



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118119408 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 31

(21) 申请号 202280070329.8

(22) 申请日 2022.10.17

(30) 优先权数据

2021-170114 2021.10.18 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/038604 2022.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/068226 JA 2023.04.27

(71) 申请人 第一三共株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 寺内智子 新上雄司 菅原肇

须知佑介 后藤力

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 李唐 彭昶

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

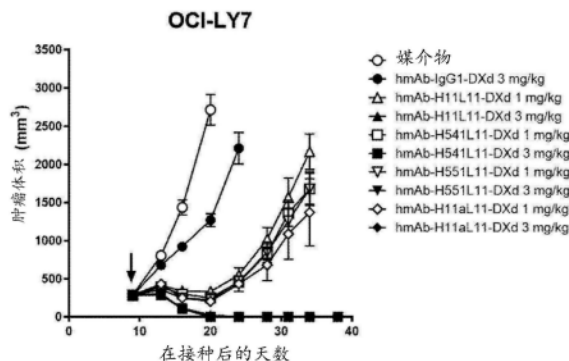
权利要求书5页 说明书47页  
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

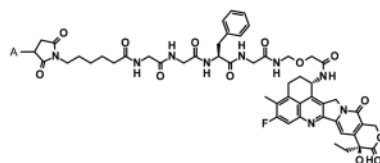
抗CD37抗体-药物缀合物

(57) 摘要

本发明的一个目的是提供与CD37阳性肿瘤细胞例如恶性B细胞淋巴瘤特异性结合的抗体,包含所述抗体的抗体-药物缀合物,使用抗体对肿瘤具有疗效的药物组合物,使用前述药物组合物用于治疗肿瘤的方法,用于生产所述抗体的方法,以及用于生产所述抗体-药物缀合物的方法等等。本发明提供了抗CD37抗体-药物缀合物,其中抗体通过硫醚键与由下式(其中A表示与抗体的连接位置)表示的药物接头缀合,具体而言,具有内化能力的人源化抗CD37抗体和含有所述抗体的抗体-药物缀合物。



CN 118119408 A



1. 一种抗体-药物缀合物,其中抗CD37抗体与由选自下式(a)至(f)的任何一个式表示的药物-接头结构缀合:

(a) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

(b) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

(c) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

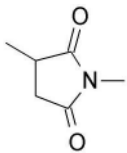
(d) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

(e) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,和

(f) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,其中

- (琥珀酰亚胺-3-基-N) -具有由下式表示的结构:

[式1]

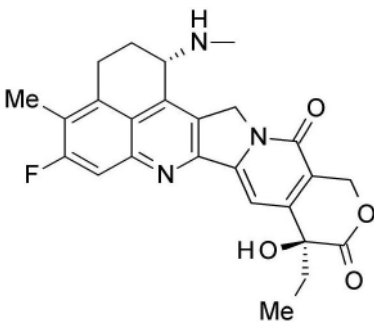


其在位置3处连接至抗体,并且在位置1处的氮原子上连接至含有该结构的所述接头结构中的亚甲基,

GGFG代表由通过肽键连接的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸组成的氨基酸序列,

- (NH-DX) 是由下式表示的基团:

[式2]



其中在位置1处的氨基的氮原子作为连接位置,和

所述抗CD37抗体是包含轻链可变区和重链可变区的抗体,所述轻链可变区具有在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列、或者与在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列具有90%或更高同源性的氨基酸序列;所述重链可变区具有在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列、或者与在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列具有90%或更高同源性的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选自下述组合

(g) 至 (j) 的任何一种组合的重链可变区和轻链可变区的抗体:

(g) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

(h) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

(i) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;和

(j) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区。

3. 根据权利要求1或2的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选自下述组合(h)至(j)的任何一种组合的重链可变区和轻链可变区的抗体:

(h) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

(i) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;和

(j) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区。

4. 根据权利要求1至3中任一项的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选自下述组合(k)至(n)的任何一种组合的重链和轻链的抗体:

(k) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

(l) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

(m) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;和

(n) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链。

5. 根据权利要求1至4中任一项的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选

自下述组合(1)至(n)的任何一种组合的重链和轻链的抗体:

(1) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

(m) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;和

(n) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链。

6. 根据权利要求1至5中任一项的抗体-药物缀合物,其中所述药物-接头结构由选自下式(c)、(d)和(e)的任何一个式表示:

(c) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

(d) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), 和

(e) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

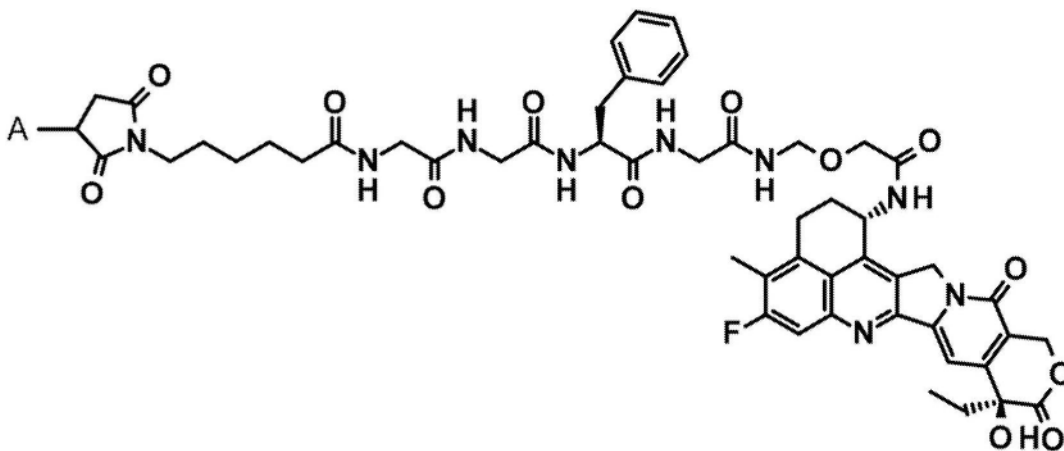
7. 根据权利要求1至6中任一项的抗体-药物缀合物,其中所述药物-接头结构由下式(c)或(e)表示:

(c) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), 或

(e) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

8. 根据权利要求1至7中任一项的抗体-药物缀合物,其由下式(其中A表示与抗体的连接位置)表示:

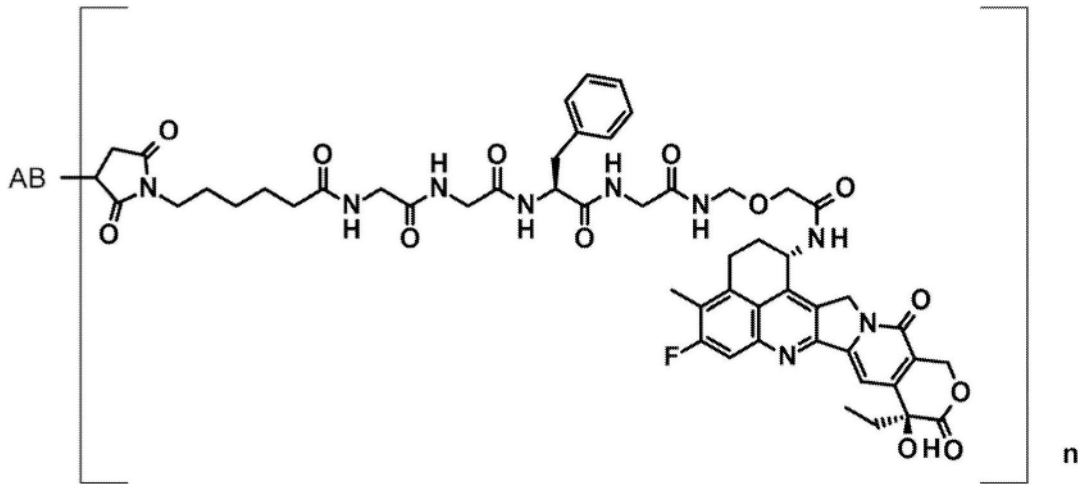
[式3]



其中所述抗体通过硫醚键缀合至药物接头。

9. 根据权利要求1至8中任一项的抗体-药物缀合物,其由下式表示:

[式4]



其中AB表示抗体,n表示每个抗体缀合至所述抗体的药物-接头结构的平均单元数,并且抗体经由衍生自所述抗体的巯基连接至接头。

10. 根据权利要求1至9中任一项的抗体-药物缀合物,其中所述抗体重链已经历了选自以下的一种或两种或更多种修饰:N-连接糖基化、O-连接糖基化、氨基末端加工、羧基末端加工、脱酰胺、天冬氨酸异构化、甲硫氨酸氧化、色氨酸氧化、甲硫氨酸残基向氨基末端的添加、脯氨酸残基酰胺化以及从羧基末端缺失一个或两个氨基酸。

11. 根据权利要求10的抗体-药物缀合物,其中从所述抗体重链的羧基末端缺失一个或两个氨基酸。

12. 根据权利要求10或11的抗体-药物缀合物,其中从两条抗体重链的羧基末端各缺失一个氨基酸。

13. 根据权利要求10至12中任一项的抗体-药物缀合物,其中将所述抗体重链的羧基末端处的脯氨酸残基进一步酰胺化。

14. 根据权利要求1至13中任一项的抗体-药物缀合物,其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在1至10的范围内。

15. 根据权利要求1至14中任一项的抗体-药物缀合物,其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在2至8的范围内。

16. 根据权利要求1至15中任一项的抗体-药物缀合物,其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在3至8的范围内。

17. 根据权利要求1至16中任一项的抗体-药物缀合物,其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在7至8的范围内。

18. 根据权利要求1至17中任一项的抗体-药物缀合物,其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数为8。

19. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至18中任一项的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者所述缀合物或所述盐的水合物。

20. 根据权利要求19的药物组合物,其是抗肿瘤药物。

21. 根据权利要求20的药物组合物,其中所述肿瘤是表达CD37的肿瘤。

22. 根据权利要求20或21的药物组合物,其中所述肿瘤是选自弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的任何

一种肿瘤。

23. 根据权利要求20或21的药物组合物,其中所述肿瘤是选自T细胞淋巴瘤例如外周T细胞淋巴瘤或皮肤T细胞淋巴瘤、骨髓增生异常综合征和急性髓样白血病的任何一种肿瘤。

24. 一种治疗肿瘤的方法,其包括向个体施用根据权利要求1至18中任一项的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者所述缀合物或所述盐的水合物的步骤。

25. 根据权利要求24的治疗方法,其中所述肿瘤是表达CD37的肿瘤。

26. 根据权利要求24或25的治疗方法,其中所述肿瘤是选自弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的任何一种肿瘤。

27. 根据权利要求24或25的治疗方法,其中所述肿瘤是选自T细胞淋巴瘤例如外周T细胞淋巴瘤或皮肤T细胞淋巴瘤、骨髓增生异常综合征和急性髓样白血病的任何一种肿瘤。

28. 一种肿瘤治疗剂,其包含根据权利要求1至18中任一项的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者所述缀合物或所述盐的水合物。

29. 根据权利要求1至18中任一项的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者所述缀合物或所述盐的水合物用于治疗肿瘤的用途。

30. 根据权利要求1至18中任一项的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者所述缀合物或所述盐的水合物用于制备用于治疗肿瘤的药剂的用途。

31. 一种生理盐水溶液制剂,其包含0.001至100mg/kg的根据权利要求1至18中任一项的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者所述缀合物或所述盐的水合物。

## 抗CD37抗体-药物缀合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及与CD37结合的抗CD37抗体,用于生产所述抗体的方法,包含所述抗体的抗体-药物缀合物,包含所述抗体-药物缀合物的抗肿瘤剂等等。

### 背景技术

[0002] 癌症在死亡原因中名列前茅。尽管癌症患者的数目预计随着人口老龄化而增加,但治疗需求尚未得到充分满足。传统化疗药物的问题在于:由于其低选择性,这些化疗药物不仅对肿瘤细胞是毒性的,而且对正常细胞也是毒性的,且从而具有不良反应;并且化疗药物无法以足够的量施用,且因此无法充分发挥其效应。因此,近年来,已开发了更高度选择性的分子靶向药物和抗体药物,其靶向癌细胞的突变特征、高度表达的分子、或涉及细胞的恶性转化的特异性分子。

[0003] 利妥昔单抗(Rituximab)是一种靶向CD20的抗体药物,并且于1997年被FDA批准为用于B细胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL)的治疗药物(非专利文献1)。利妥昔单抗的典型作用机制是直接诱导细胞凋亡、ADCC(抗体依赖性细胞的细胞毒性)和CDC(补体依赖性细胞毒性)。利妥昔单抗对表达靶CD20的B细胞NHL,包括弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)显示出显著的疗效,并且像这样,仍然被广泛使用。然而,一定数目的患者对利妥昔单抗是无应答的。另外,即使对利妥昔单抗有应答的患者也具有靶CD20的减少表达,或获得对每种作用机制的抗性机制,最终导致许多患者中的复发,这在治疗B细胞NHL方面是一个挑战(非专利文献2)。针对此背景,靶向除CD20外的分子的抗体药物或具有与利妥昔单抗不同的作用机制的抗体药物处于临床开发中。

[0004] 抗体在血液中是高度稳定的,并且特异性结合其靶抗原。由于这些原因,预计不良反应的降低,并且对于在癌细胞的表面上高度表达的分子已开发了大量抗体药物。依赖抗体的抗原特异性结合能力的技术之一可以是使用抗体-药物缀合物(ADC)。ADC是一种缀合物,其中与在癌细胞的表面上表达的抗原结合并可以通过此类结合将抗原内化到细胞内的抗体与具有细胞毒性活性的药物缀合。ADC可以有效地将药物递送至癌细胞,并且从而可以预计通过在癌细胞中累积药物来杀死癌细胞(非专利文献3以及专利文献1和2)。关于ADC,例如,包含与卡利奇霉素衍生物缀合的单克隆抗体并靶向CD33的Mylotarg(注册商标)(吉妥珠单抗奥唑米星(gemtuzumab ozogamicin))已被批准作为用于急性髓样白血病的治疗药物,并且靶向CD22的Besponsa(注册商标)(奥加伊妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin))已被批准作为用于复发性或难治性前体B细胞急性淋巴细胞白血病的治疗药物。包含与一甲基澳瑞他汀E缀合的单克隆抗体且靶向CD30的Adcetris(注册商标)(维布妥昔单抗(brentuximab vedotin))已被批准作为用于何杰金氏淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤的治疗药物;靶向CD79b的Polivy(注册商标)(泊洛妥珠单抗(polatuzumab vedotin))已被批准作为用于弥漫性大B细胞淋巴瘤的治疗药物;靶向结合素-4的PADCEV(注册商标)(恩诺单抗(enfortumab vedotin))已被批准作为用于局部晚期或转移性尿路上皮癌的治疗药物;并且包含与一甲基澳瑞他汀F缀合的抗B细胞成熟抗原单克隆抗体的BLENREP(注册商标)(贝

兰他单抗莫福汀 (belantamab mafodotin) 已被批准作为用于复发性或难治性多发性骨髓瘤的治疗药物。包含与emtansine缀合的抗HER2单克隆抗体的KADCYLA (注册商标) (恩美曲妥珠单抗 (trastuzumab emtansine)) 用于治疗HER2阳性晚期或复发性乳腺癌, 并且包含与SN-38 (伊立替康的活性代谢物) 缀合的抗TROP2单克隆抗体的Trodelvy (注册商标) (戈沙妥珠单抗 (sacituzumab govitecan)) 用于治疗晚期三阴性乳腺癌。

[0005] 适合于作为抗肿瘤药物的ADC的靶抗原的特征可以是: 抗原在癌细胞的表面上是特异性高度表达的, 但在正常细胞中具有低表达或不表达; 抗原可以内化到细胞内; 抗原并非从细胞表面分泌的; 等。适合于ADC的抗体的重要特征是抗体与靶抗原特异性结合, 并且具有高内化能力。抗体的内化能力取决于靶抗原和抗体两者的性质。难以根据靶的分子结构预测适合于内化的抗原结合位点, 或根据抗体的结合强度、物理性质等等预测具有高内化能力的抗体。因此, 在开发具有高功效的ADC方面的重要挑战是获得针对靶抗原具有高内化能力的抗体 (非专利文献4)。

[0006] CD37是四跨膜蛋白超家族的四次跨膜蛋白 (非专利文献5)。例如, 根据先前的研究, 尽管严格的生理功能尚不清楚, 但已报道了在CD37缺陷小鼠的分析中, 经由PI3K/Akt途径的激活或IgG1的产生降低的细胞存活控制 (非专利文献6和7)。CD37在从前体B细胞到成熟B细胞的分化阶段广泛表达, 但在浆细胞中不表达。尽管还在T细胞、NK细胞和单核细胞中发现了其表达, 但表达水平很低, 并且CD37在血细胞例如红细胞或血小板中不表达。CD37在B细胞非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 和慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 的肿瘤细胞中高度表达。此类表达谱提示了CD37充当关于恶性B细胞淋巴瘤的有希望的治疗靶, 并且靶向CD37的一些抗体药物迄今为止已进展到临床试验 (非专利文献8)。其中, CD37具有高内化活性且因此被视为也有希望作为ADC的靶。包含与DM1缀合的抗CD37抗体的IMGN529目前处于临床试验中 (非专利文献9和专利文献3)。然而, IMGN529仅对于特定患者显示出功效, 其中在靶向复发性或难治性B细胞非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 患者的I期试验中具有12.8%的总体应答率 (非专利文献10)。Betalutin (辘177标记的抗CD37抗体)、GEN3009 (抗CD37双互补位抗体) 和CAR37T细胞 (靶向CD37的CAR T细胞) 目前作为靶向CD37的药物处于临床试验中 (非专利文献11、12和13)。

[0007] 包含与喜树碱衍生物德鲁替康缀合的抗HER2单克隆抗体的ENHERTU (注册商标) (德曲妥珠单抗 (trastuzumab deruxtecan)) 用于治疗HER2阳性晚期或复发性乳腺癌 (非专利文献14)。HER3-DXd (非专利文献15)、Trop2-DXd (非专利文献16) 等等作为含有德鲁替康的ADC目前处于临床试验中。尽管如此, 尚未报道包含与德鲁替康缀合的抗CD37抗体的ADC或含有德鲁替康且靶向作为疾病的B细胞非何杰金氏淋巴瘤的ADC。

[0008] 引文列表

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1: 国际公开号W02014/057687

[0011] 专利文献2: 美国专利申请公开号2016/0297890说明书

[0012] 专利文献3: 国际公开号W02011/112978

[0013] 非专利文献1: Gilles S. 等人, Adv Ther, 2232-2273, 34, 2017

[0014] 非专利文献2: Andrew R. 等人, Best Pract Res Clin Haematol, 203-216, 24, 2011

- [0015] 非专利文献3:Polakis P.,Pharmacological Reviews,3-19,68,2016  
 [0016] 非专利文献4:Peters C.等人,Bioscience Reports,1-20,35,2015  
 [0017] 非专利文献5:Charrin S.等人,J Cell Sci.3641-3648,127,2014  
 [0018] 非专利文献6:Magdalena.等人,Expert Opin Investig Drug.171-177,27,2018  
 [0019] 非专利文献7:Knobeloch KP等人,Mol Cell Biol,5363-5369,20,2000  
 [0020] 非专利文献8:Zahra P等人,Biotechnology letters,1459-1466,40,2018  
 [0021] 非专利文献9:Jutta D等人,Blood,3500-3510,122,2013  
 [0022] 非专利文献10:Anastasios S等人,Invest New Drugs,869-876,36,2018  
 [0023] 非专利文献11:Alexandre P等人,Leukemia,1315-1328,34,2020  
 [0024] 非专利文献12:Simone C等人,Blood Cancer Journal,10,30,2020  
 [0025] 非专利文献13:Irene S等人,Blood,1495-1506,132,2018  
 [0026] 非专利文献14:Susan J等人,Drugs,501-508,80,2020  
 [0027] 非专利文献15:Kimio Y等人,Oncogene,1398-1409,38,2019  
 [0028] 非专利文献16:<https://mct.aacrjournals.org/content/early/2021/08/19/1535-7163.MCT-21-0206.abstract>

## 发明内容

### [0029] 技术问题

[0030] 本发明的一个目的是提供与CD37阳性肿瘤细胞例如恶性B细胞淋巴瘤特异性结合的抗体,包含所述抗体的抗体-药物缀合物,使用所述抗体-药物缀合物对肿瘤具有疗效的药物组合物,使用前述药物组合物用于治疗肿瘤的方法,用于生产所述抗体的方法,以及用于生产所述抗体-药物缀合物的方法等等。

### [0031] 问题的解决方案

[0032] 本发明人已针对实现上述目的进行了深入研究,并且通过抗CD37抗体-药物缀合物对CD37阳性恶性肿瘤例如恶性B细胞淋巴瘤显示出抗肿瘤作用的发现完成了本发明,所述抗CD37抗体-药物缀合物包含经由具有特异性结构的接头与在细胞中发挥毒性的药物缀合的抗CD37抗体。具体而言,本发明包括发明的下述方面。

[0033] [1]一种抗体-药物缀合物,其中抗CD37抗体与由选自下式(a)至(f)的任何一个式表示的药物-接头结构缀合:

[0034] (a) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

[0035] (b) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

[0036] (c) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

[0037] (d) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,

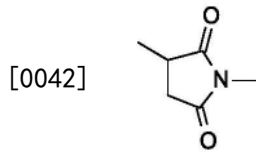
[0038] (e) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - (NH-DX) ,和

[0039] (f) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{NH}-\text{DX})$ , 其中

[0040] - (琥珀酰亚胺-3-基-N)-具有由下式表示的结构:

[0041] [式1]

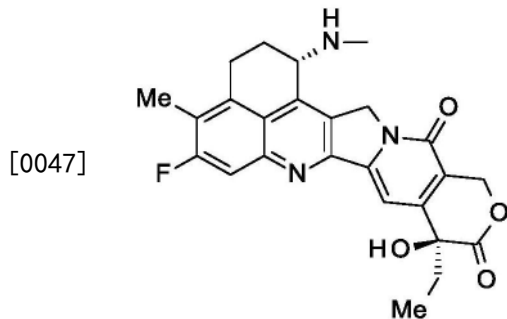


[0043] 其在其位置3处连接至抗体,并且在位置1处的氮原子上连接至含有该结构的所述接头结构中的亚甲基,

[0044] GGFG代表由通过肽键连接的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸组成的氨基酸序列,

[0045] - (NH-DX) 是由下式表示的基团:

[0046] [式2]



[0048] 其中在位置1处的氨基的氮原子作为连接位置,和

[0049] 所述抗CD37抗体是包含轻链可变区和重链可变区的抗体,所述轻链可变区具有在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列,或者与在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列具有90%或更高同源性的氨基酸序列;所述重链可变区具有在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列,或者与在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列具有90%或更高同源性的氨基酸序列。

[0050] [2]根据[1]的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选自下述组合(g)至(j)的任何一种组合的重链可变区和轻链可变区的抗体:

[0051] (g)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

[0052] (h)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

[0053] (i)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;和

[0054] (j)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸

序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区。

[0055] [3]根据[1]或[2]的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选自下述组合(h)至(j)的任何一种组合的重链可变区和轻链可变区的抗体:

[0056] (h)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

[0057] (i)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;和

[0058] (j)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区。

[0059] [4]根据[1]至[3]中任何一个的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选自下述组合(k)至(n)的任何一种组合的重链和轻链的抗体:

[0060] (k)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0061] (l)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0062] (m)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;和

[0063] (n)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链。

[0064] [5]根据[1]至[4]中任何一个的抗体-药物缀合物,其中所述抗CD37抗体是包含以选自下述组合(1)至(n)的任何一种组合的重链和轻链的抗体:

[0065] (1)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0066] (m)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;和

[0067] (n)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链。

[0068] [6]根据[1]至[5]中任何一个的抗体-药物缀合物,其中所述药物-接头结构由选

自下式 (c)、(d) 和 (e) 的任何一个式表示:

