



(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 I878186 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：113133341

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 20 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/28 (2006.01)** **A61K39/395 (2006.01)**
A61K47/68 (2017.01) **A61K35/17 (2025.01)**
A61P35/00 (2006.01) **G01N33/574 (2006.01)**
G01N33/68 (2006.01)

(30)優先權：2017/09/21 世界智慧財產權組織 PCT/CN2017/102631

(71)申請人：中國大陸商上海藥明生物技術有限公司(中國大陸) WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI)
CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：李 競 LI, JING (US)；劉潔穎 LIU, JIEYING (CN)

(74)代理人：陳長文；張哲倫；劉君怡

(56)參考文獻：

WO	2008/022152A2	WO	2009/052431A2
WO	2009/054863A2	WO	2012/010561A1

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：17 共 179 頁

(54)名稱

新型抗 CD19 抗體

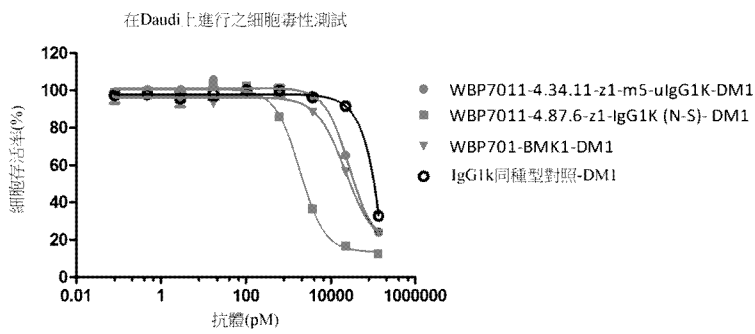
(57)摘要

本發明提供一種抗 CD19 之抗體或其抗原結合片段、編碼其之分離之多核苷酸、包括其之藥物組合物、及其用途。

Provided are anti-CD19 antibodies or antigen-binding fragments thereof, isolated polynucleotides encoding the same, pharmaceutical compositions comprising the same, and the uses thereof.

指定代表圖：

符號簡單說明：
無



【圖11】



I878186

【發明摘要】

【中文發明名稱】

新型抗CD19抗體

【中文】

本發明提供一種抗CD19之抗體或其抗原結合片段、編碼其之分離之多核苷酸、包括其之藥物組合物、及其用途。

【英文】

Provided are anti-CD19 antibodies or antigen-binding fragments thereof, isolated polynucleotides encoding the same, pharmaceutical compositions comprising the same, and the uses thereof.

【指定代表圖】

圖14

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

新型抗CD19抗體

【技術領域】

【0001】 本發明總體上係關於一種新型抗CD19抗體及其用途。

【先前技術】

【0002】 CD19(分化簇19)係表現在B細胞表面上之具有特別結構之細胞表面受體，包括但不限於B細胞淋巴瘤之所有亞型、從惰性型到侵襲型、以及B細胞慢性淋巴細胞白血病與非T細胞急性淋巴細胞白血病、前B細胞、早期發育階段中之B細胞(即未成熟B細胞)、經歷向漿細胞終末分化之成熟B細胞、以及惡性B細胞。CD19由多數前B細胞急性淋巴細胞白血病(ALL)、非霍奇金淋巴瘤、B細胞慢性淋巴細胞白血病(CLL)、促淋巴細胞性白血病、毛細胞白血病、普通型急性淋巴細胞白血病、以及一些零型急性淋巴細胞白血病表現(Nadle等，J. Immunol.，131:244-250 (1983)，Loken等，Blood，70:1316-1324 (1987)，Uckun等，Blood，71:13-29 (1988)，Anderson等，1984. Blood，63:1424-1433 (1984)，Scheuermann，Leuk. Lymphoma，18:385-397 (1995))。CD19在漿細胞上之表現進一步表明其可在分化之B細胞腫瘤上表現，例如多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、瓦爾登斯特倫腫瘤(Grossbard等，Br. J. Haematol.，102:509-15 (1998)；Trean等，Semin. Oncol.，30:248-52 (2003))。CD19亦為推薦用於免疫療法之多種靶標之一。與CD20(另一種B細胞表面受體)不同，CD19被認為在與抗CD19抗體結合時以更高之水平被表現，並且被細胞內化。

【0003】 仍然存在對新型抗CD19抗體之需要，特別是具有優異之內化能力以及高結合親和性之抗CD19抗體。

【發明內容】

【0004】 本申請全文中之冠詞「一種」、「一個」及「上述」在此用於指代一個或多於一個(即至少一個)該冠詞之語法對象。舉例而言，「一種抗體」指一種抗體或多於一種抗體。

【0005】 本申請提供一種新型抗CD19單株抗體、其胺基酸及核苷酸序列、以及其用途。

【0006】 在一個方面，本申請提供一種分離之抗體或其抗原結合片段，其包括一個或多個(例如1、2或3個)選自下組之重鏈互補決定區(CDR)序列：SEQ ID NO: 1、2、3、7、8、9、13、14、15、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、43、44、45、136、140及141，及/或一個或多個(例如1、2或3個)選自下組之κ輕鏈CDR序列：SEQ ID NO: 4、5、6、10、11、12、16、17、18、40、41、42、137、138及139。

【0007】 在某些實施形態中，上述之抗體或其抗原結合片段包括1、2或3個與SEQ ID NO: 1、2、3、7、8、9、13、14、15、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、43、44、45、136、140或141所示之序列具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性之重鏈CDR序列。在某些實施形態中，上述之抗體或其抗原結合片段包括1、2或3個與SEQ ID NO: 4、5、6、10、11、12、16、17、18、40、41、42、137、138或139具有至少

80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性之輕鏈CDR序列。

【0008】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括重鏈可變區，上述重鏈可變區選自下組：

a)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 3之CDR序列；

b)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 9之CDR序列；

c)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14及SEQ ID NO: 15之CDR序列；

d)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20及SEQ ID NO: 21之CDR序列；

e)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 24之CDR序列；

f)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26及SEQ ID NO: 27之CDR序列；

g)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29及SEQ ID NO: 30之CDR序列；

h)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32及SEQ ID NO: 33之CDR序列；

i)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35及SEQ ID NO: 36之CDR序列；

j)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 37、SEQ ID

NO: 38及SEQ ID NO: 39之CDR序列；

k)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44及SEQ ID NO: 45之CDR序列；

l)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 3之CDR序列；

m)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 140及SEQ ID NO: 9之CDR序列；及

n)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141及SEQ ID NO: 15之CDR序列。

【0009】在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括κ輕鏈可變區，上述κ輕鏈可變區選自下組：

a)κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

b)κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12之CDR序列；

c)κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18之CDR序列；

d)κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41及SEQ ID NO: 42之CDR序列；及

e)κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 138及SEQ ID NO: 139之CDR序列。

【0010】在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：

a)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 3之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

b)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 9之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12之CDR序列；

c)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14及SEQ ID NO: 15之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18之CDR序列；

d)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20及SEQ ID NO: 21之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

e)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 24之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

f)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26及SEQ ID NO: 27之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

g)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29及SEQ ID NO: 30之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

h)重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 31、SEQ ID

NO: 32及SEQ ID NO: 33之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

i) 重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35及SEQ ID NO: 36之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

j) 重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38及SEQ ID NO: 39之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41及SEQ ID NO: 42之CDR序列；

k) 重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44及SEQ ID NO: 45之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之CDR序列；

l) 重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 3之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 138及SEQ ID NO: 139之CDR序列；

m) 重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 140及SEQ ID NO: 9之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11及SEQ ID NO: 12之CDR序列；或

n) 重鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 141及SEQ ID NO: 15之CDR序列；以及κ輕鏈可變區，其包括1、2或3個選自SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17及SEQ ID NO: 18之CDR序

列。

【0011】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：重鏈CDR3序列，上述重鏈CDR3序列選自：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 39及SEQ ID NO: 45。

【0012】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：

a)重鏈CDR1序列，上述重鏈CDR1序列選自：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 43及SEQ ID NO: 136；

b)重鏈CDR2序列，上述重鏈CDR2序列選自：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 140及SEQ ID NO: 141；及

c)重鏈CDR3序列，上述重鏈CDR3序列選自：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 39及SEQ ID NO: 45。

【0013】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：

a)輕鏈CDR1序列，上述輕鏈CDR1序列選自：SEQ ID NO: 4、SEQ

ID NO: 10、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 40及SEQ ID NO: 137；

b)輕鏈CDR2序列，上述輕鏈CDR2序列選自：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 41及SEQ ID NO: 138；及

c)輕鏈CDR3序列，上述輕鏈CDR3序列選自：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 42及SEQ ID NO: 139。

【0014】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：

a)重鏈CDR1序列，上述重鏈CDR1序列選自：SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 43及SEQ ID NO: 136；

b)重鏈CDR2序列，上述重鏈CDR2序列選自：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 140及SEQ ID NO: 141；

c)重鏈CDR3序列，上述重鏈CDR3序列選自：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 39及SEQ ID NO: 45；

d)輕鏈CDR1序列，上述輕鏈CDR1序列選自：SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 40及SEQ ID NO: 137；

e)輕鏈CDR2序列，上述輕鏈CDR2序列選自：SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 41及SEQ ID NO: 138；及

f) 輕鏈CDR3序列，上述輕鏈CDR3序列選自：SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 42及SEQ ID NO: 139。

【0015】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段進而包括：一個或多個(例如1、2、3或4個)選自下組之重鏈框架區(FR)序列：SEQ ID NO: 54、55、56、57、70、71、72、73、86、87、88及89，及/或一個或多個(例如1、2、3或4個)選自下組之κ輕鏈框架區(FR)序列：SEQ ID NO: 58、59、60、61、74、75、76、77、90、91、92及93。

【0016】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段進而包括：重鏈FR1序列，上述重鏈FR1選自SEQ ID NO: 54、70及86；重鏈FR2序列，上述重鏈FR2選自SEQ ID NO: 55、71及87；重鏈FR3序列，上述重鏈FR3選自SEQ ID NO: 56、72及88；以及重鏈FR4序列，上述重鏈FR4選自SEQ ID NO: 57、73及89。

【0017】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段進而包括：輕鏈FR1序列，上述輕鏈FR1選自SEQ ID NO: 58、74及90；輕鏈FR2序列，上述輕鏈FR2選自SEQ ID NO: 59、75及91；輕鏈FR3序列，上述輕鏈FR3選自SEQ ID NO: 60、76及92；以及輕鏈FR4序列，上述輕鏈FR4選自SEQ ID NO: 61、77及93。

【0018】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：重鏈可變區，上述重鏈可變區選自下組：SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、SEQ ID

NO: 128、SEQ ID NO: 132及與其具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性之同源序列。

【0019】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：輕鏈可變區，上述輕鏈可變區選自下組：SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 134及與其具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性之同源序列。

【0020】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括選自下組之重鏈可變區序列之全部或一部分：SEQ ID NO: 94、98、102、106、108、110、112、114、116、118、122、124、128及132；及/或選自下組之輕鏈可變區序列之全部或一部分：SEQ ID NO: 100、104、120、126、130及134。在一個實施形態中，上述抗體或其抗原結合片段係由選自下組之重鏈可變區序列之全部或一部分組成之單域抗體：SEQ ID NO: 94、98、102、106、108、110、112、114、116、118、122、124、128及132。

【0021】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括：

a)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 94；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

b)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 98；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 100；

c)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 102；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 104；

d)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 106；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

e)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 108；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

f)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 110；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

g)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 112；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

h)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 114；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

i)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 116；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

j)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 118；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 120；

k)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 122；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 96；

l)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 124；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 126；

m)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 128；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 130；或

n)重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 132；以及κ輕鏈可變區，其包括

SEQ ID NO: 134。

【0022】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段進而包括一個或多個胺基酸殘基置換，但仍然保持與CD19之特異性結合親和性。

【0023】 在某些實施形態中，上述置換在一個或多個CDR序列裏、及/或在一個或多個FR序列裏，在一個或兩個可變區序列裏、及/或在Fc區。在某些實施形態中，在CDR序列裏、在FR序列裏、在可變區序列裏或在Fc區之上述置換中之至少一個(或全部)包括保守性置換。

【0024】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段在選自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、37、38、39、40、41、42、43、44、45、136、137、138、139、140及141之一個或多個CDR序列中包括不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基置換。

【0025】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段在選自SEQ ID NO: 54、55、56、57、58、59、60、61、70、71、72、73、74、75、76、77、86、87、88、89、90、91、92及93之一個或多個FR序列中包括不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基置換。在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段在選自SEQ ID NO: 94、98、102、106、108、110、112、114、116、118、122、124、128及132之重鏈可變區序列之CDR序列及/或FR序列中包括總共不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個置換。在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段在選自SEQ ID NO: 96、100、104、

120、126、130及134之輕鏈可變區序列之所有FR序列中包括不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基置換。

【0026】 在某些實施形態中，上述置換賦予一種或多種需要之性質，上述需要之性質選自：a)提高與CD19之結合親和性，b)引入或移除糖基化位點，c)引入游離之半胱胺酸殘基，d)提高或降低ADCC或CDC，e)增加血清半衰期，及f)增加FcRn結合。

【0027】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段進而包括免疫球蛋白恆定區。在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括IgG之恆定區。在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段包括鼠IgG1、鼠IgG2a、鼠IgG2b或人IgG1之恆定區。

【0028】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段為非人(例如鼠科或啮齒類動物)抗體或人源化抗體。

【0029】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段為駱駝化單域抗體(camelized single chain domain antibody)、雙功能抗體(diabody)、scFv、scFv二聚體、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv'、Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')₂、雙特異性抗體、ds雙功能抗體(ds diabody)、奈米抗體、域抗體或雙價域抗體。

【0030】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段具有雙特異性。

【0031】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段與一種或多種結合物連接。在某些實施形態中，上述結合物包括化療劑、毒素、放射性同位素、鏷系元素、發光標記、螢光標記、或酶受質標記。在某些實施形態中，上述結合物為毒素。在某些實施形態中，上述毒素為

細胞毒素、DNA烷化劑、拓撲異構酶抑制劑、微管蛋白結合劑、或其他抗癌藥物。在某些實施形態中，上述抗癌藥物為美登素類細胞毒性劑。在某些實施形態中，上述毒素為DM1。

【0032】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段能夠特異性地與CD19結合。在某些實施形態中，上述CD19源自小鼠、大鼠、猴或人。

【0033】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段能夠以不超過 5×10^{-9} M、不超過 1×10^{-9} M、不超過 9×10^{-10} M、不超過 8×10^{-10} M、不超過 7×10^{-10} M、不超過 6×10^{-10} M、不超過 5×10^{-10} M、不超過 4×10^{-10} M、不超過 3×10^{-10} M、不超過 2×10^{-10} M、不超過 1×10^{-10} M之 K_D 值特異性地與表現在細胞上之人CD19結合，上述 K_D 係藉由流式細胞術測定。

【0034】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段能夠以不超過0.04 nM、不超過0.05 nM、不超過0.1 nM、不超過0.2 nM、不超過0.3 nM、不超過0.4 nM、不超過0.5 nM、不超過0.5 nM、不超過0.6 nM、不超過0.7 nM、不超過0.8 nM、不超過0.9 nM或不超過1 nM之 EC_{50} 值特異性地與表現在細胞上之人CD19結合，上述 EC_{50} 值係藉由流式細胞術測定。

【0035】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段能夠以不超過0.2 nM、不超過0.5 nM、不超過0.8 nM、不超過1 nM、不超過2 nM或不超過3 nM之 EC_{50} 值特異性地與表現在細胞上之食蟹猴CD19結合，上述 EC_{50} 值係藉由流式細胞術測定。

【0036】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體或其抗原結合片段

能夠以不超過1 pM、不超過2 pM、不超過3 pM、不超過4 pM、不超過5pM、不超過6 pM、不超過7 pM、不超過8 pM、不超過9 pM、不超過10 pM、不超過11 pM、不超過12 pM、不超過13 pM、不超過14 pM、不超過15 pM、不超過16 pM、不超過17 pM、不超過18 pM、不超過19 pM、不超過20 pM、不超過21 pM、不超過22 pM、不超過23 pM、不超過24 pM、不超過25 pM、不超過30 pM、不超過35 pM、不超過40 pM、不超過45 pM、不超過50 pM之EC₅₀值被表現CD19之細胞內化，上述EC₅₀值係藉由Fab-Zap法測定。

【0037】 在一個方面，本申請提供一種抗體或其抗原結合片段，其與W7011-4.155.8、W7011-4.202.9或W7011-4.225.7競爭相同之表位。

【0038】 在一個方面，本申請進而提供一種藥物組合物，其包括本申請所述之抗體或其抗原結合片段以及藥學上容許之載劑。在某些實施形態中，上述藥物組合物進而包括第二藥劑，其能夠提高上述抗體或其抗原結合片段之治療效果，及/或能夠降低上述抗體或其抗原結合片段之副作用。

【0039】 在一個方面，本申請進而提供一種分離之多核苷酸，其編碼本申請所述之抗體或其抗原結合片段。在某些實施形態中，上述分離之多核苷酸包括選自下組之核苷酸序列：SEQ ID NO: 95、99、103、107、109、111、113、115、117、119、123、125、129及133，及/或選自下組之核苷酸序列：SEQ ID NO: 97、101、105、121、127、131及135，或與其具有至少80%(例如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)序列同一性但編碼同一蛋白序列之同源序列。

【0040】 在一個方面，本申請進而提供一種包括上述分離之多核苷酸之載體。

【0041】 在一個方面，本申請進而提供一種包括上述載體之宿主細胞。

【0042】 在一個方面，本申請進而提供一種表現本申請所述之抗體或其抗原結合片段之方法，其包括在表現上述多核苷酸之條件下培養上述宿主細胞。

【0043】 在一個方面，本申請進而提供一種抗體-藥物結合物，其包括一個或多個藥物部分，上述藥物部分直接或經由連接子共價連接至本申請所述之抗體或其抗原結合片段。在某些實施形態中，上述連接子為脰連接子、二硫連接子、雙官能連接子、二肽連接子、葡糖苷酸連接子、硫醚連接子。在某些實施形態中，上述連接子為SMCC。

【0044】 在某些實施形態中，至少一個藥物部分連接至本申請所述之抗體或其抗原結合片段之特定定位點。在某些實施形態中，上述特定定位點為半胱胺酸殘基。在某些實施形態中，上述藥物部分為細胞毒素或放射性同位素。在某些實施形態中，上述藥物部分為毒素，可選地為細胞毒素、DNA烷化劑、拓撲異構酶抑制劑、微管蛋白結合劑、或其他抗癌藥物，可選地為美登素類細胞毒性劑，可選地，上述毒素為DM1。

【0045】 在一個方面，本申請進而提供一種藥物組合物，其包括本申請所述之抗體或其抗原結合片段、或本申請提供之抗體-藥物結合物、以及藥學上容許之載劑。

【0046】 在一個方面，本申請進而提供一種在受試者中治療與CD19相關之疾病或狀況之方法，其包括向上述受試者施用治療有效量之

本申請所述之抗體或其抗原結合片段、本申請所述之抗體-藥物結合物、或本申請所述之藥物組合物。在某些實施形態中，上述受試者為人類。在某些實施形態中，上述施用係經由口服、鼻內、靜脈內、皮下、舌下或肌肉內施用。在某些實施形態中，上述疾病或狀況為癌症。在某些實施形態中，上述癌症為淋巴瘤、肺癌、肝癌、宮頸癌、結腸癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、黑色素瘤、膠質母細胞瘤、前列腺癌、食道癌或胃癌。在某些實施形態中，上述疾病或狀況為B細胞淋巴瘤，可選地為霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤，其中上述非霍奇金淋巴瘤包括：瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤(MZL)、黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(MALT)、小淋巴細胞性淋巴瘤(慢性淋巴細胞白血病，CLL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、或瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(WM)。

【0047】 在一個方面，本申請進而提供一種在表現CD19之細胞中調節CD19活性之方法，其包括將上述表現CD19之細胞暴露於本申請所述之抗體或其抗原結合片段。

【0048】 在一個方面，本申請進而提供一種在體內或體外殺死表現CD19之細胞之方法，其包括將上述表現CD19之細胞與本申請所述之抗體-藥物結合物接觸。

【0049】 在一個方面，本申請進而提供一種檢測樣品中CD19之存在或含量之方法，其包括將上述樣品與本申請所述之抗體或其抗原結合片段接觸，以及確定樣品中CD19之存在或含量。

【0050】 在一個方面，本申請進而提供一種診斷在受試者中與CD19相關之疾病或狀況之方法，其包括：a)獲取來自上述受試者之樣

品；b)將上述樣品與本申請所述之抗體或其抗原結合片段接觸；c)確定在上述樣品中CD19之存在或含量；及d)將上述CD19之存在或含量與上述受試者之疾病或狀況相關聯。

【0051】 在一個方面，本申請進而提供一種本申請所述之抗體或其抗原結合片段在製備用於治療受試者中之疾病或狀況之藥物中之用途，其中上述治療包括：向上述受試者施用治療有效量之上述抗體或其抗原結合片段。

【0052】 在一個方面，本申請進而提供一種本申請所述之抗體或其抗原結合片段在製備用於檢測與CD19相關之疾病或狀況之診斷試劑中之用途。

【0053】 在一個方面，本申請提供一種嵌合抗原受體(CAR)，其包括本申請所述之抗原結合片段與T細胞活化部分。在某些實施形態中，上述T細胞活化部分包括T細胞受體(TCR)之天然T細胞活化部分。在某些實施形態中，上述T細胞活化部分包括TCR之跨膜結構域與TCR之胞內信號轉導結構域。在某些實施形態中，上述抗原結合片段為scFv。

【0054】 在一個方面，本申請提供一種編碼本申請所述之CAR之核酸序列。在某些實施形態中，上述核酸序列包括編碼本申請所述之抗體之抗原結合片段之第一多核苷酸序列，上述第一多核苷酸序列可操作地連接至編碼上述TCR之跨膜結構域與TCR之胞內信號轉導結構域之第二多核苷酸序列。

【0055】 在一個方面，本申請提供一種載體，其包括編碼本申請所述之CAR之核酸序列。

【0056】 在一個方面，本申請提供一種分離之T細胞，其表現本申

請所述之CAR。

【0057】 在一個方面，本申請提供一種用於在受試者中激活T細胞介導之針對表現CD19之靶標之免疫反應之方法，上述方法包括向上述受試者施用有效量之本申請所述之T細胞。

【圖式簡單說明】

【0058】

圖1表示WBP701-BMK1與WBP701-BMK2之SDS-PAGE。M：蛋白標記；1道：BMK1，還原條件；2道：BMK2，還原條件；3道：BMK1，非還原條件；4道：BMK4，非還原條件。

圖2表示WBP701-BMK3之SDS-PAGE。M：蛋白標記；1道：BMK3，還原條件；2道：BMK3，非還原條件。

圖3A表示在人CD19轉染之293F細胞系(WBP701.293F.hPro1.FL.A2)中CD19表現之流式細胞直方圖。左邊之峰代表陰性對照信號。向右偏移之峰代表被檢測之細胞系中之CD19表現。

圖3B表示在人CD19轉染之CHO-K1細胞系(WBP701.CHO-K1.hPro1.FL.B4)中CD19表現之流式細胞直方圖。左邊之峰代表陰性對照信號。向右偏移之峰代表被檢測之細胞系中之CD19表現。

圖3C表示在食蟹猴CD19轉染之293細胞系(WBP701.293F.cpro1.FL.C1)中CD19表現之流式細胞直方圖。左邊之峰代表陰性對照信號。向右偏移之峰代表被檢測之細胞系中之CD19表現。

圖3D表示在食蟹猴CD19轉染之CHO-K1細胞系(WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9)中CD19表現之流式細胞直方圖。左邊之峰代表陰性對照信號。向右偏移之峰代表被檢測之細胞系中之CD19表現。

圖4A-4F表示藉由FACS測定之所選取之亞純系與Ramos細胞之結合。

圖5A-5C表示藉由FACS測定之所選取之亞純系與表現食蟹猴CD19之細胞(WBP701.CHO-K11.cynoPro1)之結合。

圖6A-6E表示所選取之亞純系之Fab-Zap測定。

圖7A-7C表示藉由FACS測定之針對BMK1、BMK2及BMK3抗體之候選抗體分組。

圖8表示藉由FACS測定之抗體WBP7011-4.34.11-z1-m5-IgG1k與Ramos細胞結合之Scarchard結合親和性分析。

圖9表示藉由FACS測定之抗體WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)與Ramos細胞結合之Scarchard結合親和性分析。

圖10表示藉由FACS測定之抗體W7011-4.155.8-z1-uIgG1K與Ramos細胞之Scarchard結合親和性分析。

圖11表示在Daudi細胞上進行之人源化之抗體-藥物結合物W7011-4.155.8-z1-uIgG1K-DM1與WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1之細胞毒性測試。

圖12表示在Nalm-6細胞上進行之人源化之抗體-藥物結合物WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1之細胞毒性測試。

圖13表示在WSU-DLCL2細胞上進行之人源化之抗體-藥物結合物W7011-4.155.8-z1-uIgG1K-DM1與WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1之細胞毒性測試。

圖14表示基準抗體(W7011-BMK1-DM1)、以及抗體(W7011-4.87.6-z1-uIgG1k (N-S)-DM1)之抗腫瘤效力，資料表示帶有Nalm-6淋巴細胞癌

症異種移植之雌性CB17-SCID小鼠之不同處理組中之腫瘤體積。資料點表示平均值+SEM。箭頭表示投予天數。

【實施方式】

【0059】 本申請之以下描述僅為說明本申請之多種實施形態。因此，此處討論之具體修改形態不應理解為對申請範圍之限制。本領域之技術人員在不偏離本申請範圍之情況下即可很容易地得出多種等同形態、變化及修改，應理解此種等同實施形態包括在本發明範圍內。在本申請中引用之所有文獻，包括公開出版物、專利及專利申請均藉由引用之方式全文併入。

【0060】

定義

本發明中之「抗體」一詞包括任意可結合某特定抗原之免疫球蛋白、單株抗體、多株抗體、多價抗體、雙價抗體、單價抗體、多特異性抗體或雙特異性抗體。一個天然之完整抗體包含兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈。哺乳動物之重鏈可分為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ ，每條重鏈由一個可變區(V_H)以及第一、第二及第三恆定區(分別為 C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3})組成；哺乳動物之輕鏈可分為 λ 或 κ ，每條輕鏈由一個可變區(分別為 λ 輕鏈之 V_L 或 κ 輕鏈之 V_K)以及一個恆定區(分別為 λ 輕鏈之 C_L 或 κ 輕鏈之 C_K)組成。抗體呈「Y」型，「Y」型結構之頸部由兩條重鏈之第二及第三恆定區組成，其藉由二硫鍵結合。「Y」型結構之每條臂包括其中一條重鏈之可變區及第一恆定區，其與一條輕鏈之可變區及恆定區結合。輕鏈及重鏈之可變區決定抗原之結合。每條鏈之可變區均含有三個高變區，稱互補決定區(CDR)(輕鏈之CDR包含LCDR1、LCDR2、LCDR3，重鏈之CDR包含HCDR1、

HCDR2、HCDR3)。本發明中公開之抗體及抗原結合片段之CDR邊界可藉由Kabat、IMGT、Chothia或Al-Lazikani命名法命名或識別。(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C.等, J Mol Biol. Dec 5; 186(3):651-63 (1985); Chothia, C.與Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C.等, Nature. Dec 21-28; 342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A.等, National Institutes of Health, 馬里蘭貝塞斯達(1991))。其中, 三個CDR由被稱為框架區(FR)之側面連續部分間隔開, 框架區比CDR更加高度保守並形成一個支架支持超變環。重鏈及輕鏈之恆定區與抗原結合無關, 但具有多種效應功能。抗體依據重鏈恆定區之胺基酸序列可分成幾類。根據是否含有 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 重鏈, 抗體可分別分為五個主要之分類或異構體: IgA、IgD、IgE、IgG及IgM。幾個主要之抗體分類亦可分為亞類, 如IgG1(γ 1重鏈)、IgG2(γ 2重鏈)、IgG3(γ 3重鏈)、IgG4(γ 4重鏈)、IgA1(α 1重鏈)或IgA2(α 2重鏈)等。

【0061】 本申請中之「二價」一詞係指具有兩個抗原結合位點之抗體或抗原結合片段;「單價」一詞係指僅具有一個單一抗原結合位點之抗體或抗原結合片段;「多價」一詞係指具有多個抗原結合位點之抗體或抗原結合片段。在一些實施形態中, 本申請所述之抗體或其抗原結合片段為二價。

【0062】 在本申請中,「雙特異性」抗體係指具有源自兩個不同之單株抗體之片段, 並且能夠與兩個不同之表位結合之人造抗體。上述兩個表位可存在於同一個抗原, 或者其可存在於兩個不同之抗原。

【0063】 本申請中之「抗原結合片段」一詞係指由含有1、2或3個

CDR之抗體部分或者任何其他結合抗原但不具有完整抗體結構之抗體片段所形成之一種抗體片段。抗原結合片段之例包括但不限於，如雙功能抗體(diabody)、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫鍵穩定之Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、雙特異性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定之雙功能抗體(ds diabody)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(雙價之雙功能抗體)、雙價單鏈抗體(BsFv)、雙特異性抗體、多特異性抗體、駱駝化單域抗體(camelized single domain antibody)、奈米抗體、域抗體及雙價域抗體。抗原結合片段可與母體抗體結合相同之抗原。

