



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107001465 B

(45) 授权公告日 2020.12.11

(21) 申请号 201580048588.0

(22) 申请日 2015.09.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107001465 A

(43) 申请公布日 2017.08.01

(30) 优先权数据
62/049,876 2014.09.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.03.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/049794 2015.09.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/040868 EN 2016.03.17

(73) 专利权人 基因泰克公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 郑冰 A·波尔森 C·赵
W-C·梁 Y·吴

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 31/5517 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 104470544 A, 2015.03.25
WO 2009051974 A1, 2009.04.23
CN 104411721 A, 2015.03.11

审查员 王雨方

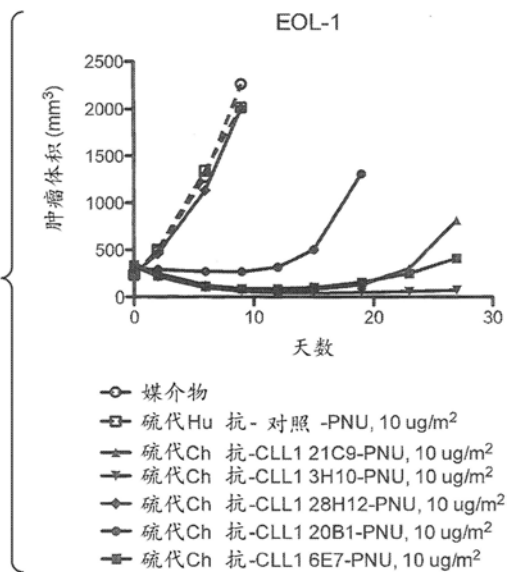
权利要求书5页 说明书98页
序列表29页 附图10页

(54) 发明名称

抗-CLL-1抗体和免疫缀合物

(57) 摘要

本发明提供抗-CLL-1抗体和免疫缀合物及其使用方法。



1. 一种分离的单克隆抗-CLL-1抗体,其中所述抗体包含(a)如SEQ ID NO:8的氨基酸序列所示的HVR-H1;(b)如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HVR-H2;(c)如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的HVR-H3;(d)如SEQ ID NO:5的氨基酸序列所示的HVR-L1;(e)如SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的HVR-L2;和(f)如SEQ ID NO:7的氨基酸序列所示的HVR-L3。

2. 权利要求1的抗体,其中所述抗体包含:

如SEQ ID NO:34的氨基酸序列所示的重链可变区和如SEQ ID NO:32的氨基酸序列所示的轻链可变区。

3. 权利要求1或权利要求2的抗体,其中所述抗体包含一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基。

4. 权利要求3的抗体,其中所述一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基位于所述轻链中。

5. 权利要求3的抗体,其中所述轻链中的一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基包含根据Kabat编号的K149C。

6. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体为人源化抗体。

7. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体为结合CLL-1的抗体片段,其中所述抗体片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、或scFv。

8. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体为IgG1、IgG2a或IgG2b抗体。

9. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体为IgG1抗体。

10. 一种分离的核酸,其编码前述权利要求中任一项的抗体。

11. 一种宿主细胞,其包含权利要求10的核酸。

12. 一种产生抗体的方法,其包括培养权利要求11的宿主细胞,从而产生该抗体,以及分离所述抗体。

13. 一种免疫缀合物,其包含权利要求1至9中任一项的抗体和细胞毒性剂。

14. 一种免疫缀合物,其具有式Ab-(L-D)_p,其中:

(a) Ab为权利要求1至9中任一项的抗体;

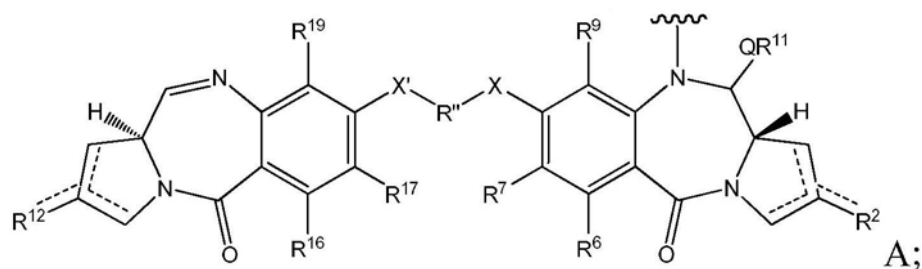
(b) L为附接Ab与D的接头;

(c) D为细胞毒性药物;且

(d) p在1-8范围内。

15. 权利要求13或权利要求14的免疫缀合物,其中所述细胞毒性药物选自类美登素(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamicin)、吡咯并苯并二氮䓬和奈莫柔比星(nemorubicin)衍生物。

16. 权利要求14的免疫缀合物,其中D为式A的吡咯并苯并二氮䓬:



其中虚线表示C1与C2或C2与C3之间任选存在双键；

R^2 选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R和COR，且任选还选自卤素或二卤素，其中R^D独立地选自R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H和卤素；

R^6 和 R^9 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn和卤素；

R^7 选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn和卤素；

Q选自O、S和NH，且 R^{11} 为H或R；或其中Q为O且 R^{11} 为SO₃M，其中M为金属阳离子；

R和R'各独立地选自任选经取代的C₁₋₈烷基、C₃₋₈杂环基和C₅₋₂₀芳基，且任选关于基团NRR'，R和R'连同其附接的氮原子一起形成任选经取代的4、5、6或7元杂环；

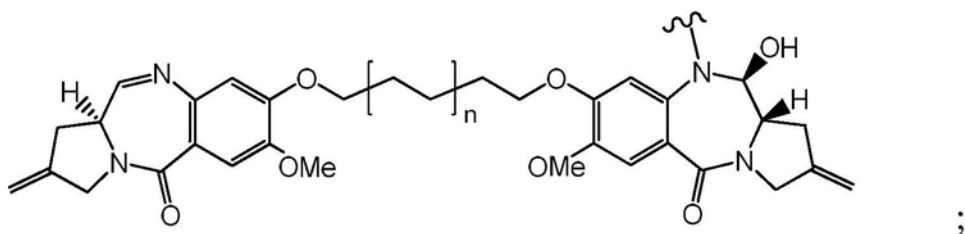
R^{12} 、 R^{16} 、 R^{19} 和 R^{17} 如分别针对 R^2 、 R^6 、 R^9 和 R^7 所定义；

R"为C₃₋₁₂亚烷基，所述C₃₋₁₂亚烷基链可杂有一或多个杂原子和/或任选经取代的芳环；

且

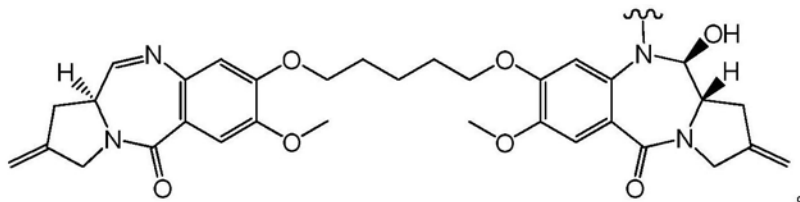
X和X'独立地选自O、S和NH。

17. 权利要求14的免疫缀合物，其中D具有结构：



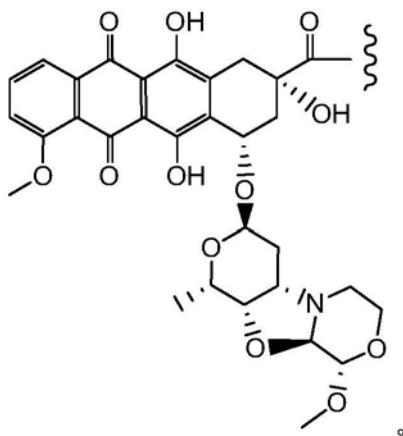
其中n为0或1。

18. 权利要求17的免疫缀合物，其中D具有结构：

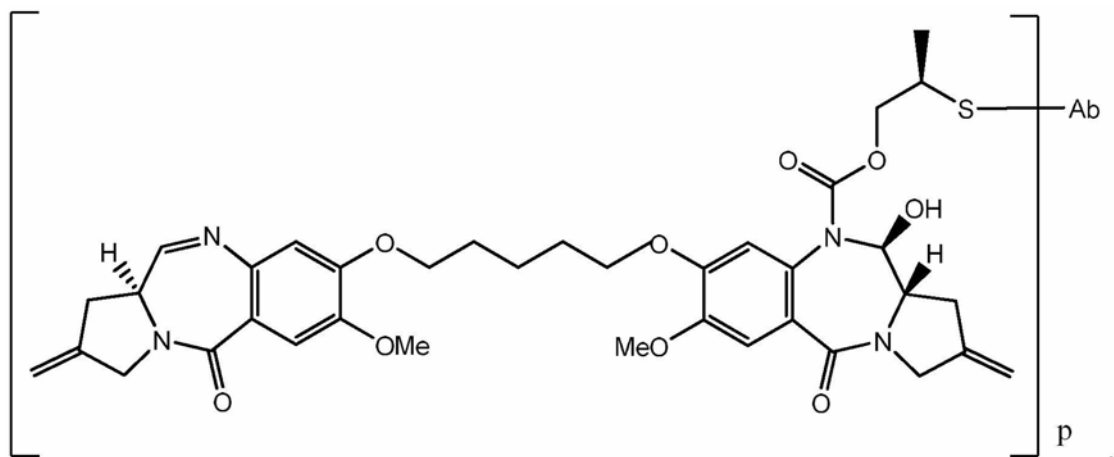


19. 权利要求14的免疫缀合物，其中D为奈莫柔比星衍生物。

20. 权利要求19的免疫缀合物，其中D具有结构：



21. 权利要求14的免疫缀合物，其中所述免疫缀合物具有结构：



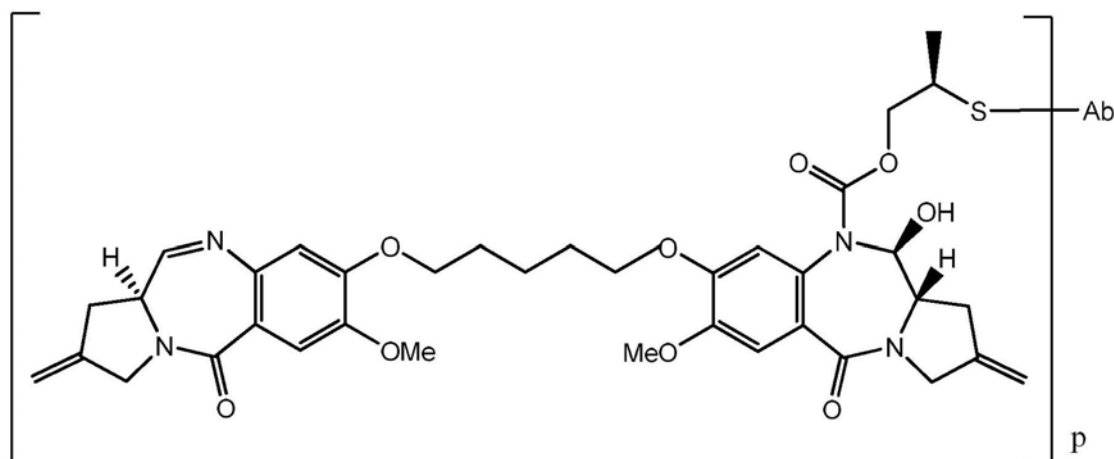
22. 权利要求14至21中任一项的免疫缀合物, 其中p在2-5范围内。

23. 权利要求14至21中任一项的免疫缀合物, 其中p为1。

24. 权利要求14至21中任一项的免疫缀合物, 其中p为2。

25. 权利要求14至24中任一项的免疫缀合物, 其中Ab包含位于轻链在根据Kabat编号的K149C处的工程改造的游离半胱氨酸且其中Ab为IgG1抗体。

26. 一种免疫缀合物, 其具有结构:

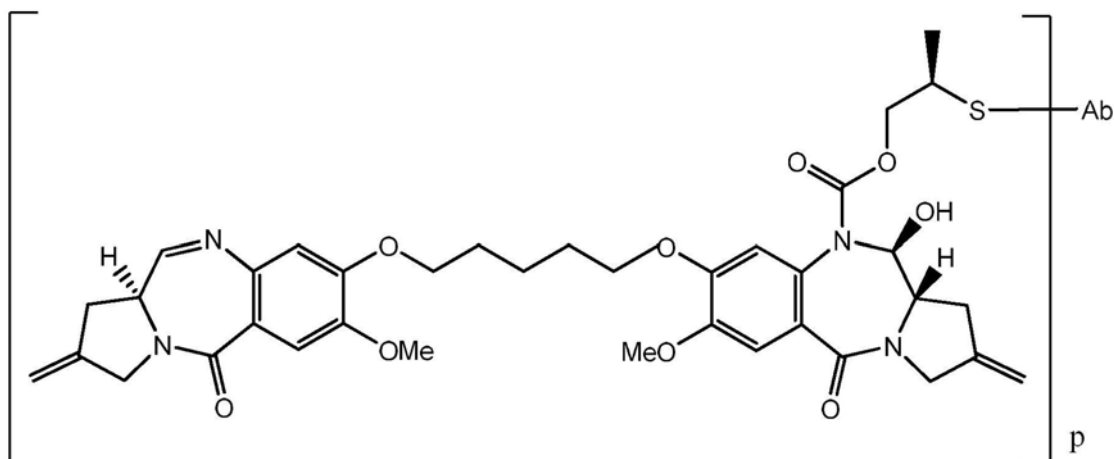


其中Ab为分离的单克隆抗-CLL-1抗体, 其中所述抗体包含 (a) 如SEQ ID NO:8的氨基酸序列所示的HVR-H1; (b) 如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HVR-H2; (c) 如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的HVR-H3; (d) 如SEQ ID NO:5的氨基酸序列所示的HVR-L1; (e) 如SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的HVR-L2; 和 (f) 如SEQ ID NO:7的氨基酸序列所示的HVR-L3;

其中所述抗体包含位于轻链在根据Kabat编号的K149C处的工程改造的游离半胱氨酸;
且

其中p为2。

27. 一种免疫缀合物, 其具有结构:



其中Ab为分离的单克隆抗-CLL-1抗体,其中所述抗体包含(a)如SEQ ID NO:8的氨基酸序列所示的HVR-H1;(b)如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HVR-H2;(c)如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的HVR-H3;(d)如SEQ ID NO:5的氨基酸序列所示的HVR-L1;(e)如SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的HVR-L2;和(f)如SEQ ID NO:7的氨基酸序列所示的HVR-L3;

其中所述抗体包含位于轻链在根据Kabat编号的K149C处的工程改造的游离半胱氨酸;
且

其中p为1。

28. 权利要求26或权利要求27的免疫缀合物,其中所述抗体为人源化抗体。

29. 权利要求26至28中任一项的免疫缀合物,其中所述抗体为IgG1、IgG2a或IgG2b抗体。

30. 权利要求29的抗体,其中所述抗体为IgG1抗体。

31. 一种药物制剂,其包含权利要求14至30中任一项的免疫缀合物及药学上可接受的载体。

32. 权利要求31的药物制剂,其进一步包含其他治疗剂。

33. 权利要求32的药物制剂,其中所述其他治疗剂选自5-氮杂胞苷或地西他滨。

34. 权利要求33的药物制剂,其中所述其他治疗剂为5-氮杂胞苷。

35. 权利要求33的药物制剂,其中所述其他治疗剂为地西他滨。

36. 权利要求14至30中任一项的免疫缀合物或权利要求31至35中任一项的药物制剂在制备用于治疗患有CLL-1阳性癌症的个体的药物中的用途。

37. 权利要求36的用途,其中所述CLL-1阳性癌症为AML。

38. 权利要求14至30中任一项的免疫缀合物在制备用于在抑制CLL-1阳性细胞增殖的体外方法中使用的药物中的用途,所述方法包括在容许权利要求14至30中任一项的免疫缀合物与所述细胞表面上的CLL-1结合的条件下将所述细胞暴露于所述免疫缀合物,由此抑制所述细胞的增殖。

39. 权利要求38的用途,其中所述细胞为AML癌细胞。

40. 权利要求1至9中任一项的抗体,其与标记缀合。

41. 权利要求40的抗体,其中所述标记为正电子发射体。

42. 权利要求41的抗体,其中所述正电子发射体为⁸⁹Zr。

43. 权利要求1至9中任一项的抗-CLL-1抗体在制备用于在检测生物样品中人CLL-1的

体外方法中使用的试剂盒中的用途,所述方法包括使所述生物样品与权利要求1至9中任一项的抗-CLL-1抗体在容许所述抗-CLL-1抗体与天然存在的人CLL-1结合的条件下接触,且检测所述抗-CLL-1抗体与所述生物样品中天然存在的人CLL-1之间是否形成复合物。

44. 权利要求43的用途,其中所述生物样品为AML癌症样品。

45. 权利要求1至9中任一项的抗-CLL-1抗体在制备用于在检测受试者中CLL-1阳性癌症的方法中使用的试剂盒中的用途,所述方法包括 (i) 向患有或怀疑患有CLL-1阳性癌症的受试者施用经标记的抗-CLL-1抗体,其中所述经标记的抗-CLL-1抗体包括权利要求1至9中任一项的抗-CLL-1抗体,和 (ii) 检测所述受试者中经标记的抗-CLL-1抗体,其中检测到经标记的抗-CLL-1抗体指示所述受试者中的CLL-1阳性癌症。

46. 权利要求45的用途,其中所述经标记的抗-CLL-1抗体包括与正电子发射体结合的抗-CLL-1抗体。

47. 权利要求46的用途,其中所述正电子发射体为⁸⁹Zr。

抗-CLL-1抗体和免疫缀合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2014年9月12日提交的美国临时申请第62/049876号的优先权,将其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有经由EFS-Web提交且通过全文引用的方式并入本文中的序列表。于2015年8月31日创建的该ASCII拷贝名称为P32314-WO_SL_txt.txt且大小为42,697个字节。

技术领域

[0005] 本发明涉及抗-CLL-1抗体和免疫缀合物及其使用方法。

背景技术

[0006] CLL-1 (也称为CLEC12A、MICL和DCAL2) 编码C型凝集素/C型凝集素样域 (CTL/CTLD) 超家族的一员。此家族的成员共享共同蛋白质折叠且具有不同的功能,诸如细胞黏附、细胞-细胞信号传导、糖蛋白转换及在炎症和免疫反应中的作用。CLL-1已展示包含单一C型凝集素样域(预测其不结合钙或糖)、茎区、跨膜域和含有ITIM模序的短胞质尾的II型跨膜受体。此外,CLL-1存在于正常外周血液和骨髓(BM)中的单核细胞和粒细胞上,而不存在于非血液组织中。CLL-1还在急性骨髓白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)和慢性骨髓白血病(CML)细胞上表达。具体而言,CLL-1为在CD34阳性(CD34+) AML中的一部分CD34+CD38-AML细胞上表达的白血病干细胞(LSC)相关表面抗原。

[0007] 基于单克隆抗体(mAb)的疗法已变成癌症的重要治疗形式。白血病非常适合此方法,因为血液、骨髓、脾和淋巴结中的恶性细胞可接近性,且造血分化的各种谱系和阶段具有定义明确的免疫表型,其允许鉴别抗原靶标。大部分急性骨髓白血病(AML)研究集中于CD33上。然而,使用未缀合抗-CD33mAb林妥珠单抗(lintuzumab)的响应已具有针对AML的适度单一药剂和活性,且当与常规化学疗法组合时未能在两个随机化试验中改善患者结果。

[0008] 本领域需要靶向包括CLL-1的AML的安全且有效的药剂,以诊断并治疗CLL-1相关病症,诸如癌症。本发明实现此需要并提供其他益处。

发明内容

[0009] 本发明提供抗-CLL-1抗体和免疫缀合物及其使用方法。

[0010] 本文提供分离的单克隆抗-CLL-1抗体,其中所述抗体结合包含SEQ ID NO:49的氨基酸的表位和/或结合包含SEQ ID NO:49的重叠表位且不结合包含SEQ ID NO:50和/或SEQ ID NO:51的表位。在一些实施方案中,抗-CLL-1抗体结合包含SEQ ID NO:49的氨基酸的表位。在一些实施方案中,抗-CLL-1抗体结合由SEQ ID NO:49的氨基酸组成或基本上由SEQ ID NO:49的氨基酸组成的表位。在一些实施方案中,表位通过羟基自由基足迹法(hydroxyl radical footprinting)确定。

[0011] 本文进一步提供分离的结合于CLL-1的抗体,其中所述抗体包含(a)包含SEQ ID

NO:8的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H2。在一些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-H2。在一些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H2。在一些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-H2。在一些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-H2。

[0012] 在一些实施方案中,所述抗体含有: (a) 包含SEQ ID NO:33的序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变区; (b) 包含SEQ ID NO:34的序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变区; (c) 包含SEQ ID NO:46的序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变区; 或 (d) 包含SEQ ID NO:48的序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:48的序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗体含有包含SEQ ID NO:34的序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:32的序列的轻链可变区。

[0013] 本文还提供分离的结合于CLL-1的抗体,其中所述抗体包含 (a) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,所述抗体包含 (a) 包含SEQ ID NO:38的序列的重链可变区和 (b) 包含SEQ ID NO:37的序列的轻链可变区。

[0014] 在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于重组人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于重组食蟹猴 (*cynomolgus monkey*) CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于人外周血液单核细胞 (PBMC) 的表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于食蟹猴PBMC的表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于癌细胞表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于AML癌细胞表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于HL-60细胞的表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于EOL-1细胞表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于包含K244Q突变的CLL-1 (具有K244Q的SEQ ID NO:1)。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合包含SEQ ID NO:49的氨基酸的表位和/或结合包含SEQ ID NO:49的重叠表位。在任一抗体的一些实施方案中,抗体不结合包含SEQ ID NO:50和/或SEQ ID NO:51的表位。在任一抗体的一些实施方案中,抗体与R&D System克隆687317抗体竞争结合人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体以小于15nM、小于10nM、小于7nM、小于5nM或小于3nM的Kd结合于内源性人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体以小于10nM、小于7nM、小于5nM或小于3nM的Kd结合于重组人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体以小于10nM、小于7nM、小于5nM或小于3nM、小于2nM或小于1nM的Kd结合于重组食蟹猴CLL-1。

[0015] 在任一抗体的一些实施方案中,抗体包含一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基

酸残基。在一些实施方案中,一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基位于轻链中。在一些实施方案中,轻链中的一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基包含根据Kabat编号的V205C。在一些实施方案中,轻链中的一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基包含根据Kabat编号的K149C。在一些实施方案中,一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基位于重链中。在一些实施方案中,重链中的一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基包含根据EU编号的A118C。在一些实施方案中,重链中的一或多个工程改造的游离半胱氨酸氨基酸残基包含根据EU编号的S400C。

[0016] 在任一抗体的一些实施方案中,抗体为单克隆抗体。在任一抗体的一些实施方案中,抗体为人或嵌合抗体。在任一抗体的一些实施方案中,抗体为结合CLL-1的抗体片段。在任一抗体的一些实施方案中,抗体为IgG1、IgG2a或IgG2b抗体。

[0017] 本文进一步提供编码本文所述的抗体的分离核酸。本文还提供包含编码本文所述的抗体的核酸的宿主细胞。本文还提供产生抗体的方法,其包含培养包含编码本文所述的抗体的核酸的宿主细胞,从而产生抗体。

[0018] 本文提供包含本文所述的抗体和细胞毒性剂的免疫缀合物。具体而言,本文提供具有式Ab-(L-D)_p的免疫缀合物,其中:

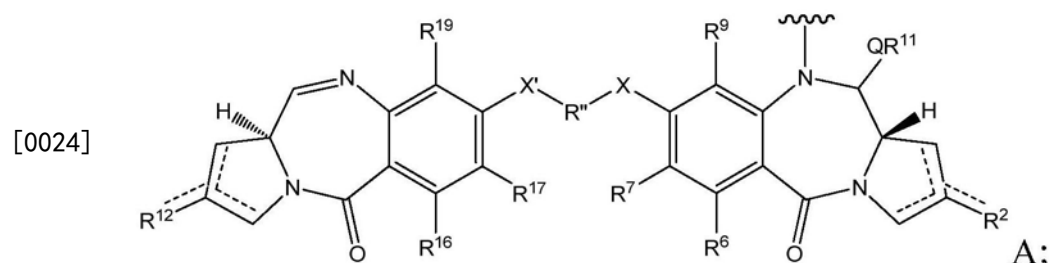
[0019] (a) Ab为本文所述的抗体;

[0020] (b) L为接头;

[0021] (c) D为细胞毒性剂且所述细胞毒性剂为药物;且

[0022] (d) p在1-8范围内。

[0023] 在任一免疫缀合物的一些实施方案中,细胞毒性剂选自类美登素(maytansinoid)、卡奇霉素(calicheamicin)、吡咯并苯并二氮草和奈莫柔比星(nemorubicin)衍生物。在任一免疫缀合物的一些实施方案中,D为式A的吡咯并苯并二氮草:



[0025] 其中虚线表示C1与C2或C2与C3之间任选存在双键;

[0026] R^2 独立地选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R和COR,且任选还选自卤素或二卤素,其中R^D独立地选自R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H和卤素;

[0027] R^6 和 R^9 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn和卤素;

[0028] R^7 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn和卤素;

[0029] Q独立地选自O、S和NH;

[0030] R^{11} 为H或R,或其中Q为O、SO₃M,其中M为金属阳离子;

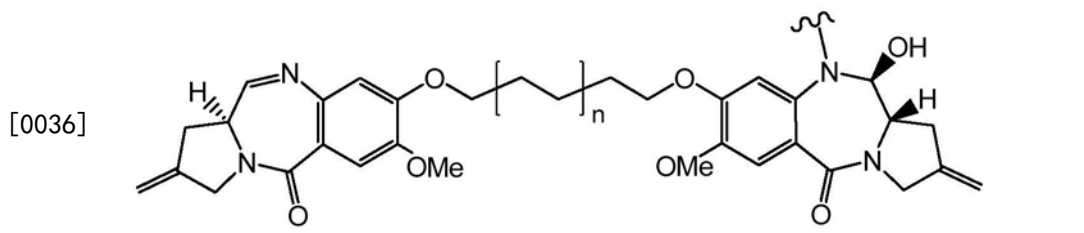
[0031] R和R'各独立地选自任选经取代的C₁₋₈烷基、C₃₋₈杂环基和C₅₋₂₀芳基,且任选关于基团NRR',R和R'连同其附接的氮原子一起形成任选经取代的4、5、6或7员杂环;

[0032] R^{12} 、 R^{16} 、 R^{19} 和 R^{17} 分别针对 R^2 、 R^6 、 R^9 和 R^7 所定义;

[0033] R''为C₃₋₁₂亚烷基,所述链可杂有一或多个杂原子和/或任选经取代的芳环;且

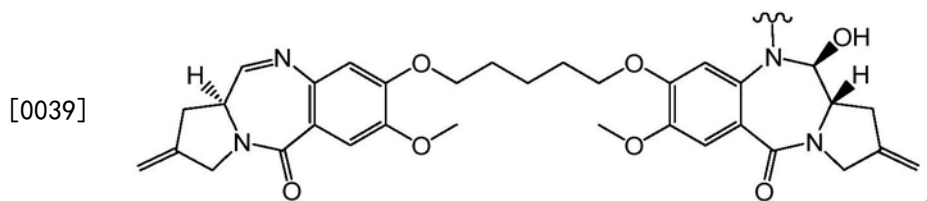
[0034] X和X'独立地选自O、S和N(H)。

[0035] 在任一免疫缀合物的一些实施方案中,D具有以下结构:

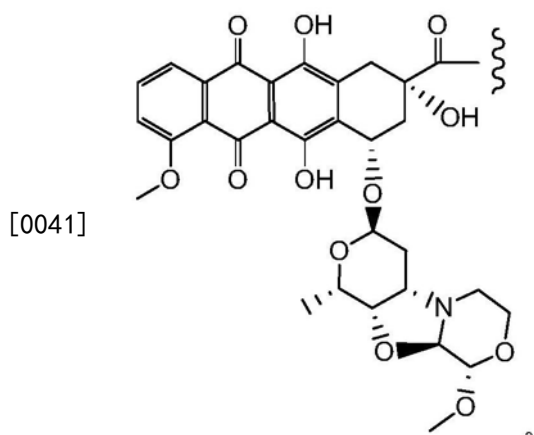


[0037] 其中n为0或1。

[0038] 在任一免疫缀合物的一些实施方案中,D具有以下结构:

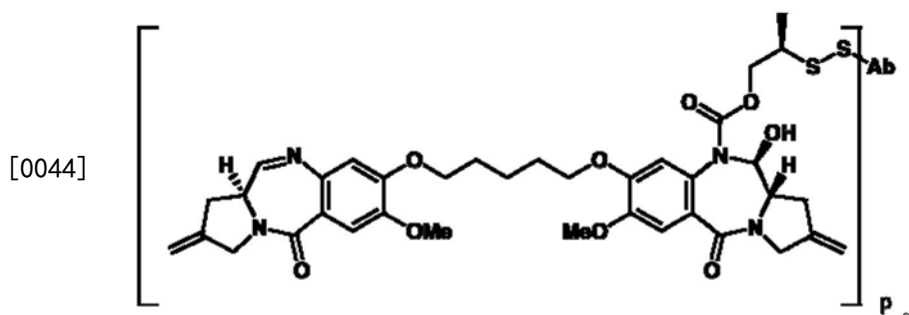


[0040] 在任一免疫缀合物的一些实施方案中,D为奈莫柔比星衍生物。在任一免疫缀合物的一些实施方案中,D具有以下结构:



[0042] 在任一免疫缀合物的一些实施方案中,L可通过蛋白酶裂解。在任一免疫缀合物的一些实施方案中,L对酸为不稳定的。在任一免疫缀合物的一些实施方案中,L包含脲。

[0043] 在任一免疫缀合物的一些实施方案中,免疫缀合物具有结构:



[0045] 在任一免疫缀合物的一些实施方案中,p在2-5范围内。

[0046] 在一些实施方案中,提供药物制剂。在一些实施方案中,药物制剂包含本文所述的免疫缀合物和药学上可接受的载体(carrier)。在一些实施方案中,药物制剂进一步包含其他治疗剂。在一些实施方案中,其他治疗剂为蒽环类(anthracycline)。在一些实施方案中,

蒽环类为道诺霉素 (daunorubicin) 或伊达比星 (idarubicin)。在一些实施方案中,其他治疗剂为阿糖胞苷 (cytarabine)。在一些实施方案中,其他治疗剂为克拉屈滨 (cladribine)。在一些实施方案中,其他治疗剂为氟达拉滨 (fludarabine) 或拓扑替康 (topotecan)。在一些实施方案中,其他治疗剂为5-氮杂胞苷 (5-azacytidine) 或地西他滨 (decitabine)。

[0047] 在一些实施方案中,提供治疗方法。在一些实施方案中,提供治疗CLL-1阳性癌症的方法。在一些实施方案中,治疗方法包括向个体施用有效量的本文所述的免疫缀合物或本文所述的药物制剂。在一些实施方案中,所述癌症为癌症。在一些实施方案中,癌症为急性骨髓白血病 (AML)、慢性骨髓白血病 (CML) 和/或骨髓发育不良综合征 (MDS)。在一些实施方案中,癌症为CLL-1阳性。在一些实施方案中,CLL-1阳性癌症为AML。在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用其他治疗剂。在一些实施方案中,其他治疗剂为蒽环类。在一些实施方案中,蒽环类为道诺霉素或伊达比星。在一些实施方案中,其他治疗剂为阿糖胞苷。在一些实施方案中,其他治疗剂为克拉屈滨。在一些实施方案中,其他治疗剂为氟达拉滨或拓扑替康。在一些实施方案中,其他治疗剂为5-氮杂胞苷或地西他滨。

[0048] 在任一方法的一些实施方案中,所述方法进一步包括向所述个体施用PD-1轴结合拮抗剂或其他治疗剂。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂为PD-L2结合拮抗剂。

[0049] 在一些实施方案中,提供抑制CLL-1阳性细胞的增殖的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在容许免疫缀合物结合于细胞表面上的CLL-1的条件下将细胞暴露于本文所述的免疫缀合物,由此抑制细胞增殖。在一些实施方案中,细胞为AML癌细胞。

[0050] 在一些实施方案中,提供一种检测生物样品中的人CLL-1的方法。在一些实施方案中,一种方法包括使生物样品与抗-CLL-1抗体在容许抗-CLL-1抗体结合于天然存在的人CLL-1的条件下接触,且检测抗-CLL-1抗体与该生物样品中天然存在的人CLL-1之间是否形成复合物。在一些实施方案中,抗-CLL-1抗体为本文所述的抗体。在一些实施方案中,生物样品为AML癌症样品。

[0051] 在一些实施方案中,提供一种检测CLL-1阳性癌症的方法。在一些此类实施方案中,一种方法包括:(i) 向患有或怀疑患有CLL-1阳性癌症的个体施用经标记的抗-CLL-1抗体,和(ii) 检测该个体中经标记的抗-CLL-1抗体,其中检测该经标记的抗-CLL-1抗体指示该个体中的CLL-1阳性癌症。在一些实施方案中,抗-CLL-1抗体为本文所述的抗体。在一些此类实施方案中,经标记的抗-CLL-1抗体包含与正电子发射体结合的抗-CLL-1抗体。在一些实施方案中,正电子发射体为⁸⁹Zr。

[0052] 附图简述

[0053] 图1A-1B展示鼠类 (m) 6E7、m21C9、m20B1和m28H12的轻链可变区序列(A) 和重链可变区序列(B) 的比对。

[0054] 图2A-2B展示K1H1、m6E7、人源化 (h) 6E7.L4H1e和h6E7.L4H1e.A54的轻链可变区序列(A) 和重链可变区序列(B) 的比对。

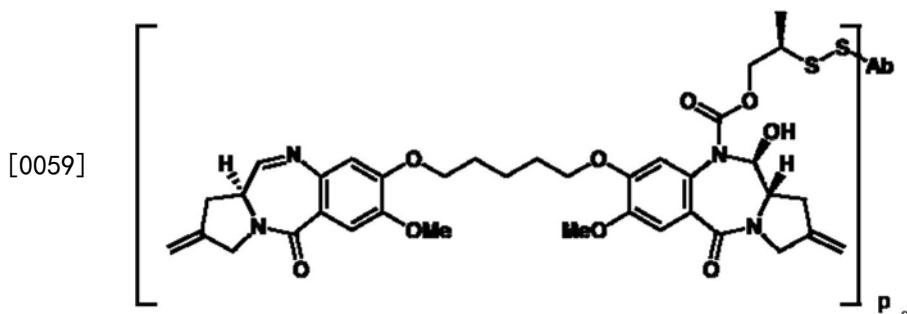
[0055] 图3A-3B展示K1H1、m21C9和h21C9.L2H3的轻链可变区序列(A) 和重链可变区序列(B) 的比对。

[0056] 图4展示在EOL-1异种移植模型中用经由在根据EU编号氨基酸残基118经半胱氨酸

工程改造的重链 (A118C) 缀合于PNU的ch21C9、ch3H10、ch28H12、ch20B1和ch6E7以 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 处理后,随时间推移肿瘤体积的改变(mm^3)。

[0057] 图5展示在HL-60异种移植模型中用经由在根据EU编号氨基酸残基118经半胱氨酸工程改造的重链 (A118C) 缀合于PNU的ch21C9、ch3H10、ch28H12、ch20B1和ch6E7以 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 处理后,随时间推移肿瘤体积的改变(mm^3)。

[0058] 图6展示在HL-60异种移植模型中用在根据EU编号氨基酸残基118经半胱氨酸工程改造的重链 (A118C) 或根据Kabat编号氨基酸残基号149经半胱氨酸工程改造的轻链 (K149C) 缀合于PBD (SG34) 的人源化抗体6E7.L4H1e或21C9.L2H3以 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 或 $20\mu\text{g}/\text{m}^2$ 处理后,随时间推移肿瘤体积的改变(mm^3)。以下展示缀合于SG34的抗体的结构:



[0060] 图7展示在HL-60异种移植模型中用在根据Kabat编号氨基酸残基号149经半胱氨酸工程改造的轻链 (K149C) 缀合于PBD (SG34) 的人源化抗体6E7.L4H1e或6E7.L4H1eN54A以 $5\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ 或 $20\mu\text{g}/\text{m}^2$ 处理后,随时间推移肿瘤体积的改变(mm^3)。

具体实施方式

[0061] I. 定义

[0062] 出于本文的目的,“受体人框架”为包含来源于如以下所定义的人免疫球蛋白框架或人共有框架的轻链可变域 (VL) 框架或重链可变域 (VH) 框架的氨基酸序列的框架。“来源于”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含人免疫球蛋白框架或人共有框架的相同氨基酸序列,或其可含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目为10个或10个以下、9个或9个以下、8个或8个以下、7个或7个以下、6个或6个以下、5个或5个以下、4个或4个以下、3个或3个以下、或2个或2个以下。在一些实施方案中,VL受体人框架序列与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列一致。

[0063] “亲和力”是指分子 (例如抗体) 的单一结合位点与其结合搭配物 (例如抗原) 之间的非共价相互作用之总和之强度。除非另外指明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对 (例如抗体与抗原) 成员之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其搭配物Y的亲和力一般可由解离常数 (K_d) 表示。可通过本领域已知的常用方法 (包括本文所述的方法) 测量亲和力。用于测量结合亲和力的特定说明性和示例性实施方案描述于下文中。

[0064] “亲和力成熟”抗体是指相较于在一或多个高变区 (HVR) 中不具有一或多个变化的亲本抗体,具有此类变化的抗体,此类变化使抗体对抗原的亲和力得到提高。

[0065] 术语“抗-CLL-1抗体”和“结合于CLL-1的抗体”是指能够以足够亲和力结合CLL-1的抗体,使得抗体可用作靶向CLL-1中的诊断和/或治疗剂。在一个实施方案中,如例如通过放射免疫测定 (RIA) 所测量,抗-CLL-1抗体与不相关的非CLL-1蛋白质的结合程度小于该抗

体与CLL-1的结合的约10%。在某些实施方案中,结合于CLL-1的抗体的解离常数(Kd) $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 5\text{nM}$ 、 $\leq 4\text{nM}$ 、 $\leq 3\text{nM}$ 、 $\leq 2\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在某些实施方案中,抗-CLL-1抗体结合于在来自不同物种的CLL-1中保守的CLL-1的表位。

[0066] 术语“抗体”在本文中以最广泛意义使用且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们展现期望的抗原结合活性。

[0067] “抗体片段”是指除完整抗体外的分子,其包含完整抗体的一部分,且结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双功能抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0068] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常特征为不受调控细胞生长/增殖的生理病状。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤(例如霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)和非霍奇金氏淋巴瘤)、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体实例包括急性骨髓白血病(AML)、骨髓发育不良综合征(MDS)、慢性骨髓白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病、急性前髓细胞性白血病(APL)、慢性骨髓增生病症、血小板性白血病、前体B细胞急性成淋巴细胞白血病(pre-B-ALL)、前体T细胞急性成淋巴细胞白血病(preT-ALL)、多发性骨髓瘤(MM)、肥大细胞疾病、肥大细胞白血病、肥大细胞肉瘤、骨髓肉瘤、淋巴性白血病和未分化白血病。在一些实施方案中,癌症为骨髓白血病。在一些实施方案中,癌症为急性骨髓白血病(AML)。

[0069] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同来源或物种的抗体。

[0070] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定域或恒定区的类型。抗体存在五种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,且其中若干者可进一步分成亚类(同工型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0071] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指抑制或预防细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱(长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道诺霉素或其他插入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,包括其片段和/或变体;以及以下所披露的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0072] “效应功能”是指可归因于抗体的Fc区的那些生物活性,其随抗体同工型变化。抗体效应功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;和B细胞活化。

[0073] 药剂(例如药物制剂)的“有效量”是指以所需剂量和持续所需时间段有效达成期望治疗或预防结果的量。

[0074] 术语“表位”是指抗体结合的抗原分子上的特定位点。在一些实施方案中,抗体结合的抗原分子上的特定位点通过羟基自由基足迹法确定。

[0075] 本文中的术语“Fc区”用于定义含有至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C末端区。该术语包括天然序列Fc区和变异Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区自Cys226或自Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C末端赖氨酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文另外说明,否则Fc区或恒定区中氨基酸残基的编号依据EU编号系统,也称为EU索引,如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0076] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基外的可变域残基。可变域的FR一般由四个FR域:FR1、FR2、FR3和FR4组成。因此,在VH(或VL)中HVR和FR序列一般以如下序列出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0077] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用且是指结构基本上类似于天然抗体结构或具有含有如本文所定义的Fc区的重链的抗体。

[0078] 术语“CLL-1的糖基化形式”是指通过添加碳水化合物残基而经翻译后修饰的CLL-1的天然存在的形式。

[0079] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用且是指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转型体”和“转型细胞”,其包括初级转型细胞及自其衍生的子代(不考虑传代次数)。子代的核酸含量可与亲本细胞不完全相同,且可能含有突变。本文包括如针对原始转型细胞筛选或选择,具有相同功能或生物活性的突变子代。

[0080] “人抗体”为氨基酸序列对应于由人或人细胞产生或来源于利用人抗体谱或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义特定排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0081] “人共有框架”为表示一系列人免疫球蛋白VL或VH框架序列中最常出现的氨基酸残基的框架。一般而言,人免疫球蛋白VL或VH序列选自可变域序列的亚组。一般而言,序列亚组为如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),第1-3卷中的亚组。在一个实施方案中,对于VL,亚组为如Kabat等,前述中的亚组κI。在一个实施方案中,对于VH,亚组为如Kabat等,前述中的亚组III。

[0082] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变域的基本上全部,其中全部或基本上全部HVR(例如CDR)均对应于非人抗体的HVR,且全部或基本上全部FR皆对应于人抗体的FR。人源化抗体任选可包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经受人源化的抗体。

[0083] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变域中在序列上具有高变性和/或形成结构上定义的环(“高变环”)的各区域。一般而言,天然四链抗体包含六个HVR;三个位于VH中(H1、H2、H3),且三个位于VL中(L1、L2、L3)。HVR一般包含来自高变环和/或来自互补决定区(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高的序列可变性和/或与抗原识别相关。示例性高变环出现在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101

(H3) (Chothia和Lesk, J.Mol.Biol.196:901-917 (1987))。示例性CDR (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3) 出现在L1的氨基酸残基24-34、L2的氨基酸残基50-56、L3的氨基酸残基89-97、H1的氨基酸残基31-35B、H2的氨基酸残基50-65和H3的氨基酸残基95-102 (Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。除VH中的CDR1之外, CDR一般包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”, 其为接触抗原的残基。SDR含于缩写称为-CDR或a-CDR的CDR区域内。示例性a-CDR (a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2和a-CDR-H3) 出现在L1的氨基酸残基31-34、L2的氨基酸残基50-55、L3的氨基酸残基89-96、H1的氨基酸残基31-35B、H2的氨基酸残基50-58和H3的氨基酸残基95-102 (参见Almagro及Fransson, Front.Biosci.13:1619-1633 (2008))。除非另外指示, 否则在本文中根据前述Kabat等对可变域中的HVR残基和其他残基 (例如FR残基) 进行编号。

[0084] “免疫缀合物”为缀合于一或多个异源分子, 包括但不限于细胞毒性剂的抗体。

[0085] “个体”或“受试者”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于家养动物 (例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物 (例如人和非人灵长类动物, 诸如猴)、家兔、和啮齿动物 (例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中, 所述个体或受试者为人。

[0086] “分离抗体”为已与其天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中, 抗体纯化至大于95%或99%的纯度, 如通过例如电泳 (例如SDS-PAGE、等电聚焦 (IEF)、毛细管电泳) 或色谱 (例如离子交换或反相HPLC) 所确定。关于抗体纯度评估方法的综述, 参见例如Flatman等, J.Chromatogr.B 848:79-87 (2007)。

[0087] “分离核酸”是指已与其天然环境的组分分离的核酸分子。分离核酸包括通常含有核酸分子的细胞中所含的核酸分子, 但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置。

[0088] “编码抗-CLL-1抗体的分离核酸”是指编码抗体重链和轻链 (或其片段) 的一或多种核酸分子, 包括单一载体 (vector) 或分开载体中的此类核酸分子和存在于宿主细胞中的一或多个位置的此类核酸分子。

[0089] 如本文所用, 术语“CLL-1”是指由细胞中CLL-1前体蛋白的加工所产生的任何天然成熟的CLL-1。除非另外指示, 否则该术语包括来自任何脊椎动物来源, 包括哺乳动物, 诸如灵长类动物 (例如人和食蟹猴) 和啮齿动物 (例如小鼠和大鼠) 的CLL-1。该术语还包括天然存在的CLL-1变体, 例如剪接变体或等位基因变体。一示例性人CLL-1蛋白的氨基酸序列展示在SEQ ID NO:1中。在一些实施方案中, 人CLL-1蛋白质序列包含K244Q SNP (SEQ ID NO:1, 其中K244为Q)。一示例性细胞外域的氨基酸序列为SEQ ID NO:2的氨基酸。一示例性C型凝集素样域 (CTLD) 的氨基酸序列为SEQ ID NO:3的氨基酸。一示例性食蟹猴CLL-1蛋白质的氨基酸序列示于SEQ ID NO:4中。

[0090] 术语“CLL-1阳性癌症”是指包含在其表面上表达CLL-1的细胞的癌症。在一些实施方案中, 细胞表面上CLL-1的表达例如在诸如免疫组织化学、FACS等方法中使用CLL-1的抗体来确定。或者, 认为CLL-1mRNA表达与细胞表面上CLL-1表达相关且可通过选自原位杂交和RT-PCR (包括定量RT-PCR) 的方法确定。

[0091] 术语“CLL-1阳性细胞”是指在其表面上表达CLL-1的细胞。

[0092] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指自基本上均质抗体的群体获得的抗体,即除可能变异抗体(例如含有天然存在的突变或在产生单克隆抗体制剂期间出现的变异抗体,此类变体一般以较小量存在)之外,构成该群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。相比于通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂,单克隆抗体制剂的各单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。因此,修饰语“单克隆”指示抗体如自基本上均质的抗体群体获得的性质,且不应理解为需要通过任何特定方法产生该抗体。举例而言,根据本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术制得,包括但不限于融合瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有所有或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,此类方法及其他制备单克隆抗体的示例性方法在本文中描述。

[0093] “裸抗体”是指未与异源部分(例如细胞毒性部分)或放射性标记结合的抗体。裸抗体可存在于药物制剂中。

[0094] “天然抗体”是指具有变化结构的天然存在的免疫球蛋白分子。举例而言,天然IgG抗体为约150,000道尔顿(dalton)的杂四聚体糖蛋白,其由二硫化物键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。自N末端至C末端,各重链具有可变区(VH),也称为可变重链域或重链可变域,接着为三个恒定域(CH1、CH2和CH3)。类似地,自N末端至C末端,各轻链具有可变区(VL),也称为可变轻链域或轻链可变域,接着为恒定轻链(CL)域。抗体轻链可基于其恒定域的氨基酸序列归为两种类型中的一种,称为 κ 和 λ 。

[0095] 术语“包装插页”用于指通常包括于治疗性产品的商业包装中的说明书,其含有关于适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、与使用此类治疗性产品有关的禁忌症和/或警告的信息。

[0096] 相对于参考多肽序列的“氨基酸序列一致性百分比(%)”定义为在比对参考多肽序列与候选序列且必要时引入间隙以达成最大序列一致性百分比之后,且在不将保守性取代视为序列一致性的一部分的情况下,候选序列中与参考多肽序列中的氨基酸残基一致的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列一致性百分比的目的之比对可以本领域技术范围内的多种方式达成,例如使用公开可获得的电脑软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较序列的全长内达成最大比对所需的任何演算法。然而,出于本文的目的,使用序列比较电脑程序ALIGN-2产生氨基酸序列一致性%值。ALIGN-2序列比较电脑程序由Genentech, Inc. 设计,且源代码已在U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559提交用户文档,其中其注册在美国版权注册第TXU510087号下。ALIGN-2程序可公开获自Genentech, Inc., South San Francisco, California, 或可自源代码编写。ALIGN-2程序应经编写可用于UNIX操作系统,包括数字化UNIX V4.0D。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变化。

[0097] 在采用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情形下,既定氨基酸序列A相对于、与或针对既定氨基酸序列B的氨基酸序列一致性%(或者其可表述为,既定氨基酸序列A具有或包含相对于、与或针对既定氨基酸序列B的氨基酸序列一致性一定%)如下计算:

[0098] $100 \times \text{分数} X/Y$

[0099] 其中X为在A与B的比对程序中通过序列比对程序ALIGN-2如一致匹配所评分的氨基酸残基数目,且其中Y为B中的氨基酸残基的总数目。应当理解的是,在氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等的情况下,A相对于B的氨基酸序列一致性%将不等于B相对

