



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I888610 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：110127556

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 07 月 27 日

(51)Int. Cl. : A61K47/68 (2017.01)

A61K31/4745(2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/07/27 中國大陸

202010730899.8

2020/07/28 中國大陸

202010735910.X

(71)申請人：大陸商上海拓界生物醫藥科技有限公司(中國大陸) TUOJIE BIOTECH (SHANGHAI) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：任文明 REN, WENMING (CN)；梁金棟 LIANG, JINDONG (CN)；許建煙 XU, JIANYAN (CN)；黃建 HUANG, JIAN (CN)；楊昌永 YANG, CHANGYONG (CN)；廖成 LIAO, CHENG (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

CN 111116745A

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：70 項 圖式數：19 共 189 頁

(54)名稱

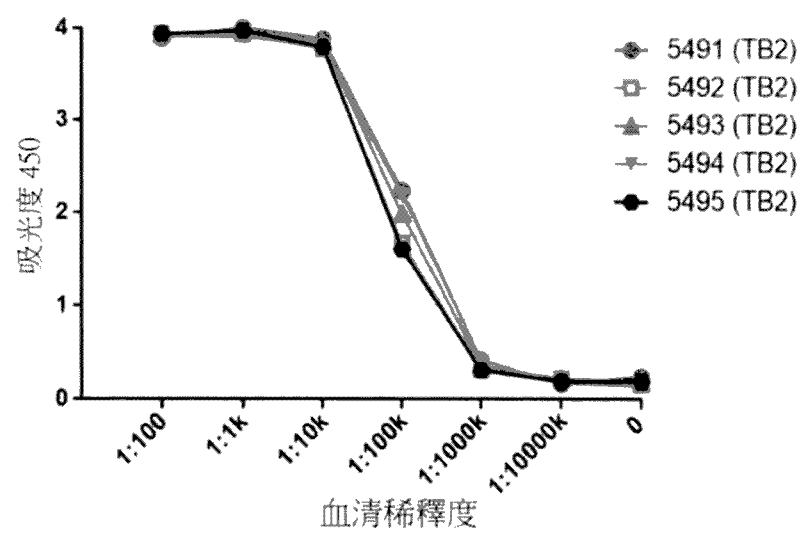
抗 CD 7 9 B 抗體藥物偶聯物、其製備方法及其醫藥用途

(57)摘要

本揭露涉及抗 CD79B 抗體藥物偶聯物、其製備方法及其醫藥用途。具體而言，提供一種抗體藥物偶聯物(ADC)，其包含與 MMAE 或其衍生物、依喜替康或其衍生物、或艾日布林或其衍生物綴合的抗 CD79B 抗體，含有所述 ADC 的藥物組成物，及其在製備治療 CD79B 介導的疾病或病症的藥物中的用途，尤其在用於製備抗癌藥物中的用途。

The present disclosure relates to anti-CD79B antibody-drug conjugate, preparation method and pharmaceutical use thereof. In particular, an antibody-drug conjugate (ADC) is provided, which comprises an anti-CD79B antibody conjugated to MMAE or derivative(s) thereof, Exatecan or derivative(s) thereof, or Eribulin or derivative(s) thereof, as well as a pharmaceutical composition comprising the ADC, and the use in the preparation of medicament for treating CD79B-mediated disease or disorder, in particular in the preparation of anticancer agents.

指定代表圖：



【圖1】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗CD79B抗體藥物偶聯物、其製備方法及其醫藥用途

【英文發明名稱】 ANTI-CD79B ANTIBODY-DRUG CONJUGATE,
PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL
USE THEREOF

【中文】

本揭露涉及抗 CD79B 抗體藥物偶聯物、其製備方法及其醫藥用途。具體而言，提供一種抗體藥物偶聯物(ADC)，其包含與 MMAE 或其衍生物、依喜替康或其衍生物、或艾日布林或其衍生物綴合的抗 CD79B 抗體，含有所述 ADC 的藥物組成物，及其在製備治療 CD79B 介導的疾病或病症的藥物中的用途，尤其在用於製備抗癌藥物中的用途。

【英文】

The present disclosure relates to anti-CD79B antibody-drug conjugate, preparation method and pharmaceutical use thereof. In particular, an antibody-drug conjugate (ADC) is provided, which comprises an anti-CD79B antibody conjugated to MMAE or derivative(s) thereof, Exatecan or derivative(s) thereof, or Eribulin or derivative(s) thereof, as well as a pharmaceutical composition comprising the ADC, and the use in the preparation of medicament for treating CD79B-mediated disease or disorder, in particular in the preparation of anticancer agents.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗CD79B抗體藥物偶聯物、其製備方法及其醫藥用途

【英文發明名稱】 ANTI-CD79B ANTIBODY-DRUG CONJUGATE,
PREPARATION METHOD AND PHARMACEUTICAL
USE THEREOF

【0001】 本申請要求 2020 年 07 月 27 日提交的申請號為 CN202010730899.8 和 2020 年 07 月 28 日提交的 CN202010735910.X 的專利申請的優先權。

【技術領域】

【0002】 本申請涉及一種抗 CD79B 抗體及抗原結合片段，包含所述抗 CD79B 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含人抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段的藥物組成物，以及其作為抗癌藥物的用途。

【先前技術】

【0003】 惡性腫瘤(癌症)是全球第二位死因，僅排在心臟病之後。其中淋巴瘤是起源於淋巴造血系統的惡性腫瘤，是全世界最常見的血液腫瘤。淋巴瘤分為非何杰金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)和何杰金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma, HL)兩類。非何杰金淋巴瘤是一組具有較強異質性的淋巴細胞異常增殖性疾病的總稱，其發病率遠高於何杰金淋巴瘤，約占淋巴瘤的 80%以上。其中彌漫大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)是成人最常見的淋巴瘤類型，約占有所有非何杰金

淋巴瘤的 32.5%；在亞洲人群中，這一比例更高，接近 40%。好發於老年患者，中位發病年齡為 60-64 歲，男性患者略多於女性患者。

【0004】目前瀰漫大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)的一線標準方案為利妥昔單抗聯合化療方案(R-CHOP)。在利妥昔單抗上市之前，以蔥環類為基礎的 CHOP(環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼、潑尼松)方案是 DLBCL 的一線標準治療方案。R-CHOP 治療方案使得 DLBCL 患者的長期存活率得到明顯改善。臨床試驗結果顯示：相比於傳統的 CHOP 方案，R-CHOP 方案治療 DLBCL 能顯著延長患者的中位總生存時間達 4.9 年，中位無病生存時間超過 6.6 年，5 年無疾病進展生存率從 30% 提高至 54%。但仍有 10%至 15%的難治患者沒有反應，並有 20%至 30%的患者出現復發。而且不是所有 DLBCL 患者都適合 R-CHOP 方案，如 80 歲以上的高齡患者，他們的體能不允許進行標準的 R-CHOP 治療。對於侵襲性更高的淋巴瘤類型，以及復發性淋巴瘤，R-CHOP 方案可能無效。

【0005】根據淋巴細胞的起源分類，DLBCL 屬於 B 細胞淋巴瘤 B 細胞抗原受體(B cell receptor, BCR)複合物，是 B 細胞表面最主要的分子。BCR 複合物由識別和結合抗原的膜免疫球蛋白(mIg)和傳遞抗原刺激信號的 $Ig\alpha$ (CD79a)和 $Ig\beta$ (CD79B)異源二聚體組成。 $Ig\alpha$ 和 $Ig\beta$ 分別為約 47kDa 和約 37kDa 的糖蛋白，屬於免疫球蛋白超家族成員，編碼 $Ig\alpha$ 和 $Ig\beta$ 的基因分別稱為 mb-1 和 B29。 $Ig\alpha$ 和 $Ig\beta$ 胞膜外區胺基端處均有一個 Ig 樣結構域。 $Ig\alpha$ 和 $Ig\beta$ 均可作為蛋白酪胺酸激酶的底物，參與 BCR 信號轉導。

【0006】BCR 廣泛表達於 B 細胞淋巴瘤以及正常 B 細胞上。鑑於靶向 CD20 的利妥昔單抗在臨床上所取得的成功以及可靠的安全性，開發靶向 BCR 的治療方法也應該具有良好的療效和安全性。針對 CD79B 抗原的治療性抗體是有益的，

其在施用給患者時(尤其是用於長期治療)產生最低限度的抗原性或不產生抗原性。本領域極需開發有效的 CD79B 抗體及其抗體藥物偶聯物，用於癌症治療或延緩癌症進展。WO2020156439A 揭露了一種抗 CD79B 抗體及其治療腫瘤的用途，本揭露全文引入其內容。

【發明內容】

【0007】 本揭露涉及抗CD69B抗體或抗原結合片段及其與藥物的偶聯物(ADC)及醫藥用途，其中提供與抗CD69B抗體或抗原結合片段與細胞毒性物質(MMAE或其衍生物、依喜替康或其衍生物、艾日布林或其衍生物)偶聯的ADC藥物。

【0008】 抗CD79B抗體及其抗原結合片段

WO2020156439A 揭露了一種抗 CD79B 抗體及其治療腫瘤的用途，本揭露全文引入其內容。

【0009】 本揭露提供一種抗CD79B抗體及其抗原結合片段，其包含：

重鏈 HCDR1，其包含 $GX_1X_2FX_3X_4Y$ (SEQ ID NO：24)所示序列，其中， X_1 為 S 或 Y， X_2 為 S 或 T， X_3 為 T 或 S， X_4 為 S 或 T；

重鏈 HCDR2，其包含 X_5PRSGN (SEQ ID NO：25)所示序列，其中， X_5 為 F 或 Y；

重鏈 HCDR3，其包含 $X_6X_7X_8X_9X_{10}GDFX_{11}Y$ (SEQ ID NO：26)，其中， X_6 為不存在或 G， X_7 為不存在或 S， X_8 為 G 或 D， X_9 為 D 或 Y， X_{10} 為 L 或 D， X_{11} 為 D 或 A；

輕鏈 LCDR1，其包含 RSSQSIVHX₁₂GNTYX₁₃E(SEQ ID NO：27)，其中，X₁₂為 S 或 H，X₁₃為 F 或 L；

輕鏈 LCDR2，其包含 SEQ ID NO：11 或 17 所示序列；和

輕鏈 LCDR3，其包含 SEQ ID NO：12 或 18 所示序列。

【0010】 一些實施方案中，上述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段包含：

抗體重鏈可變區，所述的抗體重鏈可變區包含至少 1 個選自如以下序列所述的 HCDR：SEQ ID NO：23，SEQ ID NO：7，SEQ ID NO：8，SEQ ID NO：9，SEQ ID NO：13，SEQ ID NO：14，SEQ ID NO：15；和/或

抗體輕鏈可變區，所述的抗體輕鏈可變區包含至少 1 個選自如以下序列所示的 LCDR：SEQ ID NO：10，SEQ ID NO：11，SEQ ID NO：12，SEQ ID NO：16，SEQ ID NO：17 或 SEQ ID NO：18。

【0011】 一些實施方案中，提供抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，包含：

(a)分別如 SEQ ID NO：23、8、9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO：10、11、12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(b)分別如 SEQ ID NO：7、8、9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO：10、11、12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(c)分別如 SEQ ID NO：13、14、15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO：16、17、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【0012】 在一些具體實施方案中，前述方案(a)(即抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，包含分別如 SEQ ID NO：23、8、9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO：10、11、12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的)中，不包含 VH 如 SEQ ID NO：19、VL 如 SEQ ID NO：20 的抗 CD79B 抗體或其抗原

結合片段，或不包含重鏈全長如 SEQ ID NO：28、輕鏈全長如 SEQ ID NO：29 的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【0013】一些實施方案中，上述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段為鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體、人抗體或其片段；例如，為人源化抗體或其片段。

【0014】一些實施方案中，提供抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈可變區(VH)和輕鏈可變區(VL)，其中，

重鏈可變區(VH)包含：

如 SEQ ID NO：3、5 所示或與 SEQ ID NO：3、5 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列；

和/或

輕鏈可變區(VL)包含：

如 SEQ ID NO：4、6 所示或與 SEQ ID NO：4、6 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列。

【0015】一些具體實施方案中，所述抗 CD79B 抗體或抗原結合片段的 VH 如序列 SEQ ID NO：3 所示，VL 如序列 SEQ ID NO：4 所示；或 VH 如序列 SEQ ID NO：5 所示，VL 如序列 SEQ ID NO：6 所示。

【0016】另一些實施方案中，提供抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，其中，

VH 包含：

如 SEQ ID NO：19、21 所示或與 SEQ ID NO：19、21 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列；

和/或 VL，包含：

如 SEQ ID NO : 20、22 所示或與 SEQ ID NO : 20、22 具有至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列。

【0017】一些具體實施方案中，所述抗 CD79B 抗體或抗原結合片段的 VH 如序列 SEQ ID NO : 19 所示，VL 如序列 SEQ ID NO : 20 所示；或 VH 如序列 SEQ ID NO : 21 所示，VL 如序列 SEQ ID NO : 22 所示。

【0018】一些實施方案中，上述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段包含和輕鏈恆定區；較佳地，所述重鏈恆定區選自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恆定區及其一般變體，所述輕鏈恆定區選自人抗體 κ 和 λ 鏈恆定區及其一般變體。

【0019】一些具體實施方案中，所述重鏈恆定區為人 IgG1、IgG2。

【0020】一些實施方案中，提供抗 CD79B 抗體或其片段，其中，

【0021】重鏈為 SEQ ID NO : 28 或其變體序列所示；所述變體序列在重鏈包含 0 至 10 個胺基酸變化；

輕鏈為 SEQ ID NO : 29 或其變體序列所示；所述變體序列在輕鏈包含 0 至 10 個胺基酸變化。

【0022】一些實施方案中，提供抗 CD79B 抗體或其片段，其中，

重鏈為 SEQ ID NO : 30 或其變體序列所示；所述變體序列在重鏈包含 0 至 10 個胺基酸變化；

輕鏈為 SEQ ID NO : 31 或其變體序列所示；所述變體序列在輕鏈包含 0 至 10 個胺基酸變化。

【0023】一些具體實施方案中，上述抗 CD79B 抗體或其片段可以為變體，所述變體在 VL 有 0 至 10 個(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個)胺基酸變化，和/或 VH 有 0 至 10 個(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個)胺基酸變化。

【0024】一些具體實施方案中，上述變體具有與原抗 CD79B 抗體或其片段相同或相似的生物學功能或效果。

【0025】一些實施方案中，上述抗 CD79B 抗體的抗原結合片段包括 Fab、Fv、sFv、F(ab')₂、線性抗體、單鏈抗體、scFv、sdAb、sdFv、奈米抗體、肽抗體 peptibody、結構域抗體和多特異性抗體(雙特異性抗體、diabody、triabody 和 tetrabody、串聯二-scFv、串聯三-scFv)。

【0026】一些實施方案中，提供編碼如上所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段的多核苷酸，例如 DNA 或 RNA。

【0027】一些實施方案中，提供包含上述多核苷酸的表達載體，例如真核表達載體、原核表達載體、病毒載體。

【0028】一些實施方案中，提供上述表達載體轉化的宿主細胞，例如真核細胞、原核細胞。一些具體實施方案中，宿主細胞為細菌(例如大腸桿菌)、酵母菌(例如畢赤酵母)、哺乳動物細胞(例如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或人胚腎(HEK)293 細胞)。

【0029】一些實施方案中，提供製備上述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段的方法包括步驟：在如前所述的宿主細胞中表達該抗體或其抗原結合片段，並自該宿主細胞中分離該抗體或其抗原結合片段。

【0030】一些實施方案中，提供治療或預防增殖性疾病或延緩增殖性疾病進展的方法，包括：

向受試者施用治療或延緩疾病有效量的上述抗人 CD79B 抗體或其抗原結合片段或其編碼的多核苷酸、藥物組成物，所述增殖性疾病是癌症或腫瘤。

【0031】一些具體實施方案中，所述癌症或腫瘤是淋巴瘤或白血病；

所述淋巴瘤選自：彌漫大 B 細胞淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、小淋巴細胞性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤；

所述非何杰金氏淋巴瘤選自：攻擊性 NHL、復發性攻擊性 NHL、復發性無痛性 NHL、頑固性 NHL、頑固性無痛性 NHL；

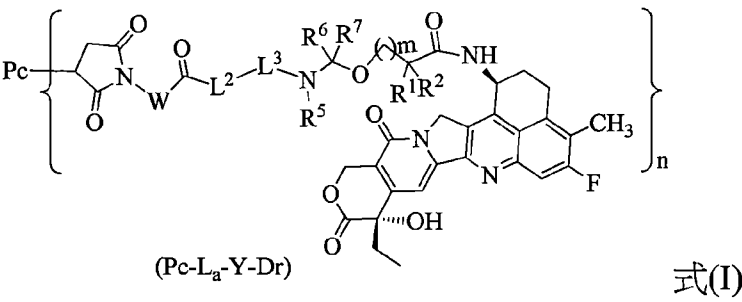
所述白血病選自：慢性淋巴細胞性白血病、毛細胞白血病、急性淋巴細胞性白血病。

【0032】 配體-藥物偶聯物

本揭露提供一種配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中，藥物選自 MMAE 或其衍生物、依喜替康或其衍生物、艾日布林或其衍生物；配體為抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，所述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段為前述本揭露任意的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【0033】 配體-藥物(依喜替康或其衍生物)的偶聯物

本揭露提供一種配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為式(I)所示的配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物：



其中，

W 選自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-環烷基或 1 至 8 個原子的直鏈雜烷基，所述雜烷基包含 1 至 3 個選自 N、O 或 S 的雜原子，其中所述的 C₁₋₈ 烷基、環烷基和直

鏈雜烷基各自獨立地任選進一步被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基的一個或多個取代基所取代；

L^2 選自 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^4(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 或化學鍵， p^1 為 1 至 20 的整數；

L^3 為由 2 至 7 個胺基酸構成的肽殘基，其中胺基酸任選進一步被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基中的一個或多個取代基所取代；

R^1 選自氫原子、鹵素、環烷基烷基、氘代烷基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基；

R^2 選自氫原子、鹵素、鹵烷基、氘代烷基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基；

或者， R^1 和 R^2 與其相連接的碳原子一起形成環烷基或雜環基；

R^4 和 R^5 相同或不同，且各自獨立地選自氫原子、烷基、鹵烷基、氘代烷基和羥烷基；

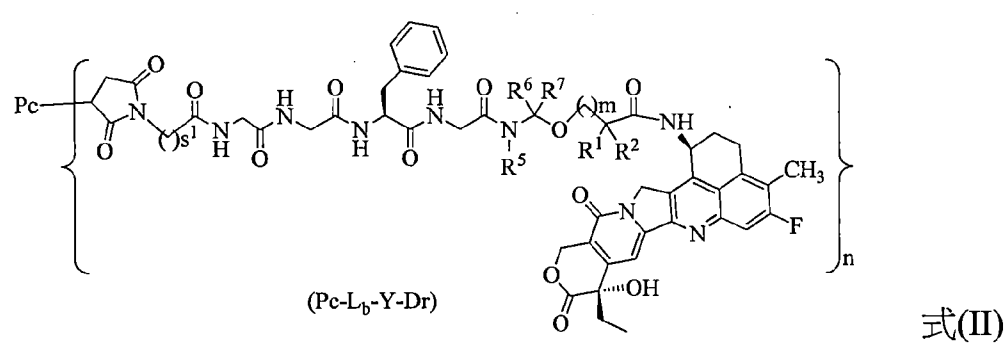
R^6 和 R^7 相同或不同，且各自獨立地選自氫原子、鹵素、烷基、鹵烷基、氘代烷基和羥烷基；

m 為 0 至 4 的整數；

n 為 1 至 10，可以為整數或小數；

Pc 為本揭露提供的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【0034】 一些實施方案中，本揭露提供配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為式(II)所示的配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物：

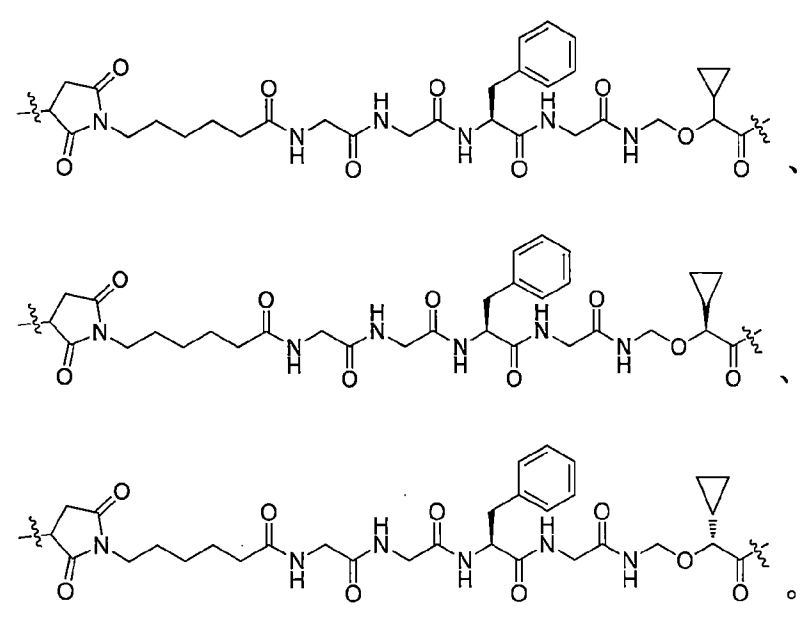


其中，

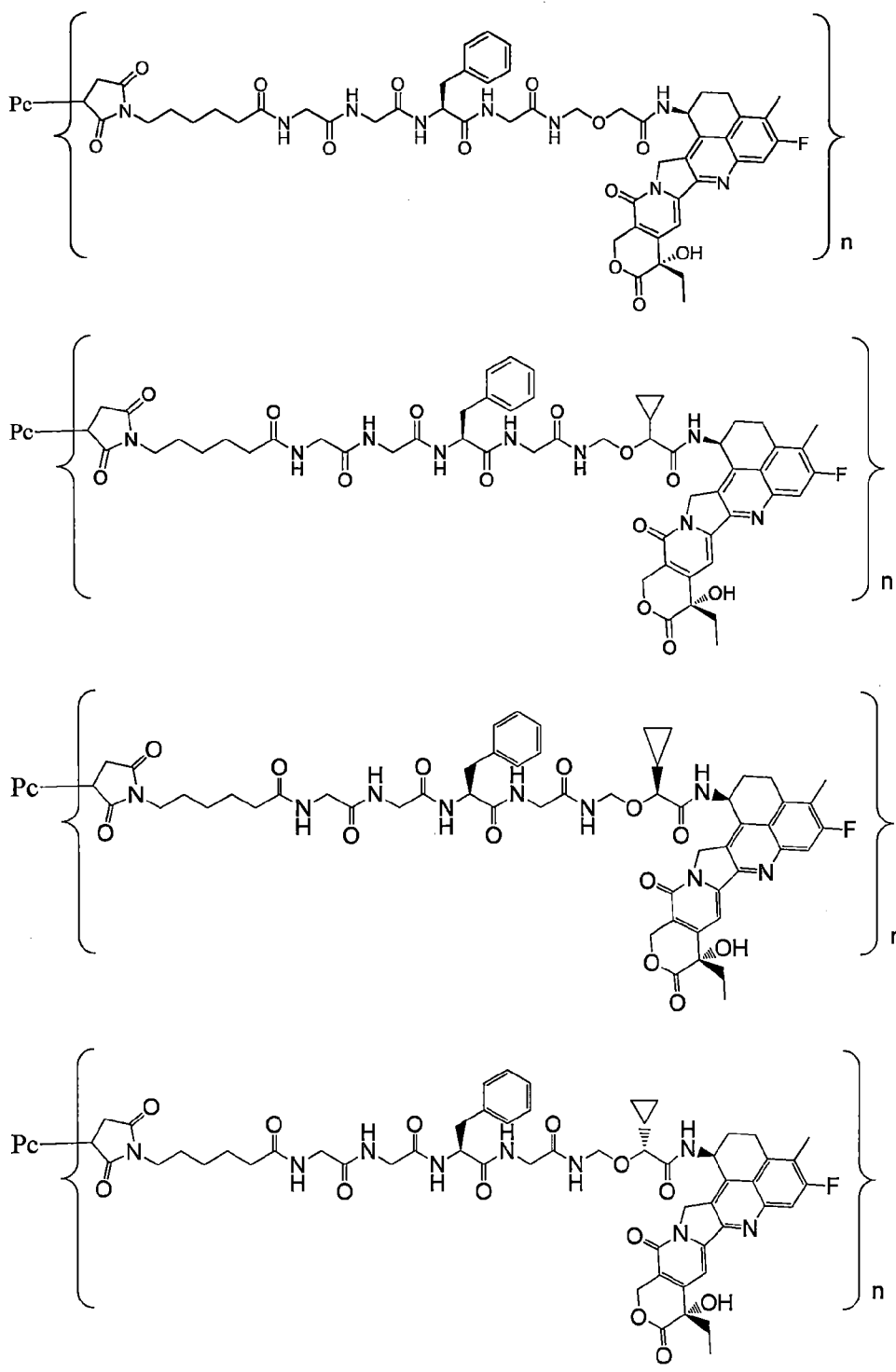
s¹為2至8的整數；較佳5；

Pc、R¹、R²、R⁵~R⁷、m和n如式(I)中所定義。

【0035】 一些實施方案中，本揭露多的配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物的連接單元-L-Y-包括，但不限於：

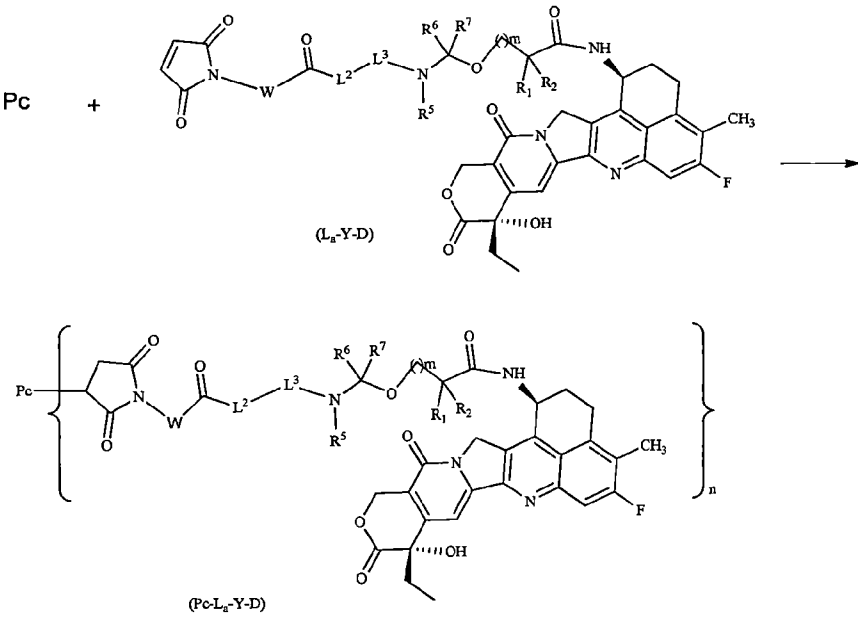


【0036】 一些實施方案中，本揭露提供配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物包括，但不限於：



其中，
n 為 1 至 10，可以為整數或小數；
Pc 為前述本揭露的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【0037】 一些實施方案中，製備如通式(Pc-L_a-Y-D)所示的配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物的方法，其包括以下步驟：



【0038】 Pc 還原後，與通式(L_a-Y-D)偶聯反應，得到通式(Pc-L_a-Y-D)所示的化合物；

其中，Pc 為本揭露的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；W、L²、L³、R¹、R²、R⁵~R⁷、m 和 n 如式(I)中所定義。

【0039】 以上實施方案中，Pc 為本揭露任意的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；較佳為包含如 SEQ ID NO：28 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：29 所示的輕鏈的抗體，或包含如 SEQ ID NO：30 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：31 所示的輕鏈的抗體。

【0040】 一些具體實施方案中，本揭露配體-依喜替康或其衍生物的偶聯物包括其互變異構體、內消旋體、外消旋體、對映異構體、非對映異構體、氘代物、或其混合物形式。

【0041】 此處全文引入 WO2020063673 中化合物及其製備方法。

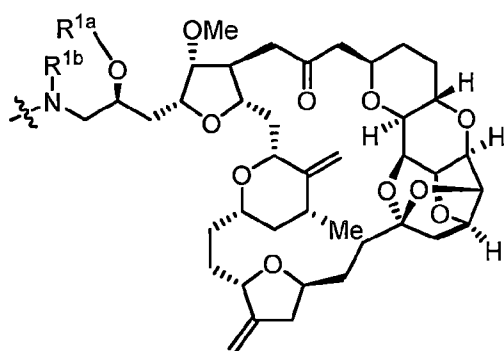
【0042】 配體-藥物(艾日布林或其衍生物)偶聯物

本揭露提供一種配體-艾日布林或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其如式 $Pc-(L-D)_k$ 所示：

其中，配體為 Pc ，所述 Pc 為本揭露任意的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，

L 為將 Pc 共價附接於 D 的接頭，且 k 為 1 至 20(包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或任意兩數值之間任意數值)，

D 如下式(III)所示：



式(III)，

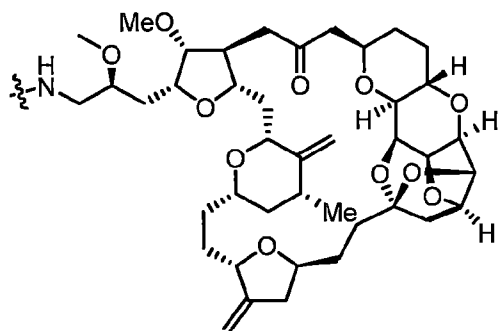
【0043】 其中 R^{1a} 選自氫、烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、芳基和雜芳基，所述的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地任選被選自烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代；較佳 R^{1a} 是甲基；

R^{1b} 選自氫、烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、芳基和雜芳基，所述的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地任選被選自烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代；較佳 R^{1b} 是氫；或者

R^{1a} 與 R^{1b} 與其相連接的原子一起形成 C_{5-8} 雜環烷基，所述雜烷基任選被烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代，且 R^{1a} 和 R^{1b} 不同時為氫。

【0044】 一些實施方案中，配體-艾日布林或其衍生物的偶聯物中 D 中 R^{1a} 為甲基。

【0045】 一些實施方案中，配體-艾日布林或其衍生物的偶聯物中 D 為下式所示：



【0046】 一些實施方案中， $Pc-(L-D)_k$ 所示的配體-艾日布林或其衍生物的偶聯物中， k 選自 1 至 10，可以為整數或小數。

【0047】 在一些實施方案中，接頭在細胞外是穩定的，使得配體-艾日布林或其衍生物的偶聯物在細胞外環境中保持完整，但在例如內化至癌細胞中時能夠裂解。

【0048】 在一些實施方案中，當配體藥物偶聯物進入表達抗原的細胞時，偶聯物中的藥物部分從配體部分裂解，且裂解釋放藥物(如艾日布林或其衍生物)。

【0049】 在一些實施方案中，接頭包含可裂解部分；其中可裂解部分所處的位置，使得裂解之後藥物(例如艾日布林衍生物)中沒有殘留的接頭和 Pc 。

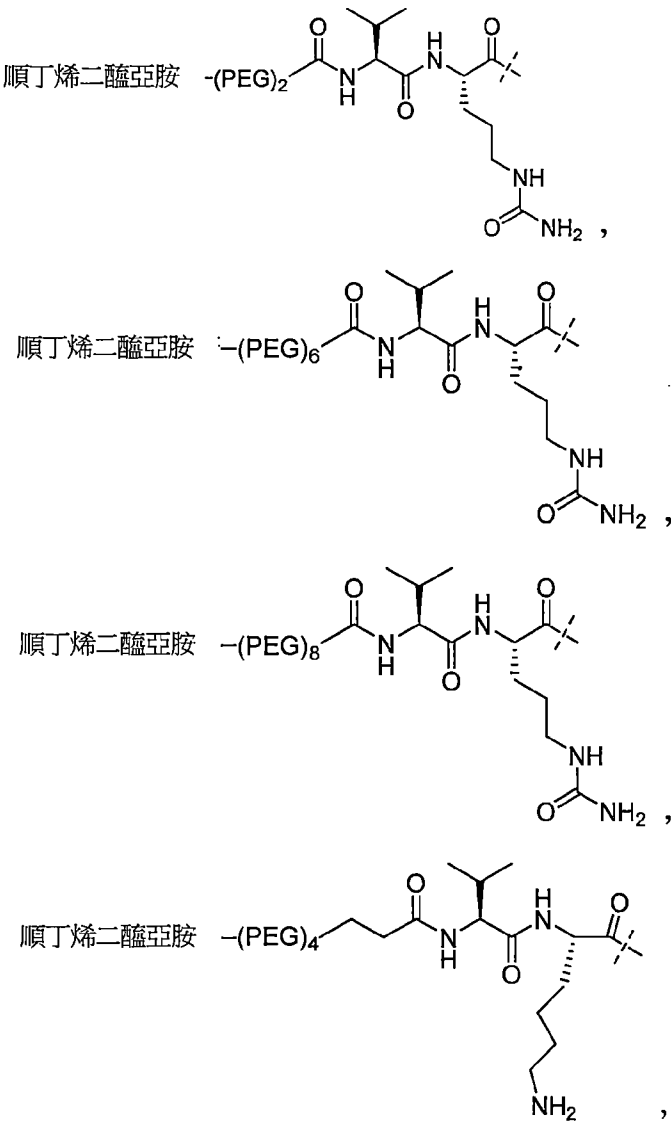
【0050】 在一些實施方案中，接頭中的可裂解部分為可裂解肽部分(moiety)。

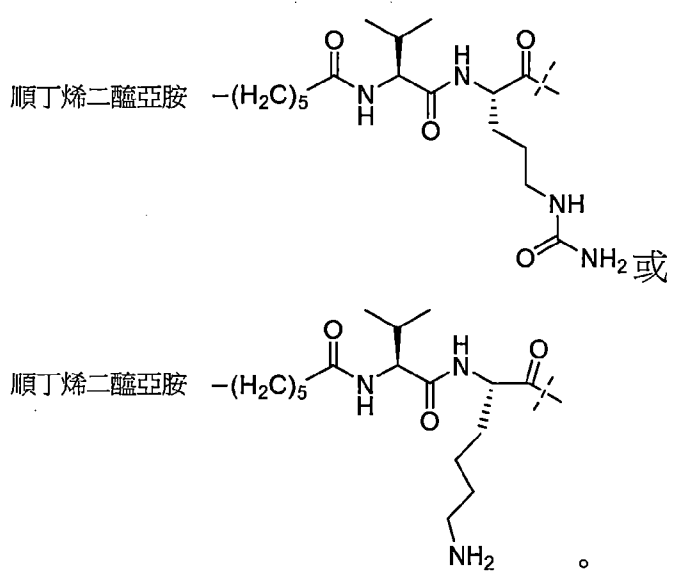
【0051】 在一些實施方案中，包含可裂解肽部分的配體藥物偶聯物顯示較低的聚集水準、改善的配體與藥物比率、增加的癌細胞的靶向殺死、減少的非癌細胞的脫靶殺死、和/或較高的藥物負載(p)。

【0052】 在一些實施方案中，相對於不可裂解的接頭，添加可裂解部分增加細胞毒性和/或效力。在一些實施方案中，在表達中等水準抗原(例如 CD79B)的癌症中增加效力和/或細胞毒性。在一些實施方案中，可裂解肽部分能夠由酶裂解，且接頭為酶能夠裂解的接頭。在一些實施方案中，接頭為組織蛋白酶能夠裂解的接頭。在某些實施方案中，酶能夠裂解的接頭(例如組織蛋白酶能夠裂解的接頭)顯示上述改善特性中的一種或多種。

【0053】 在一些實施方案中，接頭包含胺基酸單元(即，由 2 至 7 個胺基酸構成的肽殘基)，較佳所述胺基酸選自苯丙胺酸、甘胺酸、纈胺酸、賴胺酸、瓜胺酸、絲胺酸、谷胺酸、天冬胺酸，更佳纈胺酸-瓜胺酸(Val-Cit)、丙胺酸-丙胺酸-天冬醯胺(Ala-Ala-Asn)、甘胺酸-甘胺酸-賴胺酸(Gly-Gly-lys)、纈胺酸-賴胺酸(Val-lys)、纈胺酸-丙胺酸(Val-Ala)、纈胺酸-苯丙胺酸(Val-Phe)或甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸(Gly-Gly-Phe-Gly)。

【0054】 在一些實施方案中，本揭露的偶聯物中的接頭選自：





【0055】 在一些實施方案中，胺基酸單元包含纈胺酸-瓜胺酸(Val-Cit)。

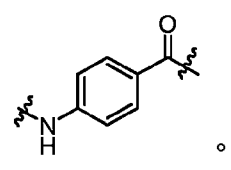
【0056】 在一些實施方案中，包含 Val-Cit 的 ADC 顯示增加的穩定性，減少的脫靶細胞殺死，增加的靶向細胞殺死，較低的聚集水準，和/或較高的藥物負載。

【0057】 另一方面，一些實施方案提供的接頭包含可裂解磺醯胺部分，所述接頭在還原條件下能夠裂解。

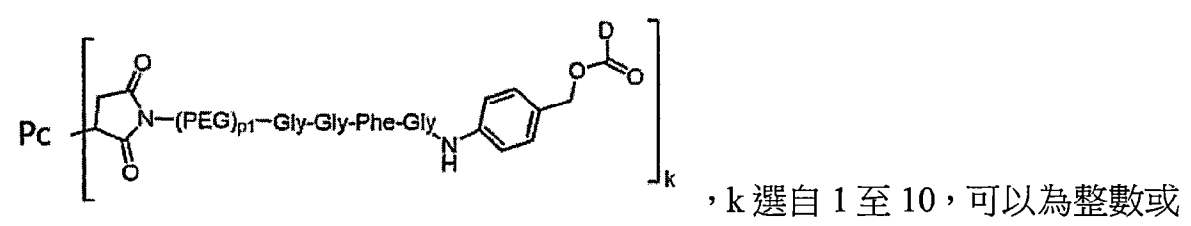
【0058】 在一些實施方案中，所述接頭包含可裂解二硫化物部分，所述接頭在還原條件下能夠裂解。

【0059】 另一方面，本揭露的接頭包含至少一種將 D(如艾日布林衍生物) 附接於可裂解部分的間隔單元。

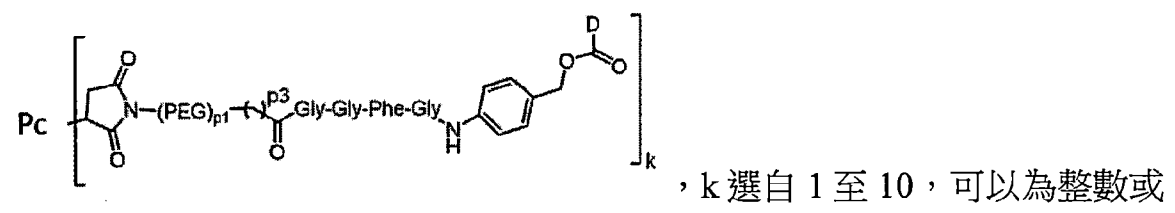
【0060】 在一些實施方案中，所述間隔單元包含對胺基苯甲氧基羰基 (PAB)，



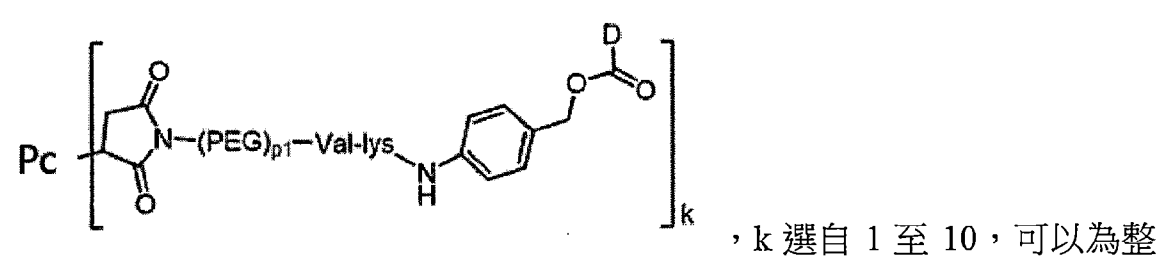
【0061】 另一方面，一些實施方案提供的偶聯物由下式表示：



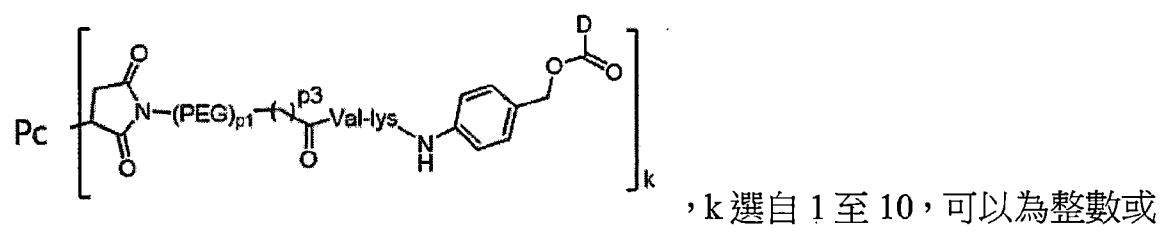
小數；p1 選自 2、4、6 或 8；



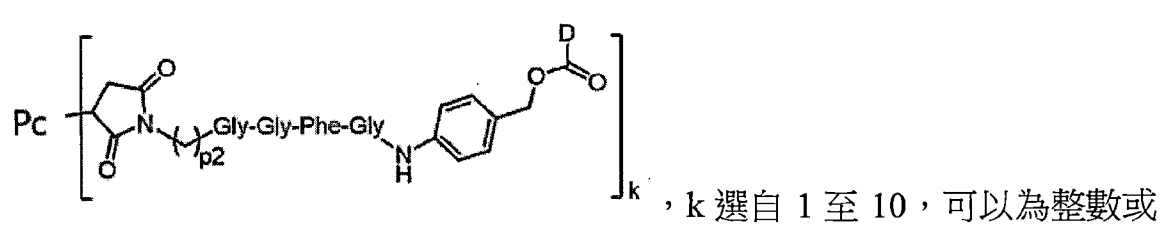
小數；p1 選自 2、4、6 或 8；P3 選自 0、1 或 2；



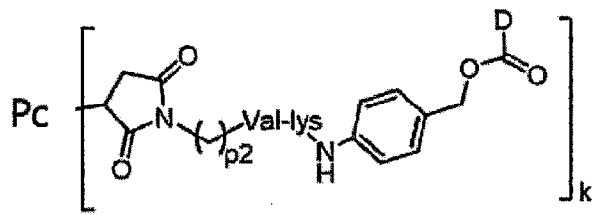
數或小數；p1 選自 2、4、6 或 8；



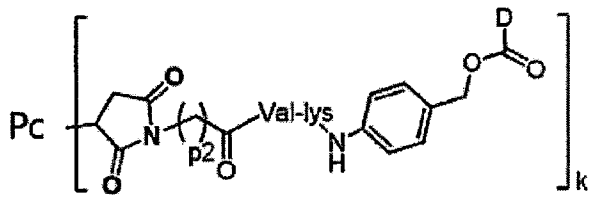
小數；p1 選自 2、4、6 或 8；P3 選自 0、1 或 2；



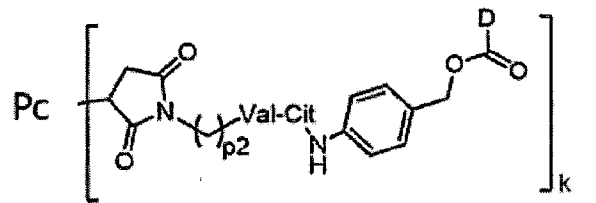
小數；p2 選自 2、4、6 或 8；



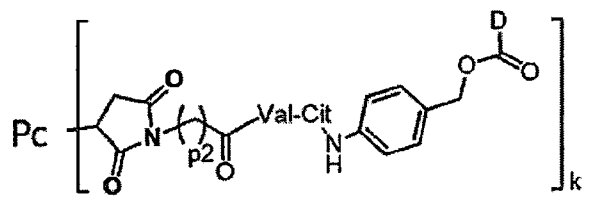
數；p2 選自 2、4、6 或 8；
，k 選自 1 至 10，可以為整數或小



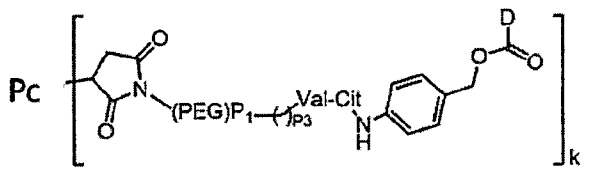
數；p2 選自 2、4、6 或 8；
，k 選自 1 至 10，可以為整數或小



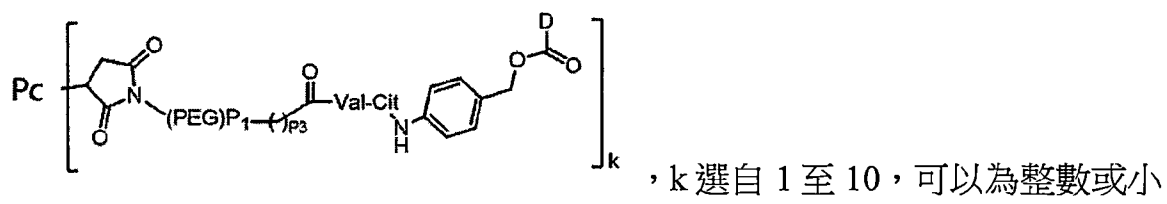
數；
p2 選自 2、4、6 或 8；
，k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；



數；
p2 選自 2、4、6 或 8；
，k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；

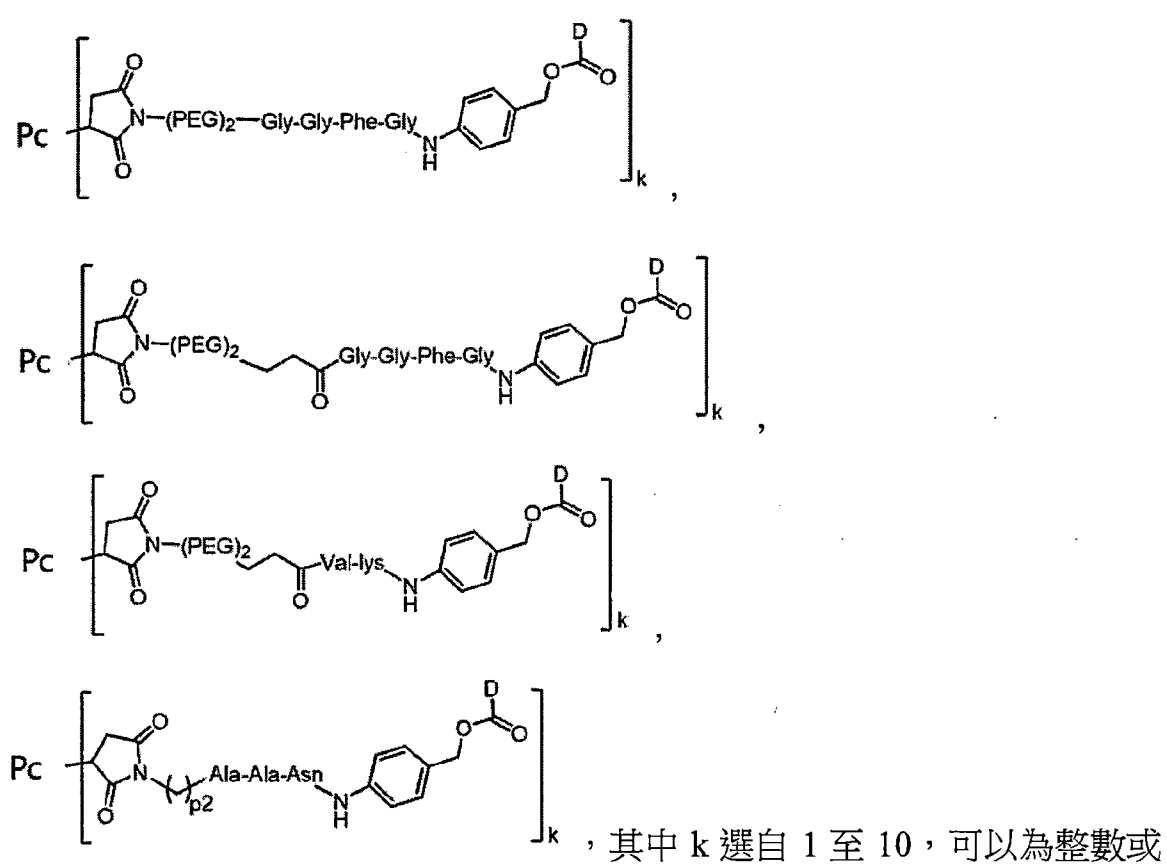


數；
P1 選自 2、4、6 或 8；P3 選自 0、1 或 2；
，k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；



