



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103347894 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201180040144.4

(22)申请日 2011.06.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103347894 A

(43)申请公布日 2013.10.09

(30)优先权数据

61/397,920 2010.06.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.02.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/041082 2011.06.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/160119 EN 2011.12.22

(73)专利权人 纪念斯隆-凯特林癌症中心

地址 美国纽约州

(72)发明人 N.张 M.阿麦德

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

(51)Int.Cl.

C07K 16/00(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

C12N 5/07(2006.01)

审查员 劳芳

权利要求书2页 说明书68页

序列表10页

(54)发明名称

抗GD2抗体

(57)摘要

本申请描述嵌合的、人源化的、亲和力成熟的、稳定性提高的、以及双特异性的抗GD2抗体及其片段。还提供了使用各种抗体或其组合物检测、预防、和/或治疗性处理GD2相关疾病,尤其是神经母细胞瘤的方法。

1. 一种能够结合GD2的IgG1抗体或其片段,其中所述抗体是人源化或嵌合抗体,其中所述抗体或其片段包含鼠抗体m3F8可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列和鼠抗体m3F8可变重链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,其中所述抗体或片段能以比m3F8强至少10倍来介导针对神经母细胞瘤LAN-1-PBMC或LAN-1-PMN的ADCC活性,其中所述抗体或片段包含以下任一种:

- (i) SEQ ID NO:1的可变重链域和SEQ ID NO:2的可变轻链域;
- (ii) SEQ ID NO:4的可变重链域和SEQ ID NO:5的可变轻链域;
- (iii) SEQ ID NO:6的可变重链域和SEQ ID NO:7的可变轻链域;
- (iv) SEQ ID NO:6的可变重链域和SEQ ID NO:5的可变轻链域;
- (v) SEQ ID NO:4的可变重链域和SEQ ID NO:7的可变轻链域;和
- (vi) SEQ ID NO:9的可变重链域和SEQ ID NO:10的可变轻链域。

2. 根据权利要求1的抗体或其片段,其为嵌合抗体或其片段。

3. 根据权利要求1的抗体或其片段,其为人源化抗体或其片段。

4. 权利要求1的抗体或其片段,其中所述抗体被末端甘露糖、N-乙酰葡萄糖或葡萄糖糖基化,但无岩藻糖糖基化。

5. 一种能结合GD2的IgG4抗体或其片段,其中所述抗体是人源化或嵌合抗体,其中所述抗体或其片段包含鼠抗体m3F8可变轻链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列和鼠抗体m3F8可变重链的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列,其中所述抗体或片段能在大鼠异常性疼痛模型中阻断疼痛,其中所述抗体或片段包含以下任一种:

- (i) SEQ ID NO:3的可变重链域和SEQ ID NO:2的可变轻链域;
- (ii) SEQ ID NO:8的可变重链域和SEQ ID NO:5的可变轻链域;和
- (iii) SEQ ID NO:8的可变重链域和SEQ ID NO:7的可变轻链域。

6. 根据权利要求5的抗体或其片段,其为嵌合抗体或其片段。

7. 根据权利要求5的抗体或其片段,其为人源化抗体或其片段。

8. 权利要求1-7中任一项的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段由包含编码所述抗体或其片段的核酸的重组载体所产生。

9. 一种分离的核酸分子,其包含编码前述权利要求中任一种抗体的序列。

10. 一种重组载体,其包含权利要求9的核酸分子。

11. 一种宿主细胞,其包含权利要求10的重组载体。

12. 产生根据权利要求1-7中任一项的抗体或其片段的方法,包括在容许所述抗体或其片段表达的条件下在培养基中培养根据权利要求11的宿主细胞,并从所述培养基分离所述抗体或其片段的步骤。

13. 一种药物组合物,其包含权利要求1-7中任一项的抗体或其片段,且还包含可药用的载体或稀释剂。

14. 权利要求13的组合物,其中所述抗体与细胞毒剂缀合。

15. 根据权利要求1-7中任一项的抗体或其片段在制备用于治疗或预防受试者中的医学状况的药物中的用途,其中所述医学状况以GD2表达为特征。

16. 根据权利要求15的用途,其中所述医学状况是神经母细胞瘤、黑素瘤、肉瘤、脑肿瘤或与GD2过表达相关的癌。

17. 权利要求15的用途,其中所述医学状况选自下组:骨肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、平滑肌肉瘤、梭形细胞肉瘤、脑肿瘤、小细胞肺癌、视网膜母细胞瘤、HTLV-1感染的T细胞白血病、以及其他GD2阳性肿瘤。

18. 一种双特异性抗体,具有第一抗原结合位点以及第二抗原结合位点,其中一个结合位点包含根据权利要求1或5的人源化或嵌合抗体或其片段。

19. 权利要求18的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合位点选自scFv、scFab、Fab或Fv。

20. 权利要求18的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合位点与选自下组的免疫细胞相关:T淋巴细胞、NK细胞、B淋巴细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、和神经干细胞。

21. 权利要求18的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合位点对CD3或DOTA (金属) 是特异性的。

22. 权利要求18的双特异性抗体,该抗体包含SEQ ID NO:23的肽,该肽包含所述第二抗原结合位点。

23. 权利要求18的双特异性抗体,该抗体包含SEQ ID NO:24的肽,该肽包含所述第二抗原结合位点。

24. 一种核酸,其包含编码权利要求18-23中任一项的双特异性抗体的序列。

25. 一种表达载体,其包含权利要求24的核酸。

26. 一种宿主细胞,其包含权利要求25的载体。

27. 一种药物组合物,其包含权利要求18-23中任一项的双特异性抗体,且还包含可药用的载体或稀释剂。

28. 根据权利要求18-23中任一项的双特异性抗体在制备用于治疗或预防受试者中的医学状况的药物中的用途,其中所述医学状况以GD2表达为特征。

29. 根据权利要求1或5的抗体或其片段,其为片段。

30. 一种嵌合抗原受体,其包含权利要求29的片段。

31. 权利要求30的嵌合抗原受体,其中所述片段是scFv。

32. 权利要求30的嵌合抗原受体,其由免疫效应物细胞所表达。

33. 权利要求30-32中任一项的嵌合抗原受体在制备用于治疗或预防受试者中的医学状况的药物中的用途,其中所述医学状况以GD2表达为特征。

34. 根据权利要求18-23中任一项的双特异性抗体,其中所述抗体是单克隆和T细胞接合性的。

## 抗GD2抗体

### [0001] 介绍

[0002] 单克隆抗体 (MoAb) 疗法是一种公认的癌症治疗模式,有5种MoAb已经被FDA批准用于成人实体瘤,包括结肠直肠癌和乳腺癌,非小细胞肺癌,鳞状细胞癌和黑素瘤 (Boyiadzis et al.,2008,Expert Opin Biol Ther8,1151-8;Yan et al.,2008,Cancer J14,178-83)。然而这种模式在儿科癌症方面的应用尚且不足。与化疗或放射不同,MoAb治疗不具有骨髓抑制性和遗传毒性,一般很少有长期毒性。这些对于幼儿来说是关键性的考虑因素。更重要的是,MoAb对在高风险神经母细胞瘤 (NB) 中通常出现的血液、骨髓和骨中的转移癌症有效。作为一类药物,人源或人源化IgG1抗体已经得到了广泛的研究。此外,抗体可携带细胞毒性负荷物(基于免疫、放射性同位素、毒素或酶的),从而增加靶向性治疗的选项。

[0003] 神经母细胞瘤 (Neuroblastoma, NB) 是最常见的儿童颅外实体肿瘤。在大约50%的病例中,根治性策略必须解决软组织团块和骨髓 (BM) 中转移的问题。剂量密集的化疗提高肿瘤的可切除性,且手术后放射可降低原发部位的复发风险至<10% (Kushner et al., 2001, J Clin Oncol19,2821-8)。然而,骨髓疾病,如组织学和间碘苯甲胍 (MIBG) 扫描所证实的,往往持续存在并预示致命的结局 (Matthay et al.,2003, J Clin Oncol21,2486-91; Schmidt et al.,2008, Eur J Cancer44,1552-8)。此外,骨髓复发是常见的,尽管在诱导治疗后可达到几乎完全的缓解。强化治疗的尝试遭遇了急性和长期的副作用,这二者对于年轻患者都是严重的担忧。有前景的新药稀缺,而且迄今为止,极少有(如果有的话)靶/途径特异性小分子已经对NB患者显示了重大临床效应,尽管有希望的前导药物不断累积。对于>18个月龄时确诊的4期患者,在毒性极限下的治愈率<30%,因此还有很大的改善空间 (Pearson et al.,2008, LancetOncol9,247-56)。

[0004] 数种因素使得NB非常适合免疫疗法。首先,在人白细胞存在下MoAb可介导高效率的NB的抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC)。其次,MoAb诱导NB细胞的补体介导细胞毒性 (CMC),NB细胞缺少衰变加速因子CD55 (Cheung et al.,1988, J Clin Invest81,1122-8) 和同源的抑制因子CD59 (Chenet et al.,2000, Cancer Res60,3013-8)。NB细胞上的补体沉积通过活化中性粒细胞上的iC3b受体而增强ADCC (Kushner and Cheung,1992, Blood79,1484-90, Metelitsa et al.,2002, Blood99,4166-73),如果给予集落刺激因子,则即使在剂量密集的或者骨髓消减性的化疗加上干细胞移植之后其仍然可用 (Mackall, CL,2000, Stem Cells18,10-8)。第三,为达到临床缓解而施用的高强度化疗 (NB的护理标准) 可导致长期淋巴细胞减少和免疫抑制 (Mackall et al.,2000, Blood96,754-762),使得患者排斥鼠源、嵌合或人源化MoAb的可能性降低 (Kushner et al.,2007, Pediatr Blood Cancer48,430-4)。

[0005] GD2是一种二唾液酸神经节苷脂 (disialoganglioside),其在神经外胚层起源的肿瘤(包括神经母细胞瘤和黑素瘤)中丰富存在的,而在正常组织中的表达高度受限。至少有两个抗体家族已经得到了临床测试,即3F8 (Cheung et al.,1985, Cancer Res45,2642-9) 和14.18 (Mujoo et al.,1989, Cancer Res49,2857-61)。嵌合ch14.18由鼠MoAb14.18的可变区和人IgG1-K的恒定区组成 (Gillies et al.,1989, J Immunol Methods125,191-202)。它在体内展现NB及黑素瘤细胞的ADCC和CMC (Barker et al.,1991, Cancer Res51,

144-9; Barker and Reisfeld, 1993, Cancer Res. 52, 362-7; Mueller et al., 1990, PNAS USA 87, 5702-050)。基于在I期研究中令人鼓舞的临床应答,在大规模II期研究中将ch14.18作为4期NB的巩固治疗进行了测试(德国NB90和NB97研究)。对于确诊时>12个月的166名患者,虽然接受ch14.18的患者的无事件生存(event-free survival, EFS)与接受维持化疗的患者相似,但总体生存(overall survival, OS)改善,且在用ch14.18治疗的患者中BM复发率降低(Simon et al., 2004, J Clin Oncol 22, 3549-57)。在2001年,儿童肿瘤学集团(Children's Oncology Group (COG))启动了一项随机化III期实验来研究ch14.18与GM-CSF和IL-2的组合在自体干细胞移植(ASCT)后处于完全缓解(CR)中的患者中防止NB复发的效力(ClinicalTrials.gov NCT00026312) (Gilman et al., J Clin Oncol 27:85-91, 2009),发现无进展生存(PFS)和OS显著提高2年(Yu et al., N Engl J Med 363:1324-1334, 2010)。3F8, 一种对GD2特异性的鼠IgG3MoAb, 诱导细胞死亡,并且在体外介导针对NB的高效的ADCC和CMC (Cheung et al., 2007, 同上)。在虽然接受了剂量密集的诱导加上积极的补救疗法仍具有化疗抗性骨髓疾病的患者中,80%的患者通常在1到2个周期的5日抗体加GM-CSF治疗后实现了骨髓缓解(Kushner et al., 2007, Proc Amer Soc Clin Oncol 25, 526s)。鉴于m3F8对化疗抗性骨髓疾病的活性,m3F8用药被扩展到处于第一次缓解期(first remission)中的患者,并取得了令人鼓舞的结果。如果在复发风险最高的最先3-5年内给予m3F8作为维持治疗,这些儿童中的有利的临床结果可以改善。然而,当化疗结束,免疫系统恢复时,人抗小鼠抗体应答(HAMA)是一个限制因素。减少HAMA的策略之一是嵌合化或人源化3F8。

[0006] 因此对于这样的嵌合和/或人源化抗体存在需求:其能够以高亲和力结合GD2、优于m3F8、并且能够介导抗体依赖性细胞毒性,从而容许长程抗体疗法以减少疾病复发。

[0007] 本文描述的是嵌合3F8(ch3F8-IgG1)和人源化3F8(hu3F8-IgG1和hu3F8-IgG4)的工程构建和分离。使用标准重组方法制备了这些抗体,并以CHO-DG44细胞系在无血清培养基中的高表达为标准加以选择。使用CHO-Magel.5细胞系产生了hu3F8-IgG1n的一种特殊糖形(又称hu3F8-IgG1-MAGE1.5)。这种特殊糖形不具有岩藻糖,且只有末端甘露糖和N-乙酰葡萄糖或葡萄糖。使用Biacore系统所使用的表面等离子体共振测量,嵌合3F8和人源化3F8保持与m3F8相似的KD。与其他抗GD2抗体相对照的是,m3F8,ch3F8-IgG1,ch3F8-IgG4,hu3F8-IgG1,hu3F8-IgG4和hu3F8-IgG1n具有明显更慢的 $k_{off}$ ,这在体外导致更慢的洗去(wash off)。与m3F8相似,嵌合和人源化3F8都在体外抑制细胞生长,这对其他抗GD2抗体而言不是典型的。类似的测量提示嵌合和人源化IgG1抗体与14.G2a相比具有更有利的KD。ch3F8-IgG1、hu3F8-IgG1、和hu3F8-IgG1n的血液单个核细胞(PBMC)-ADCC和中性粒细胞(PMN)-ADCC均优于(10至>1000倍)m3F8,而CMC逊于m3F8。这种优越性在ADCC测定中一贯地被观察到,与供体无关,与NK92是用CD16或CD32转染也无关。对于CD16介导的ADCC,hu3F8-IgG1n相比于hu3F8-IgG1好10-40倍。与m3F8相比,使用hu3F8-IgG4的PBMC-ADCC和CMC活性大大下降。与其他神经节苷脂的交叉反应性与m3F8相似。在生物分布中使用<sup>131</sup>I标记的抗体,hu3F8形式的肿瘤对正常组织比(tumor to normal tissue ratio)与m3F8近似。Hu3F8-IgG1与m3F8相比时显示更优越的抗肿瘤效果。

[0008] 还描述了新hu3F8抗体hu3F8H3L3,使用实验获得的m3F8晶体结构结合使用力场方法的计算分析设计了这些抗体以使其具有更好的安全性概貌。

## 发明内容

[0009] 人源化策略共有的前提是,将鼠源序列特征性的氨基酸残基替换为人抗体中相应位置处出现的残基将会降低所得到的抗体在人体中的免疫原性。然而,在物种之间替换序列通常会导致抗体对其抗原的结合降低,并且丧失亲和力。因此,人源化的技巧在于在替换原始的鼠源序列以降低免疫原性和人源化分子保留治疗上有用的足够抗原结合性之间取得平衡。

[0010] 本发明提供工程化的以及嵌合和人源化的3F8抗体,其具有至少一个源自m3F8的CDR序列,还有抗体组合物、抗体的糖形(glycoform)、稳定性提高的抗体、对Fc受体的结合提高的抗体、对GD2的亲和力提高的抗体、经过工程改造而表达第二种不同的结合位点的双特异性抗体或双特异性T细胞接合物,或者任何本发明的抗体的Fv片段用于模块化IgG构建用于双特异性、双特异性T细胞接合性(BiTE)抗体、三特异性或多特异性抗体的用途。这些抗体以及与之相关的编码或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、配制剂、装置、转基因动物、转基因植物,以及制造和使用它们的方法,如本申请描述的以及结合本领域的知识使之能够实现的,属于本发明的一部分。本发明的hu3F8-IgG1抗体比m3F8或任何其他已知的抗GD2抗体(包括14G.2a, ch14.18或ME361)具有显著更多的PMN-ADCC和PBMC-ADCC活性,并具有完整补体介导的细胞毒性(CMC),尽管较m3F8为少。在ADCC测定中无论供体如何,也是用转染了人CD16或CD32的NK92作为杀伤细胞,都一贯地观察到这种优越性。这一点是重要的,因为ADCC已被证明是MoAb在患者体内的抗肿瘤作用的普遍机制。hu3F8-IgG1和hu3F8-IgG1n(hu3F8-IgG1的一种糖形)与m3F8相比针对神经母细胞瘤(NB)异种移植物都显示出更优越的抗肿瘤作用。该抗体的IgG4形式显示降低的效应物功能,并可有效地阻断抗CD2抗体疗法的疼痛副作用。在重链中具有三突变的Hu3F8-IgG1-DEL(或S239D/I332E/A330L)显示对Fc受体(FcR)的亲和力增加。作为对3F8:GD2相互作用的分析的结果,设计出了一种在重链中具有突变的3F8抗体,其在重链中具有突变,产生通过热力学计算可赋予对GD2的增加的亲和力的huH1I-gamma-1与huH3I-gamma-1重链。

[0011] 本发明提供至少一种分离的工程化的嵌合抗体ch3F8,或人源化的抗体hu3F8,如本文所述的。根据本发明的抗体包括任何这样的蛋白质或肽分子:其包含源自m3F8的重链或轻链或其配体结合部分的至少一个互补决定区(CDR),与能够组入本发明的抗体的重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分组合。在一个实施方案中,本发明涉及一种hu3F8抗体,其包含如本文所述的轻链和重链,所述每条链包含人恒定区的至少一部分以及对GD2有特异性的源自m3F8的可变区的至少一部分,所述抗体以高亲和力结合GD2,并且介导期望的效应,仅举数例:抑制体外细胞生长、阻断由于抗GD2抗体治疗导致的疼痛副作用。本发明还包括此类抗体的片段或衍生物,例如抗体链的一个或多个部分,诸如重链恒定区、连接(joining)区、多样性(diversity)或可变(variable)区。抗体可以属于任何类别诸如IgG、IgM、或IgA,或任何亚类诸如IgG1、IgG2a、IgG4,以及本领域已知的其他亚类。本发明中有用的抗体还包括本发明的抗体的抗原结合性抗体片段,包括但不限于Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>、Fd、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫化物连接的或二硫化物稳定化的Fv(sdFv或dsFv)。本发明还包括包含VL域或VH域的单域抗体。此外,所述抗体可以通过任何方法来产生,诸如噬菌体展示、或者在任何生物体、卵、或细胞系中产生,包括细菌、昆虫、酵母(真菌)、哺乳动物或

其他类型的产生具有期望特征的抗体(如人源化抗体)的细胞或细胞系。还可以通过组合来自不同物种的Fab部分与Fc区,或者通过保留抗原决定区而将框架区修饰为其他物种的框架区来形成抗体。

[0012] 所述抗体可以包含源自m3F8或hu3F8的至少一个互补决定区(CDR)(例如重链或轻链可变区的CDR1、CDR2或CDR3)的至少一个特定的部分,和/或至少一个恒定区或可变框架区或其任意部分(如这些术语在本文中所定义的)。所述抗体氨基酸序列可以任选进一步包含至少一种特定的取代、插入或缺失,如本文所述的或如本领域已知的。

[0013] 本发明的优选抗体包括ch3F8-IgG1、ch3F8-IgG4、hu3F8-H1L1-IgG1、hu3F8-H2L2-IgG1、hu3F8-H1L2-IgG1、hu3F8-H2L1-IgG1、hu3F8-IgG4、hu3F8IgG1n、Hu3F8-IgG1-DEL、hu3F8H1L1S(hu3F8-IgG1轻链界面增强的)、hu3F8H3L3(hu3F8-IgG1重链和轻链稳定性增强的)、hu3F8H3L3S(界面和稳定性增强的)、hu3F8H1-I-gamma-1(hu3F8-IgG1亲和力增强的)、hu3F8H3-I-gamma-1(hu3F8-IgG1稳定性和亲和力增强的),及其片段和区域。

[0014] 在一个实施方案中,本发明涉及具有对GD2的结合特异性的嵌合单克隆抗体,其中所述抗体ch3F8-IgG1包含重链域SEQ ID NO:1,以及轻链可变域SEQ ID NO:2。在另一个实施方案中,所述抗体ch3F8-IgG4包含SEQ ID NO:3的重链可变域以及SEQ ID NO:2的轻链可变域。这样的嵌合抗体源自鼠3F8抗体,在特定的实施方案中,所述嵌合抗体包含这样的重链,其互补决定区(CDR)1、2和3分别由SEQ ID NO:1的氨基酸残基31-35、50-64和98-108所定义。在特定的实施方案中,所述嵌合抗体包含这样的轻链,其CDR1、2和3分别由SEQ ID NO:2的氨基酸残基24-34、50-56和89-95所定义。在特定的实施方案中,所述嵌合抗体包含这样的重链,其框架区(FR)1、2、3和4分别由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1-30、36-49、65-97和109-120所定义。在特定的实施方案中,所述嵌合抗体包含这样的轻链,其框架区(FR)1、2、3和4分别由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-23、35-49、57-88和96-108所定义。

[0015] 在一个实施方案中,本发明涉及具有对GD2的结合特异性的人源化单克隆抗体,其中抗体hu3F8-H1L1-IgG1包含SEQ ID NO:4的重链可变域和SEQ ID NO:5的轻链可变域,其中hu3F8H2L2-IgG1包含SEQ ID NO:6的重链可变域和SEQ ID NO:7的轻链可变域,其中hu3F8-H1L1-IgG4包含SEQ ID NO:8的重链可变域和SEQ ID NO:5或7的轻链可变域。这样的人源化抗体源自鼠3F8抗体的人源化。在特定的实施方案中,人源化抗体包含这样的重链,其互补决定区(CDR)1、2和3分别由SEQ ID NO:4、6或8的氨基酸残基31-35、50-64和98-108所定义。在特定的实施方案中,人源化抗体包含这样的轻链,其互补决定区(CDR)1、2和3分别由SEQ ID NO:5或7的氨基酸残基24-34、50-56和89-95所定义。

[0016] 本发明还涉及经过工程化而具有修饰的碳水化合物构成的抗GD2人源化抗体,hu3F8-IgG1n,其具有增加的效应物功能。

[0017] 本发明还涉及Hu3F8-IgG1-DEL抗体,其在hu3F8-IgG1或hu3F8-IgG1n的重链中具有三突变DEL(S239D/A330L/I332E)。Hu3F8-IgG1-DEL在重链中包含由SEQ ID NO:4、6或8的S239D、A330L和I332E组成的取代。

[0018] 本发明还涉及hu3F8H3L3,其是通过晶体结构的计算分析以及通过回复突变和正向突变调整氨基酸序列以提高抗体的稳定性而获得的。稳定性提高的huH3重链的序列公开于SEQ ID NO:9,而huL3轻链公开于SEQ ID NO:10。这些突变也可以单独地或者与本文所述的其他重链突变组合导入重链序列中。

[0019] 在轻链的第43位添加了一个额外的突变以提高VH-VL界面处的稳定性,得到了huL3S。因此,huL3S包含由SEQ ID NO:10的Ala43Ser组成的取代。当hu3F8-IgG1的轻链中组入了这种对43位的丝氨酸的改变时,该轻链被称为huL1S。类似地,huL1S包含由SEQ ID NO:5或7的Ala43Ser组成的取代。

[0020] 计算机建模进一步显示,重链CDR3中第54位的Gly取代为Ile会改变结合口袋的形状,并增加与GD2配体的接触。将该突变Gly54Ile添加到huH1-IgG1和huH3-IgG1的序列的CDR区域中,分别得到了huH1I-gamma1和huH3I- $\gamma$ 。因此,huH1-gamma1包含SEQ ID NO:4、6或8中的Gly54Ile取代。huH3I-gamma1包含SEQ ID NO:9中的Gly54Ile取代。

[0021] 本发明的优选抗体是那些结合人GD2并发挥期望的功能(即效应物功能,阻断疼痛或抑制细胞生长)的抗体。优选的用于通过竞争性抑制确定单克隆抗体特异性和亲和力的方法可见于Harlow, et al, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), 在此通过引用将其并入本文。至少一种本发明的抗体结合至少一个特定的人GD2特异性表位, 亚单位、片段、部分, 或其任意组合。所述表位可包含至少一个抗原结合区, 所述表位优选由GD2的至少一个部分的至少1-5个糖残基或神经酰胺组成。

[0022] 在一个方面, 本发明提供至少一种分离的人源化抗GD-2抗体, 其包含至少一个来自m3F8的可变区, 以及编码所述抗体的核酸序列。

[0023] 在另一个方面, 本发明提供至少一种分离的哺乳动物抗GD2抗体, 其包含(i) 源自m3F8的所有重链可变区(CDR)氨基酸序列, 以及编码它们的核酸序列; 或(ii) 来自m3F8的所有轻链CDR氨基酸序列, 以及编码它们的核酸序列。

[0024] 在另一个方面, 本发明提供至少一种分离的哺乳动物抗GD2抗体, 其包含至少一个具有源自m3F8的氨基酸序列的重链或轻链CDR, 以及编码它们的核酸序列。

[0025] 在另一个方面, 本发明提供至少一种分离的嵌合的、人源化的、或CDR嫁接的抗GD2抗体, 其包含至少一个m3F8CDR, 其中该抗体特异性地结合至少一个这样的表位, 该表位包含人GD2的表位的至少1-5个糖残基或神经酰胺。

[0026] 在另一个方面, 本发明提供一种诊断/检测或治疗免疫缀合物, 其包含抗体组分, 所述抗体组分包含任何本发明的3F8MoAb或其片段或包含任何本发明的3F8抗体或其片段的抗体融合蛋白或其片段, 其中所述抗体组分结合于至少一种诊断/检测剂或至少一种治疗剂。

[0027] 在另一个方面, 本发明提供一种治疗免疫缀合物, 其包含选自下组的治疗剂: 放射性核素, 硼, 钆或镭原子, 免疫调节物, 如细胞因子, 干细胞生长因子, 淋巴毒素, 肿瘤坏死因子(TNF), 造血因子如白介素(IL), 集落刺激因子(CSF) 如粒细胞集落刺激因子(G-CSF) 或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), 干扰素(IFN) 如干扰素- $\alpha$ 、- $\beta$ 或 $\gamma$ , 以及干细胞生长因子, 造血因子, 红细胞生成素, 血小板生成素、抗体、激素、激素拮抗剂、酶、酶抑制剂、光敏治疗剂、细胞毒药物、如抗有丝分裂剂、烷化剂、抗代谢剂、血管新生抑制剂、凋亡剂、生物碱、COX-2抑制剂及抗生素剂, 细胞毒性毒素, 如植物、微生物和动物毒素, 及其合成性变体, 血管新生抑制剂, 不同的抗体, 以及上述的组合。

[0028] 在另一个方面, 本发明还提供一种多价、多特异性抗体或其片段, 其包含一个或多个对由3F8抗体所识别的抗原具有亲和力的抗原结合位点, 以及一个或多个对GD2之外的表

位或半抗原具有亲和力的半抗原结合位点。优选地,所述3F8抗体或其片段是嵌合化的或人源化的。还优选的是,所述抗原或其片段是完全人的或嵌合化的。在一个实施方案中,所述多价、多特异性抗体或其片段包含诊断/检测或治疗剂。

[0029] 在又一个方面,本发明提供一种向目标投递诊断剂/检测剂或其组合的方法,包括:(i)对受试者施用本发明的多价、多特异性抗体或其片段;(ii)等待足够量的时间以使一定量的非结合蛋白从受试者的血流清除;和(iii)对所述受试者施用包含诊断/检测剂、治疗剂、或其组合的担载体分子,所述担载体分子结合所述抗体的结合位点。所述诊断/检测剂或治疗剂选自包含下列的组:同位素、染料、色原、造影剂、药物、毒素、细胞因子、酶、酶抑制剂、激素、激素拮抗剂、生长因子、放射性核素、金属、脂质体、纳米颗粒、RNA或DNA。第二特异性还包括与上述作用剂群组中任意者缀合的半抗原。这些半抗原包括但不限于生物素及其衍生物、DOTA及其衍生物、DTPA及其衍生物、荧光素及其衍生物、组胺及其衍生物、去铁胺(Deferoxamine)及其衍生物。

[0030] 在本发明的任何方法中,受试者优选是哺乳动物,如人或家养伴侣动物。

[0031] 本发明的另一个实施方案是一种治疗或鉴定受试者中的患病组织的方法,包括:(A)对所述受试者施用如下所述的双特异性抗体或抗体片段,所述抗体或片段具有至少一个特异性结合患病组织相关标志物的臂,以及至少另一个特异性结合可寻靶的缀合物的臂,其中所述患病组织相关标志物是由3F8MoAb识别的抗原;(B)任选地,对所述受试者施用清除组合物,并让所述组合物从循环中清除未定位的抗体或抗体片段;和(C)对所述受试者施用第一可寻靶缀合物,其包含担载体部分,该担载体部分包含或负载至少一个这样的表位,该表位可以被所述双特异性抗体或抗体片段的所述至少另一个臂所识别;以及一种多种缀合的治疗剂或诊断剂。优选地,特异性结合靶组织的至少一个臂是人、嵌合、或人源化抗GD2抗体或人、嵌合、或人源化抗GD2抗体的片段。一个优选的实施方案是在此类应用中使用3F8MoAb作为如这里所述的嵌合、人源化或人抗体。

[0032] 在又一个实施方案中,本发明提供一种检测或治疗哺乳动物中表达被3F8MoAb识别的抗原的肿瘤的方法,包括:(A)施用有效量的双特异性抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含至少一个特异性结合靶组织的臂,以及至少另一个特异性结合可寻靶缀合物的臂,其中所述特异性结合靶组织的一个臂是3F8抗体或其片段;和(B)施用可寻靶的缀合物。所述可寻靶的缀合物可以选自下组:(i)DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;(ii)

[0033] Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tsccg-Cys)-NH<sub>2</sub>;(iii)DOTA

[0034] -D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;(iv)DOTA

[0035] -D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;(v)DOTA

[0036] -D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;(vi)DOTA

[0037] -D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;(vii)DOTA

[0038] -D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH<sub>2</sub>;(viii)

[0039] Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH<sub>2</sub>;(ix)

[0040] Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH<sub>2</sub>;(x)

[0041] Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH<sub>2</sub>;(xi)

[0042] Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tsccg-Cys)-NH<sub>2</sub>;(xii)DOTA

[0043] -D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tsccg-Cys)-NH<sub>2</sub>;(xiii)

- [0044] (Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Lys (DOTA)-NH<sub>2</sub>; (xiv)
- [0045] Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH<sub>2</sub>; (xv)
- [0046] (Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH<sub>2</sub>; (xvi)
- [0047] Ac-D-Cys-D-Lys (DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys (DOTA)-D-Cys-NH<sub>2</sub>; (xvii)
- [0048] Ac-D-Cys-D-Lys (DTPA)-D-Tyr-D-Lys (DTPA)-NH<sub>2</sub>; (xviii)
- [0049] Ac-D-Lys (DTPA)-D-Tyr-D-Lys (DTPA)-D-Lys (Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>; (xix)
- [0050] Ac-D-Lys (DOTA)-D-Tyr-D-Lys (DOTA)-D-Lys (Tscg-Cys)-NH<sub>2</sub>; 荧光素及其衍生物、去铁敏 (desferrioxamine) 及其衍生物。

[0051] 在另一个方面,本发明提供一种寻靶方法,其中所述方法包括:(A) 给要接受此类程序的受试者注射双特异性抗体F(ab)<sub>2</sub>或F(ab')<sub>2</sub>片段,或单链Fv片段,其中所述双特异性抗体或片段具有特异性结合3F8MoAb所识别的抗原的第一抗体结合位点,且具有特异性结合半抗原的第二抗体位点,并容许所述抗体片段在靶位点累积(accrete);(B) 任选地如果所述双特异性片段没有在注射后大约24小时内从循环大部分清除,则使用清除剂清除未靶定的(non-targeted)抗体片段,并注射半抗原修饰的右旋糖酐、或树枝状化合物、或聚合物,这些物质快速地将未靶定的抗体或片段移入肝脏以便降解,(C) 在第一次注射数小时内,通过核成像或通过利用扫描仪或探针近距检测靶位点处累积的标记物的提高的水平,来检测半抗原的存在,并实施所述程序,其中所述检测在不使用造影剂或减影剂(subtraction agent)的条件下进行。在一个优选的实施方案中,所述半抗原标记有诊断/检测放射性同位素,MRI图像增强剂,荧光标记物或化学发光标记物。荧光标记可包括罗丹明、荧光素、肾造影剂(renographin)、异硫氰酸荧光素、藻红蛋白(phycoerytherin)、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛(o-phthaldehyde)和荧光胺。花絮发光标记物可包括鲁米诺(luminol)、异鲁米诺(isoluminol)、芳香吖啶酯(aromaticacridinium ester)、吖啶、吖啶盐(acridinium salt)、和草酸酯。MRI图像增强剂包括钆和铁磁性物质。对抗体-半抗原定位的成像检测携带GD2的完整肿瘤细胞,这对肿瘤分期、测量肿瘤对治疗的应答、检测早期复发和肿瘤监控而言是关键的。在外科手术进行中检测抗体-半抗原定位可给出肿瘤的精确位置,并可发现隐藏的病变部位,从而使作为癌症治愈性治疗的完全手术切除成为可能。

[0052] 本发明还考虑一种多价、多特异性抗体或其片段,其包含:一个或多个对由3F8抗体所识别的抗原具有亲和力的抗原结合位点,以及一个或多个对细胞(淋巴细胞、天然杀伤细胞、中性粒细胞、髓样细胞、干细胞、神经干细胞、间充质干细胞、白血病细胞、细胞毒性淋巴细胞和B淋巴细胞)上的表位或半抗原具有亲和力的半抗原结合位点。这些双特异性抗体或片段可以通过各种途径(包括静脉内、鞘内、或肿瘤内)施用到哺乳动物(包括人)体内,以使得内源细胞或外源输注的细胞靶向携带抗原GD2的位点或组织或细胞。或者,可以通过离体方式用这些双特异性抗体或片段武装细胞,然后施用到哺乳动物(包括人)体内。

