



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102209556 B

(45)授权公告日 2018.02.23

(21)申请号 200980144442.0

(22)申请日 2009.10.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102209556 A

(43)申请公布日 2011.10.05

(30)优先权数据
12/266,999 2008.11.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.05.06

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/061666 2009.10.22

(87)PCT国际申请的公布数据
W02010/053716 EN 2010.05.14

(73)专利权人 埃姆诺医药有限公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 H·J·汉森 Z·屈
D·M·古德伯格

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 郭文洁

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)

(56)对比文件
US 2006/0257398 A1,2006.11.16,
WO 2007/002223 A2,2007.01.04,
WO 2008/031056 A2,2008.03.13,
CN 101218351 A,2008.07.09,
US 2008/0187966 A1,2008.08.07,
审查员 曲凯

权利要求书2页 说明书33页
序列表15页 附图6页

(54)发明名称
改良的抗CD19抗体

(57)摘要
本发明提供与人B细胞标记结合的人源化、嵌合与人抗CD19抗体、抗CD19抗体融合蛋白和其片段。这类抗体、融合蛋白和其片段用于治疗 and 诊断各种B细胞病症,包括B细胞恶性肿瘤和自身免疫疾病。在更具体的实施方案中,人源化抗CD19抗体可包含一个或多个用来提高蛋白质稳定性、抗体结合和/或表达水平的框架区氨基酸取代。在特别优选的实施方案中,取代包括hA19VH序列中的Ser91Phe取代。

1. 一种可结合CD19的人源化抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链互补决定区CDR序列SEQ ID NO:16的CDR1;SEQ ID NO:17的CDR2;和SEQ ID NO:18的CDR3以及重链CDR序列SEQ ID NO:19的CDR1;SEQ ID NO:20的CDR2和SEQ ID NO:21的CDR3,并且其中所述人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段包含人抗体构架区(FR)和恒定区序列,一或多个构架区氨基酸残基被亲本鼠抗体的相应构架区序列取代,并且其中所述取代的FR氨基酸残基为Ser91Phe取代。

2. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段为裸抗体或其抗原结合片段。

3. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含序列SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:10。

4. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与至少一种治疗剂或诊断剂缀合。

5. 权利要求4所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述治疗剂选自细胞毒性剂、放射性核素、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸和光敏治疗剂。

6. 权利要求5所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述细胞毒性剂为药物或毒素。

7. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中在VH Kabat残基91处用苯基丙氨酸取代丝氨酸导致宿主细胞培养物中抗CD19的抗体表达水平增加。

8. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中在VH Kabat残基91处用苯基丙氨酸取代丝氨酸导致宿主细胞培养物中抗CD19的抗体表达水平增加10倍。

9. 权利要求5所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫调节剂选自细胞因子、淋巴毒素、干扰素(IFN)、促红血球生成素和血小板生成素。

10. 权利要求5所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述免疫调节剂选自干细胞生长因子、成血因子和集落刺激因子(CSF)。

11. 权利要求9或10所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述淋巴毒素为肿瘤坏死因子(TNF),所述成血因子为白介素(IL),所述集落刺激因子为粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF),所述干扰素为干扰素- α 、干扰素- β 或干扰素- γ ,所述干细胞生长因子为S1因子。

12. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段是双特异性或多特异性抗体的一部分,其中所述双特异性或多特异性抗体包含至少一种其它与CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD66(a-d)、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、MUC、Ia、HLA-DR、腱生蛋白、VEGF、P1GF、ED-B纤连蛋白、癌基因产物、IL-2、IL-6、TRAIL-R1或TRAIL-R2结合的抗体或其抗原结合片段。

13. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段用于制备治疗B细胞疾病的药剂的用途,其中所述B细胞疾病为自身免疫疾病。

14. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段用于制备治疗B细胞疾病的药剂的用途,其中所述B细胞疾病选自B细胞淋巴瘤和白血病。

15. 权利要求13或14所述的用途,其中所述人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段为

裸抗体或片段。

16. 权利要求15所述的用途,其还包括对所述受试者同时或相继施用治疗有效量的至少一种对CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD66 (a-d)、CD74、CD80、CD 126、CD 138、B7、MUC1、Ia、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、VEGF、P1GF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1或TRAIL-R2有反应性的人源化、嵌合、人或鼠单克隆抗体。

17. 权利要求15所述的用途,其还包括对所述受试者同时或相继施用治疗有效量的至少一种治疗剂。

18. 权利要求13或14所述的用途,其中所述人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段与至少一种治疗剂或诊断剂缀合。

19. 权利要求18所述的用途,其中所述治疗剂或诊断剂选自由细胞毒性剂、放射性核素、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸和光敏治疗剂组成的组。

20. 权利要求19所述的用途,其中所述细胞毒性剂为药物或毒素。

21. 权利要求19所述的用途,其中所述免疫调节剂选自细胞因子、淋巴毒素、干扰素 (IFN)、促红血球生成素和血小板生成素。

22. 权利要求19所述的用途,其中所述免疫调节剂选自干细胞生长因子、成血因子和集落刺激因子 (CSF)。

23. 权利要求21或22所述的用途,其中所述淋巴毒素为肿瘤坏死因子 (TNF),所述成血因子为白介素 (IL),所述集落刺激因子为粒细胞-集落刺激因子 (G-CSF) 或粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子 (GM-CSF),所述干扰素为干扰素- α 、- β 或- γ ,以及所述干细胞生长因子为S1因子。

24. 权利要求13或14所述的用途,其中所述人源化抗CD19的MAb或其抗原结合片段作为双特异性或多特异性抗体或其片段的一部分进行施用,所述双特异性或多特异性抗体或其片段包含至少一种其它与CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD66 (a-d)、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、MUC、Ia、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、VEGF、P1GF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1或TRAIL-R2结合的抗体或其片段。

25. 权利要求1所述的人源化抗CD19的抗体或其抗原结合片段用于制备诊断受试者B细胞疾病的试剂的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段与至少一种诊断剂缀合。

26. 权利要求25所述的用途,其中所述疾病为自身免疫疾病。

27. 权利要求25所述的用途,其中所述疾病为淋巴瘤或白血病。

28. 权利要求25所述的用途,其中所述诊断剂为放射性标记或非放射性标记。

29. 权利要求25所述的用途,其中所述诊断剂为光敏诊断剂或超声增强剂。

改良的抗CD19抗体

[0001] 序列表

[0002] 本申请包括已经通过EFS-Web提交的序列表,其全部内容在此以引用的方式并入。将2009年10月21日创建的所述ASCII副本命名为IMM167W03.txt,并且其大小为24,166字节。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请要求2008年11月7日提交的美国专利申请序列号12/266,999的优先权,该美国专利申请序列号12/266,999是2006年6月1日提交的美国专利申请序列号11/445,410(现以美国专利号7,462,352颁布)的部分连续案,该美国专利申请序列号11/445,410是2004年8月22日提交的美国专利申请序列号10/903,858(现以美国专利号7,109,304颁布)的分案,该美国专利申请序列号10/903,858要求2003年7月31日提交的临时美国专利申请号60/491,282的优先权,这些专利申请的每一个的全部内容以引用的方式并入本文。

[0005] 发明背景

发明领域

[0006] 本发明涉及抗CD19抗体,尤其是人源化、嵌合和人抗CD19抗体,特别是裸露的或与至少一种治疗剂和/或诊断剂缀合的单克隆抗体(MAb)和其片段,以及其使用方法。具体地说,抗CD19抗体可用于治疗B细胞疾病,如恶性肿瘤、炎症性疾病或病症或自身免疫疾病。在更具体的实施方案中,抗CD19抗体可包括设计用以优化抗体的物理和/或生理特征的一个或多个取代氨基酸。

[0007] 相关技术描述

[0008] 脊椎动物的免疫系统由许多器官和细胞类型组成,这些器官和细胞类型已进化成可精确地识别外来抗原、特异性地与这类外来抗原结合和消除/破坏这类外来抗原。除其它细胞类型外,淋巴细胞对免疫系统是关键性的。淋巴细胞分为二个主要的亚群,T细胞和B细胞。尽管相互依赖,但是T细胞主要负责细胞介导免疫,而B细胞主要负责抗体产生(体液免疫)。

[0009] 在人中,每个B细胞可产生大量抗体分子。当外来抗原已被中和的时候,这种抗体的产生通常停止(或基本上减少)。然而,偶尔特殊B细胞的增殖会连续不减弱并可导致称为B细胞淋巴瘤或白血病的癌症。B细胞淋巴瘤,如非霍奇金淋巴瘤的B细胞亚型,是癌症死亡率的重要原因。

[0010] B细胞恶性肿瘤对各种治疗形式的响应各异。例如,在可能对非霍奇金淋巴瘤进行适当的临床分期的情况下,场放射治疗可提供令人满意的治疗。但是仍然有约一半的患者死于此疾病。Devesa等,J.Nat'l Cancer Inst.79:701(1987)。

[0011] 多数慢性淋巴细胞白血病是B细胞系的。Freedman,Hematol.Oncol.Clin.North Am.4:405(1990)。在西方国家,这种类型的B细胞恶性肿瘤是最常见的白血病。Goodman等,Leukemia and Lymphoma 22:1(1996)。慢性淋巴细胞白血病的天然病史分为几个时期。在早期,慢性淋巴细胞白血病是无痛感的疾病,其特征在于积聚了具有延长寿命的小的、成熟

的、功能缺失的恶性B细胞。最后,恶性B细胞的倍增时间减少,并且患者的症状增加。虽然治疗可减轻症状,但只是最低限度地影响了患者的总存活率。慢性淋巴细胞白血病的晚期特征是显著贫血和/或血小板减少。此时,中位生存期少于二年。Foon等, *Annals Int. Medicine* 113:525 (1990)。由于极低的细胞增殖速率,慢性淋巴细胞白血病对细胞毒性药物治疗有抗性。由于毒性副作用,治疗B细胞恶性肿瘤的传统方法(包括化学疗法和放射疗法)的实用性有限制。

[0012] B细胞包括可用作标记以用于区分和识别的细胞表面蛋白。一种这样的人B细胞标记是CD19抗原,并被发现在成熟的B细胞上而不在浆细胞上。CD19在早期前B细胞发育期间表达并保持到浆细胞分化。在正常B细胞和恶性B细胞上都表达CD19,恶性B细胞的异常生长会导致B细胞淋巴瘤。例如,CD19在B细胞系恶性肿瘤上表达,B细胞系恶性肿瘤包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病和急性成淋巴细胞性白血病。

[0013] 使用非人单克隆抗体(例如,鼠单克隆抗体)的潜在问题是通常缺乏人效应物功能性。换句话说,这类抗体不能介导补体依赖性溶解或通过抗体依赖性细胞毒性或Fc受体介导的吞噬作用而溶解人靶细胞。此外,人宿主会将非人单克隆抗体识别为外源性蛋白质,因此,重复注射这类外源性抗体会导致诱发引起有害过敏反应的免疫应答。对基于鼠的单克隆抗体,这通常称为人抗小鼠抗体(HAMA)反应。

[0014] 更优选使用嵌合抗体,因为它们不会引起与鼠抗体一样强的HAMA反应。嵌合抗体是包括来自两个或多个不同物种的部分的抗体。例如,Liu,A.Y.等,"Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity" *J. Immunol.* 139/10:3521-3526 (1987) 描述了针对CD20抗原的小鼠/人嵌合抗体。同样见PCT公布号WO 88/04936。然而,在该参考文献中没有提供关于使用这类嵌合抗体治疗B细胞病症的能力、功效或实用性的信息。应注意的是,体外功能试验(例如补体依赖性溶解(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)等)不能实质性地预测嵌合抗体在体内破坏或减少表达特异性抗原的靶细胞的能力。例如,见Robinson,R.D.等,"Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities" *Hum. Antibod. Hybridomas* 2:84-93 (1991) (具有不可测的ADCC活性的嵌合小鼠-人抗体)。因此,嵌合抗体的可能治疗功效只能真正地通过体内实验来评价,优选在用于特异性治疗的目标物种中进行实验。

[0015] 一种提高鼠单克隆抗体的能力以有效治疗B细胞病症的方法使放射性标记或化学治疗剂与抗体缀合,以便使标记或试剂定位在肿瘤位点上。例如,研究表明⁹⁰Y标记的抗CD19抗体可用于减少小鼠中的淋巴瘤(McDevitt等, *Leukemia* 16:60, 2002),与伊达比星缀合的抗CD19抗体引起实验模型中的肿瘤退化(Rowland等, *Cancer Immunol. Immunother.*, 37: 195, 1993),以及¹²⁵I和¹¹¹In放射性标记的抗CD19被特异性地吸收到具有肿瘤的器官中(Mitchell等, *J. Nucl. Med.*, 44:1105, 2003)。Ek等, *Leuk. Lymphoma* 31:143 (1998) 和Uckun等, *Blood*, 79:3116 (1992) 中也公开了用抗CD19抗体的组合疗法。Hekman等, *Cancer Immunol. Immunother.*, 32:364 (1991) 和Cochlovius等, *J. Immunol.*, 165:888 (2000) 中分别公开了用抗CD19抗体和抗CD3×抗CD19抗体治疗人B细胞淋巴瘤。

[0016] 但是,这些方法没有消除与使用鼠抗体相关的障碍,尽管有这样的事实,即许多已经接受现有侵袭性细胞毒性化学疗法的淋巴瘤患者是免疫抑制的,因此比没有经过深切预

治疗的淋巴瘤患者具有更低的HAMA比率,。

[0017] 炎症性疾病(包括自身免疫疾病)也是一类与B细胞病症相关的疾病。最常见的治疗是极具毒性的皮质类固醇和细胞毒性药物。这些药物也抑制整个免疫系统,可导致严重的感染,并且对骨髓、肝脏和肾脏有不利的影响。已经用于治疗III型自身免疫疾病的其它疗法已针对T细胞和巨噬细胞。需要更有效的治疗自身免疫疾病的方法,特别是III型自身免疫疾病。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明提供用于治疗人和其它哺乳动物的B细胞淋巴瘤和白血病以及自身免疫病症的人源化、嵌合和人抗CD19单克隆抗体和其片段,以及抗体融合蛋白和其片段。所述抗体、融合蛋白和其片段可单独使用、与至少一种诊断和/或治疗剂缀合或与其它治疗形式组合使用。

[0020] 所主张的抗体的使用方法可包括用一种或多种人源化、嵌合或人抗CD19抗体治疗哺乳动物受试者(如人或家畜),这些抗体单独使用、作为抗体融合蛋白、作为单独的治疗缀合物或作为抗体融合蛋白的一部分进行使用,或与其它抗体、其它治疗剂或免疫调节剂组合作为多模式治疗进行使用,或作为与至少一种治疗剂、治疗放射性核素或免疫调节剂连接的免疫缀合物进行使用。这些人源化、嵌合和人抗CD19抗体也可单独、与其它诊断成像剂组合、并且/或与治疗应用一起而用作诊断成像剂。可治疗的疾病状态包括瘤形成,优选与B细胞相关的淋巴瘤和白血病,如非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞性白血病或多发性骨髓瘤。可治疗的其它疾病状态包括自身免疫疾病,如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮炎、西登哈姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合症、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰二氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、链球菌感染后肾炎(post-streptococcal nephritis)、结节性红斑、高安氏动脉炎、艾迪生氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、肉状瘤病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)、血栓闭塞性脉管炎(thromboangitis obliterans)、斯耶格伦综合征(Sjogren's syndrome)、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、寻常性天疱疮、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病和纤维性肺泡炎。技术人员将认识到这些没有限制性,并且其中CD19表达细胞发挥作用的任何疾病状态可能使用单独或组合的所主张的抗CD19抗体进行治疗。

[0021] 不同实施方案涉及抗体融合蛋白及其片段,所述抗体融合蛋白及其片段包含至少两个抗CD19MAb或其片段,或至少一个抗CD19 MAb或其片段以及至少一个除抗CD19 MAb或其片段之外的第二MAb或其片段。使用的第二抗体可包括抗其它B细胞相关抗原或B细胞特异性抗原(如CD20、CD22、CD23、CD80或HLA-DR)的抗体。多特异性蛋白和/或融合蛋白可以是裸露的或与至少一种治疗剂和/或诊断剂缀合。

[0022] 人源化、嵌合和人抗CD19MAb和其片段以及抗体融合蛋白和其片段可单独(裸露的或与治疗剂或诊断剂缀合)施用,或与其它裸抗体、片段或免疫缀合物组合。同样,裸露的或缀合的抗CD19抗体和其片段、以及抗体融合蛋白和其片段可与至少一种治疗剂或诊断剂组

合施用,该治疗剂或诊断剂不与抗CD19抗体或其片段或者融合蛋白或其片段缀合。

[0023] 其它实施方案涉及编码人源化、嵌合或人抗CD19抗体和其片段以及抗体融合蛋白和其片段的DNA序列。同样也涵盖了包含DNA序列的载体和宿主细胞。所主张的方法还包括人源化、嵌合和人抗CD19抗体和其片段以及融合蛋白和其片段的制备方法。

[0024] 具体的实施方案涉及抗CD19MAb或其片段,其包含对CD19有特异性的特异性鼠CDR。这些MAb可以是人源化、嵌合或人抗CD19 MAb。在优选的实施方案中,抗体可包括一个或多个取代的氨基酸残基,如人源化抗体的人构架区序列中相应的鼠构架区氨基酸残基的取代。作为取代候选的优选的构架区氨基酸包括与一个或多个CDR氨基酸侧链接近或相邻的,或另外影响所编码蛋白质的稳定性和/或表达水平的那些构架区氨基酸。在最优选的实施方案中,取代包括用在人源化A19 (hA19) 抗体的VH序列的Kabat残基91处的苯丙氨酸残基替代丝氨酸残基。

[0025] 附图简述

[0026] 图1公开Vk(可变轻链)和VH(可变重链)、cA19的序列、嵌合抗CD19抗体。CDR区序列用粗体和下划线示出。核苷酸按顺序编号。如氨基酸残基上方的编号所示,将Kabat's Ig分子编号法用于氨基酸残基。用字母编号的氨基酸残基为由Kabat编码方案所定义的插入残基。插入残基与前一个残基的前面数字相同。例如,图1B中的残基82、82A、82B和82C分别以82、A、B和C表示。图1A示出轻链可变区(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2),以及图1B示出重链可变区(SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4)。

[0027] 图2示出了细胞表面竞争性结合测定的结果,比较了cA19抗体的结合特异性与其它抗CD19抗体(BU12和B4)的结合特异性。递增浓度的cA19阻断了放射标记BU12与Raji细胞的结合,方式与未标记的BU12和B4相似,表明这些抗体识别CD19分子的相似或重叠的表位。

