



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105535967 B

(45) 授权公告日 2022.05.03

(21) 申请号 201610091069.9

(72) 发明人 T.F.特德 Y.哈马吉基 H.格伦

(22) 申请日 2006.02.15

N.雅扎瓦

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

申请公布号 CN 105535967 A

代理人 李波 石克虎

(43) 申请公布日 2016.05.04

(51) Int.CI.

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

60/653587 2005.02.15 US

A61P 35/02 (2006.01)

60/702063 2005.07.22 US

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

200680012552.8 2006.02.15

WO 2005000901 A2, 2005.01.06

(83) 生物保藏信息

WO 2005012493 A2, 2005.02.10

PTA-6580 2005.02.11

US 5530101 A, 1996.06.25

PTA-6581 2005.02.11

审查员 毛颖

(73) 专利权人 杜克大学

权利要求书3页 说明书92页

地址 美国北卡罗来纳州

序列表(电子公布) 附图28页

(54) 发明名称

抗CD19抗体及其在肿瘤学中的应用

(57) 摘要

本发明涉及抗CD19抗体及其在肿瘤学中的应用。具体地，本发明涉及在受试者中使用与人CD19抗原结合的治疗性抗体，优选介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)进行B细胞疾病和紊乱的治疗的组合物和方法，所述的疾病+例如，但不限于B细胞肿瘤。本发明涉及包含人或人源化的IgG1和/或IgG3人同种型的抗CD19抗体的药物组合物。本发明涉及包含人的、人源化的或嵌合的IgG2和/或IgG4人同种型，优选的介导人的ADCC的抗CD19抗体的药物组合物。本发明还涉及包含介导人的ADCC的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的嵌合抗CD19抗体。在优选实施方式中，本发明涉及包括单克隆的人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体的药物组合物。

1. 一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体中的单克隆嵌合人或人源化抗CD19抗体,所述抗体包含:SEQ ID N0:2所示的重链可变区和SEQ ID N0:16所示的轻链可变区,其中所述抗体(a)是IgG1或IgG3人同种型的,或(b)介导人抗体依赖性细胞毒作用(ADCC);并且,其中所述氨基酸是根据Kabat编号系统确定的。
2. 权利要求1的药物组合物,其中IgG1或IgG3人同种型的单克隆嵌合抗CD19抗体的治疗有效量为小于每千克患者体重1mg。
3. 权利要求1的药物组合物,其中IgG1或IgG3人同种型的单克隆嵌合抗CD19抗体的治疗有效量为大于每千克患者体重2mg。
4. 权利要求1的组合物,其中介导ADCC的抗CD19抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4人同种型的。
5. 权利要求1-4中任一项的药物组合物,其中抗CD19抗体具有4到7天的半寿期。
6. 权利要求1-4中任一项的药物组合物,其中组合物包含剂量为 $1500\text{mg}/\text{m}^2$ - $0.0005\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗CD19抗体。
7. 权利要求6的药物组合物,其中组合物包含剂量为 $375\text{mg}/\text{m}^2$ - $0.0005\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗CD19抗体。
8. 权利要求7的药物组合物,其中组合物包含剂量为 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ - $0.0005\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗CD19抗体。
9. 权利要求8的药物组合物,其中组合物包含剂量 $0.5\text{mg}/\text{m}^2$ - $0.0005\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗CD19抗体。
10. 权利要求1-4中任一项的药物组合物,其中抗CD19抗体是以可检测的方式标记的、是裸抗体、与治疗性化合物相缀合或与诊断试剂相缀合。
11. 权利要求1-4中任一项的药物组合物,其中抗CD19抗体是双特异性的。
12. 权利要求11的药物组合物,其中双特异性的抗CD19抗体具有对于结合效应细胞的特异性。
13. 权利要求1-4中任一项的药物组合物,其中抗CD19抗体的ADCC功能是在体外通过测定抗CD19抗体通过效应细胞介导靶细胞裂解的能力来确定的。
14. 一种单克隆人或人源化抗CD19抗体在制备用于治疗人类患者中B细胞恶性肿瘤的药物中的用途,所述抗体包含:SEQ ID N0:2所示的重链可变区和SEQ ID N0:16所示的轻链可变区;其中所述抗体(a)是IgG1人同种型的,或(b)介导人抗体依赖性细胞毒作用(ADCC);并且,其中所述氨基酸是根据Kabat编号系统确定的。
15. 权利要求14的用途,其中所述抗体能够消耗循环B细胞。
16. 权利要求14的用途,其中所述抗体能够消耗骨髓B细胞。
17. 权利要求14的用途,其中所述B细胞恶性肿瘤是急性淋巴母细胞性白血病、套细胞淋巴瘤、前B细胞急性淋巴母细胞性白血病或前体B细胞成淋巴细胞性淋巴瘤。
18. 权利要求14的用途,其中介导ADCC的抗CD19抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4人同种型的。
19. 权利要求14的用途,其中在抗CD19抗体给药之前治疗B细胞恶性肿瘤。
20. 权利要求14的用途,其中在抗CD19抗体给药之后用除了抗CD19抗体疗法以外的疗法治疗B细胞恶性肿瘤。

21. 权利要求20的用途,其中恶性肿瘤的治疗是化疗、放射免疫疗法、毒素疗法、前体药物活化酶疗法、抗体疗法、单核细胞或巨噬细胞强化疗法、免疫调节疗法、肿瘤新脉管系统疗法、刺孢霉素疗法、外科手术疗法或其任意组合。

22. 介导人抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)的单克隆抗CD19抗体在制备用于(a)治疗人类患者中B细胞恶性肿瘤的早期疾病或(b)治疗人类受试者中B细胞恶性肿瘤的药物中的用途,其中所述人类受试者以前没有接受恶性肿瘤的治疗,所述B细胞恶性肿瘤是CD19阳性的或所述人类具有至少每d1一个的单核细胞计数,其中所施用的方案消耗循环B细胞,其中,所述抗体包含:SEQ ID NO:2所示的重链可变区和SEQ ID NO:16所示的轻链可变区;

其中所述抗CD19抗体是人IgG1同种型抗体;并且

其中所述抗CD19抗体包含Fc区。

23. 权利要求22的用途,其中随后给予所述人类除了抗CD19抗体疗法以外的疗法。

24. 权利要求22的用途,其中疗法是化疗、放疗、基于毒素的疗法、基于放射化学的疗法或外科手术疗法。

25. 权利要求22的用途,其中方案包括将抗体作为单一治疗剂的施用、与另一种治疗剂联合施用或与减少毒性副作用的试剂联合施用。

26. 权利要求22的用途,其中方案包括反复施用抗体。

27. 权利要求22的用途,其中抗CD19抗体具有4到7天的半寿期。

28. 权利要求22的用途,其中抗CD19抗体是人或人源化的抗体。

29. 权利要求22的用途,其中B细胞恶性肿瘤是B细胞亚型非霍奇金氏淋巴瘤;伯基特氏淋巴瘤;多发性骨髓瘤;前B急性淋巴母细胞性白血病及其他来源于早期B细胞前体的恶性肿瘤;普通急性淋巴细胞性白血病;慢性淋巴细胞性白血病;毛细胞白血病;非急性淋巴母细胞性白血病;华氏巨球蛋白血症;以及前淋巴细胞性白血病;轻链病;浆细胞瘤;骨硬化骨髓瘤;浆细胞性白血病;特征不明的单克隆丙种球蛋白病;郁积性多发性骨髓瘤;缓慢性多发性骨髓瘤或霍奇金氏淋巴瘤。

30. 权利要求29的用途,其中B细胞恶性肿瘤是低等/滤泡非霍奇金氏淋巴瘤、小淋巴细胞性霍奇金氏淋巴瘤、中等/滤泡非霍奇金氏淋巴瘤、中等弥漫性非霍奇金氏淋巴瘤、高等免疫母细胞非霍奇金氏淋巴瘤、高等成淋巴细胞非霍奇金氏淋巴瘤、高等小非核裂细胞非霍奇金氏淋巴瘤或庞大症非霍奇金氏淋巴瘤。

31. 权利要求22的用途,其中方案进一步包括施用增强单核细胞或巨噬细胞功能的化合物。

32. 权利要求23的用途,其中人是免疫应答削弱的。

33. 权利要求22的用途,其中通过非肠道的、腹膜内的或肌肉内的途径施用抗CD19抗体。

34. 权利要求22的用途,其中通过静脉内或皮下的途径施用抗CD19抗体。

35. 权利要求34的用途,其中通过皮下的途径以 $37.5\text{mg}/\text{m}^2$ 或更少的剂量施用抗CD19抗体。

36. 权利要求35的用途,其中以 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 或更少的剂量施用抗CD19抗体。

37. 权利要求22的用途,其中方案包括对人类施用一次以上的抗CD19抗体。

38. 权利要求22的用途,其中方案进一步包括施用抗CD20抗体、抗CD22抗体、抗CD52抗

体或其任意组合。

39. 权利要求10的药物组合物,其中治疗性化合物是细胞毒素试剂。

40. 权利要求21的用途,其中肿瘤新脉管系统疗法是血管抑素或内皮抑素疗法。

## 抗CD19抗体及其在肿瘤学中的应用

[0001] 本申请是申请日为2006年2月15日的中国专利申请 200680012552.8“抗CD19抗体及其在肿瘤学中的应用”的分案申请。

[0002] 本发明部分地是在美国国立健康研究院 (National Institutes of Health) 的国立癌症研究所 (National Cancer Institute) 的基金号为 CA81776、CA105001 和 CA96547 的联邦政府基金资助下, 和美国国立健康研究院 (National Institutes of Health) 的国立过敏和传染性疾病研究所 (National Institute of Allergy and Infectious Disease) 的基金号为 AI56363 的联邦政府基金资助下完成的。美国政府享有本发明的一定权利。

[0003] 本申请根据美国法典第35卷第119条(e)款 (35U.S.C. §119 (e)) 要求2005年2月15日申请的美国临时专利申请60/653,587 和2005年7月22日申请的美国临时专利申请60/702,063的优先权, 并将其以其整体并入 作为参考。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及在受试者中使用与人CD19抗原结合的治疗性抗体进行 B细胞紊乱或疾病治疗的方法, 包括B细胞肿瘤。在优选的实施方案中, 本发明的组合物和方法的治疗性抗CD19抗体优选介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。本发明进一步涉及包含人的、人源化的或嵌合的 IgG1 和/或 IgG3 人同种型的抗CD19抗体的组合物。本发明进一步涉及包含人的、人源化的或嵌合的 IgG2 和/或 IgG4 人同种型, 优选介导人的 ADCC 的抗 CD19 抗体的组合物。本发明还包括单克隆的人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体。

### 背景技术

[0005] B细胞表面标记已被普遍地认为是B细胞紊乱或疾病、自体免疫性疾病和移植排异的靶标。B细胞表面标记的例子包括CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD53、CD72、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85 和 CD86 白细胞表面标记。已经开发了与这些标记特定结合的抗体, 并且一些抗体已经被试验用于疾病和紊乱的治疗。

[0006] 例如, 已经证实, 针对特异于成熟B细胞和它们的恶性对等物的 CD20 细胞表面分子的基于嵌合的或放射性同位素标记的单克隆抗体 (mAb) 的疗法是非霍奇金氏淋巴瘤的有效体内疗法 (Tedder 等人, *Immunol. Today* 15:450-454 (1994); Press 等人, *Hematology*, 221-240 (2001); Kaminski 等人, *N. Engl. J. Med.*, 329:459-465 (1993); Weiner, *Semin. Oncol.*, 26:43-51 (1999); Onrust 等人, *Drugs*, 58: 79-88 (1999); McLaughlin 等人, *Oncology*, 12:1763-1769 (1998); Reff 等人, *Blood*, 83:435-445 (1994); Maloney 等人, *Blood*, 90: 2188-2195 (1997); Maloney 等人, *J. Clin. Oncol.*, 15:3266-3274 (1997); Anderson 等人, *Biochem. Soc. Transac.*, 25:705-708 (1997))。还发现抗CD20单克隆抗体疗法可以改善变形性关节炎、全身性红斑狼疮、特发性血小板减少性紫癜和溶血性贫血, 以及其它的免疫介导的疾病的临床表现 (Silverman 等人, *Arthritis Rheum.*, 48:1484-1492 (2002); Edwards 等人, *Rheumatology*, 40:1-7 (2001); De Vita 等人, *Arthritis*

Rheumatism, 46:2029-2033 (2002) ; Leandro等人, Ann.Rheum.Dis., 61:883-888 (2002) ; Leandro等人, Arthritis Rheum., 46:2673-2677 (2001) )。抗CD22单克隆抗体LL-2在治疗经受化疗的攻击性和复发性的恶性淋巴瘤患者中被证明是有效的 (Goldenberg美国专利号:6,134,982和 6,306,393)。已经将抗CD20 (IgG1) 抗体, RITUXAN<sup>TM</sup>成功地用于某些疾病的治疗, 例如成人免疫血小板减少性紫癜、风湿性关节炎和自身免疫性溶血性贫血 (Cured等人, WO00/67796)。不论本疗法的有效性, 按照CD20免疫疗法, 大多数的急性淋巴母细胞性白血病 (ALL) 和许多其它的B细胞恶性肿瘤不表达CD20, 在低水平上表达CD20或已经失去了CD20表达 (Smith等人, Oncogene, 22:7359-7368 (2003))。此外, CD20的表达不是对抗CD20疗法的预兆, 仅有半数的非霍奇金氏恶性淋巴瘤患者对CD20控制的免疫疗法作出反应。

[0007] 人的CD19分子是在人的B细胞的表面上表达的结构清楚的细胞表面受体, 所述B细胞包括但不仅限于, 前B细胞 (pre-B cell) 、早期发育的B细胞 (即: 不成熟的B细胞) 、成熟的B细胞通过末端分化成为浆细胞和恶性B细胞。大多数的前-B急性淋巴母细胞性白血病 (ALL) 、非霍奇金氏恶性淋巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 、前淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、普通急性淋巴细胞白血病和一些非急性淋巴母细胞性白血病都表达CD19 (Nadler等人, J. Immunol., 131:244-250 (1983) , Loken等人, Blood, 70:1316-1324 (1987) , Uckun等人, Blood, 71:13-29 (1988) , Anderson等人, 1984. Blood, 63:1424-1433 (1984) , Scheuermann, Leuk. Lymphoma, 18:385-397 (1995) )。在浆细胞上的CD19的表达进一步说明其可在不同的B细胞瘤例如多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、华氏瘤上表达 (Grossbard等人, Br. J. Haematol., 102:509-15 (1998) ; Treon等人, Semin. Oncol., 30:248-52 (2003) )。不同于CD20, 当与抗CD19抗体结合时, CD19抗原被认为在高水平表达, 并整合入细胞中。

[0008] CD19抗原也是许多建议的用于免疫疗法的靶标之一。但是, 认识到的由于细胞内化作用而导致不能作为靶标来利用, 被认为对于可以成功地用于人类对象的治疗方案的开发已经造成了阻碍。CLB-CD19抗体 (抗CD19鼠的IgG2a mAb) 被证明抑制了植入无胸腺小鼠中的人类肿瘤的生长 (Hooijberg等人, Cancer Research, 55:840-846 (1995) )。在另一项研究中, 使用人的IgG1 Fc片段来嵌合单克隆的鼠抗体FMC63 (IgG2a)。该对于具有人B细胞恶性淋巴瘤 (异种移植模型) 的SCID小鼠的嵌合抗体的给药, 不诱导补体介导的细胞毒性或抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) , 而是导致移植的肿瘤细胞的明显杀伤 (Geoffrey等人, Cancer Immunol. Immunother., 41:53-60 (1995) )。

[0009] 使用肿瘤移植的异种移植小鼠模型所获得的结果导致了在人类患者中使用鼠的抗CD19抗体的研究。将鼠的CLB-CD19抗体给予被确诊为渐进性的非霍奇金氏恶性淋巴瘤, 并使用上述的传统疗法 (化疗或放疗) 已经失败的六个患者。给予这些患者从225到1, 000mg的总抗体剂量 (Hekman等人, Cancer Immunol. Immunotherapy, 32:364-372 (1991) )。虽然在注入抗体之后两个患者的循环肿瘤细胞暂时降低了, 但是在抗体治疗两个周期之后仅有一个患者实现了部分缓解。从这一小组难治的患者中不能得出关于治疗效能的结论。

[0010] 后来, 这些研究者显示了在移植模型中非结合的CD20mAb的抗肿瘤效果比CD19mAb的抗肿瘤效果好得多 (Hooijberg等人, Cancer Res., 55: 840-846 (1995) 和 Hooijberg等人, Cancer Res., 55:2627-2634 (1995) )。另外, 当联合使用CD19和CD20mAb

时,他们没有观察到对于肿瘤发病率的累积或协同效应(Hooijberg等人,Cancer Res.,55:840-846(1995))。虽然异种移植的动物模型被认为是受试者中功效的不良预测指示剂,但是在这些动物中获得的否定性结果阻止了人们对于用裸抗CD19抗体的疗法的兴趣。

[0011] 基于抗CD19抗体的免疫毒素的利用同样产生了令人失望的结果。在初期的临床试验中,将B4抗CD19抗体(鼠IgG1 mAb)结合到植物毒素蓖麻毒素上,并给予使用上述的传统疗法已经失败的多发性骨髓瘤人类患者(Grossbard等人,British Journal of Haematology,102:509-515 (1998))、高等非霍奇金氏恶性淋巴瘤(Grossbard等人,Clinical Cancer Research,5:2392-2398(1999))和难治的B细胞恶性肿瘤(Grossbard等人,Blood,79:576-585 (1992))。这些试验一般地证明了B4-蓖麻毒素配合给予人类的安全性;但是,与用RITUXAN<sup>TM</sup>的临床试验相比,结果混乱,并且反应速度令人失望(Grossbard等人,Clinical Cancer Research,5:2392-2398 (1999))。另外,明显有一部分患者发生了人抗鼠抗体(HAMA)反应或人抗蓖麻毒素抗体(HARA)反应。

[0012] 在另一个试验中,用鼠的CLB-CD19抗体与连续注射小剂量的白细胞介素-2结合来治疗之前用传统疗法治疗的七个轻度的非霍奇金氏恶性淋巴瘤患者(Vlasveld等人,Cancer Immunol. Immunotherapy,40:37-47 (1995))。在一个白血病患者中出现部分缓解,并且观察到循环B细胞的大于50%的降低。在测定的5个剩余患者中的4个中,循环B细胞的数量不改变。因此,鼠抗CD19抗体和在人体中基于抗CD18抗体的免疫毒素的疗效评价产生了不能用于功效评价的无对照数据。

## 发明内容

[0013] 本发明涉及用于在受试者中使用与人CD19抗原结合并优选介导ADCC的治疗性抗体来治疗B细胞疾病和紊乱,例如,但不限于,B细胞恶性肿瘤的免疫治疗组合物和方法。本发明涉及包含人的、人源化的IgG1 和/或IgG3人同种型的抗CD19抗体的药物。本发明涉及包含人的、人源化的IgG2和/或IgG4人同种型,优选介导人的ADCC抗CD19抗体。本发明涉及包含嵌合的介导人ADCC的IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的抗CD19抗体的药物组合物。在优选的实施方案中,本发明涉及包括单克隆的人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体的药物组合物。

[0014] 描述了用于治疗确诊为来源于B细胞或其前体,包括但不限于急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、霍奇金氏恶性淋巴瘤、非霍奇金氏恶性淋巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、多发性骨髓瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞恶性淋巴瘤、前淋巴细胞白血症、毛细胞白血病、普通急性淋巴细胞白血病和一些非急性成淋巴细胞白血病的B细胞恶性肿瘤的受试者的治疗性组合物和方式。

[0015] 使用转基因小鼠模型评价在受试者中的针对CD19的免疫疗法来举例说明本发明的方法。

[0016] 在一种实施方案中,本发明提供了一种包含在药学上可接受的载体中的单克隆的人的或人源化的IgG1或IgG3人同种型的抗CD19抗体的药物组合物。在另一种实施方案中,本发明提供了一种包含在药学上可接受的载体中包含治疗有效量的单克隆的嵌合IgG1或IgG3人同种型的抗CD19抗体的药物组合物。在相关的实施方案中,单克隆的嵌合

IgG1或 IgG3人同种型的抗CD19抗体的治疗上的有效量是少于每kg患者体重 1mg。在其它的相关实施方案中,单克隆的嵌合IgG1或IgG3人同种型的 抗CD19抗体的治疗上的有效量是大于每kg患者体重2mg。

[0017] 根据一个方面,本发明提供了一种包含在药学上可接受的载体中介 导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的单克隆的人的或人 源化的抗CD19抗体的治疗有效量的药物组合物。根据另一个方面,本发 明提供了一种包含在药学上可接受的载体中介导人抗体依赖性细胞介 导的细胞毒作用 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和/或细胞 凋亡活性的单克隆的嵌合的抗CD19抗体的药物组合物。

[0018] 本发明涉及一种在人体中治疗B细胞恶性肿瘤的方法,包含给予需 要的人单克隆的人的或人源化的IgG1或IgG3人同种型的抗CD19抗体,其 数量足够消耗循环的B细胞。本发明还涉及一种在人体中治疗B细胞恶性 肿瘤的方法,包含给予需要的人单克隆的人的或人源化的介导人抗体依 赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的抗CD19抗体,其数量足够消 耗 循环的B细胞。本发明涉及一种在人体中治疗B细胞恶性肿瘤的方法,包 含对需要这样的治疗的人类患者给予治疗有效量的单克隆的人的或人 源化的IgG1或IgG3人同种型的抗CD19抗体。

[0019] 在一种实施方案中,本发明提供了一种在人类患者中治疗B细胞恶 性肿瘤的方法,包含对需要这样的治疗的人类患者给予治疗有效量的单 克隆的人的或人源化的介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的抗CD19抗体。在另一种实施方案中,本发明 提供了一种治 疗在人类患者中由B细胞恶性肿瘤引起的早期疾病的方法,包含对需要 这样的治疗的人给予治疗有效量的介导人抗体依赖性细胞介导的细胞 毒作用 (ADCC) 的单克隆的抗CD19抗体。在进一步的实施方案中,本 发明提供了一种在人类患者中治疗B细胞恶 性肿瘤的方法,包含对需要 这样的治疗的人类对象给予治疗有效量的单克隆的介导人抗 体依赖性 细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的抗CD19抗体,其中受试者以前没有 受过恶性肿 瘤治疗。本发明的另一种实施方案提供了一种在人类患者中 治疗B细胞恶性肿瘤的方法,包含对需要这样的治疗的人类患者给予治 疗有效量的介导人抗体依赖性细胞介导的细胞 毒作用 (ADCC) 的单克 隆的抗CD19抗体,其中B细胞恶性肿瘤是CD19阳性的。在一个进一步 的实施方案中,本发明提供了一种在人类患者中治疗B细胞恶性肿瘤的 方法,包含对需要 这样的治疗的人类患者给予治疗有效量的介导人抗体 依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的单克隆的抗CD19抗体,其中 人类患者每dL的循环血液中含有至少1个单核细胞 数。

[0020] 具体地,本发明涉及

[0021] 1、一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体中的、IgG1或IgG3 人同种型的、单克隆、人或人源化抗CD19抗体。

[0022] 2、一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体中的、治疗有效 量的、IgG1或 IgG3人同种型的、单克隆嵌合抗CD19抗体。

[0023] 3、项目2的药物组合物,其中IgG1或IgG3人同种型单克隆嵌合抗 CD19抗体的治疗 有效量为小于每千克患者体重大约1mg。

[0024] 4、项目2的药物组合物,其中IgG1或IgG3人同种型单克隆嵌合抗 CD19抗体的治疗 有效量为大于每千克患者体重大约2mg。

- [0025] 5、项目1或2的药物组合物,其中抗CD19抗体是IgG1人同种型抗体。
- [0026] 6、项目1或2的药物组合物,其中抗CD19抗体是IgG3人同种型抗体。
- [0027] 7、一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体中的、治疗有效量的、介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)的、单克隆人或人源化抗CD19抗体。
- [0028] 8、一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体中的、介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)的、单克隆嵌合抗CD19抗体。
- [0029] 9、项目7或8的组合物,其中抗CD19抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的人同种型。
- [0030] 10、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体具有至少4到7天的半寿期。
- [0031] 11、项目1、2、7或8的药物组合物,其中组合物包含剂量为 $1500\text{mg}/\text{m}^2$ 或更少的抗CD19抗体。
- [0032] 12、项目11的药物组合物,其中组合物包含剂量为 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 或更少的抗CD19抗体。
- [0033] 13、项目11的药物组合物,其中组合物包含剂量为 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 或更少的抗CD19抗体。
- [0034] 14、项目13的药物组合物,其中组合物包含剂量 $0.5\mu\text{g}/\text{m}^2$ 或更少的抗CD19抗体。
- [0035] 15、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体是以可检测的方式标记的。
- [0036] 16、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体是裸抗体。
- [0037] 17、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体与治疗性化合物相结合。
- [0038] 18、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体与细胞毒素试剂相结合。
- [0039] 19、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体与诊断试剂相结合。
- [0040] 20、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体是双特异性的。
- [0041] 21、项目20的药物组合物,其中双特异性的抗CD19抗体具有对于结合效应细胞的特异性。
- [0042] 22、项目7的药物组合物,其中抗CD19抗体的ADCC功能是在体内通过测定抗CD19抗体通过效应细胞介导的靶细胞溶解能力来确定的。
- [0043] 23、项目1、2、7或8的药物组合物,其中抗CD19抗体包含抗体HB12a或HB12b的重链CDR3区,或与HB12a或HB12b抗体的重链CDR3区具有至少25%氨基酸序列同一性的重链CDR3区。
- [0044] 24、项目23的药物组合物,其中抗CD19抗体包含HB12a或HB12b抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3区,或与HB12a或HB12b抗体的重链CDR1、CDR2和CDR3区具有至少25%氨基酸序列同一性的重链CDR1、CDR2和CDR3区。
- [0045] 25、一种治疗人体中B细胞恶性肿瘤的方法,其包含对所需患者施用足以消耗循环B细胞的量的、IgG1或IgG3人同种型的、单克隆人或人源化抗CD19抗体。
- [0046] 26、一种治疗人体中B细胞恶性肿瘤的方法,其包含对所需患者施用足以消耗循环B细胞的量的、介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)的、单克隆人或人源化抗CD19抗体。
- [0047] 27、一种治疗人类患者中B细胞恶性肿瘤的方法,其包含对所需患者施用治疗有效量的、IgG1或IgG3人同种型的、单克隆人或人源化抗CD19抗体。
- [0048] 28、一种治疗人类患者中B细胞恶性肿瘤的方法,其包含对所需患者施用治疗有

效方案的、介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的、单克隆、人或人源化抗 CD19抗体。

[0049] 29、项目26或28的方法,其中抗CD19抗体具有IgG1、IgG2、IgG3 或IgG4人同种型。

[0050] 30、项目25、26、27或28的方法,其中在抗CD19抗体给药之前先 治疗B细胞恶性肿瘤。

[0051] 31、项目30的方法,其中恶性肿瘤的治疗是化疗、放疗、毒素治疗、前体药物活化酶治疗、抗体疗法、单核细胞或巨噬细胞强化治疗、免疫 调节治疗、抑制素治疗、刺孢霉素治疗、外科手术治疗或其任何组合。

[0052] 32、项目25、26、27或28的方法,其中在抗CD19抗体给药之后用 除了抗CD19抗体治疗以外的疗法治疗B细胞恶性肿瘤。

[0053] 33、项目32的方法,其中恶性肿瘤的治疗是化疗、放疗、毒素治疗、前体药物活化酶治疗、抗体疗法、单核细胞或巨噬细胞强化治疗、免疫 调节治疗、抑制素治疗、刺孢霉素治疗、外科手术治疗或其任意组合。

[0054] 34、一种治疗人类患者中由B细胞恶性肿瘤引起的早期疾病的方法, 其包含对所需患者施用治疗有效方案的介导人抗体依赖性细胞介导的 细胞毒作用 (ADCC) 的单克隆的抗CD19抗体。

[0055] 35、一种治疗人类患者中B细胞恶性肿瘤的方法,其包含对所需受 试者施用治疗有效方案的介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的单克隆的抗CD19抗体,其中所述受试者以前没有接受恶性 肿瘤的治疗。

[0056] 36、项目35的方法,其进一步包含随后给予人类患者除了抗CD19 抗体治疗以外的治疗。

[0057] 37、项目35或36的方法,其中治疗是化疗、放疗、基于毒素的治疗、基于放射化学的治疗或外科手术治疗。

[0058] 38、一种治疗人类患者中B细胞恶性肿瘤的方法,其包含对所需患 者施用治疗有效方案的介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的单克隆的抗CD19抗体,其中B 细胞恶性肿瘤是CD19阳性的。

[0059] 39、一种治疗人类患者中B细胞恶性肿瘤的方法,其包含对所需患 者施用治疗有效方案的介导人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的单克隆的抗CD19抗体,其中 人类患者具有至少每dL一个的 单核细胞数。

[0060] 40、项目27、28、34、35、38或39的方法,其中疗法包含将抗体作 为单一治疗剂的给药。

[0061] 41、项目27、28、34、35、38或39的方法,其中疗法包含将抗体与 另一种治疗剂联合施用。

[0062] 42、项目27、28、34、35、38或39的方法,其中疗法包含将抗体与 减少毒剂副作用的试剂联合施用。

[0063] 43、项目27、28、34、35、38或39的方法,其中给药的方案消耗了 循环B细胞。

[0064] 44、项目27、28、34、35、38或39的方法,其中疗法包含以足够消 耗循环B细胞的量的抗体反复施用。

[0065] 45、项目25、26、27、28、34、35、38或39的方法,其中抗CD19 抗体具有至少4到7天的

半寿期。

- [0066] 46、项目34、35、38或39的方法,其中抗CD19抗体是人IgG1同种型 抗体。
- [0067] 47、项目34、35、38或39的方法,其中抗CD19抗体是人IgG3同种 型抗体。
- [0068] 48、项目34、35、38或39的方法,其中抗CD19抗体是人IgG2同种 型抗体。
- [0069] 49、项目34、35、38或39的方法,其中抗CD19抗体是人IgG4同种 型抗体。
- [0070] 50、项目34、35、38或39的方法,其中抗CD19抗体是人或人源化 的抗体。
- [0071] 51、项目25、26、27、28、34、35、38或39的方法,其中B细胞恶 性肿瘤是B细胞亚型非霍奇金氏恶性淋巴瘤(NHL),其包括低等/滤泡 NHL、小淋巴细胞(SL) NHL、中等/滤泡NHL、中等弥漫性NHL、高等 免疫母细胞NHL、高等成淋巴细胞NHL、高等小非核裂细胞NHL和庞大 痘NHL;伯基特氏淋巴瘤;多发性骨髓瘤;前B急性淋巴母细胞性白血 病及其他来源于早期B细胞前体的恶性肿瘤;普通急性淋巴细胞性白血病; 慢性淋巴细胞性白血病;毛细胞白血病;非急性淋巴母细胞性白血病; 华氏巨球蛋白血症;以及前淋巴细胞性白血病;轻链病;浆细胞瘤;骨 硬化骨髓瘤;浆细胞性白血病;特征不明的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS);郁积性多发性骨髓瘤(SMM);缓慢性多发性骨髓瘤(IMM) 或霍奇金氏恶性淋巴瘤。
- [0072] 52、项目27、28、34、35、38或39的方法,其中疗法进一步包含施 用增强单核细胞或 巨噬细胞功能的化合物。
- [0073] 53、项目52的方法,其中人是免疫应答削弱的。
- [0074] 54、项目25、26、27、28、34、35、38或39的方法,其中通过非肠 道的、腹内的或肌肉 注射的途径施用抗CD19抗体。
- [0075] 55、项目25、26、27、28、34、35、38或39的方法,其中通过静脉 内或皮下的途径施用 抗CD19抗体。
- [0076] 56、项目55的方法,其中通过皮下的途径以 $37.5\text{mg}/\text{m}^2$ 或更少的剂 量施用抗CD19 抗体。
- [0077] 57、项目56的方法,其中通过皮下的途径以 $1.5\text{mg}/\text{m}^2$ 或更少的剂量 施用抗CD19抗体。
- [0078] 58、项目25、26、27、28、34、35、38或39中任一项的方法,其中 循环B细胞达到至少 75%的消耗。
- [0079] 59、项目58的方法,其中所述循环B细胞的消耗是在至少7天的时 间 内观察到的。
- [0080] 60、项目58的方法,其中所述循环B细胞的消耗是在至少30天的时 间 内观察到的。
- [0081] 61、项目58的方法,其中所述循环B细胞的消耗是在至少6个月的时 间 内观察到 的。
- [0082] 62、项目27、28、34、35、38或39中任一项的方法,其中疗法包含 对人体施用一次或 以上的抗CD19抗体。
- [0083] 63、项目27、28、34、35、38或39中任一项的方法,其中疗法进一步 包含给予抗CD20 抗体、抗CD22抗体、抗CD52抗体或其任意组合。
- [0084] 3.1定义
- [0085] 如此处所使用的,术语“抗体”和“抗体”(免疫球蛋白)指单克隆抗 体(包括全长的 单克隆抗体)、多克隆抗体、由至少两个完整的抗体形 成的多特异性抗体(例如:双特异性 抗体)、人抗体、人源抗体、camelised 抗体、嵌合抗体、单链Fvs (scFv)、单链抗体、单结构域

抗体、结构域 抗体、Fab片段、 $F(ab')_2$ 片段、表现要求生物活性的抗体片段、二硫化物连接的Fvs (sdFv) 和抗特异型 (抗Id) 抗体 (包括, 例如: 对于本发明的抗体的抗Id抗体)、胞内抗体和以上所有抗体的抗原决定簇结合片段。特别地, 抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段, 即: 包含抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以具有任一型 (例如: IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类 (例如: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2) 或亚类。

[0086] 天然抗体通常是大约150,000道尔顿由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链所组成的异四聚化糖蛋白。每个轻链通过一个共价的二硫键连接到重链上, 而在不同的免疫球蛋白同种型的重链之间改变二硫键的数目。每个重和轻链还具有有规则间隔的链内二硫桥。每个重链在其一端具有可变区(VH), 其后是一些恒定区。每个轻链在其一端具有可变区(VL), 在其另一端具有恒定区; 轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相连, 并且轻链可变区与重链可变区相连。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链的可变区之间形成了连接体。这样的抗体可来源于任一哺乳动物, 包括但不限于, 人、猴、猪、马、兔、狗、猫、小鼠等。

[0087] 术语“可变的”指在抗体中可变区的某些部分在序列上广泛地不同的事实, 并且导致每个特定的抗体对于其特定的抗原的结合专一性。但是, 可变性并不是在抗体的可变区均匀分布的。其集中在轻链可变区和重链可变区的称为互补性决定区(CDRs)的片段中。可变区的较高度恒定的部分被称作骨架区(FR)。每个天然重链和轻链的可变区包含四个FR区, 主要采取 $\beta$ -折叠结构, 通过形成环连接的三个CDRs相连, 并且有时成为 $\beta$ -折叠结构的一部分。在每个链中的CDRs通过FR区与另一个链的CDRs近似紧密地结合在一起, 有助于抗体的抗原结合簇的形成 (参见: Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。恒定区通常不直接包括在结合的抗原中, 但可能影响抗原结合的亲合力, 并可能显示出各种效应子功能, 例如参与ADCC中的抗体。

[0088] 此处所使用的术语“高变区”指抗体的导致结合到其抗原上的氨基酸残基。高变区包含来自“互补性决定区”或“CDR” (例如: 在轻链可变区的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)和在重链可变区的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3); Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) 和/或来自“高变环”的那些残基 (例如: 在轻链可变区的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)和在重链可变区的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3); Chothia和Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987))。“骨架结构”或“FR”残基是除了如此处所定义的高变区残基以外的那些可变区残基, 并且包括嵌合的、人源化的、人的、结构域抗体、双体分子(diabodies)、疫苗体(vaccibodies)、线性抗体和双特异性抗体。

[0089] 如此处所使用的术语“单克隆抗体”指从基本上同类的一组抗体中获得的抗体, 即: 除了可能以较少量存在的潜在的天然存在的突变之外, 包含相同数目的独立抗体。单克隆抗体是高度特异性的, 其与单个抗原位点相对应。此外, 与一般包括与不同决定簇 (抗原决定簇) 相对应的不同抗体的传统 (多克隆) 抗体制剂相反, 每个单克隆抗体是与抗原上的单个决定簇相对应的。除了其特异性之外, 单克隆抗体在通过杂交瘤细胞合成, 不被其

它的免疫球蛋白生产细胞污染的方面是有利的。另外，单克隆抗体可由用编码单克隆抗体的重链和轻链基因稳定地或瞬时转染的细胞来生产。

[0090] 修饰语“单克隆的”表明从抗体的基本上均一的群体中获得的抗体的特性，并且不被认为是需要通过任何特别的方法的抗体技术。此处所使用的术语“单克隆的”指来源于细胞的克隆群体，包括任何真核的、原核的或噬菌体的克隆的抗体，而不是工程化抗体的方法。例如，根据本发明所使用的单克隆抗体可通过杂交瘤方法来制备，所述方法首先由 Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)，或可通过任何重组DNA方法来制备(参见：例如，U.S.专利号:4,816,567)，其包括使用例如在Clackson等人，Nature, 352:624-628 (1991) 和Marks等人，J.Mol.Biol., 222: 581-597 (1991) 中所描述的方法从噬菌体抗体文库中分离。这些方法可用于生产单克隆的哺乳动物、嵌合的、人源化的、人的、结构域抗体、双体分子(diabodies)、疫苗体(vaccibodies)、线性抗体和双特异性抗体。

[0091] 术语“嵌合的”抗体包括其中至少重链和/或轻链的一部分与来源于特定种类或属于特定抗体的类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，并且该链的至少一个其它的部分与来源于另一个种类或属于另一个抗体的类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，以及这样的抗体片段，只要其表现出想要的生物活性即可(美国专利号:4,816,567; Morrison等人，Proc.Natl.Acad.ScL USA, 81:6851-6855 (1984))。此处所关心的嵌合抗体包括“灵长类动物化(primatized)”抗体，所述的“灵长类动物化(primatized)”抗体来源于非人灵长类动物(例如：东半球的猴子，例如：狒狒、猕猴或吸收放散试验猕猴)的可变区抗原结合序列和人的恒定区序列(美国专利号:5,693,780)。

[0092] 非人的(例如：鼠的)抗体的“人源”形式是包含来源于非人的免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。对于大部分情况，人源化的抗体是人免疫球蛋白(受体的抗体)，其中来自受体的高变区的残基被来自非人物种(供体的抗体)例如小鼠、大鼠、兔或具有要求的特异性、亲合力和活性的非人灵长类动物的高变区的残基所取代。在有些情况下，人免疫球蛋白的骨架区(FR)残基被相应的非人残基所取代。此外，人源化的抗体可包含在受体的抗体或供体的抗体中未发现的残基。进行这些修饰以便进一步地改善抗体的性能。一般说来，人源化的抗体基本上包含至少一个，并且一般地两个，可变区，其中全部或者基本上全部的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，并且全部或者基本上全部的FR是人免疫球蛋白序列的FR。在某些实施方案中，人源化的抗体包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc)，一般是人免疫球蛋白的恒定区。有关进一步的细节，参见，Jones等人，Nature, 321: 522-525 (1986)；Riechmann等人，Nature, 332: 323-329 (1988) 和Presta，Curr.Op.Struct.Biol., 2:593-596 (1992)。

[0093] “人的抗体”可以是来源于人的抗体或者从已经“设计”来生产特异的对应于抗原的攻击，并可以由本领域已知的任何方法制备的人抗体转基因的生物体中获得的抗体。根据优选的方法，将人的重链和轻链位置的元件导入到来源于胚胎干细胞系的细胞株中，所述细胞系包含内源的重链和轻链位置的靶裂解。转基因的生物体可以合成特异于人抗原的人抗体，并且生物体可用于生产人抗体分泌杂交瘤。人抗体还可以是重链和轻链由来源于人DNA的一个或多个源的核苷酸序列所编码的抗体。还可以用基因或染色体转染的方法、以及噬菌体显示技术、或体外活化B细胞，所有这些本领域已知的技术来构建完全的人抗体。

[0094] “CD19”抗原指由HD237或B4抗体(Kiesel等人,Leukemia Research II,12:1119 (1987) 鉴定的大约90kDa的抗原。将CD19固定于细胞上,所述细胞通过B系细胞的分化从干细胞阶段通过末端分化为浆细胞,包括但不仅限于,前B细胞、B细胞(包括幼稚B细胞、抗原刺激B细胞、记忆B细胞、浆细胞和B淋巴细胞)和滤泡性分枝细胞。还将CD19固定于人的胎儿组织的B细胞上。在优选的实施方案中,本发明的抗体的靶CD19抗原是人CD19抗原。

[0095] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用”和“ADCC”指细胞介导的反应,其中非特异性的细胞毒素细胞(例如:自然杀伤(NK)细胞、嗜中性嗜中性细胞和巨噬细胞)识别在靶细胞上装订结合的抗体,之后导致靶细胞的溶解。在优选的实施方案中,这样的细胞是人的细胞。不想要被限于任何特定的作用机理作用机理,这些介导ADCC的细胞毒素细胞通常表达Fc受体(FcRs)。介导ADCC、NK细胞的初级细胞表达Fc $\gamma$  RIII,而单核细胞表达Fc $\gamma$  RI、Fc $\gamma$  RII、Fc $\gamma$  RIII和/或Fc $\gamma$  RIV。将在造血细胞上表达FcR概括于Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991)。为了测定分子的ADCC活性,可进行体外ADCC试验,例如美国专利号:5,500,362或5,821,337所描述的。该试验的有用效应细胞包括周围血液单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。选择性地,或另外地,可在体内测定感兴趣的分子的ADCC活性,例如在如Clynes等人,PNAS (USA), 95:652-656 (1998)所公开的动物模型中。

[0096] “补体依赖性的细胞毒性”或“CDC”指分子起始补体激活和在有补体参与的情况下溶解靶的能力。补体激活途径起源于补体系统(CIq)的第一个元件结合到复合有同源抗原的分子(例如,抗体)。为了测定补体激活,可进行CDC试验,例如,如Gazzano-Santaro等人,J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)所述的。

[0097] “效应细胞”是表达一个或多个FcR,并执行操纵子功能的白细胞。优选地,细胞表达至少Fc $\gamma$  RI、Fc $\gamma$  RII、Fc $\gamma$  RIII和/或Fc $\gamma$  RIV,并执行ADCC操纵子功能。介导ADCC的人白细胞的实例包括周围血液单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性细胞;其中优选PBMC和NK细胞。在优选的实施方案中效应细胞是人的细胞。

[0098] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合到抗体的Fc区的受体。优选的FcR是天然序列的人FcR。另外,优选的FcR是结合IgG抗体( $\gamma$ 受体),并包括Fc $\gamma$  RI、Fc $\gamma$  RII、Fc $\gamma$  RIII和Fc $\gamma$  RIV亚类,包括等位变体和这些受体的替代性拼接形式的FcR。Fc $\gamma$  RII受体包括Fc $\gamma$  RIIA(一种“活化受体”)和Fc $\gamma$  RIIB(一种“抑制受体”),其具有相似的主要在其细胞质结构域不同的氨基酸序列。活化受体Fc $\gamma$  RIIA在其细胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。(参见, Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997))。在Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel等人, Immunomethods, 4: 25-34 (1994); 和de Haas等人, J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995)中评述了FcR。其它的FcR包括以后将鉴定出来的FcR,其由此处的术语“FcR”所包含。该术语也包括新生的受体,FcRn,其负责将母亲的IgG传递到胎儿(Guyer等人, Immunol., 117:587 (1976) 和Kim等人, J. Immunol., 24:249 (1994))。

[0099] “Fv”是包含全抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区域由一个重链和一个轻链可变区以紧密的、非共价或共价连接的二聚体所组成。其处于每个可变结构域的三个CDR相互作用的结构而在VH-VL二聚体的表面上形成抗原结合簇。总起来说,六个CDR给予对于抗体的抗原结合特异性。但是,即使单个的可变结构域(或包含仅仅三个对于抗原特异的CDR的Fv的一半)具有识别和结合抗原的能力,虽然与全部的结合位点相比具有较低

的亲合力。

[0100] 此处所述的用于治疗的抗体对于抗原表位的“亲合力”是本领域中已知的术语，指抗体结合到抗原表位的程度或强度。亲合力可用本领域许多已知的方法来测定和/或表示，包括但不限于，平衡电离常数 (KD 或 Kd)、表观平衡电离常数 (KD' 或 Kd') 和 IC50 (在竞争性试验中引起 50% 抑制所需要的量)。当然，对本发明来说，亲合力是对于结合于抗原表位的给定数量的抗体的平均亲合力。此处所报道的根据每mL的 mg IgG 的 KD' 值表示每毫升血清的 Ig 毫克数，虽然可使用血浆。当将抗体亲合力用作此处所述的治疗方法的给药基质，或用作此处所述的治疗方法的选择物时，可在治疗之前和/或期间测定抗体亲合力，并且所得的值可通过临床判断人类患者是否是适当的候选者来被用于治疗。

[0101] “抗原表位”是本领域已知的术语，指表现特异性结合于抗体的任何化学部分。“抗原表位”还可包含抗原，其是包含抗原表位的部分或分子，并且，同样地，也特异地结合于抗体。

[0102] 此处所用的“B 细胞表面标记”是在 B 细胞表面上表达的抗原，所述 B 细胞可以用与其结合的媒介物作为靶子。示例的 B 细胞表面标记包括 CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD37、CD53、CD72、CD73、CD74、CD75、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85 和 CD86 白细胞表面标记。与哺乳动物的其它非 B 细胞组织相比，特别感兴趣的 B 细胞表面标记优先在 B 细胞上表达，并且可在前体 B 细胞和成熟 B 细胞上表达。在一种实施方案中，优选的标记物是 CD19，其是基于从原/前 B 细胞阶段经过末端分化的浆细胞阶段的谱系的分化期间的 B 细胞。

[0103] 此处所用的术语“抗体半寿期”指抗体的药物动力学性质，即按照其给药的抗体分子的平均存在时间的量。抗体半寿期可表示为从患者的身 体或其特定部分中除去 50% 已知量的免疫球蛋白所需要的时间，例如，当在血清中测定时，即，循环半寿期，或在其它组织中。半寿期可在一种免疫球蛋白或一类免疫球蛋白与另一种免疫球蛋白之间有所不同。通常，抗体半寿期的增加导致抗体给药循环中平均留存时间 (MRT) 的增加。

[0104] 术语“同种型”指抗体的分类。抗体的恒定区不参与跟抗原的结合，但显示各种操纵子功能。根据重链恒定区的氨基酸序列，给定的抗体或免疫球蛋白可分为五种主要的免疫球蛋白类型之一：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。这些类型的部分可进一步分为亚类 (同种型)，例如：IgG1 (γ 1)、IgG2 (γ 2)、IgG3 (γ 3) 和 IgG4 (γ 4)，以及 IgA1 和 IgA2。对应于不同类型的免疫球蛋白的重链恒定区分别被称作 α、Δ、epsilon、γ 和 μ。已知不同类型的免疫球蛋白的结构和三维形态。在各种人免疫球蛋白的类型中，已知仅仅人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 和 IgM 激活补体。已知人 IgG1 和 IgG3 在人体中介导 ADCC。

[0105] 如此处所使用的，术语“免疫原性”指混合物能够引起免疫反应 (激发特异性抗体的产生和/或特异性 T 细胞的增殖)。

[0106] 如此处所使用的，术语“抗原性”指混合物被抗体所识别，或可结合到抗体上，并诱导免疫反应。

[0107] 如此处所使用的，术语“亲合力”抗体结合抗原的总体结合强度 (即：两个抗体臂) 的量度。抗体亲合力可使用本领域任何已知的方法通过测定在抗原过量时抗原-抗体连接的解离来确定，例如，但不限于，用由 Gray 等人，J. Virol. Metk, 44: 11-24 (1993) 所描述的间接荧光抗体的改进方法。

[0108] 由术语“治疗”、“治疗”或“对...治疗”(或符合语法的相应术语)，其指对象的病情的严重程度减少，或实现至少部分地改善或改善和/或在至少一个临床症状上有一些减轻、缓解或降低，和/或在病情的发展上存在抑制或延迟，和/或预防或延迟病症或疾病的发病。因此，术语“治疗”、“治疗”或“对...治疗”(或符合语法的相应术语)指预防和治疗方式。

[0109] 如此处所使用的，术语“足够的量”或“足量的”获得特定的效果指本发明的适量的抗体或组合物，其能有效产生预期效果，所述效果是选择性的治疗效果(即：通过治疗有效量的给药)。例如，“足够的量”或“足量的”可为有效消耗B细胞的量。

[0110] 此处所用的“治疗上有效的”量是在至少一个临床症状上提供某些减轻、缓解和/或降低的量。本领域技术人员已知与可用本发明的方法治疗的病症相关的临床症状。进一步地，本领域技术人员理解治疗效果不必是完全的或能治病的，只要能给对象提供一些益处即可。

## 附图说明

[0111] 图1A-1E说明hCD19TG小鼠细胞系的CD19表达。图1A显示来自hCD19TG (TG-1<sup>+/−</sup>) 小鼠的B细胞的人和小鼠的CD19表达。图1B显示来自hCD19TG小鼠的CD19<sup>+</sup>血液B细胞的人并且小鼠CD19表达的相对平均密度。图1C显示来自TG-1<sup>+/−</sup>小鼠组织的CD19<sup>+</sup>B细胞的hCD19和mCD19表达的相对密度。图1D显示CD19抗体在来自TG-1<sup>+/−</sup>小鼠的小鼠血液和脾B220<sup>+</sup>B细胞上的结合密度。图1E显示结合到hCD19cDNA转染的300.19细胞上的抗CD19抗体。

[0112] 图2A-2D显示在hCD19TG小鼠中血液、脾和淋巴结B细胞的消耗。图2A表明在TG-1<sup>+/−</sup>小鼠的CD19或同种型匹配的对照(CTL)抗体治疗后7天，典型的来自血液、脾和淋巴结的B细胞消耗。图2C和图2D显示在用标明剂量的CD19(填充的条带)或对照(空的条带)抗体治疗TG-1<sup>+/−</sup>小鼠后，脾和淋巴结B细胞分别的数目(±SEM)。

[0113] 图3A-3F描述在抗CD19抗体治疗之后骨髓B细胞的消耗。图3A显示用流细胞计数分析的四色免疫荧光染色测定的TG-1<sup>+/−</sup>骨髓B细胞子代的典型的hCD19和mCD19表达。图3B显示用流细胞计数分析的四色免疫荧光染色测定的，在FMC63或同种型匹配的对照抗体(250μg)治疗之后七天，hCD19TG小鼠的骨髓中hCD19<sup>+</sup>细胞的消耗。图3C显示在CD19或同种型匹配的对照抗体(250μg)治疗TG-1<sup>+/−</sup>小鼠七天，在骨髓中代表性的B220<sup>+</sup>B细胞消耗。图3D显示在FMC63或同种型匹配的对照抗体(250μg)治疗TG-1<sup>+/−</sup>小鼠七天，用三色的免疫荧光染色测定的在骨髓中代表性的B细胞亚型消耗。根据CD43表达(下图)进一步将IgM-B22010原/前B细胞细分。图3E显示在FMC63或同种型匹配的对照抗体(250μg)治疗hCD19TG小鼠七天，用双色的免疫荧光染色测定的代表性的CD25<sup>+</sup>B22010前B细胞的消耗。图3F显示在用FMC63(封闭的条带)或对照(开放的条带)将≥3对同窝出生仔畜进行抗体治疗七天，表示在两侧大腿中的原B细胞(pro-B cell)、前B细胞、不成熟的和成熟的B细胞的数目(±SEM)的条带图。

[0114] 图4A-4C表明腹膜腔B细胞对抗CD19抗体治疗敏感。图4A显示由腹膜腔CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>B<sup>Ia</sup>和CD5<sup>−</sup>B220<sup>hi</sup>B2(常规的)B细胞的人和小鼠CD19表达。图4B显示来自用CD19(250μg的HB12a、HB12b和FMC63；50μg的B4和HD237)抗体或对照抗体(250μg)治疗的TG-1<sup>+/−</sup>小鼠的腹膜腔B220<sup>+</sup>细胞的消耗。图4C显示在抗CD19或对照抗体治疗hCD19TG小鼠七天，代表性的

CD25<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>B<sup>Ia</sup>和CD5-B220<sup>hi</sup>B2B细胞的消耗。

[0115] 图5A描述HB12a抗CD19抗体的重链VH-D-JH接合序列的核苷酸 (SEQ ID NO:1) 和预测的氨基酸 (SEQ ID NO:2) 序列。图5B描述 HB12b抗CD19抗体的重链VH-D-JH接合序列的核苷酸 (SEQ ID NO:3) 和预测的氨基酸 (SEQ ID NO:4) 序列。

[0116] 图6A描述HB12a抗CD19抗体的轻链序列的核苷酸 (SEQ ID NO:15) 和预测的氨基酸 (SEQ ID NO:16) 序列。图6B描述HB12b抗CD19抗体 的轻链序列的核苷酸 (SEQ ID NO:17) 和预测的氨基酸 (SEQ ID NO: 18) 序列。

[0117] 图7A-7B描述公开的小鼠抗(人)CD19抗体的氨基酸序列。图7A 显示包括共有序列 (SEQ ID NO:5) 、HB12a (SEQ ID NO:2) 、4G7 (SEQ ID NO:6) 、HB12b (SEQ ID NO:4) 、HD37 (SEQ ID NO:7) 、B43 (SEQ ID NO:8) 和FMC63 (SEQ ID NO:9) 的重链VH-D-JH接合 序列。图7B显示抗CD19抗体的轻链VK氨基酸序列分析。定位了 共有序列 (SEQ ID NO:10) 、HB12a (SEQ ID NO:16) 、HB12b (SEQ ID NO:18) 、HD37 (SEQ ID NO:11) 、B43 (SEQ ID NO:12) 、FMC63 (SEQ ID NO:13) 和4G7 (SEQ ID NO:14) 。

[0118] 图8A-8C表明CD19浓度影响了体内由抗CD19抗体的B细胞消耗的 效率。显示了按照HB12b (图8A) 或FMC63 (图8B) 抗体治疗 (七天、250 $\mu$ g/小鼠) 后, 在hCD19TG小鼠中代表性的血液和脾的B细胞消耗。图8C显示在来自TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠的血液B220<sup>+</sup>B细胞上的相对抗CD19 和抗 CD20抗体结合浓度。图8D显示在来自TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠的脾B220<sup>+</sup>B细胞上的 相对抗CD19和抗CD20抗体结合浓度。

[0119] 图9A-9D表明由抗CD19抗体治疗的B细胞的消耗是FcR  $\gamma$  - 和单核细 胞依赖性的。图9A在hCD19TG-1<sup>+/+</sup> FcR  $\gamma$  <sup>+/+</sup> 同窝出生仔畜的CD19或同种 型对照抗体治疗之后7天代表性的血液和脾的B细胞消耗。图9B在第0天 FcR  $\gamma$  <sup>+/+</sup> 同窝出生仔畜的抗体治疗之后7天血液和组织的B细胞消耗。图9C 在单核细胞消耗的hCD19TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠中代表性的B细胞数目。图9D 在抗 体治疗之后七天血液和组织的B细胞消耗。

[0120] 图10A-10D表明由抗CD19抗体治疗的B细胞消耗的持续时间和剂量 反应。图10A显示在第0天由FMC63或同种型对照抗体治疗的TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠 的大量血液B220<sup>+</sup>B细胞和Thv-1<sup>+</sup>T 细胞。图10B-C显示抗体治疗之后11、16和30周后图10A所示的在小鼠中代表性的组织B细胞消耗。图10D显示 对应于血液、骨髓和脾的B细胞消耗的抗CD19抗体剂量。

[0121] 图11A-11C表明CD19在体内不是由抗体结合而内在化的。在用 HB12a (图11A) 、HB12b (图11B) 、FMC63 (图11C) 或同种型匹配 对照抗体 (250 $\mu$ g) 体内治疗TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠中细胞 表面CD19表达和B细胞 清除。

