



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101903403 B

(45) 授权公告日 2016.03.16

(21) 申请号 200880122233.1

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2008.10.17

A61P 35/02(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

(30) 优先权数据

60/981,206 2007.10.19 US

61/019,214 2008.01.04 US

61/080,169 2008.07.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.06.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/080373 2008.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/052431 EN 2009.04.23

(73) 专利权人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 C·麦克多纳格 C·G·赛弗尼

D·本杰明 P·卡特 H·P·格伯

L·弗朗西斯科

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶家蓉

(56) 对比文件

WO 2006089133 A2, 2006.08.24,

CN 1299410 A, 2001.06.13,

CN 1795208 A, 2006.06.28,

CN 1665532 A, 2005.09.07,

WO 2007002223 A2, 2007.01.04,

DJ Flavell 等.Preclinical studies

with the anti-CD19-saporin immunotoxin

BU12-SAPORIN for the treatment of

human-B-cell tumours.《British Journal of

Cancer》.1995, 第72卷(第6期), 1373-1379.

审查员 王金凤

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 47/48(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书104页

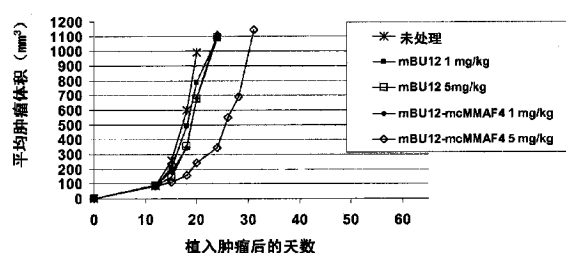
序列表42页 附图23页

(54) 发明名称

CD19 结合剂及其应用

(57) 摘要

本发明涉及 CD19 结合剂以及用该 CD19 结合剂治疗疾病的方法等。



1. 一种特异性结合人 CD19 的抗体或抗原结合片段,其重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示,其轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 24 所示,所述抗体或抗原结合片段与人 CD19 结合的解离常数等于或小于 10^{-7}M 。

2. 如权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段,其是抗体,包含与所述重链可变区结合的人 IgG 恒定区。

3. 如权利要求 2 所述的抗体或抗原结合片段,其是抗体,所述 IgG 恒定区同种型是 IgG1 或 IgG2。

4. 如权利要求 2 所述的抗体或抗原结合片段,所述 IgG 恒定区由 SEQ ID NO:39 所示序列构成。

5. 编码权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段的重链和轻链的核酸。

6. 如权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或抗原结合片段偶联于抗微管蛋白剂。

7. 如权利要求 6 所述的抗体或抗原结合片段,所述抗微管蛋白剂是奥瑞斯他汀。

8. 一种具有下式的配体-药物偶联化合物:

L-(LU-D)_p (I)

或其药学上可接受的盐或溶剂合物;

式中:

L 是配体单元,其中所述配体单元是如权利要求 1-4 中任一项所述的抗体或抗原结合片段;和

(LU-D) 是接头单元-药物单元部分,其中:

LU- 是接头单元,和

-D 是药物单元,所述药物单元是 MMAE 或 MMAF;和

p 是 1 至 8 的整数。

9. 一种药物组合物,其包含权利要求 8 所述的配体-药物偶联化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

10. 权利要求 8 所述的配体-药物偶联化合物的用途,其特征在于,用于制备治疗哺乳动物对象的 CD19- 相关疾病的药物,所述 CD19- 相关疾病是表达 CD19 的癌症。

11. 如权利要求 10 所述的用途,其特征在于,所述表达 CD19 的癌症是慢性白血病或淋巴瘤。

12. 如权利要求 10 所述的用途,其特征在于,所述表达 CD19 的癌症是 B 型急性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、或 B 细胞淋巴瘤。

13. 如权利要求 10 所述的用途,其特征在于,所述表达 CD19 的癌症是非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。

14. 如权利要求 10 所述的用途,其特征在于,所述表达 CD19 的癌症是慢性淋巴细胞白血病或弥漫性大 B 细胞淋巴瘤。

CD19 结合剂及其应用

[0001] 本申请要求 2007/10/19 提交的美国临时申请 60/981,206 ;2008/01/04 提交的美国临时申请 61/019,214 ;以及 2008/07/11 提交的美国临时申请 61/080,169 的优先权,各份申请的内容被纳入本文作为参考,用于所有目的。

发明领域

[0002] 本发明尤其涉及 CD19 结合剂以及用该 CD19 结合剂治疗疾病的方法。

背景技术

[0003] 在人类中,B 细胞能产生大量抗体分子。当外源抗原被中和时这种抗体产生过程通常停止(或实质性降低)。然而,特定 B 细胞的增殖偶尔将持续不衰减并可能导致称为 B 细胞淋巴瘤的癌症。B- 细胞淋巴瘤,如非霍奇金淋巴瘤 B- 细胞亚型,显著提高癌症死亡率。B- 细胞恶性肿瘤对各种治疗形式的反应是混杂的。尽管在医学上很重要,但对 B- 细胞介导疾病如非霍奇金淋巴瘤的研究仅产生极少临床有用数据,且治疗这种疾病的常规方法仍是乏味、令人不快的和/或具有高复发风险。例如,尽管在高级非霍奇金淋巴瘤的初步治疗中使用高剂量化疗能改善总存活率,但有大约 50% 的患者仍死于该病。Devesa 等, J. Nat' l Cancer Inst. 79 :701 (1987)。此外,低级非霍奇金淋巴瘤样慢性淋巴细胞性白血病和外套细胞淋巴瘤仍旧不可治愈。这便刺激人们研究诸如免疫疗法之类的替代疗法。针对由 CD 抗原确定的细胞表面分子的抗体为开发治疗剂提供了独特的机会。

[0004] 大多数慢性淋巴细胞性白血病为 B- 细胞谱系的。Freedman, Hematol. Oncol. Clin. North Am. 4 :405, 1990。这类 B- 细胞恶性肿瘤是西方最常见的白血病。Goodman 等, Leukemia and Lymphoma 22 :1, 1996。慢性淋巴细胞性白血病的天然病史分为若干阶段。在早期阶段,慢性淋巴细胞性白血病是一种无痛疾病,其特征是具有较长生命跨度的、小的、成熟的机能不全恶性 B 细胞的累积。最后,恶性 B 细胞的倍增时间减少,患者出现症状。尽管治疗可以缓解症状,但对患者的总存活率影响甚微。晚期慢性淋巴细胞性白血病的特征在于明显的贫血和/或血小板减少。此时,生存中值不足两年。Foon 等, Annals Int. Medicine 113 :525 (1990)。

[0005] B 细胞表达可用作分化和鉴定标记物的细胞表面蛋白。CD19 是一种在前 B 细胞发育的早期阶段到终末分化表达的泛 B 细胞膜糖蛋白,能调节 B 淋巴细胞的发育和功能。在大多数淋巴来源的肿瘤、大多数非霍奇金淋巴瘤(NHL)和包括慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(WM)在内的白血病上鉴定到 CD19 的表达。尽管对 NHL 和 CLL 患者的治疗已经有了巨大改进,但大多数会复发,并且需要用非交叉耐受性化合物补救以改善患者存活率。本领域需要改进的治疗方法。本发明解决了这种和其它需求。

发明内容

[0006] 本发明尤其提供了 CD19 结合剂及其应用方法。在一些方面,所述结合剂包含人源

化重链可变区和 / 或人源化轻链可变区的氨基酸序列并特异性结合于人 CD19。在一些实施方式中,所述 CD19 结合剂是特异性结合于人 CD19 的抗原 - 结合抗体片段。所述抗体片段可以是,例如, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 片段,双特异抗体 (diabody),线型抗体, scFv,或 scFv-Fc。

[0007] 在一些方面,所述 CD19 结合剂对表达 CD19 的细胞有细胞毒、细胞生长抑制和 / 或免疫调节效应。例如,这种效应可由消耗表达 CD19 的细胞或者抑制其增殖或分化而介导。在一些实施方式中,所述 CD19 结合剂可介导效应功能。在一些实施方式中,所述 CD19 结合剂偶联于治疗剂 (如,配体 - 药物偶联化合物)。在其他实施方式中,所述 CD19 结合剂是未偶联的,即没有偶联于治疗剂 (例如,抗 -CD19 裸抗体)。

[0008] 本发明尤其提供了配体 - 药物偶联化合物,其中的配体单元是本发明的 CD19 结合剂。所述配体 - 药物偶联物可用于,例如,治疗免疫疾病或癌症。

[0009] 用本发明方法治疗的癌症包括表达 CD19 的癌症,包括,例如, B- 细胞谱系恶性肿瘤如 B 细胞淋巴瘤或 B 细胞白血病,包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤,慢性淋巴细胞性白血病,和急性成淋巴细胞性白血病。

[0010] 还提供了杀伤表达 CD19 的肿瘤细胞的方法以及抑制表达 CD19 的肿瘤细胞增殖或分化的方法。这种方法可包括给予细胞 CD19 结合剂,所述结合剂特异性结合于表达人 CD19 的细胞并能够,例如,杀死所述细胞或抑制其增殖或分化。在一些实施方式中,将给予没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗 -CD19 全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中,将给予偶联于配体 - 药物偶联物 (如,偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂 (如,全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物))。在一些实施方式中,所述本发明方法将有效消耗例如外周血、脾脏、肠系膜和下颌淋巴结中的 B 细胞。

[0011] 本发明包括诱导与免疫疾病有关的 B 细胞如外周 B 细胞消耗的方法。该方法可包括给予细胞 CD19 结合剂。在一些实施方式中,将给予没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗 -CD19 全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中,将给予偶联于配体 - 药物偶联物 (如,偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂 (如,全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物))。在一些实施方式中,所述免疫疾病是类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症或炎性肠病。

[0012] 本发明还提供了 CD19 结合剂在制造用于治疗疾病的药物中的应用。在一些实施方式中,将使用没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗 -CD19 全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中,将使用配体 - 药物偶联物 (如,偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂 (如,全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物))。

[0013] 本发明还提供了 CD19 结合剂在制造用于消耗 B 细胞的药物中的应用。在一些实施方式中,将使用没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗 -CD19 全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中,将使用配体 - 药物偶联物 (如,偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂 (如,全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物))。

[0014] 本发明还提供了 CD19 结合剂在制造用于杀伤表达 CD19 的细胞或者抑制其增殖或

分化的药物中的应用。在一些实施方式中,将使用没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗-CD19 全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中,将使用配体-药物偶联物(如,偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂(如,全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物))。

[0015] 在另一方面,提供了药物组合物,该组合物包含 CD19 结合剂和药学上可接受的赋形剂。在一些实施方式中,所述药物组合物将包含没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗-CD19 全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中,所述药物组合物将包含配体-药物偶联物(如,偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂(如,全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物))。

[0016] 在另一方面,提供了制造配体-药物偶联化物的方法。在一个方面,CD19 结合剂直接或通过接头偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂,如下文更加详细描述。

[0017] 通过阅读以下详细描述、特定实施方式的非限制性实施例以及附图和序列列表能更充分地理解本发明。

附图说明

[0018] 图 1:CD19 抗体与非人灵长类脾细胞结合的 FACS 结果。

[0019] 图 2:重链和轻链可变区与 CD19 的结合分析。

[0020] 图 3:裸 mBU12 抗体和 mBU12-mcMMAF 对 Ramos 异种移植 SCID 模型的抗肿瘤活性。各组小鼠(5/组)未处理,或当肿瘤体积平均约为 100mm^3 时接受 mBU12 裸抗体(1mg/kg)、mBU12 裸抗体(5mg/kg)、mBU12-mcMMAF4(1mg/kg) 和 mBU12-mcMMAF4(5mg/kg)。剂量方案为 q4dx3。

[0021] 图 4:抗-CD19 抗体-药物偶联物对 SCID 小鼠 Ramos 肿瘤模型的抗肿瘤活性。各组小鼠(5/组)未处理,或当肿瘤体积平均约为 100mm^3 时用 cBU12-mcMMAF8(3mg/kg ; 1/5 小鼠完全反应), cHD37-mcMMAF8(3mg/kg ; 5/5 小鼠完全反应), c4g7-mcMMAF8(3mg/kg ; 0/5 小鼠完全反应)、或 cFMC63-mcMMAF8(3mg/kg ; 5/5 小鼠完全反应)处理。剂量方案为 q4dx3 iv。在 CR 反应中,研究期间三次连续测量的肿瘤体积小于 13.5mm^3 。

[0022] 图 5:抗-CD19 抗体-药物偶联物对 SCID 小鼠 Ramos 肿瘤模型的抗肿瘤活性。各组小鼠(10/组)未处理,或当肿瘤体积平均约为 100mm^3 时用 cBU12-mcMMAF8(3mg/kg ; 6/10 小鼠完全反应), hBU12-mcMMAF8(3mg/kg ; 10/10 小鼠完全反应; IgG₁恒定区), hBU12-mcMMAF8(3mg/kg ; 6/10 小鼠完全反应; IgG₄恒定区), cHD37-mcMMAF8(3mg/kg ; 10/10 小鼠完全反应), cFMC63-mcMMAF8(3mg/kg ; 10/10 小鼠完全反应), c4G7-mcMMAF8(3mg/kg ; 10/10 小鼠完全反应),或 cAC10-mcMMAF8(3mg/kg ; 0/10 小鼠完全反应)处理。剂量方案为 q4dx4iv。

[0023] 图 6:cBU12-mcMMAF8 和 cHD37-mcMMAF8 的波谷水平对比。

[0024] 图 7:抗-CD19 抗体-药物偶联物对 SCID 小鼠 Ramos 肿瘤模型的抗肿瘤活性。各组小鼠(10/组)未处理,或当肿瘤体积平均约为 100mm^3 时用 hBU12-mcMMAF8(3mg/kg ; 10/10 小鼠完全反应), cHD37-mcMMAF8(3mg/kg ; 10/10 小鼠完全反应),或 cAC10-mcMMAF8(3mg/kg ; 0/10 小鼠完全反应)处理。剂量方案为 q4dx4iv。

[0025] 图 8:抗-CD19 抗体-药物偶联物对 SCID 小鼠 DoHH2 肿瘤模型的抗肿瘤活

性。各组小鼠(5/组)未处理,或当肿瘤体积平均约为 100mm^3 时用 cAC10-mcMMAF8(3mg/kg), cBU12-mcMMAF8(3mg/kg), hBU12-mcMMAF8(3mg/kg), cHD37-mcMMAF8(3mg/kg) 或 cFMC63-mcMMAF8(3mg/kg) 处理。剂量方案为 q4dx4ip。

[0026] 图 9:用抗-CD19 抗体-药物偶联物处理的 SCID 小鼠 Nalm-6 肿瘤模型的存活试验。各组小鼠(5/组)未处理,或用 cAC 10-mcMMAF8(3mg/kg), cBU12-mcMMAF8(3mg/kg), hBU12-mcMMAF8(3mg/kg);cHD37-mcMMAF8(3mg/kg), 或 cFMC63-mcMMAF8(3mg/kg) 处理。剂量方案为 q4dx4iv。

[0027] 图 10:hBU12-mcMMAF8(3mg/kg) 和 cHD37-mcMMAF8(3mg/kg) 的波谷水平对比。每组处理 5 只小鼠。

[0028] 图 11:hBU12 抗体-药物偶联物对 SCID 小鼠 Ramos 肿瘤模型的抗肿瘤活性。各组小鼠(10/组)未处理,或用 hBU12-vcMMAE4(1mg/kg;0/10 完全反应),hBU12-vcMMAE4(3mg/kg;7/10 完全反应),hBU12-vcMMAF4(0.3mg/kg;0/10 完全反应)hBU12-vcMMAF4(1mg/kg;0/10 完全反应),hBU12-vcMMAF4(3mg/kg;1/10 完全反应),hBU12-mcMMAF8(1mg/kg;0/10 完全反应),或 hBU12-mcMMAF8(3mg/kg;10/10 完全反应)处理。剂量方案为 q4dx4 iv。

[0029] 图 12:抗-CD19 抗体-药物偶联物对 SCID 小鼠 DoHH2 肿瘤模型的抗肿瘤活性。各组小鼠(1/组)用 1mg/kg、3mg/kg 或 10mg/kg 的 hBU12-vcMMAE4、-mcMMAF4 和 -mcMMAF8 处理。剂量方案一次 ip 剂量。

[0030] 图 13:Ramos 细胞和抗-CD19 抗体一起培养,所述抗体与 2 倍过量山羊-抗-小鼠配体药物偶联物(vcMMAF8)交联。将培养物培育 96 小时并用 $50\mu\text{M}$ 刃天青标记。数值表示一次试验中四次测量的平均值 $\pm$ SD。

[0031] 图 14:CD19 和 CD21 的表达水平以及 hBU12-vcMMAE4 和 hBU12-mcMMAF4 对培养物中生长的 ALL、CLL 和 NHL 肿瘤细胞系的细胞毒性。

[0032] 图 15:hBU12-vcMMAE4 在 NHL 和 ALL 肿瘤细胞系上的内在化动力学和胞内运输。

[0033] 图 16A-16E:在 NHL 模型中检测 hBU12-vcMMAE4 的异种移植实验。在 SCID 小鼠的右侧皮下植入 5×10^6 个肿瘤细胞并在平均肿瘤体积达到 100mm^3 时开始处理。处理包括腹膜内(ip)给予 1 或 3mg/kg, q4dx4 hBU12-vcMMAE4。每个治疗组有 7-10 只小鼠。16A.) NHL 细胞系(伯基特淋巴瘤)的生长曲线。16B.) 滤泡性淋巴瘤细胞系 DOHH2 的生长曲线。16C.) 弥散性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)细胞系 DLCL2 的生长曲线。16D.) 经尾静脉植入 ALL 细胞系 RS4;11 的小鼠的存活曲线。在植入肿瘤后第 7 天以 q4dx4 ip 方案开始处理小鼠。16E.) 经尾静脉植入 ALL 细胞系 Nalm-6 的小鼠的存活曲线。在植入肿瘤后第 7 天以所示剂量的单次剂量 hBU12-vcMMAE4 通过腹膜内注射开始处理。

[0034] 图 17A-17D:hBU12-vcE 在利妥昔单抗耐受性淋巴瘤中的功效。17A.) 给 SCID 小鼠植入 5×10^6 亲代 Ramos-P 细胞系以产生利妥昔单抗耐受性肿瘤。利妥昔单抗(12mg/kg, q4dx4) 和 hBU12-vcE(3mg/kg, q4dx4) 的肿瘤生长抑制水平相当。17B.) 用 hBU12-vcE(1 和 3mg/kg, IP, q4dx4) 或利妥昔单抗(12mg/kg, q4dx4, IP) 处理的利妥昔单抗耐受性 Ramos 肿瘤(R-Ramos)的肿瘤生长曲线。这些化合物诱导的肿瘤生长延迟在统计学上有显著差异。17C.) 从 Ramos-P(敏感性)和 R-Ramos(耐受性)肿瘤分离的细胞上 CD19 和 CD20 表达的 FACS 分析。在两种肿瘤中这两种抗原的表达水平相当。17D.) hBU12-vcE 对用 1 和 3mg/kg q4dx4hBU12-vcE 或对照偶联物处理的皮下移植利妥昔单抗耐受性 Raji2R 肿瘤(NHL, 伯基

特淋巴瘤)的抗-淋巴瘤效应。在 9/10 的 hBU12-vcE 处理小鼠中观察到持续消退,而利妥昔单抗 (12mg/kg, q4dx4) 没有显著影响肿瘤生长。每组 5-10 小鼠。持续反应 (DR) 定义为在整个实验期间完全不存在可触知的肿瘤。

[0035] 图 18 :hBU12 在 ALL 弥散模型中的活性。小鼠在植入肿瘤后的第一天接受单剂量 10mg/kg hBU12、hBU12-vcE (4) 或 hBU12-mcF (4), IP。每组 10 只小鼠。

[0036] 图 19 :hBU12 在 NHL 皮下模型 (SUDHL4) 中的抗肿瘤效应有限每个治疗组 8-10 只小鼠。剂量方案为 Q4dx4, IP。

[0037] 发明详述

[0038] 本发明尤其提供了特异性结合人 CD19 的 CD19 结合剂。具体地说,发明人设计了人源化 BU12 抗体和包含人源化 BU12 抗体的配体-药物偶联化合物。

[0039] 在某些方面,本发明的 CD19 结合剂包含抗体 mBU12 的至少一个 CDR 区。在某些方面,本发明的 CD19 结合剂包含抗体 mBU12 的所有六个 CDR 区。在一些实施方式中,所述 CDR 区具有至少一个、至少两个或至少三个抗体 mBU12 CDR 的保守性氨基酸氨基酸取代。

[0040] 在某些方面,本发明的 CD19 结合剂包含抗体重链可变区和 / 或抗体轻链可变区,包括其衍生物。

[0041] 在一些方面,所述组合物和方法涉及结合 CD19 的抗体,包括抗体衍生物。在某些方面,所述抗-CD19 抗体和衍生物包含抗体 BU12 的人源化重链可变区和 / 或人源化轻链可变区的氨基酸序列,包括其衍生物。在某些方面,所述抗-CD19 抗体和衍生物包含抗体 mBU12 CDR 区中的至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、所有六个。在一些实施方式中,所述抗-CD19 抗体包括至少一个免疫球蛋白恒定区结构域,或者抗体的完整恒定区,如人恒定区,或者任选其功能活性部分。在一些实施方式中,所述抗体恒定区或结构域是 IgG 类的。在一些实施方式中,所述抗体恒定结构域是 IgG1、IgG2 或 IgG1V1。

[0042] 在某些方面,所述组合物和方法涉及结合 CD19 并偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗体,包括抗体衍生物。在某些实施方式中,所述抗体具有改变的糖基化模式。

[0043] 为了清楚说明而非限制,将发明详述分成以下小章节。

[0044] 定义和缩写

[0045] 除非另有说明,当在文中使用商品名时,提及的商品名也表示该商品名产品的产品配方、普通药、以及活性药物成分。

[0046] 术语“CD19 结合剂”和“抗-CD19 结合剂”在文中表示特异性结合于 CD19 的分子,如蛋白质。例子可包括全长抗-CD19 抗体、全长抗-CD19 抗体的片段、或包含抗体重链和或轻链可变区的其他试剂,以及其衍生物。

[0047] 术语“特异性结合”指 CD19 结合剂以高度选择性方式与其相应靶点 CD19 相互作用,但不与各种其它抗原相互作用。通常,CD19 结合剂的结合亲和力为至少约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$, 优选 10^{-8}M - 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 或 10^{-12}M , 其结合预定抗原的亲和力是结合除预定抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原 (如 BSA、酪蛋白) 的亲和力的至少两倍。

[0048] 文中,术语“功能”用于 CD19 结合剂时表示该结合剂能够特异性结合于 CD19。

[0049] 本文所用术语“抑制”指发生可检测的下降,或完全阻止。

[0050] 提到 CD19 结合剂对 CD19 表达细胞的作用时,术语“消耗”指大量减少或消除 CD19 表达细胞。

[0051] “天然抗体”和“天然免疫球蛋白”在文中定义为通常约 150,000 道尔顿的异质四聚体糖蛋白,它们由两个轻链(L)和两个重链(H)组成。每条轻链通过二硫键共价结合于重链从而形成异质二聚体。由该异质二聚体两条重链之间的共价二硫键形成异质四聚体。虽然轻链和重链通过二硫键连接在一起,但两条重链之间的二硫键数量随不同免疫球蛋白(Ig)同种型而变化。各条重链和轻链也含有规则间隔的链内二硫桥键。各条重链的氨基端含有可变区(V_H),后接三个或四个恒定区(C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 和/或 C_{H4} ,视抗体类型而定),以及 C_{H1} 和 C_{H2} 之间的铰链(J)区。各轻链含有两个结构域,即氨基端可变区(V_L)和羧基端恒定区(C_L)。 V_L 结构域与 V_H 结构域非共价连接,而 C_L 结构域通常通过二硫键共价连接于 C_{H1} 结构域。相信特定氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面(Chothia等,1985, J. Mol. Biol. 186 :651-663)。

[0052] 术语“高变”指在抗体之间序列广泛不同的免疫球蛋白可变区内的某些序列,它含有直接参与各具体抗体与其特异性抗原决定簇的结合和特异性的残基。轻链和重链可变区内的高变性集中在称为互补决定区(CDR)或高变环(HVL)的三个部分。Kabat等(1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质的序列),第5版,公共健康服务部(Public Health Service),国立卫生研究院(National Institutes of Health),马里兰州贝塞斯达)通过序列比较确定了CDR,而如Chothia和Lesk,1987, J. Mol. Biol. 196 :901-917所述按照可变区的三维结构从结构上确定了HVL。如Kabat所述,在轻链可变区中,CDR-L1大概位于残基24-34处,CDR-L2大概位于残基50-56处,CDR-L3大概位于残基89-97处。在重链可变区中,CDR-H1大概位于31-35处,CDR-H2大概位于50-65处,CDR-H3大概位于95-102处。

[0053] 各条重链和轻链中的三个CDR由构架区(FR)隔开。FR和CDR以下述顺序分布于重链和轻链可变区的氨基端至羧基端:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。FR的大 β -片层构型使各链的CDR互相接近,并且接近其它链的CDR。得到的构象有助于产生抗原结合位点(参见Kabat等,1991,NIH出版号91-3242,第I卷,第647-669页),但不是所有CDR残基一定直接参与抗原结合。

[0054] FR残基和Ig恒定区一般不直接参与抗原结合,但可能有助于抗原结合或介导抗体效应功能。一些FR残基可能通过至少以下三种方式对抗原结合施加显著影响:直接非共价结合于表位、与一个或多个CDR残基相互作用、影响轻链和重链之间的界面。在一些实施方式中,恒定区介导各种Ig效应功能,如抗体参与抗体依赖性细胞毒效应(ADCC)、补体依赖性细胞毒效应(CDC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。

[0055] 根据恒定区的氨基酸序列,将脊椎动物免疫球蛋白的轻链分为两种明显不同的类型 κ 和 λ 。与其相比,按照恒定区的序列将哺乳动物免疫球蛋白的重链分为五种主要类型:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。IgG和IgA进一步分为亚型(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类型免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。天然免疫球蛋白类型的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0056] 术语“抗体”、“抗-CD19抗体”、“人源化抗-CD19抗体”和“变体人源化抗-CD19抗体”在本文中以最广泛的含义使用,具体包括全长和天然抗体、单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(如双特异性抗体)和其抗体片段,如具有所需生物学活性(如CD19结合)的抗体的可变区和其它部分。术语“抗-CD19抗体片段”、“人源化

抗-CD19 抗体片段”和“变体人源化抗-CD19 抗体片段”表示全长抗-CD19 抗体的一部分，其中的可变区或功能得以保留，例如，特异性 CD19 表位结合。抗体片段的例子包括，但不限于，Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv 和 scFv-Fc 片段，双特异抗体，线型抗体，小体和由抗原-结合抗体片段形成的多特异性抗体。“抗体”的定义尤其包括抗体片段。

[0057] 术语“单克隆抗体”或“mAb”指获自基本均一抗体群体的抗体；即，群体中所含的单个抗体相同，但可能存在少量天然产生的突变。单克隆抗体的特异性高，对抗一种抗原决定簇，也称为表位。修饰词“单克隆”表明是对抗相同表位的基本均一的抗体群体，并且不应理解为要求用任何具体方法来产生该抗体。可通过本领域已知的任何技术或方法制备单克隆抗体；例如，本领域已知首先由 Köhler 等，1975, Nature 256:495 描述的杂交瘤方法，或者重组 DNA 法（参见例如，美国专利号 4,816,567）。在另一个实施例中，也可采用 Clackson 等，1991, Nature 352:624-628 和 Marks 等，1991, J. Mol. Biol. 222:581-597 所述的技术从噬菌体抗体文库分离单克隆抗体。

[0058] 本文所用术语“嵌合”抗体是一种单克隆抗体类型，其中重链和 / 或轻链的一个或多个区域或结构域中部分或全部氨基酸序列与另一物种或属于另一种免疫球蛋白类型或同种型的单克隆抗体的相应序列相同、同源或是其变体，或来自共有序列。嵌合抗体的一个例子是具有衍生自非人单克隆抗体的可变区和人 IgG 免疫球蛋白恒定区的抗体。嵌合抗体包括这种抗体的片段，条件是该抗体片段具有其母体抗体的所需生物学活性，如结合于同一表位（参见例如美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等，1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA81:6851-6855）。制备嵌合抗体的方法是本领域已知的。（参见例如 Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi 等，1986, BioTechniques 4:214; Gillies 等，1989, J. Immunol. Methods 125:191-202；美国专利 5,807,715；4,816,567；和 4,816,397。）

[0059] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段是含有抗体的 V_H和 V_L结构域的单链 Fv 变体，其中该结构域以单链多肽的形式存在，能够识别和结合抗原。scFv 多肽任选地含有位于 V_H和 V_L结构域之间的多肽接头，此接头使 scFv 能够形成用于结合抗原的三维结构（参见例如，Pluckthun, 1994,《单克隆抗体的药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibody), 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, 纽约, 第 269-315 页)。

[0060] 术语“双特异抗体”指含有两个抗原-结合位点的小抗体片段。各片段含有重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L)，V_H和 V_L连接形成 V_H-V_L或 V_L-V_H多肽。采用对于同一条链上两个结构域之间配对来说太短的接头，迫使连接的 V_H-V_L结构域与另一条链的互补结构域配对，产生两个抗原-结合位点。例如，EP 404097；WO 93/11161；和 Hollinger 等，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448 中更详细地描述了双特异抗体。

[0061] 术语“线型抗体”指含有能形成一对抗原结合区的一对串联 Fd 节段 (VH-CH1-VH-CH1) 的抗体。线型抗体可以是双特异性或单特异性，如 Zapata 等，1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062 所述。

[0062] 为本文的目的，“人源化”抗体指能够结合预定抗原并包含构架区和 CDR 的免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段，该构架区主要具有人免疫球蛋白的氨基酸序列，该 CDR 主要具有非人免疫球蛋白的氨基酸序列。

[0063] 通常，人源化抗体含有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基在本文中称为“输入”残基，它们一般取自“输入”抗体结构域，特别是可变

区。输入的残基、序列或抗体具有所需的亲和力和 / 或特异性,或其它所需抗体生物学活性,如本文所述。

[0064] 通常,人源化抗体包含基本上所有的至少一个、一般是两个可变区,其中所有或基本上全部 CDR 区均对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,并且所有或基本上全部 FR 区都是人免疫球蛋白序列的构架区,如来自共有或种系序列。人源化抗体也任选地含有免疫球蛋白,一般是人免疫球蛋白的 Fc 区的至少一部分。在某些方面,抗体将同时可含有轻链可变区以及重链可变区。抗体也可适当地包括重链的 C_H1、铰链(J)、C_H2、C_H3 和 / 或 C_H4 区,以及轻链的 C_L区。

[0065] 人源化抗体可选自任何类型的免疫球蛋白(包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE)或者任何同种型(包括 IgG₁、IgG₂、IgG₃和 IgG₄,以及 IgA₁和 IgA₂)。免疫球蛋白类型或同种型的选择将部分取决于所需的效应功能。例如,人免疫球蛋白介导 CDC 和 ADCC/ADCP 的能力通常排序为 IgM ≈ IgG₁ ≈ IgG₃ > IgG₂ > IgG₄ 和 IgG₁ ≈ IgG₃ > IgG₂/IgM/IgG₄。人源化抗体可包含来自多于一种类型或同种型的序列,本领域普通技术人员能通过选择具体的恒定区来优化所需的效应功能。人源化抗体可以具有或不具有效应功能。

[0066] 人源化抗体的 FR 和 CDR 区不需要准确对应于母体序列,例如:可通过取代、插入或缺失至少一个残基改变输入 CDR 或共有 FR,以使该位点的 CDR 或 FR 残基不对应于共有或输入抗体。一般不会广泛发生这种突变。通常,至少 75%、更常见 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或至少 99%的人源化抗体残基对应于母体 FR 和 CDR 序列的残基。

[0067] “治疗剂”是对癌细胞或活化免疫细胞产生细胞毒、细胞生长抑制和 / 或免疫调节作用的物质。治疗剂的例子包括细胞毒剂、化疗药、细胞生长抑制剂和免疫调节剂。

[0068] “化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。

[0069] “细胞毒效应”指消耗、消除和 / 或杀伤靶细胞。“细胞毒剂”指对细胞有细胞毒和 / 或细胞生长抑制效应的物质。该术语应包括放射性同位素(如 I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰和 Re¹⁸⁶)、化疗药和毒素,如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,以及它们的片段。

[0070] “细胞生长抑制效应”指抑制细胞增殖。“细胞生长抑制剂”指对细胞有细胞生长抑制效应,从而抑制特定的细胞亚组生长和 / 或扩增的物质。

[0071] 术语“标记”指直接或间接偶联于结合剂(如,抗体)的可检测化合物或组合物。该标记本身可检测(如放射性同位素标记或荧光标记),或者,在酶标记的情况下,该标记可催化底物化合物或组合物发生可检测的化学改变。可制备标记的 CD19 结合剂并用于各种应用,包括体外和体内诊断。有用的标记包括诊断剂如造影剂(如用于核磁共振成像、计算机断层摄影术或超声,如锰、铁或钆)。

[0072] “分离的”核酸分子是从在天然来源的核酸中通常与其结合的至少一种污染性核酸分子中分离和鉴定到的核酸分子。分离的核酸分子并非其天然发现的形式或情形。因此,分离的核酸分子不同于天然细胞中存在的核酸分子。然而,当(例如)核酸分子在染色体上的位置不同于天然细胞时,分离的核酸分子包括通常表达该核酸的细胞中所含的核酸分子。

[0073] 术语“控制序列”指在具体的宿主生物体中表达操作性连接的编码序列所必需的多核苷酸序列。适用于原核细胞的控制序列包括例如:启动子、操纵子和核糖体结合位点序

列。真核控制序列包括但不限于：启动子、聚腺苷酸化信号和增强子。这些控制序列可用于在原核和真核宿主细胞中表达和生产 CD19 结合剂。

[0074] 一核酸序列与另一核酸序列形成功能性关联时，它们“操作性连接”。例如，如果表达为参与多肽分泌的前蛋白，则核酸前序列或分泌前导物操作性连接于编码多肽的核酸；如果影响了编码序列的转录，则启动子或增强子操作性连接于编码序列；或者如果核糖体结合位点的定位有利于翻译，则核糖体结合位点操作性连接于编码序列。通常，“操作性连接”指连接的核酸序列毗连，在分泌性前导物的情况下，毗连并且在阅读框中。然而，增强子任选为毗连的。可通过在方便的限制性位点连接来实现连接。如果不存在这种位点，可采用合成寡核苷酸衔接子、接头或本领域已知的其它方法。

[0075] 术语“多肽”指氨基酸聚合物和其等同物，不指特定长度的产物；因此，多肽的定义包括“肽”和“蛋白质”。多肽的定义也包括本文所述的“抗体”。“多肽区”指多肽节段，该节段可含有（例如）一个或多个结构域或基序（如抗体的多肽区可含有（例如）一个或多个互补决定区（CDR））。术语“片段”指优选含有该多肽的至少 20 个毗连或至少 50 个毗连氨基酸的多肽部分。

[0076] 除非文中另有说明，“衍生物”是相对于第二种多肽，含有一个或多个非保守性或保守性氨基酸取代的多肽或其片段（也称为“变体”）；或者通过共价连接第二种分子，例如连接异源性多肽，或通过糖基化、乙酰化、磷酸化等修饰的多肽或其片段。“衍生物”的定义还包括例如，含有一种或多种氨基酸类似物（如非天然氨基酸等）的多肽、含有未取代连接以及本领域已知的其它（天然或非天然）修饰的多肽。

[0077] “分离的”多肽是从天然环境的组分中鉴定和分离和 / 或回收的多肽。其天然环境的污染组分是会干扰该多肽的诊断或治疗应用的物质，可包括酶、激素和其它蛋白性或非蛋白性溶质。分离的多肽包括分离的抗体，或其片段或衍生物。

[0078] 在某些实施方式中，将抗体纯化至 (1) 按照 Lowry 法测定，纯化至 95 重量%以上，在其它方面纯化至 99 重量%以上，(2) 足以用转杯顺序分析仪获得 N 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的程度，或者 (3) 在还原或非还原条件下用考马斯蓝或优选的银染料进行 SDS-PAGE 分析时呈现均一性。“分离的抗体”包括重组细胞内的原位抗体，因为抗体天然环境的至少一种组分不存在。

[0079] 提到多肽时，术语“异源”指与另一多肽相比来自不同来源（如细胞、组织、生物体或物种），因此两种多肽不同。一般地，异源多肽来自不同物种。

[0080] 提到免疫球蛋白多肽或其片段时，“保守取代”指基本不降低免疫球蛋白多肽或其片段与抗原的特异性结合（例如用 K_D 测定）的一个或多个氨基酸取代（即经标准结合实验如 ELISA 测定，能提高结合、不显著改变结合或使结合降低不超过约 40%、一般不超过约 30%、更一般不超过约 20%、更一般不超过约 10%、或者最一般不超过约 5% 的取代）。

[0081] 提到两种或更多种核酸或多肽序列时，术语“相同”或“相同性百分数”指比较和比对最大对应性时，两种或多种序列或亚序列相同或其中特定百分数的核苷酸或氨基酸残基相同。为了测定相同性百分数，出于最优比较目的比对序列（如可将空位引入第一种氨基酸序列或核酸序列，以便与第二种氨基或核酸序列最优比对）。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。如果第一种序列中的位置被与第二种序列的相应位置上相同的氨基酸残基或核苷酸占据，那么这两种分子在该位置上相同。两种序列的相

同性百分数是序列共有的相同位置数量的函数(即%相同性=相同位置的数量/位置总数(如重叠位置) $\times 100$)。在一些实施方式中,这两种序列长度相同。

[0082] 提到两种核酸或多肽时,术语“基本相同”指两种或更多种序列或亚序列的相同性为至少 90%,至少 91%,至少 92%,至少 93%,至少 94%,至少 95%,至少 96%,至少 97%,至少 98%或至少 99%(例如用下述方法之一测定)。

[0083] 采用本领域已知或本文所述的各种标准免疫试验测定,就本发明 CD19 结合剂而言,含有与抗-CD19 抗体的一种或多种抗原结合区(如重链或轻链可变区,或者重链或轻链 CDR)基本相同的一个或多个多肽区的蛋白质能维持与抗-CD19 抗体识别的 CD19 表位的特异性结合。

[0084] 可采用数学算法确定两个序列之间的相同性百分数。用于比较两个序列的数学算法的非限制性例子是 Karlin 和 Altschul,1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87 : 2264-2268 的算法,该算法由 Karlin 和 Altschul,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 : 5873-5877 进行了改良。将这类算法结合到 Altschul 等,1990, J. Mol. Biol., 215 :403-410 的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。可利用 NBLAST 程序进行 BLAST 核苷酸搜索(评分=100,字长=12),以获得与编码感兴趣蛋白质的核酸同源的核苷酸序列。可利用 XBLAST 程序进行 BLAST 蛋白质搜索(评分=50,字长=3),以获得与感兴趣蛋白质同源的氨基酸序列。为了进行空位比对(出于比较目的),可如 Altschul 等,1997, Nucleic Acids Res., 25 :3389-3402 所述利用空位 BLAST。或者,可采用 PSI-Blast 进行迭代搜索,其检测分子之间的距离关系(同上)。利用 BLAST、空位 BLAST 和 PSI-Blast 程序时,可使用各程序(如 XBLAST 和 NBLAST)的默认参数。用于比较序列的数学算法的另一个非限制性例子是 Myers 和 Miller, CABIOS(1989) 的算法。将这类算法整合到 ALIGN 程序(版本 2.0),它是 GCG 序列比对软件包的一部分。利用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时,可采用 PAM120 权重残基表、空位长度罚分 12、空位罚分 4。本领域已知用于序列分析的其它算法,包括如 Torellis 和 Robotti,1994, Comput. Appl. Biosci. 10 :3-5 所述的 ADVANCE 和 ADAM;以及 Pearson 和 Lipman,1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :2444-8 所述的 FASTA。在 FASTA 内, ktup 是设定灵敏度和搜索速度的控制选项。如果 ktup = 2,则通过观察成对的比对残基发现所比较的两个序列的相似区域;如果 ktup = 1,则检查单个比对的氨基酸。对蛋白质序列而言, ktup 可设定为 2 或 1,对 DNA 序列而言,可设定为 1-6。如果 keup 未指定,在其默认设置是 2(蛋白质)和 6(DNA)。或者,可利用 CLUSTAL W 算法进行蛋白质序列比对,如 Higgins 等,1996, MethodsEnzymol. 266 :383-402 所述。

[0085] 任选地,例如为确定相同性百分比,可采用 Kabat 编号系统将任意两个抗体序列进行比对,从而将一个抗体序列中的每个氨基酸与另一序列中具有相同 Kabat 编号的氨基酸对准。比对之后,如果将目标抗体区域(如,重链或轻链的整个成熟可变区)与参比抗体的相同区域进行比较,则目标和参比抗体区之间的序列相同性百分比为:目标和参比抗体区中同时被相同氨基酸占据的位置数除以两个区域比对位置的总数(不包括空位),再乘以 100 以转换成百分数。

[0086] 本文所用术语“效应细胞”指表达免疫球蛋白 Fc 区的表面受体(FcR)的细胞。例如,表达 IgG 的表面 FcR,包括 Fc γ RIII(CD16)、Fc γ R II(CD32)和 Fc γ RIII(CD64)的细胞可用作效应细胞。这种效应细胞包括单核细胞、巨噬细胞、天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细

胞和嗜酸性粒细胞。

[0087] 本文所用术语“抗体效应功能”指 Ig 的 Fc 区产生的功能。可通过（例如）Fc 效应物区结合于具有细胞吞噬或裂解活性的免疫细胞上的 Fc 受体或者 Fc 效应物区结合于补体系统的成分来实现这种功能。本发明的 CD19 结合剂可具有或不具有效应功能。

[0088] 本文所用术语“失调”和“CD19- 相关失调”和“CD19- 相关疾病”指能够得益于本文所述 CD19 结合剂治疗的任何疾病。它包括慢性和急性失调或疾病，包括使哺乳动物易患所研究疾病的病理学状态。按本文治疗的疾病的非限制性例子包括表达 CD19 的癌症，其中包括血液恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、白血病和淋巴恶性肿瘤、癌以及炎性疾病、血管新生性疾病或免疫病。下文中公开了疾病的具体例子。

[0089] B 细胞恶性肿瘤也称为 B- 细胞谱系恶性肿瘤，可用本发明方法治疗。术语 B 细胞恶性肿瘤包括衍生自 B 细胞谱系细胞的任何恶性肿瘤。

[0090] 本文所用术语“治疗”和“疗法”等应包括引起任何临床上所需或有益作用的治疗或抑制疾病或失调的方法，所述作用包括但不限于改善或缓解一种或多种症状、消退、减慢或终止疾病或失调的进展。例如，治疗可包括在临床或诊断症状发生之后给对象施用抗 -CD19 抗体或其他 CD19 结合剂以减轻或消除表达 CD19 的失调的临床或诊断症状。治疗的证据可以是症状的严重性减轻、症状数目减少或复发频率降低。

[0091] 除非另有说明，术语“对象”或“患者”可互换使用，指人患者和非人灵长类等哺乳动物，以及兔、狗、猫、大鼠、小鼠等实验动物。因此，术语“对象”或“患者”在文中表示可给予本发明的 CD19 结合剂的任何哺乳类患者或对象。本发明的对象包括那些已被诊断有表达 CD19 的癌症的对象，包括，例如，B 细胞淋巴瘤或 B 细胞白血病，包括，但不限于，非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和急性成淋巴细胞性白血病。在某些实施方式中，对象将具有难治性或复发性表达 CD19 的癌症。本发明的对象包括被诊断有自身免疫性疾病的那些。

[0092] 患有难治性表达 CD19 的癌症的对象是对治疗没有反应的对象，即在治疗后继续出现疾病进展的对象。

[0093] 患有复发性表达 CD19 的癌症的对象是在某一点对治疗有反应、但之后疾病复发或进一步进展的对象。

[0094] 术语“有效量”指足以抑制对象中 CD19- 相关失调的一种或多种临床或诊断症状发生或缓解上述症状的 CD19 结合剂或配体 - 药物偶联物的量。按照本文在“有效方案”中描述的方法给予有效量的药物。术语“有效方案”指足以治疗或预防 CD19- 相关疾病的药物量和给药频率的组合。

[0095] 术语“白血病”表示造血器官的进行性恶性疾病，且通常以血液和骨髓中白细胞及其前体的异常增殖和发育为特征。白血病的临床分类依据通常为：(1) 疾病的持续时间和特征—急性或慢性；(2) 参与的细胞类型：骨髓的（髓性），淋巴的（淋巴细胞性），或单核细胞的；以及 (3) 血液中异常细胞的数目增加或不增加—白血性或非白血性（亚白血病）。白血病包括，例如，急性非淋巴细胞性白血病，慢性淋巴细胞性白血病，急性粒细胞白血病，慢性粒细胞白血病，急性早幼粒细胞白血病，成人 T 细胞白血病，非白血性白血病，白血性白血病，嗜碱细胞性白血病 (basophilic leukemia)，原始细胞白血病，牛白血病，慢性粒细胞白血病，白血病皮肤，胚胎细胞白血病，嗜酸性粒细胞白血病，毛' 白血病，毛细胞白血病，

成血细胞性白血病, 胚胎细胞性白血病 (hemocytoblastic leukemia), 组织细胞白血病, 干细胞白血病, 急性单核细胞白血病, 白细胞减少性白血病, 淋巴白血病, 淋巴细胞白血病, 淋巴细胞白血病, 淋巴性白血病, 淋巴白血病, 淋巴瘤细胞白血病, 肥大细胞白血病, 巨核细胞白血病, 小原粒型白血病, 单核细胞白血病, 粒细胞白血病, 粒细胞性白血病, 骨髓粒细胞白血病, 单核细胞白血病, 纳杰利白血病, 浆细胞白血病, 浆细胞白血病, 早幼粒细胞白血病, 里德细胞白血病, 席林的白血病, 干细胞白血病, 亚白血性白血病, 未分化的细胞白血病。

[0096] 本文所用术语“药学上可接受的”是指经合理医疗判断范围判断适用于接触人体和动物组织而不会产生过度毒性、刺激性、变态反应或其他问题或并发症的与合理效益/风险比相适应的化合物、材料、组合物和/或剂型。术语“药学相容成分”指与 CD19 结合剂或配体-药物偶联物共同给予的药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。

[0097] 术语“药学相容成分”指与 CD19 结合剂一起给予的药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。

[0098] 术语“化合物”涉及和包括化学化合物本身以及化合物的各种形式(无论是否明确说明, 除非文中明确排除), 包括化合物的无定形和结晶形式, 包括多晶型, 这些形式可以是混合物的一部分或者是分离状态; 化合物的游离酸和游离碱形式, 它们通常是本文提供的结构所示形式; 化合物的异构体, 指光学异构体和互变异构体, 其中光学异构体包括对映异构体和非对映异构体, 手性异构体和非手性异构体, 光学异构体包括分离的光学异构体以及光学异构体混合物, 包括外消旋和非外消旋混合物; 其中异构体可以是与一种或多种其它异构体分离或混合的形式; 同位素化合物, 包括含氘和含氚化合物, 并包括含放射性同位素, 包括能有效治疗和诊断的放射性同位素的化合物; 化合物多聚体, 包括二聚体、三聚体等形式; 化合物的盐, 优选药学上可接受的盐, 包括酸加成盐和碱加成盐, 包括具有有机抗衡离子和无机抗衡离子的盐, 包括两性离子形式, 如果化合物与两种或多种抗衡离子相关联, 那么这两种或多种抗衡离子可以相同或不同; 和化合物溶剂合物, 包括半溶剂合物、单溶剂合物、二溶剂合物等, 包括有机溶剂合物和无机溶剂合物, 所述无机溶剂合物包括水合物; 如果化合物与两种或多种溶剂分子相关联, 那么这两种或多种溶剂分子可以相同或不同。在某些情况下, 本文提到本发明化合物时包括明确提及一种或多种上述形式, 如盐和/或溶剂合物, 然而, 这种提法只是为了强调, 不应排除其它上述形式。

[0099] 本文所用的“药学上可接受的盐”指所述化合物的衍生物, 其中通过制备其酸或碱盐而修饰母体化合物。药学上可接受的盐的例子包括但不限于: 碱性残基(如胺)的无机酸或有机酸盐; 酸性残基(如羧酸)的碱或有机盐, 等等。药学上可接受的盐包括由(例如)无毒无机酸或有机酸形成的常规的母体化合物的无毒盐或季铵盐。例如, 这种常规无毒盐包括衍生自无机酸, 例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等的那些盐; 由有机酸, 例如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、对氨基苯磺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、延胡索酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙二磺酸、草酸、羟乙磺酸等制备的盐。通过本领域已知方法制备这些生理上可接受的盐, 例如, 将游离胺碱溶解于过量酸的水性醇溶液中, 或用碱金属碱如氢氧化物或胺中和游离羧酸。

[0100] 除非另有说明, 术语“烷基”指具有约 1-20 个碳原子(以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合), 优选约 1-8 个碳原子的饱和的直链或支链烃。烷

基的例子是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基和 3,3-二甲基-2-丁基。

[0101] 单独出现或作为另一基团一部分的烷基可任选地被一个或多个基团,优选 1-3 个基团(以及选自卤素的任何额外取代基)取代,这些基团包括但不限于:卤素、任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、任选取代的芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$,其中 R' 各自独立地选自 H、任选取代的 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或任选取代的芳基,其中所述任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、任选取代的芳基、任选取代的 $C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 和任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 可以进一步被一个或多个基团任选取代,这些基团包括但不限于: $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、卤素、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、 $-芳基$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$,其中 R'' 各自独立地选自 H、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或芳基。

[0102] 除非另有说明,术语“烯基”和“炔基”指具有约 2-20 个碳原子(以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合),优选约 2-8 个碳原子的直链或支链碳链。烯基链的链中具有至少一个双键,炔基链的链中具有至少一个三键。烯基的例子包括但不限于:乙烯或乙烯基、烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-异丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基和 -2,3-二甲基-2-丁烯基。炔基的例子包括但不限于:乙炔基、炔丙基、乙炔基、丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基、和 -3-甲基-1-丁炔基。

[0103] 单独出现或作为另一基团一部分的烯基和炔基可任选地被一个或多个基团,优选 1-3 个基团(以及选自卤素的任何额外取代基)取代,这些基团包括但不限于:卤素、任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、任选取代的芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$,其中 R' 各自独立地选自 H、任选取代的 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或任选取代的芳基,其中所述任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、任选取代的芳基、任选取代的 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 和任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 可以进一步被一个或多个取代基任选取代,这些取代基包括但不限于: $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、卤素、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、 $-芳基$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$,其中 R'' 各自独立地选自 H、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或芳基。

[0104] 除非另有说明,术语“亚烷基”指具有约 1-20 个碳原子(以及其间的碳原子范围

和碳原子具体数目的所有组合和亚组合), 优选约 1-8 个碳原子, 并具有通过除去母体烷的同一个或两个不同碳原子上的两个氢原子产生的两个单价游离基中心的饱和支链或直链烃基。典型的亚烷基包括但不限于: 亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基、亚癸基、亚 1,4- 环己基等。单独出现或作为另一基团一部分的亚烷基可任选地被一个或多个基团, 优选 1-3 个基团 (以及选自卤素的任何额外取代基) 取代, 这些基团包括但不限于: 卤素、任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、任选取代的芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$, 其中 R' 各自独立地选自 H 、任选取代的 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或任选取代的芳基, 其中所述任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、任选取代的芳基、任选取代的 $C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、和任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 可以进一步被一个或多个取代基任选取代, 这些基团包括但不限于: $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、卤素、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、 $-$ 芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$, 其中 R'' 各自独立地选自 H 、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或芳基。

[0105] 除非另有说明, 术语“亚烯基 (alkenylene)”指含有至少一个碳-碳双键的任选取代的亚烷基。示范性亚烯基包括例如, 亚乙烯基 ($-\text{CH}=\text{CH}-$) 和亚丙烯基 ($-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$)。

