



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106456809 B

(45)授权公告日 2020.02.07

(21)申请号 201480074580.7

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(22)申请日 2014.12.01

代理人 张文辉

(65)同一申请的已公布的文献号

(51)Int.CI.

申请公布号 CN 106456809 A

A61K 51/00(2006.01)

(续)

(43)申请公布日 2017.02.22

(56)对比文件

(30)优先权数据

CN 101965363 A, 2011.02.02,

61/911,186 2013.12.03 US

US 2013316366 A1, 2013.11.28,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

US 2009220416 A1, 2009.09.03,

2016.07.29

CN 101506235 A, 2009.08.12,

(86)PCT国际申请的申请数据

JP 2852705 B2, 1999.02.03,

PCT/US2014/067957 2014.12.01

US 2008254512 A1, 2008.10.16,

(87)PCT国际申请的公布数据

EP 2021027 A2, 2009.02.11,

W02015/084736 EN 2015.06.11

WO 2007131129 A2, 2007.11.15,

(83)生物保藏信息

US 2009130111 A1, 2009.05.21,

PTA-121719 2014.11.12

EP 1972640 A1, 2008.09.24,

(73)专利权人 韦尔特生物分子医药有限责任公司

WO 2011064758 A3, 2011.08.04,

(续)

地址 美国纽约州

审查员 丁海

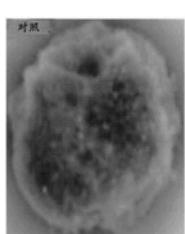
(72)发明人 S.韦尔特 D.科斯泰亚尔

权利要求书2页 说明书59页

R.S.韦尔特 V.雷蒙德 (续)

序列表8页 附图12页

(54)发明名称

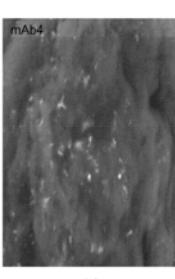
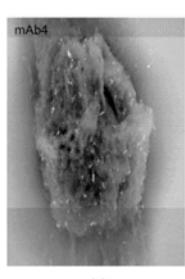


靶向B细胞受体复合物膜结合IgM的抗体及其用途



(57)摘要

本发明涉及靶向存在于B细胞淋巴瘤和白血病中的B细胞受体复合物的膜结合IgM(mIgM)的抗体及其用途。本发明的另一个方面是抗B细胞mIgM抗体在B细胞恶性肿瘤,包括B细胞淋巴瘤和白血病的治疗中的用途。



[接上页]

(83)生物保藏信息

PTA-121717 2014.11.12  
PTA-121718 2014.11.12  
PTA-121716 2014.11.12

(72)发明人 J.A.韦尔特

(51)Int.Cl.

*A61K 39/395*(2006.01)  
*A61K 39/00*(2006.01)  
*C07K 16/00*(2006.01)  
*C12P 21/08*(2006.01)

(56)对比文件

WO 2007041171 A2,2007.04.12,

Rachel S. Welt等.《Abstract 3641: Antibody targeting the IgM B-cell receptor (mBCR) induces growth inhibition and apoptosis》.《2014年AACR年会》.2014,

STEVEN M.等.《ANTI-IgM-MEDIATED B CELL SIGNALING Molecular Analysis of Ligand Binding Requisites for Human B Cell Clonal Expansion and Tolerance》.《J. Exp. MED》.1988,

DENIS, O;MACEDOSOARES, F;LATINNE, D;等..《IN-VIVO STUDY OF MIGM AND MIGD CROSS-LINKING ON MURINE B-CELLS》.《SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY》.1994,第39卷(第6期),625-632.

1. 单克隆抗体,其特异性结合B细胞受体复合物的膜结合IgM,其中所述单克隆抗体选自:由具有ATCC保藏号PTA-121716的来自融合119的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb4-2b的单克隆抗体、由具有ATCC保藏号PTA-121719的来自融合117的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb1-1的单克隆抗体、由具有ATCC保藏号PTA-121717的来自融合118的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb2-2b的单克隆抗体和由具有ATCC保藏号PTA-121718的来自融合118的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb3-2b的单克隆抗体。

2. 权利要求1的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体是由具有ATCC保藏PTA-121716的来自融合119的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb4-2b的单克隆抗体。

3. 权利要求1的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体是由具有ATCC保藏号PTA-121719的来自融合117的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb1-1的单克隆抗体。

4. 权利要求1的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体是由具有ATCC保藏PTA-121717的来自融合118的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb2-2b的单克隆抗体。

5. 权利要求1的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体是由具有ATCC保藏PTA-121718的来自融合118的杂交瘤细胞系及其克隆产生的命名为mAb3-2b的单克隆抗体。

6. 特异性结合B细胞受体复合物的膜结合IgM的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

- (a) 所述重链可变区包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列;和
- (b) 所述轻链可变区包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列。

7. 特异性结合B细胞受体复合物的膜结合IgM的单克隆抗体或其抗原结合片段,包含:

- (a) 重链可变区CDR1,由SEQ ID NO: 5的氨基酸序列组成;
- (b) 重链可变区CDR2,由SEQ ID NO: 6的氨基酸序列组成;
- (c) 重链可变区CDR3,由SEQ ID NO: 7的氨基酸序列组成;
- (d) 轻链可变区CDR1,由SEQ ID NO: 8的氨基酸序列组成;
- (e) 轻链可变区CDR2,由SEQ ID NO: 9的氨基酸序列组成;和
- (f) 轻链可变区CDR3,由SEQ ID NO: 10的氨基酸序列组成。

8. 权利要求7的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、单链Fv、单链抗体、二硫键连接的Fv、抗原结合片段、双抗体(diabody)、三抗体(triabody),或微型抗体(minibody)。

9. 特异性结合B细胞受体复合物的膜结合IgM的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

- (a) 所述重链可变区(VH)由SEQ ID NO: 1的核酸序列编码;和
- (b) 所述轻链可变区(VL)由SEQ ID NO: 3的核酸序列编码。

10. 重组核酸,包含SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 3的核酸序列。

11. 编码包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的重链可变区(VH)和编码包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的轻链可变区(VL)的重组核酸。

12. 重组多肽,其包含SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 4的氨基酸序列。

13. 杂交瘤细胞系,其选自:指定为ATCC PTA-121719的杂交瘤细胞系、指定为ATCC PTA-121717的杂交瘤细胞系、指定为ATCC PTA-121718的杂交瘤细胞系、指定为ATCC PTA-121716的杂交瘤细胞系。

14. 权利要求1、2、3、4、5、6、7、8或9的单克隆抗体,进一步包含标签。
15. 权利要求1、2、3、4、5、6、7、8或9的单克隆抗体,进一步包含细胞毒素、放射性同位素,或免疫毒素。
16. 组合物,包含权利要求1、2、3、4、5、6、7、8或9的单克隆抗体和以下至少一项:生理学可接受的载体,稀释剂,赋形剂或稳定剂。
17. 组合物,包含权利要求12的重组多肽和药学上可接受的载体或稀释剂。
18. 产生抗体的方法,包括在适合用于所述抗体的产生的条件下培养权利要求13的杂交瘤细胞系,和所述抗体的分离。
19. 表达载体,包含权利要求10或11的重组核酸。
20. 包含表达载体的宿主细胞,其中所述表达载体包含权利要求10或11的重组核酸。
21. 产生抗体或其抗原结合片段的方法,包括:
  - a. 在其中核酸序列表达的条件下在培养基中培养包含表达载体的宿主细胞,从而产生包含轻链和重链可变区的多肽,其中所述表达载体包含权利要求10或11的重组核酸;和
  - b. 从所述宿主细胞或培养基回收所述多肽。
22. 权利要求1、2、3、4、5、6、7、8或9的单克隆抗体在制备用于检测样品中的B细胞受体复合物的膜结合IgM的试剂盒中的用途。
23. 使用权利要求1、2、3、4、5、6、7、8或9的单克隆抗体纯化B细胞受体复合物的膜结合IgM的方法。
24. 试剂盒,包含容器中的预确定量的权利要求1、2、3、4、5、6、7、8或9的单克隆抗体,和单独容器中的缓冲液。
25. 试剂盒,包含容器中的预确定量的权利要求16的组合物,和单独容器中的缓冲液。

## 靶向B细胞受体复合物膜结合IgM的抗体及其用途

[0001] 政府权利

[0002] 本发明部分使用由美国国立卫生研究所给予的SBIR Grant No.1 R43 AI081332-01A1下的政府支持完成。政府对本发明具有某些权利。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已经以ASCII形式电子提交,并在此通过提述以其整体并入。所述ASCII拷贝,创建于2014年12月1日,命名为10199-003571-W00\_SL.txt,大小为7,207字节。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及靶向存在于B细胞淋巴瘤和白血病中的B细胞受体复合物的膜结合IgM (mIgM) 的抗体及其用途。

[0006] 发明背景

[0007] 现今B细胞恶性肿瘤包含淋巴瘤的主要亚型,每年具有超过100,000个新的病例。尽管这些疾病对普遍使用的一些药物和生物药剂的明显的敏感性,绝大多数的患者是不可治愈的。许多B细胞淋巴瘤和白血病的特征是基于化学疗法和/或生物学的反应是容易获得的,但治愈比较困难。B细胞淋巴瘤可以是非常侵袭性的疾病,其中许多患者对常规治疗不响应。很明显在使用化学疗法和/或生物学疗法的对数细胞杀灭后,赘生性细胞的残留克隆继续存在。治愈这些疾病的能力将取决于成功地根除所有的肿瘤细胞,特别是肿瘤干细胞。

[0008] 抗CD20抗体,例如利妥昔单抗 (rituximab)、奥法木单抗 (ofatumumab)、obinutuzumab和托西莫单抗 (tositumomab) 也已经用于治疗B细胞来源的恶性肿瘤,其作为单药剂,作为化学疗法的增效剂,作为维持疗法,和作为载体以递送放射性同位素/药物。这些抗体结合CD20,一种受限的B细胞分化抗原,仅由正常和恶性B细胞表达。因为CD20抗体在正常和恶性的B细胞上都表达,抗CD20抗体也可以引起正常B细胞部分的破坏,其长期结果未知(见,Smith MR,Oncogene 22:7359-7368 (2003) ;Jacobs SA,et al.,Expert Opin Bio Ther 7:1749-1762, (2007) )。

[0009] 与CD20相反,B细胞受体复合物 (BCRC) 是免疫系统的B细胞分支的中心分化信号传导元件,且该分子表达在所有的B细胞恶性肿瘤的表面上。BCRC包含细胞表面膜结合Ig (mIg) (例如mIgM,mIgG,mIgA,mIgE和mIgD) 并与共信号传导分子CD79 $\alpha\beta$ 紧密关联。先前的靶向B细胞恶性肿瘤中的BCRC分子的策略集中于对于每个单克隆肿瘤特异性的独特CDR序列(见,Miller RA,et al.,N Engl J Med 306:517, (1982) ;Levy R,et al.,J Natl Cancer Inst Monographs 10:61 (1990) ;Davis TA,et al.,Blood 92:1184-1190 (1998) )。然而,作为每种CDR的独特的结果,该方法必须对于每个患者生成特异性药物,其在临床中证明是不可行的。然而,靶向BCRC的这些早期临床研究确实证明了抗肿瘤活性。

[0010] B细胞受体 (BCR) 启动B细胞淋巴瘤-白血病中的驱动途径 (driver pathway)。一种策略已经靶向BCRC相关的细胞质分子,例如Syk酪氨酸激酶,BCRC信号传导通路的下游介导分子,以抑制下游途径酪氨酸激酶。纵向和横向膜BCRC相互作用两者使得该下游途径复杂

并冗余。由于Syk酪氨酸激酶途径不限于B细胞谱系组织,其抑制导致不想要的免疫效果,在乳腺组织中可能是促致癌效果而在非造血细胞中是其它毒性。BCRC的进一步下游是Bruton酪氨酸激酶(BTK)。Bruton酪氨酸激酶抑制已经作为BCR下游引人注目的靶标浮现,其现在是批准的策略,通过利用药物依鲁替尼(ibrutinib)。依鲁替尼(第一种表现出强力活性的BTK抑制物)的批准,提供了BCRC在驱动B细胞恶性肿瘤中的重要性的令人信服的证据。已经鉴定了BCRC下游的另外的分子靶标,例如PI3K delta和BCL2,且阻断这些靶标活性的药物也表现出具有显著的临床活性。

[0011] 由于BCR的序列与血清Ig的同源性,开发特异性抗膜Ig疗法存在障碍。认为体内特异性mIgM靶向是不可行的,因为药物或生物制品在到达细胞表面B细胞膜mIgM前,将结合血液中循环的IgM。先前在膜结合Ig中鉴定的独特的序列组(称为近端结构域(PD))在血清Ig中不表达。这些PD是Ig类特异性的,且对于mIgM构成13氨基酸肽。然而,对产生抗mIgM PD抗体的尝试不成功,这是由于PD肽的低免疫原性,其疏水性,以及由此导致的生成的抗体的低亲和力。相反,产生mIgE PD的努力导致了几种功能性不同的版本。见例如美国专利No.8,137,670;美国专利No.8,404,236;Poggianella M等, *J Immunol.* 177:3597-3605 (2006); Feichter S等, *J Immunol.* 5499-5505 (2008)。

[0012] 为了内化受体,抑制细胞生长,诱导凋亡或向这些mIgM B细胞递送药物、毒素或放射性同位素,而使正常的淋巴细胞(非mIgM表达的B细胞)和非淋巴组织免受毒性的伤害,对于对B细胞mIgM具有高特异性水平的抗体存在需要。此类抗体也可以用于B细胞淋巴瘤和B细胞白血病的诊断。这些独特的特异性抗体将首次允许通过免疫亲和方法学从血清IgM分离膜IgM的能力。

[0013] 附图简述

[0014] 图1A-1D. 细胞系CRL 1648扫描免疫-电子显微镜(Burkitt氏淋巴瘤)。图1A是示出了对照IgG2b同种型匹配的对照抗体加上二抗山羊抗小鼠Ig-金的显微照片。图1B和1C是示出了单克隆mAb4-2b(此后称为“mAb 4”)结合CRL 1648的2种不同细胞的显微照片,以与图1A中的对照抗体相同的放大倍率。图1D是示出了单克隆抗体mAb 4结合第三种CRL 1648细胞的显微照片,以比图1A的对照抗体更高的放大倍率。明亮的白点代表在细胞表面上与mAb 4单克隆抗体反应的免疫金颗粒-山羊抗小鼠Ig。

[0015] 图2A-2E. 细胞系CRL 1648扫描免疫-电子显微镜(Burkitt氏淋巴瘤)。图2A是示出了单克隆抗体mAb 4结合戊二醛固定化的CRL1648细胞的显微图片。图2B是示出了BCRC的微群(micro-clusters)的显微照片。图2C是示出了当CRL1648细胞与mAb 4在37°C孵育30分钟,然后固定化并使用山羊抗小鼠Ig染色时,由于BCRC的内化,在膜上缺乏可检测的单克隆抗体mAb 4的显微照片。图2D是示出了当CRL1648细胞与mAb 4在37°C孵育15分钟,然后固定化并使用山羊抗小鼠Ig染色时,因为内化不完全看到了残留的结合的单克隆抗体mAb 4的显微照片。图2E是示出了当CRL1648细胞与mAb 4在37°C孵育30分钟,然后固定化并使用山羊抗人Ig染色时,BCRC未检测到的显微照片。

[0016] 图3. 细胞系CRL 1596扫描免疫-电子显微镜(Burkitt氏淋巴瘤)。图3是其中通过金颗粒山羊抗小鼠Ig的反应性代表单克隆抗体mAb 4结合的显微照片,揭示了对CRL 1596的长突出以及细胞表面的特异性结合。

[0017] 图4A-4B. 细胞系CRL 2260扫描免疫-电子显微镜(弥散性混合B细胞淋巴瘤)。图4A

是提供了密集微群 (dense micro-cluster) 的高放大倍率视野的显微照片, 其示出了单克隆抗体mAb 4对CRL 2260的特异性结合, 通过金颗粒山羊抗小鼠Ig的反应性代表。图4B是提供了图4A相同视场的地形视野 (topographic view) 的显微照片, 其示出了单克隆抗体mAb 4对CRL 2260, 弥散性混合B细胞淋巴瘤的特异性结合, 通过金颗粒山羊抗小鼠Ig的反应性代表。

[0018] 图5A-5B. 细胞系CRL 3006扫描免疫-电子显微镜 (套细胞淋巴瘤)。图5A是提供了密集微群 (dense micro-cluster) 的高放大倍率视野的显微照片, 其示出了在CRL 3006的深裂 (deep cleft) 中单克隆抗体mAb 4的特异性结合, 通过金颗粒山羊抗小鼠Ig的反应性代表。图5B是提供了图5A相同视场的地形视野的显微照片, 其示出了单克隆抗体mAb 4对CRL 3006, 套细胞淋巴瘤的特异性结合, 通过金颗粒山羊抗小鼠Ig的反应性代表。

[0019] 图6A-6F. 图6A是比较单克隆抗体mAb 4相对于同种型匹配的对照抗体抑制表达mIgM的B细胞系CRL 1648 (CRL 1648 M $\kappa$ ) (Burkitt氏淋巴瘤) 生长的效果的图。图6B是比较单克隆抗体mAb2-2b (此后称为“mAb 2”) 相对于同种型匹配的对照抗体抑制表达mIgM的B细胞系CRL 1648 (CRL 1648 M $\kappa$ ) 生长的效果的图。图6C是比较单克隆抗体mAb 4相对于同种型匹配的对照抗体抑制表达mIgG的对照B细胞系CRL 2632 (CRL 2632 G $\kappa$ ) (弥散性大细胞淋巴瘤) 生长的效果的图。图6D是比较单克隆抗体mAb 4相对于同种型匹配的对照抗体抑制表达mIgM的B细胞系CRL 2958 (CRL 2958 M $\lambda$ ) (弥散性大细胞淋巴瘤) 生长的效果的图。图6E是比较单克隆抗体mAb 4相对于同种型匹配的对照抗体抑制表达mIgM的B细胞系CRL 1596 (CRL 1596 M $\lambda$ ) (Burkitt's淋巴瘤) 生长的效果的图。图6F是比较单克隆抗体mAb 4相对于同种型匹配的对照抗体抑制表达mIgM的B细胞系CRL 1432 (CRL 1432 M $\lambda$ ) (Burkitt氏淋巴瘤) 生长的效果的图。

[0020] 图7是示出了单克隆抗体mAb 4对表达mIgM的B细胞系CRL 1648生长的效果, 以20细胞/孔、100细胞/孔、250细胞/孔、500细胞/孔和1000细胞/孔的细胞稀释。

[0021] 发明简述

[0022] 本发明涉及分离的抗体, 其特异性靶向B细胞淋巴瘤和白血病中的B细胞受体复合物的膜结合IgM (mIgM)。本发明的抗体可以是重组抗体。本发明的抗体可以是单克隆的或来源于本发明的单克隆抗体的类型转换的单克隆 (class-switched monoclonal), 且单克隆抗体可以是小鼠抗体, 人抗体, 嵌合抗体, 或人源化的抗体。

[0023] 本发明中还包括来源于所述抗体的轻链和/或重链可变区的抗原结合区 (CDR)。本发明的抗体可以是重组抗体。本发明的抗体可以是单克隆的, 且单克隆抗体可以是人抗体, 嵌合抗体, 或人源化的抗体。

[0024] 本发明包括抗体, 其包含由SEQ ID NO:1的核酸序列编码的重链可变区 (VH); 和/或由SEQ ID NO:3的核酸序列编码的轻链可变区 (VL)。

[0025] 本发明包括抗体, 其包含具有SEQ ID NO:2描述的氨基酸序列的重链可变区 (VH); 和/或具有SEQ ID NO:4描述的氨基酸序列的轻链可变区 (VL)。

[0026] 本发明包括抗体, 其包含重链可变区 (VH), 所述重链可变区 (VH) 包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VH CDR1; 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH CDR2; 和/或具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR3; 和/或轻链可变区 (VL), 所述轻链可变区 (VL) 包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL CDR1; 具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR2; 和/或具

有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR3。

[0027] 本发明包括抗体,其包含重链可变区(VH),所述重链可变区(VH)包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的VH CDR1;具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的VH CDR2;和具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH CDR3;和/或轻链可变区(VL),所述轻链可变区(VL)包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL CDR1;具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的VL CDR2;和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的VL CDR3。

[0028] 本发明包括抗体,其中VH由在严格条件下与编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的核苷酸序列互补物杂交的核苷酸序列编码;和/或VL由在严格条件下与编码SEQ ID NO:4的氨基酸序列的核苷酸序列互补物杂交的核苷酸序列编码。

[0029] 本发明包括与SEQ ID NO:4中列出的具有至少95%序列同一性的VL序列,和与SEQ ID NO:2中列出的具有至少95%序列同一性的VH序列。

[0030] 本发明包括本发明的抗体的人抗原结合抗体片段,包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、双抗体、三抗体,或微型抗体(minibody)。

[0031] 本发明包括由来自融合117的杂交瘤细胞系(ATCC保藏号PTA-121719)及其克隆产生的命名为mAb1-1的单克隆抗体。

[0032] 本发明包括由来自融合118的杂交瘤细胞系(ATCC保藏号PTA-121717)及其克隆产生的命名为mAb2-2b的单克隆抗体。

[0033] 本发明包括由来自融合118的杂交瘤细胞系(ATCC保藏号PTA-121718)及其克隆产生的命名为mAb3-2b的单克隆抗体。

[0034] 本发明包括由来自融合119的杂交瘤细胞系(ATCC保藏号PTA-121716)及其克隆产生的命名为mAb4-2b的单克隆抗体。

[0035] 本发明涉及本发明的抗体或抗原结合片段,其降低B细胞受体活性。

[0036] 本发明包括本发明的抗体,进一步包含标签。

[0037] 本发明包括上文所述的靶向B细胞淋巴瘤和白血病中的B细胞受体复合物中的mIgM的抗体,进一步包含细胞毒素、放射性同位素或免疫毒素,及其在治疗B细胞淋巴瘤和白血病中的用途。

[0038] 本发明还包括抗体,其结合与抗体mAb4-2b相同的表位。

[0039] 本发明还包括抗体,其结合与抗体mAb1-1、mAb2-2b或mAb3-2b相同的表位,包括结合近膜结构域(membrane proximal domain)的所有异构形式的抗体。

[0040] 本发明包括组合物,包含本发明的抗体及生理学上可接受的载体,稀释剂,赋形剂或稳定剂的至少一种。

[0041] 本发明涉及本发明的抗体或抗原结合片段在制备用于治疗受试者中B细胞淋巴瘤和白血病的药物中的用途。

[0042] 本发明涉及本发明的抗体或抗原结合片段在制备用于降低B细胞受体复合物的活性的药物中的用途。

[0043] 本发明包括改善或治疗患者中B细胞淋巴瘤或白血病的方法,包括向所述患者施用有效量的抗体,所述抗体结合B细胞mIgM并诱导细胞生长抑制和/或凋亡。

[0044] 本发明包括组合物,包含根据本发明的抗体与生理学上可接受的载体,稀释剂,赋

形剂或稳定剂的组合。

[0045] 本发明包括在受试者中杀灭B细胞或抑制B细胞生长的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的根据本发明的抗体,从而在受试者中杀灭B细胞或抑制B细胞生长。

[0046] 本发明包括在受试者中杀灭B细胞或抑制B细胞生长的方法,包括向有此需要的受试者施用有效量的权利要求1的抗体与一种或多种抗B细胞抗体,细胞毒素,和/或放射性同位素的组合,从而在受试者中杀灭B细胞或抑制B细胞生长。

[0047] 本发明提供杂交瘤,其产生本发明的抗体。

[0048] 本发明包括用于产生命名为mAb1-1的单克隆抗体的命名为ATCC PTA-121719的杂交瘤细胞系。

[0049] 本发明包括用于产生命名为mAb2-2b的单克隆抗体的命名为ATCC PTA-121717的杂交瘤细胞系。

[0050] 本发明包括用于产生命名为mAb3-2b的单克隆抗体的命名为ATCC PTA-121718的杂交瘤细胞系。

[0051] 本发明包括用于产生命名为mAb4-2b的单克隆抗体的命名为ATCC PTA-121716的杂交瘤细胞系。

[0052] 本发明涉及复合物,包含B细胞膜IgM和本文所述的任一个抗体或抗原结合片段。

[0053] 本发明包括产生抗体的方法,包括在适合所述抗体的产生的条件下培养本发明的杂交瘤细胞系,和所述抗体的分离。

[0054] 本发明涉及分离的核酸,编码本发明的任意抗体或抗原结合片段。

[0055] 本发明包括编码本发明的抗体的分离的核酸分子,其中核苷酸序列包含SEQ ID NO:1和/或3。

[0056] 本发明包括编码本发明的抗体的分离的核酸分子,所述抗体包含SEQ ID NO:2或4的氨基酸序列。

[0057] 本发明包括分离的核酸分子,包含核酸序列,其编码SEQ ID NO:2中列出的重链可变区(VH)氨基酸序列,和/或SEQ ID NO:4中列出的轻链可变区(VL)氨基酸序列。

[0058] 本发明涉及表达载体,包含编码本发明的抗体或抗原结合片段的分离的核酸。在一个实施方案中,所述分离的核酸编码本文所述的任意VH或VL链。本发明也涉及包含本文所述的任意表达载体的宿主细胞。

[0059] 本发明涉及分离的多肽,包含本发明的VH或VL域或任意抗体或抗原结合片段。

[0060] 在某些实施方案中,本发明的这些核酸,表达载体或多肽在制造抗体的方法中有用。

[0061] 本发明包括用于检测样品中B细胞mIgM的方法,包括使所述样品接触本发明的抗体。

[0062] 本发明包括用于检测患者样品中B细胞mIgM的方法,包括确定微小残留病(minimal residual disease),所述方法包括使所述样品接触本发明的抗体。

[0063] 本发明包括用于检测样品中B细胞mIgM微群的方法,从而允许B细胞恶性肿瘤亚型分型(sub-typing)并提供样品中的患者特异性预后信息,所述方法包括使所述样品接触本发明的抗体。

[0064] 本发明包括使用本发明的抗体用于纯化B细胞受体的方法。

[0065] 本发明包括试剂盒,包括容器中的预确定量的本发明的抗体,和单独容器中的缓冲剂。

[0066] 本发明包括试剂盒,包括容器中的预确定量的上述本发明的组合物,以及单独容器中的缓冲剂。

[0067] **发明详述**

[0068] 本发明不限于本文所述的方法、方案、细胞系或试剂,因为它们可以变化。此外,本文使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的,而不意图限制本发明的范围。如本文和随附的权利要求中所使用的。除非上下文明确指出,单数形式“一个”、“一种”,和“这个”包括复数引用,例如,对“一种宿主细胞”的引用包括此类宿主细胞的复数。除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语和任意缩写具有与本发明的领域中的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然与本文所述的那些相似的任意方法和材料,或等同物可以用于实施本发明,本文描述了示例性的方法、装置和材料。

[0069] **缩写**

[0070] 在本发明的整个发明详述和实施例中将使用以下缩写:

[0071] ADCC抗体依赖性细胞的细胞毒性 (Antibody-dependent cellular cytotoxicity)

[0072] ATCC美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection)

[0073] BCL2或Bcl-2 B细胞淋巴瘤2

[0074] BCR B细胞受体

[0075] BCRC B细胞受体复合物

[0076] BTK 酪氨酸蛋白激酶BTK

[0077] CDC 补体依赖的细胞毒性

[0078] CDR 免疫球蛋白可变区中的互补性决定区,使用Kabat编号系统确定

[0079] CHO 中国仓鼠卵巢

[0080] CLL 慢性淋巴性白血病

[0081] ELISA 酶联免疫吸附测定

[0082] FM 荧光显微术

[0083] FR 抗体框架区:排除CDR区的免疫球蛋白可变区

[0084] HRP 辣根过氧化物酶

[0085] IFN 干扰素

[0086] IC50 导致50%抑制的浓度

[0087] Ig 免疫球蛋白

[0088] IgA 免疫球蛋白A

[0089] IgD 免疫球蛋白D

[0090] IgE 免疫球蛋白D

[0091] IgG 免疫球蛋白G

[0092] IgM 免疫球蛋白M

[0093] Kabat 一种免疫球蛋白比对和编号系统,由Elvin A.Kabat首创

((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)