[0069] (c) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

[0070] (d) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), 和

[0071] (e) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

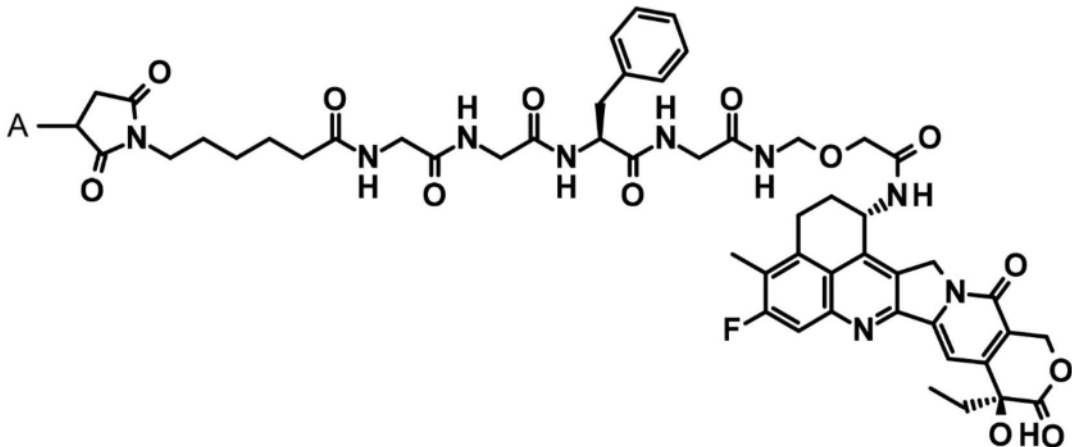
[0072] [7] 根据[1]至[6]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中所述药物-接头结构由下式 (c) 或 (e) 表示:

[0073] (c) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), 或

[0074] (e) - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

[0075] [8] 根据[1]至[7]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其由下式 (其中A表示与抗体的连接位置) 表示:

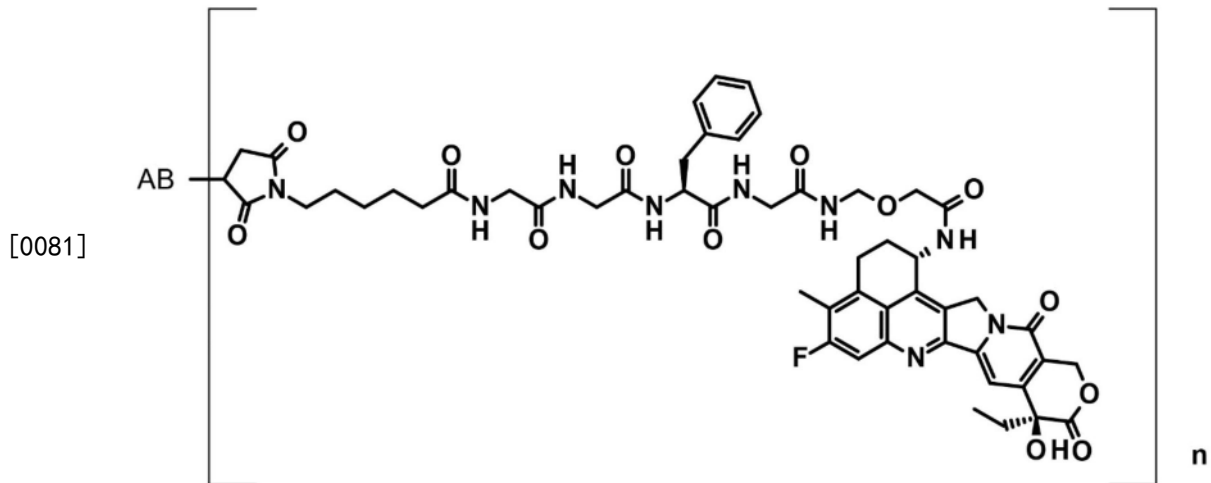
[0076] [式3]



[0078] 其中所述抗体通过硫醚键缀合至药物接头。

[0079] [9] 根据[1]至[8]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其由下式表示:

[0080] [式4]



[0082] 其中AB表示抗体, n表示每个抗体缀合至所述抗体的药物-接头结构的平均单元数, 并且抗体经由衍生自所述抗体的巯基连接至接头。

[0083] [10]根据[1]至[9]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中所述抗体重链已经历了选自以下的一种或两种或更多种修饰: N-连接糖基化、O-连接糖基化、氨基末端加工、羧基末端加工、脱酰胺、天冬氨酸异构化、甲硫氨酸氧化、色氨酸氧化、甲硫氨酸残基向氨基末端的添加、脯氨酸残基酰胺化以及从羧基末端缺失一个或两个氨基酸。

[0084] [11]根据[10]的抗体-药物缀合物, 其中从所述抗体重链的羧基末端缺失一个或两个氨基酸。

[0085] [12]根据[10]或[11]的抗体-药物缀合物, 其中从两条抗体重链的羧基末端各缺失一个氨基酸。

[0086] [13]根据[10]至[12]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中将所述抗体重链的羧基末端处的脯氨酸残基进一步酰胺化。

[0087] [14]根据[1]至[13]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在1至10的范围内。

[0088] [15]根据[1]至[14]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在2至8的范围内。

[0089] [16]根据[1]至[15]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在3至8的范围内。

[0090] [17]根据[1]至[16]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数在7至8的范围内。

[0091] [18]根据[1]至[17]中任何一个的抗体-药物缀合物, 其中每个抗体缀合的药物-接头结构的平均单元数为8。

[0092] [19]一种药物组合物, 其包含根据[1]至[18]中任何一个的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者缀合物或盐的水合物。

[0093] [20]根据[19]的药物组合物, 其是抗肿瘤药物。

[0094] [21]根据[20]的药物组合物, 其中所述肿瘤是表达CD37的肿瘤。

[0095] [22]根据[20]或[21]的药物组合物, 其中所述肿瘤是选自弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的任何

一种肿瘤。

[0096] [23]根据[20]或[21]的药物组合物,其中所述肿瘤是选自T细胞淋巴瘤例如外周T细胞淋巴瘤或皮肤T细胞淋巴瘤、骨髓增生异常综合征和急性髓样白血病的任何一种肿瘤。

[0097] [24]一种用于治疗肿瘤的方法,其包括向个体施用根据[1]至[18]中任何一个的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者缀合物或盐的水合物的步骤。

[0098] [25]根据[24]的治疗方法,其中所述肿瘤是表达CD37的肿瘤。

[0099] [26]根据[24]或[25]的治疗方法,其中所述肿瘤是选自弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病的任何一种肿瘤。

[0100] [27]根据[24]或[25]的治疗方法,其中所述肿瘤是选自T细胞淋巴瘤例如外周T细胞淋巴瘤或皮肤T细胞淋巴瘤、骨髓增生异常综合征和急性髓样白血病的任何一种肿瘤。

[0101] [28]一种用于肿瘤的治疗剂,其包含根据[1]至[18]中任何一个的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者缀合物或盐的水合物。

[0102] [29]根据[1]至[18]中任何一个的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者缀合物或盐的水合物用于治疗肿瘤的用途。

[0103] [30]根据[1]至[18]中任何一个的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者缀合物或盐的水合物用于制备用于治疗肿瘤的药剂的用途。

[0104] [31]一种生理盐水溶液制剂,其包含0.001至100mg/kg的根据[1]至[18]中任何一个的抗体-药物缀合物、其药理学上可接受的盐、或者缀合物或盐的水合物。

[0105] 进一步地,本发明还包括发明的下述方面。

[0106] (i)一种抗体或抗体的功能性片段,其与CD37特异性结合,并且包含以选自下述组合(a)至(d)的任何一种组合的重链可变区和轻链可变区:

[0107] (a)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

[0108] (b)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;

[0109] (c)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区;和

[0110] (d)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至128处的氨基酸序列组成的轻链可变区,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至138处的氨基酸序列组成的重链可变区。

[0111] (ii)根据(i)的抗体或抗体的功能性片段,其与CD37特异性结合,并且包含以选自下述组合(e)至(h)的任何一种组合的重链和轻链:

[0112] (e)由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0113] (f) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0114] (g) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;和

[0115] (h) 由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链。

[0116] (iii) 一种多核苷酸,其编码根据(i)或(ii)的抗体或抗体的功能性片段。

[0117] (iv) 一种表达载体,其包含根据(iii)的多核苷酸。

[0118] (v) 用根据(iv)的表达载体转化的宿主细胞。

[0119] (vi) 根据(v)的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核细胞。

[0120] (vii) 一种用于生产抗体或抗体的功能性片段的方法,其包括培养根据(v)或(vi)的宿主细胞的步骤,以及从通过前述步骤获得的培养物中收集感兴趣抗体的步骤。

[0121] (viii) 一种抗体或抗体的功能性片段,其通过根据(vii)的用于生产的方法获得。

[0122] (ix) 根据(viii)的抗体或抗体的功能性片段,其包含选自以下的一种或两种或更多种修饰:N-连接糖基化、O-连接糖基化、氨基末端加工、羧基末端加工、脱酰胺、天冬氨酸异构化、甲硫氨酸氧化、色氨酸氧化、甲硫氨酸残基向氨基末端的添加、脯氨酸残基酰胺化以及从羧基末端缺失一个或两个氨基酸。

[0123] (x) 根据(ix)的抗体或抗体的功能性片段,其中从其重链的羧基末端缺失一个或两个氨基酸。

[0124] (xi) 根据(ix)或(x)的抗体或抗体的功能性片段,其中从其两条重链的羧基末端各缺失一个氨基酸。

[0125] (xii) 根据(ix)至(xi)中任何一个的抗体或抗体的功能性片段,其中将所述重链的羧基末端处的脯氨酸残基进一步酰胺化。

[0126] (xiii) 一种抗体-药物缀合物,其中药物缀合至根据(viii)至(xii)中任何一个的抗体或抗体的功能性片段。

[0127] (xiv) 一种用于生产抗体-药物缀合物的方法,其包括培养根据(v)或(vi)的宿主细胞的步骤,从通过前述步骤获得的培养物中收集感兴趣抗体或抗体的功能性片段的步骤,以及使通过前述步骤获得的抗体或抗体的功能性片段与药物-接头中间化合物反应的步骤。

[0128] 发明的有利效果

[0129] 本发明的抗CD37抗体的特征是特异性结合CD37阳性肿瘤细胞,例如恶性B细胞淋巴瘤。包含经由具有特异性结构的接头与在细胞中发挥毒性的药物缀合的抗体的抗CD37抗体-药物缀合物,可以预计通过施用于具有表达CD37的癌细胞的患者来实现优异的抗肿瘤效应和安全性。具体而言,本发明的抗CD37抗体-药物缀合物可作用于恶性B细胞淋巴瘤等等的抗肿瘤剂。另外,本发明的抗CD37抗体-药物缀合物在生理盐水中具有良好的回收率并且能够在生理盐水中操作。

[0130] 附图简述

[0131] [图1]图1是显示了编码hmAb-L11轻链的核苷酸序列和hmAb-L11轻链的氨基酸序列的图示。

[0132] [图2]图2是显示了编码hmAb-H11重链的核苷酸序列和hmAb-H11重链的氨基酸序列的图示。

[0133] [图3]图3是显示了编码hmAb-H541重链的核苷酸序列和hmAb-H541重链的氨基酸序列的图示。

[0134] [图4]图4是显示了编码hmAb-H551重链的核苷酸序列和hmAb-H551重链的氨基酸序列的图示。

[0135] [图5]图5是显示了编码hmAb-H11a重链的核苷酸序列和hmAb-H11a重链的氨基酸序列的图示。

[0136] [图6]图6是显示了评估人源化抗CD37抗体-药物缀合物针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7的结合活性的结果的图示。

[0137] [图7]图7是显示了评估人源化抗CD37抗体-药物缀合物针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7的体外细胞生长抑制活性的结果的图示。

[0138] [图8]图8是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0139] [图9]图9是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系WSU-DLCL2接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0140] [图10]图10是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-8接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0141] [图11]图11是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物、POLIVY (注册商标) 和IMGN529针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0142] [图12]图12是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物、POLIVY和IMGN529针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-8接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0143] [图13]图13是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物、POLIVY和IMGN529针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系NU-DUL-1接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0144] [图14]图14是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物针对CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-4接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0145] [图15]图15是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物、RITUXAN (注册商标)、依鲁替尼 (ibrutinib)、维奈托克 (venetoclax) 和TREAKISYM (注册商标) 针对CD37阳性人慢性淋巴细胞白血病细胞系JVM-3接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0146] [图16]图16是显示了人源化抗CD37抗体-药物缀合物、POLIVY和IMGN529针对CD37阳性人滤泡性淋巴瘤细胞系DOHH-2接种到其内的SCID小鼠的体内抗肿瘤效应的图示。

[0147] 实施方式描述

[0148] 定义

[0149] 在本发明中,术语“基因”意指包含编码蛋白质的氨基酸的核苷酸序列或其互补链的核酸分子。术语“基因”意欲包括例如包含编码蛋白质的氨基酸的核苷酸序列或与其互补的核苷酸序列的多核苷酸、寡核苷酸、DNA、mRNA、cDNA和cRNA。此类基因是单链、双链、或者三链或更多链核苷酸。术语“基因”还意欲包括DNA和RNA链的缔合物、在一条核苷酸链上的核糖核苷酸(RNA)和脱氧核糖核苷酸(DNA)的混合物、以及包含此类核苷酸链的双链或三链或更多链核苷酸。本发明的“CD37基因”的实例可以包括包含编码CD37蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列的DNA、mRNA、cDNA和cRNA。

[0150] 在本发明中,术语“核苷酸”具有与“核酸”和“核酸分子”相同的含义,并且还意欲包括例如DNA、RNA、探针、寡核苷酸、多核苷酸和引物。此类核苷酸是单链、双链、或者三链或更多链核苷酸。术语“核苷酸”还意欲包括DNA和RNA链的缔合物、在一条核苷酸链上的核糖核苷酸(RNA)和脱氧核糖核苷酸(DNA)的混合物、以及包含此类核苷酸链的两条链或者三条或更多条链的缔合物。

[0151] 在本发明中,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”具有相同的含义。

[0152] 在本发明中,术语“蛋白质”指来自任何给定脊椎动物来源的“蛋白质”,所述脊椎动物来源包括哺乳动物例如灵长类动物(例如,人和猴)和啮齿类动物(例如,小鼠和大鼠),除非另有说明。

[0153] 在本发明中,术语“抗原”具有与“免疫原”相同的含义。

[0154] 在本发明中,术语“细胞”还包括例如衍生自各个动物的各种细胞、传代培养细胞、原代培养细胞、细胞系、重组细胞和微生物细胞。

[0155] 在本发明中,抗体与之结合的“位点”,即被抗体识别的“位点”,意指被抗体结合或识别的抗原上的部分肽或部分构象。在本发明中,此类位点也被称为表位或抗体结合位点。在CD37蛋白上的被本发明的抗CD37抗体结合或识别的位点的实例可以包括在CD37蛋白上的部分肽或部分构象。

[0156] 在本发明中,术语“CDR”意指互补决定区,并且术语“FR”意指框架区。已知抗体分子的重链和轻链各自具有三个CDR。CDR也称为高变结构域。这些区域定位于抗体重链和轻链的可变区中。这些位点具有特别高度可变的一级结构,并且通常在重链和轻链多肽链的分别一级结构上分成三个位置。在本发明中,抗体的互补决定区对于重链的互补决定区从重链氨基酸序列的氨基末端起被称为CDRH1、CDRH2和CDRH3,并且对于轻链的互补决定区从轻链氨基酸序列的氨基末端起被称为CDRL1、CDRL2和CDRL3。这些位点在三维结构上彼此邻近,并且决定了对于待结合的抗原的特异性。重链可变区氨基酸序列中的除CDRH1至CDRH3外的部分称为FR,并且从氨基末端直到但不包括CDRH1的部分、从紧在CDRH1后直到但不包括CDRH2的部分、从紧在CDRH2后直到但不包括CDRH3的部分、以及从紧在CDRH3后到羧基末端的部分分别称为FRH1至FRH4。同样地,轻链可变区氨基酸序列中的除CDRL1至CDRL3外的部分称为FR,并且从氨基末端直到但不包括CDRL1的部分、从紧在CDRL1后直到但不包括CDRL2的部分、从紧在CDRL2后直到但不包括CDRL3的部分、以及从紧在CDRL3后到羧基末端的部分分别称为FRL1至FRL4。即,在重链可变区和轻链可变区(的氨基酸序列)中,FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4和FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4按此次序从氨基末端侧朝向羧基末端连续地排列。

[0157] 在本发明中,术语“抗体的功能性片段”意指发挥由原始抗体发挥的至少一部分功

能的抗体片段。“抗体的功能性片段”的实例可以包括但不限于Fab、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、Fab'和单链免疫球蛋白。抗体的此类功能性片段可以通过用酶例如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体蛋白的全长分子来获得,或者可以是使用重组基因在适当的宿主细胞中产生的重组蛋白。具有针对抗原即人CD37的结合活性的“抗体的功能性片段”被称为“抗体的结合片段”。

[0158] 1. CD37

[0159] CD37是四跨膜蛋白超家族的四次跨膜蛋白(Charrin S.等人,J Cell Sci.3641-3648,127,2014)。CD37是由281个氨基酸构成的膜蛋白,并且具有氨基末端和羧基末端细胞内结构域两者,并且其序列可以参考例如登录号NM\_001774和NP\_001765(NCBI)。

[0160] 本发明中使用的CD37蛋白可以直接从人或非人哺乳动物(例如,大鼠、小鼠或猴)的CD37表达细胞中纯化,然后可以使用,或者可以制备前述细胞的细胞膜级分并且可以用作CD37蛋白。可替代地,CD37也可以通过体外合成或通过经由遗传操作允许宿主细胞产生CD37来获得。根据此类遗传操作,CD37蛋白可以通过以下特异性获得:将CD37 cDNA掺入能够表达CD37 cDNA的载体内,然后在含有转录和翻译所必需的酶、底物和能量物质的溶液中合成CD37,或者转化其它原核生物或真核生物的宿主细胞,以便允许其表达CD37。另外,基于上述遗传操作的表达CD37的细胞或表达CD37的细胞系可以用作CD37蛋白。可替代地,CD37 cDNA已掺入其内的表达载体可以直接施用于待免疫的动物,并且CD37可以在因此免疫的动物体内表达。

[0161] 此外,在术语“CD37”内还包括这样的蛋白质,其由在CD37的上述氨基酸序列中包含一个或几个氨基酸的取代、缺失和/或添加的氨基酸序列组成,并且具有与CD37蛋白等价的生物活性。应注意的是,术语“几个”在本说明书中用于意指1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3、或1或2个。

[0162] 人CD37蛋白具有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列。人CD37蛋白的细胞外区域由以下构成:具有在SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列中的位置39至59处的氨基酸序列的细胞外结构域1(在本说明书中,也被称为EC1),以及具有在SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列中的位置112至241处的氨基酸序列的细胞外结构域2(在本说明书中,也被称为EC2)。

[0163] SEQ ID NO:18

```
MSAQESCLSL IKYFLFVFNL FFFVLGSLIF CFGIWILIDK TSFVSFVGLA
FVPLQIWSKV LAISGIFTMG IALLGCVGAL KELRCLLGLY FGMLLLLFAT
QITLGILIST QRAQLERSLR DVVEKTIQKY GTNPEETAEE ESWDYVQFQL
RCCGWHYPQD WFQVLILRGN GSEHRVPCS CYNLSATNDS TILDKVILPQ
LSRLGHLARS RHSADICAVP AESHIYREGC AQGLQKWLHN NLISIVGICL
GVGLLELGMF TLSIFLCRNL DHVYNRLARY R
```

[0164] 对于人CD37蛋白的序列,还参见下述描述:

[0165] <https://www.uniprot.org/uniprot/P11049>

[0166] 2. 抗CD37抗体的生产

[0167] (2-1) 抗体

[0168] 在本发明中,结合CD37的抗体和识别CD37的抗体两者也被称为“抗CD37抗体”或者

简称为“CD37抗体”。

[0170] 本发明的抗CD37抗体可以衍生自任何物种。物种的优选实例可以包括人、大鼠、小鼠和兔。当本发明的抗CD37抗体衍生自除人外的物种时,期望通过已知技术将抗CD37抗体嵌合或人源化。本发明的抗体可以是多克隆抗体或可以是单克隆抗体,且优选单克隆抗体。

[0171] 本发明的抗CD37抗体是可以靶向肿瘤细胞的抗体。具体而言,本发明的抗CD37抗体具有能够识别肿瘤细胞的性质、能够与肿瘤细胞结合的性质、以及通过细胞摄取而内化到肿瘤细胞内的性质等等。相应地,本发明的抗CD37抗体可以经由接头缀合至具有抗肿瘤活性的化合物,以制备抗体-药物缀合物。

[0172] 抗体针对肿瘤细胞的结合活性可以通过流式细胞术进行确认。抗体摄取到肿瘤细胞内可以通过以下进行确认:(1)使用与抗体结合的二抗(荧光标记的),在荧光显微镜下显现细胞吸收的抗体的测定(Cell Death and Differentiation(2008)15,751-761), (2)使用与抗体结合的二抗(荧光标记的),测量细胞吸收的荧光量的测定(Molecular Biology of the Cell第15卷,5268-5282,2004年12月),或(3)使用与抗体结合的免疫毒素的Mab-ZAP测定,其中毒素在细胞摄取后释放,以便压制细胞生长(Bio Techniques 28:162-165,2000年1月)。白喉毒素的催化区和蛋白G的重组缀合蛋白可以用作免疫毒素。

[0173] 在本说明书中,术语“高内化能力”用于意指表达CD37的细胞的存活率(其通过相对于定义为100%的无抗体添加的细胞存活率的比率来指示)优选为70%或更少,且更优选为60%或更少,前述抗体和皂草素标记的抗大鼠IgG抗体已施用于所述表达CD37的细胞。

[0174] 本发明的抗肿瘤抗体-药物缀合物包含发挥抗肿瘤效应的缀合的化合物。因此,优选但非必需的是,抗体本身应该具有抗肿瘤效应。为了在肿瘤细胞中特异性且选择性发挥抗肿瘤化合物的细胞毒性的目的,重要且优选的是抗体应该具有被内化并转移到肿瘤细胞内的性质。

[0175] 抗CD37抗体可以通过以下获得:经由本领域中执行的方法,用充当抗原的多肽免疫动物,然后收集并纯化在其活体中产生的抗体。优选使用保留其三维结构的CD37作为抗原,因为CD37是四次跨膜蛋白。此类方法的实例可以包括DNA免疫。

[0176] 抗原的起源并不限于人,并且因此,动物也可以用衍生自非人动物例如小鼠或大鼠的抗原进行免疫。在这种情况下,可以通过检查所获得的与异源抗原结合的抗体与人抗原的交叉反应性来选择适用于人的疾病的抗体。

[0177] 此外,产生针对抗原的抗体的抗体产生细胞可以根据已知的方法与骨髓瘤细胞融合(例如,Kohler和Milstein,Nature(1975)256,第495-497页;以及Kennet,R编辑,Monoclonal Antibodies,第365-367页,Plenum Press,N.Y.(1980)),以建立杂交瘤,以便获得单克隆抗体。

[0178] 在下文中,将具体地描述用于获得针对CD37的抗体的方法。

[0179] (1) 抗原的制备

[0180] 根据遗传操作,可以通过允许宿主细胞产生编码抗原蛋白的基因来获得抗原。具体而言,产生能够表达抗原基因的载体,然后将载体引入宿主细胞内,使得基因在其中表达,并且其后,可以纯化所表达的抗原。抗体还可以用通过基于上述遗传操作的表达抗原的细胞、或表达抗原的细胞系免疫动物的方法来获得。

[0181] 可替代地,无需抗原蛋白的使用,也可以通过以下获得抗体:将抗原蛋白的cDNA掺

入表达载体内,然后将表达载体施用于待免疫的动物,并且在因此免疫的动物体内表达抗原蛋白,使得在其中产生针对抗原蛋白的抗体。

[0182] (2) 抗CD37单克隆抗体的生产

[0183] 本发明中使用的抗CD37抗体并无特别限制。例如,可以适当地使用由本申请的序列列表中所示的氨基酸序列指定的抗体。本发明中使用的抗CD37抗体期望地是具有下述性质的抗体:

[0184] (1) 具有下述性质的抗体:

[0185] (a) 与CD37特异性结合,和

[0186] (b) 具有通过与CD37结合而内化到表达CD37的细胞内的活性;

[0187] (2) 根据上文(1)的抗体,其中所述CD37是人CD37;或

[0188] (3) 根据上文(1)或(2)的抗体,其识别CD37的构象。

[0189] 用于获得本发明的针对CD37的抗体的方法并无特别限制,只要可以获得抗CD37抗体。优选的是使用保留其构象的CD37作为抗原,因为CD37是跨膜蛋白。

