(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103936859 A
(43)申请公布日 2014.07.23

(21)申请号 201410200592.1
(22)申请日 2006.03.03
(30)优先权数据
60/657695 2005.03.03 US
(62)分案原申请数据
200680015286.4 2006.03.03
(71)申请人 免疫医疗公司
地址 美国新泽西州
(72)发明人 D.M. 戈登伯格 H.J. 汉森 Z. 屈 C.-H. 郑
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李波 万雪松
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 47/48(2006.01)
A61K 49/00(2006.01)
A61K 51/10(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书51页
序列表12页 附图24页

(54)发明名称

人源化L243抗体

(57)摘要

本发明涉及人源化L243抗体。具体地,提供了特异性结合HLA-DR的人源化抗体。该抗体识别由鼠单克隆抗体L243识别的表位。提供了用于制备此类抗体、包含此类抗体的药物组合物的方法、以及关于此类抗体的临床治疗和诊断以及研究相关用途。

CN 103936859 A

1. 一种人源化抗 HLA-DR 抗体或其抗原结合片段，其包含重链互补决定区 (CDR) 序列 CDR1(NYGMN (SEQ ID NO: 39))、CDR2 (WINTYTREPTYADDFKG (SEQ ID NO: 40)) 和 CDR3 (DITAVVPTGFDY (SEQ ID NO: 41)) 以及轻链 CDR 序列 CDR1 (RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 42))、CDR2 (AASNLAD (SEQ ID NO: 43)) 和 CDR3 (QHFWTTPWA (SEQ ID NO: 44))，其中所述人源化抗体是包含 Ser241Pro 突变的 IgG4 抗体，进一步包含一个或多个构架区 (FR) 氨基酸取代，所述氨基酸取代选自轻链鼠 L243 FR 残基 R37、K39、V48、F49 和 G100 以及重链鼠 L243 FR 残基 F27、K38、K46、A68 和 F91。

2. 权利要求 1 的人源化抗 HLA-DR 抗体，包含轻链鼠 L243 FR 残基 R37、K39、V48、F49 和 G100 以及重链鼠 L243 FR 残基 F27、K38、K46、A68 和 F91 的每一个 FR 氨基酸取代。

3. 权利要求 1 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述抗体与包含重链 CDR 序列 CDR1(NYGMN (SEQ ID NO: 39))、CDR2 (WINTYTREPTYADDFKG (SEQ ID NO: 40)) 和 CDR3 (DITAVVPTGFDY (SEQ ID NO: 41)) 以及轻链 CDR 序列 CDR1 (RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 42))、CDR2 (AASNLAD (SEQ ID NO: 43)) 和 CDR3 (QHFWTTPWA (SEQ ID NO: 44)) 的鼠 L243 抗体相比，对 HLA-DR 的亲和力更高。

4. 权利要求 1 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述抗体是裸抗体。

5. 权利要求 1 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述抗体连接于至少一种治疗剂和 / 或诊断剂。

6. 权利要求 5 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述治疗剂选自药物、毒素、酶、放射性核素、免疫调节剂、细胞因子、激素、抗体或其片段、抗血管发生剂、细胞毒性剂、促凋亡剂和光动力剂。

7. 权利要求 6 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述药物选自长春花生物碱、蒽环类抗生素、表鬼臼毒素、抗代谢物、烷化剂、抗有丝分裂物、多柔比星、喜树碱、紫杉烷、氮芥、氮丙啶、烷基磺酸盐、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、反义寡核苷酸、干扰 RNA、抗生素、铂配位复合物、COX-2 抑制剂、凋亡剂、取代的尿素、甲肼、类固醇、黄体酮、雌激素、抗雌激素、雄激素、放射菌素、阿扎立平、阿纳托唑、氮杂胞苷、博来霉素、苔藓抑素 -1、白消安、卡莫司汀、希乐葆、苯丁酸氮芥、顺铂、依立替康 (CPT-11)、卡铂、克拉屈滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯咪胺、多西他奇、氮烯咪胺、放线菌素、道诺红霉素、地塞米松、二乙基己烯雌酚、多柔比星、乙炔基雌二醇、磷雌氮芥、依托泊苷、5- 氟脱氧尿苷、氟达拉滨、氟他胺、5- 氟尿嘧啶、氟甲睾酮、吉西他滨、己酸羟孕酮、羟基脲、依达比星、异磷酰胺、L- 天冬酰胺酶、亚叶酸、罗莫司汀、二氯甲基二乙胺、乙酸甲羟孕酮、乙酸甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、米托蒽醌、丝裂霉素、米托坦、奥沙利铂、丁酸苯酯、泼尼松、甲基苄肼、紫杉醇、喷司他丁、司莫司汀、链唑霉素、SN-38、它莫西芬、紫杉酚、丙酸睾酮、沙立度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶氮芥、长春碱、长春瑞滨和长春新碱。

8. 权利要求 6 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述毒素选自蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶 (RNase)、DNase I、葡萄球菌肠毒素 A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。

9. 权利要求 6 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述免疫调节剂选自干细胞生长因子、淋巴毒素、肿瘤坏死因子 (TNF)、造血因子、白介素、集落刺激因子、干扰素 -α、-β 和 -γ、促红细胞生成素和血小板生成素。

10. 权利要求 9 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述免疫调节剂是 TNF-α、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、G-CSF、GM-CSF 或称为“S1 因子”的干细胞生长因子。

11. 权利要求 6 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述放射性核素选自 In-111、Lu-177、Bi-212、Bi-213、At-211、Cu-62、Cu-64、Cu-67、Y-90、I-125、I-131、P-32、P-33、Sc-47、Ag-111、Ga-67、Pr-142、Sm-153、Tb-161、Dy-166、Ho-166、Re-186、Re-188、Re-189、Pb-212、Ra-223、Ac-225、Fe-59、Se-75、As-77、Sr-89、Mo-99、Rh-105、Pd-109、Pr-143、Pm-149、Er-169、Ir-194、Au-198、Au-199、Ac-225 和 Pb-211。

12. 权利要求 5 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述诊断剂选自放射性核素、放射学造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记、化学发光标记、超声造影剂和光活性剂。

13. 权利要求 12 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述诊断剂是选自 In-110、In-111、Lu-177、F-18、Fe-52、Cu-62、Cu-64、Cu-67、Ga-67、Ga-68、Y-86、Zr-89、Tc-94m、Tc-94、Tc-99m、I-120、I-123、I-124、I-125、I-131、Gd-154-158、P-32、C-11、N-13、0-15、Re-186、Re-188、Mn-51、Mn-52m、Co-55、As-72、Br-75、Br-76、Rb-82m、Zr-89 和 Sr-83 的放射性核素。

14. 权利要求 12 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述顺磁离子选自铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(HI)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镝(III)、钬(III)或铒(III)。

15. 权利要求 12 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述荧光标记选自若丹明、荧光素和 renographin。

16. 权利要求 12 的人源化抗 HLA-DR 抗体，其中所述诊断剂是选自钡、泛影葡胺、乙碘油、柠檬酸镓、碘卡明酸、碘西他酸、碘酰胺、iodiparmde、碘沙酸、iogulamide、碘海醇、碘必乐、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘砜葡胺、iosemetic acid、碘酞硫、碘替酸、碘他拉酸、碘托西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影钠、丙碘酮和氯化亚铊的造影剂。

17. 包含权利要求 1-16 的任一项的人源化抗 HLA-DR 抗体或其片段的药物组合物。

18. 权利要求 1-11 的任一项的抗 HLA-DR 抗体或其片段在制备用于治疗白血病或淋巴瘤的药物中的用途。

人源化 L243 抗体

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 3 月 3 日的中国专利申请 200680015286.4“人源化 L243 抗体”的分案申请。

[0002] 与相关申请的交叉参照

[0003] 本申请根据 35U.S.C. § 119(e) 要求于 2005 年 3 月 3 日提交的美国临时专利申请序列号 60/657,695 的优先权。上述申请因此为了所有目的整体引入作为参考。

技术领域

[0004] 本发明涉及针对由鼠单克隆抗体 L243 识别的表位的人源化抗体。在一个实施方案中，本发明涉及用于制备并使用此类抗体的组合物和方法。特别地，本发明提供了人源化单克隆抗体 hL243，其对主要组织相容性复合物 (MHC) 的 HLA 基因簇 D 区中编码的人白细胞抗原 (HLA) 是特异性的，在其他情况下称为 HLA-DA。该抗体抑制 HLA-DR^+ 细胞的增殖并且诱导 TNF 分子的表达和释放。

背景技术

[0005] 在人中，主要组织相容性复合物 (MHC) 是在染色体 6 上的人白细胞抗原 (HLA) 基因簇，其分成称为 D、B、C 和 A 的区域。D 区包含 II 类蛋白质的基因，所述 II 类蛋白质参与免疫系统细胞之间的合作和相互作用。D 区已涉及许多疾病，包括大多数自身免疫病。

[0006] 一种抗体 L243（下文称作 mL243）是鼠 IgG2a 抗 -HLA-DR 抗体。这种抗体在疾病例如自身免疫病的治疗中通过靶向小鼠 HLA 基因的 D 区可能具有潜在用途。mL243 证实有效抑制体外免疫功能并且对于所有 HLA-DR 是单态的。然而，给人类患者施用小鼠抗体存在问题，例如诱导人抗小鼠抗体 (HAMA) 应答。存在具有 mL243 的抗原特异性、可以施用于人类受试者的抗体的需要。

发明内容

[0007] 本发明的一个实施方案提供了对由鼠单克隆抗体 mL243 识别的表位具有特异性的重组人源化抗体分子。这种表位可以是依赖于 DR-α 链的抗原决定簇。依照这个实施方案，抗体可以是人源化 CDR- 移植抗体。

[0008] 例如，在一个实施方案中，对由鼠单克隆抗体 mL243 识别的表位具有特异性的人源化抗体分子具有抗原结合位点，其中可变结构域的至少一个互补性决定区 (CDRs) 来源于小鼠单克隆抗体 mL243(MAbL243) 并且人源化抗体分子的其余免疫球蛋白来源的部分来源于人免疫球蛋白或其类似物。在本发明的一个具体实施方案中，人源化抗体的所有 3 个重和轻链 CDRs 来源于 mAb mL243。在本发明的另一实施方案中，人源化抗体分子可以缀合至效应物或报道分子。

[0009] 在一个例子中，本发明提供了具有重链可变结构域的人源化 L243 抗体，其中可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区以及一个或多个构架残基 27、38、46、68 和 91 来自小鼠单克隆抗体 mL243 重链，并且免疫球蛋白构架结构域的其余部分来自一条或多条人重链。依照

这个例子，抗体可以结合 HLA-DR$^+$ 细胞上的 HLA-DR 的至少一个表位，并且增加细胞杀伤。在一个具体实施方案中，细胞杀伤可以增加，其中对于杀伤而言既不需要细胞毒性附加物也不需要免疫效应物机制。

[0010] 在本发明的另一实施方案中，人源化 L243 抗体可以包括轻链可变结构域，其中可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区以及一个或多个构架残基 37、39、48 和 49 来自小鼠单克隆抗体 mL243 轻链，并且免疫球蛋白构架结构域的其余部分来自一条或多条人轻链。依照这个实施方案，抗体可以结合 HLA-DR* 细胞上的 HLA-DR 的至少一个表位，并且增加细胞杀伤。在一个具体实施方案中，细胞杀伤可以增加，其中对于杀伤而言既不需要细胞毒性附加物也不需要免疫效应物机制。

[0011] 在本发明的另一实施方案中，人源化 L243 抗体可以包括重链可变结构域和轻链可变结构域，其中重链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区以及一个或多个构架残基 27、38、46、68 和 91 来自小鼠单克隆抗体 mL243 重链，并且免疫球蛋白构架结构域的其余部分来自一条或多条人重链。依照这个实施方案，人源化 L243 抗体可以包括重链可变结构域和轻链可变结构域，其中轻链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3 区以及一个或多个构架残基 37、39、48 和 49 来自小鼠单克隆抗体 mL243 轻链，并且免疫球蛋白构架结构域的其余部分来自一条或多条人轻链。此外，抗体可以结合 HLA-DR$^+$ 细胞上的 HLA-DR 的至少一个表位，并且增加细胞杀伤。在一个具体实施方案中，细胞杀伤可以增加，其中对于杀伤而言既不需要细胞毒性附加物也不需要免疫效应物机制。

[0012] 在本发明的一个实施方案中，如上所述的任何一种抗体可以在药物组合物中使用。依照这个实施方案，包括本文所述的一种或多种抗体的药物组合物可以包含如下文所述的另外治疗剂。

[0013] 此外，本发明中的一个实施方案提供核酸分子，其编码如下所述的公开的一种或多种抗体组合物、缀合物和融合蛋白。还可包括包含这些核酸的表达载体和宿主细胞。

[0014] 依照这些实施方案，可以包括用于制备抗体的方法，例如使用在合适的生长培养基中培养的宿主细胞用于产生抗体。

[0015] 在本发明的一个实施方案中，本发明公开的一种或多种抗体为了治疗和 / 或诊断目的可以在药物组合物中使用。例如，一种或多种抗体可以在治疗或药物组合物中施用于需要此类治疗的受试者（例如具有免疫病例如自身免疫病的受试者）。

[0016] 在本发明的一个更具体的实施方案中，人源化 L243 抗体具有重链可变结构域，其具有图 4 中所示序列和 / 或具有轻链可变结构域，其具有图 3 中所示序列。

[0017] 在另一实施方案中，药物组合物可以进一步包含一种或多种另外的结合分子，其特异性结合一种或多种选自下列的抗原 :CD4、CDS、CDS、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD66(a,b,c,d)、CD74、CD80、CD126、CD138、CD154、B7、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、1a、HM1.24、腱生蛋白、VEGF、EGFR、CEA、CSAp、ILGF、胎盘生长因子、Her2/neu、碳酸酐酶 IX、IL-6、SI00、MART-1、TRP-1、TRP-2、gp100、淀粉状蛋白及其组合，其中另外的结合分子在本文公开的包含人源化 L243 抗体组合物和 / 或抗体的递送媒介物的任何药物组合物之前、同时或之后给予。

[0018] 在一个实施方案中，用于给需要此类治疗的受试者施用的药物组合物可以包含人源化 L243 抗体和一种或多种肽、脂质、聚合载体、胶粒、纳米微粒、或其组合 ;和一种或多种

效应物。

[0019] 本发明公开的一种或多种方法可以用于治疗疾病，包括但不限于 B 细胞非霍奇金淋巴瘤、B 细胞急性和慢性淋巴细胞白血病、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、急性和慢性髓细胞白血病、T 细胞淋巴瘤和白血病、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、癌、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤和皮肤癌。癌可以选自口腔、胃肠道、呼吸道、乳腺、卵巢、前列腺、子宫、膀胱、胰腺、肝、胆囊、皮肤和睾丸癌。此外，一种或多种公开的方法可以用于治疗自身免疫病，例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、皮肌炎、西德纳姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨 - 舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、阿狄森氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化、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、斯耶格伦氏综合征、原发性胆汁性肝硬变、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎 / 皮肌炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎 / 多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球性肾炎、牛皮癣、或纤维化肺泡炎。

[0020] 在一个实施方案中，本发明的药物组合物可以用于治疗具有白血病的受试者，所述白血病例如慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病或急性髓细胞白血病。

[0021] 在一个实施方案中，本发明的药物组合物可以用于治疗具有代谢病例如淀粉样变性、或神经变性疾病例如阿尔茨海默氏病的受试者。此外，本发明的药物组合物可以用于治疗具有免疫失调病症的受试者。

[0022] 本发明的其他目的、特征和优点由于下列详细描述将是显而易见的。然而，应当理解说明本发明优选实施方案的详细描述和具体实施例只为了举例说明而给出，因为本发明的精神和范围内的各种改变和修饰由于这个详细描述对于本领域技术人员将是显而易见的。

附图说明

[0023] 下列附图构成本说明书的一部分并且被包括以进一步证实本发明的某些实施方案。通过参照这些附图中的一个或多个，结合本文呈现的具体实施方案的详细描述可以更好地理解实施方案。

[0024] 图 1（以及 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2）举例说明了小鼠抗 -HLA-DR 抗体 L243 的 VK 的示例性 DNA 编码和氨基酸序列。推定的 CDR 区是有下划线和标明的。核苷酸残基顺次进行编号。对于氨基酸残基使用 Kabat 的 Ig 分子编号。关于含有字母（在顶部）的残基的编号是前面残基的号码加字母，例如关于 N52 后的 T 的号码是 52A ；关于 82 后的 N、N 和 L 的号码分别是 82A、82B 和 82C。

[0025] 图 2（以及 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4）举例说明了小鼠抗 -HLA-DR 抗体 L243 的 VH 的示例性 DNA 编码和氨基酸序列。推定的 CDR 区是有下划线和标明的。核苷酸残基顺次进行编号。如上所述对于氨基酸残基使用 Kabat 的 Ig 分子编号。

[0026] 图 3（以及 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6）举例说明了人源化 L243VR 的示例性 DNA

和氨基酸序列。氨基酸序列的粗体和下划线区段表明如 Kabat 编号方案定义的 CDRs。

[0027] 图 4(以及 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8)举例说明了人源化 L243VH 的示例性 DNA 和氨基酸序列。氨基酸序列的粗体和下划线区段表明如 Kabat 编号方案定义的 CDRs。

[0028] 图 5(以及 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12)举例说明了人 RF-TS3 和 NEWM(构架 4)、鼠 L243 和 hL243VH 链的示例性氨基酸序列比对。圆点表明等同于 RF-TS3 或 NEWM 中的相应残基的 L243 及其人源化版本中的残基。长划表示引入的缺口以帮助比对。方框表示 CDR 区。hL243 的 N 和 C 末端残基(有下划线的)通过使用分段载体固定。因此,L243 的相应末端残基不与人 VH 序列的该残基进行比较。

[0029] 图 6(以及 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16)举例说明了人 REI、鼠 L243 和 hL243VK 链的示例性氨基酸序列比对。圆点表明等同于 REI 中的相应残基的 L243 中的残基。长划表示引入的缺口以帮助比对。方框表示 CDR 区。hL243 的 N 和 C 末端残基(有下划线的)通过使用分段载体固定。因此,L243 的相应末端残基不与人序列的该残基进行比较。使用 Kabat 的编号方案。

[0030] 图 7 举例说明了 hL243 的示例性抗原结合特异性。与或不与饱和浓度的 mL234(用于封闭细胞表面抗原(“Ag”位点)一起预孵育的 Raji 细胞重悬浮于包含 1% BSA 和 10μg/ml 纯化的 hL243 的 PBS 中并于 4℃孵育 1 小时。洗涤后,细胞重悬浮于包含 1% BSA 和 PE- 标记的山羊抗人 IgG-Fc 片段特异性抗体的 PBS 中。于 4℃进一步孵育 30 分钟后,细胞在 Guava PCA 中计数。(A) 显示 hL243 与 Raji 人淋巴瘤细胞(红色迹线)的特异性结合,其通过将细胞与 mL243(蓝色迹线)一起预孵育来封闭。(B) 是在相等条件下用抗 -CEA 抗体 (hMN-14) 代替 hL243 进行的阴性结合对照。

[0031] 图 8 举例说明了在竞争性细胞表面结合测定法中比较 hL243γ4P 和 mL243 的示例性 Ag- 结合亲和力。固定量 (100,000cpm,~10uCi/ug) 的 ^{125}I- 标记的 mL234(A) 或 hL243γ4P(B) 与各种浓度 (0.2-700nM) 的未标记的 hL243γ4P(A) 或 mL2343(•)混合。将混合物加入 Raji 细胞中并于室温孵育 2 小时。洗涤细胞以去除未结合的抗体并计数与细胞相关的放射性。hL243γ4P 和 mL234 显示彼此竞争结合细胞表面 Ag。在 2 种情况下 hL243γ4P 看起来比 mL243 更强烈地结合 Raji 细胞。

[0032] 图 9 举例说明了通过直接细胞表面饱和结合和斯卡恰特作图分析测定的 hL243γ4P 和 mL243 的示例性 Ag- 结合亲和力。各种浓度的 ^{125}I- 标记的 mL234(》)或 hL243γ4P(A) 与 2x10^{5}Daudi 人淋巴瘤细胞一起于 4℃孵育 2 小时,并且通过洗涤从细胞悬浮液中去除未结合的放射性。计数细胞相关放射性,计算放射标记的抗体与细胞表面抗原的特异性结合,并随后应用斯卡恰特作图分析以测定最大结合位点数目 / 细胞和表观抗原结合亲和常数 :mL234 或 hL243γ4P 与 Daudi 细胞表面的最大结合是 6x10^6 分子 / 细胞 ;关于 mL234 或 hL243γ4P 测定的解离常数分别为 14 和 2.6nM。

[0033] 图 10 举例说明了示例性 h243 在人血清补体的存在下有效杀伤靶细胞 :Daudi 细胞在人血清补体的存在下与 hL243、hL243γ4P、hA20(阳性对照)和 hMN-14(阴性对照)一起孵育。hL243γ4P 显示不产生任何补体诱导的细胞毒性。

[0034] 图 11 举例说明了如对于 hL243、hL243γ4P、hA20(阳性对照)和 1hMN-14(阴性对照)观察到的示例性 LDH 释放 (A) 和通过 ADCC 的细胞裂解% (B)。

[0035] 图 12A-B 举例说明了在 2 天结束时关于 Daudi 和 Raji 细胞系的示例性体外增殖

测定。

[0036] 图 13A-B 举例说明了在 3 天结束时关于 Daudi 和 Raji 细胞系的示例性体外增殖测定。

[0037] 图 14 举例说明了注射了 hL243γ4P 的荷瘤 SCID 小鼠的示例性平均存活时间。

[0038] 图 15 举例说明了由 L243、hL243(IgG4 同种型)、hMN-14(人源化 MN-14IgG) 和 Ag8(鼠骨髓瘤来源的 mAb) 引起的狗淋巴瘤细胞凋亡的示例性比较诱导(测量为具有亚 GO/G1 期 DNA 含量的细胞%)。L243 和 hL243 当分别与山羊抗小鼠 (GAM) 和山羊抗人 (GAH) 抗体交联时引起凋亡。

[0039] 图 16A-B 举例说明了如通过 3H- 胸苷摄取测定法测定的,含或不含山羊抗人 IgG(GAH) 的人源化抗体 (hLL1、hLL2,利妥希玛、hA20、hMN-14 和 hL243(IgG4 同种型)) 对 Namalwa 人 B 细胞淋巴瘤细胞系的示例性抗增殖效应。

[0040] 图 17 举例说明了 hL243γ4P 相对于亲本鼠 L243 的结合特征。

[0041] 图 18 举例说明了当暴露于本文公开的各种抗体时在 Raji、Ramos 和 Namalwa 细胞系中的 CDC 测定。

[0042] 图 19 举例说明了当 SU_DHL-6 细胞暴露于本文公开的各种抗体时的 ADCC 测定和钙黄绿素 AM 释放。

[0043] 图 20A 和 20B 举例说明了 hL243γ4P 对本文公开的几种细胞系的抗增殖效应。A. MTT 研究和 B. ^{3}H- 胸苷摄取测定法。在 B. 的轴标记中,hL243 指 γ4P 形式。

[0044] 图 21A 和 21B 举例说明了由空白表示的凋亡死细胞的诱导以及以实心举例说明的凋亡细胞。A. 在 SU-DHL-6 和 Namalwa 细胞中测量的 Sub GODNA 和 B. 在 4 和 24 小时时的膜联蛋白 V/7-ADD。使用的细胞在处理前具有 97%的存活率。

[0045] 图 22 举例说明了在几种细胞系中使用 JC-1 测定法测得的线粒体膜电位。

[0046] 图 23A、23B 和 23C 举例说明了在 Daudi 细胞中研究的切割的胱天蛋白酶 -3(A) 和 P-AKT(B) 时间过程。

[0047] 图 24 举例说明了使用鼠 L243 和 L243γ4P 治疗荷有 Raji 的 SCID 小鼠。

具体实施方式

[0048] 在下列部分中,描述了几种方法以详述本发明的各种实施方案。对于本领域技术人员显而易见的是实践各种实施方案不需要采用本文概述的所有或甚至某些具体细节,而是通过常规实验法可以修饰浓度、时间和其他具体细节。在某些情况下,众所周知的方法或组分未包括在说明书中以便防止不必要地掩盖各种实施方案。

[0049] 在本发明的一个实施方案中,提供了结合 HLA-DR 的人源化小鼠抗体。在一个具体实施方案中,可以提供人源化 mL243 抗体,其结合 HLA-DR 但与相应的鼠抗体比较具有减少的免疫原性。依照这个实施方案,抗体可以抑制表达 HLA-DR 分子的细胞例如淋巴瘤细胞增殖(或诱导细胞杀伤)。可替代地,本文公开的抗体可以用于结合靶分子并增加细胞杀伤的可能性。提供了包含抗体的药物组合物和治疗与 HLA-DR^{+} 细胞增殖相关的疾病的方法。

[0050] mL243 是先前由 Lampson 和 Levy(J. Immunol. (1980)125293) 描述的单克隆抗体。抗体的轻和重链可变区的氨基酸序列在图 1 和 2(以及分别的 SEQ. ID. 1 和 2) 中显示。mL243 已保藏在美国典型培养物保藏中心,Rockville,MD,保藏号为 ATCC HB55。

[0051] 在接下来的说明书中，可以使用许多术语并且提供下列定义以帮助理解本发明。

[0052] 除非另有说明，“一个”或“一种”指“一个或多个”。

[0053] 如本文说明书使用的，“受试者”可以包括但不限于哺乳动物例如人，或哺乳动物例如狗、猫、雪貂、兔、猪、马或牛。

[0054] “抗体依赖细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是细胞介导的反应，其中表达 Fc 受体的非特异性细胞毒性细胞（自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞）识别靶细胞上的结合抗体并随后引起靶细胞裂解。用于介导 ADCC 的主要细胞是自然杀伤细胞（只表达 FcDRIII）和单核细胞（表达 FcDRI、FcDRII 和 FcDRIII）。

[0055] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在补体的存在下靶的裂解。补体活化途径通过补体系统的第一种组分 (Clq) 结合与相关抗原复合的分子（例如抗体）起始。

[0056] “Fc 受体”或“FcR”用于描述结合抗体的 Fc 区的受体。CDC 和 ADCC 都需要 MAb 的 Fc 部分并且 ADCC 的效应可以通过增加对效应细胞上的 FcyR(IgG Fc 受体）的结合亲和力而增强 (Shinkawa，等人，J. Biol. Chem. 278 :3466-3473，2003 ；Shields 等人，J. Biol Chem. 211 ：26733-26740，2002 ；Shields 等 人，J. Biol. Chem. 276 :6591-6604，2002 ；Davies 等 人，Biotechnol. Bioeng. 74 :288-294，2001 ； 和 Umana 等 人，Nature Biotechnol. 176-180，1999)。“效应细胞”指能够执行效应细胞功能的任何类型的细胞。众所周知的是具有不同的专门免疫功能的效应细胞基于其广泛多样的细胞表面抗原的差异表达可以彼此区分开，所述细胞表面抗原例如可以与结合结构域多肽特异性结合的本文描述的许多抗原。效应细胞包括但不限于能够直接介导活性的任何细胞，所述活性是免疫系统功能的组分，包括天然或由于基因工程而具有此类能力的细胞。效应细胞包括免疫球蛋白的细胞表面受体，例如免疫球蛋白恒定区的受体，并且包括通常称为“Fc 受体”(FcR) 的受体类别。能够介导 ADCC 的细胞是效应细胞的例子。其他例子包括自然杀伤 (NK) 细胞、肿瘤浸润性 T 淋巴细胞 (TIL)、细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和粒细胞例如包括过敏应答机制的细胞。效应细胞还影响造血源的细胞包括在骨髓样和淋巴样细胞系中各种分化阶段上的细胞，以及可能（但不必）表达一种或多种类型的功能性细胞表面 FcR 的细胞，例如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、红细胞和此类细胞的前体、祖细胞（例如造血干细胞）、静止、活化和成熟形式。其他效应细胞可以包括能够介导免疫功能的非造血起源的细胞，例如内皮细胞、角质化细胞、成纤维细胞、破骨细胞、上皮细胞及其他细胞。免疫效应细胞还可包括介导细胞毒性或细胞抑制事件，或胞吞、吞噬或胞饮事件的细胞，或实现凋亡诱导、或实现微生物免疫或中和微生物感染的细胞，或介导过敏、炎症、超敏和 / 或自身免疫反应的细胞。

[0057] “抑制生长”的抗体是在体外和 / 或体内抑制病变细胞生长的抗体。通过抑制病变细胞的生长，减少 S 期中的细胞百分比。在体外约 0.5μg/mL-20μg/mL 的抗体浓度下以及在成人患者中约 0.5mg/kg-15mg/kg 的剂量下，通过本发明抗体的生长抑制优选百分比可以大于 20％，优选大于 50％。

[0058] 如本文使用的“抗体”指全长（即天然存在或通过正常免疫球蛋白基因片段重组方法形成的）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。术语“抗体”还包括“人源化”抗体和甚至通过噬菌体展示、基因和染色体转染方法以及其他方法可以产生的全人抗体。该术语还包括单克隆抗体、多克隆

抗体、多价抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）。

[0059] “免疫原应答”或“抗原应答”是在合适的细胞已与其接触后导致产生针对化合物的抗体的应答。用于诱发免疫原应答的化合物称为免疫原或抗原。在免疫原应答中产生的抗体特异性结合用于诱发应答的免疫原。

[0060] 用于诱发免疫原应答的化合物称为免疫原或抗原。“表位”或“抗原决定簇”是刺激针对表位的特异性免疫应答的免疫原表面上的区域。在蛋白质特别是变性蛋白中，表位一般由邻接氨基酸序列定义和表示。然而，在非变性蛋白的情况下，表位还包括结构例如活性位点，其通过蛋白质三维折叠以这样的方式形成使得来自蛋白质氨基酸序列的分离部分的氨基酸达到彼此紧密的物理接触。

[0061] 天然存在的（野生型）抗体分子是由 4 条多肽链 -2 条相同的重链和 2 条相同的轻链组成的 Y 型分子，所述多肽链通过二硫键共价连接在一起。2 种类型的多肽链都具有恒定区和可变区，所述恒定区在同类（即 IgA、IgM 等）抗体中不会改变或最低程度地改变。可变区对于特定抗体是独特的并且包括表位的识别元件。重和轻链的羧基末端区域在序列中是保守的并且称为恒定区（也称为 C 结构域）。氨基末端区域（也称为 V 结构域）在序列中是可变的并且负责抗体特异性。抗体主要通过位于其 V 结构域中的 6 个短互补性决定区 (CDRs) 特异性识别并结合抗原。

[0062] 抗体的每条轻链与一条重链缔合，并且 2 条链通过每条链的羧基末端区域中的半胱氨酸残基之间形成的二硫桥进行连接，这是构成其抗原结合结构域部分的每条链的氨基末端区域的远侧。抗体分子通过在称为绞链区的区域中 2 条重链之间的二硫桥进一步稳定，在更接近重链羧基末端的位置而不是在重和轻链之间形成二硫桥的位置。绞链区还提供了抗体的抗原结合部分的柔性。

[0063] 抗体的抗原结合特异性可以通过其位于轻和重链的氨基末端区域中的可变区决定。轻链和缔合的重链的可变区形成识别特异性表位的“抗原结合结构域”；抗体因此具有 2 个抗原结合结构域。野生型抗体中的抗原结合结构域针对免疫原性蛋白质的相同表位，并且单个野生型抗体因此能够同时结合 2 个免疫原性蛋白质分子。因此，野生型抗体是单特异性（即针对独特的抗原）和二价的（即能够结合 2 个抗原分子）。

[0064] “多克隆抗体”在针对具有许多表位的蛋白质的免疫原应答中产生。多克隆抗体的组合物（例如血清）因此包括针对蛋白质内的相同和不同表位的各种不同抗体。用于生产单克隆抗体的方法是本领域已知的（参见，例如 Cooper 等人，Section III of Chapter11in :Short Protocols in Molecular Biology，2nd Ed.，Ausubel 等人，eds.，John Wiley 和 Sons，New York，1992，第 11-37-11-41 页）。

[0065] “抗肽抗体”（也称为“单特异性抗体”）在针对短（一般为 5-20 个氨基酸）免疫原性多肽的体液应答中产生，所述短免疫原性多肽对应其来源的蛋白质的少数（优选一个）分离表位。许多抗肽抗体包括针对蛋白质的特定部分，即针对包含至少一个，优选只有一个表位的氨基酸序列的各种不同抗体。用于生产抗肽抗体的方法是本领域已知的（参见，例如Cooper 等人，Section III of Chapter11in :Short Protocols in Molecular Biology，2nd Ed.，Ausubel 等人，eds.，John Wiley 和 Sons，New York，1992，第 11-42-11-46 页）。

[0066] “单克隆抗体”是识别免疫原性蛋白质的单个特异性表位的特异性抗体。在多数单克隆抗体中，每个抗体分子等同于多数中的其他分子。为了分离单克隆抗体，首先鉴

别表达、展示和/或分泌特定单克隆抗体的克隆细胞系；这种克隆细胞系可以在生产本发明抗体的一种方法中使用。用于制备克隆细胞系和由此表达单克隆抗体的方法是本领域已知的（参见，例如 Fuller 等人，Section II of Chapter11in：Short Protocols in Molecular Biology，2nd Ed.，Ausubel 等人，eds.，John Wiley 和 Sons，New York，1992，第 11-22-11-11-36 页）。

[0067] “裸抗体”是不包含另外修饰例如与毒素或用于结合放射性核素的螯合物缀合的完整抗体分子。裸抗体的 Fc 段可以提供效应物功能，例如补体结合和 ADCC（抗体依赖性细胞毒性），其实行可以导致细胞裂解的机制。参见，例如 Markrides，Therapeutic inhibition of the complement system，Pharmacol. Rev. 50：59-87，1998。在一个实施方案中，抗体的治疗作用可能需要 Fc 区的效应物功能（参见，例如 Golay 等人，Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20monoclonal antibody rituximab in vitro：CD55and CD59regulate complement-mediated cell lysis，Blood95：3900-3908，2000）。

[0068] 在另一实施方案中，Fc 段可能不需要，或者在某些情况下对于受试者的治疗性处理是需要的。依照这个实施方案，可能引起其他机制例如凋亡。Vaswani 和 Hamilton，Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. Ann. Allergy Asthma Immunol. 81：105-119，1998。

[0069] “抗体片段”是完整抗体的一部分例如 F(ab′)a、F(ab)2、Fab′、Fab、Fv、sFv 等。不管结构如何，抗体片段结合由全长抗体识别的相同抗原。例如，抗 CD20 单克隆抗体片段结合 CD20 的表位。术语“抗体片段”还包括通过结合特异性抗原以形成复合物如同抗体一样起作用的任何合成或基因改造的蛋白质。例如，抗体片段包括由可变区组成的分离的片段，例如由重和轻链可变区组成的“Fv”片段，轻和重链可变区通过肽接头连接的重组单链多肽分子（“scFv 蛋白质”），和由模拟超变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。

[0070] 通过野生型抗体的限制性蛋白水解产生的抗体片段称为蛋白水解的抗体片段。这些包括，但不限于，下列：通过抗体有限地暴露于蛋白水解酶例如胃蛋白酶或无花果蛋白酶从抗体中释放的“$F(ab')_2$ 片段”。$F(ab')_2$ 片段包括 2 个“臂”，其中每一个包括针对并特异性结合共同抗原的可变区。2 个 Fab′ 分子通过重链绞链区中的链间二硫键连接；Fab′ 分子可以针对相同（二价）或不同（双特异性）表位。

[0071] “Fab^1 片段”包含单个抗原结合结构域，其包括 Fab 和通过绞链区的另外的重链部分。

[0072] “Fab′-SH 片段”一般由 F(ab′)2 片段产生，其通过 F(ab′)2 片段中的 H 链之间的二硫键结合在一起。用温和型还原剂例如，作为非限制性例子的 β-巯基乙胺处理断裂二硫键，并且从一个 $F(ab')_2$ 片段中释放出 2 个 Fab′ 片段。Fab′-SH 片段是单价和单特异性的。

[0073] “Fab 片段”（即包含抗原结合结构域并包括通过二硫键桥接的轻链和一部分重链的抗体片段）通过木瓜蛋白酶消化完整抗体产生。方便的方法是使用固定在树脂上的木瓜蛋白酶从而使得酶可以容易地去除并终止消化。Fab 片段不含有在 F(ab′)2 片段中存在的 H 链之间的二硫键。

