



(10) 授权公告号 CN 115279781 B

(45) 授权公告日 2025. 05. 09

(21) 申请号 202180021537.4

专利权人 江苏豪森药业集团有限公司

(22) 申请日 2021.03.24

(72) 发明人 花海清 包如迪

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115279781 A

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

(43) 申请公布日 2022.11.01

专利代理师 程伟

(66) 本国优先权数据

(51) Int.Cl.

202010224992.1 2020.03.26 CN

C07K 7/02 (2006.01)

202010743217.7 2020.07.29 CN

C07K 5/062 (2006.01)

202110123953.7 2021.01.29 CN

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.15

C07D 491/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2021/082735 2021.03.24

(56) 对比文件

CN 108778329 A, 2018.11.09

CN 109963591 A, 2019.07.02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/190564 ZH 2021.09.30

审查员 吕丽珊

(73) 专利权人 上海翰森生物医药科技有限公司
地址 201203 上海市张江高科技园区金科
路3728号2号楼

权利要求书21页 说明书62页
序列表18页

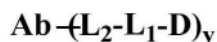
(54) 发明名称

抗体药物偶联物及其医药用途

(57) 摘要

提供了一种抗BCMA抗体-药物偶联物及其医药用途。进一步地,提供了一种包含抗BCMA抗体或其抗原结合片段的抗体-药物偶联物或其可药用盐或溶剂化合物,以及其在制备用于治疗BCMA介导的疾病或病症的药物中的用途以及用于疾病检测和诊断中的用途。

1. 一种通式 (A) 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,



(A)

其中:

D是细胞毒性药物;

L₁、L₂是接头单元;

y选自1-20的数;

Ab为抗BCMA抗体或其抗原结合片段,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中,重链可变区包含如SEQ ID NO:3所示的HCDR1、如SEQ ID NO:4所示的HCDR2和如SEQ ID NO:5所示的HCDR3;以及轻链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的LCDR1、如SEQ ID NO:7所示的LCDR2和如SEQ ID NO:8所示的LCDR3。

2. 根据权利要求1所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段选自鼠源抗体或其抗原结合片段,嵌合抗体或其抗原结合片段,人抗体或其抗原结合片段或人源化抗体或其抗原结合片段。

3. 根据权利要求2所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其变体的重链恒定区,以及进一步包含人抗体κ链、λ链或其变体的轻链恒定区。

4. 根据权利要求3所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含氨基酸突变后具有增强的ADCC毒性的IgG1重链恒定区,以及进一步包含人抗体κ链的轻链恒定区。

5. 根据权利要求3所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含如SEQ ID NO:22所示的重链恒定区,以及进一步包含如SEQ ID NO:23所示的轻链恒定区。

6. 根据权利要求2所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含选自以下序列所示的重链可变区,或与以下序列相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性的重链可变区:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11;

和/或,选自以下序列所示的轻链可变区,或与以下序列相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性的轻链可变区:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14。

7. 根据权利要求6所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含:

SEQ ID NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:12所示的轻链可变区;或,SEQ ID NO:10所示的重链可变区和SEQ ID NO:13所示的轻链可变区;或,SEQ ID NO:11所示的重链可变区和SEQ ID NO:14所示的轻链可变区。

8. 根据权利要求6所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含选自如下序列所示的重链,或与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的重链:SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID

N0:17;

和/或,选自以下序列所示的轻链,或与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的轻链:SEQ ID N0:18、SEQ ID N0:19和SEQ ID N0:20。

9. 根据权利要求8所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含:

SEQ ID N0:15所示的重链和SEQ ID N0:18所示的轻链;或,

SEQ ID N0:16所示的重链和SEQ ID N0:19所示的轻链;或,

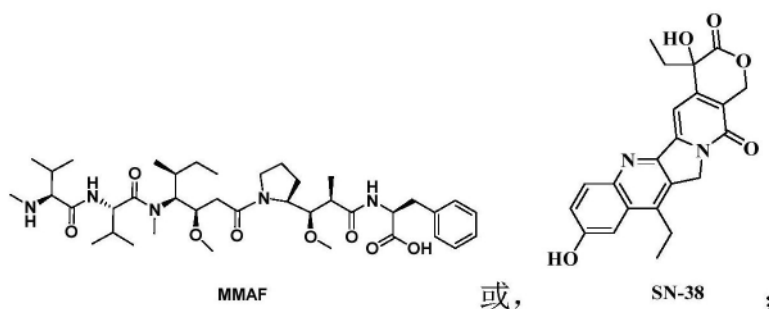
SEQ ID N0:17所示的重链和SEQ ID N0:20所示的轻链。

10. 根据权利要求1-9任一项所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述的细胞毒性药物选自毒素、化疗药物、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

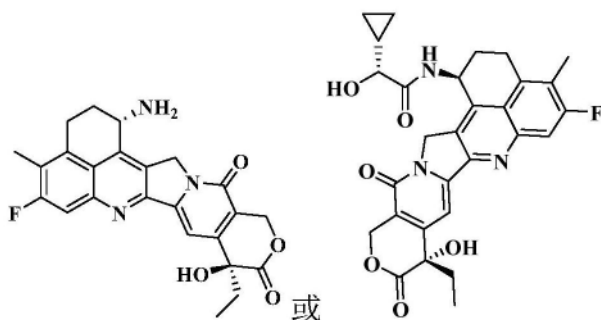
11. 根据权利要求10所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述的细胞毒性药物选自抑制细胞分裂的微管蛋白抑制剂或DNA拓扑异构酶抑制剂。

12. 根据权利要求10所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述的细胞毒性药物选自DM1、DM3、DM4、喜树碱或喜树碱衍生物、SN-38、MMAF或MMAE。

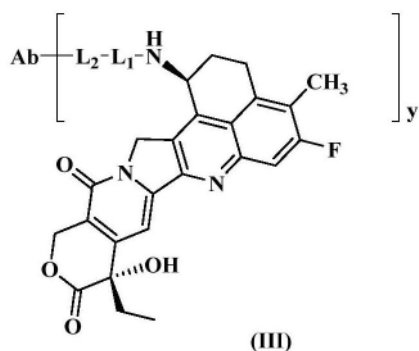
13. 根据权利要求10所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中所述的细胞毒性药物选自MMAE或MMAF,或SN-38:



或者,依喜替康或依喜替康衍生物:



14. 根据权利要求13所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为通式(III)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



其中:

L_1 、 L_2 是接头单元;

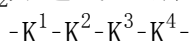
y 为选自1-10的数;

Ab选自权利要求1-9中任一项所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段。

15. 根据权利要求14所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, y 为2-8的数。

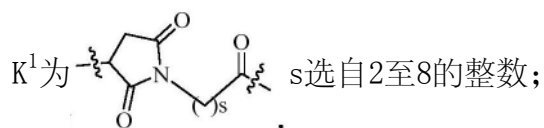
16. 根据权利要求14所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, y 为4-8的数。

17. 根据权利要求14所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 所述 L_2 如通式(D)所示:



(D)

其中:



K^2 选自 $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_pC(O)-$ 或单键, p 选自1至20的整数;

R^1 选自氢、氘、羟基、氨基、烷基、卤素、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

K^3 为四肽残基;

K^4 为 $-NR^2(CR^3R^4)_t-$, R^2 、 R^3 或 R^4 各自独立地为氢、氘、羟基、氨基、烷基、卤素、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基, t 选自1或2,

接头单元 L_2 的 K^1 端与Ab相连, K^4 端与 L_1 相连。

18. 根据权利要求17所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 所述 p 选自1至6的整数, 所述四肽残基由选自两个或多个的苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的氨基酸形成的肽残基。

19. 根据权利要求17所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 所述四肽残基为GGFG的四肽残基。

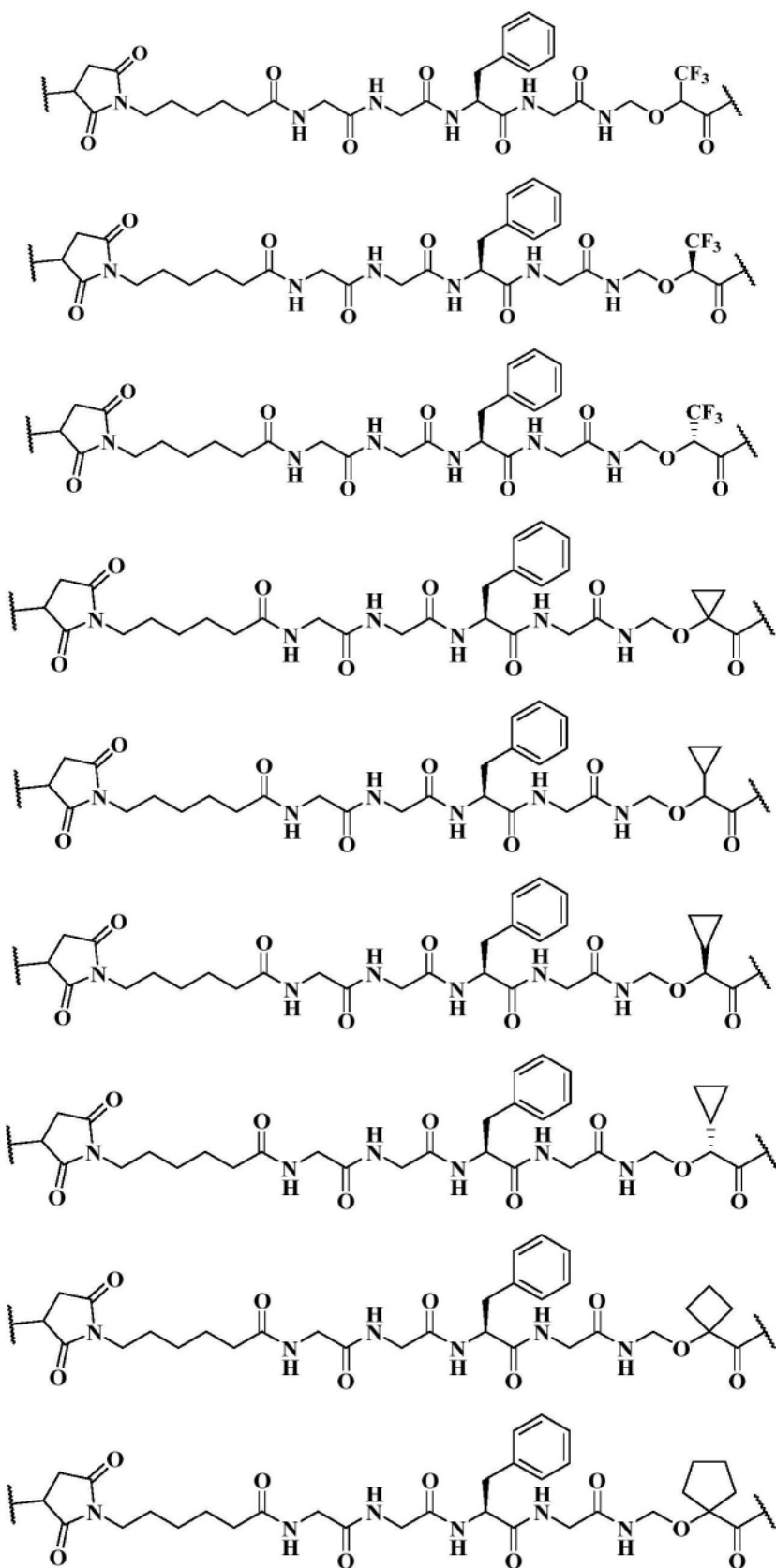
20. 根据权利要求17所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 所述 L_1 选自键、 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$ 、 $-O-CR^5R^6-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^5R^6-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$ 或 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$,

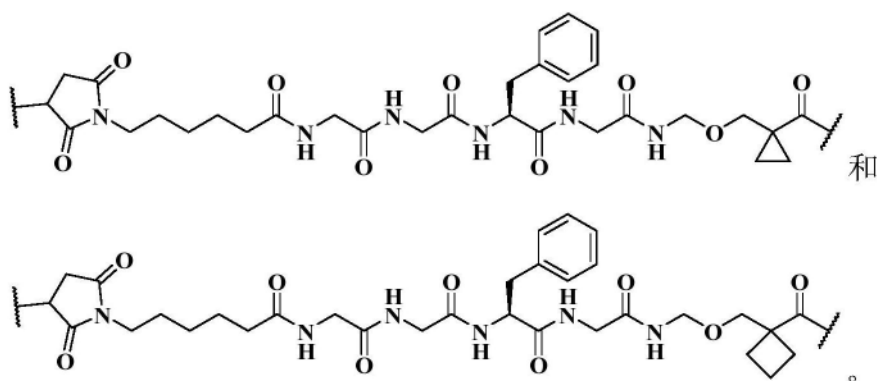
R^2 、 R^3 或 R^4 各自独立地选自氢或烷基；

s选自2至8的整数；

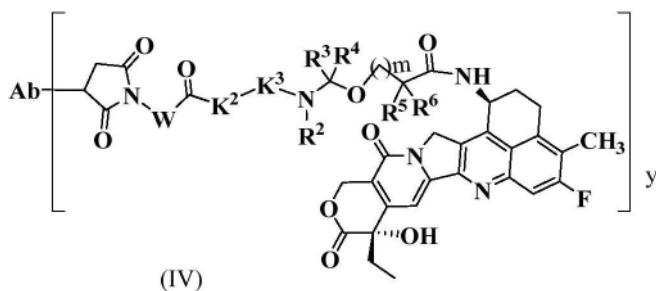
m选自0至4的整数。

25. 根据权利要求24所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中 $-L_2-L_1-$ 选自以下结构:





26. 根据权利要求14所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其为通式 (IV) 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



其中:

W选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷基-环烷基或1至8个原子的直链杂烷基, 所述杂烷基包含1至3个选自N、O或S的杂原子, 任选地, 所述的 C_{1-8} 烷基、环烷基和直链杂烷基各自独立地进一步被卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

K^2 选自 $-NR^1(CH_2CH_2O)_{p_1}CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^1(CH_2CH_2O)_{p_1}CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_{p_1}C(O)-$ 或键, R^1 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基, p_1 选自1至20的整数;

K^3 为由2至7个氨基酸构成的肽残基, 氨基酸可以是取代的或非取代的, 当被取代时, 取代基可以在任何可使用的连接点上被取代, 所述取代基为一个或多个独立地选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基;

R^2 选自氢原子、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

R^3 和 R^4 各自独立地选自氢原子、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

R^5 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

R^6 选自氢原子、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

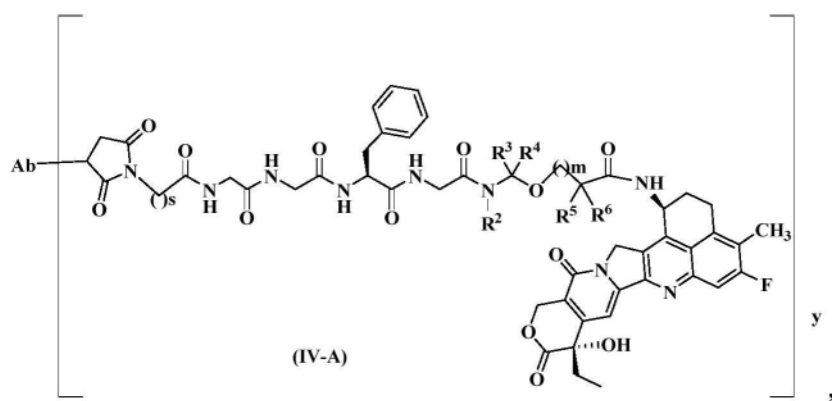
或者, R^5 和 R^6 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

m 选自0至4的整数;

y 选自1至10的数, y 是小数或整数;

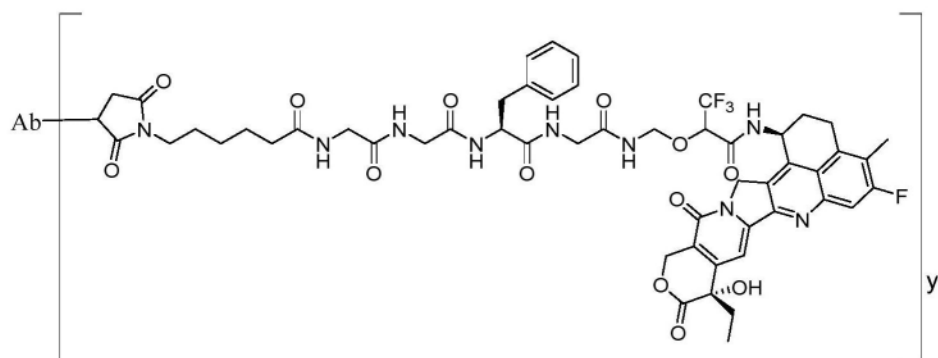
Ab为抗BCMA抗体或其抗原结合片段。

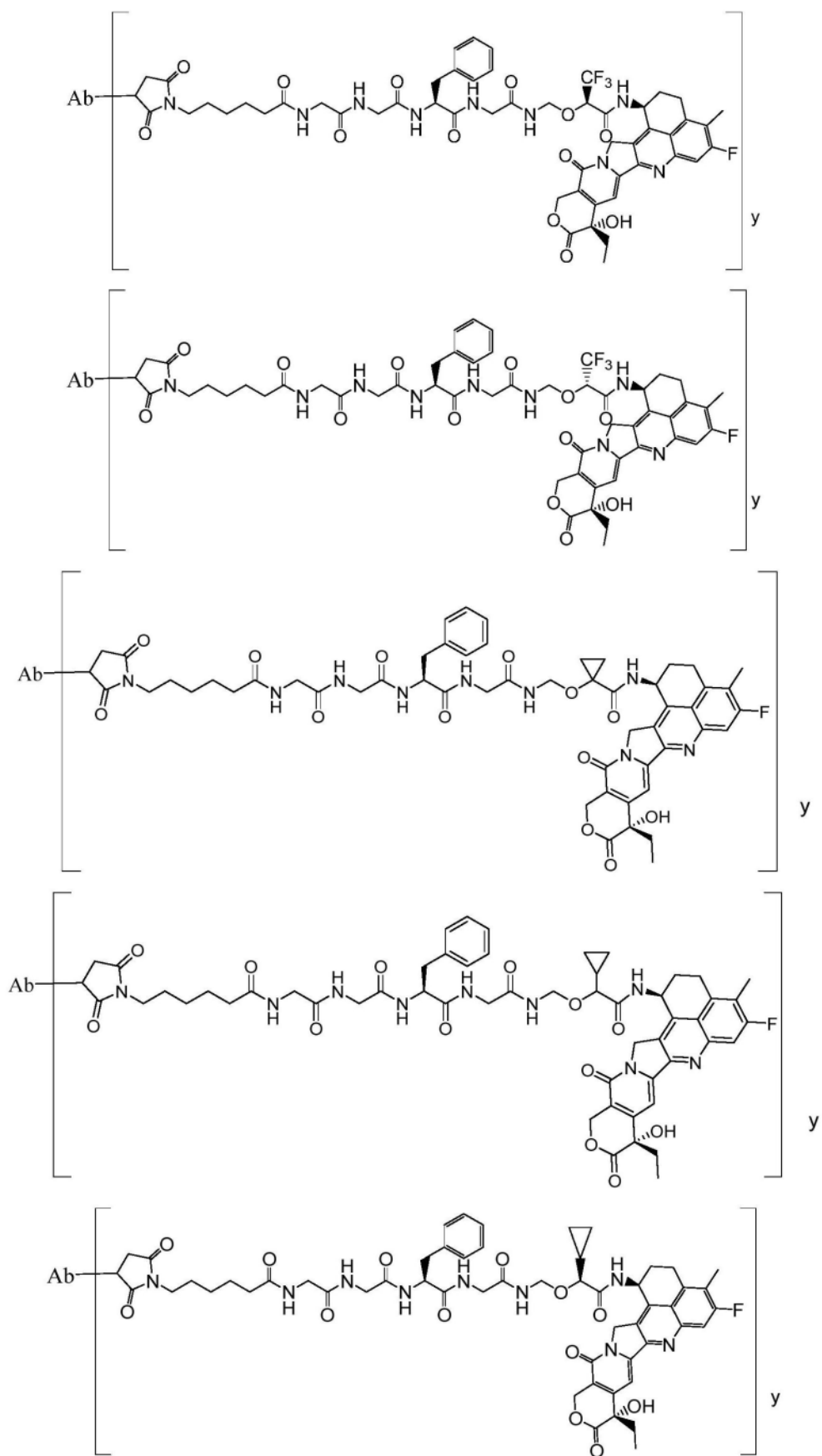
27. 根据权利要求26所述的抗体药物偶联物, 其为通式 (IV-A) 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:

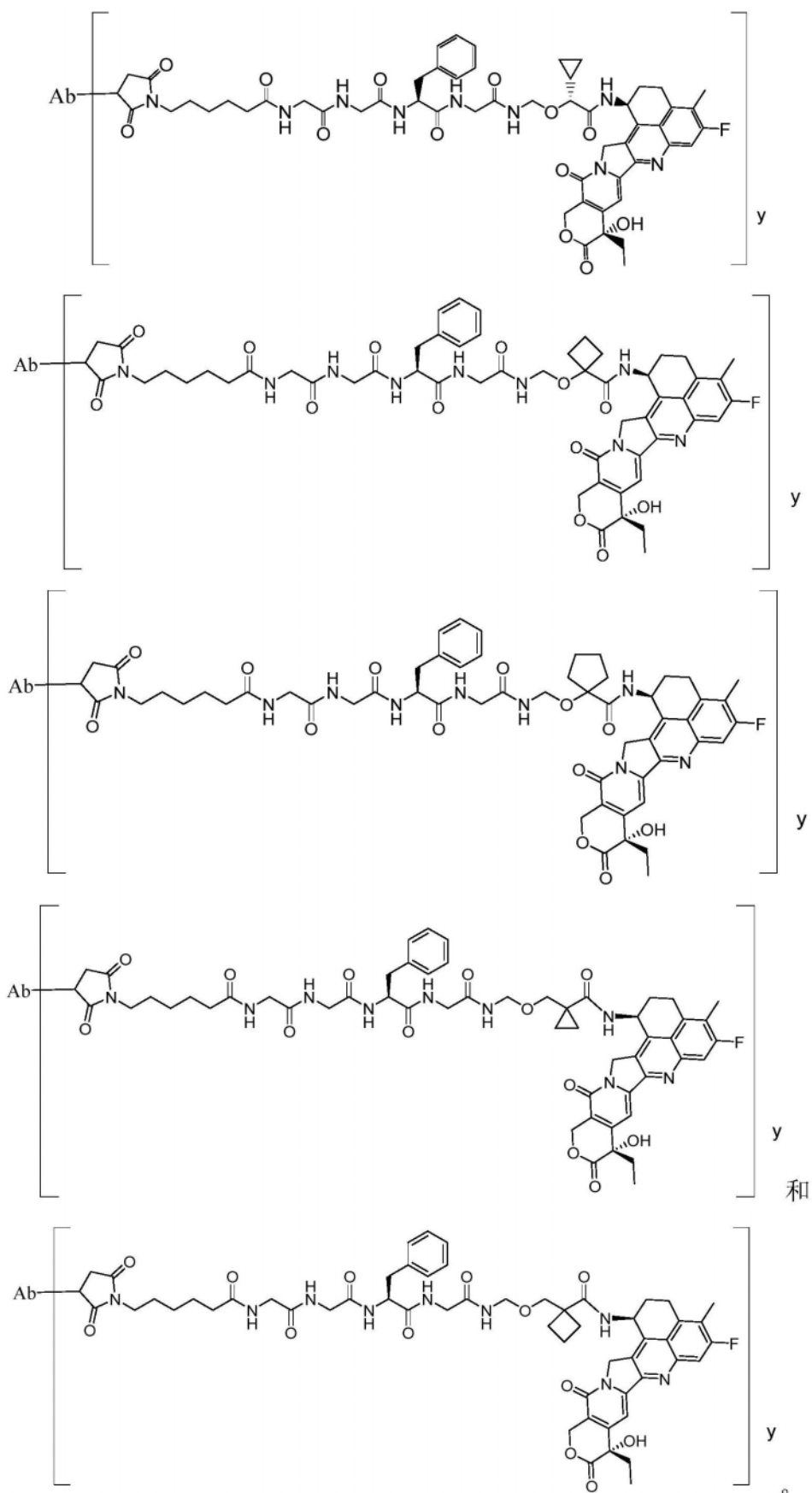


R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 s 和 m 如权利要求26中所定义。

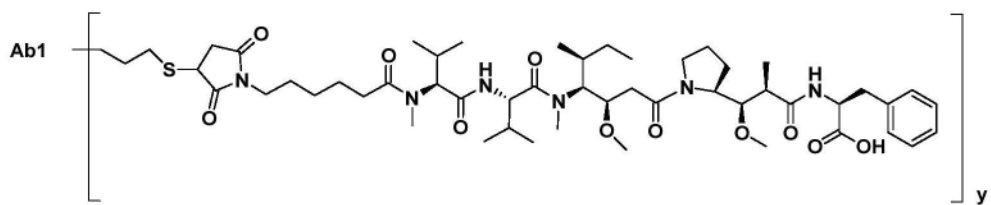
28. 根据权利要求27所述的抗体药物偶联物,其通式(IV-A)选自以下结构:



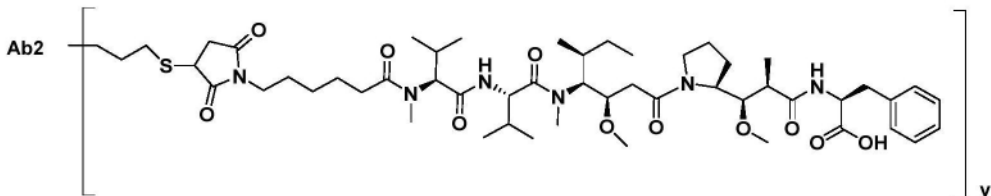




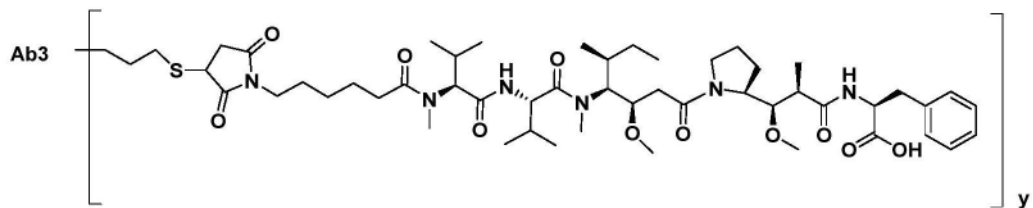
29. 根据权利要求1所述的通式(A)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物选自如下结构:



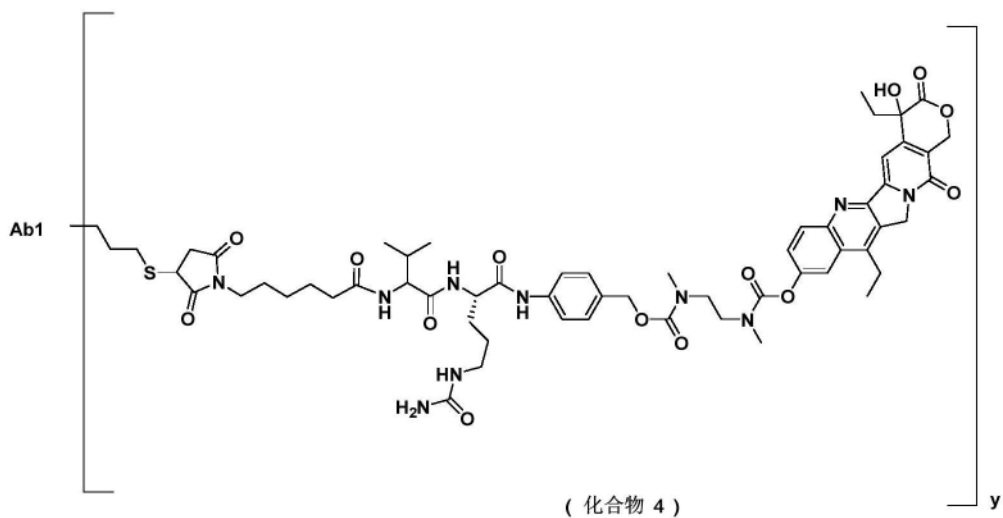
(化合物 1)



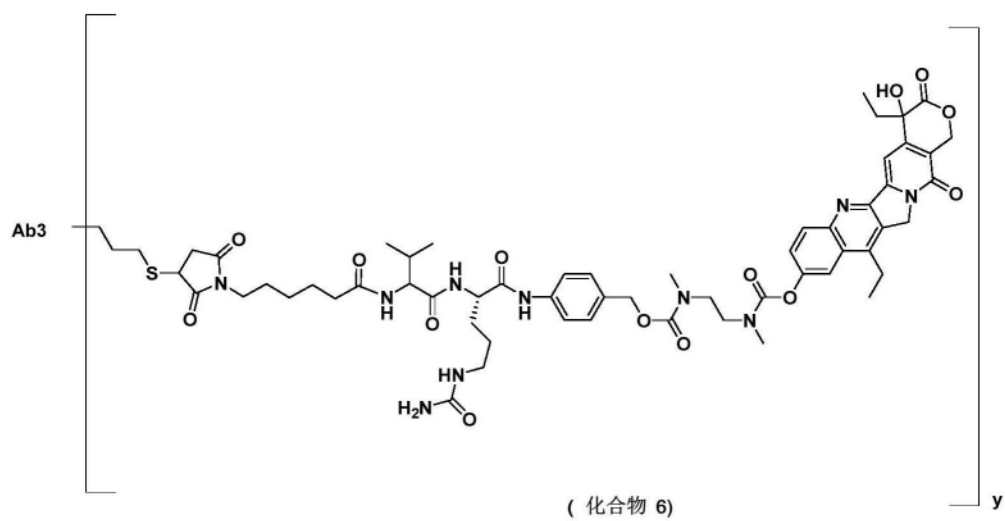
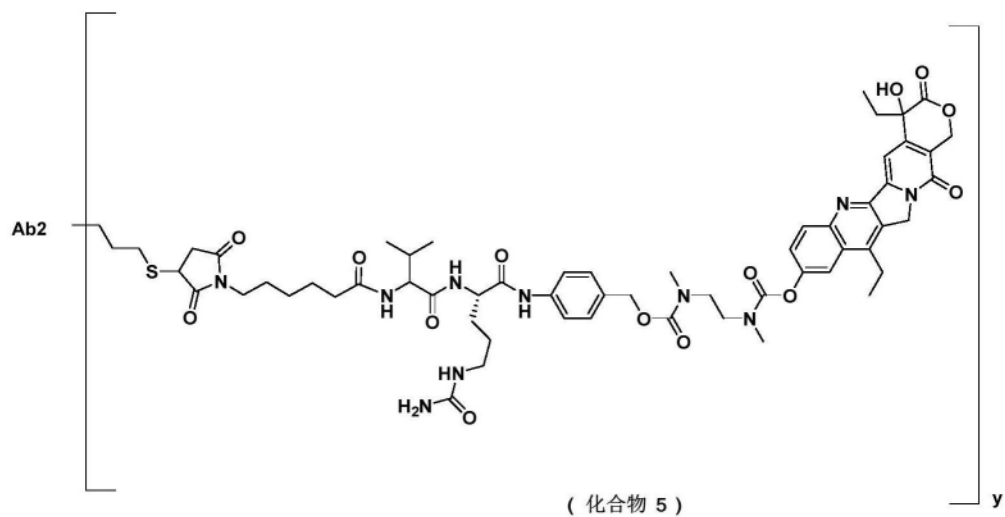
(化合物 2)