于A的氨基酸序列一致性%。除非另外特定陈述,否则本文所使用的所有氨基酸序列一致性%值如刚刚前段中所描述使用ALIGN-2电脑程序获得。

[0100] 术语“药物制剂”是指所呈形式允许其中所含活性成分的生物活性有效发挥,且不含对制剂将施用的个体具有不可接受毒性的其他组分的制剂。

[0101] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分之外对个体无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0102] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变化形式,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指试图改变所治疗个体的自然病程的临床介入且可出于防治目的或在临床病理学的病程期间进行。期望治疗作用包括但不限于预防疾病发生或复发、缓解症状、减轻疾病的任何直接或间接病理性后果、预防转移、减缓疾病进展速率、改善或缓和疾病状态及缓解或改善预后。在一些实施方案中,本发明的抗体用于延迟疾病发展或减慢疾病进展。

[0103] “化学治疗剂”是指可用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的实例包括烷基化剂,诸如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide) (**CYTOXAN®**); 烷基磺酸盐,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮杂环丙烷类,诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa); 乙烯亚胺类和甲基三聚氰胺类,包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基三聚氰胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基三聚氰胺; 多聚乙酰(尤其布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚(dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕酮; 拉帕醇; 秋水仙碱; 桦木酸; 喜树碱(包括合成模拟物拓扑替康(**HYCAMTIN®**))、CPT-11(伊立替康(irinotecan, **CAMPTOSAR®**))、乙酰基喜树碱(acetylcamptothecin)、东莨菪素(scopolectin)和9-氨基喜树碱; 苔藓虫素(bryostatin); 海洋抑素(callystatin); CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin))、卡折来新(carzelesin) 华润比折来新(bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素(podophyllotoxin); 鬼臼酸; 替尼泊苷(teniposide); 念珠藻环肽(cryptophycin) (尤其克瑞托欣(cryptophycin) 1和克瑞托欣8); 多拉司他汀(dolastatin); 倍癌霉素(duocarmycin) (包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1); 艾榴塞洛素(eleutherobin); pancratiostatine; 匍枝珊瑚醇(sarcodictyin); 海绵抑素(spongistatin); 氮芥, 诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(chlorophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、二氯甲基二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、松龙苯芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝基脲, 诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine); 抗生素, 诸如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素(calicheamicin), 尤其卡奇霉素 γ 11和卡奇霉素 Ω 11 (参见例如 Nicolaou等, Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); CDP323、口服 α -4整合素抑制剂; 达米辛(dynemicin), 包括达米辛A; 埃斯培拉霉素(esperamicin); 以及新抑癌蛋白发

色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放射菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素d(dactinomycin)、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括**ADRIAMYCIN®**)、吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉子基-多柔比星、多柔比星HCl脂质体注射液(**DOXIL®**)、脂质体多柔比星TLC D-99(**MYOCET®**)、聚乙二醇化脂质体多柔比星(**CAELYX®**)和去氧多柔比星(deoxydoxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)(诸如丝裂霉素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、泊非罗霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、奎那霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链脲菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲氨蝶呤、吉西他滨(gemcitabine)(**GEMZAR®**)、替加氟(tegafur)(**UFTORAL®**)、卡培他滨(capecitabine)(**XELODA®**)、埃坡霉素(epothilone)和5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU);叶酸类似物,诸如迪诺特宁(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pterapterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫米嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素类,诸如卡鲁睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸盐(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitioastanol)、美雄烷(mepitioastane)、睾内酯;抗肾上腺剂,诸如胺鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸;乙酰葡萄糖;醛磷酸糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);贝斯布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);艾达曲克(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(elfornithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃坡霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲(hydroxyurea);蘑菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);类美登素,诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫比达摩(mopidanmol);二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰胺;丙卡巴肼(procarbazine);**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根瘤菌素(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2'-三氯三乙胺;单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)(尤其T-2毒素、疣孢霉素(verracurin)A、杆孢菌素(roridin)A和蛇形菌素(anguidine));尿烷(urethan);长春地辛

(vindesine) (**ELDISINE®**、**FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); 加西托星 (gacytosine); 阿拉伯糖苷 (arabinoside) ("Ara-C"); 噻替派; 紫杉醇 (taxoid), 例如太平洋紫杉醇 (**TAXOL®**)、太平洋紫杉醇和多西他赛 (docetaxel) (**TAXOTERE®**) 的经白蛋白工程改造的纳米粒制剂 (ABRAXANETM); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 6-硫代鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤; 铂剂, 诸如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) (例如 **ELOXATIN®**) 和卡铂; 长春花生物碱类 (vincas), 其防止微管蛋白聚合形成微管, 包括长春碱 (**VELBAN®**)、长春新碱 (**ONCOVIN®**)、长春地辛 (**ELDISINE®**、**FILDESIN®**) 和长春瑞宾 (**NAVELBINE®**); 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 甲酰四氢叶酸 (leucovorin); 诺凡特龙 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素; 氨基嘌呤 (aminopterin); 伊班膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine, DMFO); 类视黄素, 诸如视黄酸, 包括贝沙罗汀 (bexarotene) (**TARGRETIN®**); 双膦酸盐 (bisphosphonate), 诸如氯屈膦酸盐 (clodronate) (例如 **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、依替膦酸盐 (etidronate) (**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸 (zoledronic acid) / 唑来膦酸盐 (zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿仑膦酸盐 (alendronate) (**FOSAMAX®**)、帕米膦酸盐 (pamidronate) (**AREDIA®**)、替鲁膦酸盐 (tiludronate) (**SKELID®**) 或利塞膦酸盐 (risedronate) (**ACTONEL®**); 曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 尤其抑制与异常细胞增殖相关的信号传导通路中基因表达的反义寡核苷酸, 诸如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗, 诸如 **THERATOPE®** 疫苗和基因疗法疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗; 拓扑异构酶 1 抑制剂 (例如 **LURTOTECAN®**); rmRH (例如 **ABARELIX®**); BAY439006 (索拉非尼 (sorafenib); Bayer); SU-11248 (舒尼替尼 (sunitinib)、**SUTENT®**, Pfizer); 哌立福辛 (perifosine)、COX-2 抑制剂 ((例如塞来昔布 (celecoxib) 或依他昔布 (etoricoxib))、蛋白酶体抑制剂 (例如 PS341); 硼替佐米 (bortezomib) (**VELCADE®**); CCI-779; 替吡法尼 (tipifarnib) (R11577); 索拉非尼 (orafenib)、ABT510; Bcl-2 抑制剂, 诸如奥利默森钠 (oblimersen sodium) (**GENASENSE®**); 匹蒽醌 (pixantrone); EGFR 抑制剂 (参见以下定义); 酪氨酸激酶抑制剂; 丝氨酸-苏氨酸激酶抑制剂, 诸如雷帕霉素 (rapamycin) (西罗莫司 (sirolimus)、**RAPAMUNE®**); 法呢基转移酶抑制剂, 诸如洛那法尼 (lonafarnib) (SCH 6636、SARASARTM); 以及以上任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物; 以及以上药剂中的两者或两者以上的组合, 诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼龙的组合疗法的缩写); 以及 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATINTM) 与 5-FU 及甲酰四氢叶酸组合的治疗方案的缩写)。

[0104] 如本文所定义的化学治疗剂包括用来调节、减轻、阻断或抑制可促进癌症生长的

激素作用的“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”。其本身可为激素,包括但不限于:具有混合激动剂/拮抗剂型态的抗雌激素,包括他莫昔芬(tamoxifen)(**NOLVADEX®**)、4-羟基他莫昔芬、托瑞米芬(toremifene)(**FARESTON®**)、艾多昔芬(idoxifene)、曲洛昔芬(droloxifene)、雷诺昔酚(raloxifene)(**EVISTA®**)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬(keoxifene)和选择性雌激素受体调节剂(SERM)(诸如SERM3);不具有激动剂性质的纯抗雌激素,诸如氟维司群(fulvestrant)(**FASLODEX®**)和EM800(此类药剂可阻断雌激素受体(ER)二聚、抑制DNA结合、增加ER转换和/或遏制ER含量);芳香酶抑制剂,包括类固醇芳香酶抑制剂,诸如福美司坦(formestane)和依西美坦(**AROMASIN®**),及非类固醇芳香酶抑制剂,诸如阿那曲唑(anastrozole)(**ARIMIDEX®**)、来曲唑(letrozole)(**FEMARA®**)和氨鲁米特(aminoglutethimide),及其他芳香酶抑制剂,包括伏氯唑(vorozole)(**RIVISOR®**)、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)(**MEGASE®**)、法偈唑(fadrozole)和4(5)-咪唑;释放促黄体激素的激素激动剂,包括亮丙瑞林(leuprolide)(**LUPRON®**和**ELIGARD®**)、戈舍瑞林(goserelin)、布舍瑞林(buserelin)和曲特瑞林(tripterelin);性类固醇,包括助孕素(诸如乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)和乙酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate))、雌激素(诸如己烯雌酚(diethylstilbestrol)和普雷马林(premarin))及雄激素/类视黄素(诸如氟甲睾酮(flouxymesterone)、所有反式视黄酸和非瑞替尼(fenretinide));奥那司酮(onapristone);抗孕酮;雌激素受体下调剂(ERD);抗雄激素,诸如氟他胺(flutamide)、尼鲁胺(nilutamide)和比卡鲁胺(bicalutamide);以及以上任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及以上药剂中的两者或两者以上的组合。

[0105] 如本文针对佐剂疗法所用,术语“免疫抑制剂”是指用来遏制或遮蔽本文中所治疗的哺乳动物的免疫系统的物质。此将包括遏制细胞因子产生、下调或遏制自身抗原表达或遮蔽MHC抗原的物质。此类药剂的实例包括2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶(参见美国专利第4,665,077号);非类固醇消炎药(NSAID);更昔洛韦(ganciclovir)、他克莫司(tacrolimus)、糖皮质激素(诸如皮质醇或醛固酮)、消炎药(诸如环氧和酶抑制剂、5-脂氧合酶抑制剂或白三烯受体拮抗剂);嘌呤拮抗剂,诸如硫唑嘌呤(azathioprine)或霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil,MMF);烷基化剂,诸如环磷酰胺;溴麦角隐亭(bromocryptine);达那唑(danazol);氨胺苯砒(dapsone);戊二醛(其遮蔽MHC抗原,如美国专利第4,120,649号中所述);针对MHC抗原和MHC片段的抗个体基因型抗体;环孢素A;类固醇,诸如皮质类固醇或糖皮质类固醇或糖皮质激素类似物,例如泼尼松(prednisone)、甲基泼尼龙(methylprednisolone),包括SOLU-MEDROL®甲基泼尼龙琥珀酸钠,及地塞米松(dexamethasone);二氢叶酸还原酶抑制剂,诸如甲氨蝶呤(口服或皮下);抗疟疾剂,诸如氯喹(chloroquine)和羟氯喹(hydroxychloroquine);柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine);来氟米特(leflunomide);细胞因子或细胞因子受体抗体,包括抗干扰素- α 、干扰素- β 或干扰素- γ 抗体、抗肿瘤坏死因子(TNF)- α 抗体(英利昔单抗(infliximab)(**REMICADE®**)或阿达木单抗(adalimumab))、抗-TNF- α 免疫黏附素(依那西普(etanercept))、抗-TNF- β 抗体、抗-

介白素-2 (IL-2) 抗体和抗-IL-2受体抗体, 及抗-介白素-6 (IL-6) 受体抗体和拮抗剂 (诸如 ACTEMRA™ (托西利单抗 (tocilizumab))); 抗-LFA-1抗体, 包括抗-CD11a和抗-CD18抗体; 抗-L3T4抗体; 异源抗淋巴细胞球蛋白; 泛-T抗体, 优选抗-CD3或抗-CD4/CD4a抗体; 含有LFA-3结合域的可溶性肽 (WO 90/08187, 公开于7/26/90); 链激酶; 转化生长因子- β (TGF- β); 链道酶 (streptodornase); 来自宿主的RNA或DNA; FK506; RS-61443; 苯丁酸氮芥; 脱氧精胍菌素 (deoxyspergualin); 雷帕霉素; T细胞受体 (Cohen等, 美国专利第5,114,721号); T细胞受体片段 (Offner等, Science, 251:430-432 (1991); WO 90/11294; Ianeway, Nature, 341:482 (1989); 及WO 91/01133); BAFF拮抗剂, 诸如BAFF抗体及BR3抗体和 α TNF4拮抗剂 (评述参见 Mackay和Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002) 且还参见下文定义); 干扰T细胞辅助信号的生物制剂, 诸如抗-CD40受体或抗-CD40配位体 (CD154), 包括CD40-CD40配位体 (例如 Durie等, Science, 261:1328-30 (1993); Mohan等, J. Immunol., 154:1470-80 (1995)) 和 CTLA4-Ig (Finck等, Science, 265:1225-7 (1994)) 的阻断抗体; 及T细胞受体抗体 (EP 340,109), 诸如T10B9。本文中的一些优选免疫抑制剂包括环磷酰胺、苯丁酸氮芥、硫唑嘌呤、来氟米特、MMF或甲氨蝶呤。

[0106] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是指抑制PD-1轴结合搭配物与一或多种其结合搭配物的相互作用, 以便移除由PD-1信号传导轴上信号传导引起的T细胞功能障碍的分子—结果为恢复或增强T细胞功能 (例如增殖、细胞因子产生、靶标细胞杀死)。如本文所用, PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0107] 术语“PD-1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与一或多种其结合搭配物 (诸如PD-L1、PD-L2) 的相互作用产生的信号转导的分子。在一些实施方案中, PD-1结合拮抗剂为抑制PD-1与一或多种其结合搭配物的结合的分子。在一特定方面中, PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。举例而言, PD-1结合拮抗剂包括抗-PD-1抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及降低、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2的相互作用产生的信号转导的其他分子。在一个实施方案中, PD-1结合拮抗剂减少通过或经由在经由PD-L1介导信号传导的T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负共刺激信号, 以便降低功能异常T细胞的功能异常程度 (例如增强对抗原识别的效应器响应)。在一些实施方案中, PD-1结合拮抗剂为抗-PD-1抗体。在一特定方面中, PD-1结合拮抗剂为本文中所描述的MDX-1106 (尼沃单抗 (nivolumab))。在另一特定方面中, PD-1结合拮抗剂为本文中描述的MK-3475 (拉立珠单抗 (lambrolizumab))。在另一特定方面中, PD-1结合拮抗剂为本文中描述的CT-011 (皮立珠单抗 (pidilizumab))。在另一特定方面中, PD-1结合拮抗剂为本文中描述的AMP-224。

[0108] 术语“PD-L1结合拮抗剂”是指降低、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合搭配物中的任一或多者 (诸如PD-1、B7-1) 的相互相用引起的信号转导的分子。在一些实施方案中, PD-L1结合拮抗剂为抑制PD-L1与其结合搭配物的结合的分子。在一特定方面中, PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和/或B7-1的结合。在一些实施方案中, PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及其他降低、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合搭配物中的一或多者 (诸如PD-1、B7-1) 的相互相用引起的信号转导的分子。在一个实施方案中, PD-L1结合拮抗剂降低通过或经由在经由PD-L1介导信号传导的T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负共刺激信号, 以便降低功能异常T细胞的

功能异常程度(例如增强对抗原识别的效应器响应)。在一些实施方案中,PD-L1结合拮抗剂为抗PD-L1抗体。在一特定方面中,抗-PD-L1抗体为本文中描述的YW243.55.S70。在另一特定方面中,抗-PD-L1抗体为本文中描述的MDX-1105。在再一特定方面中,抗-PD-L1抗体为本文中描述的MPDL3280A。在再一特定方面中,抗-PD-L1抗体为本文中描述的MEDI4736。

[0109] 术语“PD-L2结合拮抗剂”是指降低、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其结合搭配物中的任一或多个者(诸如PD-1)的相互相用引起的信号转导的分子。在一些实施方案中,PD-L2结合拮抗剂为抑制PD-L2与其结合搭配物中的一或多个者结合的分子。在一特定方面中,PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2与PD-1的结合。在一些实施方案中,PD-L2拮抗剂包括抗-PD-L2抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白、寡肽及其他降低、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其结合搭配物中的任一或多个者(诸如PD-1)的相互相用引起的信号转导的分子。在一个实施方案中,PD-L2结合拮抗剂降低通过或经由在经由PD-L2介导信号传导的T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白质介导的负共刺激信号,以便降低功能异常T细胞的功能异常程度(例如增强对抗原识别的效应器响应)。在一些实施方案中,PD-L2结合拮抗剂为免疫黏附素。

[0110] 术语“可变区”或“可变域”是指涉及抗体结合于抗原的抗体重链或轻链的域。天然抗体的重链和轻链(分别为VH和VL)的可变域一般具有类似结构,其中各结构域均包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)(参见例如Kindt等Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单一VH或VL域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可使用来自结合抗原的抗体的VH或VL域分离结合特定抗原的抗体以分别筛选互补VL或VH域的文库。参见例如Portolano等,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等,Nature 352:624-628(1991)。

[0111] 如本文所用,术语“载体(vector)”是指一种核酸分子,其能够传送其所连接的另一种核酸分子。该术语包括呈自我复制核酸结构的载体以及并入其已引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够引导其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0112] “烷基”为含有正、二级、三级或环状碳原子的C₁-C₁₈烃。实例为甲基(Me、-CH₃)、乙基(Et、-CH₂CH₃)、1-丙基(n-Pr、正丙基、-CH₂CH₂CH₃)、2-丙基(i-Pr、i-丙基、-CH(CH₃)₂)、1-丁基(n-Bu、正丁基、-CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-甲基-1-丙基(i-Bu、异丁基、-CH₂CH(CH₃)₂)、2-丁基(s-Bu、仲丁基、-CH(CH₃)CH₂CH₃)、2-甲基-2-丙基(t-Bu、叔丁基、-C(CH₃)₃)、1-戊基(正戊基、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-戊基(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃)、3-戊基(-CH(CH₂CH₃)₂)、2-甲基-2-丁基(-C(CH₃)₂CH₂CH₃)、3-甲基-2-丁基(-CH(CH₃)CH(CH₃)₂)、3-甲基-1-丁基(-CH₂CH₂CH(CH₃)₂)、2-甲基-1-丁基(-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃)、1-己基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-己基(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃)、3-己基(-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃))、2-甲基-2-戊基(-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃)、3-甲基-2-戊基(-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃)、4-甲基-2-戊基(-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂)、3-甲基-3-戊基(-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂)、2-甲基-3-戊基(-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂)、2,3-二甲基-2-丁基(-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂)、3,3-二甲基-2-丁基(-CH(CH₃)C(CH₃)₃)。

[0113] 如本文所用,术语“C₁-C₈烷基”是指具有1至8个碳原子的直链或支链、饱和或不饱和和烃。代表性“C₁-C₈烷基”包括但不限于-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基、-正辛基、-正壬基和-正癸基;而支链C₁-C₈烷基包括但不限于-异丙基、-仲丁

基、-异丁基、-叔丁基、-异戊基、2-甲基丁基；不饱和 C_1 - C_8 烷基包括但不限于-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、-2,3-二甲基-2-丁烯基、-1-己基、-2-己基、-3-己基、-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基、-3-甲基-1-丁炔基。 C_1 - C_8 烷基可未经取代或经一或多个包括但不限于以下各基的基团取代： $-C_1$ - C_8 烷基、 $-O$ - (C_1 - C_8 烷基)、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、-卤素、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和-CN；其中各 R' 独立地选自H、 $-C_1$ - C_8 烷基和芳基。

[0114] 如本文所用，术语“ C_1 - C_{12} 烷基”是指具有1至12个碳原子的直链或支链、饱和或不饱和烃。 C_1 - C_{12} 烷基可未经取代或经一或多个包括但不限于以下各基的基团取代： $-C_1$ - C_8 烷基、 $-O$ - (C_1 - C_8 烷基)、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、-卤素、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 和-CN；其中各 R' 独立地选自H、 $-C_1$ - C_8 烷基和芳基。

[0115] 如本文所用，术语“ C_1 - C_6 烷基”是指具有1至6个碳原子的直链或支链、饱和或不饱和和烃。代表性“ C_1 - C_6 烷基”包括但不限于-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基和-正己基；而支链 C_1 - C_6 烷基包括但不限于-异丙基、-仲丁基、-异丁基、-叔丁基、-异戊基和2-甲基丁基；不饱和 C_1 - C_6 烷基包括但不限于-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基和-异丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、-1-己基、-2-己基和-3-己基。 C_1 - C_6 烷基可未经取代或经一或多个如上针对 C_1 - C_8 烷基所述的基团取代。

[0116] 如本文所用，术语“ C_1 - C_4 烷基”是指具有1至4个碳原子的直链或支链、饱和或不饱和和烃。代表性“ C_1 - C_4 烷基”基团包括但不限于-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基；而支链 C_1 - C_4 烷基包括但不限于-异丙基、-仲丁基、-异丁基、-叔丁基；不饱和 C_1 - C_4 烷基包括但不限于-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基和-异丁烯基。 C_1 - C_4 烷基可未经取代或经一或多个如上针对 C_1 - C_8 烷基所述的基团取代。

[0117] “烷氧基”为单一键合于氧的烷基。示例性烷氧基包括但不限于甲氧基 ($-OCH_3$) 和乙氧基 ($-OCH_2CH_3$)。“ C_1 - C_5 烷氧基”为具有1至5个碳原子的烷氧基。烷氧基可未经取代或经一或多个如上针对烷基所述的基团取代。

[0118] “烯基”为含有正、二级、三级或环状碳原子和至少一个不饱和位点，即碳-碳 sp^2 双键的 C_2 - C_{18} 烃。实例包括但不限于：乙烯或乙烯基 ($-CH=CH_2$)、烯丙基 ($-CH_2CH=CH_2$)、环戊烯基 ($-C_5H_7$) 和5-己烯基 ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$)。“ C_2 - C_8 烯基”为含有2至8个正、二级、三级或环状碳原子和至少一个不饱和位点，即碳-碳 sp^2 双键的烃。

[0119] “炔基”为含有正、二级、三级或环状碳原子和至少一个不饱和位点，即碳-碳 sp 三键的 C_2 - C_{18} 烃。实例包括但不限于：乙炔基 ($-C\equiv CH$) 和炔丙基 ($-CH_2C\equiv CH$)。“ C_2 - C_8 炔基”为含有2至8个正、二级、三级或环状碳原子和至少一个不饱和位点，即碳-碳 sp 三键的烃。

[0120] “亚烷基”是指具有1-18个碳原子且具有通过自母烷烃的同一个或两个不同碳原子移除两个氢原子所衍生的两个单价自由基中心的饱和、支链或直链或环状烃基。典型亚烷基包括但不限于：亚甲基 ($-CH_2-$)、1,2-乙基 ($-CH_2CH_2-$)、1,3-丙基 ($-CH_2CH_2CH_2-$)、1,4-丁基 ($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$) 等。

[0121] “C₁-C₁₀亚烷基”为式-(CH₂)₁₋₁₀-的直链饱和烃基。C₁-C₁₀亚烷基的实例包括亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基和亚癸基。

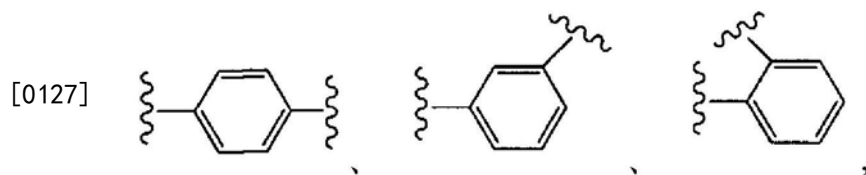
[0122] “亚烯基”是指具有2-18个碳原子且具有通过自母体烯的同一个或两个不同碳原子移除两个氢原子所衍生的两个单价自由基中心的不饱和、支链或直链或环状烃基。典型的亚烯基包括但不限于：1,2-亚乙基(-CH=CH-)。

[0123] “亚炔基”是指具有2-18个碳原子且具有通过自母体炔的同一个或两个不同碳原子移除两个氢原子所衍生的两个单价自由基中心的不饱和、支链或直链或环状烃基。典型的亚炔基包括但不限于：亚乙炔(-C≡C-)、炔丙基(-CH₂C≡C-)和4-戊炔基(-CH₂CH₂CH₂C≡C-)。

[0124] “芳基”是指碳环芳族基。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基和蒽基。碳环芳族基或杂环芳族基可未经取代或经一或多个包括但不限于以下各基的基团取代：-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-卤素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN；其中各R'独立地选自H、-C₁-C₈烷基和芳基。

[0125] “C₅-C₂₀芳基”为碳环芳环中具有5至20个碳原子的芳基。C₅-C₂₀芳基的实例包括但不限于苯基、萘基和蒽基。C₅-C₂₀芳基可经如上针对芳基所述取代或未经取代。“C₅-C₁₄芳基”为碳环芳环中具有5至14个碳原子的芳基。C₅-C₁₄芳基的实例包括但不限于苯基、萘基和蒽基。C₅-C₁₄芳基可经如上针对芳基所述经取代或未经取代。

[0126] “亚芳基”为具有两个共价键且可呈如以下结构中所示的邻、间或对构型的芳基：



[0128] 其中苯基可未经取代或经至多四个包括但不限于以下各基的基团取代：-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-卤素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN；其中各R'独立地选自H、-C₁-C₈烷基和芳基。

[0129] “芳基烷基”是指其中一个键合于碳原子、通常末端或sp³碳原子的氢原子的经芳基置换的非环状烷基。典型芳基烷基包括但不限于苯甲基、2-苯基乙-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘并苯甲基、2-萘并苯基乙-1-基等。芳基烷基包含6至20个碳原子，例如芳基烷基的烷基部分，包括烷基、烯基或炔基，为1至6个碳原子且芳基部分为5至14个碳原子。

[0130] “杂芳基烷基”是指其中一个键合于碳原子、通常末端或sp³碳原子的氢原子的经杂芳基置换的非环状烷基。典型杂芳基烷基包括但不限于2-苯并咪唑基甲基、2-呋喃基乙基等。杂芳基烷基包含6至20个碳原子，例如杂芳基烷基的烷基部分，包括烷基、烯基或炔基，为1至6个碳原子且杂芳基部分为5至14个碳原子及1至3个选自N、O、P和S的杂原子。杂芳基烷基的杂芳基部分可为具有3至7个环成员的单环(2至6个碳原子)或具有7至10个环成员的双环(4至9个碳原子及1至3个选自N、O、P和S的杂原子)，例如：双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统。

[0131] “经取代的烷基”、“经取代的芳基”和“经取代的芳基烷基”分别意指烷基、芳基和芳基烷基,其中一或多个氢原子各独立地经取代基置换。典型取代基包括但不限于-X、-R、-O⁻、-OR、-SR、-S⁻、-NR₂、-NR₃、=NR、-CX₃、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、NC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR₂、-SO₃⁻、-SO₃H、-S(=O)₂R、-OS(=O)₂OR、-S(=O)₂NR、-S(=O)R、-OP(=O)(OR)₂、-P(=O)(OR)₂、-PO₃⁻、-PO₃H₂、-C(=O)R、-C(=O)X、-C(=S)R、-CO₂R、-CO₂⁻、-C(=S)OR、-C(=O)SR、-C(=S)SR、-C(=O)NR₂、-C(=S)NR₂、-C(=NR)NR₂,其中各X独立地为卤素:F、Cl、Br或I;且各R独立地为-H、C₂-C₁₈烷基、C₆-C₂₀芳基、C₃-C₁₄杂环、保护基或前药部分。如上所述的亚烷基、亚烯基和亚炔基也可类似地经取代。

[0132] “杂芳基”和“杂环”是指其中一或多个环原子为杂原子,例如氮、氧和硫的环系统。杂环自由基包含3至20个碳原子及1至3个选自N、O、P和S的杂原子。杂环可为具有3至7个环成员的单环(2至6个碳原子及1至3个选自N、O、P和S的杂原子)或具有7至10个环成员的双环(4至9个碳原子及1至3个选自N、O、P和S的杂原子),例如:双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统。

[0133] 示例性杂环描述于例如Paquette,Leo A.,“Principles of Modern Heterocyclic Chemistry”(W.A.Benjamin,New York,1968),尤其第1、3、4、6、7和9章;“The Chemistry of Heterocyclic Compounds,A series of Monographs”(John Wiley&Sons,New York,1950至今),尤其第13、14、16、19和28卷;和J.Am.Chem.Soc.(1960)82:5566。

[0134] 杂环的实例包括(作为实例而非限制)吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氢噻吩基、硫氧化四氢噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、噻萘基、吲哚基、吲哚烯基、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、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、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、吩噻嗪基、2H-吡咯基、异噻唑基、异噻唑基、吡嗪基、哒嗪基、吡嗪基、异吡嗪基、3H-吡嗪基、1H-吡嗪基、嘌呤基、4H-喹啉基、酞嗪基、二氮杂萘基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、喋啶基、4aH-咔唑基、咔唑基、β-咔啉基、菲啶基、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、吲哚啉基、异吲哚啉基、奎宁环基基、吗啉基、噁唑烷基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、羟吲哚基、苯并噁唑啉基和靛红酰基(isatinoyl)。

[0135] 作为实例而非限制,碳键合的杂环键合在吡啶的位置2、3、4、5或6处、哒嗪的位置3、4、5或6处、嘧啶的位置2、4、5或6处、吡嗪环的位置2、3、5或6处、呋喃、四氢呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氢吡咯的位置2、3、4或5处、噁唑、咪唑或噻唑的位置2、4或5处、异噁唑、吡唑或异噻唑的位置3、4或5处、氮杂环丙烷的位置2或3处、氮杂环丁烷的位置2、3或4处、喹啉的位置2、3、4、5、6、7或8处或异喹啉的位置1、3、4、5、6、7或8处。更通常,碳键合的杂环包括2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、3-哒嗪基、4-哒嗪基、5-哒嗪基、6-哒嗪基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗪基、3-吡嗪基、5-吡嗪基、6-吡嗪基、2-噻唑基、4-噻唑基或5-噻唑基。

[0136] 作为实例而非限制,氮键合的杂环键合在氮杂环丙烷、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、哌嗪、吡啶、吡啶啉、1H-吡啶的位置1处、异吡啶或异吡啶啉的位置2处、吗啉的位置4处和咪唑或β-咪啉的位置9处。更通常，氮键合的杂环包括1-氮杂环丙烷基、1-氮杂环丁烷基、1-吡咯基、1-咪唑基、1-吡啶基和1-哌啶基。

[0137] “C₃-C₈杂环”是指其中一至四个环碳原子独立地经来自O、S和N的杂原子置换的芳族或非芳族C₃-C₈碳环。C₃-C₈杂环的代表性实例包括但不限于苯并呋喃基、苯并噻吩、吡啶基、苯并吡啶基、香豆素基、异喹啉基、吡咯基、噻吩基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡啶基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、哒嗪基、异噻唑基、异噁唑基和四唑基。C₃-C₈杂环可未经取代或经至多七个包括但不限于以下各基的基团取代：-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-卤素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN；其中各R'独立地选自H、-C₁-C₈烷基和芳基。

[0138] “C₃-C₈杂环基”是指如上文所定义的C₃-C₈杂环基，其中一个杂环氢原子经一键置换。C₃-C₈杂环基可未经取代或经至多六个包括但不限于以下各基的基团取代：-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-卤素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN；其中各R'独立地选自H、-C₁-C₈烷基和芳基。

[0139] “C₃-C₂₀杂环”是指其中一至四个环碳原子独立地经来自O、S和N的杂原子置换的芳族或非芳族C₃-C₈碳环。C₃-C₂₀杂环可未经取代或经至多七个包括但不限于以下各基的基团取代：-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-卤素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN；其中各R'独立地选自H、-C₁-C₈烷基和芳基。

[0140] “C₃-C₂₀杂环基”是指如上文所定义的C₃-C₂₀杂环基团，其中一个杂环氢原子经一键置换。

[0141] “碳环”意指作为单环，具有3至7个碳原子或作为双环，具有7至12个碳原子的饱和或不饱和环。单环碳环具有3至6个环原子，更通常具有5或6个环原子。双环碳环具有7至12个环原子，例如配置为双环[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系统，或9或10个环原子，配置为双环[5,6]或[6,6]系统。单环碳环的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环庚基和环辛基。

[0142] “C₃-C₈碳环”为3、4、5、6、7或8员饱和或不饱和非芳族碳环。代表性C₃-C₈碳环包括但不限于-环丙基、-环丁基、-环戊基、-环戊二烯基、-环己基、-环己烯基、-1,3-环己二烯基、-1,4-环己二烯基、-环庚基、-1,3-环庚二烯基、-1,3,5-环庚三烯基、-环辛基和-环辛二烯基。C₃-C₈碳环基可未经取代或经一或多个包括但不限于以下各基的基团取代：-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-卤素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂和-CN；其中各R'独立地选自H、-C₁-C₈烷基和芳基。

[0143] “C₃-C₈碳环基”是指如上文所定义的C₃-C₈碳环基团，其中一个碳环氢原子经一键置换。

[0144] “接头”是指包含共价附接抗体于药物部分的共价键或原子链的化学部分。在各种

实施方案中,接头包括二价自由基,诸如烷基二基、芳基二基、杂芳基二基、诸如 $-(CR_2)_nO$ $(CR_2)_n-$ 的部分、烷基氧基(例如聚亚乙基氧基、PEG、聚亚甲基氧基)和烷基氨基(例如聚亚乙基氨基、Jeffamine™)的重复单元;以及二酸酯和酰胺,包括琥珀酸酯、琥珀酰胺、乙二醇酸酯、丙二酸酯和己酰胺。在各种实施方案中,接头可包含一或多个氨基酸残基,诸如缬氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸和高赖氨酸。

[0145] 术语“手性”是指具有镜像搭配物的非重叠性性质的分子,而术语“非手性”是指在其镜像搭配物上可重叠的分子。

[0146] 术语“立体异构体”是指具有一致的化学构成但在原子或基团在空间中的配置方面不同的化合物。

[0147] “非对映异构体”是指具有两个或两个以上手性中心且其分子并不互为镜像的立体异构体。非对映异构体具有不同物理性质,例如熔点、沸点、光谱性质和反应性。可在诸如电泳和色谱的高分辨分析程序下分离非对映异构体的混合物。

[0148] “对映异构体”是指化合物的两个互为不可重叠镜像的立体异构体。

[0149] 本文中使用的立体化学定义和惯例一般遵循S.P.Parker编辑,McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms(1984)McGraw-Hill Book Company,New York;及Eliel, E.和Wilken, S., Stereochemistry of Organic Compounds(1994) John Wiley&Sons, Inc., New York。许多有机化合物以光学活性形式存在,即其能够使平面偏振光的平面旋转。在对光学活性化合物的描述中,使用前缀D和L或R和S表示分子围绕其手性中心的绝对构型。采用前缀d和l或(+)和(-)指明平面偏振光由化合物引起旋转的迹象,其中(-)或l意指化合物为左旋的。具有前缀(+)或d的化合物为右旋的。对于既定化学结构,这些立体异构体为一致的,例外之处在于其互为镜像。特定立体异构体也可称为对映异构体,且此类异构体的混合物通常称为对映异构体混合物。对映异构体的50:50混合物称为外消旋混合物或外消旋体,其可在化学反应或制程中尚未具有立体选择或立体特异性时出现。术语“外消旋混合物”和“外消旋体”是指两种对映异构物质的等摩尔混合物,其缺乏光学活性。

[0150] “离去基”是指可经另一官能团取代的官能团。某些离去基为本领域熟知,且实例包括但不限于卤化物(例如氯化物、溴化物、碘化物)、甲烷磺酰基(甲磺酰基)、对甲苯磺酰基(甲苯磺酰基)、三氟甲基磺酰基(三氟甲磺酸酯基)和三氟甲基磺酸酯基。

[0151] 术语“保护基”是指通常用以阻断或保护特定官能团同时使化合物上的其他官能团反应的取代基。举例而言,“氨基保护基”为附接于氨基,阻断或保护化合物中的氨基官能团的取代基。合适氨基保护基包括但不限于乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧羰基(BOC)、苯甲氧羰基(CBZ)和9-苄基亚甲氧基羰基(Fmoc)。关于保护基和其使用的一般描述,参见T.W.Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley&Sons, New York, 1991或随后版本。

[0152] II. 组合物和方法

[0153] 在一个方面中,本发明部分基于结合于CLL-1的抗体和包含此类抗体的免疫缀合物。本发明的抗体和免疫缀合物适用于例如诊断或治疗CLL-1阳性癌症。

[0154] 本发明提供抗-CLL-1抗体和免疫缀合物及其使用方法。

[0155] 本文提供分离的单克隆抗-CLL-1抗体,其中所述抗体结合包含SEQ ID NO:49的氨基酸的表位和/或结合包含SEQ ID NO:49的重叠表位且不结合包含SEQ ID NO:50和/或SEQ

ID NO:51的表位。在一些实施方案中,抗-CLL-1抗体结合包含SEQ ID NO:49的氨基酸的表位。在一些实施方案中,抗-CLL-1抗体结合由SEQ ID NO:49的氨基酸组成或基本上由其组成的表位。在一些实施方案中,表位通过羟基自由基足迹法确定。在一些实施方案中,如通过羟基自由基足迹法所确定的表位具有超过约1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0任一者的[抗原的速率常数]/[抗原与抗体复合物的速率常数]比率。在一些实施方案中,如通过羟基自由基足迹法所确定的表位具有超过约2.0的[抗原的速率常数]/[抗原与抗体复合物的速率常数]比率。

[0156] 羟基自由基足迹法可如实施例所述进行。举例而言,在Brookhaven国家实验室使用X28c光束线将样品暴露于羟基自由基达0、10、15和20毫秒(ms)的时间间隔。经标记的样品可使用PNG酶F去糖基化。样品可使用三氯乙酸/丙酮沉淀,且进行LC-MS分析。接着样品可进行还原和烷基化,使用胰蛋白酶消化,接着进行液相色谱偶联高分辨质谱分析(LC-MS)。可使用ProtMapMS分析MS数据,产生各肽的剂量响应曲线。游离抗原的结果可针对各复合物形式比较。基于同源性的抗原模型可使用Swiss-Model软件产生且可定位三个复合物中的每一者的溶剂保护区。可提取所选离子色谱图(SIC)且针对肽离子的未氧化和所有氧化形式(具有特定m/z)积分。这些峰面积值可用于以剂量响应(DR)曲线图形式表征反应动力学,其测量完整肽随着羟基自由基暴露的丧失。相较于游离抗原,复合物中的溶剂保护区经历逐渐氧化反应,且氧化速率(称为速率常数,RC)的差异可用来突出表位的位置。

[0157] 在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于重组人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于重组食蟹猴CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于人外周血液单核细胞(PBMC)的表面的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于食蟹猴PBMC的表面的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于癌细胞表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于AML癌细胞表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于HL-60细胞的表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于EOL-1细胞表面上的内源性CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合于包含K244Q突变的CLL-1(具有K244Q的SEQ ID NO:1)。在任一抗体的一些实施方案中,抗体结合包含SEQ ID NO:49的氨基酸的表位和/或结合包含SEQ ID NO:49的重叠表位。在任一抗体的一些实施方案中,抗体不结合包含SEQ ID NO:50和/或SEQ ID NO:51的表位。在任一抗体的一些实施方案中,抗体与R&D System克隆687317抗体竞争结合人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体以小于15nM、小于10nM、小于7nM、小于5nM或小于3nM的Kd结合于内源性人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体以小于10nM、小于7nM、小于5nM或小于3nM的Kd结合于重组人CLL-1。在任一抗体的一些实施方案中,抗体以小于10nM、小于7nM、小于5nM或小于3nM、小于2nM或小于1nM的Kd结合于重组食蟹猴CLL-1。

[0158] 在一些实施方案中,抗体的特征如本文在以下实施例中所述确定。

[0159] 抗体6E7及其他实施方案

[0160] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗-CLL-1抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下各者的HVR:(a)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-

L2;和(f)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H2。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0161] 在一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3和包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3和包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2。在另一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施方案中,HVR-H2包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0162] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

[0163] 在另一个方面中,本发明的抗体包含(a)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列的VH域:(i)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列的VL域:(i)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

[0164] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含(a)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该抗体

包含 (a) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中, 该抗体包含 (a) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中, 该抗体包含 (a) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

[0165] 在任一以上实施方案中, 抗-CLL-1抗体人源化。在一个实施方案中, 抗-CLL-1抗体包含如任一以上实施方案中的HVR且进一步包含人接受体框架, 例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在某些实施方案中, 人接受体框架为人VL_KI共同 (VL_{KI}) 框架和/或VH框架VH₁。在某些实施方案中, 人接受体框架为包含任一以下突变的人VL_KI共同 (VL_{KI}) 框架和/或VH框架VH₁。

[0166] 在另一个方面中, 抗-CLL-1抗体包含与SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:46和/或SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的重链可变域 (VH) 序列。在某些实施方案中, 与SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:46和/或SEQ ID NO:48的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VH序列相对于参考序列含有取代 (例如保守取代)、插入或缺失, 但包含该序列的抗-CLL-1抗体保留结合于CLL-1的能力。在某些实施方案中, SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:46和/或SEQ ID NO:48中总计1至10个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中, SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:46和/或SEQ ID NO:48中总计1至5个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中, 取代、插入或缺失发生在HVR外部区域中 (即在FR中)。任选地, 抗-CLL-1抗体包含SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33和/或SEQ ID NO:34的VH序列, 包括该序列的翻译后修饰。在一个具体实施方案中, VH包含一个、两个或三个选自以下各者的HVR: (a) 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的HVR-H1, (b) 包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (c) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H3。在一些实施方案中, HVR-H2包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。在一些实施方案中, HVR-H2包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列。在一些实施方案中, HVR-H2包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在一些实施方案中, HVR-H2包含SEQ ID NO:43的氨基酸序列。在一些实施方案中, HVR-H2包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列。

[0167] 在另一个方面中, 提供一种抗-CLL-1抗体, 其中所述抗体包含与SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的轻链可变域 (VL)。在某些实施方案中, 与SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:32的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VL序列相对于参考序列含有取代 (例如保守取代)、插入或缺失, 但包

含该序列的抗-CLL-1抗体保留结合于CLL-1的能力。在某些实施方案中,SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:32中总计1至10个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:32中总计1至5个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR外部区域中(即在FR中)。任选地,抗-CLL-1抗体包含SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:32的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体实施方案中,VL包含一个、两个或三个选自以下各者的HVR:(a)包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的HVR-L3。

[0168] 在另一个方面中,提供一种抗-CLL-1抗体,其中所述抗体包含如以上提供的任一实施方案中的VH和如以上提供的任一实施方案中的VL。

[0169] 在一个实施方案中,该抗体分别包含SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:30中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体分别包含SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:32中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体分别包含SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:33中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别SEQ ID NO:46和SEQ ID NO:33中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:33中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0170] 在另一个方面中,本文提供与本文提供的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。举例而言,在某些实施方案中,提供与包含分别SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:46和/或SEQ ID NO:48的VH序列和SEQ ID NO:30和/或SEQ ID NO:32的VL序列的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。

[0171] 本文提供含有包含如图2A中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-LC、HVR2-LC和HVR3-LC的轻链可变结构域和包含如图2B中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-HC、HVR2-HC和HVR3-HC的重链可变域的抗体。在一些实施方案中,抗体含有包含如图2A中所描绘的HVR1-LC、HVR2-LC和/或HVR3-LC序列和FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC和/或FR4-LC序列的轻链可变域。在一些实施方案中,抗体含有包含如图2B中所描绘的HVR1-HC、HVR2-HC和/或HVR3-HC序列和FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC和/或FR4-HC序列的重链可变域。

[0172] 在本发明的另一方面中,根据任一以上实施方案的抗-CLL-1抗体为单克隆抗体,包括人抗体。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体为抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双功能抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体为基本上全长抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或如本文所定义的其他抗体类别或同工型。

[0173] 抗体20B1及其他实施方案

[0174] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗-CLL-1抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下各者的HVR:(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0175] 在一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID

N0:16的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3和包含SEQ ID N0:14的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID N0:14的氨基酸序列的HVR-L3和包含SEQ ID N0:16的氨基酸序列的HVR-H2。在另一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID N0:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID N0:16的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3。

[0176] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列:(a)包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID N0:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID N0:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0177] 在另一个方面中,本发明的抗体包含(a)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列的VH域:(i)包含SEQ ID N0:15的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID N0:16的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列的VL域:(i)包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(c)包含SEQ ID N0:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0178] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含(a)包含SEQ ID N0:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID N0:16的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID N0:14的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID N0:15的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID N0:16的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID N0:17的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID N0:12的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID N0:13的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID N0:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0179] 在任一以上实施方案中,抗-CLL-1抗体人源化。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体包含如任一以上实施方案中的HVR且进一步包含人接受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在某些实施方案中,人接受体框架为人VL_{KI}共同(VL_{KI})框架和/或VH框架VH₁。在某些实施方案中,人接受体框架为包含任一以下突变的人VL_{KI}共同(VL_{KI})框架和/或VH框架VH₁。

[0180] 在另一个方面中,提供一种抗-CLL-1抗体,其中所述抗体包含如以上提供的任一实施方案中的VH和如以上提供的任一实施方案中的VL。

[0181] 在一个实施方案中,该抗体包含分别SEQ ID N0:36和SEQ ID N0:35中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0182] 在另一个方面中,本文提供与本文提供的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。举例而言,在某些实施方案中,提供与包含分别SEQ ID N0:36的VH序列和SEQ ID N0:35的VL序列的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。

[0183] 本文提供含有包含如图1A中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-LC、HVR2-LC和HVR3-

LC的轻链可变结构域和包含如图1B中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-HC、HVR2-HC和HVR3-HC的重链可变域的抗体。

[0184] 在本发明的另一方面中,根据任一以上实施方案的抗-CLL-1抗体为单克隆抗体,包括人抗体。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体为抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双功能抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体为基本上全长抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或如本文所定义的其他抗体类别或同工型。

[0185] 抗体21C9及其他实施方案

[0186] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗-CLL-1抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下各者的HVR:(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。

[0187] 在一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3和包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3和包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2。在另一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3。

[0188] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。

[0189] 在另一个方面中,本发明的抗体包含(a)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列的VH域:(i)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列的VL域:(i)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2,及(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。

[0190] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID

NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。

[0191] 在任一以上实施方案中,抗-CLL-1抗体人源化。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体包含如任一以上实施方案中的HVR且进一步包含人接受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在某些实施方案中,人接受体框架为人VL_{KI}I共同(VL_{KI})框架和/或VH框架VH₁。在某些实施方案中,人接受体框架为包含任一以下突变的人VL_{KI}I共同(VL_{KI})框架和/或VH框架VH₁。

[0192] 在另一个方面中,抗-CLL-1抗体包含与SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:40的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的重链可变域(VH)序列。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:40的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VH序列相对于参考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗-CLL-1抗体保留结合于CLL-1的能力。在某些实施方案中,SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:40中总计1至10个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:40中总计1至5个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR外部区域中(即在FR中)。任选地,抗-CLL-1抗体包含SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:40的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体实施方案中,VH包含一个、两个或三个选自以下各者的HVR:(a)包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1,(b)包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H2,和(c)包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H3。

[0193] 在另一个方面中,提供一种抗-CLL-1抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:37和/或SEQ ID NO:39的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性的轻链可变域(VL)。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:37和/或SEQ ID NO:39的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性的VL序列相对于参考序列含有取代(例如保守取代)、插入或缺失,但包含该序列的抗-CLL-1抗体保留结合于CLL-1的能力。在某些实施方案中,SEQ ID NO:37和/或SEQ ID NO:39中总计1至10个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,SEQ ID NO:37和/或SEQ ID NO:39中总计1至5个氨基酸已经取代、插入和/或缺失。在某些实施方案中,取代、插入或缺失发生在HVR外部区域中(即在FR中)。任选地,抗-CLL-1抗体包含SEQ ID NO:37和/或SEQ ID NO:39的VL序列,包括该序列的翻译后修饰。在一个具体实施方案中,VL包含一个、两个或三个选自以下各者的HVR:(a)包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-L3。

[0194] 在另一个方面中,提供一种抗-CLL-1抗体,其中所述抗体包含如以上提供的任一实施方案中的VH和如以上提供的任一实施方案中的VL。

[0195] 在一个实施方案中,该抗体包含分别SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:37中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。在一个实施方案中,该抗体包含分别SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:39中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0196] 在另一个方面中,本文提供与本文提供的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。举例而言,在某些实施方案中,提供与包含分别SEQ ID NO:38和/或SEQ ID NO:40的VH序列和SEQ ID NO:37和/或SEQ ID NO:39的VL序列的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。