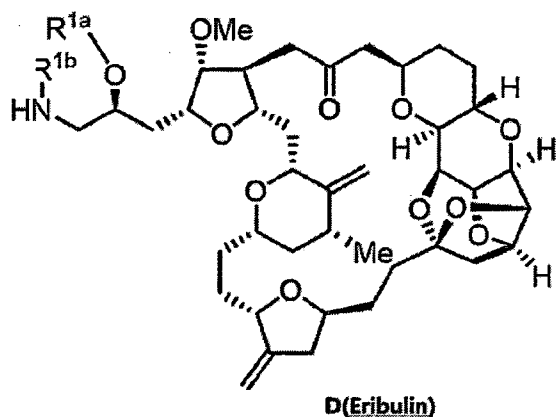
數; P1 選自 2、4、6 或 8; P3 選自 0、1 或 2。

【0062】 在一些所述方案中, 所述的偶聯物由下式表示:



小數; 進一步地, D 中 R^{1a}較佳自甲基, R^{1b}較佳自氫。

【0063】 本揭露還提供了式 D(Eribulin)所示化合物,



，或其可藥用的鹽，

其中，

R^{1a} 選自氫、烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、芳基和雜芳基，所述的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地任選被選自烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代，較佳 R^{1a} 是甲基；

R^{1b} 選自氫、烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、芳基和雜芳基，所述的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地任選被選自烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代，較佳 R^{1b} 是氫、甲基；或者

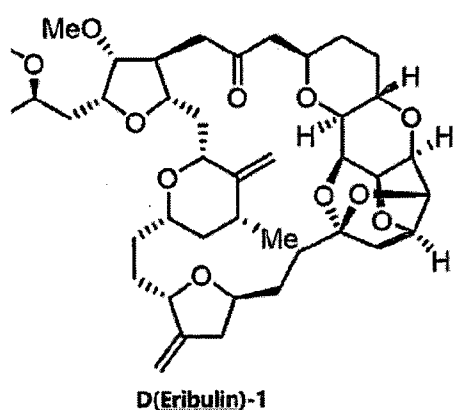
R^{1a} 與 R^{1b} 與其相連接的碳原子一起形成 C_{5-8} 雜環烷基，所述雜烷基任選被烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代，且 R^{1a} 和 R^{1b} 不同時為氫。

【0064】 在一些實施方案中，式 D(Eribulin)所示化合物中 R^{1a} 與 R^{1b} 各自獨立選自 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基。

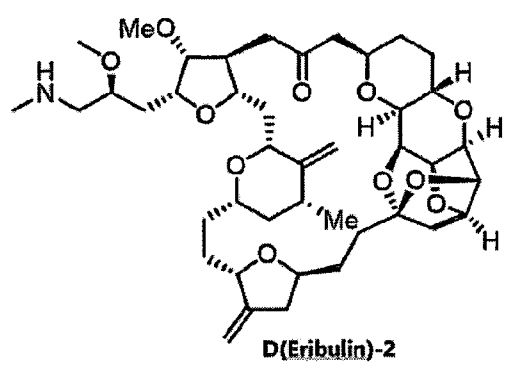
【0065】 在一些實施方案中，式 D(Eribulin)所示化合物中 R^{1a} 選自 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基； R^{1b} 選自氫。

【0066】 在一些實施方案中，式 D(Eribulin)所示化合物中 R^{1a} 與 R^{1b} 與其相連接的碳原子一起形成 C_{6-8} 雜環烷基。

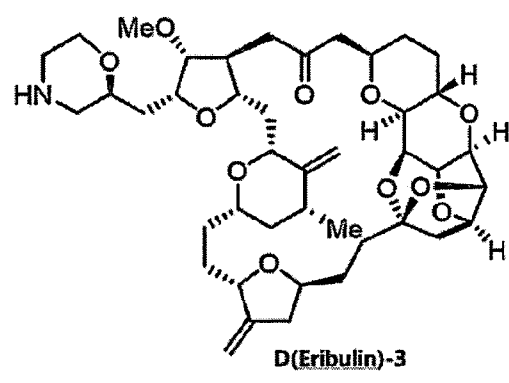
【0067】 在一些實施方案中，式 D(Eribulin)所示化合物為：



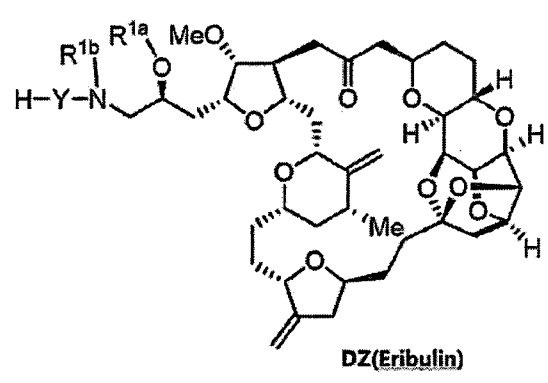
【0068】 在一些實施方案中，式 D(Eribulin)所示化合物為：



【0069】 在一些實施方案中，式 D(Eribulin)所示化合物為：



【0070】 本揭露還提供式DZ (Eribulin)所示化合物，



，或其可藥用的鹽，

其中，R^{1a}選自氫、烷基(如C₁₋₆烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、環烷基(如C₃₋₈環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、芳基和雜芳基，所述的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地任選被選自烷基(如C₁₋₆烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如C₁₋₆烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氘、胺基、氰基、硝基、羥

基、羧烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代，較佳 R^{1a} 是甲基；

R^{1b} 選自氫、烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、烷氧基、芳基和雜芳基，所述的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地任選被選自烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羧基、羧烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代，較佳 R^{1b} 是氫；

或者 R^{1a} 與 R^{1b} 與其相連接的碳原子一起形成 C_{5-8} 雜環烷基，所述雜烷基任選被烷基(如 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基)、烷氧基(如 C_{1-6} 烷氧基，包括但不限於甲氧基、乙氧基、丙氧基、異丙氧基)、鹵素(如氟、氯、溴)、氖、胺基、氰基、硝基、羧基、羧烷基、環烷基(如 C_{3-8} 環烷基，包括但不限於環丙基、環戊基或環己基)、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代；且 R^{1a} 和 R^{1b} 不同時為氫；

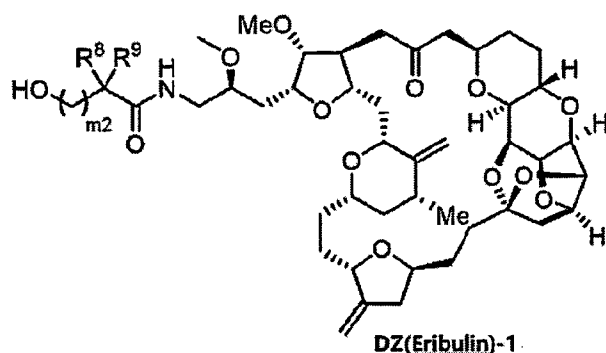
Y選自 $-O(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$ 、 $-NH-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$ 、 $-O-CR^8R^9(CR^aR^b)_{m2}-$ 、 $-OCR^8R^9-C(O)-$ 、 $-O(CR^aR^b)_{m2}C(O)-$ 或 $-S-(CR^aR^b)_{m2}-CR^8R^9-C(O)-$ ，其中 R^a 和 R^b 相同或不同，且各自獨立地選自氫、氖原子、鹵素或烷基； R^8 選自氫、 C_{3-6} 環烷基或 C_{3-6} 環烷基； R^9 選自氫、鹵烷基或 C_{3-6} 環烷基，較佳氫；或者， R^8 和 R^9 與其相連接的碳原子一起形成 C_{3-6} 環烷基； $m2$ 選自0、1、2或3。

【0071】 在一些實施方案中，式 DZ (Eribulin) 所示化合物中 R^{1a} 與 R^{1b} 各自獨立選自 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基。

【0072】 在一些實施方案中，式 DZ (Eribulin) 所示化合物中 R^{1a} 選自 C_{1-6} 烷基，包括但不限於甲基、乙基、異丙基； R^{1b} 選自氫。

【0073】 在一些實施方案中，式 DZ (Eribulin) 所示化合物中 R^{1a} 與 R^{1b} 與其相連接的碳原子一起形成 C_{6-8} 雜環烷基。

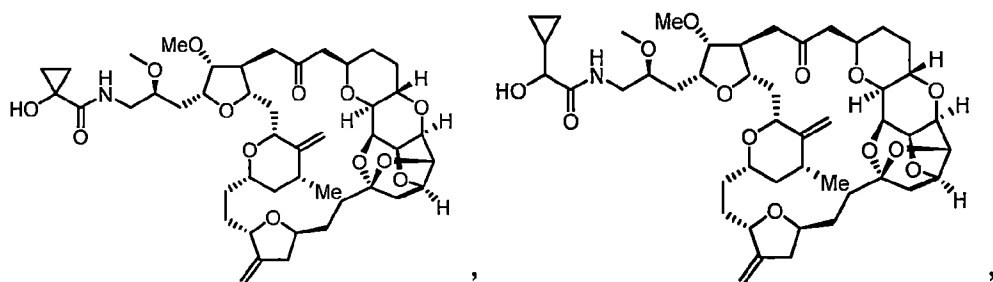
【0074】 在一些實施方案中，DZ (Eribulin) 所示化合物為：

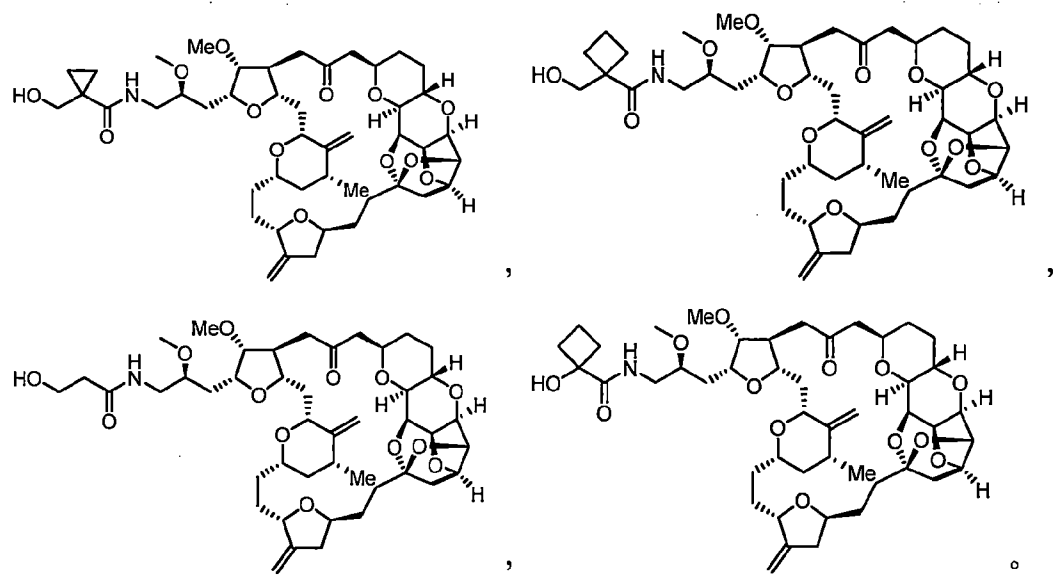


，或其可藥用的鹽，

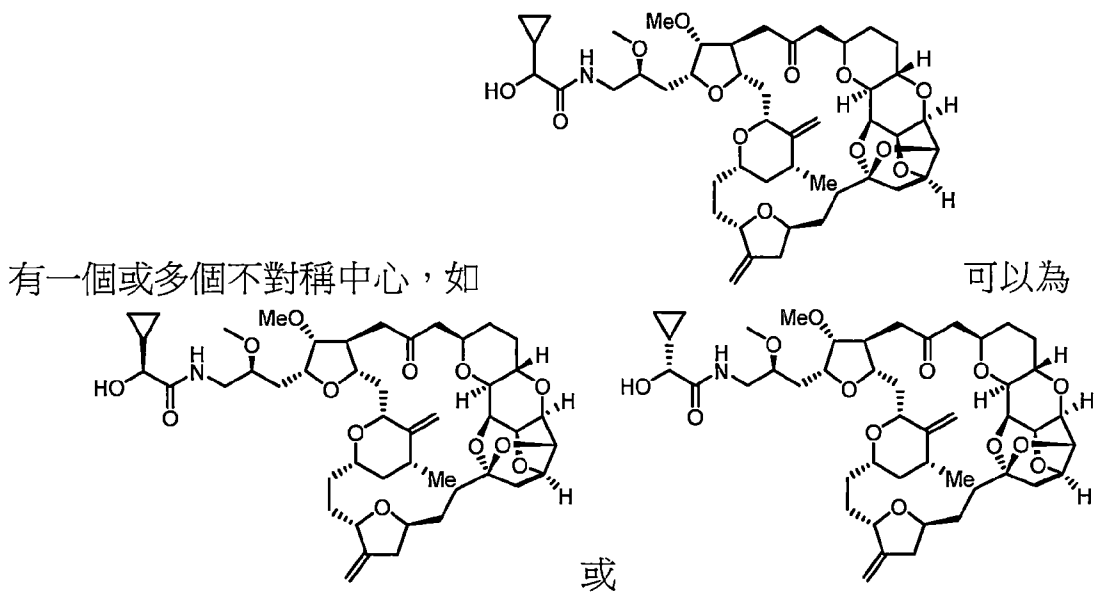
其中， R^8 選自氫、 C_{3-6} 環烷基烷基或 C_{3-6} 環烷基； R^9 選自氫、鹵烷基或 C_{3-6} 環烷基，較佳氫；或者， R^8 和 R^9 與其相連接的碳原子一起形成 C_{3-6} 環烷基； $m2$ 選自 0、1、2 或 3。

【0075】 在一些實施方案中，DZ (Eribulin) 所示化合物選自：





【0076】 另一方面，一些實施方案提供的 DZ (Eribulin)所示化合物可以含



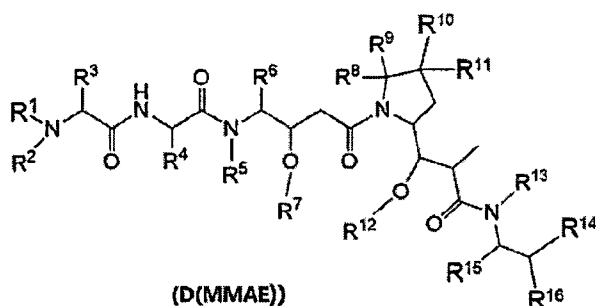
以上實施方案中，Pc 為本揭露任意的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；較佳為包含如 SEQ ID NO：28 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：29 所示的輕鏈的抗體，或包含如 SEQ ID NO：30 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：31 所示的輕鏈的抗體。

【0077】 一些具體實施方案中，本揭露的偶聯物包括其互變異構體、內消旋體、外消旋體、對映異構體、非對映異構體、氘代物、或其混合物形式。

【0078】 此處全文引入 CN202010073671.6 中化合物及其製備方法。

【0079】 配體-藥物(MMAE 或其衍生物)的偶聯物

【0080】 本揭露提供一種 MMAE 類似物/衍生物，其為如通式(D(MMAE))所示的化合物：



，或其可藥用的鹽，其中，

R¹-R⁶選自氫原子、鹵素、羥基、氰基、烷基、烷氧基和環烷基；

R⁷選自氫原子、烷基、烷氧基和環烷基；

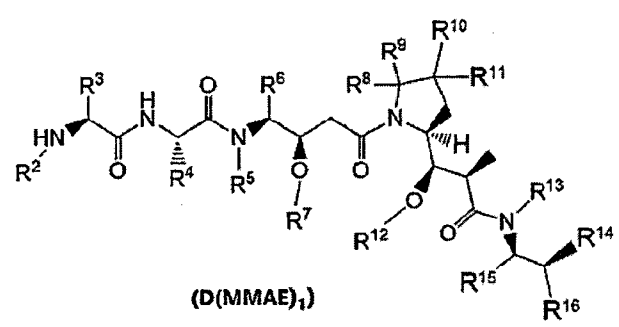
R⁸-R¹¹之中的任意兩個形成環烷基，餘下的兩個基團任選自氫原子、烷基和環烷基；

R¹²選自氫原子或烷基；

R¹³-R¹⁵選自氫原子、羥基、烷基、烷氧基或鹵素；

R¹⁶選自芳基或雜芳基，所述的芳基或雜芳基任選進一步被選自氫原子、鹵素、羥基、烷基、烷氧基和環烷基的取代基所取代。

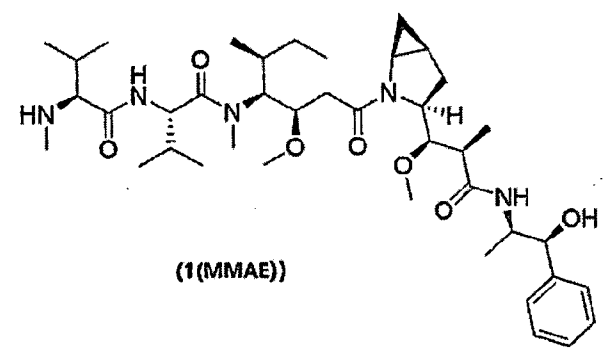
【0081】 在本揭露的一些實施方案中，所述的通式(D(MMAE))所示的化合物，其為通式(D(MMAE)₁)所示的化合物：



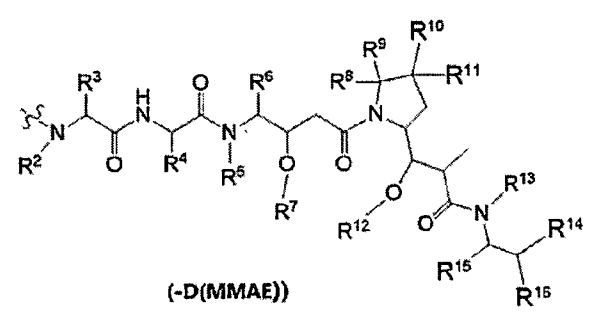
，或其可藥用的鹽，

R⁹與 R¹⁰形成環烷基；
R²-R⁸，R¹¹-R¹⁶如通式(D)中所定義。

【0082】 在本揭露的一些實施方案中，所述的通式(D(MMAE))所示的化合物，其為：



【0083】 本揭露的另一方面涉及一種配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述配體-藥物偶聯物包含式(-D(MMAE))所示的結構：



，或其可藥用的鹽，

其中，
R²-R⁶選自氫原子、鹵素、羥基、氰基、烷基、烷氧基和環烷基；

R^7 選自氫原子、烷基、烷氧基和環烷基；

R^8 - R^{11} 之中的任意兩個形成環烷基，餘下的兩個基團任選自氫原子、烷基和環烷基；

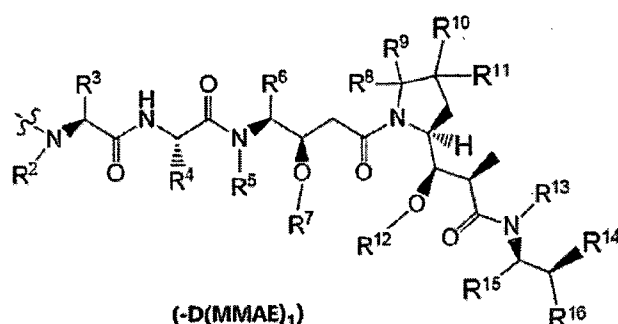
R^{12} 選自氫原子或烷基；

R^{13} - R^{15} 選自氫原子、羥基、烷基、烷氧基或鹵素；

R^{16} 選自芳基或雜芳基，所述的芳基或雜芳基任選進一步被選自氫原子、鹵素、羥基、烷基、烷氧基和環烷基的取代基所取代；

波浪線表示氫原子，或與接頭或與抗體共價連接。

【0084】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其包含式(-D(MMAE)₁)所示的結構：

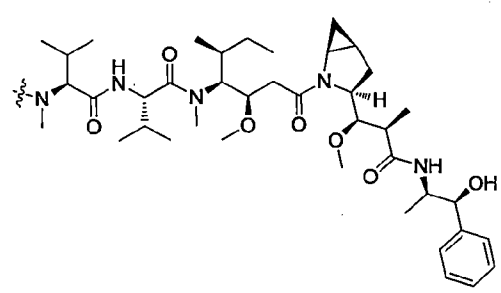


其中，

R^9 與 R^{10} 形成環烷基；

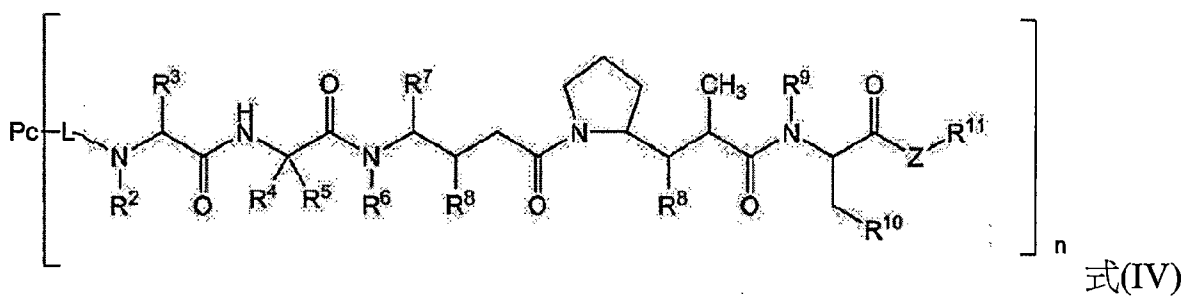
波浪線， R^2 - R^8 ， R^{11} - R^{16} 如通式(D(MMAE))中所定義。

【0085】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物包含式如下所示的結構：



【0086】 波浪線表示氫原子，或與接頭或與抗體共價連接。

【0087】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為通式(IV)所示：



- 其中，R²是 C₁-C₈烷基；
- R³是 C₁-C₈烷基；
- R⁴是 C₁-C₈烷基；
- R⁵是 H；
- R⁶是 C₁-C₈烷基；
- R⁷是 C₁-C₈烷基；
- R⁸彼此獨立，各自是 O-(C₁-C₈烷基)；
- R⁹是 H；
- R¹⁰是苯基；
- Z是 O 或 NH；
- R¹¹選自 H、C₁-C₂₀烷基或-(R¹³O)_m-R¹⁴；

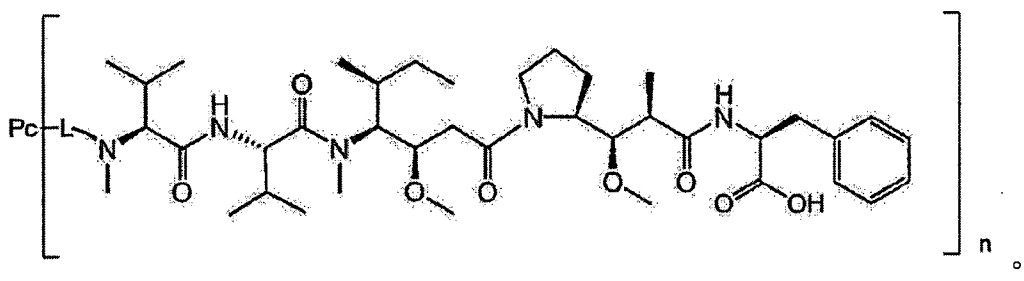
m 是 3 ；

R¹³ 是 C₂-C₈ 烷基 ；

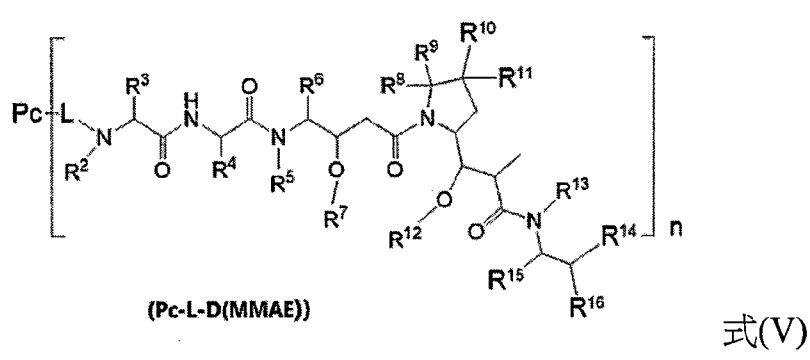
R¹⁴ 是 C₁-C₈ 烷基 ；

Pc 為本揭露的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段 ； L 為接頭 ； n 為 1 至 10 ，
可以為整數或小數 。

【0088】 在一些具體實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其包含下所示的結構：



【0089】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為通式(Pc-L-D(MMAE))所示：



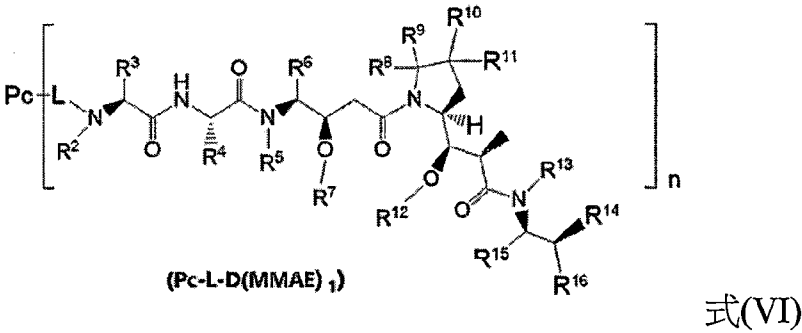
其中，

R²-R¹⁶ 如通式(D(MMAE))中所定義 ；

n 為 1 至 10 ，可以為整數或小數 ；

Pc 為本揭露的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段 ； L 為接頭 。

【0090】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為通式(Pc-L-D1)所示的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物：

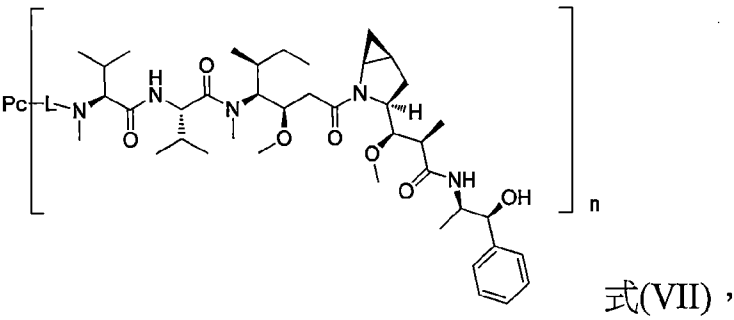


其中，

R²-R¹⁶ 如通式(-D(MMAE))中所定義；

Pc，L，n 如通式(Pc-L-D(MMAE))中所定義。

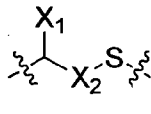
【0091】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為通式下所示：



Pc，L，n 如通式(Pc-L-D(MMAE))中所定義。

【0092】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 n 為 1 至 8，可以為整數或小數；較佳為 1 至 6，可以為整數或小數。

【0093】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中接頭為-Y-L¹-L²-L³-L⁴，

Y 為拉伸單元(stretcher unit)，選自  或化學鍵，X₁ 選自氫原子、烷基，烷氧基，芳基或鹵素，X₂ 選自伸烷基，所述的伸烷基任選進一步被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基的一個或多個取代基所取代；

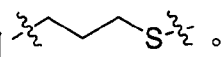
L¹ 為拉伸單元，選自-(琥珀醯亞胺-3-基-N)-W-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR¹⁷-W-C(O)-或-C(O)-W-C(O)-，其中 W 選自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-環烷基或 1 至 8 個原子的直鏈雜烷基，所述雜烷基包含 1 至 3 個選自 N、O 或 S 的雜原子，其中所述的 C₁₋₈ 烷基、環烷基和直鏈雜烷基各自獨立地任選進一步被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基的一個或多個取代基所取代；

L² 選自-NR¹⁸(CH₂CH₂O)p¹CH₂CH₂C(O)-、-NR¹⁸(CH₂CH₂O)p¹CH₂C(O)-、-S(CH₂)p¹C(O)-或化學鍵，其中 p¹ 為 1 至 20 的整數；較佳為化學鍵；

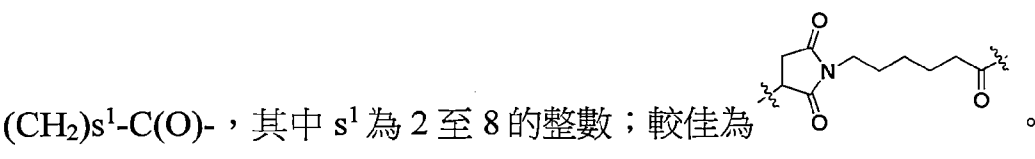
L³ 為由 2 至 7 個胺基酸構成的肽殘基，所述的胺基酸較佳自纈胺酸、瓜胺酸，甲基纈胺酸；其中胺基酸任選進一步被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基中的一個或多個取代基所取代；

R¹⁷ 和 R¹⁸ 相同或不同，且各自獨立地選自氫原子、烷基、鹵烷基、氘代烷基和羥烷基；

L⁴ 為延伸單元(extention unit)，較佳為 PAB。

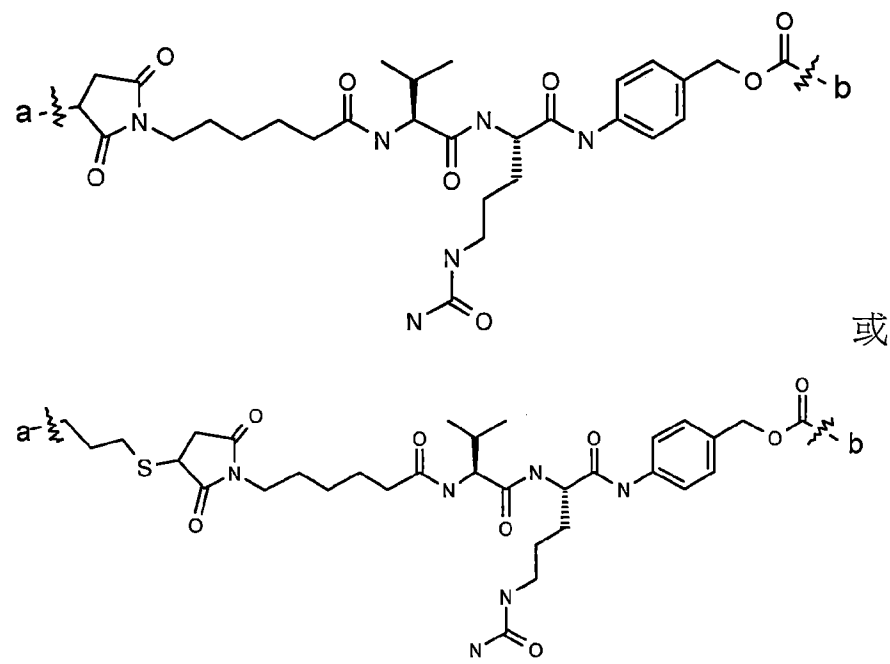
【0094】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 Y 為選自 。

【0095】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 L^1 選自-(琥珀醯亞胺-3-基-*N*)-



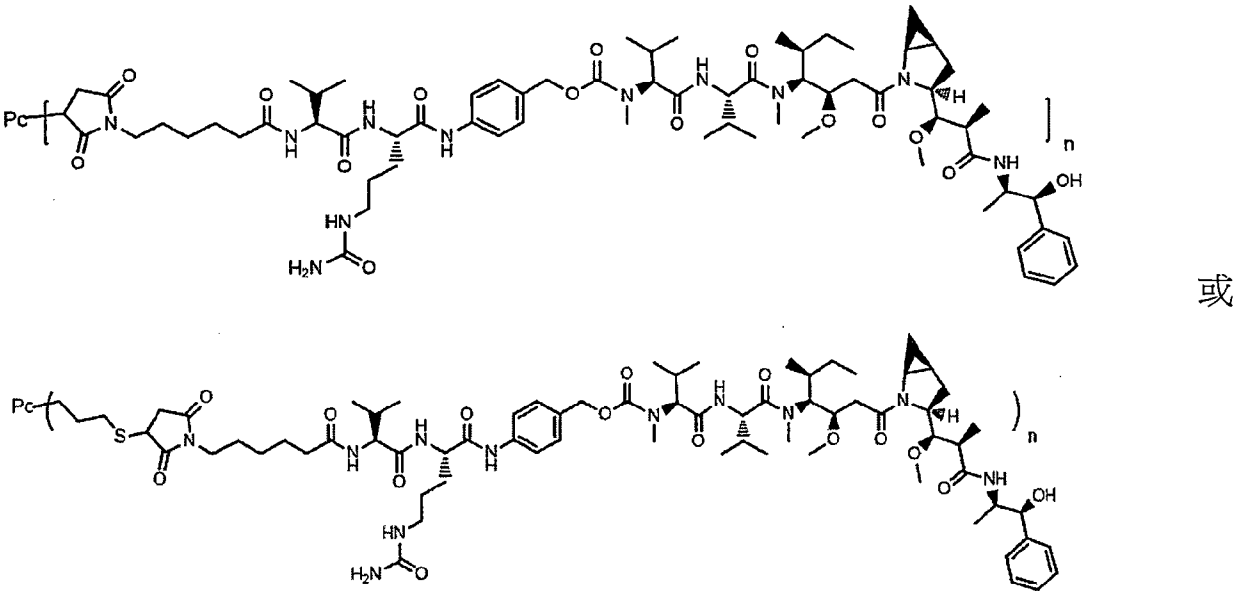
【0096】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 L^3 為二肽胺基酸單元，較佳自纈胺酸-瓜胺酸。

【0097】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中接頭選自：



【0098】 其中 a 端連接配體，b 端連接藥物。

【0099】 在本揭露的一些實施方案中，所述的配體-MMAE 或其衍生物的偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其選自以下結構式：

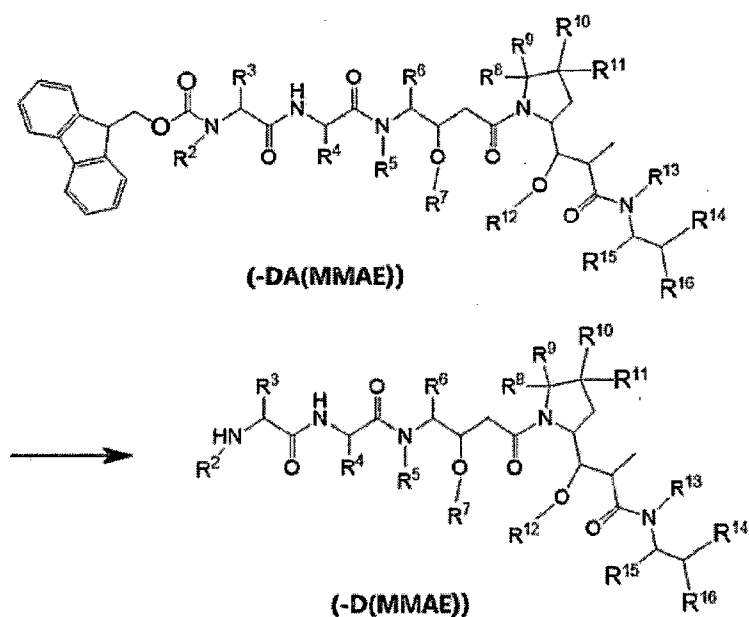


其中，

n 為 1 至 10，可以為整數或小數；

Pc 為本揭露的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；較佳包含如 SEQ ID NO：28 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：29 所示的輕鏈的抗體，或包含如 SEQ ID NO：30 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：31 所示的輕鏈的抗體。

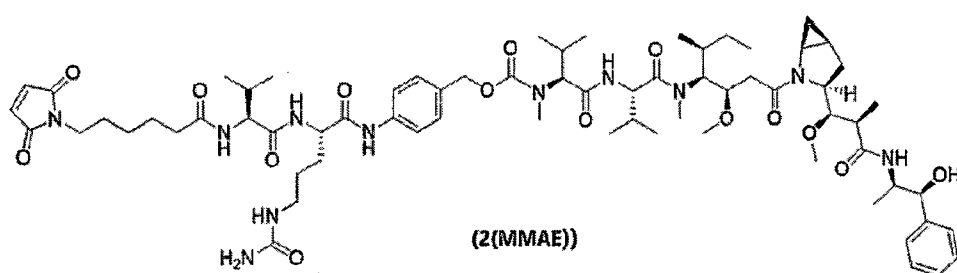
【0100】 本揭露的另一方面涉及一種製備如通式(D(MMAE))所示的化合物，或其可藥用的鹽的方法，其包括以下步驟：



【0101】 通式(-DA(MMAE))脫保護反應，得到通式(-D(MMAE))所示的化合物，

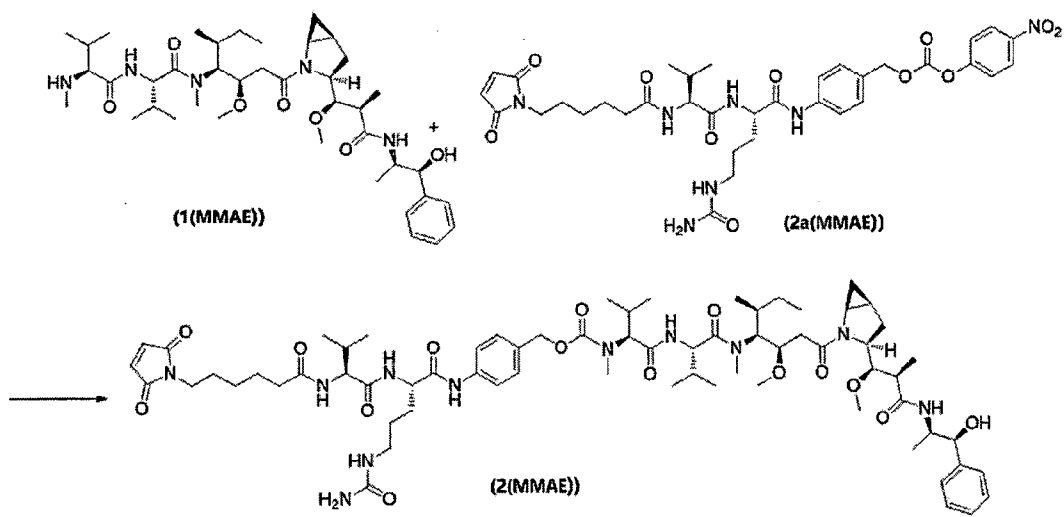
其中， R^2 - R^{16} 如通式(D)中所定義。

【0102】 本揭露的另一方面涉及一種如下所示的化合物：



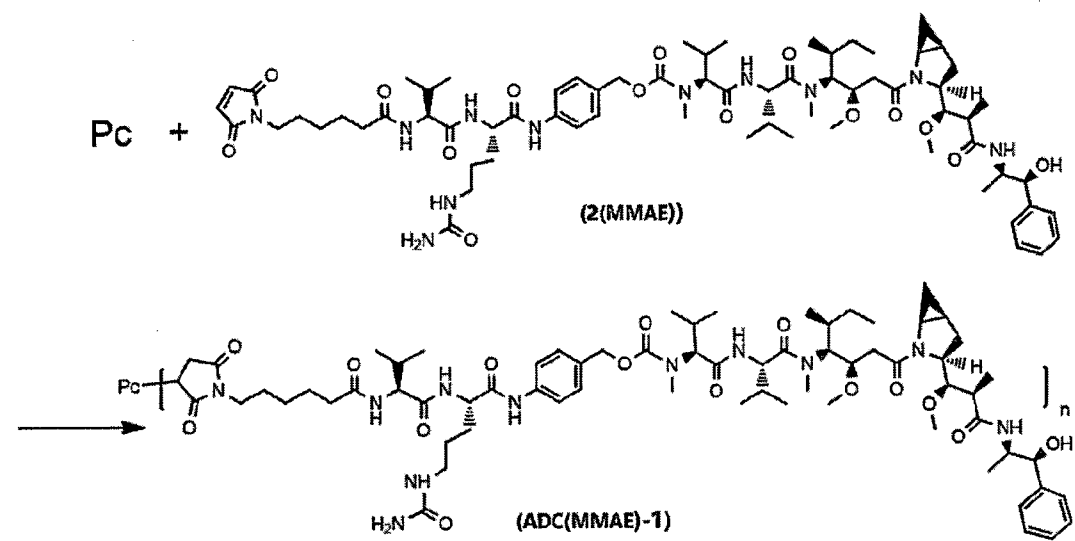
，或其可藥用的鹽，可作為製備本揭露配體-藥物偶聯物的中間體。

【0103】 本揭露的另一方面涉及一種製備化合物 2(MMAE)，或其可藥用的鹽的方法，其包括以下步驟：



【0104】 化合物 1(MMAE)和化合物 2a(MMAE)進行縮合反應，得到化合物 2(MMAE)。

【0105】 本揭露的另一方面涉及一種製備如通式(Pc-L-D (MMAE))所示的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物的方法，其包括以下步驟：



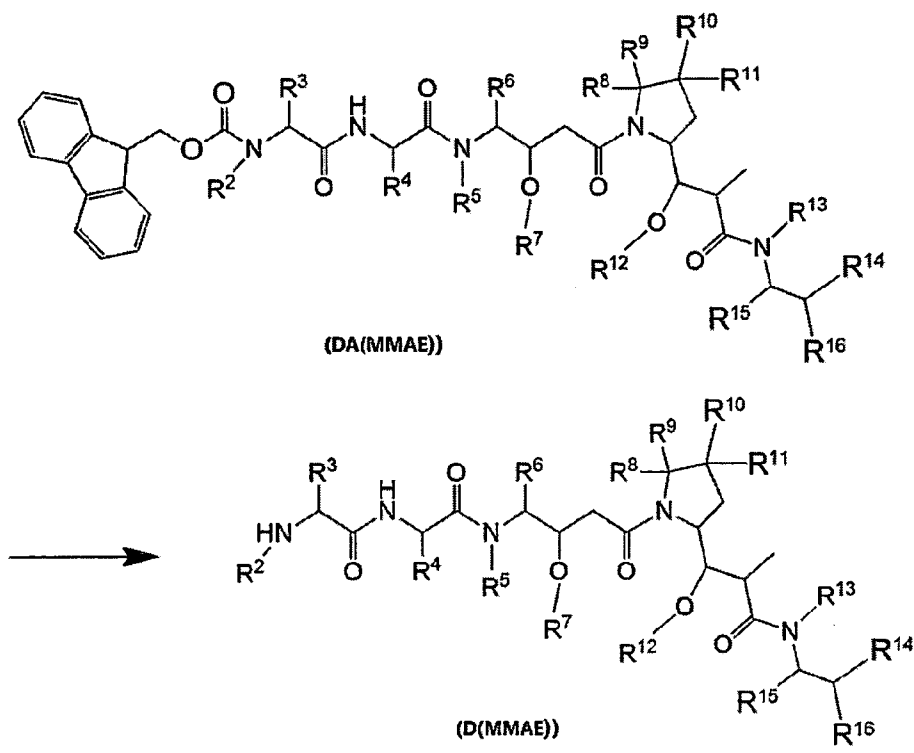
【0106】 還原 Pc 後，與化合物 2(MMAE)偶聯反應，得到通式 (ADC(MMAE)-1)所示的化合物；

其中，Pc，n 如通式(Pc-L-D(MMAE))中所定義。

【0107】 為了完成本揭露的 MMAE 及其衍射物合成目的，本揭露採用如下的合成技術方案：

【0108】 方案一：

本揭露通式(D(MMAE))所示的化合物，或其可藥用的鹽的方法，其包括以下步驟：



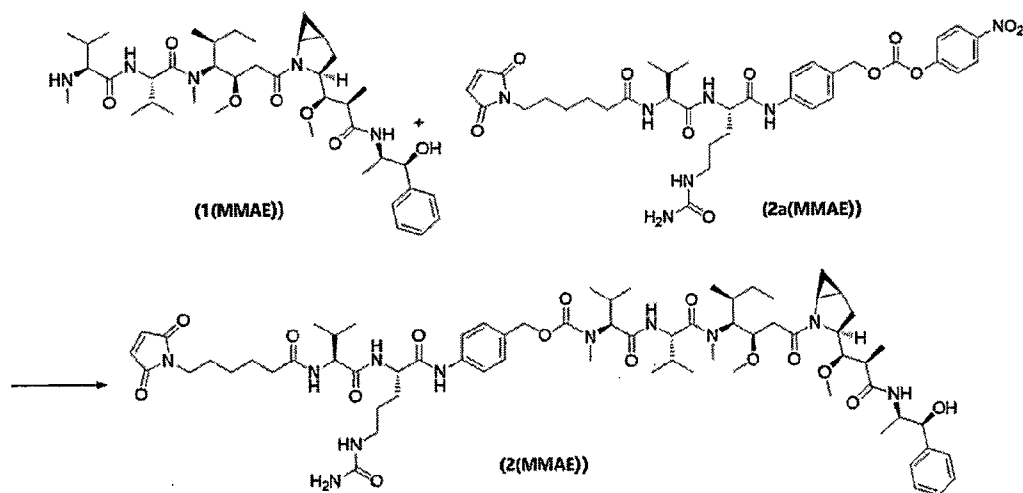
【0109】 通式(DA(MMAE))在鹼性條件下進行脫保護反應，得到通式(D(MMAE))所示的化合物，

其中，R²-R¹⁶如通式(D(MMAE))中所定義。

【0110】 提供鹼性條件的試劑包括有機鹼和無機鹼類，所述的有機鹼類包括但不限於三乙胺、二乙胺、*N*-甲基嗎啉、吡啶、六氫吡啶、*N,N*-二異丙基乙胺、正丁基鋰、二異丙基胺基鋰、醋酸鉀、第三丁醇鈉或第三丁醇鉀，所述的無機鹼類包括但不限於氫化鈉、磷酸鉀、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸銨、氫氧化鈉和氫氧化鋰；較佳二乙胺。

【0111】 方案二：

本揭露的化合物 2(MMAE)或其可藥用鹽或溶劑合物的製備方法，該方法包括：



【0112】 化合物(1(MMAE))和化合物(2a(MMAE))在鹼性條件下，加入縮合劑，進行縮合反應，得到化合物 2。

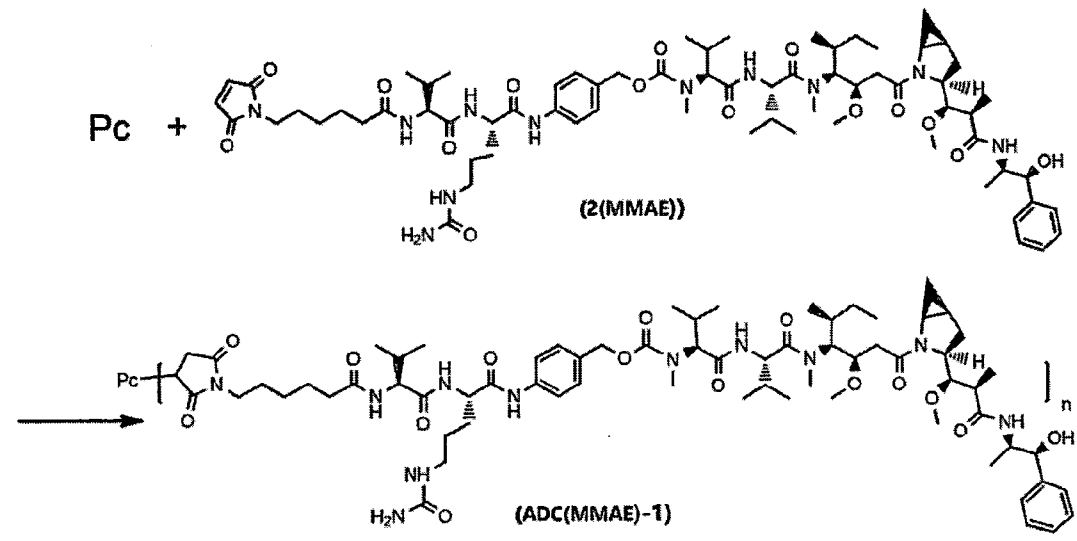
【0113】 提供鹼性條件的試劑包括有機鹼和無機鹼類，所述有機鹼類包括但不限於三乙胺、二乙胺、*N*-甲基嗎啉、吡啶、六氫吡啶、*N,N*-二異丙基乙胺、正丁基鋰、二異丙基胺基鋰、醋酸鉀、第三丁醇鈉或第三丁醇鉀，所述的無機鹼類包括但不限於氫化鈉、磷酸鉀、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸銨、氫氧化鈉和氫氧化鋰，較佳 *N,N*-二異丙基乙胺。