[0028] 图3比较了人抗体、嵌合抗体和人源化抗CD19抗体的可变轻链(Vk)和可变重链(VH)的氨基酸序列。图3A比较了人抗体(REIVk,SEQ ID NO:5)、嵌合抗体(cA19Vk,SEQ ID NO:6)和人源化抗体(hA19Vk,SEQ ID NO:7)的可变轻链(Vk)的氨基酸序列,以及图3B比较了人抗体EU(SEQ ID NO:8)和NEWM(仅FR4,SEQ ID NO:11)、嵌合抗体(cA19VH,SEQ ID NO:9)和人源化抗体(hA19VH,SEQ ID NO:10)的可变重链(VH)的氨基酸序列。

[0029] 图4公开了人源化抗CD19抗体(hA19)的氨基酸序列、轻链V基因(hA19Vk)(图4A,SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13)以及重链V基因hA19VH(图4B,SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15)。核苷酸序列以小写字体示出。Vk和VH氨基酸残基的编号与图1相同。

[0030] 图5示出了细胞表面竞争性结合测定的结果,比较了人源化A19抗体(hA19)的结合特异性和活性与cA19的结合特异性和活性。图5A示出了未缀合的hA19(闭合三角形)和cA19(闭合圆圈)都阻断了¹²⁵I-hA19与Raji细胞的结合。图5B示出了hA19(闭合圆圈)和c19(闭合正方形)同样地竞争¹²⁵I-cA19与Raji细胞的结合。递增浓度的cA19或hA19分别阻断了放射标记hA19或cA19与Raji细胞的结合。

[0031] 图6示出了通过直接细胞表面结合和Scatchard作图分析测定抗CD19Ab的Ag结合亲和性(亲和力)。将不同浓度的¹²⁵I-hA19(菱形)或¹¹²In-cA19(正方形)与Raji细胞在40℃下一同孵育1h。如插图所示,通过Scatchard作图对总放射性和结合放射性进行计数和分析。显示hA19和cA19具有几乎相同的结合亲和性。如图所示,hA19和cA19的表观解离常数数值分别计算为1.1nM和1.2nM。

[0032] 发明详述

[0033] 定义

[0034] 除另有指明外,本文使用的“一种”或“一个”指“一个(种)或多个(种)”。

[0035] 除另有指明外,按照其平常和普通的含义使用术语。

[0036] 如本文所述,“抗体”指全长的(即,天然存在的或由正常免疫球蛋白基因片段重组过程形成的)免疫球蛋白分子(例如,IgG抗体)或免疫球蛋白分子的免疫活性(即,特异性结合)部分,如抗体片段。

[0037] “抗体片段”是抗体的一部分,如F(ab)₂、F(ab')₂、Fab、Fab'、Fv、sFv等。不管结构如何,抗体片段与由完整抗体识别的相同抗原结合。例如,抗CD19单克隆抗体片段与CD19的表位结合。抗体片段包括由可变区构成的分离片段,如由重链和轻链可变区构成的“Fv”片段,或其中轻链和重链可变区由肽接头(“scFv蛋白”)连接的重组单链多肽分子。

[0038] “裸抗体”通常是未与治疗剂缀合的完整抗体。这是因为抗体分子的Fc部分提供效应物功能,如补体固定和ADCC(抗体依赖性细胞毒性),这将机制转化为可能导致细胞裂解的作用。然而,Fc部分可能对于具有正在起作用的其它机制(例如细胞凋亡)的是不需要的。“裸抗体”包括多克隆和单克隆抗体以及某些重组抗体,如嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0039] “嵌合抗体”含有可变结构域的重组蛋白,该可变结构域包括源自一个物种的抗体(优选啮齿类动物抗体)的互补决定区(CDR),而抗体分子的恒定结构域源自人抗体的恒定结构域。对于兽医应用,嵌合抗体的恒定结构域可源自其它物种(如猫或狗)的恒定结构域。

[0040] “人源化抗体”是重组蛋白,其中将来自一个物种的抗体(例如啮齿类动物抗体)的CDR从啮齿类动物抗体的可变重链和轻链转移到人源重链和轻链可变区中。抗体分子的恒定区源自人抗体的恒定区。

[0041] “人抗体”包含人可变区和恒定区序列的抗体。例如,人抗体可由转基因小鼠获得,改造该转基因小鼠以响应于抗原刺激而产生人抗体。在这种技术中,将人源重链和轻链基因座的元件导入源自胚胎干细胞系的小鼠品系中,该胚胎干细胞系包含鼠内源性重链和轻链基因座的定向破坏。转基因小鼠可合成对人抗原特异的人抗体,并且这些小鼠可用来产生分泌人抗体的杂交瘤。Green等,Nature Genet.7:13(1994)、Lonberg等,Nature 368:856(1994)和Taylor等,Int.Immun.6:579(1994)描述了从转基因小鼠获得人抗体的方法。还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建全人抗体,所有这些方法在本领域中都是已知的。见例如McCafferty等,Nature 348:552-553(1990),在体外从未免疫供体的免疫球蛋白可变结构域基因文库中产生人抗体或其片段。在该技术中,将抗体可变区基因在框内克隆到丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因上,并作为功能性抗体片段展示在噬菌体粒子的表面上。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体的功能特性的选择也导致选择编码显示出那些特性的抗体的基因。以这种方式,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行,对于其概况,可以见例如Johnson和Chiswell,Current Opinon in Structural Biology 3:5564-571(1993)。也可以通过体外活化B细胞而产生人抗体。参见美国专利号5,567,610和5,229,275,其以引用的方式整体并入。

[0042] “治疗剂”是与抗体部分分别、同时或相继施用或与抗体部分(即,抗体或抗体片段或亚片段)缀合的分子或原子,并且在疾病治疗中是有用的。治疗剂的例子包括抗体、抗体片段、药物、毒素、酶、寡核苷酸、反义和RNAi寡核苷酸、核酸酶、激素、免疫调节剂、螯合剂、

硼化合物、光敏剂(photoactive agent)或染料和放射性同位素。

[0043] “诊断剂”是可与抗体部分(即,抗体或抗体片段或亚片段)缀合而进行施用的分子或原子,并在通过定位包含靶抗原的细胞来诊断疾病中是有用的。有用的诊断剂包括但不限于放射性同位素、染料、造影剂、超声增强剂、光学增强剂、荧光化合物或分子以及用于磁共振成像(MRI)的增强剂(例如顺磁性离子)。美国专利号6,331,175描述了MRI技术和与MRI增强剂缀合的抗体的制备,并且该专利以引用的方式整体并入。优选地,诊断剂选自放射性同位素、用于磁共振成像的增强剂和荧光化合物、超声和荧光化合物。为了用放射性金属或顺磁性离子负载抗体组分,可能需要将抗体组分和具有长尾的试剂反应,该长尾附着有多个用于结合离子的螯合基团。这样的尾可以是聚合物,如聚赖氨酸、多聚糖或具有侧基的其它衍生的或可衍生的链,该侧基可结合螯合基团,例如乙二胺四乙酸(EDTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、DOTA、NOTA、卟啉、聚胺、冠醚、双硫缩氨基硫脲、聚脲以及已知用于此目的类似基团。使用标准的化学方法使螯合剂连接于肽或蛋白质。螯合剂通常通过能够以最低的免疫活性损失和最小的聚合和/或内部交联与分子形成键的基团而与抗体连接。其它更不常见的用于将螯合剂与抗体缀合的方法和试剂公开在1989年4月25日颁布的题为“Antibody Conjugates”的Hawthorne的美国专利号4,824,659中,该专利的全部内容以引用的方式整体并入本文。特别有用的金属-螯合剂组合包括2-苄基-DTPA和其一甲基和环己基类似物,它们与在一般能量范围为60至4000keV内的诊断同位素(如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{62}Cu 、 ^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{76}Br)一起使用以用于放射成像。在与本发明的抗体一同使用时,与非放射性金属(如锰、铁和钆)络合的相同的螯合剂可用于MRI。大环螯合剂(如NOTA、DOTA和TETA)与多种金属和放射性金属一起使用,最特别地分别与镓、钷和铜的放射性核素一起使用。可通过将环大小适合目标金属的大小而使这类金属-螯合剂络合物非常稳定地形成。本发明包括其它环型螯合剂(如大环聚醚),因其稳定地结合核素(如 ^{223}Ra)以用于RAIT而受关注。

[0044] “免疫缀合物”是抗体组分和治疗剂或诊断剂的缀合物。

[0045] “表达载体”是核酸分子,优选为双链DNA分子,其包括在宿主细胞中表达的基因。通常,基因表达置于在某些调控元件的控制之下,调控元件包括组成型或诱导型启动子、组织特异性调控元件和增强子。据说这样的基因“可操作地连接到”调控元件。

[0046] “重组宿主细胞”可以是含有克隆载体或表达载体的任何原核细胞或真核细胞。该术语还包括那些经基因工程改造而在宿主细胞或宿主动物细胞的染色体或基因组中含有克隆基因的原核或真核细胞以及转基因动物。合适的哺乳动物宿主细胞包括骨髓瘤细胞(如SP2/0细胞和NS0细胞)、以及中国地鼠卵巢(CHO)细胞、杂交瘤细胞系和其它用于表达抗体的哺乳动物宿主细胞。同样有用于表达MAb和其它融合蛋白的哺乳动物宿主细胞是公开在WO 0063403 A2中的人细胞系PER.C6。最优选的宿主细胞是经改造以包含Bcl-EEE基因或其它细胞凋亡抑制剂的细胞,使该细胞预适应生长并在无血清或低血清介质中感染。这类宿主细胞的例子公开在2005年7月25日提交的美国专利申请序列号11/187,863和2006年7月14日提交的美国专利申请序列号11/487,215中,每个专利申请的内容以引用的方式整体并入本文。具有改良的免疫系统的专用转基因动物对制备全人抗体特别有用。

[0047] 如本文所用,术语“抗体融合蛋白”指重组产生的抗原结合分子,其包括一个或多个具有相同或不同特异性的相同或不同单链抗体或抗体片段。抗体融合蛋白可包括附着于

另一蛋白质或肽上的抗体或其片段,如治疗剂、毒素、细胞因子、激素或其它蛋白质或肽。在其它实施方案中,抗体融合蛋白可包括至少第一和第二抗体或抗体片段。在融合蛋白包括两种或多种抗体或片段的情况中,融合蛋白的化合价表示融合蛋白对单个抗原或表位具有多少个结合臂或位点;即,单价的、二价的、三价的或多价的。特异性表示抗体融合蛋白能够结合多少个抗原或表位,即,单特异性的、双特异性的、三特异性的、多特异性的。利用这些定义,天然抗体(例如IgG)是二价的,原因是其具有二个结合臂,但其是单特异性的,原因是其与一个表位结合。

[0048] 多特异性抗体是可以同时与至少两个具有不同结构的靶(例如,两个不同抗原、在相同抗原上的两个不同表位或半抗原和/或抗原或表位)结合的抗体。一种特异性会是对B细胞、T细胞、骨髓细胞、浆细胞和肥大细胞抗原或表位。另一种特异性可能是针对相同细胞类型上的不同抗原,如B细胞上的CD20、CD19、CD20、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74和CD22。多特异性的多价抗体是具有不止一个结合位点的构建体,并且结合位点具有不同的特异性。例如,对于双抗体,一个结合位点与一个抗原反应,而另一结合位点与另一抗原反应。

[0049] 双特异性抗体是可以同时与两个具有不同结构的靶结合的抗体。双特异性抗体(bsAb)和双特异性抗体片段(bsFab)具有至少一个特异性地与例如B细胞、T细胞、骨髓细胞、浆细胞和肥大细胞抗原或表位结合的臂,以及至少一个特异性地与具有治疗剂或诊断剂的靶向缀合物结合的其它臂。利用分子工程可制备多种双特异性融合蛋白。

[0050] 家畜包括大型动物(如马、牛、绵羊、山羊、骆驼、羊驼和猪)以及伴侣动物。在优选的实施方案中,家畜是马。伴侣动物包括作为宠物饲养的动物。这些动物主要是狗和猫,尽管也包括小型啮齿类动物(如豚鼠、仓鼠、大鼠和雪貂)以及类人的灵长类(如猴)。在优选的实施方案中,伴侣动物是狗或猫。

[0051] 综述

[0052] 如上所述,未缀合的或用治疗性放射性核素标记的抗CD19抗体不能够在患有中间或侵袭性的B细胞淋巴瘤的患者中提供高比率的客观和持久响应。本发明提供用于治疗哺乳动物受试者(人和家畜)的人源化、嵌合或人抗CD19抗体和抗体融合蛋白,它们作为缀合物单独施用或与其它治疗剂(包括其它裸抗体和抗体治疗缀合物)组合施用。

[0053] 抗CD19MAb优选地包含来自一种或多种对CD19抗原有特异性的鼠或嵌合抗CD19MAb的特异性鼠CDR。抗CD19MAb是人源化、嵌合或人MAb。抗CD19MAb的轻链可变区的CDR优选地包括含有氨基酸KASQSVDYDGDSYLN(SEQ ID NO:16)的CDR1、含有氨基酸DASNLVS(SEQ ID NO:17)的CDR2、和含有氨基酸QQSTEDPWT(SEQ ID NO:18)的CDR3;并且重链可变区的CDR包括含有氨基酸SYWMN(SEQ ID NO:19)的CDR1、含有氨基酸QIWPGDGTNYNGKFKG(SEQ ID NO:20)的CDR2、和含有氨基酸RETTTVGRYYYAMDY(SEQ ID NO:21)的CDR3。

[0054] 在优选的实施方案中,人源化抗CD19MAb或其片段包括鼠抗CD19MAb的CDR、人抗体的轻链和重链可变区的构架区(FR)和人抗体的轻链和重链恒定区,同时基本上保持亲本鼠抗CD19MAb的B细胞及B细胞淋巴瘤和白血病细胞靶向,并且其中抗CD19MAb的轻链可变区的CDR包括含有氨基酸KASQSVDYDGDSYLN(SEQ ID NO:16)的CDR1、含有氨基酸DASNLVS(SEQ ID NO:17)的CDR2、和含有氨基酸QQSTEDPWT(SEQ ID NO:18)的CDR3;并且抗CD19MAb的重链可变区的CDR包括含有氨基酸SYWMN(SEQ ID NO:19)的CDR1、含有氨基酸

QIWPGDGTNYNGKFKG (SEQ ID NO:20)的CDR2、和含有氨基酸RETTTVGRYYYYAMDY (SEQ ID NO:21)的CDR3。人源化抗CD19 MAb或其片段还可在抗体的轻链和重链可变区的FR中包含至少一个来自鼠MAb的相应FR的氨基酸。具体地,人源化抗CD19 MAb或其片段可包含至少一个选自图4A中鼠重链可变区的残基5、27、28、40、48、91、94、107和108的氨基酸残基和至少一个选自图4B中鼠轻链可变区的残基4、39、58、60、87、100和107的氨基酸残基。在更优选的实施方案中,人源化A19抗体(hA19)包含上面列出的每一个取代的鼠FR氨基酸残基。一个或多个鼠氨基酸序列可保持在可变轻链和重链的人FR区中,如有必要以维持适当的结合或加强与CD19抗原的结合。更优选地,人源化抗CD19 MAb或片段包括图3A中的hA19Vk (SEQ ID NO:7)和图3B中的hA19VH (SEQ ID NO:10)。最优选的是,人源化抗CD19 MAb包括在hA19VH (SEQ ID NO:10)序列的Kabat残基91处用苯丙氨酸残基取代丝氨酸残基的另外的FR取代。

[0055] 优选的嵌合抗CD19 (cA19) MAb或其片段包括鼠抗CD19 MAb的CDR和鼠抗CD19 MAb的轻链和重链可变区的FR区(即,亲本鼠MAb的Fvs)和人抗体的轻链和重链恒定区,其中嵌合抗CD19 MAb或其片段基本上保持鼠抗CD19 MAb的B细胞及B细胞淋巴瘤和白血病细胞靶向,其中抗CD19 MAb的轻链可变区的CDR包括含有氨基酸KASQSVYDYGDSYLN (SEQ ID NO:16)的CDR1、含有氨基酸DASNLVS (SEQ ID NO:17)的CDR2、和含有氨基酸QQSTEDPWT (SEQ ID NO:18)的CDR3;并且抗CD19 MAb的重链可变区的CDR包括含有氨基酸SYWMN (SEQ ID NO:19)的CDR1、含有氨基酸QIWPGDGTNYNGKFKG (SEQ ID NO:20)的CDR2、和含有氨基酸RETTTVGRYYYYAMDY (SEQ ID NO:21)的CDR3。更优选地,嵌合抗CD19 MAb或其片段包括分别在图1A和1B中示出的嵌合抗CD19 MAb的轻链和重链可变区序列,命名为cA19Vk (SEQ ID NO:6)和cA19VH (SEQ ID NO:9)。

[0056] 不同实施方案还包括含有人抗体的轻链和重链可变和恒定区的人抗CD19 MAb或其片段,其中所述人抗CD19 MAb基本上保持了鼠抗CD19 MAb的B细胞及B细胞淋巴瘤和白血病细胞靶向和细胞结合特性,其中人抗CD19 MAb的轻链可变区的CDR包括与上面对于嵌合和人源化抗CD19 MAb所列出的并分别在图1A和1B以及图3A和3B中示出的相同的CDR (SEQ ID NOs:16-21)。

[0057] 某些实施方案也旨在包括含有至少两个如上所述的抗CD19 MAb或其片段的抗体融合蛋白或其片段。抗体融合蛋白或其片段还旨在包括具有至少一个如上所述的第一抗CD19 MAb或其片段和至少一个第二MAb或其片段(除上面所述抗CD19 MAb或片段外)的抗体融合蛋白或其片段。更优选地,这种第二MAb是与CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、MUC-1、Ia、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、血管生成因子、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1 (DR4) 和TRAIL-R2 (DR5) 或其组合反应的MAb,并甚至是针对与本文所述的抗CD19 MAb不同的表位的抗CD19 MAb。抗体融合蛋白可由一个抗CD19 MAb和一个或多个第二MAb组成以对不同抗原具有特异性,并且在下文中更详细地描述。

[0058] 人源化、嵌合和人抗CD19抗体可以具有增强的与表位结合的亲和性,以及具有抗肿瘤和抗B细胞活性,这是氨基酸突变和对可变区中的序列进行操作的结果,从而获得用于治疗B细胞病症(包括B细胞淋巴瘤和白血病及自身免疫疾病)的优良治疗剂。对于抗体的结合特异性、亲和性或亲和力所进行的修饰是已知的,并在WO 98/44001中描述为亲和力成

