



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110997721 B

(45) 授权公告日 2023.08.15

(21) 申请号 201880049730.7

(72) 发明人 K.金尼尔 R.瓦基 肖晓东

(22) 申请日 2018.07.31

E.M.赫特 D.泰斯

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

申请公布号 CN 110997721 A

专利代理人 郭慧 李唐

(43) 申请公布日 2020.04.10

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)

62/539825 2017.08.01 US

A61K 47/68 (2006.01)

62/596194 2017.12.08 US

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2020.01.23

US 2014161828 A1, 2014.06.12

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 106279418 A, 2017.01.04

PCT/IB2018/055753 2018.07.31

徐光等.JNK信号通路活化与BCMA表达对MM

(87) PCT国际申请的公布数据

细胞的作用研究.《国际检验医学杂志》.2016,第

W02019/025983 EN 2019.02.07

37卷(第22期), 第3117-3119、3122页.

(73) 专利权人 免疫医疗有限责任公司

审查员 关维

地址 美国马里兰州

权利要求书2页 说明书25页

序列表12页 附图14页

(54) 发明名称

BCMA单克隆抗体-药物缀合物

(57) 摘要

本披露内容针对抗体-药物缀合物(ADC), 该抗体-药物缀合物包含针对B细胞成熟抗原(BCMA)的、与细胞毒素缀合的单克隆抗体或其抗原结合片段。本披露内容还提供了包含抗体-药物缀合物的组合物, 以及通过使多发性骨髓瘤细胞与该ADC接触来杀伤表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞(包括多发性骨髓瘤干细胞)的方法。

1. 一种抗体-药物缀合物(ADC),该抗体-药物缀合物包含针对B细胞成熟抗原(BCMA)的、与细胞毒素缀合的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中该单克隆抗体包含(a)重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:1的互补决定区1(HCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:2的HCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:3的HCDR3氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:4的互补决定区1(LCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:5的LCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:6的LCDR3氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的抗体-药物缀合物,其中该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的抗体-药物缀合物,其中该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

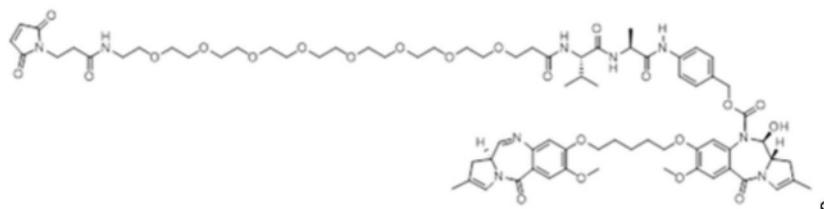
4. 如权利要求1-3中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该细胞毒素是抗微管剂、吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)、RNA聚合酶II抑制剂、或DNA烷基化剂。

6. 如权利要求5所述的抗体-药物缀合物,其中该细胞毒素是选自下组的抗微管剂,该组由以下组成:美登木素生物碱、奥瑞斯他汀和微管溶素。

7. 如权利要求5所述的抗体-药物缀合物,其中该细胞毒素是吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。

8. 如权利要求7所述的抗体-药物缀合物,其中该吡咯并苯并二氮杂卓(pyrrolobenzodiapeazine)是具有下式的SG3249:



9. 一种组合物,其包含如权利要求1-8中任一项所述的抗体-药物缀合物和药学上可接受的载体。

10. 如权利要求1-8中任一项所述的抗体-药物缀合物在制备药物中的用途,该药物用于杀伤多发性骨髓瘤细胞,其中该抗体-药物缀合物与这些多发性骨髓瘤细胞上的BCMA结合,并杀伤这些多发性骨髓瘤细胞。

11. 如权利要求9所述的组合物在制备药物中的用途,该药物用于杀伤多发性骨髓瘤细胞,其中该抗体-药物缀合物与这些多发性骨髓瘤细胞上的BCMA结合,并杀伤这些多发性骨髓瘤细胞。

12. 如权利要求10或权利要求11所述的用途,其中这些多发性骨髓瘤细胞在人体内。

13. 如权利要求10或权利要求11所述的用途,其中这些多发性骨髓瘤细胞在体外。

14. 如权利要求1-8中任一项所述的抗体-药物缀合物在制备药物中的用途,该药物用于杀伤多发性骨髓瘤干细胞,其中该抗体-药物缀合物与这些多发性骨髓瘤干细胞上的BCMA结合,并杀伤这些多发性骨髓瘤干细胞。

15. 如权利要求9所述的组合物在制备用于治疗多发性骨髓瘤的药物中的用途。

16. 一种针对B细胞成熟抗原(BCMA)的单克隆抗体或其抗原结合片段,该单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)重链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:1的互补决定区1(HCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:2的HCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:3的HCDR3氨基酸序列;以及(b)轻链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:4的互补决定区1(LCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:5的LCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:6的LCDR3氨基酸序列。

17. 如权利要求16所述的单克隆抗体,其中该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

18. 如权利要求16或权利要求17所述的单克隆抗体,其中该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

19. 如权利要求16或权利要求17所述的单克隆抗体,其中该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,并且该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

20. 一种组合物,该组合物包含如权利要求16-19中任一项所述的单克隆抗体和药学上可接受的载体。

21. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含与T细胞激活部分连接的如权利要求16-19中任一项所述的单克隆抗体的抗原结合结构域。

22. 如权利要求21所述的嵌合抗原受体,其中该抗原结合结构域包含该单克隆抗体的单链Fv(scFv)片段。

## BCMA单克隆抗体-药物缀合物

[0001] 以电子方式提交的材料通过引用结合

[0002] 通过引用以其整体并入本文的是一种计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表，该序列表在此同时提交，并确定如下：一份命名为“BCMA-100-WO-PCT-SeqListing.TXT”、创建于2018年7月31日、16,498字节的ASCII(文本)文件。

### 背景技术

[0003] 多发性骨髓瘤(MM)是恶性肿瘤，其特征在于克隆浆细胞的积累(参见，例如，Palumbo等人，New England J.Med.[新英格兰医学杂志]，364(11):1046-1060(2011)，以及Lonial等人，Clinical Cancer Res.[临床癌症研究]，77(6):1264-1277(2011))。MM的当前疗法包括化学疗法、放射疗法、手术、生物膦酸盐和自体干细胞移植(ASCT)。尽管这些疗法经常引起缓解，但是几乎所有患者最终都复发并死亡(参见，例如，Lonial等人，同上，以及Rajkumar，Nature Rev.Clinical Oncol[自然综述临床肿瘤学]，5(8):479-491(2011))。

[0004] B细胞成熟抗原(BCMA)是在B-细胞谱系的细胞上表达的肿瘤坏死家族受体(TNFR)成员(Laabи等人，Nucleic Acids Research[核酸研究]，22(7):1147-1154(1994))。BCMA表达在终末分化的B细胞上最高。BCMA参与介导浆细胞的存活，用于维持长期的体液免疫。BCMA的表达与多种癌症、自身免疫性障碍和传染性疾病有关。BCMA RNA已经在多发性骨髓瘤细胞中被普遍地检测到，并且多位研究者已经在多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面上检测到BCMA蛋白(参见，例如，Novak等人，Blood[血液]，103(2):689-694(2004)；Neri等人，Clinical Cancer Research[临床癌症研究]，73(19):5903-5909(2007)；Bellucci等人，Blood[血液]，105(10):3945-3950(2005)；以及Moreaux等人，Blood[血液]，703(8):3148-3157(2004))。因此，已经研究了BCMA作为针对多发性骨髓瘤的可能的治疗靶标。

[0005] 仍然存在针对可以在治疗多发性骨髓瘤的方法中使用的组合物的需求。本发明提供了这样的组合物和方法。

### 发明内容

[0006] 本披露内容提供了抗体-药物缀合物(ADC)，该抗体-药物缀合物包含针对B细胞成熟抗原(BCMA)的、与细胞毒素缀合的单克隆抗体或其抗原结合片段。该单克隆抗体包含(a)重链可变区，该重链可变区包含SEQ ID NO:1的互补决定区1(HCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:2的HCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:3的HCDR3氨基酸序列；以及(b)轻链可变区，该轻链可变区包含SEQ ID NO:4的互补决定区1(LCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:5的LCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:6的LCDR3氨基酸序列。

[0007] 另外，本披露内容提供包含前述抗体-药物缀合物的组合物，以及通过使多发性骨髓瘤细胞与该ADC接触来杀伤表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞(包括多发性骨髓瘤干细胞)的方法。

[0008] 本披露内容还提供了针对BCMA的单克隆抗体或其抗原结合片段，该单克隆抗体或其抗原结合片段包含(a)重链可变区，该重链可变区包含SEQ ID NO:1的互补决定区1

(HCDR1) 氨基酸序列、SEQ ID NO:2的HCDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:3的HCDR3氨基酸序列；以及(b)轻链可变区，该轻链可变区包含SEQ ID NO:4的互补决定区1(LCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:5的LCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:6的LCDR3氨基酸序列。

## 附图说明

[0009] 图1是一系列说明如下内容的图(图1A-1C)，纯化的抗体与表达如实例1所述的人BCMA、食蟹猴BCMA、BAFF-R和TACI的粘附性293(Ad293)细胞的FACS结合。15B2GL单克隆抗体是唯一测试的不与BAFF-R和/或TACI结合的食蟹猴交叉反应抗体。

[0010] 图2是说明如下内容的图，BCMA抗体药物缀合物在体外杀伤多发性骨髓瘤(MM)和浆细胞白血病(PCL)细胞的能力，如实例4所述。图2A-2H显示了用指定的ADC治疗的表达特定BCMA的多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞系的活力，而图2I和2J显示了不表达BCMA的细胞系的活力。

[0011] 图3含有说明如下内容的图，如与在条件培养基中从表达人BCMA的Ad293细胞中收集的ADC I09-SG3249(图3A)相比，或如与在条件培养基中从表达人BCMA的Ad293细胞中收集的ADC J6M0-mc-MMAF和J6M0-SG3249(图3B)相比，在可溶性BCMA的存在下，通过抗体药物缀合物15B2GL-SG3249杀伤多发性骨髓瘤细胞系，如实例4所述。

[0012] 图4是说明如下内容的图，如与未治疗的小鼠相比，对用靶向BCMA的ADC 15B2GL-SG3249、I09-SG3249、L15-SG3249和J6M0-mc-MMAF的治疗产生应答的多发性骨髓瘤的H929异种移植小鼠模型中肿瘤体积的变化。

[0013] 图5是说明如下内容的图，如与未治疗的小鼠相比，对用ADC 15B2GL-SG3249、I09-SG3249、L15-SG3249、J6M0-mc-MMAF和同型对照IgG1-SG3249的治疗产生应答的多发性骨髓瘤的JJN3异种移植小鼠模型中肿瘤体积的变化。

[0014] 图6是说明如下内容的图，如与未治疗的小鼠相比，对用ADC 15B2GL-SG3249、I09-SG3249、L15-SG3249和J6M0-mc-MMAF的治疗产生应答的浆细胞白血病的MM.1S异种移植小鼠模型中肿瘤体积的变化。

[0015] 图7是说明如下内容的图，如与未治疗的小鼠相比，对用ADC 15B2GL-SG3249和J6M0-mc-MMAF的治疗产生应答的浆细胞白血病的MM.1R异种移植小鼠模型中肿瘤体积的变化。

[0016] 图8含有一系列图和流式细胞图，这些图和流式细胞图说明了BCMA在MM干细胞上的表达。在MM浆细胞(CD19-CD138+，灰色迹线)和MM干细胞(CD19+CD138-，黑色迹线)上均检测到BCMA表达。

[0017] 图9含有一系列说明如下内容的图，如与克隆生成测定中的ADC J6M0-mc-MMAF相比，来自患者样品MM263(图9A)、MM276(图9B)、MM277(图9C)、和MM284(图9D)的MM干细胞对ADC 15B2GL-SG3249的敏感性。对照包括未治疗的细胞和最高剂量400ng/mL的非特异性IgG1-SG3249缀合物。将形成的集落数归一化至在未治疗的培养物中形成的、设为100%的数。

[0018] 图10是说明如下内容的图，BCMA抗体药物缀合物在体外杀伤多发性骨髓瘤(MM)和浆细胞白血病(PCL)细胞的能力，如实例7所述。图10A-10H显示了用指定的ADC治疗的表达特定BCMA的多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞系的活力，而图10I和10J显示了不表达BCMA

的细胞系的活力。

[0019] 图11是说明如下内容的图,如与未治疗的小鼠相比,对用靶向BCMA的ADC 15B2GL-SG3400、J6M0-SG3400和同型对照IgG1-SG3400的治疗产生应答的多发性骨髓瘤的H929异种移植小鼠模型中肿瘤体积的变化。

[0020] 图12是说明如下内容的图,如与未治疗的小鼠相比,对用靶向BCMA的ADC 15B2GL-SG3400、J6M0-SG3400和同型对照IgG1-SG3400的治疗产生应答的浆细胞白血病的MM.1S异种移植小鼠模型中肿瘤体积的变化。

[0021] 图13是说明如下内容的图,使用基于SPR的ProteOn系统,15B2GL、I09、P10和L15抗体与人BCMA结合的亲和力和动力学测量。

[0022] 图14是说明如下内容的图,使用基于SPR的ProteOn系统,N22、M02和J6M0抗体与人BCMA结合的亲和力和动力学测量。

[0023] 图15是说明如下内容的图,通过流式细胞术测量的15B2GL、L15、I09或J6M0抗体与NCI-H929、MM.1S和Ad293+人BCMA细胞系的结合。

## 具体实施方式

[0024] 本披露内容提供了抗体-药物缀合物(ADC),其包含针对B细胞成熟抗原(BCMA)的、与细胞毒素缀合的单克隆抗体或其抗原结合片段。如本文所用的,术语“抗体-药物缀合物”是指包含单克隆抗体(mAb)的化合物,该单克隆抗体经由化学接头附接至细胞毒性剂(通常具有高全身毒性的分子药物)。在一些实施例中,ADC可以包含已经被化学修饰以含有接头的小分子细胞毒素。然后使用该接头从而将细胞毒素与抗体或其抗原结合片段缀合。在与细胞表面上的靶抗原结合之后,ADC被内化并运送到溶酶体,在溶酶体中细胞毒素通过可切割的接头的蛋白质水解(例如,通过溶酶体中发现的组织蛋白酶B)或通过抗体的蛋白质降解(如果经由不可切割的接头附接至细胞毒素)释放。细胞毒素然后从溶酶体中转移出并且转移到细胞溶质或细胞核中,在细胞溶质或细胞核中然后它可以根据其作用机制结合至其靶标上。

[0025] 如本文所用的,术语“单克隆抗体”是指由B细胞的单个克隆产生并与相同表位结合的抗体。相反,术语“多克隆抗体”是指由不同的B细胞产生并与相同抗原的不同表位结合的抗体群。本文所述的抗体-药物缀合物可以包含完整抗体或抗体片段。完整抗体通常由四个多肽组成:重(H)链多肽的两个相同拷贝和轻(L)链多肽的两个相同拷贝。每条重链含有一个N-末端可变(VH)区和三个C-末端恒定(CH1、CH2和CH3)区,并且每个轻链含有一个N-末端可变(VL)区和一个C-末端恒定(CL)区。轻链和重链的每对的可变区形成抗体的抗原结合位点。VH和VL区具有相同的一般结构,其中每个区包含四个框架区,这些框架区的序列是相对保守的。框架区通过三个互补决定区(CDR)连接。这三个CDR(称为CDR1、CDR2和CDR3)形成抗体的“高变区”,负责抗原结合。

[0026] ADC可以包含抗体的抗原结合片段。术语“抗体片段”、“抗原结合片段”、“抗体的功能片段”和“抗原结合部分”在本文中可互换使用,并且是指抗体的一个或多个片段或部分,该一个或多个片段或部分保留与抗原特异性结合的能力(通常参见,Holliger等人,Nat.Biotech.[自然生物技术],23(9):1126-1129(2005))。抗体片段可以包含例如,一个或多个CDR、可变区(或其部分)、恒定区(或其部分)、或其组合。抗体片段的实例包括但不限

于, (i) Fab片段, 该Fab片段是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')2片段, 该F(ab')2片段是包含在铰链区由二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段; (iii) Fv片段, 该Fv片段由抗体的单臂的VL和VH结构域组成; (iv) 单链Fv(scFv), 该单链Fv是通过合成接头连接的Fv片段的两个结构域(即, VL和VH)组成的单价分子, 该接头使得两个结构域被合成为单个多肽链(参见, 例如, Bird等人, *Science*[科学], 242:423-426(1988); Huston等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*[美国国家科学院院刊], 85:5879-5883(1988); 和Osbourn等人, *Nat.Biotechnol.*[自然生物技术], 16:778(1998)); 以及(v) 双抗体, 该双抗体是多肽链的二聚体, 其中每个多肽链包含通过肽接头连接至VL的VH, 该肽接头过短而不能允许在相同多肽链上的VH和VL之间配对, 从而驱动在不同的VH-VL多肽链上互补结构域之间的配对, 以产生具有两个功能性抗原结合位点的二聚体分子。抗体片段是本领域已知的, 并且更详细描述于例如美国专利申请公开2009/0093024 A1中。