[0074] “单链抗体”是一种类型的抗体片段。术语单链抗体通常缩写为“scFv”或“sFv”。

这些抗体片段使用分子遗传学和重组 DNA 技术产生。单链抗体由包括 VH 和 VL 结构域的多肽链组成，其相互作用以形成抗原结合位点。VH 和 VL 结构域通常通过 10-25 个氨基酸残基的肽连接。

[0075] 术语“单链抗体”进一步包括但不限于，2 个单链抗体（其中每一个可以针对不同表位）通过二硫键连接在一起的二硫键连接的 Fv(dsFv)；不同特异性的 2 个分离的 scFvs 使用肽接头连接的双特异性 sFv；双抗体 (diabody)（当第一个 sFv 的 VH 结构域与第二个 sFv 的 VL 结构域装配，并且第一个 sFv 的 VL 结构域与第二个 sFv 的 VH 结构域装配时形成的二聚 sFv；双抗体的 2 个抗原结合区可以针对相同或不同表位）；和三抗体 (triabody)（以类似于双抗体的形式形成的三聚 SFv，但其中 3 个抗原结合结构域在单个复合物中产生；3 个抗原结合结构域可以导向相同或不同表位）。

[0076] “互补决定区肽”或“CDR 肽”是另一种形式的抗体片段。CDR 肽（也称为“最小识别单位”）是对应单个互补性决定区 (CDR) 的肽，并且可以通过构建编码目的抗体的 CDR 的基因来制备。此类基因可以例如通过使用聚合酶链式反应合成来自抗体产生细胞的 RNA 的可变区来制备。参见，例如，Larrick 等人，Methods：A Companion to Methods in Enzymology2：106，1991。

[0077] 在“半胱氨酸修饰的抗体”中，半胱氨酸氨基酸通过基因操作在抗体表面上插入或置换并用于将抗体经由例如二硫桥缀合至另一种分子。关于抗体的半胱氨酸置换或插入已得到描述（参见美国专利号 5,219,996）。用于将 Cys 残基导入 IgG 抗体的恒定区中，用于在抗体的位点特异性缀合中使用的方法由 Stimmel 等人 (J. Biol. Chem275：330445-30450，2000) 描述。

[0078] “人源化抗体”是用于减少非人蛋白质量的重组蛋白质，其中 CDRs 来自一个物种的抗体，例如啮齿类动物抗体，例如使用蛋白质工程技术以啮齿类动物抗体的重和轻可变链交换为某些人重和轻可变结构域。抗体分子的恒定结构域来源于人抗体。参见 Gussow 和 Seemann，Humanization of monoclonal antibodies，Method Enzymol. 203：99-121，1991 以及 Vaswani 和 Hamilton，Ann. Allergy Asthma Immunol. 81：105-119，1998。

[0079] 抗体片段的生产

[0080] 所要求的方法和 / 或组合物的某些实施方案可以涉及抗体片段。此类抗体片段可以通过常规方法经由胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体获得。例如，抗体片段可以通过使用胃蛋白酶酶促切割抗体产生以提供称为 $F(ab')_2$ 的 5S 片段。这种片段可以使用硫醇还原剂切割和任选地使用由二硫键切割产生的巯基的阻断基进一步切割，以产生 3.5S Fab′ 单价片段。可替代地，使用胃蛋白酶酶促切割产生 2 个单价 Fab 片段和 Fc 片段。用于生产抗体片段的示例性方法在美国专利号 4,036,945；美国专利号 4,331,647；Nisonoff 等人，1960，Arch. Biochem. Biophys.，89：230；Porter，1959，Biochem. J.，73：119；Edelman 等人，1967，Methods in Enzymology，第 422 页 (Academic Press)，和 Coligan 等人 (eds.)，1991，Current Protocols in Immunology，(John Wiley&Sons) 中公开。

[0081] 切割抗体的其他方法，例如分离重链以形成单价轻 - 重链片段，进一步切割片段或其他酶促、化学或基因技术也可以使用，只要片段结合由完整抗体识别的抗原。例如，Fv 片段包括 V_H 和 V_L 链的缔合。这种缔合可以是非共价的，如 Inbar 等人，1972，Proc. Nat′ l. Acad. Sci. USA，69：2659 中描述的。可替代地，可变链可以通过分子间二硫键连接或通过化

学试剂例如戊二醛交联。参见 Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.,12 :437。

[0082] 优选地,Fv 片段包括通过肽接头连接的 V_H 和 V_L 链。这些单链抗原结合蛋白 (sFv) 通过构建包括 DNA 序列的结构基因来制备,所述 DNA 序列编码通过寡核苷酸接头序列连接的 V_H 和 V_L 结构域。结构基因插入表达载体中,所述表达载体随后引入宿主细胞例如大肠杆菌中。重组宿主细胞合成含有桥接 2 个 V 结构域的接头肽的单个多肽链。用于生产 sFvs 的方法是本领域众所周知的。参见 Whitlow 等人,1991,Methods :A Companion to Methods in Enzymology2 :97 ;Bird 等人,1988, Science,242 :423 ;美国专利号 4,946,778 ;Pack 等人,1993,Bio/Technology,11 :1271,和 Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.,12 :437。

[0083] 另一种形式的抗体片段是编码单个互补性决定区 (CDR) 的肽。CDR 肽 (“最小识别单位”) 可以通过构建编码目的抗体的 CDR 的基因获得。此类基因例如通过使用聚合酶链式反应合成来自抗体产生细胞的 RNA 的可变区来制备。参见 Larrick 等人,1991,Methods :A Companion to Methods in Enzymology2 :106 ;Ritter 等人 (eds.),1995, Monoclonal Antibodies :Production, Engineering and Clinical Application, 第 166-179 页 (Cambridge University Press) ;Birch 等 人, (eds.),1995, Monoclonal Antibodies :Principles and Applications,第 137-185 页 (Wiley-Liss, Inc.)。

[0084] 在一个实施方案中,人源化抗体可以连接至效应物或报告分子。例如,用于螯合重金属原子的大环,或毒素例如蓖麻毒素,可以通过共价桥接结构附着至人源化抗体。可替代地,重组 DNA 技术的操作可以用于生产人源化抗体分子,其中完整抗体分子的 Fc 片段、Cu3 或 Cn2 结构域已由功能性非免疫球蛋白蛋白质例如酶或毒素分子代替或已通过肽键附着到其上。

[0085] 在本发明的另一实施方案中,人源化抗体可以包括具有全长重和轻链的完整抗体分子 ;其片段,例如 Fab、Fab′ 、F(ab′)2 或 Fv 片段 ;单链抗体片段,例如单链 Fv、轻链或重链单体或二聚体 ;包括通过连接结构彼此结合的 2、3、4 或更多个抗体或其片段的多价单特异性抗原结合蛋白 ;或具有与 MAb mL243 一样的特异性的这些或任何其他分子中任何一种的片段或类似物。在一个具体实施方案中,抗体可以包括具有全长重和轻链的完整抗体分子。

[0086] 人源化 L243 抗体

[0087] 嵌合和人源化抗体

[0088] 嵌合抗体是人抗体的可变区已由例如包括小鼠抗体互补性决定区 (CDRs) 的抗 -L243 小鼠抗体的可变区代替的重组蛋白。嵌合抗体当施用于受试者时显示减少的免疫原性和增加的稳定性。用于构建嵌合抗体的方法是本领域众所周知的 (例如,Leung 等人,1994,Hybridoma13 :469)。

[0089] 嵌合单克隆抗体可以通过将来自小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链的小鼠 CDRs 转移到人抗体的相应可变结构域中进行人源化。嵌合单克隆抗体的小鼠构架区 (FR) 同样用人 FR 序列代替。为了保持人源化单克隆的稳定性和抗原特异性,一个或多个人 FR 残基可以由小鼠对应物残基代替。人源化单克隆抗体可以用于受试者的治疗性处理。人源化抗体对靶的亲和力还可以通过 CDR 序列的选择性修饰来增加 (WO0029584A1)。用于生产人源化单克隆抗体的技术是本领域众所周知的。(参见,例如, Jones 等人,1986, Nature,321 :522 ;Riechmann 等人, Nature,1988,332 :323 ;Verhoeyen 等人,1988, Science,239 :1534 ;

Carter 等人,1992, Proc.Nat′ l Acad.Sci.USA,89 :4285 ;Sandhu, Crit.Rev.Biotech.,1992,12 :437 ;Tempest 等人,1991, Biotechnology9 :266 ;Singer 等人, J.Immun.,1993,150 :2844.)

[0090] 其他实施方案可以涉及非人灵长类动物抗体。用于在狒狒中产生治疗上有用的抗体的一般技术可以在例如 Goldenberg 等人, WO91/11465(1991),和 Losman 等人, Int.J.Cancer46 :310(1990) 中找到。

[0091] 在另一实施方案中,抗体可以是人单克隆抗体。此类抗体从转基因小鼠中获得,所述转基因小鼠已工程化以响应抗原攻击产生特异性人抗体。以这种技术将人重和轻链基因座的元件引入来源于胚胎干细胞系的小鼠品系中,其包含内源性重链和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可以合成对人抗原特异的人抗体并且小鼠可以用于生产分泌人抗体的杂交瘤。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法由 Green 等人, Nature Genet.7 :13(1994), Lonberg 等人, Nature368 :856(1994),和 Taylor 等人, Int.Immun.6 :579(1994) 描述。

[0092] 在一个实施方案中,人源化抗体可以包括在人抗体构架序列内的 mL243 的 CDR 区序列并且含有人抗体恒定区序列。更具体而言,人源化抗体可以包括在 CDR1(31-35)、CDR2(50-65) 和 CDR3(95-102) 上都包含 mL243VH 残基的重链可变结构域 (VH)。在另一实施方案中,轻链可变结构域 (VL) 的 CDRs 在 CDR1(24-34)、CDR2(50-56) 和 CDR3(89-97) 上都对应 mL243VL 残基。在本发明的另一具体实施方案中,在人源化设计中保留的其他鼠 L243VH 残基在一个或多个下列位置上 :F27、K38、K46、A68 和 F91。类似地,在人源化设计中保留的 VL 中的鼠 L243 残基在一个或多个下列位置上 :R37、K39、V48、F49 和 G100。

[0093] 关于同时保留原始非人抗体的抗原特异性的人源化抗体序列的进一步细节例如在 2001 年 11 月 16 日提交的美国专利申请号 09/988,013 中公开,其完整文本引入本文作为参考。

[0094] 在一个实施方案中,本发明进一步提供了具有可变区结构域的 CDR- 移植的人源化抗体重链,其包括来源于亚类 I 的人重链的受体构架和来源于 mL243 供体的抗原结合区,其中构架在 F27、K38、K46、A68 和 F91 中的一个或多个位置上包括 mL243 供体残基。分别参见图 3 和 4。

[0095] 在本发明的一个实施方案中,可以提供具有可变区结构域的 CDR- 移植的人源化抗体轻链,其包括来源于亚类 I 的人 κ 轻链的受体构架和 mL243 供体的抗原结合区,其中构架在 R37、K39、V48、F49 和 G100 中的一个或多个位置上包括 mL243 供体残基。

[0096] 在本发明实施方案的 CDR- 移植的人源化抗体分子中,其余非 -L243 免疫球蛋白来源 (受体) 部分可以来源于任何合适的人免疫球蛋白,条件是人源化抗体可以折叠使得它保留特异性结合 HLA-DR 的能力。优选地,使用的人构架 (FR) 的类型具有与供体抗体相同 / 相似的分类 / 类型。

[0097] 在本发明的一个实施方案中,可以选择人构架以最大化与供体抗体序列的同源性,特别是在空间靠近或邻近 CDRs 的位置上。依照这个实施方案,人源化 L243VH 或 VL 的构架 (即 FR1-4) 可以来源于人抗体的组合。可以用于构建 CDR- 移植抗体的人构架的例子是 LAY、POM、TUR、TEI、KOL、NEWM、REI、RF 和 EU ;优选地对于重链使用人 RF-TS3FR1-3 和 NEWM FR4,并且对于轻链使用 REI FR1-4。本文使用的 V 结构域残基编号系统在 Kabat 等人, (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Edition, United

States Department of Health and Human Services 中描述。关于人 RF-TS3(FR1-3 和 NEWM FR4)、mL243 和 hL243VH 链的比较性氨基酸序列比对参见图 5。关于人 REI、mL243 和 hL243VL 链的比较性氨基酸序列比对参见图 6。

[0098] 适当时人源化抗体分子的轻和重链可变结构域可以融合至人轻或重链恒定结构域（除非另有说明术语“重链恒定结构域”包括绞链区）。存在的人源化抗体分子的人恒定结构域可以针对提议的抗体功能进行选择。在一个实施方案中，人恒定结构域可以基于效应物功能的缺乏进行选择。融合至重链可变区的重链恒定结构域可以是人 IgA(al 或 a2 链）、IgG(71,72、j3 ＞或 y4 链）或 IgM(u 链）的那些。优选使用人 y 链。可以融合至轻链可变区的轻链恒定结构域包括人 λ 和 k 链。

[0099] 在本发明的一个具体实施方案中，使用 y1 链。在本发明的再一具体实施方案中，使用 ɣ 4 链。y4 链的使用在某些情况下可以增加受试者中 hL243 的耐受性（减少的副作用和输液反应，更大的耐受性等）。

[0100] 在一个实施方案中，可以使用人恒定结构域的类似物。这些包括但不限于与相应的人结构域比较包含一个或多个额外的氨基酸的那些恒定结构域，或其中相应的人结构域的一个或多个现有氨基酸已删除或改变的那些恒定结构域。此类结构域可以通过例如寡核苷酸定向诱变获得。

[0101] 如本文使用的，术语‘改变的’当与抗体结合补体的能力一起使用时指与开始未改变的抗体比较抗体结合补体的能力减少。改变合适的氨基酸可以改变抗体结合补体的能力。如本文使用的，短语‘基本上’减少补体结合指人补体结合优选少于或等于使用野生型抗体可见的水平的 30％，更优选少于或等于 20％，并且最优选少于或等于 10％。

[0102] 改变的补体结合能力可以通过本领域众所周知的技术产生，例如删除残基、在分子中的合适位置上插入糖基化位点，或交换不同同种型抗体的低级绞链区。

[0103] 编码 HL243 抗体的基因的制备

[0104] 本领域已知的任何分子生物学标准技术可以用于制备编码根据本发明的抗体的 DNA 序列。例如，DNA 序列可以使用寡核苷酸合成技术完全或部分合成。适当时可以使用定点诱变和聚合酶链式反应 (PCR) 技术。合适的方法包括如例如“PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification”(1989)，Ed.H.A.Erlich，Stockholm Press，N.Y.，London，中描述的 PCR 链重叠操作和 PCR 诱变，以及寡核苷酸定向诱变 (Kramer 等人，Nucleic.Acid.Res.129441(1984))。

[0105] 任何分子生物学标准技术还可以用于制备编码 CDR- 移植产物的 DNA 序列。例如，DNA 序列可以使用寡核苷酸合成技术完全或部分合成。适当时可以使用定点诱变和聚合酶链式反应 (PCR) 技术。可以使用先存在的可变结构域区的寡核苷酸定向合成 (Jones 等人 (1986)Nature321522-525) 和寡核苷酸定向诱变 (Verhoeyen 等人 (1988) Science231534-1536)。还可以使用利用 T4DNA 聚合酶的酶促填入有缺口的寡核苷酸 (Queen 等人 (1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA8610029-10033)。任何合适的宿主细胞 / 表达载体系统可以用于表达编码嵌合或 CDR- 移植的重和轻链的 DNA 序列。“重组宿主”可以是包含克隆载体或表达载体的任何原核或真核细胞。这个术语还包括那些原核或真核细胞，以及已进行基因工程化以在宿主细胞的染色体或基因组中包含克隆基因的转基因动物。可以有利地使用细菌例如大肠杆菌和其他微生物系统，特别用于表达抗体片段，例如 Fv、Fab

或 Fab' 片段和单链抗体片段，例如单链 Fvs。还可使用真核宿主例如哺乳动物细胞表达系统获得根据本发明的抗体，特别用于生产较大的嵌合或 CDR- 移植抗体产物。合适的哺乳动物宿主细胞包括骨髓瘤细胞，例如 Sp2/0 和 NSO 细胞，以及中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞，杂交瘤细胞系和对于表达抗体有用的其他哺乳动物细胞。

[0106] 如本文使用的“表达载体”是包括在宿主细胞中表达的目的基因的 DNA 分子。一般地，基因表达置于某些调节元件的控制下，所述调节元件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。此类基因可以说是与调节元件“可操作地连接”。在进一步的方面，一个实施方案还包括编码本发明抗体的重和轻链的 DNA 序列、包含这些 DNA 序列的克隆和表达载体、用这些 DNA 序列转化的宿主细胞、以及用于生产重或轻链和抗体分子的方法，包括在转化的宿主细胞中表达这些 DNA 序列。

[0107] 编码人免疫球蛋白序列的 DNA 可以通过本领域已知的任何方法获得。例如，优选的人受体构架例如 -LAY、POM、KOL、REI、EU、TUR、TEI、RF 和 NEWM 的氨基酸序列是广泛可用的。类似地，人轻和重链亚类的共有序列也是可用的。技术人员知道多个密码子序列可以编码相同氨基酸，并且在各种实施方案中公开的核酸序列可以用编码相同氨基酸序列的可替代序列取代。技术人员还知道取决于用于从核酸序列表达蛋白质的细胞系的物种来源，密码子选择可以优化以增强在所选择的物种中的表达。此类物种优选的密码子频率是本领域众所周知的。

[0108] 在一个实施方案中，本文公开的抗体可以是完整抗体，或如上文说明的，其片段、单体或二聚体或多价单特异性抗原结合蛋白。因此，本发明的一个进一步的方面，可以提供包括通过连接结构彼此结合的 2、3、4 或更多个抗体或其片段的多价单特异性抗原结合蛋白，这种蛋白质不是天然免疫球蛋白，所述抗体或片段中的每一个具有对于由鼠 MAb L243 识别的表位的特异性，所述抗原结合蛋白任选地与效应物或报道分子缀合。

[0109] 依照这些实施方案，每种抗体或片段可以是人源化抗体或如上文定义的其片段，并且多价单特异性抗原结合蛋白可以是人源化多价单特异性抗原结合蛋白。然而，可以考虑非人源化例如鼠多价单特异性抗原结合蛋白并且一个实施方案可以延伸至其中可应用的这些。

[0110] 在一个具体实施方案中，多价抗原结合蛋白可以提供通过连接结构彼此结合的 2、3、或 4 种抗体或其片段。在另一实施方案中，用于生产人源化抗体的方法可以包括 ：i) 在表达载体中生产编码包括可变结构域的抗体重或轻链的 DNA 序列，其中可变结构域的至少一个 CDRs 可以来源于 mL243MAb 并且抗体链的其余免疫球蛋白来源部分来源于人免疫球蛋白 ；ii) 在表达载体中生产编码包括可变结构域的互补抗体轻或重链的 DNA 序列，其中可变结构域的至少一个 CDRs 来源于 MAb mL243 并且抗体链的其余免疫球蛋白来源部分可以来源于人免疫球蛋白 ；iii) 用上述 DNA 序列转染宿主细胞 ；和 iv) 培养转染的细胞系以生产人源化抗体分子。

[0111] 重组 hL243 在宿主细胞中的生产

[0112] 在一个实施方案中，用于生产重组 hL243 的宿主细胞系可以用 2 种载体转染，第一种载体包含编码轻链来源的多肽的 DNA 序列，并且第二种载体包含编码重链来源的多肽的 DNA 序列。优选地，除去涉及的编码序列和可选标记。载体是相同的，以便尽可能确保每条多肽链相等地表达。转染可以通过本领域技术人员已知的任何技术进行。参见例如

Maniatis等人(1982)(Molecular Cloning,Cold Spring Harbor,New York)以及Primrose和Old(1980)(Principles of Gene Manipulation,Blackwell,Oxford)。用于转染的一种具体技术可以是电穿孔。其他例子包括磷酸钙介导的转染、阳离子-脂质介导的转染等。在一个可替代的实施方案中,可以使用单个载体,该载体包括编码轻链和重链来源的多肽的DNA序列以及可选标记。

[0113] 用于生产包含抗体片段的重组融合蛋白的一般方法

[0114] 编码识别特异性表位的抗体片段的核酸序列可以通过本领域众所周知的技术获得。例如,分泌所需特异性抗体的杂交瘤可以用于获得编码抗体的DNA,所述DNA可以使用已知技术例如通过PCR或通过传统cDNA克隆技术进行制备。可替代地,可以构建Fab′表达库或抗体噬菌体展示文库以筛选具有所需特异性的抗体片段。

[0115] 编码抗体片段的核酸随后可以直接或经由编码肽间隔物的序列连接至编码DDD或AD的核酸。生产编码这些类型的融合蛋白的核酸序列的方法是本领域众所周知的并且在下面的实施例中进一步讨论。

[0116] 在另一实施方案中,另外的氨基酸残基可以加入由A/DDD或B/AD组成的模块亚单位的N或C末端,其中确切的融合位点可以取决于是DDD还是AD附着至N或C末端(或在内部位置上)。另外的氨基酸氨基可以包括肽标记、信号肽、细胞因子、酶(例如,前药激活酶)、激素、毒素、肽药物、膜相互作用肽或其他功能性蛋白质。

[0117] 蛋白质或肽可以完全或部分地在溶液中或在固体支持物上依照常规技术合成。各种自动合成仪是商购可得的并且可以依据已知规程使用。参见,例如Stewart和Young,(1984,Solod Phase Peptide Synthesis,2d.ed.,Pierce Chemical Co.);Tam等人,(1983,J.Am.Chem.Soc.,105:6442);Merrifield,(1986,Science,232:341-347);以及Barany和Merrifield(1979,The Peptides,Gross and Meienhofer,eds.,Academic Press,New York,第1-284页)。通常为约6直至约35-50个氨基酸的短肽序列可以通过此类方法容易地合成。可替代地,可以采用重组DNA技术,其中编码目的肽的核苷酸序列插入表达载体中,转化或转染到合适的宿主细胞中,并在适合于表达的条件下培养。

[0118] 用于在所需宿主细胞中生产重组蛋白的方法是本领域众所周知的。为了促进纯化,稳定束缚结构可以包含合适的肽标记,例如FLAG序列或聚HIS序列,以促进其使用相关亲和柱纯化。

[0119] 在一个实施方案中,Fv片段可以包含通过肽接头连接的V_H和V_L链。这些单链抗原结合蛋白(sFv)通过构建包括DNA序列的结构基因来制备,所述DNA序列编码通过寡核苷酸接头序列连接的V_H和V_L结构域。结构基因插入表达载体中,所述表达载体随后引入宿主细胞例如大肠杆菌中。重组宿主细胞合成含有桥接2个V结构域的接头肽的单个多肽链。用于生产sFvs的方法是本领域众所周知的。参见Whitlow等人,1991,Methods:A Companion to Methods in Enzymology2:97;Bird等人,1988,Science,242:423;美国专利号4,946,778;Pack等人,1993,Bio/Technology,11:1271,和Sandhu,1992,Crit.Rev.Biotech.,12:437。

[0120] 另一种形式的抗体片段是编码单个互补决定区(CDR)的肽。CDR肽(“最小识别单位”)可以通过构建编码目的抗体的CDR的基因获得。此类基因例如通过使用聚合酶链式反应合成来自抗体产生细胞的RNA的可变区来制备。参见Larrick等人,1991,Methods:

A Companion to Methods in Enzymology2 :106 ;Ritter 等人 (eds.),1995, Monoclonal Antibodies :Production, Engineering and Clinical Application, 第 166-179 页 (Cambridge University Press) ;Birch 等 人, (eds.),1995, Monoclonal Antibodies Principles and Applications,第 137-185 页 (Wiley-Liss, Inc.)。

[0121] 用于表达稳定束缚结构的构成亚单位的合适宿主细胞或细胞系是本领域技术人员已知的。人宿主细胞的使用使得任何表达的分子能够以人糖基化模式进行修饰。然而,这并不表示人宿主细胞对于公开的方法是必需或优选的。

[0122] 双特异性抗体和缀合物

[0123] 在某些实施方案中,本文公开的 L243 配体可以与附着至配体的另一种分子组合使用。附着可以是共价的或非共价的。在某些实施方案中,L243 配体可以附着至双特异性抗体,即具有 2 个不同结合位点的抗体 - 一个针对 L243 配体并且另一个针对疾病相关靶抗原。可以靶向与血管发生、癌、转移或细胞运动性相关的任何疾病或状况,包括但不限于,原发癌、转移癌、增生、类风湿性关节炎、炎性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、肉状瘤病、哮喘、水肿、肺高压、肿瘤组织的形成和发展、牛皮癣、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、角膜移植物排斥、新生血管性青光眼、心肌血管发生、斑块内新生血管形成、再狭窄、血管创伤后新内膜形成、毛细血管扩张、血友病关节、血管纤维瘤、慢性炎症相关的纤维化、肺纤维化、深静脉血栓形成和伤口肉芽肿。用于构建和使用双特异性和多特异性抗体的方法在例如 2/11/2004 提交的美国专利申请公开号 20050002945 中公开,其完整文本引入本文作为参考。

[0124] 当双特异性抗体部分靶向针对肿瘤相关抗原时,预期还可以这样靶向任何类型的肿瘤和任何类型的肿瘤抗原。可以靶向的示例性肿瘤类型包括急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓源白血病、胆囊癌、乳癌、子宫颈癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管、胃、头和颈癌、霍奇金氏淋巴瘤、肺癌、甲状腺髓样癌、非霍奇金氏淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、神经胶质瘤、黑素瘤、肝癌、前列腺癌和膀胱癌。优选的是具有 L243 组成型表达或可以被刺激生产 L243 的肿瘤。

[0125] 各种重组方法可以用于生产双特异性抗体和抗体片段。例如,双特异性抗体和抗体片段可以在转基因家畜的乳中生产。(参见,例如, Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63 : 141-147, 1998 ;美国专利号 5,827,690,各自引入本文作为参考。)制备分别包含编码成对的免疫球蛋白重和轻链的 DNA 区段的 2 种 DNA 构建体。将片段克隆到包含启动子序列的表达载体中,所述启动子序列优先在哺乳动物上皮细胞中表达。例子包括但不限于,来自兔、牛和羊酪蛋白基因,牛 α - 乳球蛋白基因,羊 β - 乳球蛋白基因和小鼠乳清酸蛋白基因的启动子。优选地,插入的片段在其 3′ 侧与来自乳腺特异性基因的同源基因组序列侧面相接。这提供了聚腺苷酸化位点和转录物稳定序列。将表达盒共注射到哺乳动物受精卵的原核中,其随后植入受体雌性动物的子宫中并允许妊娠。出生后,通过 DNA 分析在后代中筛选 2 种转基因的存在。为了使抗体存在,重和轻链基因必须同时在同一细胞中表达。使用本领域已知的标准免疫性方法分析来自转基因雌性动物的乳中抗体或抗体片段的存在和功能性。抗体可以使用本领域已知的标准方法从乳中纯化。

[0126] 预靶向

[0127] 用于使用双特异性抗体的一种策略包括预靶向方法,其中效应分子例如抗血管生

成或抗肿瘤配体在双特异性抗体已施用后施用于受试者。包括 L243 配体的结合位点和患病组织的位点的双特异性抗体定位于患病组织并增加效应物 L243 配体定位于患病组织的特异性（美国专利申请号 20050002945）。因为效应分子可以比双特异性抗体快得多地从循环中清除，所以当使用预靶向策略时与效应分子直接连接至疾病靶向抗体时比较正常组织可以减少暴露于效应分子。

[0128] 已开发预靶向方法以增加检测或治疗剂的靶：背景比率。预靶向和生物素 / 抗生物素蛋白方法的例子在例如 Goodwin 等人，美国专利号 4,863,713；Goodwin 等人，J. Nucl. Med. 29：226，1988；Hnatowich 等 人，J. Nucl. Med. 28：1294，1987；Oehr 等 人，J. Nucl. Med. 29：728，1988；Klibanov 等 人，J. Nucl. Med. 29：1951，1988；Sinitsyn 等 人，J. Nucl. Med. 30：66，1989；Kalofonos 等 人，J. Nucl. Med. 31：1791，1990；Schechter 等人，Int. J. Cancer48：167，1991；Paganelli 等人，Cancer Res. 51：5960，1991；Paganelli 等人，Nucl. Med. Commun. 12：211，1991；美国专利号 5,256,395；Stickney 等人，Cancer Res. 51：6650，1991；Yuan 等人，Cancer Res. 51：3119，1991；美国专利号 6,077,499；美国序列号 09/597,580；美国序列号 10/361,026；美国序列号 09/337,756；美国序列号 09/823,746；美国序列号 10/116,116；美国序列号 09/382,186；美国序列号 10/150,654；美国专利号 6,090,381；美国专利号 6,472,511；美国序列号 10/114,315；美国临时申请号 60/386,411；美国临时申请号 60/345,641；美国临时申请号 60/3328,835；美国临时申请号 60/426,379；美国序列号 09/823,746；美国序列号 09/337,756；和美国临时申请号 60/342,103 中描述，所有这些引入本文作为参考。

[0129] 在某些实施方案中，双特异性抗体和可靶向构建体可以具有治疗和 / 或使正常或患病组织和器官成像的用途，例如使用美国专利号 6,126,916；6,077,499；6,010,680；5,776,095；5,776,094；5,776,093；5,772,981；5,753,206；5,746,996；5,697,902；5,328,679；5,128,119；5,101,827；和 4,735,210 中描述的方法，各自引入本文作为参考。另外的方法在 1999 年 6 月 22 日提交的美国申请序列号 09/337,756 和 2001 年 4 月 3 日提及的美国申请序列号 09/823,746 中描述。

[0130] hL243 的治疗和诊断用途

[0131] 在另一实施方案中，本发明还提供了包含本发明实施方案的抗体的治疗和诊断组合物。此类组合物可以包括根据本发明的抗体连同药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体，例如用于体内使用。

[0132] “治疗剂”是与抗体部分分开、同时或顺次施用，或缀合至抗体部分，即抗体或抗体片段、或亚片段的分子或原子，并且在疾病治疗中有用。治疗剂的例子包括抗体、抗体片段、药物、毒素、酶、核酸酶、激素、免疫调节剂、寡核苷酸、干扰 RNA、螯合剂、硼化合物、光敏剂或染料和放射性同位素。

[0133] “诊断 / 检测剂”是与抗体部分，即抗体或抗体片段，或亚片段，连接或缀合施用的分子或原子，并通过定位包含抗原的细胞在疾病的诊断或检测中有用。有用的诊断 / 检测剂包括但不限于，放射性同位素、染料（例如含有生物素 - 链霉亲和素复合物）、造影剂、荧光化合物或分子和用于核磁共振成像 (MRI) 的增强剂（例如顺磁离子），以及微粒或脂质体作为用于超声成像的试剂的例子。超声增强剂在美国专利申请 US20040219203A1 和 US20050014207A1 中公开，并且因此整体引入作为参考。优选的是充气脂质体。参

见 Maresca, G 等 人, Eur J. Radiol. Suppl2S171-178(1998) ;Demos, Sm. 等 人 J. Drug Target5507-518(1998) ;和 Unger, E. 等人, Am J. Cardiol. 8158G-61G(1998)。可替代地,双特异性抗体可以用于靶向脂质体。在一个此类实施方案中,脂质体是二价 DTPA- 肽共价附着至脂质体脂质膜外表面的充气脂质体。美国专利申请 US20040018557A1 公开了此类脂质体,并整体引入作为参考。

[0134] 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整体引入作为参考。在一个具体方法中,诊断 / 检测剂可以选自放射性同位素、用于在核磁共振成像中使用的增强剂、超声剂和荧光化合物。为了给抗体组分装上放射性金属或顺磁离子,可能必须使其与具有长尾部的反应物反应,所述长尾部附着多个螯合基团用于结合离子。此类尾部可以是聚合物例如聚赖氨酸、多糖或具有侧基的其他衍生或可衍生的链,所述侧基可以结合螯合基团例如乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、卟啉、多胺、冠醚、双缩氨基硫脲、聚肟、以及已知对这个目的有用的相似基团。螯合物可以使用标准化学偶联至抗体。螯合物可以通过基团连接至抗体,这使得能够与分子形成键,伴随免疫反应性最低限度地丧失和最小的聚集和 / 或内部交联。用于缀合螯合物与抗体的其他更罕见的方法和反应物在名称为“Antibody Conjugates”、1989 年 4 月 25 日授权给 Hawthorne 的美国专利 4,824,659 中公开,所述专利的公开内容整体引入本文作为参考。在另一具体实施方案中,有用的金属 - 螯合物组合可以包括与一般能量范围为 60-4,000keV 的诊断同位素一起使用的 2- 苄基 -DTPA 及其一甲基和环己基类似物,所述同位素例如 ^{125}1、^{131}1、^{123}1、^{124}I、^{62}Cu、^{M}Cu、^{18}F、^{in}1n、^{67}Ga ;^{68}Ga、〃〃〃 Tc、^{94m}Tc、^{H}C、^{13}N、^{15}0、^{76}Bt、^{97}Zr,用于放射成像。同一螯合物当与非放射性金属例如锰、铁和钆复合时可以用于 MRI(当连同本文公开的任何抗体一起使用时)。大环螯合物例如 NOTA、DOTA 和 TETA 具有与各种金属和射电金属一起使用的用途,最特别的是分别与镓、钇和铜的放射性核素一起使用。此类金属 - 螯合物复合物可以通过修整环大小以适于目的金属来稳定。本文的实施方案涵盖了其他环型螯合物例如大环聚醚,其对于稳定结合核素是有利的,例如 ^{223}Ra 对于 RAIT。

[0135] 治疗剂的例子包括但不限于抗体、抗体片段、药物,包括化学治疗剂、毒素、酶、酶 - 抑制剂、核酸酶、激素、激素拮抗剂、免疫调节剂、细胞因子、螯合剂、硼化合物、铀原子、光敏剂和放射性核素。

[0136] 有用的诊断 / 检测剂包括但不限于,放射性同位素、染料 (例如含有生物素 - 链霉亲和素复合物)、不透射线的材料 (例如碘、钡、镓和钆化合物等)、造影剂、荧光化合物或分子和用于核磁共振成像 (MRI) 的增强剂 (例如顺磁离子)。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整体引入作为参考。优选地,诊断 / 检测剂选自用于核成像、手术中和内窥镜检查的放射性同位素 ;用于在核磁共振成像或超声检查法中使用的增强剂 ;用于 X 射线和计算机断层摄影术的造影和造影剂 ;和用于荧光透视法包括内窥镜荧光透视法的荧光化合物。

[0137] 用于本公开内容目的的化学治疗剂包括所有已知的化学治疗剂。已知的化学治疗剂包括但不限于紫杉烷、氮芥、氮丙啶衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲、三氮烯、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物、反义寡核苷酸、转录因子的拮抗剂或抑制剂、干扰 RNAs、生物碱、抗生素、酶、铂配位复合物、COX-2 抑制剂、凋亡剂、取代的尿素、甲肼衍生物、肾上腺皮质抑制剂、或拮抗剂。在一个更具体的实施方案中,化学治疗剂可以包括类固醇、黄体酮、

雌激素、抗雌激素或雄激素。在另一具体实施方案中，化学治疗剂可以包括放射菌素、阿扎立平、阿纳托唑、氮杂胞苷、博来霉素、苔藓抑素 -1、白消安、卡莫司汀、希乐葆、苯丁酸氮芥、顺铂、依立替康 (CPT-11)、卡铂、克拉屈滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、氮烯咪胺、多西他奇、氮烯咪胺、放线菌素 D、道诺红霉素、地塞米松、二乙基己烯雌酚、多柔比星、乙炔基雌二醇、磷雌氮芥、依托泊苷、5- 氟脱氧尿苷、氟达拉滨、氟他胺、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、吉西他滨、己酸羟孕酮、羟基脲、依达比星、异磷酰胺、L- 天冬酰胺酶、亚叶酸、罗莫司汀、二氯甲基二乙胺、乙酸甲羟孕酮、乙酸甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、米托蒽醌、rnithramycin、丝裂霉素、米托坦、奥沙利铂、丁酸苯酯、泼尼松、甲基苄肼、紫杉醇、喷司他丁、司莫司汀链唑霉素、SN-38、它莫西芬、紫杉烷、紫杉酚、丙酸睾酮、沙立度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、替尼泊苷、托泊替康、尿嘧啶氮芥、长春碱、长春瑞滨或长春新碱。

