細胞相關之癌症。亦包括其他造血細胞之癌症，該等其他造血細胞包括多型核白血球(諸如嗜鹼性球、嗜伊紅血球、嗜中性白血球及單核

細胞)、樹突狀細胞、血小板、紅血球及自然殺手細胞。亦包括選自以下之癌性B細胞增殖病症：淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。B細胞癌症之來源包括如下：來源於邊緣區中之記憶B細胞的邊緣區B細胞淋巴瘤、來源於生髮中心亮區中之中心細胞的濾泡性淋巴瘤及彌漫性大B細胞淋巴瘤、來源於B1細胞(CD5+)之慢性淋巴細胞性白血病及小淋巴細胞性白血病、來源於套區中之天然B細胞的套細胞淋巴瘤及來源於生髮中心暗區中之中心母細胞的伯基特氏淋巴瘤。在本文中稱作「造血細胞組織」的包括造血細胞之組織包括胸腺及骨髓及周邊淋巴組織，諸如脾、淋巴結、與黏膜相關之淋巴組織(諸如消化道相關之淋巴組織、扁桃體、皮爾氏斑(Peyer's patch)及闌尾)及與其他黏膜(例如支氣管內層)相關之淋巴組織。該等癌症之其他特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌、胰腺癌、神經膠質瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝腫瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌(liver cancer)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病及其他淋巴細胞增殖病症及各類頭頸癌。

本文之「B細胞惡性病症」包括非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)，包括低度/濾泡性NHL、小淋巴細胞性(SL)NHL、中度/濾泡性NHL、中度彌漫性NHL、高度免疫胚細胞性NHL、高度淋巴胚細胞性NHL、高度小型無裂細胞NHL、塊狀病性NHL、套細胞淋巴瘤、AIDS相關之淋巴瘤及華氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、淋巴細胞為主型霍奇金氏症(Hodgkin's disease)(LPHD)、小淋巴細胞性淋巴瘤(SLL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、惰性NHL(包括復發性惰性NHL及利妥昔單抗(rituximab)難治性惰性NHL)；白血病，包括急性淋巴胚細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、毛細胞白血病、慢性骨髓胚細胞性白血病；套細胞淋巴瘤；及其他血液惡性病症。該等惡性病症可用針對B細胞表面標記(諸如FcRH5)之抗體治療。本文中預期該等疾病可藉由投與針對B細胞表面標記(諸如FcRH5)之抗體治療，且該抗體投與包括投與未結合之(「裸」)抗體或結合於本文所揭示之細胞毒性劑的抗體。本文中亦預期該等疾病可藉由組合療法治療，該組合療法包括本發明之抗FcRH5抗體或抗FcRH5抗體藥物結合物以及同時或依次投與之另一抗體或抗體藥物結合物、另一細胞毒性劑、輻射或其他療法。在本發明之例示性療法中，本發明之抗FcRH5抗體與抗CD20抗體、免疫球蛋白或其CD20結合片段組合同時或依次投與。抗CD20抗體可為裸抗體或抗體藥物結合物。在組合療法之一實施例中，抗FcRH5抗體為本發明之抗體

且抗CD20抗體為Rituxan®(利妥昔單抗)。

本文所用之術語「非霍奇金氏淋巴瘤」或「NHL」係指淋巴系統之不為霍奇金氏淋巴瘤的癌症。霍奇金氏淋巴瘤與非霍奇金氏淋巴瘤可能一般因霍奇金氏淋巴瘤中存在里-斯二氏細胞(Reed-Sternberg cell)且非霍奇金氏淋巴瘤中無該等細胞而不同。本文所用之術語涵蓋的非霍奇金氏淋巴瘤的實例包括熟習此項技術者(例如腫瘤學家或病理學家)根據此項技術中已知之分類方案(諸如Color Atlas of Clinical Hematology (第3版)，A. Victor Hoffbrand及John E. Pettit (編) (Harcourt Publishers Ltd., 2000)中所述之修正之歐美淋巴瘤(Revised European-American Lymphoma，REAL)方案)鑑別為非霍奇金氏淋巴瘤的任一者。詳言之，參見圖11.57、11.58及11.59中之清單。更特定實例包括(但不限於)復發性或難治性NHL、一線低度NHL、III/IV期NHL、化學療法抗性NHL、前驅B淋巴胚細胞性白血病及/或淋巴瘤、小淋巴細胞性淋巴瘤、B細胞慢性淋巴細胞性白血病及/或前淋巴細胞性白血病及/或小淋巴細胞性淋巴瘤、B細胞前淋巴細胞性淋巴瘤、免疫細胞瘤及/或淋巴漿細胞性淋巴瘤、淋巴漿細胞性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤、淋巴結外邊緣區-MALT淋巴瘤、淋巴結邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病、漿細胞瘤及/或漿細胞骨髓瘤、低度/濾泡性淋巴瘤、中度/濾泡性NHL、套細胞淋巴瘤、濾泡中心淋巴瘤(濾泡性)、中度彌漫性NHL、彌漫性大B細胞淋巴瘤、侵襲性NHL(包括侵襲性一線NHL

及侵襲性復發性NHL)、自體幹細胞移植之後復發之NHL或自體幹細胞移植難治性NHL、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、高度免疫胚細胞性NHL、高度淋巴胚細胞性NHL、高度小型無裂細胞NHL、塊狀病性NHL、伯基特氏淋巴瘤、前驅(周邊)大顆粒淋巴細胞性白血病、蕈樣真菌病及/或賽謝症候群(Sezary syndrome)、皮膚淋巴瘤、多形性大細胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤。

漿細胞病症係由漿細胞純系不受控制之分裂或繁殖所致。漿細胞產生自活化之B淋巴細胞(亦即B細胞)。各B細胞產生排列於其細胞表面上特異於外來物質(亦即抗原)之獨特受體(稱作B細胞受體)。當B細胞受體結合其同源抗原時，表現該受體之細胞經活化而再進入細胞週期，從而自行產生多個純系複本。該等純系成熟為漿細胞，該等漿細胞主要存在於骨髓中且專門產生B細胞受體之複本，該等複本釋放於血流中作為抗體。在漿細胞病症中，漿細胞或親本B細胞遭受遺傳損傷，導致抑制對細胞分裂及/或活性之正常約束或對該等正常約束不敏感。源自該等細胞之子漿細胞因可不受抑止地分裂及/或產生過量相同免疫球蛋白(抗體)而為惡性細胞。通常，所產生之免疫球蛋白為不完整的，或具有錯誤構形，此可導致血清、組織或器官(尤其腎)中積累該蛋白質(視特定病症而定亦稱作單株蛋白、M蛋白、副蛋白或澱粉樣蛋白)，從而引起器官功能障礙及/或衰竭。漿細胞病症包括意義未明之單株球蛋白症(MGUS)、多發性骨髓瘤(MM)、巨球蛋白血症、重鏈病及

全身性輕鏈澱粉樣變性病(AL)，其基於純系之增殖性質、涉及骨髓之程度及所表現M蛋白之類型區分。其他漿細胞病症為孤立性漿細胞瘤、髓外漿細胞瘤、多發性孤立性漿細胞瘤、漿細胞白血病、華氏巨球蛋白血症、B細胞非霍奇金氏淋巴瘤、B細胞慢性淋巴細胞性白血病。儘管新免疫療法(諸如利妥昔單抗及阿侖單抗(alemtuzumab))在一些B細胞惡性病症中具有改良之無病存活及總存活，但在治療漿細胞病症中該等療法尚未證實有效，部分因為惡性純系漿細胞不能充分表現標靶抗原(分別為CD20及CD52)。因此，需要鑑別且開發改良之漿細胞病症療法(參見美國公開申請案第20080166742號及第20080317745號，該等申請案各以全文引用的方式併入本文中)。

先前已展示B細胞、漿細胞及多發性骨髓瘤細胞(包括來自MM患者樣品之細胞)上表現FcRH5(IRTA2)。(參見美國公開申請案第20060251662號，該申請案以全文引用的方式併入本文中)。因此，根據多發性骨髓瘤樣品中之FcRH5表現模式，該分子為哺乳動物之腫瘤(包括漿細胞病症，諸如本文所述之漿細胞病症(亦即多發性骨髓瘤))及與抗體分泌相關之疾病(諸如過敏症或自體免疫疾病)之療法的極佳標靶。

「病症」為任何將受益於用本發明之物質/分子或方法治療的病狀。其包括慢性及急性病症或疾病，包括易於使哺乳動物患所述病症的病理學病狀。在本文中欲治療病症之非限制性實例包括癌性病狀，諸如惡性及良性腫瘤；非

白血病及淋巴惡性病症；神經元、膠質、星形膠質細胞(astrocytal)、下丘腦及其他腺體、巨噬細胞、上皮、基質及囊胚腔病症；及發炎性、免疫學及其他血管生成相關病症。病症另外包括以下癌性病狀：諸如B細胞增殖病症及/或B細胞腫瘤，例如淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

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

如本文所用之「腫瘤」係指所有贅生性細胞生長及增殖(無論惡性或良性)，及所有癌前及癌性細胞及組織。

本文之「自體免疫疾病」為產生自且針對個體自身組織或器官之疾病或病症或其共分離系(co-segregate)或表現形式或其所致病狀。在許多此等自體免疫及發炎病症中，可存在諸多臨床及實驗室標記，包括(但不限於)高γ球蛋白血症、高含量之自體抗體、組織中由皮質類固醇或免疫抑制療法所致之抗原-抗體複合物沈積及受影響組織中之淋巴樣細胞凝集物。在不受限於關於B細胞介導之自體免疫疾病的任一理論之情況下，咸信B細胞經由多種機械途徑(mechanistic pathway)顯示在人類自體免疫疾病中之病原作用，該等途徑包括自體抗體產生、免疫複合物形成、樹

突狀細胞及T細胞活化、細胞激素合成、直接趨化因子釋放且為異位新淋巴生成提供病灶。此等路徑各自可以不同程度參與自體免疫疾病之病理學。

「自體免疫疾病」可為器官特異性疾病(亦即免疫反應特異性針對器官系統，諸如內分泌系統、造血系統、皮膚、心肺系統、胃腸及肝系統、腎系統、甲狀腺、耳、神經肌肉系統、中樞神經系統等)或可影響多個器官系統之全身性疾病(例如全身性紅斑狼瘡(SLE)、類風濕性關節炎、多肌炎等)。較佳該等疾病包括自體免疫性風濕病(諸如類風濕性關節炎、休格連氏症候群(Sjögren's syndrome)、硬皮病、狼瘡(諸如SLE及狼瘡性腎炎)、多肌炎/皮肌炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗體症候群及牛皮癬性關節炎)、自體免疫性胃腸及肝病(諸如發炎性腸道疾病(例如潰瘍性結腸炎及克羅恩氏症(Crohn's disease))、自體免疫性胃炎及惡性貧血、自體免疫性肝炎、原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎及乳糜瀉)、血管炎(諸如ANCA陰性血管炎及ANCA相關血管炎，包括邱-斯氏血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、韋格納氏肉芽腫(Wegener's granulomatosis)及顯微性多血管炎)、自體免疫性神經病(諸如多發性硬化症、斜視眼陣攣(opsoclonus)肌陣攣症候群、重症肌無力、視神經脊髓炎、帕金森氏症(Parkinson's disease)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease)及自體免疫性多神經病變)、腎病(諸如腎小球腎炎、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)及貝格爾氏症(Berger's disease))、自體免疫性皮

膚病(諸如牛皮癬、蕁麻疹、風疹(hives)、尋常天疱瘡、大皰性類天疱瘡及皮膚紅斑狼瘡)、血液病(諸如血小板減少性紫癜、血栓性血小板減少性紫癜、輸血後紫癜及自體免疫性溶血性貧血)、動脈粥樣硬化、葡萄膜炎、自體免疫性聽力疾病(諸如內耳病及喪失聽力)、白塞氏症(Behcet's disease)、雷諾氏症候群(Raynaud's syndrome)、器官移植及自體免疫性內分泌病(諸如糖尿病相關之自體免疫疾病，諸如胰島素依賴性糖尿病(IDDM)、阿狄森氏症(Addison's disease)及自體免疫性甲狀腺病(例如格雷氏症(Graves' disease)及甲狀腺炎))。更佳該等疾病包括例如類風濕性關節炎、潰瘍性結腸炎、ANCA相關之血管炎、狼瘡、多發性硬化症、休格連氏症候群、格雷氏症、IDDM、惡性貧血、甲狀腺炎及腎小球腎炎。

如本文所定義之其他自體免疫疾病(其在一些情況下涵蓋上述自體免疫疾病)之特定實例包括(但不限於)關節炎(急性及慢性關節炎，類風濕性關節炎(包括青少年類風濕性關節炎)及以下各期，諸如類風濕性滑膜炎、痛風或痛風性關節炎、急性免疫性關節炎、慢性發炎性關節炎、變性關節炎、II型膠原誘發性關節炎、傳染性關節炎、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、增生性關節炎、牛皮癬性關節炎、斯蒂爾氏症(Still's disease)、脊椎關節炎、骨關節炎、慢性漸進性關節炎、變形性關節炎、慢性原發性多關節炎、反應性關節炎、絕經期關節炎、雌激素耗竭性關節炎及僵直性脊椎炎/類風濕性脊椎炎)；自體免疫性淋巴細

胞增殖病；發炎性過度增殖皮膚病；牛皮癬，諸如斑塊牛皮癬、滴狀牛皮癬(gutatte psoriasis)、膿皰型牛皮癬及指甲牛皮癬；異位性(atopy)，包括異位性疾病，諸如枯草熱及喬布氏症候群(Job's syndrome)；皮炎，包括接觸性皮炎、慢性接觸性皮炎、剝落性皮炎、過敏性皮炎、過敏性接觸性皮炎、風疹、疱疹樣皮炎、錢幣狀皮炎、脂溢性皮炎、非特異性皮炎、原發性刺激物接觸性皮炎及異位性皮炎；x聯高IgM症候群(x-linked hyper IgM syndrome)；過敏性眼內發炎疾病；蕁麻疹，諸如慢性過敏性蕁麻疹及慢性特發性蕁麻疹，包括慢性自體免疫性蕁麻疹；肌炎；多肌炎/皮肌炎；青少年皮肌炎；中毒性表皮壞死溶解；硬皮病(包括全身性硬皮病)；硬化，諸如全身性硬化症、多發性硬化症(MS)(諸如脊髓-眼MS(spino-optical MS)、原發性進行性MS(PPMS)及復發緩解性MS(RRMS))、進行性全身性硬化、動脈粥樣硬化、動脈硬化、播散性硬化(sclerosis disseminata)、共濟失調性硬化、視神經脊髓炎(NMO)；發炎性腸道疾病(IBD)(例如克羅恩氏症、自體免疫介導之胃腸病、胃腸發炎、結腸炎(諸如潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis、colitis ulcerosa)、顯微性結腸炎、膠原性結腸炎、息肉狀結腸炎、壞死性小腸結腸炎及透壁性結腸炎)及自體免疫發炎性腸道疾病)；腸發炎；壞疽性膿皮病；結節性紅斑；原發性硬化性膽管炎；呼吸窘迫症候群(包括成年或急性呼吸窘迫症候群(ARDS))；腦膜炎；葡萄膜之全部或部分發炎；虹膜炎；脈絡膜炎；自體免疫性血液

病症；移植物抗宿主病；血管性水腫，諸如遺傳性血管性水腫；腦神經損傷，如腦膜炎中之腦神經損傷；妊娠疱疹；妊娠性類天疱瘡；陰囊瘙癢(pruritis scroti)；自體免疫性卵巢早衰；因自體免疫病狀所致之突發性失聰；IgE介導之疾病，諸如全身性過敏反應及過敏性及異位性鼻炎；腦炎，諸如拉斯姆森氏腦炎(Rasmussen's encephalitis)及邊緣及/或腦幹性腦炎)；葡萄膜炎，諸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽腫性葡萄膜炎、非肉芽腫性葡萄膜炎、晶狀體抗原性葡萄膜炎、後葡萄膜炎或自體免疫葡萄膜炎；有或無腎病症候群之腎小球腎炎(GN)，諸如慢性或急性腎小球腎炎，諸如原發性GN、免疫介導之GN、膜性GN(膜性腎病變)、特發性膜性GN或特發性膜性腎病變、膜增生性GN(MPGN)(包括I型及II型)及快速進行性GN(RPGN)；增生性腎炎；自體免疫多腺內分泌功能衰竭；龜頭炎，包括侷限性漿細胞性龜頭炎(balanitis circumscripta plasmacellularis)、龜頭包皮炎；遠心性環形紅斑；持久性色素障礙性紅斑；多形紅斑；環狀肉芽腫；光澤苔癬；硬化萎縮性苔癬；慢性單純性苔癬；小棘苔蘚；扁平苔癬；板層狀魚鱗病；表皮鬆解性角化過度症；惡變前角化病；壞疽性膿皮病；過敏病狀及反應；食物過敏；藥物過敏；昆蟲過敏；罕見過敏病症，諸如肥大細胞增多症；過敏反應；濕疹，包括過敏性或異位性濕疹、皮脂缺乏性濕疹、出汗障礙性濕疹及水皰樣掌蹠濕疹；哮喘，諸如支氣管哮喘(asthma bronchiale、bronchial

asthma)及自體免疫性哮喘；涉及T細胞浸潤及慢性發炎反應之病狀；針對外來抗原(諸如妊娠期間之胎兒A-B-O血型)之免疫反應；慢性肺發炎疾病；自體免疫性心肌炎；白血球黏附缺陷病；狼瘡，包括狼瘡性腎炎、狼瘡性大腦炎、兒童狼瘡、非腎性狼瘡、腎外狼瘡、盤狀狼瘡及盤狀紅斑狼瘡、脫髮性狼瘡、SLE(諸如皮膚SLE或亞急性皮膚SLE)、新生兒狼瘡症候群(NLE)及播散性紅斑狼瘡；青少年發作型(I型)糖尿病，包括兒童IDDM；成年發作型糖尿病(II型糖尿病)；自體免疫性糖尿病；特發性尿崩症；糖尿病性視網膜病變；糖尿病性腎病變；糖尿病性結腸炎；糖尿病性大動脈病；與由細胞激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發性過敏反應相關的免疫反應；結核病；類肉瘤病；肉芽腫，包括淋巴瘤樣肉芽腫；顆粒性球缺乏症；血管炎(包括大血管血管炎(諸如風濕性多肌痛及巨細胞(高安氏(Takayasu's))動脈炎)、中血管炎(諸如川崎氏症(Kawasaki's disease)及結節性多動脈炎/結節性動脈周炎)、免疫血管炎、CNS血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、壞死性血管炎(諸如類纖維蛋白壞死性血管炎及全身性壞死性血管炎)、ANCA陰性血管炎及ANCA相關之血管炎(諸如謝格-司托司症候群(Churg-Strauss syndrome，CSS)、韋格納氏肉芽腫及顯微性多血管炎)；顳動脈炎；再生障礙性貧血；自體免疫性再生障礙性貧血；庫姆陽性貧血(Coombs positive anemia)；戴-布二氏貧血(Diamond Blackfan anemia)；溶血性貧血或免疫性溶血性貧血(包括

自體免疫性溶血性貧血(AIHA))；惡性貧血(pernicious anemia、anemia perniciosa)；阿狄森氏症(Addison's disease)；純紅血球貧血或發育不全(PRCA)；因子VIII缺乏；A型血友病；自體免疫性嗜中性白血球減少症；血細胞減少症，諸如全部血球減少症、白血球減少症、涉及白血球滲出之疾病；CNS發炎性病症；阿茲海默氏症；帕金森氏症；多器官損傷症候群，諸如敗血病、創傷或出血繼發之疾病；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜病；抗磷脂抗體症候群；運動神經炎(motoneuritis)；過敏性神經炎；白塞氏症/症候群；卡斯特門氏症候群(Castleman's syndrome)；古巴士德氏症候群；雷諾氏症候群；休格連氏症候群；史蒂芬-強森症候群(Stevens-Johnson syndrome)；類天疱瘡或天疱瘡，諸如大皰性類天疱瘡、瘢痕性(黏膜)類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常天疱瘡、副腫瘤天疱瘡、落葉型天疱瘡、天疱瘡性黏膜類天疱瘡(pemphigus mucus-membrane pemphigoid)及紅斑性天疱瘡；後天性大皰性表皮鬆解；眼發炎，較佳過敏性眼發炎，諸如過敏性結膜炎、線狀IgA大皰病、自體免疫誘發之結膜發炎；自體免疫性多內分泌病變；雷特氏症(Reiter's disease)或症候群；因自體免疫病狀所致之熱損傷；先兆子癇；免疫複合物病症，諸如免疫複合物性腎炎；抗體介導之腎炎；神經發炎性病症；多發性神經病變；慢性神經病變，諸如IgM多發性神經病變或IgM介導之神經病變；血小板減少症(如例如心肌梗塞患者產生之

血小板減少症)，包括血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、輸血後紫癜(PTP)、肝素誘發之血小板減少症及自體免疫或免疫介導之血小板減少症(包括例如特發性血小板減少性紫癜(ITP)，包括慢性或急性ITP)；鞏膜炎，諸如特發性角膜鞏膜炎、上鞏膜炎；睪丸及卵巢之自體免疫疾病，包括自體免疫性睪丸炎及卵巢炎；原發性甲狀腺功能低下；副甲狀腺機能減退症；自體免疫性內分泌疾病，包括甲狀腺炎，諸如自體免疫性甲狀腺炎、橋本氏症(Hashimoto's disease)、慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis))或亞急性甲狀腺炎；自體免疫性甲狀腺病；特發性甲狀腺功能低下；格雷氏症；格雷氏眼病(眼病變或甲狀腺相關眼病變)；多腺症候群，諸如自體免疫性多腺症候群，例如I型(或多腺內分泌病變症候群)；腫瘤形成徵兆症候群，包括神經性腫瘤形成徵兆症候群，諸如蘭伯特-伊頓肌無力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)或伊頓-蘭伯特症候群(Eaton-Lambert syndrome)、僵人症候群；腦脊髓炎，諸如過敏性腦脊髓炎(allergic encephalomyelitis或encephalomyelitis allergica)及實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)；重症肌無力，諸如胸腺瘤相關之重症肌無力；小腦變性；神經性肌強直；斜視眼陣攣或斜視眼陣攣肌陣攣症候群(OMS)及感覺神經病變；多灶性運動神經病變；席漢氏症候群(Sheehan's syndrome)；自體免疫性肝炎；慢性肝炎；狼瘡樣肝炎；巨細胞肝炎；慢性活動性肝炎或自體免疫性慢性活動性肝炎；肺炎，諸如淋巴

樣間質性肺炎(LIP)；閉塞性細支氣管炎(非移植)與NSIP；格林-巴氏症候群(Guillain-Barré syndrome)；貝格爾氏症(IgA腎病變)；特發性IgA腎病變；線狀IgA皮膚病；急性發熱性嗜中性皮膚病；角膜下膿皰皮膚病；暫時性棘層鬆解性皮膚病；硬化，諸如原發性膽汁性肝硬化及肺硬化；自體免疫性腸病變症候群；乳糜瀉或腹腔病；口炎性腹瀉(麩質腸病變)；難治性口炎性腹瀉；特發性口炎性腹瀉；冷球蛋白血症，諸如混合型冷球蛋白血症；肌肉萎縮性側索硬化(ALS；魯葛瑞格氏症(Lou Gehrig's disease))；冠狀動脈病；自體免疫性耳病，諸如自體免疫性內耳病(AIED)、自體免疫性失聽；多軟骨炎，諸如難治性或復發性或復發性多軟骨炎；肺泡性蛋白沉著症；角膜炎，諸如科幹氏症候群(Cogan's syndrome)/非梅毒間質性角膜炎；貝爾氏麻痺(Bell's palsy)；斯維特氏症(Sweet's disease)/症候群；自體免疫性紅斑痤瘡；帶狀疱疹相關之疼痛；澱粉樣變性病；非癌性淋巴細胞增多；原發性淋巴細胞增多，其包括單株B細胞淋巴細胞增多(例如良性單株球蛋白症及意義未明之單株球蛋白症，MGUS)；周邊神經病變；腫瘤形成徵兆症候群；通道病變，諸如癲癇症、偏頭痛、心律不整、肌肉性病症、聾、失明、週期性麻痺及CNS之通道病變；自閉症；發炎性肌病變；局灶性或節段性或局灶節段性腎小球硬化(FSGS)；內分泌眼病變；葡萄膜視網膜炎；脈絡膜視網膜炎；自體免疫性血液病；肌肉纖維疼痛；多發性內分泌不足；施密特氏症候群(Schmidt's

syndrome)；腎上腺炎；胃萎縮；早老性癡呆；脫髓鞘疾病，諸如自體免疫性脫髓鞘疾病及慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病變；德雷斯勒氏症候群(Dressler's syndrome)；斑形脫髮；全禿；CREST症候群(鈣質沉著症、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、食道蠕動異常、指硬皮病及毛細血管擴張)；例如因抗精子抗體所致之男性及女性自體免疫性不孕症；混合型結締組織疾病；恰加斯氏症(Chagas' disease)；風濕熱；反覆流產；農民肺(farmer's lung)；多形性紅斑；心臟切開術後症候群；庫興氏症候群(Cushing's syndrome)；養鳥人肺(bird-fancier's lung)；過敏性肉芽腫性血管炎；良性淋巴細胞性血管炎；阿爾波特氏症候群(Alport's syndrome)；肺泡炎，諸如過敏性肺泡炎及纖維化肺泡炎；間質性肺病；輸血反應；麻風；瘧疾；寄生性疾病，諸如利什曼體病(leishmaniasis)、錐蟲病(kypanosomiasis)、血吸蟲病、蛔蟲病、麴黴病；薩姆特氏症候群(Sampter's syndrome)；卡普蘭氏症候群(Caplan's syndrome)；登革熱(dengue)；心內膜炎；心內膜心肌纖維化；彌漫性間質性肺纖維化；肺間質性纖維化；纖維性縱隔炎；肺纖維化；特發性肺纖維化；囊腫性纖維化；內眼炎；持久性隆起性紅斑(erythema elevatum et diutinum)；胎性紅血球胚細胞症；嗜伊紅血球筋膜炎；舒爾曼氏症候群(Shulman's syndrome)；費爾提氏症候群(Felty's syndrome)；絲蟲病(flariasis)；睫狀體炎，諸如慢性睫狀體炎、異色性睫狀體炎(heterochronic cyclitis)、虹膜睫狀體炎(急性或慢

性)或弗齊氏睫狀體炎(Fuch's cyclitis)；亨-舍二氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)；人類免疫缺乏病毒(HIV)感染；SCID；後天性免疫缺乏症候群(AIDS)；埃可病毒感染(echovirus infection)；敗血症(全身性發炎性反應症候群(SIRS))；內毒素血症；胰腺炎；甲狀腺毒症(thyroxicosis)；小病毒感染；風疹病毒感染；疫苗接種後症候群；先天性風疹感染；愛巴病毒感染；腮腺炎；伊萬氏症候群(Evan's syndrome)；自體免疫性性腺衰竭；西德納姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)；鏈球菌感染後之腎炎；閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis ubiterans)；甲狀腺毒症；脊髓癆；脈絡膜炎；巨細胞多肌痛；慢性過敏性肺炎；結膜炎，諸如春季黏膜炎(vernal catarrh)、乾燥性角膜結膜炎及流行性角膜結膜炎；特發性腎炎症候群；微小病變性腎病變；良性家族性及缺血再灌注損傷；移植器官再灌注；視網膜自體免疫；關節發炎；支氣管炎；慢性阻塞性氣管/肺病；矽肺病；口瘡；口瘡性口炎；動脈硬化性病症(大腦血管機能不全)，諸如動脈硬化性腦病及動脈硬化性視網膜病變；精子無法形成；自體免疫性溶血；伯克氏症(Boeck's disease)；冷球蛋白血症；杜普宜特朗氏攣縮(Dupuytren's contracture)；晶狀體過敏性眼內炎(endophthalmia phacoanaphylactica)；過敏性腸炎；麻風結節性紅斑；特發性面神經麻痺；慢性疲勞症候群；風濕熱；哈-瑞二氏病(Hamman-Rich's disease)；感音神經性失聽(sensoneural hearing loss)；陣發性血紅素尿；性腺低能

症；區域性回腸炎(ileitis regionalis)；白血球減少症；傳染性單核細胞增多症；橫貫性脊髓炎；原發性特發性黏液水腫；腎病；眼炎交感神經性眼炎(ophthalmia symphatica，sympathetic ophthalmitis)；新生兒眼炎；視神經炎；肉芽腫性睪丸炎；胰腺炎；急性多神經根炎；壞疽性膿皮病；奎凡氏甲狀腺炎(Quervain's thyreoiditis)；後天性脾萎縮；非惡性胸腺瘤；淋巴濾泡性胸腺炎；白斑症；中毒性休克症候群；食物中毒；涉及T細胞浸潤之病狀；白血球黏附缺陷病；與由細胞激素及T淋巴細胞介導之急性及遲發性過敏反應相關的免疫反應；涉及白血球滲出之疾病；多器官損傷症候群；抗原-抗體複合物介導之疾病；抗腎小球基底膜病；自體免疫性多內分泌病變；卵巢炎；原發性黏液水腫；自體免疫性萎縮性胃炎；風濕性疾病；混合型結締組織疾病；腎病症候群；胰島炎；多內分泌功能衰竭；自體免疫性多腺症候群，包括多腺症候群I型；成年發作型特發性副甲狀腺機能減退症(AOIH)；心肌病變，諸如擴張型心肌病變；後天性大皰性表皮鬆解(EBA)；血色素沉著症；心肌炎；腎病症候群；原發性硬化性膽管炎；化膿性或非化膿性竇炎；急性或慢性竇炎；篩骨、前額、上頜骨或蝶竇炎；過敏性竇炎；嗜伊紅血球相關之病症，諸如嗜伊紅血球過多、肺浸潤嗜伊紅血球過多、嗜伊紅血球過多-肌痛症候群、呂弗勒氏症候群(Loffler's syndrome)、慢性嗜伊紅血球肺炎、熱帶肺嗜伊紅血球增多、支氣管肺炎性麴黴病、麴黴腫或含有嗜伊紅血球之肉芽瘤；全身性過

敏反應；脊椎關節病變；血清陰性脊椎關節炎；多內分泌自體免疫疾病；硬化性膽管炎；鞏膜炎；上鞏膜炎；慢性皮膚黏膜念珠菌病；布魯頓氏症候群(Bruton's syndrome)；幼兒期暫時性低γ球蛋白血症；維-奧二氏症候群(Wiskott-Aldrich syndrome)；共濟失調毛細血管擴張症候群；血管擴張；與膠原性疾病相關之自體免疫病症；風濕病，諸如慢性關節風濕病；淋巴腺炎；血壓反應減少；血管功能障礙；組織損傷；心血管缺血；痛覺過敏；腎缺血；大腦缺血；及伴隨血管生成之疾病；過敏性過敏反應病症；腎小球腎炎(glomerulonephritide)；再灌注損傷；缺血性再灌注病症；心肌或其他組織之再灌注損傷；淋巴瘤性氣管支氣管炎；發炎性皮膚病；具有急性發炎組分之皮膚病；多重器官衰竭；大皰病；腎皮質壞死；急性化膿性腦膜炎；或其他中樞神經系統發炎性病症；眼及眼眶發炎性病症；顆粒球輸注相關之症候群；細胞激素誘發之毒性；發作性睡病；急性嚴重發炎；慢性難治性發炎；腎盂炎；動脈內膜過度增生；消化性潰瘍；瓣炎及子宮內膜異位。本文中預期該等疾病可藉由投與結合於B細胞表面標記(諸如FcRH5)之抗體治療，且該抗體投與包括投與未結合之(「裸」)抗體或結合於本文所揭示之細胞毒性劑的抗體。本文中亦預期該等疾病可藉由組合療法治療，該組合療法包括本發明之抗FcRH5抗體或抗FcRH5抗體藥物結合物以及同時或依次投與之另一抗體或抗體藥物結合物、另一細胞毒性劑、輻射或其他療法。

「治療」或「緩和」係指治療性處理與預防性措施，其中目的在於預防或延緩(減輕)所靶向的病理學病狀或病症。需要治療者包括已患有該病症者以及易於患有該病症者或預防該病症者。若在根據本發明之方法接受治療量之抗FcRH5抗體之後，個體或哺乳動物展示以下中之一或多者可觀察及/或可測量之減少或不存在以下中之一或多者，則成功地「治療」該患者之表現FcRH5多肽的癌症：癌細胞數減少或癌細胞不存在；腫瘤尺寸減小；抑制(亦即在某種程度上延緩，且較佳停止)癌細胞浸潤於周邊器官中，包括癌症擴散於軟組織及骨中；抑制(亦即在某種程度上延緩，且較佳停止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上緩解一或多個與特定癌症相關之症狀；降低發病率及死亡率，及改良生活品質問題。就抗FcRH5抗體可阻止所存在之癌細胞生長及/或殺滅所存在之癌細胞而言，該抗FcRH5抗體可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。患者亦可感覺到此等病徵或症狀之減輕。

評定成功治療及改良疾病之上述參數可易於由醫師熟知之常規程序測量。對於癌症療法，例如可藉由評定疾病進程之時間(TTP)及/或測定反應速率(RR)測量功效。癌轉移可藉由分期測試及藉由骨掃描及鈣含量及其他酶之測試來測定以確定至骨中之擴散。亦可進行CT掃描以尋找於該區域中之骨盆及淋巴結中的擴散。分別使用胸部X射線及藉由已知方法測量肝酶含量尋找於肺及肝中之癌轉移。其他

監測疾病之常規方法包括經直腸超音波掃描術(TRUS)及經直腸針刺活檢(TRNB)。

對於較為局部之癌症膀胱癌，確定疾病進程之方法包括藉由膀胱鏡檢進行泌尿細胞學評估、監測尿中血液之存在、藉由音波掃描術或靜脈內腎盂照相觀察尿道上皮、電腦斷層攝影法(CT)及磁共振成像(MRI)。遠端癌轉移之存在可藉由腹部CT、胸部x射線或骨骼之放射性核素成像評定。

「長期」投藥係指與短期模式相反以連續模式投與藥劑，以長時間保持初始治療作用(活性)。「間歇式」投藥為並非連續不中斷地進行而本質上循環進行之療法。

「個體」為脊椎動物。在某些實施例中，脊椎動物為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)農畜(諸如母牛)、運動型動物、寵物(諸如貓、狗及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。在某些實施例中，哺乳動物為人類。

出於治療癌症、緩和癌症症狀之目的的「哺乳動物」係指任何歸屬於哺乳動物之動物，包括人類、家畜及農畜及動物園動物、運動型動物或寵物動物，諸如狗、貓、牛、馬、綿羊、豬、山羊、兔等。哺乳動物較佳為人類。

「與一或多種其他治療劑組合」投藥包括同時(共同)及以任何次序連續投藥。

如本文所用之「載劑」包括醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑，其在所採用之劑量及濃度下，對暴露於其之細胞或哺乳動物無毒。通常，生理學上可接受之載劑為

pH緩衝水溶液。生理學上可接受之載劑之實例包括緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖醇，諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽相對離子，諸如鈉；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN®、聚乙二醇(PEG)及PLURONICS®。

「固相」或「固體支撐物」意謂本發明之抗體可黏附或連接之非水性基質。本文所涵蓋之固相之實例包括部分或完全由玻璃(例如可控孔隙玻璃)、多醣(例如瓊脂糖)、聚丙烯醯胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇及聚矽氧形成之固相。在某些實施例中，視情況而定，固相可包含分析板之孔；在其他實施例中，其為純化管柱(例如親和層析管柱)。此術語亦包括離散粒子之不連續固相，諸如美國專利第4,275,149號中所述之固相。

「脂質體」為由各類脂質、磷脂及/或界面活性劑構成、適用於向哺乳動物傳遞藥物(諸如FcRH5抗體)的小泡囊。脂質體之組分通常類似於生物膜之脂質排列以雙層形式排列。

「小」分子或「小」有機分子在本文中定義為分子量低於約500道爾頓。

「個體」或「患者」為脊椎動物。在某些實施例中脊椎動物為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)農畜(諸如母牛)、運動型動物、寵物(諸如貓、狗及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。在某些實施例中，哺乳動物為人類。

術語「醫藥調配物」係指呈一定形式以使活性成分之生物活性有效且不含有對將投與調配物之個體具有不可接受毒性之其他組分的製劑。該調配物可為無菌的。

「無菌」調配物為滅菌的或不含所有活微生物及其孢子。

如本文所揭示之抗體之「有效量」為足以進行特別說明之目的的量。「有效量」可關於所說明之目的，憑經驗且以常規方式確定。

術語「治療有效量」係指抗體或其他藥物有效「治療」個體或哺乳動物之疾病或病症的量。在癌症的情況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞數；減小腫瘤尺寸；抑制(亦即在某種程度上延緩且較佳停止)癌細胞浸潤周邊器官；抑制(亦即在某種程度上延緩且較佳停止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上緩解一或多個與癌症相關之症狀。參見本文中「治療」之定義。就藥物可阻止所存在之癌細胞生長及/或殺滅所存在之癌細胞而言，該藥物可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。「預防有效量」係指在所需劑量下且歷時所需時間有效達成所需預防結果的量。因為預防劑量係在疾病發生之前或在疾病早期用於個體中，故預防有效量通常但未必小

於治療有效量。

抗FcRH5抗體之「生長抑制量」為在活體外或活體內能夠抑制細胞(尤其腫瘤，例如癌細胞)生長的量。出於抑制贅生性細胞生長之目的，抗FcRH5抗體之「生長抑制量」可憑經驗且以常規方式確定。

抗FcRH5抗體之「細胞毒性量」為在活體外或活體內能夠破壞細胞(尤其腫瘤，例如癌細胞)的量。出於抑制贅生性細胞生長之目的，抗FcRH5抗體之「細胞毒性量」可憑經驗且以常規方式確定。

「表現FcRH5之細胞」為在細胞表面上或以分泌形式表現內源或經轉染FcRH5多肽的細胞。「表現FcRH5之癌症」為包含細胞表面上存在FcRH5多肽或產生且分泌FcRH5多肽的細胞的癌症。「表現FcRH5之癌症」視情況在其細胞表面上產生足量之FcRH5多肽，以使抗FcRH5抗體可結合於該FcRH5多肽且對該癌症具有治療作用。在另一實施例中，「表現FcRH5之癌症」視情況產生且分泌足量之FcRH5多肽，以使抗FcRH5抗體拮抗劑可結合於該FcRH5多肽且對該癌症具有治療作用。對於後者，拮抗劑可為反義寡核苷酸，其減少、抑制或阻止腫瘤細胞所進行之所分泌FcRH5多肽的產生及分泌。「過度表現」FcRH5多肽之癌症為相較於相同組織類型之非癌性細胞，細胞表面具有顯著較高含量之FcRH5多肽或產生且分泌顯著較高含量之FcRH5多肽的癌症。該過度表現可能由基因擴增或由轉錄或轉譯增加引起。可在偵測或預測分析法中，藉由評估細

胞表面上存在之FcRH5蛋白或細胞分泌之FcRH5蛋白之增加含量(例如經由免疫組織化學分析法，使用針對分離之FcRH5多肽(其可使用重組DNA技術自編碼FcRH5多肽之分離之核酸製備)製備的抗FcRH5抗體；FACS分析等)來確定FcRH5多肽過度表現。或者或另外，可例如經由螢光原位雜交使用對應於編碼FcRH5之核酸或其補體的基於核酸的探針(FISH；參見1998年10月公開之WO98/45479)、南方墨點法、北方墨點法或聚合酶鏈反應(PCR)技術(諸如即時定量PCR(RT-PCR))測量細胞中編碼FcRH5多肽之核酸或mRNA的含量。亦可藉由例如使用基於抗體之分析法測量生物流體(諸如血清)中脫落之抗原來研究FcRH5多肽過度表現(亦例如參見1990年6月12日頒佈之美國專利第4,933,294號；1991年4月18日公開之WO91/05264；1995年3月28日頒佈之美國專利5,401,638；及Sias等人**J. Immunol. Methods** 132:73-80 (1990))。除上述分析法以外，熟習此項技術者可使用各種活體內分析法。舉例而言，可使患者體內之細胞暴露於視情況用可偵測標記(例如放射性同位素)進行標記之抗體，且可例如藉由外部掃描放射能或藉由分析取自先前暴露於抗體之患者之活檢物來評估患者體內抗體與細胞之結合。

本文所用之術語「免疫黏附素」係指組合異源蛋白(「黏附素」)之結合特異性與免疫球蛋白恆定域之效應功能的抗體狀分子。在結構上，免疫黏附素包含具有所需結合特異性且不為抗體之抗原識別及結合位點(亦即「異

源」)的胺基酸序列與免疫球蛋白恆定域序列的融合物。免疫黏附素分子之黏附素部分通常為至少包含受體或配位體之結合位點的相鄰胺基酸序列。免疫黏附素中之免疫球蛋白恆定域序列可獲自任何免疫球蛋白，諸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亞型、IgA(包括IgA-1及IgA-2)、IgE、IgD或IgM。

措辭「標記」當在本文中使用時係指直接或間接結合於抗體以產生「標記」之抗體的可偵測化合物或組合物。標記可自身可偵測(例如放射性同位素標記或螢光標記)或在酶標記的情況下，可催化受質化合物或組合物的化學變化，該變化為可偵測的。

本文所用之術語「細胞毒性劑」係指一種抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}及Lu之放射性同位素)、化學治療劑(例如，甲胺喋呤、阿黴素(adriamicin)、長春花生物鹼(vinca alkaloid)(長春新鹼、長春鹼、依託泊苷(etoposide))、小紅莓、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin))或其他插入劑、酶及其片段(諸如核分解酶)、抗生素及毒素(諸如小分子毒素或細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，包括其片段及/或變異體)及下文所揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。其他細胞毒性劑如下所述。殺腫瘤劑致使腫瘤細胞破壞。

「毒素」為任何能夠對細胞之生長或增殖具有不利作用之物質。

「化學治療劑」為與作用機制無關適用於治療癌症的化合物。化學治療劑之類別包括(但不限於)烷基化劑、抗代謝物、紡錘體抑制劑、植物鹼、細胞毒性/抗腫瘤抗生素、拓撲異構酶抑制劑、抗體、光敏劑及激酶抑制劑。化學治療劑包括用於「靶向療法」及習知化學療法之化合物。化學治療劑之實例包括：埃羅替尼(erlotinib) (TARCEVA®，Genentech/OSI Pharm.)、多西他賽(TAXOTERE®，Sanofi-Aventis)、5-FU(氟尿嘧啶，5-氟尿嘧啶，CAS編號51-21-8)、吉西他濱(GEMZAR®，Lilly)、PD-0325901(CAS編號391210-10-9, Pfizer)、順鉑(順雙氯胺鉑(II)，CAS編號15663-27-1)、卡波鉑(CAS編號41575-94-4)、太平洋紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、曲妥珠單抗(HERCEPTIN®，Genentech)、替莫唑胺(temozolomide)(4-甲基-5-側氧基-2,3,4,6,8-五氮雙環[4.3.0]壬-2,7,9-三烯-9-甲醯胺，CAS編號85622-93-1，TEMODAR®，TEMODAL®，Schering Plough)、他莫昔芬((*Z*)-2-[4-(1,2-二苯基丁-1-烯基)苯氧基]-*N*,*N*-二甲基-乙胺，NOLVADEX®，ISTUBAL®，VALODEX®)及小紅莓(ADRIAMYCIN®)、Akti-1/2、HPPD及雷帕黴素(rapamycin)。

化學治療劑之更多實例包括奧沙利鉑(oxaliplatin) (ELOXATIN®，Sanofi)、硼替佐米(VELCADE®，Millennium Pharm.)、蘇登特(sutent)(SUNITINIB®，SU11248, Pfizer)、

來曲唑(FEMARA®，Novartis)、甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)(GLEEVEC®, Novartis)、XL-518(Mek抑制劑，Exelixis，WO 2007/044515)、ARRY-886(Mek抑制劑，AZD6244，Array BioPharma, Astra Zeneca)、SF-1126(PI3K抑制劑，Semafore Pharmaceuticals)、BEZ-235(PI3K抑制劑，Novartis)、XL-147(PI3K抑制劑，Exelixis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、氟維司群(FASLODEX®、AstraZeneca)、亞葉酸(leucovorin)(醛葉酸)、雷帕黴素(西羅莫司(sirolimus)，RAPAMUNE®，Wyeth)、拉帕替尼(lapatinib)(TYKERB®，GSK572016，Glaxo Smith Kline)、洛那法尼(lonafarnib)(SARASAR™，SCH 66336，Schering Plough)、索拉非尼(sorafenib)(NEXAVAR®，BAY43-9006，Bayer Labs)、吉非替尼(gefitinib)(IRESSA®，AstraZeneca)、伊立替康(CAMPTOSAR®，CPT-11，Pfizer)、替比法尼(tipifarnib)(ZARNESTRA™，Johnson & Johnson)、ABRAXANE™(無十六醇聚氧乙烯醚)、太平洋紫杉醇之經白蛋白工程改造奈米粒子調配物(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Il)、凡德他尼(vandetanib)(rINN，ZD6474，ZACTIMA®，AstraZeneca)、克諾布西(chloranmbucil)、AG1478、AG1571(SU 5271；Sugen)、替羅莫司(temsirolimus)(TORISEL®，Wyeth)、帕唑帕尼(pazopanib)(GlaxoSmithKline)、康福胺(canfosfamide)(TELCYTA®，Telik)、塞替派(thiotepa)及環磷醯胺(cyclosphosphamide)(CYTOXAN®、NEOSAR®)；烷基磺

酸鹽，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶(aziridine)，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙基亞胺(ethylenimine)及甲基密胺(methylamelamine)，包括六甲密胺(altretamine)、三伸乙基密胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺(trietylenephosphoramide)、三伸乙基硫代磷醯胺(triethiylenethiophosphoramide)及三甲基密胺(trimethylolomelamine)；多聚乙醯(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan))；苔蘚抑素(bryostatin)；卡利他汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；多拉司他汀；多卡米辛(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；潘克他汀(pancratistatin)；沙考的汀(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)，諸如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、甲二氯二乙胺(mechlorethamine)、鹽酸甲二氯二乙胺氧化物(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖、新恩比興(novembichin)、苯乙醯膽固醇氮芥(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、

曲洛磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及拉甯司汀(ranimnustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如，刺孢黴素、刺孢黴素γ1I、刺孢黴素ωI1(Angew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, (1994) 33: 183-186)；達米辛(dynemicin)、達米辛A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；艾斯帕米辛(esperamicin)；以及新製癌菌素(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)，克拉斯米辛(aclacinomysins)，放線菌素(actinomycin)，奧斯拉米辛(authramycin)，偶氮絲胺酸(azaserine)，博來黴素(bleomycin)，放線菌素C(cactinomycin)，卡拉比辛(carabicin)，洋紅黴素(carminomycin)，嗜癌菌素(carzinophilin)，色黴素(chromomycinis)，放線菌素(dactinomycin)，道諾黴素，地托比星(detorubicin)，6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸，(N-嗎啉基)-小紅莓，氰基(N-嗎啉基)-小紅莓，2-吡咯啉基-小紅莓及去氧小紅莓(deoxydoxorubicin)，表柔比星(epirubicin)，依索比星(esorubicin)，依達比星(idarubicin)，麻西羅黴素(marcellomycin)，絲裂黴素(mitomycin)(諸如絲裂黴素C)，黴酚酸(mycophenolic acid)，諾拉黴素(nogalamycin)，橄欖黴素(olivomycin)，培洛黴素(peplomycin)，泊非黴素(porfiromycin)，嘌黴素(puromycin)，奎那黴素(quelamycin)，羅多比星(rodorubicin)，鏈黑菌素(streptonigrin)，鏈脲佐

菌素(streptozocin)，殺結核菌素(tubercidin)，烏苯美司(ubenimex)，淨司他丁(zinostatin)，左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特呤(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普睪酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睪內酯(testolactone)；抗腎上腺(anti-adrenal)，諸如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolinic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；伊利盧拉(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；艾弗利散(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；埃坡黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎵；羥基脲；香菇多醣體(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美

登素，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；足葉草酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醌(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙基胺；單端孢黴烯族毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿拉伯糖(「Ara-C」)；環磷醯胺；塞替派；6-硫基鳥嘌呤；巯基嘌呤；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑及卡波鉑；長春鹼；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺(ifosfamide)；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼；長春瑞濱(NAVELBINE®)；諾凡特龍(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素；胺基喋呤(aminopterin)；卡培他濱(XELODA®，Roche)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；CPT-11；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸

(DMFO)；類視黃素，諸如視黃酸；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸及衍生物。

「化學治療劑」之定義中亦包括：(i)用於調節或抑制激素對腫瘤之作用的抗激素劑，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX®；檸檬酸他莫昔芬(tamoxifen citrate))、雷洛昔芬(raloxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®(檸檬酸托瑞米芬(toremifine citrate))；(ii)抑制酶芳香酶之芳香酶抑制劑，其調節腎上腺中雌激素之產生，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特、MEGASE®(乙酸甲地孕酮(megestrol acetate))、AROMASIN®(依西美坦(exemestane)；Pfizer)、弗米斯坦(formestanie)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®(伏羅唑(vorozole))、FEMARA(®來曲唑；Novartis)及ARIMIDEX®(阿那曲唑；AstraZeneca)；(iii)及抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)、比卡魯胺(bicalutamide)、亮丙立德(leuprolide)及戈舍瑞林(goserelin)；以及曲沙他濱(troxacitabine)(一種1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；(iv)蛋白激酶抑制劑，諸如MEK抑制劑(WO 2007/044515)；(v)脂質激酶抑制劑；(vi)反義寡核苷酸，尤其抑制與異常細胞增殖有關之信號傳導路徑(例如PKC-α、Raf及H-Ras)中之基因表現的反義寡核苷酸，諸如奧布莫森(oblimersen)(GENASENSE®，Genta

Inc.)；(vii)核糖核酸酶，諸如VEGF表現抑制劑(例如ANGIOZYME®)及HER2表現抑制劑；(viii)疫苗，諸如基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®、LEUVECTIN®及VAXID®；PROLEUKIN®rIL-2；拓撲異構酶1抑制劑，諸如LURTOTECAN®；ABARELIX® rmRH；(ix)抗血管生成劑，諸如貝伐單抗(AVASTIN®，Genentech)；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸及衍生物。

「化學治療劑」之定義中亦包括治療性抗體，諸如阿侖單抗(卡普斯(Campath))、貝伐單抗(AVASTIN®, Genentech)；西妥昔單抗(ERBITUX®, Imclone)；盤尼圖單抗(VECTIBIX®, Amgen)、利妥昔單抗(RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec)、帕妥珠單抗(pertuzumab)(OMNITARG™, 2C4, Genentech)、曲妥珠單抗(HERCEPTIN®, Genentech)、托西莫單抗(tositumomab)(貝克佐(Bexxar), Corixia)及抗體藥物結合物-吉妥珠單抗奧唑米星(MYLOTARG®, Wyeth)。

「生長抑制劑」當在本文中使用時係指抑制活體外或活體內之細胞(尤表現FcRH5之癌細胞)生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S期中表現FcRH5之細胞百分比之藥劑。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(在除S期外之位置)之藥劑，諸如誘發G1停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春花類(vincas)(長春新鹼及長春鹼)、紫杉烷(taxane)及拓撲異構酶II抑制劑(諸如小紅莓、表柔比星、道諾黴素、依託泊苷及博來黴

素)。使G1期停滯之彼等藥劑亦使S期停滯，例如，DNA烷化劑，諸如他莫昔芬、潑尼松、達卡巴嗪、甲二氯二乙胺、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。其他資訊可存在於**The Molecular Basis of Cancer**, Mendelsohn及Israel編，第1章，Murakami等人之題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(WB Saunders: Philadelphia, 1995)(尤其第13頁)中。紫杉烷(太平洋紫杉醇及多西他賽)為源自紫杉樹之抗癌藥。源自歐洲紫杉(European yew)之多西他賽(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)為太平洋紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。太平洋紫杉醇及多西他賽促進自微管蛋白二聚體組裝微管且藉由阻止解聚而使微管穩定，從而對細胞有絲分裂產生抑制。

「小紅莓」為蒽環黴素抗生素。小紅莓之完整化學名稱為(8S-順)-10-[(3-胺基-2,3,6-三去氧-α-L-來蘇-己哌喃基)氧基]-7,8,9,10-四氫-6,8,11-三羥基-8-(羥基乙醯基)-1-甲氧基-5,12-稠四苯二酮。

術語「細胞激素」為由一個細胞群體釋放之作為細胞間介體作用於另一細胞的蛋白質之通用術語。該等細胞激素之實例為淋巴激素、單核球激素及傳統多肽激素。細胞激素中包括生長激素，諸如人類生長激素、N-甲硫胺醯基人類生長激素及牛生長激素；副甲狀腺激素；甲狀腺素；胰島素；前胰島素；鬆弛素；前鬆弛素；醣蛋白激素，諸如促濾泡激素(FSH)、促甲狀腺激素(TSH)及促黃體激素

(LH)；肝生長因子；纖維胚細胞生長因子；促乳素；胎盤生乳素；腫瘤壞死因子α及腫瘤壞死因子β；苗勒抑制物質；小鼠促性腺激素相關肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子；整合素；血小板生成素(TPO)；神經生長因子，諸如NGF-β；血小板生長因子；轉型生長因子(TGF)，諸如TGF-α及TGF-β；胰島素樣生長因子I及胰島素樣生長因子II；紅血球生成素(EPO)；骨誘導因子；干擾素，諸如干擾素α、干擾素β及干擾素γ；群落刺激因子(CSF)，諸如巨噬細胞-CSF(M-CSF)；顆粒球-巨噬細胞-CSF(GM-CSF)；及顆粒球-CSF(G-CSF)；介白素(IL)，諸如IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12；腫瘤壞死因子，諸如TNF-α或TNF-β；及其他多肽因子(包括LIF及kit配位體(KL))。本文所用之術語細胞激素包括來自天然來源或來自重組細胞培養物之蛋白質及天然序列細胞激素之生物活性等效物。

術語「包裝插頁」用於指通常包括於治療性產品之商業包裝中之說明書，其含有關於與使用該等治療性產品有關之適應症、用法、劑量、投藥、禁忌症及/或警告之資訊。

術語「細胞內代謝物」係指由細胞內抗體-藥物結合物(ADC)之代謝過程或反應產生的化合物。代謝過程或反應可為酶促過程，諸如蛋白水解裂解ADC之肽連接子，或水解官能基(諸如腙、酯或醯胺)。細胞內代謝物包括(但不限於)進入、擴散、吸收或輸送於細胞中之後已進行細胞內

裂解的抗體及自由態藥物。

術語「細胞內裂解」係指細胞內抗體-藥物結合物(ADC)之代謝過程或反應，由此藥物部分(D)與抗體(Ab)之間的共價連接(亦即連接子)斷裂，從而在細胞內產生自抗體解離之自由態藥物。由此ADC之裂解部分為細胞內代謝物。

術語「生物可用性」係指向患者投與之既定量之藥物的全身可用性(亦即血液/血漿含量)。生物可用性為表明藥物自所投與劑型到達體循環(general circulation)之時間(速率)及總量(程度)之量度的絕對項(absolute term)。

術語「細胞毒性活性」係指ADC或ADC之細胞內代謝物的殺滅細胞、細胞生長抑制作用或生長抑制作用。細胞毒性活性可以IC_{50}值表示，其為一半細胞存活時每單位體積之濃度(莫耳或質量)。

本文所用之術語「烷基」係指具有1至12個碳原子(C_1-C_{12})之飽和直鏈或分支鏈單價烴基，其中烷基可視情況經一或多個下述取代基獨立取代。在另一實施例中，烷基為1至8個碳原子(C_1-C_8)或1至6個碳原子(C_1-C_6)。烷基之實例包括(但不限於)甲基(Me、-CH_3)、乙基(Et、-CH_2CH_3)、1-丙基(n-Pr、正丙基、-$CH_2CH_2CH_3$)、2-丙基(i-Pr、異丙基、-$CH(CH_3)_2$)、1-丁基(n-Bu、正丁基、-$CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-甲基-1-丙基(i-Bu、異丁基、-$CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基(s-Bu、第二丁基、-$CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu、第三丁基、-$C(CH_3)_3$)、1-戊基(正戊基、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-戊基(-$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-戊基(-$CH(CH_2CH_3)_2$)、

2-甲基-2-丁基(-C(CH$_3$)$_2$CH$_2$CH$_3$)、3-甲基-2-丁基(-CH(CH$_3$)CH(CH$_3$)$_2$)、3-甲基-1-丁基(-CH$_2$CH$_2$CH(CH$_3$)$_2$)、2-甲基-1-丁基(-CH$_2$CH(CH$_3$)CH$_2$CH$_3$)、1-己基(-CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)、2-己基(-CH(CH$_3$)CH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)、3-己基(-CH(CH$_2$CH$_3$)(CH$_2$CH$_2$CH$_3$))、2-甲基-2-戊基(-C(CH$_3$)$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_3$)、3-甲基-2-戊基(-CH(CH$_3$)CH(CH$_3$)CH$_2$CH$_3$)、4-甲基-2-戊基(-CH(CH$_3$)CH$_2$CH(CH$_3$)$_2$)、3-甲基-3-戊基(-C(CH$_3$)(CH$_2$CH$_3$)$_2$)、2-甲基-3-戊基(-CH(CH$_2$CH$_3$)CH(CH$_3$)$_2$)、2,3-二甲基-2-丁基(-C(CH$_3$)$_2$CH(CH$_3$)$_2$)、3,3-二甲基-2-丁基(-CH(CH$_3$)C(CH$_3$)$_3$)、1-庚基、1-辛基及其類似基團。

術語「烯基」係指具有2個至8個碳原子(C$_2$-C$_8$)之具有至少一個不飽和位點(亦即碳-碳sp^{2}雙鍵)的直鏈或分支鏈單價烴基，其中烯基可視情況經一或多個本文所述之取代基獨立取代，且包括具有「順式」及「反式」取向或者「E」及「Z」取向的基團。實例包括(但不限於)乙烯基(-CH=CH$_2$)、烯丙基(-CH$_2$CH=CH$_2$)及其類似基團。

術語「炔基」係指具有2個至8個碳原子(C$_2$-C$_8$)之具有至少一個不飽和位點(亦即碳-碳sp參鍵)的直鏈或分支鏈單價烴基，其中炔基可視情況經一或多個本文所述之取代基獨立取代。實例包括(但不限於)乙炔基(-C≡CH)、丙炔基(炔丙基、-CH$_2$C≡CH)及其類似基團。

術語「碳環」及「碳環基」係指具有3至12個碳原子(C$_3$-C$_{12}$)單環形式或7至12個碳原子雙環形式的單價非芳族、飽和或部分不飽和環。具有7至12個原子之雙環碳環

可例如以雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統排列，且具有9或10個環原子之雙環碳環可以雙環[5,6]或[6,6]系統，或以諸如雙環[2.2.1]庚烷、雙環[2.2.2]辛烷及雙環[3.2.2]壬烷之橋式系統排列。單環碳環之實例包括(但不限於)環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環己二烯基、環庚基、環辛基、環壬基、環癸基、環十一烷基、環十二烷基及其類似基團。

「芳基」意謂具有6-20個碳原子(C_6-C_{20})之單價芳族烴基，其係藉由自母芳族環系統之單一碳原子移除一個氫原子衍生。一些芳基在例示性結構中表示為「Ar」。芳基包括包含稠合至飽和、部分不飽和環或芳族碳環之芳族環的雙環基團。典型芳基包括(但不限於)衍生自苯(苯基)、經取代之苯、萘、蒽、聯苯、茚基、二氫茚基、1,2-二氫萘、1,2,3,4-四氫萘基及其類似基團的基團。芳基視情況經一或多個本文所述之取代基獨立取代。

術語「雜環」及「雜環基」在本文中可互換使用且係指具有3至20個環原子之飽和或部分不飽和(亦即環中具有一或多個雙鍵及/或參鍵)碳環基團，其中至少一個環原子為選自氮、氧、磷及硫之雜原子，剩餘環原子為C，其中一或多個環原子視情況經一或多個下述取代基獨立取代。雜環可為具有3至7個環成員(2至6個碳原子及1至4個選自N、O、P及S之雜原子)之單環，或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至6個選自N、O、P及S之雜原子)之雙環，例

如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。雜環描述於以下文獻中：Paquette, Leo A.;「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1章、第3章、第4章、第6章、第7章及第9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950至今)，尤其第13卷、第14卷、第16卷、第19卷及第28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566。「雜環基」亦包括如下基團，其中雜環基團與飽和、部分不飽和環或芳族碳環或雜環稠合。雜環之實例包括(但不限於)吡咯啶基、四氫呋喃基、二氫呋喃基、四氫噻吩基、四氫哌喃基、二氫哌喃基、四氫硫代哌喃基、N-哌啶基、N-嗎啉基、N-硫代嗎啉基、硫氧雜環己烷基、哌嗪基、高哌嗪基、氮雜環丁烷基、氧雜環丁烷基、硫雜環丁烷基、高哌啶基、氧雜環庚烷基、硫雜環庚烷基、噁氮呯基、二氮呯基、噻氮呯基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、吲哚啉基、2H-哌喃基、4H-哌喃基、二氧雜環己烷基、1,3-二氧戊環基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫雜環戊烷基、二氫哌喃基、二氫噻吩基、二氫呋喃基、吡唑啶基咪唑啉基、咪唑啶基、3-氮雜雙環[3.1.0]己基、3-氮雜雙環[4.1.0]庚基、氮雜雙環[2.2.2]己基、3H-吲哚基喹嗪基及N-吡啶基脲。此定義之範疇內亦包括螺部分。2個環碳原子經側氧基(oxo，=O)部分取代之雜環基之實例為嘧啶酮基及1,1-二側氧基-硫代嗎啉基。本文之雜環基視情況經一或多個本文所述之取代基獨立取代。

術語「雜芳基」係指具有5員、6員或7員環之單價芳族基，且包括具有5-20個原子之稠環系統(其中至少一者為芳族環系統)，該等原子含有一或多個獨立地選自氮、氧及硫之雜原子。雜芳基之實例為吡啶基(包括例如2-羥基吡啶基)、咪唑基、咪唑幷吡啶基、嘧啶基(包括例如4-羥基嘧啶基)、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、異噁唑基、噻唑基、噁唑基、異噻唑基、吡咯基、喹啉基、異喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、啐啉基、吲唑基、吲哚嗪基、酞嗪基、噠嗪基、三嗪基、異吲哚基、喋啶基、嘌呤基、噁二唑基、三唑基、噻二唑基、噻二唑基、呋呫基、苯并呋呫基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喏啉基、啶啶基及呋喃幷吡啶基。雜芳基視情況經一或多個本文所述之取代基獨立取代。

雜環或雜芳基可在可能之處經碳(經碳連接)或氮(經氮連接)鍵結。以實例之方式且並非加以限制，經碳鍵結之雜環或雜芳基係在以下位置鍵結：吡啶之位置2、3、4、5或6，噠嗪之位置3、4、5或6，嘧啶之位置2、4、5或6，吡嗪之位置2、3、5或6，呋喃、四氫呋喃、噻吩(thiofuran、thiophene)、吡咯或四氫吡咯之位置2、3、4或5，噁唑、咪唑或噻唑之位置2、4或5，異噁唑、吡唑或異噻唑之位置3、4或5，氮丙啶之位置2或3，氮雜環丁烷之位置2、3或4，喹啉之位置2、3、4、5、6、7或8或異喹啉之位置1、3、4、5、6、7或8。

以實例之方式且並非加以限制，經氮鍵結之雜環或雜芳基係在以下位置鍵結：氮丙啶、氮雜環丁烷、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啶、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲唑之位置1，異吲哚或異吲哚啉之位置2，嗎啉之位置4及咔唑或β-咔啉之位置9。

「伸烷基」係指具有1-18個碳原子且具有兩個單價基團中心的飽和分支鏈或直鏈或環狀烴基，該等單價基團中心係藉由自母烷烴之同一個或兩個不同碳原子移除兩個氫原子衍生。典型伸烷基包括(但不限於)亞甲基(-CH_2-)、1,2-乙基(-CH_2CH_2-)、1,3-丙基(-$CH_2CH_2CH_2$-)、1,4-丁基(-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-)及其類似基團。

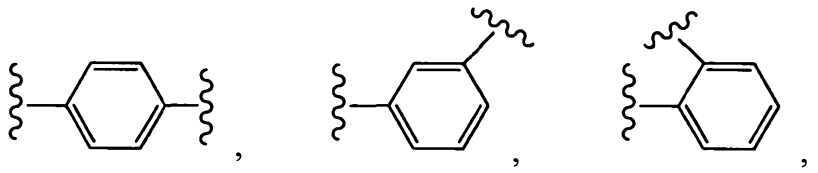
「C_1-C_{10}伸烷基」為式-$(CH_2)_{1-10}$-之直鏈飽和烴基。C_1-C_{10}伸烷基之實例包括亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸丁基、伸戊基、伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基及伸癸基。

「伸烯基」係指具有2-18個碳原子且具有兩個單價基團中心的不飽和分支鏈或直鏈或環狀烴基，該等單價基團中心係藉由自母烯烴之同一個或兩個不同碳原子移除兩個氫原子衍生。典型伸烯基包括(但不限於)1,2-伸乙基(-CH=CH-)。

「伸炔基」係指具有2-18個碳原子且具有兩個單價基團中心的不飽和分支鏈或直鏈或環狀烴基，該等單價基團中心係藉由自母炔烴之同一個或兩個不同碳原子移除兩個氫

原子衍生。典型伸炔基包括(但不限於)伸乙炔基(-C≡C-)、炔丙基(-CH_2C≡C-)及4-戊炔基(-$CH_2CH_2CH_2$C≡C-)。

「伸芳基」為具有兩個共價鍵且可為如以下結構所示之鄰位、間位或對位構型的芳基：



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

「芳基烷基」係指非環狀烷基，其中鍵結至碳原子(通常為末端或sp^3碳原子)之氫原子之一經芳基置換。典型芳基烷基包括(但不限於)苯甲基、2-苯基乙-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘幷苯甲基(naphthobenzyl)、2-萘幷苯基乙-1-基及其類似基團。芳基烷基包含6至20個碳原子，例如，芳基烷基之烷基部分(包括烷基、烯基或炔基)具有1至6個碳原子且芳基部分具有5至14個碳原子。

「雜芳基烷基」係指非環狀烷基，其中鍵結至碳原子(通常為末端或sp^3碳原子)之氫原子之一經雜芳基置換。典型雜芳基烷基包括(但不限於)2-苯并咪唑基甲基、2-呋喃

基乙基及其類似基團。雜芳基烷基包含6至20個碳原子，例如雜芳基烷基之烷基部分(包括烷基、烯基或炔基)具有1至6個碳原子，且雜芳基部分具有5至14個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子。雜芳基烷基之雜芳基部分可為具有3至7個環成員(2至6個碳原子)或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之雙環，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。

本案中所用之術語「前藥」係指醫藥學活性物質之前驅物或衍生形式，其對腫瘤細胞的細胞毒性相較於母體藥物更小且能夠酶促活化或轉化為更具活性之母體形式。例如參見Wilman,「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」*Biochemical Society Transactions*, 14, 第375-382頁，615th Meeting Belfast (1986)及Stella等人「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,」*Directed Drug Delivery*, Borchardt等人(編)，第247-267頁，Humana Press (1985)。本發明之前藥包括但不限於：含磷酸根之前藥、含硫代磷酸根之前藥、含硫酸根之前藥、含肽之前藥、經D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含β-內醯胺之前藥、含視需要經取代之苯氧基乙醯胺之前藥或含視情況經取代之苯乙醯胺之前藥、可轉化為更具活性之細胞毒性自由態藥物的5-氟胞嘧啶及其他5-氟尿苷前藥。可衍生為用於本發明之前藥形式的細胞毒性藥物之實例包括(但不限於)上述彼等化學治療劑。

「代謝物」經由指定化合物或其鹽之體內代謝產生的產

物。可使用此項技術中已知之常規技術鑑別化合物之代謝物且使用測試(諸如本文所述之測試)來測定其活性。該等產物可來自例如所投與化合物之氧化、還原、水解、醯胺化、去醯胺化、酯化、脫酯化、酶促裂解及其類似作用。因此，本發明包括本發明化合物之代謝物，包括藉由包含使本發明之化合物與哺乳動物接觸一段時間以足以產生其代謝產物的方法產生的化合物。

「脂質體」為由各類脂質、磷脂及/或界面活性劑構成、適用於向哺乳動物傳遞藥物的小泡囊。脂質體之組分通常類似於生物膜之脂質排列以雙層形式排列。

「連接子」係指包含使抗體共價連接於藥物部分之共價鍵或原子鏈的化學部分。在各種實施例中，連接子包括二價基團，諸如烷基二基，芳基二基，雜芳基二基，諸如$-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$之部分，烷氧基之重複單元(例如聚伸乙氧基、PEG、聚亞甲氧基)及烷基胺基(例如聚伸乙基胺基、Jeffamine™)；及二酸酯及醯胺，包括丁二酸酯、丁二醯胺、氧二乙酸酯、丙二酸酯及己醯胺。

術語「對掌性」係指具有不可與鏡像搭配物重疊之特性的分子，而術語「非對掌性」係指可與其鏡像搭配物重疊之分子。

術語「立體異構體」係指具有相同化學組成，但原子或基團在空間之排列不同的化合物。

「非對映異構體」係指具有兩個或兩個以上對掌性中心且分子不為彼此之鏡像的立體異構體。非對映異構體具有

不同物理特性，例如熔點、沸點、光譜特性及反應性。非對映異構體之混合物可根據高解析度分析程序(諸如電泳及層析)分離。

「對映異構體」係指化合物之不為彼此之可重疊鏡像的兩種立體異構體。

本文所用之立體化學定義及規約一般遵循S. P. Parker編，*McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；及Eliel, E.及Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York。許多有機化合物以光學活性形式存在，亦即其具有旋轉平面偏光之平面的能力。在描述光學活性化合物時，字首D及L，或*R*及*S*用以表示該分子圍繞其對掌性中心之絕對構型。字首d及l或(+)及(-)用以表示化合物旋轉平面偏光之標記，其中(-)或l意謂該化合物為左旋化合物。以(+)或d為字首之化合物為右旋化合物。對於既定化學結構，其立體異構體相同，其例外為其為彼此之鏡像。特定立體異構體亦可稱作對映異構體，且該等異構體之混合物通常稱作對映異構混合物。對映異構體之50:50混合物稱作外消旋混合物或外消旋體，其可在化學反應或製程中無立體選擇性或立體特異性時存在。術語「外消旋混合物」及「外消旋體」係指兩種對映異構物質之等莫耳混合物，其無光學活性。

術語「互變異構體」或「互變異構形式」係指具有不同能量之結構異構體，其可經由低能量障壁相互轉化。舉例

而言，質子互變異構體(亦稱作質子轉移互變異構體)包括經由質子遷移達成之相互轉化，諸如酮-烯醇及亞胺-烯胺異構化。價鍵互變異構體包括藉由一些鍵結電子重組達成之相互轉化。

如本文所用之短語「醫藥學上可接受之鹽」係指本發明化合物之醫藥學上可接受之有機或無機鹽。例示性鹽包括(但不限於)硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、丹寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、丁二酸酯、順丁烯二酸鹽、龍膽酸鹽(gentisinate)、反丁烯二酸鹽、葡糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、葡萄糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲烷磺酸鹽「甲磺酸鹽」、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(亦即1,1'-亞甲基-雙(2-羥基-3-萘甲酸鹽))。醫藥學上可接受之鹽可涉及包括另一分子(諸如乙酸根離子、丁二酸根離子或其他相對離子)。相對離子可為穩定母化合物上之電荷的任何有機或無機部分。此外，醫藥學上可接受之鹽之結構中可具有一個以上帶電原子。多個帶電原子為醫藥學上可接受之鹽之一部分的情況下可具有多個相對離子。因此，醫藥學上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。

若本發明之化合物為鹼，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由此項技術中可利用之任何適合之方法製備，例如，用

無機酸(諸如鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、甲烷磺酸、磷酸及其類似物)或用有機酸(諸如乙酸、三氟乙酸、順丁烯二酸、丁二酸、杏仁酸、反丁烯二酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水楊酸、諸如葡糖醛酸或半乳糖醛酸之哌喃糖酸(pyranosidyl acid)、諸如檸檬酸或酒石酸之α羥基酸、諸如天冬胺酸或麩胺酸之胺基酸、諸如苯甲酸或肉桂酸之芳族酸、諸如對甲苯磺酸或乙烷磺酸之磺酸或其類似物)處理游離鹼。

若本發明之化合物為酸，則所需醫藥學上可接受之鹽可藉由任何適合之方法製備，例如用無機或有機鹼(諸如胺(一級、二級或三級胺)、鹼金屬氫氧化物或鹼土金屬氫氧化物或其類似物)處理游離酸。適合鹽之說明性實例包括(但不限於)衍生自以下之有機鹽：胺基酸(諸如甘胺酸及精胺酸)，氨，一級、二級及三級胺及環胺(諸如哌啶、嗎啉及哌嗪)；及衍生自鈉、鈣、鉀、鎂、錳、鐵、銅、鋅、鋁及鋰之無機鹽。

短語「醫藥學上可接受之」表明物質或組合物必須與構成調配物之其他成分及/或用其治療之哺乳動物化學上及/或毒理學上相容。

「溶劑合物」係指一或多個溶劑分子與本發明之化合物的締合物或複合物。形成溶劑合物之溶劑的實例包括(但不限於)水、異丙醇、乙醇、甲醇、DMSO、乙酸乙酯、乙酸及乙醇胺。術語「水合物」係指溶劑分子為水之複合物。

術語「保護基」係指通常用於阻擋或保護特定官能基而使化合物上之其他功能基反應的取代基。舉例而言，「胺基保護基」為連接於胺基之阻擋或保護化合物中之胺基官能基的取代基。適合之胺基保護基包括乙醯基、三氟乙醯基、第三丁氧羰基(BOC)、苯甲氧羰基(CBZ)及9-芴基亞甲氧基羰基(Fmoc)。類似地，「羥基保護基」係指阻擋或保護羥基官能基的羥基之取代基。適合之保護基包括乙醯基及矽烷基。「羧基保護基」係指阻擋或保護羧基官能基的羧基之取代基。常見羧基保護基包括苯基磺醯基乙基、氰基乙基、2-(三甲基矽烷基)乙基、2-(三甲基矽烷基)乙氧基甲基、2-(對甲苯磺醯基)乙基、2-(對硝基苯基次磺醯基)乙基、2-(二苯基膦基)-乙基、硝基乙基及其類似基團。關於保護基及其用途之一般描述參見T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991。

「離去基」係指可經另一官能基取代之官能基。特定離去基為此項技術中所熟知且實例包括(但不限於)鹵基(例如氯基、溴基、碘基)、甲烷磺醯基(甲磺醯基)、對甲苯磺醯基(甲苯磺醯基)、三氟甲基磺醯基(三氟甲磺酸酯基)及三氟甲基磺酸酯基。

縮寫

連接子組分：

MC=6-順丁烯二醯亞胺基己醯基

Val-Cit或「vc」=纈胺酸-瓜胺酸(蛋白酶可裂解連接子

中之例示性二肽)

瓜胺酸=2-胺基-5-脲基戊酸

PAB=對胺基苯甲氧基羰基(「自我犧牲(self immolative)」連接子組分之一實例)

Me-Val-Cit=N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸(其中連接子肽鍵已經修飾以阻止其因組織蛋白酶B而裂解)

MC(PEG)6-OH=順丁烯二醯亞胺基己醯基-聚乙二醇(可連接於抗體之半胱胺酸)。

細胞毒性藥：

MMAE=單甲基奧瑞他汀E(MW 718)

MMAF=奧瑞他汀E(MMAE)之變異體，其中在藥物之C末端具有苯丙胺酸(MW 731.5)

MMAF-DMAEA=MMAF與DMAEA(二甲胺基乙胺)用鍵聯至C末端苯丙胺酸之醯胺鍵連接(MW 801.5)

MMAF-TEG=MMAF與四乙二醇，用與苯丙胺酸成酯之方式連接

MMAF-NtBu=N-第三丁基與MMAF之C末端以醯胺連接

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

DM3=N(2')-去乙醯基-N2-(4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素

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

其他縮寫如下：AE為奧瑞他汀E，Boc為*N*-(第三丁氧基羰基)，cit為瓜胺酸，dap為多拉普因(dolaproine)，DCC為

1,3-二環己基碳化二亞胺，DCM為二氯甲烷，DEA為二乙胺，DEAD為偶氮二甲酸二乙酯，DEPC為氰基膦酸二乙酯，DIAD為偶氮二甲酸二異丙酯，DIEA為*N,N*-二異丙基乙胺，dil為多拉異白胺酸(dolaisoleucine)，DMA為二甲基乙醯胺，DMAP為4-二甲胺基吡啶，DME為乙二醇二甲基醚(或1,2-二甲氧基乙烷)，DMF為*N,N*-二甲基甲醯胺，DMSO為二甲亞碸，doe為多拉苯胺(dolaphenine)，dov為*N,N*-二甲基纈胺酸，DTNB為5,5'-二硫雙(2-硝基苯甲酸)，DTPA為二伸乙基三胺五乙酸，DTT為二硫蘇糖醇，EDCI為1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽，EEDQ為2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉，ES-MS為電噴霧質譜，EtOAc為乙酸乙酯，Fmoc為*N*-(9-芴基甲氧基羰基)，gly為甘胺酸，HATU為*O*-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-*N,N,N',N'*-四甲基鎓六氟磷酸鹽，HOBt為1-羥基苯并三唑，HPLC為高壓液相層析，ile為異白胺酸，lys為離胺酸，MeCN(CH_3CN)為乙腈，MeOH為甲醇，Mtr為4-甲氧基苯甲基二苯基甲基(或4-甲氧基三苯甲基)，nor為(*1S, 2R*)-(+)-降麻黃鹼，PBS為磷酸鹽緩衝生理食鹽水(pH 7.4)，PEG為聚乙二醇，Ph為苯基，Pnp為對硝基苯基，MC為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基，phe為L-苯丙胺酸，PyBrop為六氟磷酸溴參吡咯啶鏻，SEC為尺寸排阻層析，Su為丁二醯亞胺，TFA為三氟乙酸，TLC為薄層層析，UV為紫外線且val為纈胺酸。

「游離半胱胺酸胺基酸」係指已工程改造於親本抗體中

之半胱胺酸胺基酸殘基具有硫氫基官能基(-SH)且尚未以分子內或分子間二硫橋形式配對。

術語「硫氫基反應性值」為游離半胱胺酸胺基酸之反應性的定量特徵。硫氫基反應性值為經半胱胺酸工程改造之抗體中與硫氫基反應性試劑反應之游離半胱胺酸胺基酸之百分比且換算為最大值為1。舉例而言，經半胱胺酸工程改造之抗體上與硫氫基反應性試劑(諸如與生物素-順丁烯二醯亞胺試劑反應形成生物素標記之抗體)以100%產率反應之游離半胱胺酸胺基酸的硫氫基反應性值為1.0。工程改造於相同或不同親本抗體中與硫氫基反應性試劑以80%產率反應之另一半胱胺酸胺基酸的硫氫基反應性值為0.8。工程改造於相同或不同親本抗體中完全不能與硫氫基反應性試劑反應之另一半胱胺酸胺基酸的硫氫基反應性值為0。特定半胱胺酸之硫氫基反應性值之測定可藉由ELISA分析法、質譜、液相層析、自動放射照像術或其他定量分析測試進行。

「親本抗體」為包含如下胺基酸序列的抗體，該胺基酸序列一或多個胺基酸殘基經一或多個半胱胺酸殘基置換。親本抗體可包含天然或野生型序列。親本抗體可相對於抗體之其他天然、野生型或經修飾形式具有前在胺基酸序列修飾(諸如添加、缺失及/或取代)。親本抗體可針對所關注之標靶抗原，例如生物學上重要的多肽。亦涵蓋針對非多肽抗原(諸如腫瘤相關之糖脂抗原；參見US 5091178)之抗體。

表 1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define  _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/*    A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */   { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */   { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */   {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */   { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */   { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */   {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */   { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */   {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */   {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */   {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */   {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */   {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */   { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */   {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */   { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */   { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */   {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */   { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */   { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */   { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */   {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */   {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */   { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

表 1(續)

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define  MAXJMP          16      /* max jumps in a diag */
#define  MAXGAP          24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define  JMPS            1024    /* max jmps in an path */
#define  MX              4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                      /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;          /* score at last jmp */
        long            offset;         /* offset of prev block */
        short           ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp      jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;            /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];/* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];/* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                 /* output file name */
char            *namex[2];              /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                  /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];               /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* best diag: nw() */
int             dmax0;                  /* final diag */
int             dna;                    /* set if dna: main() */
int             endgaps;                /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;             /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;           /* total size of gaps */
int             smax;                   /* max score: nw() */
int             *xbm;                   /* bitmap for matching */
long            offset;                 /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                    /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                  /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

表 1(續)

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *  where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *  The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *  Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *  Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *  A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *  Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static    _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static    _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                          main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if(ac != 3){
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

        endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";        /* output file */

        nw();                /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();          /* get the actual jmps */
        print();             /* print stats, alignment */

        cleanup(0);          /* unlink any tmp files */}
```

表 1(續)

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

表 1(續)

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```

...nw

```
        id = xx - yy + len1 - 1;
        if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                col1[yy] = mis;
```

表 1(續)