[0197] 本文提供含有包含如图3A中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-LC、HVR2-LC和HVR3-LC的轻链可变结构域和包含如图3B中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-HC、HVR2-HC和HVR3-HC的重链可变域的抗体。在一些实施方案中,抗体含有包含如图3A中所描绘的HVR1-LC、HVR2-LC和/或HVR3-LC序列和FR1-LC、FR2-LC、FR3-LC和/或FR4-LC序列的轻链可变结构域。在一些实施方案中,抗体含有包含如图3B中所描绘的HVR1-HC、HVR2-HC和/或HVR3-HC序列和FR1-HC、FR2-HC、FR3-HC和/或FR4-HC序列的重链可变域。

[0198] 在本发明的另一方面中,根据任一以上实施方案的抗-CLL-1抗体为单克隆抗体,包括人抗体。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体为抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双功能抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体为基本上全长抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或如本文所定义的其他抗体类别或同工型。

[0199] 抗体28H12及其他实施方案

[0200] 在一些实施方案中,本发明提供一种抗-CLL-1抗体,其包含至少一个、两个、三个、四个、五个或六个选自以下各者的HVR:(a)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3。

[0201] 在一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3。在一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3和包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3。在另一个实施方案中,该抗体含有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3、包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3和包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H2。在另一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H2;和(c)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3。

[0202] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列:(a)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3。在一个实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L1;(b)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L2;和(c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3。

[0203] 在另一个方面中,本发明的抗体包含(a)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VH HVR序列的VH域:(i)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1,(ii)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii)包含选自SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3;和(b)包含至少一个、至少两个或全部三个选自以下各者的VL HVR序列的VL域:(i)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L1,(ii)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L2,和(c)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3。

[0204] 在另一个方面中,本发明提供一种抗体,其包含(a)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:25的

氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,该抗体包含(a)包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1;(b)包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H2;(c)包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H3;(d)包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-L1;(e)包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-L2;和(f)包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-L3。

[0205] 在任一以上实施方案中,抗-CLL-1抗体人源化。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体包含如任一以上实施方案中的HVR且进一步包含人接受体框架,例如人免疫球蛋白框架或人共有框架。在某些实施方案中,人接受体框架为人VL_{KI}共同(VL_{KI})框架和/或VH框架VH₁。在某些实施方案中,人接受体框架为包含任一以下突变的人VL_{KI}共同(VL_{KI})框架和/或VH框架VH₁。

[0206] 在另一个方面中,提供一种抗-CLL-1抗体,其中所述抗体包含如以上提供的任一实施方案中的VH和如以上提供的任一实施方案中的VL。

[0207] 在一个实施方案中,该抗体包含分别SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:41中的VH和VL序列,包括那些序列的翻译后修饰。

[0208] 在另一个方面中,本文提供与本文提供的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。举例而言,在某些实施方案中,提供与包含分别SEQ ID NO:42的VH序列和SEQ ID NO:41的VL序列的抗-CLL-1抗体结合于相同表位的抗体。

[0209] 本文提供含有包含如图1A中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-LC、HVR2-LC和HVR3-LC的轻链可变结构域和包含如图1B中所描绘的根据Kabat编号的HVR1-HC、HVR2-HC和HVR3-HC的重链可变域的抗体。

[0210] 在本发明的另一方面中,根据任一以上实施方案的抗-CLL-1抗体为单克隆抗体,包括人抗体。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体为抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双功能抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体为基本上全长抗体,例如IgG1抗体、IgG2a抗体或如本文所定义的其他抗体类别或同工型。

[0211] 在另一方面中,根据任一以上实施方案的抗-CLL-1抗体可合并如以下所述的单一或组合的任一特征。

[0212] 1. 抗体亲和力

[0213] 在某些实施方案中,本文提供的抗体的解离常数(K_d) ≤ 1μM、≤ 100nM、≤ 50nM、≤ 10nM、≤ 5nM、≤ 1nM、≤ 0.1nM、≤ 0.01nM或≤ 0.001nM且任选可 ≥ 10⁻¹³M(例如10⁻⁸M或更低,例如10⁻⁸M至10⁻¹³M,例如10⁻⁹M至10⁻¹³M)。

[0214] 在一个实施方案中,K_d通过放射性标记的抗原结合分析(RIA)测量,该分析利用相关抗体的Fab型式(version)及其抗原,如通过以下分析所述进行。Fab对抗原的溶液结合亲和力通过在一系列滴定未标记抗原存在下使Fab与最低浓度的(¹²⁵I)-标记抗原平衡,接着用抗-Fab抗体涂布的板捕捉结合抗原来测量(参见例如Chen等,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为建立分析条件,将MICROTITER[®]多孔板(Thermo Scientific)用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml捕捉抗-Fab抗体(Cappel Labs)涂布隔夜,且随后在室温(约23℃)用PBS中的2%(w/v)牛血清白蛋白阻断2至5小时。在无吸附剂板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [¹²⁵I] 抗原与相关Fab的连续稀释液混合(例如与抗-VEGF抗体Fab-12的评估一致,Presta等,Cancer Res.57:4593-4599(1997))。接着将相关Fab培育隔夜;然而,培育可持续

较长时间段(例如约65小时)以保证达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板中以在室温培育(例如一小时)。随后移除溶液且用含0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20[®])的PBS洗涤板八次。当板干燥时,添加150微升/孔的闪烁剂(MICROSCINT-20[™];Packard),且在TOPCOUNT[™] γ 计数器(Packard)上对板计数10分钟。选择提供小于或等于最大结合20%的各Fab的浓度用于竞争性结合分析。

[0215] 根据另一个实施方案,Kd使用表面电浆共振测定法,使用BIACORE[®]-2000、BAICORE[®]-T200或BIACORE[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ),在25℃,利用固定抗原CM5芯片,在约10个反应单位(RU)下测量。简言之,根据供应商说明书,以N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。抗原用10mM乙酸钠pH 4.8和/或HBS-P(0.01M Hepes pH7.4、0.15M NaCl、0.005%表面活性剂P20)稀释至5 μ g/ml(约0.2 μ M),随后在5微升/分钟和/或30微升/分钟的流动速率下注射以获得大约10个反应单位(RU)的偶联蛋白。在抗原注射后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,在25℃,以约25 μ l/min的流动速率注射于含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20[™])表面活性剂的PBS(PBST)中的Fab两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。使用简单的一比一朗格缪尔结合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIAcore[®]评估软件3.2版),通过同时拟合缔合及解离传感图谱来计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)依比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如Chen等, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)。若通过以上表面电浆共振测定法得到的缔合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则缔合速率可使用荧光淬灭技术确定,该技术在如光谱仪(诸如配备止流的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌杯的8000-系列SLM-AMINCO[™]分光光度计(ThermoSpectronic))中所测量的浓度增加的抗原存在下,测量在25℃PBS中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)(pH 7.2)的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的增加或减少。

[0216] 2. 抗体片段

[0217] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体为抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等Nat. Med. 9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg和Moore编辑, (Springer-Verlag, New York), 第269-315页(1994);还参见WO 93/16185;以及美国专利第5,571,894号和第5,587,458号。关于包含救助受体结合表位残基和具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的论述,参见美国专利第5,869,046号。

[0218] 双功能抗体可为二价或双特异性的具有两个抗原结合位点的抗体片段。参见例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等, Nat. Med. 9:129-134(2003);和Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)。三功能抗体和四功能抗体还描述于Hudson等, Nat. Med. 9:129-134(2003)。

[0219] 单域抗体为包含抗体的重链可变域全部或一部分或轻链可变域全部或一部分的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体为人单域抗体(Domantis, Inc., Waltham, MA;参见例如美国专利第6,248,516B1号)。

[0220] 抗体片段可通过各种技术制得,包括但不限于蛋白分解消化完整抗体以及通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文所描述。

[0221] 3. 嵌合及人源化抗体

[0222] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体为嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利第4,816,567号;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一实例中,嵌合抗体为“类别转换”抗体,其中类别或亚类已自亲本抗体的类别或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0223] 在某些实施方案中,嵌合抗体为人源化抗体。通常,对非人抗体进行人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性及亲和力。一般而言,人源化抗体包含一或多个可变域,其中HVR,例如CDR(或其部分)来源于非人抗体,且FR(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体任选还包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基经来自非人抗体(例如HVR残基所来源的抗体)的相应残基取代以例如恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0224] 人源化抗体及其制造方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008),且进一步描述于例如Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);Queen等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号和第7,087,409号;Kashmiri等,Methods 36:25-34(2005)(描述SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述“表面重塑”);Dall'Acqua等,Methods 36:43-60(2005)(描述“FR改组”);及Osborn等,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的“引导选择”方法)。

[0225] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如Sims等J.Immunol.151:2296(1993));来源于具有特定亚组轻链或重链可变区的人抗体的共同序列的框架区(参见例如Carter等Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)框架区或人生殖系框架区(参见例如Almagro及Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和来源于筛选FR文库的框架区(参见例如Baca等,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0226] 4. 人抗体

[0227] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体为人抗体。可使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)。

[0228] 人抗体可通过将免疫原施用至已经修饰以回应于抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体的转基因动物来制备。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其置换内源性免疫球蛋白基因座,或存在于染色体外或随机整合至动物染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座一般已不活化。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还参见例如美国专利第6,075,181号和第6,150,584号,描述XENOMOUSE™技术;美国专利第5,770,429号,描述HUMAB®技术;及美国专利第7,041,870号,描述K-MOUSE®技术和美国专

利申请公开案第US 2007/0061900号,描述VELOCIMOUSE®技术)。通过此类动物产生的来自完整抗体的人可变区可例如通过与不同人恒定区组合而经进一步修饰。

[0229] 人抗体还可通过基于融合瘤的方法制备。已描述用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系(参见例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等,J.Immunol.,147:86(1991))。经由人B细胞融合瘤技术产生的人抗体还描述于Li等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)中。其他方法包括例如描述于美国专利第7,189,826号(描述单克隆人IgM抗体自融合瘤细胞系的产生)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述人-人融合瘤)中的方法。人融合瘤技术(三源杂交瘤技术)还描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)。

[0230] 人抗体还可通过分离选自人衍生噬菌体展示库的Fv克隆可变域序列产生。此类可变域序列接着可与期望人恒定域组合。下文描述用于自抗体文库选择人抗体的技术。

[0231] 5.来源于文库的抗体

[0232] 本发明的抗体可通过针对具有期望活性的抗体筛选组合文库来分离。举例而言,本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库和针对具有期望结合特征的抗体筛选此类文库。此类方法综述于例如Hoogenboom等,Methods in Molecular Biology 178:1-37(0'Brien等编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001)且进一步描述于例如McCafferty等,Nature 348:552-554;Clackson等,Nature352:624-628(1991);Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编辑,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0233] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因的谱系分别通过聚合酶链式反应(PCR)独立地克隆且在噬菌体文库中随机重组,接着可筛选抗原结合噬菌体,如Winter等,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所述。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或Fab片段形式呈现抗体片段。来自经免疫来源的文库提供抗免疫原的高亲和力抗体而无需构建融合瘤。或者,可克隆原始谱系(例如自人)以提供抗各种非自体抗原以及自体抗原的抗体的单一来源而无需任何免疫接种,如Griffiths等,EMBO J,12:725-734(1993)所述。最终,还可以合成方式通过自干细胞克隆未经重排的V基因区段,且使用含有随机序列的PCR引物以编码高度可变CDR3区并实现体外重排来制备原始文库,如通过Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)描述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如:美国专利第5,750,373号和美国专利公开第2005/0079574号、第2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号和第2009/0002360号。

[0234] 自人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文中视为人抗体或人抗体片段。

[0235] 6.多特异性抗体

[0236] 在某些实施方案中,本文所提供的抗体为多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特

异性抗体为对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性之一针对CLL-1而另一者针对任何其他抗原。在某些实施方案中,结合特异性之一针对CLL-1而另一者针对CD3。参见例如美国专利第5,821,337号。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合于CLL-1的两个不同表位。双特异性抗体还可用于使细胞毒性剂定位于表达CLL-1的细胞。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段。在一些实施方案中,多特异性抗体为对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。

[0237] 在一些实施方案中,多特异性抗体为对至少两个不同抗原结合位点具有结合特异性的单克隆抗体(诸如双特异性抗体)。在一些实施方案中,多特异性抗体的第一抗原结合域和第二抗原结合域可结合同一个分子内的两个表位(分子内结合)。举例而言,多特异性抗体的第一抗原结合域和第二抗原结合域可结合于同一CLL-1分子上的两个不同表位。在某些实施方案中,多特异性抗体结合的两个不同表位为正常不同时通过一种单特异性抗体(诸如常规抗体)或一种免疫球蛋白单一可变域结合的表位。在一些实施方案中,多特异性抗体的第一抗原结合域和第二抗原结合域可结合位于两个不同分子内的表位(分子间结合)。举例而言,多特异性抗体的第一抗原结合域可结合于一种CLL-1分子上的一种表位,而多特异性抗体的第二抗原结合域可结合于不同CLL-1分子上的另一表位,由此使两个分子交联。

[0238] 在一些实施方案中,多特异性抗体(诸如双特异性抗体)的抗原结合域包含两个VH/VL单元,其中第一VH/VL单元结合于第一表位且第二VH/VL单元结合于第二表位,其中各VH/VL单元包含重链可变域(VH)和轻链可变域(VL)。此类多特异性抗体包括但不限于全长抗体、具有两个或两个以上VL和VH域的抗体和抗体片段(诸如Fab、Fv、dsFv、scFv、双功能抗体、双特异性双功能抗体和三功能抗体、已共价或非共价连接的抗体片段)。进一步包含重链可变区至少一部分和/或轻链可变区至少一部分的VH/VL单元也可称为“臂(arm)”或“半聚体(hemimer)”或“半抗体(half antibody)”。在一些实施方案中,半聚体包含足以允许与第二半聚体形成二硫键的重链可变区部分。在一些实施方案中,半聚体包含钮突变(knob mutation)或孔突变(hole mutation),例如以允许与包含互补孔突变或钮突变的第二半聚体或半抗体杂二聚。钮突变和孔突变在下文中进一步论述。

[0239] 在某些实施方案中,本文提供的多特异性抗体可为双特异性抗体。如本文所用,术语“双特异性抗体”是指包含能够结合于一个分子上的两个不同表位或能够结合于两个不同分子上的表位的抗原结合域的多特异性抗体。双特异性抗体也可在本文中称为具有“双重特异性”或为“双重特异性的”。示例性双特异性抗体可结合CLL-1与任何其他抗原。在某些实施方案中,结合特异性之一针对CLL-1而另一者针对CD3。参见例如美国专利第5,821,337号。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合于同一CLL-1分子的两个不同表位。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合于两个不同CLL-1分子上的两个不同表位。双特异性抗体还可用于将细胞毒性剂定位至表达CLL-1的细胞。双特异性抗体可制备为全长抗体或抗体片段。

[0240] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见Milstein和Cuello,Nature 305:537(1983),WO 93/08829和Traunecker等,EMBO J.10:3655(1991))和“钮入孔(knob-in-hole)”工程改造(参见例如美国专利第5,731,168号、WO2009/089004、US2009/0182127、US2011/0287009,Marvin和

Zhu, *Acta Pharmacol. Sin.* (2005) 26 (6) :649-658, 和 Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.*, 26:1-9)。如本文所用, 术语“钮入孔”或“KnH”技术是指体外或体内, 通过在相互作用界面处将突起(钮)引入一种多肽并将空腔(cavity)(孔)引入另一多肽中来指导两个多肽配对在一起之技术。举例而言, KnH已引入抗体的Fc:Fc结合界面、CL:CH1界面或VH/VL界面(参见例如US 2011/0287009、US2007/0178552、WO 96/027011、WO 98/050431以及Zhu等, 1997, *Protein Science* 6:781-788)。在一些实施方案中, 在制造多特异性抗体期间KnH驱动两个不同重链配对在一起。举例而言, 在Fc区中具有KnH的多特异性抗体可进一步包含连接于各Fc区的单一可变域, 或进一步包含与类似或不同轻链可变域配对的不同重链可变域。KnH技术还可用于将两个不同受体细胞外域配对在一起或配对包含不同靶标识别序列的任何其他多肽序列(例如包括亲和体、肽体和其他Fc融合物)。

[0241] 如本文所用, 术语“钮突变”是指在多肽与另一多肽相互作用的界面处将突起(钮)引入多肽的突变。在一些实施方案中, 另一多肽具有孔突变。

[0242] 如本文所用, 术语“孔突变”是指在多肽与另一多肽相互作用之界面处将空腔(孔)引入多肽的突变。在一些实施方案中, 另一多肽具有钮突变。

[0243] 以下提供简要非限制性论述。

[0244] “突起”是指自第一多肽的界面伸出且因此可位于相邻界面(即第二多肽的界面)的互补空腔以便稳定化异源多聚体且由此有利于例如异源多聚体形成而非同源多聚体形成的至少一个氨基酸侧链。突起可存在于原始界面或可以合成方式(例如通过改变编码界面的核酸)引入。在一些实施方案中, 编码第一多肽的界面的核酸经改变以编码突起。为实现此目的, 将编码第一多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸置换为编码至少一个侧链体积大于原始氨基酸残基的“输入”氨基酸残基的核酸。应当理解的是, 可存在一个以上原始和对应的输入残基。各种氨基残基的侧链体积示于例如US2011/0287009的表1。引入“突起”的突变可称为“钮突变”。

[0245] 在一些实施方案中, 用于形成突起的输入残基为选自精氨酸(R)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W)的天然存在的氨基酸残基。在一些实施方案中, 输入残基为色氨酸或酪氨酸。在一些实施方案中, 用于形成突起的原始残基具有小侧链体积, 诸如丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或缬氨酸。

[0246] “空腔”是指自第二多肽的界面凹陷且因此容纳第一多肽的相邻界面上的对应突起的至少一个氨基酸侧链。空腔可存在于原始界面或可以合成方式(例如通过改变编码界面的核酸)引入。在一些实施方案中, 编码第二多肽的界面的核酸经改变以编码空腔。为实现此目的, 将编码第二多肽的界面中的至少一个“原始”氨基酸残基的核酸置换为编码至少一个侧链体积小于原始氨基酸残基的“输入”氨基酸残基的DNA。应当理解的是, 可存在一个以上原始和对应的输入残基。在一些实施方案中, 用于形成空腔的输入残基为选自丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)和缬氨酸(V)的天然存在的氨基酸残基。在一些实施方案中, 输入残基为丝氨酸、丙氨酸或苏氨酸。在一些实施方案中, 用于形成空腔的原始残基具有大侧链体积, 诸如酪氨酸、精氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。引入“空腔”的突变可称为“孔突变”。

[0247] 突起“可位于”空腔中, 其意指分别第一多肽和第二多肽的界面上的突起和空腔的空间位置, 且突起和空腔的尺寸使得突起可位于空腔中, 且不显著干扰第一和第二多肽在该界面的正常缔合。因为诸如Tyr、Phe和Trp的突起通常不自界面轴线垂直延长且具有优选

构象,所以突起与对应空腔的比对在一些情况下可依赖于基于三维结构,诸如通过X射线结晶学或核磁共振(NMR)获得的三维结构将突起/空腔对模型化。这可使用本领域公认的技术实现。

[0248] 在一些实施方案中,IgG1恒定区中的钮突变为T366W(EU编号)。在一些实施方案中,IgG1恒定区中的孔突变包含一或多个选自T366S、L368A和Y407V(EU编号)的突变。在一些实施方案中,IgG1恒定区中的孔突变包含T366S、L368A和Y407V(EU编号)。

[0249] 在一些实施方案中,IgG4恒定区中的钮突变为T366W(EU编号)。在一些实施方案中,IgG4恒定区中的孔突变包含一或多个选自T366S、L368A和Y407V(EU编号)的突变。在一些实施方案中,IgG4恒定区中的孔突变包含T366S、L368A和Y407V(EU编号)。

[0250] 还可通过以下来制备多特异性抗体:工程改造静电转向作用以制备抗体Fc-杂二聚体分子(WO 2009/089004A1);使两个或两个以上抗体或片段交联(参见例如美国专利第4,676,980号,和Brennan等,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如Kostelny等,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用“双功能抗体”技术制造双特异性抗体片段(参见例如Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber等,J.Immunol.,152:5368(1994));以及制备三特异性抗体,如例如Tutt等J.Immunol.147:60(1991)中描述。

[0251] 本文中还包括具有三个或三个以上功能抗原结合位点的工程改造抗体,包括“章鱼抗体”或“双重可变域免疫球蛋白”(DVD)(参见例如US 2006/0025576A1,和Wu等Nature Biotechnology(2007))。本文的抗体或片段还包括包含结合于CLL-1以及另一不同抗原的抗原结合位点的“双作用FAB”或“DAF”(参见例如US 2008/0069820)。

[0252] 7.抗体变体

[0253] 在某些实施方案中,涵盖本文所提供的抗体的氨基酸序列变体。举例而言,可能需要提高抗体的结合亲和力和/或其他生物性质。抗体的氨基酸序列变体可通过将适当修饰引入编码该抗体的核苷酸序列中或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如发生于抗体氨基酸序列内的残基缺失和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终构建体,其限制条件为最终构建体具有期望特征,例如抗原结合。

[0254] a.取代、插入和缺失变体

[0255] 在某些实施方案中,提供具有一或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代诱变的相关位点包括HVR和FR。保守取代示于表1中标题“优选取代”下。更多实质性变化提供于表1中标题“示例性取代”下,且如下文关于氨基酸侧链类别进一步描述。氨基酸取代可引入相关抗体中且针对期望活性筛选产物,例如保留/提高抗原结合、降低免疫原性或改善ADCC或CDC的产物。

[0256] 表1

[0257]

原始残基	示例性取代	优选取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser

[0258]

原始残基	示例性取代	优选取代
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0259] 氨基酸可根据共有侧链性质进行分组：

[0260] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0261] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0262] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0263] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0264] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0265] (6) 芳族: Trp、Tyr、Phe。

[0266] 非保守取代将需要将这些类别之一的成员换成另一类别。

[0267] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体)的一或多个高变区残基。一般而言,选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体将在某些生物性质方面具有修改(例如改善)(例如亲和力提高、免疫原性降低)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物性质。一种示例性取代变体为亲和力成熟抗体,其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文所描述的技术)便利地产生。简言之,使一或多个HVR残基突变且在噬菌体上呈现变异抗体且针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0268] 改变(例如取代)可在HVR中进行以例如提高抗体亲和力。可在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程期间经历高频率突变的密码子所编码的残基(参见例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)))和/或SDR(a-CDR)中用测试结合亲和力的所得变异VH或VL进行此类改变。通过构建二级文库并自二级文库再选择来达成亲和力成熟已描述于Hoogenboom等的*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等编, Human Press, Totowa, NJ, (2001))。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一者将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。随后产生二级文库。随后筛选该文库以鉴别具有期望亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一方法涉及HVR定向方法,其中将若干HVR残基(例如一次4-6个残基)随机分组。参与抗原结合的HVR残基可例如使用丙氨酸扫描诱变或模型化来特定鉴别。具体而言,通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0269] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可发生在一或多个HVR内,只要这些改变基本上不降低抗体结合抗原的能力即可。举例而言,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文所提供的保守取代)。此类改变可在HVR“热点”或SDR外。在上文提供的变异VH和VL序列的某些实施方案中,各HVR未改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0270] 一种适用于鉴别可靶向用于诱变的抗体的残基或区的方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如由Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述。在此方法中,鉴别靶标一个残基或一组残基(例如带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)且置换为中性或带负电氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)以确定抗体与抗原的相互作用是否受影响。可在对初始取代显示功能敏感性的氨基酸位置处引入进一步取代。或者或另外,抗原-抗体复合物的晶体结构用于鉴别抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可作为取代候选物的目标或排除在取代候选物之外。可筛选变体以确定其是否含有期望性质。

[0271] 氨基酸序列插入包括在一个残基至含有一百个或一百个以上残基的多肽长度范围内的氨基和/或羧基端融合物,以及具有单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N末端或C末端与延长抗体的血清半衰期的酶(例如对于ADEPT而言)或多肽的融合物。

[0272] b) 糖基化变体

[0273] 在某些实施方案中,对本文所提供的抗体进行改变以增加或降低抗体糖基化的程度。在抗体上添加糖基化位点或使抗体缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以便创建或移除一或多个糖基化位点来便利地实现。

[0274] 在抗体包含Fc区的情况下,可改变附接于其上的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支双触角寡糖,其一般通过N键附接于Fc区的CH2域的Asn297。参见例如Wright等TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的海藻糖。在一些实施方案中,可对本发明抗体中的寡糖进行修饰以便形成具有某些改善性质的抗体变体。

[0275] 在一个实施方案中,提供具有缺乏(直接或间接)附接于Fc区的海藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。举例而言,此类抗体中海藻糖的量可为1%至80%,1%至65%,5%至65%或20%至40%。海藻糖的量通过计算相对于如通过MALDI-TOF质谱法测量的附接于Asn297的所有糖结构(例如复合、杂交和高甘露糖结构)的总和,糖链内Asn297处的海藻糖的平均量来确定,如例如WO 2008/077546中所描述。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);然而,归因于抗体中微小序列变化,Asn297还可位于294位与300位之间297位的上游或下游约±3个氨基酸处。此类海藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开第US 2003/0157108号(Presta,L.);第US 2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。关于“去海藻糖基化”或“缺乏海藻糖”抗体变体的公开的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等J.Mol.Biol.336:1239-1249 (2004);Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614 (2004)。能够产生去海藻糖基化抗体的细胞系的实例包括缺乏蛋白质海藻糖基化的Lec13CHO细胞(Ripka等Arch.Biochem.Biophys.249:533-545 (1986);美国专利申请第US 2003/0157108 A1号,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等,尤其实施例11),和基因剔除细胞系,诸如 α -1,6-海藻糖基转移酶基因FUT8剔除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614 (2004);Kanda,Y.等,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688 (2006);以及WO2003/085107)。

[0276] 进一步提供具有平分寡糖的抗体变体,例如其中附接于抗体的Fc区的双触角寡糖通过GlcNAc平分。此类抗体变体可具有减少的海藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等);美国专利第6,602,684号 (Umana等);以及US 2005/0123546 (Umana等)。还提供寡糖中的至少一个半乳糖残基与Fc区附接的抗体变体。此类抗体变体可具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087 (Patel等);WO 1998/58964 (Raju,S.);及WO 1999/22764 (Raju,S.)中。

[0277] c.Fc区变体

[0278] 在某些实施方案中,可将一或多个氨基酸修饰引入本文所提供的抗体的Fc区中,从而产生Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),其在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0279] 在某些实施方案中,本发明涵盖具有一些而非所有效应功能的抗体变体,此使得该抗体成为对于其中体内抗体半衰期至关重要,而某些效应功能(诸如补体和ADCC)为不必要或有害的应用而言合乎需要的候选物。可进行体外和/或体内细胞毒性分析以确认CDC和/或ADCC活性的降低/消除。举例而言,可进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体不具有Fc

γ R结合能力(从而可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。用于介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。FcR在造血细胞上的表达概述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991) 的第464页表3中。评估相关分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于以下中:美国专利第5,500,362号(参见例如Hellstrom, I.等*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986))和Hellstrom, I.等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985);第5,821,337号(参见Bruggemann, M.等, *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))。或者,可采用非放射性分析方法(参见例如流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定法(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA);和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定法(Promega, Madison, WI))。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血液单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。或者或另外,可评估相关分子的体内ADCC活性,例如在动物模型(诸如Clynes等*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)中所公开)中。还可进行C1q结合测定以证实抗体不能结合C1q且因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为评估补体活化,可进行CDC分析(参见例如Gazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S.等, *Blood* 101:1045-1052 (2003);以及Cragg, M. S.和M. J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。还可使用本领域已知的方法测定FcRn结合和体内清除率/半衰期(参见例如Petkova, S. B.等, *Int'l. Immunol.* 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0280] 在一些实施方案中,可将一或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc部分中以增加IgG与新生Fc受体的结合。在某些实施方案中,抗体包含根据EU编号的以下三个突变:M252Y、S254T和T256E(“YTE突变”)(美国专利第8,697,650号;还参见Dall'Acqua等, *Journal of Biological Chemistry* 281 (33):23514-23524 (2006))。在某些实施方案中,YTE突变不影响抗体结合于其同源抗原的能力。在某些实施方案中,与天然(即非YTE突变)抗体相比,YTE突变增加抗体的血清半衰期。在一些实施方案中,与天然(即非YTE突变)抗体相比,YTE突变增加抗体的血清半衰期3倍。在一些实施方案中,与天然(即非YTE突变)抗体相比,YTE突变增加抗体的血清半衰期2倍。在一些实施方案中,与天然(即非YTE突变)抗体相比,YTE突变增加抗体的血清半衰期4倍。在一些实施方案中,与天然(即非YTE突变)抗体相比,YTE突变增加抗体的血清半衰期至少5倍。在一些实施方案中,与天然(即非YTE突变)抗体相比,YTE突变增加抗体的血清半衰期至少10倍。参见例如美国专利第8,697,650号;还参见Dall'Acqua等, *Journal of Biological Chemistry* 281 (33):23514-23524 (2006)。

[0281] 在某些实施方案中,YTE突变体提供一种调节抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性的手段。在某些实施方案中,YTE0突变体提供一种调节人源化IgG抗体针对人抗原的ADCC活性的手段。参见例如美国专利第8,697,650号;还参见Dall'Acqua等, *Journal of Biological Chemistry* 281 (33):23514-23524 (2006)。

[0282] 在某些实施方案中,YTE突变体允许同时调节血清半衰期、组织分布和抗体活性(例如IgG抗体的ADCC活性)。参见例如美国专利第8,697,650号;还参见Dall'Acqua等, *Journal of Biological Chemistry* 281 (33):23514-23524 (2006)。

[0283] 具有降低的效应功能的抗体包括根据EU编号Fc区残基238、265、269、270、297、327个329中的一或多个经取代的抗体(美国专利第6,737,056号)。此类Fc突变体包括在根据EU编号氨基酸位置265、269、270、297和327Fc中的两者或两者以上经取代的突变体,包括根据

EU编号残基265和297取代为丙氨酸(即根据EU编号D265A和N297A)的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利第7,332,581号)。在某些实施方案中,Fc突变体包含以下两个氨基酸取代:D265A和N297A。在某些实施方案中,Fc突变体由以下两个氨基酸取代组成:D265A和N297A。

[0284] 在某些实施方案中,用甘氨酸或精氨酸或大至足以破坏在Fc的P329与FcγRIII的色氨酸残基W87和W110之间形成的Fc/Fcγ受体界面内的脯氨酸夹心的氨基酸残基取代野生型人Fc区的位置329(EU编号)(P329)的脯氨酸(Sondermann等:Nature 406,267-273(2000年7月20日))。在另一个实施方案中,Fc变体中的至少一个其他氨基酸取代为S228P、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D或P331S,且在另一个实施方案中,所述至少一个其他氨基酸取代为人IgG1Fc区的L234A和L235A或人IgG4Fc区的S228P和L235E,均根据EU编号(美国专利第8,969,526号,其以全文引用的方式并入本文中)。

[0285] 在某些实施方案中,多肽包含野生型人IgG Fc区的Fc变体,其中所述多肽的人IgG Fc区P329经甘氨酸取代且其中所述Fc变体包含人IgG1Fc区的L234A和L235A或人IgG4Fc区的S228P和L235E的至少两个其他氨基酸取代,且其中残基根据EU编号进行编号(美国专利第8,969,526号,其以全文引用的方式并入本文中)。在某些实施方案中,包含P329G、L234A和L235A(EU编号)取代的多肽显示对人FcγRIIIA和FcγRIIA的亲和力减少,用于下调ADCC至通过包含野生型人IgG Fc区的多肽诱导的ADCC的至少20%,和/或下调ADCP(美国专利第8,969,526号,其以全文引用的方式并入本文中)。

[0286] 在一个具体实施方案中,包含野生型人Fc多肽的Fc变体的多肽包含三重突变:根据EU编号位置Pro329的氨基酸取代、L234A和L235A突变(P329/LALA)(美国专利第8,969,526号,其以全文引用的方式并入本文中)。在具体实施方案中,所述多肽包含以下氨基酸取代:P329G、L234A和L235A,根据EU编号。

[0287] 描述与FcR的结合改善或削弱的某些抗体变体。(参见例如美国专利第6,737,056号;WO 2004/056312,和Shields等,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0288] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一或多个改善ADCC的氨基酸取代(例如Fc区的位置298、333和/或334(EU编号)的取代)的Fc区。

[0289] 在一些实施方案中,在Fc区中进行引起C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)改变(即,改善或削弱)改变的,例如如美国专利第6,194,551号、WO 99/51642和Idusogie等J.Immunol.164:4178-4184(2000)中描述。

[0290] 半衰期延长且与负责将母体IgG转移至胎儿的新生儿Fc受体(FcRn)(Guyer等,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等,J.Immunol.24:249(1994))的结合改善的抗体描述于US 2005/0014934A1(Hinton等)中。那些抗体包含其中具有一或多个改善Fc区与FcRn结合的取代的Fc区。此类Fc变体包括在以下一或多个Fc区残基处具有取代的Fc变体:根据EU编号,238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如Fc区残基434的取代(美国专利第7,371,826号)。关于Fc区变体的其他实例,还参见Duncan和Winter,Nature 322:738-40(1988);美国专利第5,648,260号;美国专利第5,624,821号;和WO 94/29351。

[0291] d. 半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0292] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸工程改造的抗体,例如“THIOMAB™抗体”,其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基取代。在具体实施方案中,经取代的残基存

在于抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基借此位于抗体的可接近位点且可用于使抗体与其他部分(诸如药物部分或接头-药物部分)结合以产生如本文中进一步描述的免疫缀合物。在某些实施方案中,以下残基中的任一或多个可经半胱氨酸取代:轻链的V205(Kabat编号);重链的A140(EU编号);重链的L174(EU编号);重链的Y373(EU编号);轻链的K149(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。在具体实施方案中,本文所述的抗体包含HC-A140C(EU编号)半胱氨酸取代。在具体实施方案中,本文所述的抗体包含LC-K149C(Kabat编号)半胱氨酸取代。在具体实施方案中,本文所述的抗体包含HC-A118C(EU编号)半胱氨酸取代。可如例如美国专利第7,521,541号中所述产生半胱氨酸工程改造的抗体。

[0293] 在某些实施方案中,抗体包含以下重链半胱氨酸取代之一:

[0294]	链(HC/LC)	残基	EU 突变位点编号	Kabat 突变位点编号
	HC	T	114	110
	HC	A	140	136
	HC	L	174	170
	HC	L	179	175
[0295]	HC	T	187	183
	HC	T	209	205
	HC	V	262	258
	HC	G	371	367
	HC	Y	373	369
	HC	E	382	378
	HC	S	424	420
	HC	N	434	430
	HC	Q	438	434

[0296] 在某些实施方案中,抗体包含以下轻链半胱氨酸取代之一:

[0297]	链(HC/LC)	残基	EU突变位点编号	Kabat突变位点编号
	LC	I	106	106
	LC	R	108	108
	LC	R	142	142
	LC	K	149	149

[0298] e. 抗体衍生物

[0299] 在某些实施方案中,可将本文中所提供的抗体进一步修饰以含有本领域已知且可易于获得的其他非蛋白质部分。适于抗体衍生化生物部分包括但不限于水溶性聚合物。水

溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)和葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如丙三醇)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其于水中的稳定性而可具有制造优势。聚合物可具有任何分子量,且可为分支或未分支的。与抗体附接的聚合物的数目可变化,且若连接一个以上聚合物,则聚合物可为相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可基于多种考虑因素来确定,包括但不限于待改善抗体的特殊性质或功能,抗体衍生物是否将在指定病症下用于疗法等。

[0300] 在另一个实施方案中,提供抗体与可通过暴露于辐射而选择性地加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分为碳纳米管(Kam等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605 (2005))。辐射可具有任何波长,且包括但不限于不损害普通细胞但将非蛋白质部分加热至靠近杀死抗体-非蛋白质部分的细胞的温度的波长。

[0301] B. 重组方法和组合物

[0302] 可使用例如如美国专利第4,816,567号中所描述的重组方法和组合物产生抗体。在一个实施方案中,提供编码本文所述的抗-CLL-1抗体的分离核酸。此类核酸可编码构成抗体的VL的氨基酸序列和/或构成VH的氨基酸序列(例如抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中,提供包含此类核酸的一或多种载体(例如表达载体)。在又一个实施方案中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如经转化而具有): (1) 包含编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列的核酸的载体;或(2) 包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码构成抗体VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞为真核细胞,例如中华仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供一种制备抗-CLL-1抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养如上文所提供的包含编码抗体的核酸的宿主细胞且任选地自宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0303] 为重组产生抗-CLL-1抗体,分离例如如上所述的编码抗体的核酸且插入一或多种载体中以在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可易于使用常规程序(例如通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)分离和测序。

[0304] 适于克隆或表达抗体编码载体的宿主细胞包括本文所描述的原核或真核细胞。举例而言,抗体可于细菌中产生,尤其当不需要糖基化和Fc效应功能时。关于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利第5,648,237号、第5,789,199号和第5,840,523号(还参见Charlton, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C.Lo编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254页, 描述大肠杆菌中抗体片段的表达)。在表达之后,抗体可以可溶性级分自细菌细胞糊状物分离且其可进一步经纯化。

[0305] 除原核生物外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也为抗体编码载体的合适克隆或表达宿主,包括糖基化途径已经“人源化”,从而使得所产生的抗体具有部分或完全人糖基化模式的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) 和Li等, Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

[0306] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞还来源于多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴别出众多可与昆虫细胞联合使用的杆状病毒株,尤其是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0307] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如美国专利第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号和第6,417,429号(描述在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0308] 脊椎动物细胞也可用作宿主。举例而言,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可为可用的。可用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例为经SV40转型的猴肾CV1株(COS-7);人胚肾细胞系(如例如在Graham等,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠睾丸支持细胞(mouse sertoli cell)(如例如在Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠肝细胞(buffalo rat liver cell)(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT060562);如例如在Mather等,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述的TRI细胞;MRC 5细胞;及FS4细胞。其他可用的哺乳动物宿主细胞系包括中华仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));及骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编辑,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0309] C.测定法

[0310] 可通过本领域已知的各种测定法对本文所提供的抗-CLL-1抗体针对其物理/化学性质和/或生物活性进行鉴别、筛选或表征。

[0311] 在一个方面中,例如通过已知的方法,诸如ELISA、**BIACore®**、FACS或免疫印迹法测试本发明抗体的抗原结合活性。

[0312] 在另一方面中,可使用竞争分析来鉴别与本文中描述的任一抗体竞争结合于CLL-1的抗体。在某些实施方案中,此类竞争抗体结合于由本文所述的抗体所结合者相同的表位(例如线性或构象表位)。用于对抗体结合的表位进行图谱分析的详细示例性方法提供于Morris(1996)"Epitope Mapping Protocols",Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,NJ)。

[0313] 在一种示例性竞争测定法中,在如下溶液中培育固定的CLL-1,该溶液包含结合于CLL-1的第一标记抗体(例如本文所述的任一抗体)和测试与第一抗体竞争结合于CLL-1的能力的第二未标记抗体。第二抗体可存在于融合瘤上清液中。作为对照,在包含第一标记抗体但无第二未标记抗体的溶液中培育固定的CLL-1。在允许第一抗体结合于CLL-1的条件下培育之后,移除过量未结合的抗体,且测量与固定CLL-1缔合的标记的量。若测试样品中与固定的CLL-1缔合的标记的量相对于对照样品中基本上有所降低,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合于CLL-1。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0314] D.免疫缀合物

[0315] 本发明还提供免疫缀合物,其包含本文中结合于一或多种细胞毒性剂的抗-CLL-1

抗体,所述一或多种细胞毒性剂诸如为化学治疗剂或药物、生长抑制剂、毒素(例如蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射性缀合物)。

[0316] 免疫缀合物允许药物部分靶向递送至肿瘤,且在一些实施方案中,允许在其中发生胞内积聚,其中全身性施用未缀合的药物可对正常细胞造成不可接受的毒性水平(Polakakis P. (2005) *Current Opinion in Pharmacology* 5:382-387)。

[0317] 抗体-药物缀合物(ADC)为靶向型化学治疗分子,其通过将有效细胞毒性药物靶向表达抗原的肿瘤细胞,将抗体与细胞毒性药物的性质组合(Teicher, B.A. (2009) *Current Cancer Drug Targets* 9:982-1004),由此通过使功效最大化且使脱靶毒性最小化而增强治疗指数(Carter, P.J. 和 Senter P.D. (2008) *The Cancer Jour.* 14 (3):154-169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107)。

[0318] 本发明的ADC化合物包括具有抗癌活性的化合物。在一些实施方案中,ADC化合物包括缀合,即共价附接于药物部分的抗体。在一些实施方案中,抗体经由接头共价连接于药物部分。本发明的抗体-药物缀合物(ADC)选择性地递送有效剂量的药物至肿瘤组织,从而可实现较大选择性,即较低有效剂量,同时增加治疗指数(“治疗窗”)。

[0319] 抗体-药物缀合物(ADC)的药物部分(D)可包括具有细胞毒性或细胞生长抑制作用的任何化合物、部分或基团。药物部分可通过多种机制赋予其细胞毒性和细胞生长抑制作用,包括但不限于微管蛋白结合、DNA结合或插入和抑制RNA聚合酶、蛋白质合成和/或拓扑异构酶。示例性药物部分包括但不限于类美登素、多拉司他汀、澳瑞他汀(auristatin)、卡奇霉素、吡咯并苯并二氮革(PBD)、奈莫柔比星及其衍生物、PNU-159682、蒽环类、倍癌霉素、长春花生物碱、紫杉烷、单端孢霉烯族毒素、CC1065、喜树碱(camptothecin)、依利奈法德(elinafide)及其具有细胞毒活性的立体异构体、电子等排体、类似物和衍生物。此类免疫缀合物的非限制性实例进一步详细论述于下文中。

[0320] 1. 示例性抗体-药物缀合物

[0321] 抗体-药物缀合物(ADC)化合物的示例性实施方案包含靶向肿瘤细胞的抗体(Ab)、药物部分(D)和附接Ab与D的接头部分(L)。在一些实施方案中,抗体经由一或多个氨基酸残基,诸如赖氨酸和/或半胱氨酸附接于接头部分(L)。

[0322] 一个示例性ADC具有式I:

[0323] $Ab-(L-D)_p I$

[0324] 其中p为1至约20。在一些实施方案中,可缀合于抗体的药物部分的数目由游离半胱氨酸残基之数目限制。在一些实施方案中,游离半胱氨酸残基通过本文所描述的方法引入抗体氨基酸序列中。示例性式I之ADC包括但不限于具有1、2、3或4个工程改造半胱氨酸氨基酸的抗体(Lyon, R. 等 (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138)。在一些实施方案中,一或多个游离半胱氨酸残基不使用工程改造已存在于抗体中,在此情况下现有游离半胱氨酸残基可用于将抗体缀合于药物。在一些实施方案中,抗体在抗体结合前暴露于还原条件以产生一或多个游离半胱氨酸残基。

[0325] a) 示例性接头

[0326] “接头”(L)为可用于连接一或多个药物部分(D)于抗体(Ab)以形成式I的抗体-药物缀合物(ADC)的双官能或多官能部分。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物(ADC)可使用

具有用于共价附接于药物和抗体的反应性官能团的接头制备。举例而言,在一些实施方案中,抗体 (Ab) 的半胱氨酸硫醇可与接头或药物-接头中间体的反应性官能团形成键以制备 ADC。

[0327] 在一个方面中,接头具有能够与抗体上存在的游离半胱氨酸反应形成共价键的官能团。非限制性示例性此类反应性官能团包括马来酰亚胺、卤代乙酰胺、 α -卤代乙酰基、活化酯 (诸如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯)、酸酐、酰氯、磺酰氯、异氰酸酯和异硫氰酸酯。参见例如 Klussman 等 (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15 (4):765-773 第 766 页的缀合方法和本文中的实施例。

[0328] 在一些实施方案中,接头具有能够使抗体上存在的亲电子基团反应的官能团。示例性此类亲电子基团包括但不限于醛和酮羰基。在一些实施方案中,接头的反应性官能团的杂原子可与抗体上的亲电子基团反应且形成与抗体单元的共价键。非限制性示例性此类反应性官能团包括但不限于酰肼、肟、氨基、肼、硫半卡巴腓、肼羧酸酯和芳基酰肼。

[0329] 接头可包含一或多种接头组分。示例性接头组分包括 6-马来酰亚胺基己酰基 (“MC”)、马来酰亚胺基丙酰基 (“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸 (“val-cit” 或 “vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸 (“ala-phe”)、对氨基苯甲氧基羰基 (“PAB”)、4-(2-吡啶基硫基) 戊酸 N-琥珀酰亚胺基酯 (“SPP”) 和环己烷-1-甲酸 4-(N-马来酰亚胺基甲基) 酯 (“MCC”)。各种接头组分为本领域已知,其中一些在下文中描述。

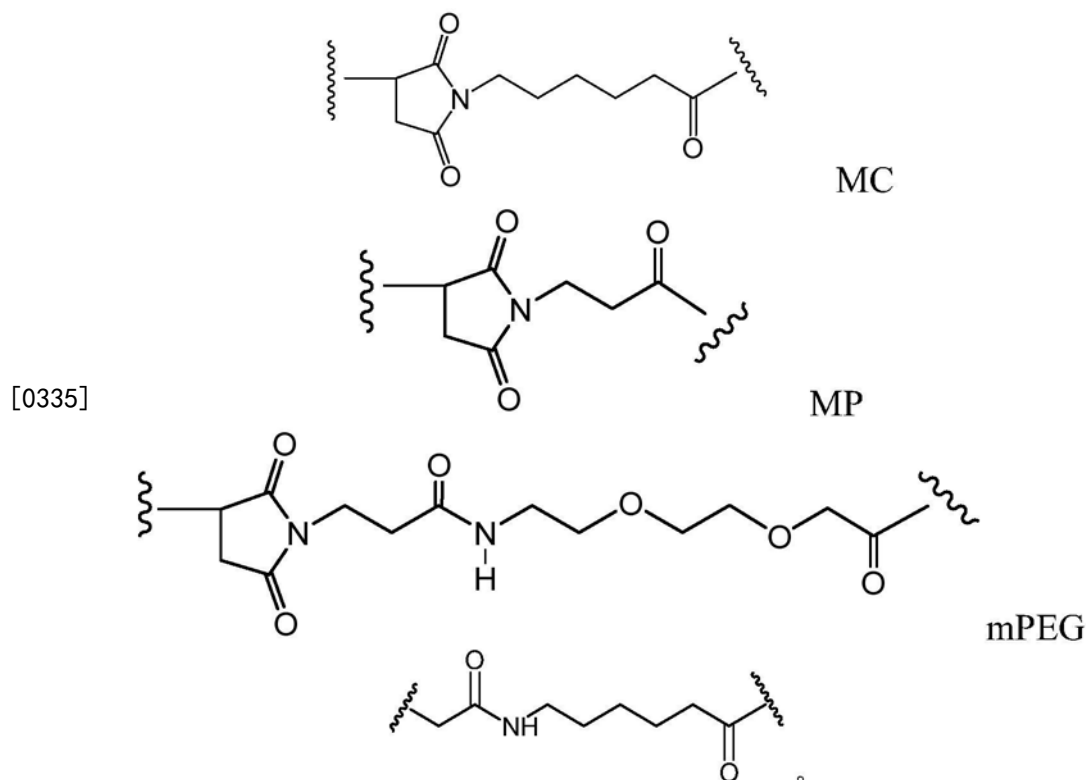
[0330] 接头可为促进药物释放的“可裂解接头”。非限制性示例性可裂解接头包括酸不稳定接头 (例如包含脲)、蛋白酶敏感性 (例如肽酶敏感性) 接头、光不稳定接头或含二硫键的接头 (Chari 等, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); US 5208020)。

[0331] 在某些实施方案中,接头具有下式 II:

[0332] $-A_a-W_w-Y_y-$ II

[0333] 其中 A 为“延伸物单元 (stretcher unit)”,且 a 为 0 至 1 的整数;W 为“氨基酸单元”,且 w 为 0 至 12 的整数;Y 为“间隔基单元 (spacer unit)”,且 y 为 0、1 或 2;且 Ab、D 和 p 如上文针对式 I 所定义。此类接头的示例性实施方案描述于美国专利第 7,498,298 号中,将其明确地以引用的方式并入本文中。

[0334] 在一些实施方案中,接头组分包含将抗体连接于另一接头组分或药物部分的“延伸物单元”。非限制性示例性延伸物单元展示如下 (其中波形线表示共价连接于抗体、药物或其他接头组分的位点):