[0138] 某些合适的化学治疗剂在Remington's Pharmaceutical Sciences19th Ed.(Mack Publishing Co.1995) 中描述。其他合适的化学治疗剂例如实验性药物是本领域技术人员已知的。

[0139] 在本发明的一个实施方案中，毒素可以包括但不限于蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶、DNA 酶 I、葡萄球菌肠毒素 A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素或假单胞菌内毒素。

[0140] 在本发明的一个实施方案中，酶也是有用的治疗剂并且可以选自下列组，包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ -V- 类固醇异构酶、酵母醇脱氢酶、a- 磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、p- 半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、过氧化氢酶、6- 磷酸葡萄糖脱氢酶、葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

[0141] 如本文使用的，术语“免疫调节剂”包括细胞因子，干细胞生长因子，淋巴毒素例如肿瘤坏死因子 (TNF)，和造血因子例如白介素 (例如白介素 -1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18 和 IL-21)、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、以及促红细胞生成素和血小板生成素。合适的免疫调节剂部分的例子包括 IL-2、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素 -y、TNF-a 等。可替代地，受试者可以接受干扰素组合物和分开施用的细胞因子，所述细胞因子可以在本文公开的组合物施用之前、同时或之后施用。本发明的实施方案可以包括缀合至免疫调节剂的组合物。

[0142] 为了本公开内容的目的，细胞因子包括任何细胞因子，包括但不限于 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21、干扰素 -α、干扰素 -β 和干扰素 -γ。它还可以是集落刺激因子，例如 GM-CSF、G-CSF、促红细胞生成素、血小板生成素等。

[0143] 此外，螯合剂可以包括但不限于 DTP A、DOTA、TETA 或 NOTA 或合适的肽，可检测的标记例如荧光分子、或细胞毒性剂例如重金属或放射性核素可以与其缀合。例如，治疗上有用的免疫缀合物可以通过将光敏剂或染料缀合至抗体复合材料获得。本文预期荧光组合物例如荧光染料、和其他色原体、或染料例如对可见光敏感的卟啉，已通过将合适的光导向损伤而检测和治疗损伤。在治疗中，这已称为光辐射、光疗法或光动力疗法 (Jori 等人 (eds.)，Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases(Libreria Progetto, 1985) ;van den Bergh, Chem.Britain22 :430,1986)。此外，预期用于实现光疗法、与光敏

化染料偶联的单克隆抗体可以用于本文的诊断或治疗目的。Mew 等人，J. Immunol. 130：1473，1983；idem.，Cancer Res. 45：4380，1985；Oseroff 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA83：8744，1986；idem.，Photochem. Photobiol. 46：83，1987；Hasan 等人，Prog. Clin. Biol. Res. 288：471，1989；Tatsuta 等人，Lasers Surg. Med. 9：422，1989；Pelegrin 等人，Cancer67：2529，1991。然而，这些初期研究不包括使用内窥镜治疗应用，特别是伴随抗体片段或亚片段的使用。因此在一个实施方案中本文预期的是包括光敏剂或染料的免疫缀合物的治疗用途。因此，本治疗方法可以包含包括光敏剂或染料的免疫缀合物的治疗用途。内窥镜检查方法和疗法在美国专利号 4,932,412；5,525,338；5,716,595；5,736,119；5,922,302；6,096,289；和 6,387,350 中描述，所述专利整体引入本文作为参考。

[0144] 在本发明的一个实施方案中，可以使用核素。在一个具体实施方案中，本文预期的是具有有用的诊断或治疗特性的放射性核素，例如分别为铟 -111 或钇 -90。其他有用的核素包括但不限于，F-18、P-32、Sc-47、Cu-62、Cu-64、Cu-67、Ga-67、Ga-68、Y-86、Y-90、Zr-89、Tc-99m、Pd-109、Ag-111、In-111、I-123、I-125、1-131、Sm-153、Gd-155、Gd-157、Tb-161、Lu-177、Re-186、Re-188、Pt-197、Pb-212、Bi-212、Bi-213、Ra-223、Ac-225、As-72、As-77、At-211、Au-198、Au-199、Bi-212、Br-75、Br-76B、C-11、Co-55Co、Dy-166、Er-169、F-18、Fe-52、Fe-59、Ga-67、Ga-68、Gd-154-158、Ho-166、1-120、1-121、1-124、In-110、In-111、M194、Lu-177、Mn-51、Mn-52、Mo-99、N-13、O-15、P-32、P-33、Pb-211、Pb-212、Pd-109、Pm-149、Pr-142、Pr-143、Rb-82、Re-189、Rh-105、Sc-47、Se-75、Sr-83、Sr-89、Tb-161、Tc-94、Tc-99、Y-86、Y-90 或 Zr-89。例如，合适的诊断性放射性核素包括但不限于 In-110、In-111、Lu-177、F-18、Fe-52、Cu-62、Cu-64、Cu-67、Ga-67、Ga-68、Y-86、Zr-89、Tc-94m、Tc-94、Tc-99m、I-120、I-123、I-124、I-125、I-131、Gd-154-158、P-32、C-11、N-13、O-15、Re-186、Re-188、Mn-51、Mn-52m、Co-55、As-72、Br-75、Br-76、Rb-82m、Zr-89 和 Sr-83。典型的诊断性放射性核素发射 25-10,000keV 的粒子和 / 或正电子。

[0145] 另外，合适的治疗性放射性核素包括但不限于 In-111、Lu-177、Bi-212、Bi-213、At-211、Cu-62、Cu-64、Cu-67、Y-90、1-125、1-131、P-32、P-33、Sc-47、Ag-111、Ga-67、、Pr-142、Sm-153、Tb-161、Dy-166、Ho-166、Re-186、Re-188、Re-189、Pb-212、Ra-223、Ac-225、Fe-59、Se-75、As-77、Sr-89、Mo-99、Rh-105、Pd-109、Pr-143、Pm-149、Er-169、Ir-194、Au-198、Au-199、Ac-225 和 Pb-211。典型的治疗性阳离子发射 20-10,000keV 的粒子和 / 或正电子。

[0146] 有用的 β- 粒子 - 发射核素的最大衰变能量优选是 20-5,000keV、更优选 100-4,000keV、并最优选 500-2,500keV。还优选的是基本上伴随俄歇 - 放射粒子的衰变的放射性核素。例如，Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、1-125、Ho-161、Os-189m 和 Ir-192。有用的俄歇 - 粒子 - 发射核素的衰变能量优选＜ 1,000keV、更优选＜ 100keV、并最优选＜ 70keV。还优选的是基本上伴随 α- 粒子产生而衰变的放射性核素。此类放射性核素包括但不限于：Dy-152、At-211、Bi-212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213 和 Fm-255。有用的 α- 粒子 - 发射放射性核素的衰变能量优选 2,000-10,000keV、更优选 3,000-8,000keV、并最优选 4,000-7,000keV。

[0147] 其他有用的治疗剂包括金属，例如作为光动力疗法一部分的那些，和核素，例如在基于中子捕获操作的治疗中有价值的那些。特别地，锌、铝、镓、镥和钯对于光动力疗法有用

并且 B-10、Gd-157 和 U-235 对于中子俘获疗法有用。

[0148] 在一个实施方案中，金属可以用作诊断剂，包括用于核磁共振成像技术的那些。这些金属包括但不限于：钆、锰、铁、铬、铜、钴、镍、镝、铕、钐、钬和铥。为了给抗体组分装上放射性金属或顺磁离子，可能必须使其与具有长尾部的反应物反应，所述长尾部附着多个螯合基团用于结合离子。例如此类尾部可以是聚合物例如多聚赖氨酸、多糖或具有侧基的其他衍生或可衍生的链，所述侧基可以结合螯合基团例如乙二胺四乙酸 (EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、卟啉、多胺、冠醚、双缩氨基硫脲、聚肟、以及已知对这个目的有用的相似基团。此外，螯合物可以使用标准化学偶联至肽。螯合物可以通过基团连接至抗体，这使得能够与分子形成键，伴随免疫反应性最低限度地丧失和最小的聚集和 / 或内部交联。用于缀合螯合物与抗体的其他方法和反应物在名称为“Antibody Conjugates”、1989 年 4 月 25 日颁发给 Hawthorne 的美国专利 4,824,659 中公开，所述专利的公开内容整体引入本文作为参考。在一个具体实施方案中，有用的金属 - 螯合物组合可以包括与一般能量范围为 20-2,000keV 的诊断同位素一起使用的 2- 苄基 -DTPA 及其一甲基和环己基类似物，所述同位素例如 ^{125}1、^{131}1、^{123}1、^{124}I、^{62}Cu、^{M}Cu、^{18}F、^{in}1n、^{67}Ga；^{68}Ga、〃〃〃 Tc、^{94m}Tc、^{H}C、^{13}N、^{15}0、^{76}Br、^{97}Zr，用于放射成像。同一螯合物当与非放射性金属例如锰、铁和钆复合时可以用于 MRI（当连同本文公开的任何抗体一起使用时）。大环螯合物例如 NOTA、DOTA 和 TETA 可以具有与各种金属和射电金属一起使用的用途，最特别的是分别与镓、钇和铜的放射性核素一起使用。此类金属 - 螯合物复合物可以通过修整环大小至目的金属而变得非常稳定。本文的实施方案涵盖了其他环型螯合物例如大环聚醚，其对于稳定结合核素是有利的，例如 ^{223}Ra 对于 RAIT。

[0149] 在本发明的一个实施方案中，治疗上有用的免疫缀合物可以通过将光敏剂或染料缀合至抗体复合材料获得。荧光和其他色原体、或染料例如对可见光敏感的卟啉，已通过将合适的光导向损伤用于检测和治疗损伤。在治疗中，这已称为光辐射、光疗法或光动力疗法 (Jori 等人 (eds.)，Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases(Libreria Progetto,1985)；van den Bergh，Chem.Britain22：430,1986)。此外，单克隆抗体已与光敏化染料偶联用于完成光疗法。Mew 等人，J.Immunol.130：1473,1983；idem.，Cancer Res.45：4380,1985；Oseroff 等 人，Proc.Natl Acad.Sci.USA83：8744,1986；idem.，Photochem.Photobiol46：83,1987；Hasan 等 人，Prog，Clin.Biol.Res.288：471,1989；Tatsuta 等人，Lasers Surg.Med.9：422,1989；Pelegrin 等人，Cancer67：2529,1991。然而，这些初期研究不包括使用内窥镜治疗应用，特别是伴随抗体片段或亚片段的使用。因此在本发明的一个实施方案中预期包括光敏剂或染料的免疫缀合物的治疗用途。

[0150] 适合于在本发明实施方案中使用的顺磁离子包括但不限于铬 (III)、锰 (II)、铁 (III)、铁 (II)、钴 (II)、镍 (II)、铜 (II)、钕 (HI)、钐 (III)、镱 (III)、钆 (III)、钒 (II)、铽 (III)、镝 (III)、钬 (III) 和铒 (III)，而钆是特别优选的。

[0151] 在其他背景例如 X 射线成像中有用的离子包括但不限于镧 (III)、金 (III)、铅 (II)、和特别是铋 (III)。荧光标记包括若丹明、荧光素和 renographin。若丹明和荧光素通常经由异硫氰酸酯中间体连接。造影和对比材料对于增强 X 射线和计算机断层摄影术有用，并且包括碘化合物、钡化合物、镓化合物、钨化合物等。特异性化合物包括钡、泛影葡胺、乙碘油、柠檬酸镓、碘卡明酸、碘西他酸、碘酰胺、iodiparmde、碘沙酸、iogulamide、碘海醇、

碘必乐、碘番酸、碘普西酸、碘西法酸、碘丝酸、碘砜葡胺、iosemetic acid、碘酞硫、碘替酸、碘他拉酸、碘托西酸、碘克沙酸、羟泛影酸、碘泊酸盐、葡甲胺、甲泛葡胺、甲泛影钠、丙碘酮和氯化亚铊。因此，在另一实施方案中，可以提供包括本文公开的抗体，与药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体组合的治疗、药物或诊断组合物。

[0152] 在本发明的另一实施方案中，可以提供用于制备治疗、药物或诊断组合物的方法，包括将本文公开的抗体连同药学可接受的赋形剂、稀释剂或载体一起混合。

[0153] 抗体和组合物可以根据使用它们的疗法以任何合适的形式和量用于施用。

[0154] 在一个实施方案中，治疗、药物或诊断组合物可以采取用于施用的任何合适的形式，并且优选适合于肠胃外施用的形式，例如通过注射或输注，例如通过快速浓注或持续输注。当产物是用于输注注射时，它可以采取在油或水媒介物中的悬浮液、溶液或乳状液的形式，并且它可以包含配制剂例如悬浮、防腐、稳定和/或分散剂。可替代地，抗体或组合物可以是干燥形式，在使用前用合适的无菌液体重建。

[0155] 本文预期治疗和诊断用途可以包括给人受试者施用有效量的根据本文公开的实施方案的抗体。施用的确切剂量将根据使用的抗体以及患者的年龄、性别和状况而变，但一般可以是约 0.1mg-1000mg，例如约 1mg-500mg。抗体可以作为单次剂量或以连续的方式经过一段时间施用。适当时剂量可以重复。

[0156] 在一个例子中，本文公开的抗体和组合物可以根据使用它们的治疗以任何合适的形式和量用于施用。抗体施用的剂量取决于待治疗状况的性质以及抗体是预防地使用还是用于治疗现有状况。剂量还可根据患者的年龄和状态进行选择。抗体的治疗剂量因此可以是例如优选 0.1-25mg/kg 体重/单次治疗剂量，并且对于单次治疗剂量最优选 0.1-10mg/kg 体重。

[0157] 在一个实施方案中，本文公开的任何抗体可以依照常规实践进行配制用于通过任何合适途径施用，并且一般可以是液体形式（例如溶于无菌的生理学可接受缓冲液的抗体溶液）用于通过例如静脉内、腹膜内、皮下或肌内途径施用。

[0158] 本文预期的“免疫缀合物”是抗体、融合蛋白、或其缀合至至少一种治疗和/或诊断/检测剂的片段。诊断/检测剂可以包括放射性核素或非放射性核素、造影剂（例如用于核磁共振成像、计算机断层摄影术或超声），并且放射性核素可以是 γ-、β-、α-、俄歇电子-或正电子发射同位素。

[0159] 如本文使用的，术语“抗体融合蛋白”是重组生产的抗原结合分子，其中 2 种或多种相同或不同的天然抗体、单链抗体或含有相同或不同特异性的抗体片段区段进行连接。融合蛋白的价态指融合蛋白具有的与抗原或表位结合的臂或位点的总数目；即单价、二价、三价或多价。抗体融合蛋白的多价指它在与抗原的结合中可以利用多重相互作用，从而增加与抗原结合的亲和力。特异性指抗体融合蛋白能够结合多少不同的抗原或表位；即单特异性、双特异性、三特异性、多特异性。使用这些定义，天然抗体例如 IgG 是二价的因为它具有 2 个结合臂，但是是单特异性的因为它结合一种抗原。单特异性、多价的融合蛋白具有对于表位的超过一个的结合位点但只结合在相同抗原上的相同表位，例如具有 2 个与相同抗原反应的结合位点的双抗体。融合蛋白可以包括不同抗体组分的多价或多特异性组合或相同抗体组分的多重拷贝。融合蛋白可以另外包括治疗剂。适合于此类融合蛋白的治疗剂的例子包括免疫调节剂（“抗体-免疫调节剂融合蛋白”）和毒素（“抗体-毒素融合蛋白”）。

一种优选的毒素包括核糖核酸酶 (RNase)，优选重组 RNase。

[0160] 在另一实施方案中，选择性键合可以通过使用异双功能接头例如马来酰亚胺 - 羟基琥珀酰亚胺酯实现。酯与抗体或片段的反应可以衍生抗体或片段上的胺基团，并且衍生物随后可以与例如具有游离巯基的抗体 Fab 片段（或，具有巯基通过例如 Traut 试剂与其附着的较大片段或完整抗体）反应。此类接头较不可能交联相同抗体中的基团并改善键合的选择性。

[0161] 在一个具体实施方案中，本文公开的抗体或片段可以在远离抗原结合位点的位点处连接。这可以通过例如如上所述与切割的链间巯基键合来实现。另一种方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体与具有至少一种游离胺官能团的另一种抗体反应。这产生起始的希夫碱（亚胺）键，所述键优选通过还原为仲胺例如通过硼氢化物还原来稳定，以形成最终产物。对于小分子，此类位点特异性键合在美国专利号 4,671,958 中公开，并且对于较大的附加物在美国专利号 4,699,784 中公开。

[0162] 具有靶特异性的 F(ab′)2 片段的链间二硫桥可以用半胱氨酸还原，避免轻 - 重链键合，以形成 Fab′ -SH 片段。SH 基团可以用过量二 - 马来酰亚胺接头 (1,1′ -15（亚甲基二 -4,1- 亚苯基）二 - 马来酰亚胺激活。

[0163] 在一个实施方案中，本文公开的 hL243 抗体以及具有不同特异性的其他结合分子可以在组合治疗中使用。例如，多特异性抗体可以包括由鼠单克隆抗体 mL243 识别的表位的至少一个结合位点，以及由鼠单克隆抗体 mL243 识别的另一种表位的至少一个结合位点，或另一种抗原。此外，多价抗体（包括对于相同表位或抗原的多个结合位点），或抗体可以是多价和多特异性的。

[0164] 在一个具体实施方案中，结合分子可以是融合蛋白。在一个更具体的实施方案中，融合蛋白可以包含人源化、嵌合、人或鼠 L243 抗体的 4 种或多种 Fvs 或 Fab′ s 或如本文所述的片段。在另一实施方案中，抗体融合蛋白可以包含人源化、嵌合、人或鼠 L243MAb 的 mAbs 或片段的一种或多种 Fvs 或 Fab′ s 或如本文所述的片段。依照这些实施方案，可以包括来自对另一种抗原特异的抗体的一种或多种 Fvs 或 Fab′ s，其对除 HLA 抗原以外的细胞标记是特异的。例如，非 HLA 抗原可以包括选自 B 细胞系抗原的肿瘤标记（例如用于治疗 B 细胞恶性肿瘤的 CD19、CD20 或 CD22）。在另一例子中，非 HLA 抗原还可以在引起其他类型的恶性肿瘤的其他细胞上表达，例如黑素瘤中的 SI00 等。此外，细胞标记可以是非 B 细胞系抗原，例如选自 HLA-DR、CD30、CDS3、CD52、CD66、MUC1 和 TAC。

[0165] 在一个实施方案中，本文公开的 L243 抗体可以与其他抗体组合并用于治疗患有或怀疑发生疾病的受试者。依照这个实施方案，L243 抗体或其组合物可以与抗癌单克隆抗体例如人源化单克隆抗体（例如 hA20(CD20Mab) 组合并用于治疗癌症。在一个更具体的实施方案中，L243 的 HLA-DR 抗体可以与抗癌单克隆抗体（例如 hA20）组合并用于具有或怀疑发生疾病的受试者。本文预期的是 hL243 抗体可以作为分开的抗体组合物与一种或多种其他分开的抗体组合物组合使用，以及作为双功能抗体使用例如 hL243 的一种和 hA20 的另一种。依照这个实施方案，hL243 抗体可以是 hL243 的 HLA-DR。在另一具体实施方案中，疾病可以包括患有此类疾病的受试者中的 B 细胞恶性肿瘤中的靶。B 细胞恶性肿瘤可以由缓慢进展形式的 B 细胞淋巴瘤、迅速进展形式的 B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和多发性骨髓瘤组成。还存在非恶性 B 细胞

病症和相关疾病，例如许多自身免疫和免疫失调疾病，在免疫失调疾病中包括败血症和败血症性休克（还参见 Goldenberg 和 Hansen 于 2004 年 12 月 8 日提交并且整体引入本文的美国临时申请号 60/634,076）。特别地，本文描述的组合物特别用于治疗各种自身免疫病，以及缓慢进展形式的 B 细胞淋巴瘤、迅速进展形式的 B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症，以及其他造血系统恶性肿瘤，例如急性和慢性髓细胞白血病和 T 细胞白血病和淋巴瘤。例如，hL243 抗体组分和免疫缀合物可以优选地用于治疗缓慢进展和迅速进展形式的非霍奇金氏淋巴瘤和淋巴性白血病。

[0166] 可以靶向的肿瘤相关抗原包括但不限于，A3、对 A33 抗体特异的抗原、BrE3- 抗原、CD1、CD1a、CD3、CD5、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD45、CD74、CD79a、CD80、HLA-DR、NCA95、NCA90、HCG 及其亚单位、CEA(CEACAM-5)、CEACAM-6、CSAp、EGFR、EGP-1、EGP-2、Ep-CAM、Ba733、HER2/neu、缺氧诱导的因子 (HIF)、KC4- 抗原、KS-1- 抗原、KS1-4、Le-Y、巨噬细胞抑制因子 (MIF)、MAGE、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-4- 抗原、PSA、PSMA、RS5、S100、TAG-72、p53、腱生蛋白、IL-6、IL-8、胰岛素生长因子 -1(IGF-1)、Tn 抗原、Thomson-Friedenreich 抗原、肿瘤坏死抗原、VEGF、17-1A- 抗原、血管发生标记（例如，ED-B 纤连蛋白）、致癌基因标记、致癌基因产物、和其他肿瘤相关抗原。肿瘤相关抗原的新近报道包括 Mizukami 等人，(2005，Nature Med. 11 :992-97) ；Hatfield 等人，(2005，Curr. Cancer Drug Targets5 :229-48) ；Vallbohmer 等人 (2005，J. Clin. Oncol. 23 :3536-44) 和 Ren 等人 (2005，Ann. Surg. 242 :55-63)，各自引入本文作为参考。

[0167] 此外，本发明的另一实施方案可以包括用于制备免疫缀合物和组合物的双特异性或多特异性抗体。依照这些实施方案，L243 抗体或其片段或抗体融合蛋白可以连接至对癌症标记物质特异的抗体或抗体片段，传染病生物表面上的表位，或血液或其他体液中的有害物质。双特异性和多特异性抗体可以用于诱导各种有害物质的清除。例如，双特异性抗体可以具有对于有害物质例如病原生物的一种或多种特异性，以及对于 HLA-DR、HLA II 类不变链 (ii) 的一种或多种特异性。HLA II 类不变链 (ii) 在 1999 年 5 月 19 日提交、名称为“Therapeutic Using a Bispecific Antibody”的美国序列号 09/314,135 中详细描述，所述专利整体引入本文作为参考。

[0168] 在另一实施方案中，本文公开的免疫缀合物和组合物还可以包括 L243 多价抗体。依照这个实施方案，多价靶结合蛋白可以通过缔合第一种和第二种多肽来构建。第一种多肽可以包括共价连接至第一种免疫球蛋白样结构域的第一种单链 Fv 分子，所述第一种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。第二种多肽可以包括共价连接至第二种免疫球蛋白样结构域的第二种单链 Fv 分子，所述第二种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。第一种和第二种单链 Fv 分子中的每一种形成靶结合位点，并且第一种和第二种免疫球蛋白样结构域缔合以形成第三种靶结合位点。

[0169] 在一个可替代的实施方案中，人源化、嵌合或人 L243 单克隆抗体可以用于生产抗原特异性双抗体、三抗体和四抗体。例如，单特异性双抗体、三抗体和四抗体可以选择性结合靶向的抗原，并且随着分子上的结合位点数目增加，对于靶细胞的亲和力增加并且在所需位置观察到更长的停留时间。对于双抗体，可以使用包括人源化 L243mAb 的 VH 多肽的 2 条链，所述 VH 多肽通过 5 个氨基酸残基的接头连接至人源化 L243mAb 的 VK 多肽。每条链

形成人源化 L243 双抗体的一半。在三抗体的情况下，使用包括人源化 L243mAb 的 VH 多肽的 3 条链，所述 VH 多肽不通过接头连接至人源化 L243mAb 的 VK 多肽。每条链形成 hL243 三抗体的三分之一。

[0170] 在另一实施方案中，本文公开的免疫缀合物和组合物还可以包括功能性双特异性单链抗体 (bscAb)（参见例如，Mack 等人，Proc. Natl. Acad. sci. USA，92 :7021-7025，1995，其引入本文作为参考）。例如，bscAb 可以通过使用重组方法经由甘氨酸 - 丝氨酸接头连接 2 个单链 Fv 片段来产生。2 种目的抗体的 V 轻链 (VL) 和 V 重链 (VH) 结构域可以使用标准 PCR 方法分离。从每种杂交瘤获得的 VL 和 VH cDNA 可以在两步融合 PCR 中连接以形成单链片段。在一个例子中，第一个 PCR 步骤引入 (Gly4-Ser1)3 接头，并且第二个步骤连接 VL 和 VH 扩增子。每种单链分子可以克隆到细菌表达载体中。扩增后，一种单链分子可以切除并亚克隆到包含第二种目的单链分子的其他载体中。随后 bscAb 片段可以亚克隆到真核表达载体中。功能性蛋白质表达可以通过将载体转染到中国仓鼠卵巢细胞中获得。其他双特异性融合蛋白以类似方式制备。双特异性单链抗体和双特异性融合蛋白可以用于制备药物载体。

[0171] 此外，一个实施方案可以包括具有双重特异性的四价串联双抗体（称为 tandab）(Cochlovius 等人，Cancer Research (2000) 60 :4336-4341)。双特异性 tandab 是 2 个相同多肽的二聚体，所述多肽各自包含 2 种不同抗体的 4 个可变结构域 (VH1、VL1、VH2、VL2)，所述可变结构域在方向上连接以促进自身缔合后形成针对 2 种不同特异性中的每一种的 2 个潜在结合位点。

[0172] 在另一实施方案中，缀合的多价 L243 抗体可以用于制备免疫缀合物或组合物。另外的氨基酸残基可以加至第一种或第二种多肽的 N 或 C 末端。另外的氨基酸残基可以包括肽标记，例如信号肽、细胞因子、酶（例如，前体药物激活酶）、激素、寡核苷酸、干扰 RNA、肽毒素例如假单胞菌外毒素、肽药物、细胞毒性蛋白质或其他功能性蛋白质。如本文使用的，功能性蛋白质是具有生物学功能的蛋白质。

[0173] 在再一实施方案中，hL243 抗体或其片段可以用于制备多价蛋白质复合物 - 包括 3 种或 4 种抗原结合位点的新型抗体融合蛋白。依照这些实施方案，一种或多种抗原结合位点可以由 hL243 可变结构域组成，并且一种或多种其余抗原结合位点可以包括所需的其他抗原特异性抗体的可变结构域。此类多价蛋白质复合物在 PCT 公开 WO04094613A2 (Rossi 等人，2004) 中描述。当与合适的抗原特异性抗体可变链组合时，包括 hL243 可变结构域的多价蛋白质复合物可以用于治疗各种瘤、感染性、代谢、神经变性、自身免疫或免疫失调病症。

[0174] 在本发明的一个实施方案中，药物、毒素、放射性化合物、酶、激素、细胞毒性蛋白质、寡核苷酸、干扰 RNAs（例如 RNAi 分子）、螯合物、细胞因子和其他功能试剂可以缀合至多价靶结合蛋白。依照这些实施方案，可以使用多价靶结合蛋白的氨基酸残基侧链的共价附着，例如胺、羧基、苯基、硫醇基或羟基。各种常规接头可以用于这个目的，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。试剂与多价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。如本文使用的，功能试剂是具有生物学功能的试剂。优选的功能试剂是细胞毒性剂。

[0175] 在再其他的实施方案中，治疗剂或前体药物聚合物至体内靶的双特异性抗体指导

的递送可以与放射性核素的双特异性抗体递送组合，从而使得实现组合化学疗法和放射免疫疗法。每种治疗剂可以缀合至可靶向的缀合物并同时施用，或者核素可以作为第一种可靶向的缀合物的一部分给予并且药物在随后步骤中作为第二种可靶向的缀合物的一部分给予。合适的可靶向的缀合物和药物是本领域已知的。

[0176] 在另一实施方案中，细胞毒性剂可以缀合至聚合载体，并且聚合载体随后可以缀合至多价靶结合蛋白。对于这种方法，参见 Ryser 等人，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，其引入本文作为参考。缀合优选不会显著影响多价结合蛋白的结合特异性或亲和力。

[0177] 人源化、嵌合和人抗体用于治疗和诊断的用途

[0178] 本文描述的人源化、嵌合和人单克隆抗体适合于在使用如本文所述的免疫缀合物和组合物的治疗方法和诊断方法中使用。因此，免疫缀合物或组合物可以包括裸露的人源化、嵌合和人抗体，其可以缀合至载体、治疗剂或诊断剂。免疫缀合物可以作为多模式疗法施用。例如，另外的治疗或诊断剂可以在免疫缀合物或组合物施用之前、同时或之后施用。免疫缀合物或组合物的功效可以通过用一种或多种其他结合分子（即，针对特异性抗原的 mAbs，例如 CD4、CDS、CD8、CD14、CD15、CD19、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CCD138、CD154、B7、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、NCA66、坏死抗原、PAM-4、KS-1、Le(y)、MAGE、1a、IL-2、IL-6、腱生蛋白、HM1.24、VEGF、EGFR、EGP-1、EGP-2、叶酸受体、人绒毛膜促性腺激素、结肠特异性抗原 -p(CSAp)、胰岛素样生长因子 (ILGF)、胎盘生长因子 (P1GF)、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PSMA、T101、TAG、TAG-72、Her2/neu、碳酸酐酶 IX、IL-6、SI00、α - 胎蛋白、A3、CA125、癌胚抗原 (CEA)、非特异性交叉反应抗原例如 CD66(a，b，c，d)、MART-1、TRP-1、TRP-2、gp100、淀粉状蛋白、含有 hL243 抗体、或其免疫缀合物、或针对这些所述抗原的抗体）补充人源化、嵌合和人 L243 免疫缀合物或组合物来增强。优选的 B 细胞相关抗原包括等同于人 CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD46、CD52、CD74、CD80 和 CDS 抗原的那些。优选的 T 细胞抗原包括等同于人 CD4、CDS 和 CD25(IL-2 受体）抗原的那些。

[0179] 可替代地，HLA-DR 抗原的取代分子可以在 B 细胞和 T 细胞病症的治疗中使用。在一个具体实施方案中，B 细胞抗原可以等同于人 CD19、CD22、CD21、CD23、CD74、CD80 和 HLA-DR 抗原。在另一具体实施方案中，可以使用等同于人 CD4、CDS 和 CD25 抗原的 T 细胞抗原。可替代地，可以使用阻断补体依赖性裂解 (CDC) 的癌细胞表面上的 CD46 和 CD59 抗原。在一个实施方案中，可以使用恶性黑素瘤相关抗原例如等同于 MART-1、TRP-1、TRP-2 和 gp100 的抗原。此外，在一个具体实施方案中，多发性骨髓瘤相关抗原是等同于 MUC1、CD38 和 CD74 的那些。

[0180] 在一个例子中，补充性结合分子可以是裸露的或与载体、治疗剂或诊断剂缀合，包括脂质、聚酯、药物、毒素、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、干扰 RNAs 和治疗性放射性核素等。依照这个实施方案，补充性结合分子可以与人源化、嵌合和人 L243 免疫缀合物或组合物同时、顺次或根据建议的给药方案进行施用。

[0181] 此外，本文预期免疫缀合物或组合物的施用用于在 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤和其他疾病或病症中的诊断和治疗用途。如本文所述的免疫缀合物可以是分子，包括缀合至载体的结合分子。依照这个实施方案，免疫缀合物可以用于形成进一步包括治疗或诊断剂

的组合物，其可以包括可能荷有诊断或治疗剂的肽。免疫缀合物保留了结合分子的免疫反应性（即，抗体部分在缀合后具有的结合相关抗原的能力与缀合前大约相同或略微减少）。免疫缀合物可以包括缀合至任何合适的第二种分子（例如，可以形成高级结构的脂质，蛋白质、碳水化合物，或其自身是高级结构，例如脂质体、胶粒和 / 或纳米微粒）的结合分子。为了促进某些效应物的递送，可能需要将 hL243 抗体缀合至能够形成高级结构的一种或多种分子（例如两亲性脂质）。两亲性分子还可能是促进效应物递送所需要的，所述效应物证实在水溶液中的溶解性有限。

[0182] 在另一实施方案中，广泛多样的诊断和治疗剂可以用于形成如本文所述的免疫缀合物和组合物。治疗剂包括，例如化学治疗药物例如长春花生物碱、蒽环类抗生素、epidophyllotoxin、紫杉烷、抗代谢物、烷化剂、抗生素、Cox-2 抑制剂、抗有丝分裂物、抗血管发生和凋亡剂，特别是多柔比星、氨甲蝶呤、紫杉酚、CPT-11、喜树碱，以及来自这些和其他类抗癌剂的其他，等等。用于制备免疫缀合物和抗体融合蛋白的其他有用的癌症化学治疗药物包括氮芥、烷基磺酸盐、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、铂配位复合物、激素等。合适的化学治疗剂在 Remington's Pharmaceutical Sciences，19th Ed.(Mack Publishing Co.1995)， 以 及 Goodman 和 Oilman's The pharmacological Basis of Therapeutics，7th Ed.(MacMillan Publishing Co.1985) 以及这些出版物的修订版中描述。其他合适的化学治疗剂，例如实验性药物，可以使用并且是本领域已知的。

[0183] 另外，在另一实施方案中，螯合剂例如 DTPA、DOTA、TETA 或 NOTA 可以缀合至本文描述的组合物的一种或多种组分。可替代地，包括可检测标记（例如荧光分子）或细胞毒性剂（例如重金属或放射性核素）的合适的肽可以共价、非共价或以别的方式与本文描述的组合物的多种组分缔合。例如，一种治疗上有用的免疫缀合物可以通过在如本文描述的组合物中掺入光敏剂或染料获得。荧光组合物，例如荧光团，和其他色原体、或染料例如对可见光敏感的卟啉，已通过将合适的光导向损伤用于检测和治疗损伤。在治疗中，这已称为光辐射、光疗法或光动力疗法 (Jori 等人 (eds.)，PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto1985) ；van den Bergh，Chem.Britain22 ：430(1986))。此外，单克隆抗体已与光敏化染料偶联用于完成光疗法。Mew 等人，J.Immunol.130 ：1473(1983) ；idem.，Cancer Res.45 ：4380(1985) ；Oseroff 等 人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA83 ：8744(1986) ；idem.，Photochem.Photobiol.46 ：83(1987) ；Hasan 等人，Prog.Clin.Biol.Res.288 ：471(1989) ；Tatsuta 等人，Lasers Surg.Med.9 ：422(1989) ；Pelegrin 等人，Cancer67 ：2529(1991)。内窥镜应用也是预期的。内窥镜检查和治疗方法在美国专利号 4,932,412 ；5,525,338 ；5,716,595 ；5,736,119 ；5,922,302 ；6,096,289 ；和 6,387,350 中描述，所述专利整体引入本文作为参考。

[0184] 在一个实施方案中，本文预期包括光敏剂或染料的 hL243 免疫缀合物组合物的治疗用途，和本诊断 / 治疗方法可以包含包括光敏剂或染料的 hL423 免疫缀合物组合物的诊断或治疗用途。免疫缀合物还可包含上文讨论的超声剂类型。还预期了放射性和非放射性试剂在如本文描述的人源化、嵌合和人 L423 免疫缀合物组合物中作为诊断剂的用途。合适的非放射性诊断剂是适合于核磁共振成像、计算机断层摄影术或超声的造影剂。磁成像剂包括例如与金属 - 螯合物组合复合的非放射性金属，例如锰、铁和钆，所述金属 - 螯合物组

合包括 2- 苄基 -DTPA 及其一甲基和环己基类似物（当连同本文描述的抗体一起使用时）（参见于 2001 年 10 月 10 日提交的美国序列号 09/921,290，其整体引入作为参考）。

[0185] 在另一实施方案中，人源化、嵌合和人 L423 免疫缀合物组合物可以包括对于诊断成像有用的放射性同位素或正电子发射体。合适的放射性同位素可以包括能量范围为 60-4,000keV 的那些。合适的放射性同位素可以包括 18-F、52-Fe、62-Cu、64-Cu、67-Cu、67-Ga、68-Ga、86-Y、89-Zr、94-Tc、94m-Tc、99m-Tc、111-In、123-1、124-1、125-1、131-1， 等等。（参见，例如名称为“Labeling Targeting Agents with Gallium-68”的美国专利申请 - 发明人 GL. Griffiths 和 W. J. McBride（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，例如 18-F、68-Ga、94m-Tc 等，并且其整体引入作为参考）。