```
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
                dmax = id;
        }
                                                        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
                                                        }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
                                        (void) free((char *)col1);                      }
```

表 1(續)

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC     3
#define P_LINE  256     /* maximum output line */
#define P_SPC   3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()                                                                 print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
                        pr_align();         }
```

表 1(續)

getmat

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if(siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if(siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if(xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if(n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if(n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if(endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

表 1(續)

...getmat

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static          nm;             /* matches in core -- for checking */
static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
static          ij[2];          /* jmp index for a path */
static          nc[2];          /* number at start of current line */
static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static          siz[2];
static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
```

pr_align

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                                                po[i] = out[i];         }
```

表 1(續)

...pr_align

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;
                        more++;
                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;
                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
```

dumpblock

```
dumpblock()
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

表 1(續)

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                                        nums
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                                     putline
                                        int     ix;             {
```

表 1(續)

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                                                    stars
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

表 1(續)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                    stripname
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

表 1(續)

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                              cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                       getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

表 1(續)

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
char    *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                    g_calloc
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                                               readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register        i, j, xx;
        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

表 1(續)

...readjmps

```
                        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                                (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                                (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                                dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;                                       }
                        else
                                break;                  }
                if (i >= JMPS) {
                        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                        cleanup(1);
                }
                if (j >= 0) {
                        siz = dx[dmax].jp.n[j];
                        xx = dx[dmax].jp.x[j];
                        dmax += siz;
                        if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                                pp[1].n[i1] = -siz;
                                xx += siz;
                                /* id = xx - yy + len1 - 1                                      */
                                pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                                gapy++;
                                ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                                siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                                i1++;
                        }
                        else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                                pp[0].n[i0] = siz;
                                pp[0].x[i0] = xx;
                                gapx++;
                                ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                                siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                                i0++;
                        }
                }
                else
                        break;
        }
        /* reverse the order of jmps    */
        for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
                i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
                i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
        }
        for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
                i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
                i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
        }
        if (fd >= 0)
                (void) close(fd);
        if (fj) {
                (void) unlink(jname);
                fj = 0;
                offset = 0;
                                                }                                       }
```

表 1(續)

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                          writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

III. 本發明之組合物及方法

本發明提供抗FcRH5抗體或其功能片段及其用於治療造血系統腫瘤之方法。

在一態樣中，本發明提供一種較佳特異性結合於任何上述或下述多肽的抗體。視情況，抗體為單株抗體、抗體片段(包括Fab、Fab'、$F(ab')_2$及Fv片段)、雙功能抗體、單域抗體、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗FcRH5多肽抗體結合於其各別抗原性抗原決定基的抗體。本發明之抗體可視情況結合於生長抑制劑或細胞毒性劑，諸如毒素(包括例如奧瑞他汀、類美登素、多拉司他汀衍生物或刺孢黴素)、抗生素、放射性同位素、核分解酶或其類似物。本發明之抗體可視情況在CHO細胞或細菌細胞中產生，且較佳誘發其所結合之細胞死亡。出於偵測目的，本發明之抗體可進行可偵測地標記、連接於固體支撐物或進行類似處理。

在一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之單價親和力(例如Fab片段形式之抗體對FcRH5之親和力)實質上等同於鼠類抗體之單價親和力(例如Fab片段形式之鼠類抗體對FcRH5之親和力)或嵌合抗體之單價親和力(例如Fab片段形式之嵌合抗體對FcRH5之親和力)，該鼠類抗體或嵌合抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述之輕鏈及重鏈可變域序列，由該等序列組成或基本上由該等序列組成。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之單價親和力(例如Fab片段形式之抗體對FcRH5之親和力)為小於鼠類抗體之單價親和力(例如Fab片段形式之鼠類抗體對FcRH5之親和力)或嵌合抗體之單價親和力(例如Fab片段形式之嵌合抗體對FcRH5之親和力)例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60倍，該鼠類抗體或嵌合抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)所述之輕鏈及重鏈可變域序列，由該等序列組成或基本上由該等序列組成。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之單價親和力(例如Fab片段形式之抗體對FcRH5之親和力)為大於鼠類抗體之單價親和力(例如Fab片段形式之鼠類抗體對FcRH5的親和力)或嵌合抗體之單價親和力(例如Fab片段形式之嵌合抗體對FcRH5的親和

力)例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍，該鼠類或嵌合抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)所述之輕鏈及重鏈可變域序列，由該等序列組成或基本上由該等序列組成。

在一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)實質上等同於鼠類抗體之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)或嵌合抗體之二價形式親和力(例如Fab片段形式之嵌合抗體對FcRH5之親和力)，該鼠類抗體或嵌合抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述之輕鏈及重鏈可變域序列，由該等序列組成或基本上由該等序列組成。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為小於鼠類抗體之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)或嵌合抗體之二價形式親和力(例如IgG片段形式之嵌合抗體對FcRH5之親和力)例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60倍，該鼠類抗體或嵌合抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)所述之輕鏈及重鏈可變域序列，由該等序列組成或基本上由該等序列組成。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，

其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為大於鼠類抗體之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)或嵌合抗體之二價形式親和力(例如IgG片段形式之嵌合抗體對FcRH5之親和力)例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍，該鼠類抗體或嵌合抗體包含如圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)所述之輕鏈及重鏈可變域序列，由該等序列組成或基本上由該等序列組成。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.4 Nm。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.4 nM +/- 0.04。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.3 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.32 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.36 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG

形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.4 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.44 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.48 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.5 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.3 nM與0.5 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.32 nM與0.48 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.36 nM與0.44 nM之間。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.2 nM。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對FcRH5之親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.2 nM +/- 0.02。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.1 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.12 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.14 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.16 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.18 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.2 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.22 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.24 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.26 nM

或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.28 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.30 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.1 nM與0.3 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.12 nM與0.28 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.14 nM與0.26 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.16 nM與0.24 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.18 nM與0.22 nM之間。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.5 nM。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價

形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.5 nM +/- 0.1。

在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.4 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.5 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.6 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)為0.7 nM或更佳。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.3 nM與0.7 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.4 nM與0.6 nM之間。在另一態樣中，本發明提供一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對FcRH5之二價形式親和力(例如IgG形式之抗體對FcRH5之親和力)在0.5 nM與0.55 nM之間。

在一態樣中，鼠類抗體對FcRH5之單價親和力實質上等同於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)之可變域序列的Fab片段之結合親和力。

如此項技術中所公認，配位體對其受體之結合親和力可使用多種分析法中之任一者測定且表示為多種數量值。因此，在一實施例中，結合親和力表示為Kd值且反映固有結合親和力(例如，具有最小之親和性作用)。一般而言且較佳，在活體外測量結合親和力，無論在無細胞或細胞相關之環境下。如本文更詳細描述，結合親和力之倍數差異可根據人類化抗體(例如Fab形式)之單價結合親和力值及參考/對照抗體(例如Fab形式)(例如具有供者高變區序列之鼠類抗體)之單價結合親和力值的比率定量，其中結合親和力值在類似分析條件下測定。因此，在一實施例中，結合親和力之倍數差異以Fab形式之人類化抗體與該參考/對照Fab抗體之Kd值的比率形式測定。舉例而言，在一實施例中，若本發明之抗體(A)之親和力為「3倍小於」參考抗體(M)之親和力，則若A之Kd值為3×，則M之Kd值應為1×，且A之Kd與M之Kd的比率應為3:1。相反地，在一實施例中，若本發明之抗體(C)之親和力為「3倍大於」參考抗體(R)之親和力，則若C之Kd值為1×，則R之Kd值應為3×，且C之Kd與R之Kd的比率應為1:3。可使用此項技術中已知之諸多分析法中之任一者(包括本文所述之分析法)獲得結合親和力測量值，包括例如Biacore、放射免疫分析法(RIA)及ELISA。

在一態樣中，提供一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含：

(a) 至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自由

以下組成之群的HVR：

(i) 包含序列KASQNVGSNVA(SEQ ID NO: 28)之HVR-L1；

(ii) 包含序列SASYRYS(SEQ ID NO: 29)之HVR-L2；

(iii) 包含序列QQYKTWT(SEQ ID NO: 30)之HVR-L3；

(iv) 包含序列GYTFTNYGMN(SEQ ID NO: 37)之HVR-H1；

(v) 包含序列NTYTGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO: 38)之HVR-H2；

(vi) 包含序列ARRSIPYYYAMDY(SEQ ID NO: 39)之HVR-H3。

在一實施例中，本發明抗體之HVR-L1包含SEQ ID NO: 28之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-L2包含SEQ ID NO: 29之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-L3包含SEQ ID NO: 30之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-H1包含SEQ ID NO: 37之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-H2包含SEQ ID NO: 38之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-H3包含SEQ ID NO: 39之序列。在一實施例中，包含此等序列(如本文所述組合)之本發明抗體為人類化或人類抗體。

在一態樣中，提供一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含：

(a) 至少一個、兩個、三個、四個、五個或六個選自由以下組成之群的HVR：

(i) 包含序列KASQNVGSNVA(SEQ ID NO: 28)之HVR-L1；

(ii) 包含序列SASYRYS(SEQ ID NO: 29)之HVR-L2；

(iii) 包含序列QQYKTWT(SEQ ID NO: 30)之HVR-L3；

(iv) 包含序列GYTFTNYGMN(SEQ ID NO: 37)之HVR-H1；

(v) 包含序列NTYTGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO: 38)之HVR-H2；

(vi) 包含序列ARRSIPYYYAMDY(SEQ ID NO: 39)之HVR-H3；及

(b) 至少一個變異HVR，其中該變異HVR序列包含對SEQ ID NO: 28、29、30、37、38或39中所述序列之至少一個殘基的修飾。在一實施例中，本發明抗體之HVR-L1包含SEQ ID NO: 28之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-L2包含SEQ ID NO: 29之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-L3包含SEQ ID NO: 30之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-H1包含SEQ ID NO: 37之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-H2包含SEQ ID NO: 38之序列。在一實施例中，本發明抗體之HVR-H3包含SEQ ID NO: 39之序列。在一實施例中，包含此等序列(如本文所述組合)之本發明抗體為人類化或人類抗體。在一實施例中，包含此等序列(如本文所述組合)之本發明抗體為人類化或人類抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包含一個、兩個、三個、

四個、五個或六個HVR之抗體，其中各HVR包含選自由SEQ ID NO: 28、29、30、37、38或39組成之群的序列，由該序列組成或基本上由該序列組成。

本發明抗體之變異HVR可在HVR內具有對一或多個殘基的修飾。

在一態樣中，本發明提供一種抗體，其包含圖9-12所述HVR序列中之一個、兩個、三個、四個、五個或全部。

用於宿主個體之治療劑較佳在該個體體內引發對藥劑之極少免疫原性反應至對藥劑無免疫原性反應。在一實施例中，本發明提供該藥劑。舉例而言，在一實施例中，本發明提供一種人類化抗體，其相較於包含SEQ ID NO: 18及20之序列的抗體在宿主個體體內引發及/或預期引發實質上較低水準之人類抗小鼠抗體反應(HAMA)。在另一實例中，本發明提供一種人類化抗體，其引發及/或預期引發最小人類抗小鼠抗體反應(HAMA)或無人類抗小鼠抗體反應(HAMA)。在一實例中，本發明之抗體引發臨床上可接受水準或低於臨床上可接受水準之抗小鼠抗體反應。

本發明之人類化抗體之重鏈及/或輕鏈可變域中可包含一或多個人類及/或人類共同非高變區(例如構架)序列。在一些實施例中，一或多個其他修飾存在於人類及/或人類共同非高變區序列內。在一實施例中，本發明抗體之重鏈可變域包含人類共同構架序列，在一實施例中其為亞群III共同構架序列。在一實施例中，本發明之抗體包含至少一個胺基酸位置處經修飾之變異亞群III共同構架序列。舉例

而言，在一實施例中，變異亞群III共同構架序列可包含位置71、73及/或78中之一或多者之取代。在一實施例中，本發明抗體之輕鏈可變域包含人類共同構架序列，在一實施例中其為κI共同構架序列。在一實施例中，本發明之抗體包含至少一個胺基酸位置處經修飾之變異κI共同構架序列。

如此項技術中已知且如本文在下文中更詳細描述，描繪抗體高變區之胺基酸位置/邊界可視此項技術中已知(下述)之情形及各種定義而改變。可變域中之一些位置可視為雜合之高變位置，此係因為此等位置可根據一組標準而視為屬於高變區，而根據一組不同標準視為在高變區以外。一或多個此等位置亦可存在於延伸之高變區(如下文進一步定義)中。本發明提供在此等雜合之高變位置中包含修飾的抗體。在一實施例中，此等高變位置包括重鏈可變域中位置26-30、33-35B、47-49、57-65、93、94及101-102中之一或多者。在一實施例中，此等雜合之高變位置包括輕鏈可變域中位置24-29、35-36、46-49、56及97中之一或多者。在一實施例中，本發明之抗體包含在一或多個雜合之高變位置處經修飾的人類變異人類亞群共同構架序列。

本發明之抗體可包含任何適合之人類或人類共同輕鏈構架序列，只要抗體展現所需生物學特性(例如所需結合親和力)即可。在一實施例中，本發明之抗體包含人類κ輕鏈構架序列之至少一部分(或全部)。在一實施例中，本發明之抗體包含人類κ亞群I構架共同序列之至少一部分(或全

部)。

在一態樣中，本發明之抗體為結合於細胞毒性劑之人類化抗FcRH5抗體。在一態樣中，結合於細胞毒性劑之人類化抗FcRH5抗體抑制異種移植物中之腫瘤進程。

在一態樣中，人類化抗體與嵌合抗體均為單價抗體。在一實施例中，人類化抗體與嵌合抗體均包含連接於Fc區之單一Fab區。在一實施例中，參考嵌合抗體包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述之連接於人類Fc區之可變域序列。在一實施例中，人類Fc區為IgG(例如IgG1、2、3或4)之Fc區。

在一態樣中，本發明之抗體包括經半胱胺酸工程改造之抗體，其中如WO 2006/034488；US 2007/0092940(以全文引用的方式併入本文中)所揭示，親本抗體之一或多個胺基酸經游離半胱胺酸胺基酸置換。抗FcRH5抗體之任何形式可如此工程改造，亦即突變。舉例而言，親本Fab抗體片段可經工程改造而形成經半胱胺酸工程改造之Fab，在本文中稱作「ThioFab」。類似地，母單株抗體可經工程改造而形成「ThioMab」。應注意，在ThioFab中單一位點突變產生單一工程改造之半胱胺酸殘基，而在ThioMab中，由於IgG抗體之二聚性質，單一位點突變產生兩個工程改造之半胱胺酸殘基。本發明之經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體包括單株抗體、人類化或嵌合單株抗體及抗體之抗原結合片段、融合多肽及優先結合細胞相關之FcRH5多肽的類似物。或者經半胱胺酸工程改造之抗體可包含如

下抗體，其在抗體或Fab之本文所揭示位置處包含半胱胺酸，從而不必改變親本抗體而諸如藉由噬菌體呈現抗體設計及選擇或經由輕鏈及/或重鏈構架序列及恆定區之重新設計(de novo design)進行抗體之序列設計及/或選擇。經半胱胺酸工程改造之抗體包含一或多個游離半胱胺酸胺基酸，其硫氫基反應性值在0.6至1.0；0.7至1.0或0.8至1.0範圍內。游離半胱胺酸胺基酸為已工程改造於親本抗體中且不為二硫橋之一部分的半胱胺酸殘基。經半胱胺酸工程改造之抗體適用於在工程改造之半胱胺酸位點經由例如順丁烯二醯亞胺或鹵基乙醯基連接細胞毒性化合物及/或成像化合物。Cys殘基之硫氫基官能基與順丁烯二醯亞胺基之親核反應性為蛋白質中之任何其他胺基酸官能基(諸如離胺酸殘基之胺基或N末端胺基)的約1000倍。碘乙醯基及順丁烯二醯亞胺試劑中之硫氫基特異性官能基可與胺基反應，但需要較高pH值(>9.0)及較長反應時間(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

在一態樣中，本發明之經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體在任何適合位置包含工程改造之半胱胺酸，其中輕鏈中的位置根據Kabat等人編號(參見Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)，且重鏈(包括Fc區)中的位置根據EU編號(參見Kabat等人，(1991)(前述))。

在一特定態樣中，本發明係關於一種經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體，其包含與以下具有至少約80%胺基酸序列一致性，或者至少約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%胺基酸序列一致性的胺基酸序列：本文所揭示之具有全長胺基酸序列的經半胱胺酸工程改造抗體或本文所揭示之無信號肽的經半胱胺酸工程改造抗體胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明係關於一種分離之經半胱胺酸工程改造抗FcRH5抗體，其包含由與編碼以下之DNA分子之補體雜交的核苷酸序列編碼的胺基酸序列：(a)本文所揭示之具有全長胺基酸序列的經半胱胺酸工程改造抗體、(b)本文所揭示之無信號肽之經半胱胺酸工程改造抗體胺基酸序列、(c)本文所揭示之有或無信號肽的經半胱胺酸工程改造之跨膜抗體蛋白質的細胞外域、(d)由本文所揭示之任何核酸序列編碼的胺基酸序列或(e)本文所揭示之經半胱胺酸工程改造之全長抗體胺基酸序列的任何其他特別定義之片段。

在一特定態樣中，本發明提供一種分離之經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體，其無N末端信號序列及/或無起始甲硫胺酸，且由編碼如...中所述之胺基酸序列的核苷酸序列編碼。本文中亦描述產生其之方法，其中彼等方法包含在適用於表現經半胱胺酸工程改造之抗體的條件下培養包含含有適當編碼核酸分子之載體的宿主細胞，且自細胞培

養物中回收經半胱胺酸工程改造之抗體。

本發明之另一態樣提供一種分離之經半胱胺酸工程改造的抗FcRH5抗體，其為跨膜域缺失或跨膜域失活抗體。本文中亦描述產生其之方法，其中彼等方法包含在適用於表現經半胱胺酸工程改造之抗體的條件下培養包含含有適當編碼核酸分子之載體的宿主細胞，且自細胞培養物中回收經半胱胺酸工程改造之抗體。

在其他態樣中，本發明提供分離之抗FcRH5嵌合經半胱胺酸工程改造抗體，其包含本文所述之融合於異源(非FcRH5)多肽的任何經半胱胺酸工程改造抗體。該等嵌合分子之實例包含本文所述之融合於異源多肽(例如抗原決定基標記序列或免疫球蛋白之Fc區)的任何經半胱胺酸工程改造抗體。

經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體可為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗FcRH5多肽抗體結合於其各別抗原性抗原決定基的抗體。本發明之抗體可視情況結合於生長抑制劑或細胞毒性劑，諸如毒素(包括例如奧瑞他汀、類美登素、多拉司他汀衍生物或刺孢黴素)、抗生素、放射性同位素、核分解酶或其類似物。本發明之抗體可視情況在CHO細胞或細菌細胞中產生，且較佳抑制其所結合之細胞生長或增殖或誘發該細胞之死亡。出於診斷目的，本發明之抗體可進行可偵測地標記、連接於固體支撐物或進行類似處理。

在本發明之其他態樣中，本發明提供包含編碼本文所述

抗FcRH5抗體及抗FcRH5經半胱胺酸工程改造抗體中之任一者之DNA的載體。亦提供包含任何該載體之宿主細胞。以實例之方式，宿主細胞可為CHO細胞、大腸桿菌細胞或酵母細胞。進一步提供一種產生任何本文所述多肽之方法，且該方法包含在適用於表現所需多肽的條件下培養宿主細胞及自細胞培養物中回收所需多肽。

經半胱胺酸工程改造之抗體可適用於治療癌症，且包括特異於細胞表面及跨膜受體及腫瘤相關抗原(TAA)之抗體。該等抗體可以裸抗體(未結合於藥物或標記部分)形式或抗體-藥物結合物(ADC)形式使用。本發明之經半胱胺酸工程改造之抗體可具有位點特異性且與硫氫基反應性試劑有效偶合。硫氫基反應性試劑可為多官能連接子試劑、捕捉標記試劑、螢光團試劑或藥物-連接子中間物。經半胱胺酸工程改造之抗體可用可偵測標記進行標記，固定於固相支撐物上及/或與藥物部分結合。硫氫基反應性可推及於任何抗體，其中可在輕鏈中選自胺基酸範圍L10-L20、L105-L115、L109-L119、L116-L126、L122-L132、L163-L173、L200-L210的範圍內；及重鏈中選自胺基酸範圍H1-H10、H18-H28、H79-H89、H107-H117、H109-H119、H111-H121的範圍內，及Fc區中選自H270-H280、H366-H376、H391-401的範圍內用反應性半胱胺酸胺基酸取代胺基酸，其中如WO2006034488；US 2007/0092940所揭示，胺基酸位置之編號起始於Kabat編號系統之位置1(Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,

第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)且在此後依次延續。硫氫基反應性亦可推及於抗體之特定域，諸如輕鏈恆定域(CL)及重鏈恆定域CH1、CH2及CH3。可分別在完整抗體IgA、IgD、IgE、IgG及IgM(包括IgG亞類IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2)之重鏈恆定域α、δ、ε、γ及μ中進行硫氫基反應性值為0.6及更高之半胱胺酸置換。該等抗體及其用途揭示於WO2006/034488；US 2007/0092940中。

本發明之經半胱胺酸工程改造之抗體較佳保留其野生型親本抗體對應物之抗原結合能力。因此，經半胱胺酸工程改造之抗體能夠較佳特異性結合於抗原。該等抗原包括例如腫瘤相關之抗原(TAA)、細胞表面受體蛋白及其他細胞表面分子、跨膜蛋白、信號傳導蛋白、細胞存活調節因子、細胞增殖調節因子、與組織發育或分化相關(例如已知或懷疑在功能上促進組織發育或分化)之分子、淋巴激素、細胞激素、參與細胞週期調節之分子、參與血小管生成之分子及與血管生成相關(例如已知或懷疑在功能上促進血管生成)之分子。腫瘤相關之抗原可為群分化因子(cluster differentiation factor)(亦即CD蛋白，包括(但不限於)FcRH5)。本發明之經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體保留其親本抗FcRH5抗體對應物之抗原結合能力。因此，本發明之經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體能夠較佳特異性結合於FcRH5抗原，包括人類抗FcRH5同功異型物β及/或α，包括當該等抗原表現於細胞(包括(但不限於)B

細胞)表面上時。

在一態樣中，本發明之抗體可與可經由反應性部分、活化部分或反應性半胱胺酸硫氫基共價連接於抗體的任何標記部分結合(Singh等人(2002) Anal. Biochem. 304:147-15；Harlow E.及Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY；Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 第2版，CRC Press, Boca Raton, FL)。所連接之標記可用於：(i)提供可偵測信號；(ii)與第二標記相互作用以調節第一或第二標記所提供之可偵測信號，產生FRET(螢光共振能量傳遞)；(iii)穩定與抗原或配位體之相互作用或提高與抗原或配位體之結合親和力；(iv)藉由電荷、疏水性、形狀或其他物理參數影響移動性(例如電泳移動率)或細胞滲透性；或(v)提供捕捉部分以調節配位體親和力、抗體/抗原結合或離子複合。

經標記半胱胺酸工程改造抗體可適用於診斷分析，例如偵測特定細胞、組織或血清中所關注抗原之表現。對於診斷應用，抗體通常用可偵測部分標記。可利用多種標記，其一般分成以下類別：

放射性同位素(放射性核種)，諸如^{3}H、^{11}C、^{14}C、^{18}F、^{32}P、^{35}S、^{64}Cu、^{68}Ga、^{86}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{133}Xe、^{177}Lu、^{211}At或^{213}Bi。經放射性同位素標記之抗體適用於受體靶向成像實驗。抗體可使用Current Protocols in Immunology，第1卷及第2卷，Coligen等人

編，Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)中所述之技術用結合、螯合或以其他方式錯合放射性同位素金屬的配位體試劑標記，其中該試劑與抗體之工程改造半胱胺酸硫氫基反應。可錯合金屬離子之螯合配位體包括DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及TETA(Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核種可經由與本發明之抗體-藥物結合物錯合靶向(Wu等人(2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146)。

連接子試劑(諸如DOTA-順丁烯二醯亞胺(4-順丁烯二醯亞胺基丁醯胺基苯甲基-DOTA))可根據Axworthy等人(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807之程序藉由使胺基苯甲基-DOTA與用氯甲酸異丙酯活化的4-順丁烯二醯亞胺基丁酸(Fluka)反應製備。DOTA-順丁烯二醯亞胺試劑與經半胱胺酸工程改造之抗體的游離半胱胺酸胺基酸反應且在抗體上提供金屬錯合配位體(Lewis等人(1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。螯合性連接子標記試劑(諸如DOTA-NHS(1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸單(N-羥基丁二醯亞胺酯))可市售(Macrocyclics, Dallas, TX)。用經放射性核種標記之抗體進行受體標靶成像可藉由偵測及定量腫瘤組織中抗體之進行性積累而提供路徑活化之標記(Albert等人(1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210)。結合之放射性金屬可在溶酶體降解之後保留在細胞內。

揭示適用作抗體標記以用於成像實驗的金屬螯合錯合

物：US 5342606；US 5428155；US 5316757；US 5480990；US 5462725；US 5428139；US 5385893；US 5739294；US 5750660；US 5834456；Hnatowich等人(1983) J. Immunol. Methods 65:147-157；Meares等人(1984) Anal. Biochem. 142:68-78；Mirzadeh等人(1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65；Meares等人(1990) J. Cancer 1990, 增刊，10:21-26；Izard等人(1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350；Nikula等人(1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90；Camera等人(1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62；Kukis等人(1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110；Verel等人(2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670；Camera等人(1994) J. Nucl. Med. 21:640-646；Ruegg等人(1990) Cancer Res. 50:4221-4226；Verel等人(2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670；Lee等人(2001) Cancer Res. 61:4474-4482；Mitchell等人(2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112；Kobayashi等人(1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111；Miederer等人(2004) J. Nucl. Med. 45:129-137；DeNardo等人(1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90；Blend等人(2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363；Nikula等人(1999) J. Nucl. Med. 40:166-76；Kobayashi等人(1998) J. Nucl. Med. 39:829-36；Mardirossian等人(1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74；Roselli等人(1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

螢光標記，諸如稀土螯合物(銪螯合物)，螢光素類，包括FITC、5-羧基螢光素、6-羧基螢光素；若丹明(rhodamine)類，包括TAMRA；丹磺醯基；麗斯胺

(Lissamine)；花青；藻紅素；德克薩斯紅(Texas Red)；及其類似物。螢光標記可使用例如前述Current Protocols in Immunology中所揭示之技術結合於抗體。螢光染料及螢光標記試劑包括可購自Invitrogen/Molecular Probes(Eugene, OR)及Pierce Biotechnology, Inc.(Rockford, IL)者。

可利用或揭示(US 4275149)各種酶-受質標記。酶一般催化發色受質之化學改變，該改變可使用各種技術測量。舉例而言，酶可催化受質中之顏色變化，該顏色變化可以分光光度法測量。或者，酶可改變受質之螢光或化學發光。定量螢光變化之技術如上所述。化學發光受質由化學反應電子激發，且可隨後發射可測量之光(使用例如化學光度計)或向螢光受者提供能量。酶標記之實例包括螢光素酶(例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶；US 4737456)、螢光素、2,3-二氫酞嗪二酮、蘋果酸去氫酶、脲酶、過氧化酶(諸如辣根過氧化酶(HRP))、鹼性磷酸酶(AP)、β-半乳糖苷酶、葡糖澱粉酶、溶菌酶、醣氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸去氫酶)、雜環氧化酶(諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶)、乳過氧化酶、微過氧化酶及其類似物。酶結合於抗體之技術描述於O'Sullivan等人(1981)「Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay」, Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis編)，Academic Press, New York, 73:147-166中。

酶-受質組合之實例包括例如：

(i) 辣根過氧化酶(HRP)與作為受質之過氧化氫酶，其中過氧化氫酶氧化染料前驅物(例如鄰苯二胺(OPD)或3,3',5,5'-四甲基聯苯胺鹽酸鹽(TMB))；

(ii) 鹼性磷酸酶(AP)與作為發色受質之對硝基苯基磷酸鹽；及

(iii) β-D-半乳糖苷酶(β-D-Gal)與發色受質(例如對硝基苯基-β-D-半乳糖苷酶)或螢光受質4-甲基香豆素-β-D-半乳糖苷酶。

熟習此項技術者可使用多種其他酶-受質組合。關於一般評述參見US 4275149及US 4318980。

標記可與胺基酸側鏈、活化胺基酸側鏈、經半胱胺酸工程改造之抗體及其類似物間接結合。舉例而言，抗體可與生物素結合，且上述三大類標記中之任一者可與抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素結合，或反之亦然。生物素選擇性結合於抗生蛋白鏈菌素，且因此標記可與抗體以此間接方式結合。或者，為使標記與多肽變異體間接結合，使多肽變異體與小半抗原(例如地高辛(digoxin))結合，且使上述不同類型標記之一與抗半抗原多肽變異體(例如抗地高辛抗體)結合。因此，可使標記與多肽變異體間接結合(Hermanson, G. (1996), Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego)。

本發明之抗體可用於任何已知分析方法，諸如ELISA、競爭性結合分析法、直接及間接夾心分析法及免疫沈澱分析法(Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of

Techniques, 第147-158頁，CRC Press, Inc.)。

偵測標記可適用於定位、觀察及定量結合或識別事件。本發明之經標記抗體可偵測細胞表面受體。經可偵測標記之抗體的另一用途為基於珠粒之免疫捕捉方法，其包含使珠粒與經螢光標記之抗體結合，且在結合配位體之後偵測螢光信號。類似結合偵測方法利用表面電漿共振(SPR)作用來測量及偵測抗體-抗原相互作用。

偵測標記(諸如螢光染料及化學發光染料)(Briggs等人(1997)「Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids」, J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058)提供可偵測信號且一般適用於標記抗體，較佳具有以下特性：(i)經標記抗體應產生極高信號而背景值較低，使得可在無細胞與基於細胞之分析法中靈敏地偵測少量抗體；及(ii)經標記抗體應對光穩定，使得可觀察、監測及記錄螢光信號而無顯著光致漂白。對於涉及經標記抗體與膜或細胞表面(尤其活細胞)的細胞表面結合的應用，標記較佳(iii)具有優良水溶性以達成有效結合濃度及檢測靈敏度，且(iv)對活細胞無毒以免破壞細胞之正常代謝過程或引起早熟細胞死亡。

細胞螢光強度之直接定量及螢光標記事件(例如肽-染料結合物之細胞表面結合)之計數可在使用活細胞或珠粒自動進行混合與讀取型(mix-and-read)非放射性分析法(Miraglia,「Homogeneous cell-and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume

assay technology」, (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204)之系統(FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.)上進行。經標記抗體之使用亦包括細胞表面受體結合分析法、免疫捕捉分析法、螢光連接免疫吸附分析法(fluorescence linked immunosorbent assay，FLISA)、卡斯蛋白酶裂解(Zheng,「Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo」, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23；US 6372907)、細胞凋亡(Vermes,「A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V」 (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51)及細胞毒性分析法。可使用螢光測定微體積分析技術鑑別由靶向至細胞表面之分子所產生的上調或下調(Swartzman,「A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology」, (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

本發明之經標記抗體適用作如下生物醫學及分子成像之各種方法及技術的成像生物標記及探針：諸如(i)MRI(磁共振成像)；(ii)MicroCT(電腦化斷層攝影術)；(iii)SPECT(單光子發射電腦化斷層攝影術)；(iv)PET(正電子發射斷層攝影術)(Chen等人(2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49)；(v)生物發光；(vi)螢光；及(vii)超音波。免疫閃爍攝影術為如下成像程序，其中向動物或人類患者投與用放射性物質

標記之抗體且拍攝體內抗體所位於之位點的相片(US 6528624)。成像生物標記可進行客觀測量且作為正常生物過程、病原性過程或對治療介入之藥理學反應的指標來評估。生物標記可具有數種類型：0型為疾病之自然史標記且與已知臨床指標(例如類風濕性關節炎中滑液發炎的MRI評定)縱向關聯；I型標記根據作用機制捕捉介入之作用，儘管該機制可能與臨床結果不相關；II型標記充當替代終點，其中生物標記之變化或生物標記之信號預測臨床利益以「證實」靶向反應，諸如藉由CT測量之類風濕性關節炎中的骨侵蝕。因此，成像生物標記可提供關於以下之藥效(PD)治療資訊：(i)標靶蛋白之表現，(ii)治療劑與標靶蛋白之結合，亦即選擇性，及(iii)清除及半衰期藥代動力學資料。活體內成像生物標記相對於基於實驗室之生物標記的優勢包括：非侵襲性處理、可定量、全身評定、反覆給藥及評定(亦即多個時間點)及臨床前(小動物)至臨床(人類)結果之潛在可轉移作用。對於一些應用，生物成像替代臨床前研究中之動物實驗或使動物實驗數減至最低。

肽標記法為吾人所熟知。參見Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.；Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2；Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London；Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2；Glazer等人(1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T.

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

用兩個部分(螢光報導基團及淬滅基團)充分近接地標記之肽及蛋白質進行螢光共振能量傳遞(FRET)。報導基團通常為由特定波長之光激發且向受者、或淬滅基團傳遞能量的螢光染料，其在最大亮度發射下具有適當斯托克斯位移(Stokes shift)。螢光染料包括具有擴展之芳香性的分子，諸如螢光素及若丹明及其衍生物。螢光報導基團可藉由完整肽中之淬滅部分而部分或顯著淬滅。肽由肽酶或蛋白酶裂解之後，可測量到螢光之可偵測增加(Knight, C. (1995)「Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes」, Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

本發明之經標記抗體亦可用作親和力純化劑。在此方法中，使用此項技術中熟知之方法將經標記抗體固定於固相(諸如葡聚糖凝膠(Sephadex)樹脂或濾紙)上。使經固定抗

體與含有欲純化抗原之樣品接觸，且此後用適合之溶劑洗滌支撐物，該溶劑實質上移除樣品中除欲純化之結合於經固定多肽變異體之抗原以外的所有物質。最後，用另一適合之溶劑(諸如甘胺酸緩衝液(pH 5.0))洗滌支撐物，該溶劑將自多肽變異體釋放抗原。

標記試劑通常具有反應性官能基，其可(i)與經半胱胺酸工程改造之抗體的半胱胺酸硫氫基直接反應以形成經標記抗體，(ii)與連接子試劑反應以形成連接子-標記中間物，或(iii)與連接子抗體反應以形成經標記抗體。標記試劑之反應性官能基包括：順丁烯二醯亞胺、鹵基乙醯基、碘乙醯胺丁二醯亞胺酯(例如NHS，N-羥基丁二醯亞胺)、異硫氰酸酯、磺醯氯、2,6-二氯三嗪基、五氟苯酯及胺基磷酸酯，但亦可使用其他官能基。

例示性反應性官能基為可偵測標記(例如生物素或螢光染料)之羧基取代基的N-羥基丁二醯亞胺酯(NHS)。標記之NHS酯可預先形成、分離、純化及/或表徵，或可當場形成且與抗體之親核基團反應。通常，標記之羧基形式藉由與碳化二亞胺試劑(例如二環己基碳化二亞胺、二異丙基碳化二亞胺)或鎓試劑(例如TSTU(O-(N-丁二醯亞胺基)-N,N,N',N'-四甲基鎓四氟硼酸鹽)、HBTU((O-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基鎓六氟磷酸鹽)或HATU (O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基鎓六氟磷酸鹽)、活化劑(諸如1-羥基苯并三唑(HOBt)及N-羥基丁二醯亞胺)之某組合反應活化以產生標記之NHS酯。在一些情況下，標記及抗

體可藉由當場活化標記且與抗體反應一步形成標記-抗體結合物而偶合。其他活化及偶合試劑包括TBTU(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基鎓六氟磷酸鹽)、TFFH(N,N',N'',N'''-四甲基鎓2-氟-六氟磷酸鹽)、PyBOP(苯并三唑-1-基-氧基-參-(N-吡咯啶基)-鏻六氟磷酸鹽)、EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氫-喹啉)、DCC(二環己基碳化二亞胺)；DIPCDI(二異丙基碳化二亞胺)、MSNT(1-(均三甲苯-2-磺醯基)-3-硝基-1H-1,2,4-三唑)及芳基磺醯基鹵化物(例如三異丙基苯磺醯氯)。

本發明之白蛋白結合肽-Fab化合物：

在一態樣中，本發明之抗體融合於白蛋白結合蛋白。血漿蛋白結合可為改良短暫存在分子之藥代動力學特性的有效方式。白蛋白為血漿中最多之蛋白質。血清白蛋白結合肽(ABP)可改變融合之活性域蛋白之藥效學，包括改變組織吸收、穿透及擴散。此等藥效學參數可藉由特別選擇適當血清白蛋白結合肽序列而調節(US 20040001827)。一系列白蛋白結合肽藉由噬菌體呈現篩選而鑑別(Dennis等人，(2002)「Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins」J Biol Chem. 277:35035-35043；WO 01/45746)。本發明之化合物包括以下所教示之ABP序列：(i)Dennis等人，(2002) J Biol Chem. 277:35035-35043，表III及表IV，第35038頁；(ii)US 20040001827，[0076] SEQ ID NO: 9-22；及(iii)WO 01/45746，第12-13頁，其全部以引用的方式併入本文中。白蛋白結合肽

(ABP)-Fab藉由使白蛋白結合肽與Fab重鏈之C末端以1:1化學計量比(1 ABP/1 Fab)融合而工程改造。在兔及小鼠體內可展示此等ABP-Fab與白蛋白之締合使抗體半衰期延長超過25倍。因此可將上述反應性Cys殘基引入此等ABP-Fab中，且用於與細胞毒性藥位點特異性結合，繼而進行活體內動物研究。

例示性白蛋白結合肽序列包括(但不限於)SEQ ID NO: 47-51中所列之胺基酸序列：

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 47
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 48
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO: 49
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO: 50
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO: 51

抗體-藥物結合物

在另一態樣中，本發明提供免疫結合物或抗體-藥物結合物(ADC)，其包含結合於細胞毒性劑(諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(亦即放射性結合物))之抗體。在另一態樣中，本發明另外提供使用該等免疫結合物之方法。在一態樣中，免疫結合物包含上述共價連接於細胞毒性劑或可偵測試劑之抗FcRH5抗體中之任一者。

在一態樣中，本發明之FcRH5抗體結合於FcRH5上與另一FcRH5抗體所結合相同的抗原決定基。在另一實施例

中，本發明之FcRH5抗體結合於FcRH5上與另一FcRH5抗體(亦即市售抗FcRH5抗體)所結合相同的抗原決定基。

在另一態樣中，本發明之FcRH5抗體結合於FcRH5上不同於另一FcRH5抗體所結合之抗原決定基的抗原決定基。在另一實施例中，本發明之FcRH5抗體結合於FcRH5上不同於另一FcRH5抗體(亦即市售抗FcRH5抗體)所結合之FcRH5上抗原決定基的抗原決定基。

在一態樣中，本發明之抗體特異性結合於第一動物物種之FcRH5，且不會特異性結合於第二動物物種之FcRH5。在一實施例中，第一動物物種為人類及/或靈長類動物(例如獼猴(cynomolgus monkey))，且第二動物物種為鼠類(例如小鼠)及/或犬類。在一實施例中，第一動物物種為人類。在一實施例中，第一動物物種為靈長類動物，例如獼猴。在一實施例中，第二動物物種為鼠類，例如小鼠。在一實施例中，第二動物物種為犬類。

在一態樣中，本發明提供如下組合物，其包含一或多種本發明之抗體及載劑。在一實施例中，載劑為醫藥學上可接受之載劑。

在一態樣中，本發明提供編碼本發明FcRH5抗體之核酸。

在一態樣中，本發明提供包含本發明核酸之載體。

在一態樣中，本發明提供包含本發明核酸或載體之宿主細胞。載體可具有任何類型，例如重組載體，諸如表現載體。可使用多種宿主細胞中之任一者。在一實施例中，宿

主細胞為原核細胞，例如大腸桿菌。在一實施例中，宿主細胞為真核細胞，例如哺乳動物細胞，諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

在一態樣中，本發明提供製備本發明抗體之方法。舉例而言，本發明提供一種製備FcRH5抗體(如本文所定義其包括全長抗體及其片段)之方法，該方法包含在適合之宿主細胞中表現編碼該抗體(或其片段)之本發明重組載體，及回收該抗體。

在一態樣中，本發明提供一種製品，其包含容器；及該容器內所含之組合物，其中該組合物包含一或多種本發明FcRH5抗體。在一實施例中，組合物包含本發明之核酸。在一實施例中，包含抗體之組合物另外包含載劑，其在一些實施例中為醫藥學上可接受之載劑。在一實施例中，本發明之製品另外包含向個體投與組合物(例如抗體)之說明書。

在一態樣中，本發明提供一種套組，其包含含有組合物的第一容器，該組合物包含一或多種本發明FcRH5抗體；及包含緩衝劑之第二容器。在一實施例中，緩衝劑為醫藥學上可接受之緩衝劑。在一實施例中，包含拮抗抗體之組合物另外包含載劑，其在一些實施例中為醫藥學上可接受之載劑。在一實施例中，套組另外包含向個體投與組合物(例如抗體)之說明書。

在一態樣中，本發明提供本發明FcRH5抗體之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫

瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。在一實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供本發明核酸之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。在一實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供本發明表現載體之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。在一實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供本發明宿主細胞之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤

及/或細胞增殖病症)的藥物。在一實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供本發明製品之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。在一實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供本發明套組之用途，其係用於製備供治療性及/或預防性處理疾病(諸如癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症)的藥物。在一實施例中，癌症、腫瘤及/或細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供一種抑制表現FcRH5之細胞生長的方法，該方法包含使該細胞與本發明之抗體接觸，從

而抑制該細胞之生長。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療性處理患有包含表現FcRH5之細胞的癌性腫瘤之哺乳動物的方法，該方法包含向該哺乳動物投與治療有效量之本發明抗體，從而有效治療該哺乳動物。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療或預防與FcRH5表現增加相關之細胞增殖病症的方法，該方法包含向需要該治療之個體投與有效量之本發明抗體，從而有效治療或預防該細胞增殖病症。在一實施例中，該增殖病症為癌症。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種抑制細胞生長之方法，其中該細胞之生長至少部分依賴於FcRH5之生長加強作用，該方法包含使該細胞與有效量之本發明抗體接觸，從而抑制該細胞之生長。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療性處理哺乳動物之腫瘤的方法，其中該腫瘤之生長至少部分依賴於FcRH5之生長加強作用，該方法包含使該細胞與有效量之本發明抗體接觸，從而有效治療該腫瘤。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實施例中，抗體結合於生長抑制劑。

在一態樣中，本發明提供一種治療癌症之方法，其包含

向患者投與包含本文所述之免疫結合物，可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑的醫藥調配物。在一實施例中，癌症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。在一實施例中，向患者投與細胞毒性劑與抗體-藥物結合化合物之組合。

在一態樣中，本發明提供一種抑制B細胞增殖之方法，其包含在允許包含本發明抗體之免疫結合物結合於FcRH5的條件下使細胞暴露於該免疫結合物。在一實施例中，B細胞增殖係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。在一實施例中，B細胞為異種移植物。在一實施例中，暴露在活體外進行。在一實施例中，暴露在活體內進行。

在一態樣中，本發明提供一種判定懷疑含有FcRH5之樣品中存在FcRH5的方法，該方法包含使該樣品暴露於本發明之抗體，及測定該抗體與該樣品中FcRH5之結合，其中該抗體與該樣品中FcRH5之結合指示該樣品中存在該蛋白質。在一實施例中，樣品為生物樣品。在另一實施例中，生物樣品包含B細胞。在一實施例中，生物樣品係來自患

有或懷疑患有如下B細胞病症及/或B細胞增殖病症的哺乳動物：包括(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，提供一種診斷與表現FcRH5之細胞(諸如B細胞)增加相關之細胞增殖病症的方法，該方法包含使生物樣品中之測試細胞與任何上述抗體接觸；藉由偵測抗體與FcRH5之結合測定結合於該樣品中之測試細胞的抗體含量；及比較結合於對照樣品中之細胞的抗體含量，其中結合之抗體含量校正為測試及對照樣品中表現FcRH5之細胞數，且其中測試樣品中結合之抗體相較於對照樣品的高含量表明存在與表現FcRH5之細胞相關的細胞增殖病症。

在一態樣中，提供一種偵測血液或血清中可溶性FcRH5之方法，該方法包含使來自懷疑患有B細胞增殖病症之哺乳動物的血液或血清的測試樣品與本發明之抗FcRH5抗體接觸，及偵測測試樣品中可溶性FcRH5相對於來自正常哺乳動物之血液或血清的對照樣品的增加。在一實施例中，該偵測方法適用作診斷與哺乳動物之血液或血清中可溶性FcRH5增加相關之B細胞增殖病症的方法。

在一態樣中，提供一種使本發明之抗體結合於表現FcRH5之細胞的方法，該方法包含使該細胞與本發明之抗體接觸。在一實施例中，抗體結合於細胞毒性劑。在一實

施例中，抗體結合於生長抑制劑。

可使用本發明之方法影響任何適合之病理狀態，例如與FcRH5表現相關之細胞及/或組織。在一實施例中，在本發明之方法中靶向之細胞為造血細胞。舉例而言，造血細胞可為選自由淋巴細胞、白血球、血小板、紅血球及自然殺手細胞組成之群的造血細胞。在一實施例中，在本發明之方法中靶向之細胞為B細胞或T細胞。在一實施例中，在本發明之方法中靶向之細胞為癌細胞。舉例而言，癌細胞可為選自由淋巴瘤細胞、白血病細胞或骨髓瘤細胞組成之群的癌細胞。

本發明之方法可另外包含其他處理步驟。舉例而言，在一實施例中，方法另外包含以下步驟，其中使靶向細胞及/或組織(例如癌細胞)暴露於輻射治療或化學治療劑。

在一態樣中，本發明提供包含投與有效量之抗FcRH5抗體與有效量之另一治療劑(諸如抗血管生成劑、另一抗體、化學治療劑、細胞毒性劑、免疫抑制劑、前藥、細胞激素、細胞毒性放射療法、皮質類固醇、抗嘔吐劑、癌症疫苗、止痛劑或生長抑制劑)之組合的方法。舉例而言，抗FcRH5抗體或免疫結合物與抗癌劑或抗血管生成劑組合使用以治療各種贅生性或非贅生性病狀。在特定實施例中，抗FcRH5抗體與以下組合使用：Velcade®(硼替佐米)、Revlimid®(來那度胺)、他莫昔芬、來曲唑、依西美坦、阿那曲唑、伊立替康、西妥昔單抗、氟維司群、長春瑞濱、貝伐單抗、長春新鹼(vincristine)、順鉑、吉西他

濱、甲胺喋呤(methotrexate)、長春鹼(vinblastine)、卡波鉑、太平洋紫杉醇、多西他賽、培美曲塞、5-氟尿嘧啶、小紅莓、硼替佐米、來那度胺、地塞米松、美法侖、潑尼松、長春新鹼、沙力度胺。

視欲治療之特定癌症適應症而定，本發明之組合療法可與其他治療劑(諸如化學治療劑)或其他療法(諸如放射療法或手術)組合。多種已知化學治療劑可用於本發明之組合療法。較佳使用治療特定適應症之彼等標準化學治療劑。欲用於組合中之各治療劑之劑量或頻率較佳等同於或小於當在無其他藥劑的情況下使用時相應藥劑之劑量或頻率。

如本文所述，多發性骨髓瘤及伯基特淋巴瘤細胞株中已觀察到FcRH5(或IRTA2)表現異常。因此，在本發明方法之一實施例中，所靶向之細胞(例如癌細胞)為如下細胞，其相較於不表現FcRH5之細胞其表現FcRH5。在另一實施例中，靶向細胞為癌細胞，其中相較於相同組織類型之正常非癌細胞，其FcRH5表現增加。在一實施例中，本發明之方法使靶向細胞死亡。

在本發明之其他態樣中，本發明提供包含編碼任何本文所述抗體之DNA的載體。亦提供包含任何該載體之宿主細胞。以實例之方式，宿主細胞可為CHO細胞、大腸桿菌細胞或酵母細胞。進一步提供一種產生任何本文所述抗體之方法，且該方法包含在適用於表現所需抗體的條件下培養宿主細胞及自細胞培養物中回收所需抗體。

在另一態樣中，本發明係關於一種相關組合物，其包含

本文所述之抗FcRH5抗體與載劑之組合。視情況，該載劑為醫藥學上可接受之載劑。

本發明之另一態樣係針對本文所述之抗FcRH5多肽抗體之用途，其係用於製備適用於治療對抗FcRH5多肽抗體起反應之病狀的藥物。

本發明之另一態樣為一種組合物，其包含式I之抗體-藥物化合物之混合物，其中每個抗體之平均藥物負載為約2個至約5個或約3個至約4個。

本發明之另一態樣為一種醫藥組合物，其包括式I ADC化合物、式I ADC化合物之混合物或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

另一態樣提供一種醫藥組合，其包含式I ADC化合物及具有抗癌特性或其他治療作用之第二化合物。

另一態樣為殺滅腫瘤細胞或癌細胞或抑制腫瘤細胞或癌細胞之增殖的方法，其包含用有效殺滅腫瘤細胞或癌細胞或抑制腫瘤細胞或癌細胞之增殖的一定量之式I抗體-藥物結合物或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物處理該等細胞。

另一態樣為一種治療癌症之方法，其包含向患者投與治療有效量之醫藥組合物，包括式I ADC。

另一態樣包括製品，亦即套組，其包含抗體-藥物結合物、容器及指示治療之包裝插頁或標籤。

本發明之一態樣為一種製備式I抗體藥物結合化合物之

方法，其包含以下步驟：(a)使經半胱胺酸工程改造之抗體的工程改造半胱胺酸基團與連接子試劑反應以形成抗體-連接子中間物Ab-L；及(b)使Ab-L與經活化藥物部分D反應；由此形成抗體-藥物結合物；或包含以下步驟：(c)使藥物部分之親核基團與連接子試劑反應以形成藥物-連接子中間物D-L；及(d)使D-L與經半胱胺酸工程改造之抗體的工程改造半胱胺酸基團反應；由此形成抗體-藥物結合物。

本發明之一態樣為一種偵測癌細胞之分析法，其包含：(a)使細胞暴露於經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體-藥物結合物；及(b)測定該經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體-藥物結合化合物結合於細胞之程度。

A. **抗FcRH5抗體**

在一實施例中，本發明提供可在本文中用作治療劑之抗FcRH5抗體。例示性抗體包括多株、單株、人類化、雙特異性及雜結合抗體。

1. **多株抗體**

較佳藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射相關抗原及佐劑在動物體內產生多株抗體。宜使相關抗原(尤其在使用合成肽時)結合於在欲免疫物種體內具有免疫原性之蛋白質。舉例而言，抗原可使用雙官能或衍生試劑(例如馬來醯亞胺基苯甲醯基磺酸基丁二醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基結合)、N-羥基丁二醯亞胺(經由離胺酸殘基)、戊二醛、丁二酸酐、$SOCl_2$或$R^1N=C=NR$，其中R及R^1為不同烷基)結

合於匙孔螺血氰蛋白(KLH)、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑。

藉由將例如100 μg或5 μg之蛋白質或結合物(分別針對兔或小鼠)與3體積之弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)組合且在多個位點皮內注射該溶液而使動物對抗原、免疫原性結合物或衍生物免疫。一個月以後，藉由在多個位點皮下注射用弗氏完全佐劑中之初始量之1/5至1/10的肽或結合物使動物加強免疫。7至14日之後，使該等動物出血且分析血清之抗體力價。使動物加強免疫直至力價平穩。亦可在重組細胞培養物中製備蛋白質融合物形式之結合物。凝集劑(諸如礬)亦適用於增強免疫反應。

2. 單株抗體

單株抗體可使用由Kohler等人，**Nature**, 256:495 (1975)首次描述之融合瘤法製備或可藉由重組DNA法(美國專利第4,816,567號)製備。

在融合瘤法中，如上所述使小鼠或其他適當之宿主動物(諸如倉鼠)免疫以誘發淋巴細胞，該等淋巴細胞產生或能夠產生將特異性結合於用於免疫之蛋白質的抗體。或者，可在活體外使淋巴細胞免疫。免疫之後，分離淋巴細胞且隨後使用適合之融合劑(諸如聚乙二醇)與骨髓瘤細胞株融合，形成融合瘤細胞(Goding, **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice**，第59-103頁(Academic Press, 1986))。

將由此製備出之融合瘤細胞接種且生長於適合之培養基中，該培養基較佳含有一或多種抑制未融合親本骨髓瘤細

胞(亦稱作融合搭配物)之生長或存活的物質。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤之選擇性培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質阻止缺乏HGPRT之細胞的生長。

較佳融合搭配物骨髓瘤細胞為有效融合、支持所選抗體產生細胞穩定高含量產生抗體且對針對未融合親本細胞選擇之選擇性培養基敏感的骨髓瘤細胞。較佳骨髓瘤細胞株為鼠類骨髓瘤株，諸如源自MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤(購自薩克研究院細胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center)，San Diego, California USA)及SP-2及衍生物，例如X63-Ag8-653細胞(購自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)，Manassas, Virginia, USA)的骨髓瘤細胞株。亦已描述人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤(heteromyeloma)細胞株以用於產生人類單株抗體(Kozbor, **J. Immunol.,** 133:3001 (1984)；及Brodeur等人，**Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications**，第51-63頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

分析生長融合瘤細胞之培養基針對抗原的單株抗體產生。較佳地，藉由免疫沈澱或藉由活體外結合分析法(諸如放射免疫分析法(RIA)或酶聯免疫吸附分析法(ELISA))測定融合瘤細胞所產生之單株抗體之結合特異性。

單株抗體之結合親和力可例如由Munson等人，**Anal. Biochem.**, 107:220 (1980)中所述之斯卡查德分析(Scatchard

analysis)來測定。

在鑑別到產生具有所需特異性、親和力及/或活性之抗體的融合瘤細胞之後，該等純系可藉由限制稀釋程序來次選殖且藉由標準方法生長(Goding, **Monoclonal Antibodies: Principles and Practice**，第59-103頁(Academic Press, 1986))。適於此目的之培養基包括例如D-MEM或RPMI-1640培養基。另外，融合瘤細胞可例如藉由於小鼠體內腹膜內注射該等細胞而在動物體內在活體內以腹水性腫瘤形式生長。

藉由習知抗體純化程序(諸如親和層析(例如使用蛋白A或蛋白質G-瓊脂糖)或離子交換層析、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析等)使次純系所分泌之單株抗體與培養基、腹水性流體或血清適合地分離。

易於使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼鼠類抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離編碼單株抗體之DNA且對其進行測序。融合瘤細胞充當該DNA之較佳來源。分離之後，可將DNA置於表現載體中，隨後將其轉染於宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)(否則該等宿主細胞不會產生抗體蛋白質)中以在重組宿主細胞中合成單株抗體。關於在細菌中重組表現編碼抗體之DNA的評述文章包括Skerra等人，**Curr. Opinion in Immunol.**, 5:256-262 (1993) and Plückthun, **Immunol. Revs.** 130:151-188 (1992)。

在另一實施例中，單株抗體或抗體片段可自使用McCafferty等人，**Nature**, 348:552-554 (1990)中所述之技

術產生的抗體噬菌體庫分離。Clackson等人，**Nature**, 352:624-628 (1991)及Marks等人，**J. Mol. Biol.**, 222:581-597 (1991)分別描述使用噬菌體庫分離鼠類及人類抗體。後續公開案描述藉由鏈改組(Marks等人，**Bio/Technology**, 10:779-783 (1992))以及組合感染及活體內重組作為構築極大噬菌體庫之策略(Waterhouse等人，**Nuc. Acids. Res.** 21:2265-2266 (1993))來產生高親和力(nM範圍)人類抗體。因此，此等技術為傳統用於分離單株抗體之單株抗體融合瘤技術的可行替代方法。

編碼抗體之DNA可例如藉由以下而修飾以產生嵌合或融合抗體多肽：用人類重鏈及輕鏈恆定域(C_H及C_L)序列取代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，**Proc. Natl Acad. Sci. USA**, 81:6851 (1984))，或使免疫球蛋白編碼序列與非免疫球蛋白多肽(異源多肽)之全部或一部分編碼序列融合。非免疫球蛋白多肽序列可取代抗體之恆定域，或其取代抗體之一個抗原結合位點的可變域以產生包含對一種抗原具有特異性之一個抗原結合位點及對不同抗原具有特異性之另一個抗原結合位點的嵌合二價抗體。

3. 人類及人類化抗體

本發明之抗FcRH5抗體可另外包含人類化抗體或人類抗體。非人類(例如鼠類)抗體之人類化形式為含有源自非人類免疫球蛋白之極少序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$或抗體之其他抗

原結合子序列)。人類化抗體包括人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中該接受者之互補決定區(CDR)之殘基已經具有所需特異性、親和力及能力之非人種(諸如小鼠、大鼠或兔)抗體(供者抗體)之CDR殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架殘基置換為相應非人類殘基。人類化抗體亦可包含既不存在於接受者抗體中亦不存在於輸入CDR或構架序列中之殘基。一般而言，人類化抗體包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中所有或實質上所有CDR區對應於非人類免疫球蛋白之CDR區，且所有或實質上所有FR區為人類免疫球蛋白共同序列之FR區。人類化抗體最佳亦包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常人類免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分[Jones等人，**Nature, 321**:522-525 (1986)；Riechmann等人，**Nature, 332**:323-329 (1988)；及Presta, **Curr. Op. Struct. Biol., 2**:593-596 (1992)]。

使非人類抗體人類化的方法為此項技術中所熟知。一般而言，人類化抗體具有一或多個自非人類之來源引入抗體中之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基通常稱作「輸入」殘基，其通常取自「輸入」可變域。人類化可基本上按照Winter及同事之方法[Jones等人，**Nature, 321**:522-525 (1986)；Riechmann等人，**Nature, 332**:323-327 (1988)；Verhoeyen等人，**Science, 239**:1534-1536 (1988)]，藉由用齧齒動物CDR或CDR序列取代人類抗體之相應序列來執行。因此，該等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第

4,816,567號)，其中實質上少於完整人類可變域已經非人種的相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為一些CDR殘基及可能之一些FR殘基經齧齒動物抗體之類似位點的殘基取代的人類抗體。

欲用於製備人類化抗體之人類可變域(輕鏈與重鏈)之選擇對於抗體欲用於人類治療用途時降低抗原性及HAMA反應(人類抗小鼠抗體)極其重要。降低或去除HAMA反應為臨床開發適合之治療劑的重要態樣。例如參見Khaxzaeli等人，J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937；Jaffers等人，Transplantation (1986), 41:572；Shawler等人，J. Immunol. (1985), 135:1530；Sears等人，J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138；Miller等人，Blood (1983), 62:988；Hakimi等人，J. Immunol. (1991), 147:1352；Reichmann等人，Nature (1988), 332:323；Junghans等人，Cancer Res. (1990), 50:1495。如本文所述，本發明提供人類化抗體以使HAMA反應降低或去除。可使用此項技術中已知之常規方法另外獲得此等抗體之變異體，其中一些在下文中進一步描述。根據所謂「最適合(best-fit)」方法，針對整個已知人類可變域序列庫篩選齧齒動物抗體之可變域序列。鑑別最接近於齧齒動物之人類V域序列，且接受其中之人類構架區(FR)用於人類化抗體(Sims等人，**J. Immunol.** 151:2296 (1993)；Chothia等人，**J. Mol. Biol.**, 196:901 (1987))。另一方法使用源自輕鏈或重鏈之特定亞群的所有人類抗體之共同序列的特定構架區。相同構架可用於數種

不同人類化抗體(Carter等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** 89:4285 (1992)；Presta等人，**J. Immunol.** 151:2623 (1993))。

舉例而言，如本文所述之抗體的胺基酸序列可充當用於多樣化構架及/或高變序列之起始(親本)序列。起始高變序列所連接之所選構架序列在本文中稱作受者人類構架。雖然受者人類構架可來自或源自人類免疫球蛋白(其VL及/或VH區)，但較佳受者人類構架係來自或源自人類共同構架序列，因為該等構架已顯示在人類患者體內具有極少或無免疫原性。

若受者序列源自人類免疫球蛋白，則可視情況選擇人類構架序列，該人類構架序列係基於其與供者構架序列之同源性藉由將供體構架序列與人類構架序列集合中之各種人類構架序列比對來選擇，且選擇最同源之構架序列作為受者序列。

在一實施例中，本文中之人類共同構架係來自或源自VH亞群III及/或VLκ亞群I共同構架序列。

雖然受者序列(無論來自人類免疫球蛋白或人類共同構架)之序列可與所選人類構架序列一致，但本發明預期受者序列可包含相對於人類免疫球蛋白序列或人類共同構架序列之前在胺基酸取代。此等前在取代較佳極少；通常相對於人類免疫球蛋白序列或共同構架序列僅四個、三個、兩個或一個胺基酸差異。

將非人類抗體之高變區殘基併入VL及/或VH受者人類構

架中。舉例而言，可併入對應於Kabat CDR殘基、Chothia高變環殘基、Abm殘基及/或接觸殘基之殘基。視情況，併入如下延伸之高變區殘基：24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)、26-35B(H1)、50-65、47-65或49-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。

雖然本文中論述「併入」高變區殘基，但應瞭解此可以多種方式達成，例如編碼所需胺基酸序列之核酸可藉由使編碼小鼠可變域序列之核酸突變以使其構架殘基變為受者人類構架殘基，或藉由使編碼人類可變域序列之核酸突變以使高變域殘基變為非人類殘基，或合成編碼所需序列之核酸等來產生。

在本文之實例中，移植有高變區之變異體藉由編碼人類受者序列之核酸之康科爾突變誘發(Kunkel mutagenesis)各高變區使用各別寡核苷酸產生。Kunkel等人，*Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987)。可使用常規技術於構架及/或高變區內引入適當變化以校正及再建立適當之高變區-抗原相互作用。

可使用噬菌體(噬菌粒)呈現(在本文中在一些情形下亦稱作噬菌體呈現)作為產生及篩選藉由序列隨機化產生之庫中之多種不同潛力變異抗體的便利且快速之方法。然而，熟習此項技術者可使用製備且篩選改變之抗體的其他方法。

噬菌體(噬菌粒)呈現技術已提供產生及選擇結合於配位體(諸如抗原)之新穎蛋白質的有效工具。使用噬菌體(噬菌

粒)呈現之技術使得可產生蛋白質變異體之大庫，可快速分選該大庫中以高親和力結合於標靶分子之序列。編碼變異多肽之核酸一般融合於編碼病毒鞘蛋白(諸如基因III蛋白或基因VIII蛋白)之核酸序列。已產生單價噬菌粒呈現系統，其中編碼蛋白質或多肽之核酸序列融合於編碼基因III蛋白之一部分的核酸序列。(Bass, S., *Proteins,* 8:309 (1990)；Lowman及Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology,* 3:205 (1991))。在單價噬菌粒呈現系統中，表現低含量之基因融合物，且亦表現野生型基因III蛋白使得可保留粒子之傳染性。產生肽庫及篩選彼等庫之方法已揭示於多個專利(例如美國專利第5,723,286號、美國專利第5,432,018號、美國專利第5,580,717號、美國專利第5,427,908號及美國專利第5,498,530號)中。

可以多種方式製備抗體或抗原結合多肽之庫，該等方式包括藉由插入隨機DNA序列而改變單一基因或藉由選殖相關基因之家族。使用噬菌體(噬菌粒)呈現來呈現抗體或抗原結合片段之方法已描述於美國專利第5,750,373號、第5,733,743號、第5,837,242號、第5,969,108號、第6,172,197號、第5,580,717號及第5,658,727號中。隨後針對具有所需特徵之抗體或抗原結合蛋白之表現篩選庫。

將所選胺基酸取代為模板核酸之方法在此項技術中已明確，其中一些描述於本文中。舉例而言，高變區殘基可使用康科爾法(Kunkel method)取代。例如參見Kunkel等人，*Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987)。

寡核苷酸之序列包括欲改變之高變區殘基的一或多個所設計之密碼子組。密碼子組為一組用於編碼所需變異胺基酸之不同核苷酸三聯體序列。如下文根據IUB編碼所示，密碼子組可使用符號表示以指示特定核苷酸或核苷酸之等莫耳混合物。

IUB編碼

G鳥嘌呤

A腺嘌呤

T胸腺嘧啶

C胞嘧啶

R(A或G)

Y(C或T)

M(A或C)

K(G或T)

S(C或G)

W(A或T)

H(A或C或T)

B(C或G或T)

V(A或C或G)

D(A或G或T)H

N(A或C或G或T)

舉例而言，在密碼子組DVK中，D可為核苷酸A或G或T；V可為A或G或C；且K可為G或T。此密碼子組可提供18個不同密碼子，且可編碼胺基酸Ala、Trp、Tyr、Lys、

Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly及Cys。

可使用標準方法合成寡核苷酸或引子組。寡核苷酸組例如可藉由固相合成來合成，其含有表示該密碼子組所提供之核苷酸三聯體之所有可能組合且將編碼所需之胺基酸組的序列。以所選核苷酸「簡併性」在特定位置合成寡核苷酸為此項技術所熟知。該等具有特定密碼子組之核苷酸組可使用市售核酸合成儀(購自例如Applied Biosystems，Foster City，CA)合成或可在商業上(例如由Life Technologies，Rockville，MD)獲得。因此，所合成之具有特定密碼子組之寡核苷酸組通常包括具有不同序列之複數個寡核苷酸，該等差異由整個序列內之密碼子組建立。根據本發明使用之寡核苷酸具有使得可與可變域核酸模板雜交且亦可包括用於選殖目的之限制酶位點的序列。