[0027] 在一个实施例中, 本文所述的抗体-药物缀合物包含针对B细胞成熟抗原(BCMA, 还称为CD269)的单克隆抗体, 或其抗原结合片段。BCMA是肿瘤坏死因子受体超家族的成员(参见, 例如, Thompson等人, *J.Exp.Medicine*[实验医学杂志], 192(1):129-135(2000), 以及 Mackay等人, *Annu.Rev.Immunol.*[免疫学年鉴], 21:231-264(2003))。BCMA结合B细胞激活因子(BAFF)和增殖诱导配体(APRIL)(参见, 例如, Mackay等人, 同上, 以及Kalled等人, *Immunological Reviews*[免疫学综述], 204:43-54(2005))。在非恶性细胞中, 已经报道BCMA主要在浆细胞和成熟B细胞的亚群中表达(参见, 例如, Laabi等人, *EMBO J.*[欧洲分子生物学学会杂志], 77(11):3897-3904(1992); Laabi等人, *Nucleic Acids Res.*[核酸研究], 22(7):1147-1154(1994); Kalled等人, 同上; O'Connor等人, *J.Exp.Medicine*[实验医学杂志], 199(1):91-97(2004); 以及Ng等人, *J.Immunol.*[免疫学杂志], 173(2):807-817(2004))。BCMA缺陷的小鼠是健康的并且具有正常数目的B细胞, 但是长寿浆细胞的存活受到损害(参见, 例如, O'Connor等人, 同上; Xu等人, *Mol.Cell.Biol.*[分子细胞生物学], 21(12):4067-4074(2001); 以及Schiemann等人, *Science*[科学], 293(5537):2111-2114(2001))。BCMA RNA已经在多发性骨髓瘤细胞中被普遍地检测到, 并且多位研究者已经在多发性骨髓瘤患者的浆细胞表面上检测到BCMA蛋白(参见, 例如, Novak等人, *Blood*[血液], 103(2):689-694(2004); Neri等人, *Clinical Cancer Research*[临床癌症研究], 73(19):5903-5909(2007); Bellucci等人, *Blood*[血液], 105(10):3945-3950(2005); 以及Moreaux等人, *Blood*[血液], 703(8):3148-3157(2004))。

[0028] 在一些实施例中, 本披露内容提供了独立于抗体-药物缀合物、针对以上所述的BCMA的单克隆抗体或其抗原结合片段。单克隆抗体或其抗原结合片段可以包含(a)重链可变区, 该重链可变区包含SEQ ID NO:1的互补决定区1(HCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:2的HCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:3的HCDR3氨基酸序列; 以及(b)轻链可变区, 该轻链可变区包含SEQ ID NO:4的互补决定区1(LCDR1)氨基酸序列、SEQ ID NO:5的LCDR2氨基酸序列、和SEQ ID NO:6的LCDR3氨基酸序列。在另一个实施例中, 单克隆抗体包含:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区, 和/或包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。

[0029] 针对BCMA的单克隆抗体, 或其抗原结合片段可以包含对BCMA或其表位的任何合适的结合亲和力。术语“亲和力”是指两种药剂可逆结合的平衡常数, 并且被表示为解离常数( $K_D$ )。抗体或其抗原结合片段对目的抗原或表位的亲和力可以使用本领域已知的任何方法

来测量。此类方法包括,例如,荧光激活细胞分选(FACS)、表面等离子体共振(例如,Biacore,ProteOn)、生物膜层干涉技术(BLI,例如Octet)、动力学排斥测定(例如,KinExA)、可分离的珠(例如,磁珠)、抗原淘选、和/或ELISA(参见,例如,Janeway等人(编),Immunobiology[免疫生物学],第5版,Garland Publishing,New York,N.Y.[加兰出版社,纽约市,纽约州],2001)。本领域中已知特定抗体的结合亲和力将根据用于分析结合亲和力的方法而变化。

[0030] 在多发性骨髓瘤患者的血清中已经检测到BCMA(sBCMA)的可溶性形式,其中报道的数值范围在从3.8至1062ng/mL之间(Lee等人Br J Haematol[英国血液学杂志]2016, Sanchez等人Br J Haematol[英国血液学杂志]2012),并且由分子的整个胞外结构域组成(Laurent等人Nat Commun[自然通讯]2015)。因此,sBCMA可能会减少基于抗体的疗法的作用。sBCMA和重组单体人BCMA的功能特征相似(Laurent等人Nat Commun[自然通讯]2015)。因此,为了减轻sBCMA对BCMA抗体-药物缀合物的功效的潜在影响,期望选择对重组单体人BCMA具有弱结合并且对膜结合的BCMA具有强结合的抗体组分。

[0031] 药剂与配体结合的亲和力,例如抗体对表位的亲和力可以是例如,从约1皮摩尔(pM)至约1微摩尔( $\mu$ M)(例如,从约1皮摩尔(pM)至约1纳摩尔(nM),或从约1nM至约1微摩尔( $\mu$ M))。在一个实施例中,单克隆抗体或其抗原结合片段可以与BCMA结合,其中 $K_D$ 小于或等于100纳摩尔(例如,100nM、约90nM、约80nM、约70nM、约60nM、约50nM、约40nM、约30nM、约20nM、或约10nM,或通过前述数值中任何两个所定义的范围)。在另一个实施例中,单克隆抗体可以与BCMA结合,其中 $K_D$ 小于或等于10纳摩尔(例如,约9nM、约8.5nM、约8nM、约7.5nM、约7nM、约6.5nM、约6nM、约5.5nM、约5nM、约4.5nM、约4nM、约3.5nM、约3nM、约2.5nM、约2nM、约1.5nM、约1nM、约0.9nM、约0.8nM、约0.7nM、约0.6nM、约0.5nM、约0.4nM、约0.3nM、约0.2nM、约0.1nM、约0.05nM、约0.025nM、约0.01nM、约0.001nM,或通过前述数值中任何两个所定义的范围)。在另一个实施例中,单克隆抗体可以与BCMA结合,其中KD小于或等于200pM(例如,约190pM、约175pM、约150pM、约125pM、约110pM、约100pM、约90pM、约80pM、约75pM、约60pM、约50pM、约40pM、约30pM、约25pM、约20pM、约15pM、约10pM、约5pM、约1pM,或通过前述数值中任何两个所定义的范围)。

[0032] 在一个实施例中,如通过表面等离子体共振(SPR)测量的,BCMA抗体或其抗原结合片段对单体BCMA的亲和力为约90nM、约80nM、约70nM、约60nM、约50nM、约40nM、约30nM、或通过前述数值中任何两个所定义的范围(例如,约50nM至约70nM、约55nM至约65nM、或约58nM至约62nM)。

[0033] 在一个实施例中,如通过FACS测量的,BCMA抗体或其抗原结合片段对膜结合的BCMA的亲和力小于或等于10纳摩尔(例如,约9nM、约8.5nM、约8nM、约7.5nM、约7nM、约6.5nM、约6nM、约5.5nM、约5nM、约4.5nM、约4nM、约3.5nM、约3nM、约2.5nM、约2nM、约1.5nM、约1nM、约0.9nM、约0.8nM、约0.7nM、约0.6nM、约0.5nM、约0.4nM、约0.3nM、约0.2nM、约0.1nM、约0.05nM、约0.025nM、约0.01nM、约0.001nM,或通过前述数值中任何两个所定义的范围)。

[0034] 单克隆抗体的抗原结合部分或片段可以是任何大小,只要该部分与BCMA结合即可。在这方面,期望针对BCMA的单克隆抗体(本文也称为“抗BCMA单克隆抗体”)的抗原结合部分或片段包含在约5和18个之间的氨基酸(例如,约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、

17、18,或通过前述数值中任何两个所定义的范围)。

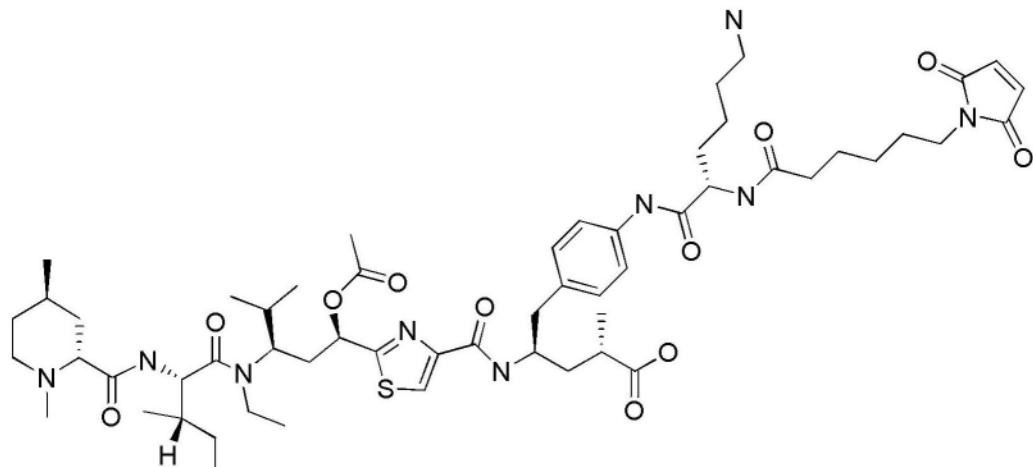
[0035] 在一个实施例中,抗体-药物缀合物包含抗BCMA单克隆抗体的可变区。在这方面,ADC可以包含抗BCMA单克隆抗体的轻链可变区、重链可变区、或轻链可变区和重链可变区两者。优选地,ADC包含抗BCMA单克隆抗体的轻链可变区和重链可变区。与BCMA结合的单克隆抗体披露于,例如国际专利申请公开WO 2010/104949中。在一个实施例中,本文所述的ADC的单克隆抗体包含(a)重链可变区,该重链可变区包含SYSMN (SEQ ID NO:1) 的互补决定区1 (HCDR1) 氨基酸序列、SISGSSNYIYYADSVKG (SEQ ID NO:2) 的HCDR2氨基酸序列、和GGNYYVEYFQY (SEQ ID NO:3) 的HCDR3氨基酸序列;和(b)轻链可变区,该轻链可变区包含RASQYISSLNYLA (SEQ ID NO:4) 的互补决定区1 (LCDR1) 氨基酸序列、GASN RAT (SEQ ID NO:5) 的LCDR2氨基酸序列、和QQYGSSPIT (SEQ ID NO:6) 的LCDR3氨基酸序列。在另一个实施例中,本文所述的ADC的单克隆抗体可以包含:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区和/或包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。

[0036] 术语“细胞毒素”和“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞的功能和/或造成细胞破坏(细胞死亡)、和/或施加抗增生作用的任何分子。应当理解的是,ADC的细胞毒素或细胞毒性剂在本领域中也被称为ADC的“有效负载”。本领域已知许多类型的细胞毒性剂在ADC分子中具有潜在的效用,并且可以用于本文所述的ADC。此类细胞毒性剂包括,例如,抗微管剂(例如,奥瑞斯他汀(auristatins)和美登木素生物碱)、吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)、RNA聚合酶II抑制剂(例如,鹅膏毒素)、和DNA烷基化剂(例如,吲哚啉苯并二氮杂卓假二聚体)。可以在本文所述的ADC中使用的特定细胞毒性剂的实例包括但不限于,鹅膏蕈碱、奥瑞斯他汀、加利车霉素、道诺霉素、多柔比星、多卡米新、多拉司他汀、烯二炔、来西菌素(lexitropsin)、紫杉烷、嘌呤霉素、美登木素生物碱、长春花生物碱、微管溶素、和吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)。更具体地,细胞毒性剂可以是例如,AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB、奥瑞斯他汀E、紫杉醇、多西他赛、CC-1065、SN-38、拓扑替康、吗啉代-多柔比星、根霉素、氰基吗啉代-多柔比星、多拉司他汀-10、棘霉素、康普瑞汀、杯形生长抑制素(chalicheamicin)、美登素、DM1、DM4、长春花碱、甲氨蝶呤、纺锤菌素、或其衍生物或类似物。适合在ADC中使用的细胞毒素还描述于例如,国际专利申请公开号WO 2015/155345和WO 2015/157592中。

[0037] 在一个实施例中,细胞毒性剂可以是抗微管剂,例如微管溶素、美登木素生物碱、奥瑞斯他汀、或其衍生物。术语“抗微管剂”和“微管靶向剂”是同义词,并且是指通过干扰微管来抑制细胞分裂的药剂。微管溶素是从粘细菌物种中分离出的一类天然产物的成员(Sasse等人,J.Antibiot.[抗生素杂志],53:879-885(2000)),其充当抑制微管蛋白聚合并导致细胞周期停滞和细胞凋亡的有丝分裂毒物(Steinmetz等人,Chem.Iht.Ed.[应用化学国际版],43:4888-4892(2004);Khalil等人,Chem.Biochem.[化学生物化学],7:678-683(2006);Kaur等人,Biochem.J.[生物化学杂志],396:235-242(2006))。微管溶素的实例披露于例如,国际专利申请公开号WO 2015/157594、WO 2004/005326、WO 2012/019123、WO 2009/134279、WO 2009/055562、WO 2004/005327;美国专利7,776,841、7,754,885和7,816,377;以及美国专利申请公开2010/0240701、2011/0021568和2011/0263650。

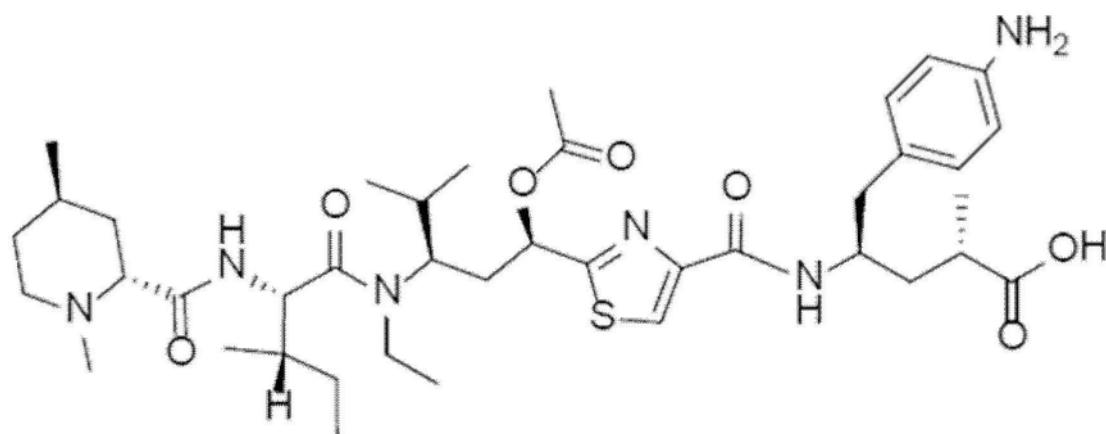
[0038] 在某些方面,微管溶素是WO 2015/157594(通过引用并入本文)中所述的化合物,例如像具有以下结构的化合物:

[0039]



[0040] 或具有以下结构的化合物：

[0041]

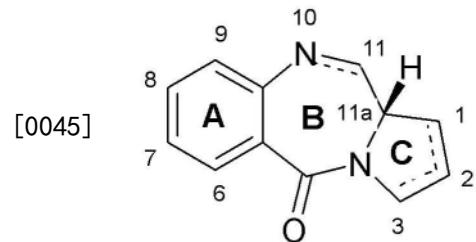


[0042] 美登木素生物碱抑制微管蛋白 (microtubule protein、tubulin) 的聚合,从而防止微管的形成(参见,例如,美国专利号6,441,163,以及Remillard等人,Science[科学],189:1002-1005(1975))。已经显示,使用细胞培养模型美登木素生物碱在体外抑制肿瘤细胞生长,并且使用实验动物系统在体内抑制肿瘤细胞生长。此外,美登木素生物碱的细胞毒性比常规化学治疗剂(例如像甲氨蝶呤、柔红霉素和长春新碱)高1,000倍(参见,例如,美国专利5,208,020)。美登木素生物碱包括美登素、美登醇、美登醇的C-3酯和其他美登醇类似物和衍生物(参见,例如,美国专利5,208,020和6,441,163)。美登醇的C-3酯可以是天然存在的或合成衍生的。此外,天然存在的和合成的C-3美登木醇酯都可以被分类为具有简单羧酸的C-3酯,或具有N-甲基-L-丙氨酸衍生物的C-3酯,后者的细胞毒性比前者更高。合成的美登木素生物碱类似物在本领域中也是已知的,并且描述于例如,Kupchan等人,J.Med.Chem.[药物化学杂志],21:31-37(1978)中。用于生成美登醇及其类似物和衍生物的方法描述于例如,美国专利4,151,042中。可以与本文所述的ADC结合使用的美登木素生物碱的实例包括但不限于,N2' -脱乙酰基-N2' -(3-巯基-1-氧代丙基)-美登素(DM1) 和N2' -脱乙酰基-N2' -(4-巯基-4-甲基-1-氧代戊基)-美登素(DM4)。

[0043] 奥瑞斯他汀代表一类高度有效的抗有丝分裂剂,在耐受良好的剂量下显示出显著的临床前活性(Law等人,Cancer Res.[癌症研究],66:2328-2337(2006);Ma等人,Clin.Cancer Res.[临床癌症研究],12:2591-2596(2006);Tse等人,Cancer Res.[癌症研究],12:1373-1382(2006);和Ofazoglu等人,Br.J.Haematol.[英国血液学杂志],142:69-

73 (2008), 以及 Of lazoglu 等人, Clin. Cancer Res. [临床癌症研究], 14: 6171-6180 (2008)。奥瑞斯他汀 ADC 目前正在临床前和临床试验中进行评估。可以与本文所述的 ADC 结合使用的奥瑞斯他汀的实例包括但不限于, 单甲基奥瑞斯他汀 E (MMAE) 和相关的分子单甲基奥瑞斯他汀 F (MMAF) (参见, 例如, Doronina 等人, Nat. Biotechnol. [自然生物技术], 21: 778-784 (2003); 以及 Doronina 等人, Bioconjug. Chem. [生物缀合物化学], 17: 114-124 (2006))。

[0044] 在一个实施例中, 细胞毒性剂可以是吡咯并苯并二氮杂卓 (PBD) 或 PBD 衍生物。PBD 易位于其中其交联 DNA 的细胞核, 阻止有丝分裂期间的复制, 通过诱导单链断裂来破坏 DNA, 并且随后导致细胞凋亡。一些 PBD 还具有识别和结合至 DNA 特定序列的能力。PBD 具有以下通用结构:



