



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101420978 B

(45) 授权公告日 2013.08.14

(21) 申请号 200780012777.8

C07K 16/28(2006.01)

(22) 申请日 2007.02.15

C07K 16/30(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

(30) 优先权数据

06003057.4 2006.02.15 EP

(56) 对比文件

SIMOES BELINDA P et al. 《Bi20

a new trifunctional bispecific
antibody(CD20×CD3)in the treatment
of resistant B cell tumors: First

clinical data》.《Biosciences Information
Service》.2003, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.10.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2007/051483 2007.02.15

(87) PCT申请的公布数据

W02007/093630 EN 2007.08.23

审查员 罗德明

(73) 专利权人 传恩制药有限责任公司

地址 德国慕尼黑

(72) 发明人 霍斯特·林德霍费尔

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书31页 附图18页

(54) 发明名称

通过三官能双特异性抗体破坏表达低至中等
水平的肿瘤相关靶抗原的肿瘤细胞

(57) 摘要

本发明描述了三官能双特异性抗体用于制备
用来预防和治疗肿瘤疾病的药物组合物的应用。
已经发现所述三官能双特异性抗体结合选自下列
各项的肿瘤-相关抗原:Her2/neu, CD20, EpCAM,
G250, 蛋白聚糖, GD3, GD2, MHC II, EGF-R 和 CEA,
其中所述肿瘤相关抗原在只具有低到中等表达水
平的所述肿瘤细胞上表达。

1. 三官能双特异性抗体用于制备用来预防和治疗肿瘤疾病的药物组合物的应用,所述三官能双特异性抗体具有下述特征:

(a) 通过 CD3 结合 T 细胞;

(b) 结合在肿瘤细胞上的至少一种肿瘤相关抗原,所述抗原选自 Her2/neu 和 CD20 组成的组;

(c) 通过它们的 Fc- 部分结合 Fc γ - 受体 I 型或 III 型阳性细胞,或它们的组合;

所述肿瘤疾病的特征在于肿瘤相关抗原 Her2/neu 或 CD20 的表达,在所述肿瘤疾病中,所述肿瘤-相关抗原在所述肿瘤细胞上以下述量表达:

- 对于 Her2/neu,以 5,000-150,000 肿瘤-相关抗原 / 肿瘤细胞的量,或

- 在检测为 FISH 阴性的肿瘤细胞中,对于 Her2/neu,以至多 500,000 肿瘤-相关抗原 / 肿瘤细胞的量,或

- 对于 CD20,以 1,000-350,000,或至多 300,000 肿瘤-相关抗原 / 肿瘤细胞的量,

其中所述三官能抗体为抗 CD3X 抗-肿瘤-相关抗原抗体,

其中所述抗体导致细胞因子和 / 或共刺激性抗原的表达的起始或增加,

其中所述三官能抗体的 Fc- 区域选自下述同种型组合的组的至少一个成员:

大鼠 -IgG2b/ 小鼠 -IgG2a,

大鼠 -IgG2b/ 小鼠 -IgG2b,

大鼠 -IgG2b/ 人 -IgG1,

大鼠 -IgG2b/ 人 -IgG2。

2. 按照权利要求 1 的应用,其中所述肿瘤抗原以下述量在所述肿瘤细胞上表达:至少 5,000, 20,000, 50,000 或 80,000 肿瘤抗原 / 肿瘤细胞的量,和以 150,000, 110,000 或 100,000 肿瘤抗原 / 肿瘤细胞的最大值。

3. 按照权利要求 1 的应用,其中所述三官能抗体选自异源双特异性抗体。

4. 权利要求 3 的应用,其中所述抗体是异源大鼠 / 小鼠双特异性抗体。

5. 按照权利要求 1 的应用,其中所述三官能抗体以 0.05-15 μ g/kg 体重的量施用。

6. 按照权利要求 1 的应用,其中所述三官能双特异性抗体是抗 -Her2/neu x 抗 -CD3 抗体,其与 Fc γ -I 型 / III 型 - 受体结合。

7. 权利要求 6 的应用,其中所述抗体具有大鼠 -IgG2b/ 小鼠 -IgG2a 的同种型组合。

8. 按照权利要求 1 的应用,其中所述 Her2/neu 抗原以 5,000-150,000 的量表达。

9. 权利要求 8 的应用,其中所述 Her-2/neu 抗原以 20,000-100,000 的量在乳腺肿瘤细胞上表达。

10. 按照权利要求 1 的应用,其中所述肿瘤疾病是下列癌症:依据 Dako HercepTest[®] 具有 1+ 的 Her2/neu 值的种类,或在依据 Dako HercepTest[®] 具有 2+ 的 Her2/neu 值的情形中为 FISH 阴性的种类,其中所述 Dako HercepTest[®] 是如 DAKO 关于出版号为 111781-001 和 K5207/EFG/AOS/13.10.04 的第一版 DAKO Cytomation Autostainer Code No. K520 所述。

11. 按照权利要求 10 的应用,其中所述癌症是乳腺癌。

12. 按照权利要求 1 的应用,其中所述三官能双特异性抗体是抗 -CD20x 抗 -CD3 抗体,其与 Fc γ -I 型 / III 型 - 受体结合。

13. 按照权利要求 12 的应用,其中所述抗体具有大鼠 -IgG2b/ 小鼠 -IgG2a 的同种型组合。

通过三官能双特异性抗体破坏表达低至中等水平的肿瘤相关靶抗原的肿瘤细胞

[0001] 本发明涉及三官能双特异性抗体用于制备预防和治疗肿瘤疾病的药物组合物的应用。

[0002] 在免疫治疗过程中通过单特异性单克隆抗体治疗肿瘤中的一个迄今尚未解决的问题是对具有低至中等表达水平的肿瘤靶抗原的肿瘤细胞破坏的功效不足性。一个具体的实例是对具有低至中等表达水平的靶抗原 Her2/neu 的乳腺癌的治疗；另一个具体的实例是对具有低表达水平的 CD20 肿瘤抗原的非霍奇金淋巴瘤和慢性淋巴白血病的治疗。

[0003] 转移性乳腺癌是几乎总是致死性的疾病。从转移的第一次表现起的平均存活时间在 17 到 20 个月范围内。许多内分泌、细胞毒性和生物学试剂已经表现出减轻的功效，但是不存在一致的护理标准，并且治疗通常引起实质上的副作用。

[0004] 表皮生长因子 (EGF) 家族成员 Her2/neu 在大约 25-30% 的乳腺癌患者的肿瘤标本中过量表达，并且其归因于更具攻击性的肿瘤生长和更坏的预后。

[0005] EGF 受体家族包括 4 个成员：EGFR (ERBB1)，Her2/neu (ERBB2)，ERBB3 和 ERBB4。EGFR 和 Her2/neu 已被作为治疗靶点进行集中研究。靶向 EGFR 和 Her2/neu 的其余的细胞结构域的抗体以及抑制细胞内受体信号传导的小分子化合物已经用于临床应用，并且已经表现出临床功效。然而，它们的抗肿瘤作用通常不如临床前研究预测的那样强，并且优选与化学治疗结合。

[0006] Herceptin® 是广泛用于乳腺癌治疗的公认的单克隆抗体；然而，Herceptin® 只可以成功地用于在他们的肿瘤细胞上具有至少 2+/FISH+ (其通过所谓的 HercepTest® 和阳性 FISH- 分析验证) 或 3+ 的靶抗原 Her2/neu 表达水平的患者。一些研究已经表明，为了获得统计学显著的存活，具有 Her2/neu 的额外基因扩增 (通过阳性 FISH 检测反映) 的靶抗原 Her2/neu 的相对高的表达密度是必需的。临床前体外实验还表明 Herceptin® 对肿瘤细胞的有效破坏只在肿瘤细胞表达高水平的靶抗原 Her2/neu 时是明显的。

[0007] 这些限制是只有大约 25-30% 的患有在他们的肿瘤上表达高水平的 Her2/neu (用 Dako HercepTest 得分 2+/FISH+ 或 3+) 的转移性乳腺癌的患者可以有效地使用 Herceptin® 进行治疗的原因。

[0008] 在 Perez 和同事的研究中，使用免疫组织化学 (IHC) 评估，35% 的乳腺癌患者得分为 Her2¹⁺，14% 为 2+，和 13% 为 3+ (Perez EA 等：Her2 testing in patients with breast cancer：poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization (在患有乳腺癌的患者中的 Her2 检测：通过免疫组织化学的弱阳性和通过原位杂交荧光的基因扩增之间的弱相关性)。Mayo Clin Proc (Mayo 临床进展) 2002；77：148-154)。

[0009] Kiewe, P. 等：“Phase I trial of the trifunctional anti-Her2x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer (三官能抗-Her2x 抗-CD3 抗体 ertumaxomab 在转移性乳腺癌中的 I 期试验)”；Journal of Clinical Oncology (临床肿瘤学杂志)，第 23 卷，编号 16S，2005 年 6 月 1 日 (ASCO 摘要 2205-06-01) 描述了靶

向 Her2/neu 和 CD3 的完整双特异性单克隆抗体的应用。这种抗体用于治疗转移性乳腺癌的 I 期试验中。为了研究通过这种抗 -Her2/neu x 抗 -CD3 抗体引起的任何副作用,和为了加快招募必要数目的 17 名患者,检测了具有**HercepTest®**得分 1+(25%),2+(12,5%) 和 3+(62,5%) 的患者。在这一初步的结果分析中在 15 名可评价的患者中有 4 名观察到抗肿瘤反应。然而,落入**HercepTest®**得分 1+ 内的这些患者没有一名表现出抗肿瘤反应。完全没有给出关于这些反应者的 Her2/neu 表达状态的信息。另外,在这种 I 期研究的设计时,只有 ertumaxomab 消除表达高水平(3+ 得分)的 Her2/neu 的细胞系(例如,Sk-Br-3)的实验数据是可用的。

[0010] 如同在所有典型的 I 期试验中,Kiewe 等的 I 期试验设计成研究所述三官能抗体 ertumaxomab 的安全性和耐受性。在这一试验中的次级变量是抗肿瘤活性和不同免疫学参数的测量。为了加快对本研究的患者招募,关于在患者肿瘤细胞上的 Her2/neu 的表达不加以限制。这是可能的,原因在于本研究的主要目的是安全性和耐受性,而 Her2/neu 在肿瘤细胞上的表达水平完全不重要。

[0011] 三官能抗体抗 -HER2x 抗 -CD3ertumaxomab 似乎只在与得分 2+ 和 3+ 一致的过表达 Her2/neu 的患者中有效的发现完全不令人吃惊,也如同使用如**Herceptin®**的抗体进行的其它研究表现出只对以中等(2+/FISH+) 到高水平(3+) 表达 Her2/neu 的患者有效。

[0012] 例如,Gatzemeier 等,Anal of Oncology(肿瘤学分析)15:19-27,2004 提供了如曲妥单抗的抗体的确只对 3+ 或 2+/FISH+ 之内的 Her2/neu 表达的患者提供临床益处的证据。

[0013] 类似地,Micromet 公司(Micromet, Inc.) 于 2006 年 10 月 2 日公布了关于使用 adecatumumab 的 2 次 II 期试验的数据,所述 adecatumumab 是一种针对乳腺癌和前列腺癌中的表皮细胞黏附分子 EpCAM 的抗体。只有在他们的肿瘤组织上表达高水平的 EpCAM 的患者表现出进展时间的显著延长,而具有低 EpCAM 表达的患者没有表现出显著的受益。强调的是 adecatumumab 可以为患有高度过量表达的 EpCAM 的乳腺癌的患者提供治疗选择。对于具有低 EpCAM 过量表达的患者完全没有发现有效性。

[0014] 非霍奇金淋巴瘤(NHL) 和慢性淋巴白血病(CLL) 是最普遍的恶性病之一。在美国 NHL 是第五最常见的恶性病,年发病率为 18-20/100,000 个体。直到 20 世纪 90 年代中期,NHL 的发病率每年增加 5-10%¹,但是从那时起保持恒定。²CLL 是西方国家中最常见的白血病,年发病率为 3-4/100,000 个体。

[0015] 除了在使用抗 -CD20 单克隆抗体利妥昔单抗(特别与化学治疗结合)的 B- 细胞淋巴瘤治疗中的有希望的结果之外,患者最终复发。^{9,35} 因此,存在对于进一步的治疗选择的需求。

[0016] 目前,除了在正式批准单克隆抗体如利妥昔单抗和 alemtuzumab 后获得的治疗中的主要改进的事实之外,无痛性 NHL 和 CLL 都是不可治愈的疾病。³⁻⁶ 尽管抗体单一治疗尚未高度成功,特别在 CLL 中,单克隆抗体与标准化学治疗方案的结合显著改善了患者的结果。^{7,8} 然而,患者最终复发,⁹ 并且新的治疗策略经历令人失望的寻找。许多新药候选诸如完全人源化的抗 -CD20 抗体或靶向其它抗原(例如,CD19, CD22, CD23, CD80 或 HLA-DR) 的抗体目前正处于集中的研究中。^{10,11}

[0017] 除了寻找新的靶点,提高抗体治疗的另一途径是开发双特异性抗体。已经开发和

检测了许多双特异性形式,例如,在细胞杂交瘤 (quadroma) 细胞中产生的全长抗体,化学交联的 F(ab)₂ 片段,单链抗体,¹² 和双抗体。¹³ 已经检测了这些抗体中的一些用于治疗人淋巴瘤。然而,除了有希望的体外功效之外,这些分子仅表现出有限的临床益处。¹⁴⁻¹⁶

[0018] 针对 B-细胞-特异性抗原如 CD19 或 CD20 的双特异性抗体在最近 10-15 年内已经处于广泛的研究中,但是迄今为止获得只表现出中等反应的有限的临床数据^{14, 36, 37}。此外,复杂的和效率低的制备过程使其难以生产充足量的抗体用于临床应用。

[0019] 双特异性抗体 (bsAb) 是通过重新定向针对肿瘤细胞的效应细胞而进行例如恶性细胞的免疫学治疗的工具。然而, bsAbs 正常仅重新定向和激活单一种类的效应细胞,即, T-细胞, NK-细胞, Fc γ RI⁺, 或 Fc α RI⁺ 细胞,因此限制了它们的功效。已经描述了所有这些现有技术抗体只在肿瘤-相关抗原以中等至高水平在所述肿瘤细胞表面上表达时有效地治疗肿瘤。

[0020] 增强抗体的免疫学效应子功能反映了一种提高基于抗体的癌症治疗功效的途径。本作者已经描述了具有提高的效应子功能的三官能双特异性抗体,例如,在 Zeidler, 等. (18), Riesenberger 等. (22), Ruf&Lindhofer (20) 或 Heiss 等. (21) 的公布中描述,所述三官能双特异性抗体不仅用其两个结合臂识别肿瘤细胞和 T 淋巴细胞,而且通过它们的 Fc 区域结合 Fc γ -受体阳性佐细胞。然而,这些抗体到目前为止也没有已知有效用于治疗以低水平表达肿瘤-相关抗原如 Her2/neu 或 CD20 的肿瘤细胞。

[0021] 上文关于 Her2/neu, EpCAM 和 CD20 解释的限制也对其它肿瘤-相关的抗原如,例如, G250, GD3, GD2, 蛋白聚糖, MHC II, EGF-R 和 CEA 有效。

[0022] 总结而言,到本发明的优先权日期之前可用的所有实验数据只提供了对具有肿瘤抗原的中等至高过量表达的患者显著有益的证据。

[0023] 因此,存在对于提高这样的抗体的抗肿瘤活性的需求,所述抗体还可以杀死,例如, Her2/neu 低表达肿瘤细胞 (使用 Dako **HercepTest®** 得分例如为 1+) 或以至多 500,000 肿瘤-相关抗原 / 肿瘤细胞的中等水平表达 Her2/neu 并且使用 Dako **HercepTest®** 得分为 2+ 但是 FISH 阴性,或 CD20 低表达肿瘤细胞,或以某种水平并且在涵盖约 1,000-350,000, 特别地 5,000-150,000 肿瘤相关抗原 / 肿瘤细胞的范围内表达上文详细描述肿瘤相关抗原中的一种或多种,特别是 CD20 和 EpCAM 的这样的肿瘤细胞。

[0024] 已经发现上述问题由从具有下述特征的三官能双特异性抗体选择的促进不同种类的免疫细胞的协作的抗体而解决:

[0025] (a) 结合 T 细胞;

[0026] (b) 结合在肿瘤细胞上的至少一种肿瘤-相关抗原,所述抗原选自由 Her2/neu, CD20, EpCAM, G250, GD3, GD2, 蛋白聚糖, MHC II, EGF-R 和 CEA 组成的组;

[0027] (c) 通过它们的 Fc-部分结合 Fc γ -受体 I 型和 / 或 III 型阳性细胞;

[0028] 所述抗体用于制备用来预防和治疗肿瘤疾病的药物组合物,其中在所述肿瘤疾病中,所述肿瘤-相关抗原在所述肿瘤细胞上以下述量表达:

[0029] • 对于 Her2/neu, 以约 5,000-约 150,000 肿瘤-相关抗原 / 肿瘤细胞的量,或

[0030] • 在检测为 FISH 阴性的肿瘤细胞中,对于 Her2/neu, 以约至多 500,000 肿瘤-相关抗原 / 肿瘤细胞的量,或

[0031] • 对于 CD20, 以约 1,000-约 350,000 肿瘤-相关抗原 / 肿瘤细胞的量,或

[0032] • 对于 EpCAM, G250, 蛋白聚糖, GD2, GD3, MHC II, EGF-R 和 CEA, 以约 1,000- 约 350,000, 优选地至多约 300,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量。

[0033] 在本发明的一个实施方案中, 所有所述的肿瘤抗原都以约 5,000 到约 150,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量在肿瘤细胞上表达。

[0034] 本发明还提供关于预防和治疗肿瘤疾病而治疗人或动物的方法, 其通过将包含人或动物的肿瘤细胞的机体或含有所述肿瘤细胞的这些机体的部分的与药学有效量的三官能双特异性抗体接触, 所述三官能双特异性抗体具有下述特征:

[0035] (a) 结合 T 细胞;

[0036] (b) 结合在肿瘤细胞上的至少一种肿瘤 - 相关抗原, 所述抗原选自由 Her2/neu, CD20, EpCAM, G250, GD3, GD2, 蛋白聚糖, MHC II, EGF-R 和 CEA 组成的组;

[0037] (c) 通过它们的 Fc- 部分结合 Fc γ - 受体 I 型和 / 或 III 型阳性细胞; 其中所述肿瘤 - 相关抗原在所述肿瘤细胞上以下述量表达:

[0038] • 对于 Her2/neu, 以约 5,000- 约 150,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量, 或

[0039] • 在检测为 FISH 阴性的肿瘤细胞中, 对于 Her2/neu, 以约至多 500,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量, 或

[0040] • 对于 CD20, 以约 1,000- 约 350,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量, 或

[0041] • 对于 EpCAM, G250, 蛋白聚糖, GD2, GD3, MHC II, EGF-R 和 CEA, 以约 1,000- 约 350,000, 优选地至多约 300,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量。

[0042] 所述将所述三官能双特异性抗体与患者的肿瘤细胞接触是通过将所述三官能双特异性抗体以任何可接受的剂型如下文所述口服或者肠胃外施用到人或动物体内而进行。

[0043] 假定要治疗包括免疫系统细胞的肿瘤疾病如白血病或淋巴瘤, 所述接触还可以离体进行。参考见例如 US7,018,632 或 US5,985,276, 其通过引用完全结合于此。

[0044] 将含有自体肿瘤细胞的物质用本文所述的三官能双特异性抗体温育, 持续 10 分钟到 10 小时期间的短期温育, 优选地达到 5 小时, 或还如关于短期温育所述的时间期间的长期温育, 以致所述自体肿瘤细胞负载它们的抗体。随后, 加入患者的血细胞, 优选外周血的单核细胞 (PBMC), 然后将这一混合物温育长时间, 诸如 1 到 14 天。备选地, 将所述自体肿瘤细胞直接与所述三官能双特异性抗体和与患者的血细胞, 优选外周血单核细胞接触。以这种方式, 已经离体实现了针对所述肿瘤的许多免疫细胞的“激活”。后来, 将这些细胞重新输注到患者中。长期的温育还导致抗体的内在化和降解。如上述, 上文引用的美国专利充分描述了这些方法; 然而, 专家完全没有提供成功的合理预期, 所述成功是指治疗包括关于上述肿瘤 - 相关抗原具有约 5,000 到约 150,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的表达的肿瘤细胞的肿瘤疾病也可以是可行的。所述方法可以以同种异源或自体形式无需另外健康供体 PBMCs 而实施。显著地, 肿瘤细胞, 特别是 B 细胞的耗尽不依赖于用细胞因子 (例如, IL-2, GM-SCF) 对效应细胞的任何预先或共激活, 这是本领域所述的其它双特异性或单特异性抗体的典型的缺点。

[0045] 本发明的优选实施方案在从属权利要求以及在下述描述和附上的实验数据、附图和表格中描述。

[0046] 本发明人可以令人吃惊地表明已经在本领域描述过的三官能双特异性抗体可以有效地用于靶向在肿瘤细胞上的特别选择的肿瘤 - 相关靶抗原, 所述肿瘤 - 相关靶抗原以

只是低到中等的水平在所述肿瘤细胞上表达。特别优选的是 Her2/neu, EpCAM 和 CD20 肿瘤 - 相关抗原作为靶抗原。

[0047] 所述肿瘤 - 相关抗原以不同水平在肿瘤细胞上表达,其取决于在所述肿瘤细胞上表达的肿瘤 - 相关抗原的类型,和在 Her2/neu 情形中所述肿瘤抗原是否得到扩增。

[0048] 已经发现,在 Her2/neu 的情形中,如果它们的肿瘤以约 5000 到约 150,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量在肿瘤细胞上表达 Her2/neu,那么患者可以成功地用所述三官能双特异性抗体进行治疗。这些患者将依据 DAKO HercepTest® 得分为 1+。将 1+ 的上限归类为对应于约 100,000 或 110,000 也可是正确的。最重要地,得分必须归类为与“中等表达”相反的“低表达”。

[0049] 还已经发现表达达到 500,000 分子的 Her2/neu 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞并且其依据 DAKO HercepTest® 归类为 2+ 的患者可以成功地进行治疗,即使他们归类为 FISH 阴性。迄今为止,只有那些患者可以被成功地治疗,所述患者具有依据 DAKO HercepTest® 得分为 2+ 的 Her2/neu 值,表达达到 500,000 Her2/neu 肿瘤抗原 / 肿瘤细胞却是 FISH 阳性的。具有 2+ 的 Her2/neu 值的 FISH 阴性患者不能被成功地治疗。