在一方法中，編碼變異胺基酸之核酸序列可藉由寡核苷酸介導之突變誘發產生。此技術為此項技術中所熟知，如Zoller等人，*Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987)所述。簡言之，編碼變異胺基酸之核酸序列藉由編碼所需密碼子組之寡核苷酸組與DNA模板雜交產生，其中該模板為含有可變區核酸模板序列之質體的單股形式。雜交之後，使用DNA聚合酶合成模板之完整第二互補股，其由此併入寡核苷酸引子且含有寡核苷酸組所提供之密碼子組。

一般而言，使用長度為至少25個核苷酸的寡核苷酸。最佳寡核苷酸應具有12至15個核苷酸，其與模板在編碼突變之核苷酸的任一側完全互補。此確保寡核苷酸與單股DNA

模板分子正確地雜交。寡核苷酸易於使用此項技術中已知之技術(諸如Crea等人，*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978)所述之技術)合成。

DNA模板係藉由源自噬菌體M13載體(市售M13mp18及M13mp19載體為適合的)之彼等載體或含有單股噬菌體複製起點之彼等載體(如Viera等人，*Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987)所述)產生。因此，可將欲突變之DNA插入此等載體之一中以產生單股模板。產生單股模板描述於上述Sambrook等人之第4.21-4.41章中。

為改變天然DNA序列，使寡核苷酸與單股模板在適合之雜交條件下雜交。隨後添加DNA聚合酶(通常T7 DNA聚合酶或DNA聚合酶I之克列諾片段(Klenow fragment))以使用寡核苷酸作為合成之引子來合成模板之互補股。由此形成異雙螺旋分子，以使DNA之一股編碼基因1之突變形式，而另一股(初始模板)編碼基因1之天然未改變序列。隨後將此異雙螺旋分子轉型至適合之宿主細胞(通常為原核生物，諸如大腸桿菌JM101)中。細胞生長之後，將其塗佈於瓊脂糖平板上且使用用32-P(32-Phosphate)放射性標記之寡核苷酸引子篩選以鑑別含有突變DNA之細菌群落。

上文方才所述之方法可進行修改使得可產生均雙螺旋(homoduplex)分子，其中質體之兩個股均含有突變。修改如下：如上所述使單股寡核苷酸黏接於單股模板。使三個去氧核糖核苷酸(去氧核糖腺苷(dATP)、去氧核糖鳥苷(dGTP)及去氧核糖胸苷(dTT))之混合物與稱作dCTP-(aS)之

經修飾硫去氧核糖胞嘧啶(其可獲自Amersham)組合。將此混合物添加至模板-寡核苷酸複合物中。向此混合物添加DNA聚合酶之後，產生除突變鹼基以外與模板一致之DNA股。另外，DNA之此新股將含有dCTP-(aS)替代dCTP，其用於保護dCTP免於限制核酸內切酶消化。用適當限制酶切割雙股異雙螺旋之模板股之後，模板股可用ExoIII核酸酶或另一適當核酸酶穿過含有欲突變誘發位點之區域消化。隨後反應停止而留下僅部分單股之分子。隨後在所有四種去氧核糖核苷酸三磷酸(ATP)及DNA連接酶存在下使用DNA聚合酶形成完整雙股DNA均雙螺旋。隨後可將此均雙螺旋分子轉型至適合之宿主細胞中。

如先前所表明，寡核苷酸組之序列具有足夠長度以與模板核酸雜交，且亦可(但未必)含有限制位點。DNA模板可由源自噬菌體M13載體之載體或含有單股噬菌體複製起點之載體(如Viera等人，*Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987)所述)產生。因此，必須將欲突變之DNA插入此等載體之一中以產生單股模板。單股模板之產生描述於前述Sambrook等人之第4.21-4.41章節中。

根據另一方法，可在抗體人類化期間經由選擇修復之高變區恢復抗原結合(參見2005年2月18日申請之申請案第11/061,841號)。該方法包括將非人類高變區併入接受者構架上，且進一步將一或多個胺基酸取代引入一或多個高變區中而不改變接受者構架序列。或者，引入一或多個胺基酸取代可伴隨改變接受者構架序列。

根據另一方法，可藉由提供上游及下游寡核苷酸組產生庫(library)，各組具有多數不同序列之寡核苷酸，該等不同序列由寡核苷酸序列內所提供之密碼子組建立。可在聚合酶鏈反應中使用上游及下游寡核苷酸組以及可變域模板核酸序列以產生PCR產物之「庫」。PCR產物可稱作「核酸卡匣」，因為其可使用已建立之分子生物學技術與其他相關或不相關核酸序列(例如病毒鞘蛋白及二聚域)融合。

PCR引子之序列包括用於高變區中溶劑可達及高度多樣化位置的一或多個設計密碼子組。如上所述，一密碼子組為一組用於編碼所欲變異胺基酸之不同核苷酸三聯體序列。

符合所需標準經由適當篩選/選擇步驟選擇的抗體選擇物可使用標準重組技術分離及選殖。

更重要的是，將抗體人類化而保留對抗原之高結合親和力及其他有利生物特性。為達成此目標，根據一個較佳方法，人類化抗體係藉由一種使用親本及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種設想之人類化產物的方法製備。三維免疫球蛋白模型通常可得且為熟習此項技術者所熟悉。可利用電腦程式，其說明且呈現所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構。該等呈現之檢查可分析殘基在候選免疫球蛋白序列作用中之可能角色，亦即分析殘基影響候選免疫球蛋白結合抗原之能力。以此方式，可自接受者及輸入序列選擇FR殘基且組合以獲得所欲抗體特徵，諸如對標靶抗原之親和力提高。一般而言，高變區殘基直接

且大部分實質上涉及影響抗原結合。

涵蓋各種形式之人類化抗FcRH5抗體。舉例而言，人類化抗體可為抗體片段(諸如Fab)，其視情況與一或多種細胞毒性劑結合以產生免疫結合物。或者，人類化抗體可為完整抗體，諸如完整IgG1抗體。

作為人類化之替代，可產生人類抗體。舉例而言，現在有可能產生轉殖基因動物(例如小鼠)，其在免疫後能夠在無內源性免疫球蛋白產生之情況下產生人類抗體之完整譜系。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變小鼠體內之抗體重鏈連接區域(J_H)基因之純合子缺失導致內源性抗體產生受到完全抑制。人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移於該等生殖系突變小鼠中將在抗原攻毒之後產生人類抗體。例如參見Jakobovits等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，**Nature**, 362:255-258 (1993)；Bruggemann等人，**Year in Immuno.** 7:33 (1993)；美國專利第5,545,806號、第5,569,825號、第5,591,669號(均屬於GenPharm)；第5,545,807號；及WO 97/17852。

或者，可使用噬菌體呈現技術(McCafferty等人，**Nature** 348:552-553 [1990])在活體外自未免疫供者之免疫球蛋白可變(V)域基因譜系產生人類抗體及抗體片段。根據此技術，將抗體V域基因同框選殖於絲狀噬菌體(諸如M13或fd)之主要或次要鞘蛋白基因中，且以功能性抗體片段形式呈現於噬菌體粒子表面上。由於絲狀粒子含有噬菌體基因組之單股DNA複本，故基於抗體之功能特性進行的選擇亦使

得可選擇編碼展現彼等特性之抗體的基因。因此，噬菌體模擬B細胞之一些特性。可以各種形式執行噬菌體呈現，該等形式評述於例如Johnson, Kevin S.及Chiswell, David J., **Current Opinion in Structural Biology** 3:564-571 (1993)中。數種來源之V基因區段可用於噬菌體呈現。Clackson等人，**Nature**, 352:624-628 (1991)由源自經免疫小鼠之脾的V基因的隨機組合小庫分離出不同抗噁唑酮抗體陣列。可構築未免疫之人類供者之V基因的譜系且針對不同抗原(包括自體抗原)陣列之抗體可基本上按照由Marks等人，**J. Mol. Biol.** 222:581-597 (1991)或Griffith等人，**EMBO J.** 12:725-734 (1993)所述之技術來分離。亦參見美國專利第5,565,332號及第5,573,905號。

如上所述，人類抗體亦可由活體外活化B細胞產生(參見美國專利5,567,610及5,229,275)。

4. 抗體片段

在某些情況下，宜使用抗體片段而非完整抗體。較小尺寸之片段使得可快速清除且可改良與實體腫瘤之接近。

已開發各種技術來產生抗體片段。傳統上，經由蛋白水解消化完整抗體獲得此等片段(例如參見Morimoto等人，**Journal of Biochemical and Biophysical Methods** 24:107-117 (1992)；及Brennan等人，**Science**, 229:81 (1985))。然而，現在可由重組宿主細胞直接產生此等片段。Fab、Fv及ScFv抗體片段均可表現於大腸桿菌中且由大腸桿菌分泌，由此使得易於產生大量此等片段。可自上述抗體噬菌體庫分離

抗體片段。或者，可自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段且使其以化學方式偶合以形成$F(ab')_2$片段(Carter等人，**Bio/Technology** 10:163-167 (1992))。根據另一方法，可自重組宿主細胞培養物直接分離$F(ab')_2$片段。美國專利第5,869,046號中描述具有延長之活體內半衰期的Fab及$F(ab')_2$片段，其包含結合抗原決定基殘基之救助受體(salvage receptor)。其他產生抗體片段之技術將為熟習此項技術者顯而易見。在其他實施例中，所選抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185；美國專利第5,571,894號；及美國專利第5,587,458號。Fv及sFv為唯一具有完整結合位點而無恆定區之物質；因此，其適合於減少活體內使用期間的非特異性結合。sFv融合蛋白質可經構築以在sFv之胺基或羧基末端產生效應蛋白之融合物。參見前述**Antibody Engineering**編，Borrebaeck。抗體片段亦可例如如美國專利第5,641,870號所述為「線性抗體」。該等線性抗體片段可具有單特異性或雙特異性。

5. 雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩個不同抗原決定基具有結合特異性之抗體。例示性雙特異性抗體可結合於本文所述之FcRH5蛋白之兩個不同抗原決定基。其他該等抗體可組合FcRH5結合位點與另一蛋白質之結合位點。或者，抗FcRH5臂可與結合於白血球上之觸發分子(諸如T細胞受體分子(例如CD3)；或IgG之Fc受體(FcγR)，諸如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)及FcγRIII(CD16))的臂組合，以便將細胞防禦

機制集中且定位於表現FcRH5之細胞。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑定位於表現FcRH5之細胞。此等抗體具有FcRH5結合臂及結合細胞毒性劑(例如，沙泊寧(saporin)、抗干擾素α、長春花生物鹼、蓖麻毒素A鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。雙特異性抗體可以全長抗體或抗體片段形式製備(例如$F(ab')_2$雙特異性抗體)。

WO 96/16673描述一種雙特異性抗ErbB2/抗FcγRIII抗體，且美國專利第5,837,234號揭示一種雙特異性抗ErbB2/抗FcγRI抗體。WO 98/02463中展示雙特異性抗ErbB2/Fcα抗體。美國專利第5,821,337號及第6,407,213號教示雙特異性抗ErbB2/抗CD3抗體。已描述結合CD3抗原上之抗原決定基及第二抗原決定基的其他雙特異性抗體。例如參見美國專利第5,078,998號(抗CD3/腫瘤細胞抗原)；第5,601,819號(抗CD3/IL-2R；抗CD3/CD28；抗CD3/CD45)；第6,129,914號(抗CD3/惡性B細胞抗原)；第7,112,324號(抗CD3/CD19)；第6,723,538號(抗CD3/CCR5)；第7,235,641號(抗CD3/EpCAM)；第7,262,276號(抗CD3/卵巢腫瘤抗原)；及第5,731,168號(抗CD3/CD4IgG)。

製備雙特異性抗體之方法為此項技術中已知。全長雙特異性抗體之傳統產生係基於共表現兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對，其中兩個鏈具有不同特異性(Millstein等人，**Nature** 305:537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重鏈與輕鏈之隨機分配，故該等融合瘤(四源雜交瘤)產生10種不同抗

體分子之可能的混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。通常藉由親和層析步驟進行之正確分子之純化相當繁瑣，且產物產率較低。類似程序揭示於WO 93/08829中及Traunecker等人，**EMBO J.** 10:3655-3659 (1991)中。

根據一不同方法，使具有所需結合特異性之抗體可變域(抗體-抗原組合位點)與免疫球蛋白恆定域序列融合。較佳與包含鉸鏈區、C_H2區及C_H3區之至少一部分的Ig重鏈恆定域融合。較佳使含有輕鏈結合所必需之位點的第一重鏈恆定區(C_H1)存在於融合物之至少一者中。將編碼免疫球蛋白重鏈融合物及(若需要)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入各別表現載體中，且共轉染至適合之宿主細胞中。當不等比率之用於構築之三個多肽鏈提供所需雙特異性抗體之最佳產率時，此舉提供調節實施例中三個多肽片段之相互比例的極大靈活性。然而，當等比率之至少兩個多肽鏈的表現產生高產率時或當比率對產生所需鏈組合無重要影響時，有可能將兩個或所有三個多肽鏈之編碼序列插入單一表現載體中。

在該方法之一較佳實施例中，雙特異性抗體係由一個臂中具有第一結合特異性的雜交免疫球蛋白重鏈及另一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)構成。已發現此不對稱結構有助於所需雙特異性化合物與非所要之免疫球蛋白鏈組合分離，因為免疫球蛋白輕鏈存在於僅一半雙特異性分子中提供一種容易之分離方式。此方法揭示於WO 94/04690中。對於產生雙特異性抗體之詳

情，例如參見Suresh等人，**Methods in Enzymology** 121:210 (1986)。

根據美國專利第5,731,168號中所述之另一方法，可將抗體分子對之間的界面工程改造以使自重組細胞培養物回收之雜二聚體之百分比最大。較佳界面包含C_H3域之至少一部分。在此方法中，來自第一抗體分子界面之一或多個小胺基酸側鏈經較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換。藉由用較小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而於第二抗體分子之界面上產生具有與大側鏈相同或類似之尺寸的補償性「空腔」。此提供一種使雜二聚體之產率增加超過其他非所要之終產物(諸如均二聚體)的機制。根據此方法產生之雙特異性抗體在本文中稱作「腔內突起(protuberance-into-cavity)」抗體。

雙特異性抗體包括交聯或「雜結合」抗體。舉例而言，雜結合物中之一種抗體可與抗生物素蛋白偶合，另一者可與生物素偶合。舉例而言，已提出該等抗體使免疫系統細胞靶向非所要之細胞(美國專利第4,676,980號)，且用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373及EP 03089)。雜結合抗體可使用任何適宜交聯方法來製備。適合之交聯劑為此項技術中所熟知，且與多種交聯技術一起揭示於美國專利第4,676,980號中。

自抗體片段產生雙特異性抗體之技術亦已描述於文獻中。舉例而言，雙特異性抗體可使用化學鍵製備。Brennan等人，**Science** 229:81 (1985)描述一種使完整抗體以蛋白

水解方式裂解以產生$F(ab')_2$片段之程序。在二硫氫基錯合劑亞砷酸鈉存在下將此等片段還原以使鄰近二硫氫基穩定且阻止形成分子間二硫基。隨後將所產生之Fab'片段轉化為硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。隨後藉由用巰基乙胺還原將Fab'-TNB衍生物之一再轉化為Fab'-硫氫基，且將其與等莫耳量之另一Fab'-TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作選擇性固定酶之試劑。

近期之進展有助於自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段，可以化學方法使該等片段偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，**J. Exp. Med.** 175: 217-225 (1992)描述完全人類化之雙特異性抗體$F(ab')_2$分子之產生。自大腸桿菌分別分泌各Fab'片段且使其經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。由此形成之雙特異性抗體能夠結合於過度表現ErbB2受體之細胞及正常人類T細胞，且觸發人類細胞毒性淋巴細胞對人類乳房腫瘤標靶之溶解活性。

亦已描述各種直接自重組細胞培養物製備且分離雙特異性抗體片段之技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人，**J. Immunol.** 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽連接於兩個不同抗體之Fab'部分。在鉸鏈區還原抗體均二聚體以形成單體，且隨後再氧化以形成抗體雜二聚體。該方法亦可用於產生抗體均二聚體。Hollinger等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90:6444-6448 (1993)所述之「雙功能抗體」技術為製備雙特異性抗體片段提供替代性機制。該

等片段包含藉由過短而使得同一鏈上之兩個域之間無法配對的連接子連接於V_L之V_H。因此，迫使一個片段之V_H及V_L域與另一片段之互補V_L及V_H域配對，從而形成兩個抗原結合位點。亦已報導另一藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體來製備雙特異性抗體片段之策略。參見Gruber等人，**J. Immunol.**, 152:5368 (1994)。

涵蓋具有2以上之價數的抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人，**J. Immunol.** 147:60 (1991)。

6. 雜結合抗體

雜結合抗體亦屬於本發明之範疇內。雜結合抗體由兩個共價接合之抗體構成。舉例而言，已提出該等抗體使免疫系統細胞靶向非所要之細胞[美國專利第4,676,980號]，且用於治療HIV感染[WO 91/00360；WO 92/200373；EP 03089]。預期該等抗體可在活體外使用合成蛋白質化學中之已知方法(包括涉及交聯劑之方法)製備。舉例而言，可使用二硫基交換反應或藉由形成硫醚鍵來構築免疫毒素。適於此目的之試劑之實例包括亞胺基硫醇鹽(iminothiolate)及4-巰基丁醯亞胺甲酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)及例如美國專利第4,676,980號中所揭示之試劑。

7. 多價抗體

相較於二價抗體，表現與抗體結合之抗原的細胞可能更快地內化(及/或異化(catabolized))多價抗體。本發明之抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點之多價抗體(其為除IgM類別之外的抗體)(例如四價抗體)，多價抗體可易

於藉由重組表現編碼抗體多肽鏈之核酸產生。多價抗體可包含二聚域及三個或三個以上抗原結合位點。較佳二聚域包含一Fc區或一鉸鏈區(或由該區組成)。在此情形下，抗體將包含一Fc區及在Fc區胺基末端之三個或三個以上抗原結合位點。本文之較佳多價抗體包含三至約八個但較佳四個抗原結合位點(或由該等位點組成)。多價抗體包含至少一條多肽鏈(且較佳兩條多肽鏈)，其中多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域。舉例而言，多肽鏈可包含$VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$，其中VD1為第一可變域，VD2為第二可變域，Fc為一Fc區之一條多肽鏈，X1及X2表示胺基酸或多肽，且n為0或1。舉例而言，多肽鏈可包含VH-CH1-可撓性連接子-VH-CH1-Fc區鏈或VH-CH1-VH-CH1-Fc區鏈。本文之多價抗體較佳另外包含至少兩個(且較佳四個)輕鏈可變域多肽。本文之多價抗體可例如包含約兩個至約八個輕鏈可變域多肽。本文所涵蓋之輕鏈可變域多肽包含輕鏈可變域且視情況另外包含CL域。

8. 效應功能工程改造

可能需要關於效應功能修飾本發明之抗體，例如以便增強抗體之抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。此可藉由在抗體之Fc區中引入一或多個胺基酸取代來達成。或者或另外，可將半胱胺酸殘基引入Fc區中，從而使得可在該區域中形成鏈間二硫鍵。由此產生之均二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增強之補體介導之細胞殺滅及抗體依賴性細胞的細胞毒性

(ADCC)。參見Caron等人，**J. Exp Med.** 176:1191-1195 (1992)及Shopes, B. **J. Immunol.** 148:2918-2922 (1992)。具有增強之抗腫瘤活性的均二聚抗體亦可使用如Wolff等人，**Cancer Research** 53:2560-2565 (1993)所述之雜雙官能交聯劑來製備。或者，抗體可經工程改造，其具有雙Fc區且從而可具有增強之補體溶解及ADCC能力。參見Stevenson等人，**Anti-Cancer Drug Design** 3:219-230 (1989)。為延長抗體之血清半衰期，可將結合救助受體之抗原決定基併入抗體(尤其抗體片段)中，例如，如美國專利5,739,277所述。如本文所用之術語「結合救助受體之抗原決定基」係指IgG分子(例如IgG_1、IgG_2、IgG_3或IgG_4)之Fc區的抗原決定基，其負責延長IgG分子之活體內血清半衰期。

9. 免疫結合物

本發明亦關於免疫結合物(可互換稱作「抗體-藥物結合物」或「ADC」)，其包含結合於細胞毒性劑(諸如化學治療劑、生長抑制劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(亦即放射性結合物))的抗體。

在某些實施例中，免疫結合物包含抗體及化學治療劑或其他毒素。上文已描述適用於產生該等免疫結合物之化學治療劑。可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、α-帚麴菌素(alpha-sarcin)、油

桐(*Aleurites fordii*)蛋白、康乃馨(dianthin)蛋白、美洲商陸(*Phytolaca americana*)蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、麻瘋樹毒素(curcin)、巴豆毒素(crotin)、肥皂草(sapaonaria officinalis)抑制劑、白樹素(gelonin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素(tricothecene)。多種放射性核種可用於產生放射性結合抗體。實例包括^{212}Bi、^{131}I、^{131}In、^{90}Y及^{186}Re。抗體與細胞毒性劑之結合物可使用多種雙官能蛋白質偶合劑來製備，該等蛋白質偶合劑諸如3-(2-吡啶基二硫氫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，**Science**, **238**: 1098 (1987)所述製備。經碳14標記之1-異硫氰酸酯基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸結合於抗體之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

本文亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素之結合物，該等毒素諸如刺孢黴素、奧瑞他汀肽(諸如單甲基奧瑞他汀(MMAE)(多拉司他汀之合成類似物))、類美登素(諸如

DM1)、單端孢黴烯(trichothene)及CC1065及此等毒素之具有毒素活性之衍生物。

例示性免疫結合物-抗體-藥物結合物

本發明之免疫結合物(或「抗體-藥物結合物」(「ADC」))可具有下式I，其中抗體經由視情況存在之連接子(L)結合(亦即共價連接)於一或多個藥物部分(D)。ADC可包括thioMAb藥物結合物(「TDC」)。

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

因此，抗體可直接或經由連接子結合於藥物。在式I中，p為每個抗體之藥物部分的平均數，其可介於例如每個抗體約1個至約20個藥物部分的範圍內，且在某些實施例中，每個抗體1個至約8個藥物部分。本發明包括一種組合物，其包含式I之抗體-藥物化合物之混合物，其中每個抗體之平均藥物負載為約2個至約5個或約3個至約4個。

a. 例示性連接子

連接子可包含一或多個連接子組分。例示性連接子組分包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(「MC」)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸(「val-cit」或「vc」)、丙胺酸-苯丙胺酸(「ala-phe」)、對胺基苯甲氧基羰基(「PAB」)及由與連接子試劑結合產生者：形成連接子部分4-巰基戊酸之4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(「SPP」)、形成連接子部分4-((2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)甲基)環己烷甲酸之4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己

烷-1-甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SMCC」，本文中亦稱作「MCC」)、形成連接子部分4-巯基丁酸之4-(吡啶-2-基二硫基)丁酸2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(「SPDB」)、N-丁二醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SIAB」)、作為一或多個重複單元之伸乙氧基-CH_2CH_2O-(「EO」或「PEO」)。其他連接子組分為此項技術中已知且一些描述於本文中。各種連接子組分為此項技術中已知，其中一些如下所述。

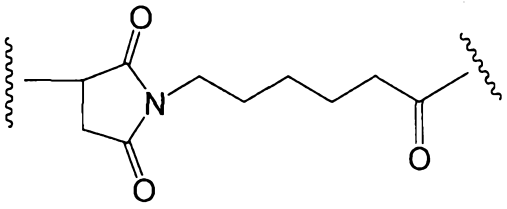
連接子可為有助於在細胞中釋放藥物之「可裂解連接子」。舉例而言，可使用酸不穩定連接子(例如腙)、蛋白酶敏感性(例如肽酶敏感性)連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫基之連接子(Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

在某些實施例中，連接子如下式II所示：

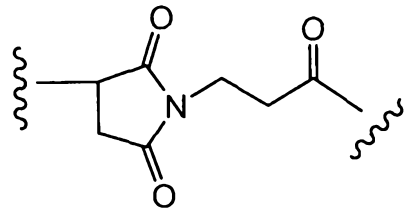
$$—A_a—W_w—Y_y—$$ II

其中A為延伸子單元，且a為0至1之整數；W為胺基酸單元，且w為0至12之整數；Y為間隔子單元，且y為0、1或2；且Ab、D及p如上文對於式I所定義。該等連接子之例示性實施例描述於US 2005-0238649 A1中，該案以引用的方式明確地併入本文中。

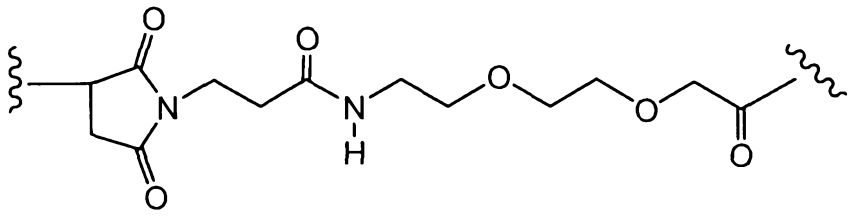
在一些實施例中，連接子組分可包含使抗體連接於另一連接子組分或藥物部分的「延伸子單元」。例示性延伸子單元如下所示(其中波形線指示與抗體共價連接之位點)：



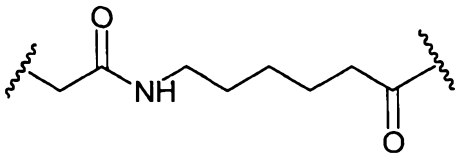
MC



MP



MPEG



。

在一些實施例中，連接子組分可包含胺基酸單元。在一該實施例中，胺基酸單元使得可藉由蛋白酶裂解連接子，從而有助於在暴露於細胞內蛋白酶(諸如溶酶體酶)之後自免疫結合物釋放藥物。例如參見Doronina等人(2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784。例示性胺基酸單元包括(但不限於)二肽、三肽、四肽，及五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)；苯丙胺酸-離胺酸(fk或phe-lys)；或N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸(Me-val-cit)。例示性三肽包括甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。胺基酸單

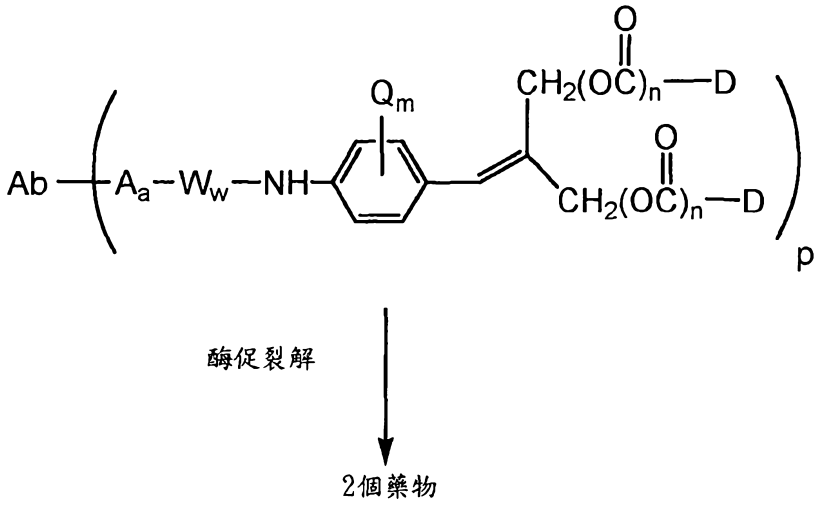
元可包含天然存在之胺基酸殘基以及微量胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸單元可在其對藉由特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶，組織蛋白酶(cathepsin)B、C及D，或纖維蛋白溶酶(plasmin)蛋白酶)達成之酶促裂解之選擇性方面進行設計及最佳化。

在一些實施例中，連接子組分可包含直接或經由延伸子單元及/或胺基酸單元將抗體連接於藥物部分之「間隔子」單元。間隔子單元可為「自我犧牲」或「非自我犧牲」間隔子單元。「非自我犧牲」間隔子單元為間隔子單元之一部分或全部在酶促(例如蛋白水解)裂解ADC之後仍結合於藥物部分的間隔子單元。非自我犧牲間隔子單元之實例包括(但不限於)甘胺酸間隔子單元及甘胺酸-甘胺酸間隔子單元。亦涵蓋易遭受序列特異性酶促裂解之肽間隔子的其他組合。舉例而言，藉由腫瘤-細胞相關蛋白酶酶促裂解含有甘胺酸-甘胺酸間隔子單元之ADC將引起自ADC之其餘部分釋放甘胺酸-甘胺酸-藥物部分。在一該實施例中，隨後甘胺酸-甘胺酸-藥物部分在腫瘤細胞中進行各別水解步驟，從而使甘胺酸-甘胺酸間隔子單元與藥物部分裂解。

「自我犧牲」間隔子單元使得可不經各別水解步驟釋放藥物部分。在某些實施例中，連接子之間隔子單元包含對胺基苯甲基單元。在一該實施例中，對胺基苯甲醇經由醯胺鍵連接於胺基酸單元，且在苯甲醇與細胞毒性劑之間生成胺基甲酸酯、甲基胺基甲酸酯或碳酸酯。例如參見

Hamann 等人 (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103。在一實施例中，間隔子單元為對胺基苯甲氧基羰基(PAB)。在某些實施例中，對胺基苯甲基單元之伸苯基部分經Qm取代，其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為範圍為0-4之整數。自我犧牲間隔子單元之實例另外包括(但不限於)電子學上類似於對胺基苯甲醇之芳族化合物(例如參見US 2005/0256030 A1)，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人，(1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)及鄰胺基苯甲基縮醛或對胺基苯甲基縮醛。可使用醯胺鍵水解之後進行環化的間隔子，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(Rodrigues等人，*Chemistry Biology*, 1995, 2, 223)；經適當取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(Storm等人，*J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815)；及2-胺基苯基丙酸醯胺(Amsberry等人，*J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867)。去除在甘胺酸之a位取代之含胺藥物(Kingsbury等人，*J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447)亦為適用於ADC之自我犧牲間隔子之實例。

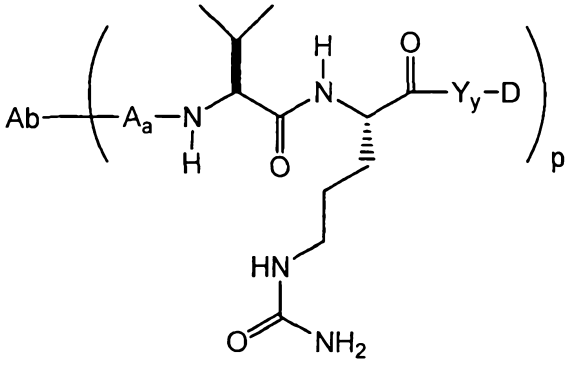
在一實施例中，間隔子單元為如下文所述之分支鏈雙(羥甲基)苯乙烯(BHMS)單元，其可用於併入及釋放多個藥物。



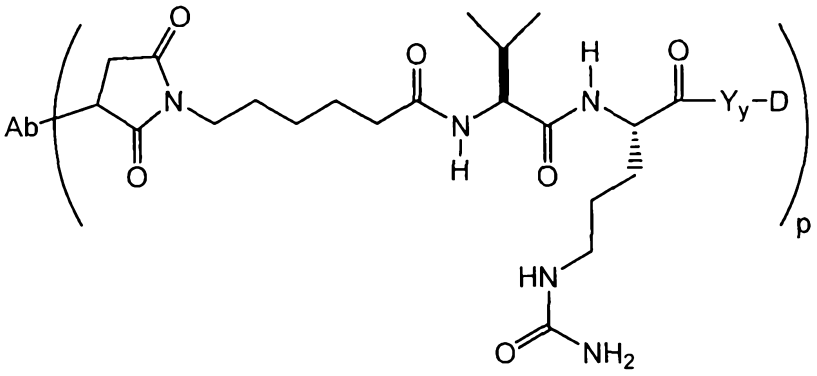
其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為介於0-4範圍內之整數；n為0或1；且p介於1至約20範圍內。

在另一實施例中，連接子L可為樹突型連接子以經由分支鏈多官能連接子部分將一個以上藥物部分共價連接於抗體(Sun等人，(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun等人，(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹突狀連接子可增加藥物與抗體之莫耳比，亦即負載，此與ADC之效能有關。因此，當經半胱胺酸工程改造之抗體僅具有一個反應性半胱胺酸硫氫基時，可經由樹突狀連接子連接多個藥物部分。

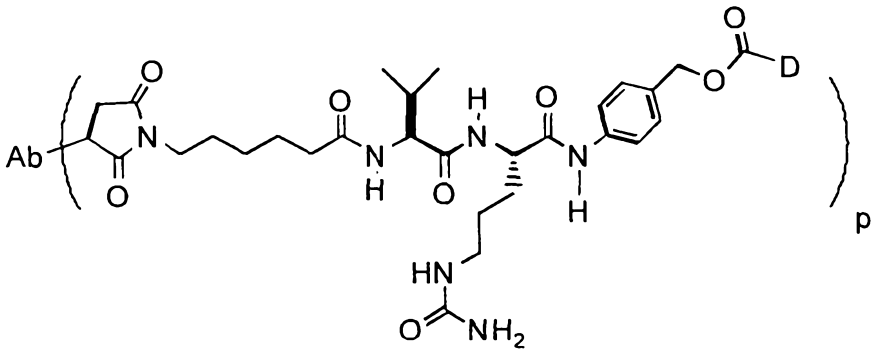
例示性連接子組分及其組合如下在式II ADC之情形下所示：



Val-Cit或VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB。

連接子組分(包括延伸子、間隔子及胺基酸單元)可藉由此項技術中已知之方法(諸如US 2005-0238649 A1中所述之方法)合成。

b. 例示性藥物部分

(1) 美登素及類美登素

在一些實施例中，免疫結合物包含結合於一或多個類美登素分子之抗體。類美登素為藉由抑制微管蛋白聚合發揮作用之有絲分裂抑制劑。美登素最先自東非灌木齒葉美登木(Maytenus serrata)分離(美國專利第3,896,111號)。隨後，發現某些微生物亦產生類美登素，諸如美登醇

(maytansinol)及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於例如美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號；及第4,371,533中。

類美登素藥物部分在抗體-藥物結合物中為具吸引力之藥物部分，此係由於其：(i)相對易於藉由醱酵或醱酵產物之化學修飾或衍生製備；(ii)易於用適用於經由二硫基及非二硫基連接子結合於抗體的官能基衍生；(iii)在血漿中穩定；及(iv)有效針對多種腫瘤細胞株。

適用作類美登素藥物部分之美登素化合物為此項技術中所熟知，且可根據已知方法自天然來源分離或使用遺傳工程改造及醱酵技術產生(US 6790952；US 2005/0170475；Yu等人(2002) PNAS 99:7968-7973)。美登醇及美登醇類似物亦可根據已知方法以合成方式製備。

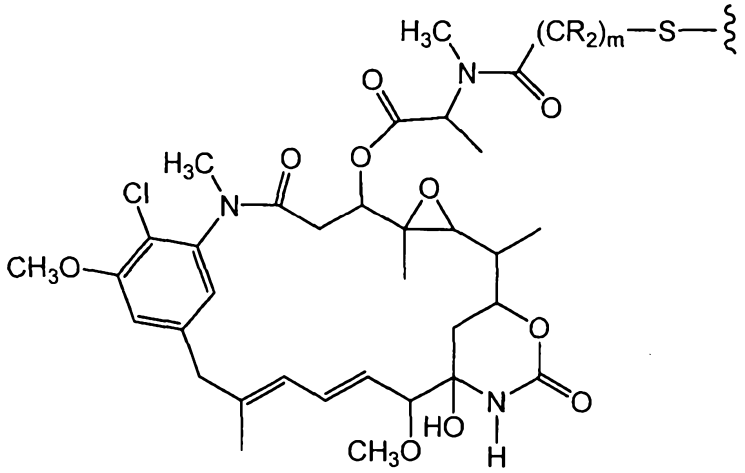
例示性類美登素藥物部分包括具有經修飾芳族環之部分，諸如：C-19-去氯(美國專利第4256746號)(藉由安絲菌素(ansamytocin)P2之氫化鋰鋁還原製備)；C-20-羥基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美國專利第4361650號及第4307016號)(藉由使用鏈黴菌(*Streptomyces*)或放線菌

(*Actinomyces*)去甲基化或使用LAH去氯製備)；及C-20-去甲氧基、C-20-醯氧基(-OCOR)、+/-去氯(美國專利第4,294,757號)(藉由使用醯基氯化物來醯基化製備)及其他位置具有修飾之部分。

例示性類美登素藥物部分亦包括具有修飾之部分，諸如：C-9-SH(美國專利第4424219號)(藉由美登醇與H_2S或P_2S_5反應製備)；C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH_2OR)(US 4331598)；C-14-羥甲基或醯氧基甲基(CH_2OH或CH_2OAc)(美國專利第4450254號)(由奴卡菌(Nocardia)製備)；C-15-羥基/醯氧基(US 4364866)(藉由鏈黴菌轉化美登醇製備)；C-15-甲氧基(美國專利第4313946號及第4315929號)(自滑桃樹(Trewia nudlflora)分離)；C-18-N-去甲基(美國專利第4362663號及第4322348號)(藉由鏈黴菌使美登醇去甲基化製備)；及4,5-去氧(US 4371533)(藉由三氯化鈦/LAH還原美登醇製備)。

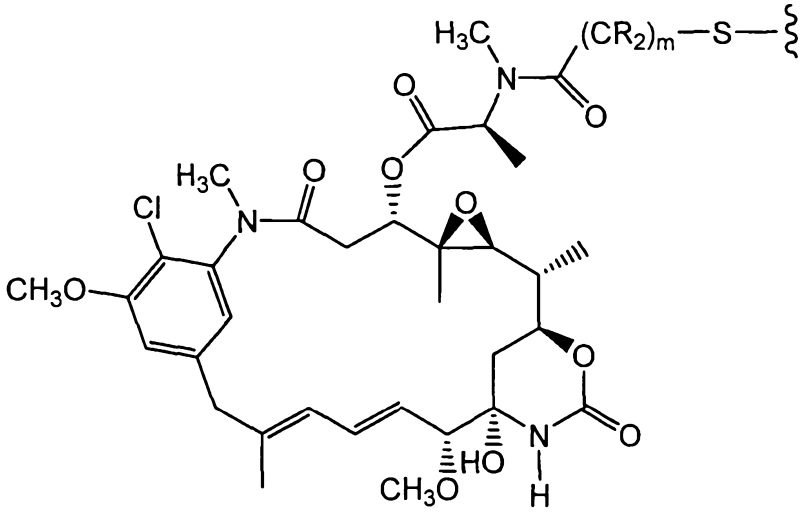
已知美登素化合物上之多個位置視連接類型而定適用作鍵聯位置。舉例而言，為形成酯鍵，具有羥基之C-3位置、用羥甲基修飾之C-14位置、用羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置均適合(US 5208020；US RE39151；US 6913748；US 7368565；US 2006/0167245；US 2007/0037972)。

類美登素藥物部分包括具有以下結構之部分：



其中波形線指示類美登素藥物部分之硫原子共價連接於ADC之連接子。R可獨立地為H或C_1-C_6烷基。使醯胺基連接於硫原子之伸烷基鏈可為甲基、乙基或丙基，亦即m為1、2或3(US 633410；US 5208020；US 7276497；Chari等人(1992) *Cancer Res.* 52:127-131；Liu等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618-8623)。

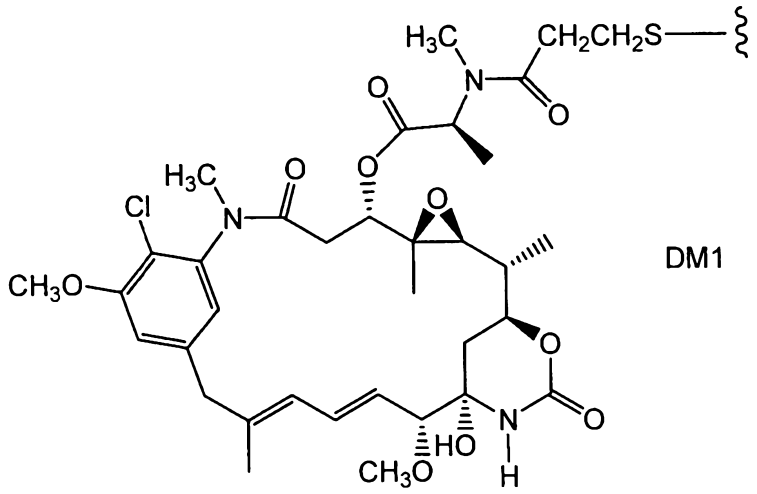
本發明之化合物涵蓋類美登素藥物部分之所有立體異構體，亦即D之對掌性碳的*R*及*S*構型的任何組合。在一實施例中，類美登素藥物部分應具有以下立體化學：



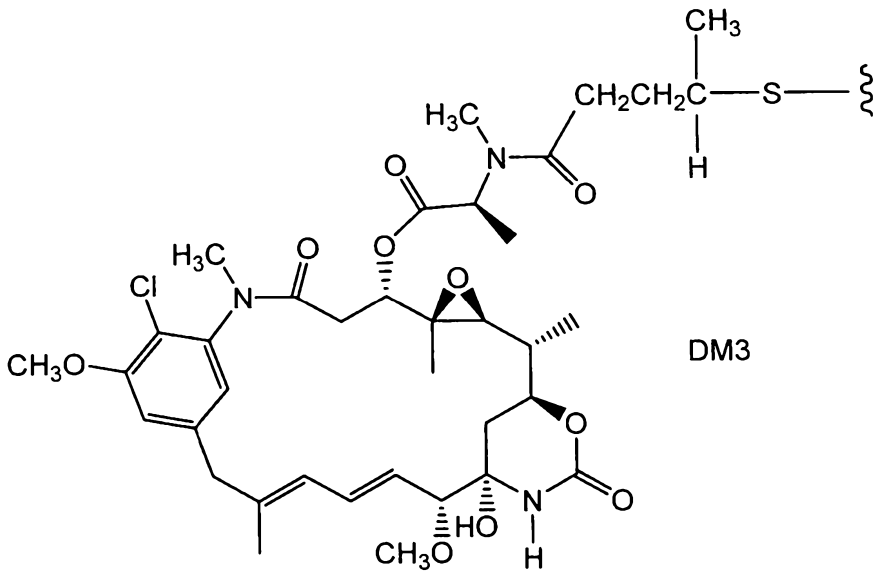
。

類美登素藥物部分之例示性實施例包括：DM1；DM3；

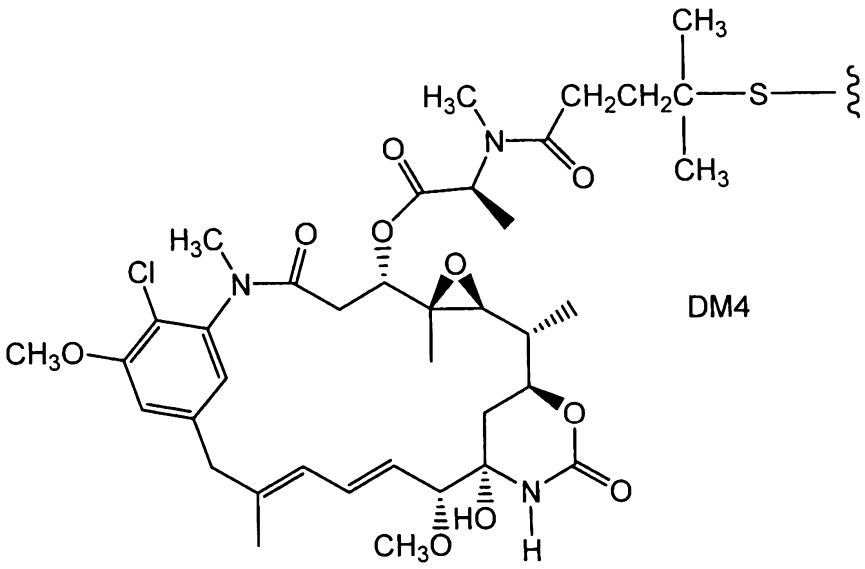
及DM4，其具有以下結構：



DM1



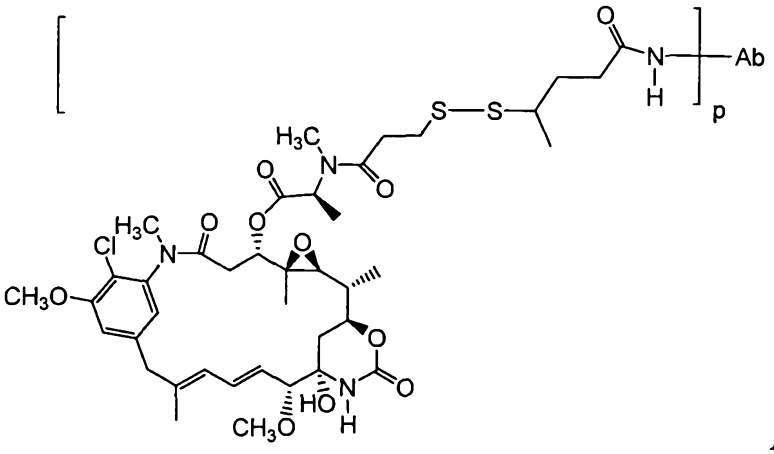
DM3



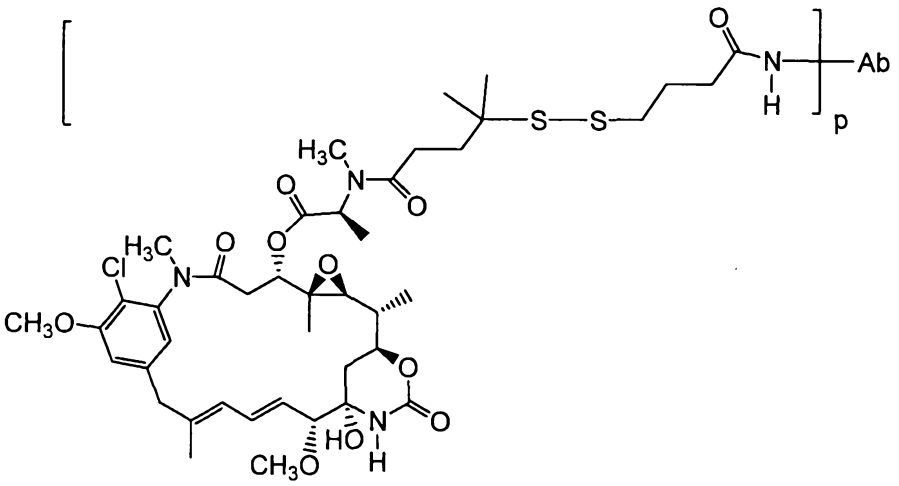
DM4

其中波形線指示藥物之硫原子共價連接於抗體-藥物結合物之連接子(L)。(WO 2005/037992；US 2005/0276812 A1)。

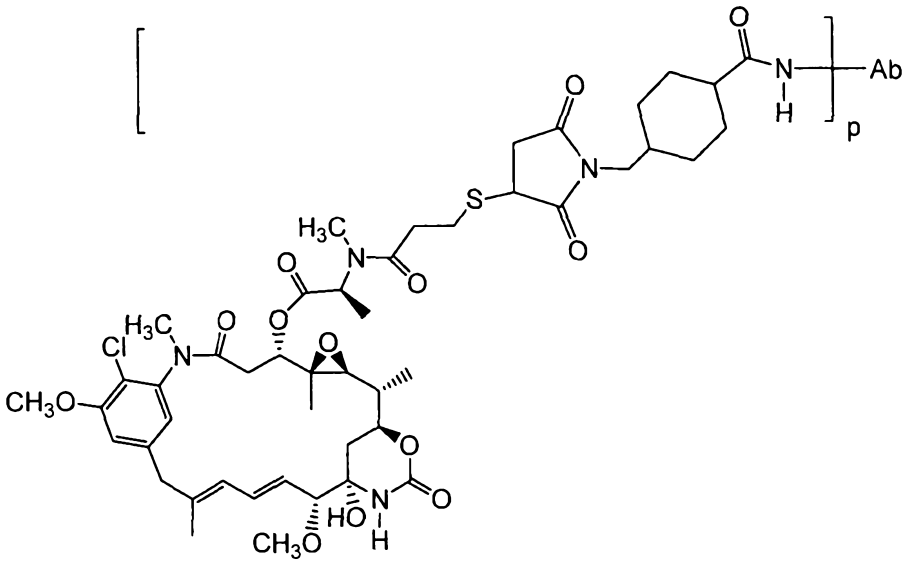
其他例示性類美登素抗體-藥物結合物具有以下結構及縮寫(其中Ab為抗體且p為1至約8)：



Ab-SPP-DM1



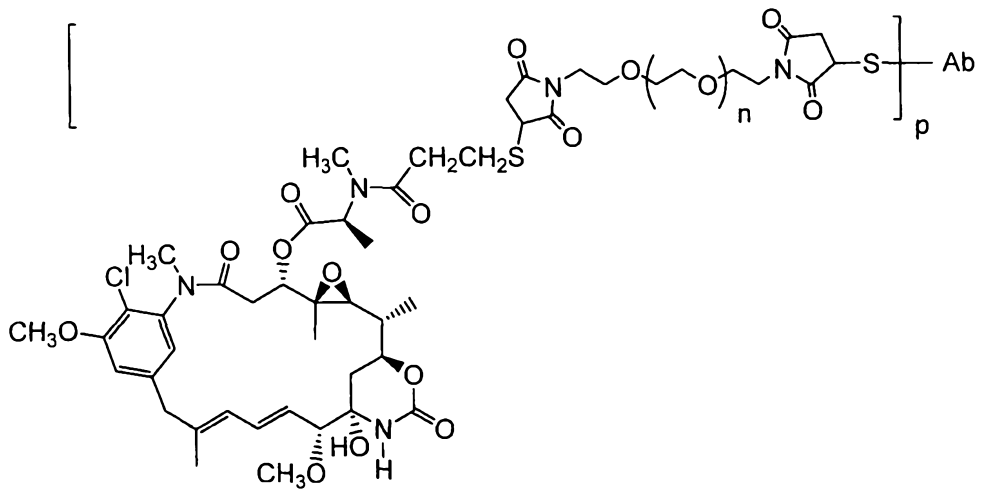
Ab-SPDB-DM4



Ab-SMCC-DM1。

在一實施例中，形成抗體-藥物結合物，其中DM4經由SPDB連接子連接於抗體之硫氫基(參見美國專利第6913748號及第7276497號，其全部內容係以引用的方式併入本文中)。

DM1經由BMPEO連接子連接於抗體之硫氫基的例示性抗體-藥物結合物具有以下結構及縮寫：



其中Ab為抗體；n為0、1或2；且p為1、2、3或4。

含有類美登素之免疫結合物、其製備方法及其治療用途

揭示於例如Erickson等人(2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433；美國專利第5,208,020號、第5,416,064號、US 2005/0276812 A1及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其揭示內容以引用的方式明確地併入本文中。

藉由將抗體以化學方式連接於類美登素分子而不顯著降低抗體或類美登素分子之生物活性來製備抗體-類美登素結合物。例如參見美國專利第5,208,020號(該專利之揭示內容以引用的方式明確地併入本文中)。類美登素可藉由已知技術合成或自天然來源分離。適合之類美登素揭示於例如美國專利第5,208,020號中及上文提及之其他專利及非專利公開案中，諸如美登醇及芳族環或美登醇分子其他位置經修飾之美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

此項技術中已知多種連接基團可用於製備抗體-類美登素結合物，包括例如美國專利第5208020號或歐洲專利0 425 235 B1；Chari等人*Cancer Research* 52:127-131 (1992)；及US 2005/016993 A1中所揭示之連接基團，該等參考文獻之揭示內容以引用的方式明確地併入本文中。包含連接子組分SMCC之抗體-類美登素結合物可如US 2005/0276812 A1,「Antibody-drug conjugates and Methods」中所揭示製備。連接子包含如以上所確定專利中所揭示的二硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定基團。本文中描述且例示其他連接子。

抗體與類美登素之結合物可使用各種雙官能蛋白質偶合

劑來製備，該等蛋白質偶合劑諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。在某些實施例中，偶合劑為提供二硫鍵之3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)(Carlsson等人，*Biochem. J.* 173:723-737(1978))或4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)。

連接子可視連接類型而定連接於類美登素分子之各位置處。舉例而言，可藉由使用習知偶合技術與羥基反應形成酯鍵。反應可發生於具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置處。在一實施例中，在美登醇或美登醇類似物之C-3位置處形成該鍵。

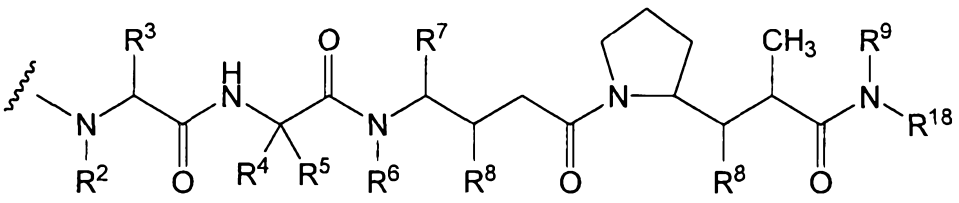
(2) 奧瑞他汀及多拉司他汀

在一些實施例中，免疫結合物包含結合於多拉司他汀或多拉司他汀肽類似物或衍生物(例如奧瑞他汀(美國專利第5635483號；第5780588號))之抗體。已展示多拉司他汀及奧瑞他汀干擾微管動力學、GTP水解及核分裂與細胞分裂(Woyke等人(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.*

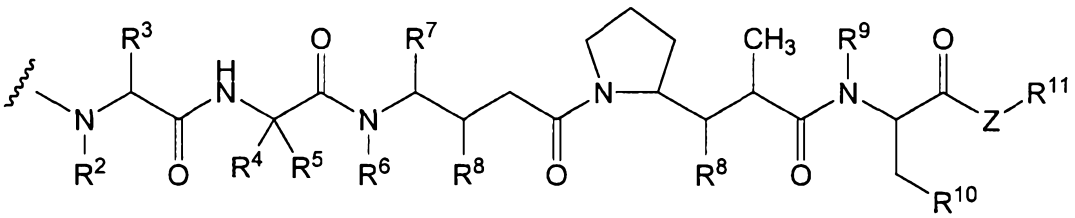
45(12):3580-3584)且具有抗癌活性(美國專利第5,663,149號)及抗真菌活性(Pettit等人，(1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。多拉司他汀或奧瑞他汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端連接於抗體(WO 02/088172)。

例示性奧瑞他汀實施例包括N末端連接之單甲基奧瑞他汀藥物部分DE及DF(US 2005/0238649，揭示於Senter等人2004年3月28日提交之Proceedings of the American Association for Cancer Research，第45卷，文摘號623中，其揭示內容以全文引用的方式明確地併入本文中)。

肽藥物部分可選自下式D_E及D_F：



D_E



D_F

其中D_E及D_F之波形線指示與抗體或抗體-連接子組分之共價連接位點，且在各位置，獨立地：

R^2係選自H及C_1-C_8烷基；

R^3係選自H、C_1-C_8烷基、C_3-C_8碳環、芳基、C_1-C_8烷

基-芳基、C_1-C_8烷基-(C_3-C_8碳環)、C_3-C_8雜環及C_1-C_8烷基-(C_3-C_8雜環)；

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

R^5係選自H及甲基；

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

R^6係選自H及C_1-C_8烷基；

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

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

R^9係選自H及C_1-C_8烷基；

R^{10}係選自芳基或C_3-C_8雜環；

Z為O、S、NH或NR^{12}，其中R^{12}為C_1-C_8烷基；

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

m為介於1-1000範圍內之整數；

R^{13}為C_2-C_8烷基；

R^{14}為H或C_1-C_8烷基；

R^{15}在每次出現時係獨立地為H、COOH、-$(CH_2)_n$-

$N(R^{16})_2$、$-(CH_2)_n-SO_3H$或$-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$烷基；

R^{16}在每次出現時係獨立地為H、C_1-C_8烷基或$-(CH_2)_n-COOH$；

R^{18}係選自$-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$芳基、$-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$雜環)及$-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8$碳環)；且

n為介於0至6範圍內之整數。

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

在另一實施例中，R^2及R^6各為甲基，且R^9為-H。

在另一實施例中，R^8在每次出現時為$-OCH_3$。

在一例示性實施例中，R^3及R^4各為異丙基，R^2及R^6各為甲基，R^5為-H，R^7為第二丁基，R^8在每次出現時為$-OCH_3$，且R^9為-H。

在一實施例中，Z為-O-或-NH-。

在一實施例中，R^{10}為芳基。

在一例示性實施例中，R^{10}為-苯基。

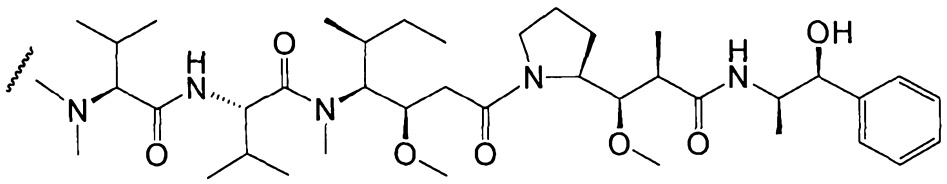
在一例示性實施例中，當Z為-O-時，R^{11}為-H、甲基或第三丁基。

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

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

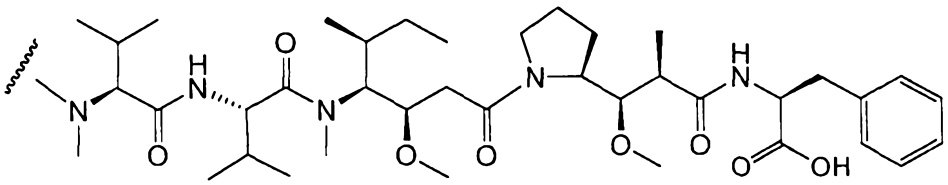
式D_E之例示性奧瑞他汀實施例為MMAE，其中波形線指

示共價連接於抗體-藥物結合物之連接子(L)：



MMAE。

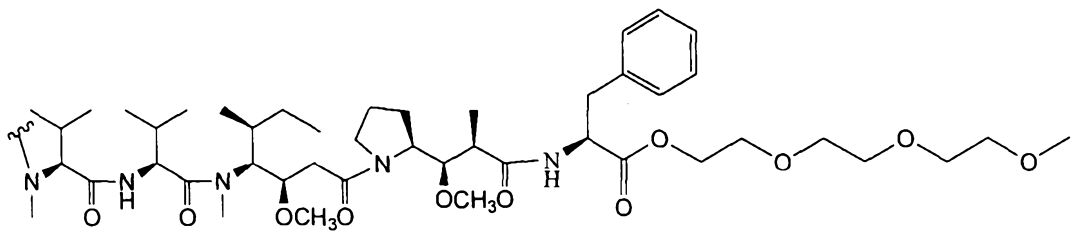
式D_F之例示性奧瑞他汀實施例為MMAF，其中波形線指示共價連接於抗體-藥物結合物之連接子(L)(參見US 2005/0238649及Doronina等人(2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124)：



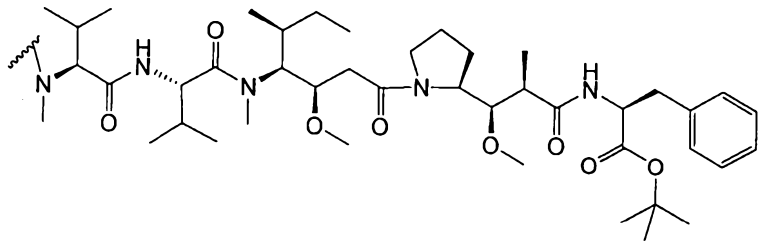
MMAF。

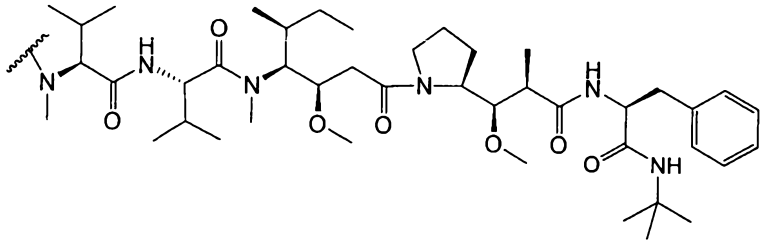
其他例示性實施例包括五肽奧瑞他汀藥物部分之C末端具有苯丙胺酸羧基修飾的單甲基纈胺酸化合物(WO 2007/008848)及五肽奧瑞他汀藥物部分之C末端具有苯丙胺酸側鏈修飾的單甲基纈胺酸化合物(WO 2007/008603)。

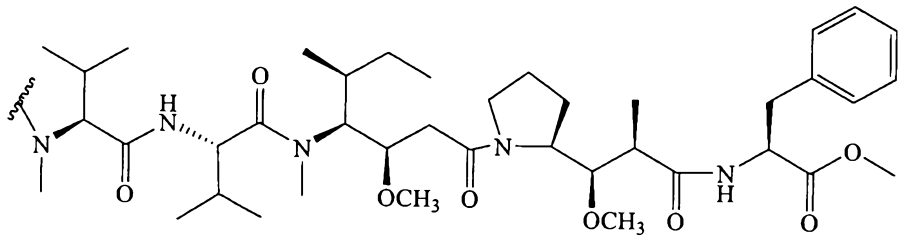
其他藥物部分包括以下MMAF衍生物，其中波形線指示共價連接於抗體-藥物結合物之連接子(L)：

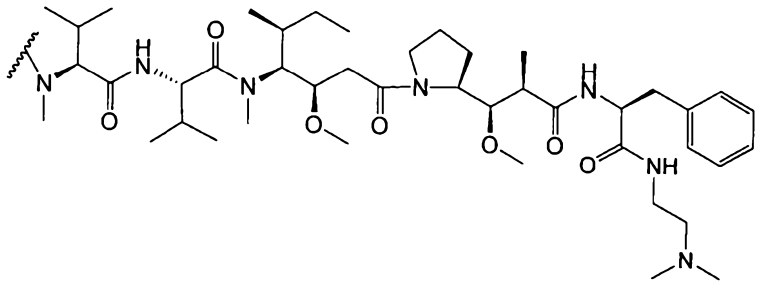


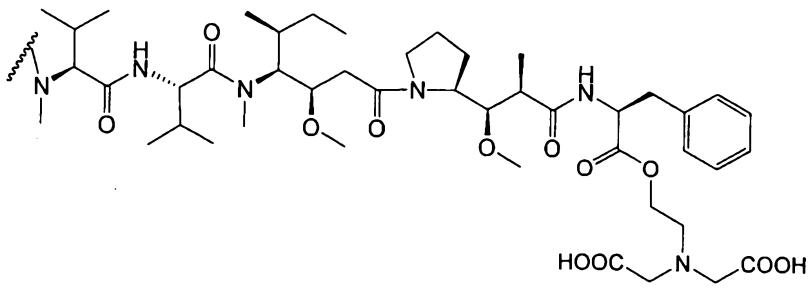
、

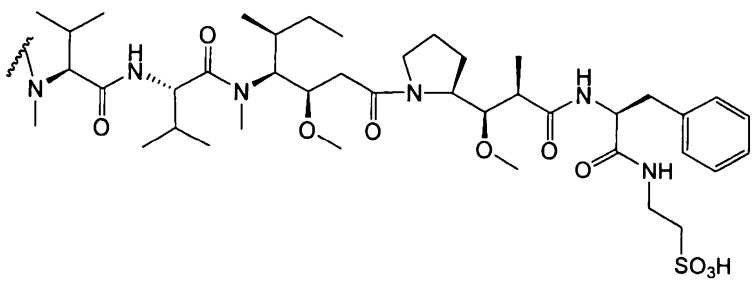


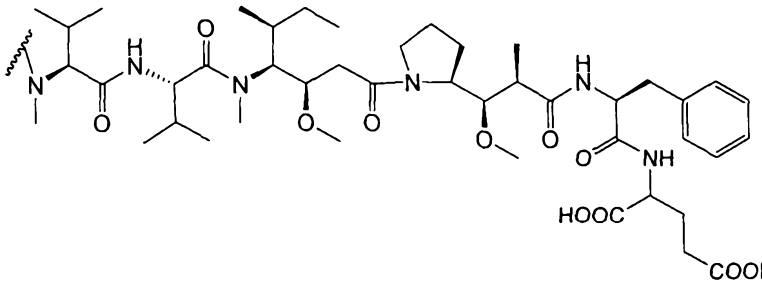




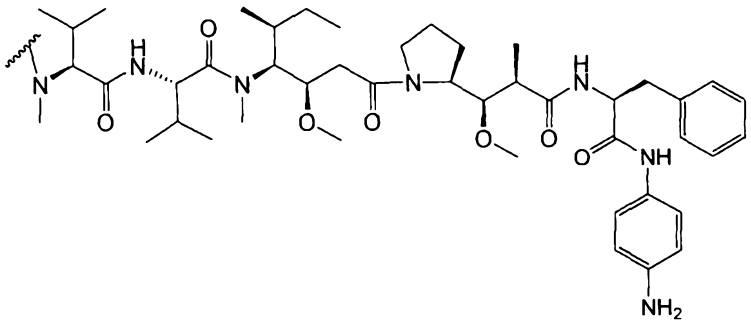








及

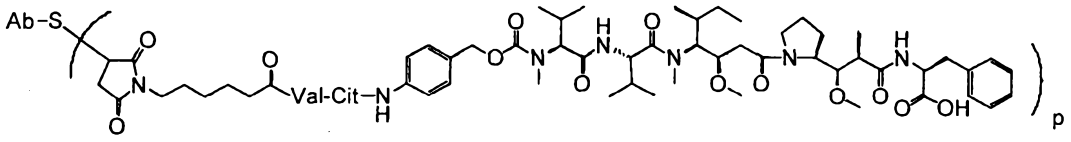


。

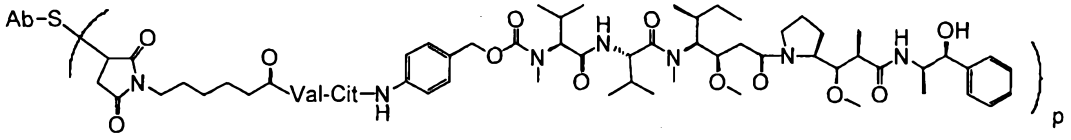
在一態樣中，如上所示，親水性基團(包括(但不限於)三乙二醇酯(TEG))可連接於藥物部分之R^{11}處。在不受任何特定理論限制的情況下，親水性基團有助於藥物部分之內化及不聚結。

包含奧瑞他汀/多拉司他汀或其衍生物之式I ADC之例示性實施例描述於US 2005-0238649及Doronina等人(2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124(其以引用的方式明確地併入本文中)中。包含MMAE或MMAF及各種連接子組分之式I ADC之例示性實施例具有以下結構及縮寫(其中「Ab」為抗體；p為1至約8，「Val-Cit」或「vc」為纈胺酸-瓜胺酸二肽；且「S」為硫原子)。應注意在本文之經硫連接之ADC的某些結構描述中，抗體表示為「Ab-S」僅指示硫連接特徵且並不指示特定硫原子具有多個連接子-藥物部分。以下結構之左括號可放置於硫原子之左方，在Ab與S

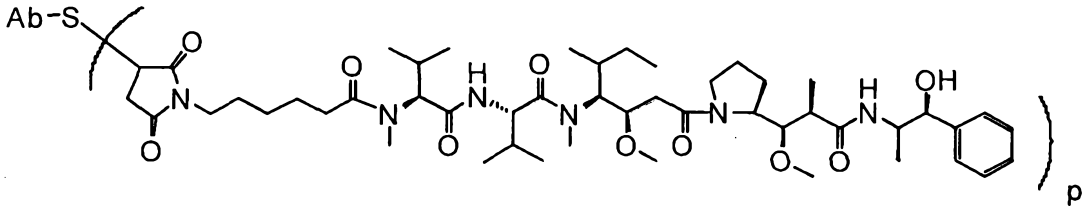
之間，其應為本文通篇所述之本發明ADC之等效說明。



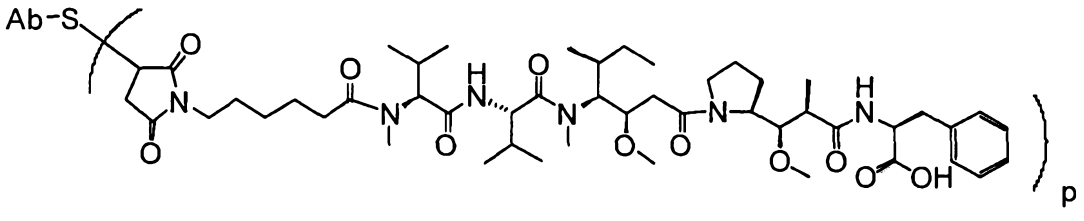
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

包含MMAF及各種連接子組分之式I ADC之例示性實施例另外包括Ab-MC-PAB-MMAF及Ab-PAB-MMAF。有趣的是，包含MMAF藉由不可以蛋白水解方式裂解之連接子連接於抗體的免疫結合物已展示具有相當於包含MMAF藉由可以蛋白水解方式裂解之連接子連接於抗體的免疫結合物的活性。參見Doronina等人(2006) *Bioconjugate Chem.*

17:114-124。在該等情況下，藥物釋放咸信藉由細胞內之抗體降解實現。同前。

一般而言，基於肽之藥物部分可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵而製備。該等肽鍵可例如根據肽化學領域中熟知之液相合成法(參見E. Schröder及K. Lübke,「The Peptides」，第1卷，第76-136頁，1965, Academic Press)製備。奧瑞他汀/多拉司他汀藥物部分可根據以下中之方法製備：US 2005-0238649 A1；美國專利第5635483號；美國專利第5780588號；Pettit等人(1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465；Pettit等人(1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277；Pettit, G.R.等人*Synthesis*, 1996, 719-725；Pettit等人(1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 5:859-863；及Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784。

詳言之，式D_F之奧瑞他汀/多拉司他汀藥物部分(諸如MMAF及其衍生物)可使用US 2005-0238649 A1及Doronina等人(2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124中所述之方法製備。式D_E之奧瑞他汀/多拉司他汀藥物部分(諸如MMAE及其衍生物)可使用Doronina等人(2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784中所述之方法製備。藥物-連接子部分MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF及MC-vc-PAB-MMAE宜藉由常規方法(例如如Doronina等人(2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784及專利申請公開案第US 2005/0238649 A1號所述之方法)合成，且隨後結合於所關注之抗體。

(3) 刺孢黴素

在其他實施例中，免疫結合物包含結合於一或多個刺孢黴素分子之抗體。刺孢黴素抗生素家族能夠於亞皮莫耳(sub-picomolar)濃度下產生雙股DNA斷裂。對於製備刺孢黴素家族之結合物，參見美國專利第5,712,374、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號、第5,877,296號(均屬於American Cyanamid Company)。可使用之刺胞黴素之結構類似物包括(但不限於)γ_1^I、α_2^I、α_3^I、N-乙醯基-γ_1^I、PSAG及θ^I_1(Hinman等人，*Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode等人，*Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)及上述屬於American Cyanamid之美國專利)。抗體可結合之另一抗腫瘤藥為QFA，其為抗葉酸藥。刺胞黴素與QFA均具有細胞內作用位點且不易穿過質膜。因此，細胞經由抗體介導之內化作用進行之對此等藥劑之吸收大大增強其細胞毒性作用。

c. 其他細胞毒性劑

可結合於抗體之其他抗腫瘤劑包括BCNU，鏈脲佐菌素，長春新鹼及5-氟尿嘧啶，美國專利第5,053,394號、第5,770,710號中所述之統稱為LL-E33288複合物的藥劑家族，以及艾斯帕米辛(美國專利第5,877,296號)。

可使用之酶促活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(獲自綠膿桿菌)、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒素A鏈、莫迪素A鏈、α-帚麴菌素、油桐蛋白、康乃馨蛋白、美洲商陸蛋白(PAPI、PAPII及PAP-

S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒素、巴豆毒素、肥皂草抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素。例如參見1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明另外涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸內切酶，諸如去氧核糖核酸酶；DNA酶)之間所形成的免疫結合物。

在某些實施例中，免疫結合物可包含高度放射性原子。可利用多種放射性同位素產生放射性結合抗體。實例包括At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、Pb^{212}及Lu之放射性同位素。當使用免疫結合物進行偵測時，其可包含用於閃爍攝影術研究之放射性原子，例如tc^{99m}或I^{123}；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱作磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123、碘-131、銦-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釓、錳或鐵。

可以已知方法將放射性標記或其他標記併入免疫結合物中。舉例而言，肽可生物合成，或可藉由使用適合之胺基酸前驅物之化學胺基酸合成(例如涉及用氟-19替代氫)來合成。諸如tc^{99m}或I^{123}、Re^{186}、Re^{188}及In^{111}之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釔-90可經由離胺酸殘基連接。可使用IODOGEN法(Fraker等人(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)併入碘-123。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)詳細描述其他方法。

在某些實施例中，免疫結合物可包含結合於將前藥(例如肽基化學治療劑，參見WO 81/01145)轉化為活性藥物(諸如抗癌症藥)之前藥活化酶的抗體。該等免疫結合物適用於抗體依賴性酶介導之前藥療法(「ADEPT」)。可結合於抗體之酶包括(但不限於)鹼性磷酸酶，其適用於將含磷酸酯前藥轉化為自由態藥物；芳基硫酸酯酶，其適用於將含硫酸酯前藥轉化為自由態藥物；胞嘧啶去胺酶，其適用於將無毒5-氟胞嘧啶轉化為抗癌藥5-氟尿嘧啶；蛋白酶，諸如沙雷氏菌蛋白酶(serratia protease)、嗜熱菌蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶(subtilisin)、羧基肽酶及組織蛋白酶(諸如組織蛋白酶B及L)，其適用於將含肽前藥轉化為自由態藥物；D-丙胺醯基羧基肽酶，其適用於轉化含有D-胺基酸取代基之前藥；碳水化合物裂解酶，諸如β-半乳糖苷酶及神經胺糖酸苷酶，其適用於將糖基化前藥轉化為自由態藥物；β-內醯胺酶，其適用於將用β-內醯胺衍生之藥物轉化為自由態藥物；及青黴素醯胺酶，諸如青黴素V醯胺酶及青黴素G醯胺酶，其適用於將胺氮分別用苯氧基乙醯基或苯基乙醯基衍生之藥物轉化為自由態藥物。酶可藉由此項技術中熟知之重組DNA技術共價結合於抗體。例如參見Neuberger等人，*Nature* 312:604-608 (1984)。

d. 藥物負載

藥物負載由p(式I分子中每個抗體之藥物部分平均數)表示。藥物負載可介於每個抗體1個至20個藥物部分(D)範圍內。式I之ADC包括與1個至20個範圍之藥物部分結合之抗

體的集合。來自結合反應之ADC製劑中每個抗體之藥物部分平均數可由習知方式(諸如質譜、ELISA分析法及HPLC)表徵。亦可測定ADC中p之定量分佈。在一些情況下，p為特定值之均質ADC與具有其他藥物負載之ADC的分離、純化及表徵可藉由諸如逆相HPLC或電泳之方式達成。因此，式I抗體-藥物結合物之醫藥調配物可為抗體連接於1、2、3、4或更多個藥物部分的該等結合物之非均質混合物。

對於一些抗體-藥物結合物，p可能受抗體上之連接位點數限制。舉例而言，若連接如以上例示性實施例為半胱胺酸硫氫基，則抗體可能僅具有一個或數個半胱胺酸硫氫基，或可能僅具有一個或數個具有足夠反應性之硫氫基，連接子可經由該等硫氫基連接。在某些實施例中，更高藥物負載(例如p > 5)可能致使某些抗體-藥物結合物凝集、不溶、呈毒性或喪失細胞滲透性。在某些實施例中，本發明ADC之藥物負載介於1個至約8個；約2個至約6個；約3個至約5個範圍內。實際上，已展示對於某些ADC，每個抗體之藥物部分最佳比率可能小於8，且可為約2至約5。參見US 2005-0238649 A1。

在某些實施例中，在結合反應期間少於理論最大值之藥物部分結合於抗體。抗體可能如下所述含有例如不與藥物-連接子中間物或連接子試劑反應的離胺酸殘基。一般而言，抗體並不含有多個可連接於藥物部分之游離及反應性半胱胺酸硫氫基；實際上抗體中之大多數半胱胺酸硫氫

基殘基以二硫橋形式存在。在某些實施例中，可在部分或完全還原條件下用還原劑(諸如二硫蘇糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP))還原抗體以產生反應性半胱胺酸硫氫基。在某些實施例中，使抗體經受變性條件以暴露反應性親核基團(諸如離胺酸或半胱胺酸)。

ADC之負載(藥物/抗體比率)可以不同方式例如藉由以下方式加以控制：(i)限制藥物-連接子中間物或連接子試劑相對於抗體之莫耳過量，(ii)限制結合反應時間或溫度及(iii)部分或完全限制半胱胺酸硫氫基修飾之還原條件。

應瞭解，若一個以上親核基團與藥物-連接子中間物或連接子試劑繼而藥物部分試劑反應，則所得產物為ADC化合物之混合物，其具有一或多個藥物部分連接於抗體之分佈。可自混合物藉由雙重ELISA抗體分析法(其特異於抗體且特異於藥物)計算每個抗體之藥物平均數。個別ADC分子可在混合物中藉由質譜鑑別且藉由HPLC(例如疏水性相互作用層析)分離(例如參見McDonagh等人(2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307；Hamblett等人(2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070；Hamblett, K.J.等人「Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate」，文摘號624，American Association for Cancer Research, 2004年年會，2004年3月27-31日，Proceedings of the AACR，第45卷，2004年3月；Alley, S.C.等人「Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates」，文摘號627，American Association

for Cancer Research, 2004年年會，2004年3月27-31日，Proceedings of the AACR，第45卷，2004年3月)。在某些實施例中，可自結合混合物藉由電泳或層析分離具有單一負載值之均質ADC。

e. 製備免疫結合物之某些方法

式I之ADC可藉由以下數種途徑採用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑製備，包括：(1)使抗體之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成Ab-L，繼而與藥物部分D反應；及(2)使藥物部分之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成D-L，繼而與抗體之親核基團反應。經由後一種途徑製備式I ADC之例示性方法描述於US 2005-0238649 A1中，該專利以引用的方式明確地併入本文中。

抗體上之親核基團包括(但不限於)(i)N末端胺基，(ii)側鏈胺基，例如離胺酸，(iii)側鏈硫氫基，例如半胱胺酸，及(iv)糖羥基或胺基，其中抗體為糖基化抗體。胺、硫氫基及羥基具有親核性且能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應形成共價鍵，該等親電子基團包括(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵基甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵基乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基。某些抗體具有可還原之鏈間二硫基，亦即半胱胺酸橋。可藉由用還原劑(諸如DTT(二硫蘇糖醇)或三羰基乙基膦(TCEP))處理以使抗體完全或部分還原而使抗體對與連接子試劑結合具有反應性。因此，理

論上各半胱胺酸橋將形成兩個反應性硫氫基親核體。可經由例如藉由使離胺酸殘基與2-亞胺基硫雜環戊烷(喬特氏試劑(Traut's reagent))反應使胺轉化為硫氫基來修飾離胺酸殘基而將其他親核基團引入抗體中。可藉由引入一個、兩個、三個、四個或更多半胱胺酸殘基(例如藉由製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之變異抗體)而將反應性硫氫基引入抗體中。

本發明之抗體-藥物結合物亦可藉由抗體上之親電子基團(諸如醛或酮羰基)與連接子試劑或藥物上之親核基團反應產生。連接子試劑上之有用親核基團包括(但不限於)醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡巴腙、羧酸肼及芳醯肼。在一實施例中，抗體經修飾以引入能夠與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應的親電子部分。在另一實施例中，可例如用過碘酸鹽氧化劑氧化糖基化抗體之糖以形成可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應的醛或酮基。所得亞胺席夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定鍵，或可例如藉由硼氫化物試劑還原而形成穩定胺鍵。在一實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏過碘酸鈉反應可於抗體中產生可與藥物上之適當基團反應的羰基(醛及酮)(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之抗體可與偏過碘酸鈉反應，產生醛而非第一胺基酸(Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146；US 5362852)。該醛可與藥物部分或連接子親核體反應。

藥物部分上之親核基團包括(但不限於)能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應形成共價鍵之胺、硫氫基、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡巴腙(thiosemicarbazone)、羧酸肼及芳醯肼基，該等親電子基團包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵基甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵基乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基。

本發明之化合物明確涵蓋(但不限於)用如下交聯劑製備之ADC：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺酸基-EMCS、磺酸基-GMBS、磺酸基-KMUS、磺酸基-MBS、磺酸基-SIAB、磺酸基-SMCC及磺酸基-SMPB及SVSB((4-乙烯碸)苯甲酸丁二醯亞胺酯)，該等交聯劑試劑可市售(例如購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A；參見第467-498頁，2003-2004 Applications Handbook and Catalog)。

包含抗體及細胞毒性劑之免疫結合物亦可使用多種雙官能蛋白質偶合劑製備，該等蛋白質偶合劑諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯

基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人，*Science* 238:1098 (1987)所述製備。經碳14標記之1-異硫氰酸酯基苯甲基-3-甲基二伸乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為一種用於使放射性核苷酸結合於抗體之例示性螯合劑。參見WO94/11026。

或者，可例如藉由重組技術或肽合成製備包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白質。重組DNA分子可包含編碼結合物之抗體及細胞毒性部分之區域，該等區域彼此相鄰或藉由不破壞結合物之所需特性的編碼連接子肽之區域分隔。

在另一實施例中，抗體可結合於「受體」(諸如抗生蛋白鏈菌素)以用於腫瘤預靶向，其中向患者投與抗體-受體結合物，繼而使用清除劑自循環中移除未結合之結合物，且隨後投與結合於細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)之「配位體」(例如，抗生物素蛋白)。

例示性免疫結合物-Thio-抗體藥物結合物

a. 製備經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體

藉由包括(但不限於)以下之多種方法製備編碼本發明之經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體及親本抗FcRH5抗體之胺基酸序列變異體的DNA：自天然來源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體的情況下)、藉由定點(或寡核苷酸介導之)突變誘發(Carter (1985)等人Nucleic Acids Res. 13:4431-4443；Ho等人(1989) Gene (Amst.) 77:51-59；Kunkel等人(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488；Liu等人(1998) J.

Biol. Chem. 273:20252-20260)、PCR突變誘發(Higuchi, (1990), PCR Protocols, 第177-183頁，Academic Press；Ito等人(1991) Gene 102:67-70；Bernhard等人(1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132；及Vallette等人(1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733)及卡匣突變誘發(Wells等人(1985) Gene 34:315-323)先前所製備出之編碼多肽之DNA來製備。突變誘發方案、套組及試劑可市售，例如QuikChange®多定點突變誘發套組(Stratagene, La Jolla, CA)。單突變亦可藉由寡核苷酸定點突變誘發，使用雙股質體DNA作為模板，藉由基於PCR之突變誘發產生(Sambrook及Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版；Zoller等人(1983) Methods Enzymol. 100:468-500；Zoller, M.J.及Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500)。重組抗體之變異體亦可藉由限制片段操作或藉由重疊延伸PCR用合成寡核苷酸構築。突變誘發引子編碼半胱胺酸密碼子置換。可採用標準突變誘發技術產生編碼該等突變之經半胱胺酸工程改造抗體的DNA(Sambrook等人Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；及Ausubel等人Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

可使用噬菌體呈現技術(McCafferty等人，(1990) Nature 348:552-553)自未免疫供者之免疫球蛋白可變(V)域基因譜系活體外產生抗FcRH5人類抗體及抗體片段。根據此技

術，將抗體V域基因同框選殖於絲狀噬菌體(諸如M13或fd)之主要或次要鞘蛋白基因中，且以功能性抗體片段形式呈現於噬菌體粒子之表面上。由於絲狀粒子含有噬菌體基因組之單股DNA複本，故基於抗體之功能特性進行的選擇亦使得可選擇編碼展現彼等特性之抗體的基因。因此，噬菌體模擬一些B細胞特性(Johnson等人(1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571；Clackson等人(1991) Nature, 352:624-628；Marks等人(1991) J. Mol. Biol. 222:581-597；Griffith等人(1993) EMBO J. 12:725-734；US 5565332；US 5573905；US 5567610；US 5229275)。

抗FcRH5抗體可使用已知寡肽合成方法以化學方式合成或可使用重組技術製備及純化。適當胺基酸序列或其部分可藉由直接肽合成使用固相技術產生(Stewart等人，**Solid-Phase Peptide Synthesis**, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA；Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154)。可使用手動技術或藉由自動化活體外合成蛋白質。可例如採用t-BOC或Fmoc保護之胺基酸及使用Applied Biosystems肽合成儀(Foster City, CA)使用製造商之說明書自動固相合成。抗FcRH5抗體或FcRH5多肽之各部分可以化學方式分別合成且使用化學法或酶法組合以產生所需抗FcRH5抗體或FcRH5多肽。

已開發各種技術來產生抗體片段。傳統上，此等片段經由蛋白水解消化完整抗體得到(Morimoto等人(1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-

117；及Brennan等人(1985) Science, 229:81)或直接藉由重組宿主細胞產生。Fab、Fv及ScFv抗FcRH5抗體片段均可表現於大腸桿菌中且由大腸桿菌分泌，從而使得易於產生大量此等片段。可自本文所論述之抗體噬菌體庫分離抗體片段。或者，可自大腸桿菌直接回收Fab'-SH片段且使其以化學方式偶合以形成$F(ab')_2$片段(Carter等人(1992) Bio/Technology 10:163-167)或直接自重組宿主細胞培養物分離。抗FcRH5抗體可為(scFv)單鏈Fv片段(WO 93/16185；US 5571894；US. 5587458)。抗FcRH5抗體片段亦可為「線性抗體」(US 5641870)。該等線性抗體片段可具有單特異性或雙特異性。

以下描述主要係關於藉由培養轉型或轉染有含有編碼抗FcRH5抗體之核酸的載體的細胞產生抗FcRH5抗體。編碼抗FcRH5抗體之DNA可獲自由咸信具有抗FcRH5抗體mRNA且表現可偵測含量之該mRNA之組織製備的cDNA庫。因此，人類抗FcRH5抗體或FcRH5多肽DNA宜獲自由人類組織製備之cDNA庫。編碼抗FcRH5抗體之基因亦可獲自基因組庫或藉由已知合成程序(例如自動核酸合成)獲得。

本發明之設計、選擇及製備方法使得可獲得經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體，其能與親電子官能基反應。此等方法使得可獲得抗體結合化合物，諸如在指定、所設計、選擇性位點處具有藥物分子之抗體-藥物結合(ADC)化合物。抗體表面上之反應性半胱胺酸殘基使得可經由硫氫

基反應性基團(諸如順丁烯二醯亞胺或鹵基乙醯基)特異性結合藥物部分。Cys殘基之硫氫基官能基與順丁烯二醯亞胺基之親核反應性為蛋白質中之任何其他胺基酸官能基(諸如離胺酸殘基之胺基或N末端胺基)的約1000倍。碘乙醯基及順丁烯二醯亞胺試劑中之硫氫基特異性官能基可與胺基反應，但需要較高pH值(>9.0)及較長反應時間(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。蛋白質中之游離硫氫基之量可藉由標準愛爾曼氏分析法(Ellman's assay)估算。免疫球蛋白M為二硫基連接之五聚體的實例，而免疫球蛋白G為內部二硫橋將次單元鍵結在一起之蛋白質的實例。在諸如此類之蛋白質中，需要用試劑(諸如二硫蘇糖醇(DTT)或硒醇(Singh等人(2002) Anal. Biochem. 304:147-156))還原二硫鍵以產生反應性游離硫氫基。此方法可導致喪失抗體三級結構及抗原結合特異性。

PHESELECTOR(用於選擇反應性硫氫基之噬菌體ELISA)分析法使得可偵測ELISA噬菌體形式之抗體的反應性半胱胺酸基團，從而有助於設計經半胱胺酸工程改造之抗體(Junutula, J.R.等人(2008) J Immunol Methods 332:41-52；WO 2006/034488；US 2007/0092940)。將經半胱胺酸工程改造之抗體塗佈於孔表面上，繼而與噬菌體粒子一起培育，添加經HRP標記之第二抗體且偵測吸光度。呈現於噬菌體上之突變蛋白可以快速、穩固且高通量方式篩選。可使用相同方法產生經半胱胺酸工程改造抗體之庫且進行結

合選擇以適當地鑑別抗體或其他蛋白質之隨機蛋白質-噬菌體庫之游離Cys併入的反應位點。此技術包括使噬菌體上所呈現之半胱胺酸突變蛋白與亦具有硫氫基反應性之親和力試劑或報導基團反應。

PHESELECTOR分析法使得可篩選抗體中之反應性硫氫基。例示藉由此方法鑑別A121C變異體。可有效搜尋完整Fab分子以鑑別具有反應性硫氫基之更多ThioFab變異體。採用參數部分表面可及性(fractional surface accessibility)鑑別及定量溶劑對多肽中胺基酸殘基之可及性。表面可及性可表示為溶劑分子(例如水)可接觸之表面積($Å^2$)。水佔據之空間近似為1.4 Å半徑之球體。軟體可以晶體學程式之CCP4套裝形式自由獲取或得到許可(CCP4之秘書，Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom，傳真：(+44) 1925 603825，或藉由網際網路：www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)，該等程式採用算法利用源自已知x射線結晶法之座標計算蛋白質之各胺基酸的表面可及性(「The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography」(1994) Acta. Cryst. D50:760-763)。執行表面可及性計算之兩種例示性軟體模組為基於B. Lee及F.M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400之算法的「AREAIMOL」及「SURFACE」。AREAIMOL將蛋白質之溶劑可及表面定義為探針球體(表示溶劑分子)在蛋白質之凡得瓦爾表面(Van der Waals surface)上翻轉時中心之軌跡。AREAIMOL藉由在各原子周圍之延伸球體上產生表面點(距離原子中心之距離等於

原子及探針半徑之總和)及去除處於與相鄰原子相關之等效球體內的點來計算溶劑可及表面積。AREAIMOL在PDB座標檔案(PDB coordinate file)中尋找原子之溶劑可及面積，且概述殘基、鏈及完整分子之可及面積。個別原子之可及面積(或面積差異)可寫至偽PDB輸出檔案(pseudo-PDB output file)。AREAIMOL假定各成分之單一半徑，且僅識別有限數目之不同成分。

AREAIMOL及SURFACE報導絕對可及性，亦即埃(Å)平方數。部分表面可及性藉由參考多肽內胺基酸之相關標準態計算。參考態為三肽Gly-X-Gly，其中X為所關注之胺基酸，且參考態將為『延伸』構形，亦即如β股之構形。延伸構形使X之可及性達到最大。將計算出之可及面積除以Gly-X-Gly三肽參考態之可及面積且報導其商，其為部分可及性。可及性百分比為部分可及性乘以100。計算表面可及性之另一例示性算法係基於程式xsae之SOLV模組(Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel))，其基於多肽之X射線座標計算胺基酸殘基對水球體之部分可及性。可使用可用晶體結構資訊(Eigenbrot等人(1993) J Mol Biol. 229:969-995)計算抗體中各胺基酸之部分表面可及性。

易於分離編碼經半胱胺酸工程改造之抗體的DNA且使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼鼠類抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)測序。融合瘤細胞充當該DNA之來源。分離之後，可將DNA置於表現載體中，隨後將其轉染於宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猴COS

細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或其他哺乳動物宿主細胞，諸如骨髓瘤細胞(US 5807715；US 2005/0048572；US 2004/0229310))(否則該等宿主細胞不會產生抗體蛋白質)中以在重組宿主細胞中合成單株抗體。

設計及選擇之後，具有經工程改造高度反應性之未配對Cys殘基「游離半胱胺酸胺基酸」的經半胱胺酸工程改造之抗體(例如ThioFab)可藉由以下產生：(i)在細菌(例如大腸桿菌)系統(Skerra等人(1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262；Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188)或哺乳動物細胞培養物系統(WO 01/00245)(例如中國倉鼠卵巢細胞(CHO))中表現；及(ii)使用通用蛋白質純化技術純化(Lowman等人(1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988)。

使工程改造之Cys硫氫基與親電子連接子試劑及藥物-連接子中間物反應以形成經半胱胺酸工程改造之抗體藥物結合物及其他經標記半胱胺酸工程改造之抗體。配對及形成鏈間及鏈內二硫鍵的經半胱胺酸工程改造抗體之Cys殘基及親本抗體中所存在之Cys殘基無任何反應性硫氫基(除非用還原劑處理)且不與親電子連接子試劑或藥物-連接子中間物反應。新工程改造之Cys殘基可保持未配對，且能夠與親電子連接子試劑或藥物-連接子中間物(諸如藥物-順丁烯二醯亞胺)反應(亦即結合於親電子連接子試劑或藥物-連接子中間物(諸如藥物-順丁烯二醯亞胺))。例示性藥物-連接子中間物包括：MC-MMAE、MC-MMAF、MC-vc-PAB-

MMAE、及MC-vc-PAB-MMAF。重鏈及輕鏈中工程改造之Cys殘基的結構位置根據順序編號系統編號。此順序編號系統與起始於N末端之Kabat編號系統(Kabat等人，(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)有關，不同於Kabat編號方案(底列)之處為由a、b、c所註解之插入部分。使用Kabat編號系統，實際線性胺基酸序列可含有更少或其他胺基酸，其對應於可變域之FR或CDR的縮短或於可變域之FR或CDR中插入。藉由順序編號及Kabat編號方案鑑別經半胱胺酸工程改造之重鏈變異位點。

在一實施例中，經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體係藉由包含以下之方法製備：

(a) 用半胱胺酸置換親本抗FcRH5抗體之一或多個胺基酸殘基；及

(b) 藉由使經半胱胺酸工程改造之抗體與硫氫基反應性試劑反應來測定經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體的硫氫基反應性。

經半胱胺酸工程改造之抗體相較於親本抗體與硫氫基反應性試劑更具反應性。

游離半胱胺酸胺基酸殘基可位於重鏈或輕鏈中或恆定域或可變域中。抗體片段(例如Fab)亦可經工程改造以使一或多個半胱胺酸胺基酸置換抗體片段之胺基酸，而形成經半胱胺酸工程改造之抗體片段。

本發明之另一實施例提供一種製備經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體的方法，其包含：

(a) 將一或多個半胱胺酸胺基酸引入親本抗FcRH5抗體中以產生經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體；及

(b) 測定經半胱胺酸工程改造之抗體與硫氫基反應性試劑的硫氫基反應性；

其中經半胱胺酸工程改造之抗體相較於親本抗體與硫氫基反應性試劑更具反應性。

製備經半胱胺酸工程改造抗體之方法的步驟(a)可包含：

(i) 使編碼經半胱胺酸工程改造抗體之核酸序列突變誘發；

(ii) 表現該經半胱胺酸工程改造之抗體；及

(iii) 分離及純化該經半胱胺酸工程改造之抗體。

製備經半胱胺酸工程改造抗體之方法的步驟(b)可包含使經半胱胺酸工程改造之抗體表現於選自噬菌體或噬菌粒粒子之病毒粒子上。

製備經半胱胺酸工程改造抗體之方法的步驟(b)亦可包含：

(i) 使經半胱胺酸工程改造之抗體與硫氫基反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記半胱胺酸工程改造之抗體；及

(ii) 測量經親和力標記半胱胺酸工程改造之抗體與捕捉介質之結合。

本發明之另一實施例為一種篩選具有高反應性未配對半

胱胺酸胺基酸之經半胱胺酸工程改造抗體的硫氫基反應性之方法，其包含：

(a) 將一或多個半胱胺酸胺基酸引入親本抗體中以產生經半胱胺酸工程改造之抗體；

(b) 使經半胱胺酸工程改造之抗體與硫氫基反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記半胱胺酸工程改造之抗體；及

(c) 測量經親和力標記半胱胺酸工程改造之抗體與捕捉介質之結合；及

(d) 測定經半胱胺酸工程改造之抗體與硫氫基反應性試劑的硫氫基反應性。篩選經半胱胺酸工程改造抗體之方法的步驟(a)可包含：

(i) 使編碼經半胱胺酸工程改造抗體之核酸序列突變誘發；

(ii) 表現該經半胱胺酸工程改造之抗體；及

(iii) 分離及純化該經半胱胺酸工程改造之抗體。

篩選經半胱胺酸工程改造抗體之方法的步驟(b)可包含使經半胱胺酸工程改造之抗體表現於選自噬菌體或噬菌粒粒子之病毒粒子上。

篩選經半胱胺酸工程改造抗體之方法的步驟(b)亦可包含：

(i) 使經半胱胺酸工程改造之抗體與硫氫基反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記半胱胺酸工程改造之抗體；及

(ii) 測量經親和力標記半胱胺酸工程改造之抗體與捕捉介質之結合。

b. 半胱胺酸工程改造抗FcRH5 IgG變異體

藉由本文所述之半胱胺酸工程改造方法將半胱胺酸在重鏈118(EU編號)(等效於順序編號之重鏈位置118)(如圖13所示)位點處引入全長嵌合親本單株抗FcRH5抗體中，或在輕鏈205(Kabat編號)(如圖14所示)位點處引入全長嵌合親本單株抗FcRH5抗體。

所產生之重鏈118(EU編號)處具有半胱胺酸的經半胱胺酸工程改造抗體為：(a)具有重鏈序列(SEQ ID NO: 60)及輕鏈序列(SEQ ID NO: 59)之thio-hu13G9-HC-A118C，圖13。

所產生之輕鏈205(Kabat編號)處具有半胱胺酸的經半胱胺酸工程改造抗體為：(a)具有重鏈序列(SEQ ID NO: 62)及輕鏈序列(SEQ ID NO: 61)之thio-hu13G9-LC-V205C，圖14。

c. 經標記半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體

經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體可具有位點特異性且與硫氫基反應性試劑有效偶合。硫氫基反應性試劑可為多官能連接子試劑、捕捉(亦即親和力)標記試劑(例如生物素-連接子試劑)、偵測標記(例如螢光團試劑)、固相固定試劑(例如SEPHAROSE™、聚苯乙烯或玻璃)或藥物-連接子中間物。硫氫基反應性試劑之一實例為N-乙基順丁烯二醯亞胺(NEM)。在一例示性實施例中，ThioFab與生物素-

連接子試劑反應提供經生物素標記之ThioFab，由此工程改造之半胱胺酸殘基的存在及反應性可偵測及測量。ThioFab與多官能連接子試劑反應提供具有官能化連接子之ThioFab，其可與藥物部分試劑或其他標記進一步反應。ThioFab與藥物-連接子中間物反應提供ThioFab藥物結合物。

本文所述之例示性方法一般可用於鑑別及產生抗體，且更一般經由應用本文所述之設計及篩選步驟而用於其他蛋白質。

該方法可用於結合其他硫氫基反應性試劑，其中反應性基團為例如順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺、吡啶基二硫基或其他硫氫基反應性結合搭配物(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.；Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2；Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2；Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, 第40-55頁，643-671)。硫氫基反應性試劑可為藥物部分；螢光團，諸如螢光染料(如螢光素或若丹明)；用於成像之螯合劑或放射治療金屬；肽基或非肽基標記或偵測標籤；或清除改良劑，諸如聚乙二醇之各種異構體；結合於第三組分之肽；或另一碳水化合物或親脂性試劑。

d. 經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體之用途

經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體及其結合物可適用作治療劑及/或診斷劑。本發明另外提供預防、控制、治療或改善一或多個與B細胞相關病症相關之症狀的方法。詳言之，本發明提供預防、控制、治療或改善一或多個與以下細胞增殖病症相關之症狀的方法：諸如癌症，例如淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。本發明另外提供診斷FcRH5相關病症或產生該病症之誘因的方法，以及鑑別優先結合B細胞相關FcRH5多肽的抗體及抗體之抗原結合片段的方法。

本發明之另一實施例係針對經半胱胺酸工程改造抗FcRH5抗體之用途，其係用於製備適用於治療對B細胞相關病症起反應之病狀的藥物。

e. 經半胱胺酸工程改造之抗體藥物結合物(Thio-抗體藥物結合物(TDC))

本發明之另一態樣為一種抗體-藥物結合化合物，其包含經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體(Ab)及奧瑞他汀藥物部分(D)，其中該經半胱胺酸工程改造之抗體經由一或多個游離半胱胺酸胺基酸藉由連接子部分(L)連接於D；該化合物具有下式I：

$Ab-(L-D)_p$ **I**

其中p為1、2、3或4；且其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係藉由包含用一或多個游離半胱胺酸胺基酸置換親本抗FcRH5抗體之一或多個胺基酸殘基的方法製備。

本發明之另一態樣為一種組合物，其包含式I之抗體-藥物化合物之混合物，其中每個抗體之平均藥物負載為約2個至約5個或約3個至約4個。

經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體藥物結合物的潛在優勢包括改良安全性(治療指數較大)；改良PK參數；保留抗體鏈間二硫鍵，此可使結合物穩定且保留其活性結合構形；藥物結合位點受到限定；及藉由使經半胱胺酸工程改造之抗體結合於藥物-連接子試劑製備經半胱胺酸工程改造之抗體藥物結合物產生更多均質產物。

連接子

「連接子」、「連接子單元」或「連接」意謂包含將抗體共價連接於藥物部分之共價鍵或原子鏈之化學部分。在各種實施例中，連接子表示為L。「連接子」(L)為雙官能或多官能部分，其可用於連接一或多個藥物部分(D)與抗體單元(Ab)以形成式I之抗體-藥物結合物(ADC)。抗體-藥物結合物(ADC)宜使用具有用於結合於藥物及抗體之反應性官能基的連接子製備。經半胱胺酸工程改造之抗體(Ab)的半胱胺酸硫氫基可與連接子試劑、藥物部分或藥物-連接子中間物之親電子官能基形成鍵。

在一態樣中，連接子具有一反應位點，其具有能與抗體上所存在之親核半胱胺酸反應之親電子基團。抗體之半胱

胺酸硫氫基能與連接子上之親電子基團反應且形成鍵接於連接子之共價鍵。有用之親電子基團包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺及鹵基乙醯胺基。

連接子包括二價基團，諸如烷基二基，伸芳基，伸雜芳基，諸如-$(CR_2)_nO(CR_2)_n$-之部分，烷氧基之重複單元(例如聚伸乙氧基、PEG、聚亞甲氧基)及烷基胺基(例如聚伸乙基胺基、Jeffamine™)；及二酸酯及醯胺，包括丁二酸酯、丁二醯胺、氧二乙酸酯、丙二酸酯及己醯胺。

經半胱胺酸工程改造之抗體與具有親電子官能基(諸如順丁烯二醯亞胺或α-鹵基羰基)之連接子試劑或藥物-連接子中間物根據Klussman等人(2004)，Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773第766頁之結合方法反應。

連接子可由一或多個連接子組分構成。例示性連接子組分包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(「MC」)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(「MP」)、纈胺酸-瓜胺酸(「val-cit」或「vc」)、丙胺酸-苯丙胺酸(「ala-phe」或「af」)、對胺基苯甲氧基羰基(「PAB」)、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(「SPP」)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SMCC」)、(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(「SIAB」)、一或多個重複單元形式之伸乙氧基-CH_2CH_2O-(「EO」或「PEO」)。其他連接子組分為此項技術中已知且一些描述於本文中。

在一實施例中，ADC之連接子L具有下式：

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

其中：

-A-為共價連接於抗體(Ab)之半胱胺酸硫氫基的延伸子單元；

a為0或1；

各-W-獨立地為胺基酸單元；

w獨立地為介於0至12範圍內之整數；

-Y-為共價連接於藥物部分之間隔子單元；且

y為0、1或2。

延伸子單元

延伸子單元(-A-)當存在時能夠將抗體單元連接於胺基酸單元(-W-)。在此情況下，抗體(Ab)具有可與延伸子之官能基形成鍵之官能基。可存在於抗體上之有用官能基(天然存在或經由化學操作而存在)包括(但不限於)氫硫基(-SH)、胺基、羥基、羧基、碳水化合物之變旋異構羥基及羧基。在一態樣中，抗體官能基為氫硫基或胺基。氫硫基可藉由還原抗體之分子內二硫鍵產生。或者，氫硫基可藉由使用2-亞胺基硫雜環戊烷(喬特氏試劑)或另一氫硫基產生試劑與抗體離胺酸部分之胺基反應產生。在一實施例中，抗體(Ab)具有游離半胱胺酸硫氫基，其可與延伸子單元之親電子官能基形成鍵。式I結合物中之例示性延伸子單元由式II及式III描述，其中Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y如上所定義，且R^{17}為選自$(CH_2)_r$、C_3-C_8碳環基、O-$(CH_2)_r$、伸芳基、$(CH_2)_r$-伸芳基、-伸芳基-$(CH_2)_r$-、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8碳環基)、(C_3-C_8碳環基)-$(CH_2)_r$、C_3-C_8雜環基、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8

