I609884

(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 I609884 B**

(45)公告日： 中華民國 107 (2018) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：103126457 (22)申請日： 中華民國 96 (2007) 年 10 月 18 日

(51)Int. Cl.： ***C07K16/28 (2006.01)*** ***A61K39/395 (2006.01)***
C07D491/22 (2006.01) ***C07D498/22 (2006.01)***
A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2006/10/19 歐洲專利局 06291628.3

(71)申請人：賽諾菲 安萬特公司 (法國) SANOFI-AVENTIS (FR)
法國

(72)發明人：帕克 彼德U PARK, PETER U (US)；巴特爾 羅拉M BARTLE, LAURA M (GB)；斯凱萊特卡亞 安娜 SKALETSKAYA, ANNA (FR)；高梅克赫 維克特S GOLMAKHER, VIKTOR S (FR)；塔維爾斯 丹尼爾 TAVARES, DANIEL (US)；丹克特 賈塔 DECKERT, JUTTA (US)；米克爾 維森 MIKOL, VINCENT (FR)；布蘭克 維諾尼克 (FR)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2005/103083A2 WO 2006/099875A1

Ellis JH et al., "Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma", The Journal of Immunology, vol.155, no.2, p.925-937, 1995

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：50 項 圖式數：20 共 156 頁

(54)名稱

用於治療癌症之新穎抗-ＣＤ３８抗體

NOVEL ANTI-CD38 ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF CANCER

(57)摘要

本發明提供特異性結合 CD38 之抗體、人類化抗體、表面重塑(resurfaced)抗體、抗體片段、衍生抗體、及其與細胞毒性劑之結合物，其能夠經由細胞凋亡(apoptosis)、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)殺死 CD38+細胞。該等抗體及其片段可用於治療表現 CD38 蛋白之腫瘤，諸如多發性骨髓瘤、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病或急性淋巴細胞性白血病；或治療自體免疫及發炎疾病，諸如全身性狼瘡、類風濕性關節炎、多發性硬化症、紅斑及哮喘。該等衍生抗體可用於診斷 CD38 表現量升高之腫瘤及使該等腫瘤成像。亦提供包含細胞結合劑及細胞毒性劑之細胞毒性結合物，包含該結合物之治療組合物，使用該結合物抑制細胞生長及治療疾病之方法，及包含該細胞毒性結合物之套組。特別言之，該細胞結合劑為識別及結合 CD38 蛋白之單株抗體及其抗原決定基(epitope)結合片段。

Antibodies, humanized antibodies, resurfaced antibodies, antibody fragments, derivatized antibodies, and conjugates of same with cytotoxic agents, which specifically bind to CD38, are capable of killing CD38 + cells by apoptosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and/or complement-

dependent cytotoxicity (CDC). Said antibodies and fragments thereof may be used in the treatment of tumors that express CD38 protein, such as multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia, acute myelogenous leukemia, or acute lymphocytic leukemia, or the treatment of autoimmune and inflammatory diseases such as systemic lupus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, erythematosus, and asthma. Said derivatized antibodies may be used in the diagnosis and imaging of tumors that express elevated levels of CD38. Also provided are cytotoxic conjugates comprising a cell binding agent and a cytotoxic agent, therapeutic compositions comprising the conjugate, methods for using the conjugates in the inhibition of cell growth and the treatment of disease, and a kit comprising the cytotoxic conjugate. In particular, the cell binding agent is a monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof, that recognizes and binds the CD38 protein.

指定代表圖：

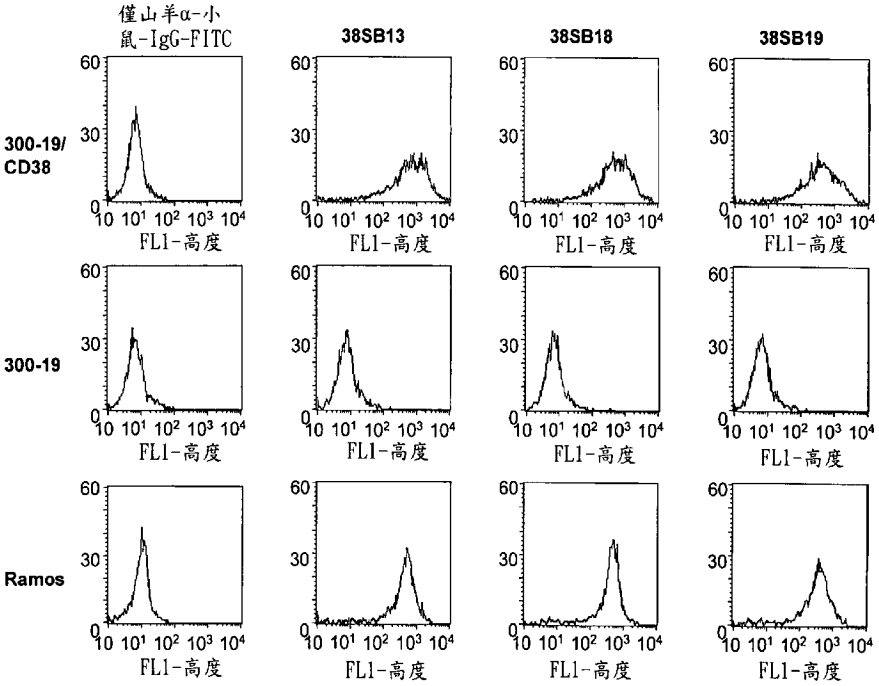


圖 1A

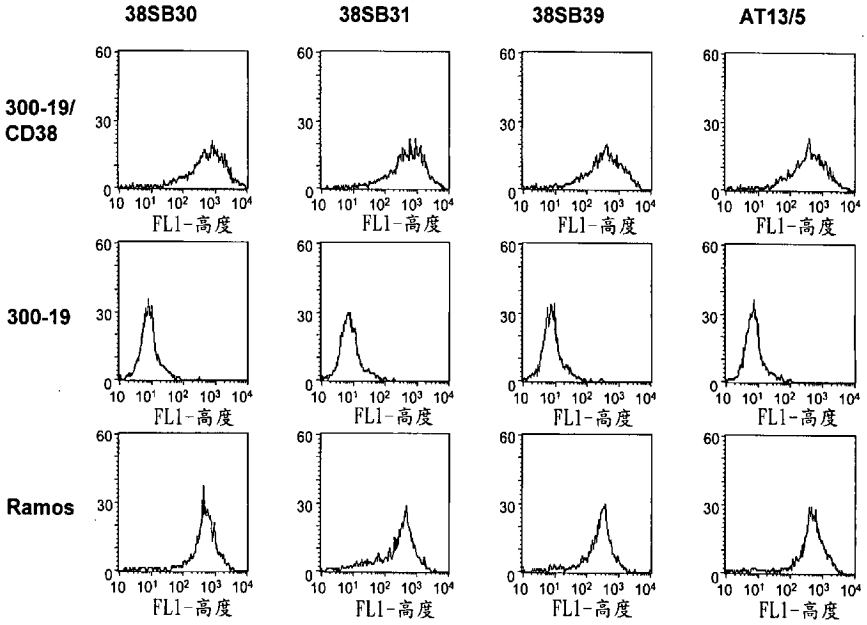

38SB30
38SB31
38SB39
AT13/5
300-19/ CD38
300-19
Ramos
60
30
0
10 10¹ 10² 10³ 10⁴
FL1-高度

圖 1B

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

用於治療癌症之新穎抗-CD38抗體

NOVEL ANTI-CD38 ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF CANCER

【技術領域】

CD38為具有長C末端細胞外域及短N末端細胞質域之45 kD II型跨膜糖蛋白。CD38蛋白為可催化NAD^+轉化成環ADP-核糖(cADPR)且亦使cADPR水解成ADP-核糖之雙功能胞外酶。在個體發生期間，CD38出現於$CD34^+$定型幹細胞上及淋巴細胞、紅血球及骨髓細胞之系定型祖細胞上。CD38表現主要在淋巴系中持續，並且在T細胞及B細胞發育之不同階段表現量不同。

CD38在許多造血惡性疾病中及來源於各種造血惡性疾病之細胞株中上調，該等造血惡性疾病包括非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma，NHL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma，BL)、多發性骨髓瘤(MM)、慢性B淋巴細胞性白血病(B-CLL)、急性B及T淋巴細胞性白血病(ALL)、T細胞淋巴瘤(TCL)、急性骨髓性白血病(AML)、毛細胞白血病(HCL)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma，HL)及慢性骨髓性白血病(CML)。另一方面，大多數造血系統之未分化多功能幹細胞為$CD38^-$。造血惡性疾病中之CD38表現及其與疾病進程之相關性使得CD38成為抗體療法之受關注標靶。

已報導CD38與Ca^{2+}動員有關(M. Morra等人，1998, *FASEB J.*, **12**: 581-592；M. T. Zilber等人，2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 2840-2845)且與在淋巴細胞及骨髓細胞或細胞株中經由許多信號轉導分子

(包括磷脂酶C-γ、ZAP-70、syk及c-cbl)之酪胺酸磷酸化的信號轉導有關(A. Funaro等人，1993, *Eur J Immunol*, **23**: 2407-2411；M. Morra等人，1998, *FASEB J.*, **12**: 581-592；A. Funaro等人，1990, *J Immunol*, **145**: 2390-2396；M. Zubiaur等人，1997, *J Immunol*, **159**: 193-205；S. Deaglio等人，2003, *Blood***102**: 2146-2155；E. Todisco等人，2000, *Blood*, **95**: 535-542；M. Konopleva等人，1998, *J Immunol*, **161**: 4702-4708；M. T. Zilber等人，2000, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 2840-2845；A. Kitanaka等人，1997, *J Immunol*, **159**: 184-192；A. Kitanaka等人，1999, *J Immunol*, **162**: 1952-1958；R. Mallone等人，2001, *Int Immunol*, **13**: 397-409)。基於此等觀察資料，提出CD38為淋巴細胞及骨髓細胞在其正常發育期間成熟及活化中之重要信號轉導分子。

CD38在信號轉導及造血中之確切作用仍不清楚，此尤其係由於大多數此等信號轉導研究係使用異位過度表現CD38及抗-CD38單株抗體(其為非生理性配位子)之細胞株。由於CD38蛋白具有產生cADPR(一種可誘發Ca^{2+}動員之分子)之酶活性(H. C. Lee等人，1989, *J Biol Chem*, **264**: 1608-1615；H. C. Lee及R. Aarhus, 1991, *Cell Regul*, **2**: 203-209)，因此已提出CD38與單株抗體接合藉由增加cADPR產生而觸發淋巴細胞中之Ca^{2+}動員及信號轉導(H. C. Lee等人，1997, *Adv Exp Med Biol*, **419**: 411-419)。與此假說相反，CD38蛋白之截斷及點突變分析顯示其細胞質尾或其酶活性均非由抗-CD38抗體介導之信號轉導所必需(A. Kitanaka等人，1999, *J Immunol*, **162**: 1952-1958；F. E. Lund等人，1999, *J Immunol*, **162**: 2693-2702；S. Hoshino等人，1997, *J Immunol*, **158**, 741-747)。

對於CD38功能之最佳證據來自$CD38^{-/-}$基因剔除小鼠，該等小鼠由於樹突狀細胞遷移中之缺陷而在先天免疫力方面具有缺陷且具有降低之T細胞依賴性體液反應(S. Partida-Sanchez等人，2004, *Immunity*,

20: 279-291；S. Partida-Sanchez等人，2001, *Nat Med*, **7**: 1209-1216)。然而，尚不清楚小鼠中之CD38功能是否與人類中之CD38功能相同，因為造血期間之CD38表現模式在人類與小鼠之間大不相同：a)不同於人類之未成熟祖幹細胞，小鼠之類似祖幹細胞具較高CD38表現量(T. D. Randall等人，1996, *Blood*, **87**: 4057-4067；R. N. Dagher等人，1998, *Biol Blood Marrow Transplant*, **4**: 69-74)；b)在人類B細胞發育期間，高CD38表現量係見於生髮中心B細胞及漿細胞中(F. M. Uckun, 1990, *Blood*, **76**: 1908-1923；M. Kumagai等人，1995, *J Exp Med*, **181**: 1101-1110)，而在小鼠中，相應細胞中之CD38表現量較低(A. M. Oliver等人，1997, *J Immunol*, **158**: 1108-1115；A. Ridderstad及D. M. Tarlinton 1998, *J Immunol*, **160**: 4688-4695)。

文獻中已描述數種對各種腫瘤細胞及細胞株具有不同增殖特性之抗人類CD38抗體。舉例而言，具有小鼠Fab及人類IgG1 Fc之嵌合OKT10抗體在來自MM患者或正常個體之周邊血液單核效應細胞存在下介導極有效對抗淋巴瘤細胞之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)(F. K. Stevenson等人1991, *Blood*, **77**: 1071-1079)。已顯示抗-CD38抗體AT13/5之CDR移植人類化型式具有對抗CD38-陽性細胞株之有效ADCC活性(US 09/797,941 A1)。已顯示人類單株抗-CD38抗體經由ADCC及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)介導活體外殺死CD38-陽性細胞株，且延緩負載MM細胞株RPMI-8226之SCID小鼠中之腫瘤生長(WO2005/103083 A2)。另一方面，數種抗-CD38抗體，IB4、SUN-4B7及OKT10(但非IB6、AT1或AT2)，誘發來自正常個體之周邊血液單核細胞(PBMC)增殖(C. M. Ausiello等人2000, *Tissue Antigens*, **56**: 539-547)。

已顯示先前技術之一些抗體能夠觸發$CD38^+$ B細胞凋亡。然而，其僅可在基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下執行此功能。已報導

促效性抗-CD38抗體(IB4)防止人類生髮中心(GC)B細胞凋亡(S. Zupo等人1994, *Eur J Immunol*, **24**: 1218-1222)，且誘發KG-1及HL-60 AML細胞增殖(M. Konopleva等人1998, *J Immunol*, **161**: 4702-4708)，但誘發Jurkat T淋巴母細胞凋亡(M. Morra等人1998, *FASEB J*, **12**: 581-592)。另一抗-CD38抗體T16誘發來自ALL患者之未成熟淋巴細胞及白血病淋巴母細胞凋亡(M. Kumagai等人1995, *J Exp Med*, **181**: 1101-1110)，且誘發來自AML患者之白血病骨髓母細胞凋亡(E. Todisco等人2000, *Blood*, **95**: 535-542)，但T16僅在基質細胞或基質衍生之細胞激素(IL-7、IL-3、幹細胞因子)存在下誘發細胞凋亡。

另一方面，一些先前技術抗體在交聯後誘發細胞凋亡，但在單獨培育時完全無任何細胞凋亡活性(WO 2006/099875)。

由於CD38為用於各種造血惡性疾病之抗體療法之受關注標靶，因此吾人針對在對抗CD38-陽性惡性造血細胞之以下三種細胞毒性活性方面具高效能產生及篩選了許多種抗人類CD38抗體：誘發細胞凋亡、ADCC及CDC。本發明描述能夠經由以下三種不同細胞毒性機制殺死$CD38^+$細胞之新穎抗-CD38抗體：誘發細胞凋亡、ADCC及CDC。顯著地，本發明最先揭示甚至在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下亦能夠直接誘發$CD38^+$細胞凋亡之抗-CD38抗體。

【發明內容】

本發明之一目的在於提供特異性結合CD38且能夠經由細胞凋亡殺死$CD38^+$細胞之抗體。一些先前技術抗體僅在交聯時能夠觸發細胞凋亡，否則無任何細胞凋亡活性，而本發明之抗體甚至在單獨培育時亦能夠誘發$CD38^+$細胞之凋亡性細胞死亡。在本發明之一態樣中，本發明之抗體能夠經由ADCC或CDC殺死$CD38^+$ B細胞。在另一態樣中，本發明之抗體能夠經由前述機制(亦即細胞凋亡、ADCC及CDC)中之至少兩者殺死$CD38^+$細胞。顯著地，本發明之抗體為最先經證明

經由所有以下三種不同機制殺死$CD38^+$ B細胞之抗-CD38抗體：細胞凋亡、ADCC及CDC。在本發明之另一實施例中，該等抗體甚至在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下亦能夠經由細胞凋亡而殺死$CD38^+$ B細胞。

本發明之抗體尤其能夠殺死惡性$CD38^+$ B細胞，包括淋巴瘤細胞、白血病細胞及多發性骨髓瘤細胞。在一些實施例中，$CD38^+$ B細胞為NHL、BL、MM、B-CLL、ALL、TCL、AML、HCL、HL或CML細胞。

在本發明之一態樣中，本發明之抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死至少24%之Daudi淋巴瘤細胞及/或至少7%之Ramos淋巴瘤細胞及/或11%之MOLP-8多發性骨髓瘤細胞及/或36%之SU-DHL-8淋巴瘤細胞及/或62%之DND-41白血病細胞及/或27%之NU-DUL-1淋巴瘤細胞及/或9%之JVM-13白血病細胞及/或4%之HC-1白血病細胞。

本發明之抗體可為多株或單株抗體。較佳者為單株抗-CD38抗體。在一更佳實施例中，提供選自38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之鼠科抗體，在本文中根據其輕鏈及重鏈可變區之胺基酸序列、輕鏈及重鏈可變區之基因的cDNA序列、其CDR(互補決定區)之鑑別、其表面胺基酸之鑑別及其以重組形式表現之方式對其進行全面表徵。

本發明包括選自38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之鼠科抗-CD38單株抗體之嵌合型式。亦包括38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體之表面重塑或人類化型式，其中抗體(或其抗原決定基結合片段)之輕鏈與重鏈中之可變區構架之表面暴露殘基均經置換以更接近類似於已知人類抗體表面。本發明之人類化抗體及其抗原決定基結合片段因其在所投予之人類受

檢者中具有比鼠科型式低之免疫原性(或完全無免疫原性)而具有改良之特性。因此，本發明之不同型式之人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體及其抗原決定基結合片段特異性識別CD38，同時對人類無免疫原性。

本發明之38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體之人類化型式在本文中根據其各別輕鏈及重鏈可變區之胺基酸序列、輕鏈及重鏈可變區之基因的DNA序列、互補決定區(CDR)之鑑別、其可變區構架表面胺基酸殘基之鑑別及其以重組形式表現之方式的揭示進行全面表徵。

本發明亦涵蓋包含(1)識別及結合CD38之細胞結合劑及(2)細胞毒性劑之細胞毒性結合物之間的結合物之用途。在細胞毒性結合物中，細胞結合劑對CD38具有高親和力且細胞毒性劑對表現CD38之細胞具高度細胞毒性，使得本發明之細胞毒性結合物形成有效殺傷劑。

在一較佳實施例中，細胞結合劑為抗-CD38抗體(例如38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39)或其抗原決定基結合片段，更佳為人類化抗-CD38抗體(例如38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39)或其抗原決定基結合片段，其中細胞毒性劑直接或經由可裂解或非可裂解連接子與抗體或其抗原決定基結合片段共價連接。在更佳實施例中，細胞結合劑為人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體或其抗原決定基結合片段，且細胞毒性劑為紫杉醇(taxol)、美登素類化合物(maytansinoid)、茅屋黴素(tomaymycin)衍生物、細黴素(leptomycin)衍生物、CC-1065或CC-1065類似物。

更佳地，細胞結合劑為人類化抗-CD38抗體38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39，且細胞毒性劑為美登素(maytansine)化合物，諸如DM1或DM4。

本發明亦涵蓋保留結合CD38能力之抗-CD38抗體之片段的用途。在本發明之另一態樣中，涵蓋抗-CD38抗體之功能性等效物之用途。

本發明亦包括一種抑制表現CD38之細胞生長之方法。在較佳實施例中，抑制表現CD38之細胞生長之方法係在活體內進行且致使細胞死亡，但亦包括活體外及離體應用。

本發明亦提供一種包含抗-CD38抗體或抗-CD38抗體-細胞毒性劑結合物及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑之治療組合物。在一些實施例中，治療組合物包含第二治療劑。此第二治療劑可選自包含以下各物之群：表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1(heregulin)、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之拮抗劑；或表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之受體(包括HER2受體、HER3受體、c-MET及其他受體酪胺酸激酶)之拮抗劑。此第二治療劑亦可選自包含靶向分化群(CD)抗原之抗體之群，該等抗原包括CD3、CD14、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD36、CD40、CD44、CD52、CD55、CD59、CD56、CD70、CD79、CD80、CD103、CD134、CD137、CD138及CD152。此第二治療劑亦可選自化學治療劑或免疫調節劑之群。

本發明進一步包括一種使用治療組合物治療患有癌症或發炎疾病(包括自體免疫疾病)之受檢者之方法。在一些實施例中，癌症係選自由NHL、BL、MM、B-CLL、ALL、TCL、AML、HCL、HL及CML組成之群。在另一實施例中，自體免疫疾病係選自由以下各病症組成

之群：全身性紅斑性狼瘡症、多發性硬化症、類風濕性關節炎、克隆氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、胃炎、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、強直性脊椎炎、C型肝炎相關之冷凝球蛋白性血管炎、慢性局竈性腦炎、大疱性類天疱瘡、A型血友病、膜性增生性絲球體腎炎、修格蘭氏症候群(Sjogren's syndrome)、成人及青少年皮肌炎、成人多發性肌炎、慢性蕁麻疹、原發性膽汁性肝硬化症、特發性血小板減少性紫癜、視神經脊髓炎、格雷氏甲狀腺機能障礙疾病(Graves' dysthyroid disease)、大疱性類天疱瘡、膜性增生性絲球體腎炎、徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)及哮喘。在較佳實施例中，細胞毒性結合物包含抗-CD38抗體及細胞毒性劑。在更佳實施例中，細胞毒性結合物包含人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體-DM1結合物，人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體-DM4，或人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體-紫杉烷結合物，且該結合物係連同醫藥學上可接受之載劑或賦形劑一起投予。

在本發明之另一態樣中，使用抗-CD38抗體偵測生物樣本中之CD38蛋白。在一較佳實施例中，使用該等抗體測定腫瘤組織中之CD38含量。

本發明亦包括一種包含抗-CD38抗體或抗-CD38抗體-細胞毒性劑結合物及使用說明書之套組。在較佳實施例中，抗-CD38抗體為人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體，且細胞毒性劑為美登素化合物(諸如DM1或DM4)、茅屋黴素衍生物、細黴素衍生物或紫杉烷，且說明書係針對在治療患有癌症之受檢者中使用該等結合物。套組亦可包括製備醫藥學上可接受之調配物所必需之組份，諸如當結合物處於凍乾狀態或濃縮形式時所必需之稀釋劑，且

包括投予調配物所必需之組份。

除非另有規定，否則本文中所引用之所有文獻及專利均以引用的方式併入。

【圖式簡單說明】

圖1A展示經純化之鼠科抗-CD38抗體38SB13、38SB18、38SB19與表現人類CD38之300-19細胞及CD38-陽性Ramos淋巴瘤細胞之特異性結合的FACS分析。

圖1B展示經純化之鼠科抗-CD38抗體38SB30、38SB31、38SB39及對照抗-CD38抗體AT13/5與表現人類CD38之300-19細胞及CD38-陽性Ramos淋巴瘤細胞之特異性結合的FACS分析。

圖2展示以Ramos細胞確立之38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之結合滴定曲線。

圖3展示在與38SB13、38SB19或AT13/5(10 nM)一起培育24 h後經歷細胞凋亡之Ramos細胞之FACS點陣圖(FL4-H；TO-PRO-3染色；y軸及FL1-H；Annexin V-FITC染色；x軸)。

圖4A展示在與38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31、38SB39、38SB7、38SB23、IB4、AT13/5、OKT10或SUN-4B7一起培育24 h後經歷細胞凋亡之Ramos細胞之平均百分數。繪製來自雙重複樣本之Annexin V-陽性細胞之平均百分數(y軸；包括TO-PRO-3陽性與陰性細胞)。

圖4B展示在與如圖4A相同之抗體組一起培育24 h後經歷細胞凋亡之Daudi細胞之平均百分數。

圖4C展示與如圖4A相同之抗體組一起培育24 h後經歷細胞凋亡之Molp-8細胞之平均百分數。

圖5A展示用於表現hu38SB19-LC之人類表現載體之圖解。

圖5B展示用於表現hu38SB19-HC之人類表現載體之圖解。

圖5C展示用於表現hu38SB19LC與hu38SB19HC之人類表現載體之圖解。

圖6A展示對於Ramos細胞，由抗體ch38SB13、ch38SB18及ch38SB19介導之ADCC活性。

圖6B展示對於Ramos細胞，由抗體ch38SB30、ch38SB31及ch38SB39介導之ADCC活性。

圖7A)展示對於LP-1多發性骨髓瘤細胞，由抗體ch38SB18、ch38SB19、ch38SB31及非結合性嵌合人類IgG1對照抗體介導之ADCC活性。

圖7B)比較對於Daudi細胞由抗體ch38SB19及鼠科38SB19介導之ADCC活性。

圖8A展示對於NALM-6 B-ALL細胞，由ch38SB19抗體及由非結合性嵌合人類IgG1對照抗體介導之ADCC活性。

圖8B展示對於MOLT-4 T-ALL細胞，由ch38SB19抗體及由非結合性嵌合人類IgG1對照抗體介導之ADCC活性。

圖9A展示對於Raji-IMG細胞，由抗體ch38SB13、ch38SB18、ch38SB19、ch38SB30及ch38SB39介導之CDC活性。

圖9B展示對於Raji-IMG細胞，由抗體ch38SB19及ch38SB31介導之CDC活性。

圖10展示對於LP-1多發性骨髓瘤細胞，由抗體ch38SB18、ch38SB19、ch38SB31及由非結合性嵌合人類IgG1對照抗體介導之CDC活性。

圖11A展示對於Daudi細胞，由抗體ch38SB13、cch38SB19及ch38SB39介導之CDC活性。

圖11B展示對於Daudi細胞，由抗體ch38SB18及ch38SB30介導之CDC活性。

圖11C展示對於Daudi細胞，由抗體ch38SB19及ch38SB31介導之CDC活性。

圖12A展示對於與Ramos細胞結合，ch38SB19、hu38SB19 v1.00及hu38SB19 v1.20之結合滴定曲線。

圖12B展示針對ch38SB19、hu38SB19 v1.00及hu38SB19 v1.00與經結合生物素之鼠科38SB19抗體競爭結合Ramos細胞之能力來比較ch38SB19、hu38SB19 v1.00及hu38SB19 v1.00之結合曲線。

圖13展示在與ch38SB19、hu38SB19 v1.00或hu38SB19 v1.20抗體一起培育24 h後經歷細胞凋亡之Daudi細胞之平均百分數。

圖14展示對於LP-1多發性骨髓瘤細胞，由抗體ch38SB19、hu38SB19 v1.00、hu38SB19 v1.20及由非結合性嵌合人類IgG1對照抗體介導之ADCC活性。

圖15A展示對於Raji-IMG淋巴瘤細胞，由抗體ch38SB19、hu38SB19 v1.00及hu38SB19 v1.20介導之CDC活性。

圖15B展示對於LP-1多發性骨髓瘤細胞，由抗體ch38SB19、hu38SB19 v1.00及hu38SB19 v1.20介導之CDC活性。

圖15C展示對於DND-41 T細胞急性淋巴母細胞白血病細胞，由抗體ch38SB19、hu38SB19 v1.00及hu38SB19 v1.20介導之CDC活性。

圖16展示對於SU-DHL-8瀰漫性大B細胞淋巴瘤細胞、NU-DUL-1 B細胞淋巴瘤細胞、DND-41 T細胞急性淋巴母細胞白血病細胞、JVM-13 B細胞慢性淋巴細胞性白血病細胞及HC-1毛細胞白血病細胞，在與hu38SB19 v1.00抗體一起培育24 h後Annexin V陽性細胞之平均百分數。

圖17展示負載經確立之播散性人類Ramos腫瘤之SCID小鼠之存活百分數。如圖所示，小鼠經鼠科38SB13、38SB18、38SB19、5

38SB30、38SB31或38SB39抗體或PBS治療。

圖18展示負載經確立之播散性人類Daudi腫瘤之SCID小鼠之存活百分數。如圖所示，小鼠經hu38SB19或mu38SB19抗體或PBS治療。

圖19展示負載NCI-H929多發性骨髓瘤異種移植腫瘤之SCID小鼠之平均腫瘤體積。如圖所示，小鼠經hu38SB19、非結合性對照IgG1抗體或PBS治療。

圖20展示負載MOLP-8多發性骨髓瘤異種移植腫瘤之SCID小鼠之平均腫瘤體積。如圖所示，小鼠經hu38SB19、mu38SB19、非結合性對照IgG1抗體或PBS治療。

【實施方式】

本文提供能夠特異性結合CD38之新抗體。詳言之，本發明者已發現特異性結合細胞表面上之CD38且經由細胞凋亡殺死$CD38^+$細胞之新穎抗體。在本發明之一態樣中，抗-CD38抗體亦能夠經由抗體依賴性細胞毒性(ADCC)殺死$CD38^+$細胞。在另一態樣中，本發明之抗-CD38抗體能夠經由補體依賴性細胞毒性(CDC)殺死$CD38^+$細胞。在另一態樣中，本發明之抗-CD38抗體能夠經由上述機制(細胞凋亡、ADCC及CDC)中之至少兩者殺死$CD38^+$細胞。詳言之，在一較佳實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠經由細胞凋亡、ADCC及CDC殺死$CD38^+$細胞。由此，本發明最先提供能夠經由三種不同機制殺死$CD38^+$細胞之抗-CD38抗體。

先前已描述能夠結合CD38且觸發$CD38^+$細胞中之凋亡性細胞死亡之抗體(M. Kumagai等人，1995, *J Exp Med*, **181**: 1101-1110；E. Todisco等人2000, *Blood*, **95**: 535-542)，但本發明之抗體為最先證明在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下具有細胞凋亡活性之抗體。如本文所用之術語"基質"係指腫瘤之非惡性支撐組織，其包括結締組織、血管及炎症細胞。基質細胞產生可影響癌細胞行為之生長因子及

其他物質(包括細胞激素)。如本文所用之術語"細胞激素"係指介導及調節免疫、炎症及造血之小分泌性蛋白質(例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5及IL-6、IFNg、IL-3、IL-7及GM-CSF)。本文中已顯示先前技術之抗體在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下不能觸發凋亡性細胞死亡。與此相反，本發明之抗-CD38抗體在相同條件下顯示有效的細胞凋亡活性。

在另一態樣中，本發明之抗體能夠以3×10^{-9} M或更低之k_D結合CD38蛋白。

如本文所用之術語"CD38"係指一種II型跨膜蛋白，其包含(例如)如Genbank寄存編號NP_001766之胺基酸序列。"$CD38^+$細胞"為表現CD38蛋白之細胞。較佳地，$CD38^+$細胞為哺乳動物細胞。

在本發明之一實施例中，$CD38^+$細胞為惡性細胞。在另一實施例中，$CD38^+$細胞為B細胞。在一較佳實施例中，$CD38^+$細胞為來源於造血惡性疾病之腫瘤細胞。在一更佳實施例中，$CD38^+$細胞為淋巴瘤細胞、白血病細胞或多發性骨髓瘤細胞。在另一較佳實施例中，$CD38^+$細胞為NHL、BL、MM、B-CLL、ALL、TCL、AML、HCL、HL或CML細胞。

因此，在一實施例中，本發明提供能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下殺死至少24%之Daudi淋巴瘤細胞之抗-CD38抗體。在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下殺死至少7%之Ramos淋巴瘤細胞。在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下殺死至少11%之MOLP-8多發性骨髓瘤細胞。在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下殺死至少36%之SU-DHL-8淋巴瘤細胞。在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在

下殺死至少27%之NU-DUL-1淋巴瘤細胞。在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下殺死至少62%之DND-41白血病細胞。在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下殺死至少9%之JVM-13白血病細胞。在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下殺死至少4%之HC-1白血病細胞。

抗體

術語"抗體"在本文中以最廣泛含義使用且特定涵蓋任何同型(諸如IgG、IgM、IgA、IgD及IgE)之單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體、多特異性抗體、嵌合抗體及抗體片段。與特異性抗原反應之抗體可藉由重組方法(諸如選擇噬菌體或類似載體中之重組抗體庫)或藉由以抗原或抗原編碼核酸免疫動物來產生。

典型IgG抗體包含由雙硫鍵連接之兩條相同重鏈及兩條相同輕鏈。每條重鏈及輕鏈含有恆定區及可變區。各可變區含有三個稱作"互補決定區"("CDR")或"高變區"之片段，其主要負責結合抗原之抗原決定基。其通常被稱作自N末端依序編號之CDR1、CDR2及CDR3。可變區中之較高度保守部分稱作"構架區"。

如本文所用之"V_H"或"VH"係指抗體之免疫球蛋白重鏈之可變區，包括Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab'或$F(ab')_2$片段之重鏈。提及"V_L"或"VL"係指抗體之免疫球蛋白輕鏈之可變區，包括Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab'或$F(ab')_2$片段之輕鏈。

"多株抗體"為在一或多種其他、非相同抗體之中或在此等抗體存在下產生之抗體。一般而言，多株抗體係在產生非相同抗體之數種其他B淋巴細胞存在下自一種B淋巴細胞產生。通常，多株抗體係直接自經免疫動物獲得。

如本文所用之"單株抗體"為自大體上均質之抗體群體獲得之抗體，亦即形成此群體之抗體除可以少量存在之可能天然產生之突變體以外基本上相同。此等抗體係針對單一抗原決定基且因此具有高度特異性。

"抗原決定基"為抗體結合之抗原位點。若抗原為聚合物(諸如蛋白質或多醣)，則抗原決定基可由相連殘基或由經抗原聚合物摺疊而緊密靠近之非相連殘基形成。在蛋白質中，由相連胺基酸形成之抗原決定基在暴露於變性溶劑後通常保留，而由非相連胺基酸形成之抗原決定基在該暴露下通常喪失。

如本文所用之術語"K_D"係指特定抗體/抗原相互作用之解離常數。

本發明係由新穎鼠科抗-CD38抗體(本文中之38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39)產生，對該等抗體根據輕鏈及重鏈之胺基酸序列、CDR之鑑別、表面胺基酸之鑑別及其以重組形式表現之方式進行全面表徵。抗體38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之輕鏈及重鏈及人類化型式之一級胺基酸及DNA序列揭示於本文中。

產生38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39鼠科抗-CD38抗體之融合瘤細胞株已分別以寄存編號PTA-7667、PTA-7669、PTA-7670、PTA-7666、PTA-7668及PTA-7671於2006年6月21日寄存於美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)(10801 University Bld, Manassas, VA, 20110-2209, USA)。

本發明之範疇並不限於包含此等序列之抗體及片段。實情為特異性結合CD38且能夠經由細胞凋亡、ADCC及/或CDC殺死$CD38^+$細胞之所有抗體及片段均在本發明之範疇內。因此，抗體及抗體片段可在其骨架、CDR、輕鏈及重鏈之胺基酸序列方面不同於抗體38SB13、

