



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114632158 A

(43) 申请公布日 2022.06.17

(21) 申请号 202210119724.2

A61K 31/522 (2006.01)

(22) 申请日 2014.11.04

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

13192006.8 2013.11.07 EP

(62) 分案原申请数据

201480061326.3 2014.11.04

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

申请人 小野药品工业株式会社

(72) 发明人 C·克莱因 吉泽敏男 康弘智子

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 岑晓东

(51) Int. Cl.

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

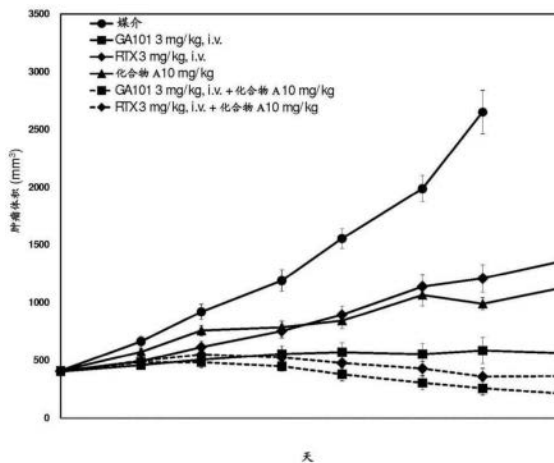
权利要求书1页 说明书36页 附图5页

(54) 发明名称

抗CD20抗体与BTK抑制剂的组合法

(57) 摘要

本发明涉及抗CD20抗体与BTK抑制剂用于治疗癌症的组合法,尤其涉及用I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体和BTK抑制剂治疗表达CD20的癌症的组合法。



1. 一种用于治疗癌症的药物组合物,其包含具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体和BTK抑制剂的组合,其特征在于所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)。

2. 一种用于治疗癌症的药物组合物,其包含I型抗CD20抗体和BTK抑制剂的组合,其特征在于所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗。

3. 依照权利要求1或2的药物组合物,其特征在于所述癌症是淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

4. 依照权利要求1至3任一项的药物组合物,其特征在于所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

5. 具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体用于制造与BTK抑制剂组合治疗癌症的药物的用途,其特征在于所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)。

6. I型抗CD20抗体用于制造与BTK抑制剂组合治疗癌症的药物的用途,其特征在于所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗。

7. 依照权利要求5或6的用途,其特征在于所述癌症是淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

8. 依照权利要求5至7任一项的用途,其特征在于所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

抗CD20抗体与BTK抑制剂的组合疗法

[0001] 本申请是申请日为2014年11月04日、中国申请号为201480061326.3、发明名称为“抗CD20抗体与BTK抑制剂的组合疗法”的发明申请的分案申请。

[0002] 本发明涉及抗CD20抗体与BTK抑制剂用于治疗癌症的组合疗法。

[0003] 发明背景

[0004] 无岩藻糖基化的抗体

[0005] 单克隆抗体的细胞介导的效应器功能可以通过工程化改造其寡糖组分来增强,如记载于Umaña,P.et al.,Nature Biotechnol.17(1999)176-180及US 6,602,684。IgG1型抗体(即在癌症免疫疗法中最常使用的抗体)是在每个CH2域中的Asn297处具有保守的N连接的糖基化位点的糖蛋白。附着于Asn297的两个复合双触角寡糖掩埋于各CH2域间,与多肽主链形成广泛的接触,并且其存在对于抗体介导效应器功能诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)是至关重要的(Lifely,M.R.et al.,Glycobiology 5(1995)813-822;Jefferis,R.et al.,Immunol.Rev.163(1998)59-76;Wright,A.and Morrison,S.L.,Trends Biotechnol.15(1997)26-32)。Umaña,P.et al.,Nature Biotechnol.17(1999)176-180及WO 99/154342显示了 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡糖胺转移酶III(“GnTIII”) (一种催化两分型寡糖形成的糖基转移酶)在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中的过表达显著提高抗体的体外ADCC活性。N297碳水化合物的组成变化或其消除也影响Fc结合Fc γ R和C1q(Umaña,P.et al.,Nature Biotechnol.17(1999)176-180;Davies,J.et al.,Biotechnol.Bioeng.74(2001)288-294;Mimura,Y.et al.,J.Biol.Chem.276(2001)45539-45547;Radaev,S.et al.,J.Biol.Chem.276(2001)16478-16483;Shields,R.L.et al.,J.Biol.Chem.276(2001)6591-6604;Shields,R.L.et al.,J.Biol.Chem.277(2002)26733-26740;Simmons,L.C.et al.,J.Immunol.Methods 263(2002)133-147)。

[0006] 已经报告了讨论无岩藻糖基化的和岩藻糖基化的抗体(包括抗CD20抗体)的活性的研究(例如Iida,S.et al.,Clin.Cancer Res.12(2006)2879-2887;Natsume,A.et al.,J.Immunol.Methods 306(2005)93-103;Satoh,M.et al.,Expert Opin.Biol.Ther.6(2006)1161-1173;Kanda,Y.et al.,Biotechnol.Bioeng.94(2006)680-688;Davies,J.et al.,Biotechnol.Bioeng.74(2001)288-294)。

[0007] CD20和抗CD20抗体

[0008] CD20分子(又称作人B淋巴细胞限制性分化抗原或Bp35)是一种已经广泛描述的位于前B和成熟B淋巴细胞上的疏水性跨膜蛋白(Valentine,M.A.et al.,J.Biol.Chem.264(1989)11282-11287;及Einfeld,D.A.et al.,EMBO J.7(1988)711-717;Tedder,T.F.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85(1988)208-212;Stamenkovic,I.et al.,J.Exp.Med.167(1988)1975-1980;Tedder,T.F.et al.,J.Immunol.142(1989)2560-2568)。CD20在大于90%的B细胞非何杰金(Hodgkin)氏淋巴瘤(NHL)上表达(Anderson,K.C.et al.,Blood 63(1984)1424-1433),但是在造血干细胞、原B细胞、正常的浆细胞、或其它正常的组织上没有找到(Tedder,T.F.et al.,J.Immunol.135(1985)973-979)。

[0009] 存在着在其CD20结合模式和生物学活性方面显著不同的两种不同类型的抗CD20

抗体 (Cragg, M.S. et al., Blood 103 (2004) 2738-2743; 及 Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052)。I型抗体 (如例如利妥昔单抗 (rituximab) (一种具有85%或更高的岩藻糖量的非无岩藻糖基化抗体)、ofatumumab、veltuzumab、ocrelizumab) 在补体介导的细胞毒性中是有力的。

[0010] II型抗体 (如例如托西莫单抗 (Tositumomab) (B1)、11B8、AT80或人源化B-Ly1抗体) 经由不依赖于胱天蛋白酶的细胞死亡诱导及伴随的磷脂酰丝氨酸暴露而有效启动靶细胞死亡。

[0011] BTK和BTK抑制剂

[0012] Bruton氏酪氨酸激酶或Bruton无丙种球蛋白血症酪氨酸激酶 (缩写为Btk或BTK) 是TEC家族激酶的一个成员。BTK与原发性免疫缺陷病X连锁的无丙种球蛋白血症 (Bruton氏无丙种球蛋白血症) 有关。精确的作用机制未知。BTK基因编码BTK蛋白, 它对于B细胞的发育和成熟 (作为经由高亲和力IgE受体的肥大细胞活化) 是至关重要的。具有X连锁的无丙种球蛋白血症的患者在骨髓中具有正常的前B细胞群, 然而, 这些细胞未能成熟及进入循环。BTK基因位于X染色体上。已经鉴定出BTK基因的超过400种突变。

[0013] BTK在上游受到Src家族激酶Blk, Lyn和Fyn活化, 并在下游导致关键细胞存活途径 (诸如NF- κ B和MAP激酶) 的活化。BTK含有pleckstrin同源性 (PH) 域, 它结合磷脂酰肌醇 (3, 4, 5) - 三磷酸 (PI (3, 4, 5) P3)。PI (3, 4, 5) P3结合诱导Btk磷酸化磷脂酶C γ (PLC γ), 后者继而将磷脂酰肌醇PI (4, 5) P2水解成两种第二信使, 即肌醇三磷酸 (IP3) 和二酰甘油 (DAG), 它们然后继续下去调控B细胞信号传导期间下游蛋白的活性。随后, Ca²⁺受到动员且NF- κ B和MAP激酶途径受到活化。

[0014] 本领域中描述的一种例示性BTK抑制剂是ibrutinib (PCI-32765; Advani et al., J Clin Oncol. 2013: Jan 1; 31 (1), page 88-94), 它是一种小分子不可逆BTK抑制剂。

[0015] 发明概述

[0016] 我们现在已经发现了I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化II型抗CD20抗体与BTK抑制剂的组合显示显著增强的抗增殖效果。令人惊讶的是, 这种组合是大于叠加的, 即高度协同的。

[0017] 本发明的一个方面是具有占Asn297处的寡糖 (糖) 总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体, 其用于与BTK抑制剂组合治疗癌症。

[0018] 本发明的另一个方面是具有占Asn297处的寡糖 (糖) 总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体用于制造与BTK抑制剂组合治疗癌症的药物的用途。

[0019] 本发明的另一个方面是治疗患有癌症的患者的方法, 其通过与BTK抑制剂组合对需要此类治疗的患者施用具有占Asn297处的寡糖 (糖) 总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体来进行。

[0020] 在一个实施方案中, 岩藻糖量介于占Asn297处的寡糖 (糖) 总量的40%和60%之间。在另一个实施方案中, 岩藻糖量占Asn297处的寡糖 (糖) 总量的0%。

[0021] 在一个实施方案中, I型抗CD20抗体是利妥昔单抗。在一个实施方案中, 无岩藻糖基化抗CD20抗体是IgG1抗体。在另一个实施方案中, 所述癌症是表达CD20的癌症, 优选淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。在一个实施方案中, 所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。在另一个实施方案中, 所述无岩藻糖基化抗体是II型抗CD20抗体。

[0022] 在一个实施方案中,所述BTK抑制剂是选自W02011/152351和W02013/081016中所述化合物的化合物。所述BTK抑制剂优选是依照本文中公开的式I或式I-1的化合物。优选地,所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

[0023] 在一个实施方案中,所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗,所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体且所述BTK抑制剂选自下组:W02011/152351和W02013/081016中所述化合物。所述BTK抑制剂优选是依照本文中公开的式I或式I-1的化合物。优选地,所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐,且所述癌症是表达CD20的癌症,在一个实施方案中是淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0024] 在一个实施方案中,无岩藻糖基化抗CD20抗体以 10^{-8} M至 10^{-13} M的KD结合CD20。

[0025] 本发明的一个实施方案是一种用于治疗癌症的药物组合物,其包含I型抗CD20抗体(在一个实施方案中是利妥昔单抗)或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体(在一个实施方案中是无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体),和BTK抑制剂(在一个实施方案中,所述BTK抑制剂选自下组:W02011/152351和W02013/081016中所述化合物。所述BTK抑制剂优选是依照本文中公开的式I或式I-1的化合物。优选地,所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐)的组合。

[0026] 本发明涉及下述实施方案。

[0027] 1.一种抗CD20抗体,其用于与BTK抑制剂组合治疗癌症。

[0028] 2.依照实施方案1的抗体,其特征在于所述抗CD20抗体是I型抗CD20抗体或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体。

[0029] 3.依照实施方案1至2任一项的抗体,其特征在于所述癌症是表达CD20的癌症。

[0030] 4.依照实施方案1至3任一项的抗体,其特征在于所述表达CD20的癌症是淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0031] 5.依照实施方案1至4任一项的抗体,其特征在于所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

[0032] 6.依照实施方案1至5任一项的抗体,其特征在于所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)。

[0033] 7.依照实施方案1至4任一项的抗体,其特征在于所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗(rituximab)。

[0034] 8.依照实施方案1至7任一项的抗体,其特征在于所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

[0035] 9.依照实施方案1至8任一项的抗体,其特征在于施用一种或多种额外的其它细胞毒剂、化疗剂或抗癌剂、或增强此类药剂效果的化合物或电离辐射。

[0036] 10.一种用于治疗癌症的药物组合物,其包含I型抗CD20抗体或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体,和BTK抑制剂的组合,所述BTK抑制剂选自下组:6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯

氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

[0037] 11. 一种治疗患有癌症的患者的方法,其通过与BTK抑制剂组合对需要此类治疗的患者施用I型抗CD20抗体或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体来进行。

[0038] 12. 依照实施方案11的方法,其特征在於所述癌症是表达CD20的癌症。

[0039] 13. 依照实施方案11至12任一项的方法,其特征在於所述表达CD20的癌症是淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0040] 14. 依照实施方案11至13任一项的方法,其特征在於所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

[0041] 15. 依照实施方案11至13任一项的方法,其特征在於所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗。

[0042] 16. 依照实施方案11至15任一项的方法,其特征在於所述BTK抑制剂选自下组:6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

[0043] 17. 依照实施方案9至16任一项的方法,其特征在於施用一种或多种额外的其它细胞毒剂、化疗剂或抗癌剂、或增强此类药剂效果的化合物或电离辐射。

[0044] 18. I型抗CD20抗体或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体用于制造与BTK抑制剂组合治疗癌症的药物的用途。

[0045] 19. 依照实施方案18的用途,其特征在於所述癌症是表达CD20的癌症。

[0046] 20. 依照实施方案18至19任一项的用途,其特征在於所述表达CD20的癌症是淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0047] 21. 依照实施方案18至20任一项的用途,其特征在於所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

[0048] 22. 依照实施方案18至21任一项的抗体,其特征在於所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

[0049] 23. 依照实施方案18至22任一项的用途,其特征在於施用一种或多种额外的其它细胞毒剂、化疗剂或抗癌剂、或增强此类药剂效果的化合物或电离辐射。

[0050] 附图简述

[0051] 图1(a)和1(b):抗肿瘤活性研究:携带皮下TMD8细胞的小鼠的均值肿瘤体积曲线(a)和中值肿瘤体积曲线(b)。

[0052] 在D0时给小鼠接种异种移植物。在D14时(图1(a)和1(b)中所示第0天)实施随机化。小鼠接受单独的每天两次(Q0.5D x 24)的一次媒介和化合物A(10mg/kg)P0施用,或者与一周一次(Q7D x 4)的一次GA101 IV注射(1和3mg/kg)组合。小鼠接受一周一次(D14(第0天),D21(第7天),D28(第14天)和D35(第21天):Q7D x 4)的一次利妥昔单抗IV注射(3mg/kg)或一次GA101 IV注射(1和3mg/kg)。一周两次监测并记录肿瘤体积。