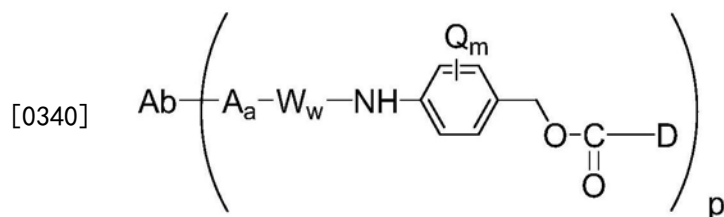
[0336] 在一些实施方案中,接头可为肽模拟物(peptidomimetic)接头,诸如W02015/095227、W02015/095124或W02015/095223中描述的肽模拟物接头,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0337] 在一些实施方案中,接头组分包含“氨基酸单元”。在一些此类实施方案中,氨基酸单元允许接头通过蛋白酶裂解,由此促进药物在暴露于胞内蛋白酶,诸如溶酶体酶时自免疫缀合物释放(Doronina等(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784)。示例性氨基酸单元包括但不限于二肽、三肽、四肽和五肽。示例性二肽包括但不限于缬氨酸-瓜氨酸(val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(alphe)、苯丙氨酸-赖氨酸(pklys)、苯丙氨酸-高赖氨酸(pkhomolys)和N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(Me-val-cit)。示例性三肽包括但不限于甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。氨基酸单元可包含天然存在的氨基酸残基和/或次要氨基酸和/或非天然存在的氨基酸类似物,诸如瓜氨酸。氨基酸单元可针对通过特定酶,例如肿瘤相关蛋白酶、组织蛋白酶B、C和D或纤维蛋白溶酶蛋白酶的酶促裂解进行设计且最佳化。

[0338] 在一些实施方案中,接头组分包含将抗体直接或经由延伸物单元和/或氨基酸单元连接于药物部分的“间隔基单元”。间隔基单元可为“自分解型(self-immolative)”或“非自分解型(non-self-immolative)”。“非自分解型”间隔基单元为在ADC裂解时部分或所有间隔基单元仍然结合于药物部分的间隔基单元。非自分解型间隔基单元的实例包括但不限于甘氨酸间隔基单元和甘氨酸-甘氨酸间隔基单元。在一些实施方案中,含有甘氨酸-甘氨酸间隔基单元的ADC通过肿瘤细胞相关蛋白酶进行酶促裂解,使得甘氨酸-甘氨酸-药物部分自ADC的其余部分释放。在一些此类实施方案中,甘氨酸-甘氨酸-药物部分在肿瘤细胞中经受水解步骤,因此自药物部分裂解甘氨酸-甘氨酸间隔基单元。

[0339] “自分解型”间隔基单元允许释放药物部分。在某些实施方案中,接头的间隔基单

元包含对氨基苯甲基单元。在一些此类实施方案中,对氨基苯甲基醇经由酰胺键附接于氨基酸单元,且在苯甲醇与药物之间制得氨基甲酸酯、甲基氨基甲酸酯或碳酸酯 (Hamann等 (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103)。在一些实施方案中,间隔基单元为对氨基苯甲氧基羰基 (PAB)。在一些实施方案中,包含自分解型接头的ADC具有以下结构:



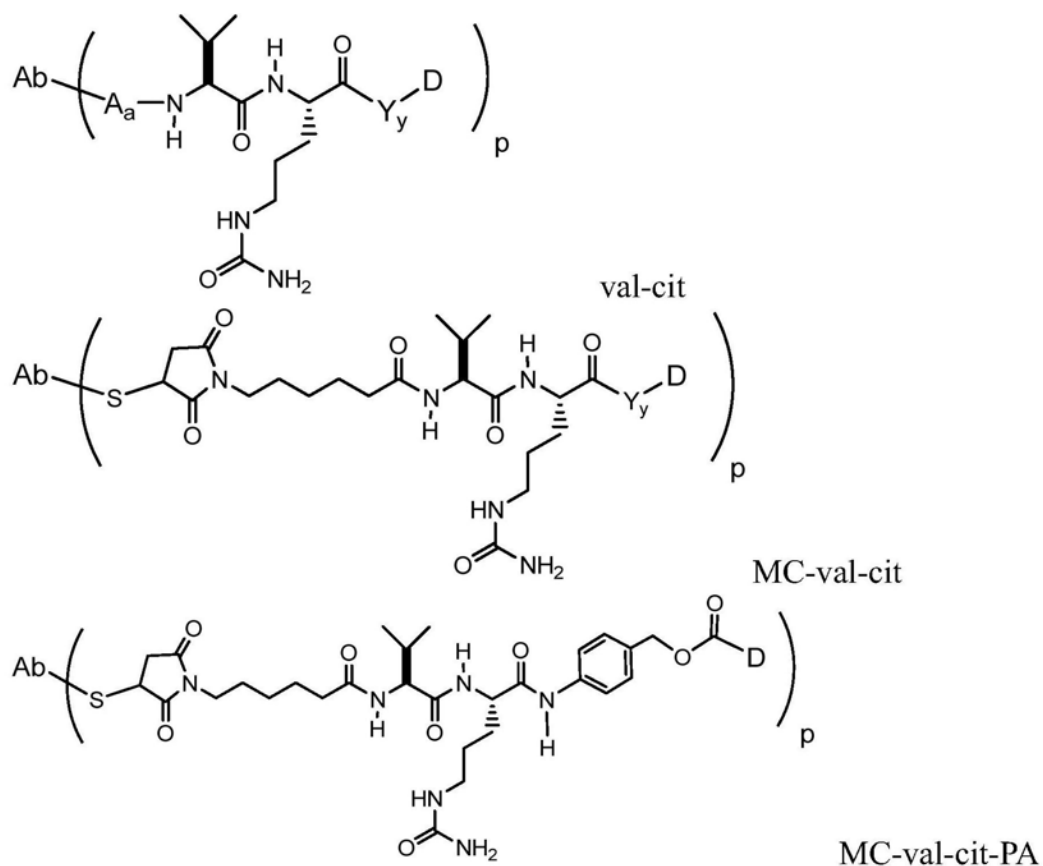
[0341] 其中Q为-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-卤素、-硝基或-氰基;m为在0至4范围内的整数;且p在1至约20范围内。在一些实施方案中,p在1至10、1至7、1至5或1至4范围内。

[0342] 自分解型间隔基的其他实例包括但不限于电子性质类似于PAB基团的芳族化合物,诸如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(美国专利第7,375,078号;Hay等(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)和邻或对氨基苯甲基缩醛。在一些实施方案中,可使用在酰胺键水解时经历环化的间隔基,诸如经取代和未经取代的4-氨基丁酰胺(Rodrigues等(1995) Chemistry Biology 2:223)、适当经取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环系统(Storm等(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)和2-氨基苯基丙酰胺(Amsberry等(1990) J. Org. Chem. 55:5867)。药物与甘氨酸残基的α-碳的连接可用于ADC的自分解型间隔基的另一实例(Kingsbury等(1984) J. Med. Chem. 27:1447)。

[0343] 在一些实施方案中,接头L可为用于经由分支的多官能接头部分共价连接一个以上药物部分于抗体的树枝状接头(Sun等(2002) Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215;Sun等(2003) Bioorganic&Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。树枝状接头可增加药物与抗体的摩尔比,即负载,其与ADC效能有关。因此,在抗体仅载有一个反应性半胱氨酸硫醇基的情况下,可经由树枝状接头附接多个药物部分。

[0344] 下文展示在式I的ADC的情况下非限制性示例性接头:

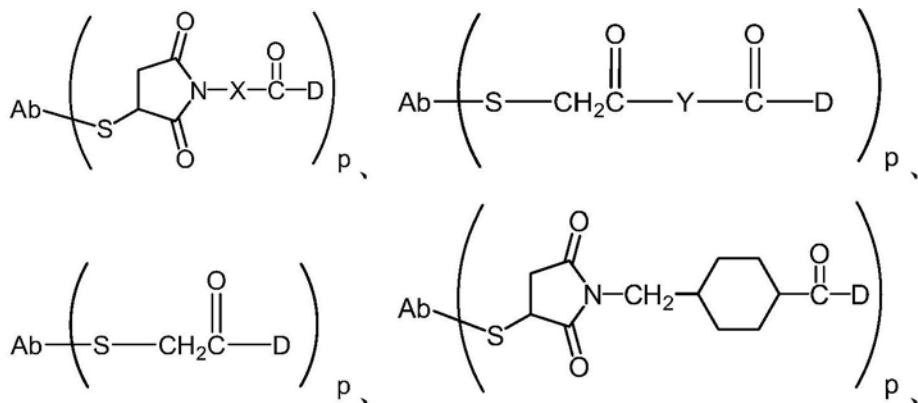
[0345]



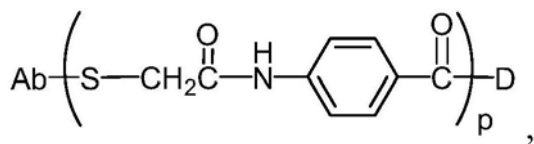
B

[0346] 其他非限制性示例性ADC包括如下结构：

[0347]

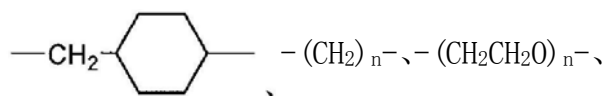


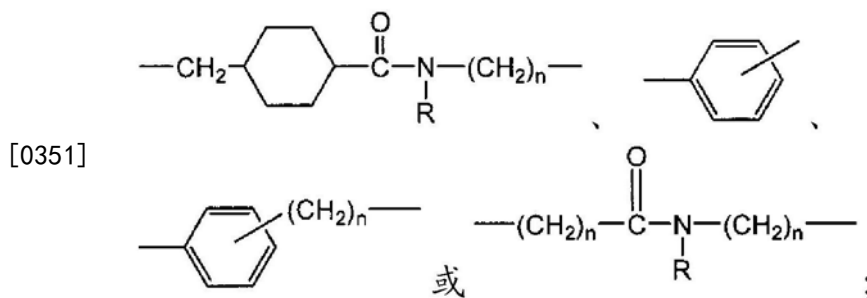
[0348]



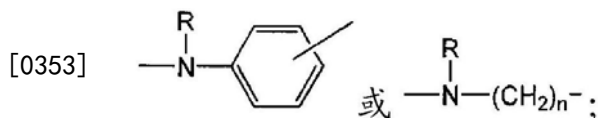
[0349] 其中X为：

[0350]





[0352] Y为:



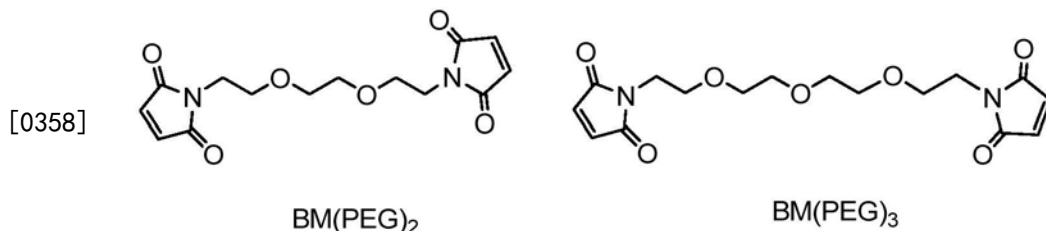
[0354] 各R独立地为H或C₁-C₆烷基;且n为1至12。

[0355] 通常,肽型接头可通过在两个或更多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备。例如根据液相合成方法可制备此类肽键(例如E. Schröder 和K. Lübke (1965) "The Peptides",第1卷,第76-136页,Academic Press)。

[0356] 在一些实施方案中,接头经调节溶解性和/或反应性的基团取代。作为一个非限制性实例,诸如磺酸根(-SO₃⁻)或铵的带电取代基可增加接头试剂的水溶性且促进接头试剂与抗体和/或药物部分的偶联反应,或促进Ab-L(抗体-接头中间体)与D或D-L(药物-接头中间体)与Ab的偶联反应,取决于用于制备ADC的合成途径而定。在一些实施方案中,使接头的一部分与抗体偶联且使接头的一部分与药物偶联,然后使Ab-(接头部分)^a与药物-(接头部分)^b偶联以形成式I的ADC。在一些此类实施方案中,抗体包含一个以上(接头部分)^a取代基,使得在式I的ADC中一个以上药物与抗体偶联。

[0357] 本发明的化合物明确涵盖(但不限于)用以下接头试剂制备的ADC:双-马来酰亚胺基-三氧基乙二醇(BMPEO)、N-(β-马来酰亚胺基丙基氧基)-N-羟基琥珀酰亚胺酯(BMPS)、N-(ε-马来酰亚胺基己酰基氧基)琥珀酰亚胺酯(EMCS)、N-[γ-马来酰亚胺基丁酰基氧基]琥珀酰亚胺酯(GMBS)、1,6-己烷-双-乙基砜(HBVS)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基-(6-酰氨基己酸)琥珀酰亚胺酯(LC-SMCC)、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)、4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酰肼(MPBH)、3-(溴乙酰氨基)丙酸琥珀酰亚胺酯(SBAP)、碘乙酸琥珀酰亚胺酯(SIA)、(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸琥珀酰亚胺酯(SIAB)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、4-(对马来酰亚胺基苯基)丁酸琥珀酰亚胺酯(SMPB)、6-[(β-马来酰亚胺基丙酰氨基)己酸]琥珀酰亚胺酯(SMPH)、亚氨基硫杂环戊烷(IT)、磺酸基-EMCS、磺酸基-GMBS、磺酸基-KMUS、磺酸基-MBS、磺酸基-SIAB、磺酸基-SMCC和磺酸基-SMPB以及琥珀酰亚胺基-(4-乙基砜)苯甲酸酯(SVSB),且包括双-马来酰亚胺基试剂:二硫基双马来酰亚胺基乙烷(DTME)、1,4-双马来酰亚胺基丁烷(BMB)、1,4-双马来酰亚胺基-2,3-二羟基丁烷(BMDB)、双马来酰亚胺基己烷(BMH)、双马来酰亚胺基乙烷(BMOE)、BM(PEG)₂(下文展示)和BM(PEG)₃(下文展示);酰亚胺酯的双官能衍生物(诸如二亚胺代己二酸二甲酯HC1)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(诸如戊二醛)、双叠氮基化合物(诸如双(对叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如

如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。在一些实施方案中,双马来酰亚胺试剂允许抗体中半胱氨酸的硫醇基附接于含硫醇的药物部分、接头或接头-药物中间体。与硫醇基反应的其他官能团包括但不限于碘乙酰胺、溴乙酰胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、异氰酸酯和异硫氰酸酯。



[0359] 某些可用的接头试剂可获自各种商业来源,诸如Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)、Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), 或根据本领域描述的程序合成; 例如Toki等(2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Dubowchik等(1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60; Walker, M. A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch等(1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 和WO 04/032828。

[0360] 碳14标记的1-异硫氰基苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)为用于将放射性核苷酸缀合于抗体的示例性螯合剂。参见例如W094/11026。

[0361] b) 示例性药物部分

[0362] (1) 美登素和类美登素

[0363] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含缀合于一或多个类美登素分子的抗体。类美登素为美登素的衍生物,且为通过抑制微管蛋白聚合而起作用的有丝分裂抑制剂。美登素首先自东非灌木齿叶美登木(Maytenus serrata)分离而得(美国专利第3896111号)。随后,发现某些微生物也产生类美登素,诸如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利第4,151,042号)。合成类美登素公开于例如美国专利第4,137,230号;第4,248,870号;第4,256,746号;第4,260,608号;第4,265,814号;第4,294,757号;第4,307,016号;第4,308,268号;第4,308,269号;第4,309,428号;第4,313,946号;第4,315,929号;第4,317,821号;第4,322,348号;第4,331,598号;第4,361,650号;第4,364,866号;第4,424,219号;第4,450,254号;第4,362,663号;和第4,371,533号。

[0364] 类美登素药物部分为抗体-药物缀合物中具有吸引力的药物部分,因为其:(i) 通过发酵或发酵产物的化学修饰或衍生化,相对易于制备;(ii) 易由适于经由非二硫化物接头缀合于抗体的官能团衍生;(iii) 在血浆中稳定;且(iv) 针对多种肿瘤细胞系有效。

[0365] 适用作类美登素药物部分的某些类美登素为本领域已知,且可自天然来源根据已知方法分离,或使用基因工程改造技术产生(参见例如Yu等(2002) PNAS 99:7968-7973)。类美登素也可根据已知方法以合成方式制备。

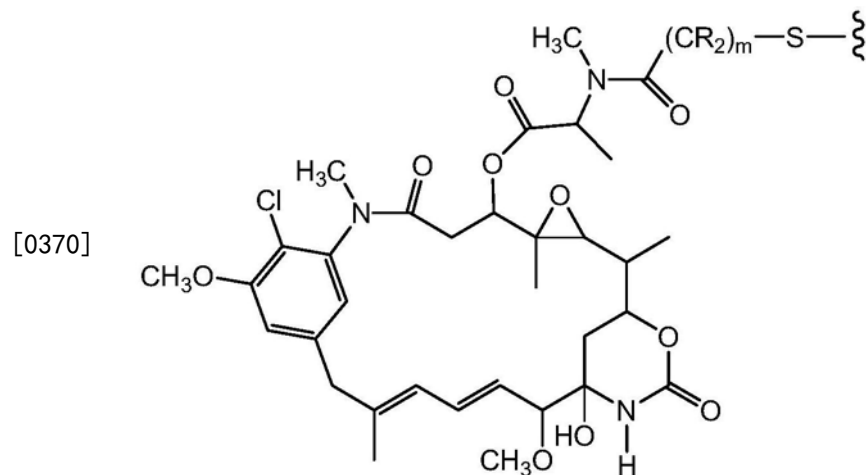
[0366] 示例性类美登素药物部分包括但不限于具有经修饰的芳环的类美登素,诸如:C-19-脱氯(美国专利第4256746号)(例如通过氢化锂铝还原安丝菌素(ansamycin) P2制备); C-20-羟基(或C-20-脱甲基)+/-C-19-脱氯(美国专利第4361650号和第4307016号)(例如通过使用链霉菌或放线菌脱甲基化或使用LAH脱氯来制备); 和C-20-脱甲氧基、C-20-酰

氧基(-OCOR)、+/-脱氯(美国专利第4,294,757号)(例如通过使用酰氯进行酰化来制备),及在芳环其他位置具有修饰的类美登素。

[0367] 示例性类美登素药物部分还包括具有诸如以下修饰的类美登素:C-9-SH(美国专利第4424219号)(例如通过美登醇与H₂S或P₂S₅反应制备);C-14-烷氧基甲基(脱甲氧基/CH₂OR)(US 4331598);C-14-羟基甲基或酰氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美国专利第4450254号)(例如由诺卡菌属(*Nocardia*)制备);C-15-羟基/酰氧基(US 4364866)(例如通过链霉菌转化美登醇制备);C-15-甲氧基(美国专利第4313946号和第4315929号)(例如自滑桃树属(*Trewia nudiflora*)分离);C-18-N-脱甲基(美国专利第4362663号和第4322348号)(例如通过美登醇由链霉菌去甲基化制备);及4,5-脱氧基(US 4371533)(例如通过三氯化钛/LAH还原美登醇制备)。

[0368] 类美登素化合物上的许多位置适用作连接位置。举例而言,可通过使用常规偶联技术与羟基反应形成酯连接。在一些实施方案中,反应可在具有羟基的C-3位置、经羟基甲基修饰的C-14位置、经羟基修饰的C-15位置和具有羟基的C-20位置发生。在一些实施方案中,在美登醇或美登醇类似物的C-3位置形成连接。

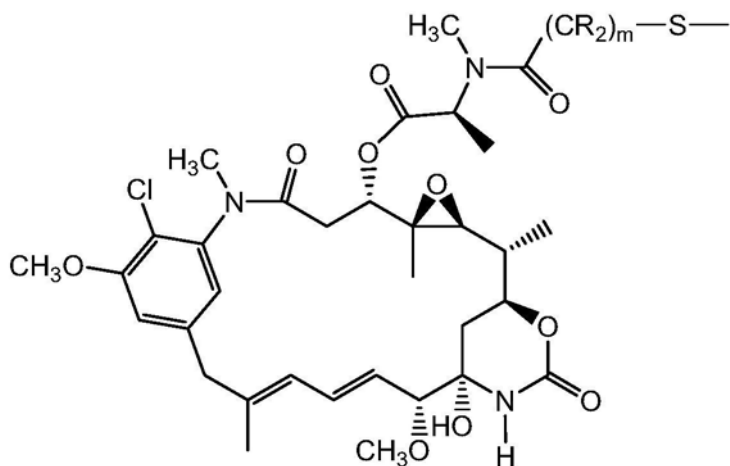
[0369] 类美登素药物部分包括具有以下结构的类美登素药物部分:



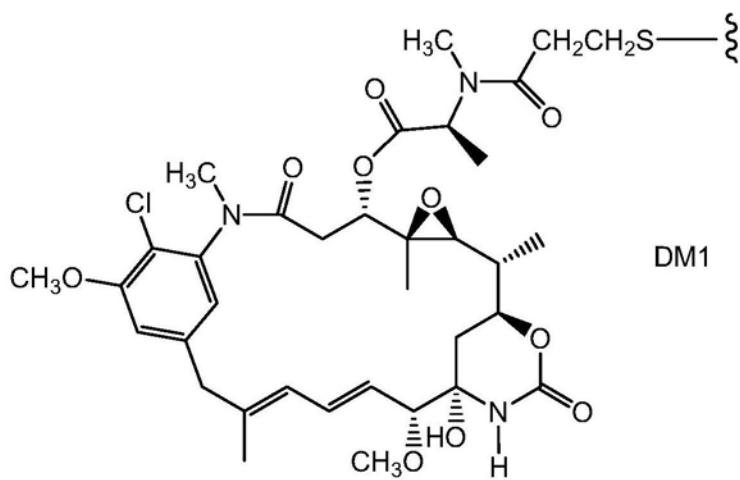
[0371] 其中波形线表示类美登素药物部分的硫原子共价附接于ADC的接头。各R可独立地为H或C₁-C₆烷基。将酰氨基附接于硫原子的亚烷基链可为甲基、乙基或丙基,即m为1、2或3(US 633410;US 5208020;Chari等(1992)Cancer Res.52:127-131;Liu等(1996)Proc.Natl.Acad.Sci USA93:8618-8623)。

[0372] 本发明的ADC涵盖类美登素药物部分的所有立体异构体,即手性碳R和S构型的任何组合(US 7276497;US 6913748;US 6441163;US 633410(RE39151);US 5208020;Widdison等(2006)J.Med.Chem.49:4392-4408,以全文引用的方式并入本文中)。在一些实施方案中,类美登素药物部分具有以下立体化学:

[0373]

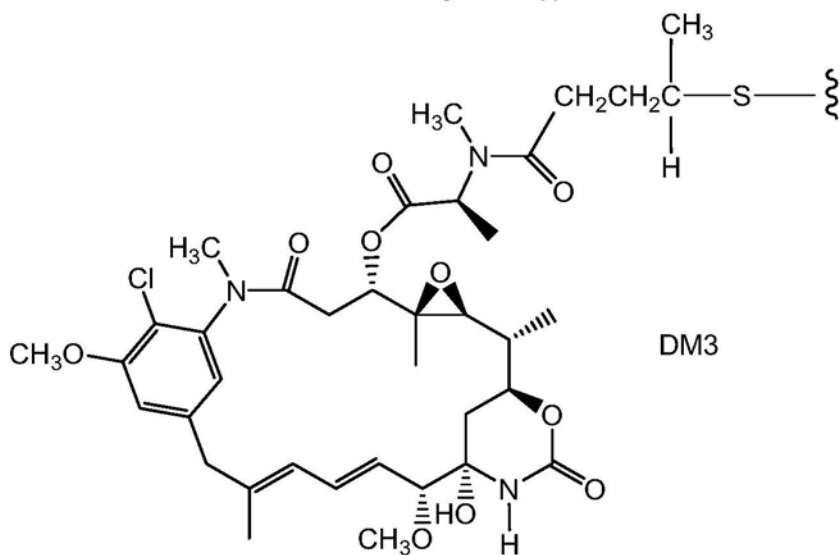


[0374] 类美登素药物部分的示例性实施方案包括但不限于具有以下结构的DM1、DM3和DM4:



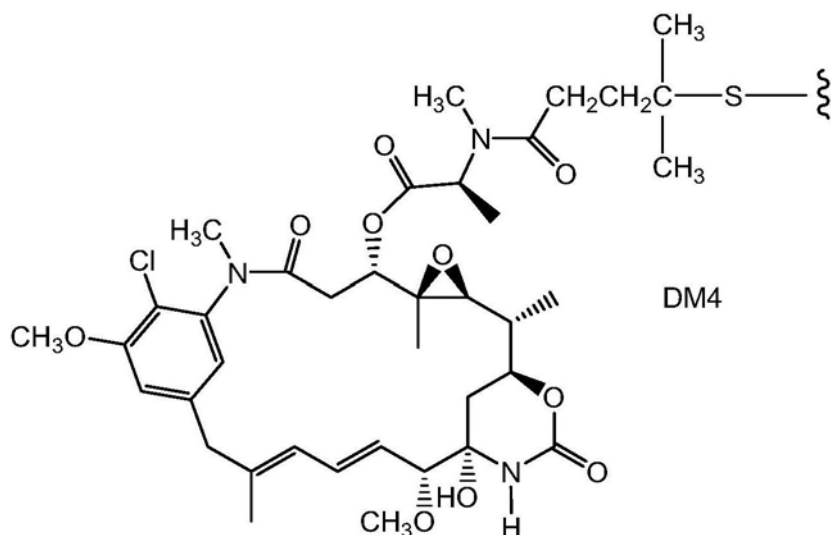
DM1

[0375]



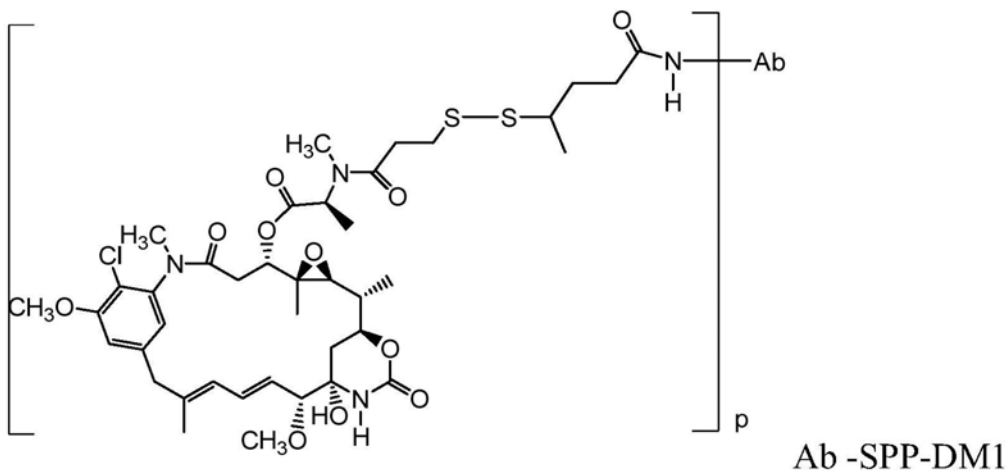
DM3

[0376]

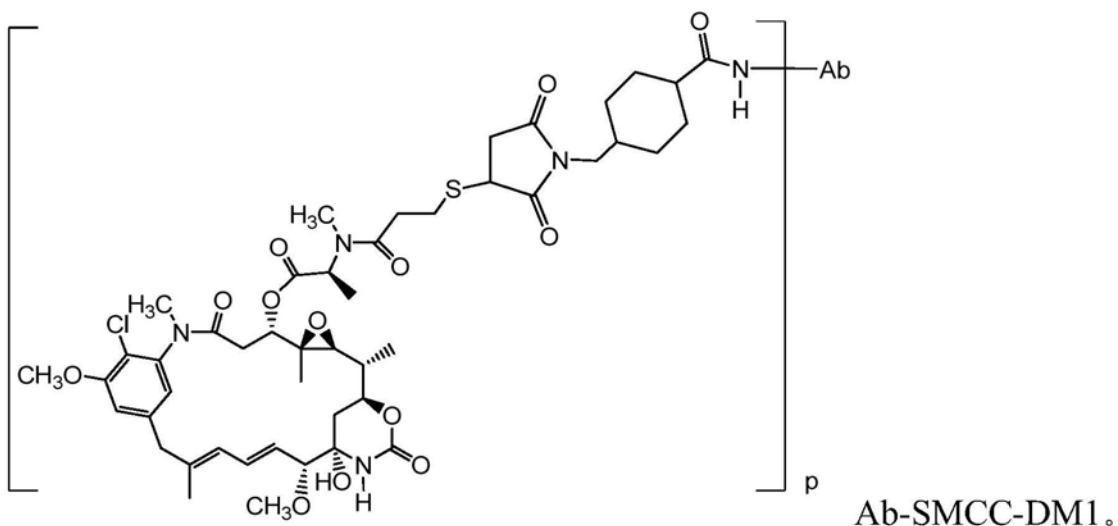


[0377] 其中波形线表示药物的硫原子共价连接于抗体-药物缀合物的接头(L)。

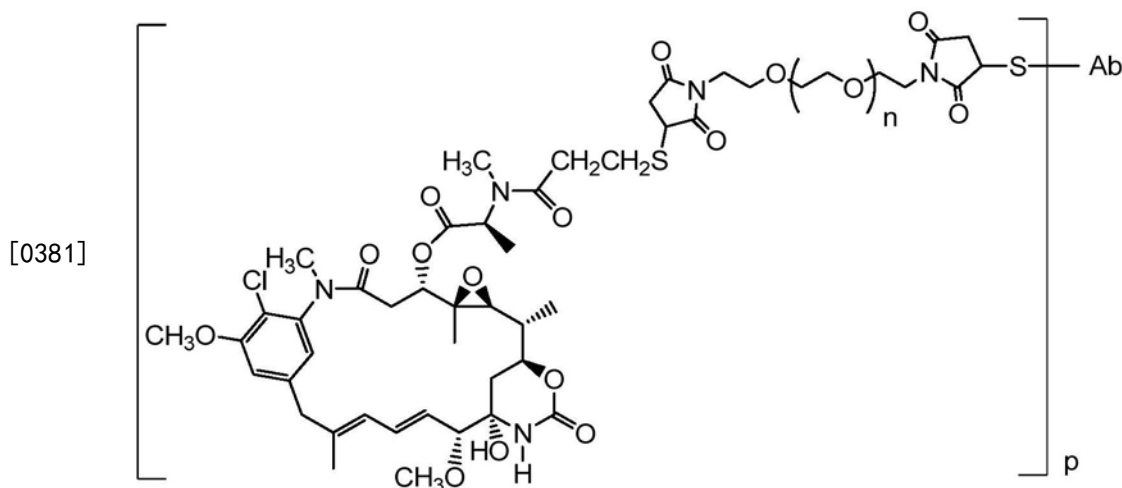
[0378] 其他示例性类美登素抗体-药物缀合物具有以下结构和缩写(其中Ab为抗体且p为1至约20。在一些实施方案中,p为1至10,p为1至7,p为1至5,或p为1至4):



[0379]



[0380] 其中DM1经由BMPE0接头连接于抗体的硫醇基的示例性抗体-药物缀合物具有以下结构和缩写:



[0382] 其中Ab为抗体;n为0、1或2;且p为1至约20。在一些实施方案中,p为1至10,p为1至7,p为1至5,或p为1至4。

[0383] 含有类美登素的免疫缀合物、其制备方法及其治疗用途例如公开于美国专利第5,208,020号和第5,416,064号、US 2005/0276812A1及欧洲专利EP 0 425 235B1,其公开内容以引用的方式明确并入本文中。还参见Liu等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623 (1996);及Chari等Cancer Research52:127-131 (1992)。

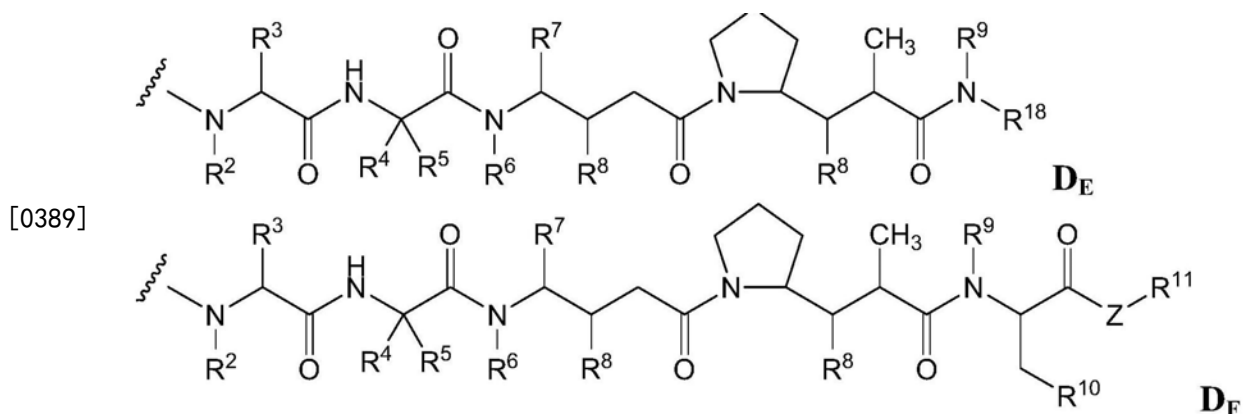
[0384] 在一些实施方案中,抗体-类美登素缀合物可通过化学连接抗体于类美登素分子来制备,不显著降低抗体或类美登素分子的生物活性。参见例如美国专利第5,208,020号(其公开内容以引用的方式明确并入本文中)。在一些实施方案中,每个抗体分子平均结合3-4个类美登素分子的ADC已展示增强靶标细胞的细胞毒性的功效,不负面影响抗体的功能或溶解性。在一些情况下,预期与使用裸抗体相比,即使一个分子毒素/抗体也可增强细胞毒性。

[0385] 用于制备抗体-类美登素缀合物的示例性连接基团包括例如本文中描述的连接基团和以下文献中披露的连接基团:美国专利第5208020号;EP专利0 425 235B1;Chari等Cancer Research 52:127-131(1992);US 2005/0276812A1;和US 2005/016993A1,其公开内容以引用的方式明确并入本文中。

[0386] (2) 澳瑞他汀和多拉司他汀

[0387] 药物部分包括多拉司他汀、澳瑞他汀及其类似物和衍生物(US 5635483;US 5780588;US 5767237;US 6124431)。澳瑞他汀为海洋软体动物化合物多拉司他汀-10的衍生物。虽然不欲受任何特定理论束缚,但多拉司他汀和澳瑞他汀已展示出干扰微管动力学、GTP水解及与细胞分裂(Woyke等(2001)Antimicrob.Agents and Chemother.45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5663149)和抗真菌活性(Pettit等(1998)Antimicrob.Agents Chemother.42:2961-2965)。多拉司他汀/澳瑞他汀药物部分可经由肽药物部分的N(氨基)末端或C(羧基)末端附接于抗体(WO 02/088172;Doronina等(2003)Nature Biotechnology 21(7):778-784;Francisco等(2003)Blood 102(4):1458-1465)。

[0388] 示例性澳瑞他汀实施方案包括N末端连接的单甲基澳瑞他汀药物部分D_E和D_F,公开于US 7498298和US 7659241,其公开内容以全文引用的方式明确并入:



[0390] 其中D_E和D_F的波形线表示共价连接于抗体或抗体-接头组分的位点,且在各位置独立地;

[0391] R²选自H和C₁-C₈烷基;

[0392] R³选自H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳环)、C₃-C₈杂环和C₁-C₈烷基-(C₃-C₈杂环);

[0393] R⁴选自H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳环)、C₃-C₈杂环和C₁-C₈烷基-(C₃-C₈杂环);

[0394] R⁵选自H和甲基;

[0395] 或R⁴和R⁵共同形成碳环且具有式-(CR^aR^b)_n-,其中R^a和R^b独立地选自H、C₁-C₈烷基和C₃-C₈碳环且n选自2、3、4、5和6;

[0396] R⁶选自H和C₁-C₈烷基;

[0397] R⁷选自H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳环)、C₃-C₈杂环和C₁-C₈烷基-(C₃-C₈杂环);

[0398] 各R⁸独立地选自H、OH、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳环和O-(C₁-C₈烷基);

[0399] R⁹选自H和C₁-C₈烷基;

[0400] R¹⁰选自芳基或C₃-C₈杂环;

[0401] Z为O、S、NH或NR¹²,其中R¹²为C₁-C₈烷基;

[0402] R¹¹选自H、C₁-C₂₀烷基、芳基、C₃-C₈杂环、-(R¹³O)_m-R¹⁴或-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

[0403] m为在1-1000范围内的整数;

[0404] R¹³为C₂-C₈烷基;

[0405] R¹⁴为H或C₁-C₈烷基;

[0406] R¹⁵每次出现时独立地为H、COOH、-(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂、-(CH₂)_n-SO₃H或-(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₈烷基;

[0407] R¹⁶每次出现时独立地为H、C₁-C₈烷基或-(CH₂)_n-COOH;

[0408] R¹⁸选自-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-芳基、-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈杂环)和-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈碳环);且

[0409] n为在0至6范围内的整数。

[0410] 在一个实施方案中,R³、R⁴和R⁷独立地为异丙基或仲丁基且R⁵为-H或甲基。在一个示例性实施方案中,R³和R⁴各为异丙基,R⁵为-H,且R⁷为仲丁基。

[0411] 在另一个实施方案中,R²和R⁶各为甲基,且R⁹为-H。

[0412] 在另一个实施方案中, R^8 每次出现时为 $-OCH_3$ 。

[0413] 在一个示例性实施方案中, R^3 和 R^4 各为异丙基, R^2 和 R^6 各为甲基, R^5 为 $-H$, R^7 为仲丁基, R^8 每次出现时为 $-OCH_3$, 且 R^9 为 $-H$ 。

[0414] 在一个实施方案中, Z 为 $-O-$ 或 $-NH-$ 。

[0415] 在一个实施方案中, R^{10} 为芳基。

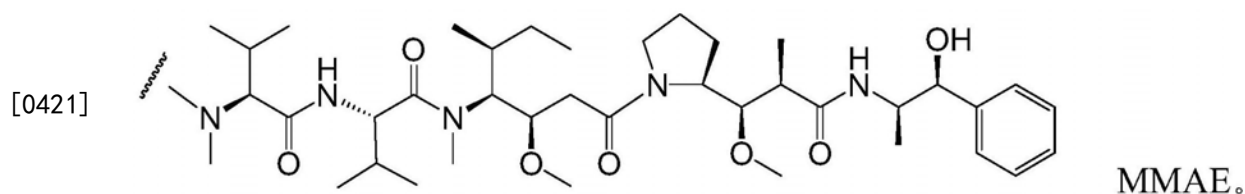
[0416] 在一示例性实施方案中, R^{10} 为 $-$ 苯基。

[0417] 在一示例性实施方案中, 当 Z 为 $-O-$ 时, R^{11} 为 $-H$ 、甲基或叔丁基。

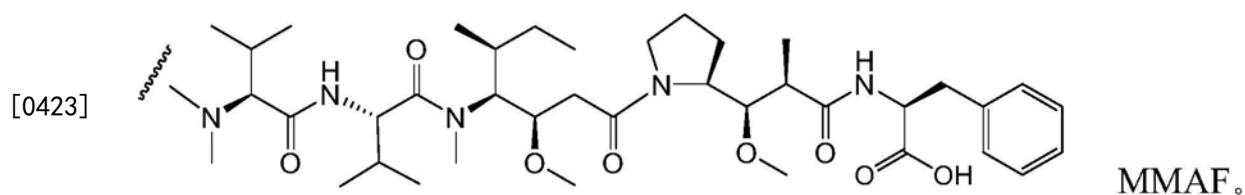
[0418] 在一个实施方案中, 当 Z 为 $-NH-$ 时, R^{11} 为 $-CH(R^{15})_2$, 其中 R^{15} 为 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, 且 R^{16} 为 $-C_1-C_8$ 烷基或 $-(CH_2)_n-COOH$ 。

[0419] 在另一个实施方案中, 当 Z 为 $-NH-$ 时, R^{11} 为 $-CH(R^{15})_2$, 其中 R^{15} 为 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 。

[0420] 式 D_E 的示例性澳瑞他汀实施方案为MMAE, 其中波形线表示与抗体-药物缀合物的接头(L)的共价附接:

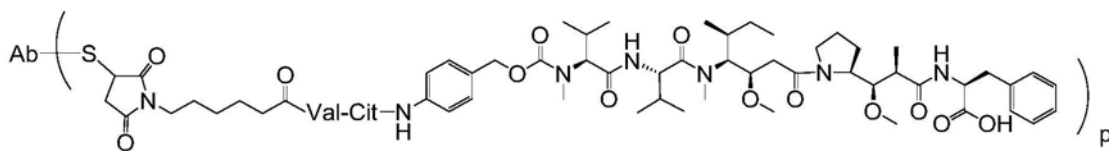


[0422] 式 D_F 的示例性澳瑞他汀实施方案为MMAF, 其中波形线表示与抗体-药物缀合物的接头(L)的共价附接:

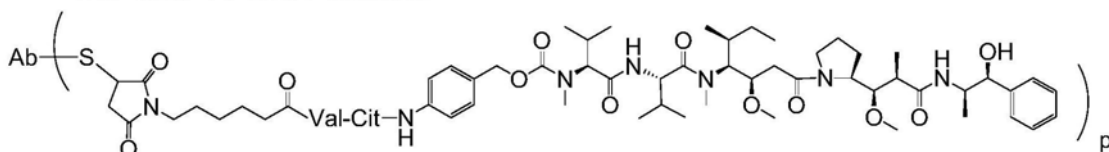


[0424] 其他示例性实施方案包括在五肽澳瑞他汀药物部分的C末端具有苯丙氨酸羧基修饰的单甲基缬氨酸化合物(WO 2007/008848)和在五肽澳瑞他汀药物部分的C末端具有苯丙氨酸侧链修饰的单甲基缬氨酸化合物(WO 2007/008603)。

[0425] 包含MMAE或MMAF和各种接头组分的式I的ADC的非限制性示例性实施方案具有以下结构和缩写(其中“Ab”为抗体; p 为1至约8, “Val-Cit”为缬氨酸-瓜氨酸二肽; 且“S”为硫原子):

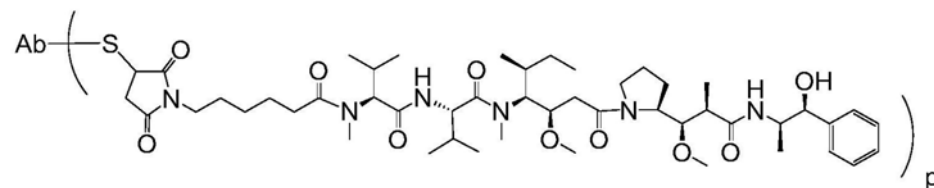


Ab-MC-vc-PAB-MMAF

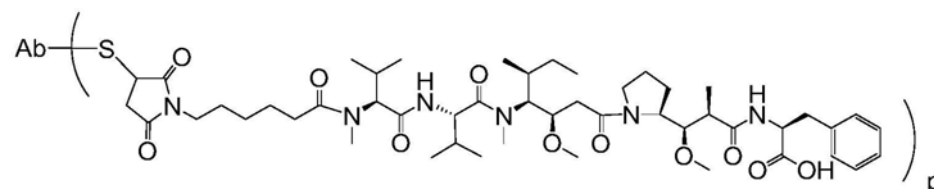


Ab-MC-vc-PAB-MMAE

[0426]



Ab-MC-MMAE



[0427]

Ab-MC-MMAF.