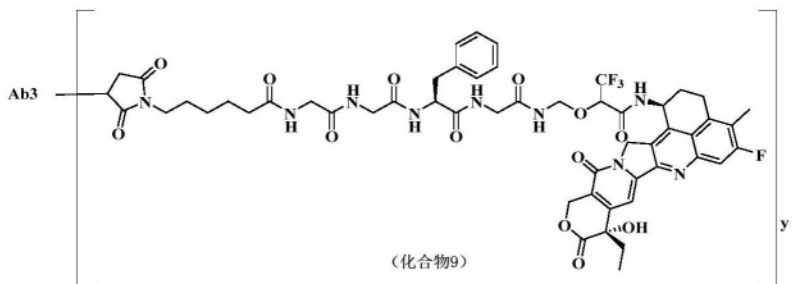
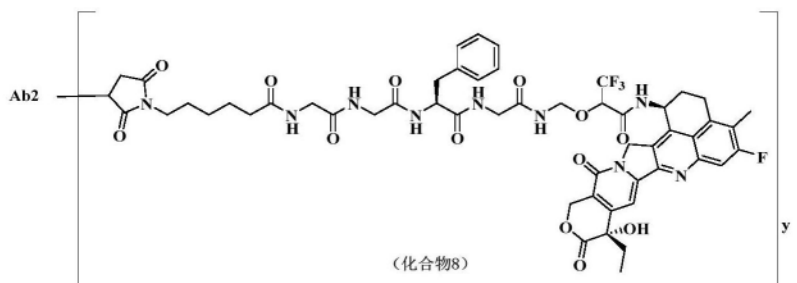
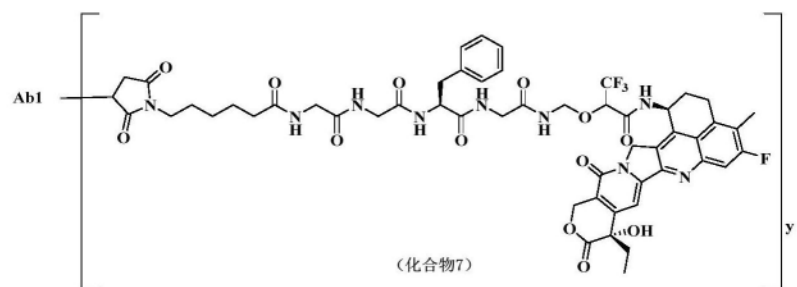


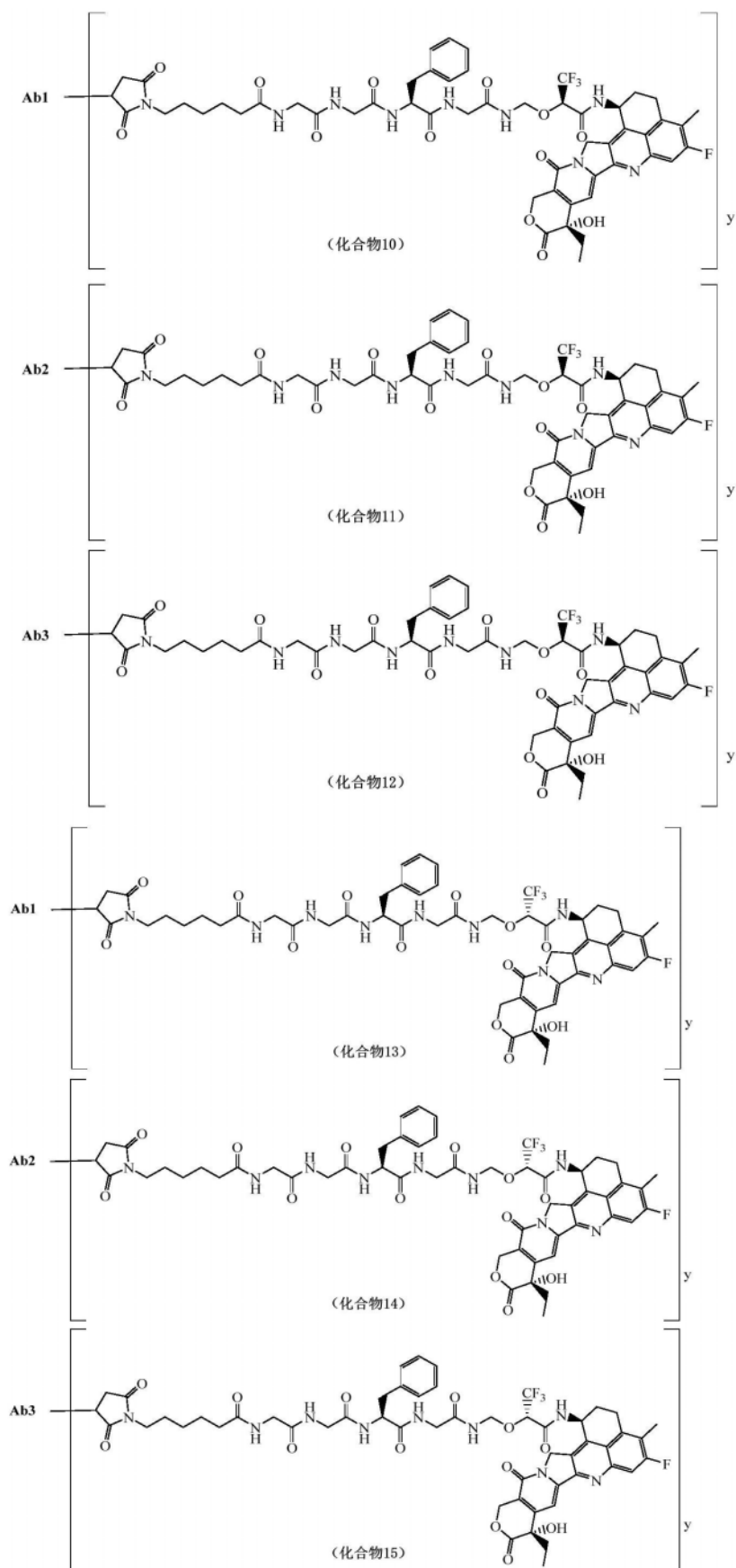
(化合物 3)

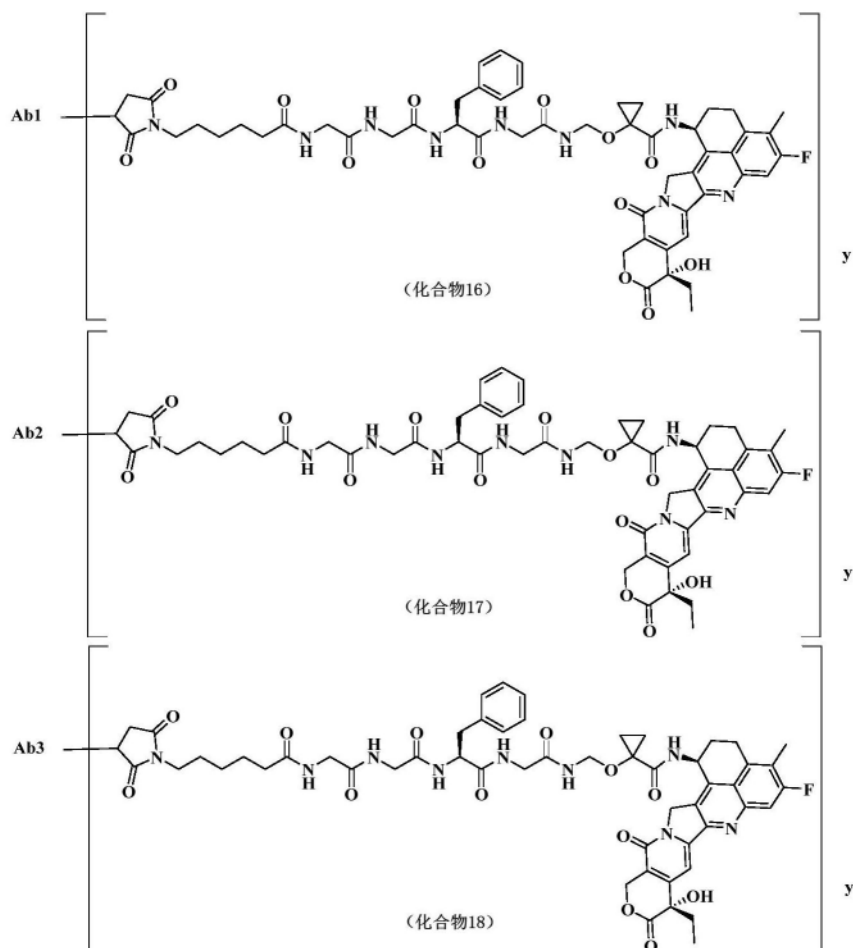


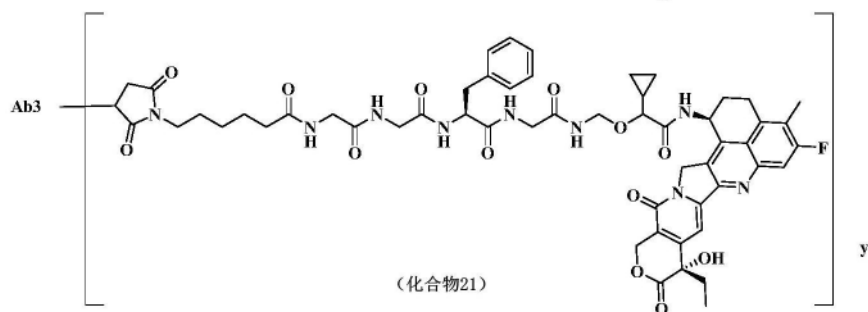
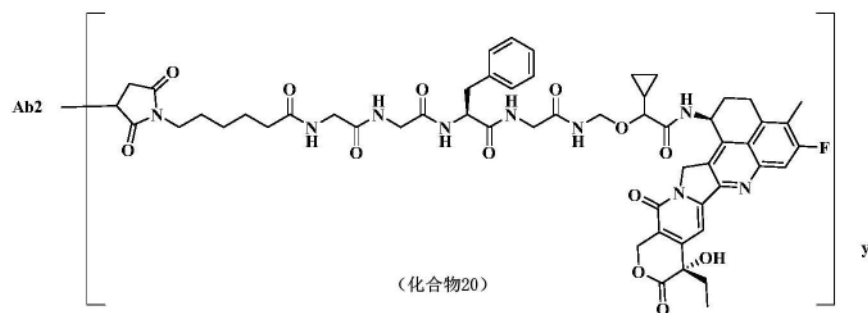
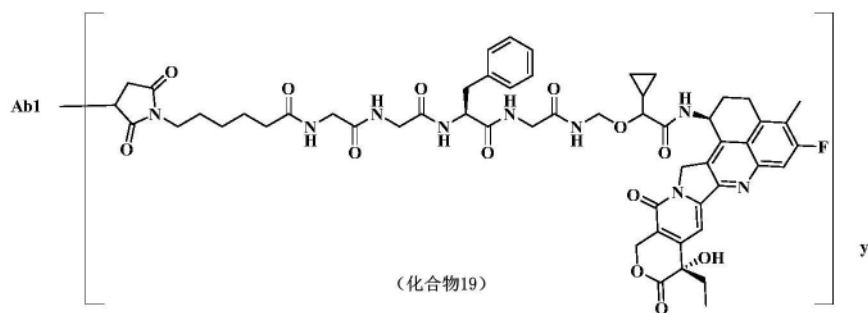
(化合物 4)

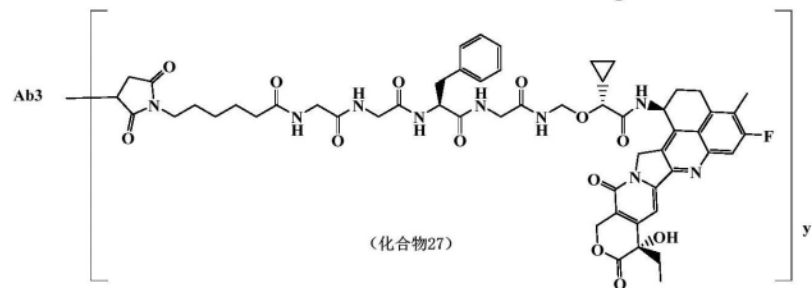
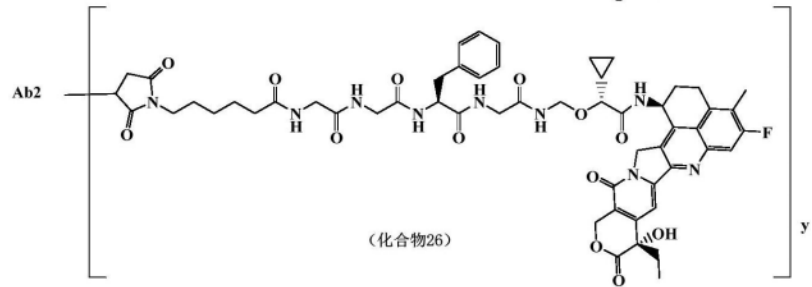
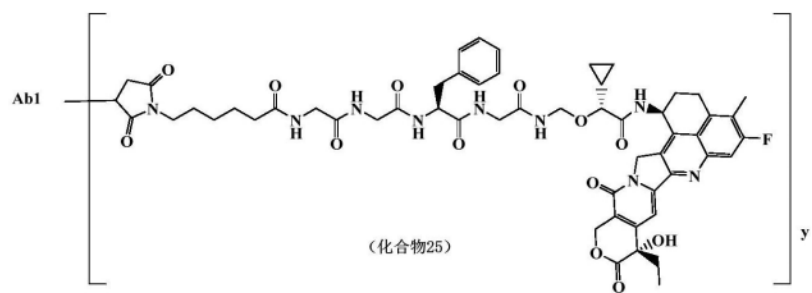
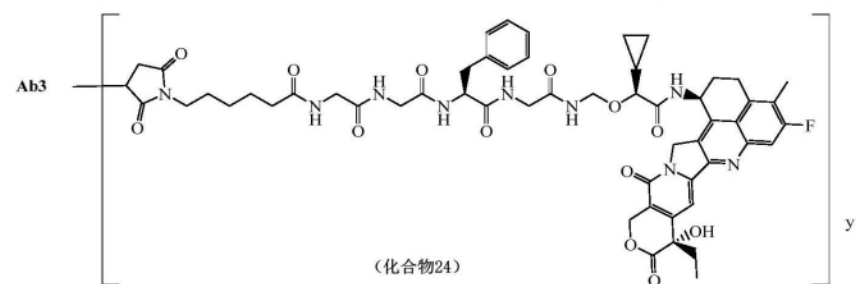
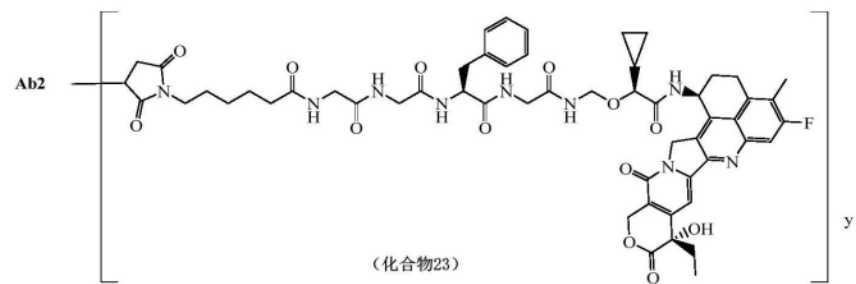
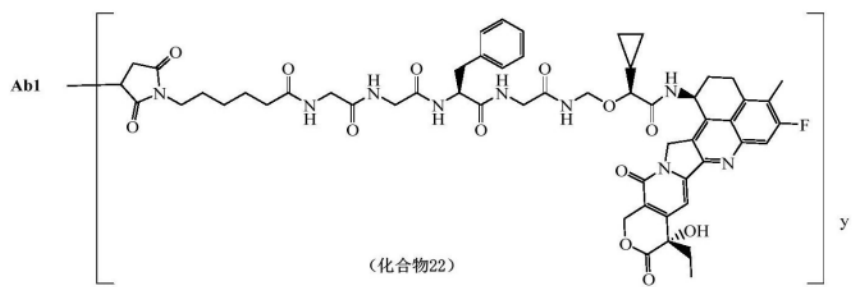


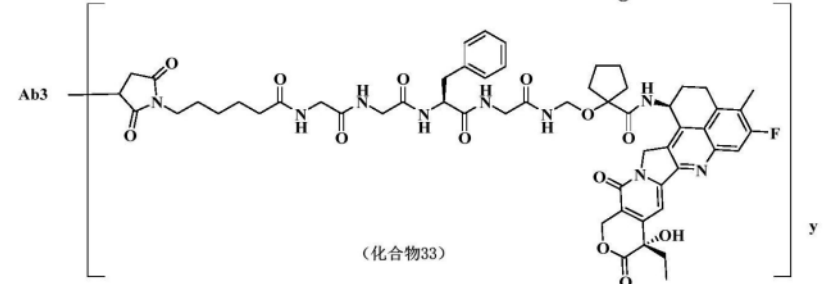
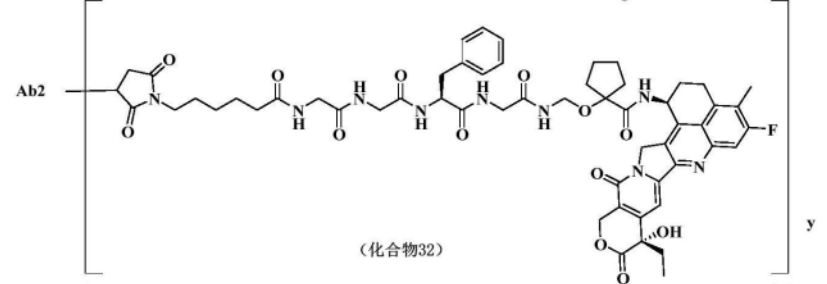
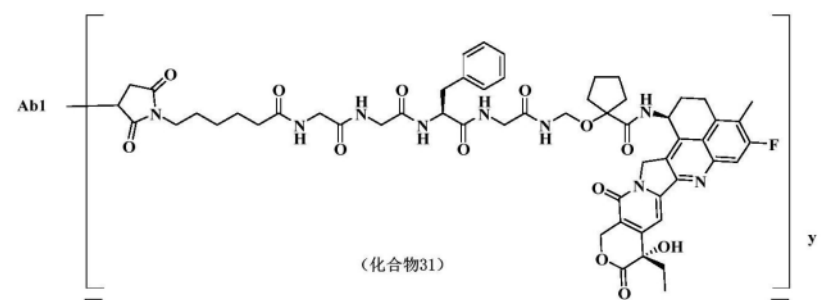
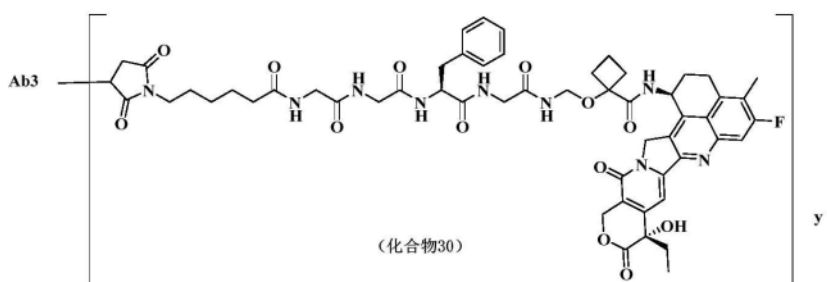
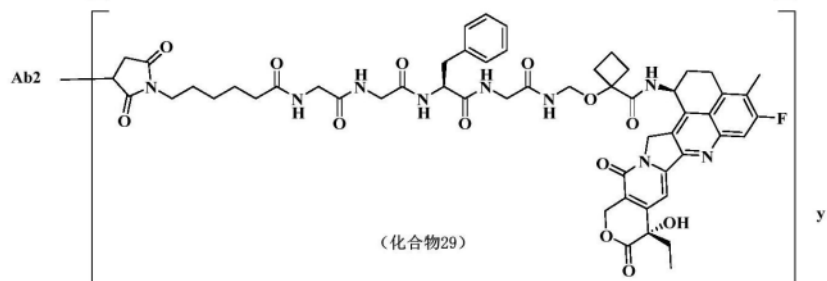
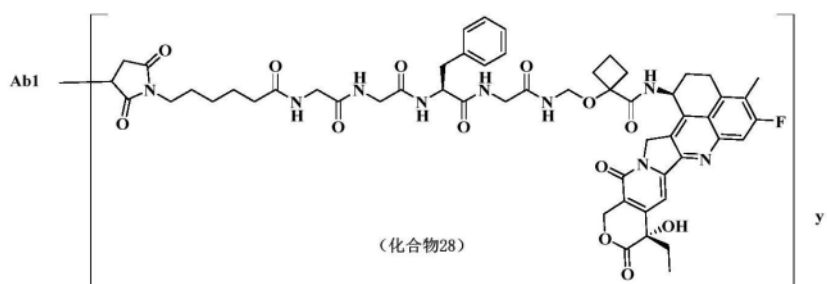


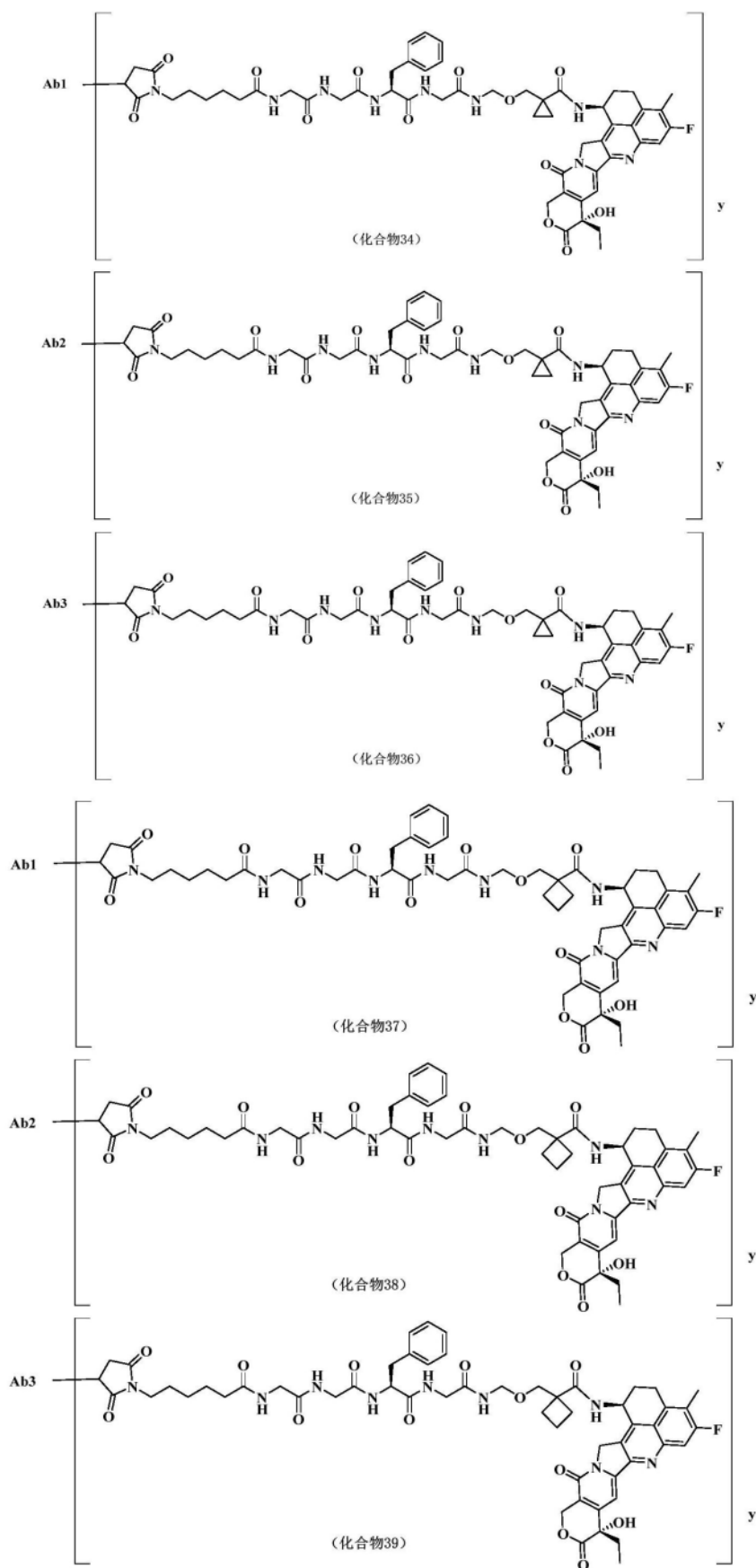












其中,y选自2-10。

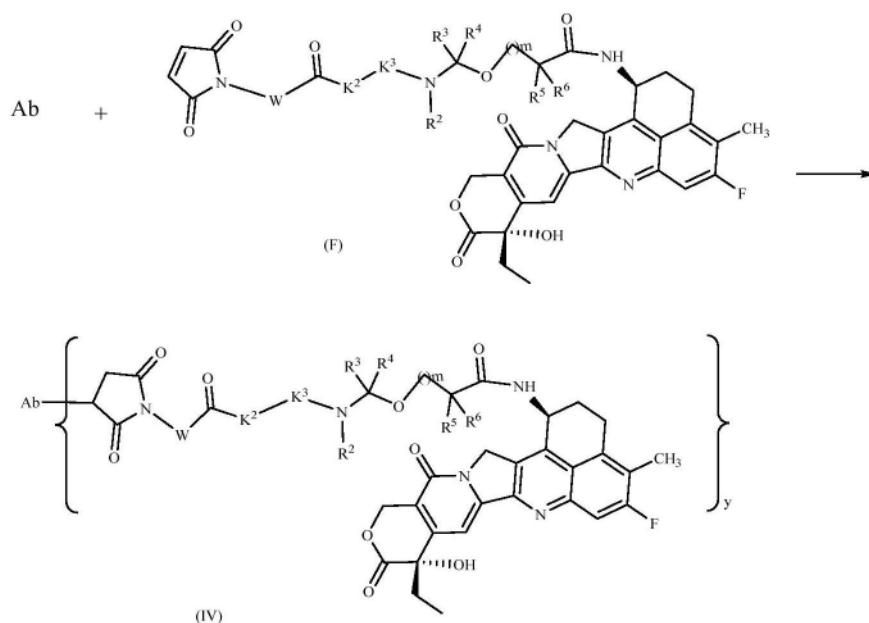
30. 根据权利要求29所述的通式(A)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或

溶剂化合物,所述y选自4-8。

31.根据权利要求29所述的通式(A)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述y选自6-8。

32.根据权利要求29所述的通式(A)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述y选自6或8。

33.一种制备如通式(IV)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物的方法,其包括以下步骤:



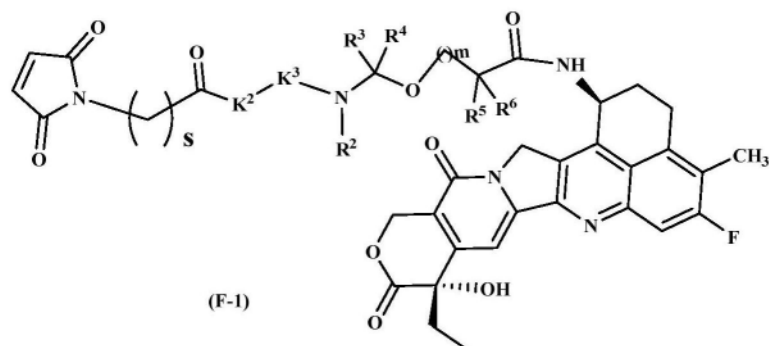
Ab还原后,与通式(F)偶联反应,得到通式(IV)所示的化合物;

其中:

Ab为抗BCMA抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中,重链可变区包含如SEQ ID NO:3所示的HCDR1、如SEQ ID NO:4所示的HCDR2和如SEQ ID NO:5所示的HCDR3;以及轻链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的LCDR1、如SEQ ID NO:7所示的LCDR2和如SEQ ID NO:8所示的LCDR3;

W、K²、K³、R²~R⁶、m和y如权利要求26中所定义。

34.根据权利要求33所述的方法,其中所述的通式(F)为通式(F-1)所示的化合物:



或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式,或其可药用的盐,

其中K²、K³、R²~R⁶、s和m如权利要求24中所定义。

35.一种药物组合物,其包含如权利要求1-32任一项所述的抗体药物偶联物或所述抗体药物偶联物药学上可接受的盐或溶剂化合物,和一种或多种可药用的载体。

36.权利要求1-32任一项所述的抗体药物偶联物或权利要求35所述的药物组合物在制备用于治疗或预防多发性骨髓瘤的药物中的用途。

抗体药物偶联物及其医药用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体地说,本发明涉及抗BCMA抗体偶联物及其医药用途。

背景技术

[0002] B细胞是淋巴细胞,其在自适应体液免疫和特异性识别抗原的抗体的产生中发挥重要的作用。B细胞的三种亚类是幼稚B细胞、记忆B细胞和浆细胞。在VDJ重组的过程,其中DNA的两种或三种片段选自基因组文库,并且重组以产生抗体可变结构域的组合阵列,通过其由不同谱系的B细胞编码的可变结构域进一步的改变导致至多 10^9 种独特的B细胞谱系,其产生和独特靶具有特异性的抗体。多种疾病涉及B细胞,B细胞的恶性转化导致癌症,包括一些淋巴瘤,如多发性骨髓瘤和霍奇金氏淋巴瘤。自身免疫性疾病也会涉及到B细胞,包括系统性红斑狼疮(SLE)和IgA肾病。涉及B细胞的癌症和自身免疫性疾病可被认为B细胞功能异常,因此控制这类疾病的可能的策略是使用靶向病理B细胞的抗体。

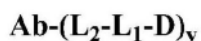
[0003] BCMA (CD269或TNFRSF17) 是TNF受体超家族的成员,其是对配体BAFF (B细胞激活因子) 和APRIL (增殖诱导配体) 的非糖基化的内在膜受体。BCMA和它的相应配体具有调节体液免疫、B细胞发育和稳态等的不同作用。BCMA由扁桃体记忆B细胞和由生发中心B细胞表达,在脾脏、淋巴结、胸腺、肾上腺和肝脏均可以检测到,并且多种B细胞系的分析表明在BCMA在成熟后的表达水平增加。

[0004] 针对BCMA的抗体描述于例如Gras M-P.等Int Immunol.7 (1995) 1093-1106、W0200124811、W0200124812、W02010104949和W02012163805中。针对BCMA的抗体及其用于治疗淋巴瘤和多发性骨髓瘤的用途例如叙述于W02002066516和W02010104949中。W02013154760涉及包含BCMA识别部分和T-细胞激活部分的嵌合抗原受体。

[0005] 在US9273141提供了一种能够内化的特异性结合BCMA和抑制BAFF和/或APRIL对BCMA的结合的抗原结合蛋白,并提供了包含所述抗原结合蛋白与细胞毒性剂的缀合物。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种抗BCMA抗体药物偶联物,或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为通式(A)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,



[0007]

(A)

[0008] 其中:

[0009] D是细胞毒性药物;

[0010] L_1 、 L_2 是接头单元;

[0011] y选自1-20的数;

[0012] Ab为抗BCMA抗体或其抗原结合片段,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和和抗体轻链可变区,其中抗体重链可变区包含至少1个选自以下序列所示的HCDR:

SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5;和抗体轻链可变区包含至少1个选自以下序列所述的LCDR: SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。

[0013] 在本发明一个优选方案中,所述抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中抗BCMA抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含:SEQ ID NO:3所示的HCDR1、SEQ ID NO:4所示的HCDR2和SEQ ID NO:5所示的HCDR3。

[0014] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段的轻链可变区包含:SEQ ID NO:6所示的LCDR1、SEQ ID NO:7所示的LCDR2和SEQ ID NO:8所示的LCDR3。

[0015] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段的重链可变区包含:SEQ ID NO:3所示的HCDR1、SEQ ID NO:4所示的HCDR2和SEQ ID NO:5所示的HCDR3;以及所述轻链可变区包含:SEQ ID NO:6所示的LCDR1、SEQ ID NO:7所示的LCDR2和SEQ ID NO:8所示的LCDR3。

[0016] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中抗BCMA抗体或其抗原结合片段的CDR序列可以与原CDR序列相比,发生1-3个优化抗体活性、抗体稳定性或降低免疫原性的氨基酸突变。

[0017] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段为鼠源抗体或其抗原结合片段、嵌合抗体或其抗原结合片段、人抗体或其抗原结合片段或人源化抗体或其抗原结合片段。

[0018] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含人IgG1或其变体、IgG2或其变体、IgG3或其变体或IgG4或其变体的重链恒定区。

[0019] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物,所述的Ab抗体或其抗原结合片段进一步包含人IgG1、IgG2或IgG4重链恒定区。

[0020] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含氨基酸突变后具有增强的ADCC毒性的人IgG1重链恒定区。

[0021] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含如SEQ ID NO:22所示的重链恒定区。

[0022] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含源自人抗体κ链、λ链或其变体的轻链恒定区,优选地,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含源自人抗体κ链的轻链恒定区。

[0023] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段进一步包含如SEQ ID NO:23所示的轻链恒定区。

[0024] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含选自以下序列所示的重链

可变区:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11。

[0025] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含与以下序列相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性的重链可变区:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:11。

[0026] 在本发明一个优选方案中,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含选自以下序列所示的轻链可变区:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14。

[0027] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含与以下序列相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性的轻链可变区:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14。

[0028] 在本发明一个优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段含有如下序列所示的重链:SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0029] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的重链:SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16或SEQ ID NO:17。

