(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114099702 B
(45)授权公告日 2024.08.27

(21)申请号 202110959355.3
(22)申请日 2011.08.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114099702 A
(43)申请公布日 2022.03.01
(30)优先权数据
1013989.7 2010.08.20 GB
(62)分案原申请数据
201180040351.X 2011.08.19
(73)专利权人 南安普敦大学
地址 英国南安普敦
(72)发明人 马克·克拉格 M·格兰尼
阿里·鲁加尼安 斯蒂芬·贝尔斯
P·约翰逊 肖恩·林
比约恩·弗伦多斯
英格丽德·泰格
(74)专利代理机构 北京世宁律师事务所 11795
专利代理师 刘永全 李洁
(51)Int.Cl.
*A61K 47/68*(2017.01)
*A61K 39/395*(2006.01)
*A61P 35/00*(2006.01)
*A61P 35/02*(2006.01)
*C07K 16/28*(2006.01)
*G01N 33/68*(2006.01)
(56)对比文件
WO 2008002933 A2,2008.01.03
审查员 刘晓晨

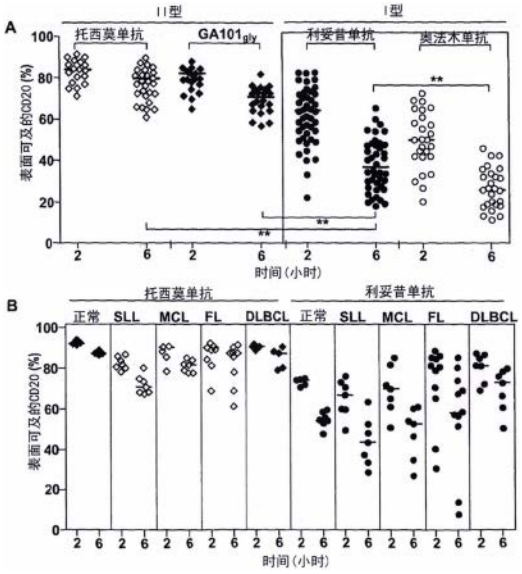
权利要求书2页 说明书44页
序列表36页 附图36页

(54)发明名称

Fc γ RIIB(CD32B)和CD20特异性抗体的组合应用

(57)摘要

本发明涉及Fc γ RIIb(CD32B)和CD20特异性抗体的组合应用,具体提供了一种治疗具有表达Fc γ RIIb的靶细胞的患者的方法,所述方法包括联合施用:(i)特异性结合所述靶细胞的表面抗原的抗体分子,所述抗体分子具有能够结合Fc γ RIIb的Fc结构域;和(ii)抑制或减少所述抗体分子的Fc结构域和Fc γ RIIb之间结合的试剂,其特征在于,所述患者是基于其靶细胞的Fc γ RIIb表达水平升高来选择的。




CN 114099702 B

1.一种结合人Fc γ RIIb的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:12中相同的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和

(b)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:25中相同的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

其中VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3根据Kabat编号系统或IMGT编号系统确定,其中所述抗体是人源化抗体或人抗体。

2.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区由如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。

3.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区由如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成。

4.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其进一步包含如SEQ ID NO:1所示的重链恒定区。

5.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其进一步包含如SEQ ID NO:2所示的轻链恒定区。

6.一种组合物,其包含:

(i)抗体分子,

(a)其包含能够结合Fc γ RIIb的Fc结构域,并且

(b)特异性结合靶细胞的细胞表面抗原;

(ii)试剂,

(a)其特异性结合Fc γ RIIb,并且

(b)阻止或减少所述抗体分子的Fc结构域与所述靶细胞上的Fc γ RIIb之间的结合,

其中所述试剂是抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区,其包含与SEQ ID NO:12中相同的VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3;和

(b)轻链可变区,其包含与SEQ ID NO:25中相同的VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;

其中VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3根据Kabat编号系统或IMGT编号系统确定。

7.如权利要求6所述的组合物,其中所述重链可变区由如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。

8.如权利要求6所述的组合物,其中所述轻链可变区由如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成。

9.如权利要求6所述的组合物,其进一步包含如SEQ ID NO:1所示的重链恒定区。

10.如权利要求6所述的组合物,其进一步包含如SEQ ID NO:2所示的轻链恒定区。

11.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述细胞表面抗原选自CD19、CD20或CD40。

12.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a)重链可变区,包括:

i.由如SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列组成的VH CDR1;

ii.由如SEQ ID NO:84所示的氨基酸序列组成的VH CDR2;和

iii.由如SEQ ID NO:85所示的氨基酸序列组成的VH CDR3;和

(b)轻链可变区,包括:

i由如SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列组成的VL CDR1;

ii.由如SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列组成的VL CDR2;和

iii.由如SEQ ID NO:88所示的氨基酸序列组成的VL CDR3。

13.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述靶细胞是癌细胞。

14.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述靶细胞是B细胞。

15.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述抗体分子是CD20抗体。

16.如权利要求15所述的组合物,其中所述CD20抗体是I型CD20抗体。

17.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述组合物被封装在脂质体、微粒、微胶囊或能够表达所述抗体分子或所述试剂的重组细胞中。

18.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制为用于肠道外、硬膜外或粘膜给药。

19.如权利要求18所述的组合物,其中所述肠道外给药选自皮内、肌肉内、腹腔内、静脉内和皮下给药,所述粘膜给药选自鼻内和口服途径。

20.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制为用于输注或团注,或用于通过上皮或皮肤粘膜内层吸收。

21.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制用于通过口腔粘膜、直肠和肠粘膜吸收。

22.如权利要求6-10中任一项所述的组合物,其中所述组合物用于治疗Fc γ RIIb表达水平升高的患者。

23.如权利要求22所述的组合物,其中所述患者是癌症患者。

# FcγRIIB(CD32B)和CD20特异性抗体的组合应用

[0001] 本申请为申请号为201710789909.3,申请日为2011年8月19日,发明名称为“FcγRIIB(CD32B)和CD20特异性抗体的组合应用”的分案申请。发明申请201710789909.3为申请号为201180040351.X,申请日为2011年8月19日,发明名称为“FcγRIIB(CD32B)和CD20特异性抗体的组合应用”的分案申请。

## 背景技术

[0002] 本发明涉及防止抗体Fc结构域和细胞表面FcγRIIb之间结合的试剂(agent)。本发明还涉及包含所述试剂的组合物,所述组合物用于治疗具有诸如使用基于抗体的组合物治疗的癌细胞的靶细胞的患者。

[0003] 另外,本发明还涉及预测靶细胞对于基于抗体的治疗的响应的方法,特别是在抗体配体对FcγRIIb介导的内化敏感的情况下预测靶细胞对于基于抗体的治疗的响应的方法,特别涉及FcγRIIb表达水平和/或治疗性抗体通过FcγRIIb介导的内化作为靶细胞对于所述治疗的响应的预后标志物的用途。

[0004] 单克隆抗体(mAb)可产生治疗效果的机制是通过招募诸如细胞毒性细胞(例如巨噬细胞)和酶(例如补体)的天然效应系统,然后所述效应系统靶向mAb结合的细胞,而刺激除去癌细胞和其他不想要的细胞。

[0005] 例如,I型抗CD20mAb(例如当前的市场主导药利妥昔单抗)通过经mAb的抗原结合结构域结合B细胞表面上的CD20分子并清除这些靶B细胞而发挥作用。它们通过招募和激活通过在效应细胞的表面表达的FcγR受体(FcγR)而与mAb的Fc结构域相互作用的这些效应细胞来实现这点。

[0006] 抗CD20单克隆抗体(mAb)利妥昔单抗改善了患有滤泡(FL)性淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的患者的总体存活率(OS)(1-4)。在外套细胞淋巴瘤(MCL)中,仅观察到轻度响应(5),而在慢性淋巴细胞白血病(CLL)中,起始单剂利妥昔单抗试验所产生的响应没有在其他非何杰金淋巴瘤(NHL)中所产生的响应显著((6)中综述)。一部分淋巴瘤显示对利妥昔单抗具有原发抗性,或者最终对含有利妥昔单抗的联合治疗产生抗性(7)。该治疗抗性及所观察到的不同NHL亚型对利妥昔单抗治疗的敏感性背后的分子基础当前尚未知,但可能包括CD20表达水平(8-10)、补体防御分子(CD55和CD59)的高表达(11、12)、凋亡抗性的形成(13)以及由于低亲和力等位基因表达导致的次佳的FcγR受体(FcγR)相互作用(14)。

[0007] 非常期望在治疗不佳或抗性明显的情况下提高这些抗体的有效性。

[0008] 通常认为Fc:FcγR相互作用对于抗CD-20mAb的功效至关重要(15-18)。与此相一致,在FcγRIIIa中携带较高亲和力的158V等位基因的淋巴瘤患者要比具有低亲和力的158F异型的淋巴瘤患者更好地响应利妥昔单抗(14),导致许多研究者都集中于提高mAb与FcγRIIIa的相互作用,例如通过去岩藻糖基化(19)。相比之下,对于抑制性FcγRIIb则给予较少关注,FcγRIIb用作诸如B细胞抗原受体(BCR)和激活性FcγR的携带ITAM的受体接收的刺激性活动的负调节剂。在B细胞中,该相互作用用于限制免疫复合物结合之后的B细胞增殖,而在巨噬细胞中,FcγRIIb的参与引起细胞毒性活性的抑制(15)。

[0009] 在B细胞恶性肿瘤中,Fc γ RIIb表达于CLL/SLL、MCL以及FL上,后者尤其在转化过程中有表达。在DLBCL中,F γ RIIb表达较弱,由此解释了在其表达和对于利妥昔单抗-CHOP(R-CHOP)化疗之间未显示相关性的原因(20,21)。关于激活性Fc γ R,还发现影响Fc γ RIIb活性的多形性,232I等位基因比232T等位基因更有效地抑制BCR介导的钙流(22,23)。然而,Weng和Levy未能在FL患者中确定这些多形性和对利妥昔单抗治疗的响应之间的相关性。

[0010] 可用于临床研究的抗CD-20mAb数量越来越多。根据这些不同抗CD20mAb在质膜中再分布CD20的能力及其在不同效应细胞测定中的活性将其分类为I型(例如,利妥昔单抗(rituximab),奥法木单抗(ofatumumab))或II型(例如,托西莫单抗(tositumomab)(B1),GA101,11B8)(25-27)。

[0011] 发明人及其他人已经证明II型mAb在许多模型系统中均更高效地清除B细胞靶(18,19)。例如,在其中II型mAb引发溶酶体细胞死亡的较高能力不明显的人正常B细胞消耗的CD20转基因(Tg)模型(25,27)中,发明人证明了该效能与其对内化的抗性相关(28)。这与诸如利妥昔单抗的I型mAb形成对比,I型mAb在具有能量和温度依赖性并涉及肌动蛋白再分布的过程中与CD20一起从细胞表面快速内化(28)。在来自不同来源的细胞上的调变(modulation)速率显著不同(原发肿瘤对细胞系,CLL对FL),但这点的分子基础仍未得到解释。

[0012] WO 2008/002933描述了Fc γ RIIb(CD32B)和CD20特异性抗体及使用这两种抗体的组合来治疗B细胞相关疾病或病症的方法。然而,没有识别和/或治疗患者亚组的教导或暗示,所述患者亚组即靶细胞Fc γ RIIb表达水平升高的那些患者,或其抗体类型适于和Fc γ RIIb抗体联合治疗的患者。

[0013] 出人意料地,发明人证明不管细胞亚型如何调变都与Fc γ RIIb表面表达显著相关,过表达能够将Ramos细胞由慢调变细胞转化为快调变细胞。Fc γ RIIb的内化与CD20一起发生,并在其激活之前发生。所有这些数据为先前在不同NHL亚型内和不同NHL亚型之间观察到的调变速率的异质性提供了明确的分子理论。

[0014] 因此,发明人证明,决定抗体对诸如CD20的抗原的有效性的关键因素是与同一细胞表面的抑制性Fc γ RIIb(还已知为且包括CD32、CD32B、CD32B1、CD32B2、FcRII、Fc γ RII或FcRIIB)的相互作用,这令人惊讶。该相互作用导致靶细胞对抗体的内化,由此去除其与效应细胞Fc受体相互作用的能力。发明人进一步证明,诸如抗CD32mAb的试剂能够阻断这种内化。发明人还证明这样的试剂可与抗体(例如利妥昔单抗)联合用于靶向细胞表面抗原并改善其体内清除正常B细胞或肿瘤细胞的活性。

[0015] 本发明提供了一种组合物,所述组合物包含:

[0016] (i)特异性结合靶细胞的细胞表面抗原的抗体分子,所述抗体分子具有能够结合Fc γ RIIb的Fc结构域;和

[0017] (ii)抑制或减少Fc γ RIIb与所述抗体分子的Fc结构域结合的试剂,

[0018] 其特征在于,所述组合物用于治疗具有Fc γ RIIb表达水平升高的靶细胞的患者。

[0019] 根据另一方面,本发明提供了抑制或减少抗体分子的Fc结构域与靶细胞上的Fc γ RIIb之间结合的试剂的用途,其中所述抗体分子特异性结合靶细胞表面抗原,其特征在于,所述用途为在制备用于治疗具有Fc γ RIIb表达水平升高的靶细胞的患者的药物中的用途。

[0020] 根据另一方面,本发明提供了一种治疗具有表达Fc γ RIIb的靶细胞的患者的方

法,所述方法包括联合施用:(i)特异性结合所述靶细胞的表面抗原的抗体分子,所述抗体分子具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域;和(ii)抑制或减少所述抗体分子的Fc结构域和Fc γRIIb之间结合的试剂,其特征在于,所述患者是基于靶细胞Fc γRIIb表达水平升高选择的。

[0021] 在本发明组合物、用途或方法的某些实施方式中,所述试剂抑制或减少靶细胞上存在的Fc γRIIb与所述抗体分子的Fc结构域的结合。

[0022] 根据另一方面,本发明提供靶细胞上的Fc γRIIb表达作为所述靶细胞对于使用特异性结合所述靶细胞表面抗原的抗体分子治疗的响应的预后标志物的用途,所述抗体分子具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域,由此Fc γRIIb水平升高提示对使用所述抗体分子治疗的响应减少或不响应。

[0023] 在一种实施方式中,靶细胞上的Fc γRIIb表达作为预后标志物的用途不需要将靶细胞上的Fc γRIIc表达用作预后标志物。

[0024] 根据另一方面,本发明提供了一种用于预测患者靶细胞对于使用特异性结合靶细胞表面抗原并具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域的抗体分子治疗的响应的方法,其特征在于,所述方法包括测定靶细胞上的Fc γRIIb表达水平,由此Fc γRIIb水平升高预示对使用所述抗体分子治疗的响应减少或不响应。

[0025] 在一种实施方式中,用于预测患者靶细胞响应的方法包括测定所述靶细胞上的Fc γRIIb表达水平,且不另外包括测定所述靶细胞上的Fc γRIIc表达水平。

[0026] 已经证明,尽管所有抗体都具有Fc结合抗体恒定结构域和已知的Fc γ受体结合能力,但并非所有抗体均以Fc γRIIb依赖性方式被内化,这使得合适抗体的鉴定对包含Fc γRIIb功能调变剂的联合治疗的治疗成功以及避免无益于患者的治疗至关重要。

[0027] 在本发明组合物、用途或方法的某些实施方式中,特异性结合靶细胞的细胞表面抗原的抗体分子也能够以Fc γRIIb依赖性方式被内化至所述细胞中,其中所述抗体具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域。

[0028] 在本发明组合物、用途或方法的某些实施方式中,抑制或减少Fc γRIIb结合所述抗体分子的Fc结构域的试剂还抑制或减少所述抗体分子被进一步内化至所述细胞中。

[0029] 在本发明组合物、用途或方法的某些实施方式中,所述靶细胞是癌细胞。方便地,所述靶细胞是B细胞。

[0030] 有利地,根据本发明,其中所述靶细胞上的Fc γRIIb表达升高是相对于对照或参照而定的。优选地,所述对照是与靶细胞相同类型的细胞中Fc γRIIb的正常表达水平。

[0031] “Fc γRIIb表达水平升高”在下文的“定义”中有定义。Fc γRIIb表达水平可计算为Fc γRIIb的几何平均荧光强度(几何MFI或Geo MFI)与同种型对照之比。可选地,Fc γRIIb表达水平可通过肿瘤活组织检查的免疫组织化学来计算。本领域技术人员应理解,有多种用于测定Fc γRIIb表达水平的技术和方法。

[0032] 本发明还教导了如何鉴定适于与Fc γRIIb抗体联合治疗的抗体,所述抗体即以Fc γRIIb依赖性方式被靶细胞表面内化的那些抗体。本发明还提供了鉴定适于与Fc γRIIb抗体联合治疗的患者亚组。

[0033] 在另一方面,本发明提供了用于鉴定减少或抑制针对靶细胞表面抗原的抗体Fc结构域和靶细胞上的Fc γRIIb之间结合的试剂的测定方法,所述测定方法包括测定在存在和

不存在试验试剂的情况下Fc结构域和FcγRIIb之间的结合程度。如果试验试剂减少或抑制了Fc结构域与FcγRIIb的结合,则鉴定为有用的试剂。这样的测定方法还可用于鉴定何种试剂(例如抗体分子)适于与抗FcγRIIb抗体的联合治疗。

[0034] 在另一种优选的实施方式中,鉴定可用于本发明用途和方法实践中的试剂的测定方法包括筛选阻断FcγRIIb刺激/信号传导的试剂,如通过蛋白质印迹检测细胞内ITIM基序中酪氨酸-293的磷酸化所提示的阻断FcγRIIb刺激/信号传导的试剂。例如,在对磷酸化FcγRIIb进行免疫印迹之前,在存在或不存在抗FcγRIIb测试试剂的情况下,将Raji细胞与针对细胞表面抗原的抗体(例如,抗CD20mAb利妥昔单抗)一起温育。磷酸化FcγRIIb的量在利妥昔单抗刺激的细胞中升高,并且,与图4A中所示使用AT10作为阻断剂相似,应被添加试验试剂所抑制。另外,根据图1A中所示的淬灭实验,这些试剂还应优选阻断利妥昔单抗的内化。图2B显示抗FcγRIIb阻断物(在此情况下为AT10)阻断的典型实例。这些测定方法还可用于鉴定何种试剂(例如抗体分子)适于与抗FcγRIIb抗体联合治疗。

[0035] 在一种优选的实施方式中,用于鉴定适于与FcγRIIb抗体联合治疗的试剂的测定方法计算了内化至表达FcγRIIb的细胞中的试剂(例如,抗体分子)的百分率。该测定方法的特征在于,所述方法包括测定在表达试剂(例如,抗体分子)靶和表达FcγRIIb的细胞一起温育之后保留于细胞表面上的试剂(例如,抗体分子)的百分数,由此,细胞表面可及的试剂(例如,抗体分子)减少的百分数可预示对使用所述抗体分子的治疗的响应。

[0036] 通过引用并入本文的Neubig et al(2003)Pharmacol.Rev.55,597-606描述了可被筛选以鉴定本发明抑制或减少FcγRIIb与抗体分子Fc结构域结合的试剂的多种类型的配体。

[0037] 上述配体可为小的有机或无机物,但优选它们为肽或多肽。通常,当配体为小的有机或无机物时,其相对分子量($M_r$)为50至2000,例如,100至1000,例如100至500。

[0038] 通常,配体以mM至pM的$K_d$结合FcγRIIb,例如在μM(微摩尔)至nM范围。通常,优选具有最低Kd的配体。

[0039] 所述配体可为拟肽、核酸、肽核酸(PNA)或适体。其还可为脂质或碳水化合物。

[0040] 所述配体可为结合FcγRIIb的多肽。这样的多肽(包括寡肽)通常为$M_r$ 500至$M_r$ 50,000,但可以更大。

[0041] 所述多肽还可为基于模块框架(modular framework)的结合蛋白,例如锚肽重复序列蛋白、犰狳(armadillo)重复序列蛋白、富亮氨酸蛋白、三十四肽(tetartriopeptide)重复序列蛋白或设计的锚肽重复序列蛋白(DARPins)或基于脂质运载蛋白或纤连蛋白结构域或Affilin支架的蛋白。

[0042] 便利地,所述测试试剂为测试化合物文库,并且优选地,该文库为任何肽文库、蛋白文库、抗体文库、重组组合抗体文库或scFV或Fab噬菌体展示文库。

[0043] 优选地,在本发明的组合物、用途或方法中,所述试剂(ii)是特异性结合FcγRIIb的一种或多种抗体分子。便利地,所述一种或多种抗体分子不包括能够招募效应细胞的结构域。

[0044] 便利地,所述一种或多种抗体分子为一种或多种单克隆抗体分子。

[0045] 优选地,所述试剂抑制或减少FcγRIIb信号传导。甚至更优选地,所述试剂抑制或减少靶细胞对所述抗体分子的内化。

[0046] 在下列实施方式中,SEQ ID NO是指在下文克隆1-13中所示的序列。

[0047] 本领域技术人员应知道,在免疫球蛋白的重链和轻链可变区上存在三个互补决定区(CDR)。本文所述的氨基酸至各CDR的分配与Kabat EA et al.1991,"Sequences of Proteins of Immulogical Interest",第5版,NIH公布号91-3242,第xv-xvii页中的定义相一致。

[0048] 本领域技术人员应知道,还有其他用于将氨基酸分配至各CDR中的方法。例如,International ImMunoGeneTics信息系统(IMGT®)(http://www.imgt.org/和Academic Press,2001出版的Lefranc"The Immunoglobulin FactsBook")。

[0049] 在一种实施方式中,所述试剂包含含有下列CDR的重链可变区(VH):

[0050] (i)SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;或

[0051] (ii)SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37;或

[0052] (iii)SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43;或

[0053] (iv)SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:49;或

[0054] (v)SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55;或

[0055] (vi)SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:61;或

[0056] (vii)SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67;或

[0057] (viii)SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73;或

[0058] (ix)SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79;或

[0059] (x)SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85;或

[0060] (xi)SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90和SEQ ID NO:91;或

[0061] (xii)SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96和SEQ ID NO:97;或

[0062] (xiii)SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102和SEQ ID NO:103。

[0063] 优选地,所述试剂包含含有下列CDR的轻链可变区(VL):

[0064] (i)SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34;或

[0065] (ii)SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;或

[0066] (iii)SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;或

[0067] (iv)SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52;或

[0068] (v)SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:58;或

[0069] (vi)SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64;或

[0070] (vii)SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70;或

[0071] (viii)SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76;或

[0072] (ix)SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82;或

[0073] (x)SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87和SEQ ID NO:88;或

[0074] (xi)SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93和SEQ ID NO:94;或

[0075] (xii)SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100;或

[0076] (xiii)SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106。

[0077] 任选地,所述试剂包含选自以下氨基酸序列组成的组的重链可变区(VH)氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14

和SEQ ID NO:15。

[0078] 任选地,所述试剂包含选自以下氨基酸序列组成的组的轻链可变区(VL)氨基酸序列:SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28。

[0079] 优选地,所述试剂包含以下CDR氨基酸序列:

[0080] (i)SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34;或

[0081] (ii)SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;或

[0082] (iii)SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;或

[0083] (iv)SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52;或

[0084] (v)SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:58;或

[0085] (vi)SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64;或

[0086] (vii)SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70;或

[0087] (viii)SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76;或

[0088] (ix)SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79和SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82;或

[0089] (x)SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87和SEQ ID NO:88;或

[0090] (xi)SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90和SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93和SEQ ID NO:94;或

[0091] (xii)SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96和SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100;或

[0092] (xiii)SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102和SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106。

[0093] 甚至更优选地,所述试剂包含以下氨基酸序列:

[0094] (i)SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:16;或

[0095] (ii)SEQ IS NO:4和SEQ ID NO:17;或

[0096] (iii)SEQ IS NO:5和SEQ ID NO:18;或

[0097] (iv)SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:19;或

[0098] (v)SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:20;或

[0099] (vi)SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:21;或

[0100] (vii)SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:22;或

[0101] (viii)SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:23;或

[0102] (ix)SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:24;或

[0103] (x)SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:25;或

[0104] (xi)SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:26;或

[0105] (xii)SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:27;或

[0106] (xiii)SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:28。

[0107] 本发明的试剂还包含SEQ ID NO 1和SEQ ID NO 2的恒定区(CH)和(CL)。

[0108] 在进一步的实施方式中,所述试剂能够与本文所述的诸如包含上述实施方式中所列出的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:1-106)的本发明试剂竞争,用于抑制或减少Fcγ RIIb与所述抗体分子的Fc结构域的结合。

[0109] 本文所述的“能够与本文所述的诸如抗原分子的试剂竞争”以用于抑制或减少Fcγ RIIb与所述抗体分子的Fc结构域的结合是指,所述测试的试剂能够至少部分抑制或干扰本文所述的试剂与Fcγ RIIb的结合并抑制或减少Fcγ RIIb与所述抗体分子Fc结构域的结合。

[0110] 例如,所述试剂能够抑制本文所述的试剂的所述结合至少10%,例如至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至100%,和/或将所述试剂抑制或减少Fcγ RIIb与抗体分子的Fc结构域的结合能力抑制至少10%。例如至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0111] 竞争性结合可通过本领域技术人员公知的方法类测定,例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)。

[0112] ELISA测定可用于评价表位修饰或阻断抗体。其他适于鉴定竞争性抗体的方法在通过引用并入本文的Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow&Lane(例如,见第567至569页、第574至576页、第583和590至612页,1988,CSHL,NY,ISBN 0-87969-314-2)中有公开。

[0113] 本发明的试剂可包含以下恒定区(CH和CL):

[0114] IgG1-CH[SEQ ID NO:1]

[0115] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0116] γ-CL[SEQ ID NO:2]

[0117] QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0118] 本发明的试剂可包含克隆1-14的一个或多个序列:

[0119] 克隆1

[0120] VH[SEQ ID NO:3]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNKYYADSVKGRF

FrH1 CDRH1

[0121] FrH2 CDRH2
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWRDAFDIWGQGTLVTVSS

FrH

CDRH3 FrH4

[0122] -VL[SEQ ID NO:16]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPS
GVPDRFSGSKSG

FrL1 CDRL1

[0123] FrL2 CDRL2 FrL3
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGSWVFGGGTKLTVLG

CDRL3

FrL4

[0124] CDR区

[0125] CDRH1:NYGMH[SEQ ID NO:29]

[0126] CDRH2:VISYDGSNKYYADSVKG[SEQ ID NO:30]

[0127] CDRH3:EWRDAFDI[SEQ ID NO:31]

[0128] CDRL1:TGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:32]

[0129] CDRL2:SDNQRPS[SEQ ID NO:33]

[0130] CDRL3:AAWDDSLSGSWV[SEQ ID NO:34]

[0131] 克隆2

[0132] -VH[SEQ ID NO:4]

[0133] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDG
SKKDYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYRDAFDIWGQG
TLVTVSS

[0134] -VL[SEQ ID NO:17]

[0135] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPS
GVPDRFSGSKSGTTASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSVSGWMFGGGTKLTVLG

[0136] CDR区

[0137] CDRH1:TYGMH[SEQ ID NO:35]

[0138] CDRH2:VIAYDGSKKDYADSVKG[SEQ ID NO:36]

[0139] CDRH3:EYRDAFDI[SEQ ID NO:37]

[0140] CDRL1:TGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:38]

[0141] CDRL2:GNSNRPS[SEQ ID NO:39]

[0142] CDRL3:AAWDDSVSGWM[SEQ ID NO:40]

[0143] 克隆3

[0144] -VH[SEQ ID NO:5]

[0145] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG
SNRYYADSVKGRFTMSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRWNGMDVWG
QGTLVTVSS

[0146] -VL[SEQ ID NO:18]

[0147] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPWVFGGGTKLTVLG

[0148] CDR区

[0149] CDRH1:NYGMH[SEQ ID NO:41]

[0150] CDRH2:VISYDGSNRYYADSVKG[SEQ ID NO:42]

[0151] CDRH3:DRWNGMDV[SEQ ID NO:43]

[0152] CDRL1:SGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:44]

[0153] CDRL2:ANNQRPS[SEQ ID NO:45]

[0154] CDRL3:AAWDDSLNGPWV[SEQ ID NO:46]

[0155] 克隆4

[0156] -VH[SEQ ID NO:6]

[0157] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS DTAYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHSVIGAFDIWGQG TLVTVSS

[0158] -VL[SEQ ID NO:19]

[0159] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAGSNNVVFGGGTKLTVLG

[0160] CDR区

[0161] CDRH1:SYGMH[SEQ ID NO:47]

[0162] CDRH2:VISYDGSDTAYADSVKG[SEQ ID NO:48]