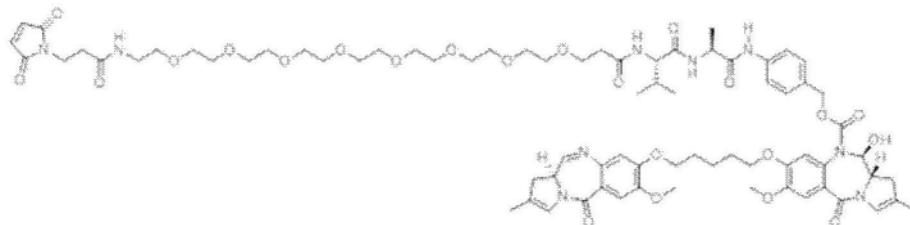
[0046] PBD 在取代基的数目、类型和位置方面, 在它们的芳香族 A 环和吡咯并 C 环二者方面, 以及在 C 环的饱和度方面不同。在 B 环中, 在 N10-C11 位置处存在亚胺 ( $N=C$ )、甲醇胺 ( $NH-CH(OH)$ )、或甲醇胺甲基醚 ( $NH-CH(OMe)$ ), 其是负责使 DNA 烷基化的亲电中心。所有已知的天然产物具有在手性 C11a 位置处的 (S)- 构型, 当从 C 环向 A 环观察时, 该构型向其提供了右旋扭曲。该特征还给予 PBD 具有 B 型 DNA 小沟的针对异螺旋性的三维形状, 导致在结合位点处的滑动配合 (Kohn, 在 Antibiotics III [抗生素 III] 中, Springer-Verlag, New York [施普林格出版社, 纽约], 第 3-11 页 (1975); 以及 Hurley 和 Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res. [化学研究述评], 19: 230-237 (1986))。PBD 可以在小沟中形成加合物, 从而干扰 DNA 加工。

[0047] 首例 PBD 抗肿瘤抗生素, 安曲霉素于 1965 年 (Leimgruber 等人, J. Am. Chem. Soc. [美国化学学会杂志] 87: 5793-5795 (1965); Leimgruber 等人, J. Am. Chem. Soc. [美国化学学会杂志] 87: 5791-5793 (1965)) 发现。此后, 已经报道了许多天然存在的 PBD, 并且针对各种类似物已经开发了超过十种合成路线 (Thurston 等人, Chem. Rev. [化学评论], 433-465 (1994); 以及 Antonow, D. 和 Thurston, D. E., Chem. Rev. [化学评论], 111: 2815-2864 (2011))。家族成员包括阿比霉素 (abbe mycin) (Hochlowski 等人, J. Antibiotics [抗体学杂志] 40: 145-148 (1987))、奇卡霉素 (chicamycin) (Konishi 等人, J. Antibiotics [抗菌素杂志] 37: 200-206 (1984))、DC-81 (日本专利 58180487; Thurston 等人, Chem. Brit. [英国化学] 26: 767-772 (1990); 和 Bose 等人, Tetrahedron [四面体] 48: 751-758 (1992))、甲基氨基霉索 (mazethramycin) (Kuminoto 等人, J. Antibiotics [抗菌素杂志] 33: 665-667 (1980))、新氨基霉索 A 和 B (Takeuchi 等人, J. Antibiotics [抗菌素杂志] 29: 93-96 (1976))、波罗斯拉霉索 (porothramycin) (Tsunakawa 等人, J. Antibiotics [抗菌素杂志] 41: 1366-1373 (1988))、prothracarcin (Shimizu 等人, J. Antibiotics [抗菌素杂志] 29: 2492-2503 (1982)); 和 Langley 和 Thurston, J. Org. Chem. [有机化学杂志] 52: 91-97 (1987))、西班牙米星 (sibanomicin) (DC-102) (Hara 等人, J. Antibiotics [抗菌素杂志] 41: 702-704 (1988)); 和

Itoh等人,J.Antibiotics[抗菌素杂志]41:1281-1284(1988)、西伯利亚霉素(Leber等人,J.Am.Chem.Soc.[美国化学学会杂志]110:2992-2993(1988))以及托马霉素(Arima等人,J.Antibiotics[抗菌素杂志]25:437-444(1972))。PBD,以及包含PBD的ADC还描述于国际专利申请公开号WO 2015/155345和WO 2015/157592中。

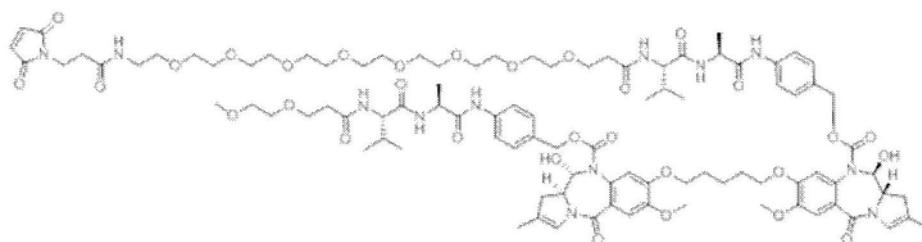
[0048] 在一个实施例中,PBD是PBD 3249,还在本文中被称为“SG3249”,并且详细描述于WO 2014/057074中,该PBD具有以下结构:

[0049]



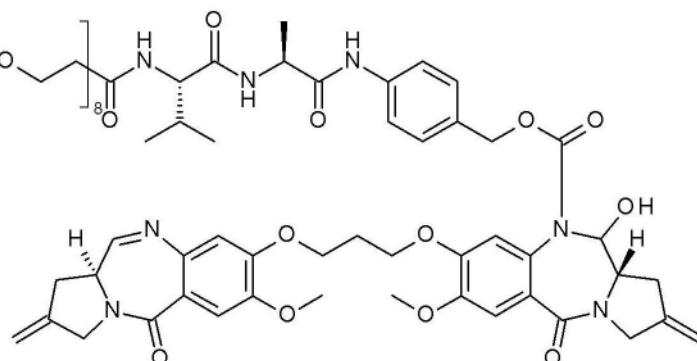
[0050] 在另一个实施例中,PBD是PBD 3315,还在本文中被称为“SG3315”,并且详细描述于WO 2015/052322中,该PBD具有以下结构:

[0051]



[0052] 在另一个实施例中,PBD是SG3400,还被称为化合物23,其详细描述于2017年2月10日提交的PCT/EP 2017/052988中,并且具有以下结构:

[0053]



[0054] 使用本领域已知的任何合适的方法(包括位点特异性或非位点特异性缀合方法),可以将BCMA单克隆抗体或其抗原结合片段与细胞毒素缀合。抗体的常规缀合策略通常依赖于通过赖氨酸或半胱氨酸将有效负载与抗体、其抗原结合片段随机(即非特异性)缀合。因此,在一些方面,将该抗体或其抗原结合片段与细胞毒性剂随机缀合,例如,通过抗体或抗体片段的部分还原,随后与所期望的药剂反应,其中接头部分被附接或不被附接。例如,可以使用二硫苏糖醇(DTT)或类似的还原剂还原抗体或其抗原结合片段。然后可以在二甲基亚砜(DMSO)的存在下,将接头部分被附接或不被附接的细胞毒性剂以摩尔过量添加至还原的抗体或抗体片段中。缀合后,可以添加过量的游离半胱氨酸以淬灭未反应的药剂。然后可以将反应混合物进行纯化,并且缓冲液更换为磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0055] 在其他实施例中,可以使用位点特异性缀合方法在特定的反应性氨基酸残基处将

细胞毒性剂与BCMA单克隆抗体缀合，产出具有均匀化学计量的均质ADC制剂。位点特异性缀合可以通过半胱氨酸残基或非天然氨基酸。在一个实施例中，细胞毒性剂可以通过至少一个半胱氨酸残基与抗体或其抗原结合片段缀合。特别地，例如，可以将细胞毒性剂化学缀合至在BCMA单克隆抗体的Fc区中特定Kabat位置处的氨基酸的侧链。在这方面，可以将细胞毒性剂通过抗体Fc区中的任何合适的位置处的半胱氨酸残基与BCMA单克隆抗体缀合，包括但不限于，在位置239、248、254、273、279、282、284、286、287、289、297、298、312、324、326、330、335、337、339、350、355、356、359、360、361、375、383、384、389、398、400、413、415、418、422、440、441、442、443和446(其中该编号对应于Kabat中的EU指数)中至少一个处的半胱氨酸。在一个实施例中，可以将细胞毒性剂通过BCMA单克隆抗体的特定Kabat位置239和/或442处的半胱氨酸残基和/或通过在BCMA抗体的Kabat位置239和240之间插入的氨基酸残基与BCMA单克隆抗体缀合(Dimasi等人,Mol Pharm[分子药理学],14(5):1501-1516(2017))。可替代地，细胞毒性剂可以通过硫醇-马来酰亚胺键(例如像，经由铰链和重链-轻链上的巯氢基反应性基团)与BCMA单克隆抗体或其抗原结合片段缀合。

[0056] 本文所述的BCMA单克隆抗体包含至少一种与其缀合的细胞毒素分子；然而，BCMA单克隆抗体可以包含任何合适数量的、与其缀合的细胞毒素分子(例如，1、2、3、4或更多种细胞毒素分子)，以实现所需的治疗效果。所期望地，本文所述的ADC包含与BCMA单克隆抗体缀合的两种细胞毒素分子。

[0057] 本文所述的BCMA抗体可用于期望靶向BCMA的任何治疗剂，例如过继细胞转移(ACT)、双特异性T细胞接合剂(BiTE)和纳米颗粒。在一个实施例中，本披露内容提供了嵌合抗原受体(CAR)，该嵌合抗原受体包含与T细胞激活部分连接的本文所述的BCMA单克隆抗体的抗原结合结构域。“嵌合抗原受体(CAR)”是人工构建的杂交蛋白或多肽，该杂交蛋白或多肽包含与T细胞信号传导或T细胞激活部分连接的抗体的抗原结合结构域(例如，单链可变片段(scFv))。CAR结构在过去20年中得到了发展，最常见的是掺入了源自单克隆抗体(mAb)的单链可变片段(scFv)和来自TCR $\zeta$ 链的信号传导基序(被称为“第一代”CAR)(参见，例如，Okur,F.V.,Brenner,M.K.,Methods Mol.Biol.[分子生物学方法],651:319-45(2010)；以及Lee等人,Clin.Cancer.Res.[临床癌症研究],18(10):2780-2790(2012))。最近，已经开发出第二代和第三代CAR，其掺入了来自例如CD28、4-1BB(CD137)和/或CD134(OX-40)的一个(“第二代”)或两个(“第三代”)共刺激激活基序，这些基序增强体内增殖、细胞毒性和持久性(参见，例如，Finney等人,J.Immunol.[免疫学杂志],172:104-13(2004)；Imai等人,Leukemia[白血病],18:676-84(2004)；Maher等人,Nat Biotechnol.[自然生物技术],20:70-5(2002)；Milone等人,Mol Ther.[分子疗法],17:1453-64(2009)；以及Lee等人，同上)。

[0058] CAR的抗原结合结构域可包含完整的单克隆抗体或单克隆抗体片段，如本文所述。在一个实施例中，CAR的抗原结合结构域可以包含抗BCMA单克隆抗体的单链Fv(scFv)片段。嵌合抗原受体和用于产生CAR的方法进一步描述于例如，Riviere,I.和M.Sadelain,Mol.Ther.[分子疗法],25(5):1117-1124(2017)；Davila,M.L.和M.Sadelain,Int.J.Hematol.[国际血液学杂志],104(1):6-17(2016)；以及美国专利申请公开2015/0051266 A1中。

[0059] 本披露内容还提供了组合物，该组合物包含上述抗体或抗体-药物缀合物以及药学上可接受的(例如，生理学上可接受的)载体。在本发明的范围内可以使用本领域已知的

任何合适的载体。载体的选择将部分地由可向其上施用组合物的特定位点以及用于施用该组合物的特定方法来确定。组合物可以任选地是无菌的。可以根据在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药学科学与实践],第21版,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA[利平科特威廉姆斯与威尔金斯出版社,费城,宾夕法尼亚州](2001)中所述的常规技术来产生组合物。

[0060] 该组合物所期望地包含处于有效治疗或预防多发性骨髓瘤的量的抗体或抗体-药物缀合物。因此,本披露内容提供了杀伤多发性骨髓瘤细胞的方法,该方法包括使表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞与本文所述的抗体或抗体-药物缀合物、包含本文所述的抗体或ADC的组合物接触,由此该抗体或抗体-药物缀合物与多发性骨髓瘤细胞上的BCMA结合,并杀伤多发性骨髓瘤细胞。本披露内容还提供了本文所述的抗体或ADC、或包含该抗体或ADC的组合物在制造用于治疗多发性骨髓瘤的药物中的用途。如本文所述,多发性骨髓瘤(也称为浆细胞骨髓瘤或卡勒氏病)是浆细胞的癌症,该浆细胞是通常负责产生抗体的白细胞的一种类型(Raab等人,Lancet[柳叶刀],374:324-329(2009))。多发性骨髓瘤影响1至4人/100,000人/年。该病在男性中更为常见,并且由于仍未知的原因,其在非裔美国人中的发病率是高加索美国人的两倍。多发性骨髓瘤是最不常见的血液系统恶性肿瘤(14%),并占所有癌症的1% (Raab等人,同上)。多发性骨髓瘤的治疗通常包括大剂量化疗,然后是造血干细胞移植(同种异体或自体);然而,在已经接受过这种治疗的多发性骨髓瘤患者中高复发率是常见的。如上所述,BCMA由多发性骨髓瘤细胞高度表达(参见,例如,Novak等人,同上;Neri等人,同上;Bellucci等人,同上;以及Moreaux等人,同上)。

[0061] 如本文所证明,BCMA还在多发性骨髓瘤干细胞上表达。因此,本披露内容提供了杀伤多发性骨髓瘤干细胞的方法,该方法包括使表达BCMA的多发性骨髓瘤干细胞与本文所述的抗体-药物缀合物、或包含本文所述的ADC的组合物接触,由此该抗体-药物缀合物与多发性骨髓瘤干细胞上的BCMA结合,并杀伤多发性骨髓瘤干细胞。可以通过CD19的表面表达和缺失CD138表面表达来鉴定多发性骨髓瘤患者骨髓中的多发性骨髓瘤干细胞(参见,例如,Matsui等人,Blood[血液],103:2332-6(2004))。这些细胞是独特的克隆生成和移植免疫缺陷的小鼠,而定义为CD138+CD19-的骨髓瘤浆细胞则不是。多发性骨髓瘤干细胞还对当前的疗法有抗性(Matsui等人,Cancer Res.[癌症研究],68:190-7(2008))。

[0062] 可以将本文所述的抗体-药物缀合物或包含该抗体-药物缀合物的组合物与离体、体内或体外表达BCMA的多发性骨髓瘤细胞群接触。“离体”是指在具有自然条件改变最小的生物体外部的人工环境中,在细胞或组织内或在细胞或组织上进行的方法。相反,术语“体内”是指在处于正常,完整状态的活生物体中进行的方法,而“体外”方法是使用已从其常规生物学环境中分离出来的生物体组分进行的。在一个实施例中,多发性骨髓瘤细胞是在体内与本文所述的ADC或包含该ADC的组合物接触的人多发性骨髓瘤细胞。

[0063] 如本文所用的,术语“治疗”(“treatment”、“treating”)等是指获得所期望的药理学和/或生理学效应。优选地,该作用是治疗性的,即,该作用部分地或完全地治愈疾病和/或归因于该疾病的不良症状。为此,本发明的方法包括施用“治疗有效量”的抗体或ADC、或包含该抗体或ADC以及药学上可接受的载体的组合物。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现所期望的治疗结果的量。治疗有效量可以根据以下因素而变化,例如:个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体或ADC在个体中引起所期望的应答的能力。例如,

本发明的ADC的治疗有效量是在多发性骨髓瘤细胞上与BCMA结合并破坏它们的量。

[0064] 可替代地,药理和/或生理作用可以是预防性的,即,该作用完全或部分地预防疾病或其症状。在这方面,本发明的方法包括向易患多发性骨髓瘤的哺乳动物施用“预防有效量”的ADC或包含ADC的组合物。“预防有效量”是指在所需的剂量和时间段内有效实现所期望的预防结果(例如,预防疾病发作)的量。

[0065] 可以通过定期评估接受治疗的患者来监测治疗或预防功效。在一个实施例中,本文所述的ADC对表达BCMA的骨髓瘤细胞的增殖抑制或遏制了至少约10% (例如,至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%)。可以使用本领域已知的任何合适方法来测量细胞增殖,例如测量将标记的核苷(例如,3H-胸昔或溴脱氧尿昔Brd(U))掺入基因组DNA中(参见,例如, Madhavan, H.N., J. Stem Cells Regen. Med. [干细胞与再生医学杂志], J(1):12-14 (2007))。

[0066] 可以使用标准施用技术(包括例如静脉内、腹膜内、皮下),向哺乳动物(例如人)施用本文所述的抗体或ADC、或包含该抗体ADC的组合物。更优选地,通过静脉内注射向哺乳动物施用抗体或ADC,或包含该抗体或ADC的组合物。

[0067] 可以将本文所述的抗体或ADC,或包含该抗体或ADC的组合物与一种或多种可以向哺乳动物共同施用的其他治疗剂一起施用。如本文所用的,术语“共同施用”是指施用一种或多种另外的治疗剂和本文所述的抗体或ADC,或包含该抗体或ADC的组合物,其时间足够接近以使得该抗体或ADC可以增强一种或多种其他治疗剂的作用,或反之亦然。在这方面,可以首先施用抗体或ADC、或含有该抗体或ADC的组合物,并且然后可以施用一种或多种其他治疗剂,或反之亦然。例如,可以将抗体或ADC、或包含该抗体或ADC的组合物与其他药剂(例如,作为佐剂)组合施用,用于治疗或预防多发性骨髓瘤。在这方面,抗体或ADC、或包含该抗体或ADC的组合物可以与至少一种其他的抗癌剂组合使用,这些其他的抗癌剂包括例如本领域已知的任何合适的化学治疗剂、电离辐射剂、小分子抗癌剂、癌症疫苗、生物治疗(例如其他单克隆抗体、抗癌病毒、基因疗法和过继性T细胞转移)和/或手术。

[0068] 以下实例进一步说明了本发明,但当然不应解释为以任何方式限制其范围。

[0069] 实例1

[0070] 该实例描述了针对B细胞成熟抗原(BCMA)的单克隆抗体的产生。

[0071] 根据Kilpatrick等人,Hybridoma[杂交瘤细胞],16(4):381-389(1997)中所述的RIMMS免疫方案,六周龄雌性Ablexis转基因小鼠(阿莱克斯有限公司(Ablexis, LLC),旧金山,加利福尼亚州)接受以下的六轮皮下注射:单独的经纯化的重组人(rHu)BCMA-Fc(处理1),或用rHu BCMA-Fc和食蟹猴BCMA-Fc(食蟹猴BCMA-Fc)或在多个位点表达Hu BCMA或食蟹猴BCMA的粘附性293细胞(Ad293)两者的交替免疫(处理2)。以2-3天的间隔经过13天的过程免疫小鼠。对于每轮免疫,首先用异氟烷麻醉小鼠。免疫原在完全或不完全的弗氏佐剂和TITERMAX®黄金佐剂(Gold adjuvant)(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),圣路易斯,密苏里州)中乳化,并在多个位点双向注射。在第13天收集测试出血,并在表达人和食蟹猴BCMA的粘附性293细胞上检测抗原ELISA和FACS结合。腹膜内给予具有良好血清滴度的小鼠预融合物加强(pre-fusion boost),并且在第17天处死。根据聚乙二醇融合方法(罗氏诊断公司(Roche Diagnostics),印第安纳波利斯,印第安纳州),收获淋巴结细胞并与骨髓瘤细胞系P3-X63-Ag8.653融合,以产生稳定的杂交瘤。