[0030] 在本发明一个优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段含有选自如下序列所示的轻链:SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20。

[0031] 在本发明一个优选方案中,根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,所述抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含与以下序列相比具有至少80%,85%,90%,95%或99%同一性的轻链:SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20。

[0032] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9所示的重链可变区和SEQ ID NO:12所示的轻链可变区。

[0033] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区选自SEQ ID NO:9,或与SEQ ID NO:9相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性,所述轻链可变区选自SEQ ID NO:12或与SEQ ID NO:12相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性。

[0034] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:10所示的重链可变区和SEQ ID NO:13所示的轻链可变区。

[0035] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区选自SEQ ID NO:10,或与SEQ ID NO:10相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性,所述轻链可变区选自SEQ ID NO:13或与SEQ ID NO:13相比具有至少70%,75%,80%,85%,90%,95%或99%同一性。

[0036] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:11所示的重链可变区和SEQ ID NO:14所示的轻链可变区。

[0037] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区选自SEQ ID NO:11,或与SEQ ID NO:11相比具有至少

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性,所述轻链可变区选自SEQ ID NO:14或与SEQ ID NO:14相比具有至少70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性。

[0038] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:15所示的重链和SEQ ID NO:18所示的轻链。

[0039] 包含SEQ ID NO:15所示的重链和SEQ ID NO:18所示的轻链的抗BCMA抗体,即为Ab1。

[0040] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,所述重链选自SEQ ID NO:15,或与SEQ ID NO:15相比具有至少80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性,所述轻链选自SEQ ID NO:18,或与SEQ ID NO:18相比具有至少80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性。

[0041] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:16所示的重链和SEQ ID NO:19所示的轻链。

[0042] 包含SEQ ID NO:16所示的重链和SEQ ID NO:19所示的轻链的抗BCMA抗体,即为Ab2。

[0043] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,所述重链选自SEQ ID NO:16,或与SEQ ID NO:16相比具有至少80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性,所述轻链选自SEQ ID NO:19,或与SEQ ID NO:19相比具有至少80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性。

[0044] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体包含SEQ ID NO:17所示的重链和SEQ ID NO:20所示的轻链。

[0045] 包含SEQ ID NO:17所示的重链和SEQ ID NO:20所示的轻链的抗BCMA抗体,即为Ab3。

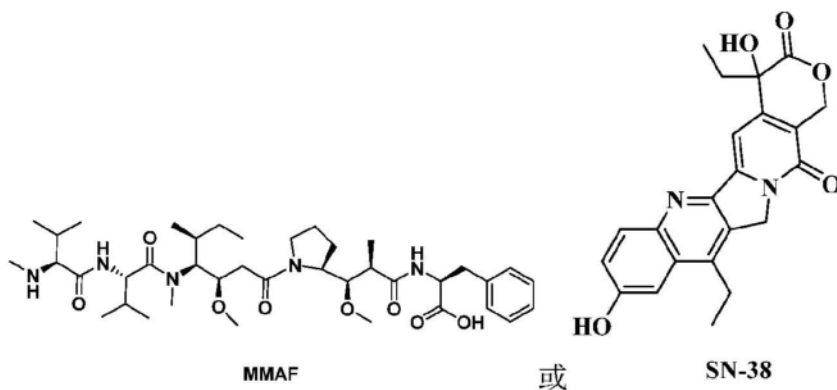
[0046] 在本发明一个更优选方案中,所述的抗BCMA抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链,所述重链选自SEQ ID NO:17,或与SEQ ID NO:17相比具有至少80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性,所述轻链选自SEQ ID NO:20,或与SEQ ID NO:20相比具有至少80%, 85%, 90%, 95%或99%同一性。

[0047] 在本发明一个实施方案中,所述的细胞毒性药物选自毒素、化疗药物、抗生素、放射性同位素和核溶酶。

[0048] 在本发明优选的实施方案中,所述的细胞毒性药物选自抑制细胞分裂的微管蛋白抑制剂或DNA拓扑异构酶抑制剂;优选DM1、DM3、DM4、喜树碱、SN-38、MMAF或MMAE;更优选微管蛋白抑制剂MMAE或MMAF,或者DNA拓扑异构酶抑制剂SN-38。

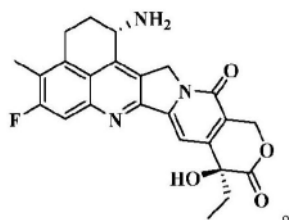
[0049] 在本发明进一步优选的实施方案中,所述的细胞毒性药物选自:

[0050]



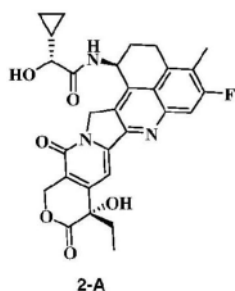
[0051] 在本发明一个优选的实施方案中,所述的细胞毒性药物选自喜树碱衍生物,优选依喜替康:

[0052]



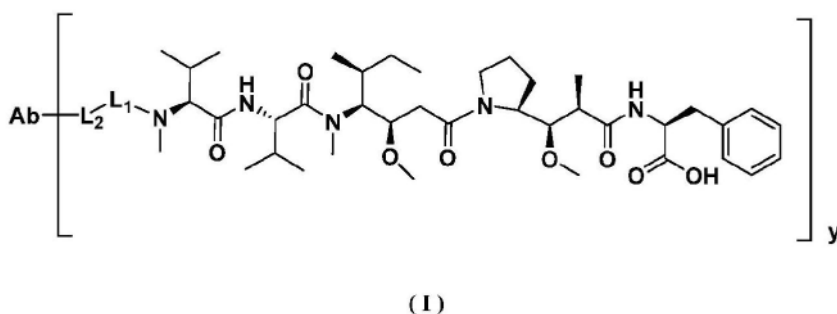
[0053] 在本发明一个更优选的实施方案中,所述的细胞毒性药物为依喜替康衍生物,优选地,所述依喜替康衍生物为化合物2-A:

[0054]



[0055] 在本发明的一些实施方案中,所述的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为通式(I)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,

[0056]



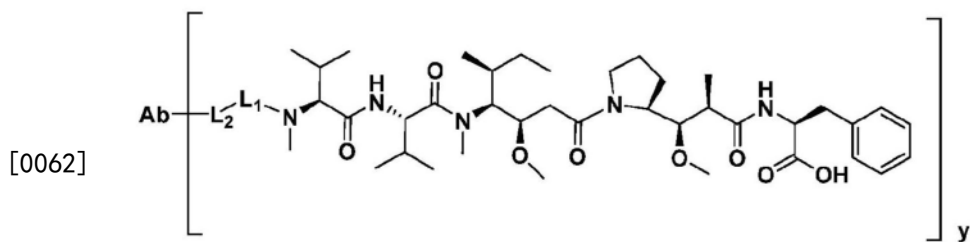
[0057] 其中:

[0058] L_1 、 L_2 是接头单元;

[0059] y 为选自1-8的整数,优选为2-4的数;

[0060] Ab选自如上述定义的抗BCMA抗体或其抗原结合片段。

[0061] 在本发明的一些实施方案中,根据本发明抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式(I)所示化合物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,



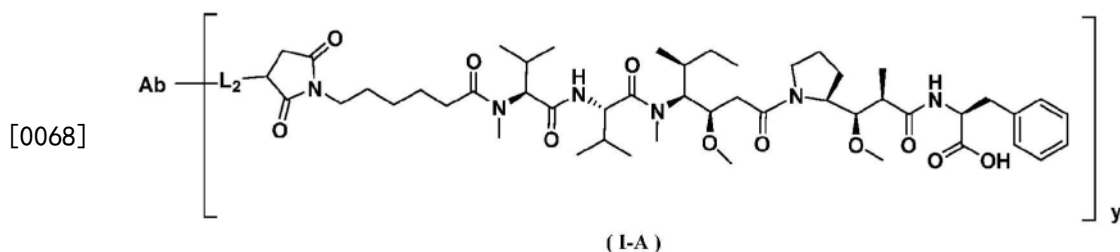
[0063] 其中:

[0064] L_1 、 L_2 是接头单元:

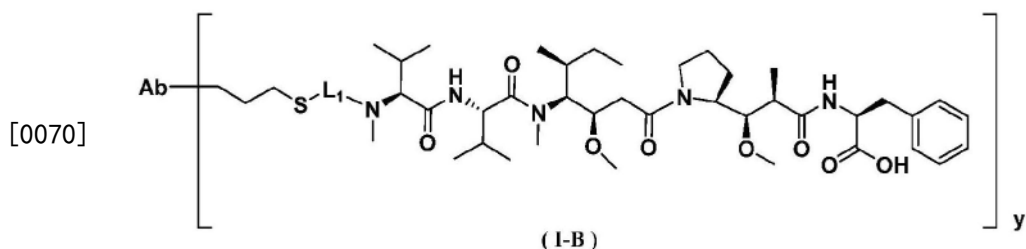
[0065] y 为选自1-8的数,优选为2-8的数,进一步为2-6的数,更优选3-6的数;

[0066] Ab选自如上述定义的抗BCMA抗体或其抗原结合片段。

[0067] 在本发明优选的实施方案中,根据本发明抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式 (I-A) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:

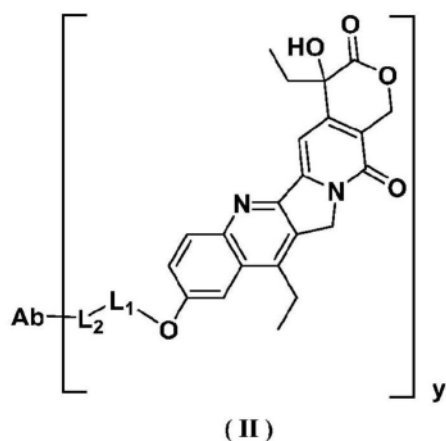


[0069] 在本发明优选的实施方案中,根据本发明抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式 (I-B) 所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



[0071] 根据本发明的抗BCMA抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式 (II) 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:

[0072]



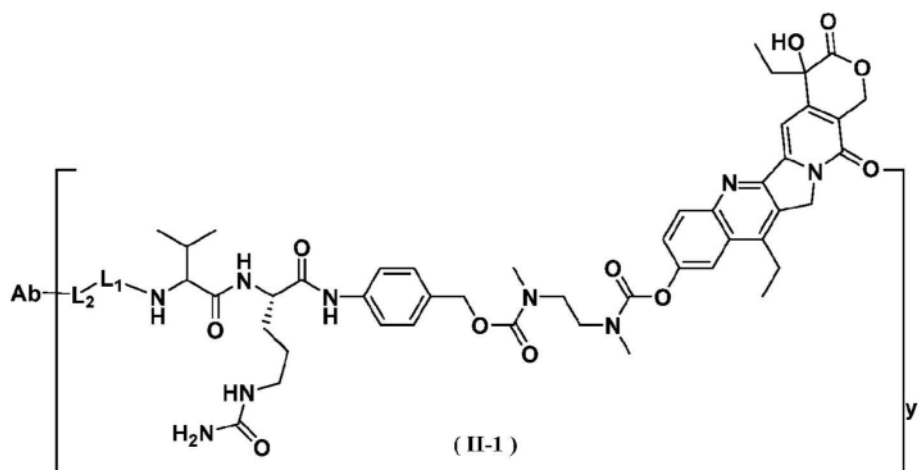
[0073] 其中：

[0074] L_1 、 L_2 是接头单元；[0075] y 为选自1-8的数，优选为2-4的数；

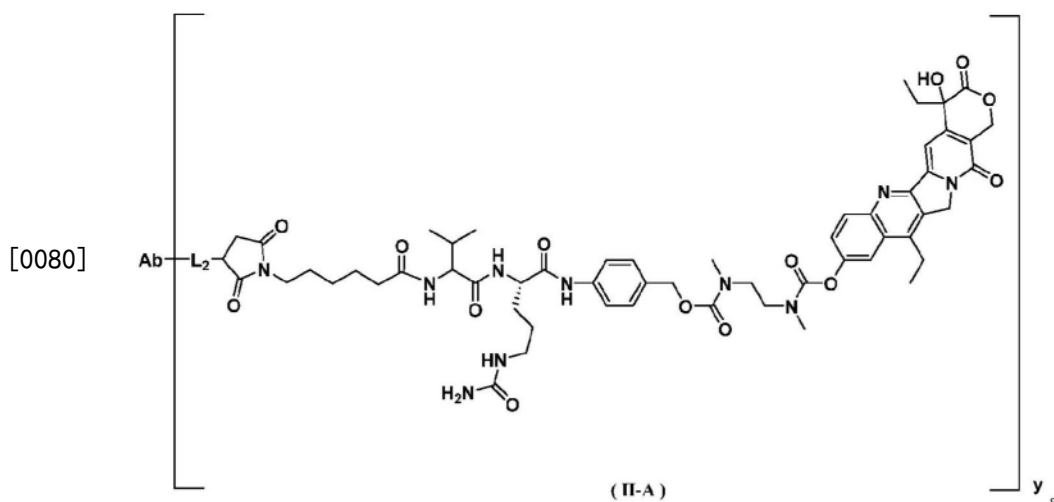
[0076] Ab选自如上述定义的BCMA抗体或其抗原结合片段。

[0077] 在本发明优选的实施方案中，根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为如通式(II-1)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：

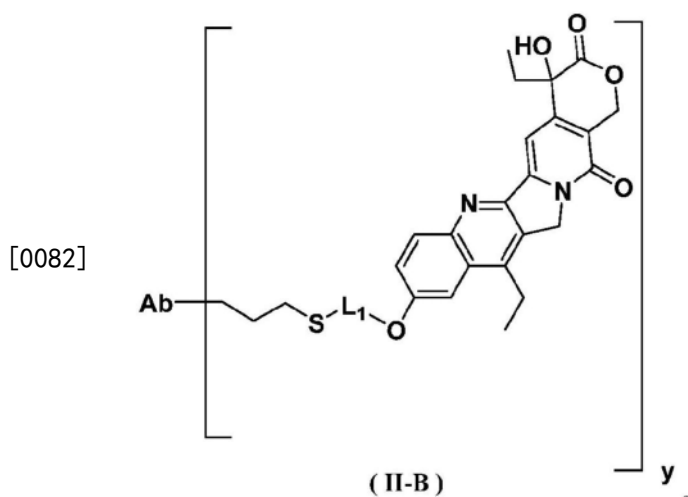
[0078]



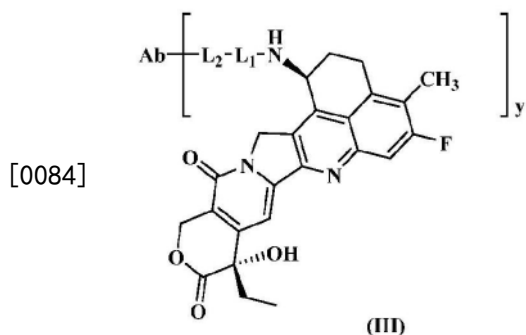
[0079] 在本发明优选的实施方案中，根据本发明抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物，其为如通式(II-A)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物：



[0081] 在本发明优选的实施方案中,根据本发明抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式(II-B)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



[0083] 根据本发明的抗BCMA抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式(III)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,



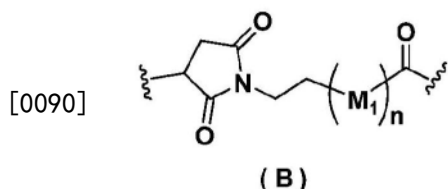
[0085] 其中:

[0086] L_1 、 L_2 是接头单元;

[0087] y为选自1-10的数,优选为2-8的数,更优选4-8的数;

[0088] Ab选自如上述定义的BCMA抗体或其抗原结合片段。

[0089] 在本发明一些实施方案中,所述 L_1 如通式(B)所示:



[0091] 其中:

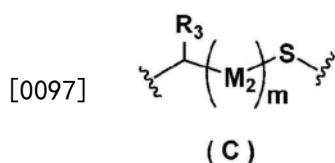
[0092] M_1 为 $-CR_1R_2-$;

[0093] R_1 和 R_2 相同或不同, R_1 和 R_2 各自独立的选自氢、烷基、卤素、羟基或氨基;

[0094] n 选自 0 ~ 5 的整数, 优选 1、2 或 3。

[0095] 在本发明优选的实施方案中, L_1 的杂环端与 L_2 相连。

[0096] 在本发明一些实施方案中, 所述 L_2 如以下通式 (C) 所示:



[0098] 其中:

[0099] M_2 为 $-CR_4R_5-$;

[0100] R_3 选自氢、卤素、羟基、氨基、烷基、烷氧基和环烷基;

[0101] R_4 和 R_5 相同或不同, R_4 和 R_5 各自独立的选自氢、烷基、卤素、羟基或氨基;

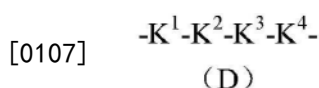
[0102] m 选自 0-5 的整数, 优选 1、2 或 3。

[0103] 在本发明优选的实施方案中, L_2 的 S 端与接头单元 L_1 相连。

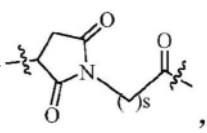
[0104] 在本发明进一步优选的实施方案中, 如通式 (I)、通式 (I-A) 或通式 (I-B), 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其具有如上述通式 (B) 所定义的连接单元 L_1 和上述通式 (C) 所定义的连接单元 L_2 。

[0105] 在本发明进一步优选的实施方案中, 如通式 (II-A) 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物, 其具有如上述通式 (C) 所定义的连接单元 L_2 。

[0106] 在本发明的一些实施方案中, 所述 L_2 如通式 (D) 所示:



[0108] 其中:

[0109] K^1 为 , s 选自 2 至 8 的整数, 进一步选为 4 至 8 的整数, 更优选为 4 至 6 的整数;

[0110] K^2 为 $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^1(CH_2CH_2O)_pCH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_pC(O)-$ 或单键, p 选自 1 至 20 的整数, 优选 1 至 6 的整数;

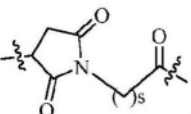
[0111] R^1 选自氢、氘、羟基、氨基、烷基、卤素、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

[0112] K^3 为四肽残基, 优选地, 所述四肽残基由选自两个或多个的苯丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、赖氨酸、瓜氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸中的氨基酸形成的肽残基; 更优选为 GGFG

的四肽残基；

[0113] K^4 为 $-NR^2(CR^3R^4)t-$, R^2 、 R^3 或 R^4 各自独立地为氢、氘、羟基、氨基、烷基、卤素、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基, t 选自1或2,

[0114] 接头单元 $-L_2-$ 的 K^1 端与Ab相连, K^4 端与 L_1 相连。

[0115] 在本发明更优选的实施方案中, K^1 为  s 为5;

[0116] K^2 为键;

[0117] K^3 为GGFG的四肽残基;

[0118] K^4 为 $-NR^2(CR^3R^4)t-$, R^2 、 R^3 或 R^4 各自独立地为氢、氘、羟基、氨基、 C_{1-6} 烷基、卤素、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 氘代烷基和 C_{1-6} 羟烷基, t 为1或2,

[0119] 接头单元 $-L_2-$, 其 K^1 端与Ab相连, K^4 端与 L_1 相连。

[0120] 在本发明一些实施方案中, L_1 选自键、 $-O-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$ 、 $-O-CR^5R^6-(CR^aR^b)_m-$ 、 $-O-CR^5R^6-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$ 或 $-S-(CR^aR^b)_m-CR^5R^6-C(O)-$;

[0121] R^a 和 R^b 各自独立地选自氢、氘、卤素或烷基;

[0122] R^5 为卤代烷基或环烷基;

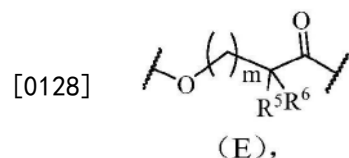
[0123] R^6 选自氢、卤代烷基或环烷基;

[0124] 或者, R^5 和 R^6 与其相连接的碳原子一起形成环烷基;

[0125] m 选自0、1、2、3或4。

[0126] 优选地, L_1 的O端与接头单元 L_2 相连。

[0127] 在本发明优选的实施方案中, 所述 L_1 如通式(E)所示:

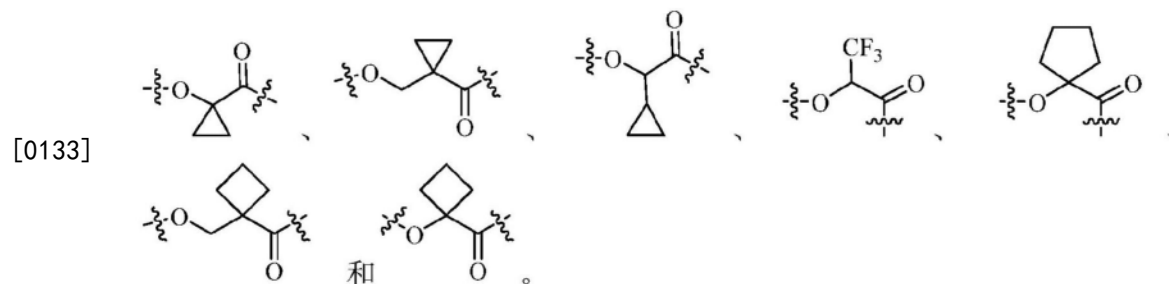


[0129] 其中, R^5 选自卤代烷基或环烷基, R^6 选自氢、卤代烷基或环烷基, 或者, R^5 和 R^6 与其相连接的碳原子一起形成环烷基;

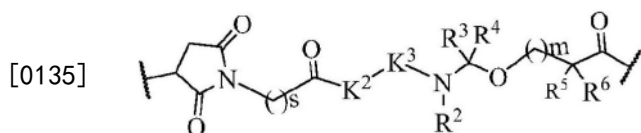
[0130] 优选地, R^5 选自 C_{1-6} 卤代烷基或 C_{3-6} 环烷基, R^6 选自氢、 C_{1-6} 卤代烷基或环烷基, 或者, R^5 和 R^6 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基;

[0131] m 选自0至4的整数,

[0132] 优选地, 通式(E)选自以下取代基:



[0134] 在本发明优选的实施方案中, 所述 $-L_2-L_1-$ 选自以下结构:



[0136] K^2 为键;

[0137] K³为GGFG的四肽残基;

[0138] R⁵为卤代烷基或C₃₋₆环烷基;

[0139] R⁶选自氢、卤代烷基或C₃₋₆环烷基;

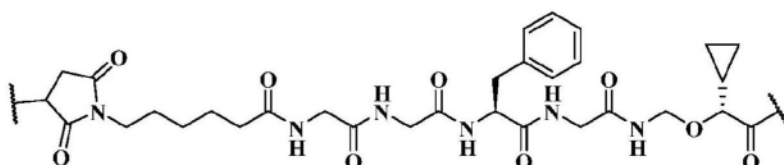
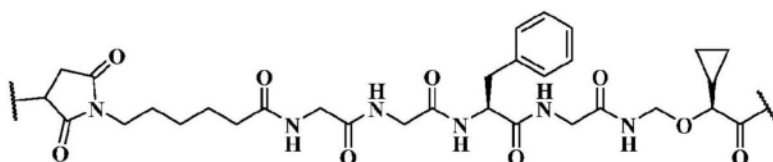
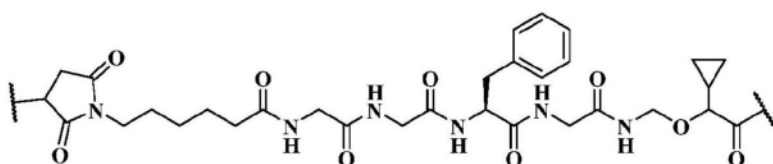
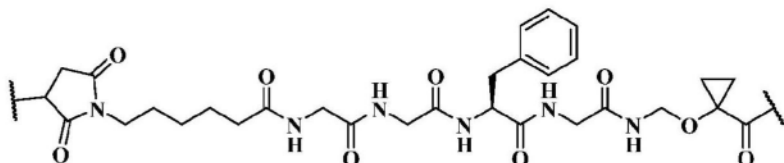
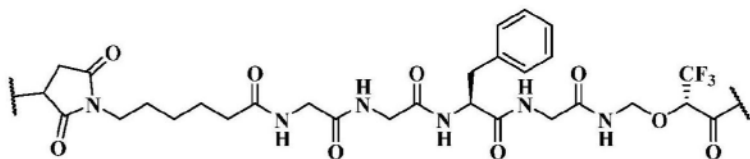
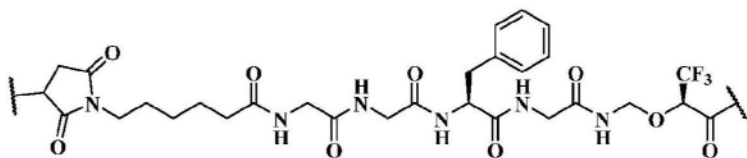
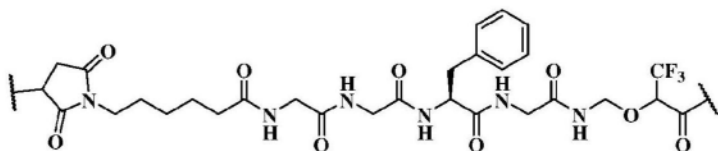
[0140] 或者, R⁵和R⁶与其相连接的碳原子一起形成C₃₋₆环烷基;

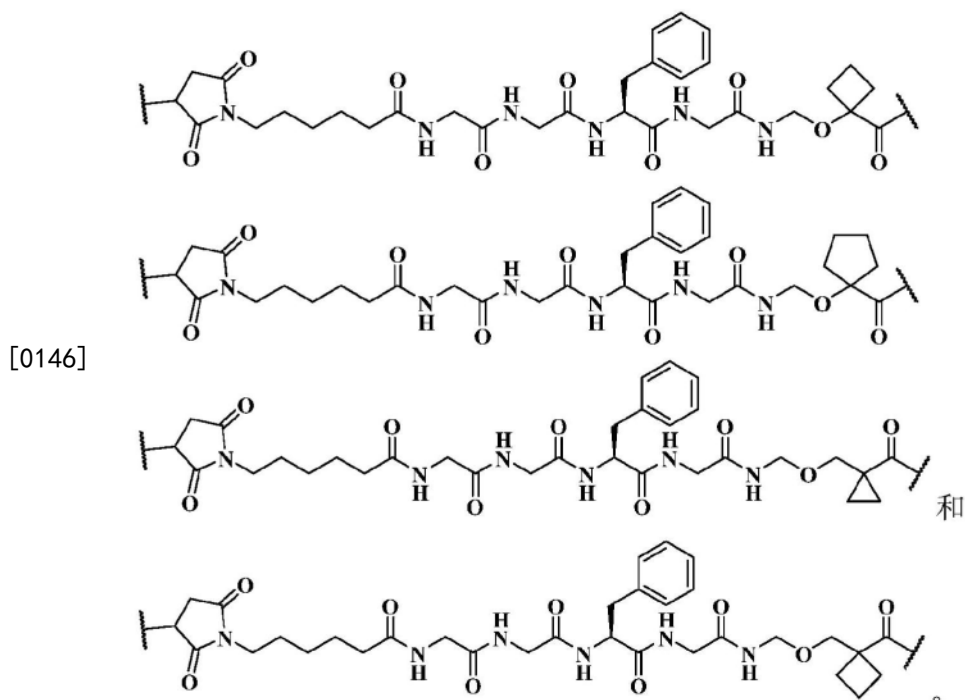
[0141] R^2 、 R^3 或 R^4 各自独立地选自氢或烷基;

[0142] s选自2至8的整数;优选地,s选自4、5或6的整数;

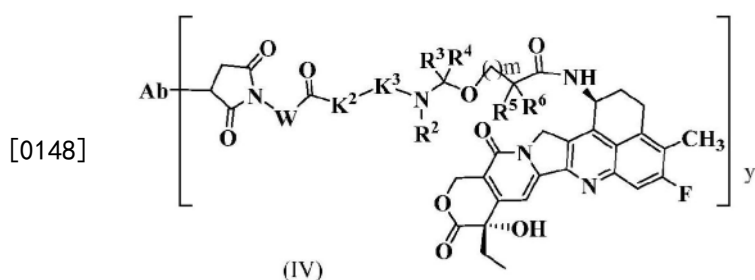
[0143] m选自0至4的整数;

[0144] 优选地, -L₂-L₁-选自以下结构:





[0147] 在本发明优选的实施方案中,根据本发明抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式(IV)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



[0149] 其中:

[0150] W选自 C_{1-8} 烷基、 C_{1-8} 烷基-环烷基或1至8个原子的直链杂烷基,所述杂烷基包含1至3个选自N、O或S的杂原子,任选地,其中所述的 C_{1-8} 烷基、环烷基和直链杂烷基各自独立地进一步被卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基的一个或多个取代基所取代;

[0151] K^2 选自 $-NR^1(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^1(CH_2CH_2O)_{p1}CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)_{p1}C(O)-$ 或键, R^1 选自氢、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基, p_1 选自1至20的整数;

[0152] K^3 为由2至7个氨基酸构成的肽残基,氨基酸可以是取代的或非取代的,当被取代时,取代基可以在任何可使用的连接点上被取代,所述取代基为一个或多个独立地选自卤素、羟基、氰基、氨基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和环烷基;

[0153] R^2 选自氢、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

[0154] R^3 和 R^4 各自独立地选自氢、卤素、烷基、卤代烷基、氘代烷基和羟烷基;

[0155] R^5 选自卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

[0156] R^6 选自氢、卤素、卤代烷基、氘代烷基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基;

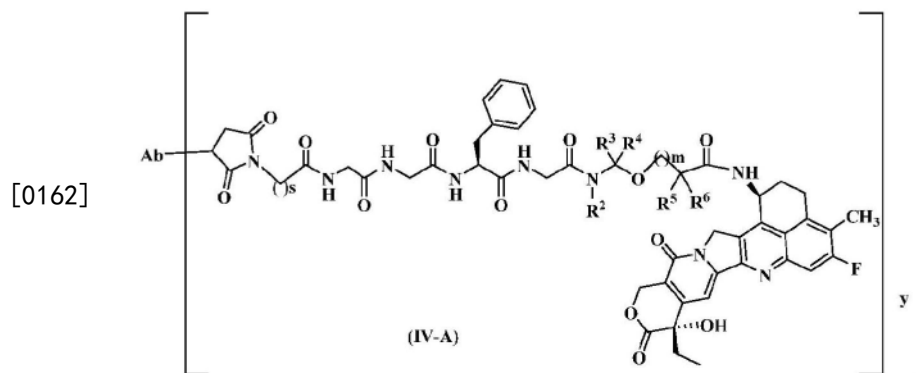
[0157] 或者, R^5 和 R^6 与其相连接的碳原子一起形成环烷基或杂环基;

[0158] m选自0至4的整数；

[0159] y为选自1-10的数,y是小数或整数；

[0160] Ab选自如上述定义的抗BCMA抗体或其抗原结合片段。

[0161] 在本发明优选的实施方案中,根据本发明抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式(IV-A)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物:



[0163] 在本发明优选的实施方案中,根据本发明抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其为如通式(IV-A)所示的抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,其中:

[0164] R^5 选自卤代烷基或 C_{3-6} 环烷基;

[0165] R^6 选自氢、卤代烷基或 C_{3-6} 环烷基;