[0053] 图2(a)和2(b):抗肿瘤活性研究:携带皮下TMD8细胞的小鼠的均值肿瘤体积曲线(a)和中值肿瘤体积曲线(b)。

[0054] 在D0时给小鼠接种异种移植物。在D14时(400-450mm³:图2(a)和2(b)中所示第0

天) 实施随机化。小鼠接受单独的每天两次(Q0.5D x 24)的一次媒介和化合物A(10mg/kg) P0施用,或者与一周一次(Q7D x 4)的一次GA101/RTX IV注射(3mg/kg)组合。小鼠接受一周一次(D14(第0天),D21(第7天),D28(第14天)和D35(第21天):Q7D x 4)的一次利妥昔单抗IV注射(3mg/kg)或一次GA101 IV注射(3mg/kg)。一周两次监测并记录肿瘤体积。

[0055] 图3:抗肿瘤活性研究:携带皮下TMD8细胞的小鼠的均值肿瘤体积曲线。

[0056] 在D0时给小鼠接种异种移植物。在D14时(450mm³左右:图3中所示第0天)实施随机化。给小鼠喂食单独含有化合物A(0.0037%,换算成6mg/kg/天)或化合物B(0.012%,换算成20mg/kg/天)的饲料,或者与一周一次(Q7D x 3)的一次RTX IV注射(3mg/kg)组合。小鼠接受一周一次(D14(第0天),D21(第7天)和D28(第14天):Q7D x 3)的一次利妥昔单抗IV注射(3mg/kg)。在第3天,第7天,第11天,第14天,第18天和第21天时监测并记录肿瘤体积。

[0057] 发明详述

[0058] 本发明包括I型抗CD20抗体或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体(IgG1或IgG3同种型的),其用于与BTK抑制剂组合治疗癌症。

[0059] 本发明包括I型抗CD20抗体或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体(IgG1或IgG3同种型的)用于制造与BTK抑制剂组合治疗癌症的药物的用途。

[0060] 在一个实施方案中,岩藻糖量占Asn297处的寡糖(糖)总量的40%至60%。

[0061] 术语“抗体”涵盖各种抗体形式,包括但不限于完整的抗体、人抗体、人源化抗体和遗传工程抗体,如单克隆抗体、嵌合抗体或重组抗体及此类抗体的片段,只要依照本发明的特征性特性得到保留。如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单一氨基酸组成的抗体分子的制备物。因而,术语“人单克隆抗体”指具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变和恒定区的展现出单一结合特异性的抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体是由杂交瘤生成的,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的自具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因非人动物,例如转基因小鼠获得的B细胞。

[0062] 术语“嵌合抗体”指通常通过重组DNA技术制备的包含来自一种来源或物种的可变区,即结合区和自不同来源或物种衍生的恒定区的至少一部分的单克隆抗体。包含鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体是特别优选的。此类鼠/人嵌合抗体是包含编码鼠免疫球蛋白可变区的DNA区段和编码人免疫球蛋白恒定区的DNA区段的所表达免疫球蛋白基因的产物。本发明所涵盖的“嵌合抗体”的其它形式是那些其中类别或亚类已经自初始抗体的类别或亚类修饰或改变的。此类“嵌合”抗体又称为“类别转换抗体”。用于生成嵌合抗体的方法牵涉本领域现在公知的常规重组DNA和基因转染技术。参见例如Morrison,S.L.et al., Proc.Natl.Acad Sci.USA 81(1984)6851-6855;US 5,202,238和US 5,204,244。

[0063] 术语“人源化抗体”指其中的框架或“互补决定区”(CDR)已经进行过修饰以包含与亲本免疫球蛋白的特异性相比不同特异性的免疫球蛋白的CDR的抗体。在一个优选的实施方案中,将鼠CDR嫁接入人抗体的框架区中以制备“人源化抗体”。参见例如Riechmann,L.et al.,Nature 332(1988)323-327;及Neuberger,M.S.et al.,Nature 314(1985)268-270。特别优选的CDR对应于那些代表上文对嵌合和双或多特异性抗体记录的识别抗原的序列的。

[0064] 如本文中所使用的,术语“人抗体”意图包括具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的

可变和恒定区的抗体。人抗体是现有技术中公知的 (van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374)。基于此类技术, 可以生成针对极其多种靶物的人抗体。人抗体的例子记载于例如 Kellermann, S.A. et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 13 (2002) 593-597。

[0065] 如本文中所使用的, 术语“重组人抗体”意图包括通过重组手段制备、表达、创建或分离的所有人抗体, 诸如自宿主细胞诸如NS0或CHO细胞或者自对于使用转染入宿主细胞中的重组表达载体表达的人免疫球蛋白基因或抗体而言转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体。此类重组人抗体具有重排形式的自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变和恒定区。依照本发明的重组人抗体已经进行过体内体细胞超突变。如此, 重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是虽然自人种系VH和VL序列衍生及与其相关, 但可以天然存在于体内的人抗体种系全集内的序列。

[0066] 如本文中所使用的, 术语“双或多特异性抗体”指具有针对至少两种不同位点的结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中, 结合特异性之一针对CD20而另一针对任何其它抗原。在某些实施方案中, 双特异性抗体可结合CD20的两种不同表位。双特异性抗体还可用于将细胞毒剂定位至表达CD20的细胞。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段来制备。

[0067] 如本文中所使用的, 术语“结合”或“特异性结合”指用纯化的野生型抗原在体外测定法中, 优选地在等离振子共振测定法 (BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) 中抗体对肿瘤抗原的表位的结合。结合亲和力通过术语 k_a (来自抗体/抗原复合物的抗体的结合速率常数)、 k_d (解离常数)、和 K_D (k_d/k_a) 限定。结合或特异性结合意指 $10^{-8}M$ 或更小, 优选地 $10^{-8}M$ 至 $10^{-13}M$ (在一个实施方案中, $10^{-9}M$ 至 $10^{-13}M$) 的结合亲和力 (K_D)。如此, 依照本发明的无岩藻糖基化抗体以 $10^{-8}mol/l$ 或更小, 优选地 $10^{-8}M$ 至 $10^{-13}M$ (在一个实施方案中, $10^{-9}M$ 至 $10^{-13}M$) 的结合亲和力 (K_D) 特异性结合肿瘤抗原。

[0068] 如本文中所使用的, 术语“核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链, 但是优选地双链DNA。

[0069] “恒定域”不直接牵涉抗体对抗原的结合, 但是牵涉效应器功能 (ADCC、补体结合、和CDC)。

[0070] 如本文中所使用的, “可变区” (轻链可变区 (VL)、重链可变区 (VH)) 意为直接牵涉抗体结合抗原的轻链和重链对之每种。人轻链和重链可变域具有相同的一般结构, 并且每个域包含通过三个“高变区” (或互补决定区, CDR) 连接的其序列广泛保守的四个框架 (FR) 区。框架区采用 β -片层构象, 而CDR可以形成连接 β -片层结构的环。每条链中的CDR通过框架区保持其三维结构, 并且与来自另一条链的CDR一起形成抗原结合位点。

[0071] 术语“高变区”在本文中使用指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基。“框架”或“FR”区是与如本文中所限定的高变区残基不同的那些可变域区。因此, 抗体的轻链和重链包含自N至C端的域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、和FR4。特别地, 重链的CDR3是对抗原结合贡献最大的区。CDR和FR区依照 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 的标准定义和/或那些来自“高变环”的残基来确定。

[0072] 术语“无岩藻糖基化抗体”指在Fc区中在Asn297处具有改变的糖基化样式且具有降低的岩藻糖残基水平的IgG1或IgG3同种型的(优选地IgG1同种型的)抗体。在Asn297处发生人IgG1或IgG3的糖基化,作为以多至两个Gal残基为末端的核心岩藻糖化双触角复合寡糖糖基化。根据末端Gal残基的量,这些结构称为G0、G1($\alpha 1,6$ 或 $\alpha 1,3$)或G2聚糖残基(Raju, T.S., *BioProcess Int.* 1 (2003) 44-53)。抗体Fc部分的CHO型糖基化例如由Routier, F.H., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207描述。在非糖修饰的CHO宿主细胞中重组表达的抗体在Asn297处通常以至少85%的量进行岩藻糖基化。应当理解,如本文中所使用的,术语无岩藻糖基化抗体包括在其糖基化样式中没有岩藻糖的抗体。通常已知的是,抗体中典型的糖基化残基位置是依照EU编号系统的第297位的天冬酰胺(“Asn297”)。

[0073] “EU编号系统”或“EU索引”一般在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中报告的EU索引,通过提及而将其明确收入本文)。

[0074] 如此,依照本发明的无岩藻糖基化抗体意指其中的岩藻糖量占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少(这意味着在Fc区中Asn297处的寡糖的至少40%或更多是无岩藻糖基化的)的IgG1或IgG3同种型的(优选地IgG1同种型的)抗体。在一个实施方案中,岩藻糖量占Fc区中Asn297处的寡糖的40%至60%。在另一个实施方案中,岩藻糖量是50%或更小,并且在又一个实施方案中,岩藻糖量占Fc区中Asn297处的寡糖的30%或更小。依照本发明,“岩藻糖的量”意指通过MALDI-TOF质谱术测量的,并以平均值计算的,相对于附着于Asn297的所有寡糖(糖)(例如复合的、杂合的和高甘露糖结构)的总和,Asn297处寡糖(糖)链内所述寡糖(岩藻糖)的量(关于测定岩藻糖量的详细规程,见例如WO 2008/077546)。此外,在一个实施方案中,Fc区的寡糖是两分的。可以在工程化改造成表达至少一种核酸的糖修饰的宿主细胞中表达依照本发明的无岩藻糖基化抗体,所述核酸编码具有GnTIII活性的多肽,其量足以部分岩藻糖基化Fc区中的寡糖。在一个实施方案中,具有GnTIII活性的多肽是融合多肽。或者,可以依照US 6,946,292降低或消除宿主细胞的 $\alpha 1,6$ -岩藻糖基转移酶活性以生成糖修饰的宿主细胞。可以例如通过发酵条件(例如发酵时间)或者通过组合至少两种具有不同岩藻糖基化量的抗体来预先确定抗体岩藻糖基化的量。此类无岩藻糖基化抗体及相应的糖工程方法记载于WO 2005/044859, WO 2004/065540, WO 2007/031875, Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180, WO 99/154342, WO 2005/018572, WO 2006/116260, WO 2006/114700, WO 2005/011735, WO 2005/027966, WO 97/028267, US 2006/0134709, US 2005/0054048, US 2005/0152894, WO 2003/035835, WO 2000/061739。这些糖工程抗体具有升高的ADCC。依照本发明产生无岩藻糖基化抗体的其它糖工程方法记载于例如Niwa, R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T. et al., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 3466-3473; WO 03/055993或US 2005/0249722。

[0075] 如此,本发明的一方面是I型抗CD20抗体或特异性结合CD20的,具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体(IgG1或IgG3同种型的,优选地IgG1同种型的),其用于与BTK抑制剂组合治疗癌症。本发明的另一方面是IgG1或IgG3同种型的(优选地IgG1同种型的),特异性结合CD20的,具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体用于制造与BTK抑制剂组合治疗癌

症的药物的用途。在一个实施方案中,岩藻糖量占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%至20%之间。在一个实施方案中,岩藻糖量占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%至40%之间。在一个实施方案中,岩藻糖量占Asn297处的寡糖(糖)总量的0%之间。

[0076] CD20(又称为B淋巴细胞抗原CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5、和LF5;序列以SwissProt数据库条目P11836为特征)是一种位于前B和成熟B淋巴细胞上的具有约35kD分子量的疏水性跨膜蛋白(Valentine,M.A.et al.,J.Biol.Chem.264(1989)11282-11287;Tedder,T.F.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85(1988)208-212;Stamenkovic,I.et al.,J.Exp.Med.167(1988)1975-1980;Einfeld,D.A.et al.,EMBO J.7(1988)711-717;Tedder,T.F.et al.,J.Immunol.142(1989)2560-2568)。相应的人基因是跨膜4域,A亚家族,成员1,又称为MS4A1。此基因编码跨膜4A基因家族的一个成员。此初生蛋白质家族的成员以共同的结构特征和相似的内含子/外显子剪接边界为特征,并且在造血细胞和非淋巴样组织中展现出独特的表达样式。此基因编码B淋巴细胞表面分子,其在B细胞发育及分化成浆细胞中发挥作用。在一簇家族成员中,此家族成员定位于11q12。此基因的可变剪接产生编码同一蛋白质的两种转录物变体。

[0077] 术语“CD20”和“CD20抗原”在本文中可互换使用,包括由细胞天然表达的或者在用CD20基因转染的细胞上表达的人CD20的任何变体、同等型和物种同系物。本发明的抗体对CD20抗原的结合通过灭活CD20而介导对表达CD20的细胞(例如,肿瘤细胞)的杀伤。可以通过下列一项或多项机制而发生对表达CD20的细胞的杀死:细胞死亡/凋亡诱导、ADCC和CDC。

[0078] 如本领域中认可的,CD20的同义词包括B淋巴细胞抗原CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5、和LF5。

[0079] 依照本发明的术语“抗CD20抗体”是特异性结合CD20抗原的抗体。根据抗CD20抗体对CD20抗原的结合特性和生物学活性,两种类型的抗CD20抗体(I型和II型抗CD20抗体)可以依照Cragg,M.S.et al.,Blood 103(2004)2738-2743;及Cragg,M.S.et al.,Blood 101(2003)1045-1052区别,参见表1。

[0080] 表1:I型和II型抗CD20抗体的特性

I型抗CD20抗体	II型抗CD20抗体
I型CD20表位	II型CD20表位
将CD20定位于脂筏	不将CD20定位于脂筏
升高的CDC (若为IgG1同种型的话)	降低的CDC (若为IgG1同种型的话)
ADCC活性 (若为IgG1同种型的话)	ADCC活性 (若为IgG1同种型的话)
完全的结合性能	降低的结合性能
同型聚集	更强的同型聚集
交联后的凋亡诱导	在没有交联的情况中的强烈细胞死亡诱导

[0082] II型抗CD20抗体的例子包括例如人源化B-Ly1抗体IgG1(一种嵌合的人源化IgG1抗体,如披露于WO 2005/044859中的)、11B8 IgG1(如披露于WO 2004/035607中的)、和AT80

IgG1。通常，IgG1同种型的II型抗CD20抗体显示特征性的CDC特征。与IgG1同种型的I型抗体相比，II型抗CD20抗体具有降低的CDC（若为IgG1同种型的话）。

[0083] I型抗CD20抗体的例子包括例如利妥昔单抗、HI47 IgG3 (ECACC, 杂交瘤)、2C6 IgG1 (如披露于WO 2005/103081中的)、2F2 IgG1 (如披露于WO 2004/035607和WO 2005/103081的) 和2H7 IgG1 (如披露于WO 2004/056312中的)。

[0084] 依照本发明的无岩藻糖基化抗CD20抗体在一个实施方案中是II型抗CD20抗体，在另一个实施方案中是无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体。

[0085] 与没有降低岩藻糖的抗CD20抗体不一样，依照本发明的无岩藻糖基化抗CD20抗体具有升高的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。