38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39或人類化衍生物，且仍在本發明之範疇內。

在一實施例中，本發明提供包含一或多個具有選自由SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35及36組成之群之胺基酸序列之CDR的抗體或其抗原決定基結合片段。在一較佳實施例中，本發明之抗體包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含三個具有選自由SEQ ID NO: 1、2、3、7、8、9、13、14、15、19、20、21、25、26、27、31、32及33組成之群之胺基酸序列之連續CDR，且該輕鏈包含三個具有選自由SEQ ID NO: 4、5、6、10、11、12、16、17、18、22、23、24、28、29、30、34、35及36組成之群之胺基酸序列之連續CDR。

在一更佳實施例中，本發明之抗體包含三個具有選自SEQ ID NO: 1、2、3、4、5及6之群之胺基酸序列之CDR。在另一更佳實施例中，提供一種38SB13抗體，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含具有由SEQ ID NO: 1、2及3組成之胺基酸序列之三個連續CDR，且該輕鏈包含具有由SEQ ID NO: 4、5及6組成之胺基酸序列之三個連續CDR。

在另一更佳實施例中，本發明之抗體包含三個具有選自SEQ ID NO: 7、8、9、10、11及12之群之胺基酸序列之CDR。在另一更佳實施例中，提供一種38SB18抗體，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含具有由SEQ ID NO: 7、8及9組成之胺基酸序列之三個連續CDR，且該輕鏈包含具有由SEQ ID NO: 10、11及12組成之胺基酸序列之三個連續CDR。

在另一更佳實施例中，本發明之抗體包含三個具有選自SEQ ID NO: 13、14、15、16、17及18之群之胺基酸序列之CDR。在另一更佳

實施例中，提供一種38SB19抗體，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含具有由SEQ ID NO: 13、14及15組成之胺基酸序列之三個連續CDR，且該輕鏈包含具有由SEQ ID NO: 16、17及18組成之胺基酸序列之三個連續CDR。

在另一更佳實施例中，本發明之抗體包含三個具有選自SEQ ID NO: 19、20、21、22、23、24之群之胺基酸序列之CDR。在另一更佳實施例中，提供一種38SB30抗體，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含具有由SEQ ID NO: 19、20及21組成之胺基酸序列之三個連續CDR，且該輕鏈包含具有由SEQ ID NO: 22、23及24組成之胺基酸序列之三個連續CDR。

在另一更佳實施例中，本發明之抗體包含三個具有選自SEQ ID NO: 25、26、27、28、29及30之群之胺基酸序列之CDR。在另一更佳實施例中，提供一種38SB31抗體，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含具有由SEQ ID NO: 25、26及27組成之胺基酸序列之三個連續CDR，且該輕鏈包含具有由SEQ ID NO: 28、29及30組成之胺基酸序列之三個連續CDR。

在另一更佳實施例中，本發明之抗體包含三個具有選自31、32、33、34、35及36之群之胺基酸序列之CDR。在另一更佳實施例中，提供一種38SB39抗體，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含具有由SEQ ID NO: 31、32及33組成之胺基酸序列之三個連續CDR，且該輕鏈包含具有由SEQ ID NO: 34、35及36組成之胺基酸序列之三個連續CDR。

在另一實施例中，本發明之抗-CD38抗體包含具有選自由以下各序列組成之群之胺基酸序列之V_L：SEQ ID NO: 38、40、42、44、46及48之V_L。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 38組成之胺基酸序列之V_L的38SB13抗體。在一更佳實施例中，提供包含具

有由SEQ ID NO: 40組成之胺基酸序列之V_L的38SB18抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 42組成之胺基酸序列之V_L的38SB19抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 44組成之胺基酸序列之V_L的38SB30抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 46組成之胺基酸序列之V_L的38SB31抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 48組成之胺基酸序列之V_L的38SB39抗體。

在另一實施例中，本發明之抗體包含具有選自由SEQ ID NO: 50、52、54、56、58及60組成之群之胺基酸序列之V_H。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 50組成之胺基酸序列之V_H的38SB13抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 52組成之胺基酸序列之V_H的38SB18抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 54組成之胺基酸序列之V_H的38SB19抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 56組成之胺基酸序列之V_H的38SB30抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 58組成之胺基酸序列之V_H的38SB31抗體。在一更佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 60組成之胺基酸序列之V_H的38SB39抗體。

嵌合及人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體

如本文所用之"嵌合抗體"為其中恆定區或其一部分經改變、置換或交換使得可變區與不同種或屬於另一抗體類別或子類之恆定區連接之抗體。"嵌合抗體"亦指其中可變區或其一部分經改變、置換或交換使得恆定區與不同種或屬於另一抗體類別或子類之可變區連接之抗體。用於產生嵌合抗體之方法在此項技術中係已知的。例如參見Morrison, 1985, *Science*, **229**: 1202；Oi等人，1986, *BioTechniques*, 4: 214；Gillies等人，1989, *J. Immunol. Methods*, **125**: 191-202；美國專

利第5,807,715號、第4,816,567號及第4,816,397號，該等文獻之全文以引用的方式併入本文中。

在本發明之一實施例中，提供38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之嵌合型式。詳言之，該等嵌合型式含有至少一個人類恆定區。在一更佳實施例中，此人類恆定區為人類IgG1/κ恆定區。

如本文所用之術語"人類化抗體"係指含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列之嵌合抗體。人類化之目的在於降低引入人類之異種抗體(諸如鼠科抗體)之免疫原性，同時保持完全抗原結合親和力及抗體特異性。人類化抗體或適於不受其他哺乳動物排斥之抗體可使用諸如表面重塑及CDR移植之數種技術來產生。如本文所用之表面重塑技術使用分子模型化、統計分析及突變之組合來改變抗體可變區之非CDR表面以類似於靶宿主之已知抗體之表面。CDR移植技術涉及將(例如)小鼠抗體之互補決定區代入人類構架域中，例如參見WO 92/22653。人類化嵌合抗體較佳具有除互補決定區(CDR)外大體上或專一地來源於相應人類抗體區之恆定區及可變區及大體上或專一地來源於非人類哺乳動物之CDR。

用於抗體表面重塑之策略及方法及用於降低抗體在不同宿主內之免疫原性之其他方法揭示於美國專利第5,639,641號中，該專利之全文以引用的方式併入本文中。簡言之，在一較佳方法中，(1)產生一組抗體重鏈及輕鏈可變區之位置對準以得到一組重鏈及輕鏈可變區構架表面暴露位置，其中對於所有可變區之對準位置至少約98%一致；(2)對於齧齒動物抗體(或其片段)定義一組重鏈及輕鏈可變區構架表面暴露胺基酸殘基；(3)鑑別與該組齧齒動物表面暴露胺基酸殘基最接近一致之一組重鏈及輕鏈可變區構架表面暴露胺基酸殘基；(4)除在齧齒動物抗體之互補決定區之任何殘基之任何原子之5 Å內的彼等胺

基酸殘基以外，將在步驟(2)中定義之該組重鏈及輕鏈可變區構架表面暴露胺基酸殘基用在步驟(3)中鑑別之該組重鏈及輕鏈可變區構架表面暴露胺基酸殘基取代；及(5)產生具有結合特異性之人類化齧齒動物抗體。

抗體可使用多種其他技術來人類化，該等技術包括CDR移植(EP 0 239 400、WO 91/09967、美國專利第5,530,101號及第5,585,089號)、鑲飾或表面重塑(EP 0 592 106、EP 0 519 596；Padlan E. A., 1991, *Molecular Immunology* **28(4/5)**: 489-498；Studnicka G. M.等人，1994, *Protein Engineering*, **7(6)**: 805-814；Roguska M.A.等人，1994, *PNAS*, **91**: 969-973)及鏈改組(美國專利第5,565,332號)。人類抗體可藉由多種此項技術中已知之方法來製成，該等方法包括噬菌體呈現法。亦參見美國專利第4,444,887號、第4,716,111號、第5,545,806號及第5,814,318號；及國際專利申請公開案第WO 98/46645號、第WO 98/50433號、第WO 98/24893號、第WO 98/16654號、第WO 96/34096號、第WO 96/33735號及第WO 91/10741號(該等文獻之全文以引用的方式併入)。

本發明提供人類化抗體或其片段，其識別CD38且經由細胞凋亡、ADCC及/或CDC殺死$CD38^+$細胞。在另一實施例中，人類化抗體或其抗原決定基結合片段具有經由所有三種機制殺死該等$CD38^+$細胞之能力。在另一實施例中，本發明之人類化抗體或其抗原決定基結合片段甚至在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下亦能夠經由細胞凋亡殺死該等$CD38^+$細胞。

該人類化抗體之一較佳實施例為人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗體或其抗原決定基結合片段。

在更佳實施例中，提供38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體之表面重塑或人類化型式，其中抗體或其片段

之輕鏈與重鏈中之表面暴露殘基均經置換以更接近類似於已知人類抗體表面。本發明之人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體或其抗原決定基結合片段具有改良之特性。舉例而言，人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體或其抗原決定基結合片段特異性識別CD38蛋白。更佳地，人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體或其抗原決定基結合片段具有經由細胞凋亡、ADCC及/或CDC殺死$CD38^+$細胞之額外能力。

38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體之人類化型式在本文中亦根據其各別輕鏈及重鏈可變區之胺基酸序列、輕鏈及重鏈可變區之基因的DNA序列、CDR之鑑別、其表面胺基酸之鑑別及其以重組形式表現之方式的揭示進行全面表徵。然而，本發明之範疇並不限於包含此等序列之抗體及片段。實情為特異性結合CD38且能夠經由細胞凋亡、ADCC及/或CDC殺死$CD38^+$細胞之所有抗體及片段均在本發明之範疇內。較佳地，該等抗體能夠經由所有三種機制殺死$CD38^+$細胞。因此，本發明之抗體及抗原決定基結合抗體片段可在其骨架、CDR及/或輕鏈及重鏈之胺基酸序列方面不同於38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體或其人類化衍生物，且仍在本發明之範疇內。

38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體之CDR係藉由模型化來鑑別且已預測其分子結構。另外，儘管CDR對於抗原決定基識別具有重要性，但其並非為本發明之抗體及片段所必需。因此，提供經(例如)本發明之抗體之親和力成熟而產生之具有改良特性之抗體及片段。

38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體之重鏈及輕鏈可變區之序列及其CDR之序列先前係未知的且在本申請案

中列出。該等資訊可用於產生38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體之人類化型式。此等人類化抗-CD38抗體或其衍生物亦可用作本發明之細胞結合劑。

因此，在一實施例中，本發明提供包含一或多個具有選自由SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35及36組成之群之胺基酸序列之CDR的人類化抗體或其抗原決定基結合片段。在一較佳實施例中，本發明之人類化抗體包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，且該重鏈包含三個具有選自由SEQ ID NO: 1、2、3、7、8、9、13、14、15、19、20、21、25、26、27、31、32及33組成之群之胺基酸序列之連續CDR，且該輕鏈包含三個具有選自由SEQ ID NO: 4、5、6、10、11、12、16、17、18、22、23、24、28、29、30、34、35及36組成之群之胺基酸序列之連續CDR。在另一較佳實施例中，提供一種38SB13之人類化型式，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，其中該重鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 1、2及3表示之胺基酸序列之連續互補決定區，且其中該輕鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 4、5及6表示之胺基酸序列之連續互補決定區。在另一較佳實施例中，提供一種38SB18之人類化型式，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，其中該重鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 7、8及9表示之胺基酸序列之連續互補決定區，且其中該輕鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 10、11及12表示之胺基酸序列之連續互補決定區。在另一較佳實施例中，提供一種38SB19之人類化型式，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，其中該重鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 13、14及15表示之胺基酸序列之連續互補決定區，且其中該輕鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 16、17及18表示之胺基酸序列之連續互補決定區。在另一較佳實施例中，提供一種38SB30之人類

化型式，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，其中該重鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 19、20及21表示之胺基酸序列之連續互補決定區，且其中該輕鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 22、23及24表示之胺基酸序列之連續互補決定區。在另一較佳實施例中，提供一種38SB31之人類化型式，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，其中該重鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 25、26及27表示之胺基酸序列之連續互補決定區，且其中該輕鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 28、29及30表示之胺基酸序列之連續互補決定區。在另一較佳實施例中，提供一種38SB39之人類化型式，其包含至少一條重鏈及至少一條輕鏈，其中該重鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 31、32及33表示之胺基酸序列之連續互補決定區，且其中該輕鏈包含三個具有由SEQ ID NO: 34、35及36表示之胺基酸序列之連續互補決定區。

在一實施例中，本發明提供包含具有選自SEQ ID NOS: 66及72之群之胺基酸序列之V_H的人類化抗體或其片段。在一較佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 66表示之胺基酸序列之V_H的人類化38SB19抗體。在另一較佳實施例中，提供包含具有由SEQ ID NO: 72表示之胺基酸序列之V_H的人類化38SB31抗體。

在另一實施例中，本發明提供包含具有選自SEQ ID NOS: 62、64、68及70之群之胺基酸序列之V_L的人類化抗體或其片段。在一較佳實施例中，提供包含具有選自SEQ ID NO: 62及64之群之胺基酸序列之V_L的人類化38SB19抗體。在另一較佳實施例中，提供包含具有選自SEQ ID NO: 68及70之群之胺基酸序列之V_L的人類化38SB31抗體。

本發明之人類化38SB19抗體及其抗原決定基結合片段亦可包括在由表1A及表1B中之灰色殘基定義之一或多個位置處之輕鏈及/或重鏈胺基酸殘基取代，該等灰色殘基表示已自原鼠科殘基變為人類抗體28E4中之相應構架表面殘基之鼠科表面構架殘基。表1B中之標星號

(*)殘基對應於人類化38SB19重鏈變異體(SEQ ID NO: 65)中之鼠科回復突變。回復突變之殘基接近於CDR之殘基且係如美國專利第5,639,641號中所述或類似於在先前人類化操作中使抗原結合親和力降低之殘基的選擇進行選擇(Roguska等人，1996，美國專利申請公開案2003/0235582及2005/0118183)。

同樣地，本發明之人類化38SB13、38SB18、38SB30、38SB31及38SB39抗體及其抗原決定基結合片段亦可包括輕鏈及/或重鏈胺基酸殘基之取代。

聚核苷酸、載體及宿主細胞

提供編碼本發明之抗-CD38抗體之核酸。在一實施例中，核酸分子編碼抗-CD38免疫球蛋白之重鏈及/或輕鏈。在一較佳實施例中，單一核酸編碼抗-CD38免疫球蛋白之重鏈且另一核酸分子編碼抗-CD38免疫球蛋白之輕鏈。

在本發明之另一態樣中，提供編碼具有選自SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70及72之群之胺基酸序列之多肽的聚核苷酸。在一較佳實施例中，本發明之聚核苷酸係選自由SEQ ID NO: 37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69及71組成之群。本發明並不限於該等聚核苷酸本身，而亦包括顯示與該等聚核苷酸至少80%一致之所有聚核苷酸。

本發明提供包含本發明之聚核苷酸之載體。在一實施例中，載體含有編碼抗-CD38免疫球蛋白之重鏈之聚核苷酸。在另一實施例中，該聚核苷酸編碼抗-CD38免疫球蛋白之輕鏈。本發明亦提供包含編碼融合蛋白、經修飾抗體、抗體片段及其探針之聚核苷酸分子之載

體。

為表現本發明之抗-CD38抗體之重鏈及/或輕鏈，將編碼該等重鏈及/或輕鏈之聚核苷酸插入表現載體中使得基因可操作地連接至轉錄及轉譯序列。表現載體包括質體、YAC、黏質體、反轉錄病毒、EBV衍生之離合染色小體，及熟習此項技術者已知有利於確保該等重鏈及/或輕鏈表現之所有其他載體。熟習此項技術者應瞭解可將編碼重鏈及輕鏈之聚核苷酸選殖至不同載體中或同一載體中。在一較佳實施例中，將該等聚核苷酸選殖於同一載體中。

本發明之聚核苷酸及包含此等分子之載體可用於轉化合適之哺乳動物宿主細胞。轉化可藉由用於將聚核苷酸引入細胞宿主中之任何已知方法來達成。該等方法為熟習此項技術者所熟知且包括葡聚糖介導之轉化、磷酸鈣沈澱、聚凝胺介導之轉染、原生質體融合、電穿孔、將聚核苷酸封裝入脂質體中、將DNA基因槍注射及直接微注射至細胞核中。

抗體片段

本發明之抗體包括上文所論述之全長抗體以及其抗原決定基結合片段。如本文所用之"抗體片段"包括保留與由全長抗體識別之抗原決定基結合之能力的抗體之任何部分，一般稱作"抗原決定基結合片段"。抗體片段之實例包括(但不限於)Fab、Fab'及$F(ab')_2$、Fd、單鏈Fv(scFv)、單鏈抗體、雙硫鍵連接之Fv(dsFv)及包含VL或VH區之片段。抗原決定基結合片段(包括單鏈抗體)可包含單獨或與以下各者之整體或一部分組合之可變區：鉸鏈區、CH1、CH2及CH3域。

此等片段可含有一或兩個Fab片段或$F(ab')_2$片段。儘管含有少於完整抗體之所有六個CDR(諸如三個、四個或五個CDR)之片段亦具有功能性，但較佳地抗體片段含有所有該等區。此外，片段可為或可組合以下免疫球蛋白類別中之任一者之成員：IgG、IgM、IgA、IgD或S

IgE及其子類。

Fab及$F(ab')_2$片段可藉由蛋白水解裂解，使用諸如木瓜蛋白酶(Fab片段)或胃蛋白酶($F(ab')_2$片段)之酶來產生。

"單鏈Fv"("scFvs")片段為含有與至少一個抗體輕鏈可變區(V_L)片段連接之至少一個抗體重鏈可變區(V_H)片段之抗原決定基結合片段。連接子可為短的可撓性肽，該肽經選擇以確保在V_L區與V_H區連接後發生該等區之正確三維摺疊以維持單鏈抗體片段來源之完整抗體之靶分子結合特異性。V_L或V_H序列之羧基末端可經由連接子與互補V_L或V_H序列之胺基酸末端共價連接。

本發明之單鏈抗體片段含有具有本說明書中所述之完整抗體之可變區或互補決定區(CDR)中之至少一者，但缺乏彼等抗體之一些或所有恆定域的胺基酸序列。此等恆定域並非抗原結合所必需，但構成完整抗體結構之主要部分。單鏈抗體片段可由此克服與使用含有一部分或所有恆定域之抗體相關之一些問題。舉例而言，單鏈抗體片段傾向於無生物分子與重鏈恆定區之間的不當相互作用，或無其他不合需要之生物活性。另外，單鏈抗體片段比完整抗體小得多且可由此具有大於完整抗體之毛細管滲透性，從而使單鏈抗體片段可更有效地定位及結合靶抗原結合位點。另外，抗體片段可在原核細胞中以相對較大規模產生，由此有利於其產生。此外，單鏈抗體片段之相對較小尺寸使其比完整抗體在接受者中引起免疫反應之可能性較小。

單鏈抗體片段可藉由分子選殖、抗體噬菌體呈現庫或熟習此項技術者所熟知之類似技術來產生。此等蛋白質可(例如)在真核細胞或原核細胞(包括細菌)中產生。本發明之抗原決定基結合片段亦可使用此項技術中已知之各種噬菌體呈現方法來產生。在噬菌體呈現方法中，在載有編碼功能性抗體域之聚核苷酸序列之噬菌體粒子之表面上呈現功能性抗體域。詳言之，可使用該噬菌體呈現自全套或組合抗體

庫(例如人類或鼠科)所表現之抗原決定基結合域。表現與所關注抗原結合之抗原決定基結合域之噬菌體可用抗原(例如使用結合或俘獲於固體表面或珠粒之經標記抗原)來選擇或鑑別。此等方法中所用之噬菌體通常為包括自具有與噬菌體基因III或基因VIII蛋白重組融合之Fab、Fv或雙硫鍵穩定之Fv抗體域之噬菌體所表現之fd及M13結合域的絲狀噬菌體。

可用於產生本發明之抗原決定基結合片段之噬菌體呈現方法之實例包括以下文獻中所揭示之方法：Brinkman等人，1995, *J. Immunol. Methods*, **182**: 41-50；Ames等人，1995, *J. Immunol. Methods*, **184**: 177-186；Kettleborough等人，1994, *Eur. J. Immunol.*, **24**: 952-958；Persic等人，1997, *Gene*, **187**: 9-18；Burton等人，1994, *Advances in Immunology*, **57**: 191-280；WO/1992/001047、WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/11236、WO 95/15982、WO 95/20401；及美國專利第5,698,426號、第5,223,409號、第5,403,484號、第5,580,717號、第5,427,908號、第5,750,753號、第5,821,047號、第5,571,698號、第5,427,908號、第5,516,637號、第5,780,225號、第5,658,727號、第5,733,743號及第5,969,108號；該等文獻之各者之全文均以引用的方式併入本文中。

在噬菌體選擇後，(例如)如下文詳細描述，可將編碼片段之噬菌體區域分離且用其使用重組DNA技術經由在包括哺乳動物細胞、昆蟲細胞、植物細胞、酵母及細菌之所選宿主中表現來產生抗原決定基結合片段。舉例而言，用以重組產生Fab、Fab'及$F(ab')_2$片段之技術亦可使用諸如以下文獻中所揭示之方法的此項技術中已知之方法來使用，WO 92/22324；Mullinax等人，1992, *BioTechniques*, **12(6)**: 864-869；Sawai等人，1995, *AJRI*, **34**: 26-34；及Better等人，1988, *Science*,

240:1041-1043；該等文獻之全文以引用的方式併入。可用於產生單鏈Fv及抗體之技術之實例包括以下文獻中所述之技術：美國專利第4,946,778號及第5,258,498號；Huston等人，1991, *Methods in Enzymology*, **203**: 46-88；Shu等人，1993, *PNAS*, **90**: 7995-7999；Skerra等人，1988, *Science*, **240**: 1038-1040。

功能性等效物

本發明之範疇內亦包括抗-CD38抗體及人類化抗-CD38受體抗體之功能性等效物。術語"功能性等效物"包括具有同源序列之抗體、嵌合抗體、人工抗體及經修飾抗體，例如其中各功能性等效物係由其與CD38蛋白結合之能力來定義。熟習此項技術者應瞭解稱作"抗體片段"之分子之群與稱作"功能性等效物"之群存在重疊。產生功能性等效物之方法為熟習此項技術者所已知且揭示於(例如)WO 93/21319、EP 239,400、WO 89/09622、EP 338,745及EP 332,424中，該等文獻之全文分別以引用的方式併入。

具有同源序列之抗體為具有與本發明之抗-CD38抗體及人類化抗-CD38抗體之胺基酸序列具有序列同源性之胺基酸序列的彼等抗體。較佳地，同源性為與本發明之抗-CD38抗體及人類化抗-CD38抗體之可變區之胺基酸序列的同源性。如本文中應用於胺基酸序列之"序列同源性"定義為如(例如)根據Pearson及Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2444-2448藉由FASTA搜索法所測定，與另一胺基酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%或94%序列同源性，且更佳至少約95%、96%、97%、98%或99%序列同源性之序列。

人工抗體包括scFv片段、微型雙功能抗體、微型三功能抗體、微型四功能抗體及mru(參見Winter, G.及Milstein, C., 1991, *Nature*, **349**: 293-299；Hudson, P.J., 1999, *Current Opinion in Immunology*, **11**: 548-557之論述)，該等人工抗體之各者均具有抗原結合能力。在單鏈Fv片

段(scFv)中，抗體之V_H及VL域係經由可撓性肽連接。通常，此連接肽長約15個胺基酸殘基。若連接子更小，例如5個胺基酸，則形成微型雙功能抗體，其為二價scFv二聚體。若連接子減至少於三個胺基酸殘基，則形成被稱作微型三功能抗體及微型四功能抗體之三聚及四聚結構。抗體之最小結合單位為CDR，通常為具有充分特異性識別及結合而可單獨使用之重鏈CDR2。此片段稱作分子識別單位或mru。數個此等mru可經短連接肽連接在一起，由此形成具有高於單一mru之親和力之人工結合蛋白。

本申請案之功能性等效物亦包括經修飾抗體，例如藉由任何類型之分子與抗體共價連接而經修飾之抗體。舉例而言，經修飾抗體包括已(例如)藉由糖基化、乙醯化、聚乙二醇化、磷酸化、醯胺化、由已知保護基/阻隔基衍生化、蛋白水解裂解、與細胞配位子或其他蛋白質連接等而經修飾之抗體。共價連接不阻礙抗體產生抗獨特型反應。此等修飾可藉由已知技術來進行，該等技術包括(但不限於)特定化學裂解、乙醯化、甲醯化、衣黴素之代謝合成等。另外，經修飾抗體可含有一或多種非常規胺基酸。

功能性等效物可藉由互換不同構架內不同鏈上之不同CDR來產生。因此，舉例而言，藉由取代不同重鏈，針對一組特定CDR可產生不同類別之抗體，藉此可產生(例如)IgG1-4、IgM、IgA1-2、IgD、IgE抗體類型及同型。類似地，本發明之範疇內之人工抗體可藉由將一組特定CDR嵌入完全合成構架內來產生。

功能性等效物可易於藉由使用此項技術中已知之多種方法在側接一組特定CDR之可變區及/或恆定區序列內執行突變、缺失及/或插入來產生。本發明之抗體片段及功能性等效物涵蓋當與38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗體相比時與CD38具有可偵側結合程度之彼等分子。可偵側結合程度包括在鼠科

38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗體與CD38之結合能力之至少10-100%，較佳至少50%、60%或70%，更佳至少75%、80%、85%、90%、95%或99%之範圍內的所有值。

經改良抗體

CDR對於抗原決定基識別及抗體結合具有首要重要性。然而，可對構成CDR之殘基作出改變而不干擾抗體識別及結合其同源抗原決定基之能力。舉例而言，可作出不影響抗原決定基識別，而增加抗體對抗原決定基之結合親和力之改變。

因此，本發明之範疇內亦包括鼠科與人類化抗體之經改良型式，其亦特異性識別及結合CD38，並較佳具有增加之親和力。

數項研究已基於一級抗體序列之瞭解來研究在抗體序列中之多個位置處引入一或多種胺基酸改變對其特性(諸如結合及表現量)之影響(Yang, W. P.等人，1995, *J. Mol. Biol.*, **254**: 392-403；Rader, C.等人，1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 8910-8915；Vaughan, T. J.等人，1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 535-539)。

在此等研究中，藉由使用諸如寡核苷酸介導之定點誘變、盒式誘變、易錯PCR、DNA改組或大腸桿菌(*E. coli*)之突變菌株之方法改變CDR1、CDR2、CDR3或構架區中之重鏈及輕鏈基因之序列來產生一級抗體之等效物(Vaughan, T. J.等人，1998, *Nature Biotechnology*, **16**: 535-539；Adey, N. B.等人，1996，第16章，第277-291頁，於"Phage Display of Peptides and Proteins"中，編者Kay, B. K.等人，Academic Press)。改變一級抗體之序列之此等方法使得二級抗體之親和力得以改良(Gram, H.等人，1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 3576-3580；Boder, E. T.等人，2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 10701-10705；Davies, J.及Riechmann, L., 1996, *Immunotechnolgy*, **2**: 169-179；Thompson, J.等人，1996, *J. Mol. Biol.*, **256**: 77-88；Short,

M. K.等人，2002, *J. Biol. Chem.*, **277**: 16365-16370；Furukawa, K.等人，2001, *J. Biol. Chem.*, **276**: 27622-27628)。

藉由改變抗體之一或多個胺基酸殘基之類似定向策略，可使用本發明中所述之抗體序列研發具有經改良功能(包括針對CD38之經改良親和力)之抗-CD38抗體。

較佳之胺基酸取代為：(1)可降低蛋白質水解之敏感性，(2)可降低氧化之敏感性，(3)可改變形成蛋白質複合物之結合親和力，及(4)可賦予或修飾該等類似物之其他物理化學或功能特性之胺基酸取代。類似物可包括序列不同於天然產生之肽序列之各種突變蛋白質。舉例而言，可在天然產生之序列中，較佳在多肽形成分子間接觸之域以外之部分中進行單或多胺基酸取代(較佳為保守胺基酸取代)。保守胺基酸取代不應實質上改變親本序列之結構特徵(例如，置換胺基酸不應傾向於斷裂存在於親本序列中之螺旋，或破壞表徵親本序列之其他類型二級結構)。此項技術認知之多肽二級結構及三級結構之實例描述於Proteins, Structures and Molecular Principles(Creighton編，W. H. Freeman and Company, New York (1984))；Introduction to Protein Structure(C. Branden及J. Tooze編，Garland Publishing, New York, N. Y. (1991))；及Thornton等人，1991, *Nature*, **354**: 105中，該等文獻各併入本文供參考。

改良抗體亦包括該等藉由動物免疫、融合瘤形成及選擇具有特異性特徵之抗體的標準技術所製備之具有改良特徵之抗體。

本發明之改良抗體尤其包括具有增強之功能特性之抗體。尤其受關注者為該等具有增強介導細胞毒性效應功能(諸如ADCC)之能力之抗體。該等抗體可藉由在抗體之恆定構架中進行單或多取代以改變其與Fc受體之相互作用來獲得。用於設計此等突變體之方法可見於例如Lazar等人(2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**(11): 4005-4010)及

Okazaki等人(2004, *J. Mol. Biol.* **336**(5): 1239-49)中。亦參見WO 03/074679、WO 2004/029207、WO 2004/099249、WO2006/047350、WO 2006/019447、WO 2006/105338、WO 2007/041635。亦可使用經特定工程以產生改良抗體之細胞株。詳言之，此等細胞株已改變糖基化路徑之調節，產生極少岩藻糖基化或甚至完全去岩藻糖基化之抗體。該等細胞株及其工程方法揭示於例如Shinkawa等人(2003, *J. Biol. Chem.* **278**(5): 3466-3473), Ferrara等人(2006, *J. Biol. Chem.* **281**(8): 5032-5036；2006, *Biotechnol. Bioeng.* **93**(5): 851-61), EP 1331266、EP 1498490、EP 1498491、EP 1676910、EP 1792987及WO 99/54342中。

本發明亦包括細胞毒性結合物。此等細胞毒性結合物包含兩種主要組份，細胞結合劑及細胞毒性劑。

如本文所用之術語"細胞結合劑"係指特異性識別及結合細胞表面上之CD38蛋白之藥劑。在一實施例中，細胞結合劑特異性識別CD38使其允許結合物以靶向方式發揮作用而具有極少由非特異性結合所產生之副作用。

在另一實施例中，本發明之細胞結合劑亦特異性識別CD38蛋白使得結合物可與靶細胞接觸足夠時間段以允許結合物之細胞毒性藥物部分作用於細胞及/或給予結合物由細胞內在化之足夠時間。

在一較佳實施例中，細胞毒性結合物包含抗-CD38抗體作為細胞結合劑，更佳包含鼠科38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗-CD38單株抗體。在另一較佳實施例中，細胞結合劑為該抗-CD38抗體之嵌合型式。在一更佳實施例中，細胞毒性結合物包含人類化38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體或其抗原決定基結合片段。38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體能夠特異性識別CD38，且以靶向方式將細胞毒性劑定向於異常細胞或組織(諸如癌細胞)。

本發明之細胞毒性結合物之第二組份為細胞毒性劑。如本文所用之術語"細胞毒性劑"係指降低或阻斷細胞之功能或生長及/或引起細胞破壞之物質。

在較佳實施例中，細胞毒性劑為小分子藥物、前藥、紫杉類藥物(taxoid)、美登素類化合物(諸如DM1或DM4)、茅屋黴素衍生物、細黴素衍生物、CC-1065或CC-1065類似物。在較佳實施例中，本發明之細胞結合劑係直接或經由可裂解或非可裂解連接子與細胞毒性劑共價連接。

細胞結合劑、細胞毒性劑及連接子在下文中更詳細地論述。

細胞結合劑

本發明之化合物作為治療劑之效用視謹慎選擇適當細胞結合劑而定。細胞結合劑可為目前已知或成為已知之任何種類，且包括肽及非肽。細胞結合劑可為可以特異性或非特異性方式結合細胞之任何化合物。一般而言，此等化合物可為抗體(尤其是單株抗體)、淋巴因子、激素、生長因子、維生素、營養轉運分子(諸如轉鐵蛋白)或任何其他細胞結合分子或物質。

可使用之細胞結合劑之更特定實例包括：

a) 多株抗體；

b) 單株抗體；

c) 諸如Fab、Fab'及$F(ab')_2$、Fv之抗體片段(Parham, 1983, *J. Immunol.*, **131**: 2895-2902；Spring等人，1974, *J. Immunol.*, **113**: 470-478；Nisonoff等人，1960, *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**: 230-244)；

詳言之，選自38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之抗-CD38單株抗體可用作本發明之細胞結合劑。同樣地，該細胞結合劑可為38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及5

38SB39單株抗體之一之嵌合型式。較佳地，使用人類化抗-CD38抗體作為本發明之細胞結合劑。更佳地，人類化抗-CD38抗體係選自人類化或表面重塑38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體。

細胞毒性劑

在另一實施例中，人類化抗體或其抗原決定基結合片段可與藥物(諸如美登素類化合物)結合形成藉由將藥物靶向CD38蛋白而對抗原表現細胞具有特異性細胞毒性之前藥。包含該等抗體及小分子高毒性藥物(例如美登素類化合物、紫杉烷、茅屋黴素衍生物、細黴素衍生物及CC-1065類似物)之細胞毒性結合物可用作用於治療諸如淋巴瘤、白血病及多發性骨髓瘤之腫瘤的治療劑。

本發明之細胞毒性結合物中所用之細胞毒性劑可為致使細胞死亡或誘發細胞死亡或以某種方式降低細胞生存力之任何化合物。較佳之細胞毒性劑包括(例如)下文所定義之美登素類化合物及美登素類化合物類似物、紫杉類藥物、茅屋黴素衍生物、細黴素衍生物、CC-1065及CC-1065類似物、海兔毒素及海兔毒素類似物。此等細胞毒性劑與如本文所揭示之抗體、抗體片段、功能性等效物、經改良抗體及其類似物結合。

細胞毒性結合物可藉由活體外方法來製備。為使藥物或前藥與抗體連接，使用連接基團。合適之連接基團在此項技術中係熟知的且包括雙硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團及酯酶不穩定基團。較佳之連接基團為雙硫基及硫醚基。舉例而言，結合物可使用雙硫鍵交換反應或藉由在抗體與藥物或前藥之間形成硫醚鍵來建構。

美登素類化合物

可在本發明中使用以形成細胞毒性結合物之細胞毒性劑包括美

登素類化合物及美登素類化合物類似物。合適之美登素類化合物之實例包括美登醇及美登醇類似物。美登素類化合物為抑制微管形成且對哺乳動物細胞具有高度毒性之藥物。

合適之美登醇類似物之實例包括具有經修飾芳環之美登醇類似物及在其他位置處具有修飾之美登醇類似物。該等合適之美登素類化合物揭示於美國專利第4,424,219號、第4,256,746號、第4,294,757號、第4,307,016號、第4,313,946號、第4,315,929號、第4,331,598號、第4,361,650號、第4,362,663號、第4,364,866號、第4,450,254號、第4,322,348號、第4,371,533號、第6,333,410號、第5,475,092號、第5,585,499號及第5,846,545號中。