[0122] 图12A-12C表明体内由抗CD19抗体结合的CD19饱和剂量。图12A显 示体内在用 FMC63或同种型匹配对照抗体 (250 $\mu$ g) 治疗的TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠 中B细胞的清除。图12B显示FMC63 抗体治疗 (250 $\mu$ g) 在给药1小时之内 使hCD19上的抗体结合位点饱和。图12C显示HB12b抗 CD19抗体治疗 (250 $\mu$ g) 如在图12B所确定的那样在给药1小时之内使hCD19上的抗体 结合位点饱和。

[0123] 图13A-13B表明抗CD19抗体治疗在TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠中降低了血清免疫 球蛋白和自身 抗体的水平。图13A描述血清免疫球蛋白的水平,而图13B 描述在抗CD19抗体治疗之后的抗 dsDNA、抗ssDNA和抗组蛋白自身抗体 的水平。

[0124] 图14A-14B表明抗CD19抗体治疗阻断了TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠中的由体液引 起的免疫应答。

用图14A的TNP-LPS、图14B的DNP-Ficoll和图14C-14D 的DNP-KLH免疫抗体治疗的小鼠。在首次免疫第0天之前7天 (A-C) 或 之后14天 (D) , 用FMC63 (密闭的圈) 或对照 (开放的圈) 抗体 (250 $\mu$ g) 治疗同窝出生仔畜。

[0125] 图15表明同时添加抗CD19和抗CD20抗体治疗。

[0126] 图16表明抗CD19抗体的皮下 (s.c.) 、腹内 (i.p.) 和静脉 (i.v.) 给 药有效地消耗体内循环的和组织中的B细胞。

[0127] 图17A-17B抗CD19抗体治疗阻止了体内hCD19<sup>+</sup>淋巴瘤的生长 (图 17A) , 并且增加了存活率 (图17B) 。

## 5. 具体实施方式

[0128] 本发明涉及用于治疗人体B细胞疾病和紊乱的免疫治疗组合物和方法, 例如, 但不仅限于, 用结合CD19抗原的治疗性抗体, 优选人抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 来治疗B细胞恶性肿瘤。本发明涉及包含人的、人源化的或嵌合的IgG1或IgG3人同种型抗CD19抗体的药物组合物。本发明还涉及包含IgG2或IgG4人同种型的人的或人源化的抗CD19抗体, 优选介导人类ADCC的药物组合物。在某些实施方案中, 本发明还涉及可用本领域已知的方法生产的包含单克隆人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体的药物组合物。

[0129] 描述治疗诊断为由B细胞和及其前体衍生的B细胞恶性肿瘤的人类患者的治疗的处方和给药方案, 所述B细胞和及其前体衍生的B细胞恶性肿瘤, 包括但不限于, 急性淋巴母细胞性白血病 (ALL) 、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 、多发性骨髓瘤、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、前-淋巴细胞白血症、毛细胞白血病、普通急性淋巴细胞性白血病和某些非急性淋巴细胞性白血病。

[0130] 5.1抗CD19抗体的产生

[0131] 5.1.1多克隆抗CD19抗体

[0132] 多克隆抗体优选通过将相关抗原和辅药多次皮下 (s.c.) 或腹内 (i.p.) 注射, 在动物体内产生。用双功能试剂或衍生试剂, 例如马来酰亚胺基 苯甲酰基 (maleimidobenzoyl) 硫基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基结合) 、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基) 、戊二醛、琥珀酸酐、SOC1<sub>2</sub>, 将相关抗原与免疫物种免疫原蛋白, 例如钥孔血蓝素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂结合可能是有用的。

[0133] 用抗原、免疫共轭物或衍生物来免疫动物, 例如将100 $\mu$ g或5 $\mu$ g蛋白质或共轭物 (分别对于兔子或老鼠) 与3倍量的完全弗氏佐剂混合, 将溶液在多个位置上真皮内注射。一个月后, 给动物在多个位置上皮下注射含有1/5到1/10原量的肽或共轭物的不完全弗氏佐剂。7到14天后, 给动物抽血, 测定其血清的抗体滴度。对动物加强免疫直到滴度不变。优选地, 用相同的但由不同的蛋白结合的和/或通过不同的交联试剂来结合的抗原共轭物给动物加强免疫。也可以在重组细胞培养物中以蛋白融合物的形式来制备共轭物。聚合体例如明矾也适合用来增强免疫反应。

[0134] 5.1.2单克隆的抗CD19抗体

[0135] 本发明的单克隆抗CD19抗体表现出与人CD19抗原的结合特异性, 并可优选介导人的ADCC。这些抗体可用本领域已知的多种技术, 包括 利用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合来获得。抗体是高度特异性的, 其针对单个的抗原位点。此外, 与一般包括针对

不同决定簇(抗原表位)的传统的(多克隆)抗体制剂相比,每个单克隆抗体针对人CD19抗体上的单个决定簇。例如,根据本发明所使用的单克隆抗体可用Kohler等人,Nature,256:495(1975)首次描述的杂交瘤方法来制备其可用于产生鼠抗体(或来源于其它非人哺乳动物的抗体,例如:鼠、山羊、绵羊、牛、骆驼等)或来源于转基因动物的人抗体(参见,美国专利号6,075,181、6,114,598、6,150,584和6,657,103)。选择性地,可用重组DNA技术来制备单克隆抗体(参见,例如:美国专利号4,816,567),并且所述单克隆抗体包括嵌合的和人源化的抗体。“单克隆抗体”也可用如Clackson等人,Nature,352:624-628(1991)与Marks等人,J.Mol Biol, 222:581-597(1991)所描述的方法从噬菌体抗体文库中分离出来。

[0136] 可用本领域已知的任何方法来制备工程化抗CD19抗体,包括但不限于,下述方法及这些方法的改进。大规模的高产量生产一般涉及培养产生工程化抗CD19抗体的寄主细胞,并从寄主细胞培养物中回收抗CD19抗体。

[0137] 5.1.3杂交瘤技术

[0138] 可用杂交瘤技术来制备单克隆抗体,其中包括本领域和教导中已知的技术,例如在Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed,1988);Hammerling等人,在Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas,563-681(Elsevier,N.Y., 1981)中(所述参考文献以其整体作为参考并入此处)。例如,在杂交瘤方法中,将老鼠或其它适当的宿主动物,例如仓鼠或猕猴免疫以得到产生或能够产生与用于免疫的蛋白进行特定性结合的抗体的淋巴细胞。替代性地,可在体外免疫淋巴细胞。然后将淋巴细胞与骨髓瘤细胞利用适当的助熔剂混合,例如聚乙二醇,产生杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,59-103(Academic Press,1986))。

[0139] 在适当的培养基中接种并培育如此制备的杂交瘤细胞,所述培养基优选包含一种或多种抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活率的物质。例如,如果亲代的骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT或HPRT),那么杂交瘤的培养基一般就要包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷(HAT介质),该物质阻碍HGPRT-缺陷型细胞的生长。

[0140] 优选高效融合的骨髓瘤细胞,用挑选的抗体产生细胞维持稳定高水平的抗体产生,并且所述细胞对介质敏感,例如HAT介质。这些细胞之中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,例如来源于Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤中,以及从American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA得到的SP-2或X63-Ag8.653细胞的细胞系。人骨髓瘤和小鼠人heteromyeloma细胞系也被描述为可产生人的单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol, 133:3001(1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Application, 51-63 (Marcel Dekker, Inc, New York, 1987))。

[0141] 为生产针对人CD19抗原的单克隆抗体,测定杂交瘤细胞生长的培养基。优选地,用免疫沉淀反应或通过体外结合试验,例如放射免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA)来检验用杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

[0142] 在鉴定了杂交瘤细胞所产生的抗体具有要求的特异性、亲合力和/或活性之后,可通过有限稀释的方法亚克隆该细胞,并按照标准方法培养(Goding,Monoclonal

Antibodies:Principles and Practice,59-103 (Academic Press,1986))。可达此目的的适当培养基包括,例如: D-MEM或RPMI1640培养基。此外,杂交瘤细胞可能会在动物体内生长 成腹腔肿瘤。

[0143] 将由亚克隆分泌出的单克隆抗体从通过传统的免疫球蛋白纯化方法获得的培养基、腹腔积液或血清中适当地分离出来,所述纯化方法例如蛋白质A-琼脂糖凝胶、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱 法。

[0144] 5.1.4 重组DNA技术

[0145] 利用常规程序(例如:利用能特异性结合编码抗CD19抗体的重链 和轻链的基因的寡聚核苷酸探针),分离和测序编码本发明中抗CD19 抗体的DNA。将杂交瘤细胞作为优选的该DNA的来源。一旦分离出来,可将DNA放入表达载体中,然后将其转染入寄主细胞,例如大肠杆菌 细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞或不再产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以实现重组寄主细胞中的抗CD19抗体的合成。

[0146] 在噬菌体展示技术中,在噬菌体粒子的表面上展示了功能性抗体结 构域,其带有编码它们的多核苷酸序列。尤其是,从动物cDNA文库(例如:感染组织的人或鼠cDNA文库) 中扩增编码VH和VL结构域的DNA 序列。利用PCR将编码VH和VL结构域的DNA序列与scFv连接子重 组在一起,并克隆入噬菌粒载体。将载体电转化到E.coli中,并用辅助 噬菌体感染 E.coli。在此方法中所用的噬菌体一般为丝状噬菌体,其包括fd和M13,并且VH和VL结构域通常被重组融合到噬菌体基因III 或基因VIII中。可用抗原选择或鉴定表达结合到特定抗原的抗体结合结 构域的噬菌体,例如:用标记的抗原或结合或捕获到固体表面或珠上的抗原。可用来制造本发明的抗体的噬菌体展示技术的实例包括Brinkman 等人,1995, J. Immunol. Methods,182:41-50;Ames等人,1995, J. Immunol. Methods,182:41-50;Ames等人,1995,J. Immunol. Methods, 184:177-186;Kettleborough等人,1994,Eur. J. Immunol, 24:952-958; Persic等人,1997, Gene, 187:9-18;Burton等人,1994, Advances in Immunology,57:191-280;国际申请号PCT/GB91/01134;国际公开号 WO 90/02809,WO 91/10737,WO 92/01047,WO 92/18619,WO 93/11236, WO 95/15982,WO 95/20401和W097/13844;美国专利号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和 5,969,108;其中的每一文献以其整体并入此处作为参考。

[0147] 如上述参考文献所述,噬菌体选择之后,可分离来自噬菌体的抗体 编码区,并用来产生完整的抗体,包括人抗体或任何其它需要的抗原结 合片段,并在任何需要的宿主中表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,如下所述。也可使用本技术领域已知的方法来 使用重组生产Fab、Fab' 和F (ab')<sub>2</sub>片段的技术,例如PCT公开号W0 92/22324;Mullinax等人,1992,BioTechniques,12 (6) :864-869; Sawai等人,1995,AJRI,34: 26-34和Better等人,1988,Science,240: 1041-1043(所述参考文献以其整体引入作为参考)。

[0148] 在进一步的实施方案中,可从抗体噬菌体文库中分离抗体,所述抗体噬菌体文库是使用McCafferty等人,Nature,348:552-554 (1990) 所描述的技术产生的.Clackson等人,Nature,352:624-628 (1991)。Marks等人,J.Mol.Biol,222:581-597 (1991) 分别描述了使用噬菌体 文库来分离鼠和人抗体。链替换可用于高亲合力 (nm范围) 人抗体的 制备

(Marks等人, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), 还有组合感染和体内重组, 作为构建大规模噬菌体文库的策略 (Waterhouse等人, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993))。这样, 此方法可替代传统的单克隆抗体杂交瘤技术用于抗CD19抗体的分离。

[0149] 为产生完整的抗体, 包含VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧面序列可用于扩增在scFv克隆中的VH或VL序列。利用对于本领域技术人员来说已知的克隆方法, 可将PCR扩增的VH结构域克隆入表达VH恒定区的载体中, 例如: 人 $\gamma$ 4恒定区, 可将PCR扩增的VL结构域克隆入表达VL恒定区的载体中, 例如: 人类kappa或lambda恒定区。优选地, 表达VH或VL结构域的载体包含EF-1 $\alpha$ 启动子、分泌信号、可变区的克隆位点、恒定区、和选择标记, 例如新霉素的选择标记。也可将VH和VL结构域克隆入表达必需恒定区的载体中。然后利用本领域技术人员已知的技术, 将重链转化载体和轻链转化载体共转染入细胞系中, 来产生表达全长抗体(例如: IgG)的稳定的或不稳定的细胞系。

[0150] 也可修饰DNA, 例如用人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源的鼠序列(美国专利号4,816,567; Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), 或通过共价将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列连接到免疫球蛋白编码序列上。

#### [0151] 5.1.5 嵌合的抗体

[0152] 此处的抗CD19抗体特别地包括嵌合的抗体(免疫球蛋白), 其中重链和/或轻链的部分等同于或同源于来自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列, 而链的另一部分等同于或同源于来自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中, 以及这类抗体片段中的相应序列, 只要该抗体或抗体片段显示了需要的生物活性即可(美国专利号4,816,567; Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。此处研究的嵌合抗体包括“灵长目”抗体, 其包含来自非人灵长类的(例如: 东半球的猴子, 如狒狒、恒河猴或食蟹猴)的可变结构域抗原结合序列和人类恒定区的序列(美国专利号5,693,780)。

#### [0153] 5.1.6 人源化的抗体

[0154] 可用各种本领域已知的技术来制备人源化的抗体, 包括但不仅限于CDR-替换(参见, 例如: 欧洲专利号EP 239,400; 国际公开号WO 91/09967; 以及美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089, 其中的每一文献以其整体并入此处作为参考), veneer或表面置换(参见, 例如: 欧洲专利号EP 592,106和EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology* 28 (4/5): 489-498; Studnicka等人, 1994, *Protein Engineering Protein Engineering*, 7 (6): 805-814和Roguska等人, 1994, *PNAS*, 91:969-973, 其中的每一文献以其整体并入此处作为参考), 链替换(参见, 例如: 美国专利号5,565,332, 其以整体并入此处作为参考), 以及公开的技术, 例如: 美国专利号6,407,213、美国专利号码5,766,886、国际公开号WO 9317105, Tan等人, *J. Immunol.*, 169:1119-25 (2002), Caldas等人, *Protein Eng.*, 13 (5): 353-60 (2000), Morea等人, *Methods*, 20 (3): 267-79 (2000), Baca等人, *J. Biol. Chem.*, 272 (16): 10678-84 (1997), Roguska等人, *Protein Eng.*, 9 (10): 895-904 (1996), Couto等人, *Cancer Res.*, 55 (23Supp): 5973s-5977s (1995), Couto等人, *Cancer Res.*, 55 (8): 1717-22 (1995), Sandhu JS, *Gene*, 150 (2): 409-10 (1994) 和Pedersen等人, *J. Mol. Biol.*, 235 (3): 959-73 (1994), 其中的每一文献以其整体并入此处作为参考。通常, 将构架区的构架残基用来自CDR供体抗体的相应残基取代, 优选地促进, 抗原的结合。用

本领域已知的技术来鉴定这些构架取代物,例如:通过 CDRs和构架残基的交互作用模式来鉴定对于抗原结合重要的构架残基,并且序列比对以鉴定在特定位置异常的构架残基。(参见,例如: Queen等人,美国专利号5,585,089;和Riechmann等人,1988,Nature, 332: 323,其以整体并入此处作为参考)。

[0155] 人源化的抗CD19抗体具有从非人源引入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,其一般获得自“输入”可变区。因此,人源化的抗体包含来自非人免疫球蛋白分子的一个或多个CDR和来自人的构架区。在本领域中已知抗体的人源化,并可按照Winter和其同事们的办法来操作(Jones等人,Nature,321:522-525 (1986);Riechmann等人,Nature,332:323-327 (1988);Verhoeyen等人,Science,239: 1534-1536 (1988)),通过将啮齿类的CDRs或 CDR序列替换为人抗体的相应序列,即CDR-替换(EP 239,400;PCT 公开号W0 91/09967;以及美国专利号4,816,567;6,331,415;5,225, 539; 5,530,101;5,585,089;6,548,640,其内容以其整体作为参考并入此处)。在该人源化嵌合抗体中,大体上少于一个完整的人可变结构域被非人类物种的相应序列所取代。实际上,人源化抗体是典型的人抗体,其中一些CDR残基和可能的一些FR残基被啮齿类的抗体在相似位点取代。抗 CD19抗体的人源化也可通过veenear或表面置换来实现(EP 592, 106; EP 519,596;Padlan,1991,Molecular Immunology 28 (4/5):489-498; Studnicka等人,Protein Engineering,7 (6):805-814 (1994);以及 Roguska等人,PNAS,91:969-973 (1994))或链替换(美国专利号 5,565,332),其内容以其整体并入此处作为参考。

[0156] 用于制备人源化抗体的人类可变区(包括轻链和重链)的选择,是为了减少抗原性。按照所谓的“最佳配合”方法,将啮齿类抗体的可变区序列从已知的人可变区序列的全文库中筛选出来。然后,将接近于啮齿类序列的人类序列作为用于人源化抗体的人类构架(Sims等人, J. Immunol,151:2296 (1993);Chothia等人,J.Mol.Biol,196:901 (1987),其内容以其整体并入此处作为参考)。另一个方法使用来自特定亚类的轻链或重链的所有人类抗体的共有序列的特定构架。同样的构架可用于几个不同的人源化抗CD19抗体(Carter等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285 (1992);Vresta等人,J. Immunol, 151:2623 (1993),其内容以其整体并入此处作为参考)。

[0157] 抗CD19抗体可被人源化,使其保持对CD19的高亲合力以及其它良好的生物学特性。根据本发明的一方面,通过用亲代和人源化的序列的三维模型分析亲代序列和各种概念上的人源化产物的过程,来制备人源化的抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可获得的,并且是本领域技术人员所熟知的。可用计算机程序图解和显示选取的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构。查看这些显示可分析出残基在候选免疫球蛋白序列的功能中起的可能作用,即:分析影响候选免疫球蛋白结合CD19的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选择并结合FR残基,以便获得需要的抗体特征,例如对CD19的增加的亲合力。通常,CDR残基直接并很大程度上参与影响对抗原的结合。

[0158] “人源化”的抗体保持与原抗体相似的抗原特异性,即:在本发明中,结合人CD19抗原的能力。然而,利用某种人源化的方法,使用“定向进化”方法,可增加抗体结合人CD19抗原的亲合力和/或特异性,所述“定向进化”方法如Wu等人,J.Mol.Biol,294:151 (1999),其中的每一文献以其整体并入此处作为参考。

[0159] 5.1.7人的抗体

[0160] 为了在人的体内使用抗体,可优选使用人的抗体。为了治疗人类对象,特别需要完整的人抗体。可以用本领域已知的各种方法制备人的抗体,这些方法包括上文提到的利用获得自人免疫球蛋白序列的抗体库的噬菌体展示技术,包括对这些技术的改进。同时参见,美国专利号 4,444,887 和 4,716,111; 和 PCT 公开文本 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 和 WO 91/10741, 其中的每一文献以其整体并入此处作为参考。人的抗体也可以是这样的抗体,其用获得自一个或多个类人 DNA 来源的核苷酸序列所编码的重链和轻链。

[0161] 也可用不能表达功能性内源免疫球蛋白,但能表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备人抗 CD19 抗体。例如:可将人重链和轻链免疫蛋白基因复合体随机或通过同源重组到小鼠的胚胎干细胞中。选择性地,除了人重链和轻链基因外,可将人可变区、恒定区和差异区导入小鼠的胚胎干细胞中。通过同源重组在位点导入人免疫球蛋白后,小鼠的重链和轻链免疫球蛋白基因可能会分别或同时表现为无功能。例如:已经描述了,将嵌合的和种系突变的小鼠的抗体的重链连接区 (JH) 基因进行同源缺失,导致对内源抗体产生的完全抑制。将改变的胚胎干细胞扩增并微注射入胚泡来制备嵌合小鼠。然后使嵌合小鼠繁殖,产生出表达人抗体的纯合后代。以通常的方法用选择的抗原对转基因小鼠进行免疫,所述的抗原例如:本发明多肽的整体或一部分。可用传统的杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠中获得针对人 CD19 抗原的抗 CD19 抗体。转基因小鼠所有的人免疫球蛋白转基因在 B 细胞分化期进行了重排,后来又经历了类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术,可能制备出治疗上有用的 IgG、IgA、IgM 和 IgE 抗体,包括但不仅限于, IgG1 ( $\gamma$ 1) 和 IgG3。对用该技术制备人抗体的概述,参见 Lonberg 和 Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995))。对制备人抗体和人单克隆抗体的该技术和制备这样的抗体的技术方案的详细讨论,参见,例如:PCT 公开号 WO 98/24893, WO 96/34096 和 WO 96/33735; 以及美国专利号 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318 和 5,939,598, 其中的每一文献以其整体并入此处作为参考。另外,例如 Abgenix, Inc. (Freemont, CA) 和 Genpharm (San Jose, CA) 等公司可用上文所述的类似技术提供针对所选抗原的人抗体。对于在种系突变的小鼠中的人胚胎免疫球蛋白基因的转移的具体讨论,将导致抗原激发的人抗体的产生,参见,例如: Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits 等人, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann 等人, Year in Immunol., 7:33 (1993) 和 Duchosal 等人, Nature, 355:258 (1992)。

[0162] 也可从噬菌体展示文库中获得人抗体 (Hoogenboom 等人, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan 等人, Nature Biotech., 14:309 (1996))。噬菌体展示技术 (McCafferty 等人, Nature, 348:552-553 (1990)) 可用于由全部来自未免疫供体的免疫球蛋白可变 (V) 区的基因在体外生产人类抗体和抗体片段。根据这种方法,将在构架内的抗体 V 区基因克隆至丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因内,例如:M13 或 fd, 并且在噬菌体粒子表面上作为功能性抗体片段展示。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的一个单链 DNA 拷贝, 根据抗体功能特性作出的选择也会导致编码展示这些特性的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了 B 细胞的一些特性。可用各种形式进行噬菌体展示;对于其概述,参见,例如: Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)。V-基因片段的一些来源可用于噬菌

体展示。Clackson等人, *Nature*, 352:624-628 (1991) 从获得自未免疫小鼠脾的V基因的一个小型随机组合文库中分离出了多样的抗恶唑酮抗体。可构建来自未经免疫的人供体的V基因的全部组成部分, 并且可按照 Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 或 Griffith等人, *EMBO J.*, 12:725-734 (1993) 描述的方法彻底分离出针对各种抗原(包括自身抗原)的抗体。同时参见, 美国专利号5,565,332和5,573,905, 其中的每一文献以其整体并入此处作为参考。

[0163] 也可用体外活化的B细胞生产人抗体(参见, 美国专利5,567,610和5,229,275, 其中的每一文献以其整体并入此处作为参考)。也可用杂交瘤技术在体外生产人抗体, 例如, 但不仅限于, Roder等人描述的方法 (*Methods Enzymol.*, 121:140-167 (1986))。

[0164] 5.1.8 改变的/突变的抗体

[0165] 本发明的组成成分和方法中的抗CD19抗体可以是突变的抗体。如此处所用的, “抗体突变”或“改变的抗体”指抗CD19抗体的氨基酸序列变体, 其中抗CD19抗体的一个或多个氨基酸残基已被修饰。对抗CD19抗体氨基酸序列的改变, 包括: 为改善抗体对其抗原的亲合力或亲抗原性而对序列做的修饰, 和/或为改善效应子功能而对抗体Fc部分做的修饰。可对任何已知的抗CD19抗体或按此处描述所确定的抗CD19抗体进行修饰。这样改变的抗体必然与已知的抗CD19抗体具有小于100%的序列同一性或相似性。在优选的实施方案中, 改变的抗体具有与抗CD19抗体重链或轻链的可变区的氨基酸序列有至少25%、35%、45%、55%、65%或75%的同一性或相似性的氨基酸序列, 更优选至少80%, 更优选至少85%, 更优选90%, 最优选至少95%。在优选的实施方案中, 改变的抗体具有与抗CD19抗体的重链CDR1、CDR2或CDR3的氨基酸序列有至少25%、35%、45%、55%、65%或75%的同一性或相似性的氨基酸序列, 更优选至少80%, 更优选至少85%, 更优选至少90%, 最优选至少95%。在优选的实施方案中, 改变的抗体保持了人CD19的结合能力。在某些实施方案中, 本发明的抗CD抗体包含与SEQ ID NO:2(图5A)的氨基酸序列有大约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性的重链, 所述的SEQ ID NO:2(图5A)的氨基酸序列与HB12a重链所对应。在某些实施方案中, 本发明的抗CD19抗体包含与SEQ ID NO:4(图5B)的氨基酸序列有大约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性的重链, 所述的SEQ ID NO:4(图5B)的氨基酸序列与HB12b重链所对应。在某些实施方案中, 本发明的抗CD19抗体包含与SEQ ID NO:16(图6A)的氨基酸序列有大约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性的轻链, 所述的SEQ ID NO:16(图6A)的氨基酸序列与HB12a重链所对应。在某些实施方案中, 本发明的抗CD19抗体包含与SEQ ID NO:18(图6B)的氨基酸序列有大约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的同一性的轻链, 所述的SEQ ID NO:16(图6A)的氨基酸序列与HB12b重链所对应。产生HB12a和HB12b抗CD19抗体的杂交瘤于2005年2月11日分别以ATCC保藏号PTA-6580和PTA-6581保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC, 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209, 美国)。

[0166] 对于该序列的同一性或相似性在此处定义为: 在进行序列比对并引入缺口之后, 在候选序列中与与抗CD19抗体残基相同(即相同的残基)或相似(即基于通常的侧链特性, 来自同组的氨基酸残基, 见下文)的氨基酸残基所占的百分比, 如果需要, 得到最大百分比

的序列同一性。不认为N-末端,C-末端或内部的扩展、删除或向可变区外的抗体序列中的插入影响了序列的同一性或相似性。

[0167] 本领域中已知的“%同一性”，是两个多核苷酸或两个多肽之间关系的量度，通过比较它们的序列来确定。通常，要比较的两个序列应排列为序列之间获得最大关联。测定两个序列的排列，确定两个序列之间相对应的氨基酸或核苷酸的准确数目，用排列的总长度除以该数目，并乘以100，就得到了同一性的%值。该同一性的%值可由相比较的序列的全长来确定，其尤其适合于相同或非常相似长度的序列，以及高度同源的序列，或可由更短定义的长度来确定，其更适合于不等长度的序列或具有较低同源性的序列。

[0168] 例如：可用Unix操作系统下的clustalw软件来排列序列，产生以“.aln”为扩展名的文件，将这个文件导入Bioedit程序(Hall, T.A. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98)，用它打开这个.aln文件。在Bioedit视窗中，可选择单独的序列(每次两个)，并排列它们。用此方法比较整个序列。

[0169] 在本领域中已知比较两个或多个序列的同一性的方法。例如：Wisconsin序列分析程序包9.1版(Devereux J.等人, Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984, 获得自 Genetics Computer Group, Madison, WI, USA)提供了程序。可使用数学算法来完成两个序列之间同一性百分比的测定。例如：可使用BESTFIT和GAP程序来测定两个多核苷酸之间的%同一性和两个多肽序列之间的%同一性。BESTFIT使用Smith和 Waterman (Advances in Applied Mathematics, 2:482-489, 1981)的“局部同源性”算法，并找到两个序列之间相似性最好的单区。BESTFIT更适合比较长度不同的两个多核苷酸或两个多肽序列，该程序假定较短序列代表了较长序列的一部分。相比较，GAP根据Needleman和Wunsch (J. Mol. Biol., 48:443-354, 1970)的算法，排列发现“最大相似性”的两个序列。GAP更适合于比较大大概相同长度的序列，以及想要对全长进行的排列。在每个程序中使用的参数“Gap权重”和“长度权重”分别优选为：对于多核苷酸是50和3，对于多肽是12和4。优选当被比较的两个序列为最佳排列时，测定%同一性和相似性。

[0170] 在本领域中也已知测定序列之间同一性和/或相似性的其他程序，例如BLAST类的程序(Karlin&Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 如Karlin& Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877所改进，获得自国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCB), Bethesda, MD, USA，并通过NCBI的主页[WWW.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)进入)。这些程序示范了用于比较两个序列的优选的数学算法的非限制性例子。将这种算法代入Altschul等人, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410的NBLAST和XBLAST程序。可用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索，得分=100，词长=12，以获得与编码本发明抗CD19抗体的全部或一部分的核酸分子同源的核苷酸序列。可用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索，得分=50，词长=3，以获得与本发明蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得缺口的排列用于比较的目的，可使用Altschul等人, 1997, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402所描述的Gapped BLAST。选择性地，可使用PSI-Blast进行重复搜索，测定分子(Id.)之间的距离关系。当使用BLAST、Gapped BLAST、PSI-Blast程序时，可使用各自程序(例如：XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见，<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。另一个用于比较序列的数学算法的优选的非限制性例子是Myers

和Miller,1988,CABIOS 4: 11-17的算法。将这种算法导入ALIGN程序(2.0版),所述程序是GCG 序列比对软件包的一部分。当将ALIGN程序用于比较氨基酸序列时, 使用PAM120权重残基表,缺口长度扣分12,缺口扣分4。

[0171] 本领域中已知的测定序列之间同一性和/或相似性的程序的另一个 非限制性例子是FASTA (Pearson W.R. 和Lipman DJ., Proc.Nat.Acad.Sci. USA,85:2444-2448,1988, 作为Wisconsin序列分析软件包的部分获 得)。优选将BLOSUM62氨基酸取代矩阵 (Henikoff S. 和HenikoffJ.G., Proc.Nat.Acad.Sci.USA,89:10915-10919,1992) 用于多肽序列比较, 所述多肽序列比较包括在比较前首先将核苷酸序列转换为氨基酸序列。

[0172] 本领域中已知的测定氨基酸序列之间的同一性和/或相似性的程序 的另一个非限制性例子是SeqWeb软件(一个基于网页界面的GCG Wisconsin软件包:Gap程序),其使用程序的缺省算法和参数设置: blosum62,缺口权重8,长度权重2。

[0173] 可用类似于上述方法的方法来测定两个序列之间的同一性百分比, 有或没有容许的缺口。在计算同一性百分比时,一般计算精确匹配。

[0174] 根据本发明的多核苷酸或多肽序列优选使用程序BESTFIT测定查 询的多核苷酸或多肽序列的%同一性,查询和对照的序列处于最佳排列, 程序参数设在缺省值。

[0175] 为产生改变的抗体,将一个或多个氨基酸改变(例如:取代) 导入 一个或多个物种依赖性抗体的高变区。选择性地,或另外,将构架区残 基的一个或多个改变(例如:取代) 导入抗CD19抗体,其导致抗体突 变体对于来自第二个哺乳动物物种的抗原的结合亲合力得到改善。要改 变的构架区残基的例子包括那些直接非共价结合的抗原 (Amit等人, Science,233:747-753(1986)) ;结合/影响CDR的构造 (Chothia等 人,J.Mol.Biol.,196: 901-917 (1987)) ;和/或参与VL-VH的分界 (EP239400B1)。在某些实施方案中,一个或多个这种构架区残基的改 变导致抗体对于来自第二个哺乳动物物种的抗原的结合亲合力的增强。例如:本发明的实施方案中可能有大约一个到大约五个构架残基改变。有时,这可能能够产生适合潜伏期试验使用的抗体突变物,甚至其没有 高变区残基被改变。然而,一般来说修改的抗体包含其它的高变区改变。

[0176] 改变的高变区残基可以是随机变化的,尤其其在抗CD19抗体对于 来自第二个哺乳动物物种的抗原的起始结合亲合力是这样的,以致随机 产生的改变的抗体可被轻易筛选出来。

[0177] 产生这种改变的抗体的一个有效方法被称作“丙氨酸扫描诱变” (“alanine scanning mutagenesis”) (Cunningham和Wells,Science, 244:1081-1085 (1989))。此处,用丙氨酸或聚丙氨酸残基取代一个 或多个高变区残基,以影响氨基酸与来自第二个哺乳动物物种的抗原的 交互作用。然后,通过在取代位点或针对取代位点导入附加的或其他的突变来改进对取代物表现出功能灵敏性的高变区残基。因此,当预先确 定了导入氨基酸序列改变的位点时,突变体的性质就不必预先确定了。按照此处所描述的,根据其生物活性来筛选用这种方法生产的Ala-突变 体。

[0178] 产生这种改变抗体的另一种方法涉及使用噬菌体展示的亲合力熟 化(Hawkins等人,J.Mol.Biol.,254:889-896 (1992) 和Lowman等人, Biochemistry,30 (45) :10832-10837 (1991))。简单地说,突变几 个高变区位点(例如:6-7个位点),在每个位点上产生所有可能的氨 基酸取代物。将这样产生的抗体突变体以单价形式来自丝状噬菌体粒子 中,在每个

粒子内部作为与M13包装的基因III产物的融合物展示出来。按照此处所公开的,再根据其生物活性(例如:结合亲合力)来筛选噬菌体展示的突变体。

[0179] 抗体序列的突变可包括取代、缺失,包括内部缺失、添加,包括产生融合蛋白的添加,或氨基酸序列内部和/或靠近氨基酸序列的氨基酸残基保守取代,但其导致“沉默”改变,其中改变产生功能上等效的抗CD19抗体。可基于涉及的残基的极性、电荷、可溶性、疏水性、亲水性和/或两性分子的性质来制备保守的氨基酸取代物。例如:非极性的(疏水的)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;极性的中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺;带正电的(基本)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸;带负电的(酸式)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。另外,甘氨酸和脯氨酸是能影响链定位的残基。非保守取代要求用这些种类之一的物质交换另一种类的物质。此外,如果需要的话,可将非经典氨基酸或化学的氨基酸的类似物作为取代物导入或加入抗体序列中。非经典的氨基酸包括,但不仅限于,常见氨基酸的D-异构体、 $\alpha$ -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、丁氨酸、2-氨基丁酸、 $\gamma$ -丁氨酸、 $\epsilon$ -氨基己酸、6-氨基己酸、 $\alpha$ -氨基异丁酸、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、碘丙氨酸、t-丁基甘氨酸、t-丁基丙氨酸、苯甘氨酸、环己基丙氨酸、 $\beta$ -丙氨酸、荧光-氨基酸、人工设计的氨基酸例如 $\beta$ -甲基氨基酸、Ca-甲基氨基酸、Na-甲基氨基酸和常见的氨基酸类似物。

[0180] 在另一种实施方案中,选择的用于改变的位点是用噬菌体展示达到亲合力成熟(参见上文)。

[0181] 可用本领域已知的任何诱变技术来改变DNA序列中的单个核苷酸,为了制备在抗体序列内的氨基酸取代物,或为了创造/除去限制性位点以促进更多的诱变。这样的技术包括,但不限于,化学诱变、体外定位诱变(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 488 (1985); Hutchinson, C. 等人, J. Biol. Chem., 253: 6551 (1978)),寡聚核苷酸-定向诱变(Smith, Ann. Rev. Genet., 19: 423-463 (1985); Hill 等人, Methods Enzymol., 155: 558-568 (1987)),基于PCR的重叠扩展(Ho 等人, Gene, 77: 51-59 (1989)),基于PCR的大引物诱变(Sarkar 等人, Biotechniques, 8: 404-407 (1990))等。可用双链的双脱氧DNA测序来确定改变。

[0182] 在本发明的某些实施方案中,可改变抗CD19抗体来产生融合蛋白;即抗体,或融合到异性蛋白、多肽或肽的片段。在某些实施方案中,融合到抗CD19抗体的部分的蛋白是ADEPT的酶成分。可作为与抗CD19抗体融合的蛋白使用的其它蛋白或多肽的例子包括,但不仅限于,毒素例如蓖麻毒、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶、DNase I、葡萄球菌的肠毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白质、多花白树抑制剂(gelonin)、白喉毒素毒素、假单胞菌属外毒素和假单胞菌属内毒素。参见,例如:Pastan等人, Cell, 47: 641 (1986) 和Goldenberg等人, Cancer Journal for Clinicians, 44: 43 (1994)。可使用的酶促的活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合的活性片段、外毒素A链(来自绿脓杆菌)、蓖麻毒A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ -吊曲菌素、油桐蛋白、茜素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII 和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、sapaonaria药用抑制剂、多花白树抑制剂(gelonin)、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和tricothecenes。参见,例如:1993年10月28日公开的WO 93/21232。

[0183] 可通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(共同被称作“DNA改组”的方法产生附加的融合蛋白。可用DNA改组来改变SYNAGIS®或其片段(例如:具较高亲合力和较低离解率的抗体或其片段)的活性。参见,一般来说,美国专利号5,605,793;5,811,238;5,830,721;5,834,252和5,837,458,以及Patten等人,1997,Curr.Opinion Biotechnol.,8:724-33;Harayama,1998,Trends Biotechnol.16(2):76-82;Hansson等人,1999,J.Mol.Biol.,287:265-76;以及Lorenzo 和Blasco,1998,Biotechniques 24(2):308-313(所述每个专利和出版物以其整体并入此处作为参考)。如Ledbetter等人的美国公开号20030118592,美国公开号200330133939和PCT公开号W0 02/056910所述,抗体可进一步是结合结构域免疫球蛋白融合的蛋白,所述参考文献以其整体并入此处作为参考。

[0184] 5.1.9结构域抗体

[0185] 本发明的组合物和方法中的抗CD19抗体可以是结构域抗体,例如:包含小的功能性结合单元的抗体,其对应于人抗体重链(VH)或轻链(VL)的可变区。结构域抗体的例子包括,但不仅限于,由Domantis 有限公司(Cambridge,UK) 和Domantis公司(Cambridge,MA,USA) 提供的,特异于治疗靶标的结构域抗体(参见,例如W004/058821; W004/003019;美国专利号6,291,158;6,582,915;6,696,245和6,593,081)。可用商业上可提供的结构域抗体库来识别抗CD19结构域的抗体。在某些实施方案中,本发明的抗CD19抗体包含一个CD19功能性结合单元 和一个Fc  $\gamma$  受体功能性结合单元。

[0186] 5.1.10双抗体

[0187] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在相同的多肽链(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>)中与轻链可变域(V<sub>L</sub>)相连的重链可变域(V<sub>H</sub>)。通过使用短到不允许在相同链上的两个结构域之间配对的连接物,使结构域与另一个链的互补结构域相配对,并创造出两个抗原结合位点。对于完全体的更全面描述在,例如EP 404,097;W0 93/11161; 和 Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sd.USA,90:6444-6448(1993)中。

[0188] 5.1.11疫苗体(vaccibody)

[0189] 在本发明的某些实施方案中,抗CD19抗体为疫苗体。疫苗体为二聚多肽。疫苗体的每个单体由通过绞链区和C  $\gamma$  3结构域与第二个scFv 连接的对于APC表面分子具有特异性的scFv组成。在本发明的其它实施方案中,包含scFv的抗CD19抗体片段之一的疫苗体可用于将那些有待毁坏的B细胞与介导ADCC的效应细胞并列起来。例如:参见,Bogen 等人,美国专利申请公开号20040253238。

[0190] 5.1.12线性抗体

[0191] 在本发明的某些实施方案中,抗CD19抗体是线性抗体。线性抗体包含一对串联的Fd片段(V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>),它们形成了一对抗原结合区。线性抗体可为双特异性的或单特异性的。参见,Zapata等人,Protein Eng.,8(10):1057-1062(1995)。

[0192] 5.1.13亲代抗体

[0193] 在本发明的某些实施方案中,抗CD19抗体是亲代抗体。“亲代抗体”指与此处所公开的改变的/突变的抗体相比,包含在其一个或多个高变区内或靠近其一个或多个高变区处缺乏或缺少一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列的抗体。因此,如此处所公开的,亲代抗体与相应的抗体突变体高变区相比,具有更短的高变区。亲代多肽可包含天然序列(即

天然存在的)抗体(包括天然存在的等位变体)或预先存在氨基酸序列 改变的天然存在序列的抗体(例如其它的添加、缺失和/或取代)。亲代 抗体优选是人源化的抗体或人抗体。

[0194] 5.1.14抗体片段

[0195] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,一般具有其抗原结合或可变 区。抗体片段的例子包括由抗体片段形成的Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv 片段;完全体;线性抗体;单链抗体分子和多特异性抗体。

[0196] 传统上,经由对完整抗体的溶解蛋白消化,得到这些片段。(参见, 例如:Morimoto 等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992) 和 Brennan等人,Science,229:81 (1985))。但是,现在可以 直接通过重组宿主细胞生产这些片段。例如:可从上文 所述的抗体噬菌体文库分离出抗体片段。选择性地,可直接从E.coli 回 收Fab'-SH片段,并进行化学连接形成F(ab')<sub>2</sub>片段(Carter等人, Bio/Technology,10: 163-167 (1992))。按照另一个方法,可从重组 宿主细胞培养基中直接分离出F(ab')<sub>2</sub>片段。产生抗体片段的其它技术 对熟练的医生来说是显而易见的。在其它的实施方案中,选择的抗体为 单链Fv片段 (scFv)。参见,例如:W0 93/16185。在某些实施方案中, 抗体不是Fab片段。

[0197] 5.1.15双特异性抗体

[0198] 双特异性抗体是对至少两个不同的表位具有结合特异性的抗体。典 型的双特异性抗体可结合到B细胞表面标记的两个不同表位上。其它这 样的抗体可结合第一个B细胞标记,再结合第二个B细胞表面标记。选 择性地,抗B细胞标记结合臂可与在白血球,例如T 细胞受体分子(例 如CD2或CD3)或IgG的Fc受体(Fc  $\gamma$  R)上结合了引发分子的臂相 结合,以便将细胞的防卫机理集中在B细胞上。也可用双特异性抗体将 细胞毒素试剂定位于B细胞上。这些抗体具有B细胞标记结合臂和结合 细胞毒素(例如:肥皂草素(saporin)、抗干扰素-\*、长春花碱、蓖麻 毒A链、methola-exate或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性抗 体制备成全长抗体或抗体片段(例如:F(ab') :双特异性抗体)。

[0199] 在本领域已知制备双特异性抗体的方法。(参见, 例如:Millstein 等人,Nature, 305:537-539 (1983) ;Traunecker等人,EMBO J.,10: 3655-3659 (1991) ;Suresh等人, Methods in Enzymology,121:210 (1986) ; Kostelny等人,J.Immunol,148 (5) :1547-1553 (1992) ;Hollinger 等人,Proc.NatlAcad.Sci.USA,90:6444-6448 (1993) ;Gruber等人, J.Immunol.,152:5368 (1994) ;美国专利号4,474,893;4,714,681; 4,925,648;5,573,920; 5,601,81;95,731,168;4,676,980和4,676,980; WO 94/04690;WO 91/00360;WO 92/ 200373;WO 93/17715;WO 92/08802 和EP 03089。)

[0200] 在本发明的某些实施方案中,组合物和方法不包含对人的CD19和 T细胞受体的 CD3 $\epsilon$ 链具有特异性的双特异性鼠科抗体,例如Daniel 等人,Blood,92:4750-4757 (1998) 所描述的双特异性抗体。在优 选 的实施方案中,本发明的组合物和方法中的抗CD19抗体为双 特异性抗 体,抗CD19抗体为人的或人源化的,并对于人CD19和在T细胞上的 表位具有特异 性,或能够结合到人的效应细胞,例如,单核细胞/巨噬细 胞和/或影响细胞死亡的自然杀 伤细胞。

[0201] 5.1.16工程化效应子的功能

[0202] 可根据效应子的功能改变本发明的抗CD19抗体,以增强抗体在治 疗例如B细胞恶

性肿瘤中的作用。例如:可将半胱氨酸残基导入Fc区,从而使此区中形成链间的二硫键。如此产生的同型二聚抗体可改善内化作用能力和/或增加补体介导的细胞杀伤和/或抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。参见,Caron等人,J.Exp Med.,176:1191-1195(1992)和Shopes,B.,J.Immunol.,148:2918-2922(1992)。也可用Wolff等人,Cancer Research,53:2560-2565(1993)描述的异双功能交联来制备具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚抗体。选择性地,可将抗体设计成具有双Fc区,从而增强了补体溶解和ADCC的能力。参见,Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design,3:219-230(1989)。

[0203] 在本领域已知设计抗体Fc区,以使其改变效应子功能的其它方法(例如:Koenig等人,美国专利公开号20040185045和PCT公开号W0 2004/016750,其描述了改变Fc区,从而与对Fc $\gamma$  RIIA的结合亲合力相比,增强了对Fc $\gamma$  RIIB的结合亲合力;也参见,Armour等人,PCT公开号W0 99/58572,Idusogie等人,W0 99/51642和Deo等人,U.S.6,395,272;所述参考文献的内容以其整体并入此处)。在本领域也已知改变Fc区以降低对于Fc $\gamma$  RIIB的结合亲合力的方法(例如:Ravetch等人,美国专利公开号20010036459和PCT公开号W0 01/79299,所述参考文献以其整体并入此处)。也描述了与野生型Fc区相比,对于Fc $\gamma$  RIIIA和/或Fc $\gamma$  RIIA具有增强的结合亲合力的变体Fc区的修饰抗体(例如:Stavenhagen等人,PCT公开号W0 2004/063351,所述参考文献以其整体并入此处)。

[0204] 可用本领域已知的体外检验来测定在本发明的组合物和方法中使用的抗CD19抗体是否能够调节ADCC,如5.3.2节所述。

[0205] 5.1.17变体Fc区

[0206] 本发明提供包含改变的Fc区的蛋白的配方。即非自然存在的Fc区,例如包含一个或多个非自然存在的氨基酸残基的Fc区。本发明的改变的Fc区也包括含有氨基酸缺失、添加和/或改变的Fc区。

[0207] 已知此处所用的Fc区包括含有除第一恒定区免疫球蛋白结构域之外的抗体恒定区的多肽。因此Fc指IgA、IgD和IgG的前两个恒定区免疫球蛋白结构域,IgE和IgM的前三个恒定区免疫球蛋白结构域,以及这些结构域的可变形的铰链N-末端。对于IgA和IgM,Fc可包括J链。对于IgG,Fc包含免疫球蛋白结构域Cgamma2和Cgamma3(C $\gamma$  2和C $\gamma$  3)以及Cgamma1(C $\gamma$  1)和Cgamma2(C $\gamma$  2)之间的铰链。虽然Fc区的边界可发生改变,但是通常将人IgG重链Fc区定义为在其羧基末端包含残基C226或P230,其数目是根据Kabat等人(1991,NIH Publication 91-3242,National Technical Information Service, Springfield, VA)的EU索引。“Kabat提出的EU索引”指上述Kabat等人所描述的人IgG1EU抗体的残基数目。Fc可指分离的这个区或抗体、抗体片段或Fc融合蛋白范围内的这个区。Fc变体蛋白可以是包含Fc区的抗体、Fc融合体或任何蛋白或蛋白结构域。尤其优选包含变体Fc区的蛋白,它是非自然存在的Fc变体。注意:在Fc位点的数目观察到多态性,其包括但不仅限于Kabat 270,272,312,315,356和358,因此在这些序列和现有技术中的序列之间可能存在细微差异。

[0208] 本发明包括Fc变体蛋白质,其相对于可比较的分子(例如除了具有野生型Fc区外,具有相同氨基酸序列的蛋白)而言,对于Fc配体(例如Fc受体、C1q)而言具有改变了的结合特性。结合特性的例子包括,但不仅限于,结合特异性、平衡电离常数(KD)、分解和结合率(分别为Koff和Kon)、结合亲合力和/或活性。一般认为,相对于具有高KD的结合分子

(例如:Fc变体蛋白质,例如抗体),优选具有低KD的结合分子。然而,在有些情况下kon或koff的值可能比KD的值更相关。本领域技术人员可以确定哪个动力参数对于给定的抗体应用是最主要的。

[0209] Fc区对于其配体的亲合力和结合性质,可通过各种本领域已知用于测定Fc-Fc $\gamma$ R相互作用的体外测定方法(以生物化学或免疫学为基础的试验)来测定,即Fc区与Fc $\gamma$ R的特异性结合,包括但不仅限于,平衡法(例如:酶联免疫吸附测定(ELISA),或放射免疫测定(RIA),或动力学(例如:BIACORE<sup>®</sup>分析)及其它方法例如间接结合测定、竞争性抑制测定、荧光共振能量传递(FRET)、凝胶电泳和色谱法(例如:凝胶过滤)。这些和其它方法可用在一个或多个组分上的标记检测和/或使用各种检测方法,包括但不仅限于发色的、荧光的、发冷光的或各向同性的标记物。结合亲合力和动力学的详细描述可参见Paul,W.E.,ed.,Fundamental Immunology,4th Ed.,Lippincott-Raven,Philadelphia (1999),其集中于抗体-免疫原相互作用。

[0210] 在一种实施方案中,相对于可比较的分子,Fc变体蛋白提高了结合一个或多个Fc配体的能力。在另一种实施方案中,Fc变体蛋白具有与可比较的分子对于Fc配体的亲合力相比至少2倍,或至少3倍,或至少5倍,或至少7倍,或至少10倍,或至少20倍,或至少30倍,或至少40倍,或至少50倍,或至少60倍,或至少70倍,或至少80倍,或至少90倍,或至少100倍,或至少200倍的对于Fc配体的亲合力。在特定的实施方案中,Fc变体蛋白提高了结合Fc受体的能力。在另一个特定的实施方案中,Fc变体蛋白质提高了结合Fc受体FcRn的能力。在另一个特定的实施方案中,Fc变体蛋白质相对于可比较的分子提高了结合C1q的能力。

[0211] 可通过增加Fc区对FcRn的结合亲合力来延长包含Fc区的蛋白的血清半寿期。在一种实施方案中,相对于可比较的分子,延长了Fc变体蛋白的血清半寿期。

[0212] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用”或“ADCC”指细胞毒性使这些细胞毒素的效应细胞特异地结合到抗原产生靶细胞上,并最终用细胞毒素杀死靶细胞,所述细胞毒性分泌的Ig与某种细胞毒素细胞(例如:自然杀伤(NK)细胞、嗜中性细胞和巨噬细胞)呈现的Fc受体(FcRs)相结合。特异性的高亲合力IgG抗体指向“装备”细胞毒素细胞的靶细胞的表面,并绝对需要这样的杀伤。靶细胞的溶解在细胞外,要求指向细胞-到-细胞的接触,并不涉及补体。可以认为,除抗体之外,包含Fc区的其它蛋白,特别地是具有特异结合到抗原产生靶细胞能力的Fc融合蛋白,将能影响细胞介导的细胞毒性。简而言之,由Fc融合蛋白的活性引起的细胞介导的细胞毒性也指此处的ADCC活性。

[0213] 测定了任何特定的Fc变体蛋白通过ADCC介导靶细胞的溶解的能力。为了测定ADCC活性,将研究的Fc变体蛋白加入与免疫效应细胞结合的靶细胞中,其可用抗原抗体复合物来活化而引起靶细胞的细胞溶解。通过从溶解细胞中除去标记(例如:放射性底物、荧光染料或天然胞内蛋白)大体地检验细胞溶解。对这样的检验有用的效应细胞包括外周血液单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。体外ADCC检验的具体例子在Wisecarver等人,1985,79:277-282;Bruggemann等人,1987,J Exp Med 166:1351-1361;Wilkinson等人,2001,J Immunol Methods 258:183-191;Patel等人,1995,J Immunol Methods 184:29-38。替代地或补充地,研究的Fc变体蛋白的ADCC活性可在体内测定,例如:在动物模型例如Clynes等人,1998,PNAS USA 95:652-656所公开的动物模型中。

[0214] 在一种实施方案中,相对于可比较的分子,Fc变体蛋白质具有增强的ADCC活性。

在一种实施方案中,Fc变体蛋白具有与可比较的分子相比至少2倍、或至少3倍、或至少5倍或至少10倍或至少50倍或至少100倍的ADCC活性。在另一个特定的实施方案中,Fc变体蛋白相对于可比较的分子,具有对于Fc受体Fc $\gamma$ RIIIA的增强的结合能力,并具有增强的ADCC活性。在其它的实施方案中,Fc变体蛋白相对于可比较的分子,具有增强的ADCC活性,并具有延长的血清半寿期。

[0215] “补体依赖性的细胞毒性”和“CDC”指在补体存在下靶细胞的细胞溶解。通过补体系统的第一组分(C1q)结合到分子上,如抗体与同源抗原结合,来起始补体激活途径。要测定补体激活,可实施CDC检测,例如Gazzano-Santoro等人,1996,J. Immunol. Methods, 202:163的描述。在一种实施方案中,相对于可比较的分子,Fc变体蛋白具有增强的CDC活性。在一种实施方案中,Fc变体蛋白具有与可比较的分子相比至少2倍、或至少3倍、或至少5倍或至少10倍或至少50倍或至少100倍的CDC活性。在其它的实施例中,相对于可比较的分子,Fc变体蛋白具有增强的CDC活性和延长的血清半寿期。

[0216] 在一种实施方案中,本发明提供了一种剂型,其中Fc区包含在由按照Kabat提出的EU索引编号得到的234,235,236,239,240,241,243,244,245,247,252,254,256,262,263,264,265,266,267,269,296,297,298,299,313,325,326,327,328,329,330,332,333,和334所组成的组中选出的一个或多个位点上非天然存在的氨基酸残基。任意地,Fc区可包含本领域技术人员已知的,在添加和/或取代位点的非天然产生的氨基酸残基(参见,例如:美国专利5,624,821;6,277,375;6,737,056;PCT专利公开文本WO 01/58957;WO 02/06919;WO 04/016750;WO 04/029207;WO 04/035752和WO 05/040217)。

[0217] 在一种实施方案中,本发明提供了Fc变体蛋白的剂型,其中Fc区包含在由按照Kabat提出的EU索引编号得到的234D,234E,234N,234Q5,234T,234H,234Y,234I,234V,234F,235A,235D,235R,235W,235P,235S,235N,235Q,235T,235H,235Y,235I,235V,235F,236E,239D,239E,239N,239Q,239F,239T,239H,239Y,240I,240A,240T,240M,241W,241L,241Y,241E,241R,243W,243L,243Y,243R,243Q,244H,245A,247V,247G,252Y,254T,256E,262I,262A,262T,262E,263I,263A,263T,263M,264L,264I,264W,264T,264R,264F,264M,264Y,264E,265G,265N,265Q,265Y,265F,265V,265I,265L,265H,265T,266I,266A,266T,266M,267Q,267L,269H,269Y,269F,269R,296E,296Q,296D,296N,296S,296T,296L,296I,296H,269G,297S,297D,297E,298H,298I,298T,298F,299I,299L,299A,299S,299V,299H,299F,299E,313F,325Q,325L,325I,325D,325E,325A,325T,325V,325H,327G,327W,327N,327L,328S,328M,328D,328E,328N,328Q,328F,328I,328V,328T,328H,328A,329F,329H,329Q,330K,330G,330T,330C,330L,330Y,330V,330I,330F,330R,330H,332D,332S,332W,332F,332E,332N,332Q,332T,332H,332Y和332A所组成的组中选出的至少一个非天然存在的氨基酸残基。任意地,Fc区可包含添加的和/或取代的本领域技术人员已知的非天然存在的氨基酸残基(参见,例如:美国专利5,624,821;6,277,375;6,737,056;PCT专利公开文本WO 01/58957;WO 02/06919;WO 04/016750;WO 04/029207;WO 04/035752和WO 05/040217)。

[0218] 在另一种实施方案中,本发明提供Fc变体蛋白质的剂型,其中Fc区包含在由按照Kabat提出的EU索引编号得到的239、330和332所组成的组中选出的至少一个非天然存在的氨基酸残基。在一个特定的实施方案中,本发明提供了一种Fc变体蛋白的剂型,其中Fc

区包含在由按照Kabat提出的EU索引编号得到的239D,330L和332E5所组成的组中选出的一个或多个位点上非天然存在的氨基酸。任选地,Fc区可进一步包含在由按照Kabat提出的EU索引编号得到的252、254和256所组成的组中选出的一个或多个位点上非天然存在的氨基酸。在特定的实施 方案中,本发明提供了一种Fc变体蛋白的剂型,其中Fc区包含在由按照Kabat提出的EU索引编号得到的239D,330L和332E5所组成的组中选出的至少一个非天然存在的氨基酸和在由按照Kabat提出的EU索 引编号得到的252Y,254T和256E所组成的组中选出的一个或多个位 点上非天然存在的氨基酸。

