



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103228291 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 31

(21) 申请号 201180054813. 3

A61K 39/395 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 11. 14

(30) 优先权数据

61/413, 771 2010. 11. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/060520 2011. 11. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02012/067981 EN 2012. 05. 24

(71) 申请人 米迪缪尼有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 R·赫伯斯特 E·K·沃德

K·P·麦基弗

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 沈端

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书27页 附图16页

(54) 发明名称

用于 B 细胞淋巴瘤的联合疗法

(57) 摘要

本披露提供了用于使用抗 CD19 和抗 CD20 抗体的组合来治疗 B 细胞淋巴瘤的方法。这类方法相比单一抗体疗法提供了治疗优点,包括延长的抗肿瘤活性和 / 或减少的剂量。

1. 一种用于治疗 B 细胞淋巴瘤的方法,该方法包括对有需要的患者给予一种联合疗法,该联合疗法包括抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体,其中所述联合疗法相比以相当的给药时程表单独给予的所述抗 CD19 抗体或所述抗 CD20 抗体而言,提供了持续更长的持续时间的抗肿瘤活性。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 B 细胞淋巴瘤是选自急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、或非霍奇金淋巴瘤 (NHL)。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中该联合疗法提供协同治疗作用。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体和该抗 CD20 抗体被同时地给予。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体和该抗 CD20 抗体被依序地给予。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗肿瘤活性是肿瘤生长的抑制。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗肿瘤活性是恶性 B 细胞的耗尽。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其中该联合疗法相比以相当的给药时程表单独给予的所述抗 CD19 抗体或所述抗 CD20 抗体而言,赋予持续长了至少一个月的抗肿瘤活性。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其中该联合疗法相比以相当的给药时程表单独给予的所述抗 CD19 抗体或所述抗 CD20 抗体而言,赋予持续长了至少六个月的抗肿瘤活性。

10. 如权利要求 1 所述的方法,其中该联合疗法赋予持续至少六个月的抗肿瘤活性。

11. 如权利要求 1 所述的方法,其中该患者的肿瘤体积在使用该联合疗法的六个月时间段的治疗过程中增大了小于 10%。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体具有如在体外所测量的增强的抗体依赖性的、细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。

13. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体是未岩藻糖基化的。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体是人或人源化抗体。

15. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含:含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR1;含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR2;含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的重链 CDR3;含有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR1;含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的轻链 CDR2;以及含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含一个 VH 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含一个 VL 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。

18. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含一个 VH 结构域和一个 VL 结构域,该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。

19. 如权利要求 1 所述的方法,其中该抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。

20. 一种用于治疗 B 细胞淋巴瘤的方法,该方法包括对有需要的患者给予一种联合疗法,该联合疗法包括抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体,其中所述联合疗法的剂量相比是该联合疗法的该剂量至少两倍高的所述抗 CD19 抗体的剂量而言,具有更大的抗肿瘤活性。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述 B 细胞淋巴瘤是选自急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、或非霍奇金淋巴瘤 (NHL)。

22. 如权利要求 20 所述的方法,其中该联合疗法提供协同治疗作用。
23. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体和该抗 CD20 抗体被同时地给予。
24. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体和该抗 CD20 抗体被依序地给予。
25. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗肿瘤活性是肿瘤生长的抑制。
26. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗肿瘤活性是恶性 B 细胞的耗尽。
27. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体具有如在体外所测量的增强的抗体依赖性的、细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。
28. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体是未岩藻糖基化的。
29. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体是人或人源化抗体。
30. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含:含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR1;含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR2;含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的重链 CDR3;含有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR1;含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的轻链 CDR2;以及含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链 CDR3。
31. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含一个 VH 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。
32. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含一个 VL 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。
33. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD19 抗体包含一个 VH 结构域和一个 VL 结构域,该 VH 结构域包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列,该 VL 结构域包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。
34. 如权利要求 20 所述的方法,其中该抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。

用于 B 细胞淋巴瘤的联合疗法

[0001] 背景

[0002] 大多数人白血病和淋巴瘤,包括急性淋巴母细胞性白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 以及非霍奇金淋巴瘤 (NHL),起源于 B 细胞。近年来,基于通过使用单克隆抗体 (mAb) 靶向 B 细胞限制性表面抗原的 B 细胞耗尽的治疗方法已经获得了越来越多的关注。具体而言,抗 CD20 mAb 利妥昔单抗已经在 B 细胞恶性肿瘤的治疗中显示出有希望的结果。(罗巴克 (Robak) 等人,癌症治疗评论 (Cancer Treatment Reviews),2007 ;33 :710-728.) 利妥昔单抗的活性大部分取决于该 mAb 通过参与活化效应细胞 (如巨噬细胞和 NK 细胞) 表面上的 Fc γ 受体而介导抗体依赖性的细胞毒性 (ADCC) 的能力。(戴斯杰拉斯 (Desjarlais) 等人,今日药物发现 (Drug Discovery Today),2007 ;12 :898-910.) 虽然其他机制,如补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和细胞凋亡的直接诱导也可以产生作用,但 ADCC 似乎是利妥昔单抗借以在体内介导恶性的以及正常的 B 细胞的消除的主导机制。(爱德华兹 (Edwards) 等人,免疫学自然评论 (Nat Rev Immunol),2006 ;6 :394-403.) 利妥昔单抗与化学疗法的组合已经在患有滤泡淋巴瘤 (FL) 和 CLL 的患者中引起显著的改进,并且可以导致持久的缓解。然而,此疗法不是对所有的患者群体都有效。因此,仍然急需新颖且改进的治疗选项。

[0003] 人分化 (CD) 群抗原 19 是由早期前 B 细胞从重链重排时所表达的一种 B 细胞特异性表面抗原。CD19 属于跨膜受体的含免疫球蛋白结构域的超家族。当 CD19 表达被下调时,CD19 在 B 细胞上从祖 B 细胞至浆细胞阶段的其整个谱系中受到表达。(纳德勒 (Nadler) 等人,免疫学杂志 (J Immunol.)1983 ;131 :244-250.) 作为一种 B 细胞特异性蛋白、和 B 细胞 - 受体 (BCR) 复合物的组分,CD19 是调控 B 细胞活化和体液免疫的阈值的 B 细胞信号传导的一种正调控因子。(佐藤 (Sato) 等人,国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci),1995 ;92 :11558-62 ;佐藤等人,免疫学杂志 1997 ;158 :4662-9.) CD19 不在造血干细胞上或在祖 B 细胞阶段之前的 B 细胞上表达。(纳德勒 (Nadler) 等人,免疫学杂志 (J Immunol.)1983 ;131 :244-250 ;洛肯 (Loken) 等人,血液 (Blood),1987 ;70 :1316-1324.)。

[0004] 重要的是,CD19 的表达在 B 细胞的恶性转化之后得以维持,并且 CD19 在大多数 B 细胞恶性肿瘤 (包括 ALL、CLL 以及 NHL) 上表达。(Uckun 等人,血液,1988 ;71 :13-29 ;D' Arena 等人,美国血液学杂志 (Am J of Hematology),2000 ;64 :275-281 ;吉乃尔迪 (Ginaldi) 等人,临床病理学杂志 (J Clin Pathol),1998 ;51 :364-369 ;安德森 (Anderson) 等人,血液,1984 ;63 :1424-1433.) CD19 在 B 细胞恶性肿瘤上的广泛且相对稳定的表达使得此抗原成为基于 mAb 的疗法的有吸引力的靶标。

[0005] 因此需要利用抗 CD19 和抗 CD20 抗体的优点的联合疗法来治疗 B 细胞恶性肿瘤。

[0006] 发明概述

[0007] 在此提供用于治疗 B 细胞淋巴瘤的方法,这些方法包括对有需要的患者给予一种联合疗法,该联合疗法包括抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体。这类联合疗法相比以相当的给药时间表单独给予的所述抗 CD19 抗体或所述抗 CD20 抗体而言,赋予持续更长的持续时间的抗肿瘤活性。

[0008] 还提供了用于利用减少剂量的抗 CD19 和 / 或抗 CD20 抗体来治疗 B 细胞淋巴瘤的

方法。具体而言,这类方法包括对有需要的患者给予一种联合疗法,该联合疗法包括抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体,其中所述联合疗法的剂量相比剂量是该联合疗法的剂量至少两倍高的所述抗 CD19 抗体的剂量而言,具有更大的抗肿瘤活性。

[0009] 附图简要说明

[0010] 图 1 显示了未岩藻糖基化的抗 CD19 mAb 16C4(16C4-afuc) 和抗 CD20 mAb(利妥昔单抗) 针对多种 B 细胞白血病和淋巴瘤细胞系的 ADCC 活性。显示了使用四种细胞系的体外 ADCC 测定的结果,这些结果是通过一组 15 种白血病和淋巴瘤细胞系所观察到的活性概况的代表。包括岩藻糖基化的 CD19 mAb 16C4 以用于对比。当针对 Karpas-1106P 细胞进行测试时,16C4-afuc 和利妥昔单抗的 ADCC 活性是相当的(图 1A);使用细胞系 Farage、Raji 以及 MeC2 获得类似的结果。JVM2(图 1B) 是在体外针对其利妥昔单抗比 16C4-afuc 更有效的细胞系的代表;使用细胞系 Granta-519、DB、以及 JVM-13 获得类似的结果。Oci-LY19(图 1C) 和 Daudi(图 1D) 是针对其 16C4-afuc 比利妥昔单抗更具效力的细胞系的代表;使用 Toledo、Karpas-422、Nalm-6、RL、以及 Namalwa 细胞获得类似的结果。在测试的所有细胞系的情况下,16C4-afuc 比 16C4 的岩藻糖基化版本更具效力。显示的结果是三份重复样品的平均值 $\pm$ 标准差。图 1F-H 显示了 CD19 和 CD20 的相对表达(表示为 MFI,参见实例 2 中的表 I),该相对表达是针对观察到的 % 最大细胞杀伤(CD19,图 1F;CD20,图 1G) 并且针对对于 16C4-afuc 和利妥昔单抗而测定的 EC50 值(CD19,图 1H;CD20,图 1I) 而绘制的。排除其 EC50 不能被测定的细胞系 /mAb 组合(也参见实例 2 中的表 I)。遍及细胞系的这个多样性的组,不能测定到 EC50 或最大细胞杀伤与抗原表达的显著相关性。

[0011] 图 2 图解了患者衍生的慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 细胞在体外对 16C4-afuc 介导的 ADCC 敏感的情况。在图 2A 中,患者 CLL 细胞显示了 CD19 和 CD20 的可变的细胞表面表达。CLL 细胞上的 CD19 和 CD20 抗原位点的数目如下文在材料和方法中所描述的来测定。在图 2B-C 中,显示了使用基于 FACS 的测定、用患者衍生的 CLL 细胞进行的 16C4-afuc 和利妥昔单抗的体外 ADCC 测定结果。使用 KC1333NK 细胞作为效应细胞,E : T 比例是 2.5 : 1。显示了总共测试的六种样品中的三个代表性患者样品的结果。在测试的所有样品的情况下,在耗尽来自患者 PBMC 样品的 CLL B 细胞方面,16C4-afuc 比利妥昔单抗更有效。所有的 ADCC 测定重复进行三次,并且呈现平均值 ($\pm$ 标准差)。显示了抗原表达与 16C4-afuc(图 2E) 和利妥昔单抗(图 2F) 对于测试的所有六种 CLL 患者样品的体外 ADCC 活性的关系。CD19 和 CD20 的抗原位点的数目相比分别使用 16C4 和利妥昔单抗获得的最大细胞杀伤百分比进行绘制。

[0012] 图 3 显示,患者衍生的急性淋巴母细胞性白血病 (ALL) 细胞对 16C4-afuc 介导的 ADCC 敏感。图 3A 图解了患者 ALL 细胞上的 CD19 和 CD20 的表达。对于三种单独的 ALL 样品,测定 CD19 和 CD20 的抗原位点的数目。为了对比,显示来自四位单独供体的正常人外周血 B 细胞上的抗原位点的数目。如在图 3B、3C、3D、以及 3E 中所示,16C4-afuc 具有针对原代 ALL 细胞的有力的体外 ADCC 活性。显示了使用来自四位患者的样品的基于 FACS 的测定的结果。使用 KC1333 NK 细胞作为效应细胞,E : T 比例是 2.5 : 1;包括利妥昔单抗用于对比。所有的测量重复进行三次,呈现平均值 ($\pm$ 标准差)。

[0013] 图 4 显示,16C4-afuc 对肿瘤生长的抑制取决于 Fc 介导的效应子功能。显示了使用 16C4-afuc 和效应子减少的 Fc 突变的 mAb 16C4-TM 在 Daudi(图 4A) 和 Raji(图 4B)

SCID- 淋巴瘤异种移植模型中的体内肿瘤生长抑制。在第 0 天对 SCID 小鼠皮下接种淋巴瘤细胞。从第 7 天开始,动物接受三个每周剂量 (2.5mg/kg) 的 mAb 或等体积的媒介物 (PBS)。使用人 IgG1 mAb R347 作为同种型对照物。

[0014] 图 5 显示,16C4-afuc 对 SCID 小鼠中的淋巴瘤生长的抑制是剂量依赖的。当与同种型对照物治疗的动物相比时,使用一系列 mAb 浓度和给药频率对 Raji 细胞异种移植进行的治疗引起显著的肿瘤生长抑制。剂量范围包括 0.3、1、3、以及 10mg/kg 16C4-afuc。给药时程表变化包括 1、3、以及 5 次剂量。第一次剂量在细胞植入后第 5 天给予。在图 5A 中,半周一次给予的 16C4-afuc 的 5 次剂量相比每周一次给予的 3 次剂量 (图 5B) 产生更强的抗肿瘤活性。使用 3mg/kg 的治疗获得与使用 10mg/kg 的治疗相当的功效。

[0015] 图 6 显示,CD19 mAb 16C4-afuc 在多个 SCID 淋巴瘤模型中是具有活性的。图 6A 显示了在三个皮下淋巴瘤异种移植模型中使用 16C4-afuc 和利妥昔单抗的肿瘤生长抑制。显示了对于 Namalwa (图 6A)、Daudi (图 6B)、以及 Toledo (图 6C) B 淋巴瘤细胞系的结果。在第 0 天对 SCID 小鼠皮下植入肿瘤细胞,然后从第 5 天开始腹膜内注射 16C4-afuc、同种型对照物、媒介物或利妥昔单抗,每周两次,总共 5 次剂量 (3mg/kg)。在图 6D 和 6E 中,CD19 mAb 16C4-afuc 在患有播散性疾病的小鼠模型中具有活性。显示了 16C4-afuc 与利妥昔单抗在两个系统性疾病模型中的抗肿瘤活性的对比。显示的结果是针对注射有 Namalwa (图 6A) 和 Daudi (图 6B) 细胞的小鼠。在细胞注射后第 7 天开始每周两次腹膜内给予 16C4-afuc、利妥昔单抗、或同种型对照物 (3mg/kg),并且持续 5 次剂量。在该播散性肿瘤模型中,使用生存时间或麻痹时间作为终点。

[0016] 图 7 显示了在 SCID 淋巴瘤模型中由 16C4-afuc 和利妥昔单抗的组合产生的延长的肿瘤生长抑制的作用。在 SCID- 淋巴瘤模型中,根据与 16C4-afuc 相同的时程表和浓度 (3mg/kg, 半周一次,总共 5 次剂量) 来给予利妥昔单抗。显示了来自 Raji (图 7A)、Daudi (图 7B)、Oci-LY19 (图 7C) 以及 Ramos (图 7D) 异种移植模型的结果。16C4-afuc 与利妥昔单抗的组合对于 Raji 和 Daudi 模型产生了延长的肿瘤生长抑制。在 Oci-LY19 模型 (其对利妥昔单抗应答不佳) 和 Ramos 模型 (其对 16C4-afuc 应答不佳) 中观察到较小的作用。

[0017] 图 8 显示了单独给予或与利妥昔单抗联合给予的 16C4-afuc,在 huCD19/CD20 转基因小鼠中的药代动力学和药效动力学。考虑了四种分开的给予:16C4-afuc (1mg/kg) + 对照物;16C4-afuc (10mg/kg) + 对照物;16C4-afuc (1mg/kg) + 利妥昔单抗;16C4-afuc (10mg/kg) + 利妥昔单抗。不论是单独给予或是联合给予,更高剂量的 16C4-afuc (10mg/kg) 比更低剂量的 16C4-afuc (1mg/kg) 在血液中保留的更久。

[0018] 图 9 显示了在给予联合疗法、单独的利妥昔单抗或单独的 16C4-afuc 之后,B 细胞耗尽实验的结果。结果显示,使用利妥昔单抗 (10mg/kg) + 16C4-afuc (10mg/kg) 的最高剂量的联合疗法导致了持续时间最长的来自血液和脾脏的 B 细胞耗尽的最大百分比。

[0019] 详细说明

[0020] A. 使用抗 CD19 和抗 CD20 抗体的联合疗法

[0021] 在此提供用于治疗 B 细胞恶性肿瘤的方法,这些方法包括给予抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体的组合。该联合疗法与单一抗体疗法 (例如,抗 CD19 或抗 CD20 单独的给予) 相比,在减少的剂量下提供了延长的抗肿瘤功效和 / 或有效的治疗。还提供了用于通过对有需要的受试者 (例如,遭受 B 细胞恶性肿瘤的受试者) 给予抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体的

组合而延长对该受试者中肿瘤生长的抑制的方法。

[0022] 如在此所使用,“进行治疗”或“治疗”是指向受试者给予抗 CD19 抗体或其抗原结合片段,或向来自受试者的分离组织或细胞系给予抗 CD19 抗体或其片段,并联合向该受试者、或向来自该受试者的分离组织或细胞系给予抗 CD20 抗体或其抗原结合片段,其中该受试者具有一种疾病、一种疾病的症状、或对一种疾病的易感性,其中目的是治愈、愈合、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进、或影响该疾病、该疾病的症状、或对该疾病的易感性。通过“进行治疗”或“治疗”还意指可将这些抗体或其抗原结合片段作为一种单一药用组合物的一部分、或可替代地作为各自包含该抗 CD19 抗体(或其抗原结合片段)或抗 CD20 抗体(或其抗原结合片段)的单独药用组合物的一部分而给予该受试者、或来自该受试者的分离组织或细胞系,其中该受试者具有一种疾病、一种疾病的症状、或对一种疾病的易感性,其中目的是治愈、愈合、减轻、缓解、改变、补救、改善、改进、或影响该疾病、该疾病的症状、或对该疾病的易感性。

[0023] 多种参数可以指示治疗功效,例如抗肿瘤活性。这些包括但不限于:肿块大小的减小;肿瘤转移性侵袭力的减小;肿瘤生长速率的减小;肿瘤相关后遗症(如恶病质和腹水产生)的严重度或发病率的降低;肿瘤相关并发症(如病理骨折、自身免疫性溶血性贫血、幼淋巴细胞转化、Richter 综合征等)的降低和/或预防;肿瘤对化学疗法和其他治疗的敏化作用;增加的患者生存率;观察到的改进的预后如增加的肿瘤浸润淋巴细胞与降低的肿瘤血管化的临床相互关联性的增加;等等。因此,在一些实施例,给予这两种类型的抗体的组合将导致经受治疗的患者(例如,受试者)中的这些参数中的一个或多个的改进。在其他实施例中,患者中的这些改进关于一些参数是协同性的,而关于其他参数是加和性的。

[0024] 在某些实施例中,使用 CD19 和 CD20 抗体的联合疗法的作用可以是加和性的。在其他实施例中,使用 CD19 和 CD20 抗体的联合疗法的作用可以是协同性的。术语“协同性”用来描述两种或更多种活性剂的联合作用,该联合作用比每种相应的活性剂的单独作用的总和大。因此,在两种或更多种试剂的这种联合作用导致对活性或过程(例如,肿瘤生长)的“协同抑制”的情况下,意图是对该活性或过程的抑制大于每种相应的活性剂的抑制作用的总和。术语“协同治疗作用”是指使用两种或更多种疗法的组合所观察到的一种治疗作用,其中该治疗作用(如通过多种参数中的任一种所测量的)比使用相应的单独疗法所观察到的单独治疗作用的总和大。出于在此的目的,协同作用意思是:在利用以相当的给药时程表或方案给予的 CD19 抗体和 CD20 抗体的组合时所观察到的作用,(1) 大于在单独地(或单个地)利用这种 CD19 抗体或 CD20 抗体时所获得的作用;并且(2) 大于这种 CD19 抗体和 CD20 抗体的相加总和(加和性)作用。如在此所使用,相当的给药时程表是指这样的给药时程表或方案:它用于评估或比较至少两种不同的治疗的结果并且因而被设计成在正被比较的这些治疗之间是相同的,即,患者正被以相同的方式(例如,天数、给药之间的时间、抗体试剂的浓度)给药,但是使用不同的抗体或联合疗法。该给药时程表的变量将由本领域的技术人员根据正被处理的 B 细胞恶性肿瘤和治疗选择来确定。这种协同性或协同作用可以通过本领域的技术人员所已知的多种手段来确定。例如,CD19 抗体和 CD20 抗体的协同作用可以使用检验肿瘤细胞数目或肿瘤大小的减少的体外或体内测定形式、或通过肿瘤生长的抑制或肿瘤细胞的耗尽来进行观察。类似地,每个单独组分的协同有效量可以通过测试一系列各个组分的浓度来确定。