具有經修飾芳環之美登醇之合適類似物之特定實例包括：

(1) C-19-去氯(美國專利第4,256,746號)(藉由安沙托辛P2(ansamytocin P2)之LAH還原來製備)；

(2) C-20-羥基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美國專利第4,361,650號及第4,307,016號)(藉由使用鏈黴菌(Streptomyces)或放線菌(Actinomyces)去甲基或使用LAH去氯來製備)；及

(3) C-20-去甲氧基、C-20-醯氧基(-OCOR)+/-去氯(美國專利第4,294,757號)(藉由使用醯基氯進行醯化來製備)。

具有其他位置修飾之美登醇之合適類似物之特定實例包括：

(1) C-9-SH(美國專利第4,424,219號)(藉由使美登醇與H2S或P2S5反應來製備)；

(2) C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH2OR)(美國專利第4,331,598號)；

(3) C-14-羥甲基或醯氧基甲基(CH2OH或CH2OAc)(美國專利第4,450,254號)(自土壤絲菌屬(Nocardia)製備)；

(4) C-15-羥基/醯氧基(美國專利第4,364,866號)(藉由以鏈黴菌轉

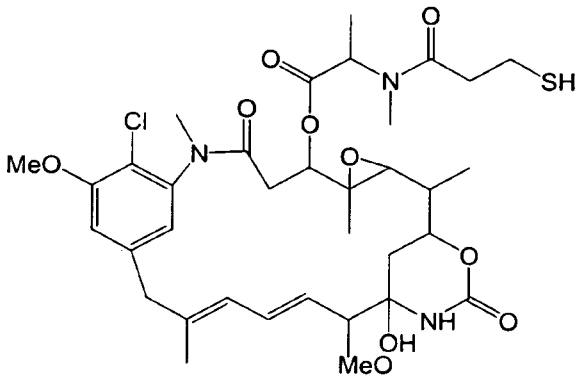
化美登醇來製備)；

(5) C-15-甲氧基(美國專利第4,313,946號及第4,315,929號)(自滑桃樹(Trewia nudiflora)分離)；

(6) C-18-N-去甲基(美國專利第4,362,663號及第4,322,348號)(藉由以鏈黴菌使美登醇去甲基化來製備)；及

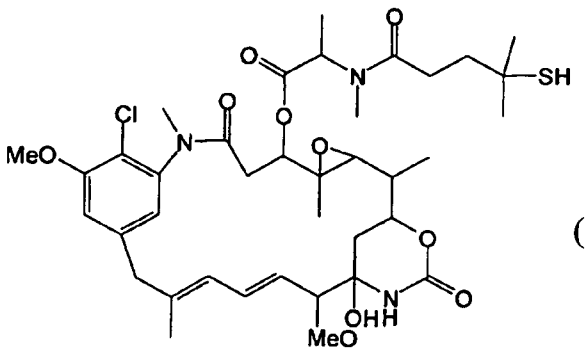
(7) 4,5-去氧(美國專利第4,371,533號)(藉由美登醇之三氯化鈦/LAH還原來製備)。

在一較佳實施例中，本發明之細胞毒性結合物利用含硫醇之美登素類化合物(DM1)，形式上稱作N2'-去乙醯基-N2'-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素，作為細胞毒性劑。DM1由以下結構式(I)表示：



(I)

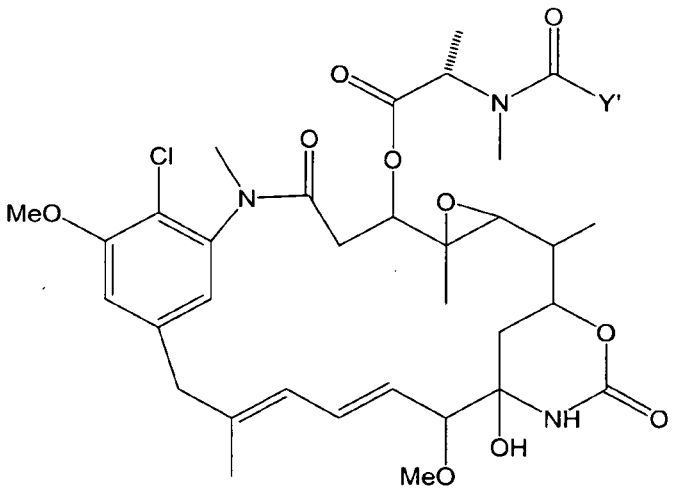
在另一較佳實施例中，本發明之細胞毒性結合物利用含硫醇之美登素類化合物N2'-去乙醯基-N-2'(4-甲基-4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素作為細胞毒性劑。DM4由以下結構式(II)表示：



(II)

在本發明之其他實施例中，可使用其他美登素，包括在帶有硫原子之碳原子上帶有單烷基或二烷基取代之含硫醇及含雙硫鍵之美登素類化合物。此等化合物包括在C-3、C-14羥甲基、C-15羥基或C-20去甲基處具有含帶有受阻氫硫基之醯基之醯化胺基酸側鏈的美登素類化合物，其中帶有硫醇官能基之醯基之碳原子具有一或兩個取代基，該等取代基為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈或支鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之環烷基或環烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基，且此外其中該等取代基之一可為H，且其中醯基在羰基官能基與硫原子之間具有至少三個碳原子之直鏈鏈長。

該等其他美登素包括由式(III)表示之化合物：



(III)

其中：

Y'表示：

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_n$ CR_1R_2SZ，

其中：

R_1及R_2各自獨立地為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷

基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基，且此外R_2可為H；

A、B、D為具有3-10個碳原子之環烷基或環烯基、簡單或經取代之芳基或雜環芳族基團或雜環烷基；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、R_{11}及R_{12}各自獨立地為H、CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基；

l、m、n、o、p、q、r、s及t各自獨立地為0或1至5之整數，其限制條件為l、m、n、o、p、q、r、s及t中之至少兩者在任何時候不均為零；且

Z為H、SR或-COR，其中R為具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基，或簡單或經取代之芳基，或雜環芳族基團或雜環烷基。

式(III)之較佳實施例包括以下式(III)化合物，其中：

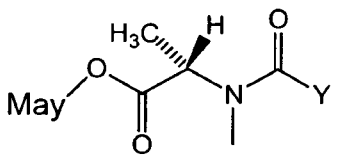
R_1為H，R_2為甲基且Z為H。

R_1及R_2為甲基且Z為H。

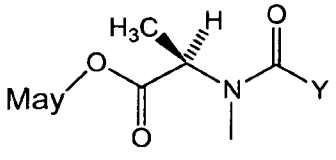
R_1為H，R_2為甲基，且Z為-SCH_3。

R_1及R_2為甲基，且Z為-SCH_3。

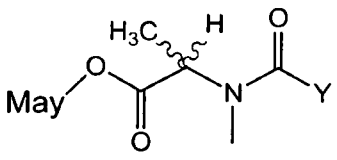
該等其他美登素亦包括由式(IV-L)、(IV-D)或(IV-D,L)表示之化合物：



(IV-L)



(IV-D)



(IV-D,L)

其中：

Y表示$(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$，

其中：

R_1及R_2各自獨立地為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基，且此外R_2可為H；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7及R_8各自獨立地為H、CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基；

l、m及n各自獨立地為1至5之整數，且此外n可為0；

Z為H、SR或-COR，其中R為具有1至10個碳原子之直鏈或支鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之環烷基或環烯基，或簡單或經取代之芳基，或雜環芳族基團或雜環烷基；且

May表示在C-3、C-14羥甲基、C-15羥基或C-20去甲基處帶有側鏈之美登素類化合物。

式(IV-L)、(IV-D)及(IV-D,L)之較佳實施例包括以下式(IV-L)、(IV-D)及(IV-D,L)之化合物，其中：

R_1為H，R_2為甲基，R_5、R_6、R_7及R_8各自為H，l及m各自為1，n為0，且Z為H。

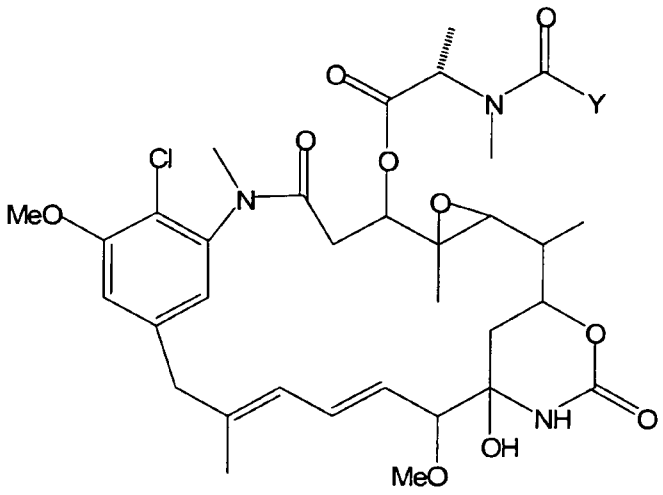
R_1及R_2為甲基，R_5、R_6、R_7、R_8各自為H，l及m為1，n為0，且Z為H。

R_1為H，R_2為甲基，R_5、R_6、R_7、R_8各自為H，l及m各自為1，n為0，且Z為$-SCH_3$。

R_1及R_2為甲基，R_5、R_6、R_7、R_8各自為H，l及m為1，n為0，且Z為$-SCH_3$。

較佳地，細胞毒性劑由式(IV-L)表示。

該等其他美登素亦包括由式(V)表示之化合物：



(V)

其中：

Y表示$(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$，

其中：

R_1及R_2各自獨立地為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基，且此外R_2可為H；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7及R_8各自獨立地為H、CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基；

l、m及n各自獨立地為1至5之整數，且此外n可為0；且

Z為H、SR或-COR，其中R為具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基，或簡單或經取代之芳基，或雜環芳族基團或雜環烷基。

式(V)之較佳實施例包括以下式(V)化合物，其中：

R_1為H，R_2為甲基，R_5、R_6、R_7及R_8各自為H；l及m各自為1；n

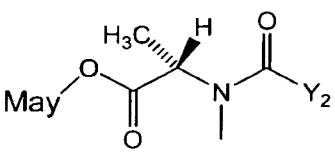
為0；且Z為H。

R_1及R_2為甲基，R_5、R_6、R_7及R_8各自為H，l及m為1；n為0；且Z為H。

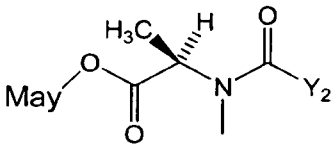
R_1為H，R_2為甲基，R_5、R_6、R_7及R_8各自為H，l及m各自為1，n為0，且Z為$-SCH_3$。

R_1及R_2為甲基，R_5、R_6、R_7及R_8各自為H，l及m為1，n為0，且Z為$-SCH_3$。

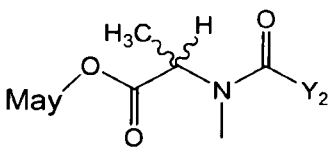
該等其他美登素進一步包括由式(VI-L)、(VI-D)或(VI-D,L)表示之化合物：



(VI-L)



(VI-D)



(VI-D,L)

其中：

Y_2表示$(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$，

其中：

R_1及R_2各自獨立地為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基，且此外R_2可為H；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7及R_8各自獨立地為H、CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基；

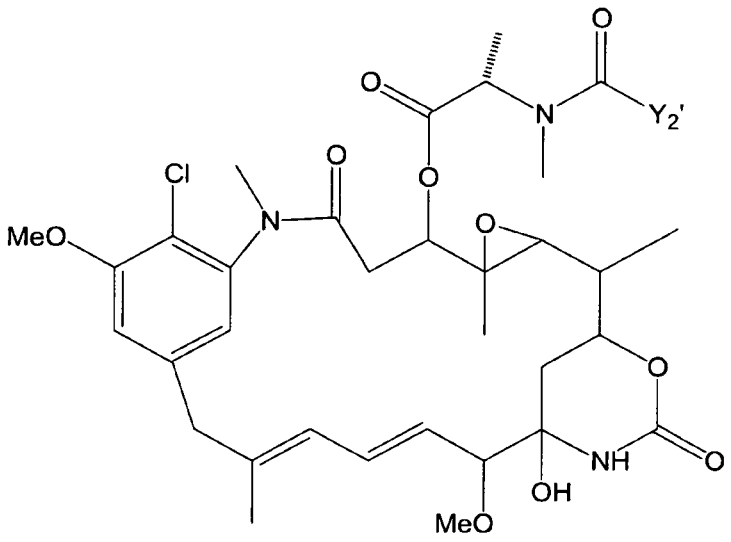
l、m及n各自獨立地為1至5之整數，且此外n可為0；

Z_2為SR或-COR，其中R為具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基，或簡單或經取代

之芳基，或雜環芳族基團或雜環烷基；且

May為美登素類化合物。

該等其他美登素亦包括由式(VII)表示之化合物：



(VII)

其中：

Y_2'表示

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$，

其中：

R_1及R_2各自獨立地為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈或支鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之環烷基或環烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基，且此外R_2可為H；

A、B及D各自獨立地為具有3至10個碳原子之環烷基或環烯基、簡單或經取代之芳基或雜環芳族基團或雜環烷基；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、R_{11}及R_{12}各自獨立地為H、CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基；

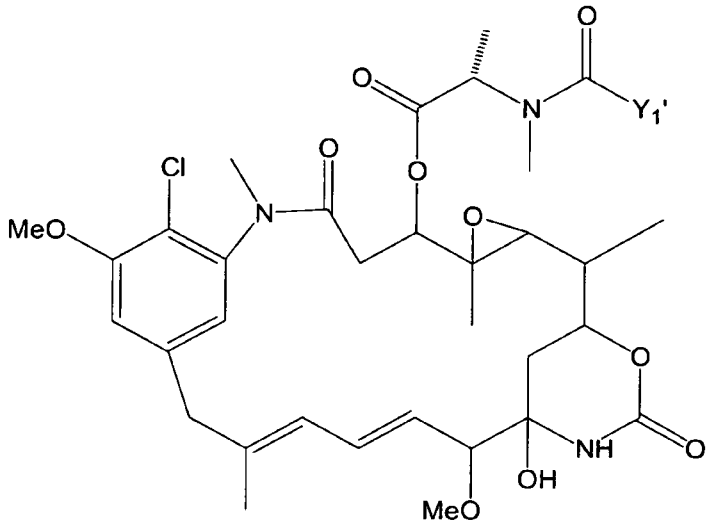
l、m、n、o、p、q、r、s及t各自獨立地為0或1至5之整數，其限制條件為l、m、n、o、p、q、r、s及t中之至少兩者在任何時候不均為零；且

Z_2為SR或-COR，其中R為具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3-10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基，或簡單或經取代之芳基，或雜環芳族基團或雜環烷基。

式(VII)之較佳實施例包括以下式(VII)化合物，其中：R_1為H且R_2為甲基。

上述美登素類化合物可與抗-CD38抗體38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39或其同源物或片段結合，其中該抗體係使用存在於美登素類化合物之C-3、C-14羥甲基、C-15羥基或C-20去甲基處所見之醯化胺基酸側鏈之醯基上的硫醇或雙硫鍵官能基與美登素類化合物連接，且其中醯化胺基酸側鏈之醯基之硫醇或雙硫鍵官能基位於具有一或兩個取代基之碳原子處，該等取代基為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基，且此外該等取代基之一可為H，且其中醯基在羰基官能基與硫原子之間具有至少三個碳原子之直鏈鏈長。

本發明之較佳結合物為包含與式(VIII)之美登素類化合物結合之抗-CD38抗體38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39或其同源物或片段之結合物：



(VIII)

其中：

Y_1'表示

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2S$-，

其中：

A、B及D各自獨立地為具有3-10個碳原子之環烷基或環烯基、簡單或經取代之芳基或雜環芳族基團或雜環烷基；

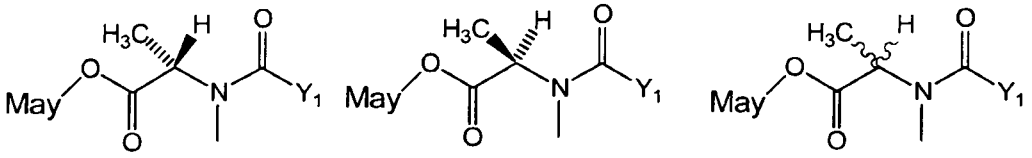
R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、R_{11}及R_{12}各自獨立地為H、CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基；且

l、m、n、o、p、q、r、s及t各自獨立地為0或1至5之整數，其限制條件為l、m、n、o、p、q、r、s及t中之至少兩者在任何時候不均為零。

較佳地，R_1為H且R_2為甲基或R_1及R_2為甲基。

本發明之甚至更佳之結合物為包含與式(IX-L)、(IX-D)或(IX-D,L)之美登素類化合物結合之抗-CD38抗體38SB13、38SB18、

38SB19、38SB30、38SB31或38SB39或其同源物或片段之結合物：



IX-L　　IX-D　　IX-D,L

其中：

Y_1表示$(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S$-，

其中：

R_1及R_2各自獨立地為CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基、雜環芳族基團或雜環烷基，且此外R_2可為H；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7及R_8各自獨立地為H、CH_3、C_2H_5、具有1至10個碳原子之直鏈烷基或烯基、具有3至10個碳原子之支鏈或環狀烷基或烯基、苯基、經取代之苯基或雜環芳族基團或雜環烷基；

l、m及n各自獨立地為1至5之整數，且此外n可為0；且

May表示在C-3、C-14羥甲基、C-15羥基或C-20去甲基處帶有側鏈之美登醇。

式(IX-L)、(IX-D)及(IX-D,L)之較佳實施例包括以下式(IX-L)、(IX-D)及(IX-D,L)之化合物，其中：

R_1為H且R_2為甲基或R_1及R_2為甲基，

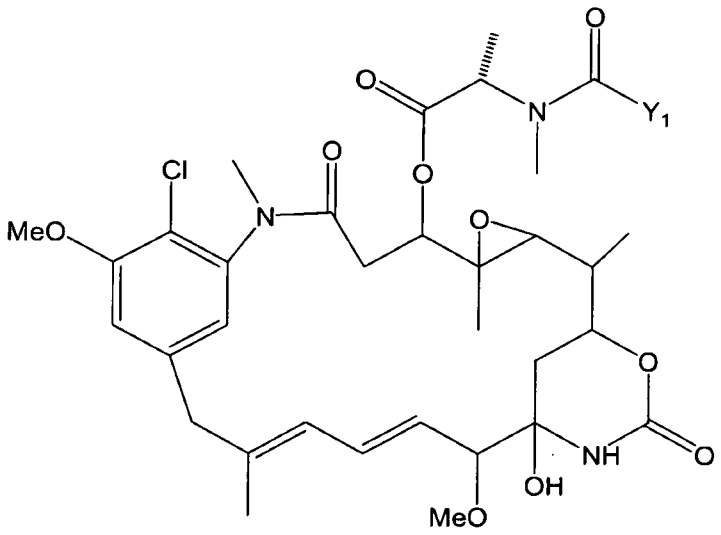
R_1為H，R_2為甲基，R_5、R_6、R_7及R_8各自為H；l及m各自為1；n為0，

R_1及R_2為甲基；R_5、R_6、R_7及R_8各自為H；l及m為1；n為0。

較佳地，細胞毒性劑由式(IX-L)表示。

本發明之另一較佳結合物為包含與式(X)之美登素類化合物結合

之抗-CD38抗體38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39或其同源物或片段之結合物：



(X)

其中取代基係如上文針對式(IX)所定義。

尤其較佳者為其中R_1為H，R_2為甲基，R_5、R_6、R_7及R_8各自為H，l及m各自為1，且n為0之上述化合物中之任一者。

其他尤其較佳者為其中R_1及R_2為甲基，R_5、R_6、R_7、R_8各自為H，l及m為1，且n為0之上述化合物中之任一者。

此外，L-胺基醯基立體異構體為較佳。

2004年5月20日申請之申請中之美國專利申請案第10/849,136號中所教示之美登素類化合物中之各者亦可用於本發明之細胞毒性結合物。美國專利申請案第10/849,136號之全部揭示內容以引用的方式併入本文中。

含雙硫鍵之連接基團

為使美登素類化合物與諸如38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗體之細胞結合劑連接，美登素類化合物包含連接部分。連接部分含有允許完全活性美登素類化合物在特定位點處釋放之化學鍵。合適之化學鍵在此項技術中係熟知的且包括雙硫

鍵、酸不穩定鍵、光不穩定鍵、肽酶不穩定鍵及酯酶不穩定鍵。較佳為雙硫鍵。

連接部分亦包含反應性化學基團。在一較佳實施例中，反應性化學基團可經由雙硫鍵連接部分與美登素類化合物共價結合。

尤其較佳之反應性化學基團為N-琥珀醯亞胺酯及N-磺基琥珀醯亞胺酯。

包含含有反應性化學基團之連接部分之尤其較佳之美登素類化合物為美登醇及其類似物之C-3酯，其中連接部分含有雙硫鍵且化學反應性基團包含N-琥珀醯亞胺酯或N-磺基琥珀醯亞胺酯。

美登素類化合物上之許多位置可充當與連接部分化學連接之位置。舉例而言，預期具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置均適用。然而，C-3位置為較佳且美登醇之C-3位置尤其較佳。

儘管具有連接部分之美登醇之酯的合成係根據含雙硫鍵之連接部分來描述，但熟習此項技術者應瞭解具有其他化學鍵(如上文所述)之連接部分亦可用於本發明，同樣可使用其他美登素類化合物。其他化學鍵之特定實例包括酸不穩定鍵、光不穩定鍵、肽酶不穩定鍵及酯酶不穩定鍵。併入本文中之美國專利第5,208,020號之揭示內容教示帶有該等鍵之美登素類化合物的產生。

具有帶有反應性基團之雙硫鍵部分之美登素類化合物及美登素類化合物衍生物的合成描述於美國專利第6, 441,163號及第6,333,410號及美國申請案第10/161,651號中，該等文獻之各者均以引用的方式併入本文中。

含反應性基團之美登素類化合物(諸如DM1)與諸如38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗體之抗體反應而產生細胞毒性結合物。此等結合物可藉由HPLC或由凝膠過濾來純化。

用於產生此等抗體-美登素類化合物結合物之數種極佳流程提供於美國專利第6,333,410號及美國申請案第09/867,598號、第10/161,651號及第10/024,290號中，該等文獻之各者之全文均併入本文中。

一般而言，可將抗體於水性緩衝液中之溶液與莫耳過量之具有帶有反應性基團之雙硫鍵部分的美登素類化合物一起培育。可藉由添加過量胺(諸如乙醇胺、牛磺酸等)來中止反應混合物。接著可藉由凝膠過濾來純化美登素類化合物-抗體結合物。

每個抗體分子所結合之美登素類化合物分子數可藉由以分光光度法量測252 nm與280 nm下之吸光度比值來測定。平均每個抗體分子結合1-10個美登素類化合物分子為較佳。

可對抗體與美登素類化合物藥物之結合物活體外抑制各種不合需要之細胞株增殖之能力進行評估。舉例而言，諸如人類淋巴瘤細胞株Daudi、人類淋巴瘤細胞株Ramos、人類多發性骨髓瘤細胞株MOLP-8及人類急性T淋巴細胞性白血病株系MOLT-4之細胞株可易用於評估此等化合物之細胞毒性。可將待評估之細胞暴露於化合物歷時24小時且藉由已知方法在直接檢定中量測細胞之存活分數。接著可自檢定結果計算IC_{50}值。

含PEG之連接基團

如美國申請案第10/024,290號中所陳述，美登素類化合物亦可使用PEG連接基團與細胞結合劑連接。此等PEG連接基團可溶於水中與非水性溶劑中，且可用於連接一或多種細胞毒性劑與細胞結合劑。例示性PEG連接基團包括雜雙官能PEG連接子，其在連接子之相對端經由官能性氫硫基，或在一端經由雙硫基而在另一端經由活性酯與細胞毒性劑及細胞結合劑結合。

作為使用PEG連接基團合成細胞毒性結合物之一般實例，再次參

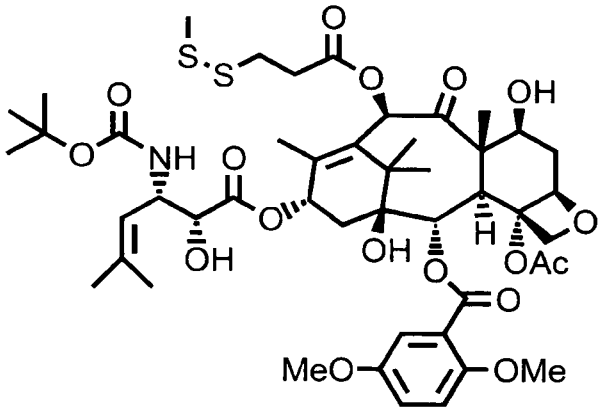
考美國申請案第10/024,290號之特定細節。合成以一或多種帶有反應性PEG部分之細胞毒性劑與細胞結合劑之反應起始，使得各反應性PEG部分之末端活性酯由細胞結合劑之胺基酸殘基置換，以得到包含一或多種與細胞結合劑經PEG連接基團共價鍵結之細胞毒性劑之細胞毒性結合物。

紫杉烷

本發明之細胞毒性結合物中所用之細胞毒性劑亦可為紫杉烷或其衍生物。

紫杉烷為包括太平洋紫杉醇(紫杉醇)(一種細胞毒性天然產物)及多烯紫杉醇(紫杉德(Taxotere))(一種半合成衍生物)之化合物家族，此兩種化合物在癌症治療中廣泛使用。紫杉烷為抑制微管蛋白解聚而致使細胞死亡之有絲分裂紡錘體毒劑。儘管多烯紫杉醇及太平洋紫杉醇為治療癌症之適用藥劑，但其抗腫瘤活性因其對正常細胞之非特異性毒性而受到限制。此外，如太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇本身之化合物並不充分有效以細胞結合劑之結合物之形式使用。

用於製備細胞毒性結合物之較佳紫杉烷為式(XI)之紫杉烷：



(XI)

用於合成可在本發明之細胞毒性結合物中使用之紫杉烷之方法連同用於使紫杉烷與諸如抗體之細胞結合劑結合之方法一起詳細描述於美國專利第5,416,064號、第5,475,092號、第6,340,701號、第

6,372,738號及第6,436,931號及美國申請案第10/024,290號、第10/144,042號、第10/207,814號、第10/210,112號及第10/369,563號中。

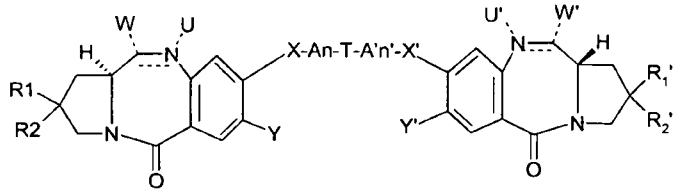
茅屋黴素衍生物

本發明之細胞毒素亦可為茅屋黴素衍生物。茅屋黴素衍生物為吡咯并[1,4]苯并二氮呯(PBD)，其為藉由共價結合DNA小凹槽中之鳥嘌呤之N2來發揮其生物特性之一類已知化合物。PBD包括許多小凹槽結合劑，諸如安麴黴素(anthramycin)、新茴黴素(neothramycin)及DC-81。

保留高細胞毒性且可與細胞結合劑有效連接之新穎茅屋黴素衍生物描述於國際申請案第PCT/IB2007/000142號中，該申請案之內容以引用的方式併入本文中。細胞結合劑-茅屋黴素衍生物複合物允許茅屋黴素衍生物之全測度細胞毒性作用以靶向方式僅施加於不合需要之細胞，由此避免因損害非靶向健康細胞所引起之副作用。

本發明之細胞毒性劑包含一或多種經由連接基團與諸如38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗體之細胞結合劑連接之茅屋黴素衍生物。連接基團為經由習知方法與茅屋黴素衍生物共價結合之化學部分之一部分。在一較佳實施例中，該化學部分可經由雙硫鍵與茅屋黴素衍生物共價結合。

適用於本發明之茅屋黴素衍生物具有下文所展示之式(XII)：



(XII)

其中：

----表示一可選單鍵；

┄┄ 表示一單鍵或一雙鍵；

其限制條件為當 ┄┄ 表示一單鍵時，相同或不同之U及U'獨立地表示H，且相同或不同之W及W'係獨立地選自由以下各基團組成之群：OH、諸如-OR之醚、諸如-OCOR之酯(例如乙酸酯)、諸如-OCOOR之碳酸酯、諸如-OCONRR'之胺基甲酸酯、環狀胺基甲酸酯(使得N10及C11為環之一部分)、諸如-NRCONRR'之脲、諸如-OCSNHR之硫代胺基甲酸酯、環狀硫代胺基甲酸酯(使得N10及C11為環之一部分)、-SH、諸如-SR之硫醚、諸如-SOR之亞碸、諸如-SOOR之碸、諸如-SO_3-之磺酸酯、諸如-NRSOOR之磺醯胺、諸如-NRR'之胺、可選擇之環胺(使得N10及C11為環之一部分)、諸如-NROR'之胲衍生物、諸如-NRCOR之醯胺、諸如-N_3之疊氮基、氰基、鹵基、三烷基鏻或三芳基鏻、衍生自胺基酸之基團；較佳地，W及W'相同或不同且為OH、Ome、Oet、$NHCONH_2$、SMe；

且當 ┄┄ 表示一雙鍵時，U及U'不存在且W及W'表示H；

R1、R2、R1'、R2'相同或不同且係獨立地選自鹵離子或視情況經一或多個Hal、CN、NRR'、CF_3、OR、芳基、Het、$S(O)_qR$取代之烷基，或R1與R2及R1'與R2'分別一起形成含雙鍵基團=B及=B'。

較佳地，R1與R2及R1'與R2'分別一起形成含雙鍵基團=B及=B'。

B及B'相同或不同且係獨立地選自視情況經一或多個Hal、CN、NRR'、CF_3、OR、芳基、Het、$S(O)_qR$取代之烯基，或B及B'表示氧原子。

較佳地，B = B'。

更佳地，B = B'= $=CH_2$或$=CH-CH_3$。

X、X'相同或不同且係獨立地選自一或多個-O-、-NR-、-(C=O)-、-$S(O)_q$-。

較佳地，X = X'。

更佳地，X = X' = O。

A、A'相同或不同且係獨立地選自視情況含有氧、氮或硫原子之烷基或烯基，其各自視情況經一或多個Hal、CN、NRR'、CF_3、OR、$S(O)_qR$、芳基、Het、烷基、烯基取代。

較佳地，A = A'。

更佳地，A = A' =直鏈未經取代之烷基。

Y、Y'相同或不同且係獨立地選自H、OR；

較佳地，Y = Y'。

更佳地，Y = Y' =烷氧基，更佳為甲氧基。

T為-NR-，-O-，$-S(O)_q-$，或各自視情況經一或多個Hal、CN、NRR'、CF_3、R、OR、$S(O)_qR$及/或連接子取代之4至10員芳基、環烷基、雜環或雜芳基，或視情況經一或多個Hal、CN、NRR'、CF_3、OR、$S(O)_qR$及/或連接子取代之支鏈烷基，或經一或多個Hal、CN、NRR'、CF_3、OR、$S(O)_qR$及/或連接子取代之直鏈烷基。

較佳地，T為視情況經一或多個連接子取代之4至10員芳基或雜芳基，更佳為苯基或吡啶基。

該連接子包含連接基團。合適之連接基團在此項技術中係熟知的且包括硫醇、硫醚、雙硫基、硫醚基、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團及酯酶不穩定基團。較佳為雙硫基及硫醚基。

當連接基團為含硫醇-、硫醚(-S-)或雙硫基(-S-S-)之基團時，帶有硫醇、硫醚或雙硫基之側鏈可為直鏈或支鏈，芳族或雜環的。一般技術者可易於鑑別合適之側鏈。

較佳地，該連接子具有下式：

$-G-D-(Z)_p-S-Z'$

其中：

G為一單鍵或雙鍵、-O-、-S-或-NR-；

D為一單鍵或-E-、-E-NR-、-E-NR-F-、-E-O-、-E-O-F-、-E-NR-CO-、-E-NR-CO-F-、-E-CO-、-CO-E-、-E-CO-F、-E-S-、-E-S-F-、-E-NR-C-S-、-E-NR-CS-F-；

其中E及F相同或不同且係獨立地選自直鏈或支鏈-$(OCH_2CH_2)_i$烷基$(OCH_2CH_2)_j$-、-烷基$(OCH_2CH_2)_i$-烷基-、-$(OCH_2CH_2)_i$-、-$(OCH_2CH_2)_i$環烷基$(OCH_2CH_2)_j$-、-$(OCH_2CH_2)_i$雜環$(OCH_2CH_2)_j$-、-$(OCH_2CH_2)_i$芳基$(OCH_2CH_2)_j$-、-$(OCH_2CH_2)_i$雜芳基$(OCH_2CH_2)_j$-、-烷基-$(OCH_2CH_2)_i$烷基$(OCH_2CH_2)_j$-、-烷基-$(OCH_2CH_2)_i$-、-烷基-$(OCH_2CH_2)_i$環烷基$(OCH_2CH_2)_j$-、-烷基$(OCH_2CH_2)_i$雜環$(OCH_2CH_2)_j$-、-烷基-$(OCH_2CH_2)_i$芳基$(OCH_2CH_2)_j$-、-烷基$(OCH_2CH_2)_i$雜芳基$(OCH_2CH_2)_j$-、-環烷基-烷基-、-烷基-環烷基-、-雜環-烷基-、-烷基-雜環-、-烷基-芳基-、-芳基-烷基-、-烷基-雜芳基-、-雜芳基-烷基-；

其中相同或不同之i及j為整數且係獨立地選自0、1至2000；

Z為直鏈或支鏈-烷基-；

p為0或1；

Z'表示H、諸如COR之硫醇保護基、R20或SR20，其中R20表示H、甲基、烷基、視情況經取代之環烷基、芳基、雜芳基或雜環，其限制條件為當Z'為H時，該化合物與由藉由添加硫醇基-SH至PBD部分之一之亞胺鍵-NH=上而引起之分子內環化所形成之相應化合物平衡。

相同或不同之n、n'為0或1。

q為0、1或2。

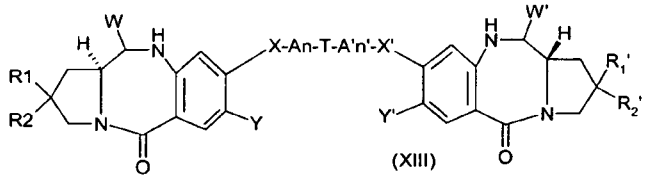
R、R'相同或不同且係獨立地選自H、烷基、芳基，其各自視情況經Hal、CN、NRR'、CF_3、R、OR、$S(O)_qR$、芳基、Het取代；