- [0094] mAb, Mab, 或 MAb 单克隆抗体  
[0095] mAb 1或mAb1 单克隆抗体mAb1-1  
[0096] mAb 2或mAb2 单克隆抗体mAb2-2b  
[0097] mAb 3或mAb3 单克隆抗体mAb3-2b  
[0098] mAb 4或mAb4 单克隆抗体mAb4-2b  
[0099] mIg 细胞表面膜结合免疫球蛋白  
[0100] mIgA 细胞表面膜结合免疫球蛋白A  
[0101] mIgD 细胞表面膜结合免疫球蛋白D  
[0102] mIgE 细胞表面膜结合免疫球蛋白D  
[0103] mIgG 细胞表面膜结合免疫球蛋白G  
[0104] mIgM 细胞表面膜结合免疫球蛋白M  
[0105] PCR 聚合酶链式反应  
[0106] PD 近域  
[0107] PI3K 磷酸肌醇3-激酶  
[0108] PK 药代动力学  
[0109] SEM 扫描免疫电子显微术  
[0110] V区 IgG链的片段,其在不同抗体之间序列可变。其在轻链中延伸至Kabat残基109并在重链中延伸至113。

- [0111] VH 免疫球蛋白重链可变区  
[0112] VK 免疫球蛋白kappa轻链可变区  
[0113] VL 免疫球蛋白轻链可变区  
[0114] 定义

[0115] 本申请通篇使用的术语解释为本领域普通技术人员所理解的普通和典型含义。然而,申请人希望给予以下术语如下文所定义的具体定义。

[0116] 短语“实质上相同”关于抗体链多肽序列可以解释为抗体链表现出与参考多肽序列至少70%,或80%,或90%,或95%序列同一性。该术语关于核酸序列可以解释为核苷酸的序列表现出与参考核酸序列至少约85%,约90%,或95%,或97%序列同一性。

[0117] 术语“同一性”或“同源性”应当理解为在比对所述序列且如果必要的话引入缺口以实现整个序列的最大百分比同一性且不考虑任意保守取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列中与其比较的对应序列的残基相同的氨基酸残基百分比。N-或C-末端延伸或插入都不应当被解释为降低同一性或同源性。用于比对的方法和计算机程序在本领域中是公知的。可以使用序列分析软件测量序列同一性。

[0118] 术语“抗体”以最广的含义使用,包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子,且特别的涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,以及多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。抗体(Ab)和免疫球蛋白(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。尽管抗体表现出对特定靶标的结合特异性,免疫球蛋白包括抗体和缺乏靶标特异性的其它抗体样分子。天然抗体和免疫球蛋白通常约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(V)链组成。每

一条重链在一个末端具有可变域( $V_H$ )接着是若干个恒定域。每条轻链在一个末端具有可变域( $V_L$ )而在其另一个末端具有恒定域。此外,术语“抗体”(Ab)或“单克隆抗体”(mAb)意在包括完整的分子,以及能够特异性结合蛋白的抗体片段两者(例如,Fab和 $F(ab')_2$ 片段)。Fab和 $F(ab')_2$ 片段缺乏完整抗体的Fc片段,从动物或植物的循环中更快速的清除,并可以具有比完整抗体较少的非特异性组织结合(Wahl等,J Nucl Med 24:316 (1983))。

[0119] 如本文所使用的,“抗B细胞mIgM抗体”表示以这样的方式结合人B细胞mIgM的抗体,以便抑制具有该mIgM表位的B细胞的细胞生长,内化mIgM或诱导凋亡。

[0120] 术语“可变”在抗体可变域的语境中,指代抗体之间可变域的某些部分序列广泛不同,并用于每个特定抗体对其特定靶标的结合和特异性的事实。然而,可变性不是平均的分布在抗体的整个可变域。其集中在重链和轻链可变域两者中的称为互补决定区(CDR)的三个片段,也称为高变区(hypervariable region)。可变域的较高度保守的部分称为框架(FR)。如本领域中已知的,划定抗体的高变区的氨基酸位置/边界可以变化,取决于上下文和本领域已知的各种定义。可变域中的一些位置可以视作杂合高变位置,因为这些位置在一组标准下可以认为在高变区中,而在不同组的标准下可以认为在高变区之外。在延伸的高变区中可以发现一个或多个这些位置。本发明提供抗体,包含这些杂合高变位置中的修饰。天然重链和轻链的可变域每个包含四个FR区,很大程度上采用 $\beta$ -层构象,由三个CDR连接,其形成环连接,并在一些情况下形成 $\beta$ -层结构的一部分。每条链中的CDR由FR区保持在一起与来自另一条链的CDR靠近,有助于抗体的靶标结合位点的形成(见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987))。如本文所使用的,除非另有说明,免疫球蛋白氨基酸残基的编号根据Kabat等的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统完成。

[0121] 术语“抗体片段”指代全长抗体的一部分,通常是靶标结合或可变区。抗体片段的例子包括Fab、 $F(ab')_2$ 和Fv片段。短语抗体的“抗原结合片段”是具有与全长抗体共同的定性的生物学活性的化合物。例如,抗B细胞mIgM抗体的抗原结合片段是其能够以这样的方式结合B细胞mIgM受体,以便防止或实质上降低此类分子具有结合B细胞mIgG的能力。如本文所使用的,“功能性片段”关于抗体,指代Fv、 $F(ab)$ 和 $F(ab')_2$ 片段。“Fv”片段是含有完全的靶标识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由一个重链和一个轻链可变域以紧密的,非共价结合的二聚体( $V_H$ - $V_L$ 二聚体)组成。在这样的构象中,每个可变域的三个CDR相互作用以定义 $V_H$ - $V_L$ 二聚体表面上的靶标结合位点。共同地,六个CDR赋予抗体靶标结合特异性。然而,即便是单个可变域(或Fv的一半,仅包含对靶标特异性的三个CDR)具有识别和结合靶标的能力,尽管以比完整结合位点低的亲和力。“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 $V_H$ 和 $V_L$ 域,其中这些域存在于单个多肽链中。一般来说,Fv多肽进一步包含 $V_H$ 和 $V_L$ 域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成所需的结构用于靶向结合。

[0122] Fab片段含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。 $Fab'$ 片段区别于Fab片段在重链CH1域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。 $F(ab')$ 片段通过切割 $F(ab')_2$ 胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处的二硫键产生。抗体片段的其它化学偶联对于本领域的普通技术人员是已知的。

[0123] 术语“单克隆抗体”(mAb)如本文所使用的指代从实质上同质的抗体群体得到的抗体,即,群体中包含的个体抗体除了可能的天然发生的突变以及含有相同CDR序列的天然存

在的类型转换变体以外相同,所述突变可以少量存在。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个靶标位点。此外,与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物不同,每个单克隆抗体针对靶标上的单个决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体是有利的,因为它们可以通过杂交瘤培养物合成,不被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示抗体是从实质上同质的抗体群体获得的特性,而不解释为要求通过任何特定的方法产生抗体。例如,用于本发明的单克隆抗体可以使用公知的技术从噬菌体抗体库分离。根据本发明使用的亲本单克隆抗体可以通过首先由Kohler等,Nature 256:495(1975)描述的杂交瘤方法制备,或可以通过重组方法制备。尽管通常在与融合多发性骨髓瘤配对物(partner)(例如,SP2/0)相同遗传背景的小鼠中产生单克隆抗体,先前Yin等,J Immunol Methods 144:165-173(1991)已经报道了为了利用不同小鼠品系中遗传增强的免疫反应性和亲和力,使用不相同的配对物。

[0124] 术语“嵌合”抗体如本文所使用的指代具有来源于非人免疫球蛋白例如大鼠或小鼠抗体的可变序列的抗体,以及人免疫球蛋白恒定区,通常选自人免疫球蛋白模板。最近,已经开发了包含单克隆抗体的结合可变序列和细胞受体的嵌合结构。嵌合也应当指代具有人源化的可变区序列和小鼠恒定区序列的抗体,以允许对于鼠试剂优化的常规免疫组织化学,流式细胞术或其它测定。

[0125] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合的免疫球蛋白,免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其它靶标结合子序列),其含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列。一般来说,人源化的抗体将包含实质上全部的至少一个且通常为两个可变域,其中全部或基本上全部的CDR区对应非人免疫球蛋白的那些,且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化的抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是选择的人免疫球蛋白模板的恒定区。

[0126] 如本文所使用的,“人抗体”包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体并包括从人免疫球蛋白文库或从一种或多种人免疫球蛋白转基因且其不表达内源性免疫球蛋白的动物分离的抗体,如下文所述,例如,由Kucherlapati等描述于美国专利No.5,939,598中。

[0127] 术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”包括后代。还应当理解由于有意或无意突变,所有后代的DNA含量可能不是精确地相同。还包括变体后代,其具有相同的功能或生物学特定,如在最初转化的细胞中筛选的。本发明中使用的“宿主细胞”通常是原核或真核宿主。

[0128] 使用DNA“转化”细胞生物体表示将DNA引入生物体中使得DNA可复制,不论是作为染色体外元件或通过染色体整合。使用DNA“转染”细胞生物指代由细胞或生物体吸收DNA,例如,表达载体,不论任意编码序列实际上是否表达。术语“转染的宿主细胞”和“转化的”指代其中引入了DNA的细胞。该细胞称为“宿主细胞”且其可以是原核的或真核的。典型的原核宿主细胞包括大肠杆菌的多种菌株。典型的真核宿主细胞是哺乳动物,例如中国仓鼠卵巢或人来源的细胞。引入的DNA序列可以来自与宿主细胞相同的物种,或与宿主细胞不同的物种,或其可以是杂交DNA序列,含有一些外源和一些同源性DNA。

[0129] 术语“载体”表示含有DNA序列的DNA构建体,所述DNA序列可操作地连接到适合的控制序列,使得能够实现DNA在适合的宿主中的表达。此类控制序列包括启动子以实现转录,任选地操纵子序列以控制此类转录,编码适合的mRNA核糖体结合位点的序列,以及控制

转录和翻译的终止的序列。所述载体可以是质粒，噬菌体颗粒，或简单的潜在基因组插入物。一旦转化到适合的宿主中，所述载体可以复制并独立于宿主的基因组发挥功能，或可以在一些情况下，整合到基因组自身中。在本说明书中，“质粒”和“载体”有时候可替换使用，因为质粒是载体最普遍使用的形式。然而，本发明意图包括此类其它形式的载体，其发挥等同的功能，且其是或称为在本领域中公知的。

[0130] “哺乳动物”用于处理的目的指代任意分类为哺乳动物的任意动物，包括人类，家畜和农场动物，非人灵长类，以及动物园、运动或宠物动物，例如狗、马、猫、牛等。

[0131] 词语“标签”当用于本文时指代可检测化合物或组合物，其可以直接或间接缀合至分子或蛋白，例如抗体。所述标签可以自身是可检测的（例如，放射性同位素标签或荧光标签）或，在酶标签的情况下，可以催化底物化合物或组合物的化学变化，其是可检测的。

[0132] 如本文所使用的，“固相”表示非水性基质，本发明的抗体可以粘附至它。本文包含的固相的例子包括部分或全部由玻璃（例如可控孔径玻璃），多糖（例如，琼脂糖），聚丙烯酰胺，聚苯乙烯，聚乙烯醇和硅酮形成的那些。在某些实施方案中，根据上下文，所述固相可以包含测定板的壁；在其它中其是纯化柱（例如，亲和色谱柱）。

[0133] 术语“活化”、“刺激”和“处理”，当其应用到细胞或受体时，除非上下文有明确说明，可以具有相同的含义，例如，使用配体活化，刺激，或处理细胞或受体。“配体”包含天然和合成的配体，例如，细胞因子，细胞因子变体，类似物，突变蛋白（mutants），和来源于抗体的结合化合物。“配体”也包含小分子，例如，细胞因子的肽模拟物或抗体的肽模拟物。“活化”可以指代细胞活化，如由内部机制以及外部或环境因子调节的。“应答/反应”例如，细胞、组织，器官或生物体的，包含生物学或生理学行为的变化，例如浓度、密度、粘附或生物室中的迁移，基因表达的速率，或分化的状态，其中所述变化与活化、刺激或处理相关，或与内部机制例如基因编程相关。

[0134] 分子的“活性”可以描述或指代分子与配体或与受体的结合，指代催化活性；指代刺激基因表达或细胞信号转导、分化，或成熟的能力；指代抗原性活性，指代对其它分子活性的调节，等等。分子的“活性”还可以指代调节或维持细胞-细胞相互作用例如粘附的活性，或维持细胞结构的活性，例如细胞膜或细胞骨架。“活性”也可以表示特异性活性，例如，免疫活性/mg蛋白，在生物室中的浓度，等等。“活性”可以指代先天或获得性免疫系统组分的调节。

[0135] 术语“增殖活性”包含促进例如正常细胞分裂，以及癌症，肿瘤，发育异常、细胞转化、转移和血管生成，对于其必要，或与其特异性相关的活性。

[0136] 术语“施用”和“处理”当其应用于动物，人，实验受试者，细胞，组织，器官或生物流体时，指代外源性药物、治疗、诊断试剂，或组合物与所述动物，人，受试者，细胞，组织，器官或生物流体的接触。“施用”和“处理”可以指代，例如治疗，药代动力学，诊断，研究和实验方法。细胞的处理包含试剂与所述细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与所述细胞有接触。“施用”和“处理”也表示对例如细胞的体外和离体处理，由试剂、诊断、结合化合物，或另一种细胞进行。术语“受试者”包括任意生物体，优选动物，更优选哺乳动物（例如，大鼠、小鼠、狗、猫、兔）和最优选人。

[0137] 术语“治疗”表示内部地或外部地施用治疗剂，如含有本发明的抗体或抗原结合片段的组合物，至具有一种或多种疾病症状，或怀疑患有疾病或处于罹患疾病的风险升高的

受试者或患者,对于所述疾病所述试剂具有治疗活性。典型地,所述试剂以有效减轻治疗的受试者或群体中一种或多种疾病症状的量施用,其中通过诱导此类症状的消退或抑制进展达到任意临床可测量的程度。有效地减轻任意具体疾病症状的治疗剂的量(也称为“治疗有效量”)可以根据因素变化,例如疾病状态,年龄,患者的重量,以及药物在所述受试者中引起期望的反应的能力。可以通过由内科医生或其它有技能的医疗保健提供商通常使用的任意临床测量评估疾病症状是否已经减轻,以评估该症状的严重性或进展状态。尽管本发明的实施方案(例如,治疗方法或制造品)可能不能在每一个受试者中有效减轻靶标疾病症状,其应当在统计学显著数量的受试者中减轻所述靶标疾病症状,如通过本领域已知的任意统计学检验所确定的,例如Student's t检验,chi<sup>2</sup>检验,根据Mann and Whitney的U检验,Kruskal-Wallis检验(H检验),Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon符号秩检验。

[0138] 术语“治疗”当其应用到人,兽医,或研究受试者,指代对研究和诊断应用的治疗处理,预防性或防止性措施。“治疗”当其应用到人,兽医,或研究受试者,或细胞,组织,或器官时,包含激动剂或拮抗剂与人或动物受试者,细胞,组织,生理区室,或生理流体的接触。“细胞的治疗”还包含以下情况,其中所述激动剂或拮抗剂接触受体,例如在流动相或胶体相中,但也包括以下情况,其中所述激动剂或拮抗剂不与所述细胞或所述受体接触。

[0139] 细胞系

[0140] 在本发明的发明详述和实施例通篇指代了以下十一种人B细胞谱系细胞系和一种鼠细胞系,如下:

- [0141] 1.CRL 1432-Namalwa mIgM-L Burkitt氏
- [0142] 2.CRL 1596-Ramos sIgM mIgM-L Burkitt氏
- [0143] 3.CRL 1647-ST 486sIgM mIgM-K Burkitt氏
- [0144] 4.CRL 1648-CA 46mIgM-K Burkitt氏
- [0145] 5.CRL 1649-MC 116mIgM-L未分化的淋巴瘤
- [0146] 6.CRL 2260-HT mIgM-K弥散性混合B细胞淋巴瘤
- [0147] 7.CRL 2289-DB mIgG-L大B细胞淋巴瘤
- [0148] 8.CRL 2568-H2.8鼠IgG1-K骨髓瘤
- [0149] 9.CRL 2632-弥散性大细胞淋巴瘤IgGk
- [0150] 10.CRL 2958-SU-DHL-5弥散性大细胞淋巴瘤mIgM
- [0151] 11.CRL 3006-JeKo-1-L套细胞淋巴瘤mIgM
- [0152] 12.SK007-淋巴瘤IgE

[0153] 这些细胞系从美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110获得,并通过RT-PCR测试PD的表达。通过上清和经洗涤的0.01%NP-40细胞裂解物的ELISA确认了细胞质和分泌的IgM组分。

[0154] 抗体生成

[0155] 可以通过本领域已知的任意适合方法生成本发明的抗体。本发明的抗体可以包含多克隆抗体。制备多克隆抗体的方法是本领域技术人员已知的(Harlow等, *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)),其通过提及以其整体并入本文)。

[0156] 例如,如上文所述的免疫原可以施用到各种宿主动物,包括但不限于,兔,小鼠,大

鼠等,以诱导含有对所述抗原特异性的多克隆抗体的血清的产生。用于免疫的特定小鼠品系的选择对于引起较差反应的免疫原可以是关键的。可以通过预筛选和选择品系克服小鼠品系的耐受,例如测试具有自身免疫缺陷或更野生型的免疫反应性的那些。免疫原的施用可以需要免疫试剂和(如果需要)佐剂的一次或多次注射。取决于宿主物种,可以使用各种佐剂以增加免疫应答,包括但不限于,弗氏佐剂(完全的和不完全的),矿物胶例如氢氧化铝,表面活性物质例如溶血卵磷脂,多元醇,聚阴离子,肽,油乳剂,匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanins),二硝基苯酚,多抗原肽,以及潜在有用的人佐剂例如BCG(卡介苗)和短小棒状杆菌(Corynebacterium parvum)。可以采用的佐剂的另外的例子包括具有结合的免疫原肽的匙孔血蓝蛋白,具有结合的免疫原肽的多抗原多肽,和MPL-TDM佐剂(单磷酰脂A,合成海藻糖二白喉菌酸酯(dicorynomycolate))。免疫方案是本领域中公知的,并可以通过引起选择的动物宿主中的免疫应答的任意方法实施。佐剂也是本领域公知的。

[0157] 典型的,通过多种皮下或腹膜内注射,或肌肉内或通过IV将免疫原(有或没有佐剂)注射到哺乳动物中。所述免疫原包括靶标肽,对于膜IgM:EGEVSADEEGFEN (SEQ ID NO: 11) 或对于膜IgG:ELQLEESCAEAQDGELDG (SEQ ID NO:12),纯化的B细胞mIgM,融合蛋白,或其变体。对于膜IgM的靶标肽EGEVSADEEGFEN (SEQ ID NO:11)。具有与人IgM肽hCG2038942(登录号EAW81938.1) 100%的同源性,其具有序列EGEVSEDEEGFE (SEQ ID NO:13)。取决于所述肽的性质(即,疏水性百分比,亲水性百分比,稳定性,净电荷,等电点,多种异构形式等),其可以有用于将所述免疫原缀合到已知在被免疫的哺乳动物中为免疫原性的蛋白。此类缀合包括化学缀合,其通过对所述免疫原和待缀合的所述免疫原性蛋白两者的化学官能团的活性衍生,使得形成共价键,或者通过基于融合-蛋白的方法,或本领域技术人员已知的其它方法。此类免疫原性蛋白的例子包括但不限于,匙孔血蓝蛋白,多抗原肽,卵清蛋白,血清白蛋白,牛甲状腺球蛋白,大豆胰蛋白酶抑制剂,以及混杂T辅助肽。可以使用各种佐剂以增加如上文所述的免疫应答。

[0158] 本发明的抗体可以包含单克隆抗体。单克隆抗体是识别单个抗原性位点的抗体。它们统一的特异性使得单克隆抗体比多克隆抗体有用得多,所述多克隆抗体通常或含有识别各种不同抗原性位点的抗体。可以使用杂交瘤技术制备单克隆抗体,例如由Kohler等, Nature 256:495 (1975) ;U.S.Pat.No.4,376,110;Harlow等, Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed. (1988) 和Hammerling等, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas,Elsevier (1981) 描述的那些,重组DNA方法,或技术人员已知的其它方法。可以采用用于产生单克隆抗体的方法的其它例子包括但不限于,人B细胞杂交瘤技术(Kosbor等, Immunology Today 4:72 (1983) ;Cole, et al., Proc Natl Sci USA 80:2026 (1983) ),和EBV-杂交瘤技术(Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,pp.77-96.Alan R.Liss (1985) )。此类抗体可以是任意免疫球蛋白类,包括IgG、IgM、IgE、和IgA、IgD及其任意亚类。可以体外或体内培养产生本发明的mAb的杂交瘤。

[0159] 在杂交瘤模型中,宿主例如小鼠,人源化的小鼠,具有人免疫系统的小鼠,仓鼠,兔,骆驼或其它任意适合的宿主动物,经免疫以引起产生或能够产生以下抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白。在本发明中,不能使用利用人Ig遗传库(genetic repertoire)的小鼠,因为初始B细胞自身将是所期望的抗体的靶标,并将导致所述B细胞的

凋亡。或者,淋巴细胞可以体外免疫。然后使用适合的融合试剂例如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,pp.59-103 (1986))。

[0160] 一般来说,在制造产生抗体的杂交瘤中,如果人源的细胞是合意的,使用外周血淋巴细胞("PBLs"),或如果非人哺乳动物来源是合意的,使用脾细胞或淋巴结细胞。然后使用适合的融合试剂例如聚乙二醇,将所述淋巴细胞与永生化的细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,pp.59-103 (1986))。永生化的细胞系通常是转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿类,牛或人源的骨髓瘤细胞。典型的,采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞。可以在适合的培养基中培养所述杂交瘤细胞,所述培养基优选含有抑制非融合的,永生化的细胞的生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT或HPRT),用于杂交瘤的所述培养基通常将包括次黄嘌呤,氨基喋呤和胸昔("HAT培养基"),阻止HGPRT缺陷细胞的生长的物质。

[0161] 优选的永生化的细胞系是融合效率高的,支持由选择的产生抗体的细胞稳定的高水平抗体产生,并对培养基例如FIAT培养基敏感的。在这些骨髓瘤细胞中为鼠骨髓瘤系,例如来源于可以从ATCC,10801 University Boulevard,Manassas,VA,USA获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤和SP2/0或X63-Ag8-653的那些。也已经描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系用于人单克隆抗体的产生(Kozbor,J Immunol 133:3001 (1984);Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,Marcel Dekker, Inc. pp.51-63 (1987))。也可以使用小鼠骨髓瘤细胞系NS0(European Collection of Cell Cultures,Salisbury,Wilshire,UK)。

[0162] 对于骨髓瘤细胞在其中生长的培养基测定针对肽的单克隆抗体的产生,例如,对于IgM,EGEVSADEEGFEN(SEQ ID NO:11)而对于IgG,ELQLEESCAEAQDGELDG(SEQ ID NO:12)。可以通过免疫沉淀或通过体外结合测定确定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性,例如放射免疫测定(RIA),免疫印迹,Western或酶联免疫吸附测定(ELISA)。此类技术是本领域已知的并在技术人员的技术范围内。可以通过,例如Scatchard分析确定单克隆抗体的结合亲和力(Munson等,Anal Biochem 107:220 (1980))。

[0163] 在鉴定了产生所需特异性,亲和力,和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限稀释法(limiting dilution procedure)亚克隆该克隆并通过标准方法培养(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,pp.59-103 (1986))。用于这一方法的适合的培养基包括,例如Dulbecco's Modified Eagle's Medium(D-MEM)或RPMI-1640培养基。另外,所述杂交瘤细胞可以作为腹水瘤在动物中体内生长。

[0164] 通过常规免疫球蛋白纯化方法如,例如蛋白A-琼脂糖,羟磷灰石色谱法,凝胶排阻色谱法,凝胶电泳,透析,或亲和层析,从所述培养基、腹水或血清适合地分离由所述亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0165] 本领域中存在用于产生单克隆抗体的各种方法,因此本发明不限于其仅在杂交瘤中的产生。例如,可以通过重组DNA方法制成单克隆抗体,例如描述于美国专利No.4,816,567中的那些。所述杂交瘤细胞作为此类DNA的来源。一旦分离,可以将DNA放置于表达载体中,其接着转染到宿主细胞中例如大肠杆菌细胞,NS0细胞,猿COS细胞,中国仓鼠卵巢(CHO)

细胞,或骨髓瘤细胞,其原本不产生免疫球蛋白,以获得在所述重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。还可以通过例如将人重链和轻链恒定域的编码序列取代代替同源的鼠序列(美国专利No.4,816,567;Morrison等,Proc Natl Acad Sci USA 81:6851(1984)),或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分的编码序列共价连接到免疫球蛋白编码序列,来修饰该DNA。此类非免疫球蛋白多肽可以取代本发明的抗体的恒定域,或可以取代本发明的抗体的一个抗原结合位点的可变域以创建嵌合的二价抗体。

[0166] 结合B细胞受体复合物(BCRC)的膜结合IgM(mIgM)的本发明的抗体或其抗原结合片段可以包括本文公开的抗体的一个,两个,三个,四个,五个,或六个互补决定区(CDR)。所述一个,两个,三个,四个,五个,或六个CDR可以独立地选自本发明单个描述的抗体(例如,表1,表2)。在某些实施方案中,一个,两个或三个CDR选自描述的抗体的VL CDR(例如,表1;SEQ ID N0s:8-10)和/或一个,两个或三个CDR选自本发明描述的VH CDR(例如,表2;SEQ ID N0s:5-7)。

[0167] 结合BCRC的mIgM的本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体轻链可变(VL)域,包含抗体mAb4-2b的CDR-L1,CDR-L2或CDR-L3的一个或多个。

[0168] 结合BCRC的mIgM的本发明的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体重链可变(VH)域,包含抗体mAb4-2b的CDR-H1,CDR-H2或CDR-H3的一个或多个。

[0169] 在进一步的实施方案中,所述结合BCRC的mIgM的分离的抗体或其抗原结合片段包含抗体轻链可变(VL)域,其包含抗体mAb4-2b的CDR-L1,CDR-L2或CDR-L3的一个或多个,和抗体重链可变(VH)域,其包含抗体mAb4-2b的CDR-H1,CDR-H2或CDR-H3的一个或多个。本发明的mAb4-2b抗体的轻链和重链CDR的序列分别提供与表1和表2。

[0170] 表1

[0171] 轻链CDR

[0172]

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
mAb4-2b	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10

[0173] 表2

[0174] 重链CDR

[0175]

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
mAb4-2b	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:7

[0176] 本发明还提供包含本发明的抗体的VL域的分离的多肽(例如,SEQ ID NO:4)和包含本发明的抗体的VH域的分离的多肽(例如,SEQ ID NO:2)。在其它实施方案中,本发明提供抗体或其抗原结合片段,其特异性结合BCRC的mIgM并具有与SEQ ID N0s:2和4至少50%,75%,80%,85%,90%,95%,98%或99%序列同一性的VL域和VH域,同时仍然表现出期望的结合和功能特性。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗原结合片段包含VL和VH域(具有或没有信号序列),具有多达0,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或更多的保守或非保守氨基酸取代,同时仍然表现出期望的结合和功能特性。

[0177] “保守修饰变体”或“保守取代”指代蛋白中的氨基酸取代为具有相似特性的其它氨基酸(例如,电荷,侧链大小,疏水性/亲水性,骨架构象和刚性等),使得该变化可以频繁

的进行而不改变所述蛋白的生物学活性。本领域的技术人员认识到，一般来说，肽的非必需区中的单个氨基酸取代不实质上改变生物学活性（见，例如Watson等，(1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)）。另外，结构上或功能上相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物学活性。本发明的抗体或抗原结合片段的各种实施方案包含具有本文公开的序列的多肽链，例如SEQ ID NOS:2,4,5,6,7,8,9,和10,或包含多达1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,15,20或更多个保守氨基酸取代的多肽链。表3中列出了示例性的保守取代。

[0178] 表3

[0179] 示例性的保守氨基酸取代

初始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

[0180]

[0181] 本发明还涵盖本发明的抗体的功能保守的变体。“功能保守的变体”如本文所使用

的,指代抗体或片段,其中改变了一个或多个氨基酸残基而没有改变期望的特性,例如抗原亲和力和/或特异性。此类变体包括但不限于,使用具有相似特性的氨基酸置换氨基酸,例如表3的保守氨基酸取代。

[0182] 在另一个实施方案中,本发明提供抗体或其抗原结合片段,其特异性结合人BCRC的mIgM并具有与本文所述的一个或多个VL域和VH域至少95%,90%,85%,80%,75%或50%序列同源性的VL域或VH域,并表现出对人BCRC的mIgM的特异性结合。在另一个实施方案中,本发明的结合抗体或其抗原结合片段包含具有多达1,2,3,4,或5个或更多氨基酸取代的VL域和VH域(具有或没有信号序列),并表现出对人BCRC的mIgM的特异性结合。