[0025] 如在此所使用,术语“联合”以其最广泛的含义使用并且意思是使用至少两种治疗方案来治疗受试者。因此,“联合抗体疗法”或“联合疗法”旨在意指使用至少两种抗体方案、更具体地说联合使用至少一种抗 CD20 抗体(或其抗原结合片段)与至少一种抗 CD19 抗体(或其抗原结合片段)来治疗受试者,但给予不同抗体方案的时间安排可以改变,只要获得这些抗体的组合的有益作用。联合使用抗 CD20 抗体(或其抗原结合片段)与抗 CD19 抗体(或其抗原结合片段)的治疗可以是在同一时间(例如,同时地或并存地)、或在不同时间(例如,连续地或依序地)或其组合。出于本披露的目的,在同一时间(例如,同时地)给予是指一起在同一配制品中或在分开配制品中给予这些抗体,其中该给予可以相隔几分钟至几小时,但是不超过一天。如在此所使用,在不同时间(例如,依序地)给予是指相隔几小时至几天、几周并且甚至几个月地给予该联合疗法的抗体。

[0026] 因此,在某些实施例,经受联合抗体疗法的受试者可以在同一时间(例如,同时地)或在不同时间(例如,在同一天、或在不同天按任一顺序依序地)接受两种抗体,只要在该经受疗法的受试者中产生两种物质的组合的治疗作用。在一些实施例中,将同时给予抗体组合用于一次给药,但其他给药将包括在同一天、或在不同天以任一顺序进行依序给予。依序给予可以在不管受试者是否应答于第一单克隆抗体给予的情况下进行。在这两种抗体被同时给予的情况下,它们可以作为各自包含抗 CD20 抗体(或其抗原结合片段)或抗 CD19 抗体(或其抗原结合片段)的分开药用组合物来给予、或可以作为包含这两种抗体的一种单一药用组合物来给予。

[0027] 本披露的方法包括使用对需要 B 细胞疾病治疗的受试者赋予积极治疗应答的联合疗法。关于使用抗 CD19 和抗 CD20 抗体的联合治疗而言的积极治疗应答旨在意指与这些抗体或其片段的抗肿瘤活性相关联的在疾病中的改进,和/或在与该疾病相关的症状中的改进。也就是说,可以观察到一种抗增生作用、对进一步肿瘤过度生长的阻止、肿瘤大小的减小、癌细胞数目的减小、和/或由赘生性 B 细胞介导的一种或多种症状的减少。因此,例如,疾病的改进可被表征为完全应答。通过“完全应答”意指临床上可检测到的疾病的缺乏,伴有任何先前异常的射线照相研究、骨髓、以及脑脊髓液(CSF)的正常化。这样一种应答必须持续在根据本披露的方法治疗之后至少一个月。可替代地,疾病的改进可被归类为部分应答。通过“部分应答”意指在不存在新病变的情况下并且持续至少一个月的所有可测量的肿瘤负荷(例如,受试者中存在的肿瘤细胞的数目)的至少约 50% 的降低。这样一种应答仅适用于可测量的肿瘤。

[0028] 可以使用筛选技术,如磁共振成像(MRI)扫描、X-射线照相成像、计算机断层照相(CT)扫描、流式细胞计量术或荧光活化细胞分选仪(FACS)分析;生物发光成像,例如荧光素酶成像、骨扫描成像,以及肿瘤活检取样(包括骨髓穿刺(BMA)),针对肿瘤形态学(例如,整体肿瘤负荷、肿瘤大小,等)的变化来评定肿瘤应答。除了这些积极治疗应答之外,正经受疗法的受试者可以经历与疾病相关的症状的改进的有益效果。因此,对于 B 细胞肿瘤,受试者可以经历所谓的 B 症状,例如盗汗、发热、重量损失和/或荨麻疹的减少。

[0029] 在此披露的联合疗法以治疗有效剂量来给予。术语“治疗有效剂量”、“治疗有效量”、或“有效量”意指一定量的抗 CD19 抗体(或其抗原结合片段),当与一定量的抗 CD20 抗体(或其抗原结合片段)联合给予时,带来在受试者的包括赘生性 B 细胞的癌症的治疗方面的积极治疗应答。在一些实施例中,抗 CD20 抗体(或其抗原结合片段)或抗 CD19 抗

体（或其抗原结合片段）的治疗有效剂量是在从约 1mg/kg 至约 200mg/kg 的范围内。应理解，该治疗方法可以包括治疗有效剂量的在本方法的实践中有用的抗体组合的单次给予或治疗有效剂量的该抗体组合的多次给予。

[0030] 在某些实施例中，使用抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体的联合疗法相对于单独包括抗 CD19 抗体或单独包括抗 CD20 抗体的治疗而言，提供了延长的抗肿瘤活性。在某些实施例中，联合疗法可以提供的抗肿瘤活性，与单独使用抗 CD19 抗体或单独使用抗 CD20 抗体可获得的抗肿瘤活性相比，持续长至少 1 周、2 周、3 周、1 个月、2 个月、3 个月、4 个月、5 个月、6 个月、1 年、或 2 年。抗肿瘤活性的相对持续时间可以在测试群体的统计分析的基础上进行确定。例如，如果抗 CD19 抗体在一个测试群体中展现出持续平均 6 周的一定水平的抗肿瘤活性，并且抗 CD20 抗体在一个测试群体中展现出持续平均 8 周的一定水平的抗肿瘤活性，则该组合展现出比单独给予的任一抗体疗法长至少 4 周的抗肿瘤活性，前提条件是该联合疗法在一个测试群体中展现出持续平均至少 12 周的与对于单一抗体疗法所见到的至少同等水平的抗肿瘤活性。抗肿瘤活性的持续时间可以被测量为疗法开始的日期到该疗法不再提供所希望的水平的抗肿瘤活性（例如，通过防止肿瘤体积的增大的能力、耗尽 B 细胞的能力等所测量的）的时间点。

[0031] 在某些实施例中，如在此所述的抗肿瘤活性是指防止肿瘤大小增大超过 1%、2%、5%、8%、10%、12%、15%、20%、25% 或 30% 的能力。如在此所使用，肿瘤大小是指直径测量值或估算的肿瘤体积测量值。例如，如果一种联合疗法可以在六个月时间段上防止肿瘤的单维或二维测量值增大超过 10%，则它展现出在六个月时间段上的抗肿瘤活性。淋巴瘤肿瘤（例如，存在于周围淋巴结中的肿瘤）的这些二维测量值可以通过使用以上所述的提供了直径或估算的肿瘤体积测量值的仪器进行身体扫描而获得（临床肿瘤学杂志（Journal of Clinical Oncology），2004 ASCO 年会论文集（Annual Meeting Proceedings）（会后版），第 22 卷，第 14S 号（7 月 15 日增补），2004 :6606）。因此，当在肿瘤的直径测量值方面或在估算的肿瘤体积测量值方面缺乏增长时，目前披露的联合疗法展现出抗肿瘤活性。在另一个实施例中，抗肿瘤活性可以反映在肿瘤大小的实际减小、或者肿瘤在固定大小下在一段时间上的维持中。在另一个实施例中，抗肿瘤活性可以通过相对于治疗前的肿瘤大小，例如直径测量值或估算的肿瘤体积测量值而言，将肿瘤生长抑制超过 1%、2%、5%、8%、10%、12%、15%、20%、25% 或 30% 来确定。

[0032] 在某些实施例中，抗肿瘤活性可以通过确定使用一种给定疗法而获得的 B 细胞耗尽水平来测量。循环 B 细胞（包括恶性 B 细胞）最容易通过流式细胞计量术、或以上所述的并且本领域熟知的其他细胞计数装置进行测量，从而产生循环 B 细胞的计数数目。进一步考虑的是，为大量循环 B 细胞提供的任何方法可以用于确定在使用该联合疗法的治疗之后 B 细胞的耗尽。众所周知，循环 B 细胞耗尽是用于组织 B 细胞耗尽的替代标志物。因此，这样的 B 细胞耗尽包括循环 B 细胞和组织 B 细胞，这些细胞中的一些可能是恶性的。在某些实施例中，抗肿瘤活性可以通过相对于治疗之前的 B 细胞水平而言为至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100% 的 B 细胞耗尽水平来确定。例如，如果一种疗法可以在至少六个月时间段上维持 90% 的 B 细胞耗尽水平，则该疗法展现出在六个月时间段上的抗肿瘤活性。

[0033] 预测临床功效的一种方法是在一种合适的模型中测量使用这些抗体的联合疗法

的作用；例如，抗 CD20 抗体和抗 CD19 抗体的组合在鼠类癌症模型中的用途。这些模型包括裸小鼠异种移植肿瘤模型，如使用被称为 Namalwa 和 Daudi 的人伯基特淋巴瘤细胞系的那些。在一些实施例中，抗肿瘤活性是在一个分期的裸小鼠异种移植肿瘤模型中使用 Daudi 人淋巴瘤细胞系进行测定。一个分期的裸小鼠异种移植肿瘤模型细胞系相比未分期的模型而言，在辨别一种给定抗体的治疗功效方面通常更有效，因为在该分期的模型中，抗体给药仅在肿瘤已经达到可测量的大小之后才起始。在该未分期的模型中，抗体给药通常在肿瘤接种约 1 天内并且在可触知的肿瘤出现之前起始。一种抗体在一个分期的模型中展现出增大的抗肿瘤活性的能力是该抗体将是治疗有效的一个强有力指示。

[0034] 在其他实施例中，抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体的组合提供了用于使用这些治疗抗体的减少剂量来抑制肿瘤生长或治疗具有 B 细胞恶性肿瘤的患者。具体而言，在此提供的实例显示，联合疗法（例如，抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体的组合）的总剂量比抗 CD19 抗体的大于该联合疗法的总剂量的剂量更有效。因此，在此披露的方法提供用于增强一种单一抗体疗法的功效，从而允许在更低剂量下的有效治疗并且潜在地避免与该抗体疗法的更高剂量相关联的不希望的副作用。在某些实施例中，联合疗法在至少 2 倍、3 倍、4 倍或 5 倍低于提供相同抗肿瘤活性（例如，应答于单一剂量的相同程度的抗肿瘤活性、或使用相当的给药时程表在限定的时间段上的相同程度的抗肿瘤活性）所需的抗 CD19 抗体或抗 CD20 抗体任一者的剂量的总剂量下提供相同或更大的抗肿瘤作用。因此，对于赋予了抗肿瘤活性的抗 CD19 抗体的任何给定的剂量，该联合疗法将在相比该抗 CD19 抗体的剂量而言更低的浓度下赋予更大的抗肿瘤活性。该更低的浓度可以是抗 CD19 抗体的浓度的一半，或者可以小于抗 CD19 抗体的浓度的一半。

[0035] 在某些实施例中，在此所述的联合疗法可以通过不同的给予手段来完成。例如，该抗 CD19 抗体和该抗 CD20 抗体可以分开地配制并且给予患者。可替代地，该抗 CD19 和抗 CD20 抗体可以在单一配制品中被配制在一起。当该抗 CD19 和抗 CD20 抗体是处于分开配制品中时，这些抗体可以按照相同或不同的给药时程表进行给予。例如，这两种抗体可以在同一时间并且在相同的频率下进行给予（例如，两种抗体一周一次在同一时间进行给予）；它们可以在分开的时间但是以相同的给予频率进行给予（例如，两种抗体一周一次、但是在不同时间进行给予）；或者它们可以使用频率不同的时程表进行给予（例如，一种抗体每周给予一次而另一种抗体每隔一周进行给予），等等。在多个示例性实施例中，该抗 CD19 和抗 CD20 抗体被配制在一起并且以相同的给药时程表进行给予。

[0036] B. 抗 CD19 抗体

[0037] 在此所述的联合疗法包括抗 CD19 抗体。术语“CD19”或“CD19 抗原”是指例如由 HD237 或 B4 抗体鉴别的为约 90kDa 的抗原（基泽尔 (Kiesel) 等人，白血病研究 II (Leukemia Research II), 12:1119 (1987)）。CD19 被发现在贯穿 B 谱系细胞从干细胞阶段通过终末分化成为浆细胞的整个分化中的细胞上，这些细胞包括但不限于：前 B 细胞、B 细胞（包括初始 B 细胞、抗原刺激的 B 细胞、记忆 B 细胞、浆细胞、以及 B 淋巴细胞）以及滤泡性树突细胞。CD19 还被发现在人胎儿组织中的 B 细胞上。在多个优选实施例中，被在此披露的抗体靶向的 CD19 抗原是人 CD19 抗原。

[0038] 可以根据在此所述的方法和组合物使用任何合适的抗 CD19 抗体。合适的抗 CD19 抗体包括，例如，已知的抗 CD19 抗体、可商购的抗 CD19 抗体、或使用本领域熟知的方法开发

的抗 CD19 抗体。

[0039] 如在此所使用,术语“抗体”和“多种抗体”(又称为免疫球蛋白)包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、由至少两种不同的表位结合片段形成的多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体、嵌合抗体、单链 Fvs(scFv)、单链抗体、单结构域抗体、结构域抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、展现出所希望的生物活性的抗体片段(例如,抗原结合部分)、二硫化物连接的 Fvs(dsFv)、以及抗独特型(抗 Id)抗体(包括,例如对于在此披露的抗体的抗 Id 抗体)、胞内抗体、以及上述任何各项的表位结合片段。具体而言,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,例如含有至少一个抗原结合位点的分子。

[0040] 本披露的 CD19 抗体可以是单克隆人、人源化或嵌合抗 CD19 抗体。在本披露的组合物和方法中使用的抗 CD19 抗体可以是裸抗体、免疫偶联物或融合蛋白。在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体可以介导人抗体依赖性的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDC)、和/或足以耗尽循环 B 细胞的量的细胞凋亡。在多个示例性实施例中,本披露的抗 CD19 抗体是已经被工程化成相对亲本抗体而言具有增强的 ADCC 活性的抗 CD19 抗体。用于产生具有增强的 ADCC 活性的抗体变体的方法在下文进行进一步描述。在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体是具有增强的 ADCC 活性的未岩藻糖基化的(afucosylated)抗体。

[0041] 在某些实施例中,在本披露的组合物和方法中使用的抗 CD19 抗体可以是具有 IgG 同种型、特别是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 人同种型或在人群中发现的任何 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 等位基因的人、人源化或嵌合抗体。人 IgG 类别的抗体具有多种功能特征,如在血清中的长半衰期和介导不同的效应子功能的能力(单克隆抗体:原理与应用(Monoclonal Antibodies:Principles and Applications),威利-利斯公司(Wiley-Liss, Inc.),第 1 章(1995))。人 IgG 类别抗体被进一步分成以下 4 个子类别:IgG1、IgG2、IgG3 以及 IgG4。迄今为止,已经针对作为 IgG 类别抗体的效应子功能的 ADCC 和 CDC 进行了大量的研究,并且据报道,在该人 IgG 类别的抗体中,IgG1 子类别在人中具有最高的 ADCC 活性和 CDC 活性(化学免疫学(Chemical Immunology),65,88(1997))。

[0042] 在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体是一种已知的抗 CD19 抗体,包括但不限于:HD37(IgG1, κ)(DAKO 北美公司(DAKO North America, Inc.),加利福尼亚州(Calif.)卡平特提里亚市(Carpinteria));BU12(卡拉尔(Callard)等人,免疫学杂志,148(10):2983-7(1992));4G7(IgG1)(米克(Meeker)等人,杂交瘤(Hybridoma),3(4):305-20(1984 年冬));J4.119(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter),德国克雷费尔德市(Krefeld));B43(PharMingen 公司,加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego));SJ25C1(BD PharMingen 公司,加利福尼亚州圣地亚哥);FMC63(IgG2a)(左拉(Zola)等人,免疫细胞生物学(Immunol. Cell. Biol.)69(PT6):411-22(1991);尼科尔森(Nicholson)等人,分子免疫学(Mol. Immunol.),34:1157-1165(1997);彼得斯(Pietersz)等人,癌症免疫学免疫治疗(Cancer Immunol. Immunotherapy)41:53-60(1995));89B(B4)(IgG1)(贝克曼库尔特公司,佛罗里达州(Fla.)迈阿密(Miami);纳德勒(Nadler)等人,免疫学杂志,131:244-250(1983));和/或 HD237(IgG2b)(关于人白细胞分化抗原的第四次国际研讨会(Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens),奥

地利 (Austria) 维也纳 (Vienna), 1989 ; 和皮佐托 (Pezzutto) 等人, 免疫学杂志, 138(9) : 2793-2799 (1987))。在其他实施例中, 本披露的抗 CD19 抗体是在美国公开号 2008/0138336 和 2009/0142349 以及美国专利号 7,462,352 和 7,109,304 中描述的任何抗 CD19 抗体。在多个示例性实施例中, 抗 CD19 抗体是 16C4 抗体或其抗原结合片段, 如美国公开号 2008/0138336 和下文所描述的。

[0043] 在某些实施例中, 抗 CD19 抗体是如以上所述的那些的已知抗 CD19 抗体的一种同种型转换变体 (如, 转换成 IgG1 或 IgG3 人同种型)。

[0044] 在某些实施例中, 本披露的抗 CD19 抗体可以免疫特异性地结合至人 CD19, 并且可以具有如使用本领域的技术人员所已知的方法 (例如, BIAcore 测定, ELISA) (Biacore International AB 公司, 瑞典 (Sweden) 乌普萨拉 (Uppsala)) 所评定的为小于 3000pM、小于 2500pM、小于 2000pM、小于 1500pM、小于 1000pM、小于 750pM、小于 500pM、小于 250pM、小于 200pM、小于 150pM、小于 100pM、小于 75pM 的解离常数 (K_d)。在某些实施例中, 本披露的抗 CD19 抗体可以免疫特异性地结合至人 CD19 抗原, 并且可以具有如使用本领域的技术人员所已知的方法 (例如, BIAcore 测定, ELISA) 所评定的在 25 至 3400pM、25 至 3000pM、25 至 2500pM、25 至 2000pM、25 至 1500pM、25 至 1000pM、25 至 750pM、25 至 500pM、25 至 250pM、25 至 100pM、25 至 75pM、25 至 50pM 之间的解离常数 (K_d)。在某些实施例中, 本披露的抗 CD19 抗体可以免疫特异性地结合至人 CD19, 并且可以具有如使用本领域的技术人员所已知的方法 (例如, BIAcore 测定, ELISA) 所评定的为 500pM、100pM、75pM 或 50pM 的解离常数 (K_d)。

[0045] 在某些实施例中, 用于在本披露的组合物和方法中使用的抗 CD19 抗体可能能够减少或耗尽用其治疗的人中的 B 细胞。B 细胞的耗尽可以是在循环 B 细胞中、或在特定的组织中, 这些组织如但不限于骨髓、脾脏、肠相关淋巴样组织、和 / 或淋巴结。在一个实施例中, 本披露的抗 CD19 抗体可耗尽循环 B 细胞、血液 B 细胞、脾 B 细胞、边缘区 B 细胞、滤泡性 B 细胞、腹膜 B 细胞和 / 或骨髓 B 细胞。在一个实施例中, 本披露的抗 CD19 抗体可以完成以下细胞的耗尽: 祖 B 细胞、早期祖 B 细胞、晚期祖 B 细胞、大前 B 细胞、小前 B 细胞、未成熟的 B 细胞、成熟的 B 细胞、抗原刺激的 B 细胞、和 / 或浆细胞。这种耗尽可通过以下不同机制来完成: 如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、和 / 或通过阻断 CD19 与其预期配体的相互作用、和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)、B 细胞增生的抑制和 / 或 B 细胞死亡的诱导 (例如, 通过细胞凋亡)。通过 B 细胞的“耗尽”, 是指循环 B 细胞和 / 或一种或多种特定组织中的 B 细胞减少了至少约 25%、40%、50%、65%、75%、80%、85%、90%、95% 或更多。在多个具体实施例中, 几乎所有可检测到的 B 细胞从循环和 / 或一种或多种特定组织中耗尽。

[0046] 在某些实施例中, 由本披露的抗 CD19 抗体导致的 B 细胞耗尽可以持续至少 1 天、至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天、至少 6 天、至少 7 天、至少 8 天、至少 9 天、至少 10 天、至少 15 天、至少 20 天、至少 25 天、或至少 30 天。在另一个实施例中, 由本披露的抗 CD19 抗体导致的 B 细胞耗尽可以持续至少 1 周、至少 2 周、至少 3 周、至少 4 周、至少 5 周、至少 6 周、至少 7 周、至少 8 周、至少 9 周、或至少 10 周。在一个进一步的实施例中, 由本披露的抗 CD19 抗体导致的 B 细胞耗尽可以持续至少 1 个月、至少 2 个月、至少 3 个月、至少 4 个月、至少 5 个月、至少 6 个月、至少 7 个月、至少 8 个月、至少 9 个月、至少 10 个月、至少 11 个月或至少 12 个月。

[0047] B 细胞恶性肿瘤的特征是特异性 B 细胞亚群的病理性扩张,例如,前体 B 细胞急性淋巴瘤母细胞白血病的特征是对应于祖 B 细胞 / 前 B 细胞发育阶段的 B 细胞异常扩张。这些恶性 B 细胞维持正常 B 细胞标志物如 CD19 的细胞表面表达。抗 CD19 抗体因此可以耗尽人受试者中的恶性 B 细胞。在一个具体的实施例中,本披露的抗 CD19 抗体可以实现至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、或至少 100% 的人受试者中的恶性 B 细胞的耗尽。