[0219] 在一种实施方案中,本发明的Fc变体可与其它已知的Fc变体结合,所述其它Fc变体例如在Ghetie等人,1997,Nat Biotech.15:637-40; Duncan等人,1988,Nature 332: 563-564;Lund等人,1991,J. Immunol 147:2657-2662;Lund等人,1992,Mol Immunol 29: 53-59;Alegre等 人,1994,Transplantation 57:1537-1543;Hutchins等人,1995,Proc Natl. Acad Sci USA 92:11980-11984;Jefferis等人,1995,Immunol Lett.44: 111-117; Lund等人,1995,Faseb J 9:115-119;Jefferis等人,1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund等人,1996,J Immunol 157:4963-4969; Armour等人,1999,Eur J Immunol 29:2613-2624;Idusogie等人,2000, J Immunol 164:4178-4184;Reddy等人,2000,J Immunol 164: 1925-1933; Xu等人,2000,Cell Immunol 200:16-26;Idusogie等人,2001,J Immunol 166:2571-2575;Shields等人,2001,J Biol Chem 276:6591-6604;Jefferis 等人,2002, Immunol Lett 82:57-65;Presta等人,2002,Biochem Soc Trans 30:487-490;美国专利号 5,624,821;5,885,573;5,677,425; 6,165,745;6,277,375;5,869,046;6,121,022;5,624, 821;5,648,260; 6,528,624;6,194,551;6,737,056;6,821,505;6,277,375;美国专利公开号2004/0002587和PCT公开文本W0 94/29351;W0 99/58572;W0 00/42072;W0 02/060919; W0 04/029207;W0 04/099249;W0 04/063351 中所公开的Fc变体。本发明还包括含有缺失、添加和/或改变的Fc区。对Fc区进行的其它改变/取代/添加/缺失对本领域技术人员来说是显而 易见的。

[0220] 在本领域中已知产生非天然存在的Fc区的方法。例如:可通过诱 变方法产生氨基酸的取代和/或缺失,所述诱变方法包括但不仅限于,定 点诱变 (Kunkel, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492 (1985))、PCR诱变(Higuchi,在“PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications”,Academic Press, San Diego,pp.177-183 (1990) 中)和 盒式诱变 (Wells等人, Gene 34:315-323 (1985))。优选地,用重叠 -扩展PCR方法实施定点诱变(Higuchi,在“PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification”,Stockton Press,New York, pp.61-70 (1989) 中)。选择性地,可用重叠-扩展PCR技术(Higuchi, ibid)将任何想要的突变导入靶序列(起始DNA)。例如:重叠-扩展方 法的第一轮PCR包括用外部引物(引物1)和内部诱变引物(引物3) 扩增靶序列,分别使 用第二个外部引物(引物4)和内部引物(引物2), 得到两个PCR片段(片段A和B)。将内部诱 变引物(引物3)设计 为包含与指定想要突变的靶序列的错配。在第二轮PCR中,用两个外部引物(引物1和4)通过PCR扩增第一轮PCR的产物(片段A和B)。用限制酶消化产生的PCR全长 片段(片段C),并将产生的限制性片段 克隆到适当的载体中。作为诱变的第一步,将起始 DNA(例如:编码 Fc融合蛋白、抗体或仅仅一个Fc区)可实施地克隆到诱变载体中。将 引子设计成能反映想要的氨基酸取代。在本领域中已知产生变体Fc区 其它有用的方法(参见,

例如:美国专利号5,624,821;5,885,573; 5,677,425;6,165,745;6,277,375;5,869,046; 6,121,022;5,624,821; 5,648,260;6,528,624;6,194,551;6,737,056;6,821,505;6,277,375;美国专利公开号2004/0002587和PCT公开文本W0 94/29351;W0 99/58572;W0 00/42072;W0 02/060919;W0 04/029207;W0 04/099249; W0 04/063351)。

[0221] 在某些实施方案中,Fc变体蛋白包含一个或多个工程化的糖形,即 共价附着于包含Fc区的分子的碳水化合物组分。工程化的糖形可用于 各种用途,包括但不仅限于,增强或降低效应子的功能。可用本领域技术人员已知的任何方法生产工程化的糖形,例如通过工程化的或变体表达的菌株、通过与一种或多种酶的共表达,例如DIN-乙酰氨基葡萄糖转移酶III (GnTI11)、通过表达在各种有机体或来自各种有机体的细胞系中 包含Fc区的分子,或在包含Fc区的分子表达之后通过改变碳水化合物。在本领域中已知产生工程化的糖形的方法,包括但不仅限于在Umana 等人,1999,Nat.Biotechnol 17:176-180;Davies等人,20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields等人,2002,J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa等人,2003,J Biol Chem 278:3466-3473) 美国专利号6,602,684; U.S.Ser.No.10/277,370;U.S.Ser.No.10/113,929;PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1;PCT WO 02/311140A1;PCT WO 02/30954A1; Potillegent<sup>TM</sup> technology (Biowa, Inc.Princeton,N.J.);GlycoMAb<sup>TM</sup> glycosylation engineering technology (GLYCART biotechnology AG, Zurich,Switzerland) 中所描述的方法。参见,例如:W0 00061739; EA 01229125;US 20030115614;Okazaki等人,2004,JMB,336:1239-49。

#### [0222] 5.1.18抗体的糖基化

[0223] 在另一种实施方案中,改变了按照本发明使用的抗体糖基化。例如: 可制备糖基化的抗体(即缺乏糖基化的抗体)。可改变糖基化至,例如: 增加抗体对靶抗原的亲合力。这样的碳水化合物改变可伴随有,例如: 在抗体序列内部改变糖基化的一个或多个位点。例如:制备一个或多个 氨基酸取代物,导致一个或多个可变区构架糖基化位点的消除,从而除 去在该位点上的糖基化。这样的糖基化可以增加抗体对抗原的亲合力。在美国专利号 5,714,350和6,350,861中更详细地描述了该方法。选择性 地,可制备引起Fc区糖基化位点(例如:IgG的天门冬酰胺297)消除 的一个或多个氨基酸取代物。此外,可在缺乏必要的糖基化结构的细菌 细胞内制备糖基化的抗体。

[0224] 另外或选择性地,可制备具有糖基化变种的抗体,例如具有荧光残 基的量减少了的弱荧光抗体或具有增加了分叉GlcNAc结构的抗体。这样改变的糖基化模式已被证明能增强抗体的ADCC能力。这样的碳水化 合物改变可伴随有,例如:具有改变的糖基化结构的宿主细胞中表达抗 体。本领域中描述了具有改变的糖基化结构的细胞,并可将其用作表达本发明的重组体抗体从而产生具有改变糖基化的抗体的宿主细胞。参 见,例如:Shields, R.L.等人(2002) J.Biol.Chem.277:26733-26740; Umana等人(1999) Nat.Biotech.17:176-1,以及欧洲专利号EP 1,176,195; PCT公开文本W0 03/035835;W0 99/54342。

#### [0225] 5.2抗CD19抗体的大规模制备/生产

[0226] 一旦将想要的抗CD19抗体设计好了,就可用本领域已知的大规模 抗体制备的方法以工业规模生产抗CD19抗体。例如:可用重组表达体 系完成生产,所述的重组表达体系例如但不仅限于如下所述的体系。

#### [0227] 5.2.1重组表达体系

[0228] 本发明的抗体或其变体的重组表达,通常要求构建包含编码抗体的 多核苷酸的表达载体。一旦获得本发明的编码抗体分子或抗体重链或轻 链或其部分(优选,但不必要,包含重链或轻链的可变区)的多核苷酸, 可用本领域内已知的重组DNA技术产生用来制备抗体分子的载体。参 见,例如:美国专利号6,331,415,所述参考文献以其整体并入此处作为 参考。因此,此处描述了通过表达包含抗体编码核苷酸序列的多核苷酸 来制备蛋白的方法。可用本领域技术人员所熟知的方法,来构建包含抗 体编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括, 例如:体外重组DNA技术、合成技术和体内基因重组。因此,本发明 提供了包含与启动子可操作相连的编码本发明的抗体分子、抗体重链或 轻链、抗体或其部分的重链或轻链可变区,或重链或轻链CDR的核苷 酸序列的可复制的载体。这样的载体可包括编码抗体分子恒定区的核苷 酸序列(参见,例如:国际公开号WO 86/ 05807和WO 89/01036;以及 美国专利号5,122,464),并且可将抗体可变区克隆入表达整条 重链、整 条轻链或整条重链和轻链的载体中。

[0229] 在选择性的实施方案中,可用产生全部或部分抗CD19抗体的靶同 源复合物来制备本发明的组合物和方法的抗CD19抗体(参见,美国专利号6,063,630,6,187,305和6, 692,737)。在某些实施方案中,可用生 产全部或部分抗CD19抗体的随机重组技术来制备本 发明的组合物和方 法的抗CD19抗体(参见,美国专利号6,361,972,6,524,818,6,541,221 和6,623,958)。也可使用Cre-介导的位点特异性同源重组,在表达来自 包含改变的免疫球 蛋白位点的细胞的基因组序列的抗体的细胞中产生 抗CD19抗体(参见,美国专利号6,091, 001)。当想要生产人抗体时, 宿主细胞应为人类细胞系。可将这些方法方便地用于设计永 久表达抗体 分子的稳定的细胞系。

[0230] 一旦用常规方法将表达载体转化到宿主细胞中,然后就用生产本发 明抗体的常 规技术培养转化细胞。因此,本发明包括含有与启动子可操 作相连的编码本发明的抗体或 其片段,或其重链或轻链,或其部分,或 本发明单链抗体的多核苷酸的宿主细胞。在表达双 链抗体的优选的实施 方案中,可在表达整个免疫球蛋白分子的宿主细胞中共表达编码重 链和 轻链的载体,详述如下。

[0231] 可用各种宿主表达载体系统来表达可用于抗CD19抗体的制备生产 的本发明的抗 CD19抗体或其部分(参见,例如:美国专利号5,807,715)。例如:哺乳动物细胞,如中国仓鼠 卵巢细胞(CHO),与如来自人巨细 胞病毒的主要介导早期基因启动子元件的载体相连接, 这是抗体的有效 表达体系(Foecking等人, Gene, 45:101 (1986) 和Cockett等人, Bio/ Technology, 8:2 (1990))。另外,可选择调整插入的抗体序列 表达,或以想要的特定方式改 变和加工抗体基因产物的宿主细胞株。蛋白产物的这种修饰(例如糖基化)和加工(例如分 裂)对蛋白的功能来 说可能是重要的。不同的宿主细胞对于蛋白和基因产物的翻译前加工 和 修饰具有典型和特异的机制。可选择适当的细胞系或宿主系统,来确保 对于表达的抗 体或其部分的正确修饰和加工。为此,可使用具有对基因 产物的主要转录产物、糖基化和 磷酸化进行适当加工的细胞结构的真核 宿主细胞。这样的哺乳动物宿主细胞包括,但不仅 限于CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、 BT20和T47D、 NS0(不内源产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系) CRL7030以及HsS78Bst细胞。

[0232] 在优选的实施方案中,可用由永生化人类淋巴细胞发展而来的人类 细胞系重组 产生单克隆的人抗CD19抗体。在优选的实施方案中,可用 人类细胞系PER.C6. (Crucell, 荷

兰) 重组产生单克隆的人抗CD19抗 体。

[0233] 在细菌体系中,可按照表达的抗体分子的用途来方便地挑选许多表 达载体。例如:当要大量生产这种抗体时,可能需要使易于纯化的融合 蛋白产物高水平表达的载体。这样的载体包括,但不仅限于,E.coli表 达载体pUR278 (Ruther等人,EMBO,12:1791 (1983)),其中抗体 编码序列可在lacZ编码区框架内各自连接到载体中,从而生产了融合蛋 白;pIN载体 (Inouye&Inouye,1985,Nucleic Acids Res.13:3101-3109 (1985);Van Heeke&Schuster,1989,J.Biol.Chem.,24:5503-5509 (1989))等。也可用pGEX载体来以与谷胱甘肽5-转移酶 (GST) 的 融合蛋白的形式来表达外源多肽。通常,这样的融合蛋白是可溶的,并 可在用游离的谷光甘肽洗脱之后,通过吸附和结合于基质谷胱甘肽琼脂 珠来从 溶解细胞中容易地纯化出来。把pGEX载体设计成包括凝血酶或 因子Xa蛋白酶的裂解位点,以便从GST部分中释放出克隆的靶基因产 物。

[0234] 在昆虫系统中,把苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 用作表 达外源基因的载体。病毒在草地贪夜蛾细胞中生长。可将抗体编码序列 各自克隆到病毒的非必需区 (例如:多角体蛋白基因),并置于AcNPV 启动子的控制下 (例如:多角体蛋白启动子)。

[0235] 在哺乳动物宿主细胞中,可利用许多基于病毒的表达体系。如果把 腺病毒用作表 达载体,可将研究的抗体编码序列连接于腺病毒转录/翻译 的控制复合物,例如:晚期启动子和三联先导序列。然后可通过体外或 体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组。在病毒 基因组的非必需区 (例如E1或E3区) 的插入将产生可以并能够在受感染的宿主中表达抗 体分子的重组病毒 (例如:参见,Logan&Shenk,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:355-359 (1984))。插入的抗体编码序列的有效翻译也可能需要特 异的起始信号。这些信号包括ATG 起始密码子和连接序列。此外,通 常起始密码子与想要的编码序列的读码框同相,以确保 整个插入片段的 翻译。这些外源的翻译控制信号和起始密码子可有各种来源,天然的和 人工的皆可。可通过包含适当的转录增强元件、转录终止子等,来提高 表达的效率 (参见, 例如:Bittner等人,Methods in Enzymol,153:51-544 (1987))。

[0236] 为了长期、高产地产生重组蛋白,优选稳定地表达。例如:可设计 稳定表达抗体分子的细胞系。比用包含复制的病毒原点的复制表达载体 的短暂表达体系更好,可用适当的 表达控制元件 (例如:启动子、增强 子、序列、转录终止子、多聚腺苷酸位点等) 及可选的 标记来控制DNA 转化宿主细胞。通过导入DNA,可使工程细胞在浓缩培养基中生长1- 2天,然后将其转移到选择培养基中。在重组质粒中的选择性标记对选 择具有抗性,并允许细胞稳 定地将质粒整合到其染色体上,并生长成 focus,其依次能被克隆并扩增为细胞系。可用编 码抗CD19抗体的质粒 将基因/cDNA导入适合在培养基中产生的任何细胞系。选择性地,可 用 称为“靶载体”的质粒将表达控制元件 (例如:启动子、增强子等) 导 入宿主细胞内适当的 染色体位点,以“活化”抗CD19抗体的内源基因。

[0237] 可用许多选择系统,包括但不仅限于,单纯疱疹病毒胸苷激酶 (Wigler等人, Cell,11:223 (1977))、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基 转移酶 (Szybalska&Szybalski, Proc.Natl.Acad.ScL USA,48:202 (1992)) 和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 (Lowy等人,Cell, 22:8-17 (1980))基 因,可分别在tk<sup>-</sup>、hgprt<sup>-</sup>或aprT<sup>-</sup>细胞中使用。也可将抗代谢物抗性用 作 为选择下列基因的基础:具有对氨基蝶呤抗性的dhfr (Wigler等人,Natl. Acad.Sci.USA, 77:357 (1980);O'Hare等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78:1527 (1981));对霉酚酸有抗性

的gpt (Mulligan&Berg, Proc.Natl. Acad.Sci.USA, 78:2072 (1981)) ; 对氨基糖昔类G-418有抗性neo (Wu和Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann.Rev.Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993) 以及Morgan和Anderson, Ann.Rev.Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11 (5):155-215 (1993)) 以及对潮霉素有抗性的 hygro (Santerre等人, Gene, 30:147 (1984))。可将在重组DNA技术领域通常已知的方法常规地应用于挑选想要的重组克隆,并且对该方法的描述,例如:在Ausubel等人.(eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 以及 在第12和13章, Dracopoli等人 (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley&Sons, NY (1994); Colberre-Garapin等人, 1981, J.Mol.Biol., 150:1,所述参考文献以其整体并入此处作为参考。

[0238] 可通过载体扩增来提高抗体分子的表达水平(对于综述,参见: Bebbington和Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. Academic Press, New York (1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时,在宿主细胞培养基中抑制剂水平的增加将增加标记基因拷贝的数目。因为扩增区与抗体基因相连,抗体的产生也将增加 (Grouse等人, Mol.Cell.Biol, 3:257 (1983))。可通过使用重组蛋白生产领域的技术人员已知的重组方法和工具,包括围绕染色质改型技术提高以活化人工转录结构域的形式的转基因表达,来提高抗体的表达水平。

[0239] 可用本发明的两个表达载体共转染宿主细胞,第一个载体编码来自多肽的重链,第二个载体编码来自多肽的轻链。两个载体可以包含同样的选择性标记,该标记能平等地表达多肽的重链和轻链。选择性地,可以使用编码并能表达多肽的重链和轻链的单一载体。在这些位点上,把轻链放在重链之前以避免过量有毒的游离重链 (Proudfoot, Nature 322: 562-65 (1986) 和Kohler, 1980, Proc.Natl Acad.ScL USA, 77:2197 (1980))。重链和轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。

[0240] 当用重组表达产生本发明的抗体分子时,可用免疫球蛋白分子提纯领域中已知的任何方法纯化它,例如:用色谱法(例如:离子交换、亲合性,尤其是对蛋白A之后的特异性抗原的亲合性和涂料柱色谱法)、离心作用、差示可溶性或用任何其它提纯蛋白质的标准技术。此外,可将本发明的抗体或其片段融合到此处描述的或本领域已知的促进提纯的其它异种多肽序列。

[0241] 5.2.2抗体的提纯和分离

[0242] 当使用重组技术时,可在细胞内的胞质腔中产生抗体,或直接分泌到培养基中。如果在细胞内产生抗体,作为第一步,除去颗粒碎片,包括宿主细胞或细胞溶解片段,例如:通过离心作用或超滤法。Carter等人, Bio/Technology, 10:163-167 (1992) 描述了分离分泌到E.coli胞质腔中的抗体的步骤。简单地说,在醋酸钠 (pH3.5)、EDTA和苯甲磺酰氟 (PMSF) 存在的条件下溶解细胞糊超过30分钟。可用离心作用除去细胞碎片。当抗体突变体分泌到培养基中,通常将来自该表达体系的上清液首先用商业上可得到的蛋白浓缩过滤器,例如:Amicon或 Millipore Pellicon超滤单元。任何上述步骤都可使用蛋白酶抑制剂,例如PMSF来抑制蛋白水解作用,并可使用抗生素来抑制外来污染物的生长。

[0243] 可用例如羟磷灰石色谱法、疏水性相互作用色谱法、离子交换色谱 法、凝胶电泳、透渗析和/或亲和色谱法或单独或与其它的纯化步骤共同 使用来纯化从细胞中制备的抗体组合物。蛋白质A作为亲合性配体的适 用性取决于存在于抗体变体中的任何免疫球蛋白Fc区的种类和同种型。可使用蛋白质A来纯化基于人 $\gamma$ 1、 $\gamma$ 2或 $\gamma$ 4重链的抗体 (Lindmark 等 人, J. Immunol. Methods, 62:1-13 (1983))。推荐对所有老鼠同种型 和人 $\gamma$ 3使用蛋白质G (Guss 等人, EMBO J., 5:1567-1575 (1986))。附着有亲合性配体的基质通常是琼脂糖, 但也可使用其它基质。力学上 稳定的基质例如可控多孔玻璃或多(苯乙烯二乙烯)苯与琼脂糖相比可 加快流速, 缩短处理时间。对于包含CH3区的抗体, 可将Bakerbond ABX 树脂 (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ) 用于纯化。根据要回收的抗体, 也 可使用蛋白纯化的其它技术例如离子交换柱法、乙醇沉淀法、反相高效 液相层析法(反相HPLC)、硅石色谱法、肝素色谱法、阴离子或阳离 子交换树脂琼脂糖凝胶色谱法(例如多天冬氨酸柱法)、色谱聚焦法、SDS-PAGE法和硫酸铵沉淀法。

[0244] 在任何初步净化步骤之后, 可用pH大约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液, 优选在低盐浓度下操作(例如:从大约0-0.25M盐), 用低pH疏水性 相互作用色谱法处理包含研究的抗体和污染物的混合物。

[0245] 5.3治疗性的抗CD19抗体

[0246] 在本发明的组合物和方法中使用的抗CD19抗体, 优选人抗体或人 源化抗体, 优选介导人类ADCC的人抗体或人源化抗体, 或是从已知抗 CD19抗体中挑选出来的, 优选介导人类ADCC的抗体。在某些实施方 案中, 抗CD19抗体可为嵌合抗体。在某些实施方案中, 抗CD19抗体 可为单克隆的人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体。用于本发明的组 合物和方法的抗CD19抗体优选IgG1或IgG3人同种型的人抗体或人源 化抗体。在其它实施方案中, 用于本发明的组合物和方法的抗CD19抗 体优选IgG2或IgG4人同种型的抗体或人源化的抗体, 其 优选介导ADCC 的抗体或人源化的抗体。

[0247] 当用上述方法产生这种抗体时, 在本发明的其它实施方案中, 此处 描述的鼠抗体 HB12a和HB12b或其它商业上可得到的抗CD19抗体可 为嵌合的、人源化的或制成人抗体。

[0248] 例如:可使用的已知抗CD19抗体包括, 但不仅限于, HD37 (IgG1) (DAKO, Carpinteria, CA) , BU12 (G.D. Johnson, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom) , 4G7 (IgG1) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) , J4.119 (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) , B43 (PharMingen, San Diego, CA) , SJ25C1 (BD PharMingen, San Diego, CA) , FMC63 (IgG2a) (Chemicon Int'l., Temecula, CA) (Nicholson等人, Mol. Immunol, 34:1157-1165 (1997) ; Pietersz等人, Cancer Immunol. Immunotherapy, 41: 53-60 (1995) 以及Zola等人, Immunol Cell Biol, 69:411-422 (1991) ), B4 (IgG1) (Beckman Coulter, Miami, FL) Nadler等人, J. Immunol, 131:244-250 (1983) 和/或HD237 (IgG2b) (Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Vienna, Austria, 1989以及Pezzutto 等人, J. Immunol, 138:2793-2799 (1987) )。

[0249] 在某些实施方案中, 本发明的抗CD19抗体包括含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的 HB12a重链(图5A)。在其它实施方案中, 本发明 的抗CD19抗体包括含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HB12b重链(图 5B)。

[0250] 在某些实施方案中, 本发明的抗CD19抗体包括含有SEQ ID NO: 16的氨基酸序列

的HB12a轻链(图6A)。在其它实施方案中,本发明的抗CD19抗体包括含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HB12b轻链(图6B)。

[0251] 在某些实施方案中,抗体是已知抗体的同种型可调节变体(例如: IgG1或IgG3的人同种型)例如上文提到的抗体(例如:HB12a或HB12b)。

[0252] 用于本发明的组合物和方法的抗CD19抗体可为裸抗体,免疫共轭物或融合蛋白。用于本发明的组合物和方法的上述抗CD19抗体优选能减少或消耗用其治疗的患者的B细胞和循环免疫球蛋白。消耗的B细胞可在循环的B细胞中或特殊组织中,例如但不仅限于,骨髓、脾、肠道 淋巴组织和/或淋巴结。可通过各种机制例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或补体依赖细胞毒性(CDC)、B细胞增殖抑制和/或B细胞死亡诱导(例如:通过细胞凋亡)来实现这种消耗。“消耗”B细胞意味着循环B细胞和/或特定组织中B细胞的减少,减少至少大约25%、40%、50%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或更多,如 5.4.3节所述。在特定的实施方案中,事实上所有可检测的B细胞都从 循环中消耗了。

[0253] 5.3.1人的CD19结合抗体的筛选

[0254] 可用结合试验鉴定结合人CD19抗原的抗体。可用直接结合试验或 竞争结合试验来进行结合试验。可用标准ELISA或标准流式细胞光度法 试验来检测结合。在直接结合试验中,测试候选抗体与人CD19抗原的 结合。在某些实施方案中,筛选试验包含,在第二步,测定造成表达人 CD19的B细胞的细胞死亡或细胞凋亡的能力。另一方面,竞争结合试验测定候选抗体与已知的抗CD19抗体或其它结合人CD19的化合物竞争的能力。

[0255] 在直接结合试验中,在允许候选抗体与人CD19抗原结合的情况下,使人CD19抗原与候选抗体相接触。结合可能发生在溶液中或固体表面上。优选地,在此之前标记候选抗体用于检测。任何可检测的化合物都 可用于标记,例如但不仅限于,发冷光的、荧光或放射性同位素或包含 同样物质或非同位素标记的组,例如酶或染剂。在培育到足够发生结合的一段时期之后,对反应物进行除去过量的或非特异性结合的抗体的条件和处理。一般地,这包括用适当的缓冲剂冲洗。最后,检测到CD19 抗体复合物的存在。

[0256] 在竞争性结合试验中,测定候选抗体抑制或转移已知抗CD19抗体 (或其它化合物)与人CD19抗原结合的能力。可将标记的CD19的已 知结合物与候选抗体相混合,并置于有和没有候选抗体的加入,而它们 之间的相互作用可正常发生的条件下。可在候选抗体存在或缺少的情况下比较标记的已知的结合了人CD19的CD19结合物的量。

[0257] 在优选的实施方案中,为了促进抗体抗原复合物的形成和检测,可 将一个或多个成分固定在固体表面进行结合试验。在各种实施方案中,固相支持物可为,但不仅限于,聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、玻璃、硝化纤维、右旋糖酐、尼龙、聚丙烯酰胺和琼脂糖。支持结构可 包括珠、薄膜、微粒,反应容器的内表面例如微量滴定盘、试管或其它 反应容器。可通过共价的或非共价的附着来实现人CD19或其它成分的 固定。在一种实施方案中,将人的CD19抗原和负对照物连接于表位, 例如谷胱甘肽S-转移酶(GST),以便用商业上可得到的抗体例如抗 GST(Santa Cruz Biotechnology) 介导对固体表面的附着。

[0258] 例如,可用固定到固相支持物上的人CD19抗原进行这种亲合性结合试验。一般地,将结合反应的非运动组分,此处指候选抗CD19抗体, 进行标记来实现检测。可使用各种标记方法,例如发冷光的、发色团、荧光或放射性同位素或或包含同样物质或非同位素标记的组,例如酶或 染剂。在优选的实施方案中,候选抗CD19抗体可用荧光基团,例如异 硫

氰酸荧光素(异硫氰酸荧光素,提供自Sigma Chemicals,St.Louis) 来标记。

[0259] 最后,可用本领域已知的任何检测方法检测存留在固体表面的标记。例如:如果用荧光基团标记候选抗CD19抗体,可用荧光计检测复合物。

[0260] 优选地,以表达人CD19抗原的完整细胞,或包含人CD19抗原的分离膜的形式,将人CD19抗原加入到结合试验中。因此,可在培养的完整细胞或动物模型中,在有或没有候选抗CD19抗体存在的情况下,检测出对人CD19抗原的直接结合。可将标记的候选抗CD19抗体与表达人CD19抗原的细胞,或获得自这些细胞的粗提物相混合,并可加入候选抗CD19抗体。可用分离的膜鉴定与人CD19结合的候选抗CD19抗体。例如:在使用分离的膜的典型实验中,可用遗传工程使细胞表达人CD19抗原。可用标准技术获得膜,并用于体外结合试验。将标记的候选抗CD19抗体(例如:荧光标记抗体)结合于膜,并测定特定的活性;通过与在过量未标记(冷的)候选抗CD19抗体存在的情况下结合试验相比较来测定特异性结合。选择性地,可溶的人CD19抗原可被重组表达,并在基于非细胞的试验中利用以鉴定与人CD19抗原相结合的抗体。可在基于非细胞的筛选试验中使用重组表达的人CD19多肽。选择性地,可在基于非细胞的试验系统中使用与一个或多人CD19抗原结合部分、或包含一个或多人CD19抗原结合部分的融合蛋白相对应的肽,以鉴定结合于人CD19抗原部分的抗体。在基于非细胞的试验中,使用本领域已知的方法将重组表达的人CD19附着于固体底物例如试管、微量滴定孔或柱上(参见,Ausubel等人, supra)。然后测定试验抗体结合人CD19抗原的能力。

[0261] 选择性地,可在溶液中进行结合反应。在该试验中,允许标记的组分与其溶液中的结合配体相结合。如果标记的组分和其结合配体之间大小的不同能允许进行这种分离,则可通过将结合反应的产物通过超滤器来实现分离,所述超滤器的孔允许未结合标记的组分通过,但不允许其结合配体或结合于其结合配体上的标记组分通过。也可用任何能从溶液中捕获标记组分结合配体的试剂实现分离,所述的试剂例如:对于结合配体的抗体等。

[0262] 例如,在一种实施方案中,可将来自连续噬菌体展示文库中的噬菌体通过与固相例如塑料珠相连的包含纯化的人CD19抗原、或衍生物、相似体、片段或其结构域的柱,来筛选噬菌体文库。通过改变冲洗缓冲剂的强度,可增加表达对人CD19抗原具有高亲合性的肽的噬菌体。可克隆从柱上分离的噬菌体,并直接测定其亲合性。知道哪个抗体和其氨基酸序列对人CD19抗原结合最强,可用计算机模型来鉴定CD19抗原和候选抗体之间的分子接触。

[0263] 在本发明这方面的另一个特定的实施方案中,固相支持物是包含附着于微量滴定盘的人CD19抗原的膜。例如,候选抗体可在允许文库成员在微量滴定盘中表达的条件下与表达文库抗体的细胞相结合。收获与人CD19结合的文库成员。此方法,通常以实施例的方式在Parmley和Smith,1988, Gene, 73:305-318; Fowlkes等人, 1992, BioTechniques, 13:422-427; PCT公开号W094/18318以及在上文引用的参考文献中有所描述。鉴定的与人CD19抗原相结合的抗体可为以上所述的任何类型或修饰形式的抗体。

[0264] 5.3.2抗体的人ADCC效应子功能的筛选

[0265] 在本发明中优选使用人IgG类抗体,因为其在血清中具有长半寿期的功能特性,可介导各种效应子的功能(Monoclonal Antibodies: Principles and Applications,

Wiley-Liss, Inc., 第1章 (1995)。人IgG类抗体可进一步分为下列4个亚类: IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。迄今已经对ADCC和CDC和作为IgG类抗体的效应子功能的细胞凋亡活性进行了很多研究,并且已经报道了在人IgG类的抗体中, IgG1亚类在人体中具有最高的ADCC活性和CDC活性 (Chemical Immunology, 65, 88 (1997))。

[0266] 人IgG1亚类抗体的ADCC活性和CDC活性和细胞凋亡活性的表现 通常包括抗体Fc区与存在于效应细胞表面的抗体受体的结合(以下称 为“Fc $\gamma$  R”),所述的效应细胞如杀伤细胞、自然杀伤细胞或活化巨噬细胞。可以结合各种补体组分。关于结合,已知在抗体C区(以下称 为“C $\gamma$  2区”)的绞链区和第二结构域的几个氨基酸残基很重要 (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)),并且C $\gamma$  2区的糖链 (Chemical Immunology, 65, 88 (1997))也很重要。

[0267] 考虑到效应子功能,可修饰本发明的抗CD19抗体,例如:增强抗体的ADCC和/或补体依赖细胞毒性(CDC)和/或细胞凋亡活性。这可通过在抗体的Fc区引入一个或多个氨基酸取代来实现。选择性地或补充地,可在Fc区引入半胱氨酸残基,使在该区内形成链间二硫键。这样可产生同型二聚抗体,其具有改善的内化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和ADCC (Caron等人, J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) 和Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992))。也可用异双功能 交叉连接来产生具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚抗体 (Wolff等人, Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993))。也可把抗体设计成具有两个或更多个Fc区,导致补体溶解和ADCC能力的增强 (Stevenson等人, Anti-Cancer Drug Design, (3) 219-230 (1989))。

[0268] 在本领域已知设计抗体Fc区以便改变效应子功能的其它方法(例如:Koenig等人,美国专利公开号20040185045和PCT公开号WO 2004/016750,其描述了改变Fc区以便与对Fc $\gamma$  RIIA的结合亲合力相比 增强对Fc $\gamma$  RIIB的结合亲合力;也参见Armour等人,PCT公开号WO 99/58572,Idusogie等人,WO 99/51642,以及Deo等人,U.S.6,395,272; 所述参考文献的内容以其整体并入此处)。在本领域中也已知修饰Fc区 来降低对Fc $\gamma$  RIIB结合亲合性的方法(例如:Ravetch等人,美国专利公开号20010036459和PCT公开号WO 01/79299,所述参考文献的内容以其 整体并入此处)。也描述了相对于野生型Fc区,包含具有增强的对于Fc $\gamma$  RIIIA和/或Fc $\gamma$  RIIA的结合亲合力的变体Fc区的修饰抗体(例如: Stavenhagen等人,PCT公开号WO 2004/063351;所述参考文献的内容以 其整体并入此处)。

[0269] 已发现了至少四种不同类型的Fc $\gamma$  R,其分别被称作Fc $\gamma$  RI (CD64)、Fc $\gamma$  RII (CD32)、Fc $\gamma$  RIII (CD16) 和Fc $\gamma$  RIV。在人体中,将Fc $\gamma$  RII和Fc $\gamma$  RIII进一步分别分为Fc $\gamma$  RIIa和Fc $\gamma$  RIIb,以及Fc $\gamma$  RIIIA和Fc $\gamma$  RIIIB。Fc $\gamma$  R是属于免疫球蛋白超家族的膜蛋白,Fc $\gamma$  RII、Fc $\gamma$  RIII和Fc $\gamma$  RIV具有一个 $\alpha$ 链,其具有包含两个免疫球蛋白相似结构域的胞外区,Fc $\gamma$  RI具有一个作为组成成分的 $\alpha$ 链,其具有包含三个免疫球蛋白相似结构域的胞外区,并且该 $\alpha$ 链与IgG结合活性有关。另外, Fc $\gamma$  RI和Fc $\gamma$  RIII具有作为组成成分的 $\gamma$ 链或 $\zeta$ 链,其具有与 $\alpha$ 链相关的信号转导功能 (Annu. Rev. Immunol., 18, 709 (2000), Annu. Rev. Immunol., 19, 275 (2001)).Bruhns等人,Clin. Invest. Med., (Canada) 27:3D (2004) 描述了Fc $\gamma$  RIV。

[0270] 为了测定研究的抗CD19抗体的ADCC活性,可用体外ADCC试验, 例如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的。对该试验有用的效应细胞包括外周血液单核细胞 (PBMC)

和自然杀伤 (NK) 细胞。例如: 可 测定任何特异的抗体通过补体激活和/或ADCC来介导靶细胞溶解的能 力。使研究的细胞在体外生长和标记; 向与免疫细胞结合的细胞培养基 中加入抗体, 其可被抗原抗体复合物活化; 即: 效应细胞参与ADCC反 应。也可测定抗体的补体活性。在两种情况下, 都通过从溶解细胞中除 去标记来检测靶细胞的细胞溶解。事实上, 可将患者自己的血清作为补 体和/或免疫细胞的来源, 来筛选抗体。然后可在对特定患者中治疗性地 使用在体外试验中能介导人ADCC的抗体。选择性地, 或补充地, 可在 体内测定研究的分子的ADCC活性, 例如: 在动物模型内, 例如在Clynes 等人, PNAS (USA) 95:652-656 (1998) 所公开的内容。此外, 在本 领域中已知调整 (即增加或减少) 抗体的ADCC水平、选择性地CDC活 性和选择性地细胞凋亡活性的方法。参见, 例如: 美国专利号6,194,551 (参见, 例如: Chaouchi等人, J. Immunol., 154 (7) :3096-104 (1995); Pedersen等人, Blood, 99 (4) : 1314-1318 (2002); Alberts等人, Molecular Biology of the Cell; Steensma等人, Methods Mol Med., 85:323-32, (2003))。本发明的抗体优选能或已经修饰而具有引起ADCC和/或CDC 和/或细胞凋亡反应的能力。优选地, 可通过这种测定ADCC功能的测验, 用人效应细胞来测定人的ADCC功能。

[0271] 5.3.3免疫共轭物和融合蛋白

[0272] 根据本发明的某些方面, 可将治疗剂或毒素连接到本发明的组合物 和方法中使用的嵌合的、人的、或人源化的抗CD19抗体。在某些实施方案中, 可像融合蛋白一样生产这些共轭物 (参见5.1.8节)。治疗剂和毒 素的例子包括, 但不仅限于, 烯二炔类分子家族的成员, 例如: 刺孢霉 素 (calicheamicin) 和埃斯波霉素 (esperamicin)。也可从duocarmycin、氨甲蝶呤、阿霉素、米尔法兰、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、去乙酰长春酰 胺、自力霉素、顺式铂、依托泊甙、争光霉素和5-氟尿嘧啶所组成的群 中取得化学毒素 (参见, 例如: 美国专利号5, 703,080和美国专利号 4,923,990)。化疗剂的例子也包括阿霉素、羟柔红霉素、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷 (阿糖胞苷)、环磷酰胺、硫替派、泰索帝 (紫杉醇)、白消 安、环磷酰胺、紫杉 酚、氨甲蝶呤、顺氯氨铂、米尔法兰、长春花碱、争光霉素、依托泊甙、异环磷酰胺、自力霉 素、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞宾、卡铂、替尼泊甙、红比霉素、洋红霉素、氨基蝶呤、更生霉 素、丝裂霉素、埃斯波霉素 (esperamicin) (参见, 美国专利号4,675,187)、米尔法兰及其他相关的氮芥类。

[0273] 例如, 在其它实施方案中, 可在本发明的联合治疗中使用“CVB” ( $1.5\text{g}/\text{m}^2$ 环磷酰 胺、 $200\text{-}400\text{mg}/\text{m}^2$ 依托泊甙和 $150\text{-}200\text{mg}/\text{m}^2$ 卡氮芥)。CVB是用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤的给药方案 (Patti等人, Eur. J. Haematol., 51:18 (1993))。在本领域中已知其它合适的联合化疗的 给药方案。参见, 例如: Freedman等人, Cancer Medicine中的 “Non-Hodgkin's Lymphomas”, Volume 2, 3rd Edition, Holland等人 (eds.), pp.2028-2068 (Lea&Febiger 1993)。作为说明, 治疗中度非 霍奇金氏淋巴瘤的第一代化疗给药方案包括C-MOPP (环磷酰 胺、长春 新碱、甲基苄肼和脱氢可的松) 和CHOP (环磷酰胺、阿霉素、长春新 碱和脱氢可的 松)。有用的第一代化疗给药方案为m-BACOD (氨甲蝶 吲、争光霉素、阿霉素、环磷酰胺、长春 新碱、地塞米松和甲酰四氢叶 酸), 而合适的第三代给药方案是MACOP-B (氨甲蝶呤、阿霉素、环 磷酰胺、长春新碱、脱氢可的松、争光霉素和甲酰四氢叶酸)。其它有 效的药物包括 丁酸苯酯和brostatin-1。

[0274] 在本发明的免疫共轭物中可用的其它毒素包括有毒外源凝集素、植 物毒素例如

蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、蒴莲根毒素、肉毒杆菌毒素和白喉毒素。当然,也可将各种毒素的复合体连接于一个抗体分子,从而调节可变的细胞毒性。适合应用于本发明的联合疗法的毒素的例子是蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶、DNaseI、葡萄球菌肠毒素-A、商陆抗病毒蛋白、多花白树抑制剂(gelonin)、白喉毒素、假单胞菌属外毒素和假单胞菌内毒素。参见,例如:Pastan等人,Cell,47:641(1986)和Goldenberg等人,Cancer Journal for Clinicians,44:43(1994)。可使用的酶促活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自绿脓杆菌)、蓖麻毒蛋白A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素A链、 $\alpha$ -吊曲菌素、油桐蛋白、茜素蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、Sapaponaria officinalis抑制剂、多花白树抑制剂(gelonin)、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和trichothecene。参见,例如:1993年10月28日公开的WO 93/21232。

[0275] 在Remington's Pharmaceutical Sciences,19th Ed. (Mack Publishing Co.1995) 和Goodman And Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,7th Ed. (MacMillan Publishing Co.1985) 中描述了合适的毒素和化疗剂。本领域技术人员已知其它合适的毒素和/或化疗剂。

[0276] 也可通过将抗体连接到将前体药物(例如:肽基化疗剂,参见 WO81/01145)转换成活性抗癌药物的前体药物活化酶,将本发明的抗CD19抗体用于ADEPT。参见,例如:WO 88/07378和美国专利号 4,975,278。对ADEPT有用的免疫共轭物的酶成分包括任何能作用于前体药物,并通过此途径将其转化为其更活化、更具细胞毒素的形式的酶。

[0277] 在本发明的方法中有用的酶包括,但不仅限于,对将包含磷酸盐的前体药物转换成游离药物有用的碱性磷酸酶;对将包含硫酸盐的前体药物转换成游离药物有用的芳基硫酸酯酶;对将无毒的5-氟胞嘧啶转换成抗癌药物5-氟尿嘧啶有用的胞嘧啶脱氨酶;蛋白酶类,例如沙雷氏菌属蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(例如:组织蛋白酶B和L),其对将包含肽的前体药物转换成游离药物有用;D-内氨酰羧肽酶,其对转换包含D-氨基酸取代基的前体药物有用;对将糖基化的前体药物转换成游离药物有用的分解酶,例如 $\beta$ -半乳糖苷酶和神经氨糖酸苷酶;对将 $\alpha$ -内酰胺衍生的药物转换成游离药物有用的 $\beta$ -内酰胺酶;青霉素酰胺酶,例如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶,分别对将苯氧基乙酰基或苯乙酰基的胺氮所衍生的药物转换成游离药物有用。选择性地,有酶活性的抗体,在本领域中也称作“抗体酶”,可用于将本发明的前体药物转换成游离的活性药物(参见,例如:Massey, Nature 328:457-458(1987))。可按照此处描述的来制备抗体酶共轭物,按照希望的将抗体酶转移到被恶性B细胞感染的人体部位。

[0278] 可用本领域已知的技术,例如使用上文所述的异双功能交联试剂将本发明的酶共价结合于抗体。选择性地,用本领域已知的重组DNA技术,构建包含本发明的至少一个抗体的抗原结合区的融合蛋白,所述抗原结合区与本发明的酶的至少一个功能性活化部分相连(参见,例如:Neuberger等人,Nature,312:604-608(1984))。

[0279] 本发明的抗CD19抗体的共价修饰物包含在本发明的范围内。如可适用,可通过抗体的化学合成或通过酶或化学的裂解来制备它们。通过用组织衍生试剂使抗体的靶氨基酸残基与组织衍生试剂发生反应,来将抗CD19抗体的其它种类的共价修饰引入分子,所述的组织衍生试剂能与挑选的侧链或N-或C-末端残基反应。

[0280] 通常用半胱氨酸残基与 $\alpha$ -盐乙酸(和相应的胺),例如氯乙酸或氯乙酰胺反应,得到羧甲基或羧基酰胺基甲基的衍生物。类似地,也可使用碘代试剂。也可通过与溴三氟丙酮、 $\alpha$ -溴二甲氧- $\beta$ -(5-咪唑基(imidozoyl))丙酸、氯乙酰基磷酸盐、N-烷基马来酰亚胺基、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基-2-吡啶基二硫化物、p-对氯汞苯甲酸、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯-2-氧-1,3-二唑反应来衍生出半胱氨酸残基。

[0281] 通过在pH5.5-7.0与焦碳酸二乙酯反应衍生组氨酸残基,因为该试剂对组氨酸侧链相对特异。对侧-溴二甲氧溴苯乙酮也有用;优选在pH6.0,在0.1M的二甲胂酸钠的条件下进行反应。

[0282] 用赖氨酸和氨基末端残基与丁二酸酐或用其它羧酸酐反应。用这些试剂进行的衍生具有改变赖氨酸残基的电荷的作用。其它用于衍生包含 $\alpha$ -氨基的残基和/或包含 $\epsilon$ -氨基的残基的合适的试剂包括亚氨酸酯,例如吡啶甲亚胺酸甲脂(methyl picolinimidate)、磷酸吡哆醛、吡哆醛、氯硼氢化物、三硝基苯磺酸、0-甲基异脲、2,4-2,4-戊二酮,并且用乙醛酸盐进行转氨酶催化的反应。

[0283] 通过与一个或几个常用的试剂,其中包括苯甲酰甲醛、丁二酮、1,2-环己烷和茚三酮反应,来修饰精氨酸残基。精氨酸残基的衍生作用通常要求在碱性条件下进行反应,因为胍功能基团的高pKa。此外,可将这些试剂与赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基基团以及精氨酸 $\epsilon$ -氨基基团反应。

[0284] 可通过与芳香族的重氮化合物或四硝基甲烷反应,向酪氨酸残基中引入光谱标记,来制备特异性修饰的酪氨酸残基。通常,用N-乙酰咪唑和四硝基甲烷分别形成O-乙酰基酪氨酸类和3-硝基衍生物。用 $^{125}$ I或 $^{131}$ I碘化酪氨酸残基来制备用于放射性免疫试验的标记蛋白。

[0285] 通过与碳化二亚胺( $R-N=C=N-R'$ )反应,有选择地修饰羧基侧基(天冬氨酸基或谷氨酰基),其中R和R'是不同的烷基,例如:1-环己基-3-(4-吗啉基-4-乙基)碳化二亚胺或1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基甲烷)碳化二亚胺。此外,通过与氨盐基反应来将天冬氨酸基和谷酰基转化为天冬酰和谷酰胺基残基。

[0286] 经常分别对谷酰胺基和天冬酰残基去氨基,来形成相应的谷酰基和天冬酰胺残基。在中性或基本条件下对这些残基去氨基。这些残基的去氨基形式落入本发明的范围中。

[0287] 其它的修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基基团的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 $\alpha$ -氨基的甲基化(T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H.Freeman&Co., San Francisco, pp.79-86 (1983))、N-末端氨基的乙酰化和任何C-末端羧基基团的酰胺化。

[0288] 共价修改的另一种类型包括化学地或酶促地将糖结合到抗体上。这些步骤的优点在于其不要求在对N-或O-连接的糖基化作用具有糖基化能力的宿主细胞内产生抗体。依赖所用的结合方式,可将糖附着于(a)精氨酸和组氨酸、(b)自由羧基、(c)游离硫氢基,例如:半胱氨酸的游离硫氢基、(d)游离羟基,例如:丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的游离羟基、(e)芳香族残基,例如:苯基丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳香族残基、或(f)谷酰胺的酰胺基。在1987年9月11日公开的WO 87/05330,以及在Aplin和Wriston, CRC Crit.Rev.Biochem., PP.259-306 (1981)中描述了这些方法。

[0289] 5.4药物的配方、给药和剂量

[0290] 本发明的药物配方包含作为活性成分的人的、人源化的或嵌合的抗 CD19抗体。配方包含适于对人类患者给予的重量或体积单位而产生想要的反应的有效量的裸抗体、免疫共轭物、或融合蛋白质,优选消毒的。例如,可通过测定对抗CD19抗体组分的生理学效果来测定反应,例如,但不仅限于,循环B细胞消耗、组织B细胞消耗、B细胞恶性肿瘤的消退或疾病症状的减少。本领域普通技术人员都知道其它的试验,其可用于测定反应的水平。

[0291] 5.4.1药物的配方

[0292] 可用药学上可接受的载体配制抗CD19抗体的组合物。术语“药学上可接受的”指不影响活性成分的生物活性效果的一种或多种无毒材料。这种制剂可常规包含盐、缓冲剂、防腐剂、兼容载体和选择性的其它治疗剂。这种药学上可接受的制剂也可常规包含兼容的固体或液体填料、稀释剂或适于对人给药的胶囊物质。当用于医学时,盐应该是药学上可接受的,但也可将非药学上可接受的盐方便地用于制备其药学上可接受的盐,并且不应被排除在本发明的范围之外。这种药理学和药学上可接受的盐包括,但不仅限于,由下列酸所制备的盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、醋酸、水杨酸、柠檬酸、硼酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。同时,可将药学上可接受的盐制成碱金属或碱土盐,例如钠、钾或钙的盐。术语“载体”表示有生命的或无生命的成分、自然的或合成的,用其与活性成分结合来促进应用。药品组合物的组合物也能与本发明的抗体以混合的交互作用基本上不会削弱预期药物效力的方式互相混合。

[0293] 根据本发明的某些方面,可通过将具有要求纯度的抗体或免疫共轭物与任选的生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来配制以冻干剂型或含水溶液的形式用于储存的抗CD19抗体的组合物(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, 0sol, A.Ed. (1999))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下对接受者无毒,其包括缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧化剂,其包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如:十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;氯化苯甲烃铵、氯化苄乙氧铵;石炭酸、丁基或苯甲醇;烷基对羟苯甲酸,例如甲基或对羟苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇以及间甲酚);低分子量(小于大约10个残基)的多肽;蛋白质,例如:血清白蛋白、白明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,例如:聚乙烯吡咯烷;氨基酸,例如:甘氨酸、谷氨酰胺、天门冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如:EDTA;糖,例如:蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;抗盐类形成离子,例如:钠;金属复合物(例如锌-蛋白复合物)和/或非离子型表面活性剂,例如:TWEEN、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0294] 抗CD19抗体的组合物也可选择性地包含适当的防腐剂,例如:氯化苯甲烃铵;氯丁醇;对羟苯甲酸和硫柳汞。

[0295] 抗CD19抗体的组合物可常规地存在于单位剂型中,并通过药学领域内已知的任何方法来配制。所有方法都包括将活性剂与由一种或多种次要成分组成的载体相混合的步骤。通常地,通过均匀并紧密地将活性物质与液态载体、磨碎的固态载体或两者相混合来制备组合物,然后,必要时,使产物成形。

[0296] 适于肠胃外给药的组合物常规地包含抗CD19抗体的消毒的含水或无水的制剂,其优选与患者血液等压。可按照已知的方法,利用适当的分散或润湿剂和悬浮剂来配制该

制剂。消毒注射剂也可是消毒的可注射 溶液或无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂的混悬液,例如:1,3-丁烷 二醇的溶液。所用可接受的载体和溶剂是水、Ringer氏溶液和等渗的氯化钠溶液。另外,将消毒的固定油类传统地用作溶剂或悬液的介质。为了这个目的,可使用任何温和的固定油类,包括合成的单-或双-甘油酯。另外,可用脂肪酸,例如油酸配制注射制剂。适合于口部、皮下、静脉 内、肌肉内等注射的载体制剂可在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.,Easton,PA中找到。在某些实施方案中,适合于 各种给药途径的载体剂型可与RITUXAN<sup>TM</sup>描述的相同或类似。参见:Physicians'Desk Reference (Medical Economics Company, Inc.,Montvale, NJ,2005), pp.958-960和1354-1357,所述参考文献以其整体并入此处 作为参考。在本发明的某些实施方案中,用氯化钠、柠檬酸钠二水合物、聚山梨醇酯80和无菌水配制用于静脉注射的抗CD19抗体的组合物,其中 组合物的pH调节在大约6.5。本领域技术人员知道,由于快速传递抗体 的全面循环,静脉注射提供了一种注射的有用方式。然而,静脉内注射 受到脉管阻碍物的限制,所述脉管阻碍物包括脉管系统的内皮细胞和内 皮下基质。脉管阻碍物仍是固体肿瘤对治疗性抗体吸收的比较显著的问 题。淋巴瘤具有比较高的血流速度,有助于有效的抗体输送。淋巴管给 药途径,例如皮下或肌肉注射,或通过淋巴管导管插入术,也提供了治疗B细胞淋巴瘤的有用方法。在优选的实施方案中,本发明的组合物和 方法的抗CD19抗体是皮下自体给药的。在这种优选的实施方案中,作为 冻干试剂或在液体缓冲剂中(例如:PBS和/或柠檬酸盐)以大约50mg/ml 来配制组合物。

[0297] 此处的制剂配方也可包含超过一种的对于治疗特定适应症需要的 活性成分,优选具有不相互逆向影响的互补活性的物质。例如:可使用 进一步提供免疫抑制的制剂。这种分子适当地与对预定目标有效的剂量 结合出现。

[0298] 也可将活性成分放入准备的微型胶囊剂中,例如:通过凝聚技术或 界面聚合,例如:羟甲基纤维素或白明胶微型胶囊剂和聚-(甲基甲基丙 烯酸)微型胶囊剂,分别在胶体的药物传递系统(例如:脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳粒子和纳囊剂)或在大乳胶中。在Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition,Osol,A.Ed. (1980) 中公开了这样 的技术。

[0299] 用于体内给药的制剂一般是消毒的。可通过用灭菌过滤膜过滤来轻 易地完成。

[0300] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适当例子包括包含抗CD19 抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,此基质为以定型物的形式,例如: 胶片或微囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如:多(2- 羟乙基-异丁烯酸)或多(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号 3,773,919)、L-谷氨酸和γ 乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物,例如LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(由乳酸-羟基 乙酸共聚物和亮丙瑞林醋酸盐组成的可注射的微球体)和聚-D-(-)-3 -羟丁酸。当聚合体例如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸能释放分子超 过100天时,某些水凝胶可在短期内释放蛋白。当胶囊化的抗体在体内 保持很长时间时,它们可能会在37°C下暴露于潮湿而造成变性或聚合, 导致生物活性的丧失和免疫原性的可能改变。依据涉及的机制,可获得 实现稳定的合理策略。例如:如果发现聚集机制是通过硫醚互换形成的 分子间的S-S键,则可通过修改巯基残基、从酸性溶液冻干、控制含湿 量、利用适当的添加剂,以及发展特异的聚合基质组合物来实现稳定。在某些具体的实施方式中,本发明的组合物所用的药学上可接受的载体 不影响人的

ADCC或CDC。

[0301] 此处公开的抗CD19抗体的组合物也可作免疫微脂粒来配制。“脂 质体”是由用于向人类输送药物(例如:此处公开的抗CD19抗体)的各 种类型的脂质体、磷脂和/或表面活性剂组成的小囊。脂质体的组分通常 呈双分子层形式,类似于脂质体在生物膜上的排列形式。可用本领域内 已知的方法制备包含本发明抗体的脂质体,例如:Epstein等人, Proc.Natl. Acad. ScL USA,82:3688 (1985) ;Hwang等人, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980) ;以及美国专利号4,485,045和4,544,545所述。在美国 专利号5,013,556中公开了具有更长循环时间的脂质体。可通过反相蒸 发 法,用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE) 的脂质组合物制备特别有用的脂质体。通过规定孔径大小的过滤器过滤 脂质体,来产生想要直径的脂质体。本发明的抗体可以经由二硫化物互 换反应与脂质体相结合,如Martin等人,J.Biol.Chem.,257:286-288 (1982) 所述。脂质体中 也可包含治疗剂。参见:Gabizon等人,J.National Cancer Inst., (19) 1484 (1989) 。

[0302] 一些优选的药物制剂包括,但不仅限于:

[0303] (a) 以10mg/ml的浓度填充于100mg (10mL) 或500mg (50mL) 的 单个使用的小瓶中的 用于静脉内 (i. v.) 注射抗CD19抗体的消毒的、无 防腐剂的浓缩液。可用氯化钠、柠檬酸钠 二水合物、多山醇酯和用于注 射的无菌水来配制产物。例如:在9.0mg/ml氯化钠、7.35mg/ ml柠檬酸钠 二水合物、0.7mg/ml聚山梨醇酯80和用于注射的无菌水中配制产物。将 pH调节为6.5。

[0304] (b) 在单独使用的小玻璃瓶中的用于皮下(s.c) 注射的消毒的、冻干粉末。可用蔗糖、L-盐酸组氨酸一水合物、L-组氨酸和多山醇酯20 来配制产物。例如:每个单个使用的小瓶可包含150mg抗CD19抗体、123.2mg蔗糖、6.8mgL-盐酸组氨酸一水合物、4.3mgL-组氨酸 和3mg 多山醇酯20。用1.3ml灭菌注射水重构单个使用的小瓶,产生大约1.5ml 溶液,每 1.25ml输送125mg的抗体(100mg/ml)。

[0305] (c) 用于静脉 (i.v.) 注射的消毒的、无防腐剂的冻干粉末。可用  $\alpha$ -海藻糖二水合物、L-组氨酸HCl、组氨酸和聚山梨酸酯20USP来配制 产物。例如:每个小瓶可装440mg抗 CD19抗体、400mg $\alpha$ -海藻糖二 水合物、9.9mgL-组氨酸HCl、6.4mgL-组氨酸和1.8mg聚山梨 酸酯20,USP。用20ml抑菌剂注射用水 (BWFI) 、包含1.1%苯甲醇作为防腐剂的USP 进行重 构,得到pH大约为6的包含21mg/ml抗体的多剂量的溶液。