【0064】 抗體之「Fab」片段係指由一條輕鏈(包括可變區及恆定區)與一條重鏈之可變區及恆定區經二硫鍵結合而成之那部分抗體分子。

【0065】 「Fab'」片段係指包含了部分鉸鏈區之Fab片段。

【0066】 「F(ab')₂」係指Fab'-之二聚體。抗體之「Fv」係指含有完整抗原結合位點之最小抗體片段。Fv片段由一條輕鏈之可變區及一條重鏈之可變區組成。

【0067】 「dsFv」係指二硫鍵穩定之Fv片段，其單條輕鏈之可變區與單條重鏈之可變區之間之連接為二硫鍵。在一些實施形態中「(dsFv)₂」或「(dsFv-dsFv')」含有三條肽鏈：兩個V_H部分藉由肽連接子(例如較長之彈性連接子)相連，並藉由二硫鍵分別與兩個V_L部分結合。在一些實施形態中，dsFv-dsFv'具有雙特異性，其中每對藉由二硫鍵配對之重鏈輕鏈具有不同之抗原特異性。

【0068】 「單鏈Fv抗體」或「scFv」係指由輕鏈可變區與重鏈可變區直接相連或藉由一個肽鏈連接而成之工程抗體(Huston JS 等，Proc Natl Acad Sci USA、85:5879 (1988))。

【0069】 抗體之「Fc」係指由第一重鏈之第二及第三恆定區經由二硫鍵與第二重鏈之第二及第三恆定區連接組成之那部分抗體。抗體之Fc段負責多種不同之效應功能，如抗體依賴之細胞介導之細胞毒性(ADCC)及補體依賴之細胞毒性(CDC)，但在抗原結合中不起作用。

【0070】 「單鏈抗體Fv-Fc」或「scFv-Fc」係指由連接至某抗體Fc段之scFv組成之工程抗體。

【0071】 「駱駝化單域抗體(Camelized single domain antibody)」、「重鏈抗體」或「HCAb(Heavy-chain-only antibodies, HCAb)」均係指含有兩個V_H域而不含有輕鏈之抗體(Riechmann L.與Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10; 231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun; 74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; 美國專利號6,005,079)。重鏈抗體最初源自駝科(駱駝、單峰駝及美洲駝)。雖然缺失輕鏈，但駱駝化抗體(camelized antibodies)有確證之抗原結合全部功能(Hamers-Casterman C.等, Nature. Jun 3; 363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK.等, 「Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation」 Immunogenetics. Apr; 54(1):39-47 (2002); Nguyen VK.等, Immunology. May; 109(1):93-101 (2003))。重鏈抗體之可變區(VHH域)為最小之已知之獲得性免疫產生之抗原結合單位(Koch-Nolte F.等, FASEB J. Nov; 21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007))。

【0072】 「奈米抗體」係指一種抗體片段，其由一個來自重鏈抗體之VHH域及兩個恆定區CH2與CH3組成。

【0073】 「雙功能抗體(diabody)」或「dAb」包括帶有兩個抗原結

合位點之小抗體片段，其中該片段含有在同一條多肽鏈上相連之 V_H 域與 V_L 域(V_H-V_L 或 V_H-V_L)(請參見Holliger P.等，Proc Natl Acad Sci USA.，7月15日；90(14):6444-8 (1993)；EP404097；WO93/11161)。兩個域之間銜接物很短，使同一條鏈上之兩個域不能互相配對，從而迫使兩個域與另一條鏈之互補域配對，形成兩個抗體結合位點。該兩個抗體結合位點可靶向結合相同或不同之抗原(或抗原表位)。在某些實施形態中，「雙特異性ds雙功能抗體」係靶向兩個不同之抗原(或抗原表位)之雙功能抗體。在某些實施形態中，「scFv二聚體」係雙價雙功能抗體或雙價單鏈抗體(BsFv)，含有二聚化之兩個 V_H-V_L (由多肽銜接物連接)基，其中一個基之 V_H 與另一個基之 V_L 協作形成兩個結合位點，該兩個結合位點可靶向結合相同抗原(或抗原表位)或不同抗原(或抗原表位)。在另一些實施形態中，「scFv二聚體」係雙特異性雙功能抗體，含有相互連接之 $V_{L1}-V_{H2}$ (由多肽銜接物連接)與 $V_{H1}-V_{L2}$ (由多肽銜接物連接)，其中 V_{H1} 與 V_{L1} 協作， V_{H2} 與 V_{L2} 協作，且每個協作之配對具有不同之抗原特異性。

【0074】「域抗體」係指僅含有重鏈可變區或輕鏈可變區之抗體片段。在某些情況下，兩個或多個 V_H 域由肽連接子共價結合形成雙價域或多價域抗體。雙價域抗體之兩個 V_H 域可靶向作用於相同或不同之抗原。

【0075】本申請中使用之術語「嵌合」係指具有源自一種物種之重鏈及/或輕鏈之一部分，與上述重鏈及/或輕鏈其餘部分源自不同物種之抗體或抗原結合片段。在一個示例性之實例中，嵌合抗體可包括源自人之恆定區及源自非人動物(例如小鼠或大鼠)之可變區。在一些實施形態中，上述非人動物為哺乳動物，例如小鼠、大鼠、兔、山羊、綿羊、豚鼠或倉鼠。

【0076】 本申請中使用之術語「人源化」係指包括源自非人動物之CDR、源自人之FR區、以及源自人之恆定區(當適用時)之抗體或抗原結合片段。

【0077】 本申請中使用之術語「CD19」係指分化簇19蛋白，其為可在白血病前體細胞上檢測到之抗原決定簇。人與小鼠CD19之胺基酸及核酸序列可在公眾資料庫中找到，如GenBank、UniProt及Swiss-Prot。例如，以UniProt/Swiss-Prot登錄號P15391可找到人CD19之胺基酸序列，以登錄號NM_001178098可找到編碼人CD19之核酸序列。本申請中使用之術語CD19包括包含突變之蛋白，例如全長野生型CD19之點突變、片段、插入、缺失及剪接變體。CD19表現於大多B細胞型癌症中，包括例如急性淋巴細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病及非霍奇金淋巴瘤。CD19亦為祖B細胞之早期標記物。參見例如Nicholson等，Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)。在一個方面，CD19蛋白表現在癌細胞上。

【0078】 本申請中之「特異性結合」或「特異性之結合」係指兩分子間之非隨機結合反應，如抗體與抗原間之反應。在某些實施形態中，本申請之抗體或其抗原結合片段與人及/或猴CD19特異性結合，並且其結合親和力(K_D) $\leq 10^{-6}$ M(如： $\leq 5 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 5 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 4 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 3 \times 10^{-9}$ M、 $\leq 2 \times 10^{-9}$ M或 $\leq 10^{-9}$ M)。本申請中之 K_D 係指解離速度與結合速度之比值(k_{off}/k_{on})，其可藉由使用任何本領域公知之傳統方法測定，包括但不限於表面電漿共振法、微量熱泳法、HPLC-MS方法及流式細胞術(例如FACS)方法。在某些實施形態中，藉由使用流式細胞術方法可適當地確定 K_D 值。

【0079】本申請中之「阻斷結合」或「競爭性同樣之表位」之能力係指抗體或其抗原結合片段將兩個分子間結合(例如人CD19與抗CD19抗體)之相互作用抑制至任何可檢測之程度之能力。在某些實施形態中，阻斷兩個分子間結合之抗體或抗原結合片段可將兩個分子間結合之相互作用抑制至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%。在某些實施形態中，此種抑制作用可大於60%、大於70%、大於75%、大於80%、大於85%或大於90%。

【0080】本申請中使用之「表位」係指抗原分子中與抗體結合之那部分胺基酸或原子基。若兩種抗體表現出對抗原之競爭性結合，則可能結合抗原上相同或密切相關之表位。例如，若抗體或其抗原結合片段對參照抗體結合至抗原(例如人/猴CD19)之阻斷達到至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%，則上述抗體或其抗原結合片段可被認為與上述參照抗體結合相同/密切相關之表位。

【0081】本領域之技術人員將認識到，無需過度之實驗即可判斷人單株抗體是否與本申請所述之抗體(例如小鼠單株抗體 WBP7011-4.34.11、WBP7011-4.87.6、WBP7011_4.155.8、WBP7011_4.56.1、WBP7011-4.15.10、WBP7011-4.100.1、WBP7011-4.106.3、WBP7011_4.108.3、WBP7011_4.191.6、WBP7011_4.194.10、WBP7011_4.231.5以及人源化抗體 W7011-4.34.11-z1-m5、W7011-4.87.6-z1 (N-S)及W7011-4.155.8-z1-P15)結合至相同之表位，藉由確定前者是否阻止後者與CD19抗原多肽結合。若測試抗體與本申請所述之抗體競爭，顯示為本申請所述之抗體與CD19抗原多肽之結合減少，則該兩種抗體與相同或密切相關之表位結合。或者若本申請所述之抗體抑制測試

抗體與CD19抗原多肽之結合，則該兩種抗體與相同或密切相關之表位結合。

【0082】 本申請使用之抗體名稱中之符號具有不同代表意義：「mIgG2」係指具有小鼠IgG2同種型恆定區之抗體；「uIgG1」係指具有人IgG1同種型恆定區之抗體；「K」或「L」係指上述抗體使用κ輕鏈或λ輕鏈。

【0083】 在本申請中當「保守置換」用於胺基酸序列時，係指將一個胺基酸殘基用另一個具有相似理化性質之側鏈之胺基酸殘基置換。例如，可在疏水側鏈胺基酸殘基間(例如Met、Ala、Val、Leu及Ile)、中性親水側鏈殘基間(例如Cys、Ser、Thr、Asn及Gln)、酸性側鏈殘基間(例如Asp、Glu)、鹼性側鏈胺基酸間(例如His、Lys及Arg)或方向側鏈殘基間(例如Trp、Tyr及Phe)進行保守置換。本領域已知保守置換通常不會引起蛋白構象結構之顯著變化，因此能夠保留蛋白質之生物活性。

【0084】 本申請所述之術語「同源」與「同源之」可互換使用，係指當最佳比對時核酸序列(或其互補鏈)或胺基酸序列具有與另一條序列至少80%(如至少85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)之同一性。

【0085】 當「百分比序列同一性」用於胺基酸序列(或核酸序列)時，係指在進行序列比對，並且必要時引入間隔使相同胺基酸(或核酸)數目達到最多後，在候選序列中，與參比序列相同之胺基酸(或核酸)殘基占上述候選序列之胺基酸(或核酸)殘基之百分比。上述胺基酸殘基之保守置換可認為或可不認為係相同殘基。可藉由本領域公開之工具，例如BLASTN、BLASTp(美國國家生物技術資訊中心網站(NCBI)，亦可參見

Altschul S.F.等，J. Mol. Biol.，215:403-410 (1990)；Stephen F. 等，Nucleic Acids Res.，25:3389-3402 (1997))、ClustalW2(歐洲生物資訊研究所網站，可參見Higgins D.G.等，Methods in Enzymology，266:383-402 (1996)；Larkin M.A.等，Bioinformatics(英國牛津)，23(21): 2947-8 (2007))及ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體，對序列進行比對以確定胺基酸(或核酸)序列之百分比序列同一性。本領域技術人員可使用上述工具之默認參數或根據比對之需要適當調整參數，例如藉由挑選合適之算法。

【0086】本申請中使用之「效應功能」係指抗體之Fc區與其效應器例如C1複合體及Fc受體結合之生物活性。示例性之效應功能包括抗體與C1複合體上之C1q相互作用誘導之補體依賴性細胞毒性(CDC)、抗體之Fc區與效應細胞上之Fc受體結合誘導之抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)以及吞噬。

【0087】本申請中使用之「內化」或「能夠被內化」之抗體係在細胞表面上與其抗原結合之後被該細胞攝取之抗體。在一些實施形態中，本申請所述之抗體及其片段可至少在一定程度上被在其表面表現CD19之細胞內化。例如，在一些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體可在與表現在細胞表面上之CD19結合後被B淋巴細胞內化。內化可在體外或體內發生。為了治療中之應用，內化可在體內發生。抗原在與哺乳動物細胞結合後是否發生內化可藉由各種檢驗確定，包括如下實施例中所記述之(例如Fab-Zap方法)。檢測抗體是否內化進入細胞之方法亦記載於美國專利號7,619,068，其藉由引用整體併入本申請。在一些實施形態中，能夠被內化之抗體及其抗原結合片段可與抗癌劑(例如在內化後殺死細胞之細胞毒

性部分)相連接或共軛。依據抗體或抗體結合物之效力，在某些情況下，將單個抗體分子攝入細胞足以殺死與抗體結合之靶細胞。例如，某些毒素殺滅效力很高，將與抗體共軛之該毒素之一個分子內化即足以殺死腫瘤細胞。

【0088】 對某種狀況之「治療」或「療法」包括預防或減輕某種狀況、降低某種狀況興起或發展之速度、減少發展出某種狀況之風險、預防或延遲與某種狀況相關之症狀發展、減少或終止與某種狀況相關之症狀、產生某種狀況之完全或部分之逆轉、治癒某種狀況、或以上之組合。

【0089】 「被分離」之物質已被人工由自然狀態改變。若自然界中出現某種「被分離」之物質或成分，則其已被改變或脫離其原始狀態，或二者均有發生。例如，某一活體動物體內天然存在之多核苷酸或多肽未被分離，但若該等多核苷酸或多肽與之在天然狀態下共存之物質足夠分離並以足夠純之狀態存在，則可認為「被分離」。被分離「核酸」與「多核苷酸」可互換使用，係指被分離之核酸分子之序列。在某些實施形態中，「分離之抗體或其抗原結合片段」係指純度為至少60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%之抗體或抗原結合片段，其由電泳方法(如SDS-PAGE、等電聚焦、毛細管電泳)、或層析法(如離子交換層析或反相HPLC)確定。

【0090】 本發明中「載體」係指可將編碼某蛋白之多核苷酸操作性地插入其中並使該蛋白獲得表現之一種運載工具。載體可用於轉化、轉導或轉染宿主細胞，使其攜帶之遺傳物質元件在宿主細胞內得以表現。舉例而言，載體包括：質粒、噬菌粒、柯斯質粒、人工染色體如酵母人工染色

體(YAC)、細菌人工染色體(BAC)或P1衍生之人工染色體(PAC)、噬菌體如 λ 噬菌體或M13噬菌體、以及動物病毒等。用作載體之動物病毒種類有逆轉錄病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒(如單純疱疹病毒)、痘病毒、桿狀病毒、乳頭瘤病毒、乳頭多瘤空泡病毒(如SV40)。載體可含有多種控制表現之元件，包括啟動子序列、轉錄起始序列、增強子序列、選擇元件及報告基因。又，載體亦可含有複製起始位點。載體亦可包括協助其進入細胞之成分，包括但不限於病毒顆粒、脂質體或蛋白外殼。載體可為表現載體或選殖載體。本申請提供之載體(例如表現載體)含有本申請所述之編碼抗原或其抗原結合片段之核酸序列、至少一個可操作地連接至上述核酸序列之啟動子(例如SV40、CMV、EF-1 α)、以及至少一個選擇標記。載體之實例包括但不限於逆轉錄病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒(例如單純疱疹病毒)、痘病毒、桿狀病毒、乳頭瘤病毒、乳多空病毒(例如SV40)、 λ 噬菌體與M13噬菌體、質粒pcDNA3.3、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos等。

【0091】 本發明中「宿主細胞」係指導入外源多核苷酸及/或載體之細胞。

【0092】本申請中使用之「與CD19相關之疾病或狀況」係指由CD19提高或減少之表現或活性引起、惡化，或藉由其他方式產生聯繫之任何疾病或狀況。在一些實施形態中，與CD19相關之狀況為B細胞淋巴瘤，可選地為霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤，其中上述非霍奇金淋巴瘤包括：瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤(MZL)、黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(MALT)、小淋巴細胞性淋巴瘤(慢性淋巴細胞白血病，CLL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、或瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(WM)。

【0093】本申請中使用之「癌症」係指以惡性細胞生長或腫瘤、異常增生、浸潤或轉移為特徵之任何醫學狀況，並且包括實體腫瘤及例如白血病之非實體癌症(血液惡性腫瘤)。本申請中使用之「實體瘤」係指腫瘤及/或惡性細胞之實體團塊。癌症之實例包括但不限於非小細胞肺癌(鱗狀/非鱗狀)、小細胞肺癌、腎細胞癌、結直腸癌、結腸癌、卵巢癌、乳腺癌(包括基底乳腺癌、乳腺導管內癌及乳腺小葉癌)、胰腺癌、胃癌、膀胱癌、食道癌、間皮瘤、黑色素瘤、頭頸癌、甲狀腺癌、肉瘤、前列腺癌、膠質母細胞瘤、宮頸癌、胸腺癌、黑色素瘤、骨髓瘤、蕈狀肉芽腫、梅克爾細胞癌、肝細胞癌(HCC)、纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、成骨肉瘤以及其他肉瘤、滑膜肉瘤、間皮瘤、尤文氏腫瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、淋巴惡性腫瘤、基底細胞癌、腺癌、肝腺癌、甲狀腺髓樣癌、乳頭狀甲狀腺癌、嗜鉻細胞瘤、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、髓樣癌、支氣管癌、肝癌、膽管癌、絨毛膜癌、維爾姆斯腫瘤、宮頸癌、睪丸癌、精原細胞瘤、經典型霍奇金淋巴瘤(CHL)、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、富於T細胞/組織細胞之B細胞淋巴瘤、急性淋巴細胞性白血病、

急性髓細胞性白血病、急性粒細胞性白血病、慢性髓細胞性(粒細胞性)白血病、慢性粒細胞性白血病、慢性淋巴細胞性白血病、真性紅細胞增多症、肥大細胞源性腫瘤、EBV陽性及陰性PTLD、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤(MZL)、黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(MALT)、小淋巴細胞性淋巴瘤(慢性淋巴細胞白血病，CLL)、套細胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、漿母細胞淋巴瘤、淋巴結外NK/T細胞淋巴瘤、鼻咽癌、HHV8相關原發滲出淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、多發性骨髓瘤、瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(WM)、重鏈疾病、骨髓增生異常綜合症、多毛細胞白血病及脊髓發育不良、原發性中樞神經系統淋巴瘤、脊柱腫瘤、腦幹膠質瘤、星形細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突膠質細胞瘤、腦膜瘤、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤。

【0094】「藥用容許之」係指所指之載劑、溶劑、稀釋劑、賦形劑及/或鹽，總體而言在化學上及/或在物理上與製劑中之其他配料相容，並在生理上與接受者相容。

【0095】

抗CD19抗體

本申請提供一種包含選自下組之抗CD19抗體之一個或多個(例如1、2、3、4、5或6個)CDR序列之抗CD19抗體及其抗原結合片段：
WBP7011-4.34.11、WBP7011-4.87.6、WBP7011_4.155.8、
WBP7011_4.56.1、WBP7011-4.15.10、WBP7011-4.100.1、WBP7011-
4.106.3、WBP7011_4.108.3、WBP7011_4.191.6、
WBP7011_4.194.10、WBP7011_4.231.5、W7011-4.34.11-z1-m5、

W7011-4.87.6-z1 (N-S)及W7011-4.155.8-z1-P15。在本申請全文中，當提及抗體名稱時，術語「WBP7011」與「W7011」可互換使用。例如，抗體WBP7011-4.34.11亦被指代為W7011-4.34.11，並且該名稱指代同一抗體。

【0096】本申請中使用之「WBP7011-4.34.11」係指具有如SEQ ID NO: 94所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0097】本申請中使用之「WBP7011-4.87.6」係指具有如SEQ ID NO: 98所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 100所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0098】本申請中使用之「WBP7011_4.155.8」係指具有如SEQ ID NO: 102所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 104所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0099】本申請中使用之「WBP7011_4.56.1」係指具有如SEQ ID NO: 106所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0100】本申請中使用之「WBP7011-4.15.10」係指具有如SEQ ID NO: 108所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0101】本申請中使用之「WBP7011-4.100.1」係指具有如SEQ ID NO: 110所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0102】本申請中使用之「WBP7011-4.106.3」係指具有如SEQ ID

NO: 112所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0103】本申請中使用之「WBP7011_4.108.3」係指具有如SEQ ID NO: 114所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0104】本申請中使用之「WBP7011_4.191.6」係指具有如SEQ ID NO: 116所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0105】本申請中使用之「WBP7011_4.194.10」係指具有如SEQ ID NO: 118所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 120所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0106】本申請中使用之「WBP7011_4.231.5」係指具有如SEQ ID NO: 122所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 96所示之 κ 輕鏈可變區之小鼠單株抗體。

【0107】本申請中使用之「W7011-4.34.11-z1-m5」係指基於WBP3311_2.166.48之人源化抗體，其包含如SEQ ID NO: 124所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 126所示之 κ 輕鏈可變區。

【0108】本申請中使用之「W7011-4.87.6-z1 (N-S)」係指基於WBP3311_2.166.48之人源化抗體，其包含如SEQ ID NO: 128所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 130所示之 κ 輕鏈可變區。

【0109】本申請中使用之「W7011-4.155.8-z1-P15」係指基於WBP3311_2.166.48之人源化抗體，其包含如SEQ ID NO: 132所示之重鏈可變區、以及如SEQ ID NO: 134所示之 κ 輕鏈可變區。

【0110】 表1表示該11個小鼠抗CD19抗體、以及3個人源化抗體 W7011-4.34.11-z1-m5、W7011-4.87.6-z1 (N-S) 及 W7011-4.155.8-z1-P15之CDR序列。以下亦提供重鏈及輕鏈之可變區序列。

【0111】 表1

		CDR1	CDR2	CDR3
WBP7011-4.34.11	VH	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
		GYTFTNYVIH	YFNPNYNDGTEYNEKFKA	GPYYYGGSPFDY
WBP7011-4.34.11	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011-4.87.6	VH	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9
		GYAFSTYWMN	QIYPGDDDTKYNGKFKG	RYFRYDYWYSDV
WBP7011-4.87.6	VK	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
		RASQDISNYLN	YTSRLHS	HQGNTLPLT
WBP7011_4.155.8	VH	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
		GYAFTSYNMY	YIDPYNGDTTYNQKFKG	TAYAMDY
WBP7011_4.155.8	VK	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
		SASSTVNYMH	STSNLAS	HQWSSYPYT
WBP7011_4.56.1	VH	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21
		GYTFTNYVIH	YINPYNDGTEYNEKFKG	GPYYYGGSPFDY
WBP7011_4.56.1	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011-4.15.10	VH	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
		GYTFTSYVMH	YINPYNDGTEYHEKFKG	GPYYYGGSPFDF
WBP7011-4.15.10	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011-4.100.1	VH	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
		GYTFTSYVIH	YINPYNDGAEYTEKFKG	GPYYYGGSPFDY
WBP7011-4.100.1	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011-4.106.3	VH	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 30
		GYTFSSYVIH	YINPYNDGAEYAEKFKG	GPYYYGGSPFDY
WBP7011-4.106.3	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011_4.108.3	VH	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
		GYTFTSYVIH	YINPYNDGAEYNEKFKG	GPYYYGGSPFDY
WBP7011_4.108.3	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011_4.191.6	VH	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 36
		GYTFTDYVIH	YINPYNDGSEYSEKFKG	GPYYYGGSPFDY
WBP7011_4.191.6	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011_4.194.10	VH	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39
		GYTFTSYVMH	YINPYNDGTYNEKFKG	GPYYYGGSPFDY
WBP7011_4.194.10	VK	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 42
		RSSQTLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
WBP7011_4.231.5	VH	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 45
		GYTFTSYVMH	YINPYNDGTQYNEKFKG	GPYYYSPSPFDY
WBP7011_4.231.5	VK	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
		RSSQSLENSNGNTYLN	RVSNRFS	LQVTHVPYT
W7011-4.34.11-z1-m5	VH	SEQ ID NO: 136	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3
		GYTFTDYVIH	YFNPNYNDGTEYNEKFKA	GPYYYGGSPFDY
W7011-4.34.11-z1-m5	VK	SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 138	SEQ ID NO: 139
		RSSQSLENSNHNNTYIN	RVSKRFS	HQVTHVPYT

W7011-4.87.6-z1 (N-S)	VH	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 140	SEQ ID NO: 9
		GYAFSTYWMN	QIYPGDDDTKYSGKFKG	RYFRYDYWYSDV
W7011-4.87.6-z1 (N-S)	VK	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
		RASQDISNYLN	YTSRLHS	HQGNTLPLT
W7011-4.155.8-z1-P15	VH	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 141	SEQ ID NO: 15
		GYAFTSYNMY	YIDPYNADTTYNQKFKG	TAYAMDY
W7011-4.155.8-z1-P15	VK	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18
		SASSTVNYMH	STSNLAS	HQWSSYPYT

【0112】 以下提供 WBP7011-4.34.11 、 WBP7011-4.87.6 、 WBP7011_4.155.8 、 WBP7011_4.56.1 、 WBP7011-4.15.10 、 WBP7011-4.100.1 、 WBP7011-4.106.3 、 WBP7011_4.108.3 、 WBP7011_4.191.6 、 WBP7011_4.194.10或WBP7011_4.231.5 、 以及人源化之W7011-4.34.11-z1-m5 、 W7011-4.87.6-z1 (N-S)及W7011-4.155.8-z1-P15抗體之重鏈或κ輕鏈可變區序列。

【0113】

WBP7011-4.34.11-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 94)：

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVIHWVKQKPGQGLEWIGYFNPY
NDGTEYNEKFKAKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAKGPYYYGSSPED
YWGQGTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 95)：

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCATACTATGTTATTCAC
TGGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATTTTAATCC
TTACAATGATGGTACTGAATACAATGAGAAGTTCAAAGCCAAGGCCACACTG
ACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTC
TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAAGGTCCCTACTACTACGGTAGTA
GCCCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011-4.34.11-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96)：

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLNSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLDKRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLOVTHVPYTFGGGTKEIK

核酸序列(SEQ ID NO: 97)：

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAAC TGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCTTGACAGGTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGA
ATAAAAA

WBP7011-4.87.6-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 98) :

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSTYWMNWVKQRPQG
LEWIGQIYPGDDDTKYNGKFKGKASLTADKSSSTAYMQLISLTSEDS
AVYFCARRYFRYDYWYS
DVWGAGTTVTTS

核酸序列(SEQ ID NO: 99) :

CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTG
AAGATTTCTTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCACTGATGACCTATTGGATGAACTGGG
TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAG
ATGATGATACTAAGTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCTCACTGACTGCAG
ACAAATCCTCCAGCACCGCCTACATGCAGCTCATCAGCCTAACATCTGAGGACTC
TGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAAGATACTTTAGGTACGACTACTGGTATTCCGAT
GTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCACCGTCACCTCA

WBP7011-4.87.6-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 100) :

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYT
SR LHSGVPARFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCHQGNTLPLTFGAGTKLELK

核酸序列(SEQ ID NO: 101) :

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAG
TCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCA
GCAGAAACCGGATGGAAC TGTAAACTCCTGATCTATTACACATCAAGATTACAC
TCAGGAGTCCCAGCAAGATTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTACTCTCTCA
CCATTAGTAACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCACCAGGGTAA
TACGCTTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

WBP7011-4.155.8-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 102) :

EIQLQQSGPELVKPGASVKVSC
KASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPY
NGDTTYNQKEFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDS
AVYYCLTTAYAMDYWG
QGTSVTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 103) :

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGTTATGCATTCACTAGCTACAACATGTACTGGG
TGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTGATCCTTACA
ATGGTGATACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTG
ACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGCATCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTC
TGCAGTCTATTACTGTCTCACTACGGCCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGA
ACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

WBP7011-4.155.8-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 104) :

QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTCASSTVNYMHWYQKSGTSPKLLIYSTSNLASG
VPSRFSGSGSGTFYSLTIRSVEAEDAADYYCHQWSSYPYTFGGGKLEIK

核酸序列(SEQ ID NO: 105) :

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGA
TCACCCTAACCTGCAGTGCCAGCTCGACTGTAAATTACATGCACTGGTACCAGCA
GAAGTCAGGCACTTCTCCCAAACCTTTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTACAAT
CAGAAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCGATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAG
TTATCCGTACACGTTCTGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

WBP7011_4.56.1-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 106) :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPY
NDGTEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAYMALSSLTSEDSAVYYCTRGPYYYGGSPFD
YWGQGTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 107) :

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAACTATGTTATACACTGGG
TGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTACTGAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGGCGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTC
TGCGGTCTATTACTGTACAAGAGGACCCTATTACTACGGTGGTAGCCCCCTTCGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011_4.56.1-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLSNSGNTYLNWYLVKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFC LQVTHVPYTFGGGKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 97) :

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAACGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCTTGACAGGTTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

WBP7011_4.15.10-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 108) :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWMKQKPGQGLEWIGYINP
YNDGTEYHEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVFYCARGPYYYGGSPF
DFWGQGTTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 109) :

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCCTAGCTATGTTATGCACTGGA
TGAAACAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTACTGAGTACCATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACT
CTGCGGTCTTTTACTGTGCAAGAGGACCCTATTACTACGGTGGTAGCCCCTTTGA
CTTCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACGGTCTCCTCA

WBP7011_4.15.10-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLNSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLDRFSSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCLQVTHVPYTFGGGKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 97) :

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAACGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCTTGACAGGTTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