[0048] 工程化效应子功能

[0049] 在一些实施例中,关于效应子功能对抗 CD19 抗体进行修饰,例如以便增强该抗体在治疗 B 细胞恶性肿瘤中的有效性。一种示例性效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或 ADCC,它是这样一种细胞介导的反应:其中非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并且随后导致该靶细胞溶解。这些细胞毒性细胞或效应细胞可以是表达一种或多种 FcR 的白细胞。效应细胞在小鼠中至少表达 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 / 或 Fc γ RIV。介导 ADCC 的一些人白细胞包括外周血单核细胞 (PBMC)、自然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和中性粒细胞。这些细胞中,用于介导 ADCC 的原代细胞是 NK 细胞, NK 细胞表达 Fc γ RIII。单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 / 或 Fc γ RIV。造血细胞上的 FcR 表达概述在拉瓦克 (Ravetch) 和基内特 (Kinet),免疫学年度评论 (Annu. Rev. Immunol.), 9 :457-92(1991) 中。

[0050] 用于增强抗体的效应子功能的一种方法是通过产生工程化的糖型。工程化的糖型可以通过本领域的技术人员已知的任何方法来产生:例如,通过使用工程化的或变体的表达菌株、通过与一种或多种酶(例如,DI N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III(GnTIII))进行共表达、通过在各种生物体或来自各种生物体的细胞系中表达包含 Fc 区的分子,或通过在该包含 Fc 区的分子已经被表达之后修饰一种或多种碳水化合物。用于产生工程化的糖型的方法在本领域中是已知的,并且包括但不限于在以下文献中描述的那些:乌马纳 (Umana) 等人,1999,自然生物技术 (Nat. Biotechnol) 17 :176-180;戴维斯 (Davies) 等人,2001 生物技术 (Biotechnol Bioeng) 74 :288-294;希尔兹 (Shields) 等人,2002,生物化学杂志 (J Biol Chem) 277 :26733-26740;新川 (Shinkawa) 等人,2003,生物化学杂志 278 :3466-3473) 美国专利号 6,602,684;美国序列号 10/277,370;美国序列号 10/113,929;PCT W000/61739A1;PCT W001/292246A1;PCT W002/311140A1;PCT W002/30954A1;Potillegent™ 技术 (Biowa 公司,新泽西州普林斯顿 (Princeton, N. J.)); GlycoMAb™ 糖基化工程化技术 (GLYCART 生物技术 AG 公司,苏黎世 (Zurich), 瑞士)。参见,例如 W000061739;EA01229125;US20030115614;冈崎 (Okazaki) 等人,2004, JMB, 336 : 1239-49。还可以进行一个或多个氨基酸置换,氨基酸置换导致存在于 Fc 区中的糖基化位点(例如, IgG 的天冬酰胺 297) 消除。另外,未糖基化的抗体可以在缺乏必要的糖基化体系的细菌细胞中产生。

[0051] 还可以制备具有改变的糖基化类型的抗体,如具有减小量的岩藻糖残基的低岩藻糖基化的抗体或具有增加的等分 GlcNAc 结构的抗体。已证明,这类改变的糖基化模式增大了抗体的 ADCC 能力。这类碳水化合物修饰可以通过,例如在具有改变的糖基化体系的宿主细胞中表达抗体来完成。具有改变的糖基化体系的细胞已经在本领域中予以描述并且可被用作宿主细胞,在那里以表达本披露的重组抗体,从而产生具有改变的糖基化的抗体。

参见,例如希尔兹·R·L(Shields, R. L.) 等人(2002) 生物化学杂志 277 :26733-26740 ; 乌马纳等人(1999) 自然生物技术 17 :176-1, 以及美国专利号 6, 946, 292 ; 欧洲专利号 EP1, 176, 195 ; PCT 公开 W003/035835 ; W099/54342, 这些文献各自通过引用以其全文结合于此。

[0052] 在一个实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含一个变体 Fc 区,该区介导增强的抗体依赖性的细胞毒性 (ADCC)。在一个实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含具有连接至 Asn297 的多个复杂的 N-糖苷连接的糖链的一个 Fc 区,其中岩藻糖未结合至还原端中的 N-乙酰葡萄糖胺,其中所述 Fc 区介导增强的抗体依赖性的细胞毒性 (ADCC)。

[0053] 在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含一个 Fc 变体,其中所述变体 Fc 结构域具有的对 Fc γ 受体 IIIB 的亲合力是相当的变体 Fc 结构域对该受体的亲和力的至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、或至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍、或至少 200 倍。

[0054] 在其他实施例中,效应子功能可以通过在抗体的 Fc 区中引入一个或多个半胱氨酸残基、从而允许在此区中形成链间二硫键来改变。由此产生的同型二聚体抗体可以具有改进的内在化能力和 / 或增加的补体介导的细胞杀伤和 / 或抗体依赖性的细胞毒性 (ADCC)。参见,卡洛 (Caron) 等人,实验医学杂志 (J. Exp. Med.) 176 :1191-1195(1992) 和肖彭斯·B·J(Shopes, B., J.), 免疫学杂志, 148 :2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体还可以使用如在沃尔夫 (Wolff) 等人,癌症研究 (Cancer Research), 53 :2560-2565(1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。具有双重 Fc 区的一种抗体也可以被工程化并且因此可以具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见,史蒂文森 (Stevenson) 等人,抗癌药物设计 (Anti-Cancer Drug Design), 3 :219-230(1989)。

[0055] 其他工程化抗体的 Fc 区以便改变效应子功能的方法是本领域中已知的 (例如,科尼格 (Koenig) 等人的美国专利公开号 20040185045 和 PCT 公开号 W02004/016750, 它们描述了改变 Fc 区以相比对于 Fc γ RIIB 的结合亲合力增强对于 Fc γ RIIB 的结合亲合力;还参见,阿莫 (Armour) 等人的 PCT 公开号 W099/58572、依度斯基 (Idusogie) 等人的 W099/51642、以及迪欧 (Deo) 等人的美国专利号 6, 395, 272 ; 这些文献的披露内容以其全文结合在此)。修饰 Fc 区以降低对 Fc γ RIIB 的结合亲和力的方法也是本领域中已知的 (例如,拉万科 (Ravetch) 等人的美国专利公开号 20010036459 和 PCT 公开号 W001/79299, 这些公开的披露内容以其全文结合在此)。还已经描述了具有多种变体 Fc 区的修饰的抗体,这些区与野生型 Fc 区相比具有对于 Fc γ RIIB 和 / 或 Fc γ RIIB 的增强的结合亲合力 (例如,斯塔文哈根 (Stavenshagen 等人) 的 PCT 公开号 W02004/063351, 其披露内容以其全文结合在此)。

[0056] 本领域已知的体外测定可以用于确定在本披露的组合物和方法中使用的抗 CD19 抗体是否能够介导 ADCC。示例性测定描述在美国专利号 5, 500, 362 或 5, 821, 337 中。特别地,用于这类测定的有用的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。可替代地或另外地,相关分子的 ADCC 活性可以在体内,例如在如克莱因斯 (Clynes) 等人 (国家科学院院刊 (美国), 95 :652-656(1998)) 中披露的那种的动物模型中进行评定。该测定还可以使用一种可商购的试剂盒,例如 CytoTox96™ (普洛麦格公司 (Promega)) 来进行。

[0057] 示例性抗 CD19 抗体

[0058] 在某些实施例中,在此所述的方法和组合物利用抗 CD19 抗体 16C4(参见,例如美国公开号 2008/0138336)、或其抗原结合片段。16C4 是一种 CD19 mAb,它显示具有有力的 ADCC 效应子功能。16C4 是 CD19 mAb 抗 CD19-2 的一种未岩藻糖基化的形式,该抗 CD19-2 是通过 HB12b mAb 的人源化和亲和力优化而发展的(堪萨斯·GS(Kansas GS)和泰德·TF(Tedder TF). 免疫学杂志,1991;147:4094-4102;矢沢(Yazawa)等人,国家科学院院刊,2005;102(42):15178-15183;赫布斯特(Herbst)等人,药理学与实验治疗学杂志(J Pharmacol Exp Ther),2010,335(1):213-222)。

[0059] 在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含这样一种重链:它包含含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的 CDR1;含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的 CDR2;以及含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 CDR3。在其他实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含这样一种重链:它包含含有具有与 SEQ ID NO:2 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的 CDR1;含有具有与 SEQ ID NO:3 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的 CDR2;以及含有具有与 SEQ ID NO:4 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的 CDR3。在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含这样一种重链:它包含含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的一个可变区。在其他实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含这样一种重链:它包含一个可变区,该可变区含有具有与 SEQ ID NO:1 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列。

[0060] 在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含这样一种轻链:它包含含有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的 CDR1;含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的 CDR2;以及含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的 CDR3。在其他实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含这样一种轻链:它包含含有具有与 SEQ ID NO:6 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的 CDR1;含有具有与 SEQ ID NO:7 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的 CDR2;以及含有具有与 SEQ ID NO:8 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的 CDR3。在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含这样一种轻链:它包含含有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的一个可变区。在其他实施例中,一种抗 CD19 抗体包含这样一种轻链:它包含一个可变区,该可变区含有具有与 SEQ ID NO:5 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列。

[0061] 在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含:含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链 CDR1;含有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的重链 CDR2;含有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的重链 CDR3;含有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的轻链 CDR1;含有 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的轻链 CDR2;以及含有 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0062] 在某些实施例中,本披露的抗 CD19 抗体包含:含有具有与 SEQ ID NO:2 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的重链 CDR1;含有具有与 SEQ ID NO:3 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的重链 CDR2;含有具有与 SEQ ID NO:4 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的重链 CDR3;含有具有与 SEQ ID NO:6 至少 75%、80%、85%、90%、

95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的轻链 CDR1；含有具有与 SEQ ID NO :7 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的轻链 CDR2；以及含有具有与 SEQ ID NO :8 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列的轻链 CDR3。

[0063] 在某些实施例中，本披露的抗 CD19 抗体包含：包含含有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的可变区的重链和包含含有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的可变区的轻链。在其他实施例中，本披露的抗 CD19 抗体包含：一个重链，该重链包含一个可变区，该可变区含有具有与 SEQ ID NO :1 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列；和一个轻链，该轻链包含一个可变区，该可变区含有具有与 SEQ ID NO :5 至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99%一致性的氨基酸序列。

[0064] 本披露涵盖是结合至人 CD19 的抗体 16C4 的衍生物的多种抗体。本领域的普通技术人员所已知的标准技术可以用于在编码一种抗体的核苷酸序列中引入突变（例如，添加、缺失和 / 或置换），包括例如通常用于产生氨基酸置换的定点诱变和 PCR 介导的诱变。在一个实施例中，相对于 16C4 抗 CD19 抗体的原始 VH 和 / 或 VKCDR，这些 VH 和 / 或 VK CDR 的衍生物可以包括小于 25 个氨基酸置换、小于 20 个氨基酸置换、小于 15 个氨基酸置换、小于 10 个氨基酸置换、小于 5 个氨基酸置换、小于 4 个氨基酸置换、小于 3 个氨基酸置换、小于 2 个氨基酸置换、或小于 1 个氨基酸置换。在另一个实施例中，这些 VH 和 / 或 VK CDR 衍生物可以具有在一个或多个预测的非必需的氨基酸残基（例如，对抗体特异性结合至人 CD19 不重要的氨基酸残基）上进行的保守性氨基酸置换。突变还可以例如通过饱和诱变，沿着所有或部分 VH 和 / 或 VK CDR 编码序列来随机引入，并且可以针对生物活性筛选生成的突变体以鉴别保留活性的突变体。诱变之后，可以表达编码的抗体并且可以测定该抗体的活性。两种氨基酸序列的百分比一致性可以通过本领域普通技术人员所已知的任何方法（包括但不限于 BLAST 蛋白质搜索）来测定。

[0065] C. 抗 CD20 抗体

[0066] 在此所述的联合疗法进一步包括抗 CD20 抗体。CD20 抗原（又叫做人 B 淋巴细胞限制的分化抗原，Bp35）是位于前 B 和成熟 B 淋巴细胞上的具有的分子量为约 35kD 的一种疏水性跨膜蛋白（瓦伦丁 (Valentine) 等人生物化学杂志 264(19) :11282-11287(1989)；爱因菲尔德 (Einfeld) 等人 EMBO 杂志 7(3) :711-717(1988)；克拉克 (Clark) 和莱德贝特 (Ledbetter)，癌症研究进展 (Adv. Can. Res.) 52 :81-149(1989)；以及瓦伦丁等人生物化学杂志 264(19) :11282-11287(1989))。CD20 在早期前 B 细胞发育的过程中表达并且保持到浆细胞分化为止；它未被发现在人干细胞、淋巴样祖细胞或正常浆细胞上。CD20 存在于正常 B 细胞以及恶性 B 细胞，例如 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 中的细胞上，其中 CD20 在多于 90% 的 NHL 上表达（安德森等人，血液，63(6) :1424-1433(1984))。CD20 未被发现在造血干细胞、祖 B 细胞、正常浆细胞或其他正常组织上（泰德等人，免疫学杂志 135(2) :973-979(1985))。CD20 调控用于细胞周期起始和分化的活化过程中的一个或多个早期步骤（泰德等人，上文），并且可能用作钙离子通道（泰德等人细胞生物化学杂志 (J. Cell. Biochem.) 14D :195(1990))。

[0067] 可以根据在此所述的方法和组合物使用任何合适的抗 CD20 抗体。合适的抗 CD20 抗体包括，例如，已知的抗 CD20 抗体、可商购的抗 CD20 抗体、或使用本领域熟知的方法开发

的抗 CD20 抗体。

[0068] 本披露的 CD20 抗体可以是单克隆人、人源化或嵌合抗 CD20 抗体。在本披露的组合物和方法中使用的抗 CD20 抗体可以是裸抗体、免疫偶联物或融合蛋白。在某些实施例中，本披露的抗 CD20 抗体可以介导人抗体依赖性的细胞毒性 (ADCC)、补体依赖性细胞介导的细胞毒性 (CDC)、和 / 或足以耗尽循环 B 细胞的量的细胞凋亡。在多个示例性实施例中，本披露的抗 CD20 抗体是已经被工程化成相对亲本抗体而言具有增强的 ADCC 活性的抗 CD20 抗体。用于产生具有增强的 ADCC 活性的抗体变体的方法在上文予以描述。在某些实施例中，本披露的抗 CD20 抗体是具有增强的 ADCC 活性的非岩藻糖基化的抗体。

[0069] 在某些实施例中，在本披露的组合物和方法中使用的抗 CD20 抗体是具有 IgG 同种型、特别是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 人同种型或在人群体中发现的任何 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 等位基因的人、人源化或嵌合抗体。

[0070] 结合 CD20 抗原的抗体的实例包括：“C2B8”，现在叫做“利妥昔单抗”（“RITUXANTM”）；钇-[90] 标记的 2B8 鼠类抗体，命名为“Y2B8”或“替伊莫单抗”（ZEVALINTM）（美国专利号 5,736,137，通过引用明确结合在此）；鼠类 IgG2a “B1”，又叫做“托西莫单抗”（贝克曼库尔特公司），任选地用 ¹³¹I 标记，以生成“¹³¹I-B1”抗体（碘 I¹³¹ 托西莫单抗，BEXXARTM）（美国专利号 5,595,721，通过引用明确结合在此）；鼠类单克隆抗体“1F5”（普莱斯 (Press) 等人，血液 69(2):584-591(1987)）及其变体，包括“框架修补的 (framework patched)”或人源化的 1F5(W003/002607，梁·S(Leung, S.))；ATCC 保藏物 HB-96450；鼠类 2H7 和嵌合 2H7 抗体（美国专利号 5,677,180，通过引用明确结合在此）；人源化的 2H7；huMax-CD20 (Genmab 公司，丹麦)；AME-133 (应用分子进化 (Applied Molecular Evolution))；A20 抗体或其变体，如嵌合或人源化 A20 抗体（分别为 cA20、hA20）(US2003/0219433，免疫医学 (Immunomedics))；以及单克隆抗体 L27、G28-2、93-1B3、B-CI 或 NU-B2，它们可获得自国际白细胞分型研讨会 (International Leukocyte Typing Workshop)（瓦伦丁等人，见：白细胞分型 III (Leukocyte Typing III)（麦克迈克尔 (McMichael) 编，第 440 页，牛津大学出版社 (1987)）。在一个示例性实施例中，本披露的方法和组合物中联合利用利妥昔单抗或其抗原结合片段与抗 CD19 抗体或其片段。

[0071] 利妥昔单抗 (RITUXANTM) 是在 1998 年 4 月 7 日授权的美国专利号 5,736,137 (安德森等人) 中称为“C2B8”的抗体。RITUXANTM 被指出用于治疗患有复发性或难治性低级或滤泡性、CD20 阳性、B 细胞非霍奇金淋巴瘤的患者。体外作用机制研究已经表明，RITUXANTM 结合人补体并且通过补体依赖性细胞毒性 (CDC) 溶解淋巴样 B 细胞系（雷夫 (Reff) 等人，血液 83(2):435-445(1994)）。此外，它在用于抗体依赖性的细胞毒性 (ADCC) 的测定中具有显著的活性。最近，RITUXANTM 显示在氚标记的胸苷掺入测定中具有抗增生作用并且直接诱导细胞凋亡（马隆尼 (Maloney) 等人，血液 88(10):637a(1996)）。体内临床前研究已经显示，RITUXANTM 可能是通过补体和细胞介导的过程，而耗尽来自食蟹猴的外周血、淋巴结以及骨髓的 B 细胞（雷夫等人，血液 83(2):435-445(1994)）。利妥昔单抗于 1997 年 11 月在美国被批准用于以每周 375mg/m² 的剂量、用四次剂量治疗患有复发性或难治性低级或滤泡性 CD20⁺B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 的患者。

[0072] 术语“利妥昔单抗”或“RITUXANTM”在此是指基因工程化的嵌合鼠类 / 人单克隆抗体，它是针对 CD20 抗原并且在美国专利号 5,736,137 中命名为“C2B8”，该专利通过引用明

确结合在此。用于利妥昔单抗的轻链可变区和重链可变区的完整核酸和氨基酸序列披露在美国专利号 5,736,137 中。具体而言,用于利妥昔单抗的轻链可变区的核酸和氨基酸序列披露在美国专利号 5,736,137 的图 4 和 SEQ ID NO:6 中。用于利妥昔单抗的重链可变区的核酸和氨基酸序列披露在美国专利号 5,736,137 的图 5 和 SEQ ID NO:9 中。美国专利号 5,736,137 的 SEQ ID NO:6 和 9 以及图 4 和 5 的核酸和氨基酸序列通过引用明确结合在此。利妥昔单抗还可以由包含存在于大肠杆菌宿主细胞中的载体 DNA 的 CHO 细胞转染瘤制成,该转染瘤存放于美国典型培养物保藏中心(ATCC),登录号为 69119。利妥昔单抗还可以从杂交瘤 2B8 中产生,该杂交瘤存放于 ATCC,登录号为 HB11388。

[0073] D. B 细胞恶性肿瘤

[0074] 在此所述的包括抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体的联合疗法可以用于治疗 B 细胞疾病,包括 B 细胞恶性肿瘤。术语“B 细胞恶性肿瘤”包括从 B 细胞谱系的细胞衍生的任何恶性肿瘤。示例性的 B 细胞恶性肿瘤包括但不限于:B 细胞亚型非霍奇金淋巴瘤(NHL),包括低级别/滤泡性 NHL、小淋巴细胞(SL)NHL、中间级/滤泡性 NHL、中间级弥漫性 NHL、高级免疫母细胞 NHL、高级淋巴母细胞 NHL、高级小无裂细胞 NHL、套细胞淋巴瘤、以及大块疾病 NHL;伯基特淋巴瘤;多发性骨髓瘤;前 B 急性淋巴母细胞白血病以及从早期 B 细胞前体衍生的其他恶性肿瘤;常见的急性淋巴细胞性白血病(ALL);慢性淋巴细胞性白血病(CLL),包括免疫球蛋白突变的 CLL 和免疫球蛋白未突变的 CLL;毛细胞白血病;Null 型急性淋巴母细胞白血病;瓦氏巨球蛋白血症;弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL),包括生发中心 B 细胞样(GCB)DLBCL、活化的 B 细胞样(ABC)DLBCL、以及 3 型 DLBCL;幼淋巴细胞白血病(pro-lymphocytic leukemia);轻链病;浆细胞瘤;骨硬化性骨髓瘤;浆细胞白血病;意义不明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS);焖燃性多发性骨髓瘤(SMM);惰性多发性骨髓瘤(IMM);霍奇金淋巴瘤,包括经典和结节性淋巴细胞主导型;淋巴浆细胞性淋巴瘤(LPL);以及边缘区淋巴瘤,包括胃黏膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤。

[0075] 还涵盖对这些癌症的复发的治疗。LPHD 是霍奇金病的一个类型,不管是放射治疗还是化学疗法治疗它都趋于频繁复发并且其特征是 CD20 阳性恶性细胞。CLL 是白血病的四种主要类型中的一种。一种成熟 B 细胞(叫做淋巴细胞)的癌症-CLL 体现为血液、骨髓以及淋巴组织中的细胞的渐进性累积。惰性淋巴瘤是一种生长缓慢的、不可治愈的疾病,其中患者在多个周期的缓解和复发之后平均生存 6 与 10 年之间。