[0186] 在本发明的另一实施方案中，毒素例如假单胞菌外毒素，可以存在于如本文描述的人源化、嵌合和人 L243 抗体，或其免疫缀合物或组合物中。例如，毒素可以复合至或形成本文描述的 hL243 的抗体融合蛋白的治疗剂部分。其他毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶 (RNase)、DNase I、葡萄球菌肠毒素 A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。（参见，例如 Pastan 等人，Cell47 :641(1986)，和 Goldenberg，CA-A Cancer Journal for Clinicians44 :43(1994)。适合于本文使用的另外毒素是本领域技术人员已知的并且在美国专利 6,077,499 中公开，所述专利整体引入作为参考）。

[0187] 可替代地，免疫调节剂例如细胞因子也可以存在于如本文描述的施用的 hL423 免疫缀合物组合物中。例如，免疫调节剂可以缀合至，或形成抗体融合蛋白的治疗剂部分，或作为如本文描述的人源化、嵌合和人 L423 免疫缀合物组合物的一部分施用。合适的细胞因子包括但不限于，如下文描述的干扰素和白介素。

[0188] 在一个实施方案中，人源化 L243 抗体可以用作预靶向、非免疫原性、高度选择性可替代物的一部分用于诊断和治疗应用，其中使用共识别在载体分子上的肿瘤抗原和一种或多种半抗原的双特异性抗体，其中载体分子可以包括效应分子。双特异性抗体 (bsAb) 具有能够工程化为相对非免疫原性的人源化蛋白质的优点。bsAb 的结合亲和力可以取决于原始靶向剂的结合亲和力。通过使用二价肽，可以达到亲和力增强，与单价肽比较其可以极大地改善肽与靶位点的结合。参见，例如，美国专利号 5,256,395，其内容整体引入本文。

[0189] 在一个实施方案中，使用 hL243bsAb 的预靶向可以包括来源于如本文描述的 hL243 抗体可变区的 bsAb 的一个臂，以及识别包含诊断或治疗剂的部分的抗体的第二个臂（例如，载体与诊断或治疗剂一起作为“可靶向构建体”）。合适的可靶向构建体和使用方法在美国专利申请 20050002945 中描述，所述专利的内容因此整体引入作为参考。可靶向构建体可以是例如 (i)DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH_2 ;(ii)DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys-(HSG)-NH_2 ;或 (iii)Ac-Lys(HSG)D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tsc_g-Cys)-NH_2，尽管技术人员应当理解可以使用其他可靶向构建体。在其他系统中，可靶向构建体包括由抗体的第二个臂识别的半抗原部分和治疗或诊断剂。例如，治疗剂可以是化学治疗剂或毒素，例如上文描述的那些。

[0190] 一个具体实施方案包括由 Janevik-Ivanovska 等人描述的预靶向系统，其使用针对组胺衍生物，即组胺 - 琥珀酰 -glycl(HSG) 的抗体作为在其上可以制备各种效应物物质的识别系统。本发明的人源化 L243 抗体可以在此类系统中使用。这种预靶向系统代表超

过其他预靶向系统的显著优点，因为它可以与各种不同成像或治疗剂一起使用。在一个例子中，这种系统可以基于针对 DTPA 或 HSG 的抗体的使用和包含 DTPA 或 HSG 残基的肽的开发。可以合成包含 DTPA 和 / 或包含 HSG 的肽，并且当肽包含 DTPA 时，肽可以用螯合的核素进行标记，例如 In、Y 或 Lu，其在治疗或诊断中可能有用。抗体已针对 DTPA-In 部分产生。在其他实施方案中，系统包括半抗原的肽和 / 或螯合剂例如 DTPA，并且其可能适合于用 ^{90}Y、′ ″ in 和 ^{177}Lu 以及 ^{99m}Tc 放射标记。

[0191] 免疫缀合物的制备

[0192] 本文描述的免疫缀合物可以通过将抗体与脂质、碳水化合物、蛋白质或其他原子和分子连接的已知方法进行制备。例如，本文描述的结合分子可以与本文描述的一种或多种载体（例如脂质、聚合物、脂质体、胶粒或纳米微粒）缀合以形成免疫缀合物，并且免疫缀合物可以共价、非共价或以别的方式掺入治疗或诊断剂。此外，本文描述的任何结合分子可以与本文描述的一种或多种治疗或诊断剂，或另外的载体缀合。一般地，一种治疗或诊断剂可以附着至每种结合分子，但超过一种的治疗剂或诊断剂可以附着至相同的结合分子。在一个实施方案中，本文预期的抗体融合蛋白可以包括 2 种或多种抗体或其片段，并且包括这种融合蛋白的每种抗体可以与本文描述的一种或多种载体缀合。此外，抗体融合蛋白中的一种或多种抗体可以具有附着的一种或多种治疗或诊断剂。此外，治疗不必是相同的而可以是不同的治疗剂。例如，本文描述的组合物可以包括药物和放射性同位素。

[0193] 在一个例子中，IgG 可以用 131-1 放射标记并缀合至脂质，从而使得 IgG- 脂质缀合物可以形成脂质体。依照这个例子，脂质体可以掺入一种或多种治疗或诊断剂（例如药物，例如 FUdR-dO）。可替代地，除了载体以外，IgG 可以缀合至 131-1（例如在酪氨酸残基上）和药物（例如在赖氨酸残基的 ε 氨基上），并且载体可以掺入另外的治疗或诊断剂。治疗和诊断剂可以与结合分子共价缔合（例如缀合至还原的二硫基、碳水化合物侧链、或结合分子上的任何其他反应基团。

[0194] 在另一实施方案中，载体、治疗剂或诊断剂可以经由二硫键形成附着在还原的抗体组分的绞链区。作为可替代方法，肽可以使用异双功能交联剂，例如 N- 琥珀酰 3-(2- 吡啶二巯基）丙酸酯 (SPDP) 附着至抗体组分。Yu 等人，Int. J. Cancer56 :244(1994)。用于此类缀合的一般技术是本领域众所周知的。（参见，例如，Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking(CRC Press1991) ;Upeslacis 等 人，“Modification of Antibodies by Chemical Methods,”in Monoclonal Antibodies Principles and Applications, Birch 等 人 (eds.)， 第 187D230 页 (Wiley-Liss, Inc. 1995) ;Price, “Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,”in Moniclonal Antibodies :Production, Engineerting and Clinical Application, Ritter 等人 (eds.)，第 60D84 页 (Cambridge University Press1995))。可替代地，载体、治疗剂或诊断剂可以经由抗体 Fc 区中的碳水化合物部分缀合。碳水化合物基团可以用于增加结合硫醇基的相同肽的装载，或者碳水化合物部分可以用于结合不同肽。

[0195] 用于经由抗体碳水化合物部分将肽缀合至抗体组分的方法是本领域技术人员众所周知的。（参见，例如，Shih 等人，Int. J. Cancer41 :832(1988) ;Shih 等人，Int. J. Cancer46 :1101(1990) ;和 Shih 等人，美国专利号 5,057,313，所有这些整体引入作为参考）。类似化学作用可以用于将一种或多种 hL243 抗体或其组分缀合至一种或多种载体、治

疗剂或诊断剂。在一个实施方案中，一种一般方法涉及使具有氧化碳水化合物部分的抗体组分与载体聚合物反应，所述载体聚合物具有至少一个游离胺官能团并装载了多个多肽。这种反应产生起始的希夫碱（亚胺）键，所述键可以通过还原为仲胺来稳定，以形成最终缀合物。

[0196] 在一个实施方案中，Fc 区可以缺乏，例如，如果 hL423 结合分子是抗体片段。可替代地，碳水化合物部分可以引入全长抗体或抗体片段的轻链可变区中。（参见，例如，Leung 等人，J. Immunol. 154 :5919(1995) ;Hansen 等人，美国专利号 5,443,953(1995)，Leung 等人，美国专利号 6,254,868，所有这些整体引入作为参考）。依照这些实施方案，改造的碳水化合物部分可以用于附着载体、治疗或诊断剂。

[0197] 载体（脂质、脂质体、胶粒、聚合物和纳米微粒）

[0198] 用于形成脂质体和胶粒的任何方法可以使用并且是本领域已知的。（参见，例如，Wrobel 等人，Biochimica et Biophysica Acta,1235 :296(1995) ;Lundberg 等人，J. Pharm. Pharmacol. ,51 :1099-1105(1999) ;Lundberg 等人，Int. J. Pharm. ,205 :101-108(2000) ;Lundberg, J. Pharm. Sci. ,83 :72-75(1994) ;Xu 等人，Molec. Cancer Then, 1 :337-346(2002) ;Torchilin 等人，Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA,100 :6039-6044(2003) ;U. S. 5,565,215 ;U. S. 6,379,698 ;和 U. S. 2003/0082154)。由聚合物、二氧化硅或金属形成的纳米微粒或纳米胶囊已得到描述，其在本文预期用于药物递送或成像。（参见，例如，West 等人，Applications of Nanotechnology to Biotechnology,11 :215-217(2000) ;U. S. 5,620,708 ;U. S. 5,702,727 ;和 U. S. 6,530,944)。

[0199] 免疫脂质体

[0200] 将抗体或结合分子缀合至脂质体以形成关于治疗或诊断剂的靶向载体的某些方法已得到描述。（参见，例如，Bendas, Biodrugs,15 :215-224(2001) ;Xu 等人，Molec. Cancer Ther. ,1 :337-346(2002) ;Torchilin 等人，Proc. Nat' l. Acad. Sci. , 100 :6039-6044(2003) ;Bally, 等人，J. Liposome Res. ,8 :299-335(1998) ;Lundberg, Int. J. Pharm. ,109 :73-81(1994) ;Lundberg, J. Pharm. Pharmacol. ,49 :16-21(1997) ;Lundberg, Anti-cancer Drug Design,13 :453-461(1998))。还参见 U. S. 6,306,393 ;U. S. 序列号 10/350,096 ;U. S. 序列号 09/590,284，和 1999 年 6 月 9 日提交的 U. S. 序列号 60/138,284。所有这些参考文献引入本文作为参考。

[0201] 药学可接受的赋形剂

[0202] 在一个实施方案中，免疫缀合物或组合物可以包括一种或多种药学合适的赋形剂、一种或多种另外的成分、或其组合。

[0203] 在另一实施方案中，本文公开的免疫缀合物或组合物可以根据已知方法配制以制备药学有用的组合物，由此免疫缀合物或组合物在混合物中与药学合适的赋形剂组合。无菌磷酸盐缓冲盐水是药学合适的赋形剂的一个例子。其他合适的赋形剂是本领域技术人员众所周知的。(参见，例如，Ansel 等人，Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,5th(Lea 和 Febiger1990), 和 Gennaro(ed), Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Edition(Mack Publishing Company1990)，及其修订版。

[0204] 在另一实施方案中，本文公开的免疫缀合物或组合物可以配制用于经由例如快速注射或持续输注静脉内施用。

[0205] 用于注射的制剂可以以例如单位剂型与加入的防腐剂一起存在于例如安瓿或多剂量容器中。组合物可以采取此类形式，如在油或水媒介物中的悬浮液、溶液或乳状液，并且可以包含配制剂例如悬浮、稳定和 / 或分散剂。可替代地，活性成分可以是粉末形式用于在使用之前用合适的媒介物例如灭菌无热原水构建。另外的药学方法可以用于控制治疗、诊断缀合物或裸抗体的作用持续时间。例如，控制释放制剂可以通过使用聚合物复合或吸附免疫缀合物或裸抗体来制备。在一个例子中，生物相容性聚合物包括聚（乙烯 - 共 - 乙酸乙烯酯）基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酐共聚物基质。Sherwood 等人，Bio/Technology10 :1446(1992)。免疫缀合物或抗体从此类基质中释放速率中的一些取决于免疫缀合物或抗体的分子量，基质内的免疫缀合物、抗体的量和分散微粒的大小。Saltzman 等人，Biophys. J. 55 :163(1989) ;Sherwood 等人，同上。其他固体剂型在 Ansel 等人，Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,5th Edition(Lea&Febiger1990)，和 Gennaro(ed.)，Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition(Mack Publishing Company1990)，及其修订版中描述。

[0206] 在一个实施方案中，免疫缀合物或组合物还可以皮下或还通过其他肠胃外途径施用于哺乳动物。此外，施用可以通过持续输注或通过单次或多次快速浓注。在一个例子中，对于人施用的免疫缀合物、融合蛋白或裸抗体的剂量将依此类因素而变，所述因素例如患者年龄、重量、身高、性别、一般医疗条件和以往医疗史等。在一个具体实施方案中，受体可以施用约 1mg/kg-mg/kg 免疫缀合物或包括免疫缀合物的组合物的剂量作为单次静脉内输注，尽管根据环境指示也可以施用较低或较高剂量。这种剂量可以根据需要重复，例如，每周一次共 4-10 周，优选每周一次共 8 周，并更优选每周一次更 4 周。它还可以较不频繁地给予，例如每隔一周共数月。剂量可以通过各种肠胃外途径给予，伴随剂量和时间表的合适调整。

[0207] 在一个实施方案中，为了治疗目的，免疫缀合物或包括免疫缀合物的组合物以治疗有效量施用于哺乳动物。对于本文公开的治疗和诊断方法的合适受试者可以是人，尽管非人动物受试者也是预期的。

[0208] 在一个例子中，如果施用的量是生理学显著的，那么抗体制剂认为是以“治疗有效量”施用。如果试剂的存在导致受体哺乳动物生理学中可检测的改变，那么它是生理学显著的。特别地，如果抗体制剂的存在产生抗肿瘤应答或减轻自身免疫状况态的体征和症状，那么它是生理学显著的。生理学显著效应还可以是受体哺乳动物中体液和 / 或细胞免疫应答的诱发。

[0209] 使用包括人源化、嵌合和人 L243 抗体的组合物的治疗方法

[0210] 在一个实施方案中，可以用本发明的抗体治疗的免疫病可以包括，例如关节疾病例如强直性脊柱炎、青少年类风湿性关节炎、类风湿性关节炎 ;神经系统疾病例如多发性硬化症和重症肌无力 ;胰腺疾病例如糖尿病，特别是幼年发作型糖尿病 ;胃肠道疾病例如慢性活动性肝炎、腹部疾病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、恶性贫血 ;皮肤病例如牛皮癣或硬皮病 ;过敏性疾病例如哮喘和移植相关状况例如移植物抗宿主病和同种异体移植物排斥。

[0211] 在本发明的另一实施方案中，提供了可以包括本文公开的抗体、或其免疫缀合物的组合物和方法用于治疗自身免疫病或病症。使用靶向 B 细胞的抗体的自身免疫性病症的免疫治疗在 PCT 申请公开号 WO00/74718 中描述，所述 PCT 申请要求美国临时申请序列号

60/138,284 的优先权，所述专利中的每一种的内容整体引入本文。示例性自身免疫病包括但不限于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、皮肌炎、西德纳姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨 - 舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、阿狄森氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化、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、斯耶格伦氏综合征、原发性胆汁性肝硬变、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎 / 皮肌炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎 / 多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球性肾炎、牛皮癣、和纤维化肺泡炎。

[0212] 在本发明的另一实施方案中，提供了用于治疗选自下列病症的组合物和方法 ：癌、肉瘤、神经胶质瘤、淋巴瘤、白血病或皮肤癌。癌可以选自皮肤、食管、胃、结肠、直肠、胰腺、肺、乳腺、卵巢、膀胱、子宫内膜、颈、睾丸、肾脏、肾上腺或肝癌。B 细胞相关疾病可以是缓慢进展形式的 B 细胞淋巴瘤、迅速进展形式的 B 细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症或多发性骨髓瘤。此外，B 细胞相关疾病可以是人或牲畜类型的疾病。另一方面，T 细胞相关疾病可以包括人或其他哺乳动物 T 细胞白血病或淋巴瘤、皮肤牛皮癣、牛皮癣性关节炎或蕈样霉菌病。在一个例子中，代谢病可以是淀粉样变性病。在一个例子中，神经变性疾病可以是阿尔茨海默氏病。

[0213] 在本发明的一个实施方案中本文还预期的是抗体包括免疫缀合物作为用于治疗下列任何疾病或病症的组合物的用途，其中疾病或病症选自免疫失调疾病、自身免疫病、器官移植物排斥、移植物抗宿主病、代谢病（例如淀粉样变性病）、和神经变性疾病（例如阿尔茨海默氏病）。恶性病或病症选自实体瘤、造血系统肿瘤（淋巴瘤、白血病、骨髓瘤等）。实体瘤选自黑素瘤、癌和肉瘤，并且癌选自肾癌、乳癌、肺癌、胃肠癌和泌尿生殖系统癌。B 细胞恶性肿瘤选自缓慢进展形式的 B 细胞淋巴瘤、迅速进展形式的 B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和多发性骨髓瘤。还存在非恶性 B 细胞病症和相关疾病，例如许多自身免疫和免疫失调疾病，在免疫失调疾病中包括败血症和败血症性休克（免疫失调疾病的列表可以在由 Goldenberg 和 Hansen 于 2004 年 12 月 8 日提交并且整体引入本文的美国临时申请号 60/634,076 中更全面地找到）。特别地，本文描述的组合物对于治疗下列疾病特别有用 ：各种自身免疫病，以及缓慢进展形式的 B 细胞淋巴瘤、迅速进展形式的 B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症，以及其他造血系统恶性肿瘤，例如急性和慢性髓细胞白血病以及 T 细胞白血病和淋巴瘤。例如，hL243 抗体组分和免疫缀合物可以优选用于治疗缓慢进展和迅速进展形式的非霍奇金氏淋巴瘤和淋巴性白血病。

[0214] 在另一实施方案中，适当时本发明的人源化、嵌合和人 L243 抗体可以用于治疗所有哺乳动物中的上述疾病和病症，所述哺乳动物包括人和驯养哺乳动物，包括但不限于，狗、猫、马和牛。

[0215] 在一个具体实施方案中，用于治疗 B 细胞恶性肿瘤的方法可以包括给具有 B 细胞相关恶性肿瘤的受试者施用治疗组合物，所述治疗组合物包括药学可接受载体、治疗剂、和包括 L243 抗体或其组分的免疫缀合物（例如，人源化、嵌合或人 L243 抗体或其片段或其抗体融合蛋白），其中 B 细胞恶性肿瘤是淋巴瘤或白血病。更具体而言，B 细胞恶性肿瘤是缓

慢进展形式的 B 细胞淋巴瘤、迅速进展形式的 B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病或急性淋巴细胞白血病。在一个更具体的实施方案中，免疫缀合物或包括免疫缀合物的组合物可以以约 20-2000mg 的剂量静脉内或肌内施用，其进一步包括在用于检测或治疗 B 细胞恶性肿瘤的至少一种另外的治疗剂或诊断剂施用之前、同时或之后施用免疫缀合物或组合物。例如，另外的试剂可以包括如本文描述的包括治疗或诊断剂的另外免疫缀合物。依照这些实施方案，治疗剂可以包括裸抗体、免疫调节剂、激素、细胞毒性剂、酶和 / 或抗体，所述抗体缀合至至少一种免疫调节剂、放射性标记、激素、酶、寡核苷酸、干扰 RNA 或细胞毒性剂，或其组合。在一个具体例子中，免疫调节剂可以是细胞因子并且细胞毒性剂可以是药物或毒素。在一个更具体的实施方案中，可以作为裸抗体或作为补充性免疫缀合物组合施用的抗体优选与下列反应 :CD4、CDS、CDS、CD14、CD15、CD19、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CD138、CD154、B7、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、NCA66、坏死抗原、PAM-4、KS-1、90Le(γ)、MAGE、la、IL-2、IL-6、腱生蛋白、HM1.24、VEGF、EGFR、EGP-1、EGP-2、叶酸受体、人绒毛膜促性腺激素、CEA、结肠特异性抗原 -p(CSAp)、胰岛素样生长因子 (ILGF)、胎盘生长因子 (P1GF)、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PSMA、T101、TAG、TAG-72、Her2/neu、碳酸酐酶 IX、IL-6、SI00、α 胎蛋白、A3、CA125、癌胚抗原 (CEA)、非特异性交叉反应抗原例如 CD66(a，b，c，d)、MART-1、TRP-1、TRP-2、淀粉状蛋白或 gp100。

[0216] 本文还预期的是恶性肿瘤的治疗可以包括给具有除淋巴瘤或白血病以外的恶性肿瘤的受试者施用治疗组合物，所述治疗组合物可以包括 :(1)hL243 抗体，或其免疫缀合物，和载体 ;(2) 效应物 ;和 (3) 药学可接受的赋形剂。组合物还可以以 20-2000mg 的剂量静脉内或肌内施用。此外，组合物还可以在至少一种另外的治疗剂或诊断剂施用之前、同时或之后施用。如上文和说明书自始至终描述的，治疗剂可以包括免疫调节剂、激素、细胞毒性剂或结合分子 (裸露的或缀合至至少一种免疫调节剂、放射性标记、酶、激素、细胞毒性剂、反义寡核苷酸、干扰 RNA、或其组合，其中免疫调节剂优选是细胞因子并且细胞毒性剂优选是药物或毒素)。治疗剂或诊断剂可以包括如本文公开的组合物或免疫缀合物。在一个具体实施方案中，抗体可以与治疗和 / 或诊断组合物组合施用以治疗不是 B 细胞恶性肿瘤的恶性肿瘤，但很可能与除由 hL243 抗体识别以外的标记反应，所述标记由包括被治疗的恶性肿瘤的细胞表达，并且抗体应当在药学可接受的媒介物中配制。可以对于恶性黑素瘤相关抗原施用的抗体的例子是与 MART-1、TRP-1、TRP-2 和 gp100 反应的那些抗体。此外，针对多发性骨髓瘤相关抗原的优选抗体包括与 MUC1、CD74 和 CD38 反应的那些。用于治疗的组合物可以包含 WL243 抗体，或其免疫缀合物，单独或与其他抗体组合，例如其他人源化、嵌合或人抗体。

[0217] 在一个例子中，组合物可以包括免疫调节剂作为效应物。如本文使用的，术语“免疫调节剂”包括细胞因子，干细胞生长因子，淋巴毒素，例如肿瘤坏死因子 (TNF)，和造血因子，例如白介素 (例如，白介素 -1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18 和 IL-21)，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“SI 因子”的干细胞生长因子、促红细胞生成素、血小板生成素或其组合。合适的免疫调节剂部分的例子包括 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21 及其组合，和干扰素 -ct、p 和 j，TNF-a 和 P 等。在一个

实施方案中，免疫调节剂可以存在于组合物中，或可替代地，免疫调节剂可以在治疗和 / 或诊断组合物施用之前、同时或之后施用。在一个具体实施方案中，hL243 抗体还可缀合至免疫调节剂。免疫调节剂还可以缀合至由结合不同抗原的一种或多种抗体组成的杂交抗体。

[0218] 在一个例子中，本文预期的多模式疗法可以包括使用免疫缀合物例如 hL243 抗体的免疫治疗，伴随补充施用另外的结合分子（例如抗 -CD22、抗 -CD19、抗 -CD21、抗 -CD20、抗 -CD80、抗 -CD23、抗 -CD46 或 HLA-DR，优选裸抗体、融合蛋白形式或作为免疫缀合物的成熟的 HLA-DR 二聚抗体）。此外，如本文描述的胶粒、脂质体或纳米微粒可以包括除 hL243 抗体以外的结合分子。例如，抗体可以是识别上述抗原决定簇上至少一种表位的多克隆、单克隆、嵌合、人或人源化抗体。此外，抗 -CD19 和抗 -CD22 抗体是本领域已知的。（参见，例如，Ghetie 等人，Cancer Res. 48 :2610(1988) ;Hekman 等人，Cancer Immunol. Immunother. 32 :364(1991) ;Longo，Curr. Opin. Oncol. 8 :353(1996) 以及美国专利号 5,798,554 和 6,187,287，整体引入作为参考。）

[0219] 在一个具体例子中，另一种形式的多模式疗法可以是其中受试者接受 hL243 免疫缀合物连同标准癌症化学治疗。例如，“CVB”(1.5g/m^2 环磷酰胺、200-400mg/m^2 依托泊苷和 150-200mg/m^2 卡莫司汀）是用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤的方案。Patti 等人，Eur. J. Haematol. 51 :18(1993)。其他合适的组合化学治疗方案是本领域技术人员众所周知的。（参见，例如，Freedman 等人，“Non-Hodgkin′ s Lymphomas，”in Cancer Medicine，第 2 卷，3rd Edition，Holland 等人 (eds.)，第 2028-2068 页 (Lea 和 Febiger1993)）。作为举例说明，用于治疗中度非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 的第一代化学治疗方案包括 C-MOPP（环磷酰胺、长春新碱、甲基苄肼和泼尼松）和 CHOP（环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松）。在本发明的一个具体实施方案中，第二代化学治疗方案可以是 m-BACOD（氨甲蝶呤、博来霉素、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、地塞米松和亚叶酸），而合适的第三代方案是 MACOP-B（氨甲蝶呤、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、泼尼松、博来霉素和亚叶酸）。另外的治疗可以包括丁酸苯酯和苔藓抑素 -1。在一种优选多模式疗法中，化学治疗药物和细胞因子可以与抗体、免疫缀合物或融合蛋白共同施用。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同时施用。

[0220] 在一个具体实施方案中，NHL 可以用 hL243 免疫缀合物（例如治疗组合物）每周一次输注治疗 4 次，以 25-700mg/m^2 的剂量每周一次连续 4 周，或每隔一周一次（静脉内经过 2-8 小时），需要时经过接下来的月 / 年重复，更优选以 100-400mg/m^2 的剂量每周一次连续 4 周，或每隔一周一次（静脉内经过 2-8 小时），需要时经过接下来的月 / 年重复。此外，NHL 可以如上用每半个月一次输注治疗 4 次，但在同一天与依帕珠单抗（抗 -CD22 人源化抗体）组合，剂量为 360mg/m^2，作为静脉内输注经过 1 小时给予，在 hL243 抗体免疫缀合物输注之前、之时或之后。可替代地，HL 可以如上用 hL243 抗体免疫缀合物每周一次输注治疗 4 次，与用治疗同位素例如钇 -90f 放射标记的 CD22mAb 的一次或多次注射组合 (90-Y 的剂量为 5-35mCi/m^2 作为一次或多次注射经过数周或数月的时间段。在一个例子中，当在对 CK20 抗体有较低应答的患者中使用时，wL243 可以与此类 CD20 抗体如利妥希玛或 hA20 组合。依照这个例子，后面的组合可以在同一天或周内顺次或同时给予，并且以各种剂量，例如对于利妥希玛或 hA20 为 375mg/m^2 每周一次通过静脉内输注，并且对于 H1243 为 250mg/m^2 每周一次同样通过静脉内输注给予。在所有上述情况下，剂量可以分开，作为持续输注或

通过本领域已知的肠胃外途径施用。它们还可以通过其他途径例如皮下施用。

[0221] 此外，在一个实施方案中，如本文公开的治疗组合物可以包含 hL243 免疫缀合物的杂交分子的混合物，所述 hL243 免疫缀合物针对由 hL243 抗体识别的不同的非封闭表位。根据这个实施方案，治疗组合物可以包括结合由 hL243 抗体识别的至少 2 个表位的 hL243 免疫缀合物的混合物。同样地，本文描述的免疫缀合物可以包含具有各种 CDR 序列的 hL243 抗体的混合物。

[0222] 在本发明的一个实施方案中，hL243 抗体或其免疫缀合物可以用于治疗 B 细胞淋巴瘤和白血病，或其他 B 细胞疾病或病症以及其他恶性肿瘤，在所述其他恶性肿瘤中感染或关联的恶性细胞与由 hL243 抗体识别的表位反应。例如，hL243 抗体或其免疫缀合物可以用于治疗免疫失调疾病和相关的自身免疫病，包括但不限于 III 类自身免疫病例如免疫介导的血小板减少症，例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、皮肌炎、斯耶格伦氏综合征、多发性硬化、西德纳姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、糖尿病、亨 - 舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、高安氏动脉炎、阿狄森氏病、类风湿性关节炎、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、原发性胆汁性肝硬变、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮病、慢性活动性肝炎、多发性肌炎 / 皮肌炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳氏肉芽肿、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化、脊髓痨、巨细胞动脉炎 / 多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球性肾炎、和纤维化肺泡炎。

[0223] 在一个更具体的实施方案中，hL243 抗体或其免疫缀合物或片段或其抗体融合蛋白可以施用于具有一种或多种这些自身免疫病的受试者。本文公开的 hL243 抗体在治疗自身免疫性病症的方法中特别有用，所述方法在 2000 年 6 月 9 日提交、名称为“Immunotherapy of Autoimmune Disorders using Antibodies that Target B-Cells”的未决的美国序列号 09/590,284 中公开，其整体引入作为参考。在一个具体实施方案中，hL243 抗体可以以 20-2000mg 的剂量静脉内或肌内施用。此外，hL243 抗体还可以在至少一种治疗剂或诊断剂施用之前、之时或之后施用。在一个更具体的实施方案中，如本文描述的治疗剂可以包括抗体、免疫调节剂、激素、酶、细胞毒性剂、抗体，所述抗体缀合至至少一种免疫调节剂、放射性标记、激素、酶、或细胞毒性剂、反义寡核苷酸、干扰 RNA，或其组合，其中免疫调节剂是细胞因子并且所述细胞毒性剂是药物或毒素。例如，治疗剂可以包括如本文描述的免疫缀合物。在一个具体实施方案中，可以作为裸抗体或作为补充性免疫缀合物组合施用的抗体包括在药学可接受媒介物中配制的与下列反应的抗体，即针对特异性抗原的 mAbs，所述抗原例如 CD4、CDS、CDS、CD14、CD15、CD19、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD46、CD52、CD54、CD74、CD80、CD126、CCD138、CD154、B7、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC16、NCA66、坏死抗原、PAM-4、KS-1、Le(y)、MAGE、1a、IL-2、IL-6、腱生蛋白、HM1.24、VEGF、EGFR、EGP-1、EGP-2、叶酸受体、人绒毛膜促性腺激素、结肠特异性抗原 -p(CSAp)、胰岛素样生长因子 (ILGF)、胎盘生长因子 (P1GF)、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PSMA、T101、TAG、TAG-72、Her2/neu、碳酸酐酶 IX、IL-6、S100、α 胎蛋白、A3、CA125、癌胚抗原 (CEA)、非特异性交叉反应抗原例如 CD66(a，b，c，d)、MART-1、TRP-1、TRP-2、淀粉状蛋白或 gp100。

[0224] 如本文使用的，“药物组合物”指其中载体是药学可接受的载体、包括药物的组合

物，而“兽医学组合物”是其中载体是兽医学可接受的载体的组合物。术语“药学可接受的载体”或“兽医学可接受的载体”可以包括任何介质或材料，其不是生物学或在其他方面不希望的，即载体可以连同本发明的组合物或化合物一起施用于生物，而不引起任何不希望的生物效应或以有害的形式干扰复合物或其任何组分或生物。药学可接受的反应物的例子在由此整体引入本申请中作为参考的美国药典，美国药品集，美国药典委员会，Inc.，Rockville，MD1990中提供，如PharmaceuticalDosage Forms&Drug Delivery Systems，7th Edition，Ansel 等人，editors，Lippincott Williams 和 Wilkins，1999。

[0225] 药物（即可靶向的构建体或复合物）可以包括在药物组合物中，其量足以在患者中产生所需效应。本发明的药物组合物可以进一步包括其他化学组分，例如稀释剂和赋形剂。“稀释剂”是在溶剂优选含水溶剂中稀释的化学化合物，其促进药物在溶剂中的溶解并且它还可以用于稳定生物学活性形式的药物或其一种或多种组分。在缓冲溶液中溶解的盐用作本领域的稀释剂。例如，优选的稀释剂是包含一种或多种不同盐的缓冲溶液。优选的缓冲溶液是磷酸盐缓冲盐水（特别是结合预期用于药学施用的组合物），因为它模拟人血液的盐条件。因为缓冲盐可以控制溶液的pH在低浓度，所以缓冲的稀释剂很少修饰生物活性肽的生物活性。

[0226] 在本发明的一个实施方案中，药物组合物促进人源化抗体给生物的施用，优选动物，优选哺乳动物。具体的哺乳动物包括牛科、犬科、马科、猫科、羊科和猪科动物，和非人灵长类。人是特别优选的。本领域现有的施用或递送化合物的多种技术包括但不限于，口服、直肠（例如灌肠剂或栓剂）、气雾剂（例如用于鼻或肺递送）、胃肠外（例如，静脉内、肌内、皮下）和局部施用。优选地，可以递送足够量的组合物或化合物以达到预期效应。待递送的组合物或化合物的具体量将取决于多种因素，包括达到的效应、组合物递送到的生物的类型、递送途径、给药方案，以及生物的年龄、健康状态和性别。像这样，在给定制剂中本文公开的实施方案的组合物或化合物的具体剂量留给普通技术人员的判断（例如，健康提供者的判断）。

[0227] 本领域技术人员应当理解当本发明的药物组合物作为试剂施用以达到特别希望的生物学结果时，所述生物学结果可以包括治疗或保护效应（包括疫苗接种），必须将本文公开的组合物或化合物与合适的药学载体组合。药学载体的选择和作为治疗或保护剂的组合物或化合物的制备将取决于预期用途和施用方式。治疗剂的合适配制和施用方法包括但不限于，用于口服、肺、鼻、颊、眼睛、皮肤、直肠或阴道递送的那些。

[0228] 取决于采用的递送方式，背景依赖性功能实体可以以各种药学可接受的形式递送。例如，背景依赖性功能实体可以以固体、溶液、乳状液、分散系、胶粒、脂质体等的形式，掺入到丸剂、胶囊、片剂、栓剂、气溶剂、滴剂或喷雾剂中递送。丸剂、片剂、栓剂、气溶剂、粉剂、滴剂和喷雾剂可以具有复杂的多层结构并且具有大范围的尺寸。气溶剂、粉剂、滴剂和喷雾剂的尺寸可以从小（大约1微米）到大（大约200微米）。

[0229] 本文公开的药物组合物可以以固体、冻干粉末、溶液、乳状液、分散系、胶粒、脂质体等的形式使用，其中所得到的组合物包含作为活性成分、与适合于肠或肠胃外应用的有机或无机载体或赋形剂混合的本发明实施方案的一种或多种可靶向的构建体或复合物。活性成分可以与用于片剂、丸剂、胶囊、栓剂、溶液、乳状液、悬浮液以及适合于使用的任何其他形式的通常无毒、药学可接受的载体化合。可以使用的载体包括固体、半固体或液体形式

的葡萄糖、乳糖、甘露糖、阿拉伯胶、明胶、甘露醇、淀粉糊、三硅酸镁、滑石粉、玉米淀粉、角蛋白、胶体二氧化硅、土豆淀粉、尿素、中等链长的甘油三酯、葡聚糖、以及适合于在制造业制备中使用的其他载体。此外，可以使用辅助、稳定、增稠和着色剂以及香料。稳定干燥剂的例子包括丙酮糖，优选浓度为 0.1％或更大（参见，例如美国专利号 5,314,695）。

[0230] 尽管个体需要可能不同，但关于药物组合物有效量的最佳范围的测定在本领域技术内。人剂量可以由动物研究推断 (Katocs 等人，Chapter27In :Remington′ S Pharmaceutical Sciences,18th Ed.,Gennaro,ed.,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.,1990)。一般地，提供有效量药物组合物需要的剂量将依受体的年龄、健康状态、身体条件、重量、疾病或病症的类型和程度、治疗频率、共存的治疗（如果有）的性质以及所需效应的性质和范围而变，所述有效量可以由本领域技术人员调整。参见，例如，Nies 等人，Chapter3In :Goodman&Oilman′ s The Pharmacological Basis of Therapeutics,9th Ed.,Hardman 等人，eds.,McGraw-Hill,New York,N.Y.,1996)。

[0231] 治疗组合物的剂量取决于待治疗的疾状况态的严重度和应答性，疗程从数天持续至数月，或直至达到治愈或实现疾状况态减轻。最佳给药时间表可以由患者体内的药物蓄积的测量结果计算。术语“患者”意欲包括动物（例如、猫、狗和马）以及人。普通技术人员可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。最佳剂量可以依个别治疗剂的相对功效而变，并且一般可以基于在体外和体内动物模型中发现有效的 EC_{50} 进行估计。