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或水合鹽，或此等化合物或其光學異構體、外消旋體、非對映體或對映異構體之多晶型結晶結構。

具有幾何異構體及立體異構體之通式(XII)之化合物亦為本發明之一部分。

已知式(XII)之茅屋黴素衍生物之N-10、C-11雙鍵在水、醇、硫醇、一級胺或二級胺、脲及其他親核試劑存在下可易於以可逆方式轉化成相應亞胺加合物。此過程為可逆的且可易於在脫水劑存在下，在非質子性有機溶劑中，在真空中或在高溫下再生相應茅屋黴素衍生物(Z. Tozuka, 1983, *J. Antibiotics*, **36**: 276)。

因此，通式(XIII)之茅屋黴素衍生物之可逆衍生物亦可用於本發明：



(XIII)

其中A、X、Y、n、T、A'、X'、Y'、n'、R1、R2、R1'、R2'係如式(XII)中所定義，且W、W'相同或不同且係選自由以下各基團組成之群：OH、諸如-OR之醚、諸如-OCOR之酯(例如乙酸酯)、-COOR、諸如-OCOOR之碳酸酯、諸如-OCONRR'之胺基甲酸酯、環狀胺基甲酸酯(使得N10及C11為環之一部分)、諸如-NRCONRR'之脲、諸如-OCSNHR之硫代胺基甲酸酯、環狀硫代胺基甲酸酯(使得N10及C11為環之一部分)、-SH、諸如-SR之硫醚、諸如-SOR之亞碸、諸如-SOOR之碸、諸如-SO_3-之磺酸酯、諸如-NRSOOR之磺醯胺、諸如-NRR'之胺、可選擇之環胺(使得N10及C11為環之一部分)、諸如-NROR'之胲衍生物、諸如-NRCOR之醯胺、-NRCONRR'、諸如-N_3之疊氮基、氰

基、鹵基、三烷基鏻或三芳基鏻、衍生自胺基酸之基團。較佳地，W及W'相同或不同且為OH、Ome、Oet、$NHCONH_2$、SMe。

式(XIII)化合物因此可被視為溶劑合物，當溶劑為水時，其可被視為包括水之溶劑合物；此等溶劑合物可尤其適用。

在一較佳實施例中，本發明之茅屋黴素衍生物係選自由以下各物組成之群：

8,8'-[1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-甲氧基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[1,5-戊烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[1,4-丁烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[3-甲基-1,5-戊烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[2,6-吡啶二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[4-(3-第三丁氧基羰基胺基丙氧基)-2,6-吡啶二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(3-胺基丙氧基)-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(N-甲基-3-第三丁氧基羰基胺基丙基)-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-

c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-{5-[3-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)丙氧基]-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)}-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[5-乙醯基硫基甲基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞甲基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

雙-{2-[(S)-2-亞甲基-7-甲氧基-5-側氧基-1,3,,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-8-基氧基]-乙基}-胺基甲酸第三丁酯

8,8'-[3-(2-乙醯基硫基乙基)-1,5-戊烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞甲基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[5-(N-4-巯基-4,4-二甲基丁醯基)胺基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[5-(N-4-甲基二硫基-4,4-二甲基丁醯基)-胺基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[5-(N-甲基-N-(2-巯基-2,2-二甲基乙基)胺基-1,3-苯二基(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[5-(N-甲基-N-(2-甲基二硫基-2,2-二甲基乙基)胺基-1,3-苯二基(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(2-(4-巯基-4-甲基)-戊醯胺基-乙氧基-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(1-(2-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基-乙氧基)-苯-3,5-二甲

基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(4-(3-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基-丙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(4-(4-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基-丁氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基)-哌嗪-1-基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基)-哌嗪-1-基]-丙基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-5

二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(1-(2-[甲基-(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-胺基]-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

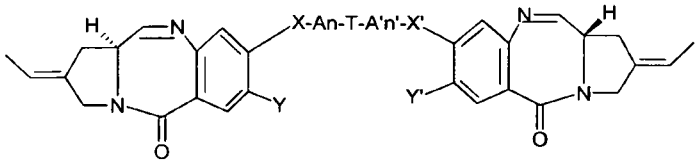
8,8'-[(4-(3-[甲基-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基)-胺基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(3-[甲基-(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-胺基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

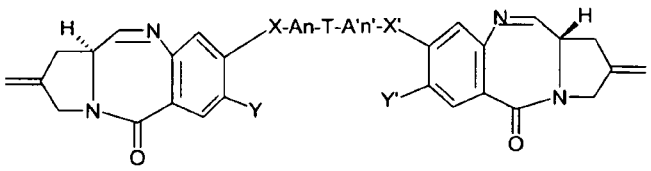
8,8'-[(1-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

以及相應甾基衍生物，或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或水合鹽，或此等化合物或其光學異構體、外消旋體、非對映體或對映異構體之多晶型結晶結構。

較佳化合物為以下式之化合物：



或



其中X、X'、A、A'、Y、Y'、T、n、n'係如上文所定義。

式(XII)化合物可以熟習此項技術者熟知之許多方式來製備。該等化合物可(例如)藉由應用或調整下文所述之方法，或如熟習此項技術者所瞭解之其變體來合成。適當之修改及替代對於熟習此項技術者將顯而易見且為其所熟知或可易於自科學文獻獲得。詳言之，該等方法可見於R.C. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999中。

用於合成可在本發明中使用之茅屋黴素衍生物之方法描述於國際申請案第PCT/IB2007/000142號中。本發明之化合物可由多種合成途徑來製備。試劑及起始物質可購得，或易於由一般技術者以熟知技術來合成(例如參見WO 00/12508、WO 00/12507、WO 2005/040170、WO 2005/085260、FR1516743，M. Mori等人，1986, *Tetrahedron*, **42**: 3793-3806)。

本發明之結合物分子可使用任何技術來形成。本發明之茅屋黴素衍生物可經由酸不穩定連接子或經由光不穩定連接子與抗體或其他細胞結合劑連接。該等衍生物可與具有合適序列之肽縮合且隨後與細胞結合劑連接以產生肽酶不穩定連接子。可製備含有一級羥基之結合物，其可經琥珀醯化且與細胞結合劑連接以產生可由細胞內酯酶裂解以釋放游離衍生物之結合物。較佳地，所合成之衍生物含有游離或經保護之硫醇基，且接著一或多種含雙硫鍵或硫醇之衍生物各自經由雙硫鍵或硫醚鍵與細胞結合劑共價連接。

眾多結合方法教示於USP 5,416,064及USP 5,475,092中。茅屋黴素衍生物可經修飾以產生游離胺基且接著經由酸不穩定連接子或光不穩定連接子與抗體或其他細胞結合劑連接。具有游離胺基或羧基之茅屋黴素衍生物可與肽縮合且隨後與細胞結合劑連接以產生肽酶不穩定連接子。在連接子上具有游離羥基之茅屋黴素衍生物可經琥珀醯化且

與細胞結合劑連接以產生可由細胞內酯酶裂解以釋放游離藥物之結合物。最佳地，茅屋黴素衍生物經處理以產生游離或經保護之硫醇基，且接著含雙硫鍵或硫醇之茅屋黴素二聚體經由雙硫鍵與細胞結合劑連接。

較佳地，單株抗體或細胞結合劑-茅屋黴素衍生物結合物為如上所述經由雙硫鍵連接且能夠傳遞茅屋黴素衍生物之結合物。該等細胞結合結合物可藉由已知方法來製備，諸如藉由用琥珀醯亞胺基吡啶基-二硫代丙酸酯(SPDP)修飾單株抗體來製備(Carlsson等人，1978, *Biochem. J.*, **173**: 723-737)。接著將所得硫代吡啶基藉由用含硫醇之茅屋黴素衍生物處理來置換以產生雙硫鍵連接之結合物。或者，在芳基二硫基-茅屋黴素衍生物之狀況下，細胞結合結合物之形成可藉由以預先引入抗體分子中之氫硫基直接置換茅屋黴素衍生物之芳基-硫醇來實現。易於藉由任一種方法來製備含有1至10個經由雙硫橋連接之茅屋黴素衍生藥物之結合物。

更特定言之，2.5 mg/ml濃度之經二硫基-硝基吡啶基修飾之抗體於含有2 mM EDTA之0.05 M磷酸鉀緩衝液(pH 7.5)中之溶液用含硫醇之茅屋黴素衍生物(1.3莫耳當量/二硫吡啶基)處理。以分光光度法在325 nm監測硫基-硝基吡啶自經修飾抗體之釋放，該釋放在約16小時內完成。藉由凝膠過濾經Sephadex G-25或Sephacryl S300管柱純化抗體-茅屋黴素衍生物結合物且使其不含未反應之藥物及其他低分子量物質。每個抗體分子所結合之茅屋黴素衍生物部分之數目可藉由測量在230 nm與275 nm之吸光比值來測定。藉由此方法每個抗體分子可經由雙硫鍵連接平均1-10個茅屋黴素衍生物分子。

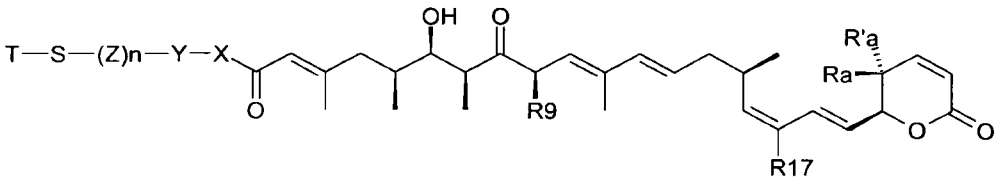
結合對於針對抗原表現細胞之結合親和力的影響可使用先前Liu等人，1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 8618-8623所述之方法來測定。茅屋黴素衍生物及其抗體結合物對於細胞株之細胞毒性可藉由

Goldmacher等人，1985, *J. Immunol.*, **135**: 3648-3651所述之細胞增殖曲線之反向外推來測量。此等化合物對黏附細胞株之細胞毒性可藉由Goldmacher等人，1986, *J. Cell Biol.*, **102**: 1312-1319所述之細胞群落檢定來測定。

細黴素衍生物

本發明之細胞毒素亦可為細黴素衍生物。根據本發明，"細黴素衍生物"係指Kalesse等人(2002, *Synthesis* **8**: 981-1003)中所定義之細黴素家族之成員，包括：細黴素，諸如細黴素A及細黴素B；卡爾他汀(callystatin)；瑞佳酮(ratjadone)，諸如瑞佳酮A及瑞佳酮B；安桂黴素(anguinomycin)，諸如安桂黴素A、B、C、D；卡蘇黴素(kasusamycin)；萊托他汀(leptolstatin)；萊託福甯(leptofuranin)，諸如萊託福寧A、B、C、D。細黴素A及B之衍生物為較佳。

更特定言之，本發明之衍生物具有式(I)：



(I)

其中：

Ra及Ra'為H或-Alk；較佳地，Ra為-Alk，尤其為甲基，且Ra'為H；

R17為視情況經OR、CN、NRR'、全氟烷基取代之烷基；較佳地，R17為烷基，更佳為甲基或乙基；

R9為視情況經OR、CN、NRR'、全氟烷基取代之烷基；較佳地，R9為烷基，更佳為甲基；

X為-O-或-NR-；較佳地，X為-NR-；

Y為-U-、-NR-U-、-O-U-、-NR-CO-U-、-U-NR-CO-、-U-CO-、-CO-U-；

較佳地，當X為-O-時，Y為-U-、-NR-U-、-U-NR-CO-；

其中U係選自直鏈或支鏈-Alk-、-Alk$(OCH_2CH_2)_m$-、-$(OCH_2CH_2)_m$-Alk-、-Alk-$(OCH_2CH_2)_m$-Alk-、-$(OCH_2CH_2)_m$-、-環烷基-、-雜環-、-環烷基-Alk-、-Alk-環烷基-、-雜環-Alk-、-Alk-雜環-；

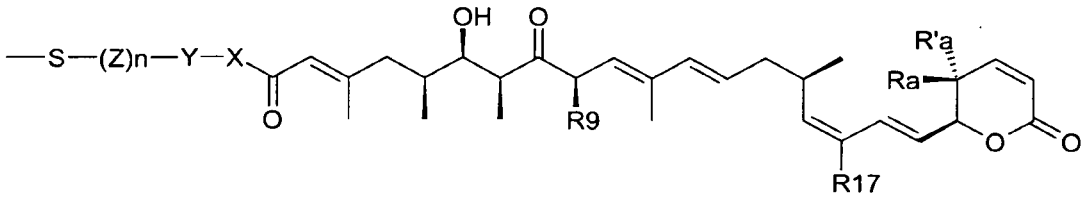
其中m為選自1至2000之整數；

較佳地，U為直鏈或支鏈-Alk-；

Z為-Alk-；

n為0或1；較佳地，n為0；

T表示H、諸如Ac之硫醇保護基、R_1或SR_1，其中R_1表示H、甲基、Alk、環烷基、視情況取代之芳基或雜環；或T表示：



其中：

Ra、Ra'、R17、R9、X、Y、Z、n係如上文所定義；

較佳地，T為H或SR_1，其中R_1表示Alk，更佳為甲基；

相同或不同之R、R'為H或烷基；

Alk表示直鏈或支鏈烷基；較佳地，Alk表示(-$(CH_{2-q}(CH_3)_q)_p$-，其中p表示1至10之整數；且q表示0至2之整數；較佳地，Alk表示-(CH_2)-或-$C(CH_3)_2$-；

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或水合鹽，或此等化合物或其光學異構體、外消旋體、非對映體或對映異構體之多晶型結晶結

構。

較佳化合物可選自以下各物：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基硫基-乙基)-醯胺

雙-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰基乙基)-醯胺]

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰基-乙基)-醯胺

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基二硫基-乙基)-醯胺

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-醯胺

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰基-2-甲基-丙基)-醯胺

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或水合鹽，或此等化合物或其光學異構體、外消旋體、非對映體或對映異構體之多晶型結晶結構。

為使衍生物與細胞結合劑連接，衍生物須包括允許衍生物經由諸如雙硫鍵、硫醚鍵、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定基團之鍵聯與細胞結合劑連接之部分(連接基團)。衍

生物經製備成使其含有使細黴素衍生物經由(例如)雙硫鍵、硫醚鍵、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩定基團或酯酶不穩定基團與細胞結合劑連接所必需之部分。為另外增強於水溶液中之溶解性，連接基團可含有聚乙二醇間隔基。較佳地，使用硫醚或雙硫鍵，因為靶分子之還原環境可使硫醚或雙硫鍵裂解且在細胞毒性相關聯增加之情況下釋放衍生物。

本發明之化合物可藉由多種合成途徑來製備。試劑及起始物質可購得，或易於由一般技術者以熟知技術來合成。用於合成可在本發明之細胞毒性結合物中使用之細黴素衍生物之方法連同用於使該等細黴素衍生物與諸如抗體之細胞結合劑結合之方法一起詳細描述於歐洲專利申請案第06290948.6號中，該申請案之內容以引用的方式併入本文中。

CC-1065類似物

本發明之細胞毒性結合物中所用之細胞毒性劑亦可為CC-1065或其衍生物。

CC-1065為自澤倫氏鏈黴菌(*Streptomyces zelensis*)之培養肉湯分離之有效抗腫瘤抗生素。CC-1065之活體外效用比諸如阿黴素(doxorubicin)、甲胺喋呤(methotrexate)及長春新鹼(vincristine)之常用抗癌藥物大約1000倍(B.K. Bhuyan等人，1982, *Cancer Res.*, **42**, 3532-3537)。CC-1065及其類似物揭示於美國專利第6,372,738號、第6,340,701號、第5,846,545號及第5,585,499號中。

CC-1065之細胞毒性效能與其烷基化活性及其DNA結合或DNA插入活性相關聯。此等兩種活性存在於分子之獨立部分中。因此，烷基化活性含於環丙基吡咯并吲哚(cyclopropapyrroloindole，CPI)子單位中且DNA結合活性存在於兩個吡咯并吲哚子單位中。

儘管CC-1065作為細胞毒性劑具有某些具有吸引力之特徵，但其

在治療用途中存有侷限性。將CC-1065投予小鼠引起緩發性肝中毒而在單次靜脈內給予12.5 μg/kg後第50天產生死亡率(V. L. Reynolds等人，1986, *J. Antibiotics*, **XXIX**: 319-334)。此已激勵努力研發不引起緩發毒性之類似物，且已描述以CC-1065為模型之較簡單類似物之合成(M.A. Warpehoski等人，1988, *J. Med. Chem.*, **31**: 590-603)。

在另一系列之類似物中，CPI部分經環丙基苯并吲哚(cyclopropabenzindole，CBI)部分置換(D.L. Boger等人，1990, *J. Org. Chem.*, **55**: 5823-5833；D.L. Boger等人，1991, *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, **1**: 115-120)。此等化合物維持母體藥物之高活體外效能，而在小鼠體內不引起緩發毒性。如同CC-1065，此等化合物為以共價方式與DNA之小凹槽結合而引起細胞死亡之烷基化劑。然而，最具前景之類似物阿多來新(Adozelesin)及卡折來新(Carzelesin)之臨床評估得到令人失望之結果(B.F. Foster等人，1996, *Investigational New Drugs*, **13**: 321-326；I. Wolff等人，1996, *Clin. Cancer Res.*, **2**: 1717-1723)。此等藥物因其高全身毒性而顯示不良治療作用。

CC-1065類似物之治療功效可藉由經靶向傳遞至腫瘤位點改變活體內分布，從而對非靶向組織產生較低毒性，且由此降低全身毒性而極大地改良。為達成此目的，已描述CC-1065之類似物及衍生物與特異性靶向腫瘤細胞之細胞結合劑之結合物(美國專利第5,475,092號、第5,585,499號、第5,846,545號)。此等結合物通常在活體外顯示高標靶特異性細胞毒性，且在小鼠中之人類腫瘤異種移植模型中顯示優越之抗腫瘤活性(R.V. J. Chari等人，1995, *Cancer Res.*, **55**: 4079-4084)。

最近，已描述在水介質中具有增強溶解性之CC-1065類似物之前藥(歐洲專利申請案第06290379.4號)。在此等前藥中，分子之烷基化部分之酚基經官能基保護，該官能基使藥物在儲存於酸性水溶液之過程中穩定，且賦予藥物與未經保護之類似物相比增加之水溶性。保護

基易於在活體內在生理pH值下裂解而得到相應活性藥物。在EP 06290379.4中所述之前藥中，酚取代基經保護成在生理pH值下具有電荷之含磺酸之胺基甲酸苯酯，且由此具有增強之水溶性。為另外增強水溶性，可將可選擇之聚乙二醇間隔基引入吲哚基子單位與諸如雙硫基之可裂解鍵之間的連接子中。此間隔基的引入不改變藥物之效能。

用於合成可在本發明之細胞毒性結合物中使用之CC-1065類似物之方法連同用於使該等類似物與諸如抗體之細胞結合劑結合之方法一起詳細描述於EP 06290379.4(其內容以引用的方式併入本文中)及美國專利第5,475,092號、第5,846,545號、第5,585,499號、第6,534,660號及第6,586,618號及美國申請案第10/116,053號及第10/265,452號中。

其他藥物

諸如甲胺喋呤、道諾黴素(daunorubicin)、阿黴素、長春新鹼、長春鹼(vinblastine)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、卡奇黴素(calicheamicin)、托布來新(tubulysin)及托布來新類似物、多卡黴素(duocarmycin)及多卡黴素類似物、海兔毒素及海兔毒素類似物之藥物亦適用於製備本發明之結合物。藥物分子亦可經諸如血清白蛋白之中間載體分子與抗體分子連接。如(例如)美國申請案第09/740991號中所述之多克黴素(Doxarubicin)及單諾黴素(Danorubicin)化合物亦可為適用之細胞毒性劑。

治療組合物

本發明亦係關於一種用於治療哺乳動物之過度增生性病症或發炎疾病或自體免疫疾病之治療組合物，其包含治療有效量之本發明之化合物及醫藥學上可接受之載劑。在一實施例中，該醫藥組合物係用於治療癌症，其包括(但不限於)以下各病症：癌瘤，包括膀胱、乳房、結腸、腎、肝、肺、卵巢、胰腺、胃、子宮頸、甲狀腺及皮膚之

癌瘤；包括鱗狀細胞癌；淋巴系之造血腫瘤，包括白血病、急性淋巴細胞性白血病、急性淋巴母細胞白血病、B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤；骨髓系之造血腫瘤，包括急性及慢性骨髓性白血病及前髓細胞性白血病；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤及橫紋肌肉瘤；其他腫瘤，包括黑素瘤、精原細胞瘤、畸胎癌、神經母細胞瘤及神經膠質瘤；中樞及周邊神經系統之腫瘤，包括星形細胞瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤及神經鞘瘤；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤及骨肉瘤；及其他腫瘤，包括黑素瘤、著色性乾皮病、角化棘皮瘤、精原細胞瘤、甲狀腺濾泡癌及畸胎癌；及仍待確定之其中CD38優勢表現之其他癌症。在一較佳實施例中，本發明之醫藥組合物係用於治療其中表現CD38之癌症，諸如非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、毛細胞白血病、多發性骨髓瘤、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病或急性淋巴細胞性白血病，及仍待確定之其中CD38優勢表現之其他癌症。在另一實施例中，本發明之醫藥組合物可用於治療自體免疫疾病，諸如全身性紅斑性狼瘡症、類風濕性關節炎、多發性硬化症、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、胃炎、橋本氏甲狀腺炎、強直性脊椎炎、C型肝炎相關之冷凝球蛋白性血管炎、慢性局竈性腦炎、大疱性類天疱瘡、A型血友病、膜性增生性絲球體腎炎、修格蘭氏症候群、成人及青少年皮肌炎、成人多發性肌炎、慢性蕁麻疹、原發性膽汁性肝硬化症、特發性血小板減少性紫癜、視神經脊髓炎、格雷氏甲狀腺機能障礙疾病、大疱性類天疱瘡、膜性增生性絲球體腎炎、徹奇-斯全司症候群及哮喘。在另一實施例中，該醫藥組合物係關於其他病症，諸如移植排斥反應，諸如腎移植排斥反應、肝移植排斥反應、肺移植排斥反應、心臟移植排斥反應及骨髓移植排斥反應；移植物抗宿主疾病；病毒感染，諸如mV感染、HIV感染、AIDS等；及寄生蟲感染，諸如梨形鞭毛蟲症、變形

蟲症、血吸蟲病；及如由一般技術者所確定之其他病症。

本發明提供醫藥組合物，其包含：

a)有效量之本發明之抗體、抗體片段或抗體結合物；及

b)醫藥學上可接受之載劑，其可為惰性或生理學活性的。

如本文所用之"醫藥學上可接受之載劑"包括生理學上相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣塗料、抗細菌及抗真菌劑及類似物。合適之載劑、稀釋劑及/或賦形劑之實例包括水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、丙三醇、乙醇及類似物中之一或多者及其組合。在許多狀況下，組合物中較佳包括諸如糖、多元醇或氯化鈉之等張劑。詳言之，合適載劑之相關實例包括：(1)含有或不含有約1 mg/ml至25 mg/ml人類血清白蛋白之杜貝卡氏(Dulbecco's)磷酸鹽緩衝生理食鹽水(pH值約7.4)，(2)0.9%生理食鹽水(0.9% w/v氯化鈉(NaCl))，及(3)5% (w/v)右旋糖；且亦可含有諸如色胺之抗氧化劑及諸如Tween 20之穩定劑。

本文中之組合物亦可含有如接受治療之特定病症所必需之另一治療劑。較佳地，本發明之抗體、抗體片段或抗體結合物與補充活性化合物將具有不會彼此不利影響之互補活性。在一較佳實施例中，另一治療劑為表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1(heregulin)、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之拮抗劑；或表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之受體(包括HER2受體、HER3受體、c-MET及其他受體酪胺酸激酶)之拮抗劑。在一較佳實施例中，另一治療劑為靶向分化群(CD)抗原之藥

劑，該等抗原包括CD3、CD14、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD36、CD40、CD44、CD52、CD55、CD59、CD56、CD70、CD79、CD80、CD103、CD134、CD137、CD138及CD152。在一較佳實施例中，另一治療劑為化學治療劑或免疫調節劑。

本發明之組合物可為多種形式。此等形式包括(例如)液體、半固體及固體劑型，但較佳形式視目標投藥模式及治療應用而定。典型較佳組合物為可注射或可輸注溶液之形式。較佳投藥模式為非經腸(例如靜脈內、肌肉內、腹膜內、皮下)。在一較佳實施例中，本發明之組合物係以快速注射形式或藉由經一段時間連續輸液來靜脈內投予。在另一較佳實施例中，其係藉由肌肉內、皮下、關節內、滑膜內、腫瘤內、腫瘤旁、病灶內或病灶旁途徑來注射以發揮局部以及全身治療作用。

用於非經腸投藥之無菌組合物可藉由將本發明之抗體、抗體片段或抗體結合物以所需量併入適當溶劑中，接著藉由微濾殺菌來製備。作為溶劑或媒劑，可使用水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、丙三醇、乙醇及類似物以及其組合。在許多狀況下，組合物中較佳包括諸如糖、多元醇或氯化鈉之等張劑。此等組合物亦可含有佐劑，尤其是濕潤劑、等張劑、乳化劑、分散劑及穩定劑。用於非經腸投藥之無菌組合物亦可以無菌固體組合物形式製備，可將該等無菌固體組合物在使用時溶解於無菌水或任何其他可注射無菌介質中。

本發明之抗體、抗體片段或抗體結合物亦可經口投予。作為用於經口投藥之固體組合物，可使用錠劑、丸劑、散劑(明膠膠囊、藥囊)或顆粒。在此等組合物中，將本發明之活性成份與一或多種諸如澱粉、纖維素、蔗糖、乳糖或二氧化矽之惰性稀釋劑在氬氣流下混

合。此等組合物亦可包含除稀釋劑以外之物質，例如一或多種諸如硬脂酸鎂或滑石之潤滑劑、著色劑、包衣塗料(糖衣錠劑)或糖漿釉料。

作為用於經口投藥之液體組合物，可使用含有諸如水、乙醇、丙三醇、植物油或石蠟油之惰性稀釋劑的醫藥學上可接受之溶液、懸浮液、乳液、糖漿及酏劑。此等組合物可包含除稀釋劑以外之物質，例如濕潤、增甜、增稠、調味或穩定化產品。

劑量視所需作用、治療持續時間及所用投藥途徑而定；對於成人而言，其一般介於每天口服5 mg與1000 mg之間，其中單位劑量在1 mg至250 mg活性物質之範圍內。一般而言，醫生將視待治療受檢者之特定年齡、體重及任何其他因素來確定適當劑量。

治療使用方法

在另一實施例中，本發明提供一種殺死$CD38^+$細胞之方法，其係藉由將結合該CD38且能夠經由細胞凋亡、ADCC及/或CDC殺死該$CD38^+$細胞之抗體投予有需要之患者。可治療性使用任何類型之本發明之抗體、抗體片段或細胞毒性結合物。因此，本發明包括抗-CD38單株抗體、其片段或其細胞毒性結合物作為藥劑之用途。

在一較佳實施例中，本發明之抗體、抗體片段或細胞毒性結合物係用於治療哺乳動物之過度增生性病症或發炎疾病或自體免疫疾病。在一更佳實施例中，將上文所揭示且含有本發明之抗體、抗體片段或細胞毒性結合物之醫藥組合物之一用於治療哺乳動物之過度增生性病症。在一實施例中，該病症為癌症。特定言之，該癌症為轉移性癌症。

因此，本發明之醫藥組合物適用於治療或預防多種癌症，其包括(但不限於)以下各病症：癌瘤，包括膀胱、乳房、結腸、腎、肝、肺、卵巢、胰腺、胃、子宮頸、甲狀腺及皮膚之癌瘤；包括鱗狀細胞癌；淋巴系之造血腫瘤，包括白血病、急性淋巴細胞性白血病、急性

淋巴母細胞白血病、B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤；骨髓系之造血腫瘤，包括急性及慢性骨髓性白血病及前髓細胞性白血病；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤及橫紋肌肉瘤；其他腫瘤，包括黑素瘤、精原細胞瘤、畸胎癌、神經母細胞瘤及神經膠質瘤；中樞及周邊神經系統之腫瘤，包括星形細胞瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤及神經鞘瘤；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤及骨肉瘤；及其他腫瘤，包括黑素瘤、著色性乾皮病、角化棘皮瘤、精原細胞瘤、甲狀腺濾泡癌及畸胎癌；及仍待確定之其中表現CD38之其他癌症。較佳地，該病症為其中表現CD38之NHL、BL、MM、B-CLL、ALL、TCL、AML、HCL、HL或CML，及仍待確定之其中CD38優勢表現之其他癌症。在另一實施例中，本發明之醫藥組合物可用於治療自體免疫疾病，諸如全身性紅斑性狼瘡症、類風濕性關節炎、多發性硬化症、克隆氏病、潰瘍性結腸炎、胃炎、橋本氏甲狀腺炎、強直性脊椎炎、C型肝炎相關之冷凝球蛋白性血管炎、慢性局竈性部腦炎、大疱性類天疱瘡、A型血友病、膜性增生性絲球體腎炎、修格蘭氏症候群、成人及青少年皮肌炎、成人多發性肌炎、慢性蕁麻疹、原發性膽汁性肝硬化症、特發性血小板減少性紫癜、視神經脊髓炎、格雷氏甲狀腺機能障礙疾病、大疱性類天疱瘡、膜性增生性絲球體腎炎、徹奇-斯全司症候群及哮喘。在另一實施例中，該醫藥組合物係關於其他病症，諸如移植排斥反應，諸如腎移植排斥反應、肝移植排斥反應、肺移植排斥反應、心臟移植排斥反應及骨髓移植排斥反應；移植物抗宿主疾病；病毒感染，諸如mV感染、HIV感染、AIDS等；及寄生蟲感染，諸如梨形鞭毛蟲症、變形蟲症、血吸蟲病；及如由一般技術者所確定之其他病症。

類似地，本發明提供一種用於抑制所選細胞群體之生長之方法，其包含使靶細胞或含有靶細胞之組織與有效量之單獨或與其他細

胞毒性劑或治療劑組合之本發明之抗體、抗體片段或抗體結合物，或構成細胞毒性結合物之抗體、抗體片段或治療劑接觸。在一較佳實施例中，另一治療劑為表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之拮抗劑；或表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之受體(包括HER2受體、HER3受體、c-MET及其他受體酪胺酸激酶)之拮抗劑。在一較佳實施例中，另一治療劑為靶向分化群(CD)抗原之藥劑，該等抗原包括CD3、CD14、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD36、CD40、CD44、CD52、CD55、CD59、CD56、CD70、CD79、CD80、CD103、CD134、CD137、CD138及CD152。在一較佳實施例中，另一治療劑為化學治療劑或免疫調節劑。

用於抑制所選細胞群體之生長之方法可活體外、活體內或離體實施。如本文所用之"抑制生長"意謂歷經短時段或長時段的減緩細胞生長、降低細胞生存力、致使細胞死亡、溶解細胞及誘發細胞死亡。

活體外用途之實例包括在自體骨髓移植至同一患者中之前處理自體骨髓以殺死病變或惡性細胞；在骨髓移植前處理骨髓以殺死感受態T細胞及預防移植物抗宿主疾病(GVHD)；處理細胞培養物以殺死除不表現靶抗原之所要變異體以外之所有細胞或殺死表現不當抗原之變異體。

非臨床活體外使用之條件易於由一般技術者確定。

臨床離體用途之實例為在癌症治療中或在自體免疫疾病治療中

在自體移植前自骨髓移除腫瘤細胞或淋巴細胞，或在移植前自自體或同種異體骨髓或組織移除T細胞及其他淋巴細胞以預防移植物抗宿主疾病(GVHD)。治療可如下進行。自患者或其他個體採集骨髓且接著在含有其中添加本發明之細胞毒性劑之血清的培養基中培育。濃度在約10 μM至1 pM之範圍內，在約37℃下歷時約30分鐘至約48小時。培育濃度及時間之確切條件(亦即劑量)易於由一般技術者確定。在培育後，將骨髓細胞用含有血清之培養基洗滌且藉由根據已知方法靜脈內輸液而返回患者體內。在患者於採集骨髓與回輸經治療細胞之時間之間接受諸如去除式(ablative)化學療法或全身照射之療程的其他治療之情形中，使用標準醫用設備將經治療骨髓細胞冷凍儲存於液氮中。

對於臨床活體內使用而言，本發明之抗體、抗原決定基結合抗體片段或細胞毒性結合物將以經測試無菌性及內毒素含量之溶液之形式供給。細胞毒性結合物投藥之合適方案之實例如下。結合物每週給予一次歷時4週，每週以靜脈內快速注射之形式給予。單次劑量係在其中可添加5至10 ml人類血清白蛋白之50至100 ml生理食鹽水中給予。每次靜脈內投藥劑量可為10 μg至100 mg(每天在100 ng至1 mg/kg之範圍內)。更佳地，劑量將在50 μg至30 mg之範圍內。最佳地，劑量將在1 mg至20 mg之範圍內。治療四週後，患者可基於每週一次繼續接受治療。關於投藥途徑、賦形劑、稀釋劑、劑量、時間等之特定臨床方案可由一般技術者根據臨床情況來確定。

診斷

本發明之抗體或抗體片段亦可用於活體外或活體內偵側生物樣本中之CD38。在一實施例中，本發明之抗-CD38抗體係用於測定組織中或來源於該組織之細胞中之CD38含量。在一較佳實施例中，該組織為病變組織。在該方法之一較佳實施例中，組織為腫瘤或其活組織檢查切片。在該方法之一較佳實施例中，首先自患者切除組織或其活

組織檢查切片，且接著可在免疫檢定中以本發明之抗體或抗體片段測定組織或活組織檢查切片中之CD38含量。在另一較佳實施例中，CD38含量係針對可經冷凍或固定之組織或其活組織檢查切片之樣本來測定。相同方法可用於測定CD38蛋白之其他特性，諸如其細胞表面含量或其細胞定位。

上述方法可用於診斷已知或懷疑患有癌症之受檢者之癌症，其中將在該患者中所量測之CD38含量與正常參考受檢者或標準之CD38含量比較。該方法可接著用於判定腫瘤是否表現CD38，腫瘤表現CD38可表明該腫瘤將良好回應於本發明之抗體、抗體片段或抗體結合物之治療。較佳地，腫瘤為其中表現CD38之NHL、BL、MM、B-CLL、ALL、TCL、AML、HCL、HL或CML，及仍待確定之其中CD38優勢表現之其他癌症。