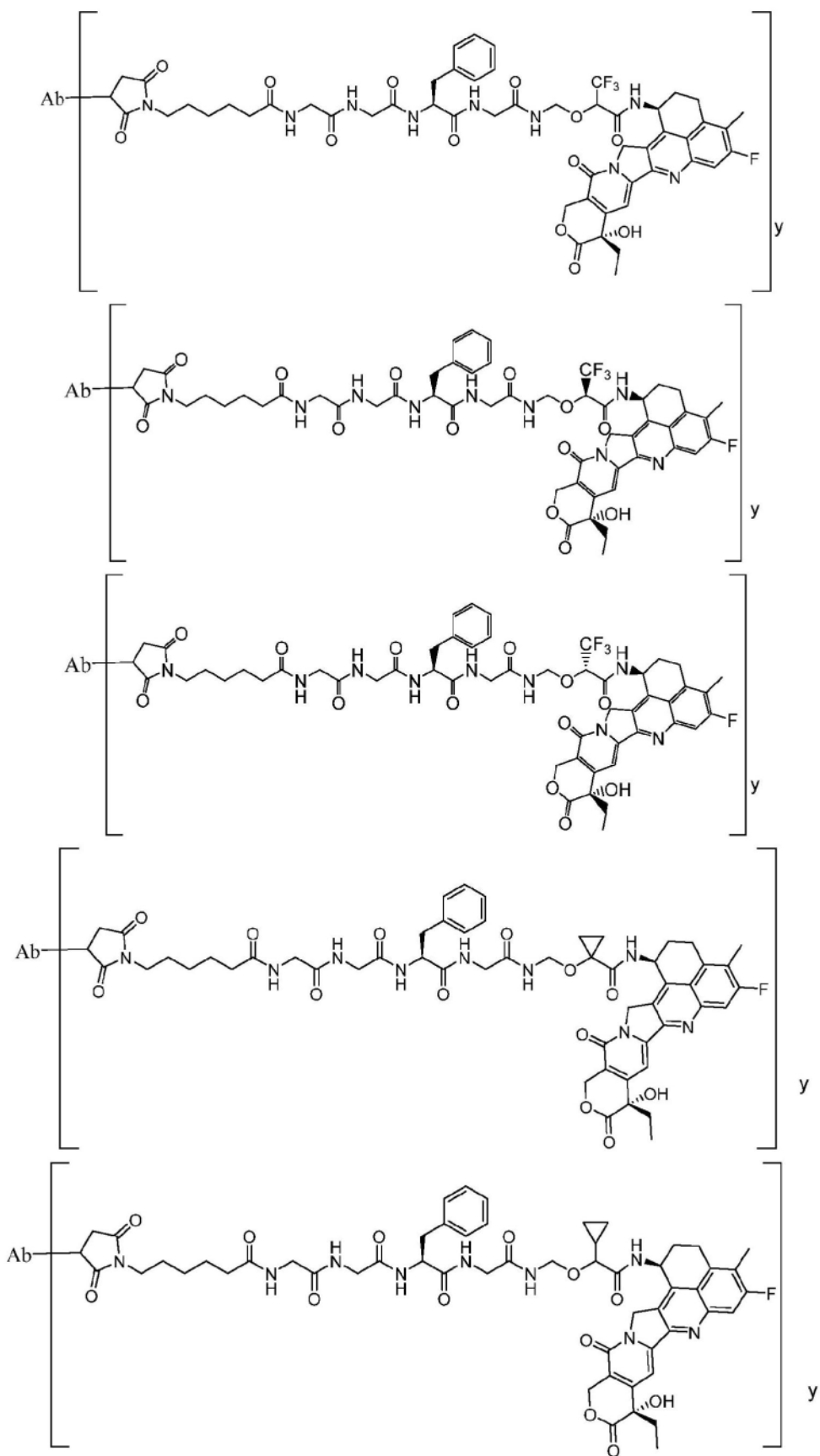
[0166] 或者, R^5 和 R^6 与其相连接的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基;

[0167] R^2 、 R^3 或 R^4 各自独立地选自氢或烷基;

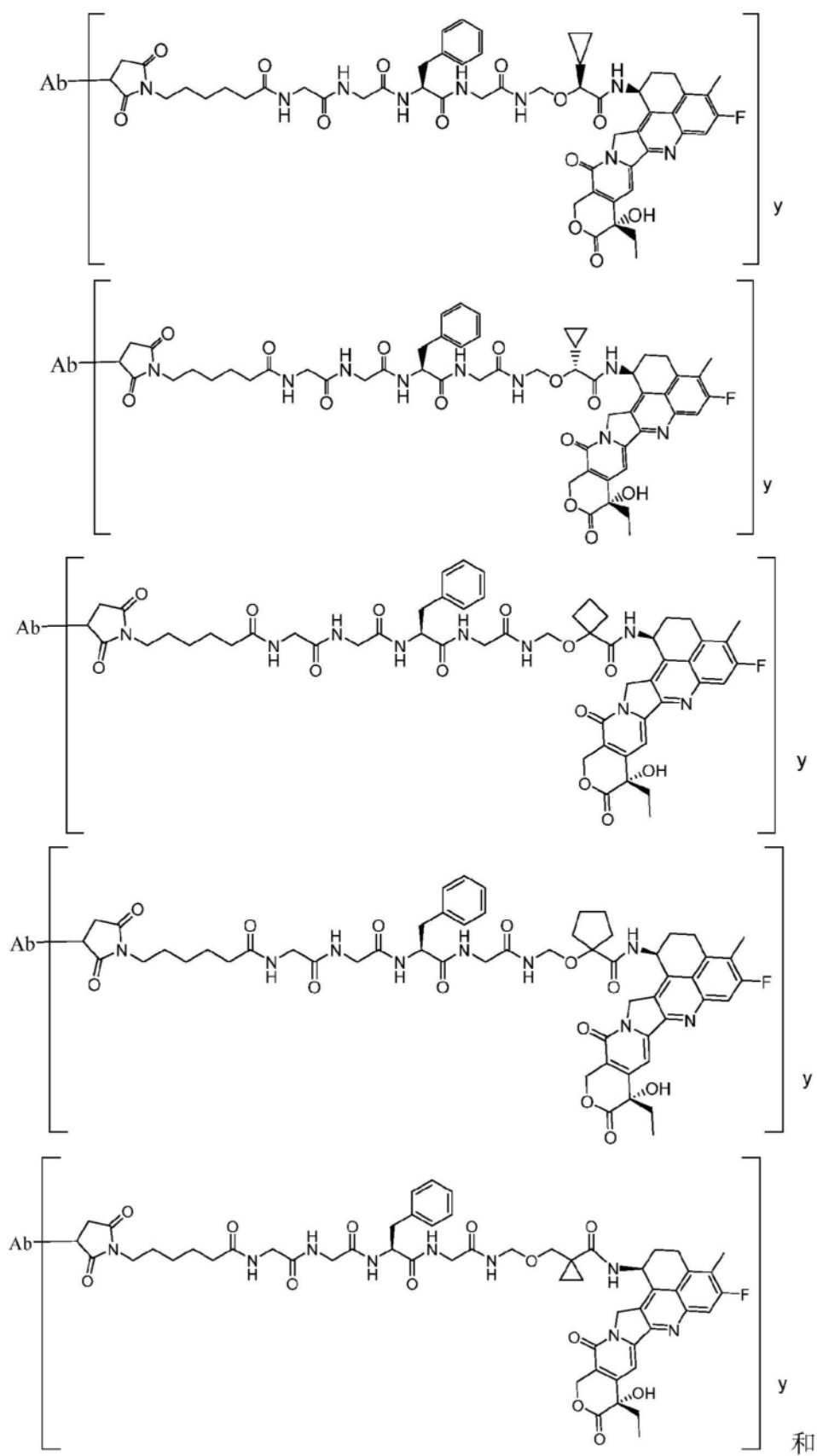
[0168] s选自2至8的整数;

[0169] m选自0至4的整数。

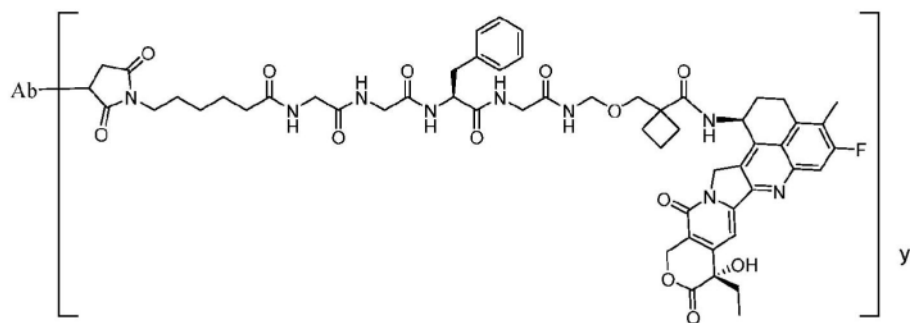
[0170] 在本发明更优选的实施方案中,根据本发明的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,通式(IV-A)所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物选自以下结构:



[0172]

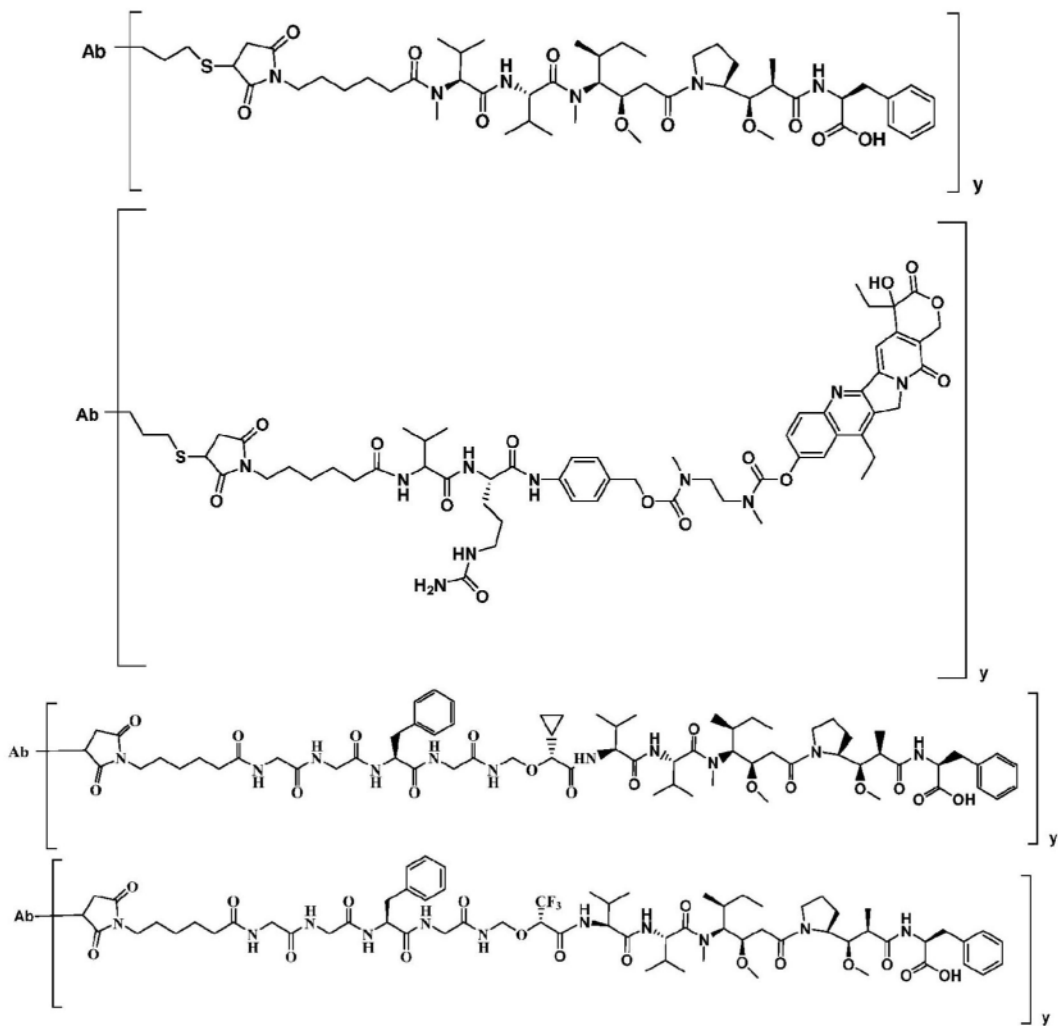


[0173]



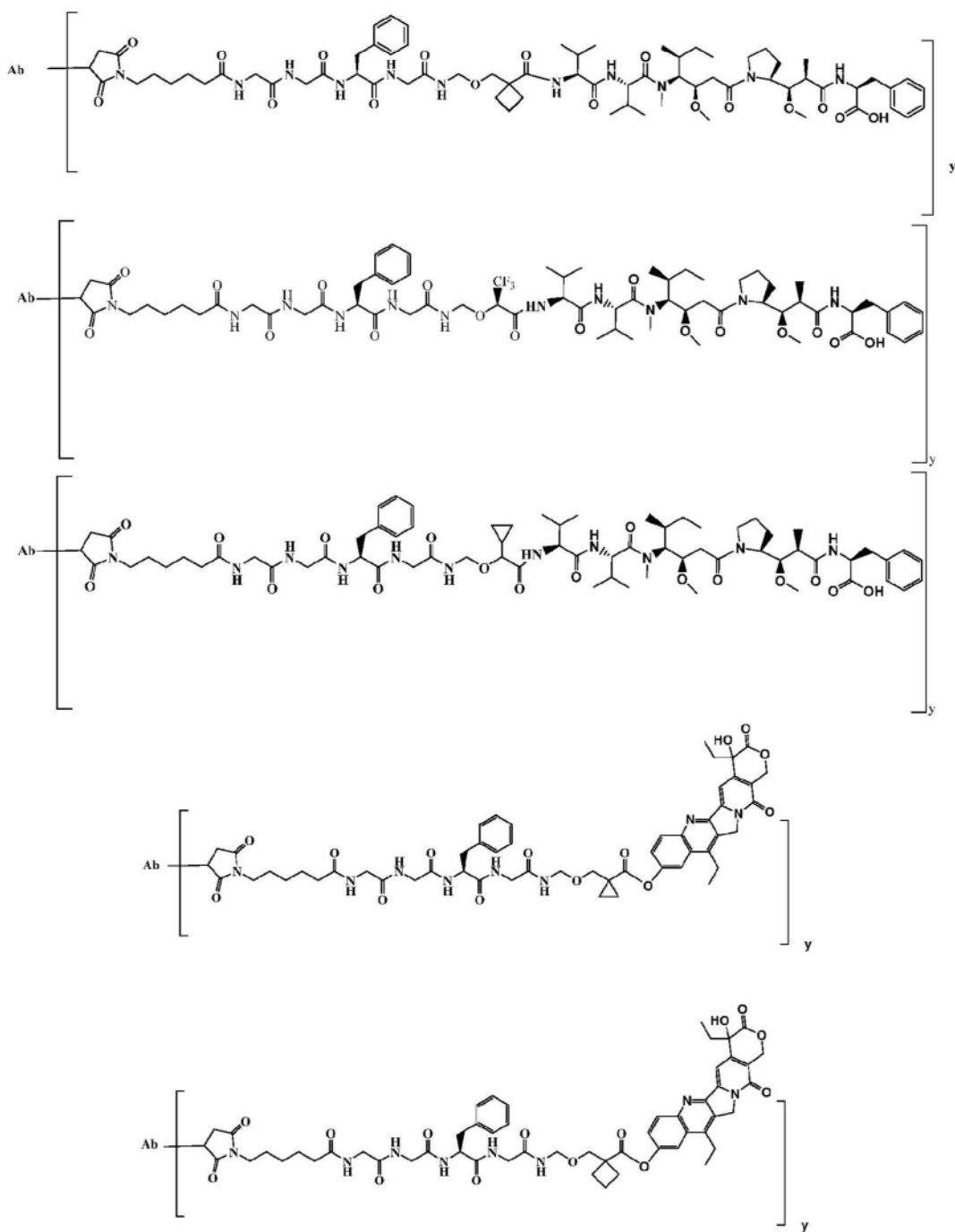
[0174] 根据本发明的一些实施方案,所述抗体-药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物选自以下化合物,

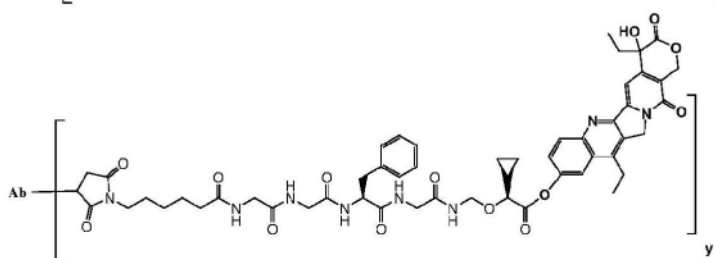
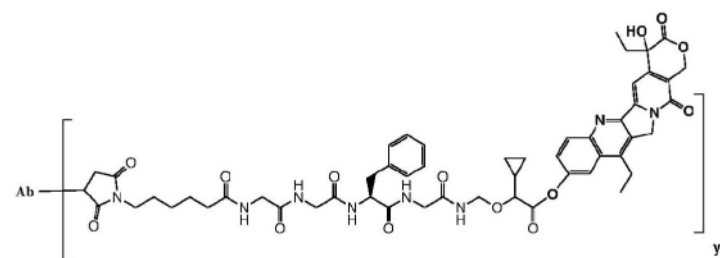
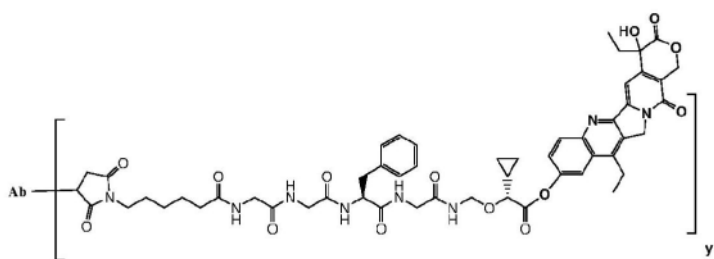
[0175]



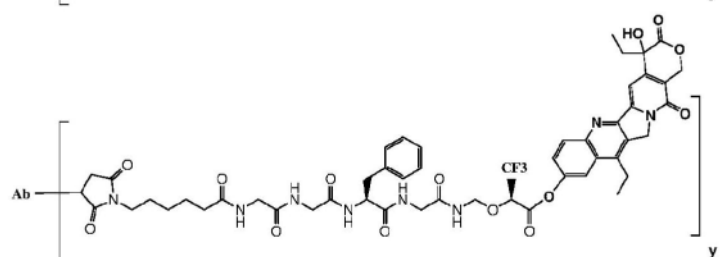
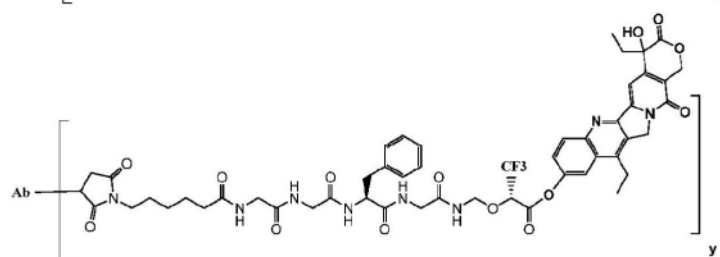
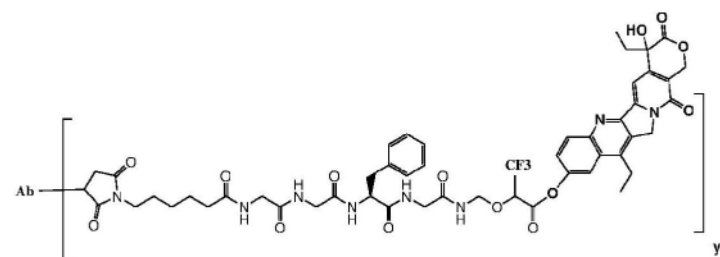


[0177]





[0178]





Ab1

(化合物 1)

Ab2

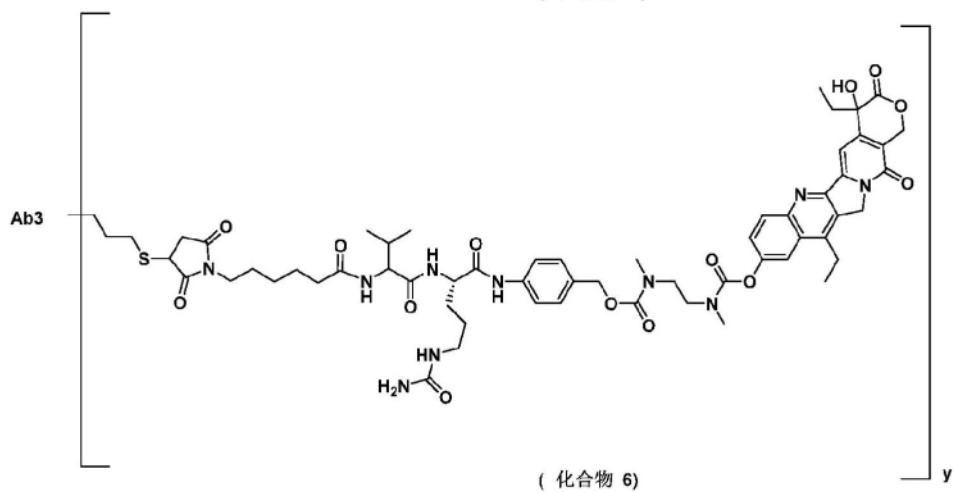
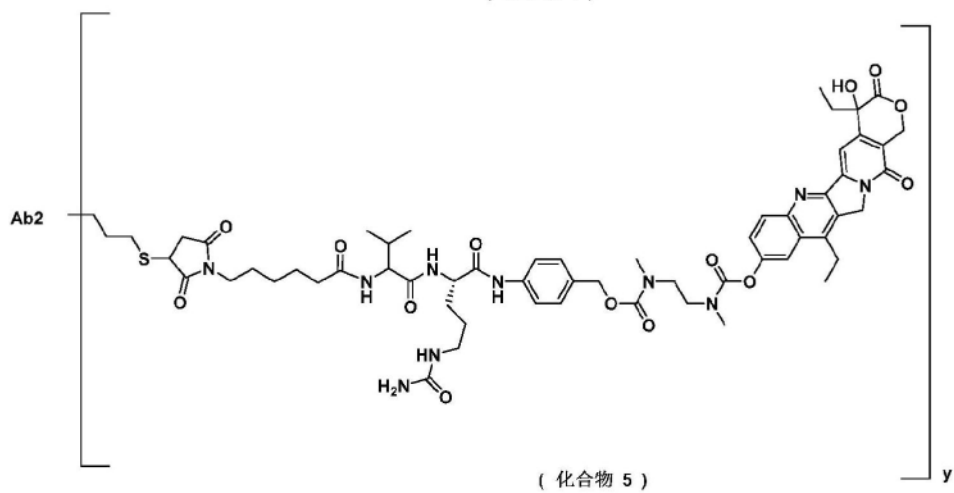
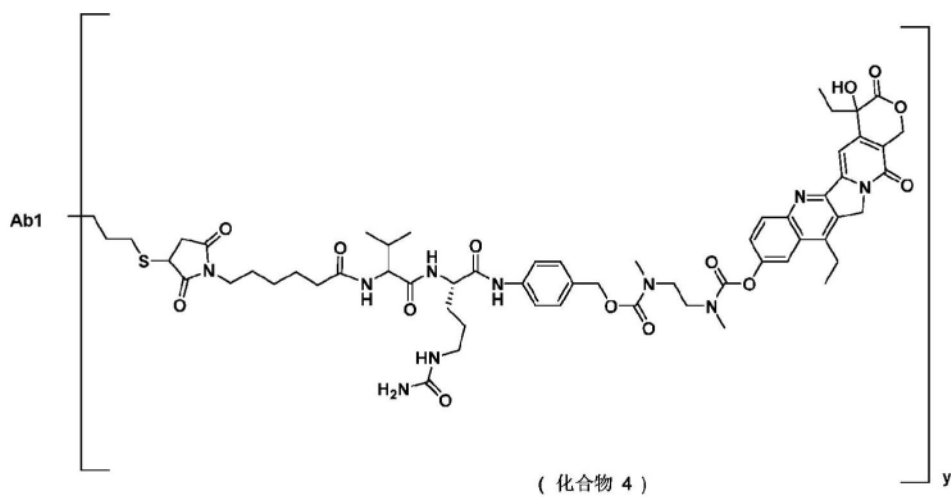
(化合物 2)

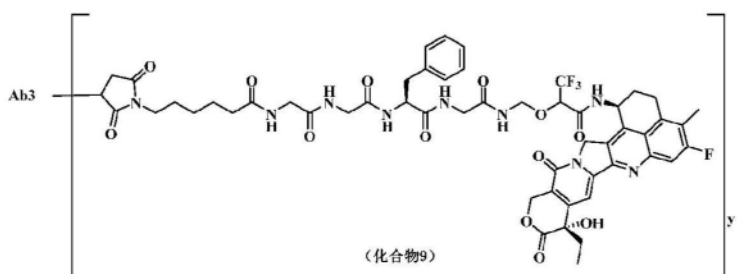
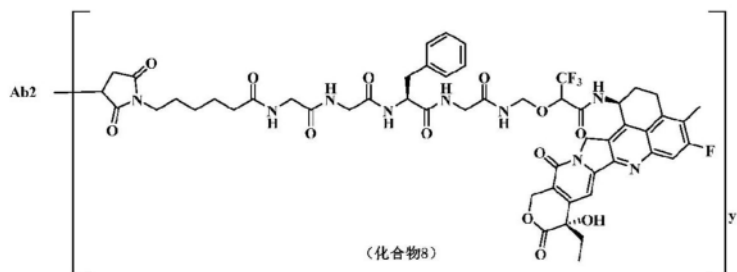
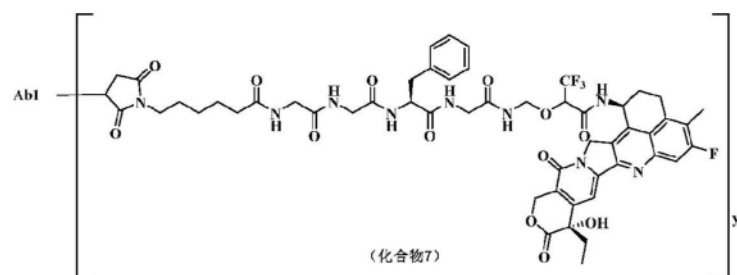
Ab3

(化合物 3)

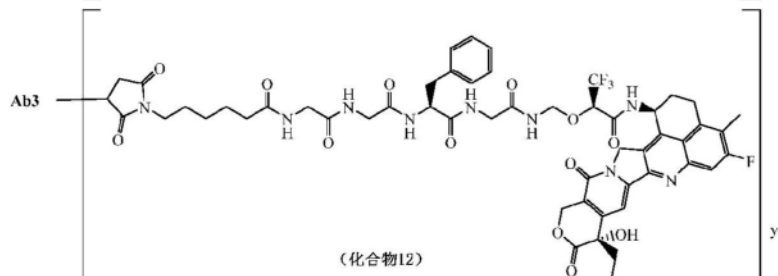
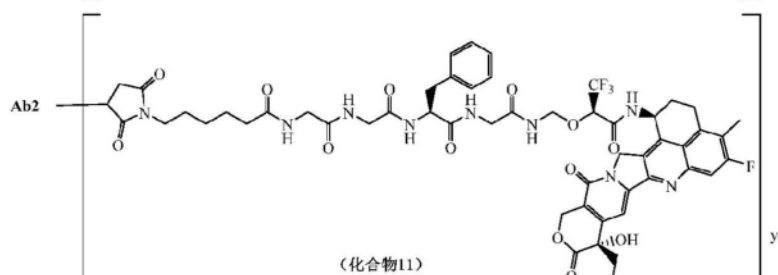
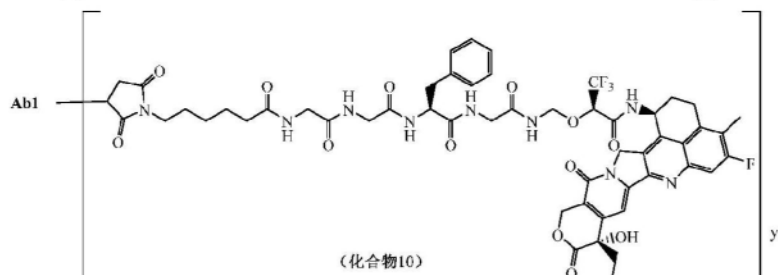
[0181]

[0182]

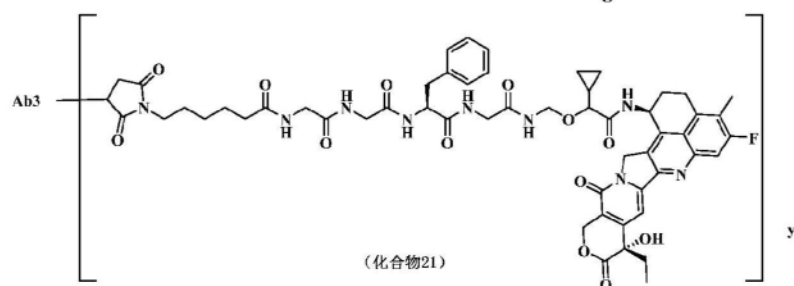
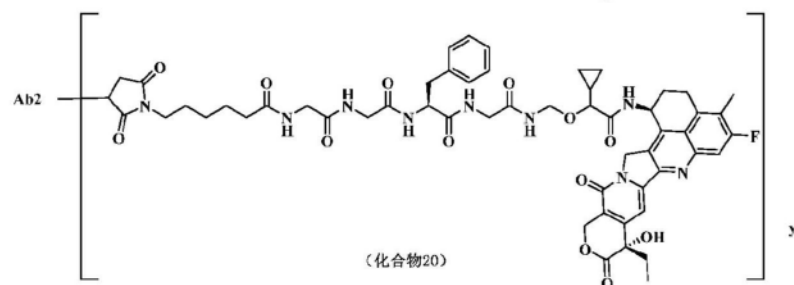
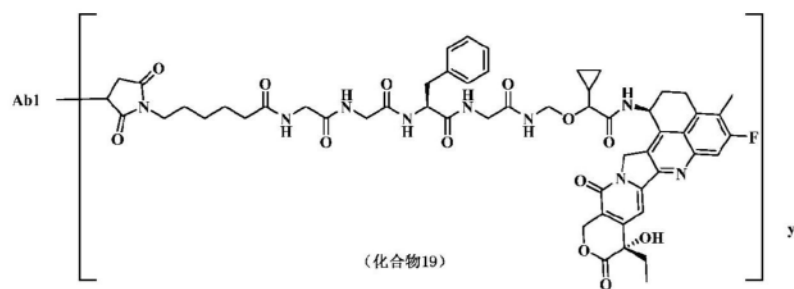




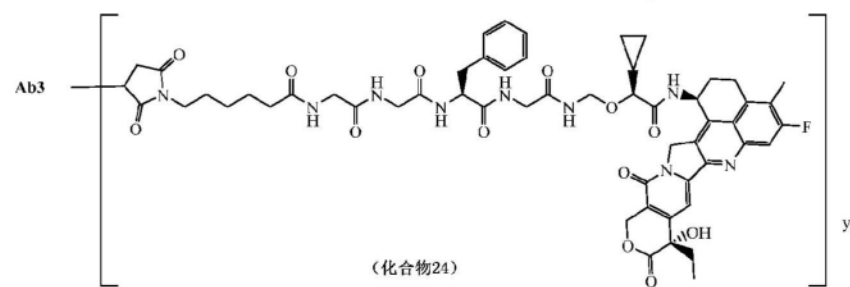
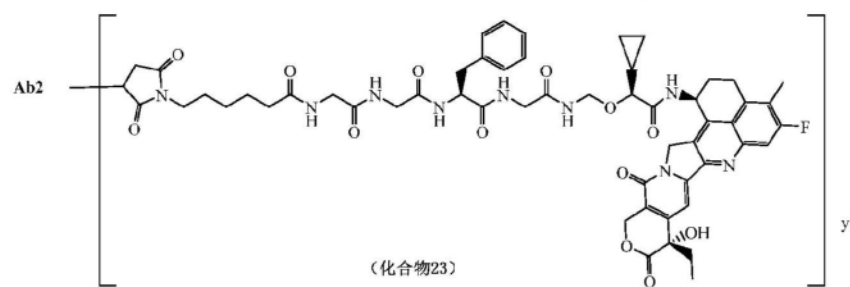
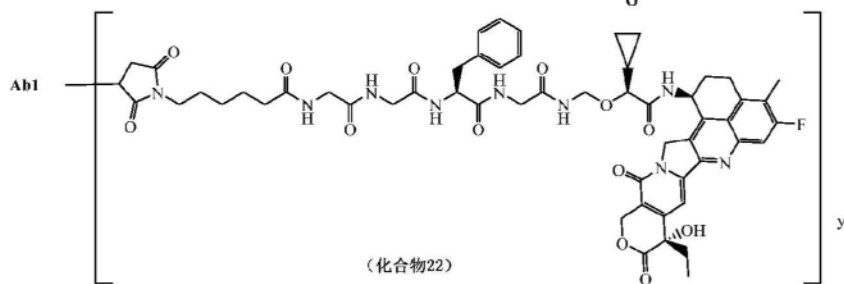
[0183]