[0183] 所述抗体可以是单价抗体。用于制备单价抗体的方法是本领域公知的。例如,一种方法涉及免疫球蛋白轻链和修饰的重链的重组表达。所述重链通常在Fc区中的任意位点截短,以防止重链交联。或者,相关半胱氨酸残基使用另一种氨基酸残基取代或缺失以防止交联。

[0184] 可以通过已知的技术生成识别特定表位的抗体片段。传统上,通过完整抗体的蛋白水解消化衍生这些片段(见例如,Morimoto等,J Biochem Biophys Methods 24:107(1992);Brennan等,Science 229:81(1985))。例如,可以通过免疫球蛋白分子的蛋白水解剪切产生本发明的Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段,使用酶例如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')<sub>2</sub>片段)。F(ab')<sub>2</sub>片段含有可变区,轻链恒定区和重链的CH1域。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可以从抗体噬菌体文库分离所述抗体片段。或者,可以从大肠杆菌直接回收F(ab')<sub>2</sub>-SH片段并化学偶联以形成F(ab'),片段(Carter等,Bio/Technology 10:163(1992))。根据另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物直接分离F(ab')<sub>2</sub>片段。用于产生抗体片段的其它技术对于技术实践者将是显而易见的。在其它实施方案中,选择的抗体是单链Fv片段(Fv)(PCT公开文本No.WO 93/16185)。

[0185] 对于一些用途,包括抗体在人中的体内用途和体外检测测定,可以优选使用嵌合的,人源化的,或人抗体。嵌合抗体是其中抗体的不同部分来源于不同动物物种的分子,例如具有来源于鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。用于产生嵌合抗体的方法是本领域已知的,见例如Morrison,Science 229:1202(1985);Oi等,BioTechniques 4:214(1986);Gillies等,J Immunol Methods 125:191(1989);美国专利Nos.5,807,715;4,816,567;和4,816,397,其通过提述以其整体并入本文。

[0186] 人源化抗体经设计比动物来源的单克隆抗体具有与人免疫球蛋白更高的同源性。人源化是用于制造嵌合抗体的技术,其中实质上少于完整人可变域已经被来自非人物种的对应序列取代。人源化的抗体是在非人物种中生成的抗体,其结合期望的抗原,具有来自所述非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架(FR)区。通常,人框架区中的框架残基将被来自CDR供体抗体的对应残基取代,以改变,优选改进抗原结合。这些框架取代通过本领域公知的方法鉴定,例如,通过CDR和框架残基的相互作用的建模以鉴定对于抗原结合重要的框架残基和序列比较以鉴定具体位置处的不常见的框架残基。见例如美国专利No.5,585,089;Riechmann等,Nature 332:323(1988),其通过提述以其整体并入本文。可以使用本领域已知的各种技术人源化抗体,包括,例如CDR嫁接(欧洲申请No.EP239,400;PCT公布No.WO 91/09967;美国专利Nos.5,225,539;5,530,101;和5,585,089),饰面(veneering)或重铺(resurfacing)(欧洲申请No.EP592,106;欧洲申请No.EP

519,596; Padlan, Molecular Immunology 28:489 (1991); Studnicka等, Protein Engineering 7:805 (1994); Roguska等, Proc Natl Acad Sci USA 91:969 (1994), 和链转换 (chain shuffling) (美国专利5,565,332)。

[0187] 一般来说,人源化的抗体具有引入其中的来自非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“导入 (import)”残基,其通常从“导入”可变域获取。可以基本上遵循Winter和同事的方法进行人源化 (Jones, 等, Nature 321:522 (1986); Riechmann, et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen, 等, Science 239:1534 (1988)), 通过将非人CDR或CDR序列取代为人抗体的对应序列。因此,此类“人源化的”抗体是嵌合抗体 (美国专利No.4,816,567), 其中实质上少于完整人抗体可变区已经被来自非人物种的对应序列取代。在实践中,人源化的抗体通常是人抗体,其中一些CDR残基和一些可能的FR残基被来自啮齿类抗体中的类似位点取代。

[0188] 更为重要的是,人源化的抗体保留了对抗原的较高亲和力和其它的有利的生物学特性。为了实现该目标,根据优选的方法,通过对亲本序列的分析过程制备人源化的抗体和各种概念性的人源化产品,使用亲本和人源化序列的三维模型。对于本领域的技术人员,三维免疫球蛋白模型是常用的且熟悉的。阐明并显示选择的候选免疫球蛋白序列的很可能的三维构象结构的计算机程序是可得到的。对这些显示的检查允许对特定残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的相似角色的分析,即对残基影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的分析。以这种方式,可以从受体和导入序列选择FR残基并组合使得最大化期望的抗体特性,例如对于靶标抗原增加的亲和力,尽管直接且最显著影响抗原结合的是CDR残基。

[0189] 对人可变域的选择(轻链和重链两者),以用于制造人源化的抗体对于降低抗原性是重要的。根据所谓的“最佳拟合 (best-fit)”方法,针对已知人可变域序列的整个文库筛选非人抗体的可变域的序列。然后接受与所述非人亲本抗体最接近的人序列作为人FR用于所述人源化的抗体 (Sims等, J Immunol 151:2296 (1993); Chothia等, J Mol Biol 196:901 (1987))。

[0190] 另一种方法使用来源于轻链或重链的特定亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可以用于几种不同的人源化的抗体 (Carter等, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285 (1992); Presta等, J Immunol 151:2623 (1993))。本发明的抗体可以包含任意适合的人或人共有轻链或重链框架序列,只要所述抗体表现出期望的生物学特性(例如,期望的结合亲和力)。在一些实施方案中,在人和/或人共有非高变区序列中存在一个或多个(例如2,3,4,5,6,7,8,9,或更多)另外的修饰。在一个实施方案中,本发明的抗体包含人轻链的框架序列的至少部分(或全部)。在一个实施方案中,本发明的抗体包含人重链的框架序列的至少部分(或全部)。在一个实施方案中,本发明的抗体包含人亚组I框架共有序列的至少部分(或全部)。在一些实施方案中,本发明的抗体包含人亚组III重链框架共有序列的至少部分(或全部)。在一个实施方案中,本发明的抗体的框架共有序列包含在位置71、73和/或78处的取代。在这些抗体的一些实施方案中,位置71是A, 73是T和/或78是A。

[0191] 对于人患者的治疗处理,完全的人抗体是特别合意的。可以通过本领域已知的各种方法制成人抗体,包括上文所述的噬菌体展示方法,使用来源于人免疫球蛋白序列的抗体文库。也见,美国专利Nos.4,444,887和4,716,111;和PCT公布Nos.WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 和WO 91/10741;其各自通

过提述以其整体并入本文。Cole等和Boerner等的技术也可以用于人单克隆抗体的制备 (Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Riss (1985); 和Boerner等, *J Immunol* 147:86 (1991))。

[0192] 还可以使用转基因小鼠产生人抗体,所述转基因小鼠不能表达功能性的内源性免疫球蛋白,但其可以表达人免疫球蛋白基因。例如,可以随机或通过同源性重组将人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物引入小鼠胚胎干细胞中。或者,除人重链和轻链基因外,可以将人可变区,恒定区,以及多样性区 (diversity region) 引入小鼠胚胎干细胞中。可以通过同源性重组用人免疫球蛋白基因座分别或同时使得小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因无功能。具体的,JH区的纯合缺失防止内源性抗体产生。扩增经修饰的胚胎干细胞并显微注射到囊胚中以产生嵌合小鼠。然后繁育所述嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合后代。见例如 Jakobovitis等, *Proc Acad Sci USA* 90:2551 (1993); Jakobovitis 等, *Nature* 362:255 (1993); Bruggermann等, *Year in Immunol* 7:33 (1993); Duchosal等, *Nature* 355:258 (1992))。

[0193] 使用选择的抗原例如本发明的肽的全部或部分,以正常的方式免疫所述转基因小鼠。可以使用常规杂交瘤技术从免疫的,转基因小鼠中获得针对所述抗原的单克隆抗体。所述转基因小鼠含有的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,并接着经历类别转换和体细胞突变。然后,使用这样的技术,产生治疗上有用的人IgG, IgA, IgM和IgE抗体是可能的。对于用于产生人抗体的该技术的综述,见Lonberg等, *Int Rev Immunol* 13:65-93 (1995)。对于用于产生人抗体和人单克隆抗体的该技术的详细讨论以及用于产生此类抗体的方案,见,例如PCT公开Nos. WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 欧洲专利No. 0 598 877; 美国专利Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 5,885,793; 5,916,771; 和5,939,598,其通过提述以其整体并入本文。另外,可以雇用公司例如Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San Jose, Calif.), and Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) 以提供针对选择的抗原的人抗体,使用与上文所述相似的技术。

[0194] 还可以通过免疫移植了人外周血白细胞,脾细胞或骨髓的小鼠制成人mAb (例如, XTL的Trioma技术)。可以使用称为“引导选择 (guided selection)”的技术产生识别选择的表位的完全人抗体。在该方法中,选择的非人单克隆抗体,例如,小鼠抗体,用于引导识别相同表位的完全人抗体的选择 (Jespers等, *Bio/Technology* 12:899 (1988))。值得注意的是,人B细胞不能用于生成需要的特异性单克隆抗体,因为所述单克隆抗体将与起始应答的初始免疫的B细胞是自身反应性的。

[0195] 此外,可以使用对于本领域的技术人员公知的技术,利用针对本发明的多肽的抗体可以转而生成抗独特型抗体 (anti-idiotype antibodies),其“模拟”本发明的多肽 (见, 例如Greenspan等, *FASEB J* 7:437 (1989); Nissinoff, *J Immunol* 147:2429 (1991))。例如,结合并竞争性抑制多肽多聚化和/或本发明的多肽与配体结合的抗体可以用于生成抗独特型抗体,其“模拟”所述多肽多聚化和/或结合域,且作为结果,结合并中和多肽和/或其配体。此类中和性抗独特性或此类抗独特型的Fab片段可以用于治疗方案中以中和多肽配体。例如,此类抗独特型抗体可以用于结合本发明的多肽和/或结合其配体/受体,并从而阻断其生物学活性。

[0196] 本发明的抗体可以是双特异性抗体。双特异性抗体是单克隆的,优选人或人源化的抗体,其具有对至少两种不同抗原的结合特异性。在本发明中,一种结合特异性可以针对B细胞mIgM,而另一种可以用于任意其它抗原,并优选细胞表面蛋白,受体,受体亚基,组织特异性抗原,病毒衍生的蛋白,病毒编码的包膜蛋白,细菌来源的蛋白,或细菌表面蛋白等。

[0197] 用于制造双特异性抗体的方法是公知的。传统的,双特异性抗体的重组产生是基于两种免疫球蛋白重链/轻链对的共表达,其中所述两种重链具有不同的特异性(Milstein等,Nature 305:537 (1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(细胞杂交瘤,quadroma)产生潜在的十种不同抗体分子的混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和色谱步骤完成该正确的分子的纯化。相似的程序公开于PCT公布No.WO 93/08829和Traunecker等,EMBO J 10:3655 (1991)中。

[0198] 可以将具有期望的结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域融合到免疫球蛋白恒定域序列。该融合优选使用免疫球蛋白重链恒定域,包含至少部分的铰链区,CH2和CH3区。其可以具有第一重链恒定区(CH1)含有对于存在于至少一种融合中的轻链结合必要的位点。将编码免疫球蛋白重链融合,和如果需要,免疫球蛋白轻链的DNA插入分别的表达载体中,并共转化到适合的宿主生物体中。对于生成双特异性抗体的进一步细节,见例如Suresh等,Meth In Enzym 121:210 (1986)。

[0199] 本发明还涵盖异缀合抗体(Heteroconjugate antibodies)。异缀合抗体由两个共价连接的抗体组成。例如,已经提出此类抗体将免疫系统细胞靶向至不想要的细胞(美国专利No.4,676,980)。涵盖可以使用合成蛋白化学中已知的方法体外制备所述抗体,包括涉及交联试剂的那些。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫酯键构建免疫毒素。用于该目的的适合试剂的例子包括亚氨基硫醇酯(iminothiolate)和4-巯基丁亚氨酸甲酯(methyl-4-mercaptopbutyrimidate)和例如美国专利No.4,676,980中描述的那些。

[0200] 另外,可以生成针对B细胞mIgM的单域抗体。该技术的例子已经于PCT公开文本No.WO9425591中描述来源于骆驼科的重链Ig的抗体,以及在美国公布No.20030130496中描述了从噬菌体文库的单域全人抗体的分离。

[0201] 还可以创建单肽链结合分子,其中重链和轻链Fv区相连。单链抗体("scFv")和他们的构建方法描述于美国专利No.4,946,778。或者,可以通过相似的方式构建并表达Fab。所有的全部和部分的人抗体比全鼠mAb免疫原性较低,且片段和单链抗体也免疫原性较低。

[0202] 可以从抗体噬菌体文库分离抗体或抗体片段,所述文库使用McCafferty等,Nature 348:552 (1990);Clarkson等,Nature 352:624 (1991)和Marks等,J Biol 222:581 (1991)中描述的技术生成,其分别描述了使用噬菌体文库的鼠和人抗体的分离。后续的公开描述了通过链转换的高亲和力(nM范围)的人抗体的产生(Marks等,Bio/Technology 10:779 (1992)),以及组合感染和体内重组作为策略用于构建非常大的噬菌体文库(Waterhouse等,Nuc Acids Res 21:2265 (1993))。因此,这些技术是用于单克隆抗体分离的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行的替代方案。

[0203] 还可以修饰DNA,例如,通过人重链和轻链恒定域的编码序列取代置换同源性的鼠序列(美国专利No.4,816,567;Morrison等,Proc Natl Acad Sci USA 81:6851 (1984))。

[0204] 另一种选择是使用电融合而不是化学融合以形成杂交瘤。该技术是良好建立的。代替融合,也可以转化B细胞使得其永生化,使用例如Epstein Barr病毒,或转化基因。见例

如"Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity,"Zurawaki等,in Monoclonal Antibodies,ed. by Kennett等,Plenum Press,pp.19-33. (1980))。可以通过用由真核或原核系统表达的B细胞mIgM蛋白、融合蛋白,或其片段免疫啮齿类动物(例如小鼠,大鼠,仓鼠,和豚鼠)引发抗B细胞mIgM mAb。可以使用其它动物用于免疫,例如,非人灵长类,表达免疫球蛋白的转基因小鼠,以及使用人B淋巴细胞移植的严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠。可以通过常规程序,通过融合来自免疫的动物的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞(例如,Sp2/0和NSO)生成杂交瘤,如先前描述的(Kohler等,Nature 256:495 (1975))。另外,可以通过在噬菌体展示系统中从人B淋巴细胞筛选重组单链Fv或Fab文库生成抗B细胞mIgM抗体。可以通过ELISA,Western印迹,或其它免疫化学技术测试mAb对B细胞mIgM的特异性。可以通过增殖、细胞因子释放,以及凋亡测定评估抗体对CD4+细胞活化的抑制活性。通过有限稀释克隆阳性孔中的杂交瘤。纯化抗体以通过上文所述的测定表征对人B细胞mIgM的特异性。

[0205] 编码抗体的多核苷酸

[0206] 本发明进一步提供多核苷酸或核酸,例如DNA,包含编码本发明的抗体或其片段的核苷酸序列。示例性的多核苷酸序列包括编码抗体链的那些,所述抗体链包含序列表中描述的氨基酸序列的一个或多个(例如,SEQ ID N0s:1和3)。本发明还包含在严格或低严格杂交条件下与编码本发明的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0207] 优选的,所述核酸在低,中或高严格条件下杂交,并编码维持了特异性结合BCRC的mIgM的能力的抗体。当第一核酸分子的单链形式在温度和溶液离子强度的适合条件下可以退火到第二核酸分子时,第一核酸分子“可杂交”到第二核酸分子(见,Sambrook等,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,2<sup>nd</sup> ed. (1990),3<sup>rd</sup> ed. (2001))。温度和离子强度的条件决定杂交的“严格度”。典型的低严格杂交条件包括55°C,5X SSC,0.1% SDS和无甲酰胺;或30%甲酰胺,5X SSC,0.5% SDS在42°C。典型的中严格杂交条件为40%甲酰胺,和5X或6X SSC以及0.1% SDS在42°C。高严格杂交条件为50%甲酰胺,5X或6X SSC在42°C,或任选的,在更高的温度(例如57°C,59°C,60°C,62°C,63°C,65°C或68°C)。一般来说,SSC为0.15M NaCl和0.015M柠檬酸钠。杂交要求两个核酸含有互补序列,尽管取决于杂交的严格度,碱基之间的错配是可能的。用于杂交核酸的适合的严格度取决于核酸的长度以及互补的程度,其为本领域公知的变量。两个核酸序列之间的相似性或同源性的程度越高,所述核酸可以杂交的严格度越高。对于大于100个核苷酸的杂交体,已经导出了用于计算解链温度的方程(见Sambrook等,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,9.50-9.51,Cold Spring Harbor Laboratory,2<sup>nd</sup> ed. (1990),3<sup>rd</sup> ed. (2001))。对于使用较短核酸的杂交,例如寡核苷酸,错配的位置变得更重要,而寡核苷酸的长度决定其特异性(见Sambrook等,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,9.50-9.51,Cold Spring Harbor Laboratory,2<sup>nd</sup> ed. (1990),3<sup>rd</sup> ed. (2001))。

[0208] 可以通过本领域已知的任意方法,获得所述多核苷酸,并确定所述多核苷酸的核苷酸序列。例如,如果抗体的核苷酸序列是已知的,可以从化学合成的寡核苷酸组装编码所述抗体的多核苷酸(例如,描述于Kutmeier等,Bio/Techniques 17:242 (1994)),其,简短的说,涉及重叠的寡核苷酸的合成,所述重叠的寡核苷酸含有编码所述抗体的序列的一部分,那些寡核苷酸的退火和连接,以及然后通过PCR对连接的寡核苷酸的扩增。

[0209] 或者,可以从来自适合的来源的核酸生成编码抗体的多核苷酸。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆不可用,但抗体分子的序列是已知的,可以化学合成或使用与所述序列的3'和5'末端可杂交的合成引物通过PCR扩增从适合的来源获得编码所述免疫球蛋白的核酸(例如,从表达所述抗体的任意组织或细胞,例如经选择以表达本发明的抗体的杂交瘤细胞生成的抗体cDNA文库,或cDNA文库,或分离的核酸,优选聚A<sup>+</sup>RNA),或通过克隆使用对特定基因序列特异性的寡核苷酸探针以鉴定,例如从cDNA文库鉴定编码所述抗体的cDNA克隆体。然后可以使用本领域公知的任意方法将通过PCR生成的扩增的核酸克隆到可复制克隆载体中。

[0210] 一旦确定了抗体的核苷酸序列和对应的氨基酸序列,可以使用本领域公知的用于核苷酸序列操作的方法操作所述抗体的核苷酸序列,例如,重组DNA技术,定点诱变,PCR等(见,例如Sambrook等,Molecular Cloning, A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory 2<sup>nd</sup> ed. (1990), 3<sup>rd</sup> ed. (2001);Ausubel等,eds.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons (1998)中所述的技术,其两者通过提述以其整体并入本文),以生成具有不同氨基酸序列的抗体,例如,以创建氨基酸取代,缺失,和/或插入。

[0211] 在特定的实施方案中,可以通过公知的方法检查重链和/或轻链可变域的氨基酸序列以鉴定CDR的序列,例如,通过与其它重链和轻链可变区的已知氨基酸序列的比较以确定序列高变的区域。使用常规的重组DNA技术,可以将一个或多个CDR插入框架区中,例如,插入人框架区中以人源化非人抗体,如上文所述。所述框架区可以是天然发生的或共有框架区,并优选人框架区(对于人框架区的列表见,例如Chothia等,J Mol Biol 278:457 (1998))。优选的,通过框架区和CDR的重组生成的多核苷酸编码特异性结合本发明的多肽的抗体。优选的,如上文所讨论的,在框架区中可以制成一个或多个氨基酸取代,且优选的,所述氨基酸取代改进抗体对其抗原的结合。另外,此类方法可以用于制造一个或多个可变区半胱氨酸残基的氨基酸取代或缺失,所述半胱氨酸残基参与链内二硫键,以形成缺乏一个或多个链内二硫键的抗体分子。本发明包含多核苷酸的其它改变并在本领域的技术范围内。

[0212] 另外,可以使用开发用于“嵌合抗体”的产生的技术(Morrison等,Proc Natl Acad Sci 81:851 (1984);Neuberger等,Nature 312:604 (1984);Takeda等,Nature 314:452 (1985)),通过剪接来自小鼠的具有适合的抗原特异性的抗体分子的基因连同来自人的具有适合的生物学活性的抗体分子的基因。如上文所述,嵌合抗体是其中不同部分来源于不同动物物种的分子,例如具有来源于鼠mAb和人免疫球蛋白恒定区的那些,例如人源化的抗体。

[0213] 或者,用于单链抗体的产生的描述的技术(美国专利No.4,946,778;Bird,Science 242:423 (1988);Huston等,Proc Natl Acad Sci USA 85:5879 (1988);和Ward等,Nature 334:544 (1989))可以适合于产生单链抗体。通过氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段形成单链抗体,产生单链多肽。还可以使用用于在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术(Skerra等,Science 242:1038 (1988))。

[0214] 载体和宿主细胞

[0215] 在另一个方面,本发明提供编码如本文公开的抗体的分离的核酸序列,包含编码本发明的抗体的核苷酸序列的载体构建物,包含此类载体的宿主细胞,以及用于所述抗体

的产生的重组技术。

[0216] 对于抗体的重组产生,将编码它的核酸分离并插入可复制载体用于进一步克隆(DNA的扩增)或用于表达。使用常规方法容易地分离并测序编码所述抗体的DNA(例如,通过使用寡核苷酸探针,其能够特异性结合编码所述抗体的重链和轻链的基因)。用于克隆和转化的标准技术可以用于表达本发明的抗体的细胞系的制备。

[0217] 载体

[0218] 许多载体是可用的。载体组成一般包括,但不限于,以下一项或多项:信号序列,复制起点,一个或多个标志基因,增强子元件,启动子,和转录终止序列。可以使用公知的技术制备含有编码本发明的抗体的核苷酸序列的重组表达载体。重组载体可以包括可操作地连接至适合的转录或翻译调控核苷酸序列的核苷酸序列,所述转录或翻译调控核苷酸序列例如来源于哺乳动物,微生物,病毒,或插入基因的那些。调控序列的例子包括转录启动子,操纵子,增强子,mRNA核糖体结合位点,和/或其它适合的序列,其控制转录和翻译起始和终止。当所述调控序列与适合的多肽的核苷酸序列功能上相关时,核苷酸序列为“可操作地连接”。因此,如果启动子核苷酸序列控制适合的核苷酸序列的转录,所述启动子核苷酸序列为可操作地连接至,例如抗体重链序列。用于表达本发明的抗体的有用的表达载体的例子可以在PCT公开No.WO 04/070011中找到,其通过提述并入本文。

[0219] 另外,可以将编码适合的信号肽的序列整合到表达载体中,所述信号肽不天然与抗体重链和/或轻链序列相关联。例如,可以将信号肽(分泌前导)的核苷酸序列符合阅读框地融合到所述多肽序列,使得所述抗体分泌到周质空间或分泌到培养基中。在预期的宿主细胞中功能性的信号肽提高适合的抗体的胞外分泌。所述信号肽可以当抗体从所述细胞分泌后从所述多肽剪切。此类分泌信号的例子是公知的,并包括例如美国专利Nos.5,698,435;5,698,417;和6,204,023中描述的那些。

[0220] 宿主细胞

[0221] 在本发明中有用的宿主细胞是原核的,酵母,或高等真核细胞,并包括但不限于使用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA,质粒DNA,或粘粒DNA表达载体转化的微生物例如细菌(例如大肠杆菌,枯草芽孢杆菌);使用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,酵母属,毕赤酵母);使用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;使用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的或使用重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或包含重组表达构建物的哺乳动物细胞系统(例如,COS,CHO,BHK,293,3T3细胞),所述重组表达构建物含有来源于哺乳动物细胞(例如,金属硫蛋白启动子)或来自哺乳动物病毒的基因组的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)。

[0222] 在本发明中作为宿主细胞有用的原核细胞包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物例如大肠杆菌,枯草芽孢杆菌,肠杆菌,欧文氏菌,克雷伯氏菌,变形杆菌,沙门氏菌,沙雷氏菌,和志贺菌,以及芽孢杆菌,假单胞菌属,和链霉菌。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446),尽管其他菌株例如大肠杆菌B,大肠杆菌X1776(ATCC 31,537),和大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)是适合的。这些例子是说明性的而非限制性的。

[0223] 用于在原核宿主细胞中使用的表达载体通常包含一个或多个表型选择标志基因。表型选择标志基因是,例如,编码赋予抗生素抗性或提供自养需求的蛋白的基因。对于原核

宿主细胞有用的表达载体的例子包括来源于市场上可买到的质粒的那些,例如pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pGEM1 (Promega Biotecl, Madison, Wis., USA), 和pET (Novagen, Madison, Wis., USA) 以及pRSET (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif., USA) 系列载体 (Studier, J Mol Biol 219:37 (1991); Schoepfer, Gene 124:83 (1993))。对于重组原核宿主细胞表达载体通常使用的启动子序列包括T7 (Rosenberg等, Gene 56:125 (1987));  $\beta$ -半乳糖苷酶(青霉素酶), 乳糖启动子系统 (Chang等, Nature 275:615 (1978), Goeddel等, Nature 281:544 (1979)); 色氨酸(trp)启动子系统 (Goeddel等, Nucl Acids Res 8:4057 (1980)); 和tac启动子 (Sambrook等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1990))。

[0224] 在本发明中有用的酵母和丝状真菌包括来自酵母 (*Saccharomyces*) 属, 毕赤酵母属, 放线菌属, 克鲁维酵母属, 裂殖酵母属, 假丝酵母属, 木霉属, 脉孢菌属的那些, 以及丝状真菌例如脉孢菌属, 青霉属, 弯颈霉属和曲霉属。酵母载体将通常含有来自2 $\mu$ 酵母质粒的复制起点序列, 自主复制序列(ARS), 启动子区, 用于多聚腺苷酸化的序列, 用于转录终止的序列, 以及选择标志基因。对于酵母载体适合的启动子序列包括, 除其它外, 金属硫蛋白, 3-磷酸甘油酸激酶 (Hitzeman等, J Biol Chem 255:2073 (1980)) 或其它糖酵解酶 (Holland等, Biochem 17:4900 (1978)) 的启动子, 例如烯醇酶, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶, 己糖激酶, 丙酮酸脱羧酶, 磷酸果糖激酶, 葡萄糖-6-磷酸异构酶, 3-磷酸甘油酸变位酶, 丙酮酸激酶, 磷酸丙糖异构酶, 磷酸葡萄糖异构酶, 和葡萄糖激酶。用于在酵母表达中使用的其它适合的载体和启动子进一步描述于Fleer等, Gene 107:285 (1991) 中。用于酵母和酵母转化方法的其它适合的启动子是本领域中公知的。酵母转化方法是公知的。一种此类方法由Hinnen等, Proc Natl Acad Sci 75:1929 (1978) 描述。Hinnen方法在选择培养基中选择Trp<sup>+</sup>转化子。

[0225] 也可以采用哺乳动物或昆虫宿主细胞培养系统以表达重组抗体。原则上, 任意高等真核细胞培养物是可行的, 不论来自脊椎动物或非脊椎动物培养物。非脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞 (Luckow等, Bio/Technology 6:47 (1988); Miller等, Genetics Engineering, Setlow等, eds. Vol. 8, pp. 277-9, Plenum Publishing (1986); Mseda等, Nature 315:592 (1985))。例如, 杆状病毒系统可以用于异源蛋白的产生。在昆虫系统中, 茸毒蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus) (AcNPV) 可以用作载体以表达外来基因。所述病毒在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中生长。可以将抗体编码序列单独地克隆到所述病毒的非必需区(例如, 多角蛋白基因)中并放置在AcNPV启动子的控制下(例如, 多角蛋白启动子)。已经鉴定的其它宿主包括伊蚊 (*Aedes*), 果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 和家蚕 (*Bombyx mori*)。用于转染的各种病毒株是公开可用的, 例如AcNPV的L-1变体和家蚕的Bm-5株, 而根据本发明此类病毒可以用作本文的病毒, 特别是用于草地夜蛾细胞的转染。此外, 也可以利用棉花, 玉米, 马铃薯, 大豆, 矮牵牛, 番茄和烟草的植物细胞培养物作为宿主。