本發明進一步提供經另外標記以用於研究或診斷應用之單株抗體、人類化抗體及其抗原決定基結合片段。在較佳實施例中，標記為放射性標記、螢光團、發色團、成像劑或金屬離子。

亦提供一種診斷方法，其中將該等經標記之抗體或其抗原決定基結合片段投予疑患癌症或發炎疾病或自體免疫疾病之受檢者，且量測或監測該受檢者體內之標記分布。

套組

本發明亦包括(例如)包含所述細胞毒性結合物及該細胞毒性結合物用於殺死特定細胞類型之使用說明書的套組。該等說明書可包括活體外、活體內或離體使用細胞毒性結合物之指導。

通常，套組將具有含有細胞毒性結合物之隔區。細胞毒性結合物可為凍乾形式、液體形式或可經改適以包括於套組中之其他形式。套組亦可含有實施套組中之說明書上所述之方法所需之其他要素，諸如用於使凍乾粉末復水之經殺菌溶液、用於在投予患者前與細胞毒性

結合物組合之其他藥劑及幫助將結合物投予患者之工具。

實例

現參考以下實例描述本發明，該等實例僅為說明性的且並不意欲限制本發明。

實例1

小鼠CD38抗體

使用穩定表現高含量人類CD38之300-19細胞(一種來源於Balb/c小鼠之前B細胞株)(M. G. Reth等人1985, *Nature*, 317: 353-355)免疫Balb/c VAF小鼠。藉由在ImmunoGen, Inc.使用標準免疫方案以每2-3週每隻小鼠約5×10^6個表現CD38之300-19細胞經皮下免疫小鼠。在處死以產生融合瘤之前三天用另一劑量之抗原補強經免疫小鼠。根據標準動物方案採集小鼠之脾且將其在兩個無菌、磨砂載玻片之間研磨以獲得於RPMI-1640培養基中之單細胞懸浮液。將脾細胞粒化，洗滌，且藉由使用聚乙二醇-1500(Roche 783 641)使其與鼠科骨髓瘤P3X63Ag8.653細胞融合(J. F. Kearney等人1979, *J Immunol*, 123: 1548-1550)。將融合細胞再懸浮於含有次黃嘌呤-胺基喋呤-胸苷(HAT)(Sigma H-0262)之RPMI-1640選擇培養基中且經選擇以在37℃(5% CO_2)下在96孔平底培養盤(Corning-Costar 3596，每孔200 μL細胞懸浮液)中生長。培育5天後，自各孔移除100 μL培養上清液且用100 μL含有次黃嘌呤-胸苷(HT)補充物(Sigma H-0137)之RPMI-1640培養基替換。在37℃(5% CO_2)下繼續培育直至融合瘤純系備妥用於抗體篩選。亦可使用免疫及融合瘤產生之其他技術，包括J. Langone及H. Vunakis(編，*Methods in Enzymology*，第121卷，"Immunochemical Techniques, Part I"；Academic Press, Florida)及E. Harlow及D. Lane("Antibodies: A Laboratory Manual"；1988；Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)所述之技術。

藉由使用Becton Dickinson FACSCalibur或FACSArray機器進行螢光活化細胞分選(FACS)，對來自融合瘤之培養上清液針對分泌與表現CD38之300-19細胞結合，但不與母體300-19細胞結合之小鼠單株抗體進行篩選(使用結合FITC或PE之抗小鼠IgG抗血清)。次選殖測試為陽性之融合瘤純系，且使用商業分型試劑(Roche 1493027)鑑別各經分泌抗-CD38抗體之同型。將對於CD38結合呈陽性之總共29種抗體藉由使用標準方案之蛋白質A或G層析來純化且接著進一步表徵。

實例2

抗-CD38抗體之結合表徵

證明抗-CD38抗體38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39與表現CD38之300-19細胞結合且不存在與母體300-19細胞結合之FACS直方圖展示於圖1中。將38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39抗體(10 nM)與表現CD38之300-19細胞或母體300-19細胞(每個樣本1-2×10^5個細胞)在100 μL補充2%正常山羊血清之冰冷RPMI-1640培養基中一起培育3 h。接著，將細胞粒化，洗滌，且在冰上與結合FITC之山羊抗小鼠IgG抗體(Jackson Laboratory，100 μL，6 μg/mL於補充2%正常山羊血清之冷RPMI-1640培養基中)一起培育1 h。將細胞再次粒化，洗滌，再懸浮於200 μL含有1%甲醛之PBS中，且使用FACSCalibur流式細胞儀以CellQuest軟體(BD Biosciences)進行分析。

與相應陰性對照組(僅與結合FITC之山羊抗小鼠IgG抗體一起培育之細胞)相比，與38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39一起培育之表現CD38之300-19細胞之FACS直方圖展示出強螢光位移(圖1)。另外，當將母體300-19細胞與此等抗體中之任一者一起培育時，未偵側到顯著螢光位移。當使用陽性對照抗-CD38抗體AT13/5(Serotec，MCA1019)時獲得類似結果。

當將Ramos(ATCC CRL 1596)淋巴瘤細胞與38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39一起培育時亦觀測到強螢光位移(圖1)。使用針對S形劑量反應曲線之非線性回歸方法(GraphPad Prizm，第4版，軟體，San Diego, CA)，自圖2所示之FACS分析曲線評估38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39與Ramos細胞結合之表觀解離常數(K_D)之值。該等值如下：分別為0.10 nM、0.10 nM、0.12 nM、0.16 nM、0.11 nM及3.03 nM。

實例3

38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗體對Ramos及Daudi淋巴瘤細胞凋亡之誘發

抗-CD38抗體38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39誘發Ramos及Daudi(ATCC CCL-213)淋巴瘤細胞株及MOLP-8多發性骨髓瘤細胞株(DSMZ ACC 569)凋亡。在用Annexin V之FITC結合物(Biosource PHN1018)及用TO-PRO-3(Invitrogen T3605)染色後藉由FACS分析量測細胞凋亡程度。Annexin V結合完整細胞之細胞膜雙層之外的磷脂醯絲胺酸而不結合其內之磷脂醯絲胺酸。在健康、正常細胞中，磷脂醯絲胺酸係在膜雙層之內表現，且磷脂醯絲胺酸自質膜內層轉移至質膜外層為細胞凋亡之可最早可偵側信號之一。因此，Annexin V結合為誘發細胞凋亡之信號。TO-PRO-3為當如細胞凋亡之後期階段所發生之膜完整性破壞時可僅穿透質膜之單體花青核酸染料。

將指數生長細胞以約2×10^5個細胞/毫升塗於24孔盤中之補充10%胎牛血清(FBS)、2 mM L-麩胺醯胺及50 μg/mL慶大黴素(gentamycin)之RMPI-1640培養基(下文表示為完全RMPI-1640培養基)中。除非另有規定，否則細胞一般係在完全RMPI-1640培養基中生長。在37℃下在含有5% CO_2之潮濕氣氛中將細胞與抗-CD38抗體(10 nM)一起培育

24 h。接著將細胞粒化，用500 μL PBS洗滌兩次，再懸浮於100 μL含有5 μL Annexin V-FITC之結合緩衝液(Annexin V-FITC套組中提供)中，且在冰上培育15 min。接著，將400 μL結合緩衝液及TO-PRO-3(達到1 μM之最終濃度)添加至混合物中，且藉由FACS立即量測FITC及TO-PRO-3之細胞結合螢光。對於各樣本收集4000個事件。使用CellQuest軟體產生TO-PRO-3之螢光(FL4-H；y軸)及Annexin V-FITC之螢光(FL1-H；x軸)之點陣圖。

結果展示於圖3及圖4中。圖3給出Daudi細胞在與各種抗-CD38抗體一起培育24 h後之該點陣圖之一實例。自此等圖示確定來自雙重複樣本之Annexin V陽性細胞(包括TO-PRO-3陽性與陰性細胞)之平均百分數且展示於圖4中。意外發現38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39顯示強細胞凋亡活性。與僅約6%之未經處理細胞相比，大於30%之暴露於此等抗體中之任一者之Daudi細胞呈Annexin V陽性(圖3及圖4A)。38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39顯示出比在10 nM之相同濃度下測試之先前技術鼠科CD38抗體(AT13/5、OKT10、IB4及SUN-4B7，在減去未經處理對照值後小於10% Annexin V陽性)及在吾人實驗室中產生之兩種其他抗-CD38抗體(38SB7及38SB23，不高於未經處理對照組，亦即約6% Annexin V陽性)強至少2.4倍之細胞凋亡活性(在減去未經處理對照值後為24%)(圖4A)。AT13/5係購自Serotec(MCA1019)且OKT10係自融合瘤(ATCC CRL-8022)產生及純化。IB4及SUN-4B7為來自Prof. F. Malavasi, University, Turin, Italy之贈品。類似地，38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗-CD38抗體展示出比先前技術鼠科CD38抗體AT13/5、OKT10、IB4及SUN-4B7或兩種其他新抗-CD38抗體38SB7及38SB23(在減去未經處理對照值後小於2% Annexin V陽性)強至少3.5倍之對另一淋巴瘤細胞株Ramos之促細胞凋

亡活性倍(在減去非經處理對照值後7%或更多Annexin-V陽性)(圖4B)。最後，38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39抗-CD38抗體展示出對多發性骨髓瘤細胞株MOLP-8之強促細胞凋亡活性(圖4C)。與約39%之未經處理細胞相比，約50%之經此等抗體處理之MOLP-8細胞呈Annexin V陽性。相比之下，經先前技術鼠科CD38抗體AT13/5、OKT10、IB4及SUN-4B7或兩種其他新抗-CD38抗體38SB7及38SB23中之任一者處理並不使凋亡細胞部分增加。

實例4

抗-CD38抗體之輕鏈及重鏈之選殖及定序

38SB19抗體

自產生38SB19抗體之融合瘤細胞製備RNA

使用Qiagen's RNeasy小規模純化套組，自產生38SB19抗體之5×10^6個融合瘤細胞獲得總RNA製劑。簡言之，將5×10^6個細胞粒化且再懸浮於350 μL RLT緩衝液(含有1% β-巯基乙醇)中。藉由使懸浮液穿過21.5號針及注射器約10-20次或直至其不再具黏性來將其均質化。將乙醇(350 μL之70%含水乙醇)添加至均質物中，將其充分混合。將溶液轉移至離心管柱，將管柱置放於2 mL收集管中且以大於8000 x g旋轉15秒鐘。將管柱用500 μL RPE緩衝液洗滌兩次，接著轉移至新鮮管中且用30 μL無RNase水溶離且旋轉1分鐘。將溶離液(30 μL)返回置於管柱上以進行第二次1分鐘之溶離旋轉。將30 μL溶離液之等分試樣用水稀釋且用於量測260 nm下之UV吸收來定量RNA。

以逆轉錄酶(RT)反應製備cDNA

使用Invitrogen之SuperscriptII套組自總RNA產生可變區38SB19抗體cDNA。嚴格遵循套組方案，利用來自Qianeasy小規模純化之多達5 μg之總RNA。簡言之，用無RNase無菌蒸餾水使RNA、1 μL隨機引子及1 μL dNTP混合物達到12 μL且在65℃下培育5分鐘。接著將混合物

置於冰上歷時至少1分鐘。接著添加4 μL之5×反應緩衝液、2 μL 0.1 M DTT及1 μL RNaseOUT且在25℃下將混合物在MJ Research熱循環儀中培育2分鐘。將熱循環儀暫停以便添加1 μL SuperscriptII酶且接著重新啟動在25℃下再進行10分鐘，隨後轉換至55℃歷時50分鐘。藉由加熱至70℃歷時15 min將反應熱滅活且藉由添加1 μL RNase H且在37℃下培育20分鐘來移除RNA。

簡并PCR反應

對來源於融合瘤細胞之cDNA執行第一輪簡并PCR反應之程序係基於Wang等人(2000)及Co等人(1992)所述之方法。用於此輪之引子(表2)含有有利於選殖至pBluescriptII質體中之限制性位點。

將PCR反應組份(表3)在冰上於薄壁PCR管中混合且接著轉移至預加熱及暫停於94℃下之MJ research熱循環儀中。使用來源於Wang等人，2000之程式如下進行反應：

名稱：Wang45

94℃　3:00 min

94℃　0:15 sec

45℃　1:00 min

72℃　2:00 min

轉到2　29次

72℃　6:00 min

4℃　總是

結束

接著使PCR反應混合物在1%低熔點瓊脂糖凝膠上跑膠，將300至400 bp帶切除，使用Zymo DNA微型管柱純化，且送至Agencourt biosciences用於定序。使用各別5'及3' PCR引子作為定序引子以自兩個方向產生38SB19可變區cDNA。

選殖5'端序列

由於用於選殖38SB19可變區輕鏈及重鏈cDNA序列之簡并引子改變5'端序列，因此需要額外定序工作來解密完整序列。使用來自上述方法之初步cDNA序列對38SB19序列所來源之鼠科生殖系序列搜索NCBI IgBlast位點(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/)。PCR引子經設計(表3)以與鼠科抗體之前導序列黏接以致新PCR反應可產生未由PCR引子改變之完整可變區cDNA。PCR反應、帶純化及定序係如上所述進行。

序列確認之肽分析

將可變區之cDNA序列資訊與生殖系恆定區序列組合以獲得全長抗體cDNA序列。接著計算重鏈及輕鏈之分子量且與藉由鼠科38SB19抗體之LC/MS分析所獲得之分子量比較。

表4給出來自38SB19 LC及HC之cDNA序列之計算質量以及藉由LC/MS所量測之值。分子量量測值與38SB19輕鏈及重鏈之cDNA序列相符。

實例5

hu38SB19抗體之重組表現

將hu38SB19之可變區序列密碼子優化且藉由Blue Heron Biotechnology來合成。使該等序列側接限制性內切酶位點以便與各別恆定區序列同框選殖於單鏈與串聯雙鏈哺乳動物表現質體中。輕鏈可變區係選殖至ps38SB19LCZv1.0與ps38SB19v1.00質體中之EcoRI及BsiWI位點(圖5A及圖5C)。重鏈可變區係選殖至ps38SB19HCNv1.0與ps38SB19v1.00質體中之HindIII及Apa1位點(圖5B及圖5C)。此等質體可用於以瞬間或穩定轉染在哺乳動物細胞中表現hu38SB19。使用類似表現載體構築體來產生其他嵌合及人類化抗體。

使用來自BD biosciences之$CaPO_4$試劑進行瞬間轉染以在HEK-

293T細胞中表現hu38SB19。對所提供之方案略作修改以增強表現量。簡言之，在轉染前24 h將2×10^6個HEK-293T細胞塗於經聚乙烯亞胺(PEI)塗覆之10 cm組織培養盤上。藉由用PBS洗滌細胞且用10 mL含1%超低IgG FBS(Hyclone)之DMEM(Invitrogen)替換培養基開始轉染。在旋轉下將溶液A(10 μg DNA，86.8 μL Ca^{2+}溶液，且以H_2O補至500 μL)逐滴添加至溶液B中。將混合物在室溫下培育1 min且將1 mL混合物逐滴添加至各10 cm盤中。轉染後約16 h，將培養基用10 mL含1%超低IgG FBS之新鮮DMEM替換。約24小時後，將2 mM丁酸鈉添加至各10 cm盤中。4天後採集轉染。

藉由添加1/10體積之1 M Tris/HCl緩衝液(pH 8.0)製備上清液之蛋白質A親和性層析。將pH值經調節之上清液經0.22 μm濾膜過濾且裝載於經結合緩衝液(PBS，pH 7.3)平衡之蛋白質A瓊脂糖管柱(HiTrap Protein A HP，1 mL，Amersham Biosciences)上。在樣本裝載期間將Q-瓊脂糖前管柱(10 mL)連接至蛋白質A管柱之上游以減少細胞物質(諸如DNA)之污染。樣本裝載後，移除前管柱且翻轉蛋白質A管柱之定向進行洗滌及溶離。將管柱用結合緩衝液洗滌直至獲得在280 nm下無吸光度之穩定基線。使用0.5 mL/min之流動速率，將抗體用含有0.15 M NaCl之0.1 M乙酸緩衝液(pH 2.8)溶離。收集約0.25 mL之溶離份且藉由添加1/10體積之1 M Tris/HCl(pH 8.0)將其中和。將峰溶離份相對於PBS透析隔夜兩次且根據OD_{280}下之吸光度量化經純化抗體。亦可使用蛋白質G管柱以略微不同之程序來純化人類化及嵌合抗體。

所有所述嵌合及人類化抗-CD38抗體均係以如上所述之類似程序經表現及純化。

實例6

嵌合抗-CD38抗體之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)活性

由於先前已顯示一些抗-CD38抗體作為具有人類IgG1恆定區之嵌

合或人類化抗體之形式具有ADCC及/或CDC活性(J. H. Ellis等人1995, *J Immunol*, 155: 925-937；F. K. Stevenson等人1991, *Blood*, 77: 1071-1079；WO 2005/103083)，因此製造由鼠科可變區及人類IgG1/Igκ恆定區組成之38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之嵌合型式且測試ADCC及/或CDC活性。

首先使用Ramos細胞作為靶細胞及使用人類自然殺傷(NK)細胞作為效應細胞測試ch38SB13、ch38SB18、ch38SB19、ch38SB30、ch38SB31及ch38SB39之ADCC。使用乳酸去氫酶(LDH)釋放檢定量測細胞溶解(R. L. Shields等人，2001, *J Biol Chem*, 276: 6591-6604)。

使用NK分離套組II(Miltenyi Biotech)之修改方案，首先自人類血液(來自正常供體；購自Research Blood Components, Inc., Brighton, MA)分離NK細胞。將血液用漢克氏(Hank's)平衡鹽溶液(HBSS)稀釋2-3倍。將25 mL經稀釋血液小心疊層於50 mL錐形管中之25 mL Ficoll Paque之上且在19℃下以400 g離心45 min。自界面收集周邊血液單核細胞(PBMC)，將其轉移至新的50 mL錐形管中，且用HBSS洗滌一次。將PBMC再懸浮於2 mL NK分離緩衝液中，且接著將500 μL生物素-抗體混合液(來自NK分離套組，130-091-152，Miltenyi Biotech)添加至細胞懸浮液中。生物素-抗體混合液含有與淋巴細胞(除NK細胞以外)結合之經結合生物素之抗體。將混合物在4℃下培育10 min，且接著添加1.5 mL NK分離緩衝液(PBS、0.1% BSA、1 mM EDTA)及1 mL抗生物素微珠。將細胞-抗體混合物在4℃下再培育15 min。接著，將細胞用50 mL NK分離緩衝液洗滌一次且再懸浮於3 mL NK分離緩衝液中。接著，將MACS LS管柱(在MACS分離器上，Miltenyi Biotech)用3 mL NK分離緩衝液預洗滌。接著將細胞懸浮液施加於LS管柱上。將排出液(具有未經標記細胞之溶離份)收集於新的50 mL錐形管中。將管柱用3 mL NK分離緩衝液洗滌3次。將全部排出液收集於同一管中

且用50 mL NK分離緩衝液洗滌一次。將NK細胞塗於30 mL補充5%胎牛血清、50 μg/mL慶大黴素之RPMI-1640中。

將於補充0.1% BSA、20 mM HEPES(pH 7.4)及50 μg/mL慶大黴素之RPMI-1640培養基(下文表示為RHBP培養基)中之各種濃度之ch38SB13、ch38SB18、ch38SB19、ch38SB30、ch38SB31及ch38SB39抗體等分(50 μL/孔)至圓底96孔盤中。將靶Ramos細胞以10^6個細胞/毫升再懸浮於RHBP培養基中且添加至含有抗體稀釋液之各孔中(100 μL/孔)。將含有靶細胞及抗體稀釋液之盤在37℃下培育30 min。接著將NK細胞(50 μL/孔)添加至含有靶細胞之孔中，通常添加比率為1個靶細胞/3-6個NK細胞。將RHBP培養基(50 μL/孔)添加至含有NK細胞之對照孔中。另外，將20 μL Triton X-100溶液(RPMI-1640培養基，10% Triton X-100)添加至僅含有靶細胞而無抗體之3個孔中以測定最大可能LDH釋放。將混合物在37℃下培育4 h，接著以1200 rpm離心10 min，且將100 μL上清液小心轉移至新的平底96孔盤中。將細胞毒性偵側套組(Roche 1 644 793)之LDH反應混合物(100 μL/孔)添加至各孔中且在室溫下培育5-30 min。在490 nm下量測樣本之光學密度(OD_{490})。藉由將100%溶解歸於經Triton X-100處理之樣本的OD_{490}值且將0%溶解歸於僅含有靶細胞之未經處理對照樣本之OD_{490}值來測定各樣本之特異性溶解百分數。僅含有NK細胞之樣本得到可忽略之OD_{490}讀數。

當使用Ramos靶細胞及NK效應細胞測試時，嵌合抗-CD38抗體顯示極有效之ADCC活性(圖6)。藉由非線性回歸方法使用S形劑量反應曲線評估EC_{50}值且得到如下值：對於ch38SB13為0.0013 μg/mL，對於ch38SB18為0.0013 μg/mL，對於ch38SB19為0.0018 μg/mL，對於ch38SB30為0.0022 μg/mL，對於ch38SB31為0.0012 μg/mL，對於ch38SB39為0.1132 μg/mL。嵌合抗-CD38抗體亦對LP-1(DSMZ ACC

41)多發性骨髓瘤細胞顯示出有效之ADCC活性(EC_{50}值：對於ch38SB18為0.00056 μg/mL；對於ch38SB19為0.00034 μg/mL；對於ch38SB31為0.00024 μg/mL)(圖7A)。Ch38SB19亦經由ADCC有效殺死Daudi淋巴瘤細胞(圖7B)、NALM-6 B-ALL細胞(DSMZ ACC 128)(圖8A)及MOLT-4 T-ALL細胞(ATTC CRL-1582)(圖8B)，從而表明具有顯著有效細胞凋亡活性之抗-CD38抗體亦具有對抗來源於各種造血惡性疾病之各種腫瘤細胞之有效ADCC活性。另外，非結合性IgG1對照抗體(利妥昔單抗(rituximab)，BiogenIdec)(圖7A、圖8A及圖8B)或mu38SB19(圖7B)在相同實驗中不具有顯著ADCC活性。

實例7

嵌合抗-CD38抗體之CDC活性

Ch38SB13、ch38SB18、ch38SB19、ch38SB30、ch38SB31及ch38SB39之CDC活性係基於自(H. Gazzano-Santoro等人1997, *J. Immunol Methods*, 202: 163-171)修改之方法來量測。人類補體為凍乾人類補體血清(Sigma-Aldrich S1764)，在即將實驗前將其如製造商所指示用無菌純化水復水且接著用RHBP培養基稀釋5倍。將以10^6個細胞/毫升懸浮於RHBP培養基中之靶細胞等分至平底96孔組織培養盤之孔中(50 μL/孔)。接著，添加50 μL於RHBP培養基中之各種濃度(10 nM至0.001 nM)之抗-CD38抗體(每個樣本一種抗體)，隨後添加50 μL/孔之補體溶液。接著在37℃下在含有5% CO_2之潮濕氣氛中將盤培育2 h，其後將50 μL於RHBP中稀釋(最終10%)之40% Alamar藍試劑(Biosource DAL1100)添加至各孔中以量測細胞生存力。Alamar藍監測減少存活細胞之能力。將盤在37℃下培育5-18 h，隨後在540/590 nm下量測螢光(單位為相對螢光單位，RFU)。藉由首先自各樣本之RFU值減去背景RFU值(僅含有培養基而無任何細胞之孔)而相對於背景螢光校正實驗值，且接著以該經校正RFU值除以未經處理之細胞樣本之

經校正RFU值來測定各樣本之特異性細胞生存力之百分數。

當使用最終稀釋度為5%之人類補體以Raji-IMG細胞來測試嵌合抗-CD38抗體樣本之CDC活性時，嵌合抗-CD38抗體顯示極有效之CDC活性(圖9)。Raji-IMG為來源於Raji細胞(ATCC CCL-86)之細胞且表現較低含量之膜補體抑制劑CD55及CD59。藉由非線性回歸自圖8所示之S形劑量反應曲線來評估EC_{50}值且結果如下：對於ch38SB13為0.005 μg/mL，對於ch38SB18為0.0101 μg/mL，對於ch38SB19為0.028 μg/mL，對於ch38SB30為0.020 μg/mL，對於ch38SB31為0.010 μg/mL，且對於ch38SB39為0.400 μg/mL。嵌合抗-CD38抗體亦對LP-1多發性骨髓瘤細胞顯示出有效之CDC活性(EC_{50}值：對於ch38SB18為0.032 μg/mL；對於ch38SB19為0.030 μg/mL；對於ch38SB31為0.043 μg/mL)，而非結合性嵌合對照IgG1(利妥昔單抗，BiogenIdec)不具有任何CDC活性(圖10)。當針對Daudi淋巴瘤細胞測試嵌合CD38抗體時，不同抗-CD38抗體在其CDC活性方面不同(圖11)。在補體存在下與1.25 μg/mL ch38SB19一起培育後Daudi細胞之特異性生存力小於15%，而在補體存在下與ch38SB18或ch38SB39(1.25 μg/mL或更高濃度)一起培育後此等細胞之特異性生存力僅少量降低(特異性生存力分別為85%及91%)。另外，當在補體存在下將Daudi細胞與1.25 μg/mL或更高濃度之ch38SB13、ch38SB30及ch38SB31一起培育時，觀測到特異性生存力僅適度降低(特異性生存力分別為65%、45%及53%)。

實例8

人類化抗-CD38抗體之結合親和力及細胞凋亡、ADCC及CDC活性

人類化38SB19之兩種型式(hu38SB19 v1.00及v1.20)及嵌合38SB19在使用Ramos細胞測試時顯示相似之結合親和力，K_D值分別為0.23 nM、0.25 nM及0.18 nM之(圖12A)。亦在競爭結合檢定中比較嵌合及人類化38SB19抗體之結合親和力，其中量測其與經結合生物素

之鼠科38SB19抗體競爭結合之能力。將經生物素標記之鼠科38SB19抗體(3×10^{-10} M)與各種濃度之ch38SB19、hu38SB19 v1.00或hu38SB19 v1.20混合。將抗體混合物與Ramos細胞一起培育，且藉由FACS分析使用結合FITC之抗生蛋白鏈菌素量測與細胞結合之經結合生物素之鼠科38SB19的量。Hu38SB19 v1.00、hu38SB19 v1.20及ch38SB19充分等同地與經結合生物素之鼠科38SB19競爭結合(圖12B)，從而再次表明結合親和力不受人類化影響。當比較ch38SB19、hu38SB19 v1.00及hu38SB19 v1.20(10^{-8}至10^{-11} M)之誘發Daudi細胞凋亡之能力時，其顯示相似之細胞凋亡活性(圖13)。此外，hu38SB19 v1.00及v1.20在LP-1細胞中亦顯示與ch38SB19相似之ADCC(圖14)且在Raji-IMG及LP-1細胞中顯示與ch38SB19相似之CDC效能(圖15)。Hu38SB19 v1.00在T細胞急性淋巴母細胞白血病細胞株DND-41(DSMZ 525)中亦顯示與ch38SB19相似之CDC活性(圖15)。對hu38SB19 v1.00進一步測試其在一組不同細胞株中誘發細胞凋亡之能力(圖16)。用hu38SB19 v1.00(10^{-8} M)處理使得以下細胞株中之Annexin V陽性細胞顯著增加：B細胞淋巴瘤細胞株SU-DHL-8(DSMZ ACC 573)(自未經處理對照組中之7%至經hu38SB19處理之細胞中之97%)及NU-DUL-1(DSMZ ACC 579)(自未經處理對照組中之10%至經hu38SB19處理之細胞中之37%)及T-ALL細胞株DND-41(自未經處理對照組中之7%至經hu38SB19處理之細胞中之69%)。另外，用hu38SB19 v1.00(10^{-8} M)處理使以下細胞株中之Annexin V陽性細胞之部分增加：B細胞淋巴細胞性白血病細胞株JVM-13(DSMZ ACC 19)(自未經處理對照組中之8%至經hu38SB19處理之細胞中之17%)及毛細胞白血病細胞株HC-1(DSMZ ACC 301)(自未經處理對照組中之6%至經hu38SB19處理之細胞中之10%)。

類似地，人類化38SB31之兩種型式(hu38SB31 v1.1及v1.2)及嵌合38SB31在使用Ramos細胞測試時顯示相似之結合親和力，K_D值分別為5

0.13 nM、0.11 nM及0.12 nM。如上文所述亦在競爭結合檢定中比較嵌合及人類化38SB31抗體之結合親和力且其表現充分等同。對hu38SB31 v1.1進一步測試其在數種細胞株中誘發細胞凋亡之能力。人類化抗體對Ramos、Daudi、Molp-8及SU-DHL-8細胞顯示與ch38SB31相似之細胞凋亡活性。此外，hu38SB31 v1.1在此等細胞株中亦顯示與ch38SB31相似之ADCC及CDC活性。

實例9

38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之活體內功效

在使用Ramos淋巴瘤細胞確立之免疫缺乏小鼠(雌性CB.17 SCID)中之存活人類異種移植腫瘤模型中研究38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31及38SB39之活體內抗腫瘤活性。將雌性CB.17 SCID小鼠用於0.1 mL無血清培養基中之2×10^6個Ramos細胞經側尾靜脈接種。腫瘤細胞接種後7天，將小鼠基於體重隨機分成7組。除具有6隻小鼠之經38SB31處理之組及具有8隻小鼠之經38SB39處理之組以外，每組有10隻小鼠。以40 mg/kg之劑量，每週兩次，在三個連續週內，在細胞接種後7天開始，將抗體經靜脈內給予小鼠。若一或兩隻後肢麻痺，體重自預處理值降低20%以上或動物過度病態而不能進食及進水，則處死小鼠。與經PBS處理之小鼠相比，用38SB13、38SB18、38SB19、38SB30、38SB31或38SB39處理顯著延長小鼠存活(圖17)。經PBS處理之小鼠之中值存活期為22天且經抗體處理之組之中值存活期在28至33天之範圍內。

在免疫缺乏小鼠中之其他人類異種移植腫瘤模型中進一步研究mu38SB19及hu38SB19之活體內抗腫瘤活性。對於Daudi淋巴瘤存活模型，將SCID小鼠用於0.1 mL無血清培養基中之5×10^6個Daudi細胞經側尾靜脈接種。如上所述進行研究。與經PBS處理之小鼠相比，用

mu38SB19或hu38SB19處理顯著延長小鼠存活(圖18)。經PBS處理之小鼠之中值存活期為22天，而經抗體處理之小鼠之中值存活期為47天。

對於NCI-H929多發性骨髓瘤腫瘤模型，將SCID小鼠用10^7個細胞經皮下接種。當腫瘤在第6天可觸知時，將動物根據體重隨機分成10組且開始抗體處理。以40 mg/kg之劑量，每週兩次，在三個連續週內，將hu38SB19抗體或非結合性嵌合IgG1對照抗體(利妥昔單抗，BiogenIdec)經靜脈內給予小鼠。監測腫瘤體積，且若腫瘤尺寸達到2000 mm^3或腫瘤壞死，則處死動物。經PBS處理之組在第89天達到1000 mm^3之平均腫瘤體積，嵌合IgG1對照抗體組在第84天達到此平均腫瘤體積(圖19)。用hu38SB19處理在所有10隻動物中完全阻止腫瘤生長。相比之下，在經PBS處理之組中僅有兩隻動物且在嵌合IgG1對照抗體組中有三隻動物顯示腫瘤衰退。

對於MOLP-8多發性骨髓瘤腫瘤模型，將SCID小鼠用10^7個細胞經皮下接種。當腫瘤在第4天可觸知時，將動物根據體重隨機分成10組且開始抗體處理。以40 mg/kg之劑量，每週兩次，在三個連續週內，將hu38SB19及mu38SB19抗體或嵌合IgG1對照抗體經靜脈內給予小鼠。監測腫瘤體積，且若腫瘤尺寸達到2000 mm^3或腫瘤壞死，則處死動物。經PBS處理之組在第22天達到500 mm^3之平均腫瘤體積，嵌合IgG1對照抗體組在第23天達到此平均腫瘤體積(圖20)。在此等組中無一腫瘤衰退。相比之下，用hu38SB19或mu38SB19處理分別使10隻動物中之8隻或10隻動物中之6隻腫瘤衰退。

表格

表1A：

mu38SB19輕鏈構架表面殘基及人類1.69抗體中之相同Kabat位置處之相應殘基。不同的且因此在hu38SB19抗體中改變之殘基係處於灰色框中。標星號(*)殘基在一或多種hu38SB1變異體中回復突變為mu38SB19殘基。

mu38SB19輕鏈構架表面殘基及人類1.69抗體中之相應殘基		
Kabat位置	mu38SB19	1.69
1	D	D
3	V	V
5*	T	A
9	L	K
10	S	F
15	L	V
18	P	R
40	P	P
41	G	G
42	Q	Q
45	R	K
57	G	G
60	D	D
67	A	S
80	A	A
本案現呈	E	E
107	K	K
108	R	R

表1B：

mu38SB19重鏈構架表面殘基及人類1.69抗體中之相同Kabat位置處之相應殘基。不同的且因此在hu38SB19抗體中改變之殘基係處於灰色框中。

mu38SB19重鏈構架表面殘基及人類1.69抗體中之相應殘基		
Kabat位置	mu38SB19	1.69
1	Q	Q
3	Q	Q
5	V	Q
9	A	A
11	V	L
13	K	R
14	P	P
19	K	K
23	K	K
28	T	T
41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	Q	Q
62	K	K
64	Q	K
65	G	G
73	K	K
74	S	S
82B	S	S
84	S	S
85	E	E
106	Q	Q
113	S	S

表2：

用於簡并PCR反應之引子係基於Wang等人，2000中之引子，例外為HindKL係基於Co等人，1992。混合鹼基係如下定義：H=A+T+C，S=g+C，Y=C+T，K=G+T，M=A+C，R=A+g，W=A+T，V=A+C+G。

引子	序列
BamIgG1 (SEQ ID NO. 73)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC
IgG2Abam (SEQ ID NO. 74)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO. 75)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
EcoMH2 (SEQ ID NO. 76)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG
SacIMK (SEQ ID NO. 77)	GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA
HindKL (SEQ ID NO. 78)	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC

表3：

用於選殖38SB19可變區cDNA序列之輕鏈及重鏈PCR反應混合物。

輕鏈反應混合物	重鏈反應混合物
5 μl 10×PCR反應緩衝液(Roche) 4 μl 10 mM dNTP混合物(各2.5 mM) 2 μl模板(RT反應) 5 μl 10 μM Sac1MK左引子 5 μl 10 μM HindKL右引子 5 μl DMSO 0.5 μl Taq聚合酶(Roche) 23.5 μl無菌蒸餾H_2O 總計50 μl	5 μl 10×PCR反應緩衝液(Roche) 4 μl 10 mM dNTP混合物(各2.5 mM) 2 μl模板(RT反應) 2.5 μl 10 μM EcoMH1左引子 2.5 μl 10 μM EcoMH2左引子 5 μl 10 μM BamIgG1右引子 5 μl DMSO 0.5 μl Taq聚合酶(Roche) 23.5 μl無菌蒸餾H_2O 總計50 μl