[0106] 除非另有说明, 术语“亚炔基 (alkynylene)”指含有至少一个碳-碳三键的任选取代的亚烷基。示范性亚炔基包括例如, 亚乙炔基 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$)、炔丙基 ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$) 和 4- 戊炔 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-$)。

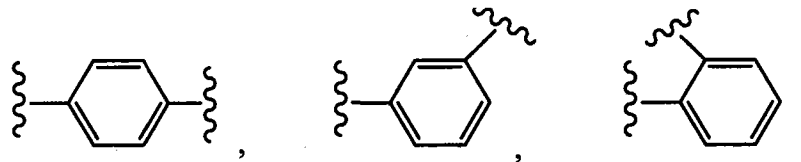
[0107] 除非另有说明, 术语“芳基”指通过除去母体芳环系统的一个碳原子上的一个氢原子获得的 6-20 个碳原子 (以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合) 的单价芳族烃基。示范性结构中, 某些芳基用 “Ar” 表示。典型的芳基包括但不限于: 衍生自苯、取代的苯、苯基、萘、蒽、联苯基等的基团。

[0108] 单独出现或作为另一基团一部分的芳基可任选地被一个或多个基团, 优选 1-5 个基团, 或甚至是 1-2 个基团取代, 这些基团包括但不限于: 卤素、任选取代的 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、任选取代的芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$, 其中 R' 各自独立地选自 H 、任选取代的 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或任选取代的芳基, 其中所述任选取代的 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、任选取代的 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、任选取代的 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、和任选取代的芳基可以进一步被一个或多个基团任选取代, 这些基团包括但不限于: $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 、卤素、 $-O-(C_1-C_8\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、 $-$ 芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$, 其中 R'' 各

自独立地选自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或芳基。

[0109] 除非另有说明,术语“亚芳基 (arylene)”指任选取代的二价芳基 (即通过除去母体芳环系统的同一个或两个不同碳原子上的两个氢原子获得),它可以是邻位、间位或对位构型,如以下结构所示 (以苯基作为示范性芳基):

[0110]



[0111] 典型的“ $-(C_1-C_8$ 亚烷基)芳基”、“ $-(C_2-C_8$ 亚烯基)芳基”和“ $-(C_2-C_8$ 亚炔基)芳基”包括但不限于:苄基、2-苯基乙-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘并苄基、2-萘并苯基乙-1-基等。

[0112] 除非另有说明,术语“杂环”指具有 3-14 个环原子 (也称为环成员) 的单环、双环或多环系统,其中至少一个环中的至少一个环原子是选自 N、O、P 或 S 的杂原子 (包括其间的碳原子和杂原子的范围和具体数目的所有组合和亚组合)。杂环可具有独立选自 N、O、P 或 S 的 1-4 个环杂原子。杂环中的一个或多个 N、C 或 S 原子可以被氧化。单环杂环优选具有 3-7 个环原子 (如 2-6 个碳原子和 1-3 个独立选自 N、O、P 或 S 的杂原子),双环杂环优选具有 5-10 个环成员 (如 4-9 个碳原子和 1-3 个独立选自 N、O、P 或 S 的杂原子)。包含杂原子的环可以是芳环或非芳环。除非另有说明,杂环在可产生稳定结构的任何杂原子或碳原子处连接于其侧链基团。

[0113] 杂环的描述参见 Paquette, “现代杂环化学原理” (Principles of Modern Heterocyclic Chemistry) (W. A. Benjamin, 纽约, 1968), 特别是第 1、3、4、6、7 和 9 章; “杂环化合物的化学: 专题论文集” (The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs) (约翰威利父子公司 (John Wiley & Sons), 纽约, 1950 至今), 具体是第 13、14、16、19 和 28 卷; 和 J. Am. Chem. Soc. 82 :5566 (1960)。

[0114] 除非另有说明,术语“亚杂环基 (heterocyclo)”指任选取代的本文定义的二价杂环基团 (即通过除去母体杂环系统的同一个或两个不同碳原子上的两个氢原子获得)。

[0115] “杂环”基团的例子包括例如但不限于,吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基 (哌啶基)、噻唑基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、硫萘基、吡啶基、假吡啶基、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、吡咯啉基、四氢呋喃基、双四氢呋喃基、四氢吡喃基、双四氢吡喃基、四氢噻啉基、四氢异噻啉基、十氢噻啉基、八氢异噻啉基、吡辛因基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒎基、吡喃基、异苯并呋喃基、色烯基、咕吨基、二苯并氧硫杂环己二烯基 (phenoxathinyl)、2H-吡咯基、异噻唑基、异噻唑基、吡嗪基、哒嗪基、中氮茛基、异吡啶基、3H-吡啶基、1H-吡啶基、嘌呤基、4H-喹啉基、酞嗪基、萘啶基、喹啉基、喹啉基、噌啉基、蝶啶基、4aH-咪唑基、咪唑基、 β -咪唑基、菲啶基、吡啶基、嘧啶基、菲咯啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、呋喃基、吩噻嗪基、异色满基、色满基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、二氢吡啶基、异二氢吡啶基、奎宁环基、吗啉基、噻唑烷基、苯并三唑基、苯并异噻唑基、羟吡啶基、苯并噻唑啉基和靛红酰基 (isatinoyl)。优选的“杂环”基团包括但不限于:苯并呋喃基、苯并苯硫基、吡啶基、苯并吡啶基、香豆酰基 (coumarinyl)、异

喹啉基、吡咯基、苯硫基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、噻吩基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、哒嗪基、异噻唑基、异噁唑基和四唑基。

[0116] 单独出现或作为另一基团一部分的杂环基团可任选地被一个或多个基团, 优选 1-2 个基团取代, 这些基团包括但不限于: 任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、卤素、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、任选取代的 $-$ 芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$, 其中 R' 各自独立地选自 H 、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基或任选取代的芳基, 其中所述任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基和任选取代的芳基可以进一步被一个或多个取代基任选取代, 这些取代基包括但不限于: $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-$ 卤素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、 $-$ 芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$, 其中 R'' 各自独立地选自 H 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或芳基。

[0117] 例如但不限于, 碳-键合杂环可以在以下位置发生键合: 吡啶的 2、3、4、5 或 6 位; 哒嗪的 3、4、5 或 6 位; 嘧啶的 2、4、5 或 6 位; 吡嗪的 2、3、5 或 6 位; 呋喃、四氢呋喃、噻吩、噻吩、吡咯或四氢吡咯的 2、3、4 或 5 位; 噁唑、咪唑或噻唑的 2、4 或 5 位; 异噁唑、吡唑或异噻唑的 3、4 或 5 位; 吡丙啶的 2 或 3 位; 氮杂环丁烷的 2、3 或 4 位; 喹啉的 2、3、4、5、6、7 或 8 位; 或异喹啉的 1、3、4、5、6、7 或 8 位。更一般地, 碳键合杂环包括 2- 吡啶基、3- 吡啶基、4- 吡啶基、5- 吡啶基、6- 吡啶基、3- 哒嗪基、4- 哒嗪基、5- 哒嗪基、6- 哒嗪基、2- 嘧啶基、4- 嘧啶基、5- 嘧啶基、6- 嘧啶基、2- 吡嗪基、3- 吡嗪基、5- 吡嗪基、6- 吡嗪基、2- 噻唑基、4- 噻唑基或 5- 噻唑基。

[0118] 例如但不限于, 氮键合杂环可以在吡丙啶、氮杂环丁烷、吡咯、吡咯烷、2- 吡咯啉、3- 吡咯啉、咪唑、咪唑烷、2- 咪唑啉、3- 咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2- 吡唑啉、3- 吡唑啉、哌啶、哌啶、吡啶、二氢吡啶或 1H- 吡啶的 1 位; 异吡啶或异二氢吡啶的 2 位; 吗啉的 4 位; 和咪唑或 β 咪唑的 9 位键合。更一般地, 氮键合杂环包括 1- 吡丙啶基、1- 吡丁啶基 (1-azetedy1)、1- 吡咯基、1- 咪唑基、1- 吡唑基和 1- 哌啶基。

[0119] 除非另有说明, 术语“碳环”指具有 3-14 个环原子 (以及其间的碳原子范围和碳原子具体数目的所有组合和亚组合) 且所有环原子都是碳原子的饱和或不饱和的非芳族单环、双环或多环系统。单环碳环优选具有 3-6 个环原子, 更优选具有 5 或 6 个环原子。双环碳环优选具有 7-12 个环原子, 如排列为双环 [4, 5]、[5, 5]、[5, 6] 或 [6, 6] 系统, 或具有 9 或 10 个环原子, 排列为双环 [5, 6] 或 [6, 6] 系统。术语“碳环”包括例如, 稠合于芳环的单环碳环 (如, 稠合于苯环的单环碳环)。碳环优选具有 3-8 个碳环原子。

[0120] 单独出现或作为另一基团一部分的碳环基团可任选被一个或多个基团, 优选 1-2 个基团 (以及选自卤素的任何额外取代基) 取代, 这些基团包括但不限于: 卤素、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、任选取

代的芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $=\text{O}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 和 $-\text{CN}$ ，其中 R' 各自独立地选自 H 、任选取代的 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、任选取代的 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、任选取代的 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基或任选取代的芳基，其中所述任选取代的 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、任选取代的 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、任选取代的 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基、任选取代的 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、任选取代的 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{烯基})$ 、任选取代的 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{炔基})$ 和任选取代的芳基可以进一步被一个或多个取代基任选取代，这些取代基包括但不限于： $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基、卤素、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{烯基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{炔基})$ 、 $-\text{芳基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}'')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{SR}''$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}'')$ 、 $-\text{N}(\text{R}'')_2$ 和 $-\text{CN}$ ，其中 R'' 各自独立地选自 H 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基或 $-\text{芳基}$ 。

[0121] 单环碳环取代基的例子包括 $-\text{环丙基}$ 、 $-\text{环丁基}$ 、 $-\text{环戊基}$ 、 $1-\text{环戊}-1-\text{烯基}$ 、 $1-\text{环戊}-2-\text{烯基}$ 、 $1-\text{环戊}-3-\text{烯基}$ 、 $-\text{环己基}$ 、 $1-\text{环己}-1-\text{烯基}$ 、 $1-\text{环己}-2-\text{烯基}$ 、 $1-\text{环己}-3-\text{烯基}$ 、 $-\text{环庚基}$ 、 $-\text{环辛基}$ 、 $1,3-\text{环己二烯基}$ 、 $1,4-\text{环己二烯基}$ 、 $1,3-\text{环庚二烯基}$ 、 $1,3,5-\text{环庚三烯基}$ 和 $-\text{环辛二烯基}$ 。

[0122] 单独使用或作为另一基团一部分的术语“亚碳环基(carbocyclo)”指任选取代的上述二价碳环基团(即通过除去母体碳环系统的同一个或两个不同碳原子上的两个氢原子获得)。

[0123] 当任何变量在任何组分或任何式子中出现一次以上时，它每次出现时的定义相互独立。只有当取代基和/或变量的组合产生稳定化合物时，才允许这种组合。

[0124] 除非文中另有说明，连字号(-)指侧链分子的连接点。因此，术语“ $-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{亚烷基})\text{芳基}$ ”或“ $-\text{C}_1-\text{C}_8\text{亚烷基}(\text{芳基})$ ”指本文定义的 C_1-C_8 亚烷基，其中亚烷基在该亚烷基的任何碳原子上连接于侧链分子且连接于该亚烷基碳原子的一个氢原子被本文定义的芳基取代。

[0125] 当某特定基团被“取代”时，该基团可具有一个或多个取代基，优选1-5个取代基，更优选1-3个取代基，最优选1-2个取代基，取代基独立地选自取代基列表。然而，该基团通常可具有任何数量的选自卤素的取代基。如此表示被取代的基团。

[0126] 特定分子位置上的任何取代基或变量的定义应独立于它在该分子其他位置上的定义。应理解，本领域普通技术人员可选择本发明化合物上的取代基和取代方式，以提供化学性质稳定并容易用本领域已知技术和本文所述方法合成的化合物。

[0127] 本文所用的保护基指选择性阻断(暂时或永久)多官能化合物中的一个反应性位点的基团。本发明所用的合适的羟基保护基在本发明文中是可给予对象的，且在给予对象后可能需要或不需要从母体化合物上切除而使该化合物具有活性。在体内，切割通过正常代谢过程进行。羟基保护基是本领域众所周知的，参见《有机合成中的保护基》(Protective Groups in Organic Synthesis)，T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts(约翰威利父子公司，第3版)，通过引用全文纳入本文用于所有目的，这类保护基包括例如，醚(如，烷基醚和甲硅烷基醚，包括例如，二烷基甲硅烷基醚、三烷基甲硅烷基醚、二烷基烷氧基甲硅烷基醚)、酯、碳酸酯、氨基甲酸酯、磺酸酯和磷酸酯保护基。羟基保护剂的例子包括但不限于：甲醚；甲氧基甲醚、甲硫基甲醚、(苯基二甲基甲硅烷基)甲氧基甲醚、苄氧基甲醚、对-甲氧基苄氧基甲醚、对-硝基苄氧基甲醚、邻-硝基苄氧基甲醚、(4-甲氧基苯氧基)甲醚、愈创木酚

甲醚、叔丁氧基甲醚、4-戊烯氧基甲醚、甲硅烷氧基甲醚、2-甲氧基乙氧基甲醚、2,2,2-三氯乙氧基甲醚、双(2-氯乙氧基)甲醚、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲醚、薄荷氧基甲醚(menthoxyethyl ether)、四氢吡喃基醚、1-甲氧基环己醚、4-甲氧基四氢噻喃基醚、4-甲氧基四氢噻喃基醚 S, S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1-(2-氟苯基)-4-甲氧基哌啶-4-基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氢呋喃基醚、四氢噻吩基醚；取代的乙醚如 1-乙氧基乙醚、1-(2-氯乙氧基)乙醚、1-[2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基]乙醚、1-甲基-1-甲氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基乙醚、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙醚、1-甲基-1-苄氧基乙醚、2-三甲基甲硅烷基醚、叔丁醚、烯丙醚、炔丙醚、对-氯苯基醚、对-甲氧基苯基醚、苄基醚、对-甲氧基苄基醚、3,4-二甲氧基苄基醚三甲基甲硅烷基醚、三乙基甲硅烷基醚、三丙基甲硅烷基醚、二甲基异丙基甲硅烷基醚、二乙基异丙基甲硅烷基醚、二甲基己基甲硅烷基醚、叔丁基二甲基甲硅烷基醚、二苯基甲基甲硅烷基醚、苯甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苄基乙酸酯、苯甲酸酯、甲基碳酸烷基酯、9-苄基甲基碳酸烷基酯、乙基碳酸烷基酯、2,2,2-三氯乙基碳酸烷基酯、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基碳酸酯、烷基磺酸酯、甲磺酸酯、苄磺酸酯、甲苯磺酸酯、亚甲基缩醛(methylene acetal)、亚乙基缩醛(ethylidene acetal)和叔丁基亚甲基缩酮(t-butylmethylenediacetal)。优选的保护基由下式代表： $-R^a$ 、 $-\text{Si}(R^a)(R^a)(R^a)$ 、 $-\text{C}(\text{O})R^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(R^a)$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2R^a$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ 和 $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OR}^a$ ，式中 R^a 是 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基、 $-\text{C}_1$ - C_{20} 亚烷基(碳环)、 $-\text{C}_2$ - C_{20} 亚烯基(碳环)、 $-\text{C}_2$ - C_{20} 亚炔基(碳环)、 $-\text{C}_6$ - C_{10} 芳基、 $-\text{C}_1$ - C_{20} 亚烷基(芳基)、 $-\text{C}_2$ - C_{20} 亚烯基(芳基)、 $-\text{C}_2$ - C_{20} 亚炔基(芳基)、 $-\text{C}_1$ - C_{20} 亚烷基(杂环)、 $-\text{C}_2$ - C_{20} 亚烯基(杂环)或 $-\text{C}_2$ - C_{20} 亚炔基(杂环)，其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基任选被独立选自 A1 的一个或多个基团取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团任选被独立选自 A2 的一个或多个基团取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基任选被独立选自 A3 的一个或多个基团取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团任选被独立选自 A4 的一个或多个基团取代。A1、A2、A3 和 A4 的定义如本文所述。

[0128] 缩写“AFP”指二甲基缬氨酸-缬氨酸-朵拉异亮氨酸(dolaisoleuine)-朵拉脯氨酸(dolaproline)-苯丙氨酸-对苯二胺(见下文中的结构式 XVI)。

[0129] 缩写“MMAE”指单甲基奥瑞斯他汀 E(见下文中的结构式 XI)。

[0130] 缩写“AEB”指奥瑞斯他汀 E 与对乙酰基苯甲酸反应产生的酯(见下文中的结构式 XX)。

[0131] 缩写“AEVB”指奥瑞斯他汀 E 与苯甲酰戊酸反应产生的酯(见下文中的结构式 XXI)。

[0132] 缩写“MMAF”指朵缬氨酸(dovaline)-缬氨酸-朵拉异亮氨酸(dolaisoleuine)-朵拉脯氨酸-苯丙氨酸(见下文中的结构式 XIV)。

[0133] CD19 结合剂

[0134] 本文所述方法包括 CD19 结合剂和配体-药物偶联化合物的应用，其中所述配体单元是特异性结合于 CD19 的抗-CD19 结合剂。所述 CD19 结合剂可以是，例如，抗-CD19 抗体，抗-CD19 抗原-结合片段，或包含人源化抗体重链和/或轻链可变区氨基酸序列的其他

CD19 结合剂,或其衍生物。

[0135] 在某些方面,本发明的 CD19 结合剂包括重链和 / 或轻链可变区,所述重链和轻链可变区各自具有:(a) 与 mAb mBU12 的相对应 CDR 相同或基本相同的一组三个 CDR,和 (b) 与人免疫球蛋白的构架区相同或基本相同的一组四个可变区构架区。

[0136] 在本发明包括的实施方式中,为本发明 CD19 结合剂的重链可变区选择的构架区是人种系 V_H 外显子 V_H2-70 或 V_H4-31 以及人源化 FR4 序列的人种系 J_H4 外显子。在一些实施方式中,所述人种系 J_H1 、 J_H2 、 J_H3 、 J_H5 或 J_H6 外显子用来代替人源化 FR4 序列中的人种系 J_H4 外显子。

[0137] 在本发明包括的实施方式中,为本发明 CD19 结合剂的轻链可变区选择的构架区是人种系 V_L 外显子 V_L-L6 或 V_LA10 以及人源化 FR4 序列的人种系 J_k2 外显子。在一些实施方式中,所述人种系 J_k1 、 J_k3 、 J_k4 或 J_k5 外显子用来代替人源化 FR4 序列中的人种系 J_k2 外显子。

[0138] 在本发明包括的实施方式中,小鼠供体残基被再引入 CD19 结合剂构架区序列中。这种残基可包括,例如,再引入以下一个或多个位置的小鼠供体残基:按照 Kabat 编号系统, V_H2-70/J_H4 种系的位置 75、79、81、82、82A、82B、82C 和 89;按照 Kabat 编号系统, V_H4-31/J_H4 种系的位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89;按照 Kabat 编号系统, V_L-L6/J_k2 种系的位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83;按照 Kabat 编号系统, V_LA10/J_k2 种系的位置 2 和 71。其他位置的其他小鼠供体残基也可被再引入序列。

[0139] 在本发明包括的实施方式中,本文所述 CD19 结合剂在受体人种系外显子中具有除了小鼠供体残基的再引入以及超变区中的氨基酸序列修饰之外的氨基酸序列修饰。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力和 / 或其他生物学特性。可在抗体核酸中引入合适的核苷酸变化或通过肽合成来制备 CD19 结合剂的氨基酸序列变体。这种修饰包括,例如,删除和 / 或插入和 / 或取代抗体氨基酸序列中的残基。可作出缺失、插入和取代的任意组合以获得最后的构建体,只要最后的构建体具有理想的特征。取代可以是保守性取代或非保守性取代。氨基酸改变还可改变抗体的翻译后处理过程,例如改变糖基化位点的数目和位置。

[0140] 鉴定 CD19 结合剂中有利诱变位置的某些残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如 Cunningham 和 Wells Science, 244:1081-1085 (1989) 所述。其中,残基或靶残基的基团被鉴定(例如,带电荷的残基如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸)并被中性的或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)取代以影响氨基酸与抗原的相互作用。那些被证明对取代具有功能敏感性的氨基酸位置再通过取代位点上进一步引入突变或引入其他突变来优化。因此,虽然预先确定引入氨基酸序列变异的位点,但不需要预先确定突变本身的性质。例如,为了分析给定位点上突变的表现,要在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机突变,然后筛选所表达变体的理想活性。

[0141] 氨基酸序列插入包括氨基 - 和 / 或羧基 - 末端融合,以及在序列内插入单个或多个氨基酸残基。另一类变体是氨基酸取代变体。在这些变体中,抗体分子的至少一个氨基酸残基被不同残基替代。最感兴趣的取代诱变位点包括超变区,但也可考虑 FR 改变。

[0142] CD19 结合剂生物学特性的实质改变可通过筛选取代来完成,其中的取代在以下方面具有明显不同的效应:(a) 维持取代区多肽骨架的结构,例如,形成片层或螺旋构型,(b)

维持分子在靶位上的电荷或疏水性,或(c)维持侧链的大小(bulk)。天然残基根据常见的侧链特性可分成以下几组:

[0143] (1) 疏水性的 :met, ala, val, leu, ile ;

[0144] (2) 中性亲水性的 :cys, ser, thr ;

[0145] (3) 酸性的 :asp, glu ;

[0146] (4) 碱性的 :asn, gln, his, lys, arg ;

[0147] (5) 影响侧链取向的残基 :gly, pro ;和

[0148] (6) 芳香族残基 :trp, tyr, phe。

[0149] 非保守取代指将一种类型的成员更换为另一种类型。保守性取代则必需用同一类型的成员更换。

[0150] 一种类型的取代变体涉及取代一个或多个超变区残基。在一些实施方式中,选出以供进一步开发的所得变体相对于得到它们的母体结合剂将具有改进的生物学特性。制备这种取代突变体的一种简便方法包括利用噬菌体展示技术进行亲和力成熟。简言之,突变几个超级可变区位点(例如,6-7个位点)以在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。然后将制备的变体与包裹在每个丝状噬菌体颗粒内的M13的基因III产物融合并以单价方式展示在噬菌体颗粒上。然后,如本文所述筛选噬菌体展示变体的生物学活性(如结合亲和力)。为鉴定供修饰的候选超变区位置,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合有重要贡献的超变区残基。或者,或此外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定结合剂和抗原之间的接触点是有用的。这种接触残基及其邻近残基是利用本文所述技术进行取代的候选残基。一旦制备出这样的变体,就可以如本文所述筛选这一组变体,筛选出在一个和多个相关分析中具有优越特性的结合剂用于进一步的开发。

[0151] 在一些实施方式中,本发明的CD19结合剂(如,抗-CD19抗体或其衍生物)在与Fc γ 受体相互作用的氨基酸残基内具有修饰(如,取代、缺失或添加)。在一些方面,本发明的CD19结合剂包括在参与Fc结构域与一种或多种Fc γ 受体之间的结合相互作用的氨基酸残基内具有修饰的结合剂(如,抗-CD19抗体或其衍生物)。在一些实施方式中,本发明的CD19结合剂包括在参与抗-Fc结构域与FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基内具有修饰的结合剂(如,抗-CD19抗体或其衍生物)(参见,例如,国际公开号W0 97/34631,通过引用全文纳入本文)。

[0152] 在一些实施方式中,可用本领域已知的一种或多种抗体工程方法破坏靶结合剂与一种或多种Fc γ 受体的结合。在一些实施方式中,可用本领域已知的一种或多种抗体工程方法通过降低靶结合剂的效应功能来破坏靶结合剂与一种或多种Fc γ 受体的结合。下面提供了此类方法的示例性的非限制性例子。

[0153] 抗体某区域与Fc γ 受体(Fc γ R)之间相互作用的介导Fc γ 受体结合。Fc区或Fc结构域表示参与Fc区与一种或多种Fc γ 受体(如Fc γ RI(CD64)、Fc γ RIIb(CD32b)或Fc γ RIIIa(CD16)结合相互作用的抗体恒定区的某个(某些)区域(如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)。IgG Fc区的糖基化状态和原始氨基酸序列都对Fc区-Fc γ R相互作用有功能影响。

[0154] 已知IgG同种型恒定区Fc区中特定氨基酸位置的取代对抗体结合一种或多种Fc γ 受体的能力有功能影响。参见,例如,Shields等,2001,J. Biol. Chem. 276 :6591-6604,

和 Canfield 和 Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173 :1483-1491。所述 Fc 区包括, 例如但不限于, 绞链区和 C_H2 结构域中的氨基酸残基。用非保守性氨基酸取代 IgG 恒定区的 Fc 区或者部分的一个或多个氨基酸残基预计会改变, 即降低或升高, Fc 区 -Fc γ R 相互作用的亲和力。引入非保守性氨基酸取代的方法是本领域熟知的。

[0155] 或者或此外, 可将半胱氨酸残基引入 Fc 区或部分 IgG 恒定区之内或所述区域附近, 从而在该区域中形成链间二硫键。预计形成的这种链间二硫键会造成空间位阻, 从而降低 Fc 区 -Fc γ R 结合相互作用的亲和力。引入 IgG 恒定区的 Fc 区之内或该区域附近的半胱氨酸残基还可用作偶联于治疗剂的位点 (即, 利用硫醇特异性试剂偶联细胞毒性药物, 例如药物的马来酰亚胺衍生物)。预计治疗剂的存在会造成位阻, 从而降低 Fc 区 -Fc γ R 结合相互作用的亲和力。在抗体或其衍生物中引入半胱氨酸残基的方法是本领域熟知的。

[0156] 或者或此外, 可将一个或多个 N- 连接的糖基化位点引入 IgG 恒定区的 Fc 区之内或附近, 从而允许在该区域中进行翻译后糖基化。预计这种 N- 连接的糖基化会造成空间位阻, 从而降低 Fc 区 -Fc γ R 结合相互作用的亲和力。在抗体或其衍生物中引入 N- 连接的糖基化位点的方法是本领域熟知的。

[0157] 暴露于溶剂的人 IgG1 Fc 区氨基酸的系统性取代会产生 Fc γ R 结合亲和力改变的 IgG 衍生物 (Shields 等, 2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。例如, 当与母体 IgG1 比较时, 包括用 Ala 取代 Thr256/Ser298、Ser298/Glu333、Ser298/Lys334 或 Ser298/Glu333/Lys334 的这些衍生物的亚组显示出对 Fc γ R 的结合亲和力和 ADCC 活性都增加 (Shields 等, 2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604; Okazaki 等, 2004, J. Mol. Biol. 336 :1239-49)。相反, 当与母体 IgG1 比较时, 包括用 Pro 取代 Glu233、Val 取代 Leu234/Ala 取代 Leu235 和 Gly 236 缺失, 用 Ala 取代 Pro238, 用 Ala 取代 Asp265, 用 Ala 取代 Asn297, 用 Gln 取代 Ala327, 或用 Ala 取代 Pro329 的这些衍生物的亚组显示出对所有 Fc γ R 的结合亲和力降低; 用 Ala 取代 Asp265 还导致 ADCC 活性降低 (Shields 等, 2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。已知绞链区和 C_H2 区内的氨基酸对于人 IgG 对 Fc γ R 的高亲和力有贡献 (Canfield 和 Morrison, 1991, J. Exp. Med. 173 :1483-1491)。这些氨基酸位置, 或其附近的氨基酸参与介导 Fc 区 -Fc γ R 结合相互作用, 它们是用非保守性氨基酸取代和 / 或引入一个或多个半胱氨酸和 / 或引入一个或多个 N- 连接的糖基化位点的潜在靶点。

[0158] 抗体的体内半衰期也影响其效应功能。在一些实施方式中, 需要提高抗体的半衰期以改变其治疗活性。在一些实施方式中, 需要降低抗体的半衰期以改变其治疗活性。FcRn 是结构上类似于非共价结合于 β 2- 微球蛋白的 MHC I 类抗原的受体。FcRn 调节 IgG 的异化作用和其跨组织胞运作用 (Ghetie 和 Ward, 2000, Annu. Rev. Immunol. 18 :739-766; Ghetie 和 Ward, 2002, Immunol. Res. 25 :97-113)。IgG-FcRn 相互作用在 pH 6.0 (胞内小泡的 pH) 时发生, 但在 pH 7.4 (血液 pH) 时不发生; 这种相互作用使 IgG 能够循环回循环系统 (Ghetie 和 Ward, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18 :739-766; Ghetie 和 Ward, 2002, Immunol. Res. 25 :97-113)。对参与 FcRn 结合的人 IgG₁ 上的区域作图 (Shields 等, 2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。人 IgG1 的位置 Pro238、Thr256、Thr307、Gln311、Asp312、Glu380、Glu382 或 Asn434 上发生的丙氨酸取代能增强 FcRn 结合 (Shields 等, 2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。预计带有这些取代的 IgG₁ 分子具有较长的血清半衰期。因此, 与未修饰 IgG₁ 相比, 这些修饰的 IgG₁ 分子可能在长时间内进行其效应功能, 从而行使其治疗功效。

[0159] 在一些实施方式中,与一种或多种 Fc γ R 结合受损的本发明结合剂至少在一定程度上保留了结合 FcRn 的能力。在一些实施方式中,与一种或多种 Fc γ R 结合受损的结合剂至少在一定程度上保留了结合 FcRn 的能力。抗体或其衍生物或其他结合剂结合 FcRn 的能力可通过本领域已知技术测定(例如,Shields 等,2001, J. Biol. Chem. 276 :6591-604)。

[0160] 在一些实施方式中,就效应功能进行修饰的 CD19 结合剂的内化能力得以提高,和/或补体介导的细胞杀伤和抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)得以增强。参见 Caron 等, J. Exp. Med., 176 :1191-1195 (1992) 和 Shopes, B., J. Immunol., 148 :2918-2922 (1992)。也可利用如 Wolff 等, Cancer Research, 53 :2560-2565 (1993) 所述的异源双功能交联剂制备抗肿瘤活性提高的同源二聚体抗体。另外,抗体可以经改造使其包含两个 Fc 区,从而增强其补体裂解和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等, Anti-Cancer Drug Design, 3 :219-230 (1989)。

[0161] 在某些实施方式中,可将半胱氨酸残基引入 Fc 区以影响 Fc 区与 Fc γ RIIIa 受体的结合相互作用。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 239、265、269 或 327 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 239 或 269 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 239 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 265 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 269 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 327 位上的天然氨基酸。

[0162] 在其他实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 236 或 238 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 236 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 238 位上的天然氨基酸。

[0163] 在其他实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 234、235、237、267、298、299、326、330 或 332 位上的天然氨基酸。在其他实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 237、298、299、326、330 或 332 位上的天然氨基酸。在其他实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 298、299、326 或 330 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 234 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 235 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 237 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 267 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 298 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 299 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 326 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 330 位上的天然氨基酸。在一些实施方式中,按照 Kabat 编号系统,用半胱氨酸残基取代氨基酸位置第 332 位上的天然氨基酸。

[0164] 在一些实施方式中,为进一步提高本发明 CD19 结合剂的血清半衰期,例如,可按

照美国专利号 5,739,277 的描述修饰该结合剂的补救受体结合表位。在本文中,术语“补救受体结合表位”是指 IgG 分子(如 IgG₁、IgG₂、IgG₃或 IgG₄)的 Fc 区上的表位,其负责提高 IgG 分子在体内的血清半衰期。或者,如下文所述,可就与 Fc γ 受体的结合来修饰抗体的 Fc 区(例如,IgG 恒定区)从而提高 CD19 结合剂的血清半衰期。

[0165] 可在抗体恒定区的保守性位置上将其糖基化(参见,例如,Jefferis 和 Lund,1997,Chem. Immunol. 65:111-128;Wright 和 Morrison,1997,TibTECH15:26-32)。免疫球蛋白的寡糖侧链会影响蛋白质的功能(参见,例如,Boyd 等,1996,Mol. Immunol. 32:1311-1318;Wittwe 和 Howard,1990,Biochem. 29:4175-4180)以及糖蛋白各部分之间的分子内相互作用,所述部分会影响糖蛋白的构象以及出现的三维表面(参见,例如,Jefferis 和 Lund,同上;Wyss 和 Wagner,1996,Current Opin. Biotech. 7:409-416)。寡糖也可用来将给定的糖蛋白靶向某些基于特定识别结构的分子。例如,有报道称在非半乳糖基化(agalactosylated)IgG 中,寡糖部分从 C_H2 空间内部“浮出”,同时末端 N-乙酰氨基葡萄糖残基可结合甘露糖结合蛋白(参见,例如,Malhotra 等,1995,Nature Med. 1:237-243)。通过糖肽酶除去中国仓鼠卵巢(CHO)细胞内产生的 CAMPATH-1H(一种识别人淋巴细胞 CDw52 抗原的重组人源化鼠单克隆 IgG1 抗体)上的寡糖导致补体介导的溶解(CMCL)充分降低(Boyd 等,1996,Mol. Immunol. 32:1311-1318),而用神经氨酸酶选择性除去唾液酸残基导致 DMCL 没有损失。曾报道抗体的糖基化会影响 ADCC。尤其,具有四环素-调节的 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III(GnTIII)(一种催化二等分 GlcNAc 形成的糖基转移酶)表达的 CHO 细胞据报道具有改善的 ADCC 活性(参见,例如,Umana 等,1999,Mature Biotech. 17:176-180)。

[0166] 抗体的糖基化通常是 N-连接的或 O-连接的。N-连接是指糖基序连接到天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是糖基基序经酶催化连接到天冬酰胺侧链上的识别序列,其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸。因此,多肽上的这些三肽序列只要有一个存在就可以成为潜在的糖基化位点。O-连接糖基化是指将所述糖,N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接到羟氨基酸上,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸也可以使用。

[0167] 抗体的糖基化衍生物是抗体的糖基化模式被改变的衍生物。本发明的某些抗体具有改变的糖基化模式。“改变”表示删除一个或多个在抗体中发现的碳水化合物部分,在抗体中加入一个或多个碳水化合物部分,改变糖基化构成(即糖基化模式)、糖基化程度,等等。在某些实施方式中,本发明的抗体的核心岩藻糖基化降低。

[0168] 例如,通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列可以方便地实现在抗体中加入糖基化位点(对于 N-连接的糖基化位点)。例如,也可通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基插入到原始抗体的序列上或者用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代原始抗体的序列来制造改变(对于 O-连接的糖基化位点)。类似地,可通过抗体天然糖基化位点内的氨基酸改变来除去糖基化位点。

[0169] 通常通过改变下划线标出的核酸序列来改变氨基酸序列。这些方法包括但不限于从天然来源中分离(对于天然氨基酸序列衍生物的情况),或者通过寡核苷酸介导的(位点特异性的)突变、PCR 突变、或盒式突变先前制备的衍生物或抗体的非衍生形式来制备。

[0170] 在不改变氨基酸序列或相应核苷酸序列的情况下也可改变抗体的糖基化(包括糖基化模式)。糖基化主要依赖于用来表达抗体的宿主细胞。由于用来表达重组糖蛋白

(如抗体)作为潜在治疗方法的细胞类型很少是天然细胞,因此预计抗体的糖基化模式会有显著变化。参见例如 Hse 等,1997, J. Biol. Chem. 272 :9062-9070。除了对宿主细胞的选择,在重组制造抗体期间影响糖基化的因素包括生长模式、培养基成分、培养密度、氧合作用、pH、纯化方法,等等。已经提出许多方法用来改变特定宿主生物的糖基化模式,其中包括引入或过表达某些涉及寡糖产生的酶(参见,例如,美国专利号 5,047,335 ;5,510,261 ;和 5,278,299)。例如,可用内切糖苷酶 H(Endo H) 通过酶法除去糖蛋白的糖基化,或糖基化的某些类型。此外,可通过遗传工程构建重组宿主细胞,例如,在某些类型多糖的加工中制造缺陷。这些及类似技术是本领域众所周知的。

[0171] 可通过常规的碳水化合物分析技术方便地分析抗体的糖基化结构,其中包括凝集素层析、NMR、质谱、HPLC、GPC、单糖组成分析、连续酶消化和 HPAEC-PAD(该方法采用高 pH 阴离子交换层析基于电荷分离寡糖)。出于分析目的而释放寡糖的方法也是已知的,其中包括但不限于:酶处理(通常用肽-N-糖苷酶 F/内切- β -半乳糖苷酶进行),用强碱性环境消除以释放大部分 O-连接的结构,以及使用无水肼的化学方法以释放 N-和 O-连接的寡糖。

[0172] 下表总结了对应于各序列标识符(SEQ ID NO.)的嵌合和人源化 BU12 各区域。

[0173]

分析	核苷酸或氨基酸	SEQ ID NO
前导序列 (重链区域)	氨基酸	1
重链可变区 (VH2-70/J _H 4 种系)/ 也称为变体 HA	氨基酸	2

[0174]

分析	核苷酸或氨基酸	SEQ ID NO
重链恒定结构域(IgG ₁)	氨基酸	3
变体 HB 重链可变区 (VH2-70/J _H 4 种系)	氨基酸	4
变体 HC 重链可变区 (VH2-70/J _H 4 种系)	氨基酸	5
变体 HD 重链可变区 (VH2-70/J _H 4 种系)	氨基酸	6

变体 HE 重链可变区 (VH2-70/J _H 4 种系)	氨基酸	7
重链可变区 (鼠科)	氨基酸	8
重链可变区 (VH4-31/J _H 4 种系)/ 也称为变体 HF	氨基酸	9
变体 HG 重链可变区 (VH4-31/J _H 4 种系)	氨基酸	10
变体 HH 重链可变区 (VH4-31/J _H 4 种系)	氨基酸	11
变体 HI 重链可变区 (VH4-31/J _H 4 种系)	氨基酸	12
变体 HJ 重链可变区 (VH4-31/J _H 4 种系)	氨基酸	13
变体 HK 重链可变区 (VH4-31/J _H 4 种系)	氨基酸	14
变体 HL 重链可变区 (VH4-31/J _H 4 种系)	氨基酸	15
前导序列 (轻链区域)	氨基酸	16
轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)/ 也称为变体 LA	氨基酸	17
轻链恒定结构域 (κ 结构域)	氨基酸	18

变体 LB 轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)	氨基酸	19
---	-----	----

[0175]

分析	核苷酸或氨基酸	SEQ ID NO
变体 LC 轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)	氨基酸	20
变体 LD 轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)	氨基酸	21
变体 LE 轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)	氨基酸	22
变体 LF 轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)	氨基酸	23
变体 LG 轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)	氨基酸	24
轻链可变区 (鼠科)	氨基酸	25
轻链可变区 (VL-A10/J _k 2 种系)/ 也称为变体 LH 结构域	氨基酸	26
变体 LI 轻链可变区 (VL-A10/J _k 2 种系)	氨基酸	27
重链可变区共有序列 (VH2-70/J _H 4 种系)	氨基酸	28
重链可变区共有序列 (VH4-31/J _H 4 种系)	氨基酸	29

轻链可变区共有序列 (VL-L6/J _k 2 种系)	氨基酸	30
轻链可变区共有序列 (VL-A10/J _k 2 种系)	氨基酸	31
重链可变区共有序列 (VH2-70/J _H 1-6 种系)	氨基酸	32
重链可变区共有序列 (VH4-31/J _H 1-6 种系)	氨基酸	33
轻链可变区共有序列 (VL-L6/J _k 1-5 种系)	氨基酸	34
轻链可变区共有序列 (VL-A10/J _k 1-5 种系)	氨基酸	35
重链恒定结构域 (IgG ₂)	氨基酸	36
重链恒定结构域 (IgG ₃)	氨基酸	37
重链恒定结构域 (IgG ₄)	氨基酸	38
重链恒定结构域变体 (IgG ₁ V ₁)	氨基酸	39
前导序列 (重链区域)	核苷酸	40
重链可变区	核苷酸	41

[0176]

分析	核苷酸或氨基酸	SEQ ID NO
(VH4-31/J _H 4 种系)/ 也称为变体 HF		
重链恒定结构域 (IgG ₁)	核苷酸	42
前导序列 (轻链区域)	核苷酸	43
变体 LG 轻链可变区 (VL-L6/J _k 2 种系)	核苷酸	44

轻链恒定结构域 (κ 结构域)	核苷酸	45
重链 CDR1	氨基酸	46
重链 CDR2	氨基酸	47
重链 CDR3	氨基酸	48
轻链 CDR1	氨基酸	49
轻链 CDR2	氨基酸	50
轻链 CDR3	氨基酸	51
或重链序列 (包括前导区、可变区(变体 HF) 和恒定结构域)	核苷酸	53
或前导序列 (重链区域)	核苷酸	54
或重链恒定结构域(IgG1)	核苷酸	55
或重链序列 (包括前导区、可变区(变体 HF) 和恒定结构域)	氨基酸	56
或前导序列 (重链区域)	氨基酸	57
或轻链序列 (包括前导区、可变区(变体 LG) 和恒 定结构域)	核苷酸	58
或前导序列 (轻链区域)	核苷酸	59
或轻链序列 (包括前导区、可变区(变体 LG) 和恒定结构域)	氨基酸	60
或前导序列 (轻链区域)	氨基酸	61

[0177] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含具有与 SEQ ID NO :2 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或100%)的氨基酸序列的重链可变区。所述氨基酸序列可以是,例如,具有任何数量取代的SEQ ID NO:2的氨基酸序列,只要CD19结合剂保留功能活性(即CD19结合活性)且该序列与SEQ ID NO:2所列氨基酸序列保持基本相同或完全相同即可。示例性的重链可变区包含下述氨基酸序列:与SEQ ID NO:2所列氨基酸序列相同并按照Kabat编号系统在SEQ ID NO:2所列氨基酸序列的第75、79、81、82、82A、82B、82C或89位任选具有至少一个氨基酸取代,优选0、1或2个氨基酸取代。示例性的序列包括,例如,SEQ ID NO:2、4、5、6和7所列氨基酸序列。在一个方面,包含具有与SEQ ID NO:2所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的氨基酸序列的重链可变区的CD19结合剂包含抗体mBU12的CDR区,即SEQ ID NO:46、47和48。

[0178] 在本发明包括的实施方式中,CD19结合剂包含具有与SEQ ID NO:9所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的氨基酸序列的重链可变区。所述氨基酸序列可以是,例如,具有任何数量取代的SEQ ID NO:9的氨基酸序列,只要CD19结合剂保留功能活性且该序列与SEQ ID NO:9所列氨基酸序列保持基本相同或完全相同即可。示例性的重链可变区包含下述氨基酸序列:与SEQ ID NO:9所列氨基酸序列相同并按照Kabat编号系统在SEQ ID NO:9所列氨基酸序列的24、27、29、71、75、78、79或89位任选具有至少一个氨基酸取代,优选0、1或2个氨基酸取代。示例性的序列包括,例如,SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14和15所列氨基酸序列。在一个方面,包含具有与SEQ ID NO:9所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的氨基酸序列的重链可变区的CD19结合剂包含抗体mBU12的CDR区,即SEQ ID NO:46、47和48。

[0179] 在本发明包括的实施方式中,CD19结合剂包含具有与SEQ ID NO:17所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的氨基酸序列的轻链可变区。所述氨基酸序列可以是,例如,具有任何数量取代的SEQ ID NO:17的氨基酸序列,只要CD19结合剂保留功能活性且该序列与SEQ ID NO:17所列氨基酸序列保持基本相同或完全相同即可。示例性的轻链可变区包含下述氨基酸序列:与SEQ ID NO:17所列氨基酸序列相同并按照Kabat编号系统在SEQ ID NO:17所列氨基酸序列的第2、40、41、42、69、70、71、72和83位任选具有至少一个氨基酸取代,优选0、1或2个氨基酸取代。示例性的序列包括,例如,SEQ ID NO:17、19、20、21、22、23和24所列氨基酸序列。在一个方面,包含具有与SEQ ID NO:17所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的氨基酸序列的轻链可变区的CD19结合剂包含抗体mBU12的CDR区,即SEQ ID NO:49、50和51。

[0180] 在本发明包括的实施方式中,CD19结合剂包含具有与SEQ ID NO:26所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的氨基酸序列的轻链可变区。所述氨基酸序列可以是,例如,具有任何数量取代的SEQ ID NO:26的氨基酸序列,只要CD19结合剂保留功能活性且该序列与SEQ ID NO:26所列氨基酸序列保持基本相同或完全相同即可。示例性的轻链可变区包含下述氨基酸序列:与SEQ ID NO:26所列氨基酸序列相同并按照Kabat编号系统在SEQ ID NO:

26 所列氨基酸序列的第 2 和 71 位任选具有至少一个氨基酸取代。示例性的序列包括,例如,SEQ ID NO:26 和 27 所列氨基酸序列。在一个方面,包含具有与 SEQ ID NO:26 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区的 CD19 结合剂包含抗体 mBU12 的 CDR 区,即 SEQ ID NO:49、50 和 51。

[0181] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO:2 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO:17 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。在这些实施方式中的任何一个中,所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO:3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO:18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:61 所列氨基酸序列。

[0182] 因此,在某些实施方式中,所述 CD19 结合剂将包含:具有 SEQ ID NO:2 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:4 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:5 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:6 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;或具有 SEQ ID NO:7 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链。在这些实施方式中的任何一个中,所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO:3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO:18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:61 所列氨基酸序列。

[0183] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO:2 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO:26 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。在这些实施方式中的任何一个中,所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO:3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO:18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:61 所列氨基酸序列。

[0184] 因此,在某些实施方式中,所述 CD19 结合剂将包含:具有 SEQ ID NO:2 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:4 所列氨

基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :26 或 27 所列氨基酸序列的轻链 ;具有 SEQ ID NO :5 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :26 或 27 所列氨基酸序列的轻链 ;具有 SEQ ID NO :6 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :26 或 27 所列氨基酸序列的轻链 ;或具有 SEQ ID NO :7 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :26 或 27 所列氨基酸序列的轻链。在这些实施方式中的任何一个中,所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO :3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO :18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO :16 或 SEQ ID NO :61 所列氨基酸序列。

[0185] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO :9 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO :17 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。在这些实施方式中的任何一个中,所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO :3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO :18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO :16 或 SEQ ID NO :61 所列氨基酸序列。

[0186] 因此,在某些实施方式中,所述 CD19 结合剂将包含:具有 SEQ ID NO :9 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO :10 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO :11 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO :12 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO :13 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO :14 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链;或具有 SEQ ID NO :15 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO :17、19、20、21、22、23 或 24 所列氨基酸序列的轻链。在这些实施方式中的任何一个中,所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO :3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO :18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO :16 或 SEQ ID NO :61 所列氨基酸序列。

[0187] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO :9 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO :26 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。在这些实施方式中的任何一个中,

所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO:3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO:18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:61 所列氨基酸序列。

[0188] 因此,在某些实施方式中,所述 CD19 结合剂将包含:具有 SEQ ID NO:9 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:10 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:11 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:12 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:13 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:14 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链;具有 SEQ ID NO:15 所列氨基酸序列的重链和具有 SEQ ID NO:26 或 27 所列氨基酸序列的轻链。在这些实施方式中的任何一个中,所述重链可变区可结合于恒定区,且所述轻链可变区可结合于恒定区。一些实施方式中,所述重链恒定区将包含 SEQ ID NO:3 或 36-39 所列氨基酸序列。一些实施方式中,所述轻链恒定区将包含 SEQ ID NO:18 所列氨基酸序列。在某些实施方式中,所述重链可变区还包含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:57 所列氨基酸序列,且所述轻链可变区还包含 SEQ ID NO:16 或 SEQ ID NO:61 所列氨基酸序列。

[0189] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含具有与 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:32 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区。所述氨基酸序列可以是,例如,具有任何数量取代的 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:32 的氨基酸共有序列,只要 CD19 结合剂保留功能活性(即 CD19 结合活性)且该序列分别与 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:32 所列氨基酸共有序列保持基本相同或完全相同即可。

[0190] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含具有与 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:33 所列氨基酸共有序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区。所述氨基酸序列可以是,例如,具有任何数量取代的 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:33 的氨基酸序列,只要 CD19 结合剂保留功能活性且该序列分别与 SEQ ID NO:29 或 SEQ ID NO:33 所列氨基酸共有序列保持基本相同或完全相同即可。

[0191] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含具有与 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:34 所列氨基酸共有序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。所述氨基酸序列可以是,例如,具有任何数量取代的 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列,只要 CD19 结合剂保留功能活性且该序列分别与 SEQ ID NO:30 或 SEQ ID NO:34 所列氨基酸共有序列保持基本相同或完全相同即可。

[0192] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含具有与 SEQ ID NO:31 或 SEQ ID NO:35 所列共有氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。所述氨基酸序列可以

是,例如,具有任何数量取代的 SEQ ID NO :31 或 SEQ ID NO :35 的氨基酸序列,只要 CD19 结合剂保留功能活性且该序列分别与 SEQ ID NO :31 或 SEQ ID NO :35 所列氨基酸共有序列保持基本相同或完全相同即可。

[0193] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32 相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO :30 或 SEQ ID NO :34 相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0194] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO :28 或 SEQ ID NO :32 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO :31 或 SEQ ID NO :35 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0195] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO :29 或 SEQ ID NO :33 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO :30 或 SEQ ID NO :34 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0196] 在本发明包括的实施方式中,CD19 结合剂包含上述具有与 SEQ ID NO :29 或 SEQ ID NO :33 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的重链可变区,并且还包含上述具有与 SEQ ID NO :31 或 SEQ ID NO :35 所列氨基酸序列相同或基本相同(即相同性为至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0197] 在一些实施方式中,本发明的 CD19 结合剂包含人源化抗体。包含 SEQ ID NO :9 的重链可变区和 SEQ ID NO :17 的轻链可变区的人源化抗体具有小鼠 BU12 抗体所有六个完整 CDR 和完整的人可变区构架氨基酸。与许多其他人源化抗体不同,这种抗体即便没有任何进一步的取代对其抗原也具有有用的结合亲和力。然而,这种抗体还为制造变体提供了起点。这种变体中的一些包含与 SEQ ID NO :9 有至少 90% 序列相同性(在其完整长度上)的重链可变区和与 SEQ ID NO :17 有至少 90% 序列相同性的轻链可变区。一些变体在重链可变区内与 SEQ ID NO :9 的区别不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸,在轻链可变区内与 SEQ ID NO :17 的区别不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸。

[0198] 一些变体的可变区构架相对于 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO :17 有一个或多个氨基酸取代,故而不同于上述抗体。取代可采用分别占据 BU12 抗体(有时也称为供体抗体)重链和轻链可变区相应位置(除非另有说明,所述位置通过 Kabat 编号)的氨基酸。用供体氨基酸取代可在人源化抗体中提供与供体小鼠抗体更相似的构架构象故而通常会提高所得人源化抗体对其抗原的亲和力。L83 位置上的供体取代提高了亲和力因而特别有利,如图 2

所示（比较含取代的轻链 G 和不含取代的轻链 H）。SEQ ID NO:9 和 BU12 重链之间不相同的可进行供体取代的其他位置包括，例如，H24、H27、H29、H71、H75、H789、H79 和 H89，其中，在供体取代之后上述位置分别被 F、F、L、K、S、V、F 和 A 占据。SEQ ID NO:17 和 BU12 轻链之间不相同的轻链可变区构架位置包括 L2、L40、L41、L42、L69、L70、L71、L72 和 L83，它们分别被小鼠 BU12 轻链中的、S、S、T、N、S、H、F 和 V 占据。这些取代中的许多对抗体亲和力的影响也如图 2 所示。可见，这些取代或取代组合中的一些提高了亲和力。一些优选的重链取代包括在供体取代之后分别被 K、S、V 和 F 占据的 H71、H75、H78 和 H79 中的一个或多个。一些优选的轻链取代包括在供体取代之后分别被 N、N、H、F 和 V 占据的位置 L2、L69、L71、L72 和 L83 中的一个或多个。所测试的取代或取代组合不会造成不可接受的亲和力损失。

[0199] 包括多少供体取代反映了竞争因素的平衡。通常需要能显著提高亲和力的取代。然而，将可变区构架取代的总数最小化也有利于降低潜在的免疫原性。在重链可变区构架中没有取代同时在轻链可变区构架中有 L83 供体取代的人源化抗体代表了亲和力最大化和免疫原性最小化之间的一种优选平衡。许多其他排列也是可能的。