雜環基)、-(C_3-C_8雜環基)-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、-$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-、-$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$-$CH_2$-及-$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$-之二價基團；其中$R^b$為H、$C_1$-$C_6$烷基、苯基或苯甲基；且r獨立地為介於1-10範圍內之整數。

伸芳基包括藉由自芳族環系統移除兩個氫原子衍生的具有6-20個碳原子的二價芳族烴基。典型伸芳基包括(但不限於)衍生自苯、經取代之苯、萘、蒽、聯苯及其類似基團的基團。

雜環基包括如下環系統，其中一或多個環原子為雜原子，例如氮、氧及硫。雜環基包含1至20個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子。雜環可為具有3至7個環成員(2至6個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之單環，或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之雙環，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。雜環描述於以下文獻中：Paquette, Leo A.;「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1章、第3章、第4章、第6章、第7章及第9章；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950至今)，尤其第13卷、第14卷、第16卷、第19卷及第28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566。

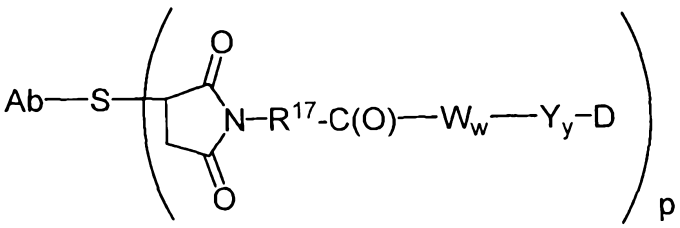
雜環之實例包括(以實例之方式且並不限於)吡啶基、二

氫吡啶基、四氫吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氫噻吩基、硫氧化之四氫噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、噻萘基、吲哚基、吲哚啉基(indolenyl)、喹啉基、異喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯啶基、2-吡咯啶酮基、吡咯啉基、四氫呋喃基、雙-四氫呋喃基、四氫哌喃基、雙-四氫哌喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹啉基、吖辛因基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻噁基、哌喃基、異苯并呋喃基、吭烯基、吖基、啡噁噻基、2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、噠嗪基、吲哚嗪基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、吙嗪基、嗒啶基、喹喏啉基、喹唑啉基、啐啉基、喋啶基、4Ah-咔唑基、咔唑基、β-咔啉基、啡啶基、吖啶基、嘧啶基、啡啉基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋呫基、啡噁嗪基、異吭烷基、吭烷基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡唑啶基、吡唑啉基、哌嗪基、吲哚啉基、異吲哚啉基、哢啶基、嗎啉基、噁唑啶基、苯并三唑基、苯并異噁唑基、羥吲哚基、苯并噁唑啉基(benzoxazolinyl)及靛紅醯基(isatinoyl)。

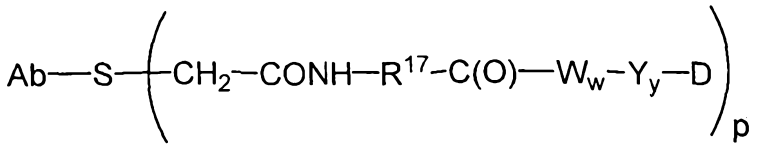
碳環基包括具有3至7個碳原子之單環形式或7至12個碳原子之雙環形式的飽和或不飽和環。單環碳環具有3至6個環原子，更通常5或6個環原子。雙環碳環具有例如以雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統形式排列的7至12個環原子，或以雙環[5,6]或[6,6]系統形式排列的9或10個環原

子。單環碳環之實例包括環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環庚基及環辛基。

應瞭解，在式I ADC之所有例示性實施例(諸如II-VI)中，即使並未明確指示，但視工程改造之半胱胺酸殘基數而定，1至4個藥物部分連接於抗體(p=1-4)。

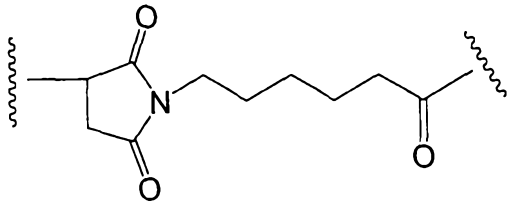


II



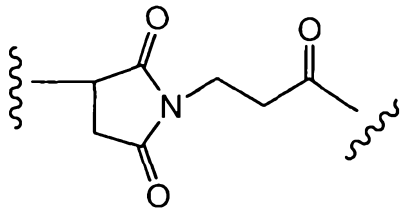
III

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



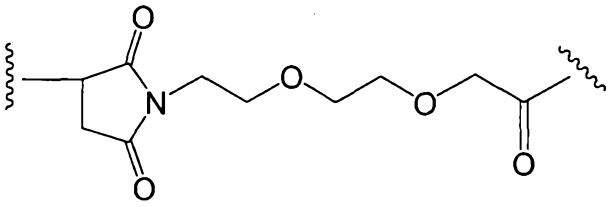
MC。

說明性式II延伸子單元係衍生自順丁烯二醯亞胺基-丙醯基(MP)，其中R^{17}為$-(CH_2)_2-$：



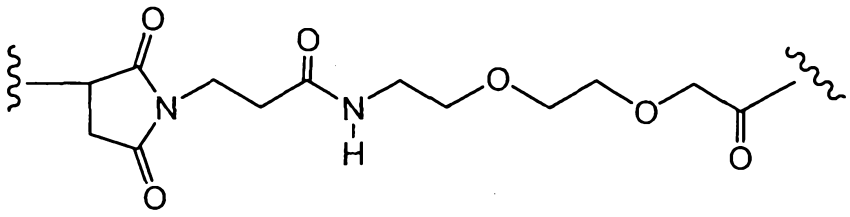
MP。

另一說明性式II延伸子單元為如下，其中R^{17}為$-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$且r為2：



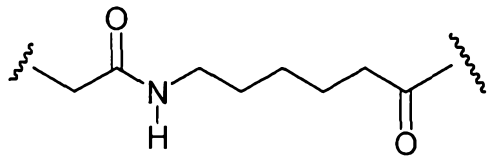
。

另一說明性式II延伸子單元為如下，其中R^{17}為$-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$，其中$R^b$為H且各r為2：



MPEG。

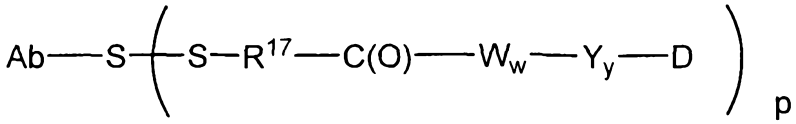
說明性式III延伸子單元如下，其中R^{17}為$-(CH_2)_5-$：



。

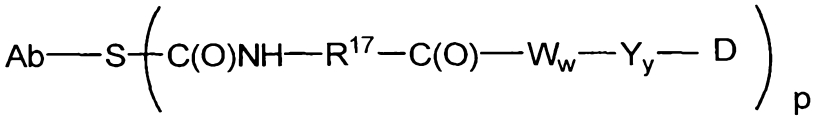
在另一實施例中，延伸子單元經由抗體之工程改造半胱胺酸硫原子與延伸子單元之硫原子之間的二硫鍵連接於經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體。此實施例之代表性延

伸子單元由式IV描述，其中R^{17}、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y如上所定義。

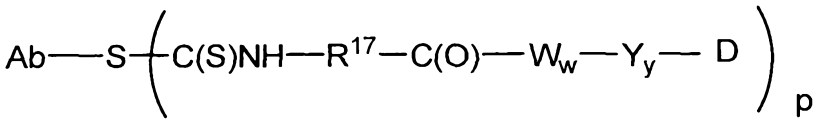


IV

在另一實施例中，延伸子之反應性基團含有硫氫基反應性官能基，其可與抗體之游離半胱胺酸硫氫基形成鍵。硫氫基反應性官能基之實例包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺、α-鹵基乙醯基、活性酯(諸如丁二醯亞胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯)、酸酐、酸氯化物、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性延伸子單元由式Va及式Vb描述，其中-R^{17}-、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y如上所定義；



Va



Vb

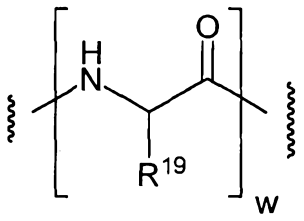
在另一實施例中，連接子L可為樹突型連接子以經由分支鏈多官能連接子部分將一個以上藥物部分共價連接於抗體(Sun等人，(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun等人(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768；King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)。樹突狀連接子可增加藥物與抗體之莫耳

比，亦即負載，此與ADC之效能有關。因此，當經半胱胺酸工程改造之抗體僅具有一個反應性半胱胺酸硫氫基時，可經由樹突狀連接子連接多個藥物部分。

胺基酸單元

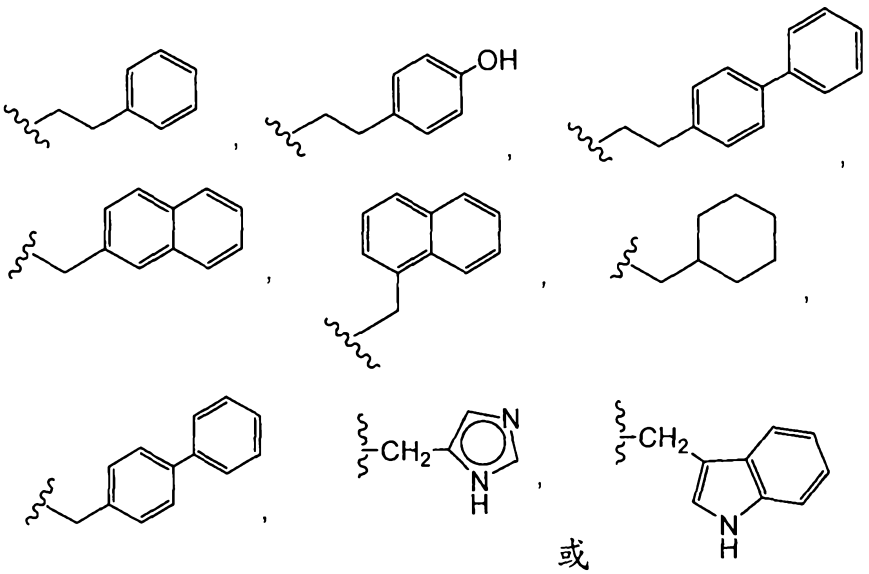
連接子可包含胺基酸殘基。胺基酸單元(-W_w-)當存在時將抗體(Ab)連接於本發明之經半胱胺酸工程改造之抗體-藥物結合物(ADC)的藥物部分(D)。

-W_w-為二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。包含胺基酸單元之胺基酸殘基包括天然存在之胺基酸以及次要胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。各-W-單元獨立地具有以下方括號中所示之式，且w為介於0至12範圍內之整數：



其中R^{19}為氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苯甲基、對羥基苯甲基、-CH_2OH、-$CH(OH)CH_3$、-$CH_2CH_2SCH_3$、-CH_2CONH_2、-CH_2COOH、-$CH_2CH_2CONH_2$、-CH_2CH_2COOH、-$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、-$(CH_2)_3NH_2$、-$(CH_2)_3NHCOCH_3$、-$(CH_2)_3NHCHO$、-$(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、-$(CH_2)_4NH_2$、-$(CH_2)_4NHCOCH_3$、-$(CH_2)_4NHCHO$、-$(CH_2)_3NHCONH_2$、-$(CH_2)_4NHCONH_2$、-$CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶基甲基-、3-

吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基、



或

。

當R^{19}不為氫時，R^{19}所連接之碳原子具有對掌性。R^{19}所連接之各碳原子獨立地呈(S)或(R)構型或外消旋混合物。因此胺基酸單元可為對映異構純、外消旋或非對映異構單元。

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

胺基酸單元可由一或多種酶(包括腫瘤相關之蛋白酶)酶促裂解以釋放藥物部分(-D)，在一實施例中，該藥物部分在釋放之後在活體內質子化以提供藥物(D)。胺基酸連接子組分可在其對藉由特定酶(例如腫瘤相關蛋白酶、組織

蛋白酶B、C及D或纖維蛋白溶酶蛋白酶)達成之酶促裂解之選擇性方面經設計及最佳化。

間隔子單元

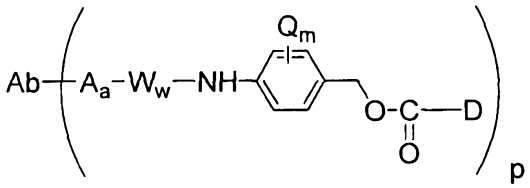
間隔子單元(-Y_y-)當存在時(y=1或2)將胺基酸單元(-W_w-)(當胺基酸單元存在時(w=1-12))連接於藥物部分(D)。或者，當胺基酸單元不存在時，間隔子單元將延伸子單元連接於藥物部分。當胺基酸單元與延伸子單元均不不存在時(w、y=0)，間隔子單元亦將藥物部分連接於抗體單元。間隔子單元具有兩種一般類型：自我犧牲及非自我犧牲型。非自我犧牲間隔子單元為如下間隔子單元，其中間隔子單元之一部分或全部在胺基酸單元自抗體-藥物結合物或藥物部分-連接子裂解(尤其酶促裂解)之後仍結合於藥物部分。當含有甘胺酸-甘胺酸間隔子單元或甘胺酸間隔子單元之ADC經由腫瘤細胞相關之蛋白酶、癌症細胞相關之蛋白酶或淋巴細胞相關之蛋白酶進行酶促裂解時，甘胺酸-甘胺酸-藥物部分或甘胺酸-藥物部分自Ab-A_a-W_w-裂解。在一實施例中，標靶細胞內進行獨立的水解反應，從而使甘胺酸-藥物部分之鍵裂解且釋放藥物。

在另一實施例中，-Y_y-為對胺基苯甲基胺甲醯基(PAB)單元，其伸苯基部分經Q_m取代，其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為介於0-4範圍內之整數。

非自我犧牲間隔子單元(-Y-)之例示性實施例為-Gly-Gly-；-Gly-；-Ala-Phe-；-Val-Cit-。

在一實施例中，提供一種藥物部分-連接子或ADC，其中不存在間隔子單元(y=0)，或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

或者，含有自我犧牲間隔子單元之ADC可釋放-D。在一實施例中，-Y-為經由PAB基團之胺基氮原子連接於-W_w-且經由碳酸酯、胺基甲酸酯或醚基直接連接於-D的PAB基團，其中ADC具有以下例示性結構：

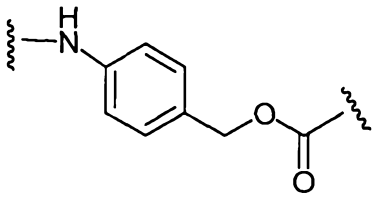


其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為介於0-4範圍內之整數；且p介於1至4範圍內。

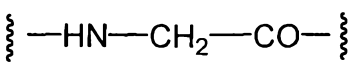
自我犧牲間隔子之其他實例包括(但不限於)電子學上類似於PAB基團之芳族化合物，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、雜環PAB類似物(US 2005/0256030)、β-葡萄糖苷酸(WO 2007/011968)及鄰胺基苯甲基縮醛或對胺基苯甲基縮醛。可使用醯胺鍵水解之後進行環化的間隔子，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(Rodrigues等人(1995) Chemistry Biology 2:223)；經適當取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(Storm等人(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)；及2-胺基苯基丙酸醯胺(Amsberry等人(1990) J. Org. Chem. 55:5867)。去除在甘胺酸處經取代之含胺藥物

(Kingsbury等人(1984) J. Med. Chem. 27:1447)亦為適用於ADC之自我犧牲間隔子之實例。

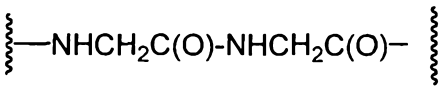
例示性間隔子單元(-Y_y-)由式X-XII表示：



X



XI

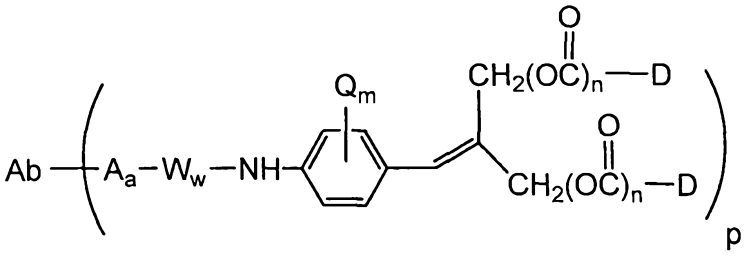


XII。

樹突狀連接子

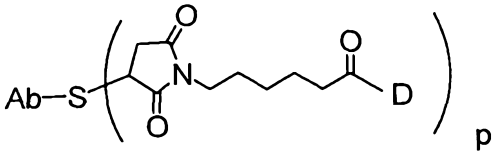
在另一實施例中，連接子L可為樹突型連接子以經由分支鏈多官能連接子部分將一個以上藥物部分共價連接於抗體(Sun等人(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun等人(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹突狀連接子可增加藥物與抗體之莫耳比，亦即負載，此與ADC之效能有關。因此，當經半胱胺酸工程改造之抗體僅具有一個反應性半胱胺酸硫氫基時，可經由樹突狀連接子連接多個藥物部分。分支鏈樹突狀連接子之例示性實施例包括2,6-雙(羥甲基)-對甲酚及2,4,6-參(羥甲基)-苯酚樹突狀聚合物單元(WO 2004/01993；Szalai等人(2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689；Shamis等人(2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731；Amir等人(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499)。

在該實施例中，間隔子單元為具有以下結構之分支鏈雙(羥甲基)苯乙烯(BHMS)，其可用於併入及釋放多個藥物：

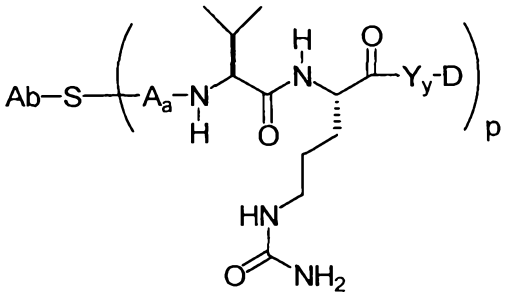


其包含2-(4-胺基苯亞甲基)丙-1,3-二醇樹突狀聚合物單元(WO 2004/043493；de Groot等人(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494)，其中Q為-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為介於0-4範圍內之整數；n為0或1；且p介於1至4範圍內。

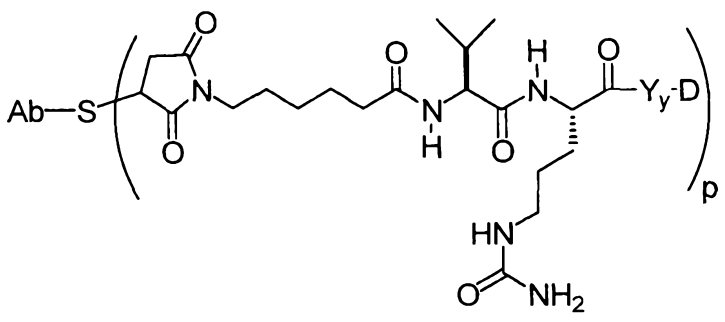
式I抗體-藥物結合化合物之例示性實施例包括XIIIa(MC)、XIIIb(val-cit)、XIIIc(MC-val-cit)及XIIId(MC-val-cit-PAB)：



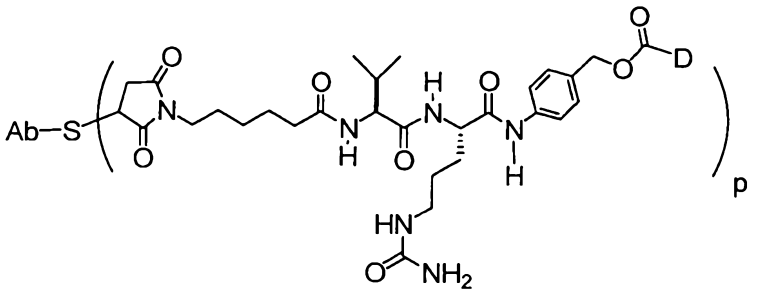
XIIIa



XIIIb

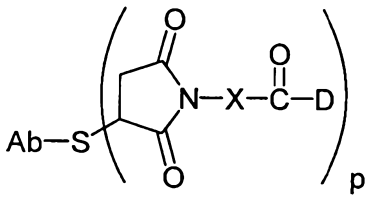


XIIIc

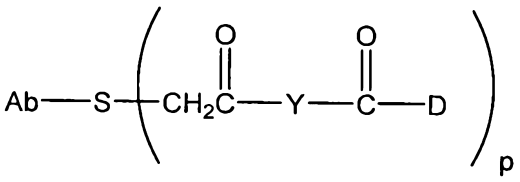


XIIId。

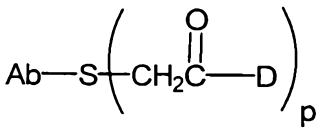
式Ia抗體-藥物結合化合物之其他例示性實施例包括XIVa-e：



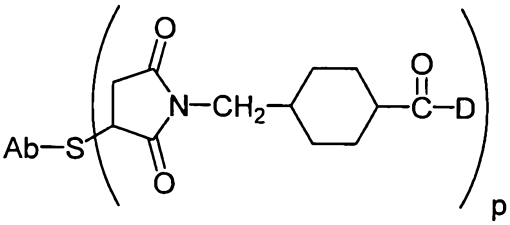
XIVa



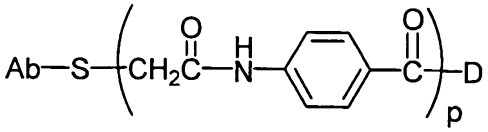
XIVb



XIVc

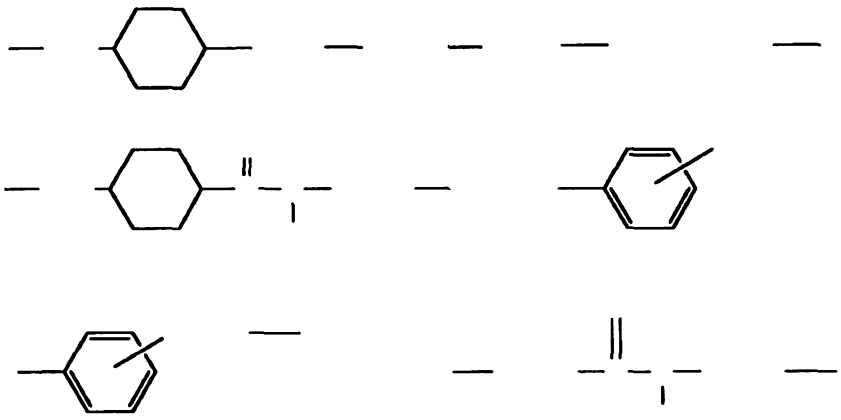


XIVd

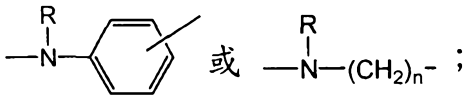


XIVe

其中X為：



Y為：



且R獨立地為H或C_1-C_6烷基；且n為1至12。

在另一實施例中，連接子具有反應性官能基，其具有與抗體上所存在之親電子基團反應的親核基團。抗體上有用之親電子基團包括(但不限於)醛及酮羰基。連接子之親核基團的雜原子可與抗體上之親電子基團反應且與抗體單元形成共價鍵。連接子上之有用親核基團包括(但不限於)醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡巴腙、羧酸肼及芳醯肼。抗體上之親電子基團提供連接於連接子之適宜位點。

一般而言，肽型連接子可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵而製備。該等肽鍵可例如根據肽化學領域中熟知之液相合成法(E. Schröder及K. Lübke (1965)「The Peptides」，第1卷，第76-136頁，Academic Press)製備。連接子中間物可以反應物(包括間隔子、延伸

子及胺基酸單元)之任何組合或順序組裝。間隔子、延伸子及胺基酸單元可採用本質上為親電子、親核或自由基的反應性官能基。反應性官能基包括(但不限於)羧基、羥基、對硝基苯基碳酸酯、異硫氰酸酯及離去基，諸如O-甲磺醯基、O-甲苯磺醯基、-Cl、-Br、-I；或順丁烯二醯亞胺。

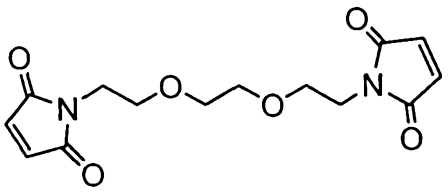
舉例而言，帶電取代基(諸如磺酸酯($-SO_3^-$)或銨)可提高試劑之水溶性且有助於連接子試劑與抗體或藥物部分之偶合反應，或有助於Ab-L(抗體-連接子中間物)與D或D-L(藥物-連接子中間物)與Ab之偶合反應，視用於製備ADC之合成途徑而定。

連接子試劑

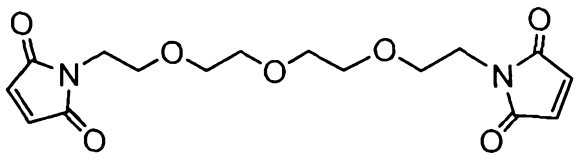
抗體與奧瑞他汀之結合物可使用各種雙官能連接子試劑來製備，該等連接子試劑諸如3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸丁二醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

抗體藥物結合物亦可用如下連接子試劑製備：BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、

MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、磺酸基-EMCS、磺酸基-GMBS、磺酸基-KMUS、磺酸基-MBS、磺酸基-SIAB、磺酸基-SMCC及磺酸基-SMPB及SVSB((4-乙烯碸)苯甲酸丁二醯亞胺酯)，且包括雙-順丁烯二醯亞胺試劑：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、1,8-雙-順丁烯二醯亞胺基二乙二醇(BM(PEO)$_2$)及1,11-雙-順丁烯二醯亞胺基三乙二醇(BM(PEO)$_3$)，其可購自Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL及其他試劑供應商。雙-順丁烯二醯亞胺試劑使得可以依次或同時方式將經半胱胺酸工程改造抗體之硫氫基連接於含硫氫基藥物部分、標記或連接子中間物。除順丁烯二醯亞胺以外的其他可與經半胱胺酸工程改造抗體、藥物部分、標記或連接子中間物之硫氫基反應的官能基包括碘乙醯胺、溴乙醯胺、乙烯基吡啶、二硫基、吡啶基二硫基、異氰酸酯及異硫氰酸酯。



BM(PEO)$_2$

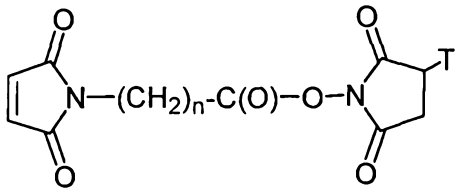


BM(PEO)$_3$

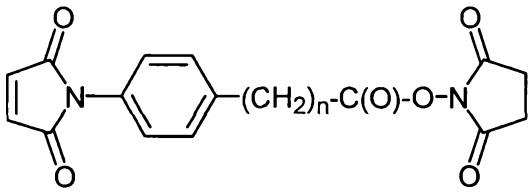
有用之連接子試劑亦可經由其他市售來源(諸如Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO))獲得，或根據Toki等人(2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872；Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355；Frisch等人(1996) Bioconjugate Chem.

7:180-186；US 6214345；WO 02/088172；US 2003130189；US2003096743；WO 03/026577；WO 03/043583；及WO 04/032828所述之程序合成。

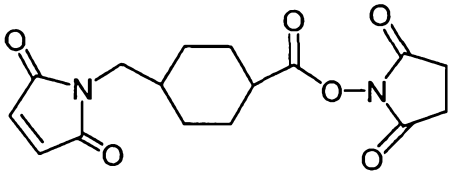
式(IIIa)之延伸子可藉由使以下連接子試劑與胺基酸單元之N末端反應引入連接子中：

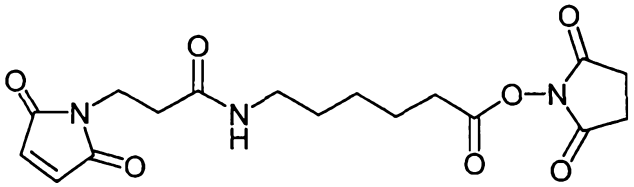


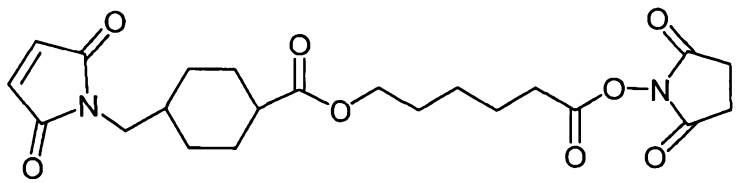
其中n為介於1-10範圍內之整數且T為-H或-SO_3Na；

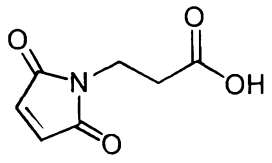


其中n為介於0-3範圍內之整數；

 ；

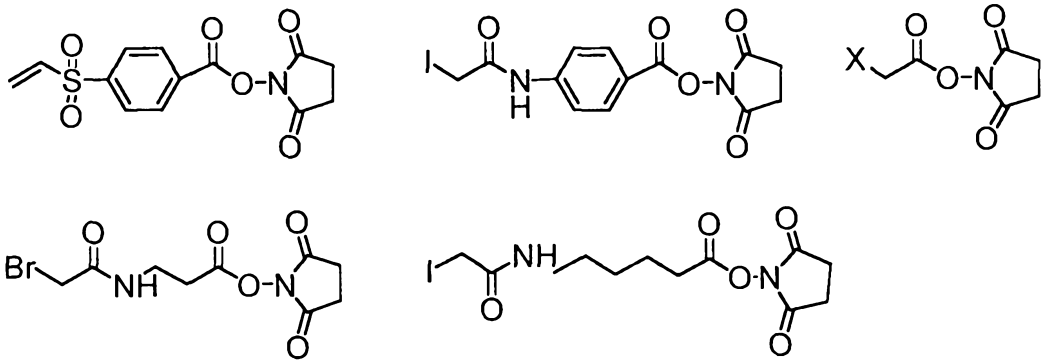
 ；

 ；及



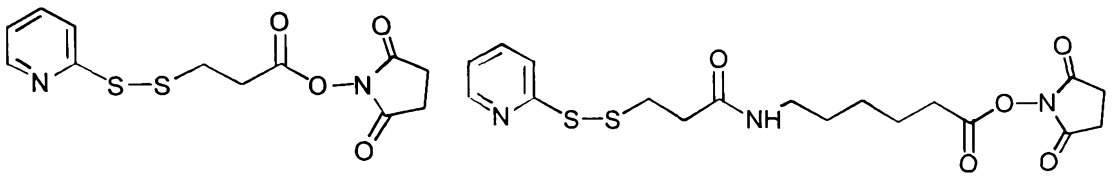
。

延伸子單元可藉由使以下雙官能試劑與胺基酸單元之N末端反應引入連接子中：

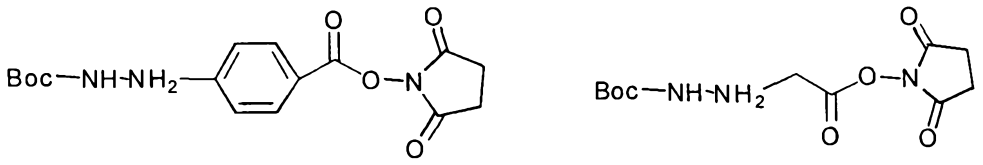


其中X為Br或I。

式之延伸子單元亦可藉由使以下雙官能試劑與胺基酸單元之N末端反應引入連接子中：

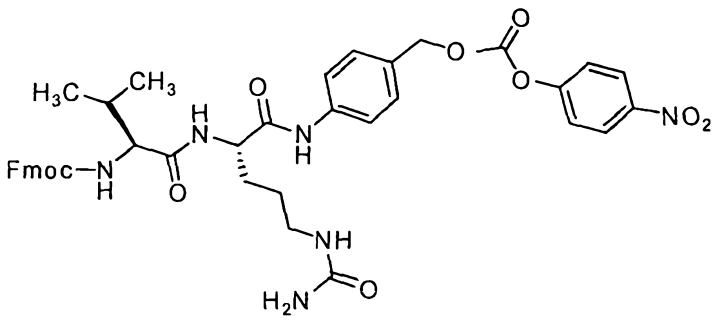


。



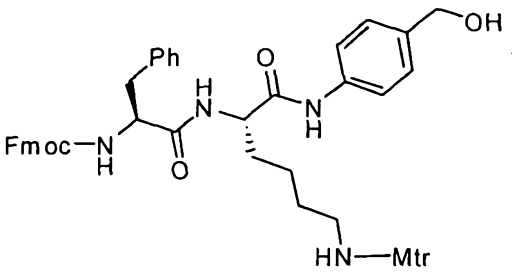
。

具有順丁烯二醯亞胺延伸子及對胺基苯甲基胺甲醯基(PAB)自我犧牲間隔子之例示性纈胺酸-瓜胺酸(val-cit或vc)二肽連接子試劑具有以下結構：



。

具有順丁烯二醯亞胺延伸子單元及PAB自我犧牲間隔子單元之例示性phe-lys(Mtr，單-4-甲氧基三苯甲基)二肽連接子試劑可根據Dubowchik等人(1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60製備且具有以下結構：



。

製備經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體-藥物結合物

式I之ADC可藉由以下數種途徑採用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑製備，包括：(1)使經半胱胺酸工程改造抗體之半胱胺酸基團與連接子試劑反應以經由共價鍵形成抗體-連接子中間物Ab-L，繼而與經活化之藥物部分D反應；及(2)使藥物部分之親核基團與連接子試劑反應以經由共價鍵形成藥物-連接子中間物D-L，繼而與經半胱胺酸工程改造抗體之半胱胺酸基團反應。結合方法(1)及(2)可用於多種經半胱胺酸工程改造抗體、藥物部分及連接子來製備式I之抗體-藥物結合物。

抗體半胱胺酸硫氫基具有親核性且能夠與連接子試劑及藥物連接子中間物上之親電子基團經由硫基交換反應形成共價鍵，該等親電子基團包括(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵基甲酸酯及酸鹵化物；(ii)烷基及苯甲基鹵化物，諸如鹵基乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基；及(iv)二硫基，包括吡啶基二硫基。藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應形成共價鍵的胺、硫氫基、羥基、醯肼、肼、胲、硫半卡巴腙、羧酸肼及芳醯肼。

可藉由用還原劑(諸如DTT(克萊倫德氏試劑(Cleland's reagent)，二硫蘇糖醇)或TCEP(參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽；Getz等人，(1999) Anal. Biochem.第273卷：73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA))處理，繼而再氧化再形成鏈間及鏈內二硫鍵(實例5)而使經半胱胺酸工程改造之抗體對與連接子試劑結合具有反應性。舉例而言，在37℃下用約50倍莫耳過量之TCEP還原CHO細胞中所表現之經半胱胺酸工程改造之全長單株抗體(ThioMab)3小時以還原半胱胺酸加合物中之二硫鍵，可在新引入之半胱胺酸殘基與培養基中所存在之半胱胺酸之間形成該半胱胺酸加合物。於10 mM乙酸鈉(pH 5)中稀釋經還原之ThioMab且負載於HiTrap S管柱上，且用含0.3 M氯化鈉之PBS溶離。在室溫下用稀(200 nM)硫酸銅($CuSO_4$)水溶液在親本Mab中所存在之半胱胺酸殘基之間重建二硫鍵隔夜。或者，去氫抗壞血酸(DHAA)為在還原裂解半胱胺酸加合物之後重建經半胱胺酸工程改

造之抗體鏈內二硫基之有效氧化劑。可使用此項技術中已知之其他氧化劑及氧化條件。環境空氣氧化亦有效。此溫和的部分再氧化步驟以高保真度有效形成鏈內二硫基且保持新引入之半胱胺酸殘基的硫氫基。添加約10倍過量之藥物-連接子中間物(例如MC-vc-PAB-MMAE)，混合且在室溫下靜置約1小時以實現結合且形成抗FcRH5抗體-藥物結合物。將結合混合物凝膠過濾且負載且經由HiTrap S管柱溶離以移除過量藥物-連接子中間物及其他雜質。

製備由細胞培養物表現之用於結合的經半胱胺酸工程改造抗體的通用方法如下。當細胞培養基含有半胱胺酸時，可在新引入之半胱胺酸胺基酸與培養基之半胱胺酸之間形成二硫基加合物。此等在圖23(左邊)之例示性ThioMab中描述為圓之半胱胺酸加合物必須經還原產生對結合具有反應性之經半胱胺酸工程改造抗體。用還原劑(諸如TCEP)還原裂解半胱胺酸加合物(可能連同各鏈間二硫鍵一起)產生抗體之還原形式。在部分氧化條件下，用硫酸銅、DHAA或暴露於環境氧氣下於配對半胱胺酸殘基之間再形成鏈間二硫鍵。新引入之工程改造且未配對半胱胺酸殘基仍可用於與連接子試劑或藥物-連接子中間物反應以形成本發明之抗體結合物。哺乳動物細胞株中所表現之ThioMab經由形成-S-S-鍵產生與工程改造之Cys而外部結合的Cys加合物。因此，用還原及再氧化程序處理經純化ThioMab以產生反應性ThioMab。使用此等ThioMab與含順丁烯二醯亞胺之細胞毒性藥、螢光團及其他標記結合。

10. **免疫脂質體**

本文中所揭示之抗FcRH5抗體亦可調配為免疫脂質體。「脂質體」為由各種類型之脂質、磷脂及/或界面活性劑構成之適用於向哺乳動物傳遞藥物的小泡囊。脂質體之組分通常類似於生物膜之脂質排列以雙層形式排列。含有抗體之脂質體藉由此項技術中已知之方法製備，該等方法諸如描述於以下中之方法：Epstein等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 82:3688 (1985)；Hwang等人，**Proc. Natl Acad. Sci. USA** 77:4030 (1980)；美國專利第4,485,045號及第4,544,545號；及1997年10月23日公開之WO97/38731。美國專利第5,013,556號中揭示具有延長之循環時間的脂質體。

尤其有用之脂質體可藉由使用包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及PEG衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)的脂質組合物的逆相蒸發法產生。經由限定孔徑之過濾器擠出脂質體以得到具有所需直徑之脂質體。本發明抗體之Fab'片段可經由二硫基交換反應而結合於脂質體(如Martin等人，**J. Biol. Chem.** 257:286-288 (1982)所述)。該脂質體中視情況含有化學治療劑。參見Gabizon等人，**J. National Cancer Inst.** 81(19):1484 (1989)。

B. **製備抗體之特定方法**

1. **篩選具有所需特性之抗FcRH5抗體**

產生結合於FcRH5多肽之抗體的技術如上所述。可視需要進一步選擇具有特定生物學特徵之抗體。

本發明之抗FcRH5抗體的生長抑制作用可藉由此項技術

中已知之方法，例如使用內源表現FcRH5多肽或在轉染有FcRH5基因之後表現FcRH5多肽的細胞評定。舉例而言，可用各種濃度之本發明抗FcRH5單株抗體處理適當腫瘤細胞株及轉染有FcRH5之細胞數日(例如2-7日)，且用結晶紫或MTT染色或藉由某另一比色分析法分析。測量增殖之另一方法為藉由比較在有本發明之抗FcRH5抗體時或無本發明之抗FcRH5抗體時經處理細胞的^{3}H-胸苷吸收。處理之後，收集細胞且在閃爍計數器中定量併入DNA中之放射性之量。適當陽性對照組包括用已知抑制所選細胞株生長之生長抑制性抗體處理該細胞株。活體內腫瘤細胞之生長抑制可以此項技術中已知之多種方式測定。腫瘤細胞可為過度表現FcRH5多肽之細胞。在一實施例中，在約0.5至30 μg/ml之抗體濃度下，相較於未處理腫瘤細胞，抗FcRH5抗體將活體外或活體內表現FcRH5之腫瘤細胞的細胞增殖抑制約25-100%，更佳約30-100%，且甚至更佳約50-100%或70-100%。可在細胞培養物中抗體濃度為約0.5至30 μg/ml或約0.5 nM至200 nM下測量生長抑制，其中在將腫瘤細胞暴露於抗體之後1-10日測定生長抑制。若投與每公斤體重約1 μg至每公斤體重約100 mg抗FcRH5抗體在首次投與抗體約5日至3個月內、較佳約5日至30日內使腫瘤尺寸減小或腫瘤細胞增殖減少，則該抗體在活體內具有生長抑制性。

為選擇誘發細胞死亡之抗FcRH5抗體，可相對於對照組評定如例如碘化丙錠(PI)、錐蟲藍或7AAD吸收所指示之膜

完整性喪失。可在無補體及免疫效應細胞的情況下執行PI吸收分析法。將表現FcRH5多肽之腫瘤細胞與單獨之培養基或含有適當抗FcRH5抗體(例如約10 μg/ml)之培養基一起培育。將細胞培育3日。每次處理之後，洗滌細胞且於35 mm過濾器封端之12×75管中分成等份(每管1 ml，每處理組3管)以去除細胞團塊。隨後向管添加PI(10 μg/ml)。可使用FACSCAN®流式細胞儀及FACSCONVERT® CellQuest軟體(Becton Dickinson)分析樣品。如PI吸收所測定之誘發統計上顯著水準之細胞死亡的彼等抗FcRH5抗體可選作為誘發細胞死亡之抗FcRH5抗體。

為篩選結合於所關注抗體所結合的FcRH5多肽上之抗原決定基的抗體，可執行常規交叉阻斷分析法，諸如**Antibodies, A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及David Lane編(1988)中所述之分析法。此分析法可用於判定測試抗體是否與已知抗FcRH5抗體結合相同位點或抗原決定基。或者或另外，可藉由此項技術中已知之方法執行抗原決定基定位。舉例而言，可諸如藉由丙胺酸掃描使抗體序列突變誘發以鑑別接觸殘基。首先測試突變抗體與多株抗體之結合以確保正確摺疊。在不同方法中，可在與測試抗體或與測試抗體及具有已表徵或已知抗原決定基之抗體的競爭分析法中使用對應於FcRH5多肽之不同區的肽。

2. 特定庫篩選方法

本發明之抗FcRH5抗體可藉由使用組合庫以篩選具有所

需活性之抗體而製備。舉例而言，此項技術中已知多種方法可用於產生噬菌體呈現庫及篩選該等庫中具有所需結合特徵之抗體。該等方法一般描述於Hoogenboom等人(2001), Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人編，Human Press, Totowa, NJ)中，且在某些實施例中，描述於Lee等人(2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093中。

原則上，藉由篩選含有呈現融合於噬菌體鞘蛋白之抗體可變區(Fv)之各種片段之噬菌體的噬菌體庫來選擇合成之抗體純系。藉由針對所需抗原進行親和層析來淘選該等噬菌體庫。表現能夠結合於所需抗原之Fv片段的純系係吸附於該抗原且因此自庫中非結合性純系分離。隨後將結合性純系自抗原溶離，且可藉由其他抗原吸附/溶離循環進一步富集。本發明抗FcRH5抗體中之任一者可藉由設計適合之抗原篩選程序以選擇所關注之噬菌體純系，繼而使用來自所關注噬菌體純系之Fv序列及以下中所述之適合恆定區(Fc)序列構築全長抗FcRH5抗體純系來獲得：Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991)，第1-3卷。

在某些實施例中，抗體之抗原結合域係由兩個具有約110個胺基酸之可變(V)區形成，各自分別來自輕鏈(VL)及重鏈(VH)，兩者均呈現三個高變環(HVR)或互補決定區(CDR)。可變域可以單鏈Fv(scFv)片段形式(其中VH與VL經由可撓性短肽共價連接)或以Fab片段形式(其中VH與VL各融合於恆定域且以非共價方式相互作用)功能性地呈現

於噬菌體上，如Winter等人，Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)所述。如本文所用之編碼scFv之噬菌體純系及編碼Fab之噬菌體純系統稱為「Fv噬菌體純系」或「Fv純系」。

VH與VL基因譜系可藉由聚合酶鏈反應(PCR)分別選殖，且在噬菌體庫中隨機重組，隨後可供搜尋抗原結合純系，如Winter等人，Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)所述。來自經免疫來源之庫提供對於免疫原之高親和力抗體而無需構築融合瘤。或者，可選殖天然譜系以不經任何免疫而提供針對多種非自體抗原以及自體抗原的人類抗體之單一來源，如Griffiths等人，EMBO J, 12: 725-734 (1993)所述。最後，亦可藉由自幹細胞選殖未重排之V基因區段且使用含有隨機序列之PCR引子以編碼高度可變之CDR3區及實現活體外重排來以合成方式得到天然庫，如Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)所述。

在某些實施例中，使用絲狀噬菌體藉由融合於次要鞘蛋白pIII來呈現抗體片段。該等抗體片段可以單鏈Fv片段形式呈現，其中VH域與VL域藉由可撓性多肽間隔子連接於同一多肽鏈上，例如，如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)所述；或以Fab片段形式呈現，其中一條鏈融合於pIII而另一條鏈分泌於細菌宿主細胞周質內，其中藉由置換一些野生型鞘蛋白組裝呈現於噬菌體表面上的Fab-鞘蛋白結構，例如，如Hoogenboom等人，Nucl. Acids

Res., 19: 4133-4137 (1991)所述。

一般而言，編碼抗體基因片段之核酸可獲自由人類或動物收集之免疫細胞。若需要偏重於抗FcRH5純系之庫，則用FcRH5使個體免疫以產生抗體反應，且回收脾細胞及/或循環B細胞或其他周邊血淋巴細胞(PBL)進行庫構築。在一較佳實施例中，藉由在攜帶功能性人類免疫球蛋白基因陣列(且缺乏功能性內源抗體產生系統)之轉殖基因小鼠體內產生抗FcRH5抗體反應以使FcRH5免疫生成產生針對FcRH5之人類抗體的B細胞來獲得偏重於抗FcRH5純系之人類抗體基因片段庫。下文描述產生人類抗體之轉殖基因小鼠的產生。

可藉由使用適合之篩選程序分離表現FcRH5特異性膜結合抗體之B細胞(例如藉由使用FcRH5親和層析分離細胞，或使細胞吸附於經螢光染料標記之FcRH5，繼而進行流式活化細胞分選(FACS))而獲得對於抗FcRH5反應性細胞群體之額外富集。

或者，使用來自未免疫供者之脾細胞及/或B細胞或其他PBL更好呈現可能之抗體譜系，且使得可使用FcRH5不具抗原性之任何動物(人類或非人類)物種來構築抗體庫。對於併入活體外抗體基因構築之庫而言，自個體收集幹細胞以提供編碼未重排之抗體基因區段之核酸。所關注之免疫細胞可獲自多種動物物種，諸如人類、小鼠、大鼠、兔、狼(luprine)、犬、貓、豬、牛、馬及禽類物種等。

自所關注之細胞中回收編碼抗體可變基因區段(包括VH

及VL區段)之核酸且進行擴增。在重排之VH及VL基因庫的情況下，所需DNA可藉由自淋巴細胞中分離基因組DNA或mRNA，繼而用與重排VH及VL基因之5'端及3'端匹配之引子藉由聚合酶鏈反應(PCR)獲得，如Orlandi等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)所述，從而製備用於表現之多樣V基因譜系。V基因可用編碼成熟V域之外顯子之5'端處的後向引子及建於J區段內部的前向引子、自cDNA及基因組DNA擴增，如Orlandi等人，(1989)及Ward等人，Nature, 341: 544-546 (1989)中所述。然而，為自cDNA擴增，亦可使後向引子建於前導外顯子中，如Jones等人，Biotechnol., 9: 88-89 (1991)所述，且前向引子可建於恆定區內，如Sastry等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)所述。為使互補性最大化，可將簡併性併入該等引子中，如Orlandi等人，(1989)或Sastry等人，(1989)所述。在某些實施例中，藉由使用靶向各V基因家族的PCR引子使庫多樣性最大化，以擴增存在於免疫細胞核酸樣品中之所有可利用的VH與VL排列，例如，如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)之方法所述，或如Orum等人，Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)之方法所述。為將經擴增之DNA選殖於表現載體中，可將稀少之限制位點引入PCR引子內作為一端之標籤，如Orlandi等人，(1989)所述；或用經標記之引子進一步進行PCR擴增，如Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)所述。

以合成方式重排之V基因譜系可活體外源自V基因區段。大多數人類VH基因區段已進行選殖且測序(報導於Tomlinson等人，J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)中)，且定位(報導於Matsuda等人，Nature Genet., 3: 88-94 (1993)中)；可使用該等選殖區段(包括H1及H2環之所有主要構形)以及編碼具有多樣序列及長度之H3環的PCR引子產生多樣VH基因譜系，如Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)所述。亦可用集中於具有單一長度之長H3環中的所有序列多樣性產生VH譜系，如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)所述。人類Vκ及Vλ區段已進行選殖且測序(報導於Williams及Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)中)且可用於產生合成輕鏈譜系。基於一定範圍之VH與VL摺疊及L3及H3長度的合成V基因譜系將編碼具有相當大結構多樣性之抗體。擴增編碼V基因之DNA之後，生殖系V基因區段可根據Hoogenboom及Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)之方法活體外重排。

可藉由以數種方式將VH與VL基因譜系組合在一起來構築抗體片段譜系。各譜系可產生於不同載體中，且該等載體於活體外重組，例如如Hogrefe等人，Gene, 128: 119-126 (1993)所述；或活體內藉由組合感染重組，例如，Waterhouse等人，Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)所述之loxP系統。活體內重組方法利用Fab片段之雙鏈性質來克服大腸桿菌轉型效率對於庫尺寸所施加之限制。分

別選殖天然VH及VL譜系，一者選殖於噬菌粒中而另一者選殖於噬菌體載體中。隨後藉由噬菌體感染含有噬菌粒之細菌來組合兩個庫，以使各細胞含有不同組合且使庫尺寸僅受所存在細胞數(約10^{12}個純系)限制。兩個載體均含有活體內重組信號，以使VH與VL基因重組於單個複製子上且共封裝於噬菌體病毒粒子中。此等大型庫提供大量具有良好親和力(K_d^{-1}為約10^{-8} M)之多樣抗體。

或者，該等譜系可依次選殖於同一載體中，例如，如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)所述；或藉由PCR組裝在一起且隨後選殖，例如，如Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)所述。亦可使用PCR組裝將VH及VL DNA與編碼可撓性肽間隔子之DNA接合在一起以形成單鏈Fv(scFv)譜系。在另一技術中，使用「細胞內PCR組裝(in cell PCR assembly)」以藉由PCR將VH與VL基因組合於淋巴細胞內且隨後選殖已連接基因之譜系，如Embleton等人，Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)所述。

天然庫所產生之抗體(天然或合成抗體)可具有中度親和力(K_d^{-1}為約10^6至10^7 M^{-1})，但親和力成熟亦可藉由構築第二庫及自第二庫中再選擇而在活體外模擬，如前述Winter等人，(1994)所述。舉例而言，可藉由使用Hawkins等人，J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)之方法中或Gram等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)之方法中的易錯(error-prone)聚合酶(報導於Leung等人，

Technique, 1: 11-15 (1989)中)在活體外隨機引入突變。此外，可藉由例如使用PCR用攜帶跨越所關注CDR之隨機序列的引子在所選個別Fv純系中隨機突變一或多個CDR且篩選較高親和力純系來執行親和力成熟。WO 9607754(1996年3月14日公開)描述一種誘發免疫球蛋白輕鏈之互補決定區突變以產生輕鏈基因庫的方法。另一有效方法係將噬菌體呈現所選擇之VH域或VL域與獲自未免疫供者之天然存在V域變異體譜系重組且在數輪鏈改組中針對較高親和力進行篩選，如Marks等人，Biotechnol., 10: 779-783 (1992)所述。此技術使得可產生親和力為約10^{-9} M或更少之抗體及抗體片段。

可藉由各種此項技術中已知之技術篩選該等庫。舉例而言，可使用FcRH5塗佈吸附板之孔，表現於附著於吸附板上之宿主細胞上或用於細胞分選，或結合於生物素以供塗佈抗生蛋白鏈菌素之珠粒捕捉，或用於任何其他淘選噬菌體呈現庫之方法中。

在適合於使噬菌體粒子之至少一部分與吸附劑結合之條件下，使噬菌體庫樣品與經固定之FcRH5F接觸。通常，選擇包括pH值、離子強度、溫度及其類似條件之條件以模擬生理條件。洗滌結合於固相之噬菌體且隨後由酸溶離，例如，如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)所述；或由鹼溶離，例如，如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)所述；或藉由FcRH5抗原競爭溶離，例如，用類似於Clackson等人，Nature,

352: 624-628 (1991)之抗原競爭方法的程序。可在單輪選擇中富集噬菌體20-1,000倍。此外，可使富集之噬菌體生長於細菌培養物中且進行其他輪之選擇。

選擇效率取決於多個因素，包括洗滌期間之解離動力學及單一噬菌體上之多個抗體片段能否同時與抗原接合。具有快速解離動力學(及弱結合親和力)之抗體可藉由使用短時間洗滌、多價噬菌體呈現及抗原於固相中之高塗佈密度而保留。高密度不僅經由多價相互作用使噬菌體穩定，且亦有助於使已解離之噬菌體再結合。具有緩慢解離動力學(及良好結合親和力)之抗體的選擇可藉由使用長時間洗滌及單價噬菌體呈現(如Bass等人，Proteins, 8: 309-314 (1990)及WO 92/09690所述)及抗原之低塗佈密度(如Marks等人，Biotechnol., 10: 779-783 (1992)所述)而促進。

有可能在對FcRH5具有不同親和力、甚至具有略微不同之親和力的噬菌體抗體之間進行選擇。然而，所選抗體之隨機突變(例如，如一些親和成熟技術中所執行)可能產生許多突變體，其中大多數結合於抗原且少數具有較高親和力。使用限制性FcRH5可能會競爭淘汰極高親和力噬菌體。為保留所有具有較高親和力之突變體，可將噬菌體與過量經生物素標記之FcRH5一起培育，但經生物素標記FcRH5之濃度具有低於FcRH5之標靶莫耳親和常數的莫耳濃度。隨後可由抗生蛋白鏈菌素塗佈之順磁珠粒捕捉高親和力結合噬菌體。該「平衡捕捉」使得可根據抗體之結合親和力選擇抗體，其靈敏度使得可自大大過量之具有較低

親和力之噬菌體分離僅兩倍高親和力的突變純系。亦可操控用於洗滌結合於固相之噬菌體中的條件以基於解離動力學進行區分。

可基於活性選擇抗FcRH5純系。在某些實施例中，本發明提供結合於天然表現FcRH5之活細胞的抗FcRH5抗體。在一實施例中，本發明提供阻斷FcRH5配位體與FcRH5之間結合但不阻斷FcRH5配位體與第二蛋白之間結合的抗FcRH5抗體。對應於該等抗FcRH5抗體的Fv純系可藉由如下步驟選擇：(1)如上所述自噬菌體庫分離抗FcRH5純系，及視情況藉由使分離之噬菌體純系群於適合之細菌宿主中成長來擴增該群；(2)選擇分別需要阻斷活性及不阻斷活性之FcRH5及第二蛋白；(3)將抗FcRH5噬菌體純系吸附於經固定FcRH5；(4)使用過量的第二蛋白溶離任何可識別與第二蛋白之結合決定子重疊或共有之FcRH5結合決定子的非所需純系；及(5)溶離步驟(4)之後仍吸附之純系。視情況，具有所需阻斷/不阻斷特性之純系可藉由將本文中所述之選擇程序重複一或多次而進一步富集。

可易於分離編碼本發明之源自融合瘤之單株抗體或噬菌體呈現Fv純系之DNA，且使用習知程序(例如藉由使用經設計以由融合瘤或噬菌體DNA模板特異性擴增所關注之重鏈及輕鏈編碼區的寡核苷酸引子)進行測序。分離之後，可將DNA置於表現載體中，隨後將其轉染於宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)(否則該等宿主細胞不會產生免疫球蛋白蛋

白)中以在重組宿主細胞中合成所需單株抗體。關於在細菌中重組表現編碼抗體之DNA的評述文章包括Skerra等人，Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)及Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992)。

可將編碼本發明Fv純系之DNA與編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之已知DNA序列(例如適當之DNA序列可獲自前述Kabat等人)組合以形成編碼全長或部分長度重鏈及/或輕鏈之純系。應瞭解為達成此目的可使用任何同型之恆定區，包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區，且此等恆定區可獲自任何人類或動物物種。源自一種動物(諸如人類)物種之可變域DNA且隨後融合於另一種動物物種之恆定區DNA以形成「雜交」全長重鏈及/或輕鏈的編碼序列的Fv純系包括於本文中所用之「嵌合」及「雜交」抗體之定義中。在某些實施例中，源自人類可變DNA的Fv純系融合於人類恆定區DNA以形成全長或部分長度人類重鏈及/或輕鏈的編碼序列。

編碼源自融合瘤之抗FcRH5抗體的DNA亦可例如藉由用人類重鏈恆定域及輕鏈恆定域編碼序列取代源自融合瘤純系的同源鼠類序列(例如，如Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)之方法)修飾。可藉由使非免疫球蛋白多肽之所有或部分編碼序列共價接合於免疫球蛋白編碼序列來進一步修飾編碼源自融合瘤或Fv純系之抗體或片段的DNA。以此方式，製得具有本發明之源自Fv純系或融合瘤純系之抗體的結合特異性的「嵌合」或

「雜交」抗體。

C. 抗體依賴性酶介導之前藥療法(ADEPT)

本發明之抗體亦可藉由使抗體結合於將前藥(例如肽基化學治療劑，參見WO81/01145)轉化為活性抗癌藥之前藥活化酶而用於ADEPT中。例如參見WO 88/07378及美國專利第4,975,278號。

免疫結合物中適用於ADEPT之酶組分包括能夠以一定方式作用於前藥以便將其轉化為其更具活性之細胞毒性形式的任何酶。

適用於本發明方法之酶包括(但不限於)鹼性磷酸酶，其適用於將含磷酸酯前藥轉化為自由態藥物；芳基硫酸酯酶，其適用於將含硫酸酯前藥轉化為自由態藥物；胞嘧啶去胺酶，其適用於將無毒5-氟胞嘧啶轉化為抗癌藥5-氟尿嘧啶；蛋白酶，諸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶、羧基肽酶及組織蛋白酶(諸如組織蛋白酶B及L)，其適用於將含肽前藥轉化為自由態藥物；D-丙胺醯基羧基肽酶，其適用於轉化含有D-胺基酸取代基之前藥；碳水化合物裂解酶，諸如β-半乳糖苷酶及神經胺糖酸苷酶，其適用於將糖基化前藥轉化為自由態藥物；β-內醯胺酶，其適用於將用β-內醯胺衍生之藥物轉化為自由態藥物；及青黴素醯胺酶，諸如青黴素V醯胺酶或青黴素G醯胺酶，其適用於將胺氮分別用苯氧基乙醯基或苯基乙醯基衍生之藥物轉化為自由態藥物。或者，可使用具有酶活性之抗體(在此項技術中亦稱作「抗體酶」)將本發明之前藥

轉化為自由態活性藥物(例如參見Massey, **Nature** 328:457-458 (1987))。抗體-抗體酶結合物可如本文所述製備以將抗體酶傳遞於腫瘤細胞群。

本發明之酶可藉由此項技術中熟知之技術(諸如使用上述雜雙官能交聯試劑)共價結合於抗FcRH5抗體。或者，可使用此項技術中熟知之重組DNA技術(例如參見Neuberger等人，**Nature** 312:604-608 (1984))構築包含本發明抗體之至少抗原結合區連接於本發明酶之至少一個功能活性部分的融合蛋白質。

D. **抗FcRH5抗體**

除本文所述之抗FcRH5抗體以外，預期可製備抗FcRH5抗體變異體。抗FcRH5抗體變異體可藉由將適當核苷酸變化引入編碼DNA中及/或藉由合成所需抗體或多肽來製備。熟習此項技術者應瞭解胺基酸變化可改變抗FcRH5抗體之轉譯後加工，諸如改變糖基化位點之編號或位置或改變膜錨定特徵。

舉例而言，可使用任何例如美國專利第5,364,934號中所述之用於保守及非保守突變之技術及準則產生本文所述之抗FcRH5抗體之變化。變化可為取代、缺失或插入一或多個編碼抗體或多肽之密碼子，該抗體或多肽相較於天然序列抗體或多肽胺基酸序列有變化。視情況，變化係在抗FcRH5抗體之一或多個域中用任何其他胺基酸取代至少一個胺基酸。可藉由比較抗FcRH5抗體之序列與同源已知蛋白分子之序列且使高同源性區中所產生之胺基酸序列變化

數減至最小而發現確定可插入、取代或缺失何種胺基酸殘基而不會不利地影響所需活性的規則。胺基酸取代可為用另一具有類似結構及/或化學特性之胺基酸置換一個胺基酸(諸如用絲胺酸置換白胺酸，亦即，保守胺基酸置換)的結果。插入或缺失可視情況在約1至5個胺基酸範圍內。允許之變化可藉由以下確定：系統地在序列中插入、缺失或取代胺基酸，及測試所得變異體由全長或成熟天然序列所展現之活性。

本文提供抗FcRH5抗體片段。該等片段例如當與全長天然抗體或蛋白比較時可在N末端或C末端處截短或可缺失內部殘基。某些片段缺失對抗FcRH5抗體之所需生物活性並非必要之胺基酸殘基。

抗FcRH5抗體片段可藉由任何多種習知技術製備。所需肽片段可以化學方式合成。替代性方法包括藉由酶促消化產生抗體或多肽片段，例如藉由用已知在由特定胺基酸殘基界定之位點處裂解蛋白質的酶處理蛋白質，或藉由用適合之限制酶消化DNA及分離所需片段。另一適合之技術包括藉由聚合酶鏈反應(PCR)分離且擴增編碼所需抗體或多肽片段之DNA片段。在PCR中在5'及3'引子處採用界定DNA片段之所需末端的寡核苷酸。抗FcRH5抗體片段較佳與本文所揭示之天然抗FcRH5抗體共有至少一種生物及/或免疫活性。

在特定實施例中，所關注之保守性取代以表頭較佳取代展示於表8中。若該等取代引起生物活性變化，則可引入

更多實質性變化(表8中稱作「例示性取代」，或如下文參考胺基酸類別進一步描述之變化)，且篩選產物。

表8

初始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala(A)	val；leu；ile	val
Arg(R)	lys；gln；asn	lys
Asn(N)	gln；his；lys；arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro；ala	ala
His(H)	asn；gln；lys；arg	arg
Ile(I)	leu；val；met；ala；phe；	
	正白胺酸	leu
Leu(L)	正白胺酸；ile；val；	
	met；ala；phe	ile
Lys(K)	arg；gln；asn	arg
Met(M)	leu；phe；ile	leu
Phe(F)	leu；val；ile；ala；tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr；phe	tyr

Tyr(Y)	trp；phe；thr；ser	phe
Val(V)	ile；leu；met；phe；	
	ala；正白胺酸	leu

可藉由選擇取代基來實質上改變抗FcRH5抗體之功能或免疫學一致性，該等取代基在其對維持以下之作用方面顯著不同：a)取代區中多肽骨架之結構(例如呈薄片或螺旋構形)，(b)標靶位點處分子的電荷或疏水性，或(c)側鏈之大小。可基於通用側鏈特性將天然存在之殘基分組：

(1) 疏水性：正白胺酸、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性親水性：cys、ser、thr；

(3) 酸性：asp、glu；

(4) 鹼性：asn、gln、his、lys、arg；

(5) 影響鏈取向之殘基：gly、pro；及

(6) 芳族：trp、tyr、phe。

非保守性取代需要使該等類別中之一之成員換為另一類別。亦可將該等經取代之殘基引入保守性取代位點中或更佳引入其餘(非保守性)位點中。

該等變化可使用此項技術中已知之方法(諸如寡核苷酸介導之(定點)突變誘發、丙胺酸掃描及PCR突變誘發)產生。可在選殖之DNA上執行定點突變誘發[Carter等人，**Nucl. Acids Res.**, **13**:4331 (1986)；Zoller等人，**Nucl. Acids Res.**, **10**:6487 (1987)]、卡匣突變誘發[Wells等人，**Gene**, **34**:315 (1985)]、限制選擇突變誘發[Wells等人，

Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)]或其他已知技術以產生抗FcRH5抗體變異DNA。

亦可採用掃描胺基酸分析沿相鄰序列鑑別一或多個胺基酸。較佳掃描胺基酸為相對較小中性胺基酸。該等胺基酸包括丙胺酸、甘胺酸、絲胺酸及半胱胺酸。在此群中，丙胺酸通常為較佳掃描胺基酸，因為其去除β-碳之上之側鏈且不太可能改變變異體之主鏈構形[Cunningham and Wells, **Science**, 244:1081-1085 (1989)]。丙胺酸通常亦較佳因為其為最常見胺基酸。此外，其通常存在於埋藏及暴露之位置中[Creighton, **The Proteins**, (W.H. Freeman & Co., N.Y.)；Chothia, **J. Mol. Biol.**, **150**:1 (1976)]。若丙胺酸取代未能產生足量變異體，則可使用電子等排胺基酸。

亦可一般用絲胺酸取代不參與維持抗FcRH5抗體之適當構形的任何半胱胺酸殘基以改良分子之氧化穩定性且防止異常交聯。相反地，可將半胱胺酸鍵添加至抗FcRH5抗體中以改良其穩定性(尤其在抗體為抗體片段(諸如Fv片段)之情況下)。

尤其較佳之取代變異體類型包括取代親本抗體(例如人類化或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，經選擇用於進一步發展之所得變異體應相對於產生其之親本抗體具有改良之生物學特性。產生該等取代變異體之適宜方式包括使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，使數個高變區位點(例如6-7個位點)突變以於各位點處產生所有可能之胺基取代。由此產生之抗體變異體係以單價方式自絲

狀噬菌體粒子以與封裝於各粒子內之M13之基因III產物的融合物形式呈現。隨後如本文所揭示針對生物活性(例如結合親和力)篩選噬菌體呈現之變異體。為鑑別用於修飾之候選高變區位點，可執行丙胺酸掃描突變誘發以鑑別顯著促進抗原結合之高變區殘基。或者或另外，宜分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與FcRH5多肽之間的接觸點。根據本文中詳述之技術，該等接觸殘基及相鄰殘基為用於取代之候選者。產生該等變異體之後，如本文所述對變異體組進行篩選，且在一或多個相關分析法中具有優良特性之抗體可選用於進一步發展。

編碼抗FcRH5抗體之胺基酸序列變異體的核酸分子可藉由多種此項技術中已知之方法製備。此等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體的情況下)或藉由寡核苷酸介導之(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及卡匣突變誘發先前所製備之抗FcRH5抗體之變異或非變異型式製備。

E. **修飾抗FcRH5抗體**

本發明之範疇內包括抗FcRH5抗體之共價修飾。一類共價修飾包括使抗FcRH5抗體之靶向胺基酸殘基與有機衍生劑反應，該有機衍生劑能夠與抗FcRH5抗體之所選側鏈或N末端或C末端殘基反應。用雙官能劑衍生適用於例如使抗FcRH5抗體交聯於水不溶性支撐基質或表面以用於純化抗FcRH5抗體之方法，且反之亦然。常用交聯劑包括例如1,1-雙(重氮基乙醯基)-2-苯基乙烷；戊二醛；N-羥基丁二

醯亞胺酯，例如與4-疊氮基水楊酸形成之酯；同雙官能醯亞胺酯，包括二丁二醯亞胺酯，諸如3,3'-二硫基雙(丙酸丁二醯亞胺酯)；雙官能順丁烯二醯亞胺，諸如雙-N-順丁烯二醯亞胺基-1,8-辛烷；及諸如3-[(對疊氮基苯基)二硫基]丙醯亞胺甲酯之試劑。

其他修飾包括分別將麩醯胺醯基及天冬醯胺醯基殘基去醯胺化為相應麩胺醯基及天冬胺醯基，脯胺酸及離胺酸之羥基化，絲胺醯基或蘇胺醯基殘基之羥基的磷酸化，離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之α-胺基的甲基化[T.E. Creighton, **Proteins: Structure and Molecular Properties**, W.H. Freeman & Co., San Francisco，第79-86頁(1983)]，N末端胺之乙醯化及任何C末端羧基之醯胺化。

本發明之範疇內所包括之抗FcRH5抗體之另一類共價修飾包含改變抗體或多肽之天然糖基化模式。出於本文之目的，「改變天然糖基化模式」欲意謂缺失天然序列抗FcRH5抗體中所存在之一或多個碳水化合物部分(藉由移除潛在糖基化位點或藉由化學及/或酶促方式缺失糖基化)及/或添加一或多個不存在於天然序列抗FcRH5抗體中之糖基化位點。另外，該短語包括天然蛋白之糖基化的質變(qualitative change)，包括所存在之各種碳水化合物部分之性質及比例變化

抗體及其他多肽之糖基化通常經N連接或經O連接。經N連接係指碳水化合物部分連接於天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為

除脯胺酸外之任何胺基酸)為碳水化合物部分酶促連接於天冬醯胺側鏈之識別序列。因此，多肽中此等三肽序列中之任一者的存在產生潛在的糖基化位點。經O連接之糖基化係指糖N-乙醯基半乳胺糖、半乳糖或木糖之一連接於羥基胺基酸，該羥基胺基酸最常為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

宜藉由改變胺基酸序列以使其含有上述三肽序列中之一或多者向抗FcRH5抗體中添加糖基化位點(對於經N連接之糖基化位點)。亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至原始抗FcRH5抗體之序列中或用該一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基取代原始抗FcRH5抗體之序列來進行改變(對於經O連接之糖基化位點)。抗FcRH5抗體胺基酸序列可視情況經由DNA層面之變化而改變，尤其藉由使編碼抗FcRH5抗體之DNA在預選鹼基處突變以便產生轉譯為所需胺基酸之密碼子。

增加抗FcRH5抗體上之碳水化合物部分數之另一方式係藉由使醣苷化學或酶促偶合於多肽。該等方法描述於例如1987年9月11日公開之WO 87/05330及Aplin及Wriston, **CRC Crit. Rev. Biochem.**,第259-306頁(1981)的技術中。

可以化學方式或酶促方式或藉由突變取代編碼充當糖基化標靶之胺基酸殘基的密碼子移除抗FcRH5抗體上所存在之碳水化合物部分。化學無糖基化技術為此項技術中已知且描述於例如Hakimuddin等人，**Arch. Biochem. Biophys.**, **259**:52 (1987)及Edge等人，**Anal. Biochem.**, **118**:131

(1981)中。可藉由使用多種如Thotakura等人，**Meth. Enzymol.**, **138**:350 (1987)所述之內切及外切醣苷酶酶促裂解多肽上之碳水化合物部分。

抗FcRH5抗體之另一類共價修飾包含使抗體以美國專利第4,640,835號；第4,496,689號；第4,301,144號；第4,670,417號；第4,791,192號；或第4,179,337號中所述之方式連接於多種非蛋白性聚合物(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧伸烷基)之一。抗體亦可包埋於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合製備之微膠囊(分別例如羥甲基纖維素微膠囊或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中；包埋於膠態藥物傳遞系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中；或包埋於巨乳液中。該等技術揭示於**Remington's Pharmaceutical Sciences**，第16版，Oslo, A.編，(1980)中。

本發明之抗FcRH5抗體亦可以一定方式修飾以形成包含抗FcRH5抗體融合於另一異源多肽或胺基酸序列之嵌合分子。

在一實施例中，該嵌合分子包含抗FcRH5抗體與標籤多肽之融合物，該標籤多肽提供抗標籤抗體可選擇性結合之抗原決定基。抗原決定基標籤一般置於抗FcRH5抗體之胺基或羧基末端。可使用針對標籤多肽之抗體偵測抗FcRH5抗體之抗原決定基經標記形式的存在。提供抗原決定基標籤亦使得抗FcRH5抗體可易於藉由親和力純化使用抗標籤抗體或結合於抗原決定基標籤之另一類親和力基質純化。

各種標籤多肽及其各自之抗體為此項技術中所熟知。實例包括聚組胺酸(poly-his)或聚組胺酸-甘胺酸(poly-his-gly)標籤；flu HA標籤多肽及其抗體12CA5[Field等人，**Mol. Cell. Biol.**, **8**:2159-2165 (1988)]；c-myc標籤及其抗體8F9、3C7、6E10、G4、B7及9E10[Evan等人，**Molecular and Cellular Biology**, **5**:3610-3616 (1985)]；及疱疹單純型病毒醣蛋白D(gD)標籤及其抗體[Paborsky等人，**Protein Engineering**, **3**(6):547-553 (1990)]。其他標籤多肽包括Flag-肽[Hopp等人，**BioTechnology**, **6**:1204-1210 (1988)]；KT3抗原決定基肽[Martin等人，**Science, 255**:192-194 (1992)]；α-微管蛋白抗原決定基肽[Skinner等人，**J. Biol. Chem.**, **266**:15163-15166 (1991)]；及T7基因10蛋白肽標籤[Lutz-Freyermuth等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:6393-6397 (1990)]。

在一替代性實施例中，嵌合分子可包含抗FcRH5抗體與免疫球蛋白或免疫球蛋白之特定區之融合物。對於二價形式之嵌合分子(亦稱作「免疫黏附素」)，該融合可能為與IgG分子之Fc區融合。Ig融合物較佳包括用抗FcRH5抗體之可溶性(跨膜域缺失或失活)形式取代Ig分子內之至少一個可變區。在一尤佳實施例中，免疫球蛋白融合物包括IgG1分子之鉸鏈、CH_2及CH_3或鉸鏈、CH_1、CH_2及CH_3區。免疫球蛋白融合物之產生亦參見1995年6月27日所頒佈之美國專利第5,428,130號。

F. **製備抗FcRH5抗體**

以下描述主要係關於藉由培養轉型或轉染有含有編碼抗FcRH5抗體之核酸的載體的細胞產生抗FcRH5抗體。當然，預期此項技術中所熟知之替代性方法可用於製備抗FcRH5抗體。舉例而言，適當胺基酸序列或其部分可藉由直接肽合成使用固相技術[例如參見Stewart等人，**Solid-Phase Peptide Synthesis**, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)；Merrifield, **J. Am. Chem. Soc., 85**:2149-2154 (1963)]產生。可使用手動技術或藉由自動化活體外合成蛋白質。可例如使用Applied Biosystems肽合成儀(Foster City, CA)使用製造商之說明書自動合成。抗FcRH5抗體之各部分可以化學方式分別合成且使用化學法或酶法組合以產生所需抗FcRH5抗體。

1. 分離編碼抗FcRH5抗體之DNA

編碼抗FcRH5抗體之DNA可獲自由咸信具有抗FcRH5抗體mRNA且表現可偵測含量之該mRNA之組織所製備出的cDNA庫。因此，人類抗FcRH5抗體DNA宜獲自由人類組織所製備出之cDNA庫。編碼抗FcRH5抗體之基因亦可獲自基因組庫或藉由已知合成程序(例如自動核酸合成)獲得。

庫可用經設計以鑑別所關注基因或該基因所編碼之蛋白質的探針(諸如具有至少約20-80個鹼基之寡核苷酸)篩選。可使用標準程序(諸如Sambrook等人，**Molecular Cloning: A Laboratory Manual** (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述之標準程序)用所選探針篩

選cDNA或基因組庫。分離編碼抗FcRH5抗體之基因的替代性方式係使用PCR方法[前述Sambrook等人；Dieffenbach等人，**PCR Primer: A Laboratory Manual** (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

篩選cDNA庫之技術為此項技術中所熟知。選用作探針之寡核苷酸序列應具有足夠長度且足夠明確以使假陽性(false positives)減至最低。寡核苷酸較佳經標記以便其可在雜交於所篩選庫中之DNA之後可偵測。標記之方法為此項技術中所熟知，且包括使用放射性標記，如經^{32}P標記之ATP、生物素化或酶標記。前述Sambrook等人提供雜交條件(包括中嚴格度及高嚴格度)。

該等庫篩選方法所鑑別出之序列可與寄存於及獲自公用資料庫(諸如GenBank)或其他私人序列資料庫的其他已知序列比較及比對。可使用此項技術中已知及本文所述之方法測定分子限定區域內或全長序列上之序列一致性(胺基酸或核苷酸層面)。

具有蛋白質編碼序列之核酸可藉由篩選所選cDNA或基因組庫，使用本文首次揭示之推斷之胺基酸序列，且若必要，使用如前述Sambrook等人所述之習知引子延伸程序以偵測可能不能逆轉錄為cDNA之mRNA的前驅物及加工中間物而獲得。

2. 宿主細胞之選擇及轉型

將宿主細胞用本文所述之用於產生抗FcRH5抗體之表現或選殖載體轉染或轉型，且培養於視需要改良以誘導啟動

子、選擇轉型體或擴增編碼所需序列之基因的習知營養培養基中。培養條件(諸如培養基、溫度、pH值及其類似條件)可由熟習此項技術者無需過度實驗即可進行選擇。一般而言，用於使細胞培養物之生產力最大化之原理、方案及實用技術可見於**Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach**, M. Butler編(IRL Press, 1991)及前述Sambrook等人中。

真核細胞轉染及原核細胞轉型(其意謂將DNA引入宿主中使得DNA可以染色體外形式或藉由染色體整合複製)之方法為一般技術者所已知，例如$CaCl_2$法、$CaPO_4$法、脂質體介導之方法、聚乙二醇/DMSO法及電穿孔法。視所用宿主細胞而定，使用適合於該等細胞之標準技術執行轉型。如前述Sambrook等人所述採用氯化鈣之鈣處理法或電穿孔法一般用於原核生物。將根癌土壤桿菌(*Agrobacterium tumefacien*)感染用於轉型某些植物細胞，如Shaw等人，**Gene**, **23**:315 (1983)及1989年6月29日公開之WO 89/05859所述。對於無該等細胞壁之哺乳動物細胞，可採用Graham及van der Eb, **Virology**, **52**:456-457 (1978)之磷酸鈣沈澱法。哺乳動物細胞宿主系統轉染之通用態樣已描述於美國專利第4,399,216號中。通常根據Van Solingen等人，**J. Bact.**, **130**:946 (1977)及Hsiao等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, **76**:3829 (1979)之方法轉型於酵母中。然而，亦可使用其他將DNA引入細胞中之方法，諸如藉由核顯微注射、電穿孔、與完整細胞進行細菌原生質體融合或聚陽離

子(例如聚凝胺(polybrene)、聚鳥胺酸(polyornithine))法。各種轉型哺乳動物細胞之技術參見Keown等人，**Methods in Enzymology**, 185:527-537 (1990)及Mansour等人，**Nature,** 336:348-352 (1988)。

適於選殖或表現本文之載體中之DNA的宿主細胞包括原核生物、酵母或更高級真核生物細胞。

a. 原核宿主細胞

適合之原核生物包括(但不限於)古細菌(archaebacteria)及真細菌(eubacteria)，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸內菌科(Enterobacteriaceae)(諸如大腸桿菌)。各種大腸桿菌菌株可公開可得，諸如大腸桿菌K12菌株MM294(ATCC 31,446)；大腸桿菌X1776(ATCC 31,537)；大腸桿菌菌株W3110(ATCC 27,325)及K5 772(ATCC 53,635)。其他適合之原核宿主細胞包括腸內菌科，諸如埃希氏菌(*Escherichia*)，例如大腸桿菌，腸桿菌(*Enterobacter*)，歐文氏菌(*Erwinia*)，克雷伯氏菌(*Klebsiella*)，變形桿菌(*Proteus*)，沙氏桿菌(*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙氏桿菌(*Salmonella typhimurium*)，沙雷氏菌(*Serratia*)，例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*)，及志賀氏菌(*Shigella*)，以及芽胞桿菌(*Bacilli*)，諸如枯草芽胞桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽孢桿菌(*B. licheniformis*)(例如，1989年4月12日公開之DD 266,710中所揭示之地衣芽孢桿菌41P)，假單胞菌(*Pseudomonas*)，諸如綠膿桿菌(*P. aeruginosa*)，根瘤菌(*Rhizobia*)，透明顫菌(*Vitreoscilla*)，副球菌(*Paracoccus*)

及鏈黴菌(*Streptomyces*)。該等實例為說明性的而非限制性的。菌株W3110為一種尤佳宿主或親本宿主，因為其為重組DNA產物醱酵之常見宿主菌株。宿主細胞較佳分泌極少量之蛋白水解酶。舉例而言，菌株W3110(Bachmann, **Cellular and Molecular Biology**，第2卷(Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987)，第1190-1219頁；ATCC寄存編號27,325)可經修飾以實現編碼宿主之內源蛋白的基因的遺傳突變，該等宿主之實例包括大腸桿菌W3110菌株1A2，其具有完整基因型*tonA*；大腸桿菌W3110菌株9E4，其具有完整基因型*tonA ptr3*；大腸桿菌W3110菌株27C7(ATCC 55,244)，其具有完整基因型*tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan*^{r}；大腸桿菌W3110菌株37D6，其具有完整基因型*tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}；大腸桿菌W3110菌株40B4，其為具有非卡那黴素(kanamycin)抗性degP缺失突變之菌株37D6；具有基因型W3110 Δ*fhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kan*^{R}之大腸桿菌W3110菌株33D3(美國專利第5,639,635號)及1990年8月7日頒佈之美國專利第4,946,783號中所揭示之具有突變周質蛋白酶之大腸桿菌菌株。其他菌株及其衍生物(諸如大腸桿菌294(ATCC 31,446)、大腸桿菌B、大腸桿菌$_\lambda$ 1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌RV308(ATCC 31,608))亦適合。該等實例為說明性的而非限制性的。構築任何上述具有限定基因型之細菌之衍生物的方法為此項技術中已知且描述於例如

Bass等人，**Proteins, 8**:309-314 (1990)中。一般而言，需要考慮細菌細胞中複製子之複製性來選擇適當細菌。舉例而言，當使用諸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410之熟知質體提供複製子時，大腸桿菌、沙雷氏菌或沙氏桿菌種可適用作宿主。通常，宿主細胞應分泌極少量之蛋白水解酶，且宜將其他蛋白酶抑制劑併入細胞培養物中。或者，活體外選殖方法(例如PCR或其他核酸聚合酶反應)為適合的。

可於細菌中產生全長抗體、抗體片段及抗體融合蛋白質，尤其當不需要糖基化及Fc效應功能時，諸如當治療抗體結合於細胞毒性劑(例如毒素)且免疫結合物自身展示腫瘤細胞破壞之有效性時。全長抗體在循環中具有較長半衰期。在大腸桿菌中產生較快且更成本有效。關於在細菌中表現抗體片段及多肽，例如參見U.S. 5,648,237(Carter等人)、U.S. 5,789,199(Joly等人)、及U.S. 5,840,523(Simmons等人)(其描述轉譯起始區(TIR)及使表現及分泌最佳化之信號序列)，此等專利以引用的方式併入本文中。表現之後，將抗體於可溶性部分中自大腸桿菌細胞糊狀物(cell paste)分離且可視同型而定例如經由蛋白質A或G管柱純化。可類似於純化表現於例如CHO細胞中之抗體之方法進行最終純化。

b. 真核宿主細胞

除了原核生物之外，真核微生物(諸如絲狀真菌或酵母)亦為適用於編碼抗FcRH5抗體之載體的選殖或表現宿主。

釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)為常用較低級真核宿主微生物。其他真核宿主微生物包括粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)(Beach及Nurse, **Nature**, 290: 140 [1981]；1985年5月2日公開之EP 139,383)；克魯維拉菌(*Kluyveromyces*)宿主(美國專利第4,943,529號；Fleer等人，**Bio/Technology**, 9:968-975 (1991))，諸如乳酸克魯維拉菌(*K. lactis*)(MW98-8C，CBS683，CBS4574；Louvencourt等人，**J. Bacteriol.**, 154(2):737-742 [1983])、脆壁克魯維拉菌(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維拉菌(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、威克克魯維拉菌(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178)、瓦提克魯維拉菌(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅克魯維拉菌(*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906；Van den Berg等人，**Bio/Technology**, 8:135 (1990))、耐熱克魯維拉菌(*K. thermotolerans*)及馬克斯克魯維拉菌(*K. marxianus*)；耶氏酵母(*yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070；Sreekrishna等人，**J. Basic Microbiol.**, 28:265-278 [1988])；念珠菌(*Candida*)；里氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)(Case等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 76:5259-5263 [1979])；許旺酵母(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)(1990年10月31日公開之EP 394,538)；及絲狀真菌，諸如脈孢菌(*Neurospora*)、青黴菌(*Penicillium*)、彎頸黴菌(*Tolypocladium*)(1991年1月10日公開之WO 91/00357)及曲黴菌(*Aspergillus*)宿主，諸如溝巢

麴黴(*A. nidulans*)(Ballance等人，**Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 112:284-289 [1983]；Tilburn等人，**Gene**, 26:205-221 [1983]；Yelton等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 81: 1470-1474 [1984])及黑麴黴(*A. niger*)(Kelly及Hynes, **EMBO J.**, 4:475-479 [1985])。嗜甲醇酵母適用於本文，且包括(但不限於)能夠生長於甲醇上選自由漢森酵母(*Hansenula*)、念珠菌(Candida)、克勒克酵母(*Kloeckera*)、畢赤酵母(*Pichia*)、酵母菌(*Saccharomyces*)、球擬酵母(*Torulopsis*)及紅酵母(*Rhodotorula*)組成之屬的酵母。作為此類酵母之實例的一系列特定種可見於C. Anthony, **The Biochemistry of Methylotrophs**, 269 (1982)中。

適用於表現糖基化抗FcRH5抗體之宿主細胞源自多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括昆蟲細胞(諸如果蠅S2及夜蛾Sf9)以及植物細胞(諸如棉花、穀類、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄及菸草之細胞培養物)。已鑑別出多種桿狀病毒株及變異體及來自諸如草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)之宿主的相應允許昆蟲宿主細胞。多種用於轉染之病毒株可公開可得，例如苜蓿銀紋夜蛾核型多角體病毒(*Autographa californica* NPV)之L-1變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，且該等病毒可用作本發明之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。

然而，已極大關注脊椎動物細胞，且在培養物(組織培

養物)中使脊椎動物細胞繁殖已成為常規程序。有用之哺乳動物宿主細胞株之實例為由SV40轉型之猴腎CV1株(COS-7，ATCC CRL 1651)；人類胚腎株(293細胞或經次選殖以於懸浮培養物中生長之293細胞，Graham等人，**J. Gen Virol.** 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO，Urlaub等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77:4216 (1980))；小鼠足細胞(TM4，Mather, **Biol. Reprod.** 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；布法羅大鼠肝細胞(buffalo rat liver cell，BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳房腫瘤(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，**Annals N.Y. Acad. Sci.** 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝腫瘤株(Hep G2)。

將宿主細胞用上述用於產生抗FcRH5抗體之表現或選殖載體轉型，且培養於視需要經改良以誘導啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所需序列之基因的習知營養培養基中。

3. 選擇及使用可複製之載體

為重組產生本發明之抗體，分離編碼該抗體之核酸(例如cDNA或基因組DNA)且插入可複製載體中進行進一步選殖(擴增DNA)或表現。可易於分離編碼抗體之DNA且使用

習知程序(例如藉由使用能夠與編碼抗體重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)進行測序。可使用多種載體。載體之選擇部分取決於欲使用之宿主細胞。一般而言，較佳宿主細胞具有原核或真核(一般哺乳動物)來源。

載體可例如呈質體、黏質體、病毒粒子或噬菌體形式。適當之核酸序列可藉由多種程序插入載體中。一般而言，使用此項技術中已知之技術將DNA插入適當限制性核酸內切酶位點中。載體組分一般包括(但不限於)以下中之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列。構築含有此等組分中之一或多者的適合載體採用熟習此項技術者已知之標準接合技術。

FcRH5不僅可直接重組產生，且亦可以與異源多肽之融合多肽形式產生，該異源多肽可為在成熟蛋白質或多肽之N末端具有特異性裂解位點之信號序列或其他多肽。一般而言，信號序列可為載體之組分，或其可為插入載體中之編碼抗FcRH5抗體之DNA的一部分。信號序列可為選自例如以下之群的原核信號序列：鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp或熱穩定腸毒素II前導序列。對於酵母分泌，信號序列可為例如酵母轉化酶前導序列、α因子前導序列(包括酵母菌及克魯維拉菌α因子前導序列，後者描述於美國專利第5,010,182號中)或酸性磷酸酶前導序列、白色念珠菌(*C. albicans*)葡糖澱粉酶前導序列(1990年4月4日公開之EP 362,179)或1990年11月15日公開之WO 90/13646中所述之

信號。在哺乳動物細胞表現中，可使用哺乳動物信號序列直接分泌蛋白質，諸如來自相同或相關物種之分泌多肽的信號序列以及病毒分泌前導序列。

a. 原核宿主細胞

可使用標準重組技術獲得編碼本發明抗體之多肽組分的聚核苷酸序列。所需聚核苷酸序列可自抗體產生細胞(諸如融合瘤細胞)分離且測序。或者，可使用核苷酸合成儀或PCR技術合成聚核苷酸。獲得之後，將編碼多肽之序列插入能夠在原核宿主中複製及表現異源聚核苷酸之重組載體中。此項技術中可獲得且已知之多種載體可用於本發明之目的。適當載體之選擇主要取決於欲插入載體中之核酸的尺寸及欲用載體轉型之特定宿主細胞。各載體視其功能(擴增或表現異源聚核苷酸或擴增與表現異源聚核苷酸)及其與其所存在之特定宿主細胞之相容性而定含有各種組分。

一般而言，將源自與宿主細胞相容之物種的含有複製子及控制序列的質體載體與此等宿主結合使用。表現載體與選殖載體均含有使得載體可在一或多個所選宿主細胞中複製的核酸序列以及能夠在轉型細胞中提供表型選擇的標記序列。對於多種細菌、酵母及病毒熟知該等序列。含有編碼胺苄西林(ampicillin，Amp)及四環素(tetracycline，Tet)抗性之基因且因此提供鑑別已轉型細胞之簡易方式的質體pBR322之複製起點適用於大多數革蘭氏陰性細菌，2μ質體起點適用於酵母，且各種病毒起點(SV40、多瘤、腺病

毒、VSV或BPV)適用於哺乳動物細胞中之選殖載體。pBR322、其衍生物或其他微生物質體或噬菌體亦可含有或經修飾以含有微生物生物體用於表現內源蛋白可使用之啟動子。用於表現特定抗體之pBR322衍生物之實例詳細描述於Carter等人，美國專利第5,648,237號中。

另外，與宿主微生物相容之含有複製子及控制序列的噬菌體載體可與此等宿主結合用作轉型載體。舉例而言，噬菌體(諸如λGEM.TM.-11)可用於製備可用以轉型易感宿主細胞(諸如大腸桿菌LE392)的重組載體。

本發明之表現載體可包含編碼各多肽組分之兩個或兩個以上啟動子-順反子對。啟動子為位於順反子上游(5')且調節其表現的非轉譯調節序列。原核啟動子通常分成兩類：誘導型及組成型啟動子。誘導型啟動子為在其控制下響應於培養條件變化(例如營養物之存在或不存在或溫度變化)起始順反子之增加水準之轉錄的啟動子。

熟知多種潛在宿主細胞可識別之大量啟動子。所選啟動子可藉由經由限制酶消化自來源DNA移除啟動子且將該經分離啟動子序列插入本發明之載體中而可操作地連接於編碼輕鏈或重鏈之順反子DNA。天然啟動子序列與多種異源啟動子均可用於直接擴增及/或表現標靶基因。在一些實施例中，使用異源啟動子，因為相較於天然標靶多肽啟動子，其一般使表現之標靶基因轉錄更多且產率更高。

熟知多種潛在宿主細胞可識別之啟動子。適用於原核宿主之啟動子包括PhoA啟動子、β-半乳聚糖酶及乳糖啟動子

系統[Chang等人，**Nature**, 275:615 (1978)；Goeddel等人，**Nature**, 281:544 (1979)]、鹼性磷酸酶、色胺酸(trp)啟動子系統[Goeddel, **Nucleic Acids Res.**, 8:4057 (1980); EP 36,776]及雜合啟動子(諸如tac[deBoer等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 80:21-25 (1983)]或trc啟動子)。用於細菌系統之啟動子亦應含有可操作地連接於編碼抗FcRH5抗體之DNA的莎林-達卡諾(Shine-Dalgarno，S.D.)序列。然而，其他在細菌中具有功能之啟動子(諸如其他已知細菌或噬菌體啟動子)亦適合。其核苷酸序列已公開，從而使得熟練技術者可操作地使用連接子或接頭提供任何所需限制位點將其接合於編碼標靶輕鏈及重鏈之順反子(Siebenlist等人，(1980) Cell 20: 269)。

在本發明之一態樣中，重組載體內之各順反子包含引導所表現多肽易位穿過膜之分泌信號序列組分。一般而言，信號序列可為載體之組分，或其可為插入載體中之標靶多肽DNA的一部分。經選擇用於本發明之目的的信號序列應為宿主細胞可識別且加工(亦即由信號肽酶裂解)之信號序列。對於不能識別且加工異源多肽之天然信號序列的原核宿主細胞而言，該信號序列經例如選自鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp或熱穩定腸毒素II(STII)前導序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP之群的原核信號序列取代。在本發明之一實施例中，用於表現系統之兩個順反子之信號序列為STII信號序列或其變異體。

在另一態樣中，可在宿主細胞之細胞質中產生本發明之

免疫球蛋白，且因此並不需要各順反子內存在分泌信號序列。在此情況下，表現免疫球蛋白輕鏈及重鏈、摺疊且組裝以於細胞質內形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例如大腸桿菌*trxB*⁻菌株)提供有助於二硫鍵形成之細胞質條件，從而使得可正確摺疊且組裝所表現之蛋白質次單元。Proba及Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995)。

本發明提供一種表現系統，其中表現之多肽組分的數量比率可經調節以使分泌且正確組裝之本發明抗體的產率最大化。至少部分藉由同時調節多肽組分之轉譯強度實現該調節。

一種調節轉譯強度的技術揭示於Simmons等人，美國專利第5,840,523號中。其利用順反子內轉譯起始區(TIR)之變異體。對於既定TIR，可以一定範圍之轉譯強度產生一系列胺基酸或核酸序列變異體，從而提供調節此因素以獲得所需表現量之特定鏈的適宜方式。TIR變異體可藉由引起可改變胺基酸序列之密碼子變化的習知突變誘發技術產生，但核苷酸序列之沉默變化較佳。TIR改變可包括例如莎林-達卡諾序列之編號或間隔改變以及信號序列改變。一種產生突變信號序列之方法為在編碼序列之起始端產生「密碼子庫」，其不改變信號序列之胺基酸序列(亦即變化沉默)。此可藉由改變各密碼子之第三核苷酸位置實現；另外，一些胺基酸(諸如白胺酸、絲胺酸及精胺酸)具有多個第一及第二位置，此可在產生庫時增加複雜性。此突變誘發方法詳細描述於Yansura等人，(1992) *METHODS: A*

Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158中。

較佳產生一組載體，其中之各順反子具有一定範圍之TIR強度。此有限組提供各種TIR強度組合下各鏈之表現量以及所需抗體產物之產率的比較。TIR強度可如Simmons等人美國專利第5,840,523號詳細描述藉由定量報導基因之表現量來測定。基於轉譯強度比較，選擇所需個別TIR以組合於本發明之表現載體構築體中。

b. 真核宿主細胞

載體組分一般包括(但不限於)以下中之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列。

(1) 信號序列組分

用於真核宿主細胞之載體亦可含有在所關注成熟蛋白質或多肽之N末端具有特異性裂解位點的信號序列或其他多肽。所選異源信號序列較佳為宿主細胞可識別且加工(亦即由信號肽酶裂解)之信號序列。在哺乳動物細胞表現中，可使用哺乳動物信號序列以及病毒分泌前導序列(例如疱疹單純型gD信號)。

該前驅區之DNA在閱讀框架中接合於編碼抗體之DNA。

(2) 複製起點

一般而言，哺乳動物表現載體不需要複製起點組分。舉例而言，可通常僅使用SV40起點，因為其含有早期啟動子。

(3) 選擇基因組分

表現及選殖載體通常含有選擇基因，亦稱作可選標記。典型選擇基因編碼(a)對抗生素或其他毒素(例如胺苄西林、新黴素(neomycin)、甲胺喋呤或四環素)賦予抗性，(b)補充營養缺陷，或(c)提供不可自複合培養基中獲得之關鍵營養物(例如對於芽胞桿菌為編碼D-丙胺酸消旋酶之基因)的蛋白質。

選擇方案之一實例利用藥物遏止宿主細胞之生長。用異源基因成功轉型之彼等細胞產生賦予抗藥性之蛋白質且因此在選擇方案中倖存下來。此顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及潮黴素(hygromycin)。

適用於哺乳動物細胞之可選標記的一實例為使得可鑑別能夠競爭吸收編碼抗FcRH5抗體之核酸的細胞的標記，諸如DHFR或胸苷激酶、金屬硫蛋白I及II(較佳為靈長類動物金屬硫蛋白基因)、腺苷去胺酶、鳥胺酸去羧酶等。當採用野生型DHFR時，適當之宿主細胞為如Urlaub等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77:4216 (1980)所述製備及繁殖之缺乏DHFR活性之CHO細胞株(例如ATCC CRL-9096)。舉例而言，用DHFR選擇基因轉型之細胞首先藉由將所有轉型體在含有甲胺喋呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基中培養而鑑別。或者，可藉由在含有針對可選標記之選擇試劑(諸如胺基醣苷抗生素，例如卡那黴素、新黴素或G418)的培養基中生長細胞來選擇用編碼抗體、野生型DHFR蛋白及另一可選標記(諸如胺基醣苷3'-磷酸轉移酶(APH))的DNA序列轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內

源DHFR之野生型宿主)。例如參見美國專利第4,965,199號。

適用於酵母之選擇基因為存在於酵母質體YRp7中的*trp*1基因[Stinchcomb等人，**Nature**, 282:39 (1979)；Kingsman等人，**Gene**, 7:141 (1979)；Tschemper等人，**Gene**, 10:157 (1980)]。trp1基因提供在色胺酸中缺乏生長能力的酵母突變株(例如ATCC第44076號或PEP4-1)之選擇標記[Jones, **Genetics**, 85:12 (1977)]。