[0226] 培养物(组织培养物)中的脊椎动物细胞, 以及脊椎动物细胞的增殖已经成为常规程序。见Tissue Culture, Kruse等, eds., Academic Press (1973)。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是猴肾; 人胚胎肾系; 幼仓鼠肾细胞; 中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub等, Proc Acad Sci USA 77:4216 (1980)); 小鼠睾丸支持 (sertoli) 细胞; 人宫颈癌细胞 (HELA); 狗肾细胞; 人肺细胞; 人肝脏细胞; 小鼠乳腺肿瘤; 和NS0细胞。

[0227] 使用上述载体转化宿主细胞用于抗体产生并在常规营养培养基中培养,所述常规营养培养基经改进适合于诱导启动子,转录和翻译控制序列,选择转化子,或扩增编码期望序列的基因。普遍使用的启动子序列和增强子序列来源于多瘤病毒,腺病毒2,猴肾病毒40(SV40),和人巨细胞病毒(CMV)。来源于SV40病毒基因组的DNA序列可以用于提供用于在哺乳动物宿主细胞中表达结构基因序列的其它基因元件,例如,SV40起点,早期和晚期启动子,增强子,剪切和多聚腺苷酸化位点。病毒早期和晚期启动子是特别有用的,因为两者作为片段都从病毒基因组容易的获得,其可以也含有病毒复制起点。用于哺乳动物宿主细胞中使用的示例性表达载体是市场上可买到的。

[0228] 用于产生本发明的抗体的宿主细胞可以在各种培养基中培养。市场上可买到的培养基例如Ham's F10 (Sigma),最小必须培养基(MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma), 和 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基(DMEM, Sigma)适合用于培养宿主细胞。另外,Ham等, Meth Enzymol 58:44 (1979), Barnes等, Anal Biochem 102:255 (1980), 和美国专利Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,560,655; 5,122,469; 5,712,163; 或6,048,728中描述的任意培养基可以用作所述宿主细胞的培养基。必要时任意这些培养基可以使用激素和/或其它生长因子(例如胰岛素,转铁蛋白,或表皮生长因子),盐(例如X-氯化物,其中X是钠,钙,镁;和磷酸盐),缓冲物(例如HEPES),核苷酸(例如腺苷和胸苷),抗生素(例如GENTAMYCIN<sup>TM</sup>药物),痕量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物),和葡萄糖或等同能量源补充。还可以以适合的浓度包括任意其它必要的补充物,其对于本领域的技术人员将是已知的。培养条件,例如温度,pH等等,是选择用于表达的宿主细胞先前使用的那些,并对于本领域的普通技术人员将是显而易见的。

[0229] 本发明还包括多肽,当通过BLAST算法进行比较时包含与本文提供的抗体的氨基酸序列至少约70%相同,优选至少约80%相同,更优选至少90%相同并最优选至少95%相同(例如,95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%)的氨基酸序列,其中所述算法的参数经选择以给出在相应参考序列的整个长度中,相应序列之间的最大匹配。本发明还包括当使用BLAST算法进行比较时,包含与任意参考氨基酸序列至少约70%相似,优选至少约80%相似,更优选至少90%相似并最优选至少95%相似(例如,95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%)的氨基酸序列的多肽,其中所述算法的参数经选择以给出在相应参考序列的整个长度中,相应序列之间的最大匹配。

[0230] 序列同一性指代当两个序列最优比对时,在等同位置两个多肽的氨基酸相同的程度。序列相似性包括相同残基和不相同的,生物化学上相关的氨基酸。上文讨论了共享相似特性并可以替换的生物化学上相关的氨基酸。

[0231] 以下参考文献涉及通常用于序列分析的BLAST算法:BLAST ALGORITHMS: Altschul, S.F等, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W.等, (1993) Nature Genet. 3: 266-272; Madden, T.L. 等, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. 等, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. 等, (1997) Genome Res. 7:649-656; Wootton, J. C. 等, (1993) Comput. Chem. 17: 149-163; Hancock, J. M. 等, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70; ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M.O. 等, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352,

Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,DC;Schwartz,R.M.等,"Matrices for detecting distant relationships."in *Atlas of Protein Sequence and Structure*,(1978) vol.5, suppl.3."M.O.Dayhoff(ed.),pp.353-358,Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,DC;Altschul,S.F.,(1991) *J.Mol.Biol.*219:555-565;States,D.J.等,(1991) *Methods* 3:66-70;Henikoff,S.等,(1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*89:10915-10919;Altschul,S.F.等,(1993) *J.Mol.Evol.*36:290-300;ALIGNMENT STATISTICS:Karlin,S.等,(1990) *Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA*87:2264-2268;Karlin,S.等,(1993) *Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA*90:5873-5877;Dembo,A.等,(1994) *Ann.Prob.*22:2022-2039;和Altschul,S.F."Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments."in *Theoretical and Computational Methods in Genome Research* (S.Suhai,ed.), (1997) pp.1-14,Plenum,New York。

[0232] 在另一个实施方案中,本发明涉及分离的核酸,例如DNA,编码本发明的分离的抗体或抗原结合片段的多肽链。在一个实施方案中,所述分离的核酸编码包含至少一个成熟抗体轻链可变(VL)域和至少一个成熟抗体重链可变(VH)域的抗体或其抗原结合片段,其中所述VK域包含具有SEQ ID NO:3的序列的至少三个CDR,而所述VH域包含具有SEQ ID NO:1的序列的至少三个CDR。在一些实施方案中,所述分离的核酸在单个核酸分子上编码轻链和重链两者,而在其它实施方案中,所述轻链和重链在单独的核酸分子上编码。在另一个实施方案中,所述核酸进一步编码信号序列。

[0233] 产生抗体的方法

[0234] 可以通过本领域已知的用于抗体的合成的任意方法产生本发明的抗体,具体的,通过化学合成或优选的,通过重组表达技术。

[0235] 本发明的抗体,或其片段,衍生物,或类似物的重组表达(例如本发明的抗体的重链或轻链或本发明的单链抗体),要求含有编码所述抗体或所述抗体的片段的多核苷酸的表达载体的构建。一旦已经获得了编码抗体分子的多核苷酸,可以通过重组DNA技术产生用于抗体的表达的载体。构建了含有抗体编码序列和适合的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如,体外重组DNA技术,合成技术,以及体内基因重组。

[0236] 通过常规技术将表达载体转移到宿主细胞,接着通过常规技术培养该转染的细胞以产生本发明的抗体。在本发明的一个方面,可以将编码重链和轻链两者的载体在宿主细胞中共表达,用于整个免疫球蛋白分子的表达,如下文详细描述的。

[0237] 可以利用各种宿主-表达载体系统以产生如上文所述的本发明的抗体分子。此类宿主-表达系统代表媒介物(vehicle),通过其可以产生感兴趣的编码序列并随后纯化,也代表细胞,当使用适合的核苷酸编码序列转化或转染时,其可以原位表达本发明的抗体分子。普遍使用细菌细胞例如大肠杆菌和真核细胞用于重组抗体分子的表达,特别是用于整个重组抗体分子的表达。例如,哺乳动物细胞例如CHO,连同载体例如来自人巨细胞病毒的主要中间早起基因启动子元件,是用于抗体的有效表达系统(Foecking等, *Gene* 45:101 (1986);Cockett等, *Bio/Technology* 8:2 (1990))。

[0238] 另外,可以选择调整插入序列的表达,或以期望的特定方式修饰或处理基因产物的宿主细胞株。蛋白产物的此类修饰(例如,糖基化)和处理(例如,剪切)对于蛋白的功能可以是重要的。对于蛋白和基因产物的翻译后处理和修饰,不同的宿主细胞具有特性和特定

机制。可以选择适合的细胞系或宿主细胞以保证对表达的外来蛋白的正确修饰和处理。为了这一目的,可以使用真核宿主细胞,其拥有用于基因产物的初级转录物的适当处理,糖基化和磷酸化的细胞机器。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于,CHO,COS,293,3T3,或骨髓瘤细胞。

[0239] 对于重组蛋白的长期,高产出生产,优选稳定的表达。例如,可以工程化稳定地表达所述抗体分子的细胞系。不是使用含有病毒复制起点的表达载体,可以使用由适合的表达控制元件控制(例如,启动子,增强子,序列,转录终止子,多聚腺苷酸位点等)的DNA和选择标志物转化的宿主细胞。在外来DNA的引入后,可以允许工程化的细胞在丰富的培养基中生长一至两天,然后转移到选择培养基。重组质粒载体中的选择标志物赋予对选择的抗性,并允许细胞稳定地将该质粒整合到它们的染色体中并生长以形成灶(foci),其转而可以克隆并扩增成细胞系。可以有利地利用该方法以工程化表达抗体分子的细胞系。此类工程化的细胞系在筛选和评价化合物中是特别有用的,所述化合物直接或间接与所述抗体分子相互作用。

[0240] 可以使用一些选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸昔激酶(Wigler等,Cell 11:223 (1977)),次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸磷酸核糖转移酶(Szybalska等,Proc Natl Acad Sci USA 48:202 (1992)),和腺嘌呤磷酸磷酸核糖转移酶(Lowy等,Cell 22:817 (1980))基因,其分别可以在tk,hprt或aprt-细胞中采用。另外,对于以下基因抗代谢抗性可以用作选择的基础:dhfr,其赋予对氨甲喋呤的抗性(Wigler等,Proc Natl Acad Sci USA 77:357 (1980);O'Hare等,Proc Natl Acad Sci USA 78:1527 (1981));gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan等,Proc Natl Acad Sci USA 78:2072 (1981));neo,其赋予对氨基糖苷类G-418的抗性(Wu等,Biotherapy 3:87 (1991));和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等,Gene 30:147 (1984))。可以常规地应用重组DNA技术的本领域公知的方法以选择期望的重组克隆,且所述方法描述于,例如Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons (1993);Kriegler,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press (1990);和Chapters 12and 13,Dracopoli等,eds,Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons (1994);Colberre-Garapin等,J Mol Biol 150:1 (1981)中,其通过提述以其整体并入本文。

[0241] 可以通过载体扩增增加抗体分子的表达水平(对于综述,见Bebbington等,"The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells,"DNA Cloning,Vol.3.Academic Press (1987))。当表达抗体的载体系统中的标志物可扩增时,增加宿主细胞的培养基中存在的抑制物的水平将增加标志基因的拷贝数。由于该扩增的区域与所述抗体基因相关联,抗体的产生也将增加(Crouse等,Mol Cell Biol 3:257 (1983))。

[0242] 可以使用本发明的两种表达载体共转染宿主细胞,第一载体编码重链衍生的多肽而第二载体编码轻链衍生的多肽。所述两种载体可以含有相同的选择标志物,其使得重链和轻链多肽的同等表达。或者,可以使用单个载体,其编码并能够表达重链和轻链多肽两者。在此类情况下,应当将轻链放置在重链之前以避免过量的毒性游离重链(Proudfoot,Nature 322:52 (1986);Kohler,Proc Natl Acad Sci USA 77:2197 (1980))。所述重链和轻链的编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。

[0243] 一旦本发明的抗体分子已经通过动物产生,化学合成,或重组表达,可以通过本领域已知的用于免疫球蛋白分子的纯化的任意方法将其纯化,例如,通过层析法(例如,例子交换,亲和,特别是通过蛋白A后对特定抗原的亲和力,和尺寸排阻层析法),离心,差别溶解度(differential solubility),或通过用于蛋白纯化的任意其它标准方法。另外,可以将本发明的抗体或其片段融合到本文所述的或否则本领域已知的异源多肽序列,以促进纯化。

[0244] 本发明包含重组融合或化学缀合(包括共价或非共价缀合两者)至多肽的抗体。本发明的融合的或缀合的抗体可以用于便于纯化。见,例如PCT公布No.WO 93/21232;欧洲申请No.EP 439,095;Naramura等,Immunol Lett 39:91 (1994);美国专利No.5,474,981;Gillies等,Proc Nail Acad Sci USA 89:1428 (1992);Fell等,J Immunol 146:2446 (1991),其通过提述以其整体并入。

[0245] 此外,本发明的抗体或其片段可以融合至标志物序列,例如肽以促进纯化。在优选的实施方案中,所述标志物氨基酸序列是六组氨酸肽(SEQ ID NO:18),例如pQE载体中提供的标签(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)等等,许多都是市场上可买到的。如Gentz等,Proc Natl Acad Sci USA 86:821 (1989)中所述,例如,六组氨酸(SEQ ID NO:18)提供融合蛋白的便利的纯化。对于纯化有用的其它肽标签包括但不限于,“HA”标签,其对应来源于流感病毒血凝素蛋白的表位(Wilson等,Cell 37:767 (1984))和“flag”标签。

[0246] 抗体纯化

[0247] 当使用重组技术时,可以在细胞内,在周质空间中产生抗体,或直接分泌到培养基中。如果细胞内地产生所述抗体,作为第一步骤,可以去除颗粒碎片,不论是宿主细胞或裂解的片段,例如通过离心或超滤。Carter等,Bio/Technology 10:163 (1992)描述了用于分离抗体的程序,所述抗体分泌到大肠杆菌的周质空间中。简短的说,在乙酸钠(pH 3.5),EDTA,和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下,将细胞体解冻约30分钟。可以通过离心去除细胞碎片。在抗体分泌到培养基中的情况下,通常使用市场上可买得到的蛋白浓缩滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元,首先将来自此类表达系统的上清浓缩。在任意前述步骤中可以包括蛋白酶抑制剂例如PMSF以抑制蛋白水解和可能包括以防止外来污染物的生长的抗生素。

[0248] 可以使用,例如羟磷灰石层析,凝胶电泳,透析和亲和层析纯化从所述细胞制备的抗体组合物,其中亲和层析是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适合性取决于抗体中存在的任意免疫球蛋白Fc域的种类和同种型。蛋白A可以用于纯化基于人IgG1,IgG2或IgG4重链的抗体(Lindmark等,J Immunol Meth 62:1 (1983))。蛋白G推荐用于所有的小鼠同种型和用于人IgG3(Guss,等,EMBO J 5:1567 (1986))。亲和配体附着的基质最经常是琼脂糖,但其它基质是可用的。机械稳定的基质例如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯允许比使用琼脂糖能够实现的更快的流速和较短的处理时间。在所述抗体包含CH3域的情况下,Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker;Phillipsburg,N.J.)对于纯化是有用的。取决于待回收的抗体,用于抗体纯化的其它技术例如在离子交换柱上分级,乙醇沉淀,反向HPLC,硅胶层析法(chromatography on silica),肝素SEPHAROSE™层析,阴离子或阳离子交换树脂层析(例如聚天冬氨酸柱),层析聚焦,SDS-PAGE,和硫酸铵沉淀也是可用的。在任意初步纯化步

骤后,可以将含有感兴趣的抗体和污染物的混合物进行低pH疏水相互作用层析,使用pH在约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度进行(例如,从约0-0.25M盐)。

[0249] 针对B细胞受体复合物的抗体

[0250] 本发明涉及特异性靶向B细胞复合物(BCRC)的膜结合IgM(mIgM)的抗体。由于大多数B细胞淋巴瘤和白血病在它们的细胞表面上表达mIgM,这些抗体可以用于该分子的研究以及mIgM相关联的疾病的诊断和治疗。

[0251] B细胞受体复合物是免疫系统的B细胞分支的中心信号传导元件,控制分化,细胞生长和凋亡。该细胞表面分子复合物在所有的B细胞恶性肿瘤中表达并组成型活化(constitutively activated) (Tsubata T等,B cell signaling. Introduction. 20:675-678 (2000);Gauld SB等,Science 296:1641-1642 (2002);Girurajan M等,J Immunol 15:5715-5719 (2006))。BCRC由分泌形式的Ig(受体)的跨膜版本组成,与CD79 $\alpha\beta$ (信号转导元件)紧密相关联(见,Reth M,Nature 338:383-384 (1989);Gold MR.等,Proc Natl Acad Sci USA 88:3436-3440 (1991);Jugloff L S.等,J Immunol 159:1139-1146 (1991);Cambier JC等,FASEB J 6:3207-3217 (1992);Flaswinkel H等,EMBO J 13:83-89 (1994);Burkhardt AL等,Mol Cell Biol 14:1095-1103 (1994);Rowley RB等,J Biol Chem 270:11590-11594 (1995);Kabak S等,Biochem Biophys Res Commun 324:1249-1255 (2004);Patterson HC,et al.,Immunity 25:55-65 (2006);Polson AG等,Blood 110:616-623 (2007))。在mIg的跨膜序列和同源性Ig共有序列之间也存在小胞外肽片段(胞外近端域,ECPD或PD),所述同源性Ig共有序列存在于膜和分泌形式的Ig两者中(Bestagno M等,Biochemistry 40:10686-10692 (2001);Poggianella M,et al.,J Immunol 177:3597-3605 (2006))。该PD对于每种膜Ig类型是独特的,且不存在于对应的分泌Ig形式上。另外,基于人基因组数据库的搜索,每种Ig膜类型的PD序列相对于其中含有的所有序列并相比于报道的对应鼠序列是独特的。因此,对每种类型特异性PD的特异性序列的基因组数据库搜索仅产生其对应的膜Ig类型。使用这些序列不能确定其它的膜蛋白,如通过基因库搜索确定的。另外,没有发现同源性肽序列以提示这些小结构域的进化衍生(evolutionary derivation)。

[0252] 因为循环血中Ig的大量存在,不认为同源性膜结合Ig(mIg)是用于药物开发的相关靶标。本发明示出了通过靶向存在于跨膜疏水氨基酸序列和共有分泌Ig同源性序列之间的胞外存在的短肽接头,即PD,可以靶向BCRC而没有来自循环Ig的干扰。另外,包含mIgM恒定域4( $\mu$ C4)的mRNA剪接变体提供了新的,重要的特异性表位。这些发现导致了本文的抗PD mAb的生成,即抗mIgM和抗mIgG PD mAb和结合独特的 $\mu$ C4表位的抗体。这些mAb靶向mIgM或mIgG类型特异性BCRC并从而可以用于纯化这些Ig受体,并进一步探索和发现与对应的血清版本相比,mIg中存在的其它新抗原。因为它们独特的序列,假设抗PD mAb可以调节来自mIg至CD79 $\alpha\beta$ 的信号转导中的下游信号通路,如果所述信号通过PD介导。利用抗PD mAb的该靶向方法的优势是破坏与BCRC相关联的下游通路预期将仅在B细胞中调节并限制在靶向的Ig类型,例如仅在表达mIgM的细胞。除PD中含有的特定表位外,IgM的恒定区4, $\mu$ C4中含有的相邻或相近序列,与sIgM相比在mIgM中截短,通过该结构域的20个临近氨基酸的缺失。因此,将预期检测另外的免疫学定义的新表位进一步从mIgM的恒定区4, $\mu$ C4中的sIgM区分mIgM。该截短也是糖基化位点缺失的原因;缺少J链结合且该区域与定位于 $\mu$ C4域中的mIg聚集位

点临近(见,Tolar P等,Immunity 30(1):44-55(2009))。很明显可以产生针对mIgM恒定域4中的新表位的mAb且分离一种这样的mAb,其也调节通过BCRC的信号转导。由于mIgM适合BCRC的受体组分,其必须传输活化信号至CD79 $\alpha\beta$ ,在那里细胞内磷酸激酶驻留。从一个分子到另一个的信号传输的确切位点仍然未知。

[0253] 以特异性调节BCRC为目标,生成了在其PD处靶向mIg分子的特异性单克隆抗体(mAb),抗PD mAb。生成了检测mIgM分子特异性的13-聚肽PD序列(EGEVSADEEGFEN) (SEQ ID NO:11) 和mIgG特异性的18-聚肽PD序列(ELQLEESCAEAQDGELDG) (SEQ ID NO:12) 的肽特异性mAb的一大组,并发现具有肽特异性结合和对于表达肽的细胞的细胞结合。通过下文所述的免疫技术生成了高亲和力抗PD单克隆抗体(mAb)。通过ELISA,Western印迹和扫描免疫电镜(SEM)示出了这些单克隆抗体结合mIgM蛋白和mIgM+表达的细胞系CA 46 (CRL 1648),SU-DHL-5 (CRL 2958),Ramos (CRL-1596),Namalwa (CRL-1432),ST 486 (CRL-1647),MC 116 (CRL-1649),和HT (CRL-2260)。使用这些高亲和力抗PD单克隆抗体,免疫亲和纯化了mIgM并用于免疫小鼠。收集了检测BCRC上的构象表位且在ELISA/Western/SEM测定中不与sIgM反应的第二代抗体。通过MTT/CASPASE和如下文所述克隆形成有限稀释测定(clonogenic limiting dilution assay)评估了生长抑制。选择了四种单克隆抗体,命名为mAb1-1, mAb2-2b, mAb3-2b和mAb4-2b用于进一步的研究。

[0254] 在生成和评估对mIgM PD/纯化的mIgM的这些特异性mAb的过程中,出现了一些问题和挑战:

[0255] 1. 收集的初始克隆为低亲和力的,尽管用抗原靶标的独特序列。筛选免疫的Balb/c小鼠揭示了血清反应很差。研究了各种佐剂而没有实现血清样品可测量的增加的滴度或亲和力。随后测试了小鼠的各种品系,而仅发现CD-1小鼠是用于生成高亲和力抗体的适合的宿主。

[0256] 2. 该靶标多肽以至少三种异构形式存在。为了生成临幊上适合的mAb试剂,mAb筛选出识别靶标PD的所有异构形式的那些mAb。

[0257] 3. 努力为了提高鼠抗体免疫应答的亲和力,和为了扩宽另外表位的搜索,将来自细胞提取物的纯化的mIgM制备物(从mAb1-1免疫亲和柱获得)纳入免疫原中(通过与mIgM PD-肽-MAP免疫原共施用)。

[0258] 4. 抗体mAb1来源于仅包含mIgM-PD肽-MAP免疫原的融合,而所有其它抗体(mAb 2, mAb 3和mAb 4)除mIgM-PD肽-MAP免疫原外使用纯化的mIgM生成。为了表明这些mAb来源于使用不同免疫原的融合,将后缀1添加至mAb1 (mAb1-1),而后缀2添加至其它抗体(mAb2-2, mAb3-2和mAb2-4)。另外,由于用于生成抗体mAb2, mAb3和mAb4的纯化的mIgM来源于细胞系b (CA 46, CRL 1648) 提取物,将字母b添加至后缀2 (mAb2-2b, mAb3-2b和mAb4-2b)。

[0259] 5. 在使用纯化的mIgM免疫期间,生成了针对mIgM的第4恒定区共享的表位的mAb。这是生成的新表位的结果,由于相比于血清IgM mRNA剪接变体,膜IgM中远端20个氨基酸的末端缺失。mAb4-2b证明了mIgM的第4恒定区中的结构变化诱导了IgM域 $\mu$ C4中的独特的构象表位。

[0260] 以下研究,其对于证明mAb特异性和研究生物学活性的关键方面是必须的,以如下顺序在本申请的后面呈现:

[0261] 1. 杂交瘤组的生成和选择

- [0262] 2. 在活靶细胞和细胞提取物上的特异性研究(表4)
- [0263] 3. 对靶标肽,同分异构体和细胞提取物的特异性研究(表5,6)
- [0264] 4. 对免疫亲和mIgM或Perfect-FOCUS<sup>TM</sup>提取物的直接结合的抑制的分子特异性研究(表7,8)
- [0265] 5. 通过竞争性mAb结合和6-聚体抑制的分子表位定位(表9,10)
- [0266] 6. 扫描电镜结合研究(表11-18,图1-5)
- [0267] 7. mAb结合介导的BCRC内化(表19,图2)
- [0268] 8. mAb4-2b介导的生长抑制,抗克隆形成活性和凋亡(表20-24和图6-7)
- [0269] 如本申请后面示出的,通过针对一组mIgM+ vs mIgM- (mIgG+) 活细胞/固定化的细胞或提取物测试,细胞表面结合测定揭示了这些单克隆抗体的特异性。另外,正常或waldenstrom巨球蛋白血症血清未能阻断或降低mAb对mIgM+细胞的结合,该结果也通过SEM确认。这两项研究清楚的证明了体内特异性靶向B细胞的能力的实现。
- [0270] 在37°C,抗PD单克隆抗体(mAb1-1, mAb2-2b, mAb3-2b)在30分钟时内化mIgM (BCRC),但它们不调节细胞生长抑制。第二代mAb4-2b也介导mIgM (BCRC) 内化,但另外地,在低密度培养物中,观察到了细胞生长抑制,抗克隆形成活性和凋亡。在各种恶性B细胞系中看到了凋亡,包括高和低mIgM/CD79αβ表达的细胞。
- [0271] 尚未报道(1)特异性结合mIgM表达的细胞且(2)不与人血清IgM反应,并具有足够高的亲合力以免疫亲和纯化mIgM的抗体。mIgM的商业化制备物是低质量的。本发明提供使得能够mIgM纯化的此类抗体,尽管血清或这些B细胞的细胞质中分泌的IgM的存在。
- [0272] 以下呈现的数据揭示了BCRC内化不足以扰乱BCRC信号传导级联,如通过细胞生长抑制测定证实的。尽管在细胞表面上缺乏可检测的残留mIgM和CD79αβ,没有观察到生长抑制。这些数据强烈提示从mIgM至CD79αβ的信号转导不通过PD肽序列介导,且内化的BCRC在其内化的室中继续表现出磷酸化的CD79αβ。一旦mAb4-2b结合到mIgM上的非配体结合位点, mAb4-2b诱导BCRC内化和另一个不同的事件(生长抑制和凋亡)两者。通过竞争mAb研究,凋亡介导的构象表位似乎是共享的,但主要存在于线性PD序列之外。由于mAb4-2b显示出与对线性mIgM-PD肽相比,对纯化的mIgM增加的结合,且其结合不被可溶性PD 6-聚体实质上阻断,mAb4-2b靶标表位要么是构象的,或者恒定区4影响其结合,或其表位主要存在于恒定区4中。该实验结果支持这些单克隆抗体用于药物/放射性同位素靶向媒介物或作为BCRC信号传导通路抑制的介导物的用途。由于这些试剂具有高水平的特异性,因为它们不结合非mIgM B细胞,正常的淋巴细胞和非淋巴组织可以幸免于毒性。
- [0273] 实施例1
- [0274] 抗ECPD杂交瘤组的生成
- [0275] 为了分离与靶标肽反应的单克隆抗体,IgM-EGEVSADEEGFEN (SEQ ID NO:11) 和 IgG-ELQLEESCAEAQDGELDG (SEQ ID NO:12),生成(谷胱甘肽-S-转移酶(GST))或购买了(多抗原肽(MAP) (Bio-Synthesis, Lewisville, TX) 和KLH-肽 (Bio-Synthesis, Lewisville, TX))携带这些肽的免疫原。GST,MAP和KLH构建物用作免疫原携带蛋白且使用携带靶标肽的所述蛋白的一种或组合来免疫小鼠的组。对于利用Balb/c作为宿主的初始实验,立即变得清楚的是这些肽不是免疫原性的,即便是使用标准的商业化佐剂制备物。低免疫原性与先前为了产生抗mIgM和mIgG PD mAb的努力一致,而相反的是,产生mIgE的努力导致了几种功

能性不同的版本 (Poggianelli等, J Immunol 177:3597-3605 (2006); Feichter等, J of Immunol 180:5499-5505 (2008))。从Balb/c小鼠生成的11种单克隆抗体的第一组视为反应性太弱以致不能潜在地是临床有价值的。

[0276] 发现测试的所有小鼠品系 (Balb/c自身免疫小鼠品系等), 仅CD-1小鼠能够对这些免疫原显著的免疫应答。也获得了对照游离KLH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 用于体外测定。另外, 通过Perfect-FOCUS<sup>TM</sup>-膜蛋白提取技术 (G Biosciences, St Louis, MO, USA) 收集了mIgM和mIgG部分, 其从人细胞系, MC 116 (CRL1649) (表达mIgM的未分化的淋巴瘤), CA 46 (CRL1648) (表达mIgM的Burkitt氏淋巴瘤), ST 486 (CRL1647) (表达mIgM的Burkitt氏/CLL样细胞系), HT (CRL2260) (表达mIgM的弥散混合B细胞淋巴瘤) 或DB (CRL 2289) (表达mIgM的大B细胞淋巴瘤) 产生了富集的mIgM或mIgG制备物足够用于初始ELISA研究。这些膜IgM或IgG的富集部分用于免疫CD1小鼠的组, 其生成第二代单克隆抗体mAb4-2b。使用各种佐剂, 收集了免疫前和免疫后血清并稀释1:100, 和使用ELISA测试肽特异性活性。