[0053] 本发明还考虑3F8序列或其片段的如下用途:使用所述3F8序列或其片段通过遗传方法创建对GD2特异性的嵌合表面受体,以将细胞(淋巴细胞、天然杀伤细胞、中性粒细胞、髓样细胞、干细胞、神经干细胞、间充质干细胞、白血病细胞、细胞毒性淋巴细胞和B淋巴细胞)重定向至携带GD2的组织、器官或肿瘤,用于诊断和治疗应用二者。

[0054] 在一个方面,本发明提供分离的核酸分子,其包含、或互补于、或杂交到编码前述特异性抗GD2抗体的多核苷酸,包含其至少一个特定的序列、域、部分或变体。在一个更具体

的方面,本发明提供编码本发明抗体的核苷酸序列,其中Hu3F8-H1L1-IgG1(也缩写为hu3F8-IgG1)轻链由SEQ ID NO:11编码,而Hu3F8-H1L1-IgG1重链由SEQ ID NO:12编码,其中Hu3F8-H1L1-IgG4轻链由SEQ ID NO:13编码且Hu3F8-H1L1-IgG4重链由SEQ ID NO:14编码,其中Hu3F8-H1L2-IgG1轻链L2由SEQ ID NO:15编码且Hu3F8-H2L2-IgG1重链H2由SEQ ID NO:16编码。hu3F8-H1L1-IgG1的轻链和重链可以与hu3F8-H2L2-IgG1的轻链和重链互换,形成抗GD2抗体hu3F8-H1L2-IgG1和hu3F8-H2L1-IgG1。本文提供了其他核苷酸序列,其中ch3F8-IgG1轻链由SEQ ID NO:17编码且ch3F8-IgG1重链由SEQ ID NO:18编码,其中ch3F8-IgG4轻链由SEQ ID NO:19编码且ch3F8-IgG4重链由SEQ ID NO:20编码,且其中hu3F8H3L3-IgG1轻链L3由SEQ ID NO:21编码且重链H3由SEQ ID NO:22编码。

[0055] 本发明进一步提供包含所述抗GD2抗体核酸分子的重组载体,含有此类核酸和/或重组载体的宿主细胞,以及制造和/或使用此类抗体核酸分子、载体和/或宿主细胞的方法。因此,本发明包括编码至少一种分离的哺乳动物抗GD2抗体或其片段的分离的核酸,包含所述分离的核酸的分离的核酸载体,和/或包含所述分离的核酸的原核或真核宿主细胞。所述宿主细胞可任选地为选自COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、CHO-S、DG44、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髓瘤、或淋巴瘤细胞中的任一种,或其任何衍生细胞、永生化细胞或转化细胞。还提供了一种用于产生至少一种抗GD2抗体的方法,包括在体外、体外或原位的条件下翻译编码抗体的核酸,使得抗体以可检测或可回收的量表达;所述方法包括利用这样的载体的方法:所述载体可容许利用在代谢途径或者酶(包括但不限于dhfr(二氢叶酸还原酶)或GS(谷氨酰胺合酶)的控制下的生长和存活选择来扩大蛋白质表达。

[0056] 本发明还提供至少一种用于在宿主细胞中表达至少一种前述的抗GD2抗体的方法,包括在至少一种抗GD2细胞以可检测和/或可回收的量表达的条件下培养如本文所述的宿主细胞。

[0057] 本发明还提供至少一种组合物,其包含(a)分离的如本文所述的抗GD2抗体编码核酸和/或抗体;和(b)合适的担载体或稀释剂。所述担载体或稀释剂可任选为可药用的,根据已知的担载体或稀释剂。所述组合物可任选地进一步包含至少一种其他化合物、蛋白质或组合物。在这些组合物中的一些中,嵌合或人源化抗体缀合于细胞毒剂(即损害细胞的存活力和/或功能的作用剂),诸如细胞毒药物、毒素或放射性核素。

[0058] 本发明进一步提供至少一种抗GD2抗体方法或组合物,用于在相关的状况之前、之后、或之中,如本领域已知的和/或如本文所述的,施用治疗有效量来调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者和/或中的至少一种GD2相关状况。因此,本发明提供一种诊断或治疗细胞、组织、器官或动物中的GD2相关状况的方法,包括将包含有效量的至少一种本发明的分离的抗GD2抗体或其片段接触或施用给细胞、组织、器官或动物。所述方法任选地可进一步包括对细胞、组织、器官或动物施用0.001-50mg/千克的本发明的抗GD2抗体。所述方法可任选地进一步包括通过选自下组的至少一种模式来进行所述接触或施用:胃肠外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、椎管内、鞘内、奥马耶贮器内(intra-Ommaya)、玻璃体内、眼内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、含服、舌下、鼻内、或经皮。所述方法可任选地进一步包括在抗体接触或施用之前、同时或之后施用至少一种组合物,所述组合物包含有效

量的至少一种化合物或蛋白质或细胞,所述化合物、蛋白质或细胞选自下述中的至少一种:可检测的标记物或报道分子、TNF拮抗剂、抗风湿剂、肌肉弛缓剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、止痛剂、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗银屑病药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、红细胞生成素、免疫、免疫球蛋白、抗体或抗体衍生缀合物、免疫抑制剂、生长激素、激素代替药物、放射性药剂、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、 $\beta$ 激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或其类似物、细胞毒剂或其他抗癌剂、抗代谢药如甲氨蝶呤、抗增殖剂、细胞因子、白介素、生长因子、细胞因子拮抗剂、以及抗TNF- $\alpha$ 、白细胞、T细胞、LAK细胞、TIL细胞、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、NKT细胞、工程化T细胞或NK细胞或单核细胞或粒细胞。

[0059] 本发明进一步提供至少一种抗GD2抗体方法,用于在相关的状况之前、之后或之中诊断细胞、组织、器官、动物或患者和/或中的至少一种GD2相关状况,如本领域已知的和/或如本文中所描述的。

[0060] 本发明还提供至少一种投递组合物、装置和/或方法,用于根据本发明诊断至少一种抗GD2抗体状况。

[0061] 还提供一种组合物,其包含至少一种分离的人源化抗GD2抗体和至少一种可药用的担载体或稀释剂。所述组合物可任选地进一步包含有效量的至少一种选自下述的至少一种的化合物或蛋白质:可检测的标记物或报道分子、细胞毒剂或其他抗癌剂、抗代谢药如甲氨蝶呤、抗增殖剂、细胞因子、或细胞因子拮抗剂、TNF拮抗剂、抗风湿剂、肌肉弛缓剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NTHE)、止痛剂、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗银屑病药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、红细胞生成素、免疫、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素代替药物、放射性药剂、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药物、 $\beta$ 激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或类似物。

[0062] 还提供一种医学装置,包含至少一种本发明的分离的哺乳动物抗GD2抗体,其中所述装置适合于通过选自下述的至少一种模式接触或施用至少一种抗GD2抗体:胃肠外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、鞘内、奥马耶贮器内、玻璃体内、眼内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、椎管内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、含服、舌下、鼻内、或经皮。

[0063] 在一个进一步的方面,本公开提供一种试剂盒,其包含处于第一容器中的至少一种呈冻干形式的本公开的嵌合或人源化抗GD2抗体或片段,和任选的第二容器,所述第二容器包含无菌水,无菌缓冲水,或处于水性稀释剂中的选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧乙醇、甲醛、三氯叔丁醇、氯化镁、对羟基苯甲酸烷基酯、苯扎氯铵、苄索氯铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞的至少一种的防腐剂,甘露醇,蔗糖,甘露糖,其他糖,吐温80或其混合物。在一个方面,在所述试剂盒中,用所述第二容器中的内容物将所述第一容器中的抗GD2抗体或特定的部分或变体的浓度复原到大约0.1mg/ml到大约500mg/ml的浓度。在另一个方面,所述第二容器进一步包含等张剂。在另一个方面,所述第二容器进一步包含生理学上可接受的缓冲剂。在一个方面,本公开提供一种治疗至少一种GD2特征性状况的方法,包括对有需要的患者施用试剂盒中提供的、并在施用之前经复原的配制剂。

[0064] 还提供一种供人体药用或诊断用的制品,其包括:包含溶液或冻干形式的至少一

种本发明的分离的嵌合或人源化抗GD2抗体的容器和包装材料。所述制品可任选地包含具有所述容器作为胃肠外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、鞘内、奥马耶贮器内、玻璃体内、眼内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、椎管内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、含服、舌下、鼻内、或经皮递送装置或系统的组件。

[0065] 发明详述

[0066] 在下面的说明中多处使用了若干重组DNA和免疫学中使用的术语。为了提供对说明书的权利要求书,包括赋予这些术语的范围的更清楚、一致的理解,提供下面的定义。

[0067] 术语“抗体”是本领域公认的一个术语,意在包括结合已知抗原的分子或分子的活性片段。结合已知抗原的分子的活性片段的例子包括Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。这些活性片段可通过多种技术从本发明的抗体获得。例如,可以用酶,如胃蛋白酶切割经纯化的单克隆抗体,并进行HPLC凝胶过滤。然后可收集含有Fab片段的合适的级分并通过膜过滤等加以浓缩。关于分离抗体的活性片段的一般技术的进一步说明可见例如Khaw, B. A. et al. J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982)。术语“抗体”还包括双特异性和嵌合抗体。

[0068] 如本文所述的抗体指全长(即天然存在的或通过通常的免疫球蛋白基因片段重组过程形成的)免疫球蛋白分子(例如IgG抗体)或免疫球蛋白分子的免疫学活性的(即特异结合性的)片段,如抗体片段一样。

[0069] 抗体片段是抗体的部分,如F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, sFv等。不考虑结构,抗体片段与完整抗体所识别的相同抗原结合。例如,3F8单克隆抗体片段与3F8所识别的表位结合。术语“抗体片段”还包括任何通过结合特异性抗原形成复合物而像抗体一样作用的任何合成或基因工程的蛋白质。例如,抗体片段包括由下述组成的分离片段:可变区,例如由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段;其中轻链和重链可变区通过肽接头连接的重链单链多肽分子(“scFv蛋白”);以及由模拟高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。

[0070] 用语“单克隆抗体”是本领域公知的术语。单克隆抗体是相同的单特异性抗体,因为它们是一种免疫细胞生成的,这些免疫细胞都是单一亲本细胞的克隆。

[0071] 本领域存在多种用于产生单克隆抗体的方法。例如,可以通过重组DNA方法,如美国专利第4,816,567号中描述的那些方法来制作单克隆抗体。在此语境中,术语“单克隆抗体”涉及从单一真核、噬菌体、或原核克隆获得的抗体。编码本发明的单克隆抗体的DNA可以利用常规程序(例如通过使用能够特异性结合编码鼠抗体的重链和轻链、或来自人、人源化或其他来源的此类链的基因的寡核苷酸探针)分离和测序。一旦被分离,可以将DNA置入表达载体,然后将该载体转化入宿主细胞如NS0细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、酵母细胞、藻类细胞、卵、或原本不产生免疫球蛋白蛋白质的骨髓瘤细胞,以获得重组宿主细胞中单克隆细胞的合成。DNA还可以通过用期望的物种的人重链和轻链恒定域编码序列替换同源人序列(美国专利4,816,567, Morrison等人,同上),或通过非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或一部分共价连接于免疫球蛋白编码序列来加以修饰。可以用此类非免疫球蛋白多肽替换本发明的抗体的恒定域,或者可用其替换本发明的抗体的一个抗原结合位点的可变域,来形成嵌合二价抗体。

[0072] 术语“表位”是本领域公知的。按照通常本领域技术人员的理解其涉及抗原的与抗体相互作用的区域。肽或蛋白质或糖抗原的表位可以是线性的或者是构象性的,或者可以由抗原的邻接或非邻接的氨基酸和/或糖序列形成。GD2分子,像许多碳水化合物一样,含有许多表位。由本发明的抗体所识别的表位或糖,以及这些糖的仍然被该抗体识别的保守取代,GD2抗原的化学模拟物的肽,以及抗独特型抗体,都是本发明的实施方案。这些糖,或模拟肽/化学品,或抗独特型抗体,提供了在免疫亲和柱上洗脱GD2到MoAb或从GD2洗脱MoAb的方便方法。对这些表位的进一步截短是可能的。

[0073] 裸抗体通常是未与治疗剂缀合的完整抗体。这是因为抗体分子的Fc部分提供效应物功能,诸如补体固定和ADCC(抗体依赖性细胞细胞毒性),效应物功能启动某些机制的作用,有可能导致细胞裂解。裸抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体二者,以及某些重组抗体,诸如嵌合、人源化或人抗体。然而,有可能的是Fc部分并非为治疗功能所必需,而是抗体通过其他机制,诸如诱导细胞周期静息和凋亡来发挥治疗效应。在此情况下,裸抗体也包括上文定义的未缀合的抗体片段。

[0074] 嵌合抗体是一种重组蛋白质,其含有包括源自一个物种的抗体(优选啮齿动物抗体)的互补决定区(CDR)的可变域,而该抗体分子的恒定域则源自人抗体的那些。对于兽医应用,嵌合抗体的恒定域可源自其他物种(如猫或犬)的。

[0075] 人源化抗体是一种重组蛋白质,其中来源于来自一个物种的抗体(例如啮齿动物抗体)的CDR从该啮齿动物抗体的重链和轻链可变域被转移到人重链和轻链可变域中。所述抗体分子的恒定域源自人抗体的那些。

[0076] 人抗体是这样的抗体,其获自这样的转基因小鼠,所述转基因小鼠已经被“工程化”从而响应于抗原攻击而产生特异性的(specific)人抗体。在这种技术中,抗体重链和轻链基因座的元件被导入源自含有内源重链和轻链基因座位的靶向破坏的胚胎干细胞系的小鼠品系。该转基因小鼠能够合成对人抗原特异性的人抗体,且该小鼠可用来产生分泌人抗体的杂交瘤。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法在Green et al.,Nature Genet.7:13(1994),Lonberg et al.,Nature368:856(1994),and Taylor et al.,Int.Immun.6:579(1994)中有说明。完全人的抗体还可以通过基因或染色体转染方法、以及噬菌体展示技术来构建,这些都是本领域已知的。例如参见McCafferty et al.,Nature348:552-553(1990),其从来自未经免疫的供体的免疫球蛋白可变域基因库体外产生人抗体及其片段。在这种技术中,将抗体可变域基因合框地克隆到丝状细菌噬菌体的主要或次要包壳蛋白基因中,并作为功能性抗体片段展示到噬菌体颗粒的表面上。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能性质的选择亦导致编码展示这些性质的抗体的基因的选择。通过这种方式,噬菌体模拟B细胞的某些性质。噬菌体展示可以按照多种模式进行,这些模式的综述参见例如Johnson and Chiswell,CurrentOpinion in Structural Biology3:5564-571(1993)。

[0077] 还可以通过体外活化的B细胞来生成抗体。参见例如美国专利第5,567,610号和第5,229,275号,兹通过提述并入其全部内容。

[0078] 治疗剂是与抗体部分(即抗体或抗体片段,或子片段)分别、同时或顺序施用,或者缀合于抗体部分,并用于治疗疾病的分子或原子。治疗剂的粒子包括抗体、抗体片段、药物、毒素、核酸酶、激素、免疫调节物、螯合剂、硼化合物、光敏剂或染料以及放射性同位素。

[0079] 诊断剂是施用缀合于抗体部分(即抗体或抗体片段或子片段),并通过确定含有抗体的细胞的位置而有助于诊断或检测疾病的分子或原子。有用的诊断剂包括但不限于放射性同位素、染料(如具有生物素-链亲和素复合物)、造影剂、荧光化合物或分子以及用于核磁共振成像(MRI)的增强剂(例如顺磁离子)。美国专利第6,331,175号描述了MRI技术以及缀合于MRI增强剂的抗体的制备,兹通过提述并入其全部内容。优选地,诊断剂选自下组:放射性同位素、用于核磁共振成像的增强剂、以及荧光化合物。为了让抗体组分负载放射性活性金属或顺磁离子,有可能需要使其与具有长尾部的化合物反应,其中该化合物附接有多个螯合基团用于结合所述离子。这样的尾部可以是聚合物,诸如聚赖氨酸、多糖、或其他具有可结合螯合基团(例如乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、卟啉、多胺、冠醚、双-氨硫脲,聚脲、以及已知可用于此目的的类似基团)的侧基的衍生化链或可衍生化链。使用标准化学将螯合物偶连到抗体。通常通过这样的基团将螯合物连接于抗体,使得能够在最小的免疫反应性损失、最小的聚集和/或内部交联的条件下与分子形成键。其他更通常的缀合螯合物到抗体的方法和试剂公开于授予Hawthorne的美国专利第4,824,659,名称为“Antibody Conjugates”(抗体缀合物),授权公告日为1989年4月25日,兹通过提述并入其全部内容。特别有用的金属-缀合物组合包括2-苄基-DTPA及其单甲基和环己基类似物,与诊断用同位素一起用于放射性成像。相同的螯合物当与非放射性金属如锰、铁和钆复合时,当与本发明的抗体一起使用时,可用于MRI。大环螯合物如NOTA、DOTA和TETA可以与多种金属和放射性金属(radiometal)一起使用,最具体地是分别与镱、钷和铜的放射性核素一起使用。通过调整环大小以适应感兴趣的金属,可以使这些金属-螯合物复合物变得非常稳定。其他环型螯合物诸如大环聚醚,其因可稳定地结合核素如 $^{223}\text{Ra}$ 以供用于RAIT而受到关注,被本发明所涵盖。

[0080] 免疫缀合物是抗体组分与治疗或诊断剂的缀合物。诊断剂可包括放射性或非放射性标记物、造影剂(诸如用于磁共振成像、计算机断层照相或超声),且放射性标记物可以是发射 $\gamma$ 、 $\beta$ 、 $\alpha$ 、俄歇电子、或正电子的同位素。

[0081] 免疫调节物是如本发明定义的治疗剂,当存在时,典型地刺激免疫细胞在免疫应答级联中增殖或活化,诸如巨噬细胞、B细胞和/或T细胞。如本文中描述的免疫调节物的一个例子是细胞因子。如本领域技术人员将会领会的,特定的白介素和干扰素是刺激T细胞或其他免疫细胞增殖的细胞因子的实例。

[0082] 表达载体是包含在宿主细胞中表达的基因的DNA分子。典型地,基因表达被置于特定的调节元件(包括组成型和诱导型启动子、组织特异性调节元件,和增强子)的控制之下。这样的基因被称为“可操作地连接于”所述调节元件。

[0083] 重组宿主细胞可以是任何含有克隆载体或者表达载体的原核或真核细胞。该术语还包含已经过基因工程改造,从而在宿主细胞的染色体或基因组中,或者宿主细胞的细胞中含有经克隆的基因的那些原核或真核细胞,以及转基因动物。

[0084] 多特异性抗体是这样的抗体,其能够同时结合至少两个不同结构的靶,例如两种不同的抗原,同一抗原上的两种不同表位,或一种半抗原与一种抗原或表位。例如,一种特异性可以是针对例如B细胞、T细胞、髓样细胞、浆细胞、或肥大细胞抗原或表位的。另一种特异性可以是针对相同细胞类型上的不同抗原,如B细胞上的CD20、CD19、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74、或CD22。多特异性、多价抗体是具有多于一个结合位点的构建物,且所

述各结合位点具有不同特异性。例如,一种双特异性双抗体,其中一个结合位点与一种抗原反应,另一个结合位点与另一种抗原反应。

[0085] 双特异性抗体是这样的抗体,其能够同时结合具有不同结构的两个靶。双特异性抗体(bsAb)和双特异性抗体片段(bsFab)具有特异性结合例如GD2的至少一条臂,以及至少另一条特异性结合携带治疗或诊断剂的可寻靶缀合物的臂。可以利用分子工程产生多种双特异性融合蛋白。在一个形式中,双特异性融合蛋白是二价的,由例如一个具有针对一种抗原的单一结合位点的scFv,以及一个具有针对第二种抗原的结合位点的Fab片段所组成。在另一个方面,双特异性融合蛋白是四价的,由例如一个具有针对一种抗原的两个结合位点的IgG,以及两个针对第二种抗原的相同的scFv所组成。

[0086] 新近的产生双特异性MoAb的方法包括这样的工程化重组MoAb,它们具有额外的半胱氨酸残基,使得它们比更常见的免疫球蛋白同种型更强地交联。参见例如FitzGerald et al.,Protein Eng.10(10):1221-1225,1997。另一种途径是工程改造出这样的重组融合蛋白:其连接两个或更多个具有需要的双重特异性的不同单链抗体或抗体片段区段。参见例如Coloma et al.,NatureBiotech.15:159-163,1997。利用分子工程可以产生多种双特异性融合蛋白。

[0087] 连接两个或更多个不同的单链抗体或抗体片段的双特异性融合蛋白是以类似的方式产生的。重组方法可以用来产生多种融合蛋白。柔性的接头将scFv连接到3F8抗体的重链的恒定区。或者,可以将scFv连接于另一人源化抗体的轻链的恒定区。通过PCR反应,将合框连接重链Fd与scFv所需的合适接头序列导入VL和V<sub>K</sub>域。然后将编码scFv的DNA片段连接到含有编码CH1域的DNA序列的中间载体(staging vector)中。将所得的scFv-CH1构建体切离并连接到含有编码3F8抗体的V<sub>H</sub>区的DNA序列的载体中。所得的载体可以用来转染合适的宿主细胞,如哺乳动物细胞,用于表达所述双特异性融合蛋白。

[0088] 本发明的3F8抗体及其片段还可以用来制备功能性双特异性单链抗体(bscAb),又称双抗体(diabodies),并且可以使用重组方法在哺乳动物细胞中生成。参见例如Mack et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.,92:7021-7025,1995,兹通过提述并入本文。例如,利用重组方法,藉由谷氨酸-丝氨酸接头连接两个单链Fv片段来产生bscAb。利用本领域已知的标准PCR方法分离两种感兴趣的抗体的V轻链和V重链域。双特异性单链抗体和双特异性融合蛋白包括在本发明的范围内。

[0089] 本文描述的双特异性双抗体的最终用途是用于预靶定(pre-targeting)GD2阳性细胞以便后续特异性投递诊断/检测剂或治疗剂。这些双抗体选择性地结合被靶定的抗原,使得亲和力增加以及在期望位置处的驻留时间更长成为可能。此外,非抗原结合的双抗体被快速地从身体清除,且正常组织的暴露被最小化。所述诊断/检测剂及治疗剂可以包括同位素、药物、毒素、细胞因子、激素、生长因子、缀合物、放射性核素、以及金属。例如钆金属用于磁共振成像(MRI)。放射性核素,尤其是在60-4000keV的能量范围中的那些,也可以用作诊断剂和治疗剂。

[0090] 所述可寻靶的构建物可以有多种多样的结构,但对其加以选择,以便在bsAb寻靶方法中使用不仅避免引发免疫应答,还可快速地在体内清除。疏水性作用剂在引发强免疫应答方面是最好的,而亲水性作用剂对于快速体内清除而言是优选的;因此,需要在疏水性和亲水性之间建立平衡。这部分地通过依赖使用亲水性螯合剂抵消多种有机部分的固有

疏水性来实现。另外,可以选择具有相反的溶液性质的可寻靶构建体亚单位,例如肽,其含有氨基酸,其中某些氨基酸是疏水性的,某些氨基酸是亲水性的。除了肽之外,可以使用碳水化合物化合物。

[0091] 可以使用少达两个氨基酸残基的肽,优选2-10个残基,如果还偶连于其他部分如螯合剂的话。接头应当为低分子量缀合物,优选具有小于50000道尔顿的分子量,最好小于大约20000道尔顿,10000道尔顿或5000道尔顿,其中包括所述缀合物中的金属离子。

[0092] 所述接头部分上亲水性缀合物部分的存在有助于确保快速的体内清除。除了亲水性之外,还针对它们的金属结合性质遴选螯合剂,并随意加以改变,因为至少对于那些其bsAb表位是肽的一部分或者是非缀合物化学半抗原的接头而言,金属-缀合物缀合物的识别不再是问题。

[0093] 螯合剂如DTPA、DOTA、TETA、或NOTA或合适的肽,可缀合可检测的标记物(如荧光分子)或细胞毒剂(如重金属或放射性核素)。例如,将光敏剂或染料与抗体融合蛋白缀合,可以获得在治疗上有用的免疫缀合物。已经使用荧光组合物,如荧光色素,以及其他色原,或染料,如对可见光敏感的卟啉,来通过将合适的光导向病变来检测和治疗病变。在治疗中,这被称为光辐射(photoradiation),光疗(phototherapy),或光动力学疗法(photodynamic therapy)(Jori et al.(eds.),PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto 1985);van den Bergh,Chem.Britain 22:430(1986))。此外,还已将单克隆抗体偶连于光活化的染料来实现光疗。Mew et al.,J.Immunol.130:1473(1983);同上,Cancer Res.45:4380(1985);Oseroff et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8744(1986);同上,Photochem.Photobiol.46:83(1987);Hasan et al.,Prog.Clin.Biol.Res.288:471(1989);Tatsuta et al.,Lasers Surg.Med.9:422(1989);Pelegrin et al.,Cancer 67:2529(1991)。但是,这些较早的研究没有包含内窥镜疗法应用,尤其是同时使用抗体片段或子片段。因此,本发明考虑包含光敏剂或染料的免疫缀合物的治疗用途。

[0094] 相同的螯合剂当与非放射性金属如Mn、Fn和Gd螯合时,当与本发明的bsAbs一起使用时,可以用于MRI。大环螯合剂如NOTA(1,4,7-三氮杂-环壬烷-N,N',N''-三乙酸)、DOTA、和TETA(对-溴乙酰胺-苄基-四甲基胺四乙酸)可以与多种金属和放射性金属一起使用,尤其是分别与Ga、Y和Cu的放射性核素一起使用。

[0095] 如本文中使用的,术语“预防”涉及作为预防剂或治疗剂施用的结果,受试者中某种病症的一种或多种症状的复发或发病的防止。

[0096] 如本文中使用的,术语“组合”涉及使用多于一种预防和/或治疗剂。术语“组合”并不限制对具有病症的受试者施用各预防剂和/或治疗剂的顺序。对具有病症的受试者施用第一预防或治疗剂可以在施用第二预防或治疗剂之前(例如5分钟、15分钟、30分钟、25分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周前)、同时、或之后(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、或12周后)。

[0097] 如本文中所述的“效应物功能”意思是抗体Fc区域与Fc受体或配体相互作用而导致的生物化学事件。效应物功能包括但不限于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗

体依赖性细胞介导的吞噬作用 (ADCP)、以及补体介导的细胞毒性 (CMC)。效应物功能包括在抗原结合之后运作的那些,以及不依赖于抗原结合而运作的那些。

[0098] 如本文中所述的“效应(物)细胞”意思是免疫系统的表达一种或多种Fc受体并介导一种或多种效应物功能的细胞。效应物细胞包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、大颗粒淋巴细胞、郎格汉斯细胞、天然杀伤(NK)细胞、T-淋巴细胞、B-淋巴细胞,并且可以来自任何生物体,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、和猴。

[0099] 如本文中使用的“Fc配体”意思是来自任何生物的这样的分子,优选多肽,其结合抗体的Fc区而形成Fc-配体复合物。Fc配体包括但不限于Fc- $\gamma$ -RIIA (CD32A)、Fc- $\gamma$ -RIIB (CD32B)、Fc- $\gamma$ -RIIIA (CD16A)、Fc- $\gamma$ -RIIIB (CD16B)、Fc- $\gamma$ -RI (CD64)、Fc- $\epsilon$ -RII (CD23)、FcRn、C1q、C3、葡萄球菌蛋白A、葡萄球菌蛋白G、以及病毒Fc- $\gamma$ -R。Fc片段可包括结合Fc的尚未发现的分子。

[0100] 在一个优选的具体实施方案中,本发明涵盖包含变体Fc区域的分子,其中所述Fc区域相对于野生型Fc区域包含至少一个氨基酸修饰,使得所述分子具有对Fc $\gamma$ R的改变的亲合力,只要所述变体Fc区域在根据对Fc-Fc $\gamma$ R相互作用的晶体学和结构分析与Fc-Fc $\gamma$ R直接接触的位置(如Sondermann et al., 2000 (Nature, 406:267-273, 本文通过提述并入其全部内容)中公开的那些)不具有取代即可。Fc区域内与Fc $\gamma$ R直接接触的位置的例子为氨基酸234-239(铰链区)、氨基酸265-269(B/C环)、氨基酸297-299(C'/E环)、和氨基酸327-332(F/G)环。在某些实施方案中,本发明的包含变体Fc区域的分子包含对至少一个根据结构和晶体学分析与Fc-Fc $\gamma$ R直接接触的残基的修饰。

[0101] 本发明的一个方面包括具有对活化性和/或抑制性受体的改变的亲和力的3F8抗体,其具有包含一个或多个氨基酸修饰的变体Fc区域,其中所述一个或多个氨基酸修饰是在第239位用天冬氨酸的取代,在第330位用亮氨酸的取代,以及在第332位用谷氨酸的取代(见实施例13)。

[0102] 本发明涵盖包含变体Fc区域的分子,所述变体Fc区域在本发明的抗体的Fc区域中具有一个或多个氨基酸的添加、缺失和/或取代,以改变效应物功能,或增强或降低抗体对FcR的亲合力。这些突变是本领域技术人员能力之内的。因此,本发明涵盖包含变体Fc区域的分子,所述变体Fc区域以更大的亲合力结合一种或多种Fc $\gamma$ R。这样的分子优选更有效地介导效应物功能,如上文讨论的。在其他实施方案中,本发明涵盖包含变体Fc区域的分子,所述变体Fc区域以更弱的亲合力结合一种或多种Fc $\gamma$ R。降低或消除效应物功能在某些情况下是理想的,例如在抗体的作用机理涉及阻断或拮抗,而不是杀死携带靶抗原的细胞的情况下。降低或消除效应物功能在要阻断效应物细胞中的Fc $\gamma$ R活化受体的自身免疫病的情况下(这种类型的功能会存在于宿主细胞中)可能是理想的。一般而言,增加的效应物功能会指向肿瘤和外来细胞。

[0103] 本发明的Fc变体可与其他Fc修饰组合,包括但不限于改变效应物功能的修饰。本发明涵盖将本发明的Fc变体与其他Fc修饰组合来提供抗体或Fc融合物中的叠加、协同或新的性质。优选地,本发明的Fc变体增强它们与之组合的修饰的表型。例如,如果本发明的Fc变体与已知以高于相当的包含野生型Fc区域的分子的亲合力结合Fc $\gamma$ RIIIA的突变体组合,这种与本发明的突变体的组合导致Fc $\gamma$ RIIIA亲和力的更大倍数的提高。在一些实施方

案中,本发明的Fc变体被组入这样的抗体或Fc融合物中,所述抗体或Fc融合物包含一个或多个工程化的糖形(glycoforms),即与包含Fc区域的分子共价连接的碳水化合物组合物(carbohydrate composition),其中所述碳水化合物组合物在化学上不同于与包含Fc区域的亲本分子的碳水化合物组合物。

[0104] 本发明涵盖具有修饰的糖基化位点的抗体,优选不改变抗体的功能性,例如结合活性GD2。如本文中使用的,“糖基化位点”包括抗体中任何如下所述的特定的氨基酸序列:寡糖(即含有两个或更多个连接到一起的简单糖的碳水化合物+)会特异性并共价地附接到该氨基酸序列。寡糖侧链典型地通过N-或O-连接与抗体的骨架连接。N连接的糖基化指寡糖部分与天冬酰胺残基的侧链的附接。O-连接的糖基化指寡糖部分与羟基氨基酸,例如丝氨酸、苏氨酸的附接。在特殊的CHO细胞中产生了一种Fc-糖形hu3F8-H1L1-IgG1n,其缺少某些寡糖,包括岩藻糖和末端N-乙酰葡萄糖胺,并展现增强的ADCC效应物功能。

[0105] 在某些实施方案中,本发明涵盖通过增加或缺失糖基化位点来调节本发明抗体的碳水化合物含量的方法。调节抗体的碳水化合物含量的方法是本领域公知的,并涵盖在本发明中,参见例如美国专利第6,218,149号;EP0359096B1;美国专利申请公开US2002/0028486;W003/035835;美国专利申请公开2003/0115614;美国专利第6,218,149号;美国专利第6,472,511号,本文通过提述并入所有这些文献的全部内容。在其他实施方案中,本发明涵盖通过缺失抗体的一个或多个内源碳水化合物部分来调节本发明的抗体的碳水化合物含量的方法。在特定的实施方案中,本发明涵盖通过将第297位从天冬酰胺修饰为丙氨酸来缺失抗体的Fc区域的糖基化位点。

[0106] 工程化的糖形可用于多种目的,包括但不限于提高或降低效应物功能。工程化的糖形可以通过本领域技术人员所知的任何方法来生成,例如通过使用工程化的或变体表达株,通过与一种或多种酶(例如DI N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III (GnTIII) 共表达,通过在多种生物体或来自多种生物体的细胞系中表达包含Fc区域的分子,或者通过在已经表达了包含Fc区域的分子之后修饰碳水化合物。用于生成工程化的糖形的方法是本领域已知的,包括但不限于下列文献中描述的那些:Umana et al,1999,Nat.Biotechnol17:176-180;Davies et al.,20017Biotechnol Bioeng74:288-294;Shields et al,2002,J Biol Chem277:26733-26740;Shinkawa et al.,2003,J Biol Chem278:3466-3473) 美国专利第6,602,684号;美国申请流水号10/277,370;美国申请流水号10/113,929;PCT W000/61739A1;PCT W001/292246A1;PCT W002/311140A1;PCT W002/30954A1;Potillegent™技术(Biowa, Inc.Princeton,N.J.);GlycoMAb™糖基化工程化技术(GLYCART biotechnology AG, Zurich,Switzerland);本文通过提述并入每一篇的全部内容。参见例如W000061739;EA01229125;US20030115614;Okazaki et al.,2004,JMB,336:1239-49本文通过提述并入每一篇的全部内容。

[0107] 如本文使用的,术语“衍生物”在多肽或蛋白质的语境中指这样的多肽或蛋白质,其包含已经通过导入氨基酸残基取代、缺失或添加而改变了的氨基酸序列。如本文所用的,术语“衍生物”还指已经经过修饰的多肽或蛋白质,例如通过将任何类型的分子共价连接到多肽和蛋白质而修饰的多肽或蛋白质。例如,但不限于,抗体可以通过例如糖基化、乙酰化、PEG化、磷酸化、酰胺化、用已知的保护基/封闭基衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其他蛋白质结合等方式来修饰。衍生的多肽或蛋白质可以通过使用本领域技术人员已知的技术