[0050] 在患有表达 CD20 的肿瘤的患者中,已经吃惊地发现他们可以被成功地治疗,即使 CD20 的表达是以约 1000 到约 350,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量。另外,具有以约 1000 到约 350,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量表达 EpCAM, G250, 蛋白聚糖, GD2, GD3, MHC II, EGF-R 和 CEA 的患者可以成功地用本文所述的三官能双特异性抗体进行治疗。

[0051] 在 Her2/neu 的情形中,所述肿瘤 - 相关抗原在肿瘤细胞上表达,优选地以至少约 10,000, 约 20,000, 约 50,000 或约 80,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的量,并且优选地以约 110,000, 约 120,000 或约 130,000 肿瘤 - 相关抗原 / 肿瘤细胞的最大值进行表达。

[0052] 对于具有用 DAKO HercepTest® 得分为 2+ 的 Her2/neu 值 (中等表达) 的患者,肿瘤 - 相关抗原在所述肿瘤细胞上的优选的表达是以至多 500,000 或至多 450,000, 400,000, 350,000, 或 300,000 的量,并且具有约 100,000, 大于约 110,000, 大于约 150,000, 约 200,000, 或约 250,000 的下限而进行。

[0053] 在具有 CD20 肿瘤抗原表达的肿瘤细胞中,每个肿瘤细胞 CD20 分子的数目在约 1000 到约 350,000 范围内而不同,优选地至多约 310,00 或 300,000,这取决于 B 细胞恶性的类型和在体内的位点。每个肿瘤细胞 CD20 分子的数目可以特别地从约 5000, 约 10,000, 约 50,000, 到约 100,000, 150,000, 200,000, 250,000, 达到 300,000 而不同。这种情形对于在权利要求 1 中列出的所有其它肿瘤抗原 EpCAM, G250, 蛋白聚糖, GD2, GD3, MHC II, EGF-R 和 CEA 是类似的。

[0054] 应该注意到,在来源于单一确定的肿瘤实体的不同肿瘤细胞上,肿瘤 - 相关抗原的表达水平可以在下限和上限表达值之间的范围内。必须理解,所有这些附图是平均值,其取决于恶性的类型,患者的类型,肿瘤的发展等。

[0055] 很重要地注意到,本发明人所选择的肿瘤 - 相关靶抗原仅以低到中等表达水平永久并且稳定地在所述肿瘤细胞上表达。然而,其它类型的可诱导的抗原,如热激蛋白和 MIC 分子 MIC A 和 MIC B,其都在热激启动子元件的控制之下,在生命过程中在诱导之后以增加的速率进行表达,肿瘤 - 相关抗原如 Her2/neu 和 CD20 的表达速率通常是恒定的和稳定的。

[0056] 由本发明人选择的肿瘤 - 相关抗原与特定的肿瘤相关或者对特定的肿瘤特异。

EpCAM 典型地与腺癌相关, Her2/neu 与乳腺癌相关而且与结肠、肺、胃、胰腺和卵巢癌相关, CD20 与 B 细胞淋巴瘤如非霍奇金淋巴瘤或慢性淋巴白血病相关, G250 与肾癌相关, 蛋白聚糖、GD3 和 GD2 与黑素瘤相关, MHC II 与 B 细胞淋巴瘤相关, 并且 EGF-R 和 CEA 与上皮肿瘤相关。

[0057] 用于本发明的三官能双特异性抗体 (简称为 trAb) 完全是已知的。例如, 参考见 US-6, 551, 592, 其内容通过引用完全结合于此。同样对于 DE-A-19649223 和 DE-A-19710495 也是真实的, 其也通过引用与它们相对应的美国专利文献一起结合于此。

[0058] 用于本发明的抗体可以以任何可接受的剂型如胶囊、片剂、水性混悬液、溶液等而口服施用。所述抗体及其衍生物还可以肠胃外施用。这通过下述施用途径: 皮下、静脉内、腹膜内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鼻内、局部、鞘内、肝内、肿瘤内、损伤内、和颅内注射或输注技术进行。通常, 所述抗体将提供为静脉内注射或输注。

[0059] 本发明的抗体可以单独或与药用载体一起施用, 药用载体包括可接受的佐剂、载体 (vehicles) 和赋形剂 (excipients)。所有这些是本领域的技术人员所熟悉的。

[0060] 有效剂量将取决于许多因素, 并且它很好地处于熟练医师的能力范围内, 以按照不同的参数如体重、治疗目的、最高耐受剂量、所用的具体制剂、施用途径、患者的反应等而调整给与给定的患者的剂量。

[0061] 依据本发明所用的 trAbs 优选地以每次输注约 5- 约 1000 μ g, 更优选地约 10- 约 300 μ g, 约 10- 约 100 μ g, 或约 10- 约 50 μ g 的量进行施用。最佳的量可以由熟练的技术人员通过实验方法确定。更优选地, 所述三官能抗体以约 0.05- 约 15 μ g/kg, 更优选地约 0.5-5 μ g/kg 和约 0.5-2 μ g/kg 体重的量使用。施用的次数可以由医师依据患者的需要, 特别是疾病的严重性, 患者的反应, 所用的剂量和本领域已知的其它各种因素而选择。

[0062] 优选地, 选择的所述三官能抗体为抗-CD3X 抗-肿瘤-相关抗原抗体和 / 或抗-CD4X 抗-肿瘤-相关抗原抗体和 / 或抗-CD5X 抗-肿瘤-相关抗原抗体和 / 或抗-CD6X 抗-肿瘤-相关抗原抗体和 / 或抗-CD8 抗-肿瘤-相关抗原抗体和 / 或抗-CD2X 抗-肿瘤-相关抗原抗体和 / 或抗-CD28X 抗-肿瘤-相关抗原抗体和 / 或抗-CD44X 抗-肿瘤-相关抗原抗体, 其中特别优选使用抗-CD3x 抗-肿瘤-相关抗原抗体。特别优选作为所述抗-肿瘤-相关抗原的是 Her2/neu, EpCAM 或 CD20 抗原, 特别优选地与所述三官能抗体的抗-CD3 结合臂组合。

[0063] 通过使用本发明的三官能抗体, 通过所述 trAb 的 Fc- 部分与 Fc- 受体阳性细胞的结合而激活所述 Fc- 受体阳性细胞。因此, 细胞因子和 / 或共刺激性抗原的表达得到起始或增加。然后, 通过所述共刺激性抗原和 / 或细胞因子将 T 细胞生理激活所需要的至少第二次激活信号转移到所述 T 细胞中。这种激活通过激活标记的上调、肿瘤细胞的杀死和通过 T 细胞的增殖而指示。

[0064] 通过 trAb 激活所述 Fc 受体-阳性细胞分别取决于抗体重链片段的亚类或亚类的组合。如体外实验所证明, 例如, 小鼠-IgG2a/ 大鼠 IgG2b 亚类组合的 trAbs 能够结合, 并且同时激活, Fc 受体-阳性细胞, 分别导致共刺激性抗原如 CD40、CD80 或 CD86 在这些细胞表面上的上调或新形成 (表达), 而小鼠 IgG1/ 大鼠 IgG2b 亚类组合的双特异性抗体能够结合 Fc 受体阳性细胞 ((1) Haagen 等, J. Immunology (免疫学杂志), 1995, 154 :1852-1860), 但是明显地不能将这些细胞激活到相当的程度 ((2) Gast 等, Cancer Immunol. Immunother.

(癌症免疫学免疫治疗), 1995, 40 :390)。因此, 在所述 trAbFc- 区的小鼠 IgG2a/ 大鼠 IgG2b 同种型组合是特别优选的。然而, 这对于在本描述中引用的所有其它同种型组合也是如此, 以致它们可以用于本发明的其它优选的实施方案中。

[0065] 尽管 trAb 用一个结合臂 (例如, 抗 -CD3) 同时结合并且激活 T 细胞, 来自与所述 trAb 的 Fc 部分结合的 Fc 受体 - 阳性细胞结合的共刺激性信号可以转移到 T 细胞, 即, 仅是通过 trAb 的一个结合臂的 T 细胞激活和来自 Fc 受体 - 阳性细胞的共刺激性信号同时转移到 T 细胞的组合导致有效的 T 细胞激活。

[0066] 在诱导抗 - 肿瘤免疫性中的另一个重要方面是已经被所述 trAb 靶向的佐细胞 (单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞或树突细胞) 对肿瘤成分的可能的吞噬作用、加工和呈递。通过抗原呈递的这种经典机制, 肿瘤 - 特异性 CD4- 以及 CD8- 阳性细胞都可以生成。此外, 在 T/B 细胞协作的情形中, 肿瘤特异的 CD4 细胞在体液免疫反应的诱导中起重要作用。

[0067] 三官能双特异性抗体能够用一个结合臂结合 T 细胞的 T 细胞受体复合物, 并且用第二结合臂结合在所述肿瘤细胞上的所述肿瘤 - 相关抗原。由此, 它们激活 T 细胞, 其通过释放细胞因子或通过细胞程序性死亡 - 介导的机制而破坏肿瘤细胞。此外, 似乎存在这样的可能性, 即, 在通过三官能抗体激活的情形中, 通过它们的受体识别肿瘤特异性抗原的 T 细胞可以被重新激活, 由此导致长期持续的抗肿瘤免疫性。在这方面特别重要的是所述三官能双特异性抗体的完整的 Fc 部分调控与佐细胞如单核细胞 / 巨噬细胞和树突细胞的结合, 并且引起它们自我发展细胞毒性和 / 或伴随着将重要的共刺激性信号转移到 T 细胞。明显地, 以这种方式, 可以诱导针对目前尚是未知的肿瘤特异性肽的 T 细胞反应。

[0068] 通过以 trAbs 和与所述 trAb 的 Fc 部分结合的佐细胞对这样的 T 细胞的同时共刺激将具有可能的无反应性的肿瘤特异性 T 细胞重新定向于肿瘤细胞, 可以消除肿瘤特异性细胞毒性 T 细胞 (CTLs) 的无反应性状态, 即, 在患者中存在的针对所述肿瘤的预先存在的 T 细胞耐受性可以通过 trAbs 的方式消除, 并且因此, 除了对肿瘤细胞的直接破坏之外, 可以诱导长期持续的抗肿瘤免疫性。

[0069] 优选地, 依据本发明所用的抗体能够重新激活存于无反应性状态的肿瘤特异性 T 细胞。此外, 它们能够诱导肿瘤 - 反应性成分 - 结合抗体, 并且因此诱导体液免疫反应。

[0070] 与 T 细胞的结合优选地通过 CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, 和 / 或 CD44 发生。Fc 受体 - 阳性细胞具有至少一个 Fc γ 受体 I 或 III。可以依据本发明使用的抗体能够结合单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、“天然杀伤”细胞 (NK 细胞) 和 / 或激活的嗜中性粒细胞, 其是 Fc γ 受体 I 和 / 或 III- 阳性的细胞。

[0071] 可以依据本发明使用的抗体导致作为共刺激性抗原的 CD40, CD80, CD86, ICAM-1, 和 / 或 LFA-3 的表达的起始或增加, 或 / 和 Fc 受体 - 阳性细胞对细胞因子的分泌。优选地, 所述细胞因子是 IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ 和 / 或 TNF- α 。优选地, 与 T 细胞的结合通过所述 T 细胞的 T 细胞受体复合物而发生。

[0072] 优选地, 所述三官能双特异性抗体是异源完整的大鼠 / 小鼠双特异性抗体。

[0073] 通过可以依据本发明使用的 trAbs 的方式, 针对所述肿瘤细胞, T 细胞被激活并且重新定向。优选的有效的异源三官能双特异性抗体选自下述同种型组合中的一种或多种:

[0074] 大鼠 -IgG2b/ 小鼠 -IgG2a

[0075] 大鼠 -IgG2b/ 小鼠 -IgG2b,

- [0076] 大鼠-IgG2b/小鼠-IgG3；
- [0077] 大鼠-IgG2b/人-IgG1，
- [0078] 大鼠-IgG2b/人-IgG2，
- [0079] 大鼠-IgG2b/人-IgG3[东方人同种异型 G3m(st) = 结合蛋白质 A]，
- [0080] 大鼠-IgG2b/人-IgG4；
- [0081] 大鼠-IgG2b/大鼠-IgG2c；
- [0082] 小鼠-IgG2a/人-IgG3[白种人同种异型 G3m(b+g) = 不与蛋白质 A 结合，
- [0083] 在下文显示为*]
- [0084] 小鼠-IgG2a/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0085] 小鼠-IgG2a/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0086] 小鼠-IgG2a/人-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0087] 小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0088] 小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4-[铰合部]-人-IgG4[CH2 的 N-端区域]-人-IgG3*[CH2 的 C-端区域:>aa 位置 251]-人-IgG3*[CH3]
- [0089] 大鼠-IgG2b/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部-CH2-CH3]
- [0090] 大鼠-IgG2b/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG2-[铰合部-CH2-CH3]
- [0091] 大鼠-IgG2b/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG3-[铰合部-CH2-CH3, 东方人同种异型]
- [0092] 大鼠-IgG2b/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4-[铰合部-CH2-CH3]
- [0093] 人-IgG1/人-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0094] 人-IgG1/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG4[CH2 的 N-端区域]-人-IgG3*[CH2 的 C-端区域:>aa 位置 251]-人-IgG3*[CH3]
- [0095] 人-IgG1/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG4[CH2 的 N-端区域]-人-IgG3*[CH2 的 C-端区域:>aa 位置 251]-人-IgG3*[CH3]
- [0096] 人-IgG1/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG2[CH2 的 N-端区域]-人-IgG3*[CH2 的 C-端区域:>aa 位置 251]-人-IgG3*[CH3]
- [0097] 人-IgG1/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG2[CH2 的 N-端区域]-人-IgG3*[CH2 的 C-端区域:>aa 位置 251]-人-IgG3*[CH3]
- [0098] 人-IgG1/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0099] 人-IgG1/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0100] 人-IgG2/人-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG2-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- 人-IgG4/人-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0101] 人-IgG4/人-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4-[铰合部]-人-IgG4[CH2 的 N-端区域]-人-IgG3*[CH2 的 C-端区域:>aa 位置 251]-人-IgG3*[CH3]
- [0102] 小鼠-IgG2b/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0103] 小鼠-IgG2b/人-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]
- [0104] 小鼠-IgG2b/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG3*[CH2-CH3]

[0105] 小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4-[铰合部]-人-IgG4-[CH2]-人-IgG3*-[CH3]

[0106] 人-IgG1/大鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG4-[CH2]-人-IgG3*-[CH3]

[0107] 人-IgG1/小鼠-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG1-[铰合部]-人-IgG4-[CH2]-人-IgG3*-[CH3]

[0108] 人-IgG4/人-[VH-CH1, VL-CL]-人-IgG4-[铰合部]-人-IgG4-[CH2]-人-IgG3*-[CH3]

[0109] 优选地,依据本发明有用的抗体是单克隆的、嵌合的、重组的、合成的、半合成的或化学修饰的完整抗体,其具有例如 Fv、Fab、scFv、或 F(ab)₂ 片段。

[0110] 优选地,使用人源的抗体或其衍生物或片段,或者被修饰成适用于人的那些(所谓的“人源化抗体”)(参见例如,Shalaby 等, J. Exp. Med. (实验医学杂志) 175(1992), 217; Mocikat 等, Transplantation(移植) 57(1994), 405)。

[0111] 上文提及的不同类型抗体和抗体片段的制备是熟练的技术人员公知的。单克隆抗体,优选地哺乳动物来源,例如,人、大鼠、小鼠、兔或山羊的单克隆抗体的制备可以使用常规方法进行,如例如在 Köhler und Milstein (Nature(自然) 256(1975), 495), 在 Harlow 和 Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988) (抗体,实验室手册 (1988)), Cold Spring Harbor(冷泉港)) 或在 Galfré (Meth. Enzymol. (酶学方法) 73(1981), 3) 或在 DE19531346 中所述的那些方法。

[0112] 通过依据熟练的技术人员已知的技术的重组 DNA 技术的方式制备抗体也是可能的(参见, Kurucz 等, J. Immunol. (免疫学杂志) 154(1995), 4576; Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报) 90(1993), 6444)。

[0113] 具有两种不同的特异性的抗体,即所谓的双特异性抗体的制备可以一方面利用重组 DNA 技术进行,另一方面还可以通过所谓的杂交瘤融合技术进行(参见例如, Milstein 等, Nature(自然) 305(1983), 537)。这种技术包括将每种产生具有一种需要的特异性的抗体的杂交瘤细胞系融合,和鉴定并且分离产生具有两种特异性的抗体的重组细胞系。

[0114] 使用权利要求 1 中定义的双官能双特异性抗体解决了本发明潜在的问题。在下文中,更详细地描述表现出两种特异性的抗体的制备。落入本发明中的三官能双特异性抗体属于现有技术,并且描述这样的制备方法的参考文献通过引用完全结合于此。

[0115] 三官能双特异性抗体由两个抗体半分子组成(每个具有 H 和 L 免疫球蛋白链),其每个抗体半分子表现出特异性,并且具有如同行使公知的效应子功能的正常抗体的 Fc 部分。它们优选地使用细胞杂交瘤技术制备。这种制备方法在 DE-A-4419399 中示例。为了完全公开,这一文献通过引用完全结合,并且结合其关于双特异性抗体的定义。应该理解,还有其它的制备方法是有用的,只要它们形成依据本发明所需要的按照上述定义的双官能双特异性抗体。

[0116] trAb 与 Fc γ -RI 的结合表现出关于最佳抗肿瘤功效的两种实质性的优点:

[0117] (1) Fc γ -RI-阳性细胞具有通过 ADCC 消除肿瘤细胞的能力,并且因此能够通过所述 trAbs 协同地有助于细胞毒性 T 细胞针对所述肿瘤细胞的抗肿瘤效果。

[0118] (2)Fc γ RI- 阳性细胞(诸如单核细胞/巨噬细胞/树突细胞)能够提供与T细胞的抗原呈递相似的重要的共刺激性信号,并且由此防止T细胞无反应性。此外,由于trAb-介导的T细胞与佐细胞和肿瘤细胞的相互作用,甚至具有识别肿瘤-特异性肽(通过在所述肿瘤细胞上的MHC抗原呈递)的T细胞受体的T细胞可以被刺激成需要的副产物。在这种情形(constellation)中,对于正确激活T细胞所必需的共-刺激将由所述佐细胞(诸如单核细胞)提供。因此,除了直接的T细胞受体-不依赖型trAb-介导的肿瘤破坏,本发明的抗体还应该能够激活并生成肿瘤-特异的T细胞,其在trAb降解后继续在患者内巡视(patrol)。这意味着,与基因-治疗方法(例如,通过将共-刺激性抗原如B-7结合到肿瘤细胞中)相似,患者的肿瘤耐受性可以被三官能双特异性抗体消除。

[0119] 下述实验数据表明本文所述的trAbs可以令人吃惊地高度有效地用于破坏只具有低到中等表达水平的靶抗原,特别优选Her2/neu和CD20靶抗原的肿瘤细胞。发现关于高有效性的原因在于前述的所述三官能抗体的作用模式。所述作用模式显著不同于单特异性抗体。用于本发明的三官能抗体能够通过它们的抗-T细胞结合臂和它们的Fc部分靶向并且同时激活不同类型的免疫细胞。这些免疫细胞的典型的实例是T淋巴细胞和具有Fc γ -受体I型(CD64)和III型(CD16)的佐细胞。当所述第一结合臂结合在肿瘤细胞上的靶抗原如Her2/neu或CD20时,所述第二结合臂结合例如在T淋巴细胞上的CD3(图4)。

[0120] 关于怎样定量肿瘤抗原表达水平的方法是本领域已知的。例如,免疫细胞化学方法,如例如,ELISA检测、定量流式细胞术、组织染色方法和细胞离心涂片器(cytospin)分析。关于在肿瘤细胞上的肿瘤-相关靶抗原的表达的定量确定方法的典型的实例是免疫组织化学方法,如由丹麦Glostrup DAKO开发的Hercep **Test®**,其允许定量确定Her2/neu在肿瘤组织上的表达水平。参见由DAKO关于DAKO细胞瘤自动染色编号K5207(Cytomation Autostainer Code no. K5207),第一版,所述的Hercep **Test®**其由通过引用完全结合于此的公布号111781-001和K5207/EFG/AOS/13.10.04鉴定。对于Her2/neu,提供了一种评估系统,其包括4个步骤,0,1+,2+,3+,是指在肿瘤细胞表面上的表达的靶抗原的近似数目。依据这一系统,将在靶细胞表面上具有低于20,000Her2/neu分子的表达的细胞分类为阴性的;将具有大于约20,000并且至多约100,000-110,000(至多最大值150,000)分子的表达的细胞分类为1+(低表达),具有至多约500,000分子的表达的细胞分类为2+(中等表达),并且将具有在约2,000,000到10,000,000分子的表达的细胞分类为3+(高表达)。依据本发明,已经发现针对Her2/neu的三官能双特异性抗体可以用于治疗患有依据Hercep **Test®**分类为Her2/neu1+和2+(如果后者另外检测为FISH阴性)的肿瘤细胞的患者。

[0121] 所谓的FISH检测是本领域公知的。“FISH”意指“原位荧光杂交”,并且是可以用来检测和定位特异的DNA序列在染色体上的存在或不存在的细胞遗传学技术。该方法本身在本领域内是充分确定和公知的。参见,例如,Laudadio J, Quigley DI, Tubbs R, Wolff DJ. HER2testing: a review of detection methodologies and their clinical performance (HER2检测:检测方法和它们的临床表现的综述),其通过参考完全结合于此。

[0122] FISH阴性检测结果意指Her2/neu基因未得到扩增;Her2/neu基因的数目是在正常的生理范围内。然而,在15到20%的所有的乳房癌中,Her2/neu基因得到扩增。这种扩增的检测已经被确定为对于乳腺癌治疗是至关重要的。在所述Her2/neu基因得到扩增

的情形中,FISH 分析将是阳性的,并且例如在用曲妥单抗治疗的那些案例中可能是成功的。另一方面,过量表达 Her2/neu 但是 FISH 阴性的患者不能使用如曲妥单抗的抗体进行有效的治疗。因此,具有达到 500,000 的 Her2/neu 表达但是 FISH 阴性的患者也可以用本文所述的三官能双特异性抗体成功地治疗不得被视为是乳腺癌治疗中的重要的进步。许多小组还研究 CD20 在 B 细胞恶性病上的表达。Ginaldi 等,(J.Clin.Pathol.(临床病理学杂志),51:364,1998) 通过使用 Quantum 简单细胞微珠试剂盒(Quantum Simply Cellular microbeadskit, Sigma(西格玛),圣路易斯,密苏里州,美国)而评估 CD20 在不同 B 细胞恶性病上的表达。他们发现,例如,对于 B-CLL,平均值为 65,000CD20 分子/白血病细胞,并且对于套细胞(mantel cell)淋巴瘤,为 123,000CD20 分子/细胞。在多毛细胞白血病的病情中,该研究确定平均值为 312,000CD20 分子/细胞。