熟,该申请总结了修饰的方法,而且其以引用的方式整体并入。

[0059] 也可希望修饰抗体以提高效应物功能,例如,以便增强拮抗剂的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。可在Fc区中进行一个或多个氨基酸取代或引入半胱氨酸,由此提高内在化能力和/或增强的补体介导的细胞杀死能力和ADCC。参见Caron等,J.Ex.Med.176:1191-1195(1991)和Shopes,Brit.J.Immunol.148:2918-2022(1992),其以引用的方式整体并入本文。可制备这样的抗体融合蛋白,即其含有具有增强的补体溶解和ADCC能力的双重Fc区。

[0060] 某些实施方案也涉及包括编码MAb或其片段的核苷酸的DNA序列,所述MAb或其片段选自:(a)如本文所述的抗CD19 MAb或其片段;(b)包括至少两个抗CD19 MAb或其片段的抗体融合蛋白或其片段;(c)还包括至少一个含有如本文所述的抗CD19 MAb或其片段的第一MAb或其片段和至少一个除抗CD19 MAb或其片段之外的第二MAb或其片段的抗体融合蛋白或其片段;以及(d)包括至少一个含有抗CD19 MAb或其片段的第一MAb或其片段和至少一个第二MAb或其片段的抗体融合蛋白或其片段,其中第二MAb是与CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、MUC1、Ia、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、ED-B纤连蛋白、IL-6、VEGF、PIGF、TRAIL-R1(DR4)和TRAIL-R2(DR5)或其组合反应的MAb。

[0061] 也包括含有DNA序列的表达载体。在载体用于制备人源化、嵌合和人抗CD19 MAb或其抗体融合蛋白或其片段的情况下,这些载体包含人免疫球蛋白的轻链和重链恒定区和铰链区。在需要的情况下,这些载体另外包含在选定宿主细胞中表达MAb的启动子、免疫球蛋白增强子和信号或前导序列。特别是当用于表达嵌合、人源化或人抗体(如IgG)时,在本发明中特别有用的载体是pdHL2或GS,其中载体编码IgG1的重链和轻链恒定区和铰链区。更优选地,轻链和重链恒定区和铰链区来自人ED骨髓瘤免疫球蛋白,其中任选地将至少一个同种异型位置上的氨基酸转变为在不同的IgG1同种异型中发现的氨基酸,并且其中任选地将基于EU编号系统的EU重链的253位氨基酸可用丙氨酸进行取代。参见Edelman等,Proc.Natl.Acad.Sci USA 63:78-85(1969),其以引用的方式整体并入本文。

[0062] 本发明包括含有编码抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的DNA序列的宿主细胞或含有具有这些DNA序列的载体的宿主细胞。特别有用的宿主细胞是哺乳动物细胞,更具体地是淋巴细胞,如骨髓瘤细胞,这将在下面更详细地讨论。

[0063] 也包括表达抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的方法,包括:(a)用编码抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的DNA序列转染哺乳动物细胞,以及(b)培养用DNA序列转染并且分泌抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的细胞。可以使用包括在载体上具有选择标记的已知方法,从而可以容易地挑选出表达MAb和标记的宿主细胞。

[0064] 本发明特别包括B淋巴瘤细胞、白血病细胞和/或自身免疫细胞靶向的诊断或治疗缀合物,其包括含有与靶细胞结合的抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的抗体组分,所述靶细胞与至少一种诊断剂或至少一种治疗剂缀合或附着于其上。

[0065] 诊断缀合物包括含有抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的抗体组分,其中诊断剂包括至少一种光敏诊断剂,更优选地,其中标记是能量在60keV至4,000keV之间的放射性标记或非放射性标记。放射性标记优选为 γ -、 β -或正电子发射同位素,并选自

^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{76}Br 和其组合。

[0066] 诊断缀合物可利用诊断剂,如造影剂(例如锰、铁或钆),或包括超声增强剂。在一个实施方案中,超声增强剂是脂质体,其包括嵌合或人源化抗CD19抗体或其片段。也优选的是,超声增强剂是充气脂质体。同样地,双特异性抗体可以与造影剂缀合。例如,双特异性抗体可包括不止一种用在超声成像中的成像增强剂。超声增强剂可以是脂质体,并且优选地,该脂质体包括共价地附着在脂质体外表面的二价DTP A肽。也优选的是,脂质体是充气的。

[0067] 治疗缀合物包括抗体组分,如抗体融合蛋白或其片段,其中所述MAb或其片段的每一个与至少一种治疗剂结合。该治疗缀合物优选选自放射性标记、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光敏治疗剂、细胞毒性剂(可以是药物或毒素)和其组合。有用的药物包括具有药物特性的那些药物,其选自抗有丝分裂剂、烷化剂、抗代谢物、抗生素、生物碱、抗血管生成剂、细胞凋亡剂和其组合,以及反义寡核苷酸和RNA分子,如激活RNA干扰途径的短双链RNA分子。更具体地,该药物可选自氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸酯、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、COX-2抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、抗生素、酶、表鬼臼毒素、铂配位复合物、长春花生物碱、取代脲、甲胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、沙利度胺和其衍生物、拮抗剂、内皮抑素(endostatin)、紫杉酚、喜树碱、萘环类、紫杉醇类和其类似物,以及它们的组合。该毒素可选自蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、肥皂草素、onconase(即,核糖核酸酶(RNA酶))、DNA酶I、金黄色葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒蛋白(gelonin)、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。

[0068] 其它适用的治疗剂包括抗血管生成剂(或血管生成抑制剂)。这些试剂适用于组合治疗或用于与抗体缀合,例如血管抑素、血管内皮抑素、血管抑制素(vasculostatin)、癌抑素(canstatin)和乳腺丝抑蛋白(maspin),以及适用于针对血管生成因子的抗体,如血管内皮生长因子(VEGF)、胎盘生长因子(PIGF)、ED-B纤连蛋白和其它血管生长因子。单链和双链寡核苷酸是新种类的治疗剂,并包括例如反义寡核苷酸(如反义bc1-2)和其激活RNA干扰途径并造成基因表达的高特异性抑制(如bc1-2的抑制)的分子(如双链RNA分子)。细胞中bc1-2(和相关bc1家族分子)的抑制阻止了bc1-2的抗细胞凋亡活性并促进细胞的凋亡。参见Zangemeister-Wittke, Ann N Y Acad Sci. 1002:90-4 (2003)。

[0069] 有用的治疗缀合物是免疫调节剂,所述免疫调节剂选自细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、促红细胞生成素、血小板生成素和其组合。特别有用的是淋巴毒素,如肿瘤坏死因子(TNF);成血因子,如白细胞介素(IL);集落刺激因子,如粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(G-CSF);干扰素,如干扰素- α 、干扰素- β 或干扰素- γ ;以及干细胞生长因子,如“S1因子”。更具体地,可使用免疫调节剂,如IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素、TNF- α 或TNF- β 或其组合。

[0070] 特别有用的治疗缀合物包括一种或多种能量在60keV至700keV之间的放射性标记。这类放射性标记可选自 ^{225}Ac 、 ^{67}Ga 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{177}Lu 、 ^{32}P 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 和其组合。其它有用的治疗缀合物是光敏治疗剂,如色原体或染料。

[0071] 所主张的方法包括治疗受试者的B细胞疾病的方法,所述受试者诸如哺乳动物,包括人、家养宠物或伴侣宠物,如狗和猫。可用该方法治疗的B细胞疾病包括涉及不需要的或不期望的B细胞生长或活性的任何疾病,而且包括恶性肿瘤(如淋巴瘤或白血病)或自身免

疫疾病。该方法涉及对受试者施用治疗有效量的在药学上可接受的赋形剂中配制的治疗有效量的抗CD19MAb或其片段。这种疗法可使用不与治疗剂结合的“裸抗体”。可通过对受试者同时或相继地施用治疗有效量的另一种治疗剂而补充“裸抗CD19抗体”的施用,所述另一种治疗剂例如与靶细胞表面上的另一抗原结合或与其有反应性或者具有其它功能(如具有治疗性的且本文所述的MAb的Fc部分中的效应物功能)的第二“裸抗体”。优选的另外MAb是至少一种人源化、嵌合、人源或鼠(在非人类动物的情况中)MAb,其选自与在药学上可接受的赋形剂中配制的CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、HM1.24、HLA-DR、血管生成因子、腱生蛋白、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、MUC-1、T01、TAC、IL-6、TRAIL-R1 (DR4) 和TRAIL-R2 (DR5) 有反应性的MAb。在其它实施方案中,抗CD19抗体可与一种或多种治疗剂或诊断剂缀合。

[0072] 通过同时或相继地施用在药学上可接受的赋形剂中配制的治疗有效量的至少一种治疗剂,可进一步补充如上所述的单独裸抗CD19疗法或与其它裸MAb的组合。如本文所述,该治疗剂可包括在药学上可接受的赋形剂中配制的细胞毒性剂、反射性标记、免疫调节剂、激素、寡核苷酸(如反义或RNAi寡核苷酸)、酶、光敏治疗剂或其组合。

[0073] 在另一治疗方法中,通过同时或相继地施用本文所述的且在药学上可接受的赋形剂中配制的治疗有效量的至少一种治疗缀合物,可进一步补充如上讨论的单独抗CD19裸疗法或与其它裸MAb的组合。治疗缀合物的抗体组分包括至少一种人源化、嵌合、人或鼠(对于非人类受试者)MAb,其选自与在药学上可接受的赋形剂中配制的CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、HM1.24、HLA-DR、血管生成因子、腱生蛋白、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、T101、TAC、IL-6、MUC-1、TRAIL-R1 (DR4) 和TRAIL-R2 (DR5) 有反应性的MAb。如本文所述,该治疗剂可包括在药学上可接受的赋形剂中配制的细胞毒性剂、反射性标记、免疫调节剂、激素、光敏治疗剂或其组合。

[0074] 其它实施方案涉及治疗受试者的B细胞淋巴瘤或白血病或自身免疫疾病的方法,所述方法包括对受试者施用治疗有效量的抗体融合蛋白或其片段,所述抗体融合蛋白或其片段包括至少两个抗CD19MAb或其片段或包括至少一个抗CD19MAb或其片段和至少一个另外MAb,所述另外MAb优选选自与在药学上可接受的赋形剂中配制的CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、MUC-1、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1 (DR4) 和TRAIL-R2 (DR5) 有反应性的MAb。

[0075] 在其它基于预靶向技术的方法中,多特异性抗体或融合蛋白可包括本文所述的抗CD19抗体,其附着于至少一个与半抗原(如HSG半抗原)结合的其它抗体或片段。该半抗原可并入到包含一种或多种治疗剂和/或诊断剂的靶向缀合物中。可将多特异性抗体或融合蛋白施用于受试者并使其与靶抗原(如在靶细胞例如B细胞上表达的CD19)结合。经过使未结合的循环抗体足以从循环中清除的时间后,可施用靶向缀合物,然后该靶向缀合物与定位到靶细胞或组织上的多特异性抗体或融合蛋白结合。这种预靶向方法通过将治疗剂优先递送至靶细胞或组织(相比于正常细胞或组织)从而提高了治疗指数。预靶向方法在本领域是

熟知的(见例如,美国专利号6,361,774、6,962,702、7,074,403、7,201,890、7,230,084、7,230,085和7,429,381,每个专利以引用的方式整体并入本文)。

[0076] 通过同时或相继地对受试者施用在药学上可接受的赋形剂中配制的治疗有效量的至少一种治疗剂,可进一步补充治疗方法,其中所述治疗剂优选为在药学上可接受的赋形剂中配制的细胞毒性剂、放射性标记、免疫调节剂、激素、光敏治疗剂或其组合。

[0077] 另外,可对受试者同时或相继地施用抗体融合蛋白和治疗有效量的治疗缀合物,该治疗缀合物包含与至少一种治疗剂结合的至少一个MAb,其中所述缀合物的MAb组分优选地包含至少一种人源化、嵌合、人或鼠(对非人类受试者)MAb,其选自与在药学上可接受的赋形剂中配制的CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、MUC1、Ia、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、IL-6、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1 (DR4) 和TRAIL-R2 (DR5) 有反应性的MAb。抗体融合蛋白本身可与治疗剂缀合,并因此提供赋形剂以使不止一种治疗剂附着抗体组分,而且这些治疗剂可以是所引用不同制剂的组合或相同制剂的组合,如两种不同的治疗放射性标记。

[0078] 同时还包括诊断或检测受试者的B细胞淋巴瘤或白血病或自身免疫疾病的方法,所述方法包括对受试者(如哺乳动物,包括人和家养宠物或伴侣宠物,如狗、猫、兔、豚鼠)施用诊断缀合物,该诊断缀合物包含与淋巴瘤、白血病或自身免疫细胞结合的抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段,其中该抗CD19MAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段与在药学上可接受的赋形剂中配制的至少一种诊断剂结合。本文描述了有用的诊断剂。

[0079] 抗体制备

[0080] 单克隆抗体(MAb) 是针对特定抗原的同型种群的抗体,其中所述抗体仅包括一类抗原结合位点并仅与抗原决定簇上的一个表位结合。可通过本领域技术人员已知的方法获得特异性抗原的啮齿类单克隆抗体。见例如,Kohler和Milstein,Nature 256:495 (1975) 及 Coligan等(编著),CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,第1卷,2.5.1-2.6.7页(John Wiley & Sons 1991) [下文称为"Coligan"]。简言之,通过以下步骤获得单克隆抗体:给小鼠注射包含抗原的组合物;取血清样本验证抗体产生;移除脾脏以获得B淋巴细胞;使B淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞;克隆杂交瘤细胞;挑选产生所述抗原的抗体的阳性克隆;培养产生所述抗原的抗体的克隆;以及从杂交瘤细胞培养物中分离抗体。

[0081] 可通过多种完全确立的技术从杂交瘤细胞培养物中分离和纯化MAb。这类分离技术包括使用A蛋白琼脂糖凝胶(Protein-A Sepharose)的亲和层析法、尺寸排阻层析法和离子交换层析法。见例如,Coligan第2.7.1-2.7.12页和第2.9.1-2.9.3页。另外,参见Baines等,METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,第10卷中的"Purification of Immunoglobulin G (IgG)"第79-104页(The Humana Press, Inc. 1992)。

[0082] 在初始形成免疫原的抗体之后,抗体可以进行测序并随后通过重组技术来制备。鼠抗体和抗体片段的人源化和嵌合化是本领域技术人员所熟知的。例如,制备人源化单克隆抗体的方式是将来自小鼠免疫球蛋白的可变重链和轻链的小鼠互补决定区转移到与人恒定区序列连接的人源可变结构域,然后,在鼠对应物的构架区内取代所选的人残基。优选的用于取代的FR残基包括与CDR残基相近或接触的那些FR残基以及影响抗体的稳定性和/或表达水平的残基。使用源自人源化单克隆抗体的抗体组分避免了与鼠恒定区的免疫原性

相关的潜在问题。

[0083] 用于克隆鼠免疫球蛋白可变结构域的常用技术公开在例如出版的Orlandi等, *Proc Natl Acad.Sci.USA* 86:3833 (1989) 中, 该出版物以引用的方式整体并入。本领域技术人员熟知用于构建嵌合抗体的技术。例如, Leung等, *Hybridoma* 13:469 (1994), 通过将编码LL2单克隆抗体(抗CD22抗体)的Vk和VH结构域的DNA序列与各自的人源和IgG1恒定区域结合, 制备了LL2嵌合体。该出版物还分别提供了LL2轻链和重链可变区(Vk和VH)的核苷酸序列。用于制备人源化MAb的技术描述于例如Jones等, *Nature* 321:522 (1986), Riechmann等, *Nature* 332:323 (1988)、Verhoeyen等, *Science* 239:1534 (1988)、Carter等, *Proc.Natl Acad.Sci.USA* 89:4285 (1992)、Sandhu, *Crit.Rev.Biotech.*12:437 (1992) 以及Singer等 *J.Immun.*150:2844 (1993), 这些文献中的每篇以引用的方式并入本文。

[0084] 嵌合抗体是这样的重组蛋白, 其包含具有源自一个动物物种的CDR的可变结构域, 例如啮齿类动物抗体, 而抗体分子的剩余部分(即, 恒定结构域)源自人抗体。因此, 通过用一个或多个不同的人FR取代嵌合MAb可变结构域中的鼠FR序列, 从而也可使嵌合单克隆抗体人源化。具体地, 将小鼠CDR从小鼠免疫球蛋白的可变重链和轻链转移至人抗体的相应可变结构域。由于仅将小鼠CDR转移至人FR中常常导致抗体亲和力降低或甚至丧失, 因此可能需要另外的修改以便恢复鼠抗体的原始亲和力。这可以通过以下方式完成: 用鼠相似物替换FR区中的一个或多个人残基以获得对其表位有良好结合亲和力的抗体。见例如, Tempest等, *Biotechnology* 9:266 (1991) 和Verhoeyen等, *Science* 239:1534 (1988)。

[0085] 另一种用于制备抗体的方法是通过在转基因家畜的乳汁中制备。见例如, Colman, A., *Biochem.Soc.Symp.*, 63:141-147, 1998; 美国专利号5,827,690, 这两篇文献以引用的方式整体并入。制备了两种DNA构建体, 其分别包含编码配对的免疫球蛋白重链和轻链的DNA片段。将DNA片段克隆到含有启动子序列的表达载体中, 该启动子序列在乳腺上皮细胞中被优先表达。实例包括但不限于来自兔、牛和绵羊酪蛋白基因、牛-乳球蛋白基因、绵羊乳球蛋白基因和小鼠乳清酸蛋白基因的启动子。优选地, 插入片段的侧面在其3'侧有来自乳腺特异性基因的同源基因组序列。这产生聚腺苷酸化位点和转录稳定序列。将表达盒共注射至受精的哺乳动物卵细胞的原核中, 然后将卵细胞植入受体雌性动物的子宫中并进行孕育。出生后, 通过Southern分析确定两个转基因的存在以对后代进行筛选。为了产生抗体, 必须在同一细胞中同时表达重链和轻链基因。用本领域已知的标准免疫学方法对来自转基因雌性动物的乳汁中进行分析, 以确定抗体或抗体片段的存在以及功能性。可用本领域已知的标准方法从乳汁中纯化抗体。

[0086] 可从转基因非人类动物中获得全人抗体, 即, 人抗CD19MAb或其它人抗体, 如抗CD22、抗CD23、抗CD20、抗CD74或抗CD21MAb。见例如, Mendez等, *Nature Genetics*, 15:146-156 (1997); 美国专利号5,633,425, 这两篇文献以引用的方式整体并入。例如, 可从具有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中回收人抗体。通过使内源性免疫球蛋白基因失活和引入人免疫球蛋白基因座从而使小鼠体液免疫系统人源化。人免疫球蛋白基因座极其复杂且包括许多不连续片段, 总共占人类基因组的大约0.2%。为确保转基因小鼠能够产生足够量的抗体谱(repertoire of antibody), 必须将人重链和轻链基因座的大部分引入小鼠基因组。这以分步过程来实现, 分步过程在开始时形成含有种系构型的人重链或轻链免疫球蛋白基因座的酵母人工染色体(YAC)。由于每个插入物的大小约为1Mb, 因此YAC构建需要免疫