WBP7011_4.100.1-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 110) :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPY
NDGAEYTEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSTVYYCARGPYYYGGSPFD
YWGQGTTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 111) :

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTATACACTGGG
TGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTGCTGAGTACACTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACAAATCCTCCAGTACTGCCTATATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTC
TACGGTCTATTACTGTGCACGAGGACCCTATTACTACGGTGGTAGCCCCCTTGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011_4.100.1-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLD RFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPYTFGGGGTKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 97) :

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAAGTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCTTGGACAGGTTTCAAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

WBP7011_4.106.3-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 112) :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFSSYVIHWVKQKPGQGLEWIGYINPY
NDGAEYAEKFKGKATLTSDKSSSSAYMELGSLTSEDSAVYYCARGGPYYYGGSPF
DYWGQGTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 113) :

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGTATGTTATACACTGGG
TGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTGCTGAGTATGCTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACAAATCCTCCAGTTCTGCCTATATGGAGCTCGGCAGCCTGACCTCTGAGGACTC
TGCGGTCTATTACTGTGCACGAGGACCCTATTACTACGGTGGTAGTCCCTTTGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011_4.106.3-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLD RFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPYTFGGGGTKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 97) :

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAAGTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCTTGACAGGTTTCAAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTTCACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

WBP7011_4.108.3-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 114) :

EVQLQQSGPELVKPGASVEMSCKASGYTFTSYVIHWLKQKPGQGLEWIGYINPY
NDGAEYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMDLNSLTSEDSAVYYCARGPYYYGSSPF
DYWGQGTTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 115) :

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTG
GAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTATGTTATTCAGTGGT
TGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTGCTGAGTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACAAATCCTCCAGTACAGCCTATATGGATCTCAACAGCCTGACCTCTGAGGACTC
TGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGACCCTATTACTACGGTAGTAGCCCCTTTGAC
TACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011_4.108.3-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPYTFGGGKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 97) :

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAAGTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCTTGACAGGTTTCAAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTTCACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

WBP7011_4.191.6-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 116) :

EVQLLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVIHWVKQRPQGLEWIGYINPY
NDGSEYSEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGPYYYGGSPFD
YWGQGTTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 117) :

GAGGTCCAGCTGCTGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTGACTATGTTATACACTGGG
TGAAGCAGAGGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTTCTGAGTACAGTGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACT
CTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGACCCTATTACTACGGTGGTAGTCCCTTTGA
CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011_4.191.6-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLSENSNGNTYLNWY LQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC LQVTHVPYTFGGGTKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 97) :

GATGCTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAAC TGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCTTGACAGGTT CAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTT CACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

WBP7011_4.194.10-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 118) :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINP
YNDGTTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGPYYYGSSPF
DYWGQGTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 119) :

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGG
TGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGA ACTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACT
CTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGACCCTATTACTACGGTAGTAGCCCCTTTGA
CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011_4.194.10-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 120) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTLSENSNGNTYLNWY LQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLD RFSGSGSGTDFTLKISRVEDLGVYFC LQVTHVPYTFGGGTKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 121) :

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGACCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAAGTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCTAGACAGGTTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGACTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGCCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

WBP7011_4.231.5-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 122) :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINP
YNDGTQYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGPYYYSPSPF
DYWGQGTTTLTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 123) :

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTG
AAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTATGTCATGCACTGGG
TGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTAATCCTTACA
ATGATGGTACTCAGTACAATGAGAAGTTTAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAG
ACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACT
CTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGACCCTATTACTACAGTCCTAGCCCCCTTGA
CTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

WBP7011_4.231.5-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 96) :

DAVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLSNSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR
VSNRFSGVLD RFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFC LQVTHVPYTFGGGKLEI
K

核酸序列(SEQ ID NO: 97) :

GATGCTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAG
CCTCCATCTCTTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAACACCTA
TTTGAAGTGGTACCTCCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTACAGG
GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCTTGACAGGTTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGA
CAGATTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTT
CTGTCTCCAAGTTACACATGTCCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATAAAA

【0114】 已知CDR負責抗原結合，然而已發現6個CDR並不均為不可缺少或不可改變。換言之，可替換或改變或修飾抗CD19抗體
WBP7011-4.34.11 、 WBP7011-4.87.6 、 WBP7011_4.155.8 、
WBP7011_4.56.1、WBP7011-4.15.10、WBP7011-4.100.1、WBP7011-
4.106.3 、 WBP7011_4.108.3 、 WBP7011_4.191.6 、

WBP7011_4.194.10 、 WBP7011_4.231.5 、 W7011-4.34.11-z1-m5 、 W7011-4.87.6-z1 (N-S)或W7011-4.155.8-z1-P15中之1、2或3個CDR，而基本上保持與CD19特異性結合之親和力。

【0115】 在某些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體及其抗原結合片段包含抗CD19抗體WBP7011-4.34.11、WBP7011-4.87.6、WBP7011_4.155.8、WBP7011_4.56.1、WBP7011-4.15.10、WBP7011-4.100.1、WBP7011-4.106.3、WBP7011_4.108.3、WBP7011_4.191.6、WBP7011_4.194.10、WBP7011_4.231.5、W7011-4.34.11-z1-m5、W7011-4.87.6-z1 (N-S)或W7011-4.155.8-z1-P15之一之重鏈CDR3序列。在某些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體與抗原結合片段包含選自由SEQ ID NO: 3、9、15、21、24、27、30、33、36、39及45組成之群之重鏈CDR3序列。重鏈CDR3區位於抗原結合位點之中心，並因此被認為與抗原接觸最多，而且對抗體與抗原之親和力提供最多之自由能。此外亦認為重鏈CDR3由於多種多樣化機制在長度、胺基酸組成及構象方面係目前抗原結合位點最多樣化之CDR(Tonegawa S., Nature. 302:575-81)。重鏈CDR3之多樣化足以產生多數抗體特異性(Xu JL, Davis MM. Immunity. 13:37-45)以及所需之抗原結合親和性(Schier R等, J Mol Biol. 263:551-67)。

【0116】 在某些實施形態中，只要本申請所述之抗體及其抗原結合片段可特異性地結合至CD19，則上述之抗體及其抗原結合片段包含框架區(FR)序列。表1中所示之CDR序列獲取自小鼠抗體，但其可使用本領域公知之合適方法(如重組技術)移植至任何合適物種(如小鼠、人、大鼠、兔以及其他)之任何合適之FR序列。

【0117】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段人源化。人源化之抗體或抗原結合片段理想地在人體具有降低之免疫原性。人源化之抗體或其抗原結合片段在其可變區嵌合，其原因在於非人CDR序列移植至人或基本上為人之FR序列中。抗體或抗原結合片段之人源化基本上可藉由在人免疫球蛋白基因上將非人(如小鼠)CDR基因替換為對應之人CDR基因來完成(參見例如Jones等(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等(1988) *Nature* 332:323-327；Verhoeyen等(1988) *Science* 239:1534-1536)。

【0118】 可使用本領域公知之方法選擇合適之人重鏈及輕鏈可變域，以達到該目的。在一個示例性之實例中，可使用最佳擬合之方法，其中對非人(例如嚙齒動物)抗體可變域序列進行篩選，或者將其與已知之人可變域序列之資料庫進行BLAST比對，並且識別出最接近非人查詢序列之人序列，用作用於移植非人CDR序列之人框架(參見例如Sims等(1993) *J. Immunol.* 151:2296；Chothia等(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901)。或者，可將源自所有人抗體之共有序列之框架用於移植非人CDR(參見例如Carter等(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，89:4285；Presta等(1993) *J. Immunol.*，151:2623)。

【0119】 在某些實施形態中，本申請所述之人源化抗體或抗原結合片段除了非人之CDR序列以外，基本上全部由人序列組成。在一些實施形態中，可變區FR與恆定區(若存在)全部或基本上來自人免疫球蛋白序列。人FR序列與人恆定區序列可源自不同之人免疫球蛋白基因，例如，FR序列源自一個人抗體，恆定區來自另一個人抗體。在一些實施形態中，人源化抗體或抗原結合片段包含人重/輕鏈FR1-4。

【0120】 在某些實施形態中，本申請所述之人源化抗體及其抗原結合片段包含 W7011-4.34.11-z1-m5、W7011-4.87.6-z1 (N-S) 或 W7011-4.155.8-z1-P15之一個或多個FR序列。下文之表2表示W7011-4.34.11-z1-m5、W7011-4.87.6-z1 (N-S)或W7011-4.155.8-z1-P15之FR序列。對應之天然小鼠FR序列亦示於表2。下文亦提供重鏈及輕鏈可變區序列。

【0121】 表2

	FR1	FR2	FR3	FR4
WBP701 1- 4.34.11- VH	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49
	EVQLQQSGPELV KPGASVKMSCK AS	WVKQRPGQG LEWIG	KATLTSDKSSSTA YMELSSLTSEDSA VYYCAK	WGQGTTTLTVSS
W7011- 4.34.11- z1-m5- VH	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 57
	QVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSCK AS	WVRQAPGQG LEWMG	RV TITADKSTST AYMELSSLRSED TAVYYCAR	WGQGTTVTVSS
WBP701 1- 4.34.11- VK	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53
	DAVMTQTPLSLP VSLGDQASISC	WYQQKPGQSP KLLIY	GVLDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAE DLGVYFC	FGGGTKLEIK
W7011- 4.34.11- z1-m5- VK	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 61
	DIVMTQTPLSLP VTPGEPASISC	WYLQKPGQSP Q LLIY	GVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAE DVGYYCYC	FGQGTKLEIK
WBP701 1-4.87.6- VH	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65
	QVQLQQSGAELV RPGSSVKISKAS	WVKQRPGQG LEWIG	KASLTADKSSSTA YMQSLTSEDSA VYFCAR	WGAGTTVTVTS
W7011- 4.87.6-z1 (N-S)- VH	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73
	QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCK AS	WVRQAPGQG LEWMG	RV TITADKSTSTA YMELSSLRSEDT AVYYCAR	WGQGTTVTVSS
WBP701 1-4.87.6- VK	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 69
	DIQMTQTSSLSA SLGDRVITISC	WYQQKPDGT VKLLIY	GVPARFSGSGSG TDYSLTISNLEQE DIATYFC	FGAGTKLELK
W7011- 4.87.6-z1 (N-S)- VK	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 77
	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITITC	WYQQKPGKV P KLLIY	GVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPE DVATYYC	FGQGTKLEIK
WBP701 1_4.155.8 -VH	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 81
	EIQLQQSGPELVK PGASVKVSCKAS	WVKQSHGKSL EWIG	KATLTVDKSSSTA YMHLSLTSEDS AVYYCLT	WGQGTSVTVSS
W7011-	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 89

4.155.8-z1-P15-VH	QMQLVQSGPEV KKPGTSVKVSCK AS	WVRQARGQR LEWIG	RVTITRDMSTST AYMELSSLRSED TAVYYCLT	WGQGTLVTVSS
WBP701 1_4.155.8-VK	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 85
	QIVLTQSPAIMSA SLGEEITLTC	WYQQKSGTSP KLLIY	GVPSRFSGSGSG TFYSLTIRSVEAE DAADYYC	FGGGTKLEIK
W7011-4.155.8-z1-P15-VK	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 93
	DIQLTQSPSFLSA SVGDRVITIC	WYQQKPGKA PKLLIY	GVPSRFSGSGSG TEFTLTISLQPE DFATYYC	FGQGTKLEIK

【0122】

W7011-4.34.11-z1-m5-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 124):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYVIHWVRQAPGQGLEWMGYFNP
YNDGTEYNEKFKARVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGPYYYGSSPF
DYWGQGTTVTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 125):

CAGGTGCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCAGGATCCTCCG
TGAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCGATTACGTGATCCAC
TGGGTCAGGCAGGCCCTGGGCAAGGCTTGGAGTGGATGGGGTACTTTAACC
CCTACAACGATGGGACTGAGTACAATGAGAAGTTTAAAGCACGGGTGACCAT
TACCGCCGACAAGAGCACAAAGCACAGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTCCGC
AGCGAGGATACAGCCGTCTACTACTGCGCCAGAGGCCCTTACTACTATGGGTC
CAGCCCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGGACTACAGTGACTGTCAGTTCA

W7011-4.34.11-z1-m5-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 126) :

DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLSNSHNNTYINWYLQKPGQSPQLLIYRVS
KRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCHQVTHVPYTFGQGTKLEIK

核酸序列(SEQ ID NO: 127) :

GATATCGTGATGACCCAGACTCCCCTGTCCCTTCCTGTGACCCAGGAGAACC
AGCTTCTATCAGCTGTAGGTCCTCACAGAGCCTGGAGAACTCCAACCACAACA
CCTACATAAACTGGTACCTCCAGAAGCCTGGGCAGTCTCCCCAGTTGCTGATC
TACAGGGTCAGCAAACGCTTCTCCGGGGTGCCCGATCGGTTTAGTGAGCG
GGAGCGGCACAGACTTTACACTCAAGATTTCCAGAGTGGAGGCCGAGGACGT
CGGCGTCTATTACTGCCACCAAGTGACACACGTGCCCTACACATTCGGCCAGG
GCACTAAACTGGAGATTAAG

W7011-4.87.6-z1 (N-S)-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 128) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSTYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIY
PGDDDTKYSGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRYFRYDYW
YSDVWGQGTTVTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 129) :

CAGGTCCAGCTTGTCCAGTCTGGAGCAGAAGTGAAGAAGCCAGGGGCTTCAG
TGAAGGTGTCTTGCAAGGCTTCCGGATACGCCTTCTCCACTTACTGGATGAAC
TGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGGCAGGGCTTGGAGTGGATGGGCCAGATCTATC
CCGGCGATGACGACACAAAATACAGCGGGAAGTTCAAGGGGCGGGTGACCAT
TACCGCCGATAAAAGCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTCAGTTCCCTGAGAA
GCGAGGATACAGCCGTGTACTACTGTGCCAGGAGGTACTTTCGGTACGACTAC
TGGTATAGCGACGTCTGGGGGCAAGGCACAACCTGTCACAGTGAGCAGC

W7011-4.87.6-z1 (N-S)-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 130) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHS
GVPSRFSSGSGTDFLTISSLPEDVATYYCHQGNTLPLTFGQGTKLEIK

核酸序列(SEQ ID NO: 131) :

GACATCCAAATGACCCAGAGCCCTTCCTCCTTGTCCGCAAGTGTGGGAGATAG
AGTGACCATCACCTGCAGGGCTTCTCAGGATATCTCCAACCTGAACTGGT
ATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGTGCCAAAGCTCCTTATTTACTACACCTCCCGG
CTGCACAGCGGAGTCCCATCTCGCTTCAGCGGGTCAGGCAGCGGCACTGACTT
TACTCTGACAATTAGCAGCCTCCAGCCTGAAGACGTGCGCCACTTACTACTGTC
ATCAGGGGAATACTACCTCCCCCTGACATTCGGGCAGGGGACAAACTGGAGAT
TAAG

W7011-4.155.8-z1-P15-VH

胺基酸序列(SEQ ID NO: 132) :

QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGYAFTSYNMYWVRQARGQRLEWIGYIDP
YNADTTYNQKFKGRVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCLTTAYAMDYW
GQGTLTVTVSS

核酸序列(SEQ ID NO: 133) :

CAAATGCAGCTCGTCCAGTCTGGACCTGAAGTGAAGAAGCCCCGGGACATCCG
TCAAGGTCTCATGTAAGGCTAGCGGGTACGCATTCACTTCCTACAACATGTAC
TGGGTGCGCCAGGCCAGAGGACAGAGGTTGGAGTGGATCGGCTACATCGACC
CATACAACGCCGATACTACCTACAATCAGAAGTTTAAAGGGCGGGTGACCAT
TACCCGGGATATGTCCACCTCCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGGA
GCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCCTGACAACAGCCTATGCCATGGACTAT
TGGGGCCAGGGCACACTTGTGACTGTGAGCAGT

W7011-4.155.8-z1-P15-VK

胺基酸序列(SEQ ID NO: 134) :

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSTVNYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASG
VPSRFSSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCHQWSSYPYTFGQGTKLEIK

核酸序列(SEQ ID NO: 135)：

GACATCCAGCTCACCCAATCCCCTTCTTTCTCTCCGCAAGTGTCGGAGATAG
 GGTGACTATCACCTGCTCAGCTTCTTCAACCGTGAACCTACATGCATTGGTACC
 AGCAGAAGCCCGGGAAAGCCCCAAAGCTGCTGATCTACAGCACCTCCAATCT
 GGCCAGTGGAGTGCCAAGCCGGTTTAGCGGGAGCGGCTCCGGCACTGAATTC
 ACTTTGACAATTAGCAGCCTTCAGCCTGAGGACTTTGCCACATATTACTGTCA
 CCAGTGGTCCAGCTACCCCTACACATTCGGGCAGGGCACAAAGCTGGAGATT
 AAG

【0123】 示例性之人源化抗CD19抗體W7011-4.34.11-z1-m5、W7011-4.87.6-z1 (N-S)或W7011-4.155.8-z1-P15均保持與表現CD3之細胞(例如CD4 T細胞)特異性結合之親和力，並且在該方面至少可與親本小鼠抗體相當，甚至優於親本小鼠抗體。

【0124】 在一些實施形態中，源自人之FR區可包含與其所源自之人免疫球蛋白相同之胺基酸序列。在一些實施形態中，人FR之一個或多個胺基酸殘基由來自親本非人抗體之對應殘基取代。此於某些實施形態中為必需，以使人源化抗體或其片段密切接近非人親本抗體結構。在某些實施形態中，本申請所述之人源化抗體或抗原結合片段包含在各個人FR序列中不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基取代，或者在重或輕鏈可變域之所有FR不超過10、9、8、7、6、5、4、3、2或1個胺基酸殘基取代。在一些實施形態中，此種胺基酸殘基之變化可能僅存在於重鏈FR區、僅存在於輕鏈FR區、或在兩條鏈上均存在。

【0125】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段包含選自下組之重鏈可變域序列：SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 132。在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段包

含選自下組之輕鏈可變域序列：SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 134。

【0126】 在一些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體與抗原結合片段包含重鏈可變域之全部或部分、及/或輕鏈可變域之全部或部分。在一個實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體與抗原結合片段為由本申請所述之重鏈可變區域之全部或部分組成之單域抗體。此種單域抗體之更多資訊可在先前技術中得到(參見例如美國專利號6,248,516)。

【0127】 在某些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體及其抗原結合片段進而包含免疫球蛋白恆定區。在一些實施形態中，免疫球蛋白恆定區包含重鏈及/或輕鏈恆定區。重鏈恆定區包含CH1、鉸鏈及/或CH2-CH3區。在某些實施形態中，重鏈恆定區包含Fc區。在某些實施形態中，輕鏈恆定區包含Cκ。

【0128】 在一些實施形態中，上述抗CD19抗體及其抗原結合片段具有IgG1、IgG2a或IgG2b同種型之恆定區，其具有可藉由本領域公知之各種測定來評價之減少之或耗竭之效應功能(如ADCC或CDC)，例如Fc受體結合測定、C1q結合測定及細胞裂解測定。

【0129】 本申請所述之抗體與抗原結合片段之結合親和力可由 K_D 值表示，其表示當抗原與抗原結合分子之間之結合達到平衡時解離速率與結合速率之比值(k_{off}/k_{on})。使用本領域公知之合適之方法，包括例如流式細胞術測定，可恰當地確定抗原結合親和力(例如 K_D)。在一些實施形態中，可藉由流式細胞術確定不同濃度下抗體與抗原之結合，可首先將確定之平均螢光強度(MFI)對抗體濃度製圖，此時藉由使用Prism第5版本

(GraphPad Software，聖地牙哥，CA)，將特異性結合螢光強度(Y)與抗體濃度(X)之相關性擬合至單址飽和等式： $Y = B_{\max} * X / (K_D + X)$ (Scarchard分析)，可計算出 K_D 值，其中 $B_{\max}$ 係指測試抗體與抗原之最大特異性結合。

【0130】在某些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體及其抗原結合片段能夠特異性地與自然或人工表現在細胞表面上之人/食蟹猴CD19結合。例如，人/食蟹猴CD19 DNA序列可被選殖至表現載體內，並且隨後轉染並在293F細胞中表現，以使得人/食蟹猴CD19蛋白可表現在轉染之293F細胞表面上。

【0131】在一些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體及其抗原結合片段能夠以不超過 5×10^{-9} M、不超過 1×10^{-9} M、不超過 9×10^{-10} M、不超過 8×10^{-10} M、不超過 7×10^{-10} M、不超過 6×10^{-10} M、不超過 5×10^{-10} M、不超過 4×10^{-10} M、不超過 3×10^{-10} M、不超過 2×10^{-10} M或不超過 1×10^{-10} M之結合親和力(K_D)特異性地與表現在細胞表面上之人CD19結合，上述 K_D 值係藉由流式細胞術測定。

【0132】在某些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗體及其抗原結合片段與表現在細胞表面上之食蟹猴CD19交叉反應。

【0133】抗體與表現在細胞上之CD19之結合亦可利用「半最大效應濃度」(EC_{50})值表示，其係指觀察到其最大效應(例如結合或抑制等)之50%時抗體之濃度。 EC_{50} 值可藉由本領域公知之方法測得，例如夾心法(如ELISA)、Western印記、流式細胞術、以及其他結合試驗。在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其片段以不超過0.01 nM、不超過0.02 nM、不超過0.03 nM、不超過0.04 nM、不超過0.05 nM、不超過0.1

nM、不超過0.2 nM、不超過0.3 nM、不超過0.4 nM、不超過0.5 nM、不超過0.6 nM、不超過0.7 nM、不超過0.8 nM、不超過0.9 nM或不超過1 nM之EC₅₀值特異性地與表現在細胞上之人CD19結合，上述EC₅₀值係藉由流式細胞術測定。

【0134】 在某些實施形態中，抗體及其抗原結合片段以與人CD19相似之結合親和力與食蟹猴CD19結合。例如，示例性抗體WBP7011-4.34.11、WBP7011-4.87.6、WBP7011_4.155.8、WBP7011_4.56.1、WBP7011-4.15.10、WBP7011-4.100.1、WBP7011-4.106.3、WBP7011_4.108.3、WBP7011_4.191.6、WBP7011_4.194.10、WBP7011_4.225.7或WBP7011_4.231.5以與人CD19相似之親和力或EC₅₀值與食蟹猴CD19結合。

【0135】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段以不超過0.2 nM、不超過0.5 nM、不超過0.8nM、不超過1 nM、不超過2 nM或不超過3 nM之EC₅₀值特異性地與表現在細胞上之食蟹猴CD19結合，上述EC₅₀值係藉由流式細胞術測定。

【0136】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其片段以不超過1 pM、不超過2 pM、不超過3 pM、不超過4 pM、不超過5pM、不超過6 pM、不超過7 pM、不超過8 pM、不超過9 pM、不超過10 pM、不超過11 pM、不超過12 pM、不超過13 pM、不超過14 pM、不超過15 pM、不超過16 pM、不超過17 pM、不超過18 pM、不超過19 pM、不超過20 pM、不超過21 pM、不超過22 pM、不超過23 pM、不超過24 pM、不超過25 pM、不超過30 pM、不超過35 pM、不超過40 pM、不超過45 pM、不超過50 pM之EC₅₀值被表現CD19之細胞內化，上述EC₅₀值係藉由Fab-Zap法

測定。

【0137】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其片段具有足以用於診斷及/或治療用途之與人CD19特異結合之親和力。許多靶向B細胞之治療方案係藉由臨床使用抗人CD19單株抗體。

【0138】 本申請所述之抗體或其片段可為單株抗體、多株抗體、人源化抗體、嵌合抗體、重組抗體、雙特異性抗體、標記抗體、二價抗體或抗獨特型抗體。重組抗體係在體外而非在動物體內使用重組方法製備之抗體。

【0139】

抗體變體

本申請亦涵蓋本申請所述之抗體及其片段之多種變體。在某些實施形態中，本申請涵蓋本申請所述之示例性抗體之變體，即WBP7011-4.34.11、WBP7011-4.87.6、WBP7011_4.155.8、WBP7011_4.56.1、WBP7011-4.15.10、WBP7011-4.100.1、WBP7011-4.106.3、WBP7011_4.108.3、WBP7011_4.191.6、WBP7011_4.194.10、WBP7011_4.231.5、W7011-4.34.11-z1-m5、W7011-4.87.6-z1 (N-S)或W7011-4.155.8-z1-P15之變體。

【0140】 在某些實施形態中，抗體變體在表1所示之1、2或3個CDR序列中、一個或多個表2所示之FR序列中、本申請所述之重或輕鏈可變區序列中、及/或恆定區(例如Fc區)中包含一個或多個修飾或取代。該等抗體變體保持其親本與CD19特異結合之親和力，但具有一種或多種上述修飾或取代帶來之所需要之特性。例如抗體變體可具有改進之抗原結合親和力、改進之糖基化模式、減少之糖基化風險、減少之脫胺基作用、減少之

或耗竭之效應功能、改進之FcRn受體結合、提高之藥代動力學半衰期、pH值敏感性、及/或對共軛之兼容性(例如一個或多個引入之半胱胺酸殘基)。

【0141】 可使用本領域公知之方法，例如「丙胺酸掃描誘變」，篩選親本抗體序列以識別合適之或較佳之待修飾或取代之殘基(參見例如Cunningham與Wells，(1989) Science，244:1081-1085)。簡要而言，可識別靶標殘基(例如帶正電之殘基，如Arg、Asp、His、Lys及Glu)並由不帶電之或帶負電之胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)取代，產生被修飾之抗體，並且針對目標特性對其進行篩選。若在一個特定之胺基酸位置上之取代表現出目標功能性改變，則該位置可被識別為潛在之用於修飾或取代之殘基。可藉由用另一種殘基(例如半胱胺酸殘基、帶正電荷之殘基等)取代來進一步評價上述潛在之殘基。

【0142】

親和力變體

親和力變體可含有如表1所示之一個或多個CDR序列、表2所示之一個或多個FR序列、或者本申請所述之重鏈或輕鏈可變區序列中之修飾或取代。上述親和力變體保持親本抗體之與CD19特異性結合之親和力，或者甚至相對於親本抗體具有改進之與CD19特異性結合之親和力。在某些實施形態中，CDR序列、FR序列或可變區序列中之至少一個(或全部)取代包含保守取代。

【0143】 本領域技術人員應理解，在表1與表2所示之CDR序列與FR序列中，一個或多個胺基酸殘基可被取代，而得到之抗體或抗原結合片段仍然保持與CD19結合之親和力，或甚至具有改進之結合親和力。可

使用本領域公知之各種方法來達到該目的。例如，可生成抗體變體庫(如 Fab 或 scFv 變體)，並利用噬菌體展示技術表現，隨後針對與人 CD19 結合之親和力對其進行篩選。又例如，可使用電腦軟體虛擬抗體與人 CD19 之結合，並識別抗體上形成結合界面之胺基酸殘基。在取代中可避開該等殘基以防止結合親和力之降低，或者可作為取代之靶標以獲得更強之結合。

【0144】 在某些實施形態中，本申請所述之人源化抗體或抗原決定片段在一個或多個 CDR 序列及/或一個或多個 FR 序列中包含一個或多個胺基酸殘基取代。在某些實施形態中，親和力變體在 CDR 序列及/或 FR 序列中包含總共不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 個取代。

【0145】 在某些實施形態中，上述抗 CD19 抗體及其抗原結合片段包含 1、2 或 3 個與表 1 中列出之序列具有至少 80%(例如至少 85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)之序列同一性之 CDR 序列，而同時保持相對於其親本抗體水平相似或更高之與 CD19 結合之親和力。

【0146】 在某些實施形態中，上述抗 CD19 抗體及其抗原結合片段包含一個或多個與表 2 中列出之序列具有至少 80%(例如至少 85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)之序列同一性之 FR 序列，而同時保持相對於其親本抗體水平相似或更高之與 CD19 結合之親和力。

【0147】 在某些實施形態中，上述抗 CD19 抗體及其抗原結合片段包含一個或多個與下列序列具有至少 80%(例如至少 85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)之序列同一性之可變區序列：SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 102、

SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 130、SEQ ID NO: 134，而同時保持相對於其親本抗體水平相似或更高之與CD19結合之親和力。在一些實施形態中，在選自SEQ ID NO: 94、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 110、SEQ ID NO: 112、SEQ ID NO: 114、SEQ ID NO: 116、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 122、SEQ ID NO: 124、SEQ ID NO: 128、SEQ ID NO: 132、SEQ ID NO: 96、SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 126、SEQ ID NO: 130及SEQ ID NO: 134之序列中，總共有1至10個胺基酸被取代、插入或缺失。在一些實施形態中，上述取代、插入或缺失發生在CDR之外之區域(即在FR)。

【0148】

糖基化變體

本申請所述之抗CD19抗體與抗原結合片段亦包含糖基化變體。可獲取該糖基化變體以提高或降低抗體或抗原結合片段糖基化之程度。

【0149】 上述抗CD19抗體或其抗原結合片段可包括一個或多個帶有側鏈之胺基酸殘基，碳水化合物部分(例如寡糖結構)可附接至上述側鏈。抗體之糖基化通常為N連接或O連接。N連接係指碳水化合物部分附接至天冬胺酸殘基之側鏈，例如，三肽序列中之天冬胺酸殘基，如天冬胺酸-X-絲胺酸及天冬胺酸-X-蘇胺酸，其中X係除脯胺酸以外之任何胺基