[0232] 剂量范围（施用的可靶向的构建体或复合物的量）是广泛的，因为一般而言对于不同哺乳动物的疗效的功效伴随剂量广泛改变，一般在人中比在大鼠中小 20、30 或甚至 40 倍（每单位体重）。一般而言，剂量为 0.01μg-100mg/kg 体重，优选 0.01μg-10mg/kg 体重，0.01μg-50μg/kg 体重，0.01μg-100mg/kg 体重，0.01μg-10mg/kg 体重，0.01μg-1mg/kg 体重，0.01μg-100μg/kg 体重，0.01μg-10μg/kg 体重，0.01μg-1μg/kg 体重，0.01μg-10μg/kg 体重，0.01μg-1μg/kg 体重，0.01μg-0.1μg/kg 体重，并且范围基于前面浓度范围的边界。因此，例如，前面的剂量描述包括 10mg-100mg/kg 体重、1.0mg-100mg/kg 体重、0.1mg-100mg/kg 体重等的剂量。

[0233] 在一个实施方案中，剂量可以每天、每周、每月或每年给予一次或多次，或甚至每 2-5 或更多年一次。本领域普通技术人员可以基于测量的停留时间和体液或组织中的可靶向的构建体或复合物的浓度估计剂量的重复率。成功治疗后，可能需要使患者经历维持疗法以预防疾状况态复发，其中治疗剂以 0.01ug-100mg/kg 体重的维持剂量施用，每天一次或多次至每 5 年一次。

[0234] 在一个实施方案中，具体剂量可以根据患者的近似体重或体表面积计算。确定合适剂量的其他因素可以包括待治疗或预防的疾病或状况，疾病的严重度，施用途径，以及患者的年龄、性别和医疗条件。确定关于治疗的合适剂量所需计算的进一步改进由本领域技术人员常规进行，特别是根据本文公开的剂量信息和测定法。剂量还可以通过使用已知测定法用于测定与合适的剂量应答数据结合使用的剂量来测定。

[0235] 在一个实施方案中，单个患者的剂量可以根据疾病进展的监控进行调整。可以测量患者中可靶向的构建体或复合物的血液水平以判断剂量是否需要调整以达到所需结果。

[0236] 在一个例子中，药物基因组研究可以用于测定哪个可靶向的构建体和 / 或复合物及其剂量最可能对给定个体有效 (Schmitz 等人，Clinica ChimicaActa308 :43-53,2001 ；

Steimer 等人，Clinica ChimicaActa308 :33-41，2001)。

[0237] 本文公开的人源化抗体的施用可以是肠胃外的，包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、胸膜内、鞘内、腔内，通过经由导管灌注或通过直接损伤内注射。依照这种施用，抗体可以每天施用一次或多次，每周一次或多次，每月一次或多次，和每年一次或多次。

[0238] 本文提及或引用的文章、专利、和专利申请、以及所有其他文件和可电子获得的信息的内容在此整体引入作为参考，其程度与每个单个出版物特别并个别指出引入作为参考相同。申请人保留将来自任何此类文章、专利、专利申请或其他文件的任何和所有材料和信息实体并入本申请的权利。

[0239] 本文举例说明性描述的实施方案可以适当地在不存在本文未具体公开的任何一种或多种元素、一种或多种限制的情况下实践。因此，例如，术语“包括”、“包含”、“含有”等应当广泛且不加限制地理解。此外，本文采用的术语和表达可以用作描述性而非限制性的术语，并且在此类术语和表达的使用中不预期排除显示和描述的特征的任何等价物或其部分，但认识到在本发明请求保护的范围内的各种修改是可能的。因此，应当理解尽管本发明已通过优选实施方案和任选的特征具体公开，但本领域技术人员可以采用公开的本文具体表达的修改和变化，并且此类修改和变化视为在本发明范围内。

[0240] 本发明的实施方案已在本文广泛且一般地描述。属于一般公开内容的更窄的种类和亚一般分类中的每一种也可形成本发明的部分。这包括本文的一般描述，附带条件或负面限制从种类中去除任何主题，不管删除的材料是否在本文中具体叙述。

[0241] 此外，当特征或方面按照 Markush 组进行描述时，本领域技术人员将认识到实施方案因此也针对 Markush 组的任何个别成员或成员亚组进行描述。

[0242] 实施方案通过下列实施例和详细规程进一步举例说明。然而，实施例仅仅希望举例说明实施方案并且不解释为限制本文的范围。本申请自始至终引用的所有参考文献以及公布的专利和专利申请的内容由此引入作为参考。

实施例

[0243] 实施例 1. 人源化 L243 抗体的构建

[0244] L243Vk 和 VH 基因的分子克隆

[0245] 在一种示例性方法中，生产 mAb mL243 的杂交瘤细胞克隆在补充有 10％ FBS(Hyclone) 的 HSFM 培养基 (Life Technologies，Inc.，) 中进行培养。编码 mL243 的 VK(VK1BACK/CK3′) 和 VH(VH1BACK/VH1FOR) 的基因通过 RT-PCR 克隆并且序列通过 DNA 测序确定。多个独立克隆进行测序以消除由 PCR 反应产生的可能错误。

[0246] hL243V 基因的序列设计

[0247] 在一个例子中，通过在 Kabat 数据库中检索人 VK 和 VH 序列，发现 mL243VK 和 VH 的 FRs 分别显示与人 REI VK 和 RT-TS3 VH 的最高程度的序列同源性。一个例外是 mL243VH 的 FR4，其显示与 NEwMVH 的最高序列同源性。因此，在一个例子中，人 REI 构架序列用作移植 mL243VK 的 CDRs 的支架 (图 5)，并且对于 hL243Vn 使用 RF-TS3 和 NEwM 构架序列的组合 (图 6)。事实上，hL243 VH 具有与另一种人源化 Ab-hRS7 相同的人 VH 构架 (Govindan 等人，Breast Cancer Res.Treat.84，173-182，2004)。当与起始人抗体构架比较时，在 CDR 区外的每条链中存在许多氨基酸变化。基于先前建立的指导方针，侧面与假定 CDRs 相接

的鼠 FRs 中的几个氨基酸残基在工程化的 hL243Fv 中保留 (Qu 等人，Clin.Cancer Res.(1999)53095s-3100s)。这些残基是 mL243Vk 的 R37、K39、V48、F49 和 G100 以及 mL243VH 的 F27、K38、K46、A68 和 F91(分别为图 3 和 4)。关于 hL243VL 和 hL243VH 的序列还分别参见 SEQ.ID.3 和 4。

[0248] hL243V 序列的构建

[0249] 使用如 Leung 等人 (Mol.Immunol.(1995)321413-1427) 描述的修改策略，使用如图 4 中图解的长寡核苷酸合成和 PCR 的组合构建对于 hL243 设计的 VK 和 VH 基因。对于 hL243VH 结构域的构建，2 种长寡核苷酸 -hL243VHA(175- 聚体) 和 hL243VHB(168- 聚体) 在 DNA 自动合成仪 (Applied Biosystem) 上合成。

[0250] hL243VHA 代表 HL243VH 结构域的 nt23-197。

[0251] 5′ -GGTCTGAGTT GAAGAAGCCT GGGGCCTCAG TGAAGGTTTC CTGCAAGGCT TCTGGATTTA CCTTCACAAA CTATGGAATG AACTGGGTGA AGCAGGCCCC TGGACAAGGG CTTAAGTGGA TGGGCTGGAT AAACACCTAC ACTAGAGAGC CAACATATGC TGATGACTTC AAGGG-3′ (SEQ ID NO:16)hL243VHB 代表与 nt176-343 互补的 hL243VH 结构域的负链。

[0252] 5′ -ACCCTTGGCC CCAGTAGTCA AAACCCGTAG GTACAACCGC AGTAATATCT CTTGCACAGA AATACACGGC AGTGTCGTCA GCCTTTAGGC TGCTGATCTG GAGATATGCC GTGCTGACAG AGGTGTCCAA GGAGAAGGCA AACCGTCCCT TGAAGTCATC AGCATATG-3′ (SEQ ID NO:17)

[0253] 如上文序列中有下划线的，hL243VHA 和 B 的 3′ - 末端序列 (22nt 残基) 彼此互补。在一个例子中，在限定的 PCR 条件下，hL243VHA 和 B 的 3′ - 末端退火以形成侧面与长寡核苷酸其余部分相接的短双链 DNA。每个退火的末端在 PCR 反应中充当单链 DNA 复制的引物，产生包含 hL243VH 的 nt23-343 的双链 DNA。这种 DNA 在短寡核苷酸引物对 -hRS7VHBACK 和 hL243VHFOR 的存在下进一步扩增，以形成全长 hL243VH。由于在这个区域中 hRS7VH 和 hL243VH 之间的序列同一性，此处使用先前对于 hRS7Ab 设计并使用的 hRS7VHBACK。

[0254] hRS7VHBACK5′ -GTGGTGCTGC AGCAATCTGG GTCTGAGTTG AAGAAGCC-3′ (SEQ ID NO:18)hL243VHFOR

[0255] 5′ -TGAGGAGACG GTGACCAGGG ACCCTTGGCC CCAGTAGT-3′ (SEQ ID NO:19)

[0256] 在这个实施例中，最小量的 hL243VHA 和 B(凭经验确定) 在下列物质的存在下进行扩增 :10ul10x PCR 缓冲液 (500mM KC1,100mM Tris.HCL 缓冲液，pH8.3,15mM $MgCl_2$)，2umol hRS7VHBACK 和 hL243VHFOR，以及 2.5 单位 Taq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer Cetus，Norwalk,CT)。对这种反应混合物实施由 94℃变性 1 分钟、45℃退火 1 分钟和 72℃聚合 1.5 分钟组成的 3 个循环的 PCR 反应，并且随后为由 94℃变性 1 分钟、55℃退火 1 分钟和 72℃聚合 1 分钟组成的 27 个循环的 PCR 反应。关于 hL243VH 的双链 PCR 扩增产物凝胶纯化，用 PstI 和 BstEII 限制性消化，并克隆到重链分段载体 VHpBS4 的互补性 Pstl/BstEII 位点中。

[0257] 在一个例子中，为了构建人源化 VK 序列的全长 DNA，如上所述合成 hL243VKA(155- 聚体) 和 hL243VKB(155- 聚体)。如上所述通过 2 种短寡核苷酸 hlmmu31VKBACK 和 hlmmu31VKFOR 扩增 hL243VKA 和 B。设计并使用先前用于人源化抗 -AFP Ab 的 hlmmuS1VKB ACK 和 hlmmuSl VKFOR(Qu 等人，Clin.Cancer Res.(1999)53095-3100)。

[0258] hL243VKA 代表 hL243VD 结构域的 nt21-175。

[0259] 5′ -TCCATCATCT CTGAGCGCAT CTGTTGGAGA TAGGGTCACT ATCACTTGTC GAGCAAGTGA

GAATATTTAC AGTAATTTAG CATGGTATCG TCAGAAACCA GGGAAAGCAC CTAAACTGCT GGTCTTTGCT GCATCAAACT TAGCAGATGG TGTGC-3′ (SEQ ID NO:20)

[0260] hL243VKB代表与nt154-312互补的hL243VK结构域的负链。

[0261] 5′ -CAGCTTGGTC CCTCCACCGA ACGCCCACGG AGTAGTCCAA AAATGTTGAC AATAATATGT TGCAATGTCT TCTGGTTGAA GAGAGCTGAT GGTGAAAGTA TAATCTGTCC CAGATCCGCT GCCAGAGAAT CGCGAAGGCA CACCATCTGC TAAGTTTGA-3′ (SEQ ID NO:21)

[0262] Mmmu31VKBACK5′ -GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCATCATCT CTGAGCGC-3′ (SEQ ID NO:22)

[0263] hImmu31VKFOR5′ -CCGGCAGATC TGCAGCTTGG TCCCTCCACC G-3′ (SEQ ID NO:23)

[0264] 在这个实施例中hL243VK的凝胶纯化的PCR产物用PvuII和BglHI限制性消化并克隆到轻链分段载体(staging vector)VKpBR2的互补性PvuI/BcII位点中。最终表达载体hL243pdHL2如上所述通过将hL243Vic和VH的Xbal-BamHI和XhoI/NotI片段分别顺次地亚克隆到pdHL2中来构建。

[0265] hL243抗体的表达载体的构建

[0266] 在一个例子中,最终表达载体hL243pdHL2如先前所述通过将hL243Vx和VH的Xbal-BamHI和XhoI/NotI片段分别顺次地亚克隆到pdHL2中来构建(Losman等人Cancer,80:2660(1997))。如Gilles等人(J.Immunol.Methods125:191(1989)所述,表达载体pdHL2包含人γ1链的基因组序列,因此,hL243是IgG1/K同种型。

[0267] 在一种示例性方法中,为了构建其他同种型hL243例如IgG4/K的表达载体,人γ1链的基因组序列由通过PCR扩增获得的γ4链的序列代替。使用的模板是从ATCC CRL-11397细胞中提取的基因组DNA,并且引物对是P-SacII(5′ -CCGCGGTCACATGGCACCA CCTCTCTTGCAGCTTCCACCA AGGGCCC-3′)(SEQ ID NO:24)和P-EagI(5′ -CCGGCCGTCG CACTCAT TTA CCCAGAGACA GGG-3′)(SEQ ID NO:25)。扩增的PCR产物克隆到TOPO-TA测序载体(Invitrogen)中,并且序列通过DNA测序证实。

[0268] 将点突变Ser241Pro(基于Kabat编号)引入γ4序列的绞链区,以避免当IgG4Ab在哺乳动物细胞培养中表达时形成半分子(Schuurman等人,Mol.Immunol.38:1(2001))。PstI和StuI限制性位点之间的人γ4绞链区序列(56bp)由合成DNA片段代替,所述合成DNA片段使用Ser241的TCA密码子取代Pro的CCG。hL243pdHL2中的人γ1基因组序列由突变的γ4序列取代,产生IgG4同种型hL243的称为hL243γ4PpdHL2的最终表达载体。

[0269] hL243抗体的转染和表达

[0270] 在一种示例性方法中,大约30μg hL243和hL243γ4P的表达载体通过用SalI消化线性化并通过电穿孔(450V和20uF)转染到Sp2/0-Ag14细胞中。转染的细胞铺板到96孔板中2天并随后通过将MTX以0.025pM的最终浓度加入培养基中选择抗药性。MTX-抗性菌落2-3周在孔中出现。来自菌落存活选择的上清液通过ELISA测定法筛选人Ab分泌。简言之,将100ul上清液加入用GAH-IgG-F(ab′)2片段特异性Ab预包被的微量滴定板孔中,并在室温下孵育1小时。未结合的蛋白质通过用洗涤缓冲液(包含0.05% polysorbate20的PBS)洗涤3次去除。HRP-缀合的GAH-IgG-Fc片段特异性Ab加入孔中。孵育1小时后,洗涤板。结合的HRP-缀合的Ab通过加入包含4mM OPD和0.04% H_2O_2的底物溶液后在A_{490}nm读数而显现。扩展阳性细胞克隆并通过在A蛋白柱上的亲和色谱法从细胞培养上清

液中纯化 hL243γ4P。

[0271] hL243 的 Ag- 结合特异性。

[0272] 在一个例子中，HL243 的 Ag- 结合活性和特异性通过细胞表面结合测定法显示。Raji 细胞在包含饱和浓度的纯化 hL243(20ug/ml) 的 PBS/BSA(1％) 中于 4℃孵育 1 小时。洗涤后，细胞表面 - 结合的 hL243 通过将 Raji 细胞在包含 PE- 缀合的第二抗体 (山羊抗人 IgG，Fc 片段特异性) 的缓冲液中孵育并在 Guave PCA 系统 (Guava Technologies，Inc.，Hayword，CA) 中计数来检测。如图 7 中所示，hL243 结合 Raji 细胞上由 mL243 识别的抗原，因为结合通过将细胞与 mL243 一起预孵育被特异性阻断，表明 mL243 的 Ag- 结合特异性在人源化形式中保留。

[0273] hL243γ4P 的 Ag- 结合活性。

[0274] 在一种示例性方法中，进行竞争细胞结合测定法以评估 hL243γ4P 相对于亲本 mL243 的免疫反应性。固定量的 ^{125}I- 标记的鼠 L243 或 hL243γ4P(100,000cpm，~10uCi/ug) 在各种浓度 (0.2-700nM) 的纯化 hL243γ4P 或鼠 L243 的存在下与人淋巴瘤细胞 (Raji、Daudi 或 Ramos) 一起于 4℃孵育 1-2 小时。未结合的 Abs 通过在 PBS 中洗涤细胞去除。与细胞相关的放射性在洗涤后测定。如图 8 中所示，鼠 L243 和 hL243γ4P mAbs 彼此竞争结合细胞表面抗原，表明它们识别相同的抗原决定簇。hL243γ4P 显示比 mL243 明显强约 2 倍的结合亲和力，因为它比 mL243 更好地竞争 (约 7 对约 16.5nM 的 ECso)。

[0275] hL243γ4P 的抗原结合亲和常数通过放射标记抗体的直接细胞表面结合测定法和斯卡恰特作图分析来测定。为了测量特异性细胞表面抗原结合，制备 2 组细胞并在结合测定法中用于分别估计非特异性和总结合放射性。用于非特异性结合的细胞在加入放射标记的抗体之前与过量未标记的 Ab 一起预孵育以封闭所有表面抗原位点，而用于总结合的那些在 PBS 中预孵育。预孵育后，加入各种量的 ^{125}I-hL243γ4P 或 ^{125}I-mL243 并与 2×10^5 人淋巴瘤细胞 (Raji、Daudi 或 Ramos) 一起于 4℃孵育 2 小时并通过洗涤去除未结合的抗体。计数细胞相关的放射性。在放射标记抗体给定浓度上的放射标记抗体的特异性细胞表面结合计算为 :总结合计数减去非特异性结合的计数。随后进行斯卡恰特作图分析以确定每个细胞的 hL243γ4P 和 mL243 结合位点的最大数目以及平衡结合的表观解离常数。如图 9 中所示，hL243γ4P 和 mL243 与 Daudi 细胞的最大结合基本上是相同的，约 6×10^5 个分子 / 细胞，表明它们结合相同的 Ag。关于 hL243γ4P 和 mL243 的表观解离常数值分别计算为 2.6 和 14nM。使用 Raji 和 Ramos 细胞获得相似结果 (数据未显示)。

[0276] 实施例 2.hL243γ4P 功能研究

[0277] 在一种示例性方法中，进行基于体外细胞的研究以确定 hL243γ4P 是否已保留其抗增殖效应以及效应细胞和补体结合功能是否已取消。在这个实施例中，下文描述的研究表明抗增殖效应已保留，而效应细胞和补体结合功能已取消。

[0278] 效应细胞测定法

[0279] 用 IgG4 同种型 Fc 区代替 hL243 的 Fc 区的目的是取消经由 Fey- 受体的效应细胞功能和补体 - 结合。进行 CDC 和 ADCC 测定法以评估经由 hL243y4P 的这些功能。

[0280] CDC

[0281] Daudi 细胞在人补体的存在下与系列稀释的抗体 hL243、hL243γ4P、hA20(作为另一种阳性对照) 和 hMN14(阴性对照) 一起孵育 2 小时。随后添加刃天青以评估细胞存

活率。包括未处理的和最大裂解对照。荧光读数在刃天青添加后 5 小时获得。获得的荧光水平与有活力细胞的量正相关。存活细胞%通过式（测试 - 最大裂解）/（未处理的对照 - 最大裂解）×100 计算。结果表明与 hL243(EC_{50} = 2.6nM) 和 hA20(EC_{50} = 0.66nM) 比较，hL243γ4P 对细胞不产生任何补体介导的细胞毒性效应。参见图 10。

[0282] ADCC

[0283] Daudi 细胞与 5μg/ml hA20、hL243、hL243γ4P 和 hMN14 一起孵育。效应细胞以 50 ：1 的比率添加。4 小时后，细胞裂解通过 LDH 释放（图 11A）和细胞裂解（图 1IB）测定。

[0284] 在其中显示单独的抗体对效应细胞的效应的这些结果中，可以看出 KL243 诱导效应细胞显著裂解而 hL243γ4P 则不是。当特异性裂解数字与效应细胞上的效应相关时，与 hL243 比较，hL243γ4P 显示靶细胞裂解减少很多（12%对 48%）。

[0285] 体外增殖测定法

[0286] 进行利用 MTS 生物还原（用于测定有活力细胞的数目）和 BrdU（用于基于在 DNA 合成过程中掺入的 BrdU 的测量结果定量细胞增殖）的多重比色测定法。Daudi 和 Raji 细胞与系列稀释的 hL243γ4P 一起孵育 2 和 3 天。mL243 和 hMN-14 分别用作阳性和阴性对照。孵育后，进行 BrdU 和 MTS 测定法。下文显示了 MTS 测定法的结果。BrdU 测定法产生相似结果。

[0287] 在一种示例性方法中，进行利用 MTS 生物还原（用于测定有活力细胞的数目）和 BrdU（用于基于在 DNA 合成过程中掺入的 BrdU 的测量结果定量细胞增殖）的多重比色测定法。Daudi 和 Raji 细胞与系列稀释的 hL243γ4P 一起孵育 2 和 3 天。鼠 L243 和 hMN-14 分别用作阳性和阴性对照。孵育后，进行 BrdU 和 MTS 测定法。图 12 和 13 中显示了 MTS 测定法的结果。BRDU 测定法产生相似结果（未显示）。这些结果表明 hL243γ4P 抑制 Daudi 和 Raji 细胞系的增殖。然而在 EBV 阴性细胞系 Ramos 的类似实验中，只在交联抗 Fc($Fab)_2$ 的存在下观察到增殖的抑制。

[0288] 实施例 3：在人非霍奇金氏淋巴瘤的异种移植物模型中 hL243γ4P 和 mL243(IgG2a) 的体内功效比较

[0289] 在一种示例性方法中，进行治疗性研究以比较在人非霍奇金氏淋巴瘤 (Raji) 的异种移植物模型中人源化 L243-IgG4 和鼠 L243-IgG2a 单克隆抗体同种型的体内功效。先前的体外研究已显示用 IgG4 同种型代替 L243-IgGl 的 Fc 区取消抗体的效应细胞功能 (ADCC 和 CDC)，同时保留抗增殖效应。使用工程化为 IgG4 同种型的全人抗 -HLA-DR 抗体的先前研究也已显示最小化由于 Fc- 部分 - 介导的效应物功能的副作用，同时在体外以及体内非霍奇金氏淋巴瘤的异种移植物模型和动物模型（猕猴）中提供了极佳的杀肿瘤活性而没有长效血液效应。参见 Nagy 等人，Nature Medicine,8 :801(2002)。因此，这项研究旨在确定 hL243-IgG4 在异种移植物模型中是否能维持显著的抗肿瘤功效。在足够量的 hL243-IgGl 的缺乏下，使用 mL243IgG2a（鼠 IgG2a 在补体结合和实现 ADCC 方面是人 IgGl 的等价物）。

[0290] SCID 小鼠用 2.5×10^6 个 Raji 细胞注射。使用 hL243-IgG4 或 mL243-IgG2a 的治疗在肿瘤细胞施用后 1 天开始。用盐水或非特异性对照抗体 hMN-14 注射的 2 组小鼠具有 17 天的平均存活时间 (MST)。与用盐水或 hMN-14 注射的小鼠比较，用人源化或鼠 L243 治疗的所有小鼠组具有明显改善的生存期限 (PO.0001)。用各种剂量的 hL243IgG4 治疗导致

剂量 - 应答关系，接受更高剂量的小鼠具有更佳的存活时间。在用各种剂量的 mL243IgG2a 治疗的动物组中，治愈率为 80-100％。参见图 14。

[0291] 这项研究显示 L243 的 IgG4 构建体同时保留抗肿瘤功效和去除补体结合活性。尽管这项研究在小鼠中进行，但使用前述构建体可以在患有自身免疫病、淋巴瘤或白血病的所有哺乳动物中达到显著的治疗利益。特别地，前述构建体可以在 (i) 家畜，特别是猫、狗和马中有效用于治疗自身免疫病和淋巴瘤 / 白血病 ；和 (ii) 人，用于治疗自身免疫病、淋巴瘤和白血病，以及涉及 HLA-DR 表达的免疫失调、代谢和神经变性疾病。

[0292] 实施例 4 ：在人和犬科淋巴瘤治疗中 hL243 与 L243 和抗 -B 细胞 MAbs 的体外比较

[0293] 与鼠 L243 比较以及与其他抗 -B 细胞 MAbs 比较，测试 0.5mghL243(IgG4 同种型) 样品与淋巴瘤细胞系和狗 B 细胞淋巴瘤抽吸物的反应性。还进行 2 种功能研究。测定 hL243 在狗淋巴瘤抽吸物中诱导凋亡的能力，并测试 hL243 针对 Namalwa- 报道对利妥希玛有抗性的人淋巴瘤细胞系的抗增殖活性。

[0294] 通过流式细胞法使用荧光激活细胞分类器 (FACS) 测量人源化或嵌合 MAbs 在人 B 细胞淋巴瘤上的结合，其中下列 MAbs-hMN-14、hLL1、hLL2、hA20、Rituxan 和 hL243 与 FITC 山羊抗人 (GAH)IgGFc 一起进行染色。选择的细胞系是 Namalwa(利妥希玛抗性人 B 细胞淋巴瘤细胞系)、SU-DHL-6(人 B 细胞非霍奇金淋巴瘤)、WSU-FSCCL(EBV- 阴性低度人 B 细胞淋巴瘤细胞系)、Raji、Daudi 和 Ramos 细胞 ：如表 2 中所示，hL243 结合所有上述细胞系。特别地，hL243 结合 CD20- 无应答的 Namalwa 细胞，显示比其他人源化 MAbs 更大的结合。参见表 1。此外，如通过 3-H- 胸苷摄取测定法测量的，hL243 在利妥希玛抗性人 B 细胞淋巴瘤细胞系 Namalwa 中证实了抗增殖活性。其他 CD20 抗体 - 由 Immunomedics，Inc. 开发的人源化 A20(hA20) 显示与利妥希玛 - 称为 Rituxan® 的嵌合抗 -CD20 类似的结果。参见 Stein 等人 (2004)Clin.Cancer Res.10 ：2868-2878。

[0295] 如图 16A-B 中所示，当单独给予时 hL243 产生 28％的增殖抑制 ；当 hL243 与抗人 IgG 第二抗体组合给予时这增加至 51％。当与利妥希玛组合使用时，活性增加至比任何一种单独 MAb 的那种更大的水平。参见图 16-B。

[0296] 研究还证实 hL243 与狗淋巴瘤细胞的结合亲和力比其他人源化 MAbs 更大。参见表 3。此外，KL243 当与抗 - 人 IgG 第二抗体交联时在狗淋巴瘤细胞中能够诱导凋亡，测量为具有亚 GO/G1 期 DNA 含量的细胞％。参见图 15。

[0297] 实施例 5 ：hL243 抗体组合及其效应

[0298] 方法

[0299] 抗体

[0300] 在一种示例性方法中，产生抗 -HLA-DR 单克隆抗体 L243 的杂交瘤细胞克隆从 ATCC(ATCC 号 HB-55) 获得。细胞在补充有 10％ FBS(Hyclone) 的 HSFM 培养基 (Life Technologies，Inc.) 中进行培养。编码 L243V κ 和 VH 基因的基因通过 RT-PCR 进行克隆。如先前所述 (Leung 等人，Hybridoma13 ：469(1994) ；Leung 等人，Mol.Immunol.32 ：1413(1995) ；Stein 等人，Blood104 ：3705(2004) ；Govindan 等人，Breast Cancer Res.Treat.84 ：173(2004)) 类似地产生人源化 L243(IgG1/κ 同种型)hL243γ1。

[0301] hL243 的 IgG4/κ 同种型 hL243γ4p 可以通过用 γ4 链的重链恒定区编码序列代替人 γ1 链的重链恒定区编码序列进行构建。将点突变 Ser241Pro(基于 Kabat 编号)

引入 γ4 序列的绞链区，以便避免当抗体在哺乳动物细胞培养中表达和生产时形成半分子(Schuurman 等人，Mol. Immunol. 38 :1(2001))。在研究中使用的其他 MAbs 是购自例如 IDEC Pharmaceuticals Corp.(San Diego，CA) 的利妥希玛，和 hMN-14，或由 Immunomedics，Inc 提供的拉贝珠单抗 (labetuzmab)(人源化抗 - 癌胚抗原 IgG1)。此处用作阴性同种型对照的 hMN-14 的构建和表征先前已描述。

[0302] 细胞

[0303] 示例性细胞系在几项研究中使用。例如，伯基特淋巴瘤系 -Daudi、Raji 和 Ramos 购自美国典型培养物保藏中心 (Manassas，VA)。非伯基特淋巴瘤细胞系如下获得。包含染色体易位 (14 ;18) 的 RL 和 SU-DHL-6 分别从 Dr. John Gribben(Dana-Farber Cancer Institute，Boston，MA) 和 Dr. Alan Epstein(University of Southern California，Los Angeles，CA) 获得。细胞系 SU-DHL-4、SU-DHL-10 和 Karpas422 由 Dr. Myron Czuczman(Roswell Park Cancer Institute，Buffalo，NY) 提供，并且 WSU-FCCL 和 DoHH2 细胞系从 Dr. Mitchell Smith(Fox Chase Cancer Center，Philadelphia，PA) 获得。细胞在补充有 10％胎牛血清、盘尼西林 (100U/ml)、链霉素 (100μg/ml) 和 L- 谷氨酰胺 (2mM) 的 DMEM(Life Technologies，Gaithersburg，MD)(完全培养基）中作为悬浮培养进行培养。

[0304] hL243MAbs 的抗原结合特异性

[0305] hL243γ1 的抗原结合活性和特异性通过细胞表面结合测定法显示。Raji 细胞在包含饱和浓度的纯化 hL243(20μg/ml) 的 PBS/BSA(1％）中于 4℃孵育 1 小时。洗涤后，细胞表面 - 结合的 hL243γ1 通过将 Raji 细胞在包含 PE- 缀合的第二抗体（山羊抗人 IgG，Fc 片段特异性）的缓冲液中孵育并在例如 Guave PCA 系统 (Guava Technologies，Inc.，Hayword，CA) 中计数来检测。

[0306] 进行竞争细胞结合测定法以评估 hL243γ4P 相对于亲本 mL243 的反应性。固定量的 ^{125}I- 标记的鼠 L243 或 hL243γ4P(100，000cpm，约 10μCi/μg) 在各种浓度 (0.2-700nM) 的纯化 hL243γ4P 或鼠 L243 的存在下与人淋巴瘤细胞 (Raji、Daudi 或 Ramos) 一起于 4℃孵育 1-2 小时。未结合的 Abs 通过在 PBS 中洗涤细胞去除。与细胞相关的放射性在洗涤后测定。

[0307] 在一个例子中，hL243γ4P 的抗原结合亲和常数通过放射标记抗体的直接细胞表面结合测定法和斯卡恰特作图分析来测定。为了测量细胞表面抗原结合，制备 2 组细胞并在结合测定法中用于分别估计非特异性和总结合放射性。用于非特异性结合的细胞在加入放射标记的抗体之前与过量未标记的 Ab 一起预孵育以封闭所有表面抗原位点，而用于总结合的那些在 PBS 中预孵育。预孵育后，加入各种量的 ^{125}I-hL243γ4P 或 ^{125}I-mL243 并与 2×10^5 个人淋巴瘤细胞 (Raji、Daudi 或 Ramos) 一起于 4℃孵育 2 小时并通过洗涤去除未结合的抗体。计数细胞相关的放射性。在放射标记抗体给定浓度上的放射标记抗体的特异性细胞表面结合计算为 :总结合计数减去非特异性结合的计数。

[0308] 流式细胞测定法。

[0309] 免疫表型分型：使用上述细胞系实验对象组、使用 FITC- 山羊抗 - 人 IgG(Tago，Inc.，Burlingame，CA) 基本上如前所述进行间接免疫荧光测定法，并使用 FACSCaliber(Becton Dickinson，San Jose，CA) 通过流式细胞法进行分析。

[0310] 凋亡实例分析 :碘化丙啶染色后进行细胞 DNA 的流式细胞分析。细胞置于 24 孔

板中（5×10^5 细胞 / 孔）并随后用 MAbs(5μg/ml) 处理。3 个孔用每种 MAb 制备以研究与山羊抗 - 小鼠或山羊抗 - 人第二抗体交联的效应。与第一 MAbs(37℃,5% CO_2) 一起孵育 20 分钟后，$F(ab')_2$ 山羊抗 - 小鼠 IgG Fcγ - 特异性第二抗体 (Jackson Laboratories, West Grove,PA) 加入来自每种第一 MAb 的一个孔中以将第二抗体的浓度调整至 20μg/ml。$F(ab')_2$ 山羊抗 - 人 IgG Fcγ - 特异性 (Jackson Laboratories) 类似地加入来自每种第一 MAb 的第二个孔中，并通过添加培养基均衡第三组的体积。孵育 (37℃,5% CO_2)48 小时后，将细胞转移至测试管，用 PBS 洗涤，并随后重悬浮于低渗碘化丙啶溶液（溶于 0.1% 柠檬酸钠，0.1% Triton X-100 的 50mg/ml 碘化丙啶）中。使用 FACSCaliber 通过流式细胞法分析样品。凋亡细胞百分比定义为在 G1/G0 峰（亚二倍体）之前具有 DNA 染色的细胞的百分比。

[0311] hL243 的构建和表征。

[0312] 在一种示例性方法中，产生 2 种人源化抗 -DR MAbs。hL243γ1 设计为含有人 IgG1/κ 恒定区，并且 hL243γ4p 通过用人 γ4 链的序列代替人 γ1 链的重链恒定区编码序列进行构建。将点突变 Ser241Pro 引入 γ4 序列的绞链区，以便减少当抗体在哺乳动物细胞培养中表达和生产时形成半分子 (Schuurman 等人，Mol. Immunol. 38 :1(2001))。2 种人源化 L243 抗体 γ1 和 γ4P 结合 Raji 细胞的能力显示于图 7、8 和 17 中。在图 7 中，hL243γ1 与 Raji 细胞的结合通过将细胞与亲本鼠 L243(mL243) 一起预孵育被特异性阻断，表明 mL243 的抗原 - 结合特异性在人源化形式中保留。

[0313] 在一个例子中，评估 hL243γ4P 相对于亲本 mL243 的反应性并进行竞争细胞结合测定法。固定量的 ^{125}I- 标记的 mL243 或 hL243γ4P 在各种浓度的纯化 hL243γ4P 或 mL243 的存在下与人淋巴瘤细胞 (Raji、Daudi 或 Ramos) 一起孵育。如图 8 中所示，mL243 和 hL243γ4P MAbs 彼此竞争结合细胞表面抗原，表明识别共同的抗原决定簇。hL243γ4P 具有比 mL243 明显强约 2 倍的结合亲和力（约 7 对约 16.5nM 的 EC_{50}）。通过斯卡恰特作图分析确定每个细胞的 hL243γ4P 和 mL243 结合位点的最大数目以及平衡结合的表观解离常数。如图 17 中所示，hL243γ4P 和 mL243 与 Daudi 细胞的最大结合基本上是相同的，约 6×10^5 分子 / 细胞，与结合共同抗原一致。关于 hL243γ4P 和 mL243 的表观解离常数值分别计算为 2.6nM 和 14nM。使用 Raji 和 Ramos 细胞获得相似结果（数据未显示）。

[0314] 培养的淋巴瘤细胞的抗原表达。

[0315] 在一种示例性方法中，使用间接荧光染色进行流式细胞法分析以显示 hL243γ4P 结合培养的人 B 细胞淋巴瘤实验对象组。显示了与其他表面抗原的比较。如表 4 中所示，hL243γ4P MAb 结合所有测试的细胞系。对于 Daudi 和 Raji 观察到更强烈的表达，但荧光染色的水平对于所有细胞系都是强烈的。结合与针对其他 B 细胞抗原 (CD74、CD22、CD20) 的人源化 MAbs，鼠 - 人嵌合抗 -CD20MAb 利妥希玛和人源化抗 -CEA MAb（阴性对照）的结合进行比较。对于所有 7 种细胞系 hL243γ4P 的染色明显大于 CD22 和 CD74 的染色。如通过与人源化 (hA20) 和嵌合（利妥希玛）MAbs 的反应性所示，CD20 染色是更易变的。伯基特系 Daudi、Raji 和 Ramos 表达中等水平的 CD20，而滤泡性和弥散性大 B 细胞淋巴瘤系评估为易变的。与通过 hL243γ4P 结合测量的 HLA-DR 表达比较，SU-DHL-6 具有较高的 CD20 表达，Namalwa 和 WSU-FSCCL 具有较低的 CD20 表达，并且 RL 的 2 种抗原表达大约相等。