[0190] 用于获得抗体的方法的一个优选实例可以包括DNA免疫方法。DNA免疫方法是涉及用抗原的表达质粒转染个体动物(例如小鼠或大鼠),然后在动物中表达抗原以诱导针对抗原的免疫的方法。转染方法包括将质粒直接注射到肌肉中的方法,将转染试剂如脂质体或聚乙烯亚胺注射到静脉中的方法,使用病毒载体的方法,使用基因枪注射与质粒附着的金颗粒的方法,将质粒溶液大量快速注射到静脉中的流体动力学方法等等。关于将表达质粒注射到肌肉中的转染方法,已知称为体内电穿孔的技术作为用于改善表达水平的方法,所述体内电穿孔涉及将电穿孔施加于质粒的肌肉注射部位(Aihara H, Miyazaki J. Nat Biotechnol. 1998年9月;16(9):867-70或Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999年4月13日;96(8):4262-7)。这种方法通过在质粒的肌肉注射之前用透明质酸酶处理肌肉来进一步改善表达水平(McMahon JM1, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ., Gene Ther. 2001年8月;8(16):1264-70)。此外,杂交瘤产生可以通过已知的方法来执行,并且也可以使用例如Hybrimmune Hybridoma Production System (Cyto Pulse Sciences, Inc.) 来执行。

[0191] 获得单克隆抗体的具体实例还可以包括下述程序:

[0192] (a) 免疫应答可以通过以下进行诱导:将CD37 cDNA掺入表达载体内,并且通过方法例如电穿孔或基因枪将载体直接施用于待免疫的动物,以便在动物体内表达CD37。为了增强抗体滴定,必需时,通过电穿孔等等的载体施用可以执行1次或多次,优选多次;

[0193] (b) 从其中已诱导免疫应答的前述动物中收集含有抗体产生细胞的组织(例如,淋巴结);

[0194] (c) 骨髓瘤细胞(在下文中,被称为“骨髓瘤”)的制备;

[0195] (d) 在抗体产生细胞和骨髓瘤之间的细胞融合;

[0196] (e) 选择产生感兴趣抗体的杂交瘤组;

[0197] (f) 分成单细胞克隆(克隆);和

[0198] (g) 用于大量生产单克隆抗体的杂交瘤的培养,或杂交瘤接种到其内的动物的培育。

[0199] 所得到的单克隆抗体具有对于CD37的高抗原特异性。前述单克隆抗体的实例可以包括但不具体限于抗CD37小鼠单克隆抗体HH1 (Smeland E等人, Scand J Immunol, 21 (3), 205-214 (1985))。

[0200] (h) 研究因此产生的单克隆抗体的生理活性 (内化活性) 和结合特异性, 或检查抗体作为标记试剂的性质

[0201] 本文使用的用于测量抗体滴度的方法的实例可以包括但不限于流式细胞术和Cell-ELISA。

[0202] 此外, 在其中再次进行上文“2. 抗CD37抗体的生产”中描述的获得单克隆抗体的具体实例中的步骤 (a) 至 (h), 以分别独立地获得单克隆抗体的情况下, 以及在其中通过其它方法分别获得单克隆抗体的情况下, 可以获得具有与步骤 (g) 中获得的抗CD37抗体等价的细胞毒性活性的抗体。此类抗体的一个实例可以包括与步骤 (g) 中获得的抗CD37抗体所结合的相同表位结合的抗体。如果新近制备的单克隆抗体与抗CD37抗体所结合的部分肽或部分三维结构结合, 则可以确定所述单克隆抗体与抗CD37抗体所结合的相同表位结合。此外, 通过确认单克隆抗体与抗CD37抗体竞争抗体与CD37的结合 (即, 单克隆抗体干扰抗CD37抗体与CD37的结合), 可以确定所述单克隆抗体与抗CD37所结合的相同表位结合, 即使表位的具体序列或结构尚未确定。当确认单克隆抗体与抗CD37抗体所结合的相同表位结合时, 则强烈预计单克隆抗体应该具有与抗CD37抗体等价的抗原结合能力或生物活性。

[0203] (3) 其它抗体

[0204] 本发明的抗体还包括遗传重组抗体, 其已进行人工修饰用于例如降低对人的异种抗原性或改善抗体-药物缀合物的物理性质的目的, 例如嵌合抗体、人源化抗体和人抗体, 以及针对CD37的上述单克隆抗体。这些抗体可以通过已知的方法进行生产。

[0205] 嵌合抗体的实例可以包括其中可变区和恒定区彼此异源的抗体, 例如通过将小鼠或大鼠衍生的抗体的可变区与人衍生的恒定区缀合而形成的嵌合抗体 (参见 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984))。

[0206] 人源化抗体的实例可以包括通过仅将CDR掺入人衍生的抗体内而形成的抗体 (参见 Nature (1986) 321, 第522-525页), 根据CDR移植方法 (国际公开号W090/07861) 通过将来自一些框架的氨基酸残基、以及CDR序列掺入人抗体内而形成的抗体, 以及通过修饰一些CDR的氨基酸序列同时维持抗原结合能力而形成抗体。

[0207] 抗CD37小鼠单克隆抗体HH1的人源化抗体的具体实例包括包含hmAb-L11的轻链可变区和hmAb-H11、hmAb-H541、hmAb-H551或hmAb-H11a的重链可变区的抗体。hmAb-L11的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:2中, 并且hmAb-H11、hmAb-H541、hmAb-H551和hmAb-H11a的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:4、6、8和10中。在hmAb中, 轻链可变区由通过SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列中的氨基酸位置21至128表示的序列组成, 并且重链可变区由通过相应SEQ ID NO中所示的氨基酸序列中的氨基酸位置20至128表示的序列组成。本发明的抗体进一步包括包含hmAb-L11的全长轻链和hmAb-H11、hmAb-H541、hmAb-H551或hmAb-H11a的全重重链的抗体。hmAb-L11的轻链全长氨基酸序列包含通过SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列中的氨基酸位置21至234表示的序列, 并且hmAb-H11、hmAb-H541、hmAb-H551和hmAb-H11a的重链全长氨基酸序列分别包含通过SEQ ID NO:4、6、8和10中所示的氨基酸序列中的氨基酸位置20至468表示的序列。其具体实例可以包括hmAb-H11L11、hmAb-H541L11、hmAb-H551L11

和hmAb-H11aL11。

[0208] 在SEQ ID NO:2中,由在位置44至54处的氨基酸残基组成的序列(KASQDVSTAVD:SEQ ID NO:19)对应于CDRL1,由在位置70至76处的氨基酸残基组成的序列(WASTRHT:SEQ ID NO:20)对应于CDRL2,并且由在位置109至117处的氨基酸残基组成的序列(RQHYSTPFT:SEQ ID NO:21)对应于CDRL3。在SEQ ID NO:4、6、8和10中,由在位置45至54处的氨基酸残基组成的序列(GYSFTDYNMY:SEQ ID NO:22)对应于CDRH1,由在位置69至78处的氨基酸残基组成的序列(YIDPYNGDTT:SEQ ID NO:23)对应于CDRH2,并且由在位置118至127处的氨基酸残基组成的序列(SPYGHYAMDY:SEQ ID NO:24)对应于CDRH3。这些CDR序列按照AbM定义(Handbook of Therapeutic Antibodies,第5章,Bioinformatics Tools for Antibody Engineering,Andrew C.R.Martin,James Allen,2007)进行描述。

[0209] 本说明书中的氨基酸取代优选为保守氨基酸取代。保守氨基酸取代是在与某些氨基酸侧链相关的氨基酸基团内发生的取代。优选的氨基酸基团如下:酸性基团=天冬氨酸和谷氨酸;碱性基团=赖氨酸、精氨酸和组氨酸;非极性基团=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸;以及不带电荷的极性家族=甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。其它优选的氨基酸基团如下:脂肪族羧基基团=丝氨酸和苏氨酸;含酰胺基团=天冬酰胺和谷氨酰胺;脂肪族基团=丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;以及芳香族基团=苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。此类氨基酸取代优选在不损害具有原始氨基酸序列的物质的性质的情况下进行。

[0210] 通过将上述重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列显示高同源性的序列组合在一起,选择与上述抗体各自具有等价的生物活性的抗体是可能的。此类同源性一般为80%或更多,优选为85%或更多,更优选为90%或更多,进一步优选为95%或更多,且最优选为99%或更多的同源性。此外,还通过组合关于重链或轻链的氨基酸序列包含其一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加的重链和轻链的氨基酸序列,选择与上述抗体各自具有等价的生物活性的抗体是可能的。

[0211] 在两种类型的氨基酸序列之间的同源性可以使用Blast算法版本2.2.2(Altschul,Stephen F.,Thomas L.Madden,Alejandro A.Schaffer,Jinghui Zhang,Zheng Zhang,Webb Miller和David J.Lipman(1997),"Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs",Nucleic Acids Res.25:3389-3402)的默认参数进行确定。还可以通过经由互联网访问[www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)来使用Blast算法。

[0212] 在序列表中的SEQ ID NO:2中所示的轻链氨基酸序列中,由在位置1至20处的氨基酸残基组成的氨基酸序列对应于信号序列,由在位置21至128处的氨基酸残基组成的氨基酸序列对应于可变区,并且由在位置129至234处的氨基酸残基组成的氨基酸序列对应于恒定区。SEQ ID NO:2的序列在图1中进行描述。

[0213] 在SEQ ID NO:4、6、8或10中所示的重链氨基酸序列中,由在位置1至19处的氨基酸残基组成的氨基酸序列对应于信号序列,由在位置20至138处的氨基酸残基组成的氨基酸序列对应于可变区,并且由在位置139至468处的氨基酸残基组成的氨基酸序列对应于恒定区。SEQ ID NO:3、5、7或9的序列在图2、3、4或5中进行描述。

[0214] 本发明的抗体的进一步实例可以包括与CD37结合的人抗体。抗CD37人抗体意指仅

具有衍生自人染色体的抗体的基因序列的人抗体。抗CD37人抗体可以通过使用产生人抗体的小鼠的方法获得,所述小鼠具有包含人抗体的重链和轻链基因的人染色体片段(参见Tomizuka,K.等人,Nature Genetics(1997)16,第133-143页;Kuroiwa,Y.等人,Nucl.Acids Res.(1998)26,第3447-3448页;Yoshida,H.等人,Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects第10卷,第69-73页(Kitagawa,Y.,Matsuda,T.和Iijima,S编辑),Kluwer Academic Publishers,1999;Tomizuka,K.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2000)97,第722-727页;等)。

[0215] 此类产生人抗体的小鼠可以通过以下来特异性产生:使用遗传修饰的动物,所述动物的内源性免疫球蛋白重链和轻链的基因座已被破坏,并且代替地,然后已使用酵母人工染色体(YAC)载体等等引入人免疫球蛋白重链和轻链的基因座,然后从此类遗传修饰的动物产生敲除动物和转基因动物,然后使此类动物彼此交配。

[0216] 另外,抗CD37人抗体也可以通过以下获得:根据遗传重组技术,用编码此类人抗体的重链和轻链各自的cDNA,或优选地用包含此类cDNA的载体转化真核细胞,然后培养经转化的细胞并产生遗传修饰的人单克隆抗体,使得可以从培养上清液中获得抗体。

[0217] 在此上下文中,真核细胞,并且优选地,哺乳动物细胞例如CHO细胞、淋巴细胞或骨髓瘤可以例如用作宿主。

[0218] 此外,获得已选自人抗体文库的噬菌体展示衍生的人抗体的方法(参见Wormstone,I.M.等人,Investigative Ophthalmology&Visual Science.(2002)43(7),第2301-2308页;Carmen,S.等人,Briefings in Functional Genomics and Proteomics(2002),1(2),第189-203页;Siriwardena,D.等人,Ophthalmology(2002)109(3),第427-431页;等)也是已知的。

[0219] 例如,可以应用噬菌体展示方法,其包括允许人抗体的可变区在噬菌体的表面上表达为单链抗体(scFv),然后选择与抗原结合的噬菌体(Nature Biotechnology(2005),23,(9),第1105-1116页)。

[0220] 通过分析已由于其与抗原的结合能力而选择的噬菌体基因,可以确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的DNA序列。

[0221] 一旦确定了与抗原结合的scFv的DNA序列,就产生具有前述序列的表达载体,然后将产生的表达载体引入适当的宿主内,并且可以允许在其中表达,从而获得人抗体(国际公开号W092/01047、W092/20791、W093/06213、W093/11236、W093/19172、W095/01438和W095/15388,Annu.Rev.Immunol(1994)12,第433-455页,Nature Biotechnology(2005)23(9),第1105-1116页)。

[0222] 如果新近产生的人抗体与本说明书中描述的CD37抗体所结合的部分肽或部分三维结构结合,则可以确定所述人抗体与相同的表位结合。此外,通过确认人抗体与本说明书中描述的CD37抗体竞争抗体与CD37的结合(即,人抗体干扰本说明书中描述的CD37抗体与CD37的结合),可以确定所述人抗体与本说明书中描述的CD37抗体所结合的部分表位结合,即使表位的具体序列或结构尚未确定。当确认人抗体与本说明书中描述的CD37抗体所结合的部分表位结合时,则强烈预计人抗体应该具有与本说明书中描述的CD37抗体等价的抗原结合能力或生物活性。

[0223] 根据已知的方法等,关于其针对抗原的结合活性评估通过上述方法获得的嵌合抗

体、人源化抗体或人抗体,使得可以选择优选的抗体。

[0224] 用于比较抗体性质的另一种指标的一个实例可以包括抗体的稳定性。差示扫描量热计(DSC)是能够迅速且准确地测量热变性中点( $T_m$ )的仪器,所述热变性中点充当蛋白质的相对结构稳定性的良好指标。通过使用DSC来测量 $T_m$ 值并且关于所获得的值进行比较,可以比较热稳定性的差异。已知抗体的保存稳定性与抗体的热稳定性具有一定的相关性(Lori Burton等人,Pharmaceutical Development and Technology(2007)12,第265-273页),并且因此,可以使用热稳定性作为指标来选择优选抗体。用于选择抗体的指标的其它实例可以包括在合适的宿主细胞中的高产率和在水溶液中的低凝集。例如,由于具有最高产率的抗体并非始终显示出最高的热稳定性,因此有必要通过基于上述指标综合地确定其来选择最适合施用于人的抗体。

[0225] 本发明的抗体还包括抗体的修饰。修饰用于意指进行化学或生物学修饰的本发明的抗体。此类化学修饰的实例包括化学部分与氨基酸骨架的结合,以及N-连接或O-连接碳水化合物链的化学修饰。此类生物学修饰的实例包括已经历翻译后修饰(例如,N-连接或O-连接糖基化、氨基末端或羧基末端加工、脱酰胺、天冬氨酸异构化、甲硫氨酸氧化和色氨酸氧化)的抗体,以及由于已允许使用原核宿主细胞表达而向其氨基末端添加甲硫氨酸残基的抗体。另外,此类修饰还意欲包括允许检测或分离本发明的抗体或抗原的标记抗体,例如酶促标记的抗体、荧光标记的抗体和亲和标记的抗体。本发明的抗体的此类修饰可用于改善抗体的稳定性以及在血液中的滞留性;抗原性的降低;抗体或抗原的检测或分离;等。

[0226] 此外,通过调节与本发明的抗体结合的糖链修饰(糖基化、去岩藻糖基化等),可以增强抗体依赖性细胞的细胞毒性活性。作为调节抗体的糖链修饰的技术,国际公开号W01999/54342、W02000/61739、W02002/31140、W02007/133855和W02013/120066等中描述的那些技术是已知的,尽管技术并不限于此。本发明的抗体还包括关于其前述糖链修饰已得到调节的抗体。

[0227] (2-2) 用于生产抗体的方法

[0228] 一旦分离了抗体基因,就可以使用宿主和表达载体的适当组合将基因引入适当的宿主内以产生抗体。抗体基因的具体实例可以是编码本说明书中描述的抗体的重链序列的基因和编码其中描述的抗体的轻链序列的基因的组合。在宿主细胞的转化后,可以将此类重链序列基因和轻链序列基因插入单个表达载体内,或者可以代替地将这些基因各自插入不同的表达载体内。

[0229] 当使用真核细胞作为宿主时,可以使用动物细胞、植物细胞或真核微生物。特别地,动物细胞的实例可以包括哺乳动物细胞,例如其为猴细胞的COS细胞(Gluzman, Y., Cell (1981) 23, 第175-182页, ATCC CRL-1650)、小鼠成纤维细胞NIH3T3(ATCC编号CRL-1658)、中国仓鼠卵巢细胞的二氢叶酸还原酶缺陷细胞系(CHO细胞, ATCC CCL-61)(Urlaub, G. 和 Chasin, L.A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, 第4126-4220页)和FreeStyle 293F细胞(Invitrogen Corp.)。

[0230] 当使用原核细胞作为宿主时,例如可以使用大肠杆菌(*Escherichia coli*)或枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

[0231] 将感兴趣的抗体基因引入这些细胞内用于转化,然后将转化的细胞在体外培养以获得抗体。在上述培养物中,存在其中产率取决于抗体的序列而不同的情况,并且因此使用

产率作为指标,从具有等价结合活性的抗体中选择容易作为药剂生产的抗体是可能的。相应地,本发明的抗体还包括通过上述用于生产抗体的方法获得的抗体,所述方法包括培养转化的宿主细胞的步骤,以及从前述步骤中获得的培养物中收集感兴趣抗体或抗体的功能性片段的步骤。

[0232] 已知由培养的哺乳动物细胞产生的抗体重链的羧基末端处的赖氨酸残基被缺失 (Journal of Chromatography A, 705:129-134 (1995)), 并且另外, 已知在重链羧基末端处的两个氨基酸残基甘氨酸和赖氨酸被缺失, 并且新定位于羧基末端处的脯氨酸残基被酰胺化 (Analytical Biochemistry, 360:75-83 (2007))。然而, 这些重链序列的此类缺失和修饰并不对抗体的抗原结合活性和效应子功能 (补体的激活、抗体依赖性细胞的细胞毒性等) 具有影响。相应地, 根据本发明的抗体还包括已经历前述修饰的抗体和抗体的功能性片段, 并且此类抗体的具体实例包括包含在重链羧基末端处的1个或2个氨基酸缺失的缺失突变体, 以及通过使前述缺失突变体酰胺化而形成的缺失突变体 (例如, 其中在羧基末端位点处的脯氨酸残基被酰胺化的重链)。然而, 涉及在根据本发明的抗体重链的羧基末端处的缺失的缺失突变体并不限于上述缺失突变体, 只要它们保留抗原结合活性和/或效应子功能即可。构成根据本发明的抗体的两条重链可以是选自全长抗体和上述缺失突变体的任何一种类型的重链, 或者可以是选自前述组的任何两种类型的组合。各种缺失突变体的比率可以受到产生根据本发明的抗体的培养的哺乳动物细胞的类型和培养条件的影响。根据本发明的抗体的主要成分的实例可以包括其中在两条重链的羧基末端各自处缺失一个氨基酸残基的抗体。

[0233] 本发明的抗体的同种型的实例可以包括IgG (IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。其中, IgG1和IgG2是优选的。

[0234] 抗体的生物活性的实例一般可以包括抗原结合活性, 通过与抗原结合而内化到表达抗原的细胞内的活性, 中和抗原的活性的活性, 增强抗原的活性的活性, 抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 活性, 补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性和抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP)。根据本发明的抗体的功能是针对CD37的结合活性, 并且优选是通过与CD37结合而内化到表达CD37的细胞内的活性。此外, 本发明的抗体可以具有ADCC活性、CDC活性和/或ADCP活性、以及细胞内化活性。

[0235] 所获得的抗体可以纯化至同质状态。对于抗体的分离和纯化, 可以使用用于普通蛋白质的分离和纯化方法。例如, 适当地选择柱层析、过滤、超滤、盐析、透析、制备型聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦并且彼此组合, 使得抗体可以进行分离且纯化 (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak等人编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); 以及Antibodies: A Laboratory Manual. 编辑Harlow和David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), 尽管分离和纯化方法的实例并不限于此。

[0236] 层析的实例可以包括亲和层析、离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤层析、反相层析和吸收层析。

[0237] 这些层析技术可以使用液相层析例如HPLC或FPLC来进行。

[0238] 亲和层析中使用的柱的实例可以包括蛋白A柱和蛋白G柱。可用作蛋白A柱的柱的实例可以包括Hyper D、POROS和Sepharose F.F. (Pharmacia)。

[0239] 另外,使用抗原固定的载体,可以通过利用抗体与抗原的结合活性来纯化抗体。

[0240] 3. 抗CD37抗体-药物缀合物

[0241] (1) 药物

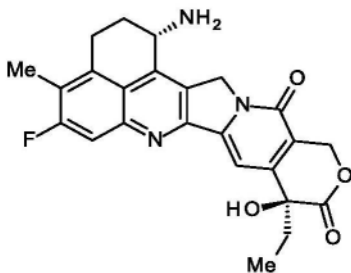
[0242] 上文“2. 抗CD37抗体的生产”中获得的抗CD37抗体可以经由接头结构部分与药物缀合,以制备抗CD37抗体-药物缀合物。药物并无特别限制,只要它具有可以与接头结构连接的取代基或部分结构即可。根据缀合的药物,抗CD37抗体-药物缀合物可以用于各种目的。此类药物的实例可以包括具有抗肿瘤活性的物质、对于血液疾病有效的物质、对于自身免疫性疾病有效的物质、抗炎物质、抗微生物物质、抗真菌物质、抗寄生虫物质、抗病毒物质和抗麻醉物质。

[0243] (1) -1 抗肿瘤化合物

[0244] 下文将描述的是使用抗肿瘤化合物作为本发明的抗CD37抗体-药物缀合物中待缀合的化合物的实例。抗肿瘤化合物并无特别限制,只要化合物具有抗肿瘤效应并且具有可以与接头结构连接的取代基或部分结构即可。在接头的部分或全部在肿瘤细胞中切割后,抗肿瘤化合物部分被释放,使得抗肿瘤化合物显示出抗肿瘤效应。由于接头在与药物的连接位置处被切割,抗肿瘤化合物以其原始结构释放,以发挥其原始抗肿瘤效应。

[0245] 作为本发明中使用的抗肿瘤化合物的一个实例,可以优选地使用依喜替康(exatecan),一种喜树碱衍生物(由下式表示的(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)。

[0246] [式5]



[0248] 化合物可以通过例如美国专利公开号2016/0297890中描述的方法或其它已知方法容易地获得,并且在位置1处的氨基基团可以优选用作与接头结构的连接位置。进一步地,依喜替康可以被释放到肿瘤细胞内,同时接头的部分仍与其附着。然而,即使在这种状态下,化合物也发挥极佳的抗肿瘤效应。

[0249] 由于依喜替康具有喜树碱结构,因此已知平衡在酸性水介质(例如,pH 3左右)中转变至具有形成的内酯环(闭环)的结构,而平衡在碱性水介质(例如,pH 10左右)中转变至具有开放的内酯环(开环)的结构。对应于此类闭环结构和开环结构的依喜替康残基已引入其内的药物缀合物也预计具有等价的抗肿瘤效应,并且不用说的是,任何此类药物缀合物都包括在本发明的范围内。

[0250] 抗肿瘤化合物的其它实例可以包括文献(Pharmacological Reviews,68,第3-19页,2016)中描述的抗肿瘤化合物。其具体实例可以包括多柔比星、卡利奇霉素、多拉司他汀10、澳瑞他汀如一甲基澳瑞他汀E(MMAE)和一甲基澳瑞他汀F(MMAF)、美登木素类如DM1和DM4、吡咯并苯并二氮卓二聚体SG2000(SJG-136)、喜树碱衍生物SN-38、倍癌霉素如CC-