进行化学修饰来产生,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成,等等。此外,衍生化多肽或蛋白质衍生物与衍生它们的多肽或蛋白质具有类似或相同的功能。

[0108] 如本文中使用的,术语“片段”指这样的肽或多肽,其包含另一多肽的氨基酸序列的至少5个连续氨基酸残基,至少10个连续氨基酸残基,至少15个连续氨基酸残基,至少20个连续氨基酸残基,至少25个连续氨基酸残基,至少40个连续氨基酸残基,至少50个连续氨基酸残基,至少60个连续氨基酸残基,至少70个连续氨基酸残基,至少连续80个氨基酸残基,至少连续90个氨基酸残基,至少连续100个氨基酸残基,至少连续125个氨基酸残基,至少150个连续氨基酸残基,至少连续175个氨基酸残基,至少连续200个氨基酸残基,或至少连续250个氨基酸残基的氨基酸序列。在特定的实施方案中,多肽的片段保留多肽的至少一种功能。

[0109] 有效量:如本文中使用的,术语“有效量”涉及对于实现期望的生物学效应为必要或充分的给定化合物、缀合物或组合物的量。给定化合物、缀合物或组合物的依照本发明的方法的量会是达到此选定结果的量,而且本领域技术人员使用本领域已知的和/或本文中描述的测定法可以常规地确定这样的量,而不需付出过度的实验。例如,用于治疗或预防癌症转移的有效量可以是为了防止肿瘤细胞体内迁移和侵袭穿过基底膜或穿过内皮细胞层所必要的量。该术语也与“充分量”同义。对于任何具体应用而言的有效量可以依赖于所治疗的疾病、病症或状况、所施用的特定组合物、施用的路径,受试者的身体大小,和/或疾病的严重程度等因素而变化。本领域普通技术人员能够遵照本文中提供的指导根据经验确定本发明的具体化合物、缀合物或组合物的有效量而不需要过度的实验。

[0110] 如本文中测得的量联用的术语“约”是指技术人员在给予与测量的目的以及所用的测量设备相当的注意水平的条件下,可预期的测得的量的正常变化。除非另有说明,“约”指所给出的数值的 $\pm 10\%$ 的变化。

[0111] “分离的”多肽或其片段、变体或衍生物意指不处于其天然环境中的多肽。不要求具体水平的纯化。例如,分离的多肽可以是从其天然或自然环境中移出的。就本发明的目的而言,在宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质被认为是分离的,而已经通过任何合适的技术分开、分级、或部分地或实质上地纯化的天然或重组多肽也认为是分离的。

[0112] 作为本发明的多肽,还包括前述肽的片段、衍生物、类似物或变体,及其任何组合。术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”当指抗GD2抗体或抗体多肽时包括任何保留相应的天然抗体或多肽的至少一些抗原结合性质的多肽,即那些保留结合GD2上的一个或多个表位的能力的多肽。本发明的多肽的片段还包括蛋白水解片段、以及缺失片段,除了本文中他处讨论的具体抗体片段之外。可依照本发明使用的抗GD2抗体和抗体多肽的变体包括如上文描述的片段,以及具有由于氨基酸取代、缺失或插入而改变的氨基酸序列的多肽。变体可以天然存在或者是非天然存在的。非天然存在的变体可以使用本领域已知的诱变技术或非天然氨基酸产生。变体多肽可包括保守或非保守氨基酸取代、缺失或添加。可以依照本发明使用的抗GD2抗体和抗体多肽的衍生物是已经经过改变而展现天然多肽中不出现的其他特征的多肽。例子包括融合多肽。变体多肽在本文中可称为“多肽类似物”。如本文中使用的,抗GD2抗体或抗体多肽的“衍生物”涉及具有一个或多个通过功能性侧基的反应而化学衍生化的残基的主题多肽。“衍生物”还包括含有一个或多个20种标准氨基酸的天然存在的

氨基酸衍生物的那些肽。例如,4-羟脯氨酸可以替换脯氨酸;5-羟赖氨酸可以替换赖氨酸;3-甲基组氨酸可以替换组氨酸;高丝氨酸可以替换丝氨酸;且鸟氨酸可以替换赖氨酸。

[0113] 治疗:如本文使用的,术语“治疗”涉及预防 (prophylaxis) 和/或疗法 (therapy),尤其是其中目标是防止或减慢(减少)不期望的生理学变化或病症,例如多发性硬化的进展。有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的减轻,疾病程度的减小,疾病状态的稳定化(即不恶化),疾病进展的延迟或减慢,疾病状态的改善或缓和,以及缓解(部分或全部),不管是可检测的或是不可检测的。“治疗”还可以意指与预期如果不接受治疗的情况相比延长生存。需要治疗者包括已经具有状况或病症者,或者倾向于具有状况或病症者,或要预防状况或病症者。“受试者”或“个体”或“动物”或“哺乳动物”意指期望进行诊断、预后或治疗的任何受试者,尤其是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人和其他灵长类动物、家养动物、农场动物,以及动物园、运动或宠物动物如犬、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、母牛等。

[0114] 人源化抗体

[0115] 在一个实施方案中,本发明提供的抗体是单克隆抗体,所述单克隆抗体在一个优选的实施方案中是源自其他物种的相关抗GD2抗体的人源化形式。人源化抗体是通过重组DNA技术产生的抗体,其中用人免疫球蛋白轻链或重链中对于抗原结合而言不需要的某些或全部氨基酸(例如恒定区以及可变域的框架区)替换来自相关的非人抗体的轻链或重链的相应氨基酸例如,针对给定抗原的鼠抗体的人源化形式在其重链和轻链上具有(1)人抗体的恒定区;(2)来自人抗体的可变域的框架区;以及(3)来自鼠抗体的CDR。当必要时,人框架区中的一个或多个残基可以改变为鼠抗体中的相应位置处的残基,以保留人源化抗体对抗原的结合亲和力。这种改变有时称为“回复突变”。类似地,为了期望的理由,例如稳定性或对抗原的亲和力,可进行正向突变(forward mutation)来恢复到鼠序列。例如,对于hu3F8-H1L1-IgG1,必须在重链序列中的19个位置上和轻链中的17个位置上进行回复突变,以保持体外结合亲和力。人源化抗体通常与嵌合抗体相比在人体中引发免疫应答的可能性较小,因为前者所含的非人组分低得多。

[0116] 在例如下列文献中记载了制造本发明的人源化抗体的合适方法:WinterEP0239400;Jones et al.,Nature321:522-525(1986);Riechmann et al.,Nature332:323-327(1988);Verhoeyen et al.,Science239:1534-1536(1988);Queen et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.USA86:10029(1989);美国专利6,180,370;和Orlandi et al.,Proc.Nat.Acad.Sci.USA86:3833(1989);本文通过提述并入所有这些文献的全部公开内容。一般地,将鼠(或其他非人)CDR移植到人抗体上是这样实现的。从杂交瘤分离编码重链和轻链可变域的cDNA。通过测序确定可变域(包括CDR)的DNA序列。将编码CDR的DNA插入人抗体重链或轻链可变域编码序列的相应区域中,与期望同种型(例如对CH而言的 $\gamma$ 1和对CL而言的K)的人恒定区基因区段连接,进行基因合成。将人源化重链和轻链基因在哺乳动物宿主细胞(例如CHO或NS0细胞)中共表达以产生可溶性人源化抗体。为便于大规模产生抗体,在生产系中利用DHFR基因或GS基因选择高表达者常常是理想的。将这些产生细胞系在生物反应器中或空纤维培养系统中,或者使用WAVE技术进行培养,以产生可溶性抗体的大批培养物,或产生在乳汁中表达抗体的转基因哺乳动物(例如山羊、牛或绵羊)(参见美国专利5,827,690)。

[0117] 使用上述的方法,生成了3F8抗体的人源化和嵌合形式。用编码轻链和重链的鼠

3F8可变区的cDNA构建用于表达鼠-人嵌合物的载体,所述嵌合物中鼠3F8可变区连接于人IgG1(对于重链)和人 $\kappa$ (对于轻链)恒定区,如本文实施例中所述的。此外,为了提高对Fc受体的结合以及提高抗原亲和力,创建了具有变体糖基化的hu3F8新形式。

[0118] 为了产生人源化3F8抗体,通过对人种系序列的同源性匹配选择了人接受体框架域。使用这些选出的人接受体框架,设计了轻链和重链可变域,并生成和表达了每一种所述可变域的多种变体/形式,如下文实施例中所述。

[0119] 本申请中描述了本发明的MoAb的重链和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列。本发明还提供包含编码本发明抗体及其片段的核苷酸序列的多核苷酸。本发明还涵盖在严格或较低严格杂交条件下与编码本发明抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。

[0120] 所述多核苷酸现在可以通过本领域中已知的任何方法获得。例如,由于抗体的核苷酸序列是已知的,可以用化学合成的寡核苷酸组装编码抗体的多核苷酸(例如如Kutmeier et al.,*BioTechniques*17:242(1994)中所述),简单地说,这包括合成含有编码抗体的序列的部分的重叠的寡核苷酸,退火并连接这些寡核苷酸,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0121] 或者,可以从来自合适来源的核酸生成编码抗体的多核苷酸。如果含有编码具体抗体的核酸的克隆不可用,但抗体分子的序列已知,则可以化学合成或者从合适的来源(例如抗体cDNA文库,或从任何表达所述抗体的组织或细胞,如选出的编码本发明抗体的杂交瘤细胞生成的cDNA文库或分离的核酸,优选多聚A+RNA)通过下述方式获得编码免疫球蛋白的核酸:使用可与所述序列的3'和5'端杂交的合成引物进行PCR扩增,或者通过使用对特定基因序列特异性的寡核苷酸探针进行克隆,以鉴定例如来自编码所述抗体的cDNA文库的cDNA克隆。随后可使用本领域公知的任何方法将PCR产生的经扩增的核酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0122] 由于抗体的核苷酸序列和相应的氨基酸序列是确定的,可以使用本领域公知的核苷酸序列操作方法,例如重组DNA技术、定点诱变、PCR等(参见例如下列文献中记载的技术: Sambrook et al.,1990,*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*,2d Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,和Ausubel et al.,eds.,1998,*Current Protocols in Molecular Biology*,John Wiley&Sons,N.Y.,二者都通过提述全部并入本文)来操作该核苷酸序列,来生成具有不同氨基酸序列的抗体,例如生成氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0123] 本发明的核酸分子可以是RNA的形式,如mRNA、hnRNA、tRNA或任何其他形式,或者是DNA的形式,包括但不限于通过克隆获得或化学合成的cDNA和基因组DNA,或其任何组合。DNA可以是三链的、双链的、或单链的,或其任何组合。DNA或RNA的至少一条链上的任何部分可以是编码链,又称有义链,或其可为非编码链,又称反义链。

[0124] 本发明的分离的核酸分子可包括这样的核酸分子,其包含可读框(ORF),任选地具有一个或多个内含子,例如但不限于至少一条重链或轻链的至少一个CDR(如CDR1、CDR2和/或CDR3)的至少一个特定的部分;包含抗GD2抗体或可变区的编码序列的核酸分子;以及包含这样的核苷酸序列的核酸分子:该核苷酸序列与上述的那些实质不同,但由于遗传密码的简并性,仍然编码如本文所述和/或本领域已知的抗GD2抗体。

[0125] 本发明提供在选择性的杂交条件下与本文中公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。

因此,该实施方案的多核苷酸可以用来分离、检测和/或定量编码此类多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可以用来鉴定、分离或扩增经保藏的文库中的部分或全长克隆。在某些实施方案中,所述多核苷酸是从来自人或哺乳动物核酸文库分离的或以其他方式与之互补的基因组或cDNA序列。

[0126] 所述核酸可方便地包含除了本发明的多核苷酸之外的序列。例如,可以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆序列插入核酸中以帮助该多核苷酸的分离。此外,可以插入可翻译的序列以帮助经翻译的本发明多核苷酸的分离。例如,六组氨酸标记序列提供了一种纯化本发明蛋白质的便利手段。本发明的核酸——不包括编码序列——任选地为用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体、适体、或接头。

[0127] 可以对此类克隆和/或表达序列添加额外的序列以优化它们在克隆和/或表达中的功能,帮助多核苷酸的分离,或改善多核苷酸对细胞的导入。克隆载体、表达载体、适体、以及接头的使用是本领域公知的(参见例如Ausubel,同上;或Sambrook同上)。

[0128] 本发明还提供包含任何上文所述的分离或纯化的核酸分子或其片段的载体。任何上述的核酸分子或其片段可以克隆到任何合适的载体中,并用于转化或转染任何合适的宿主。载体的选择和使用它们的方法是本领域普通技术人员公知的并在普通的技术参考文献中有说明(一般地,可参见"Recombinant DNA Part D,"Methods in Enzymology,Vol.153,Wu andGrossman,eds.,Academic Press(1987))。理想的是,视情况适宜,并考虑载体是DNA或RNA,载体包含调控序列,诸如转录和翻译起始和终止密码子,其对载体要导入的宿主(例如细菌、真菌、植物或动物)的类型是特异性的。优选地,载体包含对宿主的属(genus)而言特异性的调节序列。最优选地,载体包含对宿主的种(species)而言特异性的调控序列。

[0129] 除了复制系统和插入的核酸序列,构建体可包含一个或多个标志物基因,所述标志物基因使得选择经转化或转染的宿主成为可能。标志物基因包括杀生物剂抗性,例如对抗生素、重金属等的抗性,补全营养缺陷型宿主以提供原养性,等等。

[0130] 合适的载体包括设计用来增殖和扩增,或用来表达,或二者的那些。例如,克隆载体选自pUC系列、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,Calif.)、pET系列(Novagen, Madison,Wis.)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden),及pEX系列(Clontech, Palo Alto,Calif.)。也可以使用细菌噬菌体载体,如 $\lambda$ GT10、 $\lambda$ GT11、 $\lambda$ ZapII(Stratagene)、 $\lambda$ EMBL4,和 $\lambda$ NM1149。植物表达载体的例子包括pBI110,pBI101.2,pBI101.3,pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的例子包括pEUK-C1,pMAM和pMAMneo(Clontech)。TOPO克隆系统(Invitrogen,Carlsbad,Calif.)也可以遵照制造商的推荐使用。

[0131] 表达载体可包含与如上所述的分离或纯化的核酸分子可操作连接的天然或非天然启动子。启动子的选择,例如强、弱、诱导型、组织特异性和发育特异性,是本领域技术之内的。类似的,将如上所述的核酸分子或其片段与启动子组合也是本领域技术之内的。

[0132] 合适的病毒载体包括例如逆转录病毒载体、基于细小病毒的载体、例如基于腺伴随病毒(AAV)的载体、AAV-腺病毒嵌合载体,以及基于腺病毒的载体,以及慢病毒载体,如基于单纯疱疹(HSV)的载体。这些病毒载体可以使用例如下列文献中描述的标准重组DNA技术来制备:Sambrook et al.,Molecular Cloning,a Laboratory Manual,2d edition,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989);以及Ausubel et al.,Current Protocols inMolecular Biology,Green Publishing Associates and John Wiley&

Sons, New York, N.Y. (1994)。

[0133] 逆转录病毒载体来源于逆转录病毒。逆转录病毒是一种能够感染极多种宿主细胞的RNA病毒。在感染时,逆转录病毒基因组整合到它的宿主细胞的基因组中,并随宿主细胞DNA一起被复制,从而持续地产生病毒RNA和任何组入到逆转录病毒基因组中的核酸序列。这样,当使用逆转录病毒时可实现治疗因子的长期表达。考虑用于基因治疗的逆转录病毒是相对地非致病性的,虽然存在致病性的逆转录病毒。当使用致病性逆转录病毒,例如人免疫缺陷病毒(HIV)或人T细胞嗜淋巴细胞病毒(HTLV)时,需要注意改变病毒基因组以消除对宿主的毒性。可以进一步操作逆转录病毒载体来使得该病毒复制缺陷。这样,逆转录病毒载体被认为对体内稳定基因转移而言特别有用。慢病毒载体,诸如基于HIV的载体,是用于基因投递的逆转录病毒载体的例子。不同于其他逆转录病毒,基于HIV的载体已知可将它们的搭乘基因(passenger genes)组入非分裂细胞,因此可用于治疗顽固形式的疾病。

[0134] 任选地,所述分离或纯化的核酸分子,或其片段,当与另一核酸分子连接时,可编码融合蛋白。融合蛋白的生成是本领域常规技术之内的,并可涉及限制酶或重组克隆技术的使用(参见例如Gateway.TM. (Invitrogen))。另见美国专利5,314,995。

[0135] 鉴于前述,本发明还提供一种组合物,其包含上文所述的分离或纯化的核酸分子,任选以载体的形式。所述组合物可包含如本文进一步描述的其他组分。

[0136] 此外鉴于上述,本发明提供一种宿主细胞,其包含如上文描述的分离或纯化的核酸分子,任选地以载体的形式。最优选的是,本发明的细胞表达所述载体,使得所述寡核苷酸或其片段被该细胞高效率地转录和翻译。细胞的例子包括但不限于人细胞、人细胞系、大肠杆菌(例如大肠杆菌TB-1、TG-2、DH5 $\alpha$ 、XL-Blue MRF' (Stratagene)、SA2821和Y1090)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、粗糙脉孢菌(*N. crassa*)、昆虫细胞(例如Sf9、Ea4),以及其他下文所述者。宿主细胞可以存在于宿主中,宿主可为动物,如哺乳动物,尤其是人。

[0137] 术语“多肽”在本文中用作属类术语,指天然的蛋白质,片段,或多肽序列的类似物。因此,天然蛋白片段和类似物是多肽属类的种。依照本发明的多肽包含SEQ ID NO:1,2,4,7,8中显示的重链免疫球蛋白分子以及SEQ ID NO:2,5,6中显示的轻链免疫球蛋白分子,以及由包含所述重链免疫球蛋白分子与轻链免疫球蛋白分子(如 $\kappa$ 轻链免疫球蛋白分子)的组合所形成的抗体分子,反之亦然;及其片段和类似物。

[0138] 在一个特定的实施方案中,使用常规的重组DNA技术,可以将一个或多个本文中鉴定的CDR插入框架区。框架区可以是天然存在的或者是共有框架区,优选是人框架区(参见例如Chothia et al., J. Mol. Biol. 278:457-479 (1998) 中人框架区的列表)。优选地,由框架区和CDR的组合生成的多核苷酸编码特异性结合GD2的抗体。可以在框架区中进行一个或多个氨基酸取代,并且优选地,所述氨基酸取代改善抗体对其抗原的结合。此外,此类方法可用于取代或缺失一个或多个参与链间二硫键的可变区半胱氨酸残基,以生成缺少一个或多个链间二硫键的抗体分子。所述多核苷酸的其他改变为本发明所涵盖并在本领域技术之内。

[0139] 完全人抗体对于人患者的治疗性处理而言是特别理想的。人抗体可以用多种本领域已知的技术来制备,包括如上所述的噬菌体展示方法,使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库。另参见美国专利第4,444,887和4,716,111号,以及PCT公开W098/46645, W098/

60433, W098/24893, W098/16664, W096/34096, W096/33735, 和W091/10741; 将上述每一文献全文通过引用并入本文。Cole等人 和Boerder等人的技术也可以用于制备人单克隆抗体 (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Riss, (1985); 和 Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1): 86-95, (1991))。

[0140] 使用其他技术产生但保留本发明的抗GD2抗体的可变区的人抗体是本发明的一部分。人抗体还可以使用这样的转基因小鼠来产生, 其不能表达功能性的内源小鼠免疫球蛋白, 但能够表达人免疫球蛋白基因。例如, 可将人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物随机导入或通过同源重组导入小鼠胚胎干细胞。或者, 除了人重链和轻链基因之外, 可以将人可变区、恒定区和多样性区导入小鼠胚胎干细胞。在通过同源重组导入人免疫球蛋白基因座的同时或者分别地, 可以使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因变得无功能。尤其是, JH区域的纯合缺失可阻止内源抗体产生。将经过修饰的胚胎干细胞扩增后显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后繁殖嵌合小鼠来产生表达人抗体的纯合后代。用选定的抗原, 例如本发明多肽的全部或一部分, 按照正常方式免疫该转基因小鼠。可以从经过免疫的转基因小鼠使用常规的杂交瘤技术获得针对所述抗原的单克隆抗体。该转基因小鼠所携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化过程中重排, 然后经过类别转换和体细胞突变。由此, 使用这样的技术, 能够产生治疗上有用的IgG, IgA, IgM和IgE抗体。关于这种产生人抗体的技术的概述可见 Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)。关于该项技术用于产生人抗体及人单克隆抗体的详细讨论以及产生此类抗体的规程, 可见例如PCT公开W098/24893; W092/01047; W096/34096; W096/33735; 欧洲专利第0598877号; 美国专利第5, 413, 923; 5, 625, 126; 5, 633, 425; 5, 569, 825; 5, 661, 016; 5, 545, 806; 5, 814, 318; 5, 886, 793; 5, 916, 771; 和5, 939, 598号, 本文通过提述并入其全部内容。此外, 可接洽Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.), Genpharm (San Jose, Calif.), 和Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) 等公司以使用与上文所述的相似方法提供针对选定抗原的人抗体。

[0141] 对移植有人外周血白细胞、脾细胞或骨髓的小鼠 (例如XTL的三体瘤 (Trioma) 技术) 进行免疫也可以制造人MoAb。可以使用一种称为“引导选择” (guided selection) 的技术产生识别选定的表位的完全人抗体。在这种办法中, 使用选定的非人单克隆抗体, 例如小鼠抗体, 来引导选择识别相同表位的完全人抗体 (Jespersen et al., *Bio/technology* 12: 899-903 (1988))。

[0142] 如本文使用的, “抗GD2抗体”、“抗GD2抗体部分”或“抗GD2抗体片段”和/或“抗GD2抗体变体”等等包括任何含有蛋白质或肽的分子, 其包含免疫球蛋白的至少一部分, 所述至少一部分含有源自任何本文中所述的嵌合或人源化单克隆抗体的重链或轻链或其配体结合部分的至少一个互补决定区 (CDR), 以及与之组合的非鼠来源, 优选人来源的、能够组入本发明的抗体中的重链或轻链可变区, 重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分。或者, 术语“抗GD2抗体”应合指或单独地指嵌合抗体ch3F8-IgG1, ch3F8-IgG4, 人源化单克隆抗体hu3F8-H1L1-IgG1, hu3F8H1L2-IgG1, hu3F8H2L1-IgG1, hu3F8-H2L2-IgG1, hu3F8-H1L1-IgG1n, hu3F8-H1L1-IgG4, hu3F8-H3L3, hu3F8-H1L1S, hu3F8-H3L3S, huH1-I- $\gamma$ -1, huH3-I- $\gamma$ -1, hu3F8-IgG1-DEL抗体, 以及它们的片段和区域。此类抗体能够在体外、原位和/或在体内调节、减少、拮抗、轻减、缓解、阻断、抑制、消除、和/或干扰至少一种细胞功能, 其中所述细胞表达GD2。作为非限制性实例, 本发明的合适的抗GD2抗体、特定部分或片段可以高亲和

力结合人GD2表位。

[0143] 术语“抗体”进一步意在涵盖抗体、消化片段、其特定部分和变体,包括抗体模拟物或包含模拟抗体的结构和/或功能的抗体部分或其特定的片段或部分,它们各自含有至少一个源自抗GD2抗体的CDR。功能性片段包括结合哺乳动物GD2的抗原结合片段。例如,能够结合GD2或其部分的抗体片段,包括但不限于Fab(例如通过木瓜蛋白酶消化),Fab'(例如通过胃蛋白酶消化和部分还原)以及F(ab')<sub>2</sub>(例如通过胃蛋白酶消化),facb(例如通过纤溶酶消化),pFc'(例如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化),Fd(例如通过胃蛋白酶消化、部分还原和再聚集),Fv或scFv(例如通过分子生物学技术)片段,为本发明所涵盖(见例如Colligan, Immunology, 同上)。

[0144] 可以片段可以通过本领域已知和/或如本文所述的酶切割、合成或重组技术制备。还可以使用其中已经在天然终止位点的上游导入了一个或多个终止密码子的抗体基因来产生多种截短形式的抗体。例如,可以设计编码F(ab')<sub>2</sub>重链部分的组合基因以包含编码重链的CH<sub>1</sub>域和/或铰链区的DNA序列。抗体的不同部分可以通过常规技术化学连接在一起,或者可以使用基因工程技术制备为连续的蛋白质。

[0145] 如本文中使用的,“嵌合”抗体或“人源化”抗体或“CDR嫁接的”包括本文中描述的抗GD2Ab,或源自其的任何CDR,与源自非鼠抗体,优选人抗体的一种或多种蛋白质或肽组合而成的任何组合。依照本发明,嵌合或人源化抗体包括这样的抗体,其中诸CDR源自一种或多种本文所述的抗GD2Ab,而该抗体的至少一部分,或剩余部分源自一种或多种人抗体。因此,该抗体的人部分可包括在人体中基本上无免疫原性的框架、C<sub>L</sub>、C<sub>H</sub>域(例如CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>)、铰链、(V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>)区域。所述抗体的源自人抗体的部分不需要与人抗体具有100%的同一性。在一个优选的实施方案中,保留尽可能多的人氨基酸残基以使得免疫原性可忽略,但对人残基可以视需要加以修饰,以支持由CDR形成的抗原结合位点,同时使抗体的人源化最大化。相对于非修饰的抗体,这样的变化或改变任选地并且优选地保留或减少在人体或其他物种中的免疫原性。需要指出的是,人源化抗体可以由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(例如重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞生成。此外,当抗体是单链抗体时,其可包含在天然人抗体中不出现的接头肽。例如,Fv可包含这样的接头肽,诸如2个至大约20个甘氨酸或其他氨基酸残基,优选8-15个甘氨酸或其他氨基酸残基:其连接重链的可变区和轻链的可变区。这样的接头肽被认为是来源于人的。

[0146] 抗体人源化可以例如通过如下进行:合成组合文库,所述组合文库包含非人目标单克隆抗体的6个CDR与各别的人框架池融合而得到的融合物。可以利用含有代表所有已知的重链和轻链人种系基因的人框架。然后可以从所得的组合文库筛选对感兴趣抗原的结合。这种途径可容许选择就维持对亲本抗体的结合活性而言最有利的完全人框架。然后可以使用多种技术进一步优化人源化抗体。

[0147] 抗体人源化可以用来将小鼠或其他非人抗体进化为“完全人”抗体。所得的抗体仅含有人序列而没有小鼠或非人抗体序列,同时维持与起始抗体相似的结合亲和力和特异性。

[0148] 对于全长抗体分子,免疫球蛋白基因可以从杂交瘤细胞系的基因组DNA或mRNA获得。将抗体重链和轻链序列克隆到哺乳动物载体系统中。通过双链序列分析来证实组装。抗体构建体可以在其他人或哺乳动物宿主细胞系中表达。然后可以通过瞬时转染测定以及对

表达的感兴趣的载体的Western印迹分析来证明构建体的正确性。使用快速测定方法可以分离和筛选具有最高生产性的稳定细胞系。

[0149] 至少一种本发明的抗GD2抗体可任选地由细胞系、混合细胞系、永生化细胞或永生化细胞的克隆群体来产生,如本领域公知的。参见例如Ausubel,et al.,ed.,*Current Protocols in Molecular Biology*,John Wiley&Sons,Inc.,NY,N.Y.(1987-2001); Sambrook,et al.,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,2.sup.nd Edition,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989);Harlow and Lane,antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989).Colligan,et al.,eds.,*Current Protocols in Immunology*,John Wiley&Sons,Inc.,NY(1994-2001);Colligan et al.,*Current Protocols in Protein Science*,John Wiley&Sons,NY,N.Y.,(1997-2001),本文通过提述并入上述每一文献的全部内容。

[0150] 根据一种途径,通过下述方式产生杂交瘤:将合适的永生细胞系与抗体产生细胞融合,所述永生细胞系例如骨髓瘤细胞系,诸如但不限于Sp2/0,Sp2/0-AG14,NS0,NS1,NS2,AE-1,L.5,>243,P3X63Ag8.653,Sp2SA3,Sp2MAI,Sp2SS1,Sp2SA5,U937,MLA144,ACT IV,MOLT4,DA-1,JURKAT,WEHI,K-562,COS,RAJI,NIH3T3,HL-60,MLA144,NAMAIWA,NEURO2A)等等,或异源骨髓瘤(heteromyelomas),其融合产物,或源自其的任何细胞或融合细胞,或本领域已知的任何其他合适的细胞系,参见例如www.atcc.org,www.lifetech.com等等;所述抗体产生细胞诸如但不限于分离或克隆的脾、外周血、淋巴、扁桃体、或其他免疫或含B细胞的细胞,或任何其他表达重链或轻链恒定或可变或框架或CDR序列的细胞,作为内源或异源核酸,作为重组或内源、病毒、细菌、藻类、原核、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿动物、马、羊、山羊、绵羊、灵长类、真核、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交的等等,或其任何组合。参见例如Ausubel同上和Colligan,Immunology,同上,第2章,本文通过提述并入其全部内容。

[0151] 任何其他合适的宿主细胞也可以用来表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源核酸。融合的细胞(杂交瘤)或重组可以细胞使用选择性培养条件或其他合适的已知方法加以分离,并通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有期望的特异性的细胞可以通过合适的测定法(例如ELISA)来选择。

[0152] 本发明的抗体还可以这样制备:使用至少一种编码抗GD2抗体的核酸来提供在它们的乳汁中产生此类抗体的转基因动物或哺乳动物,诸如山羊、牛、绵羊等。此类动物可以利用已知方法来提供。参见例如,但不限于美国专利第5,827,690;5,849,992;4,873,316;5,849,992;5,994,616,5,565,362;5,304,489号等,本文通过提述并入每一篇的全部内容。

[0153] 本发明的抗体还可以这样制备:使用至少一种编码抗GD2抗体的核酸来提供在植物部分或从其培养的细胞中产生此类抗体、特定部分或变体的转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草和玉米)。作为非限制性的实例,表达重组蛋白的转基因烟草叶已经被成功地用于提供大量的重组蛋白,例如通过使用诱导型启动子。参见例如Cramer et al.,*Curr.Top.Microbol.Immunol.*240:95-118(1999)及其中引用的文献。此外,还已经使用转基因玉米来以工业生产水平表达哺乳动物蛋白质,其生物学活性与在其他重组系统中产生者或从天然来源纯化者等同。参见例如Hood et al.,*Adv.Exp.Med.Biol.*464:127-147(1999)及其中引用的参考文献。还已经从包含抗体片段(如单链抗体(scFv))的转基因植物

种子(包括西红柿种子和马铃薯块茎)大量地生产了抗体。参见例如Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) 及其中引用的参考文献。因此,本发明的抗体也可以根据已知方法施用转基因植物来产生。还参见例如Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99-108 (October, 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem Soc. Trans. 22:940-944 (1994) 及其中引用的参考文献。将上述每一篇文献通过提述完全并入本文。

[0154] 抗GD2抗体可以使用公知方法从重组细胞培养物回收和纯化,所述公知方法包括但不限于蛋白A纯化、蛋白G纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和卵磷脂色谱。高效液相色谱("HPLC")也可用于纯化。参见例如Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), 例如第1, 4, 6, 8, 9, 和第10章, 本文通过提述并入每一篇的全部内容。

[0155] 本发明的抗体包括天然纯化产物、化学合成程序产物、以及从真核宿主通过重组技术产生的产物,所述真核宿主包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。取决于重组产生程序中使用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或者非糖基化的,糖基化的是优选的。此类方法在多个标准实验室手册中有说明,例如Sambrook (同上) 第17.37-17.42节; Ausubel (同上), 第10, 12, 13, 16, 18和20章, Colligan, Protein Science (同上), 第12-14章, 本文通过提述并入所有上述文献的全部内容。

[0156] 纯化的抗体可以通过例如ELISA、ELISPOT、流式细胞术、immunocytology、Biacore™分析、Sapidyne KinExA™动力学排除测定、SDS-PAGE和Western印迹,或者通过HPLC分析以及多种本文公开的其他功能测定法来加以表征。

[0157] 典型的哺乳动物表达载体包含:至少一个启动子元件,其介导mRNA转录的起始;抗体编码序列;以及终止转录及对转录物进行聚腺苷酸化所要求的信号。其他的元件包括增强子、Kozak序列、以及被RNA剪接的供者和受者序列所包夹的居间序列。用来自SV40的晚期和早期启动子、来自逆转录病毒例如RSV、HTLVI、HIVI的长末端重复(LTR)、以及巨细胞病毒(CMV)的早期启动子,可以实现高效率的转录。但是,也可以使用细胞元件(例如人肌动蛋白启动子)。用于实施本发明的合适表达载体包括例如:载体如pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN、或pLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, Calif.)、pcDNA3.1 (+/-)、pcDNA/Zeo (+/-) 或pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen)、PSVL和PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pRSVcat (ATCC37152)、pSV2dhfr (ATCC37146) 和pBC12MI (ATCC67109)。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人HeLa293、H9和Jurkat细胞,小鼠NIH3T3和C127细胞, Cos1、Cos7和CV1、鹌鹑QC1-3细胞,小鼠L细胞和中华仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0158] 或者,基因可以在含有整合到染色体的该基因的稳定细胞系中表达。用选择标志物如DHFR、GPT、新霉素或潮霉素共转染容许鉴定和分离经转染的细胞。

[0159] 转染的基因也可以加以扩增以表达大量的被编码的抗体。DHFR(四氢叶酸还原酶)标志物可用于开发携带数以百计甚至数以千计的感兴趣基因拷贝的细胞系。另一种有用的选择标志物是酶谷氨酰胺合酶(GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227:277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992))。使用这些标记物,使哺乳动物细胞在选择培养基中生长,并选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合到染色体中的