[0076] B 细胞耗尽的所希望的水平将取决于疾病。为了治疗 B 细胞恶性肿瘤,可能希望的是最大化 B 细胞的耗尽,这些 B 细胞是本披露的抗 CD19 和抗 CD20 抗体的靶标。因此,为了治疗 B 细胞瘤,希望的是 B 细胞耗尽足以至少阻止疾病的进展,这可以由本领域中熟练的医师,例如通过监测具体癌症的肿瘤生长(大小)、癌细胞类型的增生、转移、其他病征和症状来评定。优选地,B 细胞耗尽足以阻止疾病进展,持续至少 2 个月、更优选 3 个月、甚至更优选 4 个月、更优选 5 个月、甚至更优选 6 或更多个月。在多个甚至更优选的实施例中,B 细胞耗尽足以将缓解时间增加至少 6 个月、更优选 9 个月、更优选 1 年、更优选 2 年、更优选 3 年、甚至更优选 5 或更多年。在一个最优选的实施例中,B 细胞耗尽足以治愈该疾病。在多个优选实施例中,癌症患者的 B 细胞耗尽是治疗前基线水平的至少约 75% 并且更优选是 80%、85%、90%、95%、99% 并且甚至是 100%。

[0077] 如果与治疗前相比,在给予本披露的组合物之后在症状或其他适用指标中存在可

测量的改进,则本披露的这些方法减轻或成功治疗了患者的 B 细胞瘤。治疗作用可能在给予本披露的组合物之后 3-10 周内是明显的。每种疾病的适用指标是适当领域中熟练的医师所熟知的。例如,该医师可以监测所治疗的患者的疾病的临床或血清学证据,如疾病的血清学标志物、全血计数(包括 B 细胞计数)、以及血清免疫球蛋白水平。患者可以表现出在以下各项中的一种或多种方面的可观察的和 / 或可测量的减少或不存在:癌细胞数目的减小或癌细胞的不存在;肿瘤大小的减小;对癌细胞浸润到器官中的抑制(例如,某种程度的减缓并且优选停止);对肿瘤转移的抑制(例如,某种程度的减缓并且优选停止);对肿瘤生长某种程度的抑制;和 / 或对与具体癌症相关的一种或多种症状的某种程度的减轻;减小的发病率和死亡率、以及活组织质量的改进。优选地,在给予本披露的组合物之后,相比在通过本披露的方法进行治疗之前所取得的具体症状或指标的基线而言,改进是至少 20%、更优选 25% -30%、甚至更优选 30% -35%、最优选 40% 及以上。

[0078] 用于评定对瘤的治疗的功效或成功的参数将是适当疾病中熟练的医师所已知的。总体而言,熟练的医师将寻求具体疾病的病征和症状的减少。参数可以包括疾病进展的中位时间、缓解时间以及稳定疾病时间。对于 B 细胞瘤,可测量的指标可以包括,例如疾病进展的时间、总体和 / 或无进展生存期的持续时间的增加。在白血病的情况下,可以进行骨髓活检以确定缓解的程度。完全缓解可被定义为,在治疗之后 30 天,白细胞组成了在患者骨髓中发现的所有细胞的不到 5%。

[0079] 以下参考文献描述了淋巴瘤和 CLL、它们的诊断、治疗以及用于测量治疗功效的标准医学程序。卡内罗斯·G·P(Canellos G P),李斯特·T·A(Lister, T A),斯克拉·J·L(Sklar J L):淋巴瘤(The Lymphomas).W.B. 桑德斯公司(W.B. Saunders Company),费城(Philadelphia),1998;范蓓思·K(van Besien K)和卡布尼拉斯·F(Cabanillas, F):临床表现(Clinical Manifestations),非霍奇金淋巴瘤的分期和治疗(Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma),第 70 章,第 1293-1338 页,见:血液学,基本原理和实践(Hematology, Basic Principles and Practice),第 3 版. 霍夫曼(Hoffman)等人(编辑). 丘吉尔利文斯通出版社(Churchill Livingstone),费城,2000;以及拉埃·K(Rai, K)和帕特尔·D(Patel, D):慢性淋巴细胞性白血病(Chronic Lymphocytic Leukemia),第 72 章,第 1350-1362 页,见:血液学,基本原理和实践,第 3 版. 霍夫曼等人(编辑). 丘吉尔利文斯通出版社,费城,2000。

[0080] E. 药用配制品

[0081] 在某些方面,本发明提供了包含抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体、或其组合以及一种药学上可接受的赋形剂的药用组合物。在某些实施例中,本披露的药用组合物被用作药物。

[0082] 在某些实施例中,抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体、或其组合可以与一种药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂一起配制作作为药用(治疗)组合物,并且可以通过本领域已知的多种方法来给予。如将为熟练的业内人士所理解,给予途径和 / 或方式将随所希望的结果而改变。术语“药学上可接受的载体”是指一种或多种不干扰活性成分的生物活性的有效性的无毒性材料。这类制剂通常可含有盐、缓冲剂、防腐剂、兼容的载体、以及任选地其他治疗剂。这类药学上可接受的制剂通常还可含有适合给予人的兼容的固体或液体填充剂、稀释剂或包封物质。可在在此所述的配制品中利用的其他设想的载体、赋形剂、和 / 或添加剂包括:例如,调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、脂质类、蛋白质赋形剂(如血

清白蛋白、明胶、酪蛋白)、成盐平衡离子(如钠),等等。适合在在此所述的配制品中使用的这些和另外已知的药用载体、赋形剂和/或添加剂是本领域中已知的,例如,如在“雷氏:药学的理论与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)”,第21版,利平科特·威廉斯&威尔金斯出版公司(Lippincott Williams & Wilkins),(2005),并且在“医师案头参考(Physician's Desk Reference)”,第60版,医学经济学(Medical Economics),新泽西州蒙特威尔(Montvale)(2005)中所列举的。通常可以选择如本领域技术人员所熟知的或者如在此所述的适合于该联合疗法的抗体的给予方式、溶解度和/或稳定性的药学上可接受的载体。

[0083] 在此所述的配制品包含处于产生适用于所希望的剂量的 w/v 的浓度的抗 CD19 抗体、抗 CD20 抗体、或其组合。在某些实施例中,抗 CD19 抗体或抗 CD20 抗体在配制品中以约 1mg/ml 至约 200mg/ml、约 1mg/ml 至约 100mg/ml、约 1mg/ml 至约 50mg/ml、或 1mg/ml 与约 25mg/ml 的浓度存在。在某些实施例中,配制品中抗 CD19 或抗 CD20 抗体的浓度可以从约 0.1 至约 100 重量%变化。在某些实施例中,抗 CD19 或抗 CD20 抗体的浓度的范围是 0.003 至 1.0 摩尔浓度。

[0084] 在某些实施例中,抗 CD19 抗体和抗 CD20 抗体被配制在一起,并且每种抗体在配制品中以约 1mg/ml 至约 200mg/ml、约 1mg/ml 至约 100mg/ml、约 1mg/ml 至约 50mg/ml、或 1mg/ml 与约 25mg/ml 的浓度存在。在某些实施例中,配制品中每种抗体的浓度可以从约 0.1 至约 100 重量%变化。在某些实施例中,每种抗体的浓度的范围是 0.003 至 1.0 摩尔浓度。

[0085] 在某些实施例中,抗 CD19 抗体是根据 W02010102276 中的任何配制品来配制。

[0086] 在一个实施例中,本披露的配制品是基本上不含有内毒素和/或相关热原物质的无热原配制品。内毒素包括被局限在微生物内部并且只有当微生物分解或死亡时才被释放的毒素。热原物质还包括来自细菌和其他微生物的外膜的诱导发热的、热稳定性物质(糖蛋白)。如果给予人类,这些物质均可以引起发热、低血压以及休克。由于潜在的毒性作用,即使是小量的内毒素也必须从静脉内给予的药用药物溶液中去除。食品与药物管理局(“FDA”)已经为静脉内药物应用设置了为在单个一小时时间段内每千克体重每剂量 5 个内毒素单位(EU)的上限(美国药典公约(The United States Pharmacopeial Convention),药典论坛(Pharmacopeial Forum)26(1):223(2000))。在某些具体实施例中,组合物中的内毒性和热原水平是小于 10EU/mg、或小于 5EU/mg、或小于 1EU/mg、或小于 0.1EU/mg、或小于 0.01EU/mg、或小于 0.001EU/mg。

[0087] 当用于体内给予时,本披露的配制品应是无菌的。本披露的配制品可以通过各种杀菌方法,包括无菌过滤、放射等进行杀菌。在一个实施例中,该配制品是用预先杀菌的 0.22 微米的过滤器进行过滤杀菌。用于注射的无菌组合物可以根据如在“雷氏:药学的理论与实践”,第21版,利平科特·威廉斯&威尔金斯出版公司,(2005)中所述的常规药学实践来配制。

[0088] 本披露的治疗组合物可以配制以用于特定的给予途经,如口服、经鼻、经肺、局部(包括经颊和舌下)、经直肠、经阴道和/或肠胃外给药。如在此所使用的短语“肠胃外给药”和“肠胃外给予的”是指非肠内和局部给药的、通常是通过注射的给予方式,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外以及胸骨内注射和输注。本披露的适合于局部或经

皮给药的配制品包括粉剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。这种或这些抗体可以在无菌条件下与药学上可接受的载体混合、并且与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂、或推进剂混合（美国专利号 7, 378, 110 ; 7, 258, 873 ; 7, 135, 180 ; 美国公开号 2004-0042972 ; 以及 2004-0042971）。

[0089] 这些配制品可以按照单位剂型呈现并且可以通过药学领域已知的任何方法来制备。本披露的药用组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变, 以便获得针对具体患者、组合物、以及给予方式而有效达到所希望的治疗应答, 而不对该患者产生毒性的活性成分量（例如, “治疗有效量”）。选择的剂量水平将取决于各种药代动力学因素, 包括所采用的本披露的具体组合物的活性、给予途径、给予时间、所采用的具体化合物的排泄率、治疗的持续时间、与所采用的具体组合物联合使用的其他药物、化合物和 / 或材料、正被治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和先前病史、以及在医学领域中熟知的类似因素。合适剂量的范围可以是约 0.0001 至约 100mg/kg 体重或更大, 例如约 0.1、1、10、或 50mg/kg 体重, 其中约 1 至约 10mg/kg 体重是优选的。

[0090] 在某些实施例中, 该方法包括联合给予多剂量的抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）与多剂量的抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）。该方法可以包括给予 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40 或更多个治疗上有效剂量的一种药用组合物, 该组合物包含抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）或抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）中的一者、或两者。给予多剂量的药用组合物的频率和持续时间可以由本领域的技术人员容易地确定而无需过多的实验。此外, 使用治疗有效量的抗体组合对受试者进行的治疗可以包括一种单一治疗、或优选地可以包括一系列治疗。例如, 受试者可以使用抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）和抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）的组合来治疗, 其中两种抗体被给予的剂量范围是在约 1 至约 100mg/kg 体重之间, 一周一次, 持续在约 1 至约 10 周之间、优选在约 2 至约 8 周之间、更优选在约 3 至约 7 周之间、并且甚至更优选持续约 4、5、或 6 周。可以每年进行治疗以预防复发, 或在出现复发迹象时进行治疗。

[0091] 还将理解的是为用于治疗所使用的抗体或其抗原结合片段的有效剂量可以在具体治疗的过程中增大或减小。剂量改变可以是由如在此所述的诊断测定的结果所引起并且因其变得明显。因此, 在一个实施例中, 给药方案包括联合给予治疗有效剂量的抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）与治疗有效剂量的抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）, 其中该组合在一个治疗期的第 1、8、15 以及 22 天进行给予。在另一个实施例中, 该给药方案包括联合给予治疗有效剂量的抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）与治疗有效剂量的抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）, 其中该组合在一个治疗期中的一周的第 1、2、3、4、5、6 以及 7 天进行给予。多个进一步的实施例包括：一个给药方案, 其中治疗有效剂量的抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）与治疗有效剂量的抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）联合给予, 其中该组合在一个治疗期中的一周的第 1、3、5、以及 7 天进行给予；一个给药方案, 该方案包括联合给予治疗有效剂量的抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）与治疗有效剂量的抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）, 其中抗体组合在一个治疗期中的一周的第 1 和 3 天进行给予；以及一个优选给药方案, 该方案包括在一个治疗期中的任一给定周的第 1 天联合给予治疗有效剂量的抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）与抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）。该治疗期可以包括 1 周、2 周、3 周、一个月、3 个月、6 个月、或一年。多个治疗期可以彼此相继或相隔 1

天、一周、2 周、一个月、3 个月、6 个月、或一年。使用抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）和抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）的组的治疗可以包括同时或并存地给予一种或两种抗体，只要该治疗在治疗过程中的某一点包括抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）和抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）的组合。该联合疗法的作用还可以通过改变给予抗 CD20 抗体和 / 或抗 CD19 抗体治疗的时间安排进行优化。联合使用抗 CD20 抗体或其抗原结合片段与抗 CD19 抗体或其抗原结合片段的治疗可以是同时的（并存的）、连续的（依序的）、或其组合。因此，经受联合抗体疗法的受试者可以在同一时间（例如，同时地）或在不同时间（例如，在同一天、或在不同天按任一顺序依序地）接受抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）和抗 CD19（或其抗原结合片段）。因此，在一些实施例中，将抗 CD20 抗体（如利妥昔单抗）（或其抗原结合片段）与抗 CD19 抗体（如 16C4）（或其抗原结合片段）同时给予。在其他实施例中，首先给予抗 CD20 抗体（如利妥昔单抗）（或其抗原结合片段），并且然后给予抗 CD19 抗体（如 16C4）（或其抗原结合片段）。在仍然其他实施例中，首先给予抗 CD19 抗体（如 16C4）（或其抗原结合片段），并且然后给予抗 CD20 抗体（如利妥昔单抗）（或其抗原结合片段）。在一些实施例中，并存地给予抗 CD20 抗体和抗 CD19 抗体（如利妥昔单抗和 16C4）的组合用于一次给药，但其他给药包括在同一天、或在不同天按任一顺序进行依序给予。在该抗 CD20 抗体（如利妥昔单抗）和该抗 CD19 抗体（如 16C4）被同时给予的情况下，它们可以作为各自包含抗 CD20 抗体（或其抗原结合片段）或抗 CD19 抗体（或其抗原结合片段）的分开的药用组合物来给予、或可以作为包含这两种抗癌剂的一种单一药用组合物来给予。

[0092] 实例

[0093] 虽然现在大体上描述了本发明，通过参考以下实例将会更容易理解，这些实例仅出于说明某些实施例和本披露的实施例的目的而包括在内，并且不旨在限制本发明。

[0094] 实例 1：抗 CD19 mAb 16C4-afuc 具有针对多种 B 白血病和淋巴瘤细胞系的有力的体外 ADCC 活性

[0095] 16C4-afuc 是 mAb 16C4 的未岩藻糖基化的形式，该抗体是通过小鼠 IgG1 mAb HB12B 的人源化和亲和力成熟而产生的。（堪萨斯 GS 和泰德 TF. 免疫学杂志, 1991 ;147 : 4094-4102 ;矢沢等人, 国家科学院院刊, 2005 ;102(42) :15178-15183 ;赫布斯特等人, 药理学与实验治疗学杂志, 2010, 335(1) :213-222）。相比于岩藻糖基化的 16C4 mAb, 16C4-afuc 具有约 9 倍增大的对于活化的人 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 和小鼠 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 的亲和力以及增强的 ADCC 效应子功能。相比于利妥昔单抗, 16C4 不介导 CDC。（赫布斯特等人, 药理学与实验治疗学杂志, 2010, 335(1) :213-222.）

[0096] 在一大组 B 白血病和淋巴瘤细胞系中，将 16C4-afuc 的 ADCC 活性与岩藻糖基化的前体 mAb 16C4 的 ADCC 活性进行对比。将 CD20 mAb 利妥昔单抗包括在所有测定中作为阳性对照。在测试的所有细胞系下，16C4-afuc 在介导 ADCC 方面显著比亲本 mAb 抗 CD19 mAb 更具效力（图 1A-1E）。当对比 16C4-afuc 与利妥昔单抗针对全组 15 种恶性 B 细胞系的活性时，观察到三种不同的活性概况：一、16C4-afuc 和利妥昔单抗针对其的能力是大约均等的细胞系，由 Karpas-1106P 细胞示例（图 1A），它们表达中度至高度量的 CD19（表 1）；二、针对其利妥昔单抗比 16C4-afuc 更有效的细胞系，如 CLL 细胞系 JVM2（图 1B）；三、针对其 16C4-afuc 比利妥昔单抗更有效的细胞系，如 Oci-LY19 细胞（图 1C）和 Daudi 细胞（图 1D）

和表 I)。

[0097] 还分别分析这些细胞系对 CD19 和 CD20 的相对表达以确定这两种抗原的表面水平是否决定了它们对 CD19 和 CD20 mAb 的体外敏感性 (表 I)。在图 1B 中,使用 16C4-afuc 和利妥昔单抗所观察到的 ADCC 活性 (细胞毒性最大百分比,图 1E 针对 CD19 mAb 并且图 1F 针对 CD20 mAb ;EC₅₀ 值,图 1G 针对 CD19 mAb 并且图 1H 针对 CD20 mAb) 针对 CD19 和 CD20 的相对表面表达而进行绘制,如通过流式细胞计量术使用 mAb 16C4-afuc 和利妥昔单抗作为初级抗体用于检测而测定的。对某些细胞系而言,对抗 CD19 和抗 CD20 mAb 的敏感性似乎匹配它们的相对抗原表达。例如,Oci-LY19 细胞具有对 CD20 的低水平但对 CD19 的高表达,并且只应答于 16C4 治疗 (表 I)。对于 Granta-519 细胞,观察到相反的情况,这些细胞高水平表达 CD20 并且被利妥昔单抗而不被 16C4-afuc 有效杀伤。然而,对所有细胞系的一个对比并没有显示出抗原表达与对由任一 mAb 介导的 ADCC 的敏感性的显著相关性。这一相关性的缺乏由 Karpas-422 细胞展示,这些细胞表达低水平的 CD19 和 CD20,并且被 16C4-afuc 而不被利妥昔单抗有效杀伤。

[0098] 总之,这些结果证明 16C4-afuc 具有针对多种细胞系的有力的体外 ADCC 活性。在测试的 15 种细胞系中的 11 种的情况下,16C4-afuc 的 ADCC 活性比 CD20mAb 优越。然而,使用这不同组的恶性 B 细胞系,不存在抗原表达与对 CD19 或 CD20 mAb 介导的 ADCC 的敏感性的显著相关性。

[0099] 实例 2 :16C4-afuc 有效针对患者衍生的体外 CLL 和 ALL 细胞

[0100] 给定 16C4-afuc 针对 B 细胞系的活性,还检验了 CD19 mAb 针对原代白血病细胞的作用。从诊断患有 CLL 的患者中获得六种 PBMC 样品,并且测定对于 CD19 和 CD20 的表面抗原密度。如图 2A 所示,这些样品中的 B 细胞不同程度地表达 CD19 和 CD20。在这些样品的一些样品中,CD20 抗原位点的数目比 CD19 位点的数目大。使用体外基于 FACS 的细胞毒性测定来评估 16C4-afuc 杀伤这些 CLL 样品中的 B 细胞的能力,使用利妥昔单抗作为阳性对照。图 2B-2D 显示了对 16C4-afuc 和利妥昔单抗进行的针对三种代表性 CLL 样品的 ADCC 测定的结果 (CLL#106,图 2B ;CLL#104,图 2C ;CLL#107,图 2D)。16C4-afuc 的 EC₅₀ 值的范围是从 0.007nM 至 0.063nM。相比之下,利妥昔单抗的 EC₅₀ 值的范围是从 0.639nM 至 0.682nM。分别将 CLL 细胞对由 16C4-afuc 和利妥昔单抗介导的 ADCC 的敏感性与它们对 CD19 和 CD20 的表面表达进行对比 (分别是图 2E 和 2F)。此分析的结果显示出一个明显的趋势:对于 CD19 和 CD20,随着抗原密度增加,细胞杀伤更有效。使用这些原代 CLL 样品的结果还显示,与利妥昔单抗相比,16C4-afuc 在相对低水平的表面抗原表达下在介导体外耗尽方面更有效。

[0101] 还在基于 FACS 的 ADCC 测定中使用来自四位患有 ALL 的患者的 PBMC 样品测试了 16C4-afuc 的活性。对于这些测定中的三个,相比于来自四位健康供体的 B 细胞,存在足够的细胞数目来测定 CD19 和 CD20 的抗原密度 (图 3A)。对于正常的外周血 B 细胞,CD19 和 CD20 的平均密度经测定分别是每细胞约 20,000 和约 200,000 个抗原位点。相比于正常的 B 细胞,CD19 表达稍微少一半,而在第三 ALL 样品中增大到约两倍 (图 3A)。然而,CD20 抗原位点的数目变化更广泛。在对于来自患有 ALL 的供体的样品的 ADCC B 细胞耗尽测定中 (图 3B-3E),使用 16C4-afuc 的 EC₅₀ 值的范围是从 0.002nM 至 0.131nM。这些值是使用利妥昔单抗获得的 EC₅₀ 值的 1/6 至小于 1/100。

[0102] 总之,这些结果显示 16C4-afuc 有效地介导针对来自患有 CLL 和 ALL 的患者的原

代白血病细胞的 ADCC。在这些体外测定中, CD19 mAb 比 CD20 mAb 利妥昔单抗更有效。在其中 CD20 表达水平显著高于细胞表面 CD19 的水平样品中, 情况也是如此。

[0103] 以上实验的结果概述在表 I 中:

[0104]