[0163] CDRH3:DHSVIGAFDI[SEQ ID NO:49]

[0164] CDRL1:SGSSSNIGSNTVN[SEQ ID NO:50]

[0165] CDRL2:DNNKRPS[SEQ ID NO:51]

[0166] CDRL3:SSYAGSNNVV[SEQ ID NO:52]

[0167] 克隆5

[0168] -VH[SEQ ID NO:7]

[0169] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQLGEAFDIWGQ GTLVTVSS

[0170] -VL[SEQ ID NO:20]

[0171] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLSGPVFGGGTKLTVLG

[0172] CDR区

[0173] CDRH1:NYGMH[SEQ ID NO:53]

[0174] CDRH2:VISYDGSNKYYADSVKG[SEQ ID NO:54]

[0175] CDRH3:DQLGEAFDI[SEQ ID NO:55]

[0176] CDRL1:TGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:56]

[0177] CDRL2:DNNKRPS[SEQ ID NO:57]

[0178] CDRL3:ATWDDSLSGPV[SEQ ID NO:58]

[0179] 克隆6

[0180] -VH[SEQ ID NO:8]

[0181] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGS STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDIDYFDYWGQGT LVTVSS

[0182] -VL[SEQ ID NO:21]

[0183] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNFGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYENNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

[0184] CDR区

[0185] CDRH1:DYGMS[SEQ ID NO:59]

[0186] CDRH2:AISGSGSSTYYADSVKG[SEQ ID NO:60]

[0187] CDRH3:GDIDYFDY[SEQ ID NO:61]

[0188] CDRL1:TGSSSNFGAGYDVH[SEQ ID NO:62]

[0189] CDRL2:ENNKRPS[SEQ ID NO:63]

[0190] CDRL3:AAWDDSLNGPV[SEQ ID NO:64]

[0191] 克隆7

[0192] -VH[SEQ ID NO:9]

[0193] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERRDAFDIWGQGT LVTVSS

[0194] -VL[SEQ ID NO:22]

[0195] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDSDTPVFGGGTKLTVLG

[0196] CDR区

[0197] CDRH1:SYGMH[SEQ ID NO:65]

[0198] CDRH2:VISYDGSNKYYADSVKG[SEQ ID NO:66]

[0199] CDRH3:ERRDAFDI[SEQ ID NO:67]

[0200] CDRL1:TGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:68]

[0201] CDRL2:SDNQRPS[SEQ ID NO:69]

[0202] CDRL3:ATWDSDTPV[SEQ ID NO:70]

[0203] 克隆8

[0204] -VH[SEQ ID NO:10]

[0205] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARDHSAAGYFDYWG QGTLVTVSS

[0206] -VL[SEQ ID NO:23]

[0207] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSIRPSGG PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSLSSPVFGGGTKLTVLG

[0208] CDR区

[0209] CDRH1:SYGMH[SEQ ID NO:71]

[0210] CDRH2:VISYDGSNKYYADSVKG[SEQ ID NO:72]

[0211] CDRH3:DHSAAGYFDY[SEQ ID NO:73]

[0212] CDRL1:SGSSSNIGSNTVN[SEQ ID NO:74]

[0213] CDRL2:GNSIRPS[SEQ ID NO:75]

[0214] CDRL3:ASWDDSLSSPV[SEQ ID NO:76]

[0215] 克隆9

[0216] -VH[SEQ ID NO:11]

[0217] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDS AIIDYAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEAAAGAFDIWGQ GTLVTVSS

[0218] -VL[SEQ ID NO:24]

[0219] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTDRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVVFGGGTKLTVLG

[0220] CDR区

[0221] CDRH1:SYGMH[SEQ ID NO:77]

[0222] CDRH2:GISWDSAIIDYAGSVKG[SEQ ID NO:78]

[0223] CDRH3:DEAAAGAFDI[SEQ ID NO:79]

[0224] CDRL1:TGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:80]

[0225] CDRL2:GNTDRPS[SEQ ID NO:81]

[0226] CDRL3:AAWDDSLSGPVV[SEQ ID NO:82]

[0227] 克隆13

[0228] -VH[SEQ ID NO:15]

[0229] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYGISWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGN TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSVGAYANDAFDIWG QGTLVTVSS

[0230] -VL[SEQ ID NO:28]

[0231] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDTNRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

[0232] CDR区

[0233] CDRH1:SYGIS[SEQ ID NO:101]

[0234] CDRH2:GISGSGGNTYYADSVKG[SEQ ID NO:102]

[0235] CDRH3:SVGAYANDAFDI[SEQ ID NO:103]

[0236] CDRL1:TGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:104]

[0237] CDRL2:GDTNRPS[SEQ ID NO:105]

[0238] CDRL3:AAWDDSLNGPV[SEQ ID NO:106]

[0239] 克隆10

[0240] -VH[SEQ ID NO:12]

[0241] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISYDG SNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARELYDAFDIWGQG TLVTVSS

[0242] -VL[SEQ ID NO:25]

[0243] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYADDHRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSQRAVIFGGGTKLTVLG

[0244] CDR区

[0245] CDRH1:SYGMH[SEQ ID NO:83]

[0246] CDRH2:VISYDGSNKYYADSVKG[SEQ ID NO:84]

[0247] CDRH3:ELYDAFDI[SEQ ID NO:85]

[0248] CDRL1:TGSSSNIGAGYDVH[SEQ ID NO:86]

[0249] CDRL2:ADDHRPS[SEQ ID NO:87]

[0250] CDRL3:ASWDDSQRAVI[SEQ ID NO:88]

[0251] 克隆11

[0252] -VH[SEQ ID NO:13]

[0253] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS NKYYADSVKGRFTISRDNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGYIILDYWGQGT LVTVSS

[0254] -VL[SEQ ID NO:26]

[0255] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRDYERPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCMAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG

[0256] CDR区

[0257] CDRH1:SYGMH[SEQ ID NO:89]

[0258] CDRH2:VISYDGSNKYYADSVKG[SEQ ID NO:90]

[0259] CDRH3:EFGYIILDY[SEQ ID NO:91]

[0260] CDRL1:SGSSSNIGSNTVN[SEQ ID NO:92]

[0261] CDRL2:RDYERPS[SEQ ID NO:93]

[0262] CDRL3:MAWDDSLSGVV[SEQ ID NO:94]

[0263] 克隆12

[0264] -VH[SEQ ID NO:14]

[0265] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDG TNKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETWDAFDVWGQ GTLVTVSS

[0266] -VL[SEQ ID NO:27]

[0267] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNNANWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLG

[0268] CDR区

[0269] CDRH1:NHGMH[SEQ ID NO:95]

[0270] CDRH2:VISYDGTNKYYADSVRG[SEQ ID NO:96]

[0271] CDRH3:ETWDAFDV[SEQ ID NO:97]

[0272] CDRL1:SGSSSNIGSNNAN[SEQ ID NO:98]

[0273] CDRL2:DNNKRPS[SEQ ID NO:99]

[0274] CDRL3:QAWDSSTVV[SEQ ID NO:100]

[0275] 优选的靶细胞表面抗原可选自下列抗原:CD20,Thy-1(CD90,分化群90(Biofactors.2009May-Jun;35(3):258-65));Ly-6(淋巴细胞抗原6(Mol Biol Rep.2009Apr;36(4):697-703));CD59(补体调节蛋白(Mol Immunol.2007Jan;44(1-3):73-81));Fas(FS7相关细胞表面抗原,CD95、APO-1或TNFRSF6(Adv Exp Med Biol.2009;647:64-93));EGFR(表皮生长因子受体(FEBS J.2010Jan;277(2):301-8));Her2(人表皮生长因子受体2(Clin Breast Cancer.2008Oct;8(5):392-401));CXCR4(趋化因子受体4(Biochim Biophys Acta.2007Apr;1768(4):952-63));CD19(分化群19(Cell Immunol.1989Feb;118(2):368-81));CD40(分化群40(Basic Clin Pharmacol Toxicol.2009Feb;104(2):87-92));HLA分子(人白细胞抗原分子(Korean J Lab Med.2010Jun;30(3):203));GM1(神经节苷脂,单唾液酸四已糖神经节苷脂(J Lipid Res.2010Sep;51(9):2731-8));CD22(Cheson(2008)NEJM 359(6):613-26);CD23(Cheson,2008);CD80(Cheson,2008);CD74(Cheson,2008);DRD(Cheson,2008)。

[0276] 优选地,在本发明的组合物、用途或方法中,所述表面抗原选自CD19、CD20、或CD40,更优选地,为其人形式。CD20、尤其是人CD20为最优选的。

[0277] 有利地,特异性结合所述细胞表面抗原的抗体分子为单克隆抗体,优选当结合靶细胞时从所述细胞表面去除并以Fcγ RIIb依赖性方式内化至靶细胞中的单克隆抗体。优选地,所述单克隆抗体为抗CD19抗体、抗CD20抗体或抗CD40抗体。最优选地,所述单克隆抗体为抗CD20单克隆抗体。

[0278] 在一种优选的实施方式中,所述特异性结合细胞表面抗原的抗体分子为I型抗CD20抗体。在另一种优选的实施方式中,所述特异性结合细胞表面抗原的抗体分子不是II型抗CD20抗体。

[0279] 在一种实施方式中,所述细胞表面抗原为CD20,所述特异性结合细胞表面抗原的抗体分子为I型抗体。

[0280] 如上所述,有两种类型的抗CD20单克隆抗体(mAb)。抗CD20mAb首先由发明人在2003定义为属于(43和25)不同分组,之后在2004定义为(26)I型和II型mAb。最初,这点的基础为抗CD20mAb基于其消除淋巴瘤异种移植物的能力而属于两种不同类型的试剂:I型(例如,利妥昔单抗和1F5)利用补体,II型(例如,B1)不利用补体。两种类型的mAb均产生了存活时间的显著延长,但通过施用CVF破坏补体活性,则显著减小了利妥昔单抗和1F5的效能,但对于B1的活性无影响。这些结果明显证明,不同的CD20mAb在体内运行不同的效应机制。另外,与先前工作完全一致,这些结果显示由于利妥昔单抗和1F5将CD20转移至靶细胞膜中的脂质阀(lipid rafts)而能够有效激活补体,而B1型mAb不能实现这点(43)。与mAb参与补体并诱导CD20以移动至脂质阀中的能力具有良好的相关性(43,26)。因此,I型和II型本质上可由其将CD20移至脂质阀中的能力来定义。这可如下文所述确定。这也与能够引发更有效的同质性粘附并指导细胞死亡的II型mAb有相关性,但这些不能单独用于定义I型或II型mAb(与Tx-100阀测定不同,见下文)。

[0281] 因此,根据这些不同抗CD20mAb在质膜中再分布CD20的能力及其在不同效应细胞

测定中的活性将其分类为I型(例如,利妥昔单抗,奥法木单抗)或II型(例如,托西莫单抗(B1),GA101,11B8)(25-27)。I型(例如,利妥昔单抗,奥法木单抗)抗CD20单克隆抗体诱导CD20再分布至大的抗去垢剂微结构域(阀),而II型(如托西莫单抗)抗CD20单克隆抗体不能实现这点(50)。

[0282] 如上所述,根据抗CD20mAb是否将CD20再分布至脂质阀中而将其定义为I型或II型。这通过Tx-100不溶解性测定或通过蔗糖密度梯度分离和蛋白质印迹来实现。这两种方法在Cragg et al Blood 2003(43)中作如下描述:

[0283] 1.通过Triton X-100不溶解性评价阀相关抗原

[0284] 针对阀微结构域中抗原存在的快速评价,在低温下利用基于Triton X-100不溶解性的流式细胞术方法。简言之,在RPMI/1%BSA中洗涤细胞,并以2.5x $10^6$/ml重悬。然后,在37℃将细胞与10μg/ml FITC偶联的mAb一起温育15分钟,在冷的PBS/1%BSA/20mM叠氮化钠中洗涤,然后将样品分为两半。一半维持于冰上以计算100%表面抗原水平,同时另一半于冰上使用0.5%Triton X-100处理15分钟以测定不溶解的阀级分中残留的抗原比例。然后在测定的其余部分将细胞维持在4℃,在PBS/BSA/叠氮化物中洗涤一次,重悬并如上详述通过流式细胞术评价。使用间接检测方法获得了相似的结果。为了测定靶抗原阀结合的组成性水平,在结合FITC标记的mAb之前首先于冰上使用0.5%Triton X-100处理细胞15分钟并在PBS/BSA/叠氮化物中洗涤。为了评价是否更多抗原可通过另外的交联移至Triton-X 100不溶解的级分中,如前所述将细胞与FITC-mAb一起温育,洗涤,然后分成四份。将这些样品中的两份与山羊抗小鼠Ig F(ab')$_2$片段于冰上一起温育15分钟。洗涤之后,在Triton X-100中裂解其中一个交联的样品和一个非交联的样品,并在流式细胞术之前如上详述进行洗涤。

[0285] 2.蔗糖密度梯度分离和蛋白质印迹-脂质阀级分制备和蛋白质印迹

[0286] 将单克隆Ab(1μg/$10^6$个细胞)添加至37℃的细胞中。20分钟温育之后,对细胞进行沉淀,并于冰冷的含1.0%Triton X-100的MES缓冲盐水(25mM MES,pH 6.5,150mM NaCl,1mM苯甲磺酰基氟化物,5μg/ml抑肽酶,5μg/ml亮抑酶肽,10mM EDTA)中裂解。然后通过蔗糖密度梯度离心制备脂质阀级分。简言之,将裂解物与等体积的含80%蔗糖的裂解缓冲液一起混合,使用不连续的5-30%的蔗糖密度梯度覆盖,然后在200,000xg离心16h。收集级分(0.5ml)并通过蛋白质印迹进行分析。在将各级分的15ml试样以1:1稀释在2x上样缓冲液中,加热至95℃持续5分钟,并在15% SDS-PAGE凝胶上分离,之后转移至PVDF膜上,与初级抗体(例如,小鼠抗CD20抗体,检测CD20的克隆7D1或鉴定阀级分的抗Lyn家兔多克隆血清;Serotec,UK)一起温育,然后与HRP偶联的二级抗体(Amersham Biosciences UK Ltd)一起温育。使用ECL+plus(Amersham Biosciences UK Ltd)使印迹可视化。

[0287] 抗CD20mAb可能需要在CD20大环中AxP基序。(奥法木单抗和其他Genmab抗体则不需要)。然而,(Niederfelner et al.(51))表明,与I型mAb相比,II型mAb在CD20环中的结合区域略有不同。

[0288] 优选地,在本发明的组合物、用途或方法中,所述靶细胞是癌细胞。更优选地,选自非何杰金淋巴瘤的癌症,包括但不限于滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤或慢性淋巴细胞性白血病。

[0289] 在一种实施方式中,本发明提供了用于治疗癌症,特别是B细胞恶性肿瘤的组合

物、用途和方法,所述B细胞恶性肿瘤优选自淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性淋巴瘤、何杰金病和非何杰金病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、具有弥漫性大B细胞淋巴瘤的滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫小卵裂细胞淋巴瘤或它们的组合。在某些实施方式中,B细胞恶性肿瘤是淋巴瘤,例如非何杰金淋巴瘤(NHL)。

[0290] 在另一种实施方式中,本发明提供了用于治疗的组合物、用途和方法。所述炎症性疾病可为自身免疫性疾病,例如,桥本甲状腺炎、恶性贫血、阿迪生氏病、I型糖尿病、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、皮肌炎、舍格伦综合征、皮肌炎、红斑狼疮、多发性硬化症、自身免疫性内耳病、重症肌无力、赖特综合征、格拉夫斯病、自身免疫性肝炎、家族性多发性腺癌和溃疡性结肠炎或它们的组合。在特定实施方式中,所述自身免疫性疾病为风湿性关节炎或系统性红斑狼疮。

[0291] 在优选的实施方式中,治疗的疾病包括慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、非何杰金淋巴瘤(NHL)、B细胞恶性肿瘤、风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、皮肌炎、系统性硬化症和自身免疫性疱病。

[0292] 在一种优选的实施方式中,通过使用本发明而增强的治疗为使用诸如利妥昔单抗的抗CD20mAb治疗。

[0293] 定义

[0294] “升高”包括的含义为与在其表面表达低水平或中等水平Fcγ RIIb的对照或参照细胞相比,所讨论的细胞于其表面表达较高水平的Fcγ RIIb。例如,如果所讨论的细胞为B型细胞,在其Fcγ RIIb表达水平高于相同细胞类型的B细胞的Fcγ RIIb正常(优选中等)表达水平的情况下,认为其Fcγ RIIb表达水平“升高”。可选地,如果所讨论的细胞的表达水平高于以低水平或中等水平表达Fcγ RIIb的不同细胞类型,则认为其表达水平“升高”。

[0295] 根据本发明,靶细胞的Fcγ RIIb表达升高程度越高,所预计的这些细胞对于使用特异性结合靶细胞表面抗原并具有能够结合Fcγ RIIb的Fc结构域的抗体分子治疗的响应越差。因此,,如图2D和3A所示,Fcγ RIIb表达升高得越多,则由使用本发明抑制或减少Fc结构域与Fcγ RIIb结合的试剂的获益越大。在通过IHC测量Fcγ RIIb水平(图10b)和将MCL样品分离为Fcγ RIIb阳性和阴性之后,在基于利妥昔单抗治疗之后观察到明显的临床响应差异(图10c和10d)。

[0296] 本领域技术人员可容易地通过多种已知方法测定细胞上的Fcγ RIIb表达水平,例如通过附图和实施例中所述的流式细胞术和免疫组织化学染色方法。

[0297] 本领域技术人员应理解,Fcγ RIIb的表达水平“正常”和“升高”将在不同细胞类型和不同疾病状态之间有差异,并且本领域技术人员能够使用本领域公知和本文所述的方法针对给定的靶细胞或疾病状态鉴定Fcγ RIIb的表达水平“正常”和“升高”。图2C中提供了某些细胞类型上Fcγ RIIb的表达水平“正常”(或中等)和“升高”的示例性水平。在这些特定实施例中,在滤泡性淋巴瘤(FL)中,“正常”水平约为50(与同种型对照的几何MFI Fcγ RIIb之比),“升高”的水平约为125或400或更多,同时在弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中,“正常”水平约为20,“升高”的水平约为80或更多,同时在外套细胞淋巴瘤(MCL)中,“正常”水平约为60,“升高”的水平约为110或190或更多,在慢性淋巴样白血病(CLL)中,“正常”水平约为100,“升高”的水平约为300或更多。

[0298] 优选地,升高的Fc γ RIIb表达水平相对于相同细胞类型的细胞(或不同细胞类型的细胞)的正常(优选中等)表达水平增加至少1.1倍,或相对于相同细胞类型的细胞(或不同细胞类型的细胞)的正常(或中等)表达水平增加至少1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0.21.0、22.0、23.0、24.0或25.0倍或更多倍。优选地,它们相对于相同细胞类型或不同细胞类型的细胞的正常(或中等)表达水平增加至少1.8倍。

[0299] 如所附实施例中所示,发明人已经确定Fc γ RIIb表达水平与来自细胞表面的mAb的调变增加之间具有相关性。Fc γ RIIb表达水平越高,产生的调变越高,即,在表达升高的程度和调变之间具有相关性,如图2D和3A所示。在图2D中,将Fc γ RIIb表达水平相对于所观察到的调变水平进行绘图。相关性为,最高水平的Fc γ RIIb(例如,>400)导致表面CD20的最低水平(<20%),即,对来自细胞表面的mAb调变的影响最大。在图3A中,将低(18)、中(70)以及高(124)水平的Fc γ RIIb引入到Fc γ RIIb阴性细胞系(Ramos)中,这与和Fc γ RIIb的表达成比例的细胞表面CD20水平的减少(低、中以及高水平为60%、40%、30%)直接相关。将Fc γ RIIb表达水平表示为Fc γ RIIb的几何平均荧光强度(几何MFI)与同种型对照之比。

[0300] 调变减少了细胞表面留下的mAb量。mAb需要Fc以参与免疫效应细胞机制(ADCC、ADCP、CDC),从而清除靶细胞。因此,使用Fc γ RIIb阻断性mAb(阻断Fc γ RIIb的mAb)来减少调变将改善Fc依赖性效应细胞功能。这在图8中显示为ADCP(吞噬作用)。单独使用利妥昔单抗的吞噬作用为40%,但当Fc γ RIIb被AT10阻断时则升至55%。

[0301] “抗体分子”包括单克隆抗体、合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体、人抗体、嵌合抗体、骆驼化抗体、单链Fv(scFv)、单链抗体、Fab片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、细胞内抗体或上述任意的表位结合片段。优选地,本发明的抗体为单克隆抗体,更优选地为人源化或人抗体。

[0302] 制备和表征可用于本发明组合物、用途和方法的抗体分子的方法为本领域技术人员公知。例如,WO 2008/002933(5.3至5.3.1部分,第74-91页)描述了特异性结合靶细胞表面抗原(例如,CD20或Fc γ RIIb)的单克隆抗体的制备和表征。包括根据布达佩斯条约保藏的杂交瘤产生的单克隆抗体在内的特异性结合Fc γ RIIb和CD20的有用抗体,还在WO 2008/002933的第15至21页中有公开,该文献的内容通过引用并入本文。

[0303] “特异性结合”包括诸如下述抗体分子的试剂,即结合靶抗原但不结合其他抗原(不与其他抗原交叉反应)或对所述其他抗原的结合较弱,即比靶抗原的亲和力低。例如,特异性结合Fc γ RIIb的抗体可以以较低亲和力结合其他肽或多肽,如通过例如免疫测定、BIAcore或本领域已知的其他测定方法所测定的。优选地,特异结合Fc γ RIIb的抗体或其片段不与其他抗原交叉反应。特异性结合Fc γ RIIb的抗体可通过例如免疫测定、BIAcore或本领域技术人员已知的其他测定方法鉴定。当根据使用诸如蛋白质印迹、反射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)的测定,抗体或其片段结合Fc γ RIIb的亲和力高于结合任

何交叉反应性抗原(见,Fundamental Immunology Second Edition,Raven Press,New York,第332-336页(1989)对于抗体特异性的讨论)和当结合Fc γRIIb、特别是人Fc γRIIb、更特别地天然人Fc γRIIb的亲和力大于所述抗体或其片段结合Fc γRIIA、特别是人Fc γRIIA、更特别地天然人Fc γRIIA的亲和力时,所述抗体或其片段特异性结合Fc γRIIb。代表性抗体在美国专利申请2004-0185045、2005-0260213以及2006-0013810中揭示,这些文献整体通过引用并入本文。

[0304] 优选地,某些与CD20抗体联合用于本发明组合物和方法的Fc γRIIb抗体结合天然人Fc γRIIb的细胞外结构域。在一些实施方式中,所述抗体或其片段结合Fc γRIIb的亲和力比所述抗体或其片段结合Fc γRIIA的亲和力高至少两倍。在其他实施方式中,所述抗体或其片段结合Fc γRIIb的亲和力为所述抗体或其片段结合Fc γRIIA的亲和力高至少4倍、至少6倍、至少8倍、至少10倍、至少100倍、至少1000倍、至少$10^4$倍、至少$10^5$倍、至少$10^6$倍、至少$10^7$倍或至少$10^8$倍。在一种优选实施方式中,所述抗体或其片段结合Fc γRIIb的亲和力比所述抗体或其片段结合Fc γRIIA的亲和力高100倍、1000倍、$10^4$倍、$10^5$倍、$10^6$倍、$10^7$倍、$10^8$倍。

[0305] 本申请提供了以下项:

[0306] 1.组合物,所述组合物包含:

[0307] (i)抗体分子,所述抗体分子特异性结合靶细胞的细胞表面抗原,且具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域;和

[0308] (ii)试剂,所述试剂抑制或减少Fc γRIIb与所述抗体分子的Fc结构域结合,

[0309] 其特征在于,所述组合物用于治疗具有Fc γRIIb表达水平升高的靶细胞的患者。

[0310] 2.抑制或减少抗体分子Fc的结构域与靶细胞上的Fc γRIIb之间结合的试剂的用途,其中所述抗体分子特异性结合所述靶细胞的表面抗原,并且其特征在于,所述用途为在制备用于治疗具有Fc γRIIb表达水平升高的靶细胞的患者的药物中的用途。

[0311] 3.治疗具有表达Fc γRIIb的靶细胞的患者的方法,所述方法包括联合施用:(i)特异性结合所述靶细胞的表面抗原的抗体分子,所述抗体分子具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域;和(ii)抑制或减少所述抗体分子的Fc结构域和Fc γRIIb之间结合的试剂,其特征在于,所述患者是基于其靶细胞的Fc γRIIb表达水平升高来选择的。

[0312] 4.靶细胞上的Fc γRIIb表达作为所述靶细胞对于使用抗体分子治疗的响应的预后标志物的用途,所述抗体分子特异性结合所述靶细胞的表面抗原,且所述抗体分子具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域,由此Fc γRIIb水平升高表明对使用所述抗体分子治疗的响应减少或不响应。

[0313] 5.用于预测患者靶细胞对于使用抗体分子治疗的响应的方法,所述抗体分子特异性结合靶细胞表面抗原并具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域,其特征在于,所述方法包括测定所述靶细胞上的Fc γRIIb表达水平,由此Fc γRIIb水平升高预示对使用所述抗体分子治疗的响应减少或不响应。

[0314] 6.根据1-3任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂抑制或减少所述靶细胞上的Fc γRIIb与所述抗体分子的Fc结构域结合。

[0315] 7.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中特异性结合靶细胞表面抗原且具有能够结合Fc γRIIb的Fc结构域的所述抗体分子能够以Fc γRIIb依赖性方式被内化

至所述靶细胞中。

[0316] 8.根据1-3和6-7任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述抑制或减少Fc γ RIIb与所述抗体分子Fc结构域的结合的试剂还抑制或减少所述抗体分子内化至所述靶细胞中。

[0317] 9.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述靶细胞是癌细胞。

[0318] 10.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述靶细胞是B细胞。

[0319] 11.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中待治疗的所述患者为癌症患者,所述治疗为癌症治疗。

[0320] 12.根据9-11任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述癌症选自非何杰金淋巴瘤,例如滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤或慢性淋巴细胞性白血病。

[0321] 13.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂为下述任一者:多肽;anticalin;肽;抗体;嵌合抗体;单链抗体;适体;darpin;Fab、F(ab′)$_2$、Fv、ScFv或dAb抗体片段;小分子;天然产物;亲和体;拟肽;核酸;肽核酸分子;脂质;碳水化合物;基于模块框架的蛋白,包括锚蛋白重复序列蛋白、犰狳重复序列蛋白、富亮氨酸蛋白、三十四肽重复序列蛋白或设计的锚蛋白重复序列蛋白(DARPins)。

[0322] 14.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂为特异性结合Fc γ RIIb的一种或多种抗体分子。

[0323] 15.根据14所述的组合物、用途或方法,其中所述一种或多种抗体分子不包含能够招募效应细胞的结构域。

[0324] 16.根据15所述的组合物、用途或方法,其中所述一种或多种抗体分子为单克隆抗体分子。

[0325] 17.根据1-3和6-16任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂包含含有下列CDR的重链可变区(VH):

[0326] (i)SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31;或

[0327] (ii)SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37;或

[0328] (iii)SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43;或

[0329] (iv)SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:49;或

[0330] (v)SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55;或

[0331] (vi)SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:61;或

[0332] (vii)SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67;或

[0333] (viii)SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73;或

[0334] (ix)SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79;或

[0335] (x)SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85;或

[0336] (xi)SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90和SEQ ID NO:91;或

[0337] (xii)SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96和SEQ ID NO:97;或

[0338] (xiii)SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102和SEQ ID NO:103。

[0339] 18.根据1-3和6-17任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂包含含有下列CDR的轻链可变区(VL):

[0340] (i)SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34;或

[0341] (ii)SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;或

[0342] (iii)SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;或

[0343] (iv)SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52;或

[0344] (v)SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:58;或

[0345] (vi)SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64;或

[0346] (vii)SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70;或

[0347] (viii)SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76;或

[0348] (ix)SEQ ID NO:80和SEQ ID NO:81和SEQ ID NO:82;或

[0349] (x)SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87和SEQ ID NO:88;或

[0350] (xi)SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93和SEQ ID NO:94;或

[0351] (xii)SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100;或

[0352] (xiii)SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106。

[0353] 19.根据1-3和6-18任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂包含选自以下氨基酸序列组成的组的重链可变区(VH)氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15。

[0354] 20.根据1-3和6-19任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂包含选自以下氨基酸序列组成的组的轻链可变区(VL)氨基酸序列:SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28。

[0355] 21.根据1-3和6-20任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂包含以下CDR氨基酸序列:

[0356] (i)SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34;或

[0357] (ii)SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;或

[0358] (iii)SEQ ID NO:41和SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46;或

[0359] (iv)SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51和SEQ ID NO:52;或

[0360] (v)SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54和SEQ ID NO:55和SEQ ID NO:56和SEQ ID NO:57和SEQ ID NO:58;或

[0361] (vi)SEQ ID NO:59和SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:61和SEQ ID NO:62和SEQ ID NO:63和SEQ ID NO:64;或

[0362] (vii)SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67和SEQ ID NO:68和SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70;或

[0363] (viii)SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72和SEQ ID NO:73和SEQ ID NO:74和SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76;或

[0364] (ix)SEQ ID NO:77和SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79和SEQ ID NO:80和SEQ ID

NO:81和SEQ ID NO:82;或

[0365] (x)SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84和SEQ ID NO:85和SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87和SEQ ID NO:88;或

[0366] (xi)SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90和SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92和SEQ ID NO:93和SEQ ID NO:94;或

[0367] (xii)SEQ ID NO:95和SEQ ID NO:96和SEQ ID NO:97和SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100;或

[0368] (xiii)SEQ ID NO:101和SEQ ID NO:102和SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105和SEQ ID NO:106。

[0369] 22.根据1-3和6-21任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂包含以下氨基酸序列:

[0370] (i)SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:16;或

[0371] (ii)SEQ IS NO:4和SEQ ID NO:17;或

[0372] (iii)SEQ IS NO:5和SEQ ID NO:18;或

[0373] (iv)SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:19;或

[0374] (v)SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:20;或

[0375] (vi)SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:21;或

[0376] (vii)SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:22;或

[0377] (viii)SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:23;或

[0378] (ix)SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:24;或

[0379] (x)SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:25;或

[0380] (xi)SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:26;或

[0381] (xii)SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:27;或

[0382] (xiii)SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:28。

[0383] 23.根据1-3和6-16任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂能够与17-22所述的试剂竞争,从而用于抑制或减少Fcγ RIIb与所述抗体分子的Fc结构域的结合。

[0384] 24.根据1-3和6-23任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂抑制或减少Fcγ RIIb信号传导。

[0385] 25.根据1-3和6-24任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述试剂抑制或减少所述抗体分子被所述靶细胞内化。

[0386] 26.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述细胞表面抗原选自CD19、CD20或CD40。

[0387] 27.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述特异性结合细胞表面抗原的抗体分子为CD20抗体。

[0388] 28.根据27所述的组合物、用途或方法,其中所述CD20抗体为I型CD20抗体。

[0389] 29.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述细胞表面抗原为CD20,所述特异性结合细胞表面抗原的抗体分子为I型抗体。

[0390] 30.根据前述任一项所述的组合物、用途或方法,其中所述靶细胞上的Fcγ RIIb表达升高是相对于对照而确定的,优选地,所述对照是Fcγ RIIb在与所述靶细胞相同类型的

细胞中的正常表达水平。

[0391] 31.组合物,其基本上如本文说明书和附图所述。

[0392] 32.用途,其基本上如本文说明书和附图所述。

[0393] 33.方法,其基本上如本文说明书和附图所述。

## 实施例

[0394] 现在通过附图描述本发明的具体方面:

[0395] 图1A-图1B:I型mAb自正常和恶性人B细胞的细胞表面内化。

[0396] A)将原代CLL细胞与Tosit-488、GA101gly-488、Ritux-488或Ofatum-488(均为5μg/ml)一起温育2小时或6小时。然后,收集细胞并洗涤两次,之后将抗Alexa-488抗体添加至一半样品中,在4℃下作用30分钟,以区分内化的和非内化的mAb。使用下列计算式计算表面可及的CD20(%):表面可及的CD20+(淬灭前的几何MFI-淬灭后的几何MFI)/(淬灭前的几何MFI)x 100。各点代表来自不同CLL患者的样品。使用Wilcoxon配对检验进行统计分析(**p值<0.001),并显示平均值。B)然后使用Tosit-488或Ritux-488以相同的测定方法检测多种原代B细胞肿瘤和来自健康志愿者的正常B细胞。使用Mann Whitney检验进行统计分析,并显示平均值。

[0397] 图1C-图1G:CD20调变和CLL表型/预后标志物之间缺乏相关性。C)调变和已知的CLL预后因素之间的相关性。对CLL病例进行IgVH基因突变状态、Zap-70和CD38表达的表型分型,并对这些样品进行内化测定以如图1A)中对调变进行评价。通过Spearman相关性分析进行各预后特征和CD20调变之间的相关性。未观察到与各预后因素之间的相关性(p>0.05)。D)相似地,评价sIg状态、细胞引发钙流的能力以及CLL细胞的活力,并与CD20调变进行比较。再次,未观察到相关性。E)使用Ritux-488通过FACS评价CLL细胞的CD20表达,并与CD20调变进行比较。观察到弱相关性(Spearman r值-0.34,p=0.038)。使用CD20和FcγRIIb表达针对CD20调变的多变量回归的随后分析显示,与CD20的弱相关性并不显著(p=0.638)。F)通过FACS测定IgM阳性CLL病例的sIg表达,并将表达水平与CD20调变进行比较。未发现相关性(p>0.05)。G)将CLL细胞与Rit m2a-488一起温育2小时,并如图1A)进行内化测定。在单CLL病例中,可见CD38表达差异。FACS曲线显示淬灭前(左)和淬灭后(右)的样品。相应的直方图显示单个样品中的$CD38^{+ve}$和$CD38^{-ve}$细胞以相同速率调变。$CD38^{+ve}$和$CD38^{-ve}$细胞分别通过实心和空心峰来表示。这些结果代表了3个不同的病例。

[0398] 图2:调变是一个Fc依赖性过程。A)在将CLL细胞与Alexa-488标记的利妥昔单抗片段Fab'、$F(ab')_2$以及IgG一起温育6小时之后重复1a)中所述的内化测定。数据代表3个不同CLL样品的平均调变水平+/-SD。B)如1a)中将CLL细胞与Tosit-488、Ritux-488+/-AT10以及Rit m2a-488一起温育2小时和6小时。显示了来自6个不同CLL样品的平均值+/-调变。将抗FcγRII mAb AT10添加至利妥昔单抗将CD20调变降低至与Rit m2a相似的水平,而将AT10添加至Rit m2a对于调变无显著差异。C)针对FcγRIIb表达,使用AT10-PE对多种正常和恶性B细胞样品进行染色。直方图显示了3个不同CLL病例中的FcγRIIb表达差异。用标明的高(黑色线)、中(暗灰色线)和低表达细胞(淡灰色线)。散点线显示了健康B细胞、CLL、SLL、MCL、FL以及SLBCL的FcγRIIb表达差异。将FcγRIIb表达表示为FcγRIIb:同种型对照几何MFI之,比以控制由于试验间差异导致的小差异。显示了中值。D)针对所有NHL亚型和正常B

细胞(由1A)中所述的内化测定获得,与Ritux-488一起温育6小时)对CD20调变和FcγRIIb表达进行绘图。使用假定非参数分布的Speraman相关性来进行分析。显示了强相关性。Spearman r值=-0.74,95%置信区间在-0.83和-0.61之间,p<0.0001。

[0399] 图3:FcγRIIb表达为CD20调变的主要决定因素。A)将使用FcγRIIb转染的Ramos细胞分选为表达低、中以及高水平的FcγRIIb,并在使用Tosit-488和Ritux-488的内化测定的6小时时间点与空白对照转染的细胞一起进行评价。误差线代表来自独立试验的平均值+/-SD。所分选的细胞的FcγRIIb表达的几何MFI值列于右侧。B)使用Tosit-488和Ritux-488在正常Ramos细胞、Rx3细胞(缺乏BCR表达)、空白对照转染的Rx3细胞以及FcγRIIb转染的Rx3细胞上于温育6小时后重复内化测定。来自5个独立试验的数据点与中值一起显示。

[0400] 图4:CD20和FcγRIIb共连接主要以顺式形式发生并导致FcγRIIb激活。A)将Raji细胞与特定的mAb(10μg/ml)在37℃一起温育2小时,之后收集、裂解细胞并随后对磷酸化的FcγRIIb进行免疫印迹。B)左图:将PKH26标记的Ramos细胞(FcγRIIb$^{-ve}$,R1)与分选的高FcγRIIb表达的Ramos转染子以1:1混合(图3A中所述)。右图:与Ritux-488一起温育6小时之后FcγRIIb$^{+ve}$和FcγRIIb$^{-ve}$细胞上的CD20调变。作为对照,还仅单独温育所述两种细胞。数据代表来自3个独立试验的平均调变水平+/-SD。C)在相似的试验中,对低FcγRIIb表达的CLL进行PKH26标记,然后与较高FcγRIIb表达的CLL以1:1混合。试验进行三次,每次使用不同的高FcγRIIb表达的CLL。FcγRIIb水平(几何MFI)为42(低),对于高表达细胞为275、306以及165。然后如4B所示进行内化测定。数据表示平均调变水平+/-SD。D)将不同的CLL样品以20x $10^5$、4x $10^5$以及1x$10^5$个细胞/ml与Ritux-488一起温育6小时,并在第6小时如前所述进行内化测定。E)将Raji细胞以20x $10^5$、4x $10^5$以及1x $10^5$个细胞/ml与特定mAb(10μg/ml)在37℃下一起温育2小时。使用明视野显微镜捕捉图像以证明细胞邻近的差异。然后,收集细胞并通过免疫印迹评价细胞磷酸化的FcγRIIb,如图4A所述。

[0401] 图5:利妥昔单抗、CD20以及FcγRIIb一起内化至溶酶体中。A)将CLL细胞与Tosit-488或Ritux-488一起温育2小时,然后使用抗CD19-APC和AT10-PE进行染色。数据显示为未处理的百分数(n+6个CLL样品)的FcγRIIb表达的平均值+/1SD。Ritux-488之后的FcγRIIb表达显著低于Tosit-488之后,*p<0.05。B)洗涤、固定并透化处理CLL细胞,然后使用AT10-647染色(蓝色),洗涤,并使用共聚焦显微镜分析。该图像表示未刺激的细胞中FcγRIIb染色图。C)将相同的CLL样品与Ritux-488一起温育30分钟,然后如图5b)中所示进行处理。细胞在该时间显示Ritux-488(绿色)与AT10-647(蓝色)之间的明显共定位。D)将CLL细胞与Tosit-488一起温育6小时,之后如5B中所示制备用于显微镜观察。另外,还使用生物素化LAMP-1和链霉亲和素-546(红色)对细胞进行染色以针对溶酶体进行染色。Tosit-488均一存留于表面,如5B所示AT10-647染色未相对基线改变。无与LAMP-1的共定位。E)使用Ritux-488处理CLL细胞6小时,并如图5D)中所示进行评价。此处显示两种代表性细胞。顶部细胞显示Ritux-488和AT10-647之间明显的共定位,但与LAMP-1无共定位。底部细胞显示所有三种荧光染料的共定位。在各情况下均显示了来自相同细胞的亮视野(BF)图像。尺度条代表5μm。

[0402] 图6:抑制性受体的缺乏增强了抗CD20mAb的清除能力。使用携带小鼠IgG1(m1)或小鼠IgG2a(m2a)的利妥昔单抗处理hCD20Tg小鼠(WT)或缺乏CD32的hCD20Tg小鼠(CD32KO),250mg静脉注射(iv),然后通过对小鼠连续放血和使用B220和CD19mAb染色通过流式细胞术

监测B细胞清除90天。

[0403] 图7:阻断抑制性受体CD32b(Fc γ RIIb)增强了抗CD20mAb在人异种移植系统中的功效。将CD20阳性人肿瘤细胞(Daudi或Raji)接种至SCID小鼠中,然后使用利妥昔单抗、AT10或二者处理,并监测小鼠存活或肿瘤生长。所使用的mAb的剂量在图注中显示。在A)中,同时接种Daudi细胞,并通过测径器每305天监测肿瘤一次。在B)和C)中,静脉内接种Raji细胞。

[0404] 图8:使用利妥昔单抗处理的CLL细胞通过与Fc γ RII阻断性mAb共温育而吞噬作用增强。单核细胞源自健康志愿者,并在使用前于6孔板中经最少7天使用M-CSF分化为巨噬细胞。然后收集巨噬细胞,并使得经最少2小时在96孔板中以5x $10^5$个细胞/孔粘附,之后添加CFSE标记的CLL细胞。CSFE标记的CLL细胞未处理,或使用10μg/ml的利妥昔单抗(ritux)和Fc γ RIIb阻断性mAb AT10(fab')$_2$调理15分钟或6小时,然后洗涤两次,并添加至巨噬细胞(1:1的比例),作用至少30分钟。然后,将抗CD16f(ab)$_2$-APC(5μg/ml添加至各孔,在室温(RT)下作用15分钟,以对巨噬细胞进行染色,然后使用Facs洗剂(PBS BSA叠氮化物)在室温下洗涤孔一次。添加进一步的冰冷FACS洗剂,于冰上温育板10分钟,之后收集用于Facs分析。%双阳性巨噬细胞代表CD16+CFSE+阳性细胞的百分数,以%CD16+细胞的总数表示。N=3次重复,线代表平均值。数据清楚地显示,利妥昔单抗仅添加15分钟比6小时时CLL细胞的吞噬作用高。该功效增加与来自细胞表面的利妥昔单抗的调变相关,可通过使用阻断Fc γ RIIb的mAb AT10处理而被逆转。重要的是,仅将Fc γ RIIb mAb添加至CLL细胞,因此对于巨噬细胞自身无作用。另外,仅使用AT10的Fab2片段,因此由于更多的mAb结合至CLL细胞表面而不能出现增加的吞噬作用。该结论还得到下述观察结果的支持,即,在温育仅15分钟(在此时间已发生小量利妥昔单抗调变)之后未观察到吞噬作用增加。

[0405] 图9:通过IHC检测Fc γ RIIb表达。使用抗CD32b特异性mAb EP888Y对石蜡包埋的组织进行染色。显示了来自4名不同FL患者的图像(x40总放大率,和x150放大插图)。通过使用AT10-PE对匹配的活细胞进行染色通过流式细胞术检测Fc γ RIIb表达。各图像的左上角均显示了由流式细胞术获得的Fc γ RIIb表达。

[0406] 图10:Fc γ RIIb水平预测了利妥昔单抗处理的MCL患者的临床结果。作为本发明体外发现的概念验证,发明人回顾性检测了已经接受利妥昔单抗的MCL患者队列的Fc γ RIIb表达。使用Fc γ RIIb特异性单抗通过免疫组织化学方法对诊断性石蜡包埋组织进行染色(图11)。在Fc γ RIIb+ve中观察到强膜染色,但在Fc γ RIIb-ve淋巴瘤样品中未观察到。通过IHC在图10a和10b中显示的Fc γ RIIb染色与图2D所示的通过流式细胞术显示的Fc γ RIIb表达相关(2D中由流式细胞术检测的数值表示为图10a和10b中的数字插图)。这些结果与由流式细胞术获得的相应的DMSO冷冻样品的Fc γ RIIb表达相关(图2C,插图数值)。尽管仅研究了小队列的16名MCL患者,但患有Fc γ RIIb-ve淋巴瘤的患者比具有Fc γ RIIb+ve细胞的那些患者的无恶化存活期中值要好得多(分别为852天和189天的中值)。图10c显示了Fc γ RIIb+和-亚组中的存活差异。这两组在临床特征上相当(MCL国际预后指数,数据未显示),但在所使用的化疗类型上具有异质性。为了解释这点,发明人检查了使用单剂利妥昔单抗或氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗(FCR)用于起始治疗而处理的那些患者,观察到相似的结果。图10d显示了在患者队列如所述进一步控制之后Fc γ RIIb+和-亚组中的存活差异。

[0407] 图11:用于免疫组织化学方法中的抗Fc γ RIIb mAb的特异性的证实。将Fc γ RIIa

和Fc γ RIIb转染的Ramos细胞进行细胞离心涂片并进行石蜡包埋。使用人Fc γ RIIb的mAb进行的免疫组织化学证实,在Fc γ RIIb转染的Ramos中具有强膜染色但在Fc γ RIIa转染的细胞中无染色。

[0408] 图12:CD32B特异性克隆抑制利妥昔单抗内化。Y轴显示了表面可及的CD20(%)。在存在或不存在不同阻断CD32b的mAb(WT或297Q(nq)突变体)的情况下将利妥昔单抗-alexa 488添加至使用CD32B转染的Ramos细胞中,并在1、2、6以及24小时后评价调变。作为CD32mAb的阻断能力的对照,发明人还使用了CD32a和CD32b双特异性mAb AT10(IgG和Fab2片段(Fab))和阴性对照同种型匹配的无关mAb(同种型wt或nq)。最后,使用ALEXa 488标记的B1作为不快速调变的对照mAb。数据清楚地表明,所有3种nCoDeR©mAb(C1、C11以及C13)均能够以wt或297q形式阻断利妥昔单抗的调变。特别地,C11mAb极其有效。

[0409] 图13:抗CD32b mAb阻断利妥昔单抗的调变的能力。所有13种mAb(nq)和C11均为wt。在存在或不存在不同阻断CD32b的mAb(WT或297Q突变体)的情况下将利妥昔单抗-alexa 488添加至使用CD32B转染的Ramos细胞中,并在1、2、6以及24小时后评价调变。Y轴显示了表面可及的CD20(%)。作为阻断CD32mAb的能力的对照,发明人还是用了CD32a和CD32b双特异性mAb AT10(IgG和Fab2片段(Fab))和阴性对照同种型匹配的无关mAb(同种型wt或nq)。最后,包括ALEXa 488标记的B1作为不快速调变的对照mAb。另外,使用对照CD32阴性Ramos细胞,以评估阻断CD32的mAb的最大作用。数据清楚地显示,大部分nCoDeR©mAb均能够阻断利妥昔单抗的调变。特别地,C10和C11mAb极其有效,甚至在24小时时也显示几乎完全阻断调变。

[0410] 图14A:抗CD32b阻断性mAb的亲和力和利妥昔单抗结合之后抑制CD32b磷酸化的能力之间的相关性。通过检测mAb结合CD32B转染的CHO细胞的剂量滴定试验,测定mAb的相对亲和力。简言之,将CD32B转染的CHO K1贴壁细胞接种于FMAT板中。以1:2稀释度将IgG由30nM滴定至约0.015nM,并在室温下结合1小时。在洗涤之后,使用抗人IgG-APC抗体检测结合的IgG。最后,洗涤板,并在FMAT(Applied Biosystems)中读数。这给出了mAb结合表达靶的细胞的EC50值,并可将其转化为相对亲和力。该相对亲和力则与抗CD32b阻断性mAb在利妥昔单抗结合之后抑制CD32b磷酸化的能力相关。通过在存在或不存在抗CD32b mAb的情况下使用利妥昔单抗刺激细胞并然后对于磷酸-CD32b进行蛋白质印迹来测定。然后,根据CD32b mAb阻断CD32磷酸化的能力来对其进行分类,其中1为最有效的。mAb的亲和力与其阻断CD32b磷酸化的能力之间密切相关。

[0411] 图14B:抗CD32b阻断性mAb的亲和力与其抑制利妥昔单抗的调变的能力之间的相关性。抗CD32b阻断性mAb的亲和力与其抑制利妥昔单抗调变的能力之间的相关性。通过检测mAb结合CD32B转染的CHO细胞的剂量滴定试验,测定mAb的相对亲和力。简言之,将CD32B转染的CHO K1贴壁细胞接种于FMAT板中。以1:2稀释度将IgG由30nM滴定至约0.015nM,并在室温下结合1小时。在洗涤之后,使用抗人IgG-APC检测结合的IgG。最后,洗涤板,并在FMAT(Applied Biosystems)中读数。这给出了mAb结合表达靶的细胞的EC50值,并可将其转化为相对亲和力。该相对亲和力则与抗CD32b阻断性mAb抑制CD32b转染的Ramos细胞上的利妥昔单抗调变的能力相关(先前的图中所示)。mAb的亲和力与其阻断利妥昔单抗调变的能力之间明显显著相关。该数据证实了CD32B在促进靶细胞表面的利妥昔单抗的调变方面的关键作用。

[0412] 图15:由克隆1介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆1介导。将细胞接种至FMAT板中。通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0413] 图16:由克隆2介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆2介导。将细胞接种至FMAT板中。通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0414] 图17:由克隆3介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆3介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0415] 图18:由克隆4介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆4介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0416] 图19:由克隆5介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆5介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0417] 图20:由克隆6介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆6介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0418] 图21:由克隆7介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与

hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆7介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0419] 图22:由克隆8介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆8介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0420] 图23:由克隆9介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆9所介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0421] 图24:由克隆10介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆10所介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0422] 图25:由克隆11介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆11所介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0423] 图26:由克隆12介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆12所介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0424] 图27:由克隆13介导。剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。由克隆13所介导。将细胞接种至FMAT板中,通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。总强度反映结合,强度越高,结合越高。结合为免疫复合物(IC)或mAb的结合。

[0425] 图28:显示抗CD32B抗体的细胞特异性。使用Ficoll密度梯度制备由外周血分离的PBMC。使用细胞特异性标志物对细胞进行染色,并评价CD32B特异性抗体的结合。如图中所示,对于克隆1-13,仅B细胞(CD19+细胞)为阳性染色。

[0426] 图29:克隆1-13的B细胞的剂量依赖性染色。使用Ficoll密度梯度制备由外周血分离的PBMC。如所示,使用CD19对细胞进行染色,之后使用10、1或0.1mg/ml CD32B特异性抗体对细胞进行染色。在该图中,使用CD19特异性mAb对B细胞(已知表达CD32B)进行门控处理(gate out)。该门控(gate)被称为"M1"。当的CD32B mAb浓度降低时,所染色的B细胞数量由近乎100%下降至低得多的数值,如根据CD32B特异性mAb所预期的,显示了B细胞的特异性和剂量依赖性染色。

[0427] 图30:各mAb抑制Fc介导的CD32B磷酸化的能力。使用导致CD32B磷酸化的利妥昔单抗(Rit)处理Raji细胞(CD32B阳性)。这在存在或不存在CD32B特异性mAb1-13的情况下进行,该图表明各mAb抑制Fc介导的CD32B磷酸化的能力。"TUB"=微管蛋白对照。

[0428] 图31:CD32b对I型抗CD20mAb调变速率的影响。CD32b促成其他I型抗CD20mAb内化的能力。将各mAb的Alexa-488标记形式与pCDNA3转染的Ramos或CD32B转染的Ramos细胞一起温育1小时或6小时,如前所述测定调变的程度。所使用的mAb为利妥昔单抗(RTX)、内部制备的奥法木单抗(OFA)以及托西莫单抗(Tos)。数据清楚地显示,OFA的内化速率与RTX相似,并被存在的CD32b加速。

[0429] 图32:抗CD19mAb也以部分依赖CD32B的方式从恶性人B细胞表面内化。Ramos huCD32b转染子。使用其他表面抗原的内化也可受到CD32b表达的影响。如前所述在存在(+)或不存在(-)使用AT10进行的CD32阻断的情况下,使用不同的mAb进行调变测定。在该6小时的测定中使用Ramos CD32B转染子。*p<0.05。f3.3=II型MHC;RFB9=CD19;RTX=利妥昔单抗。如果细胞表面残留mAb,则可被淬灭。如果其被内化则不可被淬灭。淬灭的百分数越低,则内化的水平越高。数据清楚地显示,在与CD32阻断一起温育之后,RTX和RFB9mAb的表面调变显著减少,F3.3mAb的表面调变减少较少。这些数据表明,诸如CD19的靶抗原也可以以部分依赖CD32B的方式由恶性人B细胞表面内化,并可被抗CD32b mAb阻断。

[0430] 图33:使用其他表面抗原的内化也可受到CD32表达的影响。将各mAb的Alexa-488标记形式与pCDNA3转染的Ramos细胞或CD32B转染的Ramos细胞一起温育24小时,并如前所述测定调变的程度。*=p<0.05。y轴显示调变/内化或表面可及的抗原(%)。该图显示这是因为在存在huCD32b的情况下内化/调变量增加导致。注意,对于抗CD19mAb和抗CD40mAb,在存在CD32b的情况下细胞表面具有统计学显著减少(*,p<0.05)。

[0431] 图34:IgG1-λ形式的针对人CD32B的14种抗体克隆的恒定区氨基酸序列。显示了IgG1-CH和λ-CL区的氨基酸序列。

[0432] 图35:针对人CD32B的抗体克隆1的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。标记的CDR序列标示为由标记的框架区分隔的盒内序列。

[0433] 图36:针对人CD32B的抗体克隆2的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。标记的CDR序列标示为由标记的框架区分隔的盒内序列。

[0434] 图37:针对人CD32B的抗体克隆3的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0435] 图38:针对人CD32B的抗体克隆4的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基

酸序列。盒内序列代表CDR序列。图39:针对人CD32B的抗体克隆5的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0436] 图40:针对人CD32B的抗体克隆6的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0437] 图41:针对人CD32B的抗体克隆7的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0438] 图42:针对人CD32B的抗体克隆8的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0439] 图43:针对人CD32B的抗体克隆9的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0440] 图44:针对人CD32B的抗体克隆10的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0441] 图45:针对人CD32B的抗体克隆11的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0442] 图46:针对人CD32B的抗体克隆12的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0443] 图47:针对人CD32B的抗体克隆13的可变区的氨基酸序列。显示了VH和VL区的氨基酸序列。盒内序列代表CDR序列。

[0444] 实施例1:原代CLL和其他NHL样品中的CD20调变

[0445] 发明人先前在CLL样品队列中观察到利妥昔单抗调变的速率和程度具有异质性(28)。为了验证和扩展这些发现结果,发明人将该队列增加至总共48个CLL样品(图1A)。如前所述,发明人对利妥昔单抗和托西莫单抗(分别为I型和II型mAb的临床相关原型)在2、6以及24小时内减少表面可及的CD20的能力进行了比较(图1A,数据未显示)。另外,发明人还对最近由FDA批准的用于复发性CLL的内部制备的奥法木单抗(ofatum;type I)和当前临床开发用于一系列NHL的非糖基化形式的GA101(GA101$_{gly}$;II型)(19)进行了试验。与先前的观察结果一致,样品之间存在相当大的异质性,但与II型mAb相比I型mAb导致明显更多的调变。在6小时时,在存在利妥昔单抗的情况下调变近乎最大,在淬灭测定中18%至65%(中值为37%)的mAb仍可及(图1A)。与其天然I型一致,奥法木单抗还导致高度的调变(在6小时时可及的中值为26%)。相比之下,托西莫单抗和GA101$_{gly}$显示少得多的调变,在6小时时可及的结合mAb的中值为80%(范围为61-89%)和70%(范围为57-81%)。

[0446] 在CLL队列中,发明人检查了多种已知在CLL预后中重要的因素,包括ZAP-70表达(29,30)、CD38阳性(31、32)以及IgVH基因突变状态(31、33、34)。结果(图1-2A)显示与任何这些疾病标志物无相关性。

[0447] 发明人先前证实了尽管各NHL亚型具有不同的调变模式,它们也表现了相当大的CD20调变异质性(28)。为了进一步探索这点,发明人将分析的初级样品的数量扩展为包括8个健康志愿者、7个SLL、7个MCL、11个FL以及7个DLBCL(图1B)。在所有组织学亚型中,I型和II型mAb诱导调变的能力差异持续存在。发明人还观察到,在存在利妥昔单抗的情况下来自健康志愿者的B细胞上的CD20快速调变,且与恶性B细胞相比还更均一,提示与恶性肿瘤相关的因素促成所观察到的异质性。SLL和MCL细胞的利妥昔单抗诱导的调变速率与CLL相似

(图1A),而对于DLBCL和FL,速率稍低(当与图1A的CLL相比时,分别为p<0.0001和0.0027)。然而,在FL中,发明人确实观察到2/11的患者样品非常快速地调变利妥昔单抗,使得6小时温育之后的mAb或CD20水平几乎检测不到。

[0448] 实施例2:B-NHL中CD20的调变是一个Fc依赖性过程。

[0449] 发明人和其他人之前都发现,抗CD20mAb的体内功效为Fc依赖性的(28)。发明人推定甚至在不存在效应细胞的情况下调变也可能为Fc依赖性的,并通过使用利妥昔单抗的Fab'和$F(ab')_2$片段重复内化测定来检测这点(图2A)。利妥昔单抗Fab'仅显示低水平的调变,如细胞结合测定所证实的,这可通过对于CD20的二价交联的需要或通过其低亲和力单价结合来解释(数据未显示)。相比之下,$F(ab')_2$和IgG显示了相似的结合谱(结果未显示),但在6小时培养之后,$F(ab')_2$片段(40%表面可及CD20)要比完整的IgG(20%表面可及CD20)调变少得多。由于使用高度富集(>95%纯度)的B细胞进行测试,仅丰富存在的FcR为抑制性FcγRIIb。在阻断性抗FcγRII mAb抗体AT10的存在下使用利妥昔单抗的调变减少,与利妥昔单抗$F(ab')_2$片段或Rit m2a(其结合FcγRIIb的亲和力低于携带人IgG1的利妥昔单抗)相当(图2B)。如所预期的,与AT10的共温育导致对于Rit m2a的调变影响非常小。