1065、鹅膏蕈碱、柔红霉素、丝裂霉素C、博来霉素、环胞苷、长春新碱、长春碱、氨甲蝶呤、基于铂的抗肿瘤剂(顺铂及其衍生物)、以及紫杉醇及其衍生物。

[0251] 在抗体-药物缀合物中,每个抗体分子的缀合药物分子数目是对其功效和安全性具有影响的关键因素。抗体-药物缀合物的生产通过指定反应条件例如用于反应的原材料和试剂的量来进行,以便获得恒定数目的缀合药物分子。与低分子量化合物的化学反应不同,通常获得含有不同数目的缀合药物分子的混合物。每个抗体分子的缀合药物分子数目被定义并指示为平均值,即缀合药物分子的平均数目。除非另有说明,即除了在表示具有特定数目的缀合药物分子的抗体-药物缀合物(其包括在具有不同数目的缀合药物分子的抗体-药物缀合物混合物中)的情况下之外,否则根据本发明的缀合药物分子数目通常也意指平均值。与抗体分子缀合的依喜替康分子的数目是可控的,并且作为每个抗体的缀合药物分子的平均数目,可以缀合大约1至10个依喜替康分子。依喜替康分子的数目优选为2至8、3至8、4至8、5至8、6至8或7至8,更优选5至8,进一步优选7至8,再进一步优选约8或8。应注意的是,本领域技术人员可以基于本申请的实施例的描述,设计用于将所需数目的药物分子与抗体分子缀合的反应,并且可以获得具有受控数目的缀合依喜替康分子的抗体-药物缀合物。

[0252] (2) 接头结构

[0253] 将描述的是在本发明的抗CD37抗体-药物缀合物中,将药物与抗CD37抗体缀合的接头结构。

[0254] 在本申请的抗体-药物缀合物中,将抗CD37抗体与药物缀合的接头结构并无特别限制,只要可以使用所得到的抗体-药物缀合物即可。接头结构可以根据使用目的适当地选择且使用。接头结构的一个实例可以包括已知文献(Pharmacol Rev 68:3-19,2016年1月,Protein Cell DOI 10.1007/s13238-016-0323-0等)中描述的接头。其进一步的具体实例可以包括VC(缬氨酸-瓜氨酸)、MC(马来酰亚胺己酰基)、SMCC(4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯)、SPP(N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)戊酸酯)、SS(二硫化物)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)、SS/脘、脘和碳酸酯。

[0255] 其另一个实例可以包括美国专利公开号2016/0297890中描述的接头结构(作为一个实例,前述专利公开文献中的段落[0260]至[0289]中描述的那些接头结构)。可以优选使用下文给出的任何接头结构。应注意的是,该结构的左末端是与抗体的连接位置,并且其右末端是与药物的连接位置。此外,下文给出的接头结构中的GGFG表示由通过肽键连接的甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸(GGFG)组成的氨基酸序列。

[0256] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - ,

[0257] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - ,

[0258] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O) - ,

[0259] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O) - ,

[0260] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - ,和

[0261] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) -GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O) - 。

[0262] 更优选的是下述:

[0263] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-,

[0264] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, 和

[0265] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-。

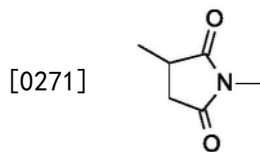
[0266] 再更优选的是下述:

[0267] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-, 和

[0268] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-。

[0269] 抗体连接至-(琥珀酰亚胺-3-基-N)的末端(例如,与-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-在"- (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-"中与之连接的末端相对的末端(左末端)),并且抗肿瘤化合物连接至与抗体连接至-(琥珀酰亚胺-3-基-N)的末端相对的末端(在上述实例中的右末端处的CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-的羰基基团)。"- (琥珀酰亚胺-3-基-N) -"具有由下式表示的结构:

[0270] [式6]



[0272] 这种部分结构的位置3是与抗CD37抗体的连接位置。在位置3处与抗体的这种连接的特征在于形成硫醚键。在这种结构部分的位置1处的氮原子连接至包括这种结构的接头内存在的亚甲基的碳原子。

[0273] 在具有依喜替康作为药物的本发明的抗体-药物缀合物中,具有下文给出的任何结构的药物-接头结构部分优选用于与抗体缀合。对于这些药物-接头结构部分,每个抗体缀合的平均数目可以是1至10,并且优选为2至8,更优选为5至8,进一步优选为7至8,并且再进一步优选为8。

[0274] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

[0275] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

[0276] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

[0277] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

[0278] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), 和

[0279] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

[0280] 更优选的是下述:

[0281] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX),

[0282] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), 和

[0283] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

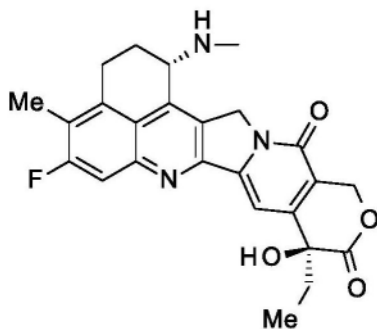
[0284] 再更优选的是下述:

[0285] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX), 和

[0286] - (琥珀酰亚胺-3-基-N) -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-GGFG-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-C(=O)-(NH-DX)。

[0287] - (NH-DX) 具有由下式表示的结构:

[0288] [式7]



[0290] 并且它表示通过从在依喜替康的位置1处的氨基基团中去除一个氢原子而衍生的基团。

[0291] (3) 用于生产抗体-药物缀合物的方法

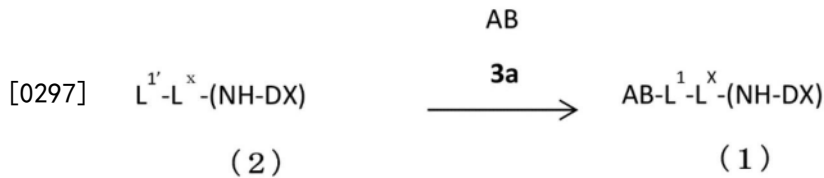
[0292] 可以用于本发明的抗体-药物缀合物中的抗体并无特别限制,只要它是具有内化活性的抗CD37抗体或抗体的功能性片段,如上文节段“2.抗CD37抗体的生产”和实施例中所描述的。

[0293] 接下来,将描述的是用于生产本发明的抗体-药物缀合物的典型方法。应注意的是,在下文的说明书中,每个反应方案中所示的“化合物编号”用于表示化合物。具体而言,每种化合物被称为“式(1)的化合物”、“化合物(1)”等等。这同样适用于其它化合物编号。

[0294] (3) -1生产方法1

[0295] 其中抗CD37抗体经由硫醚与接头结构连接、由下文给出的式(1)表示的抗体-药物缀合物可以通过以下进行生产:使具有通过抗CD37抗体的还原由二硫键转换的巯基基团的抗体AB与可通过已知方法获得(例如,可通过美国专利公开号2016/297890中描述的方法(例如,前述专利公开文献中的段落[0336]至[0374]中描述的方法)获得)的化合物(2)反应。例如,抗体-药物缀合物可以通过下述方法进行生产。

[0296] [表达式1]

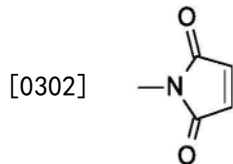


[0298] 其中AB表示具有巯基基团的抗体,其中

[0299]  $L^1$ 具有由-(琥珀酰亚胺-3-基-N)-表示的结构,和

[0300]  $L^1$ '表示由下式表示的马来酰亚胺基基团。

[0301] [式8]



[0303]  $-L^1-L^x$ 具有由下式中的任一个表示的结构:

[0304] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,

[0305] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,

[0306] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,

[0307] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,

[0308] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,和

[0309] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ 。

[0310] 其中,更优选的是下述:

[0311] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,

[0312] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,和

[0313] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ 。

[0314] 进一步优选的是下述:

[0315] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ ,和

[0316] -(琥珀酰亚胺-3-基-N)- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$ 。

[0317] 在上述反应方案中,抗体-药物缀合物(1)可以理解为具有其中从药物到接头末端的一个结构部分与一个抗体连接的结构。然而,该描述为了方便起见而给出,并且实际上存在其中多个前述结构部分与一个抗体分子连接的许多情况。这同样适用于下文描述的生产方法的说明。

[0318] 具体而言,抗体-药物缀合物(1)可以通过以下进行生产:使可通过已知方法获得(例如,可通过美国专利公开号2016/297890中描述的方法(例如,前述专利公开文献中的段

落[0336]至[0374]中描述的方法)获得)的化合物(2)与具有巯基基团的抗体反应。

[0319] 具有巯基基团的抗体可以通过本领域技术人员众所周知的方法(Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, 第56-136页, 第456-493页, Academic Press(1996))来获得。方法的实例可以包括但不限于:使Traut氏试剂与抗体的氨基基团反应;使N-琥珀酰亚胺基S-乙酰硫代链烷酸酯与抗体的氨基基团反应,随后为与羟胺的反应;使N-琥珀酰亚胺基3-(吡啶基二硫代)丙酸酯与抗体反应,随后为与还原剂的反应;使抗体与还原剂例如二硫苏糖醇、2-巯基乙醇或三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)反应,以使抗体中的链间二硫键还原,以便形成巯基基团。

[0320] 具体地,通过使用抗体中的每个链间二硫键0.3至3摩尔当量的TCEP作为还原剂,并且使还原剂与含有螯合剂的缓冲溶液中的抗体反应,可以获得其中链间二硫键部分或完全还原的抗体。螯合剂的实例可以包括乙二胺四乙酸(EDTA)和二乙烯三胺五乙酸(DTPA)。螯合剂可以以1mM至20mM的浓度使用。磷酸钠、硼酸钠、乙酸钠等等的溶液可以用作缓冲溶液,作为具体实例,可以通过使抗体与TCEP在4°C至37°C下反应1小时至4小时,来获得具有部分或完全还原的巯基基团的抗体。

[0321] 应注意的是,通过进行巯基基团与药物-接头部分的加成反应,药物-接头部分可以通过硫醚键进行缀合。

[0322] 然后,使用具有巯基基团的每个抗体2至20摩尔当量的化合物(2),可以产生其中每个抗体缀合2至8个药物分子的抗体-药物缀合物(1)。具体而言,含有溶解于其中的化合物(2)的溶液可以加入含有具有用于反应的巯基基团的抗体(3a)的缓冲溶液中。在此上下文中,乙酸钠溶液、磷酸钠、硼酸钠等等可以用作缓冲溶液。关于反应的pH为5至9,且更优选地,反应可以在pH 7附近执行。有机溶剂例如二甲亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)或N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)可以用于溶解化合物(2)的溶剂。反应可以通过将含有以1至20%v/v溶解于有机溶剂中的化合物(2)的溶液加入含有具有巯基基团的抗体的缓冲溶液中来执行。反应温度为0°C至37°C,更优选10°C至25°C,并且反应时间为0.5小时至2小时。可以通过用含巯基试剂使未反应的化合物(2)的反应性失活来终止反应。含巯基试剂例如半胱氨酸或N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)。更具体而言,可以通过向所使用的化合物(2)中添加1至2摩尔当量的NAC,并且使所获得的混合物在室温下温育10分钟至30分钟来终止反应。

[0323] (4) 抗体-药物缀合物的鉴定

[0324] 所产生的抗体-药物缀合物(1)可以经受根据下述常见程序的浓缩、缓冲液更换、纯化、以及抗体浓度和每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目的测量,以鉴定抗体-药物缀合物(1)。

[0325] (4)-1 常见程序A: 抗体或抗体-药物缀合物的水溶液的浓缩

[0326] 向Amicon Ultra(50,000MWC0, Millipore Corporation)容器中添加抗体或抗体-药物缀合物溶液,并且使用离心机(Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.),通过离心(以2000G至3800G离心5至20分钟)来浓缩抗体或抗体-药物缀合物溶液

[0327] (4)-2 常见程序B: 抗体浓度的测量

[0328] 使用UV检测器(Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.),根据由制造商限定的方法进行抗体浓度的测量。在这方面,使用在抗体中不同的280nm吸光系数

( $1.3\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 至 $1.8\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )。

[0329] (4) -3常见程序C:用于抗体的缓冲液更换

[0330] 根据由制造商定义的方法,使用Sephadex G-25载体的NAP-25柱(目录号17-0852-02,GE Healthcare Japan Corporation)用含有氯化钠(50mM)和EDTA(2mM)的磷酸盐缓冲液(50mM,pH 6.0)(在本说明书中被称为PBS6.0/EDTA)进行平衡。抗体的水溶液以2.5mL/NAP-25柱的量进行施加,并且其后,收集用3.5mL PBS6.0/EDTA洗脱的级分(3.5mL)。这种级分通过常见程序A进行浓缩。在使用常见程序B测量抗体浓度后,使用PBS6.0/EDTA将抗体浓度调整至10mg/mL。

[0331] (4) -4常见程序D:抗体-药物缀合物的纯化

[0332] NAP-25柱用任何商购可得的缓冲溶液例如含有山梨糖醇(5%)的乙酸盐缓冲液(10mM,pH 5.5;在本说明书中被称为ABS)进行平衡。将抗体-药物缀合物的水性反应溶液(大约2.5mL)施加于NAP-25柱,并且其后,用以由制造商限定的量的缓冲溶液进行洗脱,以便收集抗体级分。其中收集的级分再次施加于NAP-25柱,并且用缓冲溶液进行洗脱的凝胶过滤纯化过程重复总共2或3次,以获得不包含非缀合药物接头和低分子量化合物(三(2-羧乙基)膦酸盐(TCEP)、N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)和二甲亚砷)的抗体-药物缀合物。

[0333] (4) -5常见程序E:抗体-药物缀合物中的抗体浓度和每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目的测量(1)

[0334] 抗体-药物缀合物中的缀合药物浓度可以通过以下进行计算:测量抗体-药物缀合物的水溶液在280nm和370nm的两个波长下的UV吸光度,并且其后执行下文显示的计算。

[0335] 在任何给定波长处的总吸光度等于系统中存在的所有光吸收化学种类的吸光度之和[吸光度的加和性]。因此,基于抗体和药物的摩尔吸光系数在抗体和药物缀合之前和之后并未改变的假设,抗体-药物缀合物中的抗体浓度和药物浓度由下述等式表示。

[0336]  $A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280} C_D + \epsilon_{A,280} C_A$  等式(1)

[0337]  $A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370} C_D + \epsilon_{A,370} C_A$  等式(2)

[0338] 在此上下文中, $A_{280}$ 表示抗体-药物缀合物的水溶液在280nm处的吸光度, $A_{370}$ 表示抗体-药物缀合物的水溶液在370nm处的吸光度, $A_{A,280}$ 表示抗体在280nm处的吸光度, $A_{A,370}$ 表示抗体在370nm处的吸光度, $A_{D,280}$ 表示缀合物前体在280nm处的吸光度, $A_{D,370}$ 表示缀合物前体在370nm处的吸光度, $\epsilon_{A,280}$ 表示抗体在280nm处的摩尔吸光系数, $\epsilon_{A,370}$ 表示抗体在370nm处的摩尔吸光系数, $\epsilon_{D,280}$ 表示缀合物前体在280nm处的摩尔吸光系数, $\epsilon_{D,370}$ 表示缀合物前体在370nm处的摩尔吸光系数, $C_A$ 表示抗体-药物缀合物中的抗体浓度,并且 $C_D$ 表示抗体-药物缀合物中的药物浓度。

[0339] 在此上下文中,关于 $\epsilon_{A,280}$ 、 $\epsilon_{A,370}$ 、 $\epsilon_{D,280}$ 和 $\epsilon_{D,370}$ ,使用预先准备的值(基于计算的估计值或通过化合物的UV测量获得的测量值)。例如,可以通过已知的计算方法(Protein Science,1995,第4卷,2411-2423),从抗体的氨基酸序列估计 $\epsilon_{A,280}$ 、 $\epsilon_{A,370}$ 一般为零。可以根据朗伯-比尔定律(吸光度=摩尔浓度×摩尔吸光系数×室径长度),通过测量其中所使用的缀合物前体以一定摩尔浓度溶解的溶液的吸光度来获得 $\epsilon_{D,280}$ 和 $\epsilon_{D,370}$ 。 $C_A$ 和 $C_D$ 可以通过测量抗体-药物缀合物的水溶液的 $A_{280}$ 和 $A_{370}$ ,然后通过代入这些值来求解联立方程式(1)和(2)来确定。进一步地,通过将 $C_D$ 除以 $C_A$ ,可以确定每个抗体的缀合药物分子的平均数目。

[0340] (4) -6常见程序F:抗体-药物缀合物中的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数

## 目测量- (2)

[0341] 除前述“(4)-5常见程序E”之外,还可以使用下述方法通过高效液相层析(HPLC)分析来确定抗体-药物缀合物中的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目。在下文中,将描述的是当抗体通过二硫键与药物接头缀合时,通过HPLC用于测量缀合药物分子的平均数目的方法。参考这种方法,取决于抗体和药物接头之间的连接方式,本领域技术人员能够通过HPLC适当地测量缀合药物分子的平均数目。

[0342] F-1. 用于HPLC分析的样品制备(抗体-药物缀合物的还原)

[0343] 将抗体-药物缀合物溶液(大约1mg/mL, 60 $\mu$ L)与二硫苏糖醇(DTT)的水溶液(100mM, 15 $\mu$ L)混合。通过使混合物在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟,在抗体-药物缀合物的轻链和重链之间的二硫键被切割。所得到的样品用于HPLC分析中。

[0344] F-2. HPLC分析

[0345] HPLC分析在下述测量条件下进行。

[0346] HPLC系统:Agilent 1290HPLC系统(Agilent Technologies, Inc.)

[0347] 检测器:紫外吸收光谱仪(测量波长:280nm)

[0348] 柱:ACQUITY UPLC BEH Phenyl (2.1 $\times$ 50mm, 1.7 $\mu$ m, 130埃; Waters Corp., P/N 186002884)

[0349] 柱温:80 $^{\circ}$ C

[0350] 流动相A:含有0.10%三氟乙酸(TFA)和15%2-丙醇的水溶液

[0351] 流动相B:含有0.075%TFA和15%2-丙醇的乙腈溶液

[0352] 梯度程序:14%-36%(0分钟-15分钟)、36%-80%(15分钟-17分钟)、80%-14%(17分钟-17.01分钟)和14%(17.01分钟-25分钟)

[0353] 样品注射量:10 $\mu$ L

[0354] F-3. 数据分析

[0355] F-3-1. 与非缀合抗体轻(L0)和重(H0)链相比,与药物分子结合的轻链(与i个药物分子结合的轻链:L<sub>i</sub>)以及与药物分子结合的重链(与i个药物分子结合的重链:H<sub>i</sub>)显示出与缀合药物分子的数目成比例地更高的疏水性,并且因此具有更长的保留时间。因此,这些链按照例如L0和L1或H0、H1、H2和H3的次序洗脱。通过与L0和H0的保留时间的比较,可以将检测峰分配给L0、L1、H0、H1、H2和H3中的任一个。缀合药物分子的数目可以由本领域技术人员定义,但优选为L0、L1、H0、H1、H2和H3。

[0356] F-3-2. 由于药物接头具有UV吸收,因此使用轻链或重链和药物接头的摩尔吸光系数,根据下述表达式响应缀合的药物接头分子的数目来校正峰面积值。

[0357] [表达式2]

与i个药物分子结合的轻链的峰面积的校正值 ( $A_{Li}$ )

= 峰面积

[0358]

$$\times \frac{\text{轻链的摩尔吸光系数}}{\text{轻链的摩尔吸光系数} + \text{缀合药物分子的数目}(i) \times \text{药物接头的摩尔吸光系数}}$$

[0359] [表达式3]

与*i*个药物分子结合的重链的峰面积的校正值 ( $A_{Hi}$ )

[0360] = 峰面积

$$\times \frac{\text{重链的摩尔吸光系数}}{\text{重链的摩尔吸光系数} + \text{缀合药物分子的数目 (i)} \times \text{药物接头的摩尔吸光系数}}$$

[0361] 在此上下文中,通过已知的计算方法(Protein Science,1995,第4卷,2411-2423),从每种抗体的轻链或重链的氨基酸序列估计的值可以用作抗体轻链或重链的摩尔吸光系数(280nm)。在H01L02的情况下,根据抗体的氨基酸序列,摩尔吸光系数31710和摩尔吸光系数79990分别用作轻链和重链的估计值。其中马来酰亚胺基团通过每种药物接头与巯基乙醇或N-乙酰半胱氨酸的反应已转换为琥珀酰亚胺硫醚的化合物的实际测量的摩尔吸光系数(280nm)用作药物接头的摩尔吸光系数(280nm)。关于吸光度测量的波长可以由本领域技术人员适当地设定,但优选为在其下可以测量抗体的峰值的波长,且更优选为280nm。

[0362] F-3-3.根据下述表达式,对于峰面积的校正值的总和来计算每条链的峰面积比(%)。

[0363] [表达式4]

$$[0364] \quad \text{与}i\text{个药物分子结合的轻链的峰面积比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$[0365] \quad \text{与}i\text{个药物分子结合的重链的峰面积比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

[0366]  $A_{Li}$ ,  $A_{Hi}$ :分别为*L<sub>i</sub>*和*H<sub>i</sub>*的峰面积的校正值

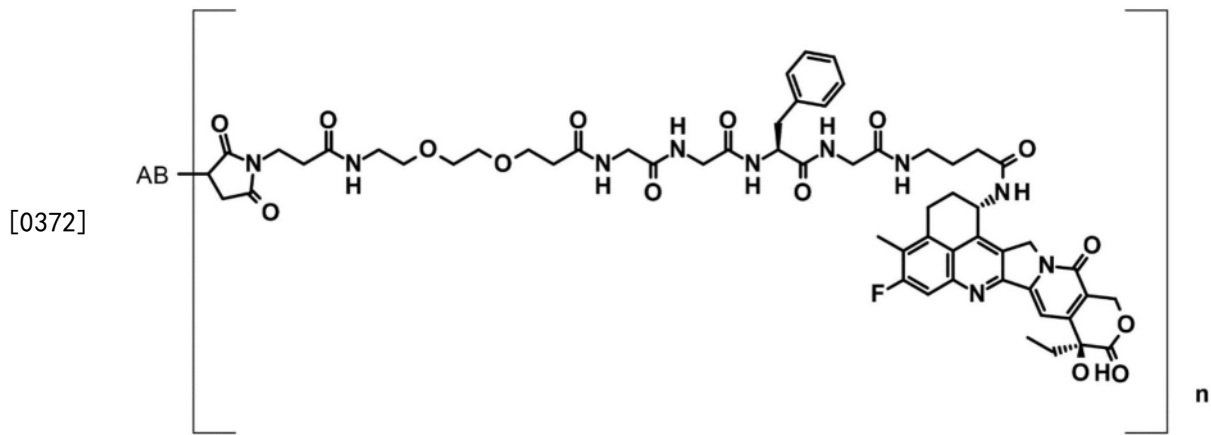
[0367] F-3-4.根据下述表达式来计算抗体-药物缀合物中的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目。

$$[0368] \quad \text{缀合药物分子的平均数目} = \frac{(L_0 \text{峰面积比} \times 0 + L_1 \text{峰面积比} \times 1 + H_0 \text{峰面积比} \times 0 + H_1 \text{峰面积比} \times 1 + H_2 \text{峰面积比} \times 2 + H_3 \text{峰面积比} \times 3)}{100 \times 2}$$

[0369] 应注意的是,为了确保抗体-药物缀合物的量,可以混合具有几乎相同的缀合药物分子的平均数目(例如,±1左右)的多种抗体-药物缀合物(其已在相似的条件下进行生产),以制备新批次。在这种情况下,新批次的缀合药物分子的平均数目落入混合之前的缀合药物分子的平均数目之间。

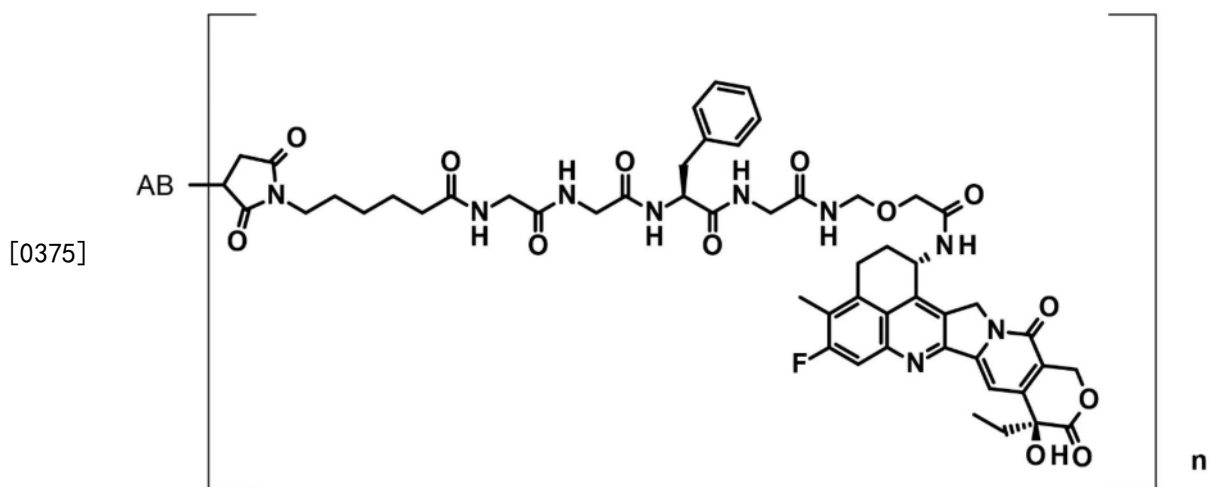
[0370] 本发明的抗体-药物缀合物的一个具体实例可以包括具有由下式:

[0371] [式9]



[0373] 或下式:

[0374] [式10]



[0376] 表示的结构的抗体-药物缀合物。

[0377] 在此上下文中,AB表示本说明书中公开的抗CD37抗体,并且抗体经由源于抗体的巯基基团与药物接头缀合。在此上下文中,n具有与所谓的DAR(药物/抗体比率)相同的含义,并且表示每个抗体的药物/抗体比率。具体而言,n表示每个抗体分子的缀合药物分子的数目,其是定义且指示为平均值的数值,即缀合药物分子的平均数目。在由本发明的式9或式10表示的抗体-药物缀合物的情况下,在通过常见程序F的测量中,n可以是2至8,并且优选为5至8,更优选为7至8,且再更优选为8。

[0378] 本发明的抗体-药物缀合物的一个实例可以包括具有由上述式9或式10表示的结构的抗体-药物缀合物,其中由AB表示的抗体包含由选自下述抗体(a)至(e)的重链和轻链组成的任何一种抗体,或抗体的功能性片段,或抗体-药物缀合物的药理学上可接受的盐:

[0379] (a) 由以下组成的抗体:由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:4中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0380] (b) 由以下组成的抗体:由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:6中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0381] (c) 由以下组成的抗体:由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置

21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:8中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;

[0382] (d)由以下组成的抗体:由在SEQ ID NO:2中所示的轻链全长氨基酸序列中的位置21至234处的氨基酸序列组成的轻链,以及由在SEQ ID NO:10中所示的重链全长氨基酸序列中的位置20至468处的氨基酸序列组成的重链;和

[0383] (e)选自抗体(a)至(d)的任何一种抗体,其中所述重链或轻链包含选自通过以下表示的翻译后修饰的一种或两种或更多种修饰:N-连接糖基化、O-连接糖基化、氨基末端加工、羧基末端加工、脱酰胺、天冬氨酸异构化、甲硫氨酸氧化、色氨酸氧化、甲硫氨酸残基向氨基末端的添加、脯氨酸残基酰胺化、以及氨基末端谷氨酰胺或氨基末端谷氨酸转换为焦谷氨酸、以及从羧基末端缺失一个或两个氨基酸。

#### [0384] 4. 药剂

[0385] 由于上文节段“2. 抗CD37抗体的生产”和实施例描述的本发明的抗CD37抗体或抗体的功能性片段与在肿瘤细胞的表面上的CD37结合并具有内化活性,因此它可以用作药剂,且特别是用作用于以下的治疗剂:B细胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL)(例如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤(MZL)和伯基特淋巴瘤(BL))、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、T细胞淋巴瘤(TCL)例如外周T细胞淋巴瘤(PTCL)或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、以及进一步的骨髓增生异常综合征(MDS)和急性髓样白血病(AML)。

[0386] 此外,本发明的抗CD37抗体或抗体的功能性片段可以用于检测表达CD37的细胞。

[0387] 此外,由于本发明的抗CD37抗体或抗体的功能性片段具有内化活性,因此它可以作为抗体-药物缀合物中的抗体施加。

[0388] 当具有抗肿瘤活性如细胞毒性活性的药物用作药物时,上文节段“3. 抗CD37抗体-药物缀合物”和实施例描述的本发明的抗CD37抗体-药物缀合物是具有内化活性的抗CD37抗体和/或抗体的功能性片段与具有抗肿瘤活性如细胞毒性活性的药物的缀合物。由于这种抗CD37抗体-药物缀合物显示出针对表达CD37的癌细胞的抗肿瘤活性,因此它可以用作药剂,且特别是用作用于癌症的治疗剂和/或预防剂。

[0389] 本发明的抗CD37抗体-药物缀合物可以吸收湿气或具有吸附水,例如,以在它静置于空气中或经受重结晶或纯化程序时转变成水合物。此类含有水的化合物或药理学上可接受的盐也包括在本发明中。

[0390] 当本发明的抗CD37抗体-药物缀合物具有碱性基团例如氨基基团时,需要时,它可以形成药理学上可接受的酸加成盐。此类酸加成盐的实例可以包括:氢卤酸盐例如氢氟酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐和氢碘酸盐;无机酸盐例如硝酸盐、高氯酸盐、硫酸盐和磷酸盐;低级链烷磺酸盐例如甲磺酸盐、三氟甲磺酸盐和乙磺酸盐;芳基磺酸盐例如苯磺酸盐和对甲苯磺酸盐;有机酸盐例如甲酸盐、乙酸盐、三氟乙酸盐、苹果酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、草酸盐和马来酸盐;以及氨基酸盐例如鸟氨酸盐、谷氨酸盐和天冬氨酸盐。

[0391] 当本发明的抗CD37抗体-药物缀合物具有酸性基团例如羧基基团时,需要时,它可以形成药理学上可接受的碱加成盐。此类碱加成盐的实例可以包括:碱金属盐例如钠盐、钾盐和锂盐;碱土金属盐例如钙盐和镁盐;无机盐例如铵盐;以及有机胺盐例如二苄胺盐、吗啉盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡萄糖胺盐、二乙胺盐、三乙胺盐、环己胺盐、二

环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、二乙醇胺盐、N-苄基-N-(2-苯基乙氧基)胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐和三(羟甲基)氨基甲烷盐。

[0392] 本发明还可以包括抗CD37抗体-药物缀合物,其中构成抗体-药物缀合物的一个或多个原子被原子的同位素替换。存在两种类型的同位素:放射性同位素和稳定同位素。同位素的实例可以包括氢同位素(2H和3H)、碳同位素(11C、13C和14C)、氮同位素(13N和15N)、氧同位素(15O、17O和18O)和氟同位素(18F)。包含用此类同位素标记的抗体-药物缀合物的组合物可用作例如治疗剂、预防剂、研究试剂、测定试剂、诊断剂和体内诊断成像剂。用同位素标记的各种和每一种抗体-药物缀合物,以及以任何给定比率的用同位素标记的抗体-药物缀合物的混合物都包括在本发明中。根据本领域已知的方法,可以例如通过使用由同位素标记的原材料代替用于稍后提到的本发明的生产方法的原材料,来产生用同位素标记的抗体-药物缀合物。

[0393] 例如,体外细胞毒性可以基于抑制细胞的增殖应答的活性进行测量。例如,培养过表达CD37的癌细胞系,并且将抗CD37抗体-药物缀合物以不同浓度加入培养系统中。其后,可以测量其针对病灶形成、集落形成和球状体生长的抑制活性。在此上下文中,例如,通过使用弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)或慢性淋巴细胞白血病(CLL)衍生的癌细胞系,可以检查针对弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)等等的细胞生长抑制活性。

[0394] 例如,可以通过将抗CD37抗体-药物缀合物施用于高度表达CD37的肿瘤细胞系已接种到其内的SCID小鼠,然后测量癌细胞中的变化,来测量对实验动物中的癌症的体内疗效。在此上下文中,例如,通过使用衍生自免疫缺陷小鼠的动物模型,通过接种衍生自B细胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL)例如弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤(MZL)或伯基特淋巴瘤(BL),慢性淋巴细胞白血病(CLL),T细胞淋巴瘤(TCL)例如外周T细胞淋巴瘤(PTCL)或皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),骨髓增生异常综合征(MDS)或急性髓样白血病(AML)的细胞,可以测量对弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、伯基特淋巴瘤(BL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、骨髓增生异常综合征(MDS)或急性髓样白血病(AML)的疗效。

[0395] 本发明的抗CD37抗体-药物缀合物施加于其的癌症类型并无特别限制,只要癌症在待治疗的癌细胞中表达CD37即可。其实例可以包括衍生自弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病的细胞,尽管癌症并不限于此,只要癌症表达CD37即可。本发明的抗CD37抗体-药物缀合物施加于其的癌症类型的更优选实例可以包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病。

[0396] 本发明的抗CD37抗体-药物缀合物可以优选施用于哺乳动物,并且更优选施用于人。

[0397] 包含本发明的抗CD37抗体-药物缀合物的药物组合物中使用的物质可以按照所施加的剂量或所施加的浓度适当地选自药物添加剂和本领域常用的其它物质,然后使用。

[0398] 本发明的抗CD37抗体-药物缀合物可以作为包含一种或多种药学相容组分的药物组合物进行施用。例如,药物组合物通常包含一种或多种药物载体(例如,无菌液体(例如,

水和油(包括石油和动物来源、植物来源或合成来源的油(例如,花生油、大豆油、矿物油和芝麻油))。当药物组合物进行静脉内施用,水是更典型的载体。盐水溶液、葡萄糖水溶液和甘油水溶液也可以用作液体载体,特别地,用于注射溶液。合适的药物媒介物是本领域已知的。需要时,组合物还可以包含痕量的保湿剂、乳化剂或pH缓冲剂。合适的药物载体的实例公开于由E.W.Martin的"Remington's Pharmaceutical Sciences"中。处方对应于施用模式。

[0399] 各种递送系统是已知的,并且它们可以用于施用本发明的抗CD37抗体-药物缀合物。施用途的实例可以包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内和皮下途径。例如,可以通过注射或推注进行施用。根据一个具体的优选实施方案,上述抗体-药物缀合物的施用通过注射来执行。肠胃外施用是优选的施用途。

[0400] 根据一个代表性实施方案,根据常规程序,药物组合物开处方为适合于静脉内施用于人的药物组合物。用于静脉内施用的组合物通常是以无菌且等渗的水性缓冲溶液的溶液。必要时,药剂还可以含有增溶剂和局部麻醉剂,以减轻在注射区域处的疼痛(例如利多卡因)。一般而言,上述成分作为包含在容器中的冻干粉末或无水浓缩物,分别地或以单位剂型在混合物中一起提供,所述容器通过密封在例如指示活性剂的量的安瓿或小袋中获得。当药剂待通过注射进行施用,它可以使用例如含有无菌药物级的水或盐水的注射瓶进行施用。当药剂待通过注射进行施用,可以这样提供注射用无菌水或盐水的安瓿,使得上述成分在施用之前彼此混合。盐水可以是例如生理盐水。

[0401] 此类药物组合物可以以冻干制剂或液体制剂的形式,制备为具有所选组成和必要纯度的制剂。制备为冻干制剂的药物组合物可以是含有本领域中使用的适当药物添加剂的制剂。同样地,可以这样制备液体制剂,使得液体制剂含有本领域中使用的各种药物添加剂。

[0402] 药物组合物的组成和浓度也取决于施用方法而变。关于本发明的药物组合物中包含的抗CD37抗体-药物缀合物对于抗原的亲合力,即,抗CD37抗体-药物缀合物与抗原的解离常数(Kd值),随着亲合力增加(即,Kd值很低),即使减少其施加的剂量,药物组合物也可以发挥药用效应。相应地,抗体-药物缀合物的施加剂量也可以通过基于抗体-药物缀合物对于抗原的亲合力状态设定施加的剂量进行确定。当将本发明的抗体-药物缀合物施用于人时,它可以以例如大约0.001至100mg/kg的剂量施用一次,或以1至180天的间隔施用多次。它可以优选以0.1至50mg/kg且更优选0.1至30mg/kg的剂量,以1至4周,优选2至3周的间隔施用多次。

## 实施例

[0403] [实施例1:人源化抗CD37抗体的生产]

[0404] 1) -1抗CD37人源化抗体的设计

[0405] 1) -1-1抗CD37抗体的可变区的分子建模。

[0406] 利用已知方法(Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991))作为同源建模。采用商购可得的蛋白质三维结构分析程序DiscoveryStudio(由Dassault Systemes S.E.制造),以搜索蛋白质数据库(Protein Data Bank)(Nuc. Acid Res. 35, D301-D303(2007))中登记的与可变区具有高序列同源性的结构。使用鉴定的重链、轻链以及在重链和轻链之间

的界面结构作为模板来产生三维模型结构。

[0407] 1) -1-2用于人源化的设计方法

[0408] 抗CD37小鼠单克隆抗体HH1 (Smeland E等人, Scand J Immunol, 21 (3), 205-214 (1985)) 的人源化抗体的构建通过一般称为CDR移植 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) 的方法来执行。通过KABAT等人 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 确定的人 $\kappa$ 链亚组1和人 $\gamma$ 链亚组1的共有序列与抗CD37人嵌合抗体的框架区具有高同源性, 并且基于此, 将它们分别选择作为用于抗CD37人嵌合抗体的轻链和重链的接纳体。另外, 选择通过IMGT (注册商标) (THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM) 确定的人 $\gamma$ 链IGHV1-2\*02和IGHJ6\*01作为重链的接纳体, 用于改善抗CD37人源化抗体-药物缀合物的物理性质的目的。参考例如通过Queen等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)) 给出的标准, 通过分析三维模型, 根据每个序列独特地设计待移植到接纳体上的供体残基。

[0409] 1) -1-3抗CD37人嵌合抗体轻链的人源化

[0410] 设计了包含与所设计的抗CD37人源化抗体轻链的可变区连接的人IgG1 $\kappa$ 链恒定区的人源化抗体轻链, 并且将其命名为hmAb-L11。hmAb-L11的全长氨基酸序列显示于SEQ ID NO:2中。编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:1中。

[0411] 1) -1-4抗CD37人嵌合抗体重链hmAb-H11的人源化

[0412] 设计了通过移植到与抗CD37人嵌合抗体具有最高同源性的人 $\gamma$ 链亚组1的共有序列内而设计的人源化抗体重链, 其包含与抗CD37人源化抗体重链的可变区连接的人IgG1 $\gamma$ 链恒定区, 并且将其命名为hmAb-H11。hmAb-H11的全长氨基酸序列显示于SEQ ID NO:4中。编码SEQ ID NO:4的氨基酸序列的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:3中。

[0413] 1) -1-5抗CD37人嵌合抗体重链hmAb-H541、hmAb-H551、hmAb-H11a的人源化

[0414] 将为了改善抗CD37人源化抗体-药物缀合物的物理性质的目的而设计的、包含与抗CD37人源化抗体重链的可变区连接的人IgG1 $\gamma$ 链恒定区的人源化抗体重链, 分别命名为hmAb-H541、hmAb-H551和hmAb-H11a。hmAb-H541的全长氨基酸序列显示于SEQ ID NO:6中。编码SEQ ID NO:6的氨基酸序列的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:5中。hmAb-H551的全长氨基酸序列显示于SEQ ID NO:8中。编码SEQ ID NO:8的氨基酸序列的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:7中。hmAb-H11a的全长氨基酸序列显示于SEQ ID NO:10中。编码SEQ ID NO:10的氨基酸序列的核苷酸序列显示于SEQ ID NO:9中。

[0415] 1) -2抗CD37人源化抗体表达载体的构建和抗体的制备

[0416] 1) -2-1轻链表达载体pCMA-LK的构建

[0417] 使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒 (由 **Takara** Bio USA制造), 将已通过用限制性酶XbaI和PmeI消化质粒pcDNA3.3-TOPO/LacZ (由Thermo Fisher Scientific Inc.制造) 获得的大约5.4-kb片段, 与包含编码人轻链信号序列和人 $\kappa$ 链恒定区的核苷酸序列 (SEQ ID NO:11) 的DNA片段连接, 以产生pcDNA3.3/LK。

[0418] 从pcDNA3.3/LK中去除新霉素抗性基因, 以构建pCMA-LK。

[0419] 1) -2-1-1 hmAb-L11表达载体的构建

[0420] 合成具有SEQ ID NO:12中所示的hmAb-L11可变区的核苷酸序列的DNA (由Thermo

Fisher Scientific Inc.制造)。使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒,将合成的DNA片段插入实施例1)-2-1中构建的pCMA-LK的位点内,所述pCMA-LK已用限制性酶BsiWI进行切割,以便构建hmAb-L11表达载体。

[0421] 1)-2-2重链表达载体pCMA-G1的构建

[0422] 合成包含编码重链信号序列和人重链G1恒定区的核苷酸序列(SEQ ID NO:13)的DNA片段(由Eurofins Genomics K.K.制造)。用限制性酶XbaI和PmeI切割这种DNA片段,然后通过琼脂糖凝胶电泳切除1.1-kb DNA片段,并且使用Wizard SV Gel和PCR Clean-Up System(由Promega Corp.制造)进行纯化。使用Ligation High(由Toyobo Co.,Ltd.制造),将大约3.4-kb片段(其已通过用限制性酶XbaI和PmeI消化实施例1)-2-1中构建的pCMA-LK而获得)与1.1-kb DNA片段连接,以构建pCMA-G1。

[0423] 1)-2-2-1 hmAb-H11表达载体的构建

[0424] 合成具有SEQ ID NO:14中所示的hmAb-H11的核苷酸序列的DNA。使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒,将合成的DNA片段插入实施例1)-2-1中构建的pCMA-G1的位点内,所述pCMA-G1已用限制性酶B1pI进行切割,以便构建hmAb-H11表达载体。

[0425] 1)-2-2-2hmAb-H541表达载体的构建

[0426] 合成具有SEQ ID NO:15中所示的hmAb-H541的核苷酸序列的DNA。使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒,将合成的DNA片段插入实施例1)-2-1中构建的pCMA-G1的位点内,所述pCMA-G1已用限制性酶B1pI进行切割,以便构建hmAb-H541表达载体。

[0427] 1)-2-2-3hmAb-H551表达载体的构建

[0428] 合成具有SEQ ID NO:16中所示的hmAb-H551的核苷酸序列的DNA。使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒,将合成的DNA片段插入实施例1)-2-1中构建的pCMA-G1的位点内,所述pCMA-G1已用限制性酶B1pI进行切割,以便构建hmAb-H551表达载体。

[0429] 1-2-2-4hmAb-H11a表达载体的构建

[0430] 合成具有SEQ ID NO:17中所示的hmAb-H11a的核苷酸序列的DNA。使用In-Fusion HD PCR克隆试剂盒,将合成的DNA片段插入实施例1)-2-1中构建的pCMA-G1的位点内,所述pCMA-G1已用限制性酶B1pI进行切割,以便构建hmAb-H11a表达载体。

[0431] 1)-2-2-5抗CD37人源化抗体的重链表达载体和轻链表达载体的组合

[0432] 将具有hmAb-H11作为重链和hmAb-L11作为轻链的抗CD37人源化抗体命名为hmAb-H11L11。将具有hmAb-H541作为重链和hmAb-L11作为轻链的抗CD37人源化抗体命名为hmAb-H541L11。将具有hmAb-H551作为重链和hmAb-L11作为轻链的抗CD37人源化抗体命名为hmAb-H551L11。将具有hmAb-H11a作为重链和hmAb-L11作为轻链的抗CD37人源化抗体命名为hmAb-H11aL11。

[0433] 1)-2-3抗CD37人源化抗体的生产

[0434] 按照手册,将FreeStyle 293F细胞(由Thermo Fisher Scientific Inc.制造)进行培养且传代。通过用FreeStyle 293表达培养基(由Thermo Fisher Scientific Inc.制造)稀释,将处于对数生长期的FreeStyle 293F细胞调整至 $2.0 \times 10^6$ 个细胞/mL,并且将600mL稀释物接种到3-LFerbach锥形瓶(由Corning Inc.制造)上。向20mL Opti-Pro SFM培养基(由Thermo Fisher Scientific Inc.制造)中,添加1.8mg聚乙烯亚胺(由Polysciences Inc.制造)。接下来,向20mL Opti-Pro SFM培养基中,添加300 $\mu$ g重链表达载

体和300 $\mu$ g轻链表达载体。向聚乙烯亚胺/Opti-Pro SFM混合溶液中,添加表达载体/Opti-Pro SFM混合溶液,并且轻轻搅拌所获得的混合物,进一步静置5分钟,然后加入FreeStyle 293F细胞中。细胞在8%CO<sub>2</sub>培养箱中在37°C下以95rpm振荡培养4小时,并且其后,将600mL EX-CELL VPRO培养基(由SAFC Biosciences Inc.制造)和30mL 43.4g/L BD Recharge CD(由BD Biosciences制造)加入培养物中。细胞进一步在8%CO<sub>2</sub>培养箱中在37°C下以95rpm振荡培养6天。所获得的培养上清液通过孔径为0.2 $\mu$ m的瓶顶过滤器(由Thermo Fisher Scientific Inc.制造)进行过滤。

[0435] 1) -2-4抗CD37人源化抗体的纯化

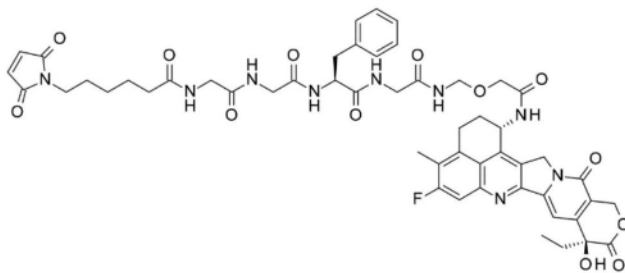
[0436] 通过两步法,即,通过rProtein A亲和层析和陶瓷羟基磷灰石,从实施例1)-2-3中获得的培养上清液中纯化抗体。将培养上清液用PBS平衡并且施加于已填充有MabSelectSuRe(由Cytiva Corp.制造)的柱中,并且其后,用两倍或更多倍柱体积的量的PBS洗涤柱。随后,使用2M精氨酸盐酸盐溶液(pH 4.0)洗脱抗体。使用Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette(由Thermo Fisher Scientific Inc.制造),对含有抗体的级分进行透析,使得缓冲液替换为PBS。抗体溶液用5mM磷酸钠/50mM MES/pH7.0的缓冲液稀释5倍,然后施加到已用5mM NaPi/50mM MES/30mM NaCl/pH 7.0的缓冲液平衡的陶瓷羟基磷灰石柱(由Bio-Rad Laboratories, Inc.制造)。用氯化钠的线性浓度梯度进行洗脱,使得收集含有抗体的级分。使用Dialysis Cassettes对这种级分进行透析,使得缓冲液替换为HBSor(25mM 组氨酸/5%山梨糖醇,pH 6.0)。用VIVASPIN20(截留分子量:UF10K,由Sartorius Stedim Biotech Inc.制造)浓缩抗体,从而将IgG浓度调整到20至25mg/ml。最后,抗体通过Minisart Plus(由Sartorius Stedim Biotech Inc.制造)进行过滤,以获得纯化的样品。

[0437] [实施例2:抗CD37抗体-药物缀合物的生产-1]

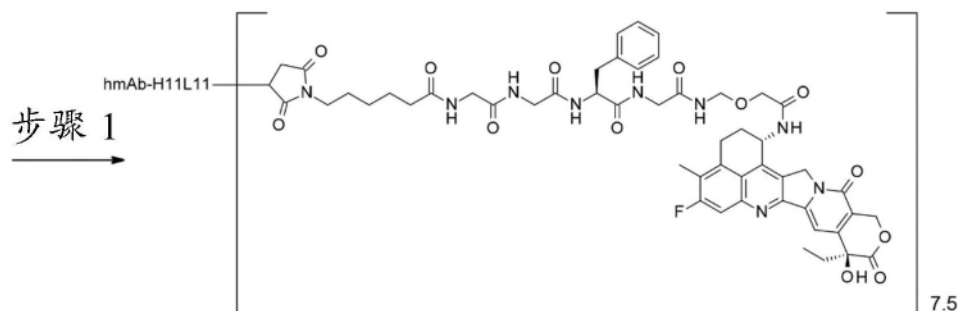
[0438] 2) -1抗体-药物缀合物的生产-(1)hmAb-H11L11-DXd

[0439] hmAb-H11L11-DXd通过下述步骤进行合成。

[0440] [式11]



[0441]



[0442] 抗体的还原:通过使用生产方法1中描述的常见程序B(使用1.50mLmg<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>作为280nm吸光系数)和C,用PBS6.0/EDTA将实施例1)-2中制备的hmAb-H11L11调整至10.67mg/

mL。向该溶液(0.5mL)中,加入1M磷酸氢二钾水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0075mL)和10mM TCEP(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)的水溶液(0.022mL; 6.0当量/抗体分子)。在确认溶液具有在 $7.0 \pm 0.1$ 内的pH后,通过使溶液在37°C下温育2小时,来还原抗体中的链间二硫键。