表4：

用於38SB19第二輪PCR反應之5'端鼠科前導序列引子。3'端引子與第一輪反應中所用之引子一致，因為其引導各別恆定區序列。

引子	序列
輕鏈 38SB19 LC前導序列 (SEQ ID NO. 79)	ATGGAGTCACAGATTCAGGTC
重鏈 38-19HC前導序列 (SEQ ID NO. 80)	TTTTGAATTCCAGTAACTTCAGGTGTCCACTC

表5：

鼠科38SB19抗體輕鏈及重鏈之cDNA計算及LC/MS量測之分子量。

	輕鏈			重鏈		
	cDNA	LC/MS	差值	cDNA	LC/MS	差值
Mu38SB19	23735	23736	1	48805	48826	21

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 法商賽諾菲-安萬特公司

<120> 用於治療癌症之新穎抗-CD38抗體

<130> FR2006-043

<140> 096139053

<141> 2007-10-18

<150> 06291628.3

<151> 2006-10-19

<160> 80

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 1

Ser Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

Arg Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr Gly Asn Gly Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Asn Ser Gly Met Asn
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9

Arg Gly Phe Val Tyr
1 5

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Leu Lys
1 5 10 15

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Asp Tyr Trp Met Gln
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val Val Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 19

Gly Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe Arg
1 5 10 15

Asp

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21

Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 22

Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 23

Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 24

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr Thr
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 25

Ser Tyr Thr Leu Ser

1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 26

Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 27

Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe
1 5

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 28

Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala Val Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 29

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 30

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 31
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 31

Asn Phe Gly Met His
1 5

<210> 32
<211> 17

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 32

Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 33

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

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 35

Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 36

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 37
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 37
aac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct ctt ggg 48
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gag att tat 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr
20 25 30

```
ggc aat ggt ttt atg aac tgg ttc cag cag aaa cca gga cag cca ccc      144
Gly Asn Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc      192
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gag ttc acc ctc acc att gat      240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asp
65                  70                  75                  80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt caa caa att aat      288
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
                85                  90                  95

gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgg      336
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110
```

<210> 38
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 38

```
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

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

Gly Asn Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110
```

<210> 39
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(336)

<400> 39

```
gac att gta ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg      48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gag agt gtt gct att tat      96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr
            20                  25                  30
```

```
ggc aat agt ttt ctg aaa tgg ttc cag cag aaa ccg gga cag cca ccc      144
Gly Asn Ser Phe Leu Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc      192
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc acc att aat      240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65                  70                  75                  80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa att aat      288
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
                85                  90                  95

gag gat ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg      336
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110
```

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 40

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

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

Gly Asn Ser Phe Leu Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
        35                  40                  45

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

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110
```

<210> 41
<211> 324
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 41

```
gac att gtg atg gcc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gtt gga      48
Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt act gtt      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
            20                  25                  30
```

```
gtg gcc tgg tat caa cag aaa cca gga caa tct cct aaa cga ctg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile
        35                  40                  45

tac tcg gca tcc tat cgg tat att gga gtc cct gat cgc ttc act ggc      192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg acg gat ttc act ttc acc atc agc agt gtg cag gct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65                  70                  75                  80

gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa cat tat agt cct ccg tac      288
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
                85                  90                  95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 42
<211> 108
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 42

```
Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
            20                  25                  30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 43
<211> 324
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 43

```
gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc ttg tcc aca tca gtt gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac agg gtc agt atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg gtt act gct      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala
            20                  25                  30
```

gtt gcc tgg ttt caa cag aaa cca gga caa tct cca aaa cta ctg att 144
Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat tcg gca tcc cac cgg tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192
Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ttc acc atc agt gtg cag gct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt caa caa cat tat act act ccc acg 288
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr
85 90 95

acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gac ttc aga cgg 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Phe Arg Arg
100 105

<210> 44
<211> 108
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 44

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ile Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Phe Arg Arg
100 105

<210> 45
<211> 324
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 45
gac act gtg atg acc cag tct cac aaa ttc ata tcc aca tca gtt gga 48
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gtt gtg ggt agt gct 96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
20 25 30

```
gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65                  70                  75                  80

gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat ccg tac      288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
                85                  90                  95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 46
<211> 108
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 46

```
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
            20                  25                  30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 47
<211> 324
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 47

```
gac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca gta gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt act aat      96
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
            20                  25                  30
```

```
gtt gcc tgg tat caa cac aaa cca gga caa tcc cct aaa ata atg att      144
Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Met Ile
        35                  40                  45

tat tcg gcg tcc tcc cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc      192
Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca ctt ttc act ctc acc atc aac aat gtg cag tct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser
65                  70                  75                  80

gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat cct ctc      288
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
                85                  90                  95

acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgg                      324
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 48
<211> 108
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 48

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
            20                  25                  30

Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Met Ile
        35                  40                  45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser
65                  70                  75                  80

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

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 49
<211> 342
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(342)

<400> 49

```
cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag      48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                   10                  15

aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ctc aca agc tac      96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
            20                  25                  30
```

```
gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg      144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
        35                  40                  45

ggc tgg ata aac acc tac act gga gaa cca aca tat gct gat gac ttt      192
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

aag gga cgt ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc act gcc ttt      240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
65                  70                  75                  80

ttg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt      288
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

gta aga cgc ggg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc      336
Val Arg Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            100                 105                 110

tct gca                                                             342
Ser Ala
```

<210> 50
<211> 114
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 50

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

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

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

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

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

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Val Arg Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            100                 105                 110

Ser Ala
```

<210> 51
<211> 342
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(342)

<400> 51

```
cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag      48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1               5                   10                  15

aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca aac tct      96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
            20                  25                  30

gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg     144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
        35                  40                  45

ggc tgg ata aac acc tac act gga gag ccg aca tat gct gat gac ttc     192
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
    50                  55                  60

aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc tct gcc tat     240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ser Ala Tyr
65                  70                  75                  80

ttg cag atc agt aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt     288
Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

gca aga agg ggt ttt gtt tac tgg ggc caa ggg act ctg gta act gtc     336
Ala Arg Arg Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            100                 105                 110

tct gca                                                            342
Ser Ala
```

<210> 52
<211> 114
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            100                 105                 110

Ser Ala
```

<210> 53
<211> 360

<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 53

```
cag gtt cag ctc cag cag tct ggg gct gag ctg gca aga cct ggg act        48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
1               5                   10                  15

tca gtg aag ttg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttt act gac tac        96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

tgg atg cag tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt ctg gag tgg att       144
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

ggg act att tat cct gga gat ggt gat act ggg tac gct cag aag ttc       192
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

aag ggc aag gcc aca ttg act gcg gat aaa tcc tcc aaa aca gtc tac       240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

atg cac ctc agc agt ttg gct tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt       288
Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga ggg gat tac tac ggt agt aat tct ttg gac tat tgg ggt caa       336
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

gga acc tca gtc acc gtc tcc tca                                      360
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 54
<211> 120
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 54

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
```

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 55
<211> 357
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 55

```
cag gtc cag tta cag caa tct gga cct gaa ctg gtg agg cct ggg gcc      48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tca gtg aag att tcc tgc aaa act tct ggc tac gca ttc agt ggc tcc      96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Gly Ser
            20                  25                  30

tgg atg aac tgg gtg aag cag agg cct gga cag ggt cta gag tgg att     144
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga cgg att tat ccg gga gat gga gat atc att tac aat ggg aat ttc     192
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe
    50                  55                  60

agg gac aag gtc aca ctg tct gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac     240
Arg Asp Lys Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

atg cag ctc agc agc ctg acc tct gtg gac tct gcg gtc tat ttt tgt     288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

tcg aga tgg ggg aca ttt acg ccg agt ttt gac tat tgg ggc caa ggc     336
Ser Arg Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

acc act ctc aca gtc tcc tca                                        357
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 56
<211> 119
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 56

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

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

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe
    50                  55                  60

Arg Asp Lys Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
```

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

Ser Arg Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 351
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(351)

<400> 57

```
gac gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg      48
Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gaa gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat      96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

acc ctg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag acg agg ctg gag tgg gtc     144
Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca acc att agt att ggt ggt cgc tac acc tat tat cca gac agt gtg     192
Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac     240
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt     288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

aca aga gat ttt aat ggt tac tct gac ttc tgg ggc caa ggc acc act     336
Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
            100                 105                 110

ctc aca gtc tcc tca                                                 351
Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 58
<211> 117
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 58

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

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

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
            100                 105                 110

Leu Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 59
<211> 360
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 59

```
aat gta cag ctg gta gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga ggg      48
Asn Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc cgg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aac ttt      96
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
            20                  25                  30

gga atg cac tgg gtt cgt cag gct cca gag aag ggt ctg gag tgg gtc     144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca tac att cgt agt ggc agt ggt acc atc tac tat tca gac aca gtg     192
Ala Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
    50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat ccc aag aac acc ctg ttc     240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65                  70                  75                  80

ctg caa atg acc agt cta agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt     288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gca aga tcc tac tat gat ttc ggg gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa     336
Ala Arg Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

ggg act ctg gtc act gtc tct gca                                    360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
        115                 120
```

<210> 60
<211> 120
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 60

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

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30

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

Ala Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 61
<211> 324
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 61

```
gat atc gta atg acc cag tcc cac ctg agt atg agt acc tcc ctg gga      48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

gat cct gtg tca atc act tgc aag gcc tca cag gat gtg agc acc gtc      96
Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
            20                  25                  30

gtt gct tgg tat cag cag aag ccc ggg caa tca ccc aga cgt ctc atc     144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
        35                  40                  45

tac tca gca tca tac cgt tac atc ggg gtg cct gac cga ttt act ggc     192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

tct ggc gct ggc aca gat ttc acc ttt aca att agt tcc gtc cag gcc     240
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65                  70                  75                  80

gaa gac ctg gcc gtg tac tac tgc cag cag cac tac agt ccc cca tac     288
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
                85                  90                  95

act ttc ggg gga ggg act aag ctc gaa atc aaa cgt                     324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 62
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 62

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

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

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

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

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 63
<211> 324
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 63
gac att gtt atg gct caa agc cat ctg tct atg agc aca tct ctg gga 48
Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat cct gtg tcc atc act tgc aaa gcc agt caa gac gtg tct aca gtt 96
Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

gtt gca tgg tat caa cag aag cca ggc cag tca ccc aga cgg ctc att 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

tac tca gct tct tac cga tac atc ggg gtc cct gac aga ttt aca ggt 192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

agt ggg gcc ggt act gac ttc act ttt act atc tca tcc gta caa gcc 240
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

gaa gac ctg gca gta tat tac tgc cag caa cat tat tcc cca ccc tac 288
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

aca ttc ggc ggg ggt act aag ctg gaa att aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 64
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 64

Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

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

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

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 65
<211> 360
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 65

```
cag gta cag ctc gtt cag tcc ggc gcc gag gta gct aag cct ggt act      48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
1               5                   10                  15

tcc gta aaa ttg tcc tgt aag gct tcc ggg tac aca ttt aca gac tac      96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

tgg atg cag tgg gta aaa cag cgg cca ggt cag ggc ctg gag tgg att     144
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

gga aca ata tat ccc ggc gac ggc gac aca ggc tat gcc cag aag ttt     192
Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60

caa ggc aag gca acc ctt act gct gat aaa tct tcc aag act gtc tac     240
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

atg cat ctg tct tcc ttg gca tct gag gat agc gct gtc tat tac tgt     288
Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gct agg ggg gac tac tat ggg tca aat tcc ctg gat tac tgg ggc cag     336
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

ggc acc agt gtc acc gtg agc agc                                    360
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 66

<211> 120
<212> PRT
<213> 人類

<400> 66

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

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

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 324
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 67

```
gac acc gtg atg acc cag tcc ccc tcc acc atc tcc acc tct gtg ggc      48
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Ile Ser Thr Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac cgg gtg tcc atc acc tgt aag gcc tcc cag gtg gtg ggc tcc gcc      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
            20                  25                  30

gtg gcc tgg tat cag cag aag cct ggc cag tcc cct aag ctg ctg atc     144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac tgg gcc tcc acc cgg cat acc ggc gtg cct gac cgg ttc acc ggc     192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

tcc ggc agc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc tcc aac gtg cag tcc     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65                  70                  75                  80

gac gac ctg gcc gac tac ttc tgc cag cag tac aac tcc tac cct tac     288
Asp Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
                85                  90                  95

acc ttt ggc ggc gga aca aag ctg gag atc aag cgt                     324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
```

100 105

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 68

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 69
<211> 324
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 69

```
gac acc gtg atg acc cag tcc ccc tcc tcc atc tcc acc tcc atc ggc      48
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Ser Thr Ser Ile Gly
1               5                  10                  15

gac cgg gtg tcc atc acc tgt aag gcc tcc cag gtg gtg ggc tcc gcc      96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
            20                  25                  30

gtg gcc tgg tat cag cag aag cct ggc cag tcc cct aag ctg ctg atc     144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac tgg gcc tcc acc cgg cat acc ggc gtg cct gcc cgg ttc acc ggc     192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

tcc ggc agc ggc acc gac ttc acc ctg acc atc tcc aac gtg cag tcc     240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65                  70                  75                  80

gag gac ctg gcc gac tac ttc tgc cag cag tac aac tcc tac cct tac     288
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
                85                  90                  95

acc ttt ggc ggc gga aca aag ctg gag atc aag cgt                     324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

100 105

<210> 70
<211> 108
<212> PRT
<213> 人類

<400> 70

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

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

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

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

<210> 71
<211> 351
<212> DNA
<213> 人類

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(351)

<400> 71

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggc ggc gga ctg gtg aag cct ggc ggc 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg agg ctg tcc tgt gag gcc tcc ggc ttc acc ttc tcc tcc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

acc ctg tcc tgg gtg agg cag acc cct ggc aag ggc ctg gag tgg gtg 144
Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gcc acc atc tcc atc ggc ggc agg tac acc tac tac cct gac tcc gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac tcc ctg aag tcc gag gac acc gcc atg tac tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

acc cgg gac ttc aac ggc tac tcc gac ttc tgg ggc cag ggc acc aca 336
Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

ctg acc gtg tcc tcc 351
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 117
<212> PRT
<213> 人類

<400> 72

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

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

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 36
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 73
ggaggatcca tagacagatg gggtgtcgt tttggc 36

<210> 74
<211> 32
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 74
ggaggatccc ttgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 75
<211> 32
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> 混合鹼基係如下定義：H=A+T+C，S=G+C，Y=C+T，K=G+T，M=A+C，
R=A+G，W=A+T，V=A+C+G，N=A+C+G+T

<400> 75
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 76
<211> 35
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(35)
<223> 混合鹼基係如下定義：H=A+T+C，S=G+C，Y=C+T，K=G+T，M=A+C，R=A+G，W=A+T，V=A+C+G，N=A+C+G+T

<400> 76
cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 77
<211> 31
<212> DNA
<213> 小鼠

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> 混合鹼基係如下定義：H=A+T+C，S=G+C，Y=C+T，K=G+T，M=A+C，R=A+G，W=A+T，V=A+C+G，N=A+C+G+T

<400> 77
ggagctcgay attgtgmtsa cmcarwctmc a 31

<210> 78
<211> 46
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 78
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tggtgc 46

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 79
atggagtcac agattcaggt c 21

<210> 80
<211> 32
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 80
tttgaattc cagtaacttc aggtgtccac tc 32

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

公告本

發明摘要

※ 申請案號：103126457(由096139053分割)

※ 申請日：096/10/18　　※IPC 分類：C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07D 491/22 (2006.01)
C07D 498/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

※分割案

【發明名稱】

用於治療癌症之新穎抗-CD38抗體

NOVEL ANTI-CD38 ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF CANCER

【中文】

本發明提供特異性結合CD38之抗體、人類化抗體、表面重塑(resurfaced)抗體、抗體片段、衍生抗體、及其與細胞毒性劑之結合物，其能夠經由細胞凋亡(apoptosis)、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)殺死CD38+細胞。該等抗體及其片段可用於治療表現CD38蛋白之腫瘤，諸如多發性骨髓瘤、慢性淋巴細胞性白血病、慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病或急性淋巴細胞性白血病；或治療自體免疫及發炎疾病，諸如全身性狼瘡、類風濕性關節炎、多發性硬化症、紅斑及哮喘。該等衍生抗體可用於診斷CD38表現量升高之腫瘤及使該等腫瘤成像。亦提供包含細胞結合劑及細胞毒性劑之細胞毒性結合物，包含該結合物之治療組合物，使用該結合物抑制細胞生長及治療疾病之方法，及包含該細胞毒性結合物之套組。特別言之，該細胞結合劑為識別及結合CD38蛋白之單株抗體及其抗原決定基(epitope)結合片段。

【英文】

Antibodies, humanized antibodies, resurfaced antibodies, antibody fragments, derivatized antibodies, and conjugates of same with cytotoxic agents, which specifically bind to CD38, are capable of killing CD38+ cells by apoptosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and/or complement-dependent cytotoxicity (CDC). Said antibodies and fragments thereof may be used in the treatment of tumors that express CD38 protein, such as multiple myeloma, chronic lymphocytic leukemia, chronic myelogenous leukemia, acute myelogenous leukemia, or acute lymphocytic leukemia, or the treatment of autoimmune and inflammatory diseases such as systemic lupus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, erythematosus, and asthma. Said derivatized antibodies may be used in the diagnosis and imaging of tumors that express elevated levels of CD38. Also provided are cytotoxic conjugates comprising a cell binding agent and a cytotoxic agent, therapeutic compositions comprising the conjugate, methods for using the conjugates in the inhibition of cell growth and the treatment of disease, and a kit comprising the cytotoxic conjugate. In particular, the cell binding agent is a monoclonal antibody, and epitope-binding fragments thereof, that recognizes and binds the CD38 protein.

圖式

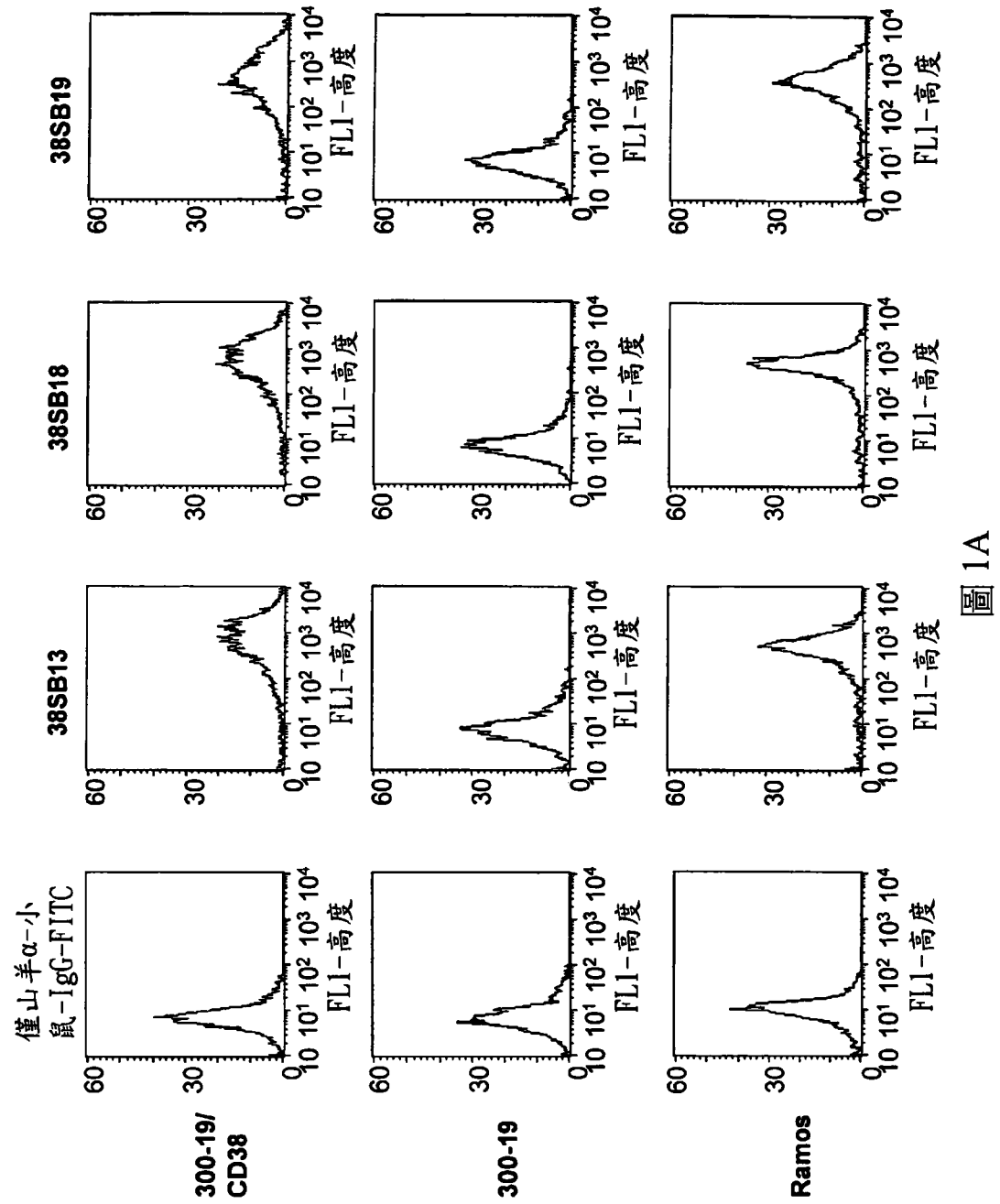

38SB19
38SB18
38SB13
僅山羊α-小鼠-IgG-FITC
300-19/CD38
300-19
Ramos
60
30
0
0 10 10¹ 10² 10³ 10⁴
FL1-高度

圖 1A

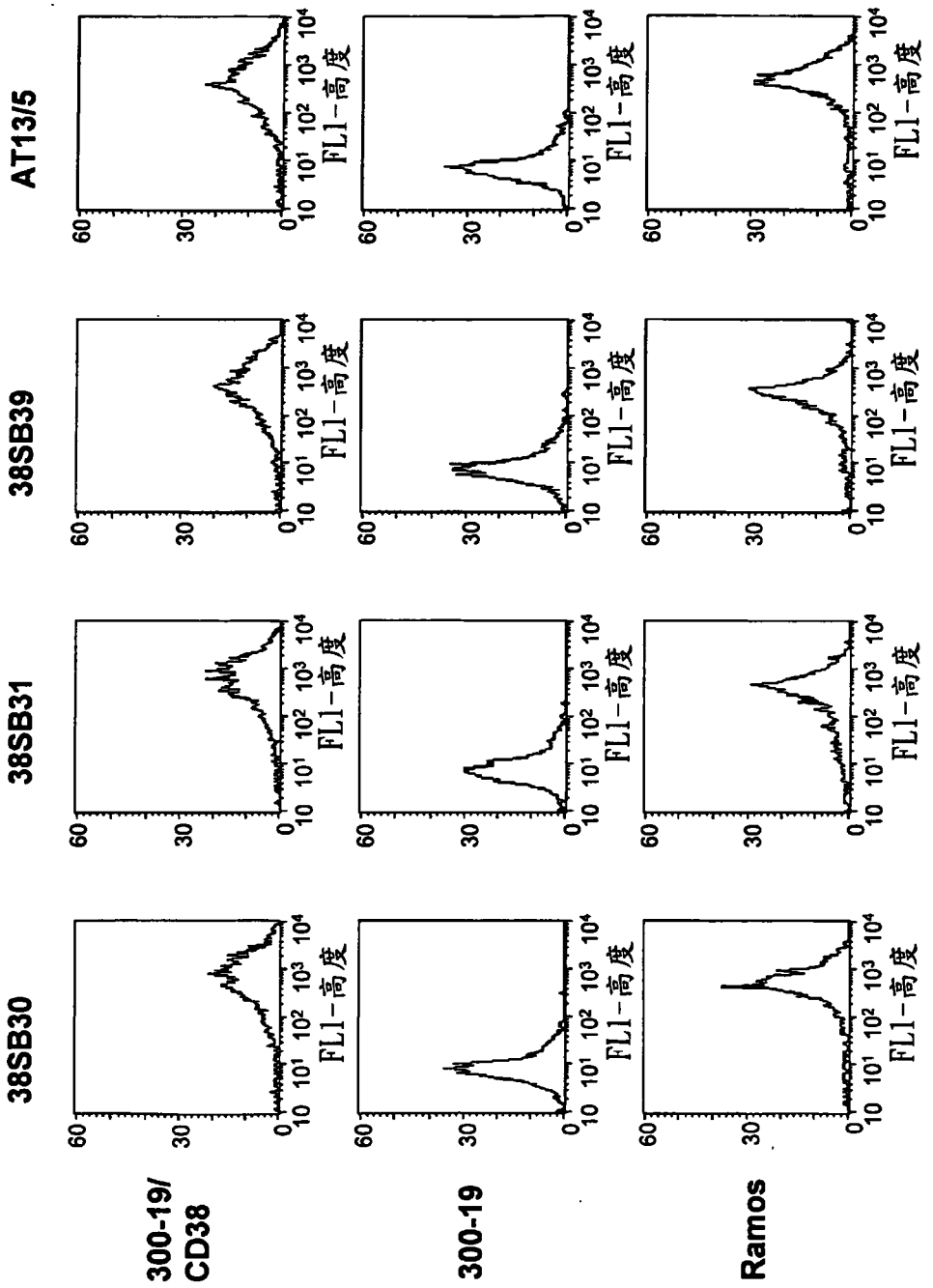

38SB30
38SB31
38SB39
AT13/5
300-19/ CD38
300-19
Ramos
60
30
0
10 10¹ 10² 10³ 10⁴
FL1-高度

圖 1B

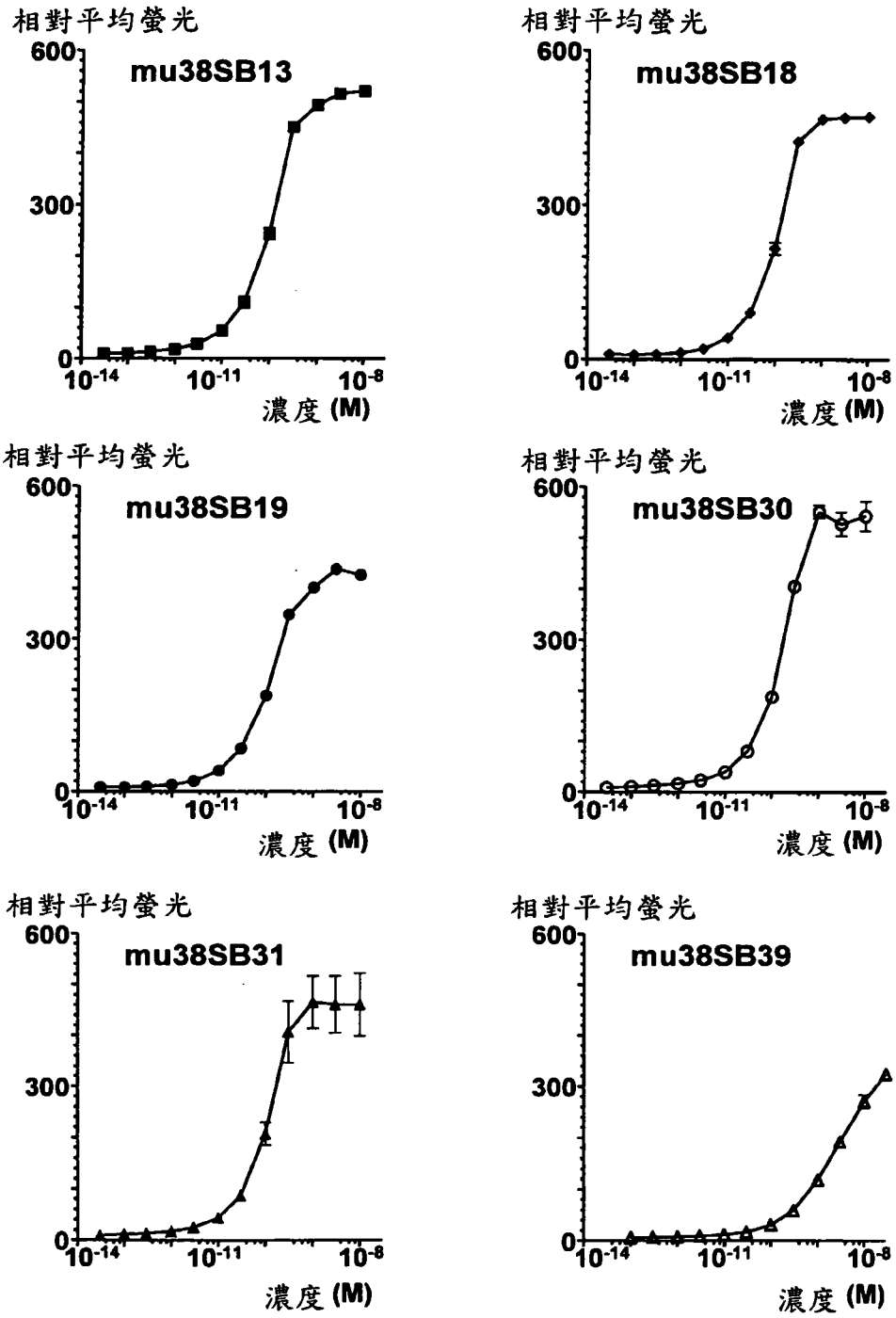

相對平均螢光
mu38SB13
600
300
0
10-14
10-11
10-8
濃度 (M)
相對平均螢光
mu38SB18
600
300
0
10-14
10-11
10-8
濃度 (M)
相對平均螢光
mu38SB19
600
300
0
10-14
10-11
10-8
濃度 (M)
相對平均螢光
mu38SB30
600
300
0
10-14
10-11
10-8
濃度 (M)
相對平均螢光
mu38SB31
600
300
0
10-14
10-11
10-8
濃度 (M)
相對平均螢光
mu38SB39
600
300
0
10-14
10-11
10-8
濃度 (M)

圖 2

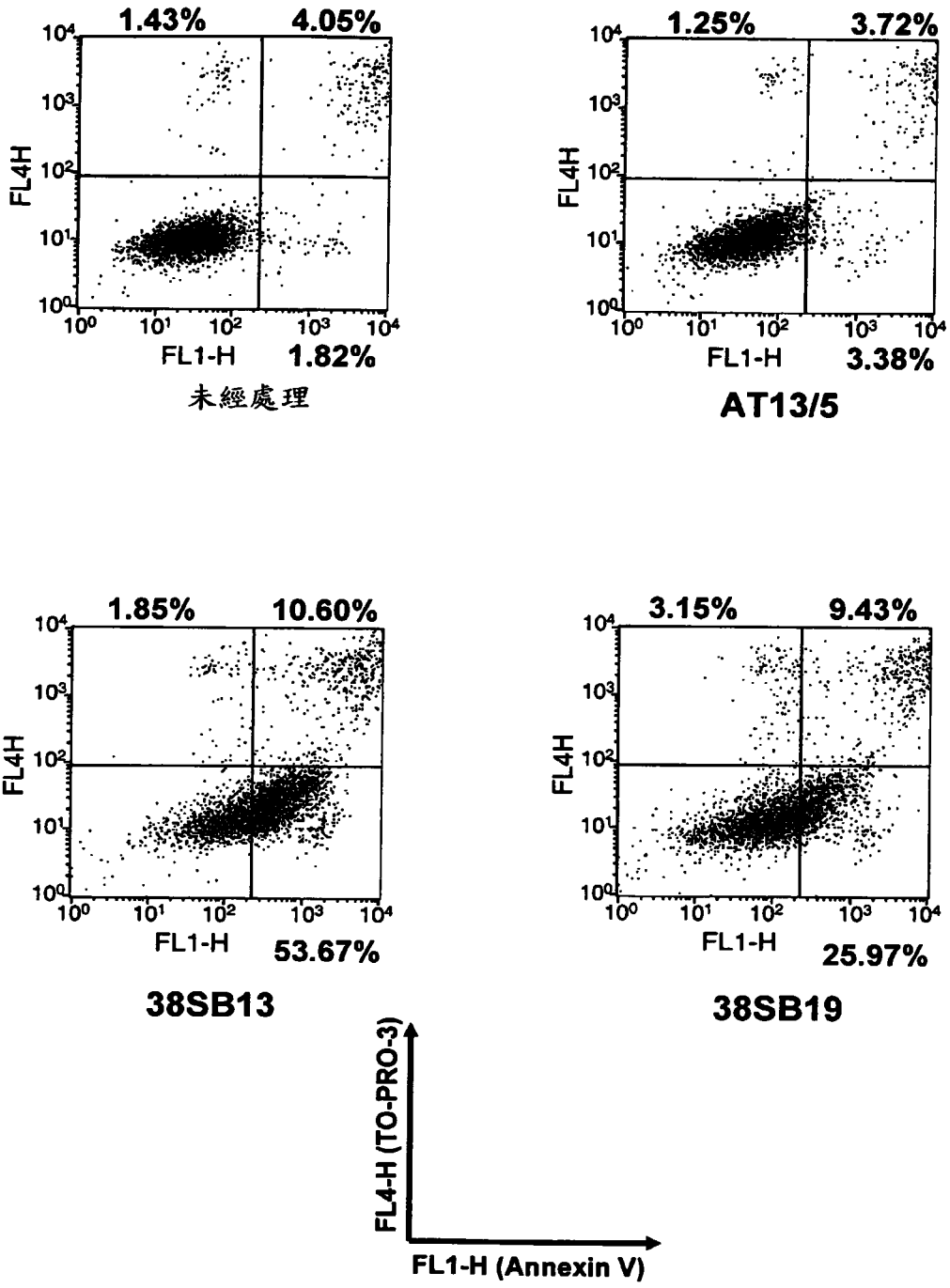

1.43%
4.05%
FL4H
FL1-H
1.82%
未經處理
1.25%
3.72%
FL4H
FL1-H
3.38%
AT13/5
1.85%
10.60%
FL4H
FL1-H
53.67%
38SB13
3.15%
9.43%
FL4H
FL1-H
25.97%
38SB19
FL4-H (TO-PRO-3)
FL1-H (Annexin V)