[0306] (d) 静脉内输注的消毒的冻干粉末,其中的抗CD19抗体用蔗糖、多山醇酯、一元磷酸钠一水合物和磷酸二钠二水合物来配制。例如:每 个单独使用的小瓶可以装100mg抗体、500mg蔗糖、0.5mg聚山梨醇酯80、2.2mg一元磷酸钠一水合物和6.1mg磷酸二钠二水合物。不存在防腐剂。接着用10ml灭菌注射水、USP重构,得到的pH为大约7.2。

[0307] (e) 在单独使用的1ml预装注射器中的用于皮下注射的消毒的、无 防腐剂的溶液。可用氯化钠、一元磷酸钠二水合物、磷酸二钠二水合物、柠檬酸钠、柠檬酸一水合物、甘露 醇、聚山梨醇酯80和注射用水、USP 来配制产物。可加入氢氧化钠将pH调整为大约5.2。

[0308] 例如:可配制每个注射器输出0.8ml (40mg) 的药物产物。每0.8ml 包含40mg抗CD19 抗体、4.93mg氯化钠、0.69mg一元磷酸钠二水合物、1.22mg磷酸二钠二水合物、0.24mg柠檬 酸钠、1.04柠檬酸一水合物、9.6mg 甘露醇、0.8mg聚山梨醇酯80和注射用水、USP。

[0309] (f) 在单独使用的小瓶中的用于皮下(s.c) 注射的,并与灭菌注 射水 (SWFI) 、USP

重构的消毒的、无防腐剂的冻干粉末。可用蔗糖、盐酸组氨酸一水合物、L-组氨酸和吐温配制产物。例如:75mg小瓶可装 129.6mg或112.5mg的抗CD19抗体、93.1mg蔗糖、1.8mgL-盐酸组氨酸一水合物、1.2mgL-组氨酸和0.3mg聚山梨酸酯20,并将其设计成在与 0.9mlSWFI、USP重构后,输出0.6ml中75mg的抗体。150mg小瓶可装 202.5mg或175mg抗CD19抗体、145.5mg蔗糖、2.8mgL-盐酸组氨酸一水合物、1.8mgL-组氨酸和0.5mg聚山梨酸酯20,并将其设计成在与 1.4mlSWFI、USP重组后,输出1.2ml中150mg的抗体。

[0310] (g) 与无菌水重构的、用于注射的消毒的、冻干产物。可用甘露醇、组氨酸和甘氨酸来配制用于肌肉 (IM) 注射的产物,用单独使用的 小瓶装。例如:每个单独使用的小瓶可以装100mg抗体、67.5mg甘露醇、8.7mg组氨酸和0.3mg甘氨酸,将其设计成与1.0ml注射用无菌水重构时,能输出1.0ml中100mg的抗体。选择性地,每个单独使用地小瓶可装50mg 抗体、40.5mg甘露醇、5.2mg组氨酸和0.2mg甘氨酸,将其设计成与0.6ml 注射用无菌水重构时,能输出50mg的抗体。

[0311] (h) 用于肌肉 (IM) 注射的消毒的、无防腐剂的溶液,其给药浓 度为100mg/ml。可在单独使用的小瓶中用组氨酸、甘氨酸和注射用无菌 水来配制产物。例如:每个单独使用的小瓶可用100mg抗体、4.7mg组氨酸和0.1mg甘氨酸配制成1.2ml容积,设计成1ml中传递100mg抗体。选择 性地,每个单独使用的小瓶可用50mg抗体、2.7mg组氨酸和0.08mg甘氨酸配制成0.7ml或0.5ml容积,设计成0.5ml中传递50mg抗体。

[0312] 在某些实施方案中,本发明的药物组合物在4℃下稳定。在某些实 施方案中,本发明的药物组合物在室温下稳定。

#### [0313] 5.4.2抗体的半寿期

[0314] 在某些实施方案中,本发明的组合物和方法的抗CD19抗体的半寿 期至少为大约4 到7天。在某些实施方案中,本发明的组合物和方法的 抗CD19抗体的平均半寿期至少为大 约2到5天、3到6天、4到7天、5到8天、6到9天、7到10天、8到11天、8到12天、9到13天、10 到14 天、11到15天、12到16天、13到17天、14到18天、15到19 天或16到20天。在其它的实施方案 中,本发明的组合物和方法的抗 CD19抗体的半寿期可达到大约50天。在某些实施方案中, 可用本领域 已知的方法延长本发明的组合物和方法的抗体的半寿期。这种延长可依 次减 少本发明抗体组合物的剂量的总量和/或频率。在美国专利号 6,277,375;国际公开号W0 98/23289和W0 97/3461中公开了延长了体 内半寿期的抗体及其制备方法。

[0315] 也可通过将惰性聚合物分子附着到带有或没有多功能连接子的抗 体上,通过PEG 与抗体的N-或C-末端的位点特异性连接,或通过在赖 氨酰残基上的 $\epsilon$ -氨基基团,来延长本发明的抗CD19抗体在体内的血清 循环,所述的惰性聚合物分子如高分子量聚乙二醇 (PEG)。采用导致 生物活性最小损失的线型或分支的聚合物衍生作用。可用SDS-PAGE和 质 谱分析法密切监视结合程度,保证PEG分子与抗体的适当连接。可用 大小-排除或用离子交 换色谱法将未反应的PEG从抗体-PEG共轭物中除 去。可用本领域技术人员已知的方法,例 如此处所述的免疫测定法,来 检测PEG衍生抗体的结合活性以及体内效力。

[0316] 此外,可将本发明的组合物和方法的抗体与白蛋白结合,为了使抗 体在体内更稳 定或在体内具有更长的半寿期。在本领域中已知这些方 法,参见,例如:国际公开号W0 93/ 15199、W0 93/15200和W0 01/77137; 欧洲专利号EP 413,622,所述参考文献并入此处作为 参考。

[0317] 5.4.3给药和剂量

[0318] 将本发明的组合物对人类患者给药可通过任何途径,包括但不仅限于:真皮内、皮肤、皮下、肌肉、吸入(例如经由气雾剂)、脸颊或口(例如舌下)、局部(即皮肤与粘膜表面两者,包括气管表面)、鞘内、关节内、胸膜内、脑内、动脉内、腹内、口部、淋巴内、产期内、直肠或阴道的给药,通过局部导管输液,或通过直接的病损内注射。在优选的实施方案中,用静脉内推进或静脉内输液在规定的时间内(例如:0.5 到2小时)用本发明的组合物进行给药。可通过蠕动的方式或储藏的形式输送本发明的组合物,但是任何给定情况下最适合的途径取决于,在本领域内已知的,物种、年龄、性别和对象的总体情况、治疗情况的性质和严重程度和/或所给药的特定组合物的性质(即:剂量、配方)。在特定的实施方案中,给药途径为通过大丸药或一定时期的连续输液,一周一或两次。在一种实施方案中,以门诊患者为基础用本发明的组合物和/或方法来进行给药。

[0319] 在某些实施方案中,包含抗CD19抗体的组合物的剂量以患者体重 mg/kg为单位来计算。在其它的实施方案中,包含抗CD19抗体的组合物的剂量以患者瘦肉体重(即:体重减去体脂肪含量) mg/kg为单位来计算。在另一些实施方案中,包含抗CD19抗体的组合物的剂量以患者体表面积mg/m<sup>2</sup>为单位来计算。在另一些实施方案中,包含抗CD19抗体的组合物的剂量以对患者给药的每剂毫克数为单位来计算。剂量的测定可与本发明的组合物和方法一起应用,剂量单位可用本领域内的标准方式进行转换。

[0320] 本领域技术人员能理解,可根据包括年龄、性别、物种和对象的情况(例如:B细胞恶性肿瘤的阶段)、细胞消耗的需要程度、要治疗的疾病和/或所使用的和本领域技术人员可确定的特定抗体或抗原结合片段的许多因素来选择剂量。例如:可从体外测试系统或动物模型(例如:棉鼠或猴子)测试系统中推导出的剂量反应曲线推知本发明组合物的有效量。在本领域中已知评估抗体影响的模型和方法(Wooldridge等人, Blood, 89 (8) :2994-2998 (1997), 以其整体并入此处作为参考)。在某些实施方案中,对于特定B细胞恶性肿瘤,可用本领域中标准的用于抗体疗法的治疗方案来使用本发明的组合物和方法。

[0321] 本发明的方法中使用的治疗方案的剂量的例子包括,但不仅限于,每天一次、每周三次(间歇性的)、每周一次或每14天一次。在某些实施方案中,治疗方案的剂量包括,但不仅限于,每月的剂量或每6-8 周的剂量。

[0322] 本领域技术人员可理解,与维持治疗方案相比,初期治疗通常使用更高的剂量和/或更高的给药频率。

[0323] 在本发明的实施方案中,将抗CD19抗体结合到B细胞上,这样可以导致更有效的(即:低剂量)B细胞消耗(如此处所述)。在患者B细胞表面上的人CD19密度高的地方可实现更高程度的结合。在实施例中,抗体的剂量(任选在作为药品组合物一部分的药学上可接受的载体中)最少为大约0.0005、0.001、0.05、0.075、0.1、0.25、0.375、0.5、1、2.5、5、10、20、37.5或50mg/m<sup>2</sup>和/或小于大约500、475、450、425、400、375、350、325、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75、60、50、37.5、20、15、10、5、2.5、1、0.5、0.375、0.1、0.075或0.01mg/m<sup>2</sup>。在某些实施方案中,剂量在大约0.0005到大约200mg/m<sup>2</sup>之间,在大约0.001到150mg/m<sup>2</sup>之间,在大约0.075到125mg/m<sup>2</sup>之间,在大约0.375到100mg/m<sup>2</sup>之间,在大约2.5到75mg/m<sup>2</sup>之间,在大约10 到75mg/m<sup>2</sup>之间,在大约20到50mg/m<sup>2</sup>之间。在相关的实施方案中,所用的抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者体重大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、

0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5mg。在某些实施方案中,所用裸抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者体重大约1到10、5到15、10到20或15到25mg。在某些实施方案中,所用的抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者体重大约1到20、3到15或5到10mg。在优选的实施方案中,所用的抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者体重大约5、6、7、8、9或10mg。在某些实施方案中,抗体的单一剂量单位(任选地在作为药物组合物一部分的药学上可接受的载体中)可为至少大约0.5、1、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248,或250微克/ $m^2$ 。在其它的实施方案中,剂量可达到每单一剂量单位1g。

[0324] 上述剂量全部为示例性的,并可用于与本发明的组合物和方法的结合,然而当用抗CD19抗体与毒素或放射性治疗试剂联合使用时,优选上述的较低剂量。在某些实施方案中,当患者有低水平的CD19密度时,优选上述的较低剂量。

[0325] 在本发明的某些实施方案中,当使用嵌合的抗CD19抗体时,嵌合的抗体的剂量或总量应大于每kg患者体重大约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16mg。在本发明的其它实施方案中,当使用嵌合的抗CD19抗体时,嵌合抗体的剂量或总量应小于每kg患者体重大约1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2或0.1mg。

[0326] 在本发明的方法的某些实施方案中,本发明的抗体和/或组合物的给药剂量低于大约375mg/ $m^2$ ;剂量低于大约37.5mg/ $m^2$ ;剂量应低于大约0.375mg/ $m^2$ 和/或剂量应低于大约0.075mg/ $m^2$ 以及大约125mg/ $m^2$ 。在本发明方法的优选实施方案中,给药方案包含低剂量、重复间隔给药。例如:在一种实施方案中,本发明的组合物的给药剂量可低于每隔大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、125、150、175或200天大约375mg/ $m^2$ 。

[0327] 用本发明的组合物和方法治疗的人中,特定的剂量可以导致B细胞消耗,给药时间至少为大约1、2、3、5、7、10、14、20、30、45、60、75、90、120、150或180天或更长。在某些实施方案中,将前-B细胞(不表达表面免疫球蛋白)消耗。在某些实施方案中,将成熟B细胞(表达表面免疫球蛋白)消耗。在其它的实施方案中,B细胞的所有非恶性类型可显示消耗。可用任何这些类型的B细胞来测定B细胞消耗。B细胞消耗可在体液如血清中,或在组织如骨髓中测定。在本发明方法的优选实施方案中,相对于使用本发明合成物和方法治疗前患者的B细胞水平,消耗至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的B细胞。在本发明方法的优选实施方案中,相对于人典型的标准B细胞水平,B细胞排空至少为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在相关的实施方案中,用考虑到年龄、性别、体重及其它因素进行治疗的患者对比测定人典型的标准B细胞水平。

[0328] 在本发明的某些实施方案中,剂量为大约125mg/ $m^2$ 或更少的抗体或抗原结合片段导致在至少大约7、14、21、30、45、60、90、120、150或200天内B细胞消耗。在另一个典型的

实施方案中,大约37.5mg/ m<sup>2</sup>或更少的剂量导致在至少大约14、21、30、45、60、90、120、150或200天内B细胞消耗。在其它的实施方案中,大约0.375mg/m<sup>2</sup>或更少 的剂量导致在至少大约7、14、21、30、45或60天内B细胞消耗。在 另一种实施方案中,大约0.075mg/m<sup>2</sup>或更少的剂量导致在至少大约7、14、21、30、45、60、90、120、150或200天内B细胞消耗。在另外其 它的实施方案中,大约0.01mg/m<sup>2</sup>、0.005mg/m<sup>2</sup>或甚至0.001mg/m<sup>2</sup>或 更少的剂量导致在至少大约3、5、7、10、14、21、30、45、60、90、120、150或200天内B细胞消耗。根据这些实施方案,可通过任何适当的途径将剂量给药,但可任选地通过皮下途径给药。

[0329] 另一方面,本发明发现可使用比目前采用的方法所使用的抗体或抗体片段更低的剂量来实现B细胞消耗和/或对B细胞紊乱的治疗。这样,在另一种实施方案中,本发明提供了一种消耗B细胞和/或治疗B细胞 紊乱的方法,包含将有效量的特异结合于CD19的抗体向人体给药,其中所述剂量大约为500、475、450、425、400、375、350、325、300、275、250、225、200、175、150、125、100、75、60、50、37.5、20、10、5、2.5、1、0.5、0.375、0.25、0.1、0.075、0.05、0.001、0.0005mg/ m<sup>2</sup>或更少,导致在至少大约3、5、7、10、14、21、30、45、60、75、90、120、150、180,或200天或更长的时期内B细胞消耗(循环和/或 组织的B细胞)25%、35%、50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更多。在典型的实施方案中,大约125mg/m<sup>2</sup>或75mg/m<sup>2</sup>或更少的 剂量会导致在至少大约7、14、21、30、60、75、90、120、150或180天内至少大约50%、75%、85%或90%B细胞的消耗。在其它的实施方案中,大约50、37.5或10mg/m<sup>2</sup>的剂量会导致在至少大约7、14、21、30、60、75、90、120或180天内至少大约50%、75%、85%或90% B 细胞的消耗。在另一些其它的实施方案中,大约0.375或0.1mg/m<sup>2</sup>的剂量会导致在至少大约7、14、21、30、60、75或90天内至少大约50%、75%、85%或90%B细胞的消耗。在另一些实施方案中,大约0.075、0.01、0.001或0.0005mg/m<sup>2</sup>的剂量会导致在至少大约7、14、21、30或60天 内至少大约50%、75%、85%或90%B细胞的消耗。

[0330] 在本发明的某些实施方案中,可提高或降低剂量以保持血液或组织 中的恒定剂量,例如但不仅限于骨髓。在相关的实施方案中,提高或降 低剂量至大约2%、5%、8%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%和95%以使本发明组合物和方法的抗体保持在需要的 水平。

[0331] 在某些实施方案中,可根据患者对本发明组合物和方法产生的免疫 反应,调节剂量和/或降低输液速率。

[0332] 根据本发明方法的一个方面,可首先使用抗CD19抗体和/或本发明 的组合物的输入剂量,随后使用维持剂量直到治疗的B细胞恶性肿瘤发 展了或随后进行规定的疗程(例如:CAMPATH<sup>TM</sup>,MYLOTARG<sup>TM</sup>或 RITUXAN<sup>TM</sup>,后者可对接受治疗的患者使用增加规定剂量数量的剂量,作为产生的附加数据)。

[0333] 根据本发明方法的另一个方面,可先用本发明的组合物和方法预治 疗患者,检测出免疫性反应的最小值,或本发明的组合物和方法的最小 副作用。

[0334] 5.4.4毒性测试

[0335] 可用细胞培养或实验动物的标准药品规程,对本发明的组合物和/ 或治疗方案的耐受性、毒性和/或效力进行测试,例如:测定LD50(总 体50%死亡率的剂量)、ED50(总体 50%有效治疗的剂量)、以及IC50 (达到50%抑制作用的有效剂量)。在优选的实施方案中,剂量指达到 至少60%、70%、80%、90%、95%或99%循环B细胞消耗或循环免疫 球蛋白消

耗或两者都消耗的有效剂量。毒剂和治疗剂的剂量比例指治疗指数,可将其表示为LD50/ED50的比值。优选显示大的治疗指数的疗法。当使用显示毒副作用的疗法时,应注意设计输送系统,将该试剂输送到CD19表达细胞,以便将对CD19阴性细胞的潜在损害降到最低,并因此减少副作用。

[0336] 可用获得自细胞培养试验和动物研究的数据来制定人体所使用的组合物和/或治疗方案的剂量。该试剂的剂量优选在循环浓度的范围内,包括具有少量毒性或无毒的ED50。剂量可以依据使用的剂型和所用的给药途径,在此范围内改变。对于本发明方法中使用的任何疗法,都可用适当的动物模型测定治疗的有效剂量。根据动物模型的种类,按照技术上可接受的配方决定人体用的剂量,例如:Freireich等人,Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, monkey, dog, and human, Cancer Chemotherapy Reports, NCI 1966 40:219-244所提供的。从细胞培养试验所获得的数据可能对预测潜在的毒性有用。可以用动物研究来制定达到循环血浆浓度范围的特定剂量,所述范围包括如在细胞培养物中所测定的IC50(即测试的达到半-最大的症状抑制作用的混合物的浓度)。可用这样的信息更准确地测定对人体有用的剂量。可测量血浆的药物水平,例如:通过高效液相色谱法、ELISA或通过基于细胞的试验。

[0337] 5.5患者的诊断、阶段划分和治疗方案

[0338] 按照本发明的某些方面,根据很多因素选择本发明的组合物和方法的治疗方案和剂量,此处所述的很多因素包括但不仅限于,所治疗的B细胞疾病或紊乱的阶段。本领域技术人员可针对某一个或一群患者B细胞疾病或紊乱的特定阶段来确定适当的治疗方案。可用本领域的标准规程来制作剂量反应曲线,用来测定治疗B细胞疾病或紊乱不同阶段的患者所用的本发明的组合物的有效量。通常,与早期B细胞疾病或紊乱的患者相比,晚期B细胞疾病或紊乱的患者需要较大的剂量和/或在较长时段内更频繁地给药。

[0339] 可用本发明的抗CD19抗体、组合物和方法治疗B细胞疾病,包括B细胞恶性肿瘤。术语“B细胞恶性肿瘤”包括任何源于B细胞系细胞的恶性肿瘤。典型的B细胞恶性肿瘤包括,但不仅限于:B细胞亚型非霍奇金氏淋巴瘤(NHL),其包括低级/滤泡NHL、小淋巴细胞(SL)NHL、中级/滤泡NHL、中级扩散NHL、高级免疫母细胞NHL、高级成淋巴细胞NHL3、高级小无核裂细胞NHL;套膜-细胞淋巴瘤和庞大病NHL;伯基特氏淋巴瘤;多发性骨髓瘤;前-B急性淋巴母细胞性白血病及其它源自早期B细胞前体的恶性肿瘤;普通急性淋巴细胞性白血病(ALL);慢性淋巴细胞性白血病(CLL),其包括免疫球蛋白突变的CLL和免疫球蛋白非突变的CLL;毛细胞白血病;非急性淋巴母细胞性白血病;华氏巨球蛋白血症;扩散大B细胞淋巴瘤(DLBCL),其包括次级淋巴小结B细胞样(GCB)DLBCL、活化B细胞样(ABC)DLBCL5和3型DLBCL;前淋巴细胞白血症;轻链病;浆细胞瘤;骨硬化骨髓瘤;浆细胞性白血病;特征不明的单克隆丙种球蛋白病(MGUS);郁积多发性骨髓瘤(SMM);慢性多发性骨髓瘤(IMM);霍奇金氏淋巴瘤,其包括典型和小节淋巴细胞前-主导型;淋巴浆细胞淋巴瘤(LPL)和边缘区淋巴瘤,其包括胃粘膜结合的淋巴组织(MALT)淋巴瘤。

[0340] 发明人已表明本发明的抗体和组合物可以消耗成熟的B细胞。因此,另一方面,可用本发明来治疗成熟的B细胞恶性肿瘤(即:在细胞表面表达免疫球蛋白)包括但不仅限于滤泡性淋巴瘤、套膜-细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、扩散大B细胞淋巴瘤(DLBCL),其包括次级淋巴小结B细胞样(GCB)DLBCL、活化的B细胞样(ABC)DLBCL5、以及3

型DLBCL、霍奇金氏淋巴瘤,其包括典型的和小节的 淋巴细胞前主导型、淋巴浆细胞淋巴瘤(LPL)、边缘区淋巴瘤,其包括胃粘膜缔合淋巴组织(MALT)淋巴瘤、以及慢性淋巴细胞性白血病 (CLL),其包括免疫球蛋白突变的CLL和免疫球蛋白非突变的CLL。

[0341] 此外,CD19在B细胞发展中表达比,例如CD20早,因此特别适 于治疗前B细胞和不成熟的B细胞恶性肿瘤(即:在细胞表面不表达免 疫球蛋白),例如,在骨髓中。示例性的前B细胞和不成熟的B细胞恶 性肿瘤包括,但不仅限于,急性淋巴母细胞性白血病。

[0342] 在其它的特定实施方案中,可用本发明治疗结节外肿瘤。

[0343] 5.5.1B细胞恶性肿瘤的诊断和阶段划分

[0344] 癌症的发展阶段,此处所述癌症例如能形成肿瘤的B细胞疾病或紊乱(例如:非霍奇金氏淋巴瘤、扩散大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤和 伯基特淋巴瘤),通常以癌症通过身体传播的程度为特征,并且通常分 为下列四个结果预后的阶段。阶段I:癌症定位在特定的组织中,并且 未扩散到淋巴节。阶段II:癌症扩散到临近的淋巴结,即转移。阶段III: 在远离组织源的身体区域的淋巴结中发现癌症,并且与一个肿瘤相反, 可能包含大量的或多发的肿瘤。阶段IV:癌症扩散到身体的远离部分。可通过本领域技术人员熟知的临床观察和试验方法确定癌症的阶段。上 述癌症的阶段传统上可用于对以肿瘤形成为特征的癌症的临床诊断,并 可用于与用本发明的组合物和方法治疗B细胞疾病和紊乱相联系。一般 早期疾病指保持定位在患者身体的一部分或还没有转移的疾病。

[0345] 对于非形成肿瘤的B细胞疾病和紊乱,例如但不仅限于多发性骨髓 瘤,确定疾病阶段的标准不同。广泛应用Durie-Salmon阶段划分系统。在此阶段划分系统中,疾病的临床阶段(阶段I、II或III)取决于几个 测量数据,包括M蛋白的水平、溶解骨骼病变的数量、血红蛋白值和血 清钙水平。根据肾脏(肾) 功能(分为A或B) 来进一步划分阶段。按 照 Durie-Salmon阶段划分系统,阶段I(低细胞团) 具有下列全部特点: 血红蛋白值 $>10\text{g/dL}$ ; 血清钙值正常或 $\leq 12\text{mg/dL}$ ;骨骼x射线,正常的 骨骼结构(等级0) 或仅单骨浆细胞瘤;以及 低的M-组分产率:IgG值  $<5\text{g/dL}$ 、IgA值 $<3\text{g/dL}$ 、凝溶蛋白 $<4\text{g/24小时}$ 。阶段I的患者一般 没有相关器官或组织的损伤或症状。阶段II(中间细胞团) 的特点在于既不符 合阶段I,也 不符合阶段III。阶段III(高细胞团) 的特点在于下列中的 一个或多个: 血红蛋白值 $<8.5\text{g/dL}$ ; 血清钙值 $>12\text{mg/dL}$ ;高级的溶解骨 骼病变(scale3);高M-组分产率:IgG值 $>7\text{g/dL}$ 、IgA值 $>5\text{g/dL}$ 、凝 溶蛋白 $>12\text{g/24小时}$ 。亚分类(A或B),其中A指相对正常的肾功能(血清肌酸酐值 $<2.0\text{mg/dL}$ ) 而B指不正常的肾功能(血清肌酸酐值  $>2.0\text{mg/dL}$ )。

[0346] 另一个骨髓瘤的阶段划分系统是骨髓瘤的国际阶段划分系统 (ISS)。此系统可更有效地分辨阶段划分群,并且以容易测定的2- 小 球蛋白( $\beta2\text{-M}$ ) 和白蛋白的血清浓度水平为依据。根据骨髓瘤的ISS, 阶段I的特征是 $\beta2\text{-M}<3.5$ 并且白蛋白 $\geq 3.5$ ,阶段II的特征是 $\beta2\text{-M}<3.5$  并且白蛋白 $<3.5$ 或 $\beta2\text{-M}3.5-5.5$ ,阶段III的特征是 $\beta2\text{-M}5.5$ (多发性骨 髓瘤研究基金会,New Canaan,CT)。

[0347] 患者B细胞恶性肿瘤的阶段由临床确定。如上所指,对于实体肿瘤, 扩展、定位和肿块的数量是阶段的临床确定的首要因素。确定非肿瘤形 式的B细胞恶性肿瘤患者的阶段更加复杂,要求如上所述的血清水平测 量。

[0348] 对B细胞疾病和紊乱阶段的描述不限于上述。可以使用在诊断B细 胞疾病和紊乱的领域内已知的其它特征作为标准,来确定患者B细胞疾 病或紊乱的阶段。

[0349] 5.5.2 诊断B细胞恶性肿瘤的临床标准

[0350] 本领域中已知不同B细胞恶性肿瘤的诊断标准。历史上,一般根据高倍放大形态与免疫表现型的组合来进行诊断。最近,已经应用分子技术,例如基因表达分布来扩展B细胞恶性肿瘤的分子定义(参见,例如:Shaffer等人,Nature2:920-932(2002))。下文提供了对特定B细胞恶性肿瘤临床诊断的示范性方法。对本领域技术人员来说,其它适当的方法是显而易见的。

[0351] 5.5.2.1 滤泡性NHL

[0352] 通常,大多数NHL(除套膜细胞淋巴瘤外)具有高度突变的免疫球蛋白基因,这是机体超变异(SHM)的结果。NHL的大多数常见遗传失常是BCL6基因的易位和突变。

[0353] 滤泡性NHL通常为具有滤泡性生长模式的惰性B细胞淋巴瘤。其为美国和西欧第二大常见淋巴瘤。表现该病的中间年龄是60岁,并且有轻微雌性特征。无痛的淋巴结病是最常见的症状。测试经常显示血髓,有时还有周围血液的参与。根据滤泡内大细胞的比例,将滤泡性NHL划分为细胞学等级,从滤泡性小核裂细胞到大细胞占优势连续划分等级(参见:S.Freedman等人,Follicular Lymphoma,pp.367-388,In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA(2004);T.Lister等人,Follicular Lymphoma,pp.309-324,In Malignant Lymphoma,B.Hancock等人,eds.,Oxford University Press,New York,N.Y.(2000))。

[0354] 大多数滤泡性NHL的特点在于导致BCL2过表达的染色体14和18之间的易位。滤泡性NHL的特征还在于SHM和发育中的SHM与类似于次级淋巴小结(GC)B细胞的基因表达分布(参见,例如:Shaffer等人,Nature 2:920-932(2002)),它是该恶性肿瘤的公认的细胞源。重链和轻链的重新排列是典型特征。该疾病的肿瘤细胞表达单克隆的表面免疫球蛋白,大多数表达IgM。几乎所有的滤泡性NHL肿瘤细胞都表达抗原CD19、CD20、CD79a、CD21、CD35和CD10,但缺乏CD5和CD43的表达。可在骨髓中观察到小的核裂细胞侧小梁的渗入。(参见,S.Freedman等人,Follicular Lymphoma,pp.367-388,In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia,PA(2004);T.Lister等人,Follicular Lymphoma,pp.309-324, In Malignant Lymphoma,B.Hancock等人,eds.,Oxford University Press, New York,N.Y.(2000))。

[0355] 滤泡性NHL的诊断通常取决于为鉴定组织结构和细胞学特征而切断的结节的活组织检查。细小针的吸出物通常不足以,因为此步骤不大可能提供能用于鉴定的组织,不能提供足够的组织做附加的试验。同时指出双侧骨髓都要进行活组织检查,因为含量可能不均匀。附加的诊断步骤包括胸部x射线、胸、腹、颈和骨盆的计算机断层(CT)扫描、全部血球计数以及化学物分布。可以利用流式细胞光度术和免疫组织化学来辨别滤泡性NHL及其它成熟的B细胞淋巴瘤。(参见:S.Freedman等人,Follicular Lymphoma,pp.367-388,In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia,PA (2004);T.Lister等人,Follicular Lymphoma,pp.309-324, In Malignant Lymphoma,B.Hancock等人,eds.,Oxford University Press,New York, N.Y. (2000))。

[0356] 5.5.2.2 套膜细胞淋巴瘤

[0357] 套膜细胞淋巴瘤定位于次级毛囊的套膜节,其特点在于结节的和/或弥漫性生长

模式。套膜细胞淋巴瘤患者的中间年龄为60-65岁,此病 主要感染男性。为了诊断的目的,通常表现出来的特征是无显著特点的 淋巴结病。另外,脾经常肿大。这种B细胞淋巴瘤与 IgH位点和细胞周期蛋白D1基因之间的t (11;14) 有关,它导致细胞周期蛋白D1的过 表达。多于50%的病例表现出附加的染色体失常。套膜细胞淋巴瘤一般 不以SHM为特征(参见: W.Hiddemann等人,Mantle Cell Lymphoma, pp.461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004) ; D.Weisenburger等人, Mantle Cell Lymphoma,pp.28-41, In Malignant Lymphoma, B.Hancock 等人,eds.,Oxford University Press,New York,N.Y. (2000))。

[0358] 套细胞淋巴瘤细胞的免疫表型(流式细胞计或冰冻切片)的免疫组织化学显示它们几乎总是单克隆的、产生表面IgM。套细胞淋巴瘤细胞 也有产生表面IgD的。细胞表达抗原CD19、CD20、CD22和CD24,但 没有CD23。它们也表达表面抗原CD5,但没有CD10,从真性滤泡中心 细胞淋巴瘤中将其辨别出来,其几乎总是CD5阴性的。通常,发现节外 成分包括骨髓渗透物和肝脏肿瘤和胃肠神经束。套膜细胞淋巴瘤具有轻 度贫血和白血病的表现并不罕见(参见:A.Lai等人,Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma,pp.181-220, In W.Finn等人,eds., Hematopathology in Oncology,Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004) ;W.Hiddemann等人,Mantle Cell Lymphoma,pp.461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia,PA (2004) )。

[0359] 套膜细胞淋巴瘤的诊断包括周围血液以及骨髓和淋巴结活组织的 检查。另外,细胞遗传研究和免疫表现分型在分化诊断中是有用的(参 见:W.Hiddemann等人,Mantle Cell Lymphoma pp.461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004) ;D.Weisenburger等人, Mantle Cell Lymphoma,pp.28-41, In Malignant Lymphoma,B.Hancock 等人,eds.,Oxford University Press,New York,N.Y. (2000))。

[0360] 5.5.2.3伯基特氏淋巴瘤

[0361] 伯基特氏淋巴瘤是一种一般在儿童和年轻成人身上观察到的攻击 性的B细胞淋 巴瘤,并且通常与颌和/或腹部的重大疾病有关。大约20% 的患者有骨髓问题。地方性伯基特氏淋巴瘤包括埃-巴二氏病毒(EBV) 恶性细胞感染;发散形式独立于EBV感染。导致c-myc 基因反常的c-myc 对免疫球蛋白位点的易位,是该病的特点(t (8;14) (q24;q32))。有趣的是,c-myc序列的缺失好象涉及疾病的发散形式,而地方性形式 通常包括点突变或插入(参见:V.Pappa等人,Molecular Biology, pp.133-157, In Malignant Lymphoma,B.Hancock 等人,eds.,Oxford University Press,New York,N.Y. (2000))。伯基特氏淋巴瘤也以SHM 为特征,并且恶性细胞具有类似于GC B细胞的基因表达分布,表明该 恶性肿瘤源于GC B 细胞。

[0362] 伯克特淋巴瘤的免疫表现型显示该病的细胞表达CD19、CD20、 CD22和CD79a,但不 表达CD5、CD23、细胞周期蛋白D或末端转脱氧核 苷酰转移因子。通常,这些细胞对CD10和 BCL6呈阳性,并且通常对BCL2 呈阴性(参见: I.Magrath等人,Burkitt's Lymphoma, pp.477-501, In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams& Wilkins,Philadelphia,PA (2004) )。

[0363] 高级的B细胞伯基特氏样淋巴瘤是伯基特氏淋巴瘤和大的B细胞淋巴瘤之间的淋巴瘤界线。该淋巴瘤的细胞表达CD19和CD20,但在真性伯基特氏淋巴瘤中几乎总是存在的CD10的表达,却常常不存在。因为这个和其它的特征,有些人相信该淋巴瘤应该被分类为扩散大B细胞淋巴瘤(参见:K.Maclennan,Diffuse Aggressive B cell Lymphoma,pp.49-54, In Malignant Lymphoma,B.Hancock等人,eds.,Oxford University Press, New York,N.Y. (2000))。

[0364] 伯基特氏淋巴瘤的诊断通常取决于与该淋巴瘤有关的易位的检测;因此,通常进行传统的细胞遗传分析。使用长距离聚合酶链式反应技术 和荧光原位杂交(FISH)来检测在与该病有关的易位及其它基因改变处 的Ig-myc连接。(参见,R.Siebert,等人,Blood 91:984-990 (1998); T.Denysevych,等人,Leukemia,16:276-283 (2002))。

[0365] 5.5.2.4扩散的大B细胞淋巴瘤(DLBCL)

[0366] DLBCL是最常见的非霍奇金氏淋巴瘤,并且可以由小B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤或边缘区淋巴瘤产生。一般来说,患者表现出淋巴结病;然而,很大比例的患者也表现在节外位点,涉及胃肠的最常见。观察到涉及骨髓的大约有患者的15% (参见:Armitage等人,Diffuse Large B cell Lymphoma,pp.427-453, In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004))。临床、生物学和形态特征的异质性使得这组淋巴瘤难以进行亚分类。然而,两个不同的亚群已经确认了一个以胚中心B细胞(GC-DLBCL)为特征的表达基因,另一个在外周血液B细胞中过表达的基因。GC-DLBCL 患者的存活率显著好于活化B细胞类型(ABC)-DLBCL的患者。(参见:W.Chan, Archives of Pathology and Laboratory Medicine128 (12): 1379-1384 (2004))。

[0367] DLBCL表达细胞表面抗原CD19、CD20、CD22和CD79a。大多数病例中都表达CD10,大约10%的病例中表达CD5(参见:K.Maclennan, Diffuse Aggressive B cell Lymphoma, pp.49-54, In Malignant Lymphoma, B.Hancock等人,eds.,Oxford University Press, New York,N.Y. (2000))。DLBCL经常以BCL6的反常和/或BCL2易位到IgH位点为标记。GC B细胞样(GC) DLBCL的特点在于具有高度突变的免疫球蛋白基因的SHM 和具有GC B细胞样基因表达分布的恶性克隆中的发育中的SHM。大多数的GC DLBCL都经历过免疫球蛋白类型的改变。ABC-DLBCL的特点 在于NF- $\kappa$ B靶基因的高水平表达,包括BCL2、干扰素调节因子4、CD44、FLIP和细胞周期蛋白D。存在SHM,而不存在发育中的SHM, 并且ABC-DLBCL不具有GC B细胞基因表达分布。几乎所有的 ABC-DLBCL都高水平地表达IgM。

[0368] 5.5.2.5结节外边缘区淋巴瘤

[0369] 结节外边缘区淋巴瘤是一种存在于通常缺乏组织性的淋巴组织的 器官(例如:胃、唾液腺、肺和甲状腺)中的结节外淋巴瘤。它是一种 主要感染老年人的疾病,感染的平均年龄超过60岁。通常,在淋巴瘤发展前出现慢性炎症或自身免疫过程。胃粘膜-相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤,边缘区淋巴瘤最常见的种类,与幽门螺杆菌感染有关。研究显示 在抗生素给药后通过根除幽门螺杆菌感染可消除症状。胃MALT淋巴瘤 表现出来的症状包括非特异性的消化不良、心痛、恶心、胃肠出血和贫血。全身性症状很少见,如乳酸脱氢酶水平的提高。(参见:J.Yahalom 等人,Extranodal Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue,pp.345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch 等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004);

J.Radford, Other Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas, pp.325-330, In Malignant Lymphoma, B.Hancock等人, eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000)。全身性B症状包括超过2周发烧超过38°C, 没有感染、盗汗、极端疲劳或在之前超过6个月的时间里无故体重减轻大于或等于体重的10%的迹象)。

[0370] MALT淋巴瘤的免疫表型的特点在于CD20、CD79a、CD21和CD35 的表达和CD5、CD23 和CD10的缺少表达。大约一半的MALT淋巴瘤表达 CD43。一般在该疾病的肿瘤细胞中表达的免疫球蛋白为IgM,而不表达 IgD。这些特征是辨别该淋巴瘤与其它小的B细胞淋巴瘤,例如套细胞淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤的关键。在60%的MALT淋巴瘤病例中报道了三染色体3型。在25-40%的胃和肺的MALT淋巴瘤中, 观察到了t (11;18)。在其它MALT淋巴瘤中更少观察到该易位。T (11; 18) 与BCL10的核表达有关。(参见: J.Yahalom等人, Extranodal Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp.345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人, eds., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA (2004))。边缘区淋巴瘤通常以 SHM和发育中的SHM为特征。

[0371] 诊断步骤包括用免疫分型或流式细胞法来测定细胞表面标记的同一性。另外,应使用分子遗传分析测定t (11;18) 的存在,因为这是该疾病不会对抗生素反应的指示剂。组织学可用于确定幽门螺杆菌的存在。附加试验应包括全血细胞计数、基本生物化学试验, 其包括对乳酸脱氢酶的试验; 腹部CT扫描、胸和骨盆以及骨髓活组织检查。(参见: J.Yahalom等人, Extranodal Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp.345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人, eds., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA (2004))。

#### [0372] 5.5.2.6 结节边缘区的B细胞淋巴瘤

[0373] 结节边缘区的B细胞淋巴瘤是一种相对新分类的淋巴瘤, 对它的公开内容很少。它是一种初期的结节B细胞淋巴瘤, 与结节外和脾边缘区淋巴瘤具有共同遗传和形态特征, 但不定位在脾或结节外。已报道肝炎C病毒与该淋巴瘤有关, 例如: SjÖgren氏综合症。(参见: F.Berger等人, Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, pp.361-365, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人, eds., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA (2004))。

[0374] 结节边缘区的淋巴瘤具有多相的细胞学和形态学。由于其较高比例的大细胞, 该淋巴瘤不同于其它边缘区淋巴瘤(脾的和结节外的), 不能把它归类为真性低等B细胞淋巴瘤。结节边缘区淋巴瘤的遗传和免疫的表型包括CD19、CD20、BCL2、sIgM和细胞质IgG(cIg)的表达。这些细胞不表达CD5、CD10、CD23、CD43或细胞周期蛋白D1。MALT淋巴瘤的易位特征, t (11;18), 在结节边缘区淋巴瘤中观察不到。(参见: F.Berger等人, Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, pp.361-365, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人, eds., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA (2004))。

#### [0375] 5.5.2.7 脾边缘区淋巴瘤

[0376] 脾边缘区淋巴瘤是一种发展缓慢的小结节B细胞淋巴瘤, 其表现出显著的脾肿大和外周血液与骨髓渗入的临床特征。另外, 报道有较高水平的肝脏损害。肝炎C病毒的作用是该淋巴瘤的先决条件。脾边缘区淋巴瘤的免疫表型一般为CD20<sup>+</sup>、IgD<sup>+</sup>、BCL2<sup>+</sup>、p27<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>、

CD5<sup>-</sup>、CD10<sup>-</sup>、CD23<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD43<sup>-</sup>、BCL-6<sup>-</sup>和细胞周期蛋白D1<sup>-</sup>。遗传特征包括7q 缺失、p53改变和SHM。(参见:M.Piris等人, Splenic Marginal Zone Lymphoma, pp.275-282, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人, eds., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA (2004) )。

[0377] 诊断通常取决于免疫表型对细胞表面标记同一性的测定。遗传和生化分析,与细胞表面标记的数据结合,有助于区别该淋巴瘤与其它小的 B细胞淋巴瘤。(参见:M.Piris等人, Splenic Marginal Zone Lymphoma, pp.275-282, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人, eds., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA (2004) )。

[0378] 5.5.2.8急性(B细胞)淋巴细胞白血症(ALL)

[0379] ALL是一种基于骨髓的肿瘤,其主要感染儿童,在1-5岁间发病率最高。表现出的最常见症状包括疲劳、昏睡、发烧和骨骼与关节疼痛。疲劳和昏睡与表现出的贫血程度有关。白血球数的增加是常见的表现。胸照经常显示出骨骼病变。常见额外扩展,其影响中枢神经系统、精巢、淋巴结、肝、脾和肾。在仅仅大约5-10%的最近确诊的病例中能观察到前纵隔块。(参见:J.Whitlock等人, Acute Lymphocytic Leukemia, pp.2241-2271, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G.Lee 等人, eds. Williams&Wilkins, Baltimore, MD (1999) )。

[0380] ALL的免疫表型为CD10<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>和CD24<sup>+</sup>。前B细胞ALL 细胞表达细胞质,而不是表面免疫球蛋白,而成熟B细胞ALL(其只占 ALL病例的1-2%)与其它B细胞系的白血病可通过表面免疫球蛋白的表达相区别。ALL的细胞遗传特征包括t (8;14)、t (2;8) 和t (8;22)。虽然其很少在细胞遗传水平检出,但是t (12;21)可能是与儿童期ALL 相关的最常见的细胞遗传失常(在大约25%的病例中观察到)。(参见: M.Kinney等人, Classification and Differentiation of the Acute Leukemias, pp.2209-2240, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G.Lee 等人, eds. Williams&Wilkins, Baltimore, MD (1999) ; J Whitlock等人, Acute Lymphocytic Leukemia, pp.2241-2271; In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G.Lee 等人, eds. Williams&Wilkins, Baltimore, MD (1999) )。

[0381] 急性白血病的精确诊断通常取决于骨骼提取物和活组织检查。提取物涂片用于形态学、免疫学和细胞学的测定。骨髓中的淋巴母细胞的验证是ALL的诊断法。骨髓中存在大于5%的白血病成淋巴细胞可确诊 ALL,但多数要求大于25%以得到肯定诊断。将腰椎穿刺用于诊断中枢 神经系统损害。在ALL中可发现血清尿酸水平和血清乳酸脱氢酶水平的提高。(参见: M.Kinney等人, Classification and Differentiation of the Acute Leukemias, pp.2209-2240, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G.Lee 等人, eds. Williams&Wilkins, Baltimore, MD (1999) ; J.Whitlock等人, Acute Lymphocytic Leukemia, pp.2241-2271; In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G.Lee 等人, eds. Williams&Wilkins, Baltimore, MD (1999) )。

[0382] 5.5.2.9慢性淋巴细胞性白血病( CLL) /小B细胞淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL)

[0383] CLL/SLL是白血病的最常见种类。当该疾病进入外周血液和骨髓时, 称其为CLL。然而,当淋巴结及其它组织被与CLL中的细胞在免疫和形 态学上相同的细胞渗入,但当该疾病缺乏白血病的特征时,该疾病被称 为SLL。该疾病主要感染老年人,男性的发病率比女性高。无痛的淋巴 结病是最常见的表现。低丙种球蛋白血是表现出所有免疫球蛋白,而不

是任何免疫球蛋白的特定亚纲的水平降低的CLL/SLL的大多数病例的常见症状。常规血计数中常见无症状的患者(淋巴细胞值超过 $5000 \times 10^9/L$ )。多达20%的CLL/SLL病例报道了B症状。附加的诊断特征是骨髓有超过30%被不成熟的淋巴细胞渗入。淋巴结活组织检查通常显示带有易辨别淋巴细胞的结节的渗入。自身免疫现象经常与CLL/SLL有关,其包括自身免疫性溶血性贫血和免疫血小板减少。(参见:J.Gribben等人,Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocyte Leukemia, pp.243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams& Wilkins,Philadelphia,PA (2004); K.Maclennan,Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pp.43-47, In Malignant Lymphoma,B.Hancock等人,eds.,Oxford University Press, New York,N.Y. (2000); Clinical Oncology,A.Neal等人,Neal,Hoskin and Oxford University Press,co-publ.,NewYork,NY (2003))。

[0384] 与许多低等B细胞恶性肿瘤相比,很少在CLL/SLL中发现非随机相互易位。但是,报道的其它细胞遗传的失常包括13q14、11q22-23和17q13处的缺失,后两者涉及p53位点。大约20%的病例表现出三染色体12型。 $\beta$ -2小球蛋白的高水平、CD38表达的较高水平和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 的产生是CLL/SLL的全部特征。CLL/SLL的免疫表型对诊断很有帮助,其包括表面免疫球蛋白的微弱表达以及细胞抗原CD19、CD20和通常CD5和CD23的表达,所述表面免疫球蛋白通常指IgM,或IgM和IgG。(参见: J.Gribben等人,Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocyte Leukemia, pp.243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams& Wilkins, Philadelphia,PA (2004); K.Maclennan,Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pp.43-47, In Malignant Lymphoma,B.Hancock等人,eds.,Oxford University Press, New York,N.Y. (2000))。

[0385] 5.5.2.10B细胞前淋巴细胞白血病 (PLL)

[0386] PLL,曾经被认为是CLL的变体,现在知道它是一种明显不同的疾病。PLL通常是老年男性的疾病,其特征在于很高的白血球数(大于 $200 \times 10^9/L$ )和脾肿大。其他的症状包括贫血和血小板减少。PLL中的前淋巴细胞包含超过55%的血液和骨髓中的细胞。与CLL相比,在PLL中很少观察到自身免疫现象。(参见:J.Gribben等人,Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocyte Leukemia, pp.243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams& Wilkins, Philadelphia,PA (2004))。

[0387] PLL的免疫表型的特征在于CD19、CD21、CD22、CD24和FMC7的表达。PLL的细胞不表达CD23,而且大多数不表达CD5。PLL细胞表现出复杂的染色体失常,最常见的一些具有13q14和11q23的缺失。PLL细胞中p53突变的模式与在CLL中观察到的不同。鉴别诊断通常取决于全血细胞计数、组织学的、免疫表型的和遗传的分析。(参见:J.Gribben等人,Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pp.243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams& Wilkins, Philadelphia,PA (2004))。

[0388] 5.5.2.11毛细胞白血病 (HCL)

[0389] HCL是一种罕见的、发展缓慢的慢性白血病,男性比女性更易感染,并且主要感染

中年人。典型症状包括大量的脾肿大和全血细胞减少。外周血液和骨髓包含典型的“毛细胞”，其通过细胞质投射为B淋巴细胞。超过90%的HCL患者出现骨髓渗入。(参见:Clinical Oncology,A.Neal 等人,Neal,Hoskin and Oxford University Press,co-publ.,New York, NY (2003) ;J.Johnston,Hairy Cell Leukemia,pp.2428-2446,In Wintrobe's Clinical Hematology,Tenth Edition,G.Lee等人,eds.Williams&Wilkins, Baltimore, MD (1999))。

[0390] 细胞遗传分析表明在19%的病例中存在纯系失常,而且涉及染色体 5、7和14数量上和结构上的失常。毛细胞白血病中,TNF- $\alpha$ 的血清浓度水平提高,其与肿块负载有关。毛细胞白血病细胞表达表面免疫球蛋白 (IgG和IgM) 和CD11c、CD19、CD20、CD22和典型地表达CD25。另外,还表达FMC7、HC-2和CD103。HCL细胞不表达CD5或CD10。诊断通常涉及骨髓提取物、细胞遗传学、血涂片和免疫表型的使用。(参见: Clinical Oncology,A.Neal等人, Neal,Hoskin and Oxford University Press, co-publ.,New York, NY (2003) ; J.Johnston,Hairy Cell Leukemia, pp.2428-2446,In Wintrobe's Clinical Hematology,Tenth Edition,G.Lee 等人,eds.Williams&Wilkins,Baltimore,MD(1999))。

[0391] 5.5.2.12前体B细胞成淋巴细胞淋巴瘤/前-B细胞急性成淋巴细胞白血病/成淋巴细胞淋巴瘤

[0392] 前体B细胞成淋巴细胞淋巴瘤/前-B细胞急性成淋巴细胞白血病/成淋巴细胞淋巴瘤是一种前体T或B细胞的疾病。T和B细胞成淋巴细胞性淋巴瘤形态相同,但根据骨髓渗入或骨髓涉及的程度可能导致临床上的区别。85-90%的成淋巴细胞性淋巴瘤是T细胞通过T细胞衍生残余物所衍生的。成淋巴细胞性淋巴瘤的平均(感染)年龄为20岁,男性居多。外周淋巴结损害是表现出来的常见特征,尤其会发生在颈、锁骨和腋窝区域。该疾病常表现出骨髓损害。中枢神经系统的表现并不常见,但经常出现在复发感染病例中。涉及的其它部位可包括肝、脾、骨骼、皮肤、咽和精巢(参见:J.Sweetenham等人,Precursor B-and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma,pp.503-513,In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004))。

[0393] 前体B细胞成淋巴细胞性淋巴瘤表达不成熟的标记B细胞标记例如 CD99、CD34和末端脱氧核苷酸转移酶。这些细胞也表达CD79a、CD19, 有时表达CD20, 并一般缺乏CD45和表面免疫球蛋白的表达。在11q23 以及 t (9;22) (q34;q11.2) 和 t (12;21) (p13;q22) 处的易位与不良的预后有关。好的预后与超二倍体染色体组型有关,尤其与三染色体4、10和17型以及 t (12;21) (p13;q22) 有关。(参见:J.Sweetenham 等人,Precursor B-and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma,pp.503-513,In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004))。

[0394] 诊断性试验包括淋巴结活组织检查、血液试验、x射线、CT扫描和腰椎穿刺,以测定恶性细胞的脑脊液。

[0395] 5.5.2.13初期的纵隔大B细胞淋巴瘤

[0396] 初期的纵隔大B细胞淋巴瘤是一种主要发生于年轻妇女中的扩散性大B细胞淋巴瘤,其特征为源于胸腺的局部侵入的前纵隔肿块。最近可扩散到末端节点,并且骨髓损害不常见。常见全身性症状。该疾病与结节的大细胞淋巴瘤类似,但其具有不同的遗传、免疫和形态特征。

[0397] 初期的纵隔大B细胞淋巴瘤的肿瘤细胞免疫表型经常是表面免疫球蛋白阴性的,但表达这种B细胞结合抗原,如:CD19、CD20、CD22和CD79a。也通常表达CD10和BCL6。浆细胞结合标记CD15、CD30、上皮细胞的膜抗原(EMA)很少表达。BCL6和c-myc基因排列也不常见。纯系的免疫球蛋白重组、免疫球蛋白可变区和基因超突变,伴随BCL6超突变的存在说明该淋巴瘤衍生自成熟的生发中心或后生发中心B细胞。可能与该疾病的肿瘤有关的染色体易位与在扩散性大细胞淋巴瘤的其它形式中观察到的相似。(参见:P.Zinzani等人,Primary Mediastinal Large B cell Lymphoma,pp.455-460,In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004))。

[0398] 初期的纵隔大B细胞淋巴瘤的诊断测试通常包括全面的身体检查、完全的血液和生化分析、全身电脑X射线层析照相法和骨髓活组织检查。镓-67扫描是对分期、治疗应答和复发评测的有效试验。(参见:P.Zinzani等人,Primary Mediastinal Large B cell Lymphoma,pp.455-460,In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004))。

[0399] 5.5.2.14淋巴浆细胞淋巴瘤(LPL)/淋巴浆细胞免疫cytoma/Waldstrom氏巨球蛋白血症

[0400] LPL/淋巴浆细胞免疫cytoma/Waldstrom氏巨球蛋白血症是一种通常发展缓慢,并经常侵入骨髓、淋巴结和脾的结节淋巴瘤。它通常是一种老年疾病,男性略占主导。大多数患者在其血清中有单克隆的IgM病变蛋白(>3g/dL),其导致血清的过高粘滞性。肿瘤细胞具有细胞浆形态。LPL亚型的特点在于染色体9和14之间重复出现的易位,其涉及PAX5和免疫球蛋白重链位点。LPL的特点在于SHM以及发育中的SHM,其被认为源自后-GC B细胞。(参见:A.Rohatiner等人,Lymphoplasmacytic Lymphoma和Waldström's Macroglobulinemia,pp.263-273,In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004);K.Maclennan,Diffuse Indolent B cell Neoplasms,pp.43-47,In Malignant Lymphoma,B.Hancock,等人,eds.,Oxford University Press,New York,N.Y. (2000);A.LaI等人,Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma,pp.181-220,In W.Finn等人,eds.,Hematopathology in Oncology,Kluwer Academic Publishers, Norwell,MA (2004))。

[0401] 该疾病的免疫表型显示B细胞结合抗原CD19、CD20、CD22和CD79a的表达,并缺乏CD5、CD10和CD23的表达。丰富的表面免疫球蛋白和CD20的存在,CD5和CD23表达的缺乏,以及胞质免疫球蛋白的存在是帮助辨别该疾病与慢性淋巴细胞白血病的特征。该疾病的症状也是t(9; 14)(p13;q32)。(参见:A.Rohatiner等人,Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia,pp.263-273,In Non-Hodgkin's Lymphomas,P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia,PA (2004);K.Maclennan,Diffuse Indolent B cell Neoplasms,pp.43-47,In Malignant Lymphoma,B.Hancock等人,eds., Oxford University Press,New York,N.Y. (2000);R.Chaganti等人,Cytogenetics of Lymphoma,pp.809-824,In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA (2004))。

[0402] 诊断检查一般包括全血细胞计数、肾和肝功能试验、CT扫描、活组织检查和骨髓提取、蛋白电泳,来测出病变蛋白和血清粘性的数量和表征。将 $\beta_2$ -小球蛋白的测量用作预

后检查。(参见:A.Rohatiner等人, Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, pp.263-273, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人, eds., Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, PA (2004))。

[0403] 5.5.2.15非急性淋巴母细胞性白血病

[0404] 非急性淋巴母细胞性白血病是一种ALL的亚型,其缺乏B-或T-细胞特征。白血病胚细胞的表型分析显示一种典型的非ALL模式,即:CD10(常见的ALL抗原)-阴性,强烈地HLA-DR-阳性,以及CD19(B4)-阳性(参见:Katz等人(1988)Blood 71(5):1438-47)。

[0405] 5.5.2.16霍奇金氏淋巴瘤

[0406] 霍奇金氏淋巴瘤通常发生在年轻成年人的淋巴结内。它可分为典型的亚型和少见的小节淋巴细胞为主的亚型。典型的类型表现SHM,但不表现发育中的SHM,且没有GC B细胞基因表达分布。相反,小节淋巴细胞为主的亚型的特点在于SHM和发育中的SHM和GC B细胞基因表达分布。这两种类型在临幊上和生物学上不同,但它们具有某些共同特征,例如:在良性发炎细胞内缺少肿瘤细胞。(B.Schnitzer等人,Hodgkin Lymphoma, pp.259-290, In W.Finn and L.Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004))。

[0407] 表型上的最常见特征为无痛的淋巴结扩增,通常在颈部,但偶而在腹股沟区域。淋巴结的蜡状物和苍白色也是该疾病的特征。在大约三分之一的患者中观察到B症状。单独的结节外损害很少,观察到的扩散发生在结节外的病例大约是其数目的10-20%。(参见:P.Johnson等人, Hodgkin's Disease: Clinical Features, pp.181-204, In Malignant Lymphoma, B.Hancock等人, eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000))。