[0200] 除了供体取代，可变区构架氨基酸可被占据另一种人抗体序列或共有人抗体序列中相应位置的氨基酸取代（参见，例如，Queen, US 7, 022, 500）。这种取代的原理通常是把人免疫球蛋白序列中相对罕见的氨基酸取代成对该位置更加通用的氨基酸以降低免疫原性。在通过种系序列提供可变区构架的人源化抗体中，这种取代是可能的，但由于种系序列缺乏可通过体细胞突变引入的罕见氨基酸因此通常不需要。

[0201] 可变区构架氨基酸也可用既非供体氨基酸又非共有氨基酸的氨基酸取代。这种取代优选是保守性氨基酸取代。尽管许多取代对亲和力的影响甚微，但它们可提高免疫原性因此通常不是优选的。

[0202] 也可取代一个或多个 CDR 残基或省略一个或多个 CDR。科技文献中已经描述了其中的一个或两个 CDR 可被省略以供结合的许多抗体。Padlan 等, FASEB Journal 9: 133-139 (1995) 基于公开的晶体结构分析了抗体和它们的抗原之间的接触区，并总结出自由 1/5 到 1/3 的 CDR 残基实际接触抗原。Padlan 等将这些残基命名为 SDR（表示“特异性决定残基”）。Padlan 还发现，许多抗体的一个或两个 CDR 中的氨基酸不接触抗原。同样，Vajdos 等 (Journal of Molecular Biology, 第 320 卷, 第 415-428 页 (2002) 报道称，针对 ErbB2 的抗体轻链的 CDR1 不参与结合。例如，这些教导被 Iwahashi 用于抗体的人源化 (Mol. Immunol. 36:1079-1091, (1999), Iwahashi 证明他们可以仅将 CR49 鼠抗体的 L1 和 L3, 或者 L2 和 L3 移植入人构架同时保留与抗原的高亲和相互作用。类似的，Tamura 等, Journal of Immunology, 2000, 164:1432-1441 (2000) 报道称，在人源化抗癌抗体中可完全省略轻链 CDR 1 和 2 以及剩余 CDR 中的若干残基。用 CDR 取代某些区域基于与省略非必要 CDR 相同的原理，即仅有一小组 CDR 残基 (SDR) 实际接触抗原。

[0203] 基于之前的研究，可通过分子建模和/或凭经验从 Chothia CDR 以外的 Kabat CDR 区域中鉴定出不与抗原接触的 CDR 残基（例如，CDRH2 中的残基 H60-H65 通常不需要）。如果某 CDR 或其残基被省略，通常是用占据人受体序列相应位置提供可变区构架序列的氨基酸取代（在该例子中，重链为 VH4-31/JH4，轻链为 VL-L6 JK2）。所包含的这种取代的数目反映了竞争因素的平衡。这种取代对于减少人源化抗体中小鼠氨基酸的数目并因此降低潜

在的免疫原性具有潜在益处。然而,取代也可造成亲和力的改变,并宜避免亲和力的显著降低。也可根据经验选择 CDR 内的取代位置以及用来取代的氨基酸。经验取代可以是保守性取代或非保守性取代。然而通常,经验取代不会具有小鼠到人的取代在降低免疫原性方面的优势。经验取代可提高或降低所得人源化抗体的亲和力。

[0204] 通常,可通过单独筛选按照上述原则和 / 或按照本实施例制造的变体以获得对 CD19 具有满意的结合亲和力并缺乏大部分免疫原性的人源化抗体。然而,可采用展示筛选方法如噬菌体展示同时筛选非常大数目的变体(参见 Dower 等, W091/17271 ;McCafferty 等, W092/001047 ;和 Winter, W092/20791)。相同考虑适用于设计本文披露的其他人源化抗体或抗体链的变体。例如, SEQ ID NO :2 提供了一种不同于 SEQ ID NO :9 的起点用于设计重链变体。SEQ ID NO :2 包含 BU12 抗体的三个重链 CDR 以及 VH2-70 和 JH4 基因的完整人可变区构架序列。SEQ ID NO :26 提供了一种不同于 SEQ ID NO :17 的起点用于设计轻链变体。SEQ ID NO :26 包含 BU12 抗体的三个轻链 CDR 以及 A10 和 JK2 基因的完整人构架序列。用于潜在取代的特定重链可变区构架位点以及用来取代该位点的氨基酸示于实施例 1 中题为“BU12 和 VH431 的非同源 FR 残基”的表中。用于 SEQ ID NO :26 中潜在取代的特定轻链可变区构架位点示于实施例 2 中题为“BU12 VL 以及 L6 和 A10 的非同源 FR 残基”的表中。

[0205] 在本发明包括的实施方式中,重链可变区还包含前导序列。示例性的重链前导序列列于 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :57。

[0206] 在本发明包括的实施方式中,轻链可变区还包含前导序列。示例性的轻链前导序列列于 SEQ ID NO :16 和 SEQ ID NO :61。

[0207] 所述 CD19 结合剂可任选包含抗体效应区。所述效应结构域可以是,例如, Fc 区如免疫球蛋白的绞链 -C_H2-C_H3 区,或者优选具有效应功能的效应区的一部分或片段。抗原-结合抗体片段(包括单链抗体)可包含(例如)可变区以及整个或一部分效应区(如单独的 C_H2 和 / 或 C_H3 结构域或与 C_H1、绞链区和 / 或 C_L 结构域组合)。另外,抗原结合片段可包含效应区的任何组合。在一些实施方式中,抗 -CD19 抗体可以是包含连接于绞链 -C_H2-C_H3 结构域的 CD70- 结合性可变区的单链抗体。

[0208] 抗 -CD19 抗体的效应区可来自任何合适的免疫球蛋白同种型。CD19 结合剂可表达为包含合适恒定区以产生所需效应功能的重组融合蛋白。

[0209] 在本发明包括的实施方式中, CD19 结合剂的重链可变区结合于恒定区,如 IgG, 即 IgG1 恒定区或 IgG2 恒定区,或结合于改变的恒定区,如, IgG1V1。示例性的恒定区结构域提供在 SEQ ID NO :3 和 36-39 中。

[0210] 在本发明还包括的实施方式中, CD19 结合剂的轻链可变区结合于恒定区,如 κ 恒定区。示例性的恒定区结构域提供在 SEQ ID NO :18 中。

[0211] 在本发明包括的实施方式中, CD19 结合剂的轻链可变区结合于恒定区,如 κ 恒定区。一种示例性的恒定区结构域提供在 SEQ ID NO :18 中,且 CD19 结合剂的重链可变区结合于恒定区,如 IgG, 例如 IgG1 恒定区或 IgG2 恒定区,或结合于改变的恒定区,如, IgG1V1。示例性的恒定区结构域提供在 SEQ ID NO :3 和 36-39 中。

[0212] 在一些实施方式中, CD19 结合剂可以是包含人或非人 Fc 区或其部分的 CD19 结合剂。例如,该抗体可包含非人来源的 Fc 区或其部分,这些来源有(例如)啮齿动物(如小鼠或大鼠)、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、羊驼、马、鸡或猴(如短尾猴、猕猴、恒河猴等),其连接

于人源重链和 / 或轻链可变区。

[0213] CD19 结合剂,如抗体,可以是单特异性、双特异性、三特异性或更多特异性的抗体。多特异性抗体可以对 CD19 不同表位特异和 / 或可以对 CD19 以及异源蛋白特异。(参见例如, PCT 公布 W0 93/17715、W0 92/08802、W091/00360 和 W0 92/05793;Tutt 等, 1991, J. Immunol. 147 :60-69 ;美国专利号 4, 474, 893、4, 714, 681、4, 925, 648、5, 573, 920 和 5, 601, 819 ;Kostelny 等, 1992, J. Immunol. 148 :1547-1553。)用于实施本文所述方法的多特异性抗体,包括双特异性和三特异性抗体是免疫特异性结合于 CD19 和介导 ADCC、ADCP 和 / 或 CDC 的第二种细胞表面受体或受体复合物的抗体。

[0214] 也可根据对 CD19 的结合亲和力描述或说明 CD19 结合剂。典型的结合亲和力包括解离常数或 K_d 小于 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。

[0215] 本发明包括编码 CD19 结合剂的核酸。所述 CD19 结合剂可以是,例如,完全人源化的抗体或人源化抗原结合片段。在一些实施方式中,本发明核酸编码的多肽链具有 SEQ ID NO :2、4、5、6、7、9、10、11、12、13、14、15、17、19、20、21、22、23、24、26 或 27 所列氨基酸序列或与上述序列基本相同的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明核酸编码的多肽链具有 SEQ ID NO :1、3、16、18、56、57、60 或 61 所列氨基酸序列或与上述序列基本相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,本发明的核酸将包含 SEQ ID NO :40、41、42、43、44、45、53、54、55、58 或 59 所列核苷酸序列。在某些实施方式中,所述核酸将编码抗体重链可变区并包含 SEQ ID NO. 41,同时任选包含 SEQ ID NO. 40 和 42 中所列的一条或多条序列。在某些实施方式中,所述核酸将编码抗体重链可变区并包含 SEQ ID NO. 41,同时任选包含 SEQ ID NO. 54 和 55 中所列的一条或多条序列。在某些实施方式中,所述核酸将编码抗体的重链可变区并将包含 SEQ ID NO. 53。在某些实施方式中,所述核酸将编码抗体轻链可变区并包含 SEQ ID NO. 44,同时任选包含 SEQ ID NO. 43 和 45 中所列的一条或多条序列。在某些实施方式中,所述核酸将编码抗体轻链可变区并包含 SEQ ID NO. 44,同时任选包含 SEQ ID NO. 59 和 45 中所列的一条或多条序列。在某些实施方式中,所述核酸将编码抗体的轻链可变区并将包含 SEQ ID NO. 58。

[0216] 一些实施方式还包括在本文所定义的低、中等和高严格条件下与本文所述的全部或部分 CD19 结合剂编码核苷酸序列或其补体杂交的编码 CD19 结合剂的核酸。核酸杂交的高严格、中等严格和低严格条件是本领域已知的。Ausubel, F.M. 等,“Current Protocols in Molecular Biology”(新编分子生物学实验指南),约翰威利父子公司,1998, 2.10.1-2.10.16 ;6.3.1-6.3.6。决定杂交严格性的精确条件不仅取决于离子强度(例如, 0.2XSSC, 0.1XSSC)、温度(例如,室温, 42°C, 68°C)和甲酰胺等去稳定剂或 SDS 等变性剂的浓度,还取决于诸如核酸序列的长度、碱基组成、杂交序列之间的错配比例以及该序列亚组在其他非相同序列中的出现频率之类的因素。例如,低严格洗涤可包括用含 0.2XSSC/0.1% SDS 的溶液室温洗涤 10 分钟;中等严格洗涤可包括用含 0.2XSSC/0.1% SDS 的预温(42°C)溶液在 42°C 洗涤 15 分钟;而高严格洗涤可包括用含 0.1XSSC/0.1% SDS 的预温(68°C)溶液在 68°C 洗涤 15 分钟。此外,如本领域已知的,可重复或连续洗涤以获得所需结果。

[0217] 在本发明包括的实施方式中, CD19 结合剂是,例如,人源化全长抗体,人源化抗体片段,或其衍生物。

[0218] 可用本领域已知方法制备 CD19 结合剂。例如,可采用各种技术制备单克隆抗体,这些技术包括,例如,使用杂交瘤、重组技术和噬菌体展示技术,或它们的组合。例如,杂交瘤技术通常描述于,例如,Harlow 等, *Antibodies :A Laboratory Manual* (抗体:实验室手册) (Cold Spring Harbor Laboratory Press(冷泉港实验室出版社),第 2 版,1988);Harlow 和 Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体应用实验室手册), Cold Spring Harbor Laboratory(冷泉港实验室出版社),纽约(1999);和 Hammerling 等,刊于: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤) 563-681 (艾思威尔出版社 (Elsevier), 纽约, 1981)。可用于制备抗 -CD19 抗体的噬菌体展示法的例子包括以下文献中描述的那些:例如, Hoogenboom 和 Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227 :381; Marks 等, 1991, *J. Mol. Biol.* 222 :581; Quan 和 Carter, 2002, *The rise of monoclonal antibodies as therapeutics in Anti-IgE and Allergic Disease* (单克隆抗体有希望用于治疗抗 -IgE 和变态反应病), Jardieu 和 Fick Jr. 编, Marcel Dekker (MD 出版社), 纽约, 纽约州, 第 20 章, 第 427-469 页; Brinkman 等, 1995, *J. Immunol. Methods* 182 :41-50; Ames 等, 1995, *J. Immunol. Methods* 184 :177-186; Kettleborough 等, 1994, *Eur. J. Immunol.* 24 :952-958; Persic 等, 1997, *Gene* 187 :9-18; Burton 等, 1994, *Advances in Immunology*, 57 :191-280; PCT 申请号 PCT/GB91/01134; PCT 公开 WO 90/02809; WO 91/10737; WO92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 和美国专利 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 和 5,969,108 (这些文献通过引用纳入本文)。

[0219] 如本文所述,所述 CD19 结合剂可包含人源化重链和 / 或轻链可变区的氨基酸序列。可以用本领域已知的各种技术使抗体人源化,包括例如 CDR 移植 (参见,例如, EP 239,400; PCT 公开 WO 91/09967; 美国专利 5,225,539; 5,530,101 和 5,585,089), 镶面 (veneering) 或表面再造 (resurfacing) (参见,例如, EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology*, 1991, 28 (4/5) :489-498; Studnicka 等, 1994, *Protein Engineering* 7 (6) :805-814; Roguska 等, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 :969-973) 和链改组 (参见,例如,美国专利 5,565,332) (所有这些参考资料通过引用纳入本文)。人源化抗体及其片段可通过本领域已知的重组 DNA 技术制造,例如,采用以下文献中描述的方法:国际公布号 WO 87/02671; 欧洲专利公布号 0 184 187; 欧洲专利公布号 171,496; 欧洲专利公布号 173,494; 国际公布号 WO 86/01533; 美国专利号 4,816,567; 欧洲专利公布号 0 012 023; Berter 等, 1988, *Science* 240 :1041-43; Liu 等, 1987, *Proc Natl Acad Sci USA* 84 :3439-43; Liu 等, 1987, *J. Immunol.* 139 :3521-26; Sun 等, 1987, *Proc Natl Acad Sci USA* 84 :214-18; Nishimura 等, 1987, *Cancer. Res.* 47 :999-1005; Wood 等, 1985, *Nature* 314 :446-449; Shaw 等, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80 :1553-59; Morrison, 1985, *Science* 229 :1202-07; Oi 等, 1986, *BioTechniques* 4 :214; 美国专利 5,225,539; Jones 等, 1986, *Nature* 321 :552-25; Verhoeyan 等, 1988, *Science* 239 :1534; 和 Beidler 等, 1988, *J. Immunol.* 141 :4053-60; 上述参考文献各自通过引用全文纳入本文。

[0220] 可用于产生单链 Fv 和抗体的技术的例子包括美国专利号 4,946,778 和 5,258,498; Huston 等, 1991, *Methods in Enzymology* 203 :46-88; Shu 等, 1993, *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 90 :7995-7999 ;和 Skerra 等,1988, Science240 :1038-1040 所述的技术。

[0221] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产方法是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共同表达,其中这两条链具有不同特异性(参见,例如,Millstein 等,1983, Nature, 305 :537-39)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四体杂交瘤)产生不同抗体分子的可能混合物,其中一种具有正确的双特异性结构。国际公布号 W0 93/08829 和 Traunecker 等,1991, EMBO J., 10 :3655-59 公开了相似方法。

[0222] 根据不同方法,将具有所需结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原结合位点)融合于免疫球蛋白恒定区序列。通常与含有绞链区、CH2 和 CH3 区的至少一部分的免疫球蛋白重链恒定区融合。在一些实施方式中,含有结合轻链所必需位点的第一重链恒定区(CH1)出现在至少一个融合物中。将具有免疫球蛋白重链和还有免疫球蛋白轻链(如果需要)融合物编码序列的核酸插入不同表达载体中,共同转染到合适的宿主生物体中。在用不同比例的三种多肽链构建以提供最优产率的实施方式中,这为调节三个多肽片段的共有部分提供了极大的灵活性。然而,当表达比例相同的至少两种多肽链导致高产率或该比例没有显著性差异时,可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0223] 在该方法的一个例子中,双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链和另一条臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。这种不对称结构有助于分离所需的双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链的组合,因为免疫球蛋白轻链仅存在于一半双特异性分子中提供了一种容易的分离方式(参见,例如,国际公布号 W0 94/04690,通过引用将其全文纳入本文)。

[0224] 有关双特异性抗体的进一步讨论参见,例如, Suresh 等,1986, Methods in Enzymology 121 :210 ;Rodrigues 等,1993, J. Immunology 151 :6954-61 ;Carter 等,1992, Bio/Technology 10 :163-67 ;Carter 等,1995, J. Hematotherapy 4 :463-70 ;Merchant 等,1998, Nature Biotechnology 16 :677-81。采用这些技术可制备双特异性抗体以便用于治疗或预防本文所定义的疾病。

[0225] 欧洲专利公开号 0 105 360 也描述了双功能抗体。如该参考文献所公开,杂交或双功能抗体可通过生物学方法,即细胞融和技术,或者化学方法,特别是利用交联剂或二硫桥形成试剂获得,这种抗体还可包含整个抗体或其片段。例如国际公开 W0 83/03679 和欧洲专利公开号 0 217 577 均公开了获得这种杂交抗体的方法,两者作为参考文献纳入本文。

[0226] CD19 结合剂可以是抗-CD19 抗体的衍生物。在某些实施方式中,抗-CD19 抗体衍生物包含抗-CD19 抗体(例如,完整抗体、抗原结合片段或保守性取代的多肽)以及与所述抗-CD19 抗体异源的至少一个多肽区或其他部分。例如,抗-CD19 抗体可被修饰,例如通过共价结合任何类型的分子,从而这种共价结合不会防止抗体衍生物通过下述区域特异性结合 CD19 :抗原结合区或其衍生区域,或者,如果需要的话,特异性结合 Fc 受体的效应区或其部分。典型的修饰包括,例如,糖基化、去糖基化、乙酰化、PEG 化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、连接于细胞配体或其它蛋白质,等等。通过已知技术可进行多种化学修饰,包括但不限于:特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合

成等。

[0227] 在一些实施方式中,所述抗体衍生物是包含一个或多个单体的多聚体,例如二聚体,其中各单体包括:(i)抗-CD19抗体的抗原结合区,或由其衍生的多肽区域(例如,通过保守性取代一个或多个氨基酸),和(ii)多聚化(例如,二聚化)多肽区域,从而抗体衍生物可形成特异性结合CD19的多聚体(例如,同二聚体)。在典型实施方式中,抗-CD19抗体的抗原结合区或其衍生多肽区域通过重组或化学方式与异源蛋白,其中所述异源蛋白包含二聚或多聚结构域。在将抗体衍生物给予对象用于治疗或者预防表达CD19的癌症之前,将衍生物置于可形成同二聚体或异二聚体的条件下。本文所用的异二聚体可包含相同的二聚化结构域但不同的CD19抗原结合区,包含相同的CD19抗原结合区但不同的二聚化结构域,或者包含不同的CD19抗原结合区和二聚化结构域。

[0228] 典型的二聚化结构域是起源于转录因子的二聚化结构域。在一个实施方式中,二聚化结构域是碱性区亮氨酸拉链(“bZIP”)的二聚化结构域(参见Vinson等,1989, Science 246:911-916)。有用的亮氨酸拉链结构域包括例如,酵母转录因子GCN4、哺乳动物转录因子CCAAT/增强子结合蛋白C/EBP和癌基因产物的核转化物Fos和Jun的亮氨酸拉链结构域。(参见例如,Landschultz等,1988, Science 240:1759-64;Baxeavanis和Vinson,1993, Curr. Op. Gen. Devel. 3:278-285;O’Shea等,1989, Science 243:538-542)。在另一实施方式中,二聚化结构域为碱性区螺旋-环-螺旋(“bHLH”)蛋白的二聚化结构域。(参见Murre等,1989, Cell 56:777-783。也参见Davis等,1990, Cell 60:733-746;Voronova和Baltimore,1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4722-26)。尤其有用的bHLH蛋白是myc、max和mac。

[0229] 在另一实施方式中,二聚化结构域为免疫球蛋白恒定区,如重链恒定区或其结构域(如C_H1结构域、C_H2结构域和/或C_H3结构域)。(参见例如,美国专利5,155,027、5,336,603、5,359,046和5,349,053;EP 0 367 166;和W096/04388。)

[0230] 已知Fos和Jun之间(Bohmann等,1987, Science 238:1386-1392)、ATF/CREB家族成员之间(Hai等,1989, Genes Dev. 3:2083-2090)、C/EBP家族成员之间(Cao等,1991, Genes Dev. 5:1538-52;Williams等,1991, Genes Dev. 5:1553-67;Roman等,1990, Genes Dev. 4:1404-15)以及ATF/CREB和Fos/Jun家族成员之间(Hai和Curran,1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3720-24)形成异二聚体。因此,当CD19结合剂作为含有不同二聚化结构域的异二聚体给予对象时,可采用上述任何组合。

[0231] 在其它实施方式中,抗-CD19抗体衍生物是偶联于第二抗体的抗-CD19抗体(“抗体异偶联物”)(参见例如美国专利号4,676,980)。例如,可在结合于CD19的抗体和结合于介导ADCC、吞噬作用和/或CDC的表面受体或受体复合物,如CD16/FcγRIII、CD64/FcγRI、杀伤细胞活化或抑制受体或者补体控制蛋白CD59的抗体之间形成异偶联物。在一个实施方式中,多特异性抗体部分与第二种细胞表面分子或受体复合物的结合能提高抗-CD19抗体的效应功能。

[0232] 可用任何已知方法测定抗体和其他结合剂与CD19(例如,人CD19)的特异性结合。可以采用的免疫测定包括,例如,竞争性和非竞争性测定系统。这些试验是本领域的常规和熟知试验。(参见例如,Ausubel等编, Short Protocols in Molecular Biology(分子生物学简明实验方案)(约翰威利父子公司,纽约,第四版,1999);Harlow和Lane, Using

Antibodies :A Laboratory Manual(抗体应用实验室手册)(冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1999))

[0233] 另外,可采用竞争性结合试验测定 CD19 结合剂(例如,抗-CD19 抗体或其衍生物)与 CD19 的结合亲和力以及结合剂-CD19 相互作用的解离速率。竞争性结合实验的一个例子是放射性免疫实验,包括在含量递增的未标记 CD19 存在下用感兴趣抗体培育标记的 CD19(如 ^3H 或 ^{125}I) 和检测结合于标记的 CD19 的抗体。然后,可通过 Scatchard 作图分析的数据确定抗体与 CD19 的亲和力和结合解离速率。也可利用放射性免疫实验确定与第二抗体的竞争。在这种情况下,在含量递增的未标记第二抗体存在下,将 CD19 与偶联于标记化合物(如 ^3H 或 ^{125}I) 的感兴趣抗体一起培育。或者,可通过表面等离子共振法测定抗体与 CD19 的结合亲和力以及抗体-CD19 相互作用的结合速率和解离速率。在一些实施方式中,抗-CD19 抗体或其衍生物可靶向或累积在表达 CD19 的细胞的膜上。

[0234] 可用本领域已知的蛋白合成方法,一般是(例如)重组表达技术产生 CD19 结合剂(如抗-CD19 抗体或其衍生物)。抗体或其衍生物的重组表达一般包括构建含有编码该结合剂的核酸的表达载体。可通过重组 DNA 技术用本领域已知技术产生用于生产蛋白质分子的载体。可采用标准技术,例如下述文献所述的技术进行核酸重组、核酸合成、细胞培养、转基因掺入和重组蛋白表达:Sambrook 和 Russell,Molecular Cloning :A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册)(冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,第 3 版,2001); Sambrook 等,Molecular Cloning :A Laboratory Manual(分子克隆:实验室手册)(冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,第 2 版,1989);Short Protocols in Molecular Biology(分子生物学简明实验方案)(Ausubel 等,约翰威利父子公司,纽约,第 4 版,1999);和 Glick 和 Pasternak,Molecular Biotechnology :Principles and Applications of Recombinant DNA(分子生物学技术:重组 DNA 原理和应用)(ASM Press(ASM 出版社),华盛顿特区,第 2 版,1998)。

[0235] 例如,就抗-CD19 抗体的重组表达而言,表达载体可编码操作性连接于启动子的重链或轻链,或重链或轻链可变区。表达载体可包括例如,编码抗体分子恒定区的核苷酸序列(参见例如,PCT 公开 WO 86/05807;PCT 公开 WO89/01036;和美国专利号 5,122,464),可将抗体可变区克隆到这类载体中以便表达完整的重链或轻链。通过常规技术将该表达载体转移到宿主细胞中,然后通过常规技术培养该转染细胞,产生抗 CD19 抗体。在表达双链抗体的典型实施方式中,可以在宿主细胞中共同表达编码重链和轻链的载体,以表达整个免疫球蛋白分子。

[0236] 可利用各种原核和真核宿主-表达载体系统表达 CD19 结合剂(如抗-CD19 抗体或其衍生物)。通常,特别是对完整的重组抗-CD19 抗体分子而言,用真核细胞表达重组蛋白。例如,哺乳动物细胞如中华仓鼠卵巢细胞(CHO;例如 DG44)与某载体如来自人巨细胞病毒的主要中间体早期基因启动子元件联用,是制造抗-CD19 抗体及其衍生物的有效表达系统(Foecking 等,1986,Gene 45:101;和 Cockett 等,1990,Bio/Technology 8:2)。也可利用 CHEF 系统表达 CD19 结合剂。(参见例如,美国专利号 5,888,809)。

[0237] 其它宿主-表达系统包括例如,细菌细胞中基于质粒的表达系统(参见例如,Ruther 等,1983,EMBO 1,2:1791;Inouye 和 Inouye,1985,Nucleic Acids Res. 13:3101-3109;Van Heeke 和 Schuster,1989,J. Biol. Chem. 24:5503-5509);昆虫系统,如在草

地贫夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中使用苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核多面体病病毒 (AcNPV) 表达载体;和哺乳动物细胞中基于病毒的表达系统,如基于腺病毒的系统(参见例如,Logan 和 Shenk,1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359; Bittner 等,1987, *Methods in Enzymol.* 153:51-544)。

[0238] 此外,可选择调节插入序列表达、或以所需的特定方式修饰和加工该基因产物的宿主细胞系。可选择合适的细胞系或宿主系统,以保证对所表达的蛋白进行正确的修饰和加工(如糖基化、磷酸化和切割)。为此,可采用具有能适当地加工初始转录物和基因产物的细胞机器的真核宿主细胞。这类哺乳动物宿主细胞包括例如,CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3 和 W138。

[0239] 通常使用稳定表达系统长期高产率地产生重组 CD19 结合剂。例如,可通过如下方法工程改造稳定表达抗-CD19 抗体或其衍生物的细胞系:用合适的表达控制元件(如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点)和选择性标记物控制的 DNA 转化宿主细胞,然后用选择性培养基培养转化的细胞。选择性标记对选择产生抗性,使得细胞能够将该 DNA 稳定整合到其染色体中,生长形成细胞灶,进而可克隆并扩增成细胞系。可使用许多选择系统,包括例如,单纯疱疹病毒胸苷激酶、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶基因,它们分别可用于 tk、hgprt 或 aprt 细胞。另外,抗代谢剂抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其产生甲氨蝶呤抗性;gpt,其产生霉酚酸抗性;neo,其产生氨基糖苷 G-418 抗性;和 hygromycin,其产生潮霉素抗性。通常应用重组 DNA 技术领域公知的方法以选择所需的重组克隆,这些方法参见例如:Ausubel 等编的《新编分子生物学实验指南》系列实验室技术手册,《新编实验指南》(1987-1999),© 1994-1999 约翰威利父子公司),Kriegler,《基因转移和表达,实验室手册》(*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*), (斯托克顿出版社 (Stockton Press), 纽约,1990);《新编人类基因组实验指南》(*Current Protocols in Human Genetics*) (Dracopoli 等编,约翰威利父子公司,纽约,1994,第 12 和 13 章);和 Colberre-Garapin 等,1981, *J. Mol. Biol.*, 150:1。

[0240] 可通过载体扩增提高抗体或其衍生物的表达水平。(通常参见例如:Bebbington 和 Hentschel, *The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning* (将基于哺乳动物细胞中表达克隆基因所用的基因扩增的载体用于 DNA 克隆),第 3 卷 (Academic Press (学术出版社), 纽约,1987))。当表达抗-CD19 抗体或其衍生物的载体系统中的标记物可扩增时,提高宿主细胞培养基中存在的抑制剂水平能选择标记物基因拷贝数升高从而对该抑制剂产生抗性的宿主细胞。相关抗体基因的拷贝数也会增加,从而提高了抗体或其衍生物的表达(参见 Crouse 等,1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257)。

[0241] 当 CD19 结合剂体包含重链和轻链时,可用两种表达载体共同转染宿主细胞,其中第一种载体编码重链蛋白,第二种载体编码轻链蛋白。这两种载体可含有相同的选择性标记物,它们能够使重链和轻链蛋白的表达量相等。或者,可采用编码并能表达重链和轻链蛋白的一种载体。在这种情况下,轻链一般位于重链之前,以避免毒性游离重链过多(参见 Proudfoot,1986, *Nature* 322:52;Kohler,1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197)。重链与轻链的编码序列可包括 cDNA 或基因组 DNA。

[0242] 一旦产生了 CD19 结合剂(如通过动物、化学合成或重组表达)后,可通过任何合

适的蛋白质纯化方法进行纯化,包括例如层析法(如,离子交换或亲和层析(如用于纯化具有完整Fc区的抗体的A蛋白层析))、离心、差异溶解度或任何其它蛋白质纯化标准技术。抗-CD19抗体或其衍生物可以,例如,融合于标记物序列如肽,以利于通过亲和层析纯化。合适的标记物氨基酸序列包括例如:六-组氨酸肽(如pQE载体(凯杰公司(QIAGEN, Inc.), Chatsworth, CA, 91311)中提供的标签)和“HA”标签(对应于衍生自流感血凝素蛋白的表位)(Wilson等,1984, Cell 37:767)和“flag”标签。

[0243] 一般地,CD19结合剂是基本纯化的(如基本不含限制其作用或产生不良副作用的物质)。在一些实施方式中,所述CD19结合剂的纯度为至少约40%,至少约50%,或至少约60%。在一些实施方式中,所述CD19结合剂的纯度为至少约60-65%、65-70%、70-75%、75-80%、80-85%、85-90%、90-95%或95-98%。在一些实施方式中,所述CD19结合剂的纯度约为99%。

[0244] 其它CD19结合剂包括与异源蛋白(一般为至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或至少100个氨基酸)的融合蛋白(即重组融合或化学偶联,包括共价和非共价偶联的蛋白质)。在一些实施方式中,这种CD19结合剂可包括特异性结合CD19的人源化重链和/或轻链可变区的氨基酸序列以及任选的免疫球蛋白效应区或其功能等价物。本文所用的免疫球蛋白效应区的功能等价物结合于具有吞噬细胞或裂解细胞活性的免疫细胞上的Fc受体,或者该免疫球蛋白效应区结合补系统的一种或多种成分。CD19结合部分与异源蛋白不一定要直接连接,可通过接头序列连接。

[0245] 例如,可通过将构架内的人源化可变区与异源蛋白编码序列融合而重组产生CD19结合剂。异源蛋白任选可包括效应区或其功能等价物,并可提供以下一种或多种特征:促进稳定表达;提供有助于高产率重组表达的方式;和/或提供多聚化结构域。

[0246] 可采用任何适合筛选蛋白-蛋白相互作用的方法来鉴定CD19结合剂。通常通过蛋白质特异性结合CD19的能力对它们进行初步鉴定。可使用的传统方法有“相互作用克隆”技术,该技术用标记的CD19探测表达文库,其方式类似于抗体探测 λ gt11文库技术。例如,这可通过下述方式进行,但不限于此:可插入心肌激酶(HMK)的磷酸化位点对编码CD19的cDNA克隆的C-末端进行修饰(参见,例如,Blancar和Rutter,1992, Science 256:1014-18)。在大肠杆菌内表达重组蛋白,在GDP-亲和柱上纯化到同质(Ederly等,1988, Gene74:517-25)并用 γ - 32 P-ATP和牛心肌激酶(密苏里州圣路易斯SA公司(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO))标记,使得比活为 1×10^8 cpm/ μ g,并用于“far-Western试验”来筛选人胎盘 λ gt11 cDNA文库(Blancar和Rutter,1992, Science 256:1014-18)。分离与CD19探针相互作用的嗜斑。释放阳性 λ 噬斑的cDNA插入物并亚克隆入适合测序的载体,如pBluescript KS(加州拉霍亚斯特拉塔基因公司(Stratagene, La Jolla, CA))。

[0247] 检测体内蛋白质相互作用的一种方法是二杂合系统。此类系统的一个例子参见(Chien等,1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-82),可由加利福尼亚州帕洛阿尔托的克隆泰克公司(Clontech, Palo Alto, CA)购得。

[0248] 配体-药物偶联化合物

[0249] 本发明尤其提供了用于药物靶向递送的配体-药物偶联化合物。发明人发现,该配体-药物偶联化合物对表达CD19的B细胞具有有效的细胞毒和/或细胞生长抑制活性。所述配体-药物偶联化合物包含共价连接于至少一个药物单元的配体单元。药物单元可直

接连接或通过接头单元 (-LU-) 连接。

[0250] 在一些实施方式中,所述配体-药物偶联化合物具有下式:

[0251] $L-(LU-D)_p$ (I)

[0252] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物;

[0253] 式中:

[0254] L 是配体单元,即本发明的 CD19 结合剂,和

[0255] (LU-D) 是接头单元-药物单元部分,其中:

[0256] LU- 是接头单元,和

[0257] -D 是对靶细胞具有细胞生长抑制或细胞毒活性的药物单元;和

[0258] p 是 1 至约 20 的整数。

[0259] 在一些实施方式中, p 的范围是 1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3 或 1-2。在一些实施方式中, p 的范围是 2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4 或 2-3。在其它实施方式中, p 是 1、2、3、4、5 或 6。在一些实施方式中, p 是 2 或 4。

[0260] 在一些实施方式中,所述配体-药物偶联化合物具有下式:

[0261] $L-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$ (II)

[0262] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物;

[0263] 式中:

[0264] L 是配体单元,即 CD19 结合剂,和

[0265] $-A_a-W_w-Y_y-$ 是接头单元 (LU), 其中:

[0266] $-A-$ 是拉伸单元,

[0267] a 是 0 或 1,

[0268] $-W-$ 各自独立地是氨基酸单元,

[0269] w 是 0-12 的整数,

[0270] $-Y-$ 是自牺牲 (self-immolative) 间隔单元,

[0271] y 是 0、1 或 2;

[0272] -D 是对靶细胞具有细胞生长抑制或细胞毒活性的药物单元;和

[0273] p 是 1 至约 20 的整数。

[0274] 在一些实施方式中, a 是 0 或 1, w 是 0 或 1, y 是 0、1 或 2。在一些实施方式中, a 是 0 或 1, w 是 0 或 1, 且 y 是 0 或 1。在一些实施方式中, p 的范围是 1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3 或 1-2。在一些实施方式中, p 的范围是 2-8、2-7、2-6、2-5、2-4 或 2-3。在其它实施方式中, p 是 1、2、3、4、5 或 6。在一些实施方式中, p 是 2 或 4。在一些实施方式中, 当 w 不是 0 时 y 是 1 或 2。在一些实施方式中, 当 w 是 1-12 时 y 是 1 或 2。在一些实施方式中, w 是 2-12 且 y 是 1 或 2。在一些实施方式中, a 是 1, w 和 y 是 0。

[0275] p 代表药物载量,即分子中每个配体(例如,抗体)对应的药物分子的平均数量。药物载量的范围可以是每个配体 1-20 个药物 (D)。可通过常规手段如质谱、ELISA 实验和 HPLC 鉴定偶联反应制备物中每个配体对应的平均药物数量。也可根据 p 确定配体-药物-偶联物的定量分布。在某些情况下,可通过诸如反相 HPLC 或电泳等方式将 p 是某一确定值的均一配体-药物-偶联物与其它药物载量的配体-药物-偶联物分离,并进行纯化和鉴定。在示范性实施方式中, p 是 2-8。

[0276] 可通过熟练技术人员已知的任何技术来制造配体-药物偶联化合物。简言之,所述配体-药物偶联化合物包含 CD19 结合剂作为配体单元、药物、以及任选的连接药物和结合剂的接头。有许多不同的反应可将药物和/或接头共价结合于结合剂。这通常是通过结合剂(如抗体分子)中的氨基酸残基反应完成的,包括赖氨酸的氨基、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧基、半胱氨酸的巯基以及芳香氨基酸的各个部分。一种最常使用的非特异性共价结合方法是将化合物的羧基(或氨基)与抗体的氨基(或羧基)相连的碳二亚胺反应。此外,二醛或酰肼酯类的双官能剂已被用来将化合物的氨基连接到抗体分子的氨基。将药物与结合剂相连接的另一种可能的方法是希夫碱反应。该方法涉及对含有乙二醇或羟基基团的药物进行高碘酸盐氧化作用,从而形成醛,然后将醛与结合剂反应。通过与结合剂的氨基形成希夫碱而发生结合。异硫氰酸盐也可用作偶联剂将药物共价连接于结合剂。其他技术是熟练技术人员已知的并包含在本发明范围内。

[0277] 在某些实施方式中,在适当条件下使作为接头前体的中间体与药物反应。在某些实施方式中,在药物和/或中间体上使用反应基。药物和中间体之间的反应产物,或衍生药物,随后在适当条件下与 CD19 结合剂反应。

[0278] 本文将更加详细地描述所述配体-药物偶联物的各个特定单元。示例性的接头单元、拉伸单元、氨基酸单元、自牺牲间隔单元和药物单元的合成与结构也描述于美国专利申请公布号 2003-0083263、2005-0238649 和 2005-0009751,出于所有目的,各专利通过引用全文纳入本文。

[0279] 接头单元

[0280] 通常,配体-药物偶联化合物在药物单元和配体单元之间包含接头区。在一些实施方式中,接头在胞内条件下可切割,切割接头将药物单元自配体释放入胞内环境。在其它实施方式中,接头单元不可切割,通过例如降解抗体释放药物。

[0281] 在一些实施方式中,接头可由胞内环境中(如,溶酶体或内体或胞膜窖(caveolea)内)存在的切割剂切割。接头可以是,例如被胞内肽酶或蛋白酶,包括但不限于溶酶体或内体蛋白酶切割的肽酰接头。在一些实施方式中,肽酰接头的长度是至少两个氨基酸或至少三个氨基酸。切割剂可包括组织蛋白酶 B 和 D 以及纤溶酶,已知它们均可水解二肽药物衍生物,导致在靶细胞内释放活性药物(参见例如,Dubowchik 和 Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83 :67-123)。最常见的是,可由 CD19 表达细胞内存在的酶切割的肽酰接头。例如,可使用可由硫醇依赖性蛋白酶组织蛋白酶-B 切割的肽酰接头(如 Phe-Leu 或 Gly-Phe-Leu-Gly 接头 (SEQ ID NO :52)),所述蛋白酶在癌组织中高表达。此类接头的其他例子描述于,例如,美国专利号 6, 214, 345, 通过引用将其全文纳入本文用于所有目的。在特定实施方式中,可由胞内蛋白酶切割的肽酰接头是 Val-Cit 接头或 Phe-Lys 接头(参见例如,美国专利 6, 214, 345, 其描述了具有 val-cit 接头的多柔比星的合成)。使用胞内蛋白水解释放治疗剂的一个优点是偶联时该物质毒性较低且偶联物的血清稳定性通常较高。

[0282] 在其它实施方式中,可切割接头具有 pH 敏感性,即对某些 pH 值下的水解敏感。通常, pH 敏感性接头在酸性条件下可水解。例如,可使用在溶酶体中可水解的酸不稳定性接头(如脲、缩氨基脲、缩氨基硫脲、顺式-乌头酰胺(cis-aconitic amide)、原酸酯、缩醛、缩酮等)。(参见例如,美国专利号 5, 122, 368 ;5, 824, 805 ;5, 622, 929 ;Dubowchik 和 Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83 :67-123 ;Neville 等, 1989, Biol. Chem. 264 :14653-14661。)

这类接头在中性 pH 条件下,例如在血液中相对稳定,但在 5.5 或 5.0 的低 pH 条件(接近溶酶体的 pH)下不稳定。在某些实施方式中,可水解接头是硫醚接头(如通过酰胺键连接于治疗剂的硫醚(参见例如,美国专利号 5,622,929))。

[0283] 在其它实施方式中,该接头在还原条件下可切割(如二硫键接头)。本领域已知众多的二硫键接头,包括例如,可用 SATA(N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫)丁酸酯)和 SMPT(N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫)甲苯)、SPDB 和 SMPT 形成的接头。(参见例如 Thorpe 等,1987,Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak 等,刊于 Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer(免疫偶联物:放射成像和癌症治疗中的抗体偶联物)(C.W.Vogel 编,牛津大学出版社,1987;也参见美国专利号 4,880,935。)

[0284] 在其它具体实施方式中,接头是丙二酸接头(Johnson 等,1995, Anticancer Res. 15:1387-93)、马来酰亚胺苯甲酰接头(Lau 等,1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304)或 3'-N-酰胺类似物(Lau 等,1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12)。

[0285] 在其它实施方式中,接头单元不可切割,通过降解抗体释放药物。(参见美国公开号 20050238649,通过引用全文纳入本文用于所有目的)。

[0286] 通常,接头对胞外环境基本不敏感。提到接头时,本文所用术语“对胞外环境基本不敏感”指配体-药物偶联化合物出现在胞外环境中(如血浆中)时,配体-药物偶联化合物样品中不超过约 20%,通常不超过约 15%,更通常不超过约 10%,更通常不超过约 5%、不超过约 3%或不超过约 1%的接头被切割。可通过以下方法测定接头是否对胞外环境基本不敏感,例如,将配体-药物偶联化合物与血浆一起培育预定的时间(如 2、4、8、16 或 24 小时),然后定量测定血浆中出现的游离药物。

[0287] 在其它非互斥实施方式中,接头促进细胞内化。在某些实施方式中,偶联于治疗剂时接头促进细胞内化(即,在本文所述的配体-药物偶联化合物的接头-治疗剂部分的情况下)。在其它实施方式中,接头偶联于奥瑞斯他汀化合物和抗 CD19 抗体时促进细胞内化。

[0288] 可用于本发明组合和方法的各种示例性接头描述于 WO 2004-010957、美国公开号 20060074008、美国公开号 20050238649 和美国公开号 20060024317(通过引用将全文纳入本文用于所有目的)。

[0289] “接头单元”(LU)是一种双官能化合物,可用来连接药物单元和配体单元以形成配体-药物偶联化合物。在一些实施方式中,接头单元具有下式:

[0290] $-A_a-W_w-Y_y-$

[0291] 式中:-A-是拉伸单元,

[0292] a 是 0 或 1,

[0293] -W-各自独立地是氨基酸单元,

[0294] w 是 0-12 的整数,

[0295] -Y-是自牺牲间隔单元,和

[0296] y 是 0、1 或 2。

[0297] 在一些实施方式中,a 是 0 或 1, w 是 0 或 1, y 是 0、1 或 2。在一些实施方式中, a

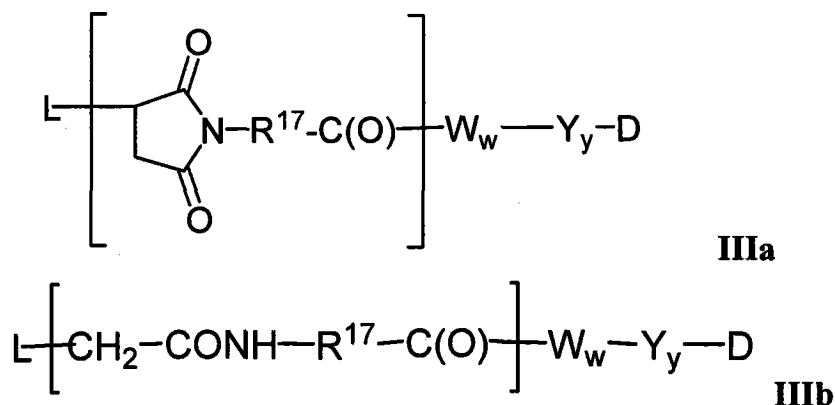
是 0 或 1, w 是 0 或 1, 且 y 是 0 或 1。在一些实施方式中, 当 w 是 1-12 时 y 是 1 或 2。在一些实施方式中, w 是 2-12 且 y 是 1 或 2。在一些实施方式中, a 是 1, w 和 y 是 0。

[0298] 拉伸单元

[0299] 存在时, 拉伸单元 (A) 能够将配体单元连接于氨基酸单元 (-W-) (如果存在)、间隔单元 (-Y-) (如果存在); 或连接于药物单元 (-D)。CD19 结合剂上可以存在 (天然存在或通过化学操作加入) 的有用官能团包括但不限于: 巯基、氨基、羟基、糖的异头羟基和羧基。合适的官能团是巯基和氨基。在一个例子中, 可通过还原抗 -CD19 抗体的分子内二硫键产生巯基。在另一个实施方式中, 可通过抗 -CD19 抗体赖氨酸部分的氨基与 2-亚氨基四氢噻吩 (兆特试剂 (Traut's reagent)) 或其它巯基生成试剂的反应产生巯基。在某些实施方式中, 抗 -CD19 抗体是重组抗体, 经工程改造携带一个或多个赖氨酸。在某些其它实施方式中, 重组抗 -CD19 抗体经工程改造携带额外的巯基, 如额外的半胱氨酸。

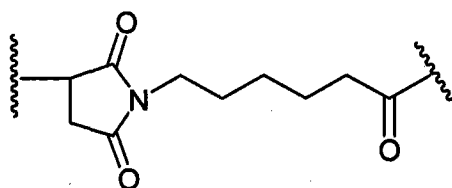
[0300] 在一个实施方式中, 拉伸单元与配体单元的硫原子成键。硫原子可衍生自配体的巯基。式 IIIa 和 IIIb 方括号内表示该实施方式的代表性拉伸单元, 其中 L-、-W-、-Y-、-D、w 和 y 的定义如上所述, R₁₇ 选自 -C₁-C₁₀亚烷基-、-C₁-C₁₀亚烯基-、-C₁-C₁₀亚炔基-、-亚碳环基-、-O-(C₁-C₈亚烷基)-、-O-(C₁-C₈亚烯基)-、-O-(C₁-C₈亚炔基)-、-亚芳基-、-C₁-C₁₀亚烷基-亚芳基-、-C₂-C₁₀亚烯基-亚芳基-、-C₂-C₁₀亚炔基-亚芳基-、-亚芳基-C₁-C₁₀亚烷基-、-亚芳基-C₂-C₁₀亚烯基-、-亚芳基-C₂-C₁₀亚炔基-、-C₁-C₁₀亚烷基-(亚碳环基)-、-C₂-C₁₀亚烯基-(亚碳环基)-、-C₂-C₁₀亚炔基-(亚碳环基)-、-(亚碳环基)-C₁-C₁₀亚烷基-、-(亚碳环基)-C₂-C₁₀亚烯基-、-(亚碳环基)-C₂-C₁₀亚炔基-、亚杂环基-、-C₁-C₁₀亚烷基-(亚杂环基)-、-C₂-C₁₀亚烯基-(亚杂环基)-、-C₂-C₁₀亚炔基-(亚杂环基)-、-(亚杂环基)-C₁-C₁₀亚烷基-、-(亚杂环基)-C₂-C₁₀亚烯基-、-(亚杂环基)-C₁-C₁₀亚炔基-、-(CH₂CH₂O)_r- 或 -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, r 是 1-10 的整数, 其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环、亚碳环基、亚杂环基和亚芳基基团是任选取代的。单独出现或作为另一基团一部分的亚烷基、亚烯基、亚炔基, 可用 (例如) 独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代; 单独出现或作为另一基团一部分的亚碳环基基团, 可用 (例如) 独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代; 单独出现或作为另一基团一部分的亚芳基可用 (例如) 独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代; 单独出现或作为另一基团一部分的亚杂环基基团可用 (例如) 独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代。A1、A2、A3 和 A4 的定义如本文所述。从所有示范性实施方式中应该理解, 即使没有明确说明, 也可将 1-20 个药物部分连接于配体 (p = 1-20)。

[0301]



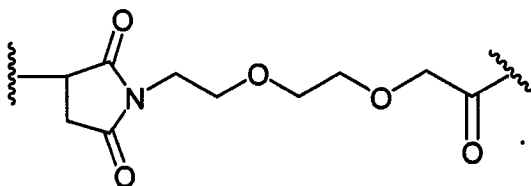
[0302] 说明性拉伸单元是式 IIIa 的拉伸单元, 其中 R^{17} 是 $-(CH_2)_5-$:

[0303]



[0304] 另一种说明性拉伸单元是式 IIIa 的拉伸单元, 其中 R^{17} 是 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$; r 是 2 :

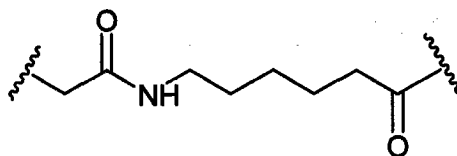
[0305]



[0306] 说明性拉伸单元是式 IIIa 的拉伸单元, 其中 R^{17} 是 - 亚芳基 - 或亚芳基 $-C_1-C_{10}$ 亚烷基 -。在一些实施方式中, 芳基是未取代的苯基。

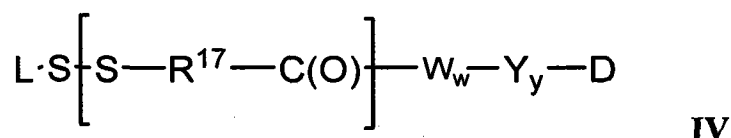
[0307] 另一说明性拉伸单元是式 IIIb 的拉伸单元, 其中 R^{17} 是 $-(CH_2)_5-$:

[0308]



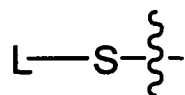
[0309] 在某些实施方式中, 通过配体单元的硫原子和拉伸单元的硫原子之间的二硫键, 将拉伸单元连接于配体单元。式 IV 的方括号内表示此实施方式的代表性拉伸单元, 其中 R^{17} 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 和 y 的定义如上所述。

[0310]



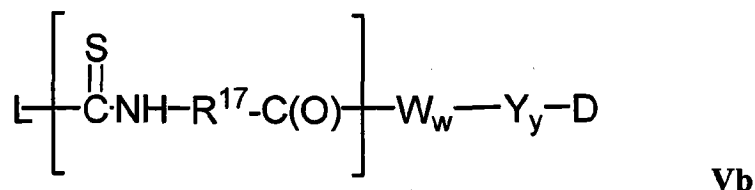
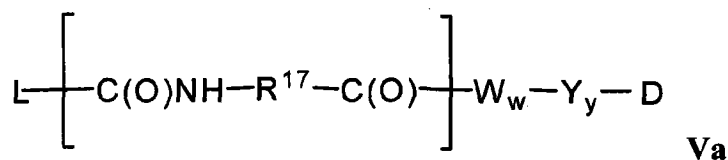
[0311] 通过本申请应该注意到, 下式的 S 部分指配体单元的硫原子, 除非文中另有说明。

[0312]