圖 3

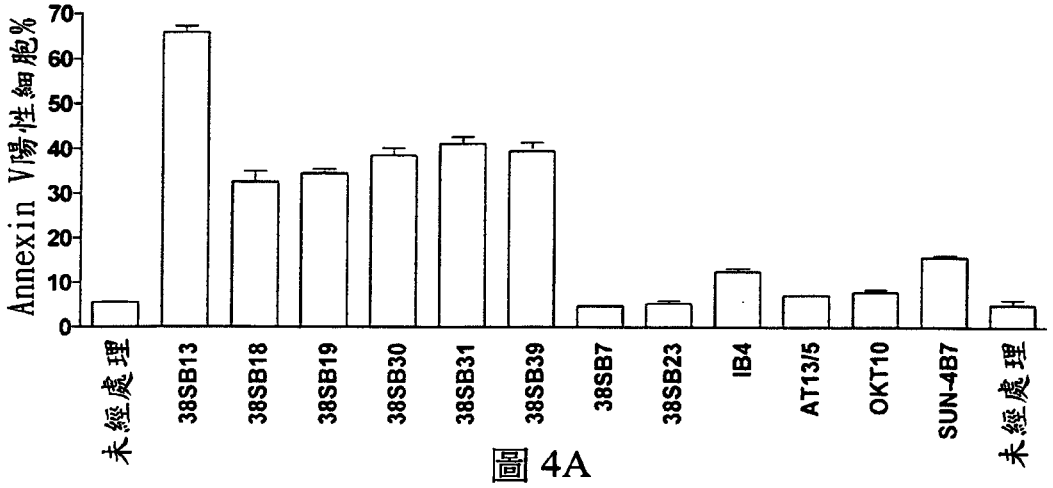

Annexin V陽性細胞%
70
60
50
40
30
20
10
0
未經處理
38SB13
38SB18
38SB19
38SB30
38SB31
38SB39
38SB7
38SB23
IB4
AT13/5
OKT10
SUN-4B7
未經處理

圖 4A

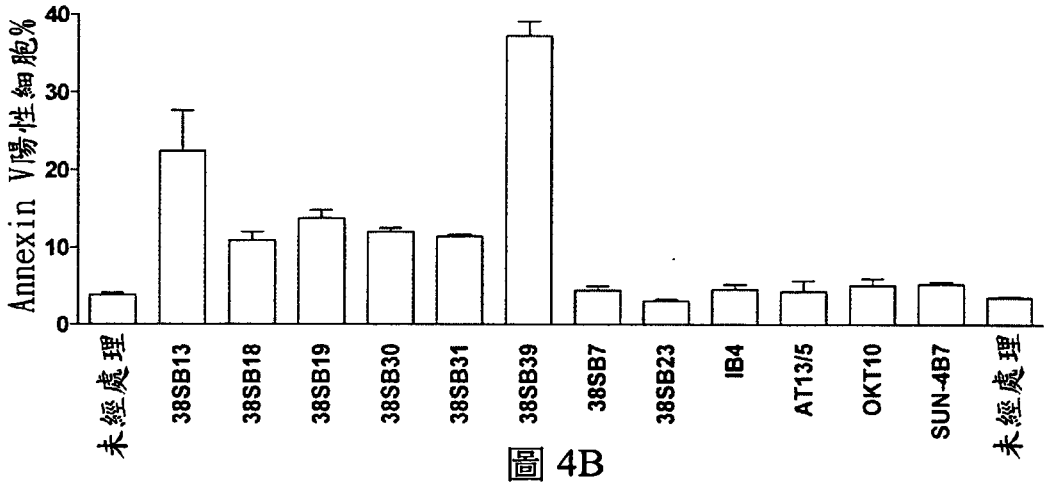

Annexin V陽性細胞%
40
30
20
10
0
未經處理
38SB13
38SB18
38SB19
38SB30
38SB31
38SB39
38SB7
38SB23
IB4
AT13/5
OKT10
SUN-4B7
未經處理

圖 4B

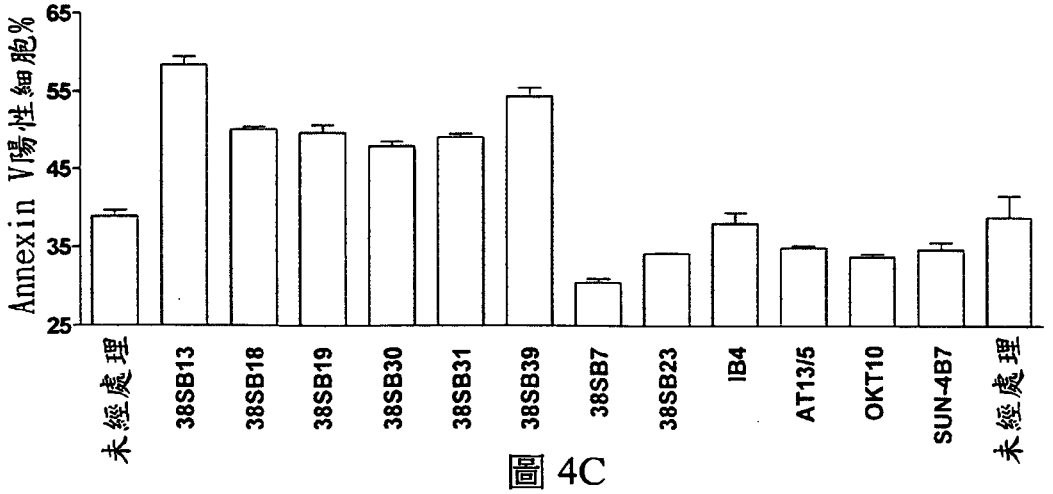

Annexin V陽性細胞%
65
55
45
35
25
未經處理
38SB13
38SB18
38SB19
38SB30
38SB31
38SB39
38SB7
38SB23
IB4
AT13/5
OKT10
SUN-4B7
未經處理

圖 4C

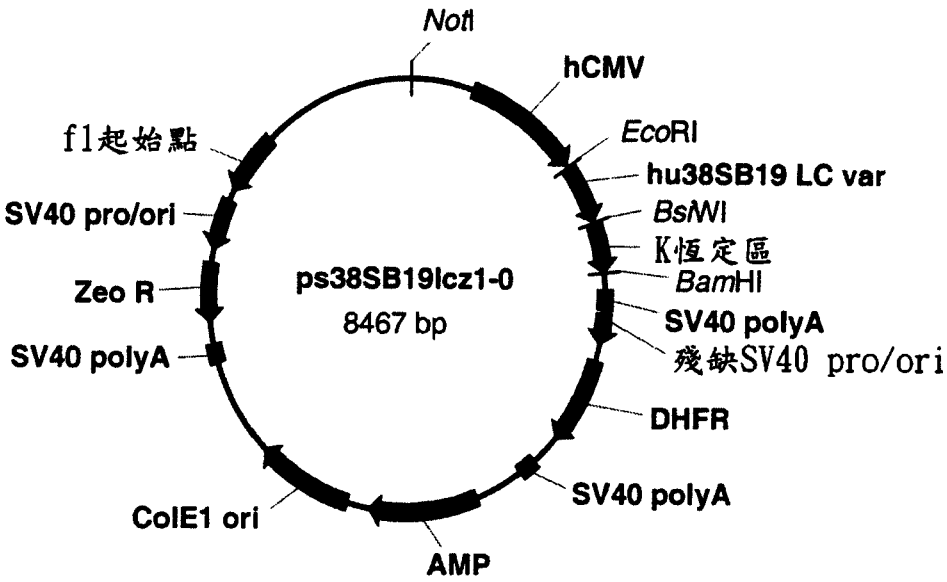

NotI
hCMV
EcoRI
hu38SB19 LC var
BsiWI
K恆定區
BamHI
SV40 polyA
殘缺SV40 pro/ori
DHFR
SV40 polyA
AMP
ColE1 ori
SV40 polyA
Zeo R
SV40 pro/ori
f1起始點
ps38SB19lcz1-0
8467 bp

圖 5A

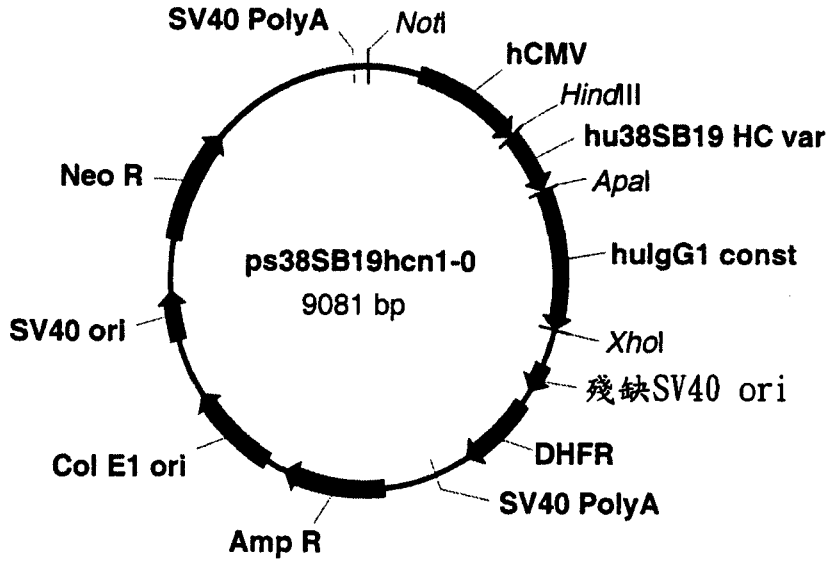

SV40 PolyA
NotI
hCMV
HindIII
hu38SB19 HC var
ApaI
huIgG1 const
XhoI
殘缺SV40 ori
DHFR
SV40 PolyA
Amp R
Col E1 ori
SV40 ori
Neo R
ps38SB19hcn1-0
9081 bp

圖 5B

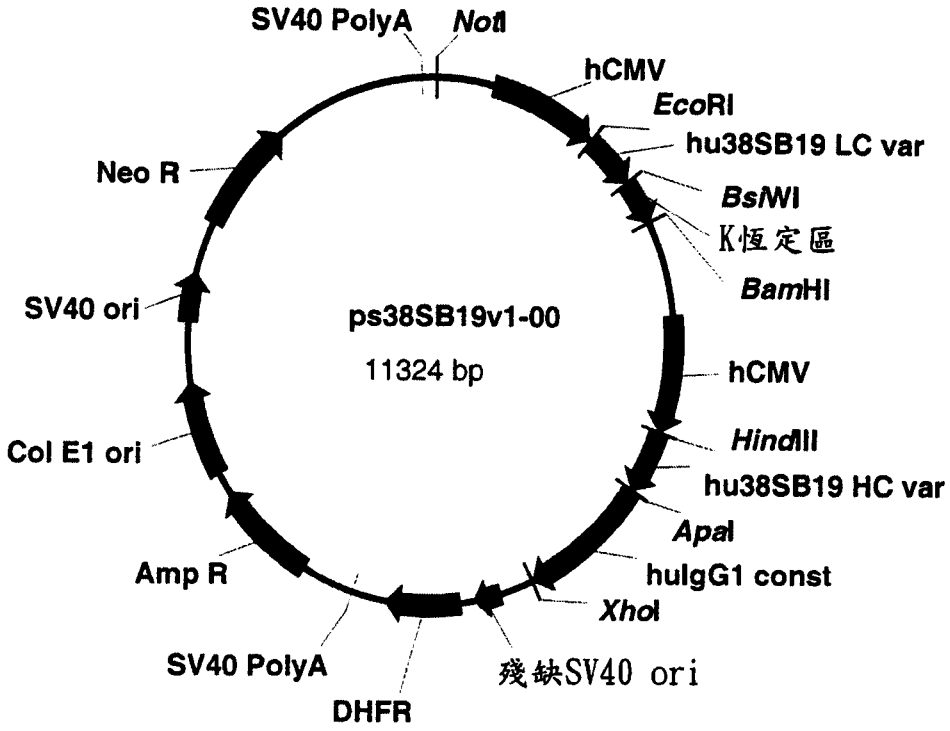

SV40 PolyA
NotI
hCMV
EcoRI
hu38SB19 LC var
BsiWI
K恒定區
BamHI
hCMV
HindIII
hu38SB19 HC var
ApaI
huIgG1 const
XhoI
殘缺SV40 ori
DHFR
SV40 PolyA
Amp R
Col E1 ori
SV40 ori
Neo R
ps38SB19v1-00
11324 bp

圖 5C

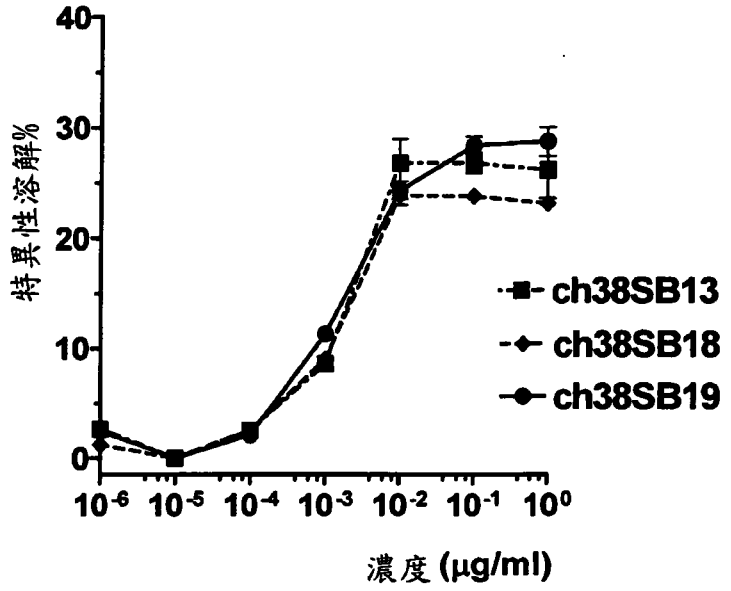

40
30
20
10
0
特異性溶解%
ch38SB13
ch38SB18
ch38SB19
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
濃度 (μg/ml)

圖 6A

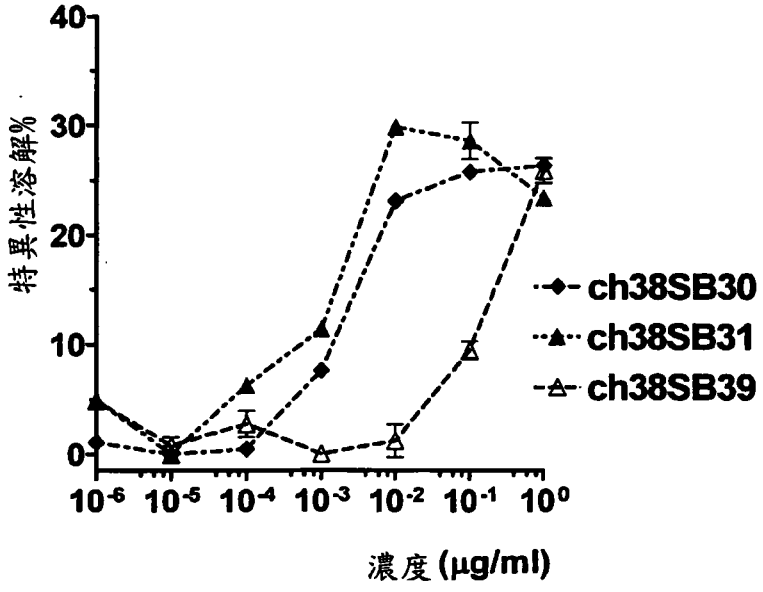

40
30
20
10
0
特異性溶解%
ch38SB30
ch38SB31
ch38SB39
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
濃度 (μg/ml)

圖 6B

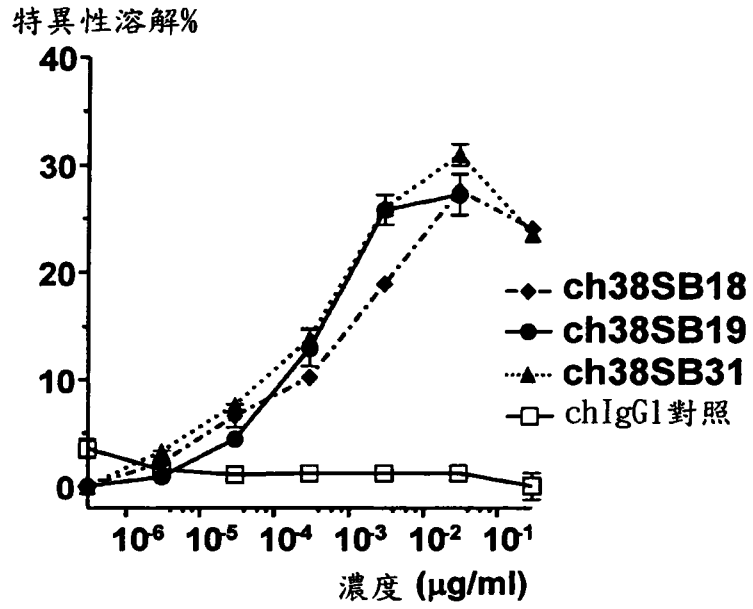

特異性溶解%
40
30
20
10
0
ch38SB18
ch38SB19
ch38SB31
chIgG1對照
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1
濃度 (μg/ml)

圖 7A

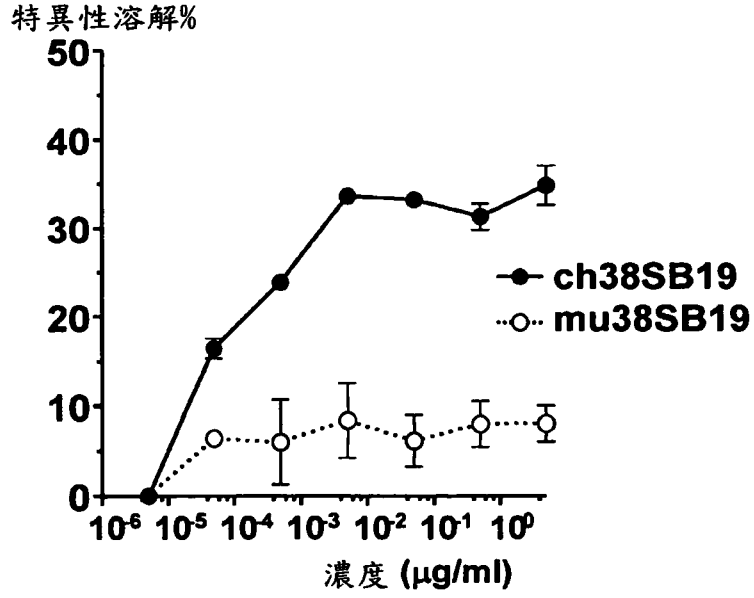

特異性溶解%
50
40
30
20
10
0
ch38SB19
mu38SB19
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
濃度 (μg/ml)

圖 7B

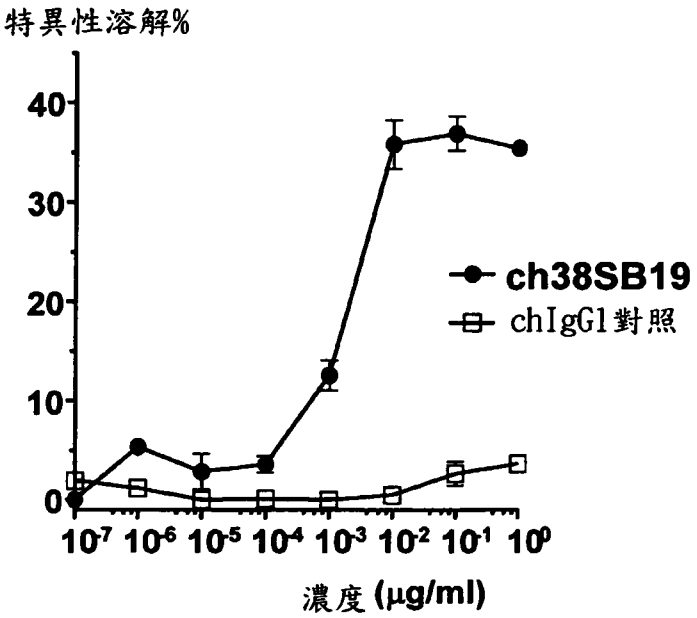

特異性溶解%
40
30
20
10
0
ch38SB19
chIgG1對照
10-7 10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
濃度 (μg/ml)

圖 8A

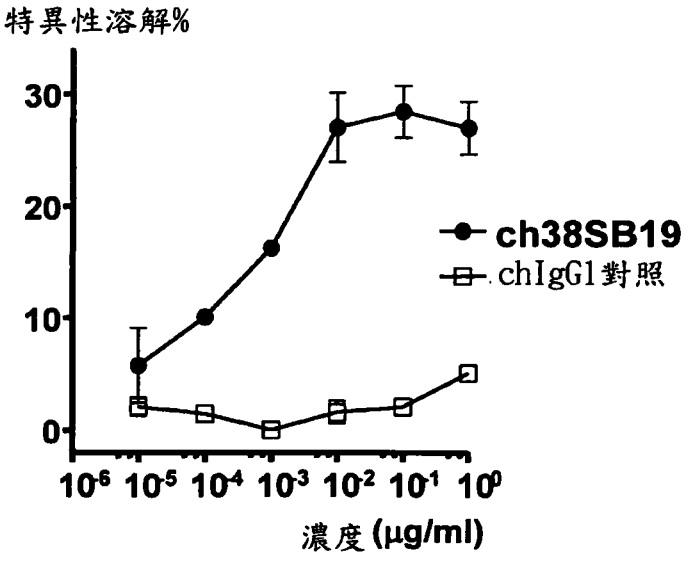

特異性溶解%
30
20
10
0
ch38SB19
chIgG1對照
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
濃度 (μg/ml)

圖 8B

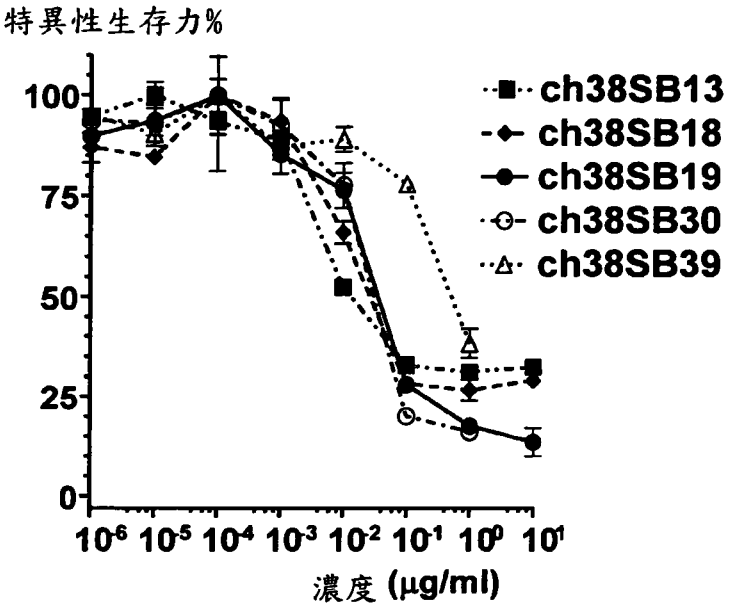

特異性生存力%
100
75
50
25
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101
濃度 (μg/ml)
ch38SB13
ch38SB18
ch38SB19
ch38SB30
ch38SB39

圖 9A

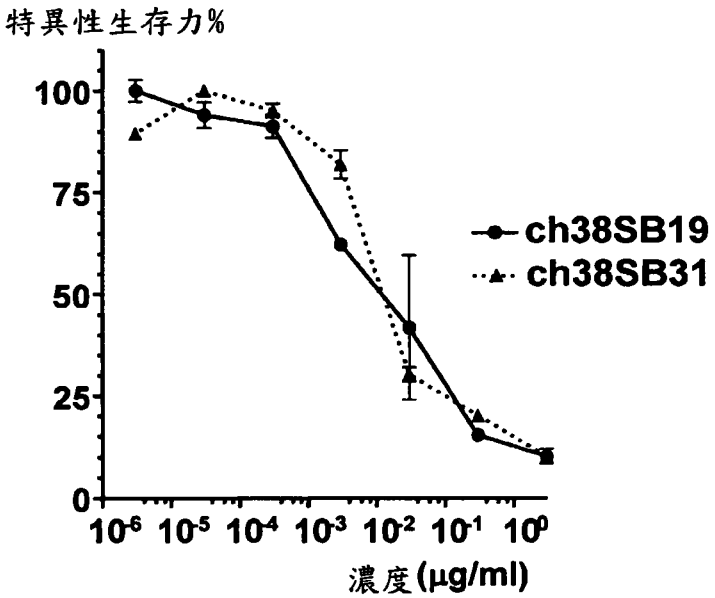

特異性生存力%
100
75
50
25
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
濃度(μg/ml)
ch38SB19
ch38SB31

圖 9B

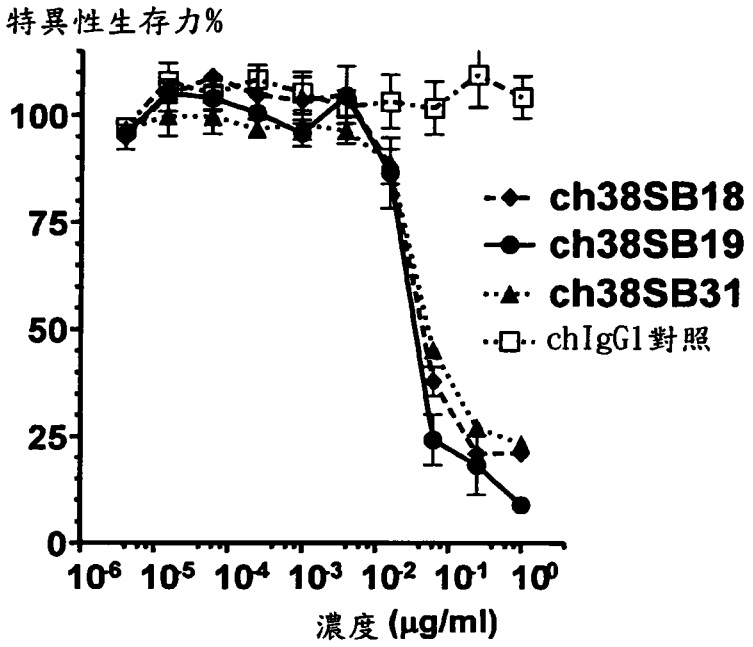

特異性生存力%
100
75
50
25
0
10⁻⁶ 10⁻⁵ 10⁻⁴ 10⁻³ 10⁻² 10⁻¹ 10⁰
濃度 (μg/ml)
ch38SB18
ch38SB19
ch38SB31
chIgG1對照

圖 10

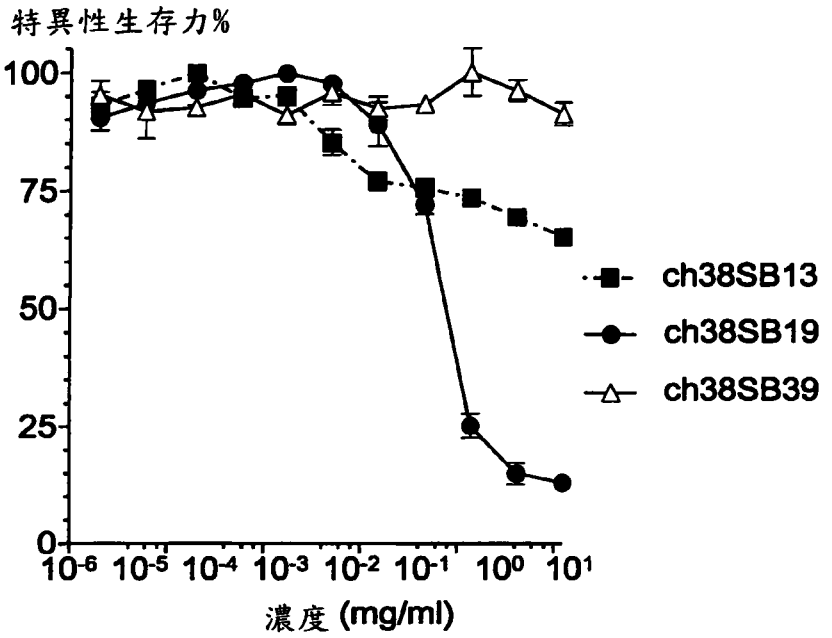

特異性生存力%
100
75
50
25
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101
濃度 (mg/ml)
ch38SB13
ch38SB19
ch38SB39

圖 11A

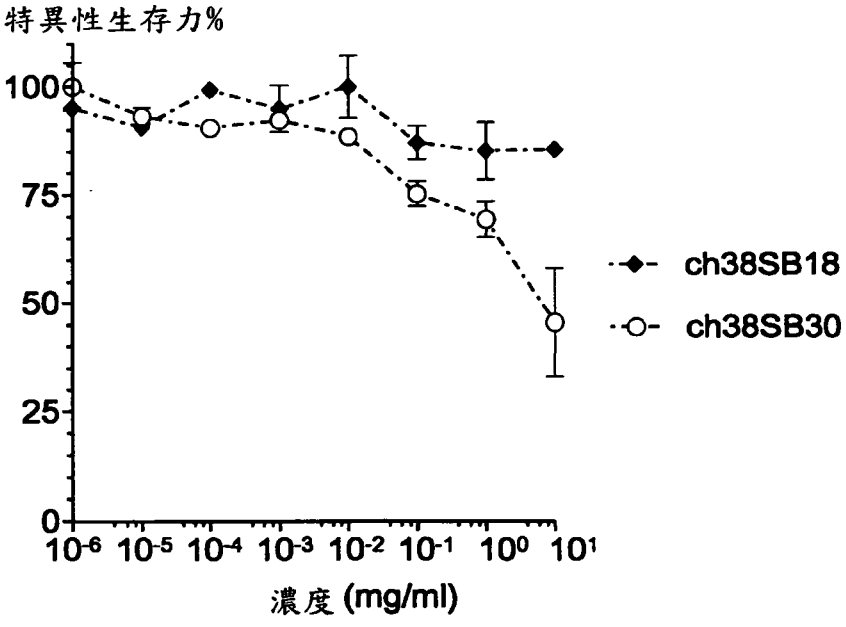

特異性生存力%
100
75
50
25
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101
濃度 (mg/ml)
ch38SB18
ch38SB30

圖 11B

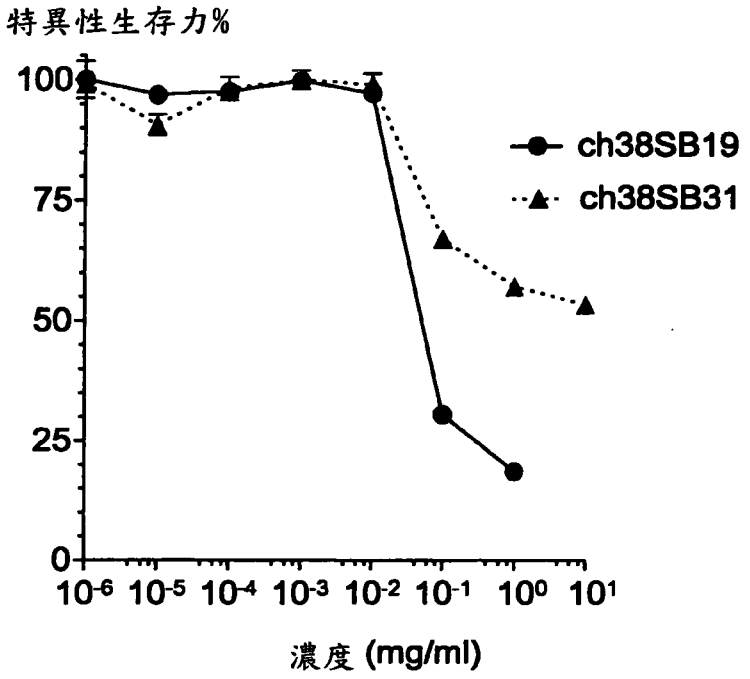

特異性生存力%
100
75
50
25
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100 101
濃度 (mg/ml)
ch38SB19
ch38SB31

圖 11C

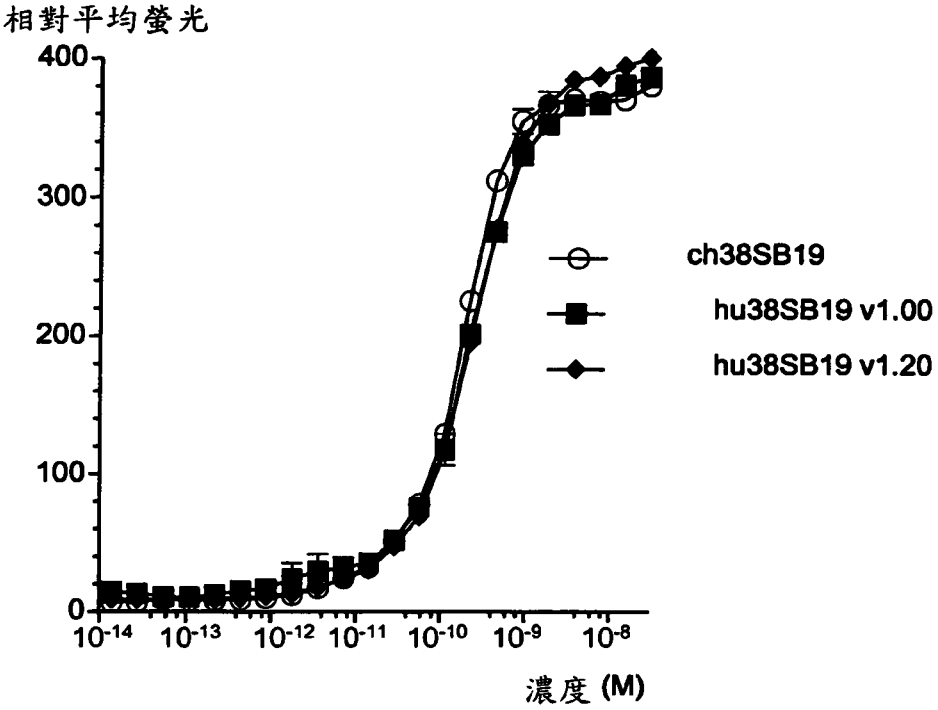

相對平均螢光
400
300
200
100
0
10-14 10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
濃度 (M)
ch38SB19
hu38SB19 v1.00
hu38SB19 v1.20

圖 12A

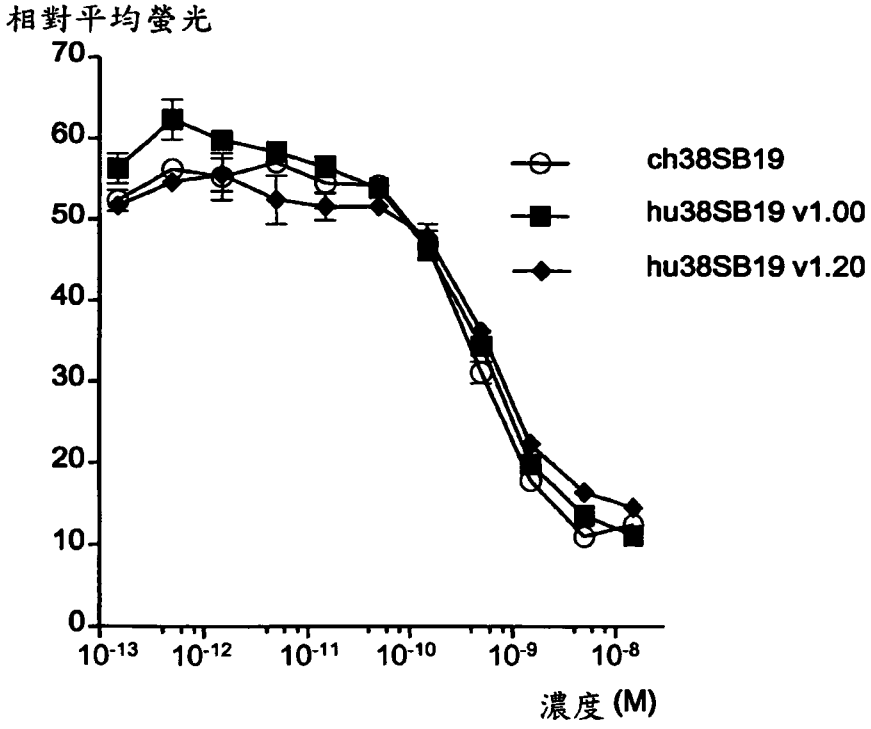

相對平均螢光
70
60
50
40
30
20
10
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8
濃度 (M)
ch38SB19
hu38SB19 v1.00
hu38SB19 v1.20