(4) 啟動子組分

表現及選殖載體通常含有可操作地連接於編碼抗FcRH5抗體之核酸序列的啟動子以引導mRNA合成。熟知可由多種潛在宿主細胞識別之啟動子。

幾乎所有真核基因均具有位於轉錄起始位點上游約25至30個鹼基處的富AT區。另一於許多基因之轉錄開始處上游70至80個鹼基處發現的序列為CNCAAT區，其中N可為任何核苷酸。大多數真核基因的3'末端為AATAAA序列，該序列可能為向編碼序列之3'末端添加poly A尾的信號。所有此等序列均適於插入真核表現載體中。

適用於酵母宿主之啟動子序列之實例包括3-磷酸甘油酸激酶[Hitzeman等人，**J. Biol. Chem.**, 255:2073 (1980)]或以下之其他糖酵解酶[Hess等人，**J. Adv. Enzyme Reg.**, 7:149 (1968)；Holland, **Biochemistry**, 17:4900 (1978)]的啟動子：諸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸去氫酶、己糖激酶、丙酮酸去羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-

磷酸甘油酸變位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡萄糖異構酶及葡糖激酶。

作為具有轉錄受生長條件控制之額外優勢之誘導型啟動子的其他酵母啟動子為用於以下之啟動區：醇去氫酶2、異細胞色素C、酸性磷酸酶、與氮代謝相關之降解酶、金屬硫蛋白、甘油醛-3-磷酸去氫酶及負責麥芽糖及半乳糖利用之酶。適用於酵母表現之載體及啟動子進一步描述於EP 73,657中。

在哺乳動物宿主細胞中自載體轉錄抗FcRH5抗體例如可藉由獲自以下之啟動子控制：病毒(諸如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公開之UK 2,211,504)、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳突狀瘤病毒、禽類肉瘤病毒、細胞巨大病毒、反轉錄病毒、B型肝炎病毒及猿猴病毒40(SV40))基因組、異源哺乳動物啟動子(例如，肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子)及熱休克啟動子，只要該等啟動子與宿主細胞系統相容即可。

SV40病毒之早期及晚期啟動子宜以亦含有SV40病毒複製起點之SV40限制片段形式獲得。人類細胞巨大病毒之即刻早期啟動子宜以HindIII E限制片段形式獲得。美國專利第4,419,446號中揭示一種使用牛乳突狀瘤病毒作為載體在哺乳動物宿主中表現DNA之系統。美國專利第4,601,978號中描述該系統之改良。關於在疱疹單純型病毒之胸苷激酶啟動子控制下在小鼠細胞中表現人類β-干擾素cDNA，亦參見Reyes等人，*Nature* 297:598-601 (1982)。或者，可使

用勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)長末端重複序列作為啟動子。

(5) 增強子元件組分

由較高級真核生物轉錄編碼抗FcRH5抗體之DNA可藉由將增強子序列插入載體中增強。增強子為DNA之順式作用元件，其通常為約10至300 bp，且作用於啟動子以增強其轉錄。現今已知多種來自哺乳動物基因(球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、α-胎蛋白及胰島素)之增強子序列。然而，通常使用來自真核細胞病毒之增強子。實例包括複製起點(bp 100-270)後側之SV40增強子、細胞巨大病毒早期啟動子增強子、複製起點後側之多瘤增強子及腺病毒增強子。關於活化真核生物啟動子之增強元件亦參見Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982)。增強子可拼接於載體中抗FcRH5抗體編碼序列之位置5'或3'處，但較佳位於啟動子之位點5'處。

(6) 轉錄終止組分

用於真核宿主細胞(酵母、真菌、昆蟲、植物、動物、人類或來自其他多細胞生物體之有核細胞)之表現載體亦含有終止轉錄及穩定mRNA所必需的序列。該等序列通常可獲自真核或病毒DNA或cDNA之5'及有時3'非轉譯區。此等區含有轉錄為編碼抗FcRH5抗體之mRNA之非轉譯部分中之聚腺苷酸化片段的核苷酸片段。一種有用之轉錄終止組分為牛生長激素聚腺苷酸化區。參見WO94/11026及其中所揭示之表現載體。

適用於改適以在重組脊椎動物細胞培養物中合成抗FcRH5抗體的其他方法、載體及宿主細胞描述於Gething等人，**Nature**, 293:620-625 (1981)；Mantei等人，**Nature**, 281:40-46 (1979)；EP 117,060；及EP 117,058中。

4. **培養宿主細胞**

可將用於產生本發明之抗FcRH5抗體的宿主細胞培養於多種培養基中。

a. 原核宿主細胞

使用於產生本發明多肽之原核細胞在此項技術中已知且適用於培養所選宿主細胞之培養基中生長。適合培養基之實例包括魯利亞培養液(luria broth，LB)加上必需之營養補充劑。在一些實施例中，培養基亦含有基於構築表現載體而選擇的選擇試劑，以選擇性地使得含有表現載體之原核細胞可生長。舉例而言，向培養基中添加胺苄西林以使表現胺苄西林抗性基因之細胞生長。

亦可包括適當濃度之除碳、氮及無機磷酸鹽來源以外的任何必需補充劑，其係單獨引入或以與另一補充劑或培養基之混合物形式(諸如複合氮源)引入。培養基視情況可含有一或多種選自由麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、巰基乙酸鹽(thioglycollate)、二硫赤藻糖醇及二硫蘇糖醇組成之群的還原劑。

在適合之溫度下培養原核宿主細胞。對於大腸桿菌生長，舉例而言，較佳溫度介於約20℃至約39℃，更佳約25℃至約37℃範圍內，甚至更佳為約30℃。培養基之pH值

主要視宿主生物體而定，可為介於約5至約9之任何pH值。對於大腸桿菌，pH值較佳為約6.8至約7.4，且更佳為約7.0。

若在本發明之表現載體中使用誘導型啟動子，則在適用於活化啟動子之條件下誘導蛋白質表現。在本發明之一態樣中，使用PhoA啟動子控制多肽轉錄。因此，在磷酸鹽限制性培養基中培養經轉型宿主細胞以進行誘導。磷酸鹽限制性培養基較佳為C.R.A.P培養基(例如參見Simmons等人，*J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147)。如此項技術中已知，可根據所用載體構築體使用多種其他誘導劑。

在一實施例中，所表現之本發明多肽分泌於宿主細胞之周質中且自周質回收。蛋白質回收通常包括破壞微生物，一般藉由諸如滲透衝擊、音波處理或溶解之方式。細胞破壞之後，藉由離心或過濾移除細胞碎片或全細胞。蛋白質可例如藉由親和力樹脂層析進一步純化。或者，蛋白質可輸送至培養基中且自其中分離。可自培養物中移除細胞且過濾培養物上清液，且濃縮以進一步純化所產生之蛋白質。可使用通常已知之方法(諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)及西方墨點分析法(Western blot assay))進一步分離且鑑別所表現之多肽。

在本發明之一態樣中，藉由醱酵製程大量產生抗體。可利用各種大規模饋料-分批醱酵程序產生重組蛋白。大規模醱酵具有至少1000公升之容量，較佳約1,000至100,000公升之容量。此等醱酵罐使用攪拌葉輪分配氧氣及營養

物，尤其葡萄糖(較佳之碳源/能源)。小規模醱酵一般係指容量不超過約100公升且可介於約1公升至約100公升範圍內之醱酵罐中之醱酵。

在醱酵製程中，誘導蛋白質表現通常在細胞已在適合條件下生長至所需密度(例如OD_{550}為約180-220，在此階段細胞處於穩定期初期)之後起始。如此項技術中已知且如上所述，可根據所用載體構築體使用多種誘導劑。細胞可在誘導之前生長較短時段。通常誘導細胞約12-50小時，但亦可使用較長或較短誘導時間。

為改良本發明多肽之生產產率及品質，可改良各種醱酵條件。舉例而言，為改良所分泌抗體多肽之正確組裝及摺疊，可使用過度表現伴隨蛋白(諸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及或DsbG)或FkpA(一種具有伴隨蛋白活性之肽基脯胺醯基順,反-異構酶))之其他載體共轉型宿主原核細胞。已顯示伴隨蛋白有助於細菌宿主細胞中所產生之異源蛋白的正確摺疊及溶解。Chen等人，(1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605；Georgiou等人，美國專利第6,083,715號；Georgiou等人，美國專利第6,027,888號；Bothmann及Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105；Ramm及Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113；Arie等人，(2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210。

為使所表現異源蛋白(尤其蛋白水解敏感性蛋白)之蛋白水解減至最小，缺乏蛋白水解酶之某些宿主株可用於本發明。舉例而言，宿主細胞株可經修飾以實現編碼已知細菌

蛋白酶(諸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其組合)之基因遺傳突變。可利用一些缺乏大腸桿菌蛋白酶之菌株且其描述於例如前述Joly等人，(1998)；Georgiou等人,美國專利第5,264,365號；Georgiou等人，美國專利第5,508,192號；Hara等人，*Microbial Drug Resistance*, **2**:63-72 (1996)中。

在一實施例中，使用缺乏蛋白水解酶且用過度表現一或多種伴隨蛋白之質體轉型的大腸桿菌菌株作為本發明表現系統中之宿主細胞。

b. 真核宿主細胞

市售培養基，諸如哈姆氏F10(Ham's F10)(Sigma)、最低必需培養基((MEM),(Sigma))、RPMI-1640(Sigma)及杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium，(DMEM)，(Sigma))適用於培養宿主細胞。此外，Ham等人，**Meth. Enz.** 58:44 (1979)，Barnes等人，**Anal. Biochem.** 102:255 (1980)，美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號；或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195；或美國專利參考案30,985中所述之任何培養基亦可用作宿主細胞之培養基。任何此等培養基均可視需要補充激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、氯化鈣、氯化鎂及磷酸鹽)、緩衝劑(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™藥物)、微量元素(定義為無機化合物，通

常以在微莫耳濃度範圍內之最終濃度存在)及葡萄糖或等效能源。亦可包括熟習此項技術者已知之適當濃度的任何其他必需補充劑。諸如溫度、pH值及其類似條件之培養條件為先前用於選用於表現之宿主細胞的條件且應對於一般技術者顯而易見。

5. 偵測基因擴增/表現

可在樣品中例如藉由習知南方墨點法(Southern blotting)、北方墨點法(Northern blotting)定量mRNA之轉錄[Thomas, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77:5201-5205 (1980)]，點漬墨法(DNA分析)，或使用適當標記之探針基於本文提供之序列原位雜交而直接測量基因擴增及/或表現。或者，可採用能識別特定雙鏈體(包括DNA雙鏈體、RNA雙鏈體及DNA-RNA雜交雙鏈體或DNA-蛋白質雙鏈體)之抗體。抗體又可進行標記，且可進行分析，其中雙鏈體結合於表面，使得於表面上形成雙鏈體之後，可偵測結合於雙鏈體之抗體的存在。

或者，基因表現可藉由免疫學方法(諸如細胞或組織切片之免疫組織化學染色及細胞培養物或體液之免疫組織化學分析)測量以直接定量基因產物之表現。適用於樣品液之免疫組織化學染色及/或分析的抗體可為單株或多株抗體，且可在任何哺乳動物體內製備。抗體宜經製備而針對天然序列FcRH5多肽，或針對基於本文提供之DNA序列的合成肽，或針對融合於FcRH5 DNA且編碼特異性抗體抗原決定基之外源序列。

6. 純化抗FcRH5抗體

可自培養基或宿主細胞溶解物中回收諸多形式之抗FcRH5抗體。若其與膜結合，則可使用適合之清潔溶液(例如Triton-X 100)或藉由酶促裂解自膜釋放。用於表現抗FcRH5抗體之細胞可藉由各種物理或化學方法(諸如凍融循環、音波處理、機械破壞或細胞溶解劑)破壞。

可能需要自重組細胞蛋白或多肽純化抗FcRH5抗體。以下程序為適合之純化程序的實例：於離子交換管柱上分級分離；乙醇沈澱；逆相HPLC；二氧化矽層析或陽離子交換樹脂層析(諸如DEAE)；層析聚焦；SDS-PAGE；硫酸銨沈澱；使用例如葡聚糖凝膠G-75凝膠過濾；蛋白質A瓊脂糖管柱移除污染物(諸如IgG)；及金屬螯合管柱結合抗FcRH5抗體之抗原決定基經標記形式。可採用各種蛋白純化方法，且該等方法為此項技術中已知且描述於例如Deutscher, **Methods in Enzymology**, 182 (1990)；Scopes, **Protein Purification: Principles and Practice**, Springer-Verlag, New York (1982)中。所選純化步驟取決於例如所用製造程序及所產生特定抗FcRH5抗體之性質。

當使用重組技術時，抗體可於細胞內、周質空間中產生或直接分泌於培養基中。若抗體於細胞內產生，則作為第一步驟，例如藉由離心或超濾移除微粒碎片(宿主細胞或溶解片段)。Carter等人，**Bio/Technology** 10:163-167 (1992)描述一種分離分泌於大腸桿菌周質空間之抗體的程序。簡言之，經約30分鐘在乙酸鈉(pH 3.5)、EDTA及苯基甲基磺醯

基氟(PMSF)存在下將細胞糊狀物融化。可藉由離心移除細胞碎片。若抗體係分泌於培養基中，則一般首先使用市售蛋白濃縮過濾器(例如Amicon或Millipore Pellicon超濾單元)濃縮該等表現系統之上清液。可於任何上述步驟中包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解且可包括抗生素以防止外來污染物生長。

由該等細胞所製備之抗體組合物可使用例如羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析及親和層析來純化，其中親和層析為較佳純化技術。蛋白質A作為親和力配位體之適合性取決於物種及存在於抗體中之任何免疫球蛋白Fc域的同型。蛋白質A可用於純化基於人類γ1、γ2或γ4重鏈的抗體(Lindmark等人，**J. Immunol. Meth.** 62:1-13 (1983))。蛋白質G推薦用於所有小鼠同型及人類γ3(Guss等人，**EMBO J.** 5:15671575 (1986))。親和力配位體所連接之基質最常為瓊脂糖，但亦可利用其他基質。相較於使用瓊脂糖可達成之流速及處理時間，機械穩定基質(諸如可控孔隙玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)可達成更快之流速及更短之處理時間。若抗體包含C_H3域，則Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)適用於純化。視欲回收之抗體而定，亦可用其他蛋白質純化技術，諸如離子交換柱上分級分離、乙醇沈澱、逆相HPLC、二氧化矽層析、肝素SEPHAROSE™層析、陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

任何初步純化步驟之後，可使用pH值在約2.5-4.5之間的

溶離緩衝液對包含所關注抗體及污染物之混合物進行低pH值疏水性相互作用層析，較佳在低鹽濃度(例如約0-0.25 M鹽)下執行。

G. 醫藥調配物

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)可藉由任何適合於欲治療病狀之途徑投與。ADC通常非經腸(亦即輸注、皮下、肌肉內、靜脈內、皮內、鞘內及硬膜外)投與。

為治療此等癌症，在一實施例中，抗體-藥物結合物經由靜脈內輸注投與。經由輸注投與之劑量範圍為每劑量約1 μg/m^{2}至約10,000 μg/m^2，一般每週一次劑量總共一次、兩次、三次或四次劑量。或者，劑量範圍為約1 μg/m^{2}至約1000 μg/m^2，約1 μg/m^{2}至約800 μg/m^2，約1 μg/m^{2}至約600 μg/m^2，約1 μg/m^{2}至約400 μg/m^2，約10 μg/m^{2}至約500 μg/m^2，約10 μg/m^{2}至約300 μg/m^2，約10 μg/m^{2}至約200 μg/m^2，及約1 μg/m^{2}至約200 μg/m^2。劑量可如下投與：每日一次，每週一次，每週多次但少於每日一次，每月多次但少於每日一次，每月多次但少於每週一次，每月一次或間歇投與以緩解或緩和疾病之症狀。可以任何所揭示間隔持續投藥，直至所治療之淋巴瘤、白血病之腫瘤或症狀減輕。可在症狀減輕或緩解之後持續投藥，其中該減輕或緩解藉由該持續投藥而延長。

本發明亦提供一種緩和自體免疫疾病之方法，其包含向罹患自體免疫疾病之患者投與治療有效量之前述實施例中任一者之人類化13G9抗體-藥物結合物。在較佳實施例

中，抗體係靜脈內或皮下投與。抗體-藥物結合物係以每劑量約1 μg/m^{2}至約100 mg/m^{2}範圍內之劑量靜脈內投與，且在一特定實施例中，劑量為1 μg/m^{2}至約500 μg/m^2。劑量可如下投與：每日一次，每週一次，每週多次但少於每日一次，每月多次但少於每日一次，每月多次但少於每週一次，每月一次或間歇投與以緩解或緩和疾病之症狀。可以任何所揭示間隔持續投藥，直至緩解或緩和所治療之自體免疫疾病之症狀。可在症狀緩解或緩和之後持續投藥，其中該緩和或緩解藉由該持續投藥而延長。

本發明亦提供一種治療B細胞病症之方法，其包含向罹患B細胞病症(諸如B細胞增殖病症(包括(但不限於)淋巴瘤及白血病))或自體免疫疾病之患者投與治療有效量之前述實施例中任一者之人類化13G9抗體，該抗體並不結合於細胞毒性分子或可偵測分子。抗體通常以約1 μg/m^{2}至約1000 mg/m^{2}之劑量範圍投與。

在一態樣中，本發明另外提供如下醫藥調配物，其包含至少一種本發明之抗FcRH5抗體及/或至少一種其免疫結合物及/或至少一種本發明之抗FcRH5抗體-藥物結合物。在一些實施例中，醫藥調配物包含(1)本發明之抗體及/或其免疫結合物，及(2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥調配物包含(1)本發明之抗體及/或其免疫結合物，及視情況存在之(2)至少另一種治療劑。其他治療劑包括(但不限於)下述治療劑。ADC通常非經腸(亦即輸注、皮下、肌肉內、靜脈內、皮內、鞘內及硬膜外)投與。

根據本發明使用之治療調配物(包含抗FcRH5抗體或FcRH5免疫結合物)藉由將具有所需純度之抗體或免疫結合物與視情況存在之醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(**Remington's Pharmaceutical Sciences** 第16版，Osol, A.編(1980))混合製備成凍乾調配物或水溶液形式以供儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者係無毒的，且包括：緩衝劑，諸如乙酸鹽、Tris、磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六烴季銨；氯化苯甲烴銨、氯化苯甲索銨(benzethonium chloride)；苯酚、丁醇或苯甲醇；對羥苯甲酸烷基酯，諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯基吡咯啶酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；張力調節劑，諸如海藻糖及氯化鈉；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；界面活性劑，諸如聚山梨醇酯；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如鋅蛋白錯合物)；及/或非離子性界面活性劑，諸如TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。欲用於活體內投藥之醫藥調配物一般無菌。此易於藉由經由無菌過濾膜過濾實現。

本文之調配物亦可含有一種以上所治療之特定適應症所必需的活性化合物，較佳為具有彼此並無不利影響之互補活性的活性化合物。舉例而言，除抗FcRH5抗體以外，在一種調配物中可能需要包括另一抗體，例如結合FcRH5多肽上之不同抗原決定基的第二抗FcRH5抗體或針對某另一標靶之抗體(諸如影響特定癌症生長之生長因子)。或者或另外，組合物可另外包含化學治療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或保心藥。該等分子適合地以有效達成所欲目的之量組合存在。

活性成分亦可包埋於例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合製備之微膠囊(分別例如羥甲基纖維素微膠囊或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中；包埋於膠態藥物傳遞系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中；或包埋於巨乳液中。該等技術揭示於**Remington's Pharmaceutical Sciences**，第16版，Osol, A.編(1980)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半滲透性基質，該等基質呈成型物品(例如膜或微膠囊)形式。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與L-麩胺酸γ乙酯之共聚物、不可降解性乙烯-乙酸乙烯酯、可降解性乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT®(由乳酸-乙醇酸共聚物與柳菩林(leuprolide acetate)構成之可注

射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。儘管諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸之聚合物能釋放分子歷時超過100天，但某些水凝膠釋放蛋白質歷時較短時段。當囊封之免疫球蛋白在體內長時間保持時，其可能會因在37℃下、暴露於水分而變性或凝集，從而導致生物活性喪失及可能的免疫原性變化。可視所涉及之機制而定設計合理的穩定策略。舉例而言，若發現凝集機制為經由硫基-二硫基互換(thio-disulfide interchange)形成分子間S-S鍵，則可藉由修飾氫硫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加劑及開發特定聚合物基質組合物來達成穩定性。

抗體可以任何適合形式調配以傳遞至標靶細胞/組織。舉例而言，抗體可調配為免疫脂質體。「脂質體」為由各類脂質、磷脂及/或界面活性劑構成之適用於向哺乳動物傳遞藥物的小泡囊。脂質體之組分通常類似於生物膜之脂質排列以雙層形式排列。含有抗體之脂質體藉由此項技術中已知之方法製備，該等方法諸如描述於以下中之方法：Epstein等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985)；Hwang等人，*Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980)；美國專利第4,485,045號及第4,544,545號；及1997年10月23日公開之WO97/38731。美國專利第5,013,556號中揭示具有延長之循環時間的脂質體。

尤其有用之脂質體可藉由使用包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及PEG衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)的脂質組合物的逆相蒸發法產生。經由限定孔徑之過濾器擠出脂質體以得到具

有所需直徑之脂質體。本發明抗體之Fab'片段可經由二硫基交換反應而結合於如Martin等人，*J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982)所述之脂質體。該脂質體中視情況含有化學治療劑。參見Gabizon等人，*J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989)。

欲用於活體內投藥之調配物必須無菌。此易於藉由無菌過濾膜過濾實現。

H. **用抗FcRH5抗體治療**

為測定FcRH5在癌症中之表現，可利用各種偵測分析。在一實施例中，可藉由免疫組織化學(IHC)分析FcRH5多肽過度表現。來自腫瘤活檢之經石蠟包埋的組織切片可進行IHC分析法且遵循如下FcRH5蛋白質染色強度標準：

0分-未觀察到染色，或少於10%腫瘤細胞中觀察到膜染色。

1+分-超過10%腫瘤細胞中偵測到模糊/勉強可覺察的膜染色。細胞僅在其部分膜中被染色。

2+分-超過10%腫瘤細胞中觀察到微弱至中度完整膜染色。

3+分-超過10%腫瘤細胞中觀察到中度至高度完整膜染色。

FcRH5多肽表現為0分或1+分之彼等腫瘤可表現為非過度表現FcRH5，而2+分或3+分之彼等腫瘤可表現為過度表現FcRH5。

或者或另外，可對福馬林(formalin)固定、石蠟包埋之

腫瘤組織進行FISH分析法(諸如INFORM®(由Ventana, Arizona出售)或PATHVISION®(Vysis, Illinois))以測定腫瘤中FcRH5過度表現之程度(若存在)。

FcRH5過度表現或擴增可使用活體內偵測分析，例如藉由投與結合欲偵測分子且標記有可偵測標記(例如放射性同位素或螢光標記)之分子(諸如抗體)且外部掃描患者以將標記定位來評估。

如上所述，本發明之抗FcRH5抗體具有各種非治療應用。本發明之抗FcRH5抗體可適用於將表現FcRH5多肽之癌症分期(例如用放射成像法)。抗體亦適用於將FcRH5多肽自細胞純化或免疫沈澱，活體外偵測及定量FcRH5多肽(例如用ELISA或西方墨點法)，作為純化其他細胞之一個步驟自混合細胞群殺滅及去除表現FcRH5之細胞。

當前，視癌症分期而定，癌症治療包括以下療法中之一者或組合：手術移除癌性組織、放射療法及化學療法。抗FcRH5抗體療法可尤其適合意地用於不能充分地耐受化學療法之毒性及副作用的老齡患者及放射療法具有有限效用之轉移性疾病。本發明之靶向腫瘤的抗FcRH5抗體適用於在疾病最初診斷之後或在復發期間緩和表現FcRH5之癌症。對於治療應用，抗FcRH5抗體可單獨使用，或以與例如激素、抗血管生成劑或放射性標記化合物或與手術、冷凍療法及/或放射療法組合之療法使用。抗FcRH5抗體治療可與其他形式之習知療法結合(與習知療法連續，在習知療法之前或之後)投與。化學治療藥物(諸如TAXOTERE®

(多西他賽)、TAXOL®(太平洋紫杉醇)、雌莫司汀及米托蒽醌)用於治療癌症，尤其低風險(good risk)患者之癌症。在本發明之治療或緩和癌症的本發明方法中，可向癌症患者投與抗FcRH5抗體，且與用一或多種前述化學治療劑治療結合。詳言之，涵蓋與太平洋紫杉醇及經修飾衍生物(例如參見EP0600517)組合之療法。抗FcRH5抗體應與治療有效劑量之化學治療劑一起投與。在另一實施例中，抗FcRH5抗體與化學療法結合投與以提高化學治療劑(例如太平洋紫杉醇)之活性及功效。Physicians' Desk Reference(PDR)揭示此等藥劑用於治療各種癌症之劑量。此等上述化學治療藥物之治療有效給藥方案及劑量取決於所治療之特定癌症、疾病之程度及熟習此項技術之醫師熟知之其他因素且可由醫師確定。

在一特定實施例中，向患者投與包含與細胞毒性劑結合之抗FcRH5抗體的結合物。結合於FcRH5蛋白之免疫結合物較佳被細胞內化，從而增強免疫結合物殺滅其所結合之癌細胞之治療功效。在一較佳實施例中，細胞毒性劑靶向或干擾癌細胞中之核酸。該等細胞毒性劑之實例如上所述且包括類美登素、刺孢黴素、核糖核酸酶及DNA核酸內切酶。

抗FcRH5抗體或其毒素結合物係根據已知方法(諸如靜脈內投藥，例如快速注射形式或藉由連續輸注一段時間，藉由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內(intracerobrospinal)、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、局部或吸入途徑)向

人類患者投與。靜脈內或皮下投與抗體較佳。

離體策略亦可用於治療應用。離體策略包括用編碼FcRH5拮抗劑之聚核苷酸轉染或轉導獲自個體之細胞。隨後將經轉染或轉導之細胞返回個體。該等細胞可為多種類型中之任一者，包括(但不限於)造血細胞(例如骨髓細胞、巨噬細胞、單核細胞、樹突狀細胞、T細胞或B細胞)、纖維母細胞、上皮細胞、內皮細胞、角質細胞或肌細胞。

舉例而言，若FcRH5拮抗劑為抗體或免疫結合物，則可藉由如下任何適合方式投與拮抗劑，包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內，且若需要用於局部免疫抑制治療，則病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。另外，宜藉由脈搏輸注，尤其以遞減劑量之抗體投與拮抗劑。部分視投藥為短期或長期投藥而定，較佳藉由注射、最佳靜脈內或皮下注射進行給藥。

在另一實例中，當病症或腫瘤之位置允許時，FcRH5拮抗化合物係局部投與，例如藉由直接注射局部投與，且注射可週期性重複。在手術切除腫瘤之後，FcRH5拮抗劑亦可向個體全身傳遞或直接傳遞於腫瘤細胞(例如腫瘤或腫瘤床)以預防或降低局部復發或癌轉移。

組合投與治療劑通常進行限定時段(視所選組合而定，通常為數分鐘、數小時、數日或數週)。「組合療法」意欲涵蓋以依次之方式投與該等治療劑(亦即其中在不同時間投與各治療劑)以及以實質上同時之方式投與該等治療劑

或該等治療劑中之至少兩者。

治療劑可由相同途徑或由不同途徑投與。舉例而言，組合中之抗FcRH抗體或免疫結合物可藉由靜脈內注射投與，而組合中之化學治療劑可經口投與。或者，視特定治療劑而定，例如，治療劑兩者均可經口投與，或治療劑兩者均可藉由靜脈內注射投與。治療劑投與順序亦視特定藥劑而改變。

視疾病之類型及嚴重性而定，無論例如藉由一或多次各別投與或藉由連續輸注，約1 μg/kg至100 mg/kg之各治療劑為向患者投與之最初候選劑量。視上述因素而定，典型日劑量範圍可為約1 μg/kg至約100 mg/kg或更多。對於重複投藥數日或更久，視病狀而定持續治療直至癌症如上述方法所測量得以治療。然而，其他給藥方案亦可能有用。

本案涵蓋藉由基因療法投與抗FcRH5抗體。關於使用基因療法產生細胞內抗體，例如參見1996年3月14日公開之WO96/07321。

其他治療方案可與投與抗FcRH5抗體組合。該組合投藥包括使用各別調配物或單一醫藥調配物共投藥及以任一次序連續投藥，其中較佳地存在兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性的一段時間。該組合療法較佳產生協同治療作用。

亦宜將投與抗FcRH5抗體與投與針對特定癌症相關之另一腫瘤抗原的抗體組合。

在另一實施例中，本發明之治療性處理方法包括組合投

與抗FcRH5抗體與一或多種化學治療劑或生長抑制劑，包括共投與不同化學治療劑或其他細胞毒性劑或其他亦抑制腫瘤生長之治療劑的混合物。化學治療劑包括磷酸雌莫司汀、潑尼莫司汀、順鉑、5-氟尿嘧啶、美法侖、環磷醯胺、羥基脲及紫杉烷(諸如太平洋紫杉醇及多西他賽)及/或蒽環黴素抗生素。該等化學治療劑之製備及給藥方案可根據製造商之說明書或由熟習此項技術者憑經驗確定來使用。該化學療法之製備及給藥方案亦描述於Chemotherapy Service, M.C. Perry編，Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中。抗體可與如下抗激素化合物組合；例如抗雌激素化合物，諸如他莫昔芬；抗黃體酮，諸如奧那司酮(參見EP 616 812)；或抗雄激素，諸如氟他胺，其劑量為該等分子之已知劑量。若欲治療之癌症為雄激素非依賴性癌症，則患者可預先進行抗雄激素療法，且在癌症不依賴於雄激素之後，可向患者投與抗FcRH5抗體(及如本文所述視情況存在之其他藥劑)。

有時，亦宜向患者共投與保心藥(以預防或減少與該療法相關之心肌功能障礙)或一或多種細胞激素。除上述治療方案以外，患者可在抗體療法之前、同時或之後進行癌細胞之手術移除及/或放射療法(例如外束照射或用放射性標記藥劑(諸如抗體)治療)。上述共投與藥劑中之任一者的適合劑量為目前所用劑量且可由於該藥劑與抗FcRH5抗體之組合作用(協同作用)而降低。

本發明之抗體組合物應以與良好醫療實踐一致之方式調

配、給與及投與。在此情形中所考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床狀況、病症之原因、藥劑傳遞之位點、投藥方法、投藥時程及醫師已知之其他因素。抗體無需但視情況可與一或多種當前用於預防或治療所述病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量取決於調配物中所存在的本發明抗體之量、病症或治療之類型及上述其他因素。其通常以與上文所用之相同劑量及投藥途徑使用或以迄今所用劑量之約1%至99%使用。

為預防或治療疾病，投藥劑量及模式應由醫師根據已知標準選擇。抗體之適當劑量應取決於欲治療疾病之類型(如上所定義)、疾病之嚴重性及病程、抗體是出於預防性抑或治療性目的而投與、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應以及主治醫師之判斷。宜一次性地或經一系列治療向患者投與抗體。抗體較佳藉由靜脈內輸注或藉由皮下注射投與。視疾病之類型及嚴重性而定，無論例如藉由一或多次各別投藥或藉由連續輸注，每公斤體重約1 μg至約50 mg(例如，每劑每公斤約0.1-15 mg)抗體可為向患者投與之最初候選劑量。給藥方案可包含投與約4 mg/kg抗FcRH5抗體之最初起始劑量，繼而約2 mg/kg抗FcRH5抗體之每週維持劑量。然而，其他給藥方案亦可能有用。視上述因素而定，典型日劑量範圍可為約1 μg/kg至100 mg/kg或更多。就經數日或更久重複投藥而言，視病狀而定，持續治療直至出現對疾病症狀之所需抑制為止。此療法之進

展可易於藉由習知方法及分析法且基於醫師或熟習此項技術之其他人員已知之標準監測。

除向患者投與抗體蛋白質以外，本案亦涵蓋藉由基因療法投與抗體。該投與編碼抗體之核酸由表述「投與治療有效量之抗體」涵蓋。關於使用基因療法產生細胞內抗體，例如參見1996年3月14日公開之WO96/07321。

存在兩大方法使核酸(視情況包含於載體中)進入患者細胞；活體內及離體。為進行活體內傳遞，將核酸直接注射於患者中，通常在需要抗體之位點處。為進行離體治療，移出患者之細胞，將核酸引入此等經分離細胞中，且將該等經修飾細胞直接投與患者或例如囊封於植入患者體內之多孔膜內而投與患者(例如參見美國專利第4,892,538號及第5,283,187號)。存在多種可用於引入核酸於活細胞中之技術。該等技術視活體外傳遞核酸於所培養細胞中抑或活體內傳遞於所欲宿主之細胞中而改變。適用於活體外傳遞核酸於哺乳動物細胞中之技術包括使用脂質體、電穿孔、顯微注射、細胞融合、DEAE-聚葡萄糖、磷酸鈣沈澱法等。離體傳遞基因之常用載體為反轉錄病毒載體。

當前較佳之活體內核酸傳遞技術包括用病毒載體(諸如腺病毒、疱疹單純型I病毒或腺相關病毒)及基於脂質之系統(用於脂質介導之基因傳遞的脂質為例如DOTMA、DOPE及DC-Chol)轉染。對於當前已知之基因標記及基因療法方案的評論，參見Anderson等人，**Science** 256:808-813 (1992)。亦參見WO 93/25673及其中所引用之參考文

獻。

本發明之抗FcRH5抗體可呈本文中「抗體」之定義所涵蓋的不同形式。因此，抗體包括全長或完整抗體、抗體片段、天然序列抗體或胺基酸變異體、人類化抗體、嵌合抗體或融合抗體、免疫結合物及其功能片段。在融合抗體中，抗體序列融合於異源多肽序列。抗體可在Fc區中進行修飾以提供所需效應功能。如本文諸部分中更詳細論述，在存在適當Fc區的情況下，結合於細胞表面之裸抗體可例如經由抗體依賴性細胞細胞毒性(ADCC)或藉由使補體補充補體依賴性細胞毒性或某另一機制誘發細胞毒性。或者，若需要去除或減少效應功能以便使副作用或治療併發症減至最小，則可使用某些其他Fc區。

在一實施例中，抗體競爭結合或實質上結合於與本發明抗體相同之抗原決定基。亦涵蓋具有本發明抗FcRH5抗體之生物特徵的抗體，該等生物特徵特別包括活體內腫瘤靶向及任何細胞增殖抑制或細胞毒性特徵。

產生上述抗體之方法詳細描述於本文中。

本發明之抗FcRH5抗體適用於治療哺乳動物之表現FcRH5之癌症或緩和該癌症之一或多個症狀。該癌症包括(但不限於)造血系統癌症或血液相關之癌症，諸如淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴惡性病症，以及脾之癌症及淋巴結之癌症。該等B細胞相關癌症之更特定實例包括例如高度、中度及低度淋巴瘤(包括B細胞淋巴瘤，諸如黏膜相關淋巴組織B細胞淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤、套細胞淋

巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、小淋巴細胞性淋巴瘤、邊緣區淋巴瘤、彌漫性大細胞淋巴瘤、濾泡性淋巴瘤及霍奇金氏淋巴瘤及T細胞淋巴瘤)及白血病(包括繼發性白血病、慢性淋巴細胞性白血病(諸如B細胞白血病(CD5+ B淋巴細胞))、骨髓性白血病(諸如急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病)、淋巴細胞性白血病(諸如急性淋巴母細胞白血病)及脊髓發育不良)及其他血液及/或B細胞或T細胞相關之癌症。癌症涵蓋任何前述各者之轉移性癌症。抗體能夠結合於在哺乳動物中表現FcRH5多肽之癌細胞的至少一部分。在一較佳實施例中，抗體於活體外或活體內，在結合於細胞上之FcRH5多肽之後，有效破壞或殺滅表現FcRH5之腫瘤細胞或抑制該等腫瘤細胞之生長。該抗體包括裸抗FcRH5抗體(未結合於任何藥劑)。具有細胞毒性或細胞生長抑制特性之裸抗體可另外擁有細胞毒性劑以使其甚至更有效地破壞腫瘤細胞。可藉由例如使抗體與細胞毒性劑結合以形成如本文所述之免疫結合物而賦予抗FcRH5抗體細胞毒性特性。細胞毒性劑或生長抑制劑較佳為小分子。諸如刺孢黴素或類美登素及其類似物或衍生物的毒素較佳。

本發明提供一種組合物，其包含本發明之抗FcRH5抗體及載劑。出於治療癌症之目的，可向需要該治療之患者投與組合物，其中該組合物可包含一或多種呈現為免疫結合物或裸抗體形式的抗FcRH5抗體。在另一實施例中，組合物可包含此等抗體與其他治療劑(諸如細胞毒性劑或生長抑制劑，包括化學治療劑)之組合。本發明亦提供包含本

發明之抗FcRH5抗體及載劑的調配物。在一實施例中，調配物為包含醫藥學上可接受之載劑的治療調配物。

本發明之另一態樣為編碼抗FcRH5抗體之分離之核酸。涵蓋編碼H鏈與L鏈及尤其高變區殘基之核酸、編碼天然序列抗體以及變異體之鏈、該抗體之修飾及人類化型式。

本發明亦提供適用於治療哺乳動物之表現FcRH5多肽之癌症或緩和該癌症之一或多個症狀的方法，其包含向哺乳動物投與治療有效量之抗FcRH5抗體。抗體治療組合物可如醫師所引導短期或長期或間歇式投與。亦提供抑制表現FcRH5多肽之細胞的生長及殺滅該細胞之方法。

本發明亦提供包含至少一種抗FcRH5抗體之套組及製品。含有抗FcRH5抗體之套組可用於例如FcRH5細胞殺滅分析法，將FcRH5多肽自細胞純化或免疫沈澱。舉例而言，為分離及純化FcRH5，套組可含有偶合於珠粒(例如瓊脂糖珠粒)之抗FcRH5抗體。可提供如下套組，其含有用於在例如ELISA或西方墨點法中活體外偵測及定量FcRH5的抗體。該適用於偵測之抗體可具有諸如螢光或放射性標記之標記。

I. **抗體-藥物結合物治療**

預期本發明之抗體-藥物結合物(ADC)可用於治療各種例如特徵為腫瘤抗原過度表現之疾病或病症。例示性病狀或過度增殖病症包括良性或惡性腫瘤；白血病及淋巴惡性病症。其他疾病包括神經元、膠質、星形膠質細胞、下丘腦、腺體、巨噬細胞、上皮、基質、囊胚腔、發炎、血管

生成及免疫學(包括自體免疫)病症。

動物模型及基於細胞之分析法中鑑別出的ADC化合物可進一步在具有腫瘤之更高級靈長類動物及人類臨床試驗中測試。人類臨床試驗可經設計以測試本發明之抗FcRH5單株抗體或免疫結合物在患有包括(但不限於)如下B細胞增殖病症之患者中的功效：淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。臨床試驗可經設計以評估ADC與已知治療方案(諸如輻射及/或涉及已知化學治療劑及/或細胞毒性劑之化學療法)之組合的功效。

一般而言，欲治療之疾病或病症為過度增殖疾病，諸如B細胞增殖病症及/或B細胞癌症。本文中欲治療癌症之實例包括(但不限於)：B細胞增殖病症，其係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

癌症可包含表現FcRH5之細胞，以便本發明之ADC能夠結合於癌細胞。為測定癌症中之FcRH5表現，可利用各種診斷/預測分析法。在一實施例中，FcRH5過度表現可藉由

IHC分析。來自腫瘤活檢之經石蠟包埋的組織切片可進行IHC分析，且關於染色度及占所檢查腫瘤細胞之比例符合FcRH5蛋白染色強度標準。

為預防或治療疾病，ADC之適當劑量取決於欲治療疾病之類型(如上所定義)、疾病之嚴重性及病程、分子是出於預防性抑或治療性目的而投與、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應及主治醫師之判斷。宜一次性地或經一系列治療向患者投與分子。視疾病之類型及嚴重性而定，無論例如藉由一或多次各別投與或藉由連續輸注，約1 μg/kg至100 mg/kg(例如0.1-20 mg/kg)之分子為向患者投與之最初候選劑量。視上述因素而定，典型日劑量範圍可為約1 μg/kg至100 mg/kg或更多。欲向患者投與之ADC之例示性劑量範圍為每公斤患者體重約0.1 mg至約10 mg。

就經數日或更久重複投藥而言，視病狀而定，持續治療直至出現對疾病症狀之所需抑制為止。例示性給藥方案包含投與約4 mg/kg之初始起始劑量之抗ErbB2抗體，繼而投與約2 mg/kg之每週維持劑量之抗ErbB2抗體。其他給藥方案亦可能有用。此療法之進展易於藉由習知技術及分析法監測。

J. 組合療法

本發明之抗體-藥物結合物(ADC)可與具有抗癌特性之第二化合物組合於醫藥組合調配物中或組合於組合療法形式之給藥方案中。醫藥組合調配物或給藥方案之第二化合物較佳具有對組合中ADC之互補活性以便其彼此無不利影

響。

第二化合物可為化學治療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或保心藥。該等分子適合地以有效達成所欲目的之量組合存在。含有本發明ADC之醫藥組合物亦可具有治療有效量之化學治療劑，諸如微管蛋白形成抑制劑、拓撲異構酶抑制劑或DNA結合劑(DNA binder)。

在一態樣中，第一化合物為本發明之抗FcRH5 ADC，且第二化合物為抗CD20抗體(裸抗體或ADC)。在一實施例中，第二化合物為抗CD20抗體利妥昔單抗(Rituxan®)或2H7(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)。適用於與本發明抗FcRH5 ADC之組合免疫療法的其他抗體包括(但不限於)抗VEGF(例如Avastin®)。

其他治療方案可與投與根據本發明鑑別出之抗癌劑組合，該等方案包括(但不限於)放射療法及/或骨髓及周邊血液移植，及/或細胞毒性劑、化學治療劑或生長抑制劑。在該等實施例之一中，化學治療劑為如下藥劑或藥劑之組合：諸如環磷醯胺、羥基道諾黴素、阿黴素(adriamycin)、小紅莓、長春新鹼(Oncovin™)、潑尼松龍(prednisolone)、CHOP、CVP或COP，或免疫治療劑(諸如抗CD20(例如Rituxan®)或抗VEGF(例如Avastin®))。

組合療法可以同時或依次方案投與。當依次投與時，組合可以兩次或兩次以上投與來投與。該組合投藥包括使用各別調配物或單一醫藥調配物共投與及以任一次序連續投

藥，其中較佳地存在兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性的一段時間。

在一實施例中，用ADC治療包括組合投與本文鑑別出之抗癌劑與一或多種化學治療劑或生長抑制劑，包括共投與不同化學治療劑之混合物。化學治療劑包括紫杉烷(諸如太平洋紫杉醇及多西他賽)及/或蒽環黴素抗生素。該等化學治療劑之製備及給藥方案可根據製造商之說明書或由熟習此項技術者憑經驗確定來使用。該化學療法之製備及給藥方案亦描述於「Chemotherapy Service」, (1992)M.C. Perry編，Williams & Wilkins, Baltimore, Md中。

任何上述共投與藥劑之適合劑量為目前所用劑量且可由於該新鑑別出之藥劑與其他化學治療劑或治療之組合作用(協同作用)而降低。

組合療法可提供「協同作用」且證實「具有協同作用」，亦即當同時使用活性成分時所達成之作用大於分別使用化合物所產生作用之總和。當活性成分(1)共調配及以組合之單位劑量調配物同時投與或傳遞；(2)以各別調配物形式交替或同時傳遞；或(3)藉由某另一方案傳遞時，可獲得協同作用。當以交替療法傳遞時，協同作用可在化合物依次投與或傳遞(例如藉由在各別注射器中分別注射)時獲得。一般而言，在交替療法期間，依次(亦即依續)投與有效劑量之各活性成分，而在組合療法中，同時投與有效劑量之兩種或兩種以上活性成分。

本發明之組合療法可另外包含一或多種化學治療劑。組

合投藥包括使用各別調配物或單一醫藥調配物共投藥或同時投藥，及以任一次序連續投藥，其中較佳地存在一段兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性的時間。

化學治療劑(若投與)通常以其所已知之劑量投與，或視情況以因藥物之組合作用或可歸因於投與抗代謝化學治療劑之不良副作用而降低之劑量投與。該等化學治療劑之製備及給藥方案可根據製造商之說明書或由熟習此項技術者憑經驗確定來使用。

各種可組合之化學治療劑揭示於本文中。

在一些實施例中，欲組合之化學治療劑係選自由以下組成之群：免疫調節劑(IMid)(包括沙力度胺及Revlimid®(來那度胺))、蛋白體抑制劑(諸如Velcade®(硼替佐米)及PS342)、紫杉醇(bora taxoid)(包括多西他賽及太平洋紫杉醇)、長春花類(諸如長春瑞濱或長春鹼)、鉑化合物(諸如卡波鉑或順鉑)、芳香酶抑制劑(諸如來曲唑、阿那曲唑或依西美坦)、抗雌激素(例如氟維司群或他莫昔芬)、依託泊苷、塞替派、環磷醯胺、培美曲塞、甲胺喋呤、脂質小紅莓、聚乙二醇化脂質小紅莓、卡培他濱、吉西他濱、美法侖(melthalin)、小紅莓、長春新鹼、COX-2抑制劑(例如塞來昔布(celecoxib))或類固醇(例如地塞米松及潑尼松)。在一些實施例(例如涉及治療多發性骨髓瘤之實施例)中，組合地塞米松與來那度胺，或地塞米松或硼替佐米，或長春新鹼、小紅莓與地塞米松，或沙力度胺與地塞米松，或脂質小紅莓、長春新鹼與地塞米松，或來那度胺與地塞米

松，或硼替佐米與地塞米松，或硼替佐米、小紅莓與地塞米松。

在一些實施例中，欲組合之化學治療劑係選自由以下組成之群：Revlimid®(來那度胺)、蛋白體抑制劑(諸如Velcade®(硼替佐米)及PS342)、紫杉醇(包括多西他賽及太平洋紫杉醇)、長春花類(諸如長春瑞濱或長春鹼)、鉑化合物(諸如卡波鉑或順鉑)、芳香酶抑制劑(諸如來曲唑、阿那曲唑或依西美坦)、抗雌激素(例如氟維司群或他莫昔芬)、依託泊苷、塞替派、環磷醯胺、培美曲塞、甲胺喋呤、脂質小紅莓、聚乙二醇化脂質小紅莓、卡培他濱、吉西他濱、美法侖、小紅莓、長春新鹼、COX-2抑制劑(例如塞來昔布)或類固醇(例如地塞米松及潑尼松)。

在一些實施例(例如涉及治療惡性骨髓瘤之實施例)中，組合地塞米松與來那度胺，或地塞米松與硼替佐米。

在另一實施例中，組合療法包含抗體或免疫結合物及一種以上化學治療劑。舉例而言，抗體或免疫結合物可與以下組合：(i)長春新鹼、小紅莓(脂質或非脂質調配物形式)及地塞米松；(ii)沙力度胺及地塞米松；(iii)Velcade®(硼替佐米)、小紅莓及地塞米松；(iv)Velcade®(硼替佐米)、沙力度胺及地塞米松；(v)美法侖及潑尼松；(vi)美法侖、潑尼松及沙力度胺；(vii)美法侖、潑尼松及Velcade®(硼替佐米)；(viii)長春新鹼、小紅莓及地塞米松；或(ix)沙力度胺及地塞米松。

在一實施例中，組合療法可包含本文所述之抗體或免疫

結合物及以下中之一或多者：(i)Velcade®(硼替佐米)、(ii)地塞米松、(iii)Revlimid®(來那度胺)。在另一實施例中，組合療法包含抗體或免疫結合物及地塞米松與Revlimid®(來那度胺)或Velcade®(硼替佐米)與地塞米松。在另一實施例中，組合療法包含抗體或免疫結合物及以下中之每一者：Velcade®(硼替佐米)、地塞米松及Revlimid®(來那度胺)。

K. **製品及套組**

本發明之另一實施例為一種製品，其含有適用於治療、預防及/或診斷表現FcRH5之癌症的物質。該製品包含容器及容器上或與容器相關聯之標籤或包裝插頁。適合之容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由多種諸如玻璃或塑膠之材料形成。該容器容納有效治療、預防及/或診斷癌症病狀之組合物，且可能具有無菌入口(例如，容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞的小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為本發明之抗FcRH5抗體。標籤或包裝插頁表明該組合物用於治療癌症。標籤或包裝插頁應另外包含向癌症患者投與抗體組合物之說明書。另外，製品可另外包含第二容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如注射用抗細菌水(BWFI)、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可另外包括自商業及使用者觀點出發所需之其他材料，其包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

亦提供適用於各種目的之套組，例如用於表現FcRH5之

細胞殺滅分析法，用於FcRH5多肽自細胞純化或免疫沈澱之套組。為分離及純化FcRH5多肽，套組可含有偶合於珠粒(例如瓊脂糖珠粒)之抗FcRH5抗體。可提供如下套組，其含有用於例如ELISA或西方墨點法中活體外偵測及定量FcRH5多肽的抗體。如製品般，套組包含容器及容器上或與容器相關聯之標籤或包裝插頁。容器容納包含至少一種本發明之抗FcRH5抗體的組合物。可包括含有例如稀釋劑及緩衝劑、對照抗體之其他容器。標籤或包裝插頁可提供組合物之描述以及所欲活體外或偵測用途之說明。

L. **FcRH5多肽之用途**

本發明涵蓋篩選化合物以鑑別模擬FcRH5多肽之化合物(促效劑)或阻礙FcRH5多肽之作用的化合物(拮抗劑)的方法。篩選拮抗藥物候選者之分析法經設計以鑑別與本文鑑別出之基因所編碼之FcRH5多肽結合或複合，或以其他方式干擾編碼多肽與其他細胞蛋白之相互作用(包括例如抑制FcRH5多肽自細胞表現)的化合物。該等篩選分析法包括易於高通量篩選化學庫的分析法，以使其尤其適用於鑑別小分子藥物候選者。

該等分析法可以此項技術中充分表徵之多種形式執行，包括蛋白質-蛋白質結合分析法、生物化學篩選分析法、免疫分析法及基於細胞之分析法。

所有拮抗劑之分析法的共同之處在於其需要使藥物候選者與本文鑑別出之核酸所編碼的FcRH5多肽在足以使此兩種組分可相互作用之條件及時間下接觸。

在結合分析法中，相互作用為結合且可在反應混合物中分離或偵測所形成之複合物。在一特定實施例中，將本文鑑別出之基因所編碼的FcRH5多肽或藥物候選者藉由共價或非共價連接而固定於固相(例如微量滴定板)上。非共價連接一般藉由用FcRH5多肽之溶液塗佈固體表面且乾燥實現。或者，可使用特異於欲固定之FcRH5多肽的經固定抗體(例如單株抗體)將該FcRH5多肽錨定於固體表面。該分析法藉由向固定組分(例如含有錨定組分之塗佈表面)添加可經可偵測標記進行標記之未固定組分來執行。當反應完成時，例如藉由洗滌移除未反應組分，且偵測錨定於固體表面上之複合物。當最初未固定組分攜帶可偵測標記時，偵測到固定於表面上之標記表明發生複合。若最初未固定組分不攜帶標記，則可例如藉由使用特異性結合經固定複合物之經標記抗體偵測複合。

若候選化合物與本文鑑別出之基因所編碼之特定FcRH5多肽相互作用但不結合於該特定FcRH5多肽，則其與該多肽之相互作用可藉由熟知用於偵測蛋白質-蛋白質相互作用之方法分析。該等分析法包括傳統方法，諸如經由梯度或層析管柱進行交聯、共免疫沈澱及共純化。另外，蛋白質-蛋白質相互作用可藉由使用Fields及同事(Fields及Song, **Nature (London)**, 340:245-246 (1989)；Chien等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88:9578-9582 (1991))所述之基於酵母之遺傳系統如Chevray及Nathans, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 5789-5793 (1991)所揭示來監測。多種轉錄活化

因子(諸如酵母GAL4)由兩個實體上不連續之模組域組成，一者充當DNA結合域，另一者充當轉錄活化域。上述公開案中所述之酵母表現系統(一般稱作「雙雜交系統」)利用此特性且採用兩種雜交蛋白，一者中標靶蛋白融合於GAL4之DNA結合域，且另一者中候選活化蛋白融合於活化域。GAL1-*lac*Z報導基因在GAL4活化之啟動子的控制下之表現取決於GAL4活性經由蛋白質-蛋白質相互作用而產生之復原。用β-半乳糖苷酶之發色受質偵測含有相互作用多肽之群落。使用雙雜交技術鑑別兩種特異性蛋白質之間的蛋白質-蛋白質相互作用的完整套組(MATCHMAKER™)可購自Clontech。此系統亦可延用於定位參與特異性蛋白質相互作用之蛋白質域以及精確定位對此等相互作用至關重要之胺基酸殘基。

干擾本文鑑別出之編碼FcRH5多肽之基因與其他細胞內或細胞外組分相互作用的化合物可如下測試：通常在使基因及細胞內或細胞外組分之產物可相互作用及結合的條件下及時間下製備含有該兩種產物的反應混合物。為測試候選化合物抑制結合之能力，在測試化合物不存在及存在下進行反應。另外，可將可安慰劑添加至第三反應混合物中作為陽性對照組。混合物中所存在之測試化合物與細胞內或細胞外組分之間的結合(複合物形成)如上文所述進行監測。對照反應物而非含有測試化合物之反應混合物中複合物之形成表明測試化合物干擾測試化合物與其反應搭配物之相互作用。

為分析拮抗劑，可將FcRH5多肽與欲篩選特定活性之化合物一起添加至細胞中，且在FcRH5多肽存在下該化合物抑制所關注活性之能力表明該化合物為FcRH5多肽之拮抗劑。或者，可藉由將FcRH5多肽及潛在拮抗劑與膜結合FcRH5多肽受體或重組受體在適當條件下組合進行競爭抑制分析法來偵測拮抗劑。FcRH5多肽可諸如藉由放射性標記，以便可使用結合於受體之FcRH5多肽分子數測定潛在拮抗劑之有效性。編碼受體之基因可由熟習此項技術者已知之多種方法鑑別，例如配位體淘選及FACS分選。Coligan等人，**Current Protocols in Immun.,** 1(2): 第5章(1991)。較佳採用表現選殖，其中自對FcRH5多肽具有反應性之細胞製備聚腺苷酸化RNA，且將由此RNA產生之cDNA庫分組，且用於轉染COS細胞或對FcRH5多肽不具反應性之其他細胞。將於玻璃載片上生長之經轉染細胞暴露於經標記FcRH5多肽。FcRH5多肽可藉由多種方式標記，包括碘化或包括位點特異性蛋白激酶之識別位點。固定且培育之後，載片進行自動放射照像分析。鑑別陽性組且製備亞群，且使用相互作用亞集合(sub-pooling)及再篩選方法再轉染，最終產生編碼假定受體之單純系。

作為受體鑑別之替代方法，可使經標記FcRH5多肽與表現受體分子之細胞膜或提取製劑光親和連接。藉由PAGE分解交聯物質，且暴露於X射線膠片(X-ray film)。可切除含有受體之經標記複合物，分解為肽片段，且進行蛋白微測量序。使用獲自微測量序之胺基酸序列設計簡併寡核苷

酸探針組以篩選cDNA庫來鑑別編碼假定受體之基因。

在拮抗劑之另一分析法中，將表現受體之哺乳動物細胞或膜製劑與經標記FcRH5多肽在候選化合物存在下一起培育。可隨後測量化合物提高或阻斷此相互作用之能力。

潛在拮抗劑之更特定實例包括結合於免疫球蛋白與FcRH5多肽之融合物的寡核苷酸，且尤其抗體，包括(但不限於)多株及單株抗體及抗體片段、單鏈抗體、抗遺傳型抗體及該等抗體或片段之嵌合或人類化型式，以及人類抗體及抗體片段。或者，潛在拮抗劑可為密切相關蛋白，例如FcRH5多肽之識別受體但不賦予作用，從而競爭性抑制FcRH5多肽之作用的突變形式。

可以醫藥組合物之形式投與特異性結合本文鑑別之FcRH5多肽的抗體以及上文所揭示之篩選分析法所鑑別的其他分子以治療各種病症，包括癌症。

若FcRH5多肽在細胞內且使用完整抗體作為抑制劑，則內化抗體較佳。然而，亦可使用脂質轉染法或脂質體將抗體或抗體片段傳遞至細胞中。若使用抗體片段，特異性結合於標靶蛋白之結合域的最小抑制片段較佳。舉例而言，基於抗體之可變區序列，可設計的肽分子應保留結合標靶蛋白序列之能力。該等肽可以化學方式合成及/或藉由重組DNA技術產生。例如參見Marasco等人，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90**: 7889-7893 (1993)。

本文之調配物亦可含有一種以上所治療之特定適應症所必需的活性化合物，較佳為具有彼此並無不利影響之互補

活性的活性化合物。或者或另外，組合物可包含提高其功能之藥劑，諸如細胞毒性劑、細胞激素、化學治療劑或生長抑制劑。該等分子適合地以有效達成所欲目的之量組合存在。

M. **抗體衍生物**

本發明之抗體可進一步經修飾以含有此項技術中已知且可易於獲得之其他非蛋白性部分。適用於衍生抗體之部分較佳為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯啶酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄糖或聚(n-乙烯基吡咯啶酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可在製造方面具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可有分支鏈或無分支鏈。連接於抗體之聚合物數目可改變，且若連接一個以上聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生之聚合物之數目及/或類型可基於以下考慮因素來確定：包括(但不限於)欲改良抗體之特定特性或功能，抗體衍生物是否將用於限定條件下之療法等。

N. **篩選方法**

本發明之另一實施例係針對一種判定懷疑含有FcRH5多肽之樣品中FcRH5多肽之存在的方法，其中該方法包含將

樣品暴露於結合於FcRH5多肽之其抗體藥物結合物，且測定其抗體藥物結合物與樣品中FcRH5多肽之結合，其中該結合之存在指示樣品中FcRH5多肽之存在。視情況，樣品可含有懷疑表現FcRH5多肽之細胞(其可為癌細胞)。用於該方法之其抗體藥物結合物可視情況經可偵測標記，連接於固體支撐物或進行類似處理。

本發明之另一實施例係針對一種診斷哺乳動物中腫瘤之存在的方法，其中該方法包含(a)使包含獲自哺乳動物之組織細胞的測試樣品與結合於FcRH5多肽之其抗體藥物結合物接觸，及(b)偵測其抗體藥物結合物與測試樣品中FcRH5多肽之間複合物之形成，其中複合物之形成指示哺乳動物中腫瘤之存在。視情況，其抗體藥物結合物經可偵測標記，連接於固體支撐物或進行類似處理，及/或組織細胞之測試樣品獲自懷疑具有癌性腫瘤之個體。

IV. 使用抗FcRH5抗體及免疫結合物之其他方法

A. 診斷方法及偵測方法

在一態樣中，本發明之抗FcRH5抗體及免疫結合物適用於偵測生物樣品中FcRH5之存在。本文中所用之術語「偵測」涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織。在某些實施例中，該等組織包括正常組織及/或相對於其他組織表現較高含量之FcRH5的癌性組織，例如B細胞及/或B細胞相關組織。

在一態樣中，本發明提供一種偵測生物樣品中FcRH5之存在的方法。在某些實施例中，該方法包含使該生物樣品

與抗FcRH5抗體在使得抗FcRH5抗體可與FcRH5結合的條件下接觸，及偵測抗FcRH5抗體與FcRH5之間是否形成複合物。

在一態樣中，本發明提供一種診斷與FcRH5表現增加相關之病症的方法。在某些實施例中，該方法包含使測試細胞與抗FcRH5抗體接觸；藉由偵測抗FcRH5抗體與FcRH5之結合來測定測試細胞之FcRH5表現量(定量或定性)；及比較測試細胞之FcRH5表現量與對照細胞(例如與測試細胞來自相同組織的正常細胞或與該正常細胞之FcRH5表現量相當的細胞)之FcRH5表現量，其中相較於對照細胞，測試細胞之較高FcRH5表現量表明存在與FcRH5表現增加相關之病症。在某些實施例中，測試細胞獲自懷疑患有與FcRH5表現增加相關之病症的個體。在某些實施例中，病症為細胞增殖病症，諸如癌症或腫瘤。

可使用本發明之抗體診斷之例示性細胞增殖病症包括B細胞病症及/或B細胞增殖病症，包括(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在某些實施例中，診斷或偵測方法(諸如上述方法)包含偵測抗FcRH5抗體與細胞表面上或獲自表面表現FcRH5之細胞之膜製劑中所表現的FcRH5的結合。在某些實施例

中，該方法包含使細胞與抗FcRH5抗體在允許抗FcRH5抗體結合於FcRH5之條件下接觸，及偵測抗FcRH5抗體與細胞表面上之FcRH5之間是否形成複合物。偵測抗FcRH5抗體與細胞表面上所表現之FcRH5的結合的例示性分析法為「FACS」分析法。

可使用某些其他方法偵測抗FcRH5抗體與FcRH5之結合。該等方法包括(但不限於)此項技術中熟知之抗原-結合分析法，諸如西方墨點法、放射免疫分析法、ELISA(酶聯免疫吸附分析法)、「夾層」免疫分析法、免疫沈澱分析法、螢光免疫分析法、蛋白質A免疫分析法及免疫組織化學(IHC)。

在某些實施例中，抗FcRH5抗體經標記。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及例如經由酶促反應或分子相互作用間接偵測之部分(諸如酶或配位體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素^{32}P、^{14}C、^{125}I、^{3}H及^{131}I；螢光團，諸如稀土螯合物或螢光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹磺醯基、傘酮(umbelliferone)；螢光素酶，例如螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化酶(HRP)；鹼性磷酸酶；β-半乳糖苷酶；葡糖澱粉酶；溶菌酶；醣氧化酶，例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸去氫酶；雜環氧化酶，諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與採用過氧化氫氧化染料前驅物之酶(諸如HRP、乳

過氧化酶或微過氧化酶)偶合；生物素/抗生物素蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基及其類似標記。

在某些實施例中，將抗FcRH5抗體固定於不溶性基質上。固定可能需要使抗FcRH5抗體與在溶液中保持游離之任何FcRH5分離。此通常藉由以下實現：使抗FcRH5抗體在分析程序之前不溶，諸如藉由吸附於水不溶性基質或表面(Bennich等人，U.S. 3,720,760)，或藉由共價偶合(例如使用戊二醛交聯)；或藉由使抗FcRH5抗體在抗FcRH5抗體與FcRH5之間形成複合物之後不溶，例如藉由免疫沈澱。

上述診斷或偵測實施例中之任一者可替代抗FcRH5抗體或在抗FcRH5抗體之外使用本發明之免疫結合物進行。

B. 治療方法

本發明之抗體或免疫結合物可用於例如活體外、離體及活體內治療方法。在一態樣中，本發明提供活體內或活體外抑制細胞生長或增殖之方法，該方法包含使細胞在允許免疫結合物結合於FcRH5之條件下暴露於抗FcRH5抗體或其免疫結合物。「抑制細胞生長或增殖」意謂使細胞之生長或增殖降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%，且包括誘發細胞死亡。在某些實施例中，細胞為腫瘤細胞。在某些實施例中，細胞為B細胞。在某些實施例中，細胞為異種移植物，例如本文所例示之異種移植物。

在一態樣中，本發明之抗體或免疫結合物可用於治療或預防B細胞增殖病症。在某些實施例中，細胞增殖病症與

FcRH5之表現及/或活性增加相關。舉例而言，在某些實施例中，B細胞增殖病症與B細胞表面上FcRH5之表現增加相關。在某些實施例中，B細胞增殖病症為腫瘤或癌症。欲藉由本發明之抗體或免疫結合物治療之B細胞增殖病症之實例包括(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，本發明提供治療B細胞增殖病症之方法，其包含向個體投與有效量之抗FcRH5抗體或其免疫結合物。在某些實施例中，治療B細胞增殖病症之方法包含向個體投與有效量之醫藥調配物，其包含抗FcRH5抗體或抗FcRH5免疫結合物及視情況存在之至少另一種治療劑，諸如下文提供之治療劑。在某些實施例中，治療細胞增殖病症之方法包含向個體投與有效量之醫藥調配物，其包含1)包含抗FcRH5抗體及細胞毒性劑之免疫結合物；及視情況存在之2)至少另一種治療劑，諸如下文提供之治療劑。

在一態樣中，至少一些本發明抗體或免疫結合物可結合來自不為人類之物種的FcRH5。因此，可使用本發明之抗體或免疫結合物結合FcRH5，例如含有FcRH5之細胞培養物中之FcRH5、具有FcRH5(本發明之抗體或免疫結合物可與其交叉反應)之人類或其他哺乳動物(例如黑猩猩、狒狒、絨猴、獼猴及恆河猴、豬或小鼠)中之FcRH5。在一實

施例中，可使用抗FcRH5抗體或免疫結合物靶向B細胞上之FcRH5，其係使抗體或免疫結合物與FcRH5接觸形成抗體或免疫結合物-抗原複合物，以便免疫結合物中結合之細胞毒素可進入細胞內部。在一實施例中，FcRH5為人類FcRH5。

在一實施例中，可在用於結合罹患與FcRH5表現及/或活性增加相關之病症的個體中FcRH5之方法中使用抗FcRH5抗體或免疫結合物，該方法包含向個體投與抗體或免疫結合物，以便結合個體中之FcRH5。在一實施例中，結合之抗體或免疫結合物內化至表現FcRH5之B細胞中。在一實施例中，FcRH5為人類FcRH5，且個體為人類個體。或者，個體可為表現抗FcRH5抗體所結合之FcRH5的哺乳動物。另外，個體可為已引入FcRH5(例如藉由投與FcRH5或藉由表現編碼FcRH5之轉殖基因引入)之哺乳動物。

抗FcRH5抗體或免疫結合物可向人類投與以用於治療目的。此外，抗FcRH5抗體或免疫結合物可向表現FcRH5(抗體可與該FcRH5交叉反應)之非人類哺乳動物(例如靈長類動物、豬、大鼠或小鼠)投與以用於獸醫用目的或作為人類疾病之動物模型。就後者而言，該等動物模型可適用於評估本發明之抗體或免疫結合物之治療功效(例如測試投藥劑量及投藥時程)。

本發明之抗體或免疫結合物可在療法中單獨使用或與其他組合物組合使用。舉例而言，本發明之抗體或免疫結合物可與至少另一種治療劑及/或佐劑共投與。在某些實施

例中，另一治療劑為細胞毒性劑、化學治療劑或生長抑制劑。在該等實施例之一中，化學治療劑為如下藥劑或藥劑組合，諸如環磷醯胺、羥基道諾黴素、阿黴素、小紅莓、長春新鹼(Oncovin™)、潑尼松龍、CHOP、CVP或COP，或免疫治療劑，諸如抗CD20(例如Rituxan®)或抗VEGF(例如Avastin®)，其中組合療法適用於治療癌症及/或B細胞病症，諸如B細胞增殖病症，包括淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

上述該等組合療法涵蓋組合投藥(其中兩種或兩種以上治療劑包括於同一或各別調配物中)，及各別投藥，在此情況下，本發明之抗體或免疫結合物之投與可在另一治療劑及/或佐劑投與之前、同時及/或之後進行。本發明之抗體或免疫結合物亦可與放射療法組合使用。

本發明之抗體或免疫結合物(及任何其他治療劑或佐劑)可藉由如下任何適合方式投與，包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內投與，且若需要進行局部治療，則病灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。另外，宜藉由脈搏輸注投與抗體或免疫結合物，尤其遞減劑量之抗體或免疫結合物。部分視投藥為短期或長期投藥而定，可藉由任何適合途徑(例如藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。

本發明之抗體或免疫結合物應以符合良好醫療實踐之方式調配、給與及投與。在此情形中所考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個別患者之臨床狀況、病症之原因、藥劑傳遞之部位、投藥方法、投藥時程及醫師已知之其他因素。抗體或免疫結合物無需但視情況可與一或多種當前用於預防或治療所述病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量取決於存在於該調配物中之抗體或免疫結合物之量、病症或治療之類型及上述其他因素。其一般以相同劑量且用本文所述之投藥途徑使用，或以本文所述劑量之約1至99%，或以憑經驗/臨床上確定為適當之任何劑量及任何途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明之抗體或免疫結合物(當單獨使用或與一或多種其他額外治療劑(諸如化學治療劑)組合使用時)之適當劑量應取決於欲治療疾病之類型、抗體或免疫結合物之類型、疾病之嚴重性及病程、抗體或免疫結合物是出於預防抑或治療目的而投與、先前療法、患者之臨床病史及對抗體或免疫結合物之反應及主治醫師之判斷。宜一次性或經一系列治療向患者投與抗體或免疫結合物。視疾病之類型及嚴重性而定，無論例如藉由一或多次各別投與或藉由連續輸注，約1 μg/kg至100 mg/kg(例如0.1 mg/kg-20 mg/kg)之抗體或免疫結合物可為向患者投與之最初候選劑量。視上述因素而定，典型日劑量範圍可為約1 μg/kg至100 mg/kg或更多。就經數日或更久重複投藥而言，視病狀而定，一般持續治療直至出現對疾病症狀之所

需抑制為止。抗體或免疫結合物之一例示性劑量範圍應為約0.05 mg/kg至約10 mg/kg。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg或10 mg/kg(或其任何組合)之一或多種劑量的抗體或免疫結合物。該等劑量可間歇投與，例如每週或每三週投與(例如以便患者接受約2次至約20次或例如約6次劑量之抗體或免疫結合物)。可投與初始較高起始劑量，繼而投與一或多次較低劑量。例示性給藥方案包含投與約4 mg/kg之初始起始劑量之抗體，繼而投與約2 mg/kg之每週維持劑量之抗體。然而，其他給藥方案亦可能有用。此療法之進展易於藉由習知技術及分析法監測。

C. 活性分析法

本發明之抗FcRH5抗體及免疫結合物可藉由此項技術中已知之各種分析法表徵其物理/化學特性及/或生物活性。

1. 活性分析法

在一態樣中，提供鑑別具有生物活性之抗FcRH5抗體或其免疫結合物的分析法。生物活性可包括例如抑制細胞生長或增殖之能力(例如「細胞殺滅」活性)或誘發細胞死亡(包括漸進式細胞死亡(細胞凋亡))之能力。亦提供在活體內及/或活體外具有該生物活性之抗體或免疫結合物。

在某些實施例中，測試抗FcRH5抗體或其免疫結合物活體外抑制細胞生長或增殖之能力。抑制細胞生長或增殖之分析法為此項技術中所熟知。某些細胞增殖分析法(由本文所述之「細胞殺滅」分析法例示)測量細胞存活率。一

種該分析法為CellTiter-Glo™發光細胞存活率分析法，其可購自Promega(Madison, WI)。該分析法基於定量所存在之ATP(其為代謝活性細胞之指示)測定培養物中之活細胞數。參見Crouch等人(1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, 美國專利第6602677號。該分析法可以96孔或384孔形式進行，使其易於自動高通量篩選(HTS)。參見Cree等人(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404。分析程序包括向培養之細胞直接添加單一試劑(CellTiter-Glo®試劑)。此引起細胞溶解及產生由螢光素酶反應產生之發光信號。發光信號與所存在ATP之量(其與培養物中所存在之活細胞數成正比)成正比。可藉由光度計或CCD相機成像裝置記錄資料。發光輸出表示為相對光單位(RLU)。

另一細胞增殖分析法為「MTT」分析法，其為一種測量線粒體還原酶氧化溴化3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓為甲臜的比色分析法。如CellTiter-Glo™分析法般，此分析法表明細胞培養物中所存在代謝活性細胞之數目。例如參見Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63，及Zhang等人(2005) Cancer Res. 65:3877-3882。

在一態樣中，測試抗FcRH5抗體誘發活體外細胞死亡之能力。誘發細胞死亡之分析法為此項技術中所熟知。在一些實施例中，該等分析法測量例如如由碘化丙錠(PI)、錐蟲藍(參見Moore等人，(1995) Cytotechnology, 17:1-11)或7AAD吸收所指示之膜完整性喪失。在例示性PI吸收分析法中，將細胞培養於補充有10%熱滅活FBS(Hyclone)及2

mM L-麩胺醯胺之杜爾貝科氏改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle Medium，D-MEM):哈姆氏F-12(Ham's F-12)(50:50)中。由此，在不存在補體及免疫效應細胞下執行該分析法。以每培養皿3×10^6個之密度將細胞接種於100×20 mm培養皿中，且使其黏附隔夜。移除培養基，置換為單獨之新鮮培養基或含有各種濃度之抗體或免疫結合物之培養基。將細胞培育3日。處理之後，用PBS洗滌單層且藉由胰蛋白酶化作用而脫離。隨後在4℃下在1200 rpm下離心細胞5分鐘，將顆粒再懸浮於3 ml冷Ca^{2+}結合緩衝液(10 mM Hepes(pH 7.4)、140 mM NaCl、2.5 mM $CaCl_2$)中，且於35 mm過濾器封端之12×75 mm管中分成等份(每管1 ml，每處理組3管)以移除細胞團塊。管隨後接受PI(10 μg/ml)。使用FACSCAN™流式細胞儀及FACSCONVERT™ CellQuest軟體(Becton Dickinson)分析樣品。由此鑑別出誘發如由PI吸收可測定之統計上顯著水準之細胞死亡的抗體或免疫結合物。

在一態樣中，測試抗FcRH5抗體或免疫結合物誘發活體外細胞凋亡(漸進式細胞死亡)之能力。誘發細胞凋亡之抗體或免疫結合物的例示性分析法為磷脂結合蛋白結合分析法。在一例示性磷脂結合蛋白結合分析法中，如前段所論述培養細胞且接種於培養皿中。移除培養基，置換為單獨之新鮮培養基或含有至0.001至10 μg/ml之抗體或免疫結合物之培養基。培育三日之後，用PBS洗滌單層且藉由胰蛋白酶化作用而脫離。隨後將細胞離心，再懸浮於Ca^{2+}結合

緩衝液中且如前段所論述於管中分成等份。管隨後接受經標記之磷脂結合蛋白(例如磷脂結合蛋白V-FTIC)(1 μg/ml)。使用FACSCAN™流式細胞儀及FACSCONVERT™ CellQuest軟體(BD Biosciences)分析樣品。由此鑑別出相對於對照組誘發統計上顯著水準之磷脂結合蛋白結合的抗體或免疫結合物。誘發細胞凋亡之抗體或免疫結合物的另一例示性分析法為偵測核小體間基因組DNA降解的組蛋白DNA ELISA比色分析法。該分析法可使用例如細胞死亡偵測ELISA套組(Roche, Palo Alto, CA)執行。

用於任何上述活體外分析法之細胞包括天然表現FcRH5或經工程改造可表現FcRH5之細胞或細胞株。該等細胞包括相對於具有相同組織來源之正常細胞過度表現FcRH5之腫瘤細胞。該等細胞亦包括表現FcRH5之細胞株(包括腫瘤細胞株)及通常不表現FcRH5但已用編碼FcRH5之核酸轉染之細胞株。

在一態樣中，測試抗FcRH5抗體或其免疫結合物抑制活體內細胞生長或增殖之能力。在某些實施例中，測試抗FcRH5抗體或其免疫結合物抑制活體內腫瘤生長之能力。活體內模型系統(諸如異種移植模型)可用於該測試。在一例示性異種移植系統中，將人類腫瘤細胞引入適當免疫功能不全之非人類動物(例如SCID小鼠)中。向該動物投與本發明之抗體或免疫結合物。測量抗體或免疫結合物抑制或減緩腫瘤生長之能力。在上述異種移植系統之某些實施例中，人類腫瘤細胞為來自人類患者之腫瘤細胞。該等適用

於製備異種移植模型之細胞包括人類白血病及淋巴瘤細胞株，其包括(但不限於)BJAB-luc細胞(用螢光素酶報導基因轉染之EBV陰性伯基特氏淋巴瘤細胞株)、Ramos細胞(ATCC，Manassas, VA, CRL-1923)、SuDHL-4細胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、DoHH2細胞(參見Kluin-Neilemans, H.C.等人，Leukemia 5:221-224 (1991)及Kluin-Neilemans, H.C.等人，Leukemia 8:1385-1391 (1994))、Granta-519細胞(參見Jadayel, D.M.等人，Leukemia 11(1):64-72 (1997))。在某些實施例中，藉由皮下注射或藉由移植於適合位點(諸如乳房脂肪墊)中將人類腫瘤細胞引入適當免疫功能不全之非人類動物中。

2. 結合分析法及其他分析法

在一態樣中，測試抗FcRH5抗體之抗原結合活性。舉例而言，在某些實施例中，測試抗FcRH5抗體結合於細胞表面上所表現之FcRH5的能力。可使用FACS分析法進行該測試。

在一態樣中，可使用競爭分析法鑑別與鼠類13G9抗體(mu13G9)、人類化13G9抗體及/或人類化13G9.v1及/或人類化13G9.v3及/或人類化13G9.v8抗體競爭結合於FcRH5的單株抗體。在某些實施例中，該競爭抗體結合於鼠類13G9抗體、人類化13G9.v1抗體及/或人類化13G9.v3抗體及/或人類化13G9.v8所結合之相同抗原決定基(例如線性或構形抗原決定基)。例示性競爭分析法包括(但不限於)常規分析法，諸如Harlow及Lane (1988) Antibodies: A Laboratory

Manual, 第14章(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)中所提供之分析法。Morris (1996)「Epitope Mapping Protocols」, Methods in Molecular Biology, 第66卷(Humana Press, Totowa, NJ)中提供定位抗體所結合之抗原決定基的詳細例示性方法。兩種抗體若各將另一者之結合阻斷50%或更多，則稱作結合於相同抗原決定基。

在一例示性競爭分析法中，在包含結合於FcRH5之第一經標記抗體(例如鼠類13G9(mu13G9)抗體、嵌合13G9(ch13G9)及/或人類化13G9(hu13G9)抗體)及測試與第一抗體競爭結合於FcRH5之能力的第二未標記抗體之溶液中培育經固定FcRH5。第二抗體可存在於融合瘤上清液中。作為對照組，在包含第一經標記抗體但無第二未標記抗體之溶液中培育經固定FcRH5。在允許第一抗體結合於FcRH5之條件下培育之後，移除過量未結合之抗體，且測量與經固定FcRH5結合之標記之量。若相對於對照樣品，測試樣品中與經固定FcRH5結合之標記之量實質上降低，則此表明第二抗體與第一抗體競爭結合於FcRH5。在某些實施例中，經固定FcRH5存在於細胞之表面上或獲自表面表現FcRH5之細胞的膜製劑中。

在一態樣中，經純化抗FcRH5抗體可進一步由如下一系列分析法表徵，包括(但不限於)N末端測序、胺基酸分析、非變性尺寸排阻高壓液相層析(HPLC)、質譜、離子交換層析及木瓜蛋白酶消化。

在一實施例中，本發明涵蓋一種具有一些但非所有效應功能的改變之抗體，該等功能使其成為諸多應用的適宜候選者，在該等應用中抗體之活體內半衰期很重要，然而某些效應功能(諸如補體及ADCC)為不必要的或有害的。在某些實施例中，測量抗體之Fc活性以確保僅維持所需特性。可進行活體外及/或活體內細胞毒性分析以證實CDC及/或ADCC活性之降低/耗竭。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合分析，以確保抗體缺乏FcγR結合能力(從而可能缺乏ADCC活性)，但保留FcRn結合能力。介導ADCC之初級細胞即NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。FcR在造血細胞上之表現概括於Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)之第464頁之表3中。評定所關注分子之ADCC活性的活體外分析法之一實例描述於美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中。該等分析法之有用效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者，或另外，例如可在動物模型(諸如Clynes等人，PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中所揭示之動物模型)中活體內評定所關注分子之ADCC活性。亦可進行C1q結合分析以證實抗體不能結合C1q且因此缺乏CDC活性。為評定補體活化，可執行例如如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述之CDC分析法。亦可使用此項技術中已知之方法執行FcRn結合及活體內清除/半衰期測定。

提供以下實例僅為說明之目的，且不欲以任何方式限制

本發明之範疇。

本說明書中所引用之所有專利及參考文獻均以全文引用的方式併入本文中。

實例

除非另外表明，否則根據製造商之說明書使用實例中所提及之市售試劑。實例中所用之抗體為市售抗體或本文所述之抗體。以下實例及整個說明書中由ATCC寄存編號標識的彼等細胞之來源為美國菌種保存中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA)。

實例1：製備結合FcRH5之抗體

此實例說明製備可特異性結合FcRH5之單株抗體。

產生單株抗體之技術為此項技術中已知且例如描述於前述Goding中。可採用之免疫原包括經純化FcRH5、含有FcRH5之融合蛋白及細胞表面上表現重組FcRH5之細胞。可由熟習此項技術者不經過度實驗選擇免疫原。

用在完全弗氏佐劑(complete Freund's adjuvant)中乳化且皮下或腹膜內注射1-100微克之量的FcRH5免疫原使小鼠(諸如Balb/c)免疫。或者，在MPL-TDM佐劑(Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT)中乳化免疫原且注射於動物後部足墊中。隨後10至12日之後，用在所選佐劑中乳化之另一免疫原使經免疫小鼠加強免疫。此後，亦可用其他免疫注射使小鼠加強免疫，歷時數週。可週期性地藉由後眼眶出血自小鼠獲得血清樣品供在ELISA分析法中測試以偵測抗FcRH5抗體。

偵測到適合之抗體力價之後，可最終靜脈內注射免疫原來注射對抗體呈「陽性」之動物。三至四日後，處死小鼠且收集脾細胞。隨後使脾細胞融合(使用35%聚乙二醇)於所選鼠類骨髓瘤細胞株(諸如P3X63AgU.1，可獲自ATCC，編號CRL 1597)。融合物產生融合瘤細胞，其可隨後塗佈於含有HAT(次黃嘌呤、胺基喋呤及胸苷)培養基之96孔組織培養板中以抑制未融合細胞、骨髓瘤雜交物及脾細胞雜交物之增殖。

將在ELISA中篩選融合瘤細胞對免疫原之反應性。判定分泌針對免疫原之所需單株抗體的「陽性」融合瘤細胞屬於此項技術之技能範疇內。

可於同源Balb/c小鼠中腹膜內注射陽性融合瘤細胞以產生含有抗免疫原單株抗體之腹水。或者，可使融合瘤細胞在組織培養燒瓶或滾瓶中生長。可使用硫酸銨沈澱繼而凝膠排阻層析純化腹水中所產生之單株抗體。或者，可採用基於抗體結合於蛋白質A或蛋白質G之親和層析。

可使用此(此等)技術成功產生針對本文所揭示之FcRH5多肽的抗體。更特定言之，可針對以下本文所揭示之FcRH5蛋白成功產生能夠識別FcRH5蛋白及結合於FcRH5蛋白(如由標準ELISA、FACS分選分析及/或免疫組織化學分析所測量)的功能性單株抗體：PRO820(DNA56041)、PRO52387(DNA257845)。

除製備針對本文所述之FcRH5多肽的單株抗體以外，許多單株抗體可成功地結合於細胞毒素以用於將細胞毒素引

導於表現(活體外與活體內)所關注之FcRH5多肽的細胞(或組織)。舉例而言，可成功地產生針對以下本文所述之FcRH5多肽之含有毒素(例如DM1)的單株抗體：PRO820(DNA56041)、PRO52387(DNA257845)。

A. **產生FcRH5/IRTA2(PRO820、PRO52387)穩定細胞株**

為製備篩選FcRH5抗體之細胞株，產生穩定表現經標記及未標記FcRH5/IRTA2之SVT2小鼠纖維母細胞細胞株。自脾細胞庫PCR擴增FcRH5/IRTA2 cDNA且TA選殖(Invitrogen)於pCR4中。為製備未標記之表現構築體，藉由使用PCR添加限制位點，消化PCR產物且接合於哺乳動物表現載體pCMV.PD.nbe中將開放閱讀框架(ORF)選殖於該載體中。N末端標記之表現構築體藉由擴增無信號序列之FcRH5/IRTA2 ORF且接合PCR產物於含有gD標籤及信號序列(M G G T A A R L G A V I L F V V I V G H G V R G K Y A L A D A S L K M A D P N R F R G K D L P V L D Q L L)(SEQ ID NO: 1)之pMSCVneo(Clontech)載體中來製備。對於各FcRH5/IRTA2，確定兩個穩定細胞株用於針對FACS特異性反應性及FcRH/IRTA之間的交叉反應性篩選單株抗體。藉由標準Lipofectamine 2000(Invitrogen; Carlsbad, Ca)方案將經gD標記及未標記之表現載體轉染於SVT2(在高葡萄糖DMEM+10% FBS+2 mM L-麩胺醯胺細胞中生長)中。將標記gD之轉染物置於0.5 mg/ml遺傳黴素(Geneticin，Invitrogen; Carlsbad, Ca)選擇下歷時一週，且隨後用gD標籤特異性單株抗體(gD:952，Genentech; South

San Francisco)進行單細胞FACS分選以獲得最高表現純系。將未標記之轉染物置於5.0 μg/ml嘌黴素(Calbiochem; La Jolla, Ca)選擇下直至長出可見群落。藉由標準Trizolâ(Invitrogen; Carlsbad, Ca)方案及TaqManâ(ABI; Foster City, Ca)試驗分離各群落之RNA以測定最高產生純系。

B. 產生針對FcRH5/IRTA2(PRO820、PRO52387)之單株抗體

製備能夠結合人類FcRH5之鼠類單株抗體。

藉由將表現FcRH5/IRTA2之標記His之細胞外域(ECD)的載體短暫轉染於CHO細胞中產生用於使小鼠免疫之蛋白質。在鎳管柱上使經轉染細胞上清液的蛋白質純化，且藉由N末端測序證實蛋白質之身分。

用Ribi佐劑(Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO)中之標記重組聚組胺酸(HIS6(SEQ ID NO: 69))的蛋白質使10隻Balb/c小鼠(Charles River Laboratories, Hollister, CA)高免疫。使用類似於前述方案(Kohler及Milstein, 1975；Hongo等人，1995)之修改方案將藉由直接ELISA顯示針對免疫原之高抗體力價且藉由FACS展示特異性結合於穩定表現所關注FcRH之SVT2小鼠纖維母細胞細胞的小鼠B細胞與小鼠骨髓瘤細胞(X63.Ag8.653；美國菌種保存中心，Rockville, MD)融合。10-12日之後，收集上清液且藉由直接ELISA及FACS針對抗體產生及結合進行篩選。將藉由限制稀釋第二輪次選殖之後展示最高免疫結合之陽性純系擴增且培養以進一步表徵，包括FcRH1、FcRH2、FcRH3、

FcRH4及FcRH5特異性及交叉反應性。藉由親和層析(Pharmacia快速蛋白質液相層析[FPLC]；Pharmacia, Uppsala, Sweden)使用類似於前述方案(Hongo等人，1995)之修改方案純化自各融合瘤譜系收集之上清液。隨後無菌過濾(0.2-μm孔徑；Nalgene, Rochester NY)經純化之抗體製劑，且在4℃下儲存於磷酸鹽緩衝生理食鹽水(PBS)中。

已針對PRO52837(FcRH5c/IRTA2c)成功產生能夠識別且結合於FcRH5蛋白(如由標準ELISA、FACS分選分析及/或免疫組織化學分析所測量)之單株抗體且表示為：

抗FcRH5-9E2(本文中稱作9E2或9E2.1.1)(ATCC編號PTA-7207，寄存於2005年11月9日)、

抗FcRH5-1H4(本文中稱作1H4或1H4.1.1(ATCC編號PTA-7208，寄存於2005年11月9日)、

抗FcRH5-13G9(本文中稱作13G9或13G9.1.1)(描述於本文中)、

抗FcRH5-4D10(本文中稱作4D10或4D10.1.1)(ATCC編號PTA-7210，寄存於2005年11月9日)、

抗FcRH5-6H1(本文中稱作6H1或6H1.1.1)(ATCC編號PTA-7211，寄存於2005年11月9日)、

抗FcRH5-8H6(本文中稱作8H6或8H6.1.1)(ATCC編號PTA-7212，寄存於2005年11月9日)、

抗FcRH5-7D11(本文中稱作7D11或7D11.1.1)(描述於本文中)、

抗FcRH5-10A8(本文中稱作10A8或10A8.1.1)(描述於

2009年4月1日申請之美國臨時專利申請案第61/211,695號、2009年4月2日申請之第61/166,217號及2009年12月4日申請之第61/266,972號中)。

1. 親和力測定(Biacore分析)

由使用Biacore 2000表面電漿共振系統(BIAcore, Inc.)測量之締合及解離速率常數計算IgG之FcRH結合親和力。根據供應商之說明書(BIAcore, Inc.)，使用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化生物感應器晶片以共價偶合任一抗鼠類IgG(BR-1008-338)。簡言之，對於各動力學分析循環，於晶片上捕捉5 μl 100 nM IgG，以20 μl/min之流速注射各種FcRH之兩倍連續稀釋液150秒。監測抗原解離180秒，然後再生(regeneration)。藉由用1:1朗繆爾結合模型(Langmuir binding model)擬合數據計算25℃下之平衡解離常數。操作緩衝液為含有0.05% Tween-20之PBS。結果如下表9所示。所有抗體均以足以用作治療劑之親和力結合抗原。

表9

鼠類抗體	對Hu抗原之親和力 (Biacore)	穩定轉染細胞上之Cyno交叉反應性(FACS)
1H4	6 nM	X*
4D10	3 nM	
6H1	< 0.1 nM	X
7D11	6 nM	X*
8H6	20 nM	X(藉由IHC確定)
9E2	0.2 nM	
10A8	N/A	X
10F5	N/A	X
13G9	19 nM	X

*飽和濃度下極微弱

C. 構築嵌合抗人類FcRH5抗體且對其測序

1. 嵌合抗人類FcRH5抗體7D11(ch7D11)

為構築嵌合7D11 IgG1，使用Qiagen RNeasy Mini套組(目錄號74104)及製造商建議之方案自7D11融合瘤細胞提取總RNA。使用為7D11單株抗體之輕鏈及重鏈弄到之N末端胺基酸序列設計特異於各鏈之PCR引子。設計RT-PCR之反向引子以匹配對應於N末端序列之基因家族的構架4。亦設計引子以添加選殖所需之限制位點。對於輕鏈，其為N末端之EcoRV及構架4之3'末端之KpnI。對於重鏈，所添加位點為N末端之BsiWI及VH-CH1接合點之略下游的ApaI。引子序列如下：

7D11LCF.EcoRV(7D11輕鏈前向引子)：

5'-GATCGATATCYTGCTSACMCARTGTCCAGC-3' (SEQ ID NO: 2)

(B=G/T/C，K=G/T，Y=C/T，M=A/C，R=A/G，D=G/A/T. S=G/C，H=A/T/C)

C7F7LCR.KpnI(7D11輕鏈反向引子)：

5'-TTTDAKYTCCAGCTTGGTACC-3' (SEQ ID NO: 3)

(B=G/T/C，K=G/T，Y=C/T，M=A/C，R=A/G，D=G/A/T. S=G/C，H=A/T/C)

1D1(IIID-2)HCF.BsiWI(7D11重鏈前向引子)：

5'-GATCGACGTACGCTGARGTGCARYTGGTGGARTCTGG-3' (SEQ ID NO: 4)

(B=G/T/C，K=G/T，Y=C/T，M=A/C，R=A/G，D=G/A/T. S=G/C，H=A/T/C)

C7F7HCR.ApaI(7D11重鏈反向引子)：

5'-ACAGTGGGCCCTTGGTGGAGGCTGMRGAGACDGTGASHRDRGT-3' (SEQ ID NO: 5)

(B=G/T/C，K=G/T，Y=C/T，M=A/C，R=A/G，D=G/A/T. S=G/C，H=A/T/C)

使用Qiagen一步RT-PCR套組(目錄號210210)及所建議之反應混合物及條件進行輕鏈及重鏈之RT-PCR反應。已預先描述哺乳動物細胞表現IgG之pRK載體(Gorman等人，DNA Prot Eng Tech 2:3-10 (1990)。載體已經修飾且併入某些核酸內切酶限制酶識別位點以有助於選殖及表現(Shields等人，*J Biol Chem 2000; 276: 6591-6604*)。將經擴增VL選殖於含有人類κ恆定域之pRK哺乳動物細胞表現載體(pRK.LPG3.人類κ)中。將經擴增VH插入編碼全長人類IgG1恆定域之pRK哺乳動物細胞表現載體(pRK.LPG4.人類HC)中。

獲得DNA序列以用於抗人類FcRH5(ch7D11)之所得鼠類-人類嵌合輕鏈(圖1)及重鏈(圖3)之完整編碼區。該等DNA所編碼之鼠類-人類嵌合輕鏈及重鏈之編碼多肽分別展示於圖2及圖4中。DNA測序之後，分析質體之表現。

將質體短暫轉染於293(腺病毒轉型之人類胚腎細胞株(Graham等人，*J. Gen. Virol.*, 36: 59-74 (1977))中。特定言之，使293細胞在轉染前之日分裂，且塗佈於含血清培養基中。次日，添加以磷酸鈣沈澱物形式製備之雙股DNA，繼而pAdVAntage™ DNA(Promega, Madison, WI)，且在

37℃下培育細胞隔夜。於無血清培養基中培養細胞且4日之後收集。在蛋白質A管柱上純化經轉染細胞上清液的抗體蛋白質，且隨後緩衝液更換為10 mM丁二酸鈉、140 mM NaCl(pH 6.0)且使用Centricon-10(Amicon)濃縮。藉由N末端測序證實蛋白質之身分。藉由定量胺基酸分析測定蛋白質濃度。藉由FACS於SVT2細胞中如下所述測試抗體與人類FcRH5之結合。

2. 嵌合抗人類FcRH5抗體10A8(ch10A8)