[0086] “具有升高的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 的无岩藻糖基化抗CD20抗体”意指具有如通过本领域普通技术人员已知的任何合适的方法测定的升高的ADCC的无岩藻糖基化抗CD20抗体，如该术语在本文中所定义的。一种公认的体外ADCC测定法如下：

[0087] 1) 该测定法使用已知表达受抗体的抗原结合区识别的靶抗原的靶细胞；

[0088] 2) 该测定法使用自随机选定的健康供体的血液分离的人外周血单个核细胞 (PBMC) 作为效应细胞；

[0089] 3) 依照下列方案来实施测定法：

[0090] i) 使用标准的密度离心规程来分离PBMC，并将其以 5×10^6 个细胞/ml在RPMI细胞培养基中悬浮；

[0091] ii) 将靶细胞通过标准的组织培养方法来培养，自具有高于90%的存活力的指数生长期收获，在RPMI细胞培养基中清洗，用100微居里 ^{51}Cr 标记，用细胞培养基清洗两次，并以 10^5 个细胞/ml的密度在细胞培养基中重悬浮；

[0092] iii) 将100微升上述最终靶细胞悬浮液转移至96孔微量滴定板的每孔；

[0093] iv) 将抗体在细胞培养基中自4000ng/ml连续稀释至0.04ng/ml，并将50微升所得的抗体溶液添加至96孔微量滴定板中的靶细胞，一式三份测试覆盖上述整个浓度范围的多种抗体浓度；

[0094] v) 对于最大释放 (MR) 对照，含有经标记的靶细胞的平板中的3个另外的孔接受50微升非离子型去污剂 (Nonidet, Sigma, St. Louis) 的2% (VN) 水溶液，代替抗体溶液 (上述第iv点)；

[0095] vi) 对于自发释放 (SR) 对照，含有经标记的靶细胞的平板中的3个另外的孔接受50微升RPMI细胞培养基，代替抗体溶液 (上述第iv点)；

[0096] vii) 然后，将96孔微量滴定板以 $50 \times g$ 离心1分钟，并于4°C温育1小时；

[0097] viii) 将50微升PBMC悬浮液 (上述第i点) 添加至每孔以产生效应细胞：靶细胞比率25:1，并将平板在培养箱中在5%CO₂气氛下于37°C放置4小时；

[0098] ix) 收获来自每孔的无细胞上清液，并使用 γ 计数器来量化实验释放的放射性 (ER)；

[0099] x) 依照公式 $(ER - MR) / (MR - SR) \times 100$ 对每个抗体浓度计算比溶解的百分比，其中ER是对所述抗体浓度量化 (参见上述第ix点) 的平均放射性，MR是对MR对照 (参见上述第v点) 量化 (参见上述第ix点) 的平均放射性，而SR是对SR对照 (参见上述第vi点) 量化 (参见上述第ix点) 的平均放射性；

[0100] 4) “升高的ADCC”定义为上文测试的抗体浓度范围内观察到的比溶解的最大百分比的增加和/或达到上文测试的抗体浓度范围内观察到的比溶解的最大百分比的一半所需要的抗体浓度降低。ADCC的升高相对于用上述测定法测量的,使用本领域技术人员已知的相同的标准生成、纯化、配制和贮存方法,由相同类型的宿主细胞产生的,但是并非由工程化改造成过表达GnTIII的宿主细胞产生的相同抗体介导的ADCC。

[0101] 可以通过所述抗体的糖工程化来获得所述“升高的ADCC”,其意味着通过工程化改造其寡糖组分来增强单克隆抗体的所述天然的、细胞介导的效应器功能,如记载于Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180及US 6,602,684的。

[0102] 术语“补体依赖性细胞毒性(CDC)”指在存在补体的情况中依照本发明的抗体对人肿瘤靶细胞的溶解。优选地,通过在存在补体的情况中用依照本发明的抗CD20抗体处理表达CD20的细胞的制备物来测量CDC。若抗体在浓度100nM时在4小时后诱导20%或更多的肿瘤细胞溶解(细胞死亡),则发现CDC。优选地,用经⁵¹Cr或Eu标记的肿瘤细胞及释放的⁵¹Cr或Eu测量来实施测定法。对照包括将肿瘤靶细胞与补体但不与抗体一起温育。

[0103] “利妥昔单抗”抗体(I型抗CD20抗体的例子)是一种针对人CD20抗原的含有人 γ 1鼠恒定域的遗传工程嵌合单克隆抗体。

[0104] “利妥昔单抗”抗体(I型抗CD20抗体的例子)是一种针对人CD20抗原的含有人 γ 1鼠恒定域的遗传工程嵌合单克隆抗体。此嵌合抗体含有人 γ 1恒定域,并且在1998年4月17日公告的归于IDEC Pharmaceuticals Corporation的US 5,736,137 (Anderson等)中以名称“C2B8”鉴定。利妥昔单抗批准用于治疗复发性或顽固性低级或滤泡性、CD20阳性、B细胞非何杰金氏淋巴瘤患者。体外作用机制研究已经显示了利妥昔单抗展现出人补体依赖性细胞毒性(CDC) (Reff, M.E. et al., Blood 83 (1994) 435-445)。另外,它在测量抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)的测定法中展现出显著的活性。利妥昔单抗不是无岩藻糖基化的。

[0105] 表2

	抗体	岩藻糖量
[0106]	利妥昔单抗(非无岩藻糖基化的)	>85%
[0107]	野生型无岩藻糖基化糖工程人源化B-Ly1 (B-HH6-B-KV1) (非无岩藻糖基化的)	>85%
	无岩藻糖基化糖工程人源化B-Ly1 (B-HH6-B-KV1 GE)	45-50%

[0108] 术语“人源化B-Ly1抗体”指如WO 2005/044859和WO 2007/031875中所披露的人源化B-Ly1抗体,其通过用来自IgG1的人恒定域嵌合化及接着的人源化自鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1(鼠重链可变区(VH):SEQ ID NO:1;鼠轻链可变区(VL):SEQ ID NO:2(参见Poppema, S. and Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139)获得(参见WO 2005/044859和WO 2007/031875)。这些“人源化B-Ly1抗体”详细披露于WO 2005/044859和WO 2007/031875中。

[0109] 在一个实施方案中,“人源化B-Ly1抗体”具有选自下组的重链可变区(VH):SEQ ID NO:3至SEQ ID NO:19(WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH2至B-HH9和B-HL8至B-HL17)。在一个具体的实施方案中,此类可变域选自下组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ

ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:15 (WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH2、B-HH3、B-HH6、B-HH8、B-HL8、B-HL11和B-HL13)。在一个具体的实施方案中，“人源化B-Ly1抗体”具有轻链可变区 (VL) SEQ ID No:20 (WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-KV1)。在一个具体的实施方案中，“人源化B-Ly1抗体”具有重链可变区 (VH) SEQ ID No:7 (WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH6) 和轻链可变区 (VL) SEQ ID No:20 (WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-KV1)。此外，在一个实施方案中，人源化B-Ly1抗体是IgG1抗体。依照本发明，依照记载于WO 2005/044859、WO 2004/065540、WO 2007/031875、Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180及WO 99/154342中的规程在Fc区中糖工程化改造 (GE) 此类无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体。在一个实施方案中，无岩藻糖基化糖工程人源化B-Ly1是B-HH6-B-KV1 GE。在一个实施方案中，抗CD20抗体是奥滨尤妥珠单抗 (obinutuzumab) (recommended INN, WHO Drug Information, Vol. 26, No. 4, 2012, p. 453)。如本文中使用的，奥滨尤妥珠单抗与GA101同义。商品名是GAZYVA。WHO药物信息文件替换所有先前的版本 (例如Vol. 25, No. 1, 2011, p. 75-76)，而且以前称作afutuzumab (recommended INN, WHO Drug Information, Vol. 23, No. 2, 2009, p. 176; Vol. 22, No. 2, 2008, p. 124)。

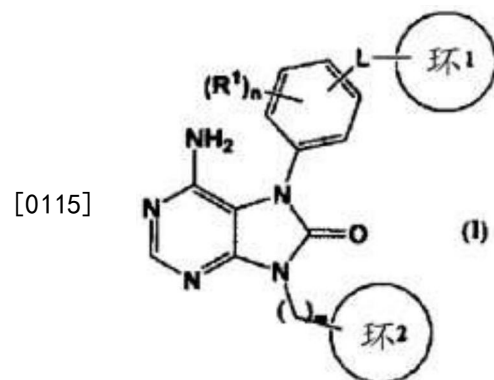
[0110] 如本文中使用的，BTK为“Bruton氏酪氨酸激酶”或“Bruton无丙种球蛋白血症酪氨酸激酶” (缩写为Btk或BTK)，它是TEC家族激酶的一个成员。BTK基因编码BTK蛋白，它对于B细胞的发育和成熟 (作为经由高亲和力IgE受体的肥大细胞活化) 是至关重要的。BTK基因位于X染色体上。已经鉴定出BTK基因的超过400种突变。

[0111] 依照本发明的术语“BTK抑制剂”指以0.001 μ M至约2 μ M，在一个实施方案中，0.002 μ M至约2 μ M的IC₅₀阻止BTK激酶活性的药剂。在一个实施方案中，BTK抑制剂是抗体，反义寡核苷酸，肽。

[0112] 在另一个实施方案中，BTK抑制剂是具有小于1500道尔顿 (Da) 的分子量 (MW) 的小分子量化合物。

[0113] 在一个实施方案中，此类小分子量BTK抑制剂化合物是W02011/152351和W02013/081016中描述的化合物。

[0114] 在一个实施方案中，依照本发明的小分子量BTK抑制剂化合物特征在于通式 (I)



[0116] 在该式中，L代表 (1) -O-，(2) -S-，(3) -SO-，(4) -SO₂-，(5) -NH-，(6) -C(O)-，(7) -CH₂-O-，(8) -O-CH₂-，(9) -CH₂-，或 (10) -CH(OH)-；

[0117] R¹代表 (1) 卤素原子，(2) C₁₋₄烷基基团，(3) C₁₋₄烷氧基基团，(4) C₁₋₄卤代烷基基团，

或(5) C_{1-4} 卤代烷氧基基团;

[0118] 环1代表4至7元环基团,它可以用1至5个取代基取代,每个取代基独立选自下组:

(1) 卤素原子, (2) C_{1-4} 烷基基团, (3) C_{1-4} 烷氧基基团, (4) 腈, (5) C_{1-4} 卤代烷基基团, 和 (6) C_{1-4} 卤代烷氧基基团, 其中当环1上存在两个或更多个取代基时, 这些取代基可以与环1中同这些取代基成键的原子一起形成4至7元环基团;

[0119] 环2代表4至7元饱和杂环, 它可以用1至3个 $-K-R^2$ 取代;

[0120] K代表(1) 键, (2) C_{1-4} 亚烷基, (3) $-C(O)-$, (4) $-C(O)-CH_2-$, (5) $-CH_2-C(O)-$, (6) $-C(O)O-$, 或 (7) $-SO_2-$ (其中左边的键与环2成键);

[0121] R^2 代表(1) C_{1-4} 烷基, (2) C_{2-4} 烯基, 或 (3) C_{2-4} 炔基基团, 它们每个可以用1至5个取代基取代, 每个取代基独立选自下组: (1) NR^3R^4 , (2) 卤素原子, (3) $CONR^5R^6$, (4) CO_2R^7 , 和 (5) OR^8 ;

[0122] R^3 和 R^4 每个独立代表(1) 氢原子, 或 (2) C_{1-4} 烷基基团, 它可以用 OR^9 或 $CONR^{10}R^{11}$ 取代;

[0123] R^3 和 R^4 可以与同它们成键的氮原子一起形成4至7元含氮饱和杂环, 它可以用氧基团或羟基基团取代;

[0124] R^5 和 R^6 每个独立代表(1) 氢原子, (2) C_{1-4} 烷基基团, 或 (3) 苯基基团;

[0125] R^7 代表(1) 氢原子或 (2) C_{1-4} 烷基基团;

[0126] R^8 代表(1) 氢原子, (2) C_{1-4} 烷基基团, (3) 苯基基团, 或 (4) 苯并三唑基基团;

[0127] R^9 代表(1) 氢原子或 (2) C_{1-4} 烷基基团;

[0128] R^{10} 和 R^{11} 每个独立代表(1) 氢原子或 (2) C_{1-4} 烷基基团;

[0129] n代表0至4的整数;

[0130] m代表0至2的整数; 且

[0131] 当n为2或更多时, R^1 可以彼此相同或可以彼此不同,

[0132] 其光学异构体或它们的混合物, 其盐, 其溶剂合物, 其N-氧化物, 或其前体药物;

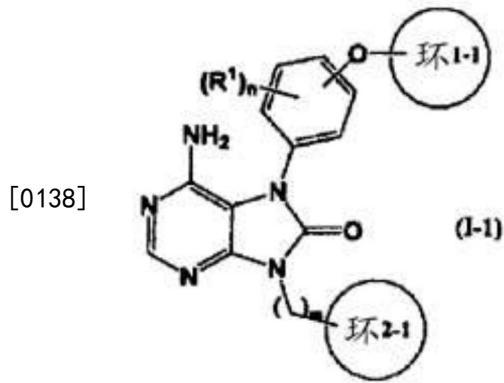
[0133] [2] 依照上文[1]的化合物, 其中 R^2 是 C_{2-4} 烯基基团或 C_{2-4} 炔基基团, 它们每个可以用1至5个取代基取代, 每个取代基独立选自下组: (1) NR^3R^4 , (2) 卤素原子, (3) $CONR^5R^6$, (4) CO_2R^7 , 和 (5) OR^8 ;

[0134] [3] 依照上文[1]的化合物, 其中环1是苯, 环己烷, 或吡啶环, 它们每个可以用1至5个取代基取代, 每个取代基独立选自下组: (1) 卤素原子, (2) C_{1-4} 烷基基团, (3) C_{1-4} 烷氧基基团, (4) 腈, 和 (5) CF_3 ;

[0135] [4] 依照上文[1]的化合物, 其中环2是4至7元含氮饱和杂环, 它可以用1至3个 $-K-R^2$ 取代;

[0136] [5] 依照上文[4]的化合物, 其中所述4至7元含氮饱和杂环是氮杂环丁烷, 吡咯烷, 或哌啶环;

[0137] [6] 依照上文[1]的化合物, 由通式(I-1)代表:



[0139] 在该式中,环1-1代表苯,环己烷,或吡啶环,它们每个可以用1至5个取代基取代,每个取代基独立选自下组:(1)卤素原子,(2) C_{1-4} 烷基基团,(3) C_{1-4} 烷氧基基团,(4)腈,和(5) CF_3 ,且环2-1代表4至7元含氮饱和杂环,它可以用1至3个-K- R^2 取代,其中其它符号具有与上文相同的定义;

[0140] [7]依照上文[6]的化合物,其中 R^2 是 C_{2-4} 烯基基团或 C_{2-4} 炔基基团,它们每个可以用1至5个取代基取代,每个取代基独立选自下组:(1) NR^3R^4 , (2)卤素原子, (3) $CONR^5R^6$, (4) CO_2R^7 ,和(5) OR^8 ;