经扩增的基因。中华仓鼠卵巢 (CHO) 及 NS0 细胞经常用于抗体的产生。

[0160] 依照本发明, 抗GD2抗体包括ch3F8-IgG1、ch3F8-IgG4、hu3F8-H1L1-IgG1、hu3F8-H1L2-IgG1、hu3F8-H2L1-IgG1、hu3F8-H2L2-IgG1、hu3F8-H1L1-IgG1n、hu3F8-H1L1-IgG4、hu3F8-H3L3、hu3F8-H1L1S、hu3F8-H3L3S、huH1I- $\gamma$ -1、huH3I- $\gamma$ -1、hu3F8-IgG1-DEL抗体中的任一者, 或这样的抗体: 其中可变区或CDR源自ch3F8-IgG1、ch3F8-IgG4、hu3F8-H1L1-IgG1、hu3F8-H1L2-IgG1、hu3F8-H2L1-IgG1、hu3F8-H2L2-IgG1、hu3F8-H1L1-IgG1n、hu3F8-H1L1-IgG4、hu3F8-H3L3、hu3F8-H1L1S、hu3F8-H3L3S、huH1I-gamma1、huH3I-gamma1、hu3F8-IgG1-DEL抗体中的任一者, 且该抗体的框架区和恒定区源自一种或多种人抗体。源自所述抗体的可变区或CDR优选与ch3F8-IgG1、ch3F8-IgG4、hu3F8-H1L1-IgG1、hu3F8-H1L2-IgG1、hu3F8-H2L1-IgG1、hu3F8-H2L2-IgG1、hu3F8-H1L1-IgG1n、hu3F8-H1L1-IgG4、hu3F8-H3L3、hu3F8-H1L1S、hu3F8-H3L3S、huH1I-gamma1、huH3I-gamma1、hu3F8-IgG1-DE中的任一者的可变区或CDR具有大约90%至大约100%的同一性, 尽管来源于自然突变或来自人为操作的任何及所有修饰, 包括取代、插入和缺失均在考虑之内, 只要该抗体保留结合GD2的能力。源自人抗体的嵌合、人源化或CDR嫁接抗体的区域并不需要与人抗体具有100%同一性。在优选的实施方案中, 尽可能多地保持人氨基酸残基以使得免疫原性可忽略, 但对于所述人残基, 尤其是框架区的残基, 根据需要并且如本文后面教导的那样依照本发明进行取代。本文中公开的此类修饰对于支持由CDR形成的抗原结合位点, 同时使抗体的人源化最大化是必须的。

[0161] 与本文中描述的序列基本上相同的氨基酸序列包括包含保守氨基酸取代、以及氨基酸缺失和/或插入的序列。保守氨基酸取代指将第一个氨基酸替换成具有与该第一个氨基酸相似的化学和/或物理性质 (例如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性) 的第二个氨基酸。保守取代包括用下列各组之内的一个氨基酸替换其他氨基酸: 赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和组氨酸 (H); 天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E); 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、酪氨酸 (Y)、K、R、H、D和E; 丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、脯氨酸 (P)、苯丙氨酸 (F)、色氨酸 (W)、甲硫氨酸 (M)、半胱氨酸 (C) 和甘氨酸 (G); F、W和Y; C、S和T。

[0162] 当然, 技术人员要实施的氨基酸取代的数目取决于多种因素, 包括上述的那些。一般而言, 对于任何给定的抗GD2抗体、片段或变体, 氨基酸取代、插入或缺失的数目不会多于40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1个, 例如1-30个或者其中的任何范围或数值, 如本文中具体规定的。

[0163] 本发明的抗GD2抗体中对功能而言必不可少的氨基酸可以通过本领域已知的方法来鉴定, 例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变 (例如Ausubel, 同上、Chapters 8、15; Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989))。后一种程序在分子中的每一个残基处导入单个丙氨酸突变。然后对所得的突变分子测试生物学活性, 包括但不限于至少对GD2的结合。对抗体结合而言的关键位点也可以通过结构分析诸如结晶、核磁共振或光亲和标记来鉴定 (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) and de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992))。

[0164] 抗GD2抗体可进一步任选地包含源自本文所述的至少一个序列的CDR的70-100%的连续氨基酸的至少一个的多肽。

[0165] 在一个实施方案中, 免疫球蛋白链或其部分 (例如可变区, CDR) 的氨基酸序列与表1-4中的至少一个序列的氨基酸序列具有大约70-100%同一性 (例如70、71、72、73、74、75、

76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或其中的任何范围或数值)。

[0166] 本文中提供了示例性的重链和轻链可变区。本发明的抗体或其特定的变体可包含来自本发明的抗体的任意数目的连续氨基酸残基,其中所述数目选自由抗GD2抗体的连续残基数目的10-100%的整数。任选地,该连续氨基酸的子序列的长度为大约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250或更多个氨基酸,或其中的任何范围或数值。此外,此类子序列的数目可以是选自1-20的任何整数,例如至少2、3、4或5。

[0167] 依照本发明,SEQ ID NO:11-22所示的核酸序列以及抗GD2抗体的可变区(轻链和重链)的推定的氨基酸序列示于SEQ ID NO:1-10。这些重链和轻链可变区中的每一个均含有3个CDR,它们联合形成抗原结合位点。这3个CDR被四个框架区包围,所述框架区主要发挥支持这些CDR的功能。重链和轻链的可变区序列中的CDR序列可以依照Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., United States Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C中Kabat等人(1987)一文通过计算机辅助比对来鉴别,或者通过对可变区的分子建模,例如利用Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168:595所述的ENCAD程序来加以鉴别

[0168] 编码本发明的人源化抗体、片段和区域的恒定(C)区的人类基因可以通过已知方法从人胎肝文库获得。人C区基因可以从任何人细胞,包括那些表达并产生免疫球蛋白的细胞获得。人C<sub>H</sub>区可以从人H链的任何已知的类别或者同种型获得,包括 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、及其亚型,诸如G1、G2、G3和G4。由于H链同种型负责抗体的各种效应物功能,因此C<sub>H</sub>区的选择将由期望的效应物功能(诸如补体固定,或者抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC))中的活性来引导。优选地,CH区源自 $\gamma$ 1(IgG1)或 $\gamma$ 4(IgG4)。

[0169] 人C<sub>L</sub>区可以从两种人L链同种型: $\kappa$ 或 $\lambda$ 中任意一种获得,优选从 $\kappa$ 获得。

[0170] 通过标准克隆技术(Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. sup. nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 和Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993)) 从人细胞获得编码人免疫球蛋白C区的基因。人C区基因可以从已知的含有呈现两类L链、五类H链、以及亚类的基因的克隆容易地获得。

[0171] 抗体的可变区的序列可以通过插入、取代和缺失来修饰,以嵌合抗体维持结合人GD2的能力为限。本领域普通技术人员可以通过实施如下所述的功能测定来确定该活性的维持。可变区例如针对下文指明的可变区可具有大约50%至大约100%同源性。在一个优选的实施方案中,所述抗体的可变区对下文指明的可变区具有大约80%至大约100%的同源性。在一个更优选的实施方案中,所述可变区针对下文指明的可变区可具有大约90%至大约100%的同源性。

[0172] 在一个特定的实施方案中,本公开的优选的抗GD2Mab包含与本文中指明的序列具有95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同源性的可变轻链区,并进一步包含与本文指明的序列具有95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同源性的可变重链区。

[0173] 优选地,本发明的抗体或其特定部分的抗体或抗原结合部分结合人GD2,因此部分地或基本上中和一种GD2蛋白或片段,从而抑制通过GD2介导的活性。如本文所用的,术语

“中和性抗体”指这样的抗体，其能够抑制GD2依赖性活性达约20-120%，优选至少约10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%或更多，依赖于测定法。抗GD2抗体抑制GD2依赖性活性的能力优选通过至少一种如本文所述的或本领域已知的合适的测定法来评估。

[0174] 如所述的，本发明还涉及这样的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和CDR，其包含与本文中描述的氨基酸序列基本相同的氨基酸序列中的氨基酸。这样的抗GD2抗体可包括一个或多个来自自然突变或人工操作（如本文具体说明的）氨基酸取代、缺失或添加。优选地，这样的抗体或抗原结合片段以及包含此类链或CDR的抗体可以高亲和力结合人GD2。

[0175] 如本领域技术人员将会领会的，本发明包括本发明的至少一种生物学活性抗体。生物学活性抗体具有天然（非合成）、内源或相关的和已知的抗体的至少20%、30%、或40%，优选至少50%、60%、或70%，最优选至少80%、90%、或95%-100%的特异性活性。测定和定量酶活性和底物特异性的度量的方法是本领域技术人员公知的。

[0176] 在另一个实施方案中，本发明涉及如本文所述的人抗体和抗原结合片段，其通过共价附接有机部分而被修饰。这样的修饰可以产生具有改善的药动学性质（例如增加的体内血清半衰期）的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或分枝的亲水性聚合物基团、脂肪酸基团、或脂肪酸酯基团。在具体的实施方案中，亲水性聚合物基团可以具有大约800至大约120,000道尔顿的分子量，并且可以是聚烷二醇（例如聚乙二醇（PEG）、聚丙二醇（PPG））、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮，并且所述脂肪酸或者脂肪酸酯基团可包含约8至约40个碳原子。

[0177] 本发明的修饰抗体及抗原结合部分可包含一个或多个直接或间接地共价结合于该抗体的有机部分。每个与本发明的抗体或抗原结合片段键合的有机部分可独立地为亲水性聚合物基团、脂肪酸基团、或脂肪酸酯基团。如本文所用的，术语“脂肪酸”涵盖单羧基酸和双羧基酸。如本文中使用的，术语“亲水性聚合物基团”指在水中比在辛烷中更可溶的有机聚合物，例如聚赖氨酸。因此，通过共价附接聚赖氨酸而修饰的抗体为本发明所涵盖。适用于修饰本发明的抗体的亲水性聚合物可以是直链的或者分枝的，并且包括例如聚烷二醇（例如PEG、单甲氧基-聚乙二醇（mPEG）、PPG等）、碳水化合物（例如右旋糖酐、纤维素、寡糖、多糖等）、亲水氨基酸的聚合物（例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等）、聚烷氧化物（例如聚氧化乙烯、聚氧化丙烯等）及聚乙烯吡咯烷酮。优选地，修饰本发明抗体的亲水性聚合物作为单独的分子实体具有约800至约150,000道尔顿的分子量。例如可以使用PEG<sub>5000</sub>和PEG<sub>20,000</sub>，其中下标为聚合物的平均分子量的道尔顿数。亲水性聚合物基团可以被一个至约6个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团所取代。被脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性聚合物可以利用合适的方法来制备。例如，可将包含胺基的聚合物偶连于脂肪酸或脂肪酸酯的羧酸，且可将脂肪酸或脂肪酸酯上活化的羧酸（例如用N,N-羰基二咪唑活化的）偶连于聚合物上的羟基。

[0178] 适于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的，或者可以含有一个或多个不饱和单位。适于修饰本发明抗体的脂肪酸包括例如正十二烷酸盐或酯、正十四烷酸盐或酯、正十八烷酸盐或酯、正二十烷酸盐或酯、正二十二烷酸盐或酯、正三十烷酸盐或酯、正四十烷酸盐或酯、顺- $\delta$ .9-十八烷酸盐或酯、所有顺- $\delta$ .5,8,11,14-二十碳四烯酸盐或酯、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷酸、等等。合适的脂肪酸酯包括含有直链或分枝的

低级烷基的二羧酸的单酯。所述低级烷基可包含1个至约12个,优选1个至约6个碳原子。

[0179] 修饰的人抗体及抗原结合片段可以使用合适的方法来制备,诸如通过与一种或多种修饰剂反应。术语“修饰剂”如本文所用的,是指包含活化基团的合适的有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是这样的化学部分或功能基团,其在合适的条件下可以与第二化学基团反应从而在该修饰剂与该第二化学基团之间形成的共价键。例如,胺反应性活化基团包括亲电性基团诸如甲苯磺酸盐或酯、甲磺酸(mesylate)、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酸亚胺酯(NHS)等等。能够与硫醇反应的活化基团包括,例如,马来酰亚胺、碘乙酰基、丙烯酰基、吡啶基二硫化物(pyridyl disulfides)、5-巯基-2-硝基苯甲酸巯基(TNB-thiol),等等。醛功能基团可以偶连于含胺或酰肼的分子,且叠氮基团可与三价磷基团反应而形成氨基磷酸酯或磷酰亚胺(phosphorimide)连接。用于将活化基团导入分子的合适方法是本领域已知的(参见例如Hernanson、G.T.、Bioconjugate Techniques、Academic Press:San Diego、Calif. (1996))。活化基团可以直接键连于所述有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯),或者通过接头部分,例如二价C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>基团,其中一个或多个碳原子可以被杂原子如氧、氮或硫替换。合适的接头部分包括例如四乙二醇、--(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>--、--NH--,仅举数例。包含接头部分的修饰剂可以例如通过使单-Boc-烷基二胺(例如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸在1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚酰胺(EDC)的存在下反应而在游离胺与脂肪酸羧酸之间形成酰胺键来产生。可以用三氟乙酸(TFA)处理从产物去除Boc保护基以暴露伯胺,后者可以偶连于如所述的另一羧酸;或者可以与马来酸酐反应,使所得产物环化而产生所述脂肪酸的经活化的马来酰亚胺衍生物(参见例如Thompson、et al.、W092/16221,兹通过提述并入其全部教导)。

[0180] 本发明的修饰抗体可以通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应来产生。例如,可以利用胺反应性修饰剂,例如PEG的NHS酯,将有机部分以非位点特异性的方式与抗体键合。还可以通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(例如链内二硫键)来制备修饰的人抗体或抗原结合片段。然后可以将该还原的抗体或抗原结合片段与巯基反应性修饰剂反应来产生本发明的修饰抗体。包含与本发明的抗体的特定定位点键合的有机部分的修饰人抗体和抗原结合部分可以使用合适的方法来加以制备,所述方法例如逆蛋白水解(reverse proteolysis)(Fisch et al.、Bioconjugate Chem.、3:147-153(1992);Werlen et al.、Bioconjugate Chem.、5:411-417(1994);Kumaran et al.、Protein Sci.6(10):2233-2241(1997);Itoh et al.、Bioorg.Chem.、24(1):59-68(1996);Capellas et al.、Biotechnol.Bioeng.、56(4):456-463(1997))、以及Hernanson、G.T.、Bioconjugate Techniques、Academic Press:San Diego、Calif. (1996)中描述的方法。

[0181] 本发明的抗体能够以如下所示的宽范围的亲和力(K<sub>D</sub>)结合人GD2。

[0182] 抗体对抗原的亲和力或亲合力可以使用任何合适的方法通过实验确定(参见例如Berzofsky、et al.、“Antibody-Antigen Interactions,”收录于Fundamental Immunology、Paul、W.E.、Ed.、Raven Press:New York、N.Y. (1984);Kuby、Janis Immunology、W.H.Freeman and Company:New York、N.Y. (1992);及本文中描述的方法)。具体的抗体-抗原相互作用的测得的亲和力如果在不同的条件下(例如,盐浓度、pH)测量可能变化。因此亲和力以及其他抗原结合参数的测量优选使用标准化的抗体及抗原溶液、以及标准化的缓冲液(如本文中所述的缓冲液)来进行。

[0183] 在本发明的方法和组合物中有用的抗GD2抗体以结合GD2为特征,并且优选以具有低毒性为特征。具体地,本发明的抗体、特定片段或变体,其中各别组分,诸如可变区、恒定区和框架,单独地和/或集合地,任选地和优选地具有低免疫原性,在本发明中是有用的。能够用于本发明的抗体任选地以它们能够长期治疗患者并产生可测量的症状缓解且毒性低和/或可接受为特征。低或可接受的免疫原性和/或高亲和力,以及其他适合的性质,可以对达到的治疗结果起贡献。“低免疫原性”在本文中定义为在少于约75%、或优选少于约50%的受治疗的患者中产生显著的HAMA、HACA或HAMA应答,和/或在受治疗的患者中产生低效价(Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994)、兹通过提述并入其全部内容)。

[0184] 也可以使用双特异性、异特异性(heterospecific)、异源缀合(heteroconjugate)、或类似的抗体,所述抗体是具有对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆、人源化抗体。在本案中,所述结合特异性之一针对的是至少一种GD2蛋白质,另一种则是针对任何其他抗原。制造双特异性抗体的方法是本领域中已知的。传统上,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条重链具有不同的特异性(Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机搭配,这些四体杂交瘤(quadromas)产生潜在的10种不同抗体分子的化合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化通常通过亲和纯化步骤来实现,这是相当繁重的,且产物产率较低。类似的程序在例如W093/08829、美国专利第6,210,668、6,193,967、6,132,992、6,106,833、6,060,285、6,037,453、6,010,902、5,989,530、5,959,084、5,959,083、5,932,448、5,833,985、5,821,333、5,807,706、5,643,759、5,601,819、5,582,996、5,496,549、4,676,980、W091/00360、W092/00373、EP03089号、Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991)、Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986); Chan and Carter, 2010, Nature Rev. 10, 301-316; Weiner et al., 2010, Nature Rev. 10, 317-327中有公开;本文通过提述并入每一篇的全部内容。

[0185] 在某些实施方案中,结合GD2的抗体可以以未缀合的形式使用。在其他实施方案中,结合GD2的抗体可以缀合,例如缀合于可检测的标记物、药物、前药或同位素。

[0186] 在下文进一步描述的本发明的某些方法,例如检测细胞或组织中的GD2表达作为肿瘤细胞的转移潜力的量度,或者作为鉴定组织中的原位癌(例如DCIS或LCIS)的方法中,将抗GD2抗体缀合于一种或多种可检测标记物。对于此类应用,抗体可以通过共价或非共价附接生色性、酶、放射性同位素、同位素、荧光性、毒性、化学发光性、核磁共振造影剂或其他标记物。

[0187] 合适的生色性标记物的例子包括二氨基联苯胺和4-羟基偶氮-苯-2-羧酸。

[0188] 合适的酶标记物的例子包括脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 $\Delta$ -5-类固醇异构酶、酵母-醇脱氢酶、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶、以及乙酰胆碱酯酶。

[0189] 合适的放射性同位素标记物的例子包括 $^3\text{H}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{58}\text{Co}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{152}\text{Eu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{217}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、等等。 $^{111}\text{In}$ 在使用体内成像的场合是优选的同位素,因为其避免了 $^{125}\text{I}$ 或 $^{131}\text{I}$ 标记的GD2结合抗体被肝脏脱卤素化的问题。此外,这种放射性核苷酸具有对于成像而言更有利的 $\gamma$ 发射能(Perkins et al.,

Eur. J. Nucl. Med. 70:296-301 (1985); Carasquillo et al., J. Nucl. Med. 25:281-287 (1987)。例如,与带有1-(P-异硫氰基苄基)-DPTA的单克隆抗体偶连的<sup>111</sup>In已经在非肿瘤组织,尤其是肝脏中显示几乎无摄取,由此提高肿瘤定位的特异性(Esteban et al., J. Nucl. Med. 28:861-870 (1987))。

[0190] 合适的非放射性同位素标记物的例子包括<sup>157</sup>Gd、<sup>55</sup>Mn、<sup>162</sup>Dy、<sup>52</sup>Tr、和<sup>56</sup>Fe。

[0191] 合适的荧光标记物的例子包括<sup>152</sup>Eu标记物、荧光素标记物、异硫氰酸盐或酯标记物、罗丹明标记物、藻红蛋白标记物、藻蓝蛋白标记物、别藻蓝蛋白标记物、绿色荧光蛋白(GFP)标记物、邻苯二醛标记物、和荧光胺标记物。

[0192] 合适的毒素标记物的例子包括白喉毒素、蓖麻毒蛋白、以及霍乱毒素。

[0193] 化学发光标记物的例子包括鲁米诺标记物、芳香吖啶酯标记物、吖啶标记物、吖啶盐标记物、草酸酯标记物、荧光素标记物、荧光素酶标记物、以及水母光蛋白(aequorin)标记物。

[0194] 核磁共振造影剂的例子包括重金属核如Gd、Mn、和铁。

[0195] 用于将上述标记物结合于抗GD2抗体的典型技术在下述文献中提供:Kennedy等人, Clin. Cmm. Acta 70:1-31 (1976), 和Schurs等人, Clin. Cmm. Acta 81:1-40 (1977)。后者中提到的偶联技术是戊二醛法,高碘酸盐法,二马来酰亚胺法,m-马来酰亚胺苄基-N-羟基-琥珀酰亚胺酯法,通过提述并入其所有这些方法。

[0196] 为了用于本发明的某些治疗手段,诸如手术后残余肿瘤细胞的消融或者转移的预防,可以将抗GD2抗体偶联于一种或多种药物、前药或同位素。优选的此类缀合物包含一种或多种结合GD2的配体,例如一种或多种抗体或片段、其衍生物或变体,所述配体缀合于一种或多种细胞毒剂;这样的缀合物可用于本发明提供的治疗和预防肿瘤转移的方法。根据本发明的某些此类实施方案,抗GD2抗体与细胞毒剂缀合。可用于生成抗GD2抗体-细胞毒剂缀合物的细胞毒剂,例如化疗剂是本领域公知的,包括但不限于顺铂、卡铂、奥沙利铂、紫杉醇、美法仑、多柔比星、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、依托泊苷、氮芥、环磷酰胺、博来霉素、微管毒物、以及番荔枝己酸配质(annonaceous acetogenins)。其他适于依照本发明的该方面使用的化疗剂是公知的,普通技术人员将熟悉之。

[0197] 本文还想到了一种或多种抗GD2抗体与一种或多种小分子毒素的缀合物的用途,所述小分子毒素诸如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素(maytansine)(美国专利5,208,020)、trichothene、以及CC1065。在本发明的一个实施方案中,抗GD2抗体缀合于一种或多种美登木素分子(例如每个抗GD2抗体约1个至约10个美登木素分子)。美登木素可以例如转化为May-SS-Me, May-SS-Me可以还原为May-SH3并与经修饰的抗GD2抗体反应来产生美登木素生物碱-抗GD2抗体缀合物(Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992))。

[0198] 或者,可以将抗GD2抗体与一个或多个加利车霉素分子缀合。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链DNA断裂。可使用的加利车霉素的结构类似物(Hinman et al. Cancer Research 53:3336-3342 (1993) and Lode et al. Cancer Research 58:2925-2928 (1998))。

[0199] 可用来与一个或多个抗GD2抗体生成缀合物的酶活毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素(modeccin)A链、 $\alpha$ -帚曲毒素

(sarcin)、油桐(Aleurites fordii)蛋白、香石竹(dianthin)蛋白、美洲商陆(Phytolaca Americana)蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(croton)、肥皂草(saponaire officinalis)抑制物、白树毒素(gelonin)、丝林毒素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌毒素(tricothecenes)。参见例如1993年10月28日以英文公布的W093/21232,兹通过提述并入其全部公开内容。也可以将美登木素生物碱缀合于一个或多个抗GD2抗体。

[0200] 本发明还设想了与具有核酸水解活性的化合物(如核糖核酸酶或DNA内切核酸酶诸如脱氧核糖核酸酶;DNA酶)缀合的抗GD2抗体。

[0201] 有多种放射性同位素可用于生成放射偶联HER2抗体。例子包括 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 和Lu的放射性同位素。

[0202] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗GD2抗体和细胞毒剂的缀合物,诸如3-(2-吡啶基二巯基)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己胺-1-羧酸琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚胺二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如Vitetta et al.,Science238:1098(1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗GD2抗体缀合的例示性螯合剂。参见W094/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari et al.,Cancer Research52:127-131(1992))。

[0203] 或者,可例如通过重组技术或肽合成来制备包含抗GD2抗体配体和细胞毒剂的融合蛋白。

[0204] 本发明还提供至少一种抗GD2抗体组合物,其包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或更多种如本文中所描述的和/或如现有技术已知的抗GD2抗体,以非天然存在的组合物、混合物或形式提供。这样的组合物包括:非天然存在的组合物,其包含选自下组的抗GD2抗体氨基酸序列的至少一种或两种全长、C-和/或N-段缺失的变体、域、片段或特定的变体:如本文所述的抗体的CDR区的70-100%的连续氨基酸,或其特定的片段、域或变体。优选的抗GD2抗体组合物包括如本文所述的抗GD2抗体氨基酸序列的至少一种含CDR或LBR的部分的至少一种或两种全长的序列、片段、域或变体。进一步优选的组合物包含如本文所述的抗GD2抗体的CDR区域的70-100%的至少一种的40-99%。这样的组分百分比是液体或干溶液、混合物、悬浮液、乳液或胶体的重量、体积、浓度、体积克分子浓度(molarity)或重量克分子浓度(molality)百分比,如本领域公知或如本文中所述的。

[0205] 本发明的抗GD2抗体组合物可以进一步包含任意适当的有效量的组合物或药物组合物中的至少一种,所述组合物包含需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者的至少一种抗GD2抗体,该组合物任选进一步包含选自下列的至少一种:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、其融合蛋白、或小分子TNF拮抗剂)、抗风湿药物(如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸

金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉弛缓剂、麻醉药(narcotic)、非甾体类抗炎药(NSAID)、止痛剂、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂(例如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯(carbapenem)、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其他抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素(例如红细胞生成素(Epoetin) $\alpha$ )、菲格司亭(filgrastim)(如G-CSF、优保津)、沙格司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫法、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如巴利昔单抗、环孢霉素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药剂、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、 $\beta$ 激动剂、吸入类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸钠、肾上腺素或类似物、 $\alpha$ 链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂、以及细胞疗法(cell therapies)。此类细胞因子的非限制性实例包括但不限于IL-1至IL-34中的任何一种。合适的剂量是本领域公知的,参见例如Wells等人编,Pharmacotherapy Handbook,2nd Edition,Appleton and Lange,Stamford,Conn.(2000);PDR Pharmacopoeia,Tarascon Pocket Pharmacopoeia2000,Deluxe Edition,Tarascon Publishing,Loma Linda,Calif.(2000),兹通过提述并入这些参考文献每一篇的全部内容。

[0206] 这些抗癌症或抗感染剂也可以包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共同配制或共同施用的毒素分子。毒素可以任选择性地杀灭病变细胞或组织。病变细胞可以是癌症或其他细胞。此类毒素可以是,但不限于,纯化的或重组的毒素或毒素片段,它包含如选自蓖麻毒蛋白、白喉毒素、蛇毒毒素或细菌毒素中的至少一种的毒素的至少一种功能性细胞毒性域。术语毒素也包括由任意天然存在的、突变或重组细菌或病毒的内毒素和外毒素,它们可以导致人类或其他哺乳动物中的任意病理学状况,包括致死的毒素休克。此类毒素可以包括,但不限于,产肠毒素的大肠杆菌的热不稳定肠毒素(LT)、热稳定性肠毒素(ST)、志贺氏菌细胞毒素、气单胞菌肠毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌肠毒素A(SEA)、B(SEB)或C(SEC)、链球菌肠毒素等。所述细菌包括,但不限于,产肠毒素的大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(如血清型O157:H7的菌株)、葡萄球菌属物种(如金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌)、志贺氏菌属菌种(如痢疾志贺氏菌、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Shigella boydii*)和索氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*))、沙门氏菌属菌种(如伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌)、梭菌属菌种(如产气荚膜梭菌、艰难梭菌、肉毒梭菌)、弯曲杆菌属菌种(如空肠弯曲杆菌、胚胎弯曲杆菌)、螺杆菌属菌种(例如幽门螺杆菌)、气单胞菌属菌种(例如温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌)、类志贺邻单胞菌(*Pleisomonas shigelloides*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、弧菌属菌种(例如霍乱弧菌、副溶血弧菌)、克雷伯氏菌属菌种、铜绿假单胞菌和链球菌。参见例如Stein编,INTERNAL MEDICINE,3rd ed.,pp1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans等人编, Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp239-254, Plenum Medical Book Co, New York (1991); Mandell等人, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, N.Y. (1990); Berkow等人编, The Merck Manual, 16th edition,

Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood等人, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack等人, Science, 248:705-711 (1990), 兹通过提述并入这些参考文献的全部内容。

[0207] 本发明的抗GD2抗体化合物, 组合物或其组合可以进一步包含任意适当辅助物质, 例如但不限于稀释剂, 粘合剂, 稳定剂, 缓冲剂, 盐, 亲脂溶剂, 防腐剂, 佐剂等中的至少一种。优选可药用的辅助物质。此类无菌溶液的非限制性的例子和制备方法是本领域公知的, 例如, 但不限于Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990。可药用的担载体可以常规选择, 此类担载体适于抗GD2抗体, 片段或变体组合物的施用方式, 溶解度和/或稳定性, 如本领域公知或如本文所描述的。

[0208] 可用于本发明组合物的药物赋形剂和添加剂包括, 但不限于蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(如糖, 包括单糖、双糖、三糖、四糖和寡糖; 衍生化糖, 如醛醇、醛酸、酯化糖等; 以及多糖或糖聚合物), 它们可以单个或组合存在, 单独地或组合地占重量或体积的1-99.99%。示例性的蛋白赋形剂包括血清白蛋白, 如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。可以起缓冲作用的代表性氨基酸/抗体成分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0209] 适合用于本发明的碳水化合物赋形剂包括, 例如单糖, 如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等; 双糖, 如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等; 多糖, 如棉籽糖、松三糖、麦芽糖糊精、右旋糖酐、淀粉等; 以及醛醇, 如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、肌醇等。用于本发明的优选的碳水化合物赋形剂是甘露醇、海藻糖和棉籽糖。

[0210] 抗GD2抗体组合物也可以包含缓冲剂或pH调节剂; 一般地, 缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐, 例如柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐; Tris, 盐酸三羟甲基氨基甲烷(tromethamine)、或磷酸缓冲液。用于本发明的组合物中的优选缓冲剂是有机酸盐如柠檬酸盐。

[0211] 此外, 本发明的抗GD2抗体组合物可包括聚合物赋形剂/添加剂, 如聚乙烯吡咯烷酮、菲柯尔(ficolls)(一种聚合的糖)、葡聚糖结合剂(dextrates)(例如环糊精、诸如2-羟基丙基- $\beta$ -环糊精)、聚乙二醇、矫味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(如聚山梨醇酯、例如“吐温20”和“吐温80”)、脂质(如磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如胆固醇), 和螯合剂(例如EDTA)。

[0212] 适用于抗GD2抗体、部分或变体组合物的这些和其他赋形剂和/或添加剂是本领域公知的, 例如, 列于“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, 19<sup>th</sup> ed., Williams & Williams, (1995), and in the “Physician's Desk Reference”, 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998), 在此通过述及引入其完整公开内容。优选的载体或赋形剂物质是碳水化合物(如糖和醛醇)和缓冲剂(如柠檬酸盐)或聚合物。

[0213] 如前文指出的, 本发明提供了稳定的制剂, 优选为含有盐水或选定的盐的磷酸盐缓冲液, 以及含有防腐剂的储存溶液和制剂, 适于药用或兽医用途的多用途贮存制剂, 包含置于可药用制剂中的至少一种抗GD2抗体。储存制剂包含在水性稀释剂中的至少一种已知

的防腐剂或任选自至少一种苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧乙醇、甲醛、三氯叔丁醇、氯化镁(例如六水合物)、对羟基苯甲酸烷基酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞、或其混合物。可以使用本领域公知的任何适当浓度或混合物,例如0.001-5%,或其中的任意范围或任意值,例如但不限于0.001、0.003、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、或其中的任意范围或任意值。非限制性实例包括,无防腐剂,0.1-2%间甲酚(例如0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0%)、0.1-3%苯甲醇(例如0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5%)、0.001-0.5%硫柳汞(例如0.005、0.01)、0.001-2.0%苯酚(例如0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0%)、0.0005-1.0%对羟基苯甲酸烷基酯(例如0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0%),等等。

[0214] 如前文指出的,本发明提供一种制品,其包括包装材料和至少一个管形瓶,其中包含至少一种抗GD2抗体的溶液和规定的缓冲剂和/或防腐剂,任选溶于水性稀释剂中,其中所述包装材料包含标签,该标签标明所述溶剂可以保留1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72个小时或更长的时间。本发明进一步包括一种制品,其包括包装材料和含有至少一种冻干的抗GD2抗体的第一管形瓶,和含有规定的缓冲剂或防腐剂的水性稀释剂的第二管形瓶,其中所述包装材料包含标签,该标签指导患者在水性稀释剂中复原所述至少一种抗GD2抗体,以便形成可以保留24小时或更长时间的溶液。

[0215] 根据本发明使用的至少一种抗GD2抗体可以通过重组方法产生,包括从哺乳动物细胞或转基因制备物产生,或者从其他生物来源纯化,如本文中所述或本领域公知的。

[0216] 本发明的产品中的至少一种抗GD2抗体的范围包括在湿/干体系中重构时产生约1.0 $\mu$ g/ml至约1000mg/ml的量,但更低和更高的浓度也是可行的,并且依赖于准备使用的递送载体,例如溶液制剂将不同于经皮贴剂、肺、经粘膜或渗透或微泵方法。

[0217] 优选地,所述水性稀释剂任选进一步包含可药用的防腐剂,优选的防腐剂包括选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞、或其混合物的那些。用于制剂中的防腐剂的浓度为足以产生抗微生物作用的浓度。这些浓度取决于选择的防腐剂,并且本领域技术人员很容易确定。

[0218] 任选地和优选地,可以将其他赋形剂,如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐增强剂加入稀释剂中。等渗剂如甘油等通常以公知的浓度使用。优选加入生理耐受的缓冲剂以改进pH控制。制剂可以有宽范围的pH值,例如约pH4-约pH10,优选约pH5-约pH9,最优选约pH6.0-约pH8.0。本发明的制剂的pH优选为约6.8-约7.8。优选的缓冲液包括磷酸盐缓冲液,最优选为磷酸盐,特别是磷酸缓冲盐水(PBS)。

[0219] 也可以任选向制剂或组合物中加入其他添加剂,如可药用的增溶剂,如吐温20(聚氧乙烯(20)失水山梨醇单月桂酸酯)、吐温40(聚氧乙烯(20)失水山梨醇单棕榈酸酯)、吐温80(聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯)、PluronicF68(聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)、和PEG(聚乙二醇)或非离子型表面活性剂,如聚山梨醇酯20或80或泊洛沙姆84或88、Pluronic®多元醇,其他嵌段共聚物,以及螯合剂如EDTA和EGTA,以减少聚集。如果用泵或

塑料容器来施用制剂,这些添加剂是特别有用的。可药用的表面活性剂的存在可减少蛋白质聚集的倾向。

[0220] 本发明的制剂可以通过以下方法制备:包括将至少一种抗GD2抗体与选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞或其混合物在水性稀释剂中混合。采用常规的溶解和混合物种在水性稀释剂中混合所述至少一种抗GD2抗体和防腐剂。为了制备适当的制剂,例如,可以将测得量的溶于缓冲液中的至少一种抗GD2抗体在其量足以提供需要浓度的蛋白质和防腐剂的缓冲液中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化,例如,加入各成分的顺序、是否使用其他添加剂、制备该制剂的温度和pH都是可以对使用的浓度和施用方式进行优化的因素。