【0114】 縮合劑選自 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化嗎啉鹽、1-羥基苯并三唑和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽、*N,N'*-二環己基碳化二亞胺、*N,N'*-二異丙基碳二亞胺、*O*-苯并三唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲四氟硼酸酯、1-羥基苯并三唑、1-羥基-7-偶氮苯并三唑、*O*-苯并三唑-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、2-(7-偶氮苯并三唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯、苯并三唑-1-基氧基三(二甲基胺基)磷鎢六氟磷酸鹽或六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基

磷，較佳 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基氯化嗎啉鹽或 1-羥基苯并三唑和 1-(3-二甲胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽，較佳 1-羥基苯并三唑。

【0115】 方案三：

本揭露通式(Pc-L-D)所示的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物的方法，其包括以下步驟：

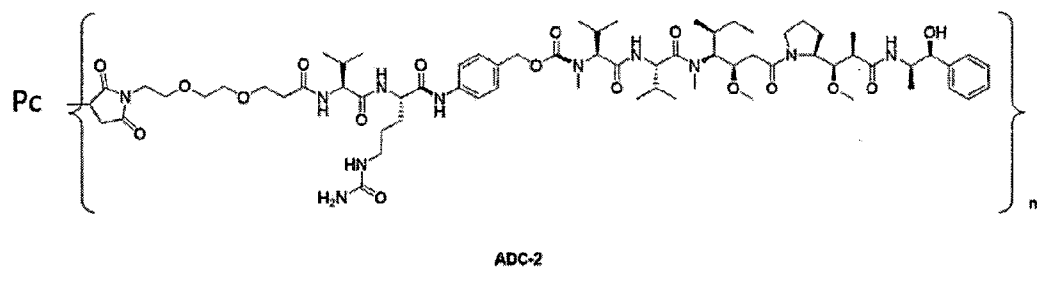


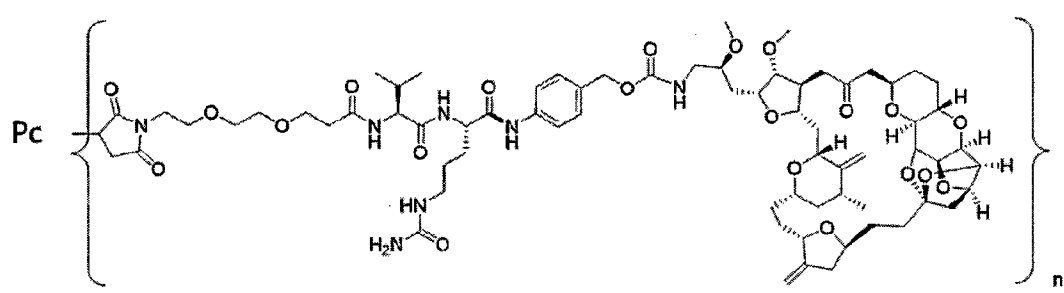
【0116】 還原 Pc 後，與化合物 2(MMAE)偶聯反應，得到通式 (ADC(MMAE)-1)所示的化合物；還原劑較佳 TCEP，特別地，較佳還原抗體上的二硫鍵；

其中，Pc，n 如通式(Pc-L-D(MMAE))中所定義。

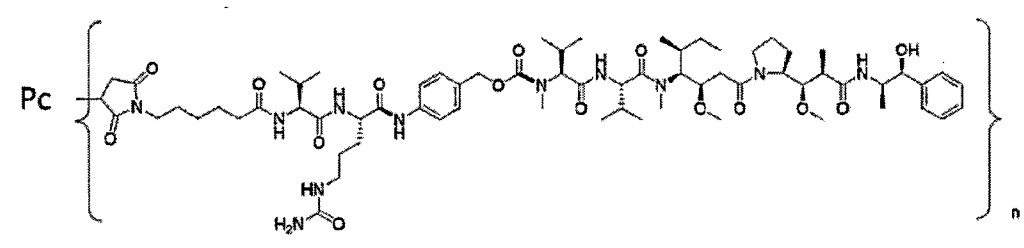
【0117】 實施例化合物

本揭露提供配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，選自：

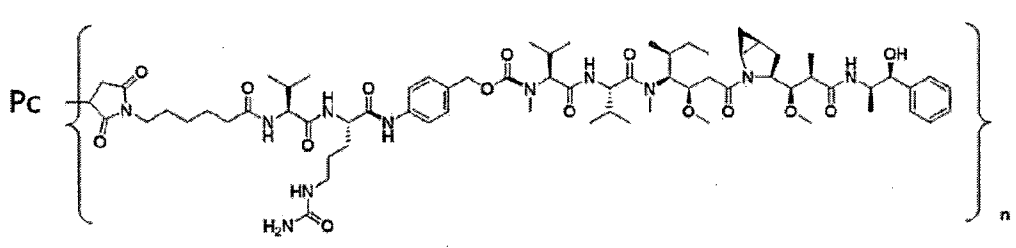




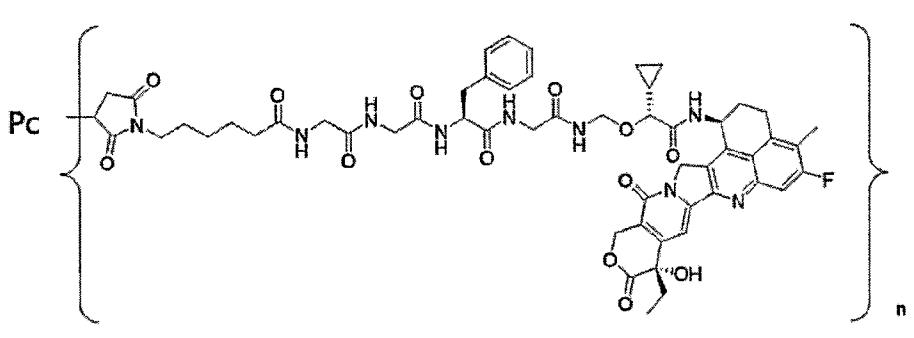
ADC-1



ADC-3



ADC-4



ADC-5

【0118】 其中，Pc 為本揭露任意抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，n 為 1 至 10，可以為整數或小數。

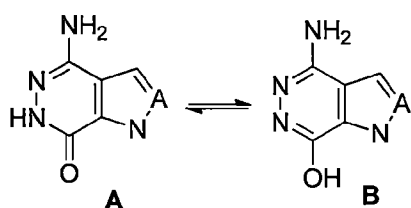
【0119】 一些具體實施方案中，Pc 為本揭露實施例中的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，例如為包含如 SEQ ID NO：28 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：

29 所示的輕鏈的抗體，或包含如 SEQ ID NO：30 所示的重鏈和如 SEQ ID NO：31 所示的輕鏈的抗體， n 為 1 至 6 之間的整數或小數。

【0120】 在一些具體的實施方案中，本揭露的抗體藥物偶聯物的平均 DAR 值可以為 1-10，例如 2-8，或 2-6，或 1-6，或 4-6 之間的任意值。

【0121】 雖然為簡便起見將全部上述結構式表示成特定的異構體形式，但是本揭露可以包括所有的異構體，如互變異構體、旋轉異構體、幾何異構體、非對映異構體、外消旋體和對映異構體。

【0122】 互變異構體是結構異構體，藉由被稱為互變異構化的化學反應容易相互轉化。這種反應常導致氫原子或質子的遷移，伴隨著單鍵和鄰近的雙鍵的轉換。一些常見的互變異構對為：酮-烯醇、內醯胺-內醯亞胺。內醯胺-內醯亞胺平衡示例是在如下所示的 A 和 B 之間。



【0123】 本揭露中的所有化合物可以被表示成 A 型或 B 型。所有的互變異構形式在本揭露的範圍內。化合物的命名不排除任何互變異構體。

【0124】 藥物組成物

本揭露進一步提供一種藥物組成物，其含有如上所述的偶聯物，以及可藥用的賦形劑、稀釋或載體。

【0125】 用途

本揭露進一步提供，選自以下的任一項或組合在製備藥物中的用途：根據本揭露的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段、根據本揭露的偶聯物、根據本揭露的

藥物組成物；其中，所述抗體或其抗原結合片段或其藥物偶聯物用於治療增殖性疾病或延緩增殖性疾病進展；所述增殖性病變可以是癌症或腫瘤；所述癌症或腫瘤選自淋巴瘤、彌漫大 B 細胞淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻擊性 NHL、復發性攻擊性 NHL、復發性無痛性 NHL、頑固性 NHL、頑固性無痛性 NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)，和/或套細胞淋巴瘤。

【0126】 治療方法

本揭露提供一種治療或預防增殖性疾病或延緩增殖性疾病進展的方法，該方法包括給予受試者治療或延緩疾病有效量的根據本揭露的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段、或根據本揭露的藥物組成物、或根據本揭露的抗體-藥物偶聯物；其中，所述增殖性病變是癌症或腫瘤。

【0127】 本揭露提供在有所需要的受試者中治療 B 細胞增殖性病變或自身免疫性病變或延遲 B 細胞增殖性病變或自身免疫性病變進展的方法。一些實施方案中，B 細胞增殖性病變為癌症或腫瘤。

【0128】 本揭露提供在具有細胞增殖性病變或自身免疫性病變的受試者中增強免疫功能的方法。一些實施方案中，所述細胞增殖性病變為癌症或腫瘤。

【0129】 上述方案中的癌症或腫瘤可以選自淋巴瘤、彌漫大 B 細胞淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻擊性 NHL、復發性攻擊性 NHL、復發性無痛性 NHL、頑固性 NHL、頑固性無痛性 NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)，和/或套細胞淋巴瘤。

【圖式簡單說明】**【0130】**

圖 1：人 CD79B ECD-hFc 蛋白免疫 Balb/c 小鼠血清效價 ELISA 檢測結果。

圖 2：人 CD79B ECD-hFc 蛋白免疫 Balb/c 小鼠血清效價 FACS 檢測結果。

圖 3：人 CD79B ECD-hFc 蛋白免疫 SJL 小鼠血清效價 ELISA 檢測結果。

圖 4：人 CD79B ECD-hFc 蛋白免疫 SJL 小鼠血清效價 FACS 檢測結果。

圖 5：人 CD79B ECD-his 蛋白免疫 SJL 小鼠血清效價 ELISA 檢測結果。

圖 6：人 CD79B ECD-his 蛋白免疫 SJL 小鼠血清效價 FACS 檢測結果。

圖 7：猴 CD79B ECD-his 蛋白免疫 SJL 小鼠血清效價 ELISA 檢測結果。

圖 8：抗人 CD79B 小鼠單株抗體 ELISA 檢測結果。

圖 9A 為抗人 CD79B 小鼠單株抗體的 FACS 檢測結果。

圖 9B 為抗人 CD79B 小鼠單株抗體 FACS 的檢測結果，其中 hIgG1 為陰性對照抗體，SN8 為陽性對照抗體。

圖 10：抗人 CD79B 小鼠單株抗體的交叉反應性的 FACS 檢測結果。

圖 11：抗猴 CD79B 小鼠單株抗體 ELISA 檢測結果。

圖 12A 至圖 12G：抗猴 CD79B 小鼠單株抗體與猴外周血單核細胞結合 FACS 檢測。圖 12A 是猴外周血單核細胞 FACS 檢測空白對照的結果；圖 12B 是陰性對照抗體與猴外周血單核細胞的 FACS 檢測結果；圖 12C 是陽性對照抗體與猴外周血單核細胞的 FACS 檢測結果；圖 12D 是抗 CD79B 抗體 mAb018 與猴外周血單核細胞的 FACS 檢測結果；圖 12E 是抗 CD79B 抗體 mAb019 與猴外周血單核細胞的 FACS 檢測結果；圖 12F 是抗 CD79B 抗體 mAb020 與猴外周血單核細胞的 FACS 檢測結果；圖 12G 是抗 CD79B 抗體 mAb021 與猴外周血單核細胞的 FACS 檢測結果。

胞的 FACS 檢測結果；圖 12G 是抗 CD79B 抗體 mAb021 與猴外周血單核細胞的 FACS 檢測結果。所使用的陽性對照是 Genentech 公司的 SN8。

圖 13A 至圖 13C 為不同 ADC 對人彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的療效。

圖 14：不同 ADC 對荷瘤裸小鼠體重的影響。

圖 15：不同 ADC 對人彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的療效。

圖 16：不同 ADC 對 WSU-DLCL2 荷瘤裸小鼠體重的影響。

圖 17：不同 ADC 對人彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的療效的腫瘤照片。

圖 18：不同 ADC 對人濾泡性淋巴瘤 DOHH-2 裸小鼠皮下移植瘤的療效。

圖 19：不同 ADC 對 DOHH-2 荷瘤裸小鼠體重的影響。

【實施方式】

【0131】 術語

【0132】 為了更容易理解本申請，以下具體定義了某些技術和科學術語。除顯而易見在本檔中的它處另有明確定義，否則本文使用的所有其他技術和科學術語都具有本申請所屬技術領域中具有通常知識者通常理解的含義。

【0133】 本申請所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如 J. Biol. Chem, 243, p3558(1968)中所述。

【0134】 “抗體” 以最廣義使用，涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體；單特異性抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)、全長抗體

和抗體片段(或抗原結合片段，或抗原結合部分)，只要它們展現出期望的抗原結合活性。抗體可以指免疫球蛋白，是由兩條重鏈和兩條輕鏈藉由鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈和 ϵ 鏈。根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，同一類 Ig 又可分為不同的亞類，如 IgG 可分為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈藉由恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。每類 Ig 都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

【0135】 抗體重鏈和輕鏈靠近 N 端的約 110 個胺基酸的序列變化很大，為可變區(V 區)；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區(C 區)。可變區包括 3 個高變區(CDR)和 4 個序列相對保守的骨架區(FR)。3 個高變區決定抗體的特異性，又稱為互補性決定區(CDR)。每條輕鏈可變區(VL)和重鏈可變區(VH)由 3 個 CDR 區 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1，LCDR2，和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。

【0136】 在本申請中，本申請所述的抗體輕鏈可變區可進一步包含輕鏈恆定區，所述的輕鏈恆定區包含人源或鼠源的 κ 、 λ 鏈或其變體。

【0137】 在本申請中，本申請所述的抗體重鏈可變區可進一步包含重鏈恆定區，所述的重鏈恆定區包含人源或鼠源的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體。

【0138】 術語“鼠源抗體”在本申請中為根據本領域知識和技能製備的對人 CD79B 或其表位的單株抗體。製備時用 CD79B 抗原注射試驗物件，然後分離表達具有所需序列或功能特性的抗體的融合瘤。在本申請一個具體的實施方案中，

所述的鼠源 CD79B 抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區。

【0139】術語“全人抗體”包括具有人種系免疫球蛋白序列的可變和恆定區的抗體。本揭露的全人抗體可包括不由人種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基(如藉由體外隨機或位點特異性誘變或藉由體內體細胞突變所引入的突變)。然而，術語“全人抗體”不包括“人源化抗體”。

【0140】術語“人源化抗體(humanized antibody)”，也稱為 CDR 移植抗體(CDR-grafted antibody)，是指將非人 CDR 序列移植到人的抗體可變區框架中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量非人蛋白成分，從而誘導的強烈的免疫應答反應。為避免在免疫原性下降的同時引起活性的下降，可對所述的全人抗體可變區可進行最少反向突變，以保持活性。

【0141】術語“嵌合抗體(chimeric antibody)”，是將第一物種抗體的可變區與第二物種抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕第一物種抗體誘發的免疫應答反應。作為一個示例，建立嵌合抗體，要先建立分泌兔源性特異性單抗的兔，分離所述抗體，根據需要選殖全人抗體的恆定區基因，將兔可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入人載體中，最後在真核工業系統或原核工業系統中表達嵌合抗體分子。全人抗體的恆定區可選自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源 IgG1 或 IgG4 重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變後無 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用)毒性的 IgG1。

【0142】術語“抗原結合片段”包括：單鏈抗體(即全長重鏈和輕鏈)；Fab、修飾的 Fab、Fab’、修飾的 Fab’、F(ab’)₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、單結構域抗體(例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二價或三價或四價抗體、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一種的表位結合片段(參見例如 Holliger and Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136；Adair and Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217)。

【0143】產生和製備這些抗體片段的方法在本領域是公知的(參見例如 Verma 等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。Fab-Fv 形式首先揭露於 WO2009/040562，其二硫鍵穩定化形式 Fab-dsFv 首先揭露於 WO2010/035012。本揭露的抗原結合片段還包括描述於 WO2005/003169、WO2005/003170 和 WO2005/003171 中的 Fab 和 Fab’片段。多價抗體可包含多特異性例如雙特異性或可以是單特異性的(參見例如 WO92/22583 和 WO05/113605)，後者的一個示例是描述於 WO 92/22583 中的 Tri-Fab(或 TFM)。

【0144】術語“單鏈抗體”、“單鏈 Fv”或“scFv”意指包含藉由接頭連接的抗體重鏈可變結構域(或區域；VH)和抗體輕鏈可變結構域(或區域；VL)形成的分子。此類 scFv 分子可具有一般結構：NH₂-VL-接頭-VH-COOH 或 NH₂-VH-接頭-VL-COOH。合適的現有技術接頭由重複的 GGGGS 胺基酸序列或其變體組成，例如使用 1-4 個重複的變體 (Holliger 等人(1993)，Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 6444-6448)。可用於本揭露的其他接頭由 Alfthan 等人(1995)，Protein Eng.8:725-731，Choi 等人(2001)，Eur.J.Immuno 1.31:94-106，Hu 等人(1996)，Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov 等人(1999)，J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人(2001)，Cancer Immunol. 描述。

【0145】術語“CDR”是指抗體的可變結構域內主要促成抗原結合的 6 個高變區之一。通常，每個重鏈可變區中存在三個 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每個輕鏈可變區中存在三個 CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。所述 6 個 CDR 的最常用的定義之一由 Kabat E.A. 等人，(1991)Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242) 提供。如本文中使用的，CDR 的 Kabat 定義只應用於輕鏈可變結構域的 CDR1、CDR2 和 CDR3，以及重鏈可變結構域的 CDR2 和 CDR3。

【0146】可以使用各種公知方案中的任何一種來確定 CDR 的胺基酸序列邊界，包括“Kabat”編號規則(參見 Kabat 等人(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD)、“Chothia”編號規則(參見 Al-Lazikani 等人，(1997)JMB 273：927-948)和 ImMunoGenTics(IMG)編號規則(Lefranc M.P.，Immunologist，7，132-136(1999)；Lefranc，M.P.等，Dev. Comp. Immunol.，27，55-77(2003)等。例如，對於經典格式，遵循 Kabat 規則，所述重鏈可變域(VH)中的 CDR 胺基酸殘基編號為 31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；輕鏈可變域(VL)中的 CDR 胺基酸殘基編號為 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 Chothia 規則，VH 中的 CDR 胺基酸編號為 26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；並且 VL 中的胺基酸殘基編號為 26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和 91-96(LCDR3)。藉由組合 Kabat 和 Chothia 兩者的 CDR 定義，CDR 由人 VH 中的胺基酸殘基 26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)和人 VL 中的胺基酸殘基 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)構成。遵循 IMG 規則，VH 中的 CDR 胺基酸殘基編號大致為 26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和 93-99(CDR3)。

99201

第 49 頁，共 130 頁(發明說明書)

102(CDR3)，VL 中的 CDR 胺基酸殘基編號大致為 27-32(CDR1)、50-52(CDR2) 和 89-97(CDR3)。遵循 IMGT 規則，抗體的 CDR 區可以使用程式 IMGT/DomainGap Align 確定。

【0147】術語“抗體框架”，是指可變結構域 VL 或 VH 的一部分，其用作該可變結構域的抗原結合環(CDR)的支架。從本質上講，其是不具有 CDR 的可變結構域。

【0148】本申請的術語“與 CD79B 結合”，指能與 CD79B 或其表位相互作用，所述 CD79B 或其表位可以是人源的。

【0149】術語“抗原”指用於免疫接種具有免疫活性的源自脊椎動物的分子，以產生識別抗原的抗體，或用於篩選表達文庫(例如尤其是噬菌體、酵母或核糖體展示文庫)。在本揭露中，抗原被更廣義地定義，包括由抗體特異性識別的靶分子，以及包括用於產生抗體的免疫接種過程或用於選擇抗體的文庫篩選中使用的分子的一部分或模擬物。對於本揭露的人 CD79B 以及人 CD79B 的截短變體和其它變體均被稱為抗原。

【0150】術語“表位”是指抗原上與免疫球蛋白或抗體結合的位點。表位可以由相鄰的胺基酸、或藉由蛋白質的三級折疊而並列的不相鄰的胺基酸形成。由相鄰的胺基酸形成的表位通常在暴露於變性溶劑後保持，而藉由三級折疊形成的表位通常在變性溶劑處理後喪失。表位通常以獨特的空間構象包括至少 3-15 個胺基酸。確定什麼表位由給定的抗體結合的方法在本領域中是熟知的，包括免疫印跡和免疫沉澱檢測分析等。確定表位的空間構象的方法包括本領域中的技術和本揭露所述的技術，例如 X 射線晶體分析法和二維核磁共振等。

【0151】術語“特異性結合”、“選擇性結合”是指抗體與預定的抗原上的表位結合。通常，當使用人 CD79B 或其表位作為分析物並使用抗體作為配體，在儀器中藉由表面電漿共振(SPR)技術測定時，抗體以大約低於 10^{-7}M 或甚至更小的平衡解離常數(KD)與預定的抗原或其表位結合，並且其與預定抗原或其表位結合的親和力是其與預定抗原(或其表位)或緊密相關的抗原之外的非特異性抗原(如 BSA 等)結合的親和力的至少兩倍。術語“識別抗原的抗體”在本揭露中可以與術語“特異性結合的抗體”互換使用。

【0152】術語“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是單鏈或雙鏈的，但較佳是雙鏈 DNA。

【0153】術語“載體”是指能夠運輸與其連接的另一個核酸的核酸分子。在一個實施方案中，載體是“質粒”，其是指可將另外的 DNA 區段連接至其中的環狀雙鏈 DNA 環。在另一個實施方案中，載體是病毒載體。本文中揭露的載體能夠在宿主細胞中自主複製(例如，具有細菌的複製起點的細菌載體和附加型哺乳動物載體)或可整合入宿主細胞的基因組，從而隨宿主基因組一起複製(例如，非附加型哺乳動物載體)。

【0154】術語“宿主細胞”是指已向其中引入了表達載體的細胞。宿主細胞可包括細菌、微生物、植物或動物細胞。易於轉化的細菌包括腸桿菌科(*enterobacteriaceae*)的成員，例如大腸桿菌(*Escherichia coli*)或沙門氏菌(*Salmonella*)的菌株；芽孢桿菌科(*Bacillaceae*)例如枯草芽孢桿菌(*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌(*Pneumococcus*)；鏈球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。適當的微生物包括釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

和畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。適當的動物宿主細胞系包括 CHO(中國倉鼠卵巢細胞系) 和 NS0 細胞。

【0155】 本揭露工程化的抗體或抗原結合片段可用一般方法製備和純化。譬如，編碼重鏈和輕鏈的 cDNA 序列，可以選殖並重組至 GS 表達載體。重組的免疫球蛋白表達載體可以穩定地轉染 CHO 細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表達系統會導致抗體的糖基化。陽性的純株在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用一般技術純化。譬如，用 A 或 G Sepharose FF 柱進行純化。洗去非特異性結合的組分。再用 pH 梯度法沖提結合的抗體，用 SDS-PAGE 檢測抗體片段，收集。抗體可用一般方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用一般方法去除，譬如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70°C，或者凍乾。

【0156】 胺基酸序列“同一性”指在比對胺基酸序列及必要時引入 gap，以達成最大序列同一性百分比(且不將保守性取代視為序列同一性的一部分)，第一序列中與第二序列中相同的胺基酸殘基的百分比。為測定胺基酸序列同一性百分比，比對可以藉由屬於本領域技術的範圍內的多種方式來實現，例如使用電腦軟體，諸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign(DNASTAR)軟體。所屬技術領域中具有通常知識者可確定適用於測量比對的參數，包括在所比較的序列全長上達成最大比對所需的任何演算法。

【0157】 術語“交叉反應”是指本申請的抗體與來自不同物種的 CD79B 結合的能力。例如，結合人 CD79B 的本申請的抗體也可以結合另一物種的 CD79B。交叉反應性是藉由在結合測定(例如 SPR 和 ELISA)中檢測與純化抗原的特異性反應性，或與表達 CD79B 的細胞的結合或功能性相互作用來測量。確定交叉反

應性的方法包括如本文所述的標準結合測定，例如表面電漿共振分析，或流式細胞術。

【0158】術語“抑制”或“阻斷”可互換使用，並涵蓋部分和完全抑制/阻斷這兩者。對 CD79B 的抑制/阻斷較佳地降低或改變無抑制或阻斷的情況下發生 CD79B 結合時出現活性的正常水準或類型。抑制和阻斷也旨在包括與抗 CD79B 抗體接觸時，與未與抗 CD79B 抗體接觸的 CD79B 相比，任何可測量的 CD79B 結合親和力降低。

【0159】術語“抑制生長”(例如涉及細胞)旨在包括細胞生長任何可測量的降低。

【0160】術語“誘導免疫應答”和“增強免疫應答”可互換使用，並指對特定抗原刺激(即，被動或適應性的)的免疫應答。

【0161】本申請中所述的“ADCC”，即 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用，是指表達 Fc 受體的細胞藉由識別抗體的 Fc 段直接殺傷被抗體包被的靶細胞。可藉由對 IgG 上 Fc 段的修飾，降低或消除抗體的 ADCC 效應功能。所述的修飾指在抗體的重鏈恆定區進行突變，如選自 IgG1 的 N297A、L234A、L235A；IgG2/4 嵌合，IgG4 的 F235E、或 L234A/E235A 突變。

【0162】生產和純化抗體和抗原結合片段的方法在現有技術中熟知和能找到，如冷泉港的抗體實驗技術指南(5-8 章和 15 章)。如，可以用人 CD79B 或其片段免疫動物，所得到的抗體能被覆性、純化，並且可以用一般的方法進行胺基酸定序。抗原結合片段同樣可以用一般方法製備。所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 區加上一個或多個人 FR 區。人 FR 種系序列

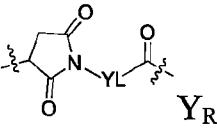
可以從 ImMunoGeneTics(IMGt)得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351 上獲得。

【0163】術語“藥物”是指細胞毒性藥物或免疫調節劑。細胞毒性藥物能在細胞內具有較強破壞其正常生長的化學分子。細胞毒性藥物原則上在足夠的濃度下都可以殺死細胞，但是由於缺乏特異性，在殺傷腫瘤細胞的同時，也會導致正常細胞的凋亡，導致嚴重的副作用。該術語包括毒素(如細菌、真菌、植物或動物來源的小分子毒素或酶活性毒素)、放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和 Lu 的放射性同位素)、化療藥物、抗生素和核溶酶。免疫調節劑是免疫關卡分子的抑制劑。

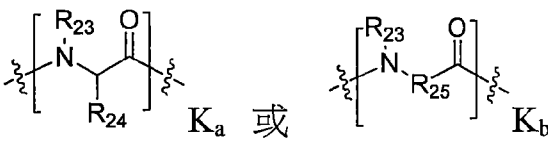
【0164】術語接頭是指一端與配體連接而另一端與藥物相連的片段或鍵，也可以連接其他接頭後再與配體或藥物相連。

【0165】接頭可以包含一種或多種接頭構件。示例性的接頭構件包括 6-馬來醯亞胺基己醯基(“MC”)、馬來醯亞胺基丙醯基(“MP”)、纈胺酸-瓜胺酸(“val-cit”或“vc”)、丙胺酸-苯丙胺酸(“ala-phe”)、對胺基苄氧羰基(“PAB”)、及那樣源自與接頭試劑的偶聯的：N-琥珀醯亞胺基 4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀醯亞胺基 4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1 羧酸酯(“SMCC”，在本文中也稱作“MCC”)和 N-琥珀醯亞胺基(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸酯(“SIAB”)。接頭可以包括拉伸單元、間隔單元、胺基酸單元和延伸單元，可以藉由本領域已知方法合成，諸如 US2005-0238649A1 中所記載的。接頭可以是便於在細胞中釋放藥物的“可切割接頭”。例如，可使用酸不穩定接頭(例如脛)、蛋白酶敏感(例如肽酶敏感)接頭、光不穩定接頭、二甲基接頭、或含二硫化物接頭(Chari 等, *Cancer Research* 52: 127-131(1992)；美國專利 No.5,208,020)。

【0166】術語“胺基酸單元”是指如果存在延伸單元的情況下，可以將以下結構式 Y_R 中的羰基與延伸單元相連，如果沒有延伸單元的情況下，可以將 Y_R 直接連接在藥物上的胺基酸，在本揭露實施方案中，胺基酸單元表示為 $-K_k-$ ：

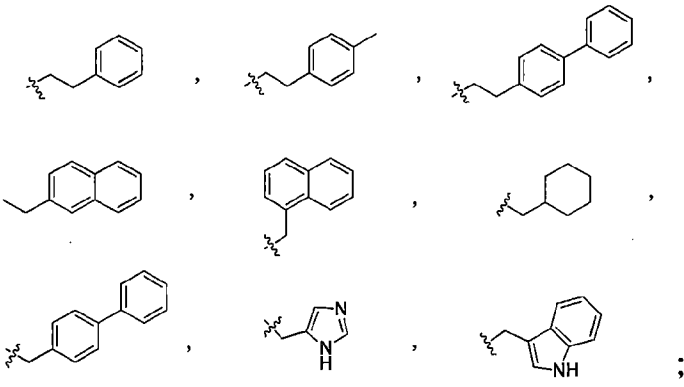


$-K_k-$ 是二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽或十肽， $-K-$ 單元各自獨立地具有以下結構式 K_a 或 K_b ， k 是 0-10 之間的一個整數：



其中，

上述胺基酸單元中的 R_{23} 為 $-H$ 或甲基；
 R_{24} 為 H 、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苄基、對羥基苄基、 $-CH_2OH$ 、 $-CH(OH)CH_3$ 、 $-CH_2CH_2SCH_3$ 、 $-CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2COOH$ 、 $-CH_2CH_2CONH_2$ 、 $-CH_2CH_2COOH$ 、 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NH_2$ 、 $-(CH_2)_3NHCOCH_3$ 、 $-(CH_2)_3NHCHO$ 、 $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHCOCH_3$ 、 $-(CH_2)_4NHCHO$ 、 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 、 $-(CH_2)_4NHCONH_2$ 、 $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$ 、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基，



R_{25} 為-芳基-、-烷基-芳基-、-環烷基-、-烷基-環烷基-、-環烷基-烷基-、-烷基-環烷基-烷基-、-雜環基-、-烷基-雜環基-、-雜環基-烷基-、-烷基-雜環基-烷基-、-芳基-、-烷基-芳基-、-芳基-烷基-、-烷基-芳基-烷基-、-雜芳基-、-烷基-雜芳基-、-雜芳基-烷基-、-烷基-雜芳基-烷基-。

【0167】 在一個實施方案中，- K_k -為二肽，較佳為-纈胺酸-瓜胺酸-、-苯丙胺酸-賴胺酸-或-N-甲基纈胺酸-瓜胺酸-，進一步較佳為-纈胺酸-瓜胺酸-。

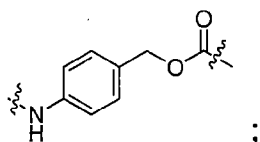
【0168】 術語“拉伸單元”指一端藉由碳原子與配體共價連接而另一端藉由硫原子與藥物(直接或間接)相連的化學結構片段。

【0169】 術語“間隔單元”是一種雙功能化合結構片段，可用於偶聯接頭和藥物最終形成配體藥物偶聯物，這種偶聯方式可以將藥物選擇性的連接到接頭上。

【0170】 術語“胺基酸”是指分子結構中含有胺基和羧基、並且胺基和羧基都直接連接在-CH-結構上的有機化合物。通式是 $H_2NCHRCOOH$ 。根據胺基連結在羧酸中碳原子的位置，可分為 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ-胺基酸。在生物界中，構成天然蛋白質的胺基酸具有其特定的結構特點，即其胺基直接連接在 α -碳原子上，即 α -胺基酸。

【0171】 術語“延伸單元”是指當胺基酸單元存在的情況下，可以將胺基酸單元與藥物偶聯，或當胺基酸單元不存在時，可藉由與 YR 上羰基與藥物偶聯的化學結構。

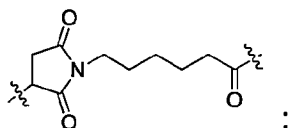
【0172】 本揭露中延伸單元為 PAB，結構如 4-亞胺基苄基胺甲醯基片段，其結構如式下式所示，連接在 D 上，



【0173】 縮寫

接頭組件包括但不限於：

MC=6-馬來醯亞胺基己醯基，結構如下：



Val-Cit 或“vc”=纈胺酸-瓜胺酸(蛋白酶可切割接頭中的例示二肽)；

瓜胺酸=2-胺基-5-脲基戊酸；

PAB=對胺基苄氧羰基(“自我犧牲”接頭組件的例示)；

Me-Val-Cit=N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸(其中接頭肽鍵已經修飾以防止其受到組織蛋白酶 B 的切割)；

MC(PEG)6-OH=馬來醯亞胺基己醯基-聚乙二醇(可附著於抗體半胱胺酸)；

SPP=N-琥珀醯亞胺基 4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯；

SPDP=N-琥珀醯亞胺基 3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯；

SMCC=琥珀醯亞胺基-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯；

IT=亞胺基硫烷；

PBS=磷酸緩衝鹽溶液；

術語“抗體-藥物偶聯物”(antibody drug conjugate, ADC)，指配體藉由接頭(或連接單元)與藥物相連。在本揭露中“抗體-藥物偶聯物”指把單株抗體(或抗原結合片段)藉由連接單元與具有毒性藥物相連。

【0174】術語“載藥量”(Drug-to-Antibody Ratio, DAR)是指抗體-藥物偶聯物群體中，每個抗體所偶聯的藥物的平均數量，也可以表示為藥物量和抗體量的比值。載藥量的範圍可以是每個抗體(Ab)連接 1-20 個，較佳 1-10 個藥物(D)。在本揭露的實施方案中，載藥量表示為 k 或 n，示例性的可以為 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或任意兩數值之間數值的均值。較佳 1-10，更佳 1-8，或 2-8，或 2-7，或 3-8，或 3-7，或 3-6，或 4-7，或 4-6，或 4-5 的均值。可用一般方法如 UV/可見光光譜法、質譜、ELISA 試驗、單抗分子大小變異體測定法(CE-SDS)和 HPLC 特徵測定載藥量。

【0175】本揭露單抗分子大小變異體測定法(CE-SDS)可採用十二烷基硫酸鈉毛細管電泳(CE-SDS)紫外檢測方法，在還原和非還原條件下，依據分子量大小，按毛電泳法(2015 年版《中國藥典》0542)，定量測定重組單株抗體產品的純度。

【0176】本揭露的一個實施方案中，藥物藉由連接單元偶聯在配體的 N 端胺基和/或賴胺酸殘基的 ϵ -胺基上，一般地，偶聯反應中能與抗體偶聯的藥物分子數將小於理論上的最大值。

【0177】可以用以下非限制性方法控制配體藥物偶聯物的載量，包括：

- (1) 控制連接試劑和單抗的莫耳比，
- (2) 控制反應時間和溫度，
- (3) 選擇不同的反應試劑。

【0178】雖然對於特定偶聯物分子而言，藥物對抗體比率具有確切值(例如，在式(I)中為 n)，但是應理解當用來描述含有許多分子的樣品時，該值將經常是平均值，這歸因於典型地與綴合步驟相關的某種程度的非均勻性。偶聯物的平

均載量在本文中稱為藥物對抗體比率或“DAR”。在一些實施例中，DAR 在約 1 與約 6 之間，並且典型地是約 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7.0、7.5、8.0。在一些實施例中，按重量計至少 50% 的樣品是具有平均 $\text{DAR} \pm 2$ 的化合物，並且較佳地至少 50% 的樣品是含有平均 $\text{DAR} \pm 1$ 的偶聯物。實施例包括其中 DAR 是約 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.4、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0 的免疫偶聯物。在一些實施例中，‘約為 x’ 的 DAR 意指 DAR 的測量值在 x 的 20 % 內。

【0179】 DAR 的檢測方法例如，從還原和去糖基化樣品的 LC-MS 資料外推出 DAR 值。LC/MS 允許定量 ADC 中連接至抗體的有效負載(藥物部分)分子的平均數。HPLC 將抗體分離成輕鏈和重鏈，並且還根據每條鏈的接頭-有效負載基團的數量分離重鏈(HC)和輕鏈(LC)。質譜資料能夠鑑定混合物中的組分種類，例如 LC、LC+1、LC+2、HC、HC+1、HC+2 等。根據 LC 和 HC 鏈的平均負載量，可以計算 ADC 的平均 DAR。給定免疫偶聯物樣品的 DAR 表示連接至含有兩條輕鏈和兩條重鏈的四聚體抗體的藥物(有效負載)分子的平均數。例如 WO2018142322 中的 DAR 檢測方法。

【0180】 術語“烷基”指飽和脂肪族烴基團，其為包含 1 至 20 個碳原子的直鏈或支鏈基團，較佳含有 1 至 12 個(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 個)碳原子的烷基，更佳含有 1 至 10 個碳原子的烷基，最佳含有 1 至 6 個碳原子的烷基。非限制性示例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁

基、第三丁基、第二丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基、正庚基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,2-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、正辛基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、正壬基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2,2-二乙基戊基、正癸基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基，及其各種支鏈異構體等。更佳的，烷基是含有 1 至 6 個碳原子的低級烷基，非限制性實例包括甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第三丁基、第二丁基、正戊基、1,1-二甲基丙基、1,2-二甲基丙基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、1-乙基-2-甲基丙基、1,1,2-三甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2-乙基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,3-二甲基丁基等。烷基可以是取代的或非取代的。當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，所述取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基、側氧基。

【0181】 術語“雜烷基”指含有一個或多個選自 N、O 或 S 的雜原子的烷基，其中烷基如上所定義。

【0182】術語“伸烷基”指飽和的直鏈或支鏈脂肪族烴基，其具有從母體烴的相同碳原子或兩個不同的碳原子上除去兩個氫原子所衍生的殘基，其為包含 1 至 20 個碳原子的直鏈或支鏈基團，較佳含有 1 至 12 個(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 個)碳原子，更佳含有 1 至 6 個碳原子的伸烷基。伸烷基的非限制性示例包括但不限於亞甲基(-CH₂-)、1,1-亞乙基(-CH(CH₃)-)、1,2-亞乙基(-CH₂CH₂-)、1,1-亞丙基(-CH(CH₂CH₃)-)、1,2-亞丙基(-CH₂CH(CH₃)-)、1,3-亞丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-亞丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)和 1,5-亞丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-)等。伸烷基可以是取代的或非取代的，當被取代時，取代基可以在任何可使用的連接點上被取代，所述取代基較佳獨立地任選選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基和側氧基中的一個或多個取代基所取代。

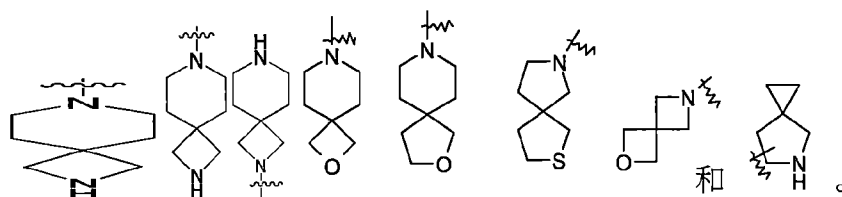
【0183】術語“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(環烷基)，其中烷基或環烷基的定義如上所述。烷氧基的非限制性示例包括：甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、環丙氧基、環丁氧基、環戊氧基、環己氧基。烷氧基可以是任選取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基。

【0184】術語“環烷基”指飽和或部分不飽和單環或多環的環狀烴取代基，環烷基環包含 3 至 20 個碳原子，較佳包含 3 至 12 個碳原子，更佳包含 3 至 10 個碳原子，最佳包含 3 至 8 個碳原子。單環環烷基的非限制性示例包括環丙基、

環丁基、環戊基、環戊烯基、環己基、環己烯基、環己二烯基、環庚基、環庚三烯基、環辛基等；多環環烷基包括螺環、稠環或橋環的環烷基。

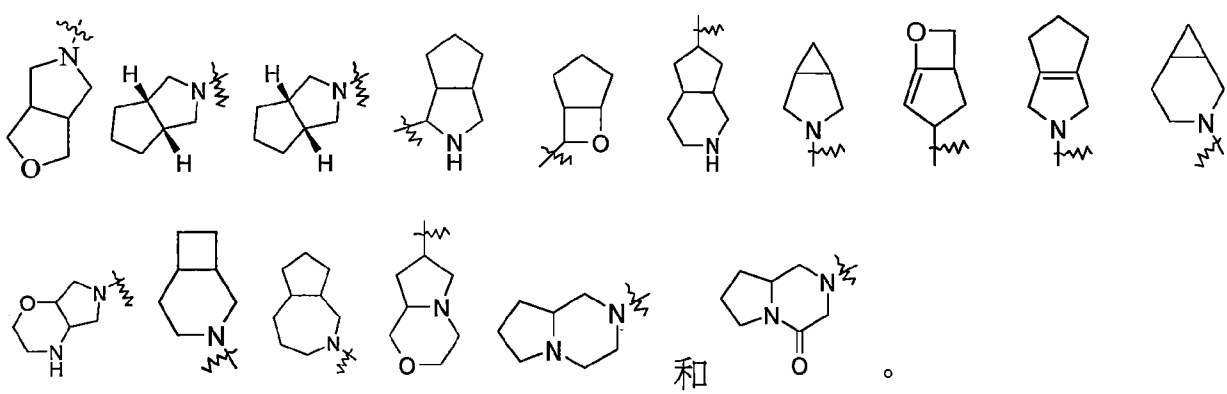
【0185】術語“雜環基”指飽和或部分不飽和單環或多環的環狀烴取代基，其包含 3 至 20 個環原子，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整數 0 至 2) 的雜原子，但不包括 -O-O-、-O-S- 或 -S-S- 的環部分，其餘環原子為碳。較佳包含 3 至 12 個環原子，其中 1 至 4 個是雜原子；更佳環烷基環包含 3 至 10 個環原子。單環雜環基的非限制性示例包括吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、嗎啉基、硫基嗎啉基、高哌嗪基等。多環雜環基包括螺環、稠環或橋環的雜環基。

【0186】術語“螺雜環基”指 5 至 20 員的環之間共用一個原子(稱螺原子)的多環雜環基團，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整數 0 至 2) 的雜原子，其餘環原子為碳。其可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統。例如為 6 至 14 員，又例如為 7 至 10 員。根據環與環之間共用螺原子的數目將螺雜環基分為單螺雜環基、雙螺雜環基或多螺雜環基，較佳為單螺雜環基或雙螺雜環基。例如為 4 員/4 員、4 員/5 員、4 員/6 員、5 員/5 員或 5 員/6 員單螺雜環基。螺雜環基的非限制性示例包括：

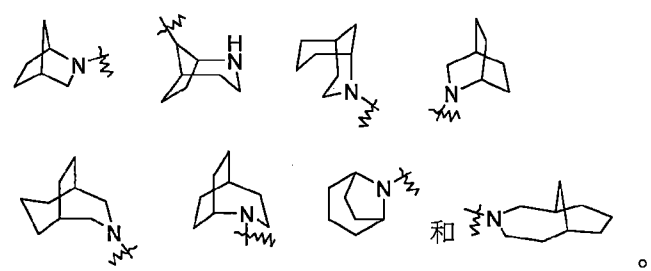


【0187】術語“稠雜環基”指 5 至 20 員，系統中的每個環與體系中的其他環共用毗鄰的一對原子的多環雜環基團，一個或多個環可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整數 0 至 2) 的雜原子，其餘環原子為碳。例如為 6 至 14 員，

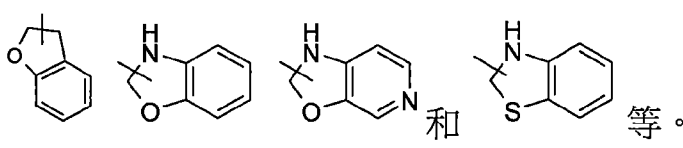
又例如為 7 至 10 員。根據組成環的數目可以分為雙環、三環、四環或多環稠雜環基，例如為雙環或三環，又例如為 5 員/5 員或 5 員/6 員雙環稠雜環基。稠雜環基的非限制性示例包括：



【0188】術語“橋雜環基”指 5 至 14 員，任意兩個環共用兩個不直接連接的原子，其可以含有一個或多個雙鍵，但沒有一個環具有完全共軛的 π 電子系統，其中一個或多個環原子為選自氮、氧或 $S(O)_m$ (其中 m 是整數 0 至 2) 的雜原子，其餘環原子為碳。例如為 6 至 14 員，又例如為 7 至 10 員。根據組成環的數目可以分為雙環、三環、四環或多環橋雜環基，例如為雙環、三環或四環，更佳為雙環或三環。橋雜環基的非限制性示例包括：

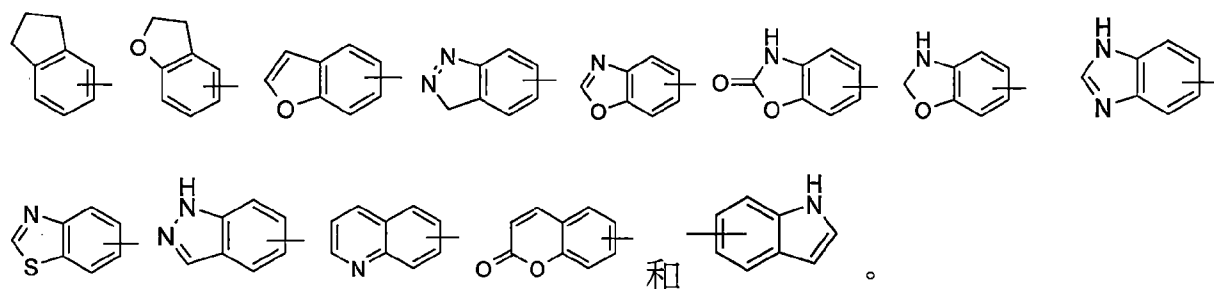


【0189】所述雜環基環可以稠合於芳基、雜芳基或環烷基環上，其中與母體結構連接在一起的環為雜環基，其非限制性示例包括：



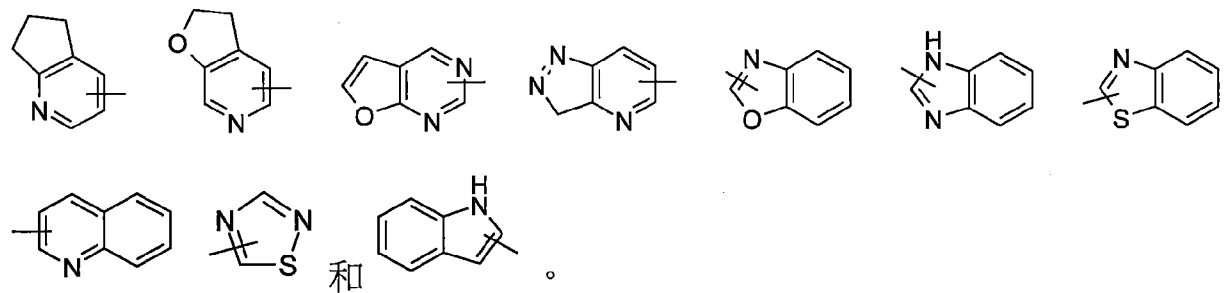
【0190】 雜環基可以是任選取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基、側氧基。

【0191】 術語“芳基”指具有共軛的 π 電子體系的 6 至 14 員全碳單環或稠合多環(也就是共用毗鄰碳原子對的環)基團，例如為 6 至 10 員，例如苯基和萘基，具體例如苯基。所述芳基環可以稠合於雜芳基、雜環基或環烷基環上，其中與母體結構連接在一起的環為芳基環，其非限制性示例包括：



【0192】 芳基可以是取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巰基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基。

【0193】 術語“雜芳基”指包含 1 至 4 個雜原子、5 至 14 個環原子的雜芳族體系，其中雜原子選自氧、硫和氮。雜芳基較佳為 5 至 10 員，更佳為 5 員或 6 員，例如呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基、四唑基等。所述雜芳基環可以稠合於芳基、雜環基或環烷基環上，其中與母體結構連接在一起的環為雜芳基環，其非限制性示例包括：



【0194】 雜芳基可以是任選取代的或非取代的，當被取代時，取代基較佳為一個或多個以下基團，其獨立地選自烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷硫基、烷基胺基、鹵素、巯基、羥基、硝基、氰基、環烷基、雜環烷基、芳基、雜芳基、環烷氧基、雜環烷氧基、環烷硫基、雜環烷硫基。