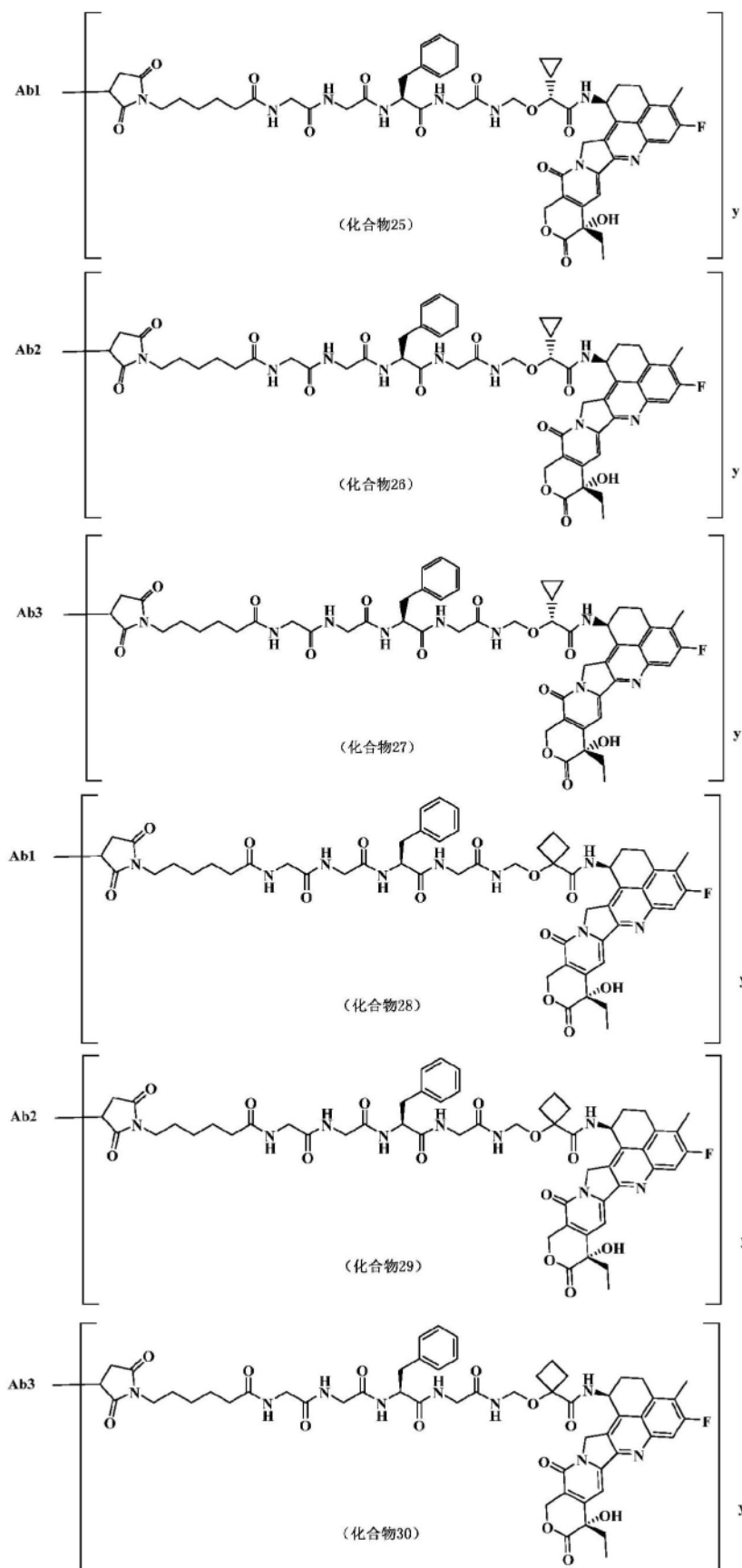




[0185]

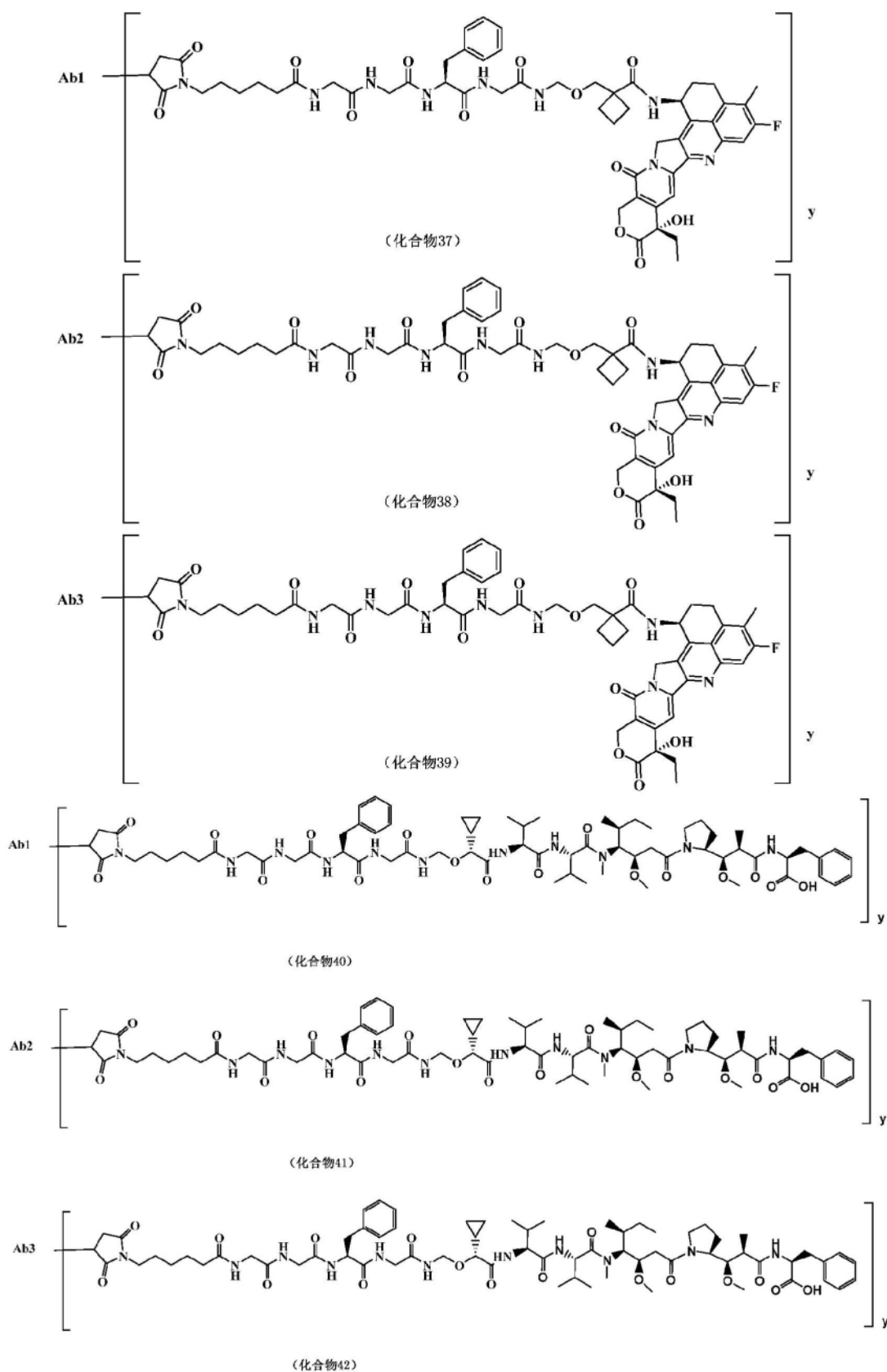


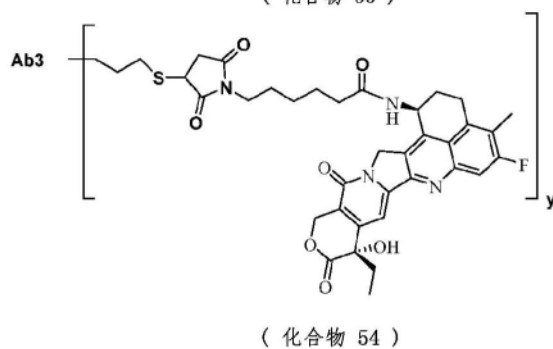
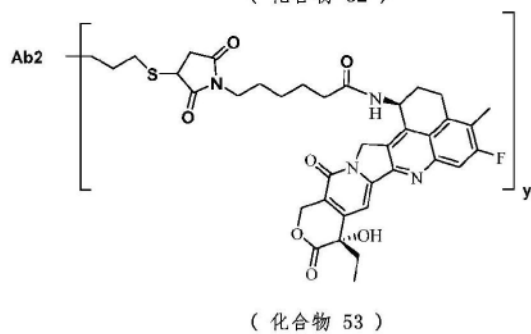
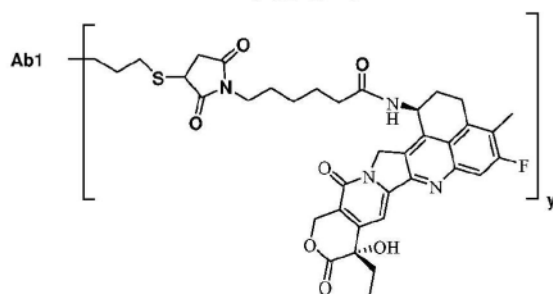
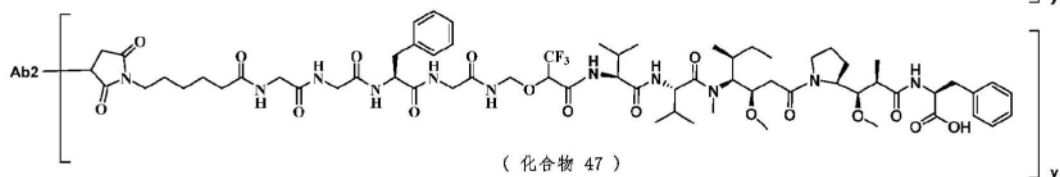
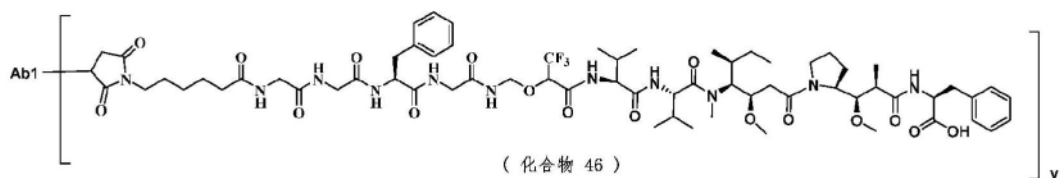
[0186]





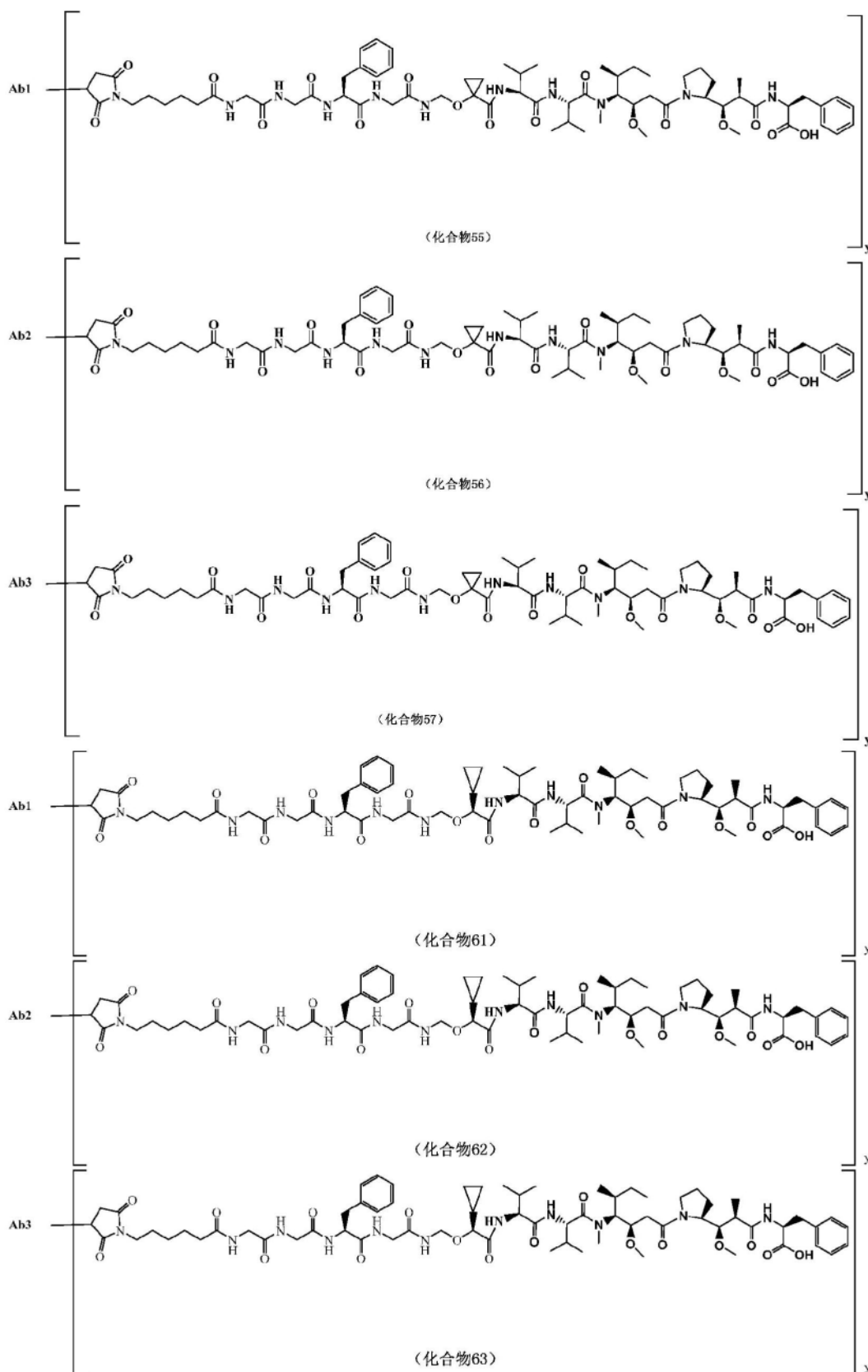
[0188]



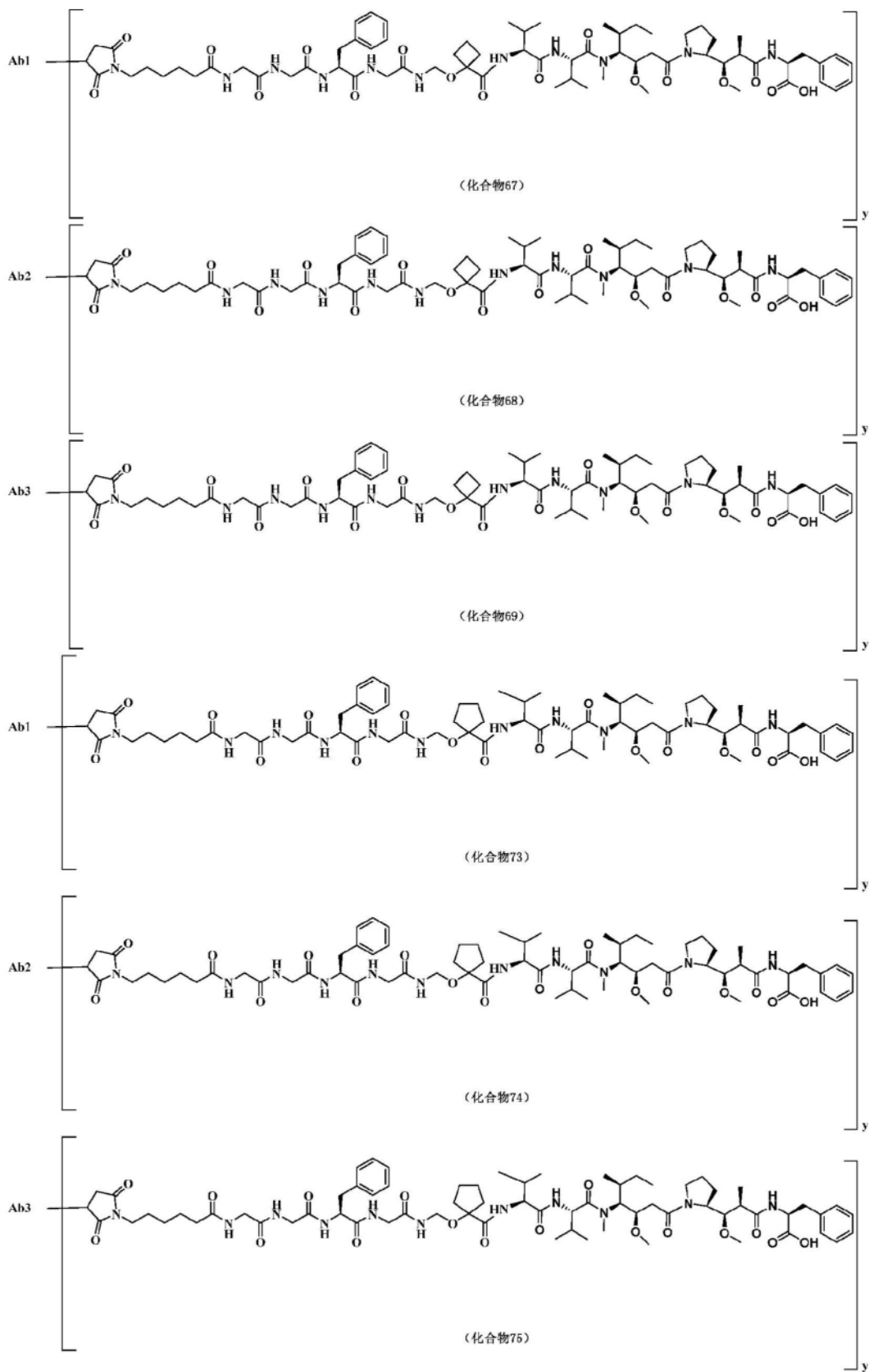


[0189]

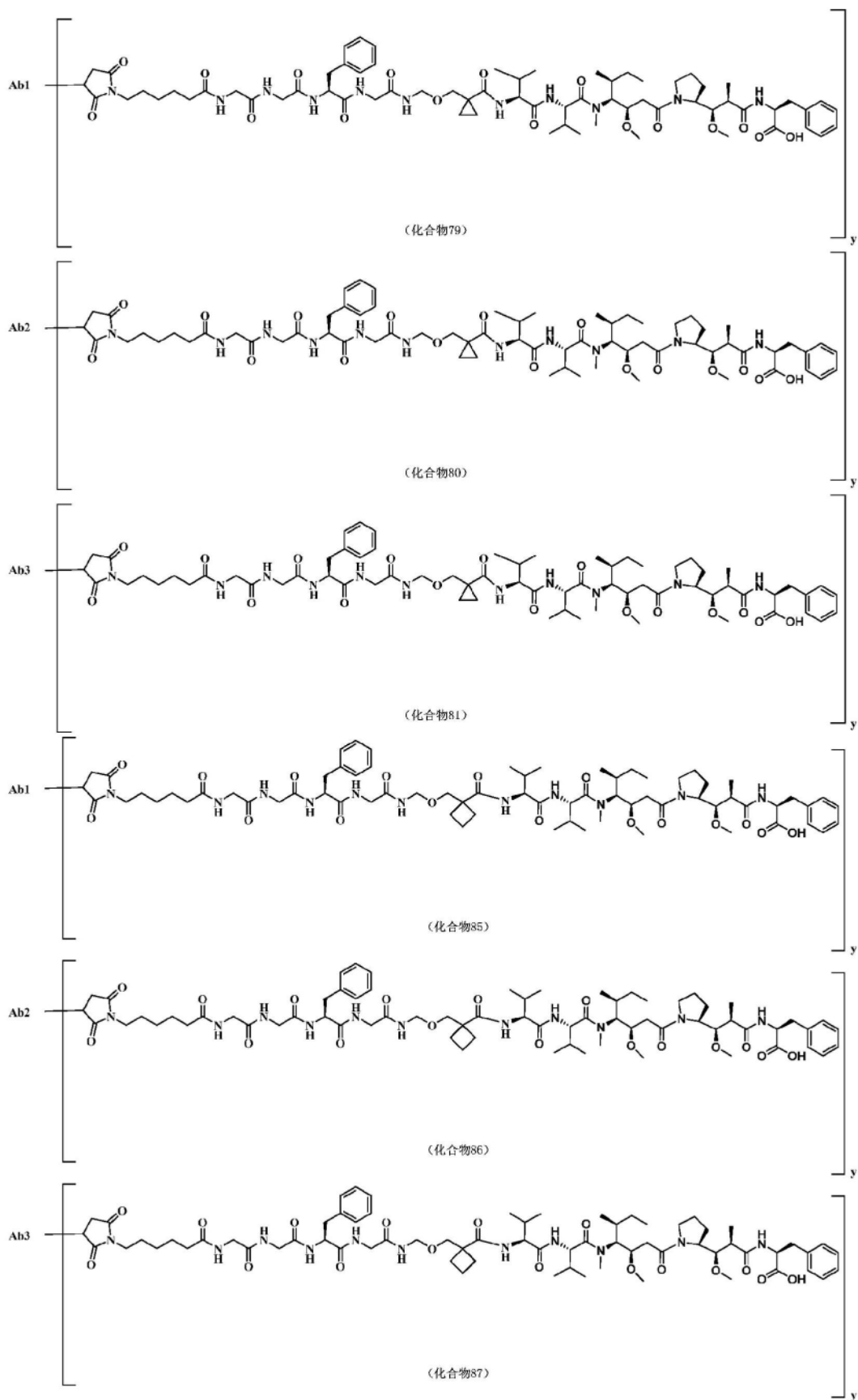
[0190]



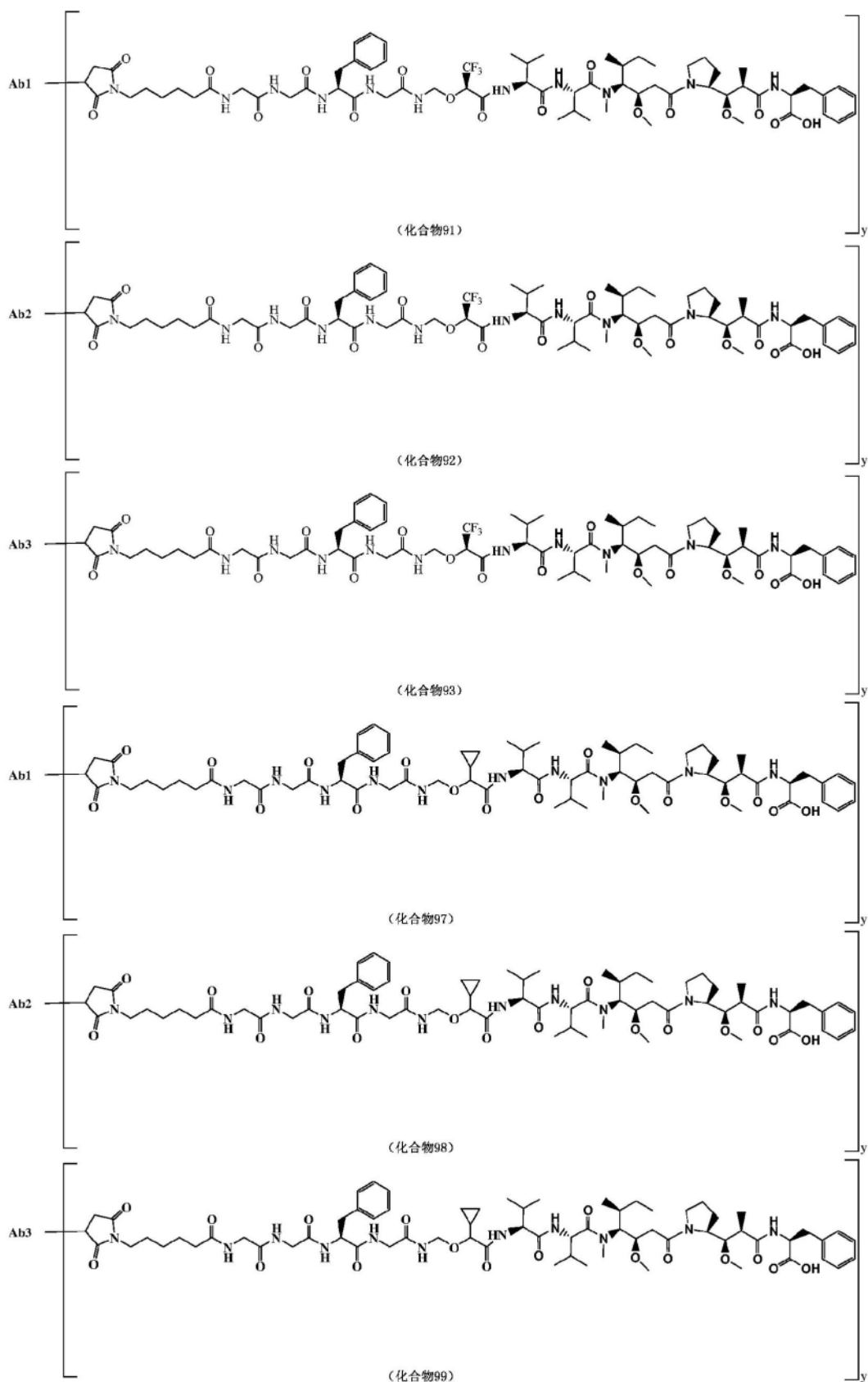
[0191]



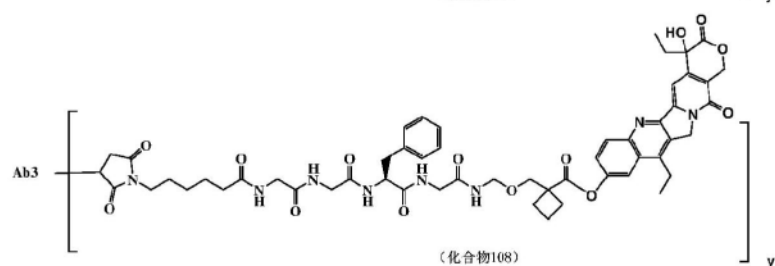
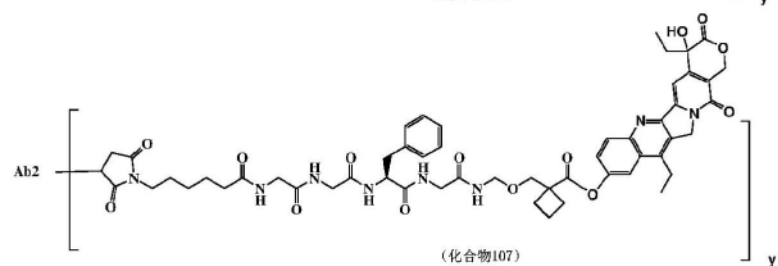
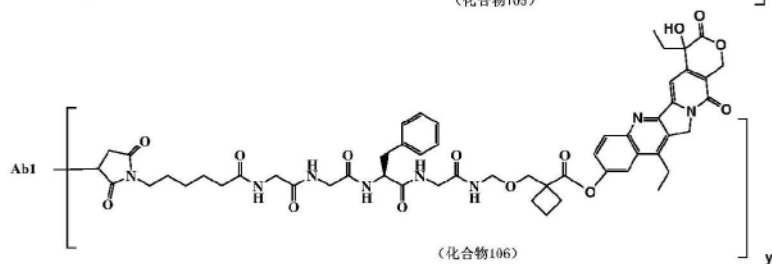
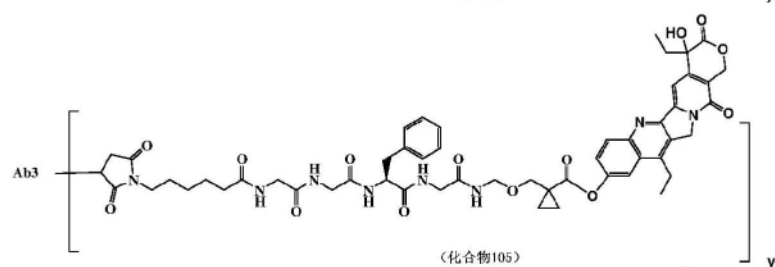
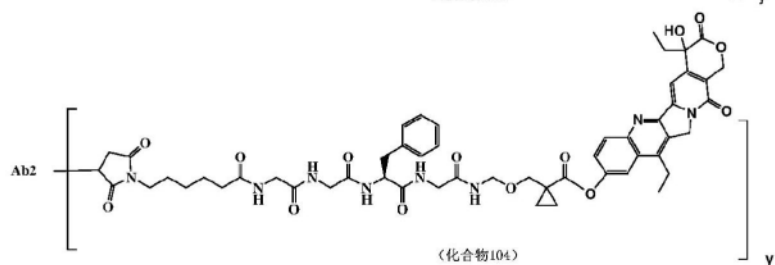
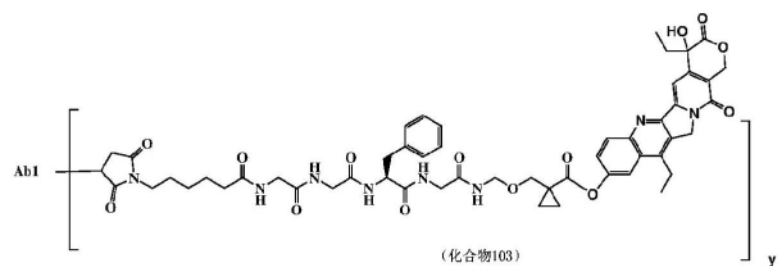
[0192]



[0193]



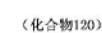
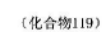
[0194]



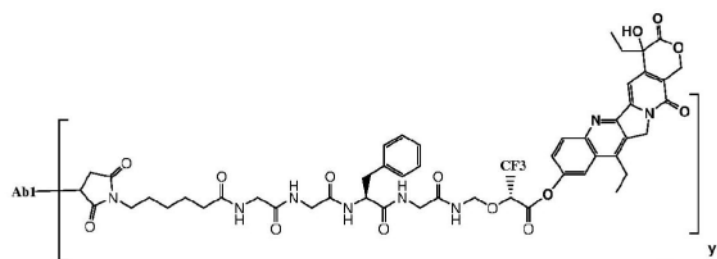


(化合物112)

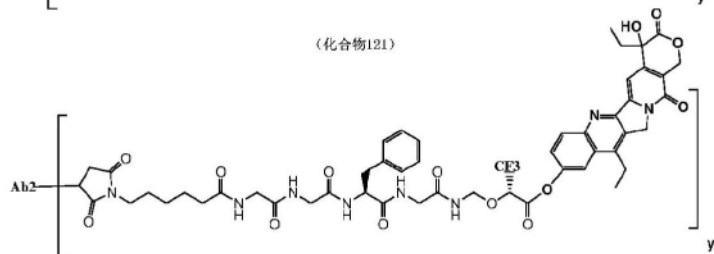




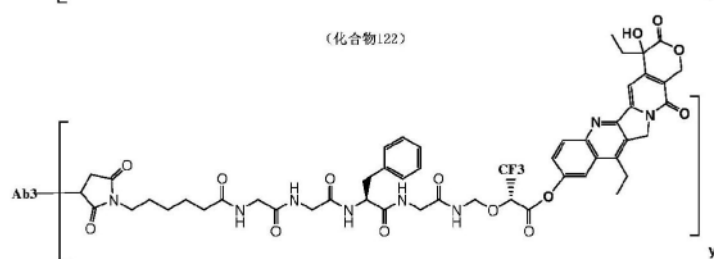
[0196]



(化合物121)

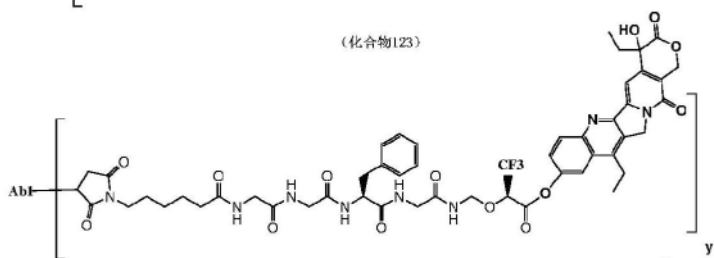


(化合物122)

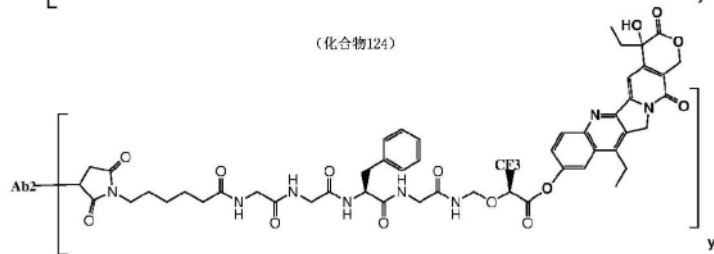


(化合物123)