[0221] 可以将要求保护的制剂以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者,双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗GD2抗体的管形瓶,所述抗体用含有水、防腐剂和/或赋形剂、优选磷酸盐缓冲剂和/或盐水和溶于水性稀释剂中的选定的盐的第二个管形瓶复原。单一溶液的管形瓶或要求复原的双管形瓶可以重复使用多次,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,因此比现有的方法提供更方便的治疗方案。

[0222] 本发明的制品可用于立即至24小时或更长的时间内施用。因此,本申请要求保护的制品为患者提供了显著的好处。本发明的制剂任选可以安全地储存在约2℃至约40℃的温度下,并且长时间保持蛋白的生物活性,因此容许包装标签指明该溶液可以在超过6、12、18、24、36、48、72、或96小时的时间内保存和/或使用。如果使用了储存稀释剂,该标签可包括长达1-12个月、半年、一年半和/或两年的使用。

[0223] 本发明中的至少一种抗GD2抗体溶液可以通过包括在水性稀释剂中混合至少一种抗体的方法来制备。采用常规的溶解和混合步骤进行混合。为了制备适当的稀释剂,例如,可以将测得的量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白的量与任选的防腐剂或缓冲液混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如,加入各成分的顺序、是否使用其他添加剂、制备该制剂的温度和pH都是可以对使用的浓度和施用方式进行优化的因素。

[0224] 要求保护的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者,双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗GD2抗体的管形瓶,所述抗体用含有水性稀释剂的第二个管形瓶复原。单一溶液的管形瓶或要求复原的管形瓶可以重复使用多次,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,因此比现有的方法提供更方便的治疗方案。

[0225] 要求保护的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给药店、诊所或其他机构和设施,从而间接提供给患者,其中双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗GD2抗体的管形瓶,所述抗体用含有水性稀释剂的第二个管形瓶复原。此情况下的澄清溶液最多达1升或甚至更多,提供于大的储存容器,其中可以一次或多次取出至少一种抗体溶液的更小部分,将其转移至更小的管形瓶中,由药店或诊所提供给用户和/或患者。

[0226] 公认的包括这些管形瓶体系的设备包括用于递送溶液的笔式注射器,例如BD笔, BD Autojector®, Humaject®, 例如由Becton Dickensen (Franklin Lakes, N.J.), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, ; Bioject, Portland, Oreg.; National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK), Medi-Ject Corp (Minneapolis, Minn.) 等

生产和开发的。公认的包括双管形瓶的设备包括用于在药筒中递送复原的冻干药物的笔式注射器系统, HumatroPen®。

[0227] 当前要求保护的产品包括包装材料。除了管理部门要求的信息, 包括材料还提供可以使用该产品的条件。本发明的包装材料为患者提供以下说明: 用双管形瓶的湿/干产品在水性稀释剂中复原至少一种抗GD2抗体, 以形成溶液, 并且在2-24小时或更长的时间内使用该溶液。对于单管形瓶的溶液产品, 标签说明该溶液可以在2-24小时或更长的时间内使用。当前要求保护的产品可以用于人类药用产品用途。

[0228] 本发明的制剂可以通过以下方法制备, 所述方法包括混合至少一种抗GD2抗体和选定的缓冲剂, 优选含有盐水或选定的盐的磷酸盐缓冲剂。用常规溶解和混合步骤在水性缓冲液中缓和至少一种抗体和缓冲剂。为了制备适当的制剂, 例如, 可以将测得量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白和缓冲剂的量与所需缓冲剂在水中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如, 对于所使用的浓度和施用方式加入各成分的顺序、是否使用其他添加剂、制备该制剂的温度和pH都是可以加以优化的因素。

[0229] 要求保护的稳定或储存的试剂可以以澄清的溶液或者作为双管形瓶的形式提供给患者, 双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗GD2抗体的管形瓶, 所述抗体用含有水性稀释液的第二个管形瓶复原。单一溶液的管形瓶或要求复原的双管形瓶可以重复使用多次, 并且可以满足患者治疗的单个或多个周期, 因此比现有的方法提供更方便的治疗方案。

[0230] 可以更加本发明通过各种递送方法给予患者此处描述的至少一种抗GD2抗体的稳定或储存制剂或溶液; 所述方法包括皮下或肌肉内注射; 经皮、肺部、经粘膜、植入、渗透泵、药筒、微泵, 或其他本领域技术人员了解的手段, 如本领域公知的。

[0231] 在本发明的一个实施方案中, 包含本公开的抗GD2抗体的药物组合物使人源化抗体对生物体, 优选动物, 优选哺乳动物的施用变得容易。具体的哺乳动物包括牛、犬、马、猫、绵羊和猪类动物, 非人灵长类, 以及人。人是特别优选的。

[0232] 针对GD2的高亲和力、中和性嵌合或人抗体在表达GD2的疾病中的使用可能是理想的, 例如, GD2在>50%的黑素瘤 (Zhang et al., 1997, Int. J. Cancer. 73, 42-49)、88%的骨肉瘤 (Heiner et al., 1987, Cancer Res. 47, 5377-5388)、以及93%的软组织肉瘤包括脂肪肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、平滑肌肉瘤、以及梭形细胞肉瘤 (Chang et al., 1992, Cancer 70, 633-638), 还有脑肿瘤 (Longee et al., 1991, Acta Neuropathol. 82, 45-54) 中表达。抗GD2抗体已经通过静脉内注射以及使用奥马耶贮器的隔室疗法 (compartmental therapy) 在具有下述疾病的患者中进行了测试: 黑素瘤 (Saleh et al., 1992, Hum. Antibodies Hybridomas 3, 19-24; Cheung et al., 1987, J. Clin. Oncol. 5, 1430-1440; Choi et al., 2006, Cancer Immunol. Immunother. 55, 761-774)、肉瘤 (Choi et al., 2006, 同上; Yeh et al., 1992, The fifth Asia and Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology Proceedings, p. 104)、小细胞肺癌 (Grant et al., 1996, Eur. J. Nucl. Med. 23, 145-149)、脑肿瘤 (Arbit et al., 1995, Eur. J. Nucl. Med. 22, 419-426)、通过静脉注射以及通过使用Ommaya贮库 (Kramer et al., 2007, J. Clin. Oncol. 25, 5465-5470)。GD2也是视网膜母细胞瘤 (Chantada et al., 2006, J. Pediatr. Hematol. Oncol. 28, 369-373) 以及HTLV-1感染的T细胞白血病细胞 (Furukawa et al., 1993, PNAS USA 90, 1972-1976) 的肿瘤靶。在一个优选的方面, 本公开的抗GD2抗体

可以用来治疗神经母细胞瘤。抗GD2抗体或其衍生物可以用作单一药剂或与其他治疗剂组合。此外,这些单抗可以用作化学敏化剂(chemosensitizer),它们的使用可以改善放射的效力。它们还可以与其他肿瘤免疫调节剂诸如IL-2、IL-12和/或IFN $\alpha$ 组合使用。此外,抗GD2抗体可以与其他单克隆抗体诸如抗TNF- $\alpha$ 、IL-12/IL-23、IL-2、GpIIb/IIIa受体、CD52、CD20、RSV蛋白、HER2/neu受体等组合使用,以及与经批准上市的抗体包括Rituxan、Herceptin、Mylotarg、Campath、Zevalin、Bexxar、Erbix、Avastin和Vectibix组合使用。

[0233] 因此,本发明还提供一种使用本发明的抗GD-2抗体调节或治疗如本领域已知或本文中记载的、细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种GD2相关疾病的方法。

[0234] 本发明包括一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法,所述疾病包括但不限于下列中的至少一种:多发性骨髓瘤、白血病、急性白血病、急性淋巴母细胞白血病(ALL)、B细胞、T细胞或FAB ALL、急性髓性白血病(AML)、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病、骨髓增生异常综合征(MDS)、淋巴瘤、何杰金氏病、恶性淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卡波西肉瘤、结肠直肠癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、鼻咽癌、恶性组织细胞病、副肿瘤综合征/恶性高钙血症、实体瘤、腺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、血管瘤、转移性疾病、癌症相关的骨重吸收、癌症相关的骨疼痛;癌症转移的阻遏;癌症恶病质的改善;以及炎症性疾病如系膜增生性肾小球肾炎等的治疗。这样的方法可任选地与GD2抗体、放射治疗、抗血管新生剂、化疗剂、法尼基转移酶抑制剂等联用,通过在该GD2抗体、放射治疗、抗血管新生剂、化疗剂、法尼基转移酶抑制剂施用之前、同时或之后施用。

[0235] 本发明还提供一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种GD2介导的免疫相关疾病的方法,所述疾病包括但不限于下列中的至少一种:类风湿性关节炎,青少年类风湿性关节炎,全身发病的幼年类风湿性关节炎、银屑病关节炎、强制性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维化、系统性血管炎/韦格纳肉芽肿、肉样瘤病、睾丸炎/输精管切除逆转程序、过敏性/特应性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、变应性接触性皮炎、变应性结膜炎、过敏性肺炎、移植、器官移植排斥、移植物抗宿主病、全身炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性菌脓毒症、革兰氏阴性菌脓毒症、培养阴性菌脓毒症、真菌脓毒症、中性粒细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、创伤/出血、烧伤、离子辐射暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎症病变、肉样瘤病、克罗恩氏病(Crohn's pathology)、镰刀状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、过敏反应、变应性鼻炎、枯草热、终年性肺炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、风疹、全身过敏、皮炎、恶性贫血、血小板减少症、溶血性疾病、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰腺移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体移植排斥、抗受体过敏反应、格雷夫斯病、雷诺氏病(Raynaud's disease)、B型胰岛素抵抗糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III型过敏反应、系统性红斑狼疮、POEMS综合征(多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆 $\gamma$ 球蛋白病和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆 $\gamma$ 球蛋白病、皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮病、混合性结缔组织病、特

发性阿狄森氏病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、白癜风、血管炎、MI心脏切开后综合征、IV型过敏、接触性皮炎、过敏性肺炎、同种异体排斥、细胞内生物引起的肉芽肿、药物过敏、代谢性/特发性威尔逊氏病、血色素沉着病、 $\alpha$ -1-抗胰岛素缺陷、糖尿病肾病、桥本氏甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬化、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶液质、囊性纤维化、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、家族性血巨噬细胞淋巴细胞组织细胞增多症、皮肤病学状况、银屑病、斑秃、肾病综合征、肾炎、肾小球肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、中毒、惊厥前状态、okt3治疗、抗cd3治疗、细胞因子治疗、化疗、放疗(如包括,但不限于虚弱、贫血、恶液质等)、慢性水杨酸盐中毒、睡眠性呼吸暂停、肥胖、心脏衰竭、窦炎、炎性肠病等。见,例如the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 每一篇通过在此引入作为参考。

[0236] 本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种感染疾病的方法,所述疾病包括,但不限于,以下疾病中的至少一种:急性和慢性细菌感染、急性和慢性寄生或感染过程,包括细菌、病毒和真菌感染、HIV感染/HIV神经病、脑膜炎、肝炎(甲型、乙型或丙型等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌0157:h7、溶血性尿毒症综合征/血栓溶解性血小板减少性紫癜、疟疾、登革热、利什曼病、麻风病、中毒性休克综合征、链球菌肌炎、气性坏疽、分支杆菌结核、胞内鸟型分枝杆菌分支杆菌(*mycobacterium avium intracellulare*)、间质性浆细胞肺炎、盆腔炎性疾病、睾丸酮/附睾炎、军团菌病、莱姆病、甲型流感、埃巴二氏病毒、生命体征相关的血巨噬细胞综合征、致命性脑炎/无菌性脑膜炎等;

[0237] 上述任何方法可以任选包括给予需要所述调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者有效量的至少一种含有至少一种抗GD2抗体的组合物或药物组合物。

[0238] 本发明的任何方法可以包括,给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种抗GD2抗体的组合物或药物组合物。所述方法可以任选进一步包括用于治疗这些免疫疾病或恶性疾病的共同施用或联合治疗,其中给予所述至少一种抗GD2抗体、其特定部分或变体,进一步包括在之前、同时和/或之后,给予至少一种选自下组至少一种的药物:TNF拮抗剂(例如,但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、其融合蛋白、或小分子TNF拮抗剂)、IL-18抗体或抗体片段、小分子IL-18拮抗剂或IL-18受体结合蛋白、IL-1抗体(包括IL-1 $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ )或片段、可溶性IL-1受体拮抗剂、抗风湿药物(如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、放疗、抗血管新生剂、化疗剂、沙利度胺肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂(如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂)、抗银屑病药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、促红细胞生成素(如epoetin $\alpha$ )、菲格司亭(如G-CSF, 优保津)、沙格司亭(GM-CSF, Leukine (重组GM-CSF))、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如巴利昔单抗、环孢霉素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、

放射性药物、抗抑郁剂、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、多奈哌齐、他克林、抗哮喘药、 $\beta$ 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸钠、肾上腺素或类似物、 $\alpha$ 链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。适当的剂量是本领域公知的。见,例如,Wellset al.,eds.,Pharmacotherapy Handbook,2nd Edition,Appleton and Lange,Stamford,CT(2000);PDR Pharmacopoeia,TarasconPocketPharmacopoeia2000,Deluxe Edition,Tarascon Publishing,LomaLinda,CA(2000),兹通过提述并入这些参考文献每一篇的全部内容。。

[0239] 适用于本发明的组合物、联合治疗、共同施用、设备和/或方法的TNF拮抗剂(进一步包括本发明的至少一种抗体、其特定片段和变体)包括,但不限于,抗TNF抗体、其抗原结合片段、以及与TNF特异性结合的受体分子;防止和/或抑制TNF合成、TNF释放或TNF作用于靶细胞的化合物,如酰胺哌啶酮、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂(如己酮可可碱和环戊苯吡酮)、A2b腺苷受体激动剂和A2b腺苷受体增强剂;防止和/或抑制TNF受体信号传递的化合物,如有丝分裂原激活的蛋白(MAP)激酶抑制剂;阻断和/或抑制膜TNF裂解的化合物,如金属蛋白酶抑制剂;阻断和/或抑制TNF活性的化合物,如血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂(如卡托普利);和阻断和/或抑制TNF活性产生和/或合成的化合物,如MAP激酶抑制剂。

[0240] 本发明的任何方法可以包括治疗GD2介导的病症或以GD2表达为特征的病症的方法,所述方法包括给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者有效量的包含至少一种GD2抗体的组合物或药物组合物。所述方法可以任选进一步包括用于治疗这些免疫疾病的共同施用或联合治疗,其中给予所述至少一种抗GD2抗体、其特定部分或变体,进一步包括在之前、同时和/或之后,给予至少一种上述试剂。

[0241] 一般地,病理学状况的治疗是通过给予有效量或剂量的至少一种抗GD2抗体组合物而实现的,该组合物中平均总共含有至少约0.01-500mg至少一种抗GD2抗体/千克患者体重/剂,优选每单次或多次施用约0.1-100mg抗体/千克患者体重,这取决于组合物中含有的具体活性。或者,有效血清浓度可以包括每单次或多次施用0.1-5000 $\mu$ g/ml的血清浓度。适当的剂量是医学从业者已知的,当然,取决于特定的疾病状态、给予的组合物的具体活性、以及患者正在进行的具体治疗。在一些情况下,为获得需要的治疗量,有可能必须提供重复施用,即重复特定监测或计量剂量的各次施用,其中重复各次施用,直到达到需要的每日剂量或效果。

[0242] 优选的剂量可以任选包括0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和/或100-500mg/kg/施用,或其中的任意范围、任意值或任意分数,或每单次或多次施用达到0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、

23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、和/或5000 $\mu$ g/ml血清浓度,或其中的任意范围、任意值或任意分数。

[0243] 此外,施用剂量可以根据已知因素而改变,例如具体试剂的药代动力学特征,以及其施用模式和途径;接受者的年龄、健康和体重;症状的性质和范围;同时进行治疗的类型、频率,以及需要的效果。通常活性成分的剂量为约0.1-100mg/kg体重。通常为0.1-50,优选0.1-10mg/kg/施用,或以有效获得需要的结果的持续释放形式。

[0244] 作为非限制性实例,人或动物的治疗可以通过一次或周期剂量的至少一种本发明的抗体而提供,其剂量为0.1-100mg/kg,例如0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/kg/日,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天中的至少一天施用,或作为选择或额外地在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、或52周的至少一周施用,或作为选择或额外地在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20年中的至少一年中施用,或其任意组合,采用单次、输注或重复给药。

[0245] 适于内部施用的剂型(组合物)一般包含约0.1mg-约500mg活性成分/单位或容器。在这些药物组合物中,活性成分的量一般为基于组合物总重量的约0.5-99.999%(重量)。

[0246] 对于肠胃外施用,可以将抗体配制为与可药用的肠胃外载体结合或分别提供的溶液、悬浮液、乳液或冻干的粉末。这些载体的例子为水、盐水、林格氏液、右旋糖溶液、和1-10%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体如固定的油。载体或冷冻干燥的粉末可以含有维持等渗性(如氯化钠、甘露醇)和化学稳定性(如缓冲剂和防腐剂)的添加剂。该制剂通过已知或适当技术灭菌。

[0247] 适当的药物担载体描述于本领域的标准参考文献Remington's Pharmaceutical Sciences, A.Osol的最新版本。

[0248] 肠胃外施用的制剂可以包含作为常规赋形剂的无菌水或盐水、聚链烷醇如聚乙二醇、植物油、氢化萘等。可以通过适当的乳化剂或润湿剂和悬浮剂根据已知方法制备用于注射的水性或油性悬浮液。用于注射的试剂可以是无毒的、可非口服施用的稀释剂,如水溶液或无菌可注射溶液或溶剂中的悬浮液。作为可使用的载体或溶剂,可以使用水、林格氏液、等渗盐水等;作为普通溶剂或悬浮溶剂,可以使用无菌的不挥发油。对于这些目的,可以使用任意类型的不挥发油和脂肪酸,包括天然或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸;天然或合成的或半合成的甘油单酯或二酯或三酯。肠胃外施用是本领域公知的,包括,但不限于,常规注射工具、描述于美国专利No.5,851,198的气加压的无针头注射设备,和描述于美国专利No.5,839,446的激光穿孔器设备,在此全文引入上述专利作为参考。

[0249] 本发明进一步涉及通过胃肠外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、鞘内、奥马耶贮器内、眼内、玻璃体内、结肠内、宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、椎管内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、阴道、直肠、颊部、舌下、鼻内、

或经皮方式施用至少一种抗GD2抗体。可以制备至少一种抗GD2抗体的组合物,用于肠胃外(皮下、肌肉或静脉内)或任意其它施用,特别是以液体溶液或悬浮液施用;用于阴道或直肠施用,特别是以半固体形式施用,例如,但不限于以霜和栓剂形式施用;用于颊部或舌下施用,例如,但不限于以片剂或胶囊形式施用;或用于鼻内施用,例如,但不限于以粉末、鼻滴液或气溶胶或某些制剂形式施用;或用于经皮施用,例如,但不限于以凝胶、油膏、洗液、悬浮液或贴剂递送系统施用,同时用化学增强剂如二甲基亚砷修饰皮肤结构或增加经皮贴剂的药物浓度(Junginger, et al. 收录于“Drug Permeation Enhancement”; Hsieh, D.S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994,) 在此全文引入作为参考),或使用氧化剂以便将含有蛋白和肽的制剂应用于皮肤上(W098/53847),或施加电场以便产生电穿孔等瞬时转运途径,或增加带电药物通过皮肤的迁移率,如离子电渗疗法,或应用超声,如超声电渗疗法(美国专利Nos. 4,309,989和4,767,402)(上述文献和专利在此全文引入作为参考)。

[0250] 对于肺部施用,至少一种抗GD2抗体组合物优选以到达肺的下气道或鼻窦的颗粒大小进行递送。根据本发明,至少一种抗GD2抗体可以通过本领域公知的各种吸入或鼻设备递送,用于通过吸入进行治疗剂的施用。这些设备可以将气溶胶化的制剂沉积在患者的鼻窦腔或肺泡中,所述设备包括计量吸入器、喷洒器、干粉产生器、喷雾器等。其它适于指导抗体的肺或鼻施用的设备是本领域公知的。所有这些设备可以使用适于以气溶胶形式给予分散抗体的制剂。这些气溶胶可以由溶液(水性和非水性)或固体颗粒组成。**Ventolin®**等计量吸入器一般使用推进气体并且在吸入时要求作动(见,例如W094/16970, W098/35888)。干粉吸入器如**Turbuhaler™**(Astra)、**Rotahaler®**(Glaxo)、**Diskus®**(Glaxo)、**Inhale Therapeutics**出售的装置,仅举数例,利用对混合粉末的呼吸作动(US4668218 Astra, EP237507 Astra, W097/25086 Glaxo, W094/08552 Dura, US5458135 Inhale, W094/06498 Fisons, 在此全文引入作为参考)。喷洒器如**Ultravent®**喷洒器(Mallinckrodt)和**Acorn II®**喷洒器(Marquest Medical Products)((US5404871 Aradigm, W097/22376), 上述参考文献在此全文引入作为参考)从溶液产生气溶胶,而计量吸入器、干粉吸入器等产生小颗粒气溶胶。这些商购吸入设备的具体例子是用于代表适于本发明的实施的具体设备,不准备限制本发明的范围。包含至少一种抗GD2抗体的组合物优选通过干粉吸入器或喷雾器递送。用于本发明的至少一种抗体的施用的吸入设备具有一些理想的特征。例如,通过吸入设备递送是有利的,它可靠、可重复并且准确。吸入设备可以任选递送小的干颗粒,例如小于约10 $\mu$ m,优选约1-5 $\mu$ m,以便能够较好地呼吸。

[0251] 可以迫使至少一种抗GD2抗体的悬浮液和溶液在压力下通过喷嘴,从而产生包括GD2抗体组合物蛋白的喷雾。可以选择喷嘴大小和构型、施加的压力和送入液体的速度而达到需要的输出量和颗粒大小。可以通过例如连接于毛细管或喷嘴的电场产生电喷雾。有利的是,由喷雾递送的至少一种抗GD2抗体组合物蛋白的颗粒大小小于约10 $\mu$ m,优选约1-5 $\mu$ m,最优选约2-3 $\mu$ m。

[0252] 适用于喷雾器的至少一种抗GD2抗体组合物蛋白的制剂一般包含溶于水溶液中的抗体组合物蛋白,其浓度为约每毫升溶液约0.1-100mg至少一种抗GD2抗体组合物蛋白或mg/gm,或其中的任意范围或任意值,例如,但不限于0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、

0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/ml或mg/gm。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定抗体组合蛋白的试剂,例如缓冲剂、还原剂、填充蛋白(bulk protein)或碳水化合物。用于配制抗体组合蛋白的填充蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制抗体组合蛋白的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合蛋白制剂也可以包含表面活性剂,它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的抗体组合蛋白的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约0.001-14%。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等。公知的用于GD2抗体或其特定部分或变体的蛋白制剂的其它试剂也可以包含在制剂中。

[0253] 抗体组合蛋白可以通过喷洒器施用,例如射流喷洒器或超声喷洒器。一般地,在射流喷洒器中,用压缩气体源通过一个孔而产生高速气体射流。当气体膨胀超过喷嘴时,产生低压区,该区将抗体组合蛋白溶液拉拽通过与液体储存器连接的毛细管。通过毛细管的液体流出管时被剪切成不稳定的细丝和微滴,产生气溶胶。可以使用各种构型、流速和挡板类型,以便使用给定的射流喷洒器达到需要的性能特征。在超声喷洒器中,采用高频电能产生振动、机械能,一般采用压电式换能器。该能量被直接或通过耦合流体转移至抗体组合蛋白,产生包含抗体组合蛋白的气溶胶。有利地,由喷洒器递送的抗体组合蛋白的颗粒大小小于约10 $\mu$ m,优选约1-5 $\mu$ m,最优选约2-3 $\mu$ m。

[0254] 适用于喷洒器,包括射流喷洒器或超声喷洒器,的至少一种抗GD2抗体制剂的浓度一般为每毫升溶液约0.1-100mg至少一种抗GD2抗体蛋白。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定至少一种抗GD2抗体组合蛋白的试剂,例如缓冲剂、还原剂、填充蛋白或碳水化合物。用于配制至少一种抗GD2抗体组合蛋白的填充蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制至少一种抗GD2抗体的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗GD2抗体制剂也可以包含表面活性剂,它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的至少一种抗GD2抗体的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约0.001-4%。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等。用于配制蛋白如抗体蛋白等的其它试剂是本领域公知的,也可以包含在制剂中。

[0255] 在计量吸入器(MDI)中,推进剂、至少一种抗GD2抗体和任意赋形剂或其它添加剂作为包含液化压缩气体的混合物被装在一个小罐中。计量阀的作动释放作为气溶胶的混合物,优选含有大小小于约10 $\mu$ m,优选约1-5 $\mu$ m,最优选约2-3 $\mu$ m的颗粒。需要的气溶胶颗粒大小可以通过使用由本领域技术人员公知的各种方法,包括射流研磨、喷雾干燥、临界点浓缩等方法产生的抗体组合蛋白制剂而获得。优选的计量吸入器包括由3M或Glaxo制造并且使用氢氟碳推进剂的那些。

[0256] 计量吸入器装置中使用的至少一种抗GD2抗体制剂一般包含精细分割的粉末,其中含有作为非水介质中的悬浮物的至少一种抗IL-6抗体,例如,在表面活性剂的帮助下悬浮于一种推进剂中。用于此目的的推进剂可以是任何常规材料,如氯氟碳、氢氯氟碳、氢氟

碳或烃,包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和1,1,1,2-四氟乙烷、HFA-134a(氢氟链烷-134a)、HFA-227(氢氟链烷-227)等。推进剂优选是氢氟碳。可以选择表面活性剂以使至少一种抗GD2抗体作为悬浮物稳定在推进剂中,从而保护活性试剂免受化学降解等。适当的表面活性剂包括山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等。在一些情况下,使用乙醇等溶剂的溶液气溶胶是优选的。本领域已知的用于蛋白制剂的其它试剂也可以包含在制剂中。

[0257] 本领域的普通技术人员将认识到,本发明的方法可以通过本文中没有描述的装置对至少一种抗GD2抗体组合物进行肺部施用而达到。

[0258] 用于口服施用的制剂依赖于佐剂(如间苯二酚和非离子型表面活性剂如聚氧乙烯油酯和正十六烷基聚乙酯)的共同施用而人工增加肠壁的通透性,并且依赖于酶抑制剂(如胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟代硫酸酯(DFF)和抑肽酶)的共同施用而抑制酶促降解。用于口服施用的固态剂型的活性组成化合物可以与至少一种添加剂混合,所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露醇、海藻糖、棉籽糖、麦芽糖醇、右旋糖苷、淀粉、琼脂、藻酸盐(arginates)、几丁质、脱乙酰壳聚糖、果胶、黄芪树胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物和甘油酯。这些剂型也可以包含其它类型的添加剂,如非活性稀释剂、润滑剂如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂如山梨酸、抗坏血酸、 $\alpha$ 生育酚、抗氧化剂如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、增甜剂、矫味剂、芳香剂等。

[0259] 片剂和丸剂可以进一步加工成肠衣制剂。用于口服施用的液体制剂包括允许医学应用的乳液、糖浆、酏剂、悬浮液和溶液制备物。这些制备物可以含有所述领域常用的非活性稀释剂,如水。也已经描述将脂质体用作胰岛素的药物递送系统(美国专利No.4,239,754)。最近,已经使用混合氨基酸(类蛋白)的人工聚合物微球体来递送药物(美国专利No.4,925,673)。此外,本领域已知美国专利No.5,879,681和美国专利No.5,587,753中描述的但载体化合物也已经用于口服递送生物活性试剂。

[0260] 对于通过粘膜的表面吸收,给予至少一种抗GD2抗体的组合物和方法包括含有多种亚微米颗粒、粘膜吸附性大分子、生物活性肽和水性连续相的乳液,它通过达到乳液颗粒的粘膜吸附而促进通过粘膜表面的吸收(美国专利Nos.5,514,670)。适于施加本发明的乳液的粘膜表面可以包括角膜、结膜、颊、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠施用途径。用于阴道或直肠施用的制剂,如栓剂,可以包含赋形剂,例如聚链烷醇、凡士林、可可油等。用于鼻内施用的制剂可以是固体,并包含例如乳糖作为赋形剂;或可以是水性或油性的鼻滴液。对于颊部施用,赋形剂包括糖、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等(美国专利Nos.5,849,695)。

[0261] 对于经皮施用,将至少一种抗IL-6抗体包被于递送装置,如脂质体或聚合纳米颗粒、微颗粒、微胶囊或微球体中(除非特别指出,统一称作微颗粒)。适合的装置已知有许多,包括由以下成分组成的微颗粒:合成聚合物如多羟基酸,如聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物、聚原酸酯、聚酐和聚磷腈,以及天然聚合物如胶原、聚氨基酸、白蛋白和其它蛋白、藻酸盐和其它多糖、及其组合(美国专利Nos.5,814,599)。

[0262] 有时可能需要在长时间内向受试者递送本发明的化合物,例如,自单次施用起一周至一年的周期。可以使用各种缓释、储存或植入剂型。例如,剂型可以包含化合物的可药用的无毒盐,该化合物在体液中具有低溶解度,例如,(a)多价酸的酸加成盐,所述酸例如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、拍酸、藻酸、聚谷氨酸、萘单或二磺酸、聚半乳糖醛酸等;(b)

多价金属阳离子的盐,所述阳离子如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等,或与有机阳离子如N,N'-二苄基-乙二胺或乙二胺形成的盐;或(c),(a)和(b)的组合物,如鞣酸锌盐。此外,本发明的化合物或优选相对不溶的盐,如前面描述的化合物和盐,可以与例如芝麻油等适于注射的物质一起配制于例如单硬脂酸铝凝胶等凝胶中。特别优选的盐是锌盐、鞣酸锌盐、双羟萘酸盐等。用于注射的缓释储存制剂的另一种类型包含用于包被于胶囊中的分散的化合物或盐,所述化合物或盐位于缓慢降解、无毒、非抗原性的聚合物中,如描述于美国专利No.3,773,919的聚乳酸/聚乙醇酸聚合物。该化合物或优选相对不溶的盐,如前面描述的化合物和盐,也可以配制于胆固醇基质硅橡胶丸中,特别是用于动物。其它缓释、储存或植入制剂,如气体或液体脂质体是文献中公知的(美国专利Nos.5,770,222和“Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”,J.R.Robinson ed.,Marcel Dekker,Inc.,N.Y.,1978)。

[0263] 在此明确地通过提述并入本申请引用的所有参考文件(包括文献参考文件、授权的专利、公布的专利申请、以及共同待审的专利申请)的内容。

[0264] 在下文对示例性的实施方案的描述过程中本发明的其他特征可变得自明,这些描述只是为了示例说明本发明而不意在限制本发明。

[0265] 下面的“材料和方法”在下文中的实施例中使用。

[0266] 材料和方法

[0267] 细胞培养物和人组织人神经母细胞瘤细胞系LAN-1由Robert Seeger博士(Children's Hospital of Los Angeles,Los Angeles,CA)提供,NB1691由Peter Houghton博士(St.Jude Children's Research Hospital,Memphis,TN)提供。NK-92MI获自American Type Culture Collection(ATCC),Manassas,VA。使所有细胞系在5%CO<sub>2</sub>培养箱中在F10[补充有10%胎牛血清(Hyclone,South Logan,UT)、2mM谷氨酰胺、100U/ml青霉素、和100ug/ml链霉素的RPMI1640培养基]中37°C下生长。将在Memorial Sloan-Kettering Cancer Center(MSKCC)获得的不同组织学类型的正常组织和实体瘤样品在液氮中速冻。遵照MSKCC机构审查委员会的指南从患者和/或他们的监护人获得了书面知情同意。

[0268] 单克隆抗体鼠3F8是一种具有κ轻链的小鼠IgG3抗体(Cheung et al.,1985,Cancer Res45,2642-9)。与神经母细胞瘤具有反应性的单克隆抗体3F8(小鼠IgG3,κ)、5F11(小鼠IgM,κ)和8H9(小鼠,κ)先前已经有描述(Cheung et al,1985,同上;Cheung et al.,2004,J Nucl Med45,867-77;Modak et al.,2001,Cancer Res61,4048-54)。它们作为腹水产生并通过亲和色谱纯化:对于3F8为蛋白A(GE Healthcare,Piscataway,NJ),对于8H9为蛋白G,而对于5F11为Clq-sepharose(Pierce,Rockford,IL)。这些抗体根据SDS-PAGE为>90%纯。如先前所述通过胃蛋白酶消化制备了F(ab')<sub>2</sub>片段(Cheung et al.,1988,J Clin Invest81,1122-28)。抗GD2杂交瘤ME361及TIB114(N.S.7),一种分泌IgG3对照抗体的杂交瘤,获自ATCC。14.G2a购自BD Biosciences,San Jose,CA。嵌合14.18由Lexigen Pharmaceuticals,Lexington,MA的Stephen Gillies博士惠赠。MAB1027(anti-B7-H3MoAb)购自R&D System,Minneapolis,MN。针对GD2特异性的小鼠IgG3抗体S220-51购自Northstar Bioproducts,Cape Cod,MA。

[0269] hu3F8-IgG1、hu3F8-IgG4、ch3F8-IgG1、和ch3F8-IgG4抗体产生系的构建。基于m3F8的人同源物,将m3F8的重链和轻链二者的CDR序列嫁接到人IgG1框架中并加以优化。从

两个重链基因和两个轻链基因设计了4个版本的hu3F8。合成这些hu3F8基因并针对CHO细胞优化(Blue HeronBiotechnology,Bothell,WA或Genscript,Piscataway,NY)。使用bluescript载体(Eureka,CA)将这些hu3F8的重链和轻链基因转染到DG44细胞中并用G418(InVitrogen,CA)选择。当转染到Mae1.5CHO细胞(Eureka,CA)中时,产生了特殊的IgG糖形(glycoform)。类似地将小鼠VH和VL序列嫁接到人IgG1和IgG4框架上以制作ch3F8-IgG1和ch3F8-IgG4重组抗体。

[0270] hu3F8与ch3F8的纯化将Hu3F8与ch3F8产生系在Opticho无血清培养基(InVitrogen,CA)中培养并收集成熟的上清液。蛋白A亲和柱用含0.15NaCl,pH8.2的25mM柠檬酸钠缓冲液预平衡。将结合的hu3F8用0.1M柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液,pH3.9洗脱并在25mM柠檬酸钠,pH8.2中碱性化(1:10v/v比)。使其通过Sartobind-Q膜并浓缩到25mM柠檬酸钠、0.15MNaCl、pH8.2中的5-10mg/ml。对hu3F8-IgG1分别在25mM柠檬酸钠、0.15M NaCl,pH8.2中及PBS pH7.4中在有或无0.7mg/ml吐温80(Sigma)的条件下进行稳定性研究。