【0195】 術語“環烷基烷基”指烷基上的氫被一個或多個環烷基取代，較佳被一個環烷基取代，其中烷基如上所定義，其中環烷基如上所定義。

【0196】 術語“鹵烷基”指烷基上的氫被一個或多個鹵素取代，其中烷基如上所定義。

【0197】 術語“氘代烷基”指烷基上的氫被一個或多個氘原子取代，其中烷基如上所定義。

【0198】 術語“羥基”指-OH 基團。

【0199】 術語“鹵素”指氟、氯、溴或碘。

【0200】 術語“胺基”指-NH₂。

【0201】 術語“硝基”指-NO₂。

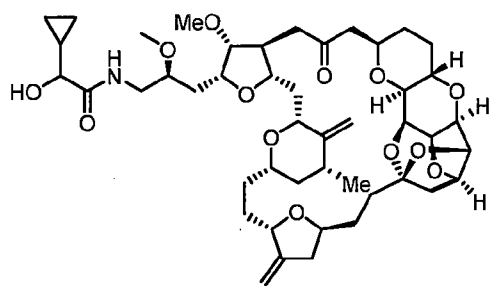
【0202】 化學式中簡稱“Me”為甲基。

【0203】 “任選地”或“任選”是指意味著隨後所描述的事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生的場合。例如“任選的被鹵素

或者氰基取代的 C1-C6 烷基”是指鹵素或者氰基可以但不必須存在，該說明包括烷基被鹵素或者氰基取代的情形和烷基不被鹵素和氰基取代的情形。

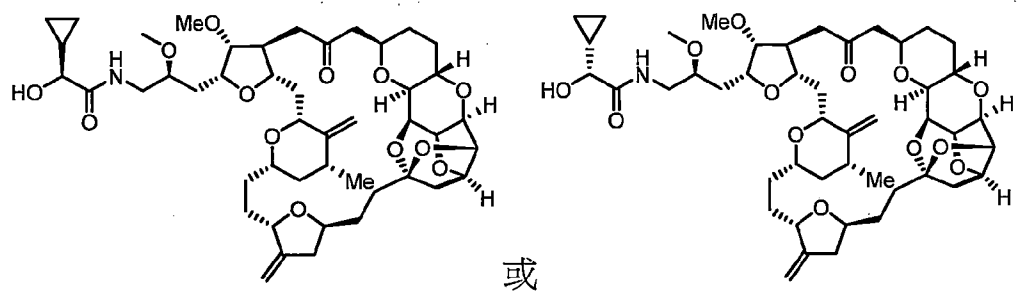
【0204】 本揭露中化合物可以含有一個或多個不對稱中心，因此可以產生對映異構體、非對映異構體、及可以根據絕對立體化學定義為(*R*)-或(*S*)-或用於胺基酸的(*D*)-或(*L*)-的其他立體異構形式。本揭露包括所有可能異構體以及其外消旋的和光學純的形式。光學活性的(+)和(-)、(*R*)-和(*S*)-或(*D*)-和(*L*)-異構體可以使用手性合成子或手性試劑製備，或者可以使用一般方法例如色譜法和分級結晶製備。用於製備/分離各個對映體的一般方法包括從合適的光學純前體手性合成或使用例如手性高壓液相色譜法(HPLC)的外消旋物(或鹽或衍生物的外消旋物)拆分。當本文描述的化合物含有烯雙鍵或其他幾何不對稱性中心，除非另有說明，否則其意味著所述化合物包括 E 和 Z 幾何異構體。而且，所有的互變異構形式也意味著包括在內。

【0205】 本揭露所述化合物的化學結構中，在未指明構型時，鍵“／”可以為“.....”或“／”，或者同時包含“.....”和“／”兩種構型。本揭露所述化合物的化學結構中，在未指明構型時，鍵“＝”可以為 Z 構型或 E 構型，或者同時包含兩種構型。



例如，

可以為



【0206】“立體異構體”指藉由相同的鍵而鍵合，但具有不同的三維結構的相同原子組成的化合物，其不可互換。本揭露中預期各種立體異構體及其混合物，並且包括“對映異構體”，其指其分子彼此為不能重疊的鏡像的兩種立體異構體。

【0207】本揭露所述化合物或其可藥用鹽、或其異構體的任何同位素標記的衍生物都被本揭露所覆蓋。能夠被同位素標記的原子包括但不限於氫、碳、氮、氧、磷、氟、氯、碘等。它們可分別被同位素同位素 2H(D)、3H、11C、13C、14C、15N、18F、31P、32P、35S、36Cl 和 125I 等代替。除另有說明，當一個位置被特別地指定為氘(D)時，該位置應理解為具有大於氘的天然豐度(其為 0.015%)至少 3000 倍的豐度的氘(即，至少 45%的氘摻入)。

【0208】“取代的”指基團中的一個或多個氫原子，較佳為最多 5 個，更佳為 1 至 3 個氫原子彼此獨立地被取代基取代。取代基僅處在它們的可能的化學位置，所屬技術領域中具有通常知識者能夠在不付出過多努力的情況下確定(藉由實驗或理論)可能或不可能的取代。例如，具有游離氫的胺基或羥基與具有不飽和(如烯)鍵的碳原子結合時可能是不穩定的。

【0209】術語“藥物組成物”表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前體藥物與其他化學組分的混合物，以及其他組分例如生理

學/可藥用的載體和賦形劑。藥物組成物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【0210】術語“藥學上可接受的鹽”或“可藥用鹽”是指本揭露配體-藥物偶聯物的鹽，或本揭露中所述的化合物的鹽，這類鹽用於受試者時具有安全性和有效性，且具有應有的生物活性。本揭露抗體-抗體藥物偶聯化合物至少含有一個胺基，因此可以與酸形成鹽，可藥用鹽的非限制性示例包括：鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、琥珀酸鹽、抗壞血酸鹽、草酸鹽、硝酸鹽、梨酸鹽、磷酸氫鹽、磷酸二氫鹽、水楊酸鹽、檸檬酸氫鹽、酒石酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽。

【0211】術語“溶劑合物”指本揭露的配體-藥物偶聯化合物與一種或多種溶劑分子形成可藥用的溶劑合物，溶劑分子的非限制性示例包括水、乙醇、乙腈、異丙醇、DMSO、乙酸乙酯。

【0212】本揭露涉及一類可裂解的特定結構的連接臂和特定結構的活性物，及由連接臂、活性物與抗體組成的抗體藥物偶聯物(ADC)。此類 ADC 是經由間隔物將一種毒性物質連於抗體而形成的複合物。該 ADC 在體內經降解而釋放出活性分子，從而起到抗腫瘤的作用。

【0213】術語“載體”當其用於本揭露的藥物組成物中時，是指能改變藥物進入受試者的方式和在體內的分佈、控制藥物的釋放速度並將藥物輸送到靶點的體系。藥物載體釋放和靶向系統能夠減少藥物降解及損失，降低副作用，提高生物利用度。如可作為載體的高分子表面活性劑由於其獨特的兩親性結構，可以進行自組裝，形成各種形式的聚集體，較佳的示例如膠束、微乳液、凝膠、液晶、

囊泡等。這些聚集體具有包載藥物分子的能力，同時又對膜有良好的滲透性，可以作為優良的藥物載體。

【0214】術語“賦形劑”是在藥物製劑中除活性成分以外的附加物，也可稱為輔料。如片劑中的黏合劑、填充劑、崩解劑、潤滑劑；半固體製劑軟膏劑、霜劑中的基質部分；液體製劑中的防腐劑、抗氧劑、矯味劑、芳香劑、助溶劑、乳化劑、增溶劑、滲透壓調節劑、著色劑等均可稱為賦形劑。

【0215】術語“稀釋劑”又稱填充劑，其主要用途是增加片劑的重量和體積。稀釋劑的加入不僅保證一定的體積大小，而且減少主要成分的劑量偏差，改善藥物的壓縮成型性等。當片劑的藥物含有油性組分時，需加入吸收劑吸收油性物，使保持“乾燥”狀態，以利於製成片劑。如澱粉、乳糖、鈣的無機鹽、微晶纖維素等。

【0216】“給予”、“施用”和“處理”當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組成物與動物、人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“給予”、“施用”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中所述流體與細胞接觸。“給予”、“施用”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合組成物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

【0217】“治療”意指給予受試者內用或外用治療劑，諸如包含本申請的任一種抗體或其抗原結合片段或其偶聯物的組成物，所述受試者已經患有、疑似患有、傾向於患有一種或多種疾病或其症狀，而已知所述治療劑對這些症狀具有治

療作用。通常，在受治療受試者或群體中以有效緩解一種或多種症狀的量給予治療劑，無論是藉由誘導這類症狀退化還是抑制這類症狀發展到任何臨床可測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量(也稱作“治療有效量”)可根據多種因素變化，例如受試者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在受試者產生需要療效的能力。藉由醫生或其他專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否已被減輕。儘管本申請的實施方案(例如治療方法或製品)在緩解某個受試者中目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢驗方法如 Student t 檢驗、卡方檢驗、依據 Mann 和 Whitney 的 U 檢驗、Kruskal-Wallis 檢驗(H 檢驗)、Jonckheere-Terpstra 核對總和 Wilcoxon 檢驗確定，其在統計學顯著數目的受試者中減輕目標疾病症狀。

實施例

【0218】 以下結合實施例用於進一步描述，但這些實施例並非限制的範圍。

【0219】 實施例或測試例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照一般條件，或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。參見 Sambrook 等人，分子選殖，實驗室手冊，冷泉港實驗室；當代分子生物學方法，Ausubel 等人著，Greene 出版協會，Wiley Interscience，NY。未註明具體來源的試劑，為市場購買的一般試劑。

【0220】 一、抗體的製備：

實施例 1-1. 蛋白抗原的選殖表達

抗體(包含輕、重鏈)和抗原用本領域公知的重疊延伸 PCR 方法構建，將重疊延伸 PCR 得到的 DNA 片段用 HindIII/BstBI 這兩個酶切位點插入到表達載體 pEE6.4(Lonza Biologics)中，在 293F 細胞(Invitrogen, Cat# R790-07)中表達得到。所得重組蛋白用於免疫或篩選。人 CD79B 胺基酸序列來源於 NCBI (NP_000617.1)，其細胞外區域(ECD)包含 159 個胺基酸(Met1-Asp159)。

【0221】 人 CD79B 細胞外區域(ECD)和人 Fc 區域融合蛋白(human CD79B ECD-hFc)的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 1 所示：

ARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMH CYMNSASGNVSWLWK
QEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEV
YQGCGTEL RVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTL LLIILFIIVPIFLLLDKDDSK
AGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEEP KSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 1。

【0222】 人 CD79B 細胞外區域(ECD)和 His 標籤的融合蛋白(human CD79B ECD-His)的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 2 所示：

ARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFTVKMH CYMNSASGNVSWLWK
QEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCNNTSEV
YQGCGTEL RVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTL LLIILFIIVPIFLLLDKDDSK
AGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQEHHHHHHH

【0223】 實施例 1-2. 小鼠單株抗體的製備**1、小鼠免疫和血清效價檢測**

以人 CD79B 細胞外區域(ECD)和人 Fc 區域融合蛋白(human CD79B ECD-hFc)以及人 CD79B 細胞外區域(ECD)和 His 標籤的融合蛋白(human CD79B ECD-His)分別作為免疫原，藉由腹腔注射法對 Balb/c 和 SJL 小鼠進行免疫，刺激小鼠體內產生針對人 CD79B 細胞外區域(ECD)的抗體。同時，以猴 CD79B 細胞外區域(ECD)和 His 標籤的融合蛋白(cyno CD79B ECD-His)作為免疫原，藉由腹腔注射法對 SJL 小鼠進行免疫，刺激小鼠體內產生針對猴 CD79B 細胞外區域(ECD)的抗體。

【0224】 實驗步驟如下：

1)腹腔注射免疫法。根據免疫程式計算出該次免疫所需的抗原量。蛋白抗原按照要求用 PBS 稀釋抗原到相應濃度，隨後進行抗原的乳化。將乳化好的抗原和佐劑混合物轉移到 2.0ml 無菌注射器中，注射入小鼠右側腹部。

2)小鼠血清的收集。將每隻小鼠對應的血清管做好標記；藉由小鼠頷下靜脈採取大約 100 μ L 全血，將收集的全血樣品室溫靜置大約 2h 後離心收集血清。將血清存放於 4 $^{\circ}$ C 冰箱，用於抗體效價等檢測。

3)免疫小鼠 ELISA 血清效價測定。以 1 μ g/ml 抗原濃度，每孔 50 μ L，4 $^{\circ}$ C 冰箱過夜包被 96 孔盤。次日，將包被好的盤清洗一次(清洗液：1 $\times$ PBST)。清洗後以 1 $\times$ PBST 配置的 1%BSA 封閉液 37 $^{\circ}$ C 封閉 1 小時。1 $\times$ PBST 洗盤 3 次後，加入不同稀釋濃度的待檢血清 37 $^{\circ}$ C 溫箱，孵育 1 小時。1 $\times$ PBST 洗盤 3 次後，加入 100 μ L 1:5000 稀釋的羊抗鼠二抗，37 $^{\circ}$ C 溫箱孵育 0.5 小時。洗盤後，取 TMB 顯

色液 A 液和 B 液 1：1 比例混合後顯色。15 分鐘後，用 1N 鹽酸終止顯色反應。在 Spectra Max M5 讀盤機上，檢測 450nm 的螢光值。

4) 免疫小鼠 FACS 血清效價測定。DoHH2 細胞或猴外周血單核細胞懸液離心後以含 0.1%BSA 的 PBS 重懸細胞後計數，加入各組的待測血清，室溫孵育 60 分鐘後清洗細胞三次後加入抗-Mouse IgG(Fc 特異性)-FITC 二抗，避光室溫孵育 30 分鐘後清洗細胞三次，用含 0.1%BSA 的 PBS 輕輕重懸細胞，上機檢測。

【0225】 各組小鼠血清效價 ELISA 和 FACS 檢測結果見圖 1 至圖 7。

【0226】 人 CD79B ECD-hFc 蛋白共免疫 5 隻 Balb/c 小鼠，編號為 5491、5492、5493、5494、5495。血清效價 ELISA 檢測結果見圖 1。結果表明，小鼠免疫血清效價達到 1:100K 以上。小鼠血清 FACS 檢測結果見圖 2，可見小鼠血清中產生的抗體可特異性識別 DoHH2 細胞表面的 CD79B 蛋白。

【0227】 人 CD79B ECD-hFc 蛋白共免疫 5 隻 SJL 小鼠，編號為 5496、5497、5498、5499、5500。血清效價 ELISA 檢測結果見圖 3。結果表明，小鼠免疫血清效價達到 1:100K 以上。小鼠血清 FACS 檢測結果見圖 4，可見小鼠血清中產生的抗體可特異性識別 DoHH2 細胞表面的 CD79B 蛋白。

【0228】 人 CD79B ECD-his 蛋白共免疫 5 隻 SJL 小鼠，編號為 5726、5727、5728、5729、5730。血清效價 ELISA 檢測結果見圖 5。結果表明，小鼠免疫血清效價達到 1:10K 以上。小鼠血清 FACS 檢測結果見圖 6，可見小鼠血清中產生的抗體可特異性識別 DoHH2 細胞表面的 CD79B 蛋白。

【0229】 猴 CD79B ECD-his 蛋白共免疫 5 隻 SJL 小鼠，編號為 5501、5502、5503、5504、5505。血清效價 ELISA 檢測結果見圖 7。結果表明，小鼠免疫血清效價達到 1:10K 以上。

【0230】藉由以上結果可知，免疫的小鼠中產生了針對 CD79B 的特異性抗體。以上小鼠可用於細胞融合以產生能夠分泌針對 CD79B 的特異性抗體的融合瘤細胞系。

【0231】 2、融合瘤製備和抗體篩選

利用電融合方法對免疫組小鼠的淋巴細胞和骨髓瘤細胞 SP2/0(ATCC, CCL-121™)進行融合，用於後續抗體篩選。

【0232】 1) 電融合實驗。融合前一週將 SP2/0 細胞於 10%DMEM 培養基中進行擴大培養。摘取小鼠脾臟和淋巴結，進行沖洗和研磨以收集淋巴細胞。將 SP2/0 和淋巴細胞按比例混合，藉由電融合儀進行融合。融合後，將細胞鋪於 96 孔盤中，37°C，5% CO₂ 培養箱中培養；每天觀察細胞狀態；融合後 5 天，統計細胞融合率。融合後 9-14 天對融合的融合瘤細胞進行篩選，挑選陽性孔中的細胞於 24 孔盤中擴大培養。

【0233】 2) 有限稀釋法進行亞選殖。將需要亞選殖的細胞株自 24 孔培養孔中重懸，進行計數。稀釋每株細胞株的濃度至 5-10 個細胞/ml；將稀釋好的細胞懸液加入 96 孔培養盤中，每孔加 0.2 ml，每孔含細胞為 1-2 個。將 96 孔盤放進 37°，5%CO₂ 培養箱中培養。7-10 天後，挑選陽性純株至 24 孔進行進一步確認。

【0234】 3) ELISA 篩選。以 1μg/ml 抗原濃度，每孔 50μL，4°C 冰箱過夜包被 96 孔盤。次日，將包被好的抗原盤清洗一次(清洗液：1×PBST)。清洗後以 1×PBST 配置的 1% BSA 封閉液 37°C 封閉 1 小時。1×PBST 洗盤 3 次後，加入 50μL 待檢細胞上清 37°C 溫箱，孵育 1 小時。1×PBST 洗盤 3 次後，加入 100μL 1:5000 稀釋的羊抗鼠二抗，37°C 溫箱孵育 0.5 小時。洗盤後，取 TMB 顯色液 A

液和 B 液 1:1 比例混合後顯色。15 分鐘後，用 1N 鹽酸終止顯色反應。在 Spectra Max M5 讀盤機上，檢測 450nm 的螢光值。

【0235】 4)FACS 篩選。DoHH2 細胞懸液離心後，以含 0.1%BSA 的 PBS 重懸細胞，並計數；加入待測上清，室溫孵育 60 分鐘，清洗細胞後加入抗-小鼠 IgG(Fc 特異性)-FITC 二抗，避光室溫孵育 30 分鐘；清洗細胞三次，用含 0.1%BSA 的 PBS 輕輕重懸細胞，上機檢測。

【0236】 5)融合瘤陽性選殖鑑定。獲得多個針對人 CD79B 抗原的特異性抗體；對其中 ELISA 和 FACS 測試中結合力最好的 17 株融合瘤進行抗體的生產和純化。抗人 CD79B 融合瘤陽性選殖的 ELISA 檢測結果見表 1。抗人 CD79B 融合瘤陽性選殖的 FACS 檢測結果見表 2。也獲得了針對猴 CD79B 抗原的特異性抗體，對其中 ELISA 和 FACS 測試中結合力最好的 4 株融合瘤進行抗體的生產和純化。抗猴 CD79B 融合瘤陽性選殖細胞的 ELISA 檢測結果見表 3。抗猴 CD79B 融合瘤陽性選殖細胞的 FACS 檢測結果見表 4。均使用 mIgG 作為陰性對照。

【0237】表 1. 抗人 CD79B 融合瘤陽性選殖的 ELISA 檢測結果

抗體編號	選殖號	檢測結果(OD450)
陰性對照	mIgG	0.05
mAb001	12A11-1G1	3.26
mAb002	19F10-1D7	3.69
mAb003	51E5G6	3.02
mAb004	67B10C1	3.41
mAb005	78A9F4	3.73
mAb006	48F11D6	3.34
mAb007	61A11F1	3.40
mAb008	63G2A2	3.56
mAb009	75F1E2	3.57
mAb010	66G3E7	3.83
mAb011	66E12H3	3.41
mAb012	73A8F3	3.45
mAb013	74C4F3	3.31
mAb014	70B8B3	3.10
mAb015	83B2G2	3.41
mAb016	83C2D4	3.46
mAb017	86F11F6	3.80

【0238】表 2. 抗人 CD79B 融合瘤陽性選殖的 FACS 檢測結果

抗體編號	選殖號	平均螢光值
陰性對照	mIgG	58
mAb001	12A11-1G1	13032
mAb002	19F10-1D7	5943
mAb003	51E5G6	33918
mAb004	67B10C1	26000
mAb005	78A9F4	24454
mAb006	48F11D6	20120
mAb007	61A11F1	18039
mAb008	63G2A2	16453
mAb009	75F1E2	16001
mAb010	66G3E7	15897
mAb011	66E12H3	14688
mAb012	73A8F3	14073
mAb013	74C4F3	12894
mAb014	70B8B3	8776
mAb015	83B2G2	10036
mAb016	83C2D4	9990
mAb017	86F11F6	8132

【0239】 表 3. 抗猴 CD79B 融合瘤陽性選殖的 ELISA 檢測結果

抗體編號	選殖號	檢測結果(OD450)
陰性對照	mIgG	0.08
mAb018	121H1E9	2.36
mAb019	152E5F6	2.80
mAb020	159E3E5	2.71
mAb021	134H2F5	2.95

【0240】 表 4. 抗猴 CD79B 融合瘤陽性選殖的 FACS 檢測結果

抗體編號	選殖號	平均螢光值
陰性對照	mIgG	35
mAb018	121H1E9	1973
mAb019	152E5F6	1708
mAb020	159E3E5	1488
mAb021	134H2F5	1225

【0241】 3、小鼠單株抗體生產、純化及鑑定

1)小鼠單株抗體生產和純化。顯微鏡下觀察需要抗體生產的融合瘤細胞，長至≥70%以上且細胞狀態良好，收集細胞並用 Countstar IC1000 型細胞計數儀進行計數。將細胞濃度調至 1×10^5 至 5×10^5 個/ ml，轉移至 Roller Bottle。將 Roller Bottle 送到培養箱中 37℃ 培養 10-15 天，每天觀察細胞生長狀況；待培養液變橙

黃且透明，取出待純化。按照一般方法，細胞上清藉由 Protein A 柱子進行抗體純化。

【0242】 2)抗人 CD79B 小鼠單株抗體 ELISA 檢測。以 1 μ g/ml 抗原濃度，每孔 50 μ L，4 $^{\circ}$ C 冰箱過夜包被 96 孔盤。次日，將包被好的抗原盤清洗一次(清洗液:1 $\times$ PBST)。清洗後以 1 $\times$ PBST 配置的 1% BSA 封閉液 37 $^{\circ}$ C 封閉 1 小時。1 $\times$ PBST 洗盤 3 次後，加入 50 μ L 按照 100nM，1:10 稀釋過的抗體，放入 37 $^{\circ}$ C 溫箱，孵育 1 小時。1 $\times$ PBST 洗盤 3 次後，加入 100 μ L 1:5000 稀釋的羊抗鼠二抗，37 $^{\circ}$ C 溫箱孵育 0.5 小時。洗盤後，取 TMB 顯色液 A 液和 B 液 1:1 比例混合後顯色。15 分鐘後，用 1N 鹽酸終止顯色反應。在 Spectra Max M5 讀盤機上，檢測 450nm 的螢光值。其中有 4 個抗人 CD79B 小鼠單株抗體的 ELISA 結合力最強(mAb008、mAb015、mAb016 和 mAb017)，具體資料見圖 8。

【0243】 3)抗人 CD79B 小鼠單株抗體 FACS 檢測。DoHH2 細胞懸液離心後以含 0.1%BSA 的 PBS 重懸細胞後計數，加入 100 μ L 按照 100nM，1:10 稀釋過的抗體，室溫孵育 1 小時。清洗細胞三次後加入抗-小鼠 IgG(Fc 特異性)-FITC 二抗，避光室溫孵育 30 分鐘後清洗細胞三次，用含 0.1%BSA 的 PBS 輕輕重懸細胞，上機檢測。其中有 4 個抗人 CD79B 小鼠單株抗體的 FACS 結合力最強(mAb008、mAb015、mAb016 和 mAb017)，具體資料見圖 9A 和圖 9B。其中 hIgG1 為陰性對照抗體，SN8 為陽性對照抗體。SN8 是羅氏製藥開發的抗體偶聯藥物波妥珠單抗維多丁(polatuzumab vedotin)中所使用的抗體(序列參考序列來源：US20170362318A)。波妥珠單抗維多丁已被 FDA 批准上市。從結果可知，在 FACS 實驗中，本揭露較佳出的三株抗人 CD79B 小鼠單株抗體 mAb015、mAb016 和 mAb017 的結合力均優於 SN8。

【0244】 4)抗人 CD79B 小鼠單株抗體交叉反應性 FACS 檢測。採用暫態轉染的方法得到 293F-cynoCD79B 細胞，細胞懸液離心後以含 0.1%BSA 的 PBS 重懸細胞後計數，加入 100 μ L 抗體，濃度分別為 10 μ g/ml 和 1 μ g/ml。室溫孵育 1 小時。清洗細胞三次後加入抗-小鼠 IgG(Fc 特異性)-FITC 二抗，避光室溫孵育 30 分鐘後清洗細胞三次，用含 0.1%BSA 的 PBS 輕輕重懸細胞，上機檢測。抗人 CD79B 小鼠單株抗體交叉反應性 FACS 檢測結果見圖 10。

【0245】 5)抗猴 CD79B 小鼠單株抗體 ELISA 檢測。以 μ g/ml 抗原濃度，每孔 50 μ L，4 $^{\circ}$ C 冰箱過夜包被。次日，將包被好的抗原盤清洗一次(清洗液:1 $\times$ PBST)。清洗後以 1 $\times$ PBST 配置的 1% BSA 封閉液 37 $^{\circ}$ C 封閉 1 小時。1 $\times$ PBST 洗盤 3 次後，加入 50 μ L 按照 100nM，1:10 稀釋過的抗體，放入 37 $^{\circ}$ C 溫箱，孵育 1 小時。1 $\times$ PBST 洗盤 3 次後，加入 100 μ L 1:5000 稀釋的羊抗鼠二抗，37 $^{\circ}$ C 溫箱孵育 0.5 小時。洗盤後，取 TMB 顯色液 A 液和 B 液 1:1 比例混合後顯色。15 分鐘後，用 1N 鹽酸終止顯色反應。在 Spectra Max M5 讀盤機上，檢測 450nm 的螢光值。檢測結果見圖 11。

【0246】 6)抗猴 CD79B 小鼠單株抗體與猴外周血單核細胞結合 FACS 檢測。從新鮮猴血中提取猴外周血單核細胞，細胞懸液離心後以含 0.1%BSA 的 PBS 重懸細胞後計數，分別加入抗-CD19 和抗-cynoCD79B 的抗體。室溫孵育 1 小時。清洗細胞三次後加入抗-小鼠 IgG(Fc 特異性)-FITC 二抗，避光室溫孵育 30 分鐘後清洗細胞三次，用含 0.1%BSA 的 PBS 輕輕重懸細胞，上機檢測。抗猴 CD79B 小鼠單株抗體與猴外周血單核細胞結合 FACS 檢測結果見圖 12A 至圖 12G。CD19 為 B 細胞的標記物。由結果可知，4 個抗猴 CD79B 小鼠單株抗體均可與猴 B 細胞結合。

【0247】 7)抗人 CD79B 小鼠單株抗體 SPR 檢測。採用表面電漿共振技術 (surface plasmon resonance, SPR) 檢測抗人 CD79B 抗體與其抗原人 CD79B-His 之間的親和力。將抗原人 CD79B-His 蛋白固定化至 CM5 晶片。偶聯水準設定在 100RU。運行緩衝液為 HBS-EP+ (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% 表面活性劑 P20)。將稀釋好的抗體以 30 μ l/min 的流速流過實驗通道和對比通道 3 分鐘, 解離 5 分鐘。然後再生緩衝液(10 mM 甘胺酸, pH1.5) 在 30 μ l/min 的流速下運行 30 秒。資料用 Biacore 8K 軟體進行分析。

【0248】 實施例 1-3. 小鼠單株抗體可變區胺基酸序列測定

將實施例 1-2 中得到的高親和力的融合瘤單選殖細胞株進行可變區胺基酸序列測定, 然後重組表達為人鼠嵌合抗體(cAb), 再進行進一步的抗體鑑定。用逆轉錄 PCR 擴增編碼重鏈可變區和輕鏈可變區的基因, 連接到載體; 經定序, 得到輕重鏈序列。首先採用 RNA 純化試劑盒(Qiagen 公司, 貨號 74134) 提取實施例 1-2 中活性好的單細胞株的總 RNA。然後使用 Invitrogen 公司的貨號為 18080-051 cDNA 合成試劑盒製備 cDNA 單鏈。以此為模版, 採用 PCR 方法合成輕重鏈可變區的序列, PCR 產物選殖到 TA 載體 pMD-18T, 然後送去定序。將得到的輕重鏈序列分別選殖到表達載體, 表達重組單株抗體。驗證活性後, 進行人源化工作。

【0249】 抗人 CD79B 抗體的 VH/VL CDR 的胺基酸殘基由 Chothia 編號系統確定並註釋。

【0250】 小鼠融合瘤細胞單株抗體 mAb015 的序列:

重鏈可變區:

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGSSFTSYGINWVKQRTGQGLEWIGEIF
PRSGNTYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAKGDLDGDFD
YWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO : 3

【0251】 輕鏈可變區：

DFLMTQTPLSLPVRLGDQASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGG
GTKLEIK

SEQ ID NO : 4。

【0252】 小鼠融合瘤細胞單株抗體 mAb017 的序列：

重鏈可變區：

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYGINWVKQRTGQGLEWIGEII
PRSGNTYYNEKFEGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARGSDYDGD
FAYWGQGTLLTVSA

SEQ ID NO : 5

【0253】 輕鏈可變區：

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI
YKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPWTFGG
GTQLEIK

SEQ ID NO : 6。

【0254】 鼠源的 CDR 序列如表 5 所示：

表 5.鼠源抗人 CD79B 抗體的 CDR 序列

抗體 CDR	mAb015	mAb017
重鏈 CDR1	GSSFTSY (SEQ ID NO : 7)	GYTFTTY (SEQ ID NO : 13)
重鏈 CDR2	FPRSGN (SEQ ID NO : 8)	YPRSGN (SEQ ID NO : 14)
重鏈 CDR3	GDLGDFDY (SEQ ID NO : 9)	GSDYDGDFA Y(SEQ ID NO : 15)
輕鏈 CDR1	RSSQSIVHSDGNTYFE(SEQ ID NO : 10)	RSSQSIVHHDGNTYLE (SEQ ID NO : 16)
輕鏈 CDR2	KVSNRFS (SEQ ID NO : 11)	KVSNRFS (SEQ ID NO : 17)
輕鏈 CDR3	FQGSHPWT (SEQ ID NO : 12)	FQGSHPWT (SEQ ID NO : 18)

【0255】 實施例 1-4. 抗人 CD79B 抗體人源化

將實施例 1-3 得到的鼠源抗 CD79B 單株抗體的輕重鏈序列，在抗體資料庫裡進行同源性比較後，建立人源化抗體模型。根據模型選擇回復突變，篩選最優的人源化抗 CD79B 單株抗體。從小鼠 Fab 晶體結構模型資料庫(譬如 PDB 資料庫)中查找與所得鼠源候選分子同源性相似的晶體結構，挑取高解析度(譬如 <2.5Å)的 Fab 晶體結構，建立小鼠 Fab 模型。將鼠源抗體輕重鏈序列和模型中的序列比對，保留和鼠源抗體序列一致的序列，得到鼠抗體的結構模型。不一致的胺基酸為可能的回復突變位點。用 Swiss-pdb viewer 軟體運行鼠抗體結構模型，優化能量(最小化)。將模型中除 CDR 外的不同胺基酸位點進行回復突變。將所得的突變抗體(人源化)和人源化之前的抗體進行活性的對比。保留活性好的人源化抗體。對 CDR 區域優化，包括避免糖基化、脫醯胺化、氧化位點等。

【0256】 分別選殖、表達、純化上述抗體；經 ELISA、FACS 和 SPR 等檢測，選出活性最好的人源化抗體 hAb015-10 和 hAb017-10，數據見表 6。人源化抗體 hAb015-10 和 hAb017-10 保持了跟小鼠單株抗體相似的親和力和相關功能。

【0257】 表 6. 人源化抗 CD79B 抗體的鑑定結果

檢測方法	蛋白/細胞系	hAb015-10	hAb017-10
ELISA 檢測(EC ₅₀ , nM)	人 CD79B-His 蛋白	0.05	0.06
SPR 檢測 (KD , nM)	人 CD79B-His 蛋白	1.5	4.3
FACS 檢測(EC ₅₀ , nM)	DoHH2 細胞	0.40	0.55
細胞殺傷實驗(IC ₅₀ , nM)	DoHH2 細胞	0.004	0.002
	WSU-DLCL2 細胞	0.013	0.049
	Raji 細胞	>100	>100
種屬間交叉反應性	人 CD79B-His 蛋白	有	有
	猴 CD79B-His 蛋白	沒有	沒有
	小鼠 CD79B-His 蛋白	沒有	沒有
熱穩定性檢測	DSC(T _m , °C)	60	65
	DLS(T _{agg} , °C)	62	67

【0258】 人源化抗體 hAb015-10 和 hAb017-10 的序列見下。

【0259】 hAb015-10 人源化抗體重鏈可變區(VH)：

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSSFSYGINWVKQAPGQGLEWIGEIFP
RSGNTYYNEKFEGRATLTADKSTSTAYMELRSLRSED~~TAVYYCAK~~GDLGDFD
YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO：19；

【0260】 hAb015-10 人源化抗體輕鏈可變區(VL)：

DFVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIY
KVSNRFS¹GV²PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGG
TKVEIK

SEQ ID NO : 20 ;

【0261】 hAb017-10 人源化抗體重鏈可變區(VH)：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVKQAPGQGLEWIGEI
YPRSGNIYYNEKF¹KGKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSDYD
GDFAYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO : 21 ;

【0262】 hAb017-10 人源化抗體輕鏈可變區(VL)：

DVVM¹MTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI
YKVSNRFS²GV³PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGG
GTKVEIK

SEQ ID NO : 22 ;

【0263】 hAb015-10 人源化抗體重鏈：

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGSSFSYGINWVKQAPGQGLEWIGEIFP
RSGNTYYNEKFEGRATLTADKSTSTAYMELRSLRSED¹AVYYCAKGD²LGDFD
YWGQGT³TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT

CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 28 ;

【0264】 hAb015-10 人源化抗體輕鏈：

DFVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSDGNTYFEWYLQKPGQSPKLLIY
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC

SEQ ID NO : 29 ;

【0265】 hAb017-10 人源化抗體重鏈：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYGINWVKQAPGQGLEWIGEI
YPRSGNIYYNEKFKGKATLTADKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGSDYD
GDFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 30 ;

【0266】 hAb017-10 人源化抗體輕鏈：

DVVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHHDGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGG
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 31 。

【0267】 人源化後的 mAb015 的 HCDR1 序列中具有 T30S 突變，突變後的 HCDR1 為 GSSFSSY(SEQ ID NO : 23)。本揭露的抗 CD79B 抗體具有如表 7 通式：

【0268】 表 7. CDR 通式結構

重鏈		輕鏈	
HCDR1	GX ₁ X ₂ FX ₃ X ₄ Y(SEQ ID NO : 24)， 其中，X ₁ 為 S 或 Y，X ₂ 為 S 或 T，X ₃ 為 T 或 S，X ₄ 為 S 或 T	LCDR1	RSSQSIVHX ₁₂ GNTYX ₁₃ E(SEQ ID NO : 27)，其中，X ₁₂ 為S或H，X ₁₃ 為F或L
HCDR2	X ₅ PRSGN(SEQ ID NO : 25)，其中，X ₅ 為F或Y	LCDR2	KVSNRFS(SEQ ID NO : 11 或 17)
HCDR3	X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ GDFX ₁₁ Y(SEQ ID NO : 26)，其中，X ₆ 為不存在或 G，X ₇ 為不存在或S，X ₈ 為G或D，X ₉ 為D或Y，X ₁₀ 為L或D，X ₁₁ 為D或A	LCDR3	FQGSHVPWT(SEQ ID NO : 12或 18)

【0269】 實施例 1-5. 抗 CD79B 抗體的內吞作用

為了檢測本揭露中的 CD79B 抗體結合人 CD79B 後，是否能夠和人 CD79B 一起內吞到細胞內，用高表達人 CD79B 蛋白的 DOHH-2 細胞(DSMZ, ACC 47) 進行細胞內吞實驗以評估抗體的內吞能力。

【0270】 DOHH-2 細胞按照一般懸浮細胞的方法進行培養，完全培養基的成分為：RPMI 1640 培養基(GIBCO,Cat No.:11835-030)，，加 10%(v/v) 胎牛血清(FBS)(GIBCO,Cat No.:10099-141)和青黴素/鏈黴素(GIBCO,Cat No.:15070-063)。

【0271】 實驗時 4℃ 低溫離心收集細胞，1000rpm，5 分鐘。將細胞重懸到 10-15ml 在冰上預冷的 FACS 緩衝液中。FACS 緩衝液的成分為：磷酸鹽緩衝液(PBS)，pH7.4，加 2% 胎牛血清(FBS)。整個實驗過程中，FACS 緩衝液放在冰上預冷。細胞計數離心後以 300,000 細胞/孔加入 96 孔盤中，離心棄去上清後加入 Fc 封閉液，12.5μg/ml(BD, Cat No.: 564220)，100μl/孔。在室溫下封閉 10 分鐘。然後加入 20μg/ml 的待測 CD79B 抗體至對應的孔中，4℃ 避光孵育 1 小時。用預冷的 PBS 緩衝液洗 2 遍以除去未結合的抗體。加入細胞完全培養基(具有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培養基)，在 37℃，5% CO₂ 下孵育 0 小時、1 小時、2 小時、4 小時。離心棄去上清後加入 100μl/孔 2% PFA 緩衝液，重懸細胞後放置 10 分鐘。然後用 FACS 緩衝液清洗 3 遍，然後加入 100μl 二抗溶液(螢光標記羊抗人二抗：1：250 稀釋，濃度為 2 μg/ml，Biolegend, Cat#409304)，在 4℃ 避光孵育半小時。加入預冷的 PBS 緩衝液，4℃ 離心棄上清，重複三次。細胞重懸在 FACS 緩衝液中，200μl /孔，使用流式細胞儀(BD FACS Calibur)檢測。

【0272】 結果表明，在 4℃ 孵育時，SN8、hAb015 和 hAb017 這 3 個抗體均不能被 DOHH-2 細胞內吞。而在 37℃ 孵育時，1 小時後大部分抗體已經被

DOHH-2 細胞內吞，4 小時後抗體內吞達到最大值。3 個抗體均具有較好的內吞作用。

【0273】 二、化合物的製備：

化合物的結構是藉由核磁共振(NMR)或/和質譜(MS)來確定的。NMR 位移(δ)以 10^{-6} (ppm)的單位給出。

【0274】 NMR 的測定是用 Bruker AVANCE-400 核磁儀，測定溶劑為氘代二甲基亞砜(DMSO- d_6)、氘代氯仿($CDCl_3$)、氘代甲醇(CD_3OD)，內標為四甲基矽烷(TMS)。

【0275】 MS 的測定用 Agilent 1200 /1290 DAD-6110/6120 Quadrupole MS 液質聯用儀(生產商：Agilent，MS 型號：6110/6120 Quadrupole MS)。

【0276】 Waters ACQuity UPLC-QD/SQD(生產商：waters，MS 型號：waters ACQuity Qda Detector/waters SQ Detector)THERMO Ultimate 3000-Q Exactive(生產商：THERMO，MS 型號：THERMO Q Exactive)。

【0277】 高效液相色譜法(HPLC)分析使用 Agilent HPLC 1200DAD、Agilent HPLC 1200VWD 和 Waters HPLC e2695-2489 高壓液相色譜儀。

【0278】 手性 HPLC 分析測定使用 Agilent 1260 DAD 高效液相色譜儀。

【0279】 高效液相製備使用 Waters 2545-2767、Waters 2767-SQ Detecor2、Shimadzu LC-20AP 和 Gilson GX-281 製備型色譜儀。

【0280】 手性製備使用 Shimadzu LC-20AP 製備型色譜儀。

【0281】 CombiFlash 快速製備儀為 Combiflash Rf200(TELEDYNE ISCO)。

【0282】 薄層層析矽膠板使用煙臺黃海 HSGF254 或青島 GF254 矽膠板；薄層色譜法(TLC)所用矽膠板的規格是 0.15 mm 至 0.2 mm；薄層層析分離純化產品時，採用的規格是 0.4 mm 至 0.5 mm。

【0283】 矽膠柱色譜法一般使用煙臺黃海矽膠 200 至 300 目矽膠為載體。

【0284】 本揭露的已知的起始原料可以採用或按照本領域已知的方法來合成，或可購買自 ABCR GmbH & Co. KG，Acros Organics，Aldrich Chemical Company，韶遠化學科技(Accela ChemBio Inc)、達瑞化學品等公司。

【0285】 實施例中無特殊說明，反應能夠均在氫氣氛或氮氣氛下進行。氫氣氛是指反應瓶連接一個約 1L 容積的氫氣氣球。

【0286】 加壓氫化反應使用 Parr 3916EKX 型氫化儀和清藍 QL-500 型氫氣發生器或 HC2-SS 型氫化儀。氫化反應通常抽真空，充入氫氣，反復操作 3 次。

【0287】 微波反應使用 CEM Discover-S 908860 型微波反應器。

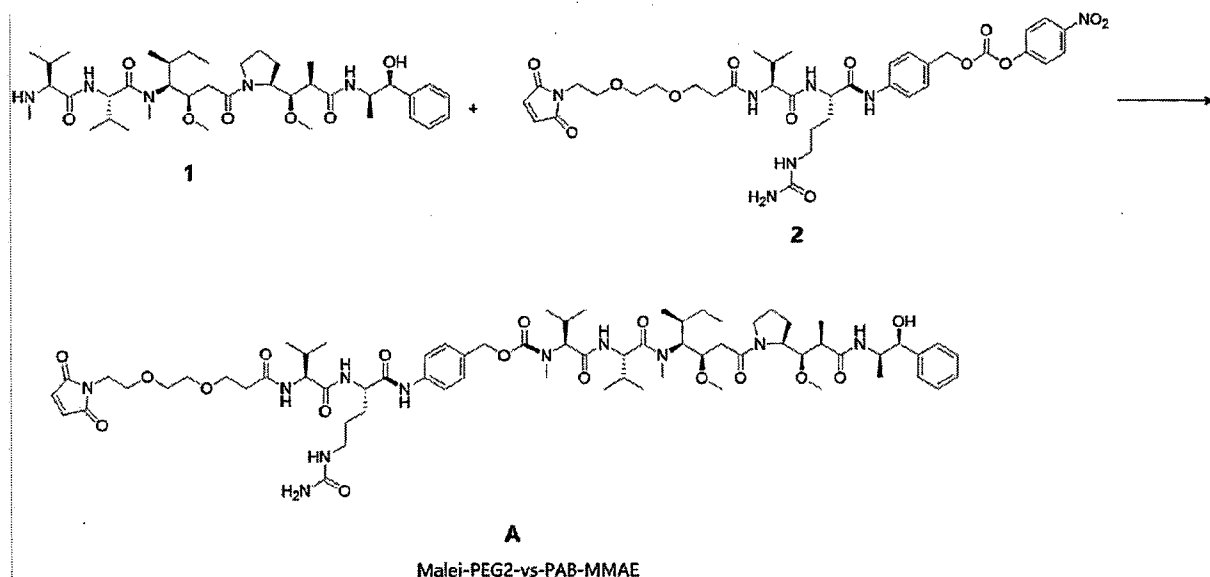
【0288】 實施例中無特殊說明，溶液是指水溶液。

【0289】 實施例中無特殊說明，反應的溫度為室溫，為 20℃ 至 30℃。

【0290】 純化採用的柱層析的沖提劑體系和薄層色譜法的展開劑體系包括：A：二氯甲烷/甲醇體系，B：正己烷/乙酸乙酯體系，C：石油醚/乙酸乙酯體系；溶劑的體積比根據化合物的極性不同而進行調節，也可以加入鹼性或酸性試劑(如三乙胺和醋酸，等)進行調節。

【0291】 本揭露 ADC 中的藥物部分參見 WO2020063676A、US7098308、US6884869、CN202010073671.6、CN201911390425.7，相關的化合物合成及測試全文引用至本揭露。其中的非限制性實施例如下：

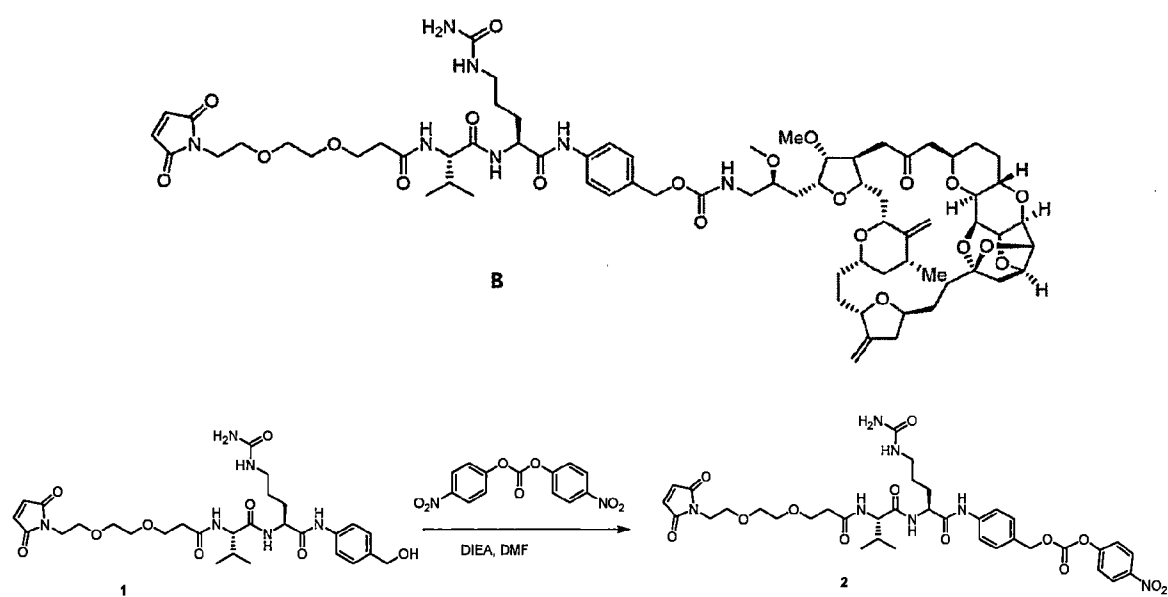
【0292】 實施例 2-1. 化合物 A



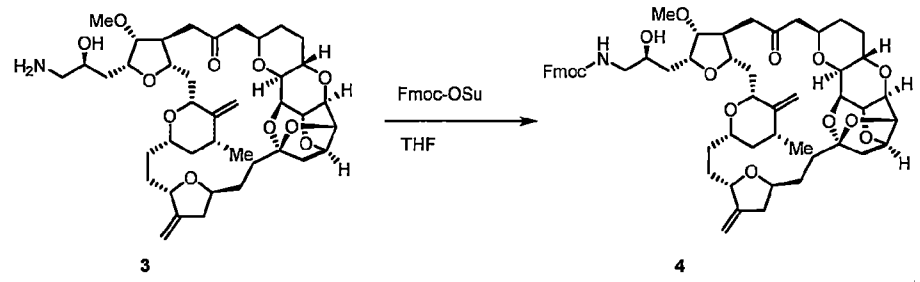
【0293】 將本實施例中的 **1** (10 mg, 0.014 mmol, 1.0 eq)，本實施例中的 **2** (21 mg, 0.021 mmol, 1.5eq) 以及催化量的 HOBt (0.5 mg) 溶於無水 DMF (2 mL) 裡，氬氣保護，開啟攪拌，加入 2.71 mg 的 DIEA 以及 0.08 mL 的吡啶，加熱反應到 40°C，攪拌 2 小時。經製備 HPLC 純化得 **A** (12.4 mg)，收率 65.4%，LC/MS (ESI): m/z 1363.4 $[M+1]^+$ 。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.63-0.95 (m, 32H), 1.05-1.36 (m, 27H), 1.60-1.98 (m, 4H), 2.1-2.55 (m, 4H), 2.78~3.02 (m, 3H), 3.17-3.79 (m, 13H), 3.93-4.20 (m, 2H), 4.60~4.96 (m, 3H), 5.14-5.36 (m, 2H), 5.67 (bs, 1H), 6.31-6.50 (m, 2H), 6.64 (s, 2H), 6.91 (d, J = 14.8 Hz, 1H), 7.19-7.30 (m, 7H), 7.55 (bs, 2H), 8.96 (bs, 1H), 9.13 (bs, 1H)。