[0141] [8]依照上文[1]的化合物,它是(1)9-(1-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基)-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(2)6-氨基-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(3)9-[(1-丙烯酰基-4-哌啶基)甲基]-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(4)6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(5)6-氨基-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(6)6-氨基-7-[4-(3-氯苯氧基)苯基]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(7)6-氨基-9-[1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,或(8)6-氨基-9-[(1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,或其光学异构体或其混合物;

[0142] 优选地,依照本发明的BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

[0143] 依照本发明的BTK抑制剂的制备如W02011/152351中公开的那样进行。

[0144] “盐”指化合物作为药学可接受盐的盐。此类盐例如与碱金属(钾,钠,等等)的盐,与碱土金属(钙,镁,等等)的盐,铵盐,与药学可接受有机胺的盐(四甲基胺,三乙胺,甲胺,二甲胺,环戊胺,苄胺,苯乙胺,哌啶,单乙醇胺,二乙醇胺,三(羟基甲基)氨基甲烷,赖氨酸,精氨酸,N-甲基-D-葡萄糖胺,等等),和酸加成盐(无机酸盐(氯化物,氢溴化物,氢碘化物,硫酸盐,磷酸盐,硝酸盐,等等)和无机酸盐(乙酸盐,三氟乙酸盐,乳酸盐,酒石酸盐,草酸盐,富马酸/反式丁烯二酸盐,马来酸盐/顺式丁烯二酸盐,苯甲酸盐,柠檬酸盐,甲磺酸盐,乙磺酸盐,苯磺酸盐,甲苯磺酸盐,羟乙磺酸盐,葡萄糖醛酸盐,葡萄糖酸盐,等等))。

[0145] “IC50”指抑制50%的特定测量活性所需要的特定化合物的浓度。抑制BTK激酶活性的BTK抑制剂的IC50可以例如如随后所述测量。

[0146] 用于测定依照本发明的BTK抑制剂的IC50的体外活性测定法:

[0147] 使用Btk (Invitrogen Corporation) 和Z' -LYTE™激酶测定试剂盒-Tyr1肽 (Invitrogen Corporation) 基于制造商提供的方案测量Btk酶抑制活性, 该试剂盒含有下述试剂: Tyr-1肽, Thy-1磷酸化肽, 5x激酶缓冲液, ATP, 显色试剂B, 显色缓冲液, 和终止试剂。将5μL/孔BTK抑制剂用二甲亚砜 (DMSO) 稀释的溶液, 或DMSO, 和10μL/孔底物/酶混合物溶液分配至96孔测定板, 并将反应于30℃进行20分钟。底物/酶混合物溶液是通过用激酶缓冲液 (DL-二硫苏糖醇 (DTT, 2.7mM), 1.33x激酶缓冲液) 稀释以提供4μM终浓度的Tyr-1肽和5nM终浓度的Btk而制备的。然后添加5μL/孔腺苷三磷酸 (ATP, 终浓度=36μM), 并将反应于30℃进行1小时。反应完全后, 添加10μL显色溶液 (通过使用显色缓冲液将显色试剂B稀释至128x来提供), 并将反应于30℃再进行1小时。然后通过添加10μL终止溶液来终止酶促反应。使用Fusion Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer Inc.) 荧光读板仪测量每个孔中在445nm和520nm处的荧光强度。依照随试剂盒提供的方案使用445nm处的发射 (香豆素发射) 对520nm处的发射 (荧光素发射) 的比来测定百分比磷酸化。

[0148] 使用下面的方程来计算BTK抑制剂所致百分比抑制 (%)。

[0149] 磷酸化的百分比抑制 (%) = $1 - \{ (AC - AX) / (AC - AB) \} \times 100$

[0150] AX: 已添加BTK抑制剂时的%磷酸化

[0151] AB: 未添加ATP时的%磷酸化 (空白)

[0152] AC: 只添加DMSO时的%磷酸化 (对照)

[0153] 基于BTK抑制剂在每个浓度时的%抑制, 自抑制曲线确定BTK抑制剂的50%抑制值 (IC50值)。

[0154] 寡糖组分可以显著影响与治疗性糖蛋白的功效有关的特性, 包括物理稳定性、对蛋白酶攻击的抗性、与免疫系统的相互作用、药动学、和特定 (specific) 生物学活性。此类特性可能不仅取决于寡糖的存在或缺乏, 而且还取决于寡糖的特定结构。可以做出寡糖结构与糖蛋白功能间的一些概括。例如, 某些寡糖结构经由与特定碳水化合物结合蛋白的相互作用而介导糖蛋白自血流的快速清除, 而其它寡糖结构可以被抗体结合, 并触发不想要的免疫反应 (Jenkins, N. et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981)。

[0155] 由于哺乳动物细胞以对于人应用最相容的形式糖基化蛋白质的性能, 它是用于生成治疗性糖蛋白的卓越的宿主 (Cumming, D.A. et al., Glycobiology 1 (1991) 115-130; Jenkins, N. et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981)。细菌糖基化蛋白质非常罕见, 并且与其它类型的常见宿主, 诸如酵母、丝状真菌、昆虫和植物细胞一样, 其产生与自血流快速清除、不想要的免疫相互作用、和 (在一些特定的情况中) 降低的生物学活性有关的糖基化样式。在哺乳动物细胞中, 在过去二十年期间最常使用中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在给予合适的糖基化样式外, 这些细胞容许遗传稳定的、高生产性克隆细胞系的一致生成。它们可以使用无血清培养基在简单的生物反应器中培养至高密度, 并容许开发安全且可再现的生物工艺。其它通常使用的动物细胞包括幼仓鼠肾 (BHK) 细胞、NS0和SP2/0小鼠骨髓瘤细胞。新近, 还已经测试了自转基因动物的生成 (Jenkins, N. et al., Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981)。

[0156] 所有抗体在重链恒定区中的保守位置处都含有碳水化合物结构, 其中每种同种型拥有独特的一批N连接的碳水化合物结构, 其易变地影响蛋白质装配、分泌或功能性活性

(Wright, A. and Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32)。根据加工程度, 附着的N连接的碳水化合物结构变化得相当大, 并且可以包括高甘露糖的、多分支的及双触角的复合寡糖 (Wright, A. and Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32)。通常, 存在着特定糖基化位点处附着的核心寡糖结构的异质加工, 使得甚至单克隆抗体以多种糖形存在。同样地, 已经显示了细胞系间存在抗体糖基化的主要差异, 而且甚至对不同培养条件下培养的给定细胞系看到次要差异 (Lifely, M.R. et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822)。

[0157] 一种在维持简单的生成过程并潜在地避免显著的、不想要的副作用的情况下获得效力大幅升高的方式是通过工程化改造单克隆抗体的寡糖组分来增强其天然的、细胞介导的效应器功能, 如记载于 Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 及 US 6, 602, 684 的。IgG1 型抗体 (即在癌症免疫疗法中最常使用的抗体) 是在每个 CH2 域中的 Asn297 处具有保守的 N 连接的糖基化位点的糖蛋白。附着于 Asn297 的两个复合双触角寡糖掩埋于各 CH2 域间, 与多肽主链形成广泛的接触, 并且其存在对于抗体介导效应器功能诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 是至关重要的 (Lifely, M.R. et al., Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R. et al., Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. and Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32)。

[0158] 先前显示了 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡糖胺转移酶 I11 (“GnTIII17y”) (一种催化两分型寡糖形成的糖基转移酶) 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的过表达显著提高由工程化改造的 CHO 细胞生成的抗成神经细胞瘤嵌合单克隆抗体 (chCE7) 的体外 ADCC 活性 (参见 Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; 及 WO 99/154342, 在此通过提及而收录其全部内容)。抗体 chCE7 属于具有高肿瘤亲和力和特异性, 但是在缺乏 GnTIII 酶的标准工业细胞系中生产时具有太少的效力以致在临床上无用的一大类未缀合的单克隆抗体 (Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180)。所述研究第一次显示了可以通过工程化改造抗体生成细胞以表达 GnTIII 来获得 ADCC 活性的大幅升高, 其还导致恒定区 (Fc) 结合的两分型寡糖 (包括两分型非岩藻糖基化寡糖) 比例的增加, 高于天然存在的抗体中找到的水平。

[0159] 如本文中所使用的, 术语“癌症”包括淋巴瘤、淋巴细胞性白血病、肺癌、非小细胞肺 (NSCL) 癌、细支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌 (stomach cancer)、胃癌 (gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金 (Hodgkin) 氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆癌 (biliary cancer)、中枢神经系统 (CNS) 赘生物、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤 (glioblastoma multiforme)、星形细胞瘤、神经鞘瘤 (schwannoma)、室鼓膜瘤 (ependymoma)、髓母细胞瘤、脑脊膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤, 包括任何上述癌症的顽固性型式、或一种或多种上述癌症的组合。在一个实施方案中, 术语癌症指表达 CD20 的癌症。

[0160] 术语“表达 CD20”抗原意图指示分别来自肿瘤或癌症, 优选地非实体瘤的细胞中, 优选地在 T 或 B 细胞, 更优选地 B 细胞的细胞表面上的 CD20 抗原的显著水平的表达。可以通过本领域已知的标准测定法来确定具有“表达 CD20 的癌症”的患者。例如, 可以使用免疫组织化学 (IHC) 检测、FACS 或者经由相应 mRNA 的基于 PCR 的检测来测量 CD20 抗原表达。

[0161] 如本文中所使用的, 术语“表达 CD20 的癌症”指癌细胞显示 CD20 抗原表达的所有癌

症。优选地,如本文中所使用的表达CD20的癌症指淋巴瘤(优选地B细胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL))和淋巴细胞性白血病。此类淋巴瘤和淋巴细胞性白血病包括例如a)滤泡性淋巴瘤、b)小无核裂细胞淋巴瘤(Small Non-Cleaved Cell Lymphoma)/伯基特(Burkitt)氏淋巴瘤(包括地方性伯基特氏淋巴瘤、散发性伯基特氏淋巴瘤和非伯基特氏淋巴瘤)、c)边缘区淋巴瘤(包括结外边缘区B细胞淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织淋巴瘤,MALT)、结边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区淋巴瘤)、d)套细胞淋巴瘤(MCL)、e)大细胞淋巴瘤(包括B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、弥漫性混合细胞淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤-肺B细胞淋巴瘤)、f)毛细胞白血病、g)淋巴细胞性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦(waldenstrom)氏巨球蛋白血症、h)急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、i)浆细胞赘生物、浆细胞骨髓瘤、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、j)何杰金氏病。

[0162] 在一个实施方案中,表达CD20的癌症是B细胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL)。在另一个实施方案中,表达CD20的癌症是套细胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、伯基特氏淋巴瘤、毛细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、移植后淋巴增殖性病症(PTLD)、HIV有关的淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、或原发性CNS淋巴瘤。

[0163] 术语“治疗方法”或其等同用语在应用于例如癌症时指设计为降低或消除患者中的癌细胞数目,或者减轻癌症症状的规程或作用过程。癌症或另一种增殖性病症的“治疗方法”不必意味着实际上会消除癌细胞或其它病症,实际上会降低细胞数目或病症,或实际上会减轻癌症或其它病症的症状。经常,甚至会实施具有较低的成功概率,但是然而鉴于医学史和估计的患者存活预期认为诱导总体有益的作用过程的治疗方法。

[0164] 术语“组合”或“共施用”指作为两种分开的配制剂(或作为一种单一配制剂)施用所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20和所述BTK抑制剂。共施用可以是同时的或者以任意次序序贯的,其中优选地,存在着所有活性剂同时施加其生物学活性的时段。同时或序贯(例如经由静脉内(i.v.)经由连续输注;对于抗CD20抗体一次,及最终对于所述BTK抑制剂一次;或例如经由静脉内(i.v.)经由连续输注施用抗CD20抗体并口服施用所述BTK抑制剂)共施用所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂。在序贯共施用两种治疗剂时,在同一天在两次分开的施用中施用剂量,或者在第1天施用药剂之一,而在第2天至第7天,优选地在第2天至第4天共施用第二种。如此,在一个实施方案中,术语“序贯地”意指在第一组分(抗CD20抗体或BTK抑制剂)的剂量后7天内,优选地在第一组分的剂量后4天内;而术语“同时地”意指同一时间。术语“共施用”就所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂的维持剂量而言意指若治疗周期对于这两种药物都是合适的,例如每周,则可以同时共施用维持剂量。或者,例如,每第一至第三天施用BTK抑制剂,而每周施用所述无岩藻糖基化抗体。或者,在一天内或在几天内序贯共施用维持剂量。

[0165] 不证自明的是,以“治疗有效量”(或仅为“有效量”)对患者施用抗体,所述治疗有效量是相应化合物或组合会引发研究人员、兽医、医学医生或其它临床医生寻找的组织、系统、动物或人的生物学或医学应答的量。

[0166] 所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂的共施用

量和共施用时机取决于所治疗患者的类型(物种、性别、年龄、重量、等)和状况和所治疗疾病或状况的严重性。可以一次或在一系列治疗里,例如在同一天或在次日对患者适当地共施用所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂。

[0167] 若施用是静脉内的,则所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体或所述BTK抑制剂的初始输注时间可以比随后的输注时间长,例如初始输注为约90分钟,而随后的输注为约30分钟(若初始输注耐受良好的话)。

[0168] 根据疾病的类型和严重性,约0.1mg/kg至50mg/kg(例如0.1-20mg/kg)所述I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体和1 μ g/kg至50mg/kg(例如0.1-20mg/kg)所述BTK抑制剂是对患者共施用这两种药物的初始候选剂量。在一个实施方案中,所述无岩藻糖基化抗CD20抗体(优选地无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体,更优选地奥滨尤妥珠单抗)的优选剂量会在约0.05mg/kg至约30mg/kg的范围中。如此,可以对患者共施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、10mg/kg或30mg/kg(或其任何组合)的一剂或多剂。在一个实施方案中,所述BTK抑制剂(优选6-氨基-9-[(3R) -1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐)的优选剂量的范围会是约0.05mg/kg至约30mg/kg。如此,可以对患者共施用一剂或多剂的约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、10mg/kg或30mg/kg(或其任何组合)。

[0169] 根据患者的类型(物种、性别、年龄、重量、等)和状况及I型抗CD20抗体(优选利妥昔单抗)或无岩藻糖基化抗CD20抗体(优选无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体,更优选奥滨尤妥珠单抗)的类型,所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体的剂量和施用日程表可以与所述BTK抑制剂不同。例如,可以例如每1至3周施用所述I型抗CD20抗体或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体,并且可以每天或每2至10天施用所述BTK抑制剂。也可以施用较高的初始加载剂量,接着是较低的一剂或多剂。

[0170] 在一个实施方案中,I型抗CD20抗体(优选利妥昔单抗)的优选剂量会在8周剂量周期的第1天、第8天、第15天、第22天、第29天、第36天、第43天、第50天、第57天的约100mg/m²至约1000mg/m²范围中。