酸。O連接之糖基化係指N-乙醯半乳糖胺、半乳糖或木糖之一之糖附接至羥基胺基酸，最常見為附接至絲胺酸或蘇胺酸。對天然糖基化位點之移除可方便地完成，例如藉由改變胺基酸序列，使得存在於該序列中之上述三肽序列(對於N連接之糖基化位點)或者絲胺酸或蘇胺酸殘基(對於O連接之糖基化位點)中之一個被取代。用相似之方式，可藉由引入此種三肽序列或者絲胺酸或蘇胺酸殘基，產生新的糖基化位點。

【0150】

半胱胺酸工程化之變體

本申請所述之抗CD19抗體與抗原結合片段亦涵蓋半胱胺酸工程化之變體，其包括一個或多個引入之游離半胱胺酸胺基酸殘基。

【0151】 游離半胱胺酸殘基係不為二硫鍵之一部分之半胱胺酸殘基。半胱胺酸工程化之變體可用於藉由例如馬來醯亞胺或鹵乙醯基，在工程化之半胱胺酸之位點與例如細胞毒性及/或成像化合物、標籤或放射性同位素、以及其他物質共軛。用於改造抗體或抗原結合片段以引入游離半胱胺酸殘基之方法為本領域公知，參見例如WO2006/034488。

【0152】

Fc變體

本申請所述之抗CD19抗體與抗原結合片段亦包括Fc變體，其包括一個或多個在其Fc區及/或鉸鏈區之胺基酸殘基修飾或取代。

【0153】 在某些實施形態中，上述抗CD19抗體或抗原結合片段包含一個或多個胺基酸取代，上述胺基酸取代改進與新生兒Fc受體(FcRn)pH值依賴性之結合。此種變體在酸性pH值下與FcRn結合，使其得以免於在溶酶體中降解，並且隨後被轉移並釋放至細胞外，因此，此種變

體可具有更長之藥代動力學半衰期。工程化抗體及其抗原結合片段以提高與FcRn之結合親和力之方法為本領域公知，參見例如Vaughn, D.等，Structure，6(1): 63-73，1998；Kontermann, R.等，Antibody Engineering，第1卷第27章：Engineering of the Fc region for improved PK，Springer出版，2010；Yeung, Y.等，Cancer Research，70: 3269-3277 (2010)；及Hinton, P.等，J. Immunology，176:346-356 (2006)。

【0154】在某些實施形態中，上述抗CD19抗體或抗原結合片段包含一個或多個改變抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之胺基酸取代。在Fc區之CH2域之某些胺基酸殘基可被取代以提高ADCC活性。可替代地或額外地，可改變上述抗體上之碳水化合物結構，以提高ADCC活性。藉由抗體工程化改變ADCC活性之方法已記述於先前技術中，參見例如Shields RL等，J Biol Chem. 2001. 276(9): 6591-604；Idusogie EE等，J Immunol. 2000.164(8):4178-84；Steurer W.等，J Immunol. 1995，155(3): 1165-74；Idusogie EE.等，J Immunol. 2001，166(4): 2571-5；Lazar GA.等，PNAS，2006，103(11): 4005-4010；Ryan MC.等，Mol. Cancer Ther.，2007，6: 3009-3018；Richards JO.等，Mol Cancer Ther. 2008，7(8): 2517-27；Shields R. L.等，J. Biol. Chem，2002，277: 26733-26740；Shinkawa T.等，J. Biol. Chem，2003，278: 3466-3473。

【0155】在某些實施形態中，上述抗CD19抗體或抗原結合片段包含一個或多個改變補體依賴毒性(CDC)之胺基酸取代，例如藉由增強或減弱C1q結合及/或補體依賴毒性(CDC)(關於其他Fc區變體之實例，參見例如WO99/51642；Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)；美國專利號5,648,260；美國專利號5,624,821；以及WO94/29351)。

【0156】 在某些實施形態中，上述抗CD19抗體或抗原結合片段包含一個或多個位於Fc區界面之胺基酸取代，以便於及/或促進異二聚體化。該等修飾包含將突起引入第一Fc多肽，以及將腔引入第二Fc多肽，其中上述突起可位於上述空腔內，以促進上述第一與第二Fc多肽之相互作用，以形成異二聚體或複合體。生成具有該等修飾之抗體之方法為本領域公知，例如，如美國專利號5,731,168所述。

【0157】

抗原結合片段

本申請亦提供一種抗CD19抗原結合片段。抗原結合片段之多種類型為本領域公知，並且可基於本申請所述之抗CD19抗體進行研發，包括例如其CDR與FR序列示於表1與表2之示例性抗體、及其不同之變體(如親和力變體、糖基化變體、Fc變體、半胱胺酸工程化抗體等等)。

【0158】 在某些實施形態中，本申請所述之抗CD19抗原結合片段係駱駝化單域抗體(camelized single chain domain antibody)、雙功能抗體(diabody)、單鏈Fv片段(scFv)、scFv二聚體、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv' Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')₂、雙特異性抗體、雙功能抗體(ds diabody)、奈米抗體、域抗體、單域抗體或雙價域抗體。

【0159】 多種技術可用於此種抗原結合片段之生產。示例性之方法包括對完整抗體進行酶消化(參見例如Morimoto等，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；以及Brennan等，Science，229:81 (1985))、由宿主細胞(如大腸桿菌)重組表現(例如對於Fab、Fv及ScFv抗體片段)、如上文討論之噬菌體展示文庫篩選(例如對於ScFv)、以及化學耦合兩個Fab'-SH片段以形成F(ab')₂片段(Carter等，

Bio/Technology 10:163-167 (1992))。生產抗體片段之其他技術對於本領域技術人員而言顯而易見。

【0160】 在某些實施形態中，上述抗原結合片段係scFv。scFv之生成記述於例如WO 93/16185；美國專利號5,571,894；及5,587,458。scFv可在胺基末端或羧基末端與效應蛋白融合以獲得融合蛋白(參見例如Antibody Engineering，Borrebaeck編)。

【0161】 本申請所述之抗CD19抗體或其抗原結合片段可為單株抗體、多株抗體、人源化抗體、嵌合抗體、重組抗體、雙特異性抗體、標記抗體、二價抗體或抗獨特型抗體。重組抗體係在體外使用重組方法而非動物製備之抗體。

【0162】 在某些實施形態中，上述抗體及其抗原結合片段可用作雙特異性或多價抗體或抗體-藥物結合物之基礎。

【0163】

雙特異性抗體、多價抗體

在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段為二價、四價、六價或多價。在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段為單特異性或雙特異性。

【0164】 本申請中使用之術語「價」係指特定分子中存在特定數量之抗原結合位點。因此，術語「二價」、「四價」及「六價」分別表示抗原結合分子中存在兩個結合位點、四個結合位點及六個結合位點。若兩個結合位點均用於與同一抗原或同一表位特異性結合，則二價分子可為單特異性。同樣，三價分子可為雙特異性，例如當兩個結合位點係針對第一抗原(或表位)為單特異性，而第三個結合位點係針對第二抗原(或表位)為特異

性。

【0165】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段可為單特異性，然而係二價、三價或係多價，其具有至少兩個對相同抗原或表位具有特異性之結合位點。在某些實施形態中，與單價之對應抗體相比，此具有與抗原或表位更強之結合。在某些實施形態中，在二價抗原結合部分中，結合位點之第一價與結合位點之第二價結構上相同(即具有相同序列)或結構上不同(即具有不同序列但特異性相同)。

【0166】 在某些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段為雙特異性。在一些實施形態中，本申請所述之抗體及其抗原結合片段具有針對CD19之第一特異性、以及第二特異性。在一些實施形態中，上述第二特異性針對CD19，但針對不同之表位。在一些實施形態中，上述第二特異性針對不同於CD19之第二抗原，而且能夠在與上述第二抗原密接時促進或有助於針對表現CD19之靶細胞之免疫反應。例如，上述雙特異性抗體可將表現CD19之靶細胞與免疫細胞如T細胞或NK細胞密接，藉此促進免疫系統對該靶細胞之識別或消除。

【0167】 本申請所述之雙特異性抗體與抗原結合片段可用本領域公知之任意合適之方法製備。在傳統方法中，可在宿主細胞中共表現兩個具有不同抗原特異性之免疫球蛋白重鏈-輕鏈對，以用重組方式產生雙特異性抗體(參見例如Milstein與Cuello，Nature，305: 537 (1983))，隨後藉由親和層析純化。

【0168】 亦可使用重組方法，其中編碼兩個特異性之抗體重鏈可變域之序列分別與免疫球蛋白恆定域序列融合，隨後插入表現載體，其與輕鏈序列之表現載體共轉染至合適之宿主細胞，以重組表現上述雙特異性抗

體(參見例如 WO 94/04690 ; Suresh 等 , Methods in Enzymology , 121:210 (1986))。相似地 , scFv二聚體亦可重組構建 , 並且自宿主細胞表現(參見例如 Gruber 等 , J. Immunol. , 152:5368 (1994))。

【0169】 在另一種方法中 , 來自 Fos 與 Jun 蛋白之亮胺酸拉鏈肽可藉由基因融合連接至兩個不同抗體之 Fab' 部分。連接之抗體在鉸鏈區被還原成四個半抗體(即單體) , 並隨後再氧化以形成異二聚體(Kostelny 等 , J. Immunol. , 148(5):1547-1553 (1992))。

【0170】 上述兩個抗原結合域亦可被共軛或交聯以形成雙特異性抗體或抗原結合片段。例如 , 一個抗體可與生物素耦合而另一個抗體與親和素耦合 , 並且生物素與親和素之間之強連接會使上述兩個抗體錯合在一起 , 以形成雙特異性之抗體(參見例如美國專利號 4,676,980 ; WO 91/00360、WO 92/00373 及 EP 03089)。又例如 , 上述兩個抗體或抗原結合片段可藉由本領域公知之傳統方法交聯 , 例如 , 如美國專利號 4,676,980 所述。

【0171】 雙特異性之抗原結合片段可生成自雙特異性抗體 , 例如藉由蛋白水解裂解或藉由化學連接。例如 , 可製備抗體之抗原結合片段(例如 Fab') , 並轉變為 Fab'-巰基衍生物並隨後與具有不同之抗原特異性之另一轉變之 Fab' 衍生物混合並發生反應 , 以形成雙特異性之抗原結合片段(參見例如 Brennan 等 , Science , 229: 81 (1985))。

【0172】 在某些實施形態中 , 上述雙特異性抗體或抗原結合片段可在界面處改造 , 使得可形成 knob-into-hole 連接 , 以促進兩個不同之抗原結合位點之異二聚體化。用於本申請之「knob-into-hole」係指兩個多肽(如 Fc)之間之相互作用 , 其中一個多肽由於存在具有龐大側鏈之胺基酸殘

基(例如酪胺酸或色胺酸)而具有突起(即「knob」),而另一個多肽具有有小側鏈胺基酸殘基(例如丙胺酸或蘇胺酸)位於其中之空腔(即「hole」),並且上述突起可置於上述空腔內以促進上述兩個多肽之相互作用,以形成異二聚體或複合體。用knobs-into-holes生成多肽之方法為本領域公知,例如,如美國專利號5,731,168所述。

【0173】

結合物

在一些實施形態中,上述抗CD19抗體及其抗原結合片段與結合物連接。結合物係可附接至上述抗體或其抗原結合片段之非蛋白質部分。可設想,本申請所述之抗體或抗原結合片段可與多種結合物連接(參見例如「Conjugate Vaccines」, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse與R. E. Lewis, Jr.(編), Carger Press, 紐約(1989))。該等結合物可藉由共價結合、親和結合、嵌入、協同結合(coordinate binding)、錯合、結合、混合或加入等其他方式與上述抗體或抗原結合片段連接。在某些實施形態中,上述抗體或其抗原結合片段經連接子與一個或多個結合物連接。在某些實施形態中,上述連接子係胺連接子、二硫連接子、雙官能連接子、二肽連接子、葡萄糖醛酸連接子、硫醚連接子。

【0174】 在某些實施形態中,本申請中公開之抗CD19抗體與抗原結合片段可工程化以在表位結合部分之外含有特定位點,上述特定位點可用於與一個或多個結合物結合。例如,該位點可包括一個或多個反應性之胺基酸殘基(例如半胱胺酸或組胺酸殘基),以便於與結合物之共價連接。

【0175】 上述結合物可為治療劑(例如化療劑)、放射性同位素、可

檢測之標記(例如鐳系元素、發光標記、螢光標記或酶-受質標記)、藥代動力學修飾部分或純化部分(如磁珠或奈米顆粒)。

【0176】 可檢測之標記之例可包括螢光標記(例如螢光素、羅丹明、丹磺醯、藻紅蛋白或德克薩斯紅)、酶-受質標記(例如辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、螢光素酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、糖氧化酶或 β -D-半乳糖苷酶)、放射性同位素、其他鐳系元素、發光標記、發色團部分、地高辛、生物素/親和素、DNA分子或金以進行檢測。

【0177】 放射性同位素之實例可包括 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 及 ^{32}P 。放射性同位素標記之抗體可用於受體靶向之成像實驗。

【0178】 在某些實施形態中，上述結合物可為藥代動力學修飾部分，如PEG，其幫助延長抗體之半衰期。其他適宜之聚合物包括例如羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、乙二醇/丙二醇共聚物等。

【0179】 在某些實施形態中，上述結合物可為純化部分，如磁珠或奈米顆粒。

【0180】

抗體-藥物結合物

在某些實施形態中，本發明提供一種抗體-藥物結合物(ADC)，其包含上文所述之任意與細胞毒性劑(如化療劑、藥物、生長抑制劑、毒素或放射性同位素(即放射結合物))共軛之抗CD19抗體或抗原結合片段。

【0181】 抗體-藥物結合物可用於細胞毒性劑之局部遞送，例如在癌

症治療中。此使得可將細胞毒性劑定向遞送至腫瘤，並在其中進行胞內積累。這一效果格外有意義，其原因在於若將該等未共軛之細胞毒性劑全身施用對正常細胞和要消除的腫瘤細胞，可能均造成無法接受之水平之毒性 (Baldwin等(1986) Lancet pp.(1986年3月15日):603-05；Thorpe，(1985)「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications，A. Pinchera等(編)，pp. 475-506；Syrigos與Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614；Niculescu-Duvaz與Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172；美國專利號4,975,278)。

【0182】在某些實施形態中，上述細胞毒性劑可為對細胞有害或可能損壞或殺死細胞之任何試劑。在某些實施形態中，上述細胞毒性劑任選地係細胞毒素、DNA烷化劑、拓撲異構酶抑制劑、微管蛋白結合劑或其他抗癌藥物。

【0183】酶活性細胞毒素之實例包括細菌毒素及植物毒素，例如白喉毒素、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌)、蓖麻毒素、相思豆毒素、葫蘆根毒素、八疊球菌毒素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陸蛋白(PARI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻風樹毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制劑、白樹毒素、侷限麴菌素、酚黴素、依諾黴素以及單端孢黴烯族毒素(參見例如WO 93/21232)。作用本領域公知之方法(例如，如Vitetta等(1987) Science，238:1098所述)，此種大分子毒素可與本申請所述之抗體或抗原結合片段共軛。

【0184】上述細胞毒性劑亦可為小分子毒素及藥物，如格爾德黴素(Mandler等(2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581；

Mandler等(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、美登素類化合物(EP 1391213；Liu等(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、卡奇黴素(Lode等(1998) *Cancer Res.* 58:2928；Hinman等(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)、紫杉醇、細胞鬆弛素B、短桿菌肽D、溴化乙錠、吐根鹼、絲裂黴素、依託泊苷、替尼泊甙、長春新鹼、長春鹼、長春地辛、秋水仙鹼、阿黴素、柔紅黴素、二羥基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神黴素、放線菌素D、1-去氫甾酮、糖皮質激素、普魯卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛爾、嘌呤黴素及其類似物、抗代謝物(例如甲胺蝶呤、6-巰基嘌呤、6-硫鳥嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶達卡巴嗪)、烷化劑(例如氮芥、塞替派苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法侖、卡莫司汀(BSNU)及洛莫司汀(CCNU)、環磷醯胺、白消安、二溴甘露醇、鏈脲黴素、絲裂黴素C及二氯二胺鉑(II)(DDP)順鉑)、蒽環類抗生素(例如柔紅黴素(以前之道諾黴素)及阿黴素)、抗生素(例如更生黴素(以前稱為放線菌素)、博來黴素、光神黴素及胺茴黴素(AMC))以及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)、卡奇黴素、美登素類化合物、海兔毒素、奧利他汀、單端孢黴烯族毒素及CC1065、及其具有細胞毒性活性之衍生物。

【0185】 上述細胞毒性劑亦可為高放射性同位素。實例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²、以及Lu之放射性同位素。放射性同位素與抗體共軛之方法為本領域公知，例如經由適宜之配體試劑(參見例如WO94/11026；*Current Protocols in Immunology*，卷1及卷2，Coligen等編，Wiley-Interscience，紐約，N.Y., Pubs. (1991))。配體試劑具有可與放射性同位素金屬結合、螯合或以其他方式錯合之螯合配體，亦具有易與抗體或抗原結合片段之半胱胺酸之巰基起反應之官能團。

示例性之螯合配體包括 DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA 及 TETA(Macrocyclics，德州達拉斯)。

【0186】本申請所述之抗體(或抗原結合片段)與細胞毒性劑之結合物可使用各種雙功能蛋白連接劑產生。示例性之雙功能連接試劑包括如N-琥珀醯亞胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸(SPDP)、琥珀醯亞胺-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸(SMCC)、亞胺基硫代烷(IT)、亞胺酸酯之雙功能衍生物(如己二亞胺鹽酸二甲酯)、活性酯(如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(如戊二醛)、雙疊氮化合物(如雙(對疊氮苯甲醯)己二胺)、雙重氮鹽衍生物(如雙(對重氮苯甲醯)乙二胺)、二異氰酸酯(如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

【0187】在某些實施形態中，本申請所述之ADC係用選自下組之連接試劑製備：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPRH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基EMCS、磺基GMBS、磺基KMUS、磺基MBS、磺基SIAB、磺基SMCC及磺基SMPB、以及SVSG(琥珀醯亞胺-(4-乙烯磺)苯甲酸)。該等連接試劑可在市場上購得(例如來自Pierce生物技術公司，美國伊利諾伊羅克福德，參見2003-2004 Applications Handbook and Catalog第467-498頁)。

【0188】在某些實施形態中，上述連接子在特定之生理環境下可裂解，從而有助於釋放細胞內之細胞毒性藥物。例如，上述連接子可為酸不穩定之連接子、對肽酶敏感之連接子、光不穩定之連接子、二甲基連接子或含二硫化物之連接子(Chari等，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利號5,208,020)。在一些實施形態中，上述連接子可包含胺基酸殘基，如二肽、三肽、四肽或五肽。上述連接子中之上述胺基酸殘基可為天

然之或非天然存在之胺基酸殘基。此種連接子之實例包括：纈胺酸-瓜胺酸(ve或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)、甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-yl-cit)、甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)、纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苄氧羰基(「vc-PAB」)。在胺基酸連接子組分對酶裂解之選擇性方面，可藉由特定之酶進行設計與優化，例如腫瘤相關蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D、或纖溶蛋白酶。

【0189】 在某些實施形態中，在本申請所述之ADC中，抗體(或抗原結合片段)以約1至約20、約1至約6、約2至約6、約3至約6、約2至約5、約2至約4或約3至約4之抗體：藥劑比例，與一個或多個細胞毒性劑共軛。

【0190】 本申請所述之ADC可藉由本領域公知之任意適宜之方法製備。在某些實施形態中，上述抗體(或抗原結合片段)之親核基首先與雙功能連接子試劑反應，並隨後與上述細胞毒性劑連接，或者反方向進行，即上述細胞毒性劑之親核基首先與雙功能連接子反應，並隨後與上述抗體連接。

【0191】 在某些實施形態中，上述細胞毒性劑可含有(或被修飾為含有)巰基反應性之官能團，其可與本申請所述之抗體或抗原結合片段之游離半胱胺酸之半胱胺酸巰基發生反應。示例性之巰基反應性之官能團包括例如馬來醯亞胺、碘乙醯胺、吡啶二硫、鹵乙醯基、琥珀醯亞胺酯(例如NHS、N-羥基琥珀醯亞胺)、異硫氰酸酯、磺醯氯、2,6-二氯三吡啶、五氟苯基酯或亞磷醯胺(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-

Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, 倫敦 (1990) Bioconjugate Chem. 1:2 ; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, 聖地牙哥, pp. 40-55, 643-671)。

【0192】 上述細胞毒性劑或上述抗體在相共軛以形成上述ADC之前，可與連接試劑反應。例如，可預先形成、分離、純化及/或表徵細胞毒性劑之N-羥基琥珀醯亞胺酯(NHS)，或者，NHS可以原位形成並與抗體之親核基反應。通常，上述結合物之羧基形式藉由與下列試劑之某些組合反應而激活：碳二亞胺試劑(例如二環己基碳二亞胺；二異丙基碳二亞胺)或脲試劑(例如TsTu(O--(N-琥珀醯亞胺)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸鹽)、HBTU(O-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽)或HATU(O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽)、激活劑(如1-羥基苯并三唑(HOBt)、以及給出NHS酯之N-羥基琥珀醯亞胺。在某些情況下，可藉由原位激活及反應連接上述細胞毒性劑與上述抗體，以一步形成上述ADC。其他激活及連接試劑包括TBTU(2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸鹽)、TFFH(N,N',N'',N'''-四甲基脲-2-氟-六氟磷酸鹽)、PyBOP(苯并三唑-1-基-氧基三吡咯啶基磷六氟磷酸鹽)、EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧羰基-1,2-二氫喹啉)、DCC(二環己基碳二亞胺)；DIPCDI(二異丙基碳二亞胺)、MSNT(1-(均三甲苯基-2-磺醯基)-3-硝基-1H-1,2,4-三唑)、以及芳基磺醯鹵化物(例如三異丙基苯磺醯氯化物。在另一個實例中，上述抗體或抗原結合片段可與生物素共軛，隨後與親和素共軛之第二結合物間接共軛。

【0193】

美登素與美登素類化合物

在一個實施形態中，本申請所述之任意抗CD19抗體或抗原結合片段與一個或多個美登素類分子共軛。美登素類化合物係利用抑制微管蛋白之聚合作用之有絲分裂抑制劑。

【0194】 適於用作美登素類藥物部分之美登素化合物(如美登醇及C-3美登醇酯)為本領域公知，並且其可依照已知方法從天然來源中分離、使用基因工程技術生產(參見Yu等(2002) PNAS 99:7968-7973)或者可依照已知方法合成製備美登醇及美登醇類似物(參見例如美國專利號4,137,230；4,248,870；4,256,746；4,260,608；4,265,814；4,294,757；4,307,016；4,308,268；4,308,269；4,309,428；4,313,946；4,315,929；4,317,821；4,322,348；4,331,598；4,361,650；4,364,866；4,424,219；4,450,254；4,362,663；及4,371,533)。

【0195】 適宜之美登素類化合物公開於例如美國專利號5,208,020、以及本申請提及之其他專利或非專利出版物中。示例性之美登素類化合物為美登醇、以及在美登醇分子之芳環中或在其他位置上被修飾之美登醇類似物，參見例如C-49-去氫(美國專利號4,256,746)；C-20-羥基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氫(美國專利號4,361,650及4,307,016)；C-20-去甲氧基、C-20-醯氧基(--OCOR)+/-去氫(美國專利號4,294,757)、C-9-SH(美國專利號4,424,219)；C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH₂OR)(美國專利號4,331,598)；C-14-羥甲基或醯氧基甲基(CH₂OH或CH₂OAc)(美國專利號4,450,254)；C-15-羥基/醯氧基(美國專利號4,364,866)；C-15-甲氧基(美國專利號4,313,946及4,315,929)；C-18-N-去甲基(美國專利號4,362,663及4,322,348)；以及4,5-去氧基(美國專利號4,371,533)。在某些實施形態中，本申請所述之與上述抗體共軛之美登素類化合物係DM1(N2'-去乙醯-

N2'-(3-巰基-1-氧代丙基)-美登素)或DM4(N2'-去乙醯-N2'-(4-巰基-4-甲基-1-氧代戊基)-6-甲基美登素)。

【0196】 可藉由將抗體化學連接至美登素類分子來製備抗CD19抗體-美登素類化合物結合物，而上述抗體或上述美登素類分子之生物活性均不會顯著減少。參見例如美國專利號5,208,020(其公開內容明確地藉由引用併入本申請)。在某些實施形態中，每個抗體分子平均與1至4個、2至4個或3至4個美登素類分子共軛，而對上述抗體之功能或溶解性無負面影響。

【0197】 美登素類部分可經由本領域公知之任意適宜之連接子，與抗體或抗原結合片段連接，參見例如美國專利號5,208,020、6,441,163或歐洲專利0 425 235 B1、Chari等，Cancer Research 52:127-131 (1992)，以及US 2005/0169933 A1，其公開內容明確地藉由引用併入本申請。本申請所述之ACD中之連接子包括二巰基、硫醚基、酸不穩定基、光不穩定基、肽酶不穩定基或酯酶不穩定基。在某些實施形態中，本申請所述之ACD中之連接子係雙功能蛋白耦合劑，如N-琥珀醯亞胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸(SPDP)、琥珀醯亞胺-4-(N-馬來醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸(SMCC)、N-琥珀醯亞胺-4-(2-吡啶巰基)戊酸(SPP)、亞胺基硫雜(IT)、亞胺酸酯之雙功能衍生物(如己二亞胺鹽酸二甲酯)、活性酯(如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(如戊二醛)、雙疊氮化合物(如雙(對疊氮苯甲醯)己二胺)、雙重氮鹽衍生物(如雙(對重氮苯甲醯)乙二胺)、二異氰酸酯(例如甲苯2,6-二異氰酸酯)、以及組胺反應性之氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

【0198】 根據連接子之不同類型，上述連接子可在各種位置附接至

上述美登素類分子。例如，使用傳統之耦合技術，可藉由與羥基反應形成酯連接子。上述反應可發生在具有羥基之C-3位置、用羥甲基修飾之C-14位置、用羥修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置。在一個較佳之實施形態中，上述連接子形成於美登醇或美登醇類似物之C-3位置。

【0199】

奧利他汀與海兔毒素

在一個實施形態中，本申請所述之任意抗CD19抗體或抗原結合片段與一個或多個海兔毒素、海兔毒素肽類似物及衍生物、或奧利他汀共軛(美國專利號5,635,483；5,780,588)。海兔毒素與奧利他汀推測藉由干擾微管動力學、GTP水解、以及核分裂與細胞分裂，而具有抗癌及抗真菌活性(參見例如美國專利號5,663,149；Pettit等(1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965；Woyke等(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)。

【0200】 示例性之奧利他汀包括MMAE與MMAF。上述奧利他汀/海兔毒素藥物部分可依照以下方法製備：US 2005/0238649；美國專利號5,635,483；美國專利號5,780,588；Pettit等(1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465；Pettit等(1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277；Pettit, G. R.等，*Synthesis*，1996，719-725；Pettit等(1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863；及Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7):778-784。

【0201】 上述海兔毒素或奧利他汀藥物部分可藉由上述肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端附接至上述抗體(WO 02/088172)。

【0202】

嵌合抗原受體(CAR)組合物

本發明亦提供一種嵌合抗原受體(CAR)，上述CAR包含本申請所述之與CD19與T細胞活化部分特異性結合之抗體之抗原結合片段。在一些實施形態中，上述T細胞活化部分包含TCR之天然T細胞活化部分。在一些實施形態中，上述T細胞活化部分包含TCR之跨膜域與胞內信號域。

【0203】

抗原結合片段

在一些實施形態中，上述抗原結合片段可為源自本申請所述之任意一個或多個抗體之與CD19結合之任意片段，包括但不限於抗原識別域。在一些實施形態中，上述抗原結合片段最佳為源自上述CAR最終會用於其中之同一物種。例如用於人時，用於上述CAR之抗原結合片段最佳為源自人抗體或人源化抗體。在一些實施形態中，上述抗原結合片段係單鏈可變片段(scFv)。在一些實施形態中，上述抗原結合片段可以多種其他之形式存在，包含例如Fv、Fab及(Fab')₂、以及雙功能之(即雙特異性之)雜合抗體片段(例如Lanzavecchia等，Eur. J. Immunol. 17，105 (1987))。

【0204】

跨膜域

關於跨膜域，在各種實施形態中，上述CAR設計為包含與上述CAR之胞外域融合之跨膜域。在一個實施形態中，使用與上述CAR中之一個域天然相連之跨膜域。在一些情況下，可選擇或藉由胺基酸取代修飾上述跨膜域，以避免該跨膜域與相同或不同之表面膜蛋白之跨膜域結合，從而使與受體複合體之其他構件之相互作用最小化。

【0205】 上述跨膜域可源自天然或合成之來源。當上述來源天然

時，上述域可源自任意膜結合或跨膜蛋白。本發明中特定用途之跨膜域可源自下組(即至少包含下組之跨膜區)：T細胞受體之 α 、 β 或 ζ 鏈、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。在一些情況下，亦可採用多種人鉸鏈，包括人Ig(免疫球蛋白)鉸鏈。