[0450] 实施例3:正常B细胞和B细胞肿瘤上的FcγRIIb表达。

[0451] 考虑到FcγRIIb:Fc相互作用可影响CD20调变速率的可能性,发明人检测了正常B细胞和原发B细胞肿瘤组上的FcγRIIb表达。如图2C所示,在各组中FcγRIIb表达具有显著的异质性。CLL细胞上的表达较高,是同种型对照的20至300倍。DLBCL和大多数FL表现了低FcγRIIb表达。两个FL病例表现了非常高的FcγRIIb表达,令人惊讶地,这正是先前观察到的调变极其快速的两个病例。MCL和SLL表达中等但异质水平的FcγRIIb(图2C),这也与先前的发现一致(21)。

[0452] 实施例4:FcγRIIb表达调节CD20调变。

[0453] 总之,这些发现表明FcγRIIb表达可能为来自B细胞靶的CD20调变的主要决定因素。为了检验该假说,发明人对所有获得的健康B细胞和原发NHL样品的FcγRIIb表达和CD20调变速率进行了比较(图2D)。Spearman相关性分析揭示了这些参数之间的显著相关性(Spearman r值-0.74,95%置信区间为-0.83至-0.61,p<0.0001)。数据显示了大多数FL和DLBCL病例位于上部且CLL和MCL样品呈广泛分布的对数曲线。该图还证实了在低表达水平时,FcγRIIb表达的小差异可导致CD20调变的相对大变化,由此强调了该受体在调节由细胞表面清除抗CD20:CD20复合物中的能力。

[0454] 为了直接解释FcγRIIb在CD20调变中的作用,使用编码FcγRIIb的质粒转染FcγRIIb$^{-ve}$ Ramos细胞。所产生的FcγRIIb$^{+ve}$细胞表现出可变的FcγRIIb表达水平,之后被分选为表达低、中以及高FcγRIIb的亚克隆。然后在内化测定中评价这些细胞以及亲本的FcγRIIb$^{-}$Ramos细胞。在存在利妥昔单抗的情况下,6小时时的CD20调变速率与FcγRIIb表达相关,调变增加的顺序为FcγRIIb$^{-ve}$>FcγRIIb$^{+ve}$低>FcγRIIb$^{+ve}$中>FcγRIIb$^{+ve}$高(图3A)。相似地,使用由野生型和表达转基因CD20的FcγRII敲除(KO)小鼠获得的B细胞,FcγRIIb-/-小鼠细胞中的调变小于野生型对应物(数据未显示),但应注意在无FcγRII的情况下仍旧观察到可察觉的调变,这表明在该转基因模型中除了FcγRII以外的因子也参与CD20调变的调节。

[0455] 由于FcγRIIb是B细胞上BCR激活的负调节因子((35)中综述)并且在CD20mAb占位

(engagement)之后CD20与BCR物理结合(36,37),发明人推定BCR表达或信号传导活性可影响调变。因此,为了排除BCR表达差异是这些发现的原因,使用Fc γ RIIb转染BCR缺陷Ramos细胞(Rx3),并将CD20调变与未操作的Ramos细胞和空白对照Rx3转染的细胞进行比较(图3B)。这些数据清楚地表明,缺乏BCR表达的Rx3细胞比Ramos细胞的调变慢,但该缺陷可通过表达高水平的Fc γ RIIb来克服(Fc γ $RIIb^{+ve}$ Rx3细胞)。Fc γ RIIb相对于BCR在调节CD20调变中的这种优势作用得到下述证据支持:1)发明人在特有表达低水平的BCR的CLL细胞中观察到高水平调变(38);和2)发明人没有观察到CLL细胞上的表面免疫球蛋白(sIg)表达和CD20调变之间的任何相关性(图1E)。

[0456] 实施例5:Fc γ RIIb激活先于CD20和Fc γ RIIb的调变

[0457] 为了进一步探测抗CD20mAb和Fc γ RIIb之间的相关作用,发明人研究了通过队细胞内ITIM基序中的酪氨酸-293磷酸化显示的抗体介导的Fc γ RIIb刺激。在存在或不存在抗Fc γ RIIb阻断性mAb(AT10)的情况下,将Raji细胞与托西莫单抗或利妥昔单抗一起温育,之后对于磷酸化的Fc γ RIIb进行免疫印迹。磷酸化Fc γ RIIb在利妥昔单抗刺激的细胞中升高,但在托西莫单抗刺激的细胞中不升高,并且通过添加AT10得到抑制(图4A)。用Daudi细胞观察到了相似的结果(数据未显示)。

[0458] 实施例6:CD20和Fc γ RIIb交联主要以顺式形式发生

[0459] 利妥昔单抗可被相同(顺式)或邻近细胞(反式)上的CD20和Fc γ RIIb共连接。为了研究这点,发明人将PKH26标记的Fc γ $RIIb^{-}$ Ramos细胞与高Fc γ RIIb表达的Ramos转染子一起共温育(图4B),然后比较各细胞类型中的调变水平,两种单独培养的细胞类型作为对照。如先前所示,当单独培养时,Fc γ $RIIb^{+ve}$细胞显示比缺乏Fc γ RIIb的细胞更大的调变(图4B)。在共培养中,Fc γ $RIIb^{-ve}$中的调变水平稍增加,但未达到Fc γ $RIIb^{+ve}$细胞中所观察到的水平。该结果表明尽管可发生反式相互作用,Fc γ RIIb对CD20mAb的调变主要以顺式方式驱动。

[0460] 为了证实该发现对于Ramos细胞系无特异性,发明人将表达低Fc γ RIIb的CLL样品(由PKH26标记区分)与来自三种表达高水平Fc γ RIIb的不同CLL病例的细胞共培养(图4C)。如在先前使用Ramos细胞进行的测定中所观察到的,在混合群中,低Fc γ RIIb B细胞中的调变不接近在高Fc γ RIIb群中所观察到的调变,再次表明Fc γ RIIb对CD20mAb的调变主要以顺式方式驱动。然而,有趣地注意到与最快速调变的CLL细胞共培养导致低Fc γ RIIb表达的CLL的调变增加最大,但该增加仅为中度(约18%,数据未显示)。

[0461] 在该类型的另一个试验中,以减少的浓度培养CLL细胞以降低细胞:细胞相互作用的潜能,结果,具有随细胞浓度减少调变较小的弱趋势(图4D)。使用不同浓度的Raji细胞重复相同的试验,再次观察到调变水平或程度程度变化小(数据未显示)。重要的是,在该试验过程中所取的亮视野显微图像表明,与2x $10^6$个细胞/ml相比,在1x $10^5$个细胞/ml的细胞间(反式)相互作用的可能性要低得多。另外,发明人观察到在不同细胞密度下,磷酸化Fc γ RIIb的水平无显著差异(图4E)。总之,这些数据表明Fc γ RIIb主要通过相同细胞的事件介导其对于CD20mAb调变的作用,相邻Fc γ RIIb表达细胞仅具有小的作用。

[0462] 实施例7:Fc γ RIIb与CD20一起内化至溶酶体中

[0463] 为了确定在利妥昔单抗占据细胞表面之后Fc γ RIIb的命运,发明人通过流式细胞术和共聚焦显微术对其表达和定位进行了监测。发明人使用流式细胞术评价了Fc γ RIIb在

来自6个不同CLL病例的B细胞表面上的表达,发现其在与利妥昔单抗一起温育2小时内下降但与托西莫单抗一起温育不下降(图5A)。这些发现表明,Fc γ RIIb可能作为三联复合物的一部分与CD20和利妥昔单抗(但非托西莫单抗)一起内化。

[0464] 发明人和其他人先前已经报道了利妥昔单抗的胞吞导致其运输至早期的内体中并随后在溶酶体中降解(9,28)。为了解释在CLL细胞中Fc γ RIIb是否作为抗CD20:CD20:Fc γ RIIb复合物的一部分而发生相同过程,发明人将它们与Tosit-488或Ritux-488一起温育,然后固定并针对Fc γ RIIb(使用Alexa 647标记的来自AT10的$F(ab')_2$)和溶酶体标志物LAMP-1进行染色。在使用mAb刺激之前,Fc γ RIIb染色扩散且不在质膜中定位(图5B)。在与抗CD20mAb一起温育30分钟之后,发明人观察到在Ritux-488和Tosit-488之间染色的明显差异,由此Tosit-488独有地存留在表面,而Ritux-488表现出细胞内点状染色,这与发明人先前的观察相一致(图5C,数据未显示和(28))。在刺激6小时之后,Tosit-488仍旧同等地分布于细胞表面,而AT10-647相对于30分钟时其基线外观则无变化,且与LAMP-1无共定位(图5D)。相比之下,在相同的时程,Ritux-488显示了不同的点状图,大多数细胞(58%)表现出AT10-647和Ritux-488之间的共定位(图5E)。还在33%细胞中观察到了Ritux-488与LAMP1和AT10-647的共定位。推测在所有三个细胞株之间观察到较低程度的共定位,这反映了Ritux-488和Fc γ RIIb一起内化且可能在它们出现于溶酶体中之前占据其他的细胞内区室。

[0465] 实施例8:Fc γ RIIb体内抑制I型抗CD20mAb

[0466] 为了解释Fc γ RIIb是否可能体内抑制I型抗CD20mAb的功效,发明人在hCD20Tg野生型小鼠和缺乏Fc γ RIIb的hCD20Tg小鼠(CD32KO)中进行了B细胞耗竭试验。在这些试验中,使用携带小鼠IgG1(m1)或小鼠IgG2a(m2a)的利妥昔单抗变体(250μg,iv)处理小鼠,然后,通过对小鼠连续放血并使用B220和CD19mAb染色通过流式细胞术监测B细胞耗竭90天(图6)。这些变体与CD32b强结合(m1)或弱结合(m2a)。数据清楚地显示,当使用m1同种型时耗竭次佳(与m2a相比),CD32丧失导致耗竭功效显著改进。相比之下,在存在或不存在CD32的情况下m2a大致相似。

[0467] 实施例9:Fc γ RIIb体内提高并增进了针对人肿瘤的抗CD20mAb的活性

[0468] 为了检查CD32对于人肿瘤细胞的作用和增进当前的治疗性mAb(例如利妥昔单抗)的潜能,发明人采用了异种移植物系统。在该系统中,仅人肿瘤细胞表达hCD32,因此任何治疗作用均最可能通过阻断调变,而非通过对于宿主效应细胞的任何作用而源自对肿瘤细胞的作用。在这些试验中,将CD20阳性、CD32阳性人肿瘤细胞(Daudi或Raji)接种至SCID小鼠中,然后使用利妥昔单抗、AT10或这二者处理所述细胞,并监测小鼠存活或肿瘤生长(图7)。所使用的mAb的剂量示于图注中。在A)中,皮下接种Daudi细胞,并通过测径器每3-5天测量对肿瘤进行监测。在B和C中,静脉内注射Raji细胞,并监测动物的存活。在两个模型中,显示AT10提高和增强了利妥昔单抗的活性,证明了该组合在体内的潜能。

[0469] 实施例10:FcgRIIb水平预测利妥昔单抗治疗的MCL患者的临床后果

[0470] 作为发明人体外发现的概念验证,发明人回顾性检测了接受利妥昔单抗的MCL队列的Fc γ RIIb表达。使用Fc γ RIIb特异性mAb通过免疫组织化学方法对诊断性石蜡包埋组织进行染色(图11)。在Fc γ RIIb+ve中观察到强膜染色,但在Fc γ RIIb-ve淋巴瘤样品未观察到。这些结果与由流式细胞术获得的相应DMSO冷冻样品的Fc γ RIIb表达相关。由IHC在图

10a和10b中显示的Fc γ RIIb染色与图2D所示的通过流式细胞术显示的Fc γ RIIb表达相关(2D中由流式细胞术检测的数值作为图10a和10b中的数字插图)。尽管仅研究了小队列的16名MCL患者,但患有Fc γ RIIb-ve淋巴瘤的患者比具有Fc γ RIIb+ve细胞的那些患者的无恶化存活期中值要好得多(分别为852天和189天的中值)。图10c显示了Fc γ RIIb+和-亚组中的存活差异。这两组在临床特征上相当(MCL国际预后指数,数据未显示),但在所使用的化疗类型上具有异质性。为了解释这点,发明人检查了使用单剂利妥昔单抗或氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗(FCR)用于起始治疗而处理的那些患者,观察到相似的结果。图10d显示了在患者队列如所述进一步控制之后Fc γ RIIb+和-亚组中存活的差异。

[0471] 实施例10和11中的试验理论如下所述。如果细胞表达高水平的CD32b(Fc γ RIIb),则其会更迅速内化利妥昔单抗(显示为表面可及的CD20的减少百分数)。如果细胞表面的利妥昔单抗较少,则Fc依赖性效应活性(例如吞噬作用或ADCC)较少,因此肿瘤细胞的杀伤较少和由此较小的治疗结果。因此,发明人检查了所治疗的患有MCL的患者队列的Fc γ RIIb表达,并确定它们是否是高或低CD32b表达者。该队列已经获得了临床数据,因此根据它们是否是高或低Fc γ RIIb表达肿瘤来对临床结果进行分类。推理是使用利妥昔单抗可成功治疗表达低水平Fc γ RIIb的肿瘤,表达高水平Fc γ RIIb的那些肿瘤则效果较差。这正是临床数据所显示的情况。图11显示了用于Fc γ RIIb染色的mAb的特异性。其仅对表达Fc γ RIIb的细胞进行染色,而对密切相关的Fc γ RIIa不染色。

[0472] 在通过IHC测量Fc γ RIIb水平(图10b)并将MCL样品分为Fc γ RIIb阳性和阴性之后,发明人观察到在基于利妥昔单抗的治疗之后明显的临床响应差异(图10c和10d)。

[0473] 实施例11:抗CD32b单克隆抗体的选择

[0474] 图37-47中显示了14个抗体克隆的可变区(VH和VL)及CDR区的氨基酸序列。在各情况下,恒定区(CH和CL)相同。图36中显示了恒定区。

[0475] 使用n-CoDeR®scFv噬菌体展示库进行针对CD32B(Fc γ RIIb)的筛选。人CD32A用作非靶。在HEK293E中制备与mIgG$_3$-Fc融合的CD32A和CD32B的细胞外结构域,并使用蛋白A进行纯化。进行了三次连续的蛋白筛选。在所有筛选中非靶用作竞争剂。将所产生的噬菌体转变为产生scFv/Fab的形式并转化至大肠杆菌Top10细菌中用于筛选单个克隆。筛选确定了对人CD32B和CD32A的特异性,并在ELISA中使用包被蛋白和通过在FMAT中转染CHO细胞进行分析。对于IC抑制特性的测定,使IgG结合CD32B转染的CHO细胞,之后添加形式为IgG1包被的牛血清白蛋白的IC。然后检测结合的IC,并且评价IgG的抑制特性。

[0476] 实施例12:抗CD32b mAb阻断利妥昔单抗调变的能力

[0477] 在存在或不存在不同CD32b阻断性mAb(WT或297Q变体)的情况下将利妥昔单抗-alexa 488添加至使用CD32B转染的Ramos细胞中,在1、2、6以及24小时之后评价调变。作为阻断CD32mAb的能力的对照,发明人还使用了CD32a和CD32b双特异性mAb AT10(IgG和Fab2片段(Fab))以及阴性对照同种型匹配的无关mAb(同种型wt或nq)包括。图12中的数据清楚地表明,所有三种nCoder mAb(C1、C3以及C11)均能够以wt或297q形式阻断利妥昔单抗的调变。

[0478] 图13显示了使用所有13种mAb时抗CD32b mAb阻断利妥昔单抗调变的能力。另外,使用对照CD32阴性Ramos细胞以评估CD32阻断性mAb的最大作用。图12中的数据清楚地表明,所有nCoder mAb均能够阻断利妥昔单抗的调变。

[0479] 先前的试验组已经证实Fc γ RIIb调节利妥昔单抗的内化。因此,这些试验试图检查使用抗Fc γ RIIb单抗阻断Fc γ RIIb是否会降低利妥昔单抗的内化量。

[0480] 实施例13:抗CD32b阻断性mAb的亲和力以及其抑制利妥昔单抗结合后的CD32b磷酸化和抑制利妥昔单抗调变之间的相关性

[0481] 通过测量mAb结合CD32B转染的CHO细胞的剂量滴定试验,测定mAb的相对亲和力。简言之,将CD32B转染的CHO K1贴壁细胞接种于FMAT板中。以1:2稀释度将IgG由30nM滴定至约0.015nM,并在室温下结合1小时。在洗涤之后,使用抗人IgG-APC检测结合的IgG。最后,洗涤板,并在FMAT(Applied Biosystems)中读数。这给出了mAb结合表达靶的细胞的EC50值,并可将其转化为相对亲和力。该相对亲和力则与抗CD32b阻断性mAb抑制利妥昔单抗结合之后的CD32b磷酸化的能力相关。这通过在存在或不存在抗CD32b mAb的情况下使用利妥昔单抗刺激细胞并然后对于磷酸-CD32b进行蛋白质印迹来测定。然后,根据CD32b mAb阻断CD32磷酸化的能力来其进行分类,其中1为最有效的。图14A显示mAb的亲和力与其阻断CD32b磷酸化之间明显具有密切相关性。图14B显示了在mAb亲和力与其阻断利妥昔单抗调变之间明显具有显著相关性。该数据证实了CD32B在促进来自靶细胞表面的利妥昔单抗的调变中的重要作用。

[0482] 理论是较高的mAb亲和力会更好地阻断Fc γ RIIb。因此,mAb阻断Fc γ RIIb越好,其阻断利妥昔单抗的调变/内化则越好。这正是图14所证明的内容。亲和力越高,其阻断利妥昔单抗结合诱导的Fc γ RIIb激活(通过蛋白质印迹染色的磷酸-Fc γ RIIb量来测定)则越好,且其阻断调变也越好。

[0483] 实施例14:剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞和免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制

[0484] 将细胞接种至FMAT板中。通过将FITC涂覆至BSA制备免疫复合物,之后将其与FITC特异性hIgG1抗体以10:1摩尔比混合。图15-27分别显示了通过克隆1-13介导的剂量依赖性结合hCD32B转染的细胞以及免疫复合物与hCD32B转染的细胞的剂量依赖性结合和抑制。圆圈显示了剂量依赖性结合hCD32A转染的CHO K1细胞,黑色菱形显示剂量依赖性结合hCD32B转染的CHO K1细胞。十字形显示了免疫复合物与hCD32B转染的CHO K1细胞的剂量依赖性抑制。

[0485] 将试验设计成:1)测定mAb的特异性。CD32B和CD32A是相关性非常密切的分子。然而,尽管CD32B传递抑制性信号,但CD32A传递阳性信号,因此抗体仅结合CD32B对于所期望的作用至关重要;2)另外,为了通过CD32B有效阻断信号,抗体不仅必需结合CD32B,而且阻断其天然配体免疫复合物(IC)的结合。因此,图中显示了结合CD32A、CD32B和抑制IC结合。图中表明所有mAb对于CD32B均具有特异性且不结合CD32A,它们均抑制IC结合。

[0486] 实施例15:抗CD32B抗体的细胞特异性

[0487] 使用Ficoll密度梯度制备由外周血分离的PBMC。使用细胞特异性标志物对细胞进行染色,并评价CD32B特异性抗体的结合。如图28所示,克隆1-13仅为B细胞染色阳性(CD19+细胞)。

[0488] 在静息的PBMC中,CD32B仅表达于B细胞,而密切相关的CD32A则表达于单核细胞和中性粒细胞。先前的附图显示了对转染的CHO细胞的特异性。图28显示了抗体还结合表达天然形式的CD32B的B细胞,而它们不对表达CD32A的中性粒细胞或单核细胞染色。因此,该图

是当抗原在正常的非转染PBMC中表达时抗体特异性的证据。

[0489] 实施例16:抗Fc γ RIIb mAb克隆1-13对B细胞的剂量依赖性染色

[0490] 使用Ficoll密度梯度制备由外周血分离的PBMC。使用CD19对细胞进行染色,之后使用10、1或0.1mg/ml CD32B特异性抗体对细胞进行染色。图29显示了各克隆对B细胞的染色如何为剂量依赖性的。

[0491] 在图29中,使用CD19特异性mAb对B细胞(已知表达CD32B)进行门控处理。该门控被称为"M1"。当CD32B mAb的浓度降低时,所染色的B细胞数量由近乎100%下降至低得多的数值,这证明了由CD32B特异性mAb所预期的B细胞的特异性和剂量依赖性染色。

[0492] 这也是抗体特异性的一个证据。如已提及的,CD32A和CD32B极其密切相关,并且获得特异性抗体并非易事。任何特异性抗体均显示剂量依赖性结合,这正是图29中所证实的,即降低抗体剂量由近乎100%(如最高剂量中所观察到的)减少B细胞染色量。因此,该图第二次证明了当抗原在正常非转染的B细胞中表达时的抗体特异性。

[0493] 实施例17:各mAb抑制Fc介导的CD32B磷酸化的能力

[0494] 使用利妥昔单抗处理Raji细胞(CD32B阳性),这导致CD32B磷酸化。这在存在或不存在CD32B特异性mAb的1-13的情况下进行,图30证明了各mAb抑制Fc介导的CD32B磷酸化的能力。

[0495] 实施例17和18后的推定是利妥昔单抗的Fc区结合Fc γ RIIb且这导致Fc γ RIIb激活。这通过Fc γ RIIb的ITIM区的磷酸化来测量。阻断与抗Fc γ RIIb mAb的这种相互作用会阻断磷酸化(图30)和调变(图31和32)。wt Fc γ RIIb IgG1还具有通过其Fc区结合Fc γ RIIb的能力,由此发明人检查了N297Q突变体(具有不结合Fc γ RIIb的Fc)是否也具有相似的活性。其具有相同的活性。

[0496] 实施例18:CD32b对I型抗CD20mAb调变速率的作用

[0497] CD32b促成其他I型抗CD20mAb内化的能力示于图31。将各mAb的Alexa-488标记形式与pCDNA3转染的Ramos或CD32B转染的Ramos细胞一起温育1小时或6小时,然后如前所述测定调变的程度。所使用的mAb为利妥昔单抗(RTX)、内部制备的奥法木单抗(OFA)以及托西莫单抗(Tos)。数据清楚地显示了OFA的内化速率与RTX相似,并被CD32b加速。

[0498] 使用利妥昔单抗(I型抗CD20)观察到这些调变作用,但使用托西莫单抗(II型抗CD20mAb)则不太明显。因此,为了解释这是否扩展至其他抗CD20mAb,发明人检测了另一种临床相关的I型mAb奥法木单抗(Teeling,2004(52)奥法木单抗),与预期相同,其如同利妥昔单抗被快速内化。

[0499] 实施例19:抗CD19mAb也以部分依赖CD32B的方式从恶性人B细胞的细胞表面内化

[0500] Ramos huCD32b转染子。使用其他表面抗原的内化也受到CD32b表达的影响。如先前所述,在存在(+)或不存在(-)使用AT10阻断CD32的情况下,使用不同mAb进行调变测定。在该6小时测定中使用Ramos CD32B转染子。*p<0.05。f3.3=II型MHC;RFB9=CD19;RTX=利妥昔单抗。图32清楚地显示,在与CD32阻断一起温育之后,RTX和RFB9mAb的表面调变显著减少,F3.3的表面调变减少较少。这些数据表明诸如CD19的靶抗原也可以以部分依赖CD32B的方式从恶性人B细胞表面内化,并可被抗CD32b mAb阻断。

[0501] 发明人希望测定非CD20的靶抗原是否也受到Fc γ RIIb表达的影响。因此,发明人检查了针对其他靶抗原(CD19和MHCII)的mAb以及阻断Fc γ RIIb的mAb是否会减少其内化。

数据显示阻断FcγRIIb也减少CD19mAb调变。

[0502] 实施例20:使用其他表面抗原的内化也受到CD32b表达的影响

[0503] Ramos细胞无CD32b,由此证明在不存在CD32B的情况下的内化水平。如果抗原能够被CD32b内化,则表达该抗原(于Ramos-CD32B细胞上)会增加内化水平。

[0504] 将各mAb的Alexa-488标记形式与pCDNA3转染的Ramos细胞或CD32B转染的Ramos细胞一起温育24小时,并如前所述测定调变的程度。*=p<0.05。图33显示了使用其他抗原内化也受到CD32b表达的影响。

[0505] 材料与方法

[0506] 细胞

[0507] 人细胞系(Daudi、Raji、Ramos)获自ECACC,维持在补充有10%胎牛血清(FCS)(Lonza,UK)、谷氨酰胺和丙酮酸盐(二者均来自Invitrogen)的RPMI中,在37℃、5% $CO_2$下培养。缺乏BCR表达的Rx3Ramos细胞为先前所生成(36)。Ramos FcγRIIb转染子和使用空载体转染的对照细胞(FcγRIIb阴性)如先前所述(36),并维持在添加遗传霉素(Invitrogen,UK)的如上所述的补充RPMI中。以相同方式制备和维持使用FcγRIIb和空载体转染的Rx3细胞。使用PE标记的AT10通过流式细胞术测定FcγRIIb表面表达(下文所述)。使用FACS Aria流式细胞仪(BD Biosciences,USA)分选表达低、中或高水平FcγRIIb的Ramos FcγRIIb转染子的细胞群。

[0508] 血液供体

[0509] 正常人B细胞获得自知情同意的健康志愿者。在K2E或LiH抽取外周血,根据制造商的方案使用Lymphoprep(Axis-Shield,UK)分离淋巴细胞,使用人B细胞分离试剂盒II(Miltenyi Biotec,Germany)通过阴性选择分离B细胞。

[0510] 临床样品

[0511] 根据赫尔辛基宣言依照知情同意获得CLL/SLL、FL、DLBCL和MCL样品。使用Lymphoprep在K2E或LiH中收集血液样品,通过无菌筛网分解固体组织并离心。在补充有人AB血清和10% DMSO的RPMI中冷冻保藏细胞,并在人体组织监管局许可下储存于南安普敦大学癌症科学部肿瘤库。南安普敦大学医院国民健康服务信托基金会从南安普敦和西南汉普郡研究伦理委员会获得了使用临床样品的伦理批准。对于CLL细胞,如先前详述测定IgVH基因的突变状态(33)和CD38阳性(44)。简言之,对于IgVH分析,使用VH前导引物混合物和Cμ100引物由cDNA扩增重链基因。将所有核苷酸序列与V-base目录进行比对,并使用98%的截断值测定突变状态。对于CD38分析,使用抗CD38PE(克隆HB7,BD Biosciences)。如Crespo et al.(30)所述进行ZAP-70状态的测定。如先前所述通过流式细胞术测定CLL细胞的表面Ig表达(45,46)。

[0512] 活力测定

[0513] 在如先前所述,使用FITC标记的膜联蛋白V和PI染色之后通过流式细胞术评价细胞的活力(25)。

[0514] 抗体和试剂

[0515] 利妥昔单抗由索斯安普敦综合性医院的肿瘤药学科馈赠。Rit m2a(具有小鼠IgG2aFc区的利妥昔单抗)、WR17(抗CD37)以及所有小鼠IgG2a均如先前所述制备(18)。如先前所述内部制备抗FcγRII mAb(AT10)(47)。托西莫单抗由Prof Tim Illidge

(Manchester,United Kingdom)馈赠。根据专利公布的序列内部制备奥法木单抗和$GA101_{gly}$(具有未修饰的Fc区的糖基化GA101)。NB:这些mAb在CHO或293F细胞中制备,由此可能与所制备用于临床用途的mAb不同(例如在其碳水化合物结构上)。Alexa-488和抗Alexa 488试剂购自Invitrogen。$F(ab')_2$片段的制备如先前所述(48)。通过使用20mM 2-巯基乙醇在25℃温育30分钟之后添加过量的碘乙酰胺生成Fab'片段。所使用的蛋白质印迹抗体为抗肌动蛋白抗体(AC74,Sigma,UK)和抗磷酸-Fcγ RIIb抗体(Cell Signaling Technology,UK)。