[0171] 在一个实施方案中,所述无岩藻糖基化抗CD20抗体(优选无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体,更优选奥滨尤妥珠单抗)的优选剂量会是一个3至6周剂量周期的第1天、第8天、第15天的800至1600mg(在一个实施方案中,800至1200mg),然后剂量是多至9个3至4周剂量周期的第1天的400至1200mg(在一个实施方案中,800至1200mg)。

[0172] 在一个实施方案中,选自(1)9-(1-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基)-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(2)6-氨基-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(3)9-[(1-丙烯酰基-4-哌啶基)甲基]-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(4)6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(5)6-氨基-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(6)6-氨基-7-[4-(3-氯苯氧基)苯基]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(7)6-氨基-9-[1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,和(8)6-氨基-9-[(1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮。

呤-8-酮的所述BTK抑制剂的剂量如下。选自所述化合物(1)至(8)的光学异构体及其混合物的所述BTK抑制剂的剂量如下。所述BTK抑制剂6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐的剂量如下。依照本发明的所述剂量为10mg/kg至70mg/kg,优选20mg/kg至55mg/kg,每天一次或隔天一次,作为口服施用。

[0173] 推荐剂量可以随是否存在有别的共施用化疗剂及基于化疗剂的类型而变化。

[0174] 在一个实施方案中,本发明可用于预防或降低患有癌症,优选地表达CD20的癌症的此类患者中的转移或进一步散布。本发明可用于延长此类患者的存活持续时间,延长此类患者的无进展存活,延长响应的持续时间,导致经治疗的患者的统计学显著的且临床上具有意义的改善,如通过存活的持续时间、无进展存活、响应率或响应的持续时间所测量的。在一个优选的实施方案中,本发明可用于提高患者组中的响应率。

[0175] 在本发明的上下文中,可以在I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂的癌症组合治疗中使用额外的其它细胞毒剂、化疗剂或抗癌剂、或增强此类药剂的效果的化合物或电离辐射(例如细胞因子)。合适地,此类分子以对于意图的目的有效的量组合存在。在一个实施方案中,所述I型抗CD20抗体(优选利妥昔单抗)或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体(优选无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体,更优选奥滨尤妥珠单抗)和所述BTK抑制剂组合治疗不与此类额外的细胞毒剂、化疗剂或抗癌剂、或增强此类额外的药剂的效果的化合物一起使用。

[0176] 此类额外的药剂包括例如:烷化剂或具有烷基化作用的药剂,诸如环磷酰胺(cyclophosphamide)(CTX;例如**cytoxan**®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)(CHL;例如**瘤可宁(leukeran)**®)、顺铂(cisplatin)(CisP;例如**platinol**®)、白消安(busulfan)(例如,马利兰(**myleran**)®)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BCNU)、链脲菌素(streptozotocin)、三乙烯三聚氰胺(triethylenemelamine)(TEM)、丝裂霉素C(mitomycin C),等等;抗代谢物,诸如甲氨蝶呤(methotrexate)(MTX)、依托泊苷(etoposide)(VP16;例如**凡毕士(vepesid)**®)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)(6MP)、6-硫鸟嘌呤(6-thioguanine)(6TG)、阿糖胞苷(cytarabine)(Ara-C)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU)、卡培他滨(capecitabine)(例如,希罗达(**Xeloda**)®)、达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC),等等;抗生素,诸如放线菌素D(actinomycin D)、多柔比星(doxorubicin)(DXR;例如**阿霉素(adriamycin)**®)、柔红霉素(daunorubicin)(道诺霉素(daunomycin))、博来霉素(bleomycin)、光神霉素(mithramycin),等等;生物碱,诸如长春花生物碱诸如长春新碱(vincristine)(VCR)、长春碱(vinblastine),等等;及其它抗肿瘤剂,诸如帕西他赛(paclitaxel)(例如**泰素(taxol)**®)和帕西他赛衍生物、细胞抑制剂、糖皮质激素诸如地塞米松(dexamethasone)(DEX;例如**地卡特隆(decadron)**®)和皮质类固醇诸如泼尼松(prednisone)、核苷酶抑制剂诸如羟基脲、氨基酸消减酶(amino acid depleting enzyme)诸如天冬酰胺酶、甲酰四氢叶酸(leucovorin)和其它叶酸衍生物、和相似的多种多样的抗肿瘤剂。也可以使用下列药剂作为额外的药剂:氨磷汀(arnifostine)(例如**ethyol**®)、更生霉素(dactinomycin)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)(氮芥)、链佐星

(streptozocin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、洛莫司汀(lomustine) (CCNU)、多柔比星脂质体(doxorubicin lipo) (例如, **doxil®**)、吉西他滨(gemcitabine) (例如**健择(gemzar)®**)、柔红霉素脂质体(daunorubicin lipo) (例如**daunoxome®**)、丙卡巴肼(procabazine)、丝裂霉素(mitomycin)、多西他赛(docetaxel) (例如**泰索帝(taxotere)®**)、阿地白介素(aldesleukin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、克拉屈滨(cladribine)、喜树碱(camptothecin)、CPT 11(伊立替康(irinotecan))、10-羟基7-乙基-喜树碱(SN38)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊达比星(idarubicin)、美司钠(mesna)、干扰素 β 、干扰素 α 、米托蒽醌(mitoxantrone)、托泊替康(topotecan)、亮丙瑞林(leuprolide)、甲地孕酮(megestrol)、美法仑(melphalan)、巯嘌呤、普卡霉素(plicamycin)、米托坦(mitotane)、培门冬酶(pegaspargase)、喷司他丁(pentostatin)、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡霉素(plicamycin)、他莫昔芬(tamoxifen)、替尼泊苷(teniposide)、睾内酪(testolactone)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、塞替派(thiotepa)、尿嘧啶芥(uracilmustard)、长春瑞滨(vinorelbine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)。在一个实施方案中,无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂组合治疗不与此类额外的药剂一起使用。

[0177] 上文所描述的细胞毒剂和抗癌剂及抗增殖性靶物特异性抗癌药物,如蛋白质激酶抑制剂在化学疗法方案中的使用一般在癌症疗法领域中得到充分表征,并且其在本文中的使用归入关于监测耐受性和效力及关于控制施用路径和剂量的相同考虑,伴有一些调整。例如,细胞毒剂的实际剂量可以通过使用组织培养方法测定的患者的培养细胞应答而变化。一般地,与在没有额外的其它药剂的情况中使用的量相比,剂量会是降低的。

[0178] 有效细胞毒剂的典型剂量可以在制造商推荐的范围中,并且在通过体外应答或动物模型中的应答指示的情况中,可以降低多至约一个数量级的浓度或量。如此,实际剂量会取决于内科医生的判断、患者的状况、和治疗方法的效力,其基于原代培养的恶性细胞或组织培养组织样品的体外响应性,或合适的动物模型中观察到的响应。

[0179] 在本发明的上下文中,在表达CD20的癌症的I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂组合治疗外,可以实施有效量的电离辐射和/或可以使用放射性药物。放射源可以是在所治疗的患者外部或内部。在来源在患者外部时,疗法称为外部束放射疗法(EBRT)。在放射源在患者内部时,治疗称作近程疗法(BT)。本发明的上下文中使用的放射性原子可以选自下组,包括但不限于镭-90、铯-137、铟-192、镅-241、金-198、钴-57、铜-67、镓-67、碘-123、碘-131、和碘-111。也有可能用此类放射性同位素标记抗体。在一个实施方案中,I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体和所述BTK抑制剂组合治疗不与此类电离辐射一起使用。

[0180] 放射疗法是一种用于控制不可切除的或不能手术的肿瘤和/或肿瘤转移的标准治疗。已经在组合放射疗法与化学疗法时看到改善的结果。放射疗法基于如下的原则,即对靶区域投递的高剂量放射会导致肿瘤和正常组织两者中的生殖细胞(reproductive cell)死亡。放射剂量方案一般在放射吸收剂量(Gy)、时间和分级方面限定,并且必须由肿瘤学家小心限定。患者接受的放射量会取决于各种考虑因素,但是两项最重要的是肿瘤相对于身体的其它重要结构或器官的位置和肿瘤已经扩散的程度。经历放射疗法的患者的一种典型治

疗过程会是在1至6周时段里的治疗日程表,以单一每日分数约1.8至2.0Gy一周5天对患者施用10-80Gy的总剂量。在本发明的一个优选的实施方案中,在用本发明的组合治疗和放射治疗人患者中的肿瘤时存在着协同。换言之,在与放射组合时(任选地有额外的化学治疗剂或抗癌剂),依靠构成本发明组合的药剂对肿瘤生长的抑制得到增强。例如,辅助放射疗法的参数包含在W099/60023中。

[0181] 依照已知的方法通过静脉内施用(以推注或者通过在一段时间里连续输注),通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、或鞘内路径对患者施用I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体。在一个实施方案中,静脉内或皮下施用抗体。

[0182] 依照已知的方法通过静脉内施用(以推注或者通过在一段时间里连续输注),口服,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、或鞘内路径对患者施用BTK抑制剂。在一个实施方案中,静脉内或皮下施用BTK抑制剂。

[0183] 如本文中所使用的,“药学可接受载体”意图包括与药学施用相容的任何和所有材料,包括溶剂、分散介质、涂层材料、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、和与药学施用相容的其它材料和化合物。除非任何常规的介质或药剂与活性化合物不相容,涵盖其在本发明的组合物中的使用。也可以将补充性活性化合物掺入组合物中。

[0184] 药物组合物

[0185] 可以通过用药学可接受的无机或有机载体加工依照本发明的抗CD20抗体和/或BTK抑制剂来获得药物组合物。可以使用乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、硬脂酸或其盐等,例如用于片剂、包衣片剂、锭剂和硬明胶胶囊的此类载体。适合于软明胶胶囊的载体是例如植物油、蜡、脂肪、半固体和液体多元醇等。然而,根据活性物质的性质,通常在软明胶胶囊的情况中不需要载体。适合于生成溶液和糖浆剂的载体是例如水、多元醇、甘油、植物油等。适合于栓剂的载体是例如天然的或硬化的油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇等。

[0186] 此外,药物组合物可以含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、增甜剂、着色剂、香料、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或抗氧化剂。它们也可以含有其它治疗上有价值的物质。

[0187] 在本发明的一个实施方案中,组合物包含所述I型抗CD20抗体(优选利妥昔单抗)或具有60%或更小的岩藻糖量的所述无岩藻糖基化抗CD20抗体(优选地,所述无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体,更优选地,奥滨尤妥珠单抗)和所述BTK抑制剂两者,其在治疗癌症,特别是表达CD20的癌症(优选淋巴瘤或淋巴细胞性白血病,更优选B细胞非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、伯基特氏淋巴瘤、毛细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、移植后淋巴增殖性病症(PTLD)、HIV有关的淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、或原发性CNS淋巴瘤)中使用。

[0188] 所述药物组合物可以进一步包含一种或多种药学可接受载体。

[0189] 本发明进一步提供了例如在癌症中使用的药物组合物,其包含(i)第一有效量的I型抗CD20抗体(优选利妥昔单抗)或具有60%或更小的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体(优选地,无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体),和(ii)第二有效量的BTK抑制剂。任选地,此类组合物包含药学可接受载体和/或赋形剂。

[0190] 通过将具有期望纯度的抗体与任选的药学可接受载体、赋形剂或稳定剂

(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编(1980)) 混合以冻干配制剂或水溶液形式制备依照本发明使用的仅I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体的药物组合物, 供贮存。可接受的载体、赋形剂、或稳定剂在所采用的剂量和浓度对于接受者无毒, 并且包括缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化己烷双胺; 苯扎氯铵、苄索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(小于约10个残基)多肽; 蛋白质, 诸如血清清蛋白、明胶、或免疫球蛋白; 亲水性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸; 单糖、二糖、和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖、或糊精; 螯合剂诸如EDTA; 糖诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇; 成盐反荷离子诸如钠; 金属复合物(例如, Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子型表面活性剂诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0191] BTK抑制剂的药物组合物可以与上文对I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体描述的药物组合物类似。

[0192] 小分子BTK抑制剂的药物组合物包括那些适合于口服、鼻、表面(包括含服和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外施用的。组合物可以以单位剂量形式方便呈现, 并且可以通过药学领域公知的任何方法来制备。可以与载体材料组合以生成单一剂量形式的活性成分量会随所治疗的宿主、及特定施用模式而有所变化。可以与载体材料组合以生成单一剂量形式的活性成分量一般是产生治疗效果的BTK抑制剂的所述量。一般地, 在100%里, 此量的范围会是约1%至约99%的活性成分, 优选约5%至约70%, 最优选约10%至约30%。制备这些组合物的方法包括下列步骤: 使BTK抑制剂与载体及任选一种或多种辅助成分进行结合。一般地, 如下制备BTK抑制剂的药物组合物, 即使BTK抑制剂与液体载体或细碎的固体载体, 或两者一致且密切地结合, 然后在必要时, 使产物成形。适合于口服施用的药物组合物可以为胶囊、扁囊剂、囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基材, 通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄耆胶得到)、粉末、颗粒, 或者作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液, 或者作为水包油或油包水液体乳剂, 或者作为酞剂或糖浆剂, 或者作为软锭剂(pastille)(使用惰性基材, 诸如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶得到)和/或作为漱口剂等等(每种含有预先确定量的BTK抑制剂作为活性成分)的形式。BTK抑制剂也可以以推注、药糖剂或糊剂施用。

[0193] 在本发明的又一个实施方案中, 将I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体和BTK抑制剂以两种分开的药物组合物配制。

[0194] 活性成分还可以包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊), 在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊), 或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. 编(1980)。

[0195] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质, 该基质是定型产品的形式, 例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(US 3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)、

及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0196] 要用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这容易通过过滤流过无菌滤膜来实现。

[0197] 一个实施方案是用于治疗癌症的药物组合物,其包含I型抗CD20抗体或具有占Asn297处的寡糖(糖)总量的60%或更少的岩藻糖量的无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体和6-氨基-9-[(3R) -1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐的组合。

[0198] 本发明进一步提供了一种用于治疗癌症的方法,包括对需要此类治疗的患者施用(i)第一有效量的I型抗CD20抗体或具有60%或更小的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体(优选地,无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体),和(ii)第二有效量的BTK抑制剂。

[0199] 在一个实施方案中,岩藻糖量是40%至60%。

[0200] 优选地,所述癌症是表达CD20的癌症。

[0201] 优选地,所述表达CD20的癌症是淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0202] 优选地,所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗。