[0428] 包含MMAF和各种接头组分的式I的ADC的非限制性示例性实施方案进一步包括Ab-MC-PAB-MMAF和Ab-PAB-MMAF。包含通过非蛋白分解可裂解的接头附接于抗体的MMAF的免疫缀合物已展示具有与包含通过蛋白分解可裂解接头附接于抗体的MMAF的免疫缀合物相当的活性(Doronina等(2006) Bioconjugate Chem.17:114-124)。在一些此类实施方案中,据信药物释放由抗体在细胞中降解来实现。

[0429] 通常,基于肽的药物部分可通过在两个或两个以上氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备。例如根据液相合成方法可制备此类肽键(参见例如E. Schröder和K. Lübke, "The Peptides", 第1卷,第76-136页,1965,Academic Press)。在一些实施方案中,澳瑞他汀/多拉司他汀药物部分可根据以下的方法制备:US 7498298;US 5635483;US 5780588; Pettit等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit等(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G. R. 等, Synthesis, 1996, 719-725; Pettit等(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863; 和Doronina(2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784。

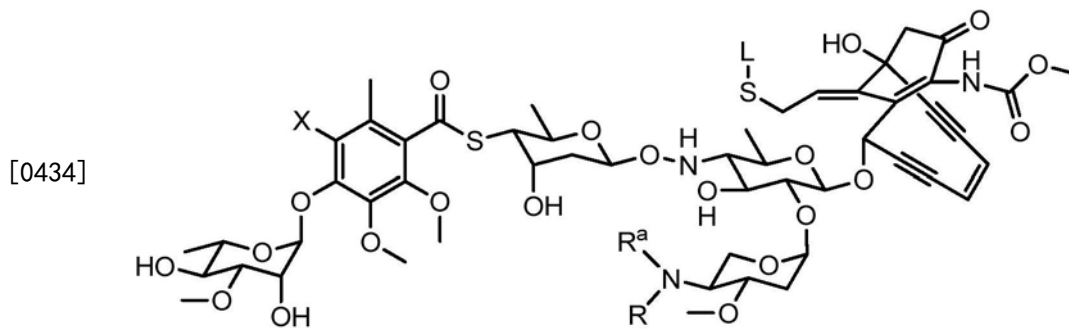
[0430] 在一些实施方案中,式D_E(诸如MMAE)和D_F(诸如MMAF)的澳瑞他汀/多拉司他汀药物部分和药物-接头中间物及其衍生物(诸如MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF和MC-vc-PAB-MMAE)可使用US 7498298、Doronina等(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124和Doronina等(2003) Nat. Biotech. 21:778-784制备,且接着缀合于相关抗体。

[0431] (3) 卡奇霉素

[0432] 在一些实施方案中,免疫缀合物包含缀合于一或多个卡奇霉素分子的抗体。卡奇

霉素家族抗生素及其类似物能够在亚皮摩尔 (sub-picomolar) 浓度下产生双股DNA断裂 (Hinman等, (1993) *Cancer Research* 53:3336-3342; Lode等, (1998) *Cancer Research* 58: 2925-2928)。卡奇霉素具有胞内作用位点,但在某些情况下,不容易跨过质膜。因此,在一些实施方案中,经由抗体介导的内化对这些药剂进行细胞摄取可大大增强其细胞毒性作用。制备具有卡奇霉素药物部分的抗体-药物缀合物的非限制性示例性方法描述于例如US 5712374、US 5714586、US 5739116和US 5767285中。

[0433] 在一些实施方案中,缀合于抗体的卡奇霉素药物部分为具有下式的化合物:



[0435] 其中X为Br或I;L为接头;R为氢、C₁₋₆烷基或-C(=O)C₁₋₆烷基;且R^a为氢或C₁₋₆烷基。

[0436] 在一些实施方案中,X为Br,R^a为氢且R为异丙基。

[0437] 在其他实施方案中,X为Br,R^a为氢且R为乙基。

[0438] 在其他实施方案中,X为I,R^a为氢且R为异丙基。

[0439] 在其他实施方案中,X为I,R^a为氢且R为乙基。

[0440] 在一些实施方案中,X为Br,R^a为氢且R为-C(=O)CH₃。

[0441] 在其他实施方案中, X为I, R^a为氢且R为-C(=O)CH₃。

[0442] 在其他实施方案中,X为I,R^a为乙基且R为-C(=O)CH₃。

[0443] 在其他实施方案中,X为Br,R^a为乙基且R为-C(=O)CH₃。

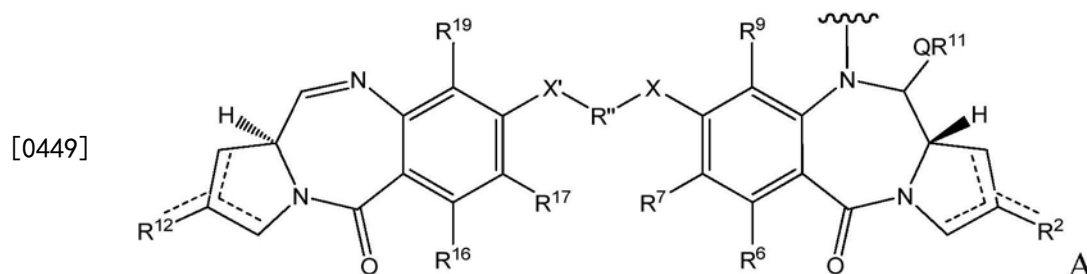
[0444] (4) 吡咯并苯并二氮^葸

[0445] 在一些实施方案中,ADC包含吡咯并苯并二氮革(PBD)。在一些实施方案中,PDB二聚体识别且结合于特定DNA序列。1965年首次报导了天然产物安曲霉素(一种PBD)(Leimgruber等,(1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5793-5795;Leimgruber等,(1965) J. Am. Chem. Soc., 87:5791-5793)。此后,已报导了许多PBD,包括天然存在的PBD与类似物(Thurston等,(1994) Chem. Rev. 1994, 433-465,包括三环PBD骨架的二聚体(US 6884799;US 7049311;US 7067511;US 7265105;US 7511032;US 7528126;US 7557099)。不欲受任何特定理论束缚,据信二聚体结构赋予适当三维形状以便与B形式DNA的小沟具有等螺旋性(isohelicity),使得在结合位点紧密贴合(Kohn, Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, 第3-11页(1975);Hurley和Needham-VanDevanter,(1986) Acc. Chem. Res., 19:230-237)。携带C2芳基取代基的二聚PBD化合物已展示出可用作细胞毒性剂(Hartley等(2010) Cancer Res. 70 (17):6849-6858;Antonow(2010) J. Med. Chem. 53 (7):2927-2941;Howard等(2009) Bioorganic and Med. Chem. Letters 19 (22):6463-6466)。

[0446] 在一些实施方案中,PBD化合物可通过在N10位置经体内可移除的氮保护基进行保护而用作前药(WO 00/12507;WO 2005/023814)。

[0447] PBD二聚体已缀合于抗体且所得ADC展示出具有抗癌性质(US 2010/0203007)。PBD二聚体上的非限制性示例性连接位点包括五员吡咯并(pyrrolo)环、PBD单元之间的系链(tether)和N10-C11亚胺基团(WO 2009/016516;US 2009/304710;US 2010/047257;US 2009/036431;US 2011/0256157;WO 2011/130598)。

[0448] ADC的非限制性示例性PBD二聚体组分具有式A:



[0450] 及其盐和溶剂合物,其中:

[0451] 波形线表示共价附接于接头的位点;

[0452] 虚线表示C1与C2或C2与C3之间任选存在双键;

[0453] R^2 独立地选自H、OH、=O、=CH₂、CN、R、OR、=CH-R^D、=C(R^D)₂、O-SO₂-R、CO₂R和COR,且任选还选自卤素或二卤素,其中R^D独立地选自R、CO₂R、COR、CHO、CO₂H和卤素;

[0454] R^6 和 R^9 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn和卤素;

[0455] R^7 独立地选自H、R、OH、OR、SH、SR、NH₂、NHR、NRR'、NO₂、Me₃Sn和卤素;

[0456] Q独立地选自O、S和NH;

[0457] R^{11} 为H或R,或Q为O时其为SO₃M,其中M为金属阳离子;

[0458] R和R'各独立地选自任选经取代的C₁₋₈烷基、C₁₋₁₂烷基、C₃₋₈杂环基、C₃₋₂₀杂环和C₅₋₂₀芳基,且任选关于基团NRR',R和R'连同其附接的氮原子一起形成任选经取代的4、5、6或7员杂环;

[0459] R^{12} 、 R^{16} 、 R^{19} 和 R^{17} 如分别针对 R^2 、 R^6 、 R^9 和 R^7 所定义;

[0460] R''为C₃₋₁₂亚烷基,所述链可杂有一或多个杂原子,例如O、S、N(H)、NMe和/或芳环,例如苯或吡啶,所述环任选经取代;且

[0461] X和X'独立地选自O、S和N(H)。

[0462] 在一些实施方案中,R和R'各独立地选自任选经取代的C₁₋₁₂烷基、C₃₋₂₀杂环和C₅₋₂₀芳基,且任选地,关于基团NRR',R和R'连同其附接的氮原子一起形成任选经取代的4、5、6或7员杂环。

[0463] 在一些实施方案中, R^9 和 R^{19} 为H。

[0464] 在一些实施方案中, R^6 和 R^{16} 为H。

[0465] 在一些实施方案中, R^7 为 R^{17} 均为OR^{7A},其中R^{7A}为任选经取代的C₁₋₄烷基。在一些实施方案中,R^{7A}为Me。在一些实施方案中,R^{7A}为CH₂Ph,其中Ph为苯基。

[0466] 在一些实施方案中,X为O。

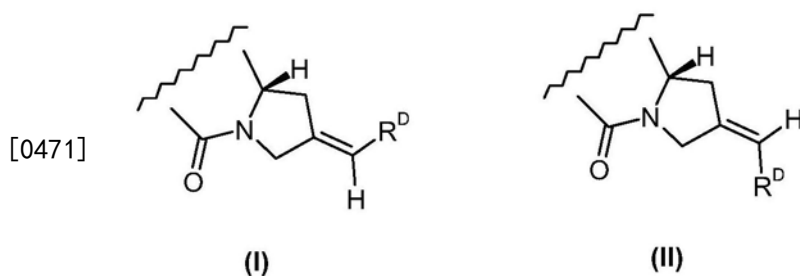
[0467] 在一些实施方案中, R^{11} 为H。

[0468] 在一些实施方案中,各单体单元中C2与C3之间存在双键。

[0469] 在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 独立地选自H和R。在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 独立地为R。在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 独立地为任选经取代的C₅₋₂₀芳基或C₅₋₇芳基或C₈₋₁₀芳基。在一

些实施方案中, R^2 和 R^{12} 独立地为任选经取代的苯基、噻吩基、萘基、吡啶基、喹啉基或异喹啉基。在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 独立地选自 $=O$ 、 $=CH_2$ 、 $=CH-R^D$ 和 $=C(R^D)_2$ 。在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 各为 $=CH_2$ 。在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 各为 H 。在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 各为 $=O$ 。在一些实施方案中, R^2 和 R^{12} 各为 $=CF_2$ 。在一些实施方案中, R^2 和/或 R^{12} 独立地为 $=C(R^D)_2$ 。在一些实施方案中, R^2 和/或 R^{12} 独立地为 $=CH-R^D$ 。

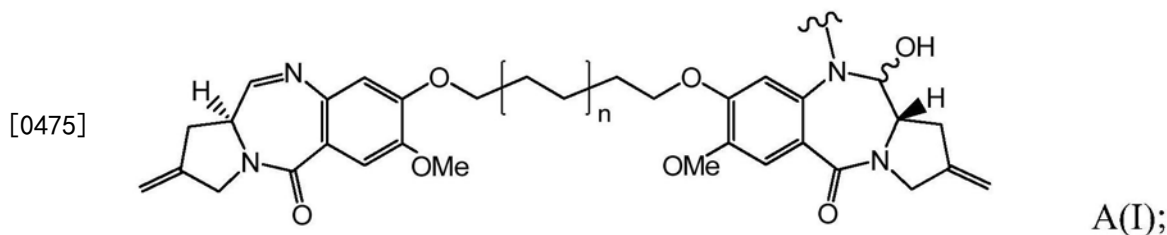
[0470] 在一些实施方案中, 当 R^2 和/或 R^{12} 为 $=CH-R^D$ 时, 各基团可独立地具有下文所示的任一构型:



[0472] 在一些实施方案中, $=CH-R^D$ 呈构型(I)。

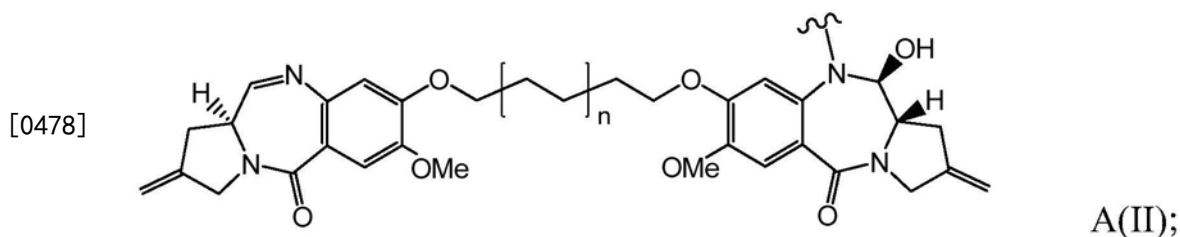
[0473] 在一些实施方案中, R'' 为 C_3 亚烷基或 C_5 亚烷基。

[0474] 在一些实施方案中, ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A(I)的结构:



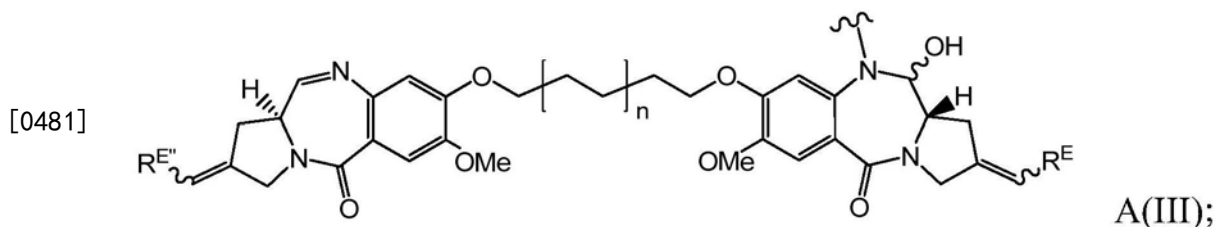
[0476] 其中 n 为0或1。

[0477] 在一些实施方案中, ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A(II)的结构:



[0479] 其中 n 为0或1。

[0480] 在一些实施方案中, ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A(III)的结构:



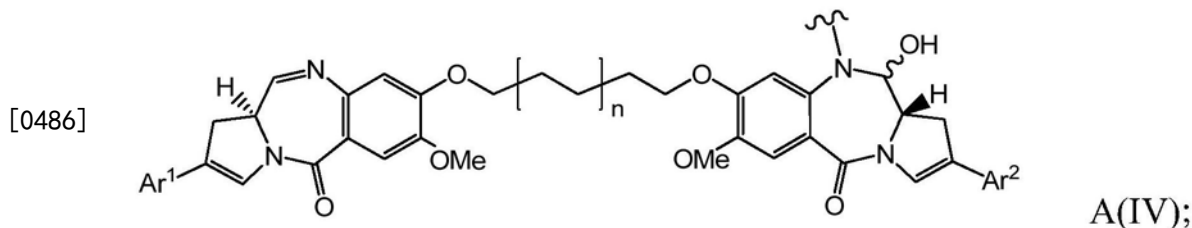
[0482] 其中 R^E 和 $R^{E''}$ 各独立地选自 H 或 R^D , 其中 R^D 如上所定义; 且

[0483] 其中 n 为0或1。

[0484] 在一些实施方案中, n 为0。在一些实施方案中, n 为1。在一些实施方案中, R^E 和/或

$R^{E''}$ 为H。在一些实施方案中, R^E 和 $R^{E''}$ 为H。在一些实施方案中, R^E 和/或 $R^{E''}$ 为 R^D ,其中 R^D 为任选经取代的 C_{1-12} 烷基。在一些实施方案中, R^E 和/或 $R^{E''}$ 为 R^D ,其中 R^D 为甲基。

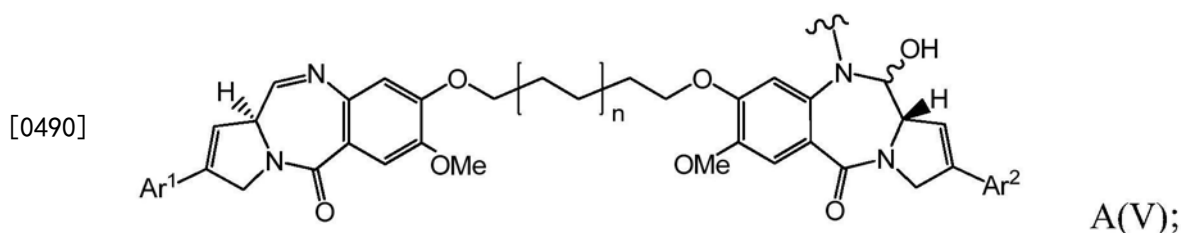
[0485] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A (IV) 的结构:



[0487] 其中 Ar^1 和 Ar^2 各独立地为任选经取代的 C_{5-20} 芳基;其中 Ar^1 和 Ar^2 可相同或不同;且

[0488] 其中n为0或1。

[0489] 在一些实施方案中,ADC的示例性PBD二聚体组分具有式A (V) 的结构:

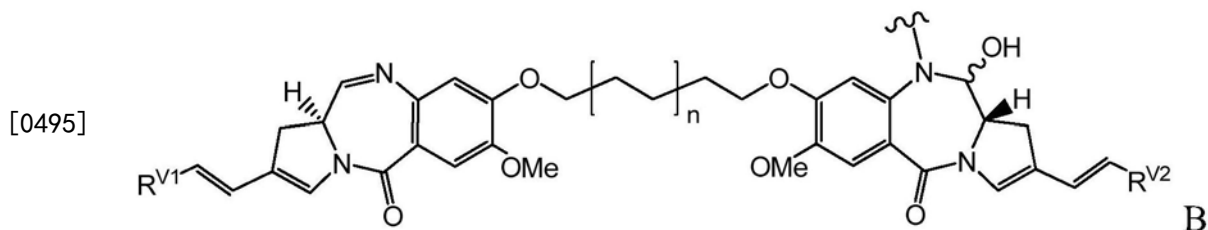


[0491] 其中 Ar^1 和 Ar^2 各独立地为任选经取代的 C_{5-20} 芳基;其中 Ar^1 和 Ar^2 可相同或不同;且

[0492] 其中n为0或1。

[0493] 在一些实施方案中, Ar^1 和 Ar^2 各独立地选自任选经取代的苯基、呋喃基、噻吩基和吡啶基。在一些实施方案中, Ar^1 和 Ar^2 各独立地为任选经取代的苯基。在一些实施方案中, Ar^1 和 Ar^2 各独立地为任选经取代的噻吩-2-基或噻吩-3-基。在一些实施方案中, Ar^1 和 Ar^2 各独立地为任选经取代的喹啉基或异喹啉基。喹啉基或异喹啉基可经由任何可用的环位置结合于PBD核心。举例而言,喹啉基可为喹啉-2-基、喹啉-3-基、喹啉-4-基、喹啉-5-基、喹啉-6-基、喹啉-7-基和喹啉-8-基。在一些实施方案中,喹啉基选自喹啉-3-基和喹啉-6-基。异喹啉基可为异喹啉-1-基、异喹啉-3-基、异喹啉-4-基、异喹啉-5-基、异喹啉-6-基、异喹啉-7-基和异喹啉-8-基。在一些实施方案中,异喹啉基选自异喹啉-3-基和异喹啉-6-基。

[0494] ADC的其他非限制性示例性PBD二聚体组分具有式B:



[0496] 及其盐和溶剂合物,其中:

[0497] 波形线表示共价附接于接头的位点;

[0498] 连接于OH的波形线表示S或R构型;

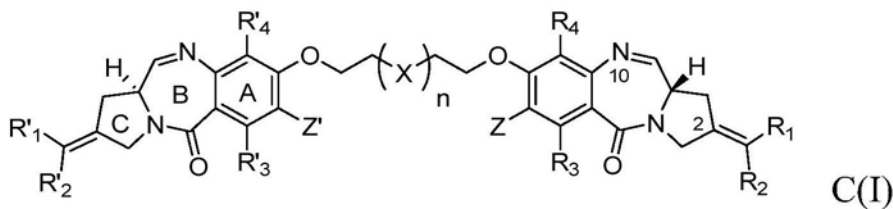
[0499] R^{V1} 和 R^{V2} 独立地选自H、甲基、乙基和苯基(所述苯基可任选经氟取代,尤其在4位置中)和 C_{5-6} 杂环基;其中 R^{V1} 和 R^{V2} 可相同或不同;且

[0500] n为0或1。

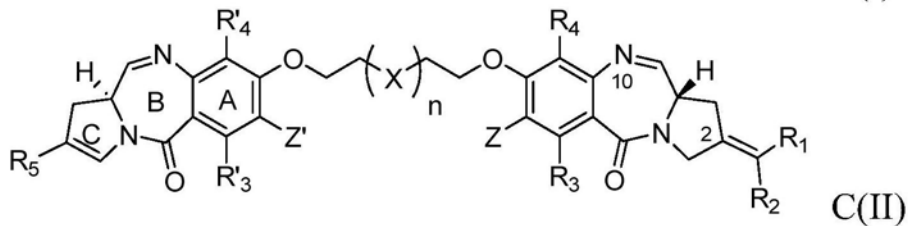
[0501] 在一些实施方案中, R^{V1} 和 R^{V2} 独立地选自H、苯基和4-氟苯基。

[0502] 在一些实施方案中, 接头可附接在PBD二聚体药物部分的各种位点之一, 包括B环的N10亚胺、C环的C-2内/外位置或连接A环的系链单元 (参见以下结构C (I) 和C (II))。

[0503] ADC的非限制性示例性PBD二聚体组分包括式C (I) 和C (II) :



[0504]



[0505] 式C (I) 和C (II) 以其N10-C11亚胺形式展示。示例性PBD药物部分还包括甲醇胺和经保护的甲醇胺形式, 如下表中所示:

<p>[0506]</p> <p>胺</p>	<p>甲醇胺(carbinolamine)</p>	<p>经保护的甲醇胺</p>
------------------------	---------------------------	----------------

[0507] 其中:

[0508] X为CH₂ (n=1至5)、N或O;

[0509] Z和Z' 独立地选自OR和NR₂, 其中R为含有1至5个碳原子的伯、仲或叔烷基链;

[0510] R₁、R'₁、R₂和R'₂各独立地选自H、C₁-C₈烷基、C₂-C₈烯基、C₂-C₈炔基、C₅-₂₀芳基 (包括经取代的芳基)、C₅-₂₀杂芳基、-NH₂、-NHMe、-OH和-SH, 其中在一些实施方案中, 烷基、烯基和炔基链包含至多5个碳原子;

[0511] R₃和R'₃独立地选自H、OR、NHR和NR₂, 其中R为含有1至5个碳原子的伯、仲或叔烷基链;

[0512] R₄和R'₄独立地选自H、Me和OMe;

[0513] R₅选自C₁-C₈烷基、C₂-C₈烯基、C₂-C₈炔基、C₅-₂₀芳基 (包括经卤素、硝基、氰基、烷氧基、烷基、杂环基取代的芳基) 和C₅-₂₀杂芳基, 其中在一些实施方案中, 烷基、烯基和炔基链包含至多5个碳原子;

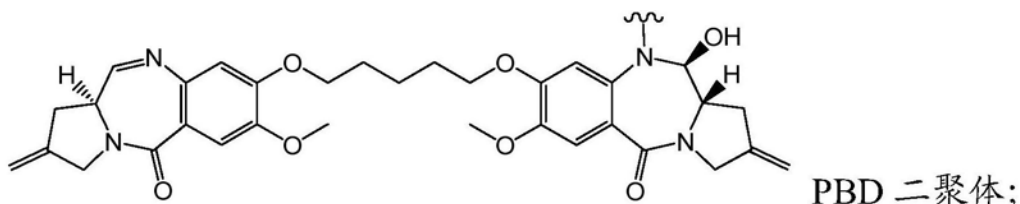
[0514] R₁₁为H、C₁-C₈烷基或保护基 (诸如乙酰基、三氟乙酰基、叔丁氧羰基 (BOC)、苯甲氧基羰基 (CBZ)、9-苄基亚甲基氧基羰基 (Fmoc) 或包含自分解型单元的部分, 诸如缬氨酸-瓜氨酸-PAB);

[0515] R₁₂为H、C₁-C₈烷基或保护基;

[0516] 其中R₁、R'₁、R₂、R'₂、R₅或R₁₂之一的氢或A环之间的-OCH₂CH₂ (X)_nCH₂CH₂O-间隔基的氢经连接于ADC的接头的键置换。

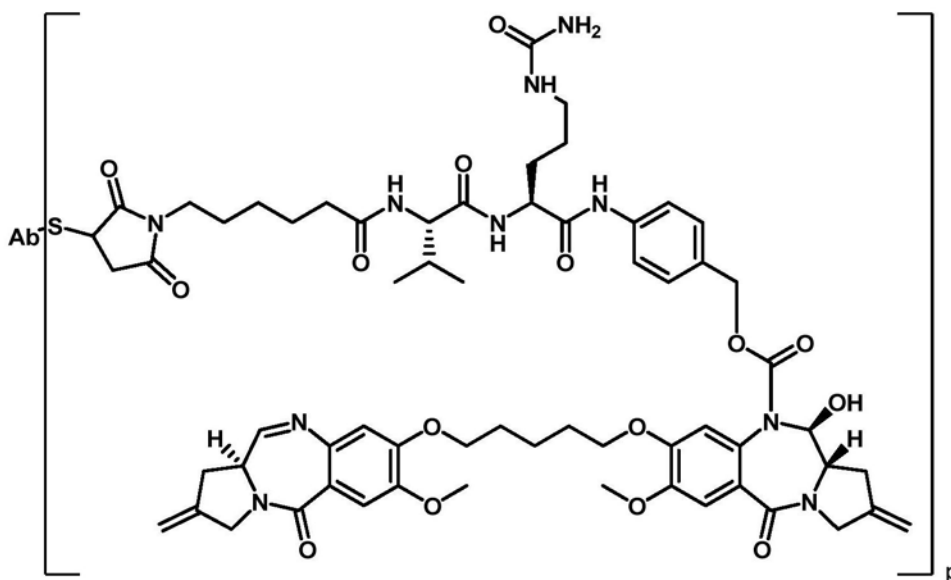
[0517] ADC的示例性PBD二聚体部分包括但不限于 (波形线表示共价附接于接头的位点):

[0518]



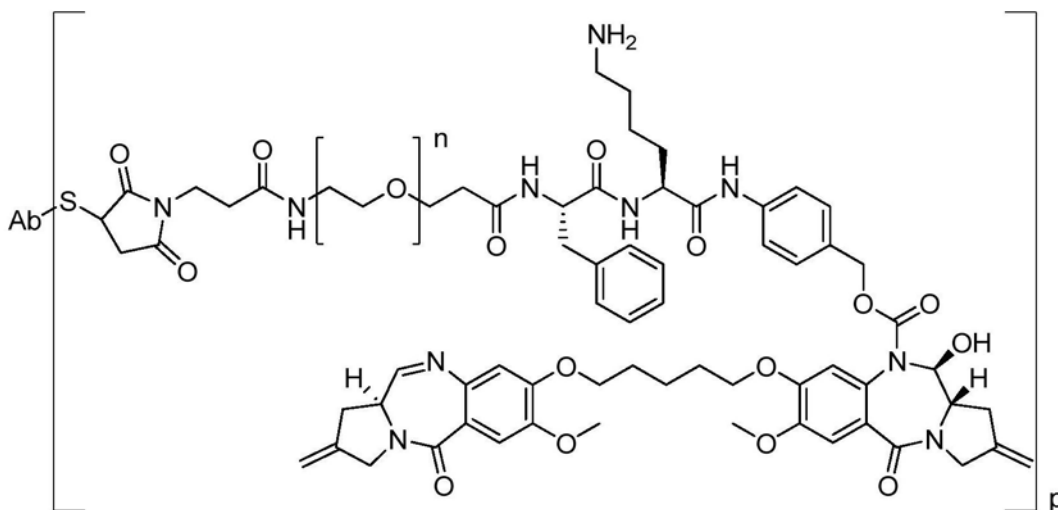
[0519] 包含PBD二聚体的ADC的非限制性示例性实施方案具有以下结构:

[0520]



[0521] PBD二聚体-val-cit-PAB-Ab;

[0522]



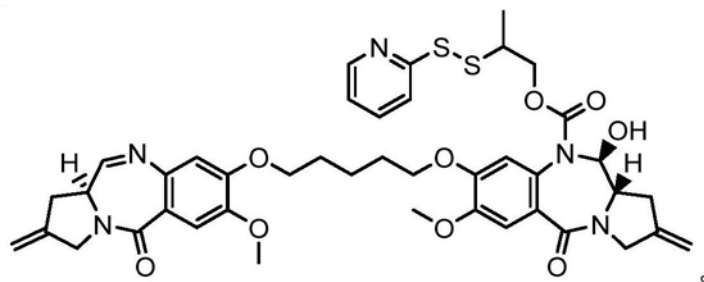
[0523] PBD二聚体-Phe-Lys-PAB-Ab,其中:

[0524] n为0至12。在一些实施方案中,n为2至10。在一些实施方案中,n为4至8。在一些实施方案中,n选自4、5、6、7和8。

[0525] 在一些实施方案中,包含本文中描述的PBD二聚体的ADC可通过包括吡啶离去基的接头-药物中间体经由硫原子与抗体的半胱氨酸硫醇缀合以形成二硫键来制备。此外,在一些实施方案中,包含本文中描述的PBD二聚体的ADC可通过缀合包括硫基吡啶基的接头-药物中间体来制备,其中吡啶环经一或多个硝基取代。在一些实施方案中,吡啶环经-NO₂单取代。在一些实施方案中,-NO₂单取代相对于二硫键为对位。在一些实施方案中,PBD二聚体经由N10位置连接。举例而言,包含PBD二聚体的非限制性示例性ADC可通过单甲基乙基吡啶基

二硫化物、N10连接的PBD接头中间体(以下展示)缀合于抗体来制备:

[0526]



[0527] PBD二聚体-val-cit-PAB-Ab合PBD二聚体-Phe-Lys-PAB-Ab的接头为蛋白酶可裂解的,而PBD二聚体-马来酰亚胺-缩醛的接头为对酸不稳定的。

[0528] PBD二聚体和包含PBD二聚体的ADC可根据本领域已知的方法制备。参见例如WO 2009/016516;US 2009/304710;US 2010/047257;US 2009/036431;US 2011/0256157;WO 2011/130598;WO 2013/055987。

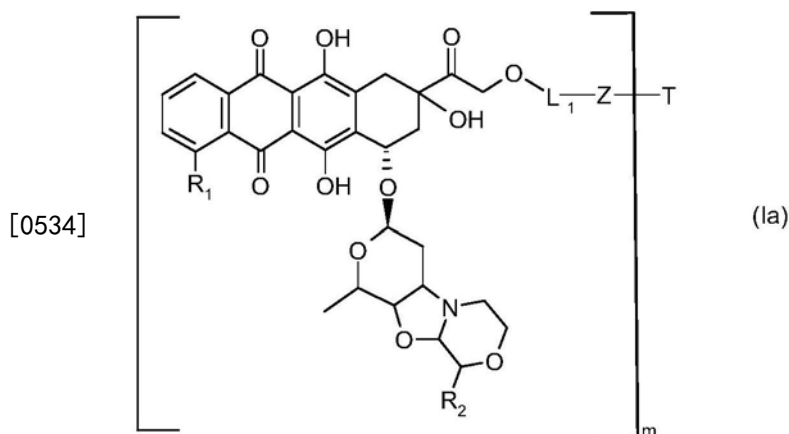
[0529] (5) 蒽环类

[0530] 在一些实施方案中,ADC包含蒽环类。蒽环类为显示细胞毒活性的抗生素化合物。虽然不欲受任何特定理论束缚,但研究已指示蒽环类可通过许多不同机制用以杀死细胞,包括:1) 药物分子插入细胞DNA中,由此抑制DNA依赖性核酸合成;2) 通过药物产生自由基,接着自由基与细胞大分子反应,对细胞造成损害,和/或3) 药物分子与细胞膜相互作用(参见例如C.Peterson等,“Transport And Storage Of Anthracycline In Experimental Systems And Human Leukemia”,Anthracycline Antibiotics In Cancer Therapy; N.R.Bachur,“Free Radical Damage”同上第97-102页)。因为具有细胞毒性潜能,所以蒽环类已用于治疗多种癌症,诸如白血病、乳腺癌、肺癌、卵巢腺癌和肉瘤(参见例如P.H-Wiernik,Anthracycline:Current Status And New Developments第11页)。

[0531] 非限制性示例性蒽环类包括多柔比星、表柔比星、伊达比星、道诺霉素、奈莫柔比星及其衍生物。已制备并研究道诺霉素和多柔比星的免疫缀合物和前药(Kratz等(2006) *Current Med.Chem.*13:477-523;Jeffrey等(2006) *Bioorganic&Med.Chem.Letters* 16:358-362;Torgov等(2005) *Bioconj.Chem.*16:717-721;Nagy等(2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97:829-834;Dubowchik等(2002) *Bioorg.&Med.Chem.Letters* 12:1529-1532;King等(2002) *J.Med.Chem.*45:4336-4343;EP 0328147;US 6630579)。抗体-药物缀合物BR96-多柔比星与肿瘤相关抗原路易斯-Y(Lewis-Y)特异性反应且已在I期和II期研究中进行评价(Saleh等(2000) *J.Clin.Oncology* 18:2282-2292;Ajani等(2000) *Cancer Jour.*6:78-81;Tolcher等(1999) *J.Clin.Oncology* 17:478-484)。

[0532] PNU-159682为奈莫柔比星的有效代谢物(或衍生物)(Quintieri等(2005) *Clinical Cancer Research* 11(4):1608-1617)。奈莫柔比星为在多柔比星的糖苷氨基上具有2-甲氧基吗啉代基团的多柔比星的半合成类似物,且已处于临床评价中(Grandi等(1990) *Cancer Treat.Rev.*17:133;Ripamonti等(1992) *Brit.J.Cancer* 65:703),包括针对肝细胞癌的II/III期试验(Sun等(2003) *Proceedings of the American Society for Clinical Oncology* 22,Abs1448;Quintieri(2003) *Proceedings of the American Association of Cancer Research*,第44:1版,Abs4649;Pacciarini等(2006) *Jour.Clin.Oncology* 24:14116)。

[0533] 包含奈莫柔比星或奈莫柔比星衍生物的一种非限制性示例性ADC示于式Ia中：



[0535] 其中R₁为氢原子、羟基或甲氧基,且R₂为C₁-C₅烷氧基,或其药学上可接受的盐；

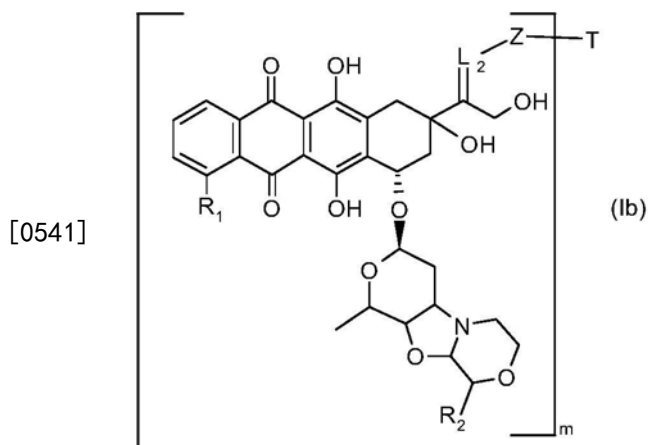
[0536] L₁和Z一起为如本文所述的接头(L)；

[0537] T为如本文所述的抗体(Ab)；且

[0538] m为1至约20。在一些实施方案中,m为1至10、1至7、1至5或1至4。

[0539] 在一些实施方案中,R₁和R₂均为甲氧基(-OMe)。

[0540] 包含奈莫柔比星或奈莫柔比星衍生物的另一非限制性示例性ADC示于式Ib中：



[0542] 其中R₁为氢原子、羟基或甲氧基,且R₂为C₁-C₅烷氧基,或其药学上可接受的盐；

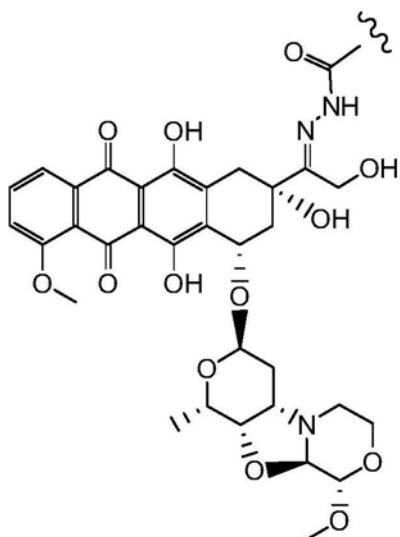
[0543] L₂和Z一起为如本文所述的接头(L)；

[0544] T为如本文所述的抗体(Ab)；且

[0545] m为1至约20。在一些实施方案中,m为1至10、1至7、1至5或1至4。

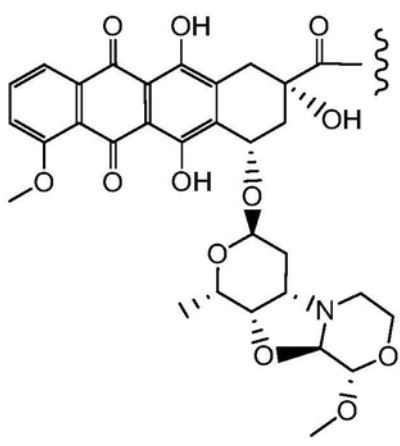
[0546] 在一些实施方案中,R₁和R₂均为甲氧基(-OMe)。

[0547] 在一些实施方案中,含奈莫柔比星的ADC的奈莫柔比星组分为PNU-159682。在一些此类实施方案中,ADC的药物部分可具有以下结构之一：



[0548]

; 或



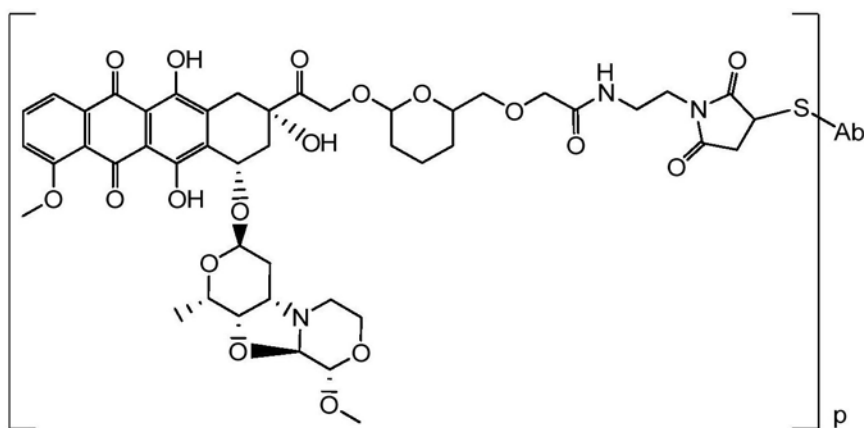
;

[0549] 其中波形线表示连接于接头(L)。

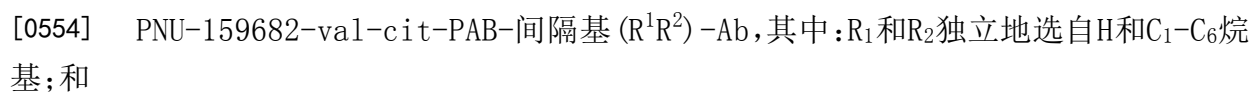
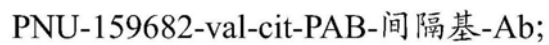
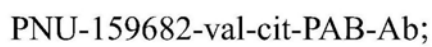
[0550] 包括PNU-159682的蒽环类可经由若干连接位点和多种接头缀合于抗体(US 2011/0076287; WO2009/099741; US 2010/0034837; WO 2010/009124), 包括本文中描述的接头。

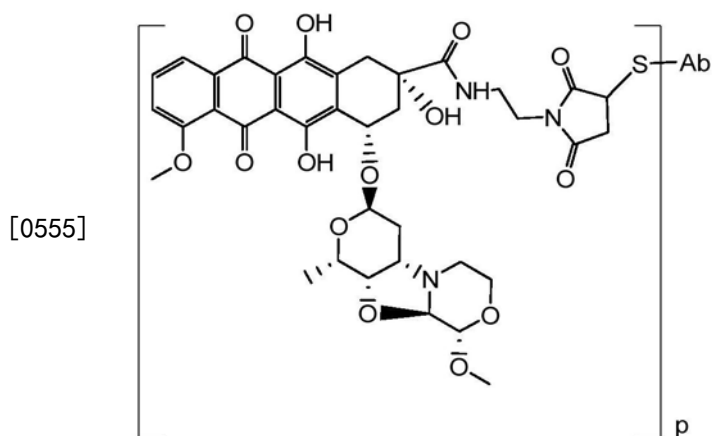
[0551] 包含奈莫柔比星和接头的示例性ADC包括但不限于:

[0552]



PNU-159682 马来酰亚胺缩醛-Ab;





[0556] PNU-159682-马来酰亚胺-Ab。

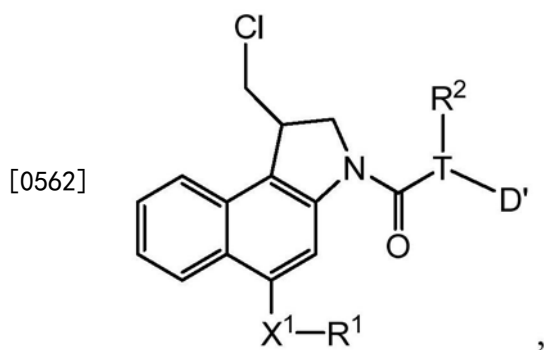
[0557] PNU-159682马来酰亚胺缩醛-Ab的接头为对酸不稳定的,而PNU-159682-val-cit-PAB-Ab、PNU-159682-val-cit-PAB-间隔基-Ab和PNU-159682-val-cit-PAB-间隔基 (R^1R^2)-Ab为蛋白酶可裂解的。

[0558] (6) 1-(氯甲基)-2,3-二氢-1H-苯并[e]吡啶 (CBI) 二聚体药物部分

[0559] 在一些实施方案中,ADC包含1-(氯甲基)-2,3-二氢-1H-苯并[e]吡啶 (CBI)。DNA小沟烷基化剂的5-氨基-1-(氯甲基)-1,2-二氢-3H-苯并[e]吡啶 (氨基CBI) 类别为有效的细胞毒素 (Atwell等 (1999) J. Med. Chem., 42:3400), 且已在设计用于癌症疗法的许多类别前药中用作效应单元。这些包括抗体缀合物 (Jeffrey等 (2005) J. Med. Chem., 48:1344)、基于氨基甲酸硝基苯甲酯的用于基因疗法的前药 (Hay等 (2003) J. Med. Chem. 46:2456) 和呈低氧活化的前药形式的对应硝基-CBI衍生物 (Terce1等 (2011) Angew. Chem., Int. Ed., 50:2606-2609)。CBI和吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮䓬 (PBD) 药效团已通过烷基链连接在一起 (Terce1等 (2003) J. Med. Chem 46:2132-2151)。

[0560] 在一些实施方案中,ADC包含1-(氯甲基)-2,3-二氢-1H-苯并[e]吡啶 (CBI) 二聚体 (WO 2015/023355)。在一些此类实施方案中,二聚体为异源二聚体,其中二聚体的一半为CBI部分且二聚体的另一半为PBD部分。

[0561] 在一些实施方案中,CBI二聚体包含下式:



[0563] 其中:

[0564] R^1 选自H、P(O) $_3$ H $_2$ 、C(O)NR a R b 或键合于接头(L)的键;

[0565] R^2 选自H、P(O) $_3$ H $_2$ 、C(O)NR a R b 或键合于接头(L)的键;

[0566] R^a 和 R^b 独立地选自H和任选经一或多个F取代的C $_1$ -C $_6$ 烷基,或 R^a 和 R^b 形成五或六员杂环基;

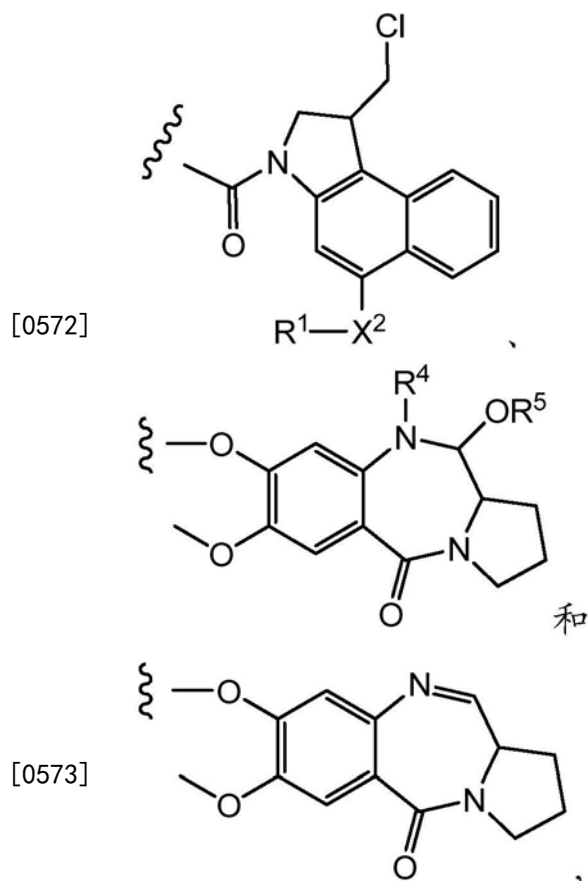
[0567] T为选自C₃-C₁₂亚烷基、Y、(C₁-C₆亚烷基)-Y-(C₁-C₆亚烷基)、(C₁-C₆亚烷基)-Y-(C₁-C₆亚烷基)-Y-(C₁-C₆亚烷基)、(C₂-C₆亚烯基)-Y-(C₂-C₆亚烯基)和(C₂-C₆亚炔基)-Y-(C₂-C₆亚炔基)的系链基团；

[0568] 其中Y独立地选自O、S、NR¹、芳基和杂芳基；

[0569] 其中亚烷基、亚烯基、芳基和杂芳基独立且任选经F、OH、O(C₁-C₆烷基)、NH₂、NHCH₃、N(CH₃)₂、OP(O)₃H₂和C₁-C₆烷基取代，其中烷基任选经一或多个F取代；

[0570] 或亚烷基、亚烯基、芳基和杂芳基独立且任选经键合于L的键取代；

[0571] D'为选自以下各者的药物部分：



[0574] 其中波形线表示与T的附接位点；

[0575] X¹和X²独立地选自O和NR³，其中R³选自H和任选经一或多个F取代的C₁-C₆烷基；

[0576] R⁴为H、CO₂R或键合于接头(L)的键，其中R为C₁-C₆烷基或苯甲基；且

[0577] R⁵为H或C₁-C₆烷基。

[0578] (7) 毒伞毒素 (Amatoxin)

[0579] 在一些实施方案中，免疫缀合物包含缀合于一或多个毒伞毒素分子的抗体。毒伞毒素为由8个氨基酸构成的环状肽。其可自条蕈 (*Amanita phalloides*) 蘑菇中分离或以合成方式制备。毒伞毒素特异性抑制哺乳动物细胞的DNA依赖性RNA聚合酶II，且由此也抑制所影响细胞的转录和蛋白质生物合成。细胞中转录的抑制引起生长和增殖停止。参见例如 Moldenhauer等JNCI104:1-13 (2012)、W02010115629、W02012041504、W02012119787、W02014043403、W02014135282和W02012119787，其以全文引用的方式并入本文中。在一些实施方案中，一或多个毒伞毒素分子为一或多个α-鹅膏蕈碱 (amanitin) 分子。

[0580] (8) 其他药物部分

[0581] 药物部分也包括格尔德霉素(geldanamycin) (Mandler等(2000) J.Nat.Cancer Inst.92(19):1573-1581;Mandler等(2000) Bioorganic&Med.Chem.Letters 10:1025-1028;Mandler等(2002) Bioconjugate Chem.13:786-791);和酶活性毒素及其片段,包括但不限于白喉(diphtheria)A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素(exotoxin)A链(来自绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素(ricin)A链、相思子毒素(abrin)A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 α -帚曲菌素(alpha-sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白、石竹素(dianthin)蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒素(curcin)、巴豆毒素(croton)、肥皂草(*sapaonaria officinalis*)抑制剂、白树毒素(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢霉烯族毒素(tricothecene)。参见例如WO 93/21232。

[0582] 药物部分还包括具有溶核活性的化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸内切酶)。

[0583] 在某些实施方案中,免疫缀合物可包含高度放射性原子。多种放射性同位素可用于产生放射性缀合的抗体。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。在一些实施方案中,当免疫缀合物用于检测时,其可包含用于闪烁法(scintigraphic)研究的放射性原子,例如 Tc^{99} 或 I^{123} ;或用于核磁共振(NMR)成像(也称磁共振成像,MRI)的自旋标记物,诸如镧-89、碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。镧-89可与各种金属螯合剂络合且缀合于抗体,例如用于PET成像(WO 2011/056983)。

[0584] 放射性或其他标记可以已知方式并入免疫缀合物中。举例而言,可使用包含例如一或多个氟-19原子代替一或多个氢的合适氨基酸前体生物合成或化学合成肽。在一些实施方案中,诸如 Tc^{99} 、 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 的标记可经由抗体中的半胱氨酸残基附接。在一些实施方案中,钪-90可经由抗体的赖氨酸残基附接。在一些实施方案中,IODOGEN方法(Fraker等(1978) Biochem.Biophys.Res.Commun.80:49-57)可用于并入碘-123。” Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”(Chatal,CRC Press 1989)描述某些其他方法。

[0585] 在某些实施方案中,免疫缀合物可包含缀合于前药活化酶的抗体。在一些此类实施方案中,前药活化酶将前药(例如肽基化学治疗剂,参见WO 81/01145)转化为活性药物,诸如抗癌药物。在一些实施方案中,此类免疫缀合物可用于抗体依赖性酶介导的前药疗法(“ADEPT”)。可缀合于抗体的酶包括但不限于碱性磷酸酶,其可用于将含磷酸酯基的前药转化成游离药物;芳基硫酸酯酶,其可用于将含硫酸酯基的前药转化成游离药物;胞嘧啶脱氨酶,其可用于将无毒5-氟胞嘧啶转化成抗癌药物5-氟尿嘧啶;蛋白酶,诸如沙雷菌属(*serratia*)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、羧基肽酶和组织蛋白酶(诸如组织蛋白酶B和L),其可用于将含肽前药转化成游离药物;D-丙氨酰基羧基肽酶,其可用于转化含有D-氨基酸取代基的前药;糖裂解酶,诸如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶,其可用于将糖基化前药转化成游离药物; β -内酰胺酶,其可用于将经 β -内酰胺衍生的药物转化成游离药物;以及青霉素酰胺酶,诸如青霉素V酰胺酶和青霉素G酰胺酶,其可用于将分别在胺氮经苯氧基乙酰基或苯乙基衍生的药物转化成游离药物。在一些实施方案

中,酶可通过本领域熟知的重组DNA技术共价结合于抗体。参见例如Neuberger等,Nature 312:604-608 (1984)。

[0586] c) 药物负载

[0587] 药物负载由式I的分子中每个抗体的药物部分的平均数目 p 表示。药物负载可在每个抗体1至20个药物部分(D)的范围内。式I的ADC包括与1至20个的范围的药物部分(1至20个)结合的抗体的集合。在由缀合反应制备ADC时,每个抗体的药物部分的平均数目可通过常规手段表征,诸如质谱法、ELISA测定法和HPLC。还可确定以 p 表示的ADC的定量分布。在一些情况下,可通过诸如反相HPLC或电泳的手段来实现其中 p 为来自具有其他药物负载的ADC的一定值的均质ADC的分离、纯化和表征。

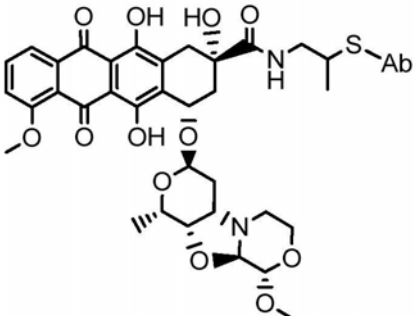
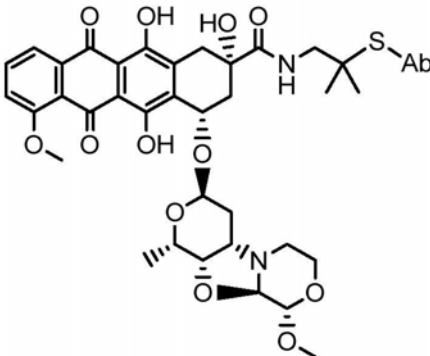
[0588] 对于一些抗体-药物缀合物, p 可受抗体上的附接位点的数目限制。举例而言,在附接为半胱氨酸硫醇的情况下,如在以上某些示例性实施方案中,抗体可仅具有一个或若干个半胱氨酸硫醇基,或可仅具有一个或若干个具有足够反应性的可附接接头的硫醇基。在某些实施方案中,较高药物负载(例如 $p>5$)可造成某些抗体-药物缀合物的聚集、不溶解、毒性或细胞渗透性丧失。在某些实施方案中,ADC的平均药物负载在1至约8;约2至约6;或约3至约5的范围内。实际上,已展示对于某些ADC而言,每个抗体的药物部分的最佳比率可小于8,且可为约2至约5(US 7498298)。