[0271] SDS-PAGE将每种蛋白质2ug在非还原性或还原性条件下进行SDS-PAGE分析,使用4-15%Tris-甘氨酸速成凝胶系统(Ready Gel System)(Bio-Rad,Hercules,CA)。使用Invitrogen SeeBlue Plus2预染色标准品作为蛋白质分子量标记物。电泳后,使用PIERCE的GelCode蓝色染色试剂对凝胶染色。使用Bio-Rad Fluor-S MultiImager(Bio-Rad)扫描凝胶,并用QuantityOne软件(Bio-Rad)对条带强度定量。

[0272] 通过ELISA定量hu3F8和ch3F8以20ng每孔用GD2包被微量滴定板。对每个板加入150μl每孔的溶于PBS(稀释剂)的0.5%BSA,在环境温度下经过至少30分钟以封闭过量的结合位点,然后用PBS洗涤至少3次。用一批次的纯化hu3F8-IgG1(储存浓度1mg/ml)来构建标准曲线,以0.5ug/ml起始,后随多个2倍稀释。将100u1的标准品和样品(也2倍稀释)添加到每个孔中并在37℃温育2.5小时。用PBS洗涤平板5次后,向每个孔中加入100u1在稀释剂中1:3500稀释后的山羊抗人IgG(H+L)(JacksonResearch Laboratory)并在4℃温育1小时。ELISA颜色反应用色原OPD(Sigma),过氧化氢为底物,室温黑暗中显色30min。用5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,用ELISA读板器MRX(Dynex)读取490的OD。基于该标准曲线,以ug/ml或ug/mg蛋白计来计算人3F8上清液的量。

[0273] Biacore T-100生物传感器(Biacore AB of GE Healthcare,Uppsala,Sweden)上的体外结合动力学CM5传感器芯片(研究级别)和相关的试剂购自Biacore USA(Piscataway,NJ)。神经节苷脂GM1来自ALEXISBiochemicals(AXXORA LLC, San Diego,CA),GD2来自AdvancedImmunoChemical(Long Beach,CA)。GM1溶于(0.5mg/ml)90%乙醇、10%甲醇(v/v),GD2溶于(0.5mg/ml)乙醇。通过疏水相互作用将神经节苷脂直接固定化到CM5传感器芯片上。参比表面固定GM1。GM1用100%乙醇1:1稀释,然后在HBS-E缓冲液(10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、及3mMEDTA)中1/5稀释。将经稀释的GM1(50μg/ml)以15μl/min的流速历时20分钟注射(300μl)。然后用10mM NaOH充分洗涤(通常以5μl/min流速20μl洗涤5次),直到获得稳定的基线。活性表面用GD2和GM1以1:1比例固定化。GD2和GM1用100%乙醇1:1稀释并以1:1比例混合。将GD2与GM1的混合物在HBS-E缓冲液(10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、及3mMEDTA)中1/5稀释。将经稀释的GD2与GM1(50μg/ml)混合物(300μl)以15μl/min流速历时20min注射。然后用10mM NaOH充分洗涤(通常以5μl/min流速20μl洗涤5次),直到获得稳定的基线。

[0274] 在分析之前将纯化的抗GD2MoAbs在含有250mM NaCl的HBS-E缓冲液中稀释到不同浓度(50~1600nM)。2.将样品(60 $\mu$ l)以30 $\mu$ l/min流速历时2分钟注射到传感器表面上。缔合阶段完成后,在相同的流速下在含有250mM NaCl的HBS-E缓冲液中监测解离300秒钟。在每个循环结束时,将表面用50 $\mu$ l 20mM NaOH以50 $\mu$ l/min流速再生1分钟,以及用100 $\mu$ l 4MMgCl<sub>2</sub>以50 $\mu$ l/min流速再生2分钟。用注射样品到固定化GD2之上后获得的生物传感器曲线减去在动力学分析之前注射样品到固定化的GM1之上而获得的对照曲线。利用Biacore T-100评价软件用二价分析物模型(bivalent analyte model)及速率常数的缺省参数设置分析数据,并计算表观缔合开(on)速率常数(k<sub>on</sub>,k<sub>a1</sub>)、解离关(off)常数(k<sub>off</sub>,k<sub>d1</sub>),以及解离平衡常数(KD=k<sub>d1</sub>/k<sub>a1</sub>)。

[0275] 进一步使用大鼠抗3F8抗独特型抗体(Cheung et al.,1993,Int J Can54,499-505)表征了Hu3F8和ch3F8。还将这些大鼠IgG1抗体消化成Fab片段,并使用Fab制备试剂盒(Pierce Protein Research Products,Thermo Fisher Scientific)加以纯化。用ELISA和BIACORE测定了它们对ch3F8和hu3F8的反应性。

[0276] 对与其他神经节苷脂的交叉反应性的ELISA GD2、GM2、GD1a、GD1b、GT1b、以及GD3、GM3、GM1、GD1a在90%乙醇中以20ng/孔包被。空气干燥后,用150 $\mu$ l/孔的含0.5%BSA的PBS室温封闭孔1小时,然后用PBS洗涤3次。一式三份地加入0.5%BSA中的1 $\mu$ g/ml的抗体(每孔100 $\mu$ l)。为了扣减背景,使用了(1)无抗原的孔和(2)无样品的孔。在37℃温育2小时并用PBS洗涤5次后,使用HRP-山羊抗小鼠IgG(Jackson Laboratory,稀释到1:1000)(用于小鼠抗体(例如3F8))或HRP-山羊抗人IgG(Jackson Laboratory,1:1000)(用于人源化抗体)。在4℃再温育1小时并再洗涤后,使用ELISA读板器MRX(Dynex)于490读取OD,并以相对于对GD2的最大结合的%来表示交叉反应性。

[0277] 抗体的生物素化将生物素(长臂(Long Arm)-N-羟基琥珀酰亚胺酯(BNHS,Vector Laboratories,Inc.,Burlingame,CA)以50mg/ml浓度溶解于二甲基亚砜(DMSO)中。以试剂对抗体1/10的重量比加入生物素化试剂。在不时搅动下,室温温育反应混合物2小时。将生物素化的抗体在PBS中室温透析4小时或4℃透析过夜。将生物素化抗体的免疫反应性与天然抗体比较,并确保二者的EC<sub>50</sub>相互在20%之内。

[0278] 免疫染色确定的组织交叉反应性用冷冻切片机切出5-7微米厚的冷冻切片,用250 $\mu$ l丙酮在-20℃固定30分钟。用PBS洗涤玻片之后,使玻片在室温下暴露于新鲜配制的0.1%过氧化氢15分钟。洗涤之后,加入封闭性亲和素溶液(VECTOR亲和素-生物素封闭试剂盒)并在室温温育20分钟。洗涤之后,加入1滴封闭性生物素溶液(VECTOR亲和素-生物素封闭试剂盒)并在室温温育20分钟。在进一步洗涤之后,加入>100 $\mu$ l封闭血清(在PBS中新鲜稀释的10%马血清)并在室温温育1h。这一步可以更长。注意:不能重复使用血清。从每个玻片吸出封闭血清后,加入100 $\mu$ l在1%马血清中稀释的1 $\mu$ g/ml生物素化MOPC21(阴性对照)或生物素化抗体并在室温温育1小时。洗涤之后,加入100 $\mu$ l在PBS中1:100稀释的亲和素-生物素复合物[ABC](Vectastain ABC试剂盒,VECTOR)并在室温温育30分钟。洗涤之后,向每个切片添加200 $\mu$ l染料(DAB过氧化氢酶底物试剂盒,VECTOR)并让颜色发色2分钟(直到根据标准品中的发色判定达到了期望的染色强度)。在流动的自来水中洗涤切片5分钟并用储存的Myer's苏木精复染,然后进一步在流动的自来水中洗涤5分钟。将玻片顺序地在75%、然后95%、再然后100%的乙醇中脱水。最后的脱水步骤在二甲苯或二甲苯替代剂中进行。加入1滴

新鲜的Cytoseal,然后用盖玻片密封切片。

[0279] 直接细胞毒性测试了抗体在没有人血清或人效应细胞存在时对肿瘤细胞生长和生存的直接影响。将肿瘤靶物用2mM EDTA或胰蛋白酶-EDTA解离,洗涤,并以 $1.2 \times 10^3$ 至 $3.5 \times 10^4$ /孔播种在96孔平底平板中的F10中。在CO<sub>2</sub>培养箱中5%CO<sub>2</sub>、37℃温育24小时后,对各个孔中加入递增浓度的溶于F10的抗体。对照孔仅接受F10。5%CO<sub>2</sub>中37℃温育72小时后,对每个孔加入WST-8试剂并在CO<sub>2</sub>培养箱中37℃黑暗中温育2-6小时。使用ELISA读板器MRX (Dy nex) 在450nm和690nm读取OD。通过使用台盼蓝 (Sigma) 或Beckman Coulter计数仪 (Beckman Coulter, Brea, CA) 直接细胞计数来验证WST-8测定。

[0280] 借助<sup>51</sup>Cr释放的抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC)将靶细胞用2mM EDTA解脱到不含Ca<sup>2+</sup>和Mg<sup>2+</sup>的PBS中,并用含10%小牛血清 (Gibco) 的RPMI1640 (F10) 洗涤。将100μCi的<sup>51</sup>Cr与10<sup>6</sup>个靶细胞在终体积250μl中37℃温育1小时,其中每隔15分钟轻柔地使沉淀重悬浮。然后洗涤细胞并在250μl F10中重悬浮并在37℃温育30分钟。洗涤后,计数细胞并使用台盼蓝 (Sigma) 测定存活力,并快速播种到96孔U底平板上。将来自正常志愿者的外周血收集到肝素化管中。将血液与3%右旋糖酐/PBS混合并保持于室温20分钟以使红细胞沉降。然后用菲柯尔 (ficoll) 处理白细胞,并分离成外周血单个核细胞 (PMBC) 和粒细胞 (PMN),分别用于PBMC-ADCC和PMN-ADCC。用F10洗涤细胞,计数,并测定存活力。在10U/ml IL-2存在下进行PBMC-ADCC,在2ng/ml GM-CSF存在下进行PMN-ADCC。ADCC的最终体积为250μl/孔。将抗体在F10中从1μg/ml起进行3倍或5倍稀释。将平板在室温500rpm短暂旋转离心,然后在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中温育4小时。收集ADCC上清液中释放的<sup>51</sup>Cr用于γ计数。使用10%SDS测定总释放,并使用没有效应物的单独F10测定背景自发释放。一般使用50:1的E:T比。类似地,使用稳定转染了人CD16或人CD32Fc受体的NK92-M1细胞进行ADCC测定。与PBMC或PMN不同,该测定中不需要细胞因子。E:T比通常保持在20:1。

$$[0281] \quad \% \text{特异性裂解} = \frac{(\text{实验} - \text{背景})}{(\text{总} - \text{背景})} \times 100\%$$

[0282] 抗体的碘化利用iodogen法 (Divgi et al., 2007, Lancet Oncol. 8, 304-10) 用<sup>124</sup>I和<sup>131</sup>I进行碘化。用50μg iodogen包被玻璃管形瓶,并将50mM磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中的100μg IgG与1mCi的<sup>124</sup>I (或<sup>131</sup>I) 一起加入。碘124在MSKCC利用回旋加速器现场制作。在反应管形瓶中将0.05M NaOH中的10mCi的<sup>124</sup>I (0.02-0.05mL) 与1mg MoAb (~0.5mL)、0.063mL 1M Tris碱和0.4mL 0.2M磷酸钠pH7.4混合。让反应在冰上进行15分钟,然后移出溶液,用P6大小排阻柱,含1%BSA的PBS作为洗脱液,通过大小排阻色谱进行纯化。

[0283] 放射免疫测定 (RIA)

[0284] 用Lindmo的方法来估计免疫反应性 (Lindmo et al., 1984, J Immunol Methods 72, 77-89)。将放射标记的MoAb用1%BSA稀释到50μl含有大约15,000-20,000cpm (约1-1.5μCi/3ml)。将50μl加入到含6.25、3.75、2.5、2.2、1.9百万个肿瘤细胞的500μl 0.5%BSA中并在环境温度下混合1小时。在1500rpm离心5分钟后移出上清液并用1ml冰冷的0.5%BSA洗涤。再次在1500rpm离心5分钟后,在γ计数器中计数细胞离心沉淀。减去在没有细胞或碘化抗体的存在下的背景计数,并使用Lindmo法估计免疫反应性 (Lindmo et al., 1984, 同上)。

[0285] MoAb在异种移植小鼠中的生物分布

[0286] 使用异种移植了皮下LAN1神经母细胞瘤肿瘤的无胸腺裸小鼠来研究药动学/生物分布和抗肿瘤性质。用卡尺测量肿瘤。当皮下肿瘤达到~200mg时启动实验。每只小鼠静脉内注射~100uCi的放射性碘化抗体,且通常在48小时处死动物,取出它们的器官并用 $\gamma$ 计数器(Packard Instruments,Perkin Elmer)计数。这些器官包括皮肤、肝脏、脾脏、肾脏、肾上腺、胃、小肠、大肠、膀胱、股骨、肌肉、肿瘤、心脏、肺、脊柱、以及脑。基于在器官中积累的uCi以及器官重量,计算了%注射剂量(ID)/gm小鼠。还计算了%ID/gm的肿瘤对正常组织比。

[0287] 糖分析

[0288] 由Complex Carbohydrate Research Center,Athens,GA进行了抗体的单糖和寡糖分析。单糖分析通过HPAEC测定。N-糖苷谱分析通过MALDI-MS进行。

[0289] 实施例1

[0290] 嵌合IgG1和四种人源化IgG1的氨基酸序列。将m3F8的重链和轻链的CDR嫁接到人IgG1框架上,基于它们各自对人框架IGG HV3-33和IGKV3-15的同源性。根据两种重链和两种轻链设计,基因合成了4个版本的hu3F8并在DG44细胞中表达。嵌合人重链和轻链的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2,人源化重链序列huH1-gamma1示于SEQ ID NO:4,huH2-gamma1示于SEQ ID NO:6,人源化轻链序列huL1-kappa示于SEQ ID NO:5,而huL2-kappa示于SEQ ID NO:7。

[0291] 当表达为完整IgG时,四种hu3F8-IgG1命名为hu3F8-H1L1-IgG1、hu3F8-H1L2-IgG1、hu3F8-H2L2-IgG1和hu3F8-H2L1-IgG1。制作了用人IgG4框架替代m3F8和hu3F8-H1L1-IgG1的重链序列(嵌合重链 $\gamma$ 4、SEQ ID NO:4和人源化3F8重链 $\gamma$ 4、SEQ ID NO:8)的其他构建物,用bluescript载体转染到DG44细胞中。在另一组实验中,将hu3F8-H1L1-IgG1序列转染到一种特殊的经过特殊的糖基化签名选择的MAGE1.5CHO细胞系(见“材料与方法”)中。嵌合和人源化3F8都是使用标准蛋白A亲和色谱纯化的。

[0292] 在SDS凝胶上,嵌合和人源化抗体作为具有合适大小的重链和轻链的IgG迁移;而且在HPLC上它们都作为完整的IgG洗脱,聚集物形成<10%(数据未显示)。在ELISA中它们都以相似的亲和力结合GD2。在FACS分析(LAN-1,数据未显示)中抗体显示最优的抗体浓度(~0.1-1ug/百万个细胞),在此浓度之外由于较高抗体浓度下的细胞死亡而平均荧光强度(MFI)下降。对于M14黑素瘤,在超过1ug每百万细胞的过量抗体条件下未发生细胞死亡(数据未显示)。IgG4倾向于具有较低的MFI,原因是荧光第二抗体与人IgG1的优先反应性。与其他hu3F8构建体相比,hu3F8-H1L1-IgG1在冻融后最为稳定,在FACS和ELISA中都保留其对肿瘤细胞的结合(数据未显示)。根据糖分析,hu3F8-IgG1n主要具有甘露糖,以及一些N-乙酰-葡萄糖胺,与之相对的是,hu3F8-IgG1和hu3F8-IgG4含有几乎等摩尔比的岩藻糖和N-乙酰-葡萄糖胺(表1)。

[0293] 实施例2

[0294] 基于SPR(BIACORE)的亲和力测量

[0295] 将GD2包被到CM5芯片上,使用BIACORE T-100通过表面等离子体共振在低GD2密度下比较了抗体结合的动力学( $k_{on}$ , $k_{off}$ 和 $K_D$ )(表2)。在高GD2密度下所有抗体的 $k_{off}$ 和 $K_D$ 均成比例地提高(数据未显示)。对BIACORE CM5芯片上在低GD2密度(数据未显示)和高GD2密

度(数据未显示)下的不同抗体浓度的代表性抗体的传感图进行比较。

[0296] 表1:单糖组成

[0297]

| 抗体                        | hu3F8-IgG1n | hu3F8-IgG1 | hu3F8-IgG4 |
|---------------------------|-------------|------------|------------|
| 残基                        | 摩尔%         | 摩尔%        | 摩尔%        |
| 阿拉伯糖(Ara)                 | 0           | 0          | 0          |
| 核糖(Rib)                   | 0           | 0          | 0          |
| 鼠李糖(Rha)                  | 0           | 0          | 0          |
| 岩藻糖(Fuc)                  | 0           | 15.1       | 13.2       |
| 木糖(Xyl)                   | 0           | 0          | 0          |
| 葡糖醛酸(GlcUA)               | 0           | 0          | 0          |
| 半乳糖醛酸 (GalUA)             | 0           | 0          | 0          |
| 甘露糖(Man)                  | 95.2        | 44.1       | 49         |
| 半乳糖(Gal)                  | 0           | 0          | 0          |
| 葡萄糖(Glc)                  | 0           | 0          | 0          |
| N 乙酰甘露糖胺<br>(ManNAc)      | 0           |            |            |
| N 乙酰半乳糖胺<br>(GalNAc)      | 0           | 0          | 0          |
| N 乙酰葡萄糖胺<br>(GlcNAc)      | 4.8         | 40.8       | 37.8       |
| 庚糖(Hep)                   | 0           | 0          | 0          |
| 3 脱氧-2-甘露-2 辛<br>酮糖酸(KDO) | 0           | 0          | 0          |
| 总和                        | 100         | 100        | 100        |

[0298] 抗体的缓慢的 $k_{off}$ 导致当抗体与GD-2阳性肿瘤细胞反应时的洗去(washoff)较慢。这里,将LAN-1细胞(数据未显示)或M14细胞(数据未显示)与单克隆抗体反应并用洗涤缓冲液洗涤多次。在每次洗涤时,使用第二种FITC标记的山羊抗小鼠抗体检测细胞表面上残余的抗体。MFI作为基线(即第一次洗涤之后)的百分比表示。在LAN-1细胞上,3F8和抗B7-H38H9抗体相比于14.G2a(~30%保留,数据未显示)具有缓慢的洗去(10次洗涤后~80%保留)。类似地,对于M14肿瘤细胞,到第5次洗涤时,肿瘤细胞上的抗体的保留存在实质性的差异。3F8、3F8-(Fab')<sub>2</sub>和hu3F8-IgG1(它们都具有缓慢的 $k_{off}$ )具有>80%的保留,而其他抗GD2抗体14.G2a(mIgG2a)、ME361(mIgG2a)、和S220-51(mIgG3)(它们都具有快速的 $k_{off}$ ,根据

BIACORE) 渗漏至<30%。Hu3F8-IgG1、hu3F8-IgG4、ch3F8-IgG1和ch3F8-IgG4也在ELISA中及通过SPR(见“方法”)与大鼠抗3F8独特型抗体(Cheung et al.,1993,Inter J Cancer54,499-505)以及它们的Fab以高亲合力特异性反应。

[0299] 实施例3

[0300] 与其他抗原的交叉反应性

[0301] 在交叉反应性研究中,hu3F8-H1L1-IgG1具有与ch3F8-IgG1和m3F8相似的概貌(表3)。与GD1b存在低水平的交叉反应性,表达为ELISA中相对于固相GD2的OD的OD百分比。Western或SPR均显示m3F8、hu3F8或14.G2a与人N-CAM无交叉反应性(Patel et al.,1989,Br.J.Cancer60,861-866)(数据未显示)。

[0302] 表2:SPR (BIACORE-T100) 测量的嵌合和人源化3F8的结合动力学

[0303]

| 抗体               | n  | kon      | koff     | KD (nM) |
|------------------|----|----------|----------|---------|
| ch3F8-IgG1       | 2  | 1.15E+05 | 1.45E-03 | 13±3    |
| hu3F8-H1L1-IgG1  | 12 | 9.19E+04 | 1.03E-03 | 11±1    |
| hu3F8-H1L2-IgG1  | 3  | 1.74E+05 | 1.07E-03 | 7±2     |
| hu3F8-H2L1-IgG1  | 3  | 1.92E+05 | 5.04E-03 | 31±14   |
| hu3F8-H2L2-IgG1  | 3  | 1.52E+05 | 3.51E-03 | 26±11   |
| hu3F8-H1L1-IgG1n | 3  | 9.76E+04 | 6.88E-04 | 11±2    |
| ch3F8-IgG4       | 2  | 9.40E+04 | 1.28E-03 | 14±2    |
| hu3F8-H1L1-IgG4  | 3  | 1.18E+05 | 1.76E-03 | 15±1    |
| m3F8             | 10 | 1.75E+05 | 1.04E-03 | 5±1     |
| m3F8 (Fab') 2    | 3  | 1.44E+05 | 1.23E-03 | 9±3     |
| 14.G2a           | 6  | 1.30E+05 | 1.11E-02 | 100±26  |

[0304] 实施例4

[0305] 直接细胞毒性

[0306] 当这些抗体体外添加到神经母细胞瘤细胞时,它们诱导直接细胞死亡并减慢体外细胞生长。在3日培养系统中通过WST-8测定时,比较m3F8和hu3F8的EC<sub>50</sub>可见二者具有相似的效力(见表4),与它们相对照的是,14.G2a大约弱10倍。

[0307] 表3:ELISA测定的与其他神经节苷脂的交叉反应性

[0308]

| 抗体               | # exp | GM2<br>/GD2 | GD1a<br>/GD2 | GD1b<br>/GD2 | GT1b<br>/GD2 | GD3/<br>GD2 | GQ1b/<br>GD2 |
|------------------|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 14.G2a           | 7     | 0           | 0            | 0            | 0            | 0           | 0            |
| m3F8             | 19    | 0           | 0            | 4.1%         | 0            | 0           | 0            |
| ch3F8-IgG1       | 5     | 0           | 0.2%         | 8.8%         | 0            | 0.2%        | 0            |
| ch3F8-IgG4       | 6     | 0           | 0            | 6.1%         | 0            | 0           | 0            |
| hu3F8-H1L1-IgG1  | 44    | 0           | 0            | 4.5%         | 0            | 0           | 0            |
| hu3F8-H1L2-IgG1  | 4     | 0           | 0            | 2.9%         | 0            | 0           | Nd           |
| hu3F8-H2L1-IgG1  | 8     | 0           | 0            | 1.9%         | 0            | 0           | 0            |
| hu3F8-H2L2-IgG1  | 9     | 0           | 0            | 1.6%         | 0            | 0           | 0            |
| hu3F8-H1L1-IgG4  | 11    | 0           | 0            | 3.1%         | 0            | 0           | 0            |
| hu3F8-H1L1-IgG1n | 6     | 0           | 0            | 6.9%         | 1.0%         | 0           | 0            |

[0309] 实施例5

[0310] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性

[0311] 使用志愿者PMBC(数据未显示)和志愿者PMN(数据未显示)作为效应物,在ADCC测定中比较了四种hu3F8IgG1抗体(H1L1、H1L2、H2L1、H2L2)。除了H1L2之外的所有三种hu3F8具有可比较的PBMC-ADCC。但最重要的是,它们全部>10-100倍优于m3F8。

[0312] 表4:抗体存在下的神经母细胞瘤LAN-1的直接细胞毒性

[0313]

| 直接细胞毒性          |             |
|-----------------|-------------|
| 抗体              | EC50(ug/ml) |
| m3F8            | 1.9         |
| hu3F8-IgG1-H1L2 | 10.5        |

[0314]

|                 |      |
|-----------------|------|
| hu3F8-IgG1-H2L1 | 16.5 |
| hu3F8-IgG1-H2L2 | 17.5 |
| hu3F8-IgG1-H1L1 | 5.1  |
| hu3F8-IgG1n     | 2.6  |
| hu3F8-IgG4      | 3.1  |
| ch3F8-IgG1      | 4.5  |
| ch3F8-IgG4      | 6.4  |
| 14.G2a          | 47.1 |

[0315] Hu3F8-H1L1-IgG1(缩写为hu3F8-IgG1)在体外最为稳定,选择其用于进一步表征。使用PMBC(数据未显示)或PMN(数据未显示)作为效应物,在针对LAN-1的ADCC测定中比较了

Ch3F8-IgG1、hu3F8-IgG1、hu3F8-IgG1n、14.G2a、和m3F8。这些抗体的ADCC效力作为(3F8的EC50)/(MoAb的EC50)之比来计算(表5)。相对于m3F8,hu3F8-IgG1在PBMC-ADCC中强217倍,在PMN-ADCC中强19倍.hu3F8-IgG1n则分别强3901倍和5倍。此外,嵌合和人源化3F8达到的最大细胞毒性实质性地且一致性高于m3F8或14.G2a,无论是PBMC-ADCC或是PMN-ADCC。

[0316] 为了考察MoAb在ADCC中对孤立的单独FcR(在没有抑制性FcR的存在下)的能力,我们使用了NK92细胞测试ADCC。NK92细胞在其细胞表面上不携带人FcR。当用人CD16和CD32转染时,它们能够介导高效的ADCC。当用神经母细胞瘤LAN-1靶物测试这些效应物细胞时,在CD16-ADCC中hu3F8-IgG1n的效率实质性地(~10倍)高于hu3F8-IgG1,而hu3F8-IgG1的效率高于m3F8(12倍)(数据未显示)。与之相对照的是,用CD32作为FcR时,hu3F8-IgG1的效力比hu3F8-IgG1n高将近10倍(数据未显示)。当使用黑素瘤M14作为靶物时观察到了类似的趋势。在CD16-ADCC中,Hu3F8-IgG1n的效率比hu3F8-IgG1或ch3F8-IgG1高大约10倍,而hu3F8-IgG1或ch3F8-IgG1的效率比mu3F8或14G.2a高大约20倍(数据未显示)。与之相对照的是,当FcR为CD32时,hu3F8-IgG1、hu3F8-IgG1n和ch3F8-IgG1相似,在CD32-ADCC中都比m3F8效率高>10倍(表6)。IgG4亚类抗体具有<3%的CMC活性,最小的CD16-ADCC活性,但比m3F8更好的C32-ADCC。

[0317] 实施例6

[0318] 补体介导的细胞毒性

[0319] 在人补体介导的裂解(CMC)中,不同的hu3F8IgG1形式(H1L1、H1L2、H2L1、和H2L2)的效率相近(表6)。在CMC中Ch3F8与hu3F8为m3F8的40-60%,而14G.2a与ch14.18为4-12%(表6)。

[0320] 表5:在ADCC和CMC中针对神经母细胞瘤LAN-1的相对抗体效力

[0321]

|                 | LAN1-PBMC | LAN1-PMN | LAN1-CMC | LAN1-CD16 | LAN1-CD32 |
|-----------------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
| 抗体              | 效力        | 效力       | 效力       | 效力        | 效力        |
| 14.G2a          | 0.03      | 1.0      | 0.12     | 4         | 2         |
| ch14.18         | 11        | 3        | 0.04     | 2         | 8         |
| ch3F8-IgG1      | 390       | 18       | 0.64     | 24        | 13        |
| ch3F8-IgG4      | 0         | 1        | 0.01     | 0         | 3         |
| hu3F8-IgG1      | 217       | 19       | 0.40     | 12        | 15        |
| hu3F8-IgG1n     | 3901      | 5        | 0.41     | 106       | 2         |
| hu3F8-IgG4      | 0         | 4        | 0.03     | 0         | 1         |
| m3F8            | 1         | 1        | 1        | 1         | 1         |
| hu3F8-H1L2-IgG1 | 7         | 11       | 0.22     | 12        | 17        |
| hu3F8-H2L1-IgG1 | 355       | 14       | 0.64     | 1         | 7         |
| hu3F8-H2L2-IgG1 | 390       | 15       | 0.47     | 10        | 3         |

[0322] 实施例7

[0323] 靶向人神经母细胞瘤异种移植物

[0324] 用<sup>131</sup>I放射性标记的Hu3F8-IgG1、hu3F8-IgG1n、和hu3F8-IgG4具有近似的免疫反应性,大约40-45%(表7)。将它们在携带皮下LAN-1神经母细胞瘤异种移植物的鼠中48小时时的生物分布与<sup>131</sup>I-m3F8进行了比较。当以%ID/gm量度时,肿瘤摄取在hu3F8-IgG1(29.6%)与m3F8(28.6%)之间是近似的,二者均大约二倍于hu3F8-IgG1n和hu3F8-IgG4(数据未显示)。对于NB LAN-1异种移植物而言这四种抗体的肿瘤对正常组织比是近似的。相比之下,对于黑素瘤M14,所有三种hu3F8抗体的%ID/gm和肿瘤对正常组织比均与m3F8相似(数据未显示)。

[0325] 表6:在ADCC和CMC中针对黑素瘤M14的相对抗体效力

[0326]

|                 | M14-CD16 | M14-CD32 |
|-----------------|----------|----------|
| 抗体              | 效力       | 效力       |
| 14.G2a          | 1        | 6        |
| ch14.18         | 9        | 21       |
| ch3F8-IgG1      | 39       | 17       |
| ch3F8-IgG4      | 0        | 0.5      |
| hu3F8-IgG1      | 20       | 31       |
| hu3F8-IgG1n     | 252      | 10       |
| hu3F8-IgG4      | 0.1      | 4        |
| m3F8            | 1        | 1        |
| hu3F8-H1L2-IgG1 | 40       | 44       |
| hu3F8-H2L1-IgG1 | 6        | 9        |
| hu3F8-H2L2-IgG1 | 15       | 11       |

[0327] 实施例8

[0328] 对神经母细胞瘤异种移植物的治疗

[0329] 用m3F8或hu3F8-H1L1-IgG1静脉内处理异种移植了已建立的人神经母细胞瘤LAN-1(0.5-1cm直径)的鼠,每周2次历时4周。对肿瘤响应和鼠生存进行监控。肿瘤生长的延迟对hu3F8-H1L1-IgG1抗体剂量具有依赖性(200ug>100ug>20ug,数据未显示)。接受100-200ug的鼠的生存显著地长于(p=0.003)接受PBS对照或m3F8的鼠(数据未显示)。

[0330] 表7:生物分布研究中<sup>131</sup>I标记的抗体的RIA

[0331]

| LAN1 | m3F8 | hu3F8-IgG1 | hu3F8-IgG1n | hu3F8-IgG4 |
|------|------|------------|-------------|------------|
| RIA  | 45%  | 45%        | 42%         | 40%        |
| TCA  | 94%  | 96%        | 96%         | 96%        |
| #小鼠  | 18   | 19         | 17          | 19         |

[0332] 讨论

[0333] 抗GD2抗体是一种已得到证实的GD2阳性神经母细胞瘤的治疗手段(Yu et al., N Engl J Med363:1324-1334,2010)。鼠抗体14.18及其衍生物(14.G2a和ch14.18)已经为将

来抗GD2疗法的改进提供了标尺。我们选择了鼠IgG3抗体m3F8进行临床开发的原因是在GD2结合过程中的 $k_{off}$ 比14.G2a或ch14.18慢10倍。在具有骨髓中化疗抵抗性的转移性神经母细胞瘤的患者中,m3F8加GMCSF诱导了80%完全的缓解(Kushner et al.,2001,J Clin Oncol19,4189-94)。然而,人抗小鼠抗体(HAMA)可以中和鼠抗体对其抗原的结合能力、阻断该抗体的直接作用、并加速抗体从循环中的清除,从而减弱鼠抗体的作用。通过基因工程来将鼠IgG框架改变为人IgG框架可能减少HAMA应答。Ch14.18与hu14.18(二者均衍生自14.G2a的VH和VL)在患者中具有最小的免疫原性。因此我们将3F8的嵌合和人源化形式作为潜在的下一代抗GD2抗体进行了测试。

[0334] 嵌合化和人源化的成功标准之一是在基因工程过程中保持亲和力。这对于人源化过程中的CDR移植是尤其不确定的。ch3F8和hu3F8保留缓慢的 $k_{off}$ 是令人放心的。但更重要的是,体外效应物功能,以及体内肿瘤靶向以及体内治疗性能的保持和增强可能是关键的。ch3F8-IgG1和hu3F8-IgG1均显示效率高于m3F8>200倍的PBMC-ADCC,而PMN-ADCC为>20倍。此外,特殊的糖形hu3F8-IgG1n的PBMC-ADCC效率比m3F8高>3500倍,PMN-ADCC效率比m3F8高5倍。与之形成鲜明对照的是,对于CMC,ch3F8和hu3F8的补体活化能力比m3F8低。

[0335] 鉴于近来关于ADCC在单克隆抗体在患者中的抗肿瘤效果中所起作用的证据,ADCC的这种大幅改善是最为理想的。在使用利妥昔单抗(rituximab)治疗的淋巴瘤患者中,高亲和力FcR2A和FcR3A均显示具有更好的响应和生存优势(Weng and Levy,2003,J Clin Oncol21,3940-7)。虽然高亲和力受体FcR3A在体外ADCC中导致的改进<10(Niwa et al.,2004,Clin Cancer Res10,6248-55),但总体响应和进展前时间改善了200%(Weng and Levy,2003,同上)。当用赫赛汀(Herceptin)治疗转移性乳腺癌时,具有高亲和力FcR3A的患者的总体响应更好(83%对35%, $p=0.03$ ),且无进展生存更长( $p=0.005$ )(Musolino et al.,2008,J Clin Oncol26,1789-96)。对于用Cetuximab治疗的转移性结肠直肠癌,具有低亲和力FcR2A和FcR3A的患者与具有突变的KRAS的患者具有近似的危险比例(Bibeau et al.,2009,J Clin Oncol27,1122-9)。对于鼠3F8,在髓样细胞上具有对m3F8的高亲和力FcR3A受体的患者显示具有更好的存活(Cheung et al.,2006,J Clin Oncol24,2885-90)。