[0203] 优选地,所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是II型抗CD20抗体。

[0204] 优选地,所述抗体是本文中公开的人源化B-Ly1抗体。

[0205] 优选地,所述抗体是奥滨尤妥珠单抗。

[0206] 优选地,所述BTK抑制剂选自下组:(1)9-(1-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基)-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(2)6-氨基-9-{(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(3)9-[(1-丙烯酰基-4-哌啶基)甲基]-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(4)6-氨基-9-[(3R) -1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(5)6-氨基-9-{(3S)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(6)6-氨基-7-[4-(3-氯苯氧基)苯基]-9-{(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(7)6-氨基-9-[1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,和(8)6-氨基-9-{1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮。还优选地,所述BTK抑制剂选自下组:所述化合物(1)至(8)的光学异构体及其混合物。

[0207] 优选地,所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R) -1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。

[0208] 优选地,所述盐是氢氯化物/盐酸盐。

[0209] 优选地,所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体且所述BTK抑制剂选自下组:(1)9-(1-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基)-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(2)6-氨基-9-{(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(3)9-[(1-丙烯酰基-4-哌啶基)甲基]-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(4)6-氨基-9-[(3R) -1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(5)6-氨基-9-{(3S)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(6)6-氨基-7-[4-(3-氯苯氧基)苯基]-9-{(3R)-1-[(2E)-

4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, (7) 6-氨基-9-[1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, 和 (8) 6-氨基-9-{1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮。还优选地, 所述BTK抑制剂选自下组: 所述化合物(1)至(8)的光学异构体及其混合物。优选地, 所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐且所述癌症是表达CD20的癌症, 优选淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0210] 如本文中所使用的, 术语“患者”优选地指出于任何目的需要用I型抗CD20抗体或无岩藻糖基化抗CD20抗体治疗的人(例如, 患有表达CD20的癌症的患者), 且更优选地需要此类治疗以治疗癌症、或癌前状况或损伤的人。然而, 术语“患者”也可以指非人动物, 优选地哺乳动物诸如犬、猫、马、牛、猪、绵羊和非人灵长类, 等等。

[0211] 本发明进一步包括在治疗癌症中使用的I型抗CD20抗体或具有60%或更小的岩藻糖量的无岩藻糖基化抗CD20抗体和BTK抑制剂。

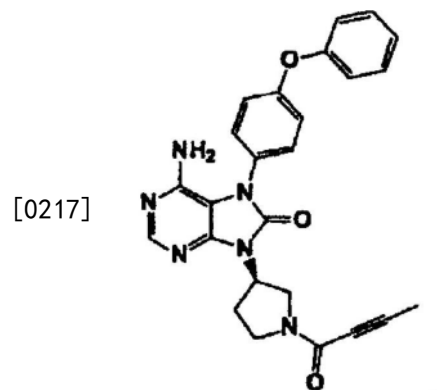
[0212] 优选地, 所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗。

[0213] 优选地, 所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

[0214] 优选地, 所述无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体是奥滨尤妥珠单抗。

[0215] 优选地, 所述BTK抑制剂选自下组: (1) 9-(1-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基)-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, (2) 6-氨基-9-[(3R)-1-(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, (3) 9-[(1-丙烯酰基-4-哌啶基)甲基]-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, (4) 6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, (5) 6-氨基-9-[(3S)-1-(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, (6) 6-氨基-7-[4-(3-氯苯氧基)苯基]-9-[(3R)-1-(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, (7) 6-氨基-9-[1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮, 和 (8) 6-氨基-9-{1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基}-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮。还优选地, 所述BTK抑制剂选自下组: 所述化合物(1)至(8)的光学异构体及其混合物。

[0216] 优选地, 所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐。所述化合物还显示为如下结构:



[0218] 优选地,所述盐是氢氯化物/盐酸盐。

[0219] 优选地,所述I型抗CD20抗体是利妥昔单抗或所述无岩藻糖基化抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体,更优选奥滨尤妥珠单抗,且所述BTK抑制剂选自下组:(1)9-(1-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基)-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(2)6-氨基-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(3)9-[(1-丙烯酰基-4-哌啶基)甲基]-6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(4)6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(5)6-氨基-9-[(3S)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(6)6-氨基-7-[4-(3-氯苯氧基)苯基]-9-[(3R)-1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,(7)6-氨基-9-[1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮,和(8)6-氨基-9-[1-[(2E)-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰基]-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮。还优选地,所述BTK抑制剂选自下组:所述化合物(1)至(8)的光学异构体及其混合物。优选地,所述BTK抑制剂是6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮或其盐,且所述癌症是表达CD20的癌症,优选淋巴瘤或淋巴细胞性白血病。

[0220] 提供以下实施例和图以帮助理解本发明,其真正的范围在所附权利要求书中列出。应当理解,可以在不背离本发明精神的前提下对列出的规程做出修改。

[0221] 序列表

[0222] SEQ ID NO:1鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1的重链可变区(VH)的氨基酸序列。

[0223] SEQ ID NO:2鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1的轻链可变区(VL)的氨基酸序列。

[0224] SEQ ID NO:3-19人源化B-Ly1抗体(B-HH2至B-HH9,B-HL8,和B-HL10至B-HL17)的重链可变区(VH)的氨基酸序列

[0225] SEQ ID NO:20人源化B-Ly1抗体B-KV1的轻链可变区(VL)的氨基酸序列实验规程

[0226] 实施例1:

[0227] BTK抑制剂与抗CD20抗体组合在皮下异种移植有TMD8(ABC-DLBCL)细胞的SCID小鼠中的抗肿瘤功效研究

[0228] 1.材料和方法

[0229] 1.1.测试物质

[0230] 测试物质,盐酸6-氨基-9-[(3R)-1-(2-丁炔酰基)-3-吡咯烷基]-7-(4-苯氧基苯基)-7,9-二氢-8H-嘌呤-8-酮(以下称作“化合物A”),保存于密封容器中,环境温度,避光。

[0231] GA101(奥滨尤妥珠单抗,以商品名Gazyva®或Gazyvaro®销售):500mg,利妥昔单抗(RTX,以商品名Rituxan®和MabThera®销售):200mg,由Roche Glycart AG供应,并保存于4℃。

[0232] 1.2.物质媒介

[0233] 称取化合物A,并使用研钵和杵在0.5w/v%甲基纤维素400cP溶液(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.,以下称作“0.5%MC”)中悬浮以获得1mg/mL悬浮液。在制备后7天内使用悬浮液。悬浮液经确认在冷藏,避光下7天,及随后于环境温度暴露于室内光24小

时是稳定且均一的。

[0234] GA101 (25mg/mL) 和利妥昔单抗 (10mg/mL) 二者的储液保持于4℃。在施用于小鼠之前,在NaCl 0.9%中稀释储液,0.3,1和3mg/ml用于剂量发现研究,而0.1mg/ml和0.3mg/ml用于组合研究。

[0235] 1.3. 药物施用路径

[0236] 一天两次通过强饲法经由一次性使用的喂食针头 (Fuchigami Kikai Co.) 以10ml/kg将化合物A经口 (PO) 施用于小鼠。以10ml/kg在小鼠的尾静脉中静脉内 (IV) 注射GA101/利妥昔单抗。对于所有处理,根据每只小鼠的个体体重的最近测量调整施用体积。在上午和下午,间隔8小时或更多,化合物A一天两次组和媒介组分别接受化合物A和0.5%MC。

[0237] 2. 动物

[0238] 使用雌性C.B-17/1cr-SCID/SCIDJcl小鼠 (Clea Japan Inc., 实验起始时的年龄: 6周; 以下称作“Scid小鼠”)。小鼠保持于金属鼠笼中,每笼3至5只,进行实验之前经历约1周的适应期。在我们的动物房中,动物能够随意获得固体食物,CRF-1 (Oriental Yeast Co., Ltd.) 和自来水 (来自自动分配器)。用自动化清洁系统处理粪便。在接收时及在适应完成时观察动物的总体状况。在实验中使用总体状况没有问题的动物。在受控条件下在室内维持动物,温度:24±2℃,湿度:55±15%,通风:15±5个循环/小时,100%新鲜外界空气,光照:12小时暗/亮周期,照明来自荧光灯 (光照:08:00至20:00)。。

[0239] 3. 癌细胞系和培养条件

[0240] 自具有弥漫性大B细胞淋巴瘤的患者的细胞建立TMD8 (Tohda S et al., Leuk Res., 2006, 30:1385-90)。制备含有10vol%灭活FBS和1vol%青霉素-链霉素液体 (Invitrogen Corporation) 的RPMI培养基1640 (Invitrogen Corporation, 以下称作“RPMI”) 并用作培养基。将培养基保存于5℃ (可容许范围:1℃至9℃)。在装有培养基的150mm皿中接种每皿 4×10^6 至 2.0×10^7 个细胞的细胞悬浮液。将板于37℃,5%CO₂,95%空气温育。在血球计中对细胞计数,而且它们在注射细胞那天的存活力为至少90%。

[0241] 4. 细胞接种

[0242] 在第0天,在先前在冰上冷却的RPMI中悬浮团粒以获得 2×10^8 个细胞/mL的细胞悬浮液。组合RPMI细胞悬浮液和等体积的BD Matrigel GFR (BD Biosciences) 以制备 1×10^8 个细胞/mL的细胞悬浮液。使用这作为用于植入的细胞悬浮液。然后,在戊巴比妥麻醉下使用25号针 (Terumo Corporation) 在小鼠右体侧中皮下注射0.1mL细胞悬浮液。

[0243] 5. 处理日程表

[0244] 当均值肿瘤体积达到100至200mm³和300至400mm³时,根据它们的个体肿瘤体积将小鼠随机化分入8-10只的组,并起始处理。每个组的均值肿瘤体积彼此没有差异 (方差分析)。

[0245] 6. 携带异种植物的动物的状况的观察

[0246] 植入TMD8后,每天记录所有动物的总体状况以测量肿瘤体积。

[0247] 7. 肿瘤直径的测量

[0248] 自TMD8植入至最终评估日,每2或4天用电子测径器 (Mitutoyo Corporation) 测量肿瘤的长轴和短轴。

[0249] 8. 终点和评估方法

[0250] 主要终点是最终评估日的肿瘤体积。另外,计算治疗组较之媒介组中的肿瘤生长抑制率(TGI,%)。使用肿瘤体积和体重自第0天起的时间变化作为次要终点。用下面的公式计算肿瘤体积。

[0251] 肿瘤体积=肿瘤长轴×(肿瘤短轴)²×0.5

[0252] 至小数点后一位,计算个体肿瘤体积。

[0253] 当肿瘤达到最大3,000mm³时,最终处死小鼠并尸检。

[0254] 9.数据的表述和处理

[0255] 9.1.数据的表述

[0256] 以均值±标准误差(S.E.)表述每个组的肿瘤体积和体重。至小数点后一位显示治疗组的TGI(%)。

[0257] 9.2.统计分析

[0258] 使用Microsoft Office Excel 2007SP-1来计算均值和标准误差及绘制表和图。使用基于SAS 9.2TS2M3(SAS Institute Japan)的EXSUS System Ver.7.7.1(CAC Corporation)来实施统计检验。使用Student氏t检验来比较GA101单一疗法和GA101和化合物A组合疗法中的肿瘤体积。所有统计检验均是双侧的,显著性水平为5%。

[0259] 10.结果

[0260] 实验组的组成

[0261] 表3

组	施用的药物 剂量(10 ml/kg)和路径	处理日程表	动物数目
媒介组	NaCl 0.9% / iv 0.5%MC / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
GA101 1 mg/kg组	GA101 0.1 mg/mL / iv 0.5%MC / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
GA101 3 mg/kg组	GA101 0.3 mg/mL / iv 0.5%MC / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
[0262] 化合物A 10 mg/kg组	NaCl 0.9% / iv 化合物A 1 mg/mL / p.o.	Q7D x 4 Q0.5Dx24	10
GA101 1mg/kg + 化合物A 10 mg/kg组	GA101 0.1 mg/mL / iv 化合物A 1 mg/mL / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
GA101 3mg/kg + 化合物A 10 mg/kg组	GA101 0.3 mg/mL / iv 化合物A 1 mg/mL / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
利妥昔单抗 3 mg/kg组	RTX 0.3 mg/mL / iv 0.5%MC / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10

[0263] 图1(a)和1(b)显示化合物A与GA101组合在TMD8异种移植物模型中的抗肿瘤活性

研究。在D14时,当均值肿瘤体积为400-450mm³时,发生小鼠根据肿瘤体积随机化分入7组,每组10只小鼠。如图1(a)和1(b)所示,GA101单一疗法显示抗肿瘤效果。然而,组合疗法组看来比相应的单一疗法更有活性。在第14,17,21和24天观察到统计学显著性。在D35时(第21天),当它们的肿瘤体积高于3,000mm³时,处死4只媒介处理的小鼠。在D38时(第24天)处死所有小鼠。

[0264] 在这项研究中,GA101-化合物A组合显著好于所示单一疗法(下文显示了统计分析)。

[0265] 令人惊讶的是,我们在3mg/kg GA101与10mg/kg化合物A组合的组中在D14和D21时观察到部分个体的肿瘤体积消退,而在单一疗法组中没有观察到完全肿瘤消退。这些结果强烈指示组合疗法针对晚期肿瘤模型会更加有效。

[0266] 实施例2:

[0267] 除下面的“物质媒介”和“处理日程表”以外,实施例2中的实验是依照实施例1中所述方法实施的。

[0268] 1.1. 物质媒介

[0269] 称取化合物A,并使用研钵和杵在0.5w/v%甲基纤维素400cP溶液(Wako Pure Chemical Industries,Ltd.,以下称作“0.5%MC”)中悬浮以获得1mg/mL(10mg/kg)悬浮液。在制备后7天内使用悬浮液。悬浮液经确认在冷藏,避光下7天,及随后于环境温度暴露于室内光24小时是稳定且均一的。

[0270] GA101(25mg/mL)和利妥昔单抗(10mg/mL)二者的储液保持于4℃。在施用于小鼠之前,在NaCl 0.9%中稀释储液,0.3mg/mL(3mg/kg)用于这项研究。

[0271] 1.2. 处理日程表

[0272] 当均值肿瘤体积达到400至450mm³时,根据它们的个体肿瘤体积将小鼠随机化分入6只的组,并起始处理。每个组的均值肿瘤体积彼此没有差异(方差分析)。

[0273] 2. 结果

[0274] 实验组的组成

[0275] 表4

组	施用的药物 剂量(10 ml/kg)和路径	处理日程表	动物数目
媒介组	NaCl 0.9% / iv 0.5%MC / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
[0276] GA101 3 mg/kg组	GA101 0.3 mg/mL / iv 0.5%MC / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
RTX 3 mg/kg组	RTX 0.3 mg/mL / iv 0.5%MC / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
化合物A 10 mg/kg组	NaCl 0.9% / iv 化合物A 1 mg/mL / p.o.	Q7D x 4 Q0.5Dx24	10
GA101 3mg/kg + 化合物A 10 mg/kg组	GA101 0.3 mg/mL / iv 化合物A 1 mg/mL / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10
[0277] RTX 3mg/kg + 化合物A 10 mg/kg组	RTX 0.3 mg/mL / iv 化合物A 1 mg/mL / p.o.	Q7D x 4 Q0.5D x 24	10