【0206】 在一個實施形態中，上述跨膜域可為合成，此時其包含主要為疏水性之殘基，如亮胺酸與纈胺酸。在一個方面，在合成之跨膜域之兩端各可見苯丙胺酸、色胺酸及纈胺酸之三聯體。任選地，長度為2至10個胺基酸之間之短寡肽或多肽連接子可形成上述CAR之跨膜域與胞質信號域之間之連接。甘胺酸-絲胺酸二聯體提供格外適宜之連接子。

【0207】

信號傳導域

本發明所述之CAR之信號傳導域負責對上述CAR所在之T細胞之至少一個正常TCR效應功能之激活。T細胞之TCR效應功能可為例如細胞殺傷活性或輔助活性，包括細胞因子之分泌。因此術語「信號轉導域」係指轉導TCR效應功能信號並且引導T細胞進行指定功能之蛋白之部分。雖然通常可採用整個胞內信號轉導域，但在很多情況下，無需使用整條鏈。對於使用胞內信號轉導域之截短之部分之情況，該截短之部分只要能轉導效應功能信號，則可代替完整鏈使用。術語胞內信號域因而意在包括胞內信號轉導域之足以轉導TCR效應功能信號之任意截短之部分。

【0208】 用於本發明所述之CAR之胞內信號域之實例包括T細胞受體(TCR)之胞質序列、以及在抗原受體參與後協同作用以啟動信號轉導之共受體、以及該等序列之任意衍生物或變體、及具有相同功能性性能之任

意合成之序列。

【0209】 已知由TCR單獨生成之信號不足以使T細胞完全活化，而還需要二級或共刺激信號。因此，T細胞活化可謂係由兩類不同之胞質信號序列介導：一類藉由TCR啟動抗原依賴之初級活化(初級胞質信號序列)，一類以抗原非依賴之方式作用，以提供二級或共刺激信號(二級胞質信號序列)。

【0210】 初級胞內信號轉導序列以刺激性之方式或以抑制性之方式調節TCR複合體之初級活化。以刺激性之方式作用之初級胞內信號序列可含有稱為免疫受體基於酪胺酸之活化模體或ITAM之信號模體。

【0211】 在本發明中有特別用途之含有初級胞質信號序列之ITAM之實例包括源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d之ITAM。特佳為本發明所述之CAR中之胞質信號分子包含源自CD3- ζ 之胞質信號序列。

【0212】 在一個較佳之實施形態中，上述CAR之胞內信號域設計為僅包含CD3- ζ 信號域本身，或包含其與可用於本發明所述之CAR之背景下之任意其他理想之胞質域之組合。例如，上述CAR之胞內信號域可包含CD3 ζ 鏈部分及共刺激信號區。上述共刺激信號區係指上述CAR之包含共刺激分子之胞內域之部分。共刺激分子係細胞表面分子，而非抗原受體或其配體，其係用於淋巴細胞對抗原之有效反應所需者。此種分子之實例包括CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴細胞功能關聯抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、以及與CD83特異性結合之配體等。上述CD3 ζ 鏈部分與上述共刺激信號區可按隨機或指定之順序彼此連接。任選地，例如長度

為2至10個胺基酸之間之短寡肽或多肽連接子可形成連接。甘胺酸-絲胺酸之二聯體提供格外適宜之連接子。

【0213】 在一個方面，本發明進而提供一種編碼本申請所述之CAR之核酸序列，包含編碼本申請所述之抗體之抗原結合片段之第一多核苷酸序列，以及任選地，編碼TCR之跨膜域與胞內信號傳導域之第二多核苷酸序列。在一些實施形態中，編碼上述抗原結合片段之序列與編碼TCR之上述跨膜域與上述信號傳導域之序列可操作地連接。在一些實施形態中，上述信號傳導域包含共刺激信號區及/或CD3 ζ 鏈部分。編碼所需分子之核酸序列可使用本領域公知之重組方法獲得，例如使用標準技術，藉由篩選來自表現上述基因之細胞之文庫、藉由從已知包括上述基因之載體中獲得上述基因、或者藉由從含有上述基因細胞與組織中直接分離。或者，目標基因可藉由合成產生，而不藉由選殖產生。

【0214】 在一個方面，本發明提供一種包含編碼本申請所述之CAR之核酸序列之載體。在一些實施形態中，上述載體係可被直接轉導入細胞之表現本發明所述之CAR之逆轉錄病毒與慢病毒載體構建，或可被直接轉導入細胞之RNA構建。

【0215】 在一個方面，本發明提供一種表現本申請所述之CAR之分離之宿主細胞。

【0216】 在一個方面，本發明進而提供一種用於在個體中激活T細胞介導之針對表現CD19之靶標之免疫反應之方法，上述方法包含向上述個體施用有效量之表現本申請所述之CAR之T細胞。

【0217】

多核苷酸與方法

本發明提供一種編碼上述抗CD19抗體及其抗原結合片段之分離之多核苷酸。在某些實施形態中，上述分離之多核苷酸包含一個或多個如下所示之編碼示例性之抗體之可變區之核苷酸序列：SEQ ID NO：95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133及/或135。使用傳統之步驟，可容易地對編碼上述單株抗體之DNA進行分離及定序(例如藉由使用能夠與編碼上述抗體之重及輕鏈之基因特異性結合之寡核苷酸探針)。編碼之DNA亦可藉由合成方法獲得。

【0218】 使用本領域公知之重組技術，可將編碼上述抗CD19抗體及其抗原結合片段之分離之多核苷酸(例如包括如下所示之序列：SEQ ID NO：95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133及/或135)插入載體，用於進一步之選殖(DNA之擴增)或用於表現。多種載體可供選擇。載體組分通常包括但不限於下列之一種或多種：信號序列、複製起始點、一種或多種標記基因、增強子元件、啟動子(例如SV40、CMV、EF-1 α)及轉錄終止序列。

【0219】 在一些實施形態中，載體體系包括哺乳動物、細菌、酵母體系等，並且包含質粒，例如但不限於pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pCMV、pEGFP、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMD18-T、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS420、pLexA、pACT2.2等、以及其他可從實驗室獲得或市售之載體。適宜之載體可包括質粒或病毒載體(例如複製缺陷型

逆轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)。

【0220】 可將包含編碼上述抗體或抗原結合片段之多核苷酸序列之載體引入宿主細胞，用於選殖或基因表現。本申請中適用於選殖或表現上述之載體中之DNA之宿主細胞為上述之原核、酵母或高等真核細胞。適用於本申請用途之原核細胞包括真細菌，如革蘭氏陰性菌或革蘭氏陽性菌，例如，腸桿菌科，如大腸桿菌、腸桿菌屬、歐文氏菌屬、克雷白氏桿菌屬、變形桿菌屬、沙門氏菌屬如鼠傷寒沙門(氏)桿菌、沙雷氏菌屬如黏質沙雷氏菌、以及志賀氏菌屬、及桿菌屬如枯草芽孢桿菌及地衣芽孢桿菌、假單胞菌如綠膿桿菌及鏈黴菌。

【0221】 除了原核細胞以外，真核微生物如絲狀真菌或酵母亦可作為宿主細胞選殖或表現編碼抗CD19抗體之載體。釀酒酵母、或麵包酵母係最常用之低等真核宿主微生物。但是，許多其他屬、種及株均較常用且在本發明中適用，如粟酒裂殖酵母；克魯維酵母屬宿主如乳酸克魯維酵母、脆壁克魯維酵母(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母(ATCC 16,045)、魏氏克魯維酵母(ATCC 24,178)、克魯維酵母(ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母(ATCC 36,906)、耐熱克魯維酵母及馬克斯克魯維酵母；解脂耶氏酵母(EP 402,226)；巴斯德畢赤酵母(EP 183,070)；假絲酵母；里氏木黴(EP 244,234)；鏈孢黴；西方許旺酵母，如：西方許旺酵母；及絲狀真菌，如：脈孢菌、青黴菌、彎頸黴及曲黴菌，如：鉤巢麴黴及黑麴黴。

【0222】 本發明中提供之適用於表現糖基化抗體或其抗原結合片段之宿主細胞由多細胞生物衍生得到。無脊椎細胞之實例包括植物與昆蟲細胞。已發現多種桿狀病毒株(baculoviral strains)及其變體以及對應之許可

性昆蟲宿主細胞(permissive insect host cells)，來自於諸如以下之宿主：草地夜蛾(毛蟲)、埃及斑蚊(蚊子)、白紋伊蚊(蚊子)、黑腹果蠅(果蠅)及家蠶。多種用於轉染之病毒株為公眾可得，例如苜蓿銀紋夜蛾核型多角體病毒與家蠶核型多角體病毒之Bm-5變種，該等病毒均可在本發明中使用，特別是用於轉染草地夜蛾細胞。棉花、玉米、土豆、大豆、矮牽牛花、西紅柿及煙草之植物細胞培養亦可用作宿主。

【0223】但是，最感興趣者為脊椎細胞，且脊椎細胞之培養(組織培養)已經成為常規操作。可用之哺乳動物宿主細胞實例有：SV40轉化之猴腎細胞CV1系(COS-7，ATCC CRL 1651)；人胚胎腎細胞系(293或懸浮培養之293細胞亞純系，Graham等，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼地鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO，Urlaub等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠睪丸支持細胞(TM4，Mather，Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76，ATCC CRL-1587)；人宮頸癌細胞(HELA，ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK，ATCC CCL 34)；布法羅大鼠肝細胞(BRL 3A，ATCC CRL 1442)；人肺細胞(W138，ATCC CCL 75)；人肝細胞(Hep G2，HB 8065)；小鼠乳腺癌(MMT 060562，ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人肝癌細胞系(Hep G2)。在某些較佳之實施形態中，上述宿主細胞為293F細胞。

【0224】用上述之可產生抗CD19抗體之表現或選殖載體轉化宿主細胞，並將其常在規之營養培養基中培養，上述營養培養基經修飾後適宜於誘導啟動子、選擇轉化細胞或擴增編碼目的序列之基因。在另一實施形

態中，上述抗體可藉由本領域公知之同源重組之方法製得。

【0225】 本發明中用於產生上述抗體或其抗原結合片段之宿主細胞可在多種培養基中培養。市售之培養基如Ham's F10(Sigma)、最低基本培養液(MEM, (Sigma))、RPMI-1640(Sigma)及Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Sigma)可用於培養上述宿主細胞。又，任何在Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等 Anal. Biochem. 102:255 (1980), 美國專利號4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 或5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美國專利申請Re. 30,985中說明之培養基均可用作上述宿主細胞之培養基。該等培養基均可添加必要之激素及/或其他生長因子(如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽類(如氯化鈉、氯化鈣、氯化鎂及磷酸鹽)、緩衝液(如HEPES)、核苷酸(如腺苷酸及胸腺嘧啶)、抗生素(如慶大黴素)、微量元素(定義為終濃度通常在微莫耳範圍無機化合物)、及葡萄糖或與之等同之能量源。上述培養基亦可含有本領域公知之適當濃度之任何其他必要之添加劑。上述培養基之條件，如溫度、pH值等類似條件係選擇用於表現之宿主細胞此前所使用之條件，為普通技術人員所熟知。

【0226】 從上述細胞中製得之抗CD19抗體或其抗原結合片段可採用純化方法進行純化，例如羧磷灰石層析、凝膠電泳、透析、DEAE-纖維素離子交換層析柱、硫酸銨沈澱、鹽析以及親和層析，其中親和層析為較佳之純化技術。

【0227】 在某些實施形態中，固定於固相之蛋白A用於上述抗體及其抗原結合片段之免疫親和純化。上述抗體之種類以及上述抗體中存在任何免疫球蛋白之Fc結構域決定了蛋白A作為親和配體是否適合。蛋白A可

用於純化基於人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。蛋白G適用於所有鼠源異構體及人 $\gamma 3$ (Guss等, EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。瓊脂糖係最常用之親和配體附著基質, 但亦可選用其他基質。機械力穩定之基質如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯)苯與用瓊脂糖相比可實現更快之流速及更短之處理時間。如該抗體含有CH3結構域, 則可用Bakerbond ABX.TM樹脂進行純化(J. T. Baker, 新澤西菲利普斯堡)。亦可根據需要獲得之抗體確定其他蛋白純化之技術, 如離子交換柱中之分餾、乙醇沈澱、反相HPLC、矽膠層析、基於陰離子或陽離子交換樹脂之肝素瓊脂糖凝膠層析(如聚天冬胺酸柱)、層析聚焦、SDS-PAGE、以及硫酸銨沈澱。

【0228】 在任意初步純化步驟之後, 可用低pH值疏水相互作用層析之方法處理含有感興趣之抗體與雜質之混合物, 用pH值約2.5~4.5之洗滌緩衝液, 較佳為於低鹽濃度下進行(例如, 從約0至0.25 M鹽濃度)。

【0229】

藥物組合物

本申請進而提供一種包含本申請所述之抗CD19抗體或其抗原結合片段或抗體-藥物結合物之藥物組合物、及一個或多個藥學上容許之載劑。

【0230】 用本申請中公開之藥物組合物中之藥學上容許之載劑可包括: 例如, 藥用容許之液體、凝膠或固體載劑、水相溶劑、非水相溶劑、抗微生物物質、等滲物質、緩衝液、抗氧化劑、麻醉劑、懸浮劑/分散劑、螯合劑、稀釋劑、助劑、輔料或無毒輔助物質、其他本領域公知之組分或以上之多種組合。

【0231】 適用之組分可包括: 例如, 抗氧劑、填充劑、黏合劑、崩

解劑、緩衝液、防腐劑、潤滑劑、攪味劑、增稠劑、著色劑、乳化劑或穩定劑例如糖及環糊精。適用之抗氧劑可包括：例如，甲硫胺酸、抗壞血酸、EDTA、硫代硫酸鈉、鉑、過氧化氫酶、檸檬酸、半胱胺酸、巰基甘油、巰基乙酸、巰基山梨醇、丁基甲基茴香醚、丁基化羥基甲苯及/或沒食子酸丙酯。如本發明所公開，在一種含有本發明公開之抗體或其抗原結合片段之組合物中包括一種或多種抗氧劑如甲硫胺酸，可降低上述抗體或其抗原結合片段之氧化。對氧化作用之減少可防止或減少結合親和力之降低，從而提高抗體穩定性並延長保質期。因此，在某些實施形態中，本發明提供之組合物中含有一種或多種上述之抗體或其抗原結合片段以及一種或多種抗氧化劑例如甲硫胺酸。本發明進而提供一種多種方法，藉由將本發明中提供之抗體或其抗原結合片段與一種或多種抗氧劑混合，例如甲硫胺酸，可防止上述抗體或其抗原結合片段氧化、延長其保質期及/或提高其活性。

【0232】 進一步而言，藥用容許之載劑可包括：例如，水相介質如氯化鈉注射液、林格氏液注射液、等滲葡萄糖注射液、無菌水注射液、或葡萄糖及乳酸林格注射液、非水介質例如：植物來源之不揮發性油、棉花子油、玉米油、芝麻油、或者花生油、細菌抑制或真菌抑制濃度下之抗菌物質、等滲劑如：氯化鈉或葡萄糖、緩衝液如：磷酸鹽或枸橼酸酸鹽緩衝液、抗氧化劑如：硫酸氫鈉、局部麻醉劑如：鹽酸普魯卡因、助懸劑及分散劑如：羧甲基纖維素鈉、羥丙基甲基纖維素或聚乙烯吡咯啉酮、乳化劑如：聚山梨醇酯 80(吐溫-80)、螯合試劑如 EDTA(乙二胺四乙酸)或 EGTA(乙二醇雙(2-氨基乙基醚)四乙酸)、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、氫氧化鈉、鹽酸、檸檬酸或乳酸。作為載劑之抗菌劑可加入多次劑量容器中之

藥物組合物中，其包括酚類或甲酚、汞製劑、苯甲醇、氯代丁醇、甲基及丙基對羥基苯甲酸酯、噻汞撒、氯苯甲烷銨及氯苯乙銨。適用之輔料可包括：例如，水、鹽、葡萄糖、甘油或乙醇。適用之無毒輔助物質可包括：例如，乳化劑、pH值緩衝劑、穩定劑、增溶劑、或者乙酸鈉、去水山梨糖醇月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或者環糊精之類之物質。

【0233】 上述藥物組合物可為液體溶液、懸浮液、乳劑、丸劑、膠囊、錠劑、持續釋放製劑或粉末。口服製劑可包括標準載劑如藥物級之甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、聚乙烯吡咯啉酮、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂等。

【0234】 在某些實施形態中，上述藥物組合物被製劑成可注射之組合物。可注射之藥物組合物可以任何常規之形式製備，例如，液體溶劑、懸浮劑、乳化劑或適用於產生液體溶劑、懸浮劑或乳化劑之固體形式。注射製劑可包括現用之無菌及/或無熱原溶液、使用前現與溶劑結合之無菌乾燥之可溶物，如凍乾粉，包括皮下片、注射即用之無菌懸浮劑、使用前現與介質結合之無菌乾燥不溶產品、及無菌及/或無熱原之乳劑。溶劑可為水相或非水相。

【0235】 在某些實施形態中，單位劑量之注射製劑包裝在一個安瓿、一支管或一支帶有針之針筒中。本領域習知，所有注射投予之製劑應為無菌無熱原。

【0236】 在某些實施形態中，藉由將本申請中公開之抗體或其抗原結合片段溶解於某適當之溶劑中可製備無菌凍乾之粉末。上述溶劑可含有一種可提高粉或由粉末製得之重組溶液之穩定性、或改善粉末或重組溶液之其他藥理組分。適用之輔料包括但不限於水、葡萄糖、三梨糖醇、果

糖、玉米糖漿、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他適用之物質。溶劑可含有緩衝液，如枸橼酸緩衝液、磷酸鈉或磷酸鉀緩衝液或其他本技術熟練人員公知之緩衝液，在一種實施形態中，緩衝液之pH值為中性。在本領域公知之標準條件下進行對上述溶解進行隨後之過濾除菌，然後凍乾製得理想之製劑。在一種實施形態中，將所得之溶劑分裝至小管中凍乾。每支小管可容納單次劑量或多次劑量之上述抗CD19抗體或其抗原結合片段或其組合物。每支小管中之裝入量可略微高於每次劑量所需或多次劑量所需(例如10%過量)，從而保證取樣精確及投予精確。凍乾粉可在適當之條件下儲存，如在約4°C至室溫範圍。

【0237】 用注射用水將凍乾粉重溶得到用於注射投予之製劑。在一種實施形態中，可將凍乾粉加至無菌無熱原水或其他適用之液體載劑中重溶。精確之量由選擇之療法決定，可根據經驗值決定。

【0238】

使用方法

本發明亦提供一種治療方法，上述治療方法包含：向需要其之個體施用治療有效量之如本申請所述之抗體或其抗原結合片段，從而治療或預防與CD19相關之病症或狀況。在一些實施形態中，上述與CD19相關之病症或狀況為癌症。在一些實施形態中，上述癌症選自由B細胞淋巴瘤、任選地霍奇金淋巴瘤或非霍奇金淋巴瘤組成之群，其中上述非霍奇金淋巴瘤包含：瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤(MZL)、黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(MALT)、小淋巴細胞性淋巴瘤(慢性淋巴細胞白血病，CLL)或套細胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴細胞白血病(ALL)、或瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(WM)。在一些實施形態中，上述

個體為人。

【0239】 在另一個方面，提供一種在會從免疫反應之CD19之調節中受益之個體中治療狀況之方法，上述方法包含向需要其之個體施用如本申請所述之治療有效量之抗體或抗原結合片段。

【0240】 本申請所述之抗體或其抗原結合片段之治療有效劑量依賴於本領域公知之多種因素，例如體重、年齡、過往病史、現用治療、對象之健康狀況及交叉感染之潛力、過敏、超敏及副作用、以及投予途徑與腫瘤發展之程度。本領域熟練人員(例如醫生或獸醫)可根據該等或其他條件或要求按比例降低或升高劑量。

【0241】 在某些實施形態中，如本申請所述之抗CD19抗體或抗原結合片段可在治療有效劑量約0.01 mg/kg至約100 mg/kg之間投予(例如約0.01 mg/kg、約0.5 mg/kg、約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約5 mg/kg、約10 mg/kg、約15 mg/kg、約20 mg/kg、約25 mg/kg、約30 mg/kg、約35 mg/kg、約40 mg/kg、約45 mg/kg、約50 mg/kg、約55 mg/kg、約60 mg/kg、約65 mg/kg、約70 mg/kg、約75 mg/kg、約80 mg/kg、約85 mg/kg、約90 mg/kg、約95 mg/kg或約100 mg/kg)。在某些實施形態中，上述抗體或抗原結合片段以約50 mg/kg或更少之劑量施用，並且在某些此種實施形態中，上述劑量為10 mg/kg或更少、5 mg/kg或更少、3 mg/kg或更少、1 mg/kg或更少、0.5 mg/kg或更少或0.1 mg/kg或更少。在某些實施形態中，投予劑量可隨治療進程變化。例如，在某些實施形態中，初始投予劑量可比後續投予劑量高。在某些實施形態中，投予劑量在治療進程中根據投予對象之反應進行調整。

【0242】 投予方案可藉由調整達到最優反應(如治療反應)。例如，

可進行單劑量投予或在一段時間分多個分隔之劑量投予。

【0243】 本申請中公開之抗CD19抗體與抗原結合片段可藉由本領域公知之投予方式投予，例如腸胃外投予(如皮下注射、腹腔注射、靜脈注射，包括靜脈滴注、肌肉注射或皮內注射)或非腸胃外投予途徑(如口服投予、鼻腔投予、舌下投予、直腸投予或外用投予)。

【0244】 在一些實施形態中，本申請中公開之抗CD19抗體或抗原結合片段可單獨投予或與一種或多種其他治療手段或物質聯合投予。例如，本發明公開之抗體與抗原結合片段可與另一種治療劑，例如化療劑或抗癌藥聯合投予。

【0245】 在某些此種實施形態中，本申請中公開之抗CD19抗體或抗原結合片段與一種或多種另外之治療物質聯用時，可與上述之一種或多種另外之治療物質同時投予，在某些此種實施形態中，上述之抗體與抗原結合片段可作為同一個藥物組合物之一部分同時投予。但是，與其他治療物質「聯用」之抗CD19抗體或抗原結合片段無需同時投予或與該治療物質在同一組合物中投予。本申請中「聯用」之含義亦包括，在另一個治療物質之前或之後投予之抗CD19抗體或抗原結合片段亦被認為係與該治療物質「聯用」，即便上述抗體或其抗原結合片段與第二種物質藉由不同投予方式投予。在可能之情況下，與本申請中公開之抗體或其抗原結合片段聯用之其他治療物質可參照該其他治療物質之產品說明書之方法用藥、或參照外科醫生之案頭參考書2003(Physicians' Desk Reference，第57版；Medical Economics Company；ISBN: 1563634457；第57版(2002年11月))、或參照其他本領域公知之方法。

【0246】 本發明進而提供一種使用上述抗CD19抗體或其抗原結合

片段之方法。在一些實施形態中，本發明提供一種在體內或在體外抑制表現CD19之細胞之生長之方法，包含：將上述表現CD19之細胞與本申請所述之抗體或其抗原結合片段接觸。在一些實施形態中，本發明提供一種在表現CD19之細胞中調節CD19活性之方法，包含將上述表現CD19之細胞暴露於本申請所述之抗體或其抗原結合片段。

【0247】 在一些實施形態中，本發明提供一種檢測樣品中CD19之存在或含量之方法，其包括將上述樣品與上述抗體或其抗原結合片段接觸，以及確定樣品中CD19之存在或含量。

【0248】 在一些實施形態中，本發明提供一種診斷在個體中與CD19相關之疾病或狀況之方法，其包括：a)獲取來自上述個體之樣品；b)將上述樣品與本申請所述之抗體或其抗原結合片段接觸；c)確定在上述樣品中CD19之存在或含量；以及d)判斷上述與CD19相關之疾病或狀況在個體中之存在情況。

【0249】 在一些實施形態中，本發明提供一種套組，上述套組包含任選地與可檢測之部分共軛之本申請所述之抗體或其抗原結合片段。上述套組可用於檢測CD19或診斷與CD19相關疾病。

【0250】 在一些實施形態中，本發明亦提供一種本申請所述之抗體或其抗原結合片段在製備用於在個體中治療與CD19相關疾病或狀況之藥物中之用途、在製備用於診斷與CD3相關之疾病或狀況之診斷試劑中之用途。

【0251】 以下實施例旨在更良好地說明本發明，且不應理解為限制本發明之範圍。所有下述之特定組合物、材料及方法，其整體或部分均在本發明之範圍內。該等特定之組合物、材料及方法並非為了限制本發明，

而僅係為了說明特定之實施形態在本發明之範圍內。本領域熟練技術人員可不添加創造性及不偏離本發明範圍而開發出等同之組合物、材料及方法。應理解，對本發明之方法作出之多種改動可仍然包括在本發明範圍內。發明人意在將此種變動包括在本發明之範圍內。

【0252】

實施例1：材料之產生

1.1 參照抗體之產生

將抗 CD19 參照抗體之各區基因 (WBP701-BMK1 對應於專利 US20140072587A1 中之 huB4；WBP701-BMK2 對應於專利 US8242252B2 中之 hBU12；WBP701-BMK3 對應於專利 US8097703B2 中之 21D4) 選殖進入含有人 Fc 區基因之表現載體。使用 ExpiFectamine293 轉染套組 (Invitrogen-A14524)，將表現質粒轉染進入 Expi293 細胞。上述細胞在以 135 rpm 旋轉之定軌振盪平台上之 37°C 培養箱內，培養於 Expi293 表現培養基 (Invitrogen-A1435101) 中。使用 Protein A 柱 (GE Healthcare 17543802) 對收集之上清液進行純化。

【0253】用 SDS PAGE 分析依照上述方法產生之參照抗體 WBP701-BMK1、WBP701-BMK2 及 WBP701-BMK3。圖 1 與 2 顯示，三個產生之參照抗體全部在還原條件下之 SDS-PAGE 上以明顯之 25 kDa 與 55 kDa 之分子量遷移，分別對應抗體之輕鏈及重鏈。在非還原 SDS-PAGE 上之主條帶對應了完整之 IgG 分子，分子量約 150 KD。參照抗體之純度大於 95% (參見圖 1 及 2)。

【0254】

1.2 人或食蟹猴 CD19 表現細胞系之產生

將全長人或食蟹猴CD19之基因選殖至pcDNA3.3載體中。簡要而言，使用Plasfect Reagent(Bioline-46025)，用30 µg DNA轉染30 mL體積之密度為 1×10^6 /mL之reeStyle 293F細胞(ThermoFisher-R79007)。經轉染之細胞培養於設為37°C、8% CO₂及100 rpm振速之培養箱中。轉染24小時後，使用終濃度為4-10 µg/mL之殺稻瘟菌素(Invitrogen-A1113902)產生穩定之庫。使用抗CD19抗體，藉由FACS檢驗所選取之純系。2至3輪之篩選之後，藉由PE共軛之抗CD19抗體及抗PE微珠(Miltenyi-013-048-801)富集上述細胞。藉由有限稀釋、以及使用抗CD19抗體藉由FACS篩選，來分離穩定之單細胞純系。

【0255】 將全長人或食蟹猴CD19之基因選殖至pcDNA3.3載體中。隨後使用Lipofectamine 2000將各表現載體分別轉染進入CHO-K1細胞。上述細胞培養於含10% FBS之F12-K。轉染24~48小時後加入殺稻瘟菌素。2至3輪之篩選之後，藉由FACS檢驗所選取之純系。2至3輪之篩選之後，藉由PE共軛之抗CD19抗體及抗PE微珠(Miltenyi-013-048-801)富集上述細胞。藉由有限稀釋、以及使用抗CD19抗體藉由FACS篩選，來分離穩定之單細胞純系。

【0256】 使用抗CD19抗體，藉由流式細胞術檢測到經轉染之細胞系表現人CD19與食蟹猴CD19。經轉染之細胞系WBP701.293F.hPro1.FL.A2、WBP701.CHO-K1.hPro1.FL.B4、WBP701.cPro1.293F.FL.C1及WBP701.CHO-K1.cpro1.FL.C9全部表現出對人或猴CD19之高表現(圖3A-3D)。

【0257】

實施例2：抗體之產生

2.1 免疫

Balb/c小鼠用CD19轉染之293F細胞免疫。細胞膜裂解產物與助劑(包括CpG-ODN及Adju-Phos或Titer-Max)混合。上述小鼠經由足底、皮下或腹腔途徑免疫兩次，其間間隔兩週。用溶於PBS中之 1×10^6 細胞/動物之細胞膜裂解產物及10 μg ECD蛋白/動物，給予具有高血清效價之小鼠加強免疫。

【0258】

2.2 血清效價檢測

血清效價係藉由流式細胞術檢測。CD19轉染之CHO-K1細胞以 1×10^5 細胞/孔之密度鋪於96孔U型底板(BD)中。小鼠血清使用染色緩衝液($1\times\text{PBS}/1\%\text{BSA}$)從100倍稀釋開始以1：3比例稀釋。血清樣品與細胞一起在4℃下培養1小時。用染色緩衝液將上述細胞洗滌兩次後，加入PE共軛之山羊抗小鼠IgG Fc抗體(Jackson)，並在4℃下在避光培養30分鐘。隨後將上述細胞洗滌兩次，並在100 μL 染色緩衝液中重懸。藉由流式細胞術(BD Canto II)測量螢光強度，並利用FlowJo分析。