[0408] Reed-Sternberg (RS) 细胞是霍奇金氏淋巴瘤的恶性肿瘤细胞。RS 细胞和其变体表达CD15、CD25、CD30和转铁蛋白受体。另外这些细胞表达多克隆的细胞质免疫球蛋白。在霍奇金氏淋巴瘤的大多数病例中, RS细胞不表达CD45,这是一个帮助辨别该疾病与非霍奇金氏淋巴瘤的特征。已证明在大约一半的霍奇金氏淋巴瘤病例中, Epstein Barr 病毒存在于Reed-Sternberg细胞内,但其作用还不清楚。

[0409] 最常使用淋巴结活组织检查进行诊断。其他的诊断检查包括全血计数(通常可见血液学测试正常;在大约20%的病例中,白血球数小于  $1.0 \times 10^9/L$ )、红细胞沉降率(经常在该疾病的早期阶段升高)、生物化学试验,其包括电解液、尿素、肌酸酐、尿酸盐、钙(血钙过多很少见,但出现时就与大范围骨骼损害有关)、肝血测试、乳酸脱氢酶(水平升高常与前期疾病有关)、白蛋白和beta<sub>2</sub>-小球蛋白(β2-M)。Lymphangiograms和胸x射线和胸部、腹部及骨盆的CT扫描对确认失常淋巴结和结节外损害的范围很重要。当骨骼损害不正常,且该活组织检查的结果不影响临床排列或预后时,一般认为可选择进行骨髓活组织检查。现在通常不进行脾切除,因为它很少影响排列,并且CT或MRI图像提供了有关脾状况的消息。p55、TNF和sICAM-1水平的显著提高与该疾病的阶段、症状的出现和完全反应率有关。(参见:P.Johnson等人, Hodgkin's Disease: Clinical Features, pp.181-204, In Malignant Lymphoma, B.Hancock等人, eds., Oxford University Press, New York, N.Y. (2000); Clinical Oncology, A.Neal等人, Neal, Hoskin and Oxford University Press, co-publ., New York, NY (2003); R.Stein, Hodgkin's Disease, pp.2538-2571, In Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, G.Lee 等人, eds. Williams&Wilkins,

Baltimore, MD (1999) )。

[0410] 5.5.2.17 多发性骨髓瘤

[0411] 多发性骨髓瘤是一种血浆细胞的恶性肿瘤。肿瘤细胞位于骨髓，并且溶骨的骨损害是特征。在免疫球蛋白位点之一和各种其它的基因，如：周期蛋白D1、周期蛋白D3、cMAF、MMSET (多发性骨髓瘤SET-功能区蛋白) 或成纤维细胞生长因子受体3之间的互换的染色体易位，被认为是初期的致癌因素。多发性骨髓瘤的特点在于SHM5，并且公认的起源细胞是后-GCB细胞。多发性骨髓瘤一般首先通过症状，例如重复感染、疲劳、疼痛以及肾脏问题而得到鉴定，并通过临床试验验证 (参见，例如：Cancer: Principles and Practice of Oncology. 6th edition. DeVita, V.T., Hellman, S. 和 Rosenberg, S.A. editors. 2001 Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia, PA 19106 pp. 2465-2499。)

[0412] 在某些实施方案中，接受本发明的组合物和方法治疗的候选患者可 经过对血液和/或尿液的进一步诊断检查，以证实多发性骨髓瘤的诊断或 怀疑，包括但不仅限于，通过全血细胞计数 (CBC) 测试来确定在CBC 中报道的细胞种类是否处于其正常范围内，其在本领域中已知，通过血液化学分布来确定各种血液组分的水平，例如白蛋白、血液尿素氮 (BUN)、钙、肌酸酐和乳酸脱氢酶 (LDH) 是否偏离标准值。也可检测  $\beta_2$ -小球蛋白 ( $\beta_2$ -M) 的血清浓度水平，并使标记替代 IL-6，骨髓 瘤细胞的一种生长因子。尿分析可用于测定尿液中的蛋白水平。电泳可 用于测定各种蛋白的水平，包括血液 (称为血清蛋白电泳或SPEP) 或尿 液 (称为尿电泳或UEP) 中的M蛋白。一种附加试验，被称为免疫固定 电泳 (IFE) 或免疫电泳，也可用来提供更多有关表现出失常抗体的蛋白类型的特定信息。各种蛋白的测定变化和比例，尤其是M蛋白，可 用于追踪骨髓瘤疾病的发展，并对治疗方案产生应答。多发性骨髓瘤的特 点在于骨髓瘤肿瘤细胞分泌的M蛋白的大量增加。

[0413] 对于骨骼的诊断检查也可用来证实多发性骨髓瘤的诊断或怀疑，包 括，但不限于，X射线及其它图像测试--包括骨骼(骨骼的) 检查、磁共 振成象 (MRI) 和计算机轴向断层成象 (CAT)，也被称为计算断层分 析 (CT) --可测定骨骼构造的变化并测定骨骼中肿瘤的数目和大小。骨 髓提取或骨髓活组织检查可用于检测骨髓中浆细胞的数量增加。提取要 求骨髓液样品，活组织检查要求固体骨组织样品。在两个测试中，优选 取自骨盆(髋骨) 的样品。胸骨(胸骨) 也可用于骨髓的提取。

[0414] 多发性骨髓瘤患者一般分为下列三类，这可帮助确定有效的治疗方 案。特征不明的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS) 的一般特征是血清M蛋 白水平小于3g/dL、骨髓纯系的浆细胞小于10%，没有其它B细胞紊乱的 证据，并且没有相关器官或组织损伤，例如血钙过多 (血清钙水平升高)、通过增加的血清肌酸酐、贫血或骨骼损害表现出的肾功能衰竭。无症 状 的骨髓瘤一般是阶段I，并包括郁积性多发性骨髓瘤 (SMM) 和发展缓 慢的多发性骨髓瘤 (IMM)。SMM的特点在于血清M蛋白质大于或等于 3g/dL, IMM的特点在于骨髓纯系的浆细胞大于或等于骨髓细胞的10%。有症状的骨髓瘤的特点在于血清和/或尿中的M蛋白，包括阶段II的多发 性骨髓瘤的特点在于骨髓纯系的浆细胞或浆细胞瘤的出现，阶段III多发 性骨髓瘤的特点在于相关器官或组织的缺陷。

[0415] 骨硬化骨髓瘤是罕见POEMS综合症的一部分 (多发性神经病、器官 巨大症、内分泌病单株丙种球蛋白病和皮肤损害)。发病率峰值是年龄 在40到50岁。全身性症状包括骨骼的病变、髓浆细胞<5%、正常CBC、血小板增加和器官巨大症。CSF具有非细胞表现的高蛋

白.M-蛋白水平 低(<3g/dL, 中值=1.1g/dL);重链类-通常为 $\alpha$ 或 $\gamma$ ;轻链类-通常为 $\lambda$ ; 罕见尿单克隆和偶尔的冷球蛋白血症。50%的患者出现近侧和远侧衰弱 的神经病,知觉丧失在粗纤维中比在细纤维中更严重;以及脱髓鞘和长 期远侧潜伏。

[0416] 郁积多发性骨髓瘤患者通常表现出数月/数年的稳定疾病;没有贫 血、骨骼病变、肾机能不全或血钙过多;骨髓和单克隆血清蛋白中有 >10%的浆细胞。郁积多发性骨髓瘤的判断与多发性骨髓瘤的诊断相一 致;然而,没有进程的证据。这些是发展缓慢的病例,诊断的肿瘤细胞 肿块少,S位相的骨髓浆细胞的比例低(<0.5%)。特定的临床特征包括: 血清M蛋白水平>3g/dL和/或骨髓浆细胞 $\geq 10\%$ ;没有贫血、肾衰竭、血 钙过多、溶解的骨骼损害。

[0417] 发展缓慢(或无症状的)多发性骨髓瘤是一种不表现症状,通常在 筛选实验室研究之后偶然确诊的多发性骨髓瘤。发展缓慢的多发性骨髓 瘤与郁积性骨髓瘤相似,但很少有骨骼病变和轻度贫血。发展缓慢的多 发性骨髓瘤的大多数病例在3年内发展成明显的多发性骨髓瘤。诊断的 标准与多发性骨髓瘤的相同,除了:没有骨骼病变或无症状的溶解性病 变(X射线检查);对于IgG,M组分水平<3g/dL、IgA2g/dL、尿轻链<4g/24h; 血红蛋白>10g/dL、血清钙正常、血清肌酸酐<2mg/dL并且无感染。

[0418] 5.5.2.18孤立性浆细胞瘤

[0419] 孤立性浆细胞瘤是浆细胞肿瘤的范围之一,其范围从良性单克隆丙 种球蛋白病到孤立性浆细胞瘤到多发性骨髓瘤。全部孤立性浆细胞瘤病 例的大约70%最终会导致多发性脊髓瘤。这些疾病的特点在于产生特征 性异型球蛋白的B细胞的增殖。孤立性浆细胞瘤导致纯系的浆细胞在孤 立的位点上增殖,通常是单一骨骼或额外组织位点。孤立性浆细 胞瘤的 诊断标准包括组织学上证实的单一病变、正常骨骼活组织检查、阴性骨 胱检查、无 贫血、正常的钙和肾功能。大多数病例表现出血清M蛋白(病 变蛋白)的最小增加。诊断的中 值年龄是50-55,大约比多发性脊髓瘤的 中值年龄年轻5-10年。(参见:C.Wilson, The Plasma Cell Dycrasias, pp.113-144, In W.Finn and L.Peterson,eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers,Norwell,MA(2004) , S.Chaganti等人, Cytogenetics of Lymphoma,pp.809-824, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P.Mauch等人,eds.,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA, (2004) )。

[0420] 浆细胞瘤的免疫表型和遗传特性显得与多发性骨髓瘤类似。

[0421] 5.5.2.19轻链疾病/轻链沉积疾病(LCDD)

[0422] LCDD是一种由组织中沉积的免疫球蛋白轻链(通常指kappa轻链) 的过合成引起的浆细胞体液不调紊乱。患者通常表现出器官机能障碍、虚弱、疲劳和体重减轻。在将近 80%的LCDD病例中可检测到单克隆免 疫球蛋白。可用免疫荧光技术检测单克隆kappa轻 链,其受到由轻链提 供过量背景染色倾向的限制,因此,超微结构免疫金标记物可能是必 须 的。(参见:C.Wilson,The Plasma Cell Dyer asias,pp.113-144, In W.Finn and L.Peterson,eds.,Hematopathology in Oncology,Kluwer Academic Publishers, Norwell,MA(2004) )。

[0423] 5.5.2.20浆细胞性白血病(PCL)

[0424] PCL,一种浆细胞体液不调,是多发性脊髓瘤的一种罕见的攻击性 变体。浆细胞性

白血病的标准是外周血液绝对浆细胞数大于 $2 \times 10^9/L$ 或 浆细胞多于白色血液细胞的20%。按照细胞质轻链限制,用流式细胞计 测定出现的CD138<sup>+</sup>数目,将可根据浆细胞的特征从淋巴瘤中辨别出 PCL。PCL细胞的特征也在于缺乏表面轻链和CD19的表达,并且不表达或微弱表达CD45。大约50%的PCL病例表达CD20,大约50%缺乏 CD56的表达。在PCL患者中观察到的遗传失常与在多发性骨髓瘤患者 中观察到的相同,但在PCL中发现的频率更高。(参见:C.Wilson,The Plasma Cell Dycrasias,pp.113-144,In W.Finn and L.Peterson, eds., Hematopathology in Oncology,Kluwer Academic Publishers,Norwell, MA, (2004))。

[0425] 浆细胞性白血病有两种形式:如果初期诊断是基于骨髓瘤的白血病 阶段,就会表现出初期类型,否则就属于二型。初期浆细胞性白血病与 年轻、肝脾肿大、淋巴结病有关,与二型相比有更少的溶解骨骼病变,但有更差的预后。浆细胞性白血病患者的外周血液有大于20%的浆细胞,所述浆细胞为2000/ml或以上的绝对数。

[0426] 5.5.2.21特征不明的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS)

[0427] MGUS是一种以电泳同性免疫球蛋白或良性M-组分为特征的相对 常见病症。该病症的出现显得随年龄而增加。大多数携带M-组分的个体 不会发展成恶性浆细胞体液不调,例如多发性脊髓瘤。但是,一些具有 该病的个体有关的恶性肿瘤病症。当发生症状时,患者可有肝或脾肿大 和pleuroneuropathy。(参见:J.Foerster,Plasma Cell Dycrasias: General Considerations,pp.2612-2630,In Wintrobe's Clinical Hematology,Tenth Edition,G.Lee等人,eds.Williams&Wilkins,Baltimore,MD(1999))。

[0428] 可通过外周血液中循环的单克隆浆细胞数量的增加,将MGUS与多 发性骨髓瘤区分开。M-组分的血清特征与其它浆细胞体液不调病症相 同,但是,M-组分的总浓度通常小于30g/L。病变蛋白通常是IgG;但是 多发性病变蛋白可能表现为包括IgG、IgA、IgM。每一个体免疫球蛋白 类型的相对数量一般与正常血清中发现的成比例。蛋白血或蛋白尿很少见。血液与尿中的M蛋白水平的顺序测定、临床和实验室特征的连续监 测(包括蛋白质电泳)是从早期浆细胞体液不调中辨别MGUS的最可靠 方法。(In Wintrobe's Clinical Hematology,Tenth Edition,G.Lee等人, eds.Williams&Wilkins,Baltimore,MD(1999))。

[0429] 5.5.2.22成熟的B细胞恶性肿瘤

[0430] 发明人显示了发明的抗CD19组合物可消耗成熟的B细胞。因此, 如另一个方面,可实施本发明来治疗成熟B细胞恶性肿瘤,包括但不仅 限于滤泡性淋巴瘤、套膜-细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、扩散性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL),其包括次级淋巴小结 B细胞样 (GCB) DLBCL、活化B细胞样 (ABC) DLBCL和3型DLBCL、霍奇金氏淋巴 瘤,其包括典型的和小节淋巴细胞为主的类型、淋巴浆细胞淋巴瘤 (LPL)、边缘区淋巴瘤,其包括胃粘膜结合淋巴组织 (MALT) 淋巴 瘤以及慢性淋巴细胞性白血病 (CLL),其包括免疫球蛋白突变的 CLL 和免疫球蛋白未突变的CLL。

[0431] 5.5.2.23前B细胞恶性肿瘤

[0432] 进一步地,在B细胞发展中,CD19比,例如CD20更早表达,因 此CD19尤其适合于治疗前B细胞和未成熟B细胞恶性肿瘤,例如:在 骨髓中。典型的前B细胞和未成熟B细胞恶性肿瘤,包括但不仅限于套 细胞淋巴瘤、前B细胞急性淋巴母细胞性白血病、前体B细胞成淋 巴细 胞性淋巴瘤以及其它以CD19表达为特征的恶性肿瘤。

[0433] 5.5.3在样品或患者中测定CD19密度

[0434] 当不需要时,对CD19密度的测定可用于进一步表征患者的诊断。测定与细胞结合的抗体的密度的方法为本领域技术人员所知(参见,例如:Sato等人,J. Immunology 165: 6635-6643 (2000);其公开了测定特异CD抗原的细胞表面密度的方法)。其它标准方法包括Scatchard分析。例如:可分离抗体或片段,进行放射性标记,确定放射性标记的抗体的比活。然后将抗体与表达CD19的靶细胞相接触。可测量与细胞有关的放射性,并且根据比活,确定与细胞结合的抗体或抗体片段的量。

[0435] 选择性地,可使用荧光活化细胞排序(FACS)来分析。通常,抗体或抗体片段与表达CD19的靶细胞结合。然后添加与抗体结合的第二种试剂,例如:荧光标记的抗免疫球蛋白抗体。然后可测定荧光着色,并用其确定与细胞结合的抗体或抗体片段的密度。

[0436] 作为另一个适当的方法,可用可检测的标记直接标记抗体或抗体片段,例如荧光基团,并与靶细胞相结合。确定标记与蛋白的比例,将其与标准珠相比较,所述的标准珠带有与其结合的已知数量的标记。把与细胞结合的标记数量与已知标准相比较,可用于计算出与细胞结合的抗体的总量。

[0437] 在又一个方面中,本发明提供了一种用于在体外或体内检测样品或个体中CD19的存在和/或密度的方法。这也可用于监测疾病和治疗的效果,以及测定和调节给药抗体的剂量。在体内方法中可以采用成像技术,例如PET(电子发射断层扫描)或SPECT(单光子发射计算机断层照相)。选择性地,可通过共价连接的螯合剂用铟标记抗CD19抗体。可用标准 $\gamma$ 辐射给产生的抗体成像,所用方法与用ZEVALIN<sup>TM</sup>(铟标记的抗CD20mAb)(Biogen Idee)给CD20抗原成像相同。

[0438] 在一种实施方案中,可通过在可使本发明的抗体与人的CD19抗原之间形成复合物的条件下,将待测样品,选择性地伴随对照样品,与本发明的人的抗CD19抗体相接触,来实现体内方法。然后检出复合物的形成(例如:使用FACS分析或Western杂交)。当使用伴随测试样品的对照样品时,在两种样品中都可检出复合物,并且任何在复合物的形成中,在样品间统计上显著的差异都表现出测试样品中人的CD19的存在。

[0439] 在其它实施方案中,可将平均荧光强度用作CD19密度的量度。在这样的实施方案中,将B细胞从患者体内除去,并用荧光标记物标记的CD19抗体进行染色,并用流动细胞计数法测定荧光强度。可用每个B细胞的平均强度测量和表示荧光强度。使用这样的方法,可比较患者使用本发明的方法和组合物治疗前后,或患者之间以及B细胞上hCD19正常水平的代表性CD19密度的平均荧光强度。

[0440] 在已经测定了B细胞上CD19表达密度的患者中,CD19的密度可能影响所用本发明的组合物和方法的抗CD19抗体的剂量和/或治疗方案的确定和/或调整。例如:当CD19密度高时,可能使用低效率的抗CD19抗体介导人的ADCC。在某些实施方案中,当用本发明的组合物和方法治疗的患者具有较低的CD19密度时,可使用较高剂量的本发明的组合物和方法的抗CD19抗体。在其它实施方案中,当用本发明的组合物和方法治疗的患者具有较低的CD19密度时,可使用较低剂量的本发明的组合物和方法的抗CD19抗体。在某些实施方案中,当用本发明的组合物和方法治疗的患者具有较高的CD19密度时,可使用较低剂量的本发明的组合物和方法的抗CD19抗体。在某些实施方案中,可比较患者体内的CD19密度和CD20密度,可将CD19密度与人类或特定患者群的平均CD19密度相比较,或可将CD19密度

与治疗前或B细胞 疾病或紊乱发病前患者的CD19水平相比较。在某些实施方案中,用本 发明的组合物和方法治疗的患者具有B细胞恶性肿瘤,其中CD19存在 于B细胞的表面上。

[0441] 5.6免疫疗法的治疗方案

[0442] 在治疗方法/方案中使用的抗CD19抗体组合物,如此处指的“抗 CD19免疫疗法”,可以是裸抗体、免疫共轭物和/或融合蛋白。本发明 的组合物可作为单剂疗法或与其它治疗剂或治疗方案联合使用。可在一 种或多种治疗剂给药之前、同时或之后,进行抗CD19抗体或免疫共轭 物给药。可用于与本发明的组合物联合的治疗方案的治疗剂,包括任何 抑制或防止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。例子包括但不仅限于, 放射性同位素、化疗剂和毒素,例如:细菌、真菌、植物或动物来源的 酶促活化毒素,或其片段。

[0443] 可用转基因的动物模型,例如下文6.2节所述的小鼠模型测试此处 所述的治疗方案,或任何想要的治疗方案的效力,所述小鼠模型表达添 加或取代天然CD19抗原的人CD19抗原。因此,可在动物模型中测试 抗CD19抗体治疗方案,来在对人类给药前确定效力。

[0444] 可采用本发明的抗CD19抗体、组合物和方法治疗B细胞疾病,包 括B细胞恶性肿瘤。术语“B细胞恶性肿瘤”包括任何来源于B细胞系 细胞的恶性肿瘤。典型的B细胞恶性肿瘤包括,但不仅限于:B细胞亚 型非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL),其包括低级/滤泡NHL、小淋巴细胞 (SL) NHL、中级/滤泡NHL、中级扩散NHL、高级免疫母细胞NHL、高级成 淋巴细胞NHL、高级小无核裂细胞NHL;套膜-细胞淋巴瘤和巨大病 NHL;伯基特氏淋巴瘤;多发性骨髓瘤;前B急性淋巴母细胞性白血病 及其它衍生自早期B细胞前体细胞的恶性肿瘤;普通急性淋巴细胞白血病 (ALL);慢性淋巴细胞性白血病 (CLL),其包括免疫球蛋白突变CLL 和免疫球蛋白未 突变CLL;毛细胞白血病;非急性淋巴母细胞性白血病;华氏巨球蛋白血症;扩散的大B细胞淋巴瘤 (DLBCL),其包括次级淋 巴小结B细胞样 (GCB) DLBCL、活化B细胞样 (ABC) DLBCL和3型 DLBCL;前淋巴细胞白血症;轻链病;浆细胞瘤;骨硬化骨髓瘤;浆细 胞性白血病;特征不明的单克隆丙种球蛋白病 (MGUS);郁积多发性骨 髓瘤 (SMM);进展缓慢的多发性骨髓瘤 (IMM);霍奇金氏淋巴瘤,其 包括典型的和小节前淋巴细胞为主的类型;淋巴浆细胞淋巴瘤 (LPL); 和边缘区淋巴瘤,其包括胃粘膜相关的淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤。

[0445] 本发明人展示了本发明的抗体和组合物可消耗成熟B细胞。因此, 另一方面,本发明可用于治疗成熟B细胞恶性肿瘤(即:在细胞表面表 达Ig),所述成熟B细胞恶性肿瘤包括但不仅限于,滤泡性淋巴瘤、套 膜-细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、扩散的大 B细胞淋 巴瘤 (DLBCL),其包括次级淋巴小结B细胞样 (GCB) DLBCL、活化 B细胞样 (ABC) DLBCL、以及3型DLBCL、霍奇金氏淋巴瘤,其包 括典型的和小节前淋巴细胞为主的类型、淋巴浆细胞淋巴瘤 (LPL)、边 缘区淋巴瘤,其包括胃粘膜-联合淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤,以及慢性 淋巴细胞性白血病 (CLL),其包括免疫球蛋白突变CLL和免疫球蛋白 未突变CLL。

[0446] 进一步地,CD19在B细胞发展中表达比,例如CD20早,因此CD19 尤其适于治疗前B 细胞和未成熟B细胞恶性肿瘤(即:不在细胞表面表达 Ig),例如:在骨髓里。列举的前B细胞 和未成熟B细胞恶性肿瘤包括但 不仅限于急性淋巴母细胞性白血病。

[0447] 在其它特定的实施方案中,本发明可用于治疗结节外肿瘤。

[0448] 5.6.1抗CD19免疫疗法

[0449] 根据本发明“抗CD19免疫疗法”包括按照此处描述的任何治疗方 案,本发明的任 何抗CD19抗体的给药。抗CD19抗体可作为裸抗体、或免疫共轭物或融合蛋白给药。

[0450] 抗CD19免疫疗法包括作为治疗B细胞恶性肿瘤的单剂疗法的抗CD19抗体的给药。抗CD19免疫疗法包括治疗由B细胞恶性肿瘤引起的早期疾病的方法。抗CD19免疫疗法包括治疗B细胞恶性肿瘤的方法，其中抗CD19抗体介导ADCC。抗CD19免疫疗法包括治疗B细胞恶性肿瘤的方法，其中在患者接受任何对恶性肿瘤的治疗之前进行抗CD19抗体给药，此处所述的疗法不论是化学疗法、基于放射化学的疗法或外科疗法。

[0451] 在优选的实施方案中，可通过人的或人源化的抗体给药，来治疗患有B细胞恶性肿瘤的患者，此处所述的人的或人源化的抗体优选介导人ADCC的抗体。如果是早期疾病或单剂疗法，可给人类患者使用任何抗CD19抗体，优选介导ADCC的抗体（包括小鼠的和嵌合的抗体）；但是，优选人的和人源化的抗体。

[0452] 优选IgG1或IgG3人同种型抗体用于治疗。但是，可使用IgG2或IgG4人同种型，只要其介导人的ADCC即可。可通过测量讨论的抗体通过效应细胞在体外或体内介导靶细胞溶化的能力，来测定这种效应子的功能。

[0453] 所用抗体的剂量应足够消耗循环B细胞。可通过分析血液样品来在患者中监测治疗进程。可用临幊上好转的其它标志来监测治疗。

[0454] 在本领域中已知可用于与本发明的组合物和方法联合的测定B细胞消耗的方法，其包括但不仅限于下列实施方案。在一个实施方案中，可通过流式细胞计，使用一种除了抗CD19抗体之外与B细胞结合来确定B细胞量的试剂，来测量循环B细胞的消耗。在其它的实施方案中，可用标准血清分析来监测血液中的抗体水平。在这样的实施方案中，通过定义已知由B细胞产生的抗体的数量，来直接测定B细胞消耗。然后监测抗体的水平，来确定B细胞的消耗和/或功能性消耗。在另一个实施方案中，可用免疫化学染色确认B细胞来测定B细胞消耗。在这样的实施方案中，可将取自患者组织的B细胞放在显微镜载玻片上，进行标记，并检查存在或不存在。在相关的实施方案中，对治疗之前和之后提取的B细胞进行比较，测定B细胞存在的差异。

[0455] 可测量肿瘤负荷，并将其与本发明的组合物和方法联合应用。本领域中已知测定肿瘤负荷的方法，包括但不仅限于下列实施方案。在某些实施方案中，可用PET扫描测定代谢活性，并确认指示肿瘤的高活性的区域。也可用CT扫描和MRI来检测表现肿瘤存在和大小的软组织。在其它的实施方案中，可用骨骼扫描来测定肿瘤的体积和位置。在另外的实施方案中，可用多普勒技术（例如：超声）检测进出肿瘤的血流，来测定肿瘤负荷。在这样的实施方案中，可用随时间改变的血流变化或与患者适当组织的正常血流的偏离来估算肿瘤负荷。可在使用本发明的治疗方法之前或之后，使用这种测定肿瘤负荷的方法。

[0456] 在本发明的方法的优选实施方案中，消耗B细胞和/或减少肿瘤负荷，而保持ADCC功能。

[0457] 在本发明的实施方案中，当将抗CD19抗体作为单剂治疗来给药时，本发明考虑了不同治疗方案的使用。

[0458] 根据本发明的某些方面，用于本发明的组合物和方法的抗CD19抗体，是裸抗体。在相关的实施方案中，所用裸抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者体重大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5mg。在某些实施方案中，所用裸抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者

体重大约1到10、5到15、10到20、或15到25mg。在某些实施方案中,所用裸抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者体重大约1到20、3到15、或5到10mg。在优选的实施方案中,所用裸抗CD19抗体的剂量至少为每kg患者体重大约5、6、7、8、9或10mg。

[0459] 在某些实施方案中,剂量包含大约 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 的抗CD19抗体,连续4到8周每周给药。在某些实施方案中,剂量至少为每kg患者体重 大约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15mg,连续4到8周每周给药。

[0460] 如上所述的抗CD19抗体的示例性剂量可按5.4.3节所述的给药。在 一种实施方案中,上述剂量是单剂注射。在其它的实施方案中,剂量是 在一段时间内给药。在其它的实施方案中,剂量是在一段时间内多次给 药。该段时间可按天、月或周计算。抗CD19抗体的多剂量可以是适于 达到治疗效果,并平衡毒副作用而采取的每隔一段时间的给药。例如,当用多剂量时,优选设定在用抗体重复治疗前,使患者的单核细胞数恢 复的间隔时间。该剂量的治疗方案将优化治疗效率,因为单核细胞数反 映出患者的ADCC功能。

[0461] 在某些实施方案中,只要患者对治疗有反应,就对人类患者进行本 发明的组合物的给药。在其它的实施方案中,只要患者的疾病不发展,就对人类患者进行本发明的组合物的给药。在相关的实施方案中,对人 类患者进行本发明的组合物的给药,直到患者的疾病不发展或在一段时 间内没有发展,然后不对该患者进行本发明的组合物的给药,除非疾病 复发或又开始发展。例如:可用上述任何剂量对患者进行4到8周治疗,在此期间,对患者监测疾病发展。如果疾病发展停止或好转,则不对该 患者进行本发明的组合物的给药,除非患者复发,即:治疗的疾病复发或 发展了。当复发或发展时,可用与最初使用相同的剂量的治疗方案或使 用上述的其它剂量来治疗患者。

[0462] 在某些实施方案中,本发明的合成物可在一段时间内多次小剂量 (保持剂量) 之后作为负荷剂量给药。在这样的实施方案中,为保持有 效的B细胞消耗,可对剂量进行定时和药量调节。在优选的实施方案中, 负荷剂量是每kg患者体重大约10、11、12、13、14、15、16、17或18mg, 维持剂量是每kg患者体重大约5到10mg。在优选的实施方案中,每隔 7、10、14或21天进行维持剂量给药。维持剂量可不定期延续,直到表 现出毒性、直到血小板数减 少、直到疾病不再发展、直到患者对药物产 生免疫反应或直到疾病发展到末期。在其它的实施方案中,对人类患者 进行本发明的组合物的给药,直到疾病发展到末期。

[0463] 在本发明的实施方案中,当监测患者的循环单核细胞水平成为治疗 方案的一部分时,抗CD19抗体的给药剂量可间隔开,以便使单核细胞 量恢复。例如:可每隔8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天对本发明的组 合物进行给药。

[0464] 在本发明的实施方案中,当抗CD19抗体与毒素共轭或联合给药时, 本领域技术人员可理解可根据毒素剂量调节抗CD19抗体的剂量,并且 该毒素剂量取决于所用毒素的特定种类。一般地,当使用毒素时,抗 CD19抗体的剂量要小于使用裸抗CD19抗体时所用的剂量。可用本领 域已知的技术来确定特定毒素的适当剂量。例如:可采用剂量范围研究测 定来确定当抗CD19抗体与毒素联合给药或共轭时,抗CD19抗体的极 限耐药量。

[0465] 在本发明的实施方案中,当抗CD19抗体与放射疗法试剂共轭或联 合给药时,抗 CD19抗体的剂量将根据所用的放射疗法而改变。在某些 优选的实施方案中,使用两步方法。第一,对人类患者进行包含裸抗 CD19抗体的组合物的给药,并在大约6、7、8、9或10天后

进行少量 放射治疗。第二,一旦测定了低剂量治疗的耐受性、分布和清除率,在 给予一定治疗量的放射治疗剂之后,对患者给予裸抗CD19抗体。这样 的治疗方案类似于那些被认可的使用ZEVALIN<sup>TM</sup> (铟标记的抗CD20 mAb) (Biogen Idee) 或BEXXAR<sup>TM</sup> (GSK, Coulter Pharmaceutical) 对非 霍奇金氏淋巴瘤进行的治疗。

[0466] 5.6.2与化疗剂的结合

[0467] 可将抗CD19免疫疗法(使用裸抗体、免疫共轭物或融合蛋白)与 其它的疗法联合使用,所述其它的疗法包括但不仅限于,化学疗法、放 射性免疫疗法(RIT)、化学疗法和外束放射疗法(混合的形态疗法、CMT) 或混合的形态放射性免疫疗法(CMRIT),单独或结合等。在某些优选的 实施方案中,可将本发明的抗CD19抗体疗法与CHOP(环磷酰胺 - Hydroxydoxorubicin-长春新碱(vincristine) - 氢化泼尼松)联合给药,治 疗非霍奇金氏淋巴瘤最常见的化疗方案。如此处所用的,术语“联合给 药”指抗CD19免疫疗法可在使用的另一个疗法之前、同时或之后给药。

[0468] 在某些实施方案中,抗CD19免疫疗法与细胞毒素的放射性核素或 放射疗法的同位素联合使用。例如: $\alpha$ 放射性同位素,例如: $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{224}\text{Ac}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{224}\text{Ra}$ 或 $^{223}\text{Ra}$ 。选择性地,细胞毒素的放射 性核素可能是 $\beta$ 放射同位素,例如: $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 或 $^{64}\text{Cu}$ 。而且,细胞毒素的放射性核素可发出Auger和低 能电子,包括:同位素 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 或 $^{77}\text{Br}$ 。在其它的实施方案中,同位素 可为 $^{198}\text{Au}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等。在某些实施方案中,向对象给药的放射性核素的量 在大约0.001mCi/kg到大约10mCi/kg之间。

[0469] 在一些优选的实施方案中,对对象给药的放射性核素的量在大约 0.1mCi/kg到大约1.0mCi/kg之间。在其它优选的实施方案中,对对象给 药的放射性核素的量在大约 0.005mCi/kg到0.1mCi/kg之间。

[0470] 在某些实施方案中,抗CD19免疫疗法与化学毒素或化疗剂联合使 用。优选从由烯 二炔类组成的组中选出的化学毒素或化疗剂,所述烯二 炔类例如:刺孢霉素和埃斯波霉素(esperamicin);duocarmycin、氨甲 蝶呤、阿霉素、米尔法兰、苯丁酸氮芥、ARA-C、去乙酰长春酰胺、丝 裂霉素C、顺-铂、依托泊甙、博来霉素和5-氟尿嘧啶。

[0471] 可与抗CD19免疫疗法联合使用的适当的化学毒素或化疗剂包括烯 二炔类家族分子的成员,例如:刺孢霉素和埃斯波霉素(esperamicin)。也可从由duocarmycin组成的组中取得化学毒素(参见,例如:美国专 利号5,703,080和美国专利号4,923,990)、氨甲蝶呤、阿霉素、米尔法兰、瘤可宁、ARA-C、去乙酰长春酰胺、丝裂霉素C、顺-铂、依托泊甙、博 来霉素和5-氟尿嘧啶。化疗剂的例子也包括阿霉素、阿霉素、5-氟尿嘧 啡、阿糖胞昔(“阿糖胞昔”)、环磷酰胺、硫替派、泰索帝(紫杉醇)、白 消安、环磷酰胺、紫杉酚、氨甲蝶呤、顺氯氨 铂、米尔法兰、长春花碱、博来霉素、依托泊甙、异环磷酰胺、丝裂霉素C、米托蒽醌、Vincristine、长春瑞宾、卡铂、替尼泊甙、红比霉素、洋红霉素、氨基蝶呤、更生霉 素、丝 裂霉素、埃斯波霉素(esperamicin)(参见:美国专利号4,675,187)、米尔法兰及其它相关的氮芥类。

[0472] 在其它的实施方案中,例如:“CVB”( $1.5\text{g}/\text{m}^2$ 环磷酰胺、 $200\text{-}400\text{mg}/\text{m}^2$ 依托泊甙和 $150\text{-}200\text{mg}/\text{m}^2$ 卡氮芥)可用于本发明的联合治 疗。CVB是用来治疗非霍奇金氏淋巴瘤的一种治疗方案。Patti等人, Eur.J.Haematol.51:18 (1993)。本领域技术人员已知其它适当的联合的化 疗方案。参见,例如:Freedman等人,“Non-Hodgkin's Lymphomas”in CANCER

MEDICINE, VOLUME 2, 3rd Edition, Holland等人 (eds.), PP. 2028-2068 (Lea&Febiger 1993)。作为例证,治疗中度非霍奇金 氏淋巴瘤的第一代化疗方案包括C-MOPP(环磷酰胺、长春新碱、甲基 苯肼和脱氢可的松)和CHOP(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和脱氢可的松)。有效的第二代化疗方案是m-BACOD(氨甲蝶呤、博来霉素、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、地塞米松和甲酰四氢叶酸),而适当的第 三代治疗方案是MACOP-B(氨甲蝶呤、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱、脱氢可的松、博来霉素和甲酰四氢叶酸)。其它的有效药物包括丁酸苯 酯和 brostatin-1。在优选的多种方式疗法中,化疗药物和细胞活素两者 与根据本发明的抗体、免疫共轭物或融合蛋白共同给药。细胞活素、化 疗药物和抗体、免疫共轭物或融合蛋白可按任何次序或共同给药。

[0473] 本发明的组合物和方法中优选使用的其它毒素包括有毒外源凝集 素、植物毒素,例如:蓖麻毒、相思豆毒蛋白、蒴莲根毒素、肉毒杆菌 毒素和白喉毒素。当然,也可将各种毒素的组合结合到抗体分子,从而 调节可变的细胞毒性。适用于本发明的联合疗法的毒素的例子是蓖麻 毒、相思豆毒蛋白、核糖核酸酶、DNase I、葡萄球菌肠毒素-A、商陆抗 病毒蛋白、多花白树抑制剂(gelonin)、白喉毒素、假单胞菌属外毒素 和假单胞菌属内毒素。参见,例如:Pastan等人,Cell 47:641 (1986) 和 Goldenberg等人,Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994)。可用的酶促 活化毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的未结合活化片段、外毒素 A链(来自绿脓杆菌)、蓖麻毒A链、相思豆毒蛋白A链、蒴莲根毒素 A链、 $\alpha$ -帚曲菌素、油桐蛋白、茜素蛋白、美洲商陆蛋白 (PAPI、PAPII 和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、sapaonaria officinalis抑制剂、多花白树抑制剂(gelonin)、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和trichothecenes。参见,例如,1993年10月28日公 开的WO 93/21232。

[0474] 在REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,19th Ed. (Mack Publishing Co.1995) 和GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS,7th Ed. (MacMillan Publishing Co.1985) 中描述了适当的毒素和化疗剂。本领域技术人员已知 其它适当的毒素和/或化疗剂。

[0475] 本发明的抗CD19免疫疗法也可与前体药物活化酶相结合,所述前 体药物活化酶将前体药物(例如:肽基化疗剂,参见:WO81/01145) 转化为有活性的抗癌剂。参见,例如:WO 88/07378和美国专利号 4,975,278。这样的组合物的酶组分包括任何能以这种方式作用于前体药 物以使其转变为更有活性的细胞毒素形式的任何酶。如本申请所用的术 语“前体药物”指药物活性物质的前体或衍生形式,其与母体药物相比对 于肿瘤细胞具有更少的细 胞毒性,并能够酶促活化或转变为更有活性的 母体药物形式。参见,例如,Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy",Biochemical Society Transactions,14,PP.375-382,615th Meeting Belfast (1986) 和Stella等人, "Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery",Directed Drug Delivery,Borchardt等人 (ed.) 5,pp.247-267,Human Press (1985)。可用于与本发明的抗CD19抗体 组合的前体药物包括,但不限于,包含磷酸盐的前体药物、包含硫代磷 酸盐的前体药物、包含硫酸盐的前体药物、包含肽的前体药物、D-氨基 酸修饰的前体药物、糖基化的前体药物、包含 $\alpha$ -内酰胺的前体药物、选择性取代包含phenoxyacetamide的前体药物或选择性取代包含苯乙酰胺 的前体药物、5-氟胞嘧啶及其它可转变为更有活性的细胞毒素游离剂的 5-氟尿苷前体药物。可衍生成本

发明中所用的前体药物形式的细胞毒类 药物的例子包括,但不限于,如上所述的那些化疗剂。

[0476] 在某些具体的实施方式中,本发明的组合物和方法的给药可使毒剂 治疗延期,并可有助于避免不必要的副作用和与化疗有关的并发症的危 险,并延迟对于化疗抗性的发展。在某些具体的实施方式中,通过对患 者给予本发明的组合物和方法,推迟了毒剂治疗和/或对毒剂治疗的抗 性,将其延迟到大约6个月、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年。

[0477] 5.6.3治疗性抗体的组合

[0478] 此处所述的抗CD19免疫疗法可与其它的抗体结合给药,所述的其它抗体包括但不限于,抗CD20mAb、抗CD52mAb、抗CD22抗体(例如, 如在美国专利号5,484,892、美国申请序号10/371,797的美国专利公开号 2004/0001828、美国申请序号10/372,481的美国专利公开号2003/0202975 和美国临时申请序号60/420,472中所述,其中每个参考文献的全部内容 并入此处作为参考,用于CD22抗原和抗CD22抗体的教导),以及抗CD20 抗体,例如: RITUXAN<sup>TM</sup> (C2B8;RITUXIMAB<sup>TM</sup>;Biogen Idee)。可 用于与本发明的抗体组合,或用于本发明的组合物的治疗性抗体的其它 例子包括,但不限于,HERCEPTIN<sup>TM</sup> (Trastuzumab; Genentech)、MYLOTARG<sup>TM</sup> (Gemtuzumab ozogamicin;Wyeth Pharmaceuticals)、CAMPATH<sup>TM</sup> (Alemtuzumab;Berlex)、ZEVALIN<sup>TM</sup> (Ibritumomab tiuxetan;Biogen Idee)、BEXXAR<sup>TM</sup> (Tositumomab;GlaxoSmithKline Corixa)、ERBITUX<sup>TM</sup> (Cetuximab;Imclone) 和AVASTIN<sup>TM</sup> (Bevacizumab;Genentech)。

[0479] 在某些实施方案中,抗CD19和抗CD20和/或抗CD22mAb可选择性地 在相同的药物组合物中,以任何适当的比例给药。为了举例说明,抗CD19 和抗CD20抗体的比例可为大约 1000:1、500:1、250:1、100:1、90: 1、80:1、70:1、60:1、50:1、40:1、30:1.20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、 8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1: 4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1: 14、1:15、1:16、1:17、1: 18、1:19、1:20、1:30、1:40、1: 50、1:60、1:70、1:80、1:90.1:100、1:250、1:500或1:1000 或以上的比例。同样地,抗CD19和抗CD22抗体的比例可为大约1000:1、500:1、250:1、100:1、90:1、80:1、70:1、60:1、50:1、40: 1、30:1.20:1、19:1、18:1、17:1、16:1、15:1、14:1、13:1、12:1、11:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1: 8、1:9、1: 10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1: 19、1:20、1:30、1:40、1: 50、1:60、1:70、1:80、1:90.1: 100、1:250、1:500或1:1000或以上的比例。

[0480] 5.6.4增强单核细胞或巨噬细胞功能的组合物

[0481] 在本发明方法的某些实施方案中,将增加单核细胞或巨噬细胞数目 或功能(例如:至少大约25%、50%、75%、85%、90%、95%或以上) 的组合物用于与抗CD19免疫疗法相结合。在本领域已知这样的组合物, 其包括,不限于,细胞活素例如白介素(例如:IL-12) 和干扰素(例如:  $\alpha$ 或  $\gamma$  干扰素)。

[0482] 可在相同的药物组合物,如抗体、免疫共轭物或抗原结合片段中配 制增强单核细胞或巨噬细胞功能或增强作用的组合物。当分别给药时, 抗体/片段和组合物可同时给药(彼此在几小时的时间之内),可在治疗 的相同过程中给药,或者可顺序给药(即:患者首先接受一系列抗体/ 片段治疗,然后接受增强治疗巨噬细胞/单核细胞功能的一系列组合物治 疗,或反过来也是一样的)。在这样的实施方案中,在用本发明的其它 治疗方案和/或组

合物治疗之前、同时或之后,将增强单核细胞或巨噬细胞功能的组合物给予受试验者。在一种实施方案中,受试验者具有在人体正常范围内的血液白细胞、单核细胞、嗜中性白细胞、淋巴细胞和/或嗜碱细胞数目。人血液白细胞(总数)的正常范围是大约3.5-大约10.5 ( $10^9/L$ )。人血液嗜中性白细胞的正常范围是大约1.7-大约7.0 ( $10^9/L$ ),单核细胞是大约0.3-大约0.9 ( $10^9/L$ ),淋巴细胞是大约0.9-大约2.9 ( $10^9/L$ ),嗜碱细胞是大约0-大约0.3 ( $10^9/L$ ),嗜酸性粒细胞是大约0.05-大约0.5 ( $10^9/L$ )。在其它的实施方案中,受试验者具有少于人体正常范围的血液白细胞数目,例如至少大约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7或0.8 ( $10^9/L$ )白细胞。

[0483] 本发明的该实施方案可用本发明的抗体、免疫共轭物或抗体片段或本领域已知的其它抗体来实施,尤其适合于对抗CD19、抗CD20和/或抗CD22抗体治疗(例如:使用现有的抗体例如C2B8的治疗)具有抗性的对象、当前正在或之前已经用化疗治疗的对象、B细胞紊乱复发的对象、免疫能力损害的对象或另外在巨噬细胞或单核细胞功能上有缺陷的对象。对治疗有抗性或B细胞紊乱复发的患者的流行,至少可部分地归因于在巨噬细胞或单核细胞功能上的缺陷。因此,本发明提供了增强ADCC和/或巨噬细胞和/或单核细胞功能来用于与给予抗CD19抗体和抗原结合片段的方法相结合的方法。

[0484] 5.6.5与免疫调节试剂的组合

[0485] 本发明的抗CD19免疫疗法也可用于与免疫调节试剂的组合。在该方法中,优选使用嵌合抗体;最优选使用人的或人源化的抗CD19抗体。此处用于联合治疗的术语“免疫调节试剂”指承担抑制、掩蔽或增强宿主免疫系统的物质。其包括抑制细胞活素产生、下调或抑制自身抗原表达或掩蔽MHC抗原的物质。这样的试剂的例子包括2-氨基-6-芳基-5-取代嘧啶(参见:美国专利号4,665,077)、咪唑硫嘌呤(或环磷酰胺,如果对于咪唑硫嘌呤存在逆反应的话);溴麦角环肽;戊二醛(如美国专利号4,120,649所述,其掩蔽MHC抗原);抗特异抗体,例如:强的松、甲基强的松龙和地塞米松;细胞活素或细胞活素受体拮抗体,其包括抗干扰素- $\gamma$ 、- $\beta$ 或- $\alpha$ 抗体;抗肿瘤坏死因子- $\alpha$ 抗体;抗肿瘤坏死因子- $\beta$ 抗体;抗干扰白细胞素-2抗体和抗IL-2受体的抗体;抗L3T4抗体;异种的抗淋巴细胞球蛋白;全T抗体,优选抗CD3或抗CD4/CD4a抗体;可溶性肽,其包含LFA-3结合结构域(1990年7月26日公开的W090/08187);链激酶;TGF- $\beta$ ;链道酶;来自宿主的RNA或DNA;FK506;RS-61443;去氧精胍菌素;雷帕霉素;T细胞受体(美国专利号5,114,721);T细胞受体片段(Offner等人,Science 251:430-432(1991);W0 90/11294和W0 91/01133);以及T细胞受体的抗体(EP340,109),例如T10B9。细胞活素的例子包括,但不限于淋巴细胞活素、单细胞活素和传统的多肽激素。在细胞活素中包括生长激素,例如:人生长激素、N-甲硫氨酸人生长激素和牛生长素;甲状腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛激素;松弛素原;糖蛋白激素,例如:促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体生成激素(LH);肝脏生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳激素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;mullerian-抑制性物质;小鼠促性腺激素结合肽;抑制素;苯丙酸诺龙;脉管内皮生长因子;整合素;甲状腺过氧化物酶(TPO);神经生长因子,例如NGF- $\alpha$ ;血小板生长因子;转化生长因子(TGFs),例如TGF- $\alpha$ 和TGF- $\beta$ ;胰岛素样生长因子-I和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导性因子;干扰素;集落刺激因子(CSFs),例如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CgP(GM-CSF)和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(ILs),例如IL-1、IL-1a、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、

IL-9、IL-11、IL-12、IL-15；肿瘤坏死因子，例如TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ ；及其它多肽因子，包括LIF和配套元件配基(KL)。如此处所使用的，术语细胞活素包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白和天然序列细胞活素的生物学上有活性的等效物。在某些实施方案中，该方法进一步包括对对象给予一种或多种免疫调节试剂，优选细胞活素。更喜欢细胞活素是从由白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-12、IL-15、IL-18、G-CSF、GM-CSF、促血小板生成素和 $\gamma$ 干扰素所组成的组中选出来的。

[0486] 这些免疫调节的试剂与本发明的抗CD19抗体同时或在分开的时间给药，并且比本领域提出的使用相同或更少的剂量。优选的免疫调节试剂依赖许多因素，包括治疗的病症的种类，以及患者的病史，但一般总的说来优选从环孢菌素A、糖皮质类固醇(最优先强的松或甲基强的松龙)、OKT-3单克隆抗体、咪唑硫嘌呤、溴环肽、异种的抗淋巴细胞球蛋白或其混合物中选出来的试剂。

[0487] 5.6.6与其它治疗剂的组合

[0488] 作用于肿瘤新脉管系统的试剂还可以用于与抗CD19免疫疗法相结合，并包括微管蛋白粘合剂，例如康姆伯勒斯亭(combrestatin) A4(Griggs等人，Lancet Oncol. 2:82 (2001))、血管抑素(angiostatin)和内皮抑素(endostatin)(综述在Rosen, Oncologist 5: 20, 2000中，并入此处作为参考)。免疫调节剂适于与抗CD19抗体联合使用，所述抗CD19抗体包括，但不限于， $\alpha$ -干扰素、 $\gamma$ -干扰素和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )。在某些实施方案中，用于联合治疗的使用本发明的组合物和方法的治疗剂是肽。

[0489] 在某些实施方案中，抗CD19免疫疗法与一种或多种刺孢霉素分子联合。抗菌素的刺孢霉素家族能在亚微微米的集合处产生双链DNA断点。可使用的刺孢霉素的结构类似物包括，但不限于， $\gamma$ 11、 $\gamma$ 21、 $\gamma$ 31、N-乙酰- $\gamma$ 11、PSAG和011(Hinman等人，Cancer Research 53:3336-3342 (1993) 和Lode等人，Cancer Research 58:2925-2928 (1998))。

[0490] 选择性地，可通过例如重组技术或肽合成来制备包含本发明的抗CD19抗体和细胞毒素试剂的融合蛋白。

[0491] 在又一个实施方式中，本发明的抗CD19抗体可与“受体”(例如：抗生蛋白链菌素)结合来用于肿瘤前寻靶，其中将拮抗物受体共轭物给予患者，随后应用澄清剂从循环中除去未结合的共轭物，然后将结合到治疗剂(例如：放射性核酸)上的“配基”(例如：生物素)给药。

[0492] 在某些实施方案中，治疗方案包括减轻本发明的抗CD19抗体组合物的细胞毒素作用的组合物。这样的组合物包括止痛剂(例如：醋氨酚)、二膦酸盐、抗组胺剂(例如：扑尔敏)和类固醇(例如：地塞米松、类视黄醇、三棱板、倍他米松、皮质醇、可的松、强的松、2-去氢睾酮、糖皮质激素、矿物类皮质激素、雌激素、睾丸激素、孕酮)。

[0493] 在某些实施方案中，与本发明的抗CD19免疫疗法联合使用的治疗剂是小分子(例如：具有小于大约2500道尔顿分子量的无机或有机化合物)。例如：小分子的库可在商业上从Specs and BioSpecs B.V. (Rijswijk, 荷兰)、Cambridge Corporation (San Diego, CA)、Comgenex USA Inc. (Princeton, NJ) 和Maybridge Chemicals Ltd. (Cornwall PL34 OHW, 英国) 处获得。

[0494] 在某些实施方案中，抗CD19免疫疗法可与抗细菌试剂结合给药。抗菌剂的非限制性例子包括抑制和/或减少细菌传染、和/或减少细菌复制或和/或减少细菌传播到其它的

细胞或对象中的蛋白质、多肽、缩氨酸、融合蛋白、抗体、核酸分子、有机分子、无机分子和小分子。抗菌剂的特定的例子包括,但不限于,抗菌素例如青霉素、头孢菌素、亚胺培南、氨曲南、万古霉素、环丝氨酸、杆菌肽、氯乙酸的、红霉素、氯林肯霉素、四环素、链霉素、托普霉素、庆大霉素、氨基羟丁基卡那霉素A、卡那霉素、新霉素、放线壮观素、甲氧苄氨嘧啶、诺氟沙星、利福平、多粘菌素、两性霉素B、制霉菌素、酮康唑、异烟肼、甲硝哒唑和戊烷脒。

[0495] 在某些实施方案中,本发明的抗CD19免疫疗法可与抗真菌试剂结合给药。抗真菌剂的特定例子包括,但不限于,吡咯试剂(例如:霉康唑、酮康唑(NIZORAL<sup>®</sup>)、caspofungin醋酸盐(CANCID AS<sup>®</sup>)、咪唑、三唑(例如:氟康唑(DIFLUCAN<sup>®</sup>)和伊曲康唑(SPORANOX<sup>®</sup>)、多烯(例如:制霉菌素、两性霉素B(FUNGIZONE<sup>®</sup>)、两性霉素B类脂复合物)(“ABLC”)(ABELCET<sup>®</sup>)、两性霉素B胶态分散体(“ABCD”)(AMPHOTEC<sup>®</sup>)、脂质体两性霉素B(AMBISONE<sup>®</sup>)、碘化钾(KI)、嘧啶(例如:5-氟胞嘧啶(ANCOBON<sup>®</sup>)和伏立康唑(VFEND))。抗细菌和抗真菌试剂的给药可减轻传染病的影响或扩大,其当明显消耗了患者的B细胞时可能发生在本发明的方法中。

[0496] 在某些实施方案中,本发明的抗CD19免疫疗法可与如上所述的一种或多种试剂联合给药,来减轻可能伴随本发明组合物给药的毒性副作用。在其它的实施方案中,本发明的抗CD19免疫疗法可与本领域已知的一种或多种用于减轻抗体给药、化学疗法、毒素或药物副作用的试剂联合给药。

[0497] 在本发明的某些实施方案中,将本发明的抗CD19免疫疗法给予治疗多发性骨髓瘤,本发明的组合物可与以下治疗联合,或在治疗方案中包含以下治疗:高剂量化疗法(苯丙氨酸氮芥、美法仑/泼尼松(MP)、长春新碱/阿霉素/地塞米松(VAD)、脂质体阿霉素/长春新碱、地塞米松(DVd)、环磷酰胺、依托泊甙/地塞米松/阿糖胞苷、顺氯氨铂(EDAP)、干细胞移植(例如:自体干细胞移植或异体干细胞移植,和/或小异体(非骨髓分离)干细胞移植、放射疗法、类固醇(例如:皮质甾类、地塞米松、沙利度胺/地塞米松、强的松、美法仑/泼尼松)、支持疗法(例如:二膦酸盐、生长因子、抗菌素、静脉内免疫球蛋白、低剂量放射疗法和/或整形外科干预)、THALOMID<sup>TM</sup>(镇静剂,Celgene)和/或VELCADE<sup>TM</sup>(bortezomib,Millennium)。

[0498] 在本发明的实施方案中,本发明的抗CD19免疫疗法与另一个或多个抗体和/或试剂结合给药,增加的一个或多个抗体和/或试剂可以相对于本发明抗体的给药的任何顺序进行给药。例如,本发明对于人类对象增加的一个或多个抗体或免疫共轭物可在抗CD19抗体给药之前、同时或之后给药。增加的一个或多个抗体可作为本发明的抗体存在于相同的药物组合物中,或存在于不同的药物组合物中。按照本申请提供的和本领域所已知的给药剂量和方式的任何教导,本发明的抗体的给药剂量和方式,以及增加的一个或多个抗体的剂量可以是相同的或不同的。

[0499] 5.7抗CD19抗体在诊断B细胞恶性肿瘤中的应用

[0500] 本发明也包含免疫特异性结合到人的CD19抗原上的抗CD19抗体及其组合物,其抗CD19抗体结合到诊断性或可检测的试剂上。在优选的具体实施方案中,抗体是人的或人源化的抗CD19抗体。这样的抗CD19抗体可作为临床试验程序的一部分,用于监控或预测B

细胞恶性肿瘤的发育或进展,例如:确定特定治疗的效力。这样的诊断和检测可伴随有将免疫特异性结合到人的CD19抗原上的抗CD19抗体结合到可检测的物质上,所述可检测的物质包括但不限于,各种酶,例如但不限于,辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,例如但不限于,抗生素蛋白链菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光原料,例如但不限于,伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸盐、玫瑰精、二氯三嗪胺荧光素、5-二甲氨基萘磺酰氯或藻红蛋白;冷光原料,例如但不限于,氨基苯二酰一肼;生物发光原料,例如但不限于,荧光素酶、萤光素和水母发光蛋白;放射性物质,例如但不限于,碘( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、氟( $^{3}\text{H}$ )、铟( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )和锝( $^{99}\text{Tc}$ )、铊( $^{201}\text{Ti}$ )、镓( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、钯( $^{103}\text{Pd}$ )、钼( $^{99}\text{Mo}$ )、氙( $^{133}\text{Xe}$ )、氟( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{85}\text{Sr}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{113}\text{Sn}$ 和 $^{117}\text{Tm}$ ;利用各种正电子发射层成象的发射正电子的金属、放射性同位素标记的或结合到特异的放射性同位素上的非放射性顺磁性金属离子和分子。可容易地测定的任何可检测的标记都可结合到抗CD19抗体上,并用于诊断B细胞恶性肿瘤。可检测的可能是直接地偶联或结合到抗体上,或应用本领域已知的方法,间接地通过中间体(例如,本领域已知的连接子)偶联或结合到抗体上。对于按照本发明可结合到抗体上用于诊断的金属离子,参见,例如:美国专利号4,741,900。在某些实施方案中,本发明提供了包含结合到诊断性或可检测的试剂上的抗CD19抗体的诊断试剂盒。