[0123] Huh 等,(Am J Clin Pathol(美国临床病理学杂志)116:437,2001) 使用比较方法进一步研究了对于 B 细胞恶性病 CD20 在不同位点如外周血和骨髓的不同的表达。此处,在骨髓标本中,每个细胞的 CD20 分子的数目在 B-CLL 中(平均 4,067;范围 222-46,395)是最低的,在滤泡淋巴瘤中(平均 22,240;范围 3,689-39,643)、套细胞淋巴瘤中(平均 29,770;范围 2,785-97,727)较高,并且在多毛细胞白血病中(平均 31,563;范围 1,607-72,540)中最高。相反,在外周血中,CD20 分子数目/细胞通常对于例如 B-CLL 更高,其中平均数是 9,051,在 563-31,507 范围内。

[0124] 综上,在 B 细胞恶性病的情形中,CD20 分子数目/细胞从约 1000 到 300,000 而不同,取决于 B 细胞恶性病的类型以及在机体内的位点,并且达到约 350,000 的最大值。

[0125] 在下述实施例,并且参考所包含的附图和图表,更详细地描述本发明。第一个实施例关于商标为 **Rexomun**[®] (INN- 名为 ertumaxomab) 的可获得的三官能抗体和被 **Rexomun**[®] 靶向的肿瘤-相关抗原 Her2/neu 举例说明本发明。第二个实施例针对命名为 Bi20 的三官能双特异性抗体(也叫作 FBTA05),其通过 CD3 结合 T 细胞,并且识别 CD20 为肿瘤抗原。这些实施例提供了令人信服的证据证明本发明可以关于在权利要求 1 和贯穿本说明书中具体描述的所有其它肿瘤-相关抗原而使用。所有这些肿瘤-相关抗原可以以这样低的数量存在于肿瘤细胞的表面上,以致它们几乎不能通过常规所用的基于抗体的免疫治疗而进行治疗。

[0126] 本发明的附图和图表联系实施例 1 和 2 解释如下。

[0127] 图 1:A-F,细胞系 Lox, HCT-8 和 SKBR3 的 Her2/neu 表达模式谱,其通过流式细胞术测量具有不同的抗 Her2 抗体。

[0128] 图 2a:Her2+3SKBR-3 细胞的杀伤:使用微小转移检测系统进行的绘图分析;*与表 3 相对应的数目

[0129] 图 2b:Her2+1HCT-8 细胞的杀伤:使用微小转移检测系统进行的绘图分析;*与表 3 相对应的数目

[0130] 图 2c:阴性 Her2Lox 细胞的杀伤:使用微小转移检测系统进行的绘图分析;*与表 3 相对应的数目

[0131] 图 2d:Her2+1HCT-8 细胞的杀伤;供体 2 作为 MDS 工作流程的实例的绘图结果;*与表 3 相对应的数目

[0132] 图 3:使用细胞因子珠点阵系统(CBA)测量 24 小时后在产克隆测定上清液中的细

胞因子分泌。

[0133] 图 4:假定的三细胞复合物。三官能抗体能够通过不同的免疫学机制加速对肿瘤细胞的识别和破坏。Bei der Auflistung der Zytokine im Bild sollte man noch IFN- γ aufnehmen

[0134] 注释:ADCC, 抗体依赖性细胞的细胞毒性;DC, 树突细胞;NK, 天然杀伤细胞;DC-CK1, 树突细胞细胞因子 1;IL, 白介素;LFA, 白细胞功能相关抗原;TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ;CD, 分化簇(摘自 Ruf 和 Lindhofer, 2001)

[0135] 图 5. Bi20 的纯化。(A) 阳离子交换层析(CIEX)。将母体小鼠抗体(峰 1)在 HR10/10 高效 SP- 琼脂糖柱上与三官能抗体(峰 2)分开。(B) Bi20 三官能抗体纯化的等电聚焦(IEF)。母体大鼠抗体(26II6)在蛋白质 A 亲和层析(AC Bi20)后去除,并且母体小鼠抗体(TPA10)通过 CIEX(CIEX P1Bi20)与三官能抗体分开。纯化的 Bi20 在阳离子交换层析的峰 2(CIEX P2Bi20)中发现。

[0136] 图 6. Bi20 特异性结合效应细胞。将 190ng Bi20 与 5×10^5 个靶细胞温育,并且通过 FACS 分析测量结合。Ramos 细胞(A)用作 CD20 臂的靶细胞,并且 THP-1 细胞(B)用于 Fc 部分。对于竞争测定,将细胞与利妥昔单抗(Rit)在指定抗体过量的情况下预先温育 30 分钟。

[0137] 图 7. 在效应细胞存在下, Bi20 调控有效的 B 细胞消耗。(A) 将 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml 肿瘤细胞(Raji, Mec1)用 50ng/ml 的 Bi20, catumaxomab(Catum), 利妥昔单抗, 或母体抗体 TPA10 和 26II6 温育。在第 3 天通过单核细胞、B 细胞和 T 细胞的锥虫蓝排除计数和 FACS 分析而确定 B 细胞的清除。将在没有抗体的测定(阴性)中的绝对的 B 细胞数目设定为 100%。(B) 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml Raji 细胞用增加量(0.5-250ng/ml)的 Bi20 温育。在第 1、2 和 3 天,通过锥虫蓝排除和 FACS 分析确定绝对的 B 细胞计数,并且计算 B 细胞消耗的百分数。

[0138] 图 8. Bi20 调控 T 细胞的激活。(A) 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml Raji 肿瘤细胞用 50ng/ml 的 Bi20, catumaxomab(Catum), 利妥昔单抗, 或母体抗体 TPA10 和 26II6 温育 3 天。CD25 在 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞上表达的 MFI 通过 FACS 分析确定。(B) PBMC 和 Raji 细胞用增加量(0.5-250ng/ml)的 Bi20 温育。在第 1、2 和 3 天测量 CD25 在 CD4⁺T 细胞上表达的 MFI。

[0139] 图 9. Bi20 诱导 T 细胞的增殖。 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml Raji 细胞用浓度为 50ng/ml 的 Bi20, catumaxomab(Catum), 利妥昔单抗, 或母体抗体 TPA10 和 26II6 温育 3 天。T 细胞数目通过锥虫蓝排除计数和使用抗-CD5/4 和抗-CD5/8 抗体的 FACS 分析确定。

[0140] 图 10. Bi20- 介导的单核细胞的激活。(A) 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml Raji 肿瘤细胞用 50ng/ml 的 Bi20, catumaxomab(Catum), 或利妥昔单抗温育 1 天。CD14⁺ 单核细胞表达 CD25 的 MFI 通过 FACS 分析确定。(B) 1×10^6 /ml PBMCs 和 1×10^5 /ml THP-1 细胞用 50ng/ml 的 Bi20, catumaxomab(Catum), 利妥昔单抗(Rit), TPA10, 或 26II6 温育 1 天。CD33⁺THP-1 细胞的激活通过 CD25 或 CD40 的表达而确定。

[0141] 图 11. 在健康的供体效应细胞的存在下, Bi20 诱导 CLL B 细胞的消耗。(A) 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml CLL 肿瘤细胞用 5, 50, 或 250ng/ml Bi20, 250ng/ml catumaxomab(Catum), 或 250ng/ml 利妥昔单抗(Rit)温育 3 天。在第 3 天通过单核细胞、B 细胞和 T 细胞的锥虫蓝排除计数和 FACS 分析而确定 B 细胞的清除。将在没有抗体的测定(阴性)中的绝对 B 细

胞的数量设定为 100%。MV :CLL-1 到 CLL-9 的平均值。(B)CD20 在 CLL 患者样品 (1-14), 细胞系 (Raji, Mec-1), 和一名健康供体 (PBMC) 中的表达的纵览。MFI = 平均荧光密度。

[0142] 表 1 :所用抗体及它们相对应的检测抗体的特征

[0143] * TRION Pharma, 慕尼黑, \$Roche, #Micromet, 慕尼黑

[0144] 表 2 :所用细胞系及它们的 Her2/neu 得分

[0145] * : 依据 Ross 等, 分子和细胞蛋白质组学 (Molecular and Cellular Proteomics) 3:379-398, 2004

[0146] 表 3 :产克隆测定样品

[0147] Ab = 抗体, μ g = 微克, ng = 纳克

[0148] 表 4 :Bi20 调控的细胞因子分泌。 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml 肿瘤细胞 (Raji, Ramos, Mec1, Granta, DOHH-2) 用 50ng/ml Bi20, catumaxomab (Catum), 利妥昔单抗, 或母体抗体 TPA10 和 26II6 温育 3 天。收集上清液, 并且用 CBA 测定和 FACS 分析测量细胞因子的分泌。

[0149] 表 5 :Bi20 在体外以自体形式调控的 CLL B 细胞的消除。B 和 T 细胞的百分数、CD20 在 B 细胞上的表达 (MFI)、和 E:T 比例在 CLL PBMC 制备后和温育之前立即确定。在第 0、3、6 和 9 天, 将 CLL 细胞用指定量的 Bi20 或利妥昔单抗温育。取决于患者样品, 如显示在第 3 天和第 10 天之间确定 B 细胞的清除。B 细胞的清除表示为消耗的 % B 细胞。T 细胞激活 :CD25 在 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞上的表达上调至少 5 倍 (++)。效应器 / 靶点比例 (E:T) 定义为单核细胞、NK 细胞和 T 细胞的数目相对于 B 细胞的数目。 $\leq 10\%$ 的 B 细胞清除标定为阴性 (neg)。

[0150] 实施例 1

[0151] 实施例 1 涉及 Her2/neu 结合三官能双特异性抗体关于其用于治疗在 HercepTest®中具有得分 1+ 的患者的能力的特征。

[0152] 方法

[0153] 细胞系和抗体

[0154] **Rexomun**® (由 Trion Pharma, 慕尼黑生产) 是一种三官能抗体, 其用一个结合臂靶向肿瘤 - 相关抗原 Her2/neu, 并且用另一个臂结合 T 细胞上的 CD3 分子。此外, **Rexomun**®以其有效的 Fc 区域结合 Fc γ RI 和 Fc γ RIII 阳性细胞 (例如, 巨噬细胞、NK 细胞、树突细胞), 所述 Fc 区域由小鼠 IgG2a 和大鼠 IgG2b 同种型组成。单克隆抗体 2502A (Trion Pharma, 慕尼黑) 对 Her2/neu 特异, 并且是包含在 **Rexomun**®中的一种母体抗体。26II6 (Trion Pharma, 慕尼黑) 对 CD3 特异, 并且是包含在 **Rexomun**®中的另一种母体抗体。520C9 (ATCC HB-8696) 是识别 Her2/neu 受体的另一种单克隆抗体。曲妥单抗是从鼠源抗 Her2/neu 抗体 Mab4D5 开发的一种人源化抗 Her2 单克隆抗体 (58)。表 1 显示所用的抗体及它们相对应的检测抗体的特征。

[0155] SKBR3 (ATCC H TB-30) 是通过 IHC 检测具有强 Her2/neu 过表达 (**HercepTest**®得分 +3) 的乳腺癌细胞系 (58)。HCT-8 (ATCC CCL-244) 是结肠癌细胞系, 和 Lox 是黑素瘤细胞系 (表 2)。

[0156] Her2/neu 得分

[0157] HCT-8 细胞的 Her2/neu 状态使用 **HercepTest**[®] 试剂盒 (DAKO, Glostrup, 丹麦) 通过 IHC 评估, 并且由慕尼黑 LMU 的病理学研究所按照供应商的手册进行。

[0158] FACS 分析

[0159] FACS 分析用 5×10^5 靶细胞 (SKBR3, HCT-8 或 Lox) 进行。将细胞用 100ng 单克隆抗体或 100ng 三官能抗体 **Rexomun**[®] 在 4°C 温育 45 分钟。然后, 将样品用不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的磷酸缓冲盐 (PBS) (PAN Biotec, Aidenbach) 洗涤, 并且用相对应的检测抗体 (Dianova, 汉堡) (表 1) 在 4°C 温育 45 分钟。在用 PBS 的另一次洗涤步骤后, 将细胞重悬在含有 $0.01 \mu g/ml$ 溴化乙锭 (西格玛, 慕尼黑) 的 PBS 中。抗体结合的量通过在叠加柱状图中的平均荧光强度进行分析。只具有抗人检测抗体的样品或用 26II6 (抗 CD3) 及其相对应的检测抗体 (同种型对照) 温育的样品作为阴性对照。所有的 FACS 分析都在 FACSCalibur (Becton Dickinson, 海德堡) 上进行, 并且用 CellQuest Pro 或 WinMDI 2.8 分析。

[0160] 产克隆测定

[0161] 抗体介导的肿瘤清除用关于未刺激的效应细胞的长期产克隆测定进行研究。因此, 将 10^6 PBMC 掺入 5% 的靶细胞 (SKBR3, HCT-8 或 Lox), 并且接种在 24 孔平板 (Greiner) 中。将抗体以在表 3 所示的不同浓度和组合加入。单独的靶细胞的样品和由靶细胞和效应细胞的混合物组成而没有添加任何抗体的样品作为对照。将样品在 37°C / 5% CO_2 中温育, 并且每 3 天用 RPMI 1640, L- 谷氨酰胺和 10% FCS 培养。在温育 8 天后, 将细胞从 24 孔平板中收集起来, 用 PBS w/o Mg^{2+}/Ca^{2+} 洗涤, 并且通过锥虫蓝用死细胞排除在 Neubauer 细胞室中计数。然后将活细胞离心在细胞离心涂片器载玻片 (Menzel) 上, 浓度为每载玻片 2.5×10^5 个细胞。将细胞离心涂片器样品干燥过夜, 然后进行免疫细胞化学。实验使用来自 3 名不同供体的 PBMC 重复 3 次。

[0162] 免疫细胞化学

[0163] 将在细胞离心涂片器载玻片上的非特异性结合特征用 10% 的人血清饱和。将 SKBR3 和 HCT-8 细胞用 $1.5 \mu g/$ 载玻片的抗细胞角蛋白 (Cytokeratine) 8, 18, 19 抗体 (A45B-B3, 小鼠 IgG1, Micromet, 慕尼黑) 染色, Lox 细胞用 $1.5 \mu g/$ 载玻片的抗 EGFR 抗体 (小鼠 IgG2a, 由慕尼黑的 Htun 博士馈赠) 染色。用于细胞角蛋白染色的抗 - 小鼠 IgG1Alexa Fluor477 (FITC) 抗体 (Molecular probes (分子探针), Eugene) 或用于 EGFR 染色的抗 - 小鼠 IgG2aAlexa Fluor477 (FITC) 抗体 (Molecular probes (分子探针), Eugene) 以 $1.5 \mu g/$ 载玻片用作检测抗体。将细胞离心涂片器载玻片在微小转移检测系统 (MDS, Applied Imaging (应用成像)) 中使用计数 FITC 标记细胞的计算机化成像分析进行分析。

[0164] 结肠癌细胞系 HCT-8 表现出 +1Her2/neu 表达

[0165] 为了找到具有 +1 的 Her2/neu 表达的细胞系, 在不同细胞系上研究 Her2/neu 的表达水平。

[0166] 因此, 使用单克隆 Her2/neu 抗体 2502A, 520C9, 曲妥单抗和三官能抗体 **Rexomun**[®] 进行 FACS 分析。单克隆抗 CD3 抗体 26II6 作为模拟对照。图 1A-F 显示所用的抗体在 SKBR3, HCT-8 或 Lox 细胞上的结合模式。由于对照作为仅具有不同检测抗体的流式细胞术样品 (图 1A), 同种型对照是具有其相对应的检测抗体的 26II6 (抗 CD3) (图 1B)。

[0167] 黑色素瘤细胞系 Lox---- 如预计 ---- 没有表现出 Her2/neu 受体的表达 (图 1C-F), 而 SKBR3 细胞用单克隆抗体 520C9 (图 1C), 2502A (图 1D) 和曲妥单抗 (图 1E) 针对 Her2/

neu 浓重染色。**Rexomun**[®]染色 SKBR3 细胞至较低的程度,可能是由于其一个结合臂的性质(图 1F)。与 SKBR3 细胞相比,使用所有所用的 Her2 抗体, HCT-8 细胞具有显著更弱的 Her2/neu 受体表达(图 1C-F),进一步证明这些细胞的评估。HCT-8 细胞的 Her2/neu 表达另外使用 DAKO **HercepTest**[®]进行分析。该检测由病理学研究所(慕尼黑 TU)进行。在进行的 DAKO 检测中,结肠癌细胞系 HCT-8 表现出 +1 的 Her2/neu 表达,这证实了 FACS 分析的结果。表 2 显示所用的细胞系、它们的 Her2/neu 得分以及用于确定 Her2/neu 表达的方法的总结。

[0168] **Rexomun**[®]能够在体外杀死 Her2/neu+3 和 Her2/neu+1 细胞系

[0169] **Rexomun**[®]同时召集并且激活不同类型的免疫细胞到肿瘤位点的能力导致这样的假说,即,**Rexomun**[®]还可能能够清除 Her2/neu(1+) 低表达的肿瘤细胞。

[0170] 因此,建立了长期的细胞毒性测定(产克隆测定)。将 3 名健康供体的 PBMC 与表达 Her2/neu+3 的细胞系 SKBR-3、Her2/neu- 阴性 Lox 细胞系或表达 Her2/neu+1 的 HCT-8 细胞系共温育 8 天。如在表 3 所示加入不同抗体浓度的曲妥单抗(100 μ g/ml-1 μ g/ml)或 **Rexomun**[®](100ng/ml-1ng/ml)。在 8 天后通过收集所述细胞,将它们转移到细胞离心涂片器载玻片上,并且用抗 CK8, 18, 19 抗体(SKBR-3 和 HCT-8)或抗 EGFR- 抗体(Lox)和相对应的 Alexa-Fluor FITC 抗体进行细胞染色,而评价肿瘤细胞的杀伤。然后将染色的细胞离心涂片器载玻片在微小转移检测系统(MDS, Applied Imaging(应用成像), 英国)上使用载玻片扫描程序通过计算机化的图像分析进行评估。

[0171] 在本研究中,将三官能抗体**Rexomun**[®](抗 Her2/neu x 抗 CD3)与人源化抗 Her2/neu 单克隆抗体曲妥单抗[®]在其抑制表达低 Her2/neu 的肿瘤细胞系 HCT-8 的肿瘤细胞(HercepTest 得分 :+1) 生长的能力上进行比较。

[0172] 在细胞系 SKBR3(+3Hercep 得分), HCT-8(+1Hercep 得分)和 Lox(Her2/neu 阴性)上的 Her2/neu 表达通过 FACS 分析测量,而 HCT-8 细胞还通过**HercepTest**[®]检测。使用针对 Her2/neu 的不同抗体的 FACS 分析表明在 SKBR3 细胞上的强 Her2 表达,在 HCT-8 细胞上的较弱表达,和在 Lox 细胞上没有 Her2/neu 表达。这些结果对应 HCT-8 细胞的 +1 的**HercepTest**[®]得分。与所述单克隆抗体的二价结合相比,由于**Rexomun**[®]的单价结合(图 1, A-F),所述三官能抗体**Rexomun**[®]的平均荧光值比所述单克隆抗体的值略低。

[0173] 为了检测**Rexomun**[®]和 **Trastuzumab**[®]抑制表达低的 Her2/neu 的细胞系 HCT-8 的生长的能力,进行了产克隆测定。在培养 8 天后,将细胞从培养皿中收集起来,离心到细胞离心涂片器载玻片上,并且对于肿瘤细胞进行染色。在 MDS 中细胞离心涂片器染色后,所有不添加抗体的对照样品(12, 500 肿瘤细胞/24 孔平板)(图 2a-c, 样品 A1, B1, C1)对于细胞系 SKBR3, HCT-8 和 Lox 都表现出肿瘤细胞生长。具有 250000PBMC 无掺加的肿瘤细胞或加入的抗体的载玻片完全没有表现出 ---- 如预计 ---- 肿瘤细胞(图 2a-c, 样品 A2, B2, C2)。肿瘤生长在同种异型对照中也是明显可见的,其中 PBMC 与 5%的 SKBR3, HCT-8 或 Lox 细胞混合而不添加任何抗体(图 2a-c, 样品 A3, B3, C3)。

[0174] Her2+3 细胞系 SKBR-3 的肿瘤细胞生长如预计通过加入 100 μ g, 50 μ g, 10 μ g 和 1 μ g **Trastuzumab**[®]而被抑制(图 2a, 样品 A4-A8)。此外,**Rexomun**[®]还能够通过只加入 100ng, 50ng, 10ng 或 1ng 而抑制肿瘤生长。如在样品 A9-A12(图 2a) 中所示,肿瘤细胞的生

长比使用**Trastuzumab®**得到更有效地抑制。

[0175] Her2/neu 阴性细胞系 LoX 的肿瘤细胞生长既没有通过加入不同量的**Trastuzumab®**也没有被**Rexomun®**抑制,这表明肿瘤细胞清除的特异性是由 Her2/neu 受体的存在而推动的(图 2c,样品 C4-C12)。

[0176] 显著地,结肠癌细胞系 HCT-8(Her2/neu 得分 +1) 的生长没有被不同量的(100 μ g-1 μ g) **Trastuzumab®**(图 2b,样品 B4-B8) 所抑制,其与使用 Her2/neu+1 乳房癌细胞系 MCF-7 的先前的发现相对应(5)。由于 MCF-7 细胞(ATCC HTB-22)表现出对 TNF- α 的生长抑制,所以这些细胞不能用于产克隆测定,因为**rexomun®**如三官能抗体**removab®**(抗 EpCAM x 抗 CD3) 由于其激活特性促进 TNF- α 的分泌(59)。然而,**Rexomun®**能够以低至 100ng,50ng 和 10ng/ 孔的浓度破坏 +1Her2/neu 细胞系 HCT-8(图 2b,样品 B9-B11)。1ng 的**Rexomun®**没有成功地抑制 HCT-8 细胞的肿瘤细胞生长(图 2b,样品 B12)。图 2d 显示使用 HCT-8 细胞作为靶点的供体 2 的产克隆测定的原始 MDS 数据图。

[0177] 总之**Rexomun®**不仅是用于具有 +3 或 +2 过量表达 / 基因扩增的乳房癌患者,而且是用于具有低 Her2/neu 表达水平的患者的治疗选择。