[0443] 在抗体和药物接头之间的缀合:使上述溶液在15°C下温育10分钟。随后,向其中添加10mM N-[6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸-N-[(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]甘氨酸的二甲亚砷溶液(0.0367mL; 10.0当量/抗体分子),并且使获得的混合物在15°C下温育1小时以使药物接头与抗体缀合。随后,向其中添加100mM NAC(Sigma-Aldrich Co. LLC)的水溶液(0.0037mL; 10.0当量/抗体分子),并且将所获得的混合物进行搅拌,然后进一步在室温下静置20分钟以终止药物接头的反应。

[0444] 纯化:上述溶液通过生产方法1中描述的常见程序D进行纯化,以获得3.5mL含有标题抗体-药物缀合物“hmAb-H11L11-ADC”的溶液。

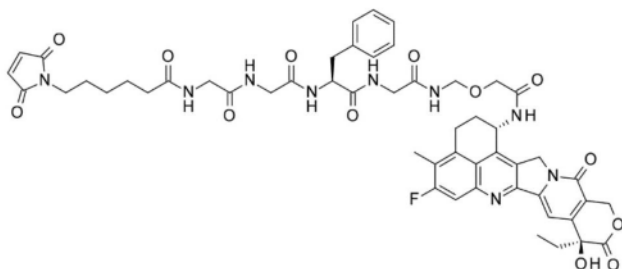
[0445] 表征:使用生产方法1中描述的常见程序E和F(使用 $\epsilon_{D,280} = 5440$ 和 $\epsilon_{D,370} = 21800$ ),获得下述特征性值。

[0446] 抗体浓度:1.30mg/mL,抗体产率:4.57mg(86%),通过常见程序E测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):5.6,以及通过常见程序F测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):7.5。

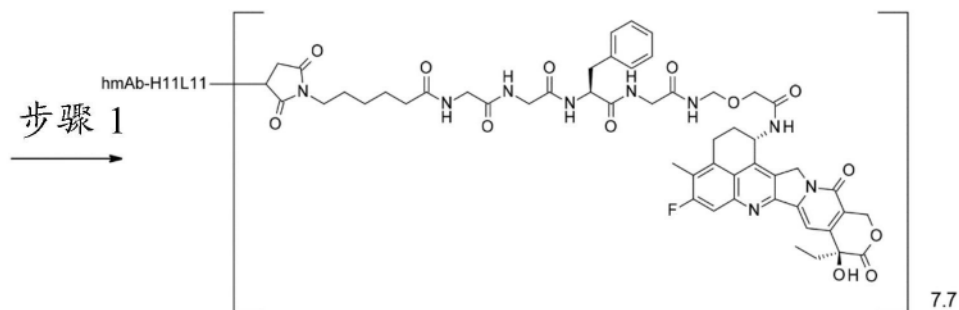
[0447] 2)-2抗体-药物缀合物的生产-(2)hmAb-H11L11-DXd

[0448] hmAb-H11L11-DXd通过下述步骤进行合成。

[0449] [式12]



[0450]



[0451] 抗体的还原:通过使用生产方法1中描述的常见程序B(使用 $1.50\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作为280nm吸光系数)和C,用PBS6.0/EDTA将实施例1)-2中制备的hmAb-H11L11调整至10.67mg/mL。向该溶液(0.5mL)中,加入1M磷酸氢二钾水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; 0.0075mL)和10mM TCEP(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)的水溶液(0.0294mL; 8.0当量/抗体分

子)。在确认溶液具有在 $7.0 \pm 0.1$ 内的pH后,通过使溶液在 $37^\circ\text{C}$ 下温育2小时,来还原抗体中的链间二硫键。

[0452] 在抗体和药物接头之间的缀合:使上述溶液在 $15^\circ\text{C}$ 下温育10分钟。随后,向其中添加10mM N-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸-N-[(2-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧代-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]甘氨酸胺的二甲亚砷溶液(0.0441mL;12.0当量/抗体分子),并且使获得的混合物在 $15^\circ\text{C}$ 下温育1小时以使药物接头与抗体缀合。随后,向其中添加100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)的水溶液(0.0044mL;12.0当量/抗体分子),并且搅拌,并且其后,将所获得的混合物进一步在室温下静置20分钟以终止药物接头的反应。

[0453] 纯化:上述溶液通过生产方法1中描述的常见程序D进行纯化,以获得3.5mL含有标题抗体-药物缀合物“hmAb-H11L11-ADC”的溶液。

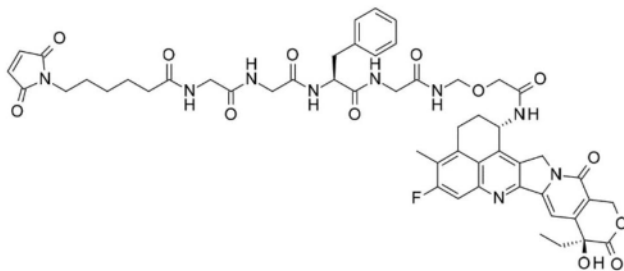
[0454] 表征:使用生产方法1中描述的常见程序E和F(使用 $\epsilon_{D,280} = 5440$ 和 $\epsilon_{D,370} = 21800$ ),获得下述特征性值。

[0455] 抗体浓度:1.34mg/mL,抗体产率:4.69mg(88%),通过常见程序E测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):5.9,以及通过常见程序F测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):7.7。

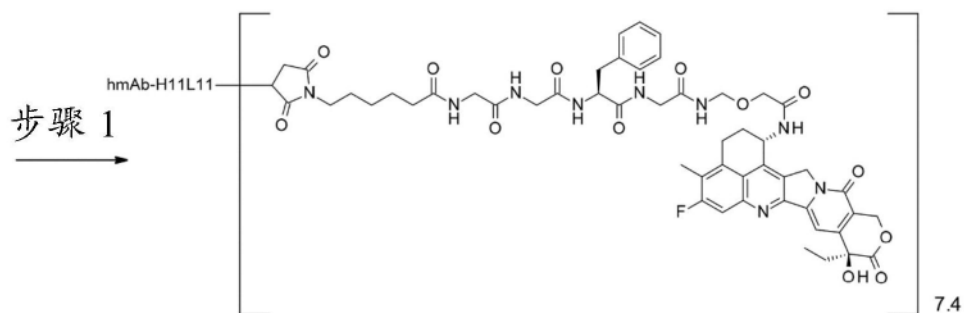
[0456] 2)-3抗体-药物缀合物的生产-(3)hmAb-H11L11-DXd

[0457] hmAb-H11L11-DXd通过下述步骤进行合成。

[0458] [式13]



[0459]



[0460] 抗体的还原:通过使用生产方法1中描述的常见程序B(使用 $1.50\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作为280nm吸光系数)和C,用PBS6.0/EDTA将实施例1)-2中制备的hmAb-H11L11调整至 $10.67\text{mg/mL}$ 。向该溶液(8.3mL)中,加入1M磷酸氢二钾水溶液(Nacalai Tesque, Inc.;0.124mL)和10mM TCEP(Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.)的水溶液(0.486mL;8.0当量/抗体分子)。在确认溶液具有在 $7.0 \pm 0.1$ 内的pH后,通过使溶液在 $37^\circ\text{C}$ 下温育2小时,来还原抗体中的链间二硫键。

[0461] 在抗体和药物接头之间的缀合:使上述溶液在15°C下温育10分钟。随后,向其中添加10mM N-[6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸-N-[2-{{[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-4-甲基-10,13-二氧化代-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙氧基)甲基]甘氨酸胺的二甲亚砷溶液(0.728mL;12.0当量/抗体分子),并且使获得的混合物在15°C下温育1小时以使药物接头与抗体缀合。随后,向其中添加100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)的水溶液(0.073mL;12.0当量/抗体分子),并且搅拌,并且其后,将所获得的混合物进一步在室温下静置20分钟以终止药物接头的反应。

[0462] 纯化:上述溶液通过生产方法1中描述的常见程序D进行纯化,以获得31.5mL含有标题抗体-药物缀合物“hmAb-H11L11-ADC”的溶液。

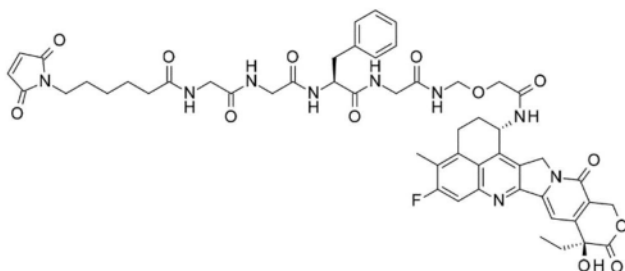
[0463] 表征:使用生产方法1中描述的常见程序E和F(使用 $\epsilon_{D,280}=5440$ 和 $\epsilon_{D,370}=21800$ ),获得下述特征性值。

[0464] 抗体浓度:2.23mg/mL,抗体产率:70.29mg(80%),通过常见程序E测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):5.6,以及通过常见程序F测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):7.4。

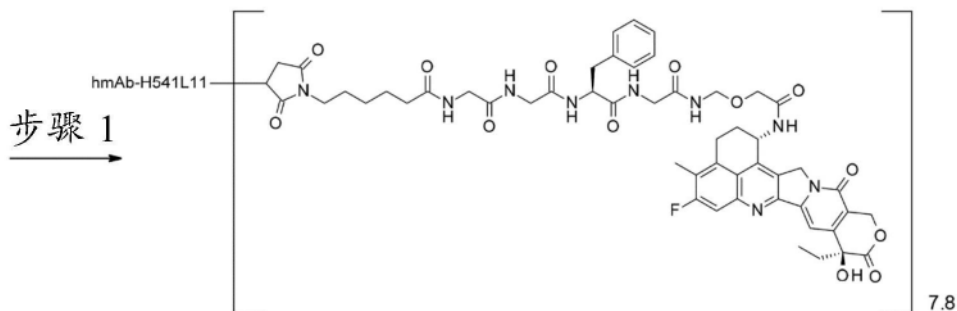
[0465] 2)-4抗体-药物缀合物的生产-(4)hmAb-H541L11-DXd

[0466] hmAb-H541L11-DXd通过下述步骤进行合成。

[0467] [式14]



[0468]



[0469] 抗体的还原:通过使用生产方法1中描述的常见程序B(使用 $1.50\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作为280nm吸光系数)和C,用PBS6.0/EDTA将实施例1)-2中制备的hmAb-H541L11调整至 $10.63\text{mg/mL}$ 。向该溶液(8.9mL)中,加入1M磷酸氢二钾水溶液(Nacalai Tesque, Inc.; $0.133\text{mL}$ )和10mM TCEP(Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.)的水溶液( $0.389\text{mL}$ ;6.0当量/抗体分子)。在确认溶液具有在 $7.0\pm 0.1$ 内的pH后,通过使溶液在37°C下温育2小时,来还原抗体中的链间二硫键。

[0470] 在抗体和药物接头之间的缀合:使上述溶液在15°C下温育10分钟。随后,向其中添加10mM N-[6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸-

N-[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]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙氧基]甲基]甘氨酸的二甲亚砷溶液(0.649mL;10.0当量/抗体分子),并且使获得的混合物在15°C下温育1小时以使药物接头与抗体缀合。随后,向其中添加100mM NAC(Sigma-Aldrich Co.LLC)的水溶液(0.065mL;10.0当量/抗体分子),搅拌,并且其后,将所获得的混合物进一步在室温下静置20分钟以终止药物接头的反应。

[0471] 纯化:上述溶液通过生产方法1中描述的常见程序D进行纯化,以获得31.5mL含有标题抗体-药物缀合物“hmAb-H541L11-ADC”的溶液。

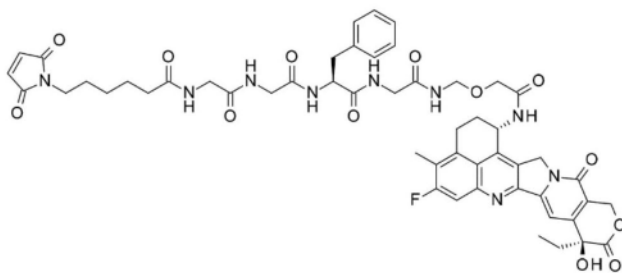
[0472] 表征:使用生产方法1中描述的常见程序E和F((使用 $\epsilon_{D,280} = 5440$ 和 $\epsilon_{D,370} = 21800$ ),获得下述特征性值。

[0473] 抗体浓度:2.68mg/mL,抗体产率:84.26mg(89%),通过常见程序E测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):5.9,以及通过常见程序F测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):7.8。

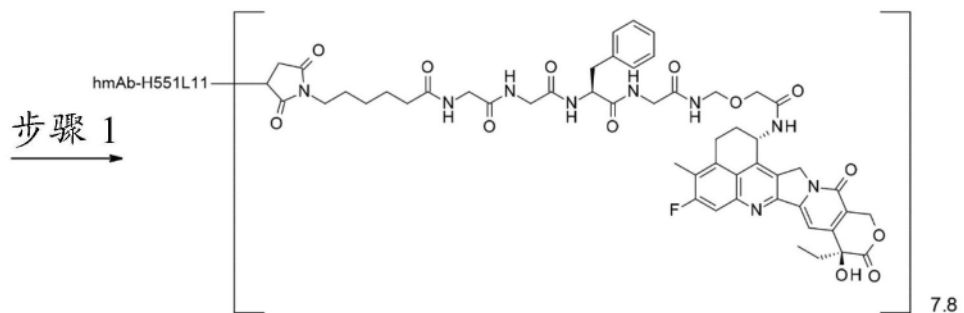
[0474] 2)-5抗体-药物缀合物的生产-(5)hmAb-H551L11-DXd

[0475] hmAb-H551L11-DXd通过下述步骤进行合成。

[0476] [式15]



[0477]



[0478] 抗体的还原:通过使用生产方法1中描述的常见程序B(使用 $1.50\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作为280nm吸光系数)和C,用PBS6.0/EDTA将实施例1)-2中制备的hmAb-H551L11调整至 $10.62\text{mg/mL}$ 。向该溶液(9.4mL)中,加入1M磷酸氢二钾水溶液(Nacalai Tesque, Inc.;0.141mL)和10mM TCEP(Tokyo Chemical Industry Co.,Ltd.)的水溶液(0.411mL;6.0当量/抗体分子)。在确认溶液具有在 $7.0 \pm 0.1$ 内的pH后,通过使溶液在37°C下温育2小时,来还原抗体中的链间二硫键。

[0479] 在抗体和药物接头之间的缀合:使上述溶液在15°C下温育10分钟。随后,向其中添加10mM N-[6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酸甘氨酸-L-苯丙氨酸-N-[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]吡啶啉并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基}-2-氧代乙氧基]甲



Co.LLC)的水溶液(0.080mL;11.0当量/抗体分子),并且搅拌,并且其后,将所获得的混合物进一步在室温下静置20分钟以终止药物接头的反应。

[0489] 纯化:上述溶液通过生产方法1中描述的常见程序D进行纯化,以获得35.0mL含有标题抗体-药物缀合物“hmAb-H11aL11-ADC”的溶液。

[0490] 表征:使用生产方法1中描述的常见程序E和F(使用 $\epsilon_{D,280}=5440$ 和 $\epsilon_{D,370}=21800$ ),获得下述特征性值。

[0491] 抗体浓度:2.62mg/mL,抗体产率:91.57mg(86%),通过常见程序E测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):5.7,以及通过常见程序F测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目(n):7.6。

[0492] 在5mg规模上的hmAb-H11L11-DXd生产中,当每个抗体分子使用6.0当量的10mM TCEP的水溶液时,缀合药物分子的平均数目为7.5。相应地,由于将10mM TCEP的水溶液的量增加至8.0当量/抗体分子,缀合药物分子的平均数目改善至7.7。然而,在100mg规模上的生产中,即使当每个抗体分子使用8.0当量的10mM TCEP的水溶液时,缀合药物分子的平均数目也为7.4。在100mg规模上的生产据推测需要更大量的10mM TCEP的水溶液,用于提高hmAb-H11L11-DXd中的缀合药物分子的平均数目。相比之下,在100mg规模上的其它缀合物hmAb-H541L11-DXd、hmAb-H551L11-DXd和hmAb-H11aL11-DXd的生产中,每个抗体分子使用6.0至7.0等量的10mM TCEP的水溶液,缀合药物分子的平均数目达到7.6至7.8。

[0493] [实施例3:抗CD37人源化抗体-药物缀合物在生理盐水内的回收率评估]

[0494] 以20mg/mL溶解于ABSor(由Nacalai Tesque, Inc.制造)中的每种抗CD37人源化抗体-药物缀合物,用Otsuka生理盐水(由Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.制造)稀释成2mg/mL,并且在室温或4°C下静置5小时。使用Prominence(由Shimadzu Corp.制造),将10 $\mu$ L这种上清液注射到YMC-Pack Diol-300 SEC, 30nm, S-2 $\mu$ m, 300 $\times$ 4.6mm(由YMC Co., Ltd.制造)中,并且使用3 $\times$ PBS和8%异丙醇(溶解于920mL超纯水中并补充有80mL异丙醇的3片PBS片剂(由Takara Bio Inc.制造)的溶液)作为流动相,通过尺寸排阻层析进行分析。根据下述表达式计算抗CD37人源化抗体-药物缀合物的回收率。

[0495] 回收率(%) = (在4°C下静置的样品的回收率/在室温下静置的样品的回收率)  $\times$  100

[0496] 如表1中所示的,包含抗体(其氨基酸序列已在实施例1)-1-5中进行设计,用于改善抗CD37人源化抗体-药物缀合物的物理性质的目的)的抗体-药物缀合物,在4°C下在生理盐水内具有的回收率优于包含抗体(其氨基酸序列已在实施例1)-1-4中进行设计)的抗体-药物缀合物。根据在4°C下在生理盐水内更好的回收率,证实了前述抗CD37人源化抗体-药物缀合物可在生理盐水中处理。另一方面,发现hmAb-H11L11-DXd难以在生理盐水中处理。在这种情况下,尽管可以讨论葡萄糖溶液的使用,但已知该溶液负责抗体的糖化(MAbs, v. 9(4), 586-594, (2017)),并且可能导致抗体-药物缀合物的药用效应降低。此外,已报道一些抗体药物通过与葡萄糖溶液混合而经历蛋白质聚集。因此,稀释剂的选项是期望的。此外,由于电解质流失的风险,葡萄糖溶液的使用需要小心施用于患有糖尿病、尿崩症或肾功能衰竭的患者。hmAb-H11L11被判断且选择为高度合理的人源化抗体,因为使用与抗CD37小鼠单克隆抗体HH1具有最高同源性的人共有序列作为用于人源化的接纳体,并且这种抗体维持了其抗原结合活性。然而,出于上述原因,考虑到抗体需要进行修饰。因此,设计了实施例

1) -1-5中所示的氨基酸序列。

[0497] [表1]

	名称	回收率(%)
	hmAb-H11L11-DXd	79.7
[0498]	hmAb-H541L11-DXd	98.6
	hmAb-H551L11-DXd	96.6
	hmAb-H11aL11-DXd	100

[0499] [实施例4:抗体-药物缀合物的体外活性评估]

[0500] 4) -1人源化抗CD37抗体-药物缀合物的结合活性评估

[0501] 通过流式细胞术来评估实施例2中产生的四种抗体-药物缀合物(克隆名称:hmAb-H11L11-DXd、hmAb-H541L11-DXd、hmAb-H551L11-DXd和hmAb-H11aL11-DXd)的结合活性。回收CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7(DSMZ)并离心,所述细胞系在37°C和5%CO<sub>2</sub>条件下在补充有20%FBS的IMDM培养基中进行培养。在上清液去除后,通过添加四种抗体-药物缀合物中的每一种或使用以每种浓度的人IgG产生的阴性对照抗体-药物缀合物(hmAb-IgG1-DXd)来悬浮细胞。细胞在4°C下静置1小时。细胞用补充有5%FBS的PBS洗涤两次,然后通过添加FLUORESCIEIN(FITC)-AffiniPure F(ab')<sub>2</sub>片段山羊抗人IgG(Fcγ片段特异性)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) (其已用补充有5%FBS的PBS稀释100倍)进行悬浮。细胞在4°C下静置30分钟。细胞用补充有5%FBS的PBS洗涤两次,随后为使用流式细胞仪(BD LSRFortessa™ X-20, BD Biosciences)的检测。使用FlowJo(Tree Star, Inc.)分析数据。结果显示于图6中。在图6中,横坐标描绘了抗体浓度(μg/ml),而纵坐标描绘了由MFI(平均荧光强度)结合的抗体量。如图6中所示的,对于人源化抗CD37抗体和抗体-药物缀合物,观察到在CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7中结合的抗体量的浓度依赖性增加。

[0502] 4) -2人源化抗CD37抗体-药物缀合物的细胞生长抑制活性的评估

[0503] 将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7(DSMZ)以 $5 \times 10^2$ 个细胞/100μL/孔接种到96孔板中补充有20%FBS的IMDM培养基中,并且将实施例2中产生的4种抗体-药物缀合物(克隆名称:hmAb-H11L11-DXd、hmAb-H541L11-DXd、hmAb-H551L11-DXd和hmAb-H11aL11-DXd)各自加入细胞中,使得最终浓度为0.0064nM至20nM。细胞在37°C和5%CO<sub>2</sub>的条件下培养6天,并且其后,使用CellTiter-Glo(TM)发光细胞活力测定(Promega Corp.)通过ATP的定量来测量活细胞数目。细胞存活率用定义为100%的媒介物组中的活细胞数目进行定量。图7显示了当将每种抗体-药物缀合物加入细胞中时的浓度依赖性细胞生长抑制活性。实验中的hmAb-IgG-DXd是由人IgG1制备的抗体-药物缀合物,其识别与CD37无关的抗原,并且用作阴性对照。

[0504] [实施例5:抗体-药物缀合物的体内抗肿瘤效应-1]

[0505] 使用通过接种CD37阳性人肿瘤细胞系细胞而衍生自免疫缺陷小鼠的动物模型,来评估抗体-药物缀合物的抗肿瘤效应。五周龄的SCID小鼠(CB17/Icr-Prkdc[scid]/CrlCrlj, Charles River Laboratories Japan Inc.)在用于实验之前于SPF条件下适应

环境3天或更长时间。给小鼠喂食灭菌的固体饲料(FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd), 并且给予灭菌的自来水(其已通过将5至15ppm次氯酸钠溶液加入自来水中进行制备)。使用电子数显卡尺(CD-15CX, Mitutoyo Corp.), 每周两次测量接种肿瘤的长径和短径, 然后根据下述表达式计算肿瘤的体积。

[0506] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) =  $1/2 \times \text{长径}(\text{mm}) \times [\text{短径}(\text{mm})]^2$

[0507] 每种抗体-药物缀合物用ABS缓冲液(10mM乙酸盐缓冲液, 5%山梨糖醇, pH 5.5)(Nacalai Tesque, Inc.)进行稀释, 并且将稀释物以每个实施例显示的剂量静脉内施用于每只小鼠的尾部。ABS缓冲液以与上文相同的方式施用于对照组(媒介物组)。实验中使用六只小鼠/组。

[0508] 5)-1抗肿瘤效应-(1)

[0509] 将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7(DSMZ)悬浮于50%Matrigel(Corning Inc., 用生理盐水稀释)中, 并且将细胞悬浮液以 $1 \times 10^7$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第9天时, 将小鼠随机分组。在分组当天时, 实施例2中产生的4种抗体-药物缀合物(克隆名称: hmAb-H11L11-DXd、hmAb-H541L11-DXd、hmAb-H551L11-DXd和hmAb-H11aL11-DXd)各自以1mg/kg或3mg/kg的剂量静脉内施用于每只小鼠的尾部。使用人IgG产生的抗体-药物缀合物(hmAb-IgG1-DXd)以与上文相同的方式以3mg/kg的剂量作为阴性对照进行施用。结果显示于图8中。横坐标描绘了天数, 而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0510] 实施例2中产生的所有4种抗体-药物缀合物都以剂量依赖性方式显著缩减肿瘤体积, 并且在3mg/kg的剂量下完全抑制肿瘤生长。

[0511] 5)-2抗肿瘤效应-(2)