[0316] 效应细胞测定法

[0317] 在一个例子中，hL243 的 Fc 区用 IgG4 同种型 Fc 区代替以取消经由 Fc- 受体的效应细胞功能和补体 - 结合。进行 CDC 和 ADCC 测定法以评估这些功能。

[0318] 在另一种示例性方法中，CDC Daudi 细胞在人补体的存在下与系列稀释的抗体 hL243γ1、hL243γ4P、hA20（作为另一种阳性对照）和 hMN14（抗 -CEA，阴性对照）一起孵育 2 小时。这随后为添加刃天青以评估细胞存活率。包括未处理的和最大裂解对照。荧光读数在刃天青添加后 5 小时获得。获得的荧光水平与有活力细胞数目正相关。此处的结果表明与其中观察到 CMC 的 hL243γ1（EC_{50} = 2.6nM）和 hA20（EC_{50} = 0.66nM）比较，hL243γ4P 对细胞不产生补体介导的细胞毒性效应（图 10 和 18）。

[0319] 通过钙黄绿素 AM 释放在 Raji、Daudi 和 SU-DHL-6 中还测量到 ADCC 的诱导。hL243γ4P 的活性与作为阳性对照的鼠 L243 和利妥希玛的那种进行比较。如预期的，利妥希玛和鼠 L243 诱导比阴性对照（无 MAb 和鼠和人源化 MN-14）明显更多的细胞裂解，而 hL243γ4P 则不是（图 19）。

[0320] 体外抗增殖效应。

[0321] 在一个例子中，使用 3H- 胸苷摄取测定法在 Raji、FSCCL 和 Namalwa 细胞上评估 hL243 对细胞增殖的效应（图 20B 和表 5）。在交联抗 Fc 抗体的存在或缺乏下，hL243γ4P 的效应与利妥希玛以及与 hL243γ4P 组合的利妥希玛的效应进行比较。在先前显示对利妥希玛相对不敏感的 FSCCL 中，hL243γ4P 产生比利妥希玛明显更大的增殖抑制。在 Ramos 中，hL243 和利妥希玛的活性是相似的，并且组合比任何一种单独的更有效。组合可能具有协同效应。与抗人 Fc 抗体的交联是在 Ramos 中看到的显著抗增殖活性所必需的。在 Namalwa 中，如同 FSCCL 一样，hL243γ4P 产生比利妥希玛明显更大的增殖抑制，并且利妥希玛和 hL243γ4P 的组合产生比任何一种单独的 MAb 明显更多的增殖抑制。

[0322] 凋亡诱导的评估

[0323] 在一种示例性方法中，hL243γ4P- 诱导的细胞死亡测定法的机制通过测量各种凋亡标记进行评估。这些包括 DNA 断裂的诱导、膜联蛋白 V/7-AAD 染色、激活的胱天蛋白酶 -3 的测量、线粒体膜电位的丧失和 AKT 存活途径的激活。

[0324] 在另一例子中，在 SU-DHL-6 和 Namalwa 中通过流式细胞法评估 DNA 断裂。细胞与含或不含用于交联的第二 MAb 的 MAbs 一起培养 48 小时，随后为使用碘化丙啶的 DNA 染色。细胞通过流式细胞法分析，并且 G1 区下的阳性荧光代表 DNA 断裂并且是凋亡的测量。hL243γ4P 的活性与针对其他 B 细胞抗原的人源化 MAbs，包括抗 -CD74（hLL1）、抗 CD22（hLL2，依帕珠单抗（epratuzumab））、抗 -CD20（hA20），以及鼠 - 人嵌合抗 -CD20MAb 利妥希玛的活性进行比较。对照包括无第一 MAb 和阴性对照人源化抗 -CEA MAb-hMN-14。hL243γ4P 在 2 种细胞系中诱导凋亡，水平类似于或大于其他抗 B 细胞 MAbs（图 21A 和 21B）。

[0325] 在一个具体实施方案中，使用试剂盒（例如 Guava Nexin™ 试剂盒）以区别 Daudi 细胞中的凋亡和非凋亡死细胞。在这个例子中，试剂盒利用膜联蛋白 -V-PE 检测凋亡细胞外膜上的磷脂酰丝氨酸（PS）和细胞不透性染料 7-AAD 作为膜结构完整性的指示剂。7-AAD 排除活的健康细胞和早期凋亡细胞，但渗入晚期凋亡和死细胞。如图 21B 中所示，这项研究的结果表明在 4 小时和 24 小时处理后 hL243γ4P 诱导类似于 mL243 的凋亡。相反，抗 -CD20MAb 在 Daudi 中不诱导可测量的凋亡。因此，通过次级试剂例如抗 - 人 IgG 或 A 蛋

白的高度交联可以在包括 Daudi 的许多细胞系中用于诱导通过抗 -CD20MAbs 的凋亡。

[0326] 在另一例子中，人源化和鼠 L243 对线粒体电位的效应在不同细胞，即 SU-DHL-6、Daudi、Raji、WSU-FSCCL、RL 和 Namalwa 中进行研究。结果在图 22 中表示，表明使用鼠和人源化 L243MAbs 都观察到线粒体膜电位的凋亡变化。与第二抗体的交联可能不是必需的，但可以增加评估的 6 种细胞系中的 2 种 -FSCCL 和 Namalwa 中的效应。无需交联剂，通过 hL243γ4P 诱导的线粒体膜电位的丧失大于抗 -CD20MAb(hA20) 的那种。使用交联，hA20 水平在 6 种细胞系中的 3 种 (RL、SU-DHL-6 和 Daudi) 中增加至 hL243γ4P 的那些。

[0327] 在一个例子中，通过人源化和鼠 L243 诱导的活化胱天蛋白酶 -3 通过流式细胞法在淋巴瘤细胞系实验对象组中进行评估。表 6 中概括的结果代表在与第二抗体交联的缺乏下在类似水平上的鼠和人源化 L243 诱导的胱天蛋白酶 -3 激活。使用 L243MAbs 诱导的活化胱天蛋白酶 -3 在所有细胞系中大于 hA20 的那种。使用第二抗体这些水平增加并且 hA20 的效应类似于 hL243γ4P 的那种，除了在 Namalwa 和 FSCCL 中，这 2 种细胞系我们照例观察到对于抗 -CD20MAbs 相对不敏感。切割的胱天蛋白酶 -3 也在 Daudi 中经过 2 天的时间进程进行测定 (图 23A)。对于 L243γ4P 的大约 2 天孵育，活性持续增加。小于 1 小时的时间段未进行。

[0328] 在一个例子中，在 L243 作用机制中 AKT 的涉及在 6 种细胞系中通过流式细胞法进行测定。细胞与各种 MAbs 一起孵育 2 天，随后测定磷酸 -AKT。表 7 中列出的结果显示 L243 在所有细胞系中激活 AKT。对于所有细胞系在抗 -CD20-hA20 处理的细胞以及抗 -CD74 和抗 -CD22 处理的细胞中磷酸 -AKT 水平 (未显示) 类似于未处理的细胞。为了确定 P-AKT 激活的时间进程，Daudi 细胞与 MAbs 一起孵育各种时间，在 0 分钟 - 约 2 天的时间点上去除 MAbs(通过离心法)(图 23B、图 23C)。这些结果表示通过 L243 的 AKT 激活可以比通过这种测定法可

[0329] 以测量的发生得更快，因为即使在 0 时间点上 P-AKT 水平也等于 2 天时间点。

[0330] 在非霍奇金氏淋巴瘤 (Raji) 异种移植物模型中 hL243 的体内治疗效应

[0331] 在一种示例性方法中，进行治疗性研究以比较比较在人非霍奇金氏淋巴瘤 (Raji) 的异种移植物模型中 hL243γ4P 和 mL243(IgG2a 同种型) 单克隆抗体的体内功效。这项研究的目标是确定 hL243γ4P 在异种移植物模型中是否能维持显著的抗肿瘤功效。SCID 小鼠用 2.5×10^6 个 Raji 细胞注射。使用 hL243γ4P 或 mL243 的治疗在肿瘤细胞施用后 1 天开始。结果显示于图 24 中。用盐水或非特异性对照抗体 hMN-14 注射的 2 组小鼠具有 17 天的平均存活时间 (MST)。与用盐水或 hMN-14 注射的小鼠比较，用人源化或鼠 L243 治疗的所有小鼠组具有明显改善的生存期限 ($P < 0.0001$)。用各种剂量的 hL243γ4P 治疗导致剂量 - 应答关系，接受更高剂量的小鼠具有更佳的存活时间。在用各种剂量的 mL243IgG2a 治疗的动物组中，治愈率为 80-100％。

[0332] 表 1. 人源化和鼠 MAbs 对 Namalwa 结合的比较

[0333]

人源化 MAbs	荧光几何平均值 第二 Ab:FITC GAH	鼠 MAbs	荧光几何平均值 第二 Ab:FITC GAM
无	2.52	无	2.91
HMN14	2.49	Ag8	3.64
hRS7	2.47	MN14	3.32
hLL1	10.06	RS7	3.39
hLL2	6.76	LL1	17.31
hA20	6.28	LL2	10.46
利妥希玛	7.33	1F5	3.83
HL243	324.16	m2B8	6.16
		L243	594.96

[0334] [利妥希玛不是人源化的,而是嵌合 MAb。]

[0335] 表 2. 细胞系的表型分型(通过 FACS 测定法测定的 B 细胞系上的人源化或嵌合 Mabs 的结合)。

[0336] 使用 FITC-GAH Fc 第二 Ab 染色的间接测定法

[0337]

荧光几何平均值							利妥希玛
无		hMN14	hLL1	hLL2	hA20	ab	HL243
Namalwa	2.56	2.36	7 .81	6.43	10. .11	14.12	260.89
SU-DHL-6	4.62	4.94	17 .29	11.00	1199 .34	1308.89	572.29
WSU-FSCCL	2.68	2.66	8 .66	4.15	8. .91	12.45	466.75
Raji	6.88	6.96	95 .10	22.61	267 .09	394.57	971.99
Daudi	3.17	3.16	48 .77	51.67	240. .96	380.45	937.42
Ramos	3.13	3.13	23 .25	14.56	203, .65	374.98	277.57

[0338] 表 3. 狗淋巴瘤抽吸物的表型分型

[0339]

鼠	MAbs %	平均 FL	人源化	MAbs %	平均 FL
	% Positive	Mean FL		% Positive	Mean FL
无	3.85	3.37	无	4.48	3.24
Ag8	2.81	3.04	hMN-14	4.63	3.24
L243	77.77	10.41	hL243	26.33 d	5.47
m2B8	2.61	3.11	hA20	3.96	3.25
LL1	6.69	4.01	hLL1	4.71	3.33
LL2	5.05	3.73	hLL2	4.85	3.37

[0340] 表 4. B 细胞系上的人源化或嵌合 MAbs 的结合。使用 FITC-GAHFc 特异性第二抗体染色进行间接流式细胞测定法。

[0341]

	荧光几何平均值						
	无	抗-CEA（hMN14）	抗-CD74（hLL1）	抗-CD22（hLL2）	抗-CD20（hA20）	抗-CD20 (利妥希玛)	抗-HLA-DR (hL243γ4P)
Daudi	3.2	3.2	48.8	51.7	241.0	380.5	937.4
Namalwa	2.6	2.4	7.8	6.4	10.1	14.1	260.9
Raji	6.9	7.0	95.1	22.6	267.1	394.6	972.0
Ramos	3.1	3.1	23.3	14.6	203.7	375.0	277.6
RL	2.4	2.8	7.9	5.1	127.5	147.8	112.2
SU-DHL-6	4.6	4.9	17.3	11.0	1199.3	1308.9	572.3
WSU-FSCCL	2.7	2.7	8.7	4.2	8.9	12.5	466.8

[0342] 表 5. 交联或不交联的 MAbs 的抗增殖活性概括 (3-H- 胸苷摄取的抑制％)

[0343]

	利妥希玛+hL243	利妥希玛	hL243γ4P
不交联的 MAbs 的抗增殖活性			
Ramos	18.2±4.9	-7.9±3.6	10.1±11.9
		(0.0001) [a]	(0.3619)
FSCCL	75.9±10.2	13.4±12.3	78.9±1.7
		(0.0028)	(0.6611)
Namalwa	50.1±1.1	13.8±5.6	27.8±3.3
		(0.0061)	(0.0038)
在抗-人第二 Ab 的存在下 MAbs 的抗增殖活性			
Ramos	69.0±7.0	50.5±9.4	56.8±0.8
		(0.0519)	(0.0073)
FSCCL	94.5±0.9	28.1±9.6	94.5±0.8
		(0.0067)	(0.9984)
Namalwa	58.1±2.1	14.7±7.0	51.5±3.0
		(0.0050)	(0.0416)

[0344] [a] 括号中的数目代表与利妥希玛 +hL243 γ 4P 的组合比较的单一 MAbs 的 P 值。

[0345] 表 6. 切割的胱天蛋白酶 -3 测定法

[0346]

	切割的胱天蛋白酶-3 （超过无 MAb 对照的 %）				
	人源化 MAbs			鼠 MAbs	
	hL243g4P	hA20	hMN-14	mL243	mMN-14
无交联					
Ramos	26.9	3.2	0.8	15.8	3.9
Namalwa	18.4	-0.1	0.2	9.4	0.5
FSCCL	46.4	0.7	0.3	26.2	-0.7
Daudi	48.1	7.9	0.9	45.8	1.0
RL	22.5	1.5	-0.1	18.2	-0.3
SU-DHL-6	52.2	30.9	2.3	46.5	0.2
Raji	22.5	1.5	-0.1	18.2	-0.3
使用第二 Ab					
Ramos	71.7	67.8	7.3	40.3	3.0
Namalwa	72.2	20.4	7.9	25.2	-0.3
FSCCL	86.7	20.0	8.4	55.0	1.5
Daudi	68.9	72.0	2.9	51.2	0.0
RL	37.3	24.2	4.0	4.0	0.7
SU-DHL-6	72.1	75.8	5.5	51.4	-0.9
Raji	59.8	37.4	2.8	20.4	-0.3

[0347] 表 7. P-AKT 测定法

[0348]

	超过无 MAb 对照的 %				
	人源化 MAbs			鼠 MAbs	
	hL243g4P	hA20	hMN-14	mL243	mMN-14
Namalwa	8.4	-2.8	1.3	3.5	-4.4
FSCCL	25.1	-1.4	3.9	16.3	-1.7
Daudi	34.9	1.0	-1.4	24.5	-2.1
RL	5.9	1.8	0.0	1.3	1.3
SU-DHL-6	29.8	0.2	1.2	26.1	-0.5
Raji	5.1	-0.9	-1.6	17.2	-4.2

[0349] 依据本公开内容本文公开和要求的所有组合物和 / 或方法和 / 或装置无需过度实

验即可制备和执行。尽管本发明的组合物和方法已根据优选实施方案进行描述，但对于本领域技术人员显而易见的是，无需背离本发明的概念、精神和范围即可对本文描述的组合物和／或方法和／或装置以及方法的步骤或步骤顺序应用变化。更具体而言，显而易见的是化学和生理学相关的某些试剂可以取代本文描述的试剂同时达到相同或相似的结果。对本领域技术人员显而易见的所有此类相似取代和修改视为在如通过所附权利要求限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0001]

序列表

<110> IMMUNOMEDICS, INC.
GOLDENBERG, David M.
HANSEN, Hans J.
QU, Zhengxing
CHANG, Chien-Hsing

<120> 人源化 L243 抗体

<130> 78258－33058

<140> 未定
<141> 2006-03-02

<160> 25

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 324
<212> DNA
<213> 小鼠抗-HLA-DR 抗体

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 1

```
gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gta tct gtg gga       48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac agt aat       96
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

tta gca tgg tat cgt cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc      144
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
        35                  40                  45

ttt gct gca tca aac tta gca gat ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc      192
Phe Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tca ggc aca cag tat tcc ctc aag atc aac agc ctg cag tct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt ggg gat tat tac tgt caa cat ttt tgg act act ccg tgg      288
Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Trp
                85                  90                  95

gcg ttc ggt gga ggc acc aac ctg gaa atc aaa cgt                      324
Ala Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

[0002]

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠抗-HLA-DR 抗体

<400> 2

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 3
<211> 363
<212> DNA
<213> 小鼠抗-HLA-DR 抗体 L243

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

<400> 3
cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag 48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

[0003]

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

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

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

gca aga gat att act gcg gtt gta cct acg ggt ttt gac tac tgg ggc      336
Ala Arg Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

caa ggc acc act ctc acc gtc tcc tca                                 363
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
        115                 120
```

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> 小鼠抗-HLA-DR 抗体 L243

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
```

[0004]

115 120

<210> 5
<211> 324
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

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

<400> 5

```
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 cga gca agt gag aat att tac agt aat       96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

tta gca tgg tat cgt cag aaa cca ggg aaa gca cct aaa ctg ctg gtc      144
Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
        35                  40                  45

ttt gct gca tca aac tta gca gat ggt gtg cct tcg cga ttc tct ggc      192
Phe Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agc gga tct ggg aca gat tat act ttc acc atc agc tct ctt caa cca      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

gaa gac att gca aca tat tat tgt caa cat ttt tgg act act ccg tgg      288
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Trp
                85                  90                  95

gcg ttc ggt gga ggg acc aag ctg cag atc aaa cgt                      324
Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 6

```
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 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30
```

[0005]

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

Phe Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp 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 His Phe Trp Thr Thr Pro Trp
                85                  90                  95

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

<210> 7
<211> 363
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 7

```
cag gtg caa ctg cag caa tct ggg tct gag ttg aag aag cct ggg gcc      48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga ttt acc ttc aca aac tat      96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

gga atg aac tgg gtg aag cag gcc cct gga caa ggg ctt aag tgg atg     144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
        35                  40                  45

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

aag gga cgg ttt gcc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg gca tat     240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

ctc cag atc agc agc cta aag gct gac gac act gcc gtg tat ttc tgt     288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

gca aga gat att act gcg gtt gta cct acg ggt ttt gac tac tgg ggc     336
Ala Arg Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
```

[0006]

caa ggg tcc ctg gtc acc gtc tcc tca 363
Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> 人

<400> 9

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

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

[0007]

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

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

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

Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Asp Ser Asn Gly Tyr Lys Ile Phe Asp Tyr
100 105

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> Murinae gen. sp.

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0008]

115 120

<210> 11
<211> 121
<212> PRT
<213> 人源化抗体

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ile Thr Ala Val Val Pro Thr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

<400> 12

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

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

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

[0009]

35 40 45

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

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

Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Asp Ser Asn Gly Tyr Lys Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

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

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

Tyr Glu Ala Ser Asn 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
100 105

[0010]

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Gly Asp Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Thr Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 15

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 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

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

[0011]

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 His Phe Trp Thr Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 16
<211> 175
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 16
ggtctgagtt gaagaagcct ggggcctcag tgaaggtttc ctgcaaggct tctggattta 60

ccttcacaaa ctatggaatg aactgggtga agcaggcccc tggacaaggg cttaagtgga 120

tgggctggat aaacacctac actagagagc caacatatgc tgatgacttc aaggg 175

<210> 17
<211> 168
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 17
acccttggcc ccagtagtca aaacccgtag gtacaaccgc agtaatatct cttgcacaga 60

aatacacggc agtgtcgtca gcctttaggc tgctgatctg gagatatgcc gtgctgacag 120

aggtgtccaa ggagaaggca aaccgtcccc tgaagtcatc agcatatg 168

<210> 18
<211> 38
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 18
gtggtgctgc agcaatctgg gtctgagttg aagaagcc 38

<210> 19
<211> 38
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 19
tgaggagacg gtgaccaggg acccttggcc ccagtagt 38

<210> 20
<211> 155

[0012]

<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 20
tccatcatct ctgagcgcat ctgttggaga tagggtcact atcacttgtc gagcaagtga 60

gaatatttac agtaatttag catggtatcg tcagaaacca gggaaagcac ctaaactgct 120

ggtctttgct gcatcaaact tagcagatgg tgtgc 155

<210> 21
<211> 159
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 21
cagcttggtc cctccaccga acgcccacgg agtagtccaa aaatgttgac aataatatgt 60

tgcaatgtct tctggttgaa gagagctgat ggtgaaagta taatctgtcc cagatccgct 120

gccagagaat cgcgaaggca caccatctgc taagtttga 159

<210> 22
<211> 38
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 22
gacattcagc tgacccagtc tccatcatct ctgagcgc 38

<210> 23
<211> 31
<212> DNA
<213> 人源化小鼠抗体

<400> 23
ccggcagatc tgcagcttgg tccctccacc g 31

<210> 24
<211> 47
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 24
ccgcggtcac atggcaccac ctctcttgca gcttccacca agggccc 47

<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> 小鼠

<400> 25
ccggccgtcg cactcattta cccagagaca ggg 33

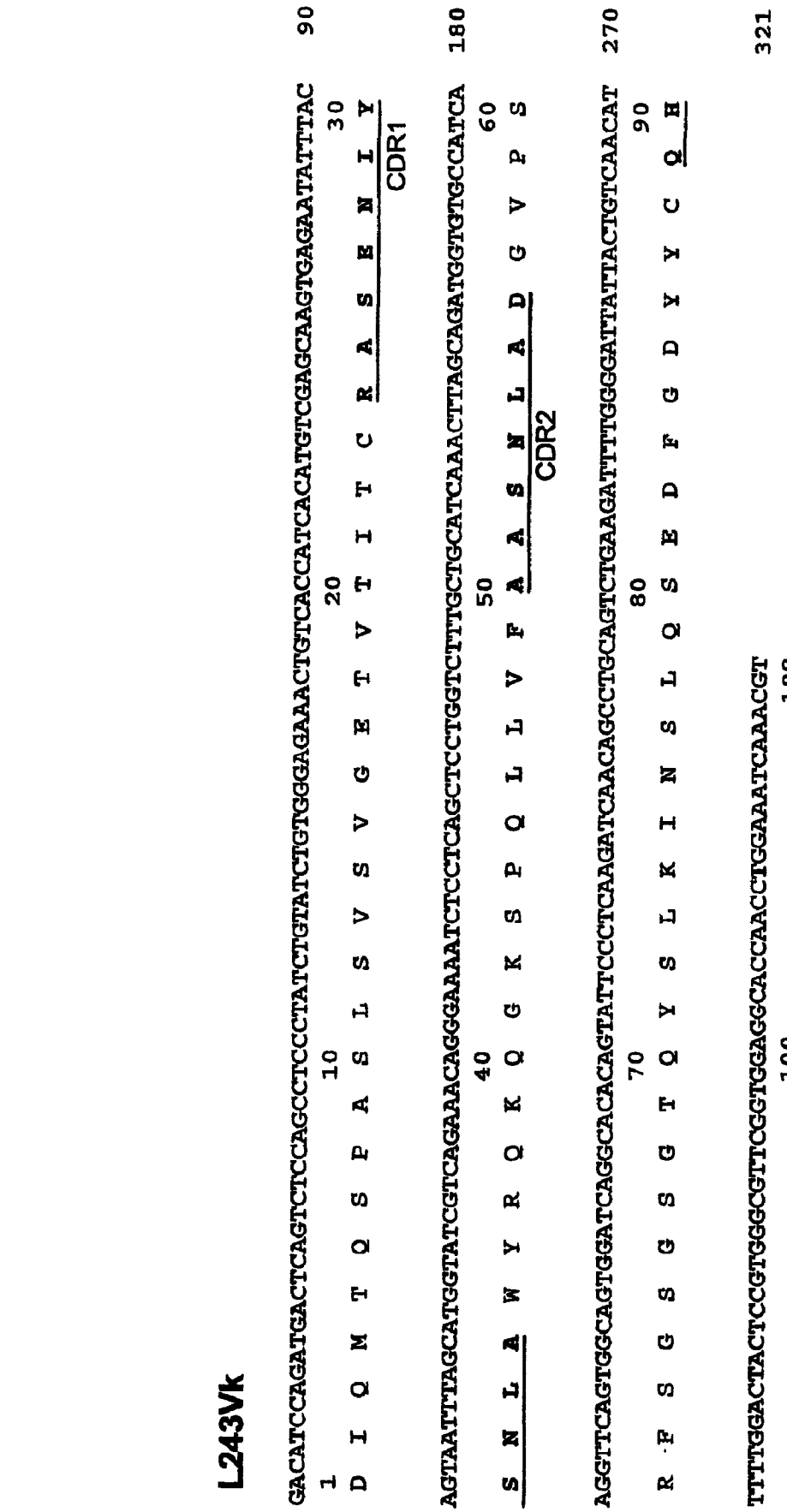

L243Vk
GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTAC
1
10
20
30
90
D I Q M T Q S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S E N I Y
CDR1
AGTAATTTAGCATGGTATCGTCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTTTGCTGCATCAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCA
40
50
60
180
S N L A W Y R Q K Q G K S P Q L L V F A A S N L A D G V P S
CDR2
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGATTATTACTGTCAACAT
70
80
270
90
R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q S E D F G D Y Y C Q H
TTTTGGACTACTCCGTGGGCGTTCGGTGGAGGCACCAACCTGGAAATCAAACGT
100
108
321
F W T T P W A F G G G T N L E I K R
CDR3

图 1

L243VH

```
CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTTTACCTTCACA   90
  1                 10                  20                  30
Q  I  Q  L  V  Q  S  G  P  E  L  K  K  P  G  E  T  V  K  I  S  C  K  A  S  G  F  T  F  T

AACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTAGAGAGCCAACATAT  180
                  40                  50      52  A
N  Y  G  M  N  W  V  K  Q  A  P  G  K  G  L  K  W  M  G  W  I  N  T  Y  T  R  E  P  T  Y
      CDR1                                        CDR 2

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

ACGGCTAAATATTTCTGTGCAAGAGATATTACTGCGGTTGTACCTACGGGTTTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACCGTCTCC  360
      90                  100 A  B  C  D                  110
T  A  K  Y  F  C  A  R  D  I  T  A  V  V  P  T  G  F  D  Y  W  G  Q  G  T  T  L  T  V  S
                        CDR3

TCA                                                                                          363
113
 S
```

图 2

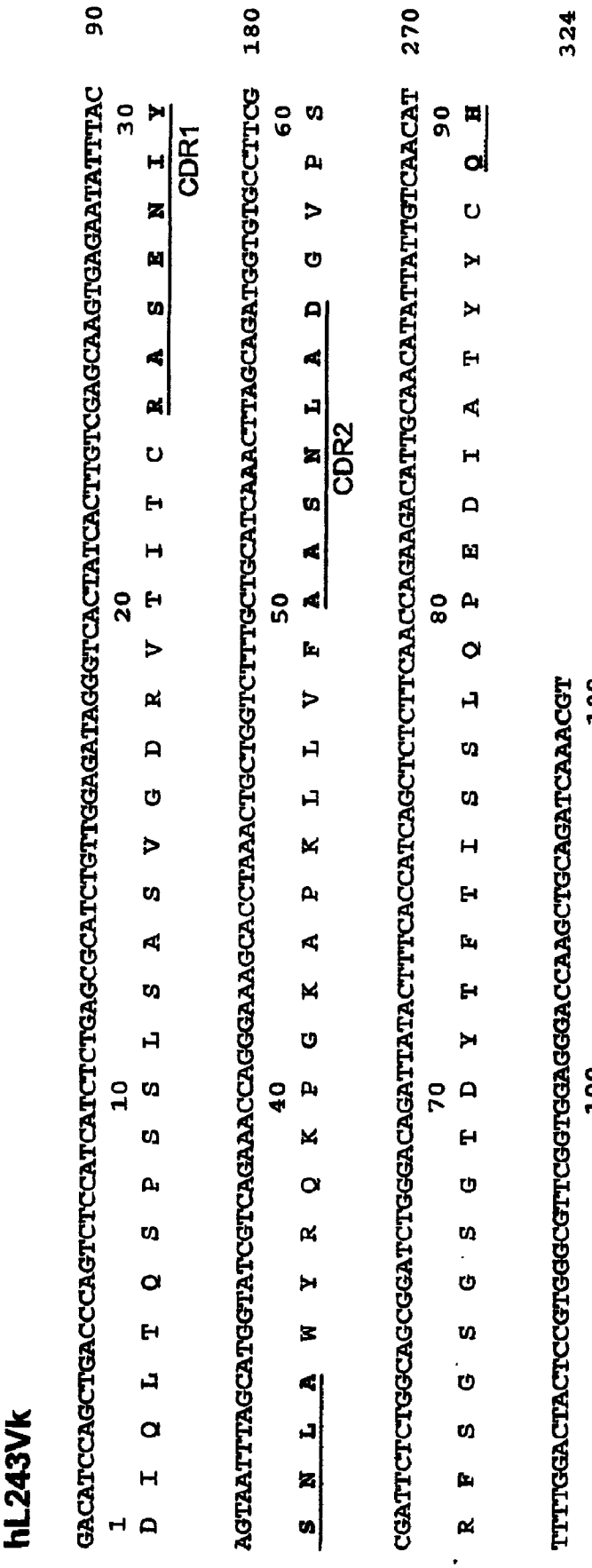

hL243Vk
GACATCCAGCTGACCCAGTCTCCATCTCTGAGCGCATCTGTTGGAGATAGGGTCACTATCACTTGTCGAGCAAGTGAGAATATTTAC
1 10 20 30 90
D I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S E N I Y
CDR1
AGTAATTTAGCATGGTATCGTCAGAAACCAGGGAAAGCACCTAAACTGCTGGTCTTTGCTGCATCAAACTTAGCAGATGGTGTGCCTTCG 180
40 50 60
S N L A W Y R Q K P G K A P K L L V F A A S N L A D G V P S
CDR2
CGATTCTCTGGCAGCGGATCTGGACAGATTATACTTTCACCATCAGCTCTCTTCAACCAGAAGACATTGCAACATATTATTGTCAACAT 270
70 80 90
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 Y C Q H
TTTTGGACTACTCCGTGGGGCGTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGCAGATCAAACGT 324
100 108
F W T T P W A F G G G T K L Q I R K
CDR3

图 3

hL243VH

```
CAGGTGCAACTGCAGCAATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATTTACCTTCACA   90
 1                 10                  20                  30
 Q  V  Q  L  Q  Q  S  G  S  E  L  K  K  P  G  A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G  F  T  F  T

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

GCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGCACGGCATATCTCCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGACGAC  270
 60                  70                  80                  82  A  B  C
 A  D  D  F  K  G  R  F  A  F  S  L  D  T  S  V  S  T  A  Y  L  Q  I  S  S  L  K  A  D  D

ACTGCCGTGTATTTCTGTGCAAGAGATATTACTGCGGTTTGTACCTACGGGTTTTTGACTACTGGGGCCAAGGGTCCCTGGTCACCGTCTCC  360
 90                  100 A  B  C  D                  110
 T  A  V  Y  F  C  A  R  D  I  T  A  V  V  P  T  G  F  D  Y  W  G  Q  G  S  L  V  T  V  S
                      ----------CDR3----------

TCA                                                                                          363
113
 S
```

图 4

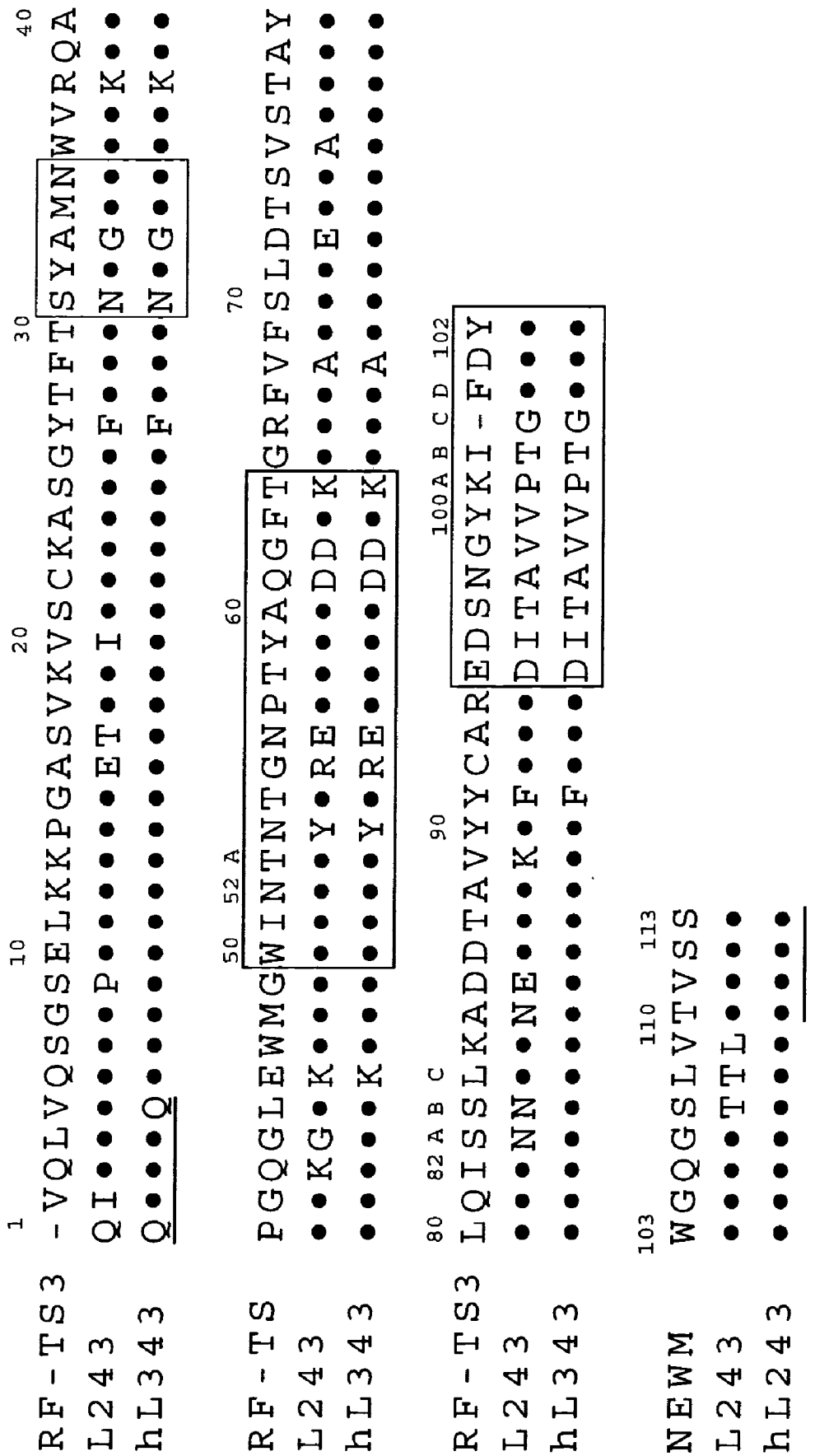

1
10
20
30
40
RF-TS3 -VQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQA
L243 QI●●●●P●●●●●ET●●I●●●●F●●●N●G●●●●K●●
hL343 Q●●●●Q●●●●●●●●●●●●●●F●●●N●G●●●●K●●
50 52 A 60 70
RF-TS PGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY
L243 ●●KG●K●●●●●●●Y●RE●●●●DD●K●●●A●●E●●A●●●
hL343 ●●●●●K●●●●●●Y●RE●●●●DD●K●●●A●●●●●●●●
80 82 A B C 90 100 A B C D 102
RF-TS3 LQISSLKADDTAVYYCAREDSNGYKI-FDY
L243 ●●●NN●●NE●●●●K●F●●●DITAVVPTG●●●
hL343 ●●●●●●●●●●●●●●F●●●DITAVVPTG●●●
103 110 113
NEWM WGQGSLVTVSS
L243 ●●●●TTL●●●●
hL243 ●●●●●●●●●●

图 5

```
          1        10        20        30        40
REIVk     DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIIKYLNWYQQTP
L243Vk    ••••••••A•••V•••ET•••••R••EN•YSN•A••R•KQ
hL243Vk   DIQL•••••••••••••••••••R••EN•YSN•A••R•K•

                   50        60        70        80
REIVk     GKAPKLLIYEASNLQAGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP
L243Vk    ••S•Q•••VFA••••AD••••••••••••Q•SLK•N•••S
hL243Vk   ••••••••VFA••••AD•••••••••••••••••••••••

                   90        100     108
REIVk     EDIATYYCQQYQSLPYTFGQGTKLQIT-
L243Vk    ••FGD••••HFWTT•WA••G••N•E•KR
hL243Vk   •••••••••HFWTT•WA••G•••••IKR
```