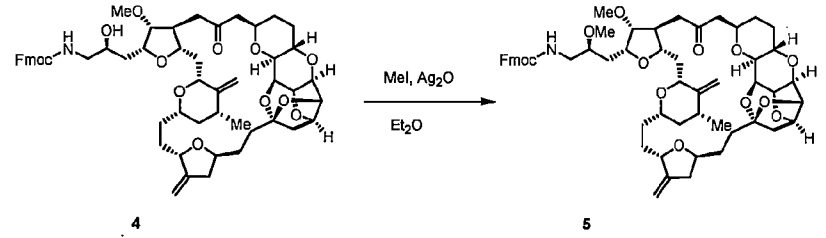
【0294】 實施例 2-2-1. 化合物 B



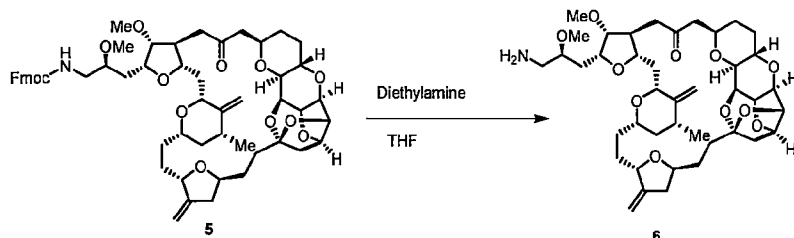
【0295】 冰水浴下，將本實施例中的 1(50 mg, 0.08 mmol)溶解到 1.5 mL 的 N,N-二甲基甲醯胺中，然後加入 DIPEA(18 mg, 0.14 mmol)，接著加入二(對硝基苯)碳酸酯(49 mg, 0.16 mmol)，然後在室溫下攪拌約 2-4 小時，HPLC 監控反應完全後，加入 20 mL 甲基第三丁基醚，攪拌，過濾收集固體，固體乾燥後得到 36 mg 粗品，直接下一步反應，LC/MS (ESI): m/z 784.1 [M+H]⁺。



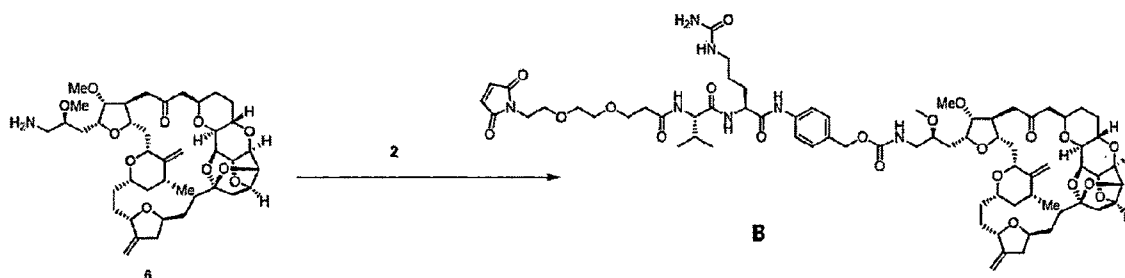
【0296】 冰水浴下，將本實施例中化合物 3 (72.91 mg, 0.1 mmol)溶於 10 mL 的四氫呋喃中，加入 Fmoc-OSu(41 mg, 0.12 mmol)，然後在室溫下攪拌 3-5 小時，HPLC 監控反應完成後，減壓濃縮得粗品，直接用於下一步反應。



【0297】將上述本實施例中 **4** 粗品溶於 10 mL 無水乙醚中，加入氧化銀 (34.8 mg, 0.15 mmol)，接著加入碘甲烷 (28.4 mg, 0.2 mmol)，然後於室溫下反應約 10-16 小時，監控反應基本完全後，過濾除去固體，然後減壓濃縮得粗品，直接進行下一步反應。



【0298】將上述本實施例中 **5** 粗品溶於 10 mL 的四氫呋喃中，加入 2 mL 的二乙基胺，然後在室溫下攪拌約 2-4 小時，HPLC 監控反應完畢後，直接減壓濃縮得粗品，經矽膠柱純化後得 40 mg 產品，LC/MS (ESI): m/z 744.2 $[M+H]^+$ 。



【0299】將上述本實施例中化合物 **6** (13.5 mg, 0.018 mmol) 溶於 1.5 mL 的 DMF 中，加入 DIPEA (7 mg, 0.054 mmol)，然後分批加入本實施例中化合物 **2** (18 mg, 1.3 mmol)，攪拌約 24-36 小時後，減壓濃縮得粗品，經 HPLC 製備分離得 12.5 mg 化合物 **B**，純度 96.95%，LC/MS (ESI): m/z 1388.3 $[M+H]^+$ 。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.85~0.90 (m, 3H), 0.93~1.00 (m, 3H), 1.08~1.10 (m, 3H), 1.20~1.50 (m, 15H), 1.75~2.04 (m, 6H), 2.13~2.55 (m, 16H), 2.70~2.77 (m, 1H), 2.80~2.96 (m, 2H), 3.16~3.97 (m, 20H), 3.99~4.39 (m, 8H), 4.60~4.80 (m, 6H), 4.88~5.10 (m, 5H), 5.24~5.37 (m, 4H), 6.71 (s, 2H), 7.03 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 7.18~7.30 (m, 3H), 7.63 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.92 (bs, 1H)。

【0300】 測試例 1：體外細胞毒活性篩選：**1.1. 實驗原理及方法**

本實驗利用 CTG 檢測 ATP 含量，反映腫瘤細胞的存活情況。首先藉由種植不同密度的細胞並培養 3 天和 5 天，根據 IC_{50} 和最大抑制率確定最終培養條件。然後按照此條件檢測毒素分子的殺傷作用。

【0301】 1.2. 細胞株的選擇

根據實驗目的，我們參考文獻報導，前期選擇乳腺癌、NSCLC 兩種疾病模型，選出 SKBR3(HER2+)、MDA-MB-468(HER2-)和 A549 三株細胞用於篩選實驗。

【0302】 1.3. 細胞培養條件的確定

1)細胞鋪盤：用胰酶將 A549 消化後，用培養介質終止，計數後分別取 4.3×10^5 ， 7.2×10^5 ， 11.5×10^5 個細胞使終體積均為 26ml。在 96 孔盤(3903)第 2 列到第 11 列每孔加 180 μ L 細胞懸液，使得細胞密度分別為每孔 3K、5K、8K。第 12 列為 200 μ L 培養介質，剩餘孔加入 PBS。SKBR3 和 MDA-MB-468 細胞重複上述操作。平行兩份。

【0303】 2)藥物配製：在圓底 96 孔盤(3788)中配製艾日布林(Eribulin)陽性對照。孔盤 1 第一列為 2mM(用 DMSO 將儲液稀釋 10 倍)，此後到第十列按梯度 10 倍稀釋於 DMSO 中，第 11 列為 DMSO。孔盤 2 中第二列至第 11 列每孔加入相應培養介質 95 μ L，從孔盤 1 的第 2 列至第 11 列吸取 5 μ L 溶液至孔盤 2，混勻後，吸取 20 μ L 加入鋪好的細胞中，繼續培養 3 天和 5 天。

【0304】 3)CTG 檢測：分別在第 3 天和第 5 天取出盤，平衡至室溫。每孔加入 90 μ L CTG，避光室溫反應 10min，酶標儀讀取發光值並計算 IC_{50} 。

【0305】 1.4. 藥效檢測

1)細胞鋪盤：將 A549，SKBR3 和 MDA-MB-468 用胰酶消化後，各自培養介質重懸計數，取 6.33×10^5 cells 加培養介質至 38ml，每孔 180 μ L 鋪至 96 孔盤 (3903)，使每孔細胞數為 3K，於 37°C 培養 24h。

【0306】 2)藥物配製：在圓底 96 孔盤(3788)中配製 Eribulin 和化合物 D-1(實施例 2-2-1 中的化合物 6)。孔盤 1 第一列為 2mM(用 DMSO 將儲液稀釋 10 倍)，此後到第十列按梯度 10 倍稀釋於 DMSO 中，第 11 列為 DMSO。孔盤 2 中第二列至第 11 列每孔加入相應培養介質 95 μ L，從孔盤 1 的第 2 列至第 11 列吸取 5 μ L 溶液至孔盤 2，混勻後，吸取 20 μ L 加入鋪好的細胞中，平行 2 份。繼續培養 5 天。

【0307】 3)CTG 檢測：取出盤，平衡至室溫。每孔加入 90 μ L CTG，避光室溫反應 10min，酶標儀讀取發光值並計算 IC₅₀。

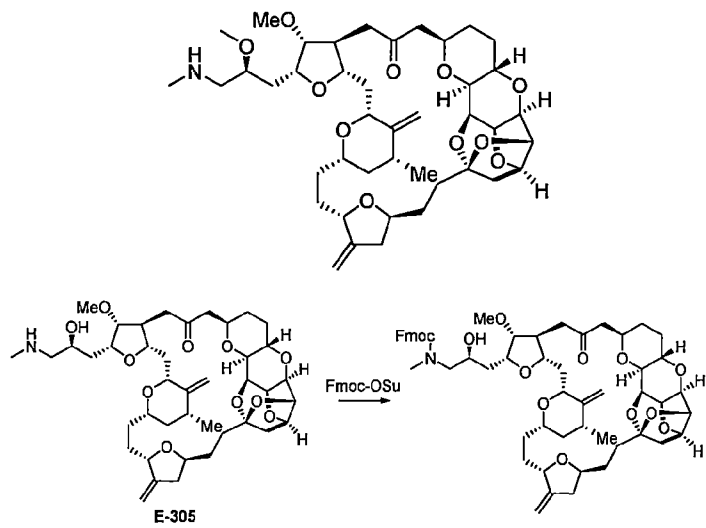
【0308】 1.5. 資料結果

表 8

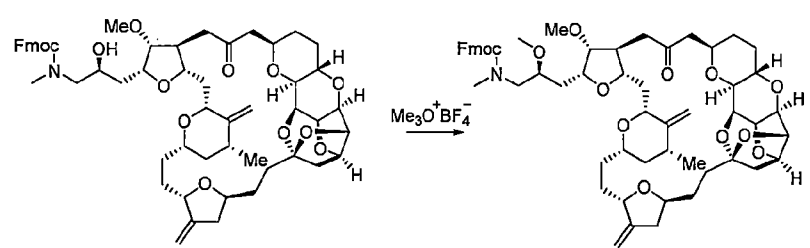
	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
化合物	IC ₅₀ (nM)	最大抑制%	IC ₅₀ (nM)	最大抑制%	IC ₅₀ (nM)	最大抑制%
Eribulin	0.7147	94.90	0.4819	87.47	0.6609	81.50
D-1	0.2052	96.87	0.1827	88.01	0.5151	81.34

結論：化合物 D-1 在三種腫瘤細胞系中都有很好的殺傷效果，且明顯優於陽性藥艾日布林。

【0309】 實施例 2-2-2.



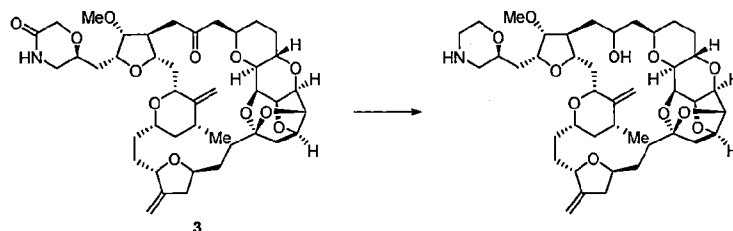
【0310】 室溫下，量取 0.3 mL 的 1,4-二噁烷和 0.3 mL 的水溶解化合物 E-305(31 mg，0.042 mmol，根據文獻 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 5551–5554. 合成得到)，再依次加入苄氧羰基琥珀酰亞胺(17 mg，0.050 mmol)和碳酸鈉固體(18 mg，0.168 mmol)。室溫攪拌過夜，檢測原料基本轉化完全。反應中加入水淬滅，乙酸乙酯提取，減壓濃縮，經矽膠柱純化後得 15 mg 產物，LC/MS (ESI): m/z 965.64 $[M+H]^+$ 。



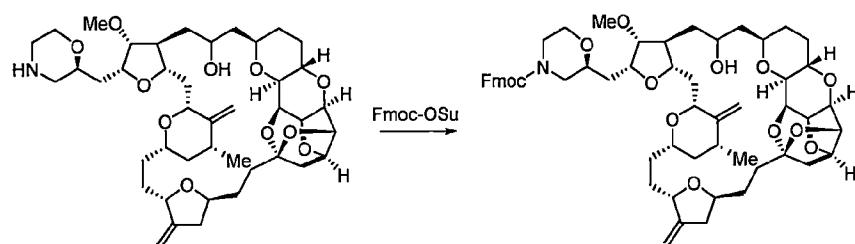
【0311】 室溫下，量取的二氯甲烷溶解上步所得產物(7 mg，0.007 mmol)，再依次加入 4A 分子篩(10 mg)、三甲基氧鎢四氟硼酸(11 mg，0.07 mmol)和質子海綿(16 mg，0.07 mmol)，室溫攪拌 1h。檢測原料基本轉化完全，反應中加入水淬滅，甲基第三丁基醚提取，再用 1 N 稀鹽酸洗，減壓濃縮，經矽膠柱純化後得 7 mg 產物，LC/MS (ESI): m/z 979.68 $[M+H]^+$ 。

【0312】 冰水浴下，量取 1 mL 的四氫呋喃溶解上步所得產物(10 mg，0.01 mmol)，再滴加入 DBU(6 μ L，0.04 mmol)，攪拌攪拌至反應完全。反應中加入水淬滅，二氯甲烷提取，減壓濃縮，經 HPLC 製備分離得 5 mg 產物 **D-2**，LC/MS (ESI): m/z 757.85 $[M+H]^+$ 。

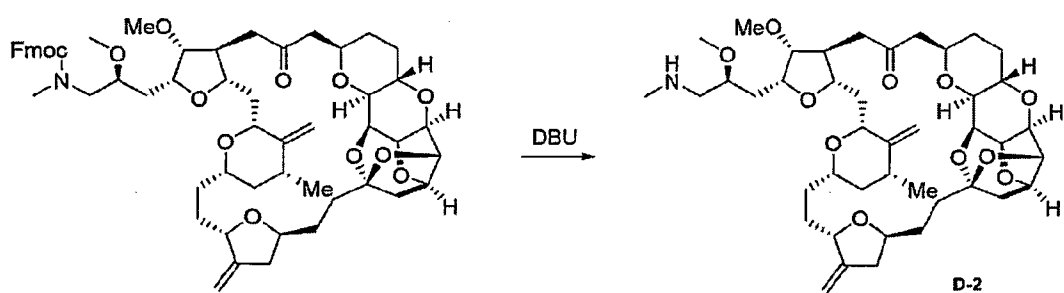
【0313】 實施例 2-2-3.



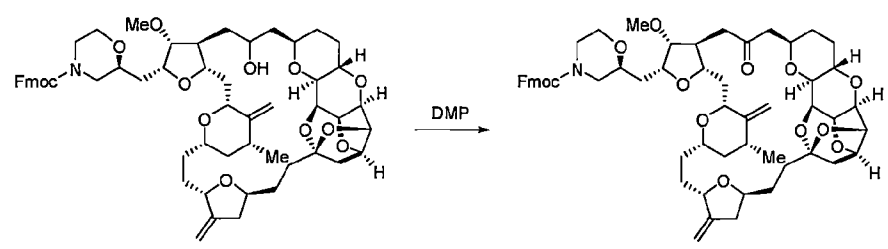
【0314】 冰水浴下，量取 2 mL 的四氫呋喃溶解本實施例中化合物 3(6 mg，0.008 mmol，根據文獻 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21 (2011) 1639–1643.合成得到)，再滴加入四氫鋰鋁溶液(80 μ L，1 M in THF，0.08 mmol)，攪拌並將反應溫度緩慢升至 40°C，LCMS 檢測原料基本轉化完全，反應用十水合硫酸鈉淬滅，冰水浴下攪拌半小時，過濾，濾液減壓濃縮得粗品，直接用於下一步反應，LC/MS (ESI): m/z 758.4 $[M+H]^+$ 。



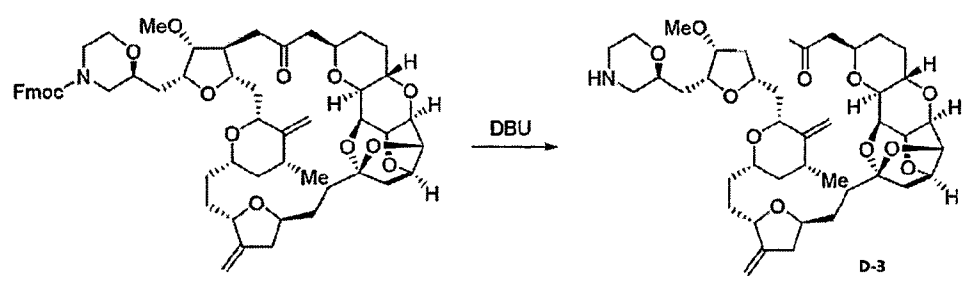
【0315】 室溫下，量取的二氯甲烷溶解上步所得產物(7 mg，0.007 mmol)，再依次加入 4A 分子篩(10 mg)、三甲基氧鎢四氟硼酸(11 mg，0.07 mmol)和質子海綿(16 mg，0.07 mmol)，室溫攪拌 1h。檢測原料基本轉化完全，反應中加入水淬滅，甲基第三丁基醚提取，再用 1 N 稀鹽酸洗，減壓濃縮，經矽膠柱純化後得 7 mg 產物，LC/MS (ESI): m/z 979.68 $[M+H]^+$ 。



【0316】室溫下，量取 0.5 mL 的 1,4-二噁烷和 0.5 mL 的水溶解上步所得產物，再依次加入苄甲氧羰基琥珀亞胺(6.5 mg，0.019 mmol)和碳酸鈉(6.8 mg，0.064 mmol)，室溫攪拌過夜，檢測原料基本轉化完全。反應中加入水淬滅，乙酸乙酯提取，減壓濃縮，粗品經矽膠柱純化後得產物 14mg，LC/MS (ESI): m/z 980.4 [M+H]⁺。



【0317】冰水浴下，量取 1 mL 的二氯甲烷溶解上步所得產物(14 mg，0.014 mmol)，再加入戴斯-馬丁氧化劑(18.2 mg，0.042 mmol)，攪拌並允許反應緩慢升至室溫，攪拌至 LCMS 檢測原料基本轉化完全。加入碳酸氫鈉水溶液淬滅反應，二氯甲烷提取，濃縮，粗品經矽膠柱純化後得產物 8 mg，LC/MS (ESI): m/z 978.4 [M+H]⁺。



【0318】冰水浴下，量取 1 mL 的四氫呋喃溶解上步所得產物(8 mg，0.008 mmol)，再滴加入 DBU(6 μ L，0.032 mmol)，攪拌 1 小時，中控檢測原料基本轉化完全，反應中加入水淬滅，二氯甲烷提取，濃縮，粗品經 HPLC 製備分離得目標產物 **D-3**(1.3 mg)，LC/MS (ESI): m/z 755.93 $[M+H]^+$ 。

【0319】測試例 2：體外細胞毒活性篩選

2.1. 實驗原理及方法

本實驗利用 CTG 檢測 ATP 含量，反映腫瘤細胞的存活情況。

【0320】2.2. 細胞培養條件的確定

1)細胞鋪盤：

用胰酶將 A549，SKBR3 和 MDA-MB-468 消化後，各自培養介質重懸計數，將細胞密度調整為 2.2×10^4 個/ml，在 96 孔盤的列 2 至列 11 每孔加入 135 μ l 細胞懸液，列 12 為空白對照。在 5% CO₂ 的 37°C 培養箱中培養 24 h。

【0321】2)藥物配製：

a)儲液準備：用 DMSO 將藥物溶解，使儲液濃度為 5mM。

b)孔盤 1：起始列 1 將儲液稀釋 40 倍，列 2 至列 11 依次 3 倍梯度稀釋。列 12 為 DMSO。

c)孔盤 2：在列 2 至列 11 加入 196 μ L 相應培養介質，從孔盤 1 的列 3 至列 12 吸 4 μ L 至孔盤 2 的列 2 到列 11。混勻。

【0322】2.3. 處理細胞

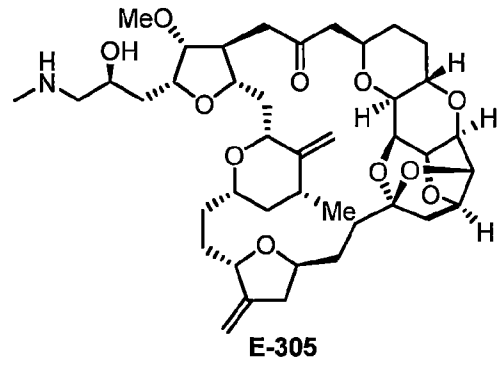
從孔盤 2 吸取 15 μ L 加入細胞。在 5% CO₂ 的 37°C 培養箱中繼續培養 5 天。

【0323】2.4. CTG 檢測：取出盤，平衡至室溫。每孔加入 75 μ L CTG，避光室溫反應 10min，酶標儀讀取發光值並計算 IC₅₀。

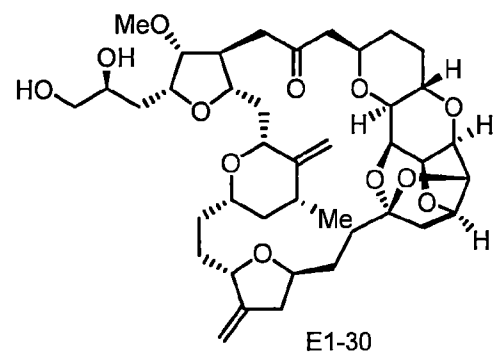
【0324】 2.5. 資料結果

表 9

	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
化合物	IC ₅₀ (nM)	最大抑制%	IC ₅₀ (nM)	最大抑制%	IC ₅₀ (nM)	最大抑制%
D-2	1.086	96.85	1.881	89.43	3.076	62.09
D-3	1.176	96.36	1.983	90.94	2.171	63.03
E-305	0.571	96.42	1.168	88.53	2.102	61.27
E1-30	0.1659	96.15	0.3596	90.49	0.7813	62.46

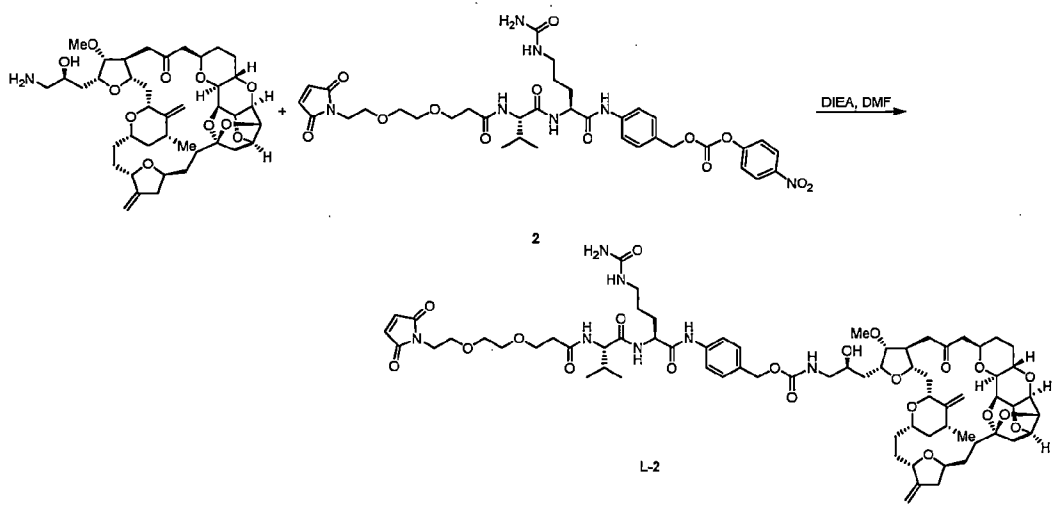


E-305 : ;



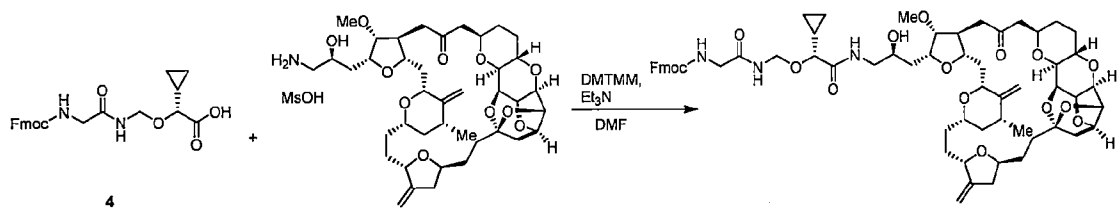
E1-30 : 。

【0325】 實施例 2-2-4.

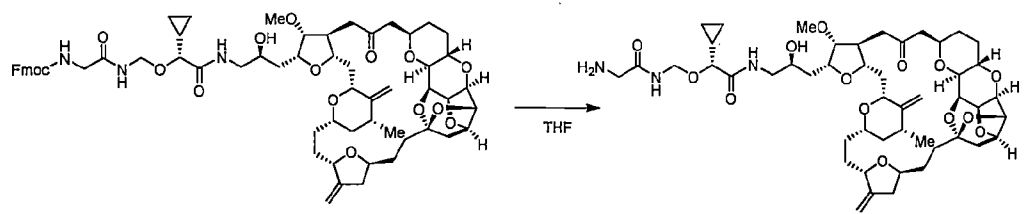


【0326】 冰水浴下，將艾日布林(9 mg, 0.012 mmol)溶於 0.3 mL DMF 中，加入 DIPEA (3.5 mg, 0.028 mmol)，然後分批加入本實施例中化合物 2(7.8 mg, 0.011 mmol)，攪拌至反應基本完全，減壓濃縮得粗品，經 HPLC 製備分離得 4.95 mg 化合物 L-2，純度 97%，LC/MS (ESI): m/z 1374.3 $[M+H]^+$ 。

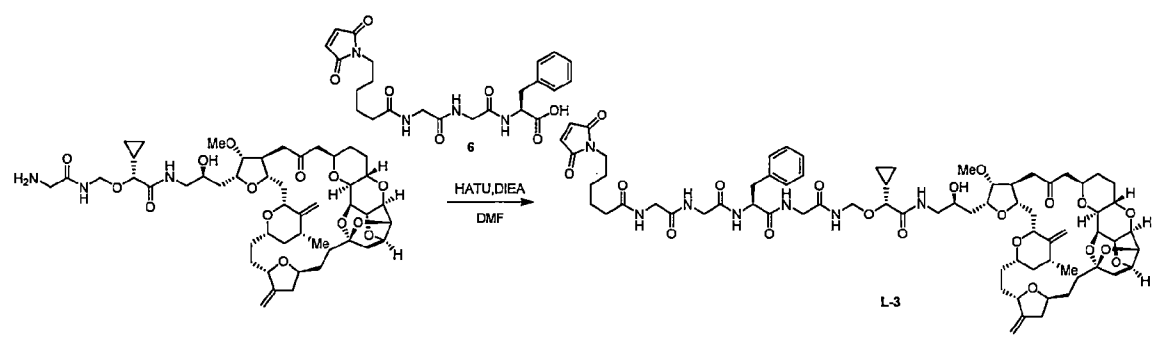
【0327】 實施例 2-2-5.



【0328】 稱取本實施例中化合物 4(13.4 mg, 0.0316 mmol, 1.7 eq)和艾日布林甲磺酸鹽(15 mg, 0.0182 mmol, 1 eq)溶於 DMF(0.5 ml)中，冰浴冷卻下加入三乙胺(10 mg, 0.0988 mmol, 5.4 eq)、DMTMM(4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基嗎啉鹽酸鹽，9.8 mg, 0.0332 mmol, 1.8 eq)，反應液自然升到室溫攪拌至基本完成。加入水(2 ml)和乙酸乙酯(3 ml)稀釋分液，乙酸乙酯提取水相，合併有機相無水硫酸鈉乾燥，濃縮，粗品經製備板純化得到 16 mg，收率 86.7%，LC/MS (ESI): m/z 1136.3 $[M+H]^+$ 。

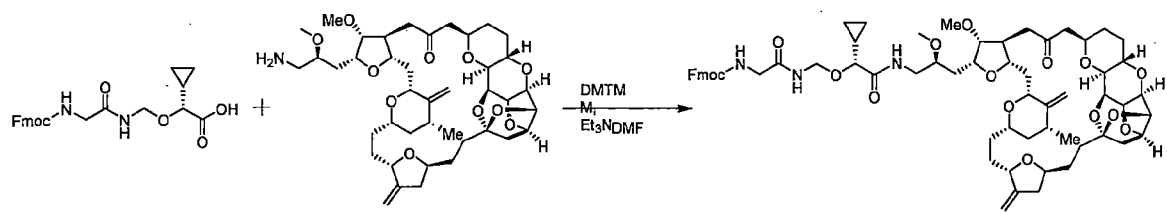


【0329】 在冰浴冷卻下，稱取上步所得產物(16 mg, 0.0141 mmol, 1 eq)溶於 THF 中(0.4 ml)，加入三乙胺(4.2 mg, 0.057 mmol, 4 eq)，保持冰浴下攪拌至基本完成。加入二氯甲烷(5 ml)稀釋，水(2 ml X 3)洗，有機相用無水硫酸鈉乾燥，濃縮得到粗品直接用於下一步，LC/MS (ESI): m/z 914.3 [M+H]⁺。

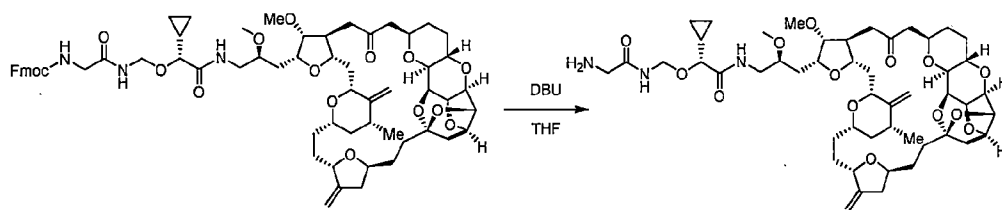


【0330】 稱取上步所得產物(16 mg, 0.0175 mmol, 1 eq)和本實施例化合物 6(11.6 mg, 0.0246 mmol, 1.4 eq)溶於 DMF 中(0.5 ml)，加入 2-(7-氧化苯并三唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(9.9 mg, 0.026 mmol, 1.5 eq)和 N,N-二異丙基乙胺(5.5 mg, 0.0426 mmol, 2.4 eq)，保持冰浴下攪拌至基本完成。加入水(2 ml)和乙酸乙酯(3 ml)稀釋分液，乙酸乙酯提取水相，合併有機相無水硫酸鈉乾燥，濃縮，粗品經製備 HPLC 純化得到 10 mg 產物 L-3，LC/MS (ESI): m/z 1368.3 [M+H]⁺。

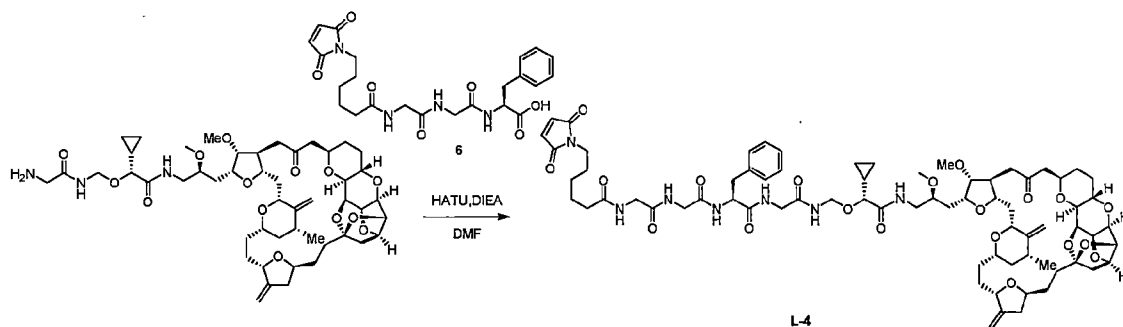
【0331】 實施例 2-2-6.



【0332】 稱取本實施例中化合物 **4** (11.6 mg, 0.0273 mmol, 1.5 eq) 和實施例 2-2-1 中的化合物 **D-1** (艾日布林衍生物, 13.5 mg, 0.0181 mmol, 1 eq) 溶於 N,N-二甲基甲醯胺 (0.5 ml) 中, 冰浴冷卻下加入 DMTMM (10.1 mg, 0.0343 mmol, 1.3 eq), 反應液至基本反應完成。加入水 (2 ml) 和乙酸乙酯 (3 ml) 中止和稀釋反應, 分液, 乙酸乙酯提取水相, 合併有機相無水硫酸鈉乾燥, 濃縮, 粗品經製備板純化得到 10 mg, 收率 47.9%, LC/MS (ESI): m/z 1150.2 $[M+H]^+$ 。



【0333】 稱取上步產物 (10 mg, 0.0087 mmol, 1 eq) 溶於 THF (1 ml) 中, 加入 1, 8-二氮雜二環十一碳-7-烯 (5.2 mg, 0.034 mmol, 4 eq), 冰浴下攪拌至基本反應完成。加入二氯甲烷 (5 ml) 稀釋, 水 (2 ml X 3) 洗, 有機相用無水硫酸鈉乾燥, 濃縮得到粗品直接用於下一步, LC/MS (ESI): m/z 928.2 $[M+H]^+$ 。

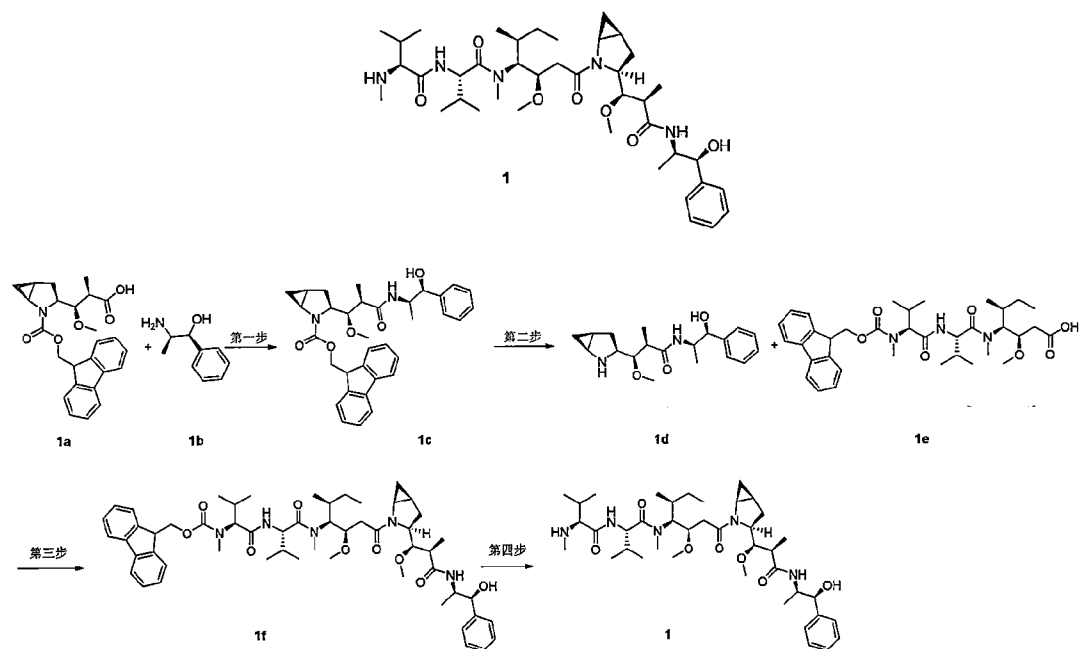


【0334】 稱取上步產物 (16 mg, 0.0087 mmol, 1 eq) 和化合物 **6** (7.8 mg, 0.0165 mmol, 1.9 eq) 溶於 DMF 中 (0.5 ml), 加入 2-(7-氧化苯并三唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (6.2 mg, 0.0163 mmol, 1.9 eq) 和 DIEA (5.7 mg, 0.0441 mmol, 5 eq), 冰浴下攪拌至基本反應基本完成。加入水 (2 ml) 和乙酸乙酯 (3 ml) 稀釋分液, 乙酸乙

酯提取水相，合併有機相無水硫酸鈉乾燥，濃縮，粗品經製備 HPLC 純化得到 3.5 mg 產物 **L-4**，兩步收率 29.1%，LC/MS (ESI): m/z 1382.2 $[M+H]^+$ 。

【0335】 實施例 2-3.

(*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧丙基)-2-氮雜雙環[3.1.0]己-2-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧庚-4-基)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基胺基)丁醯胺基)丁醯胺 本實施例化合物 **1**



【0336】 第一步

(9*H*-芴-9-基)甲基(1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧丙基)-2-氮雜雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸酯 本實施例化合物 **1c**

【0337】 將(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-(((9*H*-芴-9-基)甲氧基)羰基)-2-氮雜雙環[3.1.0]己-3-基)-3-甲氧基-2-甲基丙酸本實施例化合物 **1a** (1.05 g, 2.49 mmol，採用專利申請“US2019/55223 中說明書第 20 頁的步驟 7”揭露的方法製備而得)和 (1*S*,2*R*)-2-胺基-1-苯基丙-1-醇 本實施例化合物 **1b** (0.42 g, 2.78 mmol，採用公知 99201

的方法“*Journal of Organic Chemistry*, 2012, vol. 77, # 12, p. 5454-5460”製備而得) 加入反應瓶，加入 10 mL 二氯甲烷和 2 mL *N,N*-二甲基甲醯胺，氬氣置換三次，攪拌下加入 2-(7-氧化苯并三唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸鹽(1.14 g, 3.00 mmol)和 *N,N*-二異丙基乙胺(0.97 g, 7.47 mmol)，室溫攪拌 1 小時，加入 30 mL 水，用二氯甲烷(15 mL×4)萃取，有機相用飽和氯化鈉溶液(30 mL)洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮，用矽膠柱色譜法以展開劑體系 A 純化所得殘餘物，得到標題產物 本實施例化合物 **1c** (1.38 g, 產率：99.8%)。

MS *m/z* (ESI): 555.2 [*M*+1]

【0338】 第二步

(2*R*,3*R*)-3-((1*S*,3*S*,5*S*)-2-氮雜雙環[3.1.0]己-3-基)-*N*-((1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)-3-甲氧基-2-甲基丙醯胺 本實施例化合物 **1d**

【0339】 將本實施例化合物 **1c** (1.38 g, 2.49 mmol)溶於 10 mL 二氯甲烷中，加入 20 mL 二乙胺，氬氣置換三次，室溫攪拌反應 1 小時。反應液濃縮，用矽膠柱色譜法以展開劑體系 A 純化所得殘餘物，得到標題產物本實施例化合物 **1d** (805 mg, 產率：97.3%)。

MS *m/z* (ESI): 333.2 [*M*+1]

【0340】 第三步

(9*H*-芴-9-基)甲基((*S*)-1-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧丙基)-2-氮雜雙環[3.1.0]己-2-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧庚-4-基)(甲基)胺基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)(甲基)胺基甲酸酯 本實施例化合物 **1f**

【0341】 將(5*S*,8*S*,11*S*,12*R*)-11-((*S*)-第二丁基)-1-(9*H*-芴-9-基)-5,8-二異丙基-12-甲氧基-4,10-二甲基-3,6,9-三側氧-2-氧雜-4,7,10-三氮雜十四-14-酸 本實施例化合物 **1e** (1.54 g, 2.41 mmol, 供應商：皓元)加入反應瓶，加入 30 mL 乙腈，氬氣置換三次，冰水浴降溫至 0-5℃，加入 2-(7-氧化苯并三唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸鹽(1.10 g, 2.89 mmol)和 *N,N*-二異丙基乙胺(0.94 g, 7.27 mmol)，冰浴攪拌 10 分鐘。加入本實施例化合物 **1d** (805 mg, 2.42 mmol)的 10 mL 乙腈混懸液，冰浴攪拌反應 40 分鐘。加入 60 mL 水，用乙酸乙酯(20 mL×4)萃取，有機相用飽和氯化鈉溶液(60 mL)洗滌，無水硫酸鈉乾燥，過濾，濾液減壓濃縮，用矽膠柱色譜法以展開劑體系 A 純化所得殘餘物，得到粗品產物本實施例化合物 **1f** (2.9 g)。

MS *m/z* (ESI): 952.3 [*M*+1]

【0342】 第四步

(*S*)-*N*-((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧丙基)-2-氮雜雙環[3.1.0]己-2-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧庚-4-基)-*N*,3-二甲基-2-((*S*)-3-甲基-2-(甲基胺基)丁醯胺基)丁醯胺 本實施例化合物 **1**

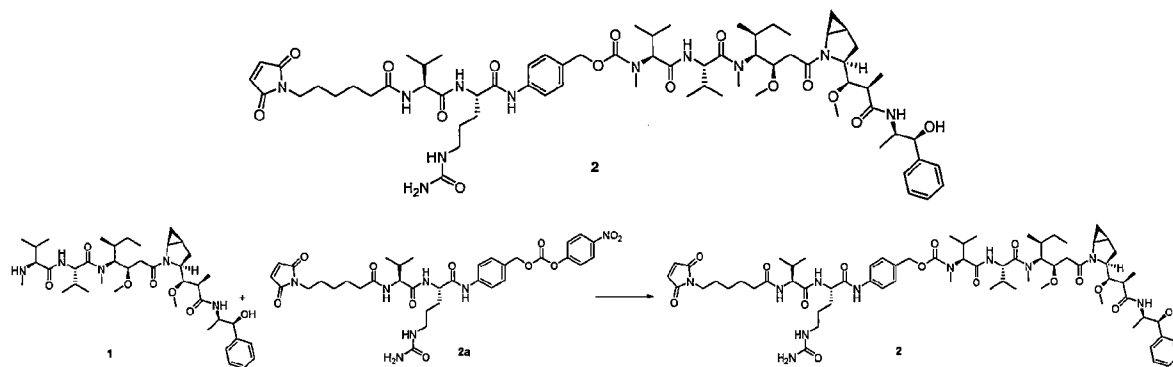
【0343】 將粗品本實施例化合物 **1f** (510 mg, 0.53 mmol)溶於 2 mL 二氯甲烷中，加入 4 mL 二乙胺，氬氣置換三次，室溫攪拌反應 1 小時。反應液濃縮，用矽膠柱色譜法以展開劑體系 A 純化所得殘餘物，得到標題產物本實施例化合物 **1** (266 mg, 產率：68.0%)。

MS *m/z* (ESI): 730.4 [*M*+1]

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.36-7.40 (m, 2H), 7.31 (t, 2H), 7.24 (d, 1H), 4.69 (d, 1H), 4.56 (d, 1H), 4.17-4.28 (m, 2H), 4.06-4.14 (m, 1H), 3.91 (d, 1H), 3.78 (t, 1H), 3.27-3.44 (m, 7H), 3.15 (s, 3H), 2.84-2.93 (m, 1H), 2.60-2.67 (m, 2H), 2.30-2.37 (m, 3H), 2.02-2.10 (m, 2H), 1.79-1.95 (m, 4H), 1.38-1.53 (m, 2H), 1.25-1.36 (m, 2H), 1.21 (d, 1H), 1.13-1.17 (m, 2H), 1.07-1.11 (m, 2H), 0.93-1.05 (m, 15H), 0.83-0.89 (m, 4H), 0.70-0.79 (m, 1H)。

【0344】 實施例 2-4.