#### [0501] 5.8试剂盒

[0502] 本发明提供了一种包含一种或多种充满本发明的用于预防、治疗、处理或改善B细胞恶性肿瘤,或被强化或强化B细胞恶性肿瘤的一种或多种症状的组合物的药物组件或试剂盒。

[0503] 本发明提供了可用于上述方法的试剂盒。在一种实施方案中,试剂盒包含在一个或多个容器中的本发明的一种组合物。在另一种实施方案中,试剂盒包含在一个或多个容器中的本发明的一种组合物和在一个或多个容器中的一种或多种其它的对预防、治疗、处理或改善B细胞恶性肿瘤,或被强化或强化B细胞恶性肿瘤的一种或多种症状有用的其它预防剂或治疗剂。优选地,试剂盒进一步包含用于预防、治疗、处理或改善B细胞恶性肿瘤的指导,以及给药方法的副作用和剂量信息。任意地与这样的容器相联系可作为政府机构的控制制造、使用或销售药品或生物制品的形式规定所要注意的,其由于制造、使用或销售人的药物的作用而需要得到许可。

#### [0504] 6.实施例

[0505] 在以下实施例中,转基因小鼠模型用于评价人的针对CD19的免疫疗法。这些数据显示结合CD19抗原和介导ADCC的抗体在具有表达Fc $\gamma$ R(优选,Fc $\gamma$ RIII或Fc $\gamma$ RIV)并进行ADCC的效应细胞的对象的体内诱导B细胞消耗上都是有效的。这样的抗体可用于诱导体内B细胞的持久消耗,并且在某些实施方案中可以几乎消除全部来自循环、脾和淋巴节的B细胞。意外地,也消耗了表达相对低密度CD19抗原的骨髓B细胞及其前体。B细胞消耗的有效性不取决于抗CD19抗体结合人的CD19的哪个区,而是受CD19密度(在患者样品中)的影响。B细胞清理的效率可能与抗CD19抗体介导ADCC的能力有关。利用抗CD19抗体进行B细胞清理的效率也可与宿主Fc $\gamma$ R表达/功能有关。

#### [0506] 6.1材料和方法

[0507] 此处所述的鼠HB12a和HB12b抗CD19抗体是结合到人CD19的抗体的示例。这样的抗体可用于通过如上5.1节所述的方法制备人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体。对于人的CD19或其部分具有相同特异性的人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体,如HB12a和HB12b抗体,可用于本发明的组合物和方法。特别地,具有相同或相似的重链CDR1、CDR2和/或CDR3区的人的、人源化的或嵌合的抗CD19抗体,如HB12a或HB12b,可用于本发明的组合物和方法。

[0508] 6.1.1材料和方法

[0509] 抗体产生和序列分析。在用小鼠前B细胞系免疫的Balb/c小鼠中产生HB12a和HB12b抗体,其中小鼠前B细胞系是用编码人CD19的cDNA转染的(Zhou等人,MoL Cell Biol,14:3884-94(1994))。两种抗体都已递交1993年11月3-7日在波士顿举行的第五届关于人的白细胞分化抗原的国际研讨会和讨论会。

[0510] 利用RNA测定重链基因的应用,所述RNA是使用RNEASY<sup>®</sup>小型试剂盒(QIAGEN<sup>®</sup>,Valencia,CA)从1-5x10<sup>6</sup>杂交瘤细胞中提取的。使用200单位的SUPERSCRIPT III<sup>®</sup>反转录酶、来自INVITROGEN<sup>®</sup>(Carlsbad, CA)的第一条链的cDNA的合成缓冲液、20ng任意六聚体引物、来自PROMEGA<sup>®</sup>(Madison, WI)的20单位的RNase抑制剂和来自Denville (Metuchen, NJ)的80nmol的dNTP。1μl的cDNA溶液被用作重链(VH)基因PCR扩增的模板。PCR反应在50μl量的反应混合物中进行,所述反应混合物由10nM Tris-HCl (pH8.3)、5mM NH<sub>4</sub>Cl、50mM KC1、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、800μMdNTP (Denville)、400pmol的每种引物和2.5U的包含10% pfu校对聚合酶(Stratagene, LaJolla, CA)的TaqDNA聚合酶(Invitrogen)组成。对于VL,PCR反应在50μl量的反应混合物中进行,所述反应混合物由20mM Tris-HCl (pH8.4)、50mM KC1、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、800μMdNTP (Denville)、400pmol的每种引物和2.5U的含有10% pfu校对聚合酶(Stratagene)的TaqDNA聚合酶(Invitrogen)组成。在3min的变性步骤之后,扩增进行32个循环(94°C 1min, 58°C 1min, 72°C 1min)。后面是在72°C下延伸10分钟(Thermocycler, Perkin Elmer)。使用如前所述的混杂方向的5' VH引物(MSVHE; 5'GGGAAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTGG3') (SEQ ID NO:19) (Kantor等人, J. Immunol., 158:1175-1186 (1997)) 和与C<sub>γ</sub>编码区互补的反义引物(引物C<sub>γ</sub> 1; 5'GAGTTC CAG GTCACT GTC ACTGGC TCA GGG3') (SEQ ID NO:20)。

[0511] 利用提取的细胞质RNA测定轻链基因的应用,所述RNA是如重链所述来提取的。从cDNA中获得5'可变区核苷酸序列,所述cDNA是利用GeneRacer<sup>™</sup>试剂盒(Invitrogen)产生的。用牛肠磷酸酶将总RNA脱磷酸。用烟草酸焦磷酸酶从完整的全长mRNA中除去5'帽子结构。在将mRNA转换为cDNA之后,提供用于GeneRacer PCR引物的已知5'引物位点,使用T4 RNA连接酶将GeneRacer RNA低聚物连接到mRNA的5'末端上。用Superscript<sup>™</sup>III RT和GeneRacer随机的引物反转录连接的mRNA。使用GeneRacer 5'引物(与GeneRacer RNA低聚物相同)和恒定区特异的反义3'引物(GAC TGA GGC ACC TCC AGA TGT TAA CTG) (SEQ ID NO:21)来扩增第一个链的cDNA。在50μL容积中进行触地PCR扩增,使用Invitrogen推荐的缓冲液、2.5U的添加10% pfu校对聚合(Stratagene)的TaqDNA聚合酶(Invitrogen)。在2min变性步骤之后,加入Taq和pfu,以3个步骤进行扩增:94°C 30s, 72°C 60s 5个循环;94°C 30s, 72°C 60s 5个循环;94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 60s 20个循环,随后在72°C下延伸10min。

加入2.5U的Taq,使延伸继续进行10min来保证完整的3' A-突出物。将扩增的PCR产品克隆到pCR4-TOPO载体中,来测序并转化到 OneShot®TOP10能力的细胞中。如对于重链所述的,使用PCR4-TOPO载体特异的“M13正向”和“M13反向”引物将来自8个克隆的DNA插入物对每个mAb轻链测序。

[0512] 在使用Perkin Elmer Dye Terminator Sequencing system扩增之后,使用ABI 377 PRISM®DNA测序仪对纯化的重链和轻链PCR产物直接双向测序,所述的Perkin Elmer Dye Terminator Sequencing system使用如轻链所述的AmpliTaq®DNA聚合酶和用于初始PCR扩增的相同引物或 pCR4-TOPO载体特异的引物。对HB12a和HB12b重链和轻链区在两个方向和反义DNA链上完全测序。

[0513] 抗体和免疫荧光分析。此处所用的结合到人CD19抗原的单克隆小鼠抗CD19抗体包括HB12a (IgG1) 和HB12b (IgG1) 、FMC63 (IgG2a, Chemicon International, Temecula, CA) 、B4 (IgG1, Beckman Coulter, Miami, FL) (Nadler等人, J. Immunol, 131:244-250 (1983)), 以及HD237 (IgG2b, 第四届关于人的白细胞分化抗原的国际研讨会, 维也纳, 奥地利, 1989) 、HD37抗体的同种型转换变体 (Pezzutto等人, J. Immunol, 138:2793-2799 (1987))。其它的抗体包括:结合到小鼠CD19上的单克隆小鼠反CD19抗体, MB19-1 (IgA) (Sato等人, J. Immunol, 157:4371-4378 (1996)); 单克隆的小鼠CD20特异性抗体 (Uchida等人, Intl. Immunol, 16:119-129 (2004)); B220抗体RA3-6B2 (DNAX Corp., Palo Alto, CA); Thy1.2抗体 (CALTAG™ Laboratories, Burlingame, CA) 以及CD5、CD43和CD25抗体 (BD PHARMINGEN™, Franklin Lakes, NJ)。同种型特异性的和抗小鼠Ig或IgM抗体来自于 Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL)。

[0514] 将用hCD19 cDNA (Tedder和Isaacs, J. Immunol, 143:712-717 (1989)) 或单个细胞的白细胞悬液转染的小鼠前B细胞系300.19 (Alt等人, Cell, 27:381-388 (1981)) 按照确定的方法 (Zhou等人, Mol. Cell. Biol, 14: 3884-3894 (1994)) 使用预先确定最佳浓度的每种抗体在冰上染色20-30分钟。在FACSCAN®或FACSCALIBUR®流动血细胞计数器 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 上分析了具有淋巴细胞转运和侧光散射性质的细胞。使用与定位的路径不反应的对照抗体 (CALTAG™ Laboratories, Burlingame, CA) 确定背景染色, 来排除>98%的细胞。对于每种检测的样品, 用在40对数标度上显示的荧光强度, 在任何可能的情况下对每份样品分析具有单核细胞转运和侧光散射性质的细胞。

[0515] 小鼠。如前所述制备表达人CD19 (h19-1) 及其野生型 (WT) 同窝出生仔畜的转基因小鼠 (Zhou等人, Mol. Cell. Biol, 14:3884-3894 (1994))。从原来的h19-1建立者 (C57BL/6xB6/SJL) 来产生TG-1小鼠, 并在C57BL/6基础上至少杂交7代。从原来的h19-4建立者 (C57BL/6xB6/SJL) 来产生TG-2小鼠。在多代回交之后, 获得了TG-1<sup>+/+</sup>小鼠, 其B细胞上人CD19表达的细胞表面密度与在人的B细胞上发现的密度差不多相同。已经进一步描述了表达人CD19的小鼠, 并将其在一些研究中用作模型 (Engel等人, Immunity, 3:39-50 (1995); Sato等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11558-11562 (1995); Sato等人, J. Immunol, 157:4371-4378 (1996); Tedder等人, Immunity, 6:107-118 (1997); Sato等人, J. Immunol, 158:4662-4669 (1997); Sato等人, J. Immunol, 159:3278-3287 (1997); Sato等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 13158-13162 (1997); Inaoki等人, J. Exp. Med., 186:1923-

1931 (1997) ; Fujimoto等人, J. Immunol, 162: 7088-7094 (1999) ; Fujimoto等人, Immunity, 11: 191-200 (1999) ; Satterthwaite等人, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 97: 6687-6692 (2000) ; Fujimoto等人, Immunity, 13: 47-57 (2000) ; Sato等人, J. Immunol, 165: 6635-6643 (2000) ; Zipfel等人, J. Immunol, 165: 6872-6879 (2000) ; Qian等人, J. Immunol, 166: 2412-2419 (2001) ; Hasegawa等人, J. Immunol, 167: 2469-2478 (2001) ; Hasegawa等人, J. Immunol, 167: 3190-3200 (2001) ; Fujimoto等人, J. Biol. Chem., 276: 44820-44827 (2001) ; Fujimoto等人, J. Immunol, 168: 5465-5476 (2002) ; Saito等人, J. Clin. Invest., 109: 1453-1462 (2002) ; Yazawa 等人, Blood, 102: 1374-80 (2003) ; Shoham等人, J. Immunol, 171: 4062-4072 (2003) )。CD19缺乏的 (CD19<sup>-/-</sup>) 小鼠及其WT同窝出生仔畜也如前所述 (Engel等人, Immunity, 3: 39-50 (1995))。已经将人 CD19在转基因小鼠中的表达显示为较低水平的内源性小鼠CD19表达 (Sato等人, J. Immunol, 157: 4371-4378 (1996) ; 以及Sato等人, J. Immunol, 158: 4662-4669 (1997)) , 并且假设也已经确定了关于内源性的小鼠CD19表达的该降低 (Shoham等人, J. Immunol, 171: 4062-4072 (2003))。CD19在表达人CD19的转基因小鼠中表达的密度也是确定的 (Sato等人, J. Immunol, 165: 6635-6643 (2000))。

[0516] 用来自Taconic Farms (Germantown, NY) 的FcR (Fc受体) 通用的  $\gamma$  链 (FcR  $\gamma$ ) 缺陷性的小鼠 (FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>, B6.129P2-Fcerg1<sup>tm1</sup>) 繁殖TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠, 来产生hCD19<sup>+/+</sup>-FcR  $\gamma$ <sup>-/-</sup> 和WT同窝出生仔畜。对于c-Myc转基因的 小鼠半合子 (E $\mu$ -cMycTG, C57B1/6J-TgN (IghMyc) ; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 如所述 (Harris等人, J. Exp. Med., 167: 353 (1988) 和Adams等人, Nature, 318: 533 (1985))。将c-MycTG 小鼠 (B6/129背景) 与hCD19TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠杂交来产生半合子的 hCD19TG-1<sup>+/+</sup>-cMycTG<sup>+/+</sup> 后代, 如通过PCR筛选所确定的。Rag1<sup>-/-</sup> (B6.129S7-Rag1<sup>tm1Mon</sup>/J) 小鼠来自于Jackson Laboratory。按照标准方法 (Van Rooijen和Sanders, J. Immunol. Methods, 174: 83-93 (1994)) , 在第2、1和4天将氯屈膦酸二钠包封的脂质体 (0.1mL/10克体重; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 通过尾部静脉注射到C57BL/6小鼠中来产生巨噬细胞缺陷性小鼠。将AU小鼠放在特定的无病原体障碍的装置中, 并在6-9周龄时首次使用。

[0517] ELISAs。通过使用亲合性纯化小鼠 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和IgA (Southern Biotechnology Associates, Inc.) 的ELISA产生所述的标 准曲线 (Engel等人, Immunity, 3: 39 (1995)) , 来确定血清Ig浓度。通过使用所述的牛胸腺双链DNA (Sigma-Aldrich) 、煮熟的牛胸腺DNA (其包含单链DNA) 或涂有组蛋白 (Sigma-Aldrich) 的微量滴定板 (Sato 等人, J. Immunol., 157: 4371 (1996)) 的ELISA来确定血清IgM和IgG 自身抗体相对于dsDNA、ssDNA 和组蛋白的水平。

[0518] 免疫治疗。通过侧向的尾部静脉注射在200 $\mu$ L磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中消毒的抗CD19和不起反应的同种型对照抗体 (0.5-250 $\mu$ g)。全部的 实验使用250 $\mu$ g的抗体, 除非指示了其它的。在红血球溶解后, 通过血 细胞计数器来测定血液白细胞的数目, 通过免疫荧光染色用流细胞计数 分析来确定B220<sup>+</sup>B细胞的频率。使用Oncology Tool Dose Calculator ([www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm](http://www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm)) 来比较人和小鼠中的抗体 剂量。

[0519] 免疫方法。用盐水中的50 $\mu$ g2,4,6-三硝基苯基 (TNP) 结合的脂多糖 (LPS) (Sigma, St. Louis, MO) 或25 $\mu$ g2,4-二硝基酚结合的 (DNP) -FICOLL<sup>®</sup> (Biosearch Technologies, San Rafael, CA) 腹膜内 (i. p.) 免 疫两个月大的野生型 (WT) 小鼠。也用在完全弗氏佐剂

(complete Freund's adjuvant) 中的 100 $\mu$ g DNP 结合的钥孔血蓝素 (DNP-KLH, CALBIOCHEM<sup>®</sup> - NOVABIOCHEM<sup>®</sup> Corp., La Jolla, CA) 免疫小鼠, 并在 21 天后用在不完全弗氏佐剂 (incomplete Freund's adjuvant) 中的 DNP-KLH 强化免疫。如所指出的, 在免疫前后对小鼠取血。按照标准方法 (Engel 等人, Immunity, 3:39-50 (1995)) 用涂有 DNP-BSA (CALBIOCHEM<sup>®</sup> - NOVABIOCHEM<sup>®</sup> Corp., La Jolla, CA) 或 TNP-BSA (Biosearch Technologies, SanRafael, CA) 的 ELISA 板, 在副本中测定 在单个血清样品中的 DNP- 或 TNP- 特异性抗体滴度。将来自 TNP-LPS 免疫的小鼠的血清稀释 1:400, 将来自 DNP-FICOLL<sup>®</sup> 和 DNP-BSA 免疫的小鼠的血清稀释 1:1000, 用于 ELISA 分析。

[0520] 肿瘤研究。将来自 hCD19TG-1<sup>+/+</sup> c-mycTG<sup>+/+</sup> 小鼠的自然存在的淋巴结 肿瘤 分离出来, 并在体内扩增。在第 0 天将肿瘤细胞 (10<sup>5</sup> / 小鼠) 通过 i.v. 给予 Rag-A 接受小鼠, 而在第 1 和 7 天将 FMC63 和 配对同种型对照 mAbs (250 $\mu$ g/ml) 通过 i.v. 给药。每周将来自接受小鼠的 血液白细胞分离, 并 通过免疫荧光染色与流细胞计数分析确定循环的小鼠 CD19<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> 细胞的数目。

[0521] 统计学分析。将全部的数据表示为平均值  $\pm$  SEM。用学生的 T 检定来 确定在样本平均值之间的差数显著性。

[0522] 6.2 实施例 1: 人 CD19 在转基因小鼠中的表达

[0523] 可将此处所描述的转基因 hCD19TG 小鼠或其它的表达人 CD19 的 转基因动物用于 评价包含人的、人源化的或嵌合的抗 CD19 抗体的不同 治疗方案, 例如例如在药剂浓度、总量或时间上变化。在不同治疗方案 的人类患者的效果可以利用如下所述的两种指标来 预测, 即: 在某些体 液和/或组织中的 B 细胞消耗和单克隆的人的或人源化的抗 CD19 抗体结合到 B 细胞上的能力。在特定的实施方案中, 在人 CD19 转基因小鼠中 有效的治疗方案和本发明的组合物和方法可用于治疗人体中的 B 细胞 恶性肿瘤。

[0524] 为了确定人 CD19 是否在来自转基因小鼠 (半合子的 TG-1<sup>+/+</sup>) 的 B 细胞上表达, 将 B 细胞从这些小鼠的骨髓、血液、脾和腹腔积液中提取 出来。通过将细胞与结合 CD19 的小鼠的单克隆抗 CD19 抗体相接触, 在这些细胞中评价人 CD19 和小鼠 CD19 的表达。利用双色的免疫荧光 染色, 通过流细胞计数分析来测定抗体对于 B 系细胞的结合。

[0525] 结果显示在图 1A, 即显示了测定的鼠 CD19 (mCD19) 的表达 (X 轴) 对测定的骨髓 (BM)、血液、脾和腹腔积液 (PL) 中人的 CD19 (hCD19) (Y 轴) 的表达的曲线的图。轴的单位表示从在较低的左边 的 1 开始的四十对数标度。将结合到人 CD19 (Beckman/Coulter) 的 B4 抗 CD19 抗体用于使人 CD19 的表达具体化, 将结合到小鼠 CD19 (PharMingen) 的 1D3CD19 抗体用于使小鼠 CD19 的表达具体化 (也用 于图 1B 和 1C)。当在人的 B 细胞发育期间逐渐增加人 CD19 表达时, 在小鼠骨髓 B 细胞发育期间鼠 CD19 在高水平表达。图 1A 显示了在血 液、脾和腹腔积液 (PL) 中得到的外周 B 细胞中, 人 CD19 的表达平行 于小鼠 CD19 的表达, 表明小鼠抗 hCD19 抗体 (其结合人 CD19) 结合 外周 B 细胞群。另外, 小量的骨髓 (BM) 衍生 B 细胞表达内源的小鼠 CD19, 而不是人 CD19 (结合到人 CD19 的单克隆小鼠抗 CD19 抗体)。因此, 在半合子的 TG-1<sup>+/+</sup> 小鼠中骨髓 B 细胞分成两类: 成熟的 B 系细 胞, 即 hCD19<sup>+</sup> mCD19<sup>+</sup> 和较少成熟的 B 系细胞, 即仅 mCD19<sup>+</sup> (图 1A)。这些结果与 Zhou 等人 (Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)) 的发 现相一致, 所述文献指出人 CD19 在这些转基因小鼠中的表达与 B 细胞 的成熟有关。血液、脾和腹

膜腔中的所有成熟B细胞都是hCD19<sup>+</sup>和 mCD19<sup>+</sup>。

[0526] mCD19和hCD19的相对表达水平,如通过分别测定平均荧光强度 (小鼠对hCD19的抗CD19和小鼠对mCD19的抗CD19) 来评价,示于图1B中。在对于hCD19转基因纯合的TG-1小鼠 (TG-1<sup>+/+</sup>) 中,在 血液产生的B细胞上的hCD19表达可与在人B细胞上的hCD19表达相比。为了比较在TG-1<sup>+/+</sup>、TG-1<sup>+/−</sup>、TG-2<sup>+/+</sup>转基因小鼠系中hCD19和 mCD19表达的相对密度,提取了血液衍生的B细胞,并如上所述测定 CD19的表达。结果以柱状图显示在图1B中,其显示了表达人CD19的 人血液B细胞,占来自hCD19TG小鼠的TG-1<sup>+/+</sup>、TG-1<sup>+/−</sup>和TG-2<sup>+/+</sup>血 液B细胞的百分比(左侧),以及表达小鼠CD19的野生型 (WT) 小 鼠血液B细胞,占来自hCD19TG小鼠的TG-1<sup>+/+</sup>、TG-1<sup>+/−</sup>和TG-2<sup>+/+</sup>CD19<sup>+</sup>血液B细胞的百分比(右侧)。该值(平均荧光强度的线性值)表示 CD19表达与来自人或野生型 (WT) 小鼠(显示为100%) 相比的平均 相对密度(±SEM)。结果表明在纯合的TG-1<sup>+/+</sup>小鼠中,对于以平均荧 光强度测定的密度,表达hCD19的血液B细胞比人血液B细胞高大约 72%。在表达hCD19的TG-1<sup>+/−</sup>小鼠中血液B细胞在密度上与人血液 B 细胞相似,而在表达hCD19的TG-2<sup>+/+</sup>小鼠中血液B细胞在密度上比人 血液B细胞低65%。

[0527] 在图1C中以柱状图显示了来自TG-1<sup>+/−</sup>小鼠组织的B细胞中的 hCD19和mCD19表达的相对密度的进一步比较,其显示对来自骨髓、血液、脾、淋巴结和PL的B细胞染色,抗CD19 抗体的平均荧光强度 (MFI±SEM),其中hCD19 (左侧) 和mCD19 (右侧)。结果表明在 TG-1<sup>+/−</sup>小鼠中,hCD19通过在骨髓中的B220<sup>+</sup>细胞在提高的水平表达(人 血液水平的63%) <血液 (100%) <脾 (121%) = 淋巴结 (120%) 并< 腹膜腔 (177%)。人CD19表达对mCD19表达有较小的影响。hCD19 和mCD19的mRNA的水平不改变。

[0528] 为了确定IgG1 (HB12a、HB12b、B4) 、IgG2a (FMC63) 和IgG2b (HD237) 同种型的小鼠抗hCD19抗体(其结合到人CD19上)起作用 是否有差异,将血液和脾的B220<sup>+</sup>B细胞从TG-1<sup>+/−</sup>小鼠中提取出来。将 提取的细胞在体外与以上抗CD19抗体相接触,并通过具体使用同种型特异性PE共轭的次级抗体与流细胞计数分析的单克隆抗体染色,来评 价其结合人CD19表达转基因小鼠 (hCD19TG) B细胞的能力。

[0529] 在图1D中以荧光强度 (X轴) 对5μg/ml的IgG2b (鼠的同种型) 、IgG2a (鼠的同种型) 和IgG1 (鼠的同种型) 抗CD19抗体的相对B细 胞数目 (Y轴) 的图显示了结果。染色的B220<sup>+</sup>细 胞的荧光强度与抗CD19 抗体显示为实线,配对的同种型对照 (CTL) 的荧光强度显示为虚 线。每个抗体在5μg/ml的浓度下达到与脾B细胞反应的饱和水平。结果表 明在来自TG-1<sup>+/−</sup>小鼠的小鼠血液和脾B220<sup>+</sup>B细胞上的抗CD19抗体结 合密度对于试验的抗体同种型来说是相同的,并且对于血液和脾B细胞 都如此。

[0530] 为了确定平均荧光强度是否与抗CD19抗体同种型无关,通过染色 小鼠前B细胞系 300.19,利用相同的抗小鼠 Ig二级抗体用hCD19cDNA 进行转染,来评价独立的抗CD19抗体 (在5μg/mL) 的结合活性。通过 流细胞计数分析利用小鼠 Ig特异性PE-结合的二级抗体,来 测定抗体染 色 (MFI±SEM)。在图1E中以柱状图显示了结果,所述的柱状图是对 于HB12a、HB12b、B4、FMC63、HD237抗CD19抗体和对照抗体 (CTL) 来说,抗CD19抗体结合 (如所示的通过染色强度, Y轴) 到hCD19cDNA 转染的300.19细胞上的柱状图。独立于抗CD19抗体同种型的具有特征 性平均荧光强度的每个抗体染色细胞,HB12b显示了最低水平的染色, 而 HD237表现了最高水平的染色。因此,显示的结果表明300.19细胞 是用于比较抗CD19抗体 在体外结合到CD19的能力的体外系统的模型。

[0531] 因此,合起来,图1所示的结果表明hCD19TG小鼠并且300.19细胞代表用于当hCD19在一定密度范围内表达时,评价抗hCD19抗体结合到B细胞上的能力的适当的体外和体内模型系统。

[0532] 图1A-D表示由每种基因型>3个小鼠中得到的结果。

[0533] 6.3实施例2:体内B细胞的抗CD19抗体消耗

[0534] 对小鼠抗CD19抗体(其结合到人CD19)评价了其体内消耗 hCD19TG (TG-1<sup>+/−</sup>) 血液、脾和淋巴结B细胞的能力。将每个抗体以 250或50 $\mu$ g/小鼠的量给予小鼠,单个剂量比人体的抗CD20治疗的基本上以四次给药375mg/m<sup>2</sup>的剂量低大约10到50倍 (Maloney等人, J.Clin. Oncol, 15:3266-74 (1997) 和McLaughlin等人, 12:1763-9 (1998))。

[0535] 在图2A中以用HB12a、HB12b或FMC63抗CD19抗体或对照来进行CD19或配对的同种型对照(CTL)治疗7天后的B细胞的块图显示了结果。对于每个抗CD19抗体或对照物的淋巴结、脾和血液组织提供了分离的块。在每块中所示的在7天中通道淋巴细胞消耗的百分比,表明通过免疫荧光染色与流细胞计数分析确定的来自TG-1<sup>+/−</sup>小鼠的血液、脾和淋巴结的典型的B细胞消耗。图2B显示在用抗CD19(闭合圈)或同种型对照(开放圈)抗体治疗之后,B220<sup>+</sup>血液B细胞的平均数目(每ml±SEM)。在时间0之后所示的值代表在1小时获得的数据。图2C和图2D分别显示在用指定的剂量的抗CD19(填充的条带)或对照(开放的条带)抗体处理TG-1<sup>+/−</sup>小鼠之后,脾和淋巴结B细胞的数目(±SEM)。在图2B-D中,表明了用抗CD19或同种型对照抗体治疗的小鼠(每一数据点>3只小鼠)的平均结果之间的显著差异;与对照相比, \*p<0.05,\*\*p<0.01。

[0536] 在治疗的一小时之内每个抗体消耗的大多数循环B细胞(图2B),在七天中对于脾和淋巴结B细胞频率(图2A)和数目(图2C-D)具有强有力消耗作用。在七天中HB12a抗体消耗了98%的血液B细胞,90-95%的脾和淋巴结B细胞。类似地,HB12b、B4、FMC63和HD237抗体分别消耗99%、96%、99%和97%的血液B细胞。HB12b、B4、FMC63 和HD237抗体分别消耗88-93%、64-85%、72-95%和88-90%的脾和淋巴结B细胞。少数剩余的外周B细胞基本上代表了表型上未成熟的细胞,其潜在地从骨髓中转移。当对WT小鼠给药时,CD19抗体不具有明显的作用,而在相同条件下给予的配对的同种型对照抗体不影响B细胞数目(图2A-D)。因此,通过七天抗hCD19抗体有效地消耗了来自hCD19TG 小鼠的循环、脾和淋巴结的B细胞。将在TG-1<sup>+/−</sup> 小鼠中B细胞消耗的概述提供于表1中。

[0537] 表1

组织	B亚类 <sup>a</sup>	对照 mAb <sup>b</sup>	CD19 mAb	%消耗
[0538]	骨髓:	B220 <sup>+</sup>	3.41±0.57 (11)	0.82±0.13 (11)
	原-B		0.75±0.1 (5)	0.97±0.22 (5)
	前-B		1.74±0.58 (5)	0.10±0.01 (5)
	未成熟的		0.70±0.16 (5)	0.04±0.01 (5)
	成熟的		0.86±0.14 (5)	0.004±0.0004 (5)
	血液:	B220 <sup>+</sup>	0.82±0.14 (11)	0.004±0.0006
	脾:	B220 <sup>+</sup>	25.2±2.2 (11)	1.7±0.2 (11)
	淋巴结:	B220 <sup>+</sup>	0.89±0.11 (11)	0.06±0.01 (11)
[0539]	腹膜:	B220 <sup>+</sup>	1.16±0.11 (11)	0.37±0.03 (11)
	B1a		0.86±0.12 (5)	0.31±0.06 (5)
	B2		0.34±0.06 (5)	0.08±0.02 (5)
				73**

[0539] <sup>a</sup>b细胞亚型是:骨髓(BM)原B细胞(CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>)、前B细胞(CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>)、未成熟的B细胞(IgM<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>)、成熟的B细胞(IgM<sup>+</sup>B220<sup>hi</sup>)；腹B1a(CD5<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>)、B2(CD5<sup>-</sup>B220<sup>hi</sup>)。

[0540] <sup>b</sup>值(±SEM)表明在抗体治疗(250μg)之后七天存在于小鼠中的细胞数目(x10<sup>-6</sup>)。BM值是对于双侧股骨的。血液数目是每一ml的个数。LN数目对于双侧腹股沟和腋窝的结节的。小鼠数目是在括号中标明的。指出了平均值之间的显著差异;\*p<0.05、\*\*p<0.01。

### [0541] 6.3.1骨髓B细胞的消耗

[0542] 在hCD19TG小鼠中测定了已知的抗CD19抗体,来确定这样的抗体在消耗来自各种体液和组织的B细胞中是否有效。此处所描述的试验可用于确定其它的抗CD19抗体,例如,结合到人CD19抗原的特定部分的抗CD19抗体,是否能有效地消耗B细胞。使用确定为能够消耗B细胞的抗CD19抗体的结果可与在人体中的应用相关。具有确定抗体的特性的抗体可被用于本发明的用于人体中B细胞恶性肿瘤治疗组合物和方法。图3A-3F描述了按照CD19抗体治疗的骨髓B细胞消耗。

[0543] 图3A显示了荧光强度(X轴)对相对B细胞数目(Y轴)的图,其中通过细胞的四色免疫荧光染色、流细胞计数分析与淋巴细胞的向前和侧面分散的性质,来评价由TG-1<sup>+/−</sup>骨髓B细胞亚类进行的hCD19和mCD19的表达。将原B细胞定义为CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>,前B细胞为CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>,未成熟的B细胞为IgM<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>,成熟的B细胞为IgM<sup>+</sup>B220<sup>hi</sup>。条形图(右侧)显示每个B细胞亚型(每个数据点>3只小鼠)所表达的CD19的相对平均MFI(±SEM)值。如在hCD19TG小鼠中(图1A),CD19表达在人体中是不均匀的,因为B细胞成熟并脱离骨髓。仅仅一小部分的原B细胞(20%,CD43<sup>hi</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>)在TG-1<sup>+/−</sup>小鼠中表达hCD19,而大多数的前B细胞是hCD19<sup>+</sup>,并且在骨髓中的大多数成熟B细胞以比较高的水平表达hCD19。半数原B细胞(55%,IgM<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>)在TG-1<sup>+/−</sup>小鼠中表达mCD19,而mCD19通过大多数前B细胞和成熟B细胞

胞在骨髓中以比较高的水平表达。

[0544] 图3B显示在FMC63或配对的同种型对照抗体(250 $\mu$ g)治疗后七天,通过双色的免疫荧光染色与流细胞计数分析评价在hCD19TG小鼠中hCD19<sup>+</sup>细胞的消耗。数目代表在指定的路线内细胞的相对频率。结果显示的是每个小鼠基因型的三同窝出生对所获得的。按照CD19抗体治疗,通过以250 $\mu$ g/小鼠给予的FMC63抗体,消耗了在TG-1<sup>+/+</sup>、TG-1<sup>+-</sup>和TG-2<sup>+-</sup>小鼠的骨髓中的大多数hCD19<sup>+</sup>细胞。

[0545] 图3C显示了在TG-1<sup>+-</sup>小鼠的抗CD19或配对同种型对照抗体(250 $\mu$ g)治疗之后七天,典型的B220<sup>+</sup>B细胞消耗。条形图的值代表在治疗的小鼠中双侧的股骨的抗体内B220<sup>+</sup>细胞的总数(±SEM)。指出了在样本平均值(每群>3只小鼠)之间的显著差异;\*p<0.05,\*\*p<0.01。出乎意料地,从骨髓中也消耗在低到不可检测的水平上的表达hCD19的大部分的mCD19<sup>+</sup>前B细胞。与此一致地,FMC63、HB12a、HB12b、B4和HD237抗体消耗大多数的骨髓B220<sup>+</sup>细胞。

[0546] 图3D显示在TG-1<sup>+-</sup>小鼠的FMC63或配对的同种型对照抗体(250 $\mu$ g)治疗后七天典型的骨髓B细胞亚型的消耗,其通过三色的免疫荧光染色进行评价。根据CD43的表达(下方的图),将IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>原/前B细胞进一步细分。图3E显示在hCD19TG小鼠系的FMC63或配对的同种型对照抗体(250 $\mu$ g)治疗后七天典型的骨髓CD25<sup>+</sup>B220<sup>lo</sup>前B细胞的消耗,其通过双色的免疫荧光染色进行评价。结果来自于在不同的天进行的实验,所以通道不是确定的。当分析了单个的骨髓子群时,大部分的CD43<sup>hi</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>原B细胞(图3D)不受在TG-1<sup>+/+</sup>、TG-1<sup>+-</sup>或TG-2<sup>+-</sup>小鼠中FMC63抗体治疗的影响,而消耗了大部分的CD25<sup>+</sup>CD43<sup>lo</sup>IgM<sup>-</sup>B220<sup>lo</sup>前B细胞(图3E)。图3F显示在>3同窝出生对的FMC63(封闭条带)或对照(开放条带)的抗体治疗后七天在双侧的股骨内原B细胞、前B细胞、未成熟的和成熟的B细胞的数目(±SEM)。结果表明也消耗了来自TG-1<sup>+/+</sup>、TG-1<sup>+-</sup>或TG-2<sup>+-</sup>小鼠的骨髓的大部分未成熟的和成熟的B细胞。因此,通过CD19抗体治疗消耗了来自骨髓的大多数hCD19<sup>+</sup>细胞,包括在低水平表达hCD19的前B细胞。

[0547] 6.3.2 腹部B细胞的消耗

[0548] 在TG-1<sup>+-</sup>小鼠的腹膜腔B细胞与其它组织B细胞相比,在较高水平上表达hCD19(图1A和图1C),主要由于CD5<sup>+</sup>IgM<sup>hi</sup>B220<sup>lo</sup>B1细胞的存在,其与常用的(B2)B细胞的CD5<sup>-</sup>IgM<sup>lo</sup>B220<sup>hi</sup>亚型相比,表达hCD19高大约25%(图4A)。图4B-4C表明腹膜腔B细胞对抗CD19抗体治疗敏感。

[0549] 图4A显示人类和小鼠CD19的表达(X轴)对腹膜腔CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>BIa和CD5<sup>-</sup>B220<sup>hi</sup>B2(常用的)B细胞的相对数目(Y轴)的图。用三色免疫荧光染色和流式细胞计数分析检测腹膜腔淋巴细胞的单个细胞混悬液。条线图表示用3对同窝出生的TG-1<sup>+-</sup>小鼠的CD19表达的MFI(±SEM)平均值。

[0550] 图4B显示用CD19(250 $\mu$ g的HB12a、HB12b和FMC63);50 $\mu$ g的B4和HD237抗体或对照抗体(250 $\mu$ g)处理的来自TG-1<sup>+-</sup>小鼠的腹膜腔B220<sup>+</sup>细胞的消耗。数目表示在第7天指出的路径内B220<sup>+</sup>细胞的相关频率。条线图的值表示在抗体治疗的小鼠(每群>3只小鼠)的腹膜内B220<sup>+</sup>细胞的总数(±SEM)。指出在样本平均值之间的显著差异;\*p<0.05,\*\*p<0.01。结果表明到第七天,在250 $\mu$ g/小鼠中抗CD19抗体的治疗消耗了大部分的腹部B220<sup>+</sup>B细胞。在图4B中显示的结果部分地由B1和常用的B2细胞来解释。当在TG-1<sup>+/+</sup>小鼠中以最高

的密度表达hCD19时,消耗了大部分的B1和B2细胞。然而,当hCD19水平较低时,B1和B2细胞的CD19介导的消耗在TG-1<sup>+-</sup>和TG-2<sup>++</sup>小鼠中是低效的。因此,依靠其利用平均荧光强度测定的CD19表达的密度,CD19抗体治疗消耗腹部的B1和B2细胞,虽然腹部B细胞与脾和淋巴结B细胞相比对抗CD19抗体介导的消耗具有更多的抗性。

[0551] 图4C显示在hCD19TG小鼠的抗CD19抗体或对照抗体治疗之后七天,CD5<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>B1a和CD5<sup>-</sup>B220<sup>hi</sup>B2B细胞的典型消耗。数目表示在指定的路径内每种B细胞亚型的相关频率。条线图的值表示在抗体治疗的小鼠(每群>3只小鼠)的腹膜内每种B细胞亚型的总数(±SEM)。指出在样本平均值之间的显著差异;\*p<0.05,\*\*p<0.01。

[0552] 6.3.3分离的抗CD19抗体介导的B细胞清除

[0553] 为了测定HB12a和HB12b抗CD19抗体是否与已知的抗CD19抗体不同,分析了此处所用的每个抗CD19抗体可变区的氨基酸序列(图5A和5B、6A和6B、7A和7B)。

[0554] 图5A描述HB12a抗CD19抗体的重链VR-D-JH连接序列的核苷酸(SEQ ID NO:1)和预测的氨基酸(SEQ ID NO:2)序列。由双下划线指出与5'PCR引物相一致的序列,其可不同于实际的DNA序列,因为使用了多余的引物。由垂直的条带(1)在序列中指定在V、D和J序列之间的近似连接边界。在少数病例中核苷酸密码指出核苷酸附加在连接边界或体超突变的潜在位点上。将抗体的氨基末端残基(E)标记为残基1。

[0555] 图5B描述HB12b抗CD19抗体的重链VH-D-JH连接序列的核苷酸(SEQ ID NO:3)和预测的氨基酸(SEQ ID NO:4)序列。由双下划线指出与5'PCR引物相一致的序列,其可不同于实际的DNA序列,因为使用了多余的引物。由垂直的条带(1)在序列中指定在V、D和J序列之间的近似连接边界。在少数病例中核苷酸密码指出核苷酸附加在连接边界或体超突变的潜在位点上。将抗体的氨基末端残基(E)标记为残基1。

[0556] 图6A描述HB12a抗CD19抗体的轻链VK-JK连接序列的核苷酸(SEQ ID NO:15)和预测的氨基酸(SEQ ID NO:16)序列。图6B描述HB12b抗CD19抗体的轻链V-J连接序列的核苷酸(SEQ ID NO:17)和预测的氨基酸(SEQ ID NO:18)序列。将由氨基酸序列分析推导出的成熟分泌蛋白的氨基末端氨基酸编为1号。由双下划线指出与3'PCR引物相一致的序列。指出了V-J-C区的预测的连接边界(/),粗体的J区核苷酸代表体超突变的潜在位点。

[0557] 图7A和7B描述公开的小鼠抗CD19抗体的氨基酸序列比对。图7A显示包括共有序列(SEQ ID NO:5)、HB12a(SEQ ID NO:2)、4G7(SEQ ID NO:6)、HB12b(SEQ ID NO:4)、HD37(SEQ ID NO:7)、B43(SEQ ID NO:8)和FMC63(SEQ ID NO:9)的重链VR-D-JH连接序列的序列比对。按照常规方法(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest.,U.S.Government Printing Office,Bethesda, MD(1991)),来对氨基酸编号并指定每个抗体V、D和J区的编码序列的原点,其中由VH基因编码氨基酸位点1-94和互补性决定区CDR1和2。虚线指示插入序列的缺口来最大化相似氨基酸序列的比对。圆点指示在每个抗CD19抗体和所有抗体的交感氨基酸序列之间的同一性。突出CDR区来使其清楚。图7B显示抗CD19抗体的轻链VK氨基酸序列的分析。列出了共有序列(SEQ ID NO:10)、HB12a(SEQ ID NO:16)、HB12b(SEQ ID NO:18)、HD37(SEQ ID NO:11)、B43(SEQ ID NO:12)、FMC63(SEQ ID NO:13)和4G7(SEQ ID NO:14)。按照常规方法(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest.,U.S.Government Printing Office,Bethesda, MD(1991)),来对氨基酸编号并指定每个抗CD19抗体的编码序列的原点,其中由VH基因编

码氨基酸位点1-94和互补性决定区CDR1和2。将按照预测的信号序列裂解位点的氨基酸编为1号。虚线指示插入序列的缺口来最大化相似氨基酸序列的比对。突出CDR区(方框)来使其清楚。

[0558] 因为本研究中所测定的每个抗CD19抗体消耗了重要数目的体内B细胞,评价每个抗CD19抗体可变区的氨基酸序列来确定这些抗体在序列上是否不同,并且是否可能结合到不同的CD19表位上。抗体通过分子间相互作用,即在每个抗体分子的可变区内由特异性的氨基酸介导的作用结合靶抗原。因此,在蛋白抗原之间的复杂的相互作用和结合到在这些抗原上的特异的表位的抗体对于每个抗体和其特异的氨基酸序列来说几乎是唯一的。这个在抗原和抗体相互作用中的复杂性的水平是各种抗体所有组成部分对于大多数蛋白抗原的反映。当抗体与靶抗原相互作用主要是由在抗体分子的互补性决定区(CDR)之内的氨基酸介导时,骨架氨基酸对于抗原结合活性也是决定性的。因此,结构上相似的抗体很可能结合到靶分子的相同抗原或区域上,而具有不同的V和CDR区的结构上不相似的抗体很可能通过不同的分子间相互作用与抗原的不同的区域相互作用。

[0559] 因为与靶抗原的相同分子区域(或表位)相互作用并结合的抗体是根据定义结构上相似的,比较了HB12a、HB12b、FMC63及其它公开的抗CD19抗体的氨基酸序列,包括:HD37(Kipriyanov等人,J.Immunol. Methods,196:51-62(1996);Le Gall等人,FEBS Letters,453:164-168(1999)、2G7(Meeker等人,Hybridoma,3:305-320(1984);Brandl等人,Exp.Hematol,27:1264-1270(1999))和B43(Bejcek等人,Cancer Res.,55:2346-2351(1995))抗体。通过V(D)J基因片段与来源于V1S39、V1S56、V1S136或V2S1基因片段的V区、来源于FL16.1基因片段的D区和来源于J2或J4基因片段的J区的不同组合来产生抗CD19抗体的重链(表2)。B43和HD37抗体公开的重链和轻链可变区在氨基酸序列上实质上是相同的(图7A-B)。这个水平的保持反映了这样的事实:这些抗体中的每个在核苷酸水平上也明显相似,具有相同的VH(D)JH和VLJL的连接,通过利用多余的引物来PCR扩增每个cDNA序列来计算大多数的差异。这表明HD37和B43与抗体共享公共的,即使不相同的起源,并因此结合到CD19蛋白的相同表位上。HB12a和4G7抗体也不同于其它的抗CD19抗体。虽然HB12a和4G7抗体的重链区是相似的,并可能来源于相同的胚系VH(D)JH基因片段,将不同的接合边界用于D-JH的装配(图7A)。HB12b和4G7抗体利用分离的VH基因片段(表2),并具有与另一个抗CD19抗体明显不同的CDR3序列(图7A)。FMC63抗体也具有与另一个抗CD19抗体完全不同的氨基酸序列。

[0560] 表2

	重链				轻链			
	V <sup>a</sup>	D	J	登录号 <sup>b</sup>	V	J	登录号	
					VI-133*	J2*		
HB12a	V1S136 (12,8)	FL16.1	J2		01	01		
						J4*		
HB12b	V1S56 (27,14)	FL16.1	J2		V3-2*01	01		
4G7	V1S136 (10,8)	FL16.1	J2	AJ555622	V2-137	J5	AJ555479	
B43	V1S39 (37,17)	FL16.1	J4	S78322	V3-4	J1	S78338	
HD37	V1S39 (34,16)	FL16.1	J4	X99230	V3-4	J1	X99232	
FMC63	V2S1 (20,16)	FL16.1	J4	Y14283	V10-96	J2	Y14284	

[0562] N.D.:未检出。

[0563] <sup>a</sup>在括号中的数字表示在CD19抗体编码基因与目前数据库中确定的最同 源的胚系序列之间的核苷酸差异的数目,排除了与PCR引物重叠的区域。

[0564] <sup>b</sup>基因序列的GENBANK®登录号。

[0565] 如图7B所示,每个HB12a、HB12b、FMC63、4G7和HD37/B43 抗体利用不同的轻链基因(图7B)。从多倍的V和J基因片段产生轻 链。在这六个抗CD19抗体H和L链序列中均一性的缺乏表明这些抗体 结合到人CD19的一些不同的位点上。成对的重链和轻链的氨基酸序列 的比较进一步表明大部分这些抗CD19抗体在结构上不同,并且能因此 通过不同的分子相互作用结合人CD19。因此,抗CD19抗体在体内消 耗B细胞的能力不限于在相同位点上结合CD19的有限抗体,而是抗 CD19抗体作为一类的一般属性。

[0566] 6.3.4CD19密度影响CD19抗体诱导的B细胞消耗的有效性

[0567] 为了确定抗CD19抗体消耗B细胞的能力是否取决于CD19密度, 将HB12b和FMC63抗CD19抗体给予具有不同水平的CD19表达的小 鼠。结果表明当抗CD19抗体存在时,在B细胞上人CD19密度和抗体 同种型可以影响B细胞的消耗。相同的试验可用于确定其它的抗CD19 抗体是否可以有效地消耗B细胞,并且结果可以与具有不同水平的 CD19表达的人类患者 的治疗相关。因此,在5.5.3节中所述的用于在受 试验者中检查CD19存在和密度的方法可用于鉴定患者或患者人群,其 中某些抗CD19抗体可以消耗B细胞,和/或用于确定合适的剂量。

[0568] 以上存在的结果表明虽然当在250或50 $\mu$ g使用时,在TG-1<sup>+/−</sup> 小鼠 中测定的全部五种抗CD19抗体是同样有效的,但是对于来自血液、骨 髓和脾的B细胞来说,B细胞消耗的程度看来似乎与抗体同种型有关, IgG2a>IgG1>IgG2b(图2A-2D)。因此,比较了在以不同的密度表达CD19 的纯合的TG-1<sup>+/+</sup>、杂合的TG-1<sup>+/−</sup> 和纯合的TG-2<sup>+/+</sup> 小鼠中HB12b(IgG1) 和 FMC63(IgG2a) 抗体的效率(图1A-E)。

[0569] 为了确定CD19密度是否影响抗CD19抗体诱导的B细胞消耗的效 率,在HB12b(图 8A) 或FMC63(图8B) 抗体治疗(7天,250 $\mu$ g/小 鼠) 之后在hCD19TG小鼠中测定典型的血液和脾的B细胞消耗。数字 表示路径的B220<sup>+</sup>淋巴细胞的百分比。条形图表示在用抗CD19抗体(闭 合的条带)或同种型对照(开放的条带)治疗之后血液(每mL)或脾 (总数) B细胞的数目 ( $\pm$  SEM)。表明了在抗CD19抗体或同种型对照 抗体治疗的小鼠 (每个数据点>3只小鼠) 中平均结果之间的显著差异; \*p<0.05,\*\*p<0.01。

[0570] 存在于图8A-8D的结果表明CD19密度在体内通过抗CD19抗体影 响B细胞消耗的效率。在第七天,在TG-2<sup>+/+</sup> 小鼠中低水平的CD19表达 对用HB12b抗体的循环或组织B细胞的消 耗有显著的影响(图8A)。由TG-1<sup>+/+</sup>、TG-1<sup>+/−</sup> 和TG-2<sup>+/+</sup> 小鼠的CD19表达中的差异也影响用 FMC63 抗体的循环和组织B细胞的消耗,而不明显改变循环B细胞的消耗(图 8B)。

[0571] 为了进一步证实CD19密度是CD19mAb介导的B细胞消耗中的一 个重要因素,直接 比较了CD19TG-1<sup>+/+</sup>和CD19TG-2<sup>+/+</sup>的相对消耗比例。通过标记来自hCD19TG-1<sup>+/+</sup>和CD19TG-2<sup>+/+</sup> 小鼠的无功能脾细胞来差别 标记来自CD19TG-1<sup>+/+</sup>和CD19TG-2<sup>+/+</sup> 小鼠的脾细胞,按照产 品的说明 书分别用0.1和0.01 $\mu$ M Vybrant<sup>TM</sup>CFDA SE (CFSE; Molecular Probes) 标记来自 hCD19TG-1<sup>+/+</sup>和CD19TG-2<sup>+/+</sup> 小鼠的无功能脾细胞。通过免疫 荧光染色与流细胞计数分析来 确定在CFSE标记的脾细胞中B220<sup>+</sup>细胞 的相对频率。后来,将相等数目的CFSE标记的B220<sup>+</sup>

hCD19TG-1<sup>+/+</sup>和 hCD19TG-2<sup>+/+</sup>脾细胞 ( $2.5 \times 10^5$ ) 注射到三种野生型B6小鼠的腹膜腔中。在1小时之后,给予小鼠FMC63或对照rnAb (250 $\mu$ g, i.p.)。在24小时之后,回收标记的淋巴细胞,通过流细胞计数测定CFSE标记的B220<sup>+</sup>和B220<sup>-</sup>细胞的相关频率。在图8C的每个柱形图中的路径显示在 CD19TG-1<sup>+/+</sup> (CFSE<sup>high</sup>) 和CD19TG-2<sup>+/+</sup> (CFSE<sup>low</sup>) 的脾细胞群内的 B220<sup>+</sup>细胞的频率。条带图表示存在于抗CD19mAb治疗的小鼠相对于对照mAb治疗的小鼠中的CFSE标记的细胞群的数目。结果表示转移到>3只野生型接受小鼠中的hCD19TG-1<sup>+/+</sup>脾细胞(填充的条带)和 hCD19TG-2<sup>+/+</sup>脾细胞(开放的条带),在指示的样本平均值(±SEM)之间有显著差异;\*\*p<0.01。

[0572] 在抗CD19或对照mAb治疗单个的小鼠24小时之后,测定B细胞的清除。与对照的mAb治疗的小鼠相比,以比在抗CD19mAb治疗的小鼠中的 CD19TG-2<sup>+/+</sup>B细胞明显更快的速率( $p<0.01$ )消耗CD19TG-1<sup>+/+</sup>B220<sup>+</sup>B 细胞(图8C)。此外,在抗CD19mAb治疗的小鼠中CD19TG-1<sup>+/+</sup>B220<sup>+</sup>B 细胞对CD19TG-2<sup>+/+</sup>B220<sup>+</sup>B细胞的相对频率明显低于( $p<0.01$ )在对照 mAb治疗的小鼠中CD19TG-1<sup>+/+</sup>B220<sup>+</sup>B细胞对CD19TG-2<sup>+/+</sup>B220<sup>+</sup>B细胞 的比率。同样地,也可比较在抗CD19或对照mAb小鼠中CD19TG-1<sup>+/+</sup>和 CD19TG-2<sup>+/+</sup>CFSE标记的B220<sup>-</sup>细胞的数目。因此,在比以低密度表达 CD19的TG-2<sup>+/+</sup>B细胞更快比率地消耗表达高密度CD19的CD19TG-1<sup>+/+</sup>B 细胞。

[0573] 图8D显示用CD19(粗线)、CD20(细线)或配对同种型对照(CTL, 虚线)抗体(5 $\mu$ g/mL)染色的B220<sup>+</sup>细胞的荧光强度,其中通过流细胞计数分析具体使用同种型特异性的、PE结合的二级抗体来进行抗体染色。结果显示在4个实验中获得的荧光强度。结果显示在来自TG-1<sup>+/+</sup>小鼠的脾B220<sup>+</sup>细胞上相关的抗hCD19和抗mCD20抗体结合密度。不论将哪个抗体用于每个抗体,同种型抗mCD20抗体结合密度都是 10-64%,与抗CD19抗体结合密度同样高(图8D)。虽然mCD20表达一般比hCD19表达低,但是在TG-1<sup>+/+</sup>小鼠中hCD19表达的水平仍然可与基于人类B细胞的hCD19表达的水平相比较(图1B)。因此,抗CD19抗体有效地消耗以相对低密度表达hCD19的TG-2<sup>+/+</sup>B细胞(图1B), 虽然通过TG-1<sup>+/+</sup>和TG-1<sup>+/+</sup>B细胞的高水平CD19表达模糊了在IgG2a 和IgG1抗体的有效性上的相对差异。虽然在TG-1和TG-2转基因小鼠 中B细胞的数量和hCD19表达的密度之间存在直接的逆相关,但是 hCD19的密度是促进B细胞消耗的一个重要因素。当以250 $\mu$ g/小鼠给药时,抗CD19抗体水平是饱和的(也参见:在图12中的饱和水平)。因此,不论B细胞的数目,游离抗CD19抗体水平过量。

[0574] 6.4实施例3:组织B细胞消耗是Fc $\gamma$ R依赖性的

[0575] 将下列试验用于确定由抗CD19抗体的B细胞消耗是否依赖于Fc $\gamma$ R 的表达。通过将hCD19tg与某些Fc $\gamma$ R缺少表达的小鼠杂种繁殖的方法, 产生了表达hCD19并某些Fc $\gamma$ R表达的小鼠。将这样的小鼠用于试验来测定抗CD19抗体对于通过包括Fc $\gamma$ R表达的途径,例如:ADCC来消耗B 细胞的能力。因此,在这些试验中鉴定的抗CD19抗体可利用在如上5.1节中所述的方法,用于制备嵌合的、人的或人源化的抗CD19抗体。这样的抗体可以依次用于本发明的组合物和方法,来治疗人体中的B细胞恶性肿瘤。

[0576] 天生的免疫系统通过Fc $\gamma$ R依赖的过程介导在抗CD20抗体治疗之后 的B细胞消耗。小鼠效应细胞表达四种不同的Fc $\gamma$ R类型:IgG、高亲合性 Fc $\gamma$  RI (CD64) 和低亲合性Fc $\gamma$  RII (CD32)、Fc $\gamma$  RIII (CD6) 和Fc $\gamma$  RIV 分子。Fc $\gamma$  RI、Fc $\gamma$  RIII和Fc $\gamma$  RIV是异低聚物复合物,其各自的配基结合的 $\alpha$ 链与公共的 $\gamma$ 链(FcR $\gamma$ )相连。对于Fc $\gamma$ R装配和Fc $\gamma$ R效应子功能的触发来说,FcR $\gamma$ 链的表达是需要的,所述的效应子功能包括由巨噬细胞的 吞噬作