[0516] 流式细胞术

[0517] 荧光色素标记的mAb获自BD Biosciences或内部制备。根据制造商的方案使用Alexa488(Invitrogen)偶联mAb。流式细胞术如先前所述(49)。在FACScan(BD Biosciences)或FACSCalibur(BD Biosciences)上评价样品,并使用CellQuest Pro(BD Biosciences)或FCS Express(DeNovo Software,USA)分析数据。使用APC标记的抗人CD19抗体(内部制备)鉴定B细胞,并使用PE标记的AT10(内外制备)测定Fcγ RIIb的表达。为了控制试验间差异,将Fcγ RIIb表达表示为Fcγ RIIb:同种型对照几何平均荧光强度(MFI)之比。

[0518] 内化测定

[0519] 如先前详述进行内化测定(28)。简言之,将2-4x $10^5$个细胞/孔与5μg/ml终浓度的Alexa-488标记的mAb一起温育。在1、2、6和/或24小时之后收集样品,洗涤两次,重悬,并在有或无淬灭抗体抗Alexa-488抗体(Invitrogen)的情况下在4℃与APC标记的抗CD19抗体一起温育30分钟。然后洗涤样品一次,并在流式细胞仪上分析。

[0520] 为了研究细胞结合的抗CD20mAb的Fc区与邻近细胞上的Fcγ RIIb的相互作用,根据制造商的说明书使用PKH26(Sigma Aldrich)标记$Fc\gamma RIIb^{-ve}$的Ramos细胞。然后,将PKH26标记的细胞与相同数量(2.5x $10^5$个细胞)使用Fcγ RIIb转染的Ramos细胞共温育。单独温育两种细胞类型作为对照。然后,如上所述进行内化测定,并与PKH26标记和未标记的细胞群的调变进行比较。在图注中描述了该共温育测定的其他变化。

[0521] 蛋白质印迹

[0522] 其方案如先前所述(36)。简言之,将约2x $10^6$个细胞/孔与mAb(5-10μg/ml)一起温育。然后,通过SDS PAGE分离样品,并将蛋白质立即转移至PVDF膜上。使用5%w/v脱脂乳粉封闭膜,与适当稀释的初级抗体一起温育,洗涤,然后与辣根过氧化物酶偶联的抗兔或抗小鼠IgG(Sigma Aldrich)一起温育,通过增强化学发光(ECL,GE Healthcare,UK or Pierce Biotechnology,UK)显像,并曝光于光敏胶片(Hyperfilm ECL,GE Healthcare,UK)或Biospectrum AC成像系统(UVP,UK)。

[0523] 光学和共焦显微术

[0524] 为了测定抗CD20mAb和Fcγ RIIb的细胞内运输,如图注中所述将CLL细胞与合适的Alexa 488标记的mAb一起温育不同时间,然后收集、洗涤并使用2%多聚甲醛固定细胞。然后对于Fcγ RIIb和LAMP-1的检测,分别将细胞使用0.3%皂苷透化并与Alexa-647标记的$AT10F(ab')_2$(根据制造商的方案使用Alexa Fluor-647标记试剂盒(Invitrogen)进行标记)和/或生物素偶联的抗人CD107a(LAMP-1)抗体(eBioscience,UK)一起温育。然后,洗涤细胞,添加链霉亲和素-Alexa Fluor-547(Invitrogen),之后进一步洗涤。之后,将细胞转移至载玻片,于TCS-SP5激光扫描共聚焦显微镜(Leica Microsystems,UK)(10x目镜,100x

物镜)上使用LAS-AF v2软件捕捉图像

[0525] 为了测定不同细胞稀释度下的细胞邻近情况,以1-20x $10^5$/ml接种细胞,使用不同mAb刺激细胞2小时和/或6小时,然后通过光学显微镜评价其相对邻近情况。使用Olympus CKX21倒置显微镜(Olympus,UK)使用10x或20x/0.25PH透镜观察细胞。使用CCL2冷却数码相机(Olympus)获取图像,并使用Cell B(Olympus Soft成像溶液)和Adobe Photoshop CS2版软件(Adobe,San Jose,CA)加工。

[0526] 数据分析

[0527] 使用GraphPadPrism(GraphPad Software,USA)进行数据分析。使用Wilcoxon配对检验分析成对的非参数数据,同时使用Mann-Whitney检验分析非配对数据。

[0528] 示例组合物、制剂以及施用方式

[0529] 本发明提供了通过给受试者或患者施用有效量本发明药物组合物来治疗、预防以及改善与疾病、病症或感染相关的一种或多种症状的方法。

[0530] 在具体实施方式中,所述受试者或患者为动物,优选哺乳动物,例如非灵长类(如,牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)和灵长类(如,诸如食蟹猴的猴和人)。在一种优选的实施方式中,所述受试者为人。

[0531] 已知多种递送系统,并且可用于施用本发明的组合物,例如,脂质体包裹、微粒、微胶囊、能够表达抗体的重组细胞等。

[0532] 在一些实施方式中,将本发明的组合物配制在脂质体中用于靶向递送本发明的抗体。脂质体为包含同心排列的磷脂双层的囊泡,所述磷脂双层包裹水相。脂质体通常包含多种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂。脂质体的组分以双层结构排列,与生物膜的脂质排列相似。脂质体为特别优选的递送载体,这部分是由于其生物相容性、低免疫原性及低毒性。用于制备脂质体的方法为本领域已知,并包含在本发明范围内,见,例如,Epstein et al,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688;Hwang et al,1980Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030-4;美国专利4,485,045和4,544,545,所有这些文献整体通过引用并入本文。

[0533] 施用本发明组合物的方法包括但不限于胃肠外施用(例如,皮内、肌内、腹腔内、静脉内以及皮下)、硬膜外以及粘膜(例如,鼻内和口腔途径)。在一种具体实施方式中,本发明的组合物通过肌内、静脉内或皮下施用。所述组合物可通过任何方便的途径施用,例如,通过输注或团注,通过上皮或皮肤粘膜内层吸收(例如,口腔粘膜,直肠或肠粘膜等),并且可与其他生物活性剂一起施用。施用可为全身或局部。另外,还可采用肺施用,例如,通过使用吸入器或喷雾器,并与气雾剂一起配制。见,例如,美国专利6,019,968;5,985,309;5,934,272;5,874,064;5,855,913;5,290,540;和4,880,078;以及PCT公布WO 92/19244;WO 97/32572;WO 97/44013;WO 98/31346;以及WO 99/66903,这些文献各自通过引用整体并入本文。

[0534] 有效治疗、预防或改善与病症相关的一种或多种症状的本发明组合物的量可通过标准临床技术来确定。制剂中所应用的精确量还取决于施用途径,疾病严重程度,并且根据医师的诊断和各患者的情况来确定。可由来自自体外或动物模型试验系统的剂量响应曲线来推断有效剂量。

[0535] 对于本发明所包含的抗体,施用于患者的剂量通常为组合物中各抗体独立地为每

kg患者体重0.0001mg至100mg。优选地,施用于患者的各抗体的剂量为每kg患者体重0.0001mg至20mg,0.0001mg至10mg,0.0001mg至5mg,0.0001mg至2mg,0.0001mg至1mg,0.0001mg/kg至0.75mg,0.0001mg至0.5mg,0.0001mg至0.25mg,0.0001mg至0.15mg,0.0001mg至0.10mg,0.001mg至0.5mg至02.5mg,或0.01mg至0.10mg。通常,由于对外源多肽的免疫反应,相对于来自其他物种的抗体,人抗体在人体内具有较长的半衰期。由此,人抗体的较低剂量和较少频率的施用通常是可能的。另外,本发明抗体或其片段的给药剂量和频率可通过修饰(例如脂质化)增强所述抗体的摄取和组织穿透力而减少。

[0536] 在一种实施方式,施用于患者的本发明组合物的各抗体的剂量为每天0.01mg至1000mg。

[0537] 本发明组合物包含本文所述的预防或治疗有效量的试剂和抗体及药学上可接受的载体。

[0538] 在一种具体实施方式中,术语“药学可接受的”表示得到管理机构批准或在美国药典中或其他通常认可的药典中所列举的用于动物和更特别地用于人的。术语“载体”是指施用治疗剂的稀释剂、佐剂(例如福氏完全和不完全佐剂)、赋形剂或载体。这样的药物载体可为无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用所述药物组合物时,水为优选的载体。盐水溶液和含水右旋糖和甘油溶液也可作为液体载体来应用,特别是用于注射液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,所述组合物还可含有小量的增湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。这些组合物可采用溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、缓释剂等形式。

[0539] 在多种实施方式中,抗体和试剂的施用可同时进行或间隔小于1小时、间隔约1小时、间隔约1小时至约2小时、间隔约2小时至约3小时、间隔约3小时至约4小时、间隔约4小时至约5小时、间隔约5小时至约6小时、间隔约6小时至约7小时、间隔约7小时至约8小时、间隔约8小时至约9小时、间隔约9小时至约10小时、间隔约10小时至约100小时、间隔约11小时至约12小时、间隔不到24小时或间隔不到48小时。在优选的实施方式中,在相同的患者就诊中施用两种或多种组分。

[0540] 治疗有效和预防有效涵盖本发明提供的施用剂量和频率。剂量和频率通常进一步根据各患者特有的因素而不同,这取决于所施用的特定治疗剂剂或预防剂,疾病严重程度和类型、施用途径以及患者年龄、体重、响应以及既往病史。本领域技术人员可通过考虑这些因素和例如文献中报道和在医师案头参考(第56版,2002)中所推荐的剂量来选择合适的方案。

[0541] 总结

[0542] 最近,发明人发现象利妥昔单抗的I型mAb由人CD20Tg小鼠B细胞(体外和体内)和由某些衍生自患有NHL的患者的原发肿瘤细胞调变,由此限制了其招募效应细胞和耗竭靶细胞的能力(28)。发明人考虑了解释利妥昔单抗和其他I型CD20mAb的治疗活性受到限制的可能机制,并提供了阻断或避免该过程并由此开发更具效力的药剂的机会,这一点尤为重要。本发明提供了由利妥昔单抗和奥法木单抗诱导的CD20调变的分子理论。Fc γ RIIb表达将为对I型抗CD20mAb的响应提供重要的预后标志物。当将原代CLL/SLL细胞与I型抗

CD20mAb一起温育时,观察到重要但异质的CD20调变,并且该异质性可能与已知的CLL的预后因子无关。其他B-NHL亚型的分析表明,MCL表现出与CLL相似的异质性调变,但FL且特别是DLBCL显示显著较少的调变。基于这些结果,发明人在此报道了这些恶性肿瘤中的Fc γ RIIb表达水平和它们在6小时温育中进行的调变之间的相关性。另外,发明人提出,该调变可解释在这些疾病中观察到的响应利妥昔单抗的某些异质性。在利妥昔单抗被确立为联合化疗的一线治疗的DLBCL和FL中,利妥昔单抗被证明最有益。相比之下,较难证明使用利妥昔单抗改进CLL中的总体存活率,并且其在MCL中的益处甚至更小。由此,总体上发现,表达Fc γ RIIb的B细胞恶性肿瘤更可能调变CD20,并往往导致从利妥昔单抗治疗中获得的益处减少。然而,甚至在DLBCL和FL中,某些病例并不响应利妥昔单抗。作为实例,转化的FL病例通常对于治疗响应差,并且表达Fc γ RIIb(21),该观察与发明人自身的观察结果,即高Fc γ RIIb表达样品之一(图2C)被鉴定为FL且表现相应的高速率调变,相一致。尽管是单病例的发现,发明人认为这可潜在提供解决利妥昔单抗抗药的重要方式。

[0543] CD20调变显示与Fc γ RIIb表达水平的强相关性,而无论B-NHL疾病亚型如何。之前提出,Fc γ RIIb可能通过与效应细胞上的激活性Fc受体竞争而抑制细胞毒性信号传导,由此抑制治疗性mAb功效(40)。本发明的体外研究表明,利妥昔单抗主要交联相同细胞上的CD20和Fc γ RIIb,导致Fc γ RIIb激活,以及两种表面抗原与所结合的mAb一起快速成对内化至溶酶体中进行降解。Fc γ RIIb的表达通过其下调靶细胞上mAb的表面表达的能力而导致效应细胞招募减少。

[0544] 本发明还显示,与阻断性抗Fc γ RIIb mAb共温育能够抑制Fc γ RIIb激活和利妥昔单抗快速内化。总之,这些数据证实了Fc γ RIIb激活和mAb由细胞表面内化之间的正相关性。

[0545] 不同B-NHL亚型中I型抗CD20mAb诱导的CD20调变与Fc γ RIIb表达之间的强相关性连同本发明的转染研究表明,Fc γ RIIb是CD20调变的关键调节剂。

[0546] 其他小组研究了Fc γ RIIb在淋巴瘤中的作用。Camilleri-Broet et al(20)未能显示在DLBCL中R-CHOP响应和Fc γ RIIb表达之间的显著相关性,然而,早期系列中研究中通过免疫组织化学方法测定认为仅18%(42/234病例)为Fc γ RIIb阳性(21)。考虑到相对低的阳性率,阳性病例数很可能不足以检测到差异。并非过表达,Weng和Levy(24)研究了两个Fc γ RIIb等位基因(232I等位基因,在自身免疫性疾病中对于BCR介导的钙调节比232T更有效(22,23))是否与利妥昔单抗功效相关,但未能证明FL患者中该多形性与单剂治疗响应之间的任何相关性。这些作者自身所考虑的主要问题是仅17名患者具有232T等位基因,再次限制了研究的统计学效力。另外,所研究的多形性反映了自身免疫性疾病中BCR抑制的效率,所公布的观察结果均未表明这些多形性在淋巴瘤中是相关的或影响人IgG1的Fc结合。通过其调节内化速率的能力,Fc γ RIIb表达将成为使用I型mAb(包括利妥昔单抗和奥法木单抗)的免疫治疗成功的重要预后标志物。当进行II型mAb治疗时,效果较不显著。

[0547] 另外,本发明在不同体内模型中,发明人证明了CD32限制mAb功效的能力及抗CD32b mAb克服该限制性并增强利妥昔单抗治疗能力。

[0548] 参考文献

[0549] 1.Feugier,P.,Van Hoof,A.,Sebban,C.,Solal-Celigny,P.,Bouabdallah,R.,Ferme,C.,Christian,B.,Lepage,E.,Tilly,H.,Morschhauser,F.,et al.2005.Long-term

results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma:astudy by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte.J Clin Oncol 23:4117-4126.

[0550] 2.Sehn,L.H.,Donaldson,J.,Chhanabhai,M.,Fitzgerald,C.,Gill,K.,Klasa,R.,MacPherson,N.,O'Reilly,S.,Spinelli,J.J.,Sutherland,J.,et al.2005.Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia.J Clin Oncol 23:5027-5033.

[0551] 3.Marcus,R.,Imrie,K.,Belch,A.,Cunningham,D.,Flores,E.,Catalano,J.,Solal-Celigny,P.,Offner,F.,Walewski,J.,Raposo,J.,et al.2005.CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma.Blood105:1417-1423.

[0552] 4.Marcus,R.,Imrie,K.,Solal-Celigny,P.,Catalano,J.V.,Dmoszynska,A.,Raposo,J.C.,Offner,F.C.,Gomez-Codina,J.,Belch,A.,Cunningham,D.,et al.2008.Phase III study ofR-CVP compared with cyclophosphamide,vincristine,and prednisone alone in patients withpreviously untreated advanced follicular lymphoma.J Clin Oncol 26:4579-4586.

[0553] 5.Lenz,G.,Dreyling,M.,Hoster,E.,Wormann,B.,Duhrsen,U.,Metzner,B.,Eimermacher,H.,Neubauer,A.,Wandt,H.,Steinhauer,H.,et al.2005.Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide,doxorubicin,vincristine,andprednisone significantly improves response and time to treatment failure,but not long-termoutcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma:results of a prospectiverandomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group(GLSG).J Clin Oncol23:1984-1992.

[0554] 6.Kharfan-Dabaja,M.A.,Fahed,R.,Hussein,M.,and Santos,E.S.2007.Evolving role ofmonoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia.Expert OpinInvestig Drugs 16:1799-1815.

[0555] 7.Stolz,C.,and Schuler,M.2009.Molecular mechanisms of resistance to Rituximab andpharmacologic strategies for its circumvention.Leuk Lymphoma 50:873-885.

[0556] 8.Davis,T.A.,Czerwinski,D.K.,and Levy,R.1999.Therapy of B-cell lymphoma withanti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression.Clin Cancer Res5:611-615.

[0557] 9.Michel,R.B.,and Mattes,M.J.2002.Intracellular accumulation of the anti-CD20antibody 1F5 in B-lymphoma cells.Clin Cancer Res 8:2701-2713.

[0558] 10.Hiraga,J.,Tomita,A.,Sugimoto,T.,Shimada,K.,Ito,M.,Nakamura,S.,Kiyoi,H.,Kinoshita,T.,and Naoe,T.2009.Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphomacells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies:its prevalenceand clinical significance.Blood 113:4885-4893.

[0559] 11.Treon,S.P.,Mitsiades,C.,Mitsiades,N.,Young,G.,Doss,D.,Schlossman,R.,andAnderson,K.C.2001.Tumor Cell Expression of CD59 Is Associated With Resistance toCD20 Serotherapy in Patients With B-Cell Malignancies.J Immunother(1991)24:263-271.12.Golay,J.,Lazzari,M.,Facchinetti,V.,Bernasconi,S.,Borleri,G.,Barbui,T.,Rambaldi,A.,and Introna,M.2001.CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab andcomplement of B-cell chronic lymphocytic leukemia:further regulation by CD55 and CD59.Blood 98:3383-3389.

[0560] 13.Jazirehi,A.R.,Vega,M.I.,and Bonavida,B.2007.Development of rituximab-resistantlymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy.CancerRes 67:1270-1281.

[0561] 14.Weng,W.K.,and Levy,R.2003.Two immunoglobulin G fragment C receptorpolymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicularlymphoma.J Clin Oncol 21:3940-3947.

[0562] 15.Clynes,R.A.,Towers,T.L.,Presta,L.G.,and Ravetch,J.V.2000.Inhibitory Fc receptorsmodulate in vivo cytoxicity against tumor targets.Nat Med 6:443-446.

[0563] 16.Uchida,J.,Hamaguchi,Y.,Oliver,J.A.,Ravetch,J.V.,Poe,J.C.,Haas,K.M.,and Tedder,T.F.2004.The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fcreceptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy.J Exp Med199:1659-1669.

[0564] 17.Nimmerjahn,F.,and Ravetch,J.V.2007.Antibodies,Fc receptors and cancer.Curr OpinImmunol 19:239-245.

[0565] 18.Beers,S.A.,Chan,C.H.,James,S.,French,R.R.,Attfield,K.E.,Brennan,C.M.,Ahuja,A.,Shlomchik,M.J.,Cragg,M.S.,and Glennie,M.J.2008.Type II (tositumomab)anti-CD20monoclonal antibody out performs type I(rituximab-like) reagents in B-cell depletionregardless of complement activation.Blood 112:4170-4177.

[0566] 19.Mossner,E.,Brunker,P.,Moser,S.,Puntener,U.,Schmidt,C.,Herter,S.,Grau,R.,Gerdes,C.,Nopora,A.,van Puijenbroek,E.,et al.Increasing the efficacy of CD20 antibodytherapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct-and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity.Blood.

[0567] 20.Camilleri-Broet,S.,Mounier,N.,Delmer,A.,Briere,J.,Casasnovas,O.,Cassard,L.,Gaulard,P.,Christian,B.,Coiffier,B.,and Sautes-Fridman,C.2004.FcgammaRIIBexpression in diffuse large B-cell lymphomas does not alter the response to CHOP+rituximab(R-CHOP).Leukemia 18:2038-2040.

[0568] 21.Camilleri-Broet,S.,Cassard,L.,Broet,P.,Delmer,A.,Le Touneau,A.,Diebold,J.,Fridman,W.H.,Molina,T.J.,and Sautes-Fridman,C.2004.FcgammaRIIB is differentiallyexpressed during B cell maturation and in B-cell lymphomas.Br J

Haematol 124:55-62.

[0569] 22.Li,X.,Wu,J.,Carter,R.H.,Edberg,J.C.,Su,K.,Cooper,G.S.,and Kimberly,R.P.2003.A novel polymorphism in the Fcgamma receptor IIB(CD32B) transmembrane region altersreceptor signaling.Arthritis Rheum 48:3242-3252.

[0570] 23.Kono,H.,Kyogoku,C.,Suzuki,T.,Tsuchiya,N.,Honda,H.,Yamamoto,K., Tokunaga,K.,and Honda,Z.2005.FcgammaRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associatedwith human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuatesinhibitory effects on B cell receptor signaling.Hum Mol Genet 14:2881-2892.

[0571] 24.Weng,W.K.,and Levy,R.2009.Genetic polymorphism of the inhibitory IgG Fcreceptor FcgammaRIIb is not associated with clinical outcome in patients with follicularlymphoma treated with rituximab.Leuk Lymphoma 50:723-727.

[0572] 25.Chan,H.T.,Hughes,D.,French,R.R.,Tutt,A.L.,Walshe,C.A.,Teeling, J.L.,Glennie,M.J.,and Cragg,M.S.2003.CD20-induced lymphoma cell death is independent of bothcaspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts.Cancer Res63:5480-5489.

[0573] 26.Cragg,M.S.,and Glennie,M.J.2004.Antibody specificity controls in vivo effectormechanisms of anti-CD20 reagents.Blood 103:2738-2743.

[0574] 27.Ivanov,A.,Beers,S.A.,Walshe,C.A.,Honeychurch,J.,Alduaij,W.,Cox, K.L.,Potter,K.N.,Murray,S.,Chan,C.H.,Klymenko,T.,et al.2009.Monoclonal antibodies directed toCD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell deathin human lymphoma and leukemia cells.J Clin Invest 119:2143-2159.

[0575] 28.Beers,S.A.,French,R.R.,Chan,H.T.,Lim,S.H.,Jarrett,J.C.,Vidal,R.M., Wijayaweera,S.S.,Dixon,S.V.,Kim,H.J.,Cox,K.L.,et al.2010.Antigenic modulation limits the efficacyof anti-CD20 antibodies.Blood:In press.

[0576] 29.Wiestner,A.,Rosenwald,A.,Barry,T.S.,Wright,G.,Davis,R.E., Henrickson,S.E.,Zhao,H.,Ibbotson,R.E.,Orchard,J.A.,Davis,Z.,et al.2003.ZAP-70 expression identifies achronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes,inferiorclinical outcome,and distinct gene expression profile.Blood 101:4944-4951.

[0577] 30.Crespo,M.,Bosch,F.,Villamor,N.,Bellosillo,B.,Colomer,D.,Rozman,M., Marce,S.,Lopez-Guillermo,A.,Campo,E.,and Montserrat,E.2003.ZAP-70 expression as a surrogatefor immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia.N Engl JMed 348:1764-1775.

[0578] 31.Damle,R.N.,Wasil,T.,Fais,F.,Ghiotto,F.,Valetto,A.,Allen,S.L., Buchbinder,A.,Budman,D.,Dittmar,K.,Kolitz,J.,et al.1999.Ig V gene mutation status and CD38expression as novel prognostic indicators in chronic

lymphocytic leukemia.Blood94:1840-1847.

[0579] 32.Ibrahim,S.,Keating,M.,Do,K.A.,O'Brien,S.,Huh,Y.O.,Jilani,I.,Lerner,S.,Kantarjian,H.M.,and Albitar,M.2001.CD38 expression as an important prognostic factorin B-cell chronic lymphocytic leukemia.Blood 98:181-186.

[0580] 33.Hamblin,T.J.,Davis,Z.,Gardiner,A.,Oscier,D.G.,and Stevenson,F.K.1999.Unmutated Ig V(H)genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocyticleukemia.Blood 94:1848-1854.

[0581] 34.Krober,A.,Seiler,T.,Benner,A.,Bullinger,L.,Bruckle,E.,Lichter,P.,Dohner,H.,andStilgenbauer,S.2002.V(H)mutation status,CD38 expression level,genomic aberrations,and survival in chronic lymphocytic leukemia.Blood 100:1410-1416.

[0582] 35.Ravetch,J.V.,and Bolland,S.2001.IgG Fc receptors.Annu Rev Immunol 19:275-290.36.Walshe,C.A.,Beers,S.A.,French,R.R.,Chan,C.H.,Johnson,P.W.,Packham,G.K.,Glennie,M.J.,and Cragg,M.S.2008.Induction of cytosolic calcium flux by CD20 isdependent upon B Cell antigen receptor signaling.J Biol Chem 283:16971-16984.

[0583] 37.Polyak,M.J.,Li,H.,Shariat,N.,and Deans,J.P.2008.CD20 homo-oligomers physicallyassociate with the B cell antigen receptor.Dissociation upon receptor engagement andrecruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins.J Biol Chem283:18545-18552.

[0584] 38.Ternynck,T.,Dighiero,G.,Follezou,J.,and Binet,J.L.1974.Comparison of normal andCLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies.I.Detectionand quantitation of light chain determinants.Blood 43:789-795.

[0585] 39.Robak,T.,Dmoszynska,A.,Solal-Celigny,P.,Warzocha,K.,Loscertales,J.,Catalano,J.,Afanasiev,B.V.,Larratt,L.,Geisler,C.H.,Montillo,M.,et al.Rituximab Plus Fludarabineand Cyclophosphamide Prolongs Progression-Free Survival Compared With Fludarabine andCyclophosphamide Alone in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia.J ClinOncol.

[0586] 40.Fridman,W.H.,Teillaud,J.L.,Bouchard,C.,Teillaud,C.,Astier,A.,Tartour,E.,Galon,J.,Mathiot,C.,and Sautes,C.1993.Soluble Fc gamma receptors.J Leukoc Biol 54:504-512.41.Nimmerjahn,F.,and Ravetch,J.V.2008.Fcgamma receptors as regulators of immuneresponses.Nat Rev Immunol 8:34-47.

[0587] 42.Aman,M.J.,Tosello-Trampont,A.C.,and Ravichandran,K.2001.Fc gammaRIIB1/SHIP-mediated inhibitory signaling in B cells involves lipid rafts.J Biol Chem276:46371-46378.

[0588] 43.Cragg,M.S.,Morgan,S.M.,Chan,H.T.,Morgan,B.P.,Filatov,A.V.,Johnson,P.W.,French,R.R.,and Glennie,M.J.2003.Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAbcorrelates with segregation into lipid rafts.Blood 101:1045-1052.

[0589] 44.Hamblin,T.J.,Orchard,J.A.,Ibbotson,R.E.,Davis,Z.,Thomas,P.W.,Stevenson,F.K.,and Oscier,D.G.2002.CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations areindependent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia,but CD38 expression mayvary during the course of the disease.Blood 99:1023-1029.

[0590] 45.Mockridge,C.I.,Potter,K.N.,Wheatley,I.,Neville,L.A.,Packham,G.,and Stevenson,F.K.2007.Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL definedby VH-gene mutational status.Blood 109:4424-4431.

[0591] 46.Potter,K.N.,Mockridge,C.I.,Neville,L.,Wheatley,I.,Schenk,M.,Orchard,J.,Duncombe,A.S.,Packham,G.,and Stevenson,F.K.2006.Structural and functional featuresof the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia.Clin Cancer Res12:1672-1679.

[0592] 47.Greenman,J.,Tutt,A.L.,George,A.J.,Pulford,K.A.,Stevenson,G.T.,and Glennie,M.J.1991.Characterization of a new monoclonal anti-Fc gamma RII antibody,AT10,and itsincorporation into a bispecific F(ab')2 derivative for recruitment of cytotoxic effectors.MolImmunol 28:1243-1254.

[0593] 48.Glennie,M.J.,McBride,H.M.,Worth,A.T.,and Stevenson,G.T.1987.Preparation andperformance of bispecific F(ab'gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab'gammafragments.J Immunol 139:2367-2375.

[0594] 49.Tutt,A.L.,French,R.R.,Illidge,T.M.,Honeychurch,J.,McBride,H.M.,Penfold,C.A.,Fearon,D.T.,Parkhouse,R.M.,Klaus,G.G.,and Glennie,M.J.1998.Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma:signaling activity on tumor cells appears more important than recruitment of effectors.J Immunol 161:3176-3185.

[0595] 50.Beer,S.A.et al.2010.Seminars in Haematology 47(2):第07-114页。

[0596] 51.Niederfellner,G et al.2011.Blood 118,358-367.

[0597] 52.Teeling,J.L.2004.Blood 104,1793-1800.