[0277] 开发了新的免疫策略。将所述肽延伸至μC4域4区 (“延伸的肽”18聚体), 以可能地捕获构象表位, 使用高度纯化的靶蛋白用于增强 (boost) 并使用CD1小鼠和新的佐剂, 产生免疫后血清滴度>1:10,000的六只小鼠。选择这些小鼠使用标准技术用于杂交瘤生成。分离了四个克隆, 其在ELISA中结合肽/延伸的肽和mIgM的膜提取部分是活性的, 且两个克隆对于mIgG是特异性的。使用对于两种PD特异性的引物通过RT PCR确认了该mIgM/mIgG分子分别由CRL 1647或CRL 2289表达, 并通过Western印迹分析示出了存在于细胞膜部分中。为了进一步筛选的目的, 对于PD肽mIgM或mIgG, 并也对于对照肽例如mIgE和mIgA肽的通用重叠序列收集了构建物 (GST, MAP和KLP+/-肽或延伸的肽)。mIgD用于所述分析的这一部分, 如同含有该肽的所有的B细胞提取物。仅使用免疫原的特定组合并使用膜提取部分增强的免疫产生了具有良好反应性的克隆; 由来自融合117仅PD-KLH肽免疫的杂交瘤细胞系产生的一个IgG2b克隆 (mAb1-1), 由来自融合118的杂交瘤细胞系产生的两个IgG2b克隆 (mAb2-2b, mAb3-2b), 和由来自融合119的杂交瘤细胞系产生的一个IgG1克隆 (mAb4-2b)。

[0278] 对杂交瘤上清的初始筛选要求与携带适合的PD肽mIgM或mIgG的反应性, 与游离的KLH, 正常人血清, IgM的纯化的制备物和对于IgE, IgD和IgA携带KLH的肽无反应性。为了测试CRL 1647-mIgM和CRL 2289-mIgG的细胞提取物, 将特异性“鼠 Ig吸附的”山羊抗人IgMFC或山羊抗IgGFC抗血清捕获抗体附着于固相塑料。将CRL 1647或CRL 2289的NP-40裂解物或对照人血清或对照乳腺癌细胞裂解物BT-474结合至孔。所述CRL 1647裂解物提供人mIgM而CRL 2289提供人mIgG以结合所述捕获抗体, 然后洗涤所述孔三次。接着添加杂交瘤上清物, 其中“特异性”单克隆抗体结合捕获的人mIgM或mIgG, 其由塑料结合的捕获的抗人IgMFC或IgGFC结合, 以形成山羊抗人IgMFC-mIgM-mAb复合物或山羊抗人IgGFC-mIgG-mAb复合物。然后使用HRP标记的特异性山羊抗小鼠Ig (使用人IgM或人IgG预吸附) 检测所述小鼠mAb。其它阳性的细胞提取例如Namalwa (CRL 1432) 和CA46 (CRL 1648), 产生相似的结果。

[0279] 收集到组中的单克隆抗体包括指定为mAb1-1, mAb2-2b, mAb3-2b, mAb4-2b, 和mAb11-1的单克隆抗体。单克隆抗体mAb1-1是IgG2b同种型。单克隆抗体mAb1-1由来自融合117的杂交瘤细胞系产生。单克隆抗体mAb2-2b和mAb3-2b为IgG2b同种型而mAb4-2b为IgG1同种型。开发了类型转换变体, 以获得IgG1同种型用于某些实验以减少靶细胞上和细胞提取物中存在的非特异性细胞Fc受体结合。单克隆抗体mAb 2-2b和mAb3-2b由来自融合118

的杂交瘤细胞系产生,而mAb4-2b由来自融合119的杂交瘤细胞系产生。单克隆抗体mAb11-1是IgG1同种型。单克隆抗体mAb11-1由来自融合200的杂交瘤细胞系产生,且是与mIgG反应性的。也收集了第二种抗mIgG mAb但没有用于本文所述的实验中。

[0280] 使用来源于人B细胞系SK007(表达mIgE没有mIgM的人B细胞系)的人mIgE进一步确认了反应性的特异性,通过SK007细胞的NP-40裂解并用ELISA使用特异性山羊抗人IgE捕获抗体测试。综合来看,这些测定表明在ELISA中,所述单克隆抗体组识别免疫原中含有的合成肽序列和人mIgM或mIgG天然蛋白中的肽序列两者,所述人mIgM或mIgG天然蛋白通过NP-40裂解和Perfect-FOCUS<sup>TM</sup>部分衍生。为了检查它们不与跨膜或胞质域反应,使用荧光标记的山羊抗小鼠Ig预吸附的表达mIgM的CLL(慢性淋巴性白血病)细胞进行活细胞的荧光显微术(FM),用于检测mAb结合活CLL细胞。结果证明了mAb特异性,但如预期的弱细胞膜染色以及相似的对抗轻链的活性,表明低水平的mIgM细胞表面表达。一般来说,相比大多数B细胞淋巴瘤,CLL细胞表达少量的BCRC。典型地,在临床中,通过将mIgM的轻链分类为kappa或lambda,确定CLL细胞为单克隆群体并因此是恶性的。然而,在血细胞吸附(Hemadsorption)测定中,似乎所有的四个克隆确实都适宜地结合完整的活细胞,因为它们与测试的所有mIgM+细胞系为强阳性的。

[0281] 另外,通过流式细胞术侧散点图,与对照或多克隆抗IgM相比,在这些单克隆抗体的存在下培养的CLL细胞表现出增加的复杂性,提示可能的新的细胞效果。

[0282] 作为这一初始筛选策略的结果,所述组中的克隆具有以下特性:在ELISA中对于以下项阳性:(1)KLH-肽/延伸的肽(mIgM)和(2)与阳性表达的细胞系CA46(CRL 1648)和Namalwa(CRL1432)的NP-40裂解物反应,其使用捕获抗人IgMFC。所述克隆在ELISA中与以下项都是阴性的:(1)单独KLH,(2)具有不相关的肽的KLH,(3)乳腺癌细胞系BT-474NP-40裂解物,使用捕获抗人IgMFC,(4)人血清,使用捕获抗人IgMFC,(5)人Waldenstrom巨球蛋白血清,使用捕获抗人IgMFC,和(6)作为对照的SP2/0小鼠骨髓瘤细胞系和H2.8(CRL 2568)小鼠骨髓瘤细胞系的裂解物(HRP标记的mAb)。然而,通过ELISA测试对CA46的膜提取物的反应性(Perfect-FOCUS<sup>TM</sup>,G-Biosciences,St.Louis,MO)和对CA46NP-40裂解物的Western印迹分析揭示了这些克隆之间它们识别或结合它们的表位(在通过Triton<sup>TM</sup>X-100和/或暴露于SDS提取后)的能力的差异。这提示了即便是对于小肽靶标13聚体或延伸的18聚体,肽构象变化对于mAb结合是至关重要的。例如,存在在Western印迹上检测mIgM带,在ELISA中针对KLH-肽或Perfect-FOCUS<sup>TM</sup>阳性,并在Triton<sup>TM</sup>X-100 ELISA中反应性的克隆的事实提示这些克隆的子集识别在去垢剂中保留的表位。另外,Western印迹是复杂的,示出了与mIgM和CD79αβ复合物相关的多个分子量条带的结合。

[0283] 由于mIgM以低水平表达,流式细胞术将不是证明阴性的可信方法,因此完成了扫描电镜。由于在一些情况下放射性标记降低单克隆抗体的亲和力(CesanoA, GaykoU, SemOncol30:253-257(2003)),使用直接标记的抗体(HRP, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)完成了结合和表位定位,以及使用小6聚体肽或延伸的mIgM PD肽的抑制。

[0284] 产生单克隆抗体mAb1-1,mAb2-2b,mAb3-2b和mAb4-2的杂交瘤细胞系于2014年11月12日保藏于美国典型培养物保藏中心专利保藏(10801 University Blvd., Manassas, VA)。按照布达拉斯条约的国际承认的用于专利程序目的的微生物保藏的规定和据此的条例(布达拉斯条约)完成保藏。产生指定为mAb1-1的单克隆抗体的杂交瘤细胞系已经给予了

ATCC保藏号PTA-121719。产生指定为mAb2-2b的单克隆抗体的杂交瘤细胞系已经给予了ATCC保藏号PTA-121717。产生指定为mAb3-2b的单克隆抗体的杂交瘤细胞系已经给予了ATCC保藏号PTA-121718。产生指定为mAb4-2b的单克隆抗体的杂交瘤细胞系已经给予了ATCC保藏号PTA-121716。

[0285] 实施例2

[0286] 抗体纯化

[0287] 使用蛋白A琼脂糖柱(Pierce Inc., Rockford, IL, USA)和应用溶于Tris溶液(pH 8.6)的来自每种杂交瘤系的上清液完成了抗体纯化。在PBS(pH 7.0)中完成了进一步的洗涤并接着在pH 4.0洗脱mIgM。将无菌过滤的单克隆抗体以500微克/ml溶于具有或没有叠氮化物的无菌PBS储存于4°C。用于ADCC, 补体溶解, 生长抑制测定和生物学测定的抗体制备物以1000微克/ml在没有叠氮化物的PBS中无菌过滤。

[0288] 实施例3

[0289] mIgM的抗体免疫亲和纯化

[0290] 使用mAb1-1或mAb1-1与mAb2-2b和mAb3-2b共价结合的免疫亲和珠(Pierce Inc., Rockford, IL, USA), 应用CRL-1648NP-40提取物并接着在Tris溶液(pH 8.6)中洗涤珠, 完成了mIgM的抗体纯化。在PBS(pH 7.0)中完成了进一步的洗涤并接着在pH 4.0洗脱mIgM。将无菌过滤的抗体批次以500微克/ml溶于具有或没有叠氮化物的无菌PBS储存于4°C。

[0291] 实施例4

[0292] 特异性分析

[0293] 完成了抗体组针对上皮细胞系库的血细胞吸附测试, 以排除具有非特异性交叉反应性的克隆(Rettig WJ等, Int J Cancer 58:385-392 (1994); Kitamura K等, Proc Natl Acad Sci USA 91:12957-12961 (1994); Garin-Chesa P等, Int J Oncol 9:465-471 (1996); Rader C等, J Biol Chem 275:13668-13676 (2000))。已经通过RT-PCR测试了这些上皮细胞系的子集的PD序列以确定真阴性, 然而, 除B细胞谱系的那些之外从未报道由恶性细胞表达mIgM, 且本文的研究没有显示组中的任意细胞系中的这些序列。通过黑色素瘤和肉瘤的组对PD 13-聚体mIgM和18-聚体mIgG的RT-PCR并没有发现表明该肽在这些非B细胞谱系细胞中的表达的信号, 延伸了这一观察。因此, 任意结合将代表交叉反应性而不是BCRC抗原检测。通过使用抗小鼠Ig抗体或蛋白A包被的红细胞的吸附, 使用显微镜检测了抗体对肿瘤细胞的细胞表面的结合。滴度定义为给出最大花节(rosetting)的最高试剂稀释(Rettig WJ等, Int J Cancer 58:385-392 (1994); Kitamura K等, Proc Natl Acad Sci USA 91:12957-12961 (1994); Garin-Chesa P等, Int J Oncol 9:465-471 (1996); Rader C等, J Biol Chem 275:13668-13676 (2000))。在抗体组中含有由申请人和同事先前开发的对照阳性抗体, 包括mAb A33, mAb 3S193, mAb G250和mAb F19(Rettig WJ等, Int J Cancer 58:385-392 (1994); Kitamura K等, Proc Natl Acad Sci USA 91:12957-12961 (1994); Garin-Chesa P等, Int J Oncol 9:465-471 (1996); Rader C等, J Biol Chem 275:13668-13676 (2000))。在结合测定中针对人上皮细胞系的组: 乳腺(9), 肺(9), 结肠(12), 肾(6), 前列腺(3), 卵巢(3), 黑色素瘤(6)和肉瘤(2)的对单克隆抗体mAb1-1, mAb2-2b, mAb3-2b和mAb4-2b的广泛筛选均为阴性。

[0294] CRL 1647是真阳性, 其微弱地塑料附着, 但通过使用聚L-赖氨酸预包被的平板使

得更多附着。对于非附着的靶细胞,通过显微镜检查玻璃载玻片上的细胞评估花结。

[0295] 实施例5

[0296] mAb与活细胞系和NP-40裂解物测定的特异性反应性

[0297] 使用蛋白G包被的huRBC的血细胞吸附测定(HA) 使用相差显微镜(100x)计分为阴性(neg), +, ++, 或+++. 该细胞系组由(1) mIgM-lambda, CRL 1432, CRL 1596, CRL 1649, CRL 3006, CRL 2958, (2) mIgM-kappa, CRL 1647, CRL 1648, CRL 2260, (3) mIgG-lambda 2289, (4) mIgG, CRL 2632, 和(5) SK007组成。选择上皮癌症和黑色素瘤细胞系用于与同种型匹配的对照mAb的反应性。使用小鼠Ig预吸附的捕获山羊抗人IgM恒定区血清进行CL的ESA(细胞裂解物的ELISA夹心测定), 并使用人Ig预吸附的山羊抗小鼠Ig-HRP检测。值得注意的是, 所有的淋巴瘤系具有与血清IgM相似的胞质IgM。因此, 该测定不确定或评估mAb特异性以区分mIgM vs. 血清或胞质IgM之间的反应性。结果展示于以下表4中。

[0298] 表4

[0299]

<u>HA</u> 细胞靶标	<b>mAb1</b>	<b>mAb2</b>	<b>mAb3</b>	<b>mAb 4</b>	<b>mAb 同种型 IgG1 对照</b>	<b>mAb 同种型 IgG2 对照</b>
mIgM-kappa	+++	+++	+++	+++	neg	neg
mIgM-lambda	+++	+++	+++	+++	neg	neg
mIgG-kappa	neg	neg	neg	neg	neg	neg

[0300]

mIgG-lambda	neg	neg	neg	neg	neg	neg
mIgE	neg	neg	neg	neg	neg	neg
结肠(12)	neg	neg	neg	neg	+++	+++
乳腺(9)	neg	neg	neg	neg	++/+++	neg
肺(9)	neg	neg	neg	neg	++/+++	neg
黑色素瘤(2)	neg	neg	neg	neg	++/+++	neg
<b><u>CL 的 ESA</u></b>						
细胞靶标						
mIgM-kappa	+++	+++	+++	+++	neg	neg
mIgM-lambda	+++	+++	+++	+++	neg	neg
mIgG-kappa	neg	neg	neg	neg	neg	neg
mIgG-lambda	neg	neg	neg	neg	neg	neg
mIgE	neg	neg	neg	neg	neg	neg
结肠 (12)	neg	neg	neg	neg	+++	+++
乳腺 (9)	neg	neg	neg	neg	+++	neg
肺(9)	neg	neg	neg	neg	+++	neg
黑色素瘤 (2)	neg	neg	neg	neg	+++	neg

[0301] 统计学分析: Student's t检验用于评估示出的Elisa数据点的统计学有效性。所

有的数据点由进行的3次实验的每一次的12个孔组成，并示出了代表性的平均值。对于所有,+++或++与它们的相相对照相比, mAb 1, mAb 2, mAb 3, 和 mAb 4的数据展现出超过p<0.5。加粗的值是统计学显著的。

[0302] 细胞系:通过从ATCC获得认证了阳性细胞系并示于每个测定的前5行,其如下确定: mIgM-kappa=CRL 1647, CRL 1648, CRL 2260; mIgM-lambda=CRL 1432, CRL 1596, CRL 1649, CRL 2958, mIgG-kappa=CRL 2632; mIgG-lambda=CRL 2289; mIgE=SK007。从ATCC获得了结肠,乳腺,肺和黑色素瘤细胞系并血清学测试以确认它们的身份。这一结肠,乳腺,肺和黑色素瘤的非淋巴癌症细胞系的组由以下细胞系组成:

[0303] (1) 结肠:T84, SW1222, Colo 205, Lim 1215, HT-29, DLD-1, SW1116, SW 620, SW 480, LoVo, HCT-15, HCT-116

[0304] (2) 乳腺:BT 474, SK BR7, CaMa-1, BT-20, MCF-7, SK Br-3, MDA-MB 453, MDA-MB 436, MDA-MB 468.

[0305] (3) 肺:H64, SW1271, DMS 78, SK-LU-9, NCI H596, A549, NCI H1105, NCI H69, DMS 53

[0306] (4) 黑色素瘤:SK MEL-29, MeWo

[0307] 实施例6

[0308] 相对结合研究

[0309] 使用如上文所述的ELISA测定,将纯化的单克隆抗体mAb1-1, mAb2-2b, mAb3-2b, mAb4-2b, 和mAb11-1以1:4系列稀释,然后添加以结合由捕获抗人IgM结合的人mIgM。然后使用特异性山羊抗小鼠IgG-HRP标记的试剂检测结合的小鼠mAb。可以彼此比较相同同种型的单克隆抗体。使用以下表5-8中确定的其它阳性靶标进行了相似的测定。

[0310] ELISA测定

[0311] 表5

[0312] 通过直接结合的mAb分子特异性和相对反应性

[0313]

ELISA 读数->	KLH- PDm	KL H	KLH- PDg	CA 46	SU-D HL-5	CRL- 1596	CRL- 1432	CRL- 1647	CRL- 1642
mAb1-1	<b>&gt;4.0</b>	0.3	0.3	<b>3.7</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>3.2</b>	<b>3.5</b>	<b>2.9</b>	<b>3.0</b>
mAb2-2b	<b>3.7</b>	0.2	0.4	<b>3.4</b>	<b>3.4</b>	<b>3.4</b>	<b>3.2</b>	<b>3.1</b>	<b>3.3</b>
mAb3-2b	<b>3.3</b>	0.3	0.3	<b>3.1</b>	<b>2.7</b>	<b>3.1</b>	<b>3.2</b>	<b>2.8</b>	<b>2.8</b>
mAb4-2b	0.9	0.3	0.2	<b>&gt;4.0</b>	<b>3.8</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>3.9</b>	<b>3.7</b>
mAb11-1	0.3	0.3	<b>3.2</b>	0.3	0.2	0.3	>4.0	0.2	0.2
抗 huIgM	0.2	0.2	0.2	<b>3.8</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>

[0314] 表6

[0315] 通过直接结合的mAb分子特异性和相对反应性

[0316]

	<b>mAb 1</b>	<b>mAb 2</b>	<b>mAb 3</b>	<b>mAb 4</b>	<b>mAb 对 照</b>	<b>mAb 对照</b>
mIgM-PD-KLH	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>0.5</b>	0.1	0.1
KLH	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
mIgM-PD-MAP	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>0.9</b>	0.1	0.1
MAP	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1

[0317]

	<b>mAb 1</b>	<b>mAb 2</b>	<b>mAb 3</b>	<b>mAb 4</b>	<b>mAb 对 照</b>	<b>mAb 对照</b>
mIgM-PD	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>0.8</b>	0.1	0.1
mIgG-PD	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
P-Focus	<b>3.1</b>	<b>2.8</b>	<b>2.6</b>	<b>&gt;4.0</b>	0.3	0.2
P-Focus + IA	<b>3.3</b>	<b>2.5</b>	<b>2.3</b>	<b>&gt;4.0</b>	0.1	0.1
mIgM-PD-异构体 1	<b>3.8</b>	<b>3.2</b>	<b>3.0</b>	<b>0.9</b>	0.1	0.1
MIgM-PD-异构体 2	<b>3.2</b>	<b>3.0</b>	<b>3.2</b>	<b>0.7</b>	0.1	0.1

[0318] mIgM-PD=EGEVSADEEGFEN (SEQ ID.NO:11)

[0319] 异构体1=EGENSADEEGFEN (SEQ ID NO:14)

[0320] 异构体2=EGEVSEDEEGFEN (SEQ ID NO:15)

[0321] 统计学分析:Student's t检验用于评估示出的数据点的统计学有效性。所有的数据点由进行的3次实验的每一次的12个孔组成,并示出了代表性的平均值。对于1,3,5,7,8,9和10行,与它们的相对对照相比,mAb 1,mAb 2,mAb 3,和mAb 4的数据展现出超过p<0.5。加粗的值是统计学显著的。缩写:PD,近端域;mIgM,膜结合的IgM;KLH,匙孔血蓝蛋白;MAP,多抗原肽(PD的);P-Focus<sup>TM</sup>,Perfect FOCUS<sup>TM</sup>细胞提取物;IA,免疫亲和柱(mAb 1)。

[0322] 表7

[0323] mAb分子特异性和相对反应性,通过直接结合的抑制

[0324]

ELISA 读数->	CRL - 2632	血清 正常	纯化 的 IgM	血清 W.M .	纯化 的 mIgM	KLH-P Dm 阻 断的纯 化的 mIgM	KLH-P Dg 阻 断的纯 化的 mIgM	KLH 阻断的 纯化的 mIgM	COLO- 205 阻 断的纯 化的 mIgM
mAb1-1	0.2	0.2	0.3	0.3	<b>&gt;4.0</b>	0.7	<b>&gt;4.0</b>	<b>3.9</b>	<b>3.7</b>
mAb2-2 b	0.3	0.3	0.4	0.3	<b>3.4</b>	0.3	<b>3.6</b>	<b>3.5</b>	<b>3.5</b>
mAb3-2 b	0.3	0.3	0.3	0.3	<b>3.6</b>	0.4	<b>3.7</b>	<b>3.6</b>	<b>3.4</b>
mAb4-2 b	0.3	0.3	0.3	0.2	<b>&gt;4.0</b>	<b>3.8</b>	<b>&gt;4.0</b>	<b>3.8</b>	<b>3.9</b>

[0325]

mAb11-1	<b>3.5</b>	0.4	0.2	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.2
抗 huIgM	0.7	<b>&gt;4.0</b>	<b>3.9</b>						

[0326] KLH-PDm=匙孔血蓝蛋白-IgM的近端域肽

[0327] KLH=匙孔血蓝蛋白

[0328] KLH-PDg=匙孔血蓝蛋白-IgG的近端域肽

[0329] CA46, SU-DHL-5, CRL-1592, CRL-1432, CRL-1647, CRL-1642=mIgM+B细胞系

[0330] CRL-2632=mIgG+B细胞系

[0331] 血清W.M.=来自患有Waldenstrom巨球蛋白血症患者的血清

[0332] 纯化的mIgM=使用mAb1-1从CA46免疫亲和纯化的mIgM

[0333] COLO-205=人结肠癌细胞系

[0334] mAb11-1=针对mIgG的PD的单克隆抗体

[0335] 抗huIgM=针对人IgM的小鼠多克隆抗体

[0336] 表8

[0337] 对纯化的mIgM细胞提取物CRL 1647的mAb结合的血清和细胞抑制

[0338]

	空白 FCS	正常 血清	正常 血浆	CLL 血清	CLL 细胞	W-Ms 血清	DLB CL 血清	INHL 血清	乳腺 血清	结肠 血清
mAb 1	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++	+++ +
mAb 2	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++	+++
mAb 3	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++	+++
mAb 4	+++	+++	+++	+++	0	+++	+++	+++	+++	+++
抗 hu-IgM	+++	+	+	++	++	0	+	+	+	+

[0339]    +++=没有检测到抑制

[0340]    0=完全抑制

[0341] 血清,血浆和CLL细胞对mAb结合Perfect FOCUS™靶细胞提取物的抑制表明血液中缺乏能够阻断mAb结合靶抗原的特异性抗原,然而,相反的是,CLL细胞吸附mAb从而降低mAb结合靶标。

[0342] 统计学分析:Student's t检验用于评估示出的数据点的统计学有效性。所有的数据点由进行的3次实验的每一次的12个孔组成,并示出了代表性的平均值作为0至+++的分数。mAb 1,mAb 2,mAb 3,和mAb 4的数据展现出结合无显著降低,除了通过CLL细胞预吸附外。这些结果与与底行示出的多克隆抗人IgM显著不同,对于正常血清,正常血浆,Waldenstrom巨球蛋白血症血清和淋巴瘤乳腺或结肠癌血清超过p<0.5。显示了计分,+++=结合无统计学降低,++=p>0.05降低,+=p>0.01和0=没有超过背景的可检测结合。测试的血清包括Waldenstrom巨球蛋白血症血清(W-Ms),其含有4.2克/分升IgM,CLL血清,其含有22mg/分升的IgM,弥漫大细胞B细胞淋巴瘤ABC型(DLBCL)惰性非霍奇金淋巴瘤(iNHL)。

[0343]    实施例7

[0344]    通过肽抑制的结合研究和表位定位

[0345] 在初始放射性标记研究中,通过放射性免疫反应性测定,IgG2b单克隆抗体没有良好标记(Barendswaard EC等,Int J Oncol 12:45-53(1998);Barendswaard E等,J Nucl Med 42:1251-1256(2001);Scatchard plots [www.curvefit.com/scatchard\\_plots.htm#transforming\\_data\\_to\\_create\\_a\\_scatchard](http://www.curvefit.com/scatchard_plots.htm#transforming_data_to_create_a_scatchard))。用于HRP的蛋白标记试剂盒(Sigma-Aldrich,St Louis,MO,USA;Pierce Chemicals,Rockford,IL,USA)用于固相标记技术。使用过量的未标记的抗体以阻断标记的抗体结合确定以下克隆组:1.阻断标记的抗体的那些(相同的表位),2.不阻断表位的那些(不同的表位)和3.部分阻断(近表位或较弱结合)。重复该过程直到所有的克隆确定了表位。通过抑制测定获得了另外的信息,其中mAb被6-聚体阻断且该数据是证实的。结合研究的结果呈现于以下表9和10中。

[0346]    表9

[0347]    通过竞争性mAb结合的分子表位定位

	由 mAb1 阻断	mAb 1	mAb 2	mAb 3	mAb 4	对照 mAb
[0348]	mIgM-PD	<b>11</b>	88	82	72	neg
	mIgG-PD	neg	neg	neg	neg	neg
	KLH-mIgM-PD	<b>6</b>	94	92	74	neg
	mIgM-PD-KLH	<b>10</b>	92	91	52	neg
	P-Focus + IA	<b>13</b>	90	89	96	neg
<b>由 mAb2 阻断</b>						
[0349]	mIgM-PD	80	<b>2</b>	23	69	neg
	mIgG-PD	neg	neg	neg	neg	neg
	KLH-mIgM-PD	67	<b>4</b>	24	68	neg
	mIgM-PD-KLH	78	<b>2</b>	34	71	neg
	P-Focus + IA	78	<b>3</b>	31	96	neg
<b>由 mAb3 阻断</b>						
[0349]	mIgM-PD	85	35	<b>9</b>	63	neg
	mIgG-PD	neg	neg	neg	neg	neg
	KLH-mIgM-PD	79	28	<b>4</b>	72	neg
	mIgM-PD-KLH	87	36	<b>9</b>	62	neg
	P-Focus + IA	82	39	<b>10</b>	85	neg
<b>由 mAb4 阻断</b>						
[0350]	mIgM-PD	93	87	84	<b>12</b>	neg
	mIgG-PD	neg	neg	neg	neg	neg
	KLH-mIgM-PD	82	88	95	<b>14</b>	neg
	mIgM-PD-KLH	90	94	85	<b>9</b>	neg
	P-Focus + IA	95	94	86	<b>9</b>	neg

[0350] 统计学分析: Student's t检验用于评估示出的数据的统计学有效性。所有的数据点由进行的3次实验的每一次的12个孔组成, 并示出了代表性的平均值。统计学显著性比较包括对mIgM-PD, KLH-mIgM-PD和P-Focus+IA的每一个在由未标记的mAb预阻断的mAb-HRP反应性的测试中(例如, mAb1-1-HRP由未标记的mAb1-1阻断, 且对于每个HRP标记的mAb由其配偶体mAb获得相似的结果, 加粗的)。mAb 1, mAb 2, mAb 3, 和mAb 4的数据点展现出对于每个自阻断vs. 未阻断超过p<0.5(数据未示出)。进一步的测试表明, mAb 1不阻断mAb 2, mAb 3或mAb 4; mAb 2不阻断mAb 1和mAb 4; 但与mAb 1和mAb 4相比, mAb 3部分降低。这些结果与对mAb 3分析相似, 显示对mAb 2的部分阻断。mAb 4分析展现出缺乏对mAb1, mAb 2和mAb 4的阻断。结论: 对于mIgM-PD, KLH-mIgM-PD和P-Focus+IA靶标, mAb 1和mAb 4各检测不同的表位, 而mAb 2和mAb 3检测部分共享的另一个确定的表位。当与其它mAbs比较时, mAb 4表现出对纯化的mIgM(P-Focus+IA)相对改进的结合。

[0351] 表10

[0352] 通过竞争性6-聚体肽结合的分子表位定位

[0353]

由6-聚体A阻断	mAb 1	mAb 2	mAb 3	mAb 4	对照mAb
mIgM-PD	28	45	61	81	neg
mIgG-PD	neg	neg	neg	neg	neg
P-Focus	19	53	54	90	neg
由6-聚体B阻断	mAb 1	mAb 2	mAb 3	mAb 4	对照mAb
mIgM-PD	84	57	50	70	neg
mIgG-PD	neg	neg	neg	neg	neg
P-Focus	90	48	57	94	neg