球蛋白基因座的重叠片段的同源重组。通过使含YAC酵母球芽与小鼠胚胎干细胞融合,将两个YAC(一个含有重链基因座,另一个含有轻链基因座)分别引入小鼠。然后将胚胎干细胞克隆显微注射到小鼠胚泡中。对所得嵌合雄性动物通过其种系传递YAC的能力进行筛选,并与在鼠抗体产生方面有缺陷的小鼠进行交配。将两种转基因品系(一种包含重链基因座,而另一种包含人轻链基因座)进行交配,从而形成可产生对于免疫作出反应的人抗体的后代。

[0087] 更新近的用于制备双特异性MAb的方法包括经工程改造的重组MAb,其具有附加的半胱氨酸残基,从而它们具有比普通的免疫球蛋白同种型更强的交联。见例如,FitzGerald等,Protein Eng.10(10):1221-1225,1997。另一种方法是对与两个或多个不同的具有所需双特异性的单链抗体或抗体片段连接的重组融合蛋白进行工程改造。见例如,Coloma等,Nature Biotech.15:159-163,1997。利用分子工程可制备多种双特异性融合蛋白。见例如,Alt等,FEBS Lett.454:90-4(1999),其以引用的方式整体并入本文。在一种形式中,双特异性融合蛋白例如由scFv和Fab片段组成,其中scFv具有对于一种抗原的单一结合位点,而Fab片段具有对于第二种抗原的单一结合位点。在另一种形式中,双特异性融合蛋白例如由IgG和两个scFv组成,其中IgG具有对于一种抗原的两个结合位点,而scFv具有对于第二种抗原的两个结合位点。

[0088] 以相似的方式制备与两个或多个不同的单链抗体或抗体片段连接的双特异性融合蛋白。可使用重组方法制备多种融合蛋白。例如,可制备包括Fab片段和scFv的融合蛋白,其中Fab片段源自人源化单克隆抗CD19抗体,而scFv源自鼠抗diDTPA。挠性接头,如GGGS(SEQ ID NO:22),将scFv连接至抗CD19抗体的重链恒定区。可选地,可将scFv连接至另一人源化抗体的轻链恒定区。通过PCR反应,把适当的对于重链Fd与scFv的框内连接所必需的接头序列引入VL和Vk中。然后将编码scFv的DNA片段连接到含有编码CH1结构域的DNA序列的阶段载体(staging vector)中。将所得scFv-CH1构建体切除并连接到含有编码抗CD19抗体VH结构域的DNA序列的载体中。可使用所得载体转染适当的宿主细胞,如用于表达双特异性融合蛋白的哺乳动物细胞。

[0089] 最近,发展了称为对接锁定(DNL)的新型技术以使得高效形成包括肽或蛋白质效应物的几乎任何组合的构建体(见例如,美国专利申请公布号20060228357、20060228300、20070086942、20070140966和20070264265,每篇专利申请以引用的方式整体并入本文)。在各种排列中,构建体不限于蛋白质或肽效应物,但可包括可附着于蛋白质或肽的其它类型的效应物试剂,如化学治疗剂。该技术利用互补蛋白质结合域,被称为锚定结构域和二聚化与对接结构域,其相互结合并允许复杂结构的装配,该复杂结构范围为二聚体、三聚体、四聚体、五聚体和六聚体。这些形成高产量的稳定的络合物而不需要大量纯化。DNL技术允许以裸抗体部分或与各种其它效应物分子结合的形式装配单特异性、双特异性或多特异性抗体,其它效应物分子如免疫调节剂、酶、化学治疗剂、趋化因子、细胞因子、诊断剂、治疗剂、放射性核素、成像剂、抗血管生成剂、生长因子、寡核苷酸、激素、肽、毒素、促细胞凋亡剂或其组合。任何一种本领域已知的用于制备双特异性或多特异性抗体的技术可以在本发明所主张的方法的实践中使用。

[0090] 已知抗体

[0091] 在某些实施方案中,例如包括并入抗CD19抗体和针对不同抗原靶的另外抗体的双特异性或多特异性抗体的那些实施方案,可优选使用可商购的或公知的抗体而非重新制

备。所使用的抗体可从多种已知来源购得。例如,各种分泌杂交瘤细胞系的抗体可从 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) 获得。针对各种疾病靶(包括但不限于肿瘤相关抗原)的许多抗体已保藏在 ATCC 和/或具有公布的可用区序列,并且可用于所主张的方法和组合物中。见例如,美国专利号 7,312,318、7,282,567、7,151,164、7,074,403、7,060,802、7,056,509、7,049,060、7,045,132、7,041,803、7,041,802、7,041,293、7,038,018、7,037,498、7,012,133、7,001,598、6,998,468、6,994,976、6,994,852、6,989,241、6,974,863、6,965,018、6,964,854、6,962,981、6,962,813、6,956,107、6,951,924、6,949,244、6,946,129、6,943,020、6,939,547、6,921,645、6,921,645、6,921,533、6,919,433、6,919,078、6,916,475、6,905,681、6,899,879、6,893,625、6,887,468、6,887,466、6,884,594、6,881,405、6,878,812、6,875,580、6,872,568、6,867,006、6,864,062、6,861,511、6,861,227、6,861,226、6,838,282、6,835,549、6,835,370、6,824,780、6,824,778、6,812,206、6,793,924、6,783,758、6,770,450、6,767,711、6,764,688、6,764,681、6,764,679、6,743,898、6,733,981、6,730,307、6,720,15、6,716,966、6,709,653、6,693,176、6,692,908、6,689,607、6,689,362、6,689,355、6,682,737、6,682,736、6,682,734、6,673,344、6,653,104、6,652,852、6,635,482、6,630,144、6,610,833、6,610,294、6,605,441、6,605,279、6,596,852、6,592,868、6,576,745、6,572,856、6,566,076、6,562,618、6,545,130、6,544,749、6,534,058、6,528,625、6,528,269、6,521,227、6,518,404、6,511,665、6,491,915、6,488,930、6,482,598、6,482,408、6,479,247、6,468,531、6,468,529、6,465,173、6,461,823、6,458,356、6,455,044、6,455,040、6,451,310、6,444,206、6,441,143、6,432,404、6,432,402、6,419,928、6,413,726、6,406,694、6,403,770、6,403,091、6,395,276、6,395,274、6,387,350、6,383,759、6,383,484、6,376,654、6,372,215、6,359,126、6,355,481、6,355,444、6,355,245、6,355,244、6,346,246、6,344,198、6,340,571、6,340,459、6,331,175、6,306,393、6,254,868、6,187,287、6,183,744、6,129,914、6,120,767、6,096,289、6,077,499、5,922,302、5,874,540、5,814,440、5,798,229、5,789,554、5,776,456、5,736,119、5,716,595、5,677,136、5,587,459、5,443,953、5,525,338,就抗体可变区和/或 CDR 序列和/或产生抗体的杂交瘤细胞系的 ATCC 登记号而言,这些专利以引用的方式并入本文。这些仅是示例性的,并且多种其它抗体和其杂交瘤细胞为本领域已知。技术人员将认识到,通过简单搜索所选疾病相关的目标靶的抗体的 ATCC、NCBI 和/或 USPTO 数据库,可获得对几乎任何疾病相关抗原的抗体序列或抗体分泌杂交瘤细胞。使用本领域熟知的标准技术,可以将克隆抗体的抗原结合域扩增、切除、连接到表达载体中,转染到适合的宿主细胞中并用于产生蛋白质。

[0092] 抗体片段的制备

[0093] 可通过已知技术产生识别特异性表位的抗体片段。该抗体片段是抗体的抗原结合部分,如 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 $F(ab)_2$ 、 Fab 、 Fv 、 sFv 等。其它的抗体片段包括但不限于:可用胃蛋白酶消化抗体分子来制备的 $F(ab')_2$ 片段,以及可通过还原 $F(ab')_2$ 片段的二硫键来产生的 Fab' 片段。可选地,可构建 Fab' 表达文库(Huse 等,1989,Science,246:1274-1281) 以使得迅速且容易地识别具有期望特异性的单克隆 Fab' 片段。

[0094] 单链 Fv 分子($scFv$) 包括 VL 结构域和 VH 结构域。VL 结构域和 VH 结构域结合形成靶结合位点。这两个结构域进一步地用肽接头(L) 共价连接。如果 VL 结构域是 $scFv$ 分子的 N 端部

分,则scFv分子表示为VL-L-VH,或者,如果VH结构域是scFv分子的N端部分,那么scFv分子表示为VH-L-VL。用于制备scFv分子与设计合适的肽接头的方法描述在美国专利号4,704,692;美国专利号4,946,778;R.Raag和M.Whitlow,"Single Chain Fvs."FASEB Vol 9:73-80 (1995),以及R.E.Bird和B.W.Walker,"Single Chain Antibody Variable Regions" TIBTECH,第9卷:132-137 (1991)中,每篇文献以引用的方式并入本文。

[0095] 可通过全长抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或编码该片段的DNA的其它宿主中表达,制备抗体片段。用常规的方法,通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全长抗体可获得抗体片段。例如,可通过用胃蛋白酶对抗体进行酶裂解制备抗体片段,从而得到表示为F(ab)2的5S片段。使用硫醇还原剂可进一步裂解该片段,和任选的由二硫键的裂解产生的巯基的阻断基团,从而制备3.5S Fab单价片段。或者,用木瓜蛋白酶进行酶裂解直接产生两个单价Fab片段和一个Fc片段。例如,这些方法描述于Goldenberg的美国专利号4,036,945和4,331,647以及其中所包含的参考文献,其以引用的方式整体并入本文。同样见Nisonoff等,Arch Biochem.Biophys.89:230 (1960);Porter,Biochem.J.73:119 (1959),Edelman等,METHODS IN ENZYMOLOGY,第1卷,422页(Academic Press 1967),以及Coligan,2.8.1-2.8.10页和2.10.-2.10.4页。

[0096] 抗体片段的另一种形式是编码单一互补决定区(CDR)的肽。CDR是抗体可变区的区段,其在结构上与结合抗体的表位是互补的,并且比可变区的其它部分更加具有可变性。因此,CDR有时被称为高变区。可变区包括三个CDR。可通过构建编码目标抗体CDR的基因来获得CDR肽。制备这类基因的方法例如是使用聚合酶链式反应从抗体产生细胞的RNA来合成可变区。见例如,Larrick等,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106 (1991);MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION,ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION,Ritter等(编著),第166-179页,Courtenay-Luck,"Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies"(剑桥大学出版社,1995);和MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS,Birch等(编著),第137-185页,Ward等,"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,"(Wiley-Liss,Inc.1995)。

[0097] 只要片段与由完整抗体识别的抗原结合,也可使用其它裂解抗体的方法(如分离重链以形成单价轻-重链片段、进一步裂解片段)或其它酶、化学或基因技术。

[0098] 多特异性与多价抗体

[0099] 用于组合疗法的抗CD19抗体以及其它具有不同特异性的抗体也可制成多特异性抗体或多价抗体,其中多特异性抗体包括至少一个对CD19表位或抗原的结合位点和至少一个对CD19上的另一表位或另一抗原的结合位点,而多价抗体包括对同一表位或抗原的多个结合位点。

[0100] 双特异性抗体或抗体片段可具有至少一个特异性地结合靶细胞标记的结合区和至少一个特异性地结合靶向缀合物的其它结合区。靶向缀合物包括载体部分,该载体部分包括或具有至少一个由双特异性抗体或抗体片段的至少一个结合区识别的表位。可使用多种重组方法制备如上所述的双特异性抗体和抗体片段。

[0101] 也涵盖抗CD19多价抗体。通过缔合第一多肽和第二多肽构建这种多价靶结合蛋白质。第一多肽包括与第一免疫球蛋白样结构域共价连接的第一单链Fv分子,该第一免疫球蛋白样结构域优选是免疫球蛋白轻链可变区结构域。第二多肽包括与第二免疫球蛋白样结

构域共价连接的第二单链Fv分子,该第二免疫球蛋白样结构域优选是免疫球蛋白重链可变区结构域。第一和第二单链Fv分子中的每一个形成靶结合位点,并且第一和第二免疫球蛋白样结构域缔合形成第三个靶结合位点。

[0102] 具有VL-L-VH构型的单链Fv分子(其中L是接头)可与具有VH-L-VL构型的另一单链Fv分子缔合以形成二价二聚体。在这种情况下,第一scFv的VL结构域和第二scFv分子的VH结构域结合形成一个靶结合位点,而第一scFv的VH结构域和第二scFv的VL结构域结合形成另一靶结合位点。

[0103] 另一个实施方案是抗CD19双特异性、三价靶向蛋白质,其包括两条非共价地缔合以形成三个结合位点的异源多肽链,其中两个结合位点对于一个靶具有亲和力,而第三个结合位点对半抗原具有亲和力,该半抗原可制造出来并附着在用于诊断剂和/或治疗剂的载体上。优选地,结合蛋白质有两个CD19结合位点和一个CD22结合位点。双特异性、三价靶向试剂具有两个不同的scFv,一个scFv包含两个VH结构域,该VH结构域来自一个通过短接头和另一抗体的VL结构域连接的抗体,且第二个scFv包含两个VL结构域,该VL结构域来自通过短接头和另一抗体的VH结构域连接的第一抗体。由VH结构域和VL结构域产生多价、多特异性试剂的方法提供了,由宿主有机体中的DNA质粒合成的单独链完全由VH结构域组成(VH-链)或者完全由VL结构域组成(VL-链),以这种方式因此任何多价和多特异性的试剂可通过一条VH链和一条VL链的非共价缔合来产生。例如,为了形成三价、三特异性试剂,VH-链将由三个VH结构域的氨基酸序列组成,其中每个VH结构域来自不同特异性的抗体,由可变长度的肽接头连接在一起,而VL结构域将由互补的VL结构域组成,它们用与用于VH链的肽接头相似的肽接头连接在一起。由于抗体的VH结构域和VL结构域以反平行的方式缔合,所以本发明优选的方法中,VL-链中的VL结构域与VH-链中的VH结构域以相反的顺序排列。

[0104] 双抗体、三抗体和四抗体

[0105] 抗CD19抗体也可用于制备功能性双特异性单链抗体(bsAb),也称为双抗体,并且可使用重组方法在哺乳动物细胞中制备。见例如,Mack等,Proc.Natl.Acad.Sci.,92:7021-7025,1995,该文献以引用的方式并入本文。例如,使用重组方法,通过甘氨酸-丝氨酸接头连接两个单链Fv片段来制备bsAb。使用标准的PCR方法来分离两个目标抗体的V轻链(VL)结构域和V重链(VH)结构域。然后连接从每个杂交瘤中获得的VL和VH cDNA以在两步融合PCR中形成单链片段。第一个PCR步骤引入(Gly4-Ser1)₃(SEQ ID NO:23)接头,且第二步连接VL和VH扩增子。然后将每个单链分子克隆到细菌表达载体中。扩增后,切除一个单链分子并亚克隆到包含第二目标单链分子的另一个载体中。将所得bsAb片段亚克隆到真核表达载体中。通过把载体转染到CHO细胞、Sp2/0细胞或Sp-EEE细胞中可获得功能蛋白质表达。以相似的方式制备双特异性融合蛋白。

[0106] 例如,人源化、嵌合或人抗CD19单克隆抗体可用来制备抗原特异性双抗体、三抗体和四抗体。单特异性双抗体、三抗体和四抗体选择性地与靶抗原结合,由于分子上结合位点的数量增加了,因此对靶细胞的亲和力增加了,而且在期望位置上观察到更长的保留时间。对于双抗体而言,在使用这样的两条链中,即其含有通过5个氨基酸残基接头与人源化抗CD19MAb的VH多肽连接的和人源化抗CD19 MAb的VK多肽通过5个氨基酸残基的连接。每条链形成人源化抗CD19双抗体的一半。对于三抗体的情况,在使用这样的三条链中,即其含有不通过接头与人源化抗CD19 MAb的VH多肽连接的和人源化抗CD19 MAb的VK多肽不用连接。每

条链形成hCD19三抗体的三分之一。

[0107] 本文所述的双特异性双抗体的最终用途是用于预靶向CD19阳性肿瘤,以便随后特异性递送诊断剂或治疗剂。这些双抗体选择性地与靶抗原结合,从而使亲和力增加,以及在期望位置上的滞留时间更长。此外,迅速从体内清除未与抗原结合的双抗体,从而将正常组织的接触减少到最小。可在美国临时申请号60/361,037中找到用于增加清除速率的双特异性抗体的点突变,该申请以引用的方式整体并入本文。用于亲和力增强的双特异性双抗体公开在美国申请号10/270,071、10/270,073和10/328,190,其以引用的方式整体并入本文。

[0108] 诊断剂和治疗剂可包括同位素、药物、毒素、细胞因子、激素、酶、寡核苷酸、生长因子、缀合物、放射性核素和金属。例如,钆金属用于磁共振成像(MRI)。放射性核素的例子是²²⁵Ac、¹⁸F、⁶⁸Ga、⁶⁷Ga、⁹⁰Y、⁸⁶Y、¹¹¹In、¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、^{99m}Tc、^{94m}Tc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁷⁷Lu、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、²¹²Bi、²¹³Bi、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、⁷⁶Br和²¹¹At。其它放射性核素也可用作诊断剂和治疗剂,尤其是能量范围为60至4,000keV的那些。

[0109] 最近,报道了具有双重特异性的四价双功能抗体(称为tandab)(Cochlovius等, Cancer Research (2000) 60:4336-4341)。双特异性tandab是两个相同的多肽的二聚体,每个多肽包含两个不同抗体的四个可变域(VH1、VL1、VH2、VL2),四个可变域在这样的方向连接,即使得经自缔合后容易形成两个对于两种不同特异性的每种特异性的可潜在结合位点。

[0110] 缀合的抗CD19抗体

[0111] 另一个实施方案涉及缀合的抗CD19抗体。多价、多特异性试剂的组合物和方法描述在2002年12月24日提交的美国专利申请号60/436,359和2003年4月23日提交的美国专利申请号60/464,532中,这两篇专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0112] 另外的氨基酸残基可加到多肽的N端或C端。另外的氨基酸残基可包括肽标签、信号肽、细胞因子、酶(例如前药活化酶)、激素、肽毒素(如假单胞菌外毒素)、肽药物、细胞毒性蛋白质或其它功能蛋白质。如本文所用,功能蛋白质是具有生物功能的蛋白质。