[0072] 通过在直接结合ELISA中筛选杂交瘤上清液,然后在表达BCMA的Ad293细胞上进行FACS来鉴定抗BCMA特异性杂交瘤。使用二级-皂草素缀合物,Fab-ZAP(高级靶向系统公司(Advanced Targeting Systems),圣地亚哥,加利福尼亚州,IT-48)并且通过FACS与细胞系上表达的内源性BCMA结合,进一步测试阳性杂交瘤在体外结合、内化、并杀伤NCI-H929多发性骨髓瘤细胞的能力。基于内化和细胞杀伤力,然后将杂交瘤进行有限稀释克隆并扩增以用于抗体纯化和可变区基因拯救。

[0073] 第一个处理产出了一组44种仅人的结合剂以及4种人和食蟹猴交叉反应结合剂。然后通过在表达BCMA的粘附性293细胞和表达内源性人BCMA的NCI-H929细胞系上进行的FACS进一步测试这48种抗体。通过以与内源性人BCMA的最佳结合对抗体进行排名来鉴定25个杂交瘤细胞系的领先的组。总共11个杂交瘤进行了亚克隆、放大、测序和纯化。还评估了克隆的基于Fab Zap的杀伤。将一种抗体(克隆4679)重组克隆为人IgG1,用于进一步评估。

[0074] 第二个处理产出一组用于用rHu/食蟹猴BCMA-Fc免疫的98种结合剂、用于用rHu/食蟹猴BCMA-Fc和表达食蟹猴BCMA的Ad293细胞免疫的九种结合剂、和用于用同时表达Hu和食蟹猴BCMA的Ad293细胞免疫的零种结合剂。通过FACS进一步测试了这些杂交瘤与TACI和BAFF-R的结合,并消除了显示出任何可检测到的与TACI和BAFF-R的结合的抗体。这些二级筛选以及FabZap测定导致鉴定了八个杂交瘤,这些杂交瘤向前进行了有限稀释克隆(LDC)。基于它们的活性,然后将两个克隆(克隆756和15B2)转化为人IgG1,用于进一步评估。

[0075] 通过FACS分析抗体4679、756和15B2GL(如下所述),以使用在Ad293细胞上稳定表达的受体重组形式,从而评估抗体与人BCMA、食蟹猴BCMA、TACI和BAFF-R的结合。通过将抗体4679、756和15B2GL与200,000个细胞在4°C下孵育45分钟,然后用PBS+2%FBS洗涤两次,进行结合测定。然后将细胞与Alexa-Fluor 647标记的二抗在4°C下孵育,然后在PBS+2%FBS中洗涤两次。根据制造商建议的稀释,在对照孔中添加抗BAFF-R、抗TACI和抗人BCMA-APC标记的抗体。将细胞重悬于200uL PBS+2%FBS+DAPI,并使用BD生物科学公司(Becton Dickinson Biosciences)LSRII细胞仪分析抗体与活细胞的结合。抗体15B2GL是唯一测试的不与BAFF-R和/或TACI结合的食蟹猴交叉反应性抗体,如图1所示。

[0076] 使用设计为使15B2中的四个非种系残基发生突变的引物,将15B2单克隆抗体突变为种系形式(15B2GL)。将15B2野生型DNA用作QuikChange Lightning诱变(安捷伦基因组学公司(Agilent Genomics),圣克拉拉,加利福尼亚州)的模板DNA。将STBIII细胞(英杰公司(Invitrogen)/赛默飞世尔科技公司(Thermofisher Scientific),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)用于转化。序列验证后,进行BCMA结合和动力学测定以比较15B2GL和15B2WT的结合,并生成了15B2GL的前导优化的(LO)克隆的集合。简言之,将15B2克隆到设计用于细菌表达的FAb表达运载体中。重链中的二十七个残基和轻链中的十九个残基各自用设计成允许十九个不同氨基酸(除半胱氨酸之外)的引物进行简约突变。使用QuikChange Lightning诱变试剂盒(安捷伦基因组学公司(Agilent Genomics),圣克拉拉,加利福尼亚州)进行诱变。

[0077] 通过结合ELISA筛选大约一百个集落/位置,总共6000个克隆。通过捕获低密度的人BCMA并在细菌表达48小时后使用细菌上清液来测量ELISA结合。命中率被定义为比15B2GL对照高两倍以上。通过ELISA对食蟹猴BCMA(不与非特异性蛋白结合)确认单个氨基酸命中。然后将来自简约筛选的经鉴定的命中组合用于引物设计,以生成组合文库。使用15B2GL作为亲本模板和ELISA对照,将上述具有ELISA结合的FAb筛选方法作为组合文库重

复进行。然后将组合筛选后鉴定的命中克隆到设计用于ADC缀合的IgG哺乳动物表达运载体(“Maia”)中。蛋白在293HEK细胞中表达，并通过蛋白A亲和色谱法纯化用于进一步测试。

[0078] 使用Fab-ZAP和通过与如上所述的细胞系上表达的内源性BCMA的FACS结合，评估15B2GL抗体和15B2GL的L0克隆在体内的结合、内化并杀伤H929多发性骨髓瘤细胞的能力。简言之，将抗体与200,000个细胞在4℃下孵育30分钟，然后用PBS+2%FBS洗涤两次。将细胞重悬浮于100uL冷的PBS+2%FBS中，并保持在4℃下。在某些时间点处，洗涤细胞并将细胞重悬浮于温热的RPMI+10%FBS中，并置于37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中。在实验结束时，洗涤细胞，并且然后与Alexa-Fluor 647标记的二抗在4℃下孵育，然后在PBS+2%FBS中洗涤两次。将细胞重悬浮于200μL PBS+2% FBS+DAPI，并使用BD生物科学公司(Becton Dickinson Biosciences)LSRII细胞仪分析抗体与活细胞的结合。如与抗BCMA抗体J6M0(描述于美国专利9,273,141)和L0抗体相比，通过该方法15B2GL抗体表现出独特且快速的内化。

[0079] 基于BCMA结合、动力学筛选(如上所述的)和内化，选择了单克隆抗体15B2GL，并选择了5个L0克隆(即I09、L15、P10、N22和M02)用于纯化并与15B2GL缀合。

[0080] 单克隆抗体15B2(野生型和种系)和L0克隆I09、L15、P10、N22和M02的重链和轻链可变区的氨基酸序列显示在表1中。

[0081] 表1

抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0082]	15B2GL VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYVEYFQ YWGQQTLTVTSS	7
	15B2GL VL EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQQGKLEIK	8
	15B2WT 可变重链 (VH) EIQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARGGNYYVEYFQ YWGQQTLTVTSS	9
	15B2WT 可变轻链 (VL) EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASN RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVFCQQYGSSPITFGQQGKLEIK	10
	I09 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRDN	11

抗体	氨基酸序列	SEQ ID NO:
[0083]	NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ QWGQGTLVTVSS	
	I09 VL EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGAASNRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYSSDPITFGQGTKLEIK	12
	L15 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGTLVTVSS	13
	L15 VL EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGAASNRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTKLEIK	14
	M02 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYYVEYFQ YWGQGTLVTVSS	15
	M02 VL EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGAASNRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYSSDPITFGQGTKLEIK	16
	N22 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGSSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYFVEYFQ YWGQGTLVTVSS	17
	N22 VL EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGAASNRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYSSSPITFGQGTKLEIK	18
	P10 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRSYSMNW VRQAPGKGLEWVSSISGQSNYIYYADSVKGRFTISRD NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYYYVEYFQ YWGQGTLVTVSS	19
	P10 VL EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQYISSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGAASNRTGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYTDSPITFGQGTKLEIK	20

[0084] 该实例的结果证明了针对BCMA的单克隆抗体的产生。

[0085] 实例2

[0086] 根据本披露内容,该实例证明了产生抗体-药物缀合物(ADC)的方法,该抗体-药物缀合物包含与细胞毒素缀合的BCMA单克隆抗体。

[0087] 使用位点特异性缀合,将实例1所述的15B2GL单克隆抗体和优化的克隆与PBD有效负载SG3249缀合(Thompson等人,J.Control Release [控制释放杂志],236:100-116 (2016);Dimasi等人Mol Pharm.[分子药理学]2017年5月1日;14(5):1501-1516)。具体地,将纯化的抗体与40摩尔过量的还原剂TCEP(三(2-羧乙基)膦)在PBS pH 7.2、1mM EDTA(乙二胺四乙酸)中于37℃下孵育3小时。孵育后,通过使用10,000MWCO透析盒在4℃的PBS pH 7.2、1mM EDTA中进行2X透析来去除还原剂,然后与20摩尔当量的脱氢抗坏血酸在25℃下孵育4小时。随后,依次添加来自10% (v/v) DMSO储备液中的八当量的PBD有效负载SG3249,然后在室温下轻轻旋转孵育一小时。通过添加四个摩尔当量(超过SG3249)的N-乙酰基半胱氨酸淬灭该缀合反应。

[0088] 缀合过程导致8%至10%的聚集体形成。使用陶瓷羟基磷灰石II型色谱法(HT)去除大分子聚集体,缀合试剂(包括半胱氨酸淬灭的SG3249),如先前所述(Thompson等人,

J.Control Release[控制释放杂志],236:100-116(2016))。在25mN4组氨酸-HCl、7%蔗糖、0.02%聚山梨酯-80,pH 6中配制位点特异性ADC。

[0089] 为了确定单体含量、聚集体和片段,使用100 $\mu$ g (100 $\mu$ L体积)的抗体或ADC进行分析型尺寸排阻色谱法(SEC-HPLC),将所述抗体或ADC加载到TSK胶G3000WXL柱(东曹生命科学公司(Tosoh Bioscience),东京,日本))。流动相由0.1M硫酸钠、0.1M磷酸钠、和10%异丙醇(pH 6.8)组成。流速是1mL/min,并且每个分析在室温下进行20分钟。将疏水作用色谱法(HIC-HPLC)用于评估缀合和载药量分布,并使用丁基非多孔树脂(NPR)柱(4.6 $\mu$ m ID×3.5cm,2.5 $\mu$ m,东曹生命科学公司(Tosoh Bioscience))进行。流动相A由25mM Tris-HCl、1.5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,pH 8.0组成;并且流动相B由25mM Tris-HCl和5%异丙醇,pH 8.0组成。以1mg/mL的浓度加载100 $\mu$ L抗体或ADC,并以1mL/min的流速,以5%B至100%B的梯度经13min进行洗脱。将还原型反相色谱法(rRP-HPLC)用于确认链特异性缀合。使用42mM二硫苏糖醇(DTT)在PBS(pH 7.2)中的溶液将抗体和ADC在37°C下还原20分钟。将10 $\mu$ g还原抗体或ADC加载到聚合的反相介质(PLRP-S)1000A柱(2.1×50mm)(安捷伦技术公司(Agilent Technologies),圣克拉拉,加利福尼亚州)上,并在80°C下、以1mL/min的流速、以5%B至100%B的梯度,经25分钟(流动相A:水中0.1%三氟乙酸;流动相B:乙腈中0.1%三氟乙酸)进行洗脱。

[0090] 在与Agilent 6230 TOF(安捷伦技术公司,圣克拉拉,加利福尼亚州)偶联的Agilent 1290系列uHPLC上进行还原液相色谱质谱法分析(rLCMS),来确定重链和轻链上的缀合以及药物:抗体比率(DAR)。将2 $\mu$ g还原抗体或ADC加载到ZORBAX快速分离高分辨率(RRHD)300-二苯基柱(2.1×50mm,1.8 $\mu$ m)(安捷伦技术公司,圣克拉拉,加利福尼亚州)上,并以0.5mL/min的流速,使用2.1min后80%B的步长梯度(流动相A:水中0.1%甲酸;以及流动相B:乙腈中0.1%甲酸)进行洗脱。需要进行阳离子飞行时间MS扫描,并使用MassHunter软件(安捷伦技术公司,圣克拉拉,加利福尼亚州)进行数据收集和处理。如Thompson等人,同上中所述,使用rLCMS数据计算DAR。

[0091] 使用以下公式确定缀合效率,其中使用的理论DAR为2:

$$\text{缀合效率} = (\text{确定的DAR} \times \text{理论的DAR}) \times \frac{1}{100}。$$

[0093] 将所测试的抗体的缀合效率和DAR列出在表2中。

[0094] 表2.

构建体名称	有效负载	缀合效率	药物 : 抗体比率 (DAR)
15B2GL	SG3249	91	1.82
I09	SG3249	91	1.82
L15	SG3249	90	1.80
M02	SG3249	92	1.84
N22	SG3249	91	1.82
P10	SG3249	93	1.86

[0096] 根据本披露内容,该实例的结果证明了ADC的产生,这些ADC包含与吡咯并苯并二氮杂卓缀合的BCMA单克隆抗体。

[0097] 实例3

[0098] 该实例证明了本文所述的单克隆BCMA抗体与单体(可溶性)和膜结合的BCMA的结合亲和力。

[0099] 使用单体人sBCMA(金斯瑞公司(GenScript),皮斯卡塔韦(Piscataway),新泽西),使用ProteOn XPR36仪器(伯乐公司(Bio-Rad),赫拉克勒斯,加利福尼亚州),评估15B2GL单克隆抗体和优化的克隆I09、L15、P10、N22和M02(描述于实例1)的结合。还评估了J6M0的结合用于进行比较。将标准的氨基偶联用于将10mM乙酸钠缓冲液(pH 4.5)中制备的25 $\mu$ g/ml抗Fc多克隆抗体(杰克逊免疫研究公司(Jackson ImmunoResearch),西格罗夫,宾夕法尼亚州)固定于用20mM EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)和5mM碘基-NHS(N-羟基碘基琥珀酰亚胺)以约200-600共振单位(RU)的密度预激活的ProteOn GLC生物传感芯片(伯乐公司(Bio-Rad),赫拉克勒斯,加利福尼亚州)的表面。随后以1 $\mu$ g/ml的浓度注射15B2GL、I09、L15、P10、N22、M02和J6M0,用于通过固定的抗Fc多克隆抗体进行捕获。通过将在具有0.005% (v/v) Tween-20(在100-6.25nM的范围内)的PBS(pH 7.4)中制备的sBCMA的两倍连续稀释液以75uL/分钟流过捕获的表面150秒其中解离时间为600秒,来记录传感图。将ProteOn数据分析软件用于分析数据。

[0100] 将该实验的结果显示在图13和14以及表3中。

[0101] 表3. 使用BioRad ProteOn进行动力学测量

[0102]

抗体	Kon	Koff	Kd	nM
15B2GL	3.73E+05	2.27E-02	6.07E-08	60.7
N22	5.36E+05	8.73E-03	1.63E-08	16
I09	6.09E+05	5.99E-03	9.82E-09	9.8
M02	4.99E+05	4.97E-03	9.95E-09	9.9
L15	8.54E+05	3.86E-03	4.51E-09	4.5
P10	7.01E+05	3.73E-03	5.32E-09	5.3
J6M0	4.21E+05	4.69E-04	1.11E-09	1

[0103] 在内源性表达BCMA的多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞系(分别为NCI-H929和MM.1S)中,使用流式细胞术评估了15B2GL、I09、L15和J6M0与膜结合的人BCMA的结合。在表达人BCMA的Ad293细胞中还评估了15B2GL、I09、L15与膜结合的人BCMA的结合。通过将抗BCMA抗体与200,000个细胞在4℃下孵育30分钟,然后用PBS+2%FBS(FACS缓冲液)洗涤两次,来进行结合测定。使用12个点,3倍稀释系列评估了一系列抗体浓度。然后将细胞与5ug/mL山羊-抗人IgG-AF647二抗(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)在4℃下孵育,随后在PBS+2%FBS中洗涤两次。将细胞重悬浮于200uL PBS+2%FBS+DAPI中。

[0104] 使用BD生物科学公司(BD Biosciences)LSRII细胞仪和BD FACSDiva软件(BD生物科学公司,圣何塞,加利福尼亚州)测量活的单个细胞的荧光。使用FlowJo软件(FlowJo有限责任公司,阿什兰,俄勒冈州)分析数据。使用平均荧光强度值确定结合百分比,并使用Prism软件(GraphPad软件公司,拉荷亚,加利福尼亚州)确定EC50。该实验的结果显示在图15中。SPR和流式细胞术“表观亲和力”数据的总结显示在表4中。

[0105] 表4.