[0512] 以与实施例5)-1相同的方式, 将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系WSU-DLCL2(DSMZ)以 $1 \times 10^7$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第11天时, 将小鼠随机分组。在分组当天时, 实施例2中产生的4种抗体-药物缀合物各自或hmAb-IgG1-DXd(阴性对照)以1mg/kg或3mg/kg的剂量静脉内施用于每只小鼠的尾部。结果显示于图9中。横坐标描绘了天数, 而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0513] 实施例2中产生的所有4种抗体-药物缀合物都以剂量依赖性方式显著缩减肿瘤体积, 并且在3mg/kg的剂量下显示出肿瘤消退效应。

[0514] 5)-3抗肿瘤效应-(3)

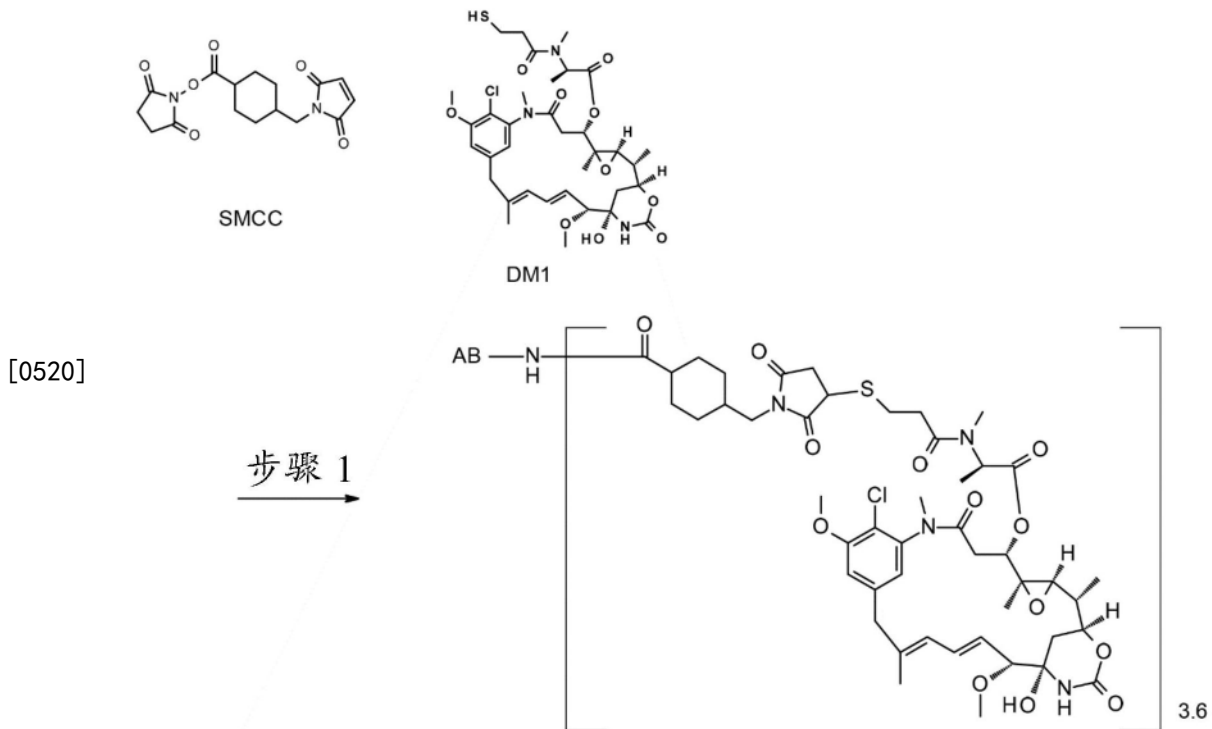
[0515] 以与实施例5)-1相同的方式, 将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-8(ATCC)以 $5 \times 10^6$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第7天时, 将小鼠随机分组。在分组当天时, 实施例2中产生的4种抗体-药物缀合物各自或hmAb-IgG1-DXd(阴性对照)以1mg/kg或3mg/kg的剂量静脉内施用于每只小鼠的尾部。结果显示于图10中。横坐标描绘了天数, 而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0516] 实施例2中产生的所有4种抗体-药物缀合物都以剂量依赖性方式显著缩减肿瘤体积, 并且在3mg/kg的剂量下完全抑制肿瘤生长。

[0517] [实施例6: 抗CD37抗体-药物缀合物的生产-2]

[0518] IMG529通过下述步骤进行合成。

[0519] [式17]



[0521] 抗体的制备:通过使用生产方法1中描述的常见程序B(使用 $1.531\text{mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 作为 $280\text{nm}$ 吸光系数)和C,用PBS6.0/EDTA将那妥昔单抗(Naratumimab)(抗CD37抗体,关于INN 10239的IMGT/2D结构-DB卡)调整至 $12.12\text{mg/mL}$ 。

[0522] 在抗体和药物接头之间的缀合:向 $0.4\text{mL}$ 上述抗体溶液中,加入 $10\text{mM}$  4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)的N,N-二甲基乙酰胺溶液( $0.0338\text{mL}$ ;  $10.0$ 当量/抗体分子)和 $10\text{mM}$ 美登素衍生物(DM1)的N,N-二甲基乙酰胺溶液( $0.0507\text{mL}$ ;  $15.0$ 当量/抗体分子)溶液,并且混合物进行搅拌,然后在室温下旋转16小时。

[0523] 纯化:上述溶液通过生产方法1中描述的常见程序D进行纯化,以获得 $2.5\text{mL}$ 含有标题抗体-药物缀合物“IMG529”的溶液。

[0524] 在 $0.4\text{mL}$ 规模上的这一反应重复六次,并且将所得到的溶液合并。

[0525] 表征:使用生产方法1中描述的常见程序E(使用 $\epsilon_{\text{D},280} = 5700$ 和 $\epsilon_{\text{D},252} = 26790$ ),获得下述特征性值。

[0526] 抗体浓度: $1.29\text{mg/mL}$ ,抗体产率: $15.61\text{mg}$  ( $54\%$ ),以及通过常见程序E测量的每个抗体分子的缀合药物分子的平均数目( $n$ ): $3.6$ 。

[0527] [实施例7:抗体-药物缀合物的体内抗肿瘤效应-2]

[0528] 使用通过接种CD37阳性人肿瘤细胞系细胞而衍生自免疫缺陷小鼠的动物模型,来评估抗体-药物缀合物的抗肿瘤效应。 $4$ 至 $6$ 周龄的SCID小鼠(CB17/Icr-Prkdc[scid]/CrlCrlj:Charles River Laboratories Japan Inc.和CB17/IcrJcl-Prkdc[scid]:CLEA Japan, Inc.) 在用于实验之前在SPF条件下适应环境3天或更长时间。给小鼠喂食灭菌的固体饲料(FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd),并且给予灭菌的自来水(其已通过将 $5$ 至 $15\text{ppm}$ 次氯酸钠溶液加入自来水中进行制备)。使用电子数显卡尺(CD-15CX, Mitutoyo Corp.),每周两次测量接种肿瘤的长径和短径,然后根据下述表达式计算肿瘤的体积。

[0529] 肿瘤体积( $\text{mm}^3$ ) =  $1/2 \times \text{长径}(\text{mm}) \times [\text{短径}(\text{mm})]^2$

[0530] 每种抗体-药物缀合物用ABS缓冲液(10mM乙酸盐缓冲液,5%山梨糖醇,pH 5.5)(Nacalai Tesque, Inc.)进行稀释,并且将稀释物以每个实施例中显示的剂量静脉内施用于每只小鼠的尾部。ABS缓冲液以与上文相同的方式施用于对照组(媒介物组)。对于对照组,将POLIVY(由Genentech Inc.制造)、IMGN529或RITUXAN(由Zenyaku Kogyo Co., Ltd.制造)静脉内施用于每只小鼠的尾部;依鲁替尼(通过本领域技术人员众所周知的方法合成)或维奈托克(通过本领域技术人员众所周知的方法合成)每天经口施用一次;并且TREAKISYM(由SymBio Pharmaceuticals Ltd.制造)每天腹膜内施用一次共2天。实验中使用五或六只小鼠/组。

[0531] 7)-1抗肿瘤效应- (1)

[0532] 将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系OCI-LY7(DSMZ)悬浮于50%Matrigel(Corning Inc.,用生理盐水稀释)中,并且将细胞悬浮液以 $1 \times 10^7$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第10天时,将小鼠随机分组。在分组当天时,将每种抗体-药物缀合物静脉内施用于每只小鼠的尾部。结果显示于图11中。横坐标描绘了天数,而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0533] 在给予POLIVY、IMGN529或hmAb-IgG1-DXd(阴性对照)的组中并未发现肿瘤消退。相比之下,在给予实施例2)-4中产生的hmAb-H541L11-DXd的组中,以1mg/kg的剂量的施用显著抑制肿瘤生长,并且以3mg/kg的剂量的施用导致完全肿瘤消退。

[0534] 7)-2抗肿瘤效应- (2)

[0535] 以与实施例7)-1相同的方式,将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-8(ATCC)以 $1 \times 10^7$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第8天时,将小鼠随机分组。在分组当天时,将每种抗体-药物缀合物静脉内施用于每只小鼠的尾部。结果显示于图12中。横坐标描绘了天数,而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0536] 在给予POLIVY、IMGN529或hmAb-IgG1-DXd(阴性对照)的组中并未发现肿瘤消退。相比之下,在给予实施例2)-4中产生的hmAb-H541L11-DXd的组中,以3mg/kg的剂量的施用导致完全肿瘤消退。

[0537] 7)-3抗肿瘤效应- (3)

[0538] 以与实施例7)-1相同的方式,将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系NU-DUL-1(DSMZ)以 $1 \times 10^7$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第14天时,将小鼠随机分组。在分组当天时,将每种抗体-药物缀合物静脉内施用于每只小鼠的尾部。结果显示于图13中。横坐标描绘了天数,而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0539] 在给予POLIVY、IMGN529或hmAb-IgG1-DXd(阴性对照)的组中并未发现肿瘤消退或者发现消退后的肿瘤再生长。相比之下,在给予实施例2)-4中产生的hmAb-H541L11-DXd的组中,以1mg/kg的剂量的施用显著抑制肿瘤生长,并且以3mg/kg的剂量的施用导致完全肿瘤消退。

[0540] 7)-4抗肿瘤效应- (4)

[0541] 以与实施例7)-1相同的方式,将CD37阳性人弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞系SU-DHL-4(DSMZ)以 $1 \times 10^7$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第16

天时,将小鼠随机分组。在分组当天时,将每种抗体-药物缀合物静脉内施用于每只小鼠的尾部。结果显示于图14中。横坐标描绘了天数,而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0542] 给予3mg/kg实施例2)-4中产生的hmAb-H541L11-DXd的组显示出与给予10mg/kg IMG529的组等价或更高的抗肿瘤效应。

[0543] 7)-5抗肿瘤效应-(5)

[0544] 以与实施例7)-1相同的方式,将CD37阳性人慢性淋巴细胞白血病细胞系JVM-3(DSMZ)以 $3 \times 10^6$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第13天时,将小鼠随机分组。在分组当天时,将每种抗体-药物缀合物静脉内施用于每只小鼠的尾部。将RITUXAN静脉内施用于每只小鼠的尾部;依鲁替尼或维奈托克每天经口施用一次;并且TREAKISYM每天腹膜内施用一次共2天。结果显示于图15中。横坐标描绘了天数,而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0545] 在给予对照药物的组中并未发现肿瘤消退。相比之下,在给予实施例2)-4中产生的hmAb-H541L11-DXd的组中,以1mg/kg的剂量的施用显著抑制肿瘤生长,并且以3mg/kg的剂量的施用导致完全肿瘤消退。

[0546] 7)-6抗肿瘤效应-(6)

[0547] 以与实施例7)-1相同的方式,将CD37阳性人滤泡性淋巴瘤细胞系DOHH-2(DSMZ)以 $1 \times 10^6$ 个细胞的剂量皮下接种到每只雌性SCID小鼠的右侧区域(第0天)。在第21天时,将小鼠随机分组。在分组当天时,将hmAb-H541L11-DXd静脉内施用于每只小鼠的尾部。结果显示于图16中。横坐标描绘了天数,而纵坐标描绘了肿瘤体积。误差范围描绘了SE值。

[0548] 在给予IMG529或hmAb-IgG1-DXd(阴性对照)的组中并未发现肿瘤消退。相比之下,在给予实施例2)-4中产生的hmAb-H541L11-DXd的组中,以1mg/kg的剂量的施用导致肿瘤消退,并且以3mg/kg的剂量的施用导致完全肿瘤消退,如给予POLIVY的组中。

[0549] 工业实用性

[0550] 本发明提供了具有内化活性的抗CD37抗体和包含所述抗体的抗体-药物缀合物。所述抗体-药物缀合物可以用作例如用于恶性B细胞淋巴瘤等等的治疗药物。

[0551] 序列表自由文本

[0552] SEQ ID NO:1:编码hmAb-L11轻链的核苷酸序列

[0553] SEQ ID NO:2:hmAb-L11轻链的氨基酸序列

[0554] SEQ ID NO:3:编码hmAb-H11重链的核苷酸序列

[0555] SEQ ID NO:4:hmAb-H11重链的氨基酸序列

[0556] SEQ ID NO:5:编码hmAb-H541重链的核苷酸序列

[0557] SEQ ID NO:6:hmAb-H541重链的氨基酸序列

[0558] SEQ ID NO:7:编码hmAb-H551重链的核苷酸序列

[0559] SEQ ID NO:8:hmAb-H551重链的氨基酸序列

[0560] SEQ ID NO:9:编码hmAb-H11a重链的核苷酸序列

[0561] SEQ ID NO:10:hmAb-H11a重链的氨基酸序列

[0562] SEQ ID NO:11:包含编码轻链信号序列和人 $\kappa$ 轻链恒定区的核苷酸序列的核苷酸片段

- [0563] SEQ ID NO:12:编码hmAb-L11轻链可变区的核苷酸序列
- [0564] SEQ ID NO:13:包含编码重链信号序列和人G1重链恒定区的核苷酸序列的核苷酸片段
- [0565] SEQ ID NO:14:编码hmAb-H11重链可变区的核苷酸序列
- [0566] SEQ ID NO:15:编码hmAb-H541重链可变区的核苷酸序列
- [0567] SEQ ID NO:16:编码hmAb-H551重链可变区的核苷酸序列
- [0568] SEQ ID NO:17:编码hmAb-H11a重链可变区的核苷酸序列
- [0569] SEQ ID NO:18:人CD37的氨基酸序列
- [0570] SEQ ID NO:19:人源化抗CD37抗体的CDRL1序列
- [0571] SEQ ID NO:20:人源化抗CD37抗体的CDRL2序列
- [0572] SEQ ID NO:21:人源化抗CD37抗体的CDRL3序列
- [0573] SEQ ID NO:22:人源化抗CD37抗体的CDRH1序列
- [0574] SEQ ID NO:23:人源化抗CD37抗体的CDRH2序列
- [0575] SEQ ID NO:24:人源化抗CD37抗体的CDRH3序列

**SEQ ID NO: 1: 编码hmAb-L11轻链的核苷酸序列**

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGAT  
ATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCATCACA  
TGCAAGGCCAGCCAGGATGTGTCCACCGCCGTGGATTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCC  
CCTAAGCTGCTGATCAACTGGGCCAGCACAAAGACACACAGGCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGC  
AGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACC  
TACTACTGCAGACAGCACTACAGCACCCCTTTACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATC  
AAGCGTACGGTGGCCGCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCC  
GGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGG  
AAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAATCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA  
GGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAGAAGCACA  
AGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGAGCTTCAACA  
GGGGGGACTGT

信号序列 (1-60), 轻链可变区 (61-384), 轻链恒定区 (385-702)

**SEQ ID NO: 2: hmAb-L11轻链的氨基酸序列**

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVDWYQQKPGKAPK  
LLINWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCRQHYSPTFTFGQGTKVEIKRTVA  
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL  
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

信号序列 (1-20), 轻链可变区 (21-128), 轻链恒定区 (129-234)

图1

**SEQ ID NO: 3: 编码hmAb-H11重链的核苷酸序列**

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTT  
 CAGCTGGTTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAA  
 GGCCAGCGGCTACAGCTTACCCGACTACAACATGTAAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCCAGTC  
 TCTTGAGTGGATGGGCTACATCGACCCCTACAACGGCGACACCACCTACAACCAGAAATTCCA  
 GGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCTCTACAAGCACCGCCTACATGGAAGTGGAGCAGCCT  
 GAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATCTCCTTACGGCCACTACGCCATGGA  
 TTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACAGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTT  
 CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA  
 GGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC  
 ACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC  
 CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA  
 AGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAG  
 CACCTGAACTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCCAAGGACACCCCTCA  
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG  
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGA  
 GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGACCCAGGACTGGCT  
 GAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC  
 CATCTCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT  
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCTCCCGTGC  
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  
 AGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCAGAAGA  
 GCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA

信号序列 (1-57), 重链可变区 (58-414), 重链恒定区 (415-1404)

**SEQ ID NO: 4: hmAb-H11重链的氨基酸序列**

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNMYWVRQAPGQS  
 LEWMGYIDPYNGDITTYNQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSPYGHYAMDY  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
 AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQFYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPELLG  
 GPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV  
 SLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列 (1-19), 重链可变区 (20-138), 重链恒定区 (139-468)

图2

## SEQ ID NO: 5: 编码hmAb-H541重链的核苷酸序列

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTG  
 CAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTTGCAA  
 GGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGACTACAACATGTAAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCCAGTC  
 TCTTGAGTGGATGGGCTACATCGACCCCTACAACGGCGACACCACCTACAACCAGAAATTCCA  
 GGGCAGAGTGACCATGACCAGAGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGGCCGGCT  
 GAGATCCGATGACACCGCCGTGTAATACTGCGCCAGATCTCCTTACGGCCACTACGCCATGGAT  
 TACTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTC  
 CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA  
 GGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC  
 ACACCTTCCCCGCTGTCTGCACTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC  
 CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA  
 AGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAG  
 CACCTGAACTCCTGGGGGGACCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCTCA  
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG  
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGA  
 GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT  
 GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAAC  
 CATCTCCAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT  
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGC  
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  
 AGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA  
 GCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA

信号序列(1-57), 重链可变区(58-414), 重链恒定区(415-1404)

## SEQ ID NO: 6: hmAb-H541重链的氨基酸序列

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNMYWVRQAPGQS  
 LEWMGYIDPYNGDTTYNQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRSDDTAVYYCARSPYGHYAMD  
 YWQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
 QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSK  
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列(1-19), 重链可变区(20-138), 重链恒定区(139-468)

图3

**SEQ ID NO: 7: 编码hmAb-H551重链的核苷酸序列**

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTG  
 CAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGA AAAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTGCAA  
 GGCCAGCGGCTACAGCTTACCCGACTACAACATGTACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCCAGTC  
 TCTTGAGTGGATGGGCTACATCGACCCCTACAACGGCGACACCACCTACAACCAGAAATTCCA  
 GGGCAGAGTGACCATGACCAGAGACACCAGCAGCAGCACC GCCTACATGGAAGT GAGCAGAC  
 TGAGAAGCGACGACACCGCCGTGTA CTACTGCGCCAGATCTCCTTACGGCCACTACGCCATGG  
 ATTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCT  
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGGCTGCCTGGTCA  
 AGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  
 CACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG  
 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC  
 AAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCCTGCCCCA  
 GCACCTGAACTCCTGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCCAAGGACACCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG  
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGA  
 GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACC GTCTGCACCAGGACTGGCT  
 GAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCC CAGCCCCATCGAGAAAAC  
 CATCTCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT  
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGC  
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  
 AGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA  
 GCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

信号序列 (1-57), 重链可变区 (58-414), 重链恒定区 (415-1404)

**SEQ ID NO: 8: hmAb-H551重链的氨基酸序列**

MKHLWFFLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTDYNMYWVRQAPGQS  
 LEWMGYIDPYNQDFTYNQKFQGRVTMTRDTSSSTAYMEL SRLRSDDTAVYYCARSPYGHYAMD  
 YWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT  
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  
 LGGSPVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
 STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
 QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC  
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列 (1-19), 重链可变区 (20-138), 重链恒定区 (139-468)

图4

**SEQ ID NO: 9: 编码hmAb-H11a重链的核苷酸序列**

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAAGTG  
 CAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTGCAA  
 GGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGACTACAACATGTAAGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCCAGTC  
 TCTTGAGTGGATGGGCTACATCGACCCCTACAACGGCGACACCCTACAACCAGAAATTCCA  
 GGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAAGAGCAAGAGCACCGCTACATGGAAGTGGAGCGC  
 TGAGAAGCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCGCCAGATCTCCTTACGGCCACTACGCCATGG  
 ATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTTACCGTTAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCT  
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
 AGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAGTCCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG  
 CACACCTTCCCCGCTGTCTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG  
 CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACC  
 AAGGTGGACAAGAAGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCCTGCCCA  
 GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG  
 GTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGA  
 GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCT  
 GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAC  
 CATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT  
 CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGC  
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  
 AGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCAGAAGA  
 GCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAA

信号序列 (1-57), 重链可变区 (58-414), 重链恒定区 (415-1404)

**SEQ ID NO: 10: hmAb-H11a重链的氨基酸序列**

MKHLWFFLLLVAAPRWLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMYWVRQAPGQS  
 LEWMGYIDPYNGDFTYNQKFQGRVTITADKSKSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARSPYGHYAMDY  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFP  
 AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPPCPAPELLG  
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV  
 SLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

信号序列 (1-19), 重链可变区 (20-138), 重链恒定区 (139-468)