细胞系	1 μ g/ml 下的 抗 CD19-2 MFI	1 μ g/ml 下的 利妥昔单抗 MFI	利妥昔单抗		16C4-afuc	
			ADCC EC50 [ng/ml]	10 μ g/ml 下 的%最大细 胞杀伤	ADCC EC50 [ng/ml]	10 μ g/ml 下 的%最大细 胞杀伤
Daudi (伯基特)	161	253	0.041	51	0.0031	50
Granta-519 (NHL/MCL)	75	403	0.0663	34	n.d.	6
Toledo (DLCL)	472	312	0.0319	55	0.0075	48
Oci-LY19 (DLCL)	258	12	n.d.	4	0.0163	47
Karpas-422 (NHL)	53	45	n.d.	5	0.0181	62
Farage (DLCL)	226	581	0.0113	54	0.0141	48
Nalm-6 (ALL)	448	26	n.d.	14	0.0199	35
Karpas-1106P	66	102	0.0137	71	0.009	59
DB (DLCL)	61	70	0.2399	46	n.d.	34
RL (NHL)	344	261	0.0296	56	0.0073	45
Raji (伯基特)	422	823	0.008	40	0.003	43
Namalwa (伯基特)	664	298	n.d.	7	0.012	23
JVM-2 (CLL)	277	76	0.0586	49	0.1881	24
JVM-13 (CLL)	262	60	0.0317	50	0.0368	20
MeC2 (CLL)	428	104	0.007	42	0.0039	39

[0105]

[0106] 实例 3: 16C4-afuc 通过 Fc 依赖性机制抑制 SCID- 淋巴瘤模型中的肿瘤生长

[0107] 接下来, 测试了 16C4-afuc 体内抑制肿瘤生长的能力。在生长在 SCID 小鼠中的多个人 CD19+ 淋巴瘤异种移植物中评估 16C4 的抗肿瘤功效。

[0108] 一些、但不是所有针对 CD19 的 mAb 具有抗增生活性。(甘提 (Ghetie) 等人, 血液, 1994 ;83 (5) :1329-1336.) 之前显示 mAb 16C4 抑制转化的 B 细胞系以及来自健康供体的原代 B 细胞的增生。(赫布斯特等人, 药理学与实验治疗学杂志, 2010, 335 (1) :213-222.) 为了测定 ADCC 对抗肿瘤作用的贡献, 将 16C4-afuc 的功效与 mAb 16C4-TM-CD19 mAb 被工程化以用于消除 Fc 介导的效应子功能的一个版本 - 进行对比。(奥加涅相 (Oganessian) 等人, 晶体学报 (Acta Cryst), 2008 ;D64 :700-704.) 在皮下细胞植入后第 7 天开始每周给药 2.5mg/kg 的情况下, 在 Daudi 和 Raji SCID- 淋巴瘤异种移植物模型中评定这些抗体。两种抗体均导致肿瘤生长的减少, 虽然未岩藻糖基化的抗 CD19 mAb 比效应子减少的突变体

mAb 16C4-TM 更有效 (图 4)。在 Raji 模型中,在第 33 天 (在同种型对照物治疗的组由于肿瘤大小必须被终止的时候),16C4-afuc 将肿瘤生长抑制了 84%,而 16C4-TM 将肿瘤生长抑制了 46% (图 4B)。在 Daudi 模型的第 33 天,16C4-afuc 将肿瘤生长抑制了 88%,而 mAb 16C4-TM 将肿瘤生长抑制了 39% (图 4A)。这些结果证明,Fc 依赖性效应子功能是有效抑制体内肿瘤生长所需要的。这些结果还显示,该 CD19 mAb 可以在不存在效应子功能的情况下减缓肿瘤生长 (虽然程度要小得多),这可能是该 mAb 的抗增生活性所导致的结果。

[0109] 实例 4:16C4-afuc 抑制具有人 B 细胞淋巴瘤的多个 SCID 小鼠模型中的肿瘤生长

[0110] 测定抑制小鼠模型中肿瘤生长所需的 16C4-afuc 的剂量。一系列 mAb 剂量和给予时程表在 SCID/Raji 皮下异种移植物模型中进行测试。mAb 剂量范围包括 0.3、1、3、以及 10mg/kg 16C4-afuc。给药时程表变化包括 1、3、以及 5 次剂量,其中第一次剂量在细胞植入后第 5 天给予 (图 5)。总体而言,16C4-afuc 的体内功效是剂量和时程表依赖的。在此处呈现的模型中,16C4-afuc 的五次剂量 (图 5B) 相比 3 次剂量 (图 5A) 产生更强的抗肿瘤活性。然而,使用 3mg/kg 的治疗获得与使用 10mg/kg 的治疗相当的功效。为了随后的研究,使用 3mg/kg 的剂量,每周给予两次,总共 5 次剂量。

[0111] 使用这一剂量评估 16C4-afuc 在多个皮下 SCID 淋巴瘤异种移植物模型中的功效,使用利妥昔单抗作为阳性对照和参照点。图 6 显示了来自使用 Namalwa (图 6A)、Daudi (图 6B)、以及 Toledo (图 6C) 细胞的肿瘤模型的结果。在这些模型中,相比于对照组所获得的结果,16C4 将肿瘤生长分别抑制了 82%、91%、以及 88%。Namalwa 肿瘤对利妥昔单抗治疗应答不佳,而在 Daudi 异种移植物的生长抑制方面,使用 CD20 mAb 比使用 16C4-afuc 稍好。在 Toledo 肿瘤模型中,两种 mAb 显示出相当的功效。

[0112] 使用 Namalwa 和 Daudi 细胞异种移植物,在 IV 播散性肿瘤模型中,使用生存时间或麻痹 (paralysis) 时间作为主要终点,来进一步测试 16C4-afuc 的抗肿瘤功效。与在对照组中观察到的生存期相比,在 Namalwa (图 6E) 和 Daudi (图 6D) 模型中给予 16C4-afuc 分别将生存生存增大了 50% 和 43%。如皮下淋巴瘤模型的情况,利妥昔单抗在使用 Namalwa 细胞的系统性疾病模型中仅具有较小的作用。同样对于 Daudi 模型,使用 mAb 16C4-afuc 和利妥昔单抗观察到的相对功效再现了在皮下模型中观察到的结果。这些结果显示,16C4-afuc 在多个 B 细胞淋巴瘤模型中、在皮下和在系统性模型二者中抑制了肿瘤生长。

[0113] 实例 5:实例 5:16C4-afuc 与利妥昔单抗的组合产生延长的肿瘤生长的抑制

[0114] 将由使用 CD19 和 CD20 mAb 对恶性 B 细胞的联合靶向介导的肿瘤生长抑制与使用任一 mAb 单独靶向所产生的肿瘤生长抑制进行对比。四个不同的皮下 SCID 淋巴瘤 / 白血病模型 (Raji、Daudi、Oci-LY19、Ramos、SUP-B15),使用 16C4-afuc 和利妥昔单抗单独或联合地进行治疗。在这些实验中,根据与 16C4-afuc 相同的时程表和浓度,在 3mg/kg 下,总共 5 次剂量,来给予利妥昔单抗。如图 5 所示,将 16C4-afuc 的剂量从 3mg/kg 增大至 10mg/kg 没有在 SCID/Raji 淋巴瘤模型中产生更大的肿瘤生长抑制作用。然而,16C4-afuc 与利妥昔单抗的组合确实导致延长的 Raji 肿瘤生长的抑制 (图 7A)。在皮下 Daudi 淋巴瘤模型中获得类似的结果 (图 7C),其中这两种 mAb 的组合产生更大的且延长的皮下淋巴瘤的抑制。该 mAb 组合的作用在 Oci-LY19 皮下异种移植物模型中不那么明显 (图 7B),这可能是利妥昔单抗在此模型中的不佳活性所导致的结果。然而 CD19 mAb 显示出良好的功效,并且 CD19 mAb 与利妥昔单抗的组合产生更大的肿瘤抑制。类似地,该 mAb 组合的作用在 Ramos

异种移植物模型中不那么明显（图 7D），这可能是 16C4-afuc 在此模型中的相对不佳活性所导致的结果。然而如对于 Oci-LY19 模型所见，CD19 mAb 与利妥昔单抗的组合在此模型中产生更大的肿瘤抑制。还在皮下模型中使用 SUP-B15 ALL 细胞单独或联合地测试了 mAb 16C4-afuc 和利妥昔单抗（图 7E）。16C4-afuc 与利妥昔单抗的组合相比单一试剂具有更明显的肿瘤生长抑制。此外，我们在一个系统性 Daudi 肿瘤模型中测试了 CD19/CD20 mAb 联合治疗。类似于来自皮下模型的结果，相比单一 mAb 治疗的对照物（数据未显示），该联合疗法显示出更大的抗肿瘤功效，这产生增大的生存率（93.5%）。这些结果证明，CD19 mAb 16C4-afuc 与 CD20 mAb 利妥昔单抗的组合，相比单独的任一 mAb，在人 B 细胞淋巴瘤的临床前模型中具有更大的功效。

[0115] 实例 6：联合疗法在 huCD19/CD20 双转基因小鼠中的药代动力学和药效动力学

[0116] 双转基因动物是通过使 huCD19 转基因小鼠与 huCD20 转基因小鼠交叉而产生的。两种菌株之前已经被详细表征、以 B 细胞限制性方式表达转基因、并且已经被成功用于研究分别使用 CD19 和 CD20 mAb 的 B 细胞耗尽。（周（Zhou）等人，1994，分子细胞生物学（Mol Cell Biol）14：3884-3894；阿费加（Ahuja）等人，2007，免疫学杂志 179：3351-3361；矢沢等人，2005，国家科学院院刊 102：15178-15183）。

[0117] 在其中给予利妥昔单抗或对照物的样品、大约 36 小时之后添加 16C4-afuc 的给药方案之后，测量 CD19/CD20 转基因小鼠中的 16C4-afuc 水平。该小鼠血液中的 16C4-afuc 水平在高达 1680 小时的时间点进行测量。考虑了四种分开的给予：16C4-afuc（1mg/kg）+ 对照物（例如，无利妥昔单抗）；16C4-afuc（10mg/kg）+ 对照物；16C4-afuc（1mg/kg）+ 利妥昔单抗（10mg/kg）；16C4-afuc（10mg/kg）+ 利妥昔单抗（10mg/kg）。图 8A 显示了该实验的药代动力学结果。不论是单独给予或是与利妥昔单抗一起给予，更高剂量的 16C4-afuc（10mg/kg）比更低剂量的 16C4-afuc（1mg/kg）在血液中保留的更久。

[0118] 实例 7：在 hu CD19/CD20 转基因小鼠中的 B 细胞耗尽

[0119] 将由联合疗法介导的体内 B 细胞耗尽的程度与利妥昔单抗单独的作用进行对比（图 8B）。双转基因 huCD19/CD20 小鼠接受以下各项之一的一次剂量：(i) 利妥昔单抗（10mg/kg）；(ii) 16C4-afuc（1mg/kg）；(iii) 16C4-afuc（10mg/kg）；(iv) 利妥昔单抗（10mg/kg）+ 16C4-afuc（1mg/kg）；(v) 利妥昔单抗（10mg/kg）+ 16C4-afuc（10mg/kg）。在给予这些不同的剂量之后，每隔一段时间通过流式细胞计量术测定剩余的血液和脾脏 B 细胞数目。

[0120] 图 9 显示，使用利妥昔单抗（10mg/kg）+ 16C4-afuc（10mg/kg）的最高剂量的联合疗法导致持续时间最长的来自血液和脾脏的 B 细胞耗尽的最大百分比。特别地，该 B 细胞耗尽在已经添加 16C4-afuc 剂量（1mg/kg）之后大约 384 小时（或 16 天）时陡然下降。在已经添加利妥昔单抗（10mg/kg）或利妥昔单抗（10mg/kg）+ 16C4-afuc（1mg/kg）之后大约 840 小时（或 35 天）时观察到一个类似的 B 细胞耗尽的下降，即使在给予后者剂量之后 B 细胞耗尽的百分比似乎上升。当已经添加了更高剂量的 16C4-afuc（10mg/kg）时，对 B 细胞耗尽的作用相对更低剂量的 16C4-afuc（不论单独或联合给予）并且相对单独的利妥昔单抗（10mg/kg）而言得以延长。然而，最强烈且最持久的作用是使用利妥昔单抗（10mg/kg）+ 16C4-afuc（10mg/kg）的联合疗法而观察到的。

[0121] 材料与方法

[0122] 细胞和试剂

[0123] 人B白血病和淋巴瘤细胞系 Raji、Daudi、Ramos、Namalwa、Toledo、Farage、以及 RL 从美国典型培养物保藏中心 (ATCC, 马纳萨斯 (Manassas), 维吉尼亚州, 美国) 获得。细胞系 OCI-LY-19、Granta-519、Karpas-422、Nalm-6、Karpas-1106P、DB、JVM-2、JVM-13 以及 MEC2 从德国微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) (DSMZ, 德国不伦瑞克 (Braunschweig)) 获得。KC1333 NK 细胞系 (表达人 CD16) 从 BioWa 公司 (新泽西州普林斯顿) 获得。所有的细胞系维持在 RPMI-1640 培养基 (英杰公司 (Invitrogen), 加利福尼亚州卡尔斯巴德 (Carlsbad)) 中并且用 10% 胎牛血清 (FBS) 增补。血样在获得知情同意后从健康供体中获得。来自诊断患有 CLL 或 ALL 的患者的冷冻的聚蔗糖-泛影葡胺纯化的 PBMC 样本从 Cureline 公司获得。人源化的、亲和力优化的且未岩藻糖基化的 CD19 mAb 16C4-afuc、mAb 16C4 (岩藻糖基化的 16C4)、人 IgG1 同种型对照 mAb R347、以及 mAb 16C4-TM 由医疗免疫抗体工程集团 (MedImmune Antibody Engineering Group) 提供。16C4-TM mAb Fc 被工程化以消除效应子功能。(奥加涅相等人, 晶体学报, 2008 ;D64 :700-704.) CD20 mAb 利妥昔单抗 (百健艾迪公司 (Biogen Idec, Inc) ;剑桥, 马萨诸塞州 (MA)) 在体外和体内测定中用作阳性对照。

[0124] 为了产生具有增强的 ADCC 效应子功能的 CD19 mAb, 对识别人 CD19 的小鼠 IgG1 mAb HB12b (堪萨斯和泰德, 免疫学杂志, 1991 ;147 :4094-4102) 进行人源化和亲和力优化, 产生 mAb 16C4。为了产生均匀未岩藻糖基化的抗体, 将人源化的 IgG1 mAb 16C4 在岩藻糖基转移酶不足的 CHO 细胞系 (BioWa Potelligent® 技术, BioWa 公司 ;新泽西州普林斯顿) 中表达以产生 16C4-afuc。

[0125] B 细胞系上的抗原表达的测定

[0126] B 细胞系上的 CD19 和 CD20 表达水平分别使用 mAb 16C4 或利妥昔单抗作为初级抗体, 随后使用荧光标记的山羊抗人 mAb 来测定。为了直接结合测定, 将 B 细胞用 PBS 洗涤并且再悬浮于 FACS 缓冲液 (含有 2% FBS 的 PBS) 中。将这些细胞与未标记的 mAb 的稀释液一起在冰上孵育 20 分钟, 洗涤并且再悬浮于含有二级 mAb 的 PBS 中。在冰上 20 分钟之后, 将细胞洗涤、再悬浮于 FACS 缓冲液中, 并且通过流式细胞计量术分析细胞表面上的荧光强度。对于所有的细胞系, mAb 16C4 和利妥昔单抗的最大结合在 $1 \mu\text{g/ml}$ 的浓度下实现。相对抗原表达在表 I 中被报道为中位荧光强度 (MFI)。

[0127] 正常和恶性 B 细胞上的抗原密度的测定

[0128] 来自患有 CLL 或 ALL 的供体的冷冻 PBMC 和来自健康成人供体的 PBMC 样品的 B 细胞上的 CD19 和 CD20 的抗原密度通过流式细胞计量术使用 QIFIKIT® (Dako, 格洛斯楚普 (Glostrup), 丹麦) 制造商说明, 使用抗 CD19 克隆 HD37 和抗 CD20 克隆 2H7 作为初级抗体来测定。

[0129] 抗体依赖性的细胞毒性测定

[0130] ADCC 测定使用作为靶标 (T) 的 B 白血病 / 淋巴瘤细胞系和 NK 效应子 (E)E, 以 2.5 : 1 的 E : T 比例来进行。将细胞与 mAb 的连续稀释液一起孵育四小时, 并且通过使用根据制造商的指示进行的 CytoTox 96® 非放射性细胞毒性测定 (普洛麦格公司 (Promega), 麦迪逊 (Madison), 威斯康辛州 (WI)) 而检测乳酸脱氢酶 (LDH) 的释放来测量靶细胞溶解。所有的测定重复进行三次。

[0131] 使用来自诊断患有 CLL 或 ALL 的供体的纯化的 PBMC, 使用多参数流式细胞计量术

来量化体外 ADCC 活性。所有样品的淋巴细胞含量都大于 90%。与来自健康供体的 PBMC 样品相比,大多数来自患有 CLL 或 ALL 的供体的样品具有低浓度的 CD56+NK 细胞。因此,将 CLL 和 ALL PBMC 样品用 KC1333 NK 细胞增补。将冷冻的 PBMC (CLL 或 ALL) 样品在 37°C 水浴中解冻、洗涤并且再悬浮于 RPMI 1640 (增补有 10% 的热活化的 FBS 和 2mM 左旋谷酰胺酸),并且以 5×10^4 细胞/孔铺在 Nunc U96 孔圆底微孔板 (赛默飞世尔科技 (ThermoFisher Scientific), 罗切斯特 (Rochester), 纽约州) 中,总体积为 200 μ L。添加 KC1333 NK 效应细胞 (25×10^4) 以达到 5 : 1 的 E : T 比例。将利妥昔单抗、16C4-afuc 的、或未岩藻糖基化的同种型对照 mAb R347 的连续稀释液以 10 μ L 等份添加至孔中 (重复三次),并且在 37°C 下使用 5% 的 CO₂ 将 PBMC 孵育 20 小时。细胞毒性的百分比通过在含有抗 CD19 藻红蛋白-Cy7 (PE-Cy7)、抗 CD20 太平洋蓝 (Pacific Blue)、抗 CD22 别藻蓝蛋白 (APC) 或抗 CD22 藻红蛋白 (PE)、以及抗 Fc ϵ R1 α 异硫氰酸荧光素 (FITC) 的多种荧光标记的抗体的混合物中染色细胞来测量。作为计数标准,添加 CountBright 绝对计数微珠 (英杰公司, 生命技术公司 (Life Technologies Corp.), 加利福尼亚州卡尔斯巴德) 以测定细胞亚群的细胞浓度。样品在 LSR II 流式细胞仪上获得。使用 FlowJo (FlowJo, 亚仕兰 (Ashland), 俄勒冈州 (OR)) 软件, 7.2.2 版来分析荧光活化细胞分选法 (FACS) 数据。IgG1 未岩藻糖基化的 mAb (R347-aFuc) 被用作非耗尽治疗对照物并且用于限定门 (gate)。对每个样品中的绝对计数微珠的数目进行量化。根据制造商说明使用标准计数微珠,将总 CD22+ 或 CD20+CD22+ 门中的生存 B 细胞的数目转换成细胞浓度。根据以下公式计算 B 细胞耗尽 (百分比细胞毒性)。

[0132] 对于利妥昔单抗:

[0133] $\% \text{ 细胞毒性} = \{1 - [\text{CD22}^+ \text{ 利妥昔单抗治疗的细胞} / \text{mL}] \div [\text{CD19} + \text{CD22}^+ \text{ 对照物治疗的细胞} / \text{mL}]\} \times 100$ 。

[0134] 对于 16C4-afuc:

[0135] $\% \text{ 细胞毒性} = \{1 - [\text{CD20} + \text{CD22}^+_{16C4} \text{ 细胞} / \text{mL}] \div [\text{CD20} + \text{CD22}^+ \text{ 对照物治疗的细胞}]\} \times 100$ 。

[0136] B 细胞细胞毒性的一半最大有效浓度 (EC₅₀) 使用一个四变量拟合曲线方程在 GraphPad Prism v5.01 (GraphPad 软件公司, 加利福尼亚州拉荷亚 (La Jolla)) 中计算。

[0137] SCID 小鼠淋巴瘤模型

[0138] 在严重联合免疫缺陷 (SCID)- 淋巴瘤异种移植物模型中研究体内肿瘤生长抑制。将四至六周龄的雌性 CB17-SCID 小鼠饲养在泰克尼克农场 (Taconic Farms) (日耳曼敦 (Germantown), 美国纽约州) 并且维持在医学免疫公司 (MedImmune) 的实验动物资源 (Laboratory Animal Resources) 设施中。所有小鼠实验根据 IACUC 批准的方案来实行。这些研究使用局部化的和播散性的 SCID- 淋巴瘤异种移植物模型来进行。对于局部化的皮下 (s. c.) 异种移植物小鼠模型,在第 0 天对小鼠 (10 只一组的多组) 接种 5×10^6 个肿瘤细胞。按照指示通过腹膜内 (i. p.) 注射,在第 5 或 7 天用 mAb 或媒介物治疗小鼠。对于皮下模型,随时间监测肿瘤体积。对于播散性 SCID 小鼠模型,经由尾静脉静脉内 (i. v.) 注射 1×10^6 至 5×10^6 个细胞。在肿瘤细胞注射之后第 7 天,用 5 次剂量的 mAb (3mg/kg 体重,每 4 天给予一次剂量) 对这些组 (每组 10 只小鼠) 进行治疗。在该播散性肿瘤模型中,使用生存时间或麻痹时间 (死亡前的临床症状) 作为终点。