4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苄基((*S*)-1-(((*S*)-1-(((3*R*,4*S*,5*S*)-1-((1*S*,3*S*,5*S*)-3-((1*R*,2*R*)-3-(((1*S*,2*R*)-1-羥基-1-苯基丙-2-基)胺基)-1-甲氧基-2-甲基-3-側氧丙基)-2-氮雜雙環[3.1.0]己-2-基)-3-甲氧基-5-甲基-1-側氧庚-4-基)(甲基)胺基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧丁-2-基)(甲基)胺基甲酸酯 本實施例化合物 **2**



【0345】 將本實施例化合物 **1** (30 mg, 0.041 mmol) 加入到 1 mL *N,N*-二甲基甲醯胺中，加入 4-((*S*)-2-((*S*)-2-(6-(2,5-二側氧-2,5-二氫-1*H*-吡咯-1-基)己醯胺)-3-甲基丁醯胺)-5-脲基戊醯胺)苄基 (4-硝基苯基) 碳酸酯 本實施例化合物 **2a** (45 mg, 0.061 mmol, 供應商：Ark)，再加入 0.25 mL 吡啶，氬氣置換三次，再加入 1-羥基苯并三唑(12 mg, 0.089 mmol)和 *N,N*-二異丙基乙胺(16 mg, 0.123 mmol)，室溫攪拌反應 4 小時後補加 **2a** (45 mg, 0.061 mmol)，繼續攪拌 16 小時。反應液

進行高效液相色譜法純化(分離條件：色譜柱：XBridge Prep C18 OBD 5um 19*250mm；流動相:A-水(10mmol NH₄OAc)：B-乙腈，梯度沖提，流速：18 mL/min)，收集其相應組分，減壓濃縮，得到標題產物本實施例化合物 **2** (18 mg，產率：33.0%)。

MS m/z (ESI): 1329.3 [M+1]

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.58 (d, 2H), 7.29-7.42 (m, 6H), 7.20-7.26 (m, 1H), 6.79 (s, 2H), 5.04-5.20 (m, 4H), 4.47-4.61 (m, 3H), 4.13-4.28 (m, 3H), 4.06-4.12 (m, 1H), 3.91 (d, 1H), 3.75-3.82 (m, 1H), 3.48 (t, 3H), 3.27-3.41 (m, 7H), 3.16-3.25 (m, 2H), 3.18 (s, 3H), 2.91-2.97 (m, 2H), 2.60-2.65 (m, 2H), 2.27 (t, 2H), 2.20 (t, 1H), 2.01-2.10 (m, 3H), 1.69-1.94 (m, 6H), 1.63-1.68 (m, 6H), 1.46-1.51 (m, 1H), 1.27-1.37 (m, 5H), 1.12-1.21 (m, 3H), 1.09 (d, 2H), 0.93-1.04 (m, 11H), 0.80-0.92 (m, 11H), 0.70-0.77 (m, 2H)。

【0346】 三、抗 CD79B 抗體藥物偶聯物的製備：

ADC 載藥量分析的實驗目的及原理：

採用紫外分光光度法(UV-Vis)測定 ADC 載量(Thermo nanodrop2000 紫外分光光度計)。原理是在某波長下 ADC 的總吸光值等於藥物與抗體在該波長下吸光值的加和。

【0347】 實驗方法

將裝有琥珀酸鈉緩衝液的比色皿分別置於參比吸收池和樣品測定吸收池中後，扣除溶劑空白後，再將裝有待測試溶液的比色皿置於樣品測定吸收池中，測定 280nm 和 370nm 處吸光度。

【0348】 結果計算：

$$A_{280nm} = \epsilon_{mab-280}bC_{mab} + \epsilon_{Drug-280}bC_{Drug} \quad \text{式(1)}$$

$\epsilon_{Drug-280}$ ：藥物在 280nm 平均莫耳消光係數 5100；

C_{Drug} ：藥物的濃度；

$\epsilon_{mab-280}$ ：單抗在 280nm 平均莫耳消光係數 214600；

C_{mab} ：單抗的濃度；

b ：光程長度為 1cm。

【0349】 同理可以得到樣品在 370nm 下的總吸光值方程：

$$A_{370nm} = \epsilon_{mab-370}bC_{mab} + \epsilon_{Drug-370}bC_{Drug} \quad \text{式(2)}$$

$\epsilon_{Drug-370}$ ：藥物在 370nm 平均莫耳消光係數 19000；

C_{Drug} ：藥物的濃度；

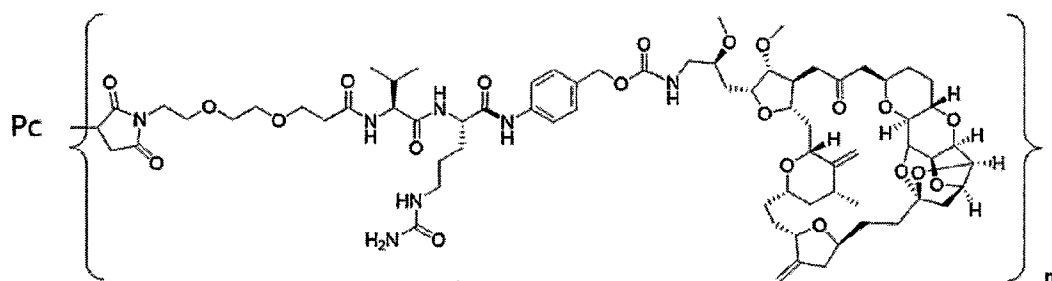
$\epsilon_{mab-370}$ ：單抗在 370nm 消光係數為 0；

C_{mab} ：單抗的濃度；

b ：光程長度為 1cm。

【0350】 由式(1)和式(2)兩種方程結合單株抗體和藥物在兩個檢測波長下的消光係數和濃度資料可以計算出 ADC 的載藥量：載藥量= C_{Drug}/C_{mab} 。

【0351】 實施例 3-1. ADC-1

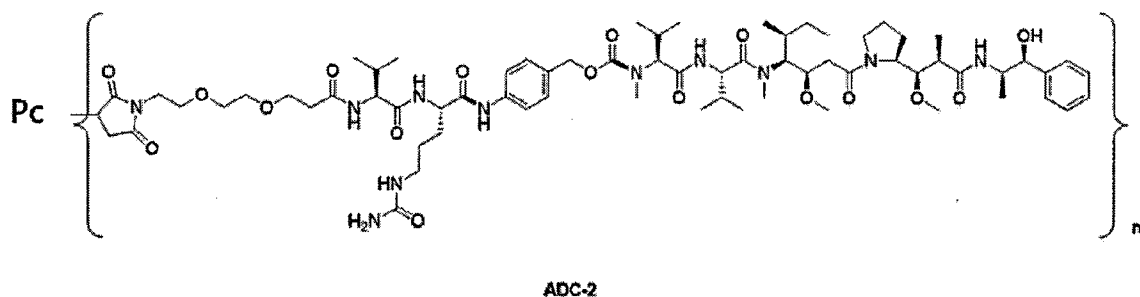


ADC-1

【0352】在 37 °C 條件下，向抗體 **hAb015-10** 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，1.5 mL，0.101 μ mol) 加入配置好的三(2-羧乙基)磷 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，25.3 μ L，0.253 μ mol)，置於水浴振盪器，於 37 °C 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25 °C。

【0353】將實施例 2-2-1 中的化合物 **B** (1.41 mg，1.015 μ mol) 溶解於 50 μ L 二甲亞碸中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25 °C 下振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-1** (即 **hAb015-10-cys-B**) 的 PBS 緩衝液 (0.84 mg/mL，13.5 mL)，於 4 °C 冷凍儲存。HIC 計算平均值：n=3.06。

【0354】實施例 3-2. ADC-2



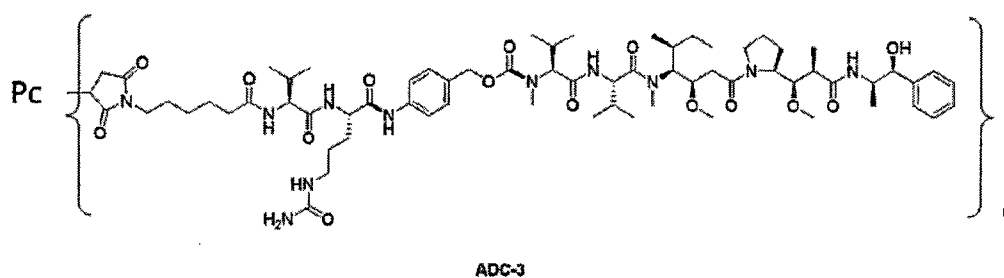
【0355】在 37 °C 條件下，向抗體 **hAb015-10** 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，3.5 mL，0.236 μ mol) 加入配置好的三(2-羧乙基)磷 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，59.1 μ L，0.591 μ mol)，置於水浴振盪器，於 37 °C 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25 °C。

【0356】將化合物 **A** (3.2 mg，2.348 μ mol) 溶解於 150 μ L 二甲亞碸中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25 °C 下振盪反應 3 小時，停止反應。

將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-2**(即 **hAb015-10-cys-Malei-PEG2-vc-PAB-MMAE**) 的 PBS 緩衝液(2.17 mg/mL，16.4 mL)，於 4 °C 冷凍儲存。

RP-HPLC 計算平均值：n=3.68。

【0357】 實施例 3-3. ADC-3

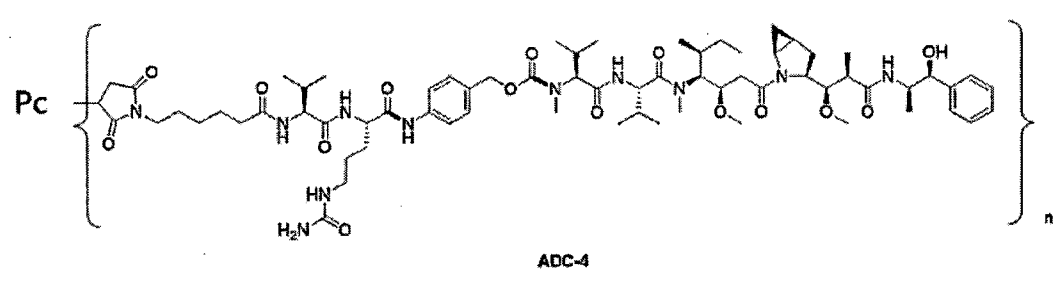


【0358】 在 37 °C 條件下，向抗體 **hAb015-10** 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，5.0 mL，0.338 umol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，85.0 μL，0.850 umol)，置於水浴振盪器，於 37°C 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25°C。

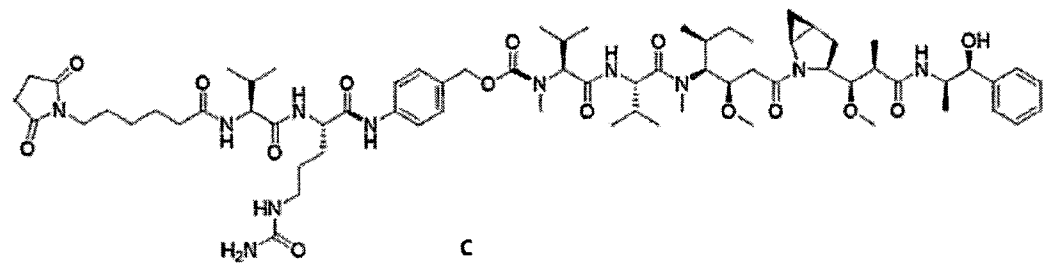
【0359】 將化合物 **MC-vc-PAB-MMAE** (4.45 mg，3.380 umol) 溶解於 250 μL 二甲亞砜中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25°C 下振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-3**(即 **hAb015-10-cys-MC-vc-PAB-MMAE**) 的 PBS 緩衝液(2.79 mg/mL，17.4 mL)，於 4 °C 冷凍儲存。

CE-SDS 計算平均值：n=3.09。

【0360】 實施例 3-4. ADC-4



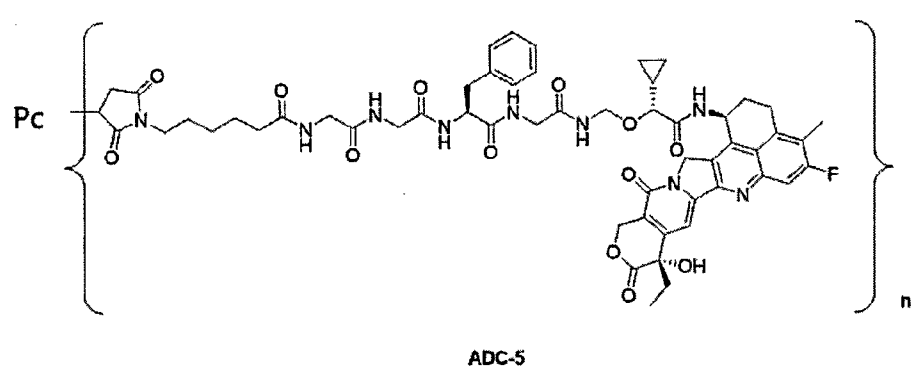
【0361】 在 37℃ 條件下，向抗體 **hAb015-10** 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，1.8 mL，0.122 umol) 加入配置好的三 (2-羧乙基)膦 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，30.4 μL，0.304 umol)，置於水浴振盪器，於 37℃ 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25℃。



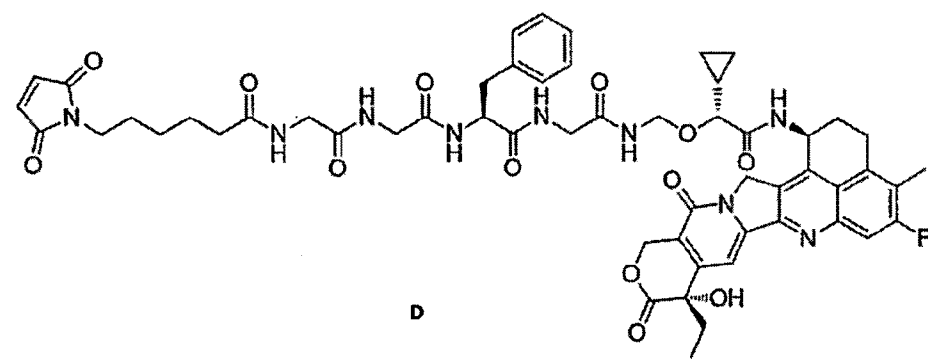
【0362】 將本實施例化合物 **C** (1.62 mg，1.220 umol) 溶解於 90 μL 二甲亞砜中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25℃ 下振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-4** (即 **hAb015-10-cys-C**) 的 PBS 緩衝液 (1.37 mg/mL，12.0 mL)，於 4℃ 冷凍儲存。

RP-HPLC 計算平均值：n=4.52。

【0363】 實施例 3-5. ADC-5



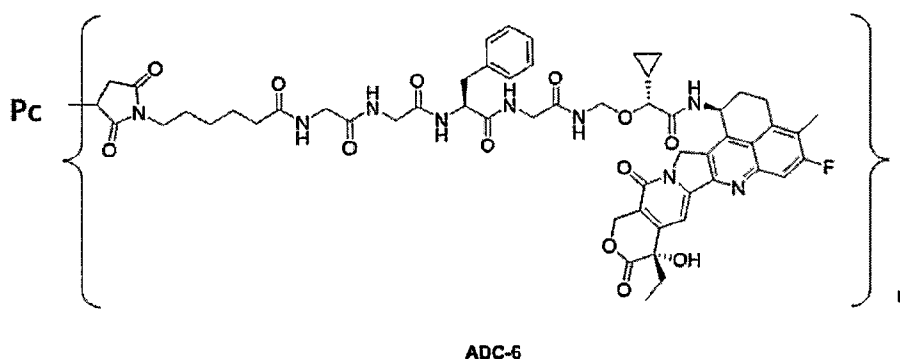
【0364】 在 37 °C 條件下，向抗體 **hAb015-10** 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，1.5 mL，0.101 μ mol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，16.2 μ L，0.162 μ mol)，置於水浴振盪器，於 37 °C 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25 °C。



【0365】 將本實施例化合物 **D** (0.87 mg，0.810 μ mol) 溶解於 37 μ L 二甲亞碸中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25 °C 下振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-5** (即 **HAB015-10-cys-D**, DAR 值約為 2) 的 PBS 緩衝液 (0.90 mg/mL，14.0 mL)，於 4 °C 冷凍儲存。

【0366】 化合物 **D** 的製備方法引自 WO2020063676A，例如其實施例 9。
RP-HPLC 計算平均值：n=1.81。

【0367】 實施例 3-6. ADC-6

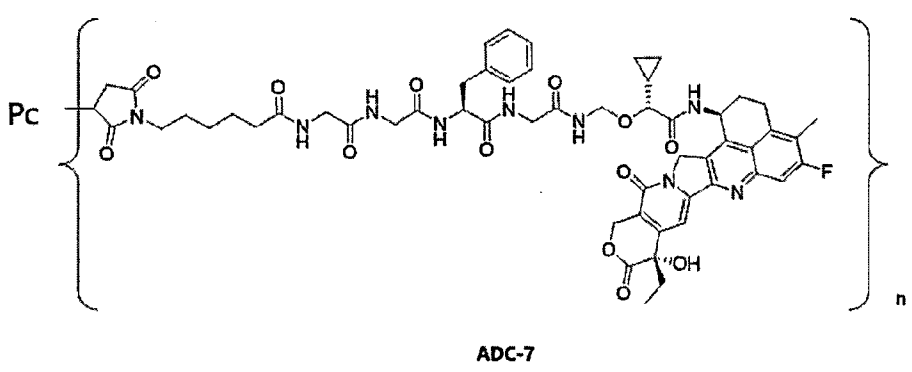


【0368】 在 37 °C 條件下，向抗體 **hAb015-10** 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，1.5 mL，0.101 μ mol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，25.3 μ L，0.253 μ mol)，置於水浴振盪器，於 37 °C 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25 °C。

【0369】 將實施例 3-5 中的化合物 **D** (1.09 mg，1.015 μ mol) 溶解於 45 μ L 二甲亞碸中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25 °C 下振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-6** (即 **hAb015-10-cys-D**，目標 DAR 值為約 4) 的 PBS 緩衝液 (0.71 mg/mL，14.0 mL)，於 4 °C 冷凍儲存。

RP-HPLC 計算平均值：n=3.46。

【0370】 實施例 3-7. ADC-7

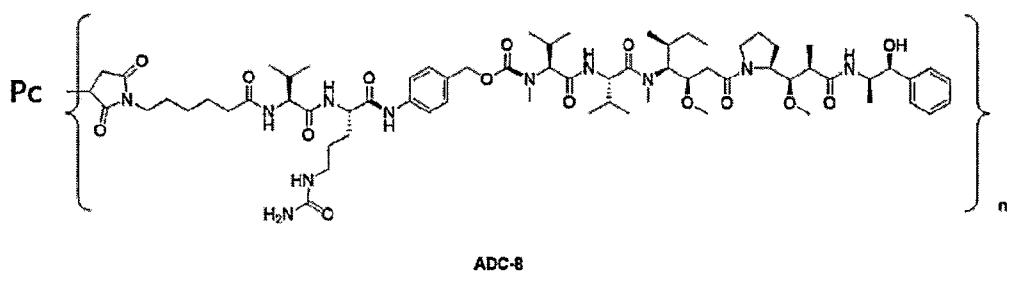


【0371】 在 37 °C 條件下，向抗體 **hAb015-10** 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，1.5 mL，0.101 umol) 加入配置好的三(2-羧乙基)磷 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，50.7 μL，0.507 umol)，置於水浴振盪器，於 37 °C 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25°C。

【0372】 將實施例 3-5 中的化合物 **D** (1.63 mg，1.518 umol) 溶解於 68 μL 二甲亞砜中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25 °C 下振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-7**(即 **hAb015-10-cys-D**, **DAR 值約為 6**) 的 PBS 緩衝液(0.81 mg/mL，13.5 mL)，於 4 °C 冷凍儲存。

RP-HPLC 計算平均值：n=5.84。

【0373】 實施例 3-8. ADC-8



【0374】 在 37℃ 條件下，向抗體 SN8 的 PBS 緩衝水溶液 (pH=6.5 的 0.05 M 的 PBS 緩衝水溶液；10.0 mg/mL，79 mL，5.338 μ mol) 加入配置好的三(2-羧乙基)膦 (TCEP) 的水溶液 (10 mM，1.388 mL，13.88 μ mol)，置於水浴振盪器，於 37 °C 振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用水浴降溫至 25 °C。

【0375】 將化合物 **MC-VC-PAB-MMAE** (70.3 mg，53.40 μ mol) 溶解於 3.5 mL 二甲亞碲中，加入到上述反應液中，置於水浴振盪器，於 25 °C 下振盪反應 3 小時，停止反應。將反應液用 Sephadex G25 凝膠柱脫鹽純化 (沖提相：pH 為 6.5 的 0.05M 的 PBS 緩衝水溶液，含 0.001M 的 EDTA)，得到本實施例標題產物 **ADC-8** (即 **SN8-cys-MC-PAB-MMAE**，**DAR 值約為 4**) 的 PBS 緩衝液 (5.83 mg/mL，132 mL)，於 4 °C 冷凍儲存。

CE-SDS 計算平均值：n=3.59。

【0376】 四、生物學評價：

實施例 4-1. Biacore 親和力實驗

本實施例用 Biacore 測定 CD79B 抗體 (hAb015-10 和 SN8) 和 ADC 與 CD79B 蛋白的親和力。

【0377】 實驗儀器、材料與試劑：Biacore T200 (GE)；生物傳感晶片 CM5 (Cat. # BR-1005-30，GE)；胺基偶聯試劑盒 (Cat. # BR-1000-50，GE)；人抗捕獲試劑盒 (Cat. # BR-1008-39，GE)；人 CD79B-His 蛋白 (Cat. # 29750-H08H，Sino Biological)；HBS-EP+ 10 X 緩衝溶液 (Cat. # BR-1006-69，GE) 用 D. I. Water 稀釋至 1 X (pH 7.4)；

【0378】 實驗方法：按照人抗捕獲試劑盒說明書中的方法將人抗捕獲抗體共價偶聯於 CM5 生物晶片上，從而親和捕獲一定量的 CD79B 抗體。

【0379】資料的統計和分析：用 BIAevaluation version 4.1，GE 軟體以 (1:1)Langmuir 模型擬合數據，得出親和力數值。

【0380】實驗結果和結論：CD79B 抗體和 ADC 與 CD79B 蛋白相結合的親和力檢測結果見表 10。針對人 CD79B 蛋白，裸抗和不同 ADC 具有類似的結合能力，且均高於陽性藥 Polivy。

【0381】其中，SN8(即 Polivy 中的抗體)序列為：

>SN8 重鏈胺基酸序列

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEIL
PGGGDTNYNEIFKGRATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLD
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

SEQ ID NO : 32

【0382】> SN8 輕鏈胺基酸序列

```
DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSDYEGDSFLNWFYQQKPGKAPKLLIY
AASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC
```

SEQ ID NO : 33。

【0383】 表 10. 抗體及不同 ADC 與人 CD79B 蛋白的結合

ADC/抗體	人 CD79B EC ₅₀ (nM)
hAb015-10	0.38
ADC-1	0.51
ADC-2	0.48
ADC-3	0.40
ADC-4	0.32
ADC-5	0.80
ADC-6	0.43
ADC-7	0.53
ADC-8	5.98

【0384】 實施例 4-2. 體外細胞內吞實驗

用高表達人 CD79B 蛋白的 DOHH-2 細胞(DSMZ，ACC 47)進行細胞內吞實驗，以評估 ADC 的內吞能力。

【0385】 DOHH-2 細胞按照一般懸浮細胞的方法進行培養，完全培養基的成分為：RPMI 1640 培養基(GIBCO，Cat No.: 11835-030)，加 10%(v/v) 胎牛血清(FBS)(GIBCO，Cat No.: 10099-141) 和青黴素/鏈黴素(GIBCO，Cat No.: 15070-063)。實驗時 4℃ 低溫離心收集細胞，1000rpm，5 分鐘。將細胞重懸到 10-15ml 在冰上預冷的 FACS 緩衝液中。FACS 緩衝液的成分為：磷酸鹽緩衝液(PBS)，pH7.4，加 2% 胎牛血清(FBS)。整個實驗過程中，FACS 緩衝液放在冰上預冷。細胞計數離心後以 300,000 細胞/孔加入 96 孔盤中，離心棄去上清後加入 Fc 封

閉液，12.5μg/ml (BD，Cat No.: 564220)，100μl/孔。在室溫下封閉 10 分鐘。然後加入 20μg/ml 的待測 ADC 至對應的孔中，4℃避光孵育 1 小時。用預冷的 PBS 緩衝液洗 2 遍以除去未結合的 ADC。加入細胞完全培養基(具有 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培養基)，在 37℃，5% CO₂ 下孵育 0 小時和 4 小時。離心棄去上清後加入 100μl /孔 2% PFA 緩衝液，重懸細胞後放置 10 分鐘。然後用 FACS 緩衝液清洗 3 遍，然後加入 100μL 二抗溶液(螢光標記羊抗人二抗: 1:250 稀釋，濃度為 2 μg/ml，Biolegend，Cat#409304), 在 4℃避光孵育半小時。加入預冷的 PBS 緩衝液，4℃離心棄上清，重複三次。細胞重懸在 FACS 緩衝液中，200μl /孔，使用流式細胞儀(BD FACS Calibur)檢測。

【0386】 結果見表 11。不同 ADC 與 DoHH2 細胞孵育 4h 的內吞率均大於 65%，具有良好的內吞能力。各 ADC 的內吞率與陽性藥 Polivy 相當。

【0387】 表 11.不同 ADC 在 DoHH2 細胞中的內吞作用

EC ₅₀	內吞率(4h)
ADC-1	73%
ADC-2	66%
ADC-3	70%
ADC-4	81%
ADC-5	76%
ADC-6	75%
ADC-7	68%
ADC-8	76%

【0388】 實施例 4-3. 細胞增殖實驗

本實施例評價不同 ADC 對體外培養 DoHH2、WSU-DLCL2 和 Raji 細胞增殖的影響。根據文獻報導(Leukemia. 2015 Jul; 29(7):1578-86 ; Blood. 2007 Jul 15; 110(2):616-23)，DoHH2 是 CD79B 高表達細胞，WSU-DLCL2 是 CD79B 低表達細胞，Raji 為 CD79B 表達陰性細胞。

【0389】 實驗材料：

ADC-1：無色澄明液體，濃度 0.84mg/mL，純度 99.17%；

ADC-2：無色澄明液體，濃度 2.17mg/mL，純度 97.93%；

ADC-3：無色澄明液體，濃度 2.79mg/mL，純度 98.28%；

ADC-4：無色澄明液體，濃度 1.36mg/mL，純度 98.48%；

ADC-5：無色澄明液體，濃度 0.9mg/mL，純度 98.49%；

ADC-6：無色澄明液體，濃度 0.71mg/mL，純度 98.71%；

ADC-7：無色澄明液體，濃度 0.81mg/mL，純度 98.27%；

ADC-8：無色澄明液體，濃度 5.83mg/mL，純度 97.07%。

【0390】 經實際檢測，ADC-1 的 DAR=3.06；ADC-2 的 DAR=3.68；ADC-3 的 DAR=3.09；ADC-4 的 DAR=4.52；ADC-5 的 DAR=1.81；ADC-6 的 DAR=3.46；ADC-7 的 DAR=5.84；ADC-8 的 DAR=3.59。

【0391】 以上藥物均遮光，4℃密閉保存。

細胞株：DoHH2 購自 DSMZ，WSU-DLCL-2 細胞購自 American Type Culture Collection(ATCC)，Raji 細胞購自 American Type Culture Collection(ATCC)。

【0392】 細胞用含 10 % 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培養液培養。

【0393】 試劑及儀器：RPMI 1640 和 FBS 購自 Gibco 公司；四甲基偶氮唑蘭(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide，MTT)購自上海生工。酶標儀購自 BioTek 公司。

【0394】 實驗方法：

接種一定數量的對數生長期細胞於 96 孔培養盤，加入不同濃度的藥物作用 72 小時。藥物作用結束後，加入 MTT 工作液作用 4 小時，然後加入三聯液溶解藍紫色結晶甲瓚。酶標儀 570nm 和 690nm 波長下測定 OD 值，以下列公式計算細胞生長抑制率：

抑制率=(對照孔 OD_{570nm}-OD_{690nm}－給藥孔 OD_{570nm}-OD_{690nm})/對照孔 OD_{570nm}-OD_{690nm}×100%

【0395】 根據各濃度抑制率，用 PrismGraph 8 計算半數抑制濃度 IC₅₀。

【0396】 結果如表 12 所示。

表 12. 不同 ADC 的體外增殖抑制活性

化合物	毒素	IC ₅₀ (ng/ml)		
		DoHH2	WSU-DLCL2	Raji
ADC-1	微管聚集抑制劑	2.1	3.2	>10000
ADC-2		1.1	1.3	>10000
ADC-3		3.3	5.9	>10000
ADC-4		1.7	3.7	>10000
ADC-5	Topo I 抑制劑	8.5	68.3	>10000
ADC-6		3.3	54.2	>10000
ADC-7		2.0	53.4	~10000
ADC-8	微管聚集抑制劑	80.6	116.9	>10000

【0397】 實施例 4-4. ADC 對人彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的療效

本實施例評價並比較各 ADC 藥物對裸小鼠皮下移植瘤的療效。

【0398】 hIgG1(HRP00252)：無色澄明液體，濃度 22.77mg/mL，純度 99.03%，生產日期 2018.7.24，有效期至 2020.01.24(暫定 18 個月)；-70℃凍存。

【0399】 1. 藥物：ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-6、ADC-8 同實施例 4-3。

【0400】 2. 細胞和小鼠：人彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 WSU-DLCL2 細胞購自 American Type Culture Collection。WSU-DLCL2 細胞用 10-cm 培養皿培養，培養條件為 RPMI 1640 培養基(Gibco)中加 10%胎牛血清以及青、鏈黴素，於 37℃、含 5% CO₂空氣的培養箱中培養。一週 2-3 次傳代，當細胞呈指數生長期時，收集細胞，計數，接種。

【0401】 裸小鼠，BALB/c-nu，35 日，母，購自北京華阜康生物科技股份有限公司。生產許可證號：SCXK(京)2019-0008，動物合格證號 No.1103222011004014。飼養環境：SPF 級。

【0402】 3. 實驗步驟：每隻裸小鼠皮下接種 2.1×10^7 WSU-DLCL2 細胞，待腫瘤生長至 100-150mm³ 後，根據腫瘤體積將動物分組(D0)。小鼠靜脈注射(IV)給藥，給藥體積 10 mL/kg；具體給藥劑量和給藥方案見表 X。每週測 2 次腫瘤體積，稱小鼠體重，記錄資料。

【0403】 4. 實驗指標及統計學分析：

實驗指標為考察藥物對腫瘤生長的影響，具體指標為 T/C%或抑瘤率 TGI(%)。

【0404】每週二次用遊標卡尺測量腫瘤直徑, 腫瘤體積(V)計算公式為：

$$V = 1/2 \times a \times b^2, \text{ 其中 } a、b \text{ 分別表示長、寬。}$$

$T/C(\%) = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100$ ，其中 T、C 為實驗結束時的腫瘤體積；T₀、C₀ 為實驗開始時的腫瘤體積。其中，T 為給藥 ADC 的腫瘤體積，C 為給藥 IgG1 作為對照組的腫瘤體積。

$$\text{腫瘤生長抑制率}\%(TGI\%) = 100 - T/C(\%);$$

當腫瘤出現消退時，腫瘤生長抑制率%(TGI%)=100-(T-T₀)/T₀×100；

【0405】如果腫瘤比起始體積縮小，即 T<T₀或 C<C₀時，即定義為腫瘤部分消退(PR)；如果腫瘤完全消失，即定義為腫瘤完全消退(CR)。

【0406】實驗結束、達到實驗終點、或溶劑組平均腫瘤體積達到 1500mm³，CO₂麻醉犧牲動物，隨後解剖取瘤並拍照。

【0407】除非特別說明，二組腫瘤體積之間比較採用雙因素 ANOVA 檢驗，P<0.05 定義為有統計學顯著性差異。

【0408】5. 結果：

ADC-1(3mg/kg、10 mg/kg, IV, D0)劑量依賴性地抑制 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的生長，抑瘤率分別為 75%和 137%，10 mg/kg 劑量組全部腫瘤部分消退；

ADC-2 (3mg/kg、10 mg/kg, IV, D0)對 WSU-DLCL2 的抑瘤率分別為 76%和 123%，10 mg/kg 劑量組有全部腫瘤部分消退；

ADC-3 (3mg/kg, IV, D0)對 WSU-DLCL2 的抑瘤率為 76%，有 1/6 腫瘤部分消退；

ADC-4(3mg/kg、10 mg/kg, IV, D0)對 WSU-DLCL2 的抑瘤率分別為 95%和 129%, 3 mg/kg 和 10 mg/kg 劑量組分別有 1/6 和 6/6 腫瘤部分消退;

ADC-6 (3mg/kg, IV, D0)對 WSU-DLCL2 的抑瘤率為 86%, 有 2/6 腫瘤部分消退;

ADC-8 (3mg/kg、10mg/kg, IV, D0)對 WSU-DLCL2 的抑瘤率分別為 39%和 93%, 10 mg/kg 劑量組有 4/6 腫瘤部分消退。

【0409】荷瘤小鼠對以上藥物均能較好耐受，沒有明顯體重減輕等症狀發生。使用 IgG1 作為陰性對照。結果請參見表 13 以及圖 13 A 至圖 13C、圖 14。

【0410】 表 13. ADC 對 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的療效

分組	給藥 時間	給藥 途徑	平均腫瘤體積 (mm ³ ±SEM)		T/C (%)	腫瘤生長 抑制率(%)	P 值	部分 消退	實驗開始/結 束動物數
			D0	D21	D21	D21	D21		
IgG1 (10 mg/kg)	D0	IV	115.3±2.8	821.3±85.1	-	-	-	-	10/10
ADC-1 (3 mg/kg)	D0	IV	113.6±3.8	291.8±71.6	25	75	<0.0001	0	6/6
ADC-1 (10 mg/kg)	D0	IV	116.7±4.6	74.0±3.3	-37	137	<0.0001	6	6/6
ADC-2 (3 mg/kg)	D0	IV	119.4±3.2	289.2±24.5	24	76	<0.0001	0	6/6
ADC-2 (10 mg/kg)	D0	IV	110.8±1.8	85.2±4.2	-23	123	<0.0001	6	6/6
ADC-3 (3 mg/kg)	D0	IV	114.4±2.9	284.8±50.0	24	76	<0.0001	1	6/6
ADC-4 (3 mg/kg)	D0	IV	114.8±3.8	151.5±18.7	5	95	<0.0001	1	6/6
ADC-4 (10 mg/kg)	D0	IV	115.4±4.9	82.5±3.0	-29	129	<0.0001	6	6/6
ADC-6 (3 mg/kg)	D0	IV	118.1±4.5	217.4±80.3	14	86	<0.0001	2	6/6
ADC-8 (3 mg/kg)	D0	IV	117.6±3.0	547.2±38.1	61	39	<0.0001	0	6/6
ADC-8 (10 mg/kg)	D0	IV	115.0±3.7	167.8±50.3	7	93	<0.0001	4	6/6

D0: 第一次給藥時間；P 值指與溶劑相比；IV：靜脈注射；部分消退：D21 腫瘤體積小於 D0。

【0411】 6. 結論

ADC-1、ADC-2、ADC-3、ADC-4、ADC-6 和 ADC-8 的 3mg/kg 或 10mg/kg 單次靜脈注射均對 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤有明顯療效，引起腫瘤部分消退；藥物有明顯的劑量依賴性，且同等劑量下各 ADC 藥效均優於陽性藥 ADC-8(即 Polivy)。荷瘤小鼠對以上藥物均能較好耐受。

【0412】 實施例 4-5. ADC 對人彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的療效

本實施例進一步評價並比較 ADC 藥物對 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的療效。

【0413】 1. 藥物：用生理鹽水將 ADC-5、ADC-6、ADC-7、ADC-1、ADC-8 藥物稀釋至實施例 4-3 中濃度。

【0414】 2. 細胞和小鼠：同實施例 4-4。

【0415】 3. 實驗步驟：每隻裸小鼠皮下接種 2×10^7 WSU-DLCL2 細胞，待腫瘤生長至 100-150mm³ 後，根據腫瘤體積將動物分組(D0)。小鼠靜脈注射(IV)給藥，給藥體積 10 mL/kg；具體給藥劑量和給藥方案見表 12。每週測 2 次腫瘤體積，稱小鼠體重，記錄資料。

【0416】 4. 實驗指標同實施例 4-4，統計學分析為：

除非特別說明，二組腫瘤體積之間比較採用雙尾 Student's t 檢驗， $P < 0.05$ 定義為有統計學顯著性差異。

【0417】 5. 結果

ADC-5 (3mg/kg、6mg/kg、12mg/kg, IV, D0)對 WSU-DLCL2 裸小鼠皮下移植瘤的抑瘤率分別為 69%、86%和 88%，其中 6 mg/kg 和 12 mg/kg 劑量組分別有 1/6 和 1/6 腫瘤部分消退；

ADC-6 (1.5 mg/kg、3 mg/kg、6 mg/kg, IV, D0) 對 WSU-DLCL2 皮下移植瘤的抑瘤率分別為 66%、108%和 125%，其中 3 mg/kg 和 6 mg/kg 劑量組分別有 5/6 和 6/6 腫瘤部分消退；

ADC-7 (1 mg/kg, IV, D0) 對 WSU-DLCL2 皮下移植瘤的抑瘤率為 91%，有 1/6 腫瘤部分消退；

ADC-1 (3 mg/kg, IV, D0) 對 WSU-DLCL2 皮下移植瘤的抑瘤率為 44%；

ADC-8 (3 mg/kg, IV, D0) 對 WSU-DLCL2 皮下移植瘤的抑瘤率為 10%。

【0418】 荷瘤小鼠對以上藥物均能很好耐受，沒有體重減輕等症狀發生。

【0419】 具體結果請參見表 14 和圖 15 至圖 17。

表 14. 給藥方案和實驗結果

分組	給藥	途徑	平均腫瘤體積(mm3)		平均腫瘤體積(mm3)		% T/C		抑瘤率	P值	部分消退	實驗開始	實驗結束
			D0	SEM	D21	SEM	D21	D21				每組動物數	每組動物數
IgG1 陰性對照 (12mg/kg)	D0	IV	111.9 ± 2.2		872.1 ± 70.0		-	-	-		0	10	10
ADC-5 (3mg/kg)	D0	IV	111.0 ± 2.0		343.7 ± 31.4		31	69	0.000		0	6	6
ADC-5 (6mg/kg)	D0	IV	110.8 ± 1.7		218.5 ± 43.7		14	86	0.000		1	6	6
ADC-5 (12mg/kg)	D0	IV	111.3 ± 3.0		203.6 ± 68.3		12	88	0.000		1	6	6
ADC-6 (1.5mg/kg)	D0	IV	109.7 ± 0.9		366.3 ± 49.9		34	66	0.000		0	6	6
ADC-6 (3mg/kg)	D0	IV	108.6 ± 2.5		99.4 ± 9.3		-8	108	0.000		5	6	6
ADC-6 (6mg/kg)	D0	IV	108.7 ± 1.5		81.2 ± 3.4		-25	125	0.000		6	6	6
ADC-7 (1mg/kg)	D0	IV	107.0 ± 0.8		178.1 ± 25.7		9	91	0.000		1	6	6
ADC-1 (3mg/kg)	D0	IV	113.0 ± 2.6		541.8 ± 68.8		56	44	0.007		0	6	6
ADC-8 (3mg/kg)	D0	IV	105.0 ± 1.4		792.6 ± 75.9		90	10	0.505		0	6	6

其中，D0：第一次給藥時間；P 值指與溶劑相比；IV：靜脈注射。

【0420】 實施例 4-6. ADC 對人 B 細胞淋巴瘤 DoHH2 裸小鼠皮下移植瘤的療效

本實施例進一步評價並比較 ADC 藥物對 DoHH2 裸小鼠皮下移植瘤的療效。

【0421】 1. 藥物：用生理鹽水將 ADC-1、ADC-6、ADC-8 藥物稀釋至實施例 4-3 中濃度。

【0422】 2. 細胞和小鼠：DOHH-2 細胞購自德國 DSMZ。DOHH-2 細胞用 10-cm 培養皿培養，培養條件為 RPMI 1640 培養基(Gibco)中加 10%胎牛血清以及青、鏈黴素，於 37°C、含 5% CO₂空氣的培養箱中培養。一週 2-3 次傳代，當細胞呈指數生長期時，收集細胞，計數，接種。

【0423】 裸小鼠，BALB/c-nu，4-5 週，母，購自上海靈暢生物科技有限公司。生產許可證號：SCXK(滬)2018-0003，動物合格證號 20180003010222。飼養環境：SPF 級。

【0424】 3. 實驗步驟：每隻裸小鼠皮下接種 3×10^7 DOHH-2 細胞，待腫瘤生長至 100-150mm³ 後，根據腫瘤體積將動物分組(D0)。小鼠靜脈注射(IV)給藥，給藥體積 10 mL/kg；具體給藥劑量和給藥方案見表 15。每週測 2 次腫瘤體積，稱小鼠體重，記錄資料。

【0425】 4. 實驗指標及統計學分析：

實驗指標為考察藥物對腫瘤生長的影響，具體指標為 T/C%或抑瘤率 TGI(%)。

【0426】 每週二次用遊標卡尺測量腫瘤直徑，腫瘤體積(V)計算公式為：

$$V = 1/2 \times a \times b^2 \quad \text{其中 } a、b \text{ 分別表示長、寬。}$$

$T/C(\%) = (T - T_0) / (C - C_0) \times 100$ 其中 T、C 為實驗結束時的腫瘤體積；T₀、C₀ 為實驗開始時的腫瘤體積。T 為給藥 ADC 的腫瘤體積，C 為給藥 IgG1 作為對照組的腫瘤體積。

$$\text{腫瘤生長抑制率}\%(TGI\%) = 100 - T/C(\%);$$

$$\text{當腫瘤出現消退時，腫瘤生長抑制率}\%(TGI\%) = 100 - (T - T_0) / T_0 \times 100;$$

如果腫瘤比起始體積縮小，即 $T < T_0$ 或 $C < C_0$ 時，即定義為腫瘤部分消退(PR)；
如果腫瘤完全消失，即定義為腫瘤完全消退(CR)。

【0427】 實驗結束、達到實驗終點、或溶劑組平均腫瘤體積達到 1500mm^3 ，
CO₂ 麻醉犧牲動物，隨後解剖取瘤並拍照。

【0428】 除非特別說明，二組腫瘤體積之間比較採用雙因素 ANOVA 檢驗，
 $P < 0.05$ 定義為有統計學顯著性差異。

【0429】 5. 結果：

ADC-1、ADC-6、ADC-8(1 mg/kg, IV, D0) 對 DOHH-2 裸小鼠皮下移植瘤的
抑瘤率分別為 82%(1/6 PR)、127%(5/6 PR)、41%；荷瘤小鼠對以上藥物均能很好
耐受，沒有明顯體重減輕等症狀發生。

【0430】 結果請參見表 15 以及圖 18、圖 19。

表 15. 不同 ADC 對人濾泡性淋巴瘤 DOHH-2 裸小鼠皮下移植瘤的療效

分組	給藥	途徑	平均腫瘤			平均腫			腫瘤生			實驗開	
			體積 (mm3)	SEM		瘤體積 (mm3)	SEM	T/C (%)	長抑制 率(%)	P 值 D20	部分 消退	始/結束 每組 動物數	
IgG1 (1 mg/kg)	D0	IV	115.7	± 2.7		1385.4	± 162.1	-	-	-	0	10/10	
ADC-1 (1 mg/kg)	D0	IV	113.7	± 3.3		345.0	± 122.5	18	82	0.000	1	6/6	
ADC-6 (1 mg/kg)	D0	IV	112.9	± 3.5		82.4	± 6.3	-27	127	0.000	5	6/6	
ADC-8 (1 mg/kg)	D0	IV	117.1	± 3.5		862.1	± 136.6	59	41	0.042	0	6/6	

D0: 第一次給藥時間；P 值指與溶劑相比；IV：靜脈注射；部分消退：D21 腫瘤體積小於 D0。

【0431】 6. 結論

ADC-1 和 ADC-6 的 1mg/kg 單次靜脈注射均對人濾泡型淋巴瘤 DoHH2 裸小鼠皮下移植瘤有明顯療效，引起腫瘤部分消退；藥效均優於陽性藥 ADC-8(即 Polivy)。荷瘤小鼠對以上藥物均能較好耐受。

【0432】 本揭露中實驗動物的使用及福利遵照“國際實驗動物評估和認可委員會(AAALAC)”的規定執行。每天監測動物的健康狀況及死亡情況，例行檢查包括觀察受試物和藥物對動物日常行為表現的影響如行為活動，體重變化，外觀體徵等。

【符號說明】 無

【序列表】

- <110> 上海拓界生物醫藥科技有限公司(TUOJIE BIOTECH(SHANGHAI) CO., LTD.)
- <120> 抗 CD79B 抗體藥物偶聯物、其製備方法及其醫藥用途
- <130> 721085CPCT
- <140> PCT/CN2021/
- <141> 2021-07-27
- <150> 202010730899.8
- <151> 2020-07-27
- <150> 202010735910.X
- <151> 2020-07-28
- <160> 33
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 433
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人 CD79B ECD-hFc
- <400> 1

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
1 5 10 15

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
20 25 30

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp
35 40 45

Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu
50 55 60

Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr
115 120 125

Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe
130 135 140

Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala
99201

145		150		155		160
Gly Met Glu Glu Asp	His Thr Tyr Glu Gly	Leu Asp Ile Asp	Gln Thr			
	165		170			175
Ala Thr Tyr Glu Asp	Ile Val Thr Leu Arg	Thr Gly Glu Val	Lys Trp			
	180		185			190
Ser Val Gly Glu His	Pro Gly Gln Glu Glu	Pro Lys Ser Cys	Asp Lys			
	195		200			205
Thr His Thr Cys Pro	Pro Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly	Gly Pro			
	210		215			220
Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met	Ile Ser			
	225		230			240
Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val Val Val	Asp Val Ser His	Glu Asp			
	245		250			255
Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val	His Asn			
	260		265			270
Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr	Arg Val			
	275		280			285
Val Ser Val Leu Thr	Val Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly	Lys Glu			
	290		295			300
Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu	Pro Ala Pro Ile	Glu Lys			
	305		310			320
Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val	Tyr Thr			
	325		330			335
Leu Pro Pro Ser Arg	Glu Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser	Leu Thr			
	340		345			350
Cys Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu			
	355		360			365
Ser Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro	Val Leu			
	370		375			380
Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser	Lys Leu Thr Val	Asp Lys			
	385		390			400
Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser	Cys Ser Val Met	His Glu			
	405		410			415
Ala Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser	Pro Gly			
	420		425			430

Lys

- <210> 2
- <211> 207
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 人 CD79B ECD-His

<400> 2

Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
1 5 10 15

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
20 25 30

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp
35 40 45

Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu
50 55 60

Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu
100 105 110

Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr
115 120 125

Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe
130 135 140

Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala
145 150 155 160

Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr
165 170 175

Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp
180 185 190

Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu His His His His His His
195 200 205

<210> 3

<211> 117
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

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

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

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

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His
20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Gly Ser Ser Phe Thr Ser Tyr
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Phe Pro Arg Ser Gly Asn
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9

Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu
1 5 10 15

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Tyr Pro Arg Ser Gly Asn
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
99201

1 5

<210> 19
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hAb015-10 人源化抗體重鏈可變區

<400> 19

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

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hAb015-10 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 20

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

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

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

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 21
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hAb017-10 人源化抗體重鏈可變區

<400> 21

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Ile Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ser Asp Tyr Asp Gly Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hAb017-10 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 22

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突變後的 HCDR2

<400> 23

Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HCDR1 通式

<220>
<221> 變體
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 為 S 或 Y

<220>
<221> 變體
<222> (3)..(3)
<223> Xaa 為 S 或 T

<220>
<221> 變體
<222> (5)..(5)
<223> Xaa 為 T 或 S

<220>
<221> 變體
<222> (6)..(6)
<223> Xaa 為 S 或 T

<400> 24

Gly Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Tyr
1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR2 通式

<220>

<221> 變體

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 為 F 或 Y

<400> 25

Xaa Pro Arg Ser Gly Asn
1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCDR3 通式

<220>

<221> 變體

<222> (1)..(1)

<223> Xaa 為不存在或 G

<220>

<221> 變體

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 為不存在或 S

<220>

<221> 變體

<222> (3)..(3)

<223> Xaa 為 G 或 D

<220>

<221> 變體

<222> (4)..(4)

<223> Xaa 為 D 或 Y

<220>

<221> 變體

<222> (5)..(5)

<223> Xaa 為 L 或 D

<220>

<221> 變體

<222> (9)..(9)

<223> Xaa 為 D 或 A

<400> 26

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Asp Phe Xaa Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> LCDR1 通式

<220>
<221> 變體
<222> (9)..(9)
<223> Xaa 為 S 或 H

<220>
<221> 變體
<222> (14)..(14)
<223> Xaa 為 F 或 L

<400> 27

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Xaa Gly Asn Thr Tyr Xaa Glu
1 5 10 15

<210> 28
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hAb015-10 人源化抗體重鏈

<400> 28

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ser Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Asp Leu Gly Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys		
	130					135					140						
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser		
145					150					155					160		
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser		
				165					170					175			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		
			180					185					190				
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn		
		195					200					205					
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His		
	210					215					220						
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
225					230					235					240		
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
				245					250					255			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
			260					265					270				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
		275					280					285					
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
	290					295					300						
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
305					310					315					320		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
				325					330					335			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
			340					345					350				
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
		355					360					365					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
	370					375					380						
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
385					390					395					400		

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 29
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hAb015-10 人源化抗體輕鏈

<400> 29

Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His 195 Val Tyr Ala Cys 200 Glu Val Thr His Gln 205 Gly Leu Ser Ser

Pro 210 Val Thr Lys Ser Phe 215 Asn Arg Gly Glu Cys

<210> 30
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> hAb017-10 人源化抗體重鏈

<400> 30

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

Ser Val Lys 20 Val Ser Cys Lys Ala 25 Ser Gly Tyr Thr Phe 30 Thr Thr Tyr

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg 55 Ser Gly Asn Ile Tyr 60 Tyr Asn Glu Lys Phe

Lys Gly Lys Ala Thr 65 Leu 70 Thr Ala Asp Lys 75 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 80

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

Ala Arg Gly Ser 100 Asp Tyr Asp Gly 105 Asp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly 110

Thr Leu Val 115 Thr Val Ser Ser Ala 120 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe 125

Pro Leu 130 Ala Pro Ser Ser 135 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu 140

Gly Cys Leu Val Lys 145 Asp Tyr Phe Pro Glu 155 Pro Val Thr Val Ser Trp 160

Asn Ser Gly Ala 165 Leu Thr Ser Gly Val 170 His Thr Phe Pro Ala Val Leu 175

Gln Ser Ser 180 Gly Leu Tyr Ser Leu 185 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser 190

Ser Ser 195 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr 200 Ile Cys Asn Val 205 Asn His Lys Pro

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 31
<211> 219
<212> PRT
99201

<213> 人工序列

<220>

<223> hAb017-10 人源化抗體輕鏈

<400> 31

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His His
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 32

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SN8 重鏈

<400> 32

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

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

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
99201 第 18 頁，共 20 頁(序列表)

260

265

270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275280285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser

290295300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305310315320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325330335

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

340345350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu

355360365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370375380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser

385390395400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

405410415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420425430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435440445

<210> 33
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SN8 輕鏈

<400> 33

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu

202530

Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro

354045

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中，

所述藥物選自：微管聚集抑制劑、Topo I 抑制劑、MMAE 或其衍生物；

所述配體為抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，其包含：

a) 分別如 SEQ ID NO：23、8、9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO：10、11、12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

b) 分別如 SEQ ID NO：7、8、9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO：10、11、12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

c) 分別如 SEQ ID NO：13、14、15 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和分別如 SEQ ID NO：16、17、18 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【請求項2】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述藥物選自 MMAE、MMAE 之衍生物、依喜替康、依喜替康之衍生物、艾日布林或艾日布林之衍生物。

【請求項3】 如請求項 1 或 2 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段為鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體、人抗體或其片段。

【請求項4】 如請求項 3 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段為人源化抗體或其片段。

【請求項5】 如請求項 1 或 2 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段包含：

如 SEQ ID NO：3 所示或與之具有至少 90% 同一性的重鏈可變區，和

如 SEQ ID NO：4 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈可變區；

或

如 SEQ ID NO：5 所示或與之具有至少 90%同一性的重鏈可變區，和

如 SEQ ID NO：6 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈可變區；

或

如 SEQ ID NO：19 所示或與之具有至少 90%同一性的重鏈可變區，和

如 SEQ ID NO：20 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈可變區；

或

如 SEQ ID NO：21 所示或與之具有至少 90%同一性的重鏈可變區，和

如 SEQ ID NO：22 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈可變區。

【請求項6】 如請求項 1 或 2 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段包含恆定區 Fc。

【請求項7】 如請求項 6 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述 Fc 為 IgG1、IgG2 或 IgG4；

【請求項8】 如請求項 7 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述 Fc 為 IgG1、IgG2。

【請求項9】 如請求項 1 或 2 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述抗 CD79B 抗體的抗原結合片段為 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

【請求項10】 如請求項 1 或 2 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述抗 CD79B 抗體包含：

如 SEQ ID NO：28 所示或與之具有至少 90%同一性的重鏈，和

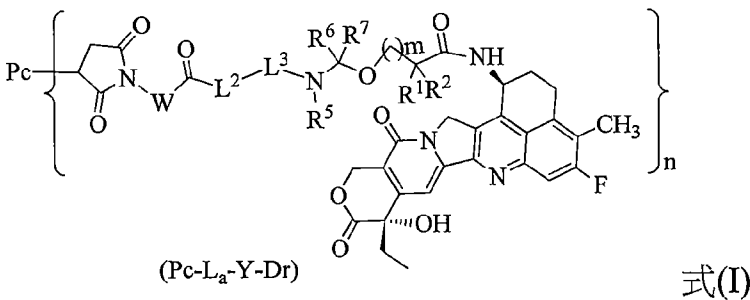
如 SEQ ID NO：29 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈；