用。因为FcR $\gamma^{-A}$ 小鼠缺乏高亲合性Fc $\gamma$  RI (CD64) 和低亲合性 Fc $\gamma$  RIII (CD16) 以及Fc $\gamma$  RIV 分子, 所以将表达hCD19的FcR $\gamma^{+/-}$ 的小鼠用于确定在抗CD19抗体治疗之后Fc $\gamma$  R在组织B 细胞消耗中的作用。图9A 显示在FcR $\gamma^{+/-}$ 或FcR $\gamma^{-/-}$ 同窝出生仔畜的抗CD19或同种型对照抗体治疗 之后七天典型的血液和脾B细胞的消耗。数字指示在指定的路径内B220 $^{+}$ 淋巴细胞的百分比。图9B显示在第0天FcR $\gamma^{+/-}$ 同窝出生仔畜的抗体治疗 之后七天血液和组织B细胞的消耗。对于血液, 在时间0点之后显示的值 代表在1小时获得的数据。条形图代表在小鼠 (每群>3只小鼠) 的抗CD19 (填充的条带) 或同种型对照 (开放的条带) 抗体治疗之后的平均B220 $^{+}$  B 细胞数目。指示了在抗CD19或同种型对照抗体治疗的小鼠之间的显著差 异; \*p<0.05, \*\*p<0.01。存在于图9A和9B中的结果表明在抗CD19抗体 治疗之后的B细胞消耗是FcR $\gamma$  依赖性的。当与用对照的IgG2a抗体处理的 FcR $\gamma^{-/-}$ 同窝出生仔畜相比, 在FMC63抗体治疗之后在FcR $\gamma^{-/-}$ 小鼠中骨髓、血液、脾、淋巴结和腹膜腔B细胞的数目没有显著的变化。相反, 抗CD19 抗体治疗消耗了FcR $\gamma^{+/-}$ 同窝出生仔畜中的大部分B细胞。因此, 抗CD19 抗体治疗主要通过需要Fc $\gamma$  RI和Fc $\gamma$  RIII表达的途径来消耗血液和组织B 细胞。

[0577] 图9C显示在单核细胞消耗的hCD19TG-1 $^{+/-}$  小鼠中典型的B细胞数 目。用氯屈膦酸二钠-脂质体在第2、1和4天治疗小鼠, 并在第0天给予 FMC63 (n=9) 、同种型对照物 (n=6) 或CD20 (n=3) mAb (250 $\mu$ g) 。用PBS-脂质体和FMC63抗CD19抗体 (n=3) 治疗的小鼠作为对照物。以 在抗体治疗之后7天, 指示的指定途径内淋巴细胞的百分比来显示典型的血液和脾B细胞消耗。

[0578] 图9D显示如在 (C) 中在抗体治疗后7天血液和组织B细胞的消耗。条形图代表在小鼠 (每群>3只小鼠) 的抗体治疗之后的平均B220 $^{+}$ B细胞 数目。对于血液, 数值表明在PBS治疗并用FMC63抗CD19抗体 (闭合三 角形) 处理的小鼠中循环B细胞, 以及用对照抗体 (开放的圆圈) 、CD20 抗体 (闭合正方形) 或FMC63抗CD19抗体 (闭合的圆圈) 处理的单核 细胞消耗小鼠的数目。指示了在同种型对照mAb治疗的小鼠及其他群的 平均结果之间的显著差异; \*p<0.05, \*\*p<0.01。

[0579] 图9中的结果显示在抗CD19抗体治疗之后的B细胞消耗是FcR $\gamma$  和单 核细胞依赖性的。通过用脂质体包封的氯屈膦酸二钠的处理而显示巨噬 细胞缺乏的小鼠在FMC63、抗 CD20 (MB20-11) 或对照抗CD19抗体治 疗之后1天, 不显著地消耗循环B细胞, 而FMC63抗体治疗除去了在用 PBS装载的脂质体处理的小鼠中的循环B细胞 (图9C-D)。在4-7天之后, 循环 B细胞数目被FMC63和抗CD20抗体治疗明显地消耗, 而抗CD19抗 体治疗在氯屈膦酸二钠治疗的小鼠中对于B细胞数目具有更多的惹人注 目的效果。类似地, 抗CD19和抗CD20抗体治疗在第7天在氯屈膦酸二钠 治疗的小鼠中减少了55%的骨髓B220 $^{+}$ 细胞数目, 而抗CD19抗 体治疗在第7天在耗尽PBS治疗的小鼠中减少了88%的骨髓B220 $^{+}$ 细胞数目。抗 CD19抗体治疗在第7天在氯屈膦酸二钠治疗的小鼠中相对于对照抗体治 疗的同窝出生仔畜来说减少了52%脾B细胞的数目, 而在PBS治疗的小鼠 中抗CD20抗体最低限度地消耗B细胞, 抗CD19抗体治疗减少了89%的脾 B细胞数目。抗CD19和抗CD20抗体治疗都在抗体治疗后7天在氯屈膦酸 二钠治疗的小鼠中减少了48-53%的淋巴结B细胞的数目, 而抗CD19抗体 治疗在PBS治疗的小鼠中减少了93%的淋巴结B细胞的数目。在血液、脾 和淋巴结中, 在氯屈膦酸二钠治疗的小鼠中抗CD19抗体治疗明显比在 PBS治疗的小鼠中低效 (p<0.01)。这些发现暗示巨噬细胞作为体内消 耗CD19 $^{+}$ 和CD20 $^{+}$ B细胞的主要的效应细胞, 并表明当单核细胞

数目或功能下降时,抗CD19抗体治疗可能比抗CD20抗体治疗更有效。

[0580] 6.5实施例4:抗CD19抗体诱导的B细胞消耗是持久的

[0581] 为了测定B细胞消耗的效力和持续时间,对hCD19TG小鼠给药抗CD19抗体的单个小剂量250 $\mu$ g注射剂。图10A-10C表示在抗CD19抗体治疗之后B细胞消耗的持续时间和剂量反应。图10A显示在第0天FMC63或同种型对照抗体治疗TG-1<sup>+/−</sup>小鼠之后,血液B220<sup>+</sup>B细胞和Thy-1<sup>+</sup>T细胞的数目。数值代表来自每组六个小鼠的平均值(±SEM)结果。结果表明在13周中消耗循环B细胞,在接下来的13周中血液承载的B细胞逐渐恢复。Thy-1<sup>+</sup>T细胞模型不是由于抗CD19治疗的结果而改变的。

[0582] 图10B-10C显示在抗体治疗之后11、16和30周,如图10A所示在小鼠中典型的组织B细胞消耗。数字指示在制定的路径内B220<sup>+</sup>淋巴细胞的百分比。在图10B中的结果显示在抗体治疗之后11周,骨髓、血液、脾、淋巴结和腹膜腔基本上缺少B细胞(指示了在样本平均值之间的显著差异;\*p<0.05,\*\*p<0.01)。在循环B细胞第一个出现之后,为了使循环B细胞数目达到正常范围,取>10个附加的周。如图10C所示,在抗体治疗后第16周,血液、脾、LN和PLB细胞的数目已经开始恢复,而BM B细胞区域与未经治疗的对照没有明显不同。到第30周,将B细胞在可与正常对照相比的水平上重新加入全部组织。

[0583] 图10D显示应答于血液、骨髓和脾B细胞消耗的抗CD19抗体剂量。在第0天用抗CD19抗体治疗小鼠,在第七天测定组织B细胞模型。结果显示对于每个抗体的剂量由每组三个小鼠所得到的值。对照抗体的剂量是250 $\mu$ g。指示了在样本平均值之间的显著差异;\*p<0.05,\*\*p<0.01。低到2 $\mu$ g/小鼠的单个FMC63抗体剂量消耗了显著数量的循环B细胞,而要求10 $\mu$ gHB12b抗体显著地减少循环B细胞的数目(图10D)。到第七天骨髓和脾B细胞的显著消耗需要高于10-50 $\mu$ g/小鼠的抗体剂量5倍。因此,在相对低的剂量上进行的CD19抗体治疗可以消耗对于重要的时段的大部分循环和组织B细胞。

[0584] 6.5.1在抗CD19抗体给药之后CD19维持在B细胞表面

[0585] 在HB12a、HB12b和FMC63抗体治疗(250 $\mu$ g)之后,通过比较细胞表面CD19的表达来确定CD19的内化作用是否影响体内B细胞的消耗。

[0586] 图11A-11C显示在体内用HB12a(图11A)、HB12b(图11B)、FMC63(图11C)或配对同种型抗体(250 $\mu$ g)治疗的TG-1<sup>+/−</sup>小鼠中细胞表面CD19表达和B细胞清理。在时间零点(在抗CD19给药之前)和在抗体给药后1、4和24小时,收获脾B细胞,并用流细胞计数分析通过在体外用同种型特异的二级抗体处理细胞来测定CD19(粗线)和对照(细线)抗体结合。也在体外将分离的B细胞用饱和浓度的每个CD19抗体加上同种型特异的二级抗体,在体外通过流细胞计数分析来测定总的细胞表面CD19的表达。每个时间点代表从一只小鼠处获得的结果。存在于图11A-11C中的结果表明在体内抗体结合之后,细胞表面CD19不被从细胞表面除去,并且显示直到抗体治疗之后24小时,大部分的脾B细胞表达相等的高水平的细胞表面hCD19,B细胞的亚型在FMC63抗体治疗之后1小时表达降低水平的hCD19(图11C)。在图11A-11C中所示的结果也表明在B细胞表面上CD19的数值是恒定值,指示B细胞保持着介导ADCC的能力。

[0587] 结果表明在抗CD19抗体给药之后,CD19令人惊讶地显示比预期更低水平的内化作用。特别地,结果表明在抗CD19抗体结合之后,CD19出乎意料地维持在细胞表面,因此,B细胞保持能有ADCC活性。这些结果部分地表明,为什么本发明的抗CD19抗体和治疗方案在

治疗B细胞恶 性肿瘤上是有效的。

[0588] 图12A-12C证明B细胞消耗的程度和抗hCD19抗体结合到hCD19并 因此阻止其它的抗hCD19抗体结合的能力。在图12A中的结果表明将 FMC63对TG-1<sup>+/−</sup> 小鼠单一给药 (250μg) 导致在抗体给药1小时之内血液 和脾的B细胞的明显消耗。在该实验中,在抗CD19抗体给药之前或在其 后不同的时间 (1、4或24小时) 收获血液和脾细胞,并测定B细胞频率。将血样用抗Thy1.2和抗B220染色来在较低的右象限中鉴定B细胞。将脾 细胞用抗IgM和抗B220抗 体染色来在指定的路径内鉴定B细胞。每个时 间点代表从一只小鼠处获得的结果。出乎意料地,血液B细胞比脾B细胞 清除得更快。

[0589] 在图12A中所述的B细胞消耗表明在给药1小时之内,给予的抗体迅 速地使hCD19 上可用的抗体结合部位饱和。为了证实该观测,将小鼠用 FMC63 (hCD19结合抗体) 或同种型对照抗体治疗。在其后不同的时间, 用荧光染料结合的B4抗体对血液和脾B细胞染色来鉴定在mCD19<sup>+</sup>或 mCD20<sup>+</sup> B细胞表面上空着的抗体结合部位。在上下右边的象限内指出了 细胞的频率。每个时间点代表从一只小鼠处获得的结果。结果表明 FMC63治疗导致在试验过程中hCD19产生细胞的逐步消耗,其中血液B 细胞比脾消耗得更快。那些留在每个时间点处的 B细胞可通过其mCD19 或mCD20的表达而不是通过B4染色来鉴定,说明给予的FMC63与剩余的 B细胞相结合。这些发现证实了在体内FMC63结合和消耗B的能力。图 12C中的结果证实 在给药1小时之内HB12b抗体治疗 (250μg) 也使hCD19 上的抗体结合部位饱和,并导致hCD19 阳性B细胞的消耗。出乎意料地, HB12b抗体不完全抑制B4抗体的结合,说明不同于FMC63, HB12b识别 hCD19上的表位,其与通过B4的识别不同。在图12B-12C中所示的结果 表明大 多数的抗CD19抗体抑制大多数其它抗CD19抗体的结合,表明大 多数抗CD19抗体结合到CD19 蛋白的相似的、相同的或重叠区或表位上。选择性地,这些观测也可能是由于与抗体分子的大小相比,CD19细胞外 结构域的相对小的大小。

[0590] 6.6实施例5:抗CD19抗体治疗消除了体液免疫和自身免疫

[0591] 在本实施例中所述的试验可用于确定抗CD19抗体是否能够消除或 减少免疫反 应。在这些试验中鉴定的抗CD19抗体可利用如上5.1节所述 的方法用于制备嵌合的、人的 或人源化的抗CD19抗体。这样的抗体可以 依次用于本发明的组合物和方法,来治疗人体中的B细胞恶性肿瘤。

[0592] 通过给予hCD19tg<sup>+/−</sup> 小鼠抗CD19抗体的单一注射剂来测定在血清抗 体水平上抗 CD19抗体诱导的B细胞消耗的效果。图13A显示CD19抗体治 疗减少了在TG-1<sup>+/−</sup> 小鼠中血清免疫球蛋白的水平。在第0天用FMC63的 单一注射剂(闭合的圆圈)或对照(开放的圆圈)抗 体 (250μg) 治疗 两个月大的同窝出生仔畜。通过ELISA确定抗体水平,采用每组>5只小 鼠 所示的平均值 (± SEM)。在CD19或对照的mAb处理的小鼠之间的差 异是明显的;\*p< 0.05,\*\*p<0.01。结果显示在1到2周之后,血清IgM、 IgG2b、IgG3和IgA抗体水平明显降低, 并保持减低至少10周(图13A)。在处理后6和4周IgG1和IgG2a血清水平明显低于正常。

[0593] 因为hCD19TG<sup>+/−</sup> 小鼠在2月龄之后产生可检测的自身抗体 (Sato等 人,J. Immunol, 157:4371 (1996)),所以可测定血清自身抗体与ssDNA、 dsDNA和组蛋白的结合。图13B显示 在抗CD19抗体治疗之后,抗CD19 抗体治疗减少了自身抗体抗dsDNA、抗ssDNA和抗组蛋白的 自身抗体水 平。结果显示在2周后抗CD19抗体治疗明显降低了血清IgM自身抗体水 平,并 直到10周阻止了同种型转换IgG自身抗体的产生(图13B)。因此, B细胞消耗实质上减少了

急性的和长期的抗体应答，并减少了正常和发病的免疫应答的类型转换。

[0594] 通过在抗CD19抗体(FMC63)或对照抗体治疗后7天，通过用TNP-LPS或DNP-FicollB免疫hCD19TG<sup>+/−</sup>小鼠(在第0天)来测定细胞消耗对于T细胞独立类型1(TI-1)和类型2(TI-2)抗体应答的影响。用抗原免疫的抗CD19抗体治疗的小鼠中观察不到明显的半抗原特异的IgM、IgG和IgA抗体应答(图14A和14B)。也在免疫前7天利用抗CD19抗体治疗的小鼠来测定对于T细胞依赖性(TD)Ag、DNP-KXH的抗体应答(图14B)。图14C显示用抗CD19抗体治疗的DNP-KLH免疫的小鼠显示了降低的由体液引起的免疫性。在第0天初次免疫之前七天用FMC63(闭合的圆圈)或对照(开放的圆圈)抗体(250μg)治疗同窝出生仔畜，在制定天获得血清。对于DNP-KLH免疫，在第21天用100μg的DNP-KLH激发全部的小鼠。AU值是利用来自每组五只小鼠的血清获得的平均(±SEM)ELISA光密度单位。在抗CD19或对照抗体治疗的小鼠之间的差异是明显的；\*p<0.05, \*\*p<0.01。结果显示对照抗体治疗的同窝出生仔畜在DNP-KLH免疫后7天产生初级IgM抗体应答，并在第21天在抗原激发后产生二级应答(图14C)。但是，在用抗原免疫或再激发的CD19mAb治疗的小鼠中未发现明显的半抗原特异的IgM、IgG或IgA应答。为了确定B细胞消耗在二级抗体应答上的效果，也在14天后用DNP-KLH免疫小鼠，并用抗CD19抗体治疗(箭头)(图14D)。到第21天，在CD19mAb治疗的小鼠中血清IgM、IgG和IgA抗DNP抗体应答下降到低于用对照mAb治疗的免疫小鼠抗体应答的水平。但是，在第21天用DNP-KLH对用对照mAb治疗的小鼠进行的再激发，诱导了明显的二级抗体应答，而CD19mAb治疗的小鼠在DNP-KLH再激发之后不产生抗DNP抗体。因此，CD19mAb诱导的B细胞消耗实质上减少了初级和二级抗体应答，并在由体液引起的免疫应答期间阻止了类型转换。

[0595] 6.7实施例6：抗CD19抗体治疗与抗CD20抗体治疗的结合

[0596] 此处所述的试验可用于确定其它的组合物或结合治疗，例如：抗CD19抗体与化学疗法、毒素治疗或放射疗法结合是否具有有益的效果，例如：增加B细胞消耗的一种或多种添加剂。通过本领域已知的手段，在动物模型中已试验的组合治疗的结果可以与人体有关。

[0597] 抗CD20抗体在体内消耗人和小鼠的B细胞上是有效的。所以，评估了同时用抗CD19(FMC63)和抗CD20(MB20-11)抗体治疗的好处来确定其是否增加了B细胞的消耗。分别用最适度下的2μg剂量的每种抗体，或1μg的两种抗体的组合，或用组合的2μg剂量来治疗小鼠。图15显示在第0天用对照(250μg)、FMC63(CD19, 2μg)、MB20-11(CD20, 2μg)、FMC63<sup>+</sup>MB20<sup>−</sup>11(每种1μg)或FMC63<sup>+</sup>MB20<sup>−</sup>11(每种2μg)抗体治疗TG-1<sup>+/−</sup>小鼠的结果。在时间零点、一小时和第一、四和七天测定血液B细胞的数目。值代表来自三个小鼠的组的平均值(±SEM)。图15所示的结果表明抗CD19和抗CD20抗体的同时治疗是有益的。在以1μg的两种抗体结合来治疗的小鼠中B细胞消耗是中间物或类似于在以每种独立抗体2μg的两种抗体来同时治疗的小鼠中所观察到的消耗(图15)。但是，用在2μg下的两种抗体同时治疗小鼠导致比用单独抗体所观察到的明显更多的B细胞消耗。因此，联合的抗CD19和抗CD20抗体治疗具有增强B细胞消耗的有益效果。这可能是由于在独立的B细胞表面上更多的治疗上有效的抗体分子的累积。

[0598] 6.8实施例7：皮下的(S.C.)抗CD19抗体给药是治疗上有效的

[0599] 此处所述的试验可用于确定抗CD19抗体的皮下给药途径是否可以有效地消耗B

细胞。通过本领域已知的手段,在动物模型中已试验的不同运送途径的效力的结果可以与人体有关。

[0600] 因为静脉内 (i.v.) 给药的抗CD19抗体有效地消耗了循环和组织B 细胞,所以测定皮下(s.c)或腹内(i.p.)给予抗CD19抗体是否消耗B 细胞达到相等的程度。用250 $\mu$ g的FMC63抗体以皮下(s.c)、腹内(i.p.) 或静脉内(i.v.)给药来治疗野生型小鼠。值代表在第七天通过流细胞计数法测定的血液(每mL)、骨髓、脾、淋巴结和腹膜腔B220<sup>+</sup>B细胞数目的平均值(±SEM)。指出了在每组小鼠的平均结果之间的显著差异; 与对照相比,\*p<0.05,\*\*p<0.01。在图16中的结果表明CD19抗体的皮下(s.c)、腹内(i.p.) 或静脉内(i.v.)给药有效地消耗了体内循环和组织B细胞。在用250 $\mu$ g剂量的抗CD19抗体以皮下(s.c)、腹内(i.p.) 或静脉内(i.v.)给药的小鼠中消耗了大部分的循环和组织B细胞(图16)。出乎意料地,腹内(i.p.) 给予抗CD19抗体所消耗腹部B细胞不明显优于静脉内(i.v.)给药。因此,当抗CD19抗体以皮下(s.c)注射<64mg时,其可用于有效地消耗循环和组织B细胞。因为静脉内(i.v.)给药时抗CD19 抗体直到10 $\mu$ g剂量仍有效(图10D),所以即使较低的皮下(s.c)给药的抗体剂量也很可能是有效的。

[0601] 6.9实施例8:抗CD19抗体治疗中止了体内肿瘤的发育

[0602] 伯基特氏淋巴瘤,人体中的一种B细胞恶性肿瘤,其特点在于c-myc 原癌基因易位到Ig基因启动子区,导致变体c-Myc过表达。类似地, Eu-cMyc转基因(cMycTG) 小鼠,其中c-myc原癌基因处于Ig重链增强子的控制之下,在早期产生攻击性的B细胞衍生恶性淋巴瘤,到20周龄 有大约90%的死亡率,并且在大约12周时有中值年龄的存活者(Harris 等人, J.Exp.Med.167:353 (1988) 和Adams等人,Nature 318:533 (1985))。来自c-MycTG小鼠的肿瘤不局限于特异的B细胞发育阶段,而主要表现为前B细胞或不成熟B细胞的Ig基因重排和表型特征(Adams 等人,Nature 318:533 (1985))。为了确定体内针对CD19的免疫疗法的效力,将hCD19TG-1<sup>+/+</sup>和cMycTG小鼠杂交来产生 hCD19TG-1<sup>+/+</sup>cMycTG<sup>+</sup>小鼠,其在早期产生攻击性的B细胞衍生恶性淋巴瘤。分离出来源于一个小鼠的肿瘤细胞,在体外扩增,并表现表型上 hCD19<sup>+</sup>和小鼠CD19<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>B220<sup>+</sup>成淋巴细胞的特性,其 代表了在c-mycTG<sup>+/+</sup>小鼠中产生的前B/不成熟B细胞肿瘤(Harris等人, J.Exp.Med.167:353 (1988) 和Adams等人,Nature 318:533 (1985))。在第0天,将来自hCD19TG-1<sup>+/+</sup>c-mycTG<sup>+</sup>小鼠的肿瘤细胞(10<sup>5</sup>)静脉内 (i.v.) 移植到20只Rag<sup>+/+</sup> 小鼠中。在第1和7天,用FMC63(填充了的圆圈)或对照(开放的圆圈)抗体(250 $\mu$ g)治疗相等数目的随机选择的 小鼠。图17A显示在6周的周期中通过流细胞计数法测定的循环肿瘤细胞 (±SEM)的数目,图17B显示在7周的周期中小鼠存活率的百分比。每个值表明在每天中试验的存活小鼠的百分比。在图17中的结果表明抗 CD19抗体治疗抑制了hCD19<sup>+</sup>恶性淋巴瘤在体内的发展。将这些肿瘤细胞移植到二十只Rag<sup>+/+</sup> 小鼠中,导致到两周后在十只随机选择的接受者 中循环小鼠CD19<sup>+</sup>和B220<sup>+</sup>成淋巴细胞的出现,所述接受者是用对照mAb 治疗,并到3.5周死亡。相比之下,在肿瘤移植之后,用抗CD19抗体治疗十只小鼠(第1和7天),直到7周在全部十个接受者中阻止了循环肿瘤细胞的出现。在取血期间一只抗CD19抗体治疗的小鼠死亡了,但是其 没有显示出循环肿瘤细胞。因此,抗CD19抗体治疗可能提供了一种用于 治疗患者B细胞系统恶性肿瘤的有效疗法,尤其是那些不表达CD20或在 低水平上表达CD20的肿瘤的患者。

[0603] 此处所述的特异的实施方案不限制本发明的范围。当然,通过以上 描述和附图,

除所描述的之外的本发明的不同改变将对本领域技术人员 显而易见。这样的改变落入附加权利要求的范围之内。

[0604] 此处引用各种出版物,其所公开的内容以其全文并入此处作为参 考。

[0605] 此处所述的特异的实施方案不限制本发明的范围。当然,通过以上 描述和附图,除所描述的之外的本发明的不同改变将对本领域技术人员 显而易见。这样的改变落入附加权利要求的范围之内。

[0606] 此处引用各种出版物,其所公开的内容以其全文并入此处作为参 考。

国际申请号: PCT/US04105674

微生物	
关于英文说明书第 29 页, 第 28 行所指微生物的可选择表格 <sup>1</sup>	
A. 保藏物标识 <sup>2</sup>	
更多的保藏物见附加页 <sup>3</sup>	
保藏机构名称	
美国典型培养物保藏中心 (ATCC)	
保藏机构地址 <sup>4</sup>	
10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 US	
保藏日期 <sup>5</sup> 2005 年 2 月 11 日 保藏号 <sup>6</sup> PTA-6580	
B. 附加说明 <sup>7</sup> (如果不适用则留置空白)。在单独的附加页续有该信息	
[0607]	
C. 所作本说明用于的指定国 <sup>8</sup> (如果本说明不是用于所有的指定国)	
D. 说明的单独事项 <sup>9</sup> (如果不适用则留置空白)	
如下所列的说明随后递交到国际局 <sup>8</sup> (指定说明的一般性质, 例如: “保藏登记号”)	
E. <input type="checkbox"/> 当国际申请递交时, 随国际申请收到本表格 (由接收机关核对)	
(审定的官员) Jsetta Stata	
<input type="checkbox"/> 由国际局收到 (来自申请) 的日期 <sup>10</sup>	
是	
(审定的官员)	

来自 PCT/RO/134 (1981 年 1 月)

国际申请号: PCT/ /

表格 PCT/RO/134 (续)

美国典型培养物保藏中心 (ATCC)

[0608] 10801 University Blvd.  
Manassas, VA 20110-2209  
US

保藏号

PTA-6581

保藏日期

2005 年 2 月 11 日

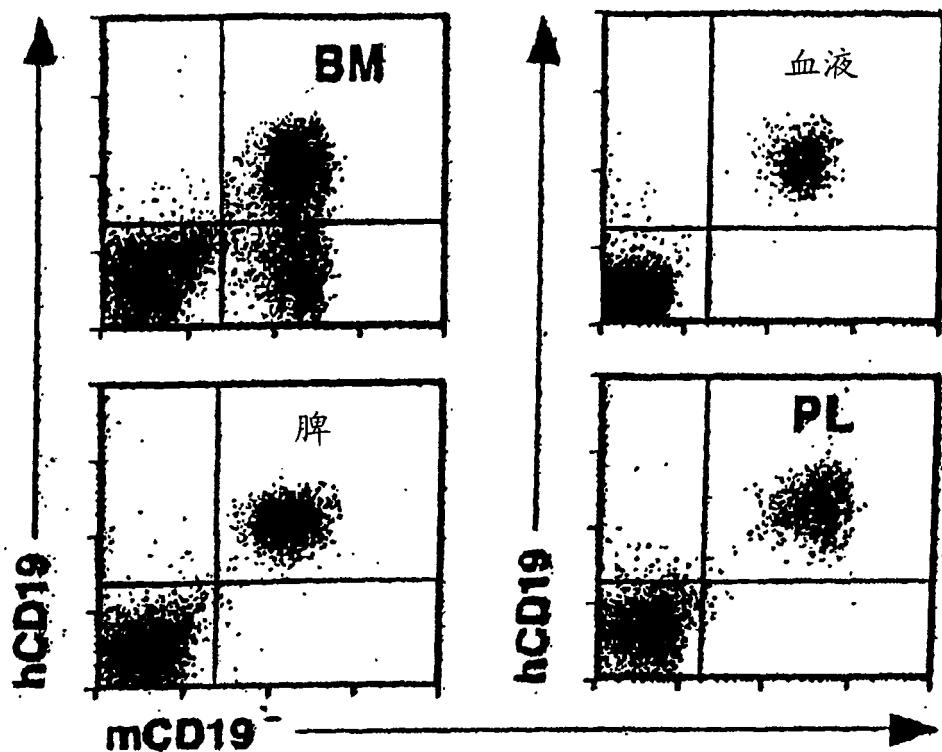


图 1A

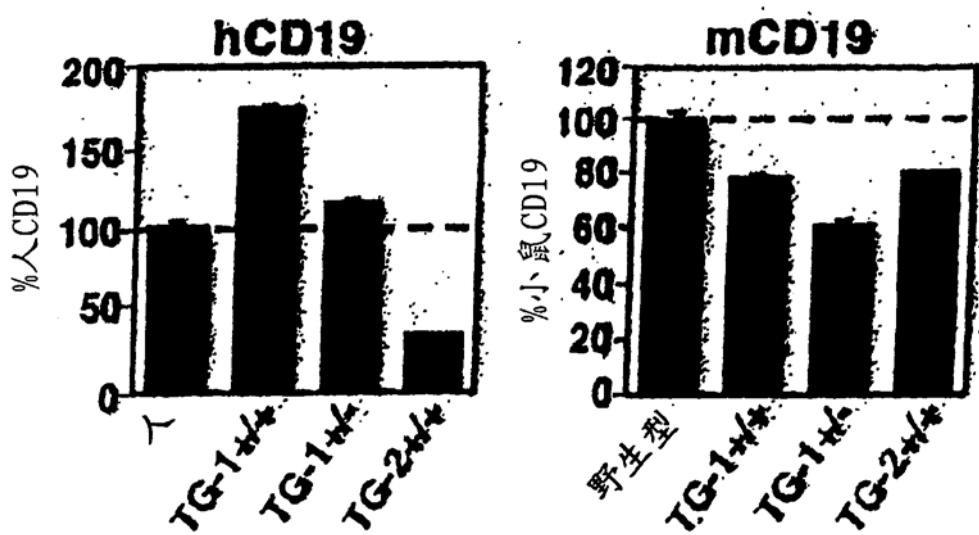


图 1B

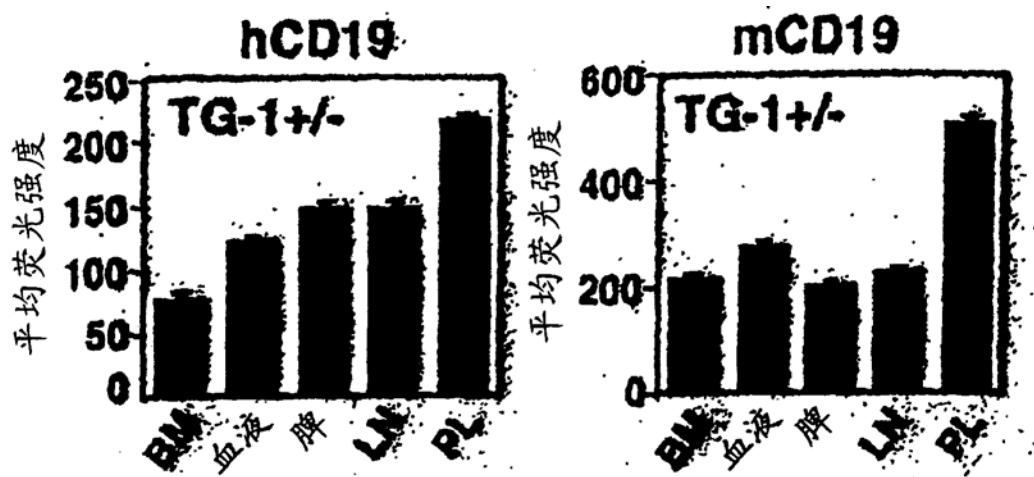


图 1C

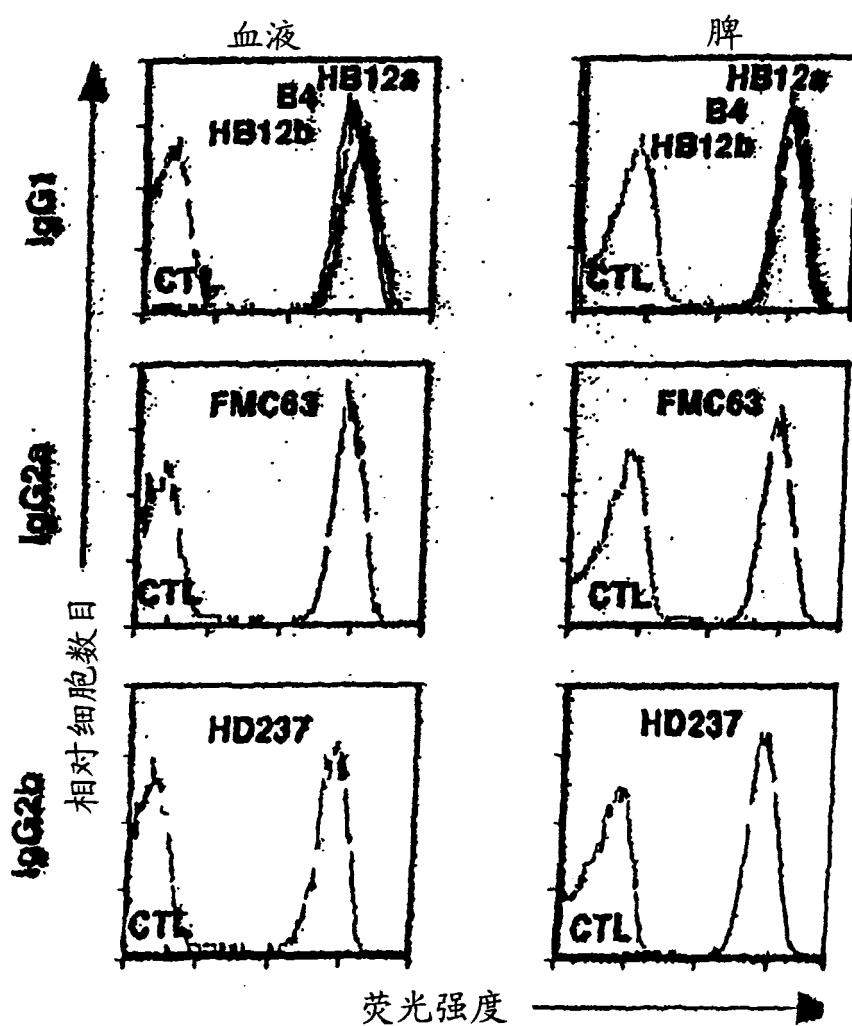


图 1D

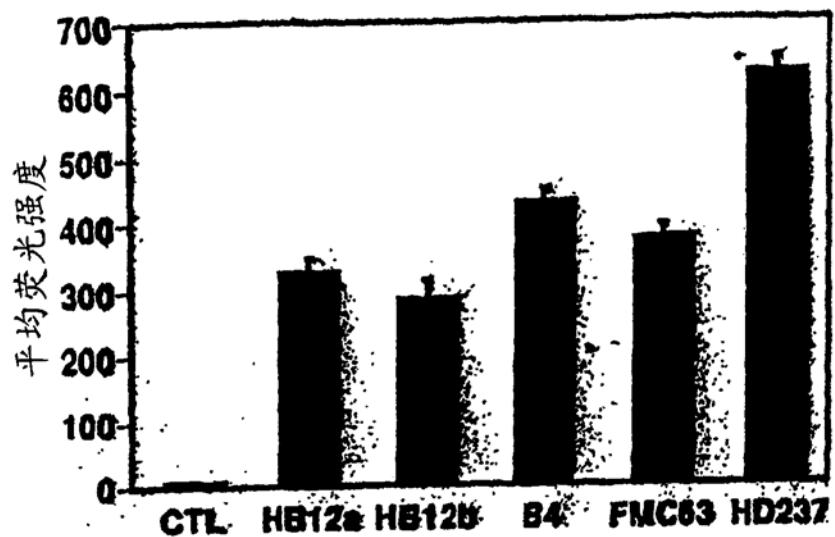


图 1E

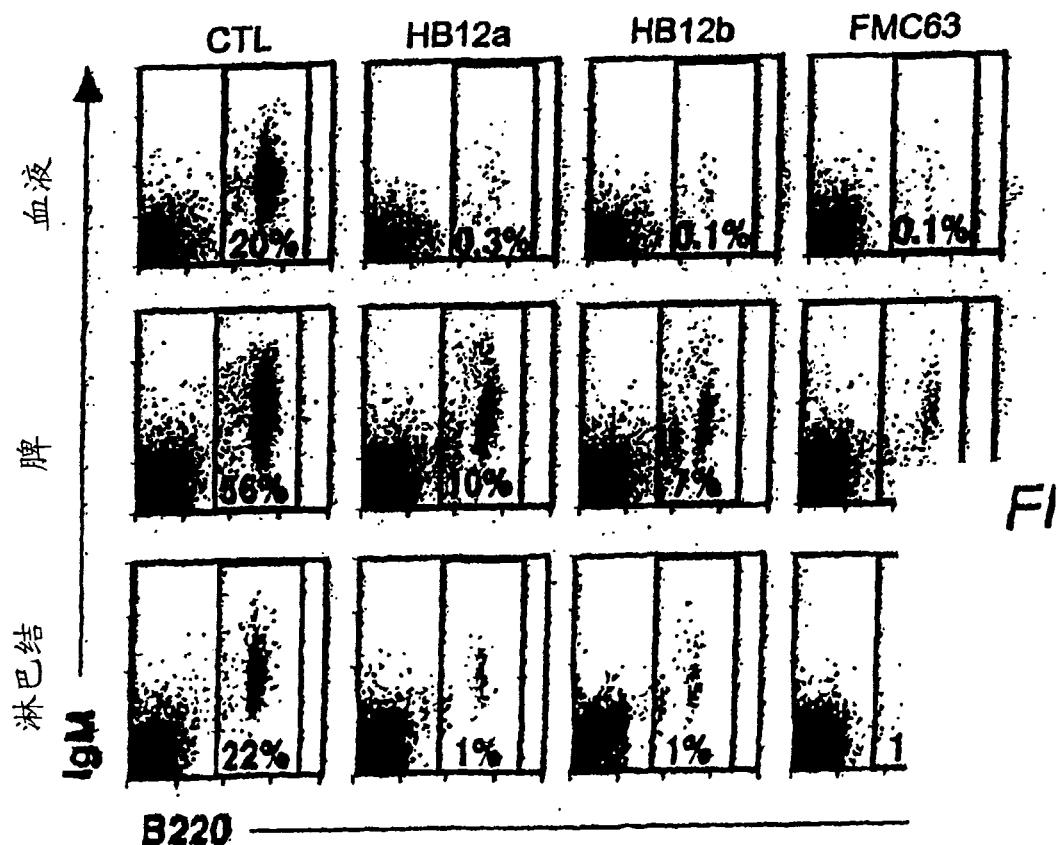


图 2A

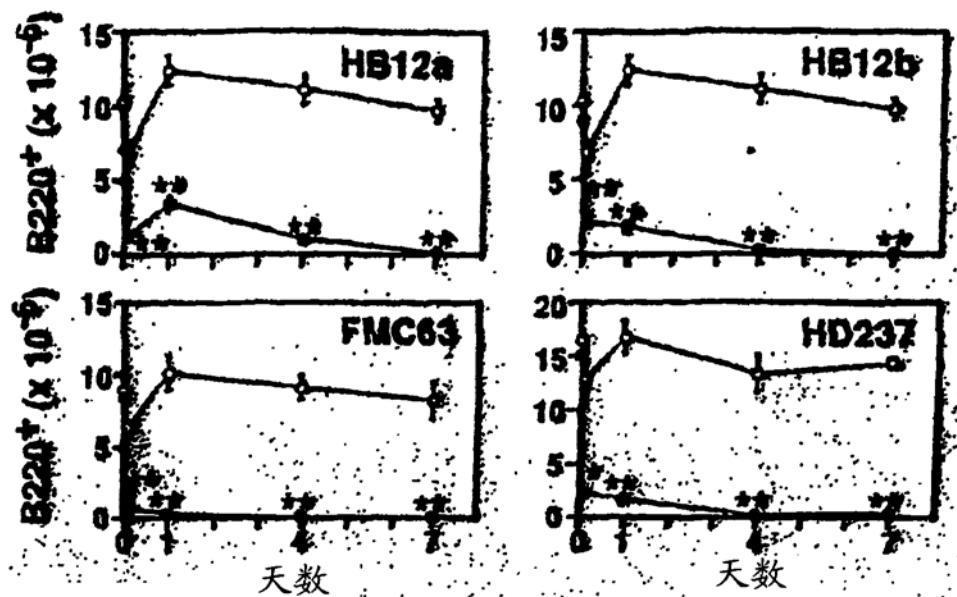


图 2B

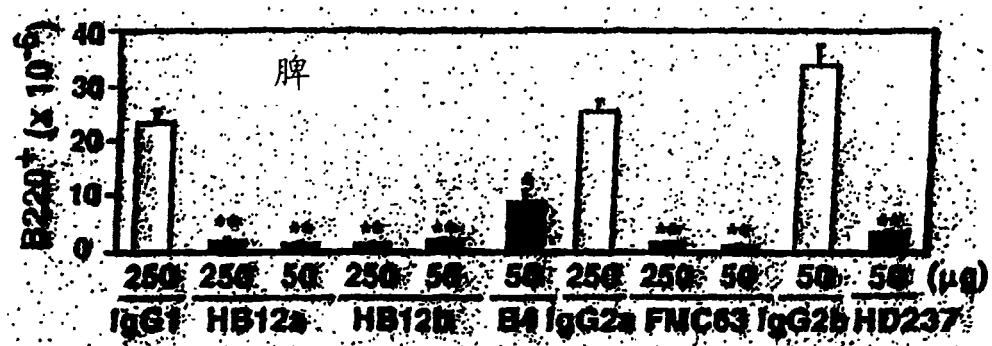


图 2C

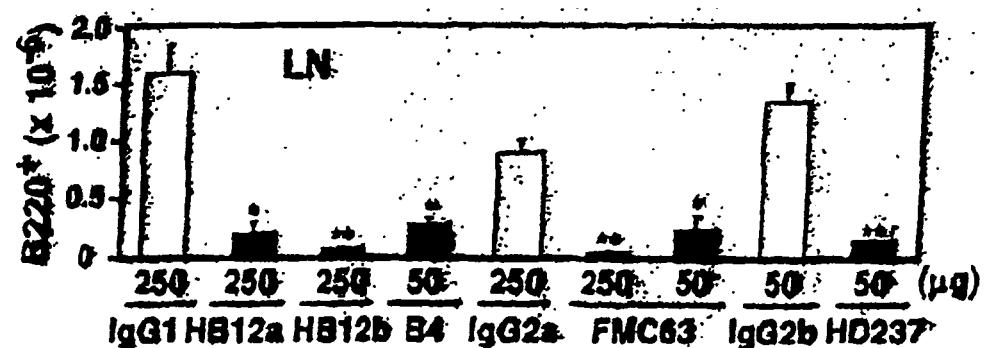


图 2D

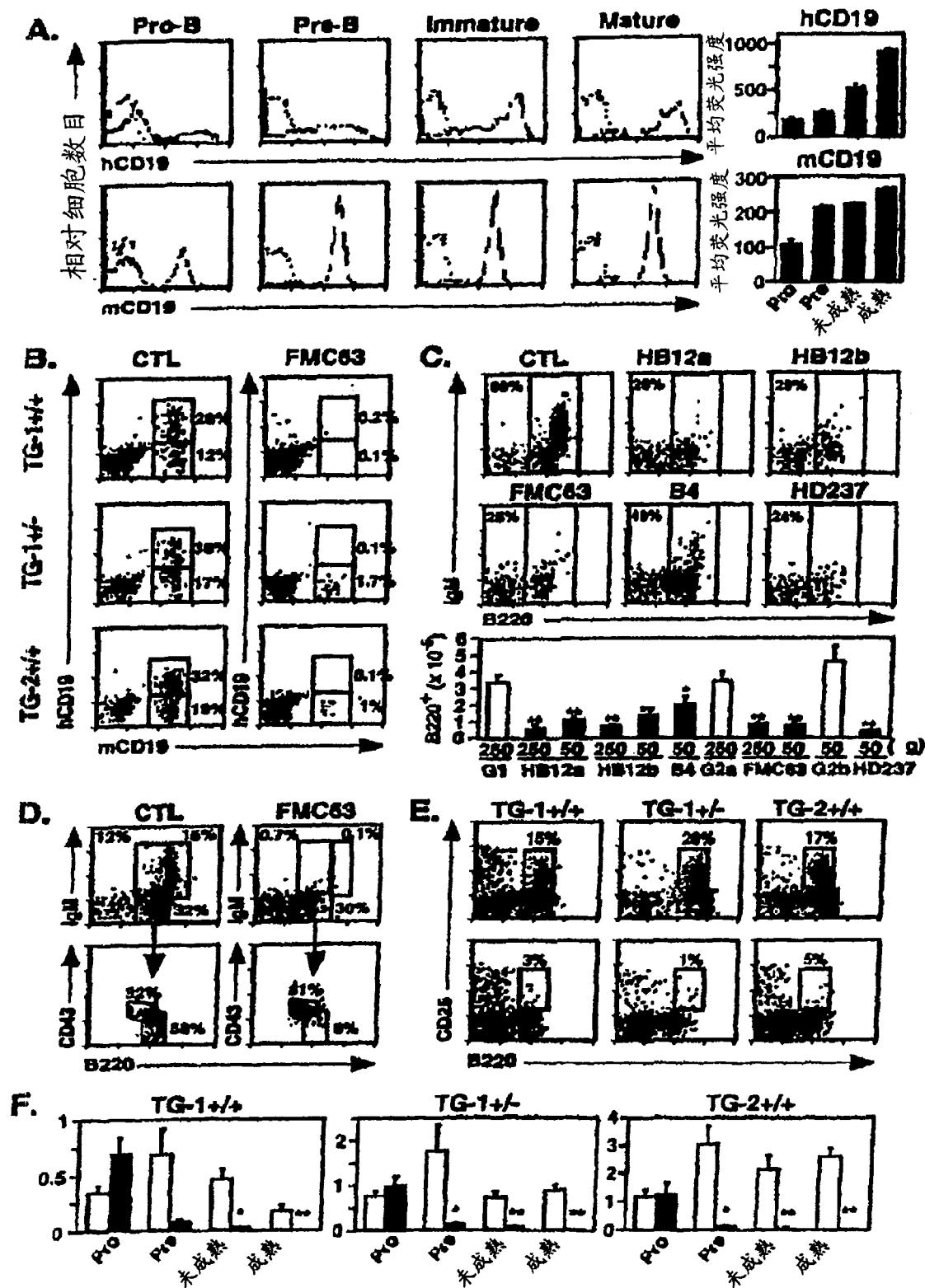


图 3

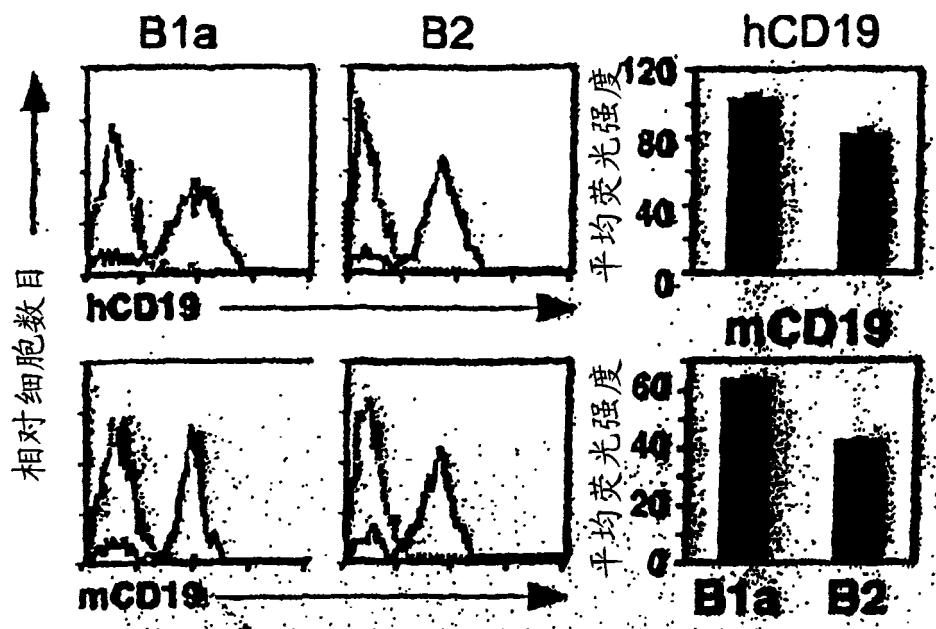


图 4A

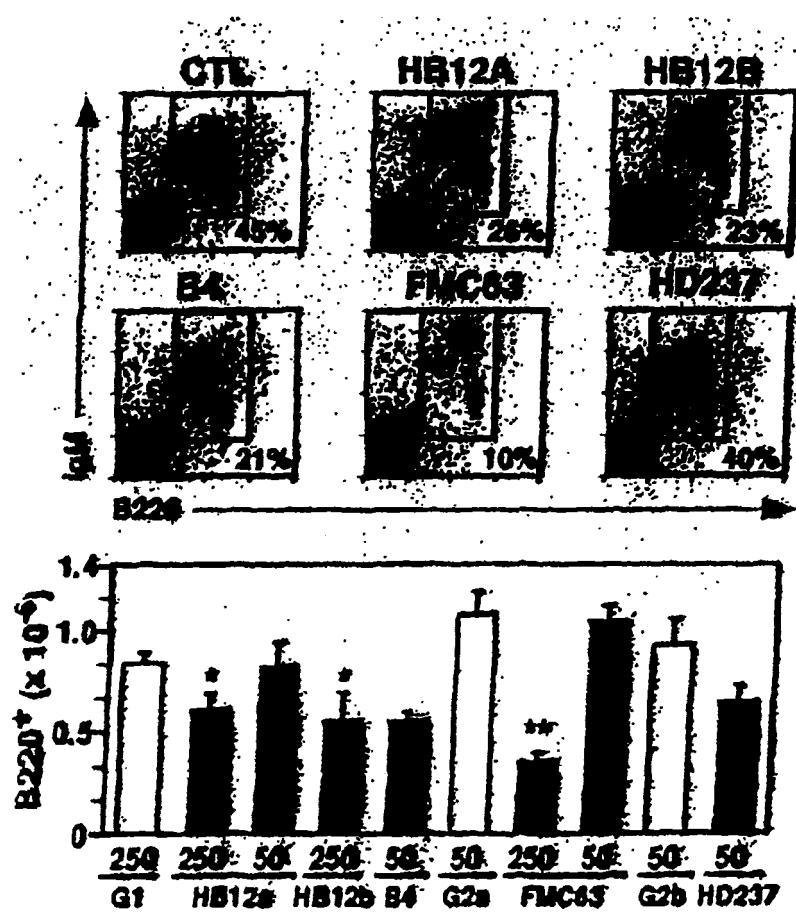


图 4B

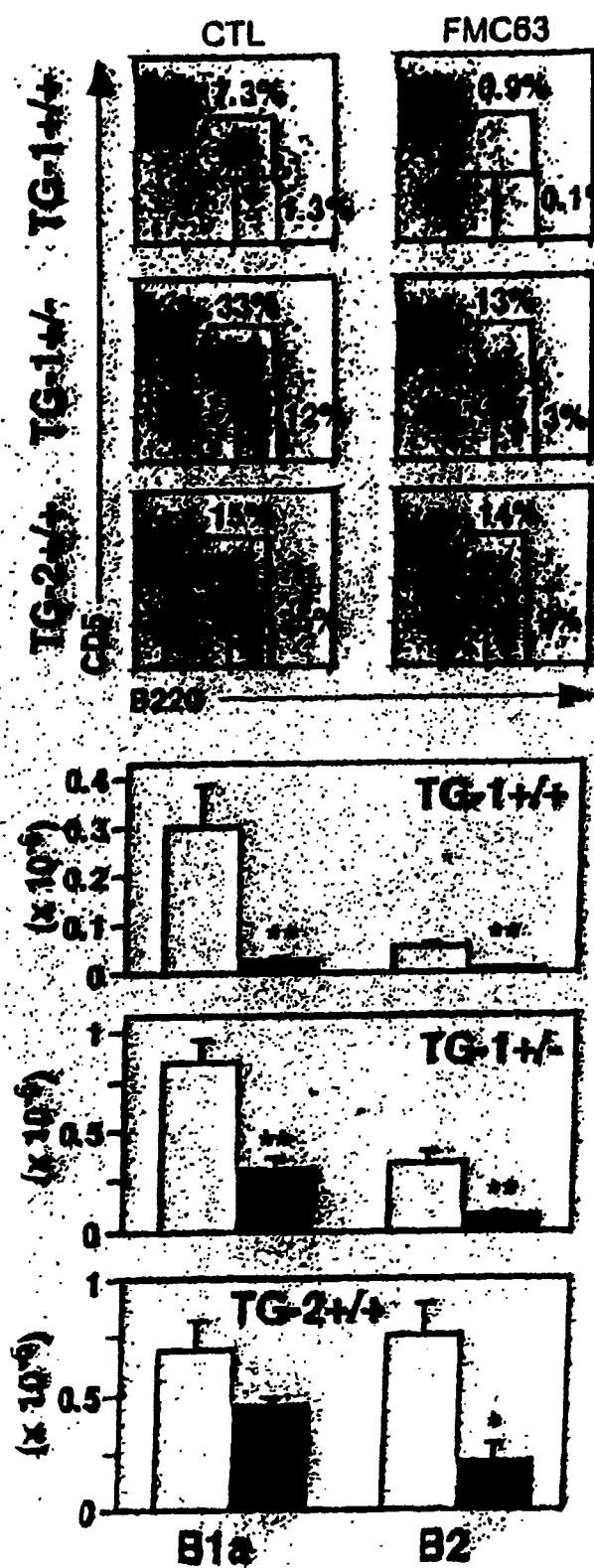


图 4C

HB12a HC

图 5A

HB12b HC

1	10	18	
E F B V Q L Q E S G P	E L V K P G A S V	GAA TTC GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG	60
K I S C K A S G Y A P	S S S W M N W V I	AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TCT TGG ATG AAC TGG GTG ATA	120
21	30	38	
Q R P G Q G L S W I G R I Y P G D G D T	CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CGG ATT TAT CCT GGA GAT GGA GAT ACT	180	
41	50	58	
N Y N G K F K G K A T L T A D K S S S T	AAC TAC ATT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGT ACA	240	
61	70	78	
A V M Q L S S L T S V D S A V Y P C A R	GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA	300	
81	90	98	
S G F I T T V L   D F D Y W G H G T T L T	TCA GGA TTT ATT ACT AGC GTT TTA G AC TTT GAC TAC TGG GGC CAC GGC ACC ACT CTC ACA	360	
101	110	118	
V S S	GTC TCC TCA G	370	

图 5B

## HE12a LC

CATGGACTGAAGGAGTAGAAANCTGATCACTCTCCPATGTTTATTTCTCRAAATG 56  
 H S P A Q P L F L L V L W I Q E T N G  
 ATG AGT CCT GCC CGG TTC CTG TTT CTG TTA GTG CTC TGG ATT CAG GAA ACC AAC AAC GGT 113  
 1 D V G M T Q T P L T L S V T I G Q P A S  
 GAT GTF CGG ATG ACC CGG ACT CCA CTC ACT TTG TCG GTC ACC ATT GGA CAA CCA GGC TCF 173  
 21 F S C K S S Q S L L V S N G X T Y L N W  
 TTC TCT TCG AAG TCA AGT CGG ACG CTC TTA TAT AGT ATT GGA AAA ACC TAT TTG AAT TGG 233  
 41 L L Q R P G Q S P K R L I H L V S X L D  
 TTA TTA CGG AGG CCA GGC CGG TCT CCA AAG CGC CTC ATC CAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC 293  
 61 S G V P D R F T G S G S G T D Y T L X I  
 TCT CGA GTC CCT GAC ACG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGA ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC 353  
 81 G R V E A E D L G V Y Y C V Q G T H P P  
 GGC AGA GTG GAG CCT GAG GAT TTG GGA GTF TAT TAC TGC GTG CAA GGT ACA CAT TTT CCG 413  
 101 Y T F G G G T K L E I X | R A D A A P T V  
 TA C ACG TTC CGA CGG CGG ACC AAA CTC GAA ATA AAA C|GG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA 473 120  
 121 S I P P P S S  
 TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT 494 127