抗体	结合亲和力 (nM), 单体 BCMA	表现亲和力 (nM), 细胞结合的 BCMA		
		NCI-H929	MM.1S	Ad293+人 BCMA
[0106]	15B2GL	60.7	3.14	2.56
	N22	16	ND	ND
	I09	9.8	5.4	4.8
	M02	9.9	ND	ND
	L15	4.5	4.2	4.48
	P10	5.3	ND	ND
	J6M0	1	6.02	6.65

[0107] ND=未确定

[0108] 该实例的结果证明,单克隆抗BCMA抗体15B2GL与膜结合的BCMA强结合,并且与单体(可溶性)BCMA弱结合,这是与在这些测定中分析的其他单克隆抗体所独有的。

[0109] 实例4

[0110] 该实例证明使用本文所述的抗体-药物缀合物,在体外杀伤多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞的方法。

[0111] 使用 CELLTITER-GLO®试剂盒(普洛麦格公司,麦迪逊,威斯康辛州)中推荐的方案,在体外评估了由包含与SG3249缀合的15B2GL或其亲和力优化的克隆的抗体-药物缀合物对多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞系的杀伤。使用 CELLTITER-GLO®试剂盒(普洛麦格公司,麦迪逊,威斯康辛州)中推荐的方案,还评估了由游离的弹头SG3199对多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞系的杀伤。简言之,将在80µL RPMI+10%FBS中的5x 10<sup>3</sup>个细胞添加至白壁96孔板(Corning® Costar®, 赛默飞世尔科技公司,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)的内孔中。测试以下表达BCMA的细胞系:NCI-H929、EJM、MM.1R、JJN3、OPM-2、MM.1S、U266.B1和L363。还测试了BMCA阴性细胞系Raji和Jurkat。将抗体-药物缀合物稀释于在RPMI+10%FBS中的5x储备液(2.5µg/mL)中。然后将处理物在RPMI+10%FBS中以1:3连续稀释。以一式两份将20µL的该系列添加至细胞中,形成从0.5µg/mL最高浓度至3x 10<sup>-6</sup>µg/mL最低浓度的范围内的抗体-药物缀合物的12个点的剂量曲线。还包括同种型抗体-药物缀合物(IgG1-SG3249和IgG1-mc-MMAF)和仅培养基对照。在37°C,5%CO<sub>2</sub>下将板孵育96小时。孵育期结束时,将100µL底物溶液(普洛麦格公司,麦迪逊,威斯康辛州)添加到每个孔中。使用EnVision多标记板读取器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)测量发光。使用GraphPad Prism软件(GraphPad软件公司,拉荷亚,加利福尼亚州)对数据进行分析和绘图,并且确定半数最大抑制浓度(IC50)。

[0112] 每个细胞系的染色体易位信息取自Moreaux等人,2011和Boersma-Vreugdenhil等人,2004。使用AF647标记的15B2(Alexa Fluor 647蛋白标记试剂盒,赛默飞世尔科技公司,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)和针对Alexa Fluor 647的Quantum™ MESF试剂盒(磅斯实验室公司(Bangs Laboratories),费歇尔斯,印第安纳州(Fishers, IN))确定BCMA受体数。

[0113] 将该实验的结果显示在表5和图2A-2J中。

[0114] 表5.多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞系中的体外细胞毒性

细胞系	疾病起源	染色体易位	BCMA受体数	15B2GL-SG3249 IC50 (ng/mL)	SG3199 IC50 (pM)
NCI-H929	MM	t(4;14)	18931	5.99	5
EJM	MM	t(14;20)	14325	153	22
MM.1R	PCL	t(14;16)	9449	8.64	3
JJN-3	MM	t(14;16)	3221	36.28	13
OPM-2	MM	t(4;14)	2873	201	19
MM.1S	PCL	t(14;16)	2698	26.8	3
U266B1	MM	t(11;14)	2340	39.7	155
L-363	PCL	t(20;22)	930	31.4	NT
Raji	伯基特淋巴瘤	NA	0	> 500	NT
Jurkat	T 淋巴细胞	NA	0	> 500	3

[0115] [0116] BCMA=B细胞成熟抗原;NA=不适用;NT=未测试

[0117] 使用以上所述的方案,在可溶性BCMA (sBCMA) 的存在下,如与 I09-SG3249 ADC相比,在MM.1S细胞中评估了15B2GL-SG3249 ADC在体外杀伤多发性骨髓瘤细胞的能力,除了还用从表达人BCMA的Ad293细胞中收集的含有BCMA的条件培养基治疗的所测试的细胞系以外(图3A和3B)。在sBCMA的存在下,还将15B2GL-SG3249 ADC细胞杀伤与包含抗BCMA抗体J6M0的ADC进行比较,这在美国专利9,273,141中进行了描述。该实验的结果显示在图3中,证明了15B2GL-SG3249 ADC活性在临床相关水平的sBCMA的存在下,维持在比ADC I09-SG3249(图3A)、J6M0-mc-MMAF和J6M0-SG3249(图3B和表6)更高的程度。

[0118] 表6.

sBCMA (ng/mL)	测试品	IC50 (ng/mL)	效力损失的倍数
720	15B2GL-SG3249	29.12	2.01
270	15B2GL-SG3249	22.86	1.58
75	15B2GL-SG3249	16.09	1.11
0	15B2GL-SG3249	14.47	1.00
720	J6M0-SG3249	92.92	19.29
270	J6M0-SG3249	32.26	6.70
75	J6M0-SG3249	12.83	2.66
0	J6M0-SG3249	4.816	1.00
720	I09-SG3249	16.16	5.75
270	I09-SG3249	5.548	1.98
75	I09-SG3249	3.791	1.35
0	I09-SG3249	2.809	1.00
720	J6M0-mc-MMAF	1458	49.80
270	J6M0-mc-MMAF	159.7	5.45
75	J6M0-mc-MMAF	55.55	1.90

0	J6M0-mc-MMAF	29.28	1.00
---	--------------	-------	------

[0120] 该实例的结果证明了15B2GL-SG3249 ADC在体外杀伤多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞，并且甚至在可溶性BCMA的存在下，细胞杀伤活性得以维持。特别地，15B2GL-SG3249 ADC在体外对MM.1S和NCI-H929均具有细胞毒性，在sBCMA的存在下以高达720ng/mL的水平杀伤平均95%的肿瘤细胞，而其中对IC50的影响很小。从在单体BCMA和膜结合的BCMA之间具有类似的亲和力的抗体开发的ADC展现出sBCMA-剂量依赖性的效力下降，其中在720ng/mL sBCMA的存在下IC50发生20倍的变化。

#### [0121] 实例5

[0122] 该实例证明使用本文所述的抗体-药物缀合物，在体内杀伤多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞的方法。

[0123] 使用MATRIGEL™(BD生物科学公司, 圣何塞, 加利福尼亚州)，通过将表达BCMA的多发性骨髓瘤或浆细胞白血病细胞系(即, NCI-H929、JJN-3、MM.1S和MM.1R)植入雌性CB-17 SCID(C.B-17/IcrHsd-Prkdc-scid)或无胸腺的裸(Foxn1<sup>nu</sup>)小鼠，产生多发性骨髓瘤和浆细胞白血病的皮下异种移植小鼠模型。一旦肿瘤达到大约180mm<sup>3</sup>(NCI-H929细胞)、190mm<sup>3</sup>(JJN3细胞)、160mm<sup>3</sup>(MM.1S细胞)或175mm<sup>3</sup>(MM.1R细胞)，基于肿瘤大小将小鼠随机化，并置于给药组中，并如下所述用靶向BCMA的ADC进行治疗。

#### [0124] NCI-H929异种移植模型

[0125] 将小鼠以0.3mg/kg用ADC 15B2GL-SG3249、I09-SG3249、L15-SG3249的单次静脉内剂量进行治疗或每周以0.3mg/kg剂量用J6M0-mc-MMAF静脉内给药持续2周。对照小鼠保持未治疗。在肿瘤植入后观察用15B2GL-SG3249、I09-SG3249和L15-SG3249治疗的小鼠持续99天，其中没有肿瘤再生的证据，如图4所示。在任何给药组中没有观察到体重损失。

#### [0126] JJN3异种移植模型

[0127] 将小鼠以1mg/kg用15B2GL-SG3249、I09-SG3249、和L15-SG3249 ADC的单次静脉内剂量进行治疗或每周以1mg/kg剂量用J6M0-mc-MMAF ADC静脉内给药持续3周。对照小鼠保持未治疗。在肿瘤植入后观察用15B2GL-SG3249、I09-SG3249和L15-SG3249治疗的小鼠持续104天，其中没有肿瘤再生的证据，如图5所示。在任何给药组中没有观察到体重损失。

#### [0128] MM.1S异种移植模型

[0129] 将小鼠以1mg/kg用15B2GL-SG3249、I09-SG3249、L15-SG3249 ADC的单次静脉内剂量进行治疗或每周两次以1mg/kg剂量用J6M0-mc-MMAF静脉内给药持续4周。对照小鼠保持未治疗。在肿瘤植入后观察用15B2GL-SG3249、I09-SG3249和L15-SG3249治疗的小鼠持续99天，其中没有肿瘤再生的证据，如图6所示。在任何给药组中没有观察到体重损失。

#### [0130] MM.1R异种移植模型

[0131] 将小鼠以1mg/kg用15B2GL-SG3249的单次静脉内剂量进行治疗或每周以3mg/kg剂量用J6M0-mc-MMAF静脉内给药持续4周。对照小鼠保持未治疗。在肿瘤植入后观察用15B2GL-SG3249治疗的小鼠持续109天，其中没有肿瘤再生的证据，如图7所示。在任何给药组中没有观察到体重损失。

[0132] 该实例的结果证明，如与其他靶向表达BCMA的细胞的ADC相比，ADC15B2GL-SG3249展示出在体内增加的抗肿瘤功效。

#### [0133] 实例6

[0134] 该实例证明,多发性骨髓瘤干细胞表达BCMA。

[0135] 多发性骨髓瘤(MM)患者的骨髓含有小群的癌症干细胞(CSC),这些癌症干细胞抗体通过CD19的表面表达和缺失CD138表面表达在患者的骨髓中进行鉴定(Matsui等人,Blood[血液],103:2332-6(2004))。

[0136] 通过流式细胞术在四个多发性骨髓瘤患者样品的干细胞群中评估BCMA表达。从普特尼克公司(Proteogenex, Inc.) (卡尔弗城,加利福尼亚州)中获得样品(参见表7),并且将单个的多发性骨髓瘤(MM)样品在37°C水浴中融化。

[0137] 表7.MM患者信息。

[0138]

样品ID	性别	年龄	种族	临床诊断	疾病状况
MM263BM	M	63	高加索人	MM	诊断时
MM277BM	F	66	高加索人	MM	诊断时
MM276BM	F	81	高加索人	MM	诊断时
MM284BM	M	84	高加索人	MM	对治疗有抗性

[0139] 将解冻的细胞添加到10mL PBS中,并使用ViCELL™计数器(贝克曼-库尔特生命科学公司(Beckmann-Coulter Life Sciences),印第安纳波利斯,印第安纳州)进行计数。制备等分试样的细胞悬液用于集落形成测定,同时将剩余的细胞悬浮液以低速离心从而沉淀细胞。按照制造商的说明书对细胞进行Fc封闭,然后以200,000个细胞/孔铺板在96孔板中。将板离心以沉淀细胞,倾析出Fc封闭液,并将细胞样品重悬浮于BV染色缓冲液中,然后用包含市售来源的直接缀合的抗体的适当抗体组染色(显示在表8和9中)。

[0140] 表8.抗体染色组

[0141]

样品	描述	抗体组
1	单染色BV510	CD3-BV510、CD34-BV510、CD14-BV510、CD193-BV510
2	单染色PE	CD138-PE
3	单染色APC	CD19-APC
4	单染色PE/Cy7	BCMA-PE/Cy7
5	未染色的	
6	单染色DAPI	DAPI
7	FMO (BV510)	CD138-PE、CD19-APC、BCMA-PE/Cy7、DAPI

样品	描述	抗体组
[0142]	8 FMO (PE)	CD3-BV510、CD34-BV510、CD14-BV510、CD193-BV510、CD19-APC、BCMA-PE/Cy7、DAPI
	9 FMO (APC)	CD3-BV510、CD34-BV510、CD14-BV510、CD193-BV510、CD138-PE、BCMA-PE/Cy7、DAPI
	10 FMO (PE/Cy7)	CD3-BV510、CD34-BV510、CD14-BV510、CD193-BV510、CD138-PE、CD19-APC、DAPI
	11 全部染色	CD3-BV510、CD34-BV510、CD14-BV510、CD193-BV510、CD138-PE、CD19-APC、BCMA-PE/Cy7、DAPI
	12 FMO (DAPI)	CD3-BV510、CD34-BV510、CD14-BV510、CD193-BV510、CD138-PE、CD19-APC、BCMA-PE/Cy7
	13 补偿珠BV510	CD193-BV510
	14 补偿珠PE	CD138-PE
	15 补偿珠APC	CD19-APC
	16 补偿珠PE/Cy7	BCMA-PE/Cy7

[0143] 表9. 用于流式细胞术分析的抗体

抗体/试剂	克隆	销售商	目录号
CD3-BV510	OKT3	生物传奇公司	317332
CD34-BV510	581	生物传奇公司	343528
CD14-BV510	M5E2	生物传奇公司	301842
CD193-BV510	5E8	生物传奇公司	310722
CD19-APC	SJ25C1	BD生物科学公司 (BD Biosciences)	340437
[0144]	CD138-PE	B-A38	贝克曼库尔特公司 (Beckman Coulter) A40316
	BCMA-PE/Cy7	19F2	生物传奇公司 357508
	DAPI		赛默飞世尔科技公司 62248
	FC阻断		BD法明根公司 (BD Pharmingen) 564220
	Horizon Brilliant 染色缓冲液		BD生物科学公司 (BD Biosciences) 563794
	Ultra Comp珠		电子生物科学公司 (eBiosciences) 01-2222-42

[0145] 另外,将补偿珠分别用测试抗体染色。将板在4℃下,在黑暗中孵育30分钟。将板离心,并且将细胞在DPBS+2% FBS中洗涤,然后重悬浮于200µL DPBS+2% FBS+DAPI中。在BD LSRII流式细胞仪(BD生物科学公司,圣何塞,加利福尼亚州)上评估来自每个孔的细胞,并生成FCS文件。使用以下门控策略进行细胞鉴定:利用补偿珠和单染色数据,在FlowJo®10 (FlowJo有限责任公司,阿什兰,俄勒冈州)中用自动补偿矩阵进行补偿。然后选择通过FSC-A相对SSC-A图门控的浆细胞用于通过DAPI相对SSC-W图的活的单细胞。然后通过BV-510与SSC-A图,使用排除门去除对CD3,CD14,CD34和CD193染色呈阳性的细胞。然后在CD138-PE相对CD19-APC图中分析该群。在被定义为CD19+/CD138-的MM CSC群以及被定义为CD19-/CD138+的MM浆细胞群上生成BCMA表达的直方图。基于适当的荧光减一(FMO)对照设置分析门控。所有样品显示出小百分比的对BCMA表达呈阳性的CD138+CD19-细胞,如图7所示。干细胞群上BCMA表达的水平通常与浆细胞上观察到的水平相等(除了MM277之外,其中水平低,但BCMA表达仍为阳性)。

[0146] 该实例的结果证明了BCMA在多发性骨髓瘤癌症干细胞上表达。

[0147] 实例7

[0148] 该实例证明了15B2GL-SG3249抗体-药物缀合物杀伤多发性骨髓瘤干细胞。

[0149] 由于MM干细胞能够在体外形成集落(Matsui等人,Blood [血液],103:2332-6 (2004)),对ADC 15B2GL-SG3249杀伤实例2中表征的MM骨髓活检组织中的克隆生成细胞的能力进行测试。特别地,使用ViCELL™计数器(贝克曼-库尔特生命科学公司,印第安纳波利斯,印第安纳州)对细胞进行计数,并以比所需高10倍的密度将细胞重悬浮于IMDM+2% FBS中用于铺板。按照制造商的说明书,将METHOCULT™ H4434 Classic(干细胞技术公司

(StemCell Technologies, Inc.), 温哥华市, 卑诗省, 加拿大) 与2000个细胞/mL(对于MM263、MM284和MM276) 以及4000个细胞/mL(对于MM277) 混合。然后将25-400ng/mL的测试ADC 15B2GL-SG3249和J6M0-mc-MMAF添加至合适的管中。仅以400ng/mL的高剂量添加对照IgG1-SG3249抗体。将所有试管彻底涡旋以混合, 并然后不受干扰放置, 使气泡升至顶部。一旦气泡上升后, 用16号钝头针将400μL移出, 并小心地铺板到24孔超低附接板(VWR, 拉德诺郡, 宾夕法尼亚州) 的一个孔中。每种处理均一式两份地铺板于板的内孔中。将PBS添加到外部孔中, 并将板在37°C下孵育7-10天。通过扫描 Celigo® 图像细胞仪(耐克赛生物科学公司(Nexcelom Biosciences), 劳伦斯, 马萨诸塞州(Lawrence, MA))上的平板, 对集落形成进行记录, 用眼计数集落。如图8所示, 在所有的4种情况下, 15B2GL-SG3249能够杀伤克隆生成细胞, 而J6M0-mc-MMAF不能。在所测试的最高剂量(400ng/mL)处, 15B2GL-SG3249能够分别杀伤100%的MM263和MM284的集落, 以及87.5%和91%的MM276和MM277的集落。相反, 400ng/mL的J6M0-mc-MMAF不减少针对MM263形成的集落数, 并且仅导致分别针对MM276、MM277和MM284的集落形成减少12.5%、40%和50%。

[0150] 该实例的结果证明, 抗体-药物缀合物15B2GL-SG3249靶向并杀伤表达BCMA的多发性骨髓瘤癌症干细胞。

[0151] 实例8

[0152] 该实例证明使用本文所述的抗体-药物缀合物, 在体外杀伤多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞的方法。

[0153] 使用CELLTITER-GLO®试剂盒(普洛麦格公司, 麦迪逊, 威斯康辛州), 在体外评估了由包含与SG3400缀合的15B2GL的抗体-药物缀合物对多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞系的杀伤作用, 如实例4所述。测试以下表达BCMA的细胞系: NCI-H929、EJM、MM.1R、JJN3、OPM-2、MM.1S、U266.B1和L363。还测试了BCMA阴性细胞系Raji和Jurkat。将抗体-药物缀合物稀释于在RPMI+10% FBS中的5x储备液(25μg/mL)中。然后将处理物在RPMI+10% FBS中以1:3连续稀释。以一式两份将20μL的该系列添加至细胞中, 形成从5μg/mL最高浓度至 $2.8 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{mL}$ 最低浓度的范围内的抗体-药物缀合物的12个点的剂量曲线。还包括同种型抗体-药物缀合物(IgG1-SG3400)和仅培养基对照。在37°C, 5% CO<sub>2</sub>下将板孵育96小时。孵育期结束时, 将100μL底物溶液(普洛麦格公司, 麦迪逊, 威斯康辛州)添加到每个孔中。使用EnVision多标记板读取器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer), 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州)测量发光。使用GraphPad Prism软件(Graphpad软件公司(GraphPad Software, Inc.), 拉荷亚, 加利福尼亚州), 对数据进行分析和绘图。该实验的结果显示在图10A-10J中。