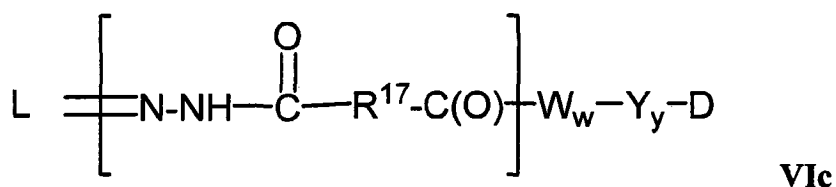
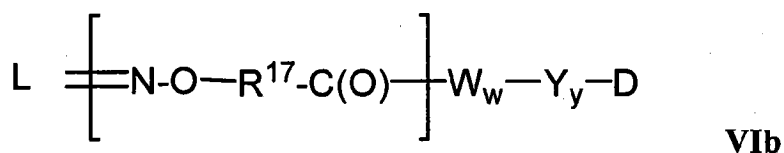
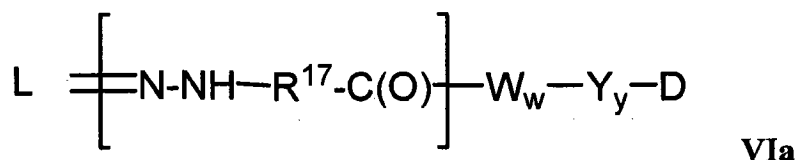
[0313] 在其它实施方式中, 拉伸单元含有可与配体的伯或仲氨基成键的反应性位点。这些反应性位点的例子包括但不限于: 活性酯如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯、酸酐、酰基氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯。式 Va 和 Vb 的方括号内表示该实施方式的代表性拉伸单元, 其中 $-R^{17}-$ 、 $L-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w 和 y 的定义如上所述;

[0314]



[0315] 在一些实施方式中,拉伸单元含有可与配体上可能出现的修饰糖的(-CHO)基团发生反应的反应性位点。例如,可利用诸如高碘酸钠等试剂温和氧化糖,所得的氧化糖的(-CHO)单元可与含有官能团如酰肼、肼、伯或仲胺、肼、缩氨基硫脲、羧酸肼和芳基酰肼的拉伸单元缩合,如 Kaneko 等,1991, Bioconjugate Chem. 2:133-41 所述。式 VIa、VIb 和 VIc 的方括号内表示该实施方式的代表性拉伸单元,其中 $-\text{R}^{17}$ 、 L 、 $-\text{W}$ 、 $-\text{Y}$ 、 $-\text{D}$ 、 w 和 y 的定义如上所述。

[0316]

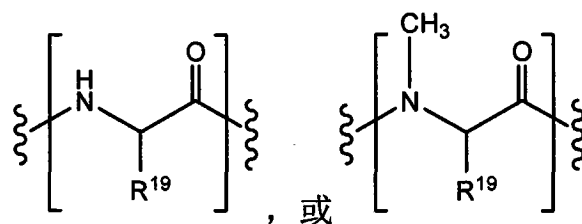


[0317] 氨基酸单元

[0318] 存在时,氨基酸单元($-\text{W}$)将拉伸单元连接于间隔单元(如果存在间隔单元),将拉伸单元连接于药物部分(如果不存在间隔单元),将配体连接于药物单元(如果不存在拉伸单元和间隔单元)。

[0319] W_w 可以是,例如,单肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。 $-\text{W}$ 单元各自独立地具有下面方括号中的结构式, w 是 0-12 的整数:

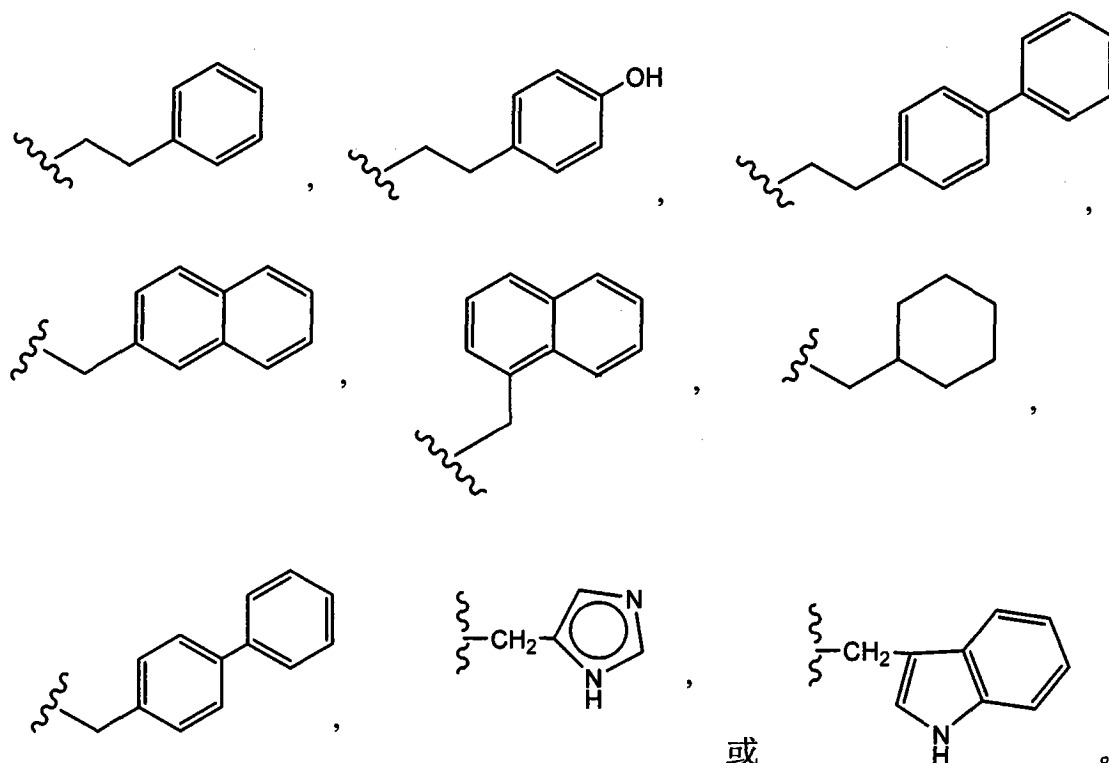
[0320]



[0321] 其中 R^{19} 是氢、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对-羟基苄基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、-

$(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、环己基、

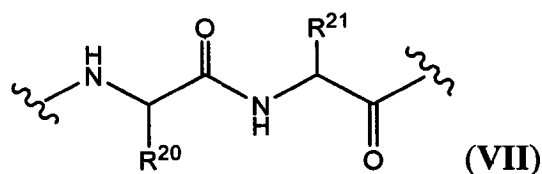
[0322]



[0323] 在一些实施方式中,可利用一种或多种酶,包括癌症或肿瘤相关蛋白酶对氨基酸单元进行酶促切割,以释放药物单元(-D),在一个实施方式中它在释放后体内质子化以提供药物(D)。

[0324] 在某些实施方式中,氨基酸单元可包含天然氨基酸。在其它实施方式中,氨基酸单元可包含非天然氨基酸。式(VII)-(IX)代表说明性Ww单元:

[0325]



[0326] 其中 R^{20} 和 R^{21} 定义如下:

[0338] R^{19} 、 R^{20} 、 R^{21} 、 R^{22} 或 R^{23} 连接的各个碳原子独立地是(S)或(R)构型。

[0339] 在氨基酸单元的一个方面,氨基酸单元是缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)。在另一方面,氨基酸单元是苯丙氨酸-赖氨酸(即fk)。在氨基酸单元的另一方面,氨基酸单元是N-甲基缬氨酸-瓜氨酸。在另一方面,氨基酸单元是5-氨基戊酸、高苯丙氨酸赖氨酸、四异喹啉羧酸赖氨酸、环己基丙氨酸赖氨酸、异哌啶酸(isonepecotic acid)赖氨酸、 β -丙氨酸赖氨酸、甘氨酸丝氨酸缬氨酸谷胺酰胺和异哌啶酸。

[0340] 间隔单元

[0341] 存在时,间隔单元(-Y-)将氨基酸单元连接于药物单元(氨基酸单元存在时)。或者,不存在氨基酸单元时,间隔单元将拉伸单元连接于药物单元。不存在氨基酸单元和拉伸单元时,间隔单元也将药物单元连接于配体单元。

[0342] 间隔单元有两种主要类型:非自牺牲的或自牺牲的。非自牺牲间隔单元是这样一种间隔单元,对配体-药物偶联物的氨基酸单元进行切割,特别是酶切后,一部分或全部间隔单元保持结合于药物部分。非自牺牲间隔单元的例子包括但不限于(甘氨酸-甘氨酸)间隔单元和甘氨酸间隔单元(均参见方案1)(见下)。通过酶(如肿瘤细胞相关性蛋白酶、癌细胞相关性蛋白酶或淋巴细胞相关性蛋白酶)对含有甘氨酸-甘氨酸间隔单元或甘氨酸间隔单元的偶联物进行酶切时,从L-Aa-Ww-上切下甘氨酸-甘氨酸-药物部分或甘氨酸-药物部分。在一个实施方式中,在靶细胞内发生独立的水解反应,切割甘氨酸-药物部分键并释放药物。

[0343] 方案1

[0344] 在一些实施方式中,非自牺牲间隔单元(-Y-)是-Gly-。在一些实施方式中,非自牺牲间隔单元(-Y-)是-Gly-Gly-。

[0345] 在一个实施方式中,提供不存在间隔单元的药物-接头偶联物($y=0$),或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

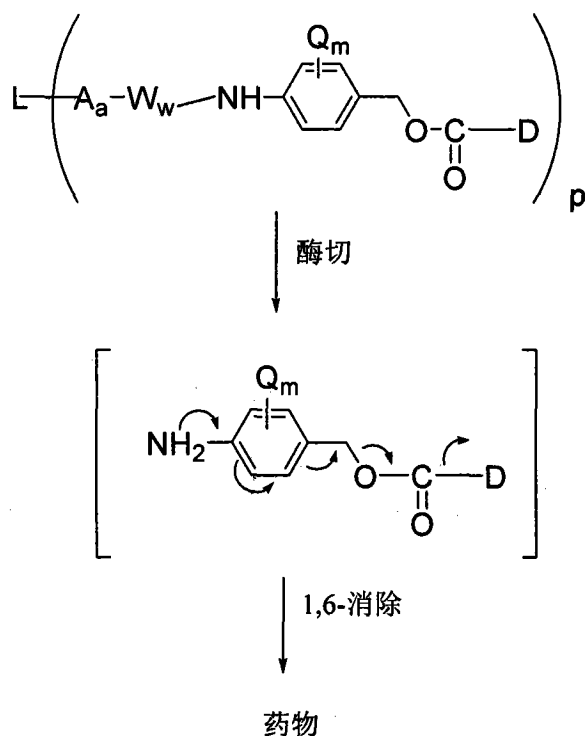
[0346] 或者,含有自牺牲的间隔单元的偶联物可释放-D。本文所用术语“自牺牲间隔物”指能够将两个隔开的化学部分共价连接成稳定的三联分子的双官能化学部分。如果与第一部分的键被切割,则自发与第二化学部分分离。

[0347] 在一些实施方式中,-Y_y-是对-氨基苯甲醇(PAB)单元(参见方案2和3),它的亚苯基部分被Q_m取代,其中Q是-C₁-C₈烷基、-C₁-C₈烯基、-C₁-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₁-C₈烯基)、-O-(C₁-C₈炔基)、-卤素、-硝基或-氰基;m是0-4的整数。烷基、烯基和炔基无论是单独的或作为其他基团的一部分都可任选被文中定义的A1取代。

[0348] 在一些实施方式中,-Y-是通过PAB基团的氨基氮原子连接于-W_w-的PAB基团,并通过碳酸酯、氨基甲酸酯或醚基团直接连接于-D。如果不希望受任何具体理论或机理的限制,方案2描述了通过氨基甲酸酯或碳酸酯基团直接连接于-D的PAB基团的药物释放的可能机理,如Toki等,2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872所述。

[0349] 方案2

[0350]

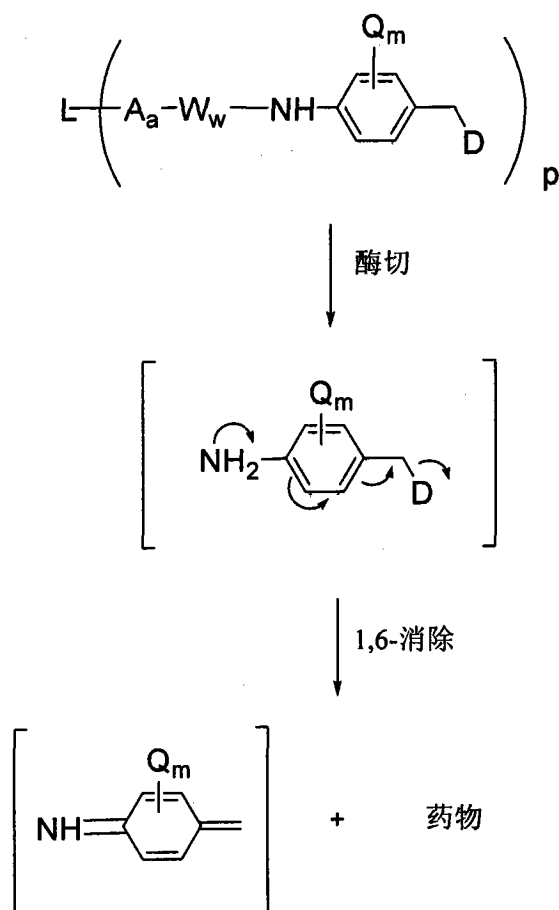


[0351] 在方案2中, Q是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_1-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_8$ 炔基)、-卤素、-硝基或-氰基; m是0-4的整数; p的范围是1至约20。烷基、烯基和炔基无论是单独的或作为其他基团的一部分都可任选被文中定义的A1取代。

[0352] 不希望受任何具体理论或机理的限制, 方案3描述了通过醚或胺连接直接连接于-D的PAB基团的药物释放的可能机理, 其中D包含构成药物单元一部分的氧或氮基团。

[0353] 方案3

[0354]



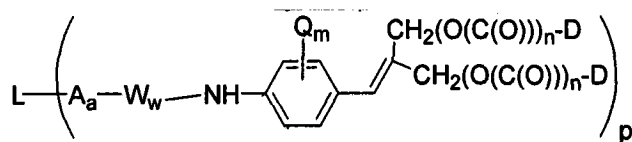
[0355] 在方案3中, Q是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_1-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_8$ 炔基)、-卤素、-硝基或-氰基; m是0-4的整数; p的范围是1至约20。烷基、烯基和炔基无论是单独的或作为其他基团的一部分都可任选被文中定义的A1取代。

[0356] 自牺牲的间隔物的其它例子包括但不限于: 电学性质类似于PAB基团的芳族化合物, 如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等, 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)和邻或对-氨基苄基缩醛。可以使用酰胺键水解后发生环化的间隔物, 例如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等, 1995, Chemistry Biology 2:223)、合适取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系统(Storm等, 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等, 1990, J. Org. Chem. 55:5867)。消除甘氨酸 α -位上取代的含胺药物(Kingsbury等, 1984, J. Med. Chem. 27:1447)也是自牺牲的间隔物的例子。

[0357] 在一个实施方式中, 间隔单元是分支的双(羟甲基)-苯乙烯(BHMS)单元, 如方案4所示, 它可用于掺入和释放多种药物。

[0358] 方案4

[0359]



酶切
↓

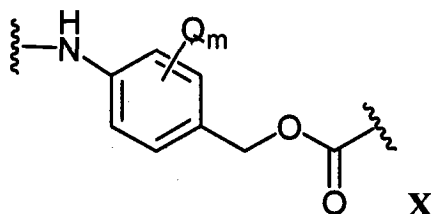
2 个药物

[0360] 在方案 4 中, Q 是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_1-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_8$ 炔基)、- 卤素、- 硝基或 - 氰基; m 是 0-4 的整数; n 是 0 或 1; p 的范围是 1- 约 20。烷基、烯基和炔基无论是单独的或作为其他基团的一部分都可任选被文中定义的 A1 取代。

[0361] 在一些实施方式中, -D 部分相同。在又一实施方式中, -D 部分不同。

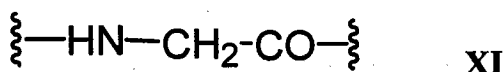
[0362] 在一个方面, 间隔单元 $(-Y_y-)$ 由式 (X)-(XII) 代表:

[0363]

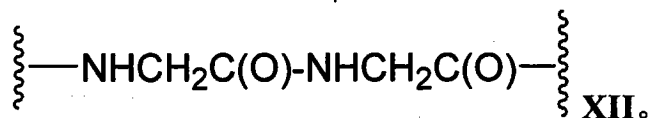


[0364] 其中 Q 是 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_1-C_8$ 烯基、 $-C_1-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_1-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_8$ 炔基)、- 卤素、- 硝基或 - 氰基; m 是 0-4 的整数。烷基、烯基和炔基无论是单独的或作为其他基团的一部分都可任选被文中定义的 A1 取代。

[0365]

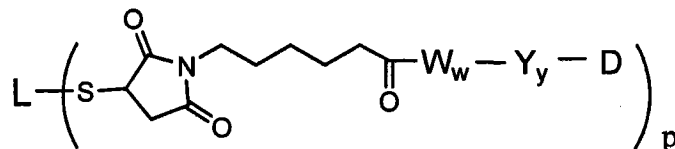


和



[0366] 包括配体 - 药物偶联化合物的式 I 和 II 的实施方式可包括:

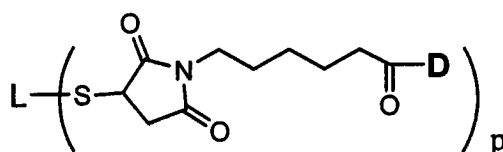
[0367]



[0368] 其中 w 和 y 各自是 0、1 或 2,

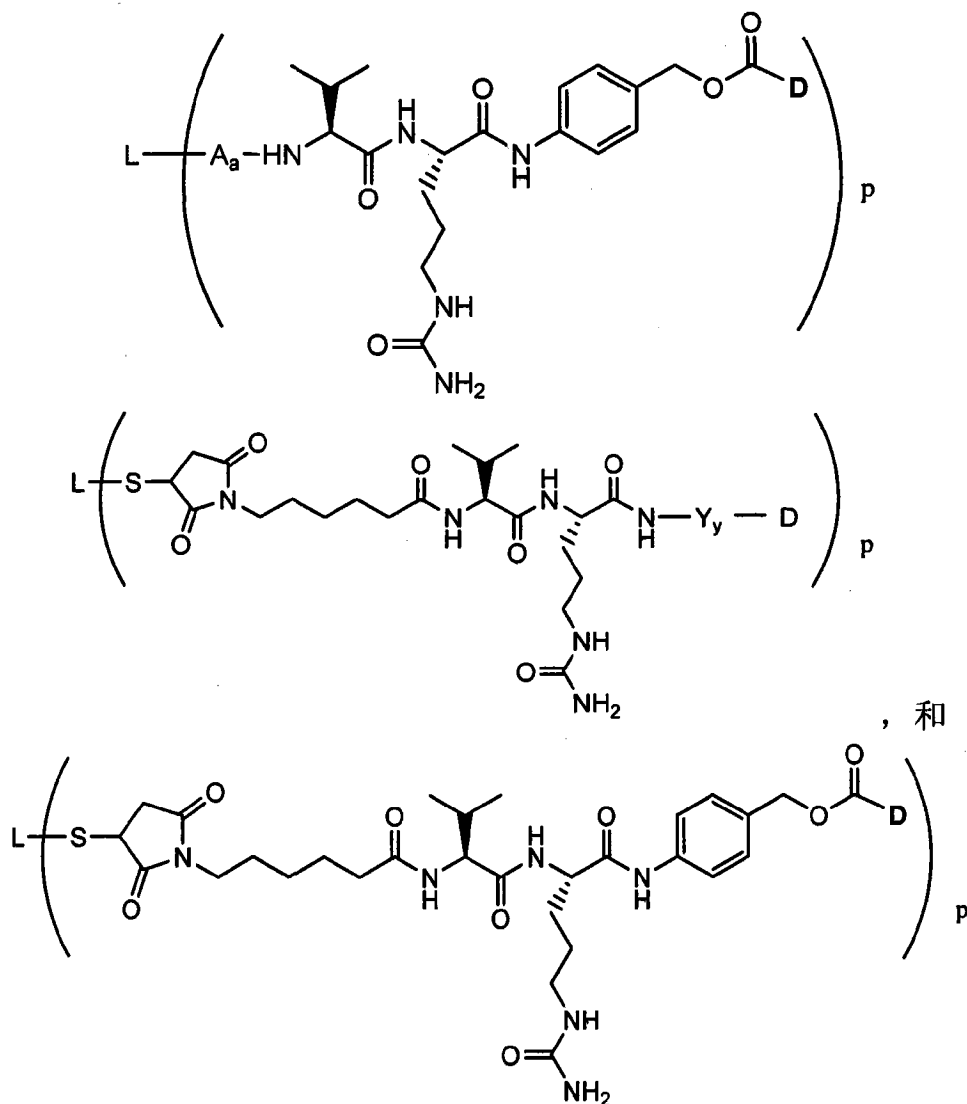
[0369] 和,

[0370]



[0371] 其中 w 和 y 各自是 0,

[0372]



[0373] 药物单元

[0374] 药物部分 (D) 可以是任何细胞毒剂、细胞生长抑制剂或免疫调节剂 (例如, 免疫抑制剂) 或药物。D 是具有可与间隔单元、氨基酸单元、拉伸单元或配体单元成键的原子的药物单元 (部分)。在一些实施方式中, 药物单元 D 具有可与间隔单元成键的氮原子。本文所用术语“药物单元”和“药物部分”同义且可互换使用。

[0375] 有用的细胞毒剂或免疫调节剂的类型包括, 例如, 抗微管蛋白剂、奥瑞斯他汀、DNA 小沟结合剂、DNA 复制抑制剂、烷化剂 (例如, 铂复合物如顺铂、单铂、二铂、和三环铂复合物以及卡铂)、蒽环类抗生素、抗生素、抗叶酸剂、抗代谢剂、化疗增敏剂、多卡霉素、喜树碱、依托泊甙、氟化嘧啶、离子载体、来西菌素、亚硝基脲、顺铂、预成型化合物、嘌呤抗代谢剂、嘌呤霉素、放疗增敏剂、类固醇、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱, 等等。

[0376] 各种细胞毒剂或免疫调节剂包括, 例如, 雄激素、氨基霉素 (AMC)、天冬酰胺酶、5-氮杂胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、白消安、丁基硫堇亚胺、卡奇霉素、喜树碱、卡铂、卡莫司汀 (BSNU)、CC-1065、苯丁酸氮芥、顺铂、秋水仙碱、氟尿嘧啶、环磷酰胺、阿糖胞苷、胞苷阿拉伯糖苷、松胞菌素 B、达卡巴嗪、放线菌素 d (以前称为放线菌素)、道诺霉素、氨基咪唑、多西他赛、多柔比星、秋水仙碱、雌激素、5-氟脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、短杆菌肽 D、

羟基脲、黄胆素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀 (CCNU)、美坦辛、双氯乙基甲胺、美法仑、6- 巯基嘌呤、甲氨蝶呤、光神霉素、丝裂霉素 C、米托蒽醌、硝基咪唑、紫杉醇、岩沙海葵毒素、普卡霉素、丙卡巴肼、根霉素、链脲霉素、替诺泊忒、6- 巯鸟嘌呤、硫替派、拓扑替康、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、VP-16 和 VM-26。

[0377] 在一些典型的实施方式中,合适的细胞毒剂包括,例如,DNA 小沟结合剂(例如,烯二炔和莱喜多星 (lexitropsin)(一种 CBI 化合物);参见美国专利号 6,130,237),多卡米星,紫杉烷(例如,紫杉醇和多西他赛),嘌呤霉素,长春花生物碱,CC-1065,SN-38,托泊替康,吗啉代-阿霉素,根霉素,氰基吗啉代-阿霉素,棘霉素,考布他汀,纺锤菌素,埃匹希龙 (epithilone)A 和 B,雌氮芥,念珠藻环肽,西马多丁,类美坦素 (maytansinoids),盘皮海绵内酯 (discodermolide),软珊瑚醇 (eleutherobin),和米托蒽醌。

[0378] 在一些实施方式中,所述药物是抗-微管蛋白剂。抗微管蛋白剂的例子包括但不限于:奥瑞斯他汀、紫杉烷(如泰素®(紫杉醇)、泰索帝®(多西他赛))、T67(Tularik)和长春花生物碱(例如,长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨)。其他抗微管蛋白剂包括,例如,浆果赤霉素衍生物、紫杉烷类似物(例如,埃匹希龙 A 和 B)、诺考达唑、秋水仙碱和考昔米德 (colcemid)、雌氮芥、自念珠藻环肽 (cryptophycin)、西马多丁、类美坦素、考布他汀、盘皮海绵内酯和软珊瑚醇。

[0379] 在某些实施方式中,所述细胞毒剂是类美坦素(另一类抗微管蛋白剂)。例如,在一个具体实施方式中,所述类美坦素是美坦辛或 DM-1 (IG 公司 (ImmunoGen, Inc.));也参见 Chari 等,1992, Cancer Res 52 :127-131)。

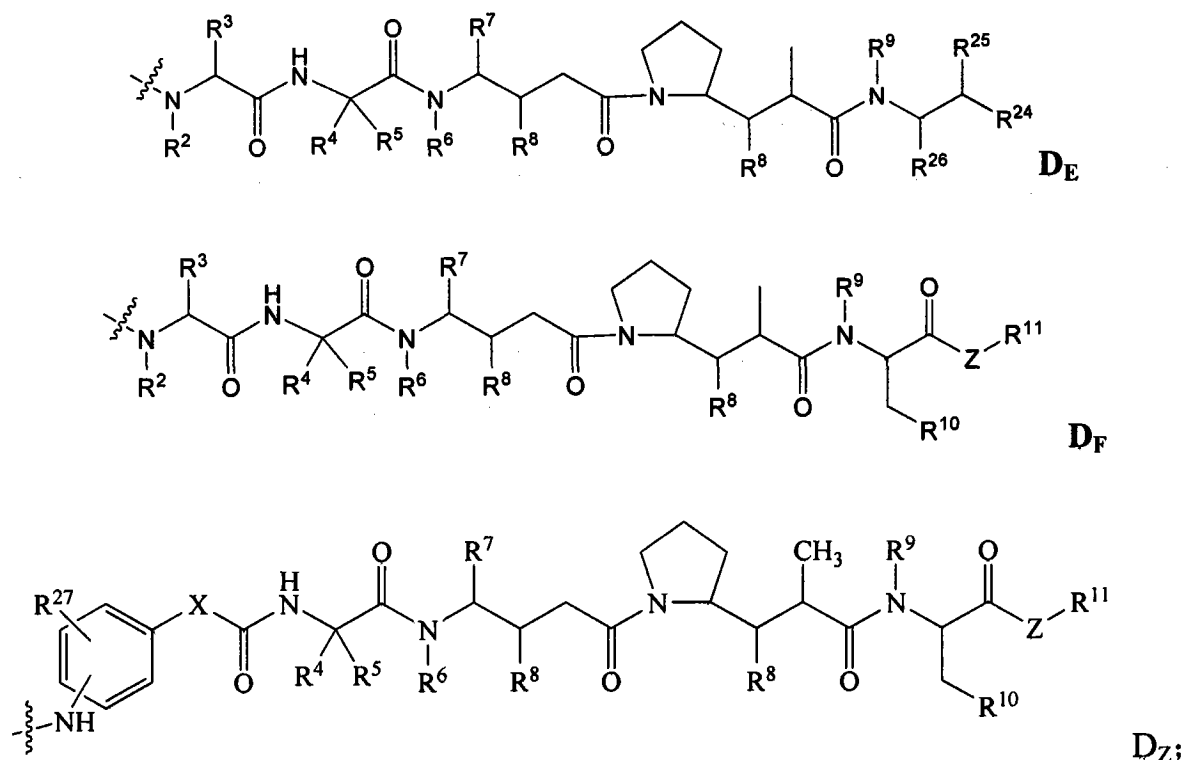
[0380] 在一些实施方式中,所述药物是奥瑞斯他汀 (auristatin),如奥瑞斯他汀 E(本领域也称为多拉司他汀-10 衍生物)或其衍生物。通常,奥瑞斯他汀 E 衍生物是,例如,奥瑞斯他汀 E 和酮酸形成的酯。例如,奥瑞斯他汀 E 可与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰戊酸反应,分别产生 AEB 和 AEVB。其它典型的奥瑞斯他汀衍生物包括 AFP、MMAE 和 MMAF。奥瑞斯他汀衍生物的合成和结构参见美国专利申请号 2003-0083263、2005-0238649 和 2005-0009751;国际专利公开号 WO 04/010957、国际专利公开号 WO 02/088172 和美国专利号 6,323,315;6,239,104;6,034,065;5,780,588;5,665,860;5,663,149;5,635,483;5,599,902;5,554,725;5,530,097;5,521,284;5,504,191;5,410,024;5,138,036;5,076,973;4,986,988;4,978,744;4,879,278;4,816,444;和 4,486,414,通过引用将其全文纳入本文用于所有目的。

[0381] 奥瑞斯他汀已显示能干扰微管动力学以及核和细胞分裂并具有抗癌活性。本发明的奥瑞斯他汀能结合微管蛋白并能对表达 CD19 的细胞系有细胞毒或细胞生长抑制作用。有许多本领域已知的不同实验可用来确定到底是奥瑞斯他汀还是所得的抗体-药物偶联物对所需细胞系产生细胞抑制或细胞毒性作用,例如参见实施例 7。

[0382] 本领域已知测定化合物是否结合微管蛋白的方法。参见例如 Muller 等, Anal. Chem 2006,78,4390-4397;Hamel 等, Molecular Pharmacology,1995 47 :965-976;和 Hamel 等, The Journal of Biological Chemistry,1990 265 :28,17141-17149。出于本发明目的,可测定化合物对微管蛋白的相对亲和力。本发明的一些优选奥瑞斯他汀结合微管蛋白的亲和力范围从 MMAE 与微管蛋白的结合亲和力的 1/10(较弱亲和),至 MMAE 与微管蛋白结合亲和力的 10 倍、20 倍或 100 倍(较强亲和)。

[0383] 在一些实施方式中, -D 是式 D_F、D_{F'}或 D_Z的奥瑞斯他汀:

[0384]



[0385] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物；

[0386] 其中,在每个位置上独立地给出以下说明:

[0387] R^2 是 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基或 C_2 - C_{20} 炔基；

[0388] R^3 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（碳环）、-芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（芳基）、-杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；

[0389] R⁴是H、C₁-C₂₀烷基、C₂-C₂₀烯基、C₂-C₂₀炔基、碳环、-C₁-C₂₀亚烷基（碳环）、-C₂-C₂₀亚烯基（碳环）、-C₂-C₂₀亚炔基（碳环）、-芳基、-C₁-C₂₀亚烷基（芳基）、-C₂-C₂₀亚烯基（芳基）、-C₂-C₂₀亚炔基（芳基）、-杂环、-C₁-C₂₀亚烷基（杂环）、-C₂-C₂₀亚烯基（杂环）或-C₂-C₂₀亚炔基（杂环）；

[0390] R^5 是 H 或 C_1-C_8 烷基；

[0391] 或者 R⁴和 R⁵一起形成碳环且具有式-(CR^aR^b)_s-, 其中 R^a和 R^b独立地是 H、C₁-C₂₀烷基、C₂-C₂₀烯基、C₂-C₂₀炔基或碳环, 且 s 是 2、3、4、5 或 6,

[0392] R⁶是H、C₁-C₂₀烷基、C₂-C₂₀烯基或C₂-C₂₀炔基；

[0393] R^7 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（碳环）、-芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（芳基）、-杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；

[0394] R⁸各自独立地是H、OH、C₁-C₂₀烷基、C₂-C₂₀烯基、C₂-C₂₀炔基、-O-(C₁-C₂₀烷基)、-O-(C₇-C₂₀烯基)、-O-(C₁-C₂₀炔基)或碳环；

[0395] R^9 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基；

[0396] R^{24} 是芳基、杂环或碳环；

[0397] R^{25} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、碳环、 $-O-(C_1-C_{20} \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 炔基})$ 或 OR^{18} ，其中 R^{18} 是 H、羟基保护基或其中 OR^{18} 代表 $=O$ 时的直接键；

[0398] R^{26} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基、芳基、杂环或碳环；

[0399] R^{10} 是芳基或杂环；

[0400] Z 是 O、S、NH 或 NR^{12} ，其中 R^{12} 是 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基；

[0401] R^{11} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（碳环）、 $-$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（芳基）、 $-$ 杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环） $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ；

[0402] m 是 1-1000 的整数；

[0403] R^{13} 是 C_2-C_{20} 亚烷基、 C_2-C_{20} 亚烯基或 C_2-C_{20} 亚炔基；

[0404] R^{14} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基；

[0405] 每次出现时， R^{15} 独立地是 H、 $COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基；

[0406] 每次出现时， R^{16} 独立地是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ；

[0407] n 是 0-6 的整数；

[0408] R^{27} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、 $O-(C_1-C_{20} \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 烯基})$ 、 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 炔基})$ 、卤素、 $-NO_2$ 、 $-COOH$ 或 $-C(O)OR^{28}$ ，其中 R^{28} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、芳基、杂环、 $-(CH_2CH_2O)_r-H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_3$ 或 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2CH_2C(O)OH$ ；其中 r 是 1-10 的整数；和

[0409] X 是 $-(CR^{29}_2)_1-$ ，其中 R^{29} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，I 是 0-10 的整数；

[0410] 其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团是任选取代的。

[0411] 式 D_E 、 D_F 或 D_Z 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物形式：

[0412] R^2 是 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0413] R^3 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-$ 杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述

杂环基团被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0414] R^4 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、-杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0415] R^5 是 H 或 C_1-C_8 烷基；

[0416] 或者 R^4 和 R^5 一起形成碳环且具有式 $-(CR^aR^b)_s-$ ，其中 R^a 和 R^b 独立地是 H、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基或碳环，且 s 是 2、3、4、5 或 6；

[0417] R^6 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0418] R^7 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、-杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0419] R^8 各自独立地是 H、OH、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_{20}$ 炔基) 或碳环，其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代；

[0420] R^9 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基；其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0421] R^{24} 是芳基、杂环或碳环；其中所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，所述芳基被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，所述杂环基团被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0422] R^{25} 选自 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、碳环、OH、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 炔基) 或 OR^{18} ；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，所述碳环被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代；

[0423] R^{18} 是 H、羟基保护基或其中 OR^{18} 代表 = O 时的直接键；

[0424] R^{26} 选自 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基或 - 碳环；其中所述烷基、烯基和炔

基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代,所述碳环被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代;

[0425] R^{10} 是用独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代的芳基,或用独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代的杂环;

[0426] Z 是 O、S、NH 或 NR^{12} ,其中 R^{12} 是 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基,各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代;

[0427] R^{11} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(碳环)、-芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(芳基)、-杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(杂环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(杂环)或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(杂环)- $(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$;其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立选自 A1 的基团取代,所述碳环基团任选被一个或多个独立选自 A2 的基团任选取代,所述芳基任选被一个或多个独立选自 A3 的基团任选取代,且所述杂环基团任选被一个或多个独立选自 A4 的基团任选取代;

[0428] m 是 1-1000 的整数;

[0429] R^{13} 是 C_2-C_{20} 亚烷基、 C_2-C_{20} 亚烯基或 C_2-C_{20} 亚炔基,各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代;

[0430] R^{14} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基,其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代;

[0431] 每次出现时, R^{15} 独立地是 H、COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基,其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代;

[0432] 每次出现时, R^{16} 独立地是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$,其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代;

[0433] n 是 0-6 的整数;

[0434] R^{27} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、O- $(C_1-C_{20}$ 烷基)、O- $(C_2-C_{20}$ 烯基)、O- $(C_2-C_{20}$ 炔基)、卤素、 $-NO_2$ 、 $-COOH$ 或 $-C(O)OR^{28}$,其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立选自 A1 的基团取代,且 R^{28} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、芳基、杂环、 $-(CH_2CH_2O)_r-H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_3$ 或 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2CH_2C(O)OH$;其中 r 是 1-10 的整数,且其中所述烷基、烯基和炔基任选被一个或多个独立选自 A1 的基团取代,所述芳基任选被一个或多个独立选自 A3 的基团任选取代,且所述杂环基团任选被一个或多个独立选自 A4 的基团任选取代;和

[0435] X 是 $-(CR^{29})_I-$,其中 R^{29} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基,且 I 是 0-10 的整数,其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代;

[0436] A1 是卤素、任选取代的 O- $(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 O- $(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 O- $(C_2-C_8$ 炔基)、任选取代的 -芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$,其中 R' 各自独立地选自 H、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基或任选取代的 -芳基,其中所述任选取代的 O- $(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 O- $(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 O- $(C_2-C_8$ 炔基)、任

选取代的 - 芳基、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基和任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基可被独立选自下组的一个或多个基团任选取代： $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、卤素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、- 芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$ ，其中 R'' 各自独立地选自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或 - 芳基；

[0437] A2 是卤素、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、任选取代的 - 芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$ ，其中 R' 各自独立地选自 H 、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基或任选取代的 - 芳基，其中所述任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基) 和任选取代的 - 芳基可被独立选自下组的一个或多个取代基任选取代： $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、卤素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、- 芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$ ，其中 R'' 各自独立地选自 H 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或芳基；

[0438] A3 是卤素、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、任选取代的 - 芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$ ，其中 R' 各自独立地选自 H 、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基或任选取代的 - 芳基，其中所述任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基) 和任选取代的 - 芳基可进一步被独立选自下组的一个或多个取代基任选取代： $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、卤素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、- 芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$ ，其中 R'' 各自独立地选自 H 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或芳基；

[0439] A4 是任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、卤素、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、任选取代的 - 芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和 $-CN$ ，其中 R' 各自独立地选自 H 、任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基或任选取代的 - 芳基，其中所述任选取代的 $-C_1-C_8$ 烷基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 烯基、任选取代的 $-C_2-C_8$ 炔基、任选取代的 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、任选取代的 $-O-(C_2-C_8$ 炔基) 和任选取代的 - 芳基可进一步被独立选自下组的一个或多个取代基任选取代： $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、卤素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)

基)、 $-O-(C_2-C_8\text{炔基})$ 、 $-芳基$ 、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 和 $-CN$,其中 R'' 各自独立地选自 H 、 $-C_1-C_8\text{烷基}$ 、 $-C_2-C_8\text{烯基}$ 、 $-C_2-C_8\text{炔基}$ 或 $芳基$ 。

[0440] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团未发生取代的化合物。

[0441] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括其中 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 基团未被取代且 R^{24} 、 R^{25} 和 R^{26} 基团被任选取代(如本文所述)的化合物。

[0442] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物,或其药学上可接受的盐或溶剂合物:

[0443] R^2 是用独立选自 $A1$ 的一个或多个基团任选取代的 C_1-C_{20} 烷基;

[0444] R^3 和 R^7 独立地选自 H 、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(单环 C_3-C_6 碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(单环 C_3-C_6 碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(单环 C_3-C_6 碳环)、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(C_6-C_{10} 芳基)、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(杂环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(杂环)或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(杂环);其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 $A1$ 的一个或多个基团任选取代,单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 $A2$ 的一个或多个基团任选取代,单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 $A3$ 的一个或多个基团任选取代,单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团被独立选自 $A4$ 的一个或多个基团任选取代;

[0445] R^4 是 H 、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(单环 C_3-C_6 碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(单环 C_3-C_6 碳环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(单环 C_3-C_6 碳环)、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(C_6-C_{10} 芳基)、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基(杂环)、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基(杂环)或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基(杂环);其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 $A1$ 的一个或多个基团任选取代,单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 $A2$ 的一个或多个基团任选取代,单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 $A3$ 的一个或多个基团任选取代,单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团被独立选自 $A4$ 的一个或多个基团任选取代;

[0446] R^5 是 H 或 C_1-C_8 烷基;

[0447] 或者 R^4 和 R^5 一起形成碳环且具有式 $-(CR^aR^b)_s-$,其中 R^a 和 R^b 独立选自 H 、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基或碳环,且 s 选自2、3、4、5或6;

[0448] R^6 是用独立选自 $A1$ 的一个或多个基团任选取代的 C_1-C_{20} 烷基;

[0449] R^8 各自独立地选自 OH 、 $-O-(C_1-C_{20}\text{烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_{20}\text{烯基})$ 或 $-O-(C_2-C_{20}\text{炔基})$,其中所述烷基、烯基和炔基基团被独立选自 $A1$ 的一个或多个基团任选取代。

[0450] R^9 是氢,或是用独立选自 $A1$ 的一个或多个基团任选取代的 C_1-C_{20} 烷基;

[0451] R^{24} 是芳基、杂环或碳环;其中所述碳环基团被独立选自 $A2$ 的一个或多个基团任选取代,所述芳基被独立选自 $A3$ 的一个或多个基团任选取代,所述杂环基团被独立选自 $A4$ 的一个或多个基团任选取代;

[0452] R^{25} 是 OR^{18} ;其中 R^{18} 是 H 、羟基保护基或其中 OR^{18} 代表 $=O$ 时的直接键;

[0453] R^{26} 选自 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基或 - 碳环；其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，所述碳环被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代；

[0454] 且 A1、A2、A3 和 A4 的定义如本文所述。

[0455] 式 D_E的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0456] R^2 是 C_1-C_8 烷基；

[0457] R^3 、 R^4 和 R^7 独立地选自 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0458] R^5 是氢；

[0459] R^6 是 C_1-C_8 烷基；

[0460] R^8 各自独立地选自 OH、O-（ C_1-C_{20} 烷基）、-O-（ C_2-C_{20} 烯基）或 -O-（ C_2-C_{20} 炔基），其中所述烷基、烯基和炔基基团被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代。

[0461] R^9 是氢或 C_1-C_8 烷基；

[0462] R^{24} 是用独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代的苯基；

[0463] R^{25} 是 OR^{18} ；其中 R^{18} 是 H、羟基保护基或其中 OR^{18} 代表 = O 时的直接键； R^{26} 选自 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基或 - 碳环；其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，所述碳环被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代；和

[0464] A1、A2、A3 和 A4 的定义如本文所述。

[0465] 式 D_E的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0466] R^2 是甲基；

[0467] R^3 是 H、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基或 C_2-C_8 炔基，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团取代；

[0468] R^4 是 H、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 C_6-C_{10} 芳基、 $-C_1-C_8$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 C_2-C_8 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_8$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_1-C_8$ 亚烷基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_8$ 亚烯基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_8$ 亚炔基（单环 C_3-C_6 碳环）；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代；

[0469] R^5 是 H； R^6 是甲基；

[0470] R^7 是 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基或 C_2-C_8 炔基；

[0471] R^8 各自是甲氧基；

[0472] R^9 是氢或 C_1-C_8 烷基；

[0473] R^{24} 是苯基；

[0474] R^{25} 是 OR^{18} ；其中 R^{18} 是 H、羟基保护基或其中 OR^{18} 代表 = O 时的直接键；

[0475] R^{26} 是甲基；且 A1、A2 和 A3 的定义如本文所述。

[0476] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0477] R^2 是甲基； R^3 是 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 是 C_1-C_5 烷基； R^5 是 H； R^6 是甲基； R^7 是异丙基或仲丁基； R^8 是甲氧基； R^9 是氢或 C_1-C_8 烷基； R^{24} 是苯基； R^{25} 是 OR^{18} ；其中 R^{18} 是 H、羟基保护基或其中 OR^{18} 代表 = O 的直接键；和 R^{26} 是甲基。

[0478] 式 D_F 或 D_Z 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0479] R^2 是 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0480] R^3 、 R^4 和 R^7 独立地选自 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0481] R^5 是 H；

[0482] R^6 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0483] R^8 各自独立地选自 H、OH、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、 $-O-(C_1-C_{20})$ 烷基）、 $-O-(C_2-C_{20})$ 烯基）、 $-O-(C_1-C_{20})$ 炔基）或碳环，其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代；

[0484] R^9 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基；其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0485] R^{10} 是用独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代的苯基；

[0486] Z 是 O、S、NH 或 NR^{12} ，其中 R^{12} 是 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0487] R^{11} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、芳基、杂环、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，所述芳基被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，所述杂环被独立选自 A4 的一个或多个基团

任选取代；

[0488] m 是 1-1000 的整数；

[0489] R^{13} 是 C_2-C_{20} 亚烷基、 C_2-C_{20} 亚烯基或 C_2-C_{20} 亚炔基，各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0490] R^{14} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0491] 每次出现时， R^{15} 独立地是 H、COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0492] 每次出现时， R^{16} 独立地是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0493] n 是 0-6 的整数；

[0494] R^{27} 是 H；和

[0495] X 是 $-(CR^{29}_2)_I-$ ，其中 I 是 0；且 A1、A2、A3 和 A4 的定义如本文所述。

[0496] 式 D_F 或 D_Z 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0497] R^2 是甲基；

[0498] R^3 、 R^4 和 R^7 独立地选自 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、单环 C_3-C_6 碳环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（单环 C_3-C_6 碳环）、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（ C_6-C_{10} 芳基）、 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（ C_6-C_{10} 芳基）、杂环、 $-C_1-C_{20}$ 亚烷基（杂环）、 $-C_2-C_{20}$ 亚烯基（杂环）或 $-C_2-C_{20}$ 亚炔基（杂环）；其中单独出现或作为另一基团一部分的所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基和亚炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述碳环基团被独立选自 A2 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述芳基基团被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，单独出现或作为另一基团一部分的所述杂环基团被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0499] R^5 是 H；

[0500] R^6 是甲基；

[0501] R^8 各自是甲氧基；

[0502] R^9 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基；其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0503] R^{10} 是用独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代的芳基，或用独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代的杂环；

[0504] Z 是 O、S、NH 或 NR^{12} ，其中 R^{12} 是 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0505] R^{11} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、芳基、杂环、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代，所述芳基被独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代，所述杂环被独立选自 A4 的一个或多个基团任选取代；

[0506] m 是 1-1000 的整数；

[0507] R^{13} 是 C_2-C_{20} 亚烷基、 C_2-C_{20} 亚烯基或 C_2-C_{20} 亚炔基，各自被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0508] R^{14} 是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基或 C_2-C_{20} 炔基，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0509] 每次出现时， R^{15} 独立地是 H、COOH、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0510] 每次出现时， R^{16} 独立地是 H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ，其中所述烷基、烯基和炔基被独立选自 A1 的一个或多个基团任选取代；

[0511] n 是 0-6 的整数；

[0512] R^{27} 是 H；和

[0513] X 是 $-(CR^{29}_2)_I-$ ，其中 I 是 0；且 A1、A2、A3 和 A4 的定义如本文所述。

[0514] 在某些这类实施方式中， R^{10} 是用独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代的苯基。

[0515] 式 D_F 的奥瑞斯他汀包括 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 基团未被取代且 R^{10} 和 R^{11} 如本文所述的化合物。

[0516] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团未发生取代的化合物。

[0517] 式 D_F 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0518] R^2 是甲基； R^3 是 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 是 C_1-C_5 烷基； R^5 是 H； R^6 是甲基； R^7 是异丙基或仲丁基； R^8 是甲氧基； R^9 是氢或 C_1-C_8 烷基； R^{10} 是用独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代的苯基； Z 是 O、S 或 NH； R^{11} 如本文所定义。

[0519] 式 D_F 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0520] R^1 是氢； R^2 是甲基； R^3 是 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 是 C_1-C_5 烷基； R^5 是 H； R^6 是甲基； R^7 是异丙基或仲丁基； R^8 是甲氧基； R^9 是氢或 C_1-C_8 烷基； R^{10} 是苯基； Z 是 O 或 NH； R^{11} 如本文所定义。

[0521] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{27} 、 R^{28} 和 R^{29} 基团未被取代且 R^{10} 和 R^{11} 如本文所述的化合物。

[0522] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括其中所述烷基、烯基、炔基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、碳环和杂环基团未发生取代的化合物。

[0523] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0524] R^1 是氢； R^2 是甲基； R^3 是 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 是 C_1-C_5 烷基； R^5 是 H； R^6 是甲基； R^7 是异丙基或仲丁基； R^8 是甲氧基； R^9 是氢或 C_1-C_8 烷基； R^{10} 是用独立选自 A3 的一个或多个基团任选取代的苯基； Z 是 O、S 或 NH； R^{11} 如本文所定义； R^{27} 是 H； X 是 $-(CR^{29}_2)_I-$ ，其中 I 是 0。

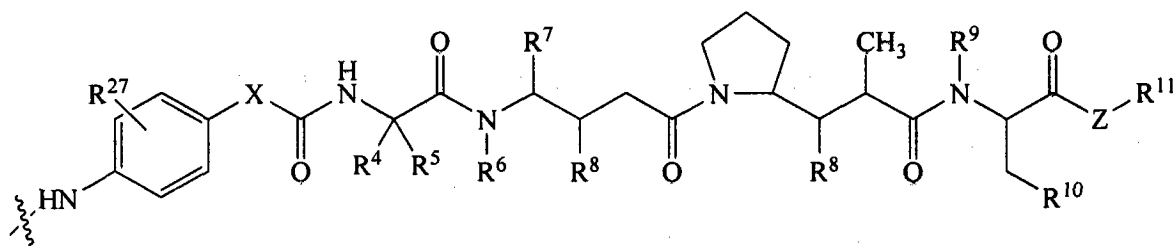
[0525] 式 D_E 的奥瑞斯他汀包括符合以下定义的那些化合物，或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0526] R^1 是氢; R^2 是甲基; R^3 是H或 C_1-C_3 烷基; R^4 是 C_1-C_5 烷基; R^5 是H; R^6 是甲基; R^7 是异丙基或仲丁基; R^8 是甲氧基; R^9 是氢或 C_1-C_8 烷基; R^{10} 是苯基; R^{11} 如本文所定义; R^{27} 是H; X是 $-(CR^{29}_2)_1-$, 其中 I 是 0; 且 Z 是 O 或 NH。

[0527] 式 D_F的奥瑞斯他汀包括其中 R^{11} 是 $-(CH_2CH_2O)_r-H$ 、 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_3$ 或 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2CH_2C(O)OH$ 的化合物; 其中 r 是 1-10 的整数; 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

[0528] 式 D_Z的奥瑞斯他汀包括其中氨基末端的苯基是如下所示对位取代的那些化合物:

[0529]



[0530] 式 D_E、D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括 R^3 、 R^4 和 R^7 独立地是异丙基或仲丁基且 R^5 是-H的化合物。在示范性实施方式中, R^3 和 R^4 各自是异丙基, R^5 是H, R^7 是仲丁基。其余取代基的定义如本文所述。

[0531] 式 D_E、D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括 R^2 和 R^6 各自是甲基且 R^9 是H的化合物。其余取代基的定义如本文所述。

[0532] 式 D_E、D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括每次出现的 R^8 均为 $-OCH_3$ 的化合物。其余取代基的定义如本文所述。

[0533] 式 D_E、D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括 R^3 和 R^4 各自是异丙基、 R^2 和 R^6 各自是甲基、 R^5 是氢、 R^7 是仲丁基、每次出现的 R^8 是 $-OCH_3$ 且 R^9 是H的化合物。其余取代基的定义如本文所述。

[0534] 式 D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括其中 Z 是 $-O-$ 或 $-NH-$ 的化合物。其余取代基的定义如本文所述。

[0535] 式 D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括其中 R^{10} 是芳基的化合物。其余取代基的定义如本文所述。

[0536] 式 D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括其中 R^{10} 是-苯基的化合物。其余取代基的定义如本文所述。

[0537] 式 D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括其中 Z 是 $-O-$ 且 R^{11} 是氢、甲基或叔丁基的化合物。其余取代基的定义如本文所述。

[0538] 式 D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括当 Z 是 $-NH$ 时, R^{11} 是 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 的那些化合物, 其中 R^{15} 是 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 且 R^{16} 是 $-C_1-C_8$ 烷基或 $-(CH_2)_n-COOH$ 。其余取代基的定义如本文所述。