[0354] 6-聚体A肽=EGEVSA (SEQ ID NO:16) 和6-聚体肽B=EEGFEN (SEQ ID NO:17) 以相比于mAb-HRP摩尔过量X100使用。统计学分析表明mAb 4识别不被A或B 6-聚体阻断的一种不同表位。尽管mAb1不被B阻断,mAb 1被A强烈地阻断且mAb 2和mAb 3被A和B两者部分地阻断。肽抑制测定中的限制因素包括小肽片段的疏水性特性。

[0355] 这些研究表明mAb 4-2b对延伸的肽具有相比11-聚体增加的结合,但两种6-聚体都不完全阻断它。这些数据提示其表位跨越ECPD和末端mu域4,且其表位是构象的并因此不被小线性肽完全抑制。值得注意的是,抗体mAb4-2b在血细胞吸附测定和FM最强。

[0356] 其它3种mAb,mAb1-1,mAb2-2b和mAb3-2b,分成两个表位,在ECPD中一个近端和一个远端,尽管使用HRP标记的实验经常存在一些程度的部分阻断的事实。尽管可以确定结合3个不同的表位,重叠(部分阻断)确实存在。4种mAb的该最终组的具有最高亲合力和限制性特异性的表位特异性克隆,每种检测延伸的ECPD中的表位如通过肽抑制确定的,收集到3种单克隆抗体的“表位组”中。

[0357] 实施例8

[0358] 通过扫描免疫电镜的结合研究

[0359] 细胞系CA46 (CRL 1648) 代表了具有相对低mIgM表达的B细胞系,基于通过流式细胞分析的“DIM”轻链反应性,与慢性淋巴性白血病 (CLL) 细胞相似,并用于扫描免疫电镜 (SEM) 以研究单克隆抗体的结合。SEM结果呈现于以下表11和18中。图1A的显微照片示出了对照IgG2b同种型匹配的对照抗体加上二抗山羊抗小鼠Ig-金。图1B和1C中的显微照片示出了单克隆抗体m-Ab4-2b,在该显微照片中指定为mAb4,结合CA 46 (CRL 1648) 的两种不同细胞,以图1A中的对照抗体相同的放大倍率。图1D中的显微照片示出了单克隆抗体m-Ab4-2b,在显微照片中指定为mAb4,结合第三种CA 46 (CRL 1648) 细胞,以相比于图1A的对照抗体更高的放大倍率。亮白点代表在细胞表面上免疫金颗粒-山羊抗小鼠Ig与mAb4单克隆抗体反应。使用图1A中的对照抗体,没有看到背景山羊抗小鼠Ig反应性,表明与人mIgM的交叉反应性的缺失和由B细胞上Fc受体的非特异性结合的缺失。从这些显微照片,估算mIgM以5,000-10,000个分子每细胞存在。这些SEM显微照片表明mAb4-2b结合细胞表面上的mIgM。

[0360] 表11

[0361]

靶细胞系: CA 46 (CRL 1648) 戊二醛固定化	扫描免疫电镜 (SEM)
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阳性
mAb2-2b	阳性
mAb3-2b	阳性
mAb4-2b	阳性
小鼠抗人IgM	阳性
小鼠抗人Kappa轻链	阳性
mAb抗人IgM重链	阳性
mAb抗人IgG重链	阴性

[0362] 通过抗人IgM, 抗人Kappa轻链, 抗人IgM重链试剂, 示出了揭示细胞表面结合和和靶mIgM的存在的直接mAb结合研究。

[0363] 表12

[0364]

靶细胞系: CA 46 (CRL 1648) 戊二醛固定化 抗体与人血清1:10或人Waldenstrom 巨球蛋白血症血清1:10 (4 .4 gm IgM/dl)预孵育	扫描免疫电镜 (SEM)
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阳性
mAb2-2b	阳性
mAb3-2b	阳性
mAb3-2b	阳性
小鼠抗人IgM	阴性
小鼠抗人Kappa轻链	阴性
mAb抗人IgM重链	阴性
mAb抗人IgG重链	阴性

[0365] 通过与含有高水平的血清IgM的人Waldenstrom血清预孵育, mAbs不被阻断细胞表面结合。相反, 抗人IgM, 抗人Kappa轻链, 和抗人IgM重链试剂被阻断, 导致它们的细胞表面结合缺失。

[0366] 表13

[0367]

靶细胞系: CA 46(CRL 1648) 戊二醛固定化; 抗体与过剩的CRL-1432预孵育(吸 附) (mIgM阳性细胞系)	扫描免疫电镜 (SEM)
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阴性
mAb2-2b	阴性
mAb3-2b	阴性
mAb4-2b	阴性
小鼠抗人IgM	阴性
mAb抗人IgM重链	阴性
mAb抗人IgG重链	阴性

[0368] 通过与表达mIgM的CRL 1432预孵育, mAb被阻断细胞表面结合, 且抗人IgM, 抗人Kappa轻链, 抗人IgM重链试剂被阻断因为它们也结合CRL 1432上的mIgM。

[0369] 表14

[0370]

靶细胞系: CA 46 (CRL 1648) 戊二醛固定化; 抗体与过剩的mIgM近端域肽预孵育	扫描免疫电镜 (SEM)
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阴性
mAb2-2b	阴性
mAb3-2b	阴性
mAb4-2b	阳性
小鼠抗人IgM	阳性

[0371]

靶细胞系: CA 46 (CRL 1648) 戊二醛固定化; 抗体与过剩的mIgM近端域肽预孵育	扫描免疫电镜 (SEM)
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb抗人IgM重链	阳性
mAb抗人IgG重链	阴性

[0372] 过剩的mIgM PD阻断mAb 1-1, mAb2-2b和mAb3-2b结合CRL 1648的细胞表面, 而mAb4-2b不被阻断且可以检测到结合CRL 1648细胞表面。

[0373] 表15

[0374]

靶细胞系: CA46(CRL 1648) CA 46细胞与mAb1-1在37° C 预孵育 30分钟, 接着戊二醛固定化, 接着抗体孵育然后SEM	扫描免疫电镜 (SEM)
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阴性
mAb2-2b	阴性
mAb3-2b	阴性
mAb4-2b	阴性
mAb抗人IgM重链	阴性
mAb抗人IgG重链	阴性

[0375] mAb1-1介导的mIgM内化达30分钟, 导致通过mAb或抗人IgM重链试剂对CRL 1648细胞表面上的mIgM检测的缺失。

[0376] 表16

[0377]

靶细胞系: CA46(CRL 1648)  CA 46细胞与mAb4-2b在37°C预孵育 30分钟, 接着戊二醛固定化, 然后 SEM	扫描免疫电镜 (SEM)
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阴性
mAb2-2b	阴性
mAb3-2b	阴性
mAb4-2b	阴性
小鼠抗人IgM	阴性
小鼠抗人IgM重链	阴性
小鼠抗人IgG重链	阴性

[0378] mAb4-2b介导的mIgM内化达30分钟, 导致通过mAb或抗人IgM重链试剂对CRL 1648细胞表面上的mIgM检测的缺失。

[0379] 表17

[0380]

靶细胞系: CA46(CRL 1648)  使用戊二醛固定化CA46细胞接着使 用mAb1-1继之以mAb孵育	扫描免疫电镜(SEM) 使用抗小鼠 IgG1抗体金
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阴性
mAb2-2b	阴性
mAb3-2b	阴性
mAb4-2b	阳性
小鼠抗人IgM重链	阳性
小鼠抗人IgG重链	阴性

[0381] 抗小鼠IgG1-金试剂检测到mAb4-2b, 其为小鼠IgG1同种型, 结合到使用IgG2b同种

型mAb1-1抗体预孵育的CRL 1648的表面,表明mAb1-1结合与mAb4-2b不同的表位且不阻断mAb4-2b。

[0382] 表18

[0383]

使用戊二醛固定化CA46细胞接着使用mAb2-2b继之以mAb孵育	扫描免疫电镜(SEM)使用抗小鼠IgG1抗体金
测试的抗体	细胞系结合结果
mAb1-1	阴性
mAb2-2b	阴性
mAb3-2b	阴性
mAb4-2b	阳性
小鼠抗人IgM	阳性
小鼠抗人IgM重链	阳性
小鼠抗人IgG重链	阴性

[0384] 抗小鼠IgG1-金试剂检测的mAb4-2b,其为小鼠IgG1同种型,结合到使用IgG2b同种型mAb2-2b抗体预孵育的CRL 1648的表面,表明mAb2-2b结合与mAb4-2b不同的表位且不阻断mAb4-2b。

[0385] 实施例9

[0386] mAb结合介导BCRC内化

[0387] 进行了扫描免疫电镜(SEM)以检测单克隆抗体mAb 4对细胞系CRL1648的结合。图2A示出了单克隆抗体mAb 4对戊二醛固定的CRL1648细胞的结合。图2B示出了mAb 4结合BCRC的微群。当CRL1648细胞与mAb 4在37℃孵育30分钟,接着固定并使用山羊抗小鼠Ig染色时,可检测单克隆抗体mAb 4缺失,示于图2C,与图2A中看到的mAb4结合形成对比。膜上可检测mAb 4的缺失是由于BCRC的内化。当CRL1648细胞与mAb 4在37℃孵育15分钟,接着固定并使用山羊抗小鼠Ig染色时,内化不完全并在图2D中看到了残留的结合的单克隆抗体mAb 4。当CRL1648细胞与mAb 4在37℃孵育30分钟,接着固定并使用山羊抗hu-IgM染色时,BCRC未检测到,其示于图2E中。

[0388] 实施例10

[0389] 预处理的B细胞系(有或没有酸洗涤)对mAb 4结合的抑制

[0390] 评估mAb诱导的mIgM内化

[0391] 为了确定在各种条件下相对细胞表面mIgM水平,将B细胞暴露于戊二醛固定的细胞(表19中的第1和2行)(按照以下SEM方案)或使用活细胞。将细胞暴露于mAb 4,10mcgs/ml在4℃持续0分钟(表19中的第3和4行),和在37℃持续5分钟(表19中的第5和6行),15分钟(表19中的第7和8行),或30分钟(表19中的第9和10行)。接着在用于mAb 4-HRP结合测定的

抑制之前,使用pH 7.0 PBS或pH 4.0 0.5M乙酸缓冲液0.15N NaCl洗涤细胞。对于每种细胞系,第1行设置为100%结合而第2行揭示了酸洗涤去除细胞结合的mAb 4和允许mAb 4-HRP被细胞吸附,减少对于结合测定可用的mAb 4-HRP的能力。对于在冰上孵育的细胞看到了相似的结果,表明戊二醛固定化和冷两者都降低mAb介导的mIgM的内化。定时实验表明通过在37°C持续30分钟,细胞抑制降低,在PBS和乙酸洗涤(pH 4.0)之间没有差异,提示mIgG主要被内化。该结果呈现于以下表19中。

[0392] 表19

[0393]

<b>mAb 4-HRP 对靶标结合的细胞抑制, 使用以下细胞</b>	<b>吸附前细胞处理</b>	<b>CRL 1648</b>	<b>CRL 1647</b>	<b>CRL1596</b>
戊二醛固定化的	PBS	100	100	100
戊二醛固定化的	乙酸	10	21	19
活细胞, 冰上	PBS	92	95	88
活细胞, 冰上	乙酸	12	18	20
活细胞 37°(5 min)	PBS	77	67	66
活细胞 37° (5 min)	乙酸	26	18	27
活细胞 37°(15 min)	PBS	78	81	72
活细胞 37° (15 min)	乙酸	48	44	56

[0394]

<b>mAb 4-HRP 对靶标结合的细胞抑制, 使用以下细胞</b>	<b>吸附前细胞处理</b>	<b>CRL 1648</b>	<b>CRL 1647</b>	<b>CRL1596</b>
活细胞 37° (30 min)	PBS	70	64	60
活细胞 37° (30 min)	乙酸	66	62	61

[0395] 实施例11

[0396] 生物学活性

[0397] mAb4-2b介导生长抑制,抗克隆形成活性和凋亡

[0398] 由于mIgM PD中序列的独特性以及跨膜细胞信号转导传达到CD79 $\alpha\beta$ 的证据,完成了检查CA46 (CRL 1648) 细胞的生长曲线(MTT) 和克隆形成,以确定是否存在对该过程的调节(Kikushige Y等,Cancer Cell 20 (2) :246-59 (2011); Martinez-Climent JA, Haematol 95 (2) :293-302 (2010); Franken NP等,Nature Protocols 1:2315-2319 (2006))。在96孔板中,对单个克隆在有限稀释的存活的初始测试表明三种单克隆抗体具有一些活性。最强的活性伴随单克隆抗体mAb4-2b,其结合PD和结构域4两者,并结合构象表位区。单克隆抗体mAb4-2b结合部分去垢剂敏感的,多聚甲醛和还原抗性的表位。其它3种mAb结合PD中更近端的表位。这些细胞生长抑制效果是否与阻断直接传输细胞信号转导的表位相关或由于mAb的大尺寸和/或由于微群而是空间相关的不清楚。

[0399] 总体来说,如以下表20至23中所示的抑制测定,最强烈的mAb,mAb4-2b,降低CA46克隆形成能力100倍(Kikushige Y等,Cancer Cell 20 (2):246-59 (2011);Martinez-Clement JA,Haematol 95 (2):293-302 (2010);Franken NP等,Nature Protocols 1:2315-2319 (2006))。

[0400] 抑制测定

[0401] 将细胞在24孔板中铺板,并以1:2系列稀释转移到96孔板中,如以下表20至23所示。进行了MTT测定,其中每个值是每个稀释点的8个孔的平均.ng=无生长,没有活细胞。

[0402] 表20

[0403] CA (CRL 1648)

[0404]

# 细胞/孔	500 0	250 0	125 0	062 5	031 2	015 6	007 8	003 9	001 9	000 8	000 4	000 0
<b>mAb4-2b</b>	2.6	1.3	0.9	0.7	ng							
<b>对照</b>	4.0	4.0	4.0	2.7	1.9	1.6	0.9	0.6	0.4	0.4	ng	ng
<b>目视确认</b>					+	+	+	+	+	+	+	+

[0405] 表21

[0406] SU-DHL-5 (CRL 2958)

[0407]

#细胞/孔	500 0	250 0	125 0	062 5	031 2	015 6	007 8	003 9	001 9	000 8	000 4	000 0
<b>mAb4-2b</b>	2.0	1.1	0.7	0.4	ng							
<b>对照</b>	4.0	4.0	4.0	3.7	2.9	1.9	0.9	0.6	0.4	0.4	ng	ng
<b>目视确认</b>					+	+	+	+	+	+	+	+

[0408] 表22

[0409] Ramos (CRL 1596)

[0410]

#细胞/孔	500 0	250 0	125 0	062 5	031 2	015 6	007 8	003 9	001 9	000 8	000 4	000 0
<b>mAb4-2b</b>	3.0	2.1	1.7	0.7	0.3	ng						
<b>对照</b>	4.0	4.0	4.0	3.6	2.7	1.1	0.8	0.8	0.5	0.5	0.3	ng
<b>目视确认</b>						+	+	+	+	+	+	+

[0411] 表23

[0412] Namalwa (CRL 1432)

[0413]

#细胞/孔	500 0	250 0	125 0	062 5	031 2	015 6	007 8	003 9	001 9	000 8	000 4	00 0
mAb4-2b	3.2	2.4	0.9	0.2	ng	ng						
对照	4.0	4.0	4.0	4.0	2.6	1.0	0.8	0.8	0.5	0.5	0.3	ng
目视确认					+	+	+	+	+	+	+	+

[0414] 实施例12

[0415] 有限稀释测定和细胞密度试验

[0416] 使用或不使用1微克mAb 4的有限稀释测定展现出到第10天时的显著的细胞存活和生长特性。该结果呈现于以下表24中。数值表示为mAb 4处理的%活细胞/对照抗体处理的%活细胞。注意在48和24孔细胞培养板之间,培养基体积加倍之间的细胞生长的显著差异。细胞以100微升在96孔板中铺板,250微升在48孔板中铺板,和500微升在24孔板中铺板。观察到了多达500-1000个铺板细胞的明显的生长抑制。据相信这代表了由干细胞产生的旁分泌生长因子的效果,其被mAb 4杀灭。这些实验也提示几种不同的干细胞群体以不同的频率存在,其能够在不同的细胞密度恢复(rescue)细胞生长。

[0417] 表24

[0418]

细胞系	10 细胞/96 孔	10 细胞/48 孔	10 细胞/24 孔	50 细胞/96 孔	50 细胞/48 孔	50 细胞/24 孔
CRL 1648	32	21	<1	67	25	<1
CRL 1647	41	18	<1	57	28	<1
CRL 1596	36	23	<1	66	18	<1

[0419] 统计学分析:Student's t检验用于评估示出的每个数据点的统计学有效性。所有的数据点由进行的3次实验的每一次的12个孔组成,并示出了代表性的平均值。第一个分析由比较mAb 4处理的%活细胞/对照mAb处理的%活细胞的每个数据点表示。示出的18个数据点的每一个达到了统计学水平p<0.5。第二个分析揭示对于每个比较中的细胞系,48孔活细胞计数和配对的24孔之间的统计学差异。在每种情况下,这些也超过了p<0.5。在生长抑制研究中,MTT活力计数表明抑制与铺板的细胞数量成反比。在对照mIgM-,mIgG+表达的细胞上的相似实验没有表现出任何生物学效果,且多克隆兔或山羊抗IgM不是抗克隆形成的。这表明该特异性决定的抑制定位在接近细胞膜的新表位中。

[0420] 生长曲线:在1 $\mu$ g/ml的mAb4-2b存在下培养mIgM B细胞系(如表20至23所示)。细胞以20个细胞/ml铺板。每2天收集平板,其中通过MTT测试确定活细胞。对于每个时间点的相对MTT OD作图。通过活细胞的缺失(第10天)对凋亡打分,如通过在没有抗体下存活细胞的

再克隆培养物确定的。该结果呈现于图6A-6F。同种型匹配的对照抗体和对照抗PD mAb2两者都没有诱导对CRL 1648细胞系的生长抑制,示于图6A,6B,和6D-6F中。当使用表达mIgG的对照B细胞系CRL 2632时,mAb 4不结合mIgG且不抑制该细胞系的生长,示于图6C中。图6D-6F示出了mAb 4不诱导表达mIgM的B细胞系CRL 1648,CRL 2958,CRL 1596和CRL 1432的生长抑制。

[0421] 以20细胞/孔,100细胞/孔,250细胞/孔,500细胞/孔和1,000细胞/孔测试了单克隆抗体mAb4对表达mIgM的B细胞系CRL 1648的在十天中的生长抑制。如图7中所示,对于10天时段,单克隆抗体mAb 4抑制表达mIgM的B细胞系CRL 1648的生长,但当细胞铺板浓度为>500细胞/孔时并非如此。

[0422] 实施例13

[0423] 补体裂解和ADCC

[0424] 目标是评估这些单克隆抗体关于人补体(C') (IgG2, IgG3和IgM) 和人效应细胞介导的抗体导向的细胞介导的细胞毒性(ADCC) (IgG2和IgG3) 的免疫细胞毒性能能力(Paneerselvam M等,J Immunol 136:2534-2541 (1986); Welt S等,Clin Immunol Immunopathol 45:214-229 (1987))。由于这些单克隆抗体是小鼠单克隆抗体,该分析部分地仅用于帮助确定使用这些小鼠抗体C'或ADCC是否阳性并因而将是在人源化的抗体临床产品开发中保留的重要因素。尽管由于它们的Ig亚类,小鼠IgG1单克隆抗体可以并不具有效应功能的能力,焦点是确定是否任何个体克隆具有特殊的活性。

[0425] 在从最终组的克隆收集的同种型的最终分析中,基于初始结合研究保存的用于进一步分析的是四种IgG2b和两种IgG1单克隆抗体,其包括抗mIgM-mAb1-1,mAb2-2b,mAb3-2b,和mAb4-2b。当它们在37°C完成时,这些中没有一个在该测定中阳性,且内化快速发生。由于这些结果是快速内化的后果,它们与其它结合近端域表位的抗体形成强烈反差,所述抗体报道介导这些免疫机制。这些结果也可以是由于低抗原水平,抗性因子或同种型(Paneerselvam M等,J Immunol 136:2534-2541 (1986); Welt S等,Clin Immunol Immunopathol 45:214-229 (1987))。Rituximab和多克隆兔抗人IgM用作阳性对照。

[0426] 药物制剂

[0427] 可以作为冻干试剂,或通过混合具有期望纯度的多肽和任选的本领域通常采用的“药学上可接受的”载体,赋形剂或稳定剂(其都称为“赋形剂”),即缓冲剂,稳定剂,防腐剂,等渗剂,非离子型去垢剂,抗氧化剂和其它添加剂得到的水性溶液制备多肽或抗体的治疗制剂用于储存。见Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, 0sol, Ed. (1980)。此类添加剂必须以对接收者无毒性的剂量和浓度采用。

[0428] 缓冲剂帮助维持pH在接近生理学条件的范围内。它们优选以从约2mM至约50mM的浓度范围存在。适合用于本发明的缓冲剂包括有机和无机酸及其盐例如柠檬酸盐缓冲液(例如,柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物,柠檬酸-柠檬酸三钠混合物,柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等),琥珀酸盐缓冲液(例如,琥珀酸-琥珀酸一钠混合物,琥珀酸-氢氧化钠混合物,琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等),酒石酸盐缓冲液(例如,酒石酸-酒石酸钠混合物,酒石酸-酒石酸钾混合物,酒石酸-氢氧化钠混合物等),延胡索酸盐缓冲液(例如,延胡索酸-延胡索酸一钠混合物等),延胡索酸盐缓冲液(例如,延胡索酸-延胡索酸一钠混合物,延胡索酸-延胡索酸二钠混合物,延胡索酸一钠-延胡索酸二钠混合物等),葡糖酸盐缓冲液(例如,葡糖酸-

葡萄糖酸钠混合物,葡萄糖酸-氢氧化钠混合物,葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等),草酸盐缓冲液(例如,草酸-草酸钠混合物,草酸-氢氧化钠混合物,草酸-草酸钾混合物等),乳酸盐缓冲液(例如,乳酸-乳酸钠混合物,乳酸-氢氧化钠混合物,乳酸-乳酸钾混合物等),和乙酸盐缓冲液(例如,乙酸-乙酸钠混合物,乙酸-氢氧化钠混合物等)。另外,可以提到磷酸盐缓冲液,组氨酸缓冲液和三甲胺盐例如Tris。

[0429] 可以添加防腐剂以阻止微生物生长,并可以以0.2%-1% (w/v) 的范围的量添加。用于本发明的适合的防腐剂包括酚,苯醇,间甲酚,对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯,十八烷基二甲基苄基氯化铵,苄烷铵卤化物(benzalconium halide) (例如,氯化物,溴化物和碘化物),氯化六烃季铵,以及烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯,儿茶酚,间苯二酚,环己醇和3-戊醇。可以添加有时称为“稳定剂”的等渗剂,以保证本发明的液体组合物的等渗性,并包括多羟基糖醇,优选三羟基或更高级的糖醇,如甘油,赤藓醇,阿糖醇,木糖醇,山梨醇和甘露糖醇。

[0430] 稳定剂指代赋形剂的大类,其功能范围可以从填充剂到添加剂,其使治疗剂溶解,或帮助防止变性或粘附至容器壁。典型的稳定剂可以是多元糖醇(上文列举的);氨基酸例如精氨酸,赖氨酸,甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,丙氨酸,鸟氨酸,L-亮氨酸,2-苯丙氨酸,谷氨酸,苏氨酸等,有机糖或糖醇,例如乳糖,海藻糖,水苏糖,甘露醇,山梨醇,木糖醇,核糖醇,肌醇,半乳糖醇,甘油等等,包括环醇例如肌糖;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含有还原剂的硫,例如尿素,谷胱甘肽,巯辛酸,巯基乙酸钠,硫代甘油,α-硫代甘油(monothioglycerol)和硫代硫酸钠硫(sodium thio sulfate);低分子量多肽(即,<10残基);蛋白例如人血清白蛋白,牛血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮的单糖,例如木糖,甘露糖,果糖,葡萄糖;二糖如乳糖,麦芽糖,蔗糖和三糖如棉子糖;以及多糖,例如葡聚糖。稳定剂可以以0.1至10,000重量每重量份活性蛋白存在。

[0431] 可以添加非离子表面活性剂或去垢剂(也称为“湿润剂”)以帮助溶解所述治疗剂以及以保护所述治疗性蛋白不受搅动诱导的聚集,其也允许所述制剂暴露于剪切表面应力而不导致蛋白的变性。适合的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20,80等),泊洛沙姆(polyoxamers)(184,188等),复合(pluronic)多元醇,聚氧乙烯脱水山梨醇单醚(TWEEN®-20,TWEEN®-80等)。非离子表面活性剂可以以约0.05mg/ml至约1.0mg/ml,优选约0.07mg/ml至约0.2mg/ml的范围存在。

[0432] 另外的其它赋形剂包括填充剂(例如,淀粉),螯合剂(例如,EDTA),抗氧化剂(例如,抗坏血酸,蛋氨酸,维生素E),和助溶剂。本文的制剂还可以含有对于治疗的具体适应症必要的多于一种活性化合物,优选具有彼此不产生不利影响的互补活性的那些。例如,进一步提供免疫抑制剂可能是合意的。此类分子以对于预期目的有效的量组合存在。该活性成分也可以包容在制备的微胶囊中,例如,通过凝聚技术或通过界面聚合,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,在胶体药物递送系统中(例如,脂质体,白蛋白微球,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊)或在宏乳剂(macroemulsion)中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, 0sol, Ed. (1980)。

[0433] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可以通过例如穿过无菌滤膜过滤容易地完成。可以制备缓释制剂。缓释制剂的适合的例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,其基质以成型制品的形式,例如薄膜或微胶囊。缓释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,聚(乙烯醇),聚交酯(美国专利No.3,773,919),L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸的共聚物,不可降解的乙烯醋酸乙烯酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物例如LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球体),和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管多聚体例如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使得分子能够释放达超过100天,某些水凝胶释放蛋白持续较短的时间周期。当装入胶囊的蛋白在体内保留长时间时,由于在37°C暴露于湿度它们可能变性或聚集,导致生物学活性的丢失和免疫原性可能的改变。

[0434] 取决于涉及的机制,可以设计理性的策略用于稳定化。例如,如果发现聚集机制为通过硫醇-二硫化物互换的分子内S--S键形成,可以通过修饰巯基残基,从酸性溶液冻干,控制湿度含量,使用适合的添加剂,和开发特定的聚合物基质组合物实现稳定化。

[0435] 在具体病症或状况的治疗中将有效的治疗性多肽,抗体,或其片段的量将取决于所述病症或状况的性质,或可以通过标准临床技术确定。在可能的情况下,合意的是在人类中测试之前,首先在体外然后在有用的动物模型中确定药物组合物的剂量反应曲线。

[0436] 在优选的实施方案中,通过皮下注射施用治疗性多肽,抗体或其片段的水性溶液。每剂量范围可以从约0.5μg至约50μg每千克体重,或更优选的,从约3μg至约30μg每千克体重。

[0437] 取决于一些临床因素,用于皮下施用的给药日程表可以从每个月一次到每天施用变化,所述因素包括疾病的类型,疾病的严重程度,以及受试者对治疗剂的敏感性。

[0438] 抗B细胞mIgM抗体的诊断用途

[0439] 本发明的抗体包括经修饰的衍生物,即,通过任意类型的分子与所述抗体的共价连接,使得共价连接不干扰与B细胞mIgM的结合。例如,但不是通过限制的方式,所述抗体衍生物包括已经修饰的抗体,例如通过生物素化,HRP,或任意其它可检测部分。

[0440] 本发明的抗体可以用于,例如,但不限于,纯化或检测BCRC,包括体外和体内诊断方法两者。例如,所述抗体在用于定性和定量测量生物样品中BCRC的水平的免疫测定中具有用途。见,例如Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988), 其通过提述以其整体并入本文。

[0441] 如以下更详细讨论的,本发明的抗体可以单独使用或与其它组合物联合。所述抗体可以进一步重组地在N-或C-末端融合至异源多肽,或化学缀合(包括共价和非共价缀合)至多肽或其它组合物。例如,本发明的抗体可以重组地融合或缀合至在检测测定中有用的分子如标签。

[0442] 本发明进一步包含抗体或其片段缀合至诊断试剂。所述抗体可以诊断地使用,例如,以检测特定细胞,组织或血清中感兴趣的靶标的表达;或监控免疫应答的形成或进程,作为临床测试程序的一部分,例如,确定给定治疗方案的效力。可以通过将所述抗体偶联至可检测物质以促进检测。可检测物质包括各种酶,辅基,荧光材料,发光材料,生物发光材料,放射性材料,使用各种正电子发射断层扫描的正电子发射金属,和非放射性顺磁性金属离子。可以使用本领域已知的技术,将所述可检测物质直接地或通过媒介物(例如,本领域已知的接头)间接地偶联或缀合至所述抗体(或其片段)。酶促标签的例子包括萤光素酶(例如,萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;美国专利No.4,737,456),萤光素,2,3-二氢酞嗪二酮,苹果酸脱氢酶,脲酶,过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRPO),碱性磷酸酶,β-半乳糖苷

酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶(例如,葡萄糖氧化酶,半乳糖氧化酶,和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶),杂环氧化酶(如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶),乳过氧化物酶,微过氧化物酶等等。

[0443] 用于将酶缀合至抗体的技术描述于O'Sullivan等,"Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay,"in Methods in Enzymology,Langone,et al.,eds.pp.147-66,Academic Press (1981)。见例如美国专利No.4,741,900可以缀合至抗体用作根据本发明的诊断的金属离子。适合的酶的例子包括辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,β-半乳糖苷酶,或乙酰胆碱酯酶;适合的辅基复合物的例子包括链霉亲和素/生物素和亲合素/生物素;适合的荧光材料的例子包括伞形酮,荧光素,异硫氰酸荧光素,若丹明(rhodamine),二氯三嗪基胺荧光素,丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的例子包括鲁米诺(luminol);生物发光材料的例子包括萤光素酶,萤光素,和水母发光蛋白(aequorin);和适合的放射性材料的例子包括<sup>125</sup>I,<sup>131</sup>I,<sup>111</sup>In或<sup>99</sup>Tc。

[0444] 有时,标签间接与抗体缀合。本领域的技术人员将知道用于实现这的各种技术。例如,所述抗体可以与生物素缀合而任意上述三大类标签可以与亲合素缀合,或反之亦然。生物素选择性结合至亲合素并因此,所述标签可以以这种间接的方式与所述抗体缀合。或者,为了实现所述标签与所述抗体的间接缀合,所述抗体与小的半抗原缀合(例如,地高辛)且上述的一种不同类型的标签与抗半抗原抗体(例如,抗地高辛抗体)缀合。从而可以实现所述标签与所述抗体的间接缀合。

[0445] 在本发明的另一个实施方案中,所述抗体不需要被标记,且可以使用结合所述抗体的标记的抗体检测其存在。

[0446] 可以在任意已知的测定方法中采用本发明的抗体,例如竞争性结合测定,直接和间接夹心法测定,和免疫沉淀测定。见Zola,Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques,pp.147-158.CRC Press (1987)。

[0447] 竞争性结合测定依赖于标记的标准品与测试样品竞争结合有限量抗体的能力。测试样品中靶标的量与变得与所述抗体结合的标准品的量成反比。为了方便确定变成结合的标准品的量,通常在竞争之前或之后使所述抗体不溶解。作为结果,可以将结合至所述抗体的标准品和测试样品方便地从保持未结合的标准品和测试样品分离。

[0448] 夹心测定涉及两种抗体的使用,每种能够结合不同的免疫原性部分,或表位,或待检测的蛋白。在夹心测定中,由第一抗体结合待分析的测试样品,所述第一抗体固定化在固体支持物上,其后第二抗体结合所述测试样品,从而形成不溶解的三部分复合物。见,例如美国专利No.4,376,110。所述第二抗体自身可以使用可检测部分标记(直接夹心测定)或可以使用用可检测部分标记的抗免疫球蛋白抗体测量(间接夹心测定)。例如,夹心测定的一种类型是ELISA测定,在此情况中所述可检测部分是酶。

[0449] 抗体可以附着于固体支持物,其对于靶抗原的免疫测定或纯化是特别有用的。此类固体支持物包括但不限于,玻璃,纤维素,聚丙烯酰胺,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯或聚丙烯。在这一过程中,使用本领域公知的方法将所述抗体固定化在固体支持物例如SEPHADEX<sup>TM</sup>树脂或滤纸上。固定化的抗体与含有待纯化的靶标的样品接触,其后使用适合的溶剂洗涤所述支持物,其将去除样品中除了待纯化的靶标外基本所有的材料,所述靶标结合至固定化的抗体。最终,使用另一种适合的溶剂洗涤所述支持物,例如甘氨酸缓冲液,其将从抗体释放靶标。

[0450] 特异性结合B细胞mIgM的标记的抗体,和其衍生物和类似物,可以用于诊断目的以检测,诊断或监控与异常表达和/或B细胞恶性肿瘤活性相关的疾病,病症,和/或状况。本发明提供对B细胞mIgM异常表达的检测,包括(a)使用对B细胞mIgM特异性的本发明的一种或多种抗体测定个体的体液或细胞中B细胞mIgM的表达和(b)将基因表达的水平与标准基因表达水平比较,其中与标准表达水平相比测定的B细胞mIgM表达水平的增加或减少指示异常表达。

[0451] 抗体可以用于检测样品中B细胞mIgM的存在和/或水平,例如体液或组织样品。该检测方法可以包括使所述样品与B细胞mIgM抗体接触并确定与所述样品结合的抗体的量。对于免疫组织化学,所述样品可以是新鲜的或冰冻的或包埋在石蜡中并使用防腐剂例如福尔马林固定的。

[0452] 本发明提供用于诊断病症的诊断测定,包括(a)使用本发明的一种或多种抗体测定个体的B细胞或体液中B细胞mIgM的表达和(b)将基因表达的水平与标准基因表达水平比较,其中与标准表达水平相比测定的基因表达水平的增加或减少指示特定病症。

[0453] 本发明的抗体可以用于使用本领域技术人员已知的经典免疫组织化学方法(见,例如Jalkanen等,J Cell Biol 101:976 (1985);Jalkanen, et al., J Cell Biol 105:3087 (1987))测定生物样品中蛋白的水平。有用于检测蛋白基因表达的其它基于抗体的方法包括免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射性免疫测定(RIA)。适合的抗体测定标签是本领域已知的并包括酶标签,例如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,例如碘(<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>121</sup>I),碳(<sup>14</sup>C),硫(<sup>35</sup>S),氚(<sup>3</sup>H),铟(<sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In),和锝(<sup>99</sup>Tc);发光标签例如鲁米诺;和荧光标签,例如荧光素,若丹明,和生物素。可以使用免疫闪烁(immunoscintigraphy)定位放射性同位素结合的同位素。

[0454] 本发明的一个方面是对动物中与B细胞mIgM的异常表达相关联的疾病或病症的检测和诊断,优选哺乳动物并最优选人类。在一个实施方案中,诊断包括:a)向受试者施用(例如,肠胃外,皮下,或腹膜内)有效量的标记的分子,其特异性结合B细胞mIgM;b)施用后等待时间间隔以允许标记的分子优先在受试者中多肽表达的位置集中(且清除未结合的标记的分子被清除至背景水平);c)确定背景水平;和d)检测受试者中标记的分子,使得标记分子的检测高于背景水平表明所述受试者患有与B细胞mIgM异常表达相关联的特定疾病或病症。可以通过各种方法确定背景水平,包括将检测的标记分子的量与先前确定的特定系统的标准值比较。

[0455] 本领域将理解所述受试者的大小和使用的成像系统将确定需要产生诊断图像的成像部分的量。在放射性同位素部分的情况下,对于人类受试者,注射的放射性的量范围通常将为从约5至20毫居的<sup>99</sup>Tc。接着标记的抗体或抗体片段将优先在含有特定蛋白的细胞的位置积累。体内成像描述于Burchiel等,"Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments."Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, Burchiel等,eds., Masson Publishing (1982)。

[0456] 取决于几个变量,包括使用的标签的类型和施用的模式,施用后允许标记的分子优先集中于受试者中的位点并用于未结合的标记分子被清除至背景水平的时间间隔为6至48小时,6至24小时,或6至12小时。在另一个实施方案中,施用后的时间间隔为5至20天,或5至10天。

[0457] 在实施方案中,通过重复用于诊断疾病或病症的方法,进行所述疾病或病症的监

控,例如,最初诊断后一个月,最初诊断后六个月,最初诊断后一年等。

[0458] 可以使用本领域已知的用于体内扫描的方法检测标记的分子的存在。这些方法取决于使用的标签的类型。技术人员将能够确定适合的方法用于检测具体标签。在本发明的诊断方法中可以使用的方法和装置包括但不限于,计算机断层扫描(CT),全身扫描例如正电子发射断层扫描(PET),磁共振成像(MRI),和超声波扫描。

[0459] 在特定的实施方案中,使用放射性同位素标记分子并使用放射响应性(radiation responsive)手术器械(美国专利No.5,441,050)在患者中检测。在另一个实施方案中,使用荧光化合物标记分子并使用荧光响应性扫描器械在患者中检测。在另一个实施方案中,使用正电子发射金属标记分子,并使用正电子发射断层扫描在患者中检测。在再一个实施方案中,使用顺磁性标记标记分子,并使用磁共振成像(MRI)在患者中检测。

[0460] 在另一个方面,本发明提供用于诊断患者是否患有B细胞淋巴瘤或白血病的方法,通过测试特定患者细胞或体液中B细胞mIgM的存在。在一个实施方案中,所述方法包括从受试者收集细胞或体液样品,分析体液中B细胞mIgM的存在,将该量与对于正常细胞或体液建立的限定或测试水平比较,并基于体液中B细胞mIgM的表达水平确定患者是否患有B细胞淋巴瘤或白血病。B细胞mIgM的限定水平可以是基于文献值的已知量,或可以通过测量正常细胞或体液中的量提前确定。特别地,对特定体液中B细胞mIgM水平的确定允许对患者中疾病的特异性和早期的检测,优选在疾病发生前。可以使用本方法检测的疾病包括但不限于,本文所述的B细胞恶性肿瘤。在优选的实施方案中,所述体液是外周血或外周血淋巴细胞。

[0461] 可以在试剂盒中提供本发明的抗体,即,以预先确定量包装的试剂组合和用于进行诊断测定的说明。在使用酶标记抗体的情况下,所述试剂盒可以包括酶需要的底物和辅因子(例如,提供可检测发色团和荧光团的底物前体)。另外,可以包括其它添加剂,例如稳定剂,缓冲剂(例如,封闭缓冲剂或裂解缓冲剂)等等。各种试剂的相对量可以广泛的变化以提供试剂溶液中的浓度,其大幅优化所述测定的灵敏度。特别地,所述试剂可以作为干粉提供,通常为冻干的,包括赋形剂,其溶解将提供具有适合浓度的试剂溶液。

[0462] 抗B细胞mIgM抗体的治疗用途

[0463] 涵盖本发明的抗体可以用于治疗哺乳动物。在一个实施方案中,所述抗体施用至非人哺乳动物用于获得例如临床前数据的用途。待处理的示例性哺乳动物包括非人灵长类,狗,猫,啮齿类和其它哺乳动物,在其中进行临床前研究。此类哺乳动物可以建立动物模型,用于使用所述抗体治疗的疾病,或可以用于研究感兴趣的抗体的毒性。在这些实施方案的每一个中,可以在哺乳动物上进行剂量递增研究。

[0464] 抗体,有或没有治疗性部分缀合到它,单独或与细胞毒性因子组合施用,可以用作治疗剂。本发明针对基于抗体的疗法,其涉及向动物,哺乳动物,或人类施用本发明的抗体,用于治疗B细胞淋巴瘤或白血病。所述动物或受试者可以是需要特定治疗的动物,例如已经诊断具有特定病症的动物,例如,涉及B细胞淋巴瘤或白血病的病症。针对B细胞mIgM的抗体对于动物中的B细胞淋巴瘤或白血病是有用的,包括但不限于牛,猪,马,鸡,猫,狗,非人灵长类等,以及人类。例如,通过施用本发明的抗体或多个抗体的治疗上可接受的剂量,或本发明的抗体的混合物(cocktail),或与各种来源的其它抗体组合,在治疗的动物中可以降低或消除疾病症状。

[0465] 本发明的治疗组合物包括但不限于,本发明的抗体(包括如本文所述的其片段,类

似物和衍生物)和如下文所述的编码本发明的抗体(包括其片段,类似物和衍生物和如本文所述的抗独特型抗体)的核酸。本发明的抗体可以用于治疗,抑制,或预防与B细胞mIgM的异常表达和/或活性相关联的疾病,病症,或状况,包括但不限于,本文所述的任意一种或多种疾病,病症或症状。对与B细胞mIgM的异常表达和/或活性相关联的疾病,病症,或状况的治疗包括但不限于,缓解与这些疾病,病症,或状况相关联的至少一种症状。可以在本领域已知的或如本文所述的药学上可接受的组合物中提供本发明的抗体。

[0466] 本发明的抗B细胞mIgM抗体可以治疗性用于各种疾病。本发明提供用于在哺乳动物中预防或治疗B细胞恶性肿瘤疾病的方法。所述方法包括向所述哺乳动物施用疾病预防或治疗量的抗B细胞mIgM抗体。所述抗B细胞mIgM抗体结合B细胞mIgM并抑制细胞生长和诱导凋亡。

[0467] 可以通过标准的临床技术,确定在与B细胞mIgM的异常表达和/或活性相关联疾病或病症的治疗,抑制和预防中,将有效的抗体的量。剂量将取决于待治疗的疾病,疾病的严重程度和过程,施用抗体是用于预防或治疗的目的,先前的疗法,患者的临床历史以及对该抗体的反应,主治医生的自由裁量。可以在与疾病相一致的治疗方案中使用该抗体,例如,一至几天单次或几次剂量,以改善疾病状态,或在延伸的时间定期剂量以预防过敏或哮喘。另外,可以任选地采用体外测定以帮助鉴定最佳剂量范围。在制剂中采用的精确剂量将取决于施用的途径,以及疾病或病症的严重程度,并应当根据医师的判断和每个患者的情况决定。将从来源于体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线推测有效剂量。

[0468] 对于抗体,施用至患者的剂量通常为患者体重的0.1mg/kg至150mg/kg。优选的,施用至患者的剂量在患者体重的0.1mg/kg和20mg/kg之间,更优选患者体重的1mg/kg至10mg/kg。一般来说,由于对外来多肽的免疫应答,在人体中人抗体比来自其他物种的抗体具有更长的半衰期。因此,较低剂量的人抗体和较少频率的施用通常是可能的。此外,可以通过修饰例如脂化增加抗体的吸收或组织穿透(例如,进入脑中),降低本发明的抗体的施用剂量和频率。对于在几天或更长的重复施用,取决于环境,持续治疗直到对疾病症状的期望的抑制发生。然而其它剂量方案可以是有用的。该疗法的进程可以通过常规的技术和测定容易地监控。用于抗LFA-1或抗ICAM-1抗体的示例性给药方案公开于PCT公布No.WO 94/04188。

[0469] 应当以与良好的医疗实践相一致的方法配制,给药和施用本发明的抗体,其可以以组合物的形式。在该环境下考虑的因素包括治疗的具体病症,治疗的具体哺乳动物,个体患者的临床状况,该病症的起因,试剂的递送位点,施用的方法,施用的时间安排,以及医生从业者已知的其它因素。将通过这些考虑决定施用的抗体组合物的“治疗有效量”,并是预防,改善,或治疗疾病或病症必要的最小量。所述抗体不需要,但任选地与目前用于预防或治疗讨论的病症的一种或多种试剂一起配制。此类其它试剂的有效量取决于所述制剂中存在的抗体的量,病症或治疗的类型,以及上文讨论的其它因素。通常这些以与上文使用的相同的剂量和施用途径,或上文采用的剂量的约1至99%使用。

[0470] 本发明的抗体可以有利地与其它单克隆抗体或嵌合抗体,或与淋巴因子或造血生长因子(例如IL-2,IL-3IL-7,和IFN- $\gamma$ )组合利用,例如,其作用于增加与所述抗体相互作用的效应细胞的数量或活性。

[0471] 本发明的抗体可以单独施用或与其它类型的治疗组合,例如免疫疗法,化学疗法,和放射性同位素。

[0472] 在优选的方面,本发明的抗体是基本上纯化的(例如,基本上不含限制其功能或产生不想要的副作用的物质)。各种递送系统是已知的并可以用于施用本发明的抗体,包括注射,例如包装在脂质体,微颗粒,微胶囊中,能够表达该化合物的重组细胞,受体介导的内吞作用(见,例如Wu等,J Biol Chem 262:4429(1987)),作为逆转录病毒或其它载体的一部分的核酸的构建等。

[0473] 可以以任意可接受的方式将抗B细胞mIgM抗体施用至哺乳动物。引入的方法包括但不限于,肠胃外,皮下,腹膜内,肺内,鼻内,硬膜外,吸入,和口服途径,且对于免疫抑制治疗如果需要,病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉内,皮内,静脉内,动脉内,或腹膜内施用。可以通过任何方便的途径施用抗体或组合物,例如通过输注或快速浓注(bolus injection),通过经上皮或皮肤黏膜内层吸收(例如,口腔黏膜,直肠和肠粘膜等)并可以与其它生物学活性试剂一同施用。可以系统的或局部的施用。另外,通过任何适合的途径将本发明的治疗性抗体或组合物引入中枢神经系统中可能是合意的,包括脑室内(intraventricular)和鞘内(intrathecal)注射。可以通过脑室内导管帮助脑室内注射,例如,附接到储库,例如Ommaya储库。另外,通过脉冲输注适合地施用抗体,特别是下降剂量的抗体。优选的,通过注射给药,最优选的静脉内或皮下注射,部分取决于该施用是短期的还是长期的。

[0474] 也可以采用肺部施用,例如,通过使用吸入器或喷雾器,并使用雾化剂配置。还可以以干粉组合物的形式将抗体施用到患者的肺中(见,例如美国专利No.6,514,496)。

[0475] 在特定实施方案中,将本发明的治疗性抗体或组合物局部施用到需要治疗的区域是合意的。可以通过,例如,并不以限制的方式,局部输注,局部应用,通过注射,通过导管的方式,通过栓剂的方式,或通过移植植物的方式实现,所述移植植物是多孔的,非多孔的,或凝胶状材料,包括膜,例如硅橡胶膜(sialastic membranes),或纤维。优选的,当施用本发明的抗体时,必须小心使用该蛋白不吸收的材料。

[0476] 在另一个实施方案中,可以在囊泡(vesicle)中递送该抗体,具体的,脂质体(见,Langer,Science 249:1527(1990);Treat等,Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein等,eds.,pp.353-365(1989);Lopez-Berestein,ibid.,pp.317-27;一般见同上)。

[0477] 在再一个实施方案中,可以在控制释放系统中递送该抗体。在一个实施方案中,可以使用泵(见,Langer,Science 249:1527(1990);Sefton,CRC Crit Ref Biomed Eng 14:201(1987);Buchwald等,Surgery 88:507(1980);Saudek,et al.,N Engl J Med 321:574(1989))。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料(见Medical Applications of Controlled Release,Langer等,eds.,CRC Press(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen等,eds.,Wiley(1984);Ranger等,J Macromol Sci Rev Macromol Chem 23:61(1983);也见Levy等,Science 228:190(1985);During等,Ann Neurol 25:351(1989);Howard等,J Neurosurg 71:105(1989))。在再一个实施方案中,可以将控制释放系统放置在治疗靶标的临近处。

[0478] 本发明还提供药物组合物。此类组合物包含治疗有效量的抗体和生理学上可接受的载体。在特定实施方案中,术语“生理学上可接受”表示通过由联邦或州政府或在美国药典或其它通常公认的药典中列出的管理机构批准的用于动物,且更具体的用于人。术语“载体”指代稀释剂,佐剂,赋形剂,或媒介物,治疗剂与其施用。此类生理学载体可以是无菌液

体,例如水和油,包括石油,动物,植物,或合成来源的那些,例如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等等。当静脉内施用所述药物组合物时,水是优选的载体。也可以采用盐水溶液和葡萄糖和甘油水溶液作为液体载体,特别是用于可注射溶液。适合的药物赋形剂包括淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,大米,面粉,白垩,硅胶,硬脂酸钠,单硬脂酸甘油酯,滑石,氯化钠,脱脂奶粉,甘油,丙烯,二醇,水,乙醇等等。如果需要,所述组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液,悬浮液,乳剂,片剂,丸剂,胶囊剂,粉剂,缓释制剂等等的形式。所述组合物可以配置为栓剂,使用传统的粘合剂和载体例如甘油三酯。口服制剂可以包括标准的载体例如药物级的甘露醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,糖精钠,纤维素,碳酸镁等。适合的载体的例子由E.W.Martin公开于"Remington's Pharmaceutical Sciences"。此类组合物将含有有效量的抗体,优选以纯化的形式,连同适合的量的载体以便提供用于适当的施用至患者的形式。所述制剂应当适合施用的方式。

[0479] 在一个实施方案中,根据常规程序配置所述组合物,如适于静脉内施用至人类的药物组合物。典型地,用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。在必要的情况下,所述组合物还可以包括增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因以缓解注射部位的疼痛。一般来说,单独地或以单位剂量混合在一起地提供成分,例如,作为密封容器中的干燥的冻干粉或无水浓缩物,例如指示活性剂的量的安瓿(ampoule)或药囊(sachette)。在所述组合物通过输注施用的情况下,其可以使用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。在所述组合物通过注射施用的情况下,可以提供安瓿的无菌注射用水或盐水,使得该成分可以在施用前混合。

[0480] 本发明还提供药物包装或试剂盒,包含由本发明的药物组合物的一种或多种成分填充的一个或多个容器。任选地与此类容器相关的是以政府机构规定的形式的通知,其规范药物或生物产品的制造,使用或销售,该通知反应了由所述机构批准的用于人施用的制造,使用或销售。

[0481] 另外,本发明的抗体可以缀合至各种效应分子例如异源性多肽,药物,放射性核苷酸,碳水化合物,核苷酸,其包括microRNA和DNA合成的核苷酸,或毒素。见例如PCT公布Nos.WO 92/08495;WO 91/14438;WO 89/12624;美国专利No.5,314,995;和欧洲专利申请No.EP 396,387。抗体或其片段可以缀合至治疗性部分例如细胞毒素(例如,细胞抑制剂或杀细胞剂),治疗剂,或放射性金属离子(例如 $\alpha$ 发射体,例如213Bi)。细胞毒素或细胞毒性试剂包括对细胞有害的任意试剂。例子包括紫杉醇(paclitaxol),细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,吐根碱(emetine),丝裂霉素,依托泊苷,替尼泊苷,长春新碱,长春碱,秋水仙碱,阿霉素(doxorubicin),柔红霉素,二羟基炭疽菌二酮,米托蒽醌,光神霉素(mithramycin),放线菌素D,1-去氢睾酮,糖皮质激素,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素和其类似物或同源物。治疗剂包括但不限于,抗代谢物(例如甲氨蝶呤,6-巯基嘌呤,6-硫鸟嘌呤,阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶达卡巴嗪(decarbazine)),烷化剂(例如氮芥(mechlorethamine),塞替派苯丁酸氮芥(thiotepa chlorambucil),美法仑,卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU),环磷酰胺,白消安,二溴甘露醇,链脲素,丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂),蒽环类抗生素(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和阿霉素),抗生素(例如,更生霉素(以前称为放线菌素),博来霉素,光神霉素和氨茴霉素(anthramycin,AMC)),抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春碱)和高毒性药物(如卡里奇霉素

(calicheamicin))。

[0482] 用于将此类治疗性部分缀合至抗体的技术是公知的,见例如Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Reisfeld,et al.(eds.),pp.243-56Alan R.Liss (1985);Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery”,in Controlled Drug Delivery,2nd ed.,Robinson等,eds.,pp.623-53,Marcel Dekker (1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review,”in Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等,eds.,pp.475-506 (1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,”in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy,Baldwin等,eds.,pp.303-16.Academic Press (1985);和Thorpe等,Immunol Rev 62:119 (1982)。或者,可以将抗体缀合至第二抗体以形成抗体异缀合物。见例如美国专利No.4,676,980。

[0483] 本发明的缀合物可以用于修饰所给的生物学反应,所述治疗剂或药物部分不应解释为限于经典的化学治疗剂。例如,所述药物部分可以是具有期望的生物学活性的蛋白或多肽。此类蛋白可以包括,例如,毒素例如相思豆毒素,蓖麻毒素A,假单胞菌外毒素,白喉毒素;蛋白例如肿瘤坏死因子,α-干扰素,β-干扰素,神经生长因子,血小板衍生的生长因子,组织纤维蛋白溶酶原活化物,凋亡剂,例如,TNF-α,TNF-β,AIM II(见,国际公开No.WO 97/34911),Fas配体(Takahashi等,Int Immunol,6:1567 (1994)),VEGI(见,国际公布No.WO 99/23105);血栓形成试剂;抗血管生成试剂,例如血管抑制素或内皮抑制素;或生物反应调节剂,例如淋巴因子,白介素-1(“IL-1”),白介素-2(“IL-2”),白介素-6(“IL-6”),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”),粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其它生长因子。

[0484] 根据布达佩斯条约,在2014年11月12日将产生单克隆抗体mAb1-1、mAb2-2b、mAb3-2b和mAb4-2b的小鼠杂交瘤细胞系保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Boulevard,Manassas,VA 2010 USA,并分别给出保藏号PTA-121719(细胞株mAb1-1)、PTA-121717(细胞株mAb2-2b)、PTA-121718(细胞株mAb3-2b)和PTA-121716(细胞株mAb4-2b)。

[0485] \*\*\*\*\*

[0486] 本文引用的所有参考文献通过提述以与如下相同的程度整合,即每个单独的出版物,数据库条目(例如,Genbank序列或GeneID条目),专利申请,或专利具体地并单独地表明通过提述并入。该通过提述引入的声明由申请人有意,根据37 C.F.R. §1.57 (b) (1)中,涉及到每一个单独的出版物,数据库条目(例如,Genbank序列或GeneID条目),专利申请或专利,其中的每一个明确地符合37 C.F.R. §1.57 (b) (2),即使这些引用不紧邻通过引用并入的专用声明。说明书中通过提述引入的专门声明的纳入,如果有的话,并没有以任何方式弱化通过提述并入的一般性声明。本文对参考文献的引用不意图承认该参考文献是相关的现有技术,也不构成对这些出版物或文件的内容或日期的承认。

[0487] 本发明并不被限制在由本文所描述的具体实施例的范围。本领域的技术人员将认识到,或能够仅仅使用常规实验确定,许多与本文描述的本发明的具体实施方案的等同物。此类等同物意图由以下权利要求所涵盖。

<110> 韦尔特生物分子医药有限责任公司

<120> 靶向 B 细胞受体复合物膜结合 IgM 的抗体及其用途

<130> 10199/003571-W00

<140>

<141>

<150> 61/911, 186

<151> 2013-12-03

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 447

<212> DNA

[0001] <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 1

gaccaggcat cccagggtca ccatggagtt agttggca gcagatccag gggccagtgg 60

atagacagat gggggtgtcg tttggctga ggagacggtg actgagggttc cttgacccca 120

gtagtccata ccatagttac ccctcggttgc tgacagtaa tagaccgcag agtcctcaga 180

tgtcaggctg ctgagttgca tgtaggctgt gctggaggat ttgtctacag tcagtgtggc 240

cttggcttg aacttctcat tgtagtttagt actaccacta ttaggatgaa ttattcctat 300

ccactcaagg cttgtccag gcctctgctt cacccagttc atccagtagc tggtaaaagt 360

gtagccagaa gccttacagg acaacttcag tgaagccccca ggctttacca gctcagcccc 420

agactcctgc agcttgaccc tccgaaag 447

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 2

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

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

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

[0002] Gly Ile Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Arg Gly Asn Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 3

<211> 380

<212> DNA

### 〈213〉 人工序列

<220>

〈223〉 人工序列的描述：合成多肽

〈400〉 3

taactgtctca ctggatgggt ggaagatgga tacagtttgt gcagcatcag cccgtttcag 60

ctccagctt gttccagcac cgaacgtgag cggaggaata ctaaaatgtt gctgacagta 120

ataaaactgcc aggtttcag cctgcacact gctgatggtg aaagtggaaat ccgtccca 180

tccactgcca gtgaagcgat cagggactcc agtgttccgg taggatgcgg agtaaatcag 240

taatgttagga gattgtccctg gtttctgttg ataccaggtt acagcagttac tcacatcctg 300

actggccttg caggtgatgc tgaccctgtc tcctactgag gtggacatga atttgtgaga 360

ctgggtcatc acaatgtccc 380

[0003]

〈210〉 4

<211> 110

<212> PRT

〈213〉人工序列

220

〈223〉人工序列的描述：合成多肽

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Thr Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Asn Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

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

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

Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala  
 100 105 110

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

[0004] <400> 5  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
 1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 6  
 Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 7

Tyr Cys Ala Arg

1

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 8

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

[0005] <210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 9

Ser Ala Ser Tyr Arg Asn Thr

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 10

Gln Gln His Phe Ser Ile Pro Pro Leu Thr  
1 5 10

<210> 11  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 11  
Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn  
1 5 10