图 6

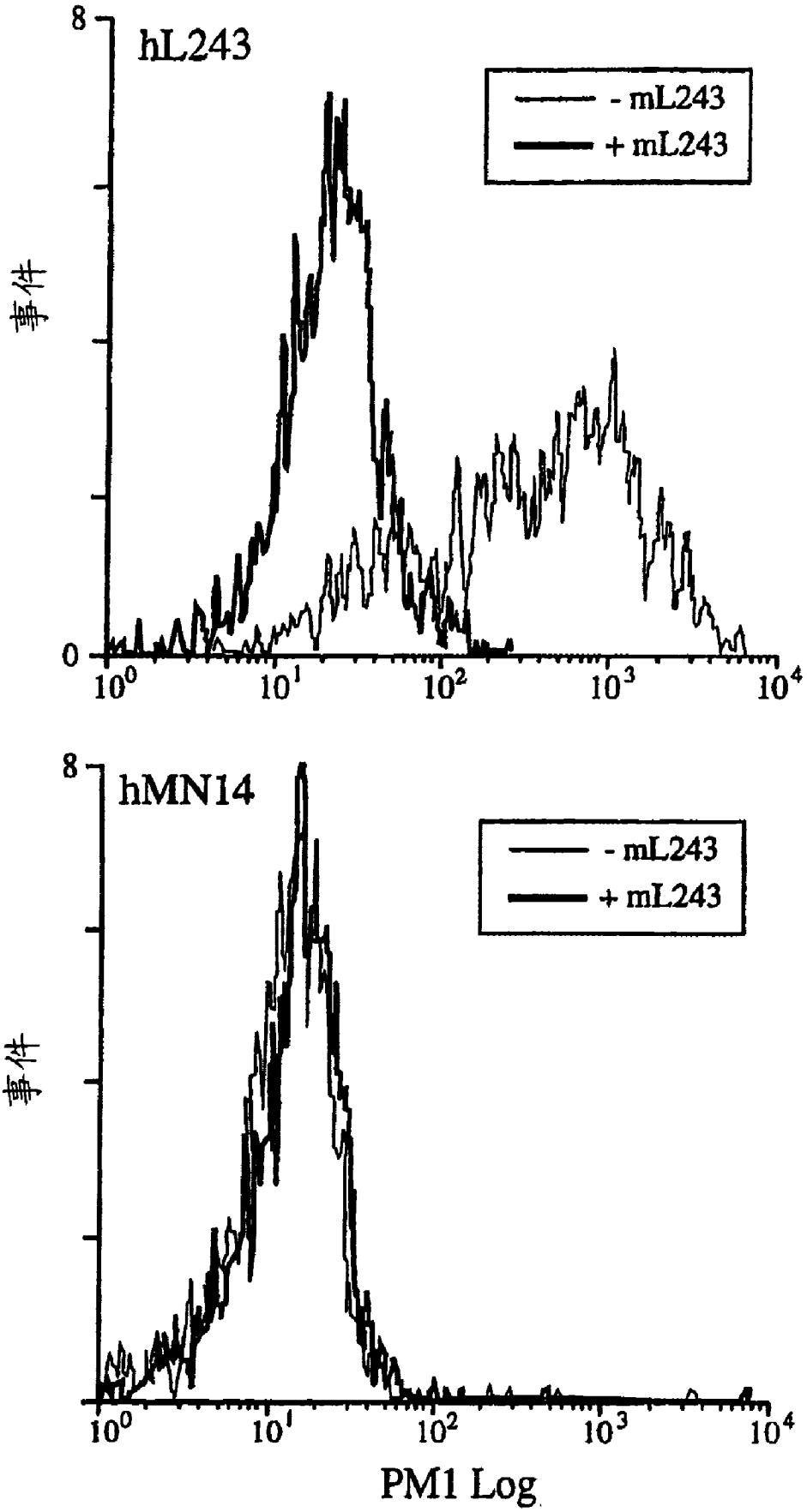
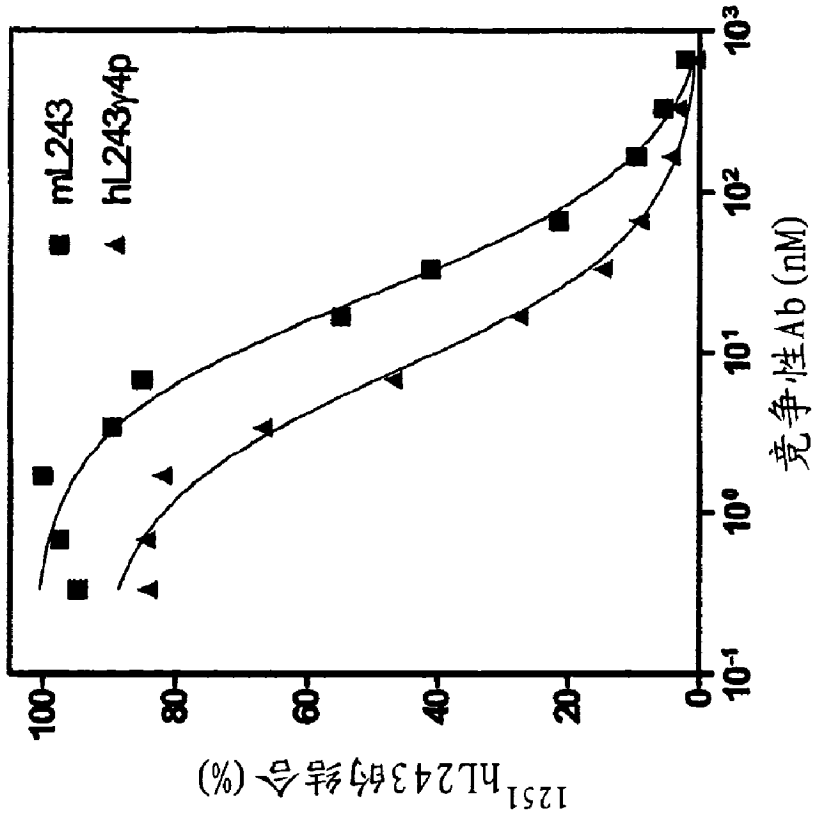

hL243
- mL243
+ mL243
事件
8
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
hMN14
- mL243
+ mL243
事件
8
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
PM1 Log

图 7


mL243
hL243γ4p
125I hL243的结合 (%)
竞争性Ab (nM)
0
20
40
60
80
100
10-1
100
101
102
103

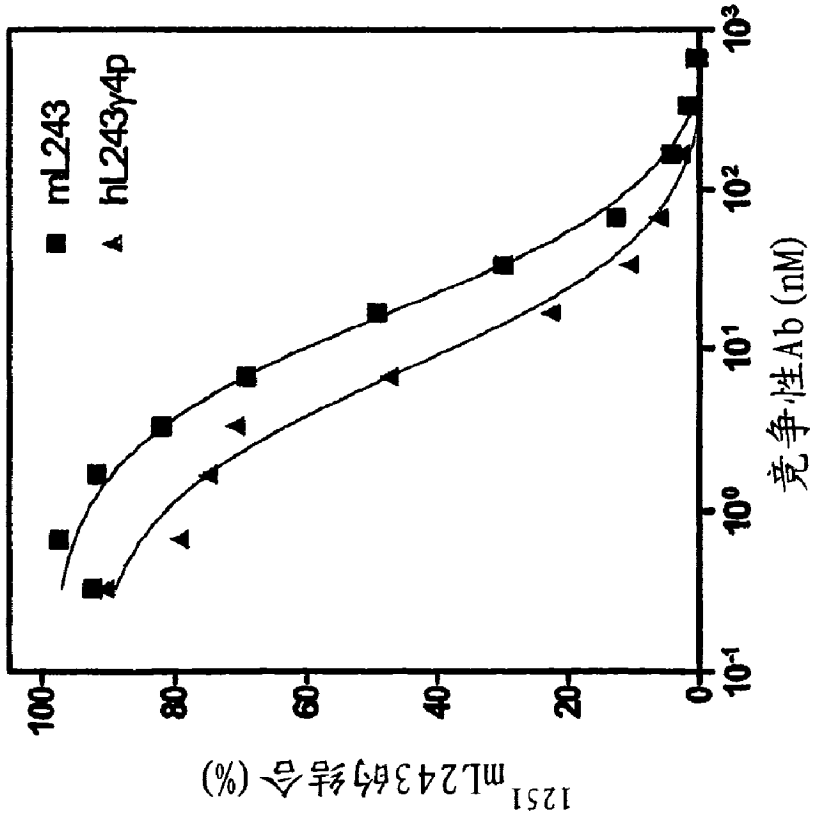

mL243
hL243γ4p
125I mL243的结合 (%)
竞争性Ab (nM)
0
20
40
60
80
100
10-1
100
101
102
103

图 8

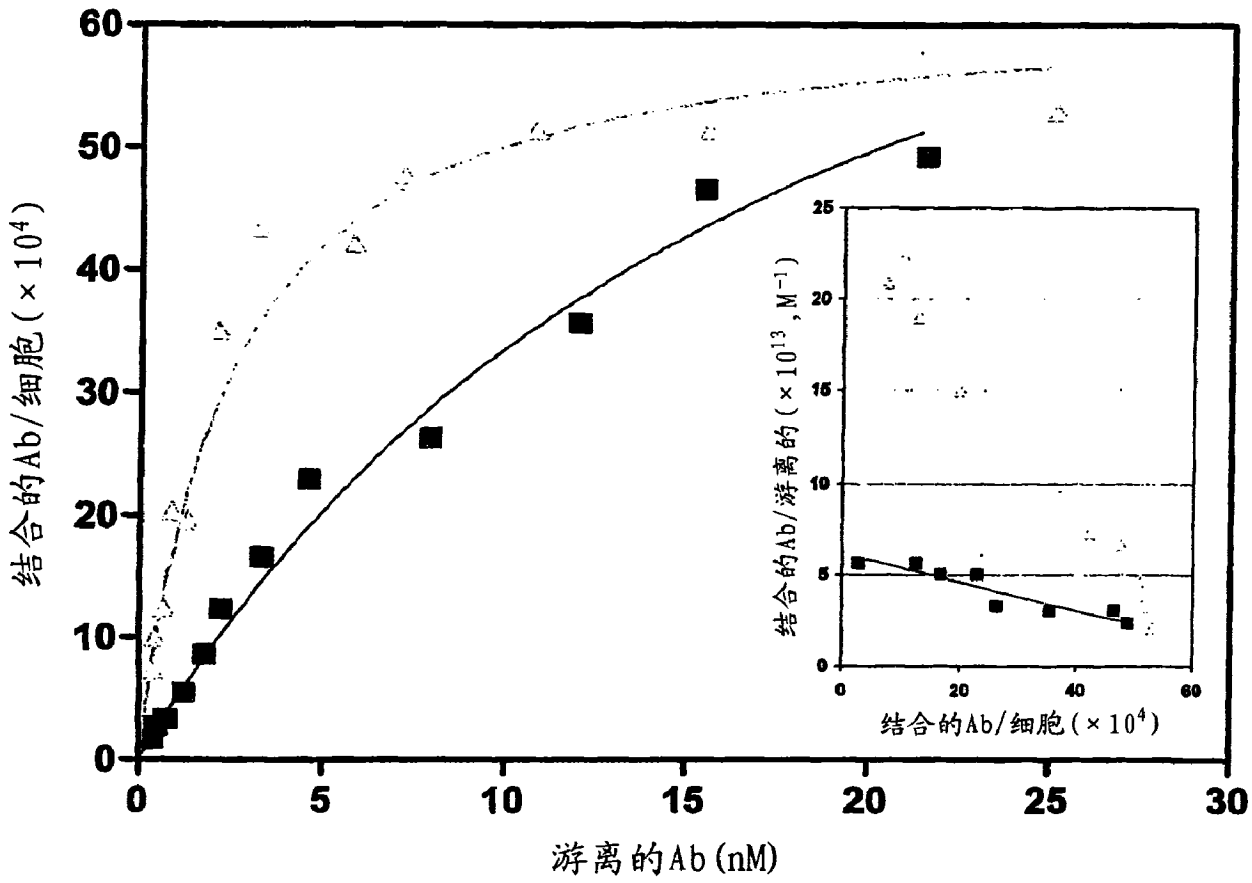

60
50
40
30
20
10
0
结合的Ab/细胞(×10⁴)
0
5
10
15
20
25
30
游离的Ab(nM)
25
20
15
10
5
0
结合的Ab/游离的(×10¹³,M⁻¹)
0
20
40
60
结合的Ab/细胞(×10⁴)

图 9

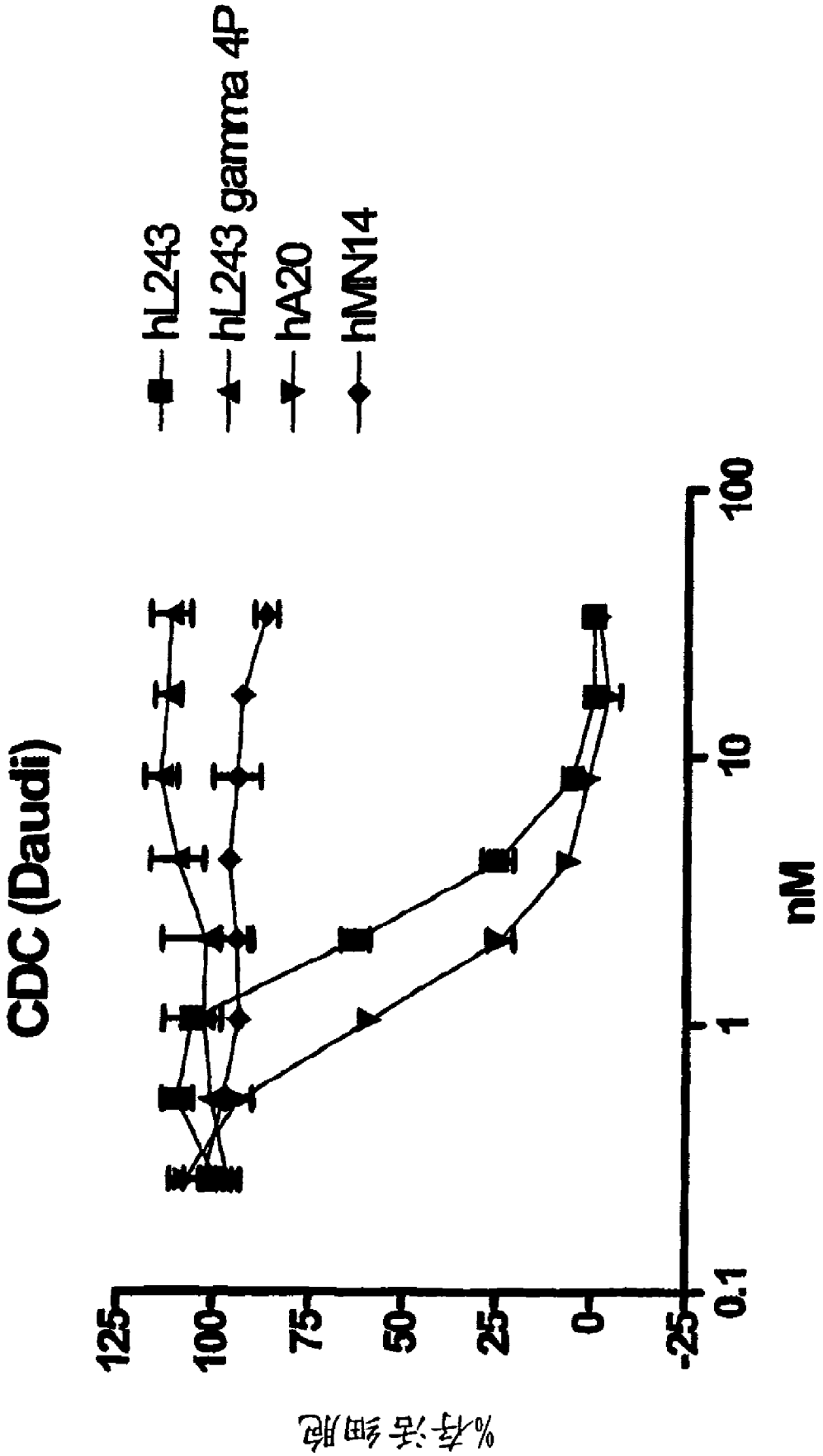

hL243
hL243 gamma 4P
hA20
hMN14
CDC (Daudi)
% 存活细胞
125
100
75
50
25
0
-25
0.1
1
10
100
nM

图 10

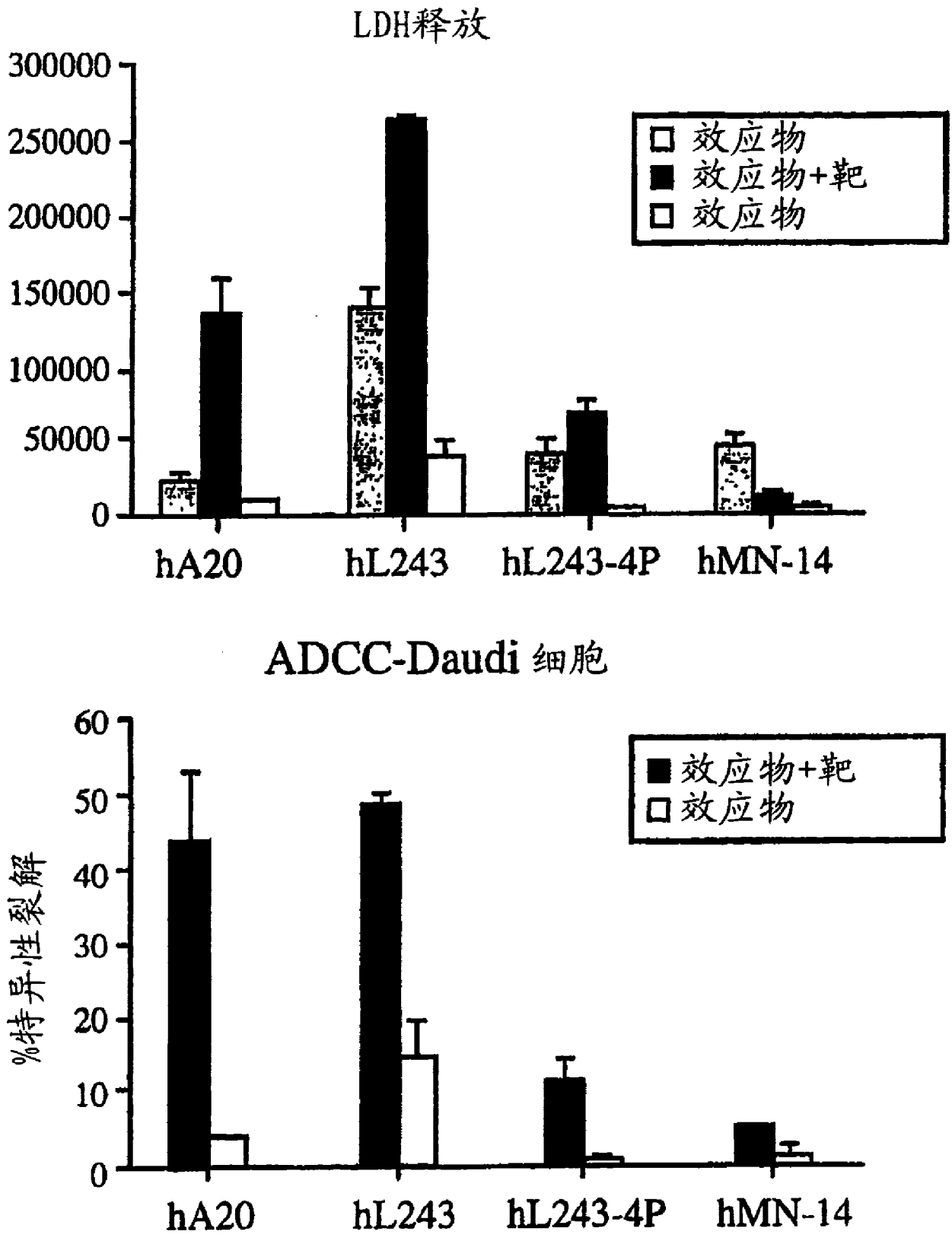
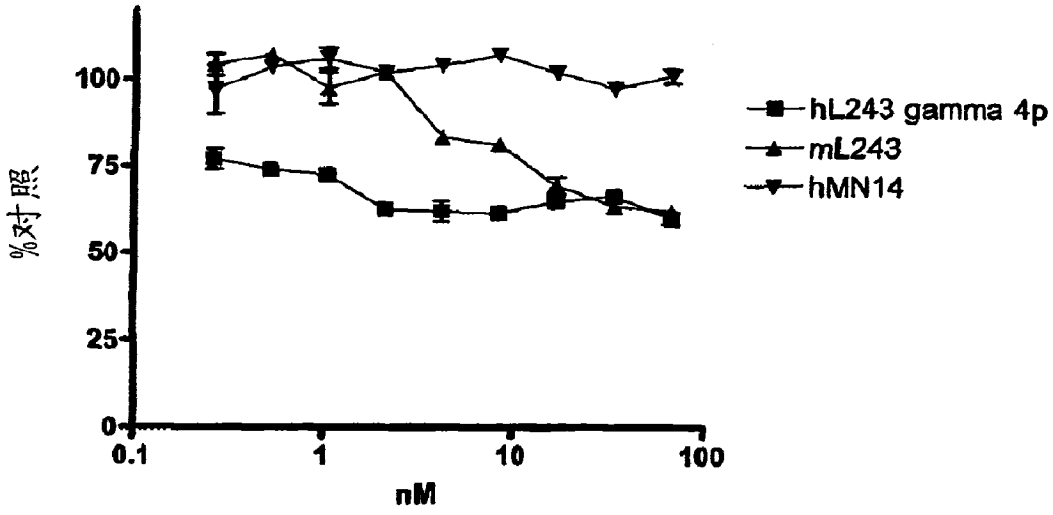

LDH释放
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
效应物
效应物+靶
效应物
hA20
hL243
hL243-4P
hMN-14
ADCC-Daudi 细胞
%特异性裂解
60
50
40
30
20
10
0
效应物+靶
效应物
hA20
hL243
hL243-4P
hMN-14

图 11

A.


Daudi (MTS 3h)
%对照
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
nM
hL243 gamma 4p
mL243
hMN14

B.

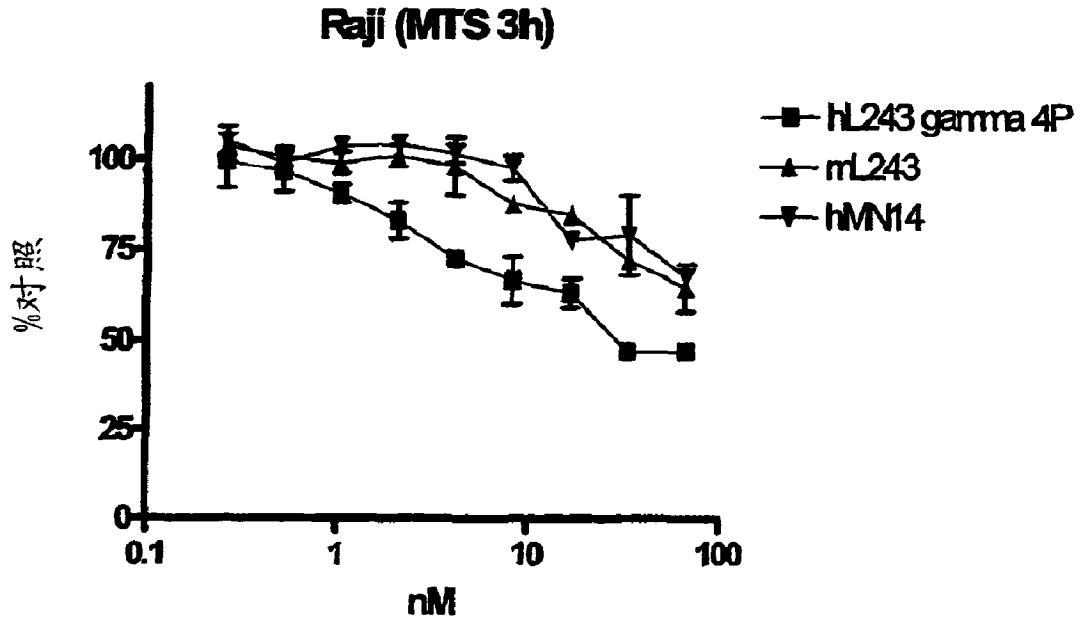
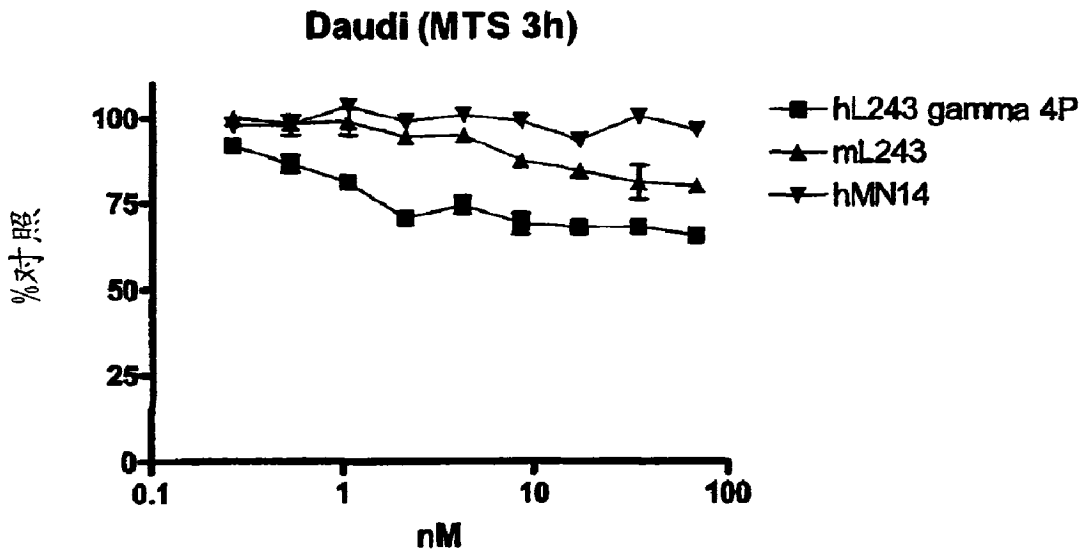

Raji (MTS 3h)
%对照
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
nM
hL243 gamma 4P
mL243
hMN14

图 12

A.


Daudi (MTS 3h)
%对照
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
nM
hL243 gamma 4P
mL243
hMN14

B.

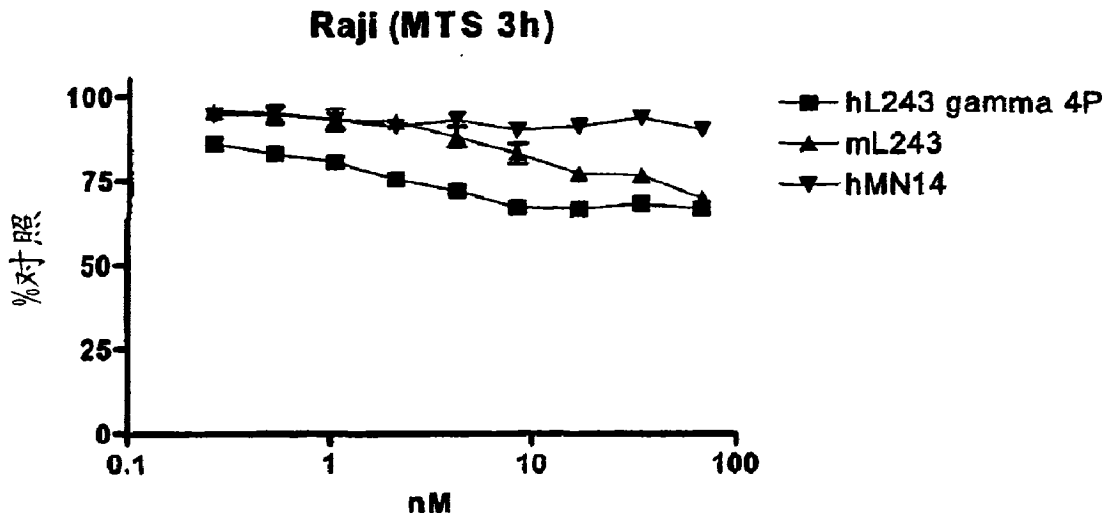

Raji (MTS 3h)
%对照
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
nM
hL243 gamma 4P
mL243
hMN14

图 13

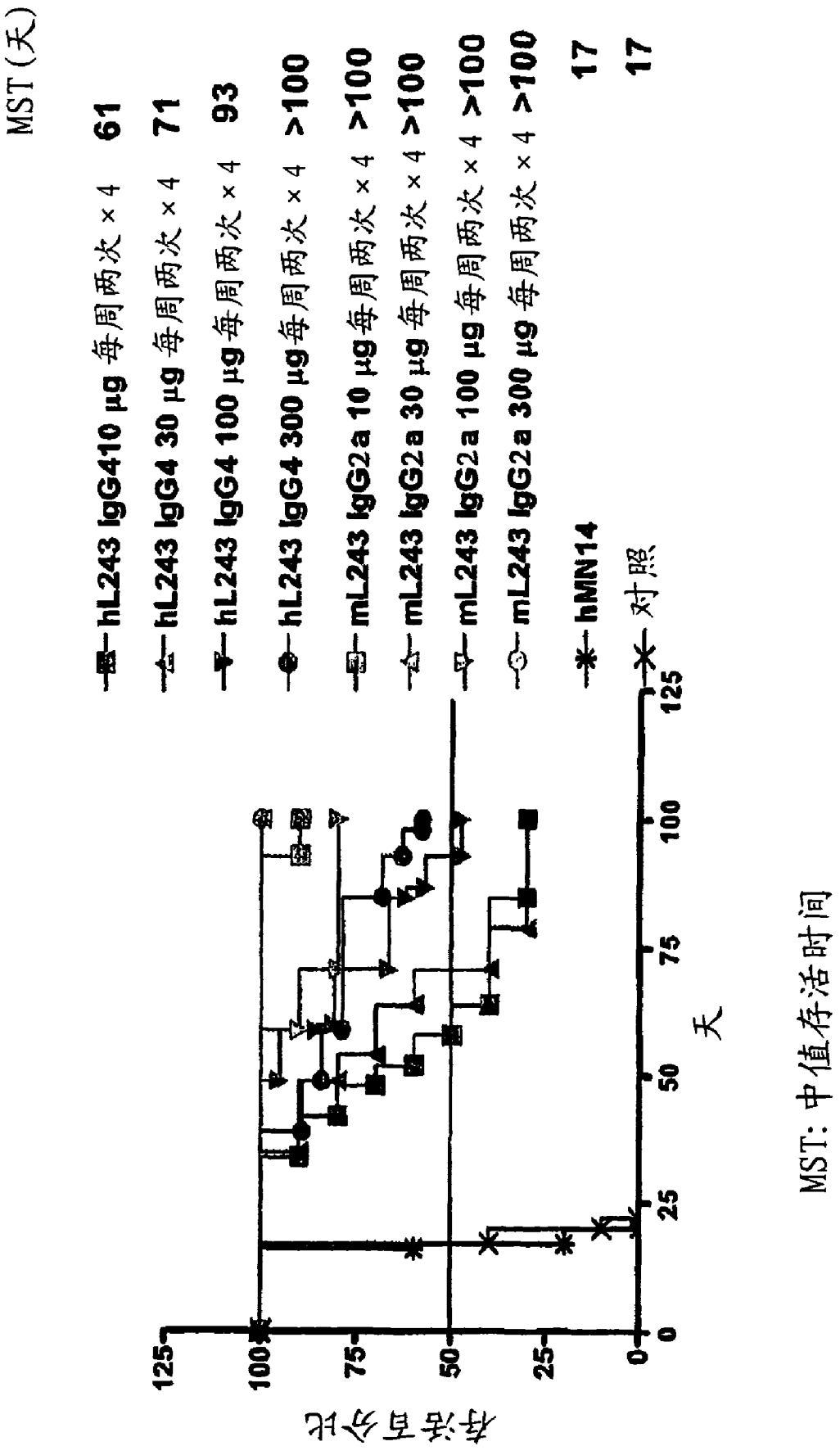

MST(天)
hL243 IgG410 μg 每周两次 × 4 61
hL243 IgG4 30 μg 每周两次 × 4 71
hL243 IgG4 100 μg 每周两次 × 4 93
hL243 IgG4 300 μg每周两次 × 4 >100
mL243 IgG2a 10 μg每周两次 × 4 >100
mL243 IgG2a 30 μg 每周两次 × 4 >100
mL243 IgG2a 100 μg 每周两次 × 4 >100
mL243 IgG2a 300 μg 每周两次 × 4 >100
hMN14 17
对照 17
存活百分比
125
100
75
50
25
0
0
25
50
75
100
125
天
MST: 中值存活时间

图 14

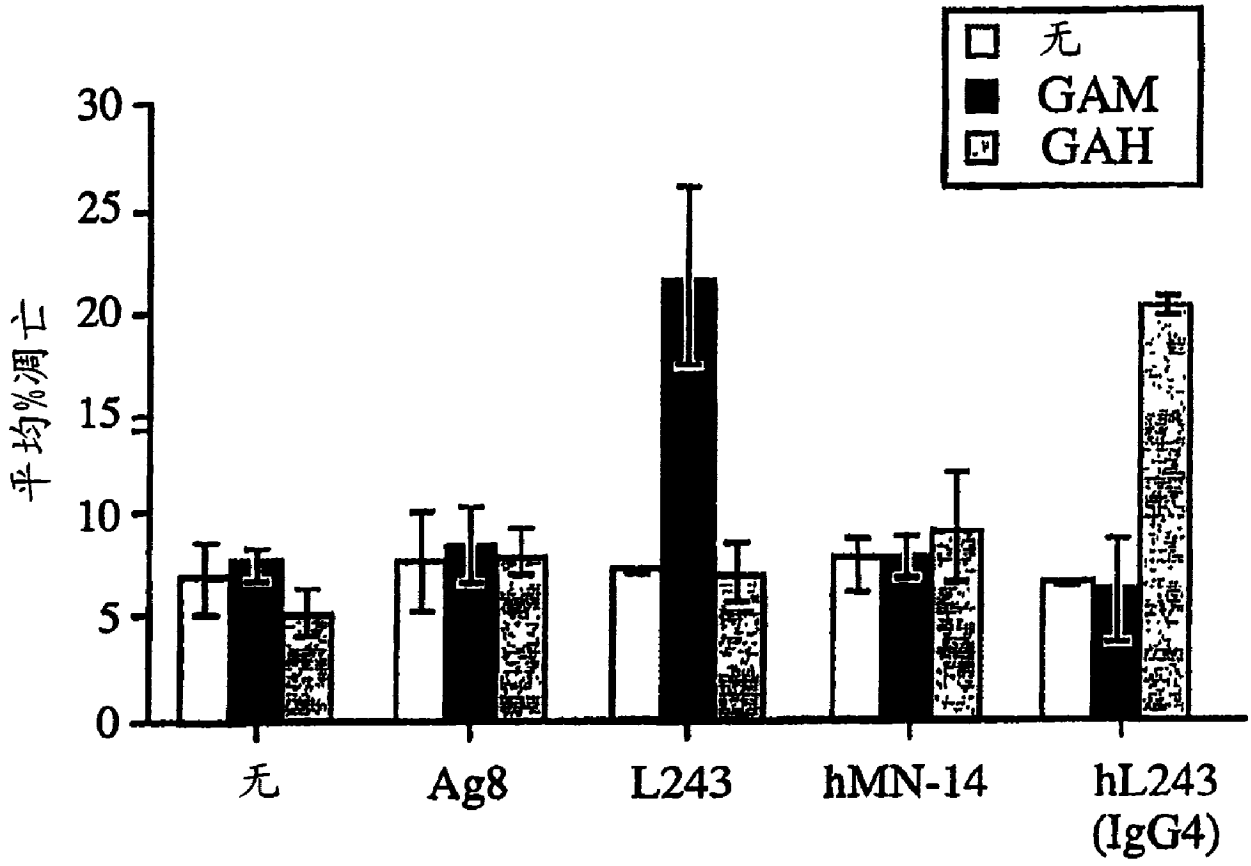


图 15

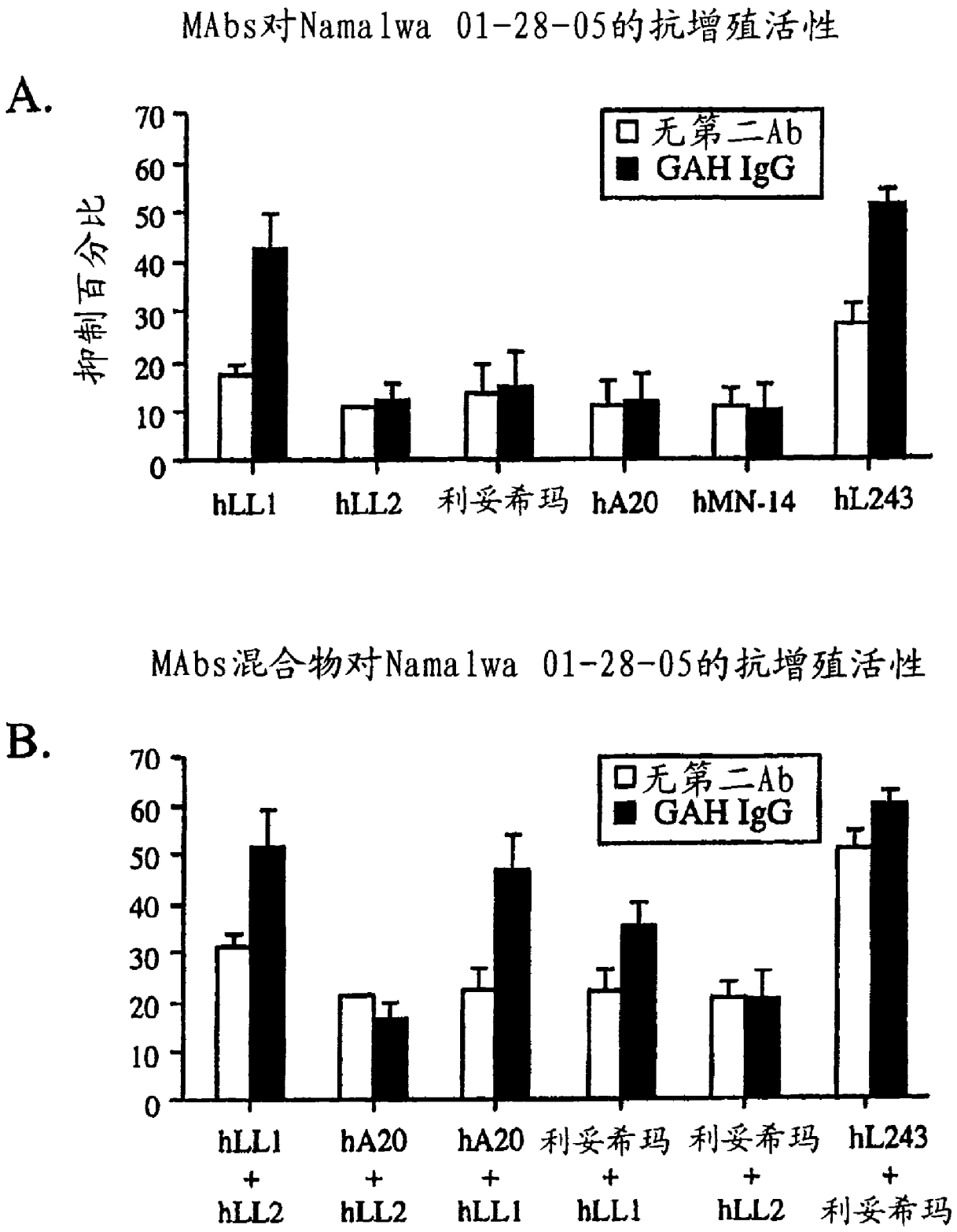

MAbs对Namalwa 01-28-05的抗增殖活性
A.
抑制百分比
70
60
50
40
30
20
10
0
无第二Ab
GAH IgG
hLL1
hLL2
利妥希玛
hA20
hMN-14
hL243
MAbs混合物对Namalwa 01-28-05的抗增殖活性
B.
70
60
50
40
30
20
10
0
无第二Ab
GAH IgG
hLL1 + hLL2
hA20 + hLL2
hA20 + hLL1
利妥希玛 + hLL1
利妥希玛 + hLL2
hL243 + 利妥希玛