[0113] 在一个实施例中,优选地通过与靶结合蛋白质的氨基酸残基的侧链共价连接(例如,氨基、羧基、苯基、硫醇基或羟基),药物、毒素、放射性化合物、酶、激素、寡核苷酸、细胞毒性蛋白质、螯合剂、细胞因子和其它功能试剂可与靶结合蛋白质缀合。多种常规接头可用于此目的,例如二异氰酸酯、二异硫氰酸酯、双(羟基琥珀酰亚胺)酯、碳化二亚胺、马来酰亚胺-羟基琥珀酰亚胺酯、戊二醛等。试剂与结合蛋白质的缀合优选不会显著影响蛋白质对其靶的结合特异性或亲和力。如本文所用,功能试剂是具有生物功能的试剂。优选的功能试剂是细胞毒性剂。

[0114] 如上所述,酶也是有用的治疗剂。例如,与含磷酸酯的前药组合使用的碱性磷酸酶(美国专利号4,975,278);与含硫酸酯的前药组合使用的芳基硫酸酯酶(美国专利号5,270,196);与肽基前药结合使用的肽酶和蛋白酶,如沙雷氏菌属蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶(美国专利号5,660,829;5,587,161;5,405,990)和组织蛋白酶(包括组织蛋白酶B和L);与D-氨基酸修饰的前药组合使用的D-丙氨酰羧肽酶;与糖基化前药结合使用的糖类裂解酶,如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸苷酶(美国专利号5,561,119;5,646,298);与含 β -内酰胺的前药组合使用的 β 内酰胺酶;与在氨基氮上用苯氧基乙酰胺或苯基乙酰胺基团衍生的药物组合使用的青霉素酰胺酶,如青霉素-V-酰胺酶(美国专利号4,975,278)或青霉

素-G-酰胺酶;以及与基于5-氟胞嘧啶前药(美国专利号4,975,278)组合使用的胞嘧啶脱氨酶(美国专利号5,338,678;5,545,548),都是合适的治疗剂。

[0115] 在另一个实施方案中,治疗剂或前药聚合物向体内靶的双特异性抗体定向递送可与放射性核素的双特异性抗体递送相结合,因此获得联合的化学疗法和放射免疫疗法。每种疗法可与靶向缀合物缀合并同时施用,或施用核素作为第一靶向缀合物部分,并且在稍后的步骤中施用药物作为第二靶向缀合物部分。

[0116] 在又一个实施方案中,细胞毒性剂可与聚合载体缀合,并且该聚合载体可随后与多价靶结合蛋白质缀合。对于这种方法,见Ryser等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,75:3867-3870,1978,美国专利号4,699,784和美国专利号4,046,722,这些文献以引用的方式并入本文。优选地,缀合并不会显著地影响结合蛋白质的结合特异性或亲和力。

[0117] 用于治疗 and 诊断的人源化、嵌合和人抗体

[0118] 人源化、嵌合和人单克隆抗体,即,本文描述的抗CD19MAb和其它MAb,适用于治疗方法和诊断方法。因此,本发明设想了作为裸抗体单独施用人源化、嵌合和人抗体或作为多模式治疗施用,这是在时间上根据给药方案来完成的,但不与治疗剂缀合。可通过用下列试剂补充裸抗体来增强裸抗CD19MAb的效能:用一种或多种其它裸抗体,即对于特异抗原(如CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、MUC1、Ia、HM1.24、HLA-DR、腱生蛋白、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1(DR4)和TRAIL-R2(DR5))的MAb;用一种或多种抗CD19或对于这些所述抗原的抗体的免疫缀合物,它们缀合了治疗剂,包括药物、毒素、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、治疗性放射性核素等;用一种或多种治疗剂,包括药物、毒素、酶、寡核苷酸、免疫调节剂、激素、治疗性放射性核素等,其根据规定的给药方案与MAb同时或施用。

[0119] 优选的B细胞抗原包括与人CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD46、CD52、CD74、CD80和CD5抗原相当的那些。优选的T细胞抗原包括与人CD4、CD8和CD2(IL-2受体)相当的那些。HLA-DR抗原的等同物可以用于治疗B细胞和T细胞病症两者。特别优选的B细胞抗原是与人CD19、CD20、CD22、CD21、CD23、CD74、CD80和HLA-DR抗原相当的那些。特别优选的T细胞抗原是与人CD4、CD8和CD25抗原相当的那些。CD46是癌细胞表面上阻断补体依赖性溶解(CDC)的抗原。

[0120] 另外,本发明涵盖了用于诊断和治疗B细胞淋巴瘤和其它疾病或病症的免疫缀合物的施用。如本文所述,免疫缀合物是包括抗体组分与治疗剂或诊断剂的分子,其包括可具有诊断剂或治疗剂的肽。免疫缀合物保留抗体组分的免疫反应性,即,缀合之后,抗体部分具有与缀合前大致相同或稍微降低的结合同源抗原的能力。

[0121] 多种治疗剂和诊断剂可有利地与所主张的抗体缀合。这里列举的治疗剂是也用于与如上所述的裸抗体分别施用的那些试剂。治疗剂包括例如化学治疗药物,如长春花生物碱、蒽环类、替尼泊苷、紫杉醇、抗代谢物、烷基化剂、抗生素、COX-2抑制剂、抗有丝分裂剂、抗血管生成剂和细胞凋亡剂,特别是阿霉素、甲氨蝶呤、紫杉酚、CPT-11、喜树碱衍生物(camptothecin)、蛋白酶体抑制剂,和来自这些和其它种类抗癌剂的其它试剂、沙利度胺和衍生物、寡核苷酸,特别是反义和RNAi寡核苷酸(例如,针对bc1-2)等。用于制备免疫缀合物和抗体融合蛋白的其它有用的癌症化学治疗药物包括氮芥、烷基磺酸酯、亚硝基脲、三氮

烯、叶酸类似物、COX-2抑制剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物、铂配位络合物、酶、激素等。适当的化学治疗剂描述在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第19版(Mack Publishing Co.1995)和GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS,第7版(MacMillan Publishing Co.1985)以及这些出版物的修订版。本领域技术人员已知其它合适的化学治疗剂,如实验药物。

[0122] 另外,螯合剂(如DTPA、DOTA、TETA或NOTA)或合适的肽(其结合可测标记如荧光分子,或细胞毒性剂如重金属或放射性核素)可与所主张的抗体缀合。例如,通过使光敏剂或染料与抗体复合物缀合,可获得治疗上有用的免疫缀合物。荧光组合物(如荧光色素)和对可见光敏感的其它色原或染料(如卟啉类化合物)已用于通过将合适的光引向病变部位检测和治疗病变。在治疗中,这被称为光辐射、光线疗法或光力学疗法(Jori等(编著),PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto 1985);van den Bergh,Chem.Britain 22:430(1986))。

[0123] 此外,已经将单克隆抗体与光敏化染料偶联以用于实现治疗。Mew等,J.Immunol.130:1473(1983);idem.,Cancer Res.45:4380(1985);Oseroff等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8744(1986);idem.,Photochem.Photobiol.46:83(1987);Hasan等,Prog.Clin.Biol.Res.288:471(1989);Tatsuta等,Lasers Surg Med.9:422(1989);Pelegrin等,Cancer 67:2529(1991)。然而,这些早期研究并不包括使用内窥镜治疗应用,特别是使用抗体片段或亚片段。因此,本发明涵盖了包含光敏剂或染料的免疫缀合物的治疗用途。

[0124] 本发明还涵盖了放射性试剂和非放射性试剂作为诊断剂的用途。适合的非放射性诊断剂是适用于磁共振成像、计算机断层摄影或超声波的造影剂。磁性成像剂包括例如非放射性金属(如锰、铁和钆),当它们与本发明的抗体一起使用时,该磁性成像剂与包括2-苄基-DTPA和其单甲基和环己基类似物的金属-螯合剂组合络合。见2001年10月10日提交的美国申请号09/921,290,其以引用的方式整体并入。

[0125] 此外,放射性标记的抗体或免疫缀合物可包括用于诊断成像的 γ -发射放射性同位素或正电子发射体。适当的放射性同位素(特别地,能量范围为60至4,000keV)包括 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 等。见例如,美国临时申请号60/342,104,其公开了用于成像目的的正电子发射体,如 ^{18}F 、 ^{68}Ga 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 等,并且其以引用的方式整体并入。

[0126] 毒素(如假单胞菌外毒素)也可与抗CD19抗体的抗体融合蛋白的治疗剂部分络合或形成治疗剂部分。适用于制备这类缀合物或其它融合蛋白的其它毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA酶I、葡萄球菌肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。见例如,Pastan等,Cell 47:641(1986),和Goldenberg,CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43(1994)。适用于本发明的其它毒素对本领域技术人员是已知的,并且公开在美国专利号6,077,499中,该专利以引用的方式整体并入。

[0127] 免疫调节剂,如细胞因子,也可抗体融合蛋白的治疗剂部分缀合或形式治疗剂部分或与人源化抗CD19抗体一起施用。适用于本发明的细胞因子包括但不限于如下文所述的干扰素和白细胞介素。

[0128] 免疫缀合物的制备:

[0129] 可将任何抗体或抗体融合蛋白与一种或多种治疗剂或诊断剂缀合。一般而言,一种治疗剂或诊断剂附着于每个抗体或抗体片段上,但是一种以上的治疗剂或诊断剂可以附着于同一抗体或抗体片段上。抗体融合蛋白可包含两个或更多个抗体或其片段并且每个构成此融合蛋白的抗体可含有治疗剂或诊断剂。此外,抗体融合蛋白中的一个或多个抗体可附着一种以上的治疗剂或诊断剂。而且,治疗剂不必相同而可为不同治疗剂。例如,可将药物和放射性同位素附着在同一融合蛋白上。特别地,IgG可用¹³¹I进行放射性标记并附着至药物上。可将¹³¹I引入到IgG的酪氨酸中并将药物附着IgG赖氨酸的ε氨基上。也可将治疗剂与诊断剂两者附着在还原的SH基团和碳水化合物侧链上。

[0130] 双特异性抗体可用于预靶向方法中并提供一种将治疗剂或诊断剂递送至受试者的优选方式。美国申请号09/382,186公开了一种使用双特异性抗体进行预靶向的方法,其中双特异性抗体用¹²⁵I标记并递送至受试者,接着递送^{99m}Tc标记的二价肽。预靶向方法也描述在美国申请号09/823,746 (Hansen等)和申请号10/150,654 (Goldenberg等)中,这些专利以引用的方式整体并入。这种递送获得¹²⁵I和^{99m}Tc的良好的肿瘤/正常组织比。可使用已知治疗剂或诊断剂的任意组合来标记抗体和抗体融合蛋白。MAb缀合物的抗体组分的结合特异性、治疗剂或诊断剂的效能和抗体Fc部分的效应子活性可通过缀合物的标准测试来确定。

[0131] 治疗剂或诊断剂可通过二硫键形成而附着在还原抗体组分的铰链区。或者,可利用异双功能交联剂,如N-琥珀酰基3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP),将这些肽附着在抗体组分上。Yu等,Int.J.Cancer 56:244 (1994)。用于这种缀合的一般技术为本领域所熟知。参见例如,Wong,CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC出版社1991);Upeslacis等,"Modification of Antibodies by Chemical Methods",MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS,Birch等(编著),187-230页(Wiley-Liss, Inc.1995);Price,"Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies",MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION,ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION,Ritter等(编著),60-84页(剑桥大学出版社1995)。

[0132] 或者,治疗剂或诊断剂可通过抗体Fc区域中的碳水化合物部分进行缀合。可使用碳水化合物部分来增加结合硫醇基的同一肽的加载,或可使用碳水化合物部分来结合不同肽。

[0133] 通过抗体碳水化合物部分将肽与抗体组分缀合的方法对于本领域技术人员来说是熟知的。参见例如,Shih等,Int.J.Cancer 41:832 (1988);Shih等,Int.J.Cancer 46:1101 (1990);和Shih等,美国专利号5,057,313,这些专利以引用的方式整体并入。一般方法包括将具有氧化的碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团和加载有多个肽的载体聚合物反应。此反应获得初始Schiff碱(亚胺)键,其可通过还原为仲胺而稳定下来,从而形成最终的缀合物。

[0134] 如果用作免疫缀合物的抗体组分的抗体是抗体片段,则不存在Fc区。但是,可将碳水化合物部分引入全长抗体或抗体片段的轻链可变区中。参见例如,Leung等,J.Immunol.154:5919 (1995);Hansen等,美国专利号5,443,953 (1995);Leung等,美国专利号6,254,868,这些专利以引用的方式整体并入。使用经工程改造的碳水化合物部分来连接

治疗剂或诊断剂。

[0135] 药学上可接受的赋形剂

[0136] 将要递送至受试者的人源化、嵌合和人抗CD19MAb可由单独MAb、免疫缀合物、融合蛋白组成,或可包含一种或多种药学上可接受的赋形剂、一种或多种其他成分、或这些物质的一些组合。

[0137] 可根据制备药学上有用的组合物的已知方法来配制免疫缀合物或裸抗体,其中将免疫缀合物或裸抗体与具有药学上可接受的赋形剂的混合物中组合。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学上适宜的赋形剂的一个实例。本领域者熟知其他适宜赋形剂。参见例如,Ansel等,PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea & Febiger1990)和Gennaro(编著),REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版(Mack Publishing Company 1990)及其修订版。

[0138] 免疫缀合物或裸抗体可配制成用于通过例如推注注射或连续输注的静脉内施用。注射用制剂可存在于单位剂量形式中,例如安瓿或多剂量容器,其中具有添加的防腐剂。组合物可采取例如在油性或水性载剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式,且可含有例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的制剂。或者,活性成分可呈粉末形式,并在使用前与适宜载剂(例如,无菌无热原的水)进行组合。

[0139] 可采用其他药学方法来控制治疗或诊断缀合物或裸抗体的作用持续时间。控释制剂可以通过使用聚合物来复合或吸附免疫缀合物或裸抗体而进行制备。例如,生物相容性聚合物包括乙烯-醋酸乙烯共聚物基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酸酐共聚物的基质。Sherwood等,Bio/Technology 10:1446(1992)。免疫缀合物或抗体从这种基质上的释放速率取决于免疫缀合物或抗体的分子量、免疫缀合物量、基质内的抗体和分散粒子的大小。Saltzman等,Biophys.J.55:163(1989);Sherwood等,如上。其他固体的剂量形式描述于Ansel等,PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,第5版(Lea & Febiger1990),和Gennaro(编著),REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,第18版(Mack Publishing Company1990)及其修订版。

[0140] 也可将免疫缀合物、抗体融合蛋白、或裸抗体皮下或甚至通过其他非胃肠外途径施用于哺乳动物。而且,可通过连续输注或单次或多次推注进行施用。一般而言,对所施用的免疫缀合物、融合蛋白或裸抗体的剂量将依赖于这些因素而变化,例如患者的年龄、体重、身高、性别、一般医学状况和先前的医疗史。当单次静脉输注时,一般宜对受试者提供约1mg/kg至20mg/kg范围内的免疫缀合物、抗体融合蛋白或裸抗体的剂量,尽管也可视情况而施用更低或更高的剂量。可根据需求而重复这种剂量,例如,每周一次且持续4-10周,优选每周一次且持续8周,更优选每周一次且持续4周。也可以更少的频率进行施用,如每隔一周一次且持续数月。可通过各种非胃肠外途径给予剂量,并适当地调节剂量和方案。

[0141] 为了治疗目的,对哺乳动物施用治疗有效量的免疫缀合物、融合蛋白或裸抗体。适宜的受试者通常是人,尽管也涵盖非人动物受试者。若施用量在生理上是显著的,则称抗体制剂是以“治疗有效量”而加以施用。若一种试剂的存在导致受体哺乳动物的生理学产生可检测的变化,则此该试剂在生理上是显著的。特定而言,若抗体制剂的存在引起抗肿瘤应答或减轻自身免疫疾病状态的病征和症状,则此抗体制剂在生理上是显著的。生理上显著的效应也可以是在受体哺乳动物中引起体液和/或细胞免疫应答。

[0142] 治疗方法

[0143] 本发明涵盖了使用裸露的或缀合的抗CD19抗体作为用于治疗B细胞疾病和其他疾病的主要组合物。特别地,本文所述的组合物对治疗各种自身免疫疾病以及无痛感形式的B细胞淋巴瘤、侵袭形式的B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、和Waldenstrom's巨球蛋白血症尤其有用。例如,人源化抗CD19抗体组分和免疫缀合物可用于治疗无痛感与侵袭形式非霍奇金淋巴瘤。

[0144] 如上所述,本发明的抗体也适用于诊断和治疗各种自身免疫疾病。这些疾病包括急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮炎、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合症、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨诺-许兰二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、艾迪生氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、肉状瘤病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯彻氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、斯耶格伦综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、寻常性天疱疮、韦格纳氏肉芽肿病、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、银屑病和纤维性肺泡炎。这些疾病的最常用的治疗是皮质类固醇和细胞毒性药物(可以具有剧毒)。这些药物也抑制整个免疫系统,可导致严重感染,且对骨髓、肝脏和肾脏具有副作用。到目前为止用于治疗III型自身免疫疾病的其他治疗剂已用于针对T细胞和巨噬细胞。

[0145] 用于治疗组合物含有单独或与其他抗体(如其他人源化、嵌合、或人抗体、治疗剂或免疫调节剂)组合的至少一种人源化、嵌合或人单克隆抗CD19抗体。特别地,涵盖使用全人抗体的组合法。

[0146] 也可以组合方式使用裸抗体或与相同或不同表位或抗原缀合的抗体。例如,可将人源化、嵌合或人裸露的抗CD19抗体与另一种裸露的人源化、嵌合或人抗CD19抗体或与裸露的抗CD 20、抗CD 22或其他B细胞系抗体组合。可将人源化、嵌合或人裸露的抗CD19抗体与抗CD19免疫缀合物或抗CD 22放射性缀合物组合。可将抗CD22抗体与缀合至同位素的人源化、嵌合或人抗CD19抗体、一种或多种化学治疗剂、细胞因子、毒素或其组合联合。也可使用人源化、嵌合或人抗CD19抗体的融合蛋白和毒素或免疫调节剂,或至少两种不同B细胞抗体(例如,抗CD19和抗CD 22MAb或抗CD19和抗CD 20MAb)的融合蛋白。靶向与如上列出的B细胞疾病相关的至少两种不同抗原的许多不同抗体组合可以以裸抗体或与治疗剂或免疫调节剂缀合的形式构建,或仅与另一种治疗剂(诸如细胞毒性药物、细胞因子或放射性核素)组合进行构建。