[0589] 在某些实施方案中,在缀合反应期间使少于理论最大值的药物部分缀合于抗体。抗体可含有例如不与药物-接头中间产物或接头试剂反应的赖氨酸残基,如下文所论述。一般而言,抗体不含许多可连接于药物部分的游离和反应性半胱氨酸硫醇基;实际上抗体中的大部分半胱氨酸硫醇残基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中,抗体可用诸如二硫苏糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)的还原剂在部分或完全还原条件下还原,产生反应性半胱氨酸硫醇基。在某些实施方案中,抗体经受变性条件,展现反应性亲核基团,诸如赖氨酸或半胱氨酸。

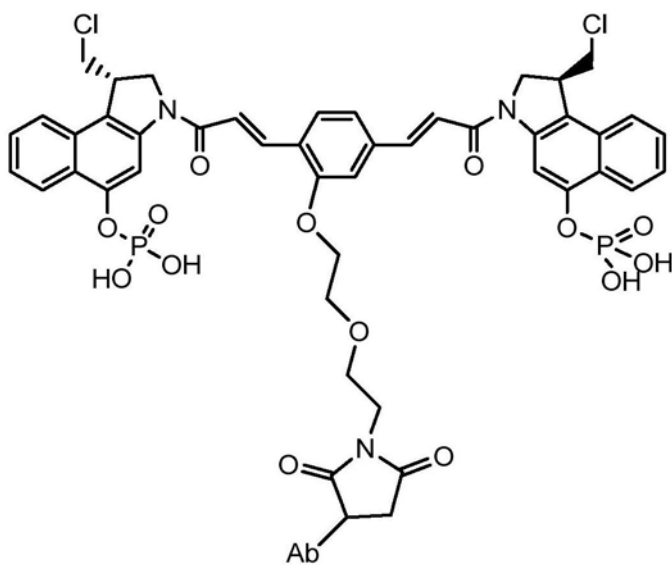
[0590] ADC的负载(药物/抗体比率)可用不同方式控制,且例如通过如下来控制:(i)限制药物-接头中间体或接头试剂相对于抗体的摩尔过量;(ii)限制缀合反应时间或温度;和(iii)用于半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制性还原条件。

[0591] 应当理解的是,在一个以上亲核基团与药物-接头中间体或接头试剂反应的情况下,所得产物为具有一或多个药物部分附接于抗体的分布的ADC化合物的混合物。每个抗体的药物的平均数目可通过双重ELISA抗体测定法自混合物计算,该测定法对抗体具有特异性且对药物具有特异性。个别ADC分子可在混合物中通过质谱法鉴别,且通过HPLC分离,例如疏水相互作用色谱法(参见例如McDonagh等(2006)Prot.Engr.Design&Selection19(7):299-307;Hamblett等(2004)Clin.Cancer Res.10:7063-7070;Hamblett,K.J.等"Effect of drug loading on the pharmacology,pharmacokinetics,and toxicity of an anti-CD30antibody-drug conjugate",摘要编号624,American Association for Cancer Research,2004Annual Meeting,2004年3月27-31日,Proceedings of the AACR,第45卷,2004年3月;Alley,S.C.等"Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates",摘要编号627,American Association for Cancer Research,2004Annual Meeting,2004年3月27-31日,Proceedings of the AACR,第45卷,2004年3月)。在某些实施方案中,具有单一负载值的均质ADC可通过电泳或色谱法自缀合物

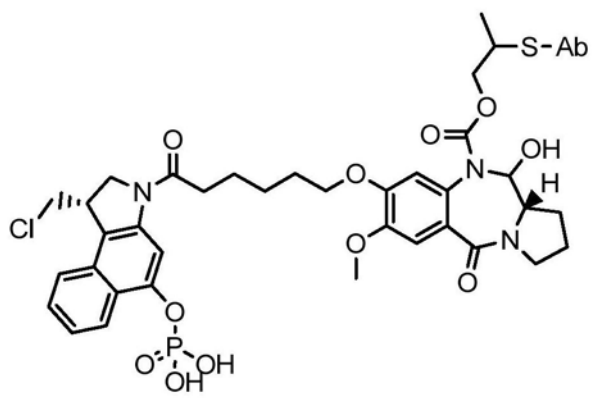
52	
53	
[0595] 54	
55	
56	

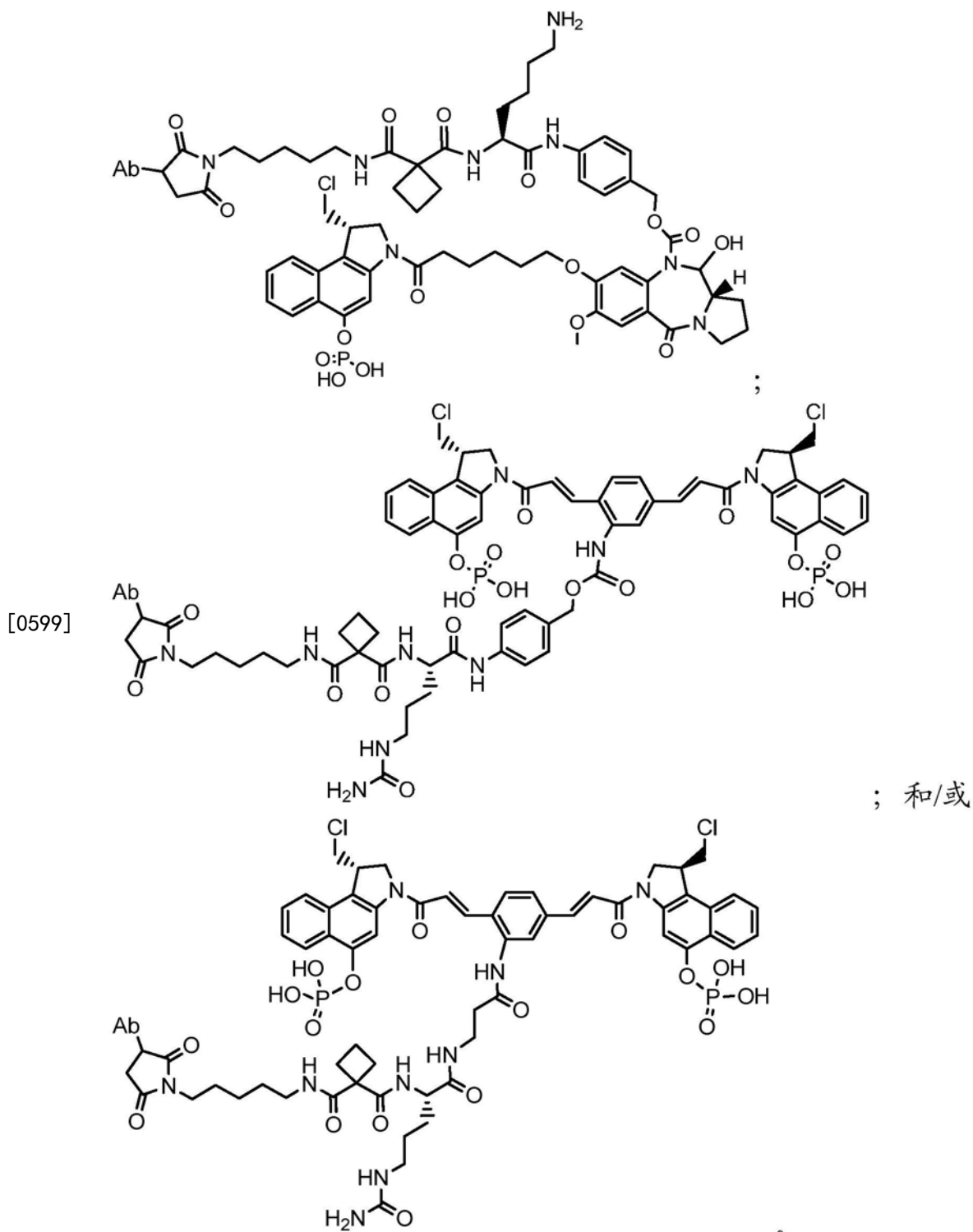
57	
[0596] 58	

[0597] 其他示例性抗体药物缀合物包括：



[0598]





[0600] 应注意为简单起见,以上结构和ADC 51至58的那些结构仅仅展示一个附接于抗体的接头-药物基团。如上文所提及,一个以上接头-药物基团可附接于抗体。

[0601] 表B具体抗体-药物缀合物(ADC)

[0602]

ADC 编号	ADC 式	接头-药物 LD 编号 (表 1)	DAR*
ADC-101	硫代 Ch 抗-CLL-1 21C9 HC A118C-(LD-55)	55	2.0

[0603]	ADC-102	硫代 Ch 抗-CLL-1 3H10 HC A118C-(LD-55)	55	2.0
	ADC-103	硫代 Ch 抗-CLL-1 28H12 HC A118C-(LD-55)	55	1.9
	ADC-104	硫代 Ch 抗-CLL-1 20B1 HC A118C-(LD-55)	55	1.8
	ADC-105	硫代 Ch 抗-CLL-1 6E7 HC A118C-(LD-55)	55	1.9
	ADC-106	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.H1eL4 HC A118C-(LD-54)	54	1.95
	ADC-107	硫代 Hu 抗-CLL-1 21C9.H3L2 HC A118C-(LD-54)	54	1.96
	ADC-108	硫代 Hu 抗-CLL-1 21C9.H3L2 LC K149C-(LD-54)	51	1.9
	ADC-109	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.H1eL4 LC K149C-(LD-51)	51	1.91
	ADC-110	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-51)	51	2.0
	ADC-111	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.H1eL4.N54A LC K149C-(LD-53)	53	2.0
	ADC-112	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.H1eL4.N54A LC K149C-(LD-52)	52	1.9
	ADC-113	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-51)	51	1.9
	ADC-114	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-56)	56	2.0
	ADC-115	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-57)	57	1.7
	ADC-116	硫代 Hu 抗-CLL-1 6E7.N54A LC K149C-(LD-58)	58	1.9

[0604] DAR=药物/抗体比率平均值

[0605] A118C (EU编号) = A121C (顺序编号) = A114C (Kabat编号)

[0606] 野生型 (“WT”)、半胱氨酸工程改造突变抗体 (“硫代”)、轻链 (“LC”)、重链 (“HC”)、6-马来酰亚胺基己酰基 (“MC”)、马来酰亚胺基丙酰基 (“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸 (“val-cit”或 “vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸 (“ala-phe”)、对氨基苯甲基 (“PAB”) 和对氨基苯甲氧基羰基 (“PABC”)

[0607] d) 某些制备免疫缀合物的方法

[0608] 式I的ADC可通过若干途径,采用本领域技术人员已知的有机化学反应、条件和试剂制备,包括以下: (1) 抗体的亲核基团与二价接头试剂反应,经由共价键形成Ab-L,接着与药物部分D反应;和 (2) 药物部分的亲核基团与二价接头试剂反应,经由共价键形成D-L,接着与抗体的亲核基团反应。经由后一种途径制备式I的ADC的示例性方法描述于以引用的方式明确并入本文中的US 7498298中。

[0609] 抗体上的亲核基团包括但不限于: (i) N末端氨基; (ii) 侧链氨基,例如赖氨酸; (iii) 侧链硫醇基,例如半胱氨酸;和 (iv) 糖羟基或氨基,其中抗体被糖基化。胺、硫醇和羟基为亲核性的且能够与接头部分和接头试剂上的亲电基团反应形成共价键,所述亲电基团包括: (i) 活性酯,诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯和酸卤化物; (ii) 烷基和苯甲基卤化物,诸如卤代乙酰胺;和 (iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基。某些抗体具有可还原的链间二硫键,即半胱氨酸桥。通过用诸如DTT (二硫苏糖醇) 或三巯基乙基膦 (TCEP) 的还原剂处理,使得抗体完全或部分还原,可使抗体具有反应性,以与接头试剂缀合。理论上各半胱氨酸桥将因此形成两个反应性硫醇亲核体。可经由例如使赖氨酸残基与2-亚氨基硫杂环戊烷 (特劳特试剂 (Traut's reagent)) 反应,修饰赖氨酸残基,使胺转化成硫醇,而将其他亲核基团引入抗体中。还可通过引入一个、两个、三个、四个或更多个半胱氨酸残基 (例如通过制备包含一或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的变异抗体),而将反应性硫醇基引入抗体中。

[0610] 本发明的抗体-药物缀合物还可通过抗体上的亲电基团 (诸如醛或酮羰基) 与接头试剂或药物上的亲核基团之间发生反应来产生。接头试剂上的可用亲核基团包括但不限于酰肼、肼、氨基、肼、硫半卡巴胺、肼羧酸酯和芳基酰肼。在一个实施方案中,抗体经修饰以引入能够与接头试剂或药物上的亲核取代基反应的亲电部分。在另一个实施方案中,糖基化抗体的糖可例如用过碘酸盐氧化试剂氧化,以形成醛基或酮基,其可与接头试剂或药物部

分的氨基反应。所得亚胺希夫碱 (Schiff base) 基团可形成稳定连接,或可例如通过硼氢化物试剂还原,以形成稳定的胺连接。在一个实施方案中,糖基化抗体的糖部分与半乳糖氧化酶或偏过碘酸钠反应可在抗体中产生羰基(醛和酮),其可与药物(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上的适当基团反应。在另一个实施方案中,含有N末端丝氨酸或苏氨酸残基的抗体可与偏过碘酸钠反应,产生醛代替第一氨基酸(Geoghegan及Stroh, (1992) Bioconjugate Chem.3:138-146;US 5362852)。此类醛可与药物部分或接头亲核体反应。

[0611] 药物部分上的示例性亲核基团包括但不限于:能够与接头部分和接头试剂上的亲电基团反应形成共价键的胺、硫醇、羟基、酰胺、肟、肼、硫半卡巴腴、肼羧酸酯和芳基酰胺基团,所述亲电基团包括:(i) 活性酯,诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯和酸卤化物;(ii) 烷基和苯甲基卤化物,诸如卤代乙酰胺;和(iii) 醛、酮、羧基和马来酰亚胺基。

[0612] 可用于制备ADC的非限制性示例性交联试剂在本文中描述于标题为“示例性接头”的部分中。使用此类交联试剂连接两个部分(包括蛋白质部分和化学部分)的方法为本领域中已知的。在一些实施方案中,包含抗体和细胞毒性剂的融合蛋白可例如通过重组技术或肽合成来制备。重组DNA分子可包含编码缀合物的抗体和细胞毒性部分的区域,所述区域彼此相邻或由编码不破坏缀合物的期望性质的接头肽的区域分离。

[0613] 在又一个实施方案中,抗体可缀合于“受体”(诸如抗生蛋白链菌素),以用于肿瘤预先靶向,其中向患者施用抗体-受体缀合物,接着使用清除剂将未结合的缀合物自循环中移除且接着施用缀合于细胞毒性剂(例如药物或放射性核苷酸)的“配体”(例如亲和素(avidin))。

[0614] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0615] 在某些实施方案中,任一本文提供的抗-CLL-1抗体可用于检测生物样品中CLL-1的存在。如本文所用,术语“检测”涵盖定量或定性检测。“生物样品”包含例如细胞或组织(例如活检材料,包括癌性或潜在癌性淋巴组织,诸如淋巴细胞、成淋巴细胞、单核细胞、骨髓单核细胞及其混合物)。

[0616] 在一个实施方案中,提供一种用于诊断或检测方法的抗-CLL-1抗体。在另一方面中,提供一种检测生物样品中CLL-1的存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使生物样品与如本文所述的抗-CLL-1抗体在允许抗-CLL-1抗体结合于CLL-1的条件下接触,且检测抗-CLL-1抗体与生物样品中CLL-1之间是否形成复合物。此类方法可为体外或体内方法。在一个实施方案中,抗-CLL-1抗体用于选择适于用抗-CLL-1抗体治疗的受试者,例如其中CLL-1为选择患者的生物标志物。在另一个实施方案中,生物样品为细胞或组织。

[0617] 在另一个实施方案中,抗-CLL-1抗体用于体内检测(例如通过体内成像)受试者的CLL-1阳性癌症,例如,出于对癌症进行诊断、预后癌症或分期的目的,确定适当治疗过程,或监测癌症对疗法的响应。一种本领域已知用于体内检测的方法为免疫-正电子发射断层扫描(免疫-PET),如例如van Dongen等,The Oncologist 12:1379-1389(2007)和Verel等, J.Nucl.Med.44:1271-1281(2003)中所述。在此类实施方案中,提供一种用于检测受试者的CLL-1阳性癌症的方法,所述方法包括向患有或怀疑患有CLL-1阳性癌症的受试者施用经标记的抗-CLL-1抗体,且检测所述受试者中经标记的抗-CLL-1抗体,其中经标记的抗-CLL-1抗体的检测指示所述个体患有CLL-1阳性癌症。在某些此类实施方案中,经标记的抗-CLL-1

抗体包含与诸如 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 和 ^{124}I 的正电子发射体缀合的抗-CLL-1抗体。在一个具体实施方案中,正电子发射体为 ^{89}Zr 。

[0618] 在其他实施方案中,诊断或检测的方法包括使固定于底物的第一抗-CLL-1抗体与待测试CLL-1的存在的生物样品接触,将所述底物暴露于第二抗-CLL-1抗体,且检测所述生物样品中所述第二抗-CLL-1是否结合于所述第一抗-CLL-1抗体与CLL-1之间的复合物。基质可为任何支撑介质,例如玻璃、金属、陶瓷、聚合物珠粒、载玻片、芯片和其他基质。在某些实施方案中,生物样品包含细胞或组织。在某些实施方案中,第一或第二抗-CLL-1抗体为任一本文所述的抗体。

[0619] 可根据任一以上实施方案诊断或检测的示例性病症包括CLL-1阳性癌症,诸如CLL-1阳性AML、CLL-1阳性CML、CLL-1阳性MDS、CLL-1阳性慢性骨髓单核细胞性白血病、CLL-1阳性APL、CLL-1阳性慢性骨髓增生病症、CLL-1阳性血小板性白血病、CLL-1阳性前-B-ALL、CLL-1阳性前T-ALL、CLL-1-阳性多发性骨髓瘤、CLL-1阳性肥大细胞疾病、CLL-1阳性肥大细胞白血病、CLL-1阳性肥大细胞肉瘤、CLL-1阳性骨髓肉瘤、CLL-1阳性淋巴性白血病和CLL-1阳性未分化的白血病。在一些实施方案中,CLL-1阳性癌症为在本文实施例B中描述的条件抗-CLL-1免疫组织化学(IHC)或原位杂交(ISH)评分大于“0”的癌症,0对应于超过90%肿瘤细胞中染色非常弱或无染色。在另一个实施方案中,CLL-1阳性癌症以如在本文实施例B中描述的条件所定义的1+、2+或3+水平表达CLL-1。在一些实施方案中,CLL-1阳性癌症为根据检测CLL-1mRNA的逆转录酶PCR(RT-PCR)测定法表达CLL-1的癌症。在一些实施方案中,RT-PCR为定量RT-PCR。

[0620] 在某些实施方案中,提供经标记的抗-CLL-1抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(诸如荧光、发色、电子致密、化学发光和放射性标记),以及例如经由酶促反应或分子间相互作用间接检测的部分(诸如酶或配体)。示例性标记包括但不限于放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I ;荧光团,诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物;若丹明(rhodamine)及其衍生物;丹酰基(dansyl);伞形酮;荧光素酶,例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利第4,737,456号);荧光素;2,3-二氢酞嗪二酮;辣根过氧化物酶(HRP);碱性磷酸酶; β -半乳糖苷酶;葡糖淀粉酶;溶菌酶;糖氧化酶,例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;杂环氧化酶,诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,其与采用过氧化氢氧化染料前体的酶(诸如HRP、乳过氧化物酶或微过氧化物酶)偶联;生物素/亲和素;自旋标记;噬菌体标记;稳定自由基等。在另一个实施方案中,标记为正电子发射体。正电子发射体包括但不限于 ^{68}Ga 、 ^{18}F 、 ^{64}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{76}Br 、 ^{89}Zr 和 ^{124}I 。在一个具体实施方案中,正电子发射体为 ^{89}Zr 。

[0621] F. 药物制剂

[0622] 如本文所述的抗-CLL-1抗体或免疫缀合物的药物制剂通过将具有期望纯度的此类抗体或免疫缀合物与一或多种任选选用的药学上可接受的载体混合来制备(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980)),呈冻干制剂或水溶液形式。药学上可接受的载体在所用剂量和浓度下一般对接受者而言无毒,且包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六羟季铵;氯化苯甲烃铵;苄索氯铵(benzethonium chloride);苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多

肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、麸酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性药学上可接受的载体进一步包括间质性药物分散剂,诸如可溶性中性-活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公开第2005/0260186号和第2006/0104968号中。在一个方面中,sHASEGP与一或多种其他糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0623] 示例性冻干抗体或免疫缀合物制剂描述于美国专利第6,267,958号中。抗体或免疫缀合物制剂水溶液包括美国专利第6,171,586号和W02006/044908中描述的那些,后者的制剂包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0624] 本文中的制剂还可含有一种以上为所治疗的具体适应症所必需的活性成分,优选为具有不会对彼此产生不利影响的互补活性的活性成分。

[0625] 活性成分可包覆于微胶囊中,例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微胶囊,例如分别为羟基甲基纤维素或明胶微胶囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊;包覆于胶态药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒和纳米胶囊)中或巨乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A.编辑(1980)中。

[0626] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体或免疫缀合物的固体疏水性聚合物的半渗透基质,所述基质呈成形制品形式,例如薄膜或微胶囊。

[0627] 用于体内施用的制剂一般为无菌的。无菌性可例如通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0628] G. 治疗方法和组合物

[0629] 本文提供的任一抗-CLL-1抗体或免疫缀合物可用于多种方法,例如治疗方法中。

[0630] 在一个方面中,本文提供的抗-CLL-1抗体或免疫缀合物用于抑制CLL-1阳性细胞增殖的方法中,所述方法包括在容许抗-CLL-1抗体或免疫缀合物结合于细胞表面上的CLL-1的条件下将所述细胞暴露于抗-CLL-1抗体或免疫缀合物,由此抑制细胞增殖。在某些实施方案中,方法为体外或体内方法。在其他实施方案中,细胞为淋巴细胞、成淋巴细胞、单核细胞或骨髓单核细胞。在其他实施方案中,细胞为单核细胞/粒细胞谱系的单核细胞、粒细胞和/或祖细胞(progenitor)。在一些实施方案中,细胞对FLT3内部串联重复序列的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞对MLL-AF9融合基因(例如MLL-AF9易位)的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞对染色体11q23易位的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞对易位t(9;11)(p22;q23)的存在呈阳性。

[0631] 体外细胞增殖的抑制可使用可购自Promega (Madison, WI)的CellTiter-Glo™发光细胞活力测定法来测定。所述测定法基于存在的ATP(其指示代谢活性细胞)的定量,确定培养物中活细胞的数目。参见Crouch等(1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88;美国专利第6602677号。所述测定法可以96或384孔格式进行,易于进行自动化高通量筛选(HTS)。参见Cree等(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404。测定法操作涉及向培养细胞中直接添加单一试剂(CellTiter-Glo®试剂)。这导致细胞溶解和由荧光素酶反应产生的发光信号的产生。

发光信号与存在的ATP的量成比例,存在的ATP的量与培养物中存在的活细胞数目成正比。可通过光度计或CCD相机成像装置记录数据。发光输出表示为相对光单位(RLU)。

[0632] 在另一个方面中,提供一种抗-CLL-1抗体或免疫缀合物,其可用作药剂。在其他方面中,提供一种抗-CLL-1抗体或免疫缀合物,其用于治疗方法中。在某些实施方案中,提供一种抗-CLL-1抗体或免疫缀合物,其用于治疗CLL-1阳性癌症。在某些实施方案中,本发明提供一种抗-CLL-1抗体或免疫缀合物,其用于治疗患有CLL-1阳性癌症的受试者的方法中,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗-CLL-1抗体或免疫缀合物。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括向所述受试者施用有效量的至少一种例如如下文所描述的其他治疗剂。

[0633] 在另一方面中,本发明提供抗-CLL-1抗体或免疫缀合物的用途,其用于制造或制备药剂。在一个实施方案中,所述药剂用于治疗CLL-1阳性癌症。在另一个实施方案中,所述药剂用于治疗CLL-1阳性癌症的方法中,所述方法包括向患有CLL-1阳性癌症的受试者施用有效量的药剂。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括向所述受试者施用有效量的至少一种例如如下文所描述的其他治疗剂。

[0634] 在另一方面中,本发明提供一种治疗CLL-1阳性癌症的方法。在一个实施方案中,所述方法包括向患有此类CLL-1阳性癌症的受试者施用有效量的抗-CLL-1抗体或免疫缀合物。在一些实施方案中,所述癌症为AML。在一个此类实施方案中,所述方法进一步包括向所述受试者施用有效量的至少一种例如如下文所描述的其他治疗剂。

[0635] 根据任一以上实施方案的CLL-1阳性癌症可为例如CLL-1阳性AML、CLL-1阳性CML、CLL-1阳性骨髓发育不良综合征(MDS)、CLL-1阳性慢性骨髓单核细胞性白血病(CML)、CLL-1阳性APL、CLL-1阳性慢性骨髓增生性白血病、CLL-1阳性血小板性白血病、CLL-1阳性前-B-ALL、CLL-1阳性前T-ALL、CLL-1阳性多发性骨髓瘤、CLL-1阳性肥大细胞疾病、CLL-1阳性肥大细胞白血病、CLL-1阳性肥大细胞肉瘤、CLL-1阳性骨髓肉瘤、CLL-1阳性淋巴性白血病和CLL-1阳性未分化的白血病。在一些实施方案中,CLL-1阳性癌症为在本文实施例B中描述的条件抗-CLL-1免疫组织化学(IHC)或原位杂交(ISH)评分大于“0”的癌症,0对应于超过90%肿瘤细胞中染色非常弱或无染色。在另一个实施方案中,CLL-1阳性癌症以如在本文实施例B中描述的条件所定义的1+、2+或3+水平表达CLL-1。在一些实施方案中,CLL-1阳性癌症为根据检测CLL-1mRNA的逆转录酶PCR(RT-PCR)测定法表达CLL-1的癌症。在一些实施方案中,RT-PCR为定量RT-PCR。

[0636] 在一些实施方案中,根据任一以上实施方案的细胞增殖性病症可为例如AML、CML和/或MDS。在一些实施方案中,CLL-1阳性细胞增殖性病症为CLL-1阳性AML、CLL-1阳性CML、CLL-1阳性MDS。在一些实施方案中,AML为AML亚型1、AML亚型2、AML亚型3、AML亚型4、AML亚型5、AML亚型6和AML亚型7中的一或多种。在一些实施方案中,AML为AML亚型3(急性前髓细胞性白血病,APML)。在一些实施方案中,AML为AML亚型1、AML亚型2、AML亚型4、AML亚型5、AML亚型6和AML亚型7中的一或多种,且不为AML亚型3。

[0637] 在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)对FLT3、核仁磷酸蛋白(NPM1)、CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)(CEBPA)和/或c-KIT中突变的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)对FLT3内部串联重复序列的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)

对FLT3酪氨酸激酶域点突变的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)对异柠檬酸脱氢酶1和/或2(IDH1和/或IDH2)中突变的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)对DNA甲基转移酶3A(DNMT3A)中突变的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)为对(a)NPM1和FLT3中的突变、(b)野生型NPM1和突变FLT3和/或(c)野生型NPM1和FLT3的存在呈阳性的NK-AML。

[0638] 在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)为阳性细胞遗传学异常,诸如以下一或多种:t(15;17)、t(8;21)、inv(16)、t(16;16)、t(9;11)(p22;q23)、t(6;9)(p23;q34)、inv(3)(q21q26.2)、inv(3;3)(q21;q26.2)、t(1;22)(p13;q13)、t(8;21)(q22;q22)、inv(16)(p13;q22)、t(16;16)(p13.1;q22)和/或t(15;17)(q22;q12)。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)对MLL-AF9融合基因(例如MLL-AF9易位)的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)对染色体11q23易位的存在呈阳性。在一些实施方案中,细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症)为对易位t(9;11)(p22;q23)的存在呈阳性的细胞增殖性病症(例如CLL-1阳性癌症和/或AML)。

[0639] 根据任一以上实施方案的“受试者”可为人。

[0640] 在另一方面中,本发明提供包含任一本文提供的抗-CLL-1抗体或免疫缀合物的药物制剂,其例如用于任一以上治疗方法中。在一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任一抗-CLL-1抗体或免疫缀合物和药学上可接受的载体。在另一个实施方案中,药物制剂包含本文提供的任一抗-CLL-1抗体或免疫缀合物和至少一种例如如下所描述的其他治疗剂。

[0641] 本发明的抗体或免疫缀合物可单独或与其他药剂组合用于疗法中。举例而言,本发明的抗体或免疫缀合物可与至少一种其他治疗剂共同施用。在一些实施方案中,其他治疗剂为蒽环类。在一些实施方案中,蒽环类为道诺霉素或伊达比星。在一些实施方案中,其他治疗剂为阿糖胞苷。在一些实施方案中,其他治疗剂为克拉屈滨。在一些实施方案中,其他治疗剂为氟达拉滨或拓扑替康。在一些实施方案中,其他治疗剂为5-氮杂胞苷或地西他滨。在一些实施方案中,其他治疗剂为ATRA(全反式视黄酸)。在一些实施方案中,其他治疗剂为三氧化二砷(arsenic trioxide)。在一些实施方案中,其他治疗剂为羟基脲。在一些实施方案中,其他治疗剂为依托泊苷。在一些实施方案中,其他治疗剂为米托蒽醌。在一些实施方案中,其他治疗剂为氯法拉滨。在一些实施方案中,其他治疗剂为羟基脲。在一些实施方案中,其他治疗剂为FLT3抑制剂,诸如喹扎替尼(quizartinib)。在一些实施方案中,其他治疗剂为IDH2抑制剂。在一些实施方案中,其他治疗剂为CHK1抑制剂。在一些实施方案中,其他治疗剂为Plk抑制剂,诸如维拉替尼(volasertib)。

[0642] 在任一方法的一些实施方案中,其他治疗剂为BCL2抑制剂。在一些实施方案中,BCL2抑制剂为venetoclax。

[0643] 在任一方法的一些实施方案中,其他治疗剂为表观遗传调节剂。在一些实施方案中,表观遗传调节剂为组蛋白脱乙酰基酶抑制剂。在一些实施方案中,表观遗传调节剂为DNA甲基转移酶I抑制剂。在一些实施方案中,表观遗传调节剂为组蛋白甲基转移酶抑制剂。在一些实施方案中,表观遗传调节剂为BET抑制剂。在一些实施方案中,BET抑制剂选择性地靶向第一布罗莫结构域(BD1)。在一些实施方案中,BET抑制剂选择性地靶向第二布罗莫结

构域(BD2)。在一些实施方案中,BET抑制剂为GSK1210151A、GSK525762、OTX-01、TEN-010、CPI-203和CPI-0610中的一或多种。

[0644] 在一些实施方案中,所述方法可进一步包括其他疗法。其他疗法可为放射疗法、手术、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法或前述各者的组合。其他疗法可呈辅助或新辅助疗法形式。在一些实施方案中,其他疗法为施用小分子酶抑制剂或抗转移性药剂。在一些实施方案中,其他疗法为施用副作用限制性药剂(例如意欲减少治疗的副作用出现和/或严重程度的药剂,诸如抗恶性剂等)。在一些实施方案中,其他疗法为放射疗法。在一些实施方案中,其他疗法为手术。在一些实施方案中,其他疗法为放射疗法与手术的组合。在一些实施方案中,其他疗法为 γ 照射。在一些实施方案中,其他疗法为干细胞移植。在一些实施方案中,其他疗法可为分开施用上述治疗剂中的一或多种。

[0645] 在任一方法的一些实施方案中,其他疗法包含癌症免疫疗法。在任一方法的一些实施方案中,癌症免疫疗法包含PD-1轴结合拮抗剂。在任一方法的一些实施方案中,癌症免疫疗法包含PD-1结合拮抗剂。在任一方法的一些实施方案中,癌症免疫疗法包含PD-L1结合拮抗剂。在任一方法的一些实施方案中,癌症免疫疗法包含PD-L2结合拮抗剂。在任一方法的一些实施方案中,癌症免疫疗法包含CTLA-4抑制。在任一方法的一些实施方案中,癌症免疫疗法包含免疫激动剂。

[0646] 以上所指出的此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包括于同一或分开制剂中)和分开施用,在此情况下本发明的抗体或免疫缀合物的施用可在其他治疗剂和/或佐剂施用之前、与其同时和/或在其之后进行。本发明的抗体或免疫缀合物还可与放射疗法组合使用。

[0647] 本发明的抗体或免疫缀合物(和任何其他治疗剂)可通过任何合适的方式,包括肠胃外、肺内和鼻内施用且必要时针对局部治疗,病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可通过任何合适途径(例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射),部分取决于施用是短期的或长期的。本文中涵盖各种给药时程,包括但不限于单次施用或经各个时间点多次施用、快速施用和脉冲式输注。

[0648] 本发明的抗体或免疫缀合物以符合良好医学实践的方式调配、给药和施用。在此情形下考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个别患者的临床病状、病症起因、药剂递送部位、施用方法、施用时间表和医学从业者已知的其他因素。抗体或免疫缀合物无需但任选与一或多种当前用于预防或治疗所述病症的药剂一起调配。此类其他药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体或免疫缀合物的量、病症或治疗的类型及如上文所述的其他因素。这些药剂一般以与本文所描述相同的剂量且用如本文所描述的施用途径使用,或以本文所描述的剂量的约1%至99%使用,或以凭经验/临床上确定为适当的任何剂量和任何途径使用。

[0649] 为预防或治疗疾病,本发明的抗体或免疫缀合物(当单独或与一或多种其他额外治疗剂组合使用时)的适当剂量将取决于待治疗的疾病类型、抗体或免疫缀合物的类型、疾病的严重程度和过程、抗体或免疫缀合物出于预防性还是治疗性目的施用、先前疗法、患者的临床病史和对抗体或免疫缀合物的响应及主治医师的判断。一次性或历经一系列治疗向患者适当地施用抗体或免疫缀合物。取决于疾病的类型和严重程度,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$

(例如0.1mg/kg-10mg/kg) 抗体或免疫缀合物可为施用患者的初始候选剂量, 无论例如通过一或多次分开施用还是通过连续输注。一种典型日剂量可在约1 μ g/kg至100mg/kg或100mg/kg以上的范围内, 取决于上文所提及的因素。对于经历数日或更长时间重复施用, 取决于病状, 治疗一般持续至疾病症状出现期望抑制为止。抗体或免疫缀合物的一种示例性剂量将在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此, 可向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg (或其任何组合) 的一或多种剂量。此类剂量可间歇地施用, 例如每周或每三周 (例如以使得患者接受约二至约二十或例如约六个剂量的抗体)。初始可施用较高负载剂量, 随后可施用一或多种较低剂量。然而, 其他给药方案可为可用的。此疗法的进程容易通过常规技术和测定法来监测。

[0650] 应当理解的是, 任一以上制剂或治疗方法可使用本发明的免疫缀合物和抗-CLL-1抗体两者进行。

[0651] H. 制品

[0652] 在本发明的另一方面中, 提供含有可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的物质的制品。制品包含容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可由多种材料 (诸如玻璃或塑料) 形成。容器装有单独或与有效治疗、预防和/或诊断病症的另一组合物组合的组合物, 且可具有无菌存取口 (例如容器可为具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中的至少一种活性剂为本发明的抗体或免疫缀合物。标签或包装插页指示组合物用于治疗所选病状。此外, 制品可包含 (a) 其中含有组合物的第一容器, 其中所述组合物包含本发明的抗体或免疫缀合物; 和 (b) 其中含有组合物的第二容器, 其中所述组合物包含另一种细胞毒性剂或其他治疗剂。本发明的此实施方案中的制品可进一步包含指示组合物可用于治疗特定病状的包装插页。或者或另外, 制品可进一步包含第二 (或第三) 容器, 其包含药学上可接受的缓冲剂, 诸如注射用抑菌水 (BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液 (Ringer's solution) 或右旋糖溶液。其可进一步包括就商业和使用者观点而言期望的其他物质, 包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0653] III. 实施例

[0654] 以下为本发明的方法和组合物的实施例。应当理解的是, 考虑到上文提供的一般描述, 可实践各种其他实施方案。

[0655] 实施例1

[0656] A. 单克隆抗体的产生

[0657] 使用以下操作产生针对人 (hu) 和食蟹猴 (cyno) CLL-1的单克隆抗体: 将动物用在哺乳动物表达系统中表达的与N末端Flag (DYKDDDDK) 融合的重组hu和cyno CLL-1细胞外域 (ECD, 65-265huCLL-1和65-265cynoCLL-1的氨基酸) 免疫接种。huCLL1ECD蛋白质 (氨基酸65-265) 包含SNP, AAA (Lys, K) 244->CAA (GLN, Q), 其具有29%的次要等位基因频率 (MAF)。

[0658] 对阳性克隆进行扩增且对于与huCLL-1和cynoCLL-1的结合, 通过ELISA和FACS再次筛选。通过荧光活化细胞分选术 (FACS), 使用表达重组hu和cyno LL-1的稳定细胞系且使用在急性骨髓白血病肿瘤细胞系上表达的肿瘤衍生的CLL-1, 鉴别反应强烈的五种克隆: m3H10、m6E7、m20B1、m21C9和m28H12。鼠类重链和轻链可变域的氨基酸序列的比对示于图1A和图1B中。m3H10和m21C9共享相同重链和轻链CDR, 仅m21C9重链和轻链可变区的氨基酸序

列展示于图1中。

[0659] B. 物种交叉反应性和结合亲和力

[0660] 测试单克隆抗体以确定其是否与cynoCLL-1细胞外域(ECD)(其与huCLL-1蛋白质ECD 85.07%一致且87.35%类似)交叉反应。嵌合抗-CLL-1人IgG通过涂布在CM5传感器芯片上的小鼠抗-人IgG捕捉。为测量动力学,注射于HBS-EP缓冲液中的人或食蟹猴CLL-1的三倍连续稀释液(4.1nM至1000nM)。使用简单的一比一朗格缪尔结合模型(one-to-one Langmuir binding model),计算缔合速率(kon)和解离速率(koff)。平衡解离常数(KD)依比率koff/kon计算。以下表2展示五种抗体(m3H10、m6E7、m20B1、m21C9和m28H12)的嵌合型式识别重组hu和cynoCLL-1,且提供关于与hu和cyno-CLL-1的相互作用的动力学的细节。通过来自食蟹猴(毛里求斯来源)的血液的FACS分析,进一步证实与cyno CLL-1的交叉反应性(数据未展示)。

[0661] 表2. 抗-CLL-1抗体的Biacore

配体	分析物	Ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Kd (s^{-1})	KD (M)
ch3H10	huCLL-1-Flag	2.7×10^5	2.4×10^{-3}	8.7nM
	CynoCLL-1Flag	1.7×10^5	7.7×10^{-4}	4.3nM
ch6E7	huCLL-1-Flag	4.6×10^5	4.4×10^{-4}	0.9nM
	CynoCLL-1Flag	4.0×10^5	4.6×10^{-4}	1.1nM
ch20B1	huCLL-1-Flag	2.2×10^5	1.0×10^{-3}	4.5nM
	CynoCLL-1Flag	1.9×10^5	1.2×10^{-3}	6.1nM
ch21C9	huCLL-1-Flag	2.5×10^5	2.4×10^{-3}	9.7nM
	CynoCLL-1Flag	1.6×10^5	1.2×10^{-3}	7.1nM
ch28H12	huCLL-1-Flag	5.0×10^5	9.5×10^{-3}	18nM
	CynoCLL-1Flag	6.7×10^5	2.3×10^{-4}	0.3nM

[0663] 遵循标准操作(Holmes等, Science 256:1205-1210(1992))进行斯卡查德分析(Scatchard analysis)以确定包括h6E7和ch21C9的抗体的相对结合亲和力。

[0664] 使用间接Iodogen法将抗-CLL-1抗体进行 $[I^{125}]$ 标记。通过使用NAP-5管柱(GE Healthcare)的凝胶过滤,自游离 ^{125}I -Na纯化 $[I^{125}]$ 标记的抗-CLL-1抗体;经纯化的碘化抗-CLL-1抗体具有8-10 μ Ci/ μ g的范围的特定活性。将50 μ L体积含有固定浓度的 $[I^{125}]$ 标记抗体和递减浓度的连续稀释的未标记抗体的竞争测定混合物置于96孔板中。将稳定表达重组hu或cynoCLL-1的HEK293AD细胞或表达内源性CLL-1的HL-60肿瘤细胞在生长培养基中在37℃在5%CO₂中培养。使用Sigma细胞解离溶液将细胞自烧瓶脱附且用结合缓冲液洗涤,该结合缓冲液由具有1%牛血清白蛋白(BSA)的达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、300mM人IgG及0.1%叠氮化钠组成。将经洗涤的细胞以0.2mL结合缓冲液中100,000个细胞的密度添加至96孔板。各孔中 $[I^{125}]$ 标记抗体的最终浓度为约250pM。竞争测定中未标记抗体的最终浓度在1000nM,经十次2倍数稀释步骤,至0nM仅仅缓冲液测定物的范围内。竞争测定一式三份进行。将竞争测定物在室温培育2小时。在培育2小时之后,将竞争测定物转移至Millipore多筛滤板(Billerica, MA)中且用结合缓冲液洗涤4次以将游离的与结合的经 $[I^{125}]$ 标记的抗体分开。过滤器在Wallac Wizard 1470 γ 计数器(PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc.; Wellesley, MA)上计数。使用

NewLigand软件 (Genentech) 评估结合数据, 该软件使用Munson和Robard的拟合算法确定抗体的结合亲和力 (Munson和Robard 1980)。

[0665] 表3展示对通过HEK293AD CLL-1稳定细胞表达的重组hu和cynoCLL-1以及HL-60细胞的亲和力 (0.45-1.2nM的K_D范围)。

[0666] 表3. 抗体对CLL-1的亲和力 [kD=nM] (斯卡查德分析)。

细胞		ch6E7	ch21C9
HL-60	K _D (nM)	0.65	0.45
EOL-1	K _D (nM)		
293AD/huCLL-1	K _D (nM)	0.80	0.59
293AD/cynoCLL-1	K _D (nM)	1.0	1.2

[0668] C. 单克隆抗体表位分组

[0669] 还使用基于细胞的竞争结合FACS测定法确定表位分组。将HL-60细胞与50-100倍过量的未标记竞争抗体一起或无所述抗体时预先培育, 接着用直接标记的检测抗体染色, 来自检测抗体的信号减弱指示未标记的竞争抗体结合于CLL-1上与检测抗体相同或类似的区域—这应发生在相同抗体用作检测剂与竞争剂时。当不存在不同未标记抗体阻断检测剂信号时, 未标记抗体结合于CLL-1中的不同区域。

[0670] 表4. 抗-CLL-1竞争实验

检测抗体	竞争抗体				
	ch6E7	ch20B1	ch21C9	ch28H12	R&D
R&D Systems-PE (克隆 687317)	✓	✗	✓	✗	✓
ch6E7-DyLight650	✓	✗	n/a	✗	n/a
ch28H12-DyLight650	n/a	✗	n/a	✓	n/a
ch21C9-DyLight650	✓	✗	✓	✗	✓
eBioscience HB3-PE	✗	✗	✗	✗	✓
BD Biosciences 50C1-PE	✗	✗	✗	✗	✗

[0672] 表4展示抗体对CLL-1的表位分组。ch6E7和ch21C9, 而非ch20B1和ch28H12与R&D Systems-PE (克隆687317) 分为一组。R&D Systems还阻断eBioscience克隆HB3, 但ch6E7和ch21C9无法阻断eBioscience克隆HB3结合。ch20B1和ch28H12未能与任何其他抗体竞争, 表明各抗体结合不同表位。所有抗体未能与BD Biosciences克隆50C1竞争, 也表明其结合不同表位。

[0673] D. 抗-CLL-1抗体的人源化

[0674] 如下所述将单克隆抗体6E7和21C9人源化。残基编号根据Kabat等, Sequences of proteins of immunological interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)。

[0675] 在6E7和21C9的人源化期间构建的变体以IgG形式评估。将来自鼠类6E7和21C9的VL和VH域与人VL κ I (VLKI) 和人VH亚组I (VHI) 共有序列比对。来自鼠类抗体的高变区经工程改造至VLKI和VHI接受体框架中。具体而言, 自mu6E7和mu21C9VL域, 位置24-34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 移植至VLKI, 且自mu6E7和mu21C9VH域, 位置26-35 (H1)、50-65 (H2) 和93-102 (H3) 移植至VHI。

[0676] 该部分中抗体的结合亲和力通过BIAcore™ T200格式 (Format) 确定。简言之, 根据供应商的说明书, BIAcore™研究级CM5芯片用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺

(EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 试剂活化。山羊抗-人Fc IgG与芯片偶联以实现各流动池中大约10,000个反应单位(RU)。未反应的偶联基团用1M乙醇胺阻断。为测量动力学,捕捉抗体以实现大约300RU。在25℃,以30μl/min的流速注射于HBS-P缓冲液(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、0.005%表面活性剂P20)中的人CLL-1的三倍连续稀释液。缔合速率(kon)与解离速率(koff)使用1:1朗格缪尔结合模型(BIAcore™ T200评价软件版本2.0)计算。平衡解离常数(Kd)依比率koff/kon计算。

[0677] 将CDR移植人源化6E7抗体的结合亲和力与嵌合6E7相比。制备CDR移植人源化6E7抗体的其他变体以评价其他维尼尔(vernier)位置对结合CLL-1的贡献。对于6E7,最初四种其他轻链(L1:CDR移植+(L4、L48和K49),L2:CDR移植+L4,L3:CDR移植+K49,和L4:CDR移植+K49)和五种其他重链(H1:CDR移植+(A67、L69、V71、K73),H2:CDR移植+A67,H3:CDR移植+L69,H4:CDR移植+V71,和H5:CDR移植+K73)。轻链上的K49为关键的小鼠维尼尔残基,且基于突变分析,测得重链上的L69和V71为关键的小鼠维尼尔残基(数据未展示)。嵌合6E7以 $9.59\text{E}-10\text{M}$ 的Kd结合,而CDR移植+K49(LC)+(A67、L69、V71、K73(HC))、CDR移植+K49(LC)+(L69、V71(HC))分别以 $1.40\text{E}-9\text{M}$ 和 $1.37\text{E}-9\text{M}$ 的Kd结合。

[0678] 将CDR移植人源化21C9抗体的结合亲和力与嵌合21C9抗体相比。制备CDR移植人源化21C9抗体的其他变体以评价其他维尼尔位置对结合CLL-1的贡献。对于21C9,最初三个其他轻链(L1:CDR移植+(F36及S43),L2:CDR移植+F36,L3:CDR移植+S43)和五个其他重链(H1:CDR移植+(A67、L69、V71、K73),H2:CDR移植+A67,H3:CDR移植+L69,H4:CDR移植+V71,和H5:CDR移植+K73)。轻链上的F36为关键的小鼠维尼尔残基。嵌合21C9以 $8.615\text{E}-9\text{M}$ 的Kd结合,而CDR移植+(F36和S43(LC))+L69(HC)和CDR移植+F36(LC)+L69(HC)分别以 $1.053\text{E}-8\text{M}$ 和 $9.785\text{E}-9\text{M}$ 的Kd结合。确定重链上的L69为关键的小鼠维尼尔残基。

[0679] 如上所述,测试人源化6E7.L4H1e和21C9.L2H3结合人和cyno CLL-1的能力,其中例外为在食蟹猴(cyno)结合测定中cynoCLL-1替代huCLL-1。人源化抗体的结合性质示于以下表5中。如通过斯卡查德分析,使用HL-60、EOL-1、293AD/cynoCLL1和293AD/huCLL-1细胞所确定,人源化6E7.L4H1e的结合亲和力分别为0.34、0.29、0.22和0.35Kd(nM)。如通过斯卡查德分析,使用HL-60、EOL-1、293AD/cynoCLL1和293AD/huCLL-1细胞所确定,人源化21C9.L2H3的结合亲和力分别为1.3、0.74、2.4和3.6Kd(nM)。

[0680] 表5

[0681]

抗体	huKD (M)	huka (1/Ms)	hukd (1/s)	cynoKD (M)	cynoka (1/Ms)	cynokd (1/s)
6E7.L4H1e	$6.218\text{E}-10$	$8.236\text{E}+5$	$5.121\text{E}-4$	$3.170\text{E}-10$	$7.391\text{E}+5$	$2.343\text{E}-4$
21C9.L2H3	$1.171\text{E}-8$	$2.244\text{E}+5$	$2.628\text{E}-3$	$9.472\text{E}-9$	$1.683\text{E}+5$	$1.594\text{E}-3$