图 16

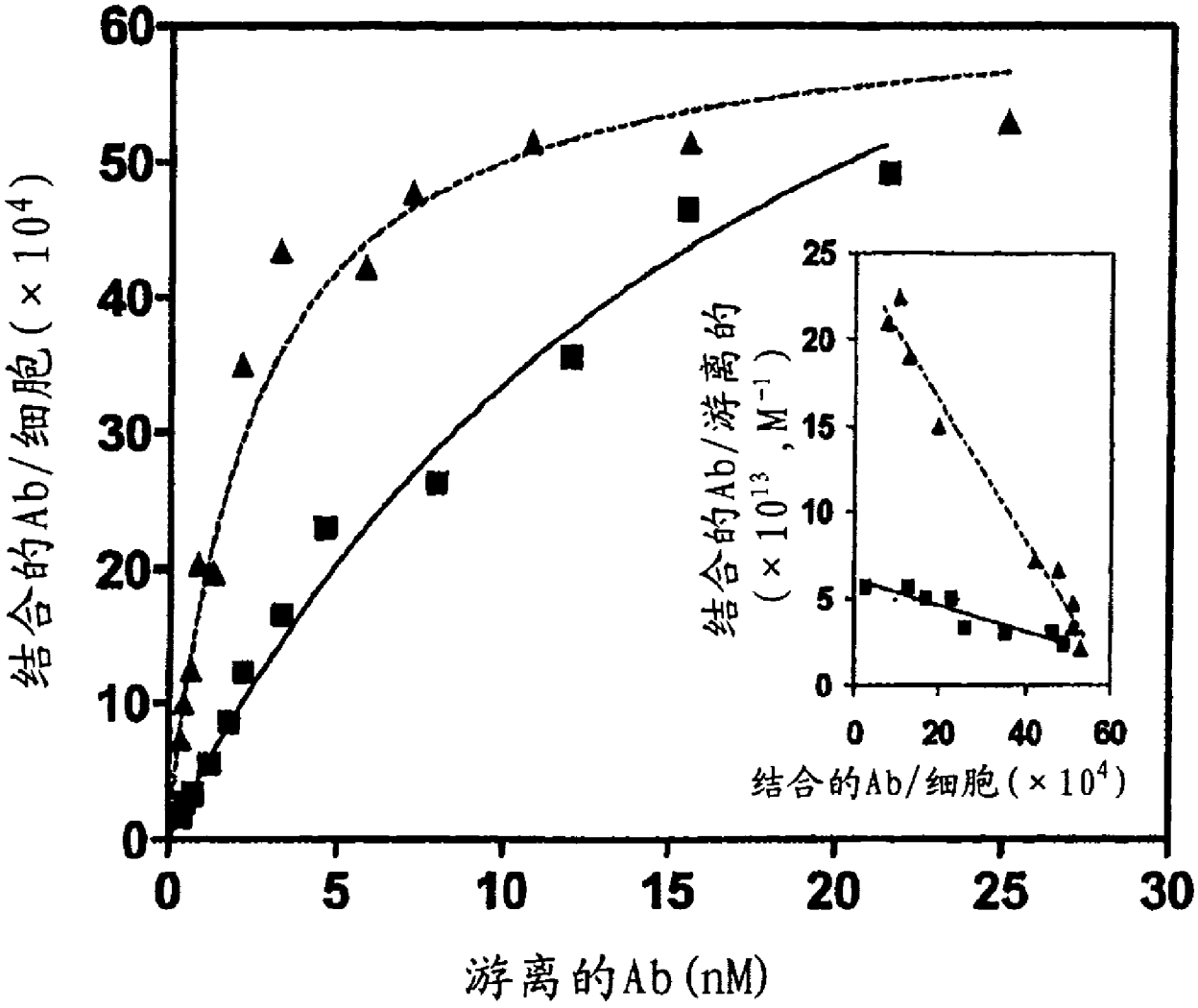

结合的Ab/细胞(×10⁴)
游离的Ab(nM)
0
10
20
30
40
50
60
0
5
10
15
20
25
30
结合的Ab/游离的
(×10¹³, M⁻¹)
结合的Ab/细胞(×10⁴)

图 17

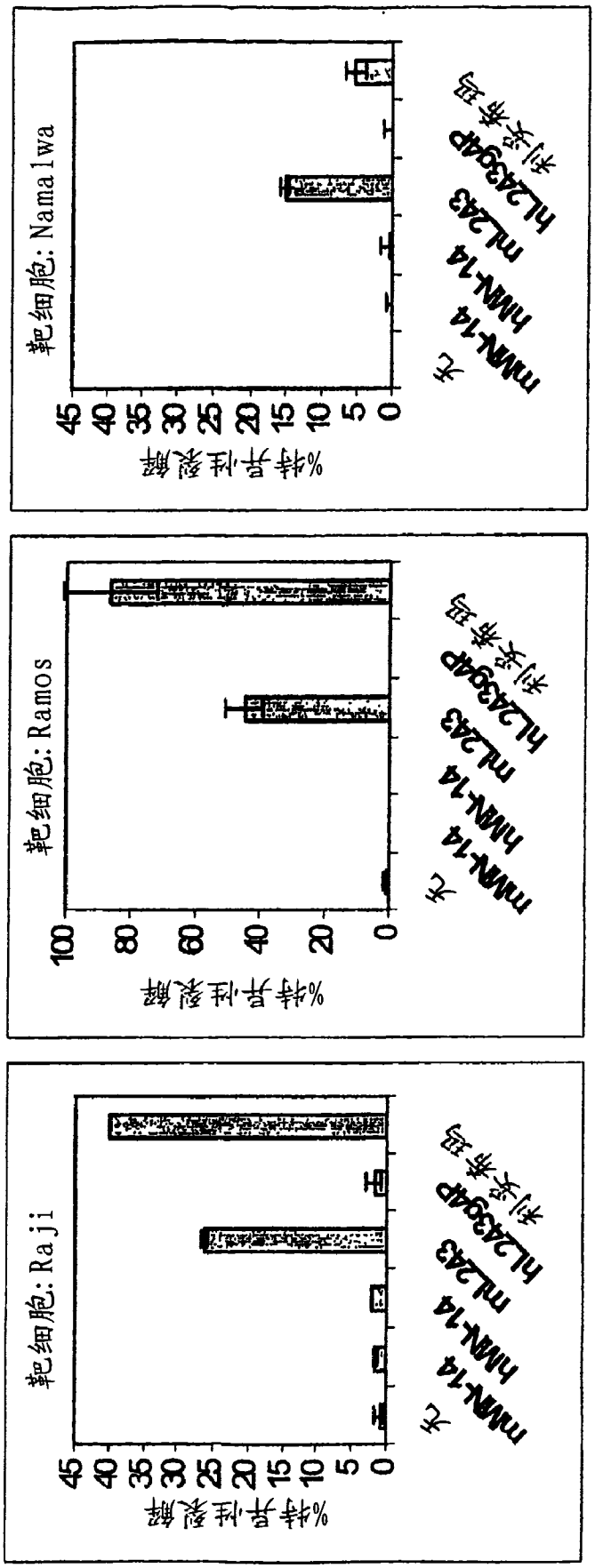

靶细胞: Nama lwa
%特异性裂解
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
无
hMN-14
hMN-14
mL243
hL243Gap
利妥希玛
靶细胞: Ramos
%特异性裂解
100
80
60
40
20
0
无
hMN-14
hMN-14
mL243
hL243Gap
利妥希玛
靶细胞: Ra ji
%特异性裂解
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
无
hMN-14
hMN-14
mL243
hL243Gap
利妥希玛

图 18

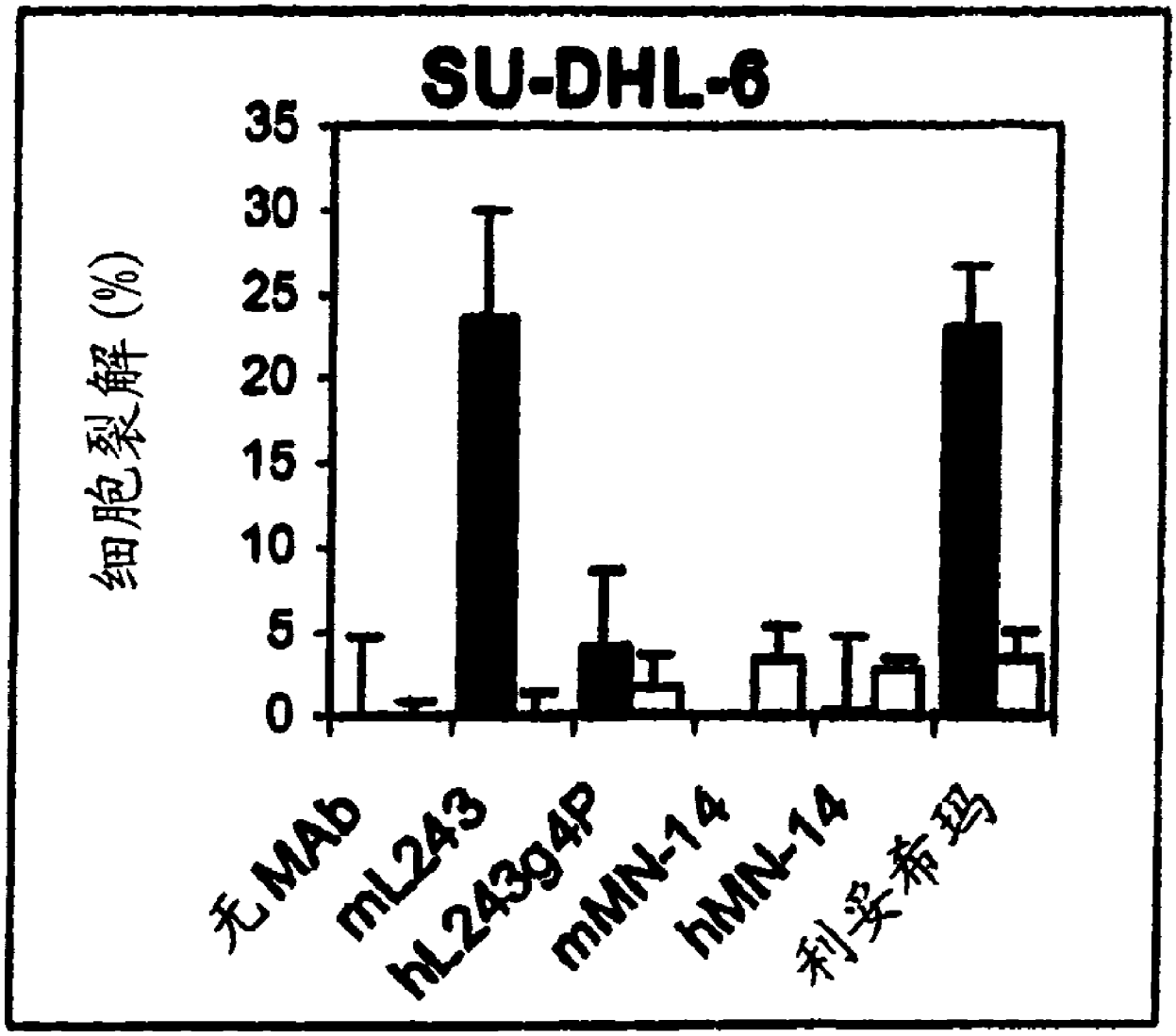

SU-DHL-6
细胞裂解 (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
无MAb
mL243
hL243g4P
mMN-14
hMN-14
利妥布玛

图 19

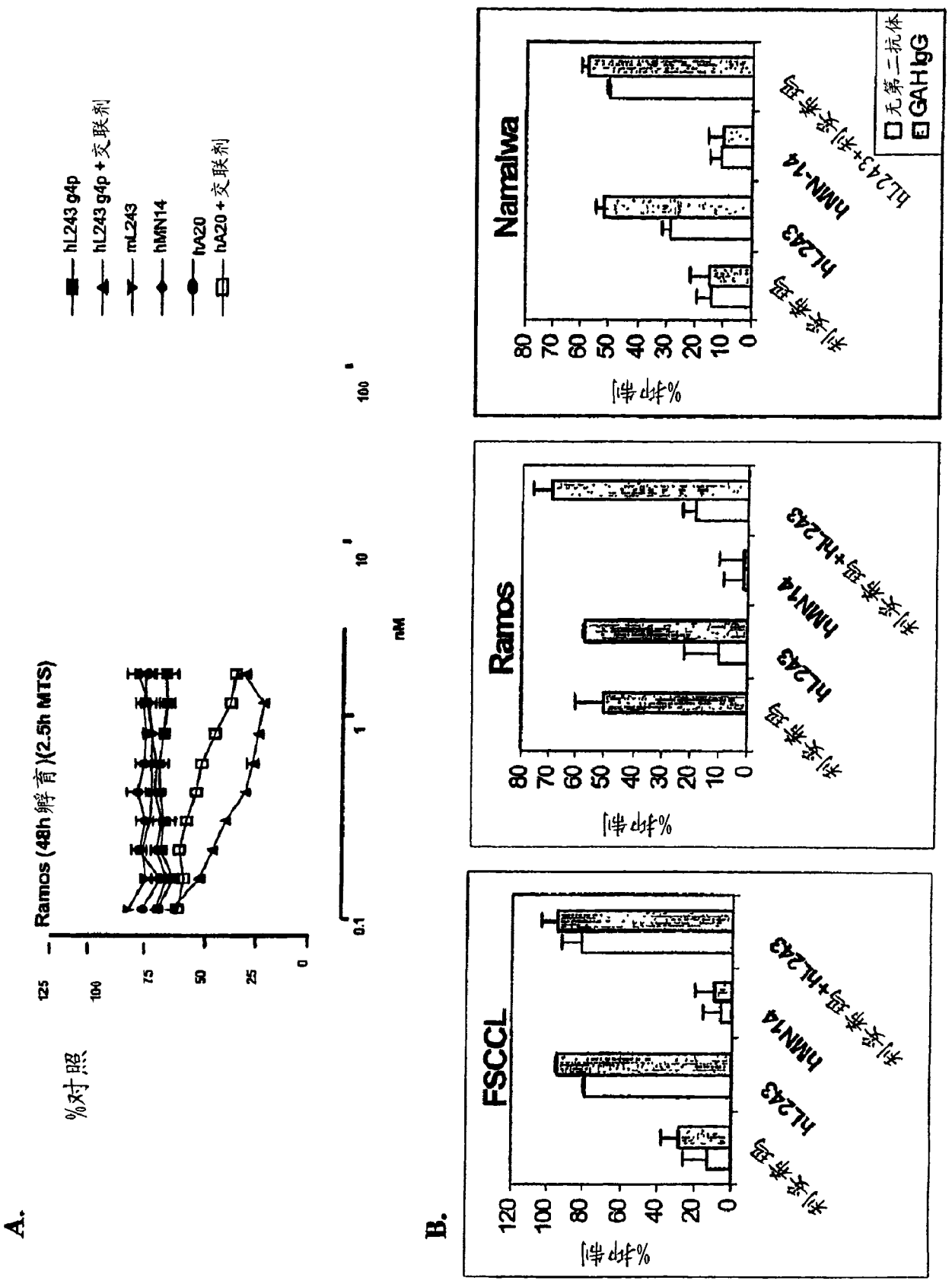
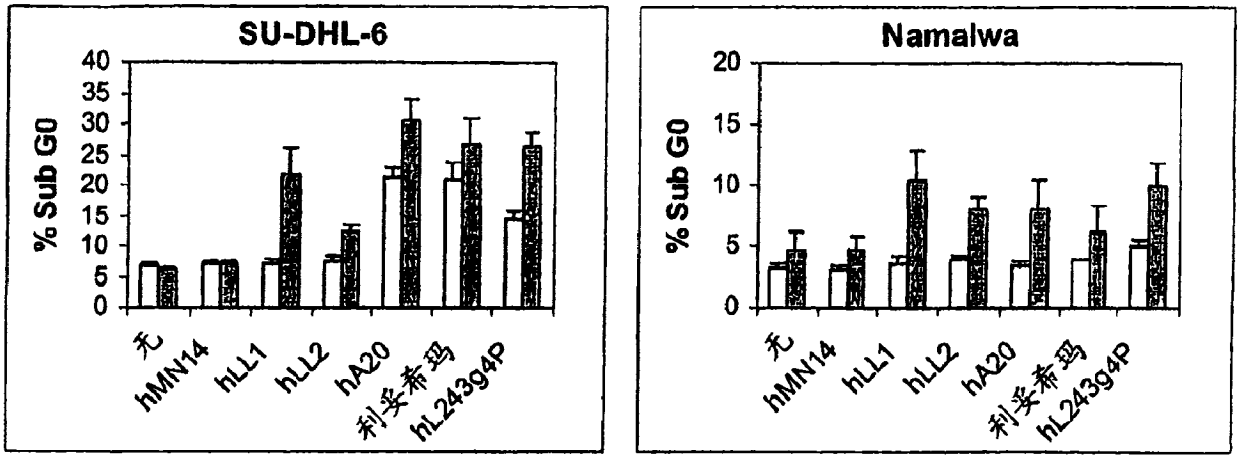

A.
hL243 g4p
hL243 g4p + 交联剂
mL243
hMN14
hA20
hA20 + 交联剂
Ramos (48h 孵育)(2.5h MTS)
%对照
125
100
75
50
25
0
0.1
1
10
100
nM
B.
FSCCL
Ramos
Namalwa
%抑制
120
100
80
60
40
20
0
裸抗体
hL243
hMN14
裸抗体+hL243
hL243+裸抗体
无第二抗体
GAH IgG

图 20

A.


SU-DHL-6
% Sub G0
40
35
30
25
20
15
10
5
0
无
hMN14
hLL1
hLL2
hA20
利妥希玛
hL243g4P
Namalwa
% Sub G0
20
15
10
5
0
无
hMN14
hLL1
hLL2
hA20
利妥希玛
hL243g4P

B.

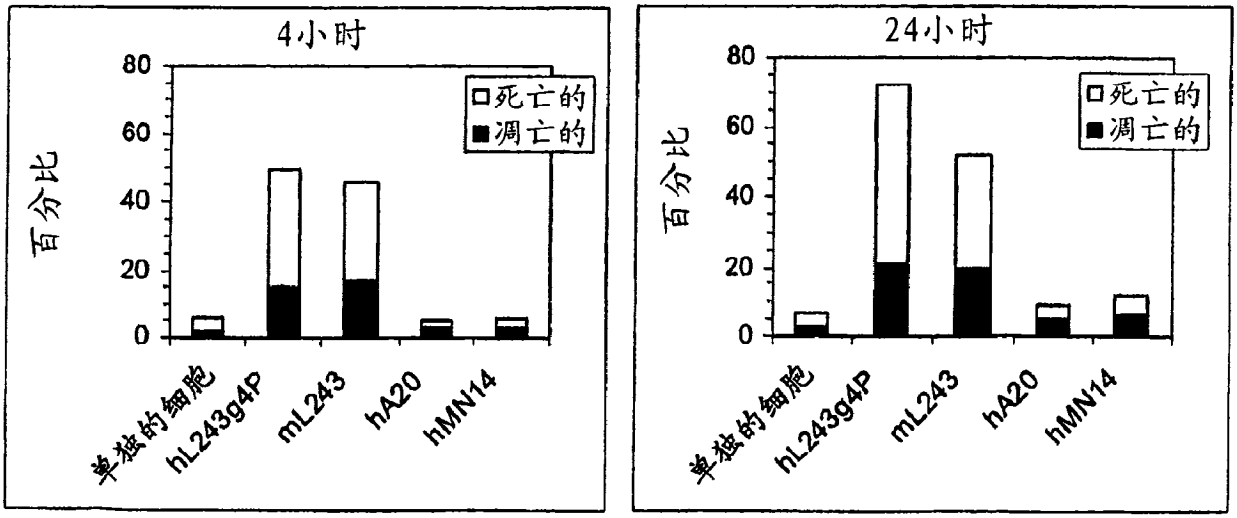

4小时
百分比
80
60
40
20
0
□死亡的
■凋亡的
单独的细胞
hL243g4P
mL243
hA20
hMN14
24小时
百分比
80
60
40
20
0
□死亡的
■凋亡的
单独的细胞
hL243g4P
mL243
hA20
hMN14

图 21

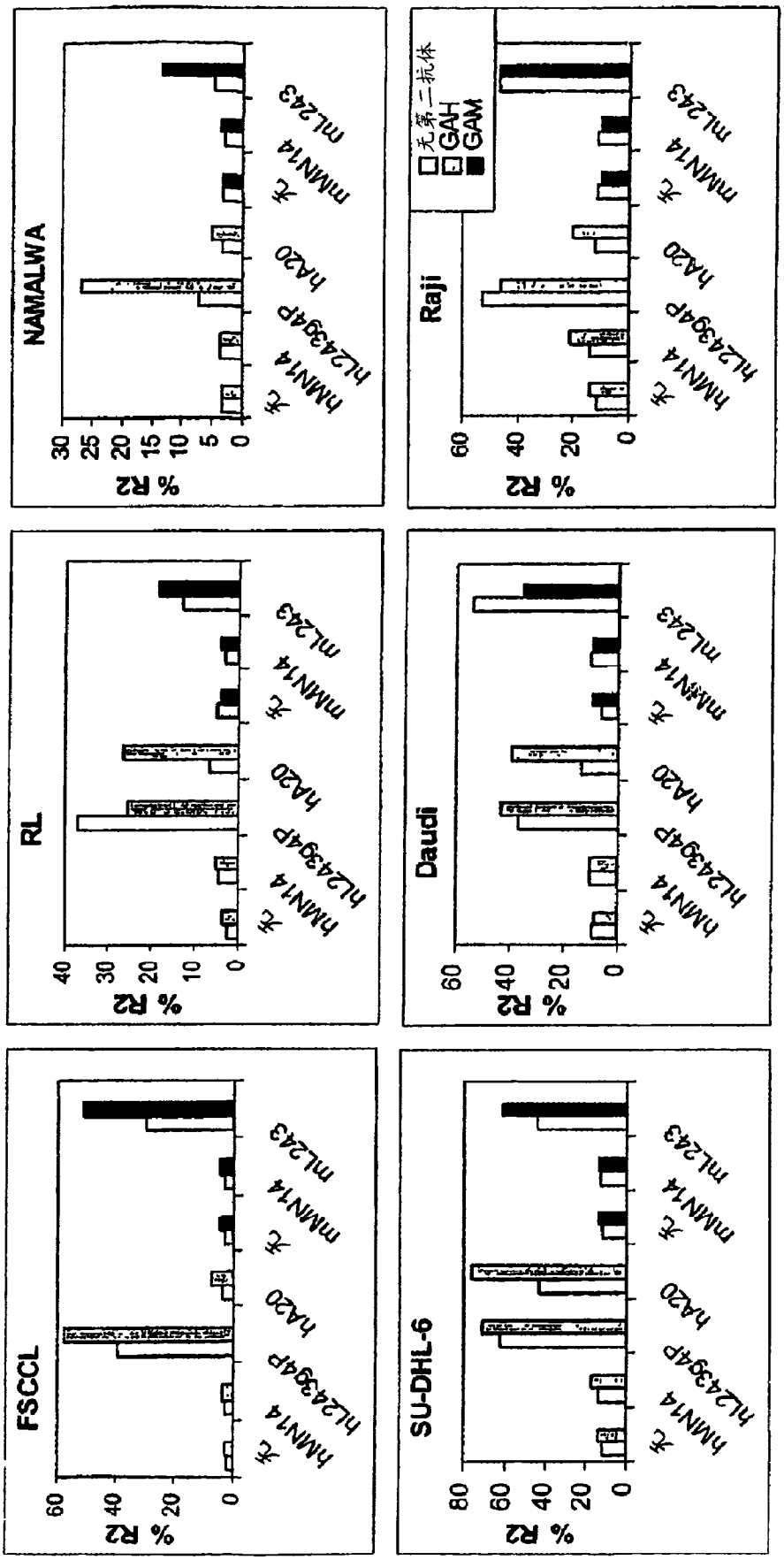

NAMALWA
Raji
RL
Daudi
FSCCL
SU-DHL-6
% R2
无第二抗体
GAH
GAM
hMN14
hL243γ4P
hA20
mMN14
mL243

图 22

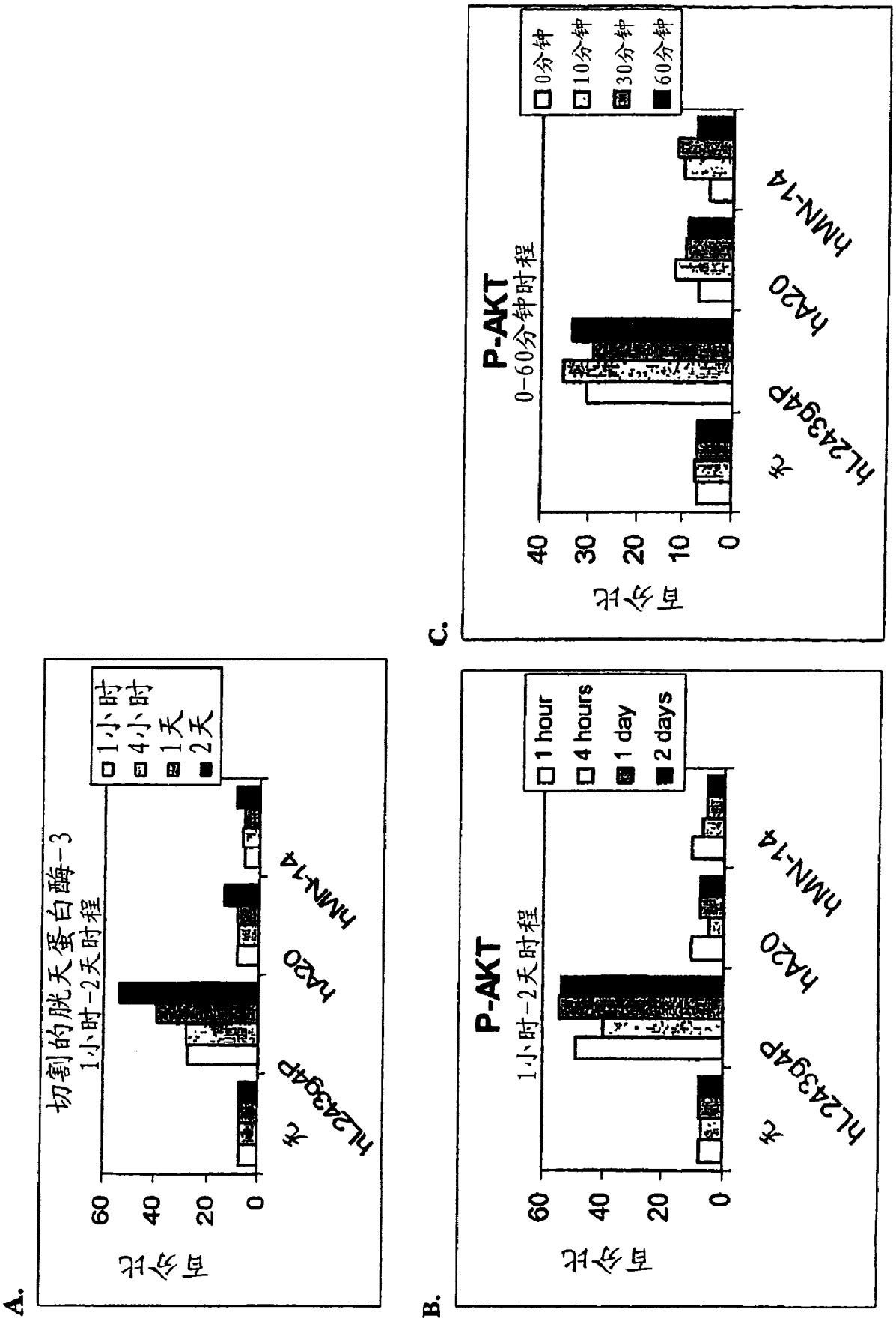

A.
切割的胱天蛋白酶-3
1小时-2天时程
1小时
4小时
1天
2天
百分比
60
40
20
0
hL243gAp
hA20
hMN-14
B.
P-AKT
1小时-2天时程
1 hour
4 hours
1 day
2 days
百分比
60
40
20
0
hL243gAp
hA20
hMN-14
C.
P-AKT
0-60分钟时程
0分钟
10分钟
30分钟
60分钟
百分比
40
30
20
10
0
hL243gAp
hA20
hMN-14

图 23

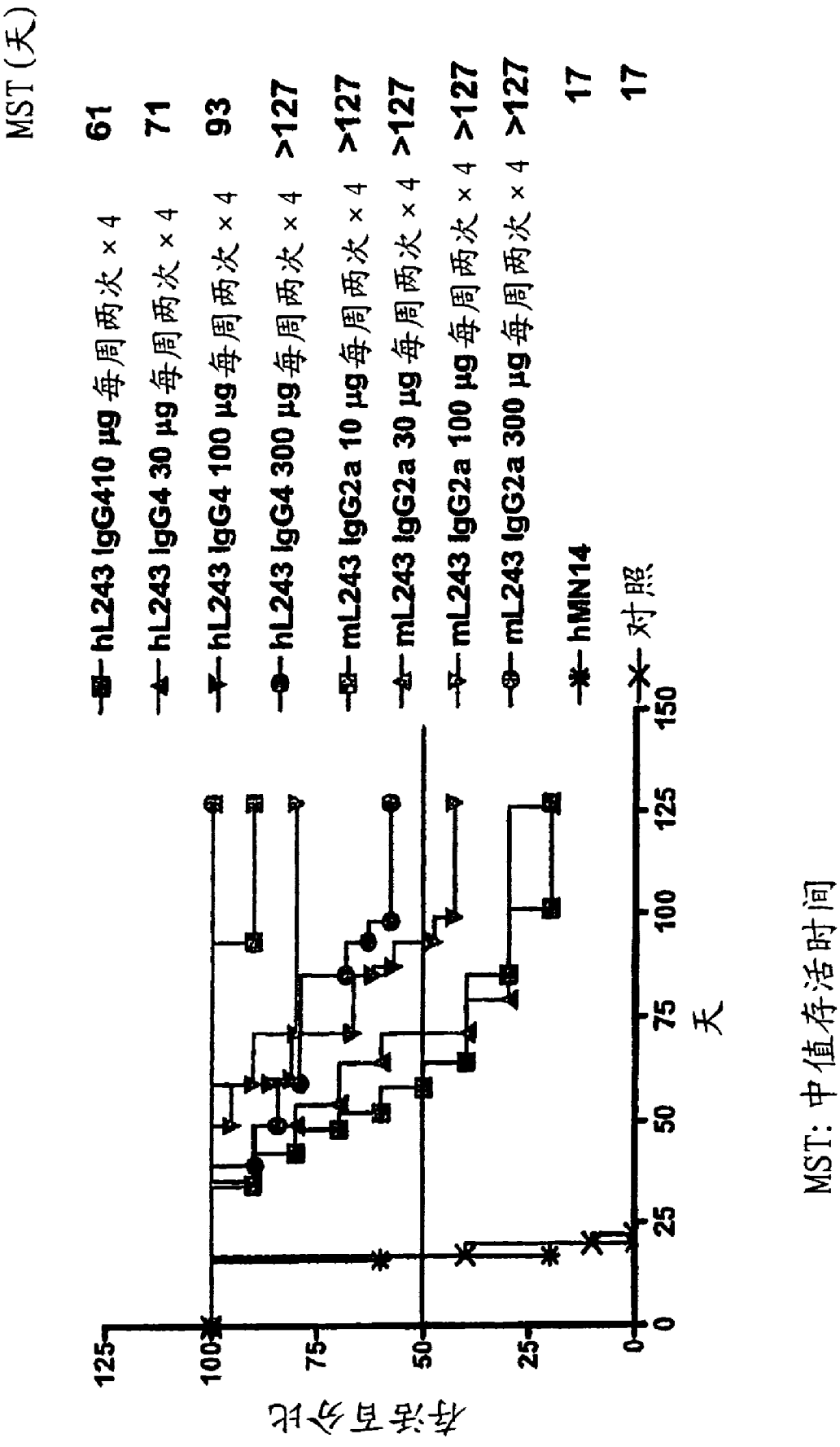

MST (天)
hL243 IgG410 μg 每周两次 × 4 61
hL243 IgG4 30 μg 每周两次 × 4 71
hL243 IgG4 100 μg 每周两次 × 4 93
hL243 IgG4 300 μg 每周两次 × 4 >127
mL243 IgG2a 10 μg 每周两次 × 4 >127
mL243 IgG2a 30 μg 每周两次 × 4 >127
mL243 IgG2a 100 μg 每周两次 × 4 >127
mL243 IgG2a 300 μg 每周两次 × 4 >127
hMN14 17
对照 17
存活百分比
125
100
75
50
25
0
0
25
50
75
100
125
150
天
MST: 中值存活时间

图 24