序列表

<110> 南安普敦大学(University Of Southampton)
<120> FcγRIIB(CD32B)和CD20特异性抗体的组合应用

<130> BIOBX/P49525PC

<140> PCT/GB2011/051572
<141> 19/08/2011

<150> GB1013989.7
<151> 20/08/2010

<160> 106

<170> SeqWin99

<210> 1
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CH区

[0001] <400> 1

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140
```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

[0002]

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 2
<211> 105
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CL区

<400> 2
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 3
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 VH区

<400> 3
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

[0003]

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Trp Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 VH区

<400> 4

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 117
[0004] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆3 VH区

<400> 5
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Trp Asn Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 VH区

<400> 6
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0005]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Val Ile Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆5 VH区

<400> 7
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gln Leu Gly Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 VH区

<400> 8
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0006]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Gly Asp Ile Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 克隆7 VH区

<400> 9
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Arg Arg Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

[0007]

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 VH区

<400> 10
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Ala Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 VH区

<400> 11
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ala Ile Ile Asp Tyr Ala Gly Ser Val
50 55 60

[0008]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Glu Ala Ala Ala Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆10 VH区

<400> 12
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Leu Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 VH区

[0009] <400> 13
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Phe Gly Tyr Ile Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 117
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆12 VH区

<400> 14
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn His
20 25 30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Thr Trp Asp Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

[0010]

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆13 VH区

<400> 15
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Ser Val Gly Ala Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 VL区

<400> 16
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

[0011]

Leu Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 VL区

<400> 17
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Thr Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Val Ser Gly Trp Met Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆3 VL区

[0012]

<400> 18
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 19
<211> 110

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 VL区

<400> 19
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn
85 90 95

Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

[0013]

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆5 VL区

<400> 20
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 VL区

<400> 21
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Glu Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

[0014]
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 22
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆7 VL区

<400> 22
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Ser Asp
85 90 95

Thr Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 23
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 VL区

<400> 23
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

[0015]

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

Ile Tyr Gly Asn Ser Ile Arg Pro Ser Gly Gly Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Ser Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 VL区

<400> 24
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asp Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 25
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

[0016]
<220>
<223> 克隆10 VL区

<400> 25
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Asp Asp His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Gln Arg Ala Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 26
<211> 111

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 VL区

<400> 26
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asp Tyr Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

[0017]

<210> 27
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆12 VL区

<400> 27
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆13 VL区

<400> 28
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

[0018]

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 CDRH1

<400> 29
Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 CDRH2

<400> 30
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 CDRH3

<400> 31
Glu Trp Arg Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 CDRL1

[0019]

<400> 32
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 CDRL2

<400> 33
Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆1 CDRL3

<400> 34
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Ser Trp Val

1 5 10

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 CDRH1

<400> 35
Thr Tyr Gly Met His
1 5

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 CDRH2

<400> 36
Val Ile Ala Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0020]

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 CDRH3

<400> 37
Glu Tyr Arg Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 38