或

如 SEQ ID NO：30 所示或與之具有至少 90%同一性的重鏈，和

如 SEQ ID NO：31 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈。

【請求項11】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為式(I)所示的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物：



其中，

W 選自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-環烷基或 1 至 8 個原子的直鏈雜烷基，所述雜烷基包含 1 至 3 個選自 N、O 或 S 的雜原子；

L² 選 自 -NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂CH₂C(O)-、-NR⁴(CH₂CH₂O)^{p¹}CH₂C(O)-、-S(CH₂)^{p¹}C(O)-或化學鍵，p¹ 為 1 至 20 的整數；

L³ 為由 2 至 7 個胺基酸構成的肽殘基；

R¹ 選自氫原子、鹵素、環烷基烷基、氘代烷基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基；

R² 選自氫原子、鹵素、鹵烷基、氘代烷基、環烷基、雜環基、芳基或雜芳基；
或者，R¹ 和 R² 與其相連接的碳原子一起形成環烷基或雜環基；

R⁴ 和 R⁵ 相同或不同，且各自獨立地選自氫原子、烷基、鹵烷基、氘代烷基和羧烷基；

R^6 和 R^7 相同或不同，且各自獨立地選自氫原子、鹵素、烷基、鹵烷基、氘代烷基和經烷基；

m 為 0 至 4 的整數；

n 為 1 至 10，可以為整數或小數；

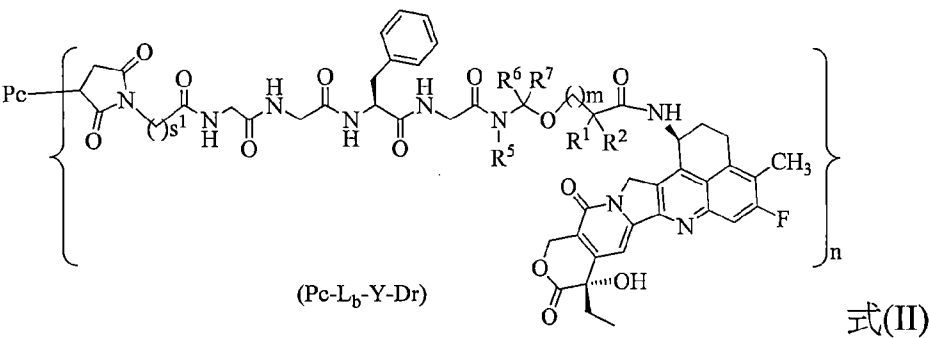
Pc 為如請求項 1 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【請求項12】 如請求項 11 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中：

所述 W 的 C_{1-8} 烷基、環烷基和直鏈雜烷基各自獨立地被選自鹵素、經基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基的一個或多個取代基所取代；

所述 L^3 的胺基酸被選自鹵素、經基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基中的一個或多個取代基所取代。

【請求項13】 如請求項 11 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為式(II)所示的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物：



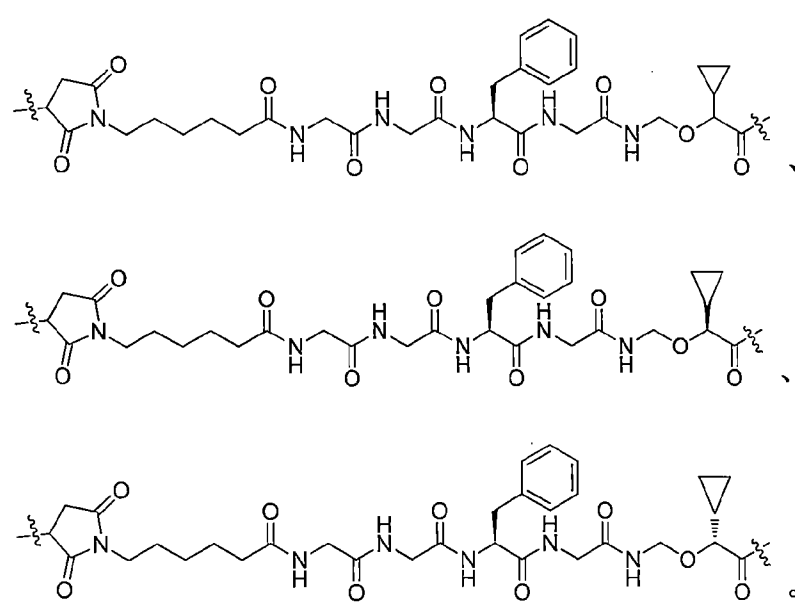
其中，

s^1 為 2 至 8 的整數；

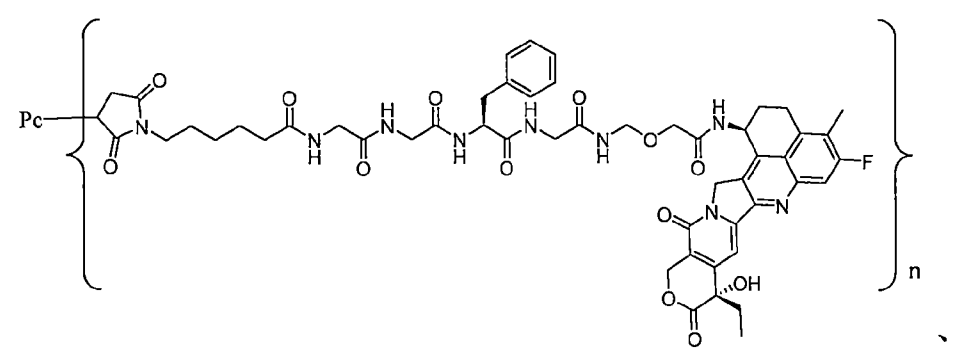
Pc 、 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 m 和 n 如請求項 11 中所定義。

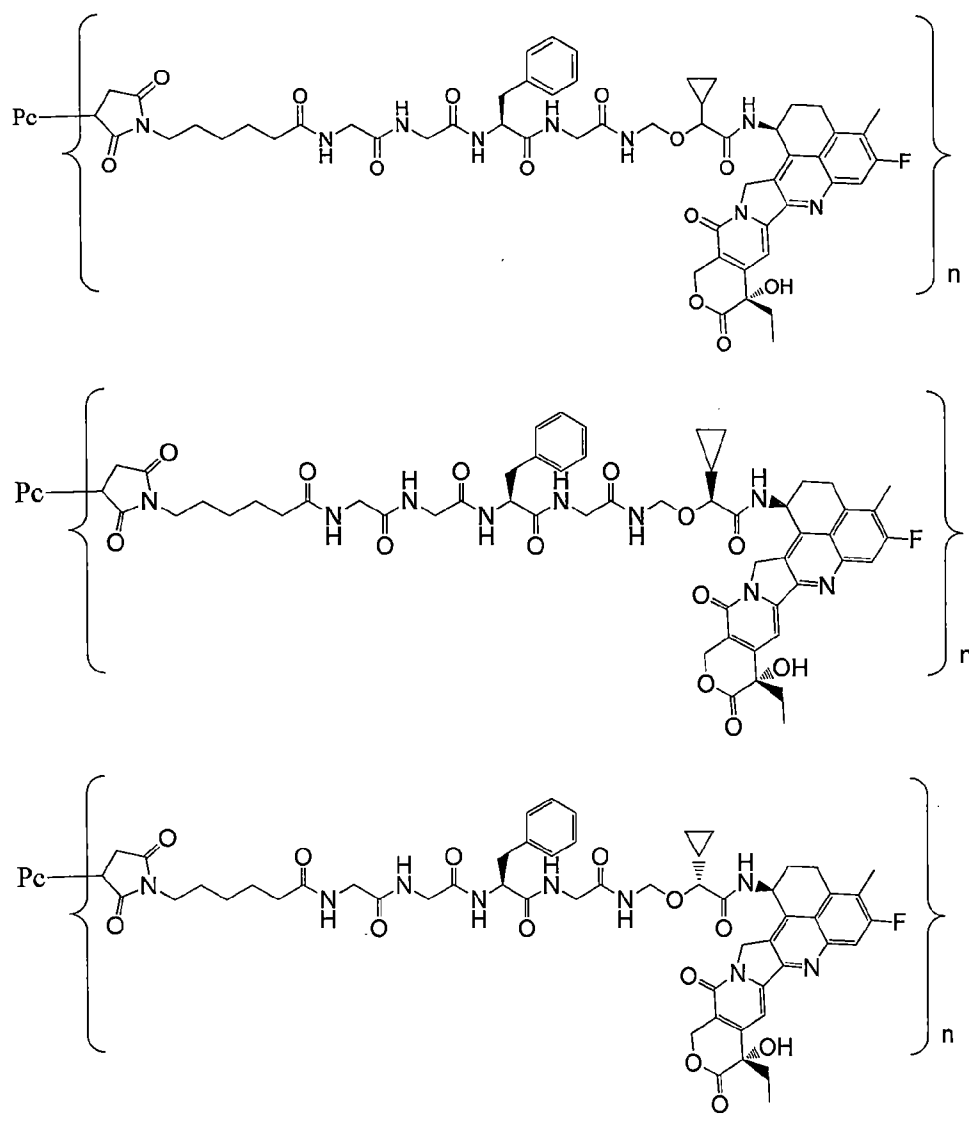
【請求項14】 如請求項 13 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 s^1 為 5。

【請求項15】 如請求項 11 或 13 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 $-L_a-Y-$ 或 $-L_b-Y-$ 選自：



【請求項16】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其是選自以下結構式所示：





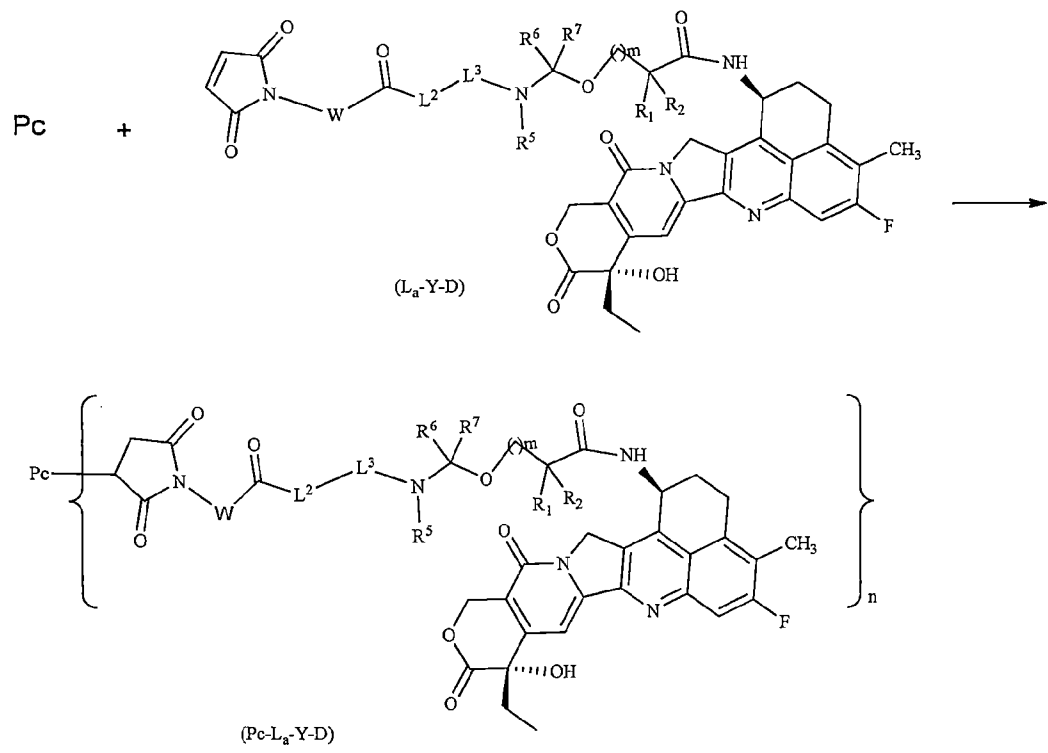
其中，

n 為 1 至 10，可以為整數或小數；

Pc 為如請求項 1 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【請求項17】 如請求項 16 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，n 為 1 至 6 的整數或小數。

【請求項18】 一種製備如請求項 1、2 或 11 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物的方法，其包括以下步驟：



Pc 還原後，與通式 $L_a\text{-Y-D}$ 所示化合物偶聯，得到通式 $Pc\text{-}L_a\text{-Y-D}$ 所示的配體-藥物偶聯物；

其中，

Pc 為如請求項 1 或 2 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；

W、 L^2 、 L^3 、 R^1 、 R^2 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、m 和 n 如請求項 11 中所定義。

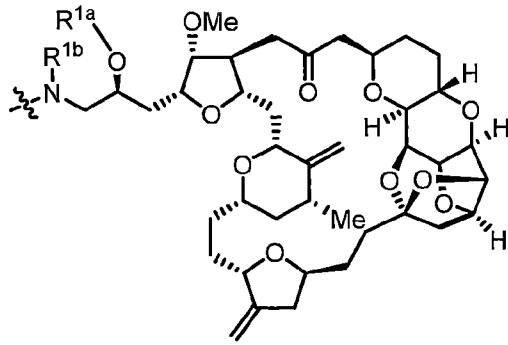
【請求項19】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其是通式 $Pc\text{-}(L\text{-D})_k$ 所示，其中，

Pc 為如請求項 1 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，

L 為接頭，

k 為 1 至 20 的整數或小數，

D 是式(III)所示：



式(III) ,

其中 ,

R^{1a} 選自氫、烷基、環烷基、芳基和雜芳基 ,

R^{1b} 選自氫、烷基、烷氧基、環烷基、芳基和雜芳基 ; 或者

R^{1a} 與 R^{1b} 與其相連接的原子一起形成 C_{5-8} 雜環烷基。

【請求項20】 如請求項 19 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物 ,

所述 R^{1a} 的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地被選自烷基、烷氧基、鹵素、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代 ;

所述 R^{1b} 的烷基、環烷基、芳基和雜芳基各自獨立地被選自烷基、烷氧基、鹵素、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代 ;

所述 R^{1a} 與 R^{1b} 的雜烷基被烷基、烷氧基、鹵素、氖、胺基、氰基、硝基、羥基、羥烷基、環烷基、雜環基、芳基和雜芳基中的一個或多個取代基所取代 , 且 R^{1a} 和 R^{1b} 不同時為氫。

【請求項21】 如請求項 19 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物 , 所述 R^{1a} 是甲基 ; 所述 R^{1b} 是氫。

【請求項22】 如請求項 19 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 k 選自 1 至 10，可以為整數或小數。

【請求項23】 如請求項 19 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述接頭包含可裂解肽部分。

【請求項24】 如請求項 23 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述可裂解肽部分能由酶裂解。

【請求項25】 如請求項 24 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述酶是組織蛋白酶。

【請求項26】 如請求項 25 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述酶是組織蛋白酶 B。

【請求項27】 如請求項 23 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中，

所述接頭包含由 2 至 7 個胺基酸構成的肽殘基，

所述胺基酸選自：苯丙胺酸、甘胺酸、纈胺酸、賴胺酸、瓜胺酸、絲胺酸、谷胺酸、天冬胺酸。

【請求項28】 如請求項 27 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述肽殘基選自：纈胺酸-瓜胺酸、丙胺酸-丙胺酸-天冬醯胺、甘胺酸-甘胺酸-賴胺酸、纈胺酸-賴胺酸、纈胺酸-丙胺酸、纈胺酸-苯丙胺酸、甘胺酸-甘胺酸-苯丙胺酸-甘胺酸。

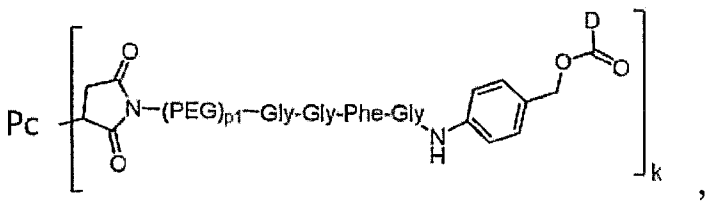
【請求項29】 如請求項 19 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述接頭包含可裂解的磺醯胺部分或可裂解的二硫化物部分。

【請求項30】 如請求項 29 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述接頭在還原條件下能夠裂解。

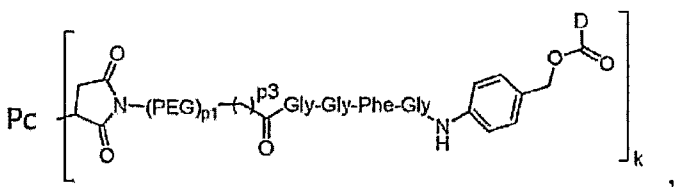
【請求項31】 如請求項 19 至 30 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述接頭包含附接於 D 的間隔單元。

【請求項32】 如請求項 31 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述間隔單元包含對胺基苯甲氧基羰基(PAB)。

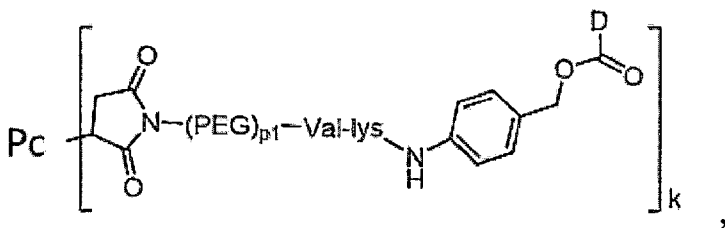
【請求項33】 如請求項 19 至 30 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其由選自以下的任一結構表示：



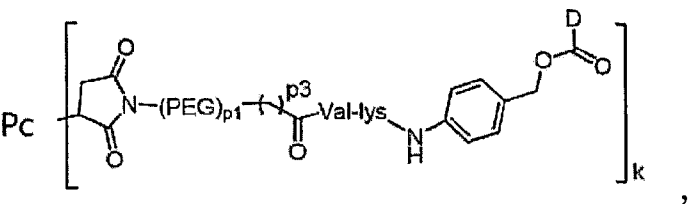
k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p1 選自 2、4、6 或 8；



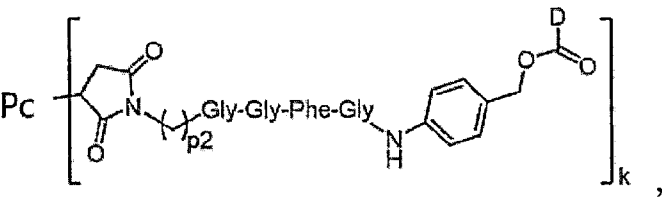
k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p1 選自 2、4、6 或 8；P3 選自 0、1 或 2；



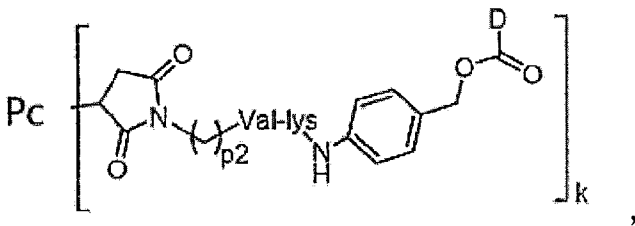
k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p1 選自 2、4、6 或 8；



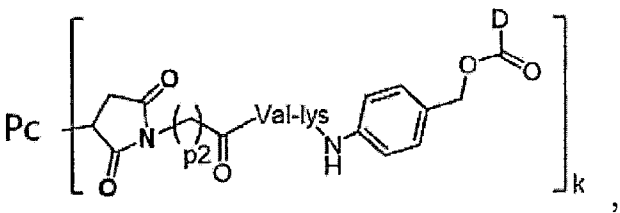
k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p1 選自 2、4、6 或 8；P3 選自 0、1 或 2；



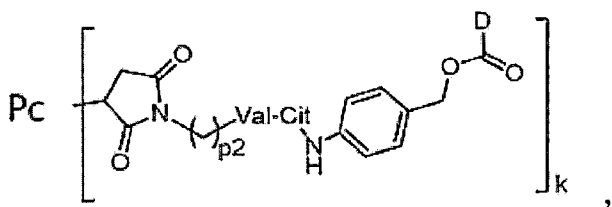
k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p2 選自 2、4、6 或 8；



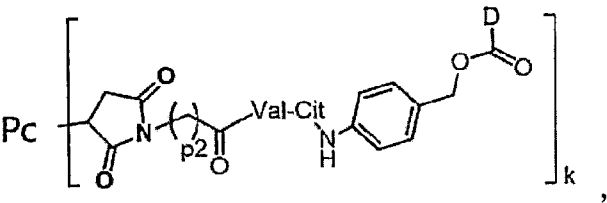
k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p2 選自 2、4、6 或 8；



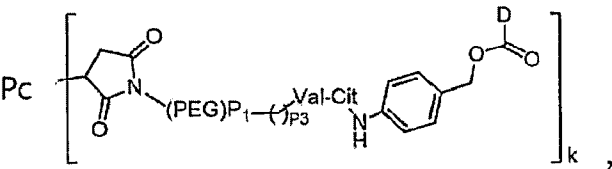
k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p2 選自 2、4、6 或 8；



k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p2 選自 2、4、6 或 8；

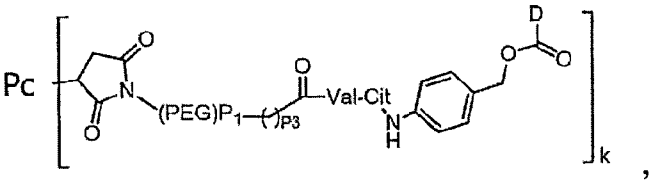


k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p2 選自 2、4、6 或 8；



k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p1 選自 2、4、6 或 8；P3 選自 0、1 或

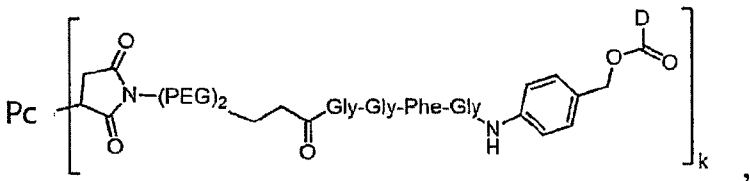
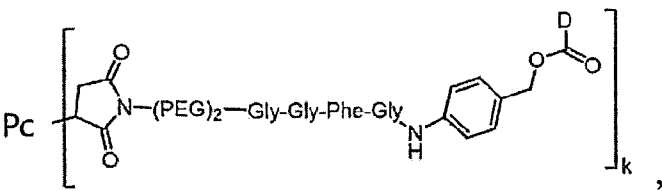
2；

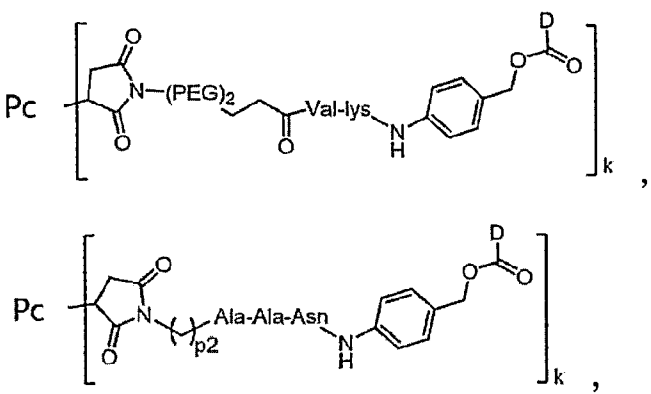


k 選自 1 至 10，可以為整數或小數；p1 選自 2、4、6 或 8；P3 選自 0、1 或

2。

【請求項34】 如請求項 33 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其由選自以下的任一結構表示：

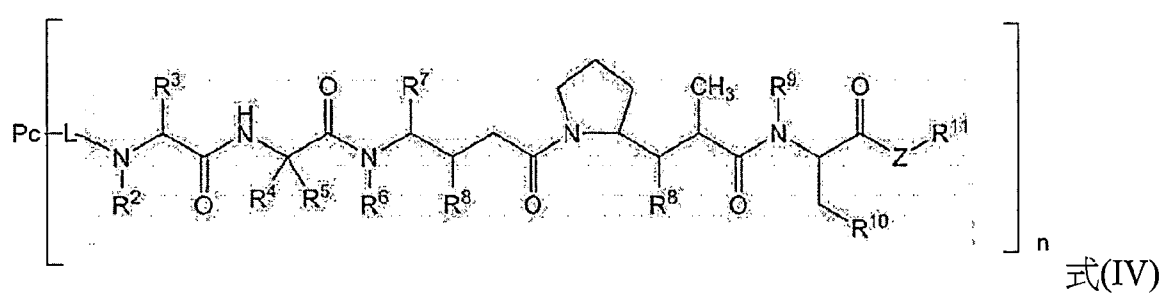




其中 k 選自 1 至 10，可以為整數或小數。

【請求項35】 如請求項 34 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，D 中 R^{1a} 是甲基，R^{1b} 是氫。

【請求項36】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其是式(IV)所示：



其中，

- R² 是 C₁-C₈ 烷基；
- R³ 是 C₁-C₈ 烷基；
- R⁴ 是 C₁-C₈ 烷基；
- R⁵ 是 H；
- R⁶ 是 C₁-C₈ 烷基；
- R⁷ 是 C₁-C₈ 烷基；
- R⁸ 彼此獨立地是 O-(C₁-C₈ 烷基)；

R⁹ 是 H ；

R¹⁰ 是苯基 ；

Z 是 O 或 NH ；

R¹¹ 選自 H 、 C₁-C₂₀ 烷基或-(R¹³O)₃-R¹⁴ ；

R¹³ 是 C₂-C₈ 烷基 ；

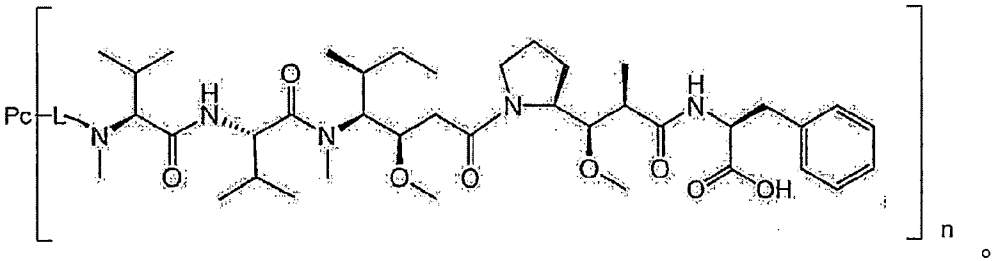
R¹⁴ 是 C₁-C₈ 烷基 ；

Pc 為如請求項 1 中所定義的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段 ；

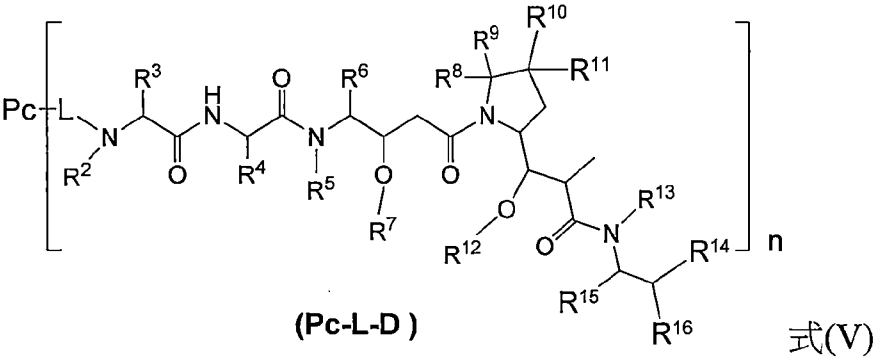
L 為接頭 ；

n 為 1 至 10 ， 可以為整數或小數 。

【請求項37】 如請求項 36 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其包含下所示的結構：



【請求項38】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其包含如式(V)所示的結構：



其中，R²-R⁶選自氫原子、鹵素、羥基、氰基、烷基、烷氧基和環烷基；

R⁷ 選自氫原子、烷基、烷氧基和環烷基；

R⁸-R¹¹ 之中的任意兩個形成環烷基，餘下的兩個任選自氫原子、烷基和環烷基；

R¹² 選自氫原子或烷基；

R¹³-R¹⁵ 選自氫原子、羥基、烷基、烷氧基或鹵素；

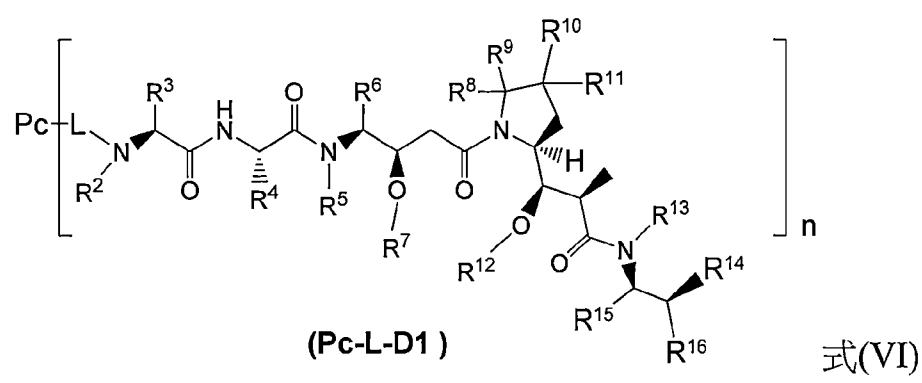
R¹⁶ 選自芳基或雜芳基，任選地所述的芳基或雜芳基被選自氫原子、鹵素、羥基、烷基、烷氧基和環烷基的取代基所取代；

n 為 1 至 10，可以為整數或小數；

Pc 為如請求項 1 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；

L 為接頭。

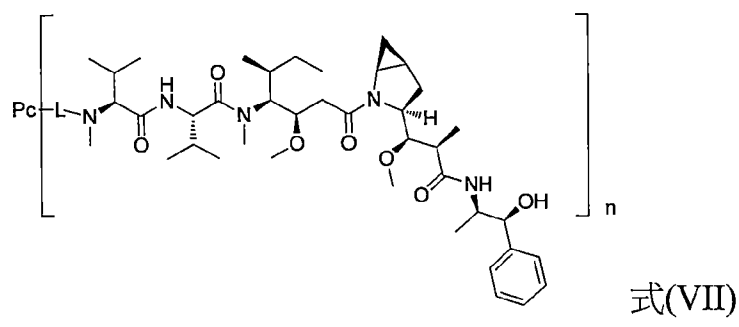
【請求項39】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其包含如式(VI)所示的結構：



其中，n、R²-R¹⁶ 如請求項 38 中所定義；

Pc 為如請求項 1 所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；L 為接頭。

【請求項40】 如請求項 1 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為式(VII)所示：



n 為 1 至 10，可以為整數或小數；

Pc 為如請求項 1 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段；

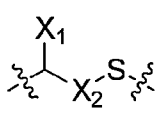
L 為接頭。

【請求項41】 如請求項 36 至 40 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中，

n 為 1 至 8，可以為整數或小數。

【請求項42】 如請求項 41 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中，n 為 1 至 6，可以為整數或小數。

【請求項43】 如請求項 36 至 40 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述接頭為-Y-L¹-L²-L³-L⁴，

Y 選自  或化學鍵，X₁ 選自氫原子、烷基，烷氧基，芳基或鹵素，X₂ 選自伸烷基，任選所述的伸烷基被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基的一個或多個取代基所取代；

L¹ 選自-(琥珀鹽亞胺-3-基-N)-W-C(O)-、-CH₂-C(O)-NR¹⁷-W-C(O)-或-C(O)-W-C(O)-，其中 W 選自 C₁₋₈ 烷基、C₁₋₈ 烷基-環烷基或 1 至 8 個原子的直鏈雜烷基，所述雜烷基包含 1 至 3 個選自 N、O 或 S 的雜原子，其中任選所述的 C₁₋₈ 烷基、

環烷基和直鏈雜烷基各自獨立地被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基的一個或多個取代基所取代；

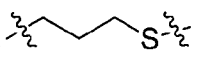
L^2 選自 $-NR^{18}(CH_2CH_2O)p^1CH_2CH_2C(O)-$ 、 $-NR^{18}(CH_2CH_2O)p^1CH_2C(O)-$ 、 $-S(CH_2)p^1C(O)-$ 或化學鍵，其中 p^1 為 1 至 20 的整數；

L^3 為由 2 至 7 個胺基酸構成的肽殘基；其中任選胺基酸被選自鹵素、羥基、氰基、胺基、烷基、氯代烷基、氘代烷基、烷氧基和環烷基中的一個或多個取代基所取代；

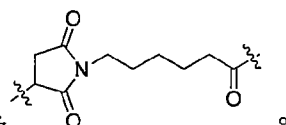
R^{17} 和 R^{18} 相同或不同，且各自獨立地選自氫原子、烷基、鹵烷基、氘代烷基和羥烷基；

L^4 為延伸單元。

【請求項44】如請求項 43 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述 L^2 為化學鍵； L^3 為選自纈胺酸、瓜胺酸和甲基纈胺酸的胺基酸；所述 L^4 為 PAB。

【請求項45】如請求項 43 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 Y 為 。

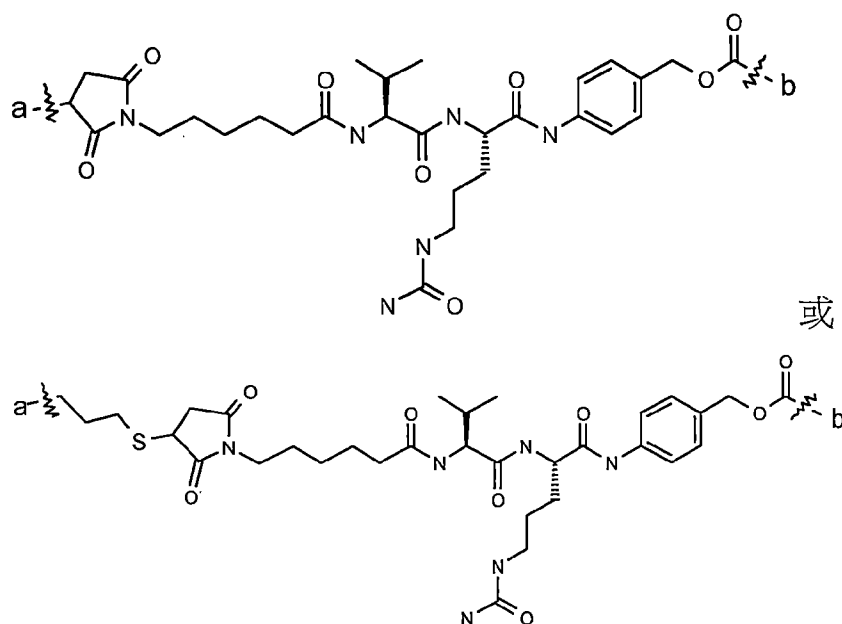
【請求項46】如請求項 43 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 L^1 選自 $-(\text{琥珀醯亞胺-3-基-N})-(CH_2)s^1-C(O)-$ ，其中 s^1 為 2 至 8 的整數。

【請求項47】如請求項 46 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述 L^1 為 。

【請求項48】 如請求項 43 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中 L^3 為二肽胺基酸單元。

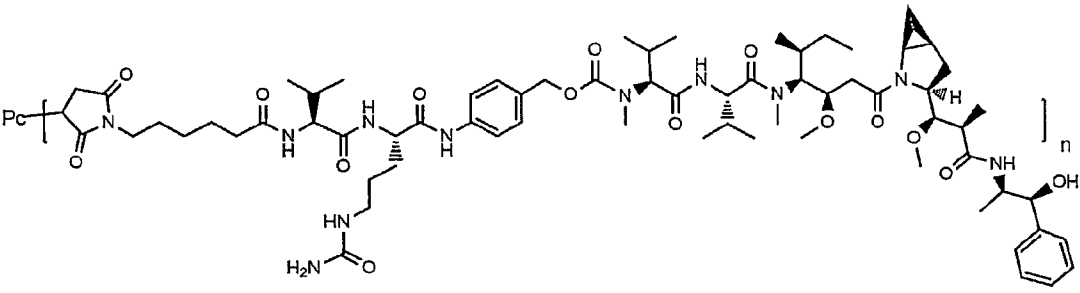
【請求項49】 如請求項 48 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，所述 L^3 是纈胺酸-瓜胺酸。

【請求項50】 如請求項 36 至 40 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其中所述接頭選自：

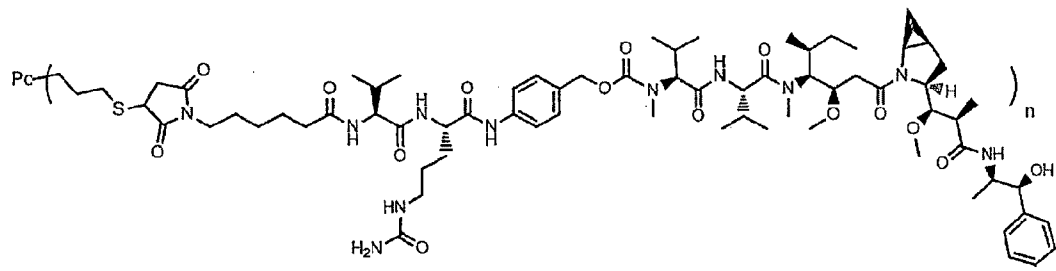


其中 a 端連接所述 Pc，b 端連接所述藥物。

【請求項51】 如請求項 36 至 40 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其選自以下結構式：



或

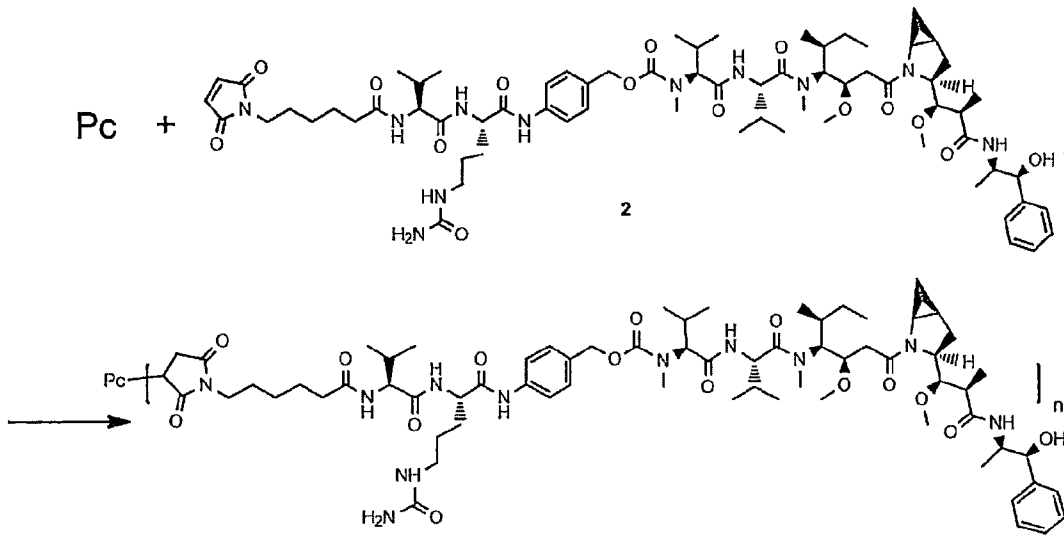


其中，

n 為 1 至 10，可以為整數或小數；

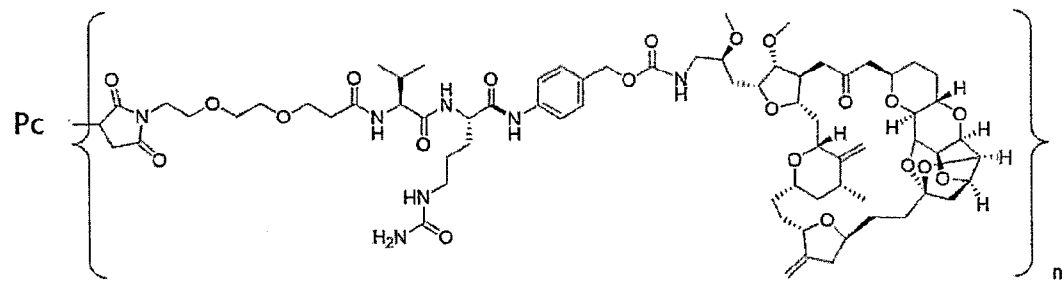
Pc 為如請求項 1 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【請求項52】 一種製備如請求項 51 所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物的方法，其包括以下步驟：

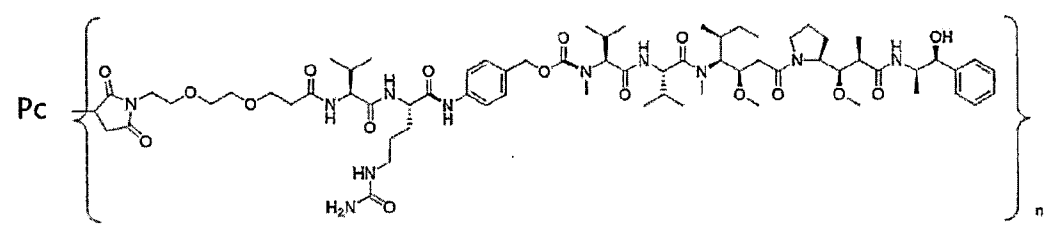


其中，Pc，n 如請求項 51 中所定義。

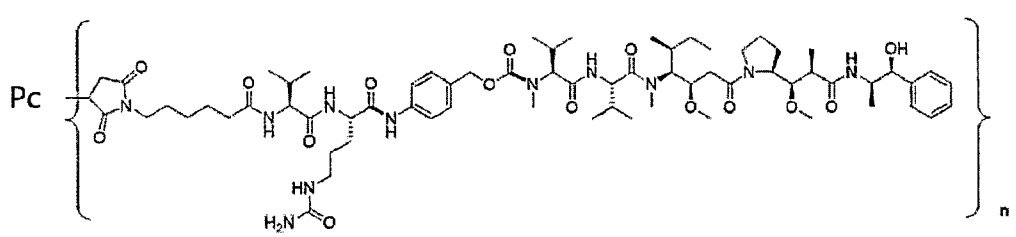
【請求項53】 一種配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其是選自以下任一項所示：



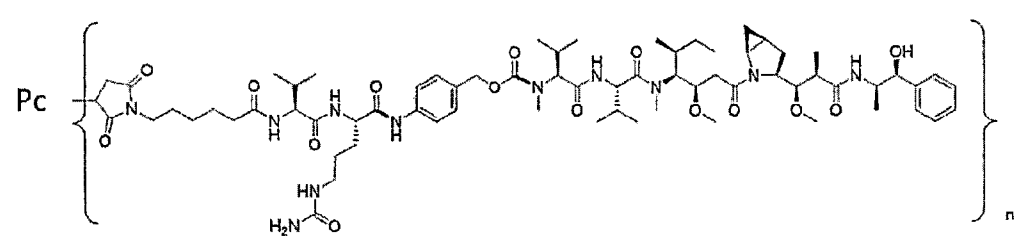
ADC-1



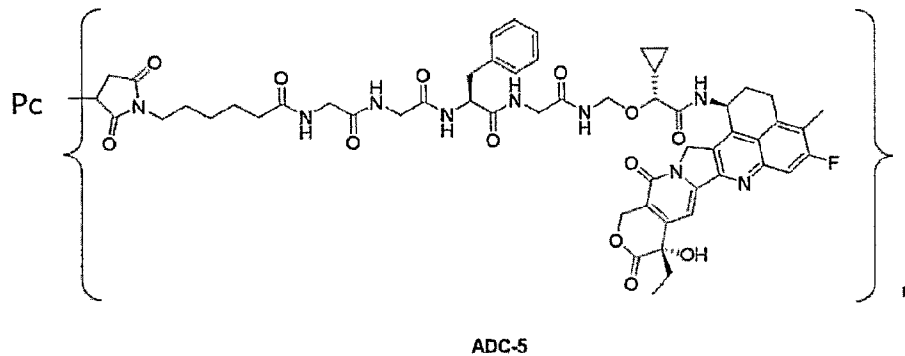
ADC-2



ADC-3



ADC-4



其中，Pc 為如請求項 1 所限定的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，n 為 1 至 10，可以為整數或小數。

【請求項54】 如請求項 53 所述配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，n 為 1 至 6 之間的整數或小數。

【請求項55】 一種配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，其為如請求項 1、11、13、19 和 36 中任一項所述的配體-藥物偶聯物的氘代物、或其混合物形式。

【請求項56】 一種藥物組成物，其含有：

藥學上可接受的載體、稀釋劑或賦形劑；和

治療有效量的如請求項 1、11、13、19 和 36 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物。

【請求項57】 如請求項 1、11、13、19 和 36 中任一項所述的配體-藥物偶聯物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物，或如請求項 56 所述的藥物組成物在製備藥物中的用途，其中，

所述藥物用於治療增殖性疾病或延緩增殖性疾病進展。

【請求項58】 如請求項 57 所述的用途，所述增殖性病症是癌症或腫瘤。

【請求項59】如請求項 58 所述的用途，所述癌症或腫瘤選自淋巴瘤、B 細胞淋巴瘤、彌漫大 B 細胞淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻擊性 NHL、復發性攻擊性 NHL、復發性無痛性 NHL、頑固性 NHL、頑固性無痛性 NHL、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、小淋巴細胞性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴細胞性白血病(ALL)，和/或套細胞淋巴瘤。

【請求項60】一種抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈可變區，其包含分別如 SEQ ID NO：23、SEQ ID NO：8 和 SEQ ID NO：9 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；和

輕鏈可變區，其包含分別如 SEQ ID NO：10、SEQ ID NO：11 和 SEQ ID NO：12 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

【請求項61】如請求項 60 所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，包含：

如 SEQ ID NO：19 所示或與之具有至少 90%同一性的重鏈可變區，和

如 SEQ ID NO：20 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈可變區。

【請求項62】如請求項 60 所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，包含恆定區 Fc。

【請求項63】如請求項 62 所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，所述 Fc 為 IgG1、IgG2 或 IgG4。

【請求項64】如請求項 60 所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段，包含如 SEQ ID NO：28 所示或與之具有至少 90%同一性的重鏈，和

如 SEQ ID NO：29 所示或與之具有至少 90%同一性的輕鏈。

【請求項65】一種多核苷酸，其編碼如請求項 60 至 64 任一項所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【請求項66】 一種宿主細胞，其包含如請求項 65 所述的多核苷酸。

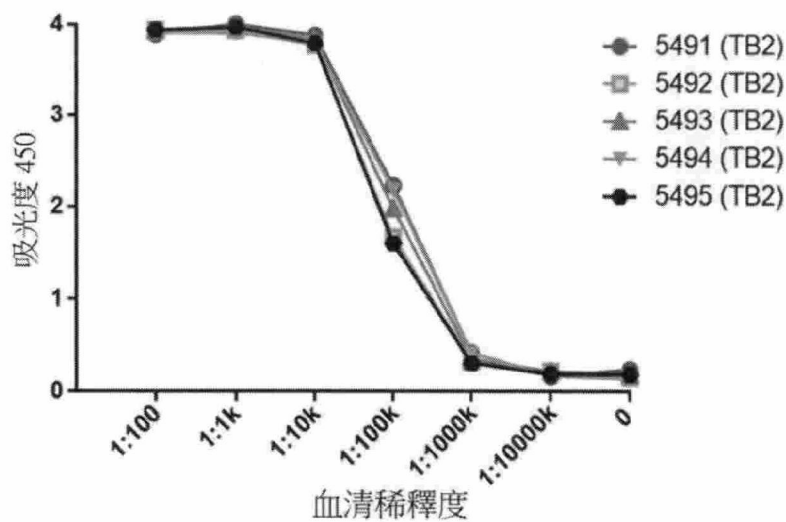
【請求項67】 如請求項 66 所述的宿主細胞，其為細菌、酵母、哺乳動物細胞。

【請求項68】 如請求項 66 所述的宿主細胞，其為大腸桿菌、畢赤酵母、中國倉鼠卵巢細胞或人胚腎 293 細胞。

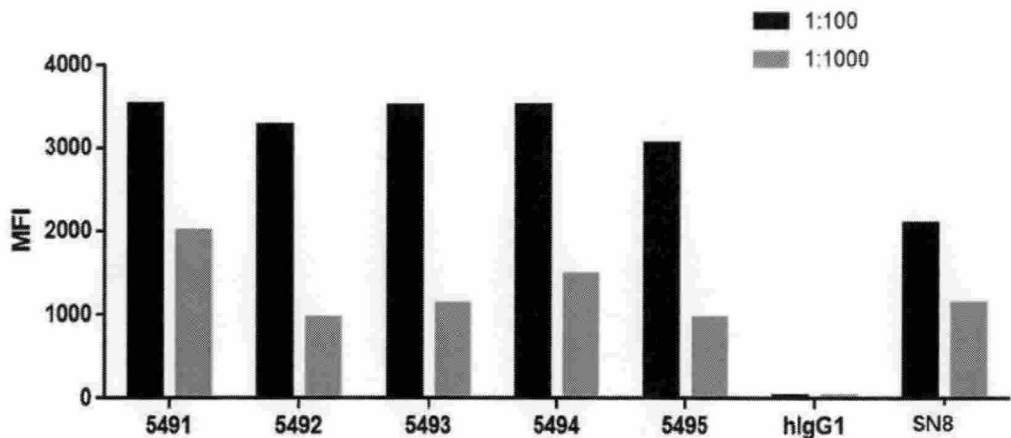
【請求項69】 一種製備抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段的方法，包括：
在如請求項 66 所述的宿主細胞中表達抗人 CD76B 抗體或其抗原結合片段，
以及從培養物中分離所述抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段。