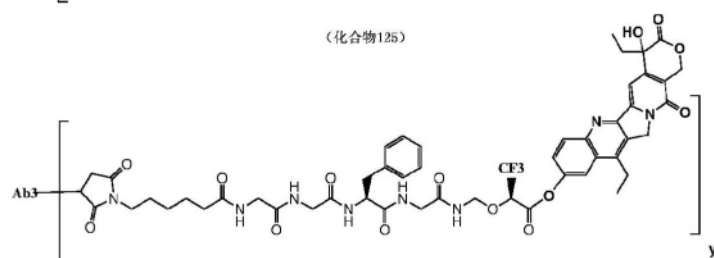
[0197]



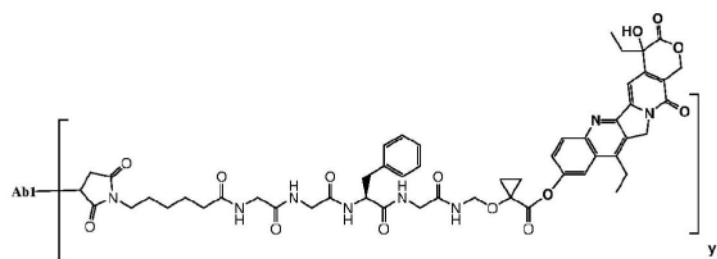
(化合物124)



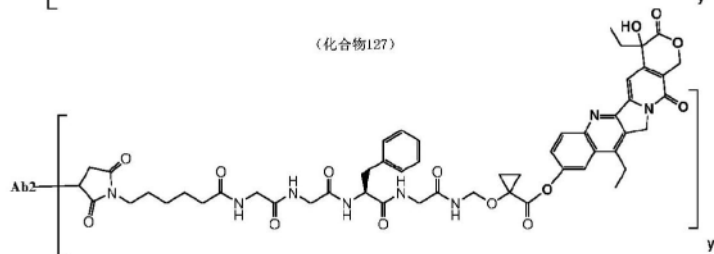
(化合物125)



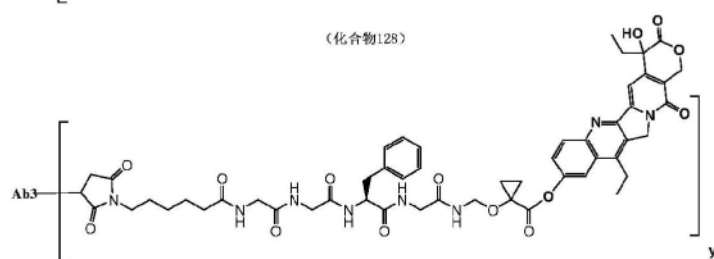
(化合物126)



(化合物127)

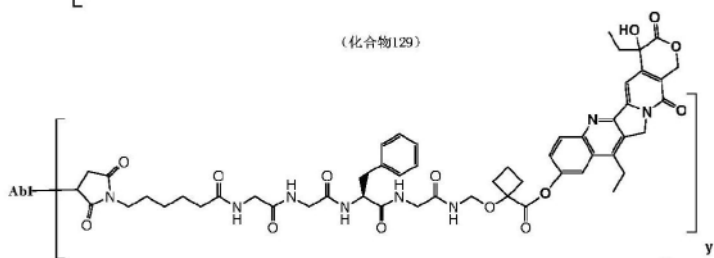


(化合物128)

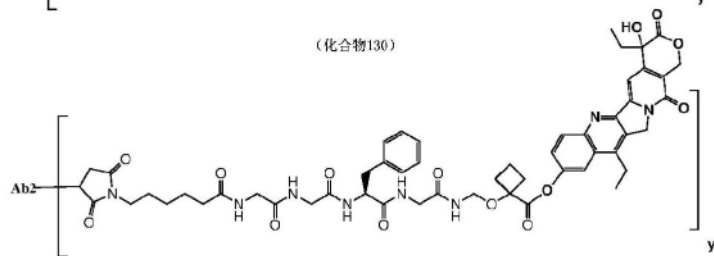


(化合物129)

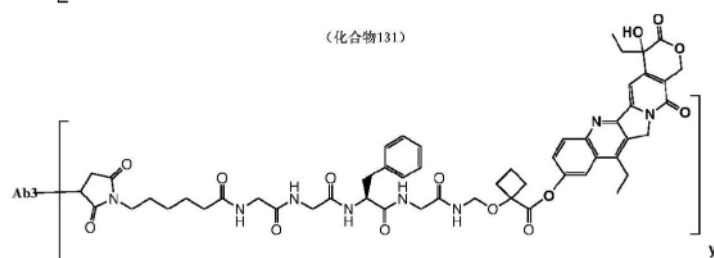
[0198]



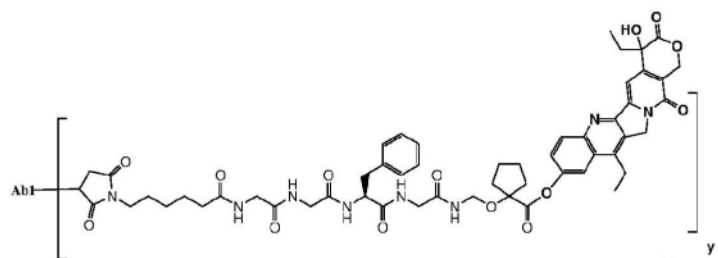
(化合物130)



(化合物131)

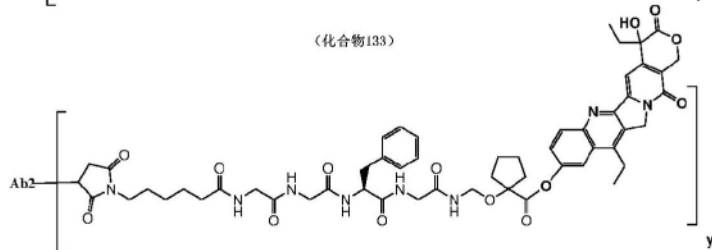


(化合物132)

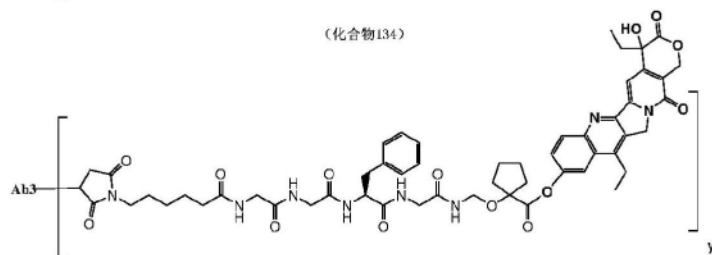


(化合物133)

[0199]



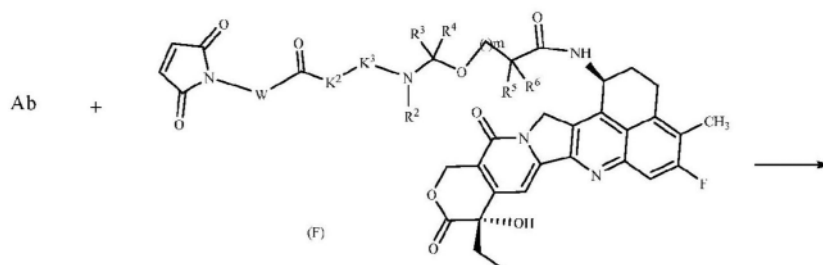
(化合物134)



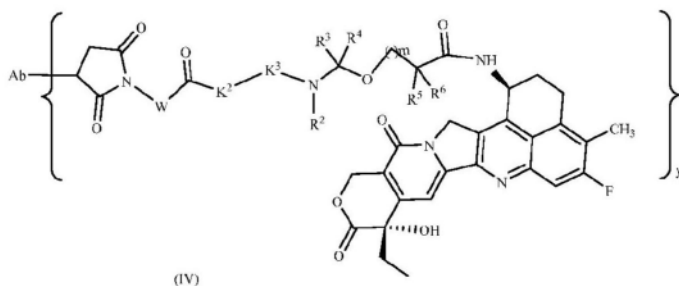
(化合物135)

[0200] 其中, y 选自2-10, 优选4-8, 更优选6-8, 进一步优选7-8, 最优选6或8; 或者 y 选自1-10的数, 优选为2-10的数, 进一步为2-6的数, 更优选3-6的数, 最优选6。

[0201] 在一个优选的实施方案中, 本发明涉及制备如通式 (IV) 所示的抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化物的方法, 其包括以下步骤:



[0202]



(IV)

[0203] Ab还原后, 与通式 (F) 偶联反应, 得到通式 (IV) 所示的化合物;

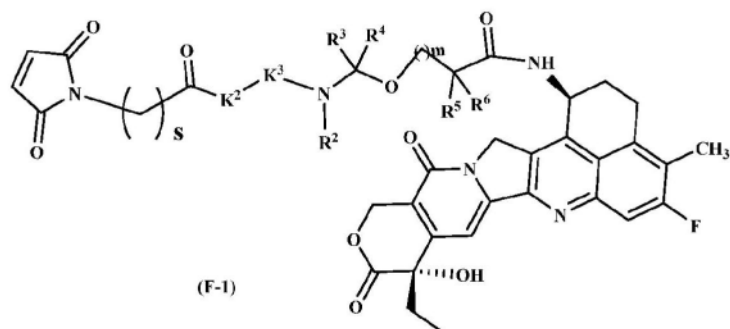
[0204] 其中:

[0205] Ab为如上述定义的抗BCMA抗体或其抗原结合片段;

[0206] W 、 K^2 、 K^3 、 $R^2 \sim R^6$ 、 m 和 y 如通式 (IV) 中所定义。

[0207] 在一个优选的实施方案中, 所述的通式 (F) 为通式 (F-1) 所示的化合物:

[0208]

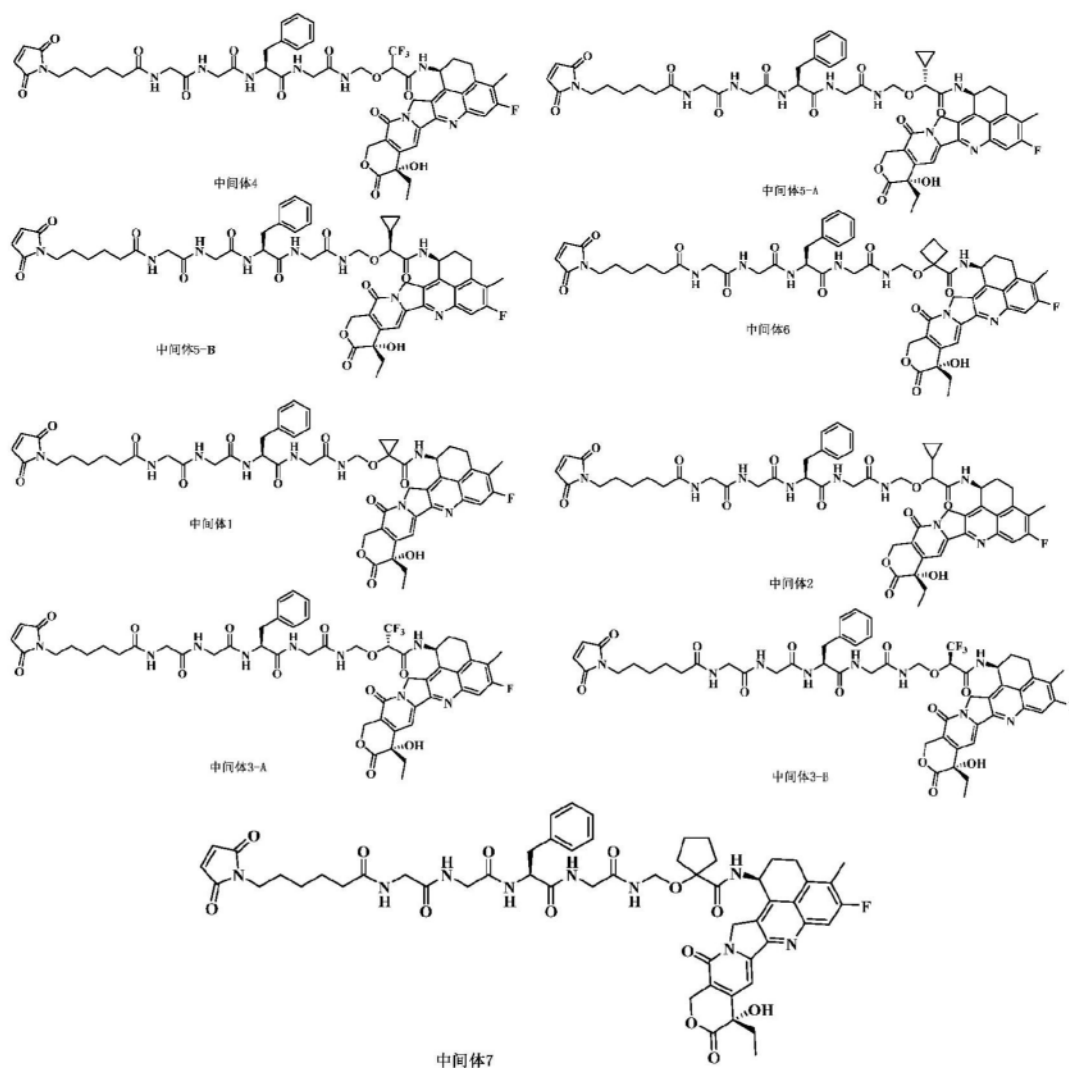


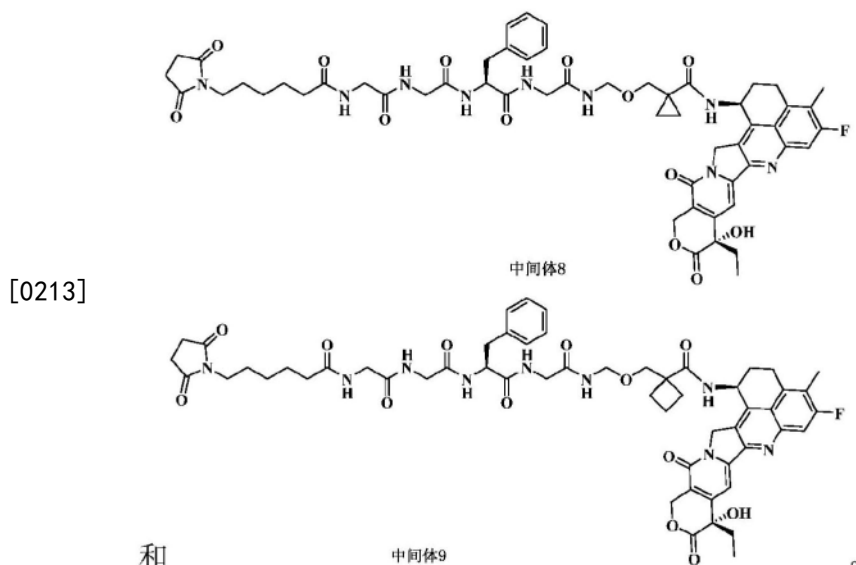
[0209] 或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、或其混合物形式,或其可药用的盐,

[0210] 其中, K^2 、 K^3 、 $R^2 \sim R^6$ 、 s 和 m 如前述-L₂-L₁-中所定义。

[0211] 在一个优选的实施方案中,通式(F)或通式(F-1)所示的化合物选自:

[0212]





[0214] 另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包含上述抗体药物偶联物或其药学上可接受的盐或溶剂化合物,和一种或多种可药用的赋形剂、稀释剂或载体。

[0215] 另一方面,本发明提供一种医药用途,本发明涉及抗BCMA抗体-药物偶联物或所述抗体-药物偶联物药学上可接受的盐或溶剂化合物或其药物组合物在用于治疗或预防BCMA介导的疾病或病症的用途。

[0216] 另一方面,本发明提供一种医药用途,本发明涉及抗BCMA抗体-药物偶联物或所述抗体-药物偶联物药学上可接受的盐或溶剂化合物或其药物组合物在用于制备治疗或预防BCMA介导的疾病或病症的药物中的用途。

[0217] 在本发明一个优选的方案中,所述BCMA介导的疾病或病症为癌症或自身免疫疾病,其中所述癌症优选为表达BCMA的癌症,更优选淋巴瘤、白血病或骨髓瘤,最优选多发性骨髓瘤;所述自身免疫疾病选自红斑狼疮,IgA肾病和风湿性关节炎。

[0218] 本发明的抗体药物偶联物及其可药用盐或溶剂化合物体外和体内肿瘤抑制作用明显,对正常细胞或组织的毒性低,具有良好的安全性,对血清中相关配体及可溶性BCMA均具有较好的竞争抑制效果;体外具有较好的药物稳定性,便于长时间保存和运输;同时具有良好的体内代谢活性,体内药效时间长,临床应用前景广阔。

[0219] 发明详述

[0220] 一、术语

[0221] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义,否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0222] 本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.Biol.Chem,243,p3558(1968)中所述。

[0223] 本发明所述的术语“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE,其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类Ig根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如IgG可分为

IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类Ig中第每类Ig都可以有 κ 链或 λ 链。

[0224] 在本发明中,本发明所述的抗体轻链可变区可进一步包含轻链恒定区,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

[0225] 在本发明中,本发明所述的抗体重链可变区可进一步包含重链恒定区,所述的重链恒定区包含人源或鼠源的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。

[0226] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(V区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区(C区)。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(VL)和重链可变区(VH)由3个CDR区4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1、LCDR2,和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1、HCDR2和HCDR3。本发明所述的抗体或抗原结合片段的VL区和VH区的CDR氨基酸残基在数量和位置符合已知的Kabat编号规则和Kabat或ABM定义规则(<http://bioinf.org.uk/abs/>)。

[0227] 术语“抗原呈递细胞”或“APC”是在其表面上展示与MHC复合的外来抗原的细胞。T细胞利用T细胞受体(TCR)识别这种复合物。APC的实例包括但不限于树突细胞(DC)、外周血单个核细胞(PBMC)、单核细胞、B淋巴母细胞和单核细胞衍生的树突细胞。

[0228] 术语“抗原呈递”是指APC捕获抗原和使它们能够被T细胞识别的过程,例如作为MHC-I/MHC-II偶联物的组分。

[0229] 术语“BCMA”包括由细胞天然表达的BCMA的任何变体或同种型。本发明的抗体可与得自非人物种的BCMA交叉反应。作为另一种选择,该抗体也可以是人BCMA特异性的,可不表现出与其他物种的交叉反应性。BCMA或其任何变体或同种型可从天然表达它们的细胞或组织中分离而得,或使用本领域通用以及本文所述的那些技术通过重组技术产生。优选地,抗BCMA抗体靶向具有正常糖基化模式的人源BCMA。

[0230] 术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、创建或分离的人抗体,所涉及的技术和方法在本领域中是熟知的,诸如:

[0231] 1. 从人免疫球蛋白基因的转基因、转染色体动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体;

[0232] 2. 从经转化以表达抗体的宿主细胞如转染瘤中分离的抗体;

[0233] 3. 从重组组合人抗体文库中分离的抗体;以及

[0234] 4. 通过将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列等方法制备、表达、创建或分离的抗体。

[0235] 此类重组人抗体包含可变区和恒定区,这些区域利用特定的由种系基因编码的人种系免疫球蛋白序列,但也包括随后诸如在抗体成熟过程中发生的重排和突变。

[0236] 术语“鼠源抗体”在本发明中为根据本领域知识和技能制备的对人BCMA的单克隆抗体。制备时用BCMA抗原注射试验对象,然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本发明一个优选的实施方案中,所述的鼠源BCMA抗体或其抗原结合片段,可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区,或进一步包含鼠源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其变体的重链恒定区。

[0237] 术语“人抗体”包括具有人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变所引入的突变)。然而,术语“人抗体”不包括这样的抗体,即其中已将衍生自另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)种系的CDR序列移植到人骨架序列上(即“人源化抗体”)。

[0238] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将小鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架中产生的抗体。人源化抗体可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分,从而诱导的强烈的免疫应答反应的缺点。为避免在免疫原性下降的同时引起活性的下降,可对所述的人抗体可变区可进行最少反向突变,以保持活性。

[0239] 术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”,是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体,可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体,要选建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤,然后从小鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因,再根据需要克隆人抗体的恒定区基因,将小鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入人载体中,最后在真核工业系统或原核工业系统中表达嵌合抗体分子。人抗体的恒定区可选自人源IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其变体的重链恒定区,优选包含人源IgG1、IgG2或IgG4重链恒定区,或者使用氨基酸突变后增强ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用)毒性的IgG1重链恒定区。

[0240] 术语“抗原结合片段”是指抗体的抗原结合片段及抗体类似物,其通常包括至少部分母体抗体(parental antibody)的抗原结合区或可变区(例如一个或多个CDR)。抗体片段保留母体抗体的至少某些结合特异性。通常,当基于摩尔来表示活性时,抗体片段保留至少10%的母体结合活性。优选地,抗体片段保留至少20%、50%、70%、80%、90%、95%或100%或更多的母体抗体对靶标的结合亲和力。抗原结合片段实例包括但不限于:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、线性抗体(linear antibody)、单链抗体、纳米抗体、结构域抗体和多特异性抗体。工程改造的抗体变体综述于Holliger和Hudson,2005,Nat.Biotechnol.23:1126-1136中。

[0241] “Fab片段”由一条轻链和一条重链的CH1及可变区组成。Fab分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。

[0242] “Fc”区含有包含抗体的CH2和CH3结构域的两个重链片段。两个重链片段由两个或多个二硫键并通过CH3结构域的疏水作用保持在一起。

[0243] “Fab'片段”含有一条轻链和包含VH结构域和CH1结构域以及CH1和CH2结构域之间区域的一条重链的部分,由此可在两个Fab'片段的两条重链之间形成链间二硫键以形成F(ab')₂分子。

[0244] “F(ab')₂片段”含有两条轻链和两条包含CH1和CH2结构域之间的恒定区的部分的重链,由此在两条重链间形成链间二硫键。因此,F(ab')₂片段由通过两条重链间的二硫键保持在一起的两个Fab'片段组成。

[0245] “Fv区”包含来自重链和轻链二者的可变区,但缺少恒定区。

[0246] 术语“多特异性抗体”按其最广义使用,涵盖具有多表位特异性的抗体。这些多特异性抗体包括但不限于:包含重链可变区VH和轻链可变区VL的抗体,其中该VH-VL单元具有

多表位特异性；具有两个或多个VL和VH区的抗体，每个VH-VL单元与不同的靶点或同一个靶点的不同表位结合；具有两个或更多个单可变区的抗体，每个单可变区与不同的靶点或同一个靶点的不同的表位结合；全长抗体、抗体片段、双抗体(diabodies)、双特异性双抗体和三抗体(triabodies)、已共价或非共价连接在一起的抗体片段等。

[0247] 术语“单链抗体”是由抗体的重链可变区VH和轻链可变区VL通过一段连接肽连接而成的单链重组蛋白，它是具有完全抗原结合位点的最小抗体片段。

[0248] 术语“结构域抗体片段”是仅含有重链可变区或轻链可变区链的具有免疫学功能的免疫球蛋白片段。在某些情况下，两个或多个VH区与肽接头共价连接以形成二价结构域抗体片段。二价结构域抗体片段的两个VH区可靶向相同或不同抗原。

[0249] 本发明的术语“与BCMA结合”，指能与人BCMA相互作用。

[0250] 本发明的术语“抗原结合位点”指本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

[0251] 术语“表位”是指抗原上与免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可以由相邻的氨基酸、或通过蛋白质的三级折叠而并列的不相邻的氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂后保持，而通过三级折叠形成的表位通常在变性溶剂处理后丧失。表位通常以独特的空间构象包括至少3-15个氨基酸。确定什么表位由给定的抗体结合的方法在本领域中是熟知的，包括免疫印迹和免疫沉淀检测分析等。确定表位的空间构象的方法包括本领域中的技术和本文所述的技术，例如X射线晶体分析法和二维核磁共振等。

[0252] 本发明所用的术语“特异性结合”、“选择性结合”是指抗体与预定的抗原上的表位结合。通常，当使用人BCMA作为分析物并使用抗体作为配体，在仪器中通过表面等离子体共振 (SPR) 技术测定时，抗体以大约低于 10^{-7} M或甚至更小的平衡解离常数(K_D)与预定的抗原结合，并且其与预定抗原结合的亲和力是其与预定抗原或紧密相关的抗原之外的非特异性抗原(如BSA等)结合的亲和力的至少两倍。术语“识别抗原的抗体”在本文中可以与术语“特异性结合的抗体”互换使用。

[0253] 术语“交叉反应”是指本发明的抗体与来自不同物种的BCMA结合的能力。例如，结合人BCMA的本发明的抗体也可以结合另一物种的BCMA。交叉反应性是通过在结合测定(例如SPR和ELISA)中检测与纯化抗原的特异性反应性，或与生理表达BCMA的细胞的结合或功能性相互作用来测量。确定交叉反应性的方法包括如本文所述的标准结合测定，例如表面等离子体共振 (SPR) 分析，或流式细胞术。

[0254] 术语“抑制”或“阻断”可互换使用，并涵盖部分和完全抑制/阻断这两者。配体的抑制/阻断优选地降低或改变无抑制或阻断的情况下发生配体结合时出现活性的正常水平或类型。抑制和阻断也旨在包括与抗BCMA抗体接触时，与未与抗BCMA抗体接触的配体相比，任何可测量的配体结合亲和力降低。

[0255] 术语“抑制生长”(例如涉及细胞)旨在包括细胞生长任何可测量的降低。

[0256] 术语“诱导免疫应答”和“增强免疫应答”可互换使用，并指免疫应答对特定抗原的刺激(即，被动或适应性的)。针对诱导CDC或ADCC的术语“诱导”是指刺激特定的直接细胞杀伤机制。

[0257] 本发明中所述的“ADCC”，即antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，

抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用,是指表达Fc受体的细胞通过识别抗体的Fc段直接杀伤被抗体包被的靶细胞。可通过对IgG上Fc段的修饰,增强或降低降低或消除抗体的ADCC效应功能。所述的修饰指在抗体的重链恒定区进行突变。

[0258] 生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法在现有技术中熟知和能找到,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8章和15章。如,小鼠可以用人BCMA或其片段免疫,所得到的抗体能被复性、纯化,并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的CDR区加上一个或多个FR区。人FR种系序列可以从ImMunoGeneTics (IMGT)的网站<http://imgt.cines.fr>得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001ISBN012441351上获得。

[0259] 本发明工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。相应抗体的cDNA序列可以克隆并重组至GS表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染CHO细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化,特别是在FC区的高度保守N端。通过表达与人源抗原特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化、收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体,也可以用常规方法去除,比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻,如-70℃,或者冻干。

[0260] 本发明的抗体指单克隆抗体。本发明所述的单克隆抗体(mAb),指由单一的克隆细胞株得到的抗体,所述的细胞株不限于真核的,原核的或噬菌体的克隆细胞株。单克隆抗体或抗原结合片段可以用如杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、合成技术(如CDR-grafting)、或其它现有技术进行重组得到。

[0261] “施用”、“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0262] “治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂,诸如包含本发明的任一种抗体,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如患者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个患都有的目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验确定,其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

[0263] 整个说明书和权利要求书中使用的术语“基本上由……组成”或其变形表示包括

所有所述元件或元件组,并且任选包括与所述元件类似或不同性质的其它元件,所述其它元件非显著改变指定给药方案、方法或组合物的基本性质或新性质。

[0264] 本发明所述的应用于某个对象的术语“天然存在的”是指这样的事实,即该对象可在自然界中发现。例如存在于可从自然界来源分离得到的生物体(包括病毒)、且未经人工在实验室中有意修饰的多肽序列或多核苷酸序列即是天然存在的。

[0265] “有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化:如待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

[0266] “外源性”指要据背景在生物、细胞或人体外产生的物质。

[0267] “内源性”指根据背景在细胞、生物或人体内产生的物质。

[0268] “同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如如果两个DNA分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时,那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同一性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数 $\times 100\%$ 的函数。例如,在序列最佳比对时,如果两个序列中的10个位置有6个匹配或同源,那么两个序列为60%同源。一般而言,当比对两个序列而得到最大的同一性百分率时进行比较。

[0269] 本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这类名称都包括其后代。因此,单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物,而不考虑转移数目。还应当理解的是,由于故意或非有意的突变,所有后代在DNA含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如,“任选包含1-3个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

[0270] “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述抗体或其抗原结合片段,以及其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

[0271] “可药用盐”是指本发明抗体-药物偶联物的盐,这类盐用于哺乳动物体内时具有安全性和有效性,其具有应有的生物活性。本发明抗体-药物偶联物至少含有一个氨基,因此可以与酸形成盐,可药用盐的非限制性实例包括:盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、柠檬酸盐、乙酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐、草酸盐、硝酸盐、梨酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、水杨酸盐、柠檬酸氢盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、甲酸盐、苯酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐。

[0272] “溶剂化合物”指本发明的抗体-药物偶联物化合物与一种或多种溶剂分子形成可药用的溶剂化合物,溶剂分子的非限制性实例包括:水、乙醇、乙腈、异丙醇、乙酸乙酯。

[0273] “细胞毒性药物”在用于本发明时指抑制细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

[0274] “微管蛋白抑制剂”是指通过抑制微管蛋白的聚合或促进微管蛋白的集合而干扰细胞有丝分裂过程,从而发挥抗肿瘤效果的一类化合物。其非限制性实例包括:美登素类、

卡利奇霉素、紫杉烷类、长春新碱、秋水仙碱、尾海兔素/奥瑞他汀/单甲基奥瑞他汀E (MMAE)/单甲基奥瑞他汀F (MMAF)。

[0275] “接头”指包含是抗体共价附着于药物的共价键或原子链的化学模块。接头的非限制性实例包括：亚芳基、亚杂芳基、PEG、聚亚甲基氧基、琥珀酸酯、琥珀酰胺、二乙醇酸酯、丙二酸酯和己酰胺。

[0276] “药物载荷” (DAR) 由y表示,即通式 (A) 中每个抗体的平均细胞毒性药物数。本发明中的药物荷载范围可以为每个抗体1-20个细胞毒性药物 (D)。通式 (A) 的抗体-药物偶联物为偶联有一定范围 (1-20个) 细胞毒性药物的抗体的集合。来自偶联反应的抗体-药物偶联物中的药物载荷 (DAR) 可通过常规手段表征,诸如质谱,HPLC和ELISA等。通过这些手段可以测定抗体-药物偶联物在y值上的定量分布。

[0277] 二、缩写

[0278] MC为6-马来酰亚氨基己酰基

[0279] MMAF为单甲基奥瑞他汀E的变体,其在分子的C-末端处有苯丙氨酸 (MW 731.5)

具体实施方式

[0280] 以下结合实施例用于进一步描述本发明,但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如冷泉港的抗体技术实验手册,分子克隆手册;或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0281] 实施例1 抗原准备

[0282] 编码带His标签的人BCMA胞外区 (BCMA-His) 蛋白由SinoBiologics公司合成 (Cat No.:10620-H08H)。

[0283] BCMA-His序列:

[0284] MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPPLTCQRYCNASVTNSVKGT
NAHHHHHHHHHHHHH

[0285] 实施例2 鼠杂交瘤及抗体序列的获得

[0286] 用人抗原BCMA-His进行动物免疫,共5只Balb/c和5只A/J小鼠,雌性,10周龄,使用Sigma完全弗氏佐剂 (CFA) 和Sigma不完全弗氏佐剂 (IFA),免疫原和免疫佐剂以1:1的比例充分混合乳化,制成稳定“油包水”液体;注射剂量25μg/200μL/小鼠。

[0287] 表1.免疫方案

[0288]

第1天	第一次免疫,完全弗氏佐剂。
第21天	第二次免疫,不完全弗氏佐剂。
第35天	第三次免疫,不完全弗氏佐剂。
第42天	采血和血清效价检测 (3免血)
第49天	第四次免疫,不完全弗氏佐剂。
第56天	采血和血清效价检测 (4免血)

[0289] 对免疫小鼠血清使用如实施例3所述的间接ELISA法评估血清效价及结合细胞表面抗原的能力,对照效价检测情况 (大于10万倍稀释度) 决定启动细胞融合。选择血清效价、亲和力和FACS结合强的免疫小鼠进行一次终免疫后处死小鼠,取脾细胞和SP2/0骨髓瘤细

胞融合后铺板获得杂交瘤,通过间接ELISA筛选到目标杂交瘤,并通过有限稀释法建株为单克隆细胞株。得到的阳性抗体株进一步使用间接ELISA进行筛选,从而选定结合重组蛋白的杂交瘤。收集对数生长期杂交瘤细胞,用Trizol (Invitrogen,15596-018)提取RNA并反转录(PrimeScript™Reverse Transcriptase,Takara#2680A)。将反转录得到的cDNA采用小鼠Ig-引物组(Novagen,TB326 Rev.B 0503)进行PCR扩增后测序,最终得到鼠源抗体M1的序列。