[0154] 该实例的结果证明15B2GL-SG3400 ADC在体外杀伤多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞。

[0155] 实例9

[0156] 该实例证明使用本文所述的抗体-药物缀合物, 在体内杀伤多发性骨髓瘤和浆细胞白血病细胞的方法。

[0157] 使用MATRIGEL™(BD生物科学公司(BD Biosciences), 圣何塞, 加利福尼亚州), 通过将表达BCMA的多发性骨髓瘤或浆细胞白血病细胞系(即, NCI-H929和MM.1S)植入雌性CB-17 SCID(C.B-17/IcrHsd-Prkdc-scid)小鼠, 产生多发性骨髓瘤和浆细胞白血病的皮下异

种移植小鼠模型。一旦肿瘤达到大约 $200\text{mm}^3$ (NCI-H929细胞)或 $180\text{mm}^3$ (MM.1S细胞),基于肿瘤大小将小鼠随机化,并置于给药组中,并如下所述用靶向BCMA的ADC进行治疗。

[0158] NCI-H929异种移植模型

[0159] 将小鼠以 $1\text{mg}/\text{kg}$ 用ADC IgG1-SG3400或以 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 或 $1\text{mg}/\text{kg}$ 用15B2GL-SG3400的单次静脉内剂量进行治疗或以 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 或 $1\text{mg}/\text{kg}$ 单次剂量用J6M0-SG3400静脉内给药。对照小鼠保持未治疗。在肿瘤植入后观察用15B2GL-SG3400治疗的小鼠持续74天,其中没有肿瘤再生的证据,如图11所示。在任何给药组中没有观察到体重损失。

[0160] MM.1S异种移植模型

[0161] 将小鼠以 $1\text{mg}/\text{kg}$ 或 $3\text{mg}/\text{kg}$ 用ADC IgG1-SG3400或15B2GL-SG3400的单次静脉内剂量进行治疗或以 $1\text{mg}/\text{kg}$ 或 $3\text{mg}/\text{kg}$ 剂量用J6M0-SG3400静脉内给药。对照小鼠保持未治疗。在肿瘤植入后观察用 $3\text{mg}/\text{kg}$ 的J6M0-SG3400治疗的小鼠持续85天,其中没有肿瘤再生的证据,如图12所示。在任何给药组中没有观察到体重损失。

[0162] 该实例的结果证明ADC 15B2GL-SG3400在体内展现出抗肿瘤功效。

[0163] 实例中描述的数据证明,包含单克隆抗体15B2GL的ADC在MM的临床前模型中显示出有效的抗肿瘤活性。重要的是,体外实验表明该活性在sBCMA存在的情况下得以维持。这些数据进一步证明,带有有效PBD有效负载的ADC15B2GL-SG3249有效地靶向大块骨髓瘤浆细胞以及更静止的CD19+/CD138-克隆生成细胞,这可以在这种遗传异质性疾病中为更持久的临床应答提供机会。

[0164] 本文引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请和专利)特此均通过引用的方式并入本文,其程度如同每个参考文献被单独地且具体地指示为通过引用并入并在本文以其全文阐述。

[0165] 除非本文另外指示或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中(尤其是在所附权利要求的上下文中),术语“一个/种(a和an)”和“该”和“至少一个”以及类似指称对象的使用应解释为包括单数和复数二者。除非本文另外指示或与上下文明显矛盾,术语“至少一个”之后是一个或多个项目的列表的使用(例如,“A和B中的至少一个”)应理解为是指从所列项目(A或B)中选择的一个项目或所列项目(A和B)中两个或更多个的任意组合。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包扩”和“含有”应被解释为开放式术语(即,意思是“包括但不限于”)。除非本文另外指出,否则本文数值范围的列举仅旨在用作分别指代落入该范围内的每个单独值的速记方法,并且每个单独值都被并入说明书中,就如同其在本文中被单独叙述一样。本文描述的所有方法可以按任何适合的顺序进行,除非本文另外指示或明显地与上下文矛盾。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“诸如”的使用仅旨在更好地说明本发明,而不对本发明的范围做出限制,除非另外要求。说明书中的语言不应当被解释为指示任何未要求保护的要素是实践本发明所必需的。

[0166] 本文描述了本发明的优选实施例,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳方式。在阅读前述说明之后,那些优选实施例的变型对于本领域普通技术人员而言将变得显而易见。发明人期望熟练的技术人员适当地采用这样的变型,并且诸位发明人打算以不同于本文具体描述的方式来实践本发明。因此,本发明包括适用法律所允许的所附权利要求中叙述的主题的所有修改和等同物。此外,除非本文另外指示或与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述要素在其所有可能的变化中的任何组合。

## 序列表

<110> 英商梅迪缪思有限公司 (MEDIMMUNE, LLC)

<120> BCMA单克隆抗体-药物缀合物

<130> BCMA-100-US-NP

<150> 62/596194

<151> 2017-12-08

<150> 62/539825

<151> 2017-08-01

<160> 20

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

[0001]

Ser Tyr Ser Met Asn  
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr  
1 5 10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0002] <220>

<223> 合成的

<400> 5

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr  
1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

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

[0003] Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

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

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

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

[0004] Glu Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 10  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

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

[0005] Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 11  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 11

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Gln Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

[0006]

<210> 12  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

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

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

<210> 13  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 13

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

[0007] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 14  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 14

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Tyr	Ile	Ser	Ser	Asn
				20					25				30		

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

Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
					50			55			60				

Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
					65			70			75			80	

Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ala	Asp	Ser	Pro
[0008]					85				90				95		

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

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的

&lt;400&gt; 15

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
					20			25				30			

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

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 16  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

[0009] <400> 16

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

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

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

<210> 17  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20                   25                   30

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50                   55                   60

[0010] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65                   70                   75                   80

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Phe Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
 100                105                110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115                120

<210> 18  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 18

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

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

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

[0011] <210> 19  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的

<400> 19

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Gly Gln Ser Asn Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Val Glu Tyr Phe Gln Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 20  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的

<400> 20

[0012] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Ser Asn  
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65 70 75 80

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

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

4679

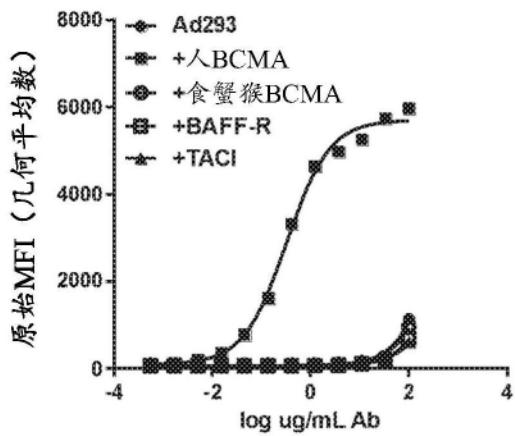


图 1A

756

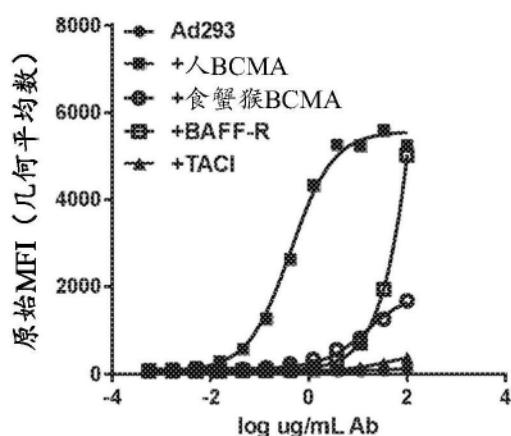


图 1B

15 B 2 GL

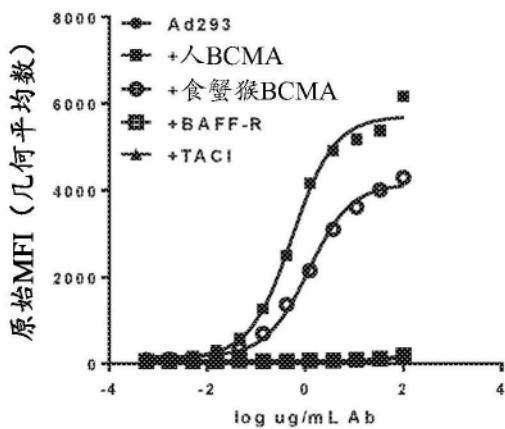


图 1C

图1

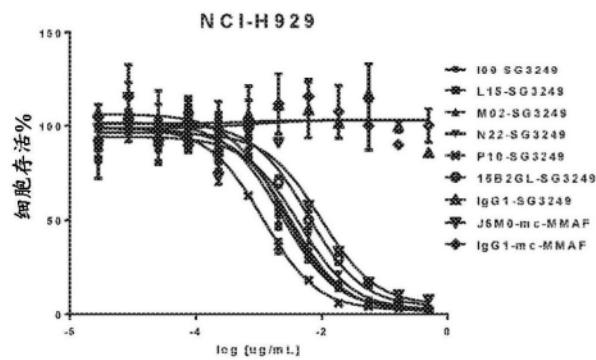


图 2A

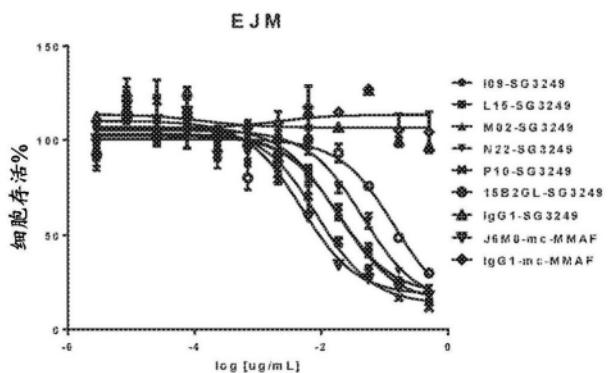


图 2B

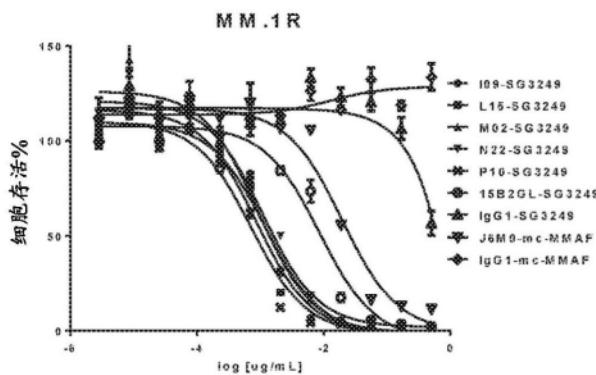


图 2C

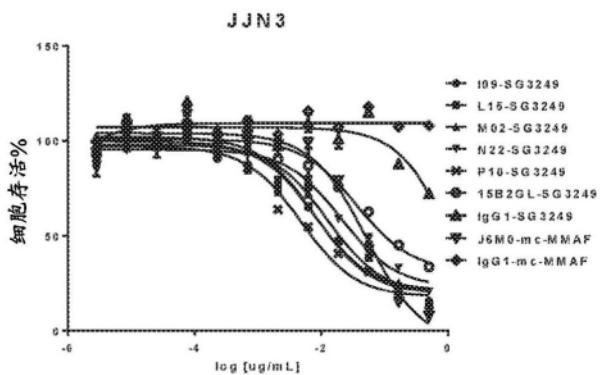


图 2D

图2

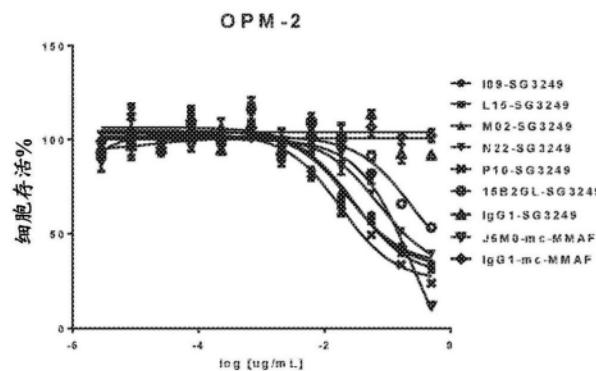


图 2E

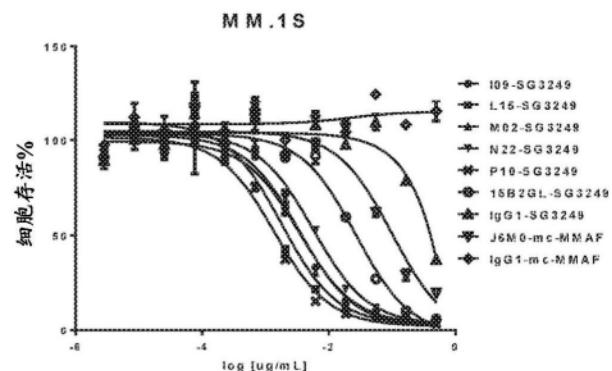


图 2F

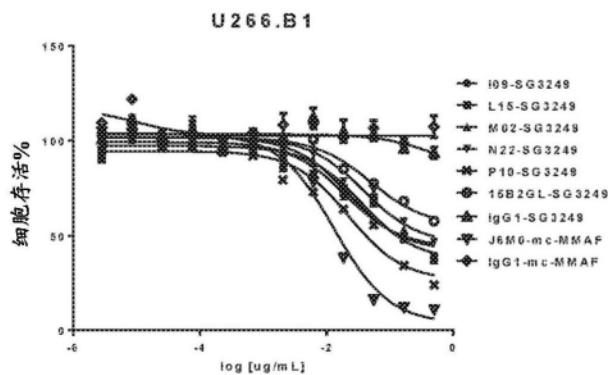


图 2G

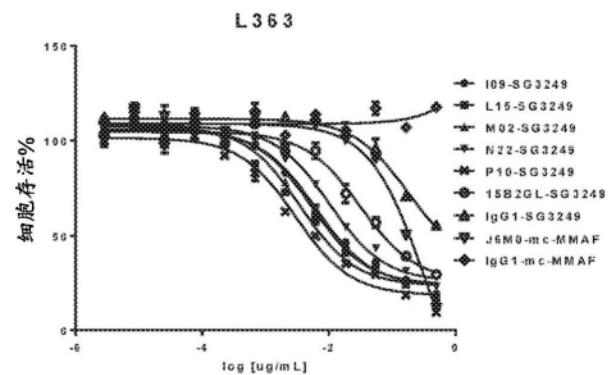


图 2H

图2(续)

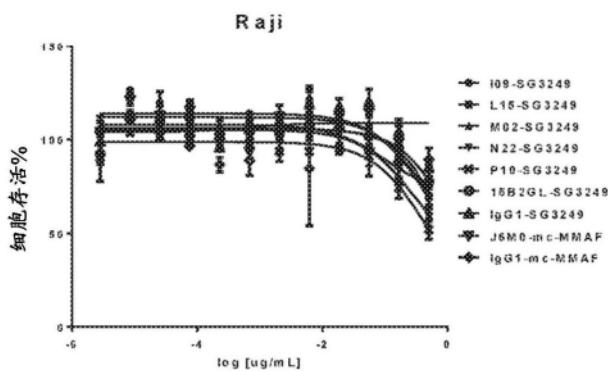


图 2I

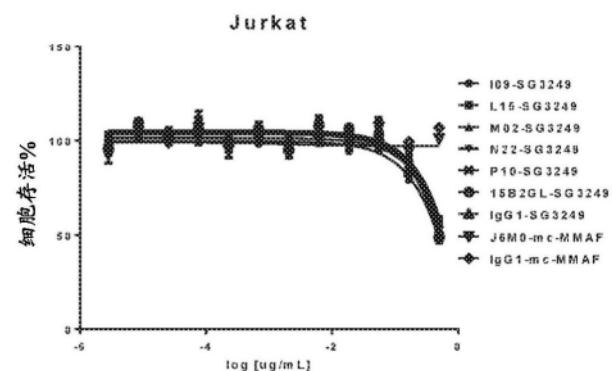


图 2J

图2(续)