得到抗體10A8作為抗人類FcRH5融合瘤組之成員。使用RT-PCR構築此等抗體之小鼠/人類嵌合體，以使用總mRNA作為受質擴增融合瘤輕鏈及重鏈之可變域。將輕鏈可變域選殖於含有人類恆定κ域之載體pRK.LPG3.人類κ中，而將重鏈可變域選殖於編碼全長人類IgG1恆定域之載體pRK.LPG4.人類HC中。DNA測序使得可鑑別可變域之構架區及CDR區。10A8之嵌合及人類化型式描述於2009年4月1日申請之美國臨時專利申請案第61/211,695號、2009年4月2日申請之第61/166,217號及2009年12月4日申請之第61/266,972號中，該等專利申請案各以全文引用的方式併入本文中。

3. 嵌合抗人類FcRH5抗體13G9(ch13G9)

得到抗體13G9作為抗人類FcRH5融合瘤組之成員。如上所述使用RT-PCR構築此等抗體之小鼠/人類嵌合體，以使用總mRNA作為受質擴增融合瘤輕鏈及重鏈之可變域。將輕鏈可變域選殖於含有人類恆定κ域之載體pRK.LPG3.人類

κ中，而將重鏈可變域選殖於編碼全長人類IgG1恆定域之載體pRK.LPG4.人類HC中。獲得DNA序列以用於抗人類FcRH5(ch13G9)之所得鼠類-人類嵌合輕鏈(圖5)及重鏈(圖7)的完整編碼區，其使得可鑑別可變域之構架區及CDR區。該等由DNA所編碼之13G9鼠類-人類嵌合輕鏈及重鏈之編碼多肽分別展示於圖6及圖8中。

用於RT-PCR之引子序列如下：

13G9LCF.EcoRV(13G9輕鏈前向引子)：

5'-GGAGTACATTCAGATATCGTGATGACCCARTCTCAGAAAATCATG-3' (SEQ ID NO: 6)

(B=G/T/C 、K=G/T、Y=C/T、M=A/C、R=A/G、D=G/A/T. S=G/C、H=A/T/C)

CA1808 RsrII(13G9輕鏈反向引子)：

5'-GGTGCAGCCACGGTCCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCCTCCACC-3' (SEQ ID NO: 7)

MM102hc.f. PvuII(13G9重鏈前向引子)：

5'-GGA GTA CAT TCA CAG ATC CAG CTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTT AAG AAG-3' (SEQ ID NO: 8)

CA2172.ApaI(13G9重鏈反向引子)：

5'-GACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGGTGASTGWGG TTCC-3' (SEQ ID NO: 9)

(B=G/T/C 、K=G/T、Y=C/T、M=A/C、R=A/G、D=G/A/T. S=G/C、H=A/T/C)

D. 產生人類化抗人類FcRH5抗體13G9

殘基編號係根據Kabat(Kabat等人，*Sequences of proteins of immunological interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。使用單字母胺基酸縮寫。使用IUB編碼(N=A/C/G/T，D=A/G/T，V=A/C/G，B=C/G/T，H=A/C/T，K=G/T，M=A/C，R=A/G，S=G/C，W=A/T，Y=C/T)表示DNA簡併性。

1. 人類化抗FcRH5抗體移植物

產生各種人類化抗FcRH5抗體。將鼠類FcRH5抗體(13G9)之VL及VH域與人類共同VLκI(huKI)及人類亞群III共同VH(huIII)域比對。鼠類13G9(mu13G9)之輕鏈可變域與人類共同序列κI之比對展示於圖9中。將13G9之CDR工程改造於含有哺乳動物信號序列、人類VκI可變域之共同序列及人類恆定κI域之哺乳動物表現載體上。使用編碼各CDR之單一寡核苷酸及受者質體之ssDNA根據昆克(Kunkle)突變誘發方案傳遞CDR。亦將一個鼠類殘基(丙胺酸46，構架2中之Vernier殘基)自供者mAb傳遞至受者質體。移植之殘基及所得人類13G9型式1輕鏈可變域展示於圖9中。

同樣，將鼠類13G9之重鏈可變域的CDR工程改造於含有哺乳動物信號序列、人類重鏈亞群III之共同序列及編碼全長人類IgG1恆定域之序列的載體上。因為已知影響CDR構形之數個Vernier殘基處存在鼠類與人類殘基之所述差異，故亦將位置6、69、71、73、76及78處之鼠類構架殘基自供者傳遞至受者質體。鼠類13G9重鏈可變域、人類亞群

III可變域及所得人類13G9型式1(hu13G9.v1)重鏈可變域之比對展示於圖10中。

如上所述使嵌合體及13G9之型式1表現於293細胞中且純化。所得蛋白質之結合藉由FACS及斯卡查德分析(參見下文)來分析。13G9型式1(hu13G9.v1)與表現FcRH5之細胞的結合基本上等效於嵌合體，因此進一步使用型式1進行結合研究。

應注意人類化13G9之表現相對較低。鼠類13G9之構架序列與數個人類亞群共同序列之比較展示，相較於人類亞群III，13G9更接近地類似亞群VII及I。此表明儘管當13G9之CDR人類化至亞群III之構架時與FcRH5之親和力較高，但或許蛋白質摺疊並非最佳。因此，改變13G9型式1構架以提高與亞群VII之同源性而改良表現。型式1、型式3及型式8之重鏈可變域的比對展示於圖11中。產生如下取代：對於型式3(hu13G9.v3)，在構架中，V12K、V13K、V78A。在CDR H1中，亦產生取代M34I以改良堆疊。對於型式8(hu13G9.v8)，取代為L11V、V12K、V13K、L18V、R19K、L20V、K75V、V78A、N82I、N82aS、R83K及M34I。

2. IgG產生

將質體短暫轉染於293(腺病毒轉型之人類胚腎細胞株(Graham等人，*J. Gen. Virol.*, 36: 59-74 (1977)))中。特定言之，使293細胞在轉染前之日分裂，且塗佈於含血清培養基中。次日，添加以磷酸鈣沈澱物形式製備之雙股

DNA，繼而pAdVAntage™ DNA(Promega, Madison, WI)，且在37℃下培育細胞隔夜。於無血清培養基中培養細胞且4日之後收集。在蛋白質A管柱上自經轉染細胞上清液純化抗體蛋白質，且隨後緩衝液更換為10 mM丁二酸鈉、140 mM NaCl(pH 6.0)且使用Centricon-10(Amicon)濃縮。藉由N末端測序證實蛋白質之身分。藉由定量胺基酸分析測定蛋白質濃度。藉由FACS於SVT2細胞中如下所述測試抗體與人類FcRH5之結合。

3. 結合分析(FACS分析)

為測定FcRH5抗體之交叉反應性，使用FACS分析來分析IgG變異體與表現人類FcRH1-6之SVT2細胞的結合。

簡言之，在100 μl中將穩定表現標記gD之huFcRH1-6的SVT2細胞之10^6個細胞與1.0 μg鼠類或嵌合Ab[Mu抗gD(陽性對照物)、Mu抗FcRH5 (1H4)(「mu1H4」)、Mu抗FcRH5 (4D10)(「mu4D10」)、Mu抗FcRH5 (6H1)(「mu6H1」)、Mu抗FcRH5 (7D11)(「mu7D11」)、Ch抗FcRH5 (7D11)(「ch7D11」)、Mu抗FcRH5 (8H6)(「mu8H6」)、Mu抗FcRH5 (9E2)(「mu9E2」)或Mu抗FcRH5 (13G9)(「mu13G9」)]一起培育。將穩定表現空載體之SVT2細胞與相同抗體一起培育且用作陰性對照組。使用結合PE之大鼠抗$MuIgG_1$、大鼠抗$MuIgG_{2a+b}$或Mu抗HuIgG作為第二偵測抗體。結果展示於圖15中。所有測試抗體均特異性結合FcRH5，除了mu6H1，其與FcRH1交叉反應。藉由FACS分析可知，mu8H6為弱的但FcRH5特異性抗體。

為進一步測定小鼠FcRH5抗體之結合，使用FACS分析來分析IgG變異體與表現人類FcRH5之Raji細胞及表現獼猴FcRH5之293T細胞的結合。

簡言之，將約10^6個穩定轉染有人類FcRH5之Raji細胞及短暫轉染有標記gD的cyno FcRH5之293T細胞與1.0 μg經生物素標記小鼠同型對照物、經生物素標記mu抗gD、經生物素標記mu6H1、經生物素標記mu13G9或經生物素標記mu7D11在100 μl FACS緩衝液(PBS、0.5% BSA、0.05%疊氮化鈉)中一起培育。使用結合PE之抗生蛋白鏈菌素作為第二偵測試劑。結果展示於圖16及17中。

為對FcRH5抗體進一步進行FACS分析，每一百萬個細胞(穩定表現huFcRH5之BJAB細胞及穩定表現cynoFcRH5之SVT2細胞)滴定1.0 μg、0.1 μg或0.01 μg抗體。簡言之，在100 μl中將約10^6個細胞與每一百萬個細胞(穩定表現huFcRH5之BJAB細胞及穩定表現cynoFcRH5之SVT2細胞)變化量(1.0 μg、0.1 μg或0.01 μg)之鼠類Ab (mu1H4、mu4D10、mu6H1、mu7D11、mu9E2、mu10A8、mu10F5或mu13G9)一起培育。使用與每10^6個細胞1.0 μg之適當Mu IgG同型對照物一起培育作為陰性對照組。使用結合PE之大鼠抗$MuIgG_1$或大鼠抗$MuIgG_{2a+b}$作為第二偵測抗體。結果展示於圖18及19中。藉由FACS分析可知Mu抗FcRH5 (1H4)、Mu抗FcRH5 (6H1)、Mu抗FcRH5 (7D11)、Ms抗FcRH5 (10A8)、Mu抗FcRH5 (10F5)或Mu抗FcRH5 (13G9)與獼猴FcRH5交叉反應，且其可用於評定標靶依賴性毒性

之臨床前安全性研究。

4. 親和力測定(斯卡查德分析)

為進一步測定FcRH5鼠類抗體及IgG純系之結合，執行碘化IgG變異體與表現人類FcRH5之OPM2細胞及表現獼猴FcRH5之SVT2細胞之結合，即斯卡查德分析(表9A)。

對於斯卡查德分析，分別使0.5 nM標記I^{125}之鼠類或IgG純系抗FcRH5與範圍為50至0.02 nM(12步，1:2連續稀釋)之未標記鼠類或IgG純系抗FcRH5在穩定表現人類FcRH5之經轉染OPM2株及穩定表現獼猴FcRH5之經轉染SVT2株存在下競爭。在4℃下培育四小時之後，洗滌細胞且藉由γ計數器(1470 WIZARD自動γ計數器；Perkin Elmer, Walthem, MA)讀取細胞顆粒計數。所有點進行三次讀數，且計數10分鐘。使用平均CPM用New Ligand(Genentech, South San Francisco, CA)程式計算Kd。結果展示於表9A中。

表9A.斯卡查德分析測定之親和力測定值

細胞株	PUR/批號	Ab	**Kd(nM)**	**St.誤差**
BJAB.huFcRH5	48350-22	mu13G9	**0.13**	0.007
SVT2.cyFcRH5	48350-22	mu13G9	**0.54**	0.064
OPM2.huFcRH5	MM071207	ch13G9	**0.26**	0.017
SVT2.cyFcRH5	MM071207	ch13G9	**1.08**	0.091
OPM2.huFcRH5	PUR 16864	hu13G9.1a (hu13G9.v1)	**0.20**	0.012
SVT2.cyFcRH5	CA51434-50	hu13G9.1a (hu13G9.v1)	**0.56**	0.027
BJAB.huFcRH5	50095-53	mu6H1	**0.19**	0.007
SVT2.cyFcRH5	50095-93	mu6H1	**0.38**	0.027
OPM2.huFcRH5	CA51434-50	hu13G9.1b*	**0.30**	0.027
SVT2.cyFcRH5	CA51434-50	hu13G9.1b*	**0.53**	0.012

*hu13G9.1b與hu13G9.1a之不同之處在於hu13G9.1b在輕鏈位置87處用F替代Y(參見圖9)。

實例2：產生抗FcRH5抗體藥物結合物(ADC)

用於產生抗人類FcRH5之抗體藥物結合物(ADC)的藥物包括類美登素DM1及DM4及多拉司他汀10衍生物單甲基奧瑞他汀E(MMAE)及單甲基奧瑞他汀F(MMAF)。(參見2005年5月31日申請之US20050276812及2004年11月5日申請之US20050238649，兩者均以全文引用的方式併入本文中)。不同於MMAE、DM1及DM4，MMAF在中性pH值下具有相對的膜不可滲透性，因此作為自由態藥物具有相對較低活性，但其在細胞中之後極有效。(Doronina等人，*Bioconjug. Chem.*, 17:114-123 (2006))。DM1、DM4、MMAE及MMAF為有絲分裂抑制劑，其細胞毒性為化學治療法治療NHL所用之長春花生物鹼有絲分裂抑制劑的至少100倍(Doronina等人，*Bioconjug. Chem.*, 17:114-123 (2006)；Doronina等人，*Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003)；Erickson等人，*Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006))。用於產生ADC之連接子對於DM1為SMCC，對於DM4為SPDB，且對於MMAE及MMAF為MC或MC-vc-PAB。對於DM1及DM4，抗體經由離胺酸之ε-胺基使用穩定硫酯連接子SMCC(結合之後稱作MCC)連接於DM1及DM4。或者，對於DM4，抗體經由離胺酸之e-胺基使用SPDB連接子連接於DM4。經由SMCC連接子連接之DM1對還原條件下之裂解具有抗性。此外，SMCC-DM1及SPDB-DM4 ADC在ADC內化且靶向於溶酶體使得釋放離胺酸-N^{ε}-DM1時誘發細胞毒性，離胺酸-N^{ε}-DM1為細胞內之有效抗有絲分裂劑，且當

自細胞釋放時，離胺酸-N^{ε}-DM1無毒(Erickson等人，*Cancer Res.*, 66: 4426-4433 (2006))。對於MMAE及MMAF，抗體經由半胱胺酸藉由順丁烯二醯亞胺基己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(vc)-對胺基苯甲氧基羰基(MC-vc-PAB)連接於MMAE或MMAF。對於MMAF，替代地，抗體藉由順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)連接子經由半胱胺酸連接於MMAF。MC-vc-PAB連接子可由細胞間蛋白酶(諸如組織蛋白酶B)裂解，且當裂解時，釋放自由態藥物(Doronina等人，*Nat. Biotechnol.*, 21: 778-784 (2003))，而MC連接子對細胞內蛋白酶裂解具有抗性。

類似於2005年5月31日申請之美國申請案第11/141,344號所述的程序使用SMCC-DM1產生抗人類FcRH5的抗體藥物結合物(ADC)，該申請案以全文引用的方式併入本文中。將抗人類FcRH5純化抗體緩衝液更換為含有50 mM磷酸鉀及2 mM EDTA(pH 7.0)之溶液。將SMCC(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)溶解於二甲基乙醯胺(DMA)中且添加至抗體溶液中，使最終SMCC/Ab莫耳比為10:1。使反應在室溫下伴隨混合進行三小時。隨後在平衡於含150 mM NaCl及2 mM EDTA之35 mM檸檬酸鈉(pH 6.0)中的GE Healthcare HiTrap去鹽管柱(G-25)上純化經SMCC修飾之抗體。將溶解於DMA中之DM1添加至SMCC抗體製劑中，使DM1與抗體之莫耳比為10:1。使反應在室溫下伴隨混合進行4-20小時。用20體積PBS使經DM1修飾之抗體溶液透濾以移除未反應之DM1，無菌過濾且儲存在4℃下。通常，經由此方法使

抗體之產率達40-60%。如凝膠過濾及雷射光散射所評定，該製劑通常具有>95%單體。因為DM1在252 nm下具有最大吸光度，故結合於抗體之藥物量可藉由252 nm及280 nm下之差異吸光度測量值確定。通常，藥物與抗體之比率為3至4。

為產生每個Ab具有3-4個藥物之抗人類FcRH5 SPDB DM4抗體-藥物結合物，首先用SPDB[4-(2-吡啶基二硫基)丁酸-N-羥基丁二醯亞胺酯]修飾抗體以產生二硫基吡啶基。向抗體添加4-6倍莫耳過量之SPDB，且在室溫下反應90分鐘。在含50 mM NaCl、2 mM EDTA之50 mM磷酸鉀(pH 7)中在5-10 mg/ml之抗體濃度下進行反應。SPDB反應之後，添加乙醇至5% V/V之最終濃度，且添加相較於SPDB 1.7倍莫耳過量之含硫氫基DM4藥物。在室溫下培育16小時。藉由透濾、凝膠過濾或陽離子交換層析純化結合物。

類似於2004年11月5日申請之美國申請案第10/983,340號中所述之程序使用MC-val-cit(vc)-PAB-MMAE藥物連接子產生抗人類FcRH5之抗體藥物結合物(ADC)，該申請案以全文引用的方式併入本文中。將經純化之抗人類FcRH5抗體溶解於500 mM硼酸鈉及500 mM氯化鈉(pH 8.0)中，且進一步用過量100 MM二硫蘇糖醇(DTT)處理。在37℃下培育約30分鐘之後，藉由經葡聚糖凝膠G25樹脂溶離更換緩衝液，且用含1 mM DTPA之PBS溶離。藉由自溶液在280 nm下之吸光度測定經還原抗體濃度且藉由與DTNB(Aldrich,

Milwaukee, WI)反應及測定412 nm下之吸光度測定硫氫基濃度來檢驗硫氫基/Ab值。於冰上冰凍溶解於PBS中之經還原抗體。將於DMSO中之藥物連接子MC-val-cit(vc)-PAB-MMAE溶解於乙腈及水中，且添加至於PBS中之經冰凍還原之抗體中。培育1小時之後，添加過量順丁烯二醯亞胺以使反應淬滅，且將任何未反應之抗體硫氫基封端。藉由離心超濾濃縮反應混合物，且純化抗體藥物結合物且藉由經由G25樹脂用PBS溶離去鹽，經由0.2 μm過濾器在無菌條件下過濾，且冷凍以供儲存。

實例3：製備經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體

如本文所揭示製備經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體。可將半胱胺酸殘基添加至抗體之輕鏈、重鏈或Fc區中以使得可結合於各種藥物。在製備經半胱胺酸工程改造之抗FcRH5抗體13G9中，使編碼輕鏈之DNA突變誘發以如圖14所示用半胱胺酸取代Kabat位置205處之纈胺酸。使編碼重鏈之DNA突變誘發以如圖13所示用半胱胺酸取代重鏈中EU位置118(順序位置118，Kabat編號114)處之丙胺酸。可使抗FcRH5抗體之Fc區突變誘發以用半胱胺酸取代重鏈Fc區中EU位置400(順序位置400；Kabat編號396)處之絲胺酸。

實例4：使用鼠類抗FcRH5抗體藥物結合物進行活體內腫瘤細胞殺滅分析

A. 異種移植物

為測試各種抗FcRH5抗體之功效，使鼠類抗人類抗體結

合於DM1，且分析結合之變異體對小鼠腫瘤之作用。

特定言之，檢查抗體消退BJAB-螢光素酶細胞(穩定轉染有人類FcRH5之伯基特氏淋巴瘤細胞株)中腫瘤之能力。

將pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5轉染於BJAB-螢光素酶細胞中及嘌黴素(Calbiochem, San Diego, CA)選擇之後，將存活細胞FACS自動選殖以得到抗FcRH5抗體(7D11)之中級表現者(mid range expresser)。自動選殖後，藉由FACS分析使用抗FcRH5抗體(7D11)選擇如FACS所確定以最密切類似於漿細胞表現方式表現FcRH5之BJAB-螢光素酶細胞株。使用以相同方式轉染空載體pRK.CMV.PD.nbe之BJAB-螢光素酶作為陰性對照組。

為分析小鼠抗體之功效，經由注射於雌性CB17 ICR SCID小鼠(6-8週齡，來自Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)之側腹用2×10^7個BJAB-FcRH5細胞皮下接種CB17 ICR SCID小鼠，且使異種移植腫瘤生長至128 mm^3之平均值。除非下文特別表明，否則第0日係指腫瘤平均值為100-250 mm^3且投與治療之第一/或唯一劑量之日。腫瘤體積係基於兩個使用測徑規測得之尺寸計算，且根據下式用mm^3表示：$V=0.5a\times b^2$，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。將自各實驗組收集之數據表示為平均值±SE。用抗FcRH5 ADC或對照抗體-藥物結合物以每平方公尺小鼠400 μg之單次靜脈內(i.v.)劑量的連接抗體的藥物(對應於每公斤小鼠約8-10 mg ADC)處理每組具有8隻小鼠之組。整個實驗期間一週測量腫瘤兩次。整個實驗期間一週

測量小鼠之體重一次(一週兩次中之任一次)。在腫瘤體積達到2000 mm^3之前或當腫瘤展示即將發生潰瘍徵兆時使小鼠安樂死。所有動物方案均經實驗動物照護及使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee，IACUC)批准。

對於DM1，抗體與毒素之間所用之連接子為硫醚交聯劑SMCC。其他連接子可包括二硫基連接子SPP或硫醚交聯劑SMCC(對於DM1)或MC或MC-纈胺酸-瓜胺酸(vc)-PAB或具有順丁烯二醯亞胺組分及對胺基苯甲基胺甲醯基(PAB)自我犧牲組分的(纈胺酸-瓜胺酸(vc))二肽連接子試劑(對於單甲基奧瑞他汀E(MMAE)或單甲基奧瑞他汀F(MMAF))。所用毒素為DM1。其他毒素可包括MMAE或MMAF。

用於此實驗之抗體包括Chang等人，PCT/US2004/043514(WO 2005/063299，其以全文引用的方式併入本文中)中所述之mu7D11以及本文所述之抗FcRH5(參見實例1B，諸如mu 7D11, mu6H11、mu10A8、mu13G9及mu9E2)。

陰性對照物包括基於抗gp-120之結合物(SMCC-DM1)。

B. 結果

1. BJAB-FcRH5異種移植物

在使用所示藥物結合物及劑量之48日時程中，mu7D11、mu6H1、mu10A8、mu13G9及mu9E2 ADC相較於陰性對照物抗gp-120 SMCC-DM1展示抑制具有BJAB-FcRH5腫瘤之SCID小鼠中的腫瘤生長。對於所有ADC及對照物，在第0日及第7日以兩次劑量(如下表10所示)投與ADC。特

定言之，所有抗FcRH5 ADC均顯著抑制腫瘤生長(圖20)。

此外，在同一研究中，測定前17日中各劑量組中之體重變化百分比。結果(圖21)表明投與此等鼠類抗FcRH5 ADC並未在此期間引起顯著體重減少或重量減輕。

此外，在表10中表明測試總數中展示部分消退(PR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至第0日時所測量到之腫瘤體積的50%以下)、完全減輕(CR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至0 mm^3)之小鼠數目(NA=不適用)；(TI=研究結束時可觀察到之腫瘤數)。

表10

所投與之抗體(治療)	TI	PR	CR	藥物-DM1劑量 ($\mu g/m^2$)	Ab劑量 (mg/kg)	藥物比 (藥物/Ab)
Mu-抗gp120	8/8	0	0	--	10.8	--
Mu-抗gp120-mcc-dm1	8/8	0	0	400	8.4	3.2
Mu-抗FcRH5 (7D11)	8/8	0	0	--	10.8	--
Mu-抗FcRH5 (7D11)-mcc-dm1	8/8	0	0	400	9	3
Mu-抗FcRH5 (6H1)-mcc-dm1	6/8	1	2	400	10.8	2.5
Mu-抗FcRH5 (10A8)-mcc-dm1	7/8	3	1	400	10	2.7
Mu-抗FcRH5 (13G9)-mcc-dm1	7/8	0	1	400	8.4	3.2
Mu-抗FcRH5 (9E2)-mcc-dm1	8/8	2	0	400	10.4	2.6

實例5：小鼠抗FcRH5 Mab藥物結合物抑制活體內腫瘤生長之分析

A. 異種移植物

為測試具有-SPDB-DM4、SMCC-DM1、MC-vc-PAB-MMAE及MC-MMAF之mu13G9藥物結合物之功效，分析mu13G9藥物結合物對小鼠腫瘤之作用。

特定言之，檢查抗體消退穩定轉染有人類FcRH5之OPM2細胞(多發性骨髓瘤細胞株)中腫瘤之能力。

將線性化pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5轉染於OPM2細胞中及嘌黴素(Calbiochem, San Diego, CA)選擇之後，用標記生物素(Pierce Biotechnology, Rockford, Il)之抗FcRH5.7D11及MACS抗生物素微珠粒在MACS LS管柱(Miltenyi Biotec, Auburn, Ca)上分離存活細胞中表現FcRH5之細胞。分離後，藉由FACS分析使用抗FcRH5抗體(10A8)及(13G9)及以相同方式轉染空載體pRK.CMV.PD.nbe作為陰性對照組之OPM2細胞株證實FcRH5表現。

為分析具有SPDB-DM4、SMCC-DM1、MC-vc-PAB-MMAE及MC-MMAF之mu13G9藥物結合物之功效，經由注射於雌性CB17 ICR SCID小鼠(6-8週齡，來自Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)之側腹用2×10^7個OPM2-FcRH5細胞皮下接種CB17 ICR SCID小鼠，且使異種移植腫瘤生長至215 mm^3之平均值。除非下文特別表明，否則第0日係指腫瘤平均值為100-250 mm^3且投與治療之第一/或唯一劑量之日。腫瘤體積係基於兩個使用測徑規測得之尺寸計算，且根據下式用mm^3表示：$V=0.5a\times b^2$，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。將自各實驗組收集之數據表示為平均值±SE。用抗FcRH5 ADC或對照抗體-藥物結合物以每公斤10 mg之單次靜脈內(i.v.)劑量的ADC處理每組具有8隻小鼠之組。整個實驗期間一週測量腫瘤兩次。整個實驗期間一週測量小鼠之體重一次。在腫瘤體積達到

3000 mm^3之前或當腫瘤展示即將發生潰瘍徵兆時使小鼠安樂死。所有動物方案均經實驗動物照護及使用委員會(IACUC)批准。

陰性對照物包括基於抗gp-120之結合物(SPDB-DM4、SMCC-DM1、MC-vc-PAB-MMAE及MC-MMAF)。

B. 結果

1. OPM2-FcRH5異種移植物

在使用表11所示之藥物結合物及劑量的50日時程中，mu13G9 SPDB-DM4、SMCC-DM1、MC-vc-PAB-MMAE及MC-MMAF ADC相較於陰性對照物抗gp-120 SPDB-DM4、SMCC-DM1、MC-vc-PAB-MMAE及MC-MMAF ADC展示抑制具有OPM-FcRH5腫瘤之SCID小鼠中的腫瘤生長。對於所有ADC及對照物，在第0日及第7日以兩次劑量投與ADC。特定言之，所有抗FcRH5 ADC均顯著抑制腫瘤生長(圖22)。

此外，在同一研究中，測定前14日中各劑量組中之體重變化百分比。結果(圖23)表明投與此等鼠類抗FcRH5 ADC並未在此期間引起顯著體重減少或重量減輕。

此外，在表11中表明測試總數中展示部分消退(PR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至第0日時所測量到之腫瘤體積的50%以下)、完全減輕(CR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至0 mm^3)之小鼠數目(NA=不適用)；(TI=研究結束時可觀察到之腫瘤數)。

表 11.

所投與之抗體(治療)	TI	PR	CR	藥物-DM1 劑量 ($\mu g/m^2$)	Ab劑量 (mg/kg)	藥物比 (藥物 /Ab)
媒劑*	7/7	0	0	n/a	--	n/a
Mu-抗gp120-spdb-DM4	7/7	0	0	329	10	3.0
Mu-抗gp120-smcc-dm1	7/7	0	0	332	10	3.2
Mu-抗gp120-MC-MMAF	7/7	0	0	371	10	3.6
Mu-抗gp120-MCvcPAB-MMAE	7/7	0	0	293	10	2.9
Mu-抗FcRH5 (13G9)-spdb-DM4	5/6	5	1	362	10	3.3
Mu-抗FcRH5 (13G9)-smcc-dm1	7/7	0	0	363	10	3.5
Mu-抗FcRH5 (13G9)-MC-MMAF	7/7	0	0	360	10	3.5
Mu-抗FcRH5 (13G9)-MCvcPAB-MMAE	7/7	0	0	363	10	3.6

*媒劑=20 mM組胺酸乙酸鹽(pH 5.5)、240 mM蔗糖、0.02% PS20

實例6：抗FcRH5 Mab藥物結合物減少活體外細胞增殖之分析

藉由細胞增殖分析法用穩定表現人類FcRH5之經轉染OPM2株(OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP.2)測量mu13G9藥物結合物(包括mu抗FcRH5 (13G9)-裸、mu抗FcRH5 (13G9)-SMCC-DM1、mu抗FcRH5 (13G9)-SPDB-DM4、mu抗FcRH5 (13G9)-MC-vc-PAB-MMAE及mu抗FcRH5 (13G9)-MC-MMAF)之活體外效能。CellTiter-Glo®發光細胞存活率分析法為一種基於重組表現鞘翅目(Coleoptera)螢光素酶(US 5583024；US 5674713；US 5700670)之市售(Promega Corp., Madison, WI)均質分析方法。此細胞增殖分析法基於定量所存在之ATP(代謝活性細胞之指示)測定培養物中活細胞數(Crouch等人，J. Immunol. Metho., 160: 81-88 (1993)；US 6602677)。以96孔形式進行CellTiter-Glo®分析法，使其易於進行自動高通量篩選(HTS)(Cree等人，

AntiCancer Drugs, 6:398-404 (1995))。均質分析程序包括直接向培養於補充血清之培養基中的細胞添加單一試劑(CellTiter-Glo®試劑)。

均質「添加-混合-測量」形式引起細胞溶解且產生與所存在之ATP之量成正比的發光信號。受質(甲蟲(Beetle)螢光素)藉由重組螢火蟲螢光素酶氧化去羧基化，同時伴有ATP轉化為AMP且產生光子。活細胞以相對發光單位(RLU)反映。可藉由光度計或CCD相機成像裝置記錄數據。發光輸出以RLU呈現，且隨時間測量。%RLU為相較於「非藥物結合物」對照組校正之RLU百分比。或者，可在閃爍體存在下在閃爍計數器中計數發光中之光子。隨後光單位可表示為CPS(每秒計數)。

藉由細胞增殖分析法，採用自CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical bulletin TB288；Mendoza等人，Cancer Res., 62: 5485-5488 (2002)修改之以下方案測量人類化抗體-藥物結合物之功效：

1. 將培養基中含有約75,000個OPM2.CMV.PD.FcRH5.SP.2細胞的50 μl份之細胞培養物沈積於96孔不透明壁板之各孔中。

2. 將mu13G9 Ab或ADC(50 μl)添加至三個實驗孔中達10000、3333、1111、370、123、41、14、4.6或1.5 ng/mL之最終濃度，其中「非藥物結合物」對照孔接受單獨之培養基，且培育3日。

3. 將培養板平衡至室溫歷時約30分鐘。

4. 添加CellTiter-Glo試劑(100 μl)。

5. 在迴轉式震盪器上混合內容物2分鐘以誘發細胞溶解。

6. 在室溫下培育培養板10分鐘以穩定發光信號。

7. 記錄發光且在曲線中以%RLU(相對發光單位)為單位報導。

8. 作為對照組，同時用不相關非結合小鼠抗GP120 Ab或ADC(包括mu抗GP120-裸、mu抗GP120-SMCC-DM1、mu抗GP120-SPDB-DM4、mu抗GP120-MC-vc-PAB-MMAE及mu抗GP120-MC-MMAF)對相同細胞株進行試驗。

培養基：使OPM2.CMV.PS.FcRH5.SP.2細胞在RPMI1640/20%FBS/2 mM麩醯胺酸/1.0 μg/ml嘌黴素中生長。

小鼠抗體-藥物結合物之功效展示於圖24-25中。此分析結果以IC_{50}值用mg/ml為單位加以說明。IC_{50}值為抗體或ADC 50%抑制細胞生長所需之濃度。

認為以上書面說明足以使得熟習此項技術者可實踐本發明。本發明之範疇並不限於所寄存之構築體，因為所寄存之實施例僅欲作為本發明之某些態樣的單一說明，且功能等效之任何構築體均屬於本發明之範疇內。本文所寄存之材料並非承認本文含有之書面說明不足以使得可實踐本發明之任何態樣，包括其最佳方式，亦不應視為將申請專利範圍之範疇限於其所代表之特定說明。實際上，熟習此項技術者由上述描述顯而易見除本文所示及所述之外的本發

明之各種修改且屬於隨附申請專利範圍之範疇內。

實例7：人類化抗FcRH5藥物結合物及Velcade®抑制活體內腫瘤生長之分析

A. 異種移植物

為測試具有MC-vc-PAB-MMAE之人類化(13G9)藥物結合物與Velcade®(硼替佐米)之組合的功效，分析單獨之結合抗體及結合抗體與Velcade®之組合對小鼠腫瘤(多發性骨髓瘤OPM2-FcRH5異種移植物)之作用。

特定言之，檢查抗體及Velcade®消退穩定轉染有人類FcRH5之OPM2細胞(多發性骨髓瘤細胞株)中腫瘤之能力。將線性化pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5轉染於OPM2細胞中及嘌黴素(Calbiochem, San Diego, CA)選擇之後，用標記生物素(Pierce Biotechnology, Rockford, Il)之抗FcRH5.7D11及MACS抗生物素微珠粒在MACS LS管柱(Miltenyi Biotec, Auburn, Ca)上分離存活細胞中表現FcRH5之細胞。分離後，藉由FACS分析使用抗FcRH5抗體(13G9)及以相同方式轉染空載體pRK.CMV.PD.nbe作為陰性對照組之OPM2細胞株證實FcRH5表現。

為分析單獨之與MC-vc-PAB-MMAE結合之hu抗FcRH5 13G9及該抗體與Velcade®之組合的功效，經由注射於雌性CB17 ICR SCID小鼠(6-8週齡，來自Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)之側腹用2×10^7個OPM2-FcRH5細胞皮下接種CB17 ICR SCID小鼠，且使異種移植腫瘤生長至331 mm^3之平均值。除非另外表明，否則第0日係指腫

瘤為172-511 mm^3且投與治療之第一/或唯一劑量之日。腫瘤體積係基於兩個使用測徑規測得之尺寸計算，且根據下式用mm^3表示：$V=0.5a\times b^2$，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。將自各實驗組收集之數據表示為平均值+SE。將小鼠隨機分為九組(每組具有約9隻小鼠)且進行給藥。第1組在第0日接受單次靜脈內(IV)注射組胺酸緩衝液，且在第0日、第3日、第7日及第10日每週兩次靜脈內注射0.9%氯化鈉(生理食鹽水)歷時兩週作為媒劑對照組。第2組在第0日接受單次靜脈內注射10 mg/kg Hu抗Her2曲妥珠單抗-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1135)作為結合物對照組。第3組在第0日、第3日、第7日及第10日每週兩次接受靜脈內注射1 mg/kg Velcade®歷時兩週。第4-5組在第0日分別接受單次靜脈內注射4 mg/kg或10 mg/kg thio hu抗FcRH5(13G9)-HC-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1465)。第6-7組在第0日分別接受單次靜脈內注射4 mg/kg或10 mg/kg hu抗FcRH5(13G9)-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1575)。第8組在第0日接受單次靜脈內注射4 mg/kg hu抗FcRH5(13G9)-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1575)，且在第0日、第3日、第7日及第10日每週兩次靜脈內注射1 mg/kg Velcade®歷時兩週。整個實驗期間一週測量腫瘤兩次。前三週一週測量小鼠體重兩次。在腫瘤體積達到3000 mm^3之前或當腫瘤展示即將發生潰瘍徵兆時使小鼠安樂死。所有動物方案均經實驗動物照護及使用委員會(IACUC)批准。

陰性對照物包括基於抗HER2(HERCEPTIN®)(曲妥珠單

抗)之結合物(MC-vc-PAB-MMAE)。

B. 結果

1. OPM2-FcRH5異種移植物

在使用單獨之藥物結合物及藥物結合物與Velcade®之組合的研究結束時，與MC-vc-PAB-MMAE結合之hu13G9與Velcade®之組合相較於陰性對照物與MC-vc-PAB-MMAE結合之人類化抗Her2(Hu抗Her2曲妥珠單抗-MC-vc-PAB-MMAE)經分析抑制具有OPM2-FcRH5腫瘤之SCID小鼠中的腫瘤生長。此外，測定前24日中各劑量組中之任何體重變化百分比。亦測定了測試總數中展示部分消退(PR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至第0日時所測量到之腫瘤體積之50%以下)、完全減輕(CR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至0 mm^3)之小鼠數目(NA=不適用)；(TI=研究結束時可觀察到之腫瘤數)。

實例9：人類化抗FcRH5藥物結合物抑制活體內腫瘤生長之分析

A. 異種移植物

為測試具有SPDB-DM4之人類化(13G9)藥物結合物與Velcade®之組合的功效，分析單獨之結合抗體及結合抗體與Velcade®之組合對小鼠腫瘤(多發性骨髓瘤OPM2-FcRH5異種移植物)的作用。

特定言之，檢查抗體及Velcade®消退穩定轉染有人類FcRH5之OPM2細胞(多發性骨髓瘤細胞株)中腫瘤之能力。將線性化pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5轉染於OPM2細胞中及嘌

徵素(Calbiochem, San Diego, CA)選擇之後，用標記生物素(Pierce Biotechnology, Rockford, Il)之抗FcRH5.7D11及MACS抗生物素微珠粒在MACS LS管柱(Miltenyi Biotec, Auburn, Ca)上分離存活細胞中表現FcRH5之細胞。分離後，藉由FACS分析使用抗FcRH5抗體(13G9)及以相同方式轉染空載體pRK.CMV.PD.nbe作為陰性對照組之OPM2細胞株證實FcRH5表現。

為分析單獨之結合於-SPDB-DM4之Hu抗FcRH5 13G9及該抗體與Velcade®之組合的功效，經由注射於雌性CB17 ICR SCID小鼠(6-8週齡，來自Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)之側腹用2×10^7個OPM2-FcRH5細胞皮下接種CB17 ICR SCID小鼠，且使異種移植腫瘤生長至306 mm^3之平均值。除非另外表明，否則第0日係指腫瘤為197-499 mm^3且投與治療之第一/或唯一劑量之日。腫瘤體積係基於兩個使用測徑規測得之尺寸計算，且根據下式用mm^3表示：$V=0.5a\times b^2$，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。將自各實驗組收集之數據表示為平均值+SE。將小鼠隨機分為六組(每組具有約9隻小鼠)且進行給藥。第1組在第0日、第3日、第7日及第10日每週兩次接受靜脈內(IV)注射1 mg/kg Velcade®歷時兩週。第2組在第0日接受單次靜脈內注射組胺酸緩衝液，且在第0日、第3日、第7日及第10日每週兩次靜脈內注射0.9%氯化鈉(生理食鹽水)歷時兩週作為媒劑對照組。第3組在第0日接受單次靜脈內注射4 mg/kg Hu抗Her2曲妥珠單抗-SPDB-DM4(CNJ 1433)作為

結合物對照組。第4組在第0日接受單次靜脈內注射4 mg/kg Hu抗FcRH5 13G9 SPDB-DM4(CNJ 1503)。第5組在第0日接受單次靜脈內注射4 mg/kg Hu抗Her2曲妥珠單抗-SPDB-DM4(CNJ 1433)，且在第0日、第3日、第7日及第10日每週兩次靜脈內注射1 mg/kg Velcade®歷時兩週。第6組在第0日接受單次靜脈內注射4 mg/kg Hu抗FcRH5 13G9 SPDB-DM4(CNJ 1503)，且在第0日、第3日、第7日及第10日每週兩次靜脈內注射1 mg/kg Velcade®歷時兩週。整個實驗期間一週測量腫瘤兩次。前三週一週測量小鼠體重兩次。在腫瘤體積達到3000 mm^3之前或當腫瘤展示即將發生潰瘍徵兆時使小鼠安樂死。所有動物方案均經實驗動物照護及使用委員會(IACUC)批准。

陰性對照物包括基於抗HER2(HERCEPTIN®)(曲妥珠單抗)之結合物(SPDB-DM4)。

B. 結果

1. OPM2-FcRH5異種移植物

在使用單獨之藥物結合物及藥物結合物與Velcade®之組合的研究結束時，與-SPDB-DM4結合之人類化抗FcRH5(13G9)與Velcade®之組合相較於陰性對照物與SPDB-DM4結合之人類化抗Her2(Hu抗Her2曲妥珠單抗-SPDB-DM4)經分析抑制具有OPM2-FcRH5腫瘤之SCID小鼠腫瘤生長。此外，測定前21日中各劑量組中之體重變化百分比。亦測定測試總數中展示部分消退(PR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至第0日時所測量到之腫瘤體積的50%以下)、

完全減輕(CR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至0 mm^3)之小鼠數目(NA=不適用)；(TI=研究結束時可觀察到之腫瘤數)。

實例10：人類化抗FcRH5藥物結合物抑制活體內腫瘤生長之分析

A. 異種移植物

為測試具有-MC-vc-PAB-MMAE之人類化(13G9)藥物結合物與Revlimid®及Revlimid®加上地塞米松之組合的功效，分析結合之抗體與Revlimid®及Revlimid®加上地塞米松之組合對小鼠腫瘤(多發性骨髓瘤OPM2-FcRH5異種移植物)的作用。

特定言之，檢查抗體與Revlimid®及Revlimid®加上地塞米松之組合消退穩定轉染有人類FcRH5之OPM2細胞(多發性骨髓瘤細胞株)中腫瘤之能力。將線性化pRK.CMV.PD.nbe.FcRH5轉染於OPM2細胞中及嘌黴素(Calbiochem, San Diego, CA)選擇之後，用標記生物素(Pierce Biotechnology, Rockford, Il)之抗FcRH5.7D11及MACS抗生物素微珠粒在MACS LS管柱(Miltenyi Biotec, Auburn, Ca)上分離存活細胞中表現FcRH5之細胞。分離後，藉由FACS分析使用抗FcRH5抗體(13G9)及以相同方式轉染空載體pRK.CMV.PD.nbe作為陰性對照組之OPM2細胞株證實FcRH5表現。

為分析結合於-MC-vc-PAB-MMAE之Hu抗FcRH5 13G9與Revlimid®及Revlimid®加上地塞米松之組合的功效，經由

注射於雌性CB17 ICR SCID小鼠(6-8週齡，來自Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)之側腹用2×10^7個OPM2-FcRH5細胞皮下接種CB17 ICR SCID小鼠，且使異種移植腫瘤生長至446 mm^3之平均值。除非另外表明，否則第0日係指腫瘤為263-630 mm^3且投與治療之第一/或唯一劑量之日。腫瘤體積係基於兩個使用測徑規測得之尺寸計算，且根據下式用mm^3表示：$V=0.5a\times b^2$，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。將自各實驗組收集之數據表示為平均值+SE。將小鼠隨機分為九組(每組具有約8隻小鼠)且進行給藥。第1組在第0日-第13日每日接受腹膜內(IP)注射DMSO與MCT緩衝液之混合物作為媒劑對照組。第2組在第0日接受單次靜脈內(IV)注射6 mg/kg Hu抗Her2曲妥珠單抗-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1135)作為結合物對照組。第3組在第0日接受單次靜脈內注射6 mg/kg Hu抗FcRH5 13G9-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1672)作為結合物對照組。第4組在第0日-第13日每日接受腹膜內注射50 mg/kg Revlimid®。第5組在第0日-第3日及第7日-第10日每日接受經口(PO)給與3 mg/kg地塞米松歷時四日繼而停藥三日歷時兩個循環。第6組在第0日-第13日每日接受腹膜內注射50 mg/kg Revlimid®，且在第0日-第3日及第7日-第10日每日經口給與3 mg/kg地塞米松歷時四日繼而停藥三日歷時兩個循環。第7組在第0日接受單次靜脈內注射6 mg/kg Hu抗Her2曲妥珠單抗-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1135)，且在第0日-第13日每日腹膜內注射50 mg/kg Revlimid®，且在第0日-第3

日及第7日-第10日每日經口給與3 mg/kg地塞米松歷時四日繼而停藥三日歷時兩個循環。第8組在第0日接受單次靜脈內注射6 mg/kg Hu抗FcRH5 13G9-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1672)，且在第0日-第13日每日腹膜內注射50 mg/kg Revlimid®，且在第0日-第3日及第7日-第10日每日經口給與3 mg/kg地塞米松歷時四日繼而停藥三日歷時兩個循環。第9組在第0日接受單次靜脈內注射6 mg/kg Hu抗FcRH5 13G9-MC-vc-PAB-MMAE(CNJ 1672)，且在第0日-第13日每日腹膜內注射50 mg/kg Revlimid®。整個實驗期間一週測量腫瘤兩次。整個實驗期間一週測量小鼠體重兩次。若小鼠體重相較於其第0日之體重減輕15%以上，則每日稱量小鼠直至重量恢復或直至體重減輕達到20%以上。當小鼠體重相較於其第0日之體重減輕達到20%以上時，在腫瘤體積達到3000 mm^3之前或當腫瘤展示即將發生潰瘍之徵兆時使小鼠安樂死。所有動物方案均經實驗動物照護及使用委員會(IACUC)批准。

陰性對照物包括基於抗HER2(HERCEPTIN®)(曲妥珠單抗)之結合物(MC-vc-PAB-MMAE)。

B. 結果

1. OPM2-FcRH5異種移植物

在使用藥物結合物與Revlimid®及Revlimid®加上地塞米松之組合的研究結束時，與-MC-vc-PAB-MMAE結合之人類化抗FcRH5 (13G9)結合物與Revlimid®及Revlimid®加上地塞米松之組合相較於陰性對照物與-MC-vc-PAB-MMAE

結合之人類化抗HER2(Hu抗Her2曲妥珠單抗-MC-vc-PAB-MMAE)經分析抑制具有OPM2-FcRH5腫瘤之SCID小鼠中的腫瘤生長。此外，測定前17日中各劑量組中之體重變化百分比。亦測定測試總數中展示部分消退(PR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至第0日時所測量到之腫瘤體積的50%以下)、完全減輕(CR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至0 mm^3)之小鼠數目(NA=不適用)；(TI=研究結束時可觀察到之腫瘤數)。

實例11：FcRH5雙特異性抗體之產生及表徵

構築及產生抗CD3/FcRH5雙特異性抗體。構築FcRH5雙特異性抗體(特定而言抗CD3/FcRH5腔內突起雙特異性抗體)如下所述。

先前已描述各種腔內突起雙特異性抗體。例如參見美國專利第5,731,168號及第7,183,076號；Ridgway等人，Prot. Eng. 9:617-621 (1996)；Atwell等人，J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997)；Merchant等人，Nat. Biotechn. 16:677-681 (1998)。在某些情況下，將先前由Chamow等人，**J. Immunol. 153**:4268 (1994)所述之人類化抗CD3/CD4-IgG嵌合體之間的C_H3界面工程改造以使可自共轉染有表現構築體之哺乳動物細胞株回收的雜多聚體的百分比最大化。如本文所用之「雜多聚體」係指包含至少第一多肽及第二多肽之分子(例如雙特異性抗體)，其中第二多肽與第一多肽的胺基酸序列的至少一個胺基酸殘基不同。

如前段所引用之文件所述，用於驅使雜多聚體形成之策

略需要向第一多肽引入一或多個「突起」突變，例如一個抗體H鏈之C_H3域，且向第二多肽引入一或多個相應「空腔」突變，例如第二抗體H鏈之C_H3域。「突起」突變用較大胺基酸置換小胺基酸，且「空腔」突變用較小胺基酸置換大胺基酸。此外，除突起及空腔突變以外，亦在兩個多肽之界面(例如兩個C_H3域)處引入含游離硫氫基之殘基，該等殘基展示可促進雜多聚體形成。已描述在多肽界面處引入之各種例示性腔內突起突變及含游離硫氫基之殘基。例如參見美國專利第5,731,168號及第7,183,076號；Ridgway等人，Prot. Eng. 9:617-621 (1996)；Atwell等人，J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997)；Merchant等人，Nat. Biotechn. 16:677-681 (1998)。

進行以下步驟以產生抗CD3/FcRH5雙特異性抗體。構築編碼鼠類抗CD3單株Ab UCHT1之人類化抗CD3輕(L)鏈及重(H)鏈變異體的大腸桿菌表現質體(美國專利第5,821,337號及第6,407,213號；Shalaby等人，*J. Exp. Med.* **175**: 217 [1992]及Rodrigues等人，*Int. J. Cancer (增刊)***7**: 45 [1992])。此項技術中已知多種適合之大腸桿菌表現質體，包括pAK19。Carter等人，Bio/Tehcnology 10:163-167 (1992)。舉例而言，藉由定點突變誘發進行向人類化抗CD3 H鏈之C_H3域(如上所述)中引入突起或空腔的突變。各種定點突變誘發方法為此項技術中所熟知。例如參見Kunkel等人，Methods Enzymol. 154:367-382 (1987)。另外，構築編碼人類化抗FcRH5輕鏈及重鏈(諸如本文所述之

人類化抗FcRH5輕鏈及重鏈)之大腸桿菌表現質體。舉例而言，藉由定點突變誘發進行在人類化抗FcRH5 H鏈之C_H3域(如上所述)中引入相應空腔(若抗CD3 C_H3域具有突起突變)或相應突起(若抗CD3 C_H3域具有空腔突變)之突變。

藉由使用此項技術中熟知之方法將上述大腸桿菌表現質體轉型於適當大腸桿菌菌株(例如33B6)中產生雙特異性抗CD3/FcRH5抗體。例如參見Rodrigues等人，Cancer Res. 55:63-70 (1995)。由在前述10 L醱酵罐中生長之經轉型大腸桿菌分泌抗體。Carter等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992)。使用此項技術中已知之程序純化且分析抗體。例如參見Atwell等人，J. Mol. Biol. 270:26-35 (1997)。

細胞結合分析：為評定抗CD3/FcRH5雙特異性抗體結合B細胞及T細胞之能力，使用聚蔗糖梯度根據此項技術中已知之標準程序自健康供者之全血分離人類周邊白血球。將約1百萬個細胞與抗CD3/FcRH5雙特異性抗體一起在冰上於含有0.5% BSA及2mM EDTA之PBS溶液的緩衝液中培育。隨後洗滌細胞，且根據製造商之方案(BD Biosciences, San Diego, CA)用結合FITC之山羊$(Fab')_2$抗人類IgG以及抗CD8-APC及抗CD138-PE及抗CD38-PerCP-Cy5抗體染色。用基於FACS之分析法，使用FACSCalibur™流式細胞儀(BD Biosciences, San Diego, CA)評定結合活性，且使用Flowjo軟體(Tree Star, Ashland, OR)進行分析。

活體外細胞殺滅分析：使用EJM-FcRH5.LSP.2多發性骨髓瘤細胞(EJM細胞，DSMZ ACC-560，穩定轉染有人類

FcRH5)作為標靶細胞，且與全人類周邊白血球或CD8+ T細胞共培養。若使用CD8+ T細胞，則自人類PBMC藉由陰性分選使用CD8+ T細胞分離套組(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)在96孔圓底板中純化CD8+ T細胞。在有或無抗CD3/FcRH5雙特異性抗體的情況下，每孔添加20,000個EJM-FcRH5.LSP.2細胞，其中標靶:效應細胞之比率=1:10。約19小時之後，根據製造商之方案(BD Biosciences, San Diego, CA)將細胞用經標記抗CD38-FITC及抗CD138-PE染色，且與Fluoresbrite® 校準級6.0微米YG微球體(Polysciences, Inc., Warrington, PA)混合。藉由閘控前散射/側散射及CD38-CD138染色進行FACS分析。根據標準程序使用碘化丙錠染色去除死細胞。根據以下等式計算抗CD3/FcRH5雙特異性抗體之特異性殺滅活性：特異性殺滅%=(1-經處理活EJM-FCRH5.LSP.2細胞數/無抗CD3/FcRH5雙特異性抗體的情況下效應細胞及EJM-FCRH5.LSP.2中活EJM-FCRH5.LSP.2細胞數)×100。

活體內功效：將EJM-FcRH5.LSP.2多發性骨髓瘤細胞與周邊血液單核細胞混合，且皮下注射於雌性NOD.CD17-*Prkdc*^{scid}/J小鼠(Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA)之右胸側。隨後將經接種小鼠隨機分成對照組及處理組。向對照組投與媒劑或抗CD3/Her2對照雙特異性抗體。向處理組投與抗CD3/FcRH5雙特異性抗體。雙特異性抗體之投與範圍為0.01 mg/kg至10 mg/kg。細胞接種後1-2小時內靜脈內投與對照組或處理組，且每日重複，連續5日。

使用測徑規一週兩次測量腫瘤之兩個尺寸(長度及寬度)。一週兩次臨床上監測小鼠。在實驗結束時，將用對照物處理之動物與用抗CD3/FcRH5雙特異性抗體處理之動物的腫瘤尺寸進行比較以評定抗CD3/FcRH5雙特異性抗體處理之功效。

實例12：人類化抗FcRH5藥物結合物抑制活體內腫瘤生長之分析

A. 異種移植物

為測試不同劑量之具有MC-vc-PAB-MMAE之hu13G9 藥物結合物的功效，分析結合之抗體對小鼠腫瘤之作用。

特定言之，檢查抗體消退穩定轉染有人類FcRH5之EJM細胞(多發性骨髓瘤細胞株)中腫瘤之能力。

EJM(ACC-560)細胞為獲自DSMZ(Germany)之市售人類多發性骨髓瘤細胞株。因為EJM細胞並不內源表現FcRH5，故用人類FcRH5穩定轉染EJM細胞，得到EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP.2細胞株。

為分析具有MC-vc-PAB-MMAE之hu13G9藥物結合物之功效，經由注射於雌性CB17 ICR SCID小鼠(6-8週齡，來自Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)之側腹用2×10^7個EJM2-FcRH5.LSP.2細胞皮下接種CB17 ICR SCID小鼠，且使異種移植腫瘤生長至134 mm^3之平均值。除非另外表明，否則第0日係指腫瘤平均值為100-250 mm^3且投與治療之第一/或唯一劑量之日。腫瘤體積係基於兩個使用測徑規測得之尺寸計算，且根據下式用mm^3表示：

$V=0.5a\times b^2$，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。將自各實驗組收集之數據表示為平均值±SE。用抗FcRH5 ADC或對照抗體-藥物結合物(ADC)以範圍為每公斤約1 mg至約8 mg之單次靜脈內(i.v.)劑量的ADC處理每組具有隻小鼠之組。整個實驗期間一週測量腫瘤兩次。一週測量小鼠之體重一次歷時2週。在腫瘤體積達到3000 mm^3之前或當腫瘤展示即將發生潰瘍徵兆時使小鼠安樂死。陰性對照物包括基於抗HER2(HERCEPTIN®)(曲妥珠單抗)之結合物(MC-vc-PAB-MMAE)。

B. 結果

1. EJM-FcRH5.LSP.2異種移植物

在實驗結束時，將用對照物處理之動物與用抗FcRH5 ADC處理之動物的腫瘤尺寸進行比較以評定抗FcRH5 ADC療法之功效。特定言之，亦測定測試總數中展示部分消退(PR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至第0日時所測量到之腫瘤體積的50%以下)、完全減輕(CR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至0 mm^3)之小鼠數目(NA=不適用)；(TI=研究結束時可觀察到之腫瘤數)。

實例13：人類化抗FcRH5藥物結合物抑制活體內腫瘤生長之分析

A. 異種移植物

為測試不同劑量之具有SPDB-DM4之hu13G9藥物結合物之功效，分析結合之抗體對小鼠腫瘤之作用。

特定言之，檢查抗體消退穩定轉染有人類FcRH5之EJM

細胞(多發性骨髓瘤細胞株)中腫瘤之能力。

EJM(ACC-560)細胞為獲自DSMZ(Germany)之市售人類多發性骨髓瘤細胞株。因為EJM細胞並不內源表現FcRH5，故用人類FcRH5穩定轉染EJM細胞，得到EJM.CMV.PD.FcRH5.LSP.2細胞株。

為分析具有SPDB-DM4之hu13G9藥物結合物之功效，經由注射於雌性CB17 ICR SCID小鼠(6-8週齡，來自Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA)之側腹用2×10^7個EJM2-FcRH5.LSP.2細胞皮下接種CB17 ICR SCID小鼠，且使異種移植腫瘤生長至134 mm^3之平均值。除非另外表明，否則第0日係指腫瘤平均值為100-250 mm^3且投與治療之第一/或唯一劑量之日。腫瘤體積係基於兩個使用測徑規測得之尺寸計算，且根據下式用mm^3表示：$V=0.5a\times b^2$，其中a及b分別為腫瘤之長直徑及短直徑。自各實驗組收集之數據表示為平均值±SE。用抗FcRH5 ADC或對照抗體-藥物結合物(ADC)以範圍為每公斤約2 mg至約8 mg之單次靜脈內(i.v.)劑量的ADC處理每組具有 隻小鼠之組。整個實驗期間一週測量腫瘤兩次。一週測量小鼠之體重一次歷時2週。在腫瘤體積達到3000 mm^3之前或當腫瘤展示即將發生潰瘍徵兆時使小鼠安樂死。陰性對照物包括基於抗HER2(HERCEPTIN®)(曲妥珠單抗)之結合物(SPDB-DM4)。

B. 結果

1. EJM-FcRH5.LSP.2異種移植物

在實驗結束時，將用對照物處理之動物與用抗FcRH5

ADC處理之動物的腫瘤尺寸進行比較以評定抗FcRH5 ADC療法之功效。特定言之，亦測定測試總數中展示部分消退(PR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至第0日時所測量到之腫瘤體積的50%以下)、完全減輕(CR；其中投藥之後任何時間的腫瘤體積降至0 mm^3)之小鼠數目(NA=不適用)；(TI=研究結束時可觀察到之腫瘤數)。

認為以上書面說明足以使得熟習此項技術者可實踐本發明。本發明之範疇並不限於所寄存之構築體，因為所寄存之實施例僅欲作為本發明之某些態樣的單一說明，且功能等效之任何構築體均屬於本發明之範疇內。本文所寄存之材料並非承認本文含有之書面說明不足以使得可實踐本發明之任何態樣，包括其最佳方式，亦不應視為將申請專利範圍之範疇限於其所代表之特定說明。實際上，除本文所示及所述之外的本發明之各種修改應對於熟習此項技術者由上述描述顯而易見且屬於隨附申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖1描述嵌合抗人類FcRH5 7D11輕鏈(DNA)；

圖2描述嵌合抗人類FcRH5 7D11輕鏈(胺基酸)；

圖3描述嵌合抗人類FcRH5 7D11重鏈(DNA)；

圖4描述嵌合抗人類FcRH5 7D11重鏈(胺基酸)；

圖5描述嵌合抗人類FcRH5(mAb13G9)輕鏈(DNA)(SEQ ID NO: 52)；

圖6描述嵌合抗人類FcRH5(mAb13G9)輕鏈(胺基酸)(SEQ ID NO: 53)；

圖7描述嵌合抗人類FcRH5(mAb13G9)重鏈(DNA)(SEQ ID NO: 54)；

圖8描述嵌合抗人類FcRH5(mAb13G9)重鏈(胺基酸)(SEQ ID NO: 55)；

圖9展示鼠類13G9之可變輕鏈(SEQ ID NO: 18)與人類化13G9v1之可變輕鏈(SEQ ID NO: 19)的比對。圖9揭示SEQ ID NO: 56之「人類k1」序列；

圖10展示鼠類13G9之可變重鏈(SEQ ID NO: 20)與人類化13G9v1之可變重鏈(SEQ ID NO: 21)之比對。圖10揭示SEQ ID NO: 58之「人類III」序列；

圖11描述人類化13G9v1之可變重鏈(SEQ ID NO: 21)、人類化13G9v3之可變重鏈(SEQ ID NO: 22)及人類化13G9v8之可變重鏈(SEQ ID NO：23)之比對；

圖12展示本發明抗體(hu13G9 v1)之胺基酸序列。圖12按出現之次序分別揭示SEQ ID NO 24-42；

圖13展示本發明之thio-Mab的經半胱胺酸工程改造多肽鏈的胺基酸序列。圖13按出現之次序分別揭示SEQ ID NO 59及60；

圖14展示本發明之thio-Mab的經半胱胺酸工程改造多肽鏈的胺基酸序列。圖14按出現之次序分別揭示SEQ ID NO 61及62；

圖15展示FcRH5抗體之交叉反應性；

圖16展示FcRH5抗體之交叉反應性；

圖17展示FcRH5抗體之交叉反應性；

圖18展示FcRH5抗體滴定；

圖19展示FcRH5抗體滴定；

圖20展示本發明之抗體對平均腫瘤體積之作用；

圖21展示本發明之抗體對平均體重之作用；

圖22展示本發明之抗體對平均腫瘤體積之作用；

圖23展示本發明之抗體對平均體重之作用；

圖24展示單一化合物劑量反應分析；

圖25展示單一化合物劑量反應分析；

圖26展示PRO820 cDNA之核苷酸序列(SEQ ID NO: 63)，其中SEQ ID NO: 63為本文中稱作「DNA56041-1416」(本文中亦稱作「FcRH5」)之純系。該核苷酸序列編碼FcRH5，其中起始及終止密碼子以粗體展示且加有下劃線。(參見Goddard等人美國專利第7491529號)；

圖27展示源自圖26所示之SEQ ID NO: 63之編碼序列的胺基酸序列(SEQ ID NO: 64)。(參見Goddard等人美國專利第7491529號)；

圖28A-B展示PRO52387 cDNA之核苷酸序列(SEQ ID NO : 65)，其中SEQ ID NO : 65為本文中稱作「DNA257845」(本文中亦稱作「FcRH5」)之純系。該核苷酸序列編碼FcRH5，其中起始及終止密碼子以粗體展示且加有下劃線(參見Chang等人美國公開專利申請案第20060251662號)；

圖29展示源自圖28A-B所示之SEQ ID NO: 65之編碼序列的胺基酸序列(SEQ ID NO: 66)(參見Chang等人美國公開專利申請案第20060251662號)；

圖30展示PRO314992 cDNA之核苷酸序列(SEQ ID NO:67)，其中SEQ ID NO: 67為來自獼猴之本文中稱作「DNA676969」(本文中亦稱作「cyno FcRH5」)之純系；及

圖31展示源自圖30所示之SEQ ID NO: 67之編碼序列的胺基酸序列(SEQ ID NO: 68)。

序　列　表

<110> 美商建南德克公司

<120> 抗-FcRH5 抗體及免疫結合物及其使用方法

<130> GNE-0351

<140> 099109950
<141> 2010-03-31

<150> 61/166,214
<151> 2009-04-02

<150> 61/211,754
<151> 2009-04-01

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 53
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 1

Met	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	Val	Val
1				5				10					15		

Ile	Val	Gly	His	Gly	Val	Arg	Gly	Lys	Tyr	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Ser
		20					25					30			

Leu	Lys	Met	Ala	Asp	Pro	Asn	Arg	Phe	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Pro	Val
		35					40					45			

Leu Asp Gln Leu Leu
50

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 2
gatcgatatc ytgctsacmc artgtccagc 30

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 3
tttdakytcc agcttggtac c 21

<210> 4
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 4
gatcgacgta cgctgargtg carytggtgg artctgg 37

<210> 5

<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 5
acagtgggcc cttggtggag gctgmrgaga cdgtgashrd rgt 43

<210> 6
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 6
ggagtacatt cagatatcgt gatgacccar tctcagaaaa tcatg 45

<210> 7
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 7
ggtgcagcca cggtccgttt gatttccagc ttggtgcctc cacc 44

<210> 8
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 8
ggagtacatt cacagatcca gctggtgcag tctggacctg agcttaagaa g 51

<210> 9
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之引子

<400> 9
gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gacggtgast gwggttcc 48

<210> 10
<211> 917
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之聚核苷酸

<400> 10
cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg ggatggtcat 60

gtatcatcct ttttctagta gcaactgcaa ctggagtaca ttcagatatc ctgctgacac 120

aatctccagc catcctgtct gtgagtccag gagaaagagt cagtttctcc tgcaggtcca 180

gtcagagcat tggcacaaac atacactggt atcagcaaag aacaaatggt tctccaaggc 240

ttctcataaa gtttgcttct gagtctctct ctgggatccc ttccaggttt agtggcagtg 300

gatcagggac agattttact cttagcatca atagtgtgga gtctgaagat tttgcagatt 360

actactgtca acaaagtaat agctggccac tcacgttcgg tgctggtacc aaggtggaga 420

tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga 480

aatctggaac tgcttctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag 540

tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc 600

aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact 660

acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgcccgtca 720

caaagagctt caacagggga gagtgttaag cttggccgcc atggcccaac ttgtttattg 780

cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 840

tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 900

tcgggaatta attcggc 917

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 11

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

Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn
			20					25					30		

Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Lys	Phe	Ala	Ser	Glu	Ser	Leu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 1484
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之聚核苷酸

<400> 12

tcggttctat cgattgaatt ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt ttctagtagc 60

aactgcaact ggagcgtacg ctgaagtgca gttggtggag tctgggggag gcttagtgca 120

gcctggaggg tccctgaaac tctcctgtgc agcctctgga ttcactttca gtagctatgg 180

catgtcttgg gttcgccaga ctccagacaa gaggctggag ttggtcgcaa ccattactag 240

aaatggtggt accacctatt atctagacag tgtgaagggc cgattcacca tctccagaga 300

caatgccaag aacaccctgt acctgcaaat gagcagtctg aagtctgagg acacagccat 360

gtattactgt gcaagaggtc ctatctacta tgattacggc tatgctatgg actactgggg 420

tcaaggaacc acagtcacag tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttcccccc 480

ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtcaagga 540

ctacttcccc gaaccggtga cggtgtcgtg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca 600

caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg tggtgactgt 660

gccctctagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa 720

caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 780

gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttccccc caaaacccaa 840

ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtggtgg acgtgagcca 900

cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa 960

gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgg gtggtcagcg tcctcaccgt 1020

cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct 1080

cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt 1140

gtacaccctg cccccatccc gggaagagat gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct 1200

ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga 1260

gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag 1320

caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat 1380

gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtaaatg 1440

agtgcgacgg ccctagagtc gacctgcaga agcttggccg ccat 1484

<210> 13
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 13

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

Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Leu	Val
		35					40					45			

Ala	Thr	Ile	Thr	Arg	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 14
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 15
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 16
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 16
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 17
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 106
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 18
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 19
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 19
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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe
85 90 95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 20
<211> 117
<212> PRT
<213> 小鼠屬

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Leu Thr
115

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 21
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 22
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Lys Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 23
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 23

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

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

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

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

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

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 24
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
20

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 25
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 26
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 26
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 27
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 28
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 29

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 30
Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Thr
1 5

<210> 31
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 31
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 32
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 32
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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe
85 90 95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 33
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 34
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 35
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 35
Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 36
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 37
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 38
Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe Lys Gly
1 5 10 15

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 39
Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 40
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
100 105

<210> 41
<211> 270
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 41
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
1 5 10 15

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
20 25 30

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
35 40 45

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
50 55 60

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
65 70 75 80

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
85 90 95

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
100 105 110

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
115 120 125

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
130 135 140

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
145 150 155 160

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
165 170 175

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
180 185 190

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
195 200 205

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
210 215 220

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
225 230 235 240

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
245 250 255

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
260 265 270

<210> 42
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 43
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
20

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 44
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 45
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 45
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之共同序列

<400> 46
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 47
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 47
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu Asp
1 5 10 15

Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 48

<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 48
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
20

<210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 49
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp Phe
20

<210> 50
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 50
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu
1 5 10 15

Asp Asp

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之肽

<400> 51
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10

<210> 52
<211> 800
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之聚核苷酸

<400> 52
acctcggttc tatcgattga attccaccat gggatggtca tgtatcatcc tttttctagt 60

agcaactgca actggagtac attcagacat tgtgatgacc cagtctcaga aaatcatgtc 120

cacatcagta ggagacaggg tcaacgtcac ctgcaaggcc agtcagaatg tgggttctaa 180

tgttgcctgg tatcaccaga aaccagggca atctcctaaa gcacttattt actcggcatc 240

ctaccggtac agtggagtcc ctgatcgctt cacaggcagt ggatctggga cagatttcac 300

tctcaccatc agcaatgtgc agtctgaaga cttggcagag tatttctgtc agcaatataa 360

gacctggacg ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cggaccgtgg ctgcaccatc 420

tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg 480

cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct 540

ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag 600

cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg 660

cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg 720

ttaagcttgg ccgccatggc ccaacttgtt tattgcagct tataatggtt acaaataaag 780

caatagcatc acaaatttca 800

<210> 53
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 53

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Ile	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		

Asp	Arg	Val	Asn	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Ser	Asn
			20				25				30				

Val	Ala	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile
		35				40				45					

Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
	50				55				60						

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
100 105 110

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
115 120 125

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135 140

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145 150 155 160

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
165 170 175

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
180 185 190

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
195 200 205

Arg Gly Glu Cys
210

<210> 54
<211> 1500
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之聚核苷酸

<400> 54

cacctcggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc ctttttctag 60

tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctggt gcagtctgga cctgagctta 120

agaagcctgg agagacagtc aagatctcct gcaaggcttc tgggtatacc ttcacaaact 180

atggaatgaa ctgggtgaag caggctccag gaaagggttt aaagtggatg ggctgggtaa 240

acacctacac tggagagcca acatatactg atgacttcaa gggacggttt gccttctctg 300

tggaaacctc tgccagcact gtctttctgc agatcaacaa cctcaaaaat gaggacacgg 360

ctacatattt ctgtgcaaga agaagtatcc cttattacta tgctatggac tactggggtc 420

aaggaacctc actcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccctgg 480

caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact 540

acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca 600

ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgactgtgc 660

cctctagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca 720

ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt 780

gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttcct cttccccca aaacccaagg 840

acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg 900

aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga 960

caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgggt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1020

tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 1080

cagccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt 1140

acaccctgcc cccatcccgg gaagagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg 1200

tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga 1260

acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca 1320

agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc 1380

atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatgag 1440

tgcgacggcc ctagagtcga cctgcagaag cttggccgcc atggcccaac ttgtttattg 1500

<210> 55
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 55

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys
450

<210> 56
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 56
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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser 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 Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 57
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 57

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr
        115
```