[0336] 虽然结合亲和力和效应物功能对治疗应用而言是关键的,但交叉反应性会造成预料之外的毒性问题。我们用纯化的神经节苷脂进行ELISA,以及对一组正常人组织进行免疫组织化学,显示了这些嵌合和人源化3F8形式具有与鼠3F8近似的交叉反应模式(数据未显示)。与m3F8相似,嵌合和人源化3F8形式与GD2相比显示对GD1b的低水平反应性。已经显示GD1b是在神经母细胞瘤肿瘤中高度普遍的神经营苷脂,尤其是当其由视黄酸类(retinoids)分化而来时(Hettmer et al.,2004,Br J Cancer91,389-97;Gong et al.,2002,Brain125,2491-506)。这可能是有意义的,因为对于接受针对高风险的神经母细胞瘤的免疫疗法的患者给予顺式视黄酸是常规做法。但是,抗GD1b抗体也已与感觉性共济失调神经病变联系起来(Gong et al.,2002,同上)。无论如何,在超过500名患者中m3F8的安全性概貌(与GD1b具有相似的交叉反应性)且没有长期的或迟发的感觉神经病变,这是令人放心的。

[0337] 补体介导的细胞毒性(CMC)对于人神经母细胞瘤异乎寻常地有效(Saarinen et al.,1985,Proc Amer Assoc Cancer Res26,291),因为人神经母细胞瘤对CD55(Cheung et al.,1987,Proc Natl Am Assoc Cancer Res28,387)和CD59(Chen et al.,2000,同上)的

表达低。所有抗GD2抗体均介导高效的补体介导细胞毒性,且m3F8似乎特别高效。然而,对于利妥昔单抗的研究提示补体活化在ADCC的下调中起负面作用(Wang et al.,2009, Blood114,5322-30)。在临床研究中,补体组分C1qA的较高活性被与对利妥昔单抗疗法的较差响应关联起来(Racila et al.,2008, Clin Cancer Res14,6697-703)。对于抗GD2抗体,补体活化被认为是疼痛副作用的原因(Navid et al., Curr Cancer Drug Targets10:200-209,2010),也促成了目前处于临床试验中的Fc-CH2域突变版本(hu14.18K322A)的问世。考虑到这些因素,CMB的亢进可能不是理想的。ch3F8和hu3F8的CMC效率都稍有降低,这是令人安心的。

[0338] 实施例9

[0339] 利用抗体来阻断急性疼痛副作用

[0340] 有假说称具有缓慢的 $k_{off}$ ,但消除了ADCC或CMC活性的抗体可以用来阻断包围血管周空间的神经纤维上的GD2。3F8的热处理(HM3F8)消除其ADCC和CMC活性,而不影响其GD2结合(Kushner et al.2011, J Clin Oncol29,1168-1174)。当对大鼠预注射经热处理的3F8时,它们对后续的5-10倍摩尔过量的天然3F8的疼痛响应被实质性降低。更重要的是,抗肿瘤效果未受折损。在一项I期临床试验中(IRB-05015, NCT00450307),30名具有抵抗性神经母细胞瘤(NB)的患者在门诊环境下接受了一至二个周期的3F8加粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子。3F8施用开始时为20mg/m<sup>2</sup>/d,在没有剂量限制性毒性(DLT)的条件下以20mg/m<sup>2</sup>/d递增。在先施用包括镇痛剂、抗组胺药、以及2mg/m<sup>2</sup>HM3F8的5分钟输注。将阿片使用与用3F820mg/m<sup>2</sup>/d处理但无HM3F8的同时对照组比较。由于药物供应限制剂量升高终止于160mg/m<sup>2</sup>/d;即使到这个剂量水平,镇痛剂的需求仍然与历史对照相似,而且没有DTL。3F8剂量水平直到80mg/m<sup>2</sup>/d时的镇痛剂需求仍显著低于对照。抗NB活性在所有剂量下均发生。这种多重3F8剂量升高是可行的,并提示HM3F8可能可以调节毒性而不钝化抗NB活性。

[0341] hu3F8-IgG4的疼痛阻断潜力

[0342] 基于HM3F8的临床结果,我们提出这样的假说,即小剂量的不具有CMC或ADCC功能的抗体可以优先阻断血管周围的疼痛纤维。虽然加热m3F8破坏其CMC和ADCC功能(而保留结合),热改性的hu3F8却保留几乎完整的CMC和ADCC功能。hu3F8-IgG4在不同的NB细胞系如Lan1、NMB7、SKNLP、BE (1) N和SHEP1中不能活化CMC和ADCC(表8,以及未显示的数据),这使得这种抗体亚类成为HM3F8的有效替代者。与对抗体结构和免疫原性具有未知影响的加热不同的是,hu3F8-IgG4是一种工程化蛋白。除了不存在CMC和ADCC功能之外,IgG4亚类具有独特的生物化学性质。它们通常是由慢性抗原刺激诱导的,已知它们可干扰其他抗体同种型的免疫复合物形成,从而抑制炎症反应(Losen et al.,2008, Ann N Y Acad Sci1132,174-9)。最重要的是,它天然能够将自身减少为单价,从而在血液中经过数小时时间后失去其与hu3F8-IgG1竞争的能力(van der Neut Kolfshoten et al.,2007, Science317,1554-7)。这种单价性来源于其已知的交换Fab臂的性质:通过与来自另一个IgG4分子的重链-轻链对互换一条重链及附接的轻链(半分子),导致针对所讨论的特定抗原(例如GD2)的单价性。

[0343]

| 表 8: 使用 NK92-CD16 ADCC 作为效应物对不同 NB 系的抗体效力 |      |      |       |        |       |
|-------------------------------------------|------|------|-------|--------|-------|
|                                           | LAN1 | NMB7 | SKNLP | BE(1)N | SHEP1 |
| 14G2a                                     | 0.4  | 1    | 1     | 1      | 1     |
| ch14.18                                   | 4    | 94   | 8     | 2      | 3     |
| hu3F8-IgG1                                | 26   | 1428 | 23    | 68     | 3     |
| hu3F8-IgG4                                | 0    | 0    | 0     | 0      | 0     |
| m3F8                                      | 1    | 1    | 1     | 1      | 1     |
| HM3F8                                     | 0.2  | -    | -     | -      | -     |

[0344] 大鼠异常性疼痛(allodynia)模型使用大鼠模型来测试hu3F8-IgG4阻断疼痛副作用的能力(MSK规程#09-05-010)。使用了m3F8(大鼠补体的高效活化物,Bergman et al., 2000,Cancer Immunol Immunother49,259-66)和hu3F8二者来诱导异常性疼痛。在静脉内施用m3F8(5mg/kg)、或hu3F8-IgG1(5mg/kg)、或ch14.18(5mg/kg)之前30分钟,将Hu3F8-IgG4(0.1、0.25或0.5mg/kg)作为静脉内推注(iv push)施用。其他组接受了热改性的m3F8(HM3F8)或对照抗体代替hu3F8-IgG4。在MoAb注射之前和之后利用Von Frey 纤维法评估基线疼痛(Chassaing et al.,2006,Br J Clin Pharmacol61,389-97;Benani et al.,2003,Eur J Neurosci18,2904-14)。

[0345] hu3F8-IgG4对<sup>131</sup>I-hu3F8-IgG1的生物分布和效力的作用将神经母细胞瘤(LAN-1)肿瘤皮下植入多组具有低血清IgG的雌性NOD/SCID/IL2-gc<sup>nu1</sup>免疫缺陷小鼠(n=10/组)中。在实验前24小时以1gm/kg对小鼠注射人IgG。将Hu3F8-IgG4(0.1、0.25或0.5mg/kg)或对照huIgG4(0.1、0.25或0.5mg/kg)、或HM3F8(0.5mg/kg)、或盐水作为静脉内推注施用,30分钟后用<sup>131</sup>I-标记的各MoAb(50uCi/小鼠)跟踪标记的m3F8、或hu3F8-IgG1或ch14.18(5mg/kg)。在第1、3、6、12、24、36、48和96h从尾部收集血液。在生物分布研究中,在两个时间点上(<sup>131</sup>I-MoAb注射之后24小时和48小时)处死小鼠以进行组织计数。移出主要器官并在具有已知体积的注射物的γ计数器中计数,数据以百分比Ig/gm组织表示。药动学分析使用WinNonlin 软件程序(Pharsight Corp.,Mountain View,CA)对血清浓度-时间数据进行非隔室分析来进行。在另外的几组实验中,类似地处理异种移植小鼠但没有<sup>131</sup>I跟踪标记,并在2个月时间内随时间测量它们的皮下肿瘤响应。

[0346] hu3F8-IgG4阻断大鼠中的异常性疼痛的能力可以与热处理的m3F8的能力比较。基于所使用的阻断抗体的剂量响应曲线(同时保持天然m3F8、或hu3F8-IgG1或ch14.18的刺激,均使用5mg/kg),可以求出在大鼠中阻断异常性疼痛的相对效力。我们预期hu3F8-IgG4阻断异常性疼痛的效率与热处理的3F8等同或更高。这些研究将提供将hu3F8-IgG4转化到临床试验的临床前依据。

[0347] 实施例10

[0348] 优化hu3F8框架序列以提高稳定性

[0349] 在人源化鼠抗体的过程中,常常将结构上重要的位置上的框架残基回复突变成鼠序列以便保持抗体稳定性和抗体结合性(Honegger,A,2008,Engineering Antibodies for

Stability and Efficient Folding, In: Therapeutic Antibodies. Handbook of Experimental Pharmacology, 181)。

[0350] 材料和方法

[0351] m3F8可变域的结构模型

[0352] 利用Discovery Studio (Accelrys, San Diego, CA) 中的MODELER (Eswar et al., 2006, Curr Prot Bioinform, Supplement 15, 5.6.1–5.6.30) 创建了m3F8可变域的同源性模型。选用疟疾抗原AMA1抗体Fab (蛋白质数据库编号2Q8A) 的晶体结构作为可变轻链的模板 (84%同一性)。选用抗体13G5Fab (蛋白质数据库编号2GJZ) 的晶体结构作为可变重链的模板。

[0353] m3F8Fab片段的晶体结构

[0354] 使用标准Fab制备试剂盒 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) 通过木瓜蛋白酶消化产生了m3F8的Fab片段。将经纯化的m3F8浓缩到20mM HEPES pH6.5中12mg/ml, 然后在悬滴中16℃下通过对含有Hampton Index试剂D9 (含0.1M Tris pH8.5、25%w/v PEG3350 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA)) 的储库进行蒸汽扩散来结晶。液滴是通过混合1μl 蛋白溶液与1μl 储库溶液而形成的。用含有25%甘油、0.1M Tris pH8.5、25%w/v PEG3350的冷冻保护液保护晶体。在Argonne Advanced Photon Source beamline24IDC收集数据。晶体属于空间群C2, 且衍射至1.7 Å 分辨率。

[0355] 使用Phaser (CCP4套件) (McCoy et al., 2007, J Appl Crystallogr 40, 658–674) 及PDB条目2AJU作为检索模型 (Qin et al., 2008, J Biol Chem 283, 29473–84) 通过分子置换来解析Fab结构。对最佳分子置换模型用Refmac5 (Murshudov et al., 1997, Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr 53, 240–255) 进行细化, 并使用0 (The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr. 50 (1994) 760–763) 进行手动搭模, 用Arp-Warp (Lamzin and Wilson, 1993, Acta Crystallogr, D: Biol. Crystallogr. 49, 129–147) 加入溶剂。最终的模型含有两个m3F8Fab多肽链和585个溶剂分子。

[0356] m3F8晶体结构的计算分析

[0357] 基于人模板IgHV3-33-HC和IGKV3-15-LC, 利用计算化学方法对每一个可能引入到m3F8上的框架中的人源化突变进行了分析。使用CHARMM (Chemistry at Harvard Molecular mechanics) 力场 (Brooks et al, 2009, J. Comp Chem 30, 1545–1615) 模拟m3F8的晶体结构, 并根据突变后结构与野生型蛋白的折叠自由能的差异来计算每个点突变的影响。使用广义玻恩近似来解释溶剂的影响, 且所有的静电项均作为库仑相互作用与对溶剂化能的极性贡献的和来计算。对每个点突变计算范德华力、静电、熵和非极性项的加权和。所有的计算均使用Discovery Studio 3.0 (Accelrys, San Diego, CA) 进行。

[0358] 结果

[0359] 对于hu3F8-H1L1重链序列, 使用人IgG重链序列IgHV3-33-HC作为模板, 并在第5、9、16、19、20、24、28、29、30、40、48、49、67、71、76、78、81、86和92位进行了回复突变。对于hu3F8-H1L1轻链, 使用人IgG轻链序列IGKV3-15-LC作为模板, 并在第1、7、9、15、19、21、22、43、45、58、60、67、70、73、78、80和87位进行了回复突变。回复突变是基于m3F8的同源性模型推断的, 包括确定这些突变是否会影响CDR环的折叠或者影响骨架稳定性 (牵涉Gly和Pro的

突变)。

[0360] 为了验证同源性模型的准确性并进一步改善人源化策略,以1.7 Å 解析了m3F8的晶体结构(数据未显示)。将m3F8可变区的同源性模型与经解析的晶体结构叠加(数据未显示)。对于CDR之外的大部分框架区域的同源性模型与实验获得的晶体结构紧密吻合。然而,在CDR区中观察到显著的差异,尤其是在环H3、H2和L3中。同源性模型也未能准确地预测任何VH-VL界面处的对Fv结构的稳定性关键的相互作用。有6对氨基酸在VH-VL形成氢键,两对氨基酸参与pi相互作用(表10)。在解析了m3F8的晶体结构之后,基于IgHV3-33-HC与IGKV3-15-LC模板,应用计算分析来确定每个人源化突变的能量效应。计算了每个突变的折叠自由能差。基于该分析,发现这些人源化突变中有5个对m3F8的整体折叠而言是失稳性的(见表9)。这些包括重链第11和21位,以及轻链第1、10、12、40、和97位。还确定了轻链中分别位于第40和97位的涉及Pro和Gly的人源化突变会显著影响骨架柔性。这5个失稳性突变,加上上述两个Gly/Pro突变,被认为是回复突变的候选者,并包含在hu3F8-H3L3的序列中(SEQ ID NO:9和10)。对m3F8晶体结构的计算分析还鉴定了5个对抗体稳定性将具有中性影响的人源化突变(数据未显示)。这些突变是轻链的第24和56位,以及重链的第20、58和92位。这些突变不包括在基于同源性模型的hu3F8-H1L1的序列中(SEQ ID NO:4和5),但包括在对hu3F8-H3L3的设计中。

[0361] 对m3F8的晶体结构的VH-VL界面进行了分析以在hu3F8中保留各个氢键和pi相互作用(表10)。在界面相互作用所牵涉的15个氨基酸中,14个被保留在hu3F8-H1L1和hu3F8-H3L3的设计中。不包括在内的那个相互作用涉及轻链中的Ser43。将该突变加入到hu3F8-L1和hu3F8-L3的设计中以产生Hu3F8-L1S和Hu3F8-L3S。

[0362] 这些稳定性增强的框架区是不可能通过涉及使用同源性建模来设计稳定的人源化框架的现有技术实现的。具有提高的稳定性概貌的新抗体的设计需要将实验获得的m3F8晶体结构与使用力场方法的计算分析结合起来使用。

[0363] 表9. 对m3F8Fv晶体结构的人源化突变的计算分析会使小鼠结构失稳或改变骨架柔性的突变。

[0364]

| 突变     | $\Delta G$ (kcal/mol) | 观察结果 |
|--------|-----------------------|------|
| 轻链S1E  | 0.82                  | 失稳性  |
| 轻链F10T | 1.36                  | 失稳性  |
| 轻链L12S | 1.98                  | 失稳性  |
| 重链L11V | 1.90                  | 失稳性  |

[0365]

|        |       |        |
|--------|-------|--------|
| 重链T21S | 1.71  | 失稳性    |
| 轻链A40P | -1.03 | 改变骨架柔性 |
| 轻链G97Q | -1.42 | 改变骨架柔性 |

[0366] 对稳定性的影响将可忽略的突变

[0367]

| 突变     | $\Delta G$ (kcal/mol) | 观察结果 |
|--------|-----------------------|------|
| 轻链K24R | -0.30                 | 中性影响 |

|        |       |      |
|--------|-------|------|
| 轻链S56T | 0.24  | 中性影响 |
| 轻链V58I | -0.73 | 中性影响 |
| 重链I20L | -0.44 | 中性影响 |
| 重链M92V | -0.56 | 中性影响 |

[0368] 表10.m3F8Fv晶体结构的VH-VL界面处的氨基酸之间的重要相互作用

[0369]

| 相互作用     | 轻链残基  | 重链残基   |
|----------|-------|--------|
| 氢键       | Gln38 | Gln39  |
| 氢键       | Ser43 | Gly110 |
| 氢键       | Tyr55 | Asp107 |
| 氢键       | Gln89 | Tyr104 |
| 氢键       | Tyr92 | Arg98  |
| 氢键       | Tyr36 | Leu106 |
| Pi-Pi    | Tyr92 | Trp47  |
| Pi-sigma | Tyr92 | Tyr104 |

[0370] 实施例11

[0371] 基于对3F8:GD2相互作用的计算分析的3F8抗体的更高亲和力

[0372] 使用m3F8的晶体结构作为模板进行计算研究来确定抗原识别的分子细节。GD2抗原由一个五糖 (penta-saccharide) 头部基团及与之相连的神经酰胺脂质尾部组成。在没有实验获得的3F8:GD2共复合物的条件下,尝试仅与GD2五糖头部基团进行计算对接,其中将神经酰胺部分替换成甲基基团。鉴于计算对接领域的发展水平,GD2五糖分子对于对接研究是一个重大挑战。首先,大型、柔性配体的对接是难于准确预测的。GD2头部基团具有超过30个可旋转的键。目前尚未报道有确立的对接规程可准确地用于具有如此高柔性的配体。其次,GD2头部基团是碳水化合物分子,而关于当对碳水化合物分子应用力场法时对接研究的准确度的报道很少。第三,GD2头部基团是一类特殊的碳水化合物,因为它具有两个带电的基团,存在于它的唾液酸部分中。尚未有确立的对接方法被显示可准确地预测如此大型、柔性、并且带电的碳水化合物的结合构象。

[0373] 一种据报道能够可靠地预测寡糖 (尽管不含带电的唾液酸残基) 的结合构象的对接算法是GLIDE (Agostino et al., 2009, J Chem Inf Model 49, 2749-60)。该报道显示,当预测寡糖对抗体的结合构象并与实验获得的共晶体结构比较时,GLIDE的性能优于AutoDock、GOLD和FlexX。应当注意的是,其测试的抗原均不大于四糖。文献中另一种有前景的对接算法是CDOCKER (Wu et al., 2003, J. Comp Chem 24, 1549), 这是一种基于CHARMm的对接算法,已显示其预测具有8个或更多可旋转键的配体的对接构象的性能优于DOCK、FlexX、和GOLD (Erickson et al., 2004, J Med Chem 47, 45-55)。应当注意,该研究中未分析寡糖,且其测试的配体的大小和柔性比GD2 (>30个可旋转键) 小得多。

[0374] 利用可获自蛋白数据库的三个测试实例 (PDB编号2HRL:Siglec-7与GT1b的复合物;PDB编号3BWR:猿病毒VP1与GM1的复合物;以及PDB编号3HMY:破伤风毒素HCR/T与GT2的复合物) 对于GLIDE与CDOCKER对接与GD2相似的配体 (含唾液酸的寡糖) 进行了头对头 (head-to-head) 比较。在三个测试实例的所有2个中,CDOCKER能够准确地预测各寡糖的正

确结合模式(均方根偏差2Å之内)。

[0375] GLIDE在3个测试实例的2个中对接不准确(均方根偏差>2Å),而在第三个测试实例中未能找到对接姿态(见表11)。由该分析可见CDOCKER对接带电荷寡糖的性能优于GLIDE。

[0376] GLIDE在每一个实例中均失败(见表11)。

[0377] 然后使用CDOCKER来将GD2五糖头部基团对接到m3F8晶体结构的抗原结合口袋。然后将最优对接的结构(top docked structure)利用CHARMm力场进行能量最小化。该分析指明了与GD2头部基团直接相互作用的14个氨基酸(表12)。然后在计算机上将这些位置分别突变成所有可能的氨基酸,并计算基于CHARMm的相互作用能。相互作用最高的突变体列于表13。基于这种方法,预测一个突变(重链Gly54Ile)可显著增加相互作用能。计算机建模显示将重链CDR3第54位的Gly取代为Ile将改变结合口袋的形状并增加与GD2配体的接触。使用该分析来将重链突变Gly54Ile添加到huH1-gamma1和huH3-gamma1的序列的CDR区,分别形成huH1I-gamma1和huH3I-gamma。

#### [0378] 对接方法

[0379] 使用Schrodinger Suite2009 (Schrödinger, New York, NY) 来进行GLIDE对接。使用OPLS力场来参数化蛋白质和配体。将最优配体姿势集簇于均方根偏差2.0Å之内并用GlideScore打分。

[0380] 使用Discovery Studio3.0 (Accelrys, San Diego, CA) 进行CDOCKER对接和相互作用能测量。使用CHARMm力场来参数化蛋白质和配体。将最优配体姿势集簇于均方根偏差2.0Å之内并用CDOCKER Interaction Energy打分。

[0381] 表11. 对接算法GLIDE与CDOCKER预测已知蛋白:神经节苷脂复合物的比较

[0382]

| 方法      | 蛋白质            | 配体   | 最优姿势的<br>RMSD(Å) |
|---------|----------------|------|------------------|
| CDOCKER | Siglec-7       | GT1b | 1.3              |
|         | 猴病毒 VP1        | GM1  | 3.2              |
|         | 破伤风毒素<br>HCR/T | GT2  | 1.2              |
|         |                |      |                  |
| GLIDE   | Siglec-7       | GT1b | 9.6              |
|         | 猴病毒 VP1        | GM1  | 无法找到对接姿势         |
|         | 破伤风毒素<br>HCR/T | GT2  | 4.2              |
|         |                |      |                  |

[0383] 实施例12

[0384] 通过提高对抗原和Fc受体 (FcR) 的亲合力改善效应物功能

[0385] 抗GD2MoAb是针对化疗抗性的转移神经母细胞瘤 (NB) 的经验证的疗法, ch14.18提供了下一代MoAb的标尺。抗GD2MoAb小鼠3F8 (m3F8) 与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-

CSF) 的组合在80%的原发性顽固性NB患者中一贯地诱导了完全骨髓缓解。在受治疗的处于最先完全缓解/非常好的部分缓解 (CR/VGPR) 中的患者中, 该组合加上13-顺-视黄酸改善了5年后PFS至51%±7%, 以及OS至80%±5%。表12. 基于CDOCKER与CHARMm能量最小化的与GD2直接相互作用的3F8氨基酸残基。结果分析一再显示基于基因多态性的FcR亲和力在NB和其他实体瘤的MoAb疗法中的重要性。在不牺牲特异性的同时改善对抗原和FcR的亲和力可改善MoAb在体外和体内的效力。

[0386] 表12. 基于CDOCKER与CHARMm能量最小化的与GD2直接相互作用的3F8氨基酸残基  
[0387]

| 链  | 氨基酸位置   |
|----|---------|
| 轻链 | Asp 91  |
|    | Tyr 92  |
| 重链 | Gly 33  |
|    | Trp 52  |
|    | Ala 53  |
|    | Gly 54  |
|    | Gly 55  |
|    | Ile 56  |
|    | Asn 58  |
|    | Arg 98  |
|    | His 101 |
|    | Tyr 102 |
|    | Gly 103 |
|    | Tyr 104 |

[0388] 表13. 3F8中与GD2头部基团相互作用的残基的计算机突变分析所得的最优CDR突变体

[0389]

| 野生型 | 突变 | 相互作用能的变化 (kcal/mol) |
|-----|----|---------------------|
|-----|----|---------------------|

[0390]

|           |     |       |
|-----------|-----|-------|
| HC GLY54  | ILE | -8.23 |
| HC GLY103 | LEU | -2.38 |
| HC GLY103 | TRP | -1.9  |
| HC GLY55  | THR | -1.38 |
| HC ILE56  | ARG | -0.93 |
| HC GLY54  | SER | -0.86 |

[0391] 方法:

[0392] 通过基因工程构建huIgG1亚类的嵌合3F8(ch3F8)和人源化3F8(hu3F8),在CHO细胞中表达,并通过蛋白A亲和色谱纯化。在特殊的MAGE1.5CHO细胞中产生了缺少岩藻糖和N-乙酰葡萄糖胺的hu3F8Fc糖形(hu3F8n或hu3F8-MAGE1.5)。使用BIAcore T-100比较了这些MoAb形式对GD2以及对FcR的亲合力。利用抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体介导的细胞毒性(CMC)测定法测试了效应物功能,并从MoAb的EC50得出了它们的效力。将这些策略应用于具有临床潜力的针对其他肿瘤抗原系统(B7-H3、HER-2、CSPG4、LI CAM)的MoAb。

[0393] 结果:

[0394] Ch3F8和hu3F8维持了与m3F8相似的Kd,它们与14G.2a或ch14.18相比都具有慢10倍的 $k_{off}$ ,从而有更好的KD和更长的驻留时间。M3F8、ch3F8或hu3F8在体外抑制了NB细胞系的扩增,而其他抗GD2抗体没有效果。在外周血单个核细胞(PBMC)-ADCC、粒细胞(PMN)-ADCC、或CMC中,ch3F8与hu3F8比ch14.18强超过10倍。hu3F8n的PBMC-ADCC比hu3F8效率高10倍,而比m3F8高>100倍。虽然在生物分布研究中 $^{131}I$ -hu3F8显示与 $^{131}I$ -m3F8近似的肿瘤对正常组织比,但hu3F8针对NB异种移植物显示了更优越的抗肿瘤作用。尽管就针对其他肿瘤抗原系统的嵌合和人源化抗体可以得到类似的结论,但肿瘤表位/抗原的性质对于确定肿瘤杀死的效率而言是关键的。

[0395] 结论:

[0396] 虽然对抗原或FcR的 $k_{off}$ (或KD)单独地改善了效应物功能,但对于抗GD2MoAb3F8而言它们的作用结合起来似乎是相乘性的(multiplicative)。将来旨在改善这两种亲和力的策略可能进一步增加迄今为止观察到的MoAb的临床效力。

[0397] 实施例13

[0398] 进一步Fc修饰以改善FcR结合:

[0399] 已经制备了在重链中具有三突变DEL(S239D/A330L/I332E)的Hu3F8-IgG1-DEL(Lazar et al.,2006,PNAS USA103,4005-10),其具有显著增加的对FcR3A和FcR2A的亲合力,以及对FcR2B的亲合力(见表14中的BIAcore数据)。然而,CD16-158V对hu3F8-IgGn的活化信号对抑制信号的A/I比为196,相比之下hu3F8-IgG1-DEL则为30,有人提出这具有临床上的优势(Nimmerjahn and Ravetch,Immunol Rev,236:265-275,2010)。

[0400] 表14:相对亲合力.通过使用BIAcore T-100使抗体流过CM5芯片上的重组FcR来确定KD。所有值均对FcRIII-158F上的hu3F8-IgG1结合标准化。

[0401]

| 抗体形式           | FcRIII |      |       | FcRII |      |       |
|----------------|--------|------|-------|-------|------|-------|
|                | 158V   | 158F | CD16B | 131H  | 131R | CD32B |
| hu3F8-IgG1     | 2.5    | 1.0  | 0.8   | 2.1   | 1.0  | 0.1   |
| hu3F8-IgG1-DEL | 35.9   | 24.2 | 24.1  | 2.8   | 2.0  | 1.2   |
| hu3F8-IgG1n    | 19.6   | 6.0  | 2.3   | 1.2   | 0.4  | 0.1   |

[0402] 对神经母细胞瘤LAN-1的CD16介导的ADCC

[0403] 在历时4小时的 $^{51}Cr$ 释放测定中,在不同抗体浓度下以效应物:靶物比5:1将NK92-CD16效应物细胞添加到LAN1神经母细胞瘤肿瘤靶物中。

[0404] 对FcR的亲合力的增加导致由CD16或CD32介导的ADCC效力增加。对于由CD16介导的ADCC(数据未显示),hu3F8-IgG1-DEL和hu3F8-IgG1n是等同的。

[0405] 补体介导的神经母细胞瘤LAN-1裂解

[0406] 在历时4小时的<sup>51</sup>Cr释放测定中,在抗体的递增浓度下以1:100的最终血清补体稀释度将人补体加入神经母细胞瘤LAN-1肿瘤靶物中。在补体介导的裂解中(CMC、数据未显示),hu3F8-IgG1-DEL并不比hu3F8-IgG1或hu3F8-IgG1n差。当IgG重链中的三突变与hu3F8-IgG1n组合时,对ADCC没有进一步的改善。

[0407] 实施例15

[0408] 在体内武装T细胞和效应物

[0409] T细胞或称T淋巴细胞是参与细胞介导免疫的关键白细胞。可以基于它们细胞表面上的称为T细胞受体(TCR)的特殊受体的存在将它们与其他淋巴细胞类型,如B细胞和天然杀伤(NK)细胞区分开来。它们还携带一种独特的表面标记物,称为CD3。T代表胸腺,这是主要负责T细胞成熟的器官。T细胞存在数种亚群,分别具有不同的功能。T辅助细胞(TH细胞)在免疫过程(包括B细胞成熟以分泌抗体,以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的活化)中帮助其他白细胞。已经将它们称为CD4+T细胞,因为它们携带CD4蛋白。当被活化时,辅助T细胞快速分裂并分泌细胞因子以调节或帮助免疫应答。这些抗体能够分化为分泌不同的细胞因子的数种亚型(例如TH1、TH2、TH3、TH17或TFH)以调节免疫应答。在某些肿瘤模型中,CD4+T细胞也足以阻遏癌症生长。尽管常规的活化信号来自抗原呈递细胞(APC),CD4+T细胞当它们的表面CD3被抗体交联时可以活化。细胞毒性T细胞(CTL)破坏被病毒感染的细胞和肿瘤细胞,并且还负责移植物或嫁接物排斥。它们被称为CD8+T细胞,因为它们表达表面CD8糖蛋白。它们通过识别与I类主要组织相容性复合物(MHC)分子(这些分子在许多人类肿瘤上不存在或稀少)缔合的抗原来接合靶物。记忆T细胞是在病毒或肿瘤细胞被杀死后长期持续存在的抗原特异性T细胞。当面对肿瘤抗原攻击时它们能够快速大量扩增,从而使免疫系统具有针对癌症的“记忆”能力。天然杀伤T细胞(NKT细胞)是一种特殊的T细胞,它们构成获得性免疫系统和天然免疫系统之间的桥梁。不同于识别MHC上的肽抗原的常规T细胞,NKT细胞识别被一种称为CD1d的分子呈递的糖脂抗原。一旦被活化,这些细胞可以行使与Th和Tc细胞二者相似的功能(即产生细胞因子以及释放溶胞性/杀细胞性分子)。已知它们可识别并消灭肿瘤细胞。 $\gamma\delta$ T细胞(gamma delta T细胞)是T细胞的一个小亚群,它们在其表面上携带TCR。大多数T细胞具有由称为 $\alpha$ 和 $\beta$ TCR链的两条糖蛋白链组成的TCR。然而,在 $\gamma\delta$ T细胞中,TCR由一条 $\gamma$ 链和一条 $\delta$ 链组成。它们仅占总T细胞的5%,但在肠粘膜中最为丰富(并且被称为表皮内淋巴细胞,IEL)。活化 $\gamma\delta$ T细胞的抗原未知;但 $\gamma\delta$ T细胞不受限于MHC,可能识别完整的蛋白,而不是MHC上的肽。

[0410] 在1986年进行的使用淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK)和肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)的获得性免疫治疗试验报道了患者中偶见的肿瘤响应。在同基因干细胞移植后的慢性髓性白血病患者,或者移植后EBV相关淋巴增殖性疾病(PTLD)的患者中,供体淋巴细胞输注显示了更多的成功。在实体瘤中,CTL在高剂量化疗造成的淋巴细胞减少期中治疗恶性黑色素瘤获得了成功。双特异性抗体是通过将两种杂交瘤融合产生具有两种结合位点的杂合免疫球蛋白分子而制作的。该抗体不但将肿瘤扭送给T细胞,还交联T细胞上的CD3并引发活化级联。由此,将基于TCR的细胞毒性重定向到期望的肿瘤靶,而回避MHC限制。通过用抗CD3×

抗TAA (BsAb或BiTE抗体) 武装多克隆活化T细胞 (ATC), 将MoAb (例如hu3F8, 当TAA为GD2时) 的靶向特异性与T细胞的非MHC限制性的穿孔素/颗粒酶介导的细胞毒性结合起来。BsAb或BiTE可以在输注到患者体内之前武装经离体扩增的活化T细胞。这种策略将每种ATC转化成特异性的CTL (Thakur and Lum, 2010, *Curr Opin Mol Ther* 12, 340-349; Grabert et al., 2006, *Clin Cancer Res* 12, 569-576)。

[0411] 肿瘤通过多种机制逃避T细胞: 低表达或不表达MHC (例如在NB中), 干扰T细胞信号传导过程, MHC上肿瘤肽的呈递减少, 缺失共刺激分子, 以及诱导抑制CTL和体液应答的调节性T细胞。由于经BsAb或BiTE武装的ATC所实施的杀伤是非MHC限制性的, 这种策略应该能够克服这些肿瘤逃避机制中的某一些。肿瘤分泌TGF- $\beta$ , 使T细胞免疫应答偏向Th2型, 下调白介素2 (IL-2) 和IFN- $\gamma$  分泌, 同时上调IL-10和IL-6, 这都导致免疫抑制。通过BsAb或BiTE重定向的T细胞可能回避这些调节性细胞因子的负面作用, 因为经武装的ATC是以IL-2非依赖性的方式裂解肿瘤靶物的。用经BsAb或BiTE武装的针对其肿瘤的T细胞治疗后的患者具有增加水平的TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ , 这应可使T细胞偏向Th1应答。此外, 细胞毒性T细胞通过它们的Fas配体 (FasL) 实施杀伤, 所述Fas配体结合肿瘤细胞上的Fas受体 (CD95)。不幸的是, 肿瘤细胞上的FasL也可诱导T细胞凋亡。通过CD3的TCR刺激可以保护CD8+细胞免于CD95介导的自杀。经武装的ATC通过交联TCR与BsAb或BiTE来抵抗CD95诱导的细胞死亡。T细胞的系列杀伤 (即一个T细胞接连杀死多个肿瘤靶物)、在该过程中扩增、以及移动到淋巴和软组织中的能力增加了当NB细胞转移出骨髓空间以形成肿瘤团块时捕捉到它们的机会。近来使用靶向人癌症的BsAb或BiTE的研究已经显示了前景。