[0147] 如本文所使用,术语“免疫调节剂”包括细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素(诸如肿瘤坏死因子(TNF))、和成血因子诸如白介素(例如白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-21和IL-18)、集落刺激因子(例如粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF))、干扰素(例如,干扰素- α 、 β 和 γ)、称为“S1因子”的干细胞生长因子、促红血球生成素和血小板生成素。适宜的免疫调节剂部分的实例包括IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素、TNF等。或者,受试者可接受裸露的抗CD19抗体和分开施用的细胞因子,这些细胞因子可在施用裸露的抗CD19抗体之前、同时或之后进行施用。如上所论述,抗CD19抗体也可与免疫调节剂缀合。免疫调节剂也可与杂交抗体缀合,此

杂交抗体是由一种或多种与不同抗原结合的抗体组成。

[0148] 多模式疗法还包括使用裸露的抗CD19抗体的免疫疗法,并通过以裸露的抗体、融合蛋白的形式或作为免疫缀合物来施用结合CD4、CD5、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、B7、MUC1、Ia、HM1.24、HLA-DR (包括恒定链)、腱生蛋白、VEGF、PIGF、ED-B纤连蛋白、癌基因、癌基因产物、CD66a-d、坏死抗原、Ii、IL-2、T101、TAC、IL-6、TRAIL-R1 (DR4) 和TRAIL-R2 (DR5) 的抗体而加以补充。这些抗体包括识别至少一种在这些抗原决定簇上的表位的多克隆、单克隆、嵌合、人或人源化抗体。已知抗CD19和抗CD 22抗体对于本领域技术人员来说是已知的。参见例如,Ghetie等,Cancer Res.48:2610 (1988);Hekman等,Cancer Immunol.Immunother.32:364 (1991);Longo,Curr.Opin.Oncol.8:353 (1996) 和美国专利号 5,798,554和6,187,287,这些文献以引用的方式整体并入。本领域描述了使用B细胞抗体的自身免疫疾病的免疫疗法。参见例如,W00074718A1,该专利以引用的方式整体并入。

[0149] 在多模式疗法的另一形式中,受试者联合标准癌症化学疗法而接受裸露的抗CD19抗体和/或免疫缀合物。例如“CVB”(1.5g/m²环磷酰胺、200-400mg/m²依托泊苷和150-200mg/m²卡莫司汀)是用于治疗非霍奇金淋巴瘤的方案。Patti等,Eur.J.Haematol.51:18 (1993)。本领域技术人员熟知其他适宜的组合型化学治疗方案。参见例如,Freedman等,“Non-Hodgkin's Lymphomas”,CANCER MEDICINE,第2卷,第3版,Holland等(编著),2027-2068页(Lea & Febiger1993)。举例而言,用于治疗中度非霍奇金淋巴瘤(NHL)的第一代化学治疗方案包括C-MOPP(环磷酰胺、长春新碱、丙卡巴肼和强的松)和CHOP(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松)。有用的第二代化学治疗方案是m-BACOD(甲氨喋呤、博来霉素、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、地塞米松和甲酰四氢叶酸),而适宜的第三代方案是MACOP-B(甲氨喋呤、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、强的松、博来霉素和甲酰四氢叶酸)。其他有用的药物包括丁酸苯酯和苔藓抑素-1。反义bc1-2寡核苷酸也是在临床试验中作为特定恶性肿瘤(包括B细胞肿瘤)的治疗药物。在优选的多模式疗法中,将化学治疗药物和细胞因子两者与抗体、免疫缀合物或融合蛋白共施用。细胞因子、化学治疗药物和抗体或免疫缀合物可以以任何顺序或一起进行施用。

[0150] 在优选的实施方案中,如下治疗NHL:每周4次输注人源化抗CD19抗体,每周剂量为200-400mg/m²,并持续4个连续的周(iv,2-8小时),并根据需求而在随后的数月/年内重复进行。也优选如下治疗NHL:如上述进行每周4次的输注,但在同样的这些天内,以360mg/m²的剂量联合施用依帕珠单抗(抗CD 22人源化抗体),依帕珠单抗是在抗CD19单克隆抗体输注之前、期间或之后通过静脉输注1小时来给予的。更优选的是,通过如上述那样每周4次输注抗CD19抗体来治疗NHL,并且联合了一次或多次注射用治疗性同位素(例如钇-90)进行放射性标记的抗CD22Mab(剂量为5-35mCi/m²的Y-90,在数周或数月的时间内进行一次或多次注射)。在类似方案中,也可将抗CD19MAb与抗CD 20MAb(例如hA20人源化MAb)组合(于2003年2月14日提交的美国申请号10/366,709),其中每周施用一次,每循环为4周,循环重复次数任选,以联合的250mg/m²i.v.单剂量给予每个抗体。任一种抗体或两种抗体也可通过皮下注射给予,其中每隔一周给予类似剂量,特别是针对患有自身免疫疾病的病患的治疗。

[0151] 此外,治疗组合物可含有针对不同非嵌段CD19表位的单克隆裸露的抗CD19抗体的混合物或杂交分子。因此,本发明涵盖这样的治疗组合物,即其包含结合至少两个CD19表位

的单克隆抗CD19抗体的混合物。

[0152] 虽然抗CD19抗体是治疗B细胞淋巴瘤和自身免疫疾病的主要治疗组合物,但此抗体疗法的效能可通过用补充剂,例如免疫调节剂,如干扰素(包括IFN- α 、IFN- β 和IFN- γ)、白介素(包括IL-1、IL-2、IL-6、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21)和细胞因子(包括G-CSF和GM-CSF)补充裸抗体来增强。因此,抗CD19抗体不仅可与抗体和细胞因子以混合物(分开给予或使用一些预定的给药方案给予)或抗CD19抗体的缀合物或融合蛋白的形式组合,而且可以与药物联合形式给予。例如,抗CD19抗体可与CHOP组合作为4种药物化学治疗方案。此外,裸抗CD19抗体可与裸抗CD22抗体和/或裸抗CD20抗体和CHOP或氟达拉滨联合作为用于NHL疗法的药物联合。可在施用抗CD19抗体之前、同时或之后施用补充性治疗组合物。

[0153] 如上所述,该抗体可用于治疗B细胞淋巴瘤和白血病,及其他B细胞疾病或病症。该抗体可用于治疗包括不需要或不期望的B细胞活性或增殖的任何疾病或综合征。例如,抗CD19抗体可用于治疗B细胞相关的自身免疫疾病,包括III型自身免疫疾病。这些抗体也可用于治疗B细胞疾病,如移植物抗宿主疾病,或用于移植免疫抑制疗法。

[0154] 抗CD19抗体也可在表达CD19抗原的细胞中诱发细胞凋亡。文献中提供了这一诱发的证据。例如,已证实可利用具有与交联的抗CD19MAb的IgG1-Fc有反应性的Fc受体的淋巴样细胞来诱导细胞凋亡。参见Shan等,Cancer Immunol.Immunother.48(12):673-683(2000)。而且,据报道,嵌合抗CD19MAb的凝聚体(即均聚物)会诱导凋亡。参见Ghetie等,Blood 97(5):1392-1398(2000)和Ghetie等,Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(14):7509-7514(1997)。抗体的促细胞凋亡活性的增加可通过同时使用促细胞凋亡剂(如抑制一个或多个抗细胞凋亡基因家族bcl-2成员的活性的试剂)来实现。在这点上,反义和RNAi试剂对此特别有效,且可通过与本文所述的抗CD19抗体的缀合来指向B细胞。

[0155] 可将针对B细胞的CD19表面抗原具有特异性的抗体注射至哺乳动物受试者中,随后这些抗体与正常的和恶性的B细胞的CD19细胞表面抗原结合。哺乳动物受试者包括人和家养动物,包括宠物,如狗和猫。当存在对于CD19抗原的物种交叉反应时,抗CD19MAb(即人源化、嵌合、人抗CD19MAb和甚至鼠抗CD19MAb)可用于治疗非人哺乳动物受试者。参见以下实例10和11。在人中具免疫原性的鼠MAb在非人哺乳动物受试者中通常具有较弱的免疫原性。结合至CD19表面抗原的抗CD19抗体导致瘤性B细胞的破坏和清除。由于正常的和恶性的B细胞均表达CD19抗原,因此抗CD19抗体将导致B细胞死亡。然而,只有正常的B细胞会再繁殖而恶性B细胞将消除或明显减少。此外,可以将具有破坏肿瘤的潜在能力的化学试剂或放射性标记与抗CD19抗体缀合,从而这些试剂特异地靶向于瘤性B细胞。

[0156] 表达载体

[0157] 可将编码人源化、嵌合或人抗CD19MAb的DNA序列通过重组工程而置于多种已知的提供核酸复制的宿主载体中。可利用已知方法来设计这些载体以含有对于在其递送至的细胞中知道指导核酸的转录、翻译或两者所必需的元件。可以使用已知的方法学来产生具有与适宜的转录/翻译控制信号可操作连接的蛋白编码序列的表达构建体。这些方法包括体外重组DNA技术和合成技术。例如,参见Sambrook等,1989,MOLECULAR CLONING:A LABORATORYMANUAL,Cold Spring Harbor Laboratory(New York);Ausubel等,1997,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley & Sons(New York)。

[0158] 适用的载体可以是病毒或非病毒的。病毒载体的具体实例包括腺病毒、AAV、单纯

疱疹病毒、慢病毒和逆转录病毒载体。非病毒载体的实例是质粒。在优选的实施方案中,载体是质粒。

[0159] 如本文所述的表达载体是含有在宿主细胞中表达的基因的多核苷酸。通常地,将基因表达处于特定调节元件下,包括组成型或诱导型启动子、组织特异性调节元件和增强子的控制下。此基因称为与调节元件“可操作地连接”。

[0160] 优选地,表达载体包含编码人源化、嵌合或人抗CD19MAb的DNA序列,该抗CD19MAb包括重链和轻链可变区和恒定区。然而,可使用两个表达载体,一个包含重链可变区和恒定区,另一个包含轻链可变区和恒定区。更优选地,表达载体进一步包含启动子、编码分泌信号肽的DNA序列、编码人IgG1重链恒定区的基因组序列、Ig增强子元件和至少一个编码选择标记的DNA序列。

[0161] 本文也涵盖了用于表达人源化抗CD19MAb的方法,其包含(i)将至少一种包含编码人源化、嵌合、或人抗CD19MAb的DNA序列的表达载体线性化,(ii)用至少一种该线性化载体转染哺乳动物细胞,(iii)选择表达标记基因的经转染的细胞,和(iv)鉴定从转染细胞中分泌人源化抗CD19MAb的细胞。

[0162] 制备抗CD19抗体的制方法

[0163] 一般而言,编码抗CD19MAb的Vk和VH序列可通过多个分子克隆方法来获得,例如RT-PCR、5'-RACE和cDNA文库筛选。特别地,抗CD19MAb的V基因可通过PCR扩增由表达鼠或嵌合抗CD19MAb的细胞进行克隆,并且随后进行测序。为了证实真实性,可以如Orlandi等(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,86:3833(1989))所述将经克隆的VL和VH克隆基因在细胞培养物中表达为嵌合Ab,该文献以引用的方式并入本文。基于V基因序列,然后可以如Leung等(Mol.Immunol.,32:1413(1995))所述设计和构建人源化抗CD19MAb,该文献以引用的方式并入本文。cDNA可通过一般分子克隆技术自任何已知的产生鼠或嵌合抗CD19MAb的杂交瘤细胞系或转染细胞系制备(Sambrook等,Molecular Cloning,A laboratory manual,第2版(1989))。MAb的VK序列可利用引物Vk1BACK和Vk1FOR(Orlandi等,1989)或Leung等(BioTechniques,15:286(1993))所述的延长引物组来扩增,而VH序列可利用引物对VH1BACK/VH1FOR(Orlandi等,1989)或Leung等(Hybridoma,13:469(1994))所述的与鼠IgG恒定区退火的引物来扩增,该文献以引用的方式并入本文。

[0164] 此PCR反应混合物含有10 μ l第一条链cDNA产物、10 μ l 10 $\times$ PCR缓冲液[500mM KCl、100mM Tris-HCl(pH 8.3)、15mM MgCl₂和0.01% (w/v) 明胶](Perkin Elmer Cetus, Norwalk,Conn.)、250 μ M每种dNTP、200nM引物、和5单位Taq DNA聚合酶(Perkin Elmer Cetus),使该PCR反应混合物进行30个PCR循环。每个PCR循环优选包括于94 $^{\circ}$ C变性1分钟、于50 $^{\circ}$ C退火1.5分钟、和于72 $^{\circ}$ C聚合化1.5分钟。可在2%琼脂(BioRad,Richmond,Calif)上对扩增的VK和VH片段进行纯化。类似地,如Leung等(Mol.Immunol.,32:1413(1995))所述,人源化V基因可通过将长寡核苷酸模板合成和PCR扩增联合而进行构建。在实施例3中可见在自动RNA/DNA合成仪(Applied Biosystems,Foster City,Calif.)合成寡聚体A和寡聚体B的方法以用于构建人源化V基因的方法。

[0165] 可将VK的PCR产物亚克隆到阶段载体中,如基于pBR327的阶段载体VkpBR,其含有Ig启动子、信号肽序列和适宜的利于框内连接VK PCR产物的限制位点。可将VH的PCR产物亚克隆到类似的阶段载体中,如基于pBluescript的VHpBS。含有各自PCR产物的单独克隆可利

用例如, Sanger等(Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 74:5463 (1977))的方法进行测序。

[0166] 可通过双限制酶切为HindIII-BamHI片段, 将含有VK和VH以及启动子与信号肽序列的表达盒分别从VKpBR和VHpBS中切除。随后, 将VK和VH表达盒分别连接至适宜的表达载体中, 如pKh和pGlg (Leung等, Hybridoma, 13:469 (1994))。可将表达载体共转染到适宜的细胞中, 例如骨髓瘤Sp2/0-Ag14或Sp-EEE, 这是由潮霉素抗性所选择的集落, 并通过例如ELISA测试对上清液进行监测以确定嵌合或人源化抗CD Mab的产生。或者, 可将VK和VH表达盒分别装配到经修饰的阶段载体YKpBR2和VHpBS2中, 然后分别作为XbaI/BamHI和XhoI/BamHI片段切除, 并亚克隆到单个表达载体(如pdHL2)中, 这些Gilles等(J.Immunol.Methods 125:191 (1989))进行了描述并且还在Losman等(Cancer, 80:2660 (1997))中显示了在细胞中的表达。另一种有用载体是GS载体, 如Bames等, Cytotechnology 32:109-123 (2000)所述, 其优选在NS0细胞系和CHO细胞中表达。其他适宜的哺乳动物表达系统描述于Wemer等, Arzneim.-Forsch./Drug Res. 48 (11), Nr.8, 870-880 (1998)中。

[0167] 共转染和用ELISA测定抗体分泌的克隆可以如下进行。根据Co等J.Immunol., 148:1149 (1992)所述, 可使用约10 μ gVkpKh(轻链表达载体)与20 μ gVHpGlg(重链表达载体)通过电穿孔(BioRad, Richmond, Calif.)转染5 $\times$ 10⁶个SP2/0骨髓瘤细胞。转染后, 在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂下, 使细胞在96孔微量滴定板的完全HSFM培养基(Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y.)中生长。选择过程可以在添加潮霉素终浓度为500单元/ml的潮霉素选择性培养基(Calbiochem, San Diego, Calif.)之后两天开始进行。通常在电穿孔后2-3周出现集落。随后, 可以让培养物进行扩增以进行进一步分析。

[0168] 对于嵌合或人源化重链的分泌呈阳性的转染瘤克隆可通过ELISA测定来鉴定。简单来讲, 将来自转染瘤培养物的上清液样品(约100 μ l)加入预涂覆有羊抗人(GAH)-IgG、F(ab')₂片段-特异性抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa.)的ELISA微量滴定板中, 一次三份。使平板在室温下温育1小时。洗涤缓冲液(包含0.05%聚山梨酸酯20的PBS)洗涤三次以去除未结合的蛋白。将辣根过氧化物酶(HRP)缀合的GAH-IgG、Fc片段-特异抗体(Jackson ImmunoResearch)加入孔中, (将100 μ l抗体原液稀释10⁴倍, 补充未缀合的抗体以达到1.0 μ g/ml最终浓度)。温育1h后, 洗涤平板, 通常洗涤三次。将反应溶液[100 μ l, 其在PBS中含有167 μ g邻苯二胺(OPD) (Sigma, St.Louis, Mo.)和0.025%过氧化氢]加入孔中。在暗处显色30分钟。将50 μ l 4N HCl溶液加入各孔中使反应停止, 然后在自动化ELISA分析仪(Bio-Tek instruments, Winooski, Vt.)中测定490nm下的吸光度。然后, 相对于不相关的嵌合抗体标准品(购自Scotgen, Ltd., Edinburg, Scotland), 确定结合的嵌合抗体。

[0169] 可按照以下所述自细胞培养基中分离抗体。转染瘤培养物适合不含血清的培养基。为了生产嵌合抗体, 让细胞在滚瓶中使用HSFM以500ml培养物进行生长。将培养物离心并将上清液通过0.2 μ m薄膜过滤。使经过滤的培养基以1ml/min的流速通过A蛋白质柱(1 $\times$ 3cm)。然后, 利用约10个柱体积的PBS洗涤树脂, 随后利用包含10mMEDTA的0.1M甘氨酸缓冲液(pH 3.5)自柱中洗脱出A蛋白结合的抗体。在包含10 μ l的3M Tris(pH 8.6)的管中收集1.0ml馏分, 由280/260nm下的吸光度测定蛋白浓度。将峰值馏分汇集在一起, 进行PBS透析, 并且例如利用Centricon 30 (Amicon, Beverly, Mass.)浓缩抗体。如上所述, 利用ELISA确定抗体浓度, 且利用PBS将其浓度调节为约1mg/ml。向样品中适宜地添加0.01% (w/v) 叠氮化钠作为防腐剂。

[0170] 以下为用于制备抗CD19抗体的引物的核苷酸序列:

[0171] hA19Vka 5'-ATCACTTGTA AGGCCAGCCA AAGTGTTGAT TATGATGGTG ATAGTTATTT GAACTGGTAC CAGCAGATTC CAGGGAAAGC ACCTAAATTG TTGATCTACG ATGCTTCGAA TCTAGTTTCT GGTATC-3' (SEQ ID NO:24)

[0172] hA19VkB 5'-TGCTGACAGT GATATGTTGC AATGTCTTCT GGTGAAGAG AGCTGATGGT GAAAGTGTA TCTGTCCCAG ATCCGCTGCC AGAGAATCGA GGAGGGATAC CAGAACTAGATTCGAAGCA TCGTA-3' (SEQ ID NO:25)

[0173] hA19VkBBack 5'-TCCGACATCC AGCTGACCCA GTCTCCATCA TCTCTGAGCG CATCTGTTGG AGATAGGGTC ACTATCACTT GTAAGGCCAG CCAAAG-3' (SEQ ID NO:26)