<210> 58

<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (101)..(101)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (103)..(103)
<223> 任何胺基酸

<400> 58

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

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

Ser	Val	Ile	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55					60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65				70					75					80	

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

Ala Arg Gly Arg Xaa Gly Xaa Gly Gly Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr
115

<210> 59
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 59
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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe
85 90 95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
100 105 110

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
115 120 125

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135 140

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145 150 155 160

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
165 170 175

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
180 185 190

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
195 200 205

Arg Gly Glu Cys
210

<210> 60
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly Lys
450

<210> 61
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 61
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 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn
20 25 30

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

```
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Thr Phe
                85                  90                  95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
            100                 105                 110

Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
        115                 120                 125

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
    130                 135                 140

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
145                 150                 155                 160

Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr
                165                 170                 175

Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys
            180                 185                 190

Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
        195                 200                 205

Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 62
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 62

```
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

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

Gly Trp Val Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr Asp Asp Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Val Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

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

Ala Arg Arg Ser Ile Pro Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

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

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly Lys
450

<210> 63
<211> 684
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之聚核苷酸

<400> 63
gatgtgctcc ttggagctgg tgtgcagtgt cctgactgta agatcaagtc caaacctgtt 60

ttggaattga ggaaacttct cttttgatct cagcccttgg tggtccaggt cttcatgctc 120

tgtgggtgat attactggtc ctggctcctg tcagtggaca gtttgcaagg acacccaggc 180

ccattatttt cctccagcct ccatggacca cagtcttcca aggagagaga gtgaccctca 240

cttgcaaggg atttcgcttc tactcaccac agaaaacaaa atggtaccat cggtaccttg 300

ggaaagaaat actaagagaa accccagaca atatccttga ggttcaggaa tctggagagt 360

acagatgcca ggcccagggc tcccctctca gtagccctgt gcacttggat ttttcttcag 420

agatgggatt tcctcatgct gcccaggcta atgttgaact cctgggctca agtgatctgc 480

tcacctaggc ctctcaaagc gctgggatta cagcttcgct gatcctgcaa gctccacttt 540

ctgtgtttga aggagactct gtggttctga ggtgccgggc aaaggcggaa gtaacactga 600

ataatactat ttacaagaat gataatgtcc tggcattcct taataaaaga actgacttcc 660

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 684

<210> 64
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 64
Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1 5 10 15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
20 25 30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg
35 40 45

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

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

His Leu Asp Phe Ser Ser Glu Met Gly Phe Pro His Ala Ala Gln Ala
100 105 110

Asn Val Glu Leu Leu Gly Ser Ser Asp Leu Leu Thr
115 120

<210> 65
<211> 5392
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之聚核苷酸

<400> 65
aattcactaa tgcattctgc tctttttgag agcacagctt ctcagatgtg ctccttggag 60

ctggtgtgca gtgtcctgac tgtaagatca agtccaaacc tgttttggaa ttgaggaaac 120

ttctcttttg atctcagccc ttggtggtcc aggtcttcat gctgctgtgg gtgatattac 180

tggtcctggc tcctgtcagt ggacagtttg caaggacacc caggcccatt attttcctcc 240

agcctccatg gaccacagtc ttccaaggag agagagtgac cctcacttgc aagggatttc 300

gcttctactc accacagaaa acaaaatggt accatcggta cctcgggaaa gaaatactaa 360

gagaaacccc agacaatatc cttgaggttc aggaatctgg agagtacaga tgccaggccc 420

agggctcccc tctcagtagc cctgtgcact tggatttttc ttcagcttcg ctgatcctgc 480

aagctccact ttctgtgttt gaaggagact ctgtggttct gaggtgccgg gcaaaggcgg 540

aagtaacact gaataatact atttacaaga atgataatgt cctggcattc cttaataaaa 600

gaactgactt ccatattcct catgcatgtc tcaaggacaa tggtgcatat cgctgtactg 660

gatataagga aagttgttgc cctgtttctt ccaatacagt caaaatccaa gtccaagagc 720

catttacacg tccagtgctg agagccagct ccttccagcc catcagcggg aacccagtga 780

ccctgacctg tgagacccag ctctctctag agaggtcaga tgtcccgctc cggttccgct 840

tcttcagaga tgaccagacc ctgggattag gctggagtct ctccccgaat ttccagatta 900

ctgccatgtg gagtaaagat tcagggttct actggtgtaa ggcagcaaca atgcctcaca 960

gcgtcatatc tgacagcccg agatcctgga tacaggtgca gatccctgca tctcatcctg 1020

tcctcactct cagccctgaa aaggctctga attttgaggg aaccaaggtg acacttcact 1080

gtgaaaccca ggaagattct ctgcgcactt tgtacaggtt ttatcatgag ggtgtccccc 1140

tgaggcacaa gtcagtccgc tgtgaaaggg gagcatccat cagcttctca ctgactacag 1200

agaattcagg gaactactac tgcacagctg acaatggcct tggcgccaag cccagtaagg 1260

ctgtgagcct ctcagtcact gttcccgtgt ctcatcctgt cctcaacctc agctctcctg 1320

aggacctgat ttttgaggga gccaaggtga cacttcactg tgaagcccag agaggttcac 1380

tccccatcct gtaccagttt catcatgagg atgctgccct ggagcgtagg tcggccaact 1440

ctgcaggagg agtggccatc agcttctctc tgactgcaga gcattcaggg aactactact 1500

gcacagctga caatggcttt ggcccccagc gcagtaaggc ggtgagcctc tccatcactg 1560

tccctgtgtc tcatcctgtc ctcaccctca gctctgctga ggccctgact tttgaaggag 1620

ccactgtgac acttcactgt gaagtccaga gaggttcccc acaaatccta taccagtttt 1680

atcatgagga catgcccctg tggagcagct caacaccctc tgtgggaaga gtgtccttca 1740

gcttctctct gactgaagga cattcaggga attactactg cacagctgac aatggctttg 1800

gtccccagcg cagtgaagtg gtgagccttt ttgtcactgt tccagtgtct cgccccatcc 1860

tcaccctcag ggttcccagg gcccaggctg tggtggggga cctgctggag cttcactgtg 1920

aggccccgag aggctctccc ccaatcctgt actggtttta tcatgaggat gtcaccctgg 1980

ggagcagctc agccccctct ggaggagaag cttctttcaa cctctctctg actgcagaac 2040

attctggaaa ctactcatgt gaggccaaca atggcctagt ggcccagcac agtgacacaa 2100

tatcactcag tgttatagtt ccagtatctc gtcccatcct caccttcagg gctcccaggg 2160

cccaggctgt ggtgggggac ctgctggagc ttcactgtga ggccctgaga ggctcctccc 2220

caatcctgta ctggttttat catgaagatg tcaccctggg taagatctca gccccctctg 2280

gaggaggggc ctccttcaac ctctctctga ctacagaaca ttctggaatc tactcctgtg 2340

aggcagacaa tggtccggag gcccagcgca gtgagatggt gacactgaaa gttgcagttc 2400

cggtgtctcg cccggtcctc accctcaggg ctcccgggac ccatgctgcg gtgggggacc 2460

tgctggagct tcactgtgag gccctgagag gctctcccct gatcctgtac cggtttttc 2520

atgaggatgt caccctagga ataggtcgt ccccctctgg aggagcgtcc ttaaacctct 2580

ctctgactgc agagcactct ggaaactact cctgtgaggc cgacaatggc ctcggggccc 2640

agcgcagtga gacagtgaca ctttatatca cagggctgac cgcgaacaga agtggccctt 2700

ttgccacagg agtcgccggg ggcctgctca gcatagcagg ccttgctgcg ggggcactgc 2760

tgctctactg ctggctctcg agaaaagcag ggagaaagcc tgcctctgac cccgccagga 2820

gccctccaga ctcggactcc caagagccca cctatcacaa tgtaccagcc tgggaagagc 2880

tgcaaccagt gtacactaat gcaaatccta gaggagaaaa tgtggtttac tcagaagtac 2940

ggatcatcca agagaaaaag aaacatgcag tggcctctga ccccaggcat ctcaggaaca 3000

agggttcccc tatcatctac tctgaagtta aggtggcgtc aaccccggtt tccggatccc 3060

tgttcttggc ttcctcagct cctcacagat gagtccacac gtctctccaa ctgctgtttc 3120

agcctctgca ccccaaagtt ccccttgggg gagaagcagc attgaagtgg gaagatttag 3180

gctgccccag accatatcta ctggcctttg tttcacatgt cctcattctc agtctgacca 3240

gaatgcaggg ccctgctgga ctgtcacctg tttcccagtt aaagccctga ctggcaggtt 3300

ttttaatcca gtggcaaggt gctcccactc cagggcccag cacatctcct ggattcctta 3360

gtgggcttca gctgtgattg ctgttctgag tactgctctc atcacacccc cacagagggg 3420

gtcttaccac acaaagggag agtgggcctt caggagatgc cgggctggcc taacagctca 3480

ggtgctccta aactccgaca cagagttcct gctttgggtg gatgcatttc tcaattgtca 3540

tcagcctggt ggggctactg cagtgtgctg ccaaatggga cagcacacag cctgtgcaca 3600

tgggacatgt gatgggtctc cccacggggg ctgcatttca cactcctcca cctgtctcaa 3660

actctaaggt cggcacttga caccaaggta acttctctcc tgctcatgtg tcagtgtcta 3720

cctgcccaag taagtggctt tcatacacca agtcccaagt tcttcccatc ctaacagaag 3780

taacccagca agtcaaggcc aggaggacca ggggtgcaga cagaacacat actggaacac 3840

aggaggtgct caattactat ttgactgact gactgaatga atgaatgaat gaggaagaaa 3900

actgtgggta atcaaactgg cataaaatcc agtgcactcc ctaggaaatc cgggaggtat 3960

tctggcttcc ctaagaaaca acggaagaga aggagcttgg atgaggaaac tgttcagcaa 4020

gaggaagggc ttctcacact ttcatgtgct tgtggatcac ctgaggatcc tgtgaaaata 4080

cagatactga ttcagtgggt ctgtgtagag cctgagactg ccattctaac atgttcccag 4140

gggatgctga tgctgctggc cctgggactg cactgcatgc atgtgaagcc ctataggtct 4200

cagcagaggc ccatggagag ggaatgtgtg gctctggctg cccagggccc aactcggttc 4260

acacggatcg tgctgctccc tggccagcct ttggccacag caccaccagc tgctgttgct 4320

gagagagctt cttctctgtg acatgttggc tttcatcagc caccctggga agcggaaagt 4380

agctgccact atctttgttt ccccacctca ggcctcacac tttcccatga aaagggtgaa 4440

tgtatataac ctgagccctc tccattcaga gttgttctcc catctctgag caatgggatg 4500

ttctgttccg cttttatgat atccatcaca tcttatcttg atctttgctc ccagtggatt 4560

gtacagtgat gacttttaag ccccacggcc ctgaaataaa atccttccaa gggcattgga 4620

agctctctcc acctgaacca tggcttttca tgcttccaag tgtcagggcc ttgcccagat 4680

agacagggct gactctgctg ccccaacctt tcaaggagga aaccagacac ctgagacagg 4740

agcctgtatg cagcccagtg cagccttgca gaggacaagg ctggaggcat ttgtcatcac 4800

tacagatatg caactaaaat agacgtggag caagagaaat gcattcccac cgaggccgct 4860

tttttaggcc tagttgaaag tcaagaagga cagcagcaag cataggctca ggattaaaga 4920

aaaaaatctg ctcacagttt gttctggagg tcacatcacc aacaaagctc acgccctatg 4980

cagttctgag aaggtggagg caccaggctc aaaagaggaa atttagaatt tctcattggg 5040

agagtaaggt acccccatcc cagaatgata actgcacagt ggcagaacaa actccaccct 5100

aatgtgggtg gaccccatcc agtctgttga aggcctgagt gtaacaaaag ggcttattct 5160

tcctcaagta agggggaact cctgctttgg gctgggacat aagtttttct gctttcagac 5220

gcaaactgaa aaatggctct tcttgggtct tgagcttgct ggcatatgga ctgaaagaaa 5280

ctatgctatt ggatctcctg gatctccagc ttgctgactg cagatcttga gatatgtcag 5340

cctctacagt cacaagagct aattcattct aataaaccaa tctttctgta aa 5392

<210> 66
<211> 977
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 66

```
Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1               5                  10                  15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
            20                  25                  30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg
        35                  40                  45

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

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser
65                  70                  75                  80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val
                85                  90                  95

His Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser
            100                 105                 110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu
        115                 120                 125

Val Thr Leu Asn Asn Thr Ile Tyr Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala Phe
    130                 135                 140
```

Leu Asn Lys Arg Thr Asp Phe His Ile Pro His Ala Cys Leu Lys Asp
145 150 155 160

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Ser Cys Cys Pro Val
165 170 175

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Pro Phe Thr Arg Pro
180 185 190

Val Leu Arg Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Asn Pro Val Thr
195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
210 215 220

Arg Phe Arg Phe Phe Arg Asp Asp Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Asn Phe Gln Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly
245 250 255

Phe Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Pro His Ser Val Ile Ser Asp
260 265 270

Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile Pro Ala Ser His Pro Val
275 280 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val
290 295 300

Thr Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Arg
305 310 315 320

Phe Tyr His Glu Gly Val Pro Leu Arg His Lys Ser Val Arg Cys Glu
325 330 335

Arg Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu Asn Ser Gly Asn
340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Lys Pro Ser Lys Ala
355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Asn Leu
370 375 380

Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Phe Glu Gly Ala Lys Val Thr Leu His
385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Leu Tyr Gln Phe His His
405 410 415

Glu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Arg Ser Ala Asn Ser Ala Gly Gly Val
420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
435 440 445

Thr Ala Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Lys Ala Val Ser Leu
450 455 460

Ser Ile Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
465 470 475 480

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val
485 490 495

```
Gln Arg Gly Ser Pro Gln Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Met
            500                 505                 510

Pro Leu Trp Ser Ser Ser Thr Pro Ser Val Gly Arg Val Ser Phe Ser
        515                 520                 525

Phe Ser Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
    530                 535                 540

Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Val Val Ser Leu Phe Val Thr
545                 550                 555                 560

Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
                565                 570                 575

Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Pro Arg Gly
            580                 585                 590

Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
        595                 600                 605

Ser Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
    610                 615                 620

Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu
625                 630                 635                 640

Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val
                645                 650                 655

Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val
            660                 665                 670
```

Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro
675 680 685

Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser
690 695 700

Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu
705 710 715 720

His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Pro Glu Ala Gln
725 730 735

Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro
740 745 750

Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val Gly Asp Leu
755 760 765

Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr
770 775 780

Arg Phe Phe His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Arg Ser Ser Pro Ser
785 790 795 800

Gly Gly Ala Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
805 810 815

Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr
820 825 830

Val Thr Leu Tyr Ile Thr Gly Leu Thr Ala Asn Arg Ser Gly Pro Phe
835 840 845

Ala Thr Gly Val Ala Gly Gly Leu Leu Ser Ile Ala Gly Leu Ala Ala
850 855 860

Gly Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Lys
865 870 875 880

Pro Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ser Pro Pro Asp Ser Asp Ser Gln Glu
885 890 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
900 905 910

Thr Asn Ala Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
915 920 925

Ile Ile Gln Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asp Pro Arg His
930 935 940

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
945 950 955 960

Ser Thr Pro Val Ser Gly Ser Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
965 970 975

Arg

<210> 67
<211> 2934
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成之聚核苷酸

<400> 67

atgctgctgt gggtgatact actggtcctg gctcctgtca gtggacagtt tgtaaggaca 60

tacaagtcca ttattttcct ccagcctcca tggaccacag tcttccgagg agagagagtg 120

aatctgactt gcaagggatt tggcttctac tcatcacaaa aaacaaaatg gtactatcgg 180

caccttggga aagaaatatc gagagaaacc caaaaaaata cccttgaggt tcaggaatct 240

ggagagtaca gatgccaggc ccagggctcc cctctcagta gccctgtgtc cttggacttt 300

tcttcagctt cgctgatcct gcaagctcca ctttctgtgt ttgaaggaga ctctgtggtt 360

ctgaggtgcc gggcaaaggc ggaagtaaca ctgaagacta ctatttacaa gaatgaaaat 420

gtcctggcat ttcttaataa atcaactgac ttccatattt ctcatgcaag tctcaaggac 480

aatggtgcat atcgctgtac tggatataag gaaacttgtt gccttgtttc ttccaacaca 540

gtcaaaatcc aagtccaaga gtcatttaca cgtccagtgt tgagagtcag ctccttccag 600

cccatcagcg ggagcccagt gaccctgacc tgtgagaccc agctctctct agagaggtca 660

gatgtcccgc tccagttctg cttcttcaga aatgaccaga tgctgggatc aggctgcagc 720

ctctccccga agttccggat tactgccatg tggagtaaag attcaggatc ctactggtgt 780

aaggcagcaa caatgtgtta tgacaccaca tctaacagct tgagatcctg gatacaggtg 840

ctgatccccg catctcatcc tgtcctcact ctcagccctg aaaaggctct gaattttgag 900

ggaaccaagg tgaaacttca ctgtgaaacc caggaagatt ctctgcgcac tttgtacaag 960

ttttatcatg acggtgttcc cctgaggtac aagtcagtcc gctgtgaaaa gggagcatcc 1020

atcagcttct cactgactac agagcattca gggaactact actgcacagc tgacaatggc 1080

catggtgcca agcccagtga ggctgtaagc ctgtcagtca ctgtccctgt gtctcgccct 1140

gtcctcaccc tcagctctgc agaggacctg atttctgagg gagccaagtt gacacttcac 1200

tgtgaagccc agagaggttc actccccatc gtgtaccagt ttcatcatga gaatgcctcc 1260

ctggggaata ggtcggccca ctctgcagga ggagtggcca tcagcttctc tctgactgca 1320

gaccattcgg ggaactacta ctgcacagct aacaatggct ttggccccca gcgcagtgag 1380

gcagtgagcc tctccatcac tgtacccgtg tctcgtcctg tcctcaccct cagctctgct 1440

gaggccctga cttttgaagg agccacggtg acactttact gtgaggtcca gagaggttcc 1500

ccacgaatcc tataccagtt ttatcatgag gacgtgcccc tggggagcaa ctcaacaccc 1560

tctgtgggaa aagtgtcctt cagcttctct ctgactgcag cacattcagg gaattactac 1620

tgcacagctg acaacggctt tggtccccag cgcagtgagg cggtgagcct ctttgtcact 1680

gttccagtgt ctcgccccat cctcaccctc agggttccca gggcccaggc tgtggtgggg 1740

gaccttctgg agcttcgctg tgaggccctg agaggctctc ccccgatcat gtactggttt 1800

tatcatgagg atgtcaccct ggggagcagc tcagtcccct ctggaggaga agcctctttc 1860

aacctctctc tgactgcaga acattctgga aactactcat gtgaggccaa caatggcctg 1920

gtggcccagc acagtgatac aatatcactc agtgttatag ttccagtgtc tcgtcccatc 1980

ctcaccttca gagctcccag ggcccaggct gtagtggggg acctgctgga gcttcactgt 2040

gaggccctga gaggctcctc cccaatcctg tactggtttt atcatgaaga tgtcaccctg 2100

ggtaagatct cagccccctc tggaggagga gcctacttca acctctctct gactacagaa 2160

cattctggaa tctactcctg tgaggcggac aatggtctgg aggcccagcg cagtgagatg 2220

gtgacactga aagttgcagt tccggtgtct cgccccgtcc tcaccctcag ggctcccagg 2280

gcccaggttg cggtggggga cctgctggag cttcactgtg aggccctgag aggctctccc 2340

ctgatcctgt accagtttta tcatgaggat gtcaccctag gaaatagctc agccctctct 2400

ggaggagcgt tcttcaacct ctctctgact gcagaacact ctggaaacta ctcctgtgag 2460

gccgacaatg gtctgggggc ccagcgcagt gagacagtga cactttatct cacagggctg 2520

accgagaaca gaagtggccc tgttgccacg ggtgtcaccg ggggtctgct cagcctagca 2580

ggccttgctg ctgtggcact gctgctctac tgctggctct caagaaaagc agggagagag 2640

cctgcctctg acccctgcag gagcccttca gacttggact cccaggagcc cacctaccac 2700

aatgtaccag cctgggaaga gctgcaacca gtgtacagta atgtgaatcc tagaggagaa 2760

aatgtggttt actcagaagt acggatcatc cgagagaaaa agaaacatgc agtggcctct 2820

aaccccaggc atctcaggaa caagggttcc tgtatcatct actctgaagt gaaggtggca 2880

tcaaccccag cctccagatg cctgttcttg gcttcctcag ctcctcacag atga 2934

<210> 68
<211> 977
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之多肽

<400> 68

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

Phe Val Arg Thr Tyr Lys Ser Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
20 25 30

Thr Val Phe Arg Gly Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Lys Gly Phe Gly
35 40 45

Phe Tyr Ser Ser Gln Lys Thr Lys Trp Tyr Tyr Arg His Leu Gly Lys
50 55 60

Glu Ile Ser Arg Glu Thr Gln Lys Asn Thr Leu Glu Val Gln Glu Ser
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser Pro Leu Ser Ser Pro Val
85 90 95

Ser Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser
100 105 110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu
115 120 125

Val Thr Leu Lys Thr Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Val Leu Ala Phe
130 135 140

Leu Asn Lys Ser Thr Asp Phe His Ile Ser His Ala Ser Leu Lys Asp
145 150 155 160

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Thr Cys Cys Leu Val
165 170 175

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Ser Phe Thr Arg Pro
180 185 190

Val Leu Arg Val Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Ser Pro Val Thr
195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
210 215 220

Gln Phe Cys Phe Phe Arg Asn Asp Gln Met Leu Gly Ser Gly Cys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Lys Phe Arg Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly
245 250 255

Ser Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Cys Tyr Asp Thr Thr Ser Asn
260 265 270

Ser Leu Arg Ser Trp Ile Gln Val Leu Ile Pro Ala Ser His Pro Val
275 280 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val
290 295 300

Lys Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Lys
305 310 315 320

Phe Tyr His Asp Gly Val Pro Leu Arg Tyr Lys Ser Val Arg Cys Glu
325 330 335

Lys Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Asn
340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly His Gly Ala Lys Pro Ser Glu Ala
355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu
370 375 380

Ser Ser Ala Glu Asp Leu Ile Ser Glu Gly Ala Lys Leu Thr Leu His
385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Val Tyr Gln Phe His His
405 410 415

Glu Asn Ala Ser Leu Gly Asn Arg Ser Ala His Ser Ala Gly Gly Val
420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Asp His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
435 440 445

Thr Ala Asn Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu
450 455 460

Ser Ile Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
465 470 475 480

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu Tyr Cys Glu Val
485 490 495

Gln Arg Gly Ser Pro Arg Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Val
500 505 510

Pro Leu Gly Ser Asn Ser Thr Pro Ser Val Gly Lys Val Ser Phe Ser
515 520 525

Phe Ser Leu Thr Ala Ala His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
530 535 540

Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu Phe Val Thr
545 550 555 560

Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
565 570 575

Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu Arg Cys Glu Ala Leu Arg Gly
580 585 590

Ser Pro Pro Ile Met Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
595 600 605

```
Ser Ser Ser Val Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
    610                 615                 620

Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu
625                 630                 635                 640

Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val
                645                 650                 655

Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val
            660                 665                 670

Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro
        675                 680                 685

Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser
    690                 695                 700

Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Tyr Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu
705                 710                 715                 720

His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Glu Ala Gln
                725                 730                 735

Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro
            740                 745                 750

Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ala Gln Val Ala Val Gly Asp Leu
        755                 760                 765

Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr
    770                 775                 780
```

```
Gln Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser Ala Leu Ser
785                 790                 795                 800

Gly Gly Ala Phe Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
                805                 810                 815

Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr
            820                 825                 830

Val Thr Leu Tyr Leu Thr Gly Leu Thr Glu Asn Arg Ser Gly Pro Val
        835                 840                 845

Ala Thr Gly Val Thr Gly Gly Leu Leu Ser Leu Ala Gly Leu Ala Ala
    850                 855                 860

Val Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Glu
865                 870                 875                 880

Pro Ala Ser Asp Pro Cys Arg Ser Pro Ser Asp Leu Asp Ser Gln Glu
                885                 890                 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
            900                 905                 910

Ser Asn Val Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
        915                 920                 925

Ile Ile Arg Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asn Pro Arg His
    930                 935                 940

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Cys Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
945                 950                 955                 960
```

Ser Thr Pro Ala Ser Arg Cys Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
965 970 975

Arg

<210> 69
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成之 6xHis 標籤

<400> 69
His His His His His His
1 5

201039846

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※申請案號：99109950

※申請日：99-03-31 ※IPC 分類：C07K; A61K; A61P; C12N

A61K39/395 (2006.01)
C07K16/18 (2006.01)
C12P21/08 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

抗-FcRH5抗體及免疫結合物及其使用方法

ANTI-FcRH5 ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND METHODS OF USE

二、中文發明摘要：

本發明係關於適用於治療哺乳動物之造血系統腫瘤的組合物，及使用該等組合物於該治療的方法。

三、英文發明摘要：

The present invention is directed to compositions of matter useful for the treatment of hematopoietic tumor in mammals and to methods of using those compositions of matter for the same.

七、申請專利範圍：

1. 一種抗FcRH5抗體，其包含：

(a) 至少一個選自由以下組成之群的HVR序列：

(i) 包含序列KASQNVGSNVA(SEQ ID NO: 28)之HVR-L1；

(ii) 包含序列SASYRYS(SEQ ID NO: 29)之HVR-L2；

(iii) 包含序列QQYKTWT(SEQ ID NO: 30)之HVR-L3；

(iv) 包含序列GYTFTNYGMN(SEQ ID NO: 37)之HVR-H1；

(v) 包含序列NTYTGEPTYTDDFKG(SEQ ID NO: 38)之HVR-H2；

(vi) 包含序列ARRSIPYYYAMDY(SEQ ID NO: 39)之HVR-H3；及

(b) 至少一個變異體HVR，其中該變異體HVR包含對SEQ ID NO: 28、29、30、37、38或39中所述序列之至少一個殘基的修飾。

2. 如請求項1之抗體，其中在變異HVR-H1中HVR-H1殘基編號9為I。

3. 如請求項1之抗體，其中構架序列之至少一部分為人類共同構架序列。

4. 如請求項1之抗體，其中該修飾為取代、插入或缺失。

5. 如請求項1之抗體，其包含具有SEQ ID NO: 38序列的HVR-H2。

6. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對人類FcRH5之單價親和力實質上等同於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類抗體之單價親和力。

7. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對人類FcRH5之單價親和力為大於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類或嵌合抗體之單價親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

8. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體對人類FcRH5之單價親和力為小於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類或嵌合抗體之單價親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60倍。

9. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力實質上等同於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類抗體之二價形式之親和力。

10. 一種人類化抗FcRH5抗體，該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為大於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類或嵌合抗體之二價形式之親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。

11. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為小於包含圖9(SEQ ID NO: 18)及圖10(SEQ ID NO: 20)中所述輕鏈及重鏈可變序列之鼠類或嵌合抗體之二價形式之親和力至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60倍。

12. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.4 nM。

13. 如請求項12之人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.4 nM +/-.04。

14. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.2 nM。

15. 如請求項14之人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.2 nM +/-.02。

16. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.5 nM。

17. 如請求項16之人類化抗FcRH5抗體，其中該抗體之二價形式對人類FcRH5之親和力為0.5 nM +/-0.1。

18. 如請求項6至17中任一項之抗體，其中該結合親和力以Kd值表示。

19. 如請求項6至17中任一項之抗體，其中該結合親和力藉由Biacore或放射免疫分析法測量。

20. 如請求項1之抗體，其包含人類κ亞群1共同構架序列。

21. 如請求項1之抗體，其包含重鏈人類亞群III共同構架序

列。

22. 如請求項21之抗體，其中該構架序列包含取代在位置11、12、13、18、19、20、75、78、82、8=2a、83及/或34。

23. 如請求項22之抗體，其中該取代為L11V、V12K、V13K、L18V、R19K、L20V、K75V、V78A、N82I、N82aS、R83K及/或M34I。

24. 如請求項21之抗體，其中該構架序列包含取代在位置12、13、34及/或78。

25. 如請求項24之抗體，其中該取代為V12K、V13K、M34I及/或V78A。

26. 一種人類化抗FcRH5抗體，其中該人類化抗體結合於細胞毒性劑時抑制腫瘤細胞生長。

27. 如請求項1、6至12、14、16及26中任一項之抗體，其中該人類化抗體與嵌合抗體均為單價或二價。

28. 如請求項1、6至12、14、16及26中任一項之抗體，其中該人類化抗體與嵌合抗體均包含單一Fab區連接於Fc區。

29. 一種抗體，其包含一個包含圖12中所述之HVR1-HC、HVR2-HC及/或HVR3-HC序列(SEQ ID NO: 37-39)的重鏈可變域。

30. 如請求項29之抗體，其中該可變域包含圖12中所述之FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC及/或FR4-HC序列(SEQ ID NO: 33-36)。

31. 如請求項29或30之抗體，其中該抗體包含圖12中所述之CH1及/或Fc序列(SEQ ID NO: 40及/或41)。

32. 一種抗體，其包含一個包含圖12中所述之HVR1-LC、HVR2-LC及/或HVR3-LC序列(SEQ ID NO: 28-30)的輕鏈可變域。

33. 如請求項32之抗體，其中該可變域包含圖12中所述之FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC及/或FR4-LC序列(SEQ ID NO: 24-27)。

34. 如請求項32或33之抗體，其中該抗體包含圖12中所述之CL1序列(SEQ ID NO: 31)。

35. 一種多肽，其包含圖11中所述之序列(SEQ ID NO: 21)。

36. 一種多肽，其包含圖9中所述之序列(SEQ ID NO: 19)。

37. 一種多肽，其包含圖11所述之序列(SEQ ID NO: 22)。

38. 一種多肽，其包含圖11所述之序列(SEQ ID NO: 23)。

39. 一種抗體，其係藉由以下方法製備：

(a) 培養表現包含如請求項29至31中任一項之重鏈可變域及如請求項32至34中任一項之輕鏈可變域之抗體的細胞；及

(b) 自該培養細胞分離該抗體。

40. 一種抗體，其包含如請求項29至31中任一項之重鏈可變域及如請求項32至34中任一項之輕鏈可變域。

41. 如請求項40之抗體，其中該抗體為單價且包含Fc區。

42. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的輕鏈

可變域。

43. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 21之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。

44. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 22之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。

45. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 23之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。

46. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含重鏈可變域，該重鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO: 33、34、35及36之構架胺基酸序列。

47. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含輕鏈可變域，該輕鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO: 24、25、26、27及28之構架胺基酸序列。

48. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含重鏈可變域，該重鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個與選自SEQ ID NO: 33、34、35及36之胺基酸具有至少90%胺基酸序列一致性的構架胺基酸序列。

49. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含輕鏈可變域，該輕鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個與選自SEQ ID NO: 24、25、26、27及28之胺基酸具有至少90%胺基酸序列一致性的構架胺基酸序列。

50. 如請求項42之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 21之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。

51. 如請求項42之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 22之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。

52. 如請求項42之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 23之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的重鏈可變域。

53. 如請求項43之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%胺基酸序列一致性的輕鏈可變域。

54. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 21之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域。

55. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 22之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域。

56. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 23之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域。

57. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的輕鏈可變域。

58. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 21之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域及與SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的輕鏈可變域。

59. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 22之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域及與SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的輕鏈可變域。

60. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 23之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域及與SEQ ID NO: 19之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的輕鏈可變域。

61. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 20之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域及與選自SEQ ID NO: 18之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的輕鏈可變域。

62. 一種結合於FcRH5之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 13之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈可變域及與選自SEQ ID NO: 11之胺基酸序列具有至少90%序列一致性的輕鏈可變域。

63. 一種聚核苷酸，其編碼如請求項1、40、50至52、61或62之抗體。

64. 一種載體，其包含如請求項63之聚核苷酸。

65. 一種宿主細胞，其包含如請求項64之載體。

66. 一種製備抗FcRH5抗體之方法，其中該方法包含(a)選自包含真核細胞及CHO細胞之群的宿主細胞在適合表現編碼該抗體之聚核苷酸的條件下培養，及(b)分離該抗體。

67. 一種抗體，其結合之抗原決定基基本上與一種包含SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 23所示胺基酸序列或基於該等胺基酸序列之共同或變異體序列之重鏈多肽之抗體結合的抗原決定基相同。

68. 如請求項67之抗體，其結合之抗原決定基基本上與一種包含SEQ ID NO: 19所示胺基酸序列或基於該等胺基酸序列之共同或變異體序列之輕鏈多肽之抗體結合的抗原決定基相同。

69. 如請求項1、40、50至52、61或62之抗體，其中該FcRH5表現於細胞之表面上。

70. 如請求項69之抗體，其中該細胞為B細胞。

71. 如請求項70之抗體，其中該B細胞與B細胞增殖病症相關。

72. 如請求項71之抗體，其中該B細胞增殖病症為癌症。

73. 如請求項72之抗體，其中該B細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma，NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性(indolent) NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

74. 如請求項1、40、50至52、61或62之抗體，其中該抗體為單株抗體。

75. 如請求項74之抗體，其中該抗體為選自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或$(Fab')_2$片段之抗體片段。

76. 如請求項74之抗體，其中該抗體為人類化抗體。

77. 如請求項1、40、50至52、61或62之抗體，其中該抗體結合的抗原決定基與一種包含SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 23之重鏈可變域及SEQ ID NO:19之輕鏈可變域的抗體結合的抗原決定基相同。

78. 一種免疫結合物(immunoconjugate)，其包含如請求項1、40、50至52、61或62之抗體共價連接於細胞毒性劑。

79. 如請求項78之免疫結合物，其中該細胞毒性劑係選自毒素、化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射性同位素及核分解酶。

80. 如請求項79之免疫結合物，其中該免疫結合物具有式Ab-(L-D)p，其中：(a) Ab為如請求項1、40、50至52、61或62之抗體；

(b) L為連接子；

(c) D為藥物部分。

81. 如請求項80之免疫結合物，其中L係選自6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)、順丁烯二醯亞胺基丙醯基(MP)、纈胺酸-瓜胺酸(val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(ala-phe)、對胺基苯甲氧基羰基(PAB)、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-丁二醯亞胺酯(SPP)、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲

酸N-丁二醯亞胺酯(SMCC)、4-(2-吡啶基二硫基)丁酸-N-羥基丁二醯亞胺酯(SPDB)及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-丁二醯亞胺酯(SIAB)。

82. 如請求項80之免疫結合物，其中D係選自由類美登素(maytansinoid)、奧瑞他汀(auristatin)及多拉司他汀(dolastatin)組成之群。

83. 一種醫藥組合物，其包含如請求項80之免疫結合物及醫藥學上可接受之載劑。

84. 一種如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體的用途，其係用於製備供抑制表現FcRH5之細胞生長的藥物。

85. 如請求項84之用途，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

86. 如請求項84之用途，其中該抗體結合於生長抑制劑。

87. 一種如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體之用途，其係用於製備治療患有癌症之個體的藥物。

88. 如請求項87之用途，其中該癌症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

89. 如請求項87之用途，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

90. 如請求項87之用途，其中該抗體結合於生長抑制劑。

91. 一種如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體之用途，其係用於製備治療個體之增殖病症的藥物。

92. 如請求項91之用途，其中該增殖病症為癌症。

93. 如請求項92之用途，其中該癌症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

94. 如請求項91之用途，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

95. 如請求項91之用途，其中該抗體結合於生長抑制劑。

96. 一種如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體之用途，其係用於製備供抑制細胞生長的藥物，其中該細胞之生長至少部分依賴於FcRH5之生長加強作用。

97. 如請求項96之用途，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

98. 如請求項96之用途，其中該抗體結合於生長抑制劑。

99. 一種如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體之用途，其係用於製備供治療性治療哺乳動物腫瘤的藥物，其中該腫瘤之生長至少部分依賴於FcRH5之生長加強作用。

100. 如請求項99之用途，其中該腫瘤與以下相關：淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

101. 如請求項99之用途，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

102. 如請求項99之用途，其中該抗體結合於生長抑制劑。

103. 一種如請求項81之免疫結合物之用途，其係用於製備供抑制B細胞增殖之藥物。

104. 如請求項103之用途，其中該B細胞增殖係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

105. 如請求項103之用途，其中該B細胞為異種移植物。

106. 如請求項103之用途，其中該暴露在活體外進行。

107. 如請求項103之用途，其中該暴露在活體內進行。

108. 一種測定懷疑含有FcRH5之生物樣品中FcRH5之存在的方法，該方法包含使該樣品暴露於如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體，及測定該抗體與該樣品中FcRH5之結合，其中該抗體與該樣品中FcRH5之結合指示該樣品中存在該蛋白。

109. 如請求項108之方法，其中該生物樣品係來自懷疑患有B細胞增殖病症之患者。

110. 如請求項109之方法，其中該B細胞增殖病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋

巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

111. 一種使如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體結合於表現FcRH5之細胞的方法，該方法包含使該細胞與如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體接觸。

112. 如請求項111之方法，其中該抗體結合於細胞毒性劑。

113. 如請求項111之方法，其中該抗體結合於生長抑制劑。

114. 一種經半胱胺酸工程改造(engineered)之抗體，其包含一或多個游離半胱胺酸胺基酸，其中該經半胱胺酸工程改造之抗體係藉由一種包含用游離半胱胺酸胺基酸置換親本抗體之一或多個胺基酸殘基的方法製備，其中該親本抗體為如請求項1、40、50至52、61或62之抗體。

115. 如請求項114之抗體，其中該一或多個游離半胱胺酸胺基酸之硫基反應值在0.6至1.0之範圍內。

116. 如請求項114之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該經半胱胺酸工程改造之抗體較該親本抗體與硫反應性(thio-reactive)試劑更具反應性。

117. 如請求項114之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該方法另外包含藉由該經半胱胺酸工程改造之抗體與硫氫基反應性(thiol-reactive)試劑反應測定該經半胱胺酸工程改造之抗體的硫氫基反應性；

其中該經半胱胺酸工程改造之抗體較該親本抗體與該硫氫基反應性試劑更具反應性。

118. 如請求項114之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該一或多個游離半胱胺酸胺基酸殘基位於輕鏈中。

119. 如請求項114之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該抗體為包含該經半胱胺酸工程改造之抗體共價連接於細胞毒性劑之免疫結合物。

120. 如請求項119之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該細胞毒性劑係選自毒素、化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射性同位素及核分解酶。

121. 如請求項114之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該抗體共價連接於捕捉標記、偵測標記或固體載體。

122. 如請求項121之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該抗體共價連接於生物素捕捉標記。

123. 如請求項121之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該抗體共價連接於螢光染料偵測標記。

124. 如請求項123之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該螢光染料係選自螢光素類、若丹明(rhodamine)類、丹磺醯基(dansyl)、麗斯胺(Lissamine)、花青、藻紅素、德克薩斯紅(Texas Red)及其類似物。

125. 如請求項121之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該抗體共價連接於選自^{3}H、^{11}C、^{14}C、^{18}F、^{32}P、^{35}S、^{64}Cu、^{68}Ga、^{86}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{123}I、^{124}I、^{125}I、^{131}I、^{133}Xe、^{177}Lu、^{211}At及^{213}Bi之放射性核種偵測標記。

126. 如請求項121之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該抗體藉由螯合配位體共價連接於偵測標記。

127. 如請求項126之經半胱胺酸工程改造之抗體，其中該螯合配位體係選自DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及TETA。

128. 如請求項1、40、50至52、61或62之抗體，其包含白蛋白結合肽。

129. 如請求項128之抗體，其中該白蛋白結合肽係選自SEQ ID NO: 246-250。

130. 一種經半胱胺酸工程改造之抗體，其包含一或多個游離半胱胺酸胺基酸在親本抗體中輕鏈之一或多個根據Kabat編號規定的位置及重鏈之一或多個根據Kabat編號規定的位置及重鏈之一或多個根據EU編號規定的位置，其中該親本抗體為如請求項1、40、50至52、61或62之抗體。

131. 如請求項130之抗體，其中該抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗體及人類化抗體。

132. 如請求項130之抗體，其為抗體片段。

133. 如請求項132之抗體，其中該抗體片段為Fab片段。

134. 如請求項130之抗體，其係選自嵌合抗體、人類抗體或人類化抗體。

135. 如請求項130之抗體，其產生於細菌中。

136. 如請求項130之抗體，其產生於CHO細胞中。

137. 一種測定懷疑含有FcRH5蛋白之樣品中該蛋白之存在的方法，該方法包含使該樣品暴露於如請求項126之抗體，及測定該抗體與該樣品中該FcRH5蛋白之結合，其中該抗體與該蛋白之結合指示該樣品中存在該蛋白。

138. 如請求項137之方法，其中該樣品包含懷疑表現該FcRH5

蛋白之細胞。

139. 如請求項137之方法，其中該細胞為B細胞。

140. 如請求項137之方法，其中該抗體共價連接於選自螢光染料、放射性同位素、生物素或金屬錯合之配位體的標記。

141. 一種醫藥調配物，其包含如請求項130之抗FcRH5抗體及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

142. 如請求項130之抗體，其中該抗體共價連接於奧瑞他汀或類美登素藥物部分，由此形成抗體藥物結合物。

143. 如請求項142之抗體，其中該抗體-藥物結合物包含抗體(Ab)及奧瑞他汀或類美登素藥物部分(D)，其中該經半胱胺酸工程改造之抗體經由一或多個游離半胱胺酸胺基酸藉由連接子部分(L)連接於D；該化合物具有下式I：

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

其中p為1、2、3或4。

144. 如請求項143之抗體，其中p為2。

145. 如請求項143之抗體，其中L具有下式：

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

其中：

A為延伸子單元，共價連接於該經半胱胺酸工程改造之抗體(Ab)之半胱胺酸硫氫基；

a為0或1；

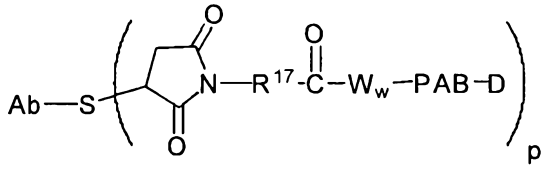
各W獨立地為胺基酸單元；

w為範圍為0至12之整數；

Y為間隔單元，共價連接於該藥物部分；及

y為0、1或2。

146. 如請求項145之抗體，其中該抗體-藥物結合物具有下式：

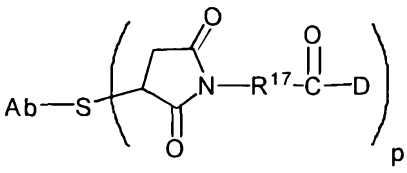


其中PAB為對胺基苯甲基胺甲醯基，R^{17}為選自以下之二價基團：$(CH_2)_r$、C_3-C_8碳環基、O-$(CH_2)_r$、伸芳基、$(CH_2)_r$-伸芳基、-伸芳基-$(CH_2)_r$-、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8碳環基)、(C_3-C_8碳環基)-$(CH_2)_r$、C_3-C_8雜環基、$(CH_2)_r$-(C_3-C_8雜環基)、-(C_3-C_8雜環基)-$(CH_2)_r$-、-$(CH_2)_r$C(O)N$R^b(CH_2)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、-$(CH_2)_r$C(O)N$R^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2)_r$C(O)N$R^b(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-、-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)N$R^b(CH_2CH_2O)_r$-、-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)N$R^b(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-及-$(CH_2CH_2O)_r$C(O)N$R^b(CH_2)_r$-；其中R^b為H、C_1-C_6烷基、苯基或苯甲基；r獨立地為範圍為1至10之整數。

147. 如請求項145之抗體，其中W_w為纈胺酸-瓜胺酸。

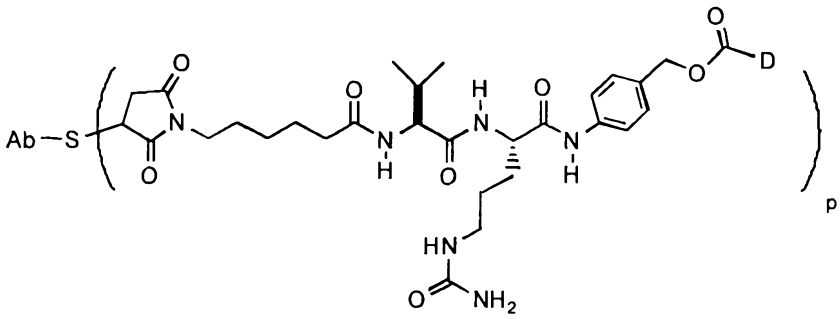
148. 如請求項145之抗體，其中R^{17}為$(CH_2)_5$或$(CH_2)_2$。

149. 如請求項145之抗體，其中該抗體-藥物結合物具有下式：



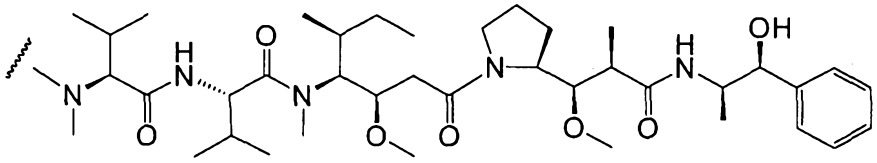
150. 如請求項149之抗體，其中R^{17}為$(CH_2)_5$或$(CH_2)_2$。

151. 如請求項149之抗體，其中該抗體-藥物結合物具有下式：



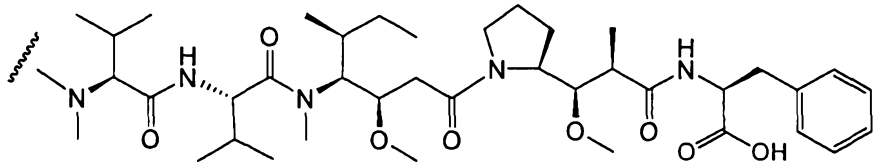
152. 如請求項143之抗體，其中L為SMCC、SPP、SPDB或BMPEO。

153. 如請求項143之抗體，其中D為MMAE，其具有以下結構：



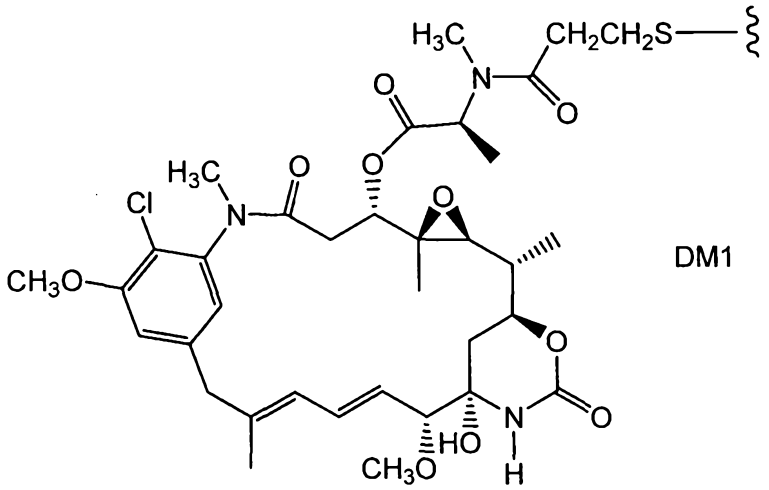
其中波形線表示與該連接子L的連接位點。

154. 如請求項143之抗體，其中D為MMAF，其具有以下結構：

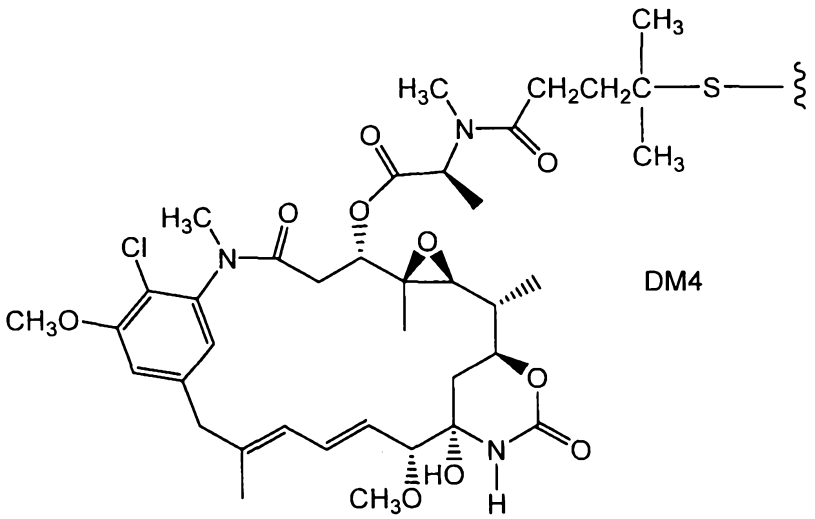


其中波形線表示與該連接子L的連接位點。

155. 如請求項143之抗體，其中D為DM1或DM4，其具有以下結構：



DM1



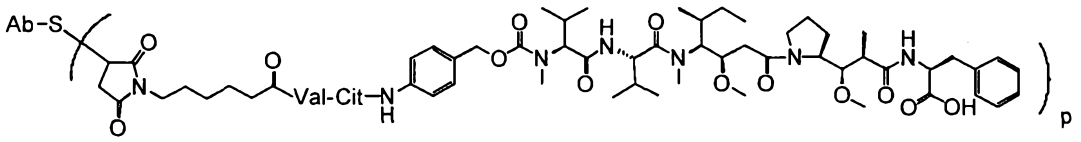
DM4

其中波形線表示與該連接子L的連接位點。

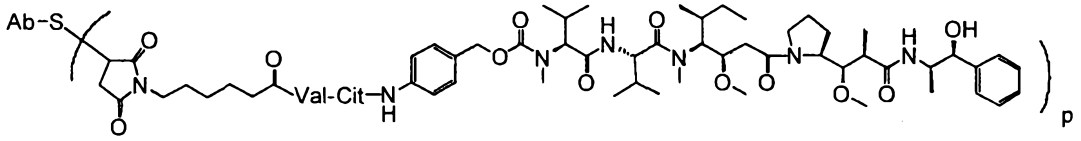
156. 如請求項142之抗體，其中該抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗體、人類化抗體及抗體片段。

157. 如請求項142之抗體，其中該抗體片段為Fab片段。

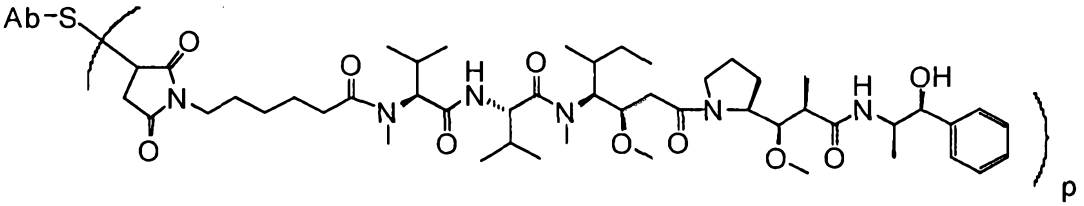
158. 一種抗體-藥物結合化合物，其係選自以下結構：



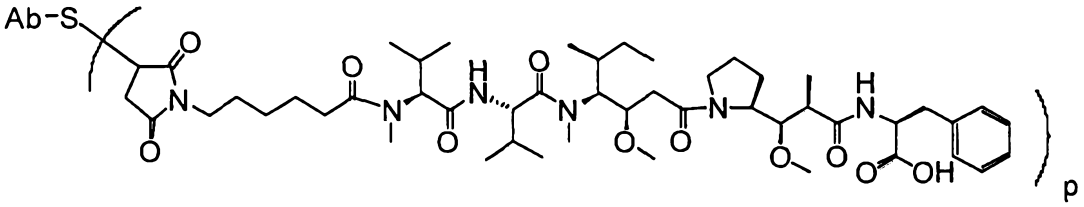
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



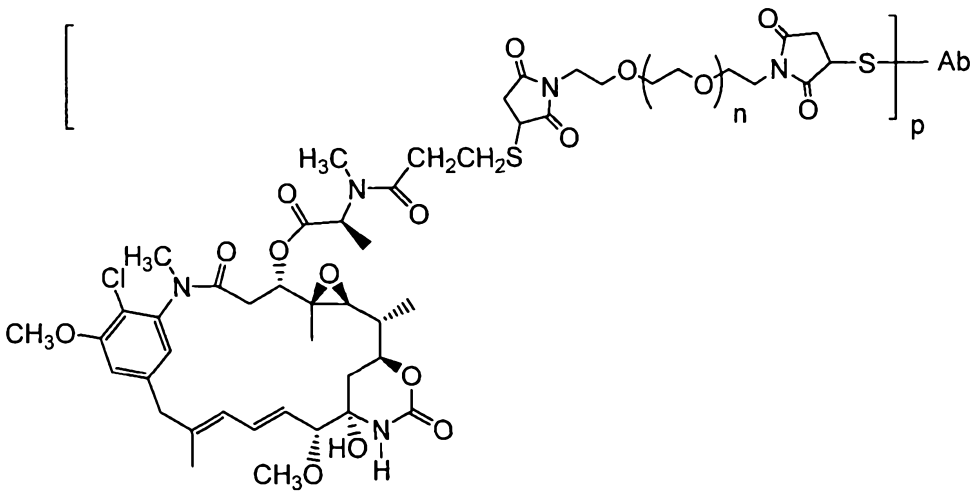
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

其中Val為纈胺酸；Cit為瓜胺酸；p為1、2、3或4；Ab為如請求項130之抗體。

159. 如請求項126之抗體，其中該奧瑞他汀為MMAE或MMAF。

160. 如請求項127之抗體，其中L為MC-val-cit-PAB或MC。

161. 一種偵測B細胞之分析法，其包含：

(a) 使細胞暴露於如請求項142之抗體-藥物結合化合物；及

(b) 測定該抗體-藥物結合化合物與該等細胞之結合程度。

162. 一種如請求項142之抗體的用途，其係用於製備供抑制細胞增殖之藥物。

163. 一種醫藥調配物，其包含如請求項142之抗體及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

164. 一種如請求項163之醫藥調配物之用途，其係用於製備供治療患者癌症的藥物。

165. 如請求項164之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

166. 如請求項164之用途，其中向該患者投與細胞毒性劑合併該抗體-藥物結合化合物。

167. 一種製品，其包含：

如請求項163之醫藥調配物；

容器；及

包裝插頁或標籤，表明該化合物可用於治療特徵為FcRH5多肽過度表現之癌症。

168. 如請求項167之製品，其中該癌症係選自由以下組成之群：淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性惰性NHL、難治性NHL、難治性惰性NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

169. 一種製備包含如請求項130之抗FcRH5抗體(Ab)及奧瑞他汀或類美登素藥物部分(D)之抗體藥物結合化合物的方法，其中該抗體經由一或多個經工程改造之半胱胺酸胺基酸藉由連接子部分(L)連接於D；該化合物具有下式I：

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

其中p為1、2、3或4；該方法包含以下步驟：

(a) 使該抗體之經工程改造半胱胺酸基團與連接子試劑反應，形成抗體-連接子中間物Ab-L；及

(b) 使Ab-L與經活化藥物部分D反應；由此形成該抗體-藥物結合物；

或包含以下步驟：

(c) 使藥物部分之親核基團與連接子試劑反應，形成藥物-連接子中間物D-L；及

(d) 使D-L與該抗體之經工程改造半胱胺酸基團反應；由此形成該抗體-藥物結合物。

170. 如請求項169之方法，其另外包含在中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中表現該抗體之步驟。

171. 如請求項169之方法，其另外包含用還原劑處理該表現之抗體的步驟。

172. 如請求項171之方法，其中該還原劑係選自三羰基乙基膦(TCEP)及二硫蘇糖醇(DTT)。

173. 如請求項171之方法，其另外包含在用該還原劑處理之後，用氧化劑處理該表現之抗體的步驟。

174. 如請求項173之方法，其中該氧化劑係選自硫酸銅、去氫抗壞血酸及空氣。

175. 如請求項130之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 44中任一者的胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈序列。

176. 如請求項130之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 43之胺基酸序列具有至少90%序列一致性之輕鏈序列及與SEQ ID NO: 44之胺基酸序列具有至少90%序列一致性之重鏈序列。

177. 如請求項130之抗體，其中該抗體包含與選自SEQ ID NO: 46中任一者的胺基酸序列具有至少90%序列一致性的重鏈序列。

178. 如請求項130之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO: 45之胺基酸序列具有至少90%序列一致性之輕鏈序列及與