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 CDRL1

<400> 38
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 39

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 CDRL2

<400> 39
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆2 CDRL3

<400> 40
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Val Ser Gly Trp Met
1 5 10

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

[0021]

<220>
<223> 克隆3 CDRH1

<400> 41
Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆3 CDRH2

<400> 42
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆3 CDRH3

<400> 43
Asp Arg Trp Asn Gly Met Asp Val
1 5

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆3 CDRL1

<400> 44
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆3 CDRL2

[0022]

<400> 45
Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆3 CDRL3

<400> 46
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Trp Val
1 5 10

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 CDRH1

<400> 47
Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 CDRH2

<400> 48
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 CDRH3

<400> 49
[0023] Asp His Ser Val Ile Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 CDRL1

<400> 50
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 CDRL2

<400> 51
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 52

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆4 CDRL3

<400> 52
Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Asn Asn Val Val
1 5 10

<210> 53
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆5 CDRH1

<400> 53
Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0024]

<220>
<223> 克隆5 CDRH2

<400> 54
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆5 CDRH3

<400> 55
Asp Gln Leu Gly Glu Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆5 CDRL1

<400> 56
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆5 CDRL2

<400> 57
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆5 CDRL3

[0025]

<400> 58
Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
1 5 10

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 CDRH1

<400> 59
Asp Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 CDRH2

<400> 60
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 CDRH3

<400> 61
Gly Asp Ile Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 CDRL1

<400> 62
[0026] Thr Gly Ser Ser Ser Asn Phe Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 CDRL2

<400> 63
Glu Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆6 CDRL3

<400> 64
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 65

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆7 CDRH1

<400> 65
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆7 CDRH2

<400> 66
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0027]

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆7 CDRH3

<400> 67
Glu Arg Arg Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆7 CDRL1

<400> 68
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆7 CDRL2

<400> 69
Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆7 CDRL3

<400> 70
Ala Thr Trp Asp Ser Asp Thr Pro Val
1 5

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 CDRH1

[0028]

<400> 71
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 CDRH2

<400> 72
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 CDRH3

<400> 73
Asp His Ser Ala Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 CDRL1

<400> 74
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 CDRL2

<400> 75
Gly Asn Ser Ile Arg Pro Ser
[0029] 1 5

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆8 CDRL3

<400> 76
Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ser Pro Val
1 5 10

<210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 CDRH1

<400> 77
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 78

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 CDRH2

<400> 78
Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ala Ile Ile Asp Tyr Ala Gly Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 CDRH3

<400> 79
Asp Glu Ala Ala Ala Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

[0030]

<210> 80
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 CDRL1

<400> 80
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 CDRL2

<400> 81
Gly Asn Thr Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆9 CDRL3

<400> 82
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val Val
1 5 10

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆10 CDRH1

<400> 83
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆10 CDRH2

[0031]

<400> 84
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆10 CDRH3

<400> 85
Glu Leu Tyr Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 86
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆10 CDRL1

<400> 86
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆10 CDRL2

<400> 87
Ala Asp Asp His Arg Pro Ser
1 5

<210> 88
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆10 CDRL3

<400> 88
Ala Ser Trp Asp Asp Ser Gln Arg Ala Val Ile
[0032] 1 5 10

<210> 89
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 CDRH1

<400> 89
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 CDRH2

<400> 90
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 91
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 CDRH3

<400> 91
Glu Phe Gly Tyr Ile Ile Leu Asp Tyr
1 5

<210> 92
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 CDRL1

<400> 92
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

[0033]

<210> 93
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 CDRL2

<400> 93
Arg Asp Tyr Glu Arg Pro Ser
1 5

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆11 CDRL3

<400> 94
Met Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val
1 5 10

<210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆12 CDRH1

<400> 95
Asn His Gly Met His
1 5

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆12 CDRH2

<400> 96
Val Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 97
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

[0034]

<220>
<223> 克隆12 CDRH3

<400> 97
Glu Thr Trp Asp Ala Phe Asp Val
1 5