[0178] 实施例 2

[0179] 这里我们描述 Bi20 的生产和功能特征,特别是其用于治疗仅以低水平表达肿瘤抗原 CD20 的患者的治疗的能力,所述 Bi20 是一种针对人 CD3 和人 CD20 的新三官能双特异性抗体。

[0180] CD20 是一种 35-kDa 的非糖基化的磷蛋白,其已被提议作用为钙通道,在 B 细胞分化中起作用。²⁴ 然而,它的准确的功能仍然未知,原因在于 CD20- 缺陷型小鼠表现出正常的 B 细胞发育并且还是表型正常的。²⁵ 出于下述原因选择 CD20 作为定向免疫治疗的靶点:(i) 它专门在正常和恶性 B 细胞上表达,而不在血液前体细胞或在其它人组织中的细胞上表达,²⁶ (ii) 它在大部分 B 细胞淋巴瘤细胞上表达,²⁷ 和 (iii) 当抗体结合时它没有被排出(shed) 或分泌。^{28,29} 此外,CD20 作为肿瘤治疗靶点的适合性已经得到了利妥昔单抗的成功应用,特别与常规化学治疗结合的成功应用的临床验证。

[0181] 在我们目前的研究中,我们详细分析了 Bi20 的体外特征,表明这种 trAb 有效杀伤人 B 细胞肿瘤细胞以及来源于仅表达低水平的 CD20 的 CLL 患者的细胞。对于肿瘤细胞的清除,不需要效应细胞的预先激活,其伴随着典型的 Th1 细胞因子模式和 T 细胞与单核细胞的强激活。作为临床应用重要的先决条件,Bi20 可以以有效量容易地纯化和生产。因此,这种 trAb 可以为目前为止难以治愈的 NHL 和 CLL 患者提供新的治疗选择。

[0182] 材料和方法

[0183] 抗体和试剂

[0184] 将产生 CD20- 特异性的单克隆 IgG2a 抗体的小鼠细胞系 TPA10 与 26II6 融合,这导致产生 Bi20(FBTA05) 的细胞杂交瘤细胞系 TPBs05,所述 26II6 为一种大鼠细胞系,其分泌 CD3- 特异性的 IgG2b 抗体。Catumaxomab (**Removab®**) 用作三官能对照抗体,由 26II6- 来源的 CD3- 特异性臂和抗 EpCAM 特异性组成。利妥昔单抗(**Mabthera®**),嵌合抗 -CD20 抗体,获自罗氏 (Roche) (巴塞尔,瑞士)。抗 -CD20 抗体及相对应的同种型获自 Beckman Coulter Immunotech (Krefeld, 德国)。用于 FACS 分析的所有其它抗体购自 BD 生物学 (BD Biosciences) (海德尔堡,德国)。碘化丙锭获自西格玛化学 (Sigma Chemicals)

(Deisenhofen, 德国)。

[0185] 细胞系和 PBMC 制备

[0186] CLL 细胞系 Mec1 由 Michael Hallek 博士馈赠 (GSF, 慕尼黑, 德国)。Burkitt's 淋巴瘤 (BL) 细胞系 Ramos 获自 ATCC (美国)。BL 细胞系 Raji, NHL 细胞系 DOHH-2 和 Granta, 以及 AML 细胞系 THP-1 购自 DSMZ (Braunschweig, 德国)。细胞生长在补充了 10% 热灭活的 FCS、非必需氨基酸、丙酮酸钠和 L-谷氨酸 (PAN-Biotech) 的 RPMI-1640 培养基 (PAN-Biotech, Aidenbach, 德国) 中。人外周血单核细胞 (PBMCs) 通过使用 PANCOLL (PAN-Biotech) 进行密度梯度离心而分离自健康供体的肝素化的血液。在告知同意后获得来自 CLL 患者的外周血样品。CLL 的诊断是基于标准的临床和实验室标准。在纯化后, CLL 细胞立即使用或者冰冻保存备用。将 CLL 细胞在补充了 10% FCS 的 IMDM (PAN Biotech) 中培育。对于以自体形式的测定, 只使用新鲜制备的 CLL 细胞。

[0187] Bi20 的生成和纯化

[0188] Bi20 应用细胞杂交瘤技术产生。³⁰ 对于与靶细胞结合的 trAb, 通过 FACS 分析检测细胞杂交瘤细胞的上清液。将产生 trAb 的细胞亚克隆几次, 以增加抗体生产的稳定性, 并且建立主细胞库。TrAbs 通过使用 **AKTA** 纯化器 100 (Amersham Biosciences (安玛西亚生物科学), 乌普萨拉, 瑞典) 如所述³¹ 用蛋白质 A 亲和和离子交换层析从所述细胞杂交瘤细胞培养物上清液中纯化。

[0189] 等电聚焦

[0190] 将抗体样品点样到 pH7-11 IsoGel- 琼脂糖 -IEF (Cambrex 生物科学 (Cambrex Bio Science), Rockland, 美国) 上, 并且在 1500V, 50mA, 和 25W 分离 75 分钟。抗体同种型通过用考马斯亮蓝 (西格玛-奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Inc.), 密苏里州, 美国) 染色而显现, 并且对凝胶进行扫描用于分析。

[0191] FACS 分析

[0192] 抗体与靶细胞的结合, 效应细胞的激活, 相对 CD20 表达和细胞亚型组成使用装配有 488-nm 氩气激光的 FACScalibur (BD 生物科学 (BDBiosciences), 海德尔堡, 德国) 通过流式细胞术而进行分析。数据使用 Cellquest 软件 (BD 生物科学) 分析。

[0193] 为了分析抗体结合, 将 5×10^5 细胞 (Ramos, Jurkat, 或 THP-1) 用指定浓度的 Bi20 在 4°C 温育 30 分钟, 用补充了 2% 热灭活 FCS 的 PBS 洗涤, 并且用 FITC- 标记的小鼠抗 - 大鼠 IgG 检测抗体 (Ramos) 或 FITC- 标记的大鼠抗 - 小鼠抗体 (Jurkat, THP-1) 在 4°C 温育 30 分钟。

[0194] 为了表征 Bi20 的激活特性, 将 1×10^6 /ml PBMCs 和 2×10^5 /ml 人肿瘤细胞用指定浓度的抗体在 RPMI 培养基中在 37°C 温育 1、2 和 3 天。对细胞进行收集、洗涤并且用针对 CD25 和 CD69 的 FITC- 或 PE- 标记的检测抗体在 4°C 温育 30 分钟。

[0195] 细胞亚型组成通过将 3×10^6 PBMCs 用下述抗 -CD 抗体混合物 (FITC/PE/APC) : 14/19/5, 4/8/5, 4/8/25, 45/3/5, 和 16/56/5 进行染色而确定。

[0196] B 细胞消耗测定

[0197] Bi20- 介导的 B 细胞消耗使用生物测定进行确定。将获自健康供体的 PBMCs (1×10^6 /ml) 补充 2×10^5 /ml 的指定的肿瘤细胞 (Raji, Ramos, Mec1, DOHH-2, 或 Granta) 或 CLL 患者细胞 (效应器 - 与 - 靶点比例 5:1), 并且在指定浓度的不同抗体的存在下在

1ml 的总体积中进行温育。在第 1、2 和 3 天,对细胞进行收集和洗涤,并且使用 PE- 缀合的抗 -CD19 检测抗体通过 FACS 分析而分析存活的 B 细胞的百分数。存活细胞的总数通过锥虫蓝排除计数而确定。为了检验在自体 CLL 样品中抗体 - 介导的 B 细胞消耗,将从 CLL 患者分离的 PBMCs 以 2×10^6 细胞 /ml 的密度接种,并且在第 0、3 和 6 天以指定的浓度加入抗体。在指定的时间点进行 FACS 测量和锥虫蓝排除计数。

[0198] 细胞因子的测量

[0199] Bi20- 诱导的细胞因子释放在与用于所述 B 细胞消耗实验相同的条件下确定。将来自健康供体的肿瘤 B 细胞系和 PBMCs 用 50ng/ml 的指定抗体温育。3 天后,收集上清液。细胞因子用人 Th1/Th2 细胞计数珠点阵 (CBA, BD 生物科学,海德堡,德国) 测量,其允许同时分析 IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, 和 IL-10。数据获得和分析按照供应商的流程进行。

[0200] 结果

[0201] Bi20 的产生和纯化

[0202] trAb Bi20 在细胞杂交瘤细胞中产生,并且通过蛋白质 A 亲和层析捕获。母体大鼠抗体不与蛋白质 A 结合,并且因此不存在于洗脱物中。然后,杂质如母体小鼠抗体通过阳离子交换层析 (CIEX) 去除 (图 5A)。小鼠抗体在 148mM NaCl 处洗脱下来 (图 5A, 峰 1), 而 trAbs 在 320mM NaCl 处洗脱。纯化的 trAbs 的等电聚焦表现出具有 ~ 8.65 - 8.15 pI 范围的不同的条带模式。TrAbs 只在 CIEX 分离的峰 2 发现。没有检测到污染的母体抗体。

[0203] Bi20 的结合特异性

[0204] 为了证明 Bi20 的三官能性质,我们检验了其特异的靶细胞的结合。我们使用 CD20⁺Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Ramos 来证实 CD20- 结合臂的官能性,CD3⁺T- 细胞系 Jurkat 用于 CD3- 结合臂,并且单核细胞系 THP-1 用来验证 Fc γ -RI 结合 (图 6)。为了证实 Bi20 与 CD20 的结合,用利妥昔单抗进行竞争性结合测定。Bi20 在 Ramos 细胞上的结合可以通过将所述细胞与 21 倍过量的利妥昔单抗预先温育而完全封闭 (图 6A)。类似地, Bi20 与 THP-1 细胞的结合可以被利妥昔单抗竞争掉 (图 6B)。Bi20 与 Jurkat 细胞上的 CD3 的结合与 Bi20 与 Ramos 细胞上的 CD20 的结合相当 (数据未显示)。由于 Bi20 的 CD3- 结合臂与在充分表征的 trAbs catumaxomab 和 ertumaxomab 中相对应的臂相同,所以没有进行关于 CD3- 结合臂的特异性的进一步分析。概言之,这些数据证实 Bi20 的三价结合模式和结合的特异性。

[0205] Bi20 调控 B 细胞消除

[0206] 为了研究 Bi20 对 B 细胞杀伤的作用,我们开发了基于 FACS 的生物测定。将不含任何预刺激或共刺激的新鲜制备的 PBMCs 与肿瘤 B 细胞以 5 : 1 的比例和 50ng/ml 的指定的抗体混合,并且温育 3 天。收集细胞,并且亚群的组成通过 FACS 分析确定。进行锥虫蓝排除计数以获得绝对细胞数。

[0207] 使用 CD20⁺Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Raji 作为靶细胞,用 50ng/ml 的 Bi20 观察有效的 B 细胞清除 (图 7)。作为对照,我们使用不结合 B 细胞 (数据未显示) 的 trAb catumaxomab (抗 -EpCAM x 抗 -CD3), 和母体抗体 26II6 (抗 -CD3) 和 TPA10 (抗 -CD20)。Catumaxomab (Catum) 以及母体抗体的组合诱导一些 B 细胞的清除,可能是由于细胞因子诸如 IFN- γ 和 TNF- α 的释放 (表 4), 表明 Bi20 的抗肿瘤活性确实由其三官能形式引起。在

这些实验条件下（低抗体浓度和 E:T 比例），利妥昔单抗只调控 B 细胞数目的较少的减少。使用 CLL 细胞系 Mec1 获得了相当的数据，其具有比 Raji 细胞低 2.5 倍的 CD20 表达（MFI179 相对 428，数据未显示）。

[0208] 这些结果鼓励我们更详细地分析 Bi20- 调控的 B 细胞消耗。时间动力学分析表明 Raji 细胞只在 24 小时后消耗（图 7B），此时在低至 0.5ng/ml 的抗体浓度消除了至少 35% 的 B 细胞。在 250ng/ml 和 50ng/ml 的 Bi20 浓度，分别在第 2 天和第 3 天观察到完全的 B 细胞消除。使用 Mec1 细胞发现相当的结果（数据未显示）。此外，我们研究了代表其它淋巴瘤实体的 B 细胞系是否可以被有效地杀伤。当将 DOHH-2（滤泡淋巴瘤），Granta（套细胞淋巴瘤），或 Ramos（Burkitt's 淋巴瘤）用作靶细胞时，检测到有效的 B 细胞消耗（数据未显示）。

[0209] Bi20 不依赖于同时发生的 B 细胞结合调控 T 细胞的激活

[0210] 与先前描述的双特异性抗-淋巴瘤抗体相反，其只在用例如抗-CD28 抗体预先刺激后表现出 B 细胞毒性，³² 对于 Bi20 诱导的有效的 B 细胞裂解，T 细胞或单核细胞的预先激活不是必需的。因此，我们询问在 Bi20 结合时效应细胞是否可以被激活。将 PBMCs 和 Raji 细胞用指定的抗体温育，并且通过流式细胞术测量在 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞上的激活标记 CD25 的上调（图 8A）。Bi20 和 catumaxomab 诱导在 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞上的 CD25 的显著的上调，表明所述 trAb 与 CD3 和 CD20 的同时结合对于 T 细胞激活不是必需的。使用母体抗体 26II6（抗-CD3）和 TPA10（抗-CD20）的组合也观察到 CD25 的上调。如预测，利妥昔单抗没有诱导任何 T 细胞激活（图 8A）。

[0211] 如在图 8B 中所示，T 细胞激活依赖于温育时间和抗体浓度，对于最高的 Bi20 浓度（250ng/ml）在第 2 天观察到最大的 CD25 表达。其它激活标记如 CD69 也被上调，尽管只上调更低的程度和持续更短的时间阶段（数据未显示）。

[0212] Bi20 诱导 T 细胞增殖

[0213] 除了 T 细胞激活外，我们确定由不同抗体诱导的 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞数目的增加（图 9）。与 CD4⁺ 亚型相比较，用 Bi20 温育导致 CD8⁺ 亚型的 T 细胞的优先增殖（145% 相对 85% 的 T 细胞扩增），将 CD4⁺:CD8⁺ 比例由 1.8:1 改变到 1.3:1。Catumaxomab 和母体抗体也诱导 T 细胞增殖，但是到比 Bi20 更低的程度。如预测，利妥昔单抗不刺激 T 细胞增殖。显著地，除了所述抗体外不需要任何刺激剂来诱导增殖。

[0214] 单核细胞的激活依赖于同时的 T 细胞结合但不依赖于同时的 B 细胞结合

[0215] 然后，我们阐释 Fc γ -RI/III⁺ 细胞诸如单核细胞/巨噬细胞是否也可以被 Bi20 激活的问题。将 PBMCs 和 Raji 细胞在不同抗体的存在下温育，并且测量 CD14⁺ 细胞的激活。如在图 6A 中所示，trAbs Bi20 和 catumaxomab 诱导在 CD14⁺ 单核细胞/巨噬细胞上的 CD25 的上调，表明同时的 B 细胞结合对于单核细胞的激活不是必需的。相反，利妥昔单抗，其通过它的 Fc 区域结合 B 细胞和单核细胞/巨噬细胞而不是 T 细胞，不诱导 CD14⁺ 细胞的激活。从这些结果我们推论对于佐细胞的激活 T 细胞的结合（engagement）是必需的。

[0216] 我们在不存在恶性 B 细胞时使用略微不同的系统证实了这一结果。将 PBMCs 和 THP-1 细胞在不同抗体的存在下温育，并且通过 CD25 和 CD40 表达监测 CD33⁺THP-1 细胞的激活（图 10B）。所有同时结合 THP-1 细胞和 T 细胞的抗体（Bi20, TPBs01, 26II6）激活 THP-1 细胞。相反，当使用结合 THP-1 和 B 细胞而不结合 T 细胞的抗体（TPA10, 利妥昔单抗）时，

没有观察到激活。不存在 PBMCs 时, THP-1 细胞不被任何抗体激活(数据未显示),表明在我们的实验设计中,T 细胞和单核细胞的同时结合对于单核细胞的激活是绝对的先决条件。

[0217] Bi20 诱导 Th-1 样细胞因子模式

[0218] 由于细胞因子释放是在治疗使用单克隆抗体之后发生的一种免疫反应,³³ 我们研究了由 Bi20 诱导的细胞因子模式。将 PBMCs 与不同的肿瘤细胞(Raji, Ramos, DOHH-2, Granta, 或 Mec1) 和 50ng/ml 的抗体温育。在 3 天后,收集上清液,并且分析 IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, 和 IL-10 的量(表 4)。

[0219] Bi20 诱导高水平的 IL-6,其也在用其它抗体温育后以显著的更低水平检测到。在 Bi20 或 catumaxomab 处理后检测到 TNF- α ,但是在用利妥昔单抗或母体抗体温育后没有检测到 TNF- α 。IL-2 表达的强增加可以仅在用 Bi20 温育后检测到,这证实使用 trAbs 的更早的研究,其表明 IL-2 仅在所有三种结合配偶体(肿瘤细胞、T 细胞和佐细胞)都存在时才释放。¹⁸IL-4, Th2 世代的标记,只是被微量地分泌,而 IFN- γ , 一种 Th1-特异性细胞因子被强烈产生。有趣的是, IL-10,其可以作用为抑制性的细胞因子,也被释放,表明免疫学的逆反应。使用所有细胞系(Raji, Ramos, Mec1, DOHH-2, Granta ;表 4) 获得相似的结果。

[0220] Bi20 调控来源于 CLL 患者的 B 细胞的清除

[0221] 然后我们研究了 Bi20-介导的 B 细胞消耗是否可以通过使用来源于 CLL 患者的细胞而证实。将来自 9 名不同供体的细胞与来自健康供体的 PBMCs 和 Bi20 (5, 50, 或 250ng/ml) 或对照抗体温育,如在图 11 中所示。增加浓度的 Bi20 导致 CLL B 细胞的提高的清除(至多 99%)。利妥昔单抗还诱导显著的 B 细胞消耗,但是即使在 250ng/ml 的浓度,几乎一半的 B 细胞是存活的。这表明,至少在我们的实验设计中,对于来自 CLL 患者的原代肿瘤细胞的清除, trAb Bi20 比利妥昔单抗更加有效得多。在这种情形中,与先前使用 B 细胞系的实验相比较,由 catumaxomab 介导的非特异性 B 细胞消耗基本上是减少的(图 7 和 11)。

[0222] 显著地,甚至在检测表达很低水平的 CD20 的 CLL B 细胞 (CLL2, 3, 和 4 ;图 11A 和 B) 时,几乎所有的 B 细胞都被 Bi20 清除(分别为 99%, 93%, 和 98%)。相反,使用来自相同患者组的细胞,利妥昔单抗表现出更低的功效或没有功效(分别为 76%, 79%, 和 1%)。

[0223] 然后,我们阐释 Bi20 能否在不添加来自健康供体的效应细胞的自体模式中诱导 CLL B 细胞的杀伤的关键问题。因此,我们将来源于 CLL 患者的 PBMCs 用 Bi20 和对照抗体温育。由于不利的 E:T 比例和已知的 CLL 中的 T 细胞无反应性,将细胞温育至少 6 天(除了患者 CLL10 之外),并且每三天加入抗体。B 细胞消耗和 T 细胞激活的分析在第 6 天和第 10 天之间进行,在患者 CLL10 的情形中例外(在第 3 天)。

[0224] 如在表 2 中所总结,在分析的 7 份患者样品中的 3 份中检测到有效的 B 细胞消耗(>85%)。在一份样品(患者 CLL13)中,观察到 65%的肿瘤 B 细胞消耗。有趣地,甚至在很低的 CD20 表达水平也观察到 B 细胞消耗(患者 CLL11, 12 和 13, 图 11B),证实在同种异型形式中获得的结果(图 11A 和 B)。使用相同浓度的利妥昔单抗的对照实验没有表现出或者表现出很低的 CLL B 细胞的减少。

[0225] 有效的 B 细胞消耗似乎取决于效应器-与-靶点的比例(E:T)。具有最佳反应的患者样品 (CLL10, 11, 和 12) 也具有最高的效应细胞百分数。特别地,具有最有利的 E:T 比例的样品 (3.5:1, 来源于患者 CLL10) 只在 3 天后表现出有效的 B 细胞消除。

[0226] CLL T 细胞已知是无反应性的,特别是 CD4 亚型。³⁴ 令人吃惊地,当我们在温育阶

段结束时通过 CD25 的上调而分析 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞亚型的激活时,我们发现在 6 份患者样品中有 5 份已经发生了 CD4⁺ 和 CD8⁺ 亚型的有效激活(表 2)。当将样品用利妥昔单抗处理时没有观察到激活(数据未显示)。这些结果表明,至少在体外,Bi20 可以克服 CLL 样品中的 T 细胞无反应性,甚至在肿瘤细胞的存在下。

[0227] 尽管在用抗-CD20 单克隆抗体利妥昔单抗治疗 B 细胞淋巴瘤(特别与化学治疗结合)中取得有希望的结果,患者最终复发。^{9,35} 因此,存在对于进一步的治疗选择的需求。一种改进可以是使用双特异性抗体,其将效应细胞诸如 T 细胞重新定向至肿瘤细胞。

[0228] 在最近的 10-15 年内,针对 B 细胞-特异性抗原诸如 CD19 或 CD20 的双特异性抗体一直处在广泛的研究中,但是迄今为止只有表现出中等反应的有限的临床数据^{14,36,37} 是可用的。此外,复杂和效率低的制备过程使得很难生产充足量的抗体用于临床应用。这里我们描述了 Bi20 的产生和生产,Bi20 是一种针对 CD20 和 CD3 的新的三官能双特异性抗体。特别地,由于物种-限制的重链/轻链配对,小鼠 IgG2a 和大鼠 IgG2b 的同种型组合以及本文所述的其它三官能双特异性抗体的应用能够产生正确配对的双特异性抗体的高产量生产。³⁰ 这些 trAbs 特征在于同时结合肿瘤细胞、T 细胞和 Fc γ RI/III⁺- 佐细胞,因此增强肿瘤细胞的清除。^{17,18}

[0229] 表明 Bi20 在体外 B 细胞清除中非常有效,不需要任何共同刺激。B 细胞消耗测定证明,甚至在低如 0.5ng/ml 的抗体浓度,在 24 小时后可以清除几乎 70% 的 Raji 肿瘤 B 细胞,在 3 天后具有完全的肿瘤细胞清除。使用代表其它 NHL 实体的 B 细胞系 (Mec1, Granta, 或 DOHH-2), 获得了相似的结果,表明肿瘤细胞的清除不限于这种恶性病的特定的亚组。