SEQ ID NO: 46之胺基酸序列具有至少90%序列一致性之重鏈序列。

179. 一種組合物，其包含如請求項1、40、50至52、61或62中任一項之抗體。

180. 如請求項179之組合物，其中該組合物包含載劑。

181. 如請求項130之抗體，其中半胱胺酸在該輕鏈之位置205。

182. 如請求項130之抗體，其中半胱胺酸在該重鏈之位置114。

183. 如請求項130之抗體，其中半胱胺酸在該重鏈之位置400。

184. 如請求項70之抗體，其中該B細胞與漿細胞病症相關。

185. 如請求項184之抗體，其中該漿細胞病症為癌症。

186. 如請求項185之抗體，其中該漿細胞病症係選自意義未明之單株球蛋白症(MGUS)、多發性骨髓瘤(MM)、巨球蛋白血症、重鏈病、全身性輕鏈澱粉樣變性病(AL)、孤立性漿細胞瘤、髓外漿細胞瘤、多孤立性漿細胞瘤、漿細胞性白血病、B細胞非霍奇金氏淋巴瘤、B細胞慢性淋巴細胞性白血病。

187. 如請求項40之抗體，其中該抗體為雙特異性抗體。

188. 如請求項187之抗體，其特異性結合CD3。

189. 如請求項188之抗體，其為一種腔內突起(protuberance-into-cavity)抗體。

190. 如請求項189之抗體，其為無糖基化抗體。

191. 如請求項190之抗體，其在大腸桿菌(*Escherichia coli*)宿主細胞中產生。

192. 如請求項190之抗體，其缺乏一或多個Fc效應功能。

193. 如請求項192之抗體，其缺乏ADCC活性。

八、圖式：

嵌合抗人類FcRH5 7D11輕鏈（DNA）

CACTCCCAGCTCCAACTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCC
TTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCCTGCTGACACAATCTCCAGCCATCCTGT
CTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGTTTCTCCTGCAGGTCCAGTCAGAGCATTGGCACAAACATACAC
TGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTTTGCTTCTGAGTCTCTCTCTGGG
ATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAATAGTGTGGAGTCT
GAAGATTTTGCAGATTACTACTGTCAACAAAGTAATAGCTGGCCACTCACGTTCGGTGCTGGTACCAA
GGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
GCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC
AAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCT
TATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC (SEQ ID NO:10)

圖1

嵌合抗人類FcRH5 7D11輕鏈（胺基酸）

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRSSQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKFASESLSGIPSRFSGSGSGTDFTLSIN
SVESEDFADYYCQQSNSWPLTFGAGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:11)

圖2

嵌合抗人類FcRH5 7D11重鏈（DNA）

TCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC
TGGAGCGTACGCTGAAGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGA
AACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAG
ACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAACCATTACTAGAAATGGTGGTACCACCTATTATCTAGACAGTGTG
AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAA
GTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGTCCTATCTACTATGATTACGGCTATGCTATGG
ACTACTGGGGTCAAGGAACCACAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT
CCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTG
TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCC
AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA
ATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT
TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGT
CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAA**TGA**GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT (SEQ ID
NO:12)

圖3

嵌合抗人類FcRH5 7D11重鏈（胺基酸）

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLELVATITRNGGTTYYLDSVKGRFTIS
RDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARGPIYYDYGYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

圖4

嵌合抗人類FcRH5（mAb13G9）輕鏈

ACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAAC
TGGAGTACATTCAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAGAAAATCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAA
CGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTTCTAATGTTGCCTGGTATCACCAGAAACCAGGGCAATCTCC
TAAAGCACTTATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGG
GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAA
GACCTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT
CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCA
GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T**TAA**GCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC
AAATTTCA (SEQ ID NO: 52)

圖5

嵌合抗人類FcRH5（mAb13G9）輕鏈

DIVMTQSQKIMSTSVGDRVNVTCKASQNVGSNVAWYHQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF
TLTISNVQSEDLAEYFCQQYKTWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 53)

圖6

嵌合抗人類FcRH5（mAb13G9）重鏈

CACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACC**ATG**GGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGC
AACTGGAGTACATTCAGAAGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTTAAGAAGCCTGGAGAGACAGTC
AAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAG
GAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGGTAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATACTGATGACTTCAA
GGGACGGTTTGCCTTCTCTGTGGAAACCTCTGCCAGCACTGTCTTTCTGCAGATCAACAACCTCAAAAAT
GAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGAAGAAGTATCCCTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTC
AAGGAACCTCACTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTC
CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG
GTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACA
TGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG
ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGT
GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA**TGA**GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAG
CTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTG (SEQ ID NO: 54)

圖7

嵌合抗人類FcRH5（mAb13G9）重鏈

EVQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWVNTYTGEPTYTDDFKGRFA
FSVETSASTVFLQINNLKNEDTATYFCARRSIPYYYAMDYWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 55)

圖8

輕鏈:揭示為SEQ ID NO: 18的「鼠類13G9」,揭示為SEQ ID NO: 19的「人類化13G9 v1」
及揭示為SEQ ID NO: 56的「人類κ1」

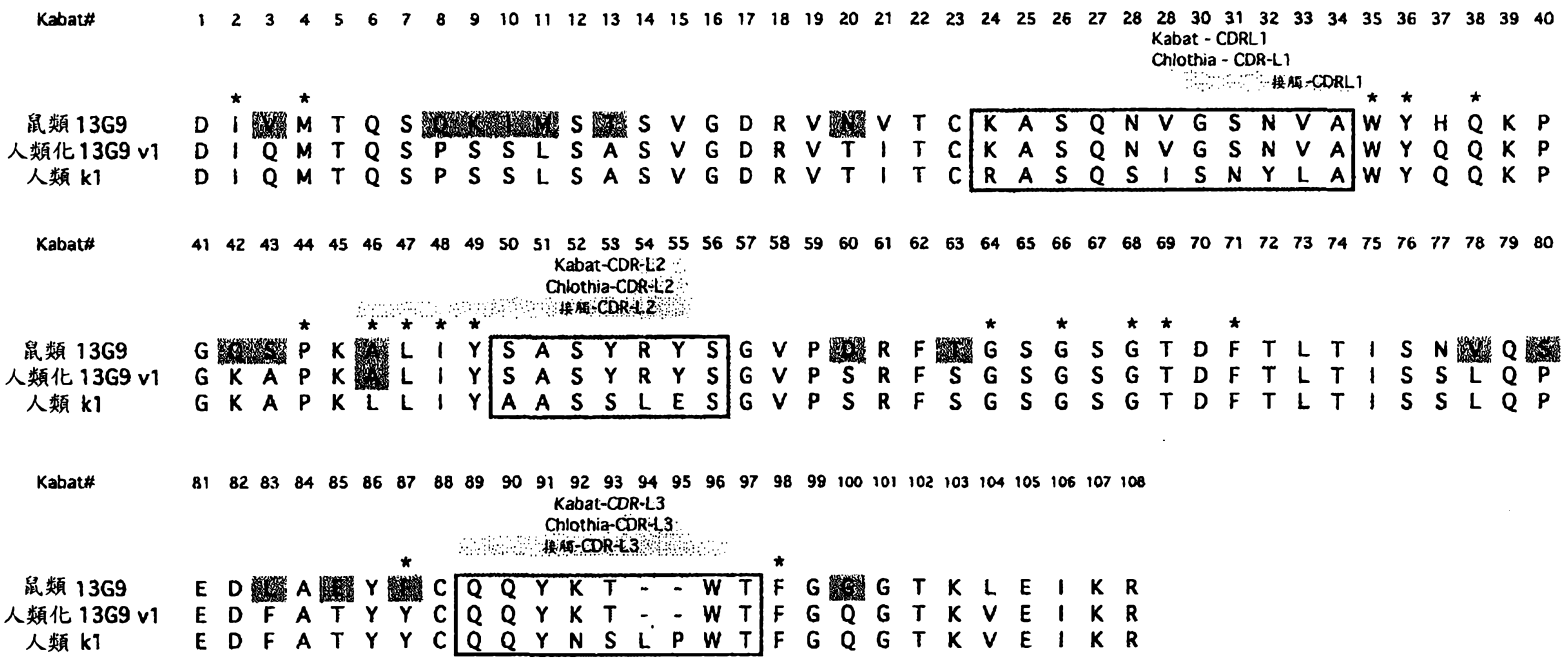


圖9

重鏈:揭示為SEQ ID NO: 20的「鼠類13G9」,揭示為SEQ ID NO: 21的「人類化13G9 v1」及揭示為SEQ ID NO: 58的「人類 III」

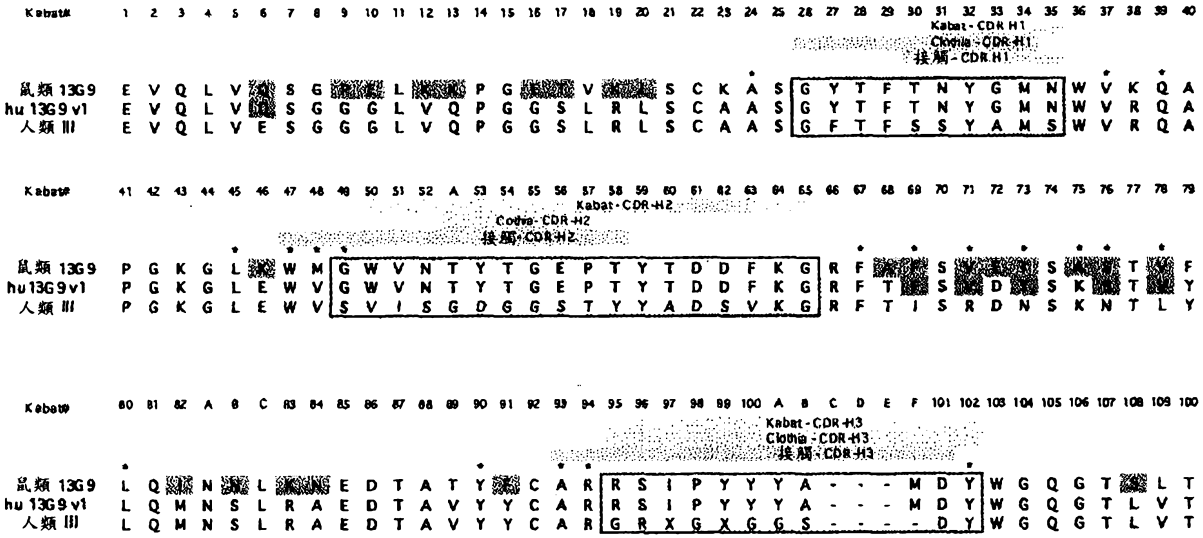


圖10

重鏈:揭示為SEQ ID NO: 21的「hu 13G9 v1」,揭示為SEQ ID NO: 22的「hu13G9 v3」及揭示為SEQ ID NO: 23的「hu13G9 v8」

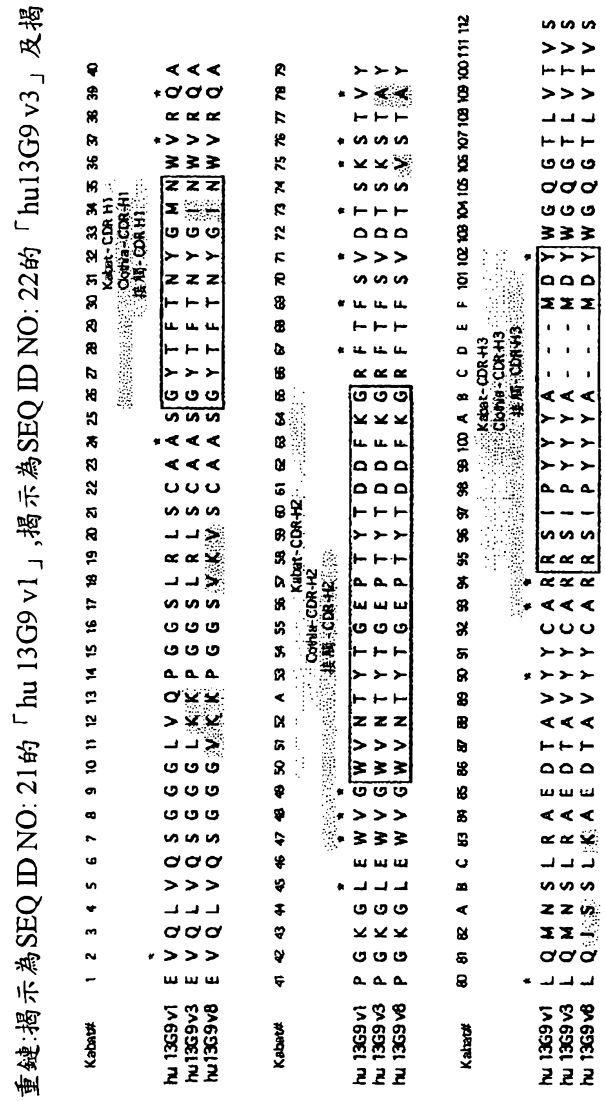


圖 11

Hu13G9輕鏈

FR1-LC: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 24)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKALIY (SEQ ID NO: 25)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 26)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 27)
HVR1-LC: KASQNVGSNVA (SEQ ID NO: 28)
HVR2-LC: SASYRYS (SEQ ID NO: 29)
HVR3-LC: QQYKTWT (SEQ ID NO: 30)
CL: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

LC-可變域:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGSNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYKTWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 32)

Hu13G9重鏈

FR1-HC: EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 33)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 34)
FR3-HC: RFTFSVDTSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 35)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 36)
HVR1-HC: GYTFTNYGMN (SEQ ID NO: 37)
HVR2-HC: NTYTGEPTYTDDFKG (SEQ ID NO: 38)
HVR3-HC: ARRSIPYYYAMDY (SEQ ID NO: 38)

CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 39)

Fc: GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 40)

HC-可變域:
EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWVNTYTGEPTY
TDDFKGRFTFSVDTSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSIPYYYAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41)

圖12

抗 **FcRH5 A118C huMA13G9**經半胱胺酸工程改造之重鏈 **thio-MAb**

A.輕鏈序列
Thio-huMA13G9-HC-A118C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGSNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYKTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 59)

B.重鏈序列
Thio-huMab13G9-HC-A118C

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWVNTYTGEPTYTDDFKGRFTFSVDTSKSTVY
LQMNSLRAEDTAVYYCARRSIPYYYAMDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 60)

圖13

抗**FcRH5 V205C huMA13G9**經半胱胺酸工程改造之輕鏈**thio-MAb**

A.輕鏈序列
Thio-huMA13G9-LC-V205C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGSNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYSGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYKTWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 61)

B.重鏈序列
Thio-huMA13G9-LC-V205C

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWVNTYTGEPTY
TDDFKGRFTFSVDTSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARRSIPYYYAMDYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 62)

圖14

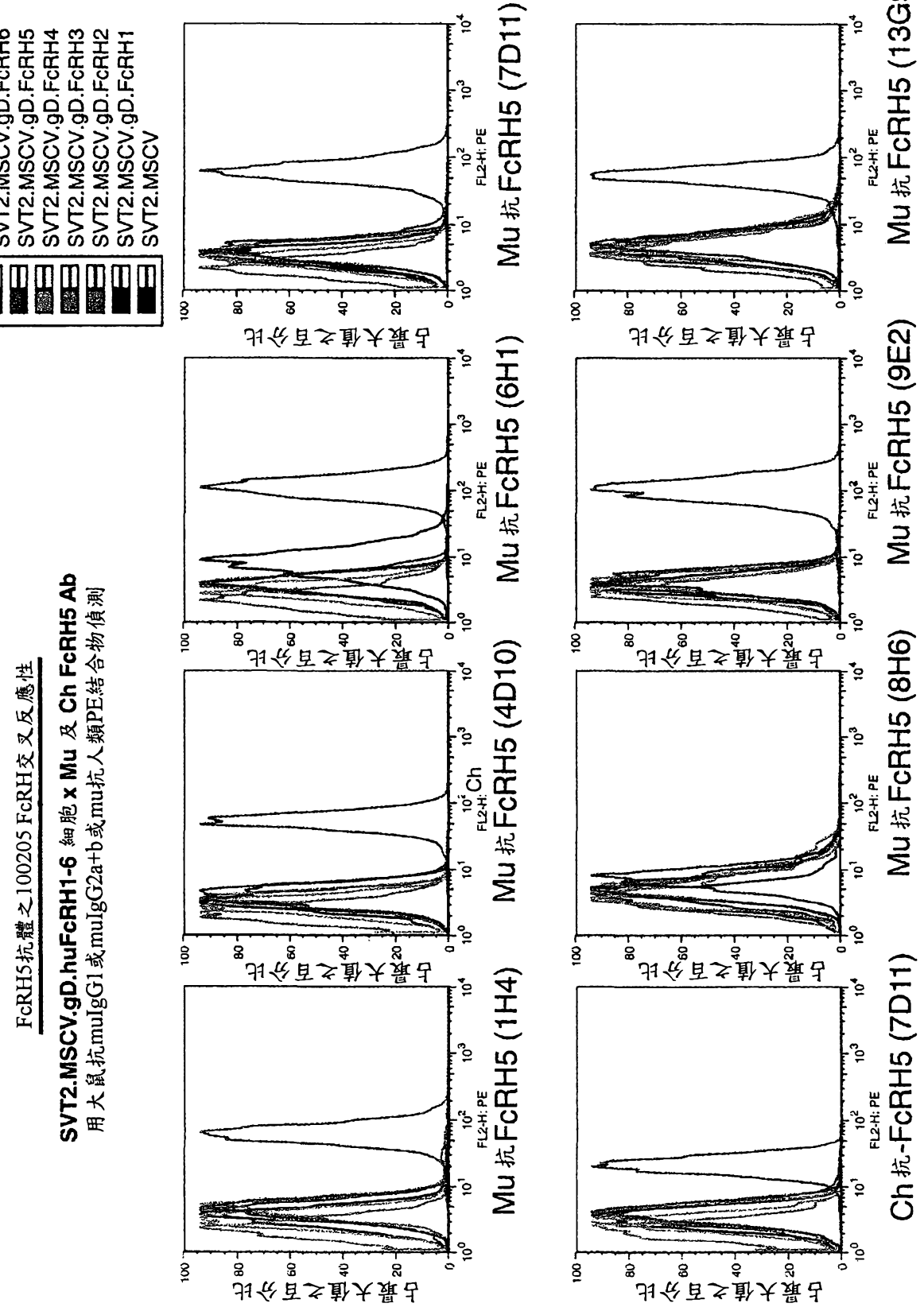

FcRH5抗體之100205 FcRH交叉反應性
SVT2.MSCV.gD.huFcRH1-6 細胞 x Mu 及 Ch FcRH5 Ab
用大鼠抗muIgG1或muIgG2a+b或mu抗人類PE結合物偵測
SVT2.MSCV.gD.FcRH6
SVT2.MSCV.gD.FcRH5
SVT2.MSCV.gD.FcRH4
SVT2.MSCV.gD.FcRH3
SVT2.MSCV.gD.FcRH2
SVT2.MSCV.gD.FcRH1
SVT2.MSCV
占最大值之百分比
FL2-H: PE
FL2-H: Ch
Mu 抗FcRH5 (1H4)
Mu 抗FcRH5 (4D10)
Mu 抗FcRH5 (6H1)
Mu 抗FcRH5 (7D11)
Ch 抗-FcRH5 (7D11)
Mu 抗FcRH5 (8H6)
Mu 抗FcRH5 (9E2)
Mu 抗FcRH5 (13G9

圖15

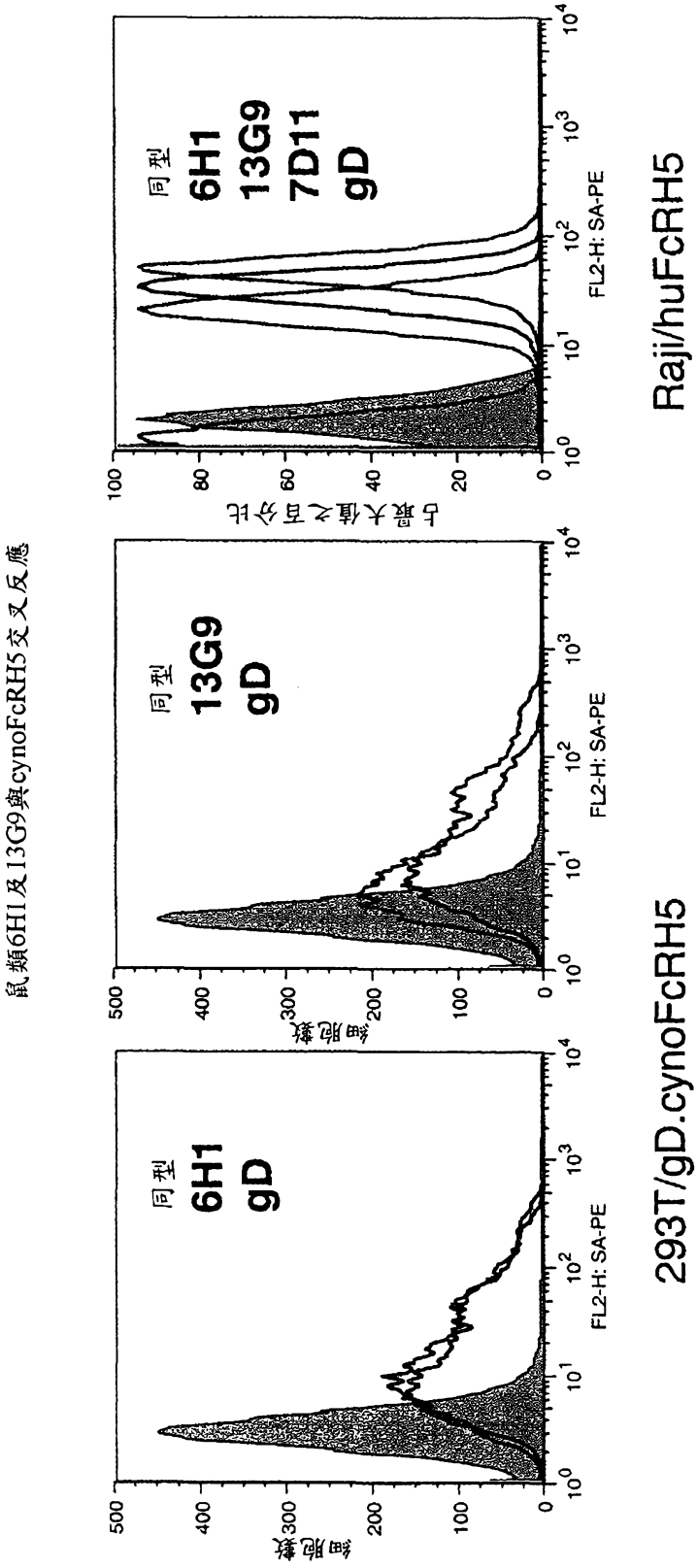
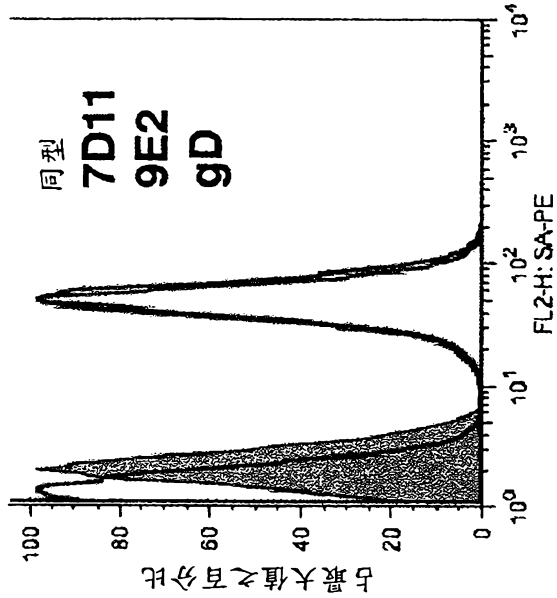

鼠類6H1及13G9與cynoFcRH5交叉反應
細胞數
同型
6H1
gD
FL2-H: SA-PE
293T/gD.cynoFcRH5
同型
13G9
gD
FL2-H: SA-PE
占最大值之百分比
同型
6H1
13G9
7D11
gD
FL2-H: SA-PE
Raji/huFcRH5

圖16


同型
7D11
9E2
gD
占最大值之百分比
FL2-H: SA-PE
Raji/huFcRH5

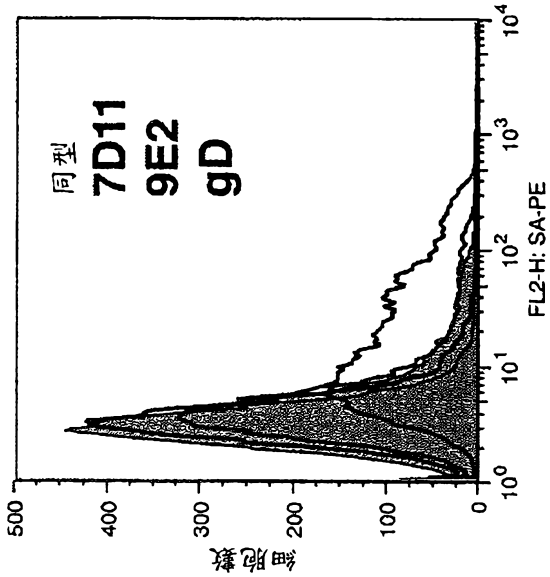

同型
7D11
9E2
gD
細胞數
FL2-H: SA-PE
293T/gD.cynoFcRH5

圖17

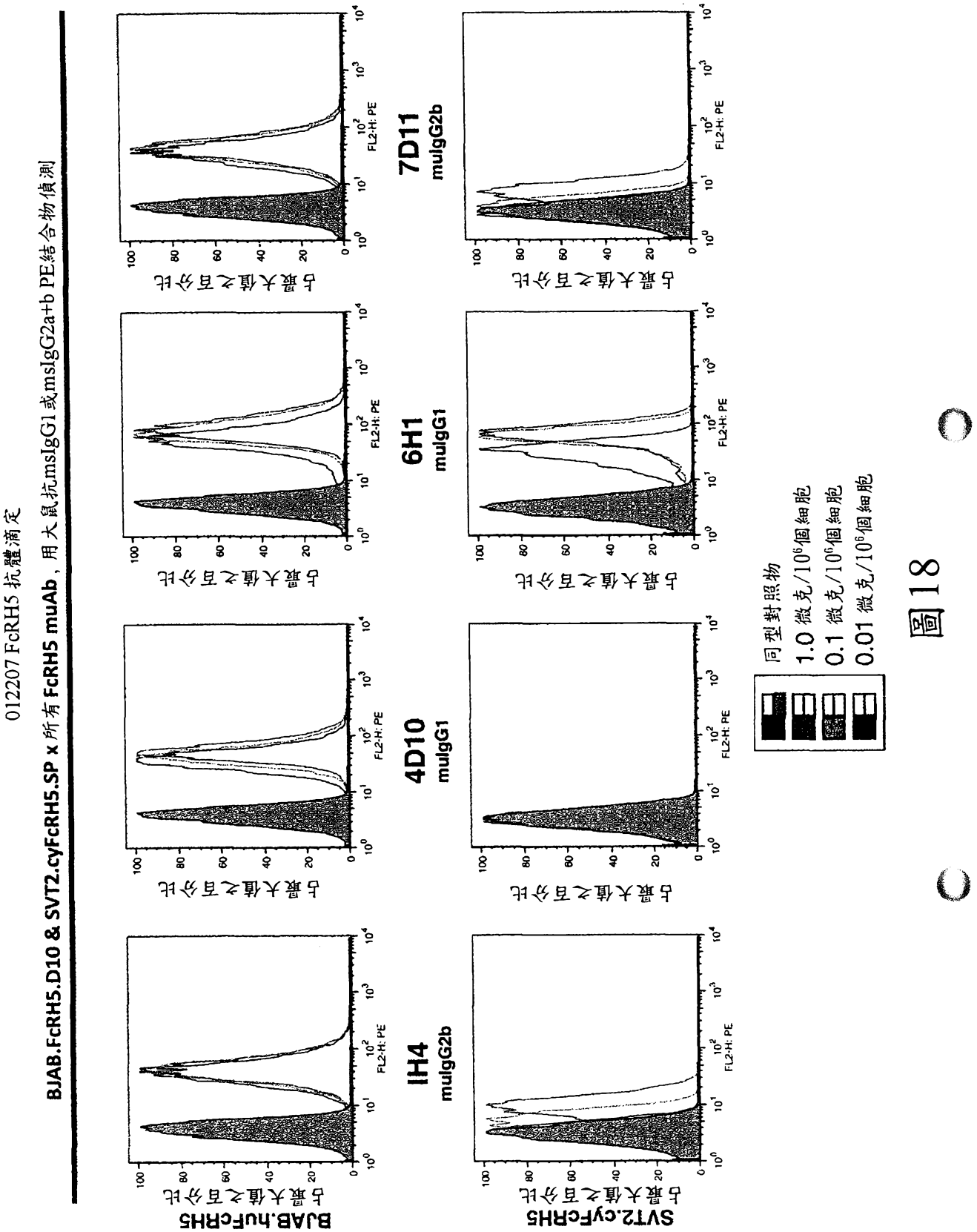

012207 FcRH5 抗體滴定
BJAB.FcRH5.D10 & SVT2.cyFcRH5.SP x 所有 FcRH5 muAb，用大鼠抗msIgG1或msIgG2a+b PE結合物偵測
BJAB.huFcRH5
SVT2.cyFcRH5
1H4
mulgG2b
4D10
mulgG1
6H1
mulgG1
7D11
mulgG2b
占最大值之百分比
FL2-H: PE
同型對照物
1.0 微克/10^6個細胞
0.1 微克/10^6個細胞
0.01 微克/10^6個細胞

圖 18

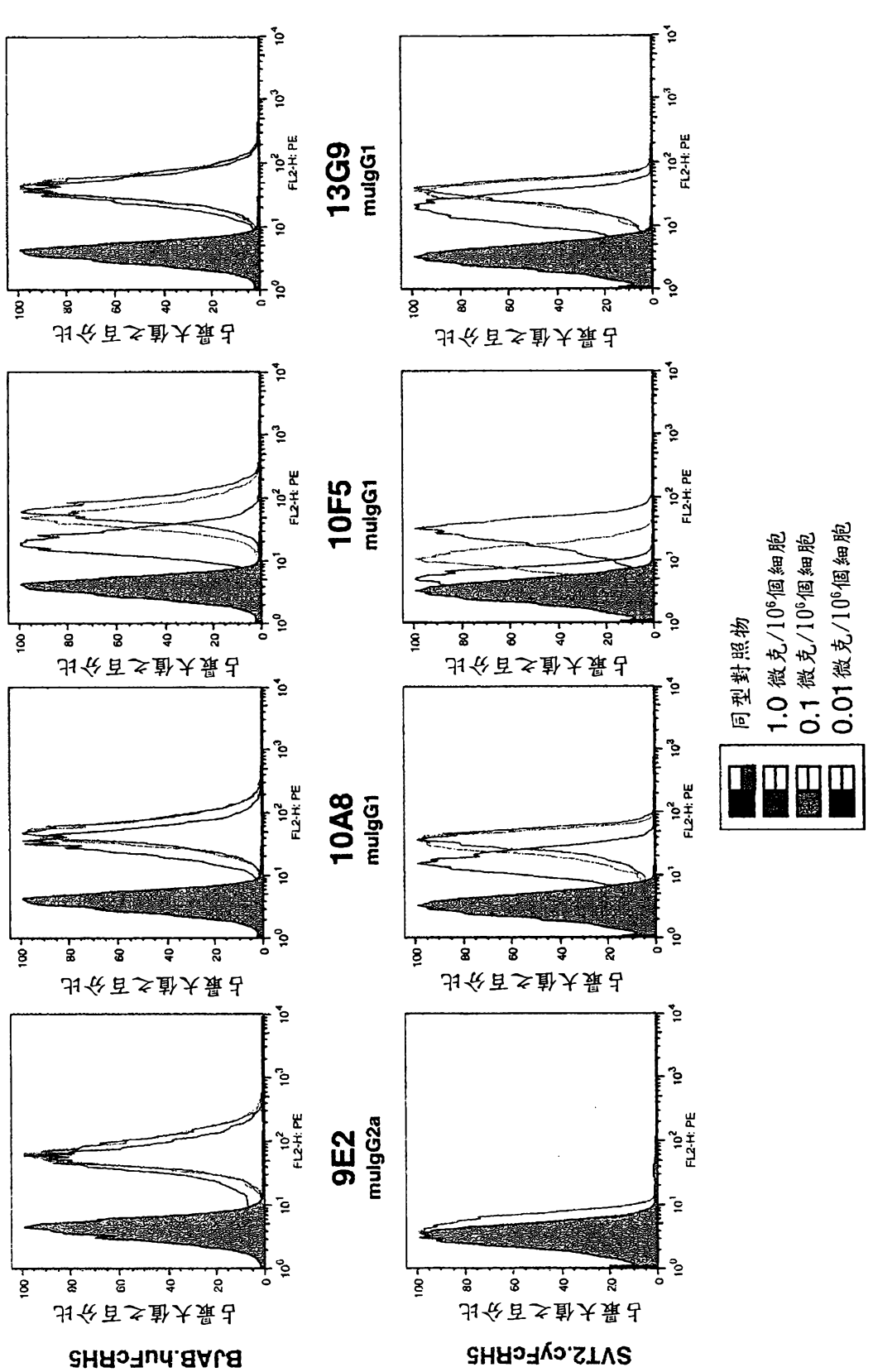

012207 FcRH5 抗體滴定
BJAB.FcRH5.D10 & SVT2.cyFcRH5.SP x 所有 FcRH5 muAb，用大鼠抗msIgG1或msIgG2a+b PE結合物偵測
BJAB.huFcRH5
SVT2.cyFcRH5
9E2
mulgG2a
10A8
mulgG1
10F5
mulgG1
13G9
mulgG1
占最大值之百分比
FL2-H: PE
同型對照物
1.0 微克/10^6個細胞
0.1 微克/10^6個細胞
0.01微克/10^6個細胞

圖19

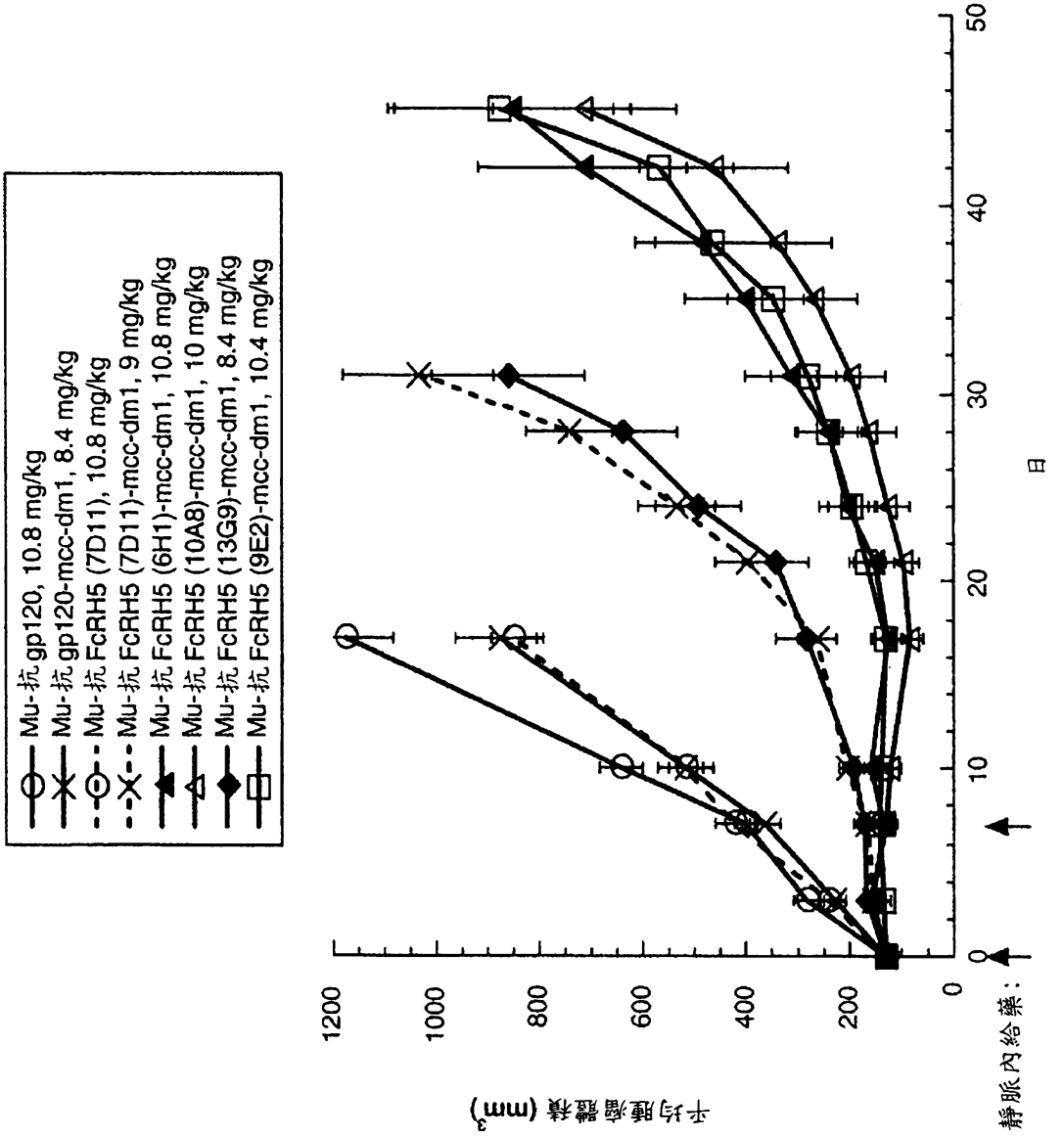

Mu-抗gp120, 10.8 mg/kg
Mu-抗gp120-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-抗FcRH5 (7D11), 10.8 mg/kg
Mu-抗FcRH5 (7D11)-mcc-dm1, 9 mg/kg
Mu-抗FcRH5 (6H1)-mcc-dm1, 10.8 mg/kg
Mu-抗FcRH5 (10A8)-mcc-dm1, 10 mg/kg
Mu-抗FcRH5 (13G9)-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-抗FcRH5 (9E2)-mcc-dm1, 10.4 mg/kg
平均腫瘤體積 (mm³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
日
靜脈內給藥：

圖20

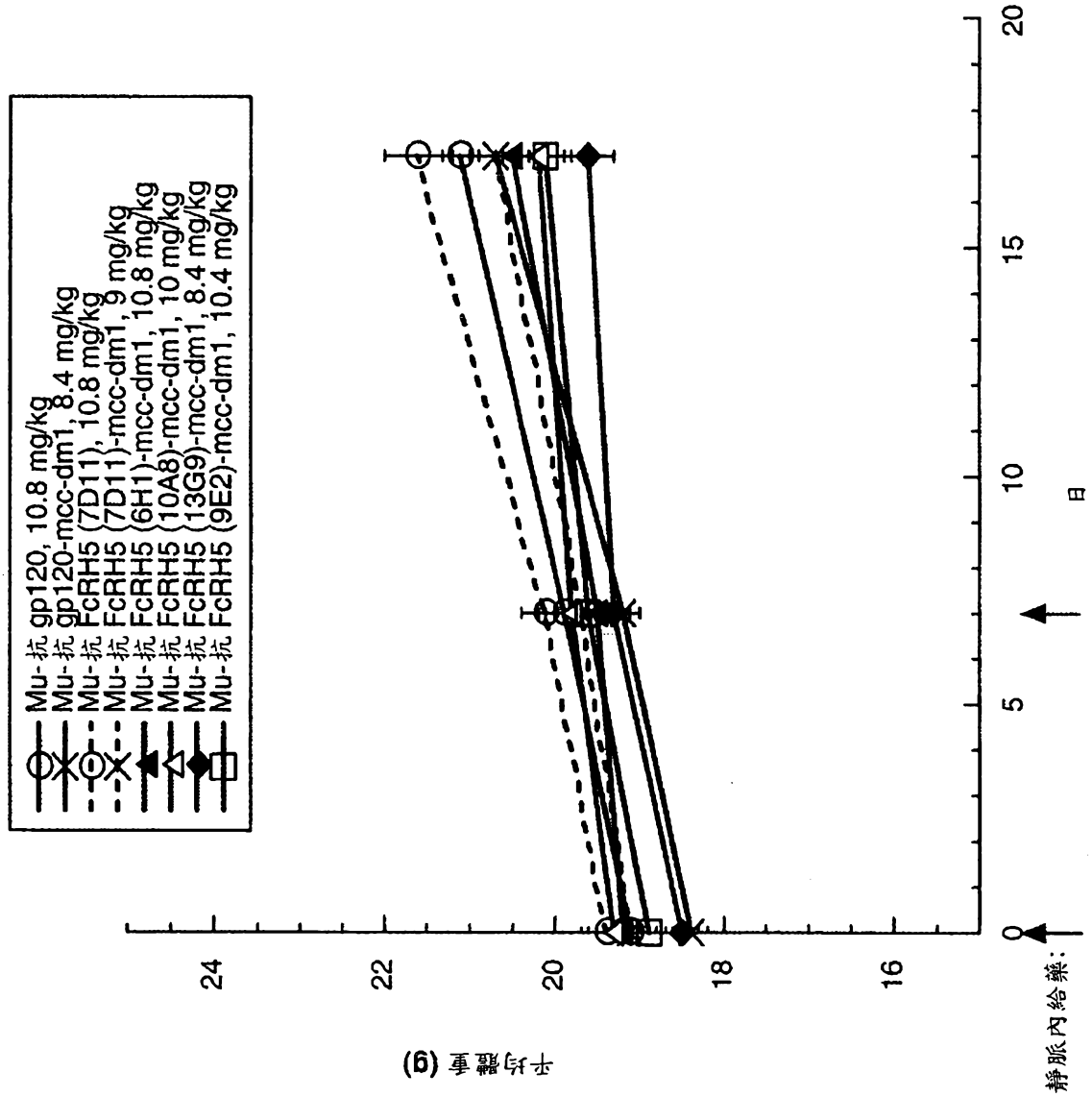

Mu-抗 gp120, 10.8 mg/kg
Mu-抗 gp120-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-抗 FcRH5 (7D11), 10.8 mg/kg
Mu-抗 FcRH5 (7D11)-mcc-dm1, 9 mg/kg
Mu-抗 FcRH5 (6H1)-mcc-dm1, 10.8 mg/kg
Mu-抗 FcRH5 (10A8)-mcc-dm1, 10 mg/kg
Mu-抗 FcRH5 (13G9)-mcc-dm1, 8.4 mg/kg
Mu-抗 FcRH5 (9E2)-mcc-dm1, 10.4 mg/kg
平均體重 (g)
24
22
20
18
16
0
5
10
15
20
日
靜脈內給藥:

圖21

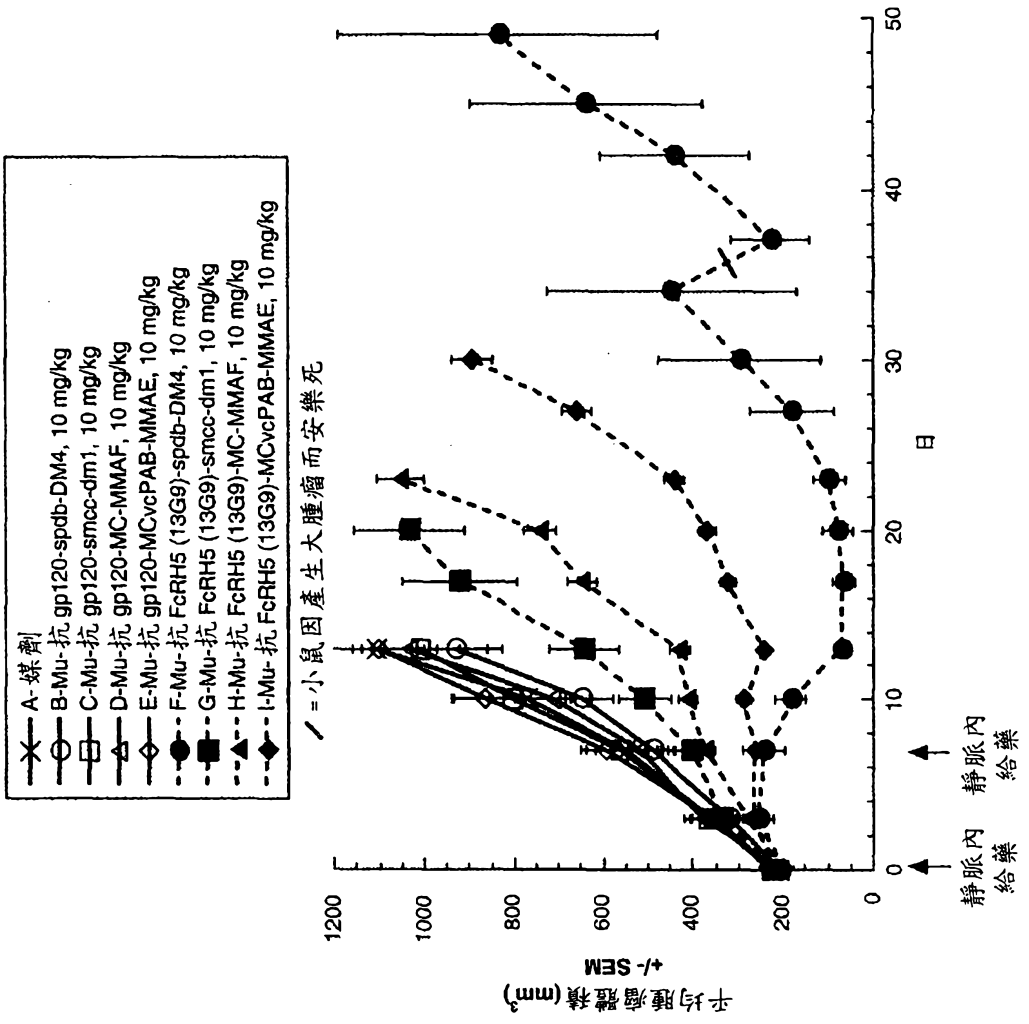

A-媒劑
B-Mu-抗 gp120-spdb-DM4, 10 mg/kg
C-Mu-抗 gp120-smcc-dm1, 10 mg/kg
D-Mu-抗 gp120-MC-MMAF, 10 mg/kg
E-Mu-抗 gp120-MCvcPAB-MMAE, 10 mg/kg
F-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-spdb-DM4, 10 mg/kg
G-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-smcc-dm1, 10 mg/kg
H-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-MC-MMAF, 10 mg/kg
I-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-MCvcPAB-MMAE, 10 mg/kg
/ = 小鼠因產生大腫瘤而安樂死
平均腫瘤體積 (mm³)
+/- SEM
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
日
靜脈內給藥
靜脈內給藥

圖22

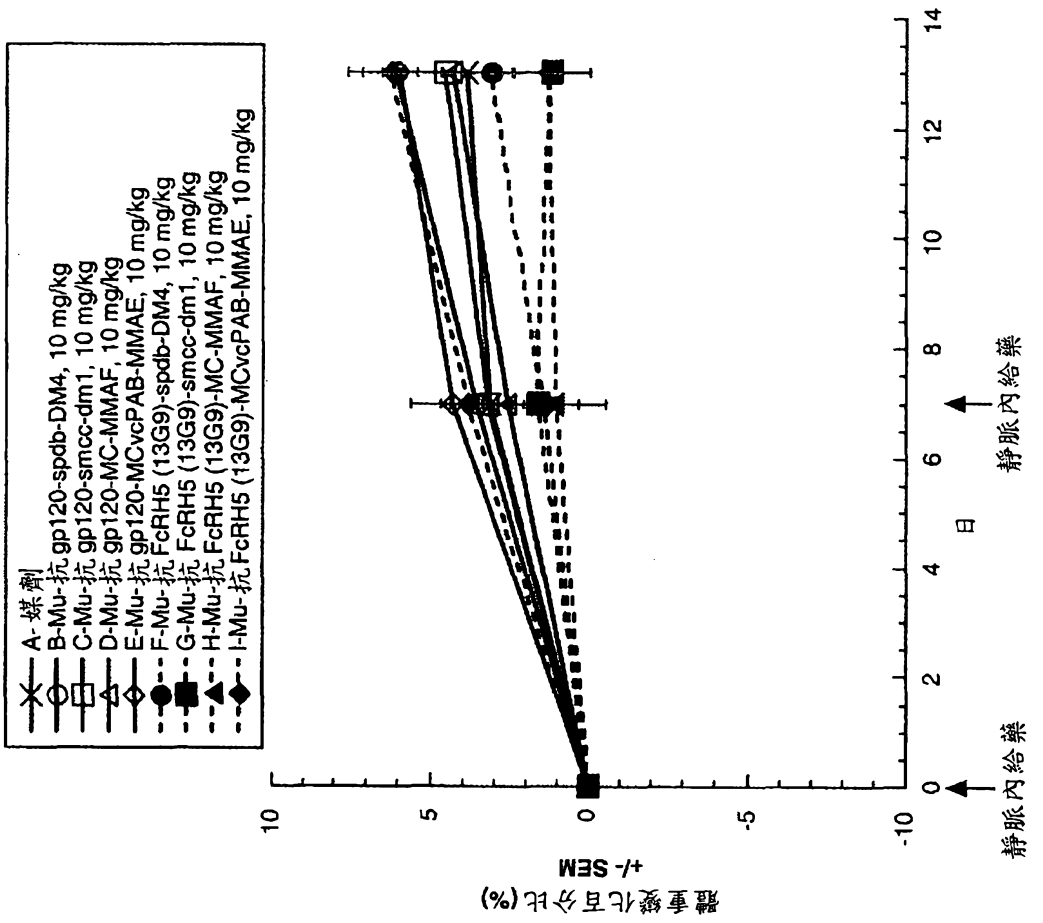

A-媒劑
B-Mu-抗 gp120-spdb-DM4, 10 mg/kg
C-Mu-抗 gp120-smcc-dm1, 10 mg/kg
D-Mu-抗 gp120-MC-MMAF, 10 mg/kg
E-Mu-抗 gp120-MCvcPAB-MMAE, 10 mg/kg
F-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-spdb-DM4, 10 mg/kg
G-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-smcc-dm1, 10 mg/kg
H-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-MC-MMAF, 10 mg/kg
I-Mu-抗 FcRH5 (13G9)-MCvcPAB-MMAE, 10 mg/kg
體重變化百分比(%)
+/- SEM
10
5
0
-5
-10
0
2
4
6
8
10
12
14
日
靜脈內給藥
靜脈內給藥

圖23

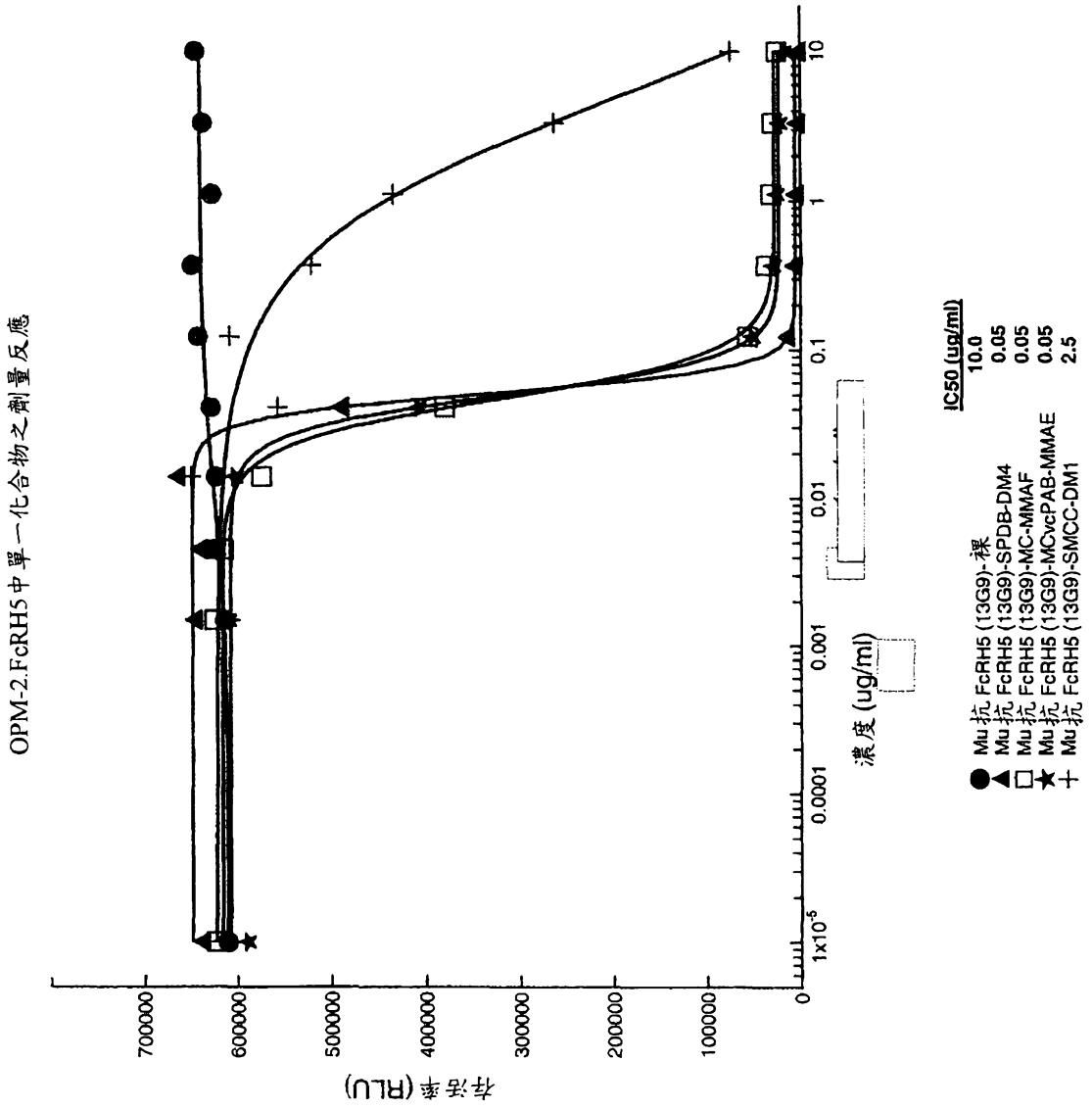

OPM-2.FcRH5中單一化合物之劑量反應
存活率(RLU)
濃度(ug/ml)
IC50 (ug/ml)
Mu抗 FcRH5 (13G9)-裸 10.0
Mu抗 FcRH5 (13G9)-SPDB-DM4 0.05
Mu抗 FcRH5 (13G9)-MC-MMAF 0.05
Mu抗 FcRH5 (13G9)-MCvcPAB-MMAE 0.05
Mu抗 FcRH5 (13G9)-SMCC-DM1 2.5

圖24

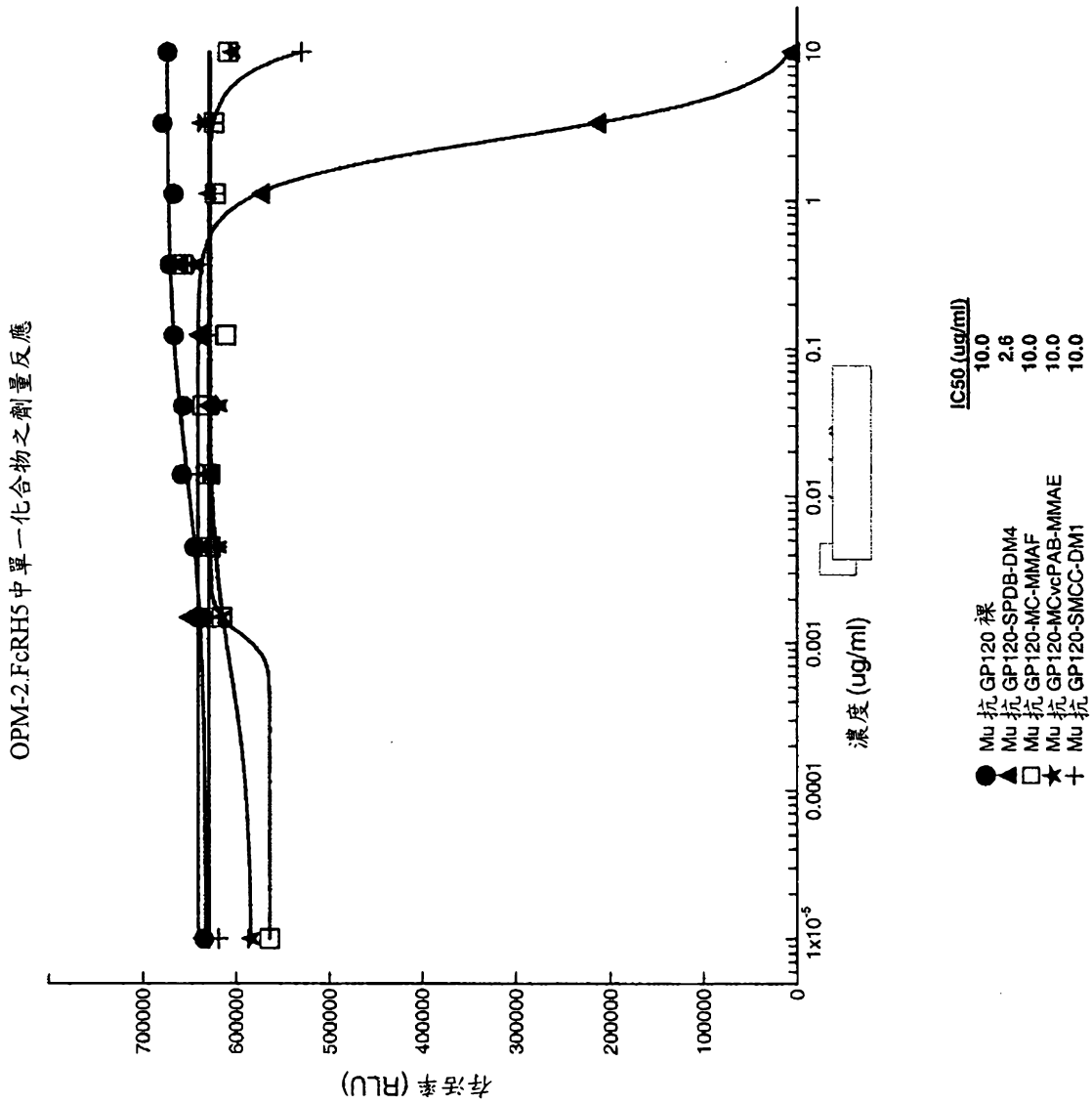

OPM-2.FcRH5 中單一化合物之劑量反應
存活率 (RLU)
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
濃度 (ug/ml)
1x10-5
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
IC50 (ug/ml)
Mu 抗 GP120 裸 10.0
Mu 抗 GP120-SPDB-DM4 2.6
Mu 抗 GP120-MC-MMAF 10.0
Mu 抗 GP120-MCvcPAB-MMAE 10.0
Mu 抗 GP120-SMCC-DM1 10.0

圖 25

GATGTGCTCCTTGGAGCTGGTGTGCAGTGTCCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCT
GTTTTGGAATTGAGGAAACTTCTCTTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTCA
TGCTCTGTGGGTGATATTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGCAAGGAC
ACCCAGGCCCATTATTTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAG
AGTGACCCTCACTTGCAAGGGATTTCGCTTCTACTCACCACAGAAAACAAAATGGTA
CCATCGGTACCTTGGGAAAGAAATACTAAGAGAAACCCCAGACAATATCCTTGAGGT
TCAGGAATCTGGAGAGTACAGATGCCAGGCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGT
GCACTTGGATTTTTCTTCAGAGATGGGATTTCCTCATGCTGCCCAGGCTAATGTTGAA
CTCCTGGGCTCAAGTGATCTGCTCACCTAGGCCTCTCAAAGCGCTGGGATTACAGCT
TCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGT
GCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATACTATTTACAAGAATGATAATGTC
CTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
(SEQ ID NO: 63)

圖26

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR
YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSEMGFPHAAQANVELLGSS
DLLT(SEQ ID NO: 64)

圖27

AATTCACTAATGCATTCTGCTCTTTTTGAGAGCACAGCTTCTCAGATGTGCTCCTTGG
AGCTGGTGTGCAGTGTCCTGACTGTAAGATCAAGTCCAAACCTGTTTTGGAATTGAG
GAAACTTCTCTTTTGATCTCAGCCCTTGGTGGTCCAGGTCTTCATGCTGCTGTGGGTG
ATATTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGCAAGGACACCCAGGCCCATT
ATTTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCAAGGAGAGAGAGTGACCCTCACT
TGCAAGGGATTTCGCTTCTACTCACCACAGAAAACAAAATGGTACCATCGGTACCTC
GGGAAAGAAATACTAAGAGAAACCCCAGACAATATCCTTGAGGTTCAGGAATCTGG
AGAGTACAGATGCCAGGCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGTGCACTTGGATTT
TTCTTCAGCTTCGCTGATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACTCTGTG
GTTCTGAGGTGCCGGGCAAAGGCGGAAGTAACACTGAATAATACTATTTACAAGAAT
GATAATGTCCTGGCATTCCTTAATAAAAGAACTGACTTCCATATTCCTCATGCATGTC
TCAAGGACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGATATAAGGAAAGTTGTTGCCCTGTTT
CTTCCAATACAGTCAAAATCCAAGTCCAAGAGCCATTTACACGTCCAGTGCTGAGAG
CCAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGAACCCAGTGACCCTGACCTGTGAGACCCAGC
TCTCTCTAGAGAGGTCAGATGTCCCGCTCCGGTTCCGCTTCTTCAGAGATGACCAGAC
CCTGGGATTAGGCTGGAGTCTCTCCCCGAATTTCCAGATTACTGCCATGTGGAGTAA
AGATTCAGGGTTCTACTGGTGTAAGGCAGCAACAATGCCTCACAGCGTCATATCTGA
CAGCCCGAGATCCTGGATACAGGTGCAGATCCCTGCATCTCATCCTGTCCTCACTCTC
AGCCCTGAAAAGGCTCTGAATTTTGAGGGAACCAAGGTGACACTTCACTGTGAAACC
CAGGAAGATTCTCTGCGCACTTTGTACAGGTTTTATCATGAGGGTGTCCCCCTGAGGC
ACAAGTCAGTCCGCTGTGAAAGGGGAGCATCCATCAGCTTCTCACTGACTACAGAGA
ATTCAGGGAACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCCTTGGCGCCAAGCCCAGTAAGG
CTGTGAGCCTCTCAGTCACTGTTCCCGTGTCTCATCCTGTCCTCAACCTCAGCTCTCCT
GAGGACCTGATTTTTGAGGGAGCCAAGGTGACACTTCACTGTGAAGCCCAGAGAGGT
TCACTCCCCATCCTGTACCAGTTTCATCATGAGGATGCTGCCCTGGAGCGTAGGTCGG
CCAACTCTGCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTCTGACTGCAGAGCATTCAGGGA
ACTACTACTGCACAGCTGACAATGGCTTTGGCCCCCAGCGCAGTAAGGCGGTGAGCC
TCTCCATCACTGTCCCTGTGTCTCATCCTGTCCTCACCCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTG
ACTTTTGAAGGAGCCACTGTGACACTTCACTGTGAAGTCCAGAGAGGTTCCCCACAA
ATCCTATACCAGTTTTATCATGAGGACATGCCCCTGTGGAGCAGCTCAACACCCTCTG
TGGGAAGAGTGTCCTTCAGCTTCTCTCTGACTGAAGGACATTCAGGGAATTACTACT
GCACAGCTGACAATGGCTTTGGTCCCCAGCGCAGTGAAGTGGTGAGCCTTTTTGTCA
CTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCTCACCCTCAGGGTTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGT
GGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCCGAGAGGCTCTCCCCCAATCCTGTA
CTGGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTGGGGAGCAGCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGA
AGCTTCTTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGGAAACTACTCATGTGAGGCC
AACAATGGCCTAGTGGCCCAGCACAGTGACACAATATCACTCAGTGTTATAGTTCCA
GTATCTCGTCCCATCCTCACCTTCAGGGCTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGTGGGGGAC
CTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTT
ATCATGAAGATGTCACCCTGGGTAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGGGCCTCCT
TCAACCTCTCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCCTGTGAGGCAGACAATG
GTCCGGAGGCCCAGCGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCCGGTGTCTC
GCCCGGTCCTCACCCTCAGGGCTCCCGGGACCCATGCTGCGGTGGGGGACCTGCTGG
AGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCTCCCCTGATCCTGTACCGGTTTTTTCATGA
GGATGTCACCCTAGGAAATAGGTCGTCCCCCTCTGGAGGAGCGTCCTTAAACCTCTC
TCTGACTGCAGAGCACTCTGGAAACTACTCCTGTGAGGCCGACAATGGCCTCGGGGC
CCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTTATATCACAGGGCTGACCGCGAACAGAAGTG

圖28A

GCCCTTTTGCCACAGGAGTCGCCGGGGGCCTGCTCAGCATAGCAGGCCTTGCTGCGG
GGGCACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCGAGAAAAGCAGGGAGAAAGCCTGCCTCTG
ACCCCGCCAGGAGCCCTCCAGACTCGGACTCCCAAGAGCCCACCTATCACAATGTAC
CAGCCTGGGAAGAGCTGCAACCAGTGTACACTAATGCAAATCCTAGAGGAGAAAAT
GTGGTTTACTCAGAAGTACGGATCATCCAAGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCCTCT
GACCCCAGGCATCTCAGGAACAAGGGTTCCCCTATCATCTACTCTGAAGTTAAGGTG
GCGTCAACCCCGGTTTCCGGATCCCTGTTCTTGGCTTCCTCAGCTCCTCACAGA<u>TGA</u>G
TCCACACGTCTCTCCAACTGCTGTTTCAGCCTCTGCACCCCAAAGTTCCCCTTGGGGG
AGAAGCAGCATTGAAGTGGGAAGATTTAGGCTGCCCCAGACCATATCTACTGGCCTT
TGTTTCACATGTCCTCATTCTCAGTCTGACCAGAATGCAGGGCCCTGCTGGACTGTCA
CCTGTTTCCCAGTTAAAGCCCTGACTGGCAGGTTTTTTAATCCAGTGGCAAGGTGCTC
CCACTCCAGGGCCCAGCACATCTCCTGGATTCCTTAGTGGGCTTCAGCTGTGATTGCT
GTTCTGAGTACTGCTCTCATCACACCCCCACAGAGGGGGTCTTACCACACAAAGGGA
GAGTGGGCCTTCAGGAGATGCCGGGCTGGCCTAACAGCTCAGGTGCTCCTAAACTCC
GACACAGAGTTCCTGCTTTGGGTGGATGCATTTCTCAATTGTCATCAGCCTGGTGGGG
CTACTGCAGTGTGCTGCCAAATGGGACAGCACACAGCCTGTGCACATGGGACATGTG
ATGGGTCTCCCCACGGGGGCTGCATTTCACACTCCTCCACCTGTCTCAAACTCTAAGG
TCGGCACTTGACACCAAGGTAACTTCTCTCCTGCTCATGTGTCAGTGTCTACCTGCCC
AAGTAAGTGGCTTTCATACACCAAGTCCCAAGTTCTTCCCATCCTAACAGAAGTAAC
CCAGCAAGTCAAGGCCAGGAGGACCAGGGGTGCAGACAGAACACATACTGGAACAC
AGGAGGTGCTCAATTACTATTTGACTGACTGACTGAATGAATGAATGAATGAGGAAG
AAAACTGTGGGTAATCAAACTGGCATAAAATCCAGTGCACTCCCTAGGAAATCCGGG
AGGTATTCTGGCTTCCCTAAGAAACAACGGAAGAGAAGGAGCTTGGATGAGGAAAC
TGTTCAGCAAGAGGAAGGGCTTCTCACACTTTCATGTGCTTGTGGATCACCTGAGGA
TCCTGTGAAAATACAGATACTGATTCAGTGGGTCTGTGTAGAGCCTGAGACTGCCAT
TCTAACATGTTCCCAGGGGATGCTGATGCTGCTGGCCCTGGGACTGCACTGCATGCA
TGTGAAGCCCTATAGGTCTCAGCAGAGGCCCATGGAGAGGGAATGTGTGGCTCTGGC
TGCCCAGGGCCCAACTCGGTTCACACGGATCGTGCTGCTCCCTGGCCAGCCTTTGGC
CACAGCACCACCAGCTGCTGTTGCTGAGAGAGCTTCTTCTCTGTGACATGTTGGCTTT
CATCAGCCACCCTGGGAAGCGGAAAGTAGCTGCCACTATCTTTGTTTCCCCACCTCA
GGCCTCACACTTTCCCATGAAAAGGGTGAATGTATATAACCTGAGCCCTCTCCATTC
AGAGTTGTTCTCCCATCTCTGAGCAATGGGATGTTCTGTTCCGCTTTTATGATATCCA
TCACATCTTATCTTGATCTTTGCTCCCAGTGGATTGTACAGTGATGACTTTTAAGCCC
CACGGCCCTGAAATAAAATCCTTCCAAGGGCATTGGAAGCTCTCTCCACCTGAACCA
TGGCTTTTCATGCTTCCAAGTGTCAGGGCCTTGCCCAGATAGACAGGGCTGACTCTGC
TGCCCCAACCTTTCAAGGAGGAAACCAGACACCTGAGACAGGAGCCTGTATGCAGC
CCAGTGCAGCCTTGCAGAGGACAAGGCTGGAGGCATTTGTCATCACTACAGATATGC
AACTAAAATAGACGTGGAGCAAGAGAAATGCATTCCCACCGAGGCCGCTTTTTTAGG
CCTAGTTGAAAGTCAAGAAGGACAGCAGCAAGCATAGGCTCAGGATTAAAGAAAAA
AATCTGCTCACAGTTTGTTCTGGAGGTCACATCACCAACAAAGCTCACGCCCTATGC
AGTTCTGAGAAGGTGGAGGCACCAGGCTCAAAAGAGGAAATTTAGAATTTCTCATTG
GGAGAGTAAGGTACCCCCATCCCAGAATGATAACTGCACAGTGGCAGAACAAACTC
CACCCTAATGTGGGTGGACCCCATCCAGTCTGTTGAAGGCCTGAGTGTAACAAAAGG
GCTTATTCTTCCTCAAGTAAGGGGGAACTCCTGCTTTGGGCTGGGACATAAGTTTTTC
TGCTTTCAGACGCAAACTGAAAAATGGCTCTTCTTGGGTCTTGAGCTTGCTGGCATAT
GGACTGAAAGAAACTATGCTATTGGATCTCCTGGATCTCCAGCTTGCTGACTGCAGA
TCTTGAGATATGTCAGCCTCTACAGTCACAAGAGCTAATTCATTCTAATAAACCAATC
TTTCTGTAAA(SEQ ID NO: 65)

圖28B

MLLWVILLVLAPVSGQFARTPRPIIFLQPPWTTVFQGERVTLTCKGFRFYSPQKTKWYHR
YLGKEILRETPDNILEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVHLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVVLR
CRAKAEVTLNNTIYKNDNVLAFLNKRTDFHIPHACLKDNGAYRCTGYKESCCPVSSNTV
KIQVQEPFTRPVLRASSFQPISGNPVTLTCETQLSLERSDVPLRFRFFRDDQTLGLGWSLSP
NFQITAMWSKDSGFYWCKAATMPHSVISDSPRSWIQVQIPASHPVLTLSPEKALNFEGTK
VTLHCETQEDSLRTLYRFYHEGVPLRHKSVRCERGASISFSLTTENSGNYYCTADNGLGA
KPSKAVSLSVTVPVSHPVLNLSSPEDLIFEGAKVTLHCEAQRGSLPILYQFHHEDAALERR
SANSAGGVAISFSLTAEHSGNYYCTADNGFGPQRSKAVSLSITVPVSHPVLTLSSAEALTF
EGATVTLHCEVQRGSPQILYQFYHEDMPLWSSSTPSVGRVSFSFSLTEGHSGNYYCTADN
GFGPQRSEVVSLFVTVPVSRPILTLRVPRAQAVVGDLLELHCEAPRGSPPILYWFYHEDV
TLGSSSAPSGGEASFNLSLTAEHSGNYSCEANNGLVAQHSDTISLSVIVPVSRPILTFRAPR
AQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGASFNLSLTTEHSGIYSCE
ADNGPEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPGTHAAVGDLLELHCEALRGSPLILYRFF
HEDVTLGNRSSPSGGASLNLSLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYITGLTANRSGP
FATGVAGGLLSIAGLAAGALLLYCWLSRKAGRKPASDPARSPPDSDSQEPTYHNVPAWE
ELQPVYTNANPRGENVVYSEVRIIQEKKKHAVASDPRHLRNKGSPIIYSEVKVASTPVSG
SLFLASSAPHR(SEQ ID NO: 66)

圖29

ATGCTGCTGTGGGTGATACTACTGGTCCTGGCTCCTGTCAGTGGACAGTTTGTAAGGACATAC
AAGTCCATTATTTTCCTCCAGCCTCCATGGACCACAGTCTTCCGAGGAGAGAGAGTGAATCTG
ACTTGCAAGGGATTTGGCTTCTACTCATCACAAAAAACAAAATGGTACTATCGGCACCTTGGG
AAAGAAATATCGAGAGAAACCCAAAAAAATACCCTTGAGGTTCAGGAATCTGGAGAGTACAG
ATGCCAGGCCCAGGGCTCCCCTCTCAGTAGCCCTGTGTCCTTGGACTTTTCTTCAGCTTCGCTG
ATCCTGCAAGCTCCACTTTCTGTGTTTGAAGGAGACTCTGTGGTTCTGAGGTGCCGGGCAAAG
GCGGAAGTAACACTGAAGACTACTATTTACAAGAATGAAAATGTCCTGGCATTTCTTAATAAA
TCAACTGACTTCCATATTTCTCATGCAAGTCTCAAGGACAATGGTGCATATCGCTGTACTGGAT
ATAAGGAAACTTGTTGCCTTGTTTCTTCCAACACAGTCAAAATCCAAGTCCAAGAGTCATTTA
CACGTCCAGTGTTGAGAGTCAGCTCCTTCCAGCCCATCAGCGGGAGCCCAGTGACCCTGACCT
GTGAGACCCAGCTCTCTCTAGAGAGGTCAGATGTCCCGCTCCAGTTCTGCTTCTTCAGAAATG
ACCAGATGCTGGGATCAGGCTGCAGCCTCTCCCCGAAGTTCCGGATTACTGCCATGTGGAGTA
AAGATTCAGGATCCTACTGGTGTAAGGCAGCAACAATGTGTTATGACACCACATCTAACAGCT
TGAGATCCTGGATACAGGTGCTGATCCCCGCATCTCATCCTGTCCTCACTCTCAGCCCTGAAA
AGGCTCTGAATTTTGAGGGAACCAAGGTGAAACTTCACTGTGAAACCCAGGAAGATTCTCTGC
GCACTTTGTACAAGTTTTATCATGACGGTGTTCCCCTGAGGTACAAGTCAGTCCGCTGTGAAA
AGGGAGCATCCATCAGCTTCTCACTGACTACAGAGCATTCAGGGAACTACTACTGCACAGCTG
ACAATGGCCATGGTGCCAAGCCCAGTGAGGCTGTAAGCCTGTCAGTCACTGTCCCTGTGTCTC
GCCCTGTCCTCACCCTCAGCTCTGCAGAGGACCTGATTTCTGAGGGAGCCAAGTTGACACTTC
ACTGTGAAGCCCAGAGAGGTTCACTCCCCATCGTGTACCAGTTTCATCATGAGAATGCCTCCC
TGGGGAATAGGTCGGCCCACTCTGCAGGAGGAGTGGCCATCAGCTTCTCTCTGACTGCAGACC
ATTCGGGGAACTACTACTGCACAGCTAACAATGGCTTTGGCCCCCAGCGCAGTGAGGCAGTG
AGCCTCTCCATCACTGTACCCGTGTCTCGTCCTGTCCTCACCCTCAGCTCTGCTGAGGCCCTGA
CTTTTGAAGGAGCCACGGTGACACTTTACTGTGAGGTCCAGAGAGGTTCCCCACGAATCCTAT
ACCAGTTTTATCATGAGGACGTGCCCCTGGGGAGCAACTCAACACCCTCTGTGGGAAAAGTGT
CCTTCAGCTTCTCTCTGACTGCAGCACATTCAGGGAATTACTACTGCACAGCTGACAACGGCT
TTGGTCCCCAGCGCAGTGAGGCGGTGAGCCTCTTTGTCACTGTTCCAGTGTCTCGCCCCATCCT
CACCCTCAGGGTTCCCAGGGCCCAGGCTGTGGTGGGGGACCTTCTGGAGCTTCGCTGTGAGGC
CCTGAGAGGCTCTCCCCCGATCATGTACTGGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTGGGGAGCAG
CTCAGTCCCCTCTGGAGGAGAAGCCTCTTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACATTCTGGAAA
CTACTCATGTGAGGCCAACAATGGCCTGGTGGCCCAGCACAGTGATACAATATCACTCAGTGT
TATAGTTCCAGTGTCTCGTCCCATCCTCACCTTCAGAGCTCCCAGGGCCCAGGCTGTAGTGGG
GGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGGCTCCTCCCCAATCCTGTACTGGTTTTAT
CATGAAGATGTCACCCTGGGTAAGATCTCAGCCCCCTCTGGAGGAGGAGCCTACTTCAACCTC
TCTCTGACTACAGAACATTCTGGAATCTACTCCTGTGAGGCGGACAATGGTCTGGAGGCCCAG
CGCAGTGAGATGGTGACACTGAAAGTTGCAGTTCCGGTGTCTCGCCCCCGTCCTCACCCTCAGG
GCTCCCAGGGCCCAGGTTGCGGTGGGGGACCTGCTGGAGCTTCACTGTGAGGCCCTGAGAGG
CTCTCCCCTGATCCTGTACCAGTTTTATCATGAGGATGTCACCCTAGGAAATAGCTCAGCCCTC
TCTGGAGGAGCGTTCTTCAACCTCTCTCTGACTGCAGAACACTCTGGAAACTACTCCTGTGAG
GCCGACAATGGTCTGGGGGCCCAGCGCAGTGAGACAGTGACACTTTATCTCACAGGGCTGAC
CGAGAACAGAAGTGGCCCTGTTGCCACGGGTGTCACCGGGGGTCTGCTCAGCCTAGCAGGCC
TTGCTGCTGTGGCACTGCTGCTCTACTGCTGGCTCTCAAGAAAAGCAGGGAGAGAGCCTGCCT
CTGACCCCTGCAGGAGCCCTTCAGACTTGGACTCCCAGGAGCCCACCTACCACAATGTACCAG
CCTGGGAAGAGCTGCAACCAGTGTACAGTAATGTGAATCCTAGAGGAGAAAATGTGGTTTAC
TCAGAAGTACGGATCATCCGAGAGAAAAAGAAACATGCAGTGGCCTCTAACCCCAGGCATCT
CAGGAACAAGGGTTCCTGTATCATCTACTCTGAAGTGAAGGTGGCATCAACCCCAGCCTCCAG
ATGCCTGTTCTTGGCTTCCTCAGCTCCTCACAGATGA (SEQ ID NO: 67)

圖30

MLLWVILLVLAPVSGQFVRTYKSIIFLQPPWTTVFRGERVNLTCKGFGFYSSQKTKWYY
RHLGKEISRETQKNTLEVQESGEYRCQAQGSPLSSPVSLDFSSASLILQAPLSVFEGDSVV
LRCRAKAEVTLKTTIYKNENVLAFLNKSTDFHISHASLKDNGAYRCTGYKETCCLVSSNT
VKIQVQESFTRPVLRVSSFQPISGSPVTLTCETQLSLERSDVPLQFCFFRNDQMLGSGCSLS
PKFRITAMWSKDSGSYWCKAATMCYDTTSNSLRSWIQVLIPASHPVLTLSPEKALNFEGT
KVKLHCETQEDSLRTLYKFYHDGVPLRYKSVRCEKGASISFSLTTEHSGNYYCTADNGH
GAKPSEAVSLSVTVPVSRPVLTLSSAEDLISEGAKLTLHCEAQRGSLPIVYQFHHENASLG
NRSAHSAGGVAISFSLTADHSGNYYCTANNGFGPQRSEAVSLSITVPVSRPVLTLSSAEAL
TFEGATVTLYCEVQRGSPRILYQFYHEDVPLGSNSTPSVGKVSFSFSLTAAHSGNYYCTA
DNGFGPQRSEAVSLFVTVPVSRPILTLRVPRAQAVVGDLLELRCEALRGSPPIMYWFYHE
DVTLGSSSVPSGGEASFNLSLTAEHSGNYSCEANNGLVAQHSDTISLSVIVPVSRPILTFRA
PRAQAVVGDLLELHCEALRGSSPILYWFYHEDVTLGKISAPSGGGAYFNLSLTTEHSGIY
SCEADNGLEAQRSEMVTLKVAVPVSRPVLTLRAPRAQVAVGDLLELHCEALRGSPLILY
QFYHEDVTLGNSSALSGGAFFNLSLTAEHSGNYSCEADNGLGAQRSETVTLYLTGLTEN
RSGPVATGVTGGLLSLAGLAAVALLLYCWLSRKAGREPASDPCRSPSDLDSQEPTYHNV
PAWEELQPVYSNVNPRGENVVYSEVRIIREKKKHAVASNPRHLRNKGSCIIYSEVKVAST
PASRCLFLASSAPHR (SEQ ID NO: 68)

圖31

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（2、4）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)