[0278] 图2(a)和2(b)显示化合物A与GA101/RTX组合在TMD8异种移植模型中的抗肿瘤活性研究。在D14时(第0天),当均值肿瘤体积为400-450mm³时,发生小鼠根据肿瘤体积随机化分入6组,每组10只小鼠。如图2(a)和2(b)所示,每种单一疗法显示抗肿瘤效果。在GA101和RTX的第4天后及在化合物A的第11天后观察到统计学显著性。而且,化合物A与GA101或RTX在亚最佳剂量每周一次3mg/kg组合导致对TMD8异种移植模型中肿瘤生长的显著抑制。还在单一疗法和化合物A组合疗法之间观察到统计学显著性,指示化合物A与GA101或RTX在亚最佳剂量组合显著好于作为单一疗法给予的相应的抗体或化合物A。在D35时(第21天),当它们的肿瘤体积高于3,000mm³时,处死3只媒介处理的小鼠。在D39时(第25天)处死所有小鼠。

[0279] 下文显示了每个组在第0,4,7,11,14,18和21天时的肿瘤生长抑制(TGI)。就肿瘤生长抑制(TGI,77.9%比54.3%,第21天)而言,GA101单一疗法显示与RTX单一疗法相比卓越的抗肿瘤活性。

[0280] 肿瘤生长抑制(TGI)

[0281] 表5

组/接种后天数	0	4	7	11	14	18	21
GA101 3 mg/kg, i.v.	1.7	30.9	45.0	53.3	63.3	72.2	77.9
RTX 3 mg/kg, i.v.	0.7	25.8	33.2	36.7	42.4	42.7	54.3
[0282] 化合物A 10 mg/kg	0.0	13.7	17.6	34.0	45.8	46.4	62.6
GA101 3mg/kg, i.v. + 化合物A 10 mg/kg	0.5	27.0	47.4	62.2	75.6	84.6	90.2
RTX 3 mg/kg, i.v. + 化合物A 10 mg/kg	1.4	25.4	40.1	55.8	69.3	78.4	86.4

[0283] 在分组后每3或4天测量肿瘤直径并计算肿瘤体积。至小数点后一位显示每个测量日所示治疗组基于媒介处理组中的肿瘤体积的肿瘤生长抑制 (TGI, %)。

[0284] 实施例3:

[0285] 除下面的“物质媒介”、“药物施用路径”和“处理日程表”以外,实施例3中的实验是依照实施例1中所述方法实施的。

[0286] 1.1测试物质

[0287] 比较用物质,ibrutinib(以下称作“化合物B”),保存于密封容器中,环境温度,避光。

[0288] 1.2药物施用路径

[0289] 给小鼠喂食分别补充有0.0037% (wt/wt,掺入团粒) 化合物A或0.012% (wt/wt,掺入团粒) 化合物B的商品化饲料 (CRF1, Oriental Yeast Co., Ltd.)。化合物A或化合物B的剂量对应于6或20mg/kg体重的日摄入量。此计算基于范围为160至180mg/g体重的均值日食物摄入量。

[0290] 1.3处理日程表

[0291] 两组(媒介和RTX):给小鼠喂食普通饲料(CRF1)。治疗组:在随机化后给小鼠喂食含有化合物A或化合物B的相同饲料。一周一次以3mg/kg静脉内施用利妥昔单抗。

[0292] 2.结果

[0293] 实验组的组成

[0294] 表6

组	施用的药物 剂量和路径	处理日程表	动物数目
媒介	NaCl 0.9% / iv	Q7D x 3	9
RTX3 mg/kg	RTX 0.3 mg/mL / iv	Q7D x 3	9
[0295] 化合物A	喂食含有0.0037%化合物A的饲料	每天	9
化合物B	喂食含有0.012%化合物B的饲料	每天	9
RTX 3mg/kg + 化合物A	RTX 0.3 mg/mL / iv 喂食含有0.0037%化合物A的饲料	Q7D x 3 每天	9
RTX 3mg/kg + 化合物B	RTX 0.3 mg/mL / iv 喂食含有0.012%化合物A的饲料	Q7D x 3 每天	9

[0296] 图3显示化合物A或化合物B与RTX组合在TMD8异种移植物模型中的抗肿瘤活性研究。在D14时(第0天),当均值肿瘤体积为450mm³左右时,发生小鼠根据肿瘤体积随机化分入6组,每组9只小鼠。如图3所示,每种单一疗法显示抗肿瘤效果。在RTX和化合物A的第7天后及在化合物B的第11天后观察到统计学显著性。在每个之间没有统计学显著性。如此,化合物A的抗肿瘤活性(0.0037%)与化合物B(0.012%)相当。有趣的是,在TMD8异种移植物模型中化合物A与RTX组合比相应的单一疗法更加有效。还在单一疗法和这种组合疗法之间观察到统计学显著性。同时,在化合物B与RTX组合和相应的单一疗法之间没有观察到统计学显著性,指示化合物A与RTX组合展现协同效应。

[0297] 下文显示了每个组在第0,3,7,11,14,18和21天时的肿瘤生长抑制(TGI)。就肿瘤生长抑制(TGI,91.1%比64.2%,第21天,p<0.001)而言,化合物A组合疗法显示与RTX单一疗法相比卓越的抗肿瘤活性。

[0298] 表7

组/接种后天数	0	3	7	11	14	18	21
RTX 3 mg/kg, i.v.	0.0	14.9	37.2	49.51	53.4	60.0	64.2
化合物A 0.0037%	0.0	12.7	42.8	47.55	51.1	61.0	56.1
[0299] 化合物B 0.0012%	0.4	3.2	19.1	34.91	40.2	39.2	47.1
RTX 3 mg/kg, i.v. + 化合物A 0.0037%	0.0	26.9	54.5	73.57	79.8	87.1	91.1
RTX 3 mg/kg, i.v. + 化合物B 0.0012%	0.0	17.0	42.2	58.68	63.0	70.2	72.3

[0300] 在分组后每3或4天测量肿瘤直径并计算肿瘤体积。至小数点后一位显示每个测量日所示治疗组基于媒介处理组中的肿瘤体积的肿瘤生长抑制(TGI,%)。

[0301] 结论

[0302] 根据实施例1,实施例2和实施例3的结果,化合物A与GA101或RTX的组合是ABC-DLBCL的有效治疗。已经报告了化合物B拮抗RTX依赖性NK细胞介导的细胞毒性(参见Kohrt

HE et al., Blood. Vol. 123, 1957-1960, 2014)。因此,应当注意到,在这种DLBCL异种移植模型中化合物A与RTX或GA101组合比化合物B与RTX组合更加有效,指示在临床设置中使用这些组合(化合物A+RTX或GA101)的基本原理。

[0303] 如本文中公开的及还有序列表中附加的,下述序列是本发明的一部分。

[0304] 序列

[0305] SEQ ID NO:1

[0306] 鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1的重链可变区(VH)的氨基酸序列

[0307] Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys

[0308] Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu

[0309] Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp

[0310] Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

[0311] Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr

[0312] Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly

[0313] Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

[0314] SEQ ID NO:2

[0315] 鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1的轻链可变区(VL)的氨基酸序列

[0316] Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

[0317] Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu

[0318] Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn

[0319] Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr

[0320] Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val

[0321] Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly

[0322] Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0323] SEQ ID NO:3

[0324] 人源化B-Ly1抗体(B-HH2)的重链可变区(VH)的氨基酸序列

[0325] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0326] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

[0327] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0328] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

[0329] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

[0330] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0331] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

[0332] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0333] SEQ ID NO:4

[0334] 人源化B-Ly1抗体(B-HH3)的重链可变区(VH)的氨基酸序列

[0335] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

[0336] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

[0337] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0338] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

- [0339] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0340] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
[0341] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0342] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0343] SEQ ID NO:5
[0344] 人源化B-Ly1抗体(B-HH4)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0345] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0346] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
[0347] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0348] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0349] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0350] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0351] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0352] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0353] SEQ ID NO:6
[0354] 人源化B-Ly1抗体(B-HH5)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0355] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0356] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
[0357] Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0358] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0359] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0360] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0361] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0362] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0363] SEQ ID NO:7
[0364] 人源化B-Ly1抗体(B-HH6)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0365] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0366] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
[0367] Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0368] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0369] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0370] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0371] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0372] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0373] SEQ ID NO:8
[0374] 人源化B-Ly1抗体(B-HH7)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0375] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0376] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
[0377] Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

- [0378] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0379] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0380] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0381] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0382] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0383] SEQ ID NO:9
[0384] 人源化B-Ly1抗体 (B-HH8) 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列
[0385] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0386] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
[0387] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0388] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0389] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0390] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0391] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0392] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0393] SEQ ID NO:10
[0394] 人源化B-Ly1抗体 (B-HH9) 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列
[0395] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0396] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
[0397] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0398] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0399] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0400] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0401] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0402] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0403] SEQ ID NO:11
[0404] 人源化B-Ly1抗体 (B-HL8) 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列
[0405] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0406] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0407] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0408] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0409] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0410] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0411] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0412] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0413] SEQ ID NO:12
[0414] 人源化B-Ly1抗体 (B-HL10) 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列
[0415] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0416] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser

- [0417] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0418] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0419] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0420] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0421] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0422] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0423] SEQ ID NO:13
[0424] 人源化B-Ly1抗体(B-HL11)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0425] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0426] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0427] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0428] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0429] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0430] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0431] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0432] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0433] SEQ ID NO:14
[0434] 人源化B-Ly1抗体(B-HL12)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0435] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0436] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0437] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0438] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0439] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0440] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0441] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0442] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0443] SEQ ID NO:15
[0444] 人源化B-Ly1抗体(B-HL13)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0445] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly
[0446] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0447] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0448] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0449] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0450] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0451] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0452] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0453] SEQ ID NO:16
[0454] 人源化B-Ly1抗体(B-HL14)的重链可变区(VH)的氨基酸序列
[0455] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Lys Lys Pro Gly Gly

- [0456] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0457] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0458] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0459] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0460] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0461] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0462] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0463] SEQ ID NO:17
[0464] 人源化B-Ly1抗体 (B-HL15) 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列
[0465] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser
[0466] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0467] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0468] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0469] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0470] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0471] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0472] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0473] SEQ ID NO:18
[0474] 人源化B-Ly1抗体 (B-HL16) 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列
[0475] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0476] Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0477] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0478] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0479] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0480] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0481] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0482] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0483] SEQ ID NO:19
[0484] 人源化B-Ly1抗体 (B-HL17) 的重链可变区 (VH) 的氨基酸序列
[0485] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0486] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
[0487] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0488] Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
[0489] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0490] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0491] Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
[0492] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0493] SEQ ID NO:20
[0494] 人源化B-Ly1抗体B-KV1的轻链可变区 (VL) 的氨基酸序列

[0495] Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
[0496] Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
[0497] Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0498] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
[0499] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0500] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
[0501] Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
[0502] Arg Thr Val

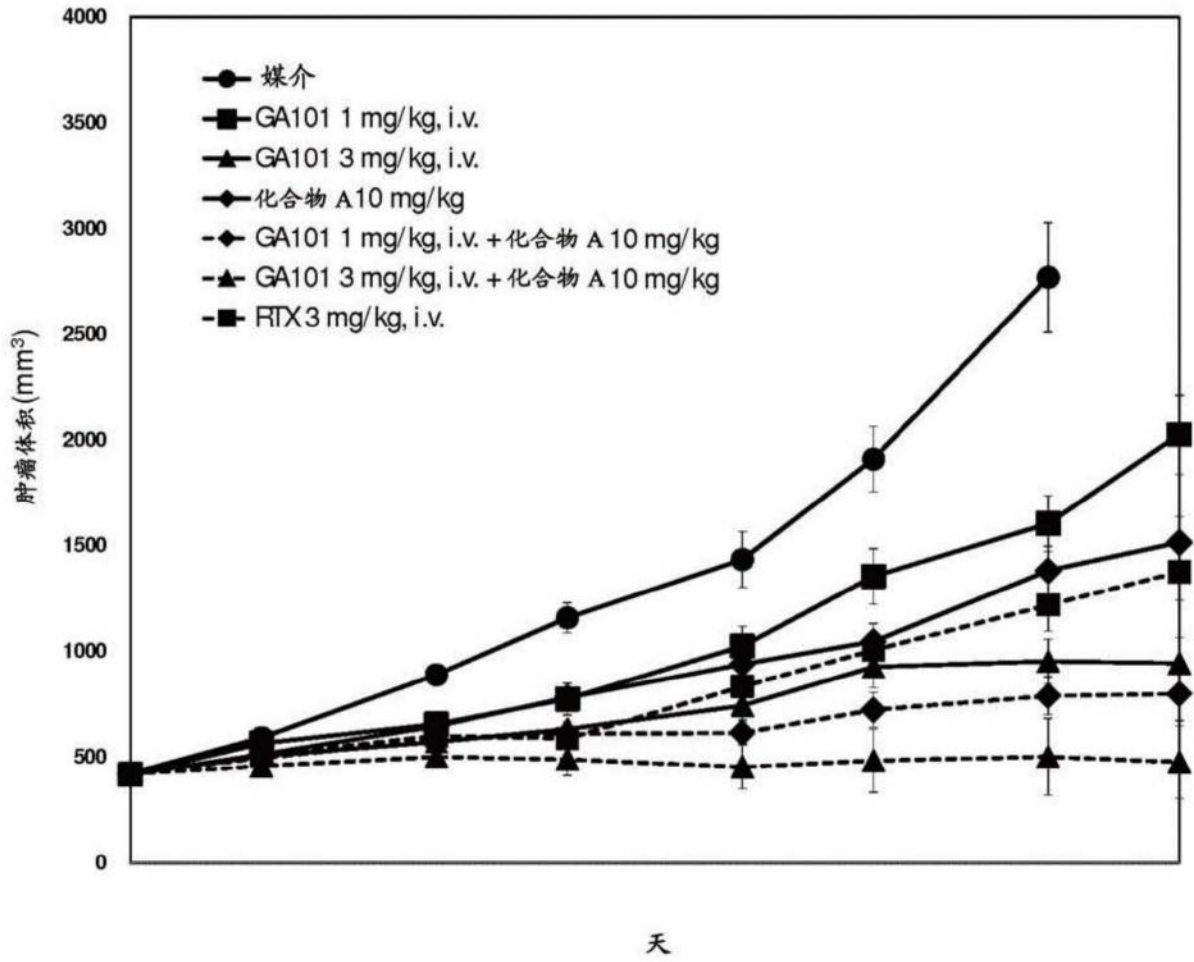


图1 (a)