[0290] 鼠单抗M1的重链和轻链可变区序列如下:

M1 HCVR

QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYSFSDYEMHWVRQTPVHGLEWIGGI
HPGSGGSAYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRLDYGYGYS
WAWFPYWGQGTLLTVSA

[0291]

SEQ ID NO: 1

M1 LCVR

EILLTQSPAIIHTSPGEKVTITCSASSSVIYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLASG
VPARFSGSGSGTSFSFTINSMEAEDVATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 2

[0292] 表2.鼠单抗M1的重链和轻链可变区CDR序列

[0293]

名称	序列	编号
HCDR1	GYSFSDYEMH	SEQ ID NO:3
HCDR2	GIHPGSGGSAYNQKFKG	SEQ ID NO:4
HCDR3	TRLDYGYSWAWFPY	SEQ ID NO:5
LCDR1	SASSSVIYMN	SEQ ID NO:6
LCDR2	GISNLAS	SEQ ID NO:7
LCDR3	QQRSSYPLT	SEQ ID NO:8

[0294] 实施例3 抗体的体外结合活性检测方法

[0295] (1) 体外间接ELISA结合实验:

[0296] 用pH7.4的PBS将BCMA His蛋白(Sino Biological Inc.,cat#10620-H08H)稀释至1 μg/ml浓度,以100 μl/孔的体积加入96孔高亲和力酶标板中,于4℃冰箱孵育过夜(16-20小时)。用PBST(pH7.4 PBS含0.05% Tween-20)洗板4次后,加入用PBST稀释的3%牛血清白蛋白(BSA)封闭液150 μl/孔,室温孵育1小时进行封闭。封闭结束后,弃去封闭液,并用PBST缓冲液洗板4次。

[0297] 用含3% BSA的PBST稀释待测抗体,1 μM起始,10倍梯度,10个剂量,以100 μl/孔加到酶标板中,放于室温孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板4次,加入100 μl/孔用含3% BSA的PBST稀释的HRP标记羊抗人二抗(Abcam,cat#ab97225),室温孵育1小时。用PBST洗板4次后,加入100 μl/孔TMB显色底物(Cell Signaling Technology,cat#7004S),于室温避光孵育1分钟,加入100 μl/孔终止溶液(Cell Signaling Technology,cat#7002S)终止反应,用酶标仪(BioTek,型号Synergy H1)在450nm处读取吸收值,分析数据。做浓度信号值曲线分析结果,如下表所示:

[0298] 表3.鼠抗体对人BCMA抗原的亲和力(EC₅₀值)

[0299]	鼠抗体	与人BCMA His抗原结合EC ₅₀ (nM)
	M1	0.53

[0300] (2) 体外细胞结合实验:

[0301] 收集培养好的BCMA高表达细胞(过表达BCMA的HEK-293T细胞和表达BCMA的肿瘤细胞,NCI-H929),调节细胞密度后分铺于96孔U底板,每孔 1×10^5 至 2×10^5 个细胞。1200g,5min离心,去上清,添加100u1已梯度稀释的抗体溶液或小鼠免疫血清,4°C度孵育60min;1200g,5min离心,去上清,PBS洗细胞2次后,添加荧光标记二抗(PE-GAM:山羊抗鼠单抗;或PE-GAH:山羊抗人单抗)100u1每孔,4°C度孵育60min。1200g,5min离心去上清。PBS洗细胞2次后,再重悬于PBS,使用流式细胞计数仪检测信号,并作浓度曲线分析结果。

[0302] 表4.鼠抗体对表达BCMA的细胞的亲和力(EC₅₀值)

[0303]	鼠抗体	与 HEK-293T/BCMA 细胞结合 EC ₅₀ (nM)	与 NCI-H929 细胞结合 EC ₅₀ (nM)
	M1	115.3	128.2

[0304] 实施例4 小鼠抗体人源化实验

[0305] 鼠源抗人BCMA单克隆抗体人源化如本领域许多文献公示的方法进行。简言之,使用人恒定结构域替代亲本(鼠源抗体)恒定结构域,根据鼠源抗体和人抗体的同一性选择人种抗体序列,本发明将鼠源抗体M1进行人源化。

[0306] 在所获得的鼠源抗体VH/VL CDR典型结构的基础上,将重、轻链可变区序列与人源抗体种系数据库比较,获得同一性高的人种系模板。

[0307] 将鼠源抗体M1的CDR区移植到选择好的相应人源化模板上。然后,以鼠源抗体的三维结构为基础,对包埋残基、与CDR区有直接相互作用的残基,以及对VL和VH的构象有重要影响的残基进行回复突变,并对CDR区化学不稳定氨基酸残基优化,经表达测试和回复突变数量对比,选择和设计了人源化重链可变区HCVR的序列,序列如下:

HCVR1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGG
IHPGSGGSAYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTRLDYG
YSWAWFPYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO: 9

HCVR2

[0308] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGI
HPGSGGSAYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRLDYGYS
WAWFPYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO: 10

HCVR3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGI
HPGSGGSAYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCTRLDYGYS
WAWFPYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO: 11

[0309] 选择和设计了人源化轻链可变区LCVR的序列,序列如下:

LCVR1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQAPRLLIYGISNLAS
[0310] GIPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 12

LCVR2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQSPKIWIYGISNLAS
GVPARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 13

[0311] LCVR3

EILLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVIYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLAS
GVPARFSGSGSGTSFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 14

[0312] 将设计的重链和轻链可变区序列分别与人IgG1重链和人抗体轻链恒定区序列连接,示例性的重链和轻链恒定区序列分别如下所示:

IgG1 C

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK

[0313]

SEQ ID NO: 22

Ig kappa C

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID NO: 23

[0314] 得到重链和轻链序列如下：

Ab1 HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWMGG
IHPGSGGSAYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCTR LDYG
YSWAWFPYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0315]

SEQ ID NO: 15

Ab2 HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGI
HPGSGGSAYNQKFKGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCTRLDYGYS
WAWFPYWGQGTTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 16

Ab3 HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSDYEMHWVRQAPGQGLEWIGGI
HPGSGGSAYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCTRLDYGYS
WAWFPYWGQGTTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0316]

SEQ ID NO: 17

Ab1 LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQAPRLLIYGISNLAS
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 18

Ab2 LC

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVIYMNWYQQKPGQSPKIWIYGISNLAS
GVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 19

Ab3 LC

EILLTQSPATLSLSPGERATLTCSASSSVIYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLAS
GVPARFSGSGSGTSFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPLTFGGGKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

[0317] 表5. 抗体及其重链、轻链、可变区的序列编号

[0318]	人源化抗体编号	重链/轻链编号	重链/轻链可变区编号
	Ab1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 9
		SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 12
	Ab2	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 10
		SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 13
	Ab3	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 11
		SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 14

[0319] 根据以上各人源化抗体轻链和重链的氨基酸序列合成cDNA片段,插入到pcDNA3.1表达载体 (Life Technologies Cat.No.V790-20) 中。将表达载体和转染试剂PEI (Polysciences, Inc. Cat.No.23966) 以1:2的比例转染HEK293细胞 (Life Technologies Cat.No.11625019), 并置于CO₂孵育箱中孵育4-5天。收取细胞培养液,离心过滤后上样到抗体纯化亲和柱,经磷酸缓冲液洗柱、甘氨酸盐酸缓冲液 (pH2.7 0.1M Gly-HCl) 洗脱、1M Tris盐酸pH 9.0中和、以及磷酸缓冲液透析,得到本发明的人源化抗体蛋白。

[0320] 实施例5 体外结合亲和力和动力学实验

[0321] 使用实施例3 (1) 中所述的体外间接ELISA结合实验测定的各人源化抗体对人BCMA抗原的亲和力 (EC₅₀) 如下表所示:

[0322] 表6. 各人源化抗体对人BCMA抗原的亲和力 (EC₅₀)

[0323]	人源化抗体	抗原	亲和力 EC ₅₀ (nM)
	Ab1	BCMA-His	0.022
	Ab2		0.033
	Ab3		0.034

[0324] 使用实施例3 (2) 中所述的体外细胞结合实验测定的各人源化抗体对NCI-H929肿瘤细胞的亲和力 (EC₅₀) 如下表所示:

[0325] 表7. 各人源化抗体对NCI-H929肿瘤细胞的亲和力 (EC₅₀)

[0326]	人源化抗体	细胞	亲和力 EC ₅₀ (nM)
	Ab1	NCI-H929	4.6
	Ab2		3.5
	Ab3		3.9

[0327] 实施例6 抗体的内吞作用

[0328] 检测本发明抗体结合BCMA后是否能够和人BCMA共同内吞入细胞内,用NCI-H929 (ATCC保藏号CRL-9068) 进行评估。NCI-H929细胞使用胰酶消化 (先用PBS清洗一遍,37°C、2min左右),收集细胞并用预冷的FACS缓冲液重悬,调整细胞浓度为1×10⁶个/mL。取EP管,加入1mL细胞悬液,1500rpm离心5分钟后去上清,加入1mL已经配制好的待测抗体重悬细胞,抗体的终浓度均为20μg/ml,4度摇床孵育1h,离心弃上清 (4°C、1500rpm×5min),FACS缓冲液洗涤两次,去上清。每管加入100μL荧光二抗工作液重悬细胞,4°C摇床孵育30min,离心弃上清 (4°C、1500rpm×5min),FACS缓冲液洗涤两次,去上清。每管加入1.0mL预热的NCI-H929

细胞完全培养基重悬细胞并混匀,分装为4管,每管200 μ L,分别为0min组,空白组,30min组和2h组,取出0min及blank置于冰上,其余放置于37 $^{\circ}$ C培养箱,分别内吞30min、2h,在相应时间点取出EP管,置于冰上预冷5min,所有处理组离心弃上清(4 $^{\circ}$ C、1500rpm $\times$ 5min),用FACS缓冲液洗涤一次,去上清。去除0min组外所有处理组EP管中加入250 μ L剥离缓冲液(strip buffer),室温孵育8min,离心弃上清(4 $^{\circ}$ C、1500rpm $\times$ 5min),FACS缓冲液洗涤两次,去上清。所有处理组加入100 μ L免疫染色固定液,4 $^{\circ}$ C放置30min以上,用流式细胞仪DxFlex进行检测。BCMA抗体内吞百分比=(各个时间点荧光强度值-空白组平均荧光强度值)/零点时的平均荧光轻度值-空白组平均荧光强度值。结果见下表:

[0329] 表8. 抗体在NCI-H929肿瘤细胞中的内吞作用(EC_{50})

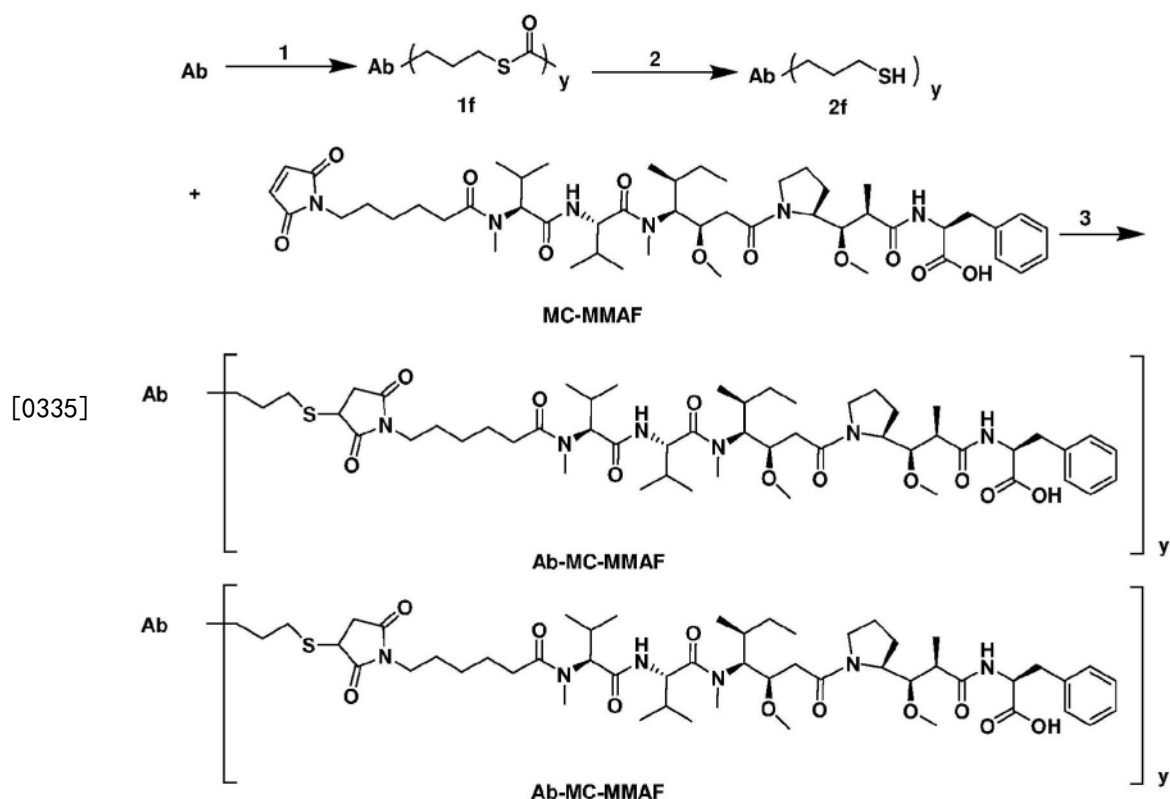
人源化抗体	细胞	内吞效率 %	
		0.5小时	2小时
[0330]	Ab1	36.6	49.5
	Ab2	36.7	48
	Ab3	35.5	45.7
	J6M0	ND	38.9

[0331] ND=未确定

[0332] 结果显示,与抗BCMA抗体J6M0(描述于美国专利9,273,141)相比,本发明抗体具有更高的内吞效率,能够快速内化。

[0333] 实施例7 抗体偶联MC-MMAF

[0334] 本发明抗体具有细胞亲和活性且具有细胞内吞活性,使得本发明抗体适合与药物偶联形成抗体-药物偶联物用于治疗BCMA介导的疾病。偶联过程见下式,其中Ab代表Ab2或Ab3抗体:



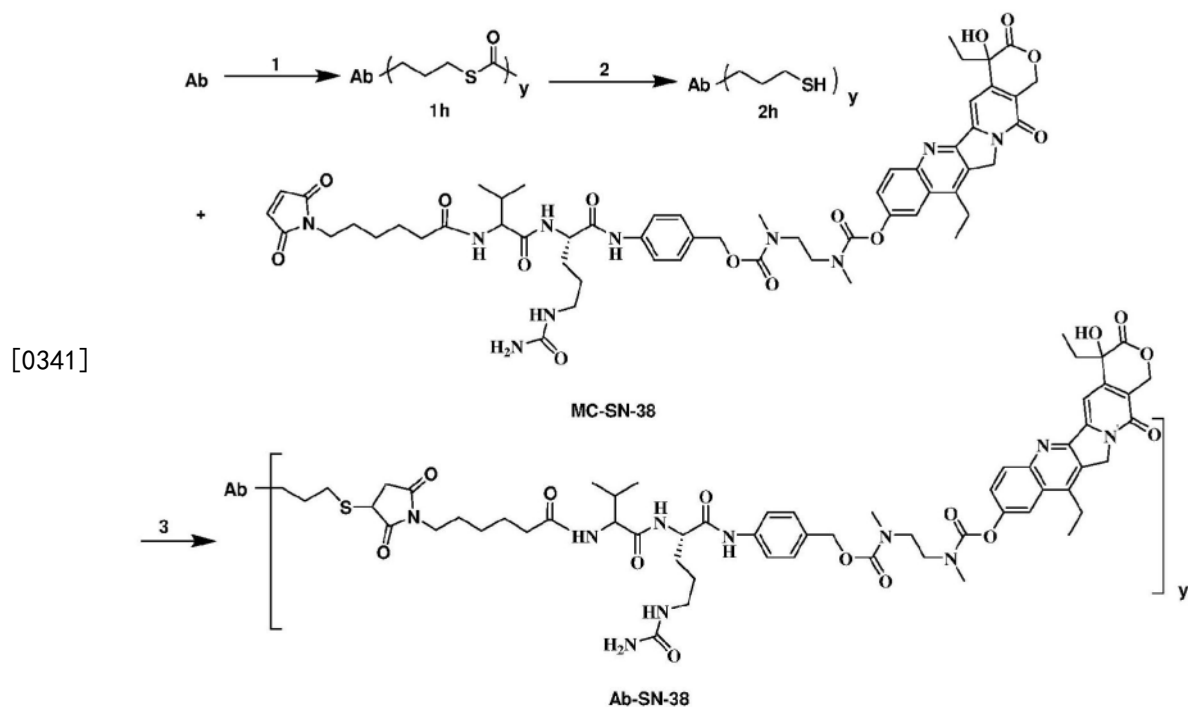
[0336] 第一步将硫代乙酸S-(3-醛丙基)酯(0.7mg, 5.3mol)溶解于0.9mL乙腈溶液备用。向抗体pH=4.3的乙酸/乙酸钠缓冲液(10.35mg/mL, 9.0mL, 0.97mol)加入上述预制的硫代乙酸S-(3-羟基丙基)酯的乙腈溶液,然后滴加1.0mL的氰基硼氢化钠(14.1mg, 224mol)的水溶液,于25℃下振荡反应2小时。反应结束后,用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH6.5的0.05M的PBS溶液)后,得产物1f溶液,浓缩到10mg/mL后直接进行下一步反应。

[0337] 第二步,向1f溶液(11.0mL)中加入0.35mL的2.0M盐酸羧胺溶液,于25℃下振荡反应30分钟后,将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH6.5的0.05M的PBS溶液)后,得到产物2f溶液(浓度6.17mg/mL, 14.7mL)。

[0338] 第三步,将化合物MC-MMAF(1.1mg, 1.2mol, 采用PCT专利W02005081711公开的方法制备得到)溶解于0.3mL乙腈中,加入2f溶液(浓度6.17mg/mL, 3.0mL)中,于25℃下振荡反应4小时后,将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH6.5的0.05M的PBS溶液)后,在无菌条件下用滤器过滤后得到产物Ab-MC-MMAF。使用HIC-HPLC测定产物ADC2(Ab2-MC-MMAF)的DAR平均值 γ 为4,将抗体-药物偶联物的PBS缓冲液(3.7mg/mL, 4.7mL)于4℃冷藏。采用上述方法制备得到产物ADC3(Ab3-MC-MMAF)。使用HIC-HPLC测定产物ADC3(Ab3-MC-MMAF)的DAR平均值 γ 为4.1,将抗体-药物偶联物的PBS缓冲液(3.5mg/mL, 5.0mL)于4℃冷藏。

[0339] 实施例8 抗体偶联SN-38

[0340] 通过以下偶联过程制备抗体偶联药物,其中Ab代表Ab2:



[0342] 第一步将硫代乙酸S-(3-醛丙基)酯(0.7mg, 5.3mol)溶解于0.9mL乙腈溶液备用。向抗体pH=4.3的乙酸/乙酸钠缓冲液(10.35mg/mL, 9.0mL, 0.97mol)加入上述预制的硫代乙酸S-(3-羟基丙基)酯的乙腈溶液,然后滴加1.0mL的氰基硼氢化钠(14.1mg, 224mol)的水溶液,于25℃下振荡反应2小时。反应结束后,用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH6.5的0.05M的PBS溶液)后,得产物1h溶液,浓缩到10mg/mL后直接进行下一步反应。

[0343] 第二步,向1h溶液(11.0mL)中加入0.35mL的2.0M盐酸羧胺溶液,于25℃下振荡反应30分钟后,将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH6.5的0.05M的PBS溶液)

后,得到产物2h溶液(浓度6.2mg/mL,15.0mL),浓缩到约10mg/mL后用于下一步反应。

[0344] 第三步,将化合物MC-SN-38(1.3mg,1.2mol)溶解于0.3ml的乙腈中,加入2h溶液(浓度6.2mg/mL,3.0mL)中,于25℃下振荡反应4小时后,将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化(洗脱相:pH6.5的0.05M的PBS溶液)后,在无菌条件下用滤器过滤后得到产物Ab-SN-38抗体-药物偶联物的PBS缓冲液(3.7mg/mL,4.7mL),于4℃冷藏。采用紫外法测定平均值y。将装有琥珀酸钠缓冲液的比色皿分别置于参比吸收池和样品测定吸收池中后,扣除溶剂空白后,再将装有供试品溶液的比色皿置于样品测定吸收池中,测定280nm和370nm处吸光度。

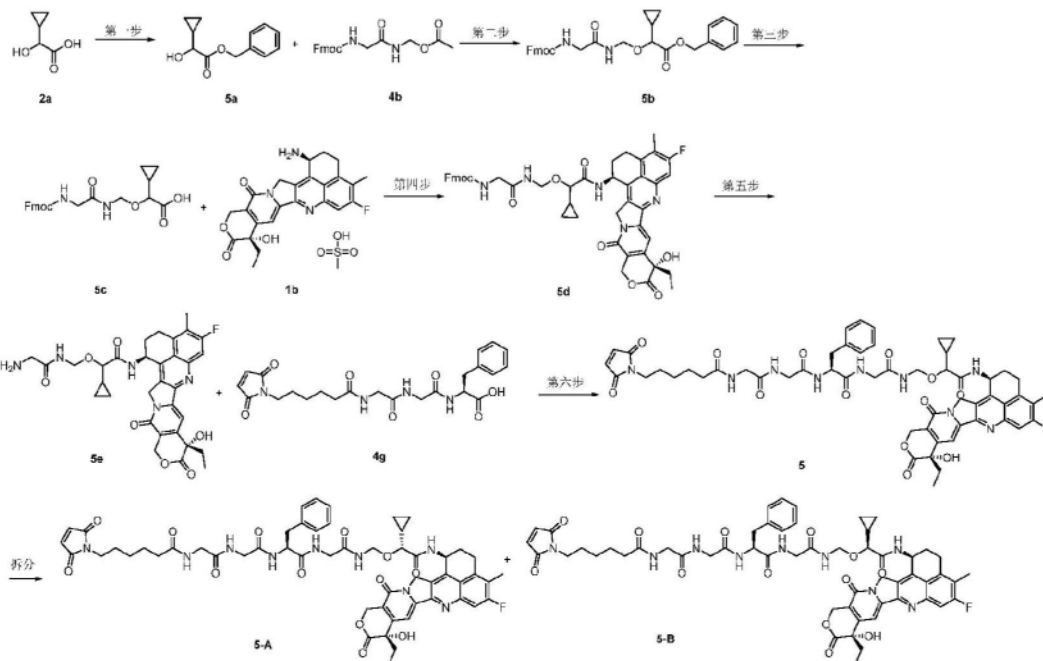
[0345] 数据处理:

[0346] 通过建立标准曲线,测定280nm波长下的吸收,确定抗体含量C_{mab},测定370nm波长下的吸收,确定小分子含量C_{Drug}。

[0347] 药物载量平均值 $y = C_{Drug}/C_{mab}$ 。

[0348] 通过上述方法测定Ab2-SN-38抗体-药物偶联物的DAR平均值y为3.9。

[0349] 实施例9 抗体偶联依喜替康衍生物



[0351] 第一步,将2a(2g,17.2mmol)溶于75mL乙腈中,依次加入碳酸钾(9.27g,67.2mmol)、溴化苄(20mL,167.2mmol)和四丁基碘化铵(620mg,1.68mmol)。将反应液室温搅拌48小时,通过硅藻土过滤,滤饼用乙酸乙酯(20mL)淋洗,合并滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物,得到产物5a(3.2g,产率:90.1%)。

[0352] 第二步,将5a(181.3mg,0.879mmol)和4b(270mg,0.733mmol)加入反应瓶,加入6mL四氢呋喃,氩气置换三次,冰水浴降温至0-5℃,加入叔丁醇钾(164mg,1.46 mmol),撤去冰浴,升至室温搅拌40分钟,加入15mL冰水,用乙酸乙酯(40mL×2)和氯仿(20mL×5)萃取,合并有机相并浓缩。所得残余物溶于6mL二氧六环中,加入3mL水,加入碳酸氢钠(73.8mg,0.879mmol)和氯甲酸-9-苄基酯(190mg,0.734mmol),室温搅拌2小时。加入30mL水,用乙酸乙酯(20mL×3)萃取,有机相用饱和氯化钠溶液(30mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩。用硅胶柱色谱法以展开剂体系C纯化所得残余物,得到产物5b 10-环丙基-1-(9H-苄-9-基)-3,6-二氧代-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸苄酯(73mg,产率:19.4%)。

[0353] MS m/z (ESI) : 515.0 [M+1]。

[0354] 第三步, 将5b (30mg, 0.058mmol) 溶于6.75mL四氢呋喃和乙酸乙酯 (V:V=2:1) 混合溶剂中, 加入钨碳 (18mg, 含量10%, 干型), 氢气置换三次, 室温搅拌反应1小时。反应液用硅藻土过滤, 滤饼用乙酸乙酯淋洗, 滤液浓缩, 得到粗品产物5c 10-环丙基-1-(9H-茛-9-基)-3,6-二氧化-2,9-二氧杂-4,7-二氮杂十一-11-酸 (20mg), 产品不经纯化直接进行下一步反应。

[0355] MS m/z (ESI) : 424.9 [M+1]。

[0356] 第四步, 将1b (15mg, 28.2 μ mol) 加入反应瓶, 加入1.5mL N,N-二甲基甲酰胺, 氩气置换三次, 冰水浴降温至0-5°C, 滴加一滴三乙胺, 加入粗品5c (20mg, 47.1 μ mol), 加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (25.4mg, 86.2 μ mol), 冰浴搅拌反应40分钟。加入15mL水, 用乙酸乙酯 (20mL $\times$ 3) 萃取, 合并有机相。有机相用饱和氯化钠溶液 (20mL $\times$ 2) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩。用薄层层析以展开剂体系B纯化所得残余物, 得到标题产物5d (9H-茛-9-基) 甲基 (2-(((1-环丙基-2-(((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基) 氨基)-2-氧代乙氧基) 甲基) 氨基)-2-氧代乙基) 氨基甲酸酯 (23.7mg, 产率: 78.9%)。

[0357] MS m/z (ESI) : 842.1 [M+1]。

[0358] 第五步, 将5d (30mg, 35.7 μ mol) 溶于3mL二氯甲烷中, 加入1.5mL二乙胺, 室温搅拌2小时。反应液减压浓缩, 加入1.5mL甲苯并减压浓缩, 重复两次。向残余物中加入4.5mL正己烷打浆, 静置后倾倒入上层清液, 保留固体。将固体残余物减压浓缩, 油泵拉干得到粗品产物5e 2-((2-氨基乙酰氨基) 甲氧基)-2-环丙基-N-((1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-1-基) 乙酰胺 (23mg), 产品不经纯化直接用于下一步反应。

[0359] MS m/z (ESI) : 638.0 [M+18]。

[0360] 第六步, 将粗品5e (20mg, 32.3 μ mol) 溶于1mL N,N-二甲基甲酰胺, 氩气置换三次, 冰水浴降温至0-5°C, 加入4g (31.8mg, 67.3 μ mol) 的0.5mLN,N-二甲基甲酰胺溶液, 加入4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化吗啉盐 (27.8mg, 94.3 μ mol), 冰浴搅拌反应10分钟, 撤去冰浴, 升至室温搅拌1小时, 反应生成化合物5。反应液进行高效液相色谱法纯化 (分离条件: 色谱柱: XBridge Prep C18 OBD 5 μ m 19 $\times$ 250mm; 流动相: A-水 (10mmol NH₄OAc) : B-乙腈, 梯度洗脱, 流速: 18mL/min), 收集其相应组分, 减压浓缩, 得到产物5-A和5-B (3.6mg, 2.6mg)。

[0361] MS m/z (ESI) : 1074.4 [M+1]。

[0362] 单一构型化合物5-A (较短保留时间) :

[0363] UPLC分析: 保留时间1.14分钟, 纯度: 85% (色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1 $\times$ 50mm, 流动相: A-水 (5mmol NH₄OAc) , B-乙腈)。

[0364] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ 8.60 (t, 1H) , 8.51-8.49 (d, 1H) , 8.32-8.24 (m, 1H) , 8.13-8.02 (m, 2H) , 8.02-7.96 (m, 1H) , 7.82-7.75 (m, 1H) , 7.31 (s, 1H) , 7.26-7.15 (m, 4H) , 6.99 (s, 1H) , 6.55-6.48 (m, 1H) , 5.65-5.54 (m, 1H) , 5.41 (s, 2H) , 5.35-5.15 (m, 3H) , 4.74-4.62 (m, 2H) , 4.54-4.40 (m, 2H) , 3.76-3.64 (m, 4H) , 3.62-3.48 (m, 2H) , 3.20-3.07 (m, 2H) ,

3.04-2.94 (m, 2H), 2.80-2.62 (m, 2H), 2.45-2.30 (m, 3H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.93-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 5H), 0.87 (t, 3H), 0.64-0.38 (m, 4H)。

[0365] 单一构型化合物5-B (较长保留时间)：

[0366] UPLC分析：保留时间1.16分钟，纯度：89% (色谱柱：ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1*50mm，流动相：A-水 (5mmol NH₄OAc)，B-乙腈)。

[0367] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ 8.68-8.60 (m, 1H), 8.58-8.50 (m, 1H), 8.32-8.24 (m, 1H), 8.13-8.02 (m, 2H), 8.02-7.94 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.13 (m, 4H), 6.99 (s, 1H), 6.55-6.48 (m, 1H), 5.60-5.50 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.35-5.15 (m, 3H), 4.78-4.68 (m, 1H), 4.60-4.40 (m, 2H), 3.76-3.58 (m, 4H), 3.58-3.48 (m, 1H), 3.20-3.10 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 2H), 2.80-2.72 (m, 2H), 2.45-2.30 (m, 3H), 2.25-2.13 (m, 2H), 2.13-2.04 (m, 2H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.91-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 5H), 0.91-0.79 (m, 3H), 0.53-0.34 (m, 4H)。

[0368] 其他中间体的制备方法参考中间体5。

[0369] 在37°C条件下，向抗体Ab2的PBS缓冲水溶液 (pH=6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液；7.3ml, 13.8mg/ml, 0.681 μ mol) 加入配置好的三 (2-羧乙基) 磷的水溶液 (10mM, 0.347mL, 3.47 μ mol)，置于水浴振荡器，于37°C振荡反应3小时，停止反应；将反应液用水浴降温至25°C，稀释至14.0ml，并取出3.3ml溶液往下反应。

[0370] 将化合物5-A (3.0mg, 3.72 μ mol) 溶解于0.15mL DMSO中，加入到上述3.3ml溶液中，置于水浴振荡器，于25°C下振荡反应3小时，停止反应。将反应液用Sephadex G25凝胶柱脱盐纯化 (洗脱相：pH为6.5的0.05M的PBS缓冲水溶液，含0.001M的EDTA)，得到Ab-依喜替康衍生物的示例性产物ADC1 (化合物26) 的PBS缓冲液 (1.35mg/mL, 13mL)，于4°C冷冻储存。

[0371] 采用紫外法测定平均值y。将装有琥珀酸钠缓冲液的比色皿分别置于参比吸收池和样品测定吸收池中后，扣除溶剂空白后，再将装有供试品溶液的比色皿置于样品测定吸收池中，测定280nm和370nm处吸光度。

[0372] 数据处理：

[0373] 通过建立标准曲线，测定280nm波长下的吸收，确定抗体含量C_{mab}，测定370nm波长下的吸收，确定小分子含量C_{Drug}。

[0374] 药物载量平均值y=C_{Drug}/C_{mab}。

[0375] 通过以上方法测定示例性产物ADC1 (化合物26，为7.6)。通过UV-HPLC纯化获得ADC1-1 (y=4)、ADC1-2 (y=6)、ADC1-3 (y=8) 的样品。

[0376] 其他抗体药物偶联物的制备方法参考ADC1。

[0377] 实施例10 抗体药物偶联物对NCI-H929肿瘤细胞的杀伤作用

[0378] 为检测本发明的抗体-药物偶联物对肿瘤细胞的杀伤作用，用NCI-H929细胞 (ATCC保藏号CRL-9068) 进行评估。收集NCI-H929细胞，离心计数后用完全培养基调整细胞密度为0.44 $\times 10^6$ 个/mL，铺于白色96孔板中间60个孔，每孔90 μ L，细胞数为40000，其余边孔加入100 μ L PBS，细胞板放入37°C，5%CO₂培养箱培养过夜。实验第二天，用PBS在96孔V型底板中配制抗体-药物偶联物溶液，浓度为15 μ g/mL起始，3倍稀释，9个浓度，配制完成后加入到白色96孔板中，每孔10 μ L，两复孔，将细胞板放入37°C，5%CO₂培养箱中继续培养72小时。实验