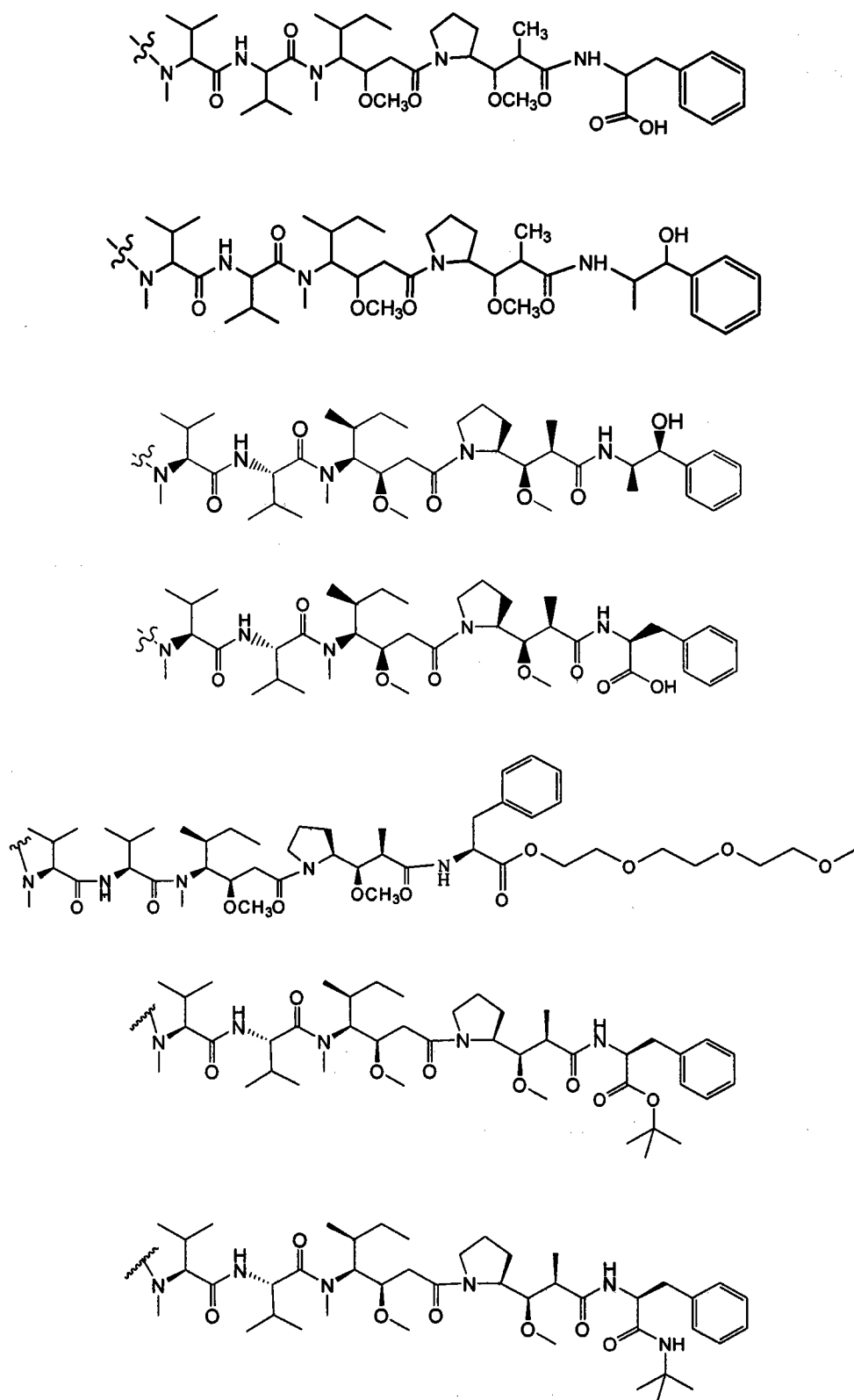
[0539] 式 D_F或 D_Z的奥瑞斯他汀包括当 Z 是 $-NH$ 时, R^{11} 是 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 的那些化合物, 其中 R^{15} 是 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 。其余取代基的定义如本文所述。

[0540] 在优选实施方式中, 当 D 是式 D_E的奥瑞斯他汀时, w 是 1-12, 优选 2-12 的整数, y 是 1 或 2, 且 a 优选为 1。

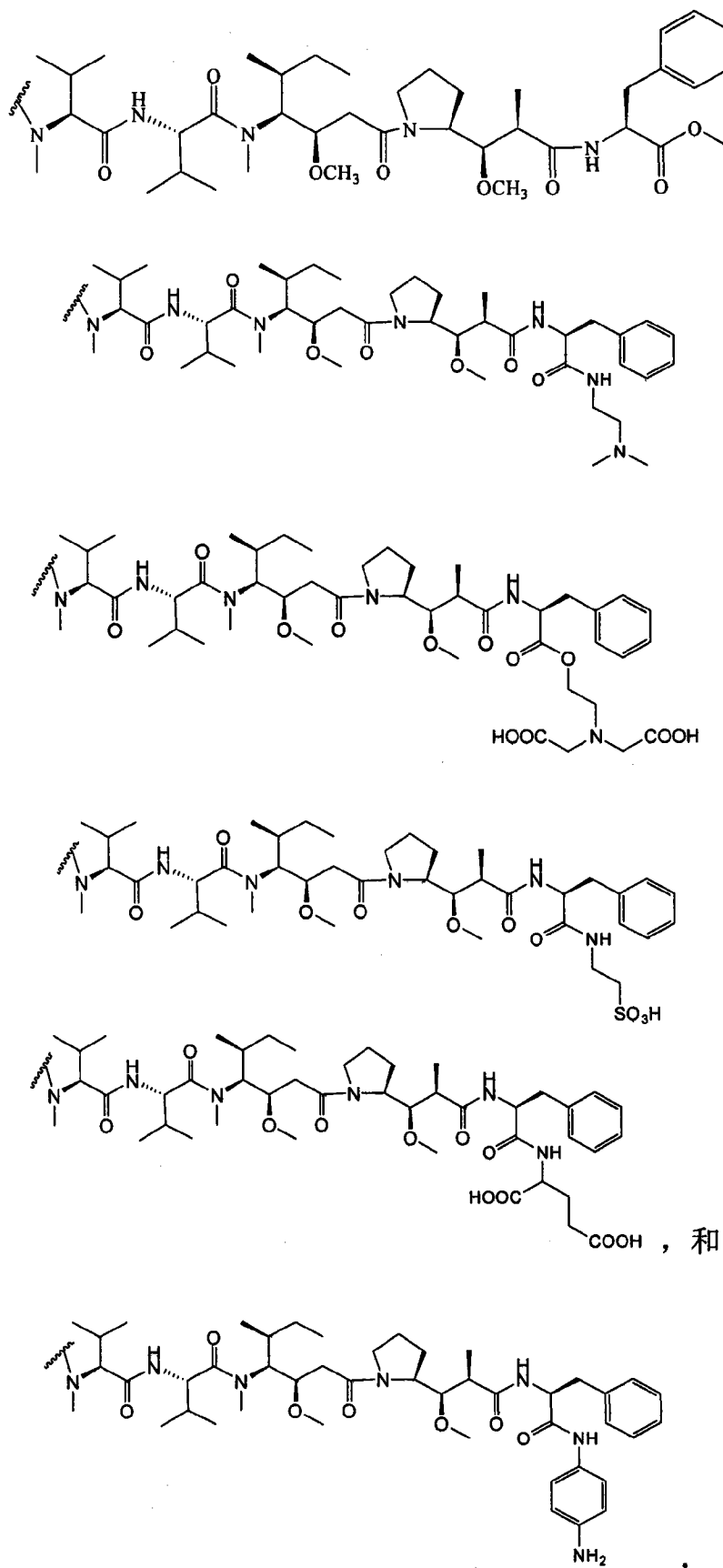
[0541] 在一些实施方式中, 当 D 是式 D_F的奥瑞斯他汀时, a 是 1 且 w 和 y 是 0。

[0542] 说明性药物单元 (-D) 包括具有以下结构的药物单元：

[0543]



[0544]



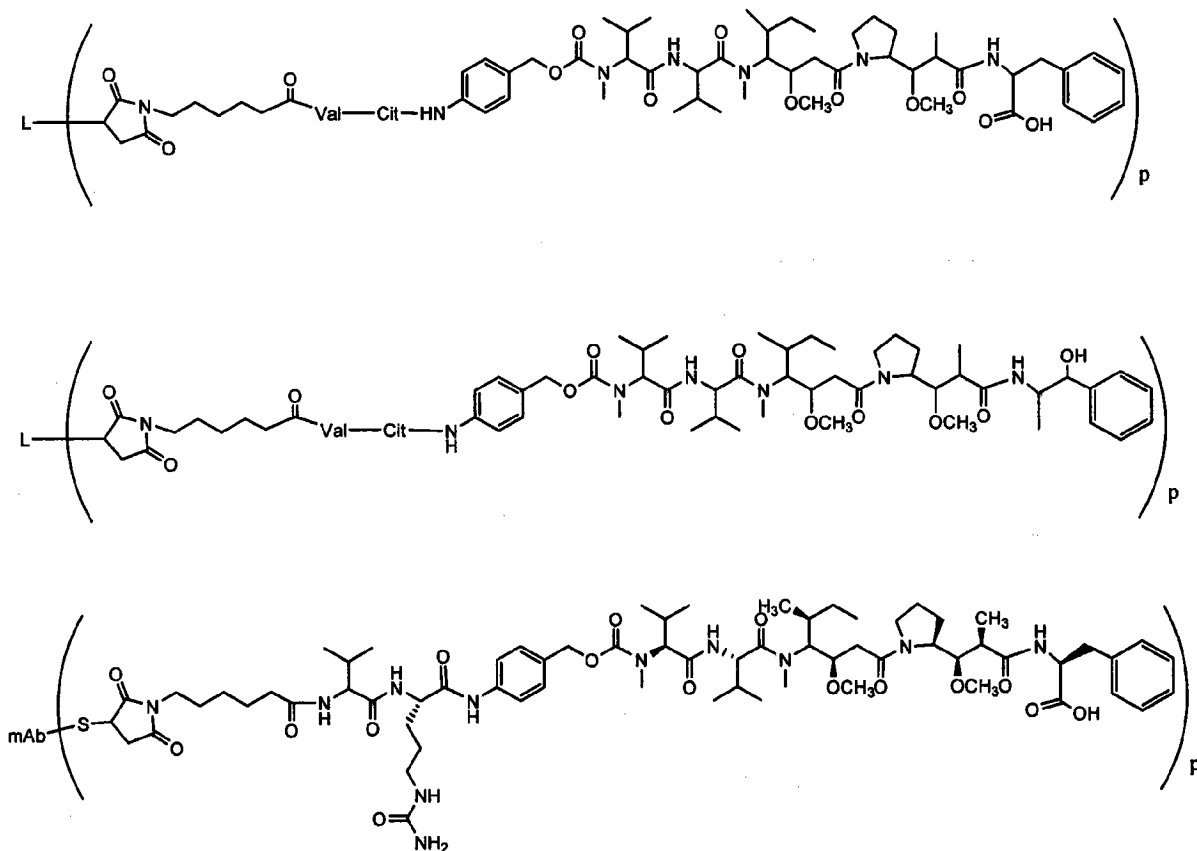
[0545] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物。

[0546] 在一个方面,可将亲水基团,例如但不限于三乙二醇酯 (TEG) 通过 R^{11} 连接于药物单元。如果不受理论限制,亲水基团有助于药物单元的内化且不发生团聚。

[0547] 在一些实施方式中, 药物单元不是 TZT-1027。在一些实施方式中, 药物单元不是奥瑞斯他汀 E、多拉司他汀 10 或奥瑞斯他汀 PE。

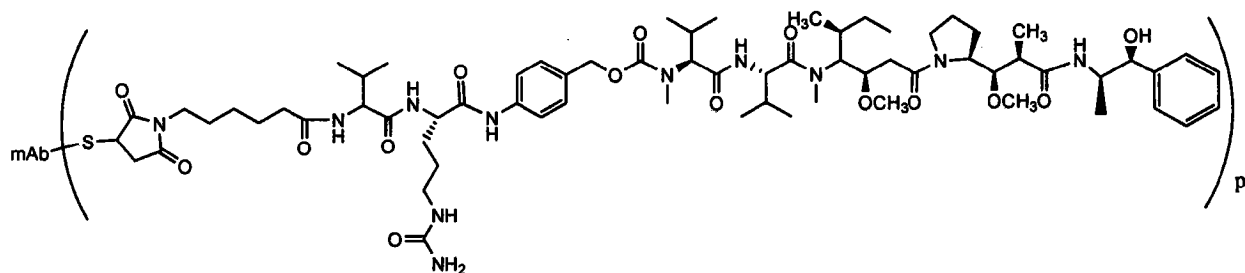
[0548] 示范性配体-药物偶联化合物具有以下结构, 其中“mAb-s-”代表抗-CD19 抗体:

[0549]



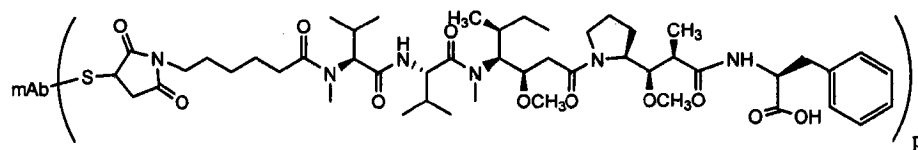
L-MC-vc-PAB-MMAF

[0550]



L-MC-vc-PAB-MMAE

或



L-MC-MMAF

[0551] 或其药学上可接受的盐或溶剂合物形式,

[0552] 其中 Val 是缬氨酸, Cit 是瓜氨酸。

[0553] 在某些实施方式中, 所述药物是抗代谢物。所述抗代谢物可以是, 例如, 嘌呤拮抗剂 (例如, 硫唑嘌呤或麦考酚酸吗乙酯)、二氢叶酸还原酶抑制剂 (例如, 甲氨蝶呤)、阿昔洛韦、更昔洛韦、齐多夫定、阿糖腺苷、利巴韦林、叠氮胸苷、胞苷阿拉伯糖苷、金刚烷胺、二脱氧尿苷、碘苷、膦甲酸钠 (poscarnet) 或三氟尿苷。

[0554] 在其它实施方式中, 所述药物是他克莫司、环孢菌素或雷帕霉素。在进一步的实施方式中, 所述药物是阿地白介素、阿仑珠单抗、阿利维 A 酸、别嘌呤醇、六甲蜜胺、氨磷汀、阿那曲唑、三氧化二砷、贝沙罗汀、贝沙罗汀、卡普罗酮、卡培他滨、塞来昔布、克拉屈滨、达依泊汀 α 、地尼白介素 2、右雷佐生、丙酸甲雄烷酮、表柔比星、阿法依伯汀、雌氮芥、依西美坦、非格司亭、氟尿苷、氟达拉滨、氟维司群、吉西他滨、吉妥珠单抗、奥佐米星、戈舍瑞林、伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸伊马替尼、干扰素 α -2a、伊立替康、来曲唑、亚叶酸钙、左旋咪唑、氮芥、甲地孕酮、美司钠、甲氨蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素 C、米托坦、苯丙酸诺龙、奥普瑞白介素、奥沙利铂、帕玛二磷酸、培加酶、培门冬酶、培非司亭、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、奎纳克林、拉布立酶、利妥昔单抗、沙格司亭、链脲菌素、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊甙、睾内酯、硫鸟嘌呤、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维甲酸、尿嘧啶芥末、戊柔比星、长春碱、长春新碱、长春瑞滨和唑来膦酸。

[0555] 在一些实施方式中, 所述药物部分是免疫调节剂。所述免疫调节剂可以是, 例如, 丙氧鸟苷、依那西普、他克莫司、环孢菌素、雷帕霉素、环磷酰胺、硫唑嘌呤、麦考酚酸莫酯或氨甲喋呤。或者, 所述免疫调节剂可以是, 例如, 糖皮质激素 (如皮质醇或醛固酮) 或糖皮质激素类似物 (如泼尼松或地塞米松)。

[0556] 在一些实施方式中, 所述免疫调节剂是抗炎药, 如芳基羧酸衍生物、含吡唑的衍生物、昔康衍生物和烟酸衍生物。抗炎剂的种类包括, 例如, 环加氧酶抑制剂、5-脂氧合酶抑制剂和白三烯受体拮抗剂。

[0557] 合适的环加氧酶抑制剂包括甲氯芬那酸、甲芬那酸、卡洛芬、双氯芬酸、二氟尼柳、芬布芬、非诺洛芬、布洛芬、吲哚美辛、酮洛芬、萘丁美酮、萘普生、舒林酸、替诺昔康、托美丁和乙酰水杨酸。

[0558] 合适的脂氧合酶抑制剂包括氧化还原抑制剂 (例如, 儿茶酚丁烷衍生物、去甲二氢愈创木酸 (NDGA)、马索罗酚、菲尼酮、伊纳帕兰 (lanopalen)、吲唑啉酮 (indazolinone)、那法扎琼 (naphazatrom)、呋喃酚 (benzofuranol)、烷基羟胺), 以及非氧化还原抑制剂 (例如, 羟基噻唑、甲氧基烷基噻唑、苯吡喃及其衍生物、甲氧基四氢吡喃、乳香酸、以及乳香酸的乙酰衍生物, 和被环烷基取代的喹啉甲氧基苯基乳酸 (quinolinemethoxyphenylacetic acid)), 以及氧化还原抑制剂的前体。

[0559] 其他合适的脂氧合酶抑制剂包括抗氧化剂 (例如, 酚类、没食子酸丙酯、黄酮类化合物和 / 或天然形成的含黄酮类化合物的物质、黄酮的羟基化物、二氢槲皮素、木犀草素、高良姜黄素、奥洛波尔、查耳酮的衍生物、4,2',4'-三羟基查耳酮、正氨基酚、N-羟基脲、呋喃酚、依布硒和提高还原性含硒酶活性的物质), 铁螯合剂 (例如, 羟肟酸及其衍生物、N-羟基脲、2-苄基-1-萘酚、儿茶酚、羟胺、鼠尾草酚 (carnosol)、水溶性维生素 E (trolox C)、儿茶酚、萘酚、柳氮磺胺吡啶、齐留通 (zyleuton)、5-羟基氨基苯甲酸和 4-(ω -芳基烷基) 苯

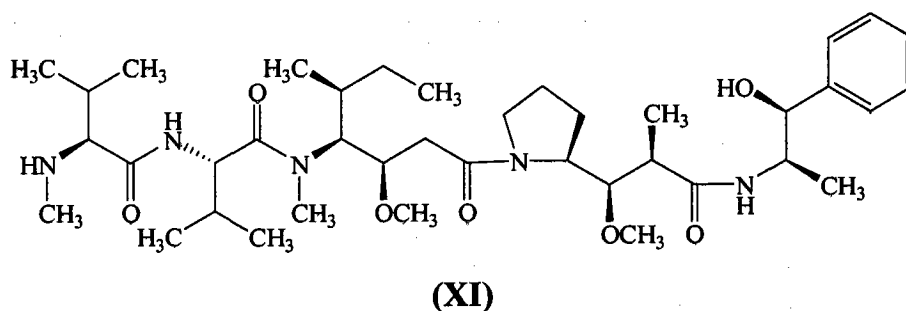
基链烷酸), 含咪唑的化合物(例如, 酮康唑和伊曲康唑), 酚噻嗪和苯并吡喃衍生物。

[0560] 还有其他合适的脂氧合酶抑制剂包括类花生酸抑制剂(例如, 十八碳四烯酸、二十碳四烯酸、二十二碳五烯酸、二十碳六烯酸和二十二碳六烯酸以及它们的酯, PGE1(前列腺素 E1)、PGA2(前列腺素 A2)、维前列醇、15-单羟基二十碳四烯酸、15-单羟基-二十碳三烯酸和 15-单羟基二十碳五烯酸, 以及白三烯 B5、C5 和 D5), 干扰钙流的化合物, 酚噻嗪, 二苯基丁胺, 维拉帕米, 岩藻糖苷(fuscoside), 姜黄素, 绿原酸, 咖啡酸, 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸(ETYA), 羟苯基维甲酰胺(hydroxyphenylretinamide), 伊纳帕兰, 七叶甙, 乙胺嗪, 菲罗啉(phenantrolin), 黄芩黄素, 普昔罗米, 硫醚, 二烯丙基硫化物和二-(1-丙烯基)硫化物)。

[0561] 白三烯受体拮抗剂包括骨化三醇、昂唑司特、拜尔制药(Bayer)Bay-x-1005、CG 公司(Ciba-Geigy)CGS-25019C、依布硒、LD 公司(LeoDenmark)ETH-615、礼来(Lilly)LY-293111、小野制药(Ono)ONO-4057、特墨公司(Terumo)TMK-688、勃林格英格汉(Boehringer Ingelheim)BI-RM-270、礼来 LY 213024、礼来 LY 264086、礼来 LY 292728、小野制药 ONO LB457、辉瑞制药(Pfizer)105696、PF 公司(Perdue Frederick)PF 10042、RPR 公司(Rhone-Poulenc Rorer)RP 66153、史克必成公司(SmithKlineBeecham)SB-201146、史克必成公司 SB-201993、史克必成公司 SB-209247、斯瑞拉公司(Searle)SC-53228、住友制药(Sumitamo)SM 15178、美国家用产品公司(American Home Products)WAY 121006、拜尔制药 Bay-o-8276、WL 公司(Warner-Lambert)CI-987、WL 公司 CI-987BPC-15LY 223982、礼来 LY 233569、礼来 LY-255283、MN 公司(MacroNex)MNX-160、默克公司(Merck and Co.)MK-591、默克公司 MK-886、小野制药 ONO-LB-448、PF 公司(Purdue Frederick)PF-5901、RPR 公司(Rhone-Poulenc Rorer)RG14893、RPR 公司 RP 66364、RPR 公司 RP 69698、盐野义制药(Shionogi)S-2474、斯瑞拉公司 SC-41930、斯瑞拉公司 SC-50505、斯瑞拉公司 SC-51146、斯瑞拉公司 SC-52798、史克必成公司 SK&F-104493、LD 公司 SR-2566、田边制药(Tanabe)T-757 和帝人制药(Teijin)TEI-1338。

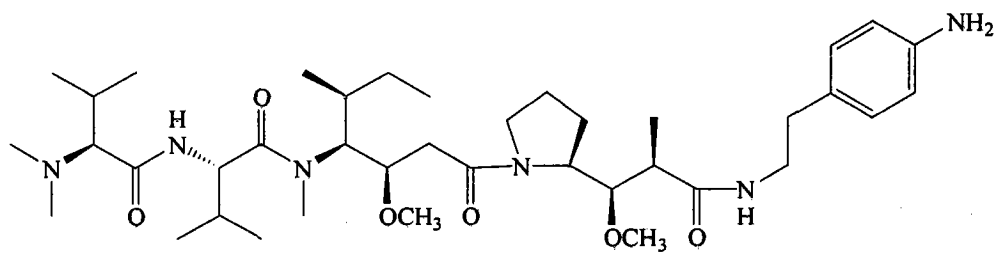
[0562] 在某些实施方式中, 细胞毒剂或细胞生长抑制剂是多拉司他汀。在某些实施方式中, 所述细胞毒剂或细胞生长抑制剂是奥瑞斯他汀类。因此, 在具体实施方式中, 细胞毒剂或细胞生长抑制剂是 MMAE(式 XI)。在另一个具体实施方式中, 所述细胞毒剂或细胞生长抑制剂是 AFP(式 XVI)。

[0563]

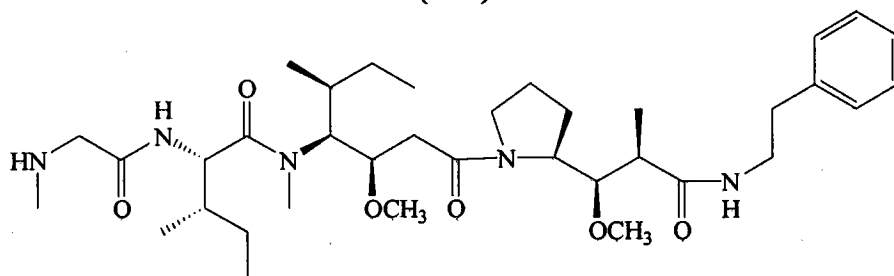


[0564] 在某些实施方式中, 所述细胞毒剂或细胞生长抑制剂是式 XII-XXI 的化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物形式:

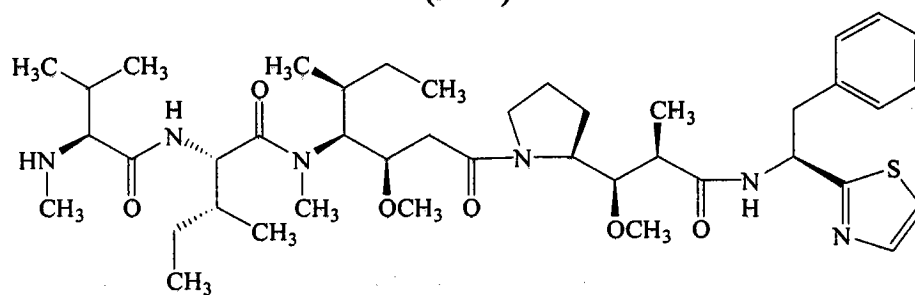
[0565]



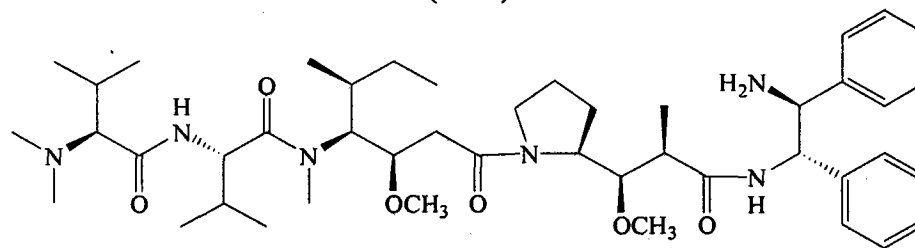
(XII)



(XIII)

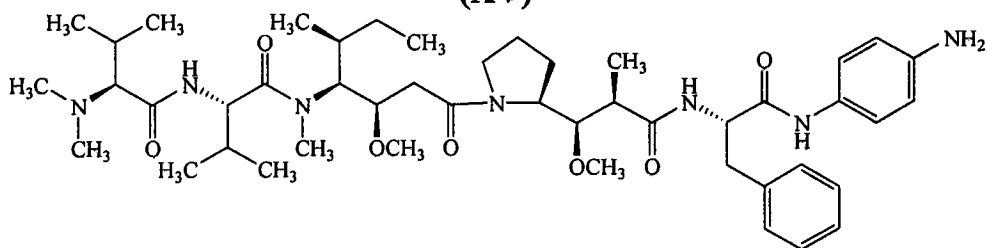


(XIV)

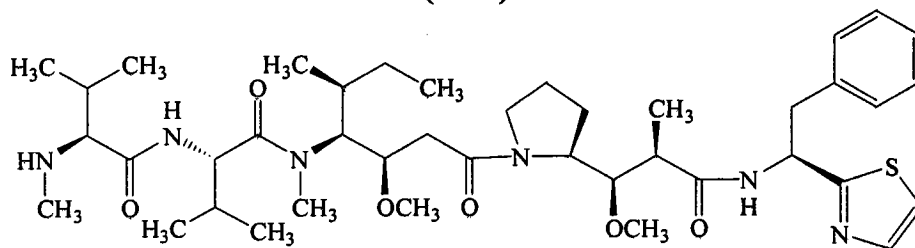


[0566]

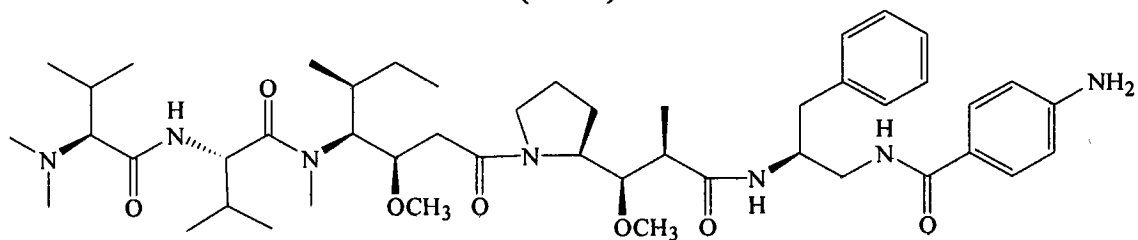
(XV)



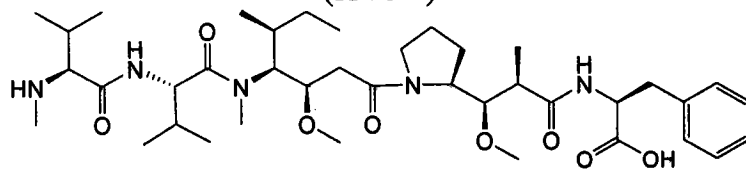
(XVI)



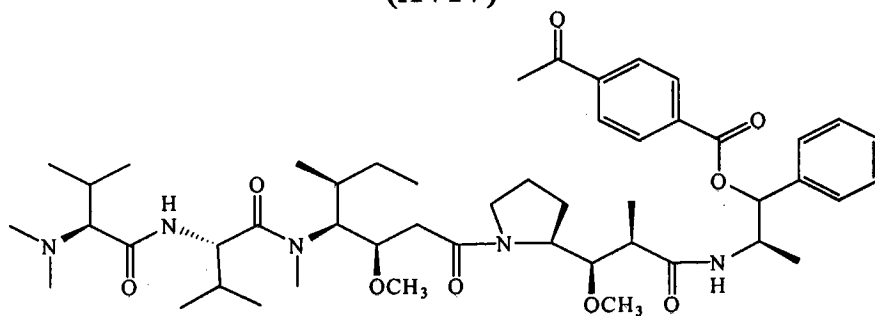
(XVII)



(XVIII)

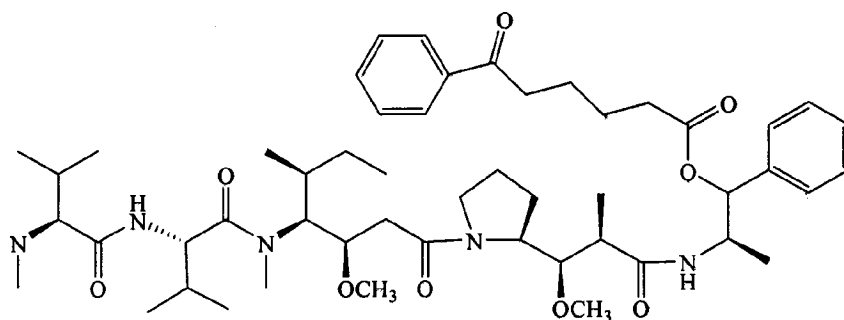


(XIV)



(XX)

[0567]



(XXI)

[0568] 确定某药物或配体-药物偶联物是否对细胞具有细胞毒和/或细胞生长抑制效应的方法是已知的。配体药物偶联物的细胞毒或细胞生长抑制活性通常可通过以下方法测定:使表达配体药物偶联物靶蛋白的哺乳动物细胞接触细胞培养基;将所述细胞培养约6小时-约5天;并测量细胞活力。可采用基于细胞的体外试验来测量活力(增殖)、细胞毒性、以及配体药物偶联物对细胞凋亡的诱导(胱冬酶活化)。

[0569] 为确定配体药物偶联物是否具有细胞生长抑制效应,可进行胸苷掺入试验。例如,在96孔板中,以5,000个细胞/孔的密度培养表达靶抗原的癌细胞72小时,在这72小时的最初8小时中加入0.5 μ Ci 3 H-胸苷。在存在和不存在配体药物偶联物的情况下测定 3 H-胸苷向培养细胞中的掺入情况。

[0570] 为了测定细胞毒性,可测定坏死或凋亡(程序性细胞死亡)。坏死通常伴随着质膜通透性增加;细胞溶胀和质膜破裂。凋亡的特征通常是膜出泡、胞质浓缩和内源性核酸内切酶的激活。对癌细胞的这些作用的测定表明,配体-药物偶联物可用于治疗或预防癌症。

[0571] 可通过测定细胞对染料如中性红、台盼蓝或ALAMARTM蓝的摄入测定细胞活力(参见例如,Page等,1993, Intl. J. of Oncology 3:473-476)。在这种实验中,在含有染料的培养基中培育细胞,洗涤细胞,用分光光度法测定剩余染料,从而反映出细胞的染料摄入量。也可利用蛋白质-结合染料磺基罗丹明B(SRB)测定细胞毒性(Skehan等,1990, J. Natl Cancer Inst. 82:1107-12)。

[0572] 或者,可用四唑盐如MTT检测活细胞而非死细胞来定量比色测定哺乳动物细胞的存活和增殖(参见,例如, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63)。

[0573] 可通过,例如,DNA片段化定量测量细胞凋亡。也可获得体外定量测量DNA片段化的市售光度测定方法。这种试验的例子,包括TUNEL(检测片段化DNA中标记核苷酸的掺入)和基于ELISA的测定,描述于Biochemica, 1999, 2:34-37(罗氏分子生物化学公司(Roche Molecular Biochemicals))。

[0574] 也可通过测量细胞形态的变化来确定凋亡。例如,与坏死一样,可通过测量某些染料(例如荧光染料,如吖啶橙或溴化乙锭)的摄入来确定质膜完整性的损失。测定凋亡细胞数的方法已描述于Duke和Cohen的Current Protocols in Immunology(新编免疫学实验指南)(Coligan等编,1992, 3.17.1-3.17.16)。细胞也可用DNA染料(例如,吖啶橙、溴化乙锭或碘化丙锭)标记并观测细胞中染色质沿内层核膜的凝聚和边缘化。可检测以确定凋亡的其他形态学变化包括,例如,胞质浓缩、膜起泡加剧和细胞收缩。

[0575] 可测量贴壁和“漂浮”培养物区室中凋亡细胞的存在。例如,可通过除去上清液、胰蛋白酶消化贴壁细胞、合并离心洗涤步骤后(例如,2000rpm 10分钟)的制品和检测凋亡

(例如,通过测量 DNA 片段化)来收集这两个区室。(参见,例如,Piazza 等,1995, Cancer Research 55 :3110-16)。

[0576] 可在动物模型内检测或验证配体药物偶联物的作用。许多已建立的癌症动物模型是本领域熟练技术人员已知的,其中任何一种都可用来评价配体药物偶联物的功效。这种模型的非限制性例子如下所述。此外,可将人肿瘤细胞系植入合适的免疫缺陷啮齿动物品系,如无胸腺裸鼠或 SCID 小鼠,从而形成用来检测配体药物偶联物体内功效的小动物模型。

[0577] 配体单元

[0578] 抗体单元 (L) 具有至少一个可与接头单元的官能团成键的官能团。配体上可以存在(天然存在、或通过化学操作或工程改造加入)的有用官能团包括但不限于:巯基(-SH)、氨基、羟基、羧基、糖的异头羟基和羧基。在一些实施方式中,配体单元官能团是巯基。通常,巯基是溶剂可接近的巯基,如半胱氨酸残基上溶剂可接近的巯基。可通过还原配体的分子内或分子间二硫键产生巯基。也可通过配体赖氨酸部分的氨基与 2-亚氨基四氢噻吩(兆特试剂(Traut's reagent))或其它巯基生成试剂的反应产生巯基。

[0579] 在一些实施方式中,通过工程改造,例如氨基酸取代将一个或多个巯基加入配体单元。例如,可将巯基引入配体单元。在一些实施方式中,通过用半胱氨酸残基取代丝氨酸或苏氨酸,和/或将半胱氨酸残基加入配体单元(工程改造的半胱氨酸残基)来引入巯基。在一些实施方式中,半胱氨酸残基是内部半胱氨酸残基,即不位于配体部分的 N 末端或 C 末端。

[0580] 在一个示例性实施方式中,可通过氨基酸取代在抗体重链或轻链可变区(例如,抗体片段如双特异抗体的可变区)工程构建半胱氨酸残基。氨基酸取代通常被引入构架区并位于可变区表位结合面的远端。例如,氨基酸取代可距离 CDR 的表位结合面至少 10 埃、至少 20 埃或至少 25 埃。可基于抗体可变区的已知或预测三维结构确定半胱氨酸残基取代的合适位置。(通常参见 Holliger 和 Hudson,2005, Nature BioTechnology 23(9): 1126-1136。)在一个示例性实施方式中,丝氨酸→半胱氨酸氨基酸取代被引入 V_H区第 84 位氨基酸上和/或 V_L区第 14 位氨基酸上(按照 Kabat 等的编号系统,Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫学感兴趣的蛋白质序列),第五版,(贝塞斯达,马里兰州,NIH)1991)。

[0581] 为了控制连接于配体单元的药物或接头单元-药物单元的数量,可通过氨基酸取代清除一个或多个半胱氨酸残基。例如,可通过用丝氨酸残基取代半胱氨酸减少免疫球蛋白绞链区中溶剂可接近半胱氨酸残基的数量。

[0582] 在一些实施方式中,配体单元含有 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个溶剂可接近的半胱氨酸残基。在一些实施方式中,配体单元含有 2 或 4 个溶剂可接近的半胱氨酸残基。

[0583] 组合物和给药方法

[0584] 所述 CD19 结合剂和配体-药物偶联化合物可采取能将化合物给予患者以治疗 CD19-相关失调的任何形式。已知各种递送系统可用于给予 CD19 结合剂和配体-药物偶联化合物。引入方法包括但不限于:皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下途径。给药可通过例如输注或推注进行。在某些优选实施方式中,通过输注给予化疗药和抗体-药物偶联化合物。肠胃外给药是优选的给药途径。

[0585] 可以包含一种或多种药学相容性成分的药物组合物的形式给予 CD19 结合剂和配体-药物偶联化合物。例如,药物组合物通常包含一种或多种药物载体(例如无菌液体,如水和油,包括来自石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等)。静脉内给予该药物组合物时,水是更常见的载体。盐水溶液和右旋糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别适用于注射液。合适的药物赋形剂是本领域众所周知的。如果需要,组合物也可含有少量润湿剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。E. W. Martin 的《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 描述了合适药物载体的例子。制剂对应于给药方式。

[0586] 在典型实施方式中,按照常规方法将该药物组合物配制成适合静脉内给予人类的药物组合物。静脉内给予的组合物通常是无菌等渗水性缓冲液配制的溶液。如果需要,药物也可含有增溶剂和局部麻醉剂,例如利多卡因来减轻注射部位的疼痛。通常,各成分单独提供或混合在一起以单位剂型的形式提供,例如在标明活性物质含量的密封容器如安瓿或药囊中的冻干粉末或无水浓缩物。通过输注给予该药物时,可用(例如)含有无菌药物级水或盐水的输液瓶分配该药物。通过注射给予该药物时,可提供例如一安瓿的无菌注射用水或盐水,以便在给药前与药物成分混合。

[0587] 能有效治疗具体疾病或病症的所述化合物的量将取决于疾病或病症的特性,并且可通过标准临床技术来确定。此外,可任选地进行体外或体内试验以助于鉴别最优的剂量范围。组合物所用的准确剂量也取决于给药途径和疾病或病症的严重程度,应该按照实施人员的判断和每个患者的情况决定。

[0588] 组合物包含有效量的化合物从而将获得合适的剂量。通常,该量为化合物至少占组合物重量的 10%。

[0589] 为静脉内给药,组合物将包含约 0.01-100mg 化合物/千克动物体重。在一方面,组合物可包含约 1-100mg 化合物/千克动物体重。在另一方面,所给予的量将在每千克体重约 0.1-25mg 化合物的范围内。

[0590] 通常,给予患者的化合物的剂量通常为每千克对象体重约 0.01-100mg。在一些实施方式中,给予患者的剂量介于每千克对象体重约 0.01-15mg。在一些实施方式中,给予患者的剂量介于每千克对象体重约 0.1-15mg。在一些实施方式中,给予患者的剂量介于每千克对象体重约 0.1-20mg。在一些实施方式中,给药剂量介于每千克对象体重约 0.1-5mg 或约 0.1-10mg。在一些实施方式中,给药剂量介于每千克对象体重约 1-15mg。在一些实施方式中,给药剂量介于每千克对象体重约 1-10mg。在一些实施方式中,在一个治疗周期内,给药剂量介于每千克对象体重约 0.1-4mg、0.1-3.2mg 或 0.1-2.7mg。在一些实施方式中,在一个治疗周期内,给药剂量介于每千克对象体重约 0.5-4mg、更优选 0.5-3.2mg、或者更有效 0.5-2.7mg。

[0591] 药物组合物通常被制成无菌、基本等渗以及完全符合美国食品药品监督管理局颁布的优质生产规范(GMP)细则的形式。

[0592] 自身免疫病

[0593] 本文所述的 CD19 结合剂以及配体-药物偶联化合物可用于治疗或预防免疫性疾病。按照本文所述方法,通过给予需要这种治疗或预防的对象有效量的 CD19 结合剂或配体-药物偶联化合物可治疗或预防免疫性疾病。在一些优选实施方式中,所述配体-药物

偶联物将 (i) 结合于表达 CD19 并与疾病状态有关的活化免疫细胞和 (ii) 对活化免疫细胞产生细胞毒、细胞生长抑制或免疫调节作用。

[0594] 可通过本文所述方法治疗或预防的以免疫细胞不正常活化为特征的免疫性疾病可通过,例如,作为所述疾病基础的超敏反应的类型,加以分类。这些反应通常分为以下四类:过敏性反应、细胞毒(细胞溶解)反应、免疫复合物反应或细胞介导的免疫(CMI)反应(也称为延迟型超敏(DTH)反应)。(参见例如,Fundamental Immunology(基础免疫学),William E.Paul 编,雷文出版社(RavenPress),纽约,第三版,1993。)

[0595] 这类免疫病的具体例子包括:类风湿性关节炎、多发性硬化、内分泌性眼病、葡萄膜视网膜炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力、格拉夫斯病、肾小球肾炎、自身免疫性肝病、自身免疫性炎症肠病、过敏反应、变态反应、舍格伦综合征、青少年糖尿病(I型糖尿病)、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、纤维肌痛、炎症肠病、多肌炎、皮炎、多发性内分泌衰竭、施密特综合征、自身免疫性葡萄膜炎、艾迪生病、肾上腺炎、甲状腺炎、桥本甲状腺炎、自身免疫性甲状腺病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、狼疮样肝炎、动脉粥样硬化、老年前期痴呆、脱髓鞘疾病、亚急性皮肤红斑狼疮、甲状旁腺功能减退症、德雷斯勒综合征、自身免疫性血小板减少、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常性天疱疮、天疱疮、疱疹样皮炎、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化病、CREST 综合征(钙质沉着、雷诺现象、食管张力减低、指趾硬化和毛细血管扩张)、成年发作的糖尿病(II型糖尿病)、男性和女性自身免疫性不育、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、混合型结缔组织病、结节性多动脉炎、全身坏死性血管炎、青少年类风湿性关节炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、肺出血-肾炎综合征、查加斯病、结节病、风湿热、哮喘、习惯性流产、抗磷脂抗体综合征、农夫肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、自身免疫性慢性活动性肝炎、鸟商肺、变应性脑脊髓炎、中毒性表皮坏死松解症、奥尔波特综合征、肺泡炎、变应性肺泡炎、纤维性肺泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、麻风、疟疾、利什曼病、锥虫病、高安动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞性动脉炎、蛔虫病、曲霉病、萨氏综合征(Sampter 综合征)、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、贝赫切特病、卡普兰综合征、川崎病、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、牛皮癣、胎儿成红细胞增多症、嗜酸性筋膜炎、舒尔曼综合征、费尔蒂综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、人免疫缺陷病毒感染、埃可病毒感染、心肌病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、疫苗接种后综合征、先天性风疹、伊顿-兰伯特综合征、复发性多软骨炎、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、EB 病毒感染、腮腺炎、埃文斯综合征和自身免疫性性腺衰竭。

[0596] 因此,本文所述方法包括治疗 B 淋巴细胞病(如系统性红斑狼疮、古德帕斯丘综合征、类风湿性关节炎和 I 型糖尿病)、Th₁-淋巴细胞病(如类风湿性关节炎、多发性硬化、牛皮癣、舍格伦综合征、桥本甲状腺炎、格拉夫斯病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、结核病或移植物抗宿主病)或者 Th₂-淋巴细胞病(如特应性皮炎、系统性红斑狼疮、特应性哮喘、鼻炎结膜炎、过敏性鼻炎或慢性移植物抗宿主病)。通常,涉及树突细胞的疾病包括 Th₁-淋巴细胞病或 Th₂-淋巴细胞病。

[0597] 本发明包括治疗自身免疫性疾病如至少部分由 B 细胞介导的自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的例子包括:急性坏死性出血性白质脑炎、艾迪生病、丙种球蛋白缺乏血

症、变应性哮喘、变应性鼻炎、斑秃、淀粉样变、强直性脊柱炎、抗-GBM/抗-TBM 肾炎、抗磷脂综合征、自身免疫性再生障碍性贫血、自身免疫性自律神经失调、自身免疫性肝炎、自身免疫性高脂血症、自身免疫性免疫缺陷、自身免疫性内耳疾病、自身免疫性心肌炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、轴突及神经病变、巴洛疾病、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心肌病、卡斯尔曼病 (Castleman's disease)、口炎性腹泻 (非热带性的)、南美锥虫病、慢性疲劳综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、丘斯综合征、瘢痕性类天疱疮 / 良性粘膜天疱疮、克罗恩病、耳蜗前庭综合征、冷凝集素病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇病毒性心肌炎、CREST 病、特发性混合性冷球蛋白血症、脱髓鞘病变、皮炎、视神经脊髓炎、盘状狼疮、德雷斯勒综合征、子宫内膜异位症、嗜酸性筋膜炎、结节性红斑、实验性变态反应性脑脊髓炎、伊文氏综合征 (Evans Syndrome)、纤维肌痛、纤维化肺炎、巨细胞动脉炎 (颞动脉炎)、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯病、格林巴利综合征、桥本病、溶血性贫血、过敏性紫癜减少性紫癜、妊娠疱疹、低丙球蛋白血症、特发性血小板减少性紫癜、IgA 肾病、免疫调节脂蛋白、包涵体肌炎、胰岛素依赖型糖尿病 (1 型)、间质性膀胱炎、青少年关节炎、青少年糖尿病、川崎综合征、朗-伊二氏综合征、白血球破碎性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、木样结膜炎、线状 IgA 病 (LAD)、狼疮 (SLE)、莱姆病、美尼尔氏病、显微血管炎、混合结缔组织病、蚕蚀性角膜溃疡、穆-哈二氏病、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、发作性睡病、嗜中性白血球减少症、眼瘢痕性类天疱疮、骨关节炎、复发性风湿病、副肿瘤性小脑变性、阵发性睡眠性血红蛋白尿症、皮特二氏综合征、睫状体扁平部炎 (周边葡萄膜炎)、天疱疮、周围神经病变、静脉周围脑脊髓炎、恶性贫血、POEMS 综合征、结节性多动脉炎、I、II 和 III 类自身免疫性多内分泌腺综合征、风湿性多肌痛、多肌炎、心肌梗死后综合征、心包切开后综合征、孕激素性皮炎、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、特发性肺纤维化、坏疽性脓皮病、纯红细胞再生障碍、雷诺现象、反射性交感神经营养不良、赖特综合征、复发性多软骨炎、不宁腿综合征、风湿热、类风湿关节炎、结节病、施密特综合征、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征、精子和睾丸自身免疫、刚性人综合征、亚急性细菌性心内膜炎、交感性眼炎、大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞动脉炎、血小板减少性紫癜、自身免疫性甲状腺疾病、托-亨二氏综合征、横贯性脊髓炎及坏死性脊髓病、溃疡性结肠炎、未分化结缔组织病、葡萄膜炎、血管炎、水疱大疱性皮肤病、白癜风以及韦氏肉芽肿病。特别感兴趣的更常见的自身免疫性疾病包括：(a) 结缔组织疾病，如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、全身硬化 (硬皮病)、干燥综合征，(b) 神经肌肉疾病，如多发性硬化、重症肌无力，(c) 内分泌疾病，如桥本甲状腺炎、格雷夫斯病、胰岛素依赖型 (1 型) 糖尿病，(d) 胃肠疾病，如炎症肠病 (包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)，和 (e) 其他疾病，如脉管炎、自身免疫性血液病、和自身免疫性皮肤病。

[0598] 例如，自身免疫性疾病包括存在自身抗体。自身抗体可特异性结合宿主靶点或抗原，例如，类风湿因子 (如在类风湿性关节炎中)；拓扑异构酶 (如在硬皮病中)；髓磷脂碱性蛋白 (如在多发性硬化中)；基膜 iv 型胶原蛋白 (如在古德帕斯彻氏综合征中)；神经节苷脂 (如在格-巴二氏综合征中)；血小板 (如在慢性特发性血小板减少症中)；平滑肌肌动蛋白 (如在自身免疫性肝炎中)；大疱性类天疱疮抗原 1 和 2；也称为半桥粒抗原 (如在大疱性类天疱疮中)；转谷氨酰胺酶 (如在腹腔病中)；桥粒芯蛋白 3 (如在寻常型天疱疮中)；p62 或 sp100 或线粒体 (m2) 抗原 (如在原发性胆汁性肝硬变中)；嗜中性粒细胞胞质 c-ANCA (如在 Wegener's 氏肉芽肿中)；嗜中性粒细胞核周 p-ANCA (如，结节性多动脉炎，

显微镜下多血管炎, 丘斯综合征, 全身性血管炎 (非特异性); 双链-DNA (如在系统性红斑狼疮中); 外来体复合物 (如在硬化性肌炎中); Ro 或 La 抗原 (如在系统性红斑狼疮和新生儿心脏传导阻滞, 或原发性干燥综合征中); Smith 抗原 (如在系统性红斑狼疮中); 磷脂抗原 (如在抗磷脂综合征中); SSA 或 SSB 抗原 (如在干燥综合征中); 着丝粒 (如在 CREST 综合征中); 线粒体 (如在原发性胆汁性肝硬变中); 烟碱乙酰胆碱受体 (如在重症肌无力中); 电压门控性钙通道 (如在朗-伊二氏综合征中); 甲状腺过氧化物酶 (如在桥本甲状腺炎中); TSH 受体 (如在格雷夫斯病中); Hu 抗原 (如在副肿瘤性小脑综合征中); 电压门控性钾通道 (如在边缘叶脑炎中) 和 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (如在脑炎中)。不只一种类型的自身抗体与自身免疫性疾病相关, 反之亦然, 列出的这些不是穷举性的。例如, 已在类风湿性关节炎中鉴定出的自身抗原包括关节相关蛋白, 如 II 型胶原、人软骨细胞糖蛋白 39 和蛋白聚糖, 以及热休克蛋白、瓜氨酸化聚丝蛋白、免疫球蛋白、葡萄糖-6-磷酸异构酶、p205 和 BiP。

[0599] 可给予有效量的 CD19 结合剂以缓解自身免疫性疾病的至少一种症状。在一些实施方式中, 给予没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗-CD19 全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中, 给予配体-药物偶联物 (即, 偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂 (如, 全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物))。本发明提供了用至少一种本发明的 CD19 结合剂或配体-药物偶联化合物治疗自身免疫性疾病, 其中包括常规疗法难治的自身免疫性疾病。CD19 结合剂或配体-药物偶联化合物任选与另一种疗法如手术、抗炎药物治疗、激素 / 酶替代疗法、血浆去除术和免疫抑制疗法组合给予。抗炎药物治疗包括类固醇类, 例如皮质类固醇类, 如泼尼松; 以及 NSAID, 如水杨酸盐类和其他 COX 抑制剂。激素替代疗法包括甲状腺激素补偿 (例如在桥本甲状腺炎中)。免疫抑制药包括糖皮质激素、烷化剂 (例如, 环磷酰胺, 通常对 SLE 有效) 和抗代谢药 (例如氨甲喋呤、硫唑嘌呤和巯基嘌呤)。其他疗法包括抗甲状腺药疗法或通过手术或通过放射碘 (例如, 在格雷夫斯病中) 除去甲状腺。

[0600] 在一些实施方式中, 本发明的 CD19 结合剂将消耗 B 细胞。

[0601] 癌症

[0602] 示例性的 CD19 结合剂可用于治疗或预防表达 CD19 的癌症。按照本文所述方法, 通过给予需要这种治疗或预防的对象有效量的 CD19 结合剂可治疗或预防表达 CD19 的癌症。在一些实施方式中, 给予没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗-CD19 全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中, 给予配体-药物偶联物 (即, 偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂 (如, 全长抗体或其抗原-结合片段或其衍生物))。在一些示例性实施方式中, 本发明的配体-药物偶联物将 (i) 结合于表达 CD19 的癌细胞和 (ii) 产生细胞毒或细胞生长抑制效应以抑制表达 CD19 的癌细胞增殖或杀伤表达 CD19 的癌细胞。