【0259】 全部小鼠均顯示CD19特異性之效價。選取具有高血清效價之小鼠用於雜交瘤細胞融合(表3)。

【0260】

表3. 血清效價

小鼠#	1	2	3	4	5
CHO-K1.CD19細胞之預放血	<100	<100	<100	<100	<100
CHO-K1.CD19細胞之效價	1968300	656100	218700	656100	72900
親本CHO-K1細胞之效價	2700	2700	900	300	2700

【0261】

2.3 雜交瘤細胞之產生

依照通用之電融合流程，藉由電融合將淋巴結細胞與Sp2/0骨髓瘤細胞融合。細胞融合之後，將上述細胞以 1×10^4 淋巴細胞/孔，與含有20% FBS及1% HAT之DMEM培養基一起鋪板於96孔板中。上述96孔板在37℃下培養10~12天。

【0262】

2.4 抗體篩選

2.4.1 與人CD19之結合

人CD19轉染之CHO-K1細胞以 1×10^5 細胞/孔之密度鋪板於96孔U型底板(BD)中。將雜交瘤細胞上清液轉移至上述96孔板，並與細胞一起在4℃下培養1小時。隨後將上述細胞用染色緩衝液(BSA/1×PBS)洗滌兩次。加入PE共軛之山羊抗小鼠IgG Fc抗體(Jackson 115-115-164)，並在4℃下避光培養30分鐘。隨後將上述細胞洗滌兩次，並在100 μL染色緩衝液中重懸。藉由流式細胞術(BD Canto II)測量螢光強度，並利用FlowJo分析。

【0263】

2.4.2 與食蟹猴CD19之結合

食蟹猴CD19轉染之CHO-K1細胞以 1×10^5 細胞/孔之密度鋪板於96孔U型底板(BD)中。將雜交瘤上清液轉移至上述96孔板，並與細胞一起在4℃下培養1小時。隨後將上述細胞用染色緩衝液(BSA/1×PBS)洗滌兩次。加入PE共軛之山羊抗小鼠IgG Fc抗體(Jackson 115-115-164)，並在4℃下避光培養30分鐘。隨後將上述細胞洗滌兩次，並在100 μL染色緩衝液中重懸。藉由流式細胞術(BD Canto II)測量螢光強度，並利用FlowJo分析。

【0264】

2.4.3 內化測試

Fab-ZAP係羊抗人單價抗體與核糖體失活蛋白皂草素之化學共軛。使用Fab-ZAP確定抗體之內化能力。藉由ELISA確定雜交瘤細胞上清液中之IgG濃度。以1：3之莫耳比將歸一化之雜交瘤細胞上清液與Fab-ZAP混合。Ramos細胞(5000/孔)與不同濃度之結合物一起在37℃、5% CO₂之培養箱中培養96小時。藉由CellTiter Glo(Promega)確定細胞毒性。細胞存活率(%)計算如下：細胞存活率(%) = 樣品之RLU/對照之RLU×100%，其中RLU代表相對光單位。

【0265】

結果

首輪篩選用雜交瘤細胞上清液進行。首輪結合篩選識別出116個可產生與抗原特異性結合之抗體之雜交瘤。隨後在CD19轉染之CHO-K1細胞上證實了該等具有抗原特異性之雜交瘤之結合，並且在親本CHO-K1細胞上進行反篩。在Ramos細胞上證實了所選取之40個雜交瘤細胞系之結合。隨後在Fab-Zap測試中篩選陽性黏合劑。選取13個雜交瘤細胞系用於基於結合及內化能力之亞純系。

【0266】

2.5 雜交瘤細胞之亞純系

所選取之各細胞系之雜交瘤細胞以1細胞/孔之密度鋪板於96孔板中。上述96孔板在加濕之37℃、6% CO₂之培養箱中存放10~12天。挑選單個純系並利用FACS檢驗。

【0267】

2.6 同種型

用ELISA鑑定抗體同種型。將板(Nunc)用山羊抗小鼠IgG1、抗小鼠IgG2a、抗小鼠IgG2b、抗小鼠IgG3、抗小鼠IgM之抗體在4℃以2 μg/ml被覆過夜。封閉及洗板後，將雜交瘤細胞上清液轉移至上述被覆之板中並室溫孵育1小時。隨後將板與山羊抗小鼠kappa HRP或山羊抗小鼠lambda HRP二抗(Southern Biotech)孵育45分鐘。洗板後加入TMB受質顯色液，用2M HCl終止顯色。使用酶標儀(Molecular Device)讀取在450奈米處之吸光值。

【0268】

結果：

藉由與CD19細胞系之結合驗證雜交瘤細胞之亞純系，亦檢測了其同種型(參見表4)。純化所選取之亞純系，並且在結合測試、內化測試、交叉家族結合測試及分組(binning)測試中進一步評價。

【0269】

表4. 抗體同種型

抗體	同種型
WBP7011_4.34.11	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.87.6	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.100.1	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.106.3	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.155.8	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.15.10	小鼠IgG1，κ
WBP7011_4.56.1	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.202.9	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.231.5	小鼠IgG2b，κ
WBP7011_4.108.3	小鼠IgG2a，κ
WBP7011_4.191.3	小鼠IgG1，κ
WBP7011_4.194.10	小鼠IgG2b，κ
WBP7011_4.225.7	小鼠IgG2a，κ

【0270】

實施例3 候選抗體表徵

3.1 抗體純化

在將pH值調節至7.0後，將收集之雜交瘤上清液上樣至蛋白A柱(MabSelect SuRe，GE)。用Glycine溶離抗體，並立即用1M Tris中和。用Nano Drop(Thermal-Fisher)檢測抗體濃度。蛋白之純度係藉由SDS-PAGE(Invitrogen，NuPAGE 4%-12% Bis-Tris膠)及HPLC-SEC(Agilent)檢測。

【0271】

3.2 藉由FACS檢測親和力

上述CD19轉染之CHO-K1細胞或Ramos細胞以 5×10^4 細胞/孔之密度鋪板於96孔板(BD)中。測試抗體在染色緩衝液(1×PBS/1%BSA)中連續稀釋，並在4℃下與細胞培養1小時。棄去上清液後，加入PE共軛之山羊抗小鼠IgG Fc抗體(Jackson 115-1154-164)，並在4℃下在避光培養30分鐘。將上述細胞洗滌一次，並在100 μL染色緩衝液中重懸。藉由流式細胞術(BD Canto II)測量螢光強度，並利用FlowJo分析。基於定量珠(PE螢光定量套組，BD 340495)之螢光強度，計算結合之IgG及游離之IgG濃度。使用Scatchard分析計算 K_D 。

【0272】

結果

藉由流式細胞術，在CD19轉染之CHO-K1細胞上檢測所選取之候選抗體之親和力。 K_D 值總結於表5中。全部候選抗體表現出次奈莫耳級之與人CD19之結合親和力。

【0273】

表5. 候選抗體之親和力

抗體	KD(M)
W7011-4.34.11	1.81E-10
W7011-4.87.6	9.55E-11
W7011-4.100.1	2.13E-10
W7011-4.106.3	2.31E-10
W7011-4.155.8	9.49E-10
W7011-4.15.10	1.70E-10
W7011-4.56.1	1.18E-10
W7011-4.202.9	8.47E-10
W7011-4.231.5	1.70E-10
W7011-4.108.3	2.52E-10
W7011-4.191.3	1.14E-10
W7011-4.194.10	4.20E-10
W7011-4.225.7	7.35E-10

【0274】

3.3 與人CD19之結合

Ramos細胞以 1×10^5 細胞/孔之密度鋪板於96孔U型底板(BD)中。純化之抗體在染色緩衝液($1\times$ PBS/1%BSA)中連續稀釋，並在4℃下與細胞孵育1小時。隨後將上述細胞用染色緩衝液(BSA/ $1\times$ PBS)洗滌兩次。加入PE共軛之山羊抗小鼠IgG Fc抗體(Jackson 115-115-164)，並在4℃下在避光培養30分鐘。隨後將上述細胞洗滌兩次，並在100 μ L染色緩衝液中重懸。藉由流式細胞術(BD Canto II)測量螢光強度，並利用FlowJo分析。

【0275】 藉由流式細胞術，在Ramos細胞上檢驗所選取之亞純系之結合親和力(圖4)。結合EC₅₀值總結於表6中。全部候選抗體表現出次奈莫耳級之與人CD19之結合親和力。

【0276】

表6. 所選取之亞純系之結合活性

純系#	EC ₅₀ (nM)
W7011-4.34.11	0.23
W7011-4.34.17	0.21
W7011-4.34.18	0.24
W7011-4.87.6	0.10
W7011-4.87.8	0.09
W7011-4.87.18	0.09
W7011-4.100.1	0.17

W7011-4.100.14	0.17
W7011-4.100.18	0.18
W7011-4.106.3	0.23
W7011-4.106.9	0.18
W7011-4.106.20	0.19
W7011-4.155.8	0.85
W7011-4.155.14	0.82
W7011-4.155.17	0.69
W7011-4.15.10	0.31
W7011-4.15.13	0.32
W7011-4.56.1	0.10
W7011-4.56.2	0.08
W7011-4.202.9	0.64
W7011-4.231.5	0.12
W7011-4.231.6	0.05
W7011-4.231.15	0.09
W7011-4.108.3	0.19
W7011-4.108.6	0.09
W7011-4.108.11	0.05
W7011-4.202.3	0.58
W7011-4.202.8	0.34
W7011-4.191.3	0.04
W7011-4.191.6	0.07
W7011-4.191.16	0.13
W7011-4.194.10	0.15
W7011-4.194.11	0.26
W7011-4.194.13	0.34
W7011-4.225.7	0.45
W7011-4.225.9	0.39
WBP701.BMK3	0.11

【0277】

3.4 與食蟹猴CD19之結合

將食蟹猴CD19轉染之CHO-K1細胞以 1×10^5 細胞/孔之密度鋪板於96孔U型底板(BD)中。將純化之抗體在染色緩衝液(1×PBS/1%BSA)中連續稀釋，並在4℃下與細胞培養1小時。用染色緩衝液(1×PBS/1%BSA)洗滌細胞兩次。加入PE共軛之山羊抗小鼠IgG Fc抗體(Jackson 115-115-164)，並在4℃下在避光培養30分鐘。隨後將上述細胞洗滌兩次，並在100 μL染色緩衝液中重懸。藉由流式細胞術(BD Canto II)測量螢光強度，並利用FlowJo分析。

【0278】 使用食蟹猴CD19轉染之CHO-K1細胞系評價候選抗體與食蟹猴CD19之結合活性(圖5)。將結合EC₅₀值總結於表7中。所選取之純系

全部表現出與食蟹猴CD19細胞之強結合。

【0279】

表7. 與食蟹猴CD19之結合活性

抗體	EC ₅₀ (nM)
W7011-4.34.11	0.4427
W7011-4.87.6	0.285
W7011-4.100.1	0.4384
W7011-4.106.3	0.4959
W7011-4.155.8	1.542
W7011-4.15.10	0.4598
W7011-4.56.1	0.4381
W7011-4.202.9	2.299
W7011-4.231.5	0.628
W7011-4.108.3	0.8634
W7011-4.191.3	0.5984
W7011-4.194.10	0.9959
W7011-4.225.7	1.77
WBP701-BMK1	0.4473
WBP701-BMK2	0.7407
WBP701-BMK3	0.1936

【0280】

3.5 內化測試

使用Fab-ZAP確定抗體之內化能力。連續稀釋之抗體與Fab-Zap以1：3之莫耳比混合。Ramos細胞(5000/孔)與不同濃度之結合物一起在37℃、5% CO₂之培養箱中孵育96小時。藉由CellTiter Glo(Promega)確定細胞毒性。細胞存活率(%)計算如下：細胞存活率(%)=樣品之RLU/對照之RLU×100%。

【0281】 使用Fab-Zap測試，在Ramos細胞上檢驗所選取之亞純系之內化活性(圖6)。細胞存活率之EC₅₀總結於表8中。全部候選抗體均可在Ramos細胞上內化，並且在Fab-Zap測試中顯示皮莫耳級之EC₅₀值。

【0282】

表8. Fab-Zap測試

抗體	EC ₅₀ (pM)
W7011-4.34.11	7
W7011-4.34.17	8.9
W7011-4.34.18	8.9
W7011-4.87.6	8.5
W7011-4.87.8	5.8
W7011-4.87.18	7.2
W7011-4.100.1	14.8
W7011-4.100.14	11.5
W7011-4.100.18	11
W7011-4.106.3	13.6
W7011-4.106.9	12.7
W7011-4.106.20	16.2
W7011-4.155.8	27.6
W7011-4.155.14	44.9
W7011-4.155.17	30.2
W7011-4.15.10	13.9
W7011-4.15.13	11
W7011-4.56.1	8.4
W7011-4.56.2	5.2
W7011-4.61.10	23.1
W7011-4.61.12	21.1
W7011-4.61.16	19.4
W7011-4.231.5	8.5
W7011-4.231.6	14.8
W7011-4.231.15	14.7
W7011-4.108.3	20.6
W7011-4.108.6	15.7
W7011-4.108.11	18.7
W7011-4.202.3	28.3
W7011-4.202.8	35.4
W7011-4.202.9	23.6
W7011-4.191.3	18.4
W7011-4.191.6	19.1
W7011-4.191.16	18.2
W7011-4.194.10	11.7
W7011-4.194.11	11.8
W7011-4.194.13	12.8
W7011-4.225.7	15
W7011-4.225.9	15.8

【0283】

3.6 表位分組(binning)

將CD19轉染之細胞WBP701.CHO-K1.hPro1.B4以1×10⁵細胞/孔之密度鋪板於96孔U型底板(BD)中。連續稀釋測試抗體並與參照抗體混合。將混合物加入96孔板，並在4℃下培養30分鐘。洗滌後，加入PE共軛之山羊

抗人IgG Fc抗體(Jackson)，並在4℃下在避光培養30分鐘。隨後將上述細胞洗滌兩次，並在100 μL染色緩衝液(1×PBS/1% BSA)中重懸。藉由流式細胞術(BD Canto II)測量螢光強度，並利用FlowJo分析。

【0284】 檢驗所選取之候選純系針對BMK1、BMK2及BMK3參照抗體之競爭性結合。一些候選抗體可阻斷參照抗體與CD19之結合。W7011-4.155.8、W7011-4.202.9及W7011-4.225.7不與參照抗體競爭(圖7)。根據競爭性結合之結果，將上述抗體分配至兩個表位組(bin)(表9)。

【0285】

表9. 候選抗體之表位分組

組1	組2
WBP701-BMK1	W7011-4.155.8
WBP701-BMK2	W7011-4.202.9
WBP701-BMK3	W7011-4.225.7
W7011-4.34.11	
W7011-4.87.6	
W7011-4.100.1	
W7011-4.106.3	
W7011-4.15.10	
W7011-4.56.1	
W7011-4.231.5	
W7011-4.108.3	
W7011-4.191.3	
W7011-4.194.10	

【0286】 對上述抗體純系定序後，我們發現抗體純系W7011-4.155.8、W7011-4.202.9及W7011-4.225.7之胺基酸序列完全相同。上述抗體純系之胺基酸及核酸序列列於發明詳述部分。

【0287】

實施例4 抗體人源化及親和力成熟

4.1 雜交瘤細胞定序

採用Trizol套組(Invitrogen-15596018)從雜交瘤細胞中分離出RNA，再利用5'-RACE套組(Takara-28001488)擴增得到cDNA，然後藉由3'-簡並

引子及3'-連接子引子(ExTaq：Takara-RR001B)PCR擴增cDNA。將PCR片段插入至pMD18-T載體(Takara-D101C)中並送定序(上海鉑尚公司)。

【0288】 來自雜交瘤細胞之抗體序列(小鼠)如SEQ ID NO: 94-123所示。

【0289】

4.2 人源化

使用「最佳擬合」法對抗體輕鏈及重鏈進行人源化。對應V基因之輕鏈胺基酸序列與公司內部之人種系V基因資料庫進行比對。藉由使用Kabat CDR定義，用命中最高之人CDR序列取代小鼠CDR序列，得到人源化之VL基因之序列。對於重鏈，得到了4條人源化序列，對於輕鏈，首先依照上述方法得到了1條人源化序列，然後藉由將小鼠框架與人種系V基因資料庫比對，產生了另外3條序列。使用延長CDR定義來定義框架，其中Kabat CDR1在N末端延長5個胺基酸。使用命中最高之三個序列得到人源化之V基因。對人源化之基因進行回譯、密碼子優化用於哺乳動物表現，以及經GeneArt Custom Gene Synthesis(Life Technologies)合成。將合成之基因重選殖至IgG表現載體內，表現並純化。

【0290】

4.3 親和力成熟

使用雜交突變方法(Kunkel，1985)，將6個互補決定區(CDR)之每個胺基酸獨立地突變為20種胺基酸。使用含有編碼20個胺基酸之NNS密碼子之DNA引子，將突變引入每個靶CDR位置。在雜交突變反應中使用單獨之簡並引子。分別彙集VH及VL CDR之合成產物。將200 ng彙集之文庫DNA轉染至BL21中，用於生產scFv片段。

【0291】 首先使用細菌之周質提取物，藉由捕獲ELISA篩選突變。96孔Maxisorp免疫板(Nunc)用被覆緩衝液(200 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ，pH值9.2)中之抗c-myc抗體在4℃下被覆過夜。用酪蛋白在室溫下阻斷1小時後，將周質提取物樣品加入96孔板，並在室溫下孵育1小時。洗滌後，加入生物素化之CD19 ECD蛋白，並在室溫下孵育1小時，隨後用鏈球菌親和素-HRP孵育1小時。洗滌後，加入TMB受質，並利用2M HCl停止反應。用酶標儀(Molecular Device)讀取波長450 nm處之吸光度。

【0292】 挑選在波長450 nm處顯示出大於親本純系之光密度(OD)信號之純系用於定序。該等獨特之純系藉由在歸一化之scFv濃度下之FACS證實，以確定突變scFv與親本抗體之相對結合親和力。

【0293】 將VH與VL中確定益於與抗原之結合之點突變進一步組合，以獲取額外之結合協同作用。將該等組合之突變表現為scFv，並使用捕獲ELISA篩選。對在波長450 nm處顯示出大於親本純系之光密度(OD)信號之純系進行定序，並進一步藉由結合FACS證實。

【0294】

4.4 工程化改造之抗體之結合親和力

4.4.1 WBP7011-4.34.11-z1-m5-IgG1k

抗體WBP7011-4.34.11為人源化，並且經親和力成熟。在Ramos細胞上藉由FACS測量工程化改造之抗體WBP7011-4.34.11-z1-m5之親和性(圖8)。使用Scatchard分析計算 K_D 。WBP7011-4.34.11-z1-m5-IgG1k之親和力為0.23 nM。

【0295】

4.4.2 WBP7011-4.87.6-z1-IgG1k (N-S)

抗體WBP7011-4.87.6為人源化，並且在PTM風險殘基上經工程化改造。在Ramos細胞上藉由FACS測量終選抗體WBP7011-4.87.6-z1-IgG1k (N-S)之親和力(圖9)。使用Scatchard分析計算 K_D 。WBP7011-4.87.6-z1-IgG1k (N-S)之親和力為0.25 nM。

【0296】

4.4.3 W7011-4.155.8-z1-uIgG1K

抗體W7011-4.155.8為人源化。在CD19轉染之CHO-K1細胞上藉由FACS測量人源化抗體W7011-4.155.8-z1-uIgG1K之親和力(圖10)。使用Scatchard分析計算 K_D 。W7011-4.155.8-z1-uIgG1K之親和力為0.82 nM。

【0297】

4.5 工程化改造之抗體序列

改造之抗體序列如SEQ ID NO: 124-135所示。

【0298】

實施例5：抗體-藥物結合物(ADC)之產生

將抗體藉由緩衝液交換至PBS(pH值7.4)緩衝液中，並與DMA混合(Alfa Aesar)。然後加入DM1-SMCC(BrightGene)，並且在22°C在溫和旋轉下培養混合物進行共軛。

【0299】 為移除游離藥物，使用30 KDa超濾管(Millipore)將ADC產物緩衝液交換至ADC貯存緩衝液中。緩衝液交換8次後，用0.22 μ m膜過濾ADC產物，用於最終表徵。

【0300】 用UV-vis(NanoDrop)表徵ADC之濃度。藉由UV-vis及SEC-HPLC確定DAR值。藉由SEC-HPLC確定聚集水平以及純度。藉由RP-HPLC確定游離藥物。藉由動態濁度測試確定內毒素水平。

【0301】 將候選抗體與DM1共軛。在共軛後評價濃度、純度、DAR、聚集水平以及游離藥物%(表10)。

【0302】

表10. DM1共軛抗體之表徵

抗體	濃 度 mg/ml	純 度 %	游離藥 物%	內 源 EU/mg	UV-	SEC- DAR	聚 集 %
					DAR		
W7011-BMK1-DM1	14.2	95.45	0	0.039	3.57	3.57	4.54
W7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1	9.71	97.7	1.06	2.36	3.38	2.95	2.31
W7011-4.34.11-z1-m5- IgG1K-DM1	6.45	96.38	0	極限	3.32	3.38	3.02
IgG1K同種型對照-DM1	5.85	98.47	0	0.086	2.86	2.69	1.53

【0303】

實施例6：ADC之細胞毒性分析

B淋巴細胞(5000/孔)與不同濃度之DM1共軛之抗體一起在37℃下培養72小時。藉由CellTiter Glo(Promega)確定細胞毒性。細胞存活率(%)計算如下：細胞存活率(%)=樣品之RLU/對照之RLU×100%。

【0304】 在Daudi、Nalm-6及WSU-DLCL2細胞上，在細胞毒性測試中檢驗DM1共軛之抗體(圖11、12、13)。EC₅₀值總結於表11、12及13中。ADC WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1在所有被測之腫瘤細胞上均表現出優於WBP701-BMK1-DM1之細胞毒性。ADC WBP7011-4.34.11-z1-m5-uIgG1K-DM1表現出可與WBP701-BMK1-DM1媲美之細胞毒性。

【0305】

表11. Daudi上之細胞毒性測試

抗體	EC ₅₀ (nM)
WBP7011-4.34.11-z1-m5-uIgG1K-DM1	27
WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1	1.9
WBP701-BMK1-DM1	22
IgG1k同種型對照-DM1	NA

【0306】

表12. Nalm-6細胞上之細胞毒性測試

抗體	EC ₅₀ (nM)
WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1	0.73
WBP701-BMK1-DM1	NA
IgG1k同種型對照-DM1	NA

【0307】

表13. WSU-DLCL2細胞上之細胞毒性測試

抗體	EC ₅₀ (nM)
WBP7011-4.34.11-z1-m5-uIgG1K-DM1	10.1
WBP7011-4.87.6-z1-IgG1K (N-S)-DM1	1.4
WBP701-BMK1-DM1	9.0

【0308】

實施例7：ADC之抗腫瘤分析

7.1 細胞培養

將Nalm-6腫瘤細胞在體外以10%胎牛血清之RPMI-1640中懸浮培養於潮濕之環境(95%空氣及5% CO₂)下。上述腫瘤細胞用常規方法每週繼代培養兩次。收集在指數生長期之細胞並計數，用於腫瘤接種。

【0309】

7.2 腫瘤接種以及分組

每隻小鼠在右側皮下植入Nalm-6腫瘤細胞(1千萬+Matrigel)，用於腫瘤發生。當平均腫瘤體積達到113 mm³時開始治療。試驗用品之施用及各組中之小鼠數量示於下表中。

【0310】

表14. 試驗ADC之施用以及各組中之小鼠數量

組別	處理	n	劑量 (mg/kg)	投予體積 (ul/g)	投予途徑	方案
1	同種型對照-DM1	6	10	10	靜脈注射	每週兩次*3週
2	W7011-BMK1-DM1	6	1	10	靜脈注射	每週兩次*3週
3	W7011-BMK1-DM1	6	10	10	靜脈注射	每週兩次*3週

4	W7011-4.87.6-z1-uIgG1k (N-S)-DM1	6	1	10	靜脈注射	每週兩次*3週
5	W7011-4.87.6-z1-uIgG1k (N-S)-DM1	6	3	10	靜脈注射	每週兩次*3週
6	W7011-4.87.6-z1-uIgG1k (N-S)-DM1	6	10	10	靜脈注射	每週兩次*3週

【0311】

7.3 觀察

本研究中關於對動物之看護及使用之方案、以及任何修改或流程，在實施前將由藥明康德之機構動物看護及使用委員會(IACUC)審閱並批准。在研究期間，對動物之看護及使用依照實驗動物看護評價與認定協會(AAALAC)之規定進行。接種後，每天檢查小鼠之發病率與死亡率。例行監控時，檢查小鼠是否出現任何腫瘤生長之影響，以及對正常行為，如行動能力、食物與水之消耗、體重增/減(每天測量體重)、眼睛/毛髮無光澤等、以及任何其他異常影響之處理。基於各子集內小鼠之數量記錄死亡情況以及觀察到之臨床症狀。

【0312】

7.4 腫瘤測量及終點

主要之終點係看是否可延緩腫瘤生長或小鼠是否可被治癒。每週兩次使用游標卡尺在兩個維度上測量腫瘤之大小，並且使用以下公式計算體積並以mm³之單位表示： $V = 0.5 \times a \times b^2$ ，其中a與b分別為腫瘤之長徑與短徑。腫瘤之大小用於計算T/C值與TGI。T/C值(單位為百分比)係抗腫瘤作用之指示；T與C係處理組與對照組分別在第21天與在第28天之平均體積。各組之TGI使用以下公式計算： $TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0)/(V_i - V_0)] \times 100$ ；T_i係處理組在第21天與第28天之平均腫瘤體積，T₀係處理組在處理開始當天之平均腫瘤體積，V_i係載劑對照組在第21天與第28天之平均腫瘤體積，而V₀係載劑組在處理開始當天之平均腫瘤體積。

【0313】 將所有組在第28天依照方案記錄下來。

【0314】 所有小鼠在實驗階段中良好地保持體重。

【0315】

7.5 在Nalm-6淋巴瘤癌症異種移植模型中之效能研究

在這一研究中，在雌性CB17-SCID小鼠中之Nalm-6淋巴瘤癌症異種移植中評價參照抗體-藥物-結合物W7011-BMK1-DM1及W7011-4.87.6-z1-uIgG1k (N-S)-DM1之效能。所有組在不同時間點之腫瘤體積展示於圖14中。

【0316】 在PG-D21上，同種型對照處理組之平均腫瘤體積達到840 mm³。用1 mg/kg(TV = 364 mm³，TGI=66%， $p < 0.01$)及10 mg/kg(TV = 327 mm³，TGI = 71%， $p < 0.001$)之W7011-BMK1-DM1處理，顯示出顯著之抗腫瘤活性。1 mg/kg(TV = 398 mm³，TGI = 61%， $p < 0.01$)、3 mg/kg(TV = 387 mm³，TGI = 62%， $p < 0.01$)及10 mg/kg(TV = 332 mm³，TGI = 70%， $p < 0.001$)之ADC W7011-4.87.6-z1-uIgG1k (N-S)-DM1均顯示出顯著之抗腫瘤活性。

【0317】 懸液投予1週後，同種型對照處理組之平均腫瘤體積達到1266 mm³。用1 mg/kg(TV = 593 mm³，TGI = 58%， $p < 0.01$)及10 mg/kg(TV = 499 mm³，TGI = 67%， $p < 0.001$)之W7011-BMK1-DM1處理，顯示出顯著之抗腫瘤活性。1 mg/kg(TV = 562 mm³，TGI = 61%， $p < 0.01$)、3 mg/kg(TV = 556 mm³，TGI = 62%， $p < 0.01$)及10 mg/kg(TV = 502 mm³，TGI = 66%， $p < 0.001$)之ADC W7011-4.87.6-z1-uIgG1k (N-S)-DM1均顯示出顯著之抗腫瘤活性。

【0318】 所有小鼠在實驗階段中良好地保持體重。

【序列表】

<110> 中國大陸商上海藥明生物技術有限公司(WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD.)