【請求項70】 一種藥物組成物，其含有選自以下的任一項或其任意組合：
如請求項 60 至 64 任一項中所述的抗 CD79B 抗體或其抗原結合片段或如請求項 65 所述的多核苷酸；以及，
任選地，可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

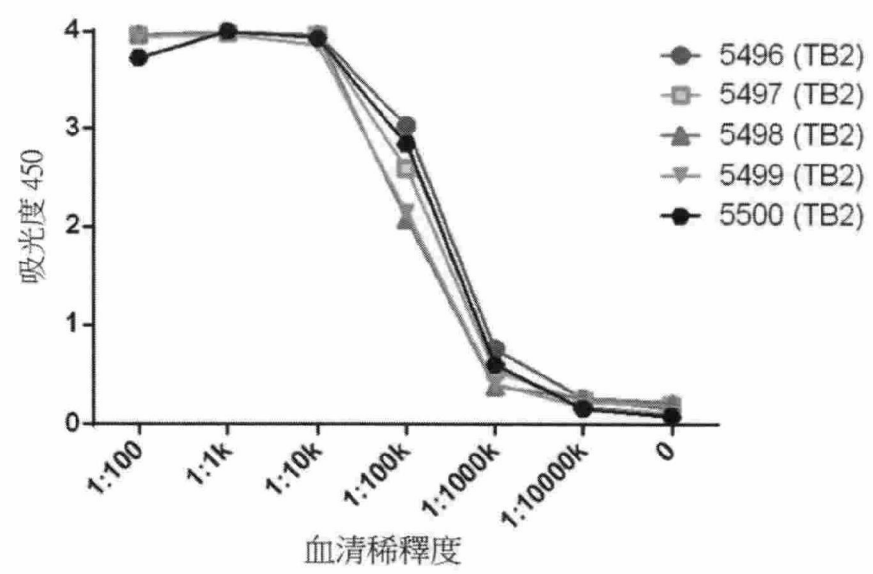
【發明圖式】



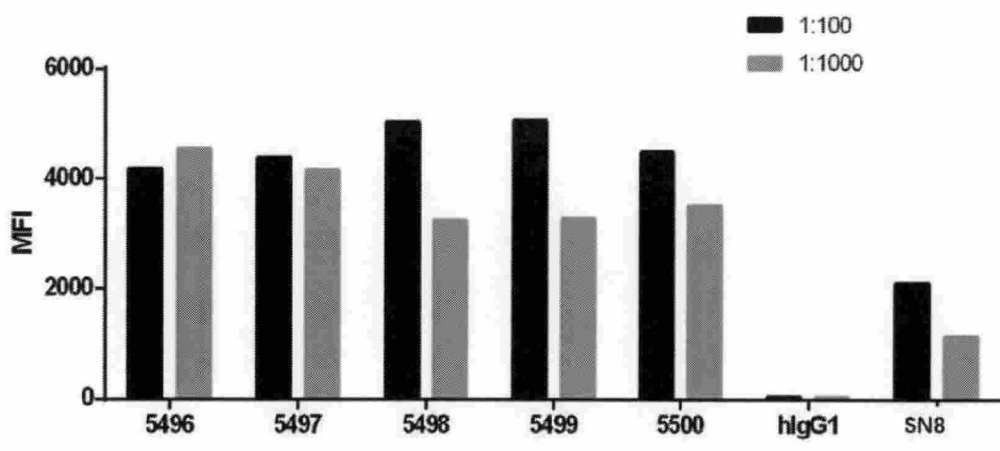
【圖1】



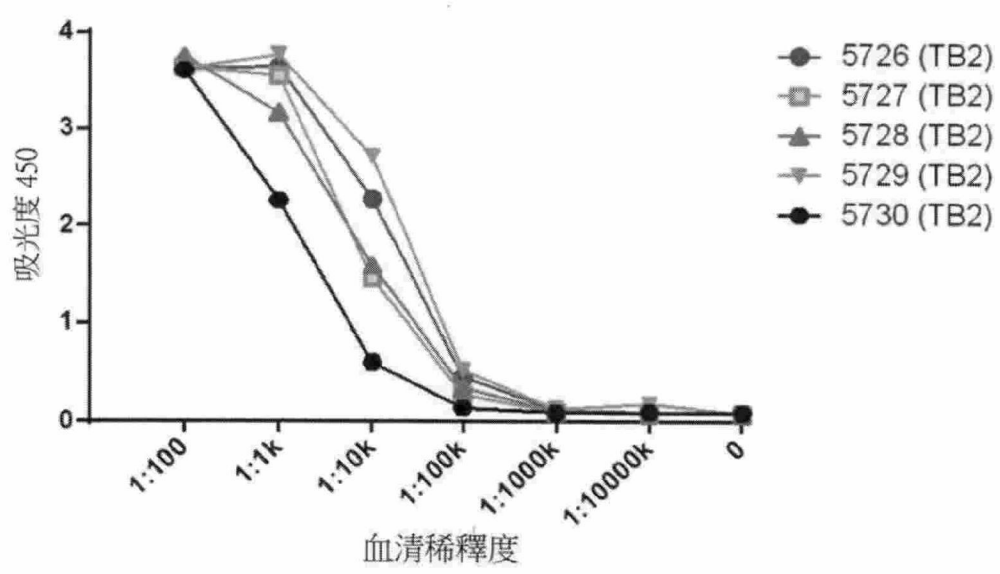
【圖2】



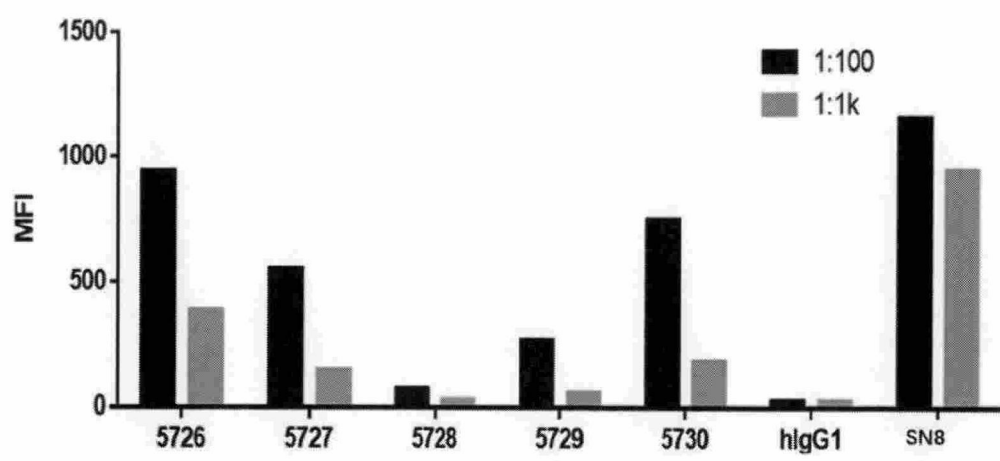
【圖3】



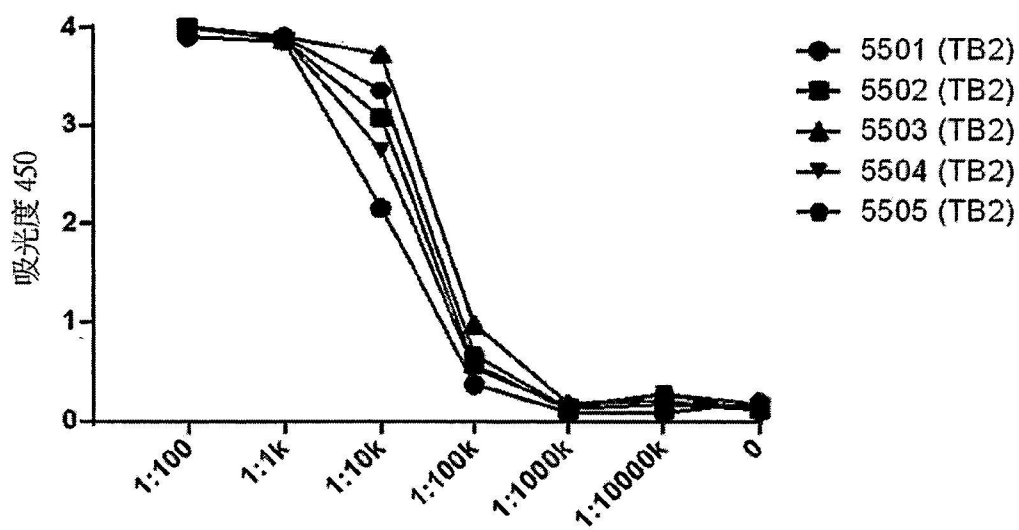
【圖4】



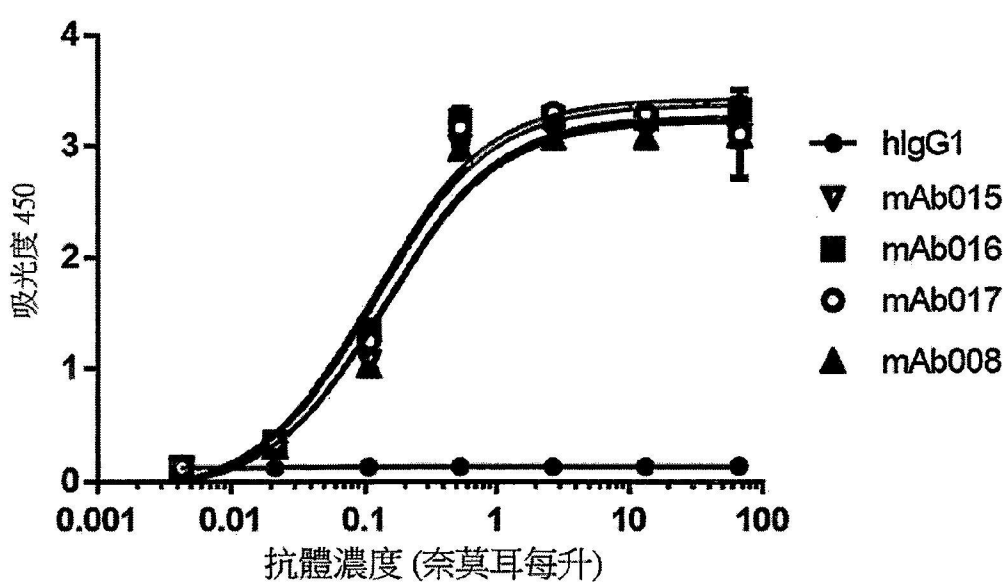
【圖5】



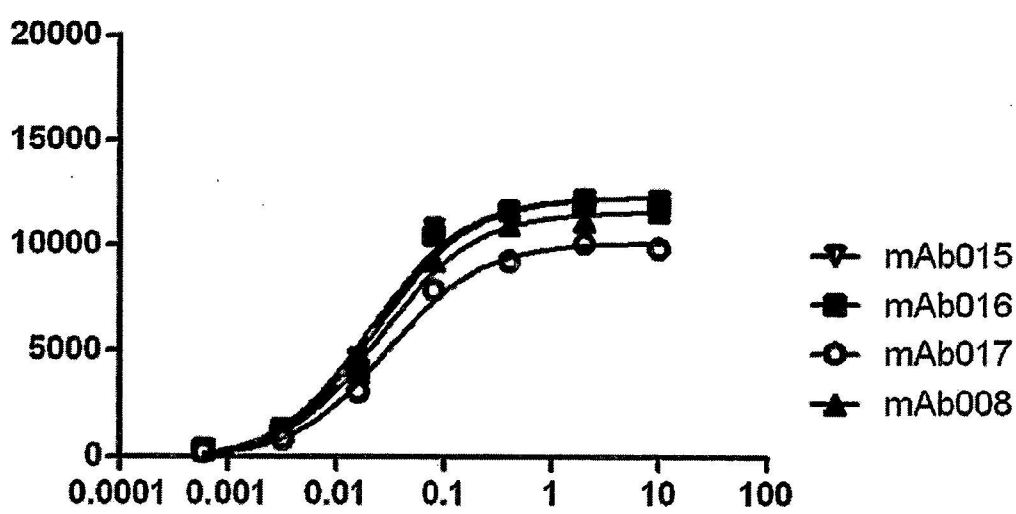
【圖6】



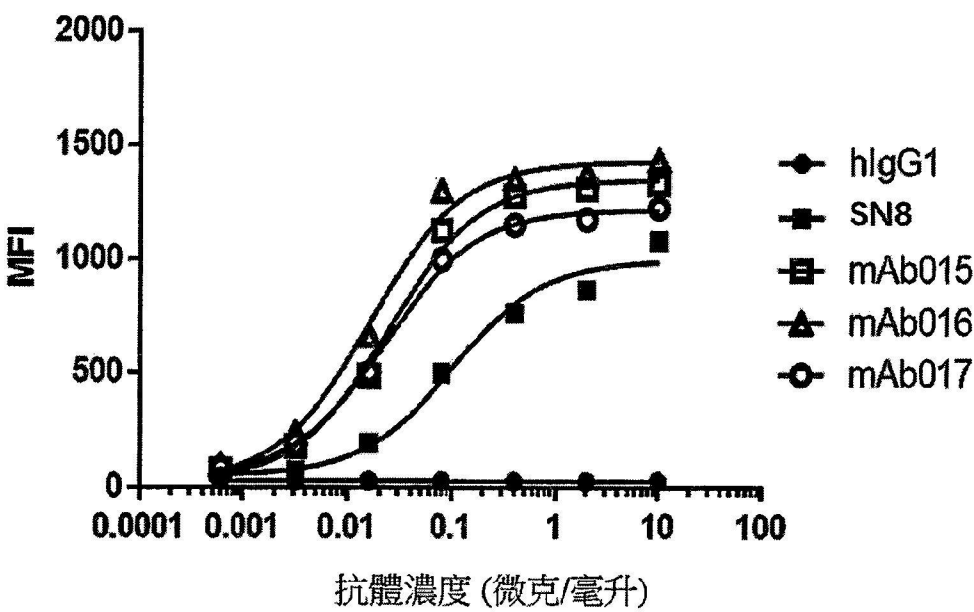
【圖7】



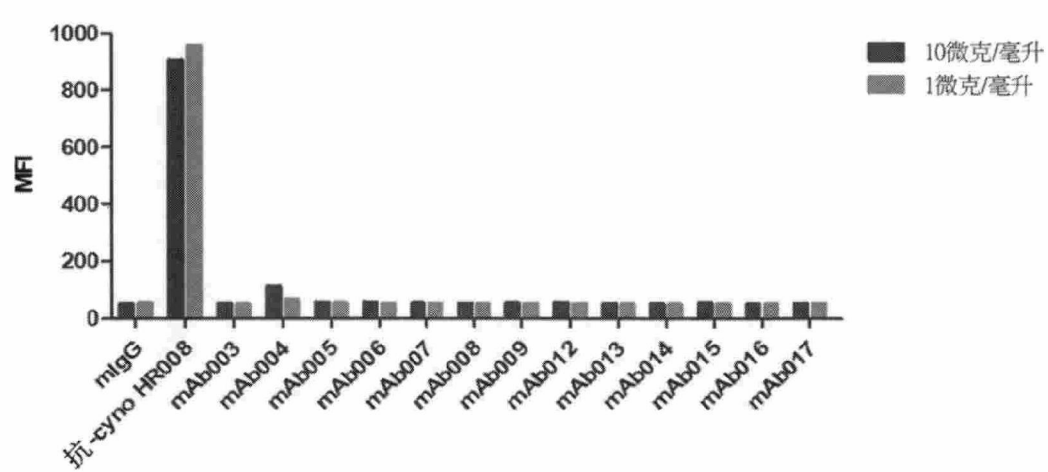
【圖8】



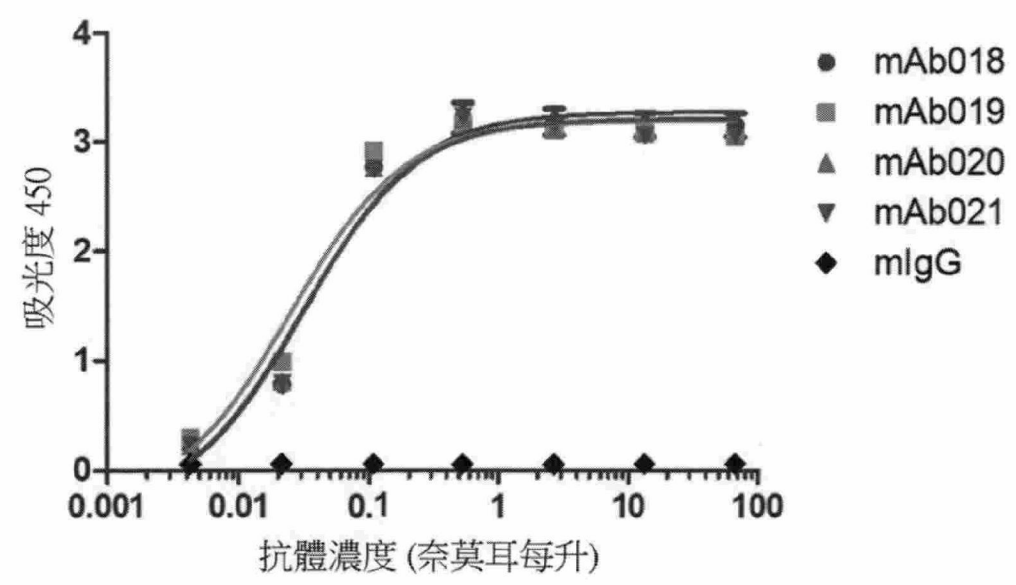
【圖9A】



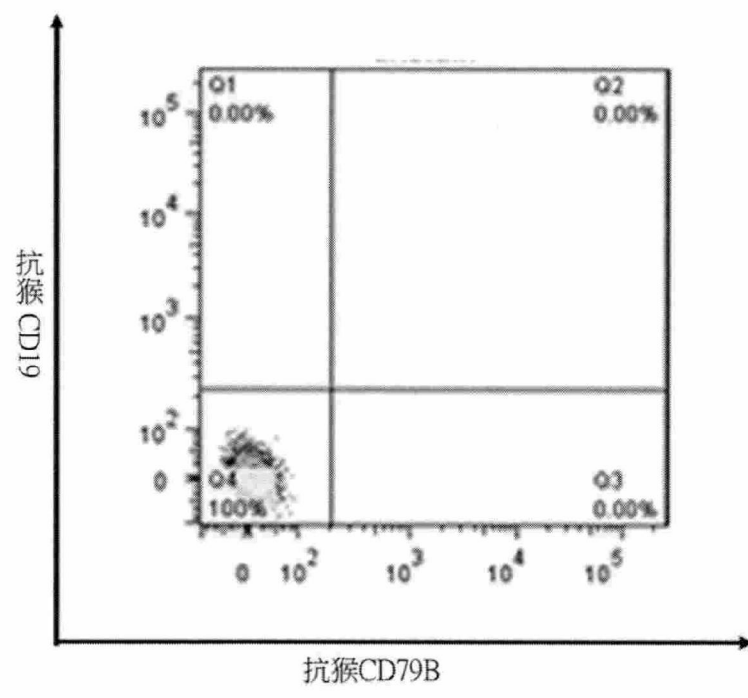
【圖9B】



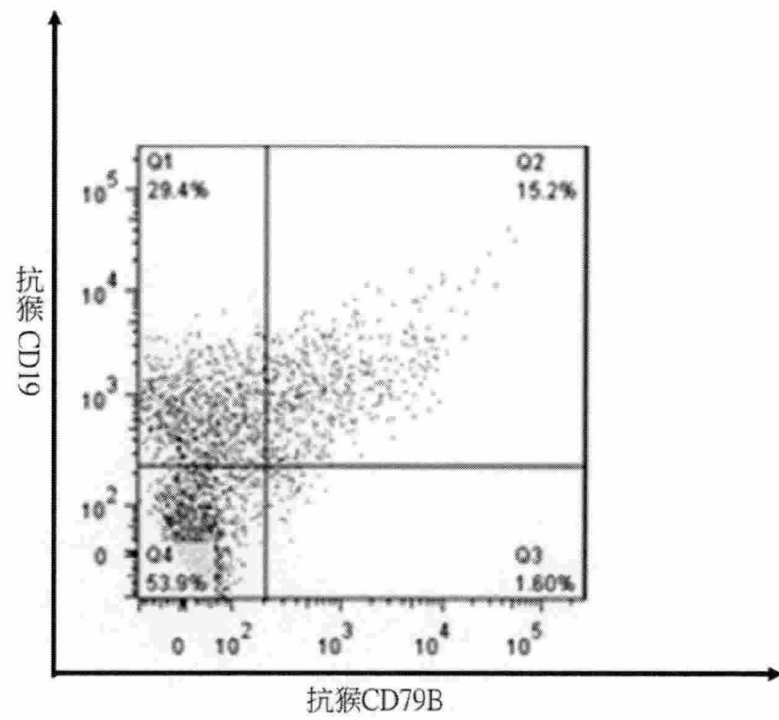
【圖10】



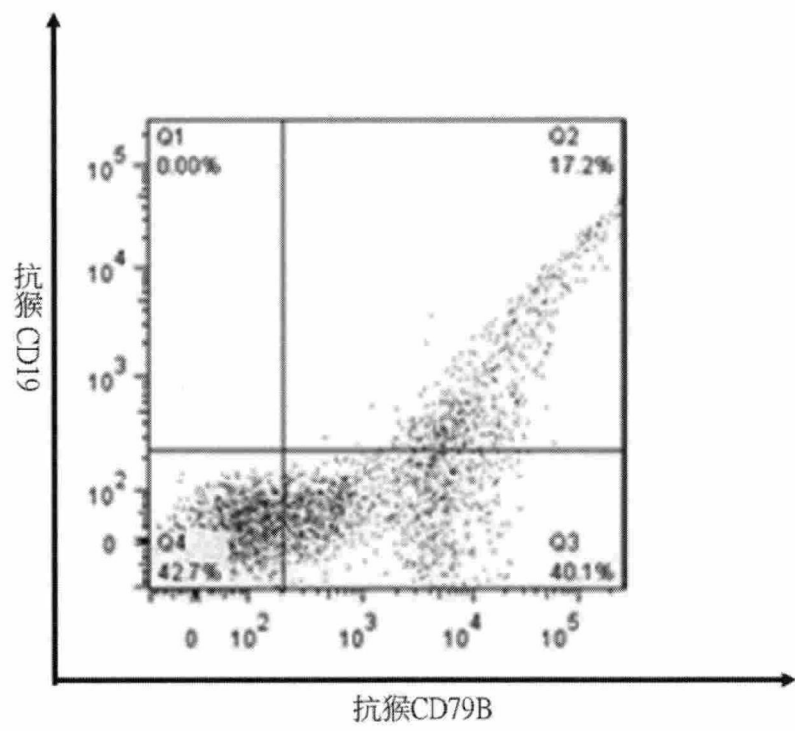
【圖11】



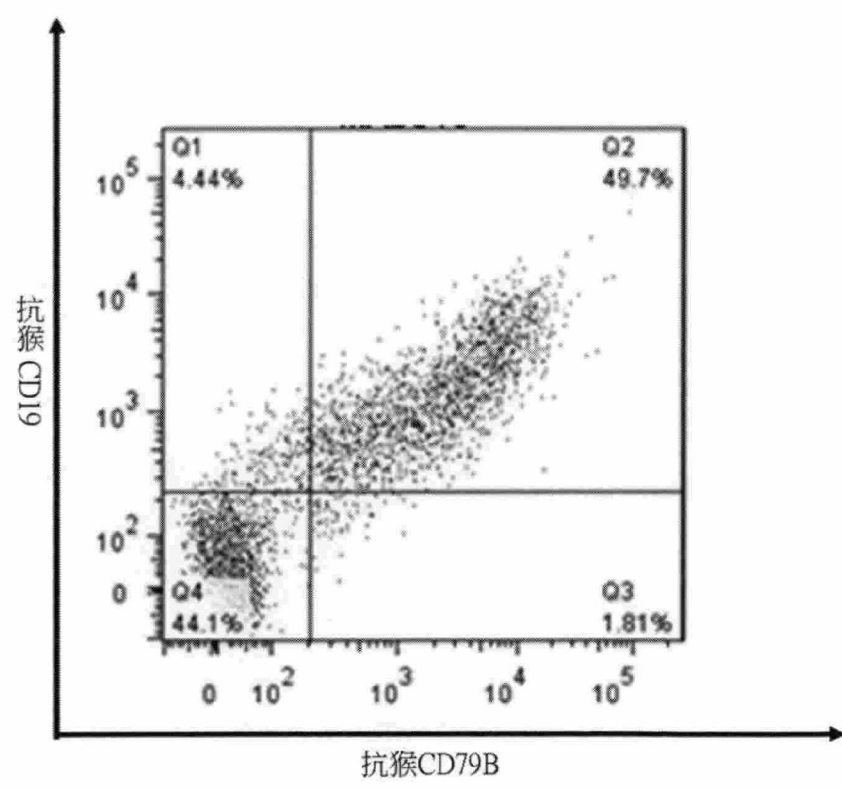
【圖12A】



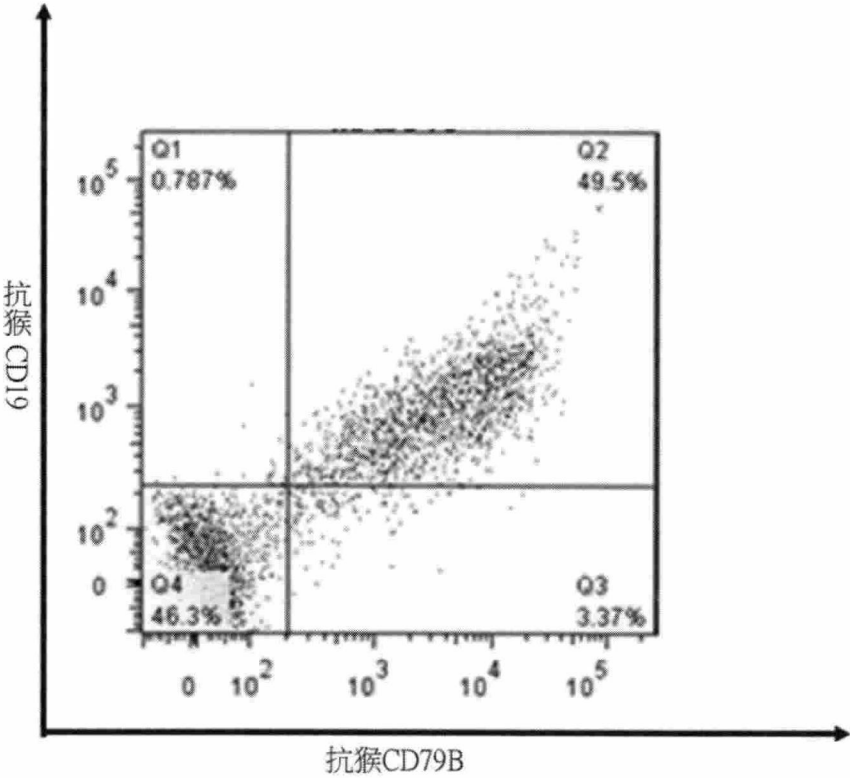
【圖12B】



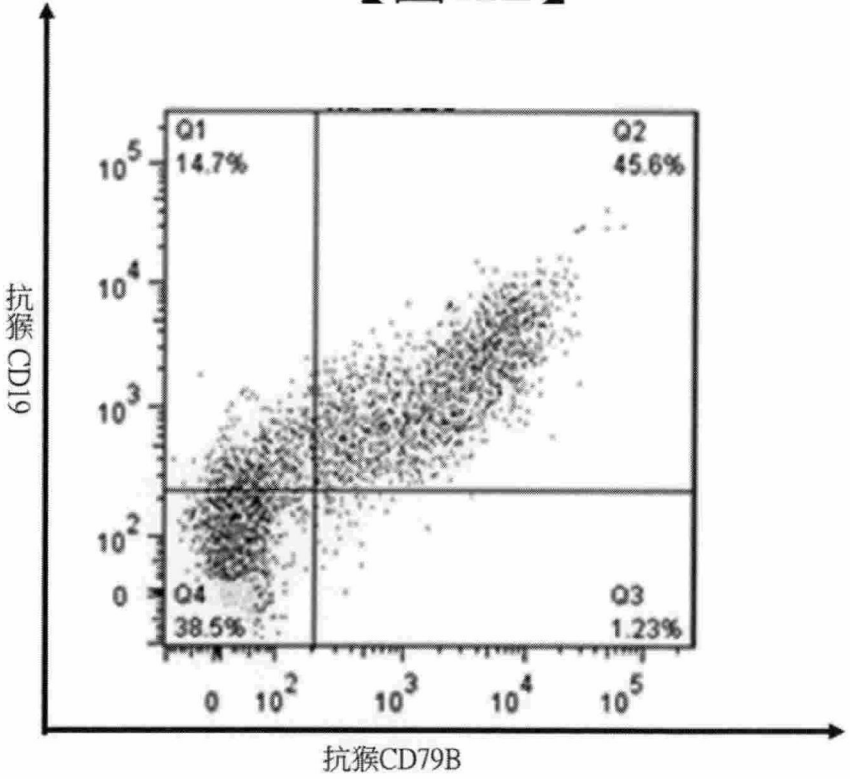
【圖12C】



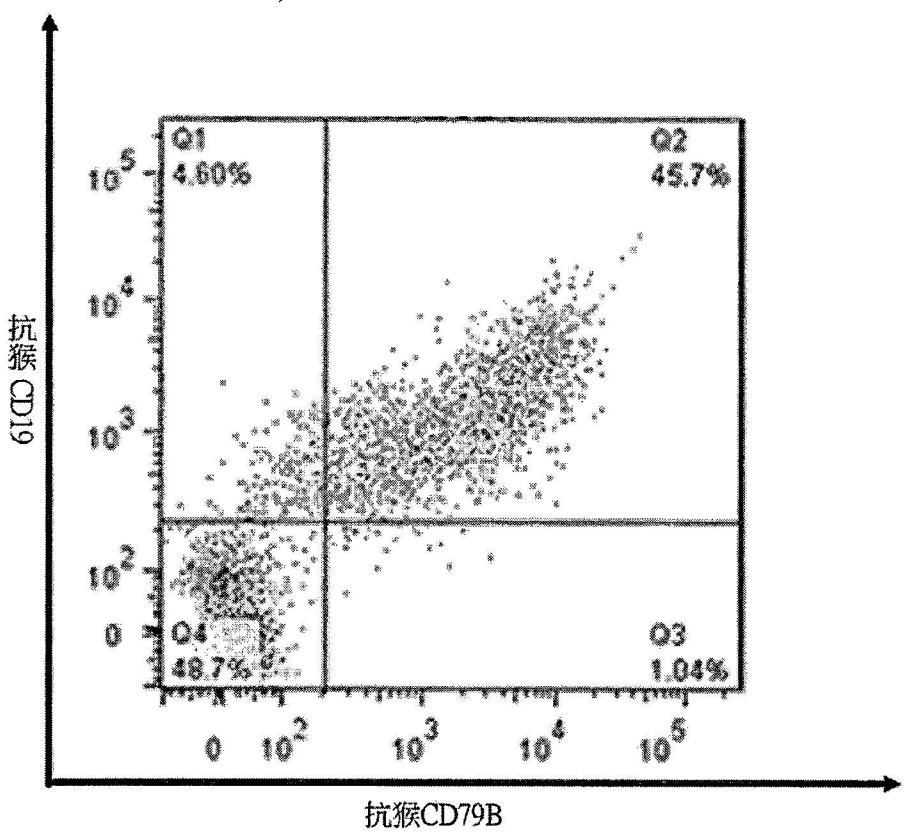
【圖12D】



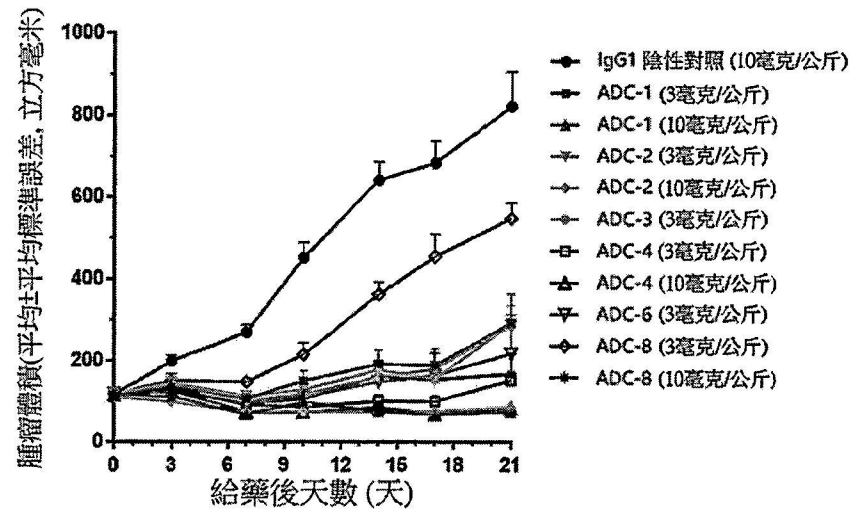
【圖12E】



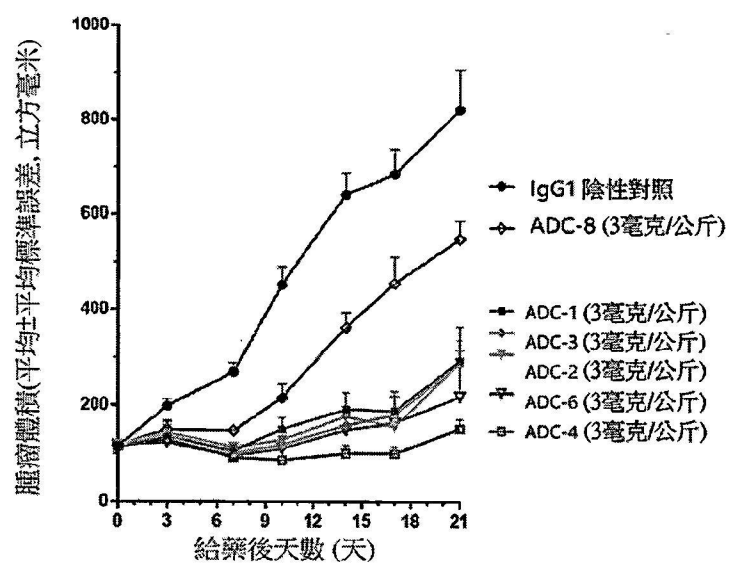
【圖12F】



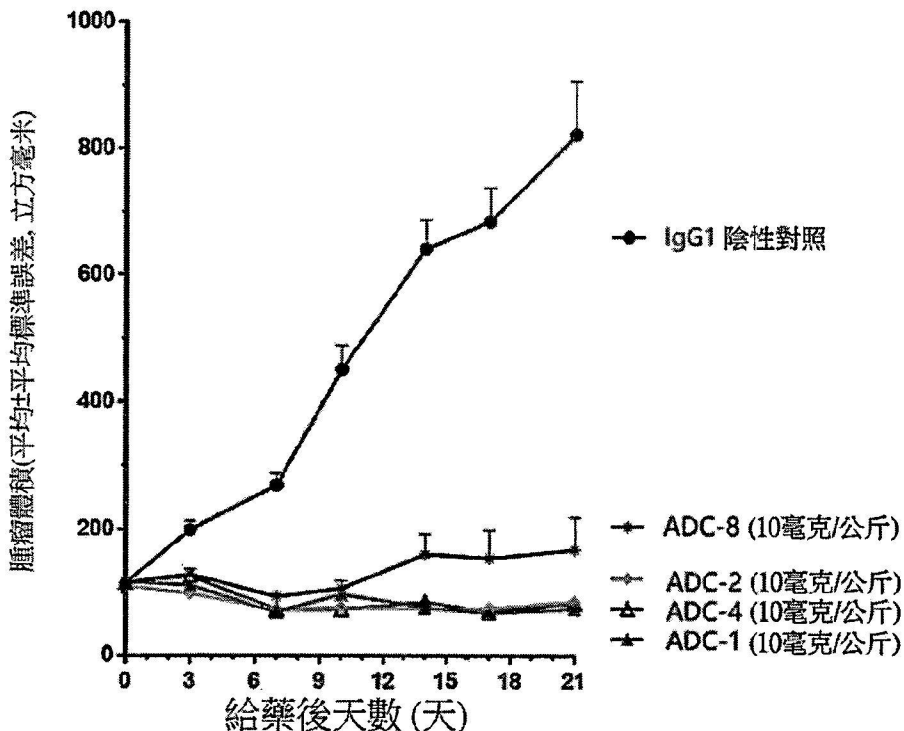
【圖12G】



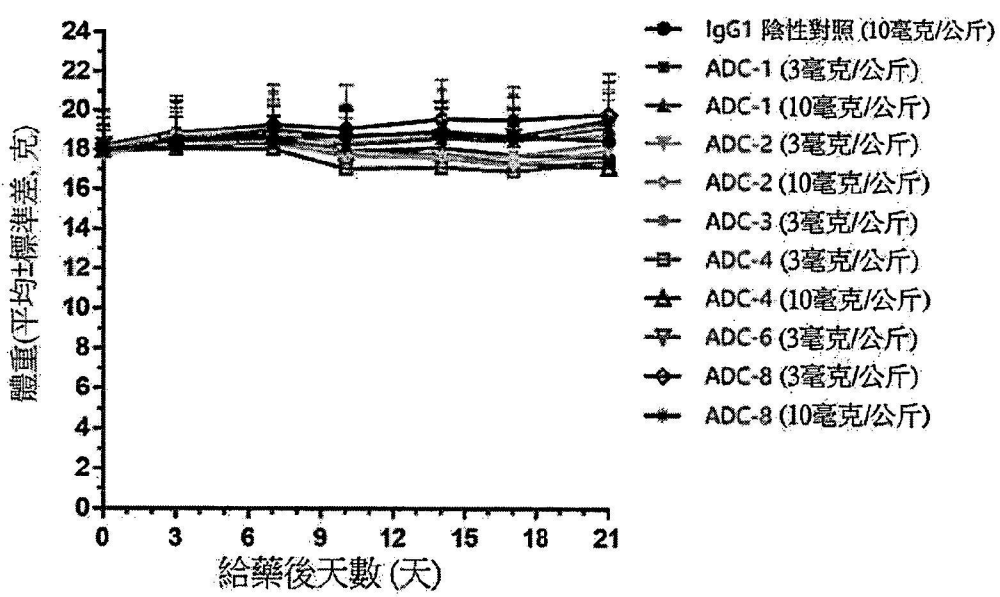
【圖13A】



【圖13B】

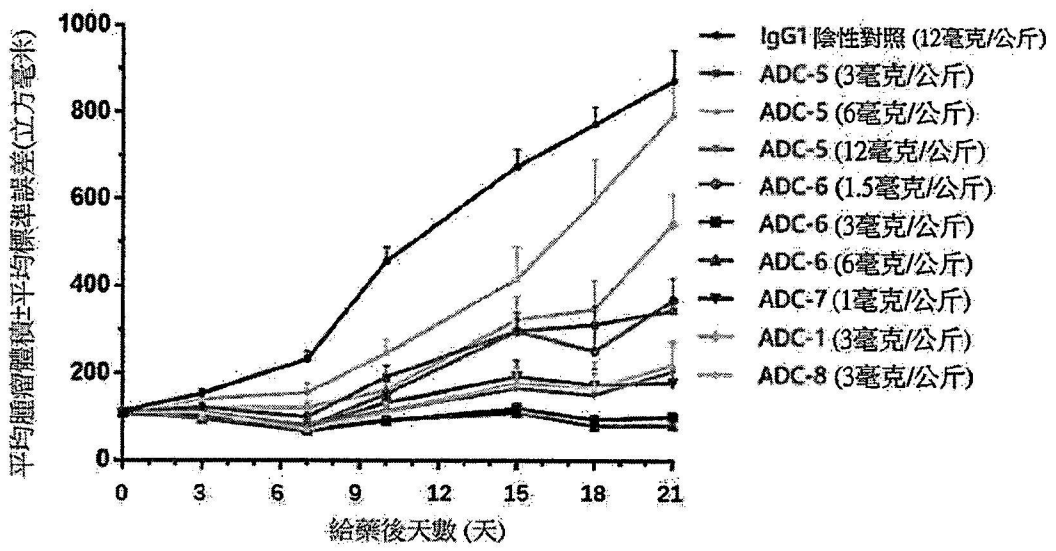


【圖13C】

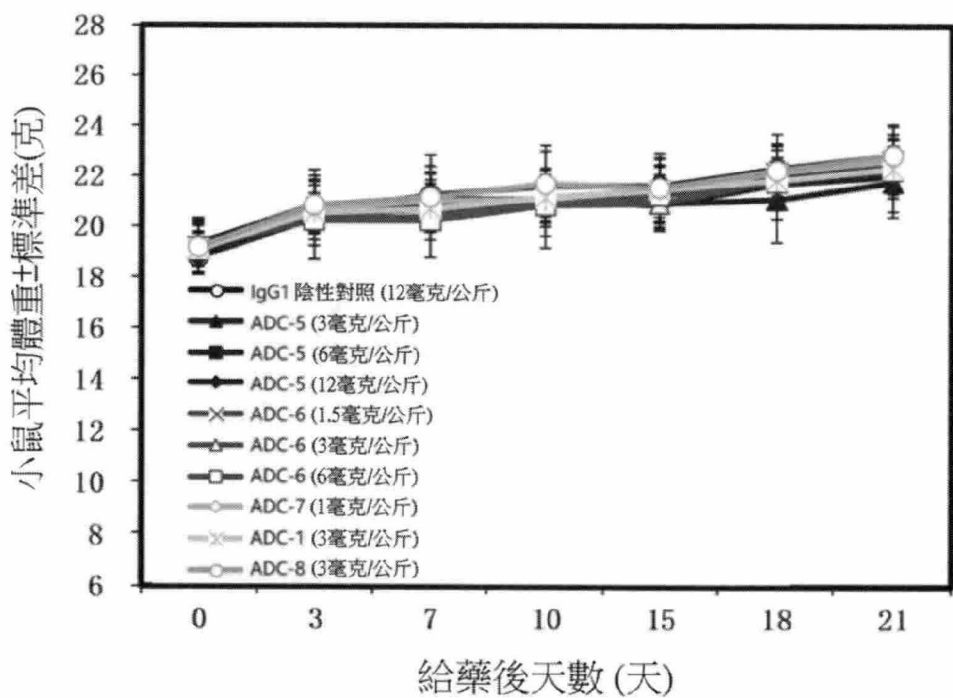


【圖14】

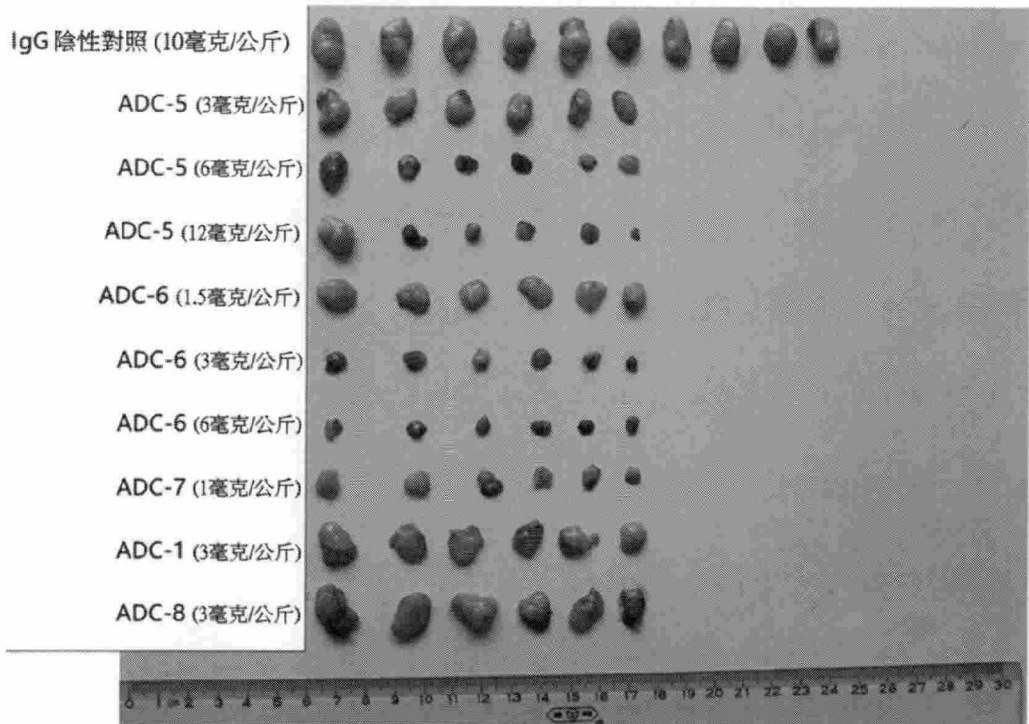
WSU-DLCL2



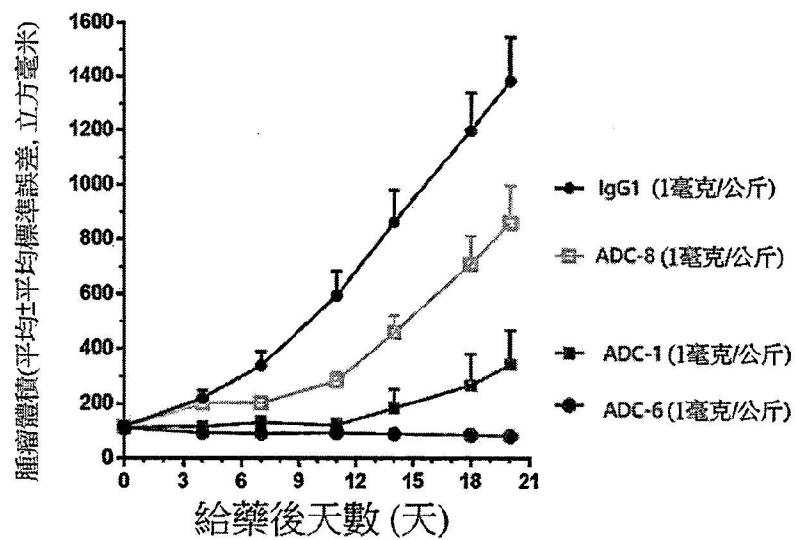
【圖15】



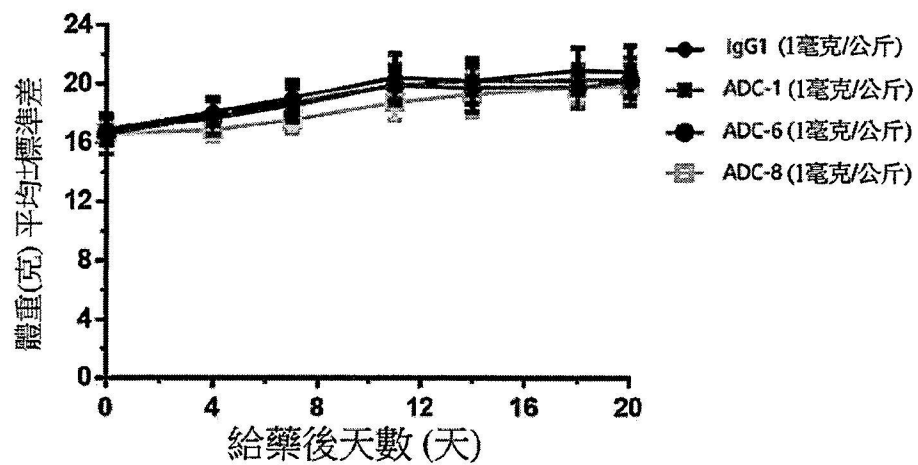
【圖16】



【圖17】



【圖18】



【圖19】