图5

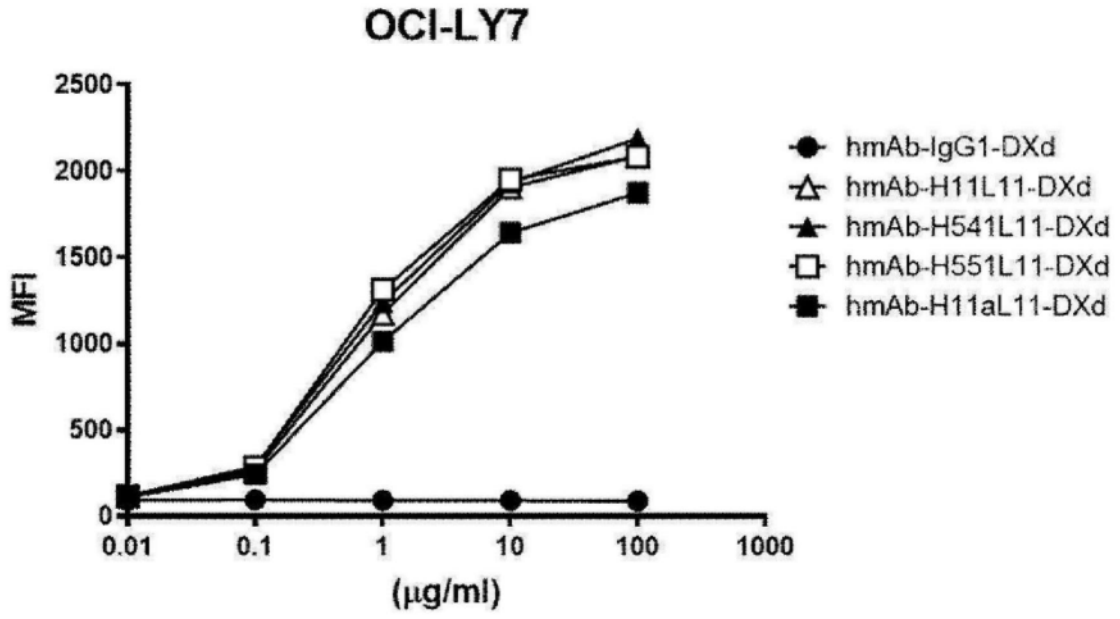


图6

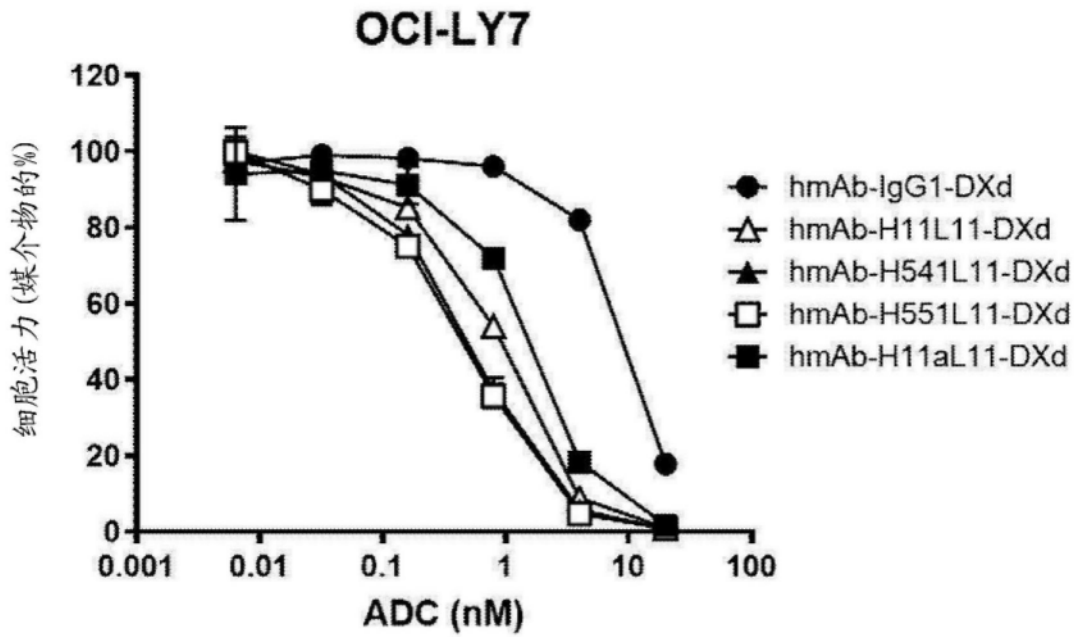


图7

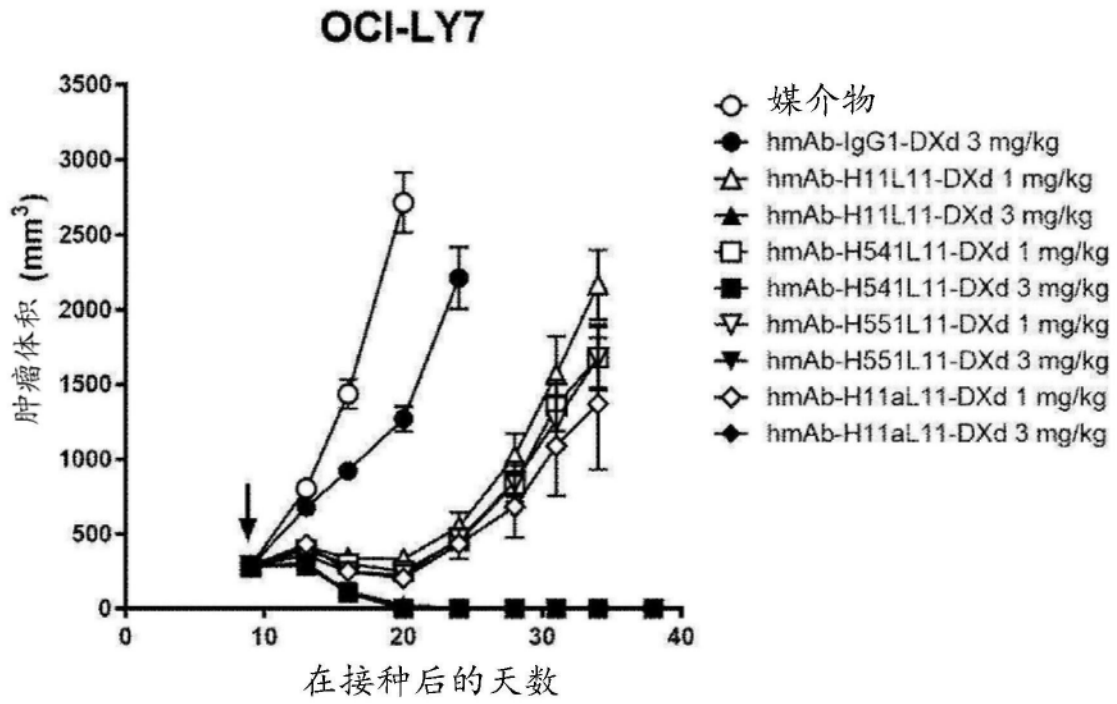


图8

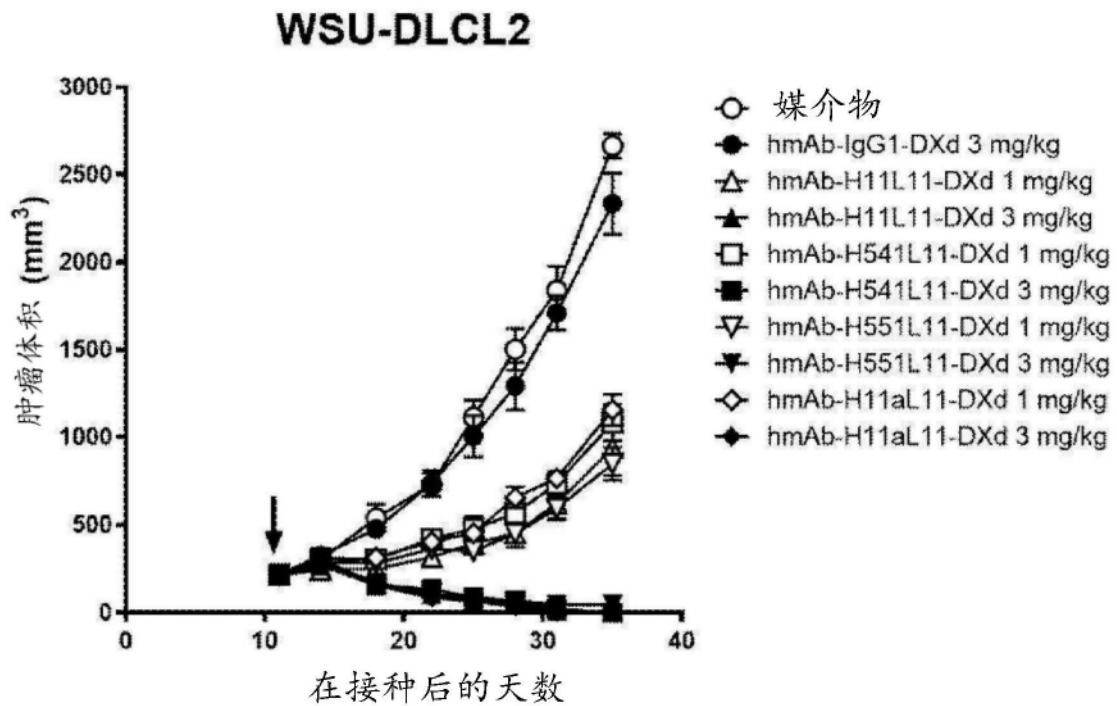


图9

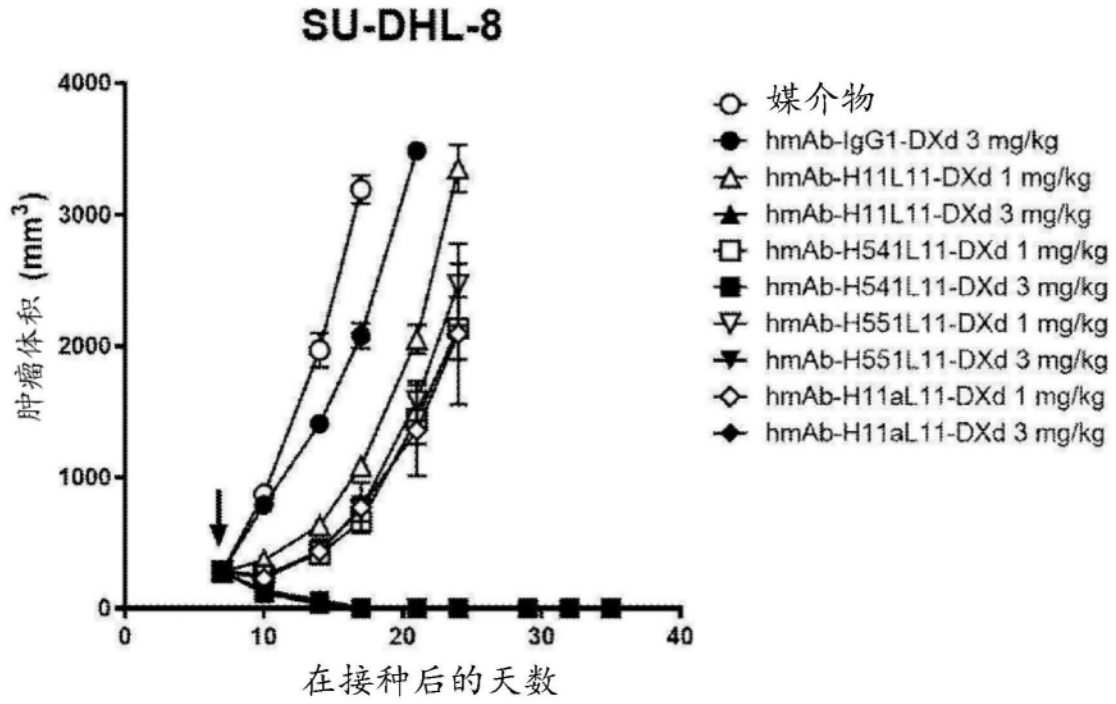


图10

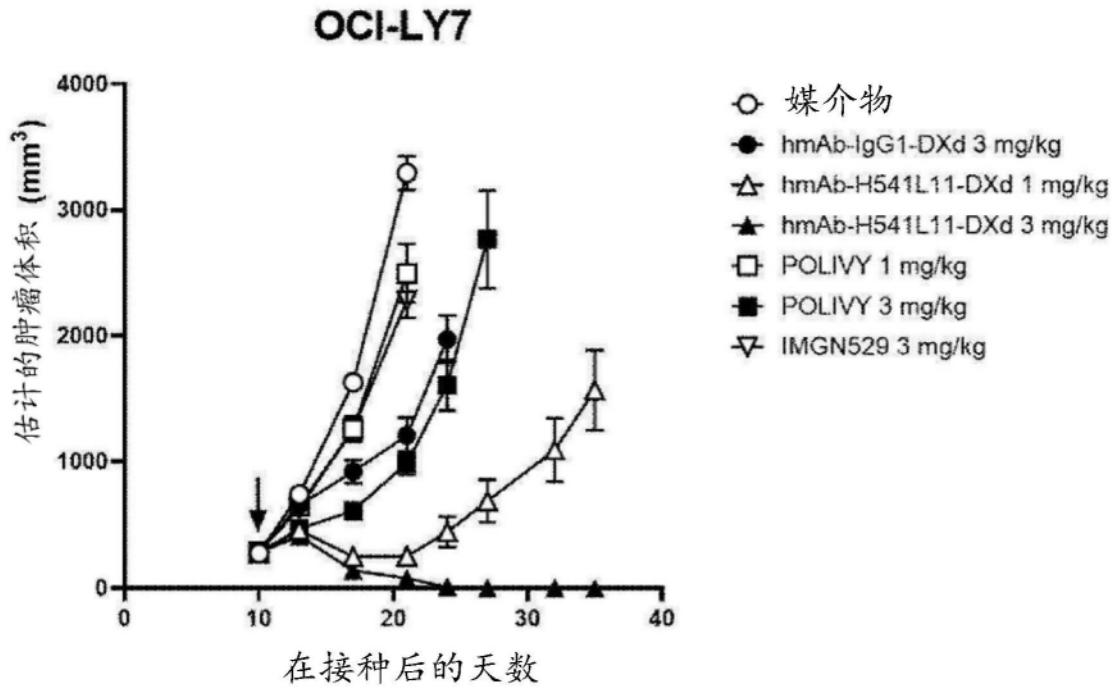


图11

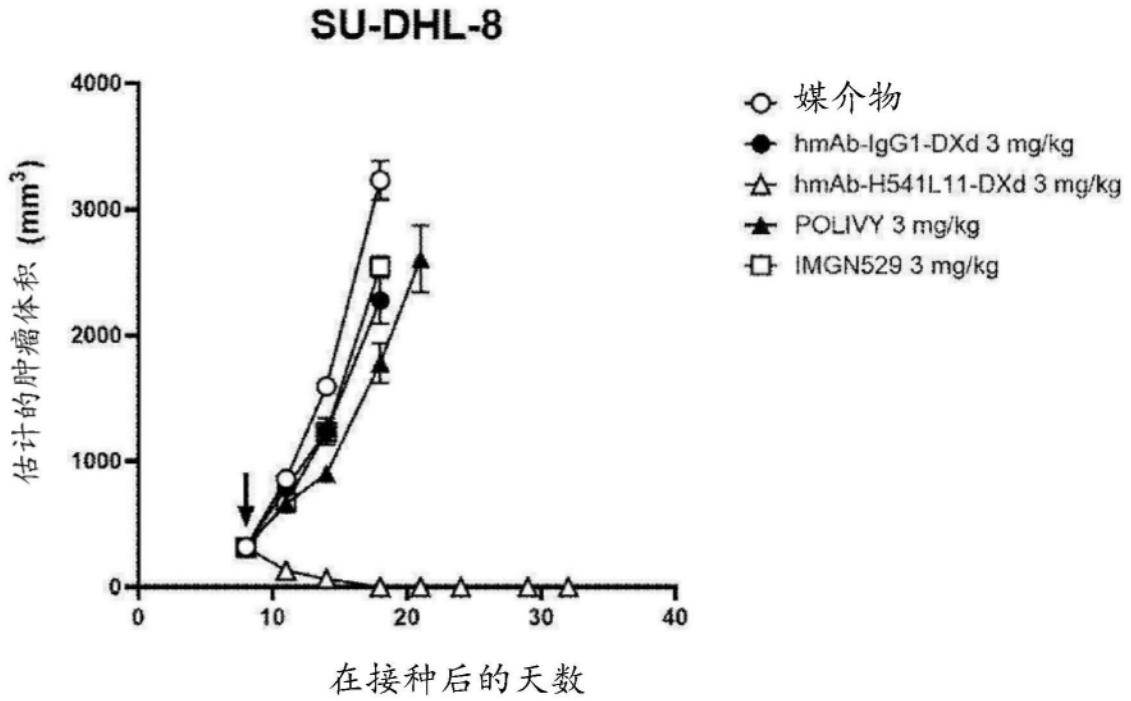


图12

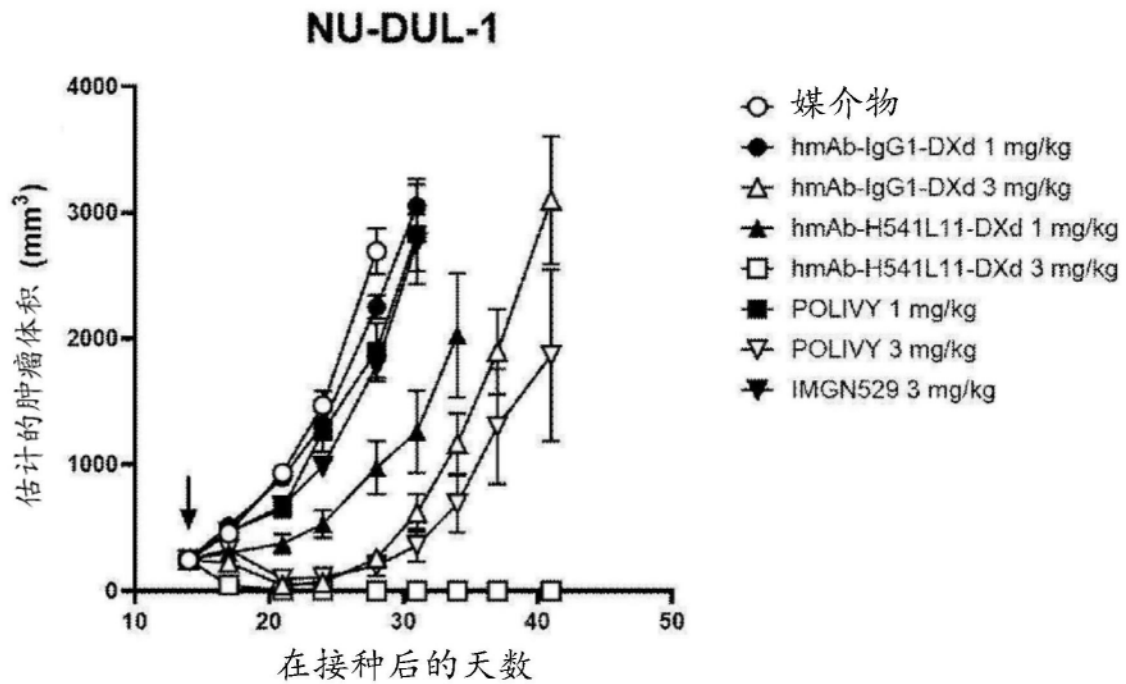


图13

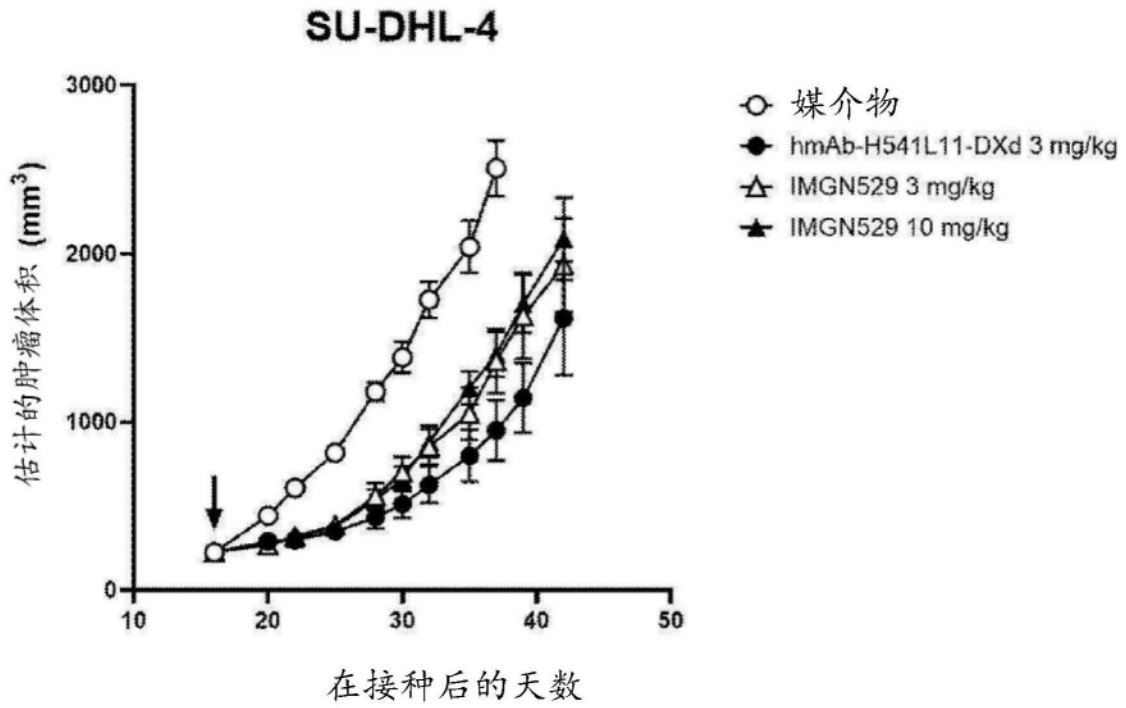


图14

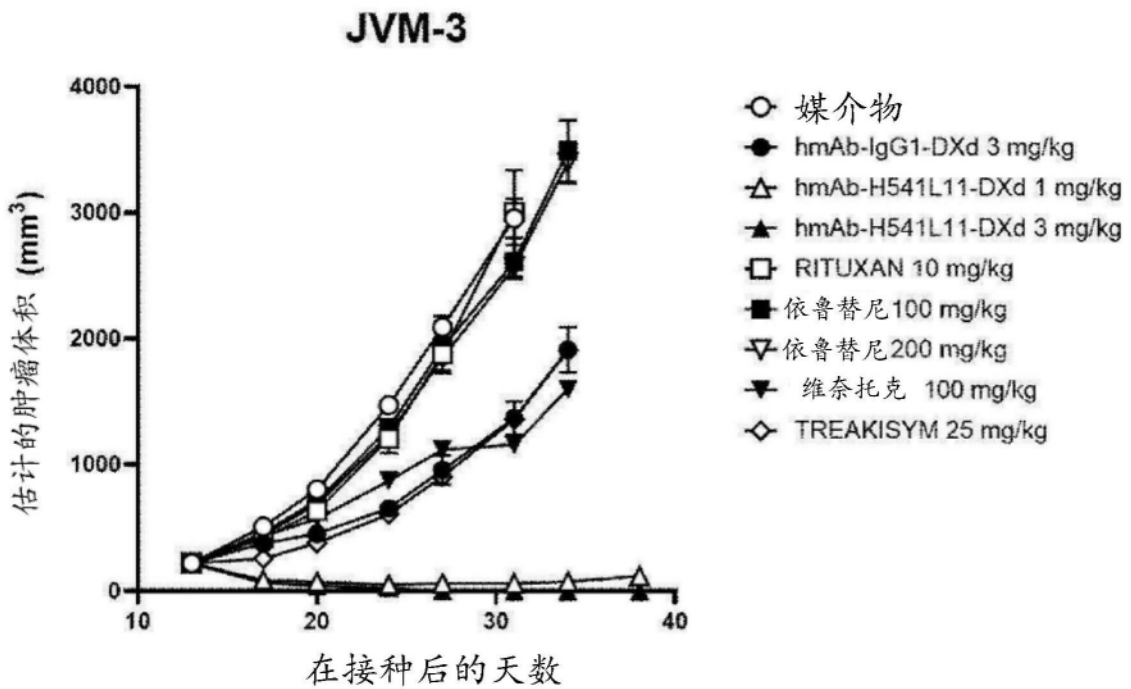


图15

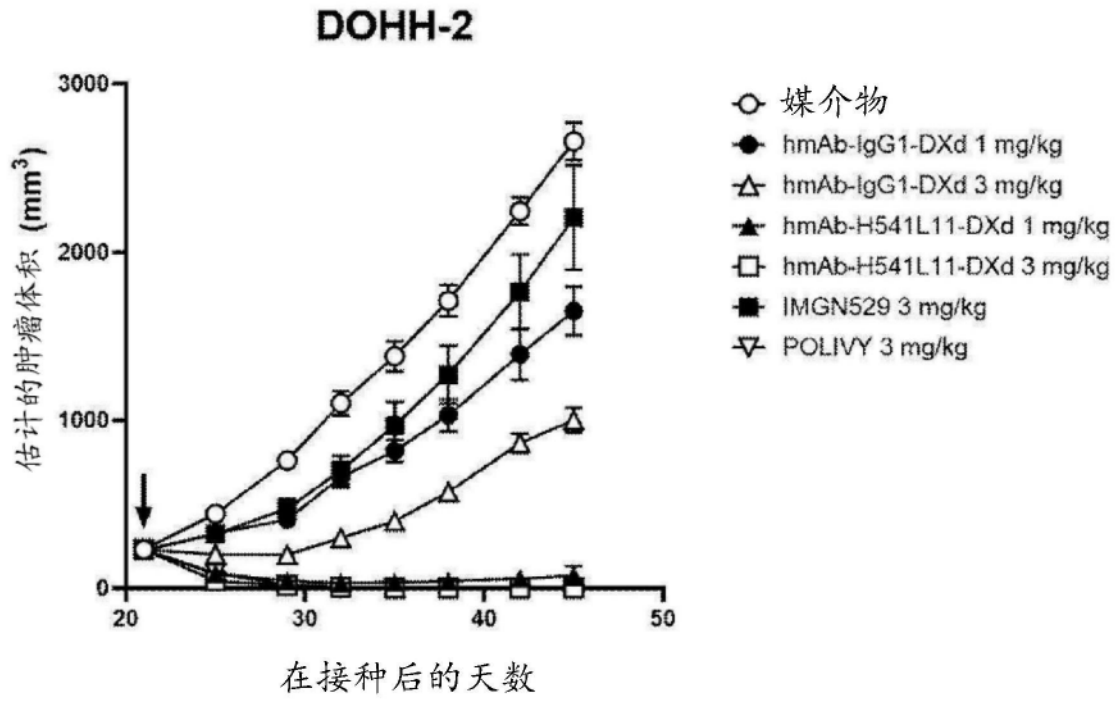


图16