<120> 新型抗CD19抗體

<130> 053674-8013CN01

<150> PCT/CN2017/102631

<151> 2017-09-21

<160> 141

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

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

Ala

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Gly Tyr Ala Phe Ser Thr Tyr Trp Met Asn
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 8

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

Gly

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 9

Arg Tyr Phe Arg Tyr Asp Tyr Trp Tyr Ser Asp Val
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 10

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

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 11

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 12

His Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu Thr
1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 13

Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5 10

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 14

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

Gly

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 15

Thr Ala Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 16

Ser Ala Ser Ser Thr Val Asn Tyr Met His
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 19

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20

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

Gly

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21

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

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 22

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
1 5 10

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 23

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

Gly

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 24

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

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 25

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 26

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

Gly

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 27

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

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 29
<211> 17

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 29

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

Gly

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 30

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

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 31

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 32

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

Gly

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 33

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

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 34

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 35
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 35

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Glu Tyr Ser Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 36

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

<210> 37
<211> 10

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 37

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
1 5 10

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 38

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

Gly

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 39

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

<210> 40
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 40

Arg Ser Ser Gln Thr Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 41

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 42

Leu Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 43

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His
1 5 10

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 44

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

Gly

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 45

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

<210> 46
<211> 25
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 46

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 47

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 48

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 49

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 50
<211> 23
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 50

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 51
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 51

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 52
<211> 32
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 52

Gly Val Leu Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 53
<211> 10

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 53

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 54
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 58
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 62
<211> 25
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 62

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 63

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 64
<211> 32
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 64

Lys Ala Ser Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15

Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 65
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 65

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Thr Ser
1 5 10

<210> 66
<211> 23
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 66

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

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 67

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 68
<211> 32
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 68

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser
1 5 10 15

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

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 69

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 70
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 71
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 72
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 76
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 78

<211> 25

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 78

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 79

<211> 14

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 79

Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 80

<211> 32

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 80

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His
1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Thr
20 25 30

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 81

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 82

<211> 23

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 82

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

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys
20

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 83

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 84

<211> 32
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 84

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

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

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 85

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 86
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 88
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Thr
20 25 30

<210> 89
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 90
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 91
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 91

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 92
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 92

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 93

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 94
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 94

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Lys Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 95
gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta ttcactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat tttaatcctt acaatgatgg tactgaatac 180

aatgagaagt tcaaagccaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aaaaggtccc 300

tactactacg gtagtagccc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tca 363

<210> 96
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 96

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

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

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

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

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

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

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

<210> 97
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 97
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120

tacctccaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acagggtttc caaccgattt 180

tctgggggcc ttgacagggt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agtagagtgg aggctgagga tttgggagtt tatttctgtc tccaagttac acatgtcccc 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 98
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 98

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Thr Ser
115 120

<210> 99
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 99
caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc agtgaagatt 60

tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt acctattgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttatcctg gagatgatga tactaagtac 180

aatggaaagt tcaagggtaa agcctcactg actgcagaca aatcctccag caccgcctac 240

atgcagctca tcagcctaac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaagatac 300

tttaggtacg actactggta ttccgatgtc tggggcgag ggaccacggt caccgtcacc 360

tca 363

<210> 100
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 100

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys His Gln Gly Asn Thr Leu Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 101
<211> 321
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 101

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaaccg 120

gatggaactg ttaaactcct gatctattac acatcaagat tacactcagg agtcccagca 180

agattcagtg gcagtgggtc tggaacagat tactctctca ccattagtaa cctggaacaa240

gaagatattg ccacttactt ttgccaccag ggtaatacgc ttccgctcac gttcgggtgct300

gggaccaagc tggagctgaa a321

<210> 102

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 102

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

151015

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr

202530

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

354045

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

505560

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65707580

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

859095

Leu Thr Thr Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100105110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 103

<211> 348

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 103
gagatccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaggta 60

tcctgcaagg cttctggtta tgcattcact agctacaaca tgtactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggatat attgatcctt acaatgggtga tactacctac 180

aaccagaagt tcaaggggcaa ggccacattg actgttgaca agtcctccag cacagcctac 240

atgcatttca acagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtct cactacggcc 300

tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 348

<210> 104
<211> 106
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 104

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

Glu Glu Ile Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Thr Val Asn Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 105

<211> 318

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 105

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctagggga ggagatcacc60

ctaacctgca gtgccagctc gactgtaaat tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc120

acttctccca aactcttgat ttatagcaca tccaacctgg cttctggagt cccttctcgc180

ttcagtggca gtgggtctgg gaccttttat tctctcaca tcagaagtgt ggaggctgaa240

gatgctgccg attattactg ccatcagtgg agtagttatc cgtacacgtt cggagggggg300

accaagctgg aaataaaa318

<210> 106

<211> 121

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 106

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr2030

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile354045

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe505560

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr65707580

Met Ala Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys859095

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 107
gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact aactatgtta tacactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactgagtac 180

aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca catcctccag cacagcctac 240

atggcgctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtac aagaggaccc 300

tattactacg gtggtagccc cttcgactac tggggccaag gcaccactct cacagtcctc 360

tca 363

<210> 108
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 108

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 109
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 109
gaggtcagc tgcagcagtc tgggcctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactggat gaaacagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactgagtac 180

catgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct tttactgtgc aagaggaccc 300

tattactacg gtggtagccc ctttgacttc tggggccaag gcaccactct cacggtctcc 360

tca 363

<210> 110
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 110

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 111
gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tacactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatccit acaatgatgg tgctgagtac 180

actgagaagt tcaagggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag tactgcctat 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctacggtct attactgtgc acgaggaccc 300

tattactacg gtggtagccc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tca 363

<210> 112

<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 112

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 113
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 113

gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcagt agttatgtta tacactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tgctgagtat 180

gctgagaagt tcaagggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag ttctgcctat

240

atggagctcg gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc acgaggaccc

300

tattactacg gtggtagtcc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc

360

tca

363

<210> 114

<211> 121

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 114

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Glu Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Val Ile His Trp Leu Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Glu Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Asp Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 115

<211> 363

<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 115
gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtggagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgta ttcactggtt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tgctgagtat 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag tacagcctat 240

atggatctca acagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggaccc 300

tattactacg gtagtagccc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tca 363

<210> 116
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 116

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 117
gagggtccagc tgctgcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatgtta tacactgggt gaagcagagg 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg ttctgagtac 180

agtgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggaccc 300

tattactacg gtggtagtcc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tca 363

<210> 118
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 118

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 119
gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaagtac 180

aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggaactca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggaccc 300

tattactacg gtagtagccc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtcctc 360

tca 363

<210> 120
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 120

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

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

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

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

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

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

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

<210> 121
<211> 336
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 121
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca ggtctagtca gacccttgaa aacagtaatg gaaacaccta tttgaactgg 120

tacctccaga aaccaggcca gtctccacag ctctgatct acagggtttc caaccgattt 180

tctgggggcc tagacagggt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg agactgagga tttgggagtt tatttctgcc tccaagttac acatgtcccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 122
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 122

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 123
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 123
gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtca tgcactgggt gaagcagaag 120

cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactcagtac 180

aatgagaagt ttaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaggaccc 300

tattactaca gtcctagccc ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

tca

363

<210> 124

<211> 121

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 124

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Tyr Phe Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 125

<211> 363

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 125

cagg	tg	cagc	ttgt	gcagtc	tgga	gctgaa	gtga	agaagc	caggat	cctc	cgtga	aggtc	60
tcct	gtaagg	cttct	ggcta	cacct	tcacc	gattac	gtga	tccact	gggt	caggc	aggcc	120	
cctg	ggcaag	gctt	ggagtg	gatg	gggtac	ttaa	accct	acaac	gatgg	gact	gagtac	180	
aatg	agaagt	ttaa	agcacg	ggtg	accatt	accg	ccgaca	agag	cacaag	cacag	cctac	240	
atgg	agctgt	ccag	cctccg	cagc	gaggat	acag	ccgtct	actact	gcgc	cagag	gccct	300	
tact	actatg	ggtc	cagccc	cttc	gactat	tggg	gccagg	ggact	acagt	gact	gtcagt	360	
tca												363	

<210> 126

<211> 112

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 126

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

859095

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100105110

<210> 127
<211> 336
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的

<400> 127
gatatcgtga tgaccagac tccctgtcc ctctctgtga cccaggaga accagcttct 60

atcagctgta ggtcctcaca gagcctggag aactccaacc acaacaccta cataaactgg 120

tacctccaga agcctgggca gtctccccag ttgctgatct acagggtcag caaacgcttc 180

tccgggggtgc ccgatcggtt tagtgggagc gggagcggca cagactttac actcaagatt 240

tccagagtgg aggccgagga cgtcggcgtc tattactgcc accaagtgac acacgtgccc 300

tacacattcg gccagggcac taaactggag attaag 336

<210> 128
<211> 121
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的

<400> 128

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
151015

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Thr Tyr
202530

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
354045

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

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

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

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

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 129
<211> 363
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的

<400> 129
caggtcacgc ttgtccagtc tggagcagaa gtgaagaagc caggggcttc agtgaagggtg 60

tcttgcaagg cttccggata cgccttctcc acttactgga tgaactgggt gcgccaggcc 120

cctgggcagg gcttggagtg gatgggccag atctatcccg gcgatgacga cacaaaatac 180

agcgggaagt tcaaggggcg ggtgaccatt accgccgata aaagcacctc caccgcctac 240

atggagctca gttccctgag aagcgaggat acagccgtgt actactgtgc caggaggtac 300

tttcggtacg actactggta tagcgacgtc tgggggcaag gcacaactgt cacagtgagc 360

agc 363

<210> 130
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 130

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

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

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

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

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

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

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

<210> 131

<211> 321

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 131

gacatccaaa tgaccagag cccttcctcc ttgtccgcaa gtgtgggaga tagagtgacc 60

atcacctgca gggtcttctca ggatatctcc aactacctga actggtatca gcagaagccc 120

ggcaaggtgc caaagctcct tatttactac acctcccggc tgcacagcgg agtcccatct 180

cgttcagcg ggtcaggcag cggcactgac ttactctga caattagcag cctccagcct 240

gaagacgtcg ccacttacta ctgtcatcag gggaatacac tccccctgac attcgggcag300

gggacaaaaac tggagattaa g321

<210> 132

<211> 116

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 132

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr

202530

Asn Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Arg Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

354045

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Ala Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe

505560

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65707580

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

859095

Leu Thr Thr Ala Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100105110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 133

<211> 348

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 133

caaatgcagc	tcgtccagtc	tggaacctgaa	gtgaagaagc	ccgggacatc	cgtcaaggtc	60
tcattgtaagg	ctagcgggta	cgcattcact	tcctacaaca	tgtactgggt	gcgccaggcc	120
agaggacaga	ggttggagtg	gacggctac	atcgacccat	acaacgccga	tactacctac	180
aatcagaagt	ttaaagggcg	ggtgaccatt	acccgggata	tgtccacctc	caccgcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	gagcgaggac	acagccgtgt	actactgcct	gacaacagcc	300
tatgccatgg	actattgggg	ccagggcaca	cttgtgactg	tgagcagt		348

<210> 134

<211> 106

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 134

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100105

<210> 135
<211> 318
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的

<400> 135
gacatccagc tcaccaatc cctttctttc ctctccgcaa gtgtcggaga tagggtgact 60

atcacctgct cagcttcttc aaccgtgaac tacatgcatt ggtaccagca gaagcccggg 120

aaagccccaa agctgctgat ctacagcacc tccaatctgg ccagtggagt gccaagccgg 180

tttagcggga gcggctccgg cactgaattc actttgacaa ttagcagcct tcagcctgag 240

gactttgcc a catattactg tcaccagtgg tccagctacc cctacacatt cgggcagggc 300

acaaagctgg agattaag 318

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的

<400> 136

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Ile His
1510

<210> 137
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的

<400> 137

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

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 138

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 139

His Gln Val Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 140

<211> 17

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 合成的

<400> 140

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

Gly

<210> 141
<211> 17
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的

<400> 141

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

Gly

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種經分離之抗-CD19抗體或其抗原結合片段，其包括：

重鏈CDR序列，其包括SEQ ID NO: 136、SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 3；以及κ輕鏈CDR序列，其包括SEQ ID NO: 137、SEQ ID NO: 138及SEQ ID NO: 139。

【請求項2】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其包括：

重鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 124；以及κ輕鏈可變區，其包括SEQ ID NO: 126。

【請求項3】

如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段，其進一步包括免疫球蛋白恆定區。

【請求項4】

如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段，其進一步包括IgG之恆定區。

【請求項5】

如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段，其進一步包括人IgG1之恆定區。

【請求項6】

如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段，其為人源化抗體。

【請求項7】

如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段，其為雙特異性抗體、雙功

能抗體(diabody)、scFv、scFv二聚體、BsFv、dsFv、(dsFv)₂、dsFv-dsFv'、Fv片段、Fab、Fab'、F(ab')₂或ds雙功能抗體(ds diabody)。

【請求項8】

如請求項1或2之抗體或其抗原結合片段，其與一種或多種結合物連接。

【請求項9】

一種經分離之多核苷酸序列，其編碼如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【請求項10】

一種載體，其包括如請求項9之經分離之多核苷酸。

【請求項11】

一種宿主細胞，其包括如請求項10之載體。

【請求項12】

一種表現如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段之方法，其包括在表現如請求項11之宿主細胞所包括之載體之條件下培養該宿主細胞。

【請求項13】

一種抗體-藥物結合物，其包括一個或多個藥物部分，該藥物部分係直接或經由連接子共價連接至如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段，其中該藥物部分為細胞毒素或放射性同位素。

【請求項14】

一種醫藥組合物，其包括如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項13之抗體-藥物結合物、以及醫藥上可接受之載劑。

【請求項15】

一種如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段或如請求項13之抗體-藥物結合物之用途，其係用於製備治療與CD19相關之疾病或病況之醫藥品。

【請求項16】

一種嵌合抗原受體(CAR)，其包括如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段與T細胞活化部分，其中該T細胞活化部分包括T細胞受體之跨膜結構域與T細胞受體之胞內信號轉導結構域，其中該抗體或其抗原結合片段為抗原結合片段。

【請求項17】

一種核酸序列，其編碼如請求項16之CAR。

【請求項18】

一種載體，其包括如請求項17之核酸序列。

【請求項19】

一種經分離之T細胞，其表現如請求項16之CAR。

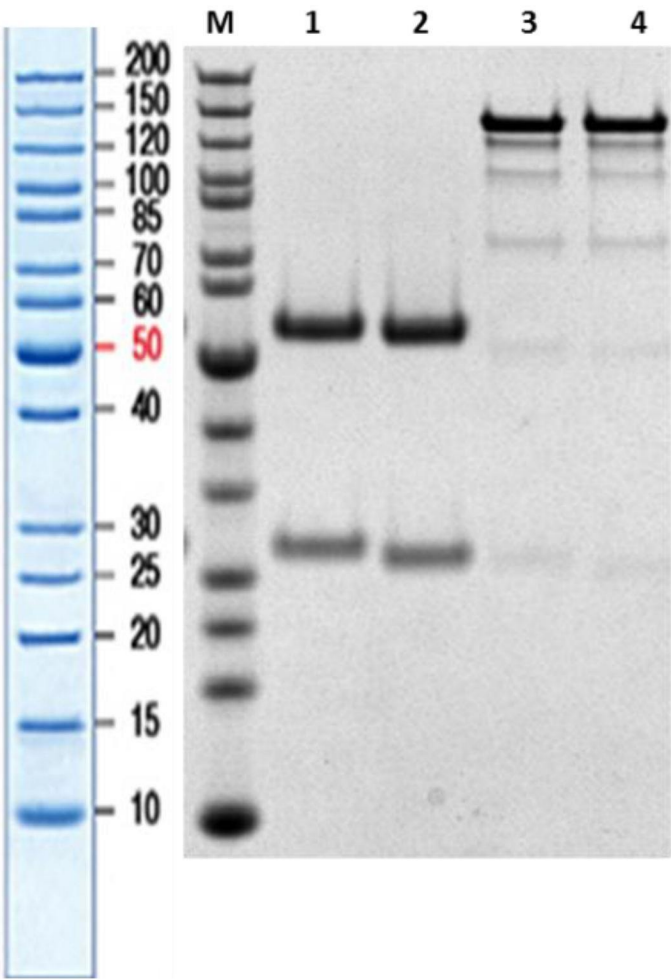
【請求項20】

一種如請求項19之T細胞之用途，其係用於製備刺激T細胞介導之針對表現CD19之靶標的免疫反應之醫藥品。

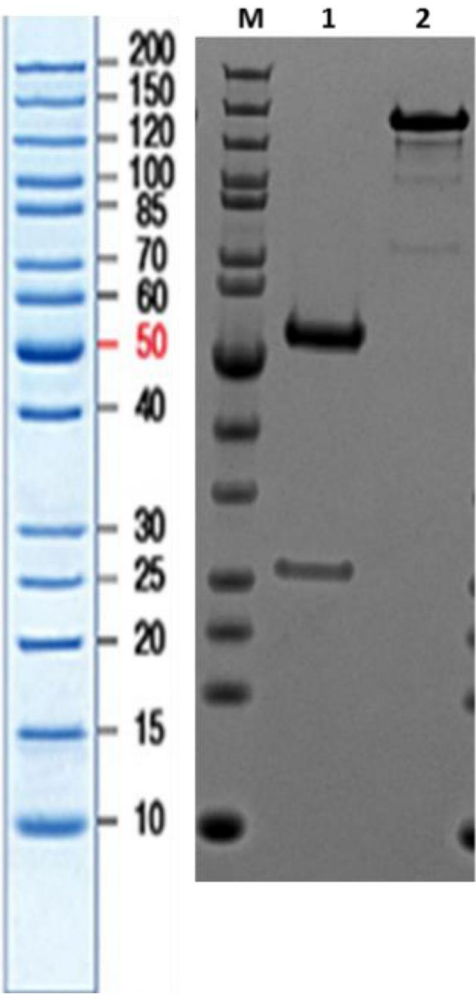
【請求項21】

一種套組，其包含如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段，其可用於檢測樣品中CD19之存在或量或用於診斷與CD19相關疾病或病況。