图 6A

HE12b LC

CATGGACTGAAAGGAGTAGAAAAGCATTCCTCTCCAGTTCTCAGAG 47

101      K    K    D    T    L    L    W    V    L    L    W    V    P    G    S    T    G  
ATG GAG AAA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTC CTG CTT CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACA GGT 107

10      D    I    V    L    T    Q    S    P    T    S    L    A    V    S    L    G    Q    R    A    T  
GAC ATT GTG CTG ACG CAG TCT CCA ACC TCT TGG GCT GTG TCT CTA CGG CAG AGG GCC ACC 167

21      I    S    C    R    A    S    S    V    D    T    P    G    I    S    P    H    N    N    W    Y  
ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT GTP GAT ACT TTT GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC 227

41      Q    Q    K    P    G    Q    P    P    X    L    L    I    H    A    A    S    N    Q    G    S  
CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC CAT GCT GCA TCC ATT CAA GGA TCC 287

61      G    V    P    A    R    F    S    G    S    G    S    G    T    D    P    S    L    N    I    H  
GGG GTC CCT GCC AGG TTT AGT GGT AGT GGG TCT GGG AGC GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT 347

81      P    N    E    D    D    S    A    H    Y    F    C    Q    Q    S    K    E    V    P    P  
CCT ATG GAG GAG GAT GAT AGT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG GAG GTT CCA TT C 407

101      T    P    G    S    G    T    K    L    E    I    K    R    A    D    A    A    P    T    V    G  
ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GAA TCG 467

121      I    P    P    P    S    S  
ATC TTC CTC CCA TTC AGT 485

图 6B

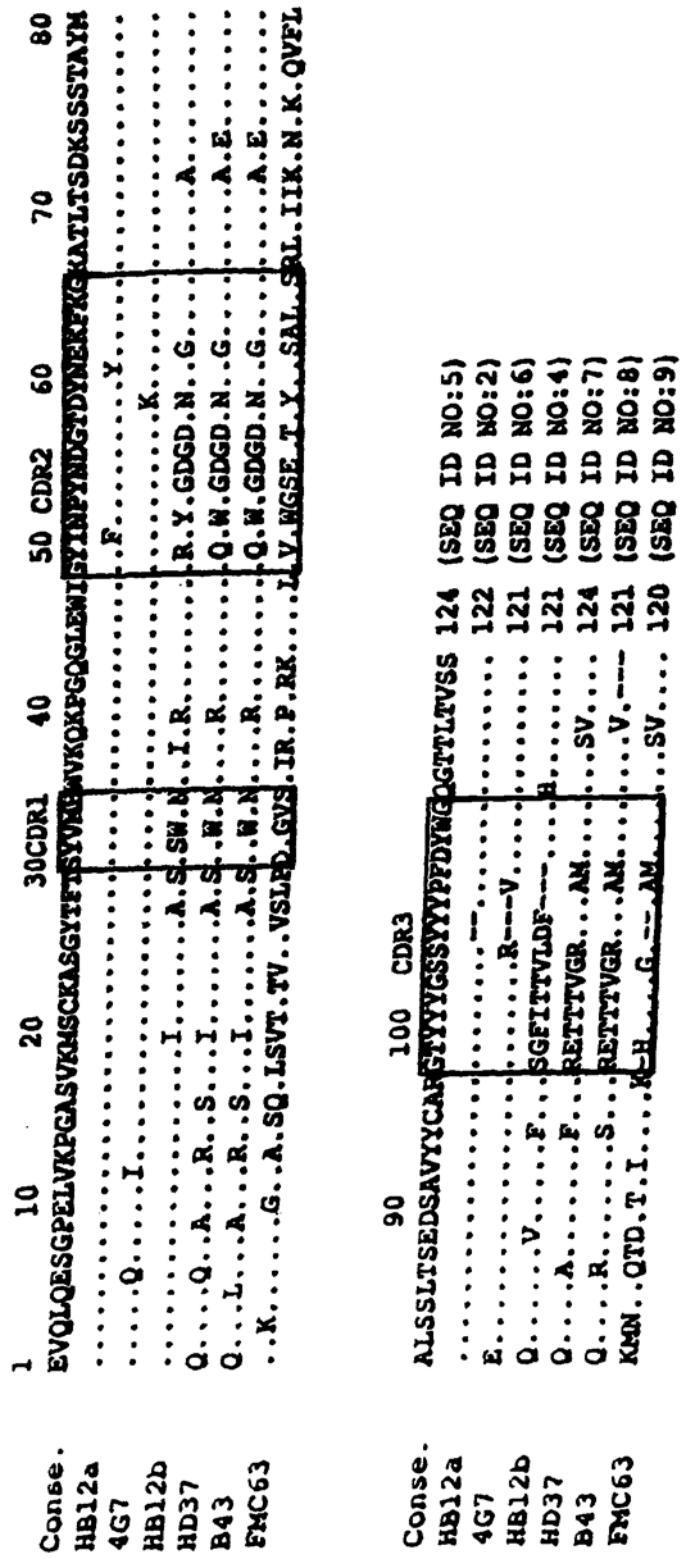


图 7A

## 轻链序列

	1	10	20	CDR1	30	40	50	CDR2	60
Conse.	DIVMTQTPASLAVSLG	ORATISCKASQ	SQV	VDY-NGD	SYLNWYQQ	RPGQPP	KLLIYD	ASMLVSG	
HB12a	.VG.....LT.	S.TI..P.SF...	S..LL,SR.	KYD..LL.....S..R..	HLV..R..D..				
4G7	.....AAP.IP.TP.	ESVS...RS.E..LLNS.	NF..Y.FL.....S.Q..	...RM..A..					
B43	EL.L..S.....	.....D..I..	.....I.....	.....					
HD37	..LL.....	.....D..I..	.....I.....	.....					
HB12b	...L..S.T.....	R..B..T..P..I..F..E..F..K..	.....H..Q..						
FMC63	..Q...TS..SA..D.V..R..DI..	...SK,..K.DGTV..	.....HT..R..H..						
	70	80	90	CDR3	100	110			
Conse.	VPDRFSGSGSGTDF	TLNIHPVEK	DAATYYCQQ	STEDPYTFGGG	TKLEIKRAD	(SEQ ID NO:10)			
HB12a	.....T.....	K.GR..A..LGV..V.G.HP..	.....	.....	.....	(SEQ ID NO:16)			
4G7	.....A..R.SR..A..VGV..M.HG..Y.FI..A..L..	.....	.....	.....	.....	(SEQ ID NO:14)			
B43	I.P.....	V.....H.....WJ.....	.....	.....	.....	RS (SEQ ID NO:12)			
HD37	I.P.....	V.....H.....WJ.....	.....	.....	.....	-- (SEQ ID NO:11)			
HB12b	..A.....S.....M.ED..S.M.F..K.V.FY..S..	.....	.....	.....	.....	(SEQ ID NO:18)			
FMC63	..S.....YS.T.SNL.Q..I..F..GNTL..	.....T---	.....	.....	.....	(SEQ ID NO:13)			

图 7B

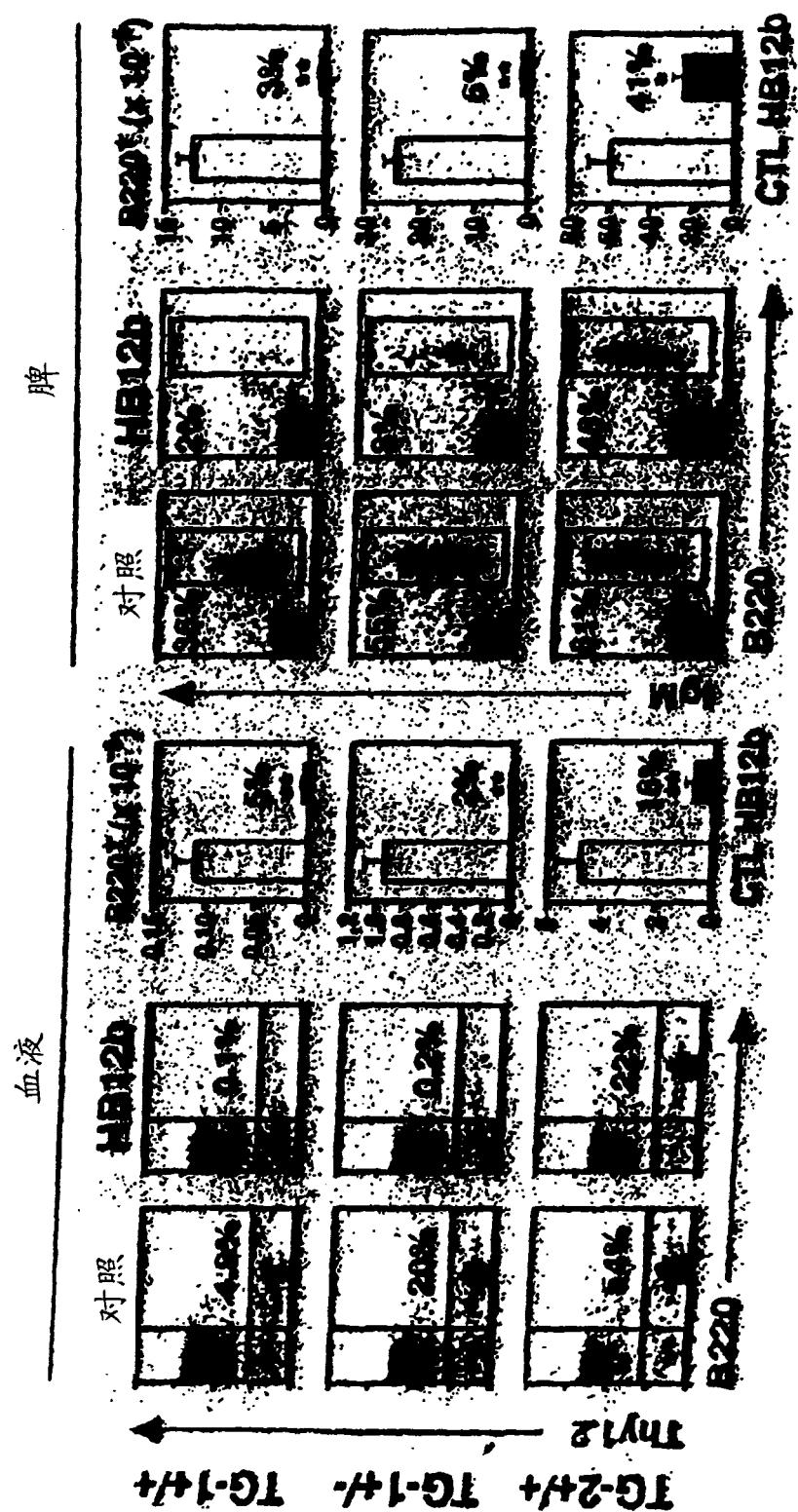


图 8A

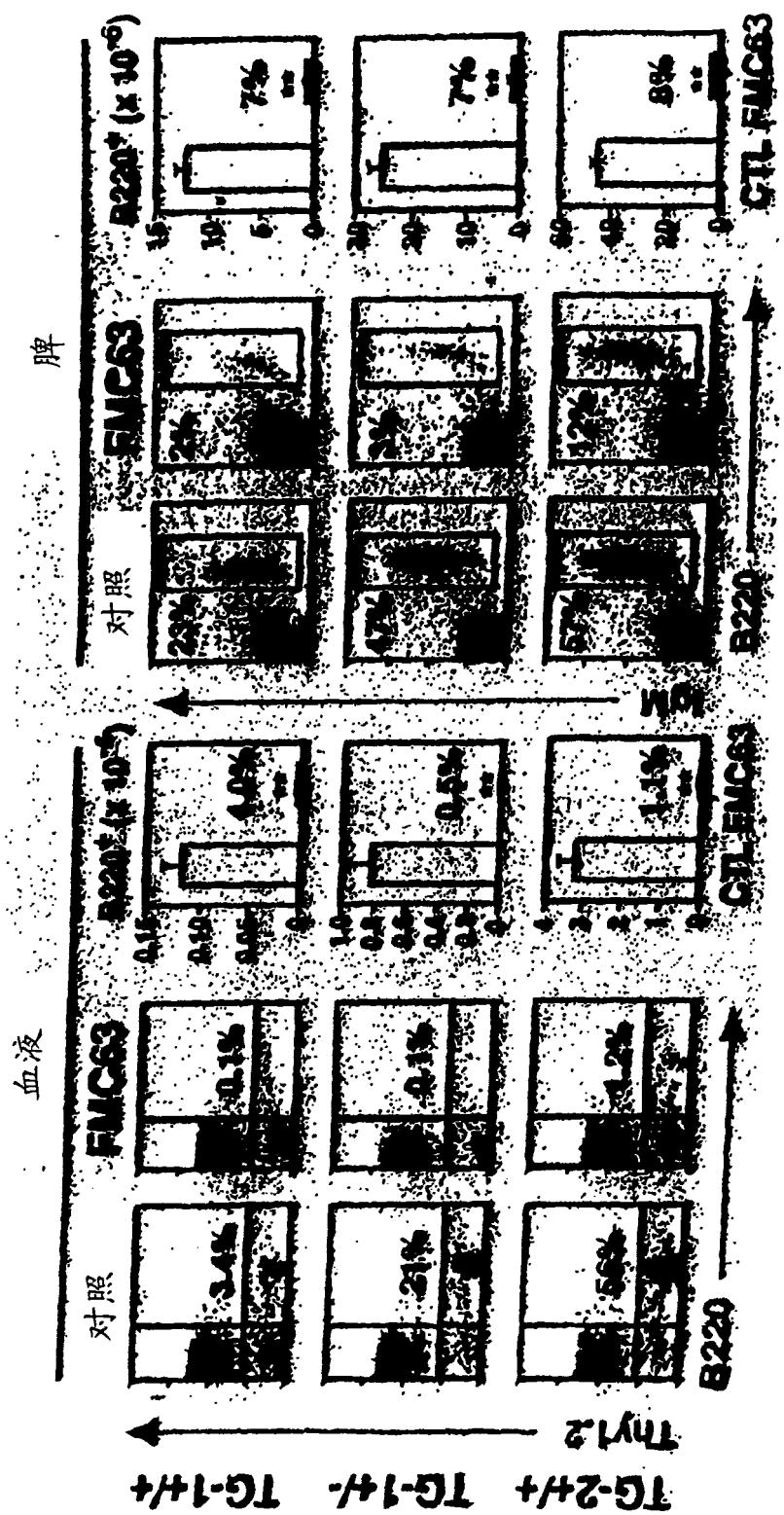


图 8B

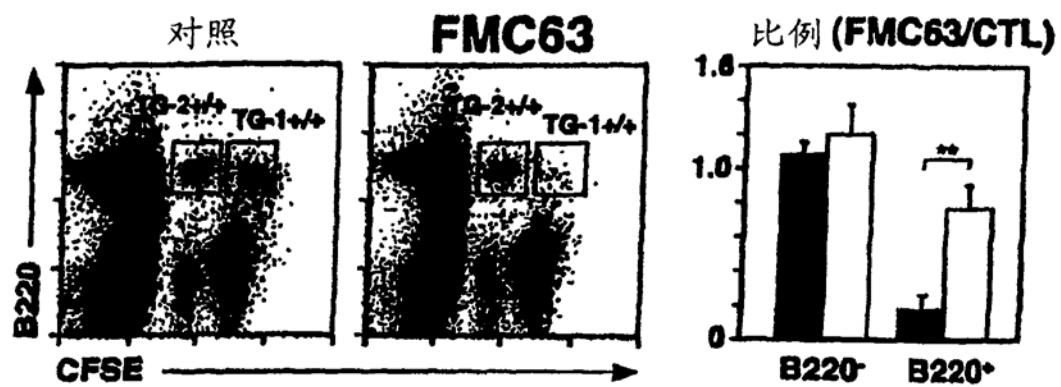


图 8C

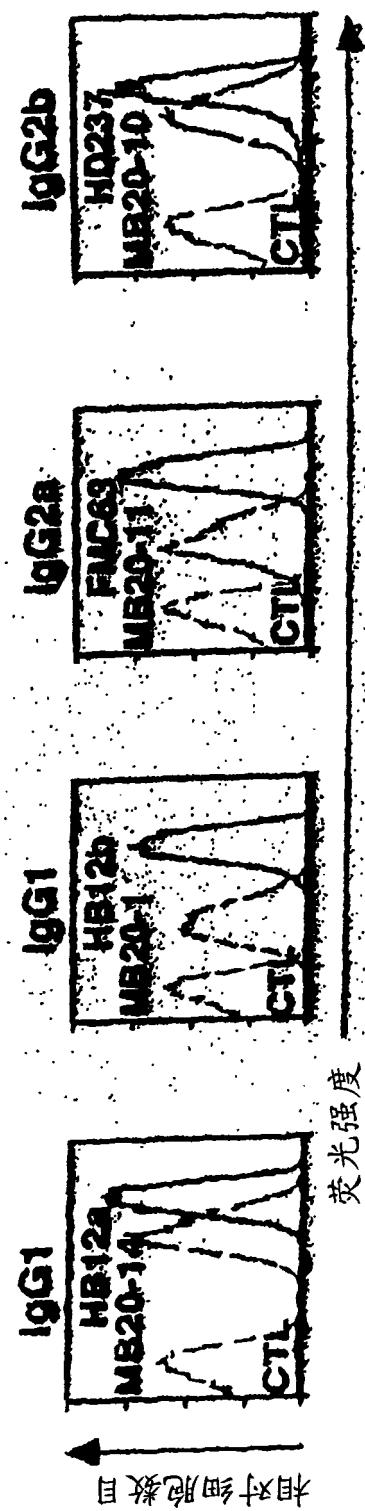


图 8D

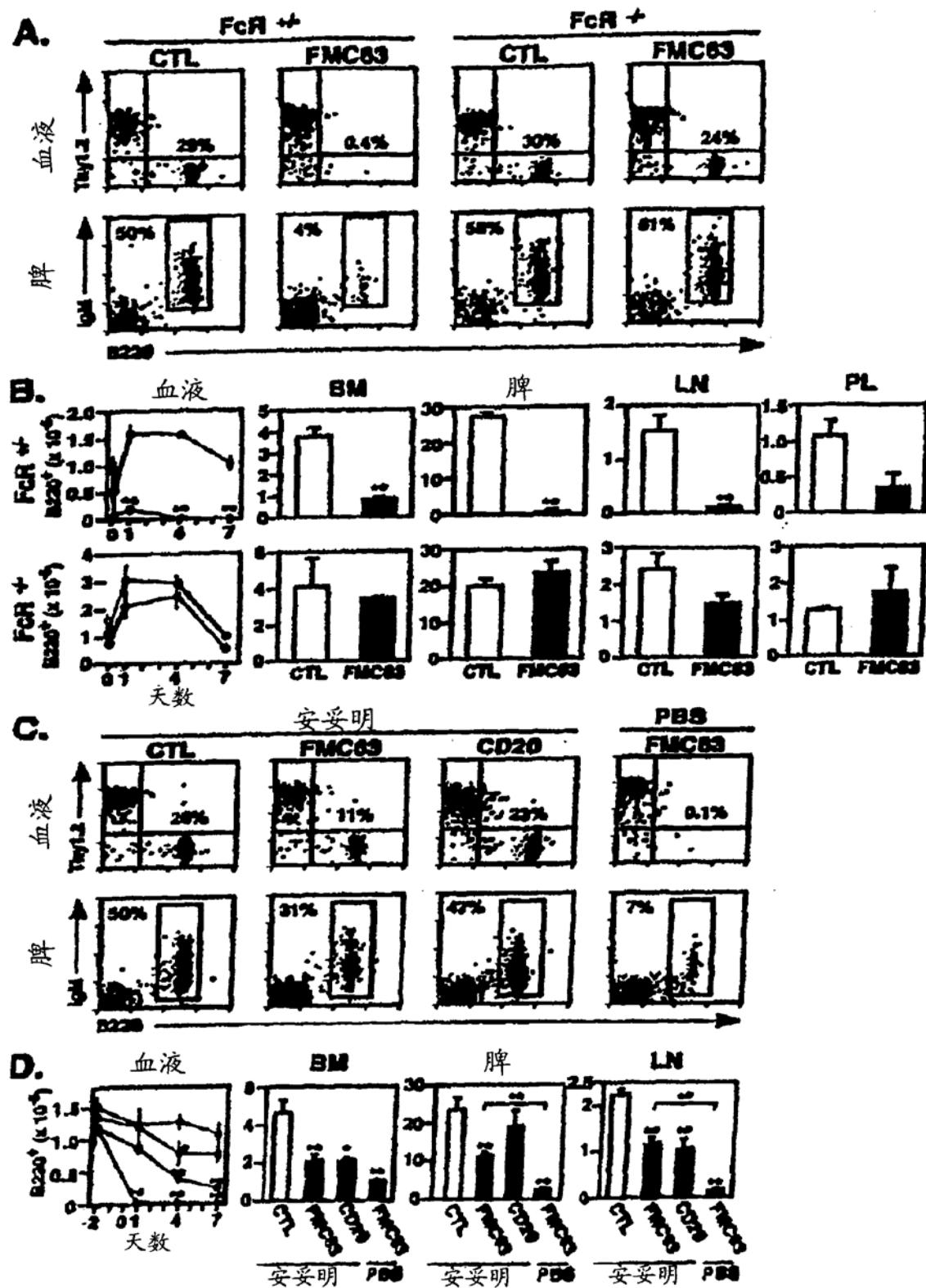


图 9

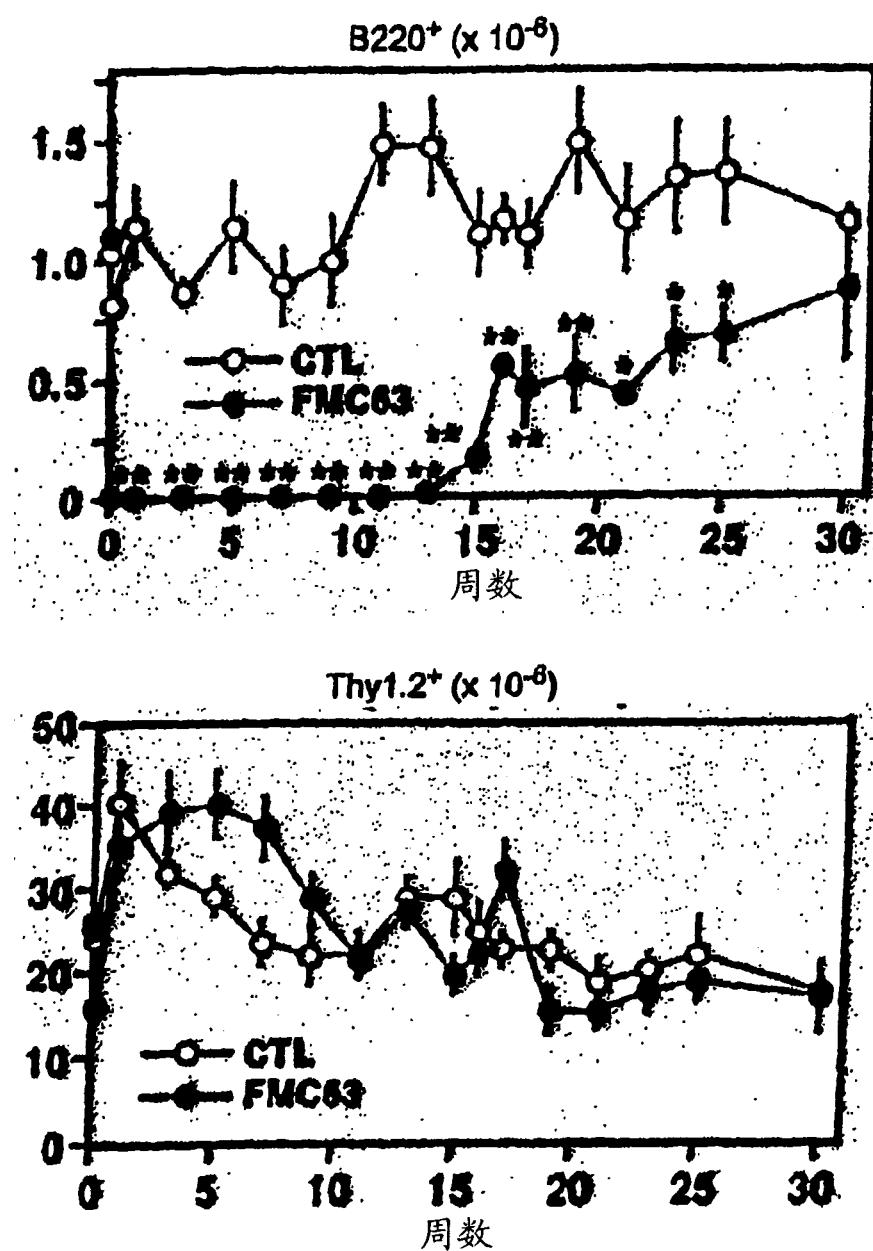


图 10A



图 10B

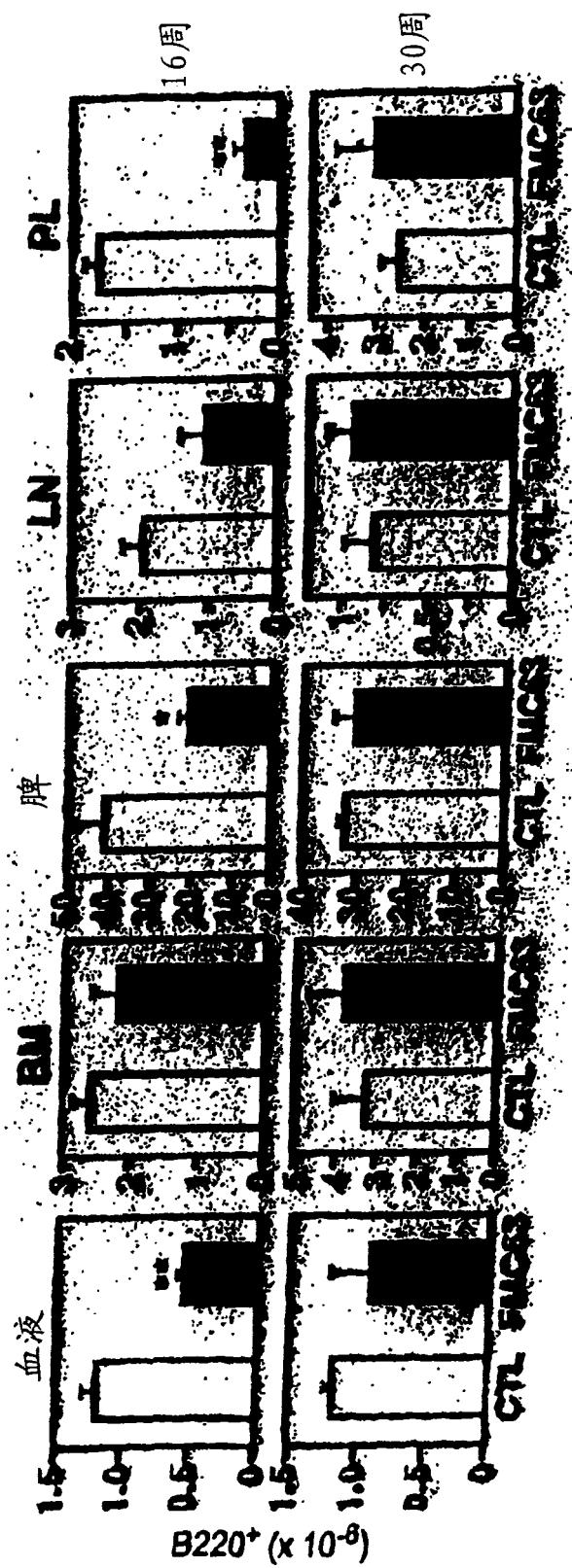


图 10C

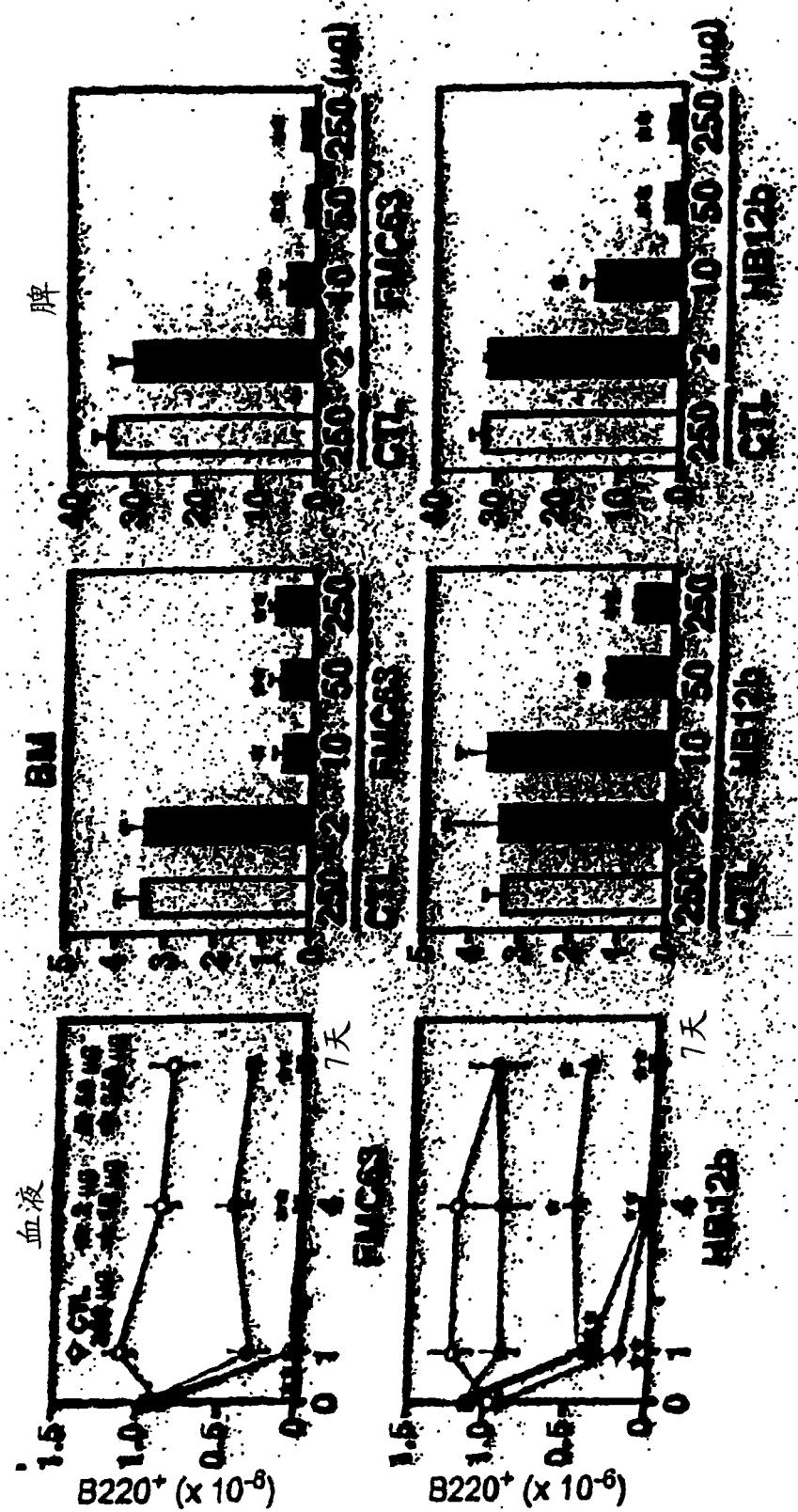


图 10D

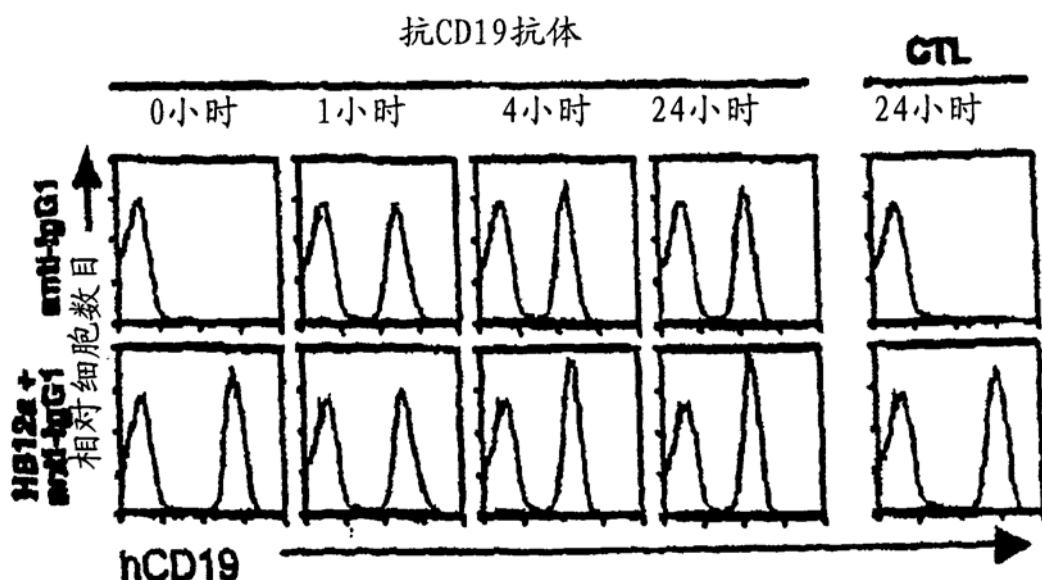


图 11A

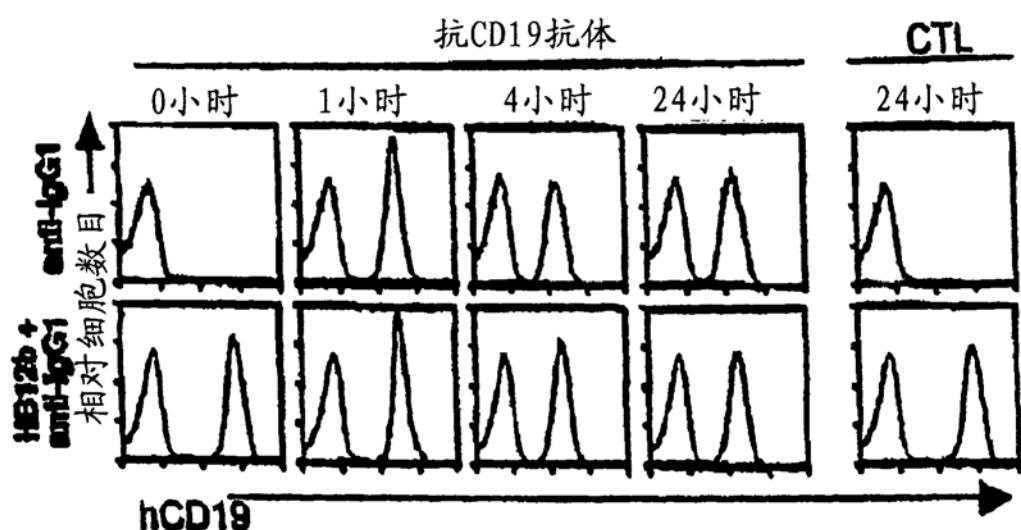


图 11B

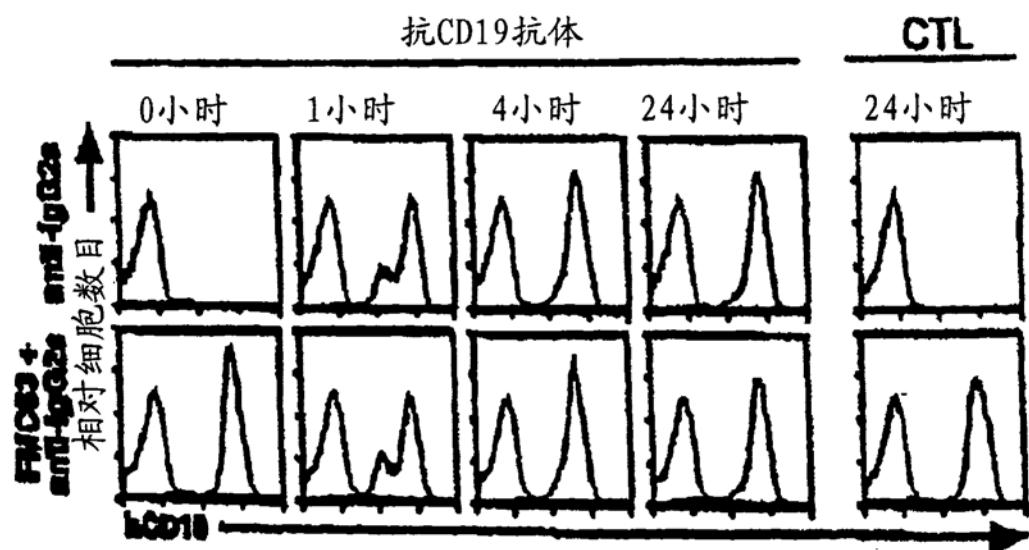


图 11C

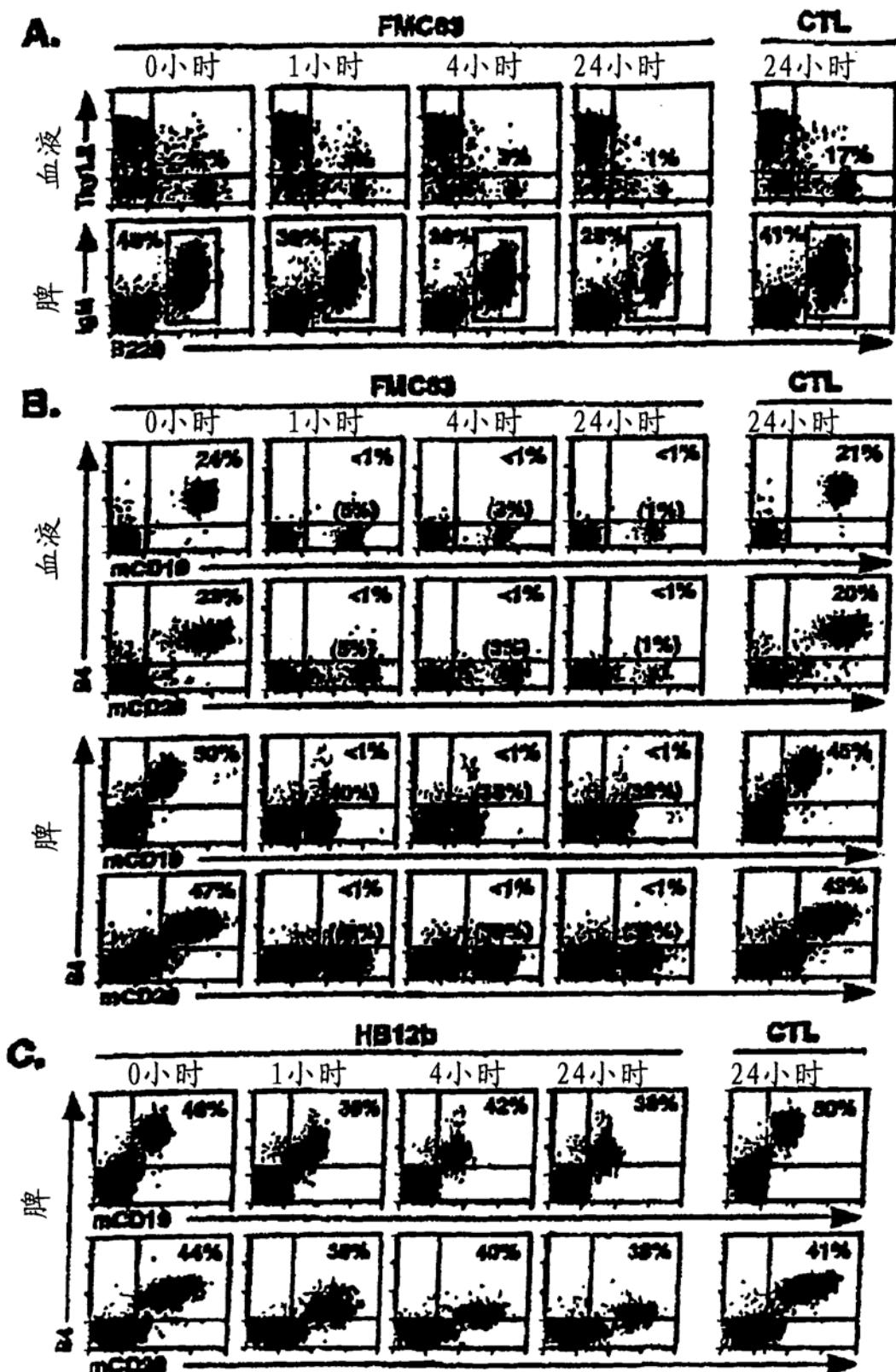


图 12

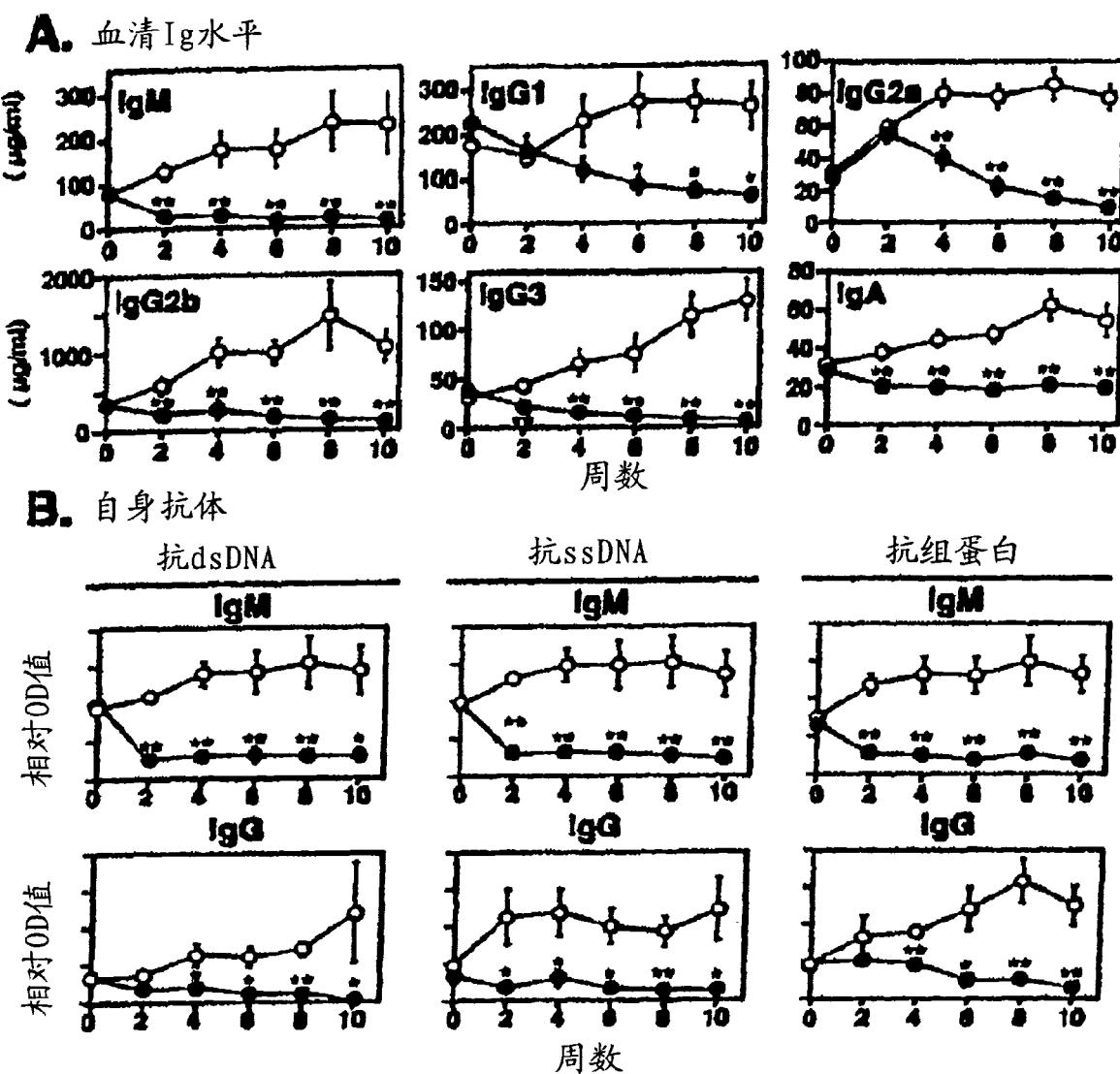


图 13

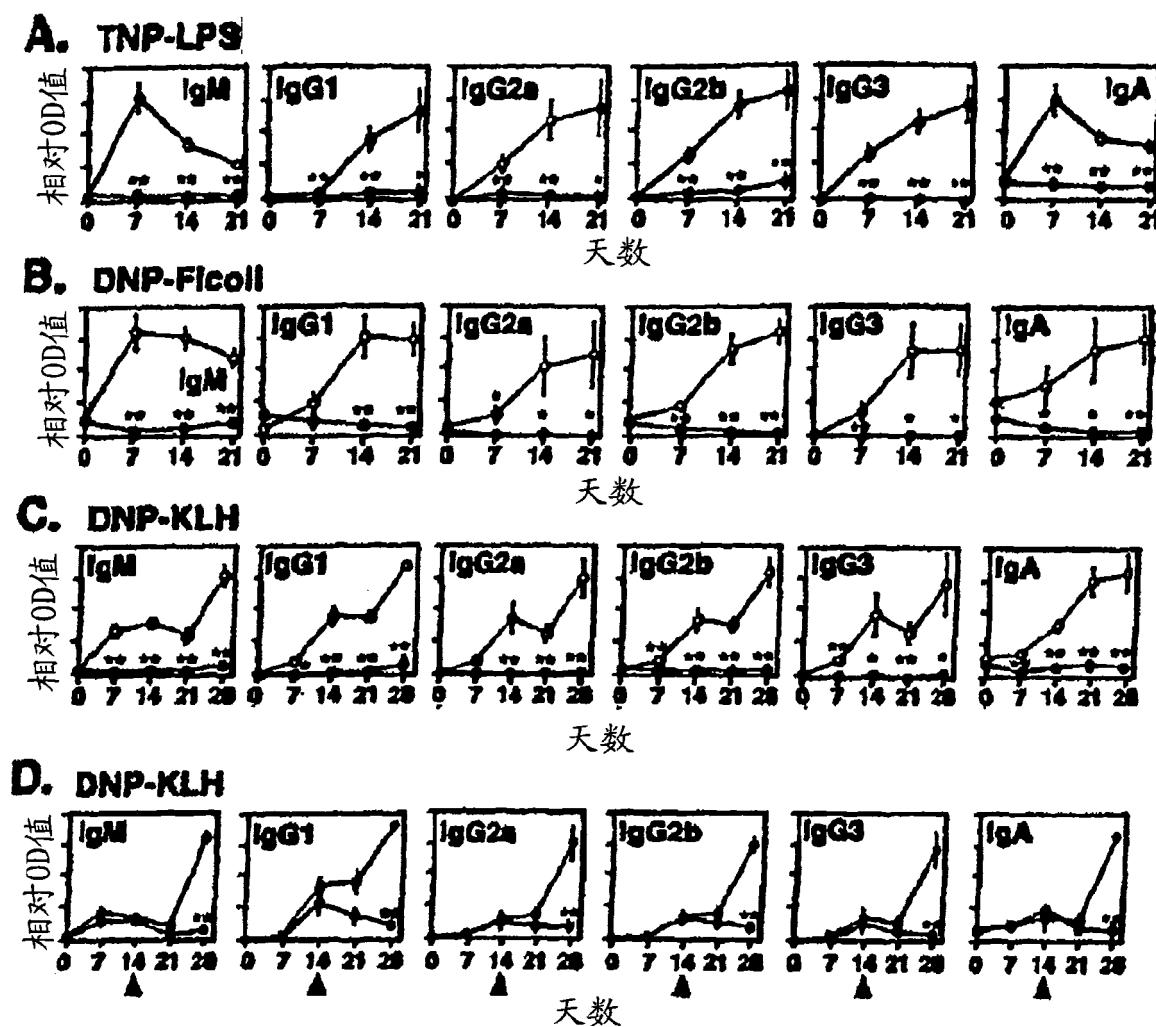


图 14

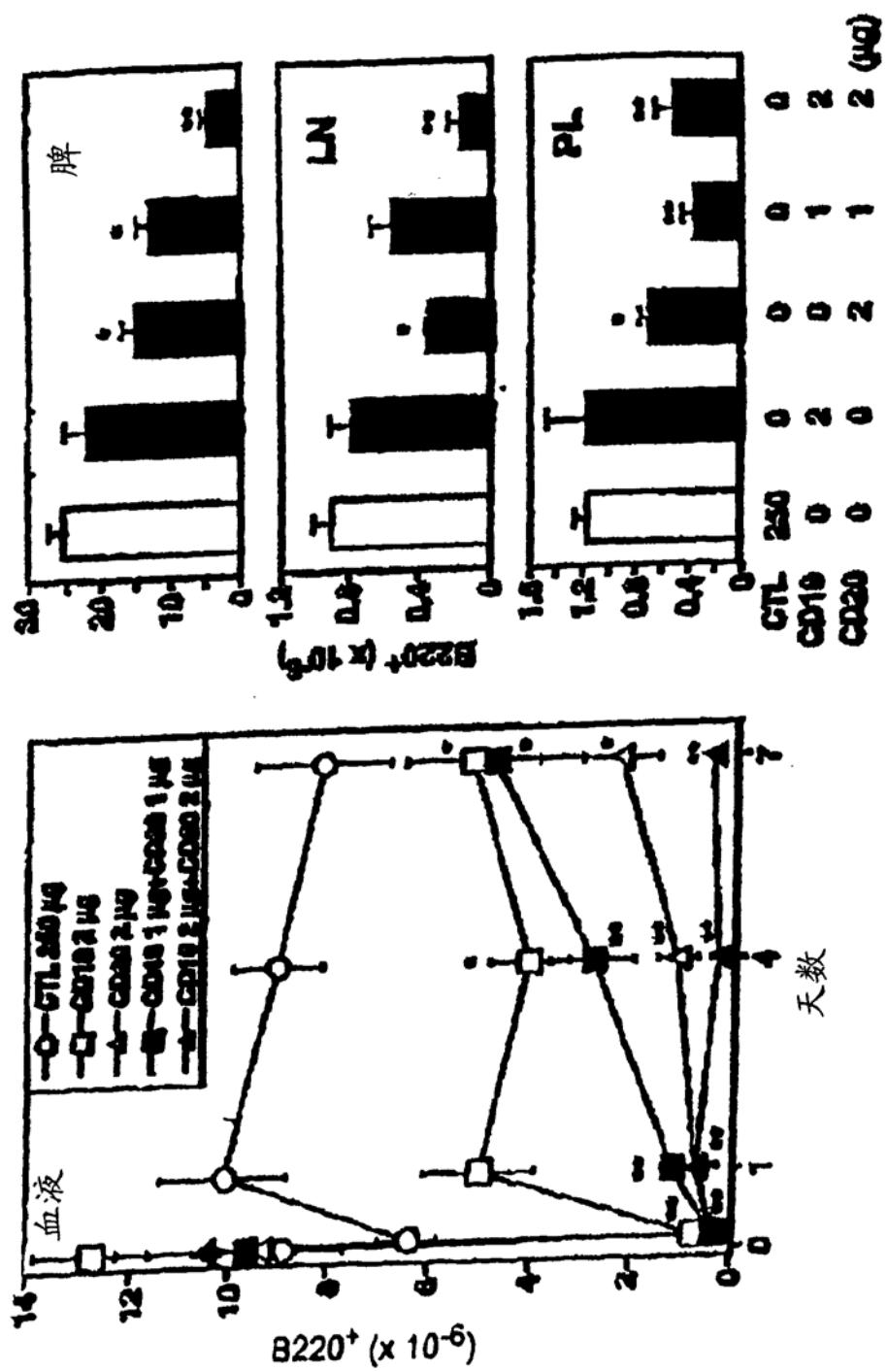


图 15

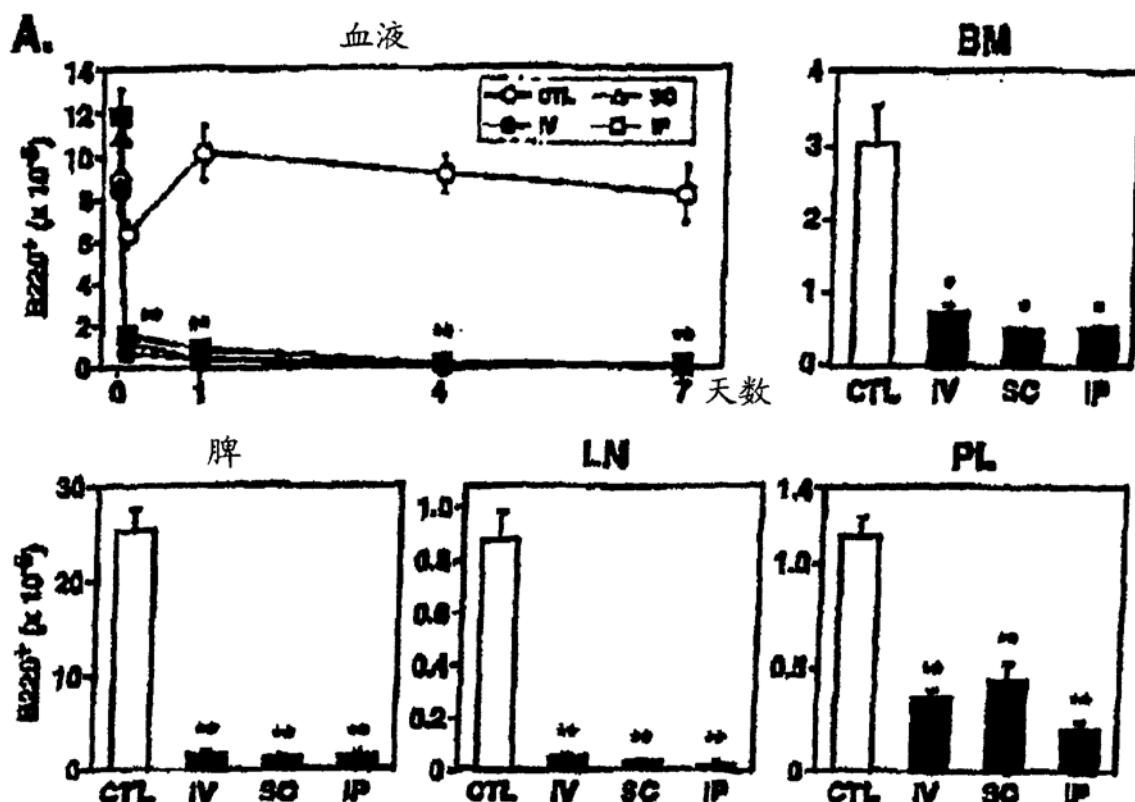


图 16

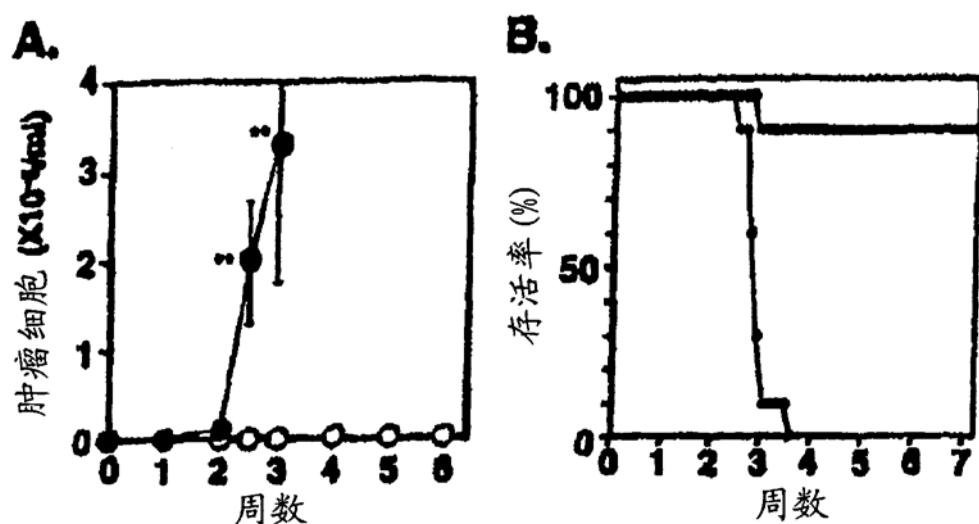


图 17