[0139] 药代动力学 / 药效动力学研究

[0140] 使用 MSD 电化学发光 (ECL) 免疫测定方法来量化小鼠血清中的 16C4 和利妥昔单抗。16C4-afuc 由涂覆到 MA6000 MSD 微量滴定板上的可溶性重组小鼠抗独特型抗体 (D9) 捕获。然后使用生物素化的驴抗人 IgG Fc γ 特异性抗体,随后使用 Sulfo-TAG 链霉亲和素来检测任何结合的 16C4。这与 MSD 读取缓冲区反应,并且将板放在 MSD Sector™ 成像仪模型 6000 读取器上以用于 ECL 信号的产生和测量。样品中的 16C4-afuc 浓度通过来自一个标准曲线的插值来测定,该标准曲线使用将 ECL 计数关联到 16C4 浓度的一个四参数曲线拟合。

[0141] 通过流式细胞计量术分析 huCD19/CD20 转基因小鼠中的 B 细胞数目

[0142] 所有的小鼠实验根据 IACUC 批准的方案在医学免疫动物设施 (MedImmune animal facility) 处在无病原体的环境中进行。在 huCD19/CD20 双转基因小鼠中评估 CD19 和 CD20 mAb 对 B 细胞的体内耗尽,这些双转基因小鼠是通过使 huCD19 转基因小鼠与 huCD20 转基因小鼠交叉而产生的 (周等人,1994,分子细胞生物学 14 :3884-3894 ;阿费加等人,2007,免疫学杂志 179 :3351-3361)。将雄性 (n = 105) 和雌性 (N = 105) 转基因小鼠 (9-12 周龄 ;2 只雄性和 2 只雌性 / 时间点 / 组) 随机分为 6 组,接受 PBS、16C4-afuc、和 / 或利妥昔单抗的尾静脉注射。在多个预定的时间点,从眶窦收集全血,以用于使用流式细胞仪进行进一步分析。通过用 PerCP-Cy5.5 偶联的 B220 (CD45R) 和 PE 偶联的 muCD19 进行染色,在每个样品中测定 B 细胞数目。还测试 B220+muCD19+B 细胞关于太平洋蓝偶联的 huCD20 和 APC-Cy7 偶联的 huCD19 抗体的结合。最后,将 T 细胞用 FITC 偶联的 CD3 抗体染色。在 BD LSRII 流式细胞仪上运行样品并且使用 FlowJo 分析数据。

[0143] 通过引用的结合

[0144] 在此提及的所有出版物和专利通过引用以其全文结合在此,如同每个单独的出版物或专利明确且单独地被表明通过引用而结合。在冲突的情况下,本申请,包括任何在此的定义,将占主导。

[0145] 等效物

[0146] 虽然已经讨论了本发明的多个具体实施例,但是以上说明书是说明性的并且不是限制性的。通过回顾此说明书和以下权利要求,本披露的多种变化对于本领域的技术人员而言将变得明显。应通过参考权利要求、连同它们的等效物的全部范围、以及说明书、连同这类变化,来确定本披露的全部范围。

[0147] 16C4 抗体的序列

[0148] SEQ ID NO :1, VH 结构域

[0149] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Val Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Phe Ile Thr Thr Val Arg Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0150] SEQ ID NO :2, VH CDR1

[0151] SSWMN

- [0152] SEQ ID NO :3, VH CDR2
- [0153] RIYPGDGDTNYNVKFKG
- [0154] SEQ ID NO :4, VH CDR3
- [0155] SGFITTVRDFDY
- [0156] SEQ ID NO :5, VK 结构域
- [0157] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys
Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Phe Gly Ile Ser Phe Ile Asn
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile His Glu Ala Ser Asn Gln
Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys Glu Val
Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
- [0158] SEQ ID NO :6, VK CDR1
- [0159] RASESVDTFGISFMN
- [0160] SEQ ID NO :7, VK CDR2
- [0161] EASNQGS
- [0162] SEQ ID NO :8, VK CDR3
- [0163] QQSKEVPFT