[0603] 可通过本文所述方法治疗或预防的癌症包括, 例如, B 细胞恶性肿瘤, 例如包括白血病和淋巴瘤, 其中包括但不限于 B 细胞亚型非霍奇金淋巴瘤 (NHL), 包括低级 / 滤泡性 NHL, 小淋巴细胞性 (SL) NHL, 中级 / 滤泡性 NHL, 中级弥漫性 NHL, 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤, 滤泡淋巴瘤, 高级免疫母细胞性 NHL, 高级淋巴母细胞性 NHL, 高级小非裂解细胞 NHL, 套细胞淋巴瘤和巨大疾病 NHL; 伯基特淋巴瘤; 多发性骨髓瘤; 前 B 急性淋巴细胞性白血病和早

期 B 细胞前体产生的其它恶性肿瘤 ; 常见急性淋巴母细胞性白血病 ; 慢性淋巴细胞性白血病 ; 多毛细胞白血病 ; 非急性成淋巴细胞性白血病 ; 沃尔登斯特伦巨球蛋白血症 ; 和幼淋巴细胞白血病 ; 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 , 幼淋巴细胞白血病 , 轻链病 ; 浆细胞瘤 ; 骨硬化性骨髓瘤 ; 浆细胞白血病 ; 意义未明的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS) ; 郁积型多发性骨髓瘤 (SMM) ; 无痛性多发性骨髓瘤 (IMM) ; 或霍奇金淋巴瘤 , 前提是所述癌症表达 CD19 抗原。

[0604] 在治疗应用中,至少一种 CD19 结合剂 (例如,抗体或配体药物偶联物)可给予疑似或已经患有 CD19 相关疾病如癌症的患者。例如,可药剂的给予量足以消除、或至少缓解所述疾病的至少一种症状。

[0605] 在治疗的预防应用中,可将至少一种药剂给予有产生或患有复发性 CD19 相关疾病风险的患者。所述患者是,例如,表面上看已经从 CD19 相关疾病中康复但可能复发的患者,或者是相比正常人群出现至少一种 CD19 相关疾病症状的风险升高的患者。出现 CD19 相关疾病或其复发风险高的患者包括,例如,诊断为具有疾病的侵袭性形式或具有与疾病或其分期 (例如恶性肿瘤) 相关的遗传或组织学异常的患者,或具有相关风险因子 (例如家族史或其他 CD19 相关疾病或 EBV 感染) 的患者,或接受过干细胞移植的患者。在一些实施方式中,本发明的 CD19 结合剂或配体 - 药物偶联化合物将作为维持疗法给予为治疗表达 CD19 的癌症接受过干细胞移植的患者。

[0606] 所述药剂可在怀疑疾病发作或增加或恶化或复发之前给予,给药量足以消除疾病或降低疾病风险或延迟疾病的发作或复发。

[0607] 所述 CD19 结合剂和配体 - 药物偶联化合物可用于治疗其中 CD19 表达或相对于正常水平 (例如非癌组织) 过表达的癌症和其他疾病。所述 CD19 结合剂可用于治疗其中 CD19 相对于正常水平没有过表达的 CD19 相关病症。例如,所述病症包括 CD19 阳性 B 细胞计数增加的疾病。在一些实施方式中,所述 CD19 结合剂和配体 - 药物偶联化合物作为单一疗法给予。在其他实施方式中,所述 CD19 结合剂和配体 - 药物偶联化合物与其他治疗剂共给予或与其他治疗剂依次给予。在一些实施方式中,所述 CD19 结合剂和配体 - 药物偶联化合物与包括护理标准化疗的化学疗法共给予或依次给予。

[0608] 可通过确定药剂对 CD19 相关疾病的效果来监测患者的反应。

[0609] 癌症的多药物疗法

[0610] 治疗癌症的方法包括给予有此需要的患者有效量的 CD19 结合剂和其他治疗剂。在一些实施方式中,所述其他治疗剂是抗癌药。在一些实施方式中,所述 CD19 结合剂是没有偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的抗 -CD19 全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物。在一些其他实施方式中,所述 CD19 结合剂是配体 - 药物偶联物 (即,偶联于细胞毒、细胞生长抑制和 / 或治疗剂的 CD19 结合剂 (如,全长抗体或其抗原 - 结合片段或其衍生物))。

[0611] 在一些实施方式中,所述其他治疗剂将是要治疗的特定疾病的标准护理或是要治疗的特定疾病的补救方案。抗癌药和化疗方案包括,例如,抗癌抗体,包括例如抗 -CD52 抗体 (如阿仑珠单抗)、抗 -CD20 抗体 (如利妥昔单抗) 和抗 -CD40 抗体 (如 SGN40) ; 化疗方案,包括例如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松) ; CVP (环磷酰胺、长春新碱和泼尼松) ; RCVP (利妥昔单抗 + CVP) ; RCHOP (利妥昔单抗 + CHOP) ; RICE (利妥昔单抗 + 异环磷酰胺 (ifosamide), 卡铂, 依托泊甙) ; RDHAP, (利妥昔单抗 + 地塞米松, 阿糖胞苷, 顺铂) ;

RESHAP(利妥昔单抗+依托泊甙,甲泼尼龙,阿糖胞苷,顺铂);吉西他滨;有或没有天冬酰胺酶的长春新碱、泼尼松和蒽环类抗生素组合疗法;柔红霉素、长春新碱、泼尼松和天冬酰胺酶组合疗法;替尼泊甙和 Ara-C(阿糖胞苷)组合疗法;氨甲喋呤和甲酰四氢叶酸组合疗法;博来霉素、多柔比星、依托泊甙、氮芥、泼尼松、长春碱和长春新碱组合疗法;小分子抑制剂;以及蛋白体抑制剂,包括例如硼替佐米。

[0612] 本发明包括用所述 CD19 结合剂(偶联的(如配体-药物偶联物)或未偶联的)治疗淋巴瘤的方法,所述 CD19 结合剂可作为单一疗法或与例如抗-淋巴瘤抗体组合,所述抗体包括例如抗-CD20 抗体、即利妥昔单抗和/或抗-CD40 抗体(即 SGN-40)。

[0613] 本发明包括用所述 CD19 结合剂(偶联的(如配体-药物偶联物)或未偶联的)治疗淋巴瘤的方法,所述 CD19 结合剂可作为单一疗法或与例如治疗淋巴瘤的化疗方案组合,所述化疗方案包括,例如,CHOP(环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松)、CVP(环磷酰胺、长春新碱和泼尼松)和/或其他蒽环类抗生素 B 化疗方案。

[0614] 本发明包括用所述 CD19 结合剂(偶联的(如配体-药物偶联物)或未偶联的)治疗缓慢进展淋巴瘤的方法,所述 CD19 结合剂可作为单一疗法或与例如 RCVP(利妥昔单抗+CVP)和/或 RCHOP(利妥昔单抗+CHOP)组合。

[0615] 本发明包括用所述 CD19 结合剂(偶联的(如配体-药物偶联物)或未偶联的)治疗患有复发性或难治性淋巴瘤的对象的方法,所述 CD19 结合剂可作为单一疗法,或与例如 RICE(利妥昔单抗+异环磷酰胺、卡铂、依托泊甙)、RDHAP(利妥昔单抗+地塞米松,阿糖胞苷,顺铂), RESHAP(利妥昔单抗+依托泊甙,甲泼尼龙,阿糖胞苷,顺铂),吉西他滨和/或免疫调节药如来那度胺组合。

[0616] 本发明包括治疗患有复发性疾病或者用利妥昔单抗或癌症治疗的其他疗法如 CHOP、CVP、CHOP、RICE、RDHAP、RCHOP、RCVP、RESHAP 难治的对象的方法。在一个方面,所述方法包括,例如,给予对象本发明的配体-药物偶联物。在一些实施方式中,所述配体药物偶联物包含偶联于奥瑞斯他汀的 CD19 结合剂。在一方面,所述 CD19 结合剂是人源化 BU12 抗体。

[0617] 本发明包括治疗患有以 CD21 表达水平为特征的癌症的对象的方法。所述癌症可以没有、有低水平、或有高水平的 CD21 表达。在一个方面,所述方法包括,例如,给予对象本发明的配体-药物偶联物。在一些实施方式中,所述配体药物偶联物包含偶联于奥瑞斯他汀的 CD19 结合剂。在一方面,所述 CD19 结合剂是人源化 BU12 抗体。

[0618] 本发明包括用所述 CD19 结合剂(偶联的(如配体-药物偶联物)或未偶联的)治疗 ALL 的方法,所述 CD19 结合剂可作为单一疗法或与例如化疗方案组合,所述方案包括有或没有天冬酰胺酶的长春新碱、泼尼松和蒽环类抗生素的组合。其他化疗方案包括,例如,柔红霉素、长春新碱、泼尼松和天冬酰胺酶的组合;替尼泊甙和 ara-C(阿糖胞苷)的组合;氨甲喋呤和甲酰四氢叶酸的组合;博来霉素、多柔比星、依托泊甙、氮芥、泼尼松、长春碱和长春新碱的组合(“斯坦福 5 号方案(Stanford 5 Regimen)”)。

[0619] 在一些实施方式中,治疗癌症的方法包括给予有此需要的患者有效量的 CD19 结合剂或配体-药物偶联化合物与放疗和任选的其他治疗剂的组合。

[0620] 在一些实施方式中,所述 CD19 结合剂或 CD19 配体-药物偶联化合物与抗癌药(例如化疗剂)和/或放疗同时或依次给予。在一些实施方式中,所述化疗剂或放疗在给予本

发明的化合物之前或之后至少 1 小时、5 小时、12 小时、1 天、1 周、1 月、数月（例如至多达 3 个月）给予。

[0621] 当本发明的化合物和化疗药是单独给予的时候，每天给予的每种化合物的剂量数不必相同，例如，如果一种化合物可具有较长的活性持续时间，则给药频率可较低。本发明的化合物和其他抗癌药可通过相同或不同的给药途径给予。可按照同时给药方案或交替给药方案，在治疗过程的相同或不同时刻，以可分形式或单一形式同时给药。一种或两种药剂的给予可采取连续方式，例如通过输注或通过植入型药盒。

[0622] 在一些实施方式中，与本发明化合物组合给予的化疗剂是其所治疗的癌症未发现难治的化疗剂。在另一个实施方式中，所述化疗剂是其所治疗的癌症已发现难治的化疗剂。

[0623] 在一些实施方式中，提供用本发明化合物治疗癌症的方法作为化疗或放疗的替代方法，其中所述化疗或放疗已证明或可证明对所治疗对象而言毒性太大，例如会导致无法接受或无法承担的副作用。

[0624] 本发明的化合物也可采取体外或离体方式使用，例如用于治疗某些癌症。

[0625] 本发明还包括试剂盒，其中装有特异性结合人 CD19 的分离的 CD19 结合剂或含 CD19 结合剂的配体-药物偶联物以及使用说明书。所述试剂盒可进一步包含至少一种额外试剂。试剂盒通常包含标明试剂盒内含物的指定用途的标签。术语标签包括试剂盒上或与试剂盒一起提供的文字或记录材料，或者其它伴随试剂盒的内容。

[0626] 本发明还包括人源化 CD19 抗体的诊断用途。例如，所述人源化 CD19 抗体可单独用作诊断成像剂和 / 或与其他诊断成像剂组合和 / 或与治疗应用结合。诊断剂可用于患有或曾经患有 CD19 相关疾病的人类患者体内。任选地，所述疾病包括离散分布在例如实体瘤内的 CD19 阳性细胞。

[0627] 在一种这样的方法中，所述 CD19 结合剂可用可检测标记如荧光团直接或间接标记，并任选在体外或体内接触靶细胞或患者样品。可确定样品或个体内 CD19 的存在和 / 或密度。体内测定方法可包括成像技术如 PET（正电子成像术）或 SPECT（单光子发射计算机断层成像术）。

[0628] 例如，使患者或样品（以及任选的对照）在允许试剂与如果存在的 CD19 抗原形成复合物的条件下接触 CD19 结合剂。然后检测测试患者中形成的复合物并与对照中的结合进行比较（例如采用 FACS 分析或 Western 印迹）。对照和测试样品 / 患者之间有关复合物形成的任何统计显著差异表明存在 CD19 相关疾病。对照可以是，例如，在不同位置或时间点从同一患者获得的类似读数或者是从未患病对象获得的对数，或者是基于从随机选择的或未知患病的个体获得的众多读数的预测统计值。诊断测试可用来辨别患有 CD19 相关疾病的患者，或用来确定特定患者中该病的程度，或者用来监测疾病随时间的进程，或者所选治疗对疾病的影响。

[0629] 上文引用的所有发表物和专利文献均通过引用全文纳入本文用于所有目的，就好像各篇文献单独列出那样。

[0630] 参考以下实施例进一步描述本发明，然而，这些实施例不能理解为是对本发明的限制。

[0631] 为实施本发明而进行的以下特定方面的实施例仅用于说明之目的，并非旨在以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0632] 实施例 1

[0633] 人源化 BU12 重链可变区的设计：

[0634] 将 BU12 V_H 与功能性人种系 V_H 外显子排列对比。基于构架同源性和经典结构选择 V_H 外显子。选择人种系 V_H 外显子 V_H2-70 和 V_H4-31 为人源化提供构架。选择人种系 J_H4 外显子以提供人源化 FR4 序列, 其与 BU12 V_H FR4 有 85% 相同性。

[0635] 将 BU12 V_H 与小鼠 V_H 外显子种系序列排列对比以鉴定可能具有结构暗示的体细胞突变区域。发现 BU12 V_H 与具有 H75、H82A 和 H89 位体细胞突变的潜在构架区的功能性 CB17H-10 V_H 外显子高度同源。

[0636] 将 BU12 V_H 与选出的人种系 V_H 外显子 (V_H2-70 或 V_H4-31) 排列对比, 并鉴定了文献中描述的影响 CDR 结构或 V_H/V_L 相互作用的残基处 BU12 V_H 和人构架之间的区别。对 V_H4-31 而言, 这种残基变化位于 H24、H27、H29 和 H71 位。还鉴定了其他非同源构架区, 并用同源 V_H 区 (1ETZ) 的晶体结构来确定非同源残基的位置以及评价它们对 CDR 结构的可能影响。

[0637] 重链变体中的人源化突变：

[0638]

V_H 变体	V_H 外显子受体序列	供体构架残基
V_HA	VH2-70	无
V_HB	VH2-70	H75
V_HC	VH2-70	H79
V_HD	VH2-70	H81, H82, H82A, H82B, H82C
V_HE	VH2-70	H89
V_HF	VH4-31	无
V_HG	VH4-31	H71
V_HH	VH4-31	H24, H27, H29
V_HI	VH4-31	H24, H27, H29, H71
V_HJ	VH4-31	H75
V_HK	VH4-31	H78, H79
V_HL	VH4-31	H89

[0639] 非同源 FR 残基 BU12 V_H 和 V_H2-70

[0640]

位置	改变	注释
H41	S → P	环区 - 排除
H75	S → K	可能的体细胞突变 / 电荷变化
H79	F → P	核的芳香性
H81	K → T	核 (连续区)
H82	I → M	核 (连续区)
H82A	A → T	核 (连续区)
H82B	S → N	核 (连续区)
H82C	V → M	核 (连续区)
H84	T → P	环区 - 排除
H89	A → T	可能的体细胞突变

[0641] BU12 重链变体的特定突变:

[0642]

变体	H75	H79	H81	H82	H82A	H82B	H82C	H89
cBU12 VH	S*	F*	K*	I*	A*	S*	V*	A*
VH2-70	K	V	T	M	T	N	M	T
HA	K	V	T	M	T	N	M	T
HB	S*	V	T	M	T	N	M	T
HC	K	F*	T	M	T	N	M	T
HD	K	V	K*	I*	A*	S*	V*	T
HE	K	V	T	M	T	N	M	A*

[0643] *小鼠残基

[0644] 非同源 FR 残基 BU12 VH 和 VH4-31

[0645]

位置	变化	注释
H3	T → Q	距离 CDR 的表面可接近距离 - 排除
H24	F → V	影响 CDR1 结构
H27	F → G	影响 CDR1 结构
H29	L → I	影响 CDR1 结构
H41	S → P	环区-排除
H71	K → V	影响 CDR2 结构
H75	S → K	可能的体细胞突变/电荷变化
H78	V → F	核的芳香性
H79	F → P	核的芳香性
H83	D → T	环区-排除
H89	A → V	可能的体细胞突变

[0646] BU12 重链变体的特定突变：

[0647]

变体	H24	H27	H29	H71	H75	H78	H79	H89
cBU12 VH*	F*	F*	L*	K*	S*	V*	F*	A*
VH4-31	V	G	I	V	K	F	S	V
HF	V	G	I	V	K	F	S	V
HG	V	G	I	K*	K	F	S	V
HH	F*	F*	L*	V	K	F	S	V
HI	F*	F*	L*	K*	K	F	S	V
HJ	V	G	I	V	S*	F	S	V
HK	V	G	I	V	K	V*	F*	V
HL	V	G	I	V	K	F	S	A*

[0648] *小鼠残基

[0649] 实施例 2

[0650] 人源化 BU12 轻链可变区的设计：

[0651] 将 BU12 V_L 与功能性人种系 V_H 外显子排列对比。由于 L6 使用频率高（约 11%），因此选择作为 BU12 V_L 人源化的最佳构架。也可选择与 BU12 V_L 最为同源的 A10。选择人种系 $J_{\kappa}4$ 外显子以提供人源化 FR4 序列，其与 BU12 V_L FR4 有 77% 相同性。

[0652] 将 BU12 V_L 与小鼠 V_L 外显子种系序列排列对比以鉴定可能具有结构暗示的体细胞突变区域。最为匹配的是 ac4、kn4 和 kk4。在 L40、L41、L42、L69、L71、L72 和 L83 位鉴定出潜在体细胞突变位点。

[0653] 将 BU12 V_L 与选出的人种系 V_L 外显子（L6 或 A10）排列对比，并鉴定了文献中描述的影响 CDR 结构或 V_H/V_L 相互作用的残基处 BU12 V_L 和人构架之间的区别。这种残基差异出现在 L2 和 L71 位。还鉴定了其他非同源构架区，并用同源 V_L 区（1Q0K）的晶体结构来确定非同源残基的位置以及评价它们对 CDR 结构的可能影响。

[0654] 轻链变体中的人源化突变：

[0655]

V_L 变体	V_H 外显子受体序列	供体构架残基
V_LA	VL-L6	无

V _L B	VL-L6	L2
V _L C	VL-L6	L71
V _L D	VL-L6	L2, L71
V _L E	VL-L6	L40, L41, L42
V _L F	VL-L6	L69, L70, L71, L72
V _L G	VL-L6	L83
V _L H	VLA10	无
V _L I	VLA10	L2, L71

[0656] 非同源 FR 残基 BU12 VL 与 L6 和 A10

[0657]

位置	变化	注释
L2	N → I	已知 L2 影响 CDR1 结构
L40	S → P	可能的体细胞突变
L41	S → G	可能的体细胞突变
L42	T → Q	可能的体细胞突变
L69	N → T	可能的体细胞突变
L70	S → D	针对 CDR1 的链堆积中的电荷
L71	H → F	体细胞突变 / 已知 L71 会影响 CDR1 结构
L72	F → T	可能的体细胞突变
L83	V → F	可能的体细胞突变

[0658] BU12 轻链变体的特定突变：

[0659]

变体	L2	L40	L41	L42	L69	L70	L71	L72	L83
cBU12 VL*	N*	S*	S*	T*	N*	S*	H*	F*	V*
L6	I	P	G	Q	T	D	F	T	F
LA	I	P	G	Q	T	D	F	T	F
LB	N*	P	G	Q	T	D	F	T	F
LC	I	P	G	Q	T	D	H*	T	F
LD	N*	P	G	Q	T	D	H*	T	F
LE	I	S*	S*	T*	T	D	F	T	F
LF	I	P	G	Q	N*	S*	H*	F*	F
LG	I	P	G	Q	T	D	F	T	V*

[0660] *小鼠残基

[0661] BU12 轻链变体的特定突变：

变体	L2	L71
cBU12*	N*	H*
A10	I	F
LH	I	F
LI	N*	H*

[0662]

[0663] *小鼠残基

[0664] 实施例 3

[0665] 从 CD19⁺NHL 细胞系中筛选出一组抗 -CD19 抗体 (图 13)。尽管细胞系之间存在差异,但所有评价的抗体能够递送药物。

[0666]

细胞系	疾病类型	CD19 分子/细胞	与 2°-ADC 相连的各种抗-CD19 抗体的 IC ₅₀ (ng/mL)				
			LT19	HIB19	cBU12	SJ25-C1	B-C3
CA46	伯基特淋巴瘤, EBV-	60527	4	1	7	4	17
HS Sultan	伯基特淋巴瘤, EBV+	59669	112	97	100	150	234
HT	弥散性混合性淋巴瘤	35813	111	~1000	238	ND	ND
MC 116	未分化的淋巴瘤	29210	192	188	186	~200	195
Ramos	伯基特淋巴瘤, EBV-	34377	1	1	5	3	13
Toledo	弥散性大细胞淋巴瘤	28657	584	~1000	~1000	512	359

[0667] 抗 -CD19 抗体将 2° - 羊 - 抗 - 小鼠 -vcMMAF 递送到 CD19⁺细胞系。细胞系和与 2 倍过量山羊 - 抗 - 小鼠 ADC (187.1-vcMMAF8) 交联的不同抗 -CD19 抗体一起培养。将培养物培育 96 小时并用 50 μM 刃天青标记。检测到 187.1-vcMMAF 对任何细胞系的生长没有影响。数值表示一次试验中四次测量的平均值 ± SD。

[0668] 实施例 4

[0669] 检测了抗 -CD19 抗体 - 药物偶联化合物对 SCID 小鼠 Ramos 肿瘤模型的抗肿瘤活性。结果通常显示,与其他嵌合抗 -CD19 抗体药物偶联物和人源化 BU12 抗体药物偶联物相比,鼠科和嵌合 BU12 抗体药物偶联物的活性较弱。参见图 3、4、5、7 和 8。

[0670] 实施例 5

[0671] 可采用标准分子生物学技术产生人源化 BU12 抗体的变体,所述变体中已知对于

结合 Fc γ R 重要的 IgG1 的 Fc 结构域中的氨基酸残基可被突变以破坏与一种或多种 Fc γ R 的结合。

[0672] 例如,根据 Kabat 编号体系, IgG1v1 包含以下突变 :E233P:L234V:L235A。IgG1V1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO :35。

[0673] 可通过类似方法产生人源化抗-CD19 抗体的其他 Fc 结构域变体,其中包括,例如,在涉及与一种或多种 Fc γ 受体结合相互作用的 Fc 结构域内部或附近具有一个或多个非保守氨基酸取代、引入一个或多个半胱氨酸残基、或引入一个或多个 N-连接的糖基化位点的 Fc 结构域变体。

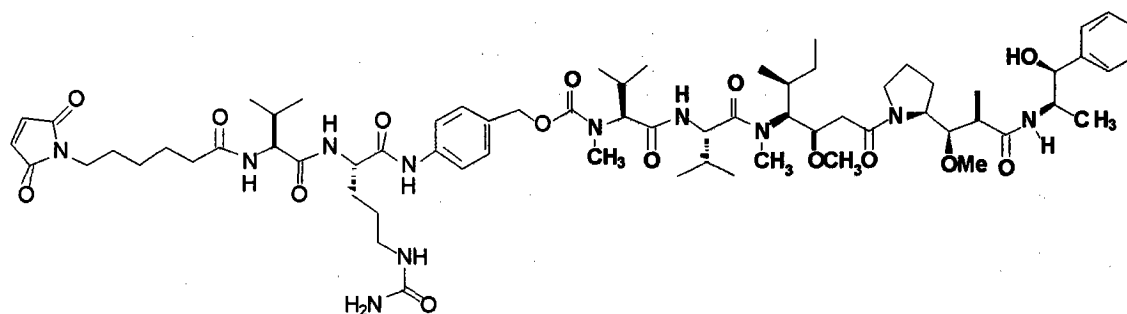
[0674] 实施例 6

[0675] 制备 hBU12 抗体药物偶联物

[0676] 将 130 毫克 hBU12 mAb (批号 PR208 (69mg) 和 1033154 (100mg)) 混合并浓缩以得到 141mg 浓度为 10.8mg/mL 的物质 (按分子量为 150kD、消光系数为 $1.47\text{AU} \cdot \text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 计算)。

[0677] 如上所述使奥瑞斯他汀 MMAE 和 MMAF 与纯化抗体偶联。将抗体 (130mg, 867nmol) 与 2.17nmol TCEP (以每个抗体 4 个游离硫醇的所需还原水平而言为 25%还原剂过量) 和 1mM 作为阳离子清除剂的 DTPA 一起在 37°C 培育 45 分钟。通过以下测试化合物的微量测试偶联来确定还原水平。

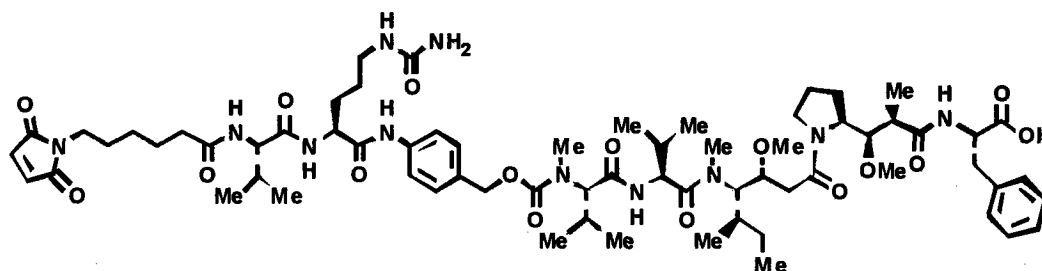
[0678]



[0679] 通过 HIC 色谱确定药物载量分布。该 mAb 显示出偶尔在鼠科抗体中看到的还原模式,其分布以 0 和 10 药物 / 抗体加权,其中 4- 和 6- 加载抗体时出现较低水平。平均药物载量高于所需 :4.9 药物 / Ab。加入增加量的 DTNB (217nmol, 然后 303.8nmol) 以重新氧化抗体二硫键,从而将药物载量降至 4.1 药物 / Ab 的测试水平。

[0680] 在大约 9.0mL mAb 溶液中加入 795 μL DMSO, 然后加入以下化合物, 马来酰亚氨基乙酰基 -Val-Cit-MMAF (3.88 μmol) 的 203.1 μL 19.1mM DMSO 溶液, 以便使部分还原的 mAb (97mg, 647nmol) 与 MMAF 偶联。

[0681]



[0682] 偶联反应在 0°C 进行 100 分钟。加入 194 μL 100mM N-乙酰半胱氨酸猝灭残余的

马来酰亚氨基乙酰基 -Val-Cit-MMAF。使用 25000MWCO 膜用 4L PBS 将反应混合物在 4℃ 透析三次以除去 DMSO、未反应或猝灭的药物以及偶联处理造成的其他小分子杂质,并浓缩。产物含有 4.1 药物 /Ab。

[0683] 实施例 7

[0684] 抗 -CD19 奥瑞斯他汀抗体药物偶联物 hBU12-vcMMAE (也称为 hBU12-MC-vc-PAB-MMAE) 对利妥昔单抗敏感性和耐药性淋巴瘤的活性以及在高和低 CD21 淋巴瘤中的活性

[0685] 材料和方法

[0686] 采用流式细胞检测分析确定肿瘤细胞系中 CD19 和 CD21 的表达水平:为评价肿瘤细胞系上 CD19 和 CD21 的拷贝数,将细胞与 PE- 偶联的小鼠抗 -CD19 和抗 -CD21 抗体 (加州圣迭戈的 BDP 公司 (BD Pharmingen, San Diego, CA)) 一起在冰上培育 30 分钟,用冷的染色介质洗涤并用 Becton Dickinson FACSscan 流式细胞仪评价。采用 DAKO QiFiKit 流式细胞计数间接免疫荧光测定和鼠抗体按照制造商 (丹麦格罗图珀市的 DAKO 公司 (DAKO A/S, Glostrup, Denmark)) 的描述来定量测定细胞表面的 CD19 和 CD21。

[0687] 确定结合亲和力的饱和结合研究:将细胞与 10 μ g/ml hBU12 或 hBU12-vcMMAE 一起在 4℃ 培育 0.5 小时,并洗涤。一组细胞改为 37℃ 并在所选时间点收获。采用 PE- 偶联的二抗进行检测并通过流式细胞术确定仍旧与表面结合的抗体的量。或者,将细胞与 AlexaFluor488- 标记的 hBU12 抗体或药物偶联物一起在冰上培育 1 小时,用冷的 PBS 洗涤,并用 Becton Dickinson FACSscan 流式细胞计数仪评价结合。用 Prism 单位点结合算法 (加州圣迭戈的 GP 软件公司 (GraphPad Software, San Diego, CA)) 确定表观 Kd 值。

[0688] CD19 内在化动力学研究:为生成放射标记的抗体-药物偶联物,用定制合成的 [3H]-vcMMAE (24.7Ci/mmol, 加州贝瑞阿的 MB 公司 (Moravek Biochemicals, Brea, CA)) 来制备放射标记的 hBU12-vcMMAE 偶联物。计算放射活性。将 1mL 培养物细胞内发现的游离药物的量加上 1mL 培养基中检测出的游离药物的量,用该值确定释放到细胞培养物中的总药物浓度。求三复份结果的平均值并用 Microsoft Excel 的 STDEVPA 函数计算这些值的标准偏差。

[0689] hBU12 和 hBU12-ADC 的溶酶体共区域化研究:将 Ramos 细胞与 1 μ g/ml hBU12 或 hBU12-ADC 一起在冰上培育 20 分钟或在 37℃ 培育 4 小时。培育之后用冷的 PBS 洗涤细胞以除去未结合的抗体或 ADC,然后固定并用 Cytofix/Cytoperm (加州圣何塞的 BD 生物科技公司 (BD Biosciences, San Jose, CA)) 做透化处理。用 AlexaFluor-488 标记的山羊抗人 IgG (俄勒冈州尤金市的分子探针公司 (Molecular Probes, Eugene, OR)) 检测抗体和 ADC。用 AlexaFluor647- 标记的 LAMP-1 抗体 (小鼠 CD107, BD 生物科技公司) 染色目测观察溶酶体区室。核区室用 DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚,瑞士巴塞尔的罗氏公司 (Roche, Basel, Switzerland)) 染色。用 Carl Zeiss Axiovert 200M 显微镜获得荧光图像。

[0690] 细胞毒性和生长停止测定:将肿瘤细胞与 hBU12 和药物偶联物培育 96 小时。如之前的报道 (Doronina, 2003#1834),用 Alamar Blue (加州卡马里奥的 BI 公司 (Biosource International, Camarillo, CA)) 染料还原以测量细胞活力。将细胞与染料一起培育 4 小时,并在 Fusion HT 荧光平板阅读器 (马萨诸塞州沃尔瑟姆的 PE 公司 (Perkin Elmer, Waltham, MA)) 上测量染料还原。结果用 IC50 表示,即使活力相比载体处理细胞降低 50%

所需的化合物浓度（对照 = 100%）。为进行生长停止和凋亡研究，首先用抗体和 ADC 处理细胞，然后用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒（BDP 公司）按照制造商的说明处理。为分析接触 ADC 后的细胞周期定位，用溴脱氧尿苷（BrdUrd，密苏里州圣路易斯的西格玛公司（Sigma, St. Louis, MO））将细胞标记 20 分钟。用抗 -BrdUrd 抗体（BD 生物科技公司）进行新生 DNA 分析并用溴化丙啶（PI）检测总 DNA 含量。然后用流式细胞仪分析细胞。

[0691] 皮下淋巴瘤和弥散性人白血病的体内模型：在 SCID 小鼠中建立局部、皮下和弥散性 B 细胞淋巴瘤模型。对皮下模型，将 5×10^6 个淋巴瘤植入雌性小鼠右胁处。当肿瘤体积达到 100mm^3 时给予 hBU12 和 -ADC 或对照化合物。肿瘤大小至少每周监测两次。为建立弥散性疾病，在 C. B. -17 SCID 小鼠（印第安纳州印第安纳波利斯的哈尔伦公司（Harlan, Indianapolis, IN））侧尾静脉中注入用 0.2ml PBS 配制的 1×10^5 NaIm6 细胞或 RS4 ;11 细胞。注射细胞 7 天后用测试化合物处理小鼠并每周监测至少两次。当小鼠出现疾病征兆时停止处理，所述征兆包括体重减轻 15-20%、弓起和缺乏理毛行为、颅肿胀和后肢麻痹。治疗过程如图所示。

[0692] 统计学分析：将肿瘤增至四倍或增至三倍的时间（如所示）选作终点时间（TTE），对指数生长期各实验动物的单独肿瘤生长数据组进行非线性回归分析，以便确定此终点时间。根据治疗开始时的肿瘤体积计算肿瘤增至四倍的时间。未达到终点的动物指定为研究最后一天的 TTE 值。 % TGD（肿瘤生长延迟）反映出相对于对照治疗的肿瘤达到 TTE 的延迟，其计算公式如下： % TGD = $[(T-C)/C] \times 100$ ，其中 T 和 C 是治疗组和对照组达到 TTE 的时间中值（天），开始治疗时作为第 1 天。用 Graphpad Prism 软件 4.01 版（加州圣迭戈的 Graphpad 公司（Graphpad, San Diego, CA））进行统计学分析和图解显示。中值肿瘤生长曲线显示各组肿瘤体积中值与时间的关系。用时序检验分析治疗组和对照肿瘤组的 TTE 差异的显著性， $0.01 \leq P \leq 0.05$ 时视为有显著性差异（*）， $P < 0.01$ 时视为高度显著性差异（**）。在 CR 反应中，研究期间三次连续测量的肿瘤体积小于 13.5mm^3 。持续反应（DR）定义为在整个实验期间完全不存在可触知的肿瘤。进行标准皮尔斯相关分析（双尾），采用 95% 置信区间，以确定 CD19 和 CD21 表达水平之间的显著相关和体外细胞毒性。

[0693] 产生利妥昔（Rituxan）耐受性 Ramos 和 Raji 肿瘤：将亲本细胞植入 40 只 SCID 小鼠，浓度为每只小鼠 5×10^6 细胞。植入细胞 2 天后每两天用 8mg/kg 利妥昔单抗处理小鼠，总共 9 剂。40 只小鼠中大概有 6 只出现肿瘤，当肿瘤达到约 $300-400\text{mm}^3$ 时对小鼠实施安乐死并无菌收集肿瘤。通过尼龙滤器分离将肿瘤制成单细胞悬液。在培养时使细胞连续接触最高达 100ug/ml 的各种水平的利妥昔单抗。每周评价细胞活力若干次。培养一周后将细胞植入 30 只 SCID 小鼠。植入两天后按照之前的方案用 12mg/kg 利妥昔单抗处理小鼠。在 10 只 SCID 小鼠中重复体外和体内选择一次。将所得肿瘤处理成单细胞悬液并用液氮冷冻。按照 Czuczamn 等，Clin Cancer Res. 2008 ;14 :1561-1570 的描述生成 Raji R2 和 Raji H4 细胞系。

[0694] hBU12-vcMMAE(4) 偶联物的药代动力学特征：给原初 SCID 小鼠腹膜内施用单剂量 hBU12-vcMMAE。在 11 周内以预定间隔收集血清样品以获得复合药代动力学曲线。采用抗 -MMAE 抗体通过定量多重珠捕获试验分析样品的抗体药物偶联物浓度。用非隔室和隔室方法完成药代动力学分析。

[0695] 结果

[0696] CD19 和 CD21 表达之间缺乏相关性以及 hBU12-vcMMAE 对培养物中生长的 ALL、CLL 和 NHL 肿瘤细胞系的功效：为确定 hBU12-vcMMAE 的功效，使代表伯基特淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL)、滤泡淋巴瘤 (FL) 和急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的 CD19 阳性淋巴瘤和白血病细胞接触浓度升高的 hBU12-vcMMAE。此外，确定 CD19 和 CD21 的细胞表面拷贝数以研究这些基因的表达与抗肿瘤活性之间的潜在关系。注意到所检测的 17 种 CD19 阳性肿瘤细胞系中有 15 种表现出较强的 hBU12-vcMMAE 偶联物细胞毒活性。T 细胞淋巴瘤细胞系 Jurkat 被用作 CD19 阴性对照细胞系。hBU12-vcMMAE 对这些对照细胞缺乏活性表明抗肿瘤活性是靶依赖的。注意到 ADC 功效和 CD19 ($p = 0.45$, $R^2 = 0.038$) 以及 CD21 ($p = 0.55$, $R^2 = 0.028$) 表达水平之间缺乏显著相关性 (数据未显示)。此外还发现 hBU12-vcMMAE 对 ALL 细胞系有类似的强细胞毒效应。总之，数据表明 CD19 和 CD21 表达水平和肿瘤亚型不足以预测淋巴瘤和白血病细胞系对基于奥瑞斯他汀的 ADC 的敏感性。

[0697] hBU12-vcMMAE4 在 NHL 细胞系上的内在化动力学和胞内运输。之前显示能确定某些基于奥瑞斯他汀的 ADC 的抗肿瘤效应的一种临界参数是靶抗原与抗体连接后内在化以及转移到溶酶体区室的能力。为研究这些过程，将低 CD21 (Ramos 和 SUDHL-4) 和高 CD21 肿瘤细胞系 (Raji, Daudi) 与 hBU12-vcMMAE 一起培育并通过荧光活化细胞分选 (FACS) 测定内在化动力学。如图 15 所示，hBU12 和 hBU12-vcMMAE 偶联物在低 CD21 Ramos 细胞内迅速内在化，并有超过 50% 的化合物在培育后 60 分钟内实现内在化。而在高 CD21 Raji 和 Daudi 细胞中发现 hBU12-vcMMAE 的内在化动力学较慢。然而，内在化动力学的微小差异不会显著影响功效，同时发现低 CD21 Ramos 细胞和高 CD21 淋巴瘤细胞的 IC50 值是可比的。总之，这些发现证明，hBU12-vcMMAE 在不同肿瘤细胞系上的内在化动力学与体外细胞毒性无关。研究了 hBU12 和 hBU12-vcMMAE 偶联物在 NHL 细胞系中的胞内运输。出于该目的，将低 CD21 Ramos 和 SUDHL4 细胞与裸抗体或 hBU12-vcMMAE 一起培育。共免疫荧光研究显示，早在培育后 15 分钟，大多数内在化的 hBU12 就局限于溶酶体。观察到低 CD21 Ramos 或 HT 和高 CD21 Daudi 和 Raji 细胞中 hBU12 和偶联物向溶酶体区室的亚细胞迁移的可比的。总之，这些发现证明，仅内在化动力学不足以解释 hBU12-vcMMAE 对不同 NHL 细胞系的功效的差异。

[0698] 利妥昔单抗敏感和耐受性高和低 CD21 淋巴瘤细胞系中 hBU12-vcE 的游离药物释放：MMAE 干扰胞质区室的微管稳定性，因此，释放到肿瘤细胞内的活性游离 MMAE 药物的量是抗淋巴瘤作用的关键。为研究这些方面，将高 CD21 Daudi 和高 CD21 利妥昔单抗耐受性 Raji R2 和 Raji 4H 细胞与 hBU12-vcMMAE 一起培育，并与低 CD21 Ramos 细胞释放的游离药物水平进行比较。将保留在细胞内的放射活性与随时间逃逸到上清液中的放射活性组合以便量化游离的活性药物的细胞释放。低 CD21 (Ramos) 和高 CD21 细胞 (Daudi) 之间的游离药物释放没有差异。因此，游离药物释放量的差异不可能造成不同淋巴瘤细胞系之间的 IC50 值相差 50 倍以上。总之，高 CD21 水平仅轻微影响内在化的 hBU12-vcMMAE 胞内释放游离药物。

[0699] hBU12 偶联物在 NHL 和 ALL 模型中的作用 采用异种移植入 SCID 小鼠的不同 NHL 细胞系以单剂量和多剂量实验检测 hBU12-vcMMAE (图 16A-E, 数据未显示)。当检测抗伯基特淋巴瘤的作用时，以 3mg/kg hBU12-vcMMAE、q4dx4 给药时观察到 7/8 有持续反应 (图 16A))。当检测抗 DOHH2 肿瘤 (滤泡淋巴瘤) 的作用时，观察到剂量水平为 3mg/kg 时有

2/10DR 肿瘤生长速率受到显著抑制（图 16B）。当检测抗 SUDHL4 淋巴瘤（DLBCL）的作用时，对肿瘤生长速率也有显著抑制（图 16C）。在代表 ALL 的弥散性 RS4 ;11 模型中，观察到用 hBU12-vcMMAE 治疗的小鼠存活率显著升高，表现为发病有延迟，从对照或未处理动物的大约 45 天到用 3mg/kg vcE 偶联物处理动物的 90 天以上（图 16D）。在第二种弥散性 ALL 模型（Na1m6）中检测 hBU12-vcMMAE 时得到类似观察结果，其中单剂量给药导致 30-60% 的持续反应（图 16E）。总之，这些数据表明，hBU12-vcMMAE 对不同 NHL 和 ALL 模型有强抗肿瘤作用，与其 CD21 表达状态无关。

[0700] hBU12-vcE 对利妥昔单抗耐受性淋巴瘤的抗肿瘤活性：为建立模拟 NHL 肿瘤对利妥昔单抗治疗的不应性的临床前模型，产生 Ramos 肿瘤细胞并将肿瘤细胞在小鼠中重复体外和体内传代并按照材料和方法的描述用利妥昔单抗处理以便提供难治性。为确定 CD20 和 CD19 的表达水平，分离 R-Ramos 肿瘤细胞，同时发现利妥昔单抗耐受性 Ramos 肿瘤中 CD20 和 CD19 的表达水平是可比的（图 17C）。与高剂量利妥昔单抗（12mg/kg, q4dx4）相比，hBU12-vcMMAE 治疗导致亲本和利妥昔单抗耐受性肿瘤的肿瘤生长延迟（TGD）百分数产生显著差异。重要的是，发现 hBU12-vcMMAE 在利妥昔单抗敏感性和耐受性细胞系中有类似的抗肿瘤活性，说明 NHL 细胞耐受利妥昔单抗的机制确实影响 hBU12-vcMMAE 功效。为进一步验证这些发现，在之前描述的两种额外的利妥昔单抗耐受性 NHL 细胞系（Raji 2R 和 4RH 27；图 17D，数据未显示）中检测了 hBU12-vcMMAE，这两种细胞系的 CD19 和 CD20 表达水平都与亲本克隆类似。与利妥昔单抗敏感性亲本 Raji 克隆相比，hBU12-vcMMAE 治疗诱导类似的持久反应支持早先测试利妥昔单抗耐受性 Ramos 肿瘤的结果。总之，观察到 CD19-ADC 对利妥昔单抗耐受性细胞系有强抗肿瘤活性。

[0701] 实施例 8

[0702] 效应细胞在介导人源化抗-CD19 抗体 hBU12 在 NHL 和 ALL 临床前模型中的疗效中的作用：

[0703] 研究了人源化抗-CD19 抗体 hBU12 诱导针对人淋巴瘤和白血病细胞系的 CDC、ADCC 和 ADCP 的能力。发现了有力的 ADCC 和 ADCP，且当 hBU12 与 vcMMAE 药物结构偶联时 ADCC 略微下降。当在激活的人原发 B 细胞分离物上检测时观察到 hBU12 和偶联物的直接抗增殖效应。注意到所有 hBU12 化合物缺乏 CDC 抗肿瘤效应。为确定效应细胞介导活性与 hBU12 治疗活性的相关性，通过皮下移植或尾静脉注射（弥散模型）将人淋巴瘤和白血病细胞植入 SCID 小鼠。在弥散模型中观察到最强的抗肿瘤效应，这与弥散模型中效应细胞接触肿瘤细胞的限制较小相一致（图 18 和 19）。为鉴定细胞介导的抗肿瘤效应的性质，在 NHL 弥散模型（Ramos）中进行了效应细胞消除实验。选择性消耗 NK 细胞、中性白细胞或巨噬细胞并测量 hBU12 对肿瘤携带小鼠的肿瘤生长抑制作用。消除巨噬细胞和中性白细胞几乎完全阻止了 hBU12 的抗肿瘤作用，而消耗 NK 细胞使活性有中等程度的降低。总之，这些发现证明，hBU12 通过效应细胞介导的 ADCP 和 ADCC 活性诱导抗肿瘤效应。

[0704] 材料和方法

[0705] 为进行体内消耗研究，从弗吉尼亚州里士满的威克精纯化学品公司（Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Richmond, VA）获得兔抗-无唾液酸-GM-1 抗体，从加州圣迭戈的 BD 生物制品公司（BD Biosciences, San Diego, CA）获得大鼠抗-小鼠-Gr-1 抗体。脂质体包裹的氯膦酸（CEL）按照之前的描述制备（Vab Rooijen 和 Sanders, 1994）。氯膦酸

由德国曼海姆的罗氏诊断公司 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 惠赠。按照之前的描述用特异性抗体或 CEL 消耗肿瘤携带小鼠的效应细胞 (Van Rooijen 和 Sanders 1994 ; van Rooijen 和 Sanders 1997 ; McEarchern, Oflazoglu 等, 2007)。天然杀伤 (NK) 细胞通过 i. p. 注射抗 - 无唾液酸 - GM 1 (1.25mg/kg) 耗尽。从植入肿瘤细胞的那天开始每 5 天给小鼠总共 3 次剂量。在注射肿瘤的当天 i. p. 注射 CEL (100 μ l/10gr) 并在之后每 3 天注射一次, 总共 5 剂, 以此消耗巨噬细胞。通过流式细胞计数分析脾细胞、淋巴结和血液证实细胞耗尽 (数据未显示)。

[0706] 序列

[0707] SEQ ID NO :1 :

[0708] **Met**Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr Val Leu Ser

[0709] SEQ ID NO :2 :

[0710] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 75、79、81、82、82A、82B、82C 和 89 用黑体表示。决定 CDR 结构的残基在其右侧用星号表示)

[0711] Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe* Ser Gly* Phe* Ser Leu* Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val* Gly** Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp* Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys* Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln Val **Val** Leu **Thr Met Thr Asn Met** Asp Pro Val Asp Thr Ala **Thr** Tyr Tyr Cys Ala Arg* **Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0712] SEQ ID NO :3 :

[0713] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu **Met** Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val **Met** His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

[0714] SEQ ID NO :4 :

[0715] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 75、79、81、82、82A、82B、82C 和 89 用黑体表示)

[0716] Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr LeuThr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val Gly** Trp Ile ArgGln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Ser** Asn Gln Val **Val**Leu**Thr Met Thr Asn Met**Asp Pro Val Asp Thr Ala**Thr**Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val SerSer

[0717] SEQ ID NO :5 :

[0718] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 75、79、81、82、82A、82B、82C 和 89 用黑体表示)

[0719] Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr LeuThr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val Gly** Trp Ile ArgGln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln Val **Phe**Leu**Thr Met Thr Asn Met**Asp Pro Val Asp Thr Ala**Thr**Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val SerSer

[0720] SEQ ID NO :6 :

[0721] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 75、79、81、82、82A、82B、82C 和 89 用黑体表示)

[0722] Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr LeuThr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val Gly** Trp Ile ArgGln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln Val **Val**Leu**Lys Ile Ala Ser Val** Asp Pro Val Asp Thr Ala**Thr**Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met**Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0723] SEQ ID NO :7 :

[0724] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 75、79、81、82、82A、82B、82C 和 89 用黑体表示)

[0725] Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr LeuThr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val Gly** Trp Ile ArgGln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Lys** Asn Gln Val **Val**Leu**Thr Met Thr Asn Met**Asp Pro Val Asp Thr Ala**Ala**Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val SerSer

[0726] SEQ ID NO :8 :

[0727] Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu

Ser LeuThr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly **Met** Gly Val Gly Trp
Ile ArgGln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp
Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn
Gln ValPhe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala
Arg**Met**Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
Ser Ser

[0728] SEQ ID NO :9 :

[0729] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89 用黑体表示。决定 CDR 结构的残基在其右侧用星号表示)

[0730] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
Ser LeuThr Cys Thr **Val*** Ser Gly* **Gly*** Ser **Ile*** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
IleArg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp
LysArg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Val*** Asp Thr Ser **Lys** Asn
Gln **Phe Ser** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala
Arg* **Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
SerSer

[0731] SEQ ID NO :10 :

[0732] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89 用黑体表示)

[0733] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
Leu Ser LeuThr Cys Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
Ile ArgGln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp
Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Lys** Asp Thr Ser **Lys** Asn
Gln **PheSer** Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys
Ala Arg**Met**Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
Val Ser Ser

[0734] SEQ ID NO :11 :

[0735] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89 用黑体表示)

[0736] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
Ser LeuThr Cys Thr **Phe** Ser Gly **Phe** Ser **Leu** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp
IleArg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp
LysArg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Val** Asp Thr Ser **Lys** Asn
Gln **Phe Ser** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala
Arg **Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
SerSer

[0737] SEQ ID NO :12 :

[0738] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89 用黑体表示)

[0739] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
Ser LeuThr Cys Thr **Phe** Ser Gly **Phe** Ser **Leu** Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp

IleArg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp
LysArg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Lys** Asp Thr Ser **Lys** Asn
Gln **Phe Ser** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Val** Tyr Tyr Cys Ala
Arg **Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr** Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
SerSer

[0740] SEQ ID NO:13:

[0741] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89 用黑体表示)

[0742] Gln Val Gln LeuGln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
Ser LeuThr Cys Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val Gly** Trp Ile
ArgGln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Val** Asp Thr Ser **Ser**Asn Gln **Phe**
SerLeu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Val**Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met**
Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0743] SEQ ID NO:14:

[0744] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89 用黑体表示)

[0745] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
Ser LeuThr Cys Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val Gly** Trp Ile
ArgGln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Val**Asp Thr Ser **Lys**Asn Gln **Val**
PheLeu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Val**Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met**
Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0746] SEQ ID NO:15:

[0747] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 24、27、29、71、75、78、79 和 89 用黑体表示)

[0748] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr
Leu Ser LeuThr Cys Thr **Val** Ser Gly **Gly** Ser **Ile** Ser **Thr Ser Gly Met Gly Val Gly** Trp
Ile ArgGln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp
Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser **Val** Asp Thr Ser **Lys** Asn
Gln **PheSer** Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Ala** Tyr Tyr Cys Ala
Arg **Met**Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
Ser Ser

[0749] SEQ ID NO:16

[0750] **Met** Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val
Ile **Met** SerArg Gly

[0751] SEQ ID NO:17

[0752] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83 用黑体表示。
决定 CDR 结构的残基在其右侧用星号表示)

[0753] Glu **Ile*** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
Arg Ala ThrLeu Ser Cys **Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His** Trp Tyr Gln Gln

Lys**Pro GlyGln**Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile
Pro Ala ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly**Thr Asp Phe* Thr**Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Glu ProGlu Asp **Phe**Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe
Gly GlnGly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0754] SEQ ID NO :18

[0755] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
Ser GlyThr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
Gln TrpLys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
Asp SerLys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
Glu LysHis Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
Lys SerPhe Asn Arg Gly Glu Cys

[0756] SEQ ID NO :19

[0757] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83 用黑体表示)

[0758] Glu **Asn**Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
Arg Ala ThrLeu Ser Cys **Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His** Trp Tyr Gln Gln
Lys**Pro GlyGln**Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile
Pro Ala ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly**Thr Asp Phe Thr**Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Glu ProGlu Asp **Phe**Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe
Gly GlnGly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0759] SEQ ID NO :20

[0760] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83 用黑体表示)

[0761] Glu**Ile**Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
ThrLeu Ser Cys **Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His** Trp Tyr Gln Gln Lys**Pro Gly**
GlnAla Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala
ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly**Thr Asp His Thr**Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
GluAsp **Phe**Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln
GlyThrLys Leu Glu Ile Lys Arg

[0762] SEQ ID NO :21

[0763] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83 用黑体表示)

[0764] Glu **Asn**Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
Arg Ala ThrLeu Ser Cys **Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His** Trp Tyr Gln Gln
Lys**Pro GlyGln**Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile
Pro Ala ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly**Thr Asp His Thr**Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Glu Pro GluAsp **Phe**Ala Val Var Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe
Gly Gln GlyThr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0765] SEQ ID NO :22

[0766] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83 用黑体表示)

[0767] Glu**Ile**Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala

ThrLeu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys **Ser Ser**
Thr Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala
ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Thr Asp Phe Thr** Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
ProGlu Asp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
GlnGly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0768] SEQ ID NO :23