[0230] 此外,尽管存在增加的细胞程序性死亡抗性和低 CD20 表达水平,其是 CLL B 细胞的特征,^{27,38,39} 来源于 CLL 患者的 B 细胞也被有效地杀死(图 11A 和 B, 表 5)。同样地,对于有效的 CLL B 细胞清除,T 细胞的预先激活或共同激活不是必需的,这与已经描述的其它双特异性抗体相反。例如,双特异性小鼠抗体 Bis20(小鼠 IgG1CD20x 小鼠 IgG2b CD3) 以在我们的实验中所用的相同 E:T 比例诱导几乎 60% 的 B 细胞消耗,但是具有 10 倍更高的抗体浓度,预先激活的 T 细胞和更短的温育时间。⁴⁰ 在使用抗-CD20x 抗-CD3 抗体的另一研究中,仅在将 PBLs 用 IL-2 预先刺激时,可以获得肿瘤细胞 (Raji) 的裂解。甚至在 1000ng/ml 的双抗体浓度和 20:1 的 E:T 比例,只有约 35% 的细胞被裂解。⁴¹ 此外,关于抗-CD3x 抗-CD19 双抗体, Cochlovius 与同事表明,在 1-2.5 μ g/ml 的抗体浓度,对于有效的 B 细胞裂解,预先激活的 PBLs 和通过 CD28 对 T 细胞的共同刺激是必需的。

[0231] 在 7 份患者样品中的 4 份中, Bi20 诱导有效的肿瘤细胞杀伤,甚至在不添加健康供体 PBMCs 的自体形式中也是如此。显著地,与利妥昔单抗相反,Bi20- 介导的 B 细胞消耗甚至在 CLL 肿瘤细胞的非常低的 CD20 表达水平的存在下也是有效的,其对于自体以及同种异型形式也是真实的(表 5 和图 11)。这一发现与 CLL 研究的临床数据一致,其中利妥昔单抗只表现出作为单一治疗的有限的功效,这可能是由于 CLL 肿瘤细胞的低 CD20 表达。^{3,43}

[0232] 与一些其它的双特异性抗体相反,^{44,45} Bi20 有效地激活 CD4⁺ 和 CD8⁺T- 细胞亚型,甚至在不存在任何共同刺激性分子如抗-CD28 抗体或 IL-2 时。结果,我们检测到高的 INF- γ 水平,其已知是由被刺激的 T 细胞释放的,并且其是 Th1- 型应答的指征。⁴⁶ T 细胞的激活还伴随着两种 T 细胞亚型的增殖。

[0233] 不仅使用健康供体的 T 细胞,而且使用来自 B-CLL 患者的 T 细胞,观察到 T 细胞的

激活(表5)。这些T细胞通常特征在于无反应性,可能是由于低的CD28和T细胞受体表达造成的。^{47,48}在我们的实验中,甚至在没有观察到基本的CLL B细胞消耗的那些样品中检测到CD4⁺和CD8⁺T-细胞亚型的激活。在一些样品(CLL-2, -4, -14)中的有限的B细胞消耗可能是由于短的温育时间,其受到B-CLL细胞在体外的有限的存活能力的限制。最近使用单链CD19x CD3双特异性抗体描述了基于不依赖于共激活剂的T细胞激活的可比较的B细胞消耗,进一步证实所述双特异性抗体形式的功效。^{49,50}因此,我们的结果表明Bi20可能不仅在体外而且在体内克服CLL T细胞无反应性的潜力。

[0234] 除了T细胞之外,Bi20还结合并且激活Fc γ -RI⁺细胞。激活取决于Bi20与T细胞的同时结合,这是因为肿瘤靶细胞和Fc γ -RI⁺细胞的结合对于激活是不充分的,如使用母体抗体TPA10所示(图10A和B)。trAbs的Fc区域的重要性得到我们最近的观察的支持,即,在免疫活性小鼠B细胞淋巴瘤模型中,长期持续的抗肿瘤免疫性的诱导取决于所述trAb的功能Fc部分。在这些实验中,trAb的F(ab)₂片段的使用显著减少了这些小鼠的存活。²⁰这一结果与最近的公布一致⁵¹,其表明,在体外和在小鼠模型中,与单一的双抗体相比较,抗-CD19x抗-Fc γ RIII和抗-CD19x抗-CD3的双抗体组合表现出更高的抗肿瘤活性,尽管在这两种情形中,通过抗-CD28抗体对T细胞的另外的共同刺激是必需的。这些结果表明,由Bi20介导的T细胞和Fc γ -R⁺效应细胞的同时结合和激活比与肿瘤细胞和T细胞单独的结合允许更有效的肿瘤细胞杀伤。

[0235] 综上所述,我们的结果表明,trAb Bi20是肿瘤B细胞消耗的有效诱导剂,其不依赖于任何预先激活或共同激活,甚至在肿瘤细胞的CD20表达非常低时有效。T细胞和辅助免疫细胞的同时激活以及它们重新定向于肿瘤细胞不仅在体外而且在体内克服了关于CLL所述的T细胞无反应性。因此,本文所述的三官能双特异性抗体提供了新的治疗选择,以治疗先前难以治愈的患者中的非霍奇金淋巴瘤和CLL,其中CD20的表达如本发明所述那样低。

[0236] 参考文献

[0237] 1. Greiner TC, Medeiros Li, Jaffe ES. Non-Hodgkin's lymphoma(非霍奇金淋巴瘤). Cancer(癌症). 1995 ;75 :370-380.

[0238] 2. Ries LAG, Harkins D, Krapcho M,等. SEER Cancer Statistics Review(SEER癌症统计学综述),1975-2003. <http://seercancer.gov>. 2006.

[0239] 3. Lin TS, Lucas MS, Byrd JC. Rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia(用于B细胞慢性淋巴细胞白血病的利妥昔单抗). Semin Oncol. (肿瘤学研讨会) 2003 ;30 :483-492.

[0240] 4. Dillman RO. Treatment of low-grade B-cell lymphoma with the monoclonal antibody Rituximab(使用单克隆抗体利妥昔单抗治疗低级B细胞淋巴瘤). Semin Oncol. (肿瘤学研讨会) 2003 ;30 :434-447.

[0241] 5. Blum KA, Bartlett NL. Antibodies for the treatment of diffuse large cell lymphoma(用于治疗弥漫性大细胞淋巴瘤的抗体). Semin Oncol. (肿瘤学研讨会) 2003 ;30 :448-456.

[0242] 6. Moreton P, Hillmen P. Alemtuzumab therapy in B-cell lymphoproliferative disorders(在B细胞淋巴增殖性疾病中的Alemtuzumab治疗). Semin Oncol. (肿瘤学研

会)2003 ;30 :493-501.

[0243] 7.Hiddemann W, Dreyling M, Unterhalt M.Rituximab plus chemotherapy in follicular and mantle cell lymphomas(用在滤泡和套细胞淋巴瘤中的利妥昔单抗加化学治疗).Semin Oncol.(肿瘤学研讨会)2003 ;30 :16-20.

[0244] 8.Montserrat E.Rituximab in chronic lymphocytic leukemia(用于慢性淋巴细胞白血病的利妥昔单抗).Semin Oncol.(肿瘤学研讨会)2003 ;30:34-39.

[0245] 9.Smith MR.Rituximab(monoclonal anti-CD20antibody) :mechanisms of action and resistance(利妥昔单抗(单克隆抗-CD20 抗体):作用和抗性机制).Oncogene(癌基因).2003 ;22 :7359-7368.

[0246] 10.Mavromatis BH, Cheson BD.Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia(用于慢性淋巴细胞白血病的新疗法).Blood Rev.(血液学综述)2004 ;18 :137-148.

[0247] 11.Nagy ZA,Hubner B,Lohning C,等.Fully human,HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells(完全人的HLA-DR-特异性单克隆抗体有效诱导恶性淋巴细胞的程序性死亡).Nat Med.(自然医学)2002 ;8 :801-807.

[0248] 12.Baeuerle PA, Kufer P, Lutterbuse R.Bispecific antibodies for polyclonal T-cell engagement(用于多克隆T细胞结合的双特异性抗体).Curr Opin Mol Ther(现代分子治疗学观点),2003 ;5 :413-419.

[0249] 13.Peipp M,Valerius T.Bispecific antibodies targeting cancer cells.(靶向癌细胞的雙特异性抗体)Biochem Soc Trans.2002 ;30 :507-511.

[0250] 14.Manzke O,Tesch H,Borchmann P,等.Locoregional treatment of low-grade B-cell lymphoma with CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation. I. Clinical phase I evaluation(使用CD3xCD19 双特异性抗体和CD28 共同刺激对低级B细胞淋巴瘤的局部区域治疗.I. I期临床评估).Int J Cancer(国际癌症杂志).2001 ;91 :508-515.

[0251] 15.Manzke O,Tesch H,Lorenzen J,Diehl V,Bohlen H.Locoregional treatment of low-grade B-cell lymphoma with CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation. II. Assessment of cellular immune responses(使用CD3xCD19 双特异性抗体和CD28 共同刺激对低级B细胞淋巴瘤的局部区域治疗.II. 细胞免疫反应评估).Int J Cancer(国际癌症杂志).2001 ;91 :516-522.

[0252] 16.Haagen IA.Performance of CD3xCD19 bispecific monoclonal antibodies in B cell malignancy(CD3xCD19 双特异性单克隆抗体在B细胞恶性病中的表现).Leuk Lymphoma(白血病淋巴瘤).1995 ;19 :381-393.

[0253] 17.Zeidler R,Mysliwietz J,Csanady M,等.The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells(新种类完整双特异性抗体的Fc-区域调控佐细胞和NK细胞的激活,并且诱导肿瘤细胞的直接的吞噬细胞裂解作用).Br J Cancer(英国癌症杂志).2000 ;83 :261-266.

- [0254] 18. Zeidler R, Reisbach G, Wollenberg B, 等. Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing(新种类的完整双特异性抗体对 T 细胞和佐细胞的同时激活导致有效的肿瘤细胞杀伤). *J Immunol.* (免疫学杂志) 1999 ;163 :1246-1252.
- [0255] 19. Lindhofer H, Menzel H, Gunther W, Hultner L, Thierfelder S. Bispecific antibodies target operationally tumor-specific antigens in two leukemia relapse models(在两种白血病复发模型中双特异性抗体可操作性地靶向肿瘤-特异性抗原). *Blood* (血液学). 1996 ;88 :4651-4658.
- [0256] 20. Ruf P, Lindhofer H. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody(三官能双特异性抗体对长期持续的抗肿瘤免疫性的诱导). *Blood* (血液学). 2001 ;98 :2526-2534.
- [0257] 21. Heiss MM, Strohlein MA, Jager M, 等. Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies(使用三官能抗体对恶性腹水的免疫治疗). *Int J Cancer* (国际癌症学杂志). 2005 ;117 :435-443.
- [0258] 22. Riesenberger R, Buchner A, Pohla H, Lindhofer H. Lysis of prostate carcinoma cells by trifunctional bispecific antibodies(α EpCAM $\times$ α CD3)(三官能双特异性抗体(α EpCAM $\times$ α CD3)对前列腺癌细胞的裂解). *J Histochem Cytochem* (组织化学细胞化学杂志). 2001 ;49 :911-917.
- [0259] 23. Kiewe P, Hasmler S, Kahlert S, 等. Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 $\times$ anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer(三官能抗-HER2 $\times$ 抗-CD3 抗体 ertumaxomab 在转移性乳腺癌中的 I 期试验). *Clin Cancer Res.* (临床癌症研究) 2006 ;12 :3085-3091.
- [0260] 24. Tedder TF, Engel P. CD20 : a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes(CD20 : B 淋巴细胞的细胞周期发展的调控子). *Immunol Today* (今日免疫学). 1994 ;15 :450-454.
- [0261] 25. O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption(携带 CD20 基因分裂的小鼠). *Immunogenetics* (免疫遗传学). 1998 ;48 :125-132.
- [0262] 26. Nadler LM, Ritz I, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin(识别 B 细胞来源的淋巴恶性病的独特的细胞表面抗原). *J Clin Invest.* (临床研究杂志) 1981 ;67 :134-140.
- [0263] 27. Delgado J, Matutes E, Morilla AM, 等. Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders(CD20 和 FMC7 在 B 细胞疾病中的表达的诊断重要性). *Am J Clin Pathol.* (美国临床病理学杂志) 2003 ;120 :754-759.
- [0264] 28. Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, Pinkus GS, Schlossman SF, Nadler LM. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas : a model of human B cell differentiation(人 B 细胞相关抗原在白血病和淋巴瘤上的表达 : 人 B 细胞分化模型). *Blood.* (血液学) 1984 ;63 :1424-1433.

- [0265] 29. Press OW, Howell-Clark J, Anderson S, Bernstein I. Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells(人淋巴瘤细胞对 B 细胞特异性单克隆抗体的保持). Blood(血液学). 1994 ;83 :1390-1397.
- [0266] 30. Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, Thierfelder S. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies(在大鼠/小鼠细胞杂交瘤中配对的优先物种限定性的重链/轻链. 双特异性抗体单步骤纯化的暗示). J Immunol. (免疫学杂志) 1995 ;155 :219-225.
- [0267] 31. Ruf P, Jager M, Ellwart J, Wosch S, Kusterer E, Lindhofer H. Two new trifunctional antibodies for the therapy of human malignant melanoma(用于治疗人恶性黑素瘤的两种新的三官能抗体). Int J Cancer. (国际癌症学杂志) 2004 ;108 :725-732.
- [0268] 32. Cochlovius B, Kipriyanov SM, Stassar MJ, 等. Treatment of human B cell lymphoma xenografts with a CD3x CD19 diabody and T cells(用 CD3xCD19 双抗体和 T 细胞治疗人 B 细胞淋巴瘤异种移植物). J Immunol. (免疫学杂志) 2000 ;165 :888-895.
- [0269] 33. Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab, TDEC-C2B8) (在用抗-CD20 单克隆抗体(利妥昔单抗, TDEC-C2B8) 治疗后, 在患有 B 细胞慢性淋巴细胞白血病和高淋巴细胞计数的患者中的细胞因子-释放综合征). Blood(血液学). 1999 ;94 :2217-2224.
- [0270] 34. B artik MM, Welker D, Kay NE. Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukemia(在 B 细胞慢性淋巴细胞白血病中的免疫细胞功能的损害). Semin Oncol. (肿瘤学研讨会) 1998 ;25 :27-33.
- [0271] 35. Ghelmini M. Multimodality therapies and optimal schedule of antibodies: Rituximab in lymphoma as an example(抗体的多形态性治疗和最佳时间表: 在淋巴瘤中的利妥昔单抗作为实例). Hematology(血液学) (Am Soc Hematol Educ Program(美国血液学教育计划学会)). 2005 ;321-328.
- [0272] 36. Weiner GJ, De Gast GC. Bispecific monoclonal antibody therapy of B-cell malignancy(B 细胞恶性病的双特异性单克隆抗体治疗). Leuk Lymphoma(白血病淋巴瘤). 1995 ;16 :199-207.
- [0273] 37. De Gast GC, Van Houten AA, Haagen IA, 等. Clinical experience with CD3x CD19 bi specific antibodies in patients with B cell malignancies. (在患有 B 细胞恶性病的患者中使用 CD3x CD19 双特异性抗体的临床经验). J Hematother 1995 ;4 :433-437.
- [0274] 38. Huh YO, Keating MJ, Saffer HL, Jilani I, Lerner S, Albitar M. Higher levels of surface CD20 expression on circulating lymphocytes compared with bone marrow and lymph nodes in B-cell chronic lymphocytic leukemia(在 B 细胞慢性淋巴细胞白血病中, 与骨髓和淋巴结相比, 表面 CD20 在循环的淋巴细胞上的表达的更高水平). Am J Clin Pathol. (美国临床病理学杂志) 2001 ;116 :437-443.

[0275] 39. Reed JC, Kitada S, Kim Y, Byrd J. Modulating apoptosis pathways in low-grade B-cell malignancies using biological response modifiers(使用生物反应调节剂调节在低级B细胞恶性病中的程序性细胞死亡途径). *Semin Oncol.* (肿瘤学研讨会) 2002 ;29 :10-24.

[0276] 40. Withoff S, Bijman MN, Stel AJ, 等. Characterization of BIS20x3, anti-specific antibody activating and retargeting T-cells to CD20-positive B-cells(BIS20x3,一种激活并且使T细胞重新靶向CD20阳性B细胞的双特异性抗体的表征). *Br J Cancer*(英国癌症学杂志). 2001 ;84 :1115-1121.

[0277] 41. Xiong D, Xu Y, Liu H, 等. Efficient inhibition of human B-cell lymphoma xenografts with an anti-CD20x anti-CD3 bispecific diabody(抗-CD20x抗-CD3双特异性双抗体对人B细胞淋巴瘤异种移植物的有效抑制). *Cancer Lett.* (癌症通讯) 2002 ;177 :29-39.

[0278] 42. Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Strauss G, Little M. Bispecific CD3xCD19 diabody for T cell-mediated lysis of malignant human B cells(用于T细胞介导的恶性人B细胞裂解的双特异性CD3x CD19双抗体). *Int J Cancer*(国际癌症学杂志). 1998 ;77 :763-772.

[0279] 43. Nguyen DT, Amess JA, Doughty H, Hendry L, Diamond LW. IDEC-C2B8 anti-CD20 (Rituximab) immunotherapy in patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma and lymphoproliferative disorders: evaluation of response in 48 patients(在患有低级非霍奇金淋巴瘤和淋巴增殖疾病的患者中的 IDEC-C2B8 抗-CD20(利妥昔单抗)免疫治疗:对48名患者的反应的评估). *Eur J Haematol*(欧洲血液学杂志). 1999 ;62 :76-82.

[0280] 44. Manzke O, Berthold F, Huebel K, Tesch H, Diehl V, Bohlen H. CD3xCD19 bispecific antibodies and CD28 bivalent antibodies enhance T-cell reactivity against autologous leukemic cells in pediatric B-ALL bone marrow(CD3xCD19双特异性抗体和CD28二价抗体增加T细胞针对小儿科B-ALL骨髓中的自体白血病细胞的反应性). *Int J Cancer*(国际癌症学杂志). 1999 ;80 :715-722.

[0281] 45. Manzke O, Titzer S, Tesch H, Diehl V, Bohlen H. CD3x CD19 bispecific antibodies and CD28 costimulation for locoregional treatment of low-malignancy non-Hodgkin's lymphoma(用于低恶性非霍奇金淋巴瘤局部治疗的CD3x CD19双特异性抗体和CD28共同刺激). *Cancer Immunol Immunother.* (癌症免疫学免疫治疗) 1997 ;45 :198-202.

[0282] 46. Berenson LS, Ota N, Murphy KM. Issues in T-helper1 development--resolved and unresolved(在T辅助细胞1发育中的问题——解决的和未解决的). *Immunol Rev.* (免疫学综述) 2004 ;202 :157-174.

[0283] 47. Mellstedt H, Choudhury A. T and B cells in B-chronic lymphocytic leukaemia(B慢性淋巴细胞白血病中的T和B细胞): Faust, Mephistopheles and the pact with the Devil. *Cancer Immunol Immunother.* (癌症免疫学免疫治疗) 2006 ;55 :210-220.

[0284] 48. Rossi E, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Heffernan AM, Catovsky D. Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia (ζ 链和 CD28 在来自慢性淋巴细胞白血病的 T 淋巴细胞上很少表达). *Leukemia* (白血病). 1996 ;10 :494-497.

[0285] 49. Dreier T, Lorenczewski G, Brandl C, 等. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody (由单链双特异性抗体催化的针对淋巴瘤细胞的极其有力的、快速和不依赖于共同刺激的细胞毒性 T 细胞反应). *Int J Cancer* (国际癌症学杂志). 2002 ;100 :690-697.

[0286] 50. Löffler A, Gruen M, Wuchter C, 等. Efficient elimination of chronic lymphocytic leukaemia B cells by autologous T cells with a bispecific anti-CD19/anti-CD3 single-chain antibody construct (使用双特异性抗-CD19/抗-CD3 单链抗体构建体通过自体 T 细胞有效清除慢性淋巴细胞白血病 B 细胞) *Leukemia* (白血病). 2003 ;17 :900-909.

[0287] 51. Kipriyanov SM, Cochlovius B, Schafer HJ, 等. Synergistic antitumor effect of bispecific CD19x CD3 and CD19x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma (双特异性 CD19x CD3 和 CD19x CD16 双抗体在非霍奇金淋巴瘤预临床模型中的协同抗肿瘤作用). *J Immunol.* (免疫学杂志) 2002 ;169 :137-144.

[0288] 52. Slamon DJ, Clark GM, Wong SC, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene (人乳腺癌: 具有 HER-2/neu 癌基因扩增的复发和存活的相关性). *Science* (科学) 1987 ;235 (4785) :177-82.

[0289] 53. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE 等. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer (在人乳腺癌和卵巢癌中的 HER-2/neu 原癌基因的研究). *Science* (科学) 1989 ;244 (4905) :707-12.

[0290] 54. Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer (erbB-2/neu/HER-2 的生物学及其在癌症中的作用). *Biochem. Biophys. Acta* 1994 ;1198 (2-3) :165-84.

[0291] 55. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C 等. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies (人肿瘤细胞系对抗-p185HER2 单克隆抗体的不同反应). *Cancer Immunol. Immunother.* (癌症免疫学免疫治疗学) 1993 ;37 (4) :255-63.

[0292] 56. Sarup JC, Johnson RM, King KL, Fendly BM, Lipari MT, Napier MA 等. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth (刺激受体作用和抑制肿瘤细胞生长的抗-p185HER2 单克隆抗体的表征). *Growth Regul.* (生长调控) 1991 ;1 (2) :72-82.

[0293] 57. Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, Romond E, Hiller W, Park K 等. Real-world

performance of HER2testing--ational Surgical Adjuvant Breastand Bowel Project experience(HER2 检测的实际表现 ----ational 手术辅助的乳腺和肠项目经验). J. Natl. Cancer Inst. (国家癌症研究所杂志)2002 ;94(11) :852-4.

[0294] 58.Hudziak RM, Lewis GD, Winget M, Fendly BM, Shepard HM, UllrichA. p185HER2monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro andsensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor(p185HER2 单克隆抗体在体外具有抗增殖作用,并且使人乳腺肿瘤细胞对肿瘤坏死因子敏感). Mol. Cell Biol. (分子细胞生物学)1989 ;9(3) :1165-72.

[0295] 59.Zeidler R, Mayer A, Gires O, Schmitt B, Mack B, Lindhofer H 等 .TNFalpha contributes to the antitumor activity of a bispecific, trifunctionalantibody(TNF α 构成双特异性、三官能抗体的抗肿瘤活性). Anticancer Res. (抗癌研究)2001 ;21(5) :3499-503.