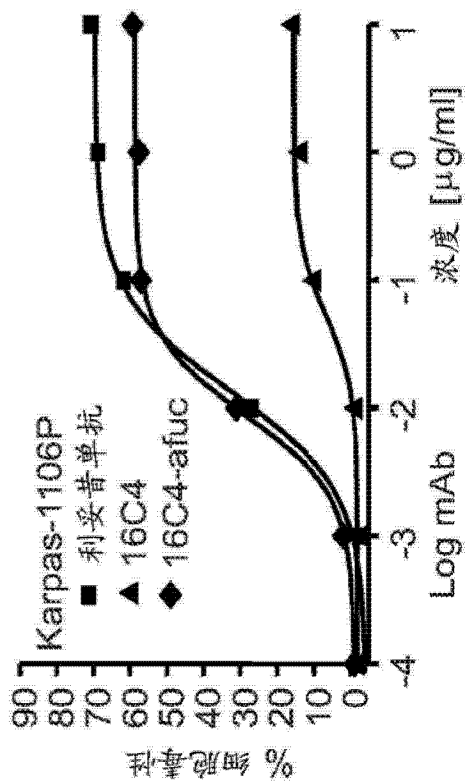


图 1A

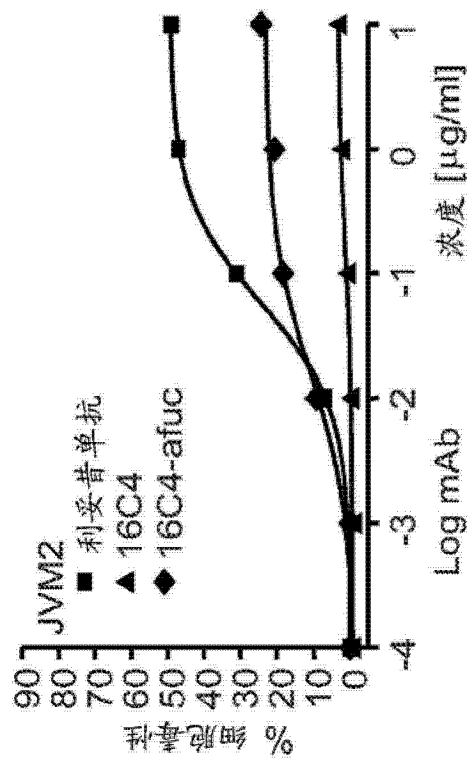


图 1B

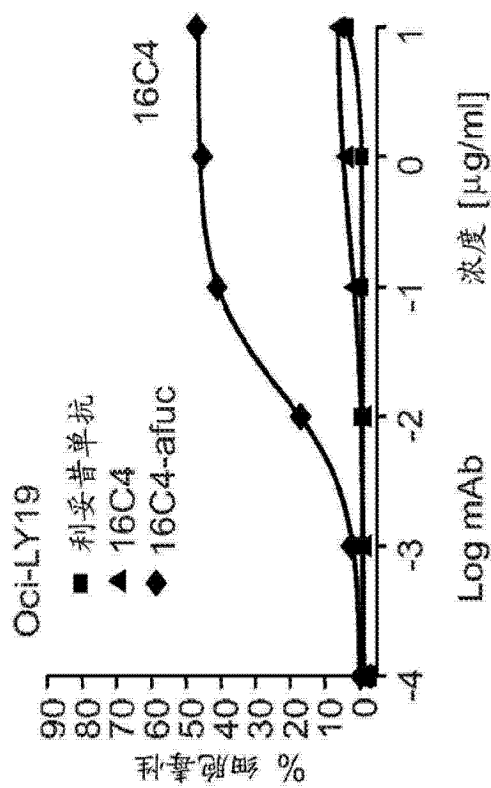


图 1C

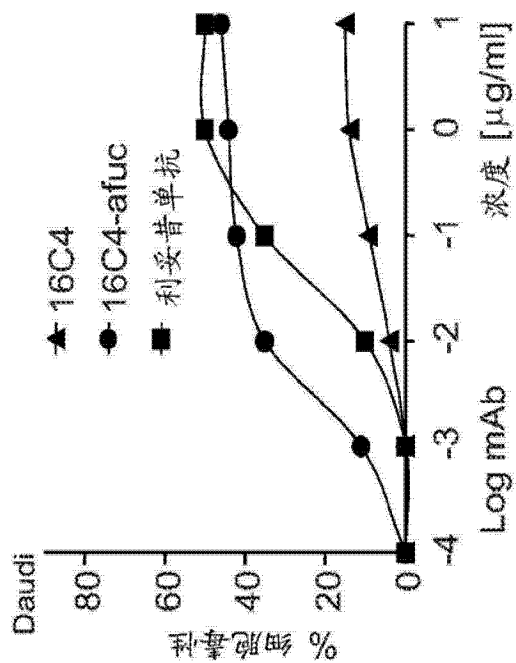


图 1D

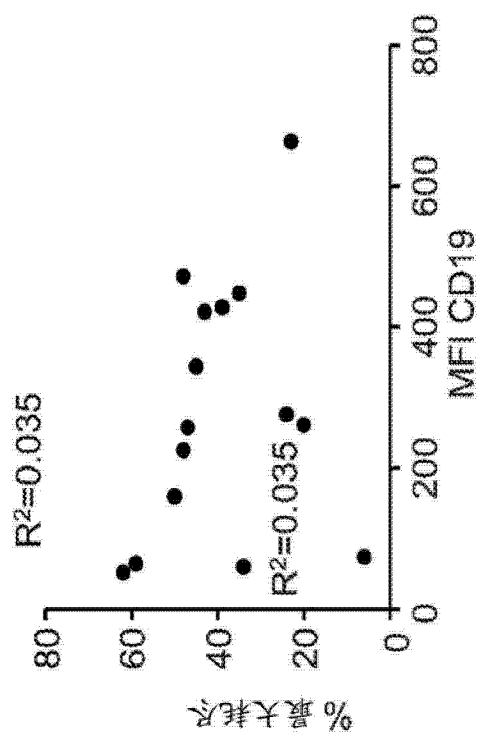


图 1E

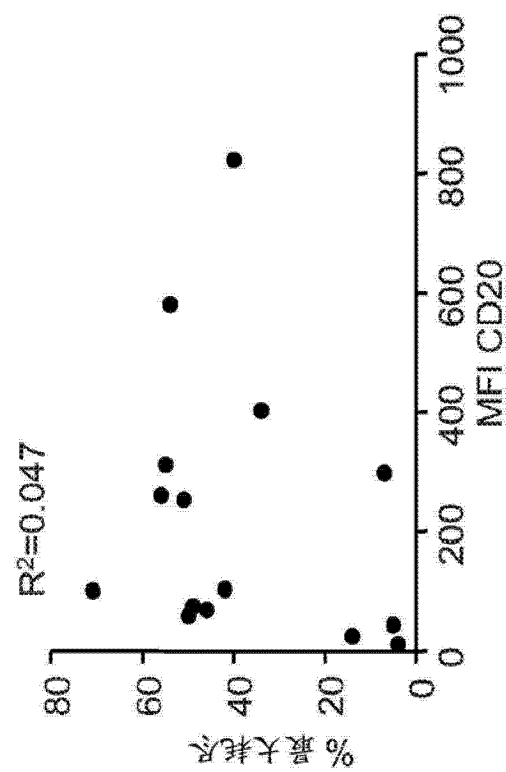


图 1F

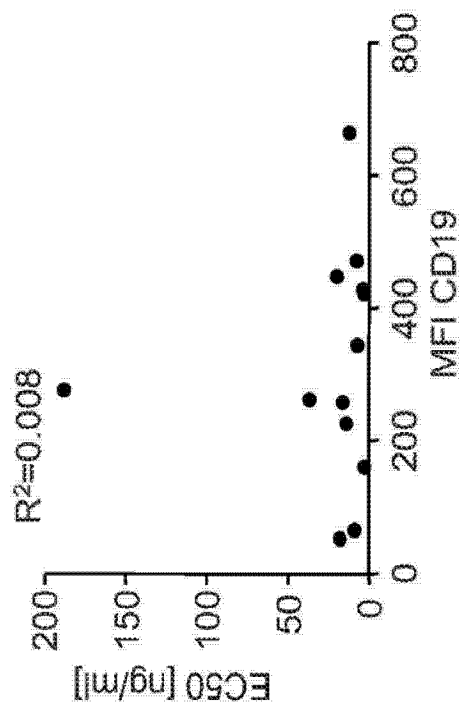


图 1G

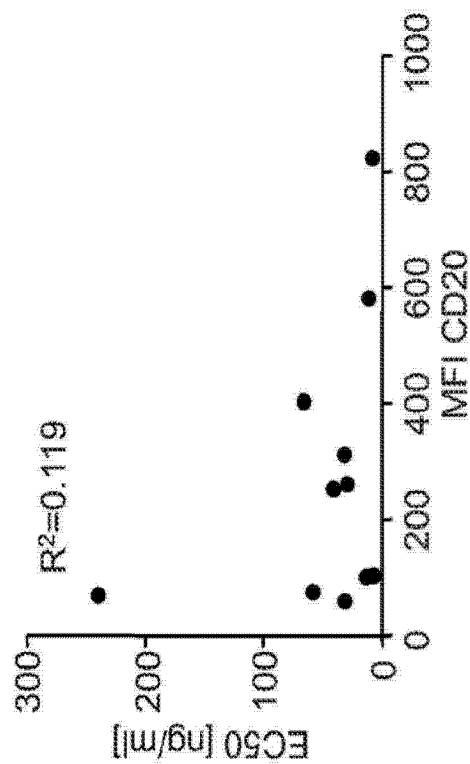


图 1H

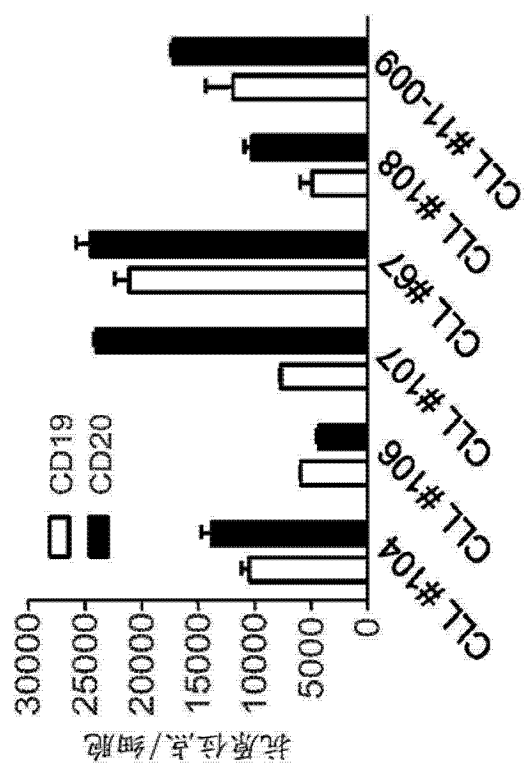


图 2A

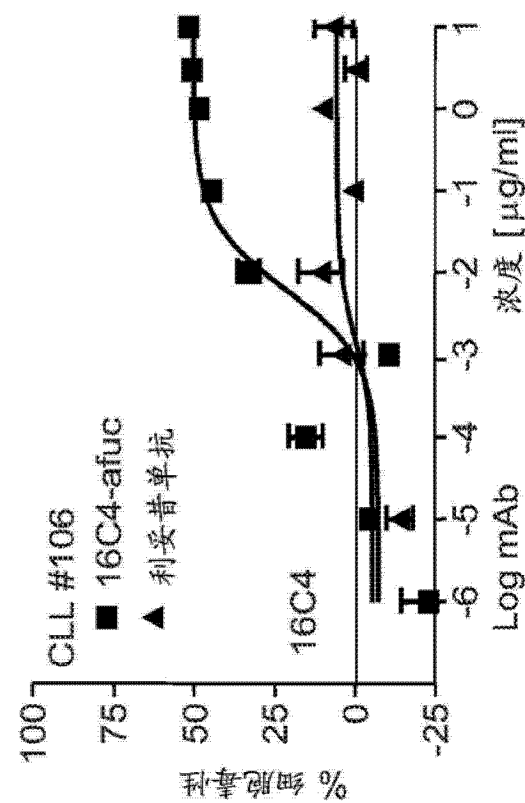


图 2B

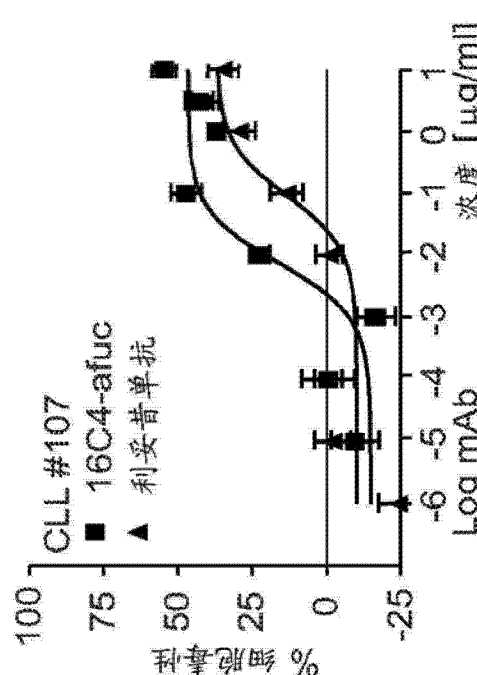


图 2C

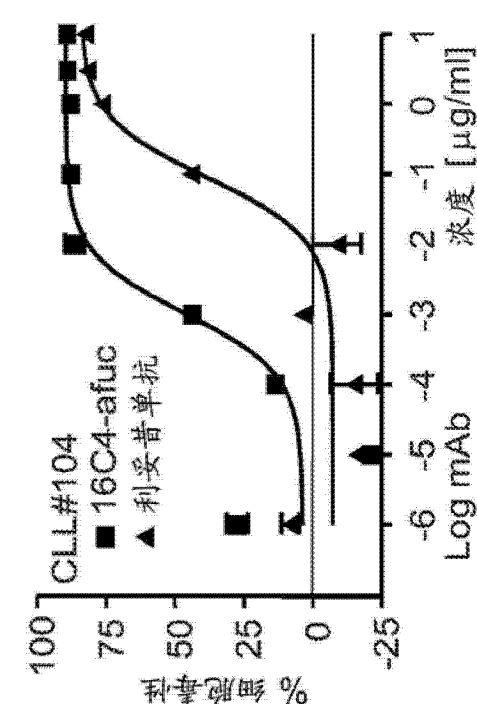


图 2D

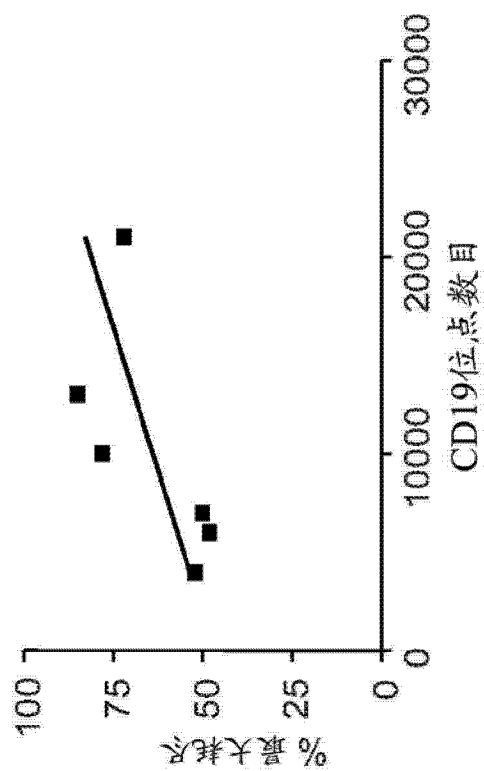


图 2E

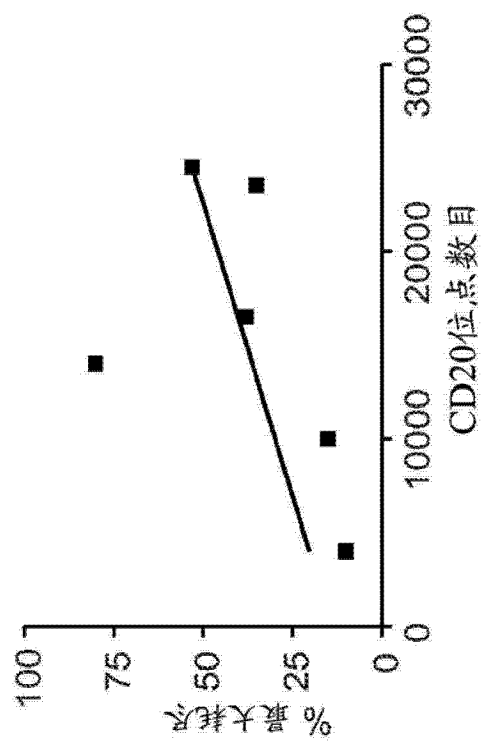


图 2F

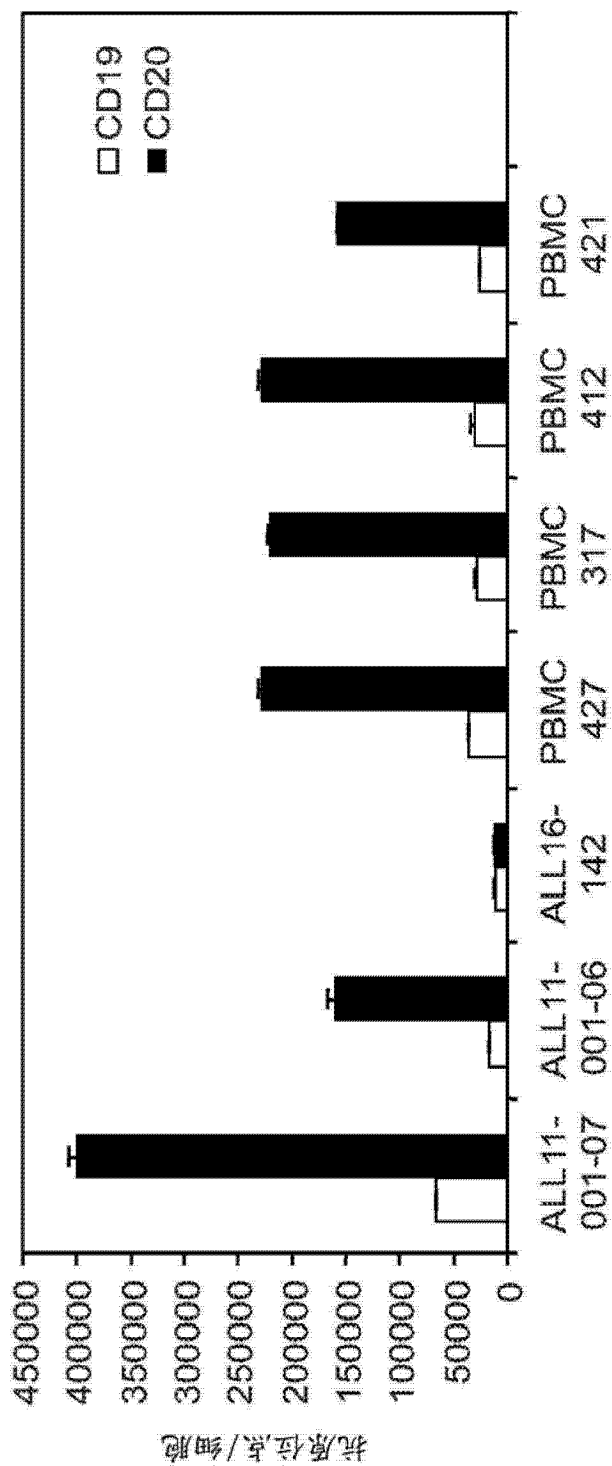


图 3A

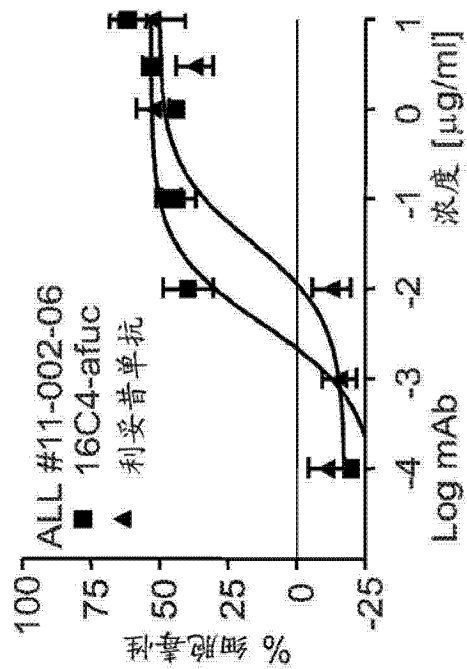


图 3B

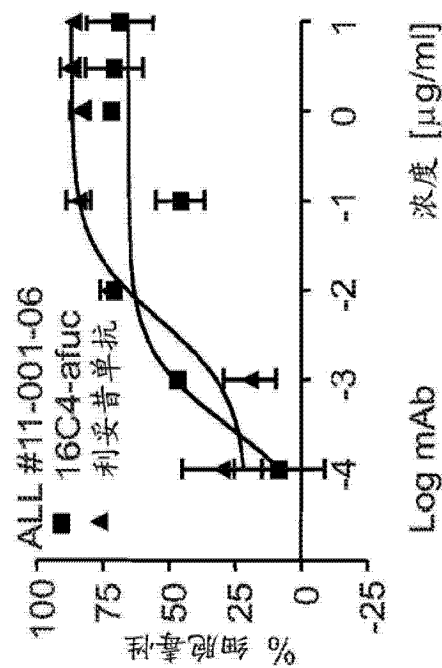


图 3C

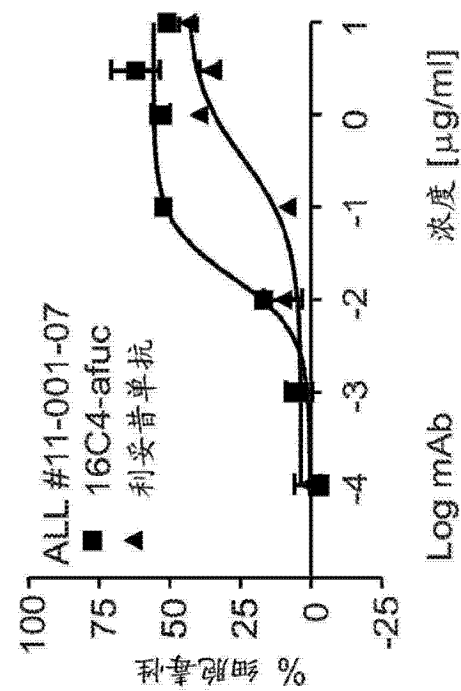