[0682] 在热压力(thermal stress)(40℃,pH 5.5,2周)和2,2'-偶氮二(2-甲脒基丙烷)盐酸盐(AAPH)分析下测试人源化抗体6E7.L4H1e和21C9.L2H3。随后样品经受热压力以模拟在产物存放期内的稳定性。样品经缓冲液交换成20mM组氨酸乙酸盐(His Acetate)、240mM蔗糖pH 5.5且稀释至1mg/mL的浓度。一毫升样品在40℃经受压力2周,且第二个样品储存在-70℃作为对照。随后使用胰蛋白酶消化两个样品以产生肽,其可使用液相色谱法(LC)-质谱分析(MS)进行分析。对于各肽,自LC获得样品保留时间,以及在MS中获得高分辨准确质量和肽离子片段化信息(氨基酸序列信息)。在+10ppm的窗口,自数据集获取相关肽(天然和经修饰的肽离子)的提取离子色谱图(XIC),且将峰积分以确定面积。针对各样品,通过将

(经修饰的肽的面积)除以(经修饰的肽的面积加天然肽的面积)乘以100来计算修饰的相对百分比。

[0683] 6E7.L4H1e和h21C9.L2H3在DR-H2中具有N⁵⁴G⁵⁵,其容易发生脱氨基作用(对于6E7.L4H1e, $t_0=13.2\%$ 和 $t_{2wk} 14.5\%$,且 $r_0=11\%$ 和 $t_{2wk}=11.9\%$)。测试两种抗体的N54变体以确定是否可减轻潜在脱氨基作用而不影响与hu和cynoCLL-1的结合。参见表6。

[0684] 表6

抗体	huKD (M)	huka (1/Ms)	hukd (1/s)	cynoKD (M)	cynoka (1/Ms)	cynokd (1/s)
6E7.L4H1eN54	1.082E-9	9.096E+5	9.837E-4	2.256E-9	8.044E+5	1.815E-3
6E7.L4H1eA54	3.082E-9	7.103E+5	2.189E-3	3.143E-9	6.087E+5	1.913E-3
6E7.L4H1eS54	5.090E-9	4.882E+5	2.485E-3	4.256E-9	6.641E+5	2.827E-3
6E7.L4H1eS54	1.413E-8	5.098E+5	7.205E-3	6.371E-9	5.133E+5	3.270E-3
6E7.L4H1eD54	1.132E-7	3.044E+5	3.444E-2	4.870E-8	1.785E+5	8.694E-3
21C9.L2H3N54	1.510E-8	1.889E+5	2.853E-3	9.302E-9	2.358E+5	2.194E-3
21C9.L2H3S54	2.859E-7	1.416E+5	4.047E-2	5.669E-6	3656	2.072E-2
21C9.L2H3A54	6.215E-7	1.113E+5	6.915E-2	4.818E-5	445.3	2.146E-2
21C9.L2H3E54	8.625E-7	1.022E+5	8.816E-2	4.961E-5	747.5	3.709E-2
21C9.L2H3D54	8.017E-7	2.858E+5	2.291E-2	2.172E-7	4.072E+4	8.846E-3

[0687] 对于人源化6E7.L4H1e CDR-H2N54抗体变体,A54具有可接受的结合特征,最类似于N54。对于人源化21C9.L2H3CDR-H2N54抗体变体,所有变体均展示在解离速率上对huCLL-1的亲合力降低(10-30倍)且在缔合速率上对cynoCLL-1的亲合力降低(60-500倍)。如通过斯卡查德分析,使用293AD/cynoCLL1、293AD/huCLL-1、HL-60和EOL-1细胞所确定,人源化6E7.L4H1e的结合亲合力分别为0.67、0.68、0.6和0.25Kd (nM)。如通过斯卡查德分析,使用293AD/cynoCLL1、293AD/huCLL-1、HL-60和EOL-1细胞所确定,人源化6E7.L4H1eN54A的结合亲合力分别为0.9、0.89、0.64和0.32Kd (nM)。人源化6E7和21C9抗体的重链和轻链可变域氨基酸序列的比对分别示于图2A-2B和图3A-3B中。

[0688] E.表位定位(Epitope Mapping)

[0689] 为确定CLL-1的结合表位,使用羟基自由基足迹分析(HRF)技术检查(a)游离抗原CLL-1和(b)三种不同抗原-mAb复合物。在Brookhaven国家实验室使用X28c光束线将样品暴露于羟基自由基达0、10、15和20毫秒(ms)的时间间隔。经标记的样品使用PNG酶F进行脱糖基化。为优化实验方案,首先在脱糖基化样品上进行先导实验(pilot experiment)。使用MS的先导研究揭示,样品含有大量聚合物污染,需要额外清理。为移除聚合物污染,使用含三氯乙酸的丙酮使样品沉淀且进行LC-MS分析。沉淀步骤成功且MS中聚合物污染信号显著减弱。经清理的样品进行还原和烷基化,使用胰蛋白酶消化,接着进行液相色谱偶联高分辨质谱(LC-MS)。使用ProtMapMS分析MS数据,产生各肽的剂量响应曲线。针对各复合物形式比较游离抗原的结果。基于同源性的抗原模型使用Swiss-Model软件产生且可定位三个复合物中的每个的溶剂保护区。

[0690] 使用胰蛋白酶定位获得的整体序列覆盖率为90.05%。缺少区域主要由长度比4个残基短的胰蛋白酶肽构成,其可固有地难以检测,因为其在LC管柱上的保留性质弱。HRF过程引入稳定的侧链氧化修饰,产生特定质量位移,可由串联质谱数据鉴别出。提取所选离子色谱图(SIC)且针对肽离子的未氧化和所有氧化形式(具有特定m/z)积分。这些峰面积值用于以剂量响应(DR)曲线图形式表征反应动力学,其测量完整肽随着羟基自由基暴露的丧失。相较于游离抗原,复合物中的溶剂保护区经历逐渐氧化反应。氧化速率(称为速率常数,

RC) 的差异用来突出表位的位置。

[0691] ProtMapMS用于处理MS数据,产生各肽的RC值。最终结果示于表1中。肽位置和对序列示于列1和2中。第三列展示复合物1 (6E7.L4H1eA54抗体和CLL-1抗原) 的保护比率PR (=RC抗原/RC复合物)。类似地,第四和第五列展示复合物2 (经在根据Kabat编号K149包含半胱氨酸残基的轻链 (K149C) 工程改造的21C9.L2H3抗体和CLL-1抗原) 和复合物3 (R&D Systems单克隆抗-CLL1抗体 (克隆687317) 和CLL-1抗原) 的对应保护比率。若给定肽对于具体肽的PR值小于1,则归因于在复合物形成期间引入的结构改变,对应区域的溶剂经历可接近性增加。接近1的PR值指示区域的溶剂可接近性保持不变,而PR>1表明对应区域显示保护其免受随复合物形成而变的溶剂。大部分肽对各复合物的PR值接近1,指示对应区域的溶剂可接近性最低程度地改变。肽142-158一致地展示所有三种抗体的最高PR值,暗示所述区域的保护显著。除保护肽142-158之外,R&D Systems单克隆抗-CLL1抗体 (克隆687317,不同于6E7.L4H1eAG和21C9.L2H3) 也展示区域103-116的显著保护,如通过重叠肽103-116和105-116证明。

[0692]

SEQ ID NO:1 的肽位置	序列	SEQ ID NO:	RCA/ RC1	RCA/ RC2	RCA/ RC3
65-69	DYKDDDDKLEHVTLK	52	1.4	1.0	1.0
68-69	DDDDKLEHVTLK	53	1.1	0.9	0.8
75-87	MNKLQNISEELQR	54	1.4	1.1	0.90
78-87	LQNISEELQR	55	1.3	1.0	0.8
88-102	NISLQLMSNMNISNK	56	1.1	0.5	0.5
103-116	IRNLSTTLQTIATK	50	1.1	0.8	2.1
105-116	NLSTTLQTIATK	51	1.2	1.0	2.2
105-119*	NLSTTLQTIATKLCR	57	NA	NA	NA
120-124*	ELYSK	58	NA	NA	NA
137-141	WIWHK	59	1.0	0.6	1.3
142-158	DSCYFLSDDVQTWQESK	49	3.1	2.0	3.1
159-160	MACAAQNASLLK	60	1.0	1.2	0.8
171-181	INNKNLEFIK	61	1.7	1.3	1.1
175-181	NALEFIK	62	1.3	1.0	1.3
175-185*	NALEFIKSQSR	63	NA	NA	NA
186-201	SYDYWLGLSPEEDSTR	64	1.0	1.0	1.0
186-204*	SYDYWLGLSPEEDSTRGMR	65	NA	NA	NA
205-117	VDNIINSSAWVIR	66	1.2	1.0	1.0
218-232	NAPDLNNMYCGYINR	67	1.2	1.0	0.9
233-243	LYVQYYHCTYK	68	1.0	1.1	1.0
246-250*	MICEK	69	NA	NA	NA
251-263	MANPVQLGSTYFR	70	0.99	1.1	1.0

[0693] F. 抗-CLL-1抗体的内化

[0694] ADC靶标的一种期望属性为使抗体内化至细胞中的降解隔室的能力。为确定抗-CLL-1抗体在结合时是否内化,将HL-60或HL-60细胞在37℃与于RPMI培养基中0.3mg/ml hIgG一起预先培育2小时以减轻与FcR的非特异性结合,接着接种于经细胞培养物处理的4孔腔室载玻片(Nalge Nunc International)。将1μg/mL的最终浓度的直接结合于Dylight 488的抗体与hIgG阻断细胞一起在冰上在黑暗中培育30分钟。立即将细胞成像以展示膜染色(T0),且在延时摄影下,利用Leica SP5共焦显微镜,在10小时时间段内在37℃追踪。代表性实例ch21C9在30分钟内由HL-60细胞迅速内化(数据未展示)。使用体外基于细胞的测定,测量抗体药物缀合物杀死靶标细胞的能力来证实ch21C9定位于溶酶体。

[0695] G.产生抗-CLL-1抗体药物缀合物

[0696] 对于更大规模的抗体产生,在CHO细胞中产生抗体。将编码VL和VH的载体转染至CHO细胞中且通过蛋白A亲和色谱,自细胞培养基纯化IgG。

[0697] 通过抗体ch21C9、ch3H10、ch28H12、ch20B1、ch6E7、6E7.L4H1e、6E7.L4H1eA54、21C9.L2H3经由接头结合于PBD和PNU衍生物,产生抗-CLL-1抗体-药物缀合物(ADC)。

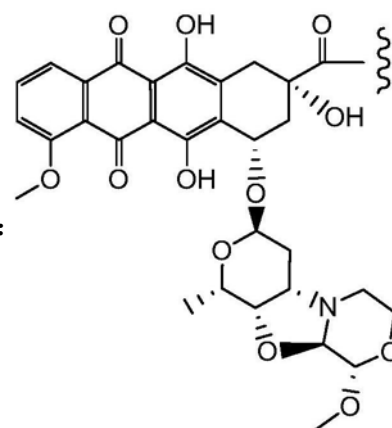
[0698] 在最初分离时,抗体中工程改造的半胱氨酸残基以具有细胞硫醇(例如谷胱甘肽)的混合二硫化物的形式存在,且因此不可进行缀合。这些抗体的部分还原(例如用DTT)、纯化和用去氢抗坏血酸(DHAA)再氧化产生具有可用于缀合的游离半胱氨酸巯基的抗体,如先前例如在Junutula等(2008)Nat.Biotechnol.26:925-932和US 2011/0301334中所描述。简言之,抗体与药物-接头部分组合,允许药物-接头部分结合于抗体的游离半胱氨酸残基。在若干小时之后,纯化ADC。

[0699] H.HL-60和EOL-1人急性骨髓白血病细胞系异种移植模型中抗-CLL-1抗体药物缀合物的功效

[0700] 使用人急性骨髓白血病异种移植模型HL-60(AML亚型M2)和EOL-1(AML亚型M4a)研究抗-CLL-1ADC的功效。两者由于其遗传和分子畸变均引起不良预后。雌性C.B-17SCID小鼠(Charles River Laboratories;Hollister,CA)各用五百万HL-60或EOL-1细胞皮下接种于腋腹区域中。当异种移植肿瘤达到100-300mm³的平均肿瘤体积(称为第0天)时,将动物随机分组,7-10只小鼠一组,且接受ADC的单一静脉内注射。在施用ADC前大约4小时,腹膜内给予动物过量(30mg/kg)抗-gD对照抗体以阻断肿瘤细胞上可能的非特异性抗体结合位点。在整个研究中每周测量小鼠的肿瘤和体重1-2次。当体重减轻超过其初始重量的20%时,立即处死小鼠。所有动物在肿瘤达到3000mm³前或展示即将发生溃疡的征象前处死。通过在注射后1、7和14天PK抽血,证实抗体的存在。

[0701] 如图4中所示,ch21C9、ch28H12、ch20B1、ch6E7和ch3H10经由在根据EU编号重链氨基

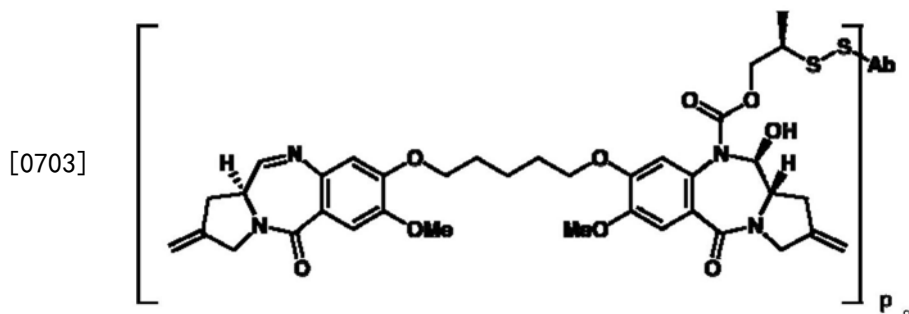
基酸118的游离半胱氨酸(A118C)结合于PNU药物部分:



显著减

小EOL-1肿瘤体积,而ch20B1中度减小肿瘤体积且ch28H12几乎无作用。使用HL-60,看到类似结果,如图5中所示。

[0702] 人源化抗体6E7.L4H1e和21C9.L2H3以各种剂量(10和20μg/m²)由不同半胱氨酸工程改造的缀合位点缀合PBD衍生物(SG34)。抗体在根据EU编号的重链氨基酸118(A118C)或在根据Kabat编号的轻链氨基酸149(K149C)包含工程改造的游离半胱氨酸。抗体-药物缀合物的结构展示如下:

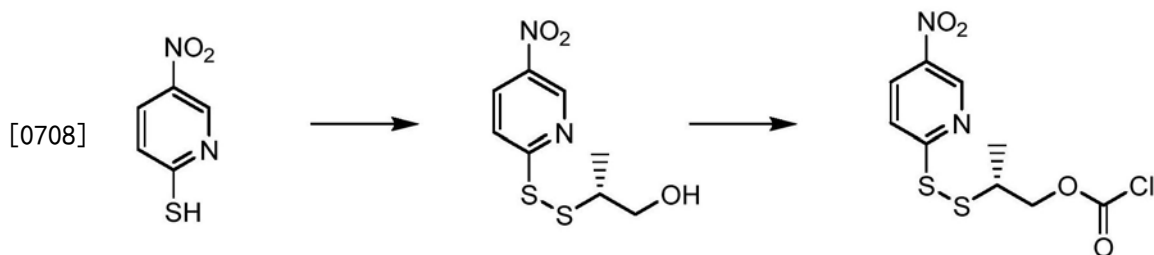


[0704] 如图6中所示,在HL-60异种移植模型中,包含6E7L4H1e或21C9.L2H3的轻链K149C半胱氨酸工程改造的免疫缀合物展示比包含6E7.L4H1e或21C9.L2H3的重链A118C半胱氨酸工程改造的免疫缀合物更大程度地减小肿瘤体积。

[0705] 还在6E7.L4H1e与经工程改造以移除潜在脱氨基位点的变体6E7.L4H1eA54之间比较减小肿瘤体积的能力以确定活性以及抗体的结合是否保留。如图7中所示,在HL-60异种移植模型中6E7L4H1e与6E7显著减小肿瘤体积。

[0706] 实施例2.合成用于制备(表A)中示例的抗体药物缀合物的接头-药物(LD)中间体

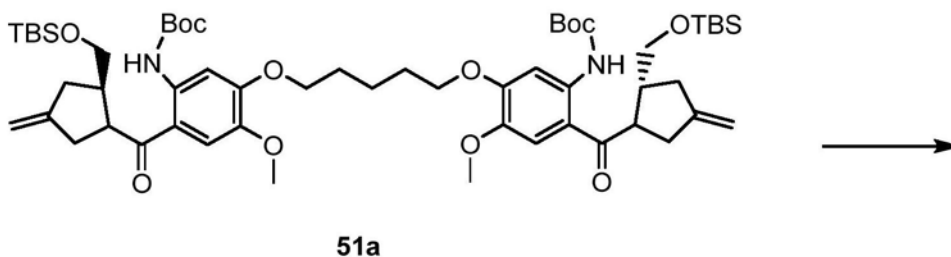
[0707] ADC-51的接头-药物中间体:(11S,11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮革-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮革-10(5H)-甲酸(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙酯(MS(ESI):875[M+H]⁺)通过W02013/055987的操作制备。



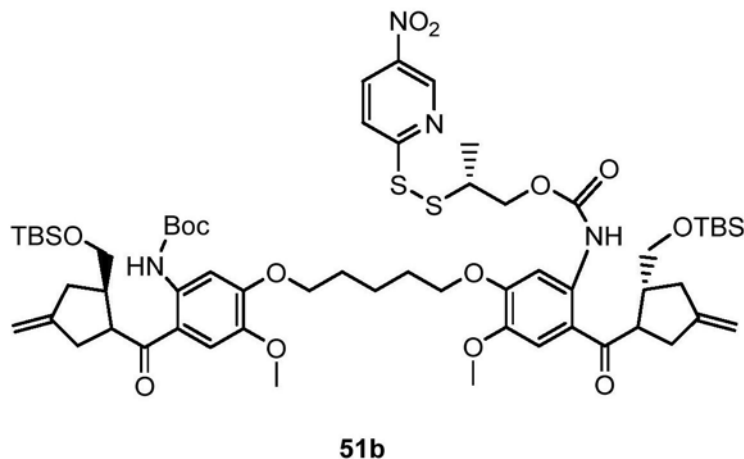
[0709] 在氩气气氛下,在0℃(冰/丙酮),将硫酰氯(2.35mL 1.0M于DCM中的溶液,2.35mmol)逐滴添加至经搅拌的5-硝基吡啶-2-硫醇(334mg,2.14mmol)于无水DCM(7.5mL)中的悬浮液中。反应混合物自黄色悬浮液变为黄色溶液且升温至室温,接着搅拌2小时,此后通过真空蒸发来移除溶剂,得到黄色固体。在0℃在氩气气氛下使固体再溶解于DCM(15mL)中且用(R)-2-巯基丙-1-醇(213mg,2.31mmol)于无水DCM(7.5mL)中的溶液逐滴处理。使反应混合物升温至室温且搅拌20小时,此时通过LC/MS分析显示在保留时间1.41分钟形成实质性产物(ES⁺)m/z 247([M+H]⁺,约100%相对强度)。通过过滤移除沉淀且真空蒸发滤液,得到橙色固体,其经H₂O(20mL)处理且用氢氧化铵溶液碱化。将混合物用DCM(3×25mL)萃取且经合并的萃取物用H₂O(20mL)、盐水(20mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤且真空蒸发,得到粗产物。通过快速色谱法(梯度洗脱以1%增量增加:100%DCM至98:2v/vDCM/MeOH)纯化,得到呈油状物的(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙-1-醇(111mg,21%产率)。

[0710] 将三光气(48mg,0.16mmol)添加至经搅拌的(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙-1-醇(111mg,0.45mmol)和吡啶(34μL,33.5mg,0.42mmol)于无水DCM(5mL)中的溶液中。将反应混合物在氩气气氛下搅拌45分钟,此后通过真空蒸发来移除溶剂,得到呈黄色膜状

物的氯甲酸(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙酯。产物未经纯化或分析即用于下一步骤。

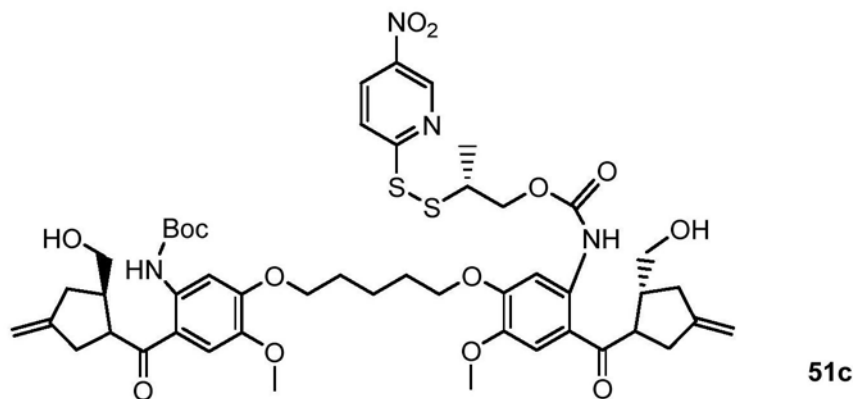


[0711]



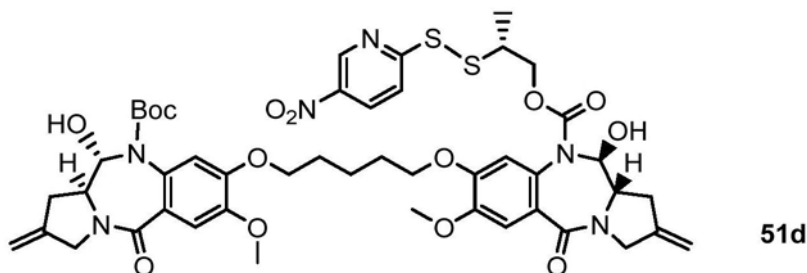
[0712] 在室温,将氯甲酸(R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙酯(约139mg,0.45mmol)于无水DCM(5mL)中的溶液逐滴添加至经搅拌的((戊-1,5-二基双(氧基))双(6-((2R)-2-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基环戊烷-1-羰基)-4-甲氧基-3,1-亚苯基))二氨基甲酸二-叔丁酯51a(通过W0 2013/055987中实施例1的操作制备)(430mg,约0.45mmol)和吡啶(40μL,39mg,0.49mmol)于无水DCM(12mL)中的溶液中。在氩气气氛下将反应混合搅拌2.5小时,此时通过LC/MS分析显示在保留时间2.42分钟形成实质性产物(ES+) m/z 1226 ([M+H]⁺,约20%相对强度)、1248 ([M+Na]⁺,约60%相对强度)。将混合物用DCM(20mL)稀释且用SiO₂处理,且通过真空蒸发来移除溶剂。所得残余物通过快速色谱法(梯度洗脱以10%增量增加:80:20v/v己烷/EtOAc至70:30v/v己烷/EtOAc)进行纯化,得到呈黄色泡沫状物的(2-((S)-2-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-5-((5-(4-((S)-2-(((叔丁基二甲基硅烷基)氧基)甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基-5-(((R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙氧基)羰基)氨基)苯氧基)戊基)氧基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酸叔丁酯51b(419mg,76%产率)。(MS(ESI):1224[M+H]⁺)。

[0713]



[0714] 将冰醋酸(24mL)添加至经搅拌的经TBS保护的51b(419mg, 0.34mmol)于THF(8mL)和H₂O(8mL)中的溶液中。将反应混合物搅拌16小时,此时通过LC/MS分析显示反应完成,其中在保留时间1.82分钟观测到期望产物(ES⁺) m/z 997 ([M+H]⁺, 约100%相对强度)、1019 ([M+Na]⁺, 约45%相对强度)。将反应混合物逐滴添加至冷却的(0-5℃)饱和NaHCO₃溶液(400mL)。使中性溶液升温至室温且用EtOAc(4×100mL)萃取,且将经合并的有机层用H₂O(80mL)、盐水(100mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤且真空蒸发,得到粗产物。通过快速色谱法(梯度洗脱以1%增量增加:100%DCM至98:2v/vDCM/MeOH)纯化,得到呈微黄色泡沫状物的(2-((S)-2-(羟基甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-5-((5-(4-((S)-2-(羟基甲基)-4-亚甲基吡咯烷-1-羰基)-2-甲氧基-5-(((R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙氧基)羰基)氨基)苯氧基)戊基)氧基)-4-甲氧基苯基)氨基甲酸叔丁酯51c(341mg, 100%产率)。(MS(ESI): 995[M+H]⁺)。

[0715]



[0716] 在氩气气氛下,在-45℃(干冰/CH₃CN),将无水DMSO(107μL, 188mg, 1.50mmol)于无水DCM(7.5mL)中的溶液逐滴添加至经搅拌的草酰氯(410μL 2.0M于DCM中的溶液, 0.82mmol)于无水DCM(7.5mL)中的溶液中。在-45℃搅拌15分钟之后,将反应混合物用51c(341mg, 0.34mmol)于无水DCM(15mL)中的溶液逐滴处理。在-45℃再搅拌1小时之后,将反应混合物用TEA(476μL, 342mg, 3.42mmol)于无水DCM(7.5mL)中的溶液逐滴处理。经1.5小时的时间使反应混合物升温至室温且用DCM(50mL)稀释,接着用饱和NH₄Cl(15mL)、饱和NaHCO₃(15mL)、盐水(15mL)洗涤,干燥(MgSO₄),过滤且真空蒸发,得到粗产物。通过快速色谱法(梯度洗脱以0.4%增量增加:100%DCM至98.4:1.6v/v DCM/MeOH)纯化,得到呈微黄色泡沫状物的(11S,11aS)-11-羟基-8-((5-(((11S,11aS)-11-羟基-7-甲氧基-2-亚甲基-10-((R)-2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙氧基)羰基)-5-氧代-2,3,5,10,11,11a-六氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮䓬-8-基)氧基)戊基)氧基)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮䓬-10(5H)-甲酸叔丁酯51d(227mg, 67%产率):LC/MS保留时间1.69分钟(ES⁺) m/z 993 ([M+H]⁺, 约80%相对强度)、1015 ([M+

Na]⁺, 约20% 相对强度)。

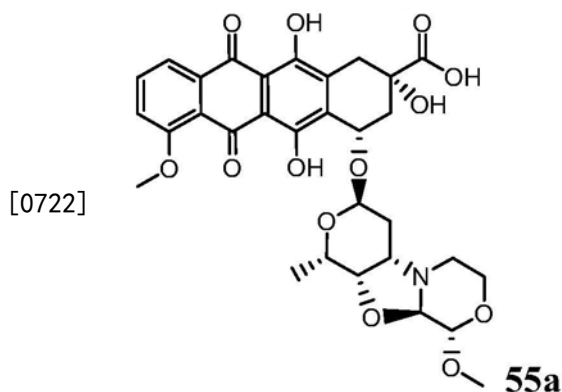
[0717] 在0℃ (丙/丙酮), 将95:5v/v TFA/H₂O溶液 (4mL) 添加至51d (216mg, 0.22mmol) 的粗样品中。在0℃ 搅拌30分钟之后, 如通过LC/MS判断, 认为反应完成, 期望产物峰保留时间在1.60分钟 (ES+) m/z 875 ([M+H]⁺, 约100% 相对强度)。保持反应混合物为冷的, 且逐滴添加至冷却的饱和NaHCO₃水溶液 (100mL) 中。将混合物用DCM (3×30mL) 萃取且将合并的有机层用盐水 (50mL) 洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤且真空蒸发, 得到粗产物。通过快速色谱法 (梯度洗脱以0.4% 增量增加: 100% CHCl₃至98.4:1.6v/v CHCl₃/MeOH) 纯化, 得到呈黄色泡沫状物的LD-51 (127mg, 66% 产率): LC/MS (操作15分钟), 保留时间6.18分钟 (ES+) m/z 875 ([M+H]⁺, 约100% 相对强度); ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.21 (s, 1H), 8.30 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.69 (d, 1H, J=4.5Hz), 7.62 (d, 1H, J=8.9Hz), 7.49 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.58 (dd, 1H, J=4.4, 9.8Hz), 5.22-5.10 (m, 4H), 4.43 (d, 1H, J=3.7Hz), 4.33-4.25 (m, 4H), 4.15-3.98 (m, 5H), 3.95-3.80 (m, 7H), 3.68-3.59 (m, 1H), 3.20-3.07 (m, 2H), 2.99-2.87 (m, 2H), 2.76-2.68 (m, 2H), 1.99-1.83 (m, 4H), 1.72-1.57 (m, 2H), 1.19 (d, 3H, J=6.6Hz)。

[0718] ADC-52的接头-药物中间体: (2,5-双((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(磷酰氧基)-1,2-二氢-3H-苯并[e]吡啶-3-基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)苯基)氨基甲酸2-((5-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙酯 (MS (ESI): 1098[M+H]⁺) 通过WO 2015/023355LD-53的操作制备。二氢磷酸(S)-1-(氯甲基)-3-((E)-3-(4-((E)-3-((S)-1-(氯甲基)-5-(磷酰氧基)-1,2-二氢-3H-苯并[e]吡啶-3-基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)-2-(2-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基)苯基)丙烯酰基)-2,3-二氢-1H-苯并[e]吡啶-5-基酯 (MS (ESI): 994[M+H]⁺) 通过WO 2015/023355的操作制备。

[0719] ADC-54的接头-药物中间体: (11S,11aS)-11-羟基-7-甲氧基-8-((5-((S)-7-甲氧基-2-亚甲基-5-氧代-2,3,5,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮草-8-基)氧基)戊基)氧基)-2-亚甲基-5-氧代-2,3,11,11a-四氢-1H-苯并[e]吡咯并[1,2-a][1,4]二氮草-10(5H)-甲酸(R)-2-((3-硝基吡啶-2-基)二硫基)丙酯 (MS (ESI): 876[M+H]⁺) 通过WO 2013/055987的操作制备。

[0720] ADC-55的接头-药物中间体: 双(甲基氨基甲酸)4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰氨基)-3-甲基丁酰氨基)-5-脲基戊酰氨基)苯甲酯·(2-氧代-2-((2S,4S)-2,5,12-三羟基-7-甲氧基-4-(((1S,3R,4aS,9S,9aR,10aS)-9-甲氧基-1-甲基八氢-1H-吡喃并[4',3':4,5]噁唑并[2,3-c][1,4]噁嗪-3-基)氧基)-6,11-二氧代-1,2,3,4,6,11-六氢并四苯-2-基)乙基)乙-1,2-二基酯。

[0721] 遵循US 8389697的实施例3, 向PNU-159682 (15.3mg, 0.02038mmol) (如WO 1998/02446和US 8470984实施例1中报道制备) 于3ml 甲醇和2ml H₂O中的溶液中添加NaIO₄ (5.1mg, 0.0238mmol) 于1ml H₂O中的溶液。将反应混合物在室温搅拌3小时, 直至无法检测到起始物质 (TLC和HPLC分析)。减压移除溶剂, 且将粗红色固体 (2S,4S)-2,5,12-三羟基-7-甲氧基-4-[[(1S,3R,4aS,9S,9aR,10aS)-9-甲氧基-1-甲基八氢-1H-吡喃并[4',3':4,5][1,3]噁唑并[2,3-c][1,4]噁嗪-3-基]氧基]-6,11-二氧代-1,2,3,4,6,11-六氢并四苯-2-甲酸55a (MS (ESI): 628[M+H]⁺) 通过WO 2010/009124的操作转化成LD-55 (MS (ESI): 1355[M+H]⁺)。



[0723] ADC-56的接头-药物中间体: (2S, 4S) -2, 5, 12-三羟基-7-甲氧基-4-(((1S, 3R, 4aS, 9S, 9aR, 10aS) -9-甲氧基-1-甲基八氢-1H-吡喃并[4', 3':4, 5]噁唑并[2, 3-c][1, 4]噁嗪-3-基) 氧基) -N-(2-((5-硝基吡啶-2-基) 二硫基) 乙基) -6, 11-二氧代-1, 2, 3, 4, 6, 11-六氢并四苯-2-甲酰胺 (MS (ESI) : 842 [M+H]⁺) 通过W02013/055987的操作制备。

[0724] ADC-57的接头-药物中间体: (2S, 4S) -2, 5, 12-三羟基-7-甲氧基-4-(((1S, 3R, 4aS, 9S, 9aR, 10aS) -9-甲氧基-1-甲基八氢-1H-吡喃并[4', 3':4, 5]噁唑并[2, 3-c][1, 4]噁嗪-3-基) 氧基) -N-(2-((5-硝基吡啶-2-基) 二硫基) 丙基) -6, 11-二氧代-1, 2, 3, 4, 6, 11-六氢并四苯-2-甲酰胺 (MS (ESI) : 856 [M+H]⁺) 通过US8389697的操作制备。

[0725] ADC-58的接头-药物中间体: (2S, 4S) -2, 5, 12-三羟基-7-甲氧基-4-(((1S, 3R, 4aS, 9S, 9aR, 10aS) -9-甲氧基-1-甲基八氢-1H-吡喃并[4', 3':4, 5]噁唑并[2, 3-c][1, 4]噁嗪-3-基) 氧基) -N-(2-甲基-2-((5-硝基吡啶-2-基) 二硫基) 丙基) -6, 11-二氧代-1, 2, 3, 4, 6, 11-六氢并四苯-2-甲酰胺 (MS (ESI) : 870 [M+H]⁺) 通过US8389697的操作制备。

[0726] 虽然出于清楚理解的目的, 前述本发明已借助于说明和实施例详细地描述, 但描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容以全文引用的方式明确并入本文中。

[0727] 序列表

[0728]

名称	序列	SEQ ID NO
人 CLL-1 (UniProt No. Q5QGZ9; NCBI Ref. NP_612210.4)	MSEEVTYADL QFQNSSEMEK IPEIGKFGEK APPAPSHVWR PAALFLTLLC LLLIGLGLV ASMFBHTLKI EMKKMNKLQN ISEELQRNIS LQLMSNMNIS NKIRNLSTTL QTATKLCRE LYSKEQEHKC KPCPRRWIWH KDSCYFLSDD VQTWQESKMA CAAQNASLLK INNKNLEFI KSQSRSDYDW LGLSPEEDST RGMVRVDNIIN SSAWVIRNAP DLNNMYCGYI NRLYVQYYHC TYKKRMICEK MANPVQLGST YFREA	1
人 CLL-1 ECD (SEQ ID NO:1 的 aa 65-265)	HVTLEIEMKKMNKLQNISEELQRNLSLQMSNMNISNKIRNLSTTL QTATKLCRELYSKEQEHCKPCPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTW QESKMACAAQNASLLKINNKNLEFIKSQSRSDYDWLGLSPEEDS TRGMVRVDNIINSSAWVIRNAPDLNNMYCGYINRLYVQYYHCTYK KRMICEKMANPVQLGSTYFREA	2
人 CLL-1 C 型凝集素样 域(CTLD) (SEQ ID NO:1 的 aa 133-250)	CPRRWIWHKDSCYFLSDDVQTWQESKMACAAQNASLLKINNKN ALEFIKSQSRSDYDWLGLSPEEDSTRGMVRVDNIINSSAWVIRNAPD LNNMYCGYINRLYVQYYHCTYKKRMICEK	3
食蟹猴 CLL-1	MSEEVTYADLKFQNSSETEKIQEIAKFGGKAPPAPSCVWRPAALF LTVLCLLMLIGLGLVLSMFHITLKTAMKKMNKLQNINEELQRNV SLQMSNMNSS NKIRNLSTTLQTATRLCRELYSKEQEHCKPCPRRWIWHKDSCY FLSDDVRTWQESRMACAAQNASLLKINNKNLEFIKSQSTSYPY WLGLSPEKDYS YGTSVDDIINSSAWVTRNASDLNNMFCGYINRIYVHYDYCIYRKK MICEKMANPVQLGFIHFREA	4
m6E7-HVR L1 6E7L4H1e-HVR L1	RASQSVSTSSYNMH	5

[0729]

6E7L4H1eA54-HVR L1		
m6E7-HVR L2 6E7L4H1e-HVR L2 6E7L4H1eA54-HVR L2	YASNLES	6
m6E7-HVR L3 6E7L4H1e-HVR L3 6E7L4H1eA54-HVR L3	QHSWEIPLT	7
m6E7-HVR H1 6E7L4H1e-HVR H1 6E7L4H1eA54-HVR H1	DYYMH	8
m6E7-HVR H2 6E7L4H1e-HVR H2	RINPYNGAAFYSQNFKD	9
m6E7-HVR H3 6E7L4H1e-HVR H3 6E7L4H1eA54-HVR H3	ERGADLEGYAMDY	10
6E7L4H1eA54-HVR H2	RINPYAGAAFYSQNFKD	11
m20B1-HVR L1	SASSISYMY	12
m20B1-HVR L2	DTSKLAS	13
m20B1-HVR L3	HQRSSWT	14
m20B1-HVR H1	SYDIN	15
m20B1-HVR H2	WIYPGDTTEYNERFKG	16
m20B1-HVR H3	SYDYDYAMDY	17
m21C9-HVR L1 21C9.L2H-HVR L1	KASQDVSTAVA	18
m21C9-HVR L2 21C9.L2H-HVR L2	SPSYRYT	19
m21C9-HVR L3 21C9.L2H-HVR L3	QQLYSTPYT	20
m21C9-HVR H1 21C9.L2H-HVR H1	DYYLD	21
m21C9-HVR H2 21C9.L2H-HVR H2	RVNPNYGGTIYNQKFKG	22
m21C9-HVR H3 21C9.L2H-HVR H3	DHYRYDPLLDY	23
m28H12-HVR L1	RASQSVSSSYSYMH	24
m28H12-HVR L2	YASNLES	25
m28H12-HVR L3	QHSWEIPYT	26
m28H12-HVR H1	DTYMH	27
m28H12-HVR H2	RIDPANGD TDYDPKFQG	28
m28H12-HVR H3	SGPPYVMDY	29
m6E7 V _L	DIVLTQSPSSLIVSLGQRATISCRASQSVSTSSYNYMHWWYQQKPGQ PPKLLKLYASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYC QHSWEIPLTFGAGTKLEIK	30
m6E7 V _H	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYYMHVWKQSHIKS LEWIGRINPYNGAAFYSQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSE DSAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTSTVTVSS	31
6E7L4H1e V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSTSSYNYMHWWYQQKPG KPPKLLIKYASNLESGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHSWEIPLTFGQGTKVEIK	32
6E7L4H1e V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYYMHVVRQAPGQ GLEWIGRINPYNGAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTSTAYLELSSLRSE DTAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTSTVTVSS	33
6E7L4H1eAG V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYYMHVVRQAPGQ GLEWIGRINPYAGAAFYSQNFKDRVTLTVDTSTSTAYLELSSLRSE DTAVYYCAIERGADLEGYAMDYWGQGTSTVTVSS	34
m20B1 V _L	DIVLTQSPAISASPGKVTMTCSASSISYMYWYQQKPGTSPKR WIYDTSKLASGVPSRFGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQR SSWTFGGGTKLEIK	35

[0730]

m20B1 V _H	EVQLQQSGPELVKPGALVKISCKASGYTFTSYDINWLKQRPQGGL EWIGWIYPGDGTTEYNERFKGKATLTADKSSSTAYLQLSSLTSEN SAVYFCARSYDYDYAMDYWGQGTSTVTVSS	36
m21C9 V _L	DIQMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWFQQKPGQSP KLLIYSPSYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQ LYSTPYTFGGGTKLEIK	37
m21C9 V _H	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYLDWVKQSHGE SFEWIGRVNPNYNGGTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMDLNSLTS EDSAVYYCARDHYRYDPLLDYWGQGTTLTVSS	38
21C9.L2H3 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWFQQKPGKAPK LLIYSPSYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLY STPYTFGGGTKVEIK	39
21C9.L2H3 V _H	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFTDYLDWVRQAPGQ GLEWIGRVNPNYNGGTIYNQKFKGRVTLTRDTSTSTAYLELSSLRS EDTAVYYCARDHYRYDPLLDYWGQGTTLTVSS	40
m28H12 V _L	DIQMTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSSSSYSYMHWWYQQKPG QPPKLLIKYASNLESGVPAFSGRSGTDFTLNIHPVEEEDTATYY CQHSWEIPYTFGGGTRLEIK	41
m28H12 V _H	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWWVKQRPEQ GLEWIGRIDPANGDTDYDPKFGKATVTADTSSNTAYLQLSSLTS EDTAVYYCTISGPPYYVMDYWGQGTSTVTVSS	42
6E7L4H1eE54-HVR H2	RINPYEGAAFYQNFKD	43
6E7L4H1eS54-HVR H2	RINPYSGAAFYQNFKD	44
6E7L4H1e 共同-HVR H2	RINPYX ₁ GAAFYQNFKD, 其中 X ₁ 为 A、E、S 或 N	45
6E7L4H1e 共同-HVR VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYSFTDYMHWWVRQAPGQ GLEWIGRINPY X ₁ GAAFYQNFKDRVTLTVDTSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCAIE RGADLEGYAMDYWGQGTTLTVTVSS, 其中 X ₁ 为 A、E、S 或 N	46
6E7L4H1e 共同 2-HVR H2	RINPYX ₂ GAAFYQNFKD, 其中 X ₂ 为 A、E 或 S	47
6E7L4H1e 共同 2-HVR VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYSFTDYMHWWVRQAPGQ GLEWIGRINPY X ₂ GAAFYQNFKDRVTLTVDTSTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCAIE RGADLEGYAMDYWGQGTTLTVTVSS, 其中 X ₂ 为 A、E 或 S	48

[0001] 序列表
 [0002] <110> 基因泰克公司.
 [0003] <120> 抗-CLL-1抗体和免疫缀合物
 [0004] <130> P32314-W0
 [0005] <140>
 [0006] <141>
 [0007] <150> 62/049,876
 [0008] <151> 2014-09-12
 [0009] <160> 73
 [0010] <170> PatentIn version 3.5
 [0011] <210> 1
 [0012] <211> 265
 [0013] <212> PRT
 [0014] <213> 智人
 [0015] <400> 1
 [0016] Met Ser Glu Glu Val Thr Tyr Ala Asp Leu Gln Phe Gln Asn Ser Ser
 [0017] 1 5 10 15
 [0018] Glu Met Glu Lys Ile Pro Glu Ile Gly Lys Phe Gly Glu Lys Ala Pro
 [0019] 20 25 30
 [0020] Pro Ala Pro Ser His Val Trp Arg Pro Ala Ala Leu Phe Leu Thr Leu
 [0021] 35 40 45
 [0022] Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ile Gly Leu Gly Val Leu Ala Ser Met Phe
 [0023] 50 55 60
 [0024] His Val Thr Leu Lys Ile Glu Met Lys Lys Met Asn Lys Leu Gln Asn
 [0025] 65 70 75 80
 [0026] Ile Ser Glu Glu Leu Gln Arg Asn Ile Ser Leu Gln Leu Met Ser Asn
 [0027] 85 90 95
 [0028] Met Asn Ile Ser Asn Lys Ile Arg Asn Leu Ser Thr Thr Leu Gln Thr
 [0029] 100 105 110
 [0030] Ile Ala Thr Lys Leu Cys Arg Glu Leu Tyr Ser Lys Glu Gln Glu His
 [0031] 115 120 125
 [0032] Lys Cys Lys Pro Cys Pro Arg Arg Trp Ile Trp His Lys Asp Ser Cys
 [0033] 130 135 140
 [0034] Tyr Phe Leu Ser Asp Asp Val Gln Thr Trp Gln Glu Ser Lys Met Ala
 [0035] 145 150 155 160
 [0036] Cys Ala Ala Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Ile Asn Asn Lys Asn Ala
 [0037] 165 170 175
 [0038] Leu Glu Phe Ile Lys Ser Gln Ser Arg Ser Tyr Asp Tyr Trp Leu Gly

[0039]	180							185							190													
[0040]	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Asp	Ser	Thr	Arg	Gly	Met	Arg	Val	Asp	Asn	Ile												
[0041]	195							200							205													
[0042]	Ile	Asn	Ser	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Pro	Asp	Leu	Asn	Asn												
[0043]	210							215							220													
[0044]	Met	Tyr	Cys	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg	Leu	Tyr	Val	Gln	Tyr	Tyr	His	Cys												
[0045]	225							230							235							240						
[0046]	Thr	Tyr	Lys	Lys	Arg	Met	Ile	Cys	Glu	Lys	Met	Ala	Asn	Pro	Val	Gln												
[0047]	245							250							255													
[0048]	Leu	Gly	Ser	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu	Ala																			
[0049]	260							265																				
[0050]	<210> 2																											
[0051]	<211> 201																											
[0052]	<212> PRT																											
[0053]	<213> 智人																											
[0054]	<400> 2																											
[0055]	His	Val	Thr	Leu	Lys	Ile	Glu	Met	Lys	Lys	Met	Asn	Lys	Leu	Gln	Asn												
[0056]	1 5 10 15																											
[0057]	Ile	Ser	Glu	Glu	Leu	Gln	Arg	Asn	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Met	Ser	Asn												
[0058]	20							25							30													
[0059]	Met	Asn	Ile	Ser	Asn	Lys	Ile	Arg	Asn	Leu	Ser	Thr	Thr	Leu	Gln	Thr												
[0060]	35							40							45													
[0061]	Ile	Ala	Thr	Lys	Leu	Cys	Arg	Glu	Leu	Tyr	Ser	Lys	Glu	Gln	Glu	His												
[0062]	50							55							60													
[0063]	Lys	Cys	Lys	Pro	Cys	Pro	Arg	Arg	Trp	Ile	Trp	His	Lys	Asp	Ser	Cys												
[0064]	65							70							75							80						
[0065]	Tyr	Phe	Leu	Ser	Asp	Asp	Val	Gln	Thr	Trp	Gln	Glu	Ser	Lys	Met	Ala												
[0066]	85							90							95													
[0067]	Cys	Ala	Ala	Gln	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Ile	Asn	Asn	Lys	Asn	Ala												
[0068]	100							105							110													
[0069]	Leu	Glu	Phe	Ile	Lys	Ser	Gln	Ser	Arg	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Leu	Gly												
[0070]	115							120							125													
[0071]	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Asp	Ser	Thr	Arg	Gly	Met	Arg	Val	Asp	Asn	Ile												
[0072]	130							135							140													
[0073]	Ile	Asn	Ser	Ser	Ala	Trp	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Pro	Asp	Leu	Asn	Asn												
[0074]	145							150							155							160						
[0075]	Met	Tyr	Cys	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg	Leu	Tyr	Val	Gln	Tyr	Tyr	His	Cys												
[0076]	165							170							175													
[0077]	Thr	Tyr	Lys	Lys	Arg	Met	Ile	Cys	Glu	Lys	Met	Ala	Asn	Pro	Val	Gln												

[0078]	180	185	190
[0079]	Leu Gly Ser Thr Tyr Phe Arg Glu Ala		
[0080]	195	200	
[0081]	<210> 3		
[0082]	<211> 118		
[0083]	<212> PRT		
[0084]	<213> 智人		
[0085]	<400> 3		
[0086]	Cys Pro Arg Arg Trp Ile Trp His Lys Asp Ser Cys Tyr Phe Leu Ser		
[0087]	1 5 10 15		
[0088]	Asp Asp Val Gln Thr Trp Gln Glu Ser Lys Met Ala Cys Ala Ala Gln		
[0089]	20 25 30		
[0090]	Asn Ala Ser Leu Leu Lys Ile Asn Asn Lys Asn Ala Leu Glu Phe Ile		
[0091]	35 40 45		
[0092]	Lys Ser Gln Ser Arg Ser Tyr Asp Tyr Trp Leu Gly Leu Ser Pro Glu		
[0093]	50 55 60		
[0094]	Glu Asp Ser Thr Arg Gly Met Arg Val Asp Asn Ile Ile Asn Ser Ser		
[0095]	65 70 75 80		
[0096]	Ala Trp Val Ile Arg Asn Ala Pro Asp Leu Asn Asn Met Tyr Cys Gly		
[0097]	85 90 95		
[0098]	Tyr Ile Asn Arg Leu Tyr Val Gln Tyr Tyr His Cys Thr Tyr Lys Lys		
[0099]	100 105 110		
[0100]	Arg Met Ile Cys Glu Lys		
[0101]	115		
[0102]	<210> 4		
[0103]	<211> 265		
[0104]	<212> PRT		
[0105]	<213> 人工序列		
[0106]	<220>		
[0107]	<221> 来源		
[0108]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"		
[0109]	<400> 4		
[0110]	Met Ser Glu Glu Val Thr Tyr Ala Asp Leu Lys Phe Gln Asn Ser Ser		
[0111]	1 5 10 15		
[0112]	Glu Thr Glu Lys Ile Gln Glu Ile Ala Lys Phe Gly Gly Lys Ala Pro		
[0113]	20 25 30		
[0114]	Pro Ala Pro Ser Cys Val Trp Arg Pro Ala Ala Leu Phe Leu Thr Val		
[0115]	35 40 45		
[0116]	Leu Cys Leu Leu Met Leu Ile Gly Leu Gly Val Leu Gly Ser Met Phe		