[0769] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83 用黑体表示)

[0770] Glu **Ile** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
Arg Ala ThrLeu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
Lys **Pro GlyGln** Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile
Pro Ala ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Asn Ser His Phe** Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Glu Pro GluAsp **Phe** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe
Gly Gln GlyThr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0771] SEQ ID NO :24

[0772] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2、40、41、42、69、70、71、72 和 83 用黑体表示)

[0773] Glu **Ile** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
Arg Ala ThrLeu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln
Lys **Pro GlyGln** Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile
Pro Ala ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly **Thr Asp Phe Thr** Leu Thr Ile Ser Ser Leu
Glu ProGlu Asn **Val** Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe
Gly GlnGly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0774] SEQ ID NO :25

[0775] Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile **Met** Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys
Val Thr **Met** Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr **Met** His Trp Tyr Gln Gln Lys
Ser SerThr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
Gly ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser His Phe Leu Thr Ile Ser Ser **Met** Glu
Ala GluAsp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
Ser GlyThr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0776] SEQ ID NO :26

[0777] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2 和 71 用黑体表示。决定 CDR 结构的残基在其右侧用星号表示)

[0778] Glu **Ile*** Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys
Val ThrIle Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro AspGln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
Ser ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp **Phe*** Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu
AlaGlu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
GlnGly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0779] SEQ ID NO :27

[0780] (CDR 区用下划线表示。Kabat 位置 2 和 71 用黑体表示)

[0781] Glu**Asn**Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val ThrIle Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro AspGln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp **His** Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala GluAsp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln GlyThr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0782] SEQ ID NO :28

[0783] Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr LeuThr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly**Met**Gly Val Gly Trp Ile ArgGln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Xa** Asn Gln Val **Xb** Leu **Xc Xd Xe Xf Xg** Asp Pro Val Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg**Met**Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0784] 其中 Xa 是 Ser 或 Lys, Xb 是 Phe 或 Val, Xc 是 Lys 或 Thr, Xd 是 Ile 或 Met, Xe 是 Ala 或 Thr, Xf 是 Ser 或 Asn, Xg 是 Val 或 Met, Xh 是 Ala 或 Thr。

[0785] SEQ ID NO :29

[0786] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser LeuThr Cys Thr **Xa** Ser Gly **Xb** Ser **Xc** Ser Thr Ser Gly **Met** Gly Val Gly Trp Ile ArgGln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser**Xd**Asp Thr Ser**Xe**Asn Gln**Xf Xg**Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met** Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0787] 其中, Xa 是 Phe 或 Val, Xb 是 Phe 或 Gly, Xc 是 Leu 或 Ile, Xd 是 Lys 或 Val, Xe 是 Ser 或 Lys, Xf 是 Val 或 Phe, Xg 是 Phe 或 Ser, Xh 是 ala 或 Val。

[0788] SEQ ID NO :30

[0789] Glu **Xa** Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg AlaThr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr **Met** His Trp Tyr Gln Gln Lys **XbXc Xd** Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro AlaArg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly**Xe Xf Xg Xh**Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu ProGlu Asp **Xi**Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly GlnGly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0790] 其中, Xa 是 Asn 或 Ile, Xb 是 Ser 或 Pro, Xc 是 Ser 或 Gly, Xd 是 Thr 或 Gln, Xe 是 Asn 或 Thr, Xf 是 Ser 或 Asp, Xg 是 His 或 Phe, Xh 是 Phe 或 Thr, Xi 是 Val 或 Phe。

[0791] SEQ ID NO :31

[0792] Glu **Xa** Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val ThrIle Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro AspGln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp **Xb** Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu

Ala GluAsp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
Gln GlyThr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0793] 其中, Xa 是 Asn 或 Ile, Xb 是 His 或 Phe。

[0794] SEQ ID NO :32

[0795] Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu
Thr LeuThr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly**Met**Gly Val Gly Trp
Ile ArgGln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp
Lys ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser **Xa** Asn
Gln Val **Xb** Leu **Xc Xd Xe Xf Xg** Asp Pro Val Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg
Met**Met**Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly**Xi**Gly Thr**Xj**Val Thr Val Ser
Ser

[0796] 其中, Xa 是 Ser 或 Lys, Xb 是 Phe 或 Val, Xc 是 Lys 或 Thr, Xd 是 Ile 或 Met, Xe
是 Ala 或 Thr, Xf 是 Ser 或 Asn, Xg 是 Val 或 Met, Xh 是 Ala 或 Thr, Xi 是 Gln 或 Arg, Xj 是
Leu、Thr 或 Met。

[0797] SEQ ID NO :33

[0798] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
Ser LeuThr Cys Thr **Xa** Ser Gly **Xb** Ser **Xc** Ser Thr Ser Gly **Met**Gly Val Gly Trp Ile
ArgGln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys
ArgTyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser**Xd**Asp Thr Ser**Xe**Asn Gln**Xf**
XgLeu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala **Xh** Tyr Tyr Cys Ala Arg **Met**
Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly **Xi** Gly Thr **Xj** Val Thr Val Ser Ser

[0799] 其中, Xa 是 Phe 或 Val, Xb 是 Phe 或 Gly, Xc 是 Leu 或 Ile, Xd 是 Lys 或 Val, Xe
是 Ser 或 Lys, Xf 是 Val 或 Phe, Xg 是 Phe 或 Ser, Xh 是 Ala 或 Val, Xi 是 Gln 或 Arg, Xj 是
Leu、Thr 或 Met。

[0800] SEQ ID NO :34

[0801] Glu**Xa**Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
AlaThr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr **Met**His Trp Tyr Gln Gln
Lys **XbXc Xd**Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile
Pro AlaArg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly**Xe Xf Xg Xh**Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
ProGlu Asp**Xi**Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly**Xj**
Gly Thr **Xk Xl Xm** Ile Lys Arg

[0802] 其中, Xa 是 Asn 或 Ile, Xb 是 Ser 或 Pro, Xc 是 Ser 或 Gly, Xd 是 Thr 或 Gln, Xe
是 Asn 或 Thr, Xf 是 Ser 或 Asp, Xg 是 His 或 Phe, Xh 是 Phe 或 Thr, Xi 是 Val 或 Phe, Xj 是
Gln、Pro 或 Gly, Xk 是 Lys 或 Arg, Xl 是 Leu 或 Val, Xm 是 Glu 或 Asp。

[0803] SEQ ID NO :35

[0804] Glu**Xa**Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys
Val ThrIle Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro AspGln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
Ser ArgPhe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp**Xb**Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

GluAsp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr Phe Gly **Xc**
GlyThr **Xd Xe Xf** Ile Lys Arg

[0805] 其中,Xa 是 Asn 或 Ile,Xb 是 His 或 Phe,Xc 是 Gln、Pro 或 Gly,Xd 是 Lys 或 Arg,
Xe 是 Leu 或 Val,Xf 是 Glu 或 Asp。

[0806] SEQ ID NO :36

[0807] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VT

[0808] VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TC

[0809] VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
AP

[0810] IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLD
SD

[0811] GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0812] SEQ ID NO :37

[0813] QMQGVNCTVSSELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPP
CP

[0814] RCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVQVHNAKTKPREQQ
FN

[0815] STFRVVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TC

[0816] LVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCFSVMHEALHNR
FT

[0817] QKSLSLSPGK

[0818] SEQ ID NO :38

[0819] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VT

[0820] VPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VT

[0821] CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PS

[0822] SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
DS

[0823] DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0824] SEQ ID NO :39

[0825] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0826] SEQ ID NO :40

[0827] atgggcaggettacttcttcattcttgttgctgattgtccctgcatatgtcctgtcc

[0828] SEQ ID NO :41

[0829] caggttcagctgcaagagtctggccctgggttggttaagccctcccagaccctcagctctgacttgtact
gtgtctgggggttcaatcagcacttctggatatgggtgtaggctggattaggcagcaccaggggaagggtctggagtg
gattggacacatttgggtgggatgatgacaagagatataaccagccctgaagagcagagtgacaatctctgtggata
cctccaagaaccagtttagcctcaagctgtccagtgtagacagctgcagatactgctgtctactactgtgctagaatg
gaactttggctctactatcttgactactggggccaaggcacccttgtcacagtctcctca

[0830] SEQ ID NO :42

[0831] gctagcaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcg
gccctgggctgcctgggtcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcgg
cgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagca
gcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccc
aaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagttctcctctt
cccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtgggtgggtgacgtgagccacg
aagaccctgaggtcaagttcaactgggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagga
cagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaa
gtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaac
cacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggc
ttctatcccagegacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgt
gctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtct
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaata

[0832] SEQ ID NO :43

[0833] atggattttcaagtgcagattttcagcttctgctaatacagtcgctcagtcataatgtccagagga

[0834] SEQ ID NO :44

[0835] gaaattgttctcaccagctctccagcaaccctgtctctctctccaggggaaagggtaccctgagct
gcagtgccagctcaagtgttaagttacatgcactgggtaccagcagaagccagggcaggtctccagactcctgattt
atgacacatccaaactggcttctgggtattccagcaaggttcagtggcagtggtctggaacagattttactca
caatcagcagcctggagccagaggatgttgctgtctattactgttttcaggggagtgatataccattcacttttg
gccaagggacaaagtttgaaatcaaaaga

[0836] SEQ ID NO :45

[0837] actgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcct
ctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaat
cgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgc
tgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgta
caaagagcttcaacaggggagagtgttag

[0838] SEQ ID NO :46

[0839] Thr Ser Gly **Met** Gly Val Gly

- [0840] SEQ ID NO :47
- [0841] His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
- [0842] SEQ ID NO :48
- [0843] **Met** Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
- [0844] SEQ ID NO :49
- [0845] Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr **Met** His
- [0846] SEQ ID NO :50
- [0847] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
- [0848] SEQ ID NO :51
- [0849] Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr

序列表

<110>C. 麦克多纳格 (McDonagh, Charlotte)

C. G. 赛弗尼 (Cervený, Charles G)

D. 本杰明 (Benjamin, Dennis)

P. 卡特 (Carter, Paul)

<120>CD19 结合剂及其应用

<130>018891-004030PC

<150>US 60/981, 206

<151>2007-10-19

<150>US 60/019, 214

<151>2008-01-04

<150>US 61/080, 169

<151>2008-07-11

<160>61

<170>PatentIn 版本 3.4

<210>1

<211>19

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 前导序列 - 重链区域

<400>1

Met Gly Arg Leu Thr Ser Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210>2

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH2-70/JH4 种系) - 变体 HA

<400>2

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala
50					55					60					
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Val
65					70					75					80
Val	Leu	Thr	Met	Thr	Asn	Met	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				85						90				95	
Cys	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115					120							

<210>3

<211>330

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链恒定区 (IgG1)

<400>3

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	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115					120					125		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130					135					140		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165						170					175

Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
180				185				190							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
195				200				205							
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
210				215				220							
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225				230				235				240			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
245				250				255							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
260				265				270							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
275				280				285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290				295				300							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305				310				315				320			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
325				330											

<210>4

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH2-70/JH4 种系)- 变体 HB

<400>4

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

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>5

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH2-70/JH4 种系)- 变体 HC

<400>5

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>6

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH2-70/JH4 种系)- 变体 HD

<400>6

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

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

 $\langle 210 \rangle_7$ $\langle 211 \rangle 120$ $\langle 212 \rangle$ PRT

〈213〉 人工的

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉合成的 hBU12 重链可变区 (VH2-70/JH4 种系)-变体 HE

 $\langle 400 \rangle_7$

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

 $\langle 210 \rangle_8$ $\langle 211 \rangle 120$

<212>PRT

〈213〉 人工的

 $\langle 220 \rangle$

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (鼠)

<400>8

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
			20					25					30		
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala
	50					55					60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val
65					70					75				80	
Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	
Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210>9

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系)- 变体 HF

<400>9

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>10

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系)- 变体 HG

<400>10

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>11

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系)- 变体 HH

<400>11

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50	55	60	
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe			
65	70	75	80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210>12

<211>120

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系)-变体 HI

<400>12

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser			
20	25	30	
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	
Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala			
50	55	60	
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe			
65	70	75	80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
85	90	95	
Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210>13

<211>120

<212>PRT

<213>人工的

<220>

<223>合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系)-变体 HJ

<400>13

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Ser Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>14

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系)- 变体 HK

<400>14

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>15

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系)- 变体 HL

<400>15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210>16

<211>22

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链区域 - 前导序列

<400>16

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly

20

<210>17

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-L6/Jk2 种系) - 变体 LA

<400>17

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

<210>18

<211>106

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链恒定区 (κ 区)

<400>18

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>19

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-L6/Jk2 种系)- 变体 LB

<400>19

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

<210>20

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-L6/Jk2 种系)- 变体 LC

<400>20

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

<210>22
<211>107
<212>PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-L6/Jk2 种系)- 变体 LE
<400>22

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210>23

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-L6/Jk2 种系)- 变体 LF

<400>23

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser His Phe Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210>24

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-L6/Jk2 种系)- 变体 LG

<400>24

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
65	70	75
Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr		
85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
100	105	

<210>25

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (鼠)

<400>25

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

<210>26

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-A10/Jk2 种系)-变体 LH

<400>26

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys		
1	5	10
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met		
20	25	30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
35 40 45
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210>27

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-A10/Jk2 种系)- 变体 LI

<400>27

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

<210>28

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区共有序列 (VH2-70/JH4 种系)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(77).. (77)
 <223>Xaa 是 Ser 或 Lys
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(81).. (81)
 <223>Xaa 是 Phe 或 Val
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(83).. (83)
 <223>Xaa 是 Lys 或 Thr
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(84).. (84)
 <223>Xaa 是 Ile 或 Met
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(85).. (85)
 <223>Xaa 是 Ala 或 Thr
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(86).. (86)
 <223>Xaa 是 Ser 或 Asn
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(87).. (87)
 <223>Xaa 是 Val 或 Met
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(94).. (94)
 <223>Xaa 是 Ala 或 Thr
 <400>28

Gln	Val	Thr	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Pro	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Gln
1				5					10					15	
Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
				20					25					30	
Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
				35				40						45	
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala
				50				55						60	

Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Xaa	Asn	Gln	Val
65					70				75					80	
Xaa	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Pro	Val	Asp	Thr	Ala	Xaa	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Met	Glu	Leu	Trp	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105						110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115				120								

<210>29

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区共有序列 (VH4-31/JH4 种系)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(24)..(24)

<223>Xaa 是 Phe 或 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222>(27)..(27)

<223>Xaa 是 Phe 或 Gly

<220>

<221>MOD_RES

<222>(29)..(29)

<223>Xaa 是 Leu 或 Ile

<220>

<221>MOD_RES

<222>(73)..(73)

<223>Xaa 是 Lys 或 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222>(77)..(77)

<223>Xaa 是 Ser 或 Lys

<220>

<221>MOD_RES

<222>(80)..(80)

<223>Xaa 是 Val 或 Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(81)..(81)

<223>Xaa 是 Phe 或 Ser

<220>

<221>MOD_RES

<222>(94)..(94)

<223>Xaa 是 Ala 或 Val

<400>29

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Xaa

65 70 75 80

Xaa Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210>30

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区共有序列 (VL-L6/Jk2 种系)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223>Xaa 是 Asn 或 Ile

<220>

<221>MOD_RES

<222>(39)..(39)

<223>Xaa 是 Ser 或 Pro

<220>

<221>MOD_RES
 <222>(40).. (40)
 <223>Xaa 是 Ser 或 Gly
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(41).. (41)
 <223>Xaa 是 Thr 或 Gln
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(68).. (68)
 <223>Xaa 是 Asn 或 Thr
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(69).. (69)
 <223>Xaa 是 Ser 或 Asp
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(70).. (70)
 <223>Xaa 是 His 或 Phe
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(71).. (71)
 <223>Xaa 是 Phe 或 Thr
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(82).. (82)
 <223>Xaa 是 Val 或 Phe
 <400>30

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

	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
100	105		
<210>31			
<211>107			
<212>PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的 hBU12 轻链可变区共有序列 (VL-A10/Jk2 种系)			
<220>			
<221>MOD_RES			
<222>(2).. (2)			
<223>Xaa 是 Asn 或 Ile			
<220>			
<221>MOD_RES			
<222>(70).. (70)			
<223>Xaa 是 His 或 Phe			
<400>31			
Glu Xaa Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys			
1 5 10 15			
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met			
20 25 30			
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys			
35 40 45			
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
50 55 60			
Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu			
65 70 75 80			
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr			
85 90 95			
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
100 105			
<210>32			
<211>120			
<212>PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的 hBU12 重链可变区共有序列 (VH2-70/JH1-6 种系)			
<220>			

<221>MOD_RES
<222>(77)..(77)
<223>Xaa 是 Ser 或 Lys
<220>
<221>MOD_RES
<222>(81)..(81)
<223>Xaa 是 Phe 或 Val
<220>
<221>MOD_RES
<222>(83)..(83)
<223>Xaa 是 Lys 或 Thr
<220>
<221>MOD_RES
<222>(84)..(84)
<223>Xaa 是 Ile 或 Met
<220>
<221>MOD_RES
<222>(85)..(85)
<223>Xaa 是 Ala 或 Thr
<220>
<221>MOD_RES
<222>(86)..(86)
<223>Xaa 是 Ser 或 Asn
<220>
<221>MOD_RES
<222>(87)..(87)
<223>Xaa 是 Val 或 Met
<220>
<221>MOD_RES
<222>(94)..(94)
<223>Xaa 是 Ala 或 Thr
<220>
<221>MOD_RES
<222>(112)..(112)
<223>Xaa 是 Gln 或 Arg
<220>
<221>MOD_RES
<222>(115)..(115)
<223>Xaa 是 Leu, Thr, 或 Met

<400>32

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Val
 65 70 75 80
 Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Pro Val Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Xaa
 100 105 110
 Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>33

<211>120

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区共有序列 (VH4-31/JH1-6 种系)

<220>

<221>MOD_RES

<222> (24).. (24)

<223>Xaa 是 Phe 或 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222> (27).. (27)

<223>Xaa 是 Phe 或 Gly

<220>

<221>MOD_RES

<222> (29).. (29)

<223>Xaa 是 Leu 或 Ile

<220>

<221>MOD_RES

<222> (73).. (73)

<223>Xaa 是 Lys 或 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222>(77).. (77)

<223>Xaa 是 Ser 或 Lys

<220>

<221>MOD_RES

<222>(80).. (80)

<223>Xaa 是 Val 或 Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(81).. (81)

<223>Xaa 是 Phe 或 Ser

<220>

<221>MOD_RES

<222>(94).. (94)

<223>Xaa 是 Ala 或 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222>(112).. (112)

<223>Xaa 是 Gln 或 Arg

<220>

<221>MOD_RES

<222>(115).. (115)

<223>Xaa 是 Leu, Thr, 或 Met

<400>33

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Xaa Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Thr Ser

20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Xaa Asn Gln Xaa

65 70 75 80

Xaa Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Xaa

100 105 110

Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210>34

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区共有序列 (VL-L6/Jk1-5 种系)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223>Xaa 是 Asn 或 Ile

<220>

<221>MOD_RES

<222>(39)..(39)

<223>Xaa 是 Ser 或 Pro

<220>

<221>MOD_RES

<222>(40)..(40)

<223>Xaa 是 Ser 或 Gly

<220>

<221>MOD_RES

<222>(41)..(41)

<223>Xaa 是 Thr 或 Gln

<220>

<221>MOD_RES

<222>(68)..(68)

<223>Xaa 是 Asn 或 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(69)..(69)

<223>Xaa 是 Ser 或 Asp

<220>

<221>MOD_RES

<222>(70)..(70)

<223>Xaa 是 His 或 Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(71)..(71)

<223>Xaa 是 Phe 或 Thr

<220>

<221>MOD_RES

<222>(82).. (82)

<223>Xaa 是 Val 或 Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(99).. (99)

<223>Xaa 是 Gln, Pro 或 Gly

<220>

<221>MOD_RES

<222>(102).. (102)

<223>Xaa 是 Lys 或 Arg

<220>

<221>MOD_RES

<222>(103).. (103)

<223>Xaa 是 Leu 或 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222>(104).. (104)

<223>Xaa 是 Glu 或 Asp

<400>34

Glu Xaa Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Xaa Xaa Xaa Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Xaa Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Xaa Ile Lys Arg

100 105

<210>35

<211>107

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区共有序列 (VL-A10/Jk1-5 种系)

<220>

<221>MOD_RES

<222>(2)..(2)

<223>Xaa 是 Asn 或 Ile

<220>

<221>MOD_RES

<222>(70)..(70)

<223>Xaa 是 His 或 Phe

<220>

<221>MOD_RES

<222>(99)..(99)

<223>Xaa 是 Gln, Pro 或 Gly

<220>

<221>MOD_RES

<222>(102)..(102)

<223>Xaa 是 Lys 或 Arg

<220>

<221>MOD_RES

<222>(103)..(103)

<223>Xaa 是 Leu 或 Val

<220>

<221>MOD_RES

<222>(104)..(104)

<223>Xaa 是 Glu 或 Asp

<400>35

Glu Xaa Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Xaa Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr

85					90					95					
Phe	Gly	Xaa	Gly	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Ile	Lys	Arg					
100					105										
<210>36															
<211>326															
<212>PRT															
<213> 人工的															
<220>															
<223> 合成的 hBU12 重链恒定区 (IgG2)															
<400>36															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1			5					10					15		
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65	70			75			80								
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
85			90			95									
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
100			105			110									
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
115			120			125									
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
130			135			140									
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145	150			155			160								
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
165			170			175									
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
180			185			190									
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
195			200			205									
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
210			215			220									
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn

225	230	235	240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
	245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			
	260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
	275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
	290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
305	310	315	320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325		

<210>37

<211>290

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链恒定区 (IgG3)

<400>37

Gln Met Gln Gly Val Asn Cys Thr Val Ser Ser Glu Leu Lys Thr Pro			
1	5	10	15
Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser			
	20	25	30
Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys			
	35	40	45
Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	50	55	60
Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
65	70	75	80
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	85	90	95
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	100	105	110
Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His			
	115	120	125
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg			
	130	135	140
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys			

145	150	155	160
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	165	170	175
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
	180	185	190
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	195	200	205
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	210	215	220
Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met			
225	230	235	240
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	245	250	255
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His			
	260	265	270
Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	275	280	285
Gly Lys			
	290		
<210>38			
<211>327			
<212>PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 合成的 hBU12 重链恒定区 (IgG4)			
<400>38			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
	85	90	95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro			

<210>40

<211>57

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链区域 - 前导序列

<400>40

atgggcaggc ttacttcttc attcttgttg ctgattgtcc ctgcatatgt cctgtcc 57

<210>41

<211>360

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链可变区 (VH4-31/JH4 种系) - 变体 HF

<400>41

caggttcagc tgcaagagtc tggccctggg ttggttaagc cctcccagac cctcagtctg 60

acttgtactg tgtctggggg ttcaatcagc acttctggta tgggtgtagg ctggattagg 120

cagcaccag ggaagggtct ggagtggatt ggacacattt ggtgggatga tgacaagaga 180

tataaccag ccctgaagag cagagtgaaca atctctgttg atacctccaa gaaccagttt 240

agcctcaagc tgtccagtgt gacagctgca gatactgctg tctactactg tgctagaatg 300

gaacttttgt cctactattt tgactactgg ggccaaggca cccttgtcac agtctcctca 360

<210>42

<211>993

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链恒定区 (IgG1)

<400>42

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgttcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360

ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 420

gaggtcatat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggctct caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 ctggactcgc acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 993

<210>43

<211>66

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链区域 - 前导序列

<400>43

atggattttc aagtgcagat ttccagcttc ctgctaata gtcctcagc cataatgtcc 60
 agagga 66

<210>44

<211>321

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链可变区 (VL-L6/Jk2 种系) - 变体 LG

<400>44

gaaattgttc tcaccagtc tccagcaacc ctgtctctct ctccagggga aagggtacc 60
 ctgagctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagccaggg 120
 caggctccca gactcctgat ttatgacaca tccaaactgg cttctgggtat tccagcaagg 180
 ttccagtggca gtgggtctgg aacagatttt acactcacia tcagcagcct ggagccagag 240
 gatgttgctg tctattactg ttttcagggg agtgtatacc cattcacttt tggccaaggg 300
 acaaagttgg aatcaaaag a 321

<210>45

<211>321

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链恒定区 (κ 区)

<400>45

actgtggctg caccatctgt ctccatcttc ccgcatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgcctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgtta g 321
<210>46
<211>7
<212>PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的 hBU12 重链 CDR1
<400>46
Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5
<210>47
<211>16
<212>PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的 hBU12 重链 CDR2
<400>47
His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210>48
<211>10
<212>PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的 hBU12 重链 CDR3
<400>48
Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210>49
<211>10
<212>PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 合成的 hBU12 轻链 CDR1
<400>49
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10
<210>50

<211>7

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链 CDR2

<400>50

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210>51

<211>9

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链 CDR3

<400>51

Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210>52

<211>4

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的接头

<400>52

Gly Phe Leu Gly

1

<210>53

<211>1410

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链备选序列

<400>53

atgggatgga gctggatctt tcttttcctc ctgtcaggaa ctgcagggtgt ccattgtcag	60
gttcagctgc aagagtctgg ccctgggttg gttaagccct cccagaccct cagtctgact	120
tgtactgtgt ctgggggttc aatcagcact tctggtatgg gtgtaggctg gattaggcag	180
cacccaggga agggctctgga gtggattgga cacatttggt gggatgatga caagagatat	240
aacccagccc tgaagagcag agtgacaatc tctgtggata cctccaagaa ccagtttagc	300
ctcaagctgt ccagtgtgac agctgcagat actgctgtct actactgtgc tagaatggaa	360

ctttggctcct actatTTTTga ctactggggc caaggcaccc ttgtcacagt ctctcagct	420
agcaccaagg gccatctgt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	480
acagctgccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccctg aacctgtgac agtgtcctgg	540
aactcaggcg cctgaccag cgcggtgcac accttcccg ctgtcctaca gtctcagga	600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttggggcac ccagacctac	660
atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa	720
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctgag	840
gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac	900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	1020
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1080
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg	1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1260
gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	1380
aagagcctct cctgtctcc gggtaaata	1410

<210>54

<211>57

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链备选前导序列

<400>54

atgggatgga gctggatctt tcttttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt ccattgt	57
---	----

<210>55

<211>993

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链备选序列 - 恒定区

<400>55

gctagcacca agggcccatc tgtcttcccc ctggcacctt cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagctg ccttgggtg cctgggtcaag gactacttcc ctgaacctgt gacagtgtcc	120
tggaactcag gcgcctgac cagcgcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga	360

ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccacct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgctctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 993

<210>56

<211>469

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链备选序列

<400>56

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys
50 55 60
Gly Leu Glu Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr
65 70 75 80
Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
85 90 95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

	165		170		175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe					
	180		185		190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val					
	195		200		205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val					
	210		215		220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys					
225		230		235	240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu					
	245		250		255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr					
	260		265		270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val					
	275		280		285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val					
	290		295		300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser					
305		310		315	320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu					
	325		330		335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala					
	340		345		350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro					
	355		360		365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln					
	370		375		380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala					
385		390		395	400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr					
	405		410		415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu					
	420		425		430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser					
	435		440		445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser					
	450		455		460
Leu Ser Pro Gly Lys					
465					

<210>57

<211>19

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 重链备选前导序列

<400>57

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1

5

10

15

Val His Cys

<210>58

<211>699

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链备选序列

<400>58

atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtga	60
attgtttctca ccagttctcc agcaaccctg tctctctctc caggggaaag ggctaccctg	120
agctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggg accagcagaa gccagggcag	180
gctcccagac tcttgattta tgacacatcc aaactggctt ctggtattcc agcaagggtc	240
agtggcagtg ggtcttggaac agattttaca ctcaaatca gcagcctgga gccagaggat	300
gttgctgtct attactgttt tcaggggagt gtatacccat tcaacttttg ccaagggaca	360
aagtttgaaa tcaaaagaac tgttggtgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat	420
gagcagttga aatcttggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga	480
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt	540
gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc	600
aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc	660
tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgttag	699