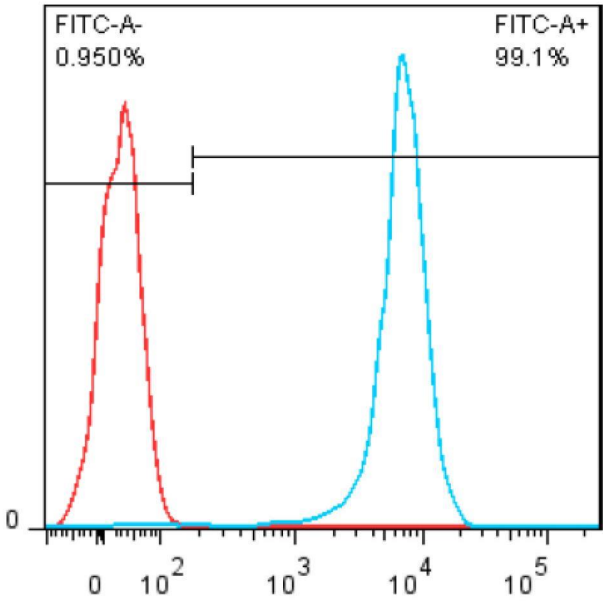
【發明圖式】



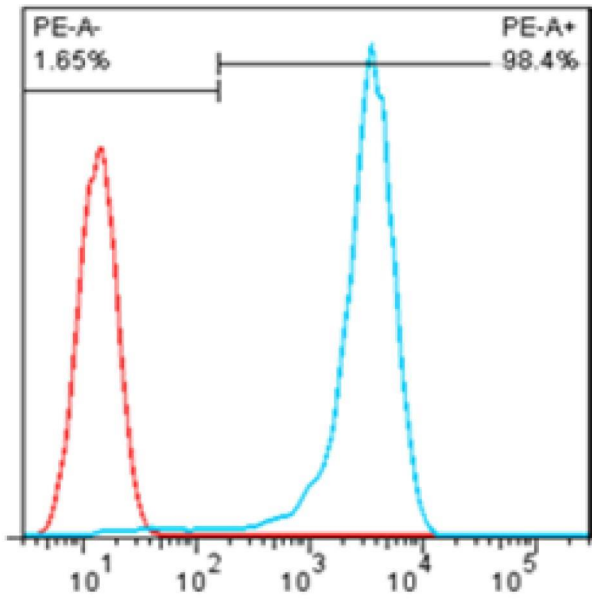
【圖1】



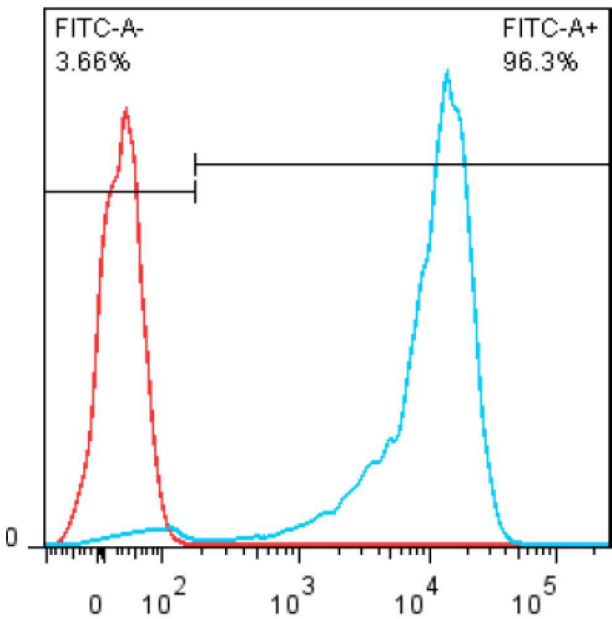
【圖2】



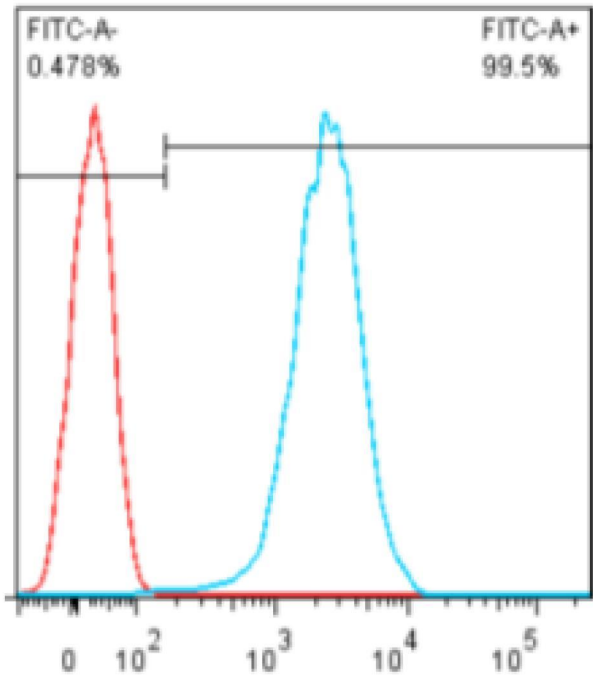
【圖3A】



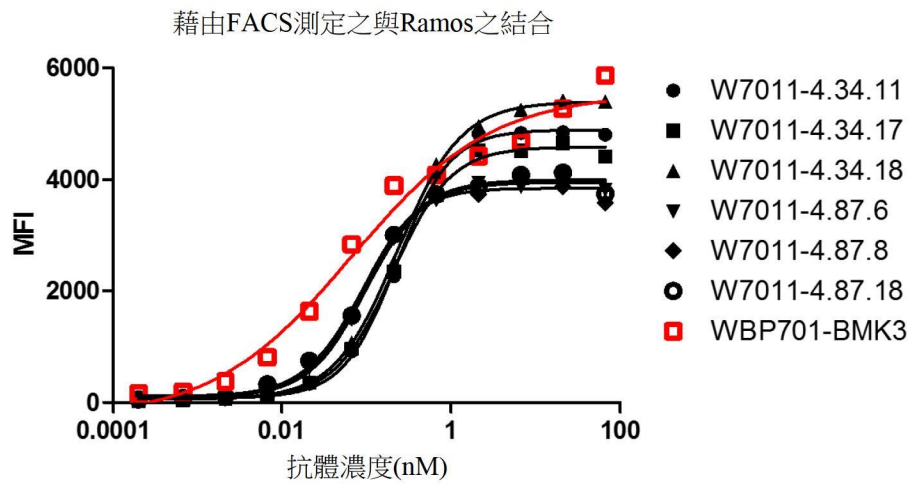
【圖3B】



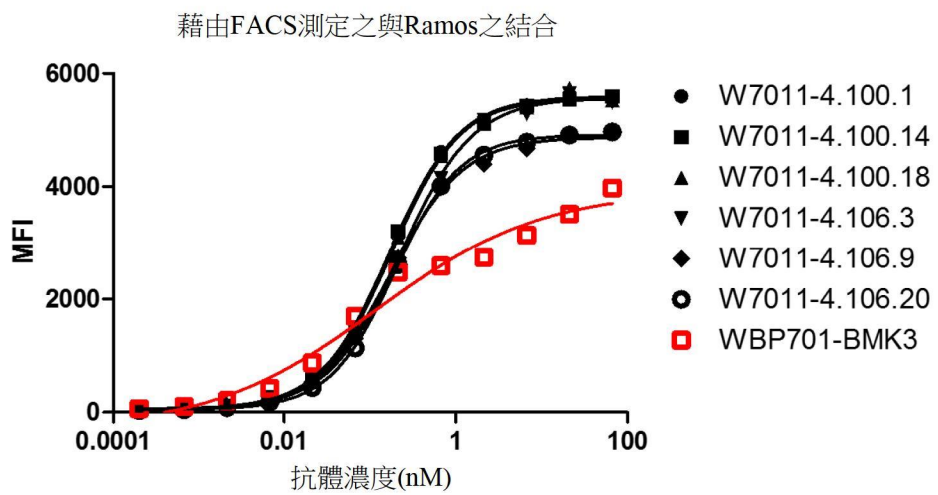
【圖3C】



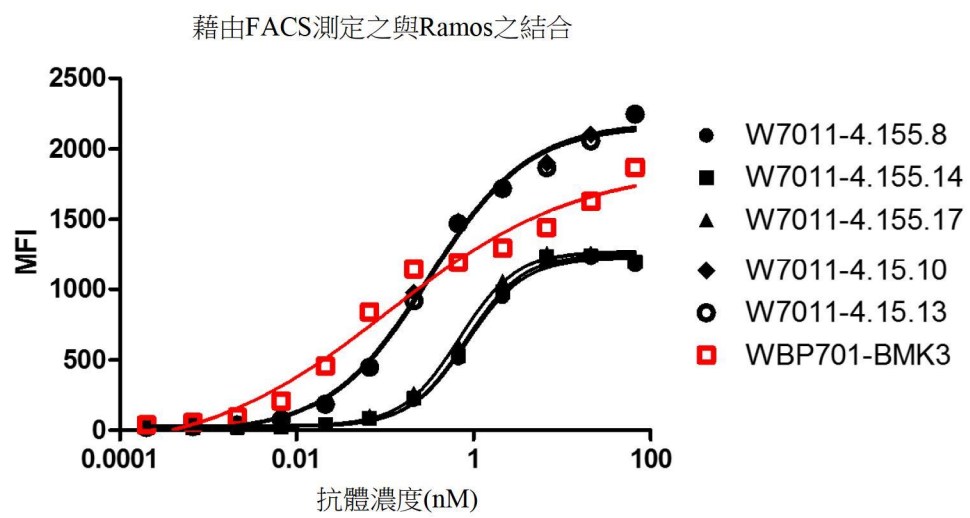
【圖3D】



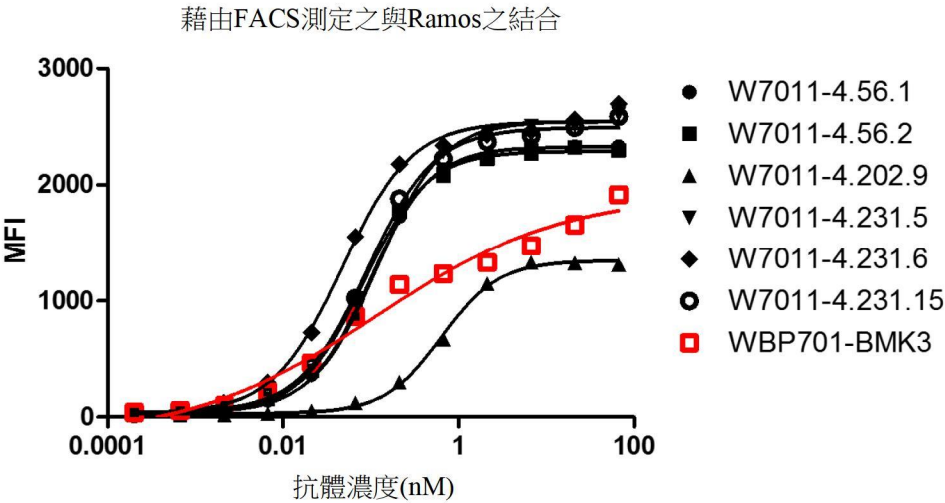
【圖4A】



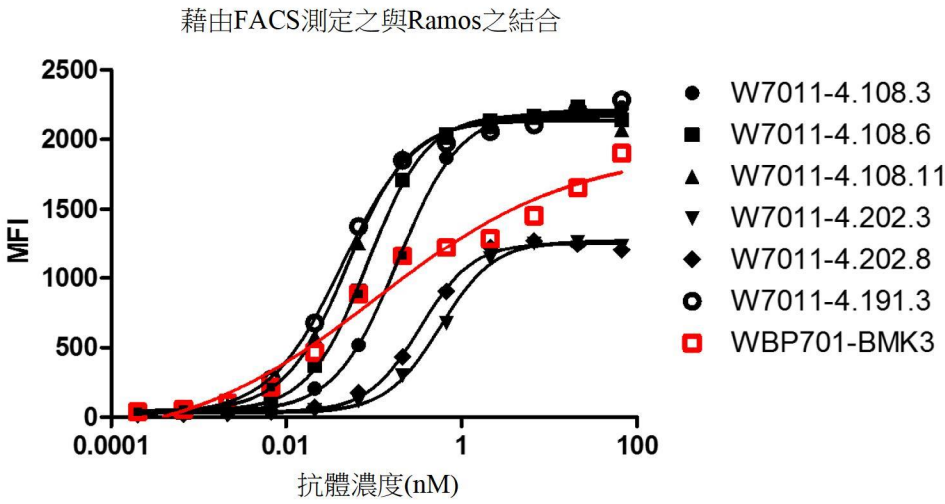
【圖4B】



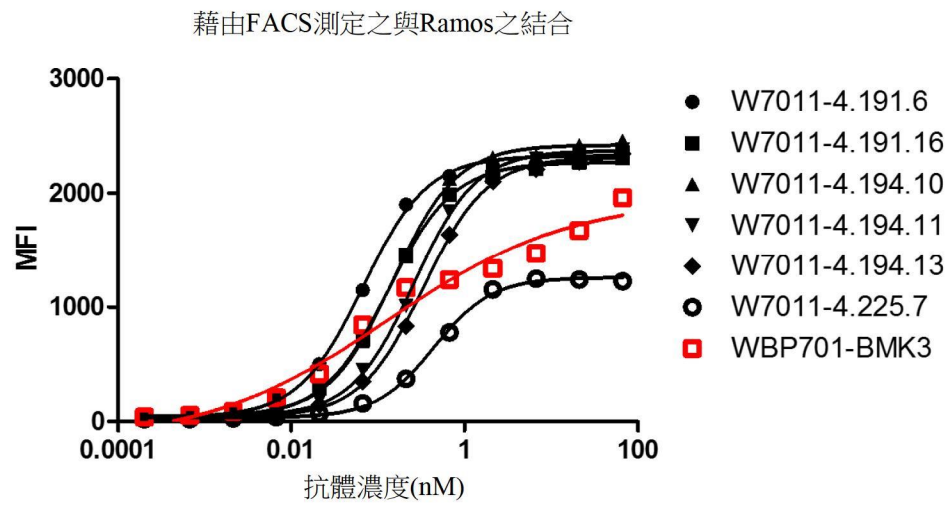
【圖4C】



【圖4D】

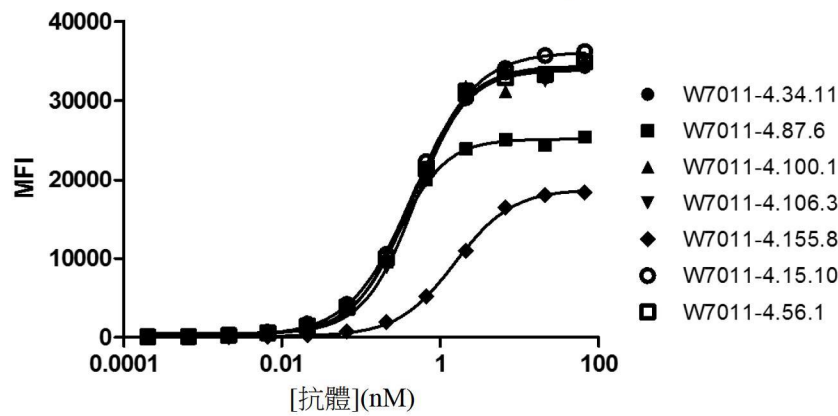


【圖4E】



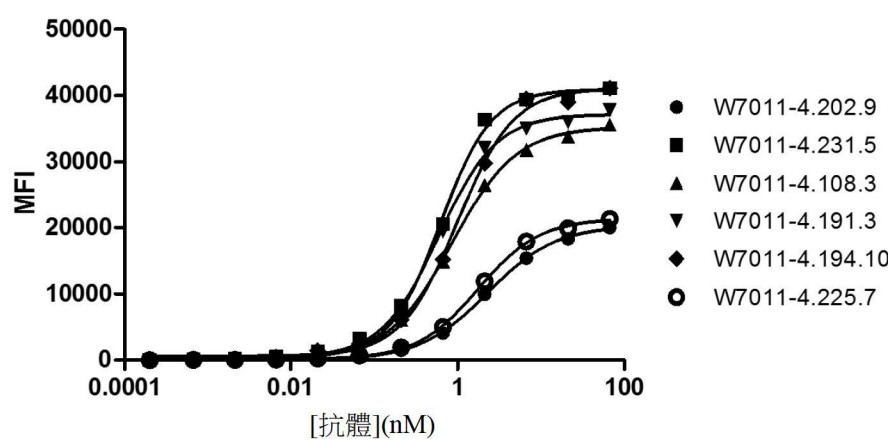
【圖4F】

藉由FACS測定之與WBP701.CHO-K1.cynoPro1之結合



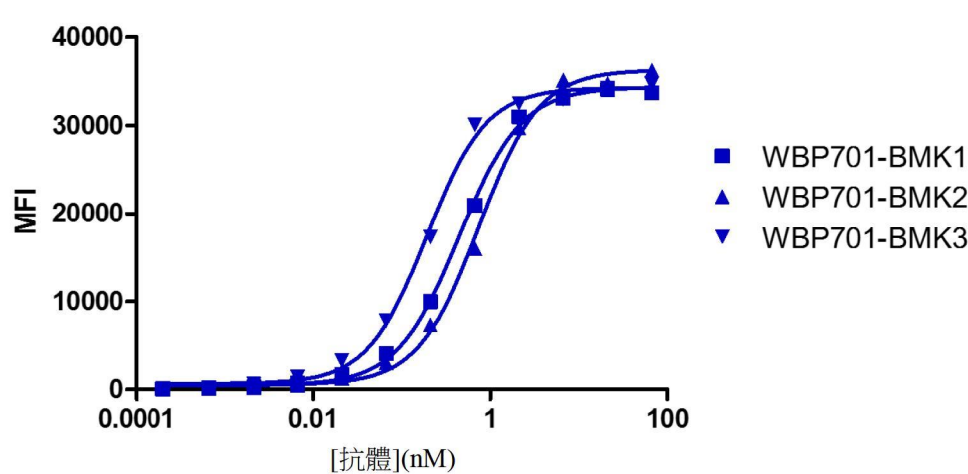
【圖5A】

藉由FACS測定之與WBP701.CHO-K1.cynoPro1之結合

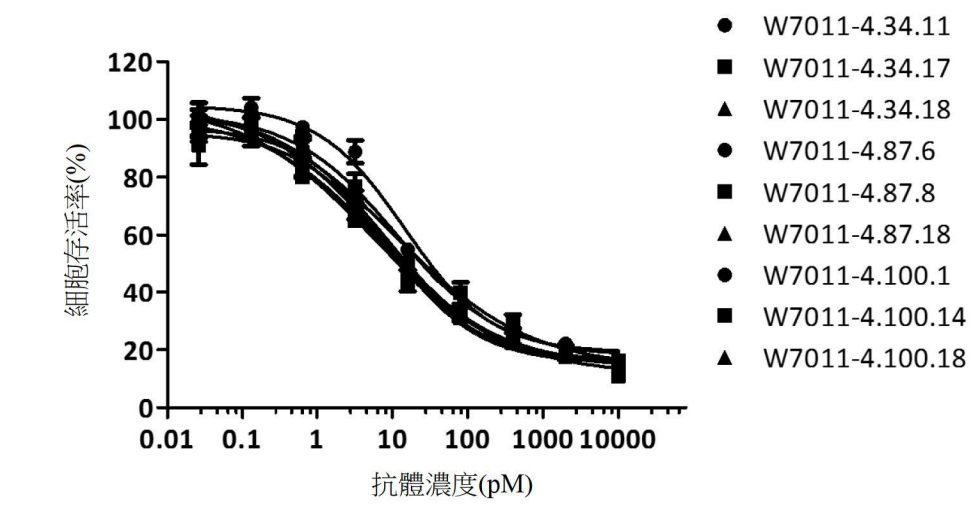


【圖5B】

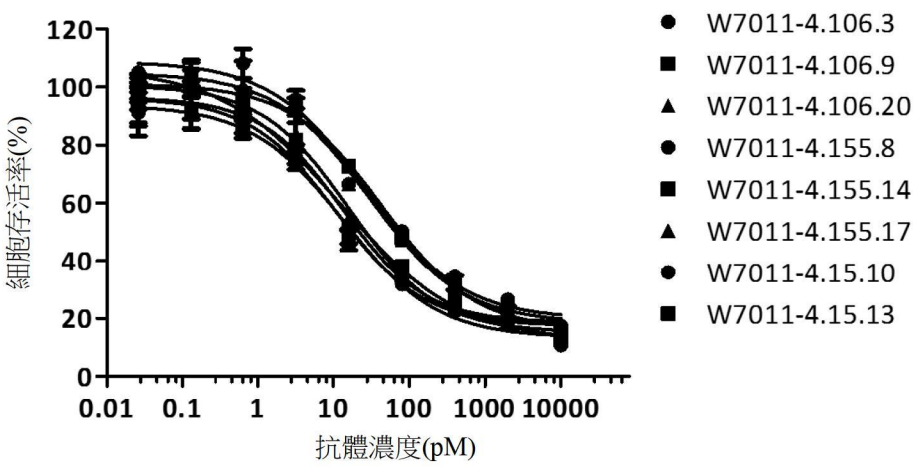
藉由FACS測定之與WBP701.CHO-K1.cynoPro1之結合



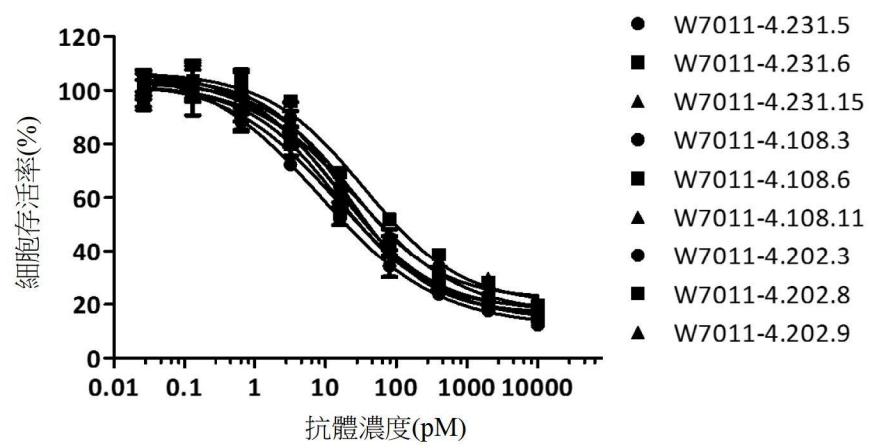
【圖5C】



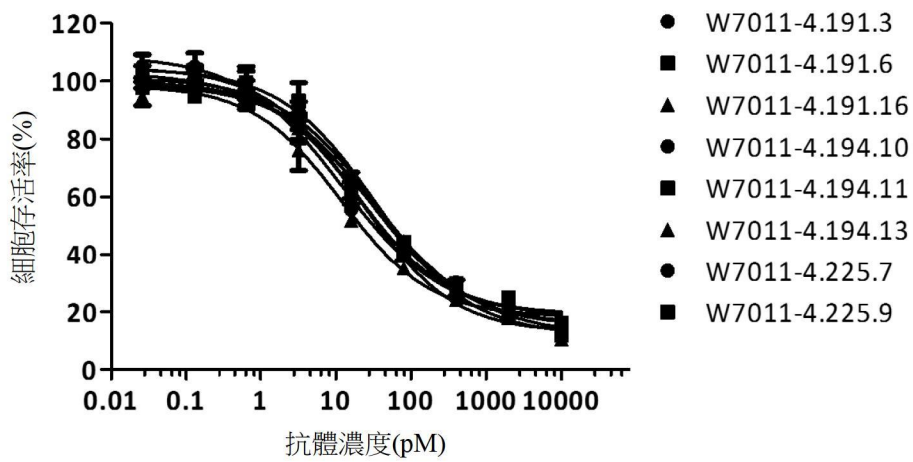
【圖6A】



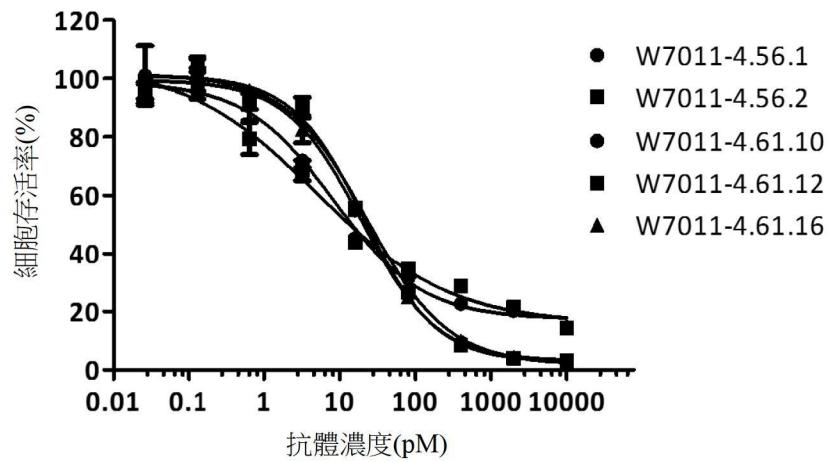
【圖6B】



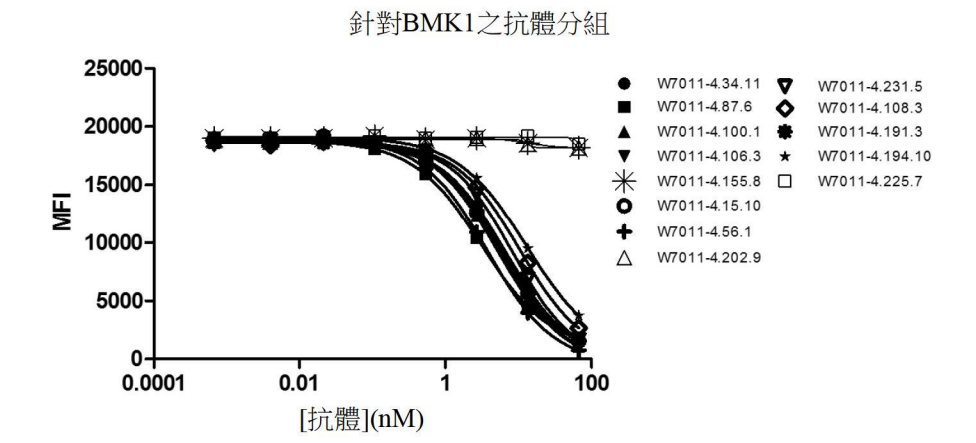
【圖6C】



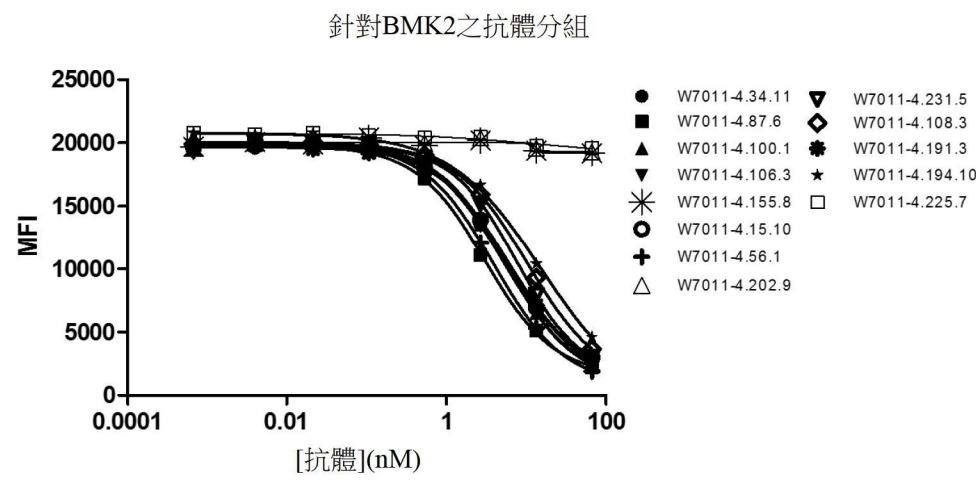
【圖6D】



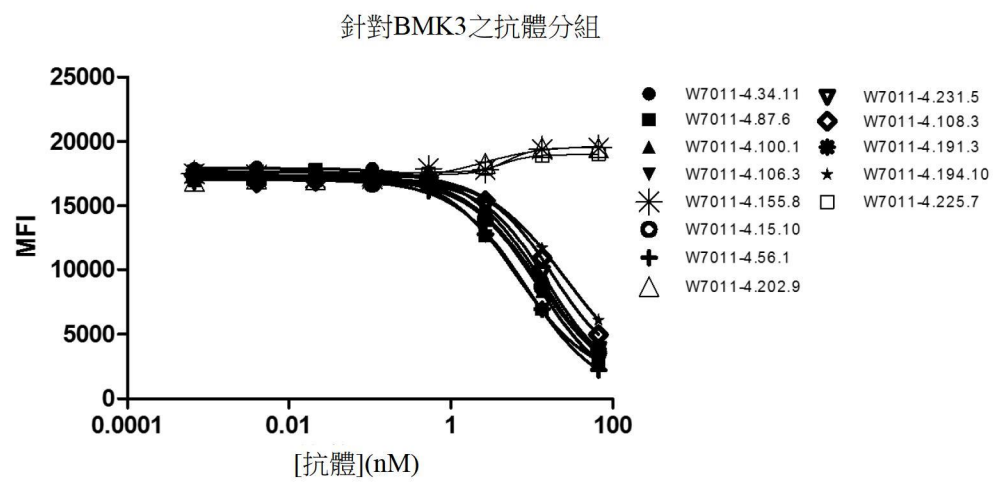
【圖6E】



【圖7A】

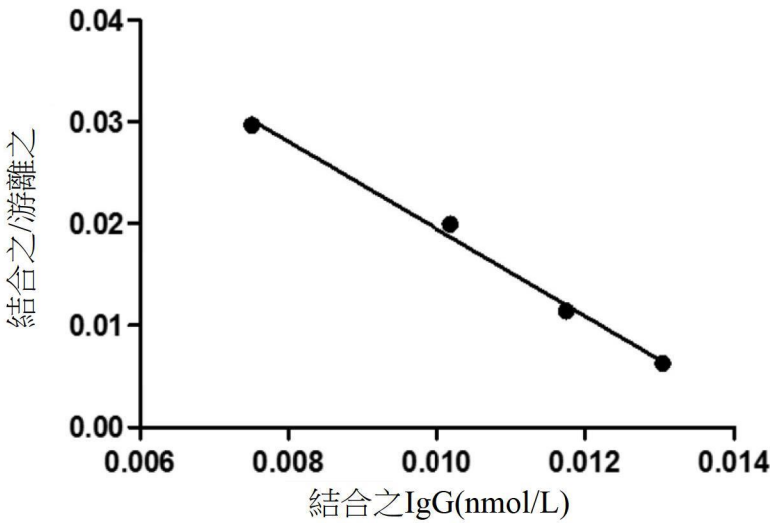


【圖7B】



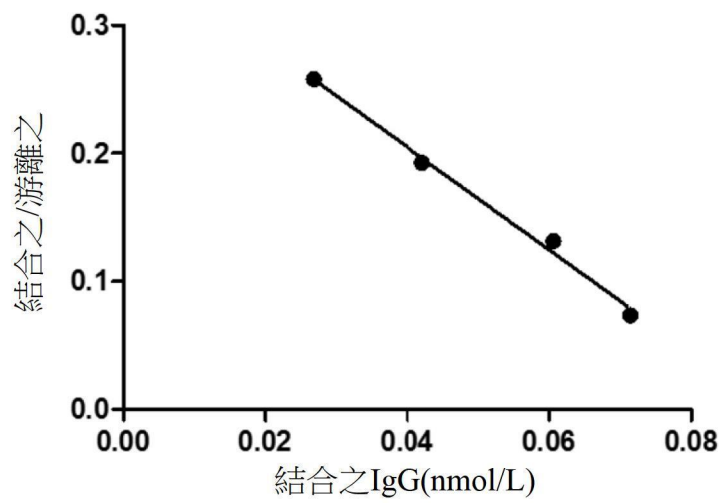
【圖7C】

在Ramos細胞上進行之WBP7011-4.34.11-z1-m5-IgG1k之親和性測試



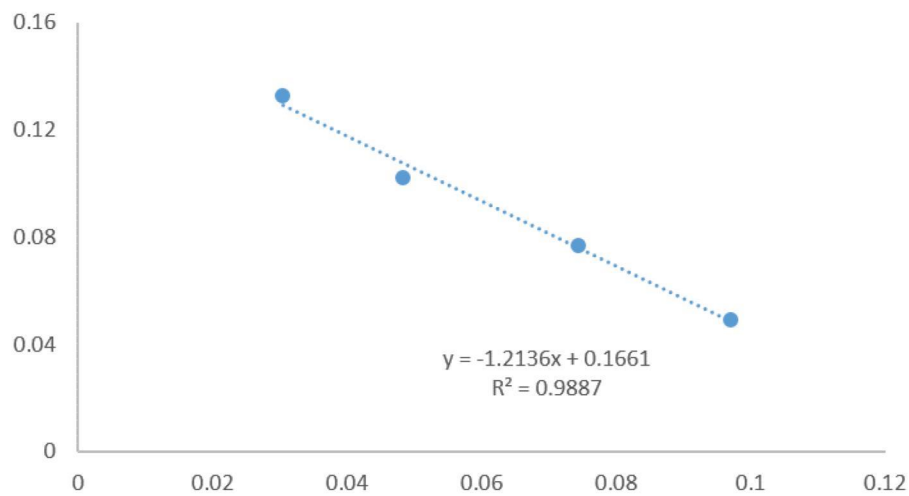
【圖8】

在Ramos細胞上進行之WBP7011-4.87.6-z1-IgG1k(N-S)之親和性測試

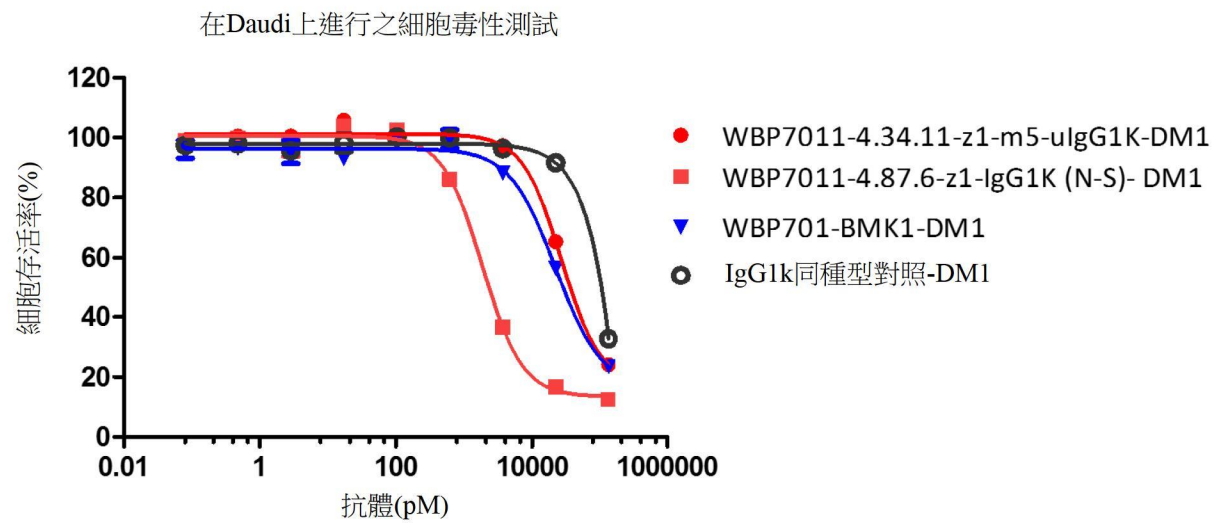


【圖9】

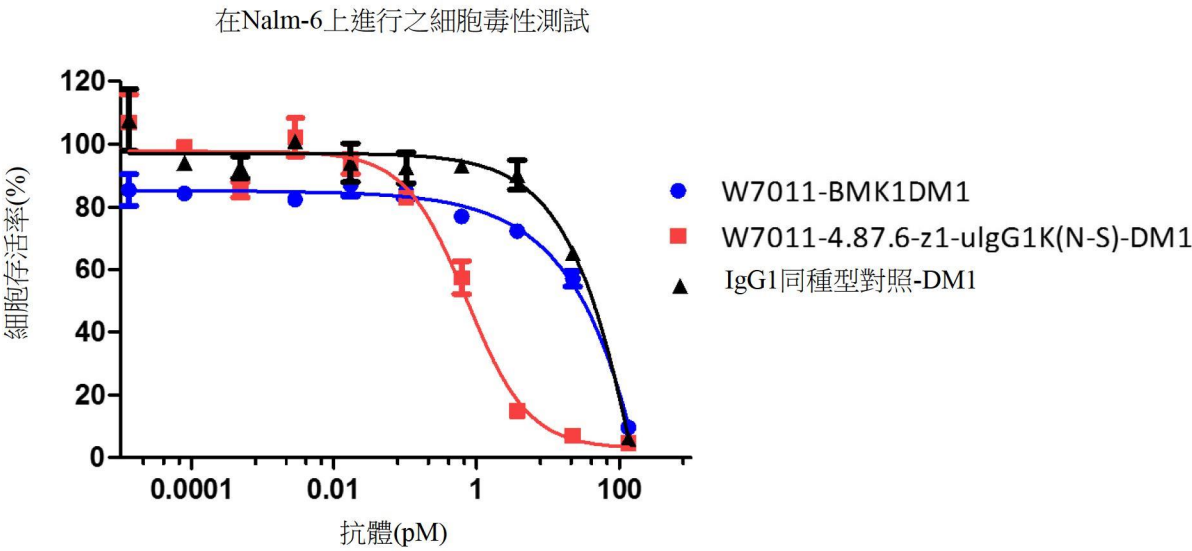
在WBP701.CHO-K1.hPro1細胞上進行之
W7011-4.155.8-z1-uIgG1k之親和性測試



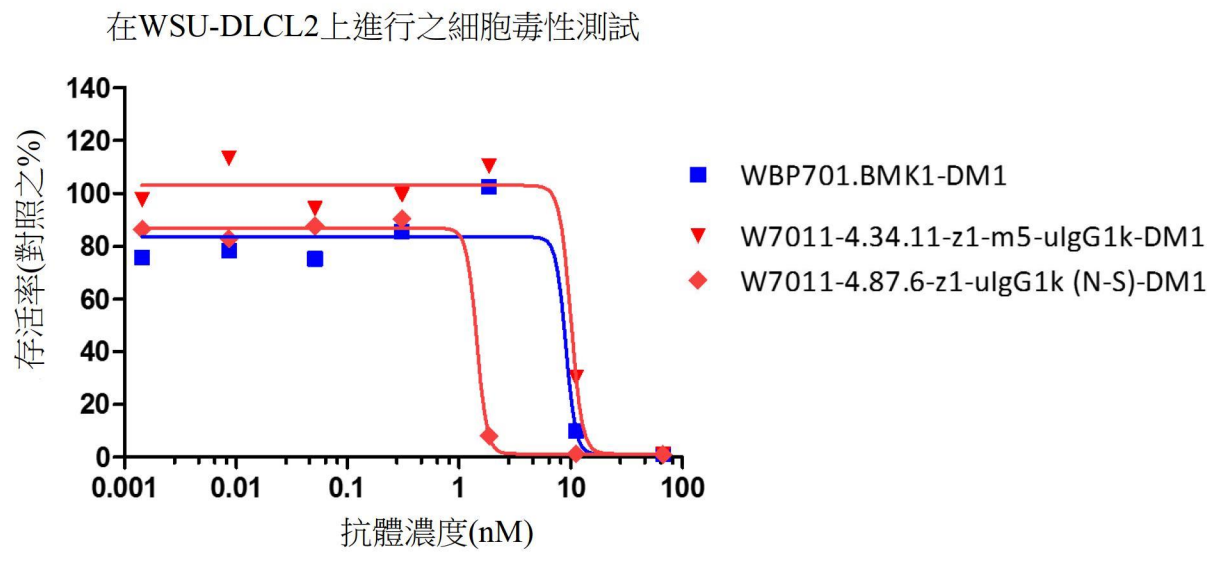
【圖10】



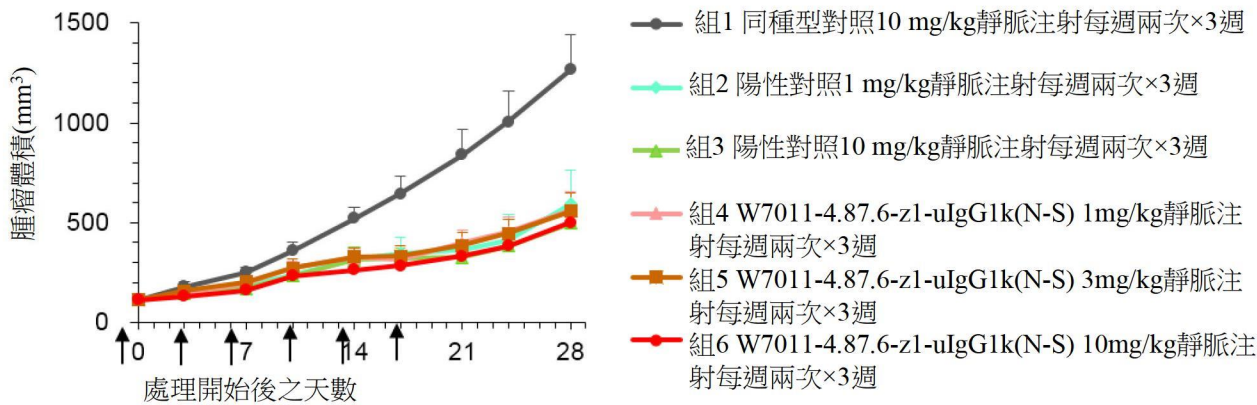
【圖11】



【圖12】



【圖13】



【圖14】