[0117]	50	55	60
[0118]	His Ile Thr Leu Lys Thr Ala Met Lys Lys Met Asn Lys Leu Gln Asn		
[0119]	65	70	75
[0120]	Ile Asn Glu Glu Leu Gln Arg Asn Val Ser Leu Gln Leu Met Ser Asn		
[0121]	85	90	95
[0122]	Met Asn Ser Ser Asn Lys Ile Arg Asn Leu Ser Thr Thr Leu Gln Thr		
[0123]	100	105	110
[0124]	Ile Ala Thr Arg Leu Cys Arg Glu Leu Tyr Ser Lys Glu Gln Glu His		
[0125]	115	120	125
[0126]	Lys Cys Lys Pro Cys Pro Arg Arg Trp Ile Trp His Lys Asp Ser Cys		
[0127]	130	135	140
[0128]	Tyr Phe Leu Ser Asp Asp Val Arg Thr Trp Gln Glu Ser Arg Met Ala		
[0129]	145	150	155
[0130]	Cys Ala Ala Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Ile Asn Asn Lys Asn Ala		
[0131]	165	170	175
[0132]	Leu Glu Phe Ile Lys Ser Gln Ser Thr Ser Tyr Pro Tyr Trp Leu Gly		
[0133]	180	185	190
[0134]	Leu Ser Pro Glu Lys Asp Tyr Ser Tyr Gly Thr Ser Val Asp Asp Ile		
[0135]	195	200	205
[0136]	Ile Asn Ser Ser Ala Trp Val Thr Arg Asn Ala Ser Asp Leu Asn Asn		
[0137]	210	215	220
[0138]	Met Phe Cys Gly Tyr Ile Asn Arg Ile Tyr Val His Tyr Asp Tyr Cys		
[0139]	225	230	235
[0140]	Ile Tyr Arg Lys Lys Met Ile Cys Glu Lys Met Ala Asn Pro Val Gln		
[0141]	245	250	255
[0142]	Leu Gly Phe Ile His Phe Arg Glu Ala		
[0143]	260	265	
[0144]	<210> 5		
[0145]	<211> 15		
[0146]	<212> PRT		
[0147]	<213> 人工序列		
[0148]	<220>		
[0149]	<221> 来源		
[0150]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"		
[0151]	<400> 5		
[0152]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Asn Tyr Met His		
[0153]	1	5	10
[0154]	<210> 6		
[0155]	<211> 7		

[0156] <212> PRT
 [0157] <213> 人工序列
 [0158] <220>
 [0159] <221> 来源
 [0160] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0161] <400> 6
 [0162] Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 [0163] 1 5
 [0164] <210> 7
 [0165] <211> 9
 [0166] <212> PRT
 [0167] <213> 人工序列
 [0168] <220>
 [0169] <221> 来源
 [0170] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0171] <400> 7
 [0172] Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Leu Thr
 [0173] 1 5
 [0174] <210> 8
 [0175] <211> 5
 [0176] <212> PRT
 [0177] <213> 人工序列
 [0178] <220>
 [0179] <221> 来源
 [0180] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0181] <400> 8
 [0182] Asp Tyr Tyr Met His
 [0183] 1 5
 [0184] <210> 9
 [0185] <211> 17
 [0186] <212> PRT
 [0187] <213> 人工序列
 [0188] <220>
 [0189] <221> 来源
 [0190] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0191] <400> 9
 [0192] Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe Lys
 [0193] 1 5 10 15
 [0194] Asp

[0195]	<210>	10		
[0196]	<211>	13		
[0197]	<212>	PRT		
[0198]	<213>	人工序列		
[0199]	<220>			
[0200]	<221>	来源		
[0201]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"		
[0202]	<400>	10		
[0203]		Glu Arg Gly Ala Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr		
[0204]		1 5 10		
[0205]	<210>	11		
[0206]	<211>	17		
[0207]	<212>	PRT		
[0208]	<213>	人工序列		
[0209]	<220>			
[0210]	<221>	来源		
[0211]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"		
[0212]	<400>	11		
[0213]		Arg Ile Asn Pro Tyr Ala Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe Lys		
[0214]		1 5 10 15		
[0215]		Asp		
[0216]	<210>	12		
[0217]	<211>	10		
[0218]	<212>	PRT		
[0219]	<213>	人工序列		
[0220]	<220>			
[0221]	<221>	来源		
[0222]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"		
[0223]	<400>	12		
[0224]		Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr		
[0225]		1 5 10		
[0226]	<210>	13		
[0227]	<211>	7		
[0228]	<212>	PRT		
[0229]	<213>	人工序列		
[0230]	<220>			
[0231]	<221>	来源		
[0232]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"		
[0233]	<400>	13		

[0234]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
[0235]	1 5
[0236]	<210> 14
[0237]	<211> 7
[0238]	<212> PRT
[0239]	<213> 人工序列
[0240]	<220>
[0241]	<221> 来源
[0242]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0243]	<400> 14
[0244]	His Gln Arg Ser Ser Trp Thr
[0245]	1 5
[0246]	<210> 15
[0247]	<211> 5
[0248]	<212> PRT
[0249]	<213> 人工序列
[0250]	<220>
[0251]	<221> 来源
[0252]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0253]	<400> 15
[0254]	Ser Tyr Asp Ile Asn
[0255]	1 5
[0256]	<210> 16
[0257]	<211> 17
[0258]	<212> PRT
[0259]	<213> 人工序列
[0260]	<220>
[0261]	<221> 来源
[0262]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0263]	<400> 16
[0264]	Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Glu Arg Phe Lys
[0265]	1 5 10 15
[0266]	Gly
[0267]	<210> 17
[0268]	<211> 10
[0269]	<212> PRT
[0270]	<213> 人工序列
[0271]	<220>
[0272]	<221> 来源

[0273] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0274] <400> 17
[0275] Ser Tyr Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
[0276] 1 5 10
[0277] <210> 18
[0278] <211> 11
[0279] <212> PRT
[0280] <213> 人工序列
[0281] <220>
[0282] <221> 来源
[0283] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0284] <400> 18
[0285] Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
[0286] 1 5 10
[0287] <210> 19
[0288] <211> 7
[0289] <212> PRT
[0290] <213> 人工序列
[0291] <220>
[0292] <221> 来源
[0293] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0294] <400> 19
[0295] Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr
[0296] 1 5
[0297] <210> 20
[0298] <211> 9
[0299] <212> PRT
[0300] <213> 人工序列
[0301] <220>
[0302] <221> 来源
[0303] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0304] <400> 20
[0305] Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr Thr
[0306] 1 5
[0307] <210> 21
[0308] <211> 5
[0309] <212> PRT
[0310] <213> 人工序列
[0311] <220>

[0312] <221> 来源
[0313] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0314] <400> 21
[0315] Asp Tyr Tyr Leu Asp
[0316] 1 5
[0317] <210> 22
[0318] <211> 17
[0319] <212> PRT
[0320] <213> 人工序列
[0321] <220>
[0322] <221> 来源
[0323] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0324] <400> 22
[0325] Arg Val Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0326] 1 5 10 15
[0327] Gly
[0328] <210> 23
[0329] <211> 11
[0330] <212> PRT
[0331] <213> 人工序列
[0332] <220>
[0333] <221> 来源
[0334] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0335] <400> 23
[0336] Asp His Tyr Arg Tyr Asp Pro Leu Leu Asp Tyr
[0337] 1 5 10
[0338] <210> 24
[0339] <211> 15
[0340] <212> PRT
[0341] <213> 人工序列
[0342] <220>
[0343] <221> 来源
[0344] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0345] <400> 24
[0346] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His
[0347] 1 5 10 15
[0348] <210> 25
[0349] <211> 7
[0350] <212> PRT

[0351] <213> 人工序列
 [0352] <220>
 [0353] <221> 来源
 [0354] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0355] <400> 25
 [0356] Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 [0357] 1 5
 [0358] <210> 26
 [0359] <211> 9
 [0360] <212> PRT
 [0361] <213> 人工序列
 [0362] <220>
 [0363] <221> 来源
 [0364] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0365] <400> 26
 [0366] Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
 [0367] 1 5
 [0368] <210> 27
 [0369] <211> 5
 [0370] <212> PRT
 [0371] <213> 人工序列
 [0372] <220>
 [0373] <221> 来源
 [0374] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0375] <400> 27
 [0376] Asp Thr Tyr Met His
 [0377] 1 5
 [0378] <210> 28
 [0379] <211> 17
 [0380] <212> PRT
 [0381] <213> 人工序列
 [0382] <220>
 [0383] <221> 来源
 [0384] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0385] <400> 28
 [0386] Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
 [0387] 1 5 10 15
 [0388] Gly
 [0389] <210> 29

[0390]	<211>	10
[0391]	<212>	PRT
[0392]	<213>	人工序列
[0393]	<220>	
[0394]	<221>	来源
[0395]	<223>	/注=“人工序列的描述：合成肽”
[0396]	<400>	29
[0397]	Ser Gly Pro Pro Tyr Tyr Val Met Asp Tyr	
[0398]	1 5 10	
[0399]	<210>	30
[0400]	<211>	111
[0401]	<212>	PRT
[0402]	<213>	人工序列
[0403]	<220>	
[0404]	<221>	来源
[0405]	<223>	/注=“人工序列的描述：合成多肽”
[0406]	<400>	30
[0407]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ile Val Ser Leu Gly	
[0408]	1 5 10 15	
[0409]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser	
[0410]	20 25 30	
[0411]	Ser Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
[0412]	35 40 45	
[0413]	Lys Leu Leu Leu Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala	
[0414]	50 55 60	
[0415]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His	
[0416]	65 70 75 80	
[0417]	Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp	
[0418]	85 90 95	
[0419]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0420]	100 105 110	
[0421]	<210>	31
[0422]	<211>	122
[0423]	<212>	PRT
[0424]	<213>	人工序列
[0425]	<220>	
[0426]	<221>	来源
[0427]	<223>	/注=“人工序列的描述：合成多肽”
[0428]	<400>	31

[0429]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0430]	1 5 10 15
[0431]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
[0432]	20 25 30
[0433]	Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ile Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[0434]	35 40 45
[0435]	Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe
[0436]	50 55 60
[0437]	Lys Asp Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0438]	65 70 75 80
[0439]	Met Glu Leu His Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0440]	85 90 95
[0441]	Ala Ile Glu Arg Gly Ala Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[0442]	100 105 110
[0443]	Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0444]	115 120
[0445]	<210> 32
[0446]	<211> 111
[0447]	<212> PRT
[0448]	<213> 人工序列
[0449]	<220>
[0450]	<221> 来源
[0451]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"
[0452]	<400> 32
[0453]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0454]	1 5 10 15
[0455]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
[0456]	20 25 30
[0457]	Ser Tyr Asn Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro
[0458]	35 40 45
[0459]	Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[0460]	50 55 60
[0461]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[0462]	65 70 75 80
[0463]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
[0464]	85 90 95
[0465]	Glu Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0466]	100 105 110
[0467]	<210> 33

[0468]	<211>	122
[0469]	<212>	PRT
[0470]	<213>	人工序列
[0471]	<220>	
[0472]	<221>	来源
[0473]	<223>	/注=“人工序列的描述：合成多肽”
[0474]	<400>	33
[0475]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0476]	1 5 10 15	
[0477]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr	
[0478]	20 25 30	
[0479]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0480]	35 40 45	
[0481]	Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe	
[0482]	50 55 60	
[0483]	Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
[0484]	65 70 75 80	
[0485]	Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0486]	85 90 95	
[0487]	Ala Ile Glu Arg Gly Ala Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp	
[0488]	100 105 110	
[0489]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0490]	115 120	
[0491]	<210>	34
[0492]	<211>	122
[0493]	<212>	PRT
[0494]	<213>	人工序列
[0495]	<220>	
[0496]	<221>	来源
[0497]	<223>	/注=“人工序列的描述：合成多肽”
[0498]	<400>	34
[0499]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0500]	1 5 10 15	
[0501]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr	
[0502]	20 25 30	
[0503]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
[0504]	35 40 45	
[0505]	Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Ala Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe	
[0506]	50 55 60	

[0507]	Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0508]	65 70 75 80
[0509]	Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0510]	85 90 95
[0511]	Ala Ile Glu Arg Gly Ala Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
[0512]	100 105 110
[0513]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0514]	115 120
[0515]	<210> 35
[0516]	<211> 104
[0517]	<212> PRT
[0518]	<213> 人工序列
[0519]	<220>
[0520]	<221> 来源
[0521]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"
[0522]	<400> 35
[0523]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0524]	1 5 10 15
[0525]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met
[0526]	20 25 30
[0527]	Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0528]	35 40 45
[0529]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0530]	50 55 60
[0531]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
[0532]	65 70 75 80
[0533]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Ser Trp Thr Phe Gly
[0534]	85 90 95
[0535]	Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0536]	100
[0537]	<210> 36
[0538]	<211> 119
[0539]	<212> PRT
[0540]	<213> 人工序列
[0541]	<220>
[0542]	<221> 来源
[0543]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"
[0544]	<400> 36
[0545]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0546]	1	5	10	15
[0547]	Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[0548]	20	25	30	
[0549]	Asp Ile Asn Trp Leu Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0550]	35	40	45	
[0551]	Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Thr Thr Glu Tyr Asn Glu Arg Phe			
[0552]	50	55	60	
[0553]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
[0554]	65	70	75	80
[0555]	Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asn Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
[0556]	85	90	95	
[0557]	Ala Arg Ser Tyr Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0558]	100	105	110	
[0559]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
[0560]	115			
[0561]	<210> 37			
[0562]	<211> 107			
[0563]	<212> PRT			
[0564]	<213> 人工序列			
[0565]	<220>			
[0566]	<221> 来源			
[0567]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"			
[0568]	<400> 37			
[0569]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly			
[0570]	1	5	10	15
[0571]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala			
[0572]	20	25	30	
[0573]	Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
[0574]	35	40	45	
[0575]	Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
[0576]	50	55	60	
[0577]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala			
[0578]	65	70	75	80
[0579]	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr			
[0580]	85	90	95	
[0581]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0582]	100	105		
[0583]	<210> 38			
[0584]	<211> 120			

[0585]	<212>	PRT
[0586]	<213>	人工序列
[0587]	<220>	
[0588]	<221>	来源
[0589]	<223>	/注="人工序列的描述:合成多肽"
[0590]	<400>	38
[0591]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
[0592]	1	5 10 15
[0593]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
[0594]	20	25 30
[0595]	Tyr Leu Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Phe Glu Trp Ile	
[0596]	35	40 45
[0597]	Gly Arg Val Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe	
[0598]	50	55 60
[0599]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
[0600]	65	70 75 80
[0601]	Met Asp Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0602]	85	90 95
[0603]	Ala Arg Asp His Tyr Arg Tyr Asp Pro Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln	
[0604]	100	105 110
[0605]	Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
[0606]	115	120
[0607]	<210>	39
[0608]	<211>	107
[0609]	<212>	PRT
[0610]	<213>	人工序列
[0611]	<220>	
[0612]	<221>	来源
[0613]	<223>	/注="人工序列的描述:合成多肽"
[0614]	<400>	39
[0615]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[0616]	1	5 10 15
[0617]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala	
[0618]	20	25 30
[0619]	Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[0620]	35	40 45
[0621]	Tyr Ser Pro Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[0622]	50	55 60
[0623]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	

[0624]	65	70	75	80
[0625]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Thr Pro Tyr			
[0626]	85	90	95	
[0627]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0628]	100	105		
[0629]	<210> 40			
[0630]	<211> 120			
[0631]	<212> PRT			
[0632]	<213> 人工序列			
[0633]	<220>			
[0634]	<221> 来源			
[0635]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"			
[0636]	<400> 40			
[0637]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0638]	1	5	10	15
[0639]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
[0640]	20	25	30	
[0641]	Tyr Leu Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0642]	35	40	45	
[0643]	Gly Arg Val Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0644]	50	55	60	
[0645]	Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0646]	65	70	75	80
[0647]	Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0648]	85	90	95	
[0649]	Ala Arg Asp His Tyr Arg Tyr Asp Pro Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln			
[0650]	100	105	110	
[0651]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0652]	115	120		
[0653]	<210> 41			
[0654]	<211> 111			
[0655]	<212> PRT			
[0656]	<213> 人工序列			
[0657]	<220>			
[0658]	<221> 来源			
[0659]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"			
[0660]	<400> 41			
[0661]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0662]	1	5	10	15

[0663]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
[0664]	20 25 30
[0665]	Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[0666]	35 40 45
[0667]	Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
[0668]	50 55 60
[0669]	Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
[0670]	65 70 75 80
[0671]	Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
[0672]	85 90 95
[0673]	Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
[0674]	100 105 110
[0675]	<210> 42
[0676]	<211> 119
[0677]	<212> PRT
[0678]	<213> 人工序列
[0679]	<220>
[0680]	<221> 来源
[0681]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"
[0682]	<400> 42
[0683]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0684]	1 5 10 15
[0685]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
[0686]	20 25 30
[0687]	Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0688]	35 40 45
[0689]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Asp Tyr Asp Pro Lys Phe
[0690]	50 55 60
[0691]	Gln Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[0692]	65 70 75 80
[0693]	Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0694]	85 90 95
[0695]	Thr Ile Ser Gly Pro Pro Tyr Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
[0696]	100 105 110
[0697]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0698]	115
[0699]	<210> 43
[0700]	<211> 17
[0701]	<212> PRT

[0702] <213> 人工序列
 [0703] <220>
 [0704] <221> 来源
 [0705] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0706] <400> 43
 [0707] Arg Ile Asn Pro Tyr Glu Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe Lys
 [0708] 1 5 10 15
 [0709] Asp
 [0710] <210> 44
 [0711] <211> 17
 [0712] <212> PRT
 [0713] <213> 人工序列
 [0714] <220>
 [0715] <221> 来源
 [0716] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0717] <400> 44
 [0718] Arg Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe Lys
 [0719] 1 5 10 15
 [0720] Asp
 [0721] <210> 45
 [0722] <211> 17
 [0723] <212> PRT
 [0724] <213> 人工序列
 [0725] <220>
 [0726] <221> 来源
 [0727] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0728] <220>
 [0729] <221> 变体
 [0730] <222> (6) .. (6)
 [0731] <223> /置换="Glu"或"Ser"或"Asn"
 [0732] <220>
 [0733] <221> misc_feature
 [0734] <222> (1) .. (17)
 [0735] <223> /注="序列中给出的变体残基关于变体位置的注释中的那些不具有偏好"
 [0736] <400> 45
 [0737] Arg Ile Asn Pro Tyr Ala Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe Lys
 [0738] 1 5 10 15
 [0739] Asp
 [0740] <210> 46

[0780] <221> 变体
 [0781] <222> (6) .. (6)
 [0782] <223> /置换="Glu"或"Ser"
 [0783] <220>
 [0784] <221> misc_feature
 [0785] <222> (1) .. (17)
 [0786] <223> /注="序列中给出的变体残基关于变体位置的注释中的那些不具有偏好"
 [0787] <400> 47
 [0788] Arg Ile Asn Pro Tyr Ala Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe Lys
 [0789] 1 5 10 15
 [0790] Asp
 [0791] <210> 48
 [0792] <211> 122
 [0793] <212> PRT
 [0794] <213> 人工序列
 [0795] <220>
 [0796] <221> 来源
 [0797] <223> /注="人工序列的描述:合成多肽"
 [0798] <220>
 [0799] <221> 变体
 [0800] <222> (55) .. (55)
 [0801] <223> /置换="Glu"或"Ser"
 [0802] <220>
 [0803] <221> misc_feature
 [0804] <222> (1) .. (122)
 [0805] <223> /注="序列中给出的变体残基关于变体位置的注释中的那些不具有偏好"
 [0806] <400> 48
 [0807] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0808] 1 5 10 15
 [0809] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 [0810] 20 25 30
 [0811] Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0812] 35 40 45
 [0813] Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Ala Gly Ala Ala Phe Tyr Ser Gln Asn Phe
 [0814] 50 55 60
 [0815] Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0816] 65 70 75 80
 [0817] Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0818] 85 90 95

[0819] Ala Ile Glu Arg Gly Ala Asp Leu Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 [0820] 100 105 110
 [0821] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0822] 115 120
 [0823] <210> 49
 [0824] <211> 17
 [0825] <212> PRT
 [0826] <213> 人工序列
 [0827] <220>
 [0828] <221> 来源
 [0829] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0830] <400> 49
 [0831] Asp Ser Cys Tyr Phe Leu Ser Asp Asp Val Gln Thr Trp Gln Glu Ser
 [0832] 1 5 10 15
 [0833] Lys
 [0834] <210> 50
 [0835] <211> 14
 [0836] <212> PRT
 [0837] <213> 人工序列
 [0838] <220>
 [0839] <221> 来源
 [0840] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0841] <400> 50
 [0842] Ile Arg Asn Leu Ser Thr Thr Leu Gln Thr Ile Ala Thr Lys
 [0843] 1 5 10
 [0844] <210> 51
 [0845] <211> 12
 [0846] <212> PRT
 [0847] <213> 人工序列
 [0848] <220>
 [0849] <221> 来源
 [0850] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0851] <400> 51
 [0852] Asn Leu Ser Thr Thr Leu Gln Thr Ile Ala Thr Lys
 [0853] 1 5 10
 [0854] <210> 52
 [0855] <211> 15
 [0856] <212> PRT
 [0857] <213> 人工序列

[0858] <220>
 [0859] <221> 来源
 [0860] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0861] <400> 52
 [0862] Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu His Val Thr Leu Lys
 [0863] 1 5 10 15
 [0864] <210> 53
 [0865] <211> 12
 [0866] <212> PRT
 [0867] <213> 人工序列
 [0868] <220>
 [0869] <221> 来源
 [0870] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0871] <400> 53
 [0872] Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu His Val Thr Leu Lys
 [0873] 1 5 10
 [0874] <210> 54
 [0875] <211> 13
 [0876] <212> PRT
 [0877] <213> 人工序列
 [0878] <220>
 [0879] <221> 来源
 [0880] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0881] <400> 54
 [0882] Met Asn Lys Leu Gln Asn Ile Ser Glu Glu Leu Gln Arg
 [0883] 1 5 10
 [0884] <210> 55
 [0885] <211> 10
 [0886] <212> PRT
 [0887] <213> 人工序列
 [0888] <220>
 [0889] <221> 来源
 [0890] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0891] <400> 55
 [0892] Leu Gln Asn Ile Ser Glu Glu Leu Gln Arg
 [0893] 1 5 10
 [0894] <210> 56
 [0895] <211> 15
 [0896] <212> PRT

[0897]	<213>	人工序列
[0898]	<220>	
[0899]	<221>	来源
[0900]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"
[0901]	<400>	56
[0902]	Asn Ile Ser Leu Gln Leu Met Ser Asn Met Asn Ile Ser Asn Lys	
[0903]	1	5 10 15
[0904]	<210>	57
[0905]	<211>	15
[0906]	<212>	PRT
[0907]	<213>	人工序列
[0908]	<220>	
[0909]	<221>	来源
[0910]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"
[0911]	<400>	57
[0912]	Asn Leu Ser Thr Thr Leu Gln Thr Ile Ala Thr Lys Leu Cys Arg	
[0913]	1	5 10 15
[0914]	<210>	58
[0915]	<211>	5
[0916]	<212>	PRT
[0917]	<213>	人工序列
[0918]	<220>	
[0919]	<221>	来源
[0920]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"
[0921]	<400>	58
[0922]	Glu Leu Tyr Ser Lys	
[0923]	1	5
[0924]	<210>	59
[0925]	<211>	5
[0926]	<212>	PRT
[0927]	<213>	人工序列
[0928]	<220>	
[0929]	<221>	来源
[0930]	<223>	/注="人工序列的描述:合成肽"
[0931]	<400>	59
[0932]	Trp Ile Trp His Lys	
[0933]	1	5
[0934]	<210>	60
[0935]	<211>	12

[0936] <212> PRT
[0937] <213> 人工序列
[0938] <220>
[0939] <221> 来源
[0940] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0941] <400> 60
[0942] Met Ala Cys Ala Ala Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys
[0943] 1 5 10
[0944] <210> 61
[0945] <211> 11
[0946] <212> PRT
[0947] <213> 人工序列
[0948] <220>
[0949] <221> 来源
[0950] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0951] <400> 61
[0952] Ile Asn Asn Lys Asn Ala Leu Glu Phe Ile Lys
[0953] 1 5 10
[0954] <210> 62
[0955] <211> 7
[0956] <212> PRT
[0957] <213> 人工序列
[0958] <220>
[0959] <221> 来源
[0960] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0961] <400> 62
[0962] Asn Ala Leu Glu Phe Ile Lys
[0963] 1 5
[0964] <210> 63
[0965] <211> 11
[0966] <212> PRT
[0967] <213> 人工序列
[0968] <220>
[0969] <221> 来源
[0970] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
[0971] <400> 63
[0972] Asn Ala Leu Glu Phe Ile Lys Ser Gln Ser Arg
[0973] 1 5 10
[0974] <210> 64

[0975] <211> 16
 [0976] <212> PRT
 [0977] <213> 人工序列
 [0978] <220>
 [0979] <221> 来源
 [0980] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0981] <400> 64
 [0982] Ser Tyr Asp Tyr Trp Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Asp Ser Thr Arg
 [0983] 1 5 10 15
 [0984] <210> 65
 [0985] <211> 19
 [0986] <212> PRT
 [0987] <213> 人工序列
 [0988] <220>
 [0989] <221> 来源
 [0990] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [0991] <400> 65
 [0992] Ser Tyr Asp Tyr Trp Leu Gly Leu Ser Pro Glu Glu Asp Ser Thr Arg
 [0993] 1 5 10 15
 [0994] Gly Met Arg
 [0995] <210> 66
 [0996] <211> 13
 [0997] <212> PRT
 [0998] <213> 人工序列
 [0999] <220>
 [1000] <221> 来源
 [1001] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [1002] <400> 66
 [1003] Val Asp Asn Ile Ile Asn Ser Ser Ala Trp Val Ile Arg
 [1004] 1 5 10
 [1005] <210> 67
 [1006] <211> 15
 [1007] <212> PRT
 [1008] <213> 人工序列
 [1009] <220>
 [1010] <221> 来源
 [1011] <223> /注="人工序列的描述:合成肽"
 [1012] <400> 67
 [1013] Asn Ala Pro Asp Leu Asn Asn Met Tyr Cys Gly Tyr Ile Asn Arg

[1014]	1	5	10	15
[1015]	<210> 68			
[1016]	<211> 11			
[1017]	<212> PRT			
[1018]	<213> 人工序列			
[1019]	<220>			
[1020]	<221> 来源			
[1021]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"			
[1022]	<400> 68			
[1023]	Leu Tyr Val Gln Tyr Tyr His Cys Thr Tyr Lys			
[1024]	1	5	10	
[1025]	<210> 69			
[1026]	<211> 5			
[1027]	<212> PRT			
[1028]	<213> 人工序列			
[1029]	<220>			
[1030]	<221> 来源			
[1031]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"			
[1032]	<400> 69			
[1033]	Met Ile Cys Glu Lys			
[1034]	1	5		
[1035]	<210> 70			
[1036]	<211> 13			
[1037]	<212> PRT			
[1038]	<213> 人工序列			
[1039]	<220>			
[1040]	<221> 来源			
[1041]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"			
[1042]	<400> 70			
[1043]	Met Ala Asn Pro Val Gln Leu Gly Ser Thr Tyr Phe Arg			
[1044]	1	5	10	
[1045]	<210> 71			
[1046]	<211> 8			
[1047]	<212> PRT			
[1048]	<213> 人工序列			
[1049]	<220>			
[1050]	<221> 来源			
[1051]	<223> /注="人工序列的描述:合成肽"			
[1052]	<400> 71			

[1053]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
[1054]	1 5
[1055]	<210> 72
[1056]	<211> 107
[1057]	<212> PRT
[1058]	<213> 人工序列
[1059]	<220>
[1060]	<221> 来源
[1061]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"
[1062]	<400> 72
[1063]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1064]	1 5 10 15
[1065]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
[1066]	20 25 30
[1067]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1068]	35 40 45
[1069]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1070]	50 55 60
[1071]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1072]	65 70 75 80
[1073]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe
[1074]	85 90 95
[1075]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[1076]	100 105
[1077]	<210> 73
[1078]	<211> 112
[1079]	<212> PRT
[1080]	<213> 人工序列
[1081]	<220>
[1082]	<221> 来源
[1083]	<223> /注="人工序列的描述:合成多肽"
[1084]	<400> 73
[1085]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[1086]	1 5 10 15
[1087]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[1088]	20 25 30
[1089]	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[1090]	35 40 45
[1091]	Gly Trp Ile Asn Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

[1092]	50	55	60
[1093]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[1094]	65	70	75 80
[1095]	Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1096]	85	90	95
[1097]	Ala Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1098]	100	105	110

轻链可变区

Kabat编号	m6E7 m21C9 m20B1 m28H12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
		D	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	I	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	T	S	S	Y	N	Y	M	H	W	Y	Q	Q	
		D	I	Q	M	T	Q	S	H	K	F	M	S	T	S	V	G	D	R	V	S	I	T	C	K	A	S	Q	.	.	.	D	V	S	T	A	V	A	W	F	Q	Q		
		D	I	V	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	S	A	S	.	.	.	S	S	I	S	Y	M	Y	W	Y	Q	Q			
		D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	S	Y	M	H	W	Y	Q	Q		
		CDR L2 - 接触																																										
		CDR L2 - Chothia																																										
		CDR L2 - Kabat																																										
Kabat编号	m6E7 m21C9 m20B1 m28H12	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	
		K	P	G	Q	P	P	K	L	L	L	K	Y	A	S	N	L	E	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P	V	E	E	
		K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	S	P	S	Y	R	Y	T	G	V	P	D	R	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	F	T	I	S	S	V	Q	A
		K	P	G	T	S	P	K	R	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	A	R	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	A
		K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	K	Y	A	S	N	L	E	S	G	V	P	A	R	R	F	S	G	R	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P	V	E	E
		CDR L3 - 接触																																										
		CDR L3 - Chothia																																										
		CDR L3 - Kabat																																										
Kabat编号	m6E7 m21C9 m20B1 m28H12	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																
		E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	H	S	W	E	I	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	I	K																
		E	D	L	A	V	Y	Y	C	Q	L	Y	S	T	P	Y	T	F	G	G	G	G	T	K	L	E	I	K																
		E	D	A	A	T	Y	Y	C	H	Q	R	S	S	.	W	T	F	G	G	G	G	T	K	L	E	I	K																
		E	D	T	A	T	Y	Y	C	Q	H	S	W	E	I	P	Y	T	F	G	G	G	G	T	R	L	E	I	K															

图1A

图1A

重链可变区

Kabat编号	CDR H1 - 接触																																												
	CDR H1 - Chothia																																												
	CDR H1 - Kabat																																												
	m6E7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42		
	m21C9	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	K	Q	S	H	I		
m20B1	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	L	D	W	V	K	Q	S	H	G			
m28H12	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	L	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	D	I	N	W	L	K	Q	R	P	G			
	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	T	A	S	G	F	N	I	K	D	T	Y	M	H	V	K	Q	R	P	E				
Kabat编号	CDR H2 - 接触																																												
	CDR H2 - Chothia																																												
	CDR H2 - Kabat																																												
	m6E7	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a		
	m21C9	K	S	L	E	W	I	G	R	I	N	P	Y	N	G	A	A	F	Y	S	Q	N	F	K	D	K	A	S	L	T	V	D	K	S	S	S	S	T	A	Y	M	E	L	H	
m20B1	E	S	F	E	W	I	G	R	V	N	P	Y	N	G	G	T	I	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	S	T	A	Y	M	D	L	N		
m28H12	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	Y	P	G	D	G	T	T	E	Y	N	E	R	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	S	S	T	A	Y	L	Q	L	S		
	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	D	P	A	N	G	D	T	D	Y	D	P	K	F	Q	G	K	A	T	V	T	A	D	T	S	S	S	N	T	A	Y	L	Q	L	S		
Kabat编号	CDR H3 - 接触																																												
	CDR H3 - Chothia																																												
	CDR H3 - Kabat																																												
	m6E7	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113						
	m21C9	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	I	E	R	G	A	D	L	E	G	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	S	S				
m20B1	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	D	H	Y	R	Y	D	P	L	L	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S	S	S	S					
m28H12	S	L	T	S	E	N	S	A	V	Y	F	C	A	R	S	Y	D	Y	D	Y	A	M	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	S	S					
	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	T	I	S	G	P	P	Y	V	V	M	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	S	V	T	V	S	S	S	S					

图1B

图1B

重链可变区

Kabat编号	CDR H1 - 接触																																										
	CDR H1 - Chothia																																										
	CDR H1 - Kabat																																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
K1H1	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	I	H	W	V	R	Q	A	P	G		
m6E7	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	K	Q	S	H	I
h6E7.L4H1e	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	
h6E7.L4H1e.A54	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G	

Kabat编号	CDR H2 - 接触																																									
	CDR H2 - Chothia																																									
	CDR H2 - Kabat																																									
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a	
K1H1	Q	G	L	E	W	I	G	W	I	N	P	G	S	G	N	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	I	T	R	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S
m6E7	K	S	L	E	W	I	G	R	I	N	P	Y	N	G	A	A	F	Y	Q	N	F	K	D	K	A	S	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y	N	E	L	H	
h6E7.L4H1e	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	N	P	Y	N	G	A	A	F	Y	Q	N	F	K	D	R	V	T	L	T	V	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S	
h6E7.L4H1e.A54	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	N	P	Y	N	G	A	A	F	Y	Q	N	F	K	D	R	V	T	L	T	V	D	T	S	T	S	T	A	Y	L	E	L	S	

Kabat编号	CDR H3 - 接触																																								
	CDR H3 - Chothia																																								
	CDR H3 - Kabat																																								
	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113			
K1H1	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	F
m6E7	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	F
h6E7.L4H1e	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	F
h6E7.L4H1e.A54	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	F

图2B

图2B

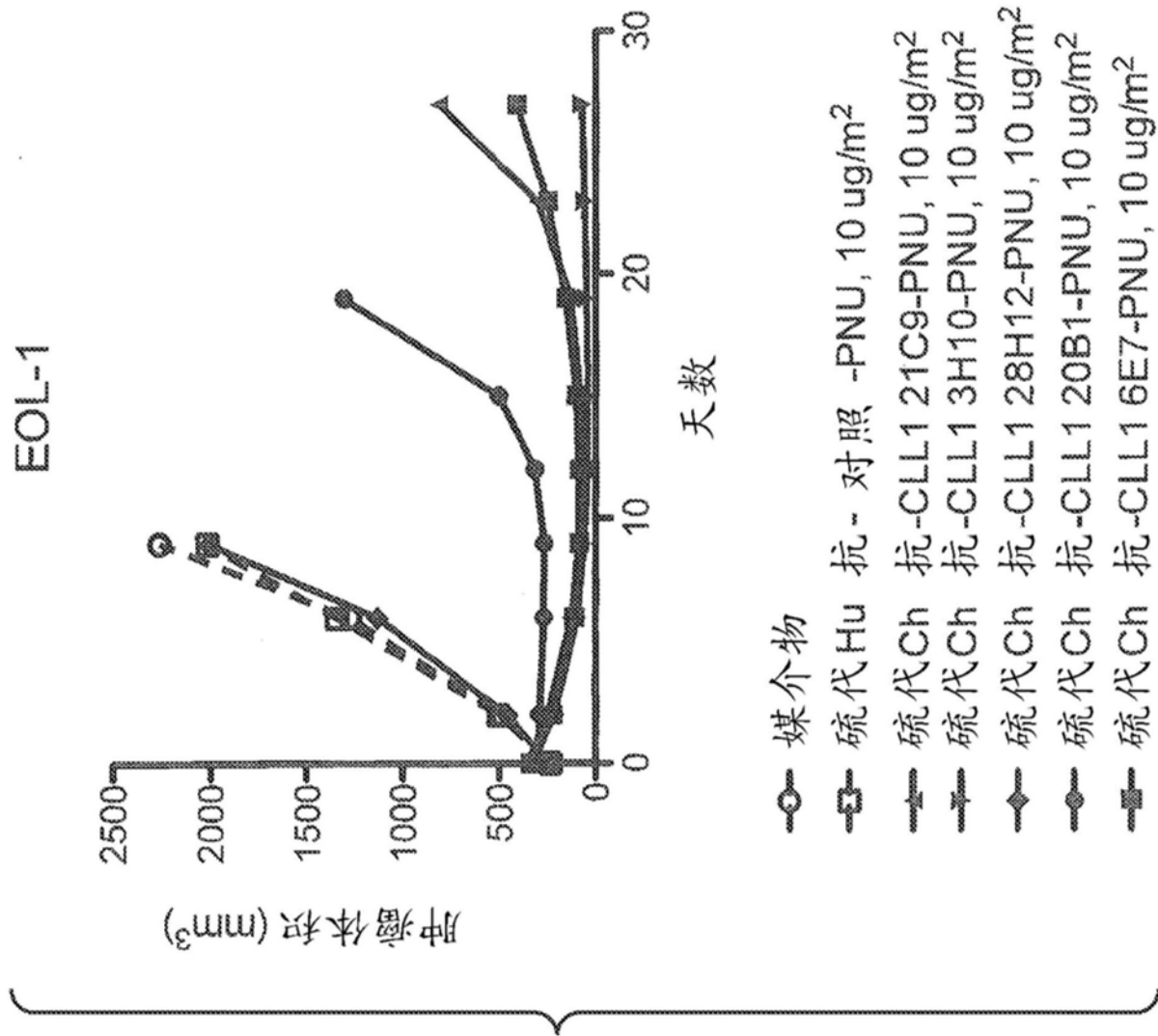


图4

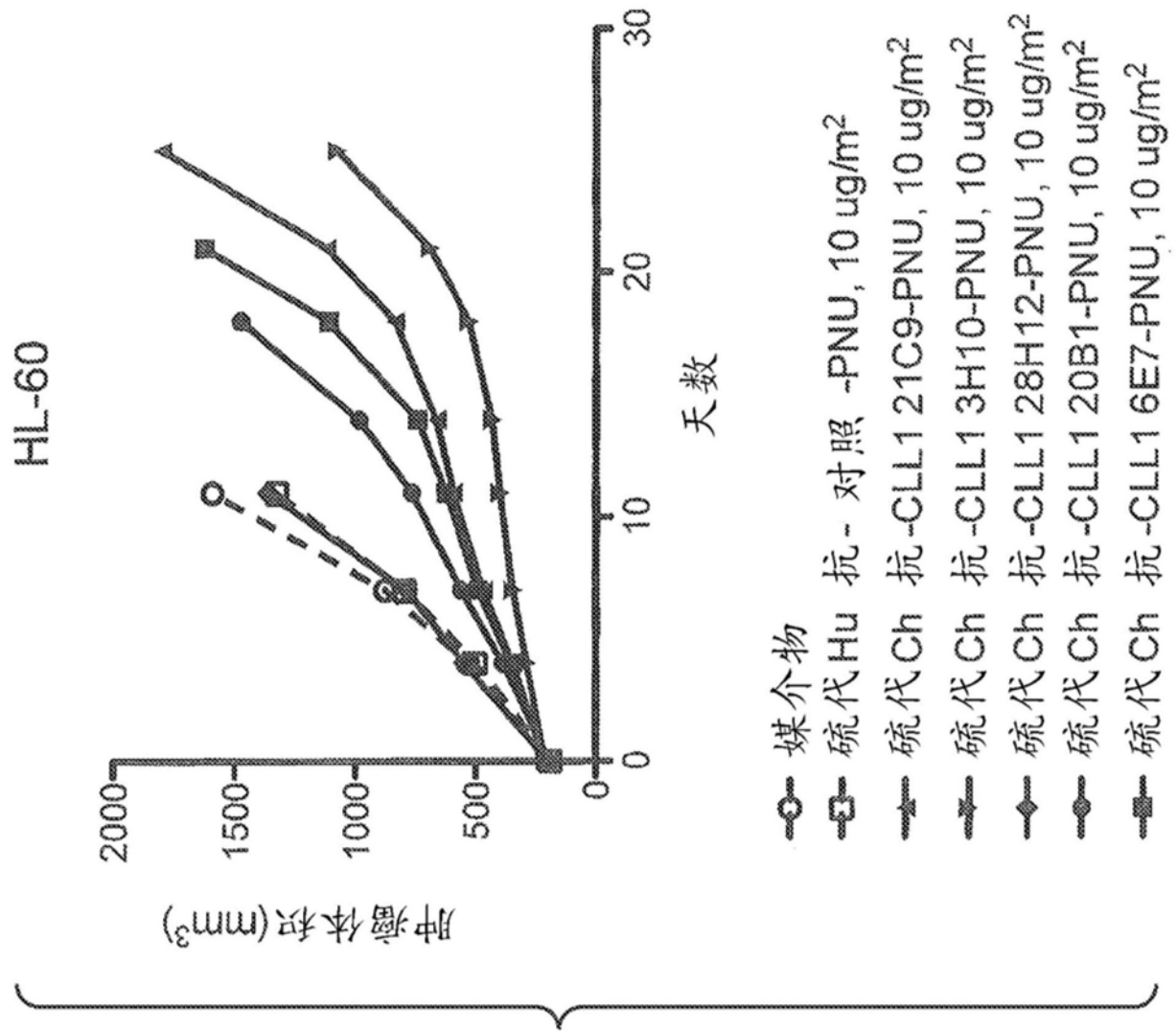


图5

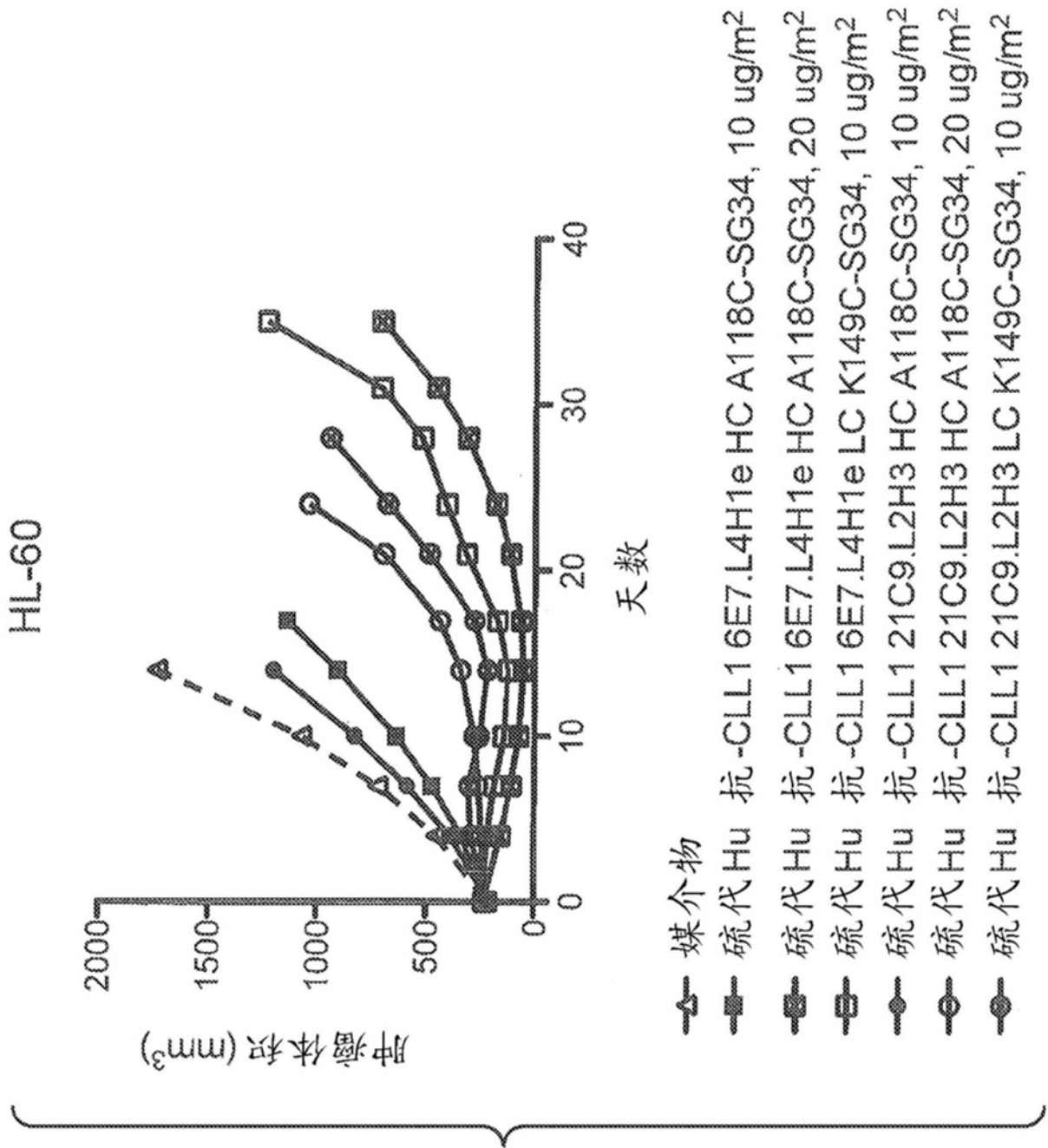


图6

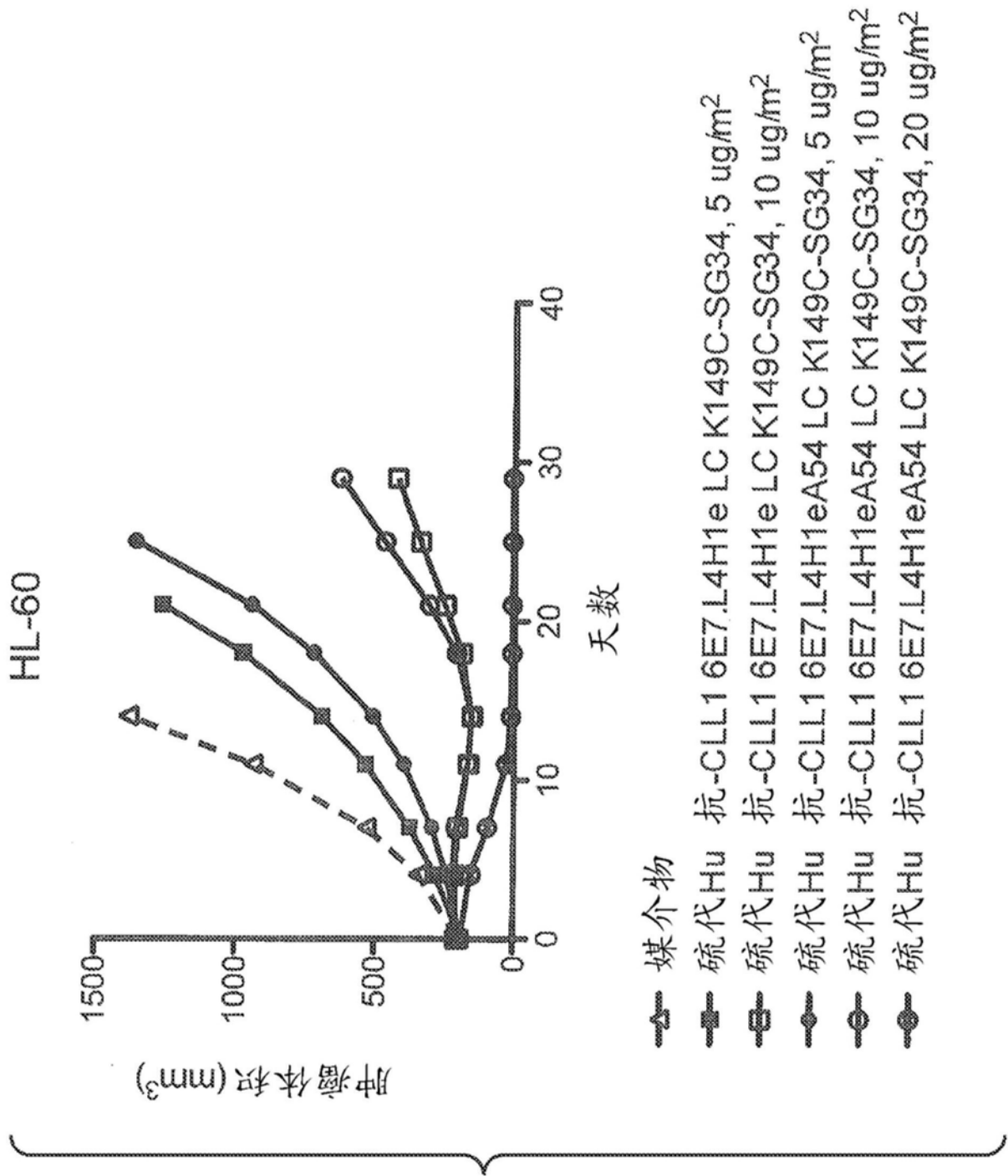


图7