[0296]

抗体名称	抗体类型	特异性	同种型	检测抗体 (FITC)
Rexomun*	三官能	Her2/neux CD3	小鼠 IgG2ax 大鼠 IgG2b	抗大鼠 IgGH+L FITC
曲妥单抗 \$	单克隆	Her2/neu	人 IgG1	抗人 IgG1 FITC
520C9	单克隆	Her2/neu	小鼠 IgG1	抗小鼠 IgG1 FITC
EGFR-1	单克隆	EGFRI	小鼠 IgG2a	Alexa Fluor477 抗小鼠 IgG2a
A45-B-B3#	单克隆	CK8, 18, 19	小鼠 IgG1	Alexa Fluor477 抗小鼠 IgG1

[0297] 表 1 :所用抗体及它们相对应的检测抗体的特征

[0298] *TRION Pharma, 慕尼黑, \$Roche, #Micromet, 慕尼黑

[0299]

细胞系	来源	在细胞表面上的分子数 *	Her2/neu 得分	方法
SKBR3	乳腺	1.000.000-20.000.000	+3	HercepTest, FACS
HCT-8	结肠	80.000-110.000	+1	HercepTest, FACS
Lox	黑素瘤	<20.000	阴性	FACS, 细胞离心 涂片器

[0300] 表 2 :所用的细胞系及它们的 Her2/neu 得分

[0301] *:依据 Ross 等, Molecular and Cellular Proteomics(分子和细胞蛋白质组学)3 :379-398, 2004

[0302]

PBMC + SKBR3 (Her2+3)			PBMC + HCT-8 (Her2+1)			PBMC + Lox (Her2 0)			对照样品		
	曲妥单抗	rexomun		曲妥单抗	rexomun		曲妥单抗	rexomun		细胞	Ab
A4	100 µg/ml	--	B4	100 µg/ml	--	C4	100 µg/ml	--	A2,B2,C2	PBMC	--
A5	50 µg/ml	--	B5	50 µg/ml	--	C5	50 µg/ml	--	A1	SKBR3	--
A6	20 µg/ml	--	B6	20 µg/ml	--	C6	20 µg/ml	--	B1	HCT-8	--
A7	10 µg/ml	--	B7	10 µg/ml	--	C7	10 µg/ml	--	C1	Lox	--
A8	1 µg/ml	--	B8	1 µg/ml	--	C8	1 µg/ml	--	A3	PBMC+	--
A9		100ng/ml	B9		100ng/ml	C9		100ng/ml	B3	PBMC+	--
A10	--	50ng/ml	B10	--	50ng/ml	C10	--	50ng/ml	C3	PBMC+	--
A11	--	10ng/ml	B11	--	10ng/ml	C11	--	10ng/ml		Lox	
A12	--	1ng/ml	B12	--	1ng/ml	C12	--	1ng/ml			

表3: 产克隆测定样品

Ab = 抗体, µg = 微克, ng = 纳克

[0303] 表 4 :Bi20 调控的细胞因子分泌

[0304]

		INF γ	IL-6	TNF α	IL-10	IL-4	IL-2
Raji	阴性	8947	821	420	81	16	1299
	Bi20	143631	7503	1261	2012	101	11559
	Catum	157624	3505	741	433	16	10
	利妥昔单抗	24148	3702	411	90	13	748
	26II6/TPA10	61910	5050	112	555	10	8
Mec1	阴性	13086	1109	486	641	20	1257
	Bi20	49905	5773	1347	3101	70	3457
	Catum	131770	2962	1758	1222	12	10
	利妥昔单抗	32225	3666	205	268	17	700
	26II6/TPA10	43951	2393	428	652	19	8
Ramos	阴性	6336	214	264	114	46	112
	Bi20	67806	4524	1033	3298	22	1256
	Catum	97615	2408	762	1156	53	10
	利妥昔单抗	13413	1570	188	148	24	73
DOHH-2	阴性	68	117	14	30	5	17
	Bi20	110309	4314	402	1543	22	13
	Catum	116321	2980	168	578	6	20
	利妥昔单抗	242	440	16	24	10	22
Granta	阴性	8393	355	391	157	16	228
	Bi20	92807	6968	2479	1652	39	3939
	Catum	184439	3364	1518	444	19	6
	利妥昔单抗	16259	3496	154	105	12	74

[0305]

表5: Bi20在体外以自体形式调控的CLL B细胞的消除

患者	B 细 胞 (%)	T 细 胞 (%)	CD20 MFI	E:T	[Ab] ng/ml	第 几 天	B细胞消耗(%)		T细胞激活
							Bi20	Rit	
CLL 2	89.3	4.6	40	1:16	250	6	18	16	++
CLL 4	90	3.4	15	1:22	500	6	3	7	++
CLL 10	22.2	54.1	120	3:5:1	200	3	88	n.d.	++
CLL 11	62	21.9	13	1:2.1	500	6	89	36	++
CLL 12	56	24.2	22	1:1.7	500	9	100	0	n.d.
CLL 13	86	15.6	31	1:4.3	500	10	65	10	-
CLL 14	76.8	10.9	41	1:5.2	250	6	0	0	++

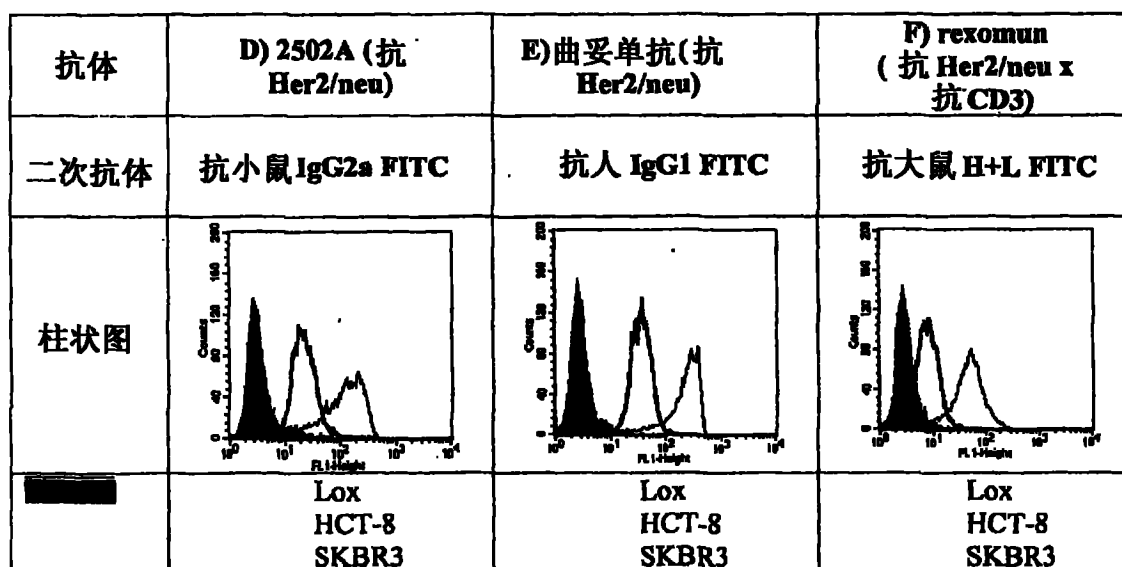
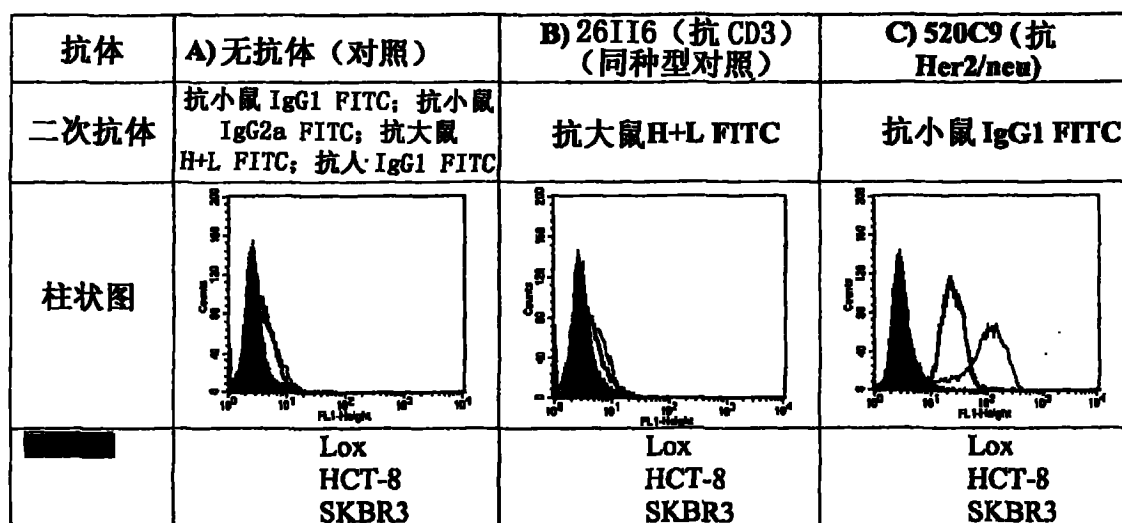
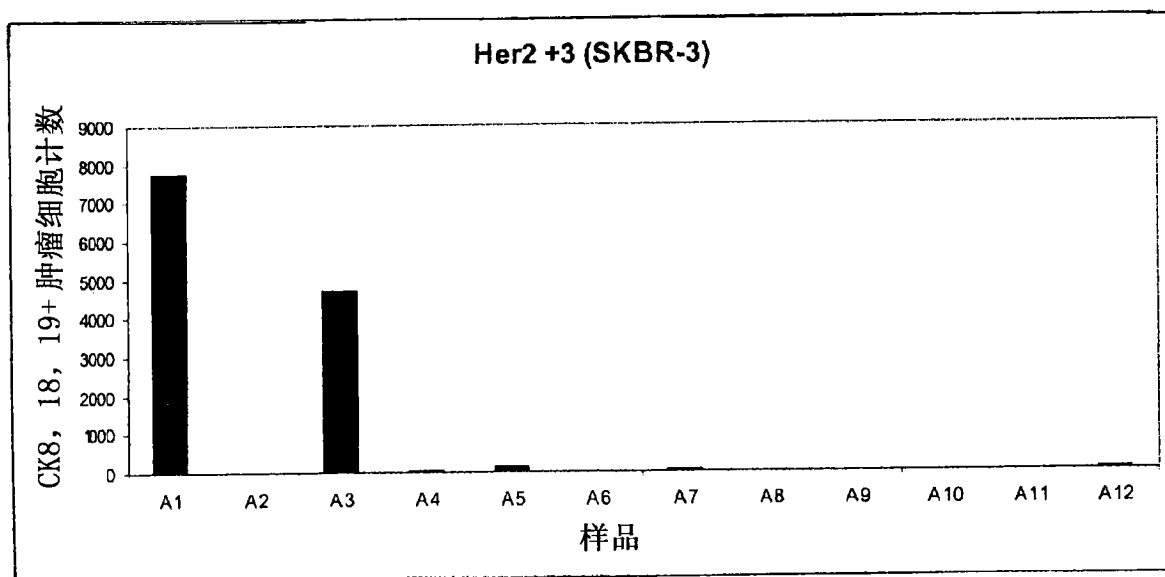
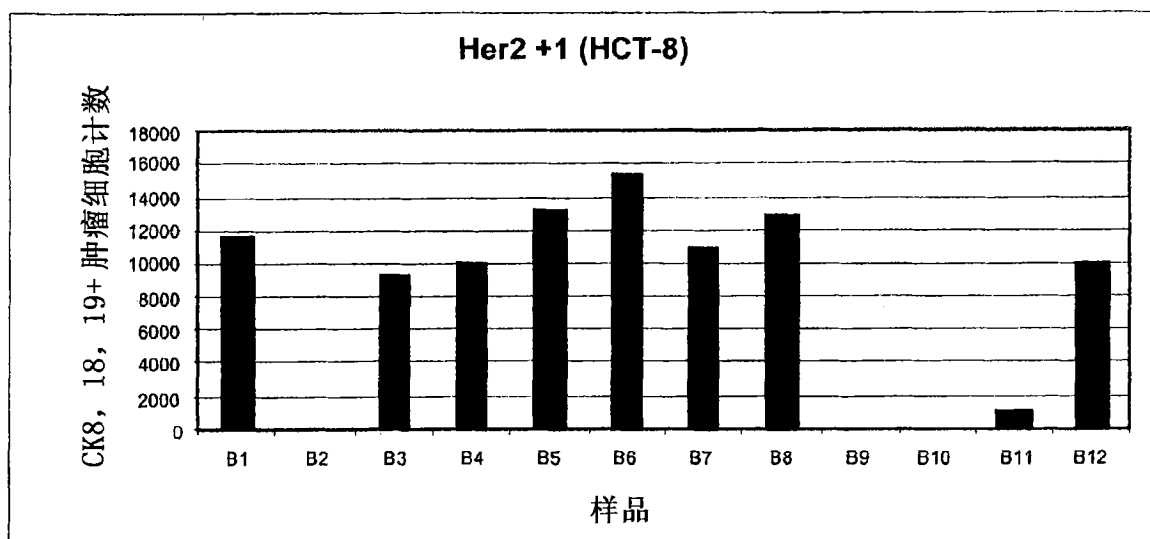


图 1 :A—F, 细胞系 Lox, HCT-8 和 SKBR3 的 Her2 / neu 表达模式谱, 其
通过流式细胞术测量不同的抗 Her2 抗体。



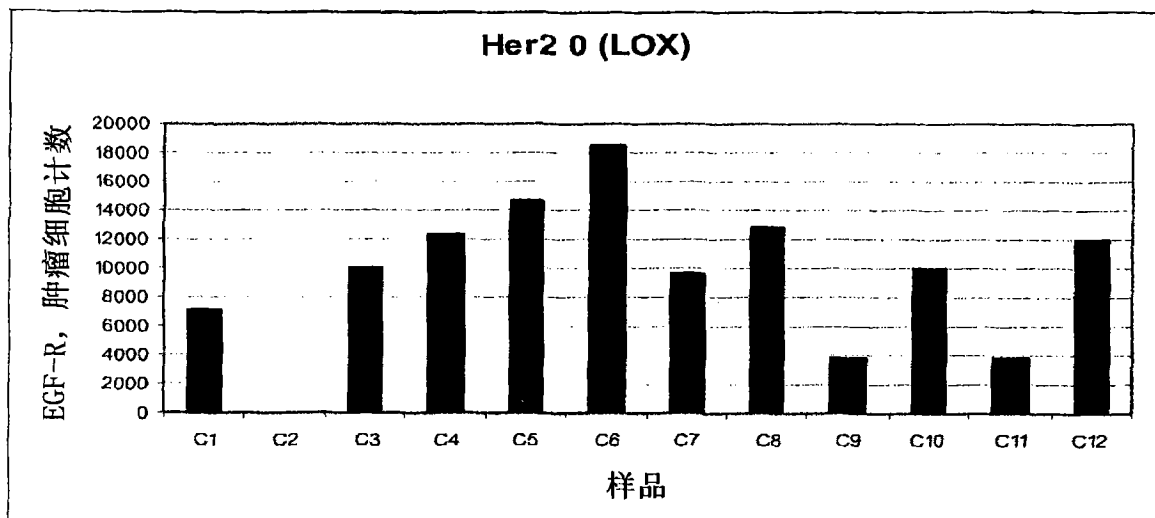
*	Her2 +3	供体1	供体2	供体3	平均值
A1	SKBR-3	2470	14939	5920	7776
A2	PBMC	0	0	0	0
A3	PBMC + SKBR3	12452	1682	0	4711
A4	PBMC+SKBR3+100 μ g 曲妥单抗	57	0	n.d.	29
A5	PBMC+SKBR3+50 μ g 曲妥单抗	286	6	n.d.	146
A6	PBMC+SKBR3+20 μ g 曲妥单抗	23	18	n.d.	21
A7	PBMC+SKBR3+10 μ g 曲妥单抗	149	22	0	57
A8	PBMC+SKBR3+1 μ g 曲妥单抗	19	10	0	10
A9	PBMC+SKBR3+100 ng rexomun	0	0	0	0
A10	PBMC+SKBR3+50 ng rexomun	0	15	n.d.	8
A11	PBMC+SKBR3+10 ng rexomun	0	0	n.d.	0
A12	PBMC+SKBR3+1 ng rexomun	75	0	0	25

图 2a :Her2+3 SKBR-3 细胞的杀伤 :使用微小转移检测系统进行的绘图分析 ;* 与表 3 相对应的数目



*	Her2 +1	供体 1	供体 2	供体 3	平均值
B1	HCT-8	12134	14460	8020	11538
B2	PBMC	0	0	0	0
B3	PBMC + HCT-8	8094	14031	5929	9351
B4	PBMC+HCT8+100 μ g 曲妥单抗	14115	5640	n.d.	9878
B5	PBMC+HCT8+50 μ g 曲妥单抗	12765	13530	n.d.	13148
B6	PBMC+HCT8+20 μ g 曲妥单抗	16473	14020	n.d.	15247
B7	PBMC+HCT8+10 μ g 曲妥单抗	18589	13676	179	10815
B8	PBMC+HCT8+1 μ g 曲妥单抗	20353	14325	3667	12782
B9	PBMC+HCT8+100 ng rexomun	198	13	0	70
B10	PBMC+HCT8+50 ng rexomun	63	16	n.d.	40
B11	PBMC+HCT8+10 ng rexomun	257	1778	n.d.	1018
B12	PBMC+HCT8+1 ng rexomun	15199	12941	1542	9894

图 2h :Hpr2+1 HCT-8 细胞的杀伤 :使用微小转移检测系统进行的绘图分析 ;* 与表 3 相对应的数目



* Her2 0		供体 1	供体 2	供体 3	平均值
C1	Lox	10334	10334	852	7173
C2	PBMC	0	0	0	0
C3	PBMC + Lox	4387	23096	2740	10074
C4	PBMC+Lox+100 μ g 曲妥单抗	6611	17992	n.d.	12302
C5	PBMC+Lox+50 μ g 曲妥单抗	9758	19623	n.d.	14691
C6	PBMC+Lox+20 μ g 曲妥单抗	11730	25364	n.d.	18547
C7	PBMC+Lox+10 μ g 曲妥单抗	4745	20176	4287	9736
C8	PBMC+Lox+1 μ g 曲妥单抗	3267	28197	6980	12815
C9	PBMC+Lox+100 ng rexomun	8712	2488	332	3844
C10	PBMC+Lox+50 ng rexomun	7859	11978	n.d.	9919
C11	PBMC+Lox+10 ng rexomun	4202	3469	n.d.	3836
C12	PBMC+Lox+1 ng rexomun	5674	22853	7313	11947

图 2c : 阴性 Her2 Lox 细胞的杀伤 : 使用微小转移检测系统进行的
绘图分析 : * 与表 3 相对应的数目

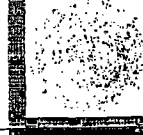
*	样品	肿瘤 细胞 计数	绘图	*	样品		绘图
B1	HCT-8	14460		B7	PBMC + HCT-8 + 10 μ g 曲妥单抗	13676	
B2	PBMC	0	没有检测 到肿瘤 细胞	B8	PBMC + HCT-8 + 1 μ g 曲妥单抗	14325	
B3	PBMC + HCT-8	14031		B9	PBMC + HCT-8 + 100 ng rexomun	13	
B4	PBMC + HCT-8 + 100 μ g 曲妥单抗	5640		B10	PBMC + HCT-8 + 50 ng rexomun	16	
B5	PBMC + HCT-8 + 50 μ g 曲妥单抗	13530		B11	PBMC + HCT-8 + 10 ng rexomun	1778	
B6	PBMC + HCT-8 + 20 μ g 曲妥单抗	14020		B12	PBMC + HCT-8 + 1 ng rexomun	12941	

图 2d :Her2 1+HCT-8 细胞的杀伤 :供体 2 作为 MDS 工作流程
的实例的绘图结果 ; * 与表 3 相对应的数目

	pg/ml IFN-g (1:50)	pg/ml TNF-a (1:50)	pg/ml IL-10 (1:1)	pg/ml IL-6 (1:50)	pg/ml IL-4 (1:1)	pg/ml IL-2 (1:1)
来自下列的上清液						
PBMC	0	0	19	553	0	2
PBMC + HCT-8	773	261	1545	22102	10	0
PBMC + HCT-8 + 50 μ g 曲妥单抗	0	269	1981	27466	5	0
PBMC + HCT-8 + 100 ng 曲妥单抗	1617	571	1703	32259	0	1
PBMC + HCT-8 + 100 ng rexomun	52479	4499	4135	40740	121	703
PBMC + HCT-8 + 1 ng rexomun	0	433	1780	23694	71	2

图 3 :使用细胞因子珠阵列系统 (CBA) 测量 24 小
时在产克隆测定上清中的细胞因子分泌

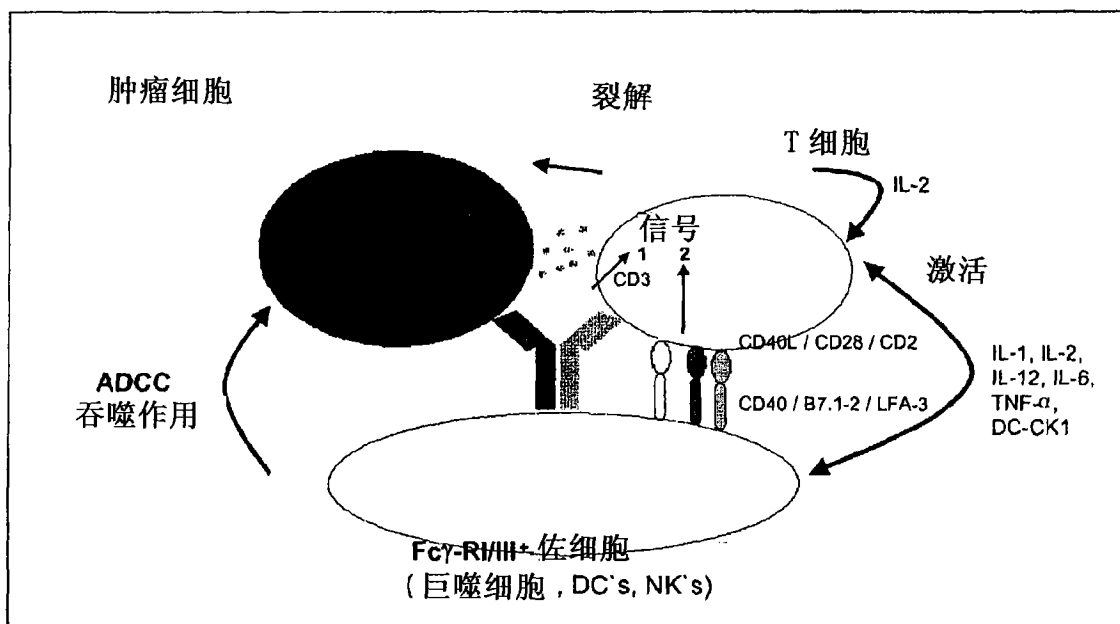


图 4:假设的三细胞复合物。三官能抗体能够通过不同的免疫学机制加速对肿瘤细胞的识别和破坏。注释:ADCC, 抗体依赖性细胞的细胞毒性;DC, 树突细胞;NK, 天然杀伤细胞;DC-CK1, 树突细胞细胞因子 1;IL, 白介素;LFA, 白细胞功能相关抗原;TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ;CD, 分化簇 (摘自 Ruf 和 Lindhofer, 2001)