[0412] 原来越多的证据, 尤其是来自接受了同基因造血细胞移植的患者的分析的证据, 支持T细胞阻遏或消灭淋巴瘤以及某些形式的白血病的潜力 (O'reilly et al., 2010, *Semin Immunol* 22, 162-172)。然而, 尚无有说服力的证据支持T细胞在控制儿童实体瘤中的作用。这一点与如下的事实一致, 即这些肿瘤中的一些不表达遗传的I类或II类HLA等位基因 (例如神经母细胞瘤) (Raffaghello et al., 2005, *Oncogene* 24, 4634-4644; Wolf1 et al., 2005, *Cancer Immunol Immunother* 54, 400-406), 或仅表达I类等位基因并且表达水平低 (例如横纹肌肉瘤) (Prados et al., 2006, *Neoplasia* 53, 226-231)。此外, 关键的共刺激分子如B7.1和ICAM-1的表达常常低或检测不到。结果, 这些肿瘤引发T细胞应答的能力低下, 且效应物T细胞通过T细胞受体结合由HLA等位基因呈递的肿瘤抗原而接合肿瘤的潜力受到限制。此外, 目前可用的对神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、尤因氏肉瘤和促纤维增生性小圆细胞肿瘤最有效的疗法使用免疫抑制性烷化剂, 尤其是环磷酰胺, 使用的剂量可诱导深度的T细胞减少。双功能抗体允许T细胞的靶向性接合, 并允许通过HLA非限制性CD3介导的活化而非它们的抗原特异性HLA限制性TCR来利用它们的效应物功能。对某些针对CD3以及一种肿瘤抗原 (如CD-19、HER-2NEU、或CEA) 特异性的双功能单克隆抗体的研究已经显示这些抗体的将细胞毒性T细胞联系到表达该另一种被靶向的抗原的肿瘤细胞的能力 (Bargou et al., 2008, *Science* 321, 974-977; Topp et al., 2009, *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 114, 840; Kiewe et al., 2006, *Clin Cancer Res* 12, 3085-3091; Lutterbuese et al., 2009, *J Immunother* 32, 341-352)。一旦两种抗体受体均得到接合, 则引发针对肿瘤细胞的T细胞应答。T细胞应答涉及T细胞受体与肿瘤细胞之间的细胞毒性突触的形成, 以及穿孔素和颗粒酶介导的肿瘤细胞凋亡诱导 (Offner et al., 2006, *Mol Immunol* 43, 763-

771;Brischwein et al.,2006,Mol Immunol43,1129-1143)。CD3的接合也活化T细胞,诱导扩增和可强化抗肿瘤作用的效应物细胞因子的产生(Brischwein et al.,2006,同上;Brischwein et al.,2007,J Immunother30,798-807)。令人注意的是,活化的T细胞上调一种抗凋亡蛋白c-FLIP,该蛋白保护它们免受在T细胞活化过程中产生的TNF和Fas配体的细胞毒作用(Dreier et al.,2002,Int J Cancer100,690-697)。结果,T细胞应答被放大。结果,皮克水平的双功能抗体可在体外(Lutterbuese et al.,2009,同上;Brandl et al.,2007,Cancer Immunol Immunother56,1551-1563)和体内发挥显著的抗肿瘤效果,如临床前动物模型中,尤其是在CD3/CD19双特异性抗体在治疗B细胞淋巴瘤和ALL的初步临床试验结果(Topp et al.,2009,同上;Kiewe et al.,2006,同上)中显示的。已经有假说称所诱导的T细胞应答还可以募集幼稚T细胞并在肿瘤部位刺激肿瘤特异性T细胞的产生(Koehne et al.,2002,Blood99,1730-1740)。除T淋巴细胞之外,双特异性抗体还可以用来重靶定其他效应物细胞。这些效应物细胞包括NK细胞、B-淋巴细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、间充质干细胞、神经干细胞和其他干细胞,到表达GD2的细胞、组织或器官。当所述组织是肿瘤时,可以利用这些效应物细胞来杀死或者沉积(deposit)用于诊断或用于治疗的蛋白质(例如细胞因子、抗体、酶或毒素)、放射性同位素。当所述组织是正常器官时,可以类似地使用所述效应物细胞来投递用于诊断或用于治疗的蛋白质或同位素。

[0413] 双特异性MoAb可以由两个可变域组成,其中一个域具有具有抗3F8可变域,另一个域选自下组:用于重靶定T细胞以实现肿瘤细胞毒性的抗OKT3,或用于多步预靶定的DOTA-金属-C8.2.5,或用于以抗41BB-scFv或CD137作为激动剂的ADCC的克隆35、CD137,用于以41BBL作为激动剂的ADC的41BBL。CH2域中的N297A突变导致无糖基化,结果是没有FcR或C1q结合。(hu3F8-LC)-(huOKT3-scFv)的氨基酸序列,其中huOKT3-scFv被二硫化物稳定化,示于SEQ ID NO:23。(hu3F8-LC)-(C8.2.5-scFv)的氨基酸序列(基于Orcutt et al.,2010,Protein Eng Design and Selection23,221),其中C8.2.5-scFv被二硫化物稳定化,示于SEQ ID NO:24。

[0414] 双特异性抗体(抗GD2和抗DOTA)可以用在多步预靶定中的第一步,然后使用DOTA(金属)-右旋糖酐作为清除剂进行血液清除,第三步导入DOTA(金属)-缀合的治疗剂诸如DOTA(金属)-放射性金属、DOTA(金属)-纳米颗粒、DOTA(金属)-脂质体、DOTA(金属)-药物、

[0415] DOTA(金属)-DNA、DOTA(金属)-RNA、和DOTA(金属)-毒素。由于C8.2.5对每种DOTA-金属复合物(complex)具有不同的亲和力,经预靶定的C8.2.5对清除剂和DOTA-配体的亲和力可以得到精确的控制。

[0416] 3F8、hu3F8及其变体的氨基酸序列可以用来构建嵌合抗原受体(CAR),如先前对其他抗GD2抗体显示的那样(Krause et al.,1998,J Exp Med188,619-626)。重靶定免疫效应物细胞的CAR策略不依赖MHC-肽-TCR相互作用,并容许细胞与许多种细胞表面抗原反应(Davies and Maher,2010,Achivum immunologiae et therapiae experimentalis58,165-178)。有数种方法已经被用于CAR的设计中,它们大多采用呈单链可变片段(scFv)形式的单克隆抗体抗原结合域来进行抗原识别。最先的T细胞活化受体源于使得研究者探明CD3 $\zeta$ 链的作用的研究(Irving and Weiss,1991,Cell64,891-901;Romeo et al.,1992,Cell68,889-897)。在后来的研究中,感兴趣的scFv被融合于CD3 $\zeta$ 链(Eshhar et al.,1993,PNAS USA90,720-724)或Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ 链(Weijtens et al.,1996,J Immunol157,836-843),发

现二者均足以活化T细胞。虽然这制定了CAR构建的蓝图,但共刺激因子的组入是在人们发现第一代CAR仅能诱导不超过2-3次细胞分裂的T细胞扩增,然后很快发生细胞凋亡之后才出现的(Gong et al.,1999,Neoplasia1,123-127)。通过在靶肿瘤细胞上表达CD80,研究者们能够显示表达CAR的细胞可以被重新刺激,导致T细胞数目的进一步增加。最早的在CD3 $\zeta$ 链之外还组入了CD28共刺激分子的CAR与仅表达CD3 $\zeta$ 链者相比显示了巨大的改善(Krause et al.,1998,同上;Haynes et al.,2002,Blood100,3155-3163;Maher et al.,2002,Nature Biotech20,70-75);这包括T细胞数目的绝对增加以及IL-2产生的增加。从那以后,若干其他研究组开始使用其他的共刺激分子,或是单独与CD3 $\zeta$ 组合,或是与CD3 $\zeta$ 及CD28二者组合。这些其他的信号分子包括4-1BB(Wang et al.,2007,Human Gene Ther18,712-725;Brentjens et al.,2007,Clin Cncer Res13,5426-5432;Imai et al.,2004,Leukemia18,676-684;Finney et al.,2004,J Immunol172,104-113),DAP10(Brentjens et al.,2007,同上),OX40(Brentjens et al.,2007,同上;Finney et al.,2004,同上;Wilkie et al.,2008,J Immunol180,4901-4909;Nguyen and Geiger,2003,Gene Therapy10,594-604;Pule et al.,2005,Mol Ther12,933-941)和ICOS(Finney et al.,2004,同上),并且已经应用于T细胞以及NK细胞的背景(Daldrup-Link et al.,2005,Eropean radiology15,4-13;Imai and Campana,2004,J Biol Reg Homeostatic Ag18,62-71;Roberts et al.,1998,J Immunol1375-384;Kruschinski et al.,2008,PNAS USA105,17481-17486;Pegram et al.,2008,J Immunol181,3449-3455)。虽然第一代CAR是迄今为止仅有的得到临床测试者,但体外和体内比较均已显示第二代和第三代CAR具有明显的优势(Haynes et al.,2002,同上;Brentjens et al.,2007,同上;Teng et al.,2004,Human Gene Ther15,699-708;Haynes et al.,2002,J Immunol169,5780-5786;Kowolik et al.,2006,Cancer Res66,10995-11004;Loskog et al.,2006,Leukemia20,1819-1928;Moeller et al.,2004,Cancer Gene Therapy11,371-379;Vera et al.,2006,Blood108,3890-3897)。

[0417] 目前,大多数研究者使用总(bulk)人外周血T细胞,但其他人近来开始使用EBV-特异性T细胞(Rossig et al.,2002,Blood99,2009-2016),淋巴样祖细胞(Zakrzewski et al.,2006,Nature Med12,1039-1047;Zakrzewski et al.,2008,Nature Biotech26,453-461),以及未分级的骨髓细胞(Papapetrou et al.,2009,J clin Invest119,157-168;Wang et al.,1998,Nature Med4,168-172)。具有溶胞性的,容易培养的杀伤性白血病细胞系(Killer leukemia cell lines)(例如NK92,NK92MI,KHYG-1)也可为临床前和临床测试提供持续的CAR表达性效应物细胞的供应源。NK92MI是一种衍生自何杰金氏淋巴瘤的,并经人IL-2cDNA转导的人NK细胞系;先前的研究已经显示其在小鼠模型中的强细胞毒能力(Tam et al.,1999,J Hematol8,281-290;Korbelik and Sun,2001,Inter J Cancer93,269-274)。此外,NK92细胞也已用于临床环境,并且经过若干在肾细胞癌和黑素瘤患者中进行的I期研究后证明是安全的(Arai et al.,2008,Cytotherapy10,625-632)。由于这些细胞易于体外维持且倍增时间相对较短,对于各种测试多种靶定途径的细胞毒测定法而言它们是理想的效应物。使用原初的IL-2依赖性NK92细胞系进行的实验在小鼠和人中显示了最小的毒性,但IL-2转导的NK92MI细胞可能具有更大的致白血病潜力。研究者中尝试在使用NK92细胞的SCID小鼠中避免白血病产生的一种方法是在接种前使用3000cGy照射效应物。在I期

临床试验中,这足以防止NK92MI细胞在免疫受损的患者体内不受控地增殖。一种替代的安全机制涉及自杀基因的使用。一个常见的例子是使用疱疹病毒胸苷激酶基因,该基因是这样工作的:通过施用阿昔洛韦或更昔洛韦,该基因杀死表达该基因的细胞(Helene et al., 1997, J Immunol 150:79-5082)。

[0001]

## 序列表

SEQ ID NO:1

嵌合 3F8 重链的氨基酸序列

嵌合重链 -gamma1:

QVQLKESGPGLVAPSSQSL SITCTVSGFSVT NYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNSAFMSRLSIS  
 KDNSKSQVFLKMNSLQIDDTAMYYCAS RGGHYGYALDYWGQGTSVTVSSASTRGPSVFPLAPSSKSTSGG  
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN  
 TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY  
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQ  
 QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:2

嵌合轻链 -kappa:

SIVMTQTPKFLVLSAGDBVTITCKASQSVSN DVTWYQQKAGQSPKLLIYSASNRYSGVPDRFTGSGYGTA  
 FTFTISTVQAEDLAVYFC QODYSSFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE  
 AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
 C

SEQ ID NO:3

IgG4 亚类的嵌合 3F8 重链的氨基酸序列, CDR 区加有下划线

嵌合重链 -gamma4

QVQLKESGPGLVAPSSQSL SITCTVSGFSVT NYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNSAFMSRLSIS  
 KDNSKSQVFLKMNSLQIDDTAMYYCAS RGGHYGYALDYWGQGTSVTVSSASTRGPSVFPLAPCSRSTSES  
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVNHNKPSN  
 TKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFPLYSRITVDKSRWQEGN  
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

[0002]

SEQ ID NO:4

人源化 3F8 重链 1 的氨基酸序列, CDR 区加有下划线

huH1-gamma1 (更像人的):

qvqlvesgpgvvqpgrslriscavsgfsvtnyqvhwvrqppgkglewlgviwaggitnynsafmsrltis  
 kdnskntvylqmnsiraedtamyycasrgghygyaldywgggtlvtvssastkgpsvfplapsskatsgg  
 taalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslasvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsn  
 tkvdkrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy  
 vdgvvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhgdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv  
 ytlppsrdeitknqvsiltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflyskltvdksrwg  
 qgnvfscsvmhhealhhhtqkalslspg

SEQ ID NO:5

人源化 3F8 轻链 1 的氨基酸序列, CDR 区加有下划线

huL1-gamma1 (更像人的):

eivmtgtpatlsvsagervtitchkasqsvsndvtwyqqkpgqaprrliysasnrysgvparfsgsgygte  
 ftftissvqsedfavyfcggdyssfggggtkleikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypr  
 akvqkwkdnlqsgnsqesavteqdsksdstyslsatltlskadyekhkvyacevthqgllaspvtskfsarge  
 c

SEQ ID NO:6

人源化 3F8 重链 2 的氨基酸序列, CDR 区加有下划线

huH2 - gamma1:

qvqlkesgpgvvqpqgslsiscavsgfsvtNYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNsafmsrltis  
 kdnskstvyllkmnsiqaedtamyycasRGGHYGYALDYWGgggtlvtvssastkgpsvfplapsskatsgg  
 taalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslasvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsn  
 tkvdkrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy  
 vdgvvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhgdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqv  
 ytlppsrdeitknqvsiltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflyskltvdksrwg  
 qgnvfscsvmhhealhhhtqkalslspg

[0003]

SEQ ID NO:7

人源化 3F8 轻链 2 的氨基酸序列, CDR 区加有下划线

huL2 - kappa:

sivmtgtptkltlsvsagervtitcKASQSVSNDVTwyqqkpgqspkiliySASNRYSgvvpdrfsgsgygtatfttissvgaedfavyfcQODYSSFGQGTKEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcollnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

SEQ ID NO:8

IgG4 亚类的人源化 3F8 重链的氨基酸序列, CDR 区加有下划线

huH1 - gamma4

qvqlvesgpgvvqpgrslriscavsgfsvtnyqvhwvrqppgkglewlgviwaggitnynsafmsrltis  
kdnsentvylqmnsdraedtamyycasrgghyqvaldywqggtltvtvssASTKGPSVFPLAPCSRSTSES  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGKTKTYTCNVDHKPSN  
TKVDKRVESESKYGPFCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG  
VEVHNATKPREEQFNSTYRVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL  
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN  
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

SEQ ID NO:9

hu3F8-H3L3 的序列, 其中稳定性增强的突变加有下划线

huH3-gamma1:

QVQLVESGPGLVQPGRSLRLTCAVSGFSVTNYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGITNYNsafmsrltis  
KDENSENTVYLOMNSLRAEDTAVYYCASRGCHYGALDYWGQGTLTVTVSSastkqpsvfplapaskstsgg  
taalgcclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvtpvssslgtqtyicnvnhkpsn  
tkvdkrvepkscdkthtccppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwy  
vdgvevhnatkpreeqnystyrsvsltlvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakgqprepqv  
ytlppsrdeitknqvsitclvkgyfypsdiavewesngqpennyktpvpvldsdgsfflyskltvdkarwq  
qgnvfscsvmhealhnhytqkslsislpgk

[0004]

SEQ ID NO:10

huL3-kappa

SIVMTQTPAFLLVLSAGERVTITCRASQSVSNDVTWYQOKAQAPRLLIYSASNRYTGIPARFSGSGYGTE  
 FTFTISSVQSEDFAVYFCQQDYSSFGGKLEIKrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypr  
 akvqkwkdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlskadyekhkvyacevthqglsapvtksfng  
 c

Hu3F8-H1L1-IgG1

轻链 -SEQ ID NO: 11

Atgggctgggtcctgcacatcctgttctggtggccaccgccaccggcgagatcgtgatgaccagaccc  
 ccgccaccctgtcctgtcgcgcggcgagcgggtgaccatcaactgcaaggcctcccagtcctgttccaa  
 cgacgtgacctgggtaccagcagaagcccgccaggcccccccggtgctgatctactccgcctccaacgg  
 tactccggcggtgcgcgcgcgggttctccggctccgggtacggcaccgagttcacctcaccatctcctccg  
 tgcagtcggaggacttcgcgcgtgtacttctgcgcagcaggactactcctccttcggccagggcaccaagct  
 ggagatcaagcggaccgtggccgccccctcctgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtc  
 ggcaccgcctcctgtggtgtgcctgctgaacaacttctaccccccggaggccaaaggtgcagtggaaggtg  
 acaacgccttgacgtccggcaactcccaggagtcctgtgaccgagcaggactccaaggactccacctactc  
 cctgtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaggtgacc  
 caccagggcctgtcctcccccggtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgctag

重链 -SEQ ID NO: 12

atgggctgggtcctgcacatcctgttctggtggccaccgccaccggccaggtgcagctgggtggagtcog  
 gccccggcggtggtgcagcccgccgggtcctcctgggatctcctgcgcctgtcgcggcttctcctgtgacaa  
 ctacggcggtgactgggtgcggcagcccccgccaaagggcctggagtggtggcggtgatctgggcgggc  
 ggcacacccaactacaactccgccttcatgtcccggtgaccatctccaaggacaactccaagaacaccg  
 tgtacctgcagatgaactccctgcgggcccaggacaccgccatgtactactgcgcctcccgggggcgcca  
 ctacggctacgcctggactactggggccagggcaccctgggtgaccgtgtcctccgcctccaccaagggc  
 ccacgtgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggggcacagcggccctgggctgcctgg  
 tcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccttgaccagcggcggtgcacac  
 ctcccgggcggtcctacagtcctcaggactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagc  
 ttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttg  
 agcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggacccgtc  
 agtcttctcttcccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtg  
 gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcata  
 atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct  
 gcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatc  
 gagaaaaccatctccaaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggt  
 atgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcagacatgcoggt  
 ggagtgaggaggaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggc  
 tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgct  
 ccgtgatgcagaggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

[0005]

hu3F8-HIL1-IgG4

轻链 -SEQ ID NO: 13

atgggctgggtcctgcacatcctgttctcgtgggccaccgccaccggcgagatcgtgatgaccagaccc  
ccgccaccctgtccgtgtccgccggcgagcggggtgaccatcacctgcaaggcctcccagtcctgttcaa  
cgacgtgacctgggtaccagcagaagcccgccaggcccccccggtgctgatctactccgcctccaaccgg  
tactccggcgtgcccgcgccgggttctccggctccggctaaggcaccgagttcaccttcacratctcctccg  
tgcagtcggaggacttcggcgtgtacttctgcccaggaggactactcctccttcggccagggcaccaagct  
ggagatcaagcggaccgtggccgcgccctccgtgttcatcttccccccctccgacgagcagctgaagtc  
ggcaccgcctccgtgggtgtgctgtgaacaacttctacccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtgg  
acaacgccttgcagtcggcgaactcccaggagtcctgtgacggagcaggactccaaggactccacctactc  
cctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctggcaggtgacc  
caccaggccctgtcctcccccgtagccaagtccttcaaccggggcgagtgctag

重链 -SEQ ID NO: 14

atgggctgggtcctgcacatcctgttctcgtgggccaccgccaccggcgaggtgcagctgggtggagtcgg  
gccccggcgtgggtgcagcccgccgggtcctcgtggatctcctgcgcctgtccggcttctccgtgaccaa  
ctacggcgtgcaactgggtgcggcagccccccggcgaaggccctggagtggtggcgtgatctgggcggc  
ggcatcaccaactacaactccgccttcatgtcccggtgacatctccaaggacaactccaagaacaccg  
tgtacctgcagatgaactccctgcgggcccaggacaccgccatgtactactgcgcctcccgggggcgcca  
ctacggctacgcctggactactggggccagggcaccctggtgaccgtgtcctccgcctccaccaagggc  
ccctccgtgttccccctggccccctgtcccggtccacctccgagtcaccgcgcctgggctgcctgg  
tgaaggactacttccccgagcccgtagccgtgtcctggaaactccggcgccctgacctccggcgtgcacac  
cttccccgcctgtgtgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtggtgacctgcctcctcctcc  
ctgggcaccaagacctacacctgcaacgtggaccacaagccctccaacaccaagggtggacaagcggtgg  
agtccaagtacggccccccctgccccctcctgccccgcccccgagttcctgggcggccccctccgtgttct  
gttcccccccaaggcccaaggacaccctgatgatctcccggaacccccgaggtgacctgcgtgggtggac  
gtgtcccaggaggacccccgaggtgcagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcacaacgccaaaga  
ccaagccccgggaggagcagttcaactccacctaccgggtgggtgtccgtgtgacctgctgcaccagga  
ctgggtgaacggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggccctgcctcctccatcgagaagacc  
atctccaaggccaaggggccagccccgggagccccaggtgtacacctgccccctccaggaggagatga  
ccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtgaagggttctacccctccgacatcgccgtggagtgga  
gtccaacggccagccccgagaacaactacaagaccaccccccggtgctggactccgacggctccttcttc  
ctgtactcccggtgacctggacaagtcccggtggcaggagggaacgtgttctcctgtccgtgatgc  
acgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgtccctgggcaagtga

[0006]

**hu3F8-H2L2-IgG1**

轻链 -SEQ ID NO: 15

atgggctgggtcctgcacatcctgttccctgggtggccacccgccacccggctccatcgtgatgacccagaccc  
ccaagaccctgtccgtgtccgccggcgagcgggtgaccatcacctgcaaggcctcccagtcctgttccaa  
cgacgtgacctgggtaccagcagaagcccgccagtcaccccaagctgctgatctactccgctccaacccg  
tactccggcgtgcccgaaccggttctccggctccggctaaggcaccgccttcaccttcaccatctctccg  
tgcaggccgaggacttccgctgtacttctgccagcaggactactcctccttcggccagggcaccaagct  
ggagatcaagcggaccgtggccgccccctccgtgttccatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcc  
ggcaccgcctccgtggtgtgctgctgaacaacttctacccccgggaggccaaggtgcagtggaaggtgg  
acaagccctgcagtcgggaactcccaggagtcctggaacgagcaggactccaaggactccacctactc  
cctgtcctccacccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcaccaaggtgtacgcctgcgaggtgacc  
caccaggccctgtcctcccccggtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgctag

重链 -SEQ ID NO: 16

atgggctgggtcctgcacatcctgttccctgggtggccacccgccacccggccaggtgcagctgaaggagtcgg  
gccccggcgtgggtgcagcccgccagtcctgtccatctcctgcgcctgtccggcttctccgtgaccaa  
ctacggcgtgcaactgggtgcggcagcccccggaaggccctggagtggtggcgctgatctgggcccggc  
ggcatcaccaactacaactccgccttcatgtcccggtgacctctccaaggacaactccaagtccacccg  
tgtacctgaagatgaactccctgcaggccgaggacaccgccatgtactactgcgcctccggggggggcca  
ctacggctacgccttggaactactggggccaggccaccctggtgaccgtgtcctccgctccaccaaggcc  
ccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctgg  
tcaaggactacttcccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaaactcaggccgctgaccagcggcgtgcacac  
cttccccggcgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagc  
ttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaccaagccagcaacaccaaggtggacaagagagttg  
agcccaaattcttgtgacaaaaactcacacatgccacccgtgccacagcacctgaactcctgggggggaccgtc  
agtcttctcttcccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtg  
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata  
atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct  
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagcccccatc  
gagaaaaacatctccaaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggg  
atgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatgcctg  
ggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcagacggc  
tcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtcttctcatgct  
ccgtgatgcagaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0007]

**ch3F8-IgG1**

轻链 -SEQ ID NO: 17

atgggctgggtcctgcacatcctgttcctgggtggccaccgccaccggcagttattgtgatgaccagactc  
ccaaattcctgcttggatcagcaggagacagggttaccataacctgcaaggccagtcagagtgtagtaa  
tgatgtaacttgggtaccaacagaaggcaggggcagttctcctaaactgctgatatactctgcacccaatcgc  
tattctggagtcctgaccgcttcactggcagtggtatgggaacggctttcactttcaccatcagcactg  
tgcaggctgaagacctggcagtttatttctgtcagcaggattatagttcgttcggaggggggaccaagct  
ggaaataaagcgggaccgtggcggcccccctcctgtgttcatttccccccctccgacgagcagctgaagtcc  
ggcaccgcctcctgggtgtgctgctgaacaaacttctacccccgggaggccaagggtgcagtggaagggtgg  
acaacgcctgcagtcgggcaactccaggagtcctgtgacggagcaggactccaaggactccacctactc  
cctgtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggtgtacgcctgcgaggtgacc  
caccagggcctgtcctccccctgaccaagtccttcaaccggggcgagtgctag

重链 -SEQ ID NO: 18

atgggctgggtcctgcacatcctgttcctgggtggccaccgccaccggcaggtgcagctgaaggagtcag  
ggcctggcctgggtggcgcctcagagagcctgtccatcacttgcactgtctctgggttttcagtaaccac  
ttatgggtgtacactgggttcggcagcctccaggaaagggtctggagtggtgggagtaatatgggtgggt  
ggaattacaaattataattcggctttcatgtccagactgagcatcagcaaaagacaactccaagagtcag  
ttttcttaaaaatgaacagtcctgcaaatgatgacacagccatgtactactgtgccagtcgggggggtca  
ctacggctatgctttggactactgggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctcagcctccaccaagggc  
ccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggcacagcggccctgggtgctgg  
tcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaaactcaggcggcctgaccagcggcgtgcacac  
cttccggcggctcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagc  
ttgggcaccacagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttg  
agcccaaattcttggtagaaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccctgaactcctgggggggaccgtc  
agtcttctcttcccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtg  
gtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcata  
atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtagaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
gcaccaggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctccagcccccac  
gagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggg  
atgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatgcctg  
ggagtgaggagcaatgggcagccgggagaactacaagaccagcctccgtgctggactccgacggc  
tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgct  
ccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaa

[0008]

**ch3F8-IgG4**

轻链 -SEQ ID NO: 19

atgggctggctcctgcatcatcctgttcctgggtggccaccgccaccggcagttattgtgatgaccagactc  
ccaaattcctgcttgatcagcaggagacagggttaccataacctgcaaggccagtcagagtgtgagtaa  
tgatgtaacttggtaccaacagaaggcaggggcagtcctcctaaactgctgatatactctgcatccaatcgc  
tattctggagtccttgaccgcttcactggcagtggtatattgggacggctttcactttcaccatcagcactg  
tgcaggctgaagacctggcagtttatttctgtcagcaggattatagttcgttcggaggggggaccaagct  
ggaaataaagcggaccgtggccgccccctcctgtgttcattctccccccctccgacgagcagctgaagtc  
ggcaccgcctcctggtgtgctgctgaacaacttctacccccgggaggccaaaggtgcagtggaaggtgg  
acaacgcctgcagtcggcaactcccaggagtcctgtgaccgagcaggactccaaggactccacctactc  
cctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgogaggtgacc  
caccagggcctgtcctccccctgaccgaagtccttcaaccggggcgagtgctag

重链 -SEQ ID NO: 20

atgggctggctcctgcatcatcctgttcctgggtggccaccgccaccggcaggtgcagctgaaggagtcag  
ggcctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcacttgcaactgtctctgggttttcagtaaccaa  
ttatgggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtctggagtggtgggagtaatatgggctgg  
ggaattacaaattataattcggctttcatgtccagactgagcatcagcaagacaactccaagagtcgaag  
ttttcttaaaaaatgaacagtcctgcaattgatgacacagccatgtactactgtgccagtcgggggggtca  
ctacggctatgctttggactactgggggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctcagcctccaccaaggcc  
cctcctgtgttccccctggccccctgtcccggtccacctccgagtcaccggccgctgggctgcttgg  
tgaaggactacttccccgagccctgaccgtgtcctggaactccggcgccctgacctccggcgtgcacac  
cttccccgcctgctgcagtcctccggcctgtactcctgtcctccgtgggtgacctgccccctcctcctcc  
ctgggcaccaagacctacacctgcaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtgg  
agtcacaagtacggccccccctgccccctcctgccccgcccccgagttcctggggcgccctcctcctgttcct  
gttcccccccaaggcccaaggacacctgatgatctcccggaaccccgaggtgacctgcgtgggtgggac  
gtgtcccaggaggaccccgagggtgcagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgcccaaga  
ccaagccccgggaggagcagttcaactccacctaccgggtgggtgtccgtgctgacctgctgcaccagga  
ctggctgaacggcaaggagtagaagtgaagggtgtccaacaaggccctgccccctcctccatcgagaagacc  
atctccaaggcccaagggccagccccgggagccccaggtgtacacctgccccctccaggaggagatga  
ccaagaaccaggtgtccctgacctgctgggtgaagggttctaccctccgacatcgccgtggagtgaggga  
gtccaacggccagccccgagaacaactacaagaccacccccccctgtgctggactccgacggctccttcttc  
ctgtactccccgtgacctggacaagtcccggtggcaggagggcaacgtgttctcctgtcctcgtgatgc  
acgaggccctgcacaaccactacaccagaagtcctgtcctgtcctgggcaag

[0009]

hu3F8~H3L3

轻链 -SEQ ID NO: 21

atgggctgggtcctgcacatcctgttccctgggtggccaccgccaccggctctatcgtcatgactcagaccc  
ctgccttccctgctgggtgtccgctggagagcgtgtcactatcacttgtcgtgectcacagagcgtgtctaa  
cgacgtgacatgggtaccagcagagggccgggtcaggctccagactgctgatctactctgcaagtaatagg  
tatactggcattcctgcccggttctcaggctccggatattgggaccgagttcacctttacaatctccagcg  
tgacagagcgaagattttgctgtctatttttgccagcaggattattcatcattcggcggcggtactaaact  
ggaaattaaagcgcaccgtggccgccccctccgtgttccatcttccccccctccgacgagcagctgaagtcc  
ggcaccgcctccgtgggtgtgctgctgaacaacttctacccccgggaggccaagggtgcagtggaaaggtgg  
acaacgccttgcagtcgggaactccagggagtcggtgaccgagcaggactccaaggactccacctactc  
cctgtcctccacctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggtgtacgcctgcgaggtgacc  
caccagggcctgtcctcccccggtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgctag

重链 -SEQ ID NO: 22

atgggctgggtcctgcacatcctgttccctgggtggccaccgccaccggccagggtgcagctgggtcgaaagcg  
ggcctgggtctgggtccagcctgggtcgttctctggtctgacttgtgccgtgtccgggttctccgtcactaa  
ctacggagtgcactgggtcagacagccacctgggaagggctcggagtggtggagtgatctgggcaggc  
ggaattaccaactacaattccgccttcatgagcagggtgacctctctaaggacaacagtaaaaaatacag  
tgtatctgcagatgaattccctgaggggcgaagatacagctgtctactattgcgcttctcggggcggtca  
ctacggttacgctctggactactgggggtcaggggactctggtoactgtcagcagcgcctccaccaagggc  
ccatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccctctgggggacagcggccctgggctgctgg  
tcaaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaaactcaggcggccctgaccagcggcgtgcacac  
cttccccggcgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagc  
ttgggcaccacagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttg  
agcccaaattcttgtgacaaaaactcacacatgccaccgtgcccagcaccctgaactcctgggggggaccgtc  
agtcttctcttcccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgagggtcacatgcgtg  
gtgggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggagcggcgtggaggtgcata  
atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct  
gcaccaggaactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagccccatc  
gagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatccggg  
atgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgt  
ggagtgaggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc  
tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcagggaacgtcttctcatgct  
ccgtgatgcagaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

[0010]

**SEQ ID NO:23**

(hu3F8-LC)-(huOKT3-scFv)-接头序列的氨基酸序列以粗体显示

EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNDVTWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYSGVPARFSG  
 SGYGTEFTFTISSVQSEDFAVYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
 VVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC**CGGGSGGGGS**QVQLVQSGGGLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
 PVTKSFNRGEC**CGGGSGGGGS**QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGK  
 CLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDN SKNTAFLQMDSLRPEDTGVIYFCARYYDDHYCLD  
 YWQGGTPVTVSS**CGGGSGGGSGGGGS**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQ  
 TPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISSLOPEDIAITYCQQWSSNPFTFGCGT  
 KLQITR

**SEQ ID NO:24**

(hu3F8-LC)-(C8.2.5-scFv) 接头序列的氨基酸序列以粗体显示

EIVMTQTPATLSVSAGERVTITCKASQSVSNDVTWYQQKPGQAPRLLIYSASNRYSGVPARFSG  
 SGYGTEFTFTISSVQSEDFAVYFCQQDYSSFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS  
 VVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE  
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC**CGGGSGGGGS**ASHVKLQESGPLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
 SPVTKSFNRGEC**CGGGSGGGGS**ASHVKLQESGPGVLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQS  
 PGKGLEWLGVIWSSGGGTAYNTALISRLNIYRDN SKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYN  
 YFDAWCGGTTVTVSS**CGGGSGGGSGGGGS**QAVVIQESALTTPPGETVTLTCSSTGAVTASNY  
 ANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHW  
 VIGGGTRLTVLG