<210>59

<211>57

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链备选前导序列

<400>59

atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagt 57

<210>60

<211>232

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链备选序列

<400>60

```

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

```

<210>61

<211>19

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的 hBU12 轻链备选前导序列

<400>61

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ser

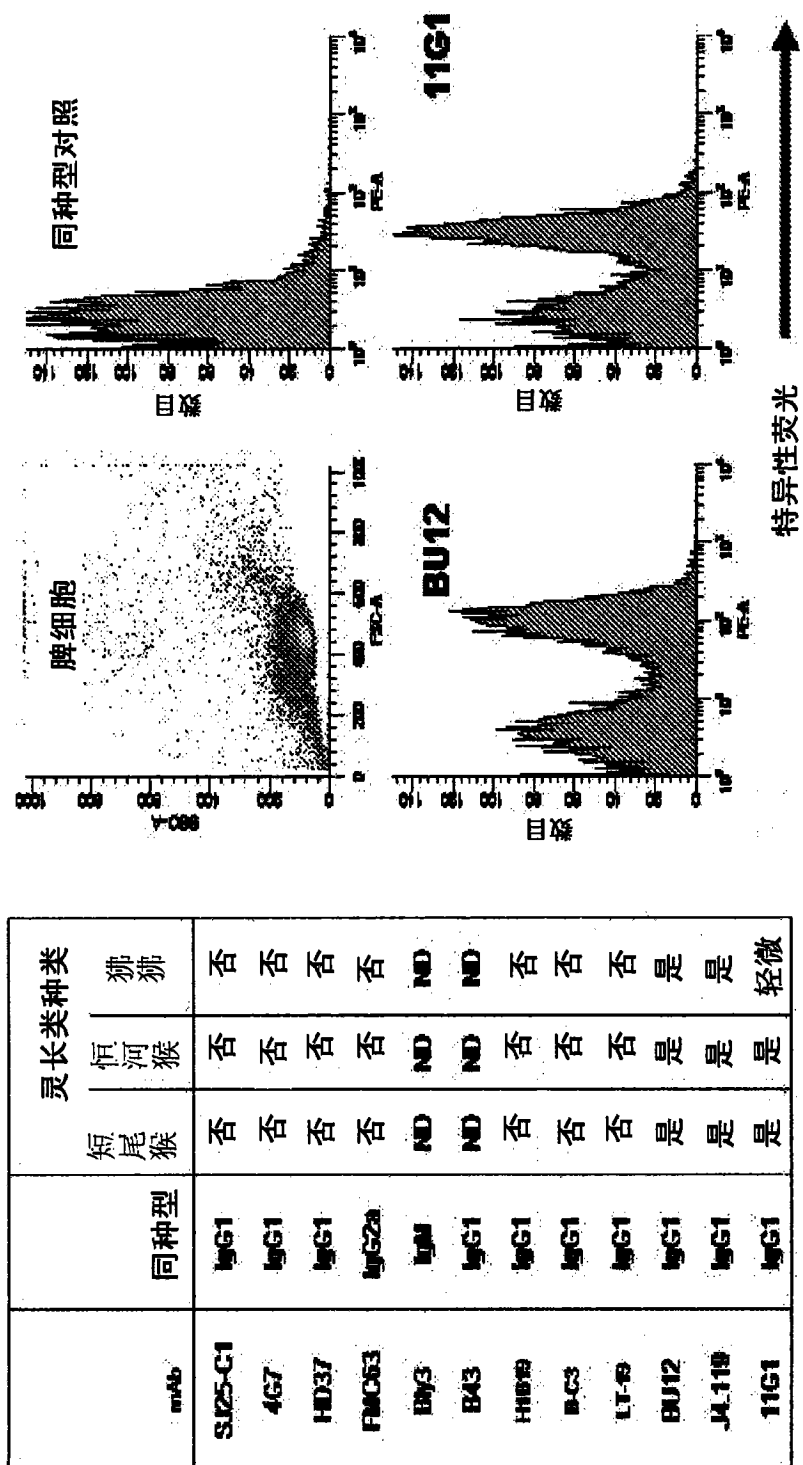


图 1

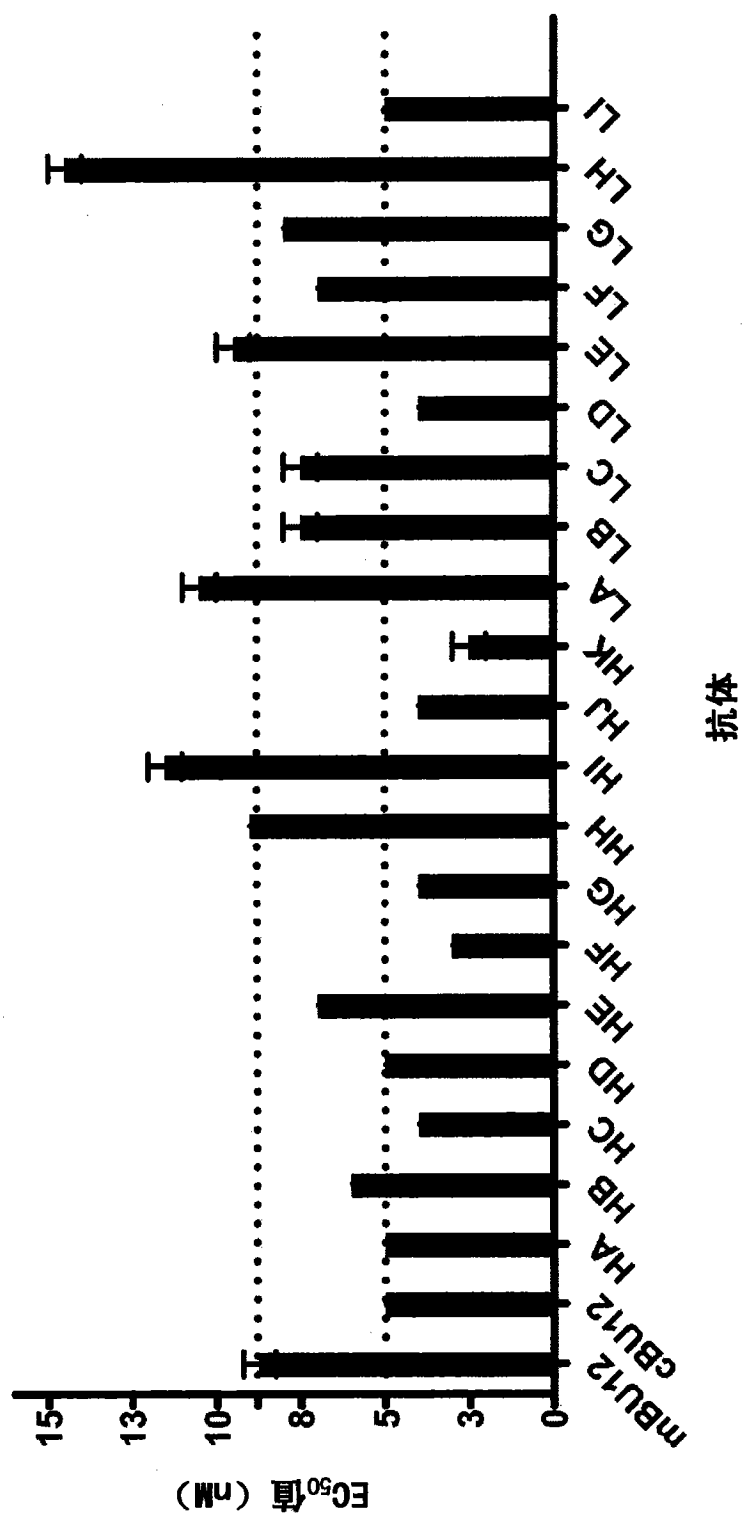


图 2

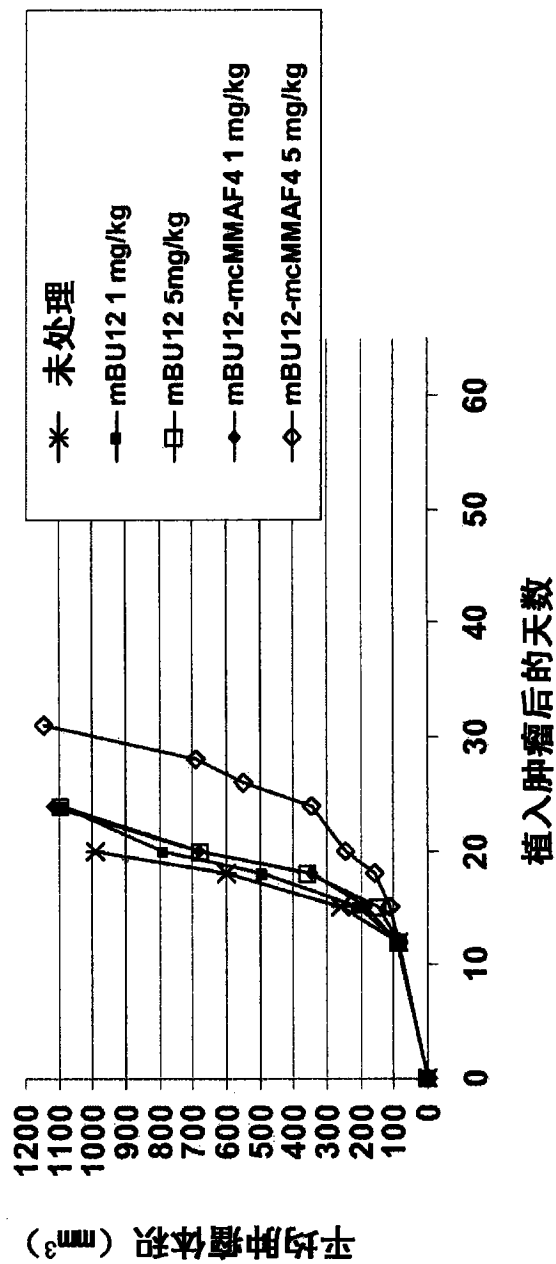


图 3

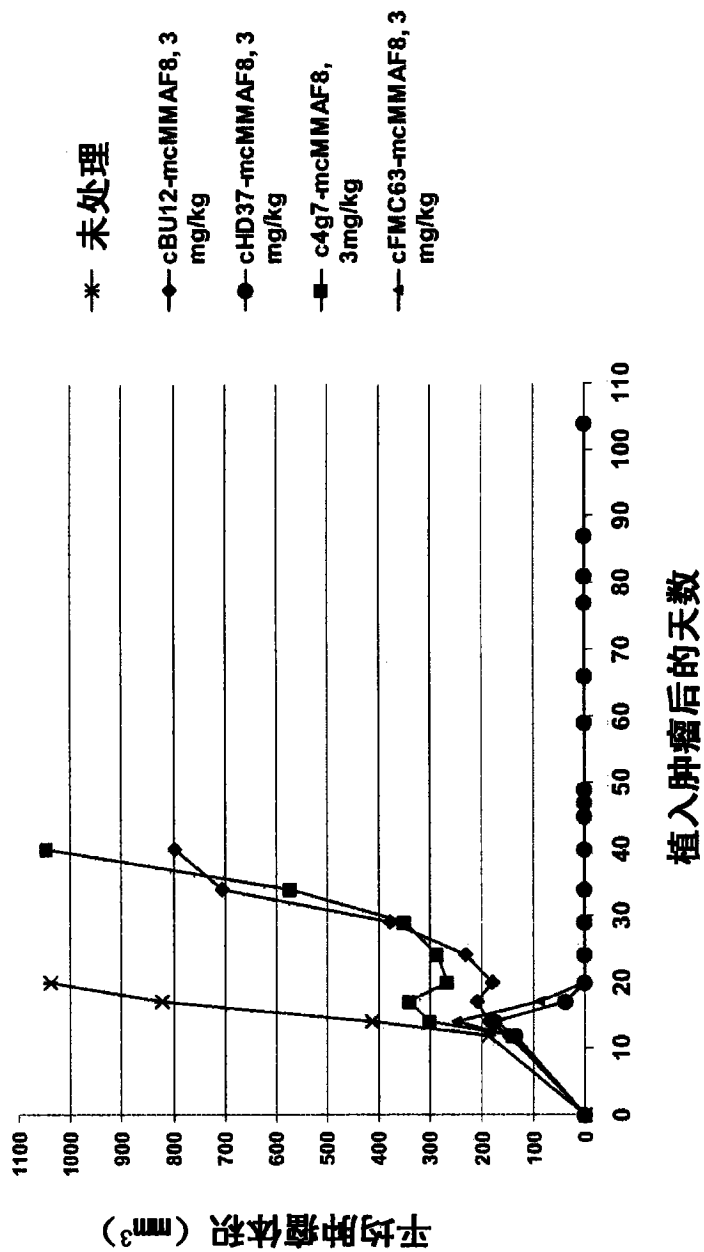


图 4

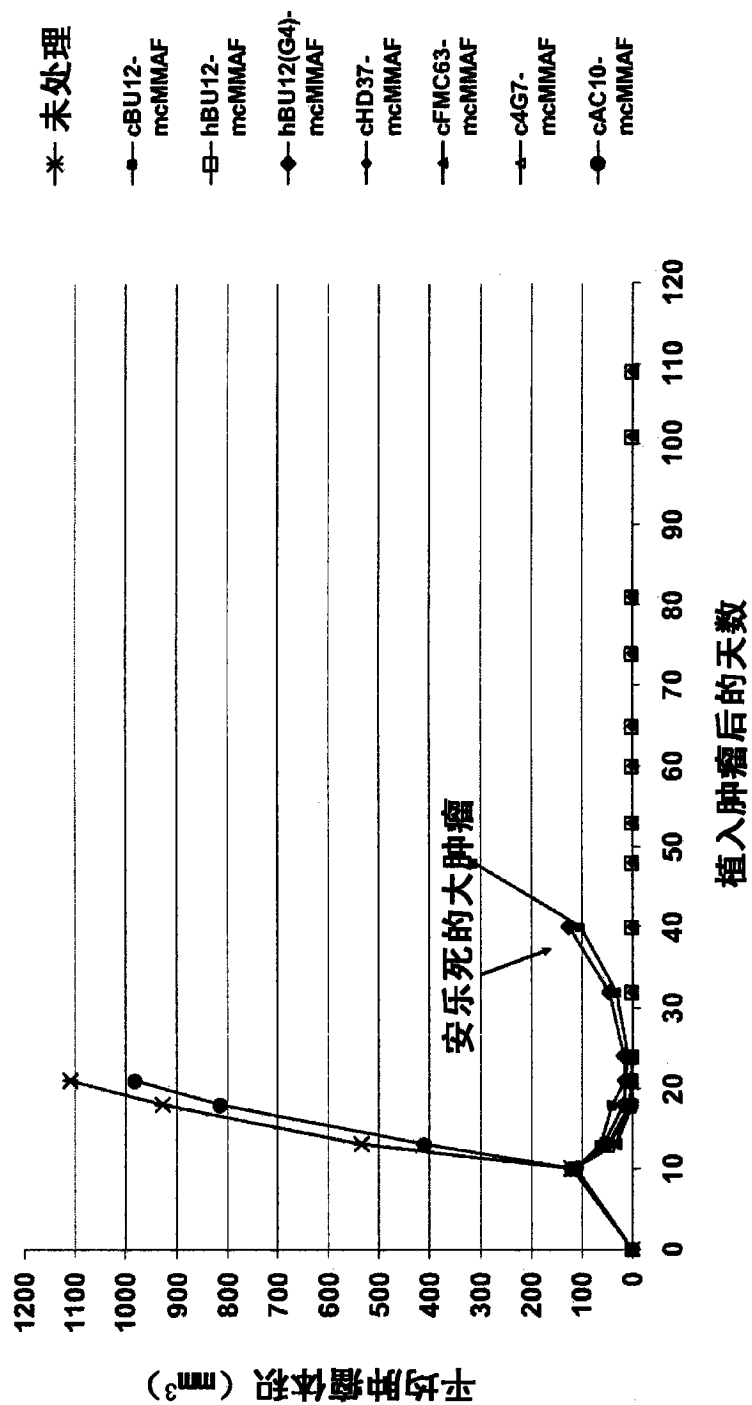


图 5

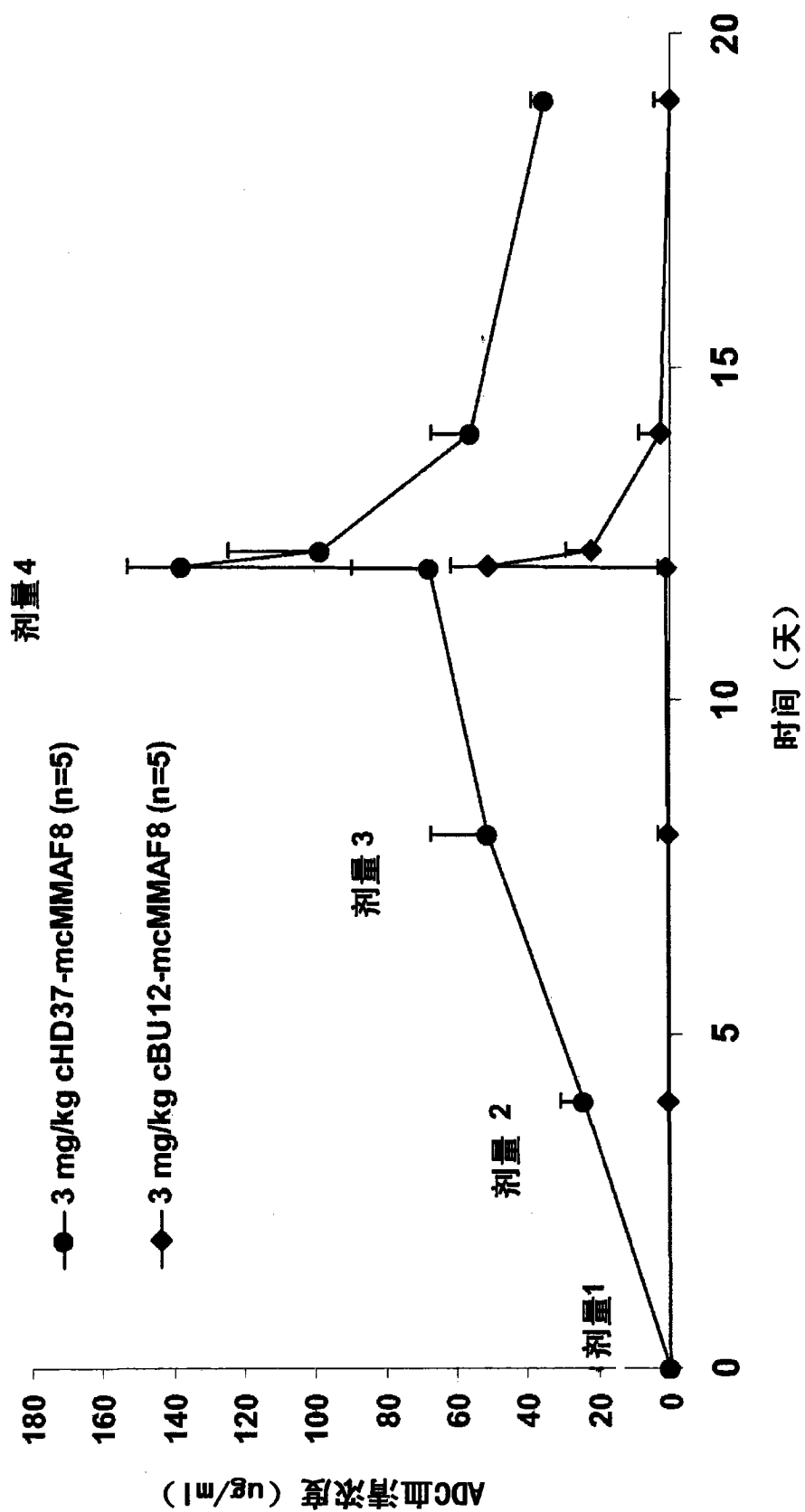


图 6

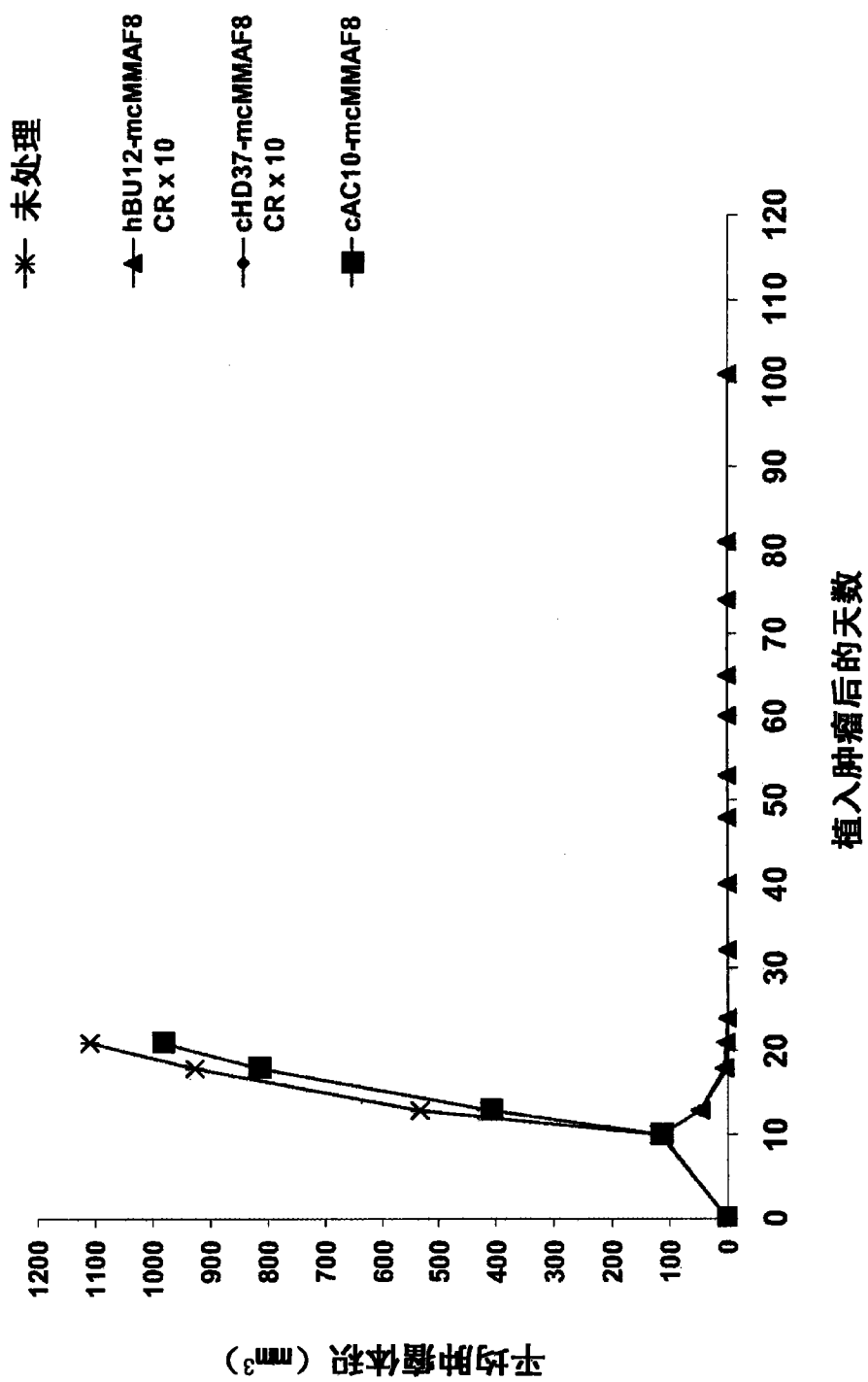


图 7

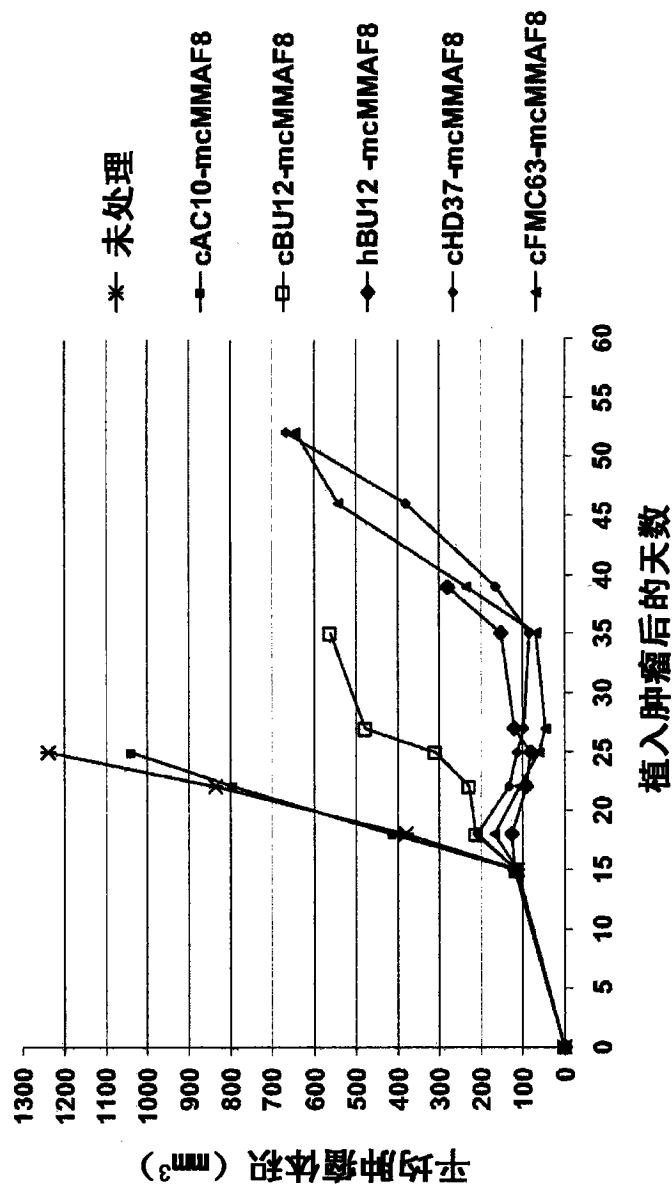


图 8

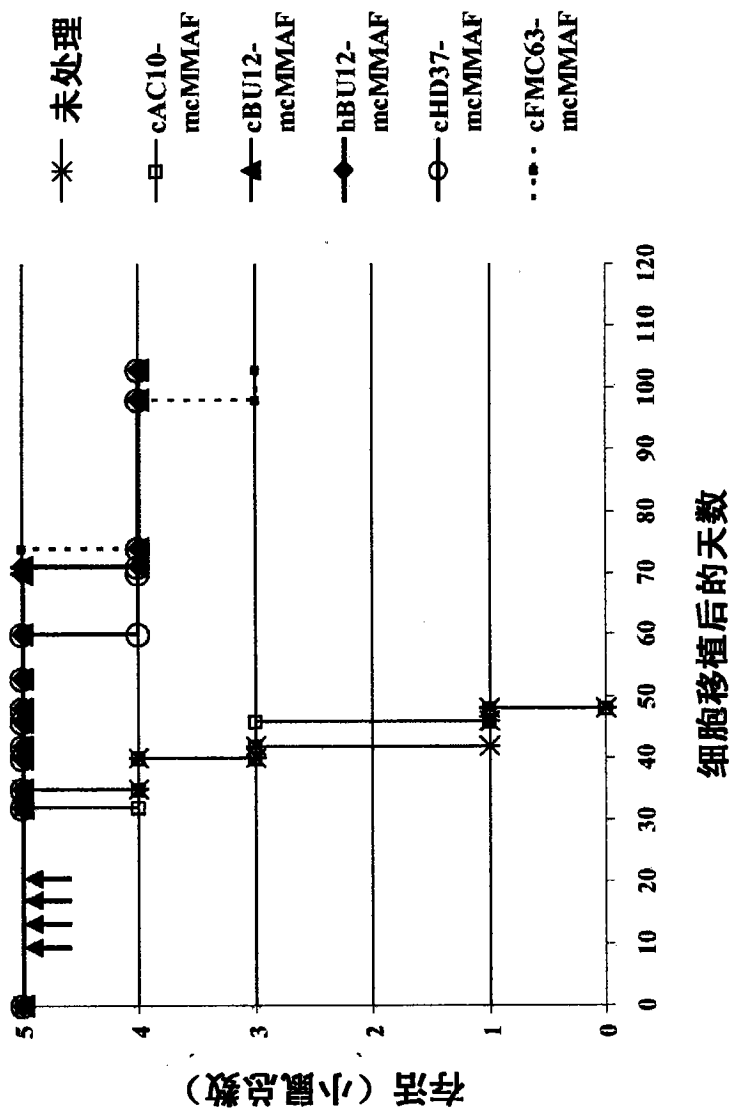


图 9

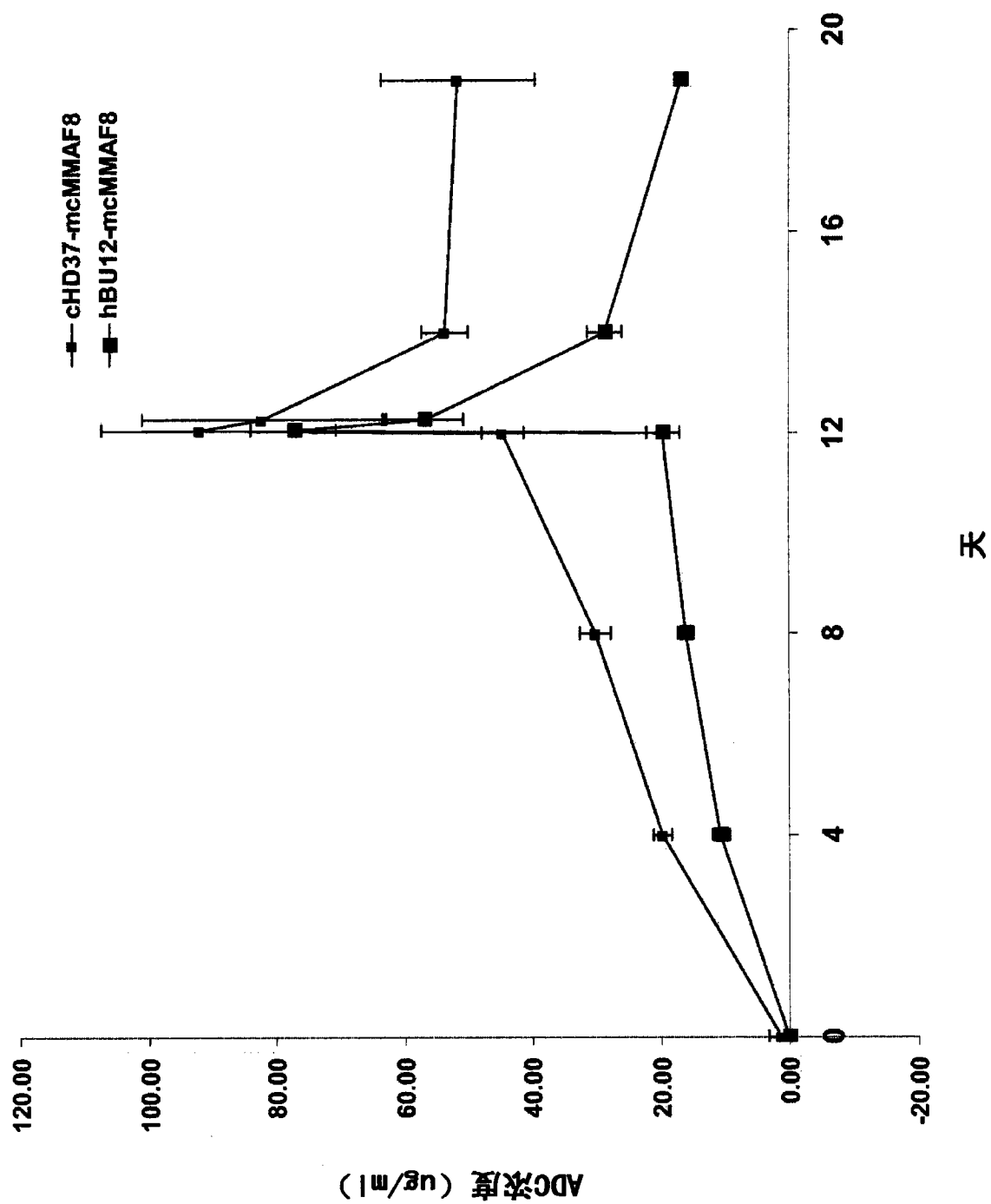


图 10

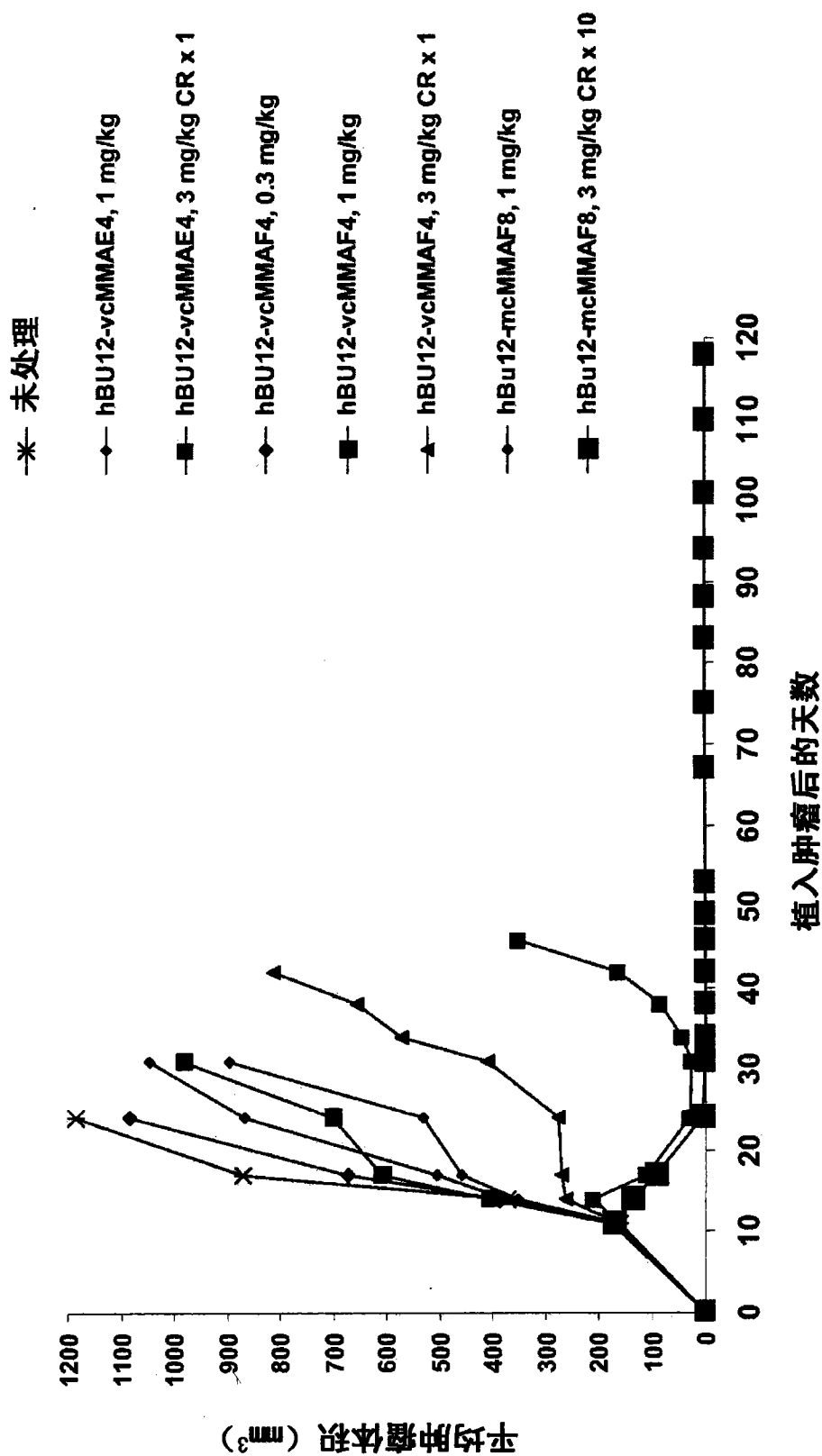


图 11

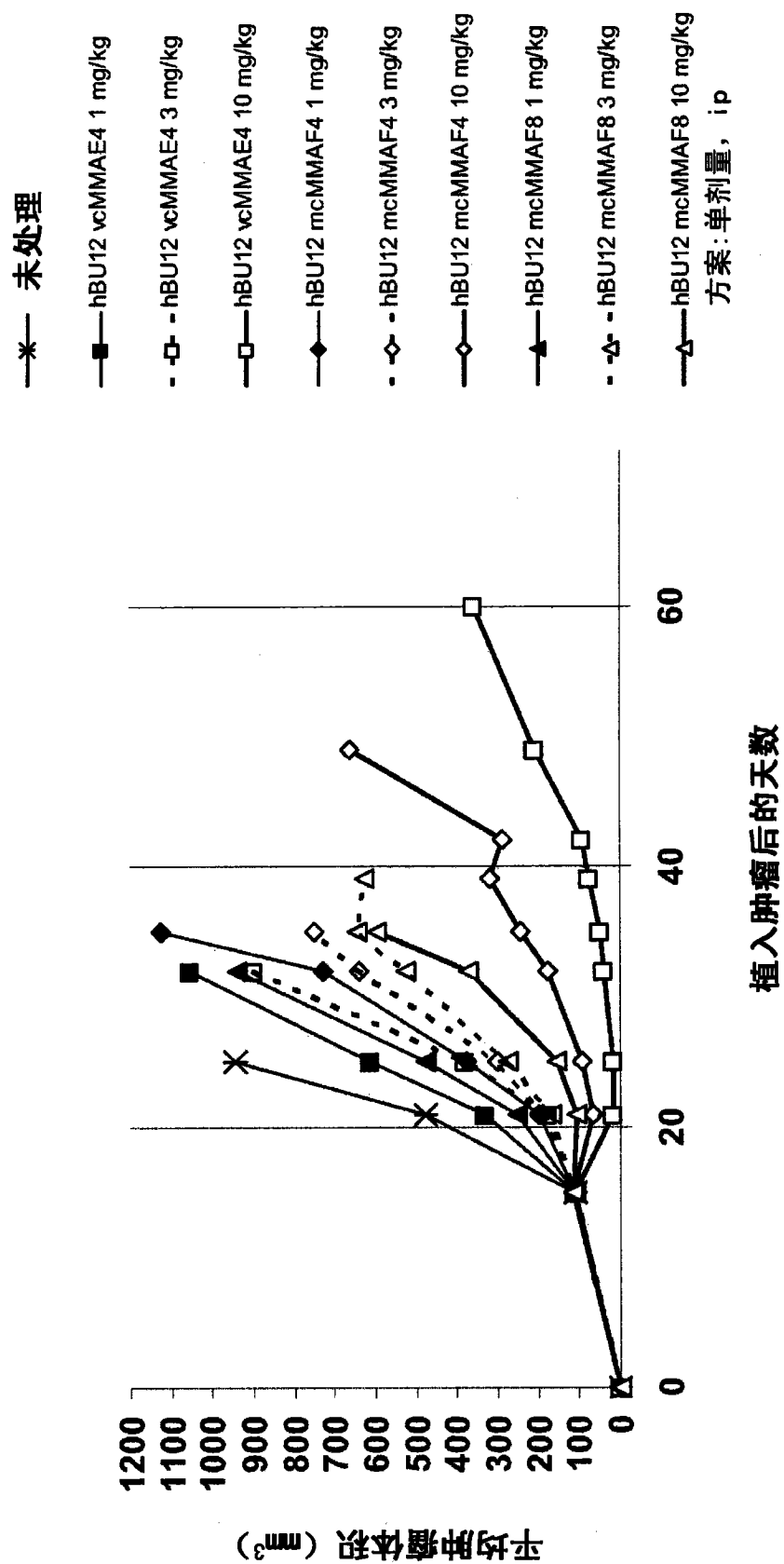


图 12

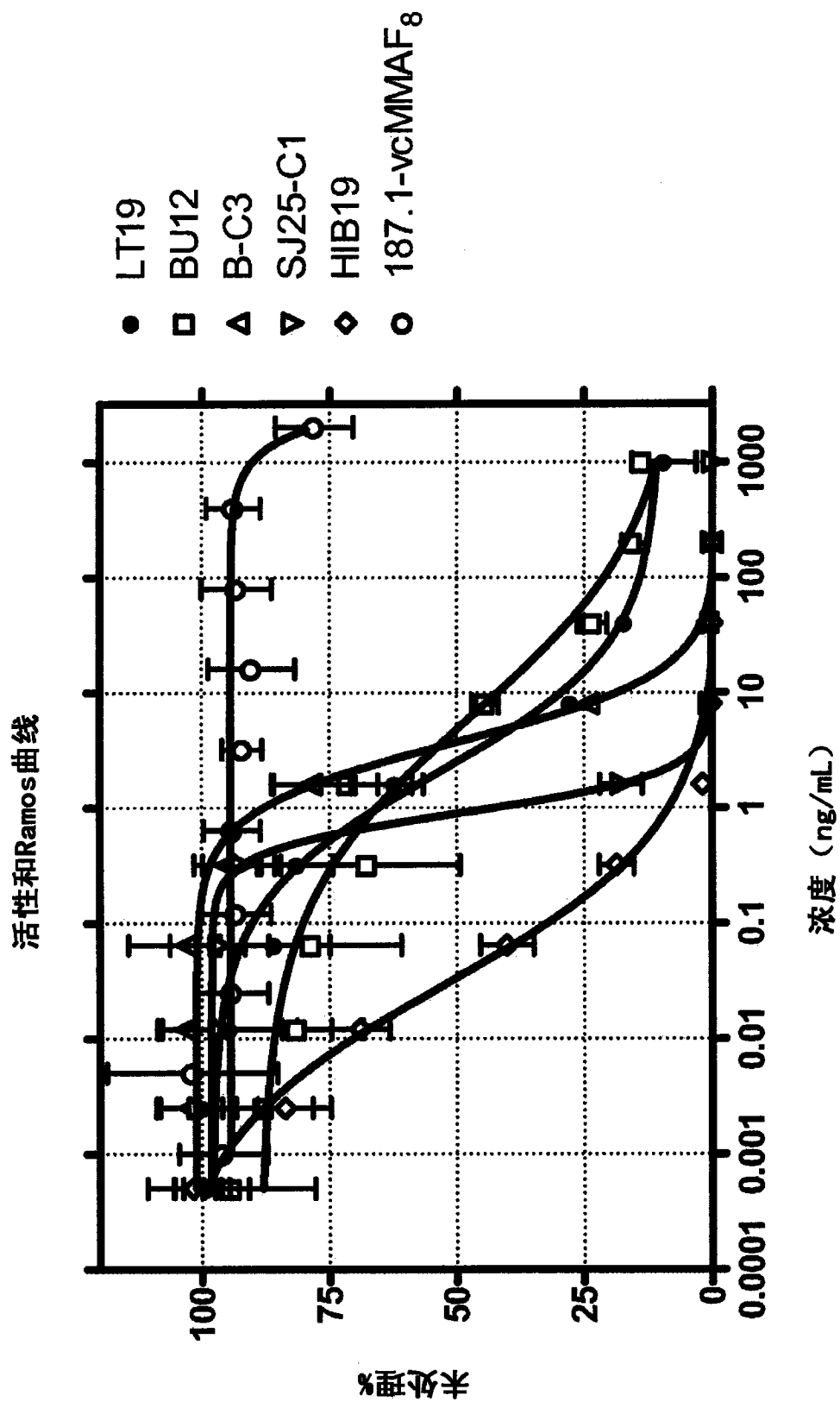


图 13

适应症	细胞系	CD21/ 细胞	CD19/ 细胞	IC ₅₀ [nM] 细胞毒性	
				hBU12- mcF(4)	hBU12- vcE(4)
ALL	Nalm-6	0	53773	38	4
	RS4;11	0	38227	0.08	0.05
滤泡淋巴瘤	DOHH2	0	40056	5	5
	WSU-NHL	0	36242	0.06	0.4
DLBCL	HT *	952	36834	0.26	0.20
	RL	0	32542	208	>300
	WSU-DLCL2	0	19924	209	51
伯基特淋巴瘤	CA46 *	2167	57240	0.5	2
	Namalwa *	374	28629	6	54
	Ramos	2369	41016	0.06	0.6
	Daudi *	25531	54074	>300	30
	Raji	56660	78798	>300	33.3
CLL	MEC-2	33246	67562	>300	>300
	JVM3	17850	26321	67	42
T细胞白血病	Jurkat: CD19-		0	>300	>300

* MHCII-mcMMAF(4) IC₅₀ = 0.5 nM;

图 14

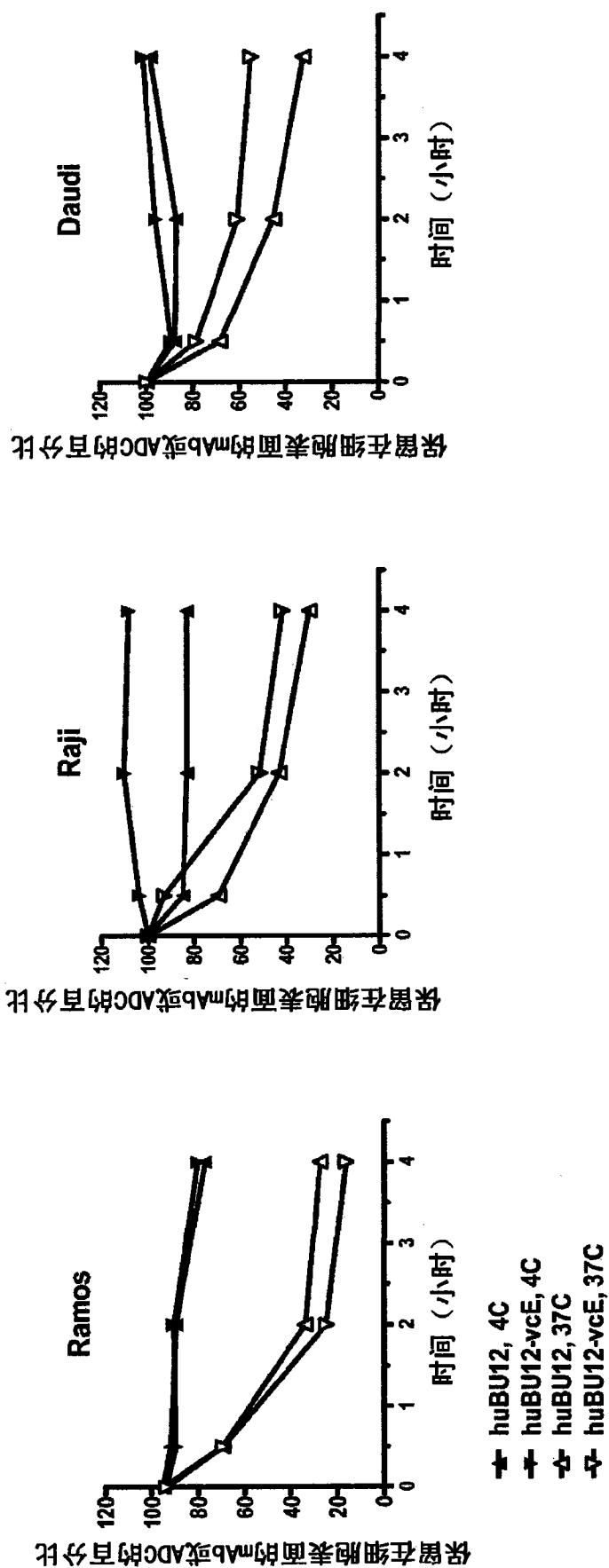


图 15

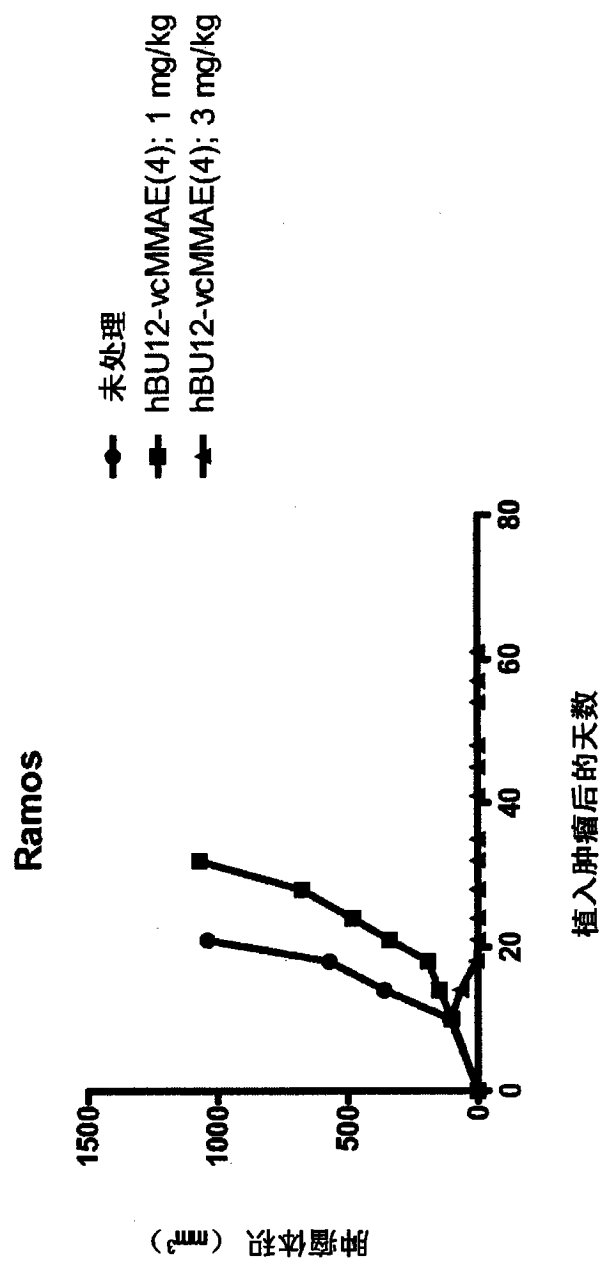


图 16A

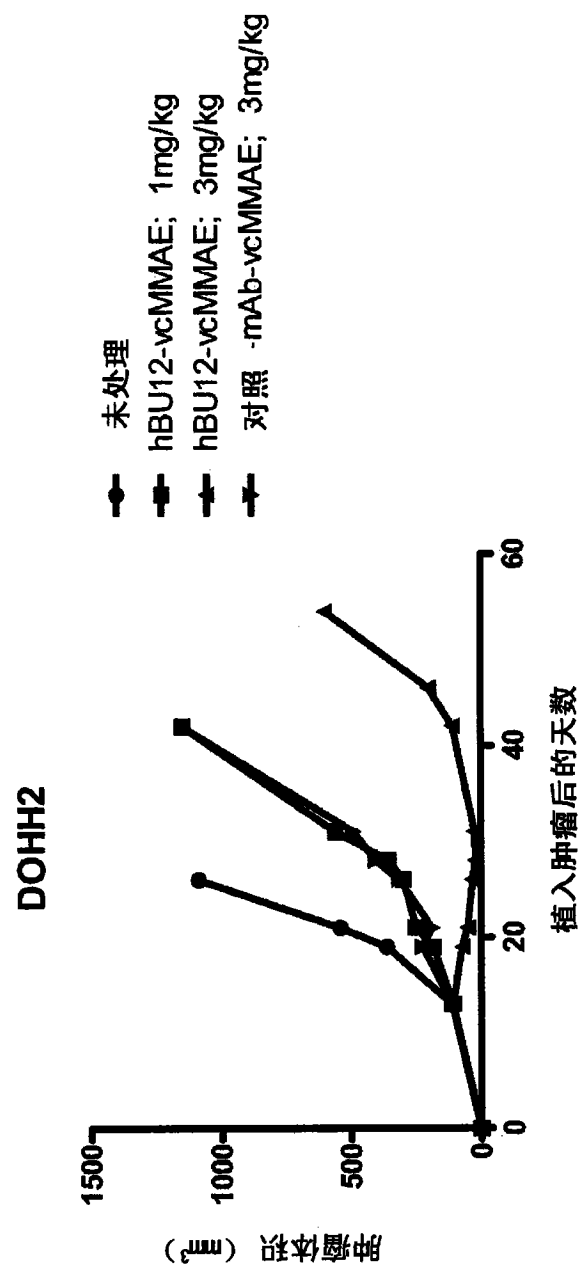


图 16B

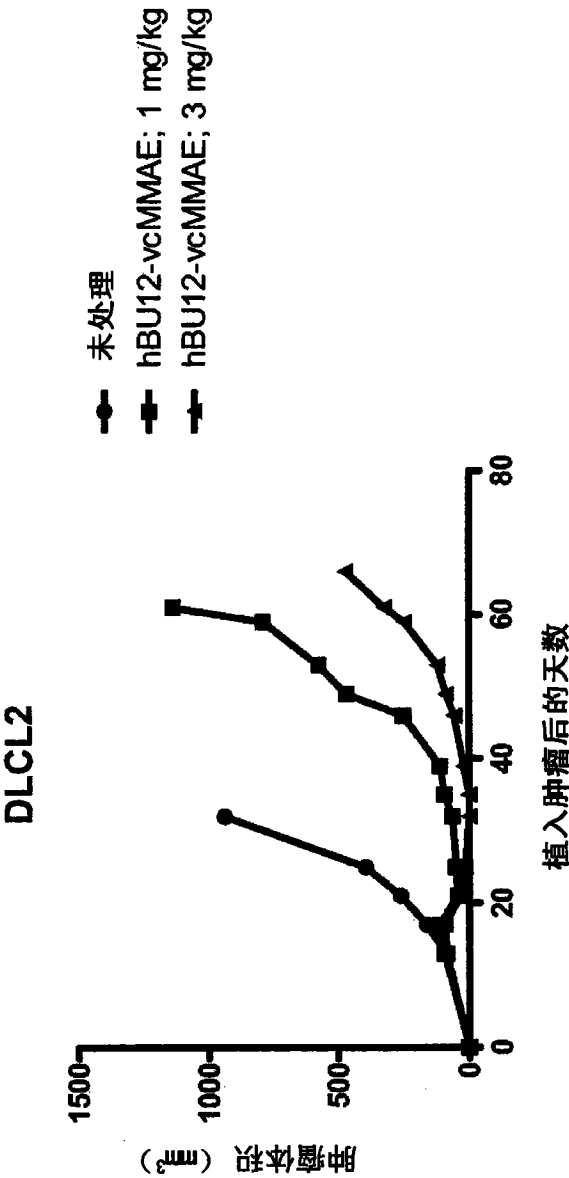


图 16C

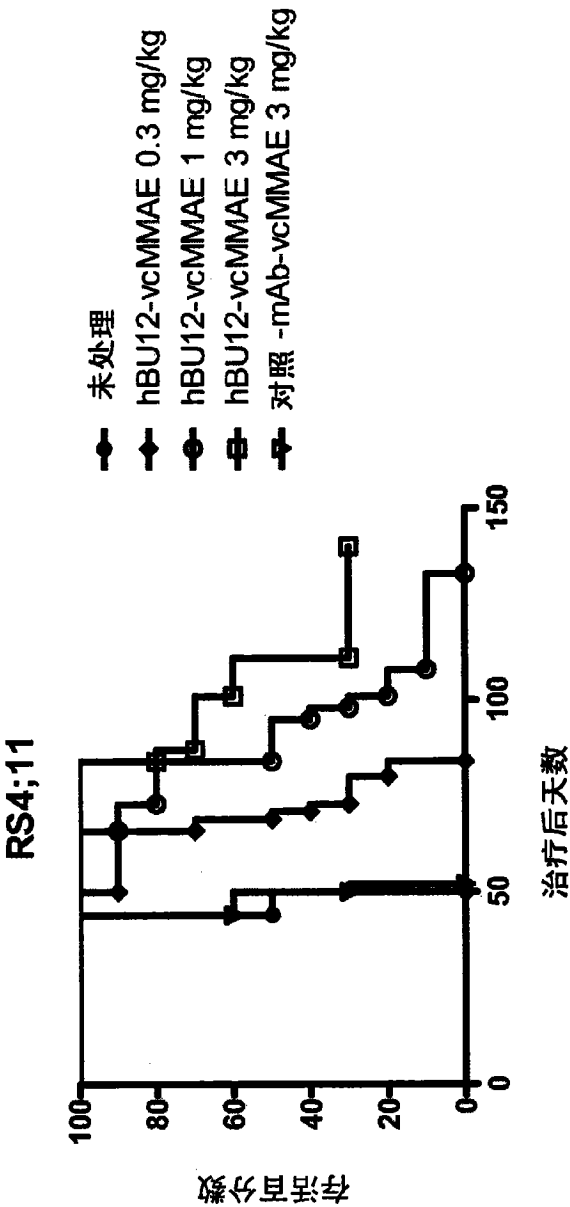


图 16D

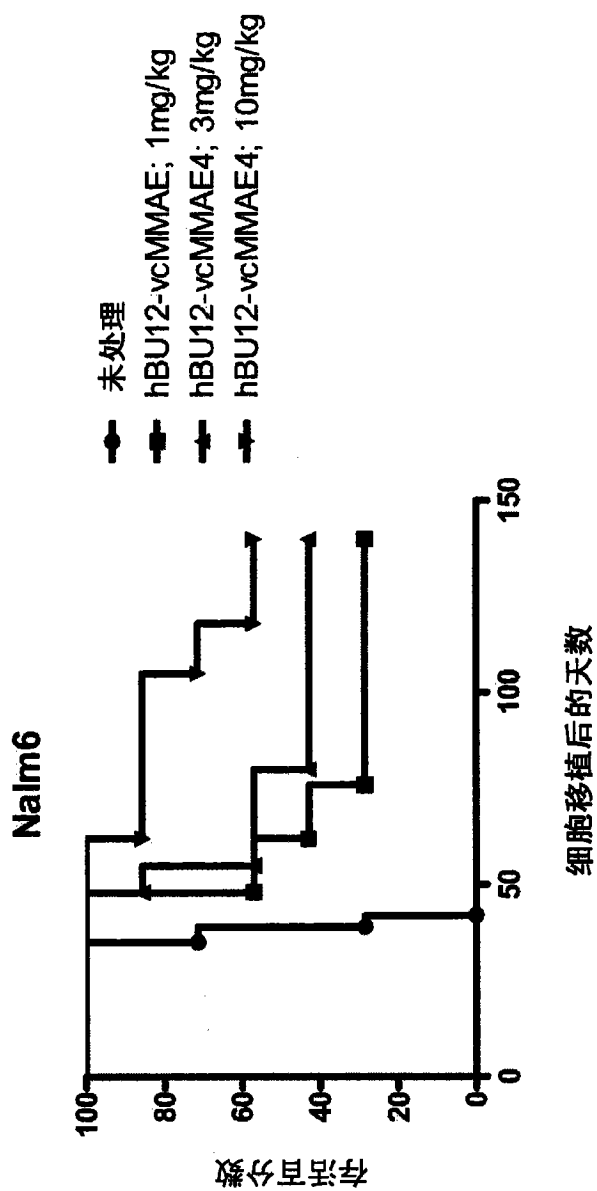


图 16E

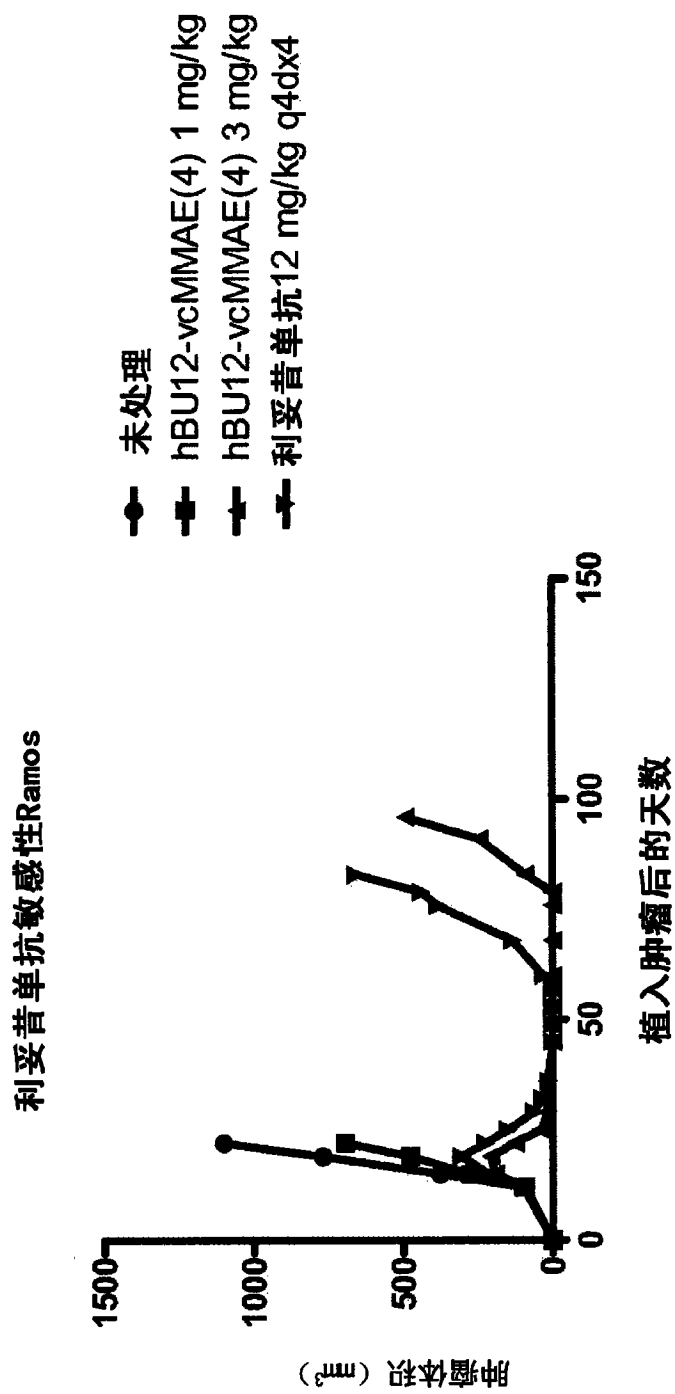


图 17A

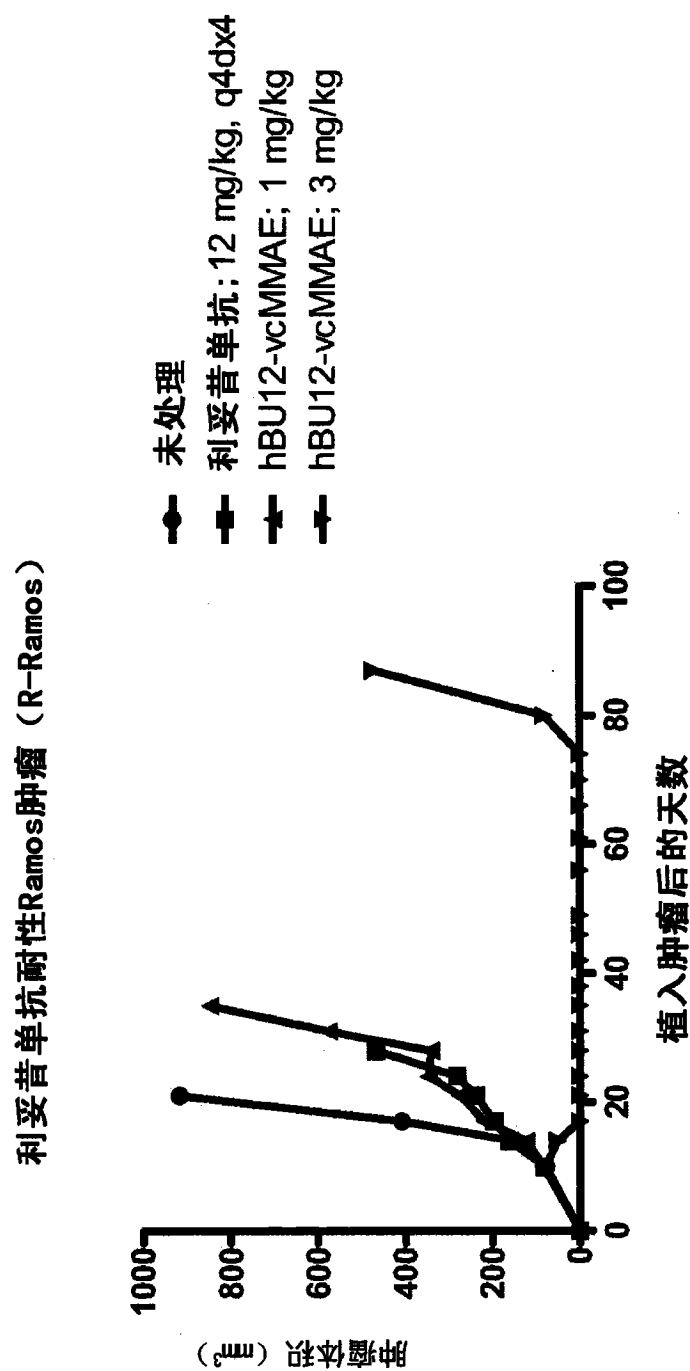


图 17B

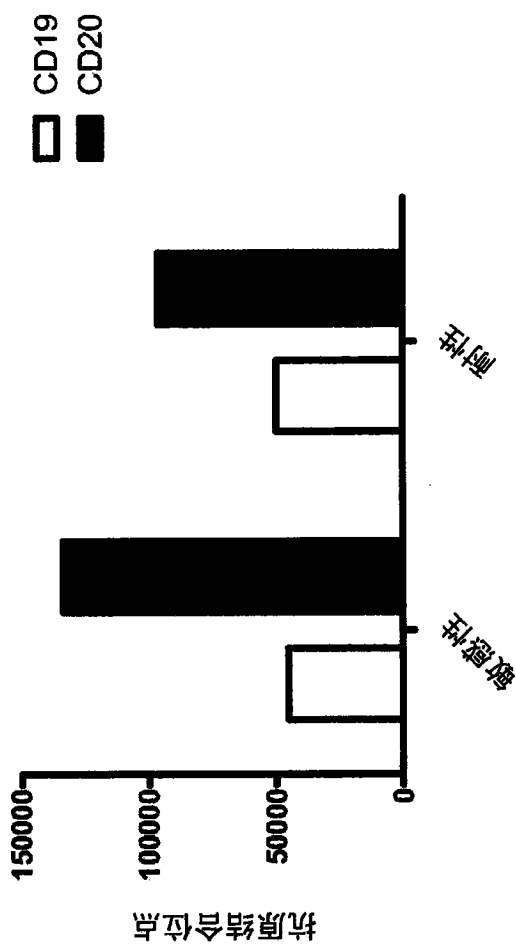


图 17C

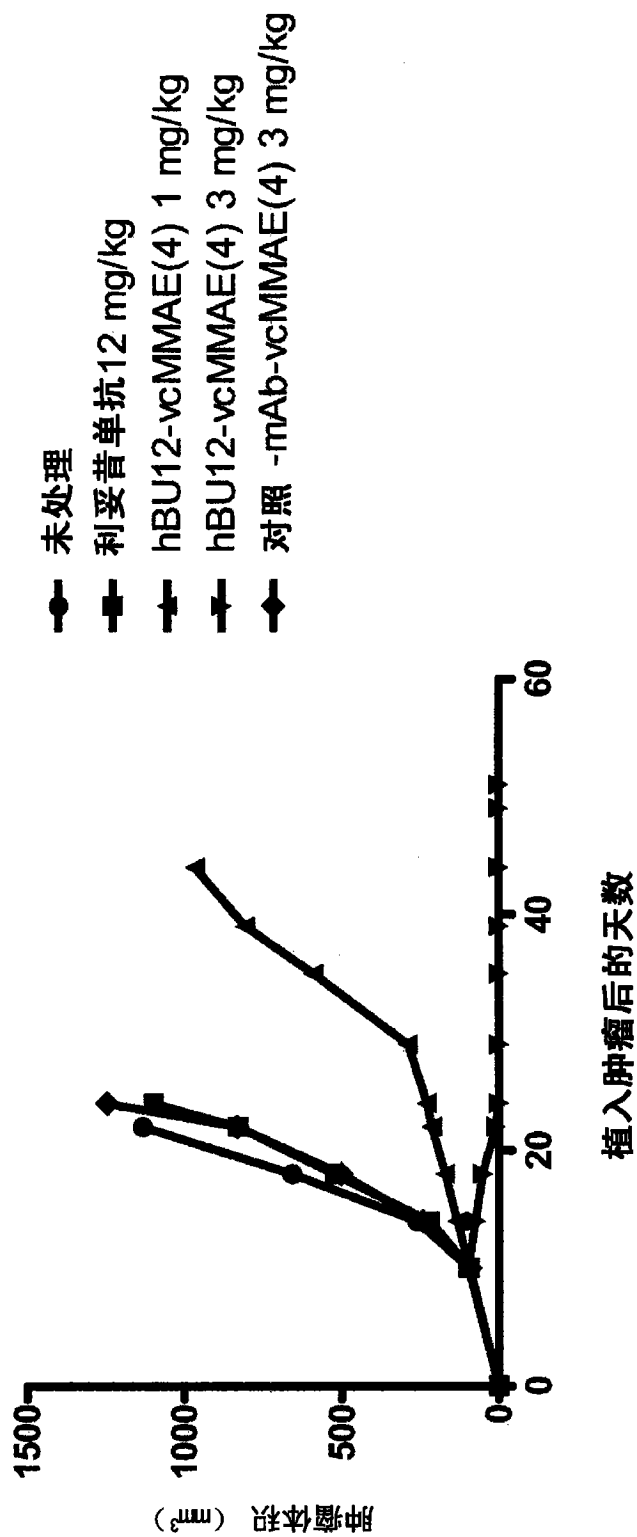


图 17D

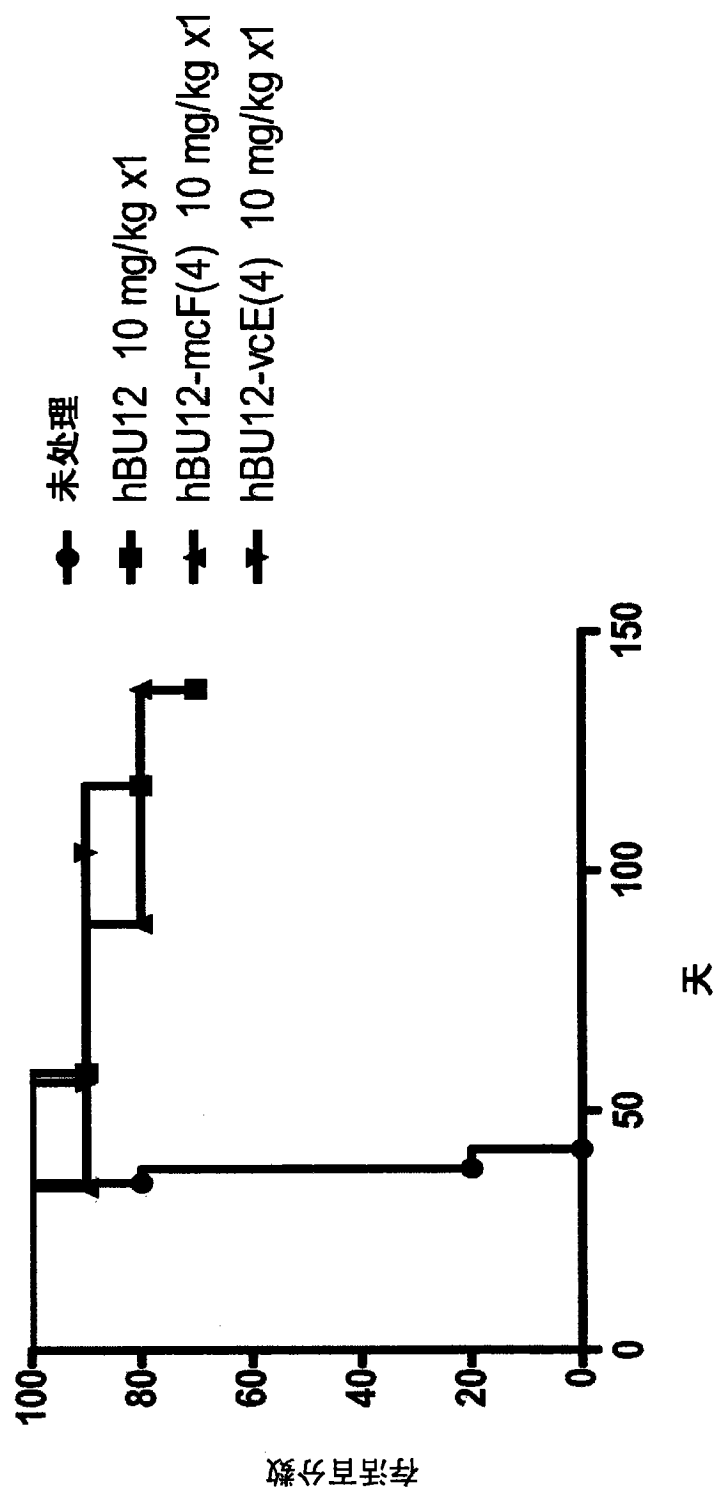


图 18

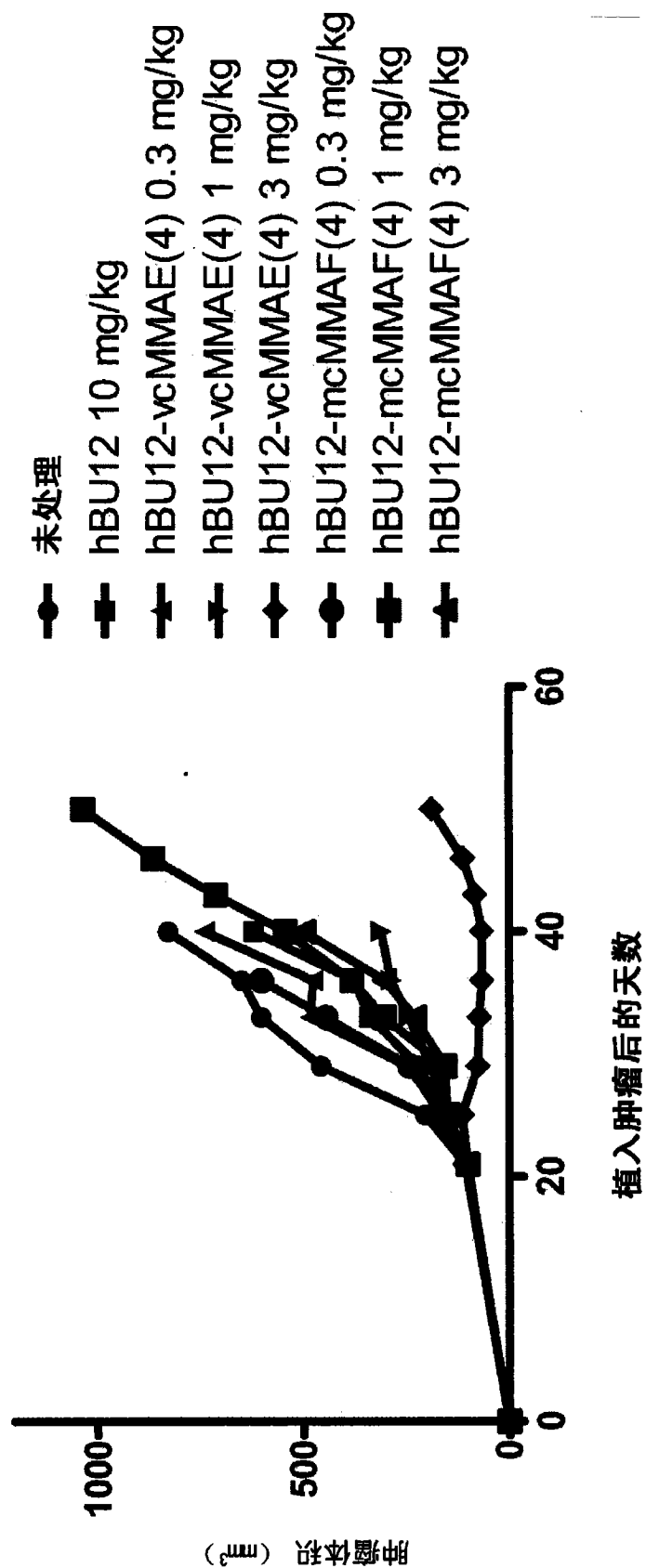


图 19