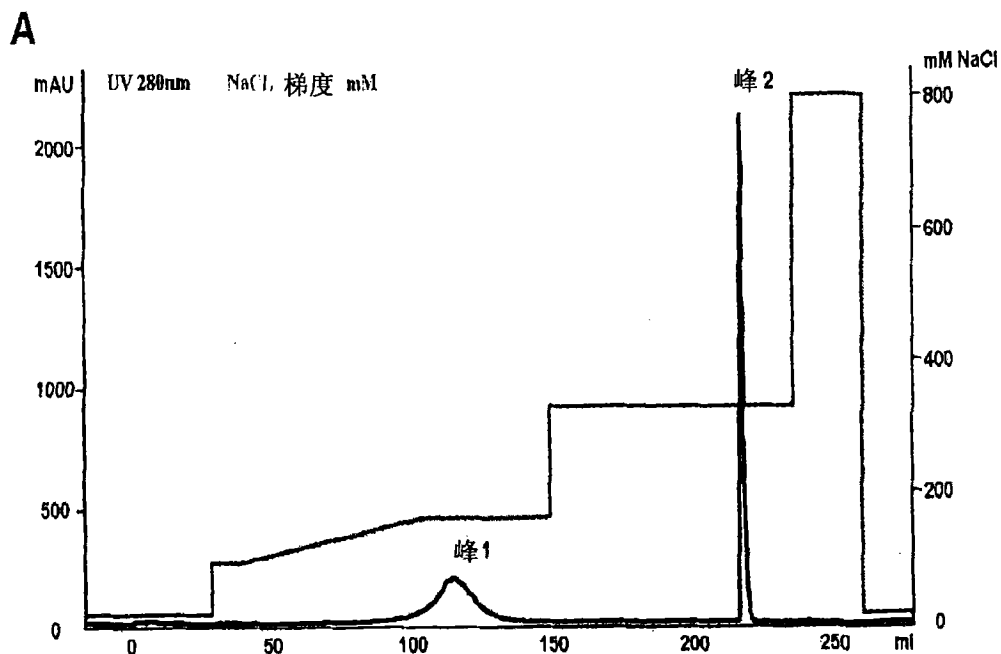
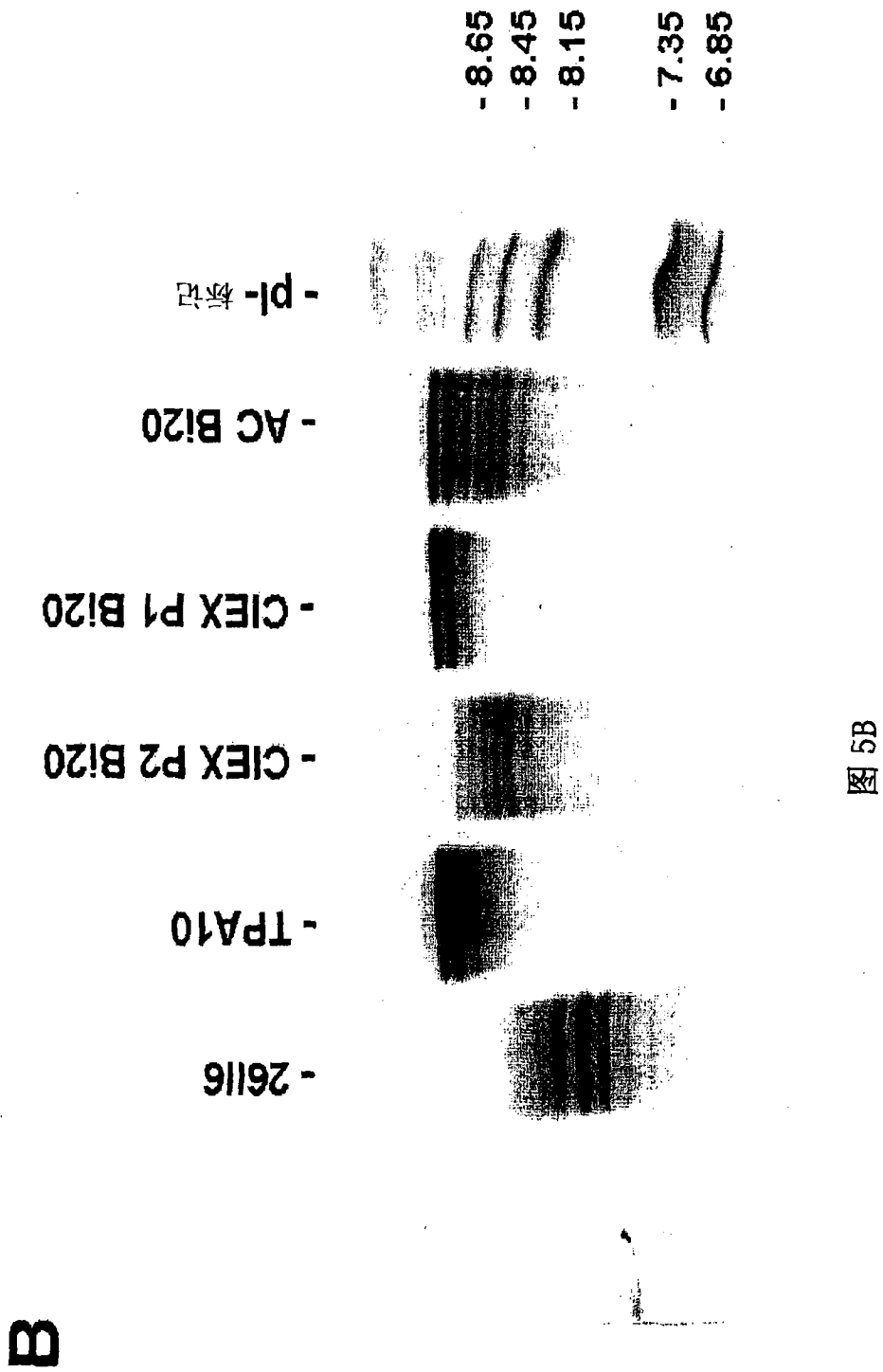