圖 12B

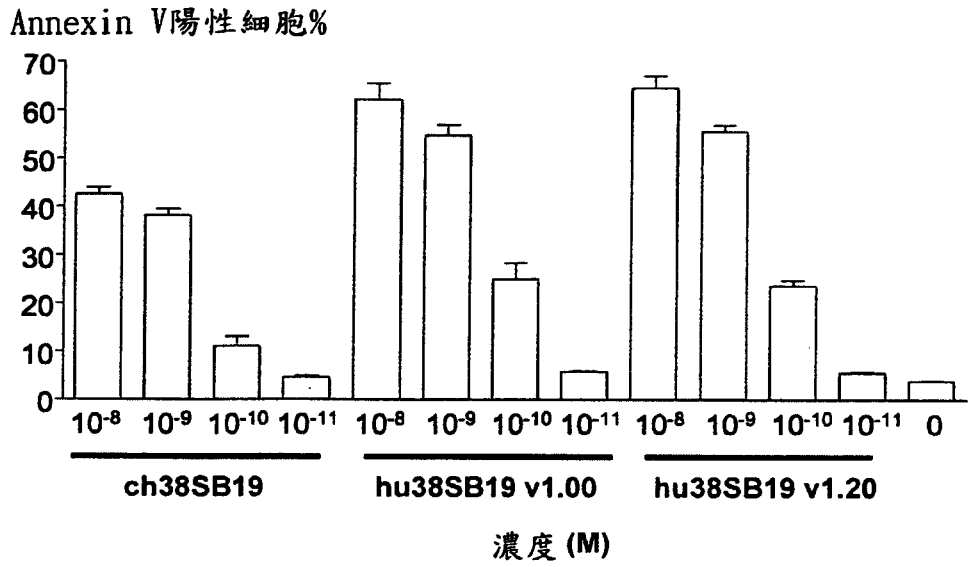

Annexin V陽性細胞%
70
60
50
40
30
20
10
0
10-8 10-9 10-10 10-11 10-8 10-9 10-10 10-11 10-8 10-9 10-10 10-11 0
ch38SB19
hu38SB19 v1.00
hu38SB19 v1.20
濃度 (M)

圖 13

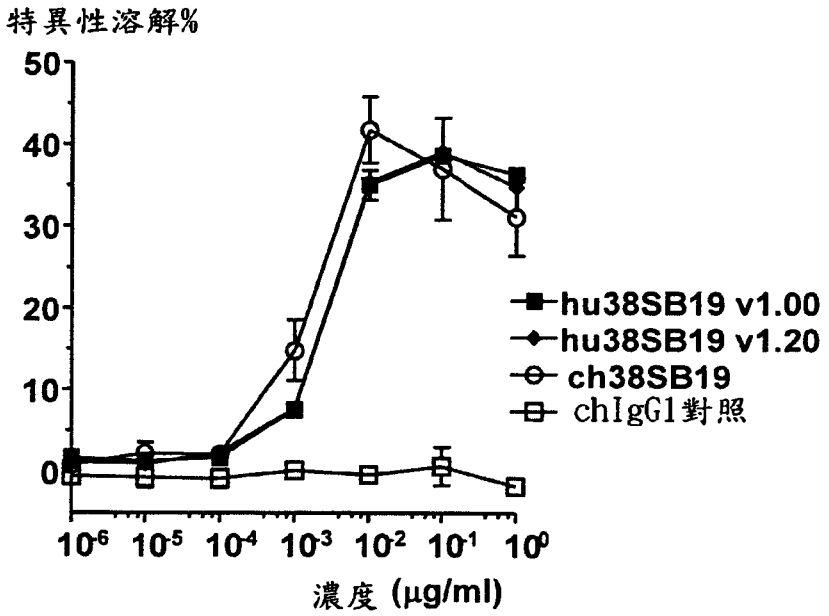

特異性溶解%
50
40
30
20
10
0
10-6 10-5 10-4 10-3 10-2 10-1 100
濃度 (μg/ml)
hu38SB19 v1.00
hu38SB19 v1.20
ch38SB19
chIgG1對照

圖 14

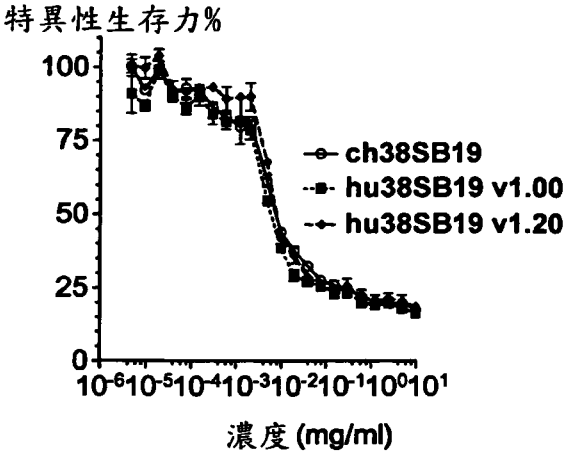


圖 15A

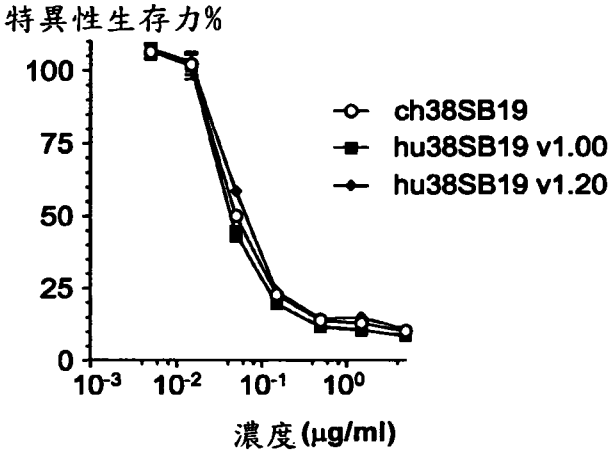


圖 15B

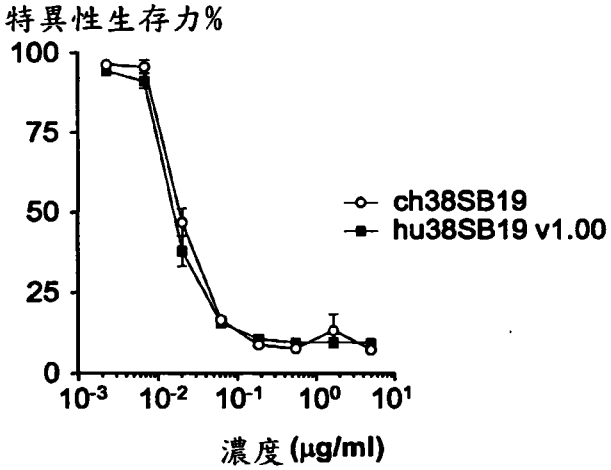


圖 15C

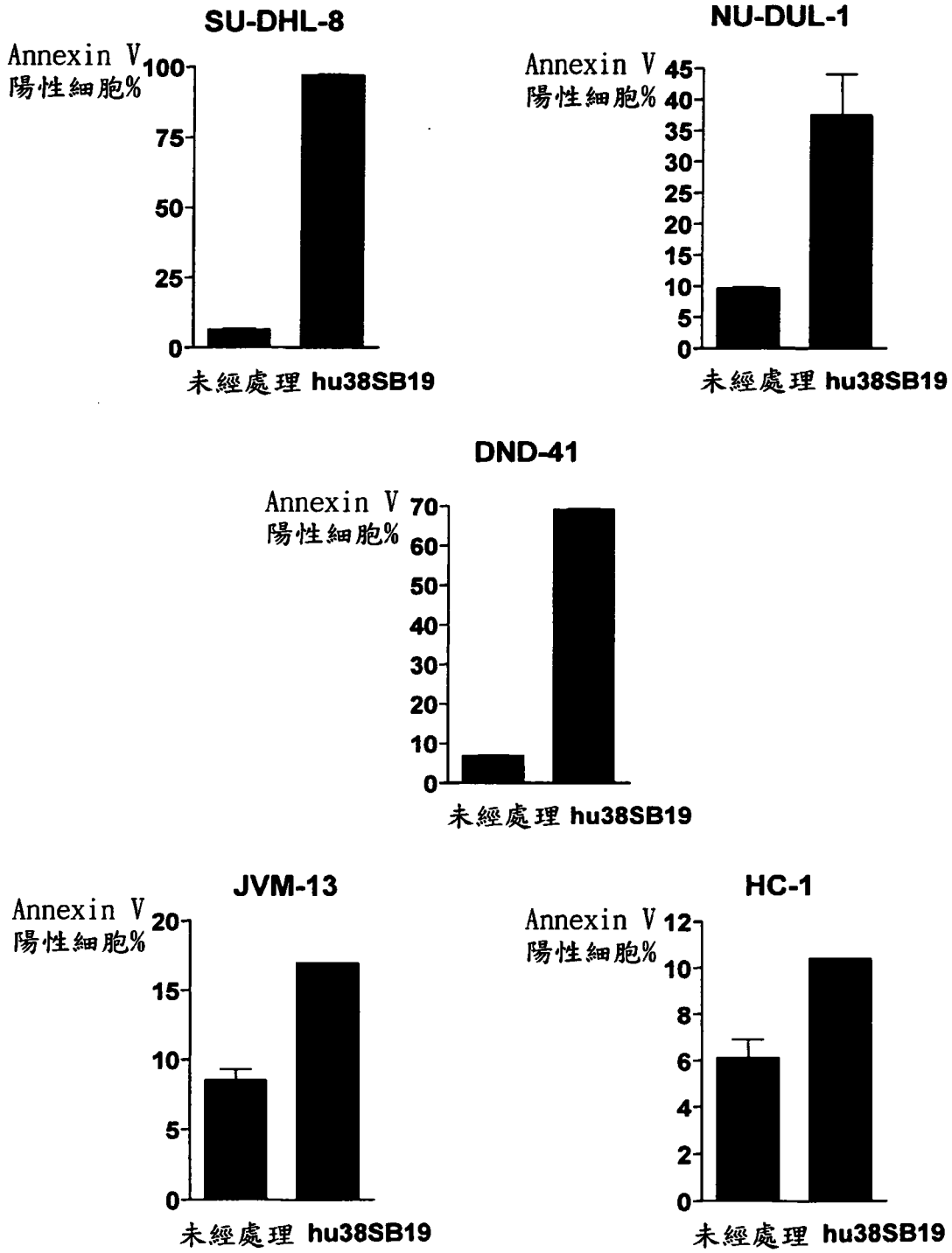

SU-DHL-8
Annexin V 陽性細胞%
100
75
50
25
0
未經處理 hu38SB19
NU-DUL-1
Annexin V 陽性細胞%
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
未經處理 hu38SB19
DND-41
Annexin V 陽性細胞%
70
60
50
40
30
20
10
0
未經處理 hu38SB19
JVM-13
Annexin V 陽性細胞%
20
15
10
5
0
未經處理 hu38SB19
HC-1
Annexin V 陽性細胞%
12
10
8
6
4
2
0
未經處理 hu38SB19

圖 16

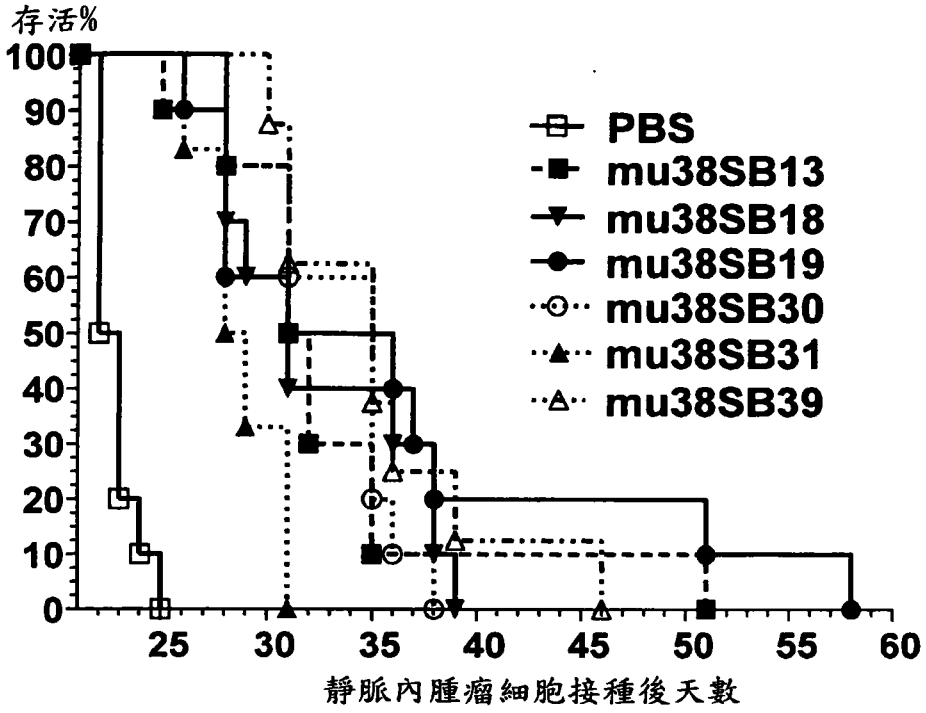

存活%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
25
30
35
40
45
50
55
60
PBS
mu38SB13
mu38SB18
mu38SB19
mu38SB30
mu38SB31
mu38SB39
靜脈內腫瘤細胞接種後天數

圖 17

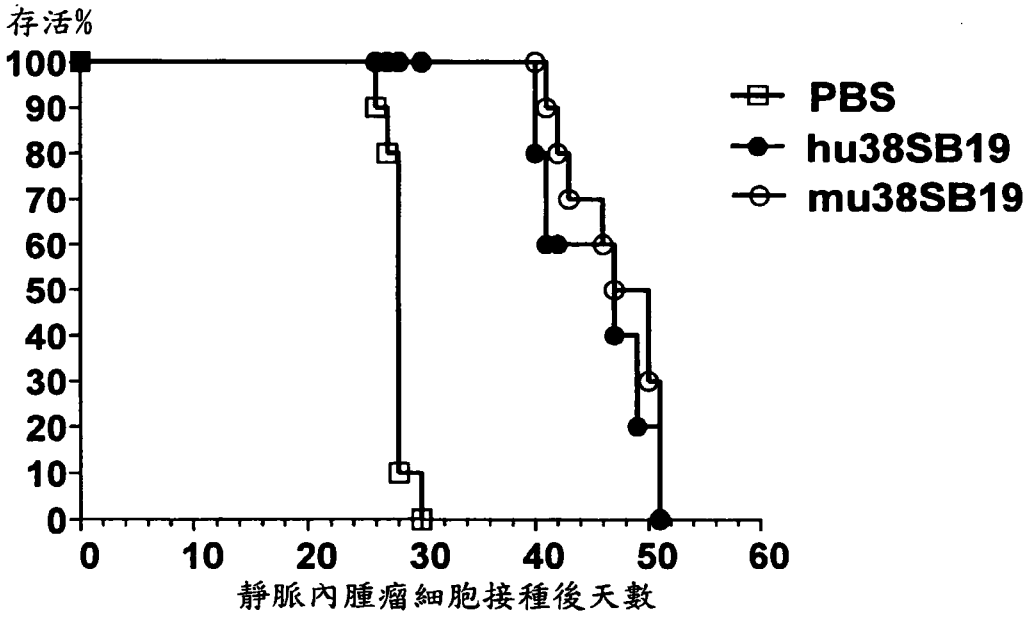

存活%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
PBS
hu38SB19
mu38SB19
靜脈內腫瘤細胞接種後天數

圖 18

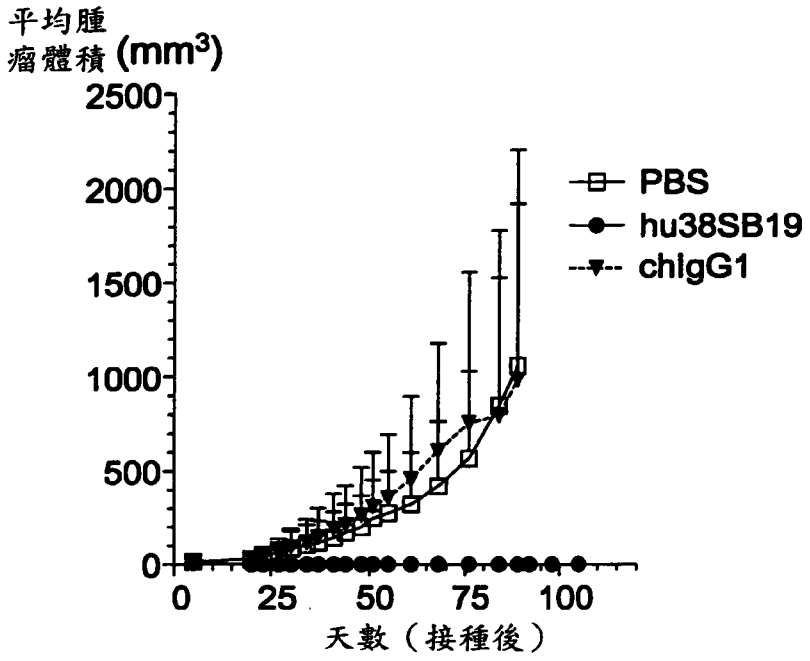

平均腫瘤體積 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
25
50
75
100
天數（接種後）
PBS
hu38SB19
chIgG1

圖 19

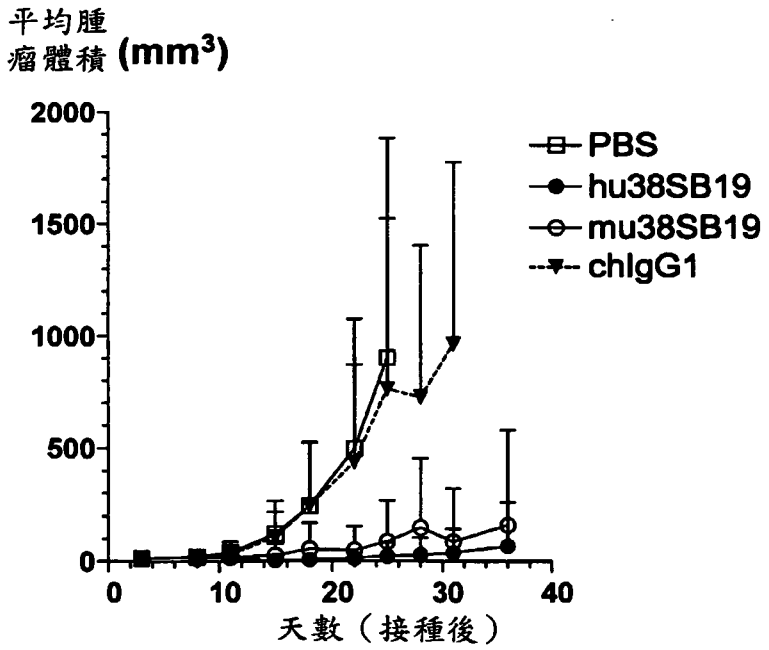

平均腫瘤體積 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
天數（接種後）
PBS
hu38SB19
mu38SB19
chIgG1

圖 20

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1A, 1B）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

申請專利範圍

1. 一種特異性結合CD38之抗體或其抗原決定基(epitope)結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段包含至少一個重鏈及至少一個輕鏈，其中

該重鏈包含三個連續互補決定區，其具有由SEQ ID NO: 25、26及27表示之胺基酸序列，且其中該輕鏈包含三個連續互補決定區，其具有由SEQ ID NO: 28、29及30表示之胺基酸序列。

2. 如請求項1之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠經由細胞凋亡(apoptosis)、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及補體依賴性細胞毒性(CDC)殺死$CD38^+$細胞。

3. 如請求項1或2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素(cytokines)存在下經由細胞凋亡殺死該$CD38^+$細胞。

4. 如請求項1或2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段為單株抗體。

5. 如請求項1或2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該$CD38^+$細胞為淋巴瘤細胞、白血病細胞或多發性骨髓瘤細胞。

6. 如請求項5之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該$CD38^+$細胞為非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma，NHL)細胞、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma，BL)細胞、多發性骨髓瘤(MM)細胞、慢性B淋巴細胞性白血病(B-CLL)細胞、急性B及T淋巴細胞性白血病(ALL)細胞、T細胞淋巴瘤(TCL)細胞、急性骨髓性白血病(AML)細胞、毛細胞白血病(HCL)細胞、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma，HL)細胞或慢性骨髓性白血病

(CML)細胞。

7. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死至少24%之Daudi淋巴瘤細胞。

8. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死7%以上之Ramos淋巴瘤細胞。

9. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死11%以上之MOLP-8多發性骨髓瘤細胞。

10. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死36%以上之SU-DHL-8淋巴瘤細胞。

11. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死62%以上之DND-41白血病細胞。

12. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死27%以上之NU-DUL-1淋巴瘤細胞。

13. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死9%以上之JVM-13白血病細胞。

14. 如請求項2之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體

或其抗原決定基結合片段能夠在無基質細胞或基質衍生之細胞激素存在下經由細胞凋亡殺死4%以上之HC-1白血病細胞。

15. 如請求項1、2及7-14中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段以3×10^{-9} M或更低之k_D結合CD38。

16. 如請求項1之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段包含一個具有由SEQ ID NO: 46組成之胺基酸序列之輕鏈可變區，及包含一個具有由SEQ ID NO: 58組成之胺基酸序列之重鏈可變區。

17. 如請求項1之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段包含至少一個人類恆定區。

18. 如請求項17之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該恆定區為人類IgG1/Igκ恆定區。

19. 如請求項1之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段為人類化或表面重塑(resurfaced)抗體。

20. 如請求項19之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該人類化或表面重塑抗體或其抗原決定基結合片段包含一個具有由SEQ ID NO: 58表示之胺基酸序列之重鏈可變區，及包含一個具有由SEQ ID NO: 46之胺基酸序列之輕鏈可變區。

21. 如請求項1之抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體或其抗原決定基結合片段為一個Fab、Fab'、$F(ab')_2$或Fv片段。

22. 一種人類化或表面重塑抗體或其抗原決定基結合片段，其特徵在於該抗體包含

-輕鏈可變區，其包含選自由SEQ ID NO: 68及70所組成之群之胺基酸序列

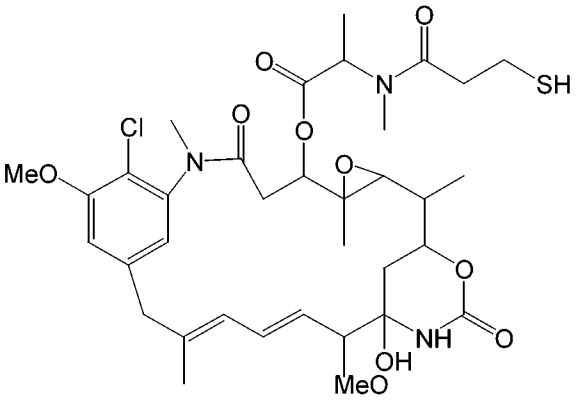
-重鏈可變區，包含具有由SEQ ID NO: 72表示之胺基酸序列。

23. 如請求項1、2、7-14及16-22中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段，其係用作藥劑。

24. 一種結合物，其包含如請求項1至22中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段與一種細胞毒性劑連接。

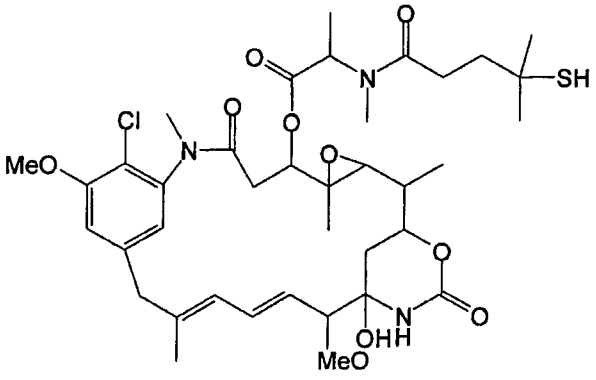
25. 如請求項24之結合物，其特徵在於該細胞毒性劑係選自由美登素類化合物(maytansinoid)、小分子藥物、茅屋黴素(tomaymycin)衍生物、細黴素(leptomycin)衍生物、前藥、紫杉類藥物(taxoid)、CC-1065及CC-1065類似物組成之群。

26. 如請求項25之結合物，其特徵在於該細胞毒性劑為下式之美登素(maytansine) DM1：



。

27. 如請求項25之結合物，其特徵在於該細胞毒性劑為下式之美登素DM4：



。

28. 如請求項25之結合物，其特徵在於該細胞毒性劑為選自由以下組成之群的茅屋黴素衍生物：

8,8'-[1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-甲氧基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[1,5-戊烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[1,4-丁烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[3-甲基-1,5-戊烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[2,6-吡啶二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[4-(3-第三丁氧基羰基胺基丙氧基)-2,6-吡啶二基雙-(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3, 11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(3-胺基丙氧基)-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(N-甲基-3-第三丁氧基羰基胺基丙基)-1,3-苯二基雙-(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3, 11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-{5-[3-(4-甲基-4-甲基二硫基(disulfanyl)-戊醯基胺基)丙氧基]-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)}-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-乙醯基硫基甲基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[(S)-2-亞甲基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c] [1,4]苯并二氮呯-5-酮]

雙-{2-[(S)-2-亞甲基-7-甲氧基-5-側氧基(oxo)-1,3,,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-8-基氧基]-乙基}-胺基甲酸第三丁酯

8,8'-[3-(2-乙醯基硫基乙基)-1,5-戊烷二基雙(氧基)]-雙[(S)-2-亞甲基-7-甲氧基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c] [1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(N-4-巰基-4,4-二甲基丁醯基)胺基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(N-4-甲基二硫基-4,4-二甲基丁醯基)-胺基-1,3-苯二基雙(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(N-甲基-N-(2-巰基-2,2-二甲基乙基)胺基-1,3-苯二基(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3,11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[5-(N-甲基-N-(2-甲基二硫基-2,2-二甲基乙基)胺基-1,3-苯二基(亞甲氧基)]-雙[7-甲氧基-2-亞甲基-1,2,3, 11a-四氫-5H-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(4-(2-(4-巰基-4-甲基)-戊醯胺基-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呯-5-酮]

8,8'-[(1-(2-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-

吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(3-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基-丙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(4-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基-丁氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基)-哌嗪-1-基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基)-哌嗪-1-基]-丙基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基胺基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-乙氧基]-乙氧基}-乙氧基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-

吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(1-(2-[甲基-(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-胺基]-乙氧基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(3-[甲基-(4-甲基-4-甲基二硫基-戊醯基)-胺基] -丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7 -二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]

8,8'-[(4-(3-[甲基-(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-胺基]-丙基)-吡啶-2,6-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]及

8,8'-[(1-(4-甲基-4-甲基二硫基)-戊醯胺基)-苯-3,5-二甲基)-二氧基]-雙[(S)-2-亞乙-(E)-基-7-二甲氧基-1,2,3,11a-四氫-吡咯并[2,1-c][1,4]苯并二氮呼-5-酮]。

29. 如請求項25之結合物，其特徵在於該細胞毒性劑為選自由以下組成之群的細黴素衍生物：

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基硫基-乙基)-醯胺

雙-[(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17 -七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巯基乙基)-醯胺]

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巯基-乙基)-醯胺

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九

碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基二硫基-乙基)-醯胺

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-甲基-2-甲基二硫基-丙基)-醯胺及

(2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-羥基-3,5,7,9,11,15,17-七甲基-19-((2S,3S)-3-甲基-6-側氧基-3,6-二氫-2H-吡喃-2-基)-8-側氧基-十九碳-2,10,12,16,18-五烯酸之(2-巰基-2-甲基-丙基)-醯胺。

30. 如請求項24-29中任一項之結合物，其係用作藥劑。

31. 一種醫藥組合物，其含有如請求項1-22中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段或如請求項24-29中任一項之結合物及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

32. 如請求項31之醫藥組合物，其特徵在於該組合物含有另一種治療劑。

33. 如請求項32之醫藥組合物，其特徵在於該另一種治療劑為表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1(heregulin)、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之拮抗劑；或表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之受體(包括HER2受體、HER3受體、c-MET及其他受體酪胺酸激酶)之拮抗劑。

34. 如請求項32之醫藥組合物，其特徵在於該另一種治療劑為一種對抗一群選自包含下列之分化抗原之抗體：CD3、CD14、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD36、

CD40、CD44、CD52、CD55、CD59、CD56、CD70、CD79、CD80、CD103、CD134、CD137、CD138及CD152。

35. 一種如請求項1-22中任一項之抗體或其抗原決定基結合片段或如請求項24-29中任一項之結合物之用途，其係用於製造用於治療癌症或自體免疫疾病之藥劑。

36. 如請求項35之用途，其特徵在於該癌症係選自由以下組成之群：癌瘤，包括膀胱、乳房、結腸、腎、肝、肺、卵巢、胰腺、胃、子宮頸、甲狀腺及皮膚之癌瘤；包括鱗狀細胞癌；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤及橫紋肌肉瘤；其他腫瘤，包括黑素瘤、精原細胞瘤、畸胎癌、神經母細胞瘤及神經膠質瘤；中樞及周邊神經系統之腫瘤，包括星形細胞瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤及神經鞘瘤；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤及骨肉瘤；及其他腫瘤，包括黑素瘤、著色性乾皮病、角化棘皮瘤、精原細胞瘤、甲狀腺濾泡癌及畸胎癌。

37. 如請求項35之用途，其特徵在於該癌症為淋巴系之造血腫瘤，包括白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、急性淋巴細胞性白血病、急性淋巴母細胞白血病、B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、毛細胞白血病、多發性骨髓瘤、慢性淋巴細胞性白血病；骨髓系之造血腫瘤，包括急性及慢性骨髓性白血病及前髓細胞性白血病。

38. 如請求項35之用途，其特徵在於該癌症為多發性骨髓瘤。

39. 如請求項35之用途，其特徵在於該自體免疫或發炎疾病係選自由以下組成之群：全身性紅斑性狼瘡症、類風濕性關節炎、多發性硬化症、克隆氏病(Crohn's disease)、潰瘍性結腸炎、胃炎、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、強直性脊椎炎、C型肝炎相關之冷凝球蛋白性(cryoglobulinemic)血管炎、慢性局竄

性腦炎、大疱性類天疱瘡、A型血友病、膜性增生性絲球體腎炎、修格蘭氏症候群(Sjogren's syndrome)、成人及青少年皮肌炎、成人多發性肌炎、慢性蕁麻疹、原發性膽汁性肝硬化症、特發性血小板減少性紫癜、視神經脊髓炎、格雷氏甲狀腺機能障礙疾病(Graves' dysthyroid disease)、大疱性類天疱瘡、膜性增生性絲球體腎炎、徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)及哮喘。

40. 如請求項35之用途，其進一步包含另一種治療劑用於製造相同或不同組合物之用途。

41. 如請求項40之用途，其特徵在於該另一種治療劑為纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1(heregulin)、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之拮抗劑；或表皮生長因子(EGF)、纖維母細胞生長因子(FGF)、肝細胞生長因子(HGF)、組織因子(TF)、蛋白質C、蛋白質S、血小板衍生之生長因子(PDGF)、神經調節素-1、巨噬細胞刺激蛋白(MSP)或血管內皮生長因子(VEGF)之受體(包括HER2受體、HER3受體、c-MET及其他受體酪胺酸激酶)之拮抗劑。

42. 如請求項40之用途，其特徵在於該另一種治療劑為一種對抗一群選自下列之分化抗原之抗體：CD3、CD14、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD36、CD40、CD44、CD52、CD55、CD59、CD56、CD70、CD79、CD80、CD103、CD134、CD137、CD138及CD152。

43. 一種診斷已知或懷疑患有表現CD38之癌症之個體中之表現CD38之癌症的活體外方法，該方法包含：

a) 使該患者之細胞與如請求項1-22之抗體或其抗原決定基結合

片段接觸，

b) 測量該抗體或其抗原決定基結合片段與該等細胞之結合，及

c) 將部分(b)中之表現與正常參考個體或標準之表現比較。

44. 如請求項43之方法，其特徵在於該癌症係選自由以下組成之群：癌瘤，包括膀胱、乳房、結腸、腎、肝、肺、卵巢、胰腺、胃、子宮頸、甲狀腺及皮膚之癌瘤；包括鱗狀細胞癌；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤及橫紋肌肉瘤；其他腫瘤，包括黑素瘤、精原細胞瘤、畸胎癌、神經母細胞瘤及神經膠質瘤；中樞及周邊神經系統之腫瘤，包括星形細胞瘤、神經母細胞瘤、神經膠質瘤及神經鞘瘤；間葉源性腫瘤，包括纖維肉瘤、橫紋肌肉瘤及骨肉瘤；及其他腫瘤，包括黑素瘤、著色性乾皮病、角化棘皮瘤、精原細胞瘤、甲狀腺濾泡癌及畸胎癌。

45. 如請求項43之方法，其中該癌症為淋巴系之造血腫瘤，包括白血病、非霍奇金氏淋巴瘤、急性淋巴細胞性白血病、急性淋巴母細胞白血病、B細胞淋巴瘤、T細胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、毛細胞白血病、多發性骨髓瘤、慢性淋巴細胞性白血病；骨髓系之造血腫瘤，包括急性及慢性骨髓性白血病及前髓細胞性白血病。

46. 如請求項43之方法，其特徵在於該等細胞為來自該患者之經冷凍或固定之組織或細胞。

47. 一種聚核苷酸，其編碼一種選自由SEQ ID NO: 46、58、68、70及72組成之群之多肽。

48. 如請求項47之聚核苷酸，其特徵在於該聚核苷酸具有一個序列與一個選自由SEQ ID NO: 45及57組成之群之聚核苷酸享有至少80%同源性。

49. 一種重組載體，其包含核酸，該核酸編碼選自由SEQ ID NO:

46、58、68、70及72所組成之群之多肽，或包含聚核苷酸，該聚核苷酸之特徵在於其與選自由SEQ ID NO: 45及57所組成之群之聚核苷酸享有至少80%同源性，且編碼選自由SEQ ID NO: 46及58所組成之群之多肽之功能性等效物。

50. 一種宿主細胞，其包含如請求項49之載體。