[0174] hA19VkFor 5'-GCTCCTTGAG ATCTGTAGCT TGGTCCCTCC ACCGAACGTC CACGGATCTT CAGTACTTTG CTGACAGTGA TATGTTGCA T-3' (SEQ ID NO:27)

[0175] hA19VHA 5'-CTGGCTACGC TTTCAGTAGC TACTGGATGA ACTGGGTGAG GCAGAGGCCT GGACAGGGTC TTGAGTGGAT TGGACAGATT TGGCCTGGAG ATGGTGATAC TAACTACAAT GGAAAGTTCA AGGGGCGCGC CACTATT-3' (SEQ ID NO:28)

[0176] hA19VHB 5'-CGTAGTCTCC CGTCTTGCAC AAGAATAGAA CGCTGTGTCC TCAGATCGTA GGCTGCTGAG TTCCATGTAG GCTGTATTAG TGGATTGTC GGCAGTAATA GTGGCGCGCC CCTTGAACCT TCCATTGTA-3' (SEQ ID NO:29)

[0177] hA19VHBBack 5'-CAGGTCCAAC TGCAGCAATC AGGGGCTGAA GTCAAGAAAC CTGGGTCATCG GTGAAGGTCTC CTGCAAGGCT TCTGGCTACG CTTTCAGTAG C-3' (SEQ ID NO:30)

[0178] hA19VHFor 5'-TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CCAGTAGTCC ATAGCATAGT AATAACGGCC TACCGTCGTA GTCTCCCGTC TTGCACAAG-3' (SEQ ID NO:31)

实施例

[0179] 参照以下实施例而对本发明作进一步描述,这些实施例仅用于举例说明。本发明不局限于这些实施例而包括从本文提供的教导中显而易见的所有变化。

[0180] 实施例1 人源化抗CD19抗体的构建

[0181] 构建嵌合A19 (cA19) 抗体且在Sp2/0细胞中进行表达。图1中显示cA19的Vk (SEQ ID NO:1与SEQ ID NO:3) 和VH (SEQ ID NO:3与SEQ ID NO:4) 序列。cA19抗体显示为结合CD19+人淋巴瘤细胞系,例如Raji,Daudi和Ramos。纯化cA19的Ag结合特异性评价法为与其他抗-CD19抗体(例如B4 (Coulter) 与BU12 (ChemBiochem)) 的细胞表面竞争性结合分析。简单而言,在恒量的I-125放射性标记的抗CD19抗体存在下,将不同浓度的cA19与Raji细胞温育1小时。洗涤除去未结合抗体后,通过在 γ 计数管中对细胞团块进行计数来定量结合细胞表面的放射标记性抗体。如图2中所示,cA19与BU12 (ChemBiochem) 竞争结合细胞表面,表明这些抗体共有CD19分子的类似或重叠的表位。

[0182] 设计和构建编码人源化抗-hCD19抗体(hA19)的轻链和重链可变区序列。cA19(图1A和1B)的可变区(V)构架(FR)序列与Kabat数据库中所注册的人抗体的比较结果表明,cA19VK的FR与人抗体REI(VK)具有极高的序列同源度,而VH序列与人抗体EU(VH)的序列紧密相关。但是,人抗体NEWM的VH FR4序列与cA19的VH FR4序列比对性更佳且用于替代EU FR4序列以人源化A19重链(图3B)。因此,人REI构架序列用于Vk(图3A),EU与NEWM构架序列

的组合用于VH。与起始人抗体构架比较,CDR区域外每条链中有许多氨基酸变化。这些残基为VK的4L、39I、58I、60P、87H、100G和107K(图3A)与VH的5Q、27Y、28A、40R、91S、94R、107T和108T(图3B)。图4A与4B中分别显示hA19VK与VH的DNA与氨基酸序列。

[0183] 实施例2 hA19抗体构建方法

[0184] 为了将CDR-接枝的hA19VH和VK基因工程化,使用长寡核苷酸合成和PCR的组合、采用Leung等(1995)所述的改进法来构建用于hA19的VK和VH基因。简单而言,代表V序列的5′-(有义链,称为A)和3′-半(反义链,称为B)的两条长合成寡核苷酸(长度约130mer)用作PCR反应的模板。设计长寡核苷酸A与B的3′-端序列以重叠并彼此互补。通过将A和B的3′-端退火以形成短双链DNA(其两侧为长寡核苷酸(单链)的其余部分)来引发PCR。各退火端用作复制单链DNA的引物,导致A与B伸长以形成双链DNA。在两短寡核苷酸引物的存在下,V基因区段通过双链DNA的PCR扩增而产生。

[0185] 重链

[0186] 为了构建hA19VH结构域,在自动化DNA合成仪(Applied Biosystems)上合成长寡核苷酸。A19VHA(SEQ ID NO:28,126-mer)和hA19VHB(SEQ ID NO:29,128-mer)。hA19VHA代表hA19VH结构域的nt 74至126,hA19VHB代表与nt 178至306互补的hA19VH结构域的负链。hA19VHA与VHB的3′-端序列(33nt残基)彼此互补。在10μl 10X PCR缓冲液(500mM KCl, 100mM Tris-HCl缓冲液,pH 8.3,15mM MgCl₂),2μmol hA19VHBack(5′-CAGGTCCAAC TGCAGCAATC AGGGGCTGAA GTCAAGAAAC CTGGGTCATCG GTGAAGGTCTC CTGCAAGGCT TCTGGCTACG CTTTCAGTAG C-3′SEQ ID NO:30)和hA19VHFor(5′-TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CCAGTAGTCC ATAGCATAGT AATAACGGCC TACCGTCGTA GTCTCCCGTC TTGCACAAG-3′SEQ ID NO:31),和2.5单位Taq DNA聚合酶(Perkin Elmer Cetus,Norwalk,Conn.)的存在下,使最少量的hA19VHA与VHB扩增(经验决定)。下划线部分为亚克隆的限制位点,如图4B所示。此反应混合物进行三个聚合酶链反应(PCR)循环,此循环包括在94℃下变性1分钟,在45℃下退火1分钟,和在72℃下聚合1.5分钟。此步骤后进行27个PCR反应循环,此循环包括在94℃下变性1分钟,在55℃退火1分钟,和在72℃聚合1分钟。所得DNA片段在琼脂糖凝胶电泳中显示预期的分子大小。hA19VH的双链PCR扩增产物经凝胶纯化,利用PstI与BstEII限制酶进行限制酶切消化并克隆到重链阶段载体VHpBS2的互补PstI/BstEII限制位点,其中用编码翻译起始密码子和框内连接在5′-端的分泌信号肽以及框内连接在3′-端的内含子序列的DNA序列完全装配VH序列。VHpBS2为VHpBS的修饰阶段载体(Leung等,Hybridoma,13:469(1994)),其中在翻译起始密码子上游16个碱基处导入XhoI限制位点以便于下一亚克隆步骤。经装配的VH基因作为XhoI-BamHI限制片段亚克隆到表达载体pdHL2中,pdHL2包含在IgH增强子与MT1启动子的控制下的人IgG重链和轻链的表达盒,以及作为选择和扩增标记的鼠dhfr基因(图4B)。因pdHL2的重链区不含BamHI限制位点,故此连接需使用接头以在可变链的BamHI位点与存在于pdHL2载体中的HindIII位点之间提供桥接。所得表达载体称为hA19VHpHL2。

[0187] 为了构建人源化VK序列的全长DNA,如上所述合成hA19VkA(SEQ ID NO:24,126-mer,代表hA19VK结构域的nt 61至186)与hA19VkB(SEQ ID NO:25,124-mer,代表与nt 157至281互补的hA19VK结构域的负链)。利用两短寡核苷酸hA19VkBack(5′-CAGGTCCAAC TGCAGCAATC AGGGGCTGAA GTCAAGAAAC CTGGGTCATCG GTGAAGGTCTC CTGCAAGGCT

TCTGGCTACG CTTTCAGTAG C-3' SEQ ID NO:30) 与 hA19VkFor (5'-TGAGGAGACG GTGACCGTGG TCCCTTGGCC CCAGTAGTCC ATAGCATAGT AATAACGGCC TACCGTCGTA GTCTCCCGTC TTGCACAAG-3' SEQ ID NO:31) 如上述那样扩增 hA19VkA 和 VkB。下划线部分为如下所述的亚克隆的限制位点。利用 PvuII 与 BglIII 对 hA19VK 的凝胶纯化的 PCR 产物限制酶切消化并且克隆成轻链阶段载体 VkpBR2 的互补 PvuII/BclI 位点。VkpBR2 为 VkpBR 的修饰阶段载体 (Leung 等, Hybridoma, 13:469 (1994)), 其中在翻译起始密码子上游 16 个碱基处引入 XbaI 限制位点。将经装配的 VK 基因作为 XbaI-BamHI 限制片段亚克隆到包含 VH 序列的表达载体 hA19VHpdHL2 中。所得表达载体称为 hA19pdHL2。

[0188] 实施例3 hA19抗体的转染和表达

[0189] 通过用 SalI 消化将约 30 μ g 的 hA19 表达载体线性化并且通过电穿孔 (450V 和 25J- μ F) 转染到 Sp2/0-Ag14 细胞中。将转染细胞置于 96-孔板中 2 天, 随后通过将 MTX 加入培养基中以达到 0.075 μ M 的最终浓度而进行耐药性选择。2-3 周后孔中出现 MTX 抗性集落。通过 ELISA 测定筛选来自存活集落选择的上清液的人 MAbs 分泌。简单而言, 将 100 μ l 上清液加入预涂覆有 GAH-IgG、F(ab')₂ 片段-特异性 Ab 的微量滴定板的孔中且室温温育 1 小时。利用洗涤缓冲液 (包含 0.05% 聚山梨酸酯 20 的 PBS) 洗涤三次以去除未结合的蛋白。将 HRP-缀合的 GAH-IgG、Fc 片段-特异性 Ab 加入孔中。培养 1 小时后, 对板进行洗涤。添加包含 4mM OPD 与 0.04% H₂O₂ 的底物溶液后, 通过对 490nm 进行读数显示结合的 HRP-缀合的 Ab。扩展阳性细胞克隆并且通过在 A 蛋白柱上进行亲和层析来纯化细胞培养物上清液中的 hB43。

[0190] 实施例4 抗CD19抗体的抗原结合特异性和亲和性的确定

[0191] 通过细胞表面竞争性结合测定对经 A 蛋白柱亲和层析纯化的 cA19 和 hA19 的 Ag-结合特异性进行评价和比较。简单而言, 在不同浓度 (0.2-700nM) 的 cA19 和 hA19 的存在下, 使恒量 (100,000cpm, -10 μ Ci/ μ g) ¹²⁵I-标记的 cA19 或 hA19 与 Raji 细胞在 4 $^{\circ}$ C 下温育 1-2 小时。通过在 PBS 中洗涤细胞以去除未结合的 Ab。洗涤后, 确定与细胞相关的放射性。如图 2 所示, 经纯化的 hA19 与 ¹²⁵I-标记的 cA19 竞争结合细胞表面, 反之亦然, 表明两 Ab 间表观结合亲和力相当。

[0192] 通过放射标记的 Ab 的直接细胞表面结合测定和 Scatchard 作图分析确定 hA19 的抗原结合亲和性 (亲和力) 常数, 并对比 cA19。简单而言, 利用氯胺-T 法对 hA19 与 cA19 进行 ¹²⁵I 标记。在 4 $^{\circ}$ C 下, 将不同量的 ¹²⁵I-hA19 或 ¹²⁵I-cA19 与 2 $\times$ 10⁵ Raji 细胞温育 2 小时且洗涤去除未结合的抗体。对细胞相关放射性进行计数且进行 Scatchard 作图分析以确定每个细胞 hA19 和 cA19 结合位点的最大数和平衡结合的表现解离常数。如图 5 所示, hA19 结合亲和性基本上与 cA19 相同。这两个抗体的表现解离常数分别计算为 1.1nM 和 1.2nM。

[0193] 实施例5 hA19序列变体

[0194] 将实施例 2 中所述的人源化抗 CD19MAb (hA19) 在 Sp2/0 细胞中表达, 但所得克隆的生产率低。进行多次转染 (总共 15 次) 且对数百个克隆进行筛选。阳性克隆的生产率维持在 0.5-3 μ g/ml 之间并且甲氨蝶呤扩增并未提高目标克隆的生产率。

[0195] 修饰Vk基因序列以减少AT含量

[0196] 为制造更多的 hA19 克隆, 使用两种方法。第一种方法 (hA19Vkp dHL2) 是再设计 hA19Vk 基因序列以减少 AT 含量, 此可能对 Ab 基因表达具有负面影响。合成新 hA19Vk 基因, 进行装配, 并且将其用于再构建 hA19 的表达载体。

[0197] hA19VkpdlHL2构建完成后,DNA测序证实序列正确,进行大量制备(maxiprep)来制备转染用质粒。进行三次转染:#739(hA19VkpdlHL2#1)、#740(hA19VkpdlHL2#5)和#741(hB43pdlHL2#1)。使用SP-E26细胞和10 μ g SalI-线性化DNA。电穿孔48小时后开始MTX选择(0.075 μ M)。使用ELISA对阳性克隆的转染进行筛选。转染#739得到31个阳性克隆(选出13个),转染#740得到49个阳性克隆(选出13个),转染#741得到41个阳性克隆(选出19个)。通过ELISA确定并监控生产率,其范围为0.5-3 μ g/ml,与hA19初始构建体的观察结果相同。

[0198] 进行两次无血清转染:#746(hA19VkpdlHL2#1)与#747(hB43pdlHL2#1)。两次转染均利用SP-ESF细胞与10 μ g SalI-线性化DNA。电穿孔48小时后开始MTX选择(0.075 μ M)。转染#746得到9个阳性克隆,转染#747得到6个阳性克隆。将阳性克隆扩展在48孔板上且扩增至0.2 μ M MTX上。将转染#739、#740和#741所得的45个克隆减少到12个(基于1.0 μ g/ml以上的ELISA读数)且使MTX增至0.15 μ M。确定无血清克隆的初始 p_{max} 且其生产率与血清培养基中的克隆类似(0.5-1.5 μ g/ml)。

[0199] 进行两次以上的血清转染:#756(hA19VkpdlHL2#5)和#757(hB43pdlHL2#1)。转染条件与先前相同,但是,给予时间使生长缓慢的克隆发育以观察 p_{max} 是否更高。转染#756得到19个阳性克隆,转染#757得到8个阳性克隆。将转染#756与#757者的 p_{max} 与转染#739、#740、#741、#746和#747者进行比较。生产率相似($\sim$ 0.5-3 μ g/ml)。选出最佳的生产者(739.1A9、740.1B1和756.2G7)并且扩增至0.2 μ M MTX上。表2中报告的结果表明平均抗体生产率在2 μ g/ml与3 μ g/ml之间。

[0200] 表1:在10%FBS和无血清条件下初始阳性与 p_{max} 值的比较

[0201]

	初始阳性	P_{max}
--	------	-----------

[0202]

SP-E26		
#739	31	0.5-3
#740	49	0.5-3
#741	41	0.5-3
#756	19	0.5-3
#757	8	0.5-3
SP-ESF		
#746	9	0.5-1.5
#747	6	0.5-1.5

[0203] 表2:三个最佳hA19VkpdlHL2克隆的平均 p_{max} 和标准偏差值

	0.2 μ M MTX	平均 (μ g/ml)	标准偏差值
[0204]	739.1A9	2.96	$\pm$ 1.40
	740.1 B1	2.30	$\pm$ 0.30
	756.2G7	2.95	$\pm$ 0.70

[0205] 基于细胞的抗体依赖性细胞毒性试验

[0206] 为了确定再设计的载体是否产生活性抗体,通过A蛋白纯化对两升克隆756.2G7进行纯化。纯化得到7.3mg抗CD-19Ab。HPLC和SDS-PAGE显示所纯化的蛋白是纯的(未显示)。经纯化的蛋白用于检测抗体处理对细胞增殖与死亡的影响。进行基于细胞的抗体依赖性细胞毒性试验以比较含与不含GAH IgG和Fc片段的hA19、hA20和hLL2。将Daudi D1-1与SP-E26细胞涂布于两个48孔板中,最终浓度为150,000细胞/ml。在含和不含GAH(最终浓度为40μg/ml)的完全培养基(对于D1-1,为RPMI和对于SP-E26,为SFM)中稀释hA19、hA20和hLL2,使最终浓度为10μg/ml。将Ab混合物加入板中并置于振荡器中振荡若干分钟,然后放入温育箱中。在第三天和第四天进行MTT。第3天的结果表明SP-E26细胞的细胞生长没有差异。D1-1细胞显示hA19+GAH与hA20+GAH的细胞生长受到抑制。此等结果表明再设计的hA19具活性。

[0207] hA19FpdHL2

[0208] 第二种方法(hA19FpdHL2)是再设计hA19VH基因以利用共有苯基丙氨酸残基替代重链(VH)构架区氨基酸残基丝氨酸91。hA19VHpdHL2中S91的TCT密码子转变为hA19FVHpdHL2中F91的TTC密码子。合成新hA19F基因,进行装配,且将其用于再构建hA19的表达载体。

[0209] hA19FpdHL2构建完成后,DNA测序确认序列正确,进行大量制备以制备转染用质粒。进行两次转染:#762(hA19FpdHL2#2)与#763(hA19FpdHL2#3)。转染条件与转染#739、#740和#741条件相同。使用ELISA筛选阳性克隆的转染。转染#762得到13个阳性克隆(选出8个),转染#743得到18个阳性克隆(选出16个)。通过ELISA确定初始生产率,示于表3中。

[0210] 表3:所选择的hA19FpdHL2克隆的平均 p_{max} 与标准偏差值

0.075 μ M MTX	平均 (μ g/ml)	标准偏差值
762.2D6	42.42	
762.2H9	11.34	
762.2B10	14.86	
762.2D4	12.69	
762.2 A10	15.96	
762.2C11	6.34	
762.2F11	9.17	
763.2B2	11.57	3.39
763.2G2	11.18	1.74
763.2B4	9.08	5.27

[0211]

[0212]

763.2D4	10.88	13.64
763.2E11	15.33	4.32
763.2C4	11.57	8.13
763.2B5	2.94	1.13
763.2H5	7.46	5.39
763.2C5	18.91	10.70
763.2H6	6.54	4.09
763.2A6	14.17	12.64
763.2A9	2.35	
763.2 A10	2.95	0.95
763.2B12	15.76	6.95
763.2C12	6.28	5.50
763.2D3	6.65	

[0213] 利用新载体转染寄主细胞得到100个以上的阳性克隆。我们随机挑选出30个克隆以用于评价。评价大多数这些克隆以得到抗体在5-25mg/L IgG的细胞培养物中产生的产率。这与先前产生的细胞培养物生产率(1-2mg/L的范围)相比。因此,我们总结出取代Ser91Phe导致hA19抗体的表达水平显著增加,抗体产量增加约10倍。这个出人意料的结果实质上允许利用哺乳动物细胞系中的表达在细胞培养物中制造更大量的抗体蛋白。