图 3D

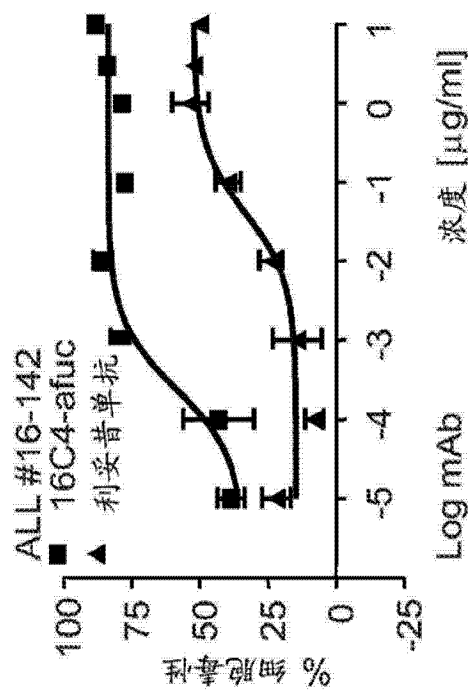


图 3E

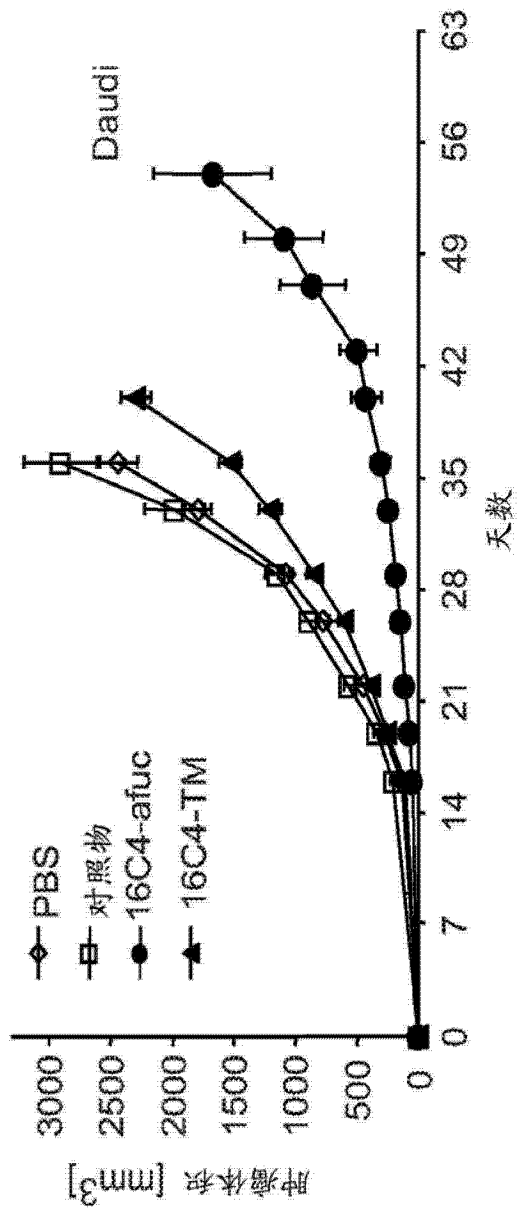


图 4A

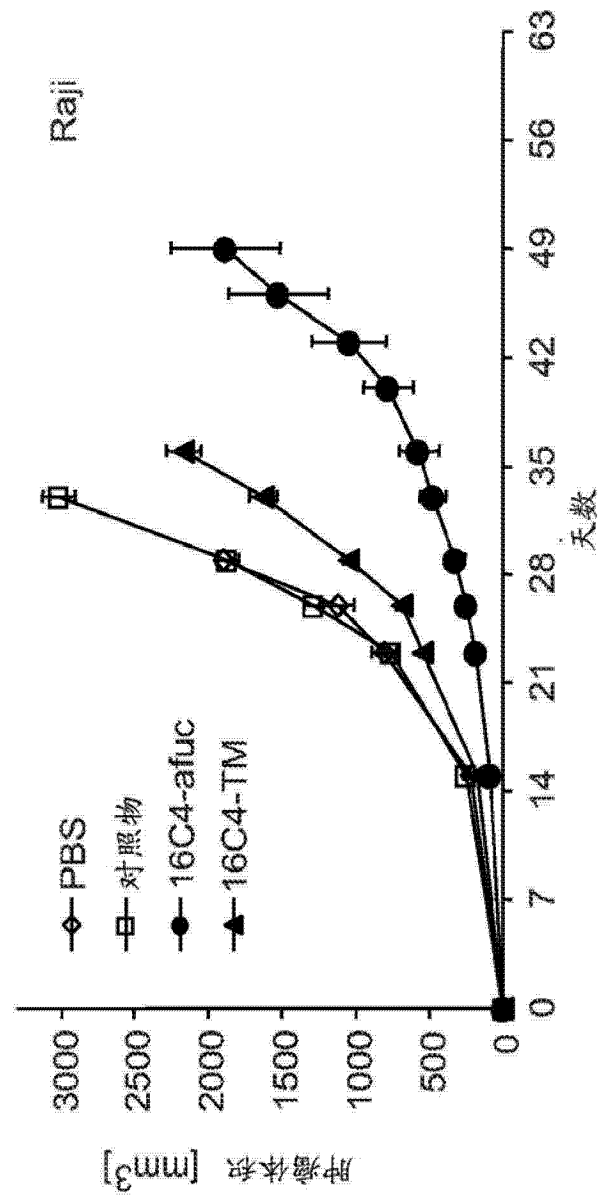


图 4B

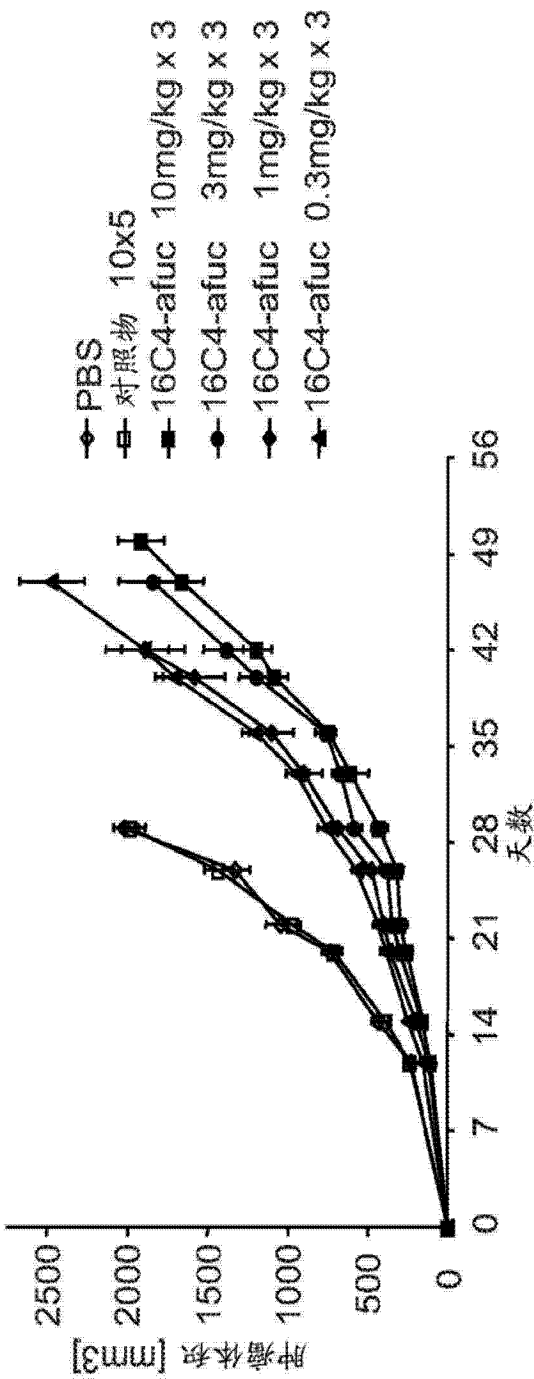


图 5A

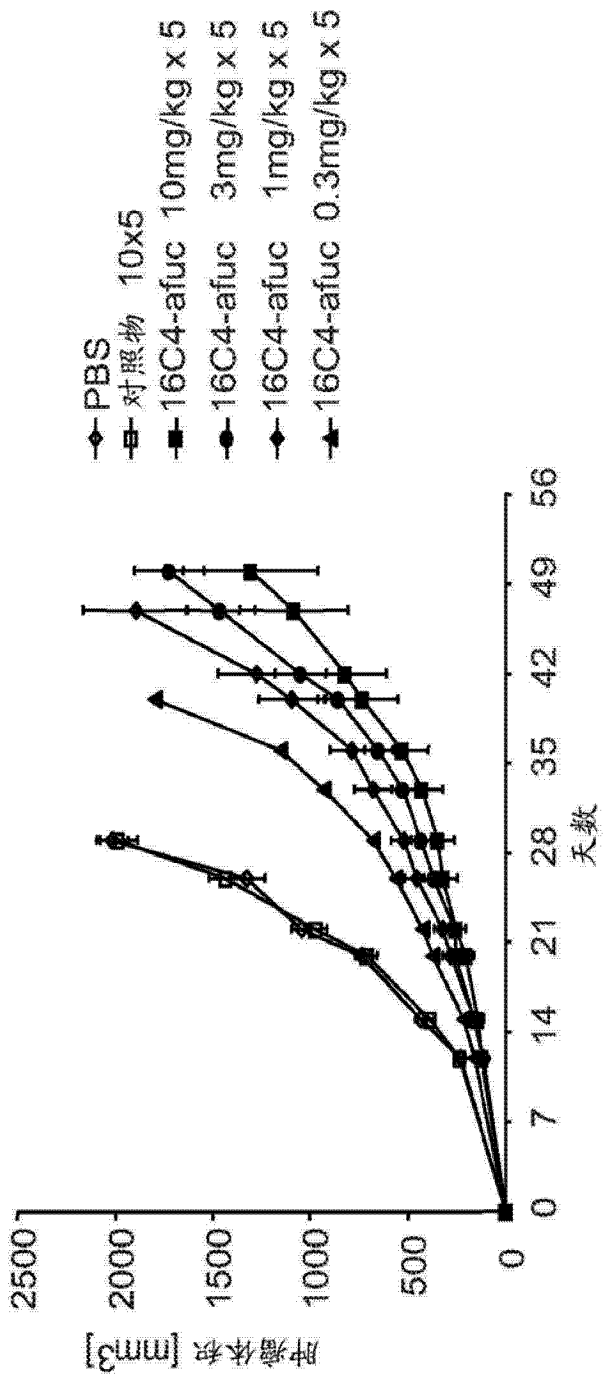


图 5B

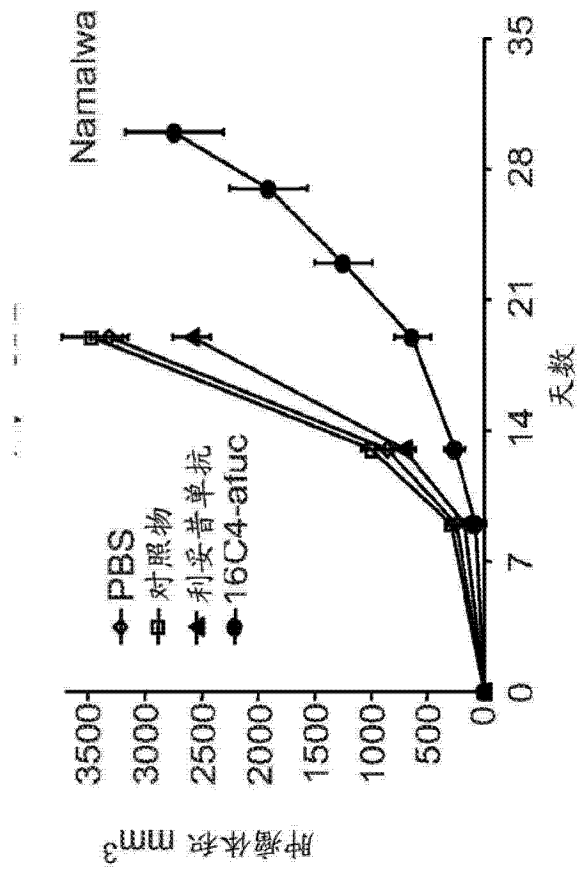


图 6A

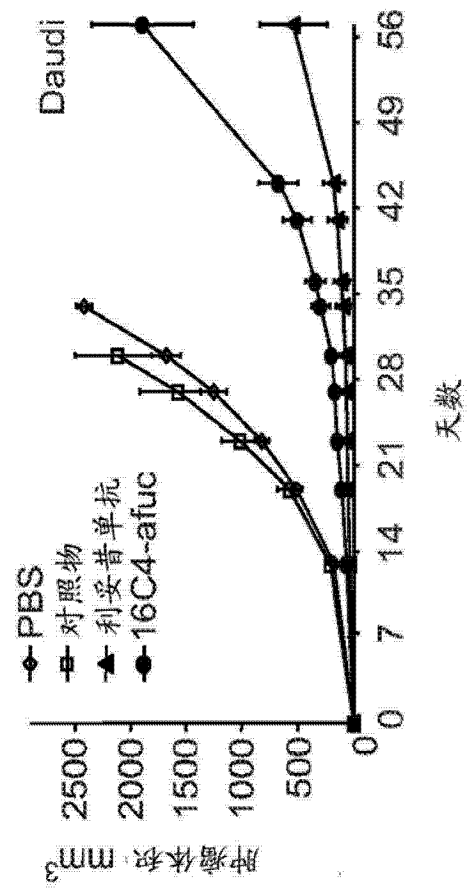


图 6B

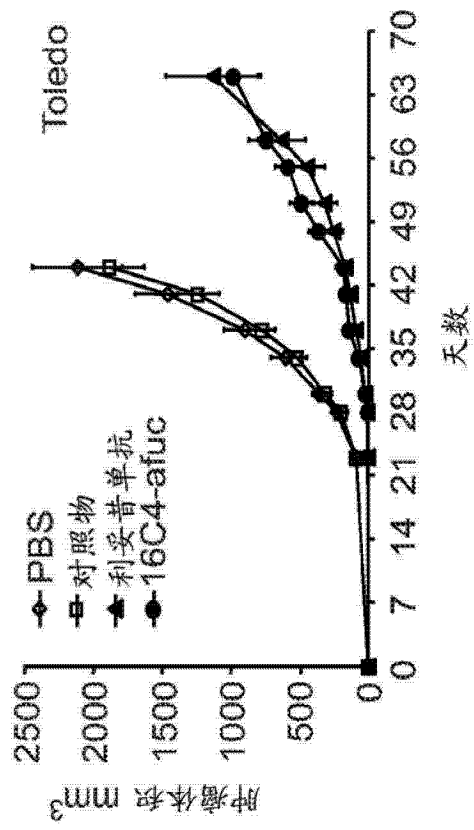


图 6C

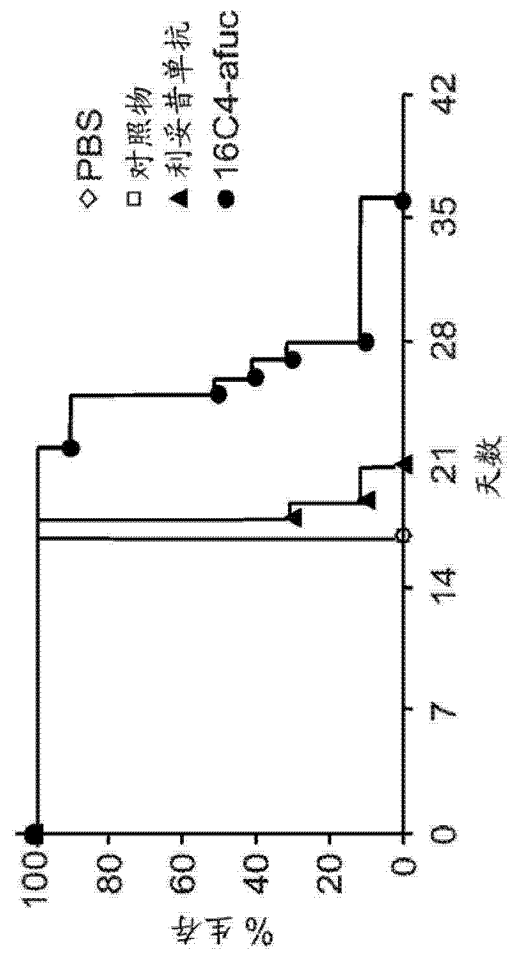


图 6D

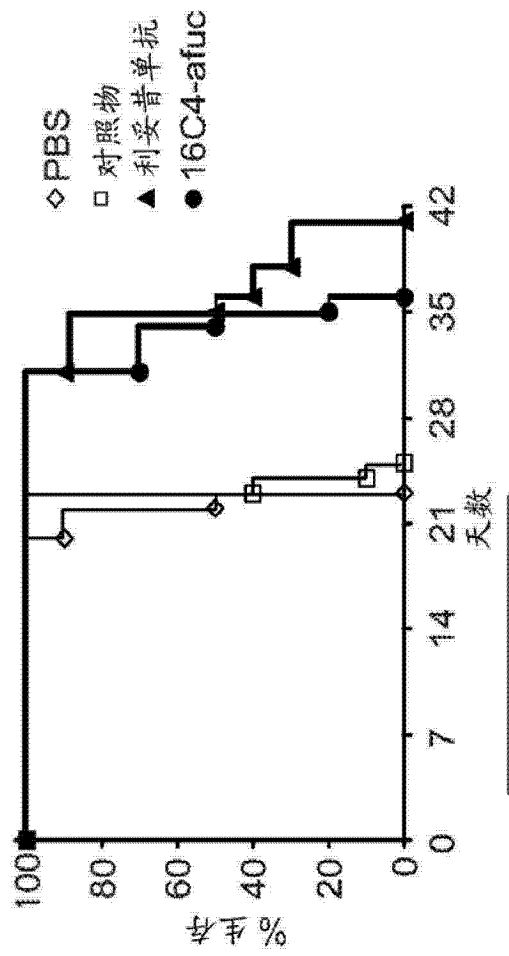


图 6E

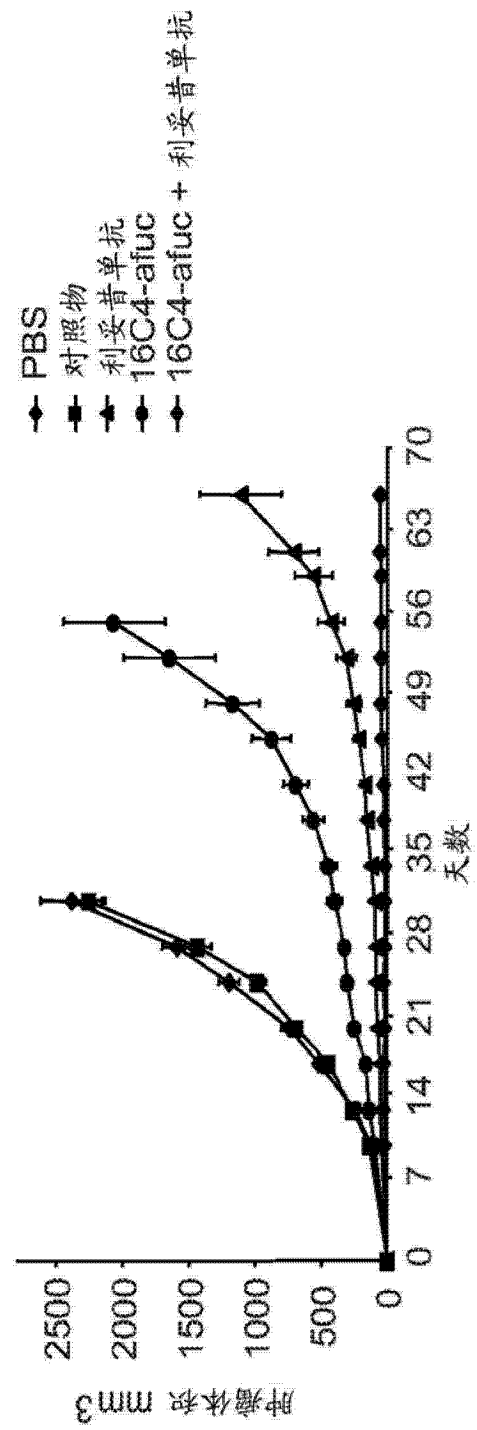


图 7A

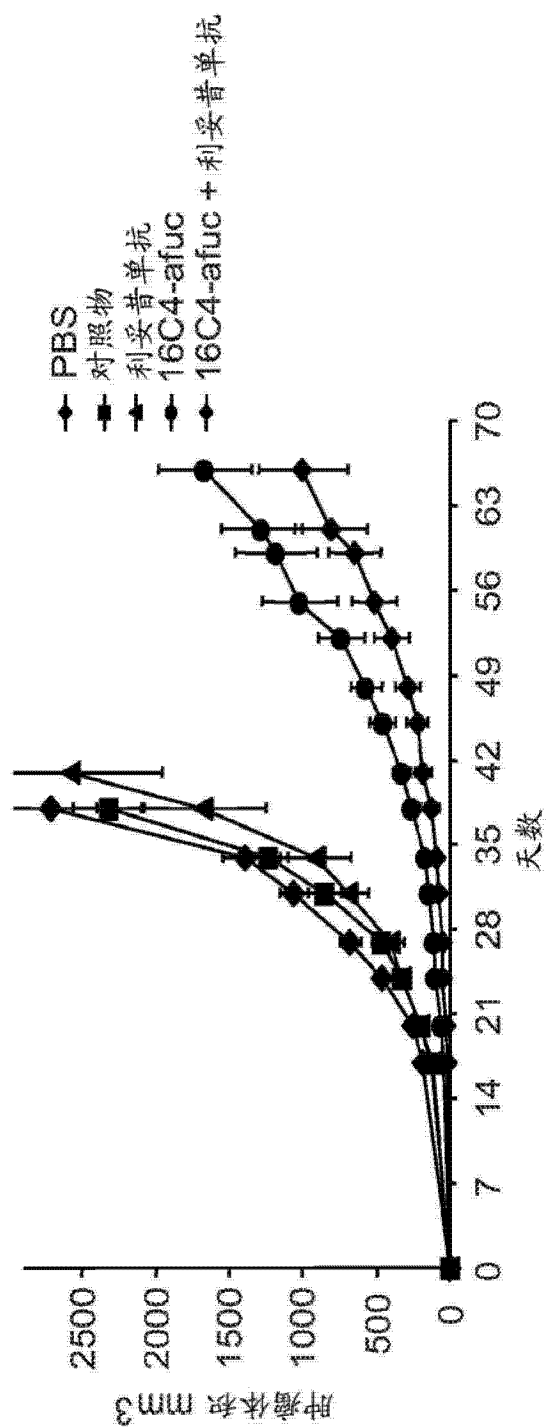


图 7B

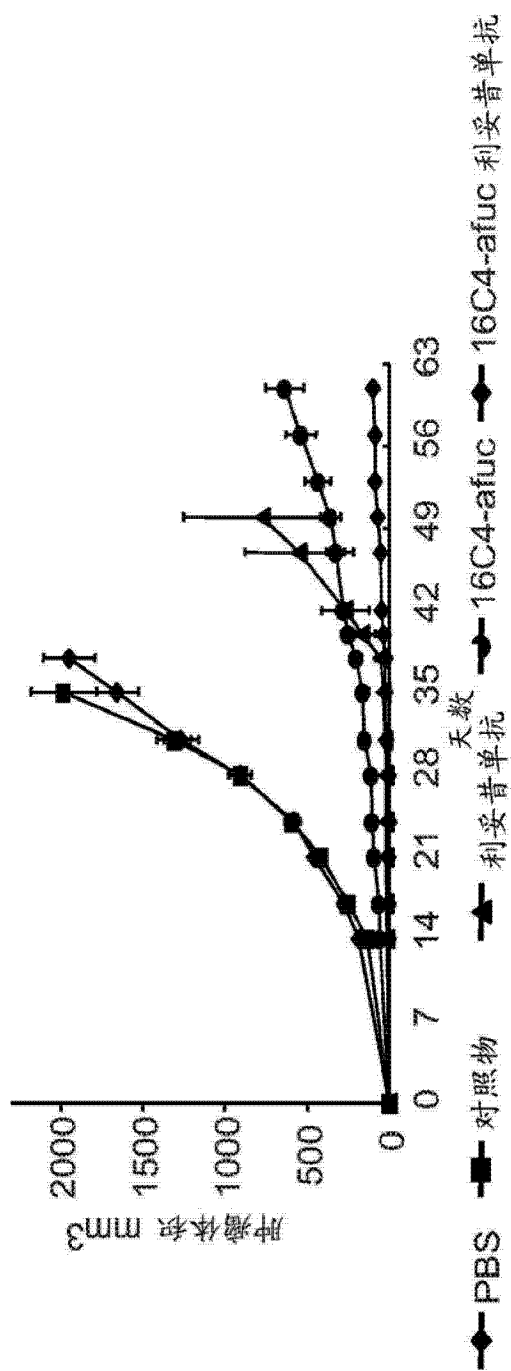


图 7C

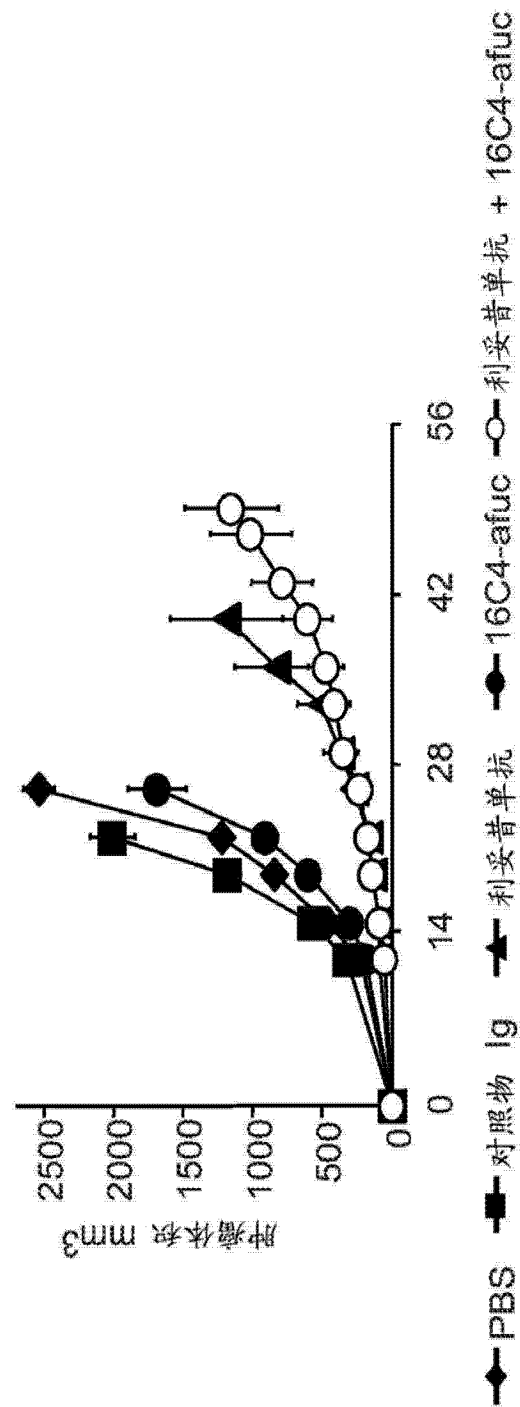


图 7D

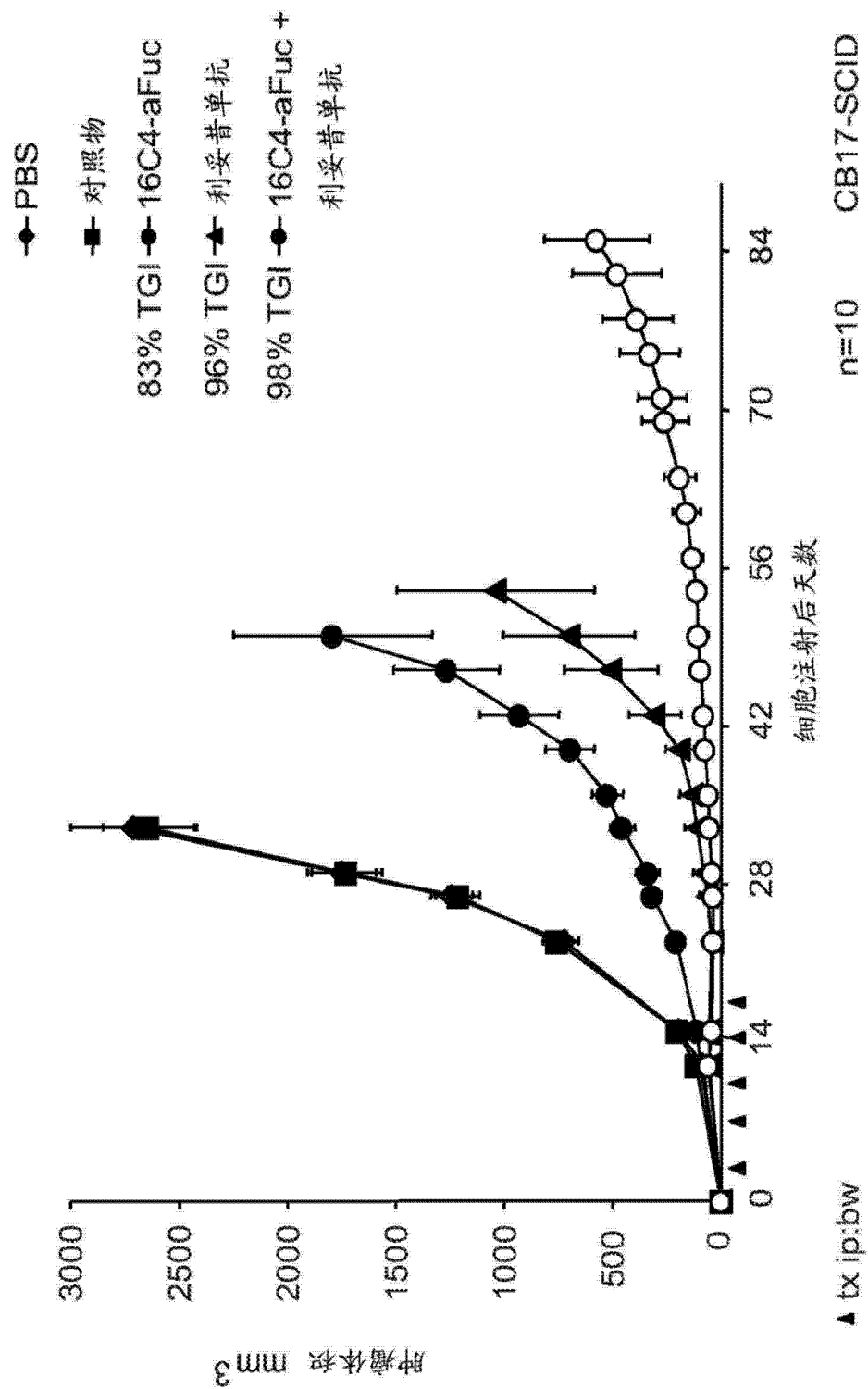


图 7E

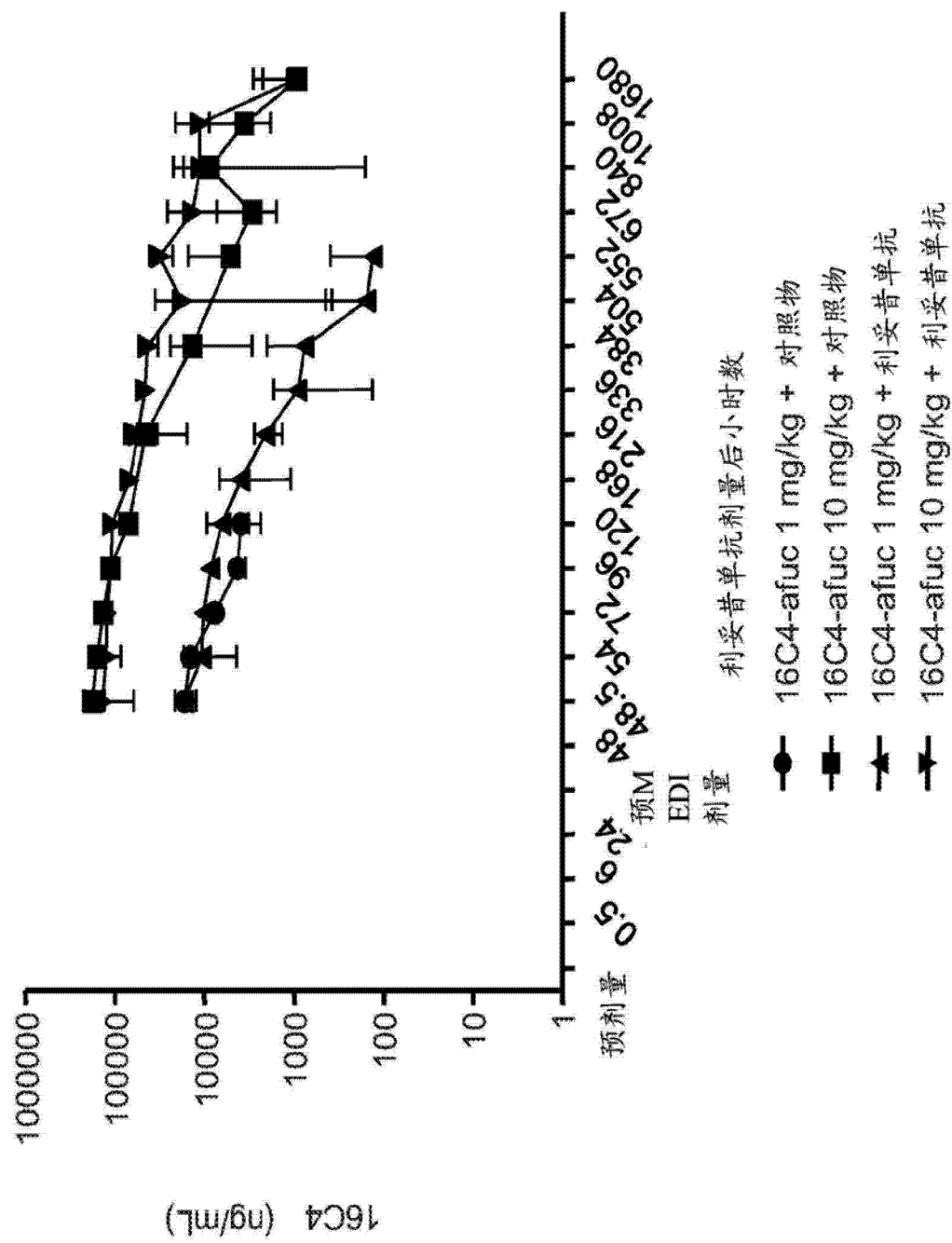


图 8

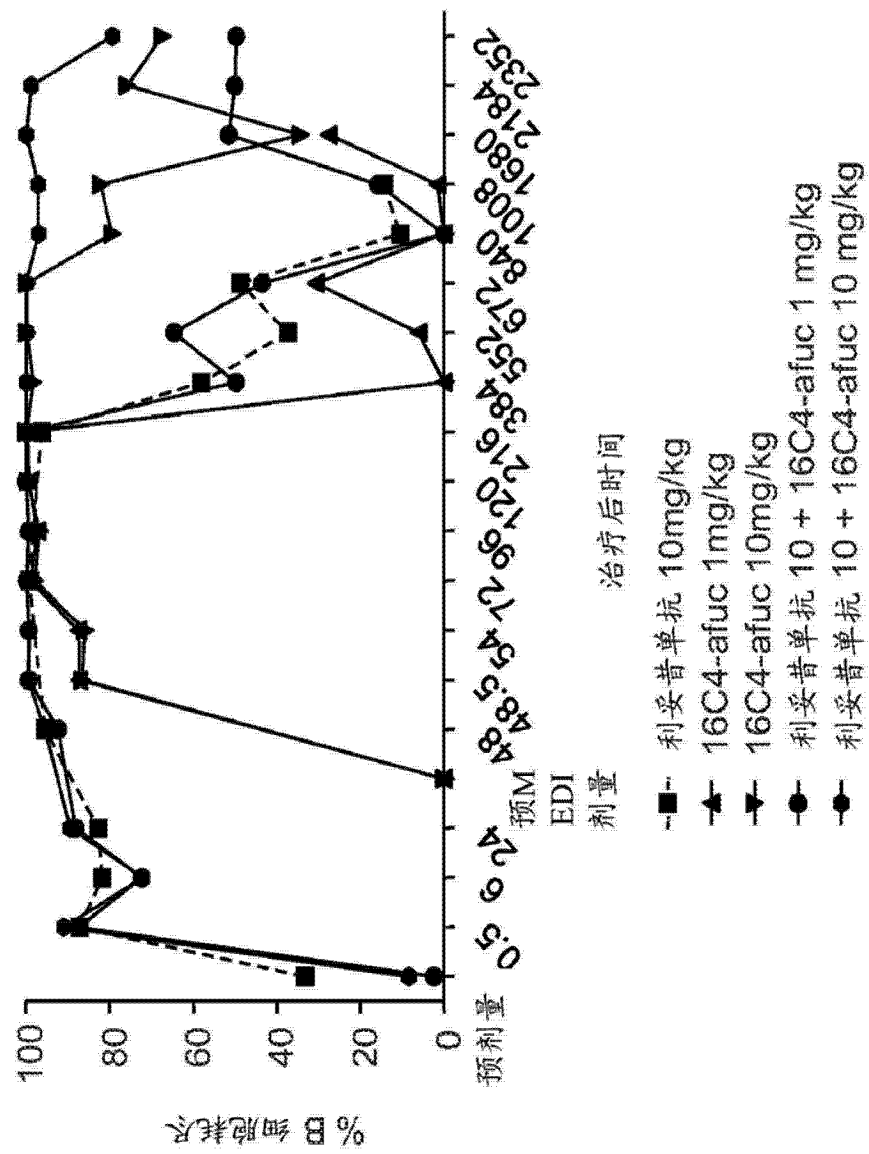


图 9