<210> 12  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
[0006]

<220>  
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 12  
Glu Leu Gln Leu Glu Glu Ser Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu  
1 5 10 15

Asp Gly

<210> 13  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 13  
Glu Gly Glu Val Ser Glu Asp Glu Glu Gly Phe Glu  
1 5 10

<210> 14

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 14

Glu Gly Glu Asn Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn

1 5 10

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

[0007] <400> 15

Glu Gly Glu Val Ser Glu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn

1 5 10

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 16

Glu Gly Glu Val Ser Ala

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 17

Glu Glu Gly Phe Glu Asn

1 5

<210> 18

[0008] <211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成 6xHis 标签

<400> 18

His His His His His His

1 5

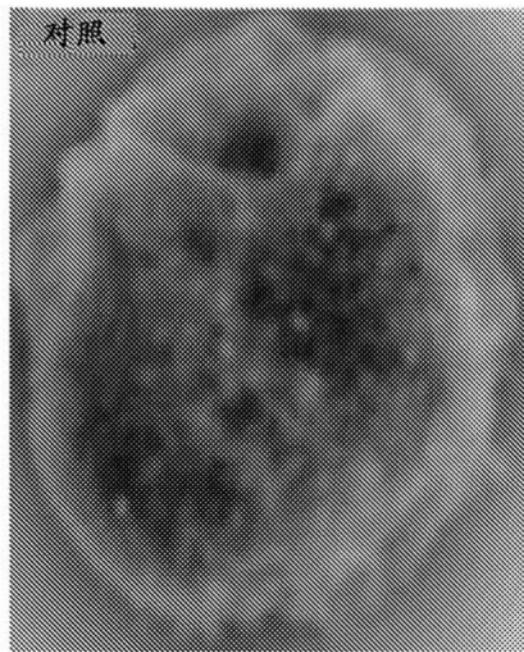


图1A

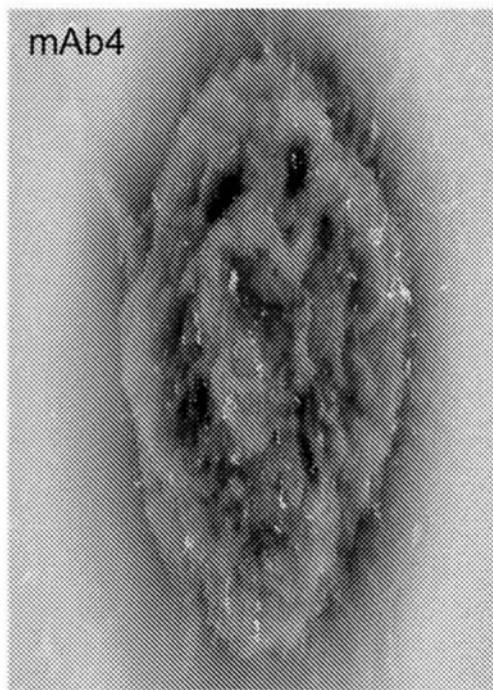


图1B

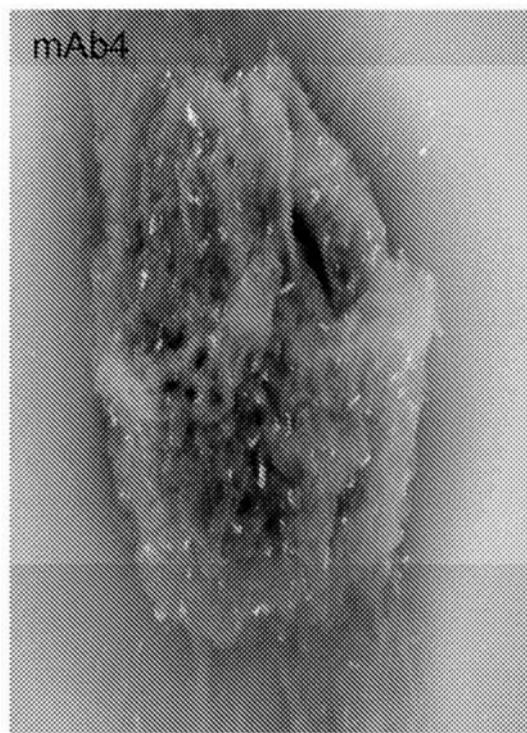


图1C

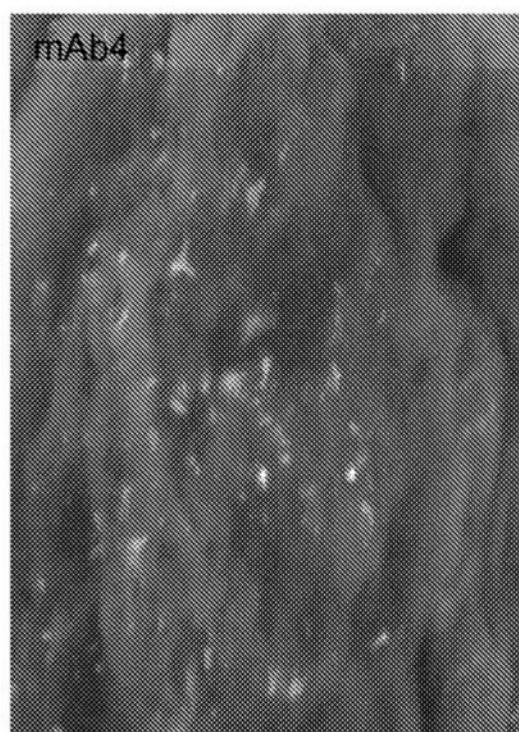


图1D

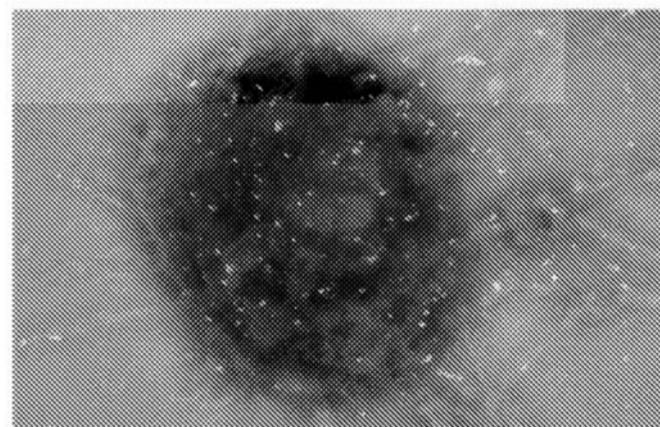


图2A

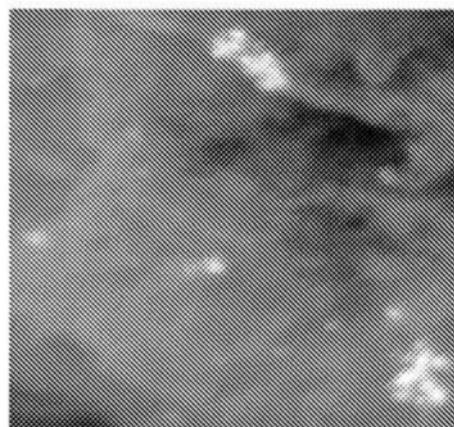


图2B

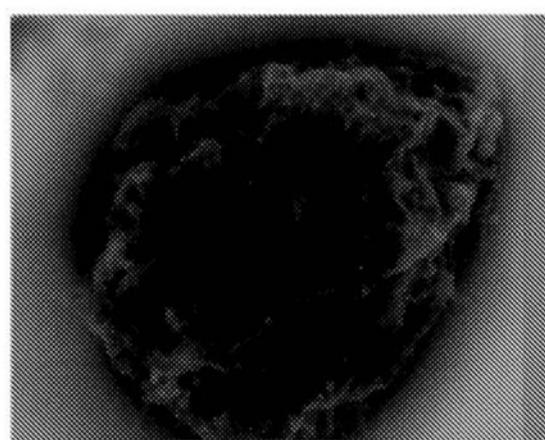


图2C

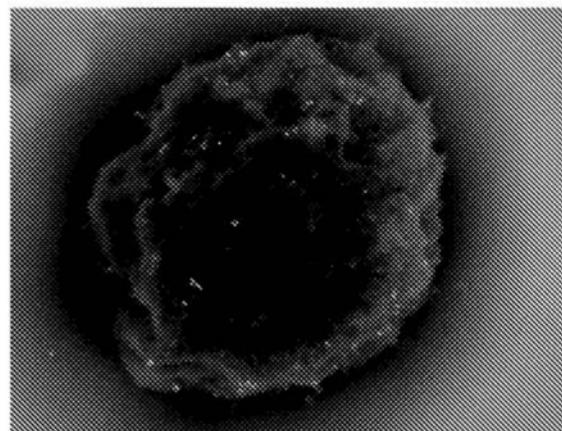


图2D

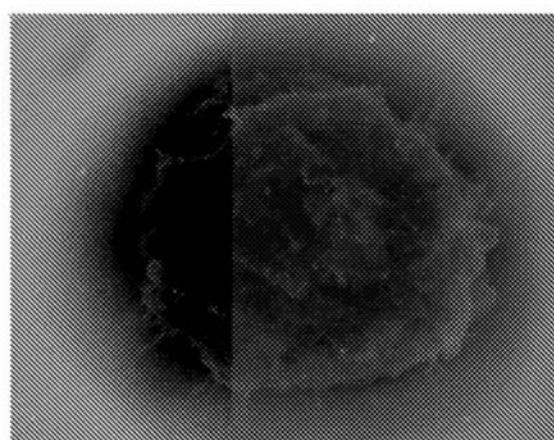


图2E

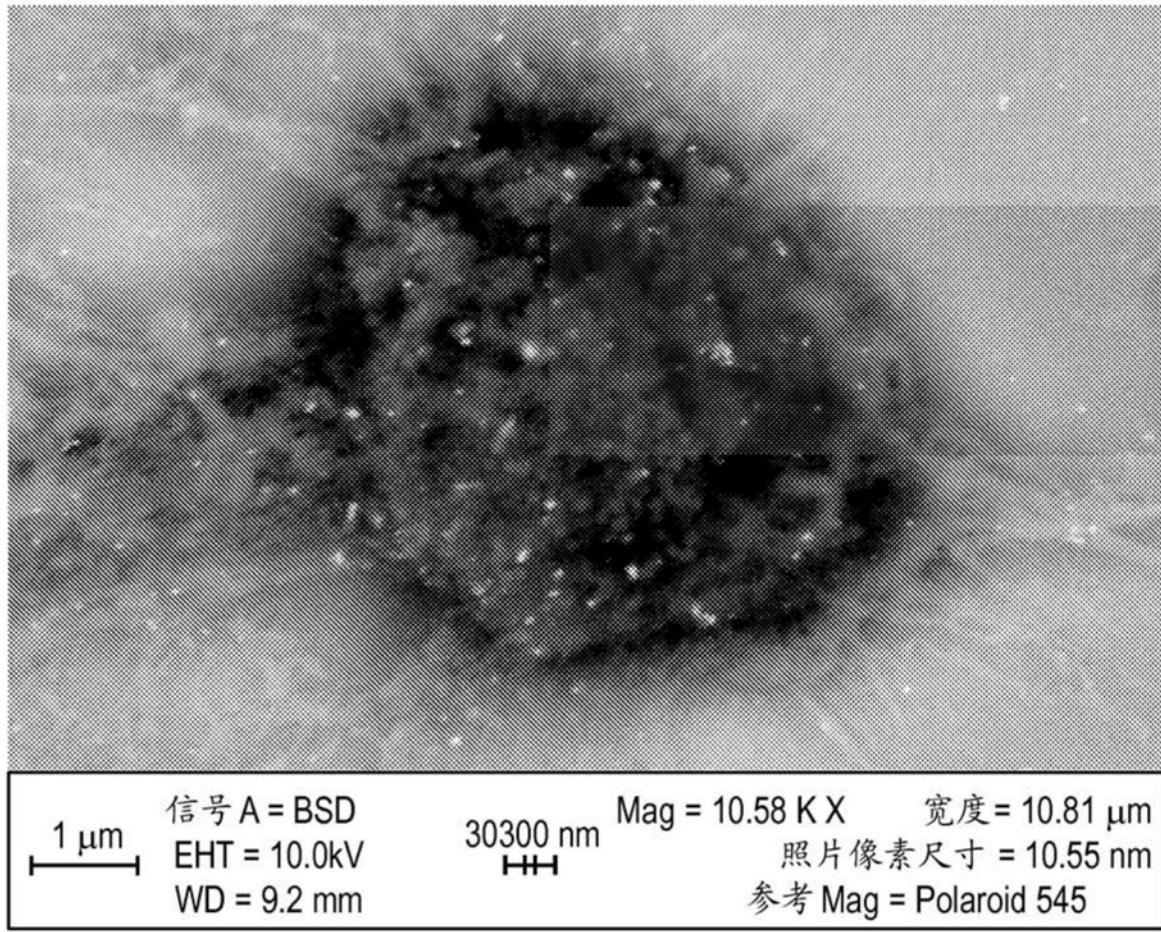
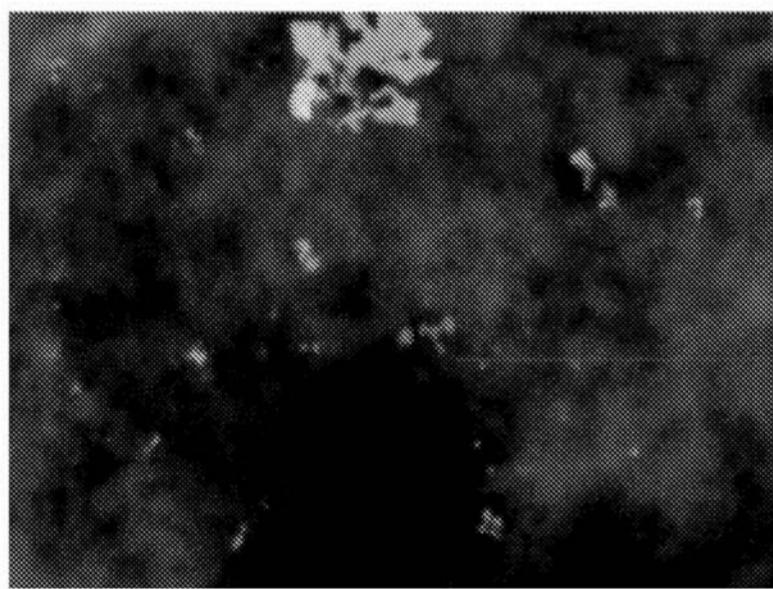


图3



100 nm 信号 A = BSD Mag = 30.00 KX 宽度 = 3.811  $\mu$ m  
EHT = 10.0kV 照片像素尺寸 = 3.722 nm  
WD = 10.4 mm 参考 Mag = Polaroid 545

图4A

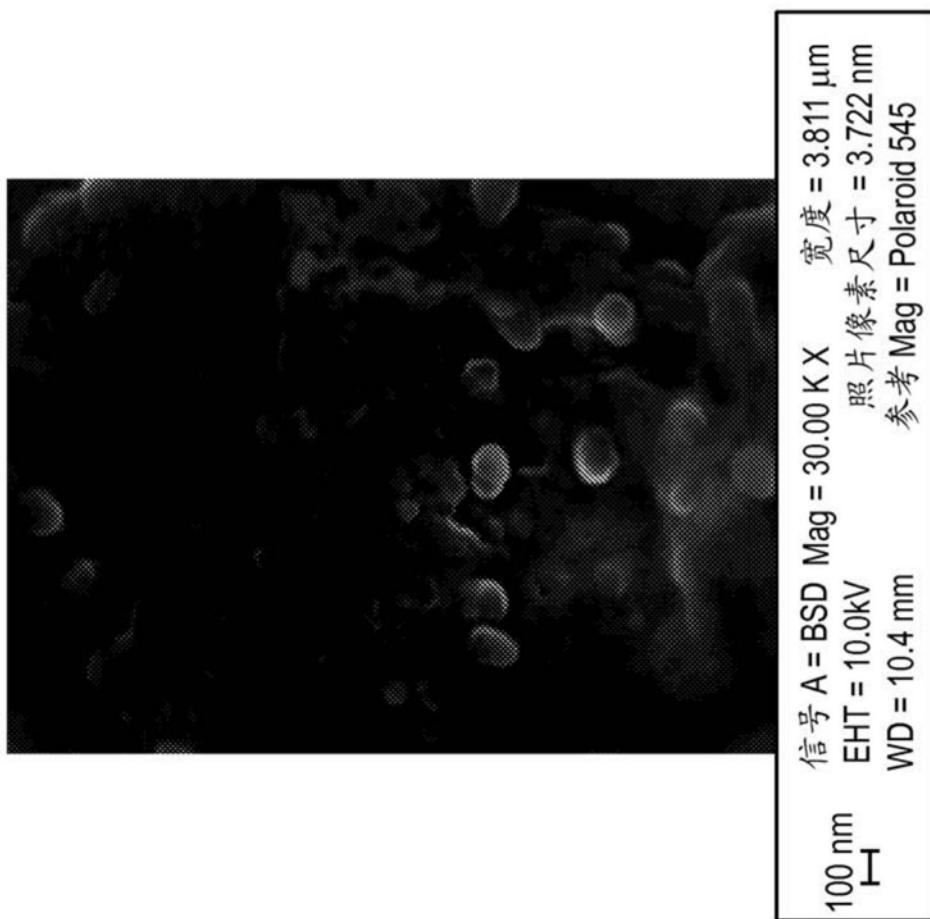
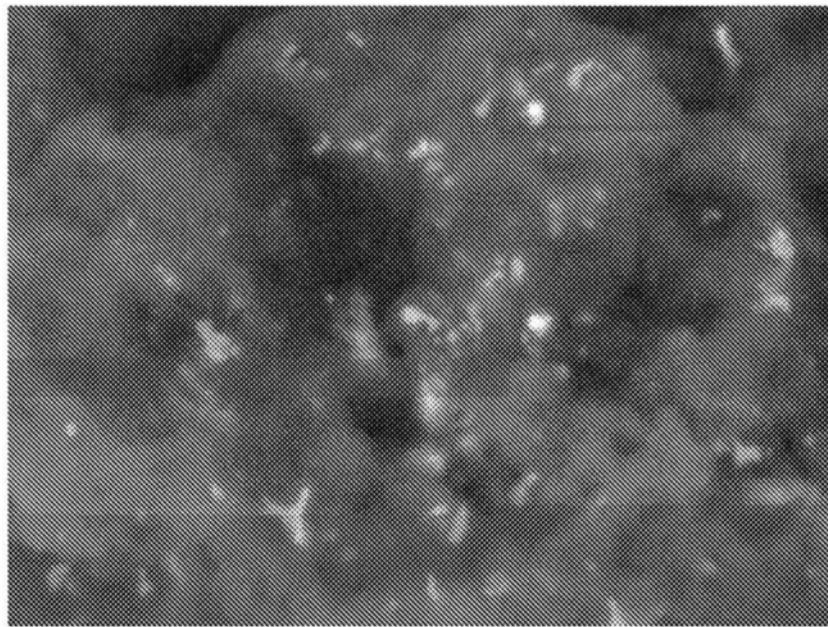
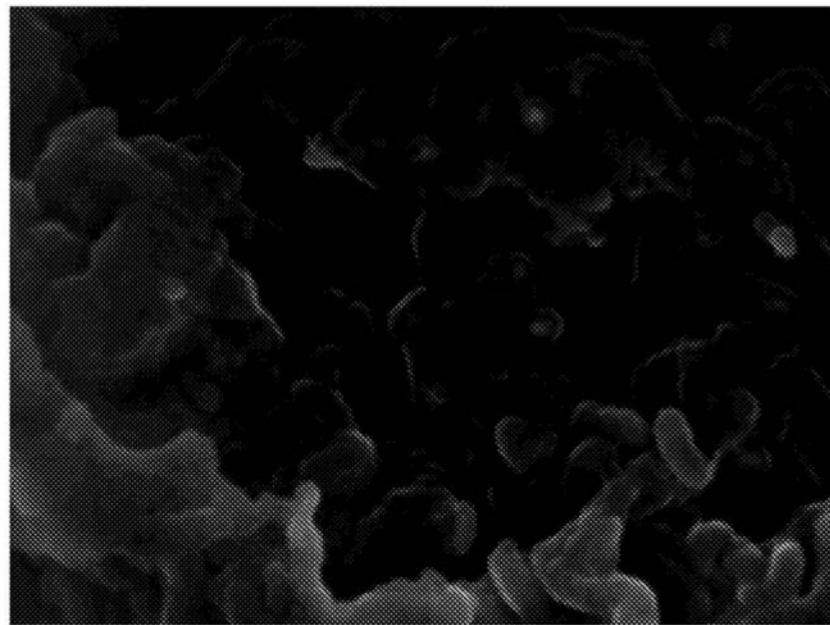


图4B



信号 A = BSD Mag = 30.00 KX 宽度 = 3.811  $\mu$ m  
EHT = 10.0kV 照片像素尺寸 = 3.722 nm  
WD = 10.2 mm 参考 = Polaroid 545

图5A



信 号 A = BSD Mag = 30.00 KX 宽 度 = 3.811  $\mu$ m  
 照 片 像 素 尺 寸 = 3.722 nm  
 参 考 Mag = Polaroid 545

100 nm

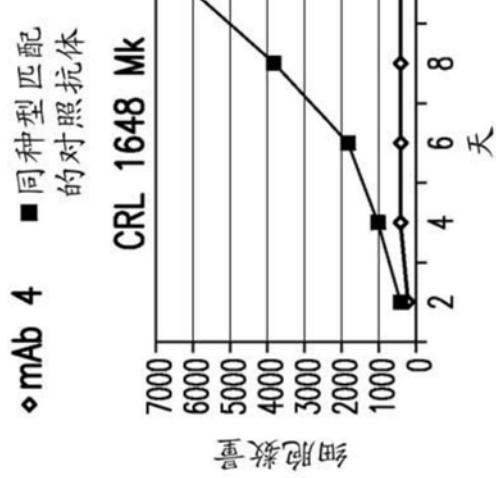


图6A

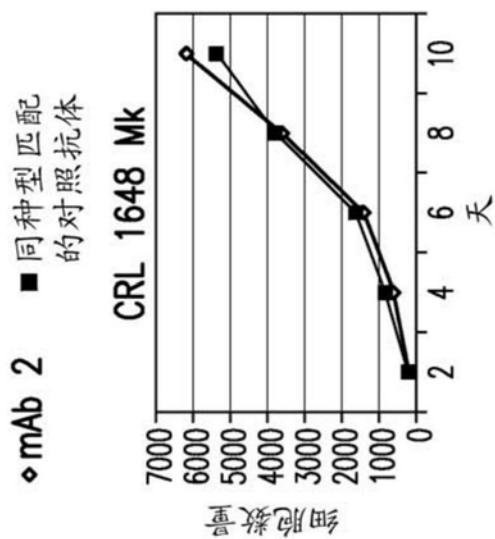


图6B

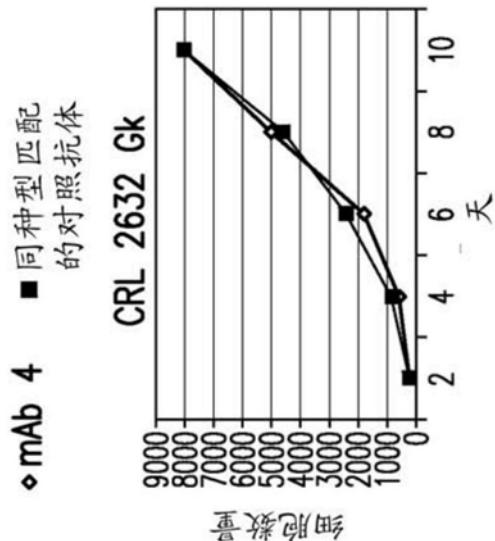


图6C

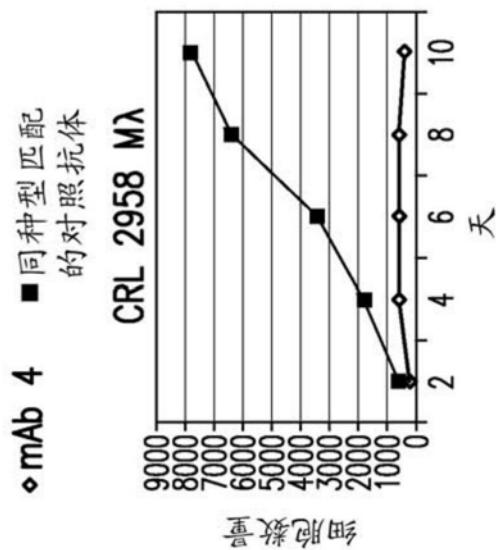


图 6D

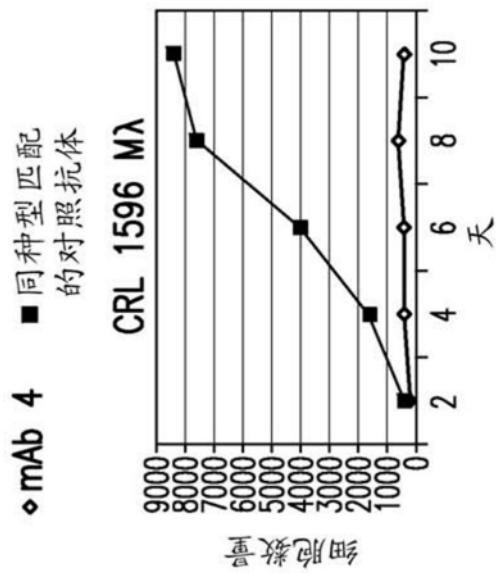


图 6E

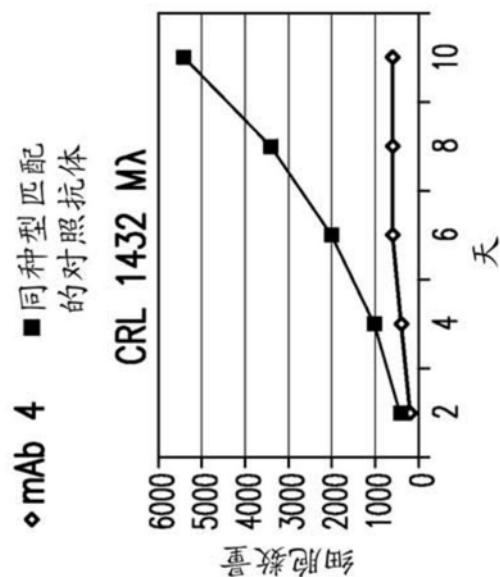


图6F

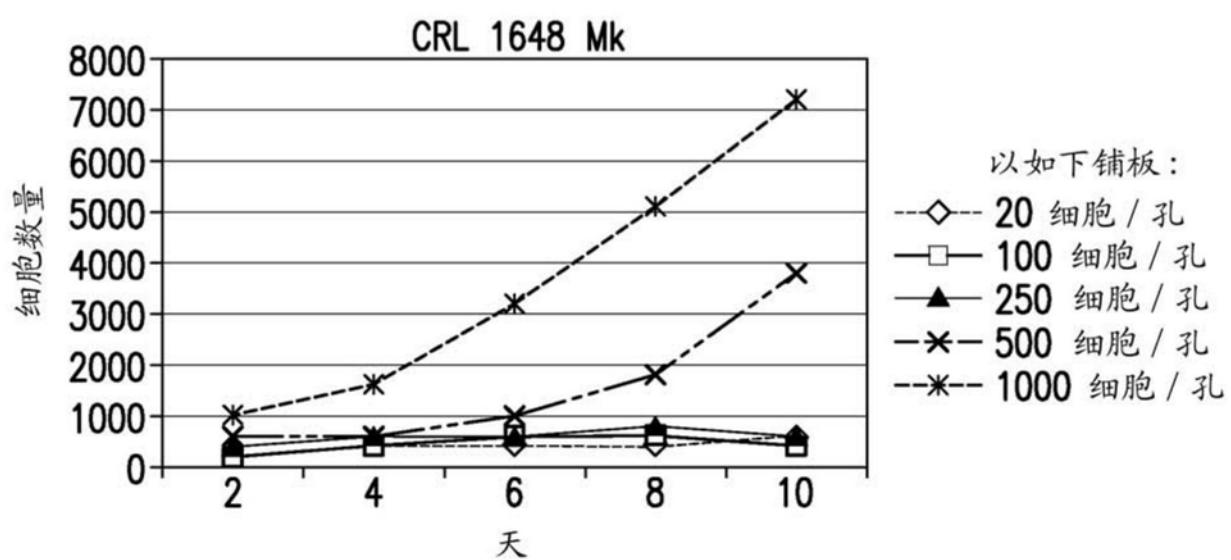


图7