[0214] 实施例6 非霍奇金淋巴瘤的治疗

[0215] 患有惰性滤泡性细胞NHL的患者在包括地塞米松的化疗后复发,且有胸部疾病(主动脉旁淋巴结)、脾肿大并受到侵害、颈淋巴结肿大。在同一天,患者通过静脉内输注来接受hA19MAb与人源化抗CD20MAb(hA20)各300mg/m²的组合疗程,每周一次,持续4周,每次根据标准的、公布的用于抑制与注射相关反应的剂量提前施用TYLENOL®和BENADRYL®。四周后,患者回访进行第一次跟踪检查且仅观察到一些可触及的淋巴结变软。第一次治疗循环后3个月的回访中,经CT扫描发现患者胸部疾患减少40%,脾大小约为治疗前的一半,颈淋巴结几乎消失。患者随后进行复治循环,又3个月后脾大小正常,无可触摸或CT扫描可测得的颈淋巴结,胸部仅有小的、1.5cm损害。又四个月,患者看起来几乎不患病。

[0216] 虽然上述涉及具有优选的实施方案,但应了解本发明并不因此而受到限制。本领域技术人员应意识到,可对所公开的实施例进行多种变更且期望这些变更在以下权利要求所限定的本发明的范围内。

[0217] 本说明书中引用的所有出版物和专利申请以及专利以引用的方式整体并入本文。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 埃姆诺医药有限公司

<120> 改良的抗CD19抗体

<130> IMM167WO3

<140>

<141>

<150> 12/266,999

<151> 2008-11-07

<150> 11/445,410

<151> 2006-06-01

<150> 10/903,858

<151> 2004-08-22

<150> 60/491,282

<151> 2003-07-31

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成的多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (336)

<400> 1

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

cag agg gcc acc atc tcc tgc aag gcc agc caa agt gtt gat tat gat	96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp	
20 25 30	

ggt gat agt tat ttg aac tgg tac caa cag att cca gga cag cca ccc	144
Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro	
35 40 45	

aaa ctc ctc atc tat gat gca tcc aat cta gtt tct ggc atc cca ccc	192
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro	
50 55 60	

agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His	
65 70 75 80	

[0002]

cct gtg gag aag gtg gat gct gca acc tat cac tgt cag caa agt act 288
Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

gaa gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt 336
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 2

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

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

Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

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

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

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

<210> 3

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (372)

[0003]

```

<400> 3
cag gtc caa ctg cag gag tct ggg gct gag ctg gtg agg cct ggg tcc      48
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1          5          10          15

tca gtg aag att tcc tgc aag gct tct ggt tat gca ttc agt agc tac      96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

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

gga cag att tgg cct gga gat ggt gat act aac tac aat gga aag ttc      192
Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
          50          55          60

aag ggt aaa gcc act ctg act gcc gac gaa tcc tcc agc aca gcc tac      240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

atg caa ctc agc agc cta cga tct gag gac tct gcg gtc tat tct tgt      288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys
          85          90          95

gca aga cgg gag act acg acg gta ggc cgt tat tac tat gct atg gac      336
Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
          100          105          110

tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca      372
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 4

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 4

```

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

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

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

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

```

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 5

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

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

[0004] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 6

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

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

[0005] <210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 7
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

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

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 8

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

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

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

Gly Gly Ile Val Pro Met Phe Gly Pro Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

[0006] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Tyr Gly Ile Tyr Ser Pro Glu Trp Gly Gln Gly Ser Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 9

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

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

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

35	40	45
Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe 50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65	70	75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser Cys 85	90	95
Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp 100	105	110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115	120	

<210> 10
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0007] <220>
 <223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 10 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr 20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45
Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe 50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr 65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Ser Cys 85 90 95
Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp 100 105 110

[0008]

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 11

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

<210> 12

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 12

gac atc cag ctg acc cag tct cca tca tct ctg agc gca tct gtt gga 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gat agg gtc act atc act tgt aag gcc agc caa agt gtt gat tat gat 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

ggt gat agt tat ttg aac tgg tac cag cag att cca ggg aaa gca cct 144
Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

aaa ttg ttg atc tac gat gct tcg aat cta gtt tct ggt atc cct cct 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro
50 55 60

cga ttc tct ggc agc gga tct ggg aca gat tac act ttc acc atc agc 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
65 70 75 80

tct ctt caa cca gaa gac att gca aca tat cac tgt cag caa agt act 288
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr
85 90 95

gaa gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggg acc aag cta cag atc aaa cgt 336
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

[0009]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多核苷酸

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(372)

<400> 14

cag gtc caa ctg cag caa tca ggg gct gaa gtc aag aaa cct ggg tca 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

tgc gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct ggc tac gct ttc agt agc tac 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

[0010]

gga cag att tgg cct gga gat ggt gat act aac tac aat gga aag ttc 192
 Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

aag ggg cgc gcc act att act gcc gac gaa tcc act aat aca gcc tac 240
 Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

atg gaa ctc agc agc cta cga tct gag gac aca gcg ttc tat tct tgt 288
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Ser Cys
 85 90 95

gca aga cgg gag act acg acg gta ggc cgt tat tac tat gct atg gac 336
 Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 372
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的多肽

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成的肽

<400> 16

Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn
1				5					10				15	

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成的肽

<400> 17

Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser
1			5			

[0011]

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成的肽

<400> 18

Gln	Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr
1			5					

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成的肽

<400> 19

Ser	Tyr	Trp	Met	Asn
1			5	

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的肽

<400> 20

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

Gly

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的肽

<400> 21

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

[0012]

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的肽

<400> 22

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的肽

<400> 23

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5				10					15	

<210> 24

<211> 126

<212> DNA

[0013]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 24

atcacttgta aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttattt gaactggtac 60

cagcagattc cagggaaagc acctaaattg ttgatctacg atgcttcgaa tctagtttct 120

ggtatc 126

<210> 25

<211> 125

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 25

tgctgacagt gatatgttgc aatgtcttct ggttgaagag agctgatggt gaaagtgtaa 60

tctgtcccag atccgctgcc agagaatcga ggagggatac cagaaactag attcgaagca 120

tcgta 125

<210> 26

<211> 86

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 26

tccgacatcc agctgaccca gtctccatca tctctgagcg catctgttgg agatagggtc 60

actatcactt gtaaggccag ccaaag 86

<210> 27

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 27

gtccttgag atctgtagct tggtcctcc accgaacgtc cacggatctt cagtactttg 60

ctgacagtga tatgttgcaa t 81

[0014]

<210> 28

<211> 137

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 28

ctggctacgc tttcagtagc tactggatga actgggtgag gcagaggcct ggacagggtc 60

ttgagtggat tggacagatt tggcctggag atggtgatac taactacaat ggaaagttca 120

aggggcgcgc cactatt 137

<210> 29

<211> 129

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 29

cgtagtctcc cgtcttgac aagaatagaa cgctgtgtcc tcagatcgta ggctgctgag 60

ttccatgtag gctgtattag tggattcgct gccagtaata gtggcgcgcc ccttgaactt 120

tccattgta 129

<210> 30

<211> 93

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 30

caggtccaac tgcagcaatc aggggctgaa gtcaagaaac ctgggtcatc ggtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctggcta cgctttcagt agc 93

<210> 31

<211> 89

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明: 合成的引物

<400> 31

tgaggagacg gtgaccgtgg tcccttggcc ccagtagtcc atagcatagt aataacggcc 60

[0015]

taccgtcgta gtctcccgtc ttgcacaag

89

```

GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGAT 90
1      10      20      27 A B C
D I Q L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C K A S Q S V D

TATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCT 180
D      30      40      50
Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G Q P P K L L I Y D A S N L V S
CDR1 CDR2

GGCATCCCAAGCTTACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGCTGGATGCTGCAACCTAT 270
60      70      80
G I P P R F S G S G S G T D F T L N I H P V E K V D A A T Y

CACTGTCAGCAAAGTACTGAAGATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGT 336
90      100      108
H C Q Q S T E D P W T F G G G T K L E I K R
CDR3

```

图1A

```

CAGGTCCAAGTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCTCAGTCAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATGCATTCAGT 90
1      10      20      30
Q V Q L Q E S G A E L V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S

AGCTACTGGATGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTCACTGGATTGGACAGATTGGCCTGGAGATGCTGATACTAACTAC 180
40      50      52 A
S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y
CDR1 CDR2

AATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCCGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTACGATCTGAGGAC 270
60      70      80      82 A B C
N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L R S E D

TCTGCGGTCTATTCTTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC 336
90      100 A B C D E F G
S A V Y S C A R R E T T T V G R Y Y A M D Y W G Q G T T V
CDR3

ACCGTCTCCTCA 336
110      113
T V S S

```

图1B

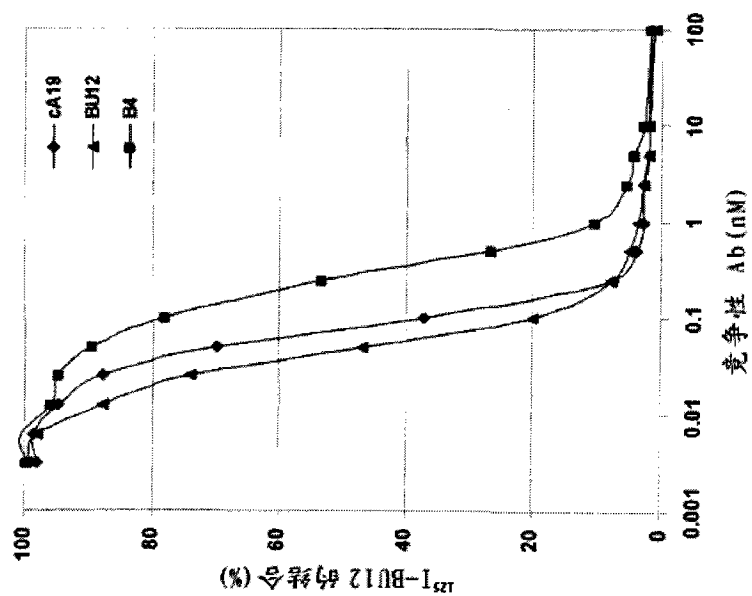


图2

	1	10	20	27 A B C D	30
REIVk	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	QASQ---- DIIKYLNWY			
cA19Vk	...L...A...AV...L...Q...A...S...	K...SVDY...GDS...			
hA19Vk	...L.....	K...SVDY...GDS...			
	40	50	60	70	
REIVk	QQTPGKAPKLLIY	EANSLQA	GVPSRFSGSGSGTDYFTIS		
cA19Vk	...I...QP.....	D...SN...VS	...I...P.....F...LN...H		
hA19Vk	...I.....	D...SN...VS	...I...P.....		
	80	90	100		
REIVk	SLQPEDIATYYC	QQYQSLPYT	FGQGTKLQITR		
cA19Vk	PVEKV...A...H...	STED...W...	...G...K...		
hA19Vk	H...	STED...W...	...G...K...		

图3A

	1	10	20	30	40
EUVH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYWLH WVRQA				
cA19VH	QE.....LVR.....I.....YA..... MNK·R				
hA19VH	Q.....YA..... MNR				

	50	52 A	60	70
EUVH	PGQGLEWMG GIVPMFGPPNYAQKFQ GRATITADESTNTAY			
cA19VH	I· Q·W·GD·DT·NG·K·K ·L.....SS....			
hA19VH	I· Q·W·GD·DT·NG·K			

	80	82 A B C	90	100 A B C D E F G
EUVH	MELSSLRSEDTAFYFCAG GYGIYS-----PE			
cA19VH	·Q.....S·V·S·R RETTTVGRYYYAMDY			
hA19VH	S·R RETTTVGRYYYAMDY			

	103	110
NEWMVH	WGQGLVTVSS	
cA19VH	TT.....	
hA19VH	TT.....	

图3B

GACATCCAGCTGA¹CCAGTCTCCATCATCTCTGAGCGCATCTGTTGGAGATAGGGTCACTATCACTTGTAAGGCCAGCCAAAGTGTGAT⁹⁰

1 10 20 27 A B C

D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C **K A S Q S V D**

TATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGCTACCAGCAGATTCCAGGGAAAGCACCTAAATTGTTGATCTACGATGCTTCGAATCTAGTTTCT¹⁸⁰

D 30 40 50

Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G K A P K L L I Y **D A S N L V S**

CDR1 CDR2

GGTATCCCTCCTCGATTCTCTGGCAGCGGATCTGGGACAGATTACACTTTCACCATCAGCTCTCTTCAACCAGAAGACATTGCAACATAT²⁷⁰

60 70 80

G I P P R F S G S G S G T D Y T F T I S S L Q P E D I A T Y

CACTGTCAGCAAAGTACTGAAGATCCGTGGACGTTGCGTGGAGGGACCAAGCTACAGATCAAACGT³³⁶

90 100 108

H C **Q Q S T E D P W T** F G G G T K L Q I K R

CDR3

图4A

CAGGTCCAACTGCAGCAATCAGGGGCTGAAGTCAAGAAACCTGGGTGATCGGTGAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACGCTTTCAGT 90
1 10 20 30
Q V Q L Q Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y A F S

AGCTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGAGGCTGCACAGGCTCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGCCTGGAGATGGTGATACTAACTAC 180
40 50 52 A
S Y W M N W V R Q R P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y
CDR1 CDR2

AATGGAAAGTTCAAGGGGCGCGCCACTATTACTGCCGACGAATCCACTAATACAGCCTACATGGAACTCAGCAGCCTACGATCTGAGGAC 270
60 70 80 82 A B C
N G K F K G R A T I T A D E S T N T A Y M E L S S L R S E D

ACAGCGTCTCTATTCTTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTC 336
90 100 A B C D E F G
T A F Y S C A R R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T T V
CDR3

ACCGTCTCTCTCA 336
110 113
T V S S

图4B

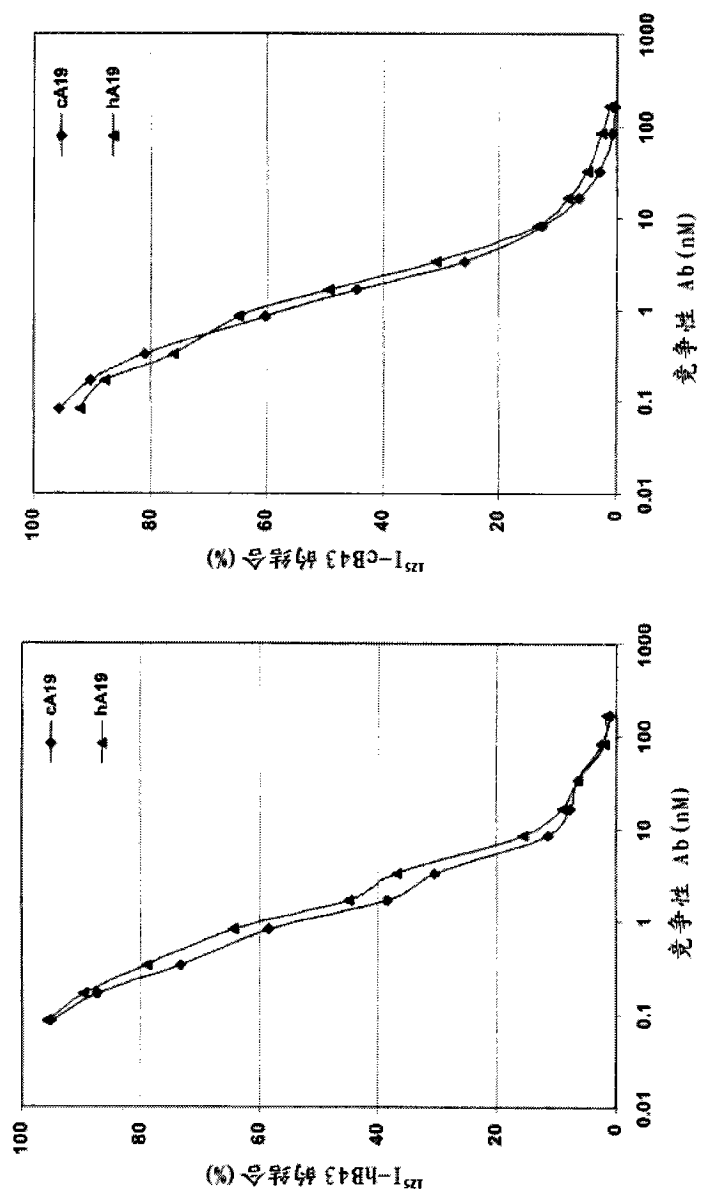


图5

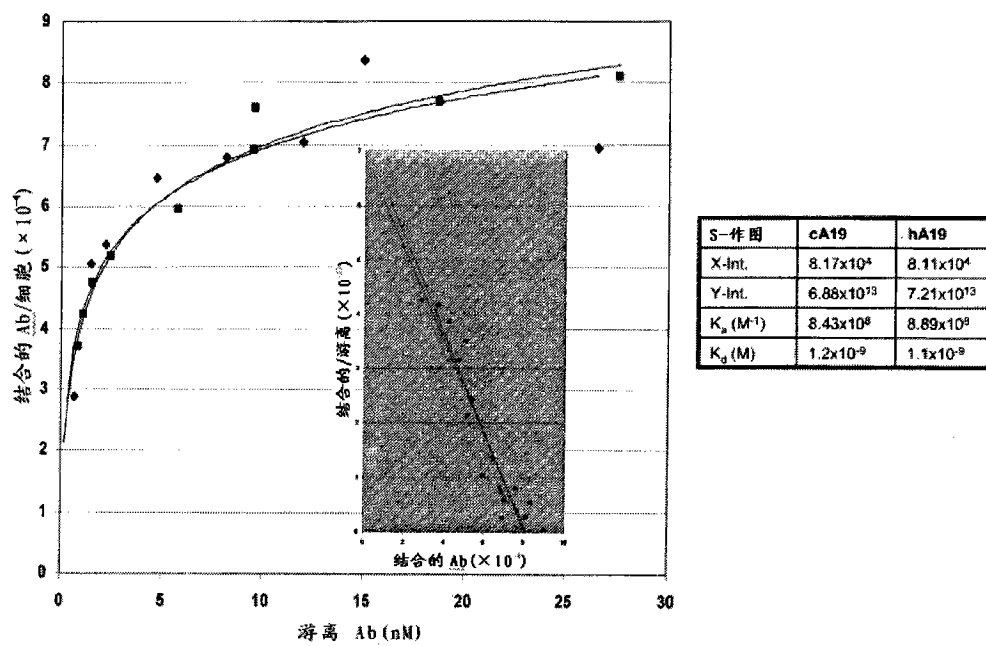


图6