图 5A



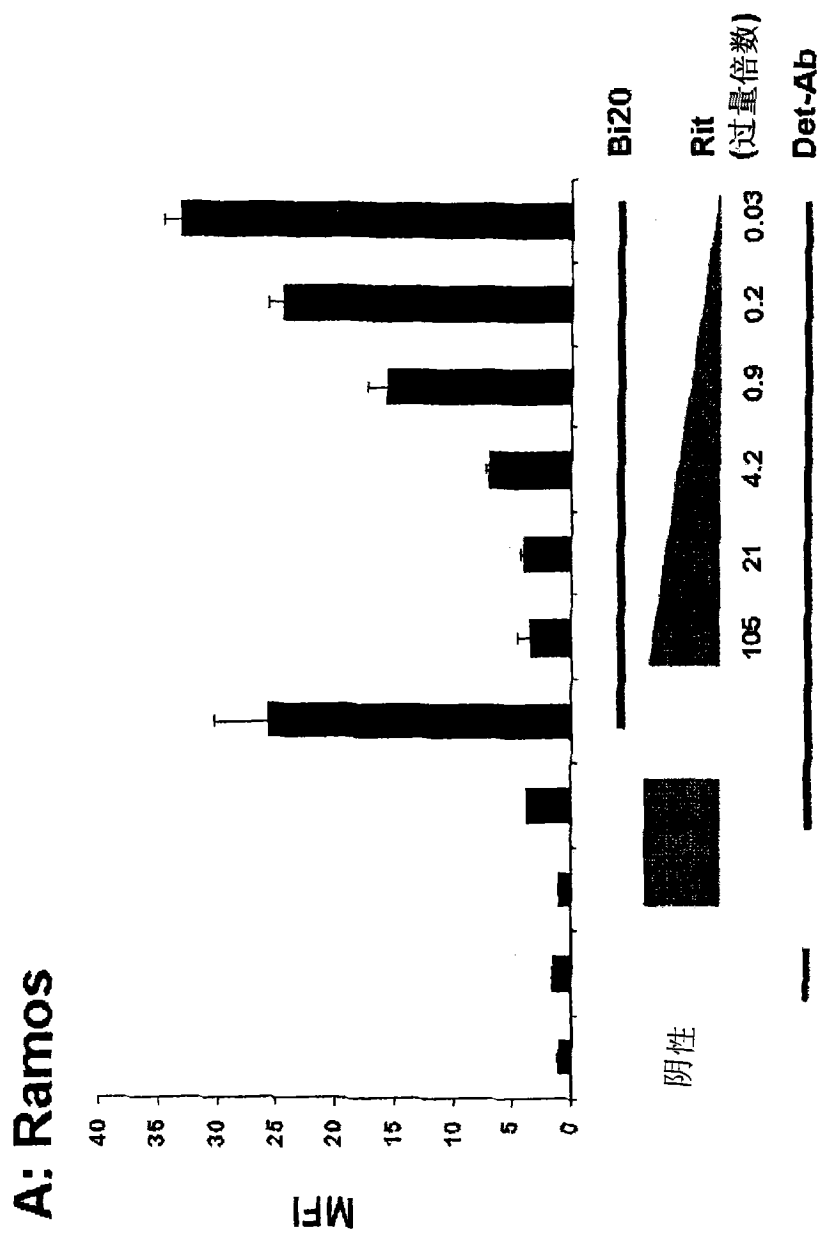


图 6A

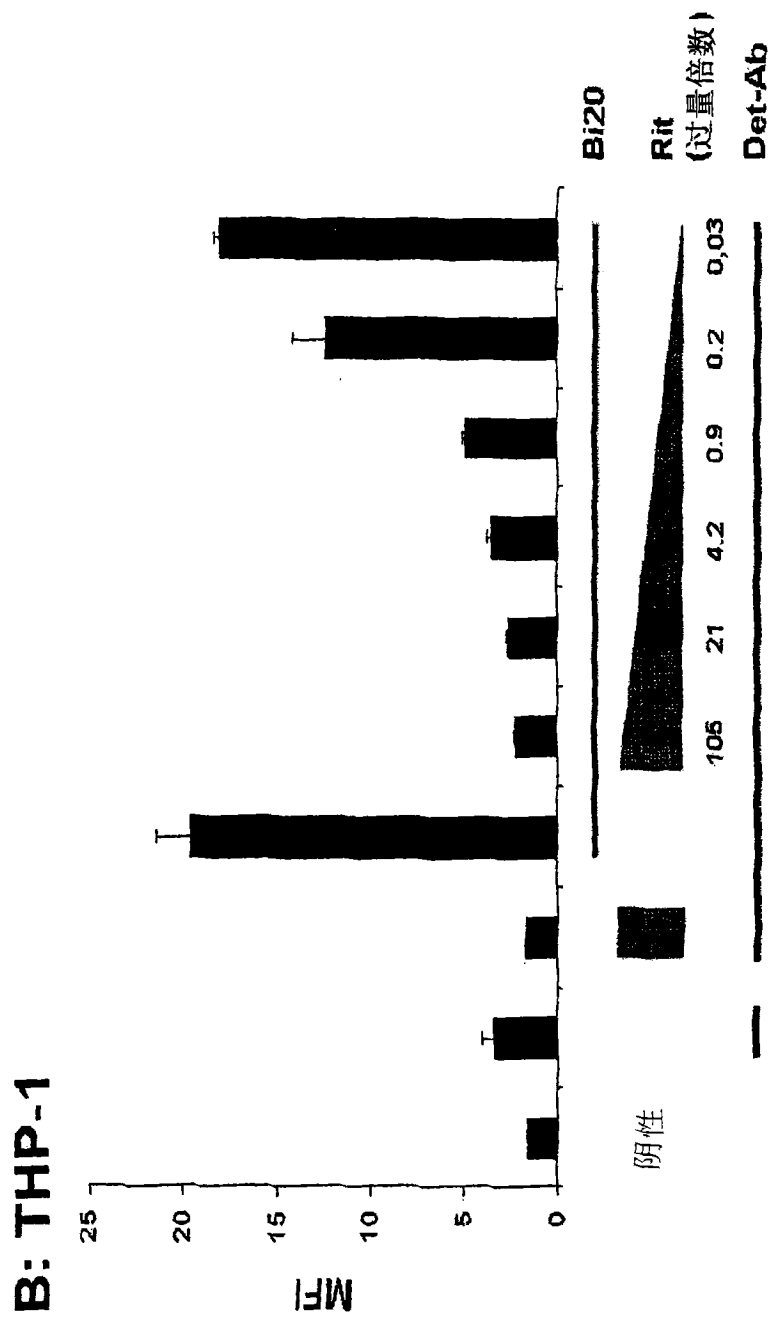


图 6B

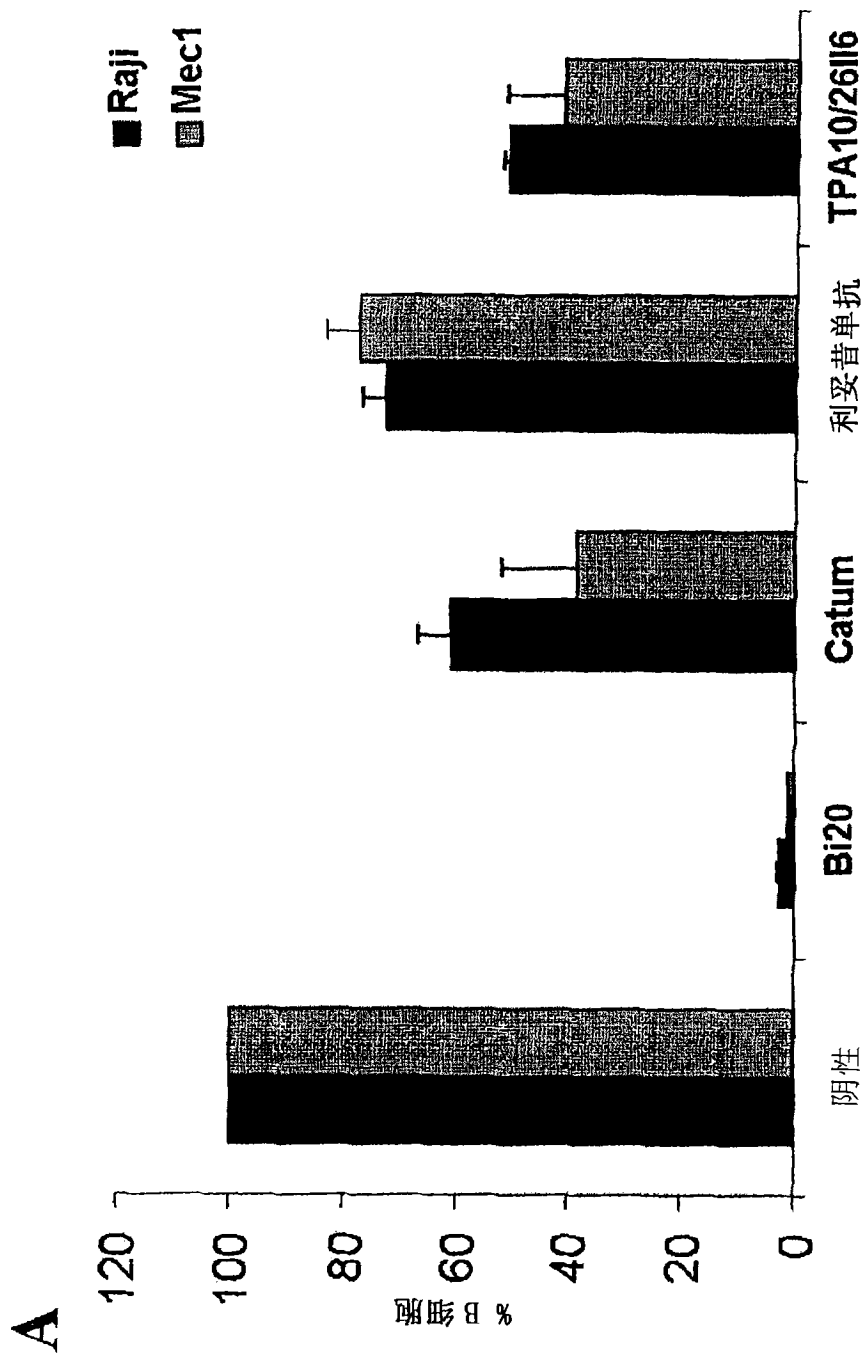


图 7A

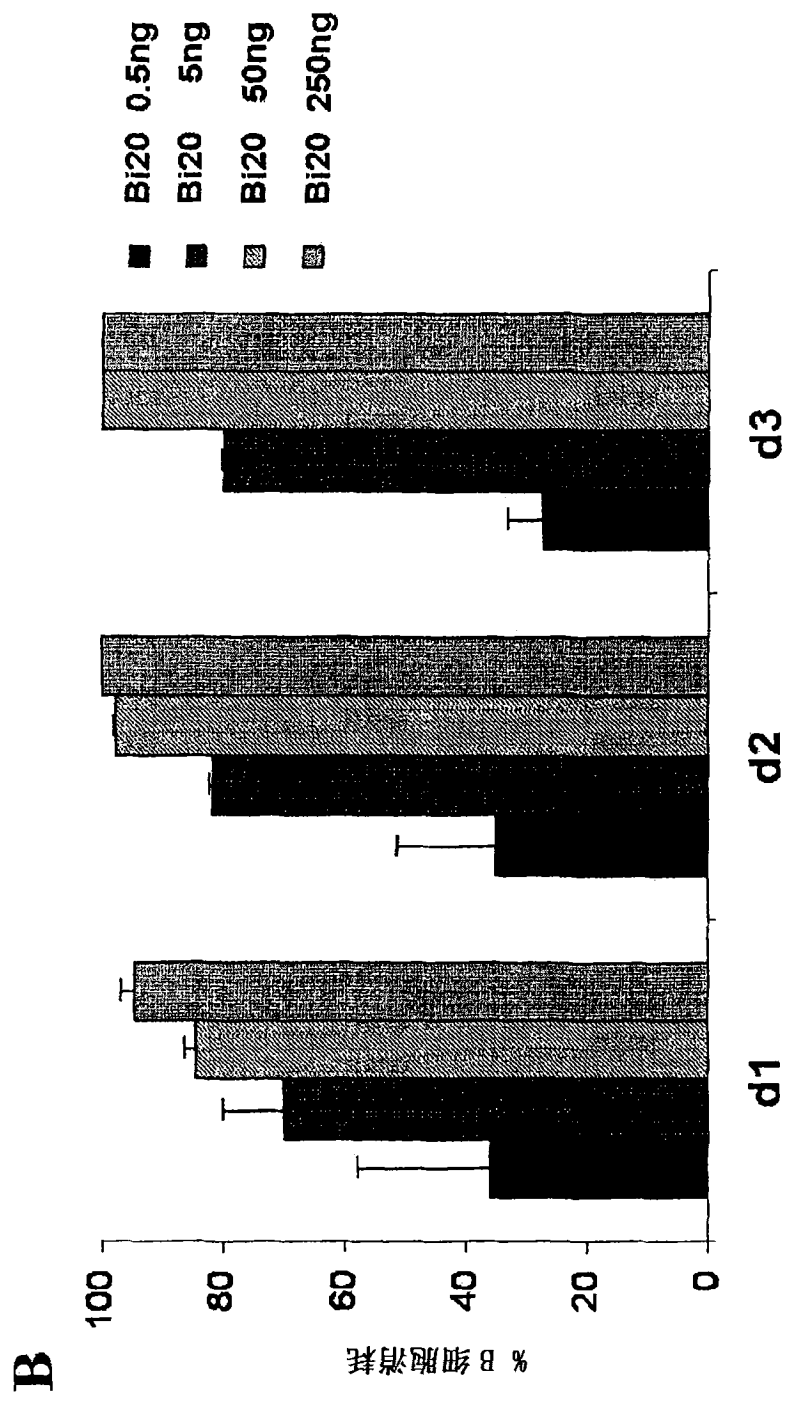


图 7B

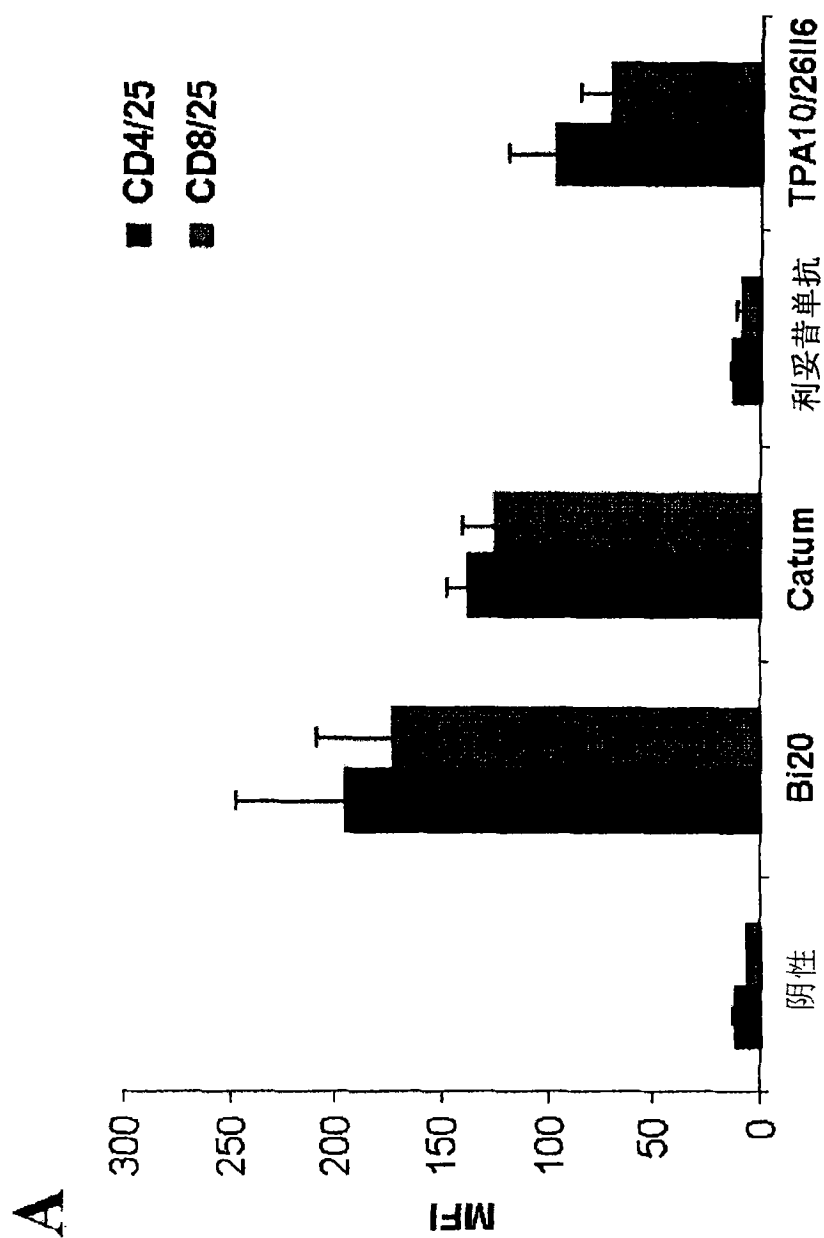


图 8A

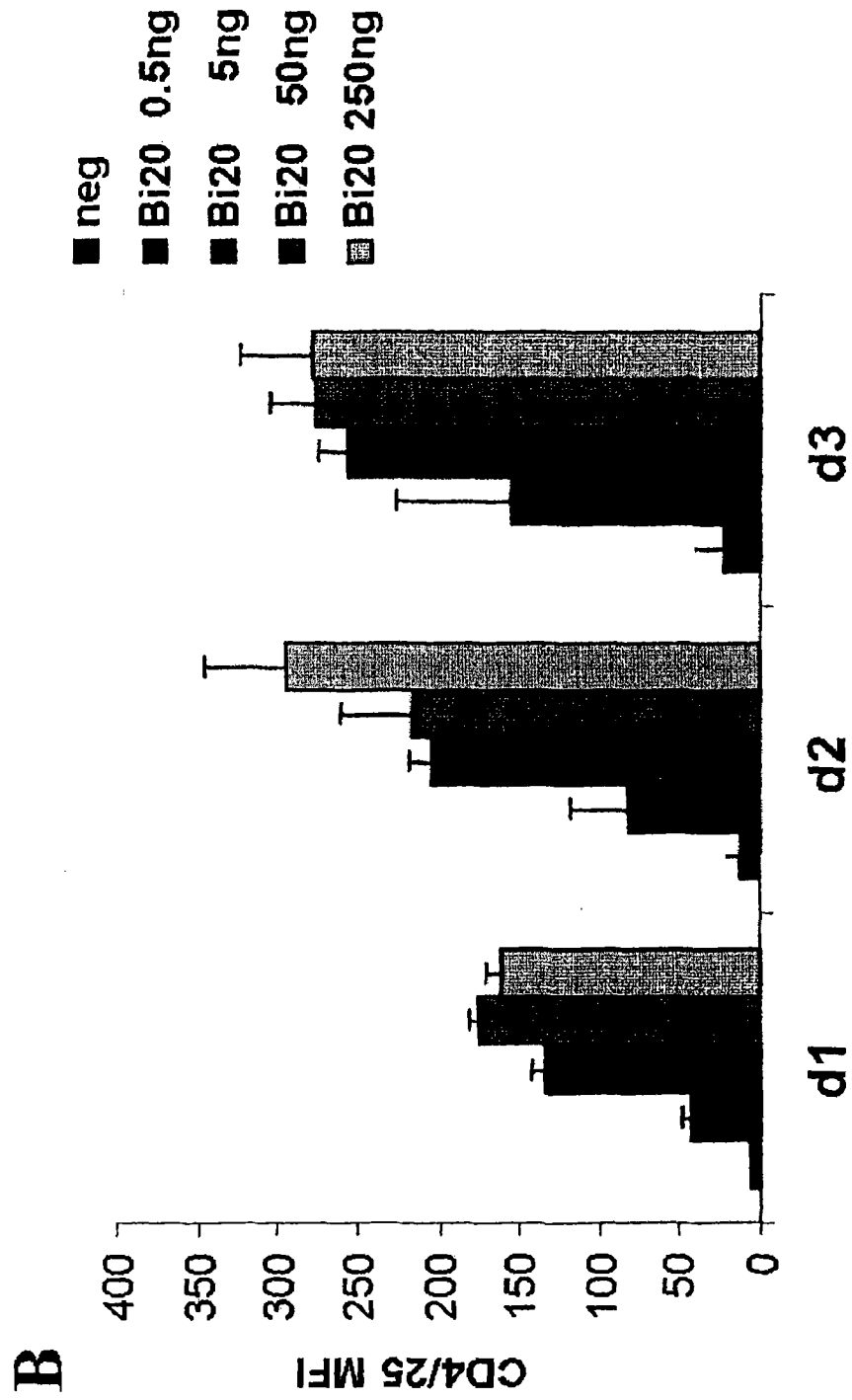


图 8B

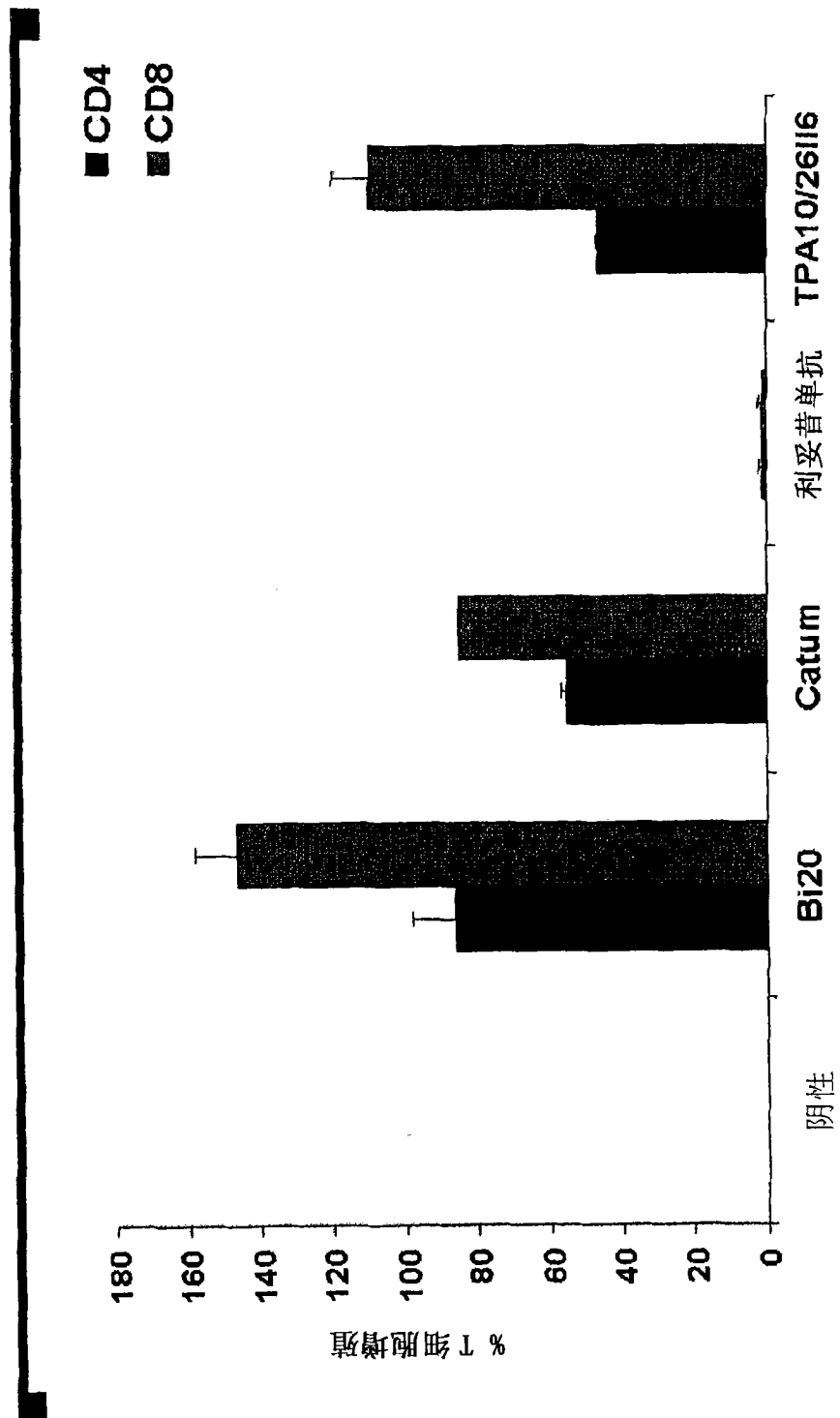


图 9

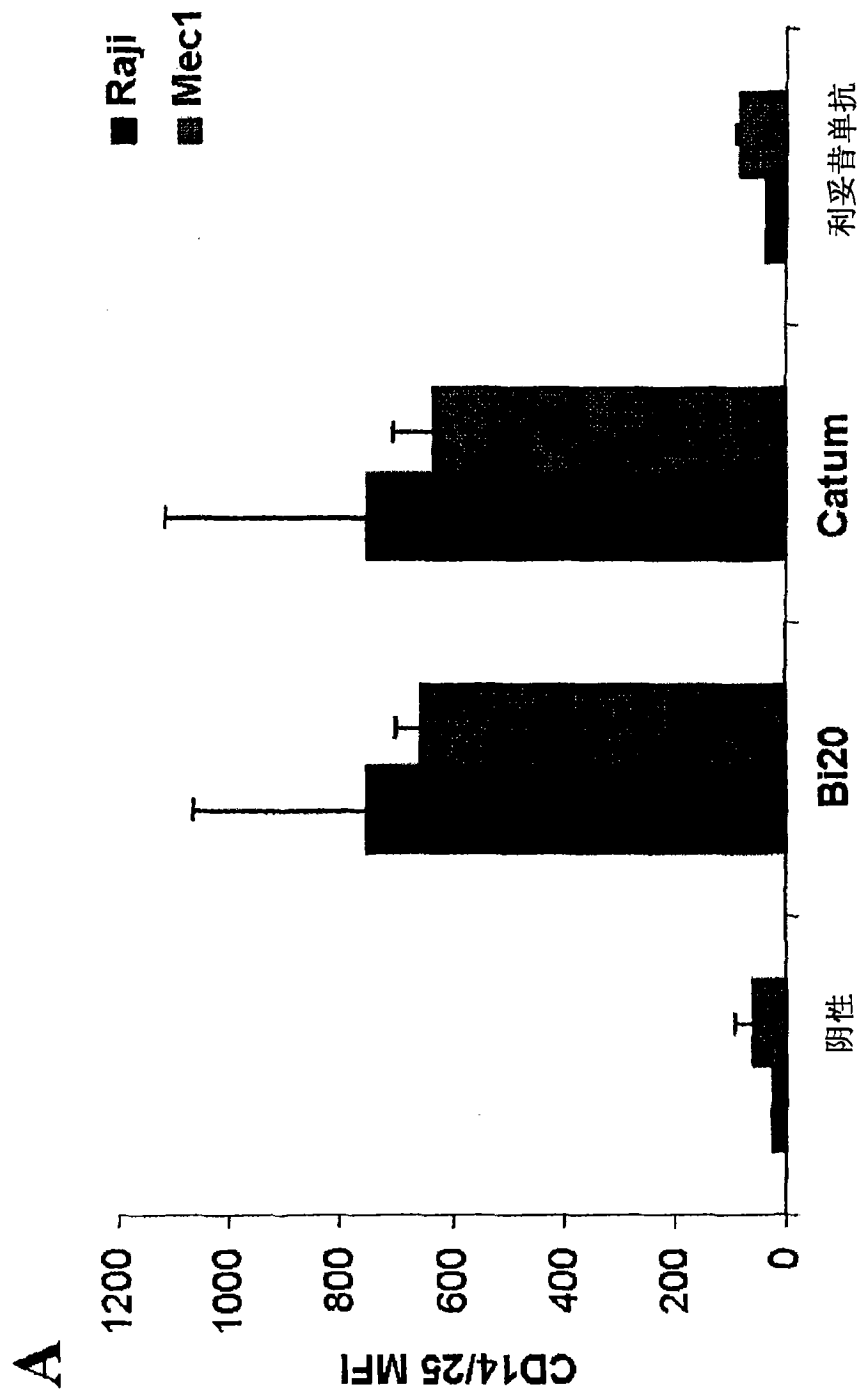


图 10A

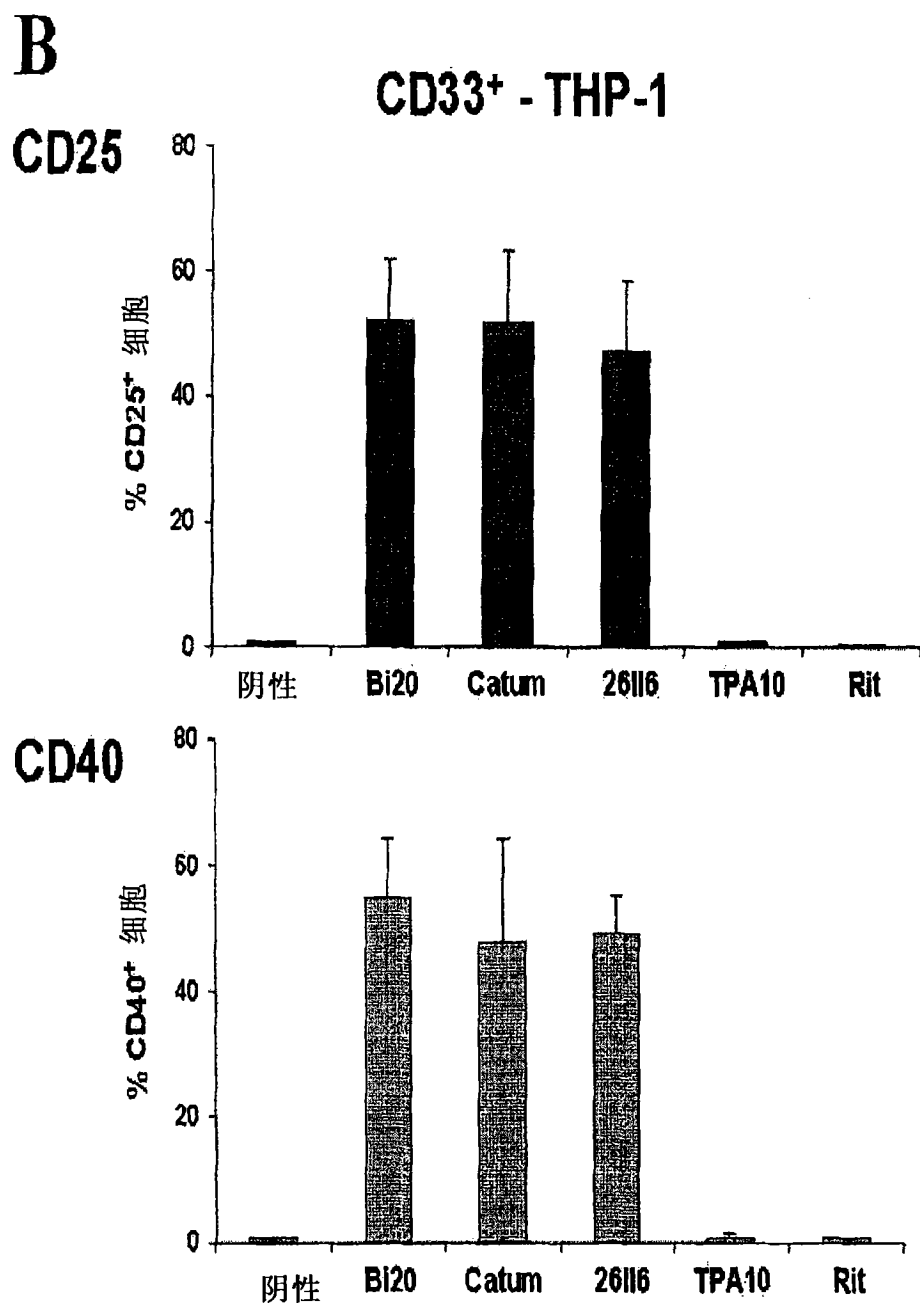


图 10B

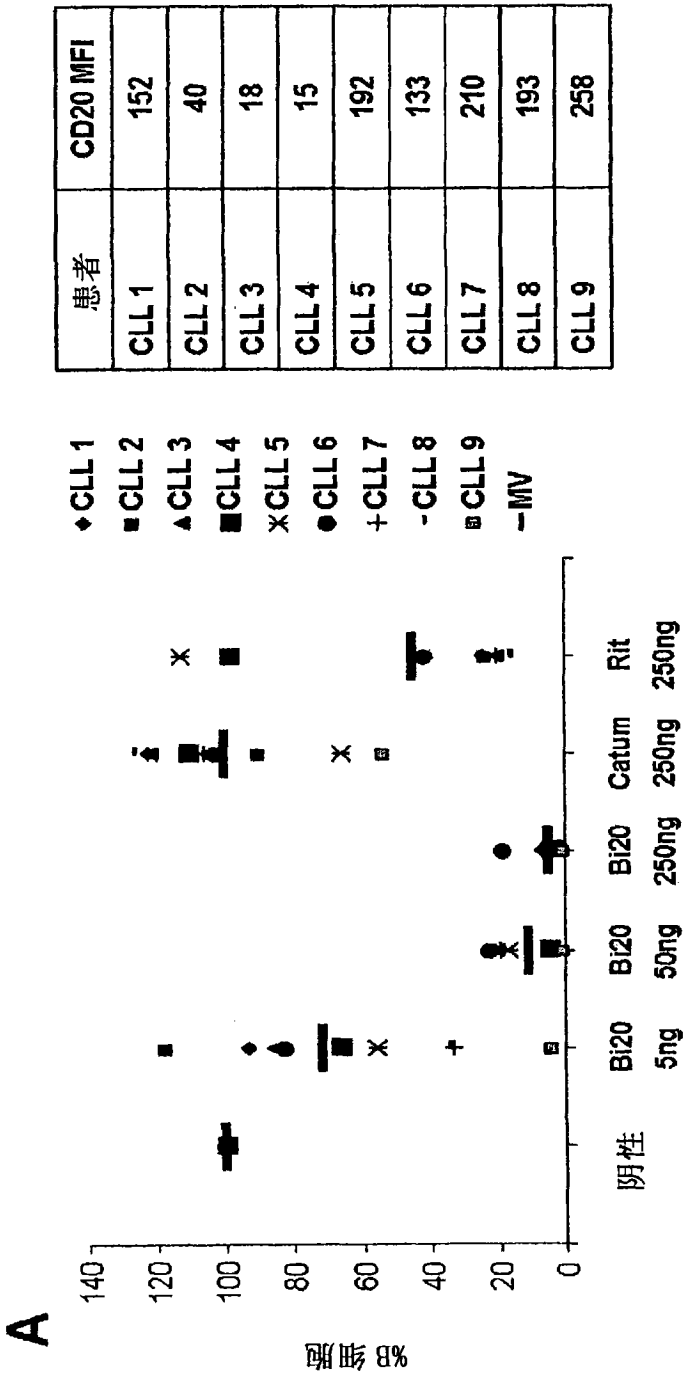


图 11A

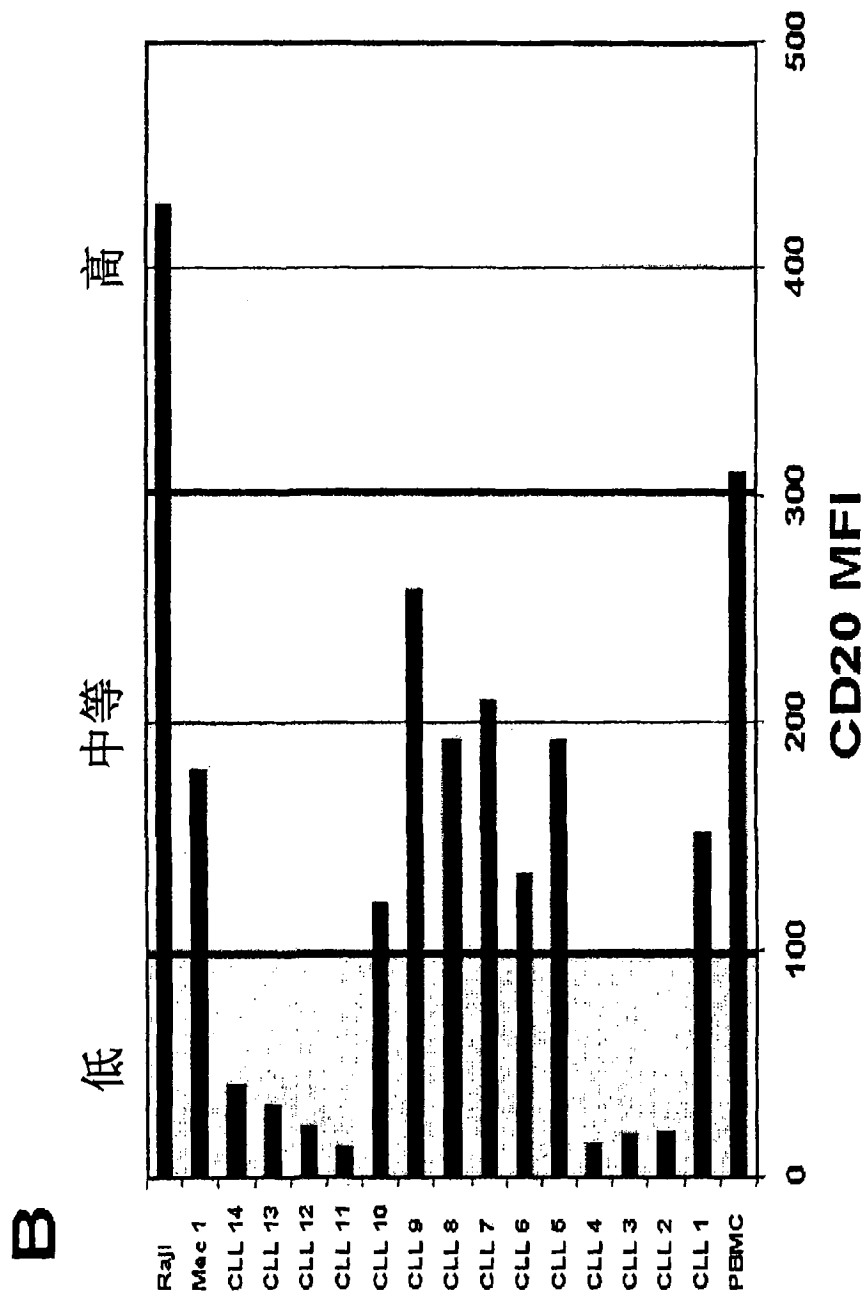


图 11B