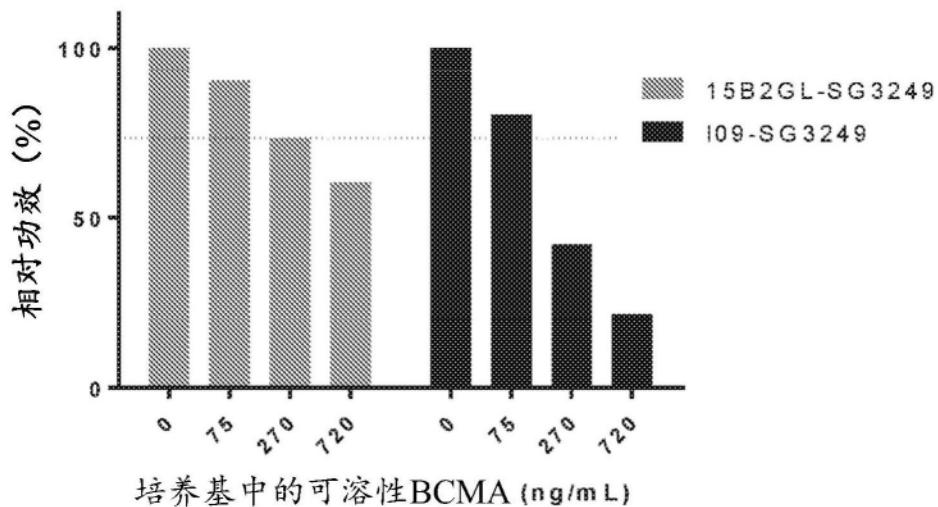


图 3A

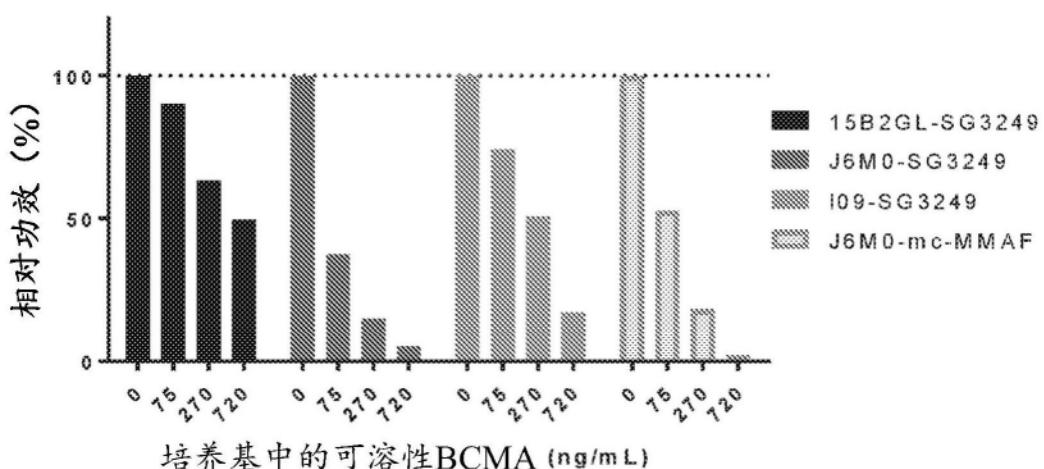


图 3B

图3

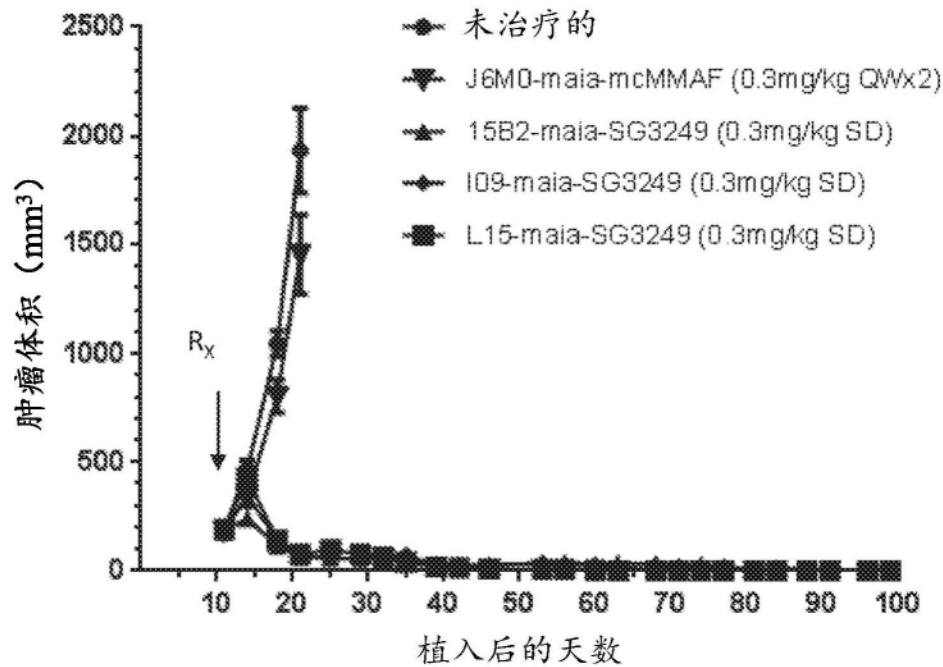


图4

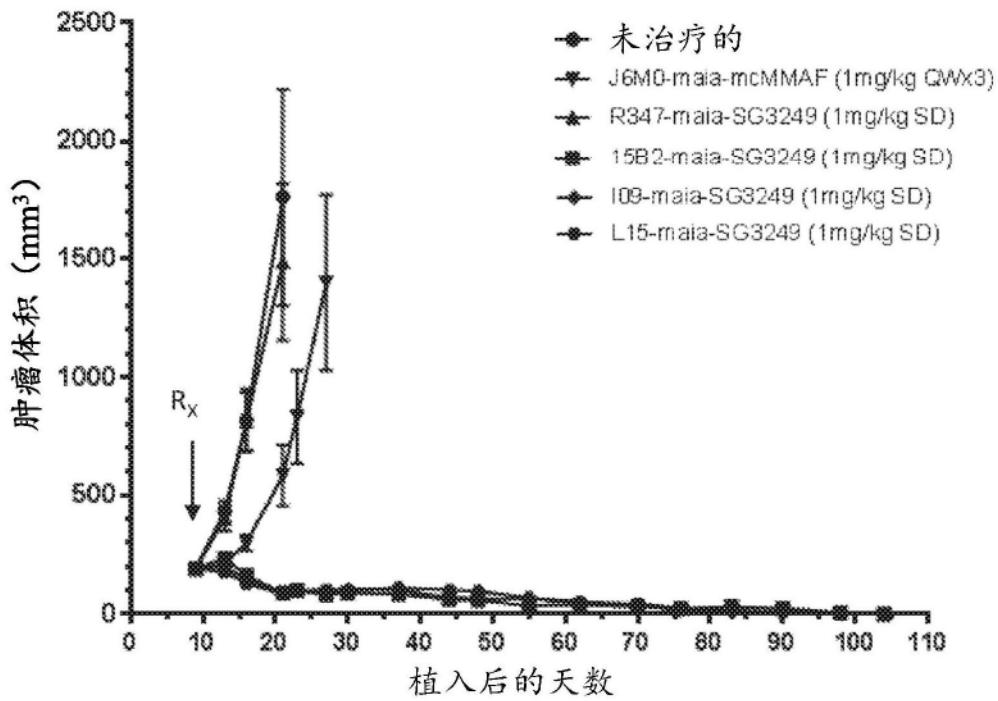


图5

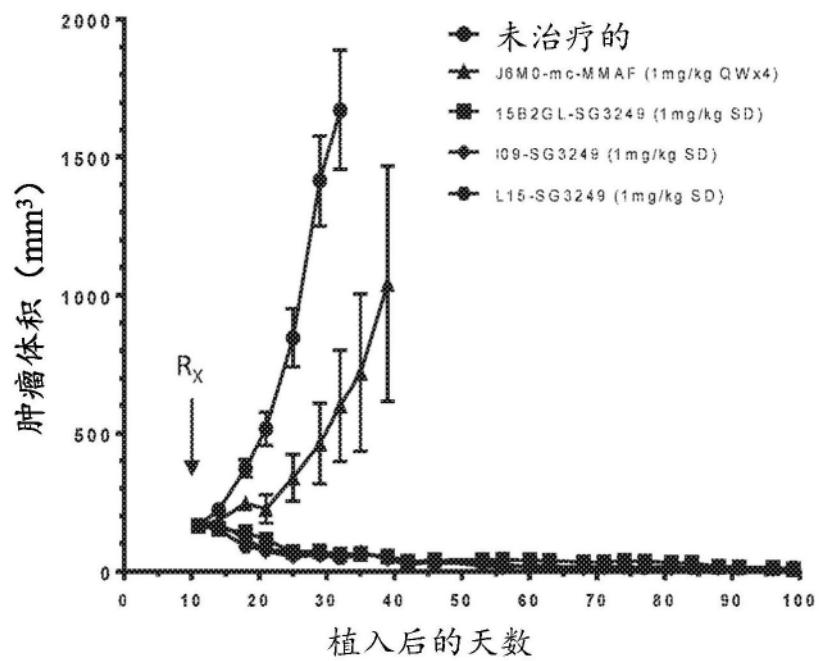


图6

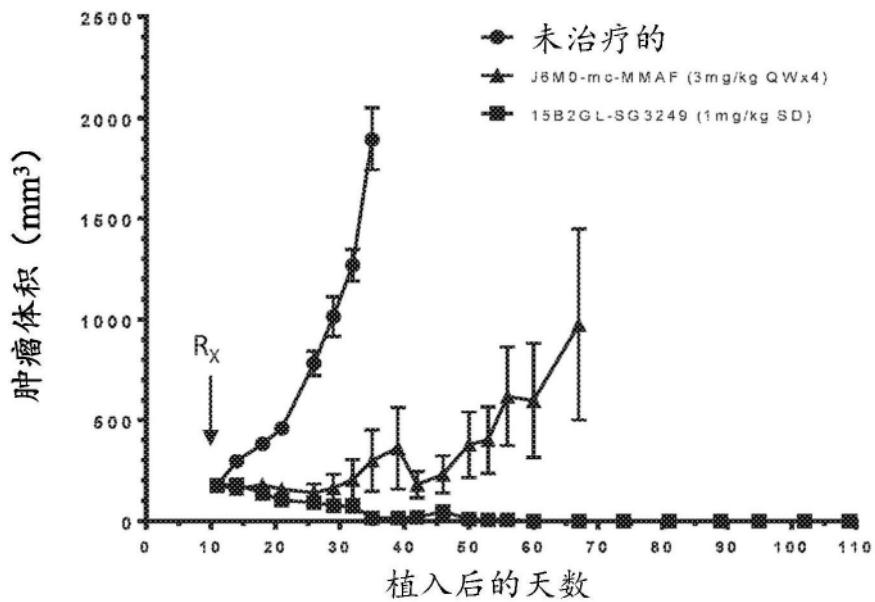


图7

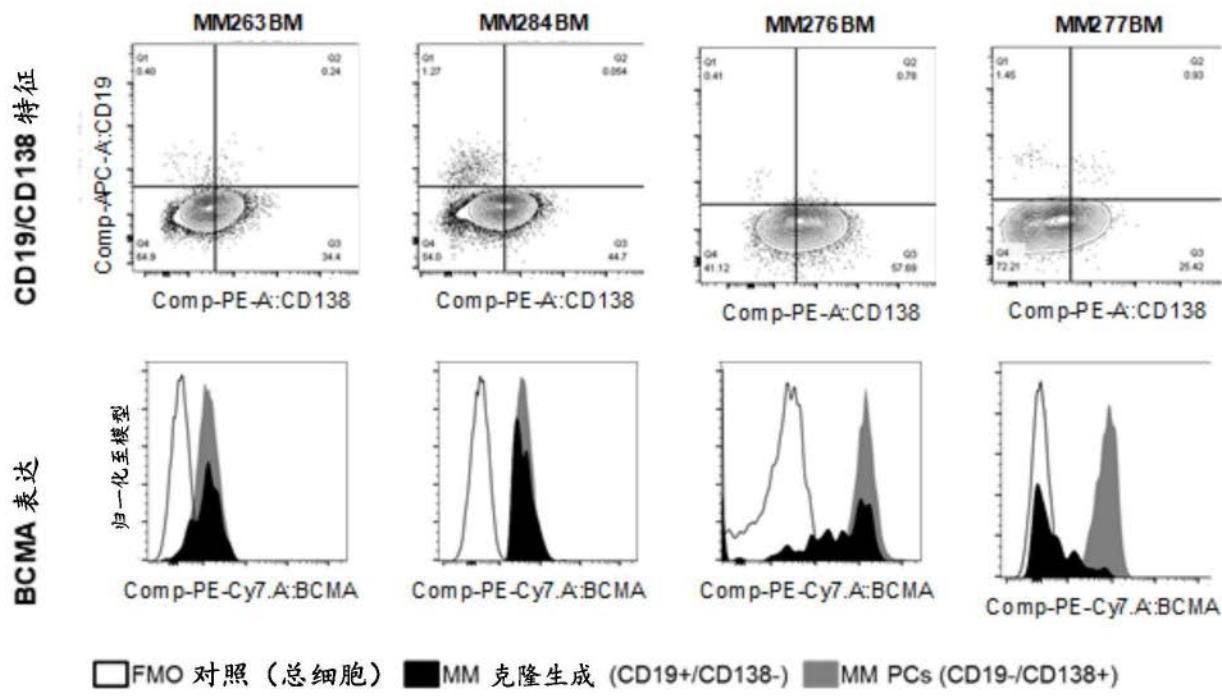


图8

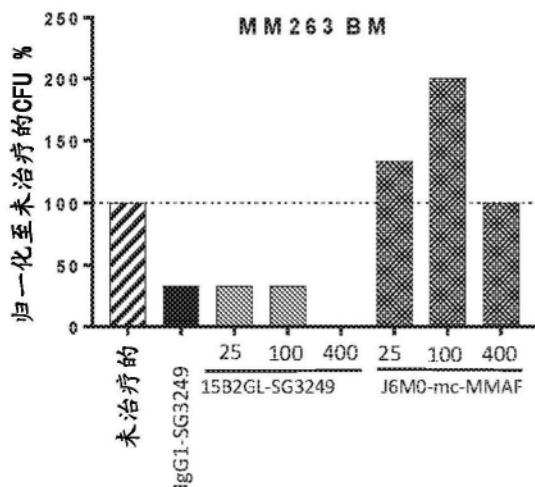


图 9A

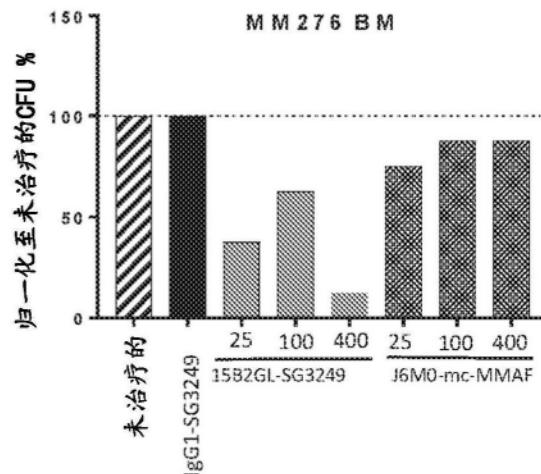


图 9B

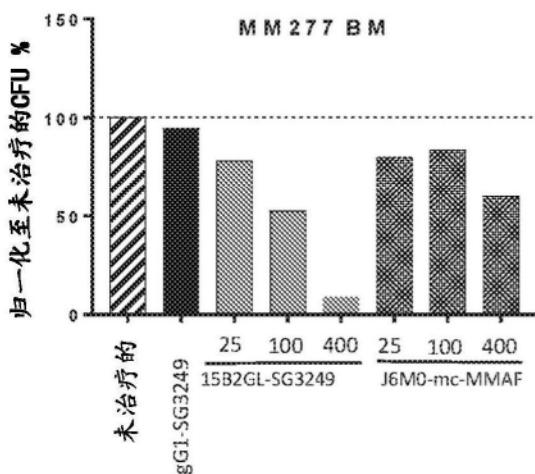


图 9C

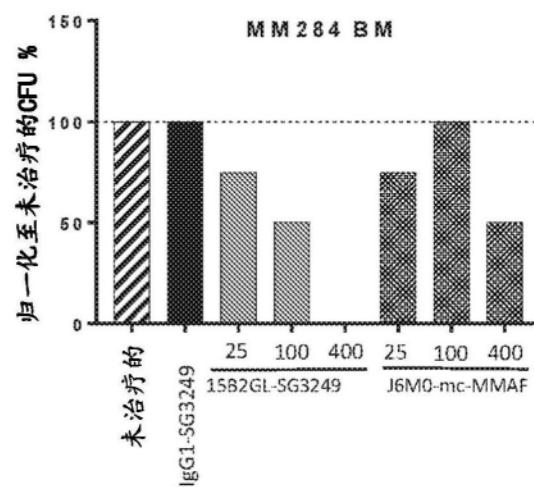


图 9D

图9

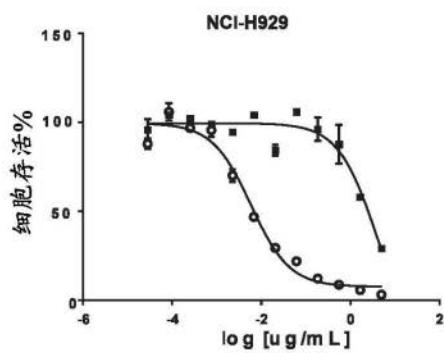


图 10A

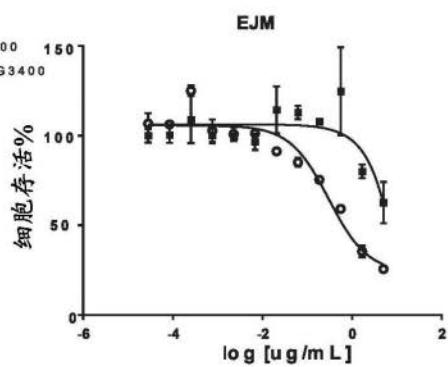


图 10B

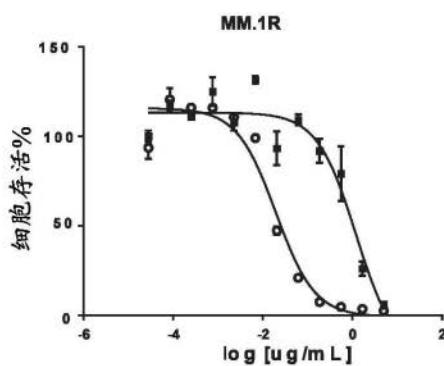


图 10C

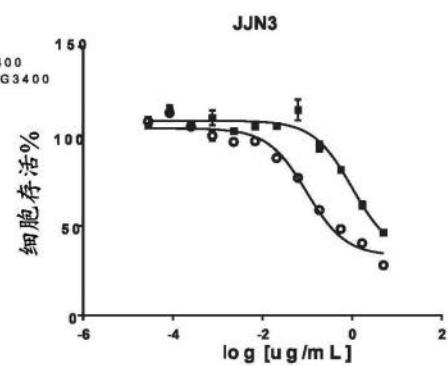


图 10D

图10

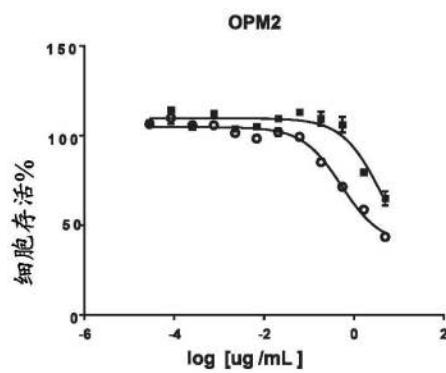


图 10E

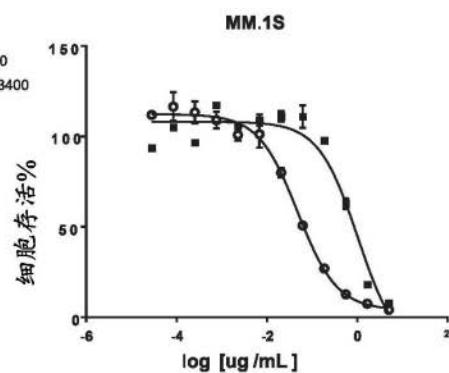


图 10F

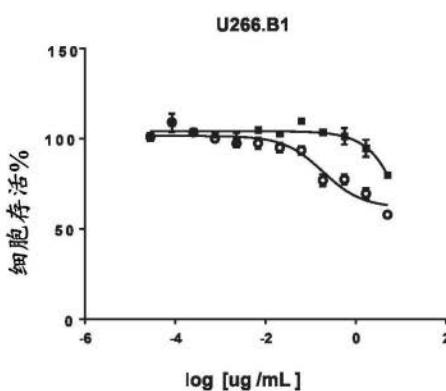


图 10G

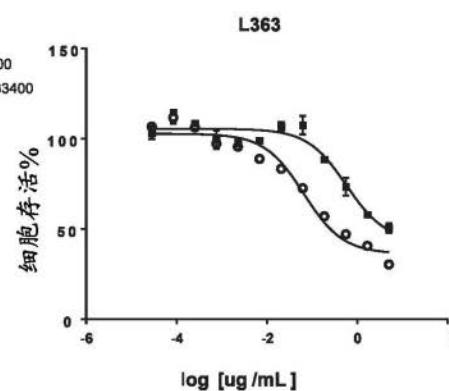


图 10H

图10(续)