第五天,检测读数:取出细胞培养板,平衡至室温后,每孔加入50 μ L CTG溶液(Promega G7573),振荡混匀后放于暗处静置10分钟后,使用酶标仪的发光程序进行检测。使用GraphPad Prims软件计算EC50值。实验结果如下表所示:

[0379] 表9. 抗体偶联药物对NCI-H929肿瘤细胞的杀伤活性 (EC₅₀)

[0380]	人源化抗体	细胞	细胞杀伤 (EC ₅₀ ng/mL)
	ADC2 (实施例7, y=4)	NCI-H929	9
	ADC3 (实施例7, y=4.1)		8
	ADC1-3 (实施例9, y=8)		64.3

[0381] 实施例11 抗体药物偶联物的抑瘤效果

[0382] 为进一步研究抗体-药物偶联物对体内形成的肿瘤的杀伤作用,在小鼠体内用NCI-H929细胞形成移植瘤后,评估本发明抗体-药物偶联物的抗肿瘤效果。将 9×10^6 个NCI-929细胞注射到8周龄的免疫缺陷的裸鼠(NOD-SCID)皮下,8天后开始通过静脉注射注射抗体-药物偶联物ADC2(Ab2-MC-MMAF,实施例7, y=4)和ADC1-3(实施例9, y=8),每1周注射一次,剂量为1mg/kg。对照采用人IgG1蛋白,剂量为1mg/kg。对照组或给药组每组5只小鼠。通过测量肿瘤体积计算抑瘤率。抑瘤率=100%-(第14天给药组肿瘤体积-第0天给药组肿瘤体积)/(第14天对照组肿瘤体积-第0天对照组肿瘤体积)。实验结果如表10所示。抗体-药物偶联物ADC2(Ab2-MC-MMAF,实施例7, y=4)和ADC1-3(实施例9, y=8)均显示抑瘤活性。

[0383] 表10. 抗体-药物偶联物的抑瘤作用

[0384]	给药组	抑瘤率
	ADC2(实施例7, y=4) 1mg/kg	29.9%
	ADC1-3(实施例9, y=8) 1mg/kg	61.1%

[0385] 实施例12 抗体药物偶联物的体内肿瘤杀伤作用

[0386] 为进一步研究抗体-药物偶联物对体内形成的肿瘤的杀伤作用,在小鼠体内用NCI-H929细胞形成移植瘤后,评估本发明抗体-药物偶联物的抗肿瘤效果。将 9×10^6 个NCI-929细胞注射到8周龄的免疫缺陷的裸鼠(NOD-SCID)皮下,8天后开始通过静脉注射抗体-药物偶联物ADC2(实施例7, y=4)和ADC3(实施例7, y=4.1),每1周注射2次,剂量为3mg/kg。对照采用人IgG1蛋白,剂量为3mg/kg。对照组或给药组每组5只小鼠。通过测量肿瘤体积计算抑瘤率。抑瘤率TGI=100%-(第14天给药组肿瘤体积-第0天给药组肿瘤体积)/(第14天对照组肿瘤体积-第0天对照组肿瘤体积)。实验结果如表11所示,ADC2(实施例7, y=4)和ADC3(实施例7, y=4.1)均显示对肿瘤的杀伤作用。

[0387] 表11. 抗体-药物偶联物对体内肿瘤的杀伤活性

[0388]	给药组	抑瘤率TGI
	ADC2(实施例7, y=4) 3mg/kg	192%
	ADC3(实施例7, y=4.1) 3mg/kg	175%

[0389] 实施例13 抗体药物偶联物肿瘤细胞杀伤活性

[0390] 为检测本发明的抗体-药物偶联物对肿瘤细胞的杀伤作用,采用BCMA高表达水平细胞株NCI-H929(ATCC保藏号CRL-9068)和BCMA低表达水平细胞株RPMI-8226(ATCC,cat:CCL-155)进行评估。收集NCI-H929、RPMI-8226细胞,离心计数后用完全培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,铺于白色96孔板中间60个孔,每孔100 μ l,细胞数为10000细胞/孔,边缘孔加入100 μ l/孔DPBS,细胞板放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养过夜。次日,用完全培养基在96孔V型底板中配制抗体-药物偶联物工作溶液,浓度为133 μ M起始,5倍稀释,9个浓度,配制完成后加入到白色96孔板中,每孔80 μ l,两复孔,将细胞板放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中继续培养72小时。实验第五天,检测读数:取出细胞培养板,平衡至室温后,每孔加入90 μ l CellTiter-Glo[®]细胞活力检测试剂(Promega,Cat#:G7573),振荡混匀后放于暗处静置10分钟后,使用酶标仪的发光程序进行检测。使用GraphPad Prims软件计算IC₅₀值。实验结果如下表所示:

[0391] 表12. 抗体偶联药物对肿瘤细胞的杀伤作用

抗体偶联药物	细胞杀伤 (IC ₅₀ nM)	
	RPMI-82226	NCI-H929
ADC1-1 (实施例 9, y=4)	3115.0	1.078
ADC1-2 (实施例 9, y=6)	1784.0	0.580
ADC1-3 (实施例 9, y=8)	1286.0	0.369

[0393] 实验结果表明BCMA-ADC对肿瘤细胞的体外杀伤活性与BCMA在细胞表面的表达水平成正相关,对NCI-H929杀伤效果明显强于对RPMI-8226杀伤;随着偶联小分子毒素的数量增加,对肿瘤细胞的杀伤活性随之提高。

[0394] 实施例14 抗体药物偶联物PK研究

[0395] 利用BALB/c小鼠模型评价抗BCMA体药物偶联物BCMA-ADC在小鼠体内的药物代谢情况。将平均体重为18-22g,18-22周龄的人BALB/c转基因小鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司)随机分为2组,每组3只动物,受试BCMA体药物偶联物均以10mpk,IV,单次的方式给药,PBS溶媒作为阴性对照组,分别在1、2、4、8、24、48、96、144、240、小时采血分离血浆,冻存于-20 $^{\circ}$ C冰箱,之后利用重组人BCMA蛋白包被高亲和力96孔瓶底板,加入稀释的待测血浆样品,再利用HRP标记二抗检测小鼠血浆中BCMA-ADC浓度,并利用WinNonlin软件非房室模型,血管内给药的公式分析其PK参数。实验结果详见下表

[0396] 表13. 抗体偶联药物在小鼠体内的药代动力学参数

参数	ADC1-2 (实施例9, y=6)
C0 (ug/mL)	116.4
AUC 0-t (ug/mL*h)	10002
AUC 0- ∞ (ug/mL*h)	20568
t _{1/2} (h)	258.0
MRT _{0-∞} (h)	363.3
CL (mL/h/kg)	0.15

Vss (mL/kg)	53.0
-------------	------

[0398] 综合半衰期 $t_{1/2}$ 、暴露量、血药最高浓度达峰时间等参数,ADC1-2显示出良好的体内代谢活性。

[0399] 实施例15 抗体药物偶联物的细胞杀伤活性

[0400] 为检测本公开的抗体-药物偶联物(ADC)及依喜替康衍生物(实施例9,化合物(5-A))对肿瘤细胞的细胞毒作用,采用BCMA高表达水平细胞株NCI-H929(ATCC保藏号CRL-9068)进行评估。

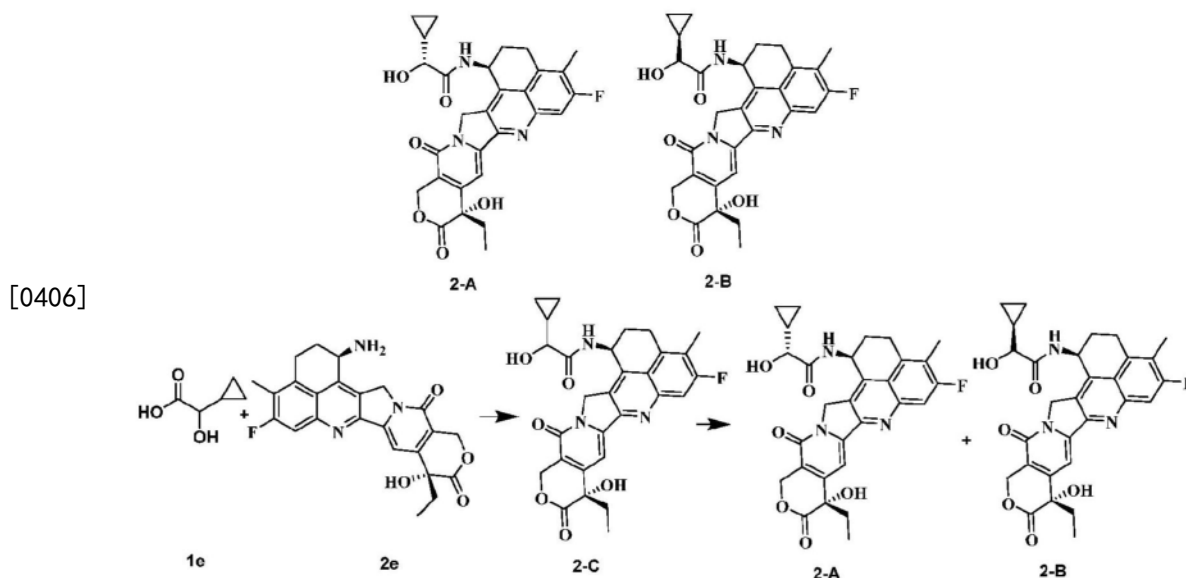
[0401] 收集NCI-H929细胞,离心计数后,用完全培养基调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,铺于白色96孔板中间60个孔,每孔50 μ L,细胞数为10000细胞/孔,边缘孔加入100 μ L/孔DPBS,细胞板放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养过夜。次日,用完全培养基在96孔V型底板中配制抗体-药物偶联物工作溶液,使依喜替康衍生物化合物(5-A)与ADC按相等摩尔量进行稀释,最高工作浓度为300nM,5倍稀释,9个浓度,配制完成后加入到白色96孔板中,每孔100 μ L,两复孔,将细胞板放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中继续培养72小时。实验第五天,检测读数:取出细胞培养板,平衡至室温后,每孔加入75 μ L CellTiter-Glo[®]细胞活力检测试剂(Promega,Cat#:G7573),振荡混匀后放于暗处静置10分钟后,使用酶标仪的发光程序进行检测。使用GraphPad Prims软件计算IC₅₀值。使用阴性抗体IgG1与依喜替康衍生物化合物(5-A)的抗体药物偶联物(ADC1-4,y=4)作为阴性对照。实验结果如下表所示:

[0402] 表14. 测试化合物对肿瘤细胞毒杀伤作用

测试化合物	细胞毒杀伤 (IC ₅₀ nM)
	NCI-H929
ADC1-1 (y=4)	0.88
ADC1-4 (y=4)	>133
化合物(5-A)	101

[0404] 通过比较细胞毒细胞杀伤IC₅₀,ADC1-1(y=4)与化合物(5-A)相比,约为1/115(0.88/101)倍,实验结果表明:本发明抗体药物偶联物对肿瘤细胞的体外细胞毒杀伤活性对NCI-H929杀伤效果明显强于小分子毒素化合物(5-A)的杀伤效果。

[0405] 实施例16 依喜替康衍生物的制备



[0407] 向2e(4mg, 7.53 μ mol)中加入2mL乙醇和0.4mL N,N-二甲基甲酰胺, 氩气置换三次, 冰水浴冷却至0-5 $^{\circ}$ C, 滴加0.3mL N-甲基吗啉, 搅拌至反应液变澄清。向反应液中依次加入2-环丙基-2-羟基乙酸1e(2.3mg, 19.8 μ mol, 采用专利申请“W02013106717”公开的方法制备而得)、1-羟基苯并三唑(3mg, 22.4 μ mol)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(4.3mg, 22.4 μ mol), 加毕, 在0-5 $^{\circ}$ C搅拌反应1小时。撤去冰水浴, 加热至30 $^{\circ}$ C搅拌2小时。反应液减压浓缩, 所得到的粗品化合物2-C用高效液相色谱法纯化(分离条件: 色谱柱: XBridge Prep C 18 OBD 5 μ m 19*250mm; 流动相: A-水(10mmol NH₄OAc), B-乙腈, 梯度洗脱, 流速: 18mL/min), 收集其相应组分, 减压浓缩, 得到标题产物(2-A: 1.5mg, 2-B: 1.5mg)。

[0408] MS m/z (ESI): 534.0 [M+1]。

[0409] 单一构型化合物2-B(较短保留时间)

[0410] UPLC分析: 保留时间1.06分钟, 纯度: 88% (色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1*50mm, 流动相: A-水(5mmol NH₄OAc), B-乙腈)。

[0411] ¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 8.37 (d, 1H), 7.76 (d, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.58-5.56 (m, 1H), 5.48 (d, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.32-5.29 (m, 2H), 3.60 (t, 1H), 3.19-3.13 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.20-2.14 (m, 1H), 1.98 (q, 2H), 1.87-1.83 (m, 1H), 1.50-1.40 (m, 1H), 1.34-1.28 (m, 1H), 0.86 (t, 3H), 0.50-0.39 (m, 4H)。

[0412] 单一构型化合物2-A(较长保留时间)

[0413] UPLC分析: 保留时间1.10分钟, 纯度: 86% (色谱柱: ACQUITY UPLC BEHC18 1.7 μ m 2.1*50mm, 流动相: A-水(5mmol NH₄OAc), B-乙腈)。

[0414] ¹HNMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 8.35 (d, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.58-5.53 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.37 (d, 1H), 5.32 (t, 1H), 3.62 (t, 1H), 3.20-3.15 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.25-2.16 (m, 1H), 1.98 (q, 2H), 1.87-1.82 (m, 1H), 1.50-1.40 (m, 1H), 1.21-1.14 (m, 1H), 0.87 (t, 3H), 0.47-0.35 (m, 4H)。

[0415] 实施例17 依喜替康衍生物对肿瘤细胞体外增殖抑制测试

[0416] 检测化合物2-A和2-B, 对U87MG细胞(中科院细胞库, Catalog#TCHu138)和SK-BR-3肿瘤细胞(人乳腺癌细胞, ATCC, 货号HTB-30)体外增殖的抑制活性。以不同浓度的化合物体

外处理细胞,经6天培养后,采用CTG(Luminescent Cell Viability Assay,Promega,货号:G7573)试剂对细胞的增值进行检测,根据IC50值评价该化合物的体外活性。

[0417] U87MG和SK-BR-3细胞分别用10%FBS的EMEM培养基(GE,货号SH30024.01)和含10%FBS的McCoy's 5A培养基(Gibco,货号16600-108)培养。

[0418] 取对数生长期的U87MG和SK-BR-3细胞,用PBS(磷酸盐缓冲液,上海源培生物科技股份有限公司)洗涤1次之后,加入2-3ml胰蛋白酶(0.25%Trypsin-EDTA(1x),Gibico,Life Technologies公司)消化2-3min,待细胞消化完全后,加入10-15ml细胞培养液,将经过消化的细胞洗脱下来,1000rpm离心5min,弃上清,接着加入10-20ml细胞培养液将细胞重悬,制成单细胞悬液。

[0419] 将U87MG和SK-BR-3单细胞悬液混匀,用细胞培养液分别调整活细胞密度至 2.75×10^3 cells/ml和 8.25×10^3 cells/ml,将密度调整过后的细胞悬液混匀,以180 μ l/孔加入96孔细胞培养板。96孔板外周孔只加入200 μ l培养基。将培养板在培养箱培养24小时(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。

[0420] 用DMSO(二甲基亚砜,上海泰坦科技股份有限公司)溶解化合物,配制成初始浓度为10mM的存储液。

[0421] 小分子化合物的起始浓度为500nM,配药方法如下:

[0422] 在96孔U型底配药板第一列中分别加入30 μ l不同待测样品,样品浓度为100 μ M;第2列至第11列每孔中加入20 μ l DMSO。取第一列样品10 μ l至第二列20 μ l DMSO中,混匀,取10 μ l至第三列中,以此类推至第10列。将配药板中的药每孔取5 μ l至95 μ l EMEM培养基中,混匀,待用。

[0423] 加样:向培养板中加入20 μ l配置的不同浓度的待测样品,每个样品两复孔。将培养板在培养箱孵育6天(37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。

[0424] 显色:取出96孔细胞培养板,向每孔加入90 μ l CTG溶液,室温孵育10分钟。

[0425] 读板:取出96孔细胞培养板,置于酶标仪(BMG labtech, PHERAstar FS)中,用酶标仪测定化学发光。

[0426] 数据分析:用Microsoft Excel, Graphpad Prism 5对数据进行处理分析。实验结果参见表15。

[0427] 表15. 依喜替康衍生物对肿瘤细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

化合物编号	IC50(nM)	
	SK-BR-3	U87MG
2-B	0.33	0.86
2-A	8.11	2.31

[0001] 序列表
 [0002] <110> 上海翰森生物医药科技有限公司
 [0003] 江苏豪森药业集团有限公司
 [0004] <120> 抗体药物偶联物及其医药用途
 [0005] <130> 721030CPCT
 [0006] <150> CN 202010224992.1
 [0007] <151> 2020-03-26
 [0008] <150> CN 202010743217.7
 [0009] <151> 2020-07-29
 [0010] <150> CN 202110123953.7
 [0011] <151> 2021-01-29
 [0012] <160> 23
 [0013] <170> SIPOSequenceListing 1.0
 [0014] <210> 1
 [0015] <211> 121
 [0016] <212> PRT
 [0017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0018] <220>
 [0019] <221> DOMAIN
 [0020] <222> (1) .. (121)
 [0021] <223> 鼠单抗M1的重链可变区
 [0022] <400> 1
 [0023] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 [0024] 1 5 10 15
 [0025] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
 [0026] 20 25 30
 [0027] Glu Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 [0028] 35 40 45
 [0029] Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0030] 50 55 60
 [0031] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0032] 65 70 75 80
 [0033] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0034] 85 90 95
 [0035] Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly
 [0036] 100 105 110
 [0037] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 [0038] 115 120

86

[0078] <221> DOMAIN
[0079] <222> (1) .. (17)
[0080] <223> 鼠单抗M1的HCDR2
[0081] <400> 4
[0082] Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0083] 1 5 10 15
[0084] Gly
[0085] <210> 5
[0086] <211> 14
[0087] <212> PRT
[0088] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0089] <220>
[0090] <221> DOMAIN
[0091] <222> (1) .. (14)
[0092] <223> 鼠单抗M1的HCDR3
[0093] <400> 5
[0094] Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr
[0095] 1 5 10
[0096] <210> 6
[0097] <211> 10
[0098] <212> PRT
[0099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0100] <220>
[0101] <221> DOMAIN
[0102] <222> (1) .. (10)
[0103] <223> 鼠单抗M1的LCDR1
[0104] <400> 6
[0105] Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met Asn
[0106] 1 5 10
[0107] <210> 7
[0108] <211> 7
[0109] <212> PRT
[0110] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0111] <220>
[0112] <221> DOMAIN
[0113] <222> (1) .. (7)
[0114] <223> 鼠单抗M1的LCDR2
[0115] <400> 7
[0116] Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser

[0117]	1	5
[0118]	<210> 8	
[0119]	<211> 9	
[0120]	<212> PRT	
[0121]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0122]	<220>	
[0123]	<221> DOMAIN	
[0124]	<222> (1) .. (9)	
[0125]	<223> 鼠单抗M1的LCDR3	
[0126]	<400> 8	
[0127]	Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr	
[0128]	1	5
[0129]	<210> 9	
[0130]	<211> 121	
[0131]	<212> PRT	
[0132]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0133]	<220>	
[0134]	<221> DOMAIN	
[0135]	<222> (1) .. (121)	
[0136]	<223> 人源化重链可变区HCVR1	
[0137]	<400> 9	
[0138]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
[0139]	1	5 10 15
[0140]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr	
[0141]	20	25 30
[0142]	Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
[0143]	35	40 45
[0144]	Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe	
[0145]	50	55 60
[0146]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr	
[0147]	65	70 75 80
[0148]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0149]	85	90 95
[0150]	Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly	
[0151]	100	105 110
[0152]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
[0153]	115	120
[0154]	<210> 10	
[0155]	<211> 121	

[0156] <212> PRT
 [0157] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0158] <220>
 [0159] <221> DOMAIN
 [0160] <222> (1) .. (121)
 [0161] <223> 人源化重链可变区HCVR2
 [0162] <400> 10
 [0163] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0164] 1 5 10 15
 [0165] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
 [0166] 20 25 30
 [0167] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0168] 35 40 45
 [0169] Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0170] 50 55 60
 [0171] Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0172] 65 70 75 80
 [0173] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0174] 85 90 95
 [0175] Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly
 [0176] 100 105 110
 [0177] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 [0178] 115 120
 [0179] <210> 11
 [0180] <211> 121
 [0181] <212> PRT
 [0182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0183] <220>
 [0184] <221> DOMAIN
 [0185] <222> (1) .. (121)
 [0186] <223> 人源化重链可变区HCVR3
 [0187] <400> 11
 [0188] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0189] 1 5 10 15
 [0190] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr
 [0191] 20 25 30
 [0192] Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0193] 35 40 45
 [0194] Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

[0195]	50	55	60
[0196]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
[0197]	65	70	75 80
[0198]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0199]	85	90	95
[0200]	Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly		
[0201]	100	105	110
[0202]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
[0203]	115	120	
[0204]	<210> 12		
[0205]	<211> 106		
[0206]	<212> PRT		
[0207]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0208]	<220>		
[0209]	<221> DOMAIN		
[0210]	<222> (1) .. (106)		
[0211]	<223> 人源化轻链可变区LCVR1		
[0212]	<400> 12		
[0213]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0214]	1 5 10 15		
[0215]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met		
[0216]	20 25 30		
[0217]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr		
[0218]	35 40 45		
[0219]	Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
[0220]	50 55 60		
[0221]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu		
[0222]	65 70 75 80		
[0223]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr		
[0224]	85 90 95		
[0225]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0226]	100 105		
[0227]	<210> 13		
[0228]	<211> 106		
[0229]	<212> PRT		
[0230]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0231]	<220>		
[0232]	<221> DOMAIN		
[0233]	<222> (1) .. (106)		

[0234]	<223> 人源化轻链可变区LCVR2															
[0235]	<400> 13															
[0236]	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
[0237]	1				5					10					15	
[0238]	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Tyr	Met
[0239]					20					25					30	
[0240]	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ile	Trp	Ile	Tyr
[0241]					35					40					45	
[0242]	Gly	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
[0243]					50					55					60	
[0244]	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
[0245]	65					70					75					80
[0246]	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr
[0247]					85					90						95
[0248]	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
[0249]					100					105						
[0250]	<210> 14															
[0251]	<211> 106															
[0252]	<212> PRT															
[0253]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0254]	<220>															
[0255]	<221> DOMAIN															
[0256]	<222> (1) .. (106)															
[0257]	<223> 人源化轻链可变区LCVR3															
[0258]	<400> 14															
[0259]	Glu	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
[0260]	1					5					10					15
[0261]	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Tyr	Met
[0262]					20						25				30	
[0263]	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Ile	Trp	Ile	Tyr
[0264]					35						40				45	
[0265]	Gly	Ile	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
[0266]					50						55				60	
[0267]	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu
[0268]	65					70					75					80
[0269]	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr
[0270]					85					90						95
[0271]	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
[0272]					100					105						

[0273]	<210> 15															
[0274]	<211> 451															
[0275]	<212> PRT															
[0276]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[0277]	<220>															
[0278]	<221> CHAIN															
[0279]	<222> (1) .. (451)															
[0280]	<223> Ab1 HC															
[0281]	<400> 15															
[0282]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0283]	1				5					10					15	
[0284]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr
[0285]				20				25						30		
[0286]	Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0287]			35				40						45			
[0288]	Gly	Gly	Ile	His	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[0289]		50				55					60					
[0290]	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
[0291]	65					70				75						80
[0292]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0293]				85					90						95	
[0294]	Thr	Arg	Leu	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Trp	Ala	Trp	Phe	Pro	Tyr	Trp	Gly
[0295]			100					105					110			
[0296]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[0297]		115				120						125				
[0298]	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
[0299]		130				135					140					
[0300]	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
[0301]	145					150					155					160
[0302]	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
[0303]				165					170						175	
[0304]	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
[0305]			180					185					190			
[0306]	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
[0307]		195				200						205				
[0308]	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
[0309]		210				215					220					
[0310]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
[0311]	225					230					235					240

[0312]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0313]		245	250 255
[0314]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0315]		260	265 270
[0316]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0317]		275	280 285
[0318]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0319]		290	295 300
[0320]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0321]	305	310	315 320
[0322]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[0323]		325	330 335
[0324]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0325]		340	345 350
[0326]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0327]		355	360 365
[0328]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0329]		370	375 380
[0330]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0331]	385	390	395 400
[0332]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0333]		405	410 415
[0334]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0335]		420	425 430
[0336]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0337]		435	440 445
[0338]	Pro Gly Lys		
[0339]	450		
[0340]	<210> 16		
[0341]	<211> 451		
[0342]	<212> PRT		
[0343]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0344]	<220>		
[0345]	<221> CHAIN		
[0346]	<222> (1) .. (451)		
[0347]	<223> Ab2 HC		
[0348]	<400> 16		
[0349]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[0350]	1	5	10 15

[0351]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr
[0352]				20					25					30		
[0353]	Glu	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[0354]			35					40					45			
[0355]	Gly	Gly	Ile	His	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
[0356]		50					55					60				
[0357]	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0358]	65					70					75					80
[0359]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0360]					85					90					95	
[0361]	Thr	Arg	Leu	Asp	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Trp	Ala	Trp	Phe	Pro	Tyr	Trp	Gly
[0362]				100					105					110		
[0363]	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
[0364]				115					120					125		
[0365]	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
[0366]		130					135					140				
[0367]	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
[0368]	145					150					155					160
[0369]	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
[0370]					165					170					175	
[0371]	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
[0372]				180						185				190		
[0373]	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
[0374]			195					200						205		
[0375]	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
[0376]		210					215					220				
[0377]	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
[0378]	225					230					235					240
[0379]	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
[0380]					245					250					255	
[0381]	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
[0382]				260					265					270		
[0383]	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
[0384]				275					280				285			
[0385]	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
[0386]		290						295					300			
[0387]	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
[0388]	305					310					315					320
[0389]	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile

[0390]		325		330		335
[0391]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val					
[0392]		340		345		350
[0393]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser					
[0394]		355		360		365
[0395]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu					
[0396]		370		375		380
[0397]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro					
[0398]	385		390		395	400
[0399]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val					
[0400]		405		410		415
[0401]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met					
[0402]		420		425		430
[0403]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser					
[0404]		435		440		445
[0405]	Pro Gly Lys					
[0406]		450				
[0407]	<210> 17					
[0408]	<211> 451					
[0409]	<212> PRT					
[0410]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
[0411]	<220>					
[0412]	<221> CHAIN					
[0413]	<222> (1) .. (451)					
[0414]	<223> Ab3 HC					
[0415]	<400> 17					
[0416]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala					
[0417]	1	5		10		15
[0418]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr					
[0419]		20		25		30
[0420]	Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
[0421]		35		40		45
[0422]	Gly Gly Ile His Pro Gly Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe					
[0423]		50		55		60
[0424]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr					
[0425]	65		70		75	80
[0426]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0427]		85		90		95
[0428]	Thr Arg Leu Asp Tyr Gly Tyr Ser Trp Ala Trp Phe Pro Tyr Trp Gly					

[0429]	100	105	110
[0430]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser		
[0431]	115	120	125
[0432]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala		
[0433]	130	135	140
[0434]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		
[0435]	145	150	155
[0436]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala		
[0437]	165	170	175
[0438]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val		
[0439]	180	185	190
[0440]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
[0441]	195	200	205
[0442]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
[0443]	210	215	220
[0444]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
[0445]	225	230	235
[0446]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0447]	245	250	255
[0448]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0449]	260	265	270
[0450]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0451]	275	280	285
[0452]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0453]	290	295	300
[0454]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0455]	305	310	315
[0456]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[0457]	325	330	335
[0458]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0459]	340	345	350
[0460]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0461]	355	360	365
[0462]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0463]	370	375	380
[0464]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0465]	385	390	395
[0466]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0467]	405	410	415

[0468]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
[0469]	420 425 430
[0470]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
[0471]	435 440 445
[0472]	Pro Gly Lys
[0473]	450
[0474]	<210> 18
[0475]	<211> 213
[0476]	<212> PRT
[0477]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0478]	<220>
[0479]	<221> CHAIN
[0480]	<222> (1) .. (213)
[0481]	<223> Ab1 LC
[0482]	<400> 18
[0483]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0484]	1 5 10 15
[0485]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met
[0486]	20 25 30
[0487]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
[0488]	35 40 45
[0489]	Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0490]	50 55 60
[0491]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0492]	65 70 75 80
[0493]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
[0494]	85 90 95
[0495]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0496]	100 105 110
[0497]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[0498]	115 120 125
[0499]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0500]	130 135 140
[0501]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[0502]	145 150 155 160
[0503]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[0504]	165 170 175
[0505]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[0506]	180 185 190

[0507]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[0508]	195 200 205
[0509]	Asn Arg Gly Glu Cys
[0510]	210
[0511]	<210> 19
[0512]	<211> 213
[0513]	<212> PRT
[0514]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0515]	<220>
[0516]	<221> CHAIN
[0517]	<222> (1) .. (213)
[0518]	<223> Ab2 LC
[0519]	<400> 19
[0520]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0521]	1 5 10 15
[0522]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met
[0523]	20 25 30
[0524]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr
[0525]	35 40 45
[0526]	Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0527]	50 55 60
[0528]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0529]	65 70 75 80
[0530]	Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
[0531]	85 90 95
[0532]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0533]	100 105 110
[0534]	Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[0535]	115 120 125
[0536]	Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0537]	130 135 140
[0538]	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[0539]	145 150 155 160
[0540]	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[0541]	165 170 175
[0542]	Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[0543]	180 185 190
[0544]	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[0545]	195 200 205

[0546] Asn Arg Gly Glu Cys
 [0547] 210
 [0548] <210> 20
 [0549] <211> 213
 [0550] <212> PRT
 [0551] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0552] <220>
 [0553] <221> CHAIN
 [0554] <222> (1) .. (213)
 [0555] <223> Ab3 LC
 [0556] <400> 20
 [0557] Glu Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0558] 1 5 10 15
 [0559] Glu Arg Ala Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ile Tyr Met
 [0560] 20 25 30
 [0561] Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr
 [0562] 35 40 45
 [0563] Gly Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 [0564] 50 55 60
 [0565] Gly Ser Gly Thr Ser Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 [0566] 65 70 75 80
 [0567] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 [0568] 85 90 95
 [0569] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 [0570] 100 105 110
 [0571] Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 [0572] 115 120 125
 [0573] Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 [0574] 130 135 140
 [0575] Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 [0576] 145 150 155 160
 [0577] Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 [0578] 165 170 175
 [0579] Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 [0580] 180 185 190
 [0581] Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 [0582] 195 200 205
 [0583] Asn Arg Gly Glu Cys
 [0584] 210

[0624]	85																90				95					
[0625]	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys										
[0626]	100																105				110					
[0627]	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro										
[0628]	115																120				125					
[0629]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys										
[0630]	130																135				140					
[0631]	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp										
[0632]	145																150				155				160	
[0633]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu										
[0634]	165																170				175					
[0635]	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu										
[0636]	180																185				190					
[0637]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn										
[0638]	195																200				205					
[0639]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly										
[0640]	210																215				220					
[0641]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu										
[0642]	225																230				235				240	
[0643]	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr										
[0644]	245																250				255					
[0645]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn										
[0646]	260																265				270					
[0647]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe										
[0648]	275																280				285					
[0649]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn										
[0650]	290																295				300					
[0651]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr										
[0652]	305																310				315				320	
[0653]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys																
[0654]	325																330									
[0655]	<210>	23																								
[0656]	<211>	107																								
[0657]	<212>	PRT																								
[0658]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)																								
[0659]	<220>																									
[0660]	<221>	DOMAIN																								
[0661]	<222>	(1) .. (107)																								
[0662]	<223>	轻链恒定区																								

[0663] <400> 23
[0664] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
[0665] 1 5 10 15
[0666] Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
[0667] 20 25 30
[0668] Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0669] 35 40 45
[0670] Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
[0671] 50 55 60
[0672] Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
[0673] 65 70 75 80
[0674] Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
[0675] 85 90 95
[0676] Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
[0677] 100 105