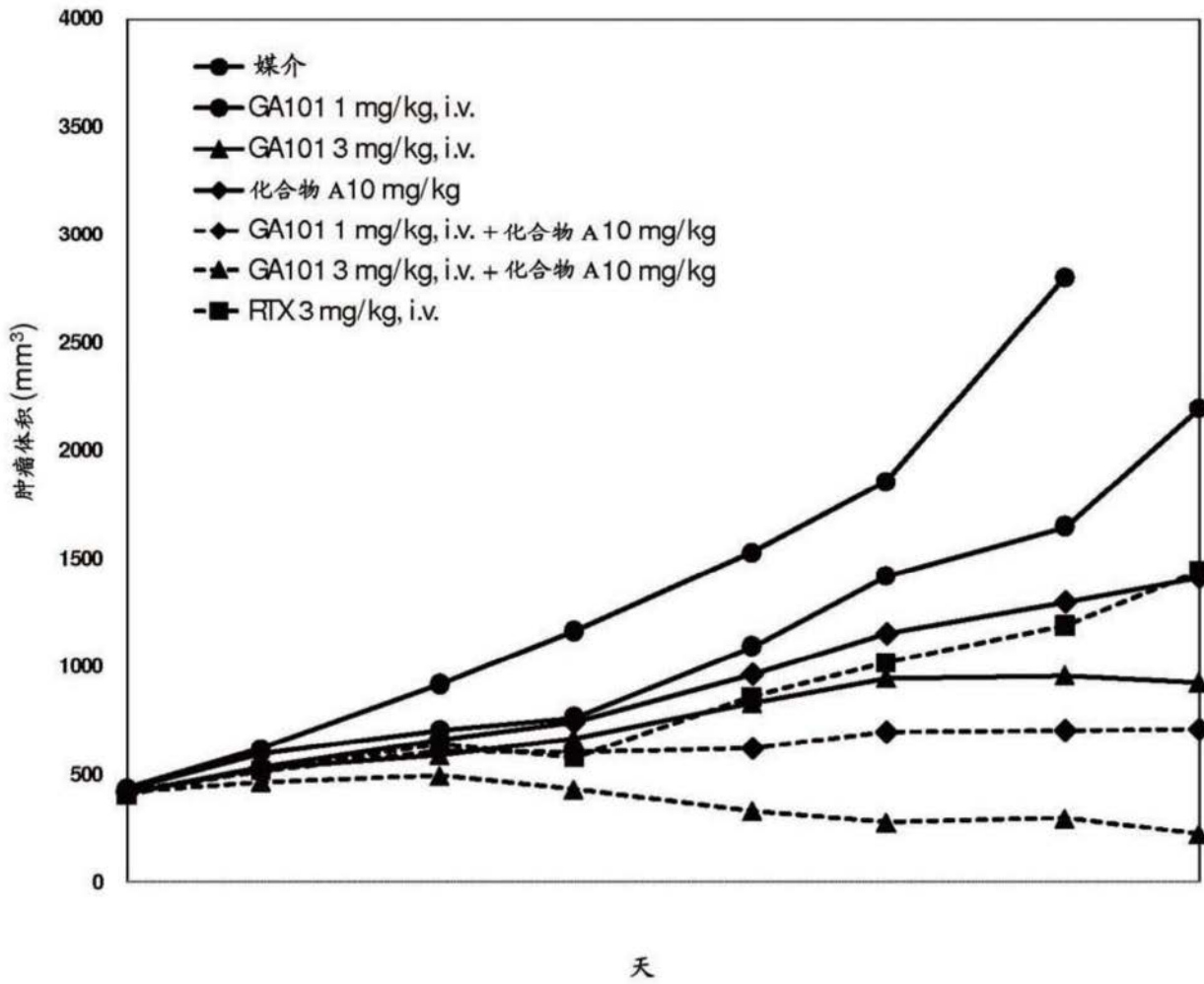


图1 (b)

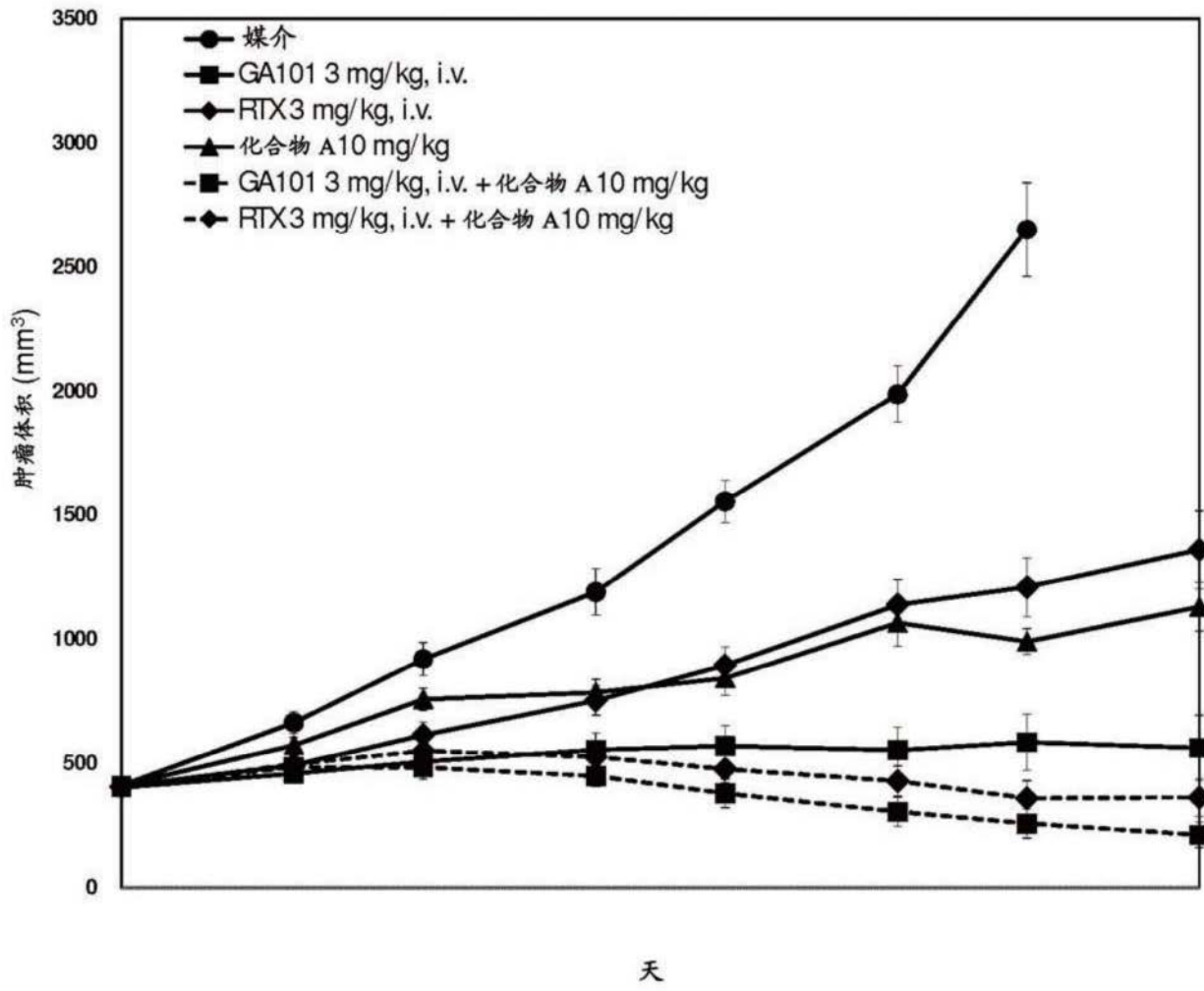


图2 (a)

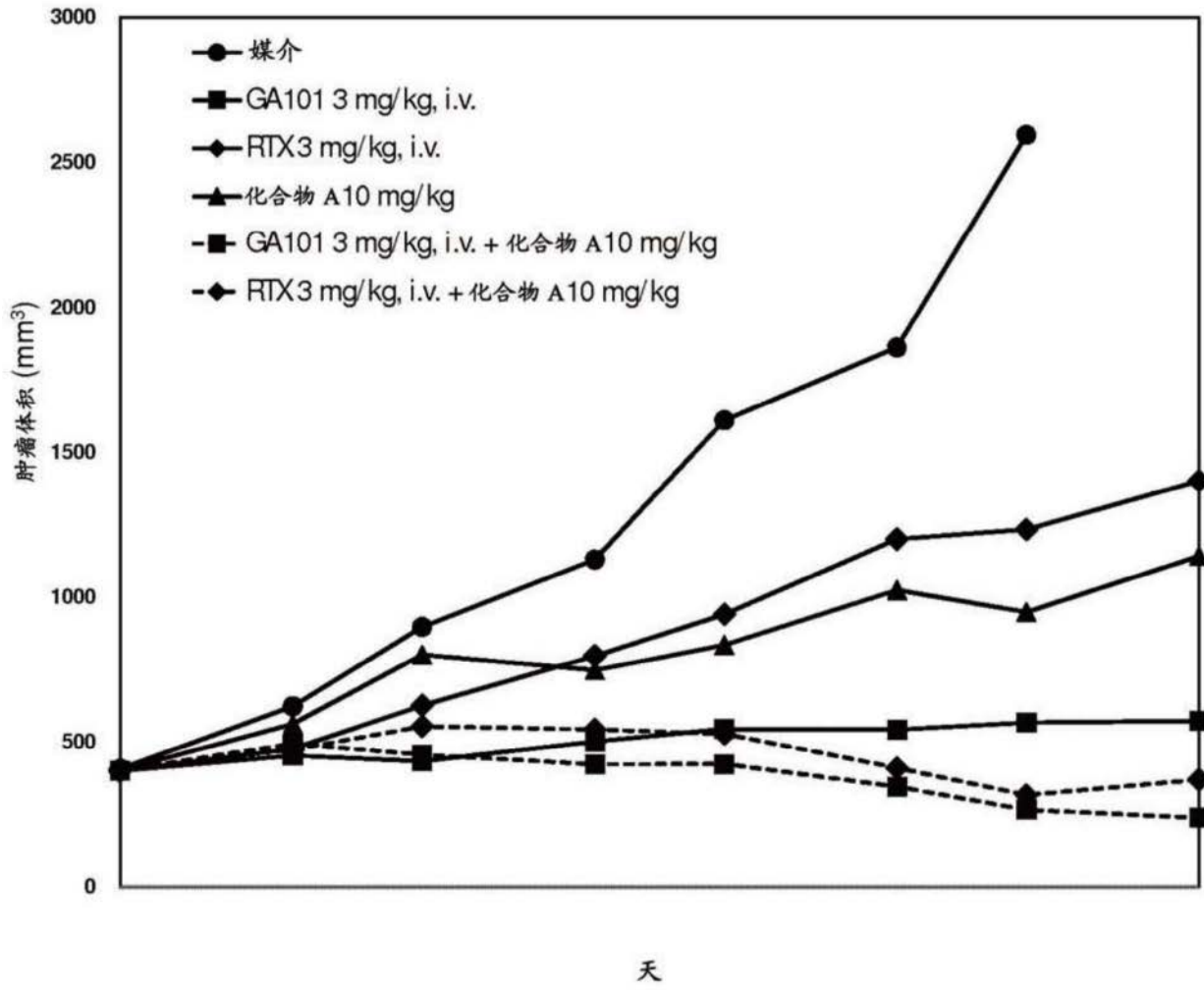


图2 (b)

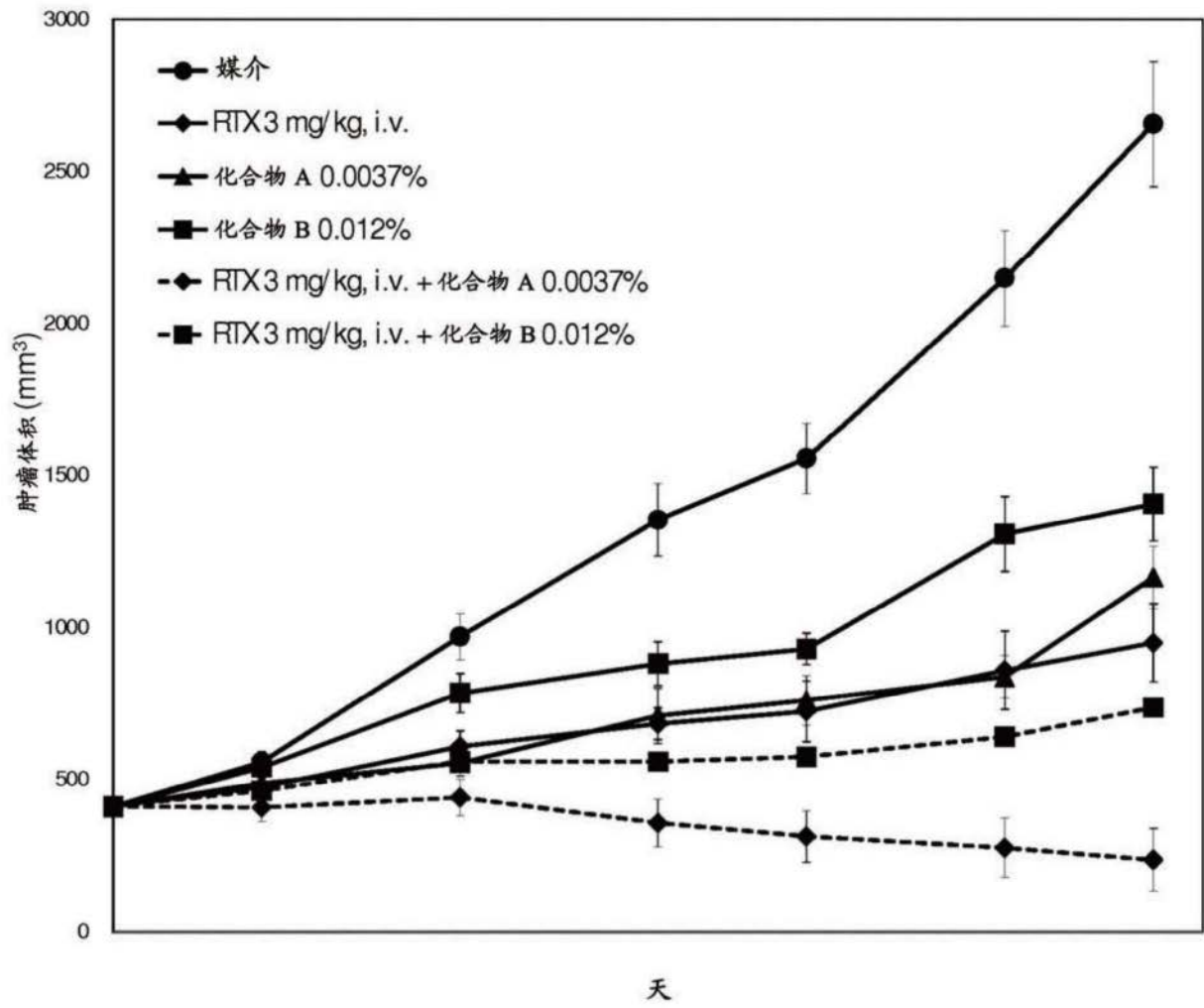


图3