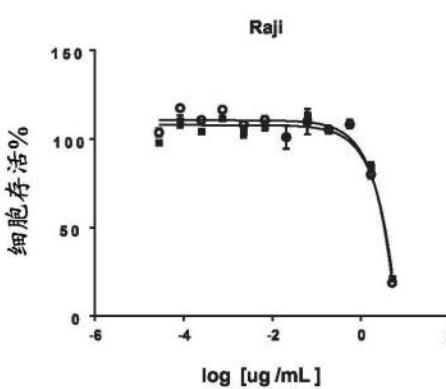


图 10I

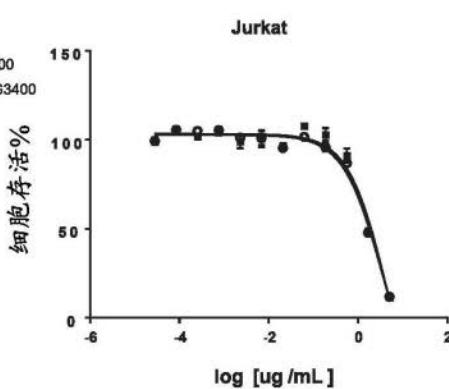


图 10J

图10(续)

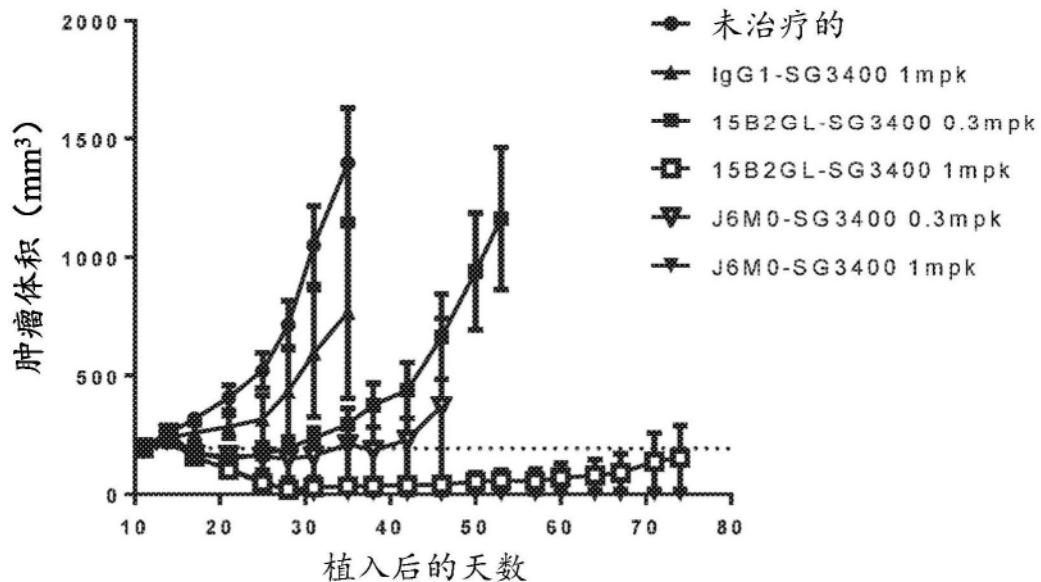


图11

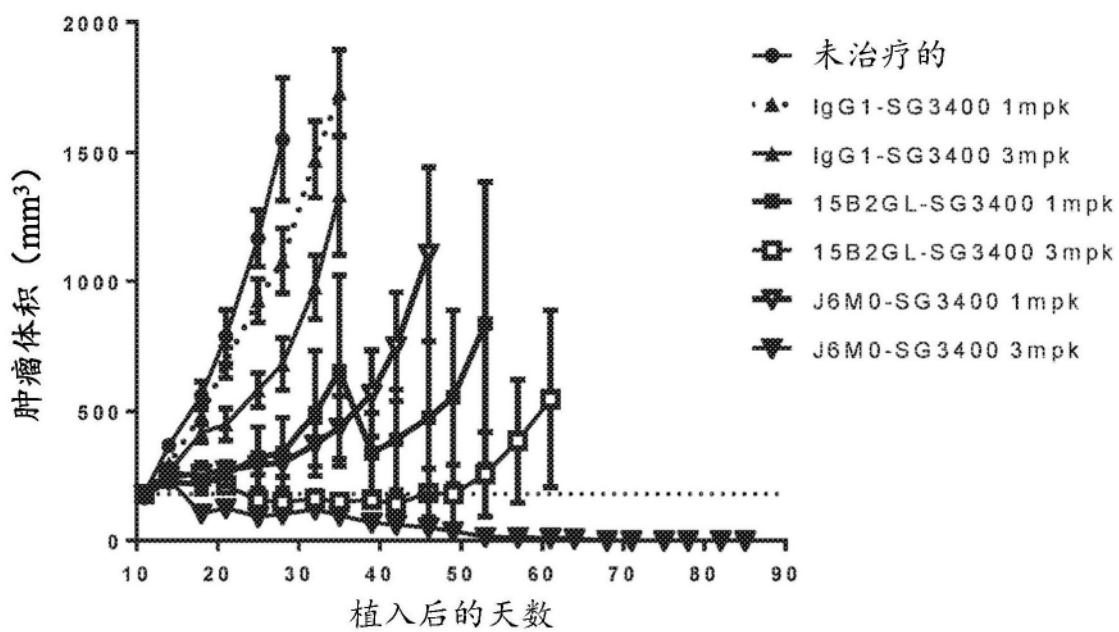


图12

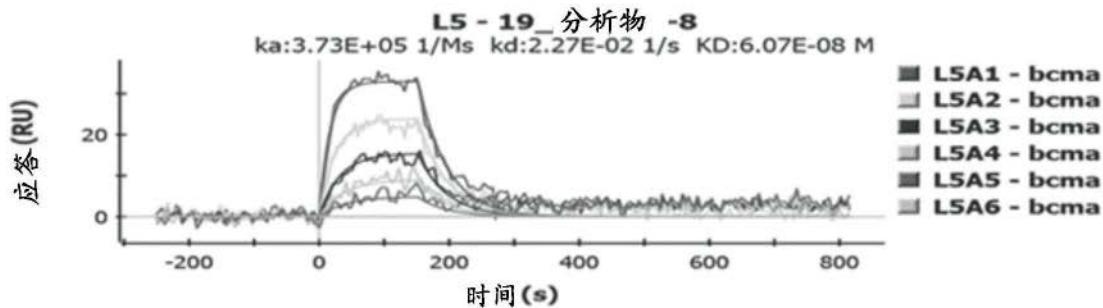
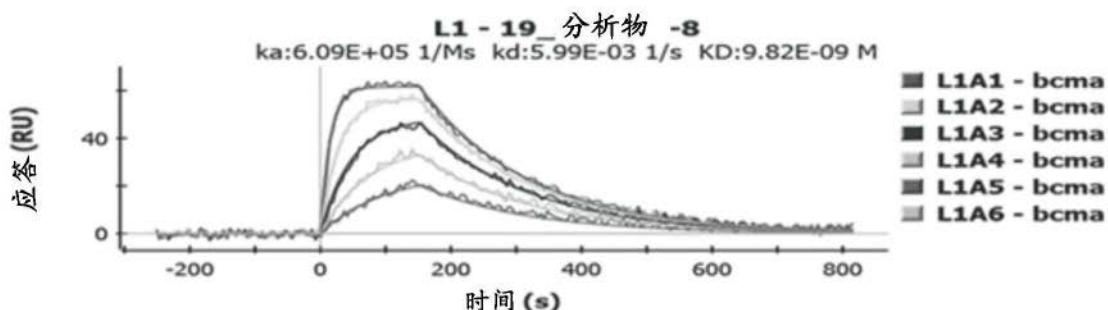
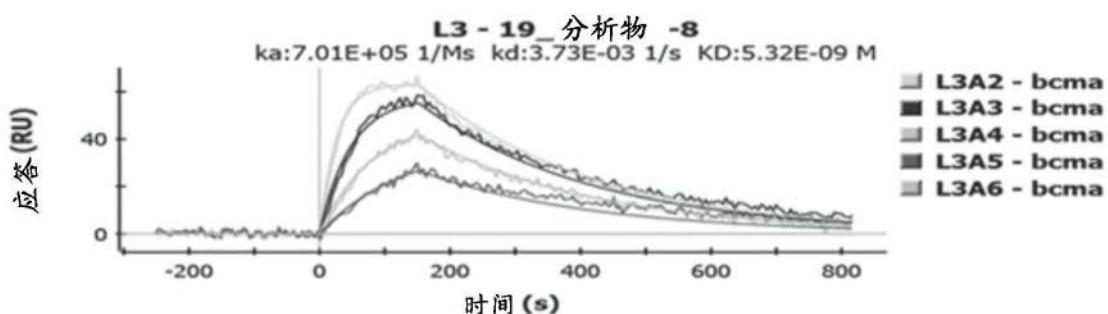
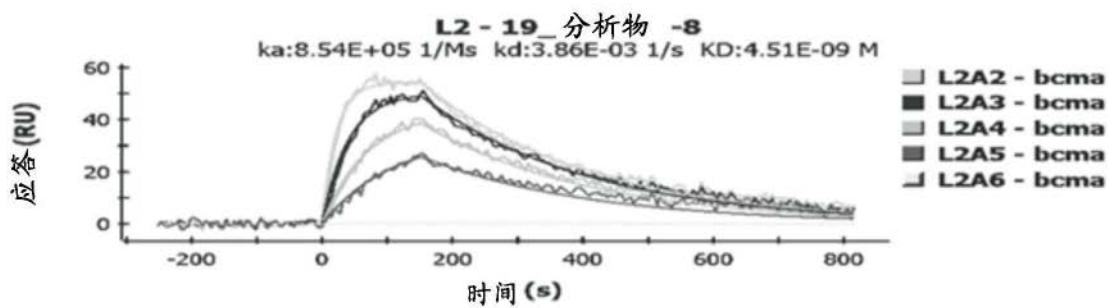
**15B2 GL 60nM****I09 9.8 nM****P10 5.3 nM****L15 4.5 nM**

图13

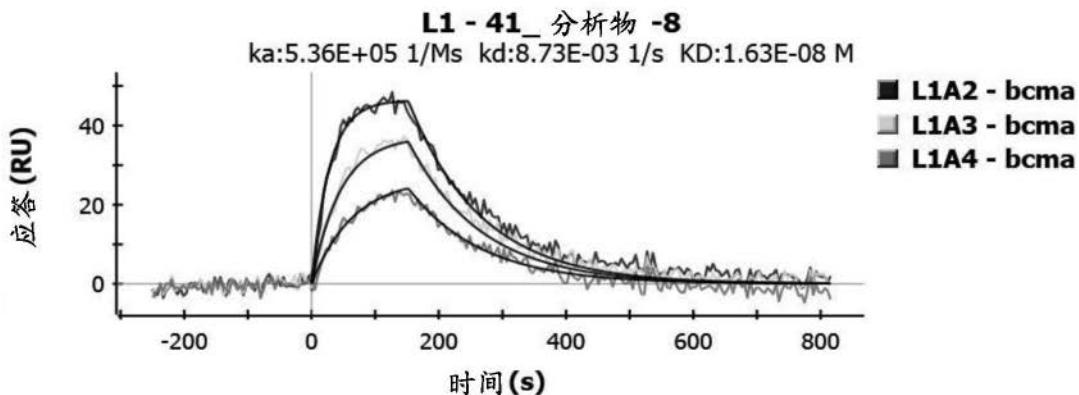
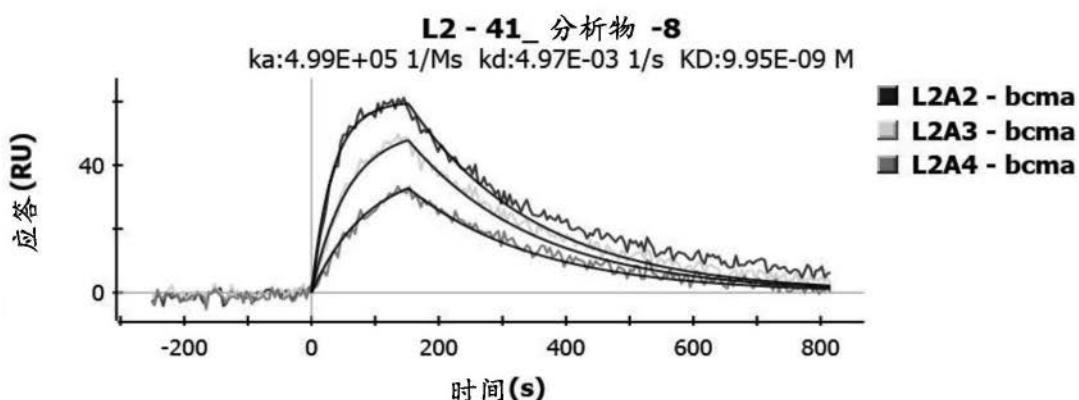
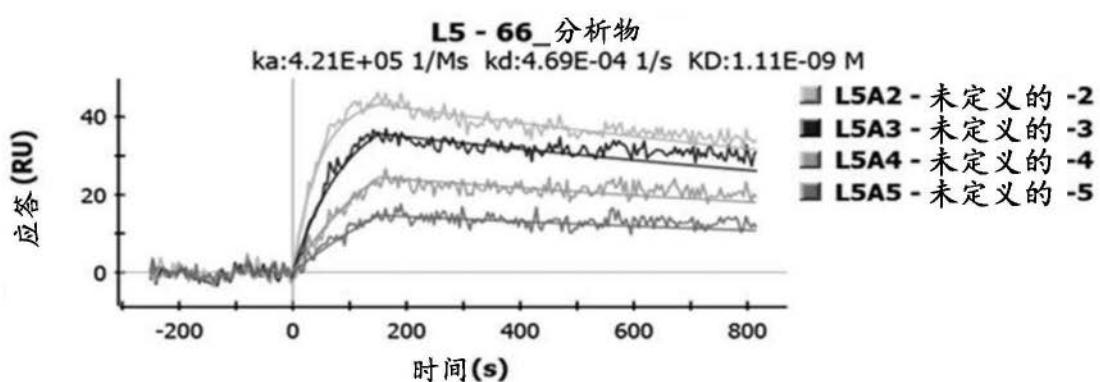
**N22 16.0 nM****M02 9.9nM****J6M0 1nM**

图14

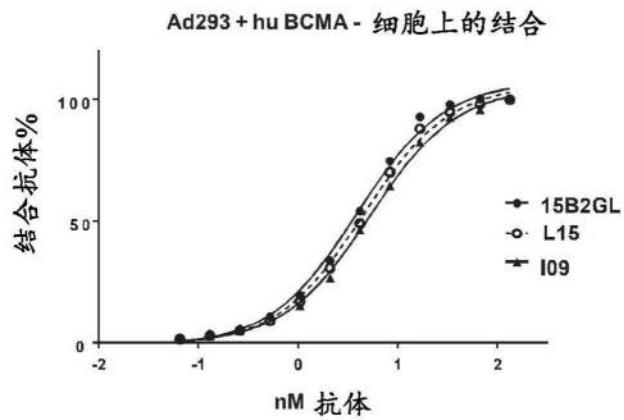
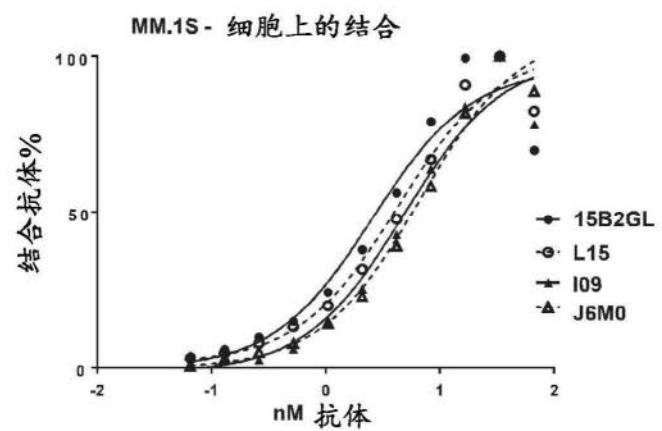
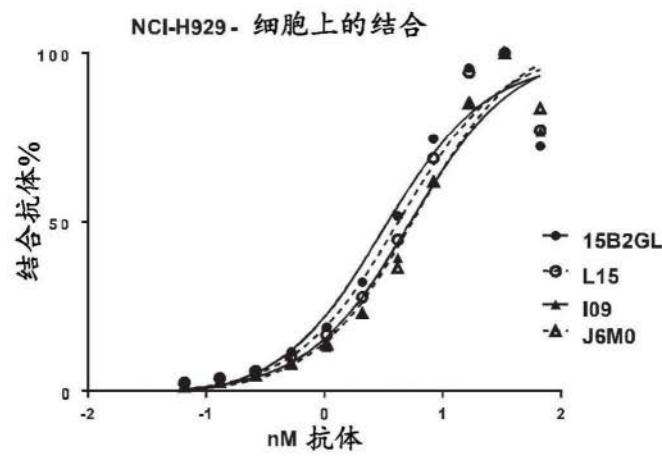


图15