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆12 CDRL1

<400> 98
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asn Ala Asn
1 5 10

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆12 CDRL2

<400> 99
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆12 CDRL3

<400> 100
Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Val Val
1 5

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆13 CDRH1

<400> 101
Ser Tyr Gly Ile Ser
[0035] 1 5

<210> 102
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆13 CDRH2

<400> 102
Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆13 CDRH3

<400> 103
Ser Val Gly Ala Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 104
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆13 CDRL1

<400> 104
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 105
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0036]

<220>
<223> 克隆13 CDRL2

<400> 105
Gly Asp Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆13 CDRL3

<400> 106
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

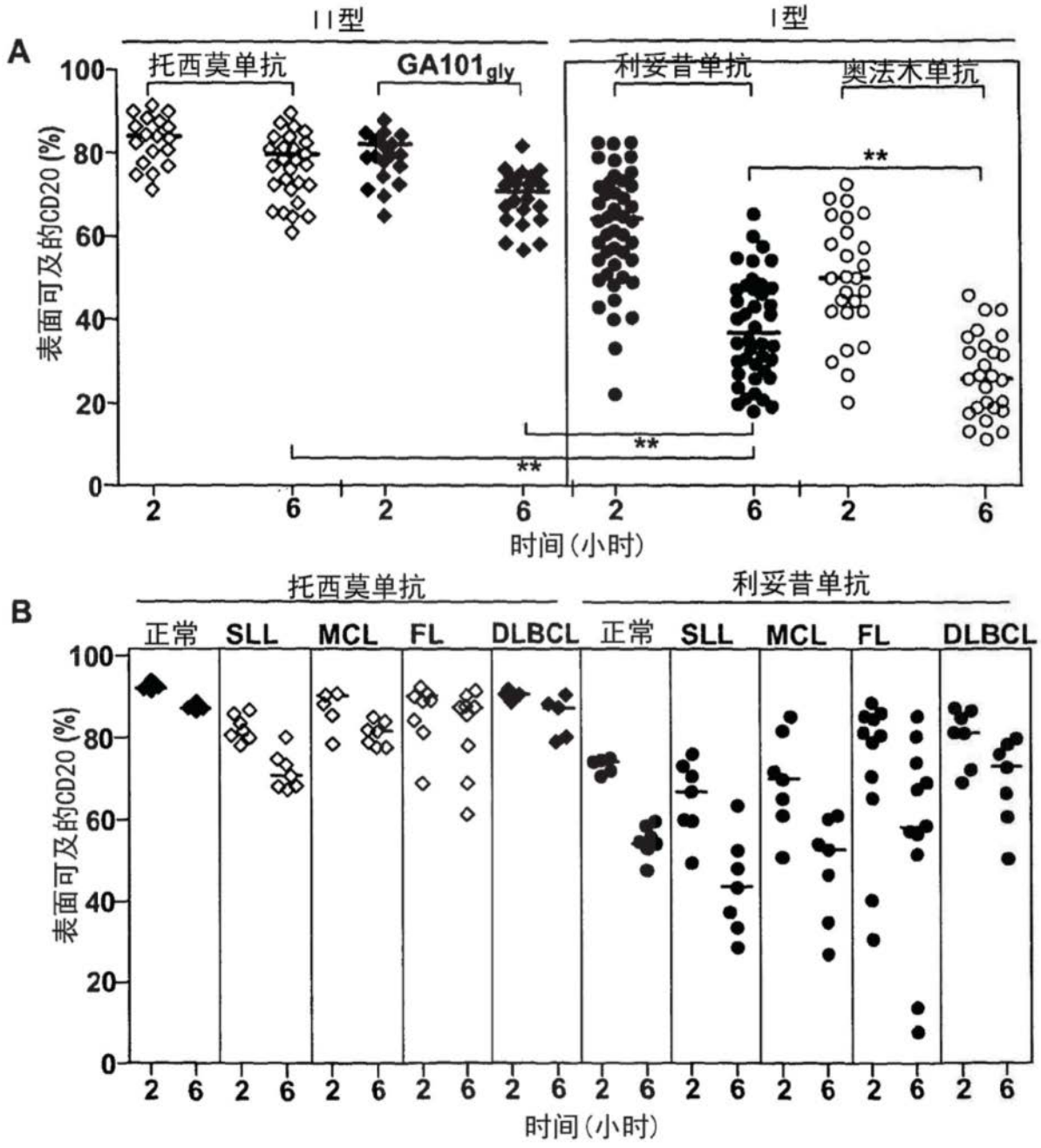

A
II型
I型
托西莫单抗
GA101gly
利妥昔单抗
奥法木单抗
表面可及的CD20 (%)
时间(小时)
**
B
托西莫单抗
利妥昔单抗
正常
SLL
MCL
FL
DLBCL
表面可及的CD20 (%)
时间(小时)

图1

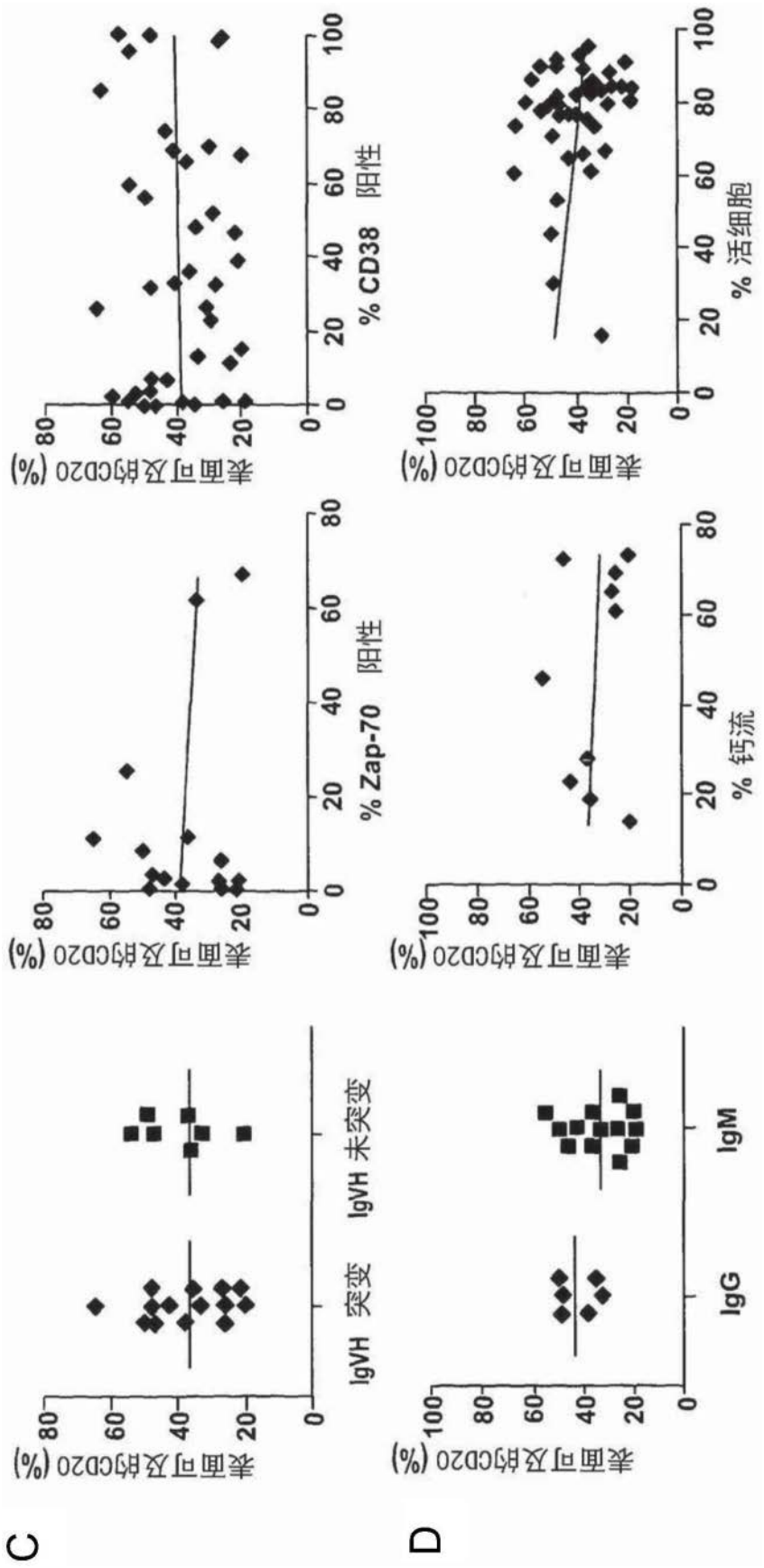



图1(续)

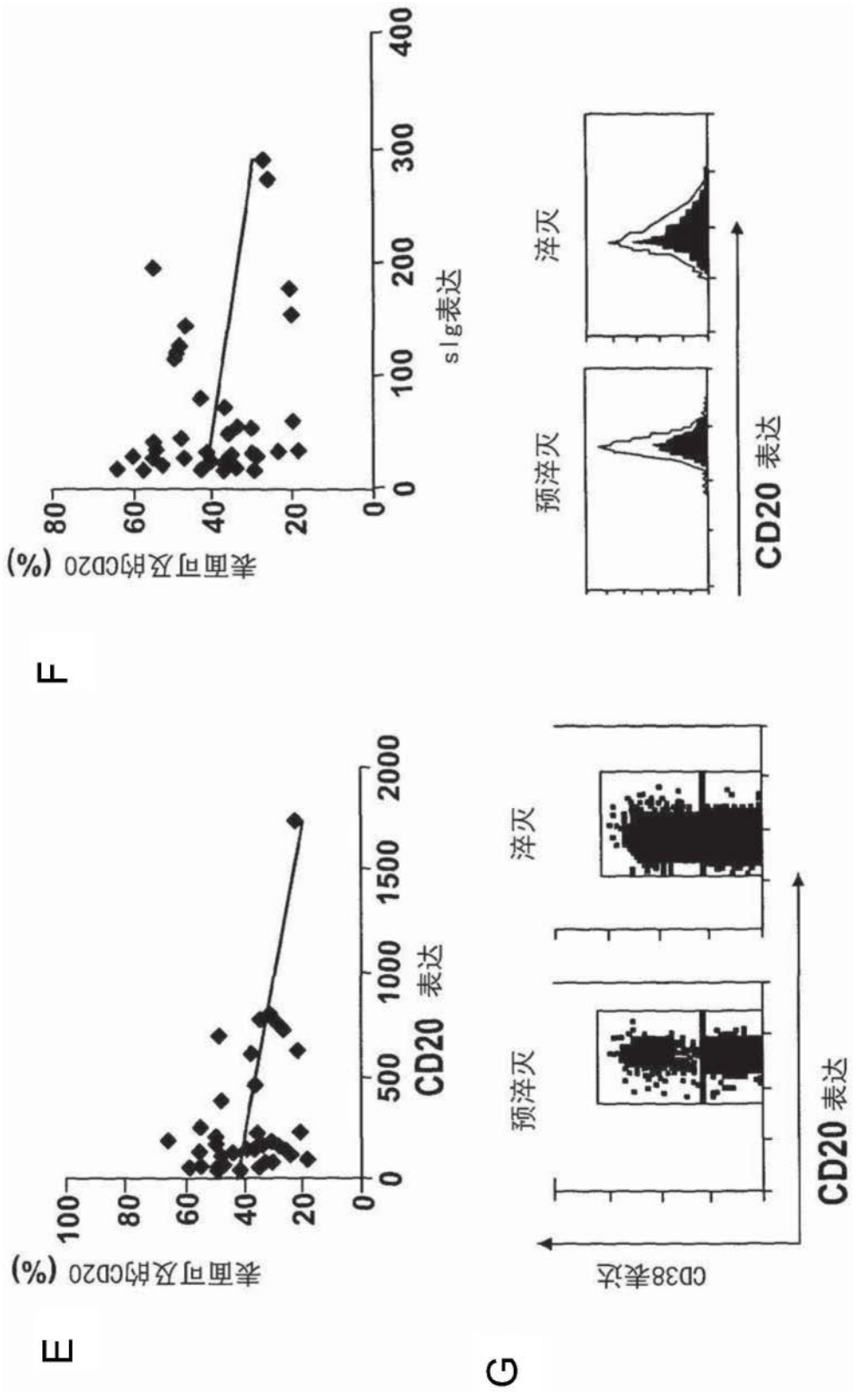

E
表面可及的CD20 (%)
0
20
40
60
80
100
0
500
1000
1500
2000
CD20 表达
F
表面可及的CD20 (%)
0
20
40
60
80
0
100
200
300
400
slg表达
G
CD38表达
预淬灭
淬灭
CD20 表达
预淬灭
淬灭
CD20 表达

图1(续)

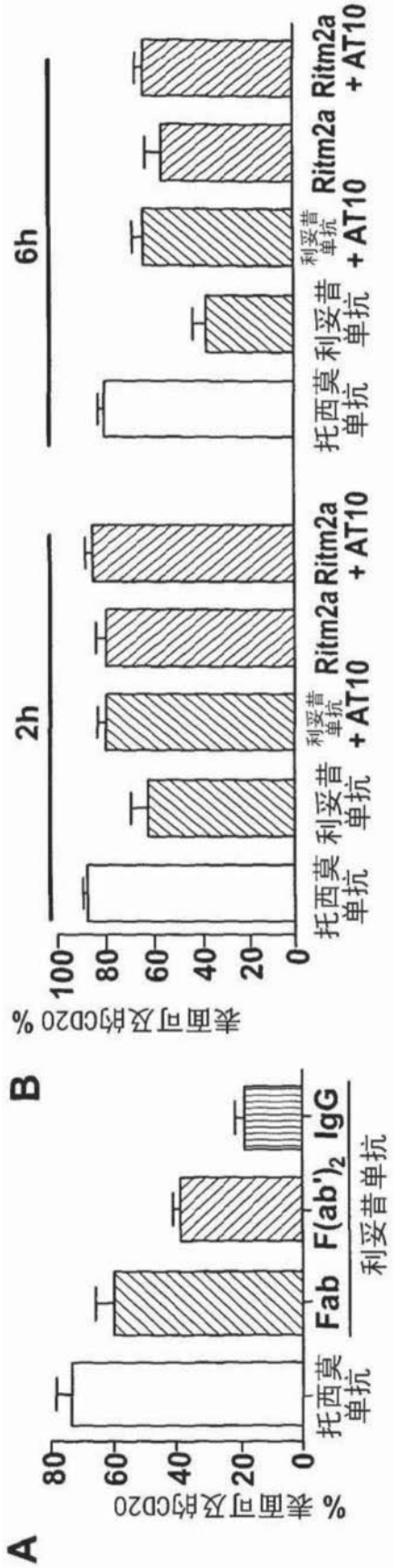

A
% 表面可及的CD20
80
60
40
20
0
托西莫单抗
Fab
F(ab')2
IgG
利妥昔单抗
B
表面可及的CD20 %
100
80
60
40
20
0
2h
6h
托西莫单抗
利妥昔单抗
利妥昔单抗 + AT10
Ritm2a
Ritm2a + AT10

图2

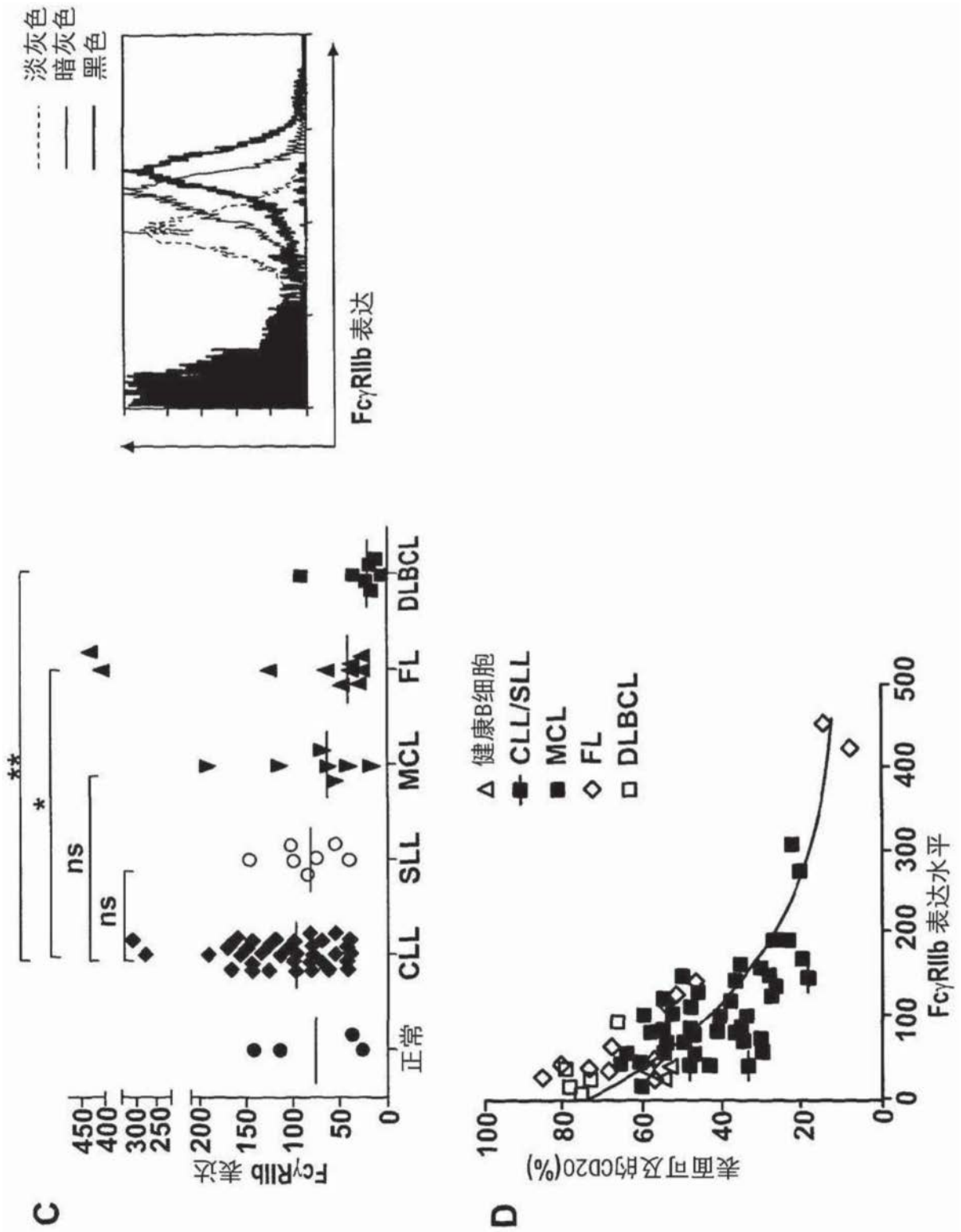

淡灰色
暗灰色
黑色
FcγRIIb 表达
C
FcγRIIb 表达
450
400
300
250
200
150
100
50
0
ns
ns
*
**
正常
CLL
SLL
MCL
FL
DLBCL
D
健康B细胞
CLL/SLL
MCL
FL
DLBCL
表面可及的CD20(%)
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
500
FcγRIIb 表达水平

图2(续)

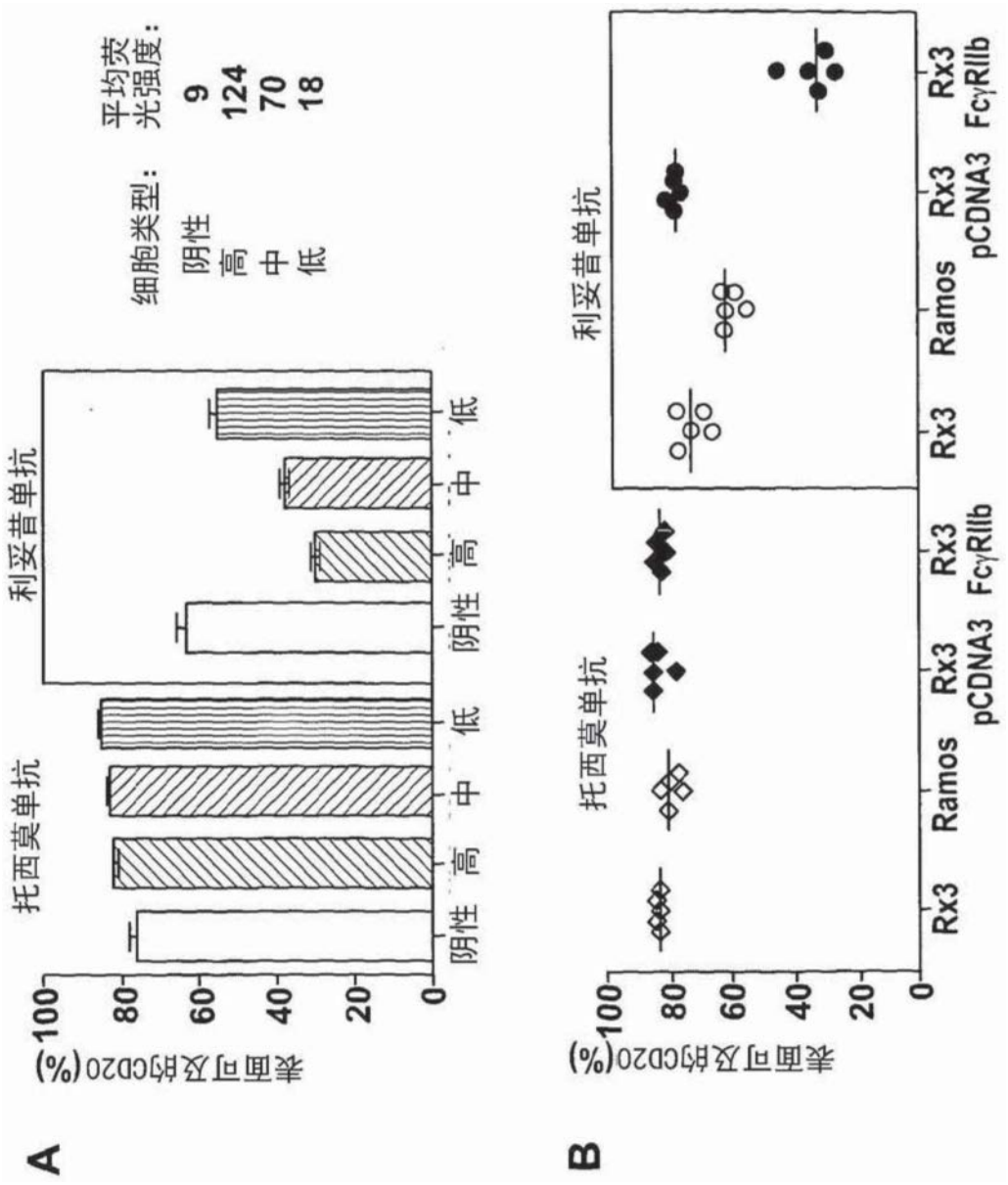

A
表面可及的CD20(%)
100
80
60
40
20
0
托西莫单抗
利妥昔单抗
阴性 高 中 低 阴性 高 中 低
细胞类型:
平均荧光强度:
阴性 9
高 124
中 70
低 18
B
表面可及的CD20(%)
托西莫单抗
利妥昔单抗
Rx3 Ramos Rx3 pCDNA3 Rx3 FcγRIIb Rx3 Ramos Rx3 pCDNA3 Rx3 FcγRIIb

图3

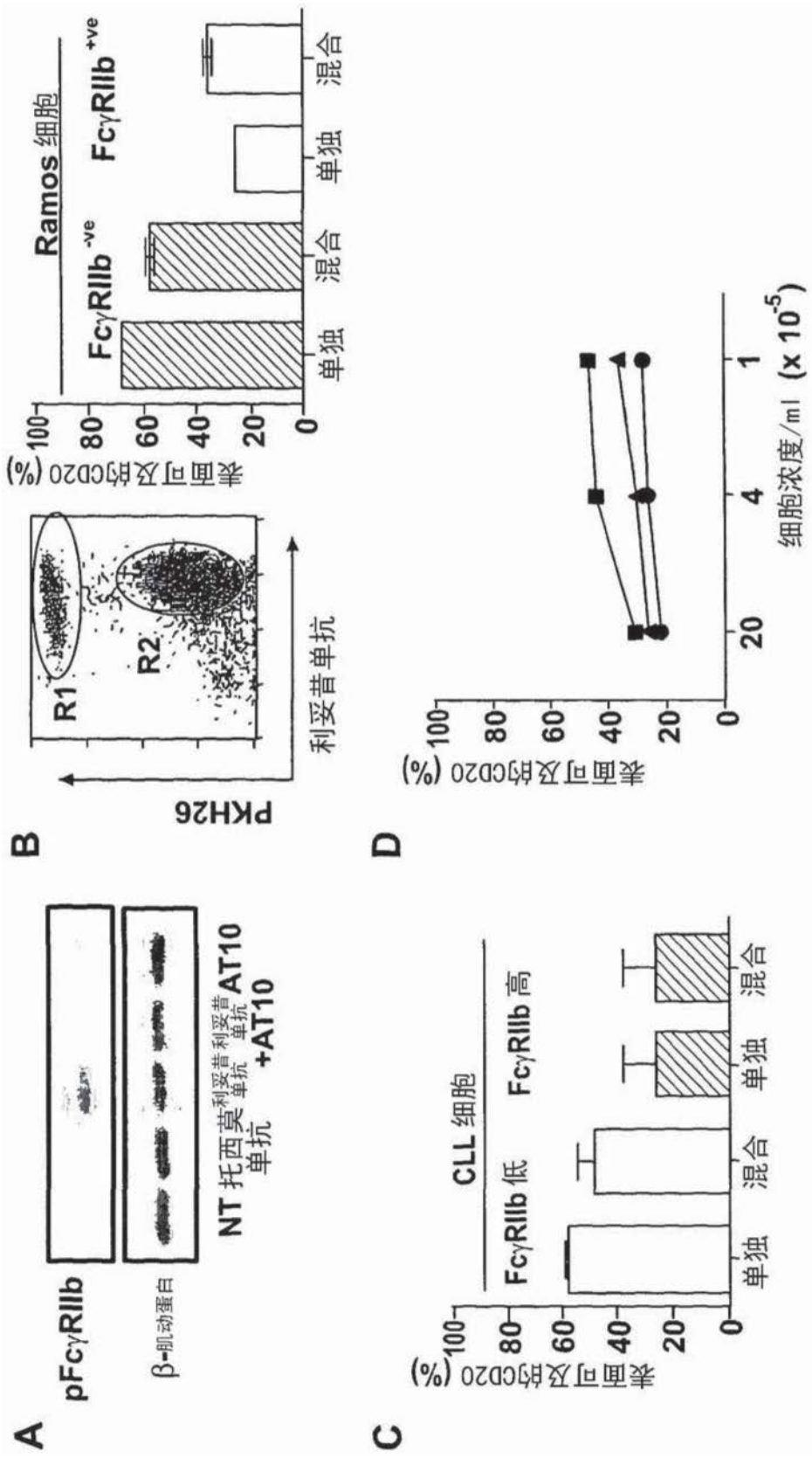

A
pFcγRIIb
β-肌动蛋白
NT
托西莫单抗
利妥昔单抗
AT10
+AT10
B
PKH26
R1
R2
利妥昔单抗
表面可及的CD20 (%)
Ramos 细胞
FcγRIIb -ve
FcγRIIb +ve
单独
混合
单独
混合
C
表面可及的CD20 (%)
CLL 细胞
FcγRIIb 低
FcγRIIb 高
单独
混合
单独
混合
D
表面可及的CD20 (%)
细胞浓度/ml (x 10-5)

图4

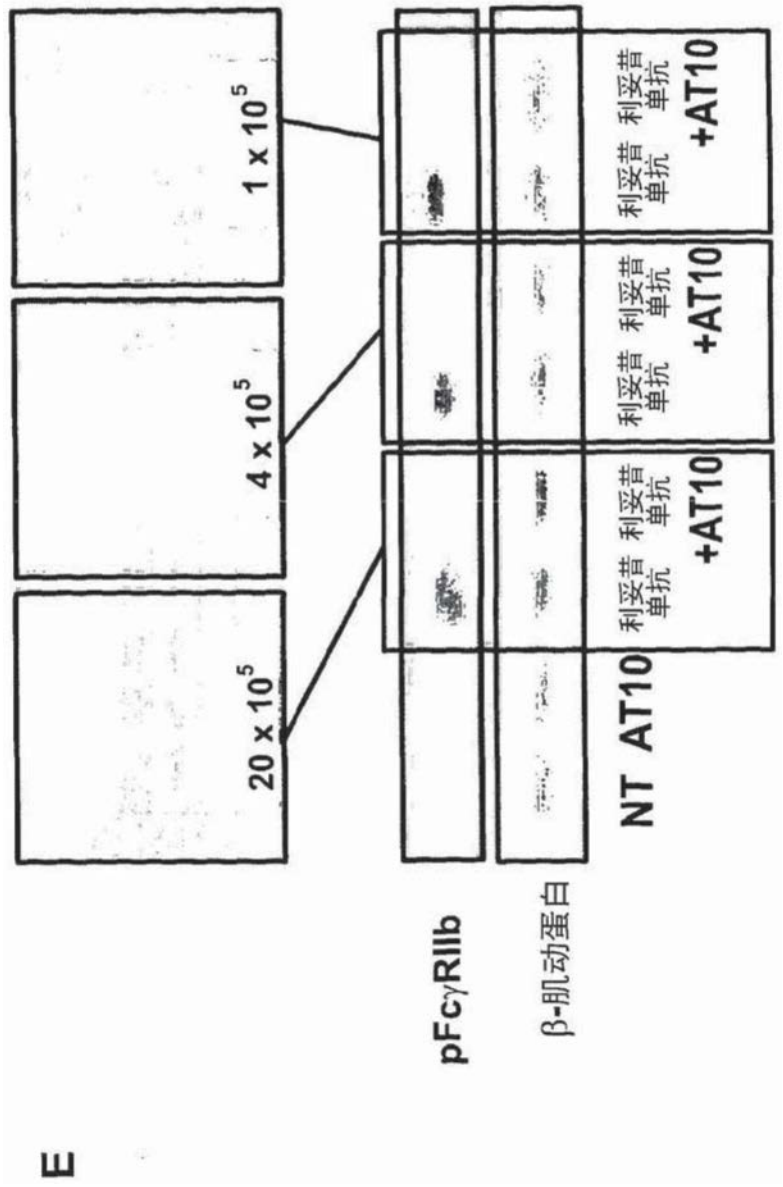

E
pFcγRIIb
β-肌动蛋白
NT
AT10
利妥昔单抗 +AT10
利妥昔单抗 +AT10
利妥昔单抗 +AT10
20 x 10^5
4 x 10^5
1 x 10^5

图4(续)

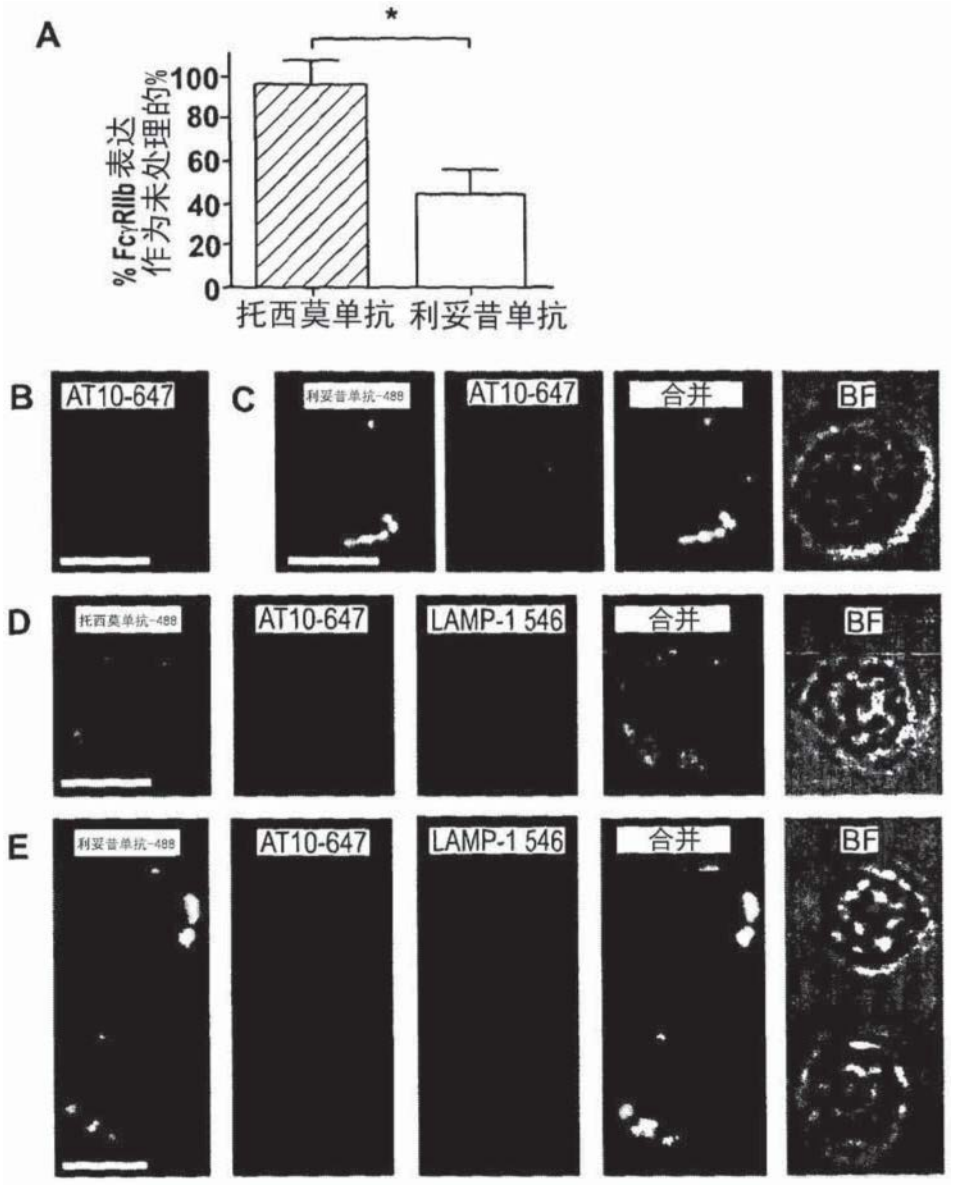

A
*
% FcγRIIb表达
作为未处理的%
100
80
60
40
20
0
托西莫单抗
利妥昔单抗
B
AT10-647
C
利妥昔单抗-488
AT10-647
合并
BF
D
托西莫单抗-488
AT10-647
LAMP-1 546
合并
BF
E
利妥昔单抗-488
AT10-647
LAMP-1 546
合并
BF

图5

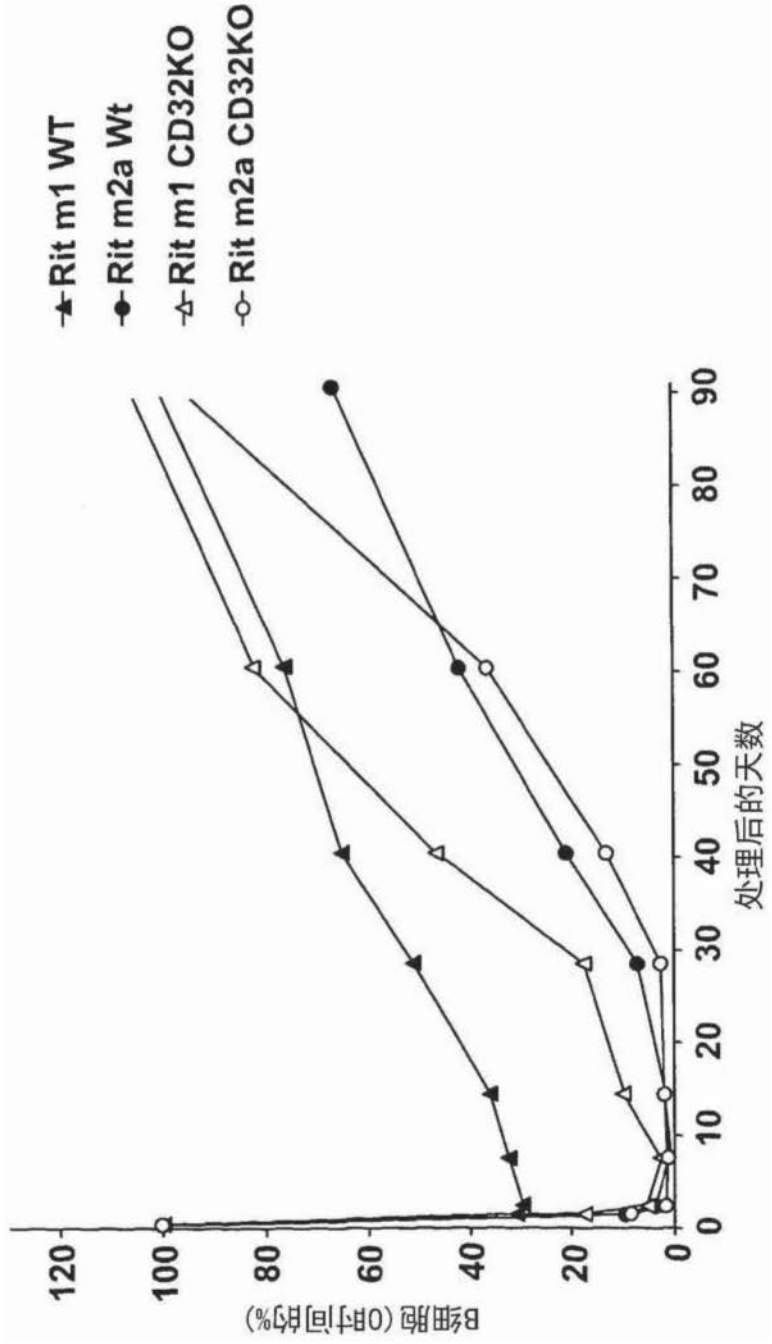

Rit m1 WT
Rit m2a Wt
Rit m1 CD32KO
Rit m2a CD32KO
B细胞(0时间的%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
处理后的天数

图6

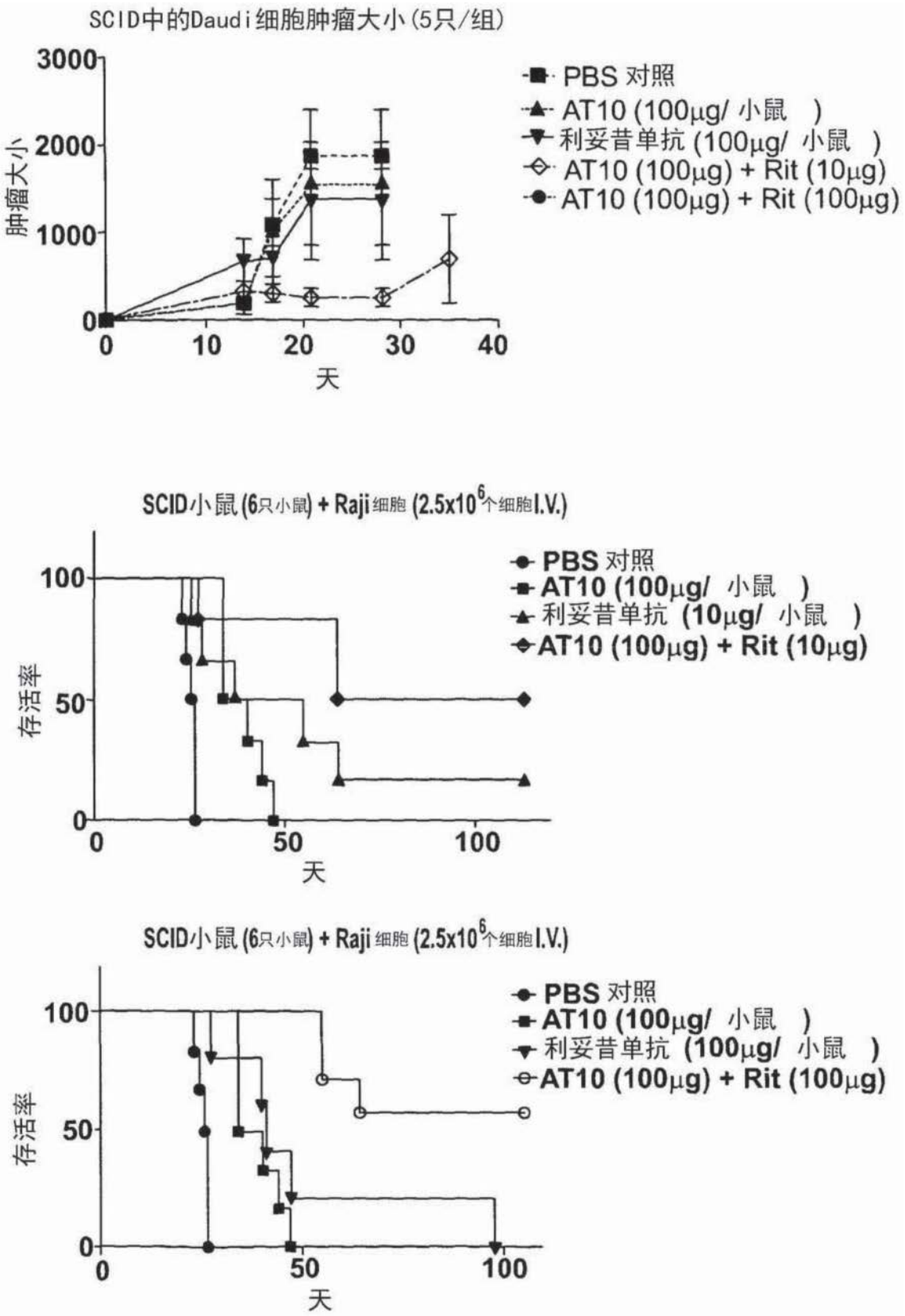

SCID中的Daudi细胞肿瘤大小(5只/组)
肿瘤大小
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
天
PBS 对照
AT10 (100μg/ 小鼠 )
利妥昔单抗 (100μg/ 小鼠 )
AT10 (100μg) + Rit (10μg)
AT10 (100μg) + Rit (100μg)
SCID小鼠 (6只小鼠) + Raji 细胞 (2.5x10^6个细胞 I.V.)
存活率
100
50
0
0
50
100
天
PBS 对照
AT10 (100μg/ 小鼠 )
利妥昔单抗 (10μg/ 小鼠 )
AT10 (100μg) + Rit (10μg)
SCID小鼠 (6只小鼠) + Raji 细胞 (2.5x10^6个细胞 I.V.)
存活率
100
50
0
0
50
100
天
PBS 对照
AT10 (100μg/ 小鼠 )
利妥昔单抗 (100μg/ 小鼠 )
AT10 (100μg) + Rit (100μg)

图7

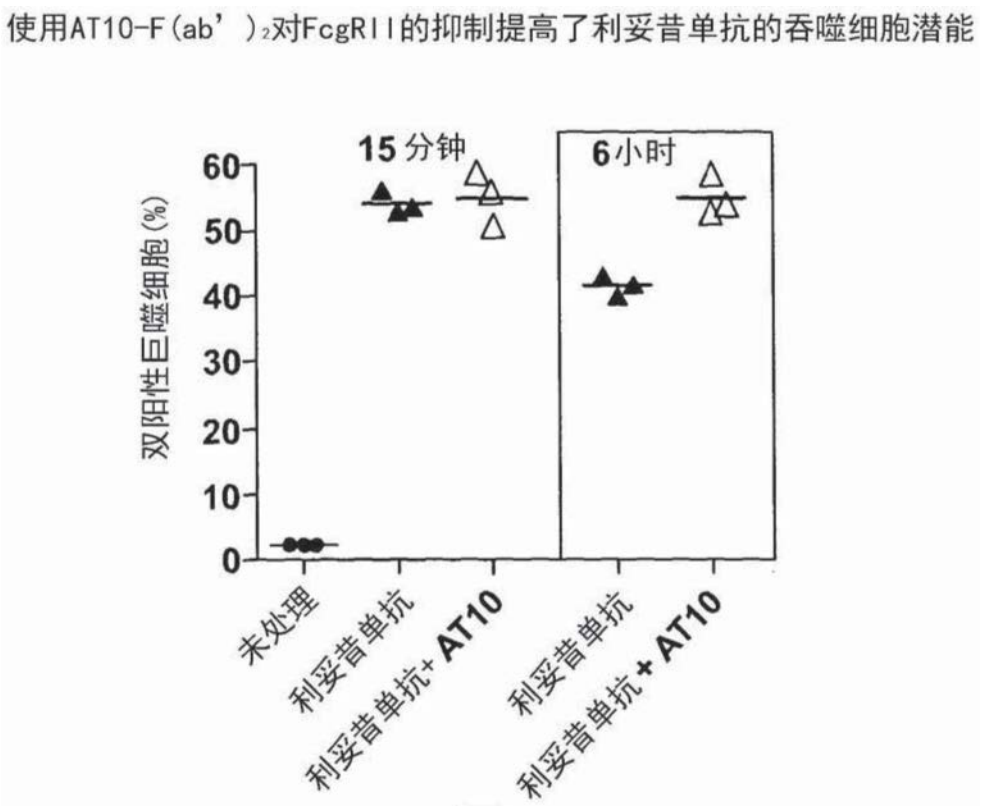

使用AT10-F(ab')2对FcgRII的抑制提高了利妥昔单抗的吞噬细胞潜能
15分钟
6小时
双阳性巨噬细胞(%)
60
50
40
30
20
10
0
未处理
利妥昔单抗
利妥昔单抗+AT10
利妥昔单抗
利妥昔单抗+AT10

图8

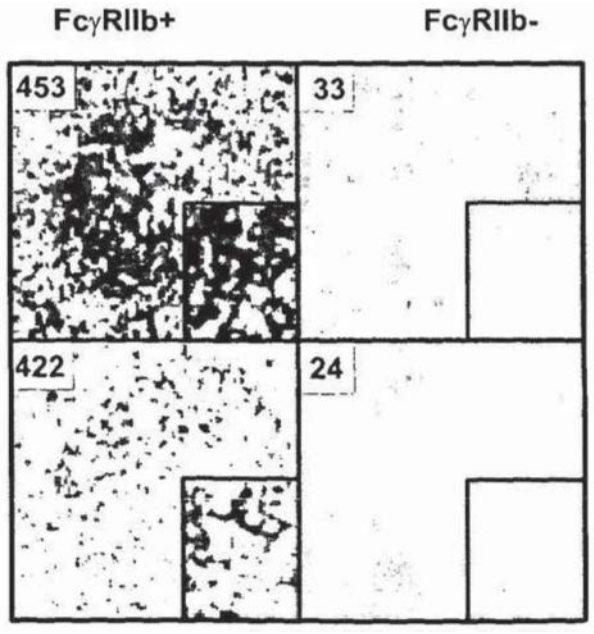

FcγRIIb+
FcγRIIb-
453
33
422
24

图9

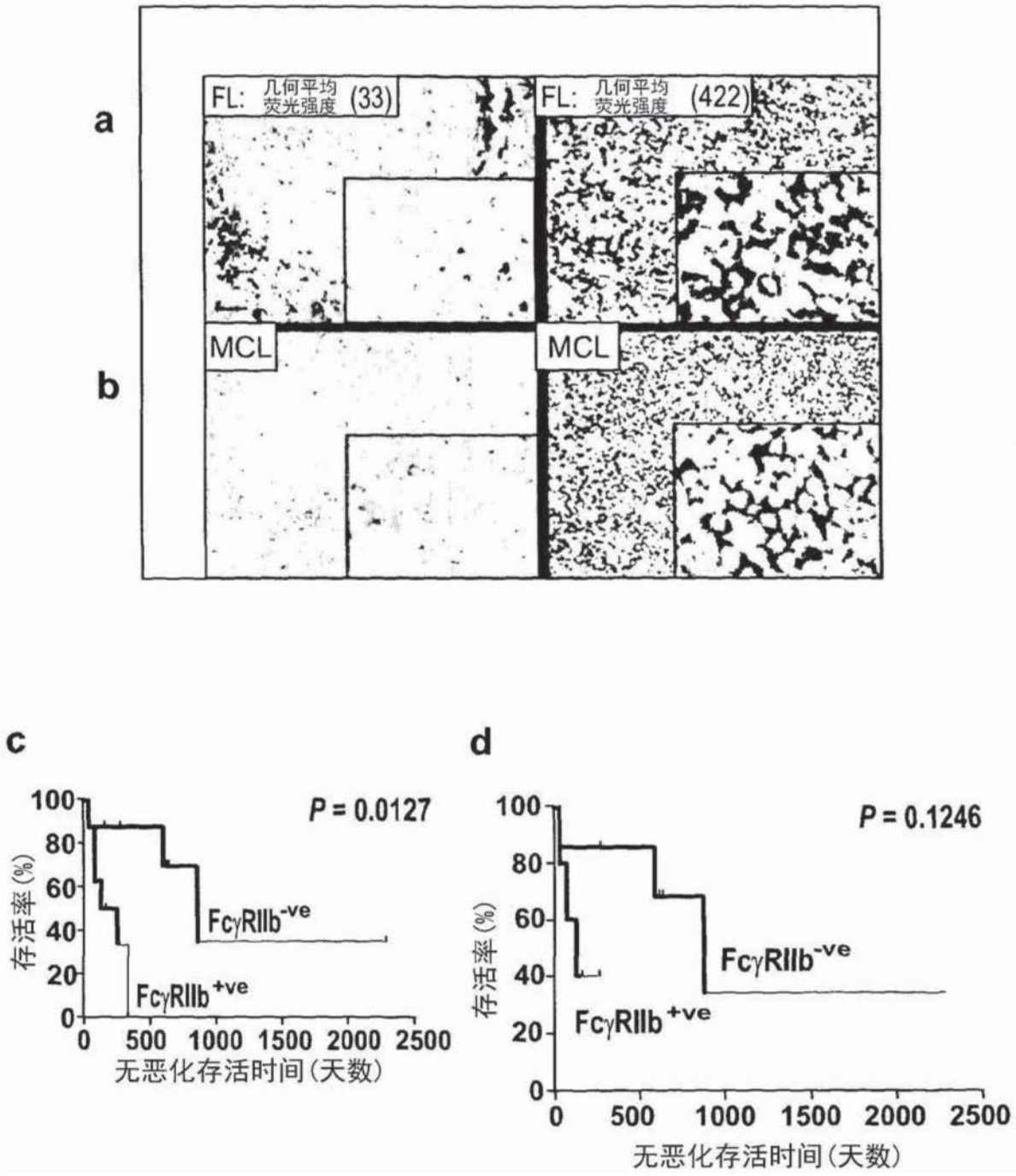

a
b
FL: 几何平均荧光强度 (33)
FL: 几何平均荧光强度 (422)
MCL
MCL
c
d
P = 0.0127
P = 0.1246
存活率(%)
FcγRIIb-ve
FcγRIIb+ve
无恶化存活时间(天数)

图10

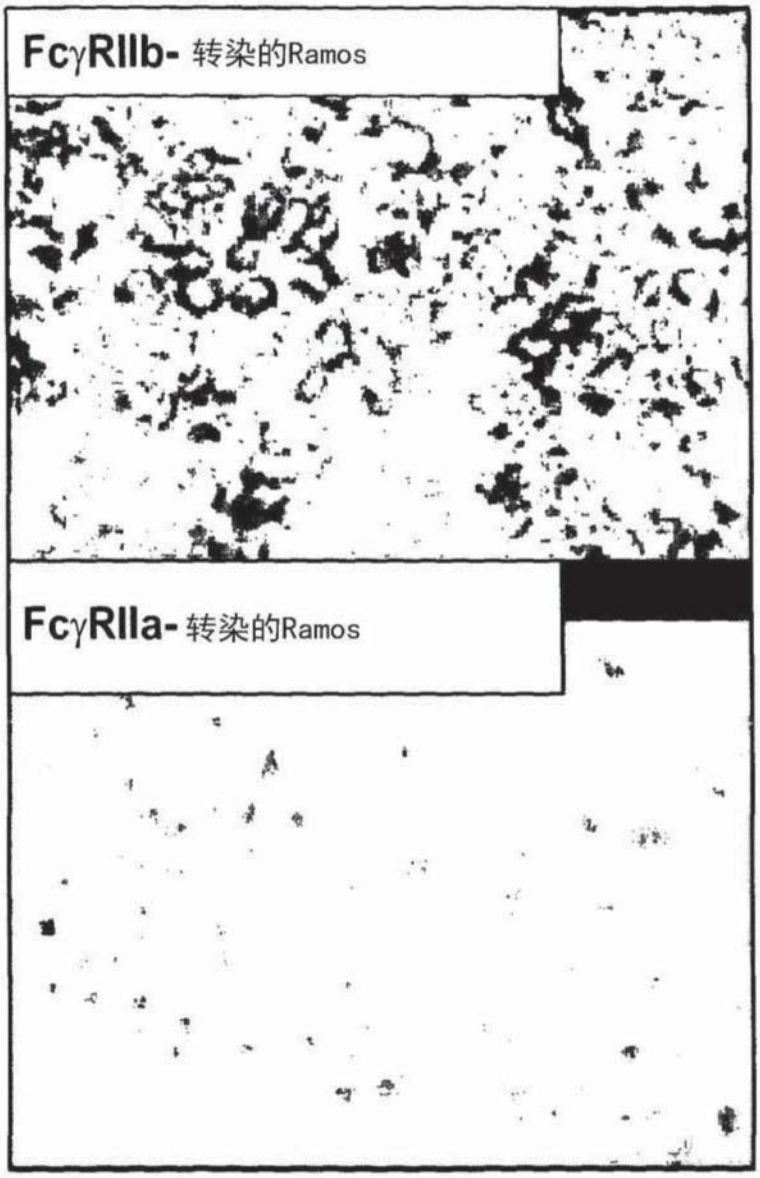



图11

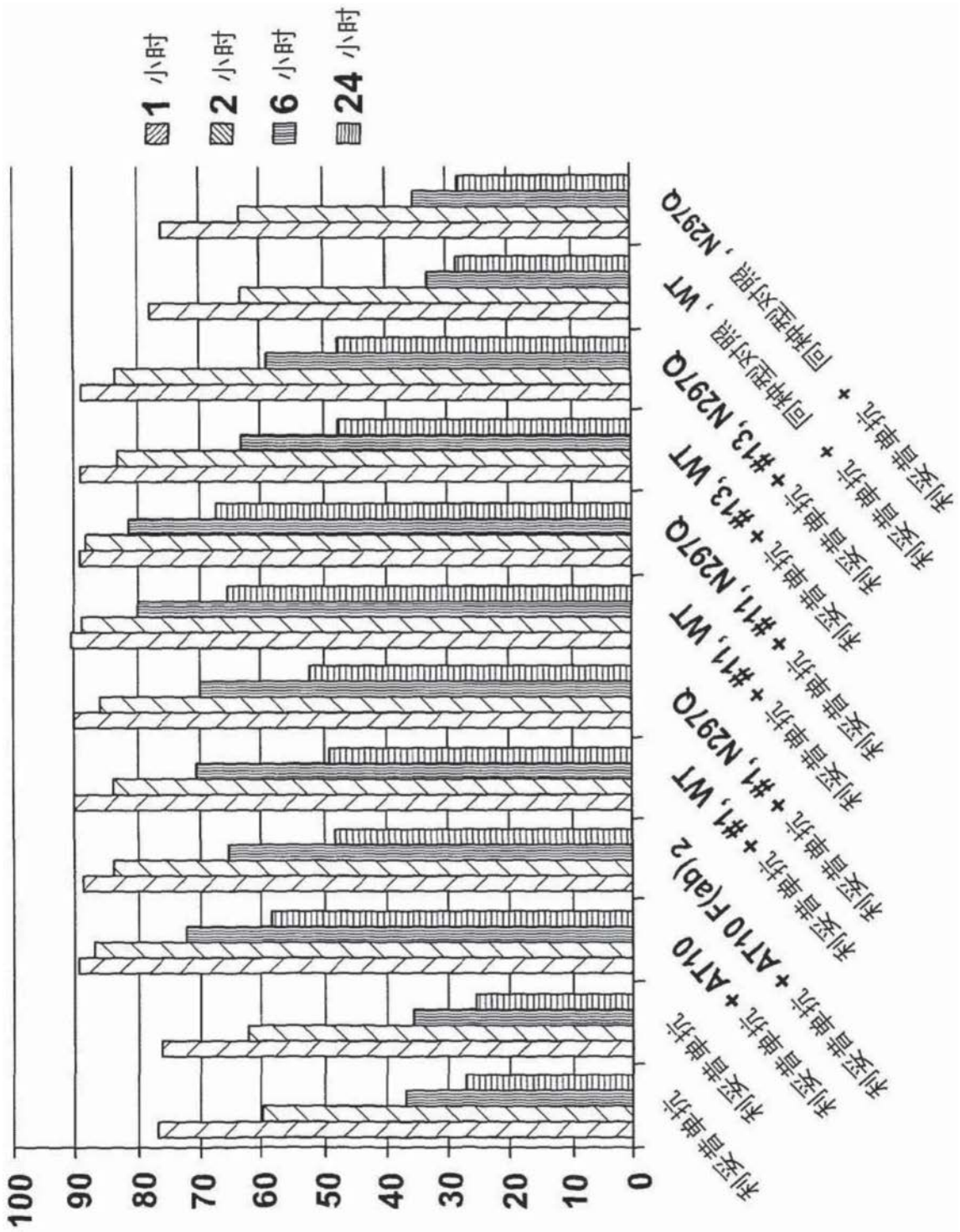

1 小时
2 小时
6 小时
24 小时
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
利妥昔单抗
利妥昔单抗 + AT10
利妥昔单抗 + AT10 F(ab)2
利妥昔单抗 + #1, WT
利妥昔单抗 + #1, N297Q
利妥昔单抗 + #11, WT
利妥昔单抗 + #11, N297Q
利妥昔单抗 + #13, WT
利妥昔单抗 + #13, N297Q
利妥昔单抗 + 同种型对照, WT
利妥昔单抗 + 同种型对照, N297Q

图12

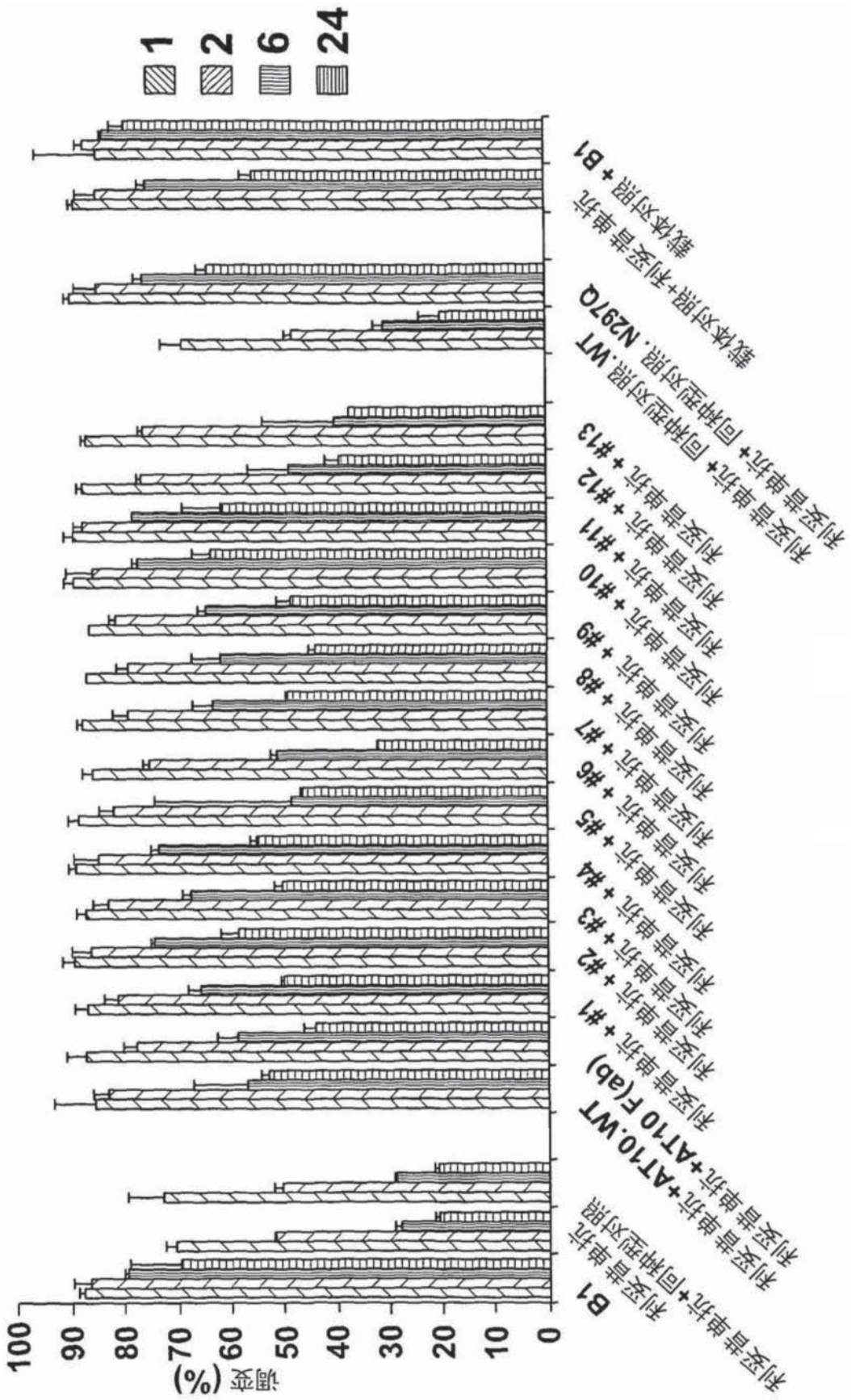
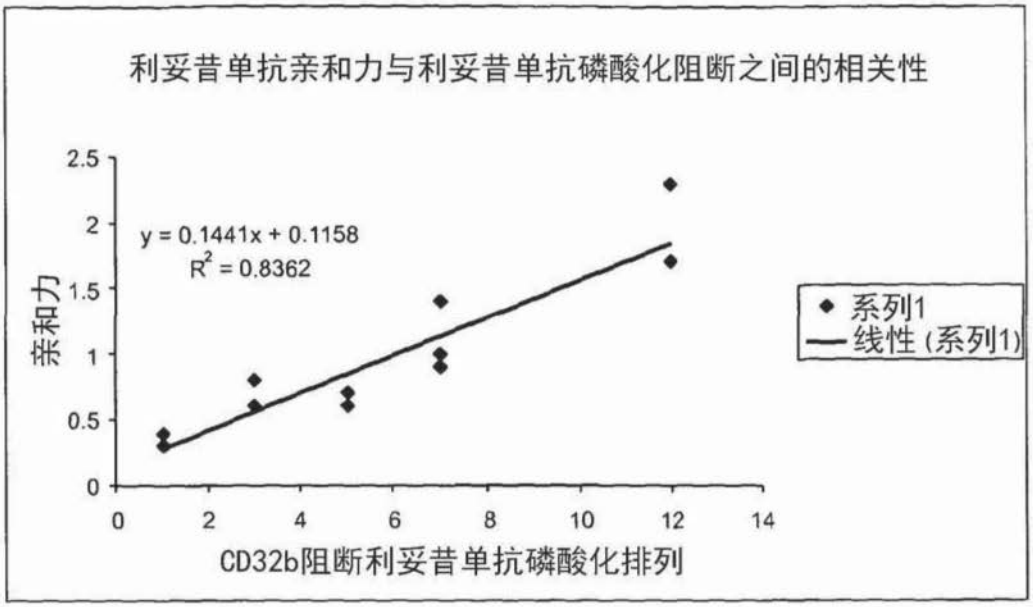

1
2
6
24
利妥昔单抗+利妥昔单抗
载体对照+B1
利妥昔单抗+同种型对照.WT
利妥昔单抗+同种型对照.N297Q
利妥昔单抗+#13
利妥昔单抗+#12
利妥昔单抗+#11
利妥昔单抗+#10
利妥昔单抗+#9
利妥昔单抗+#8
利妥昔单抗+#7
利妥昔单抗+#6
利妥昔单抗+#5
利妥昔单抗+#4
利妥昔单抗+#3
利妥昔单抗+#2
利妥昔单抗+#1
利妥昔单抗+AT10.WT
利妥昔单抗+AT10 F(ab)
B1
利妥昔单抗+同种型对照
调变 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

图13

A


利妥昔单抗亲和力与利妥昔单抗磷酸化阻断之间的相关性
y = 0.1441x + 0.1158
R2 = 0.8362
亲和力
CD32b阻断利妥昔单抗磷酸化排列
系列1
线性 (系列1)

B

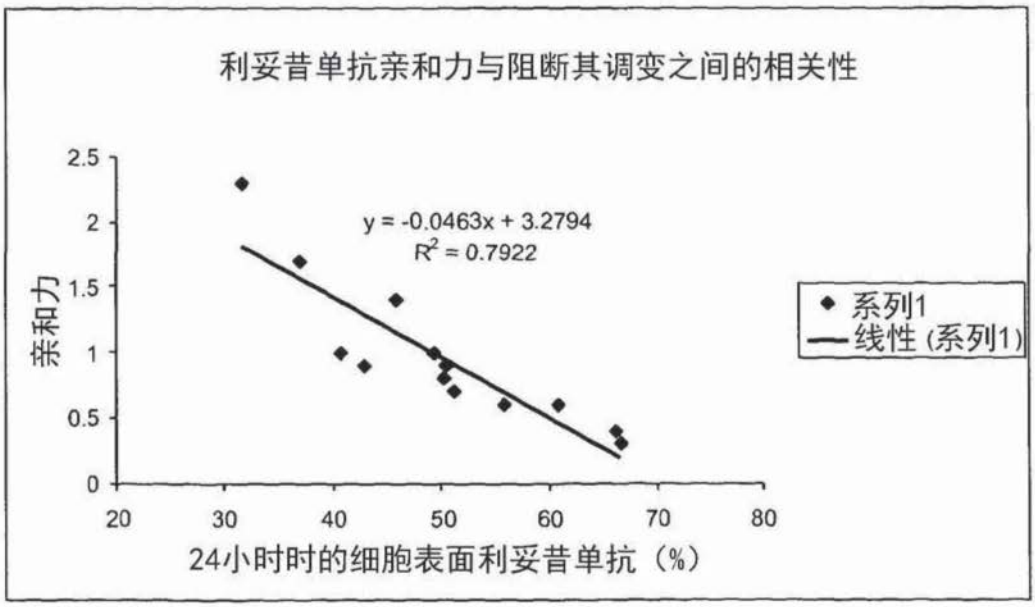

利妥昔单抗亲和力与阻断其调变之间的相关性
y = -0.0463x + 3.2794
R2 = 0.7922
亲和力
24小时时的细胞表面利妥昔单抗（%）
系列1
线性 (系列1)

图14

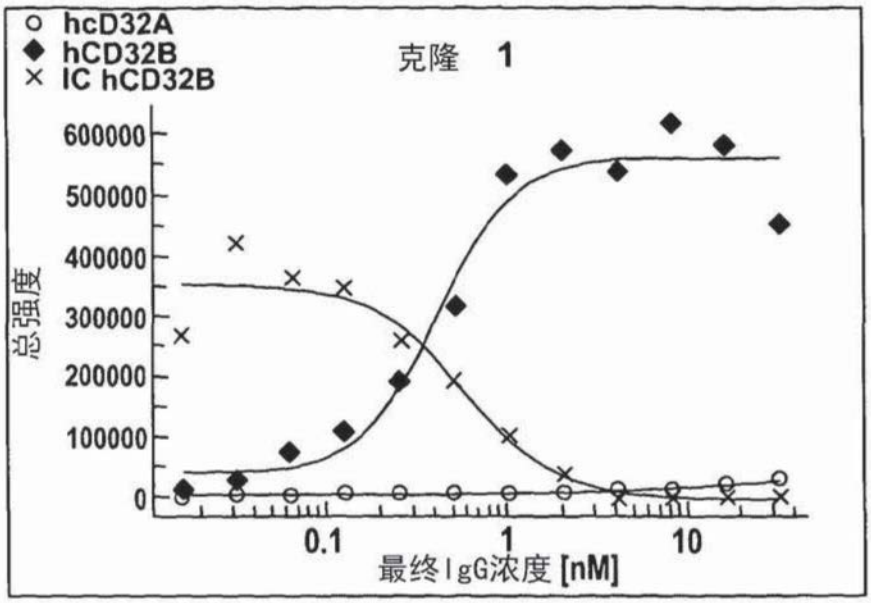

hcD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 1
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图15

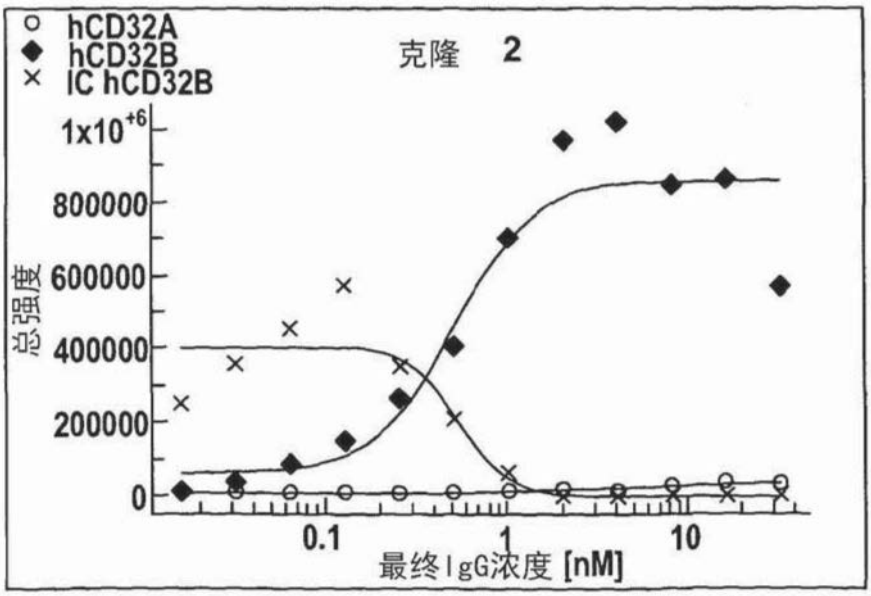

hCD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 2
1x10+6
800000
600000
400000
200000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图16

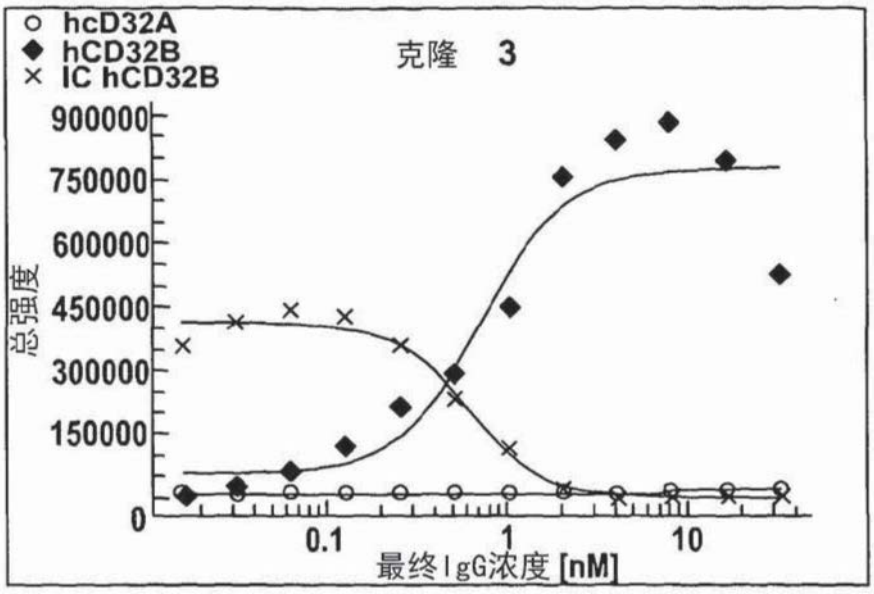

hcD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 3
900000
750000
600000
450000
300000
150000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度[nM]

图17

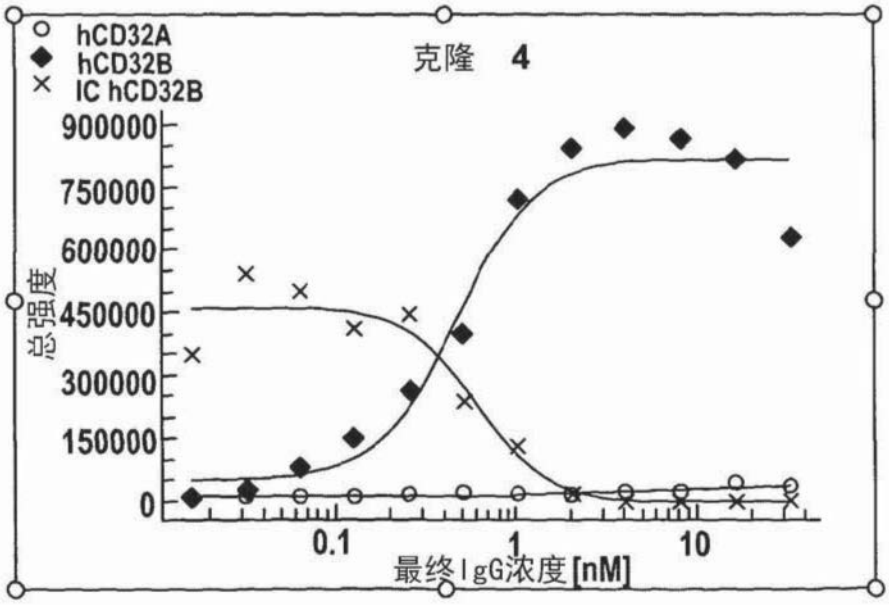

hCD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 4
900000
750000
600000
450000
300000
150000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度[nM]

图18

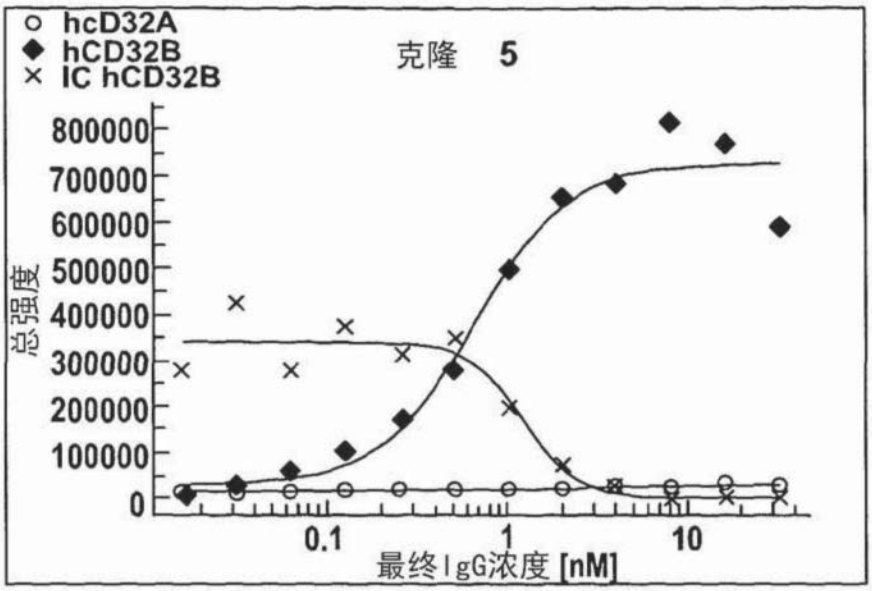

hcD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 5
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图19

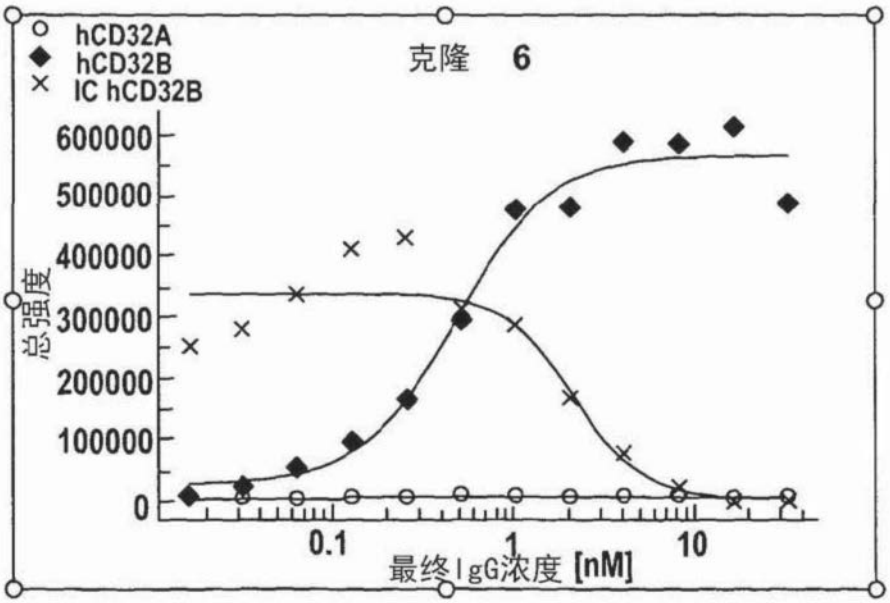

hCD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 6
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图20

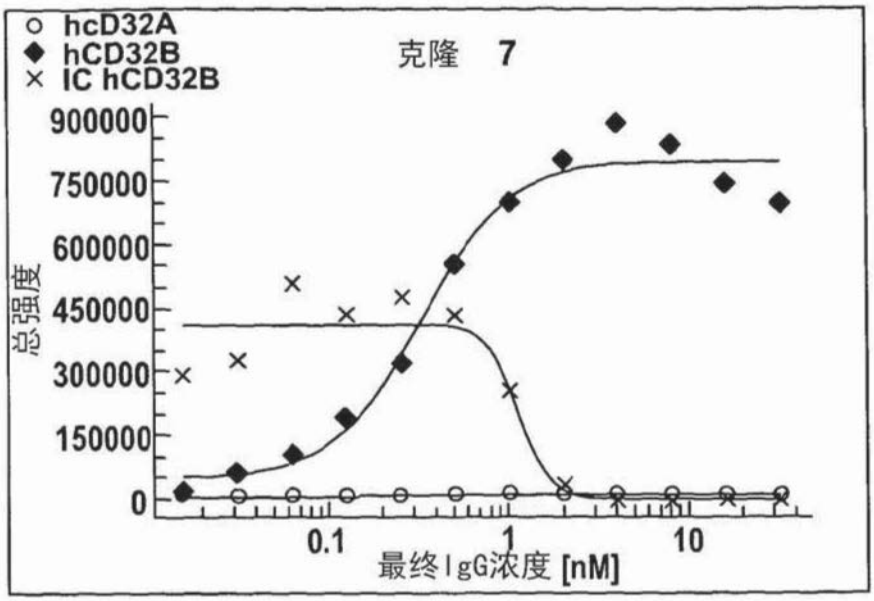

hcD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 7
900000
750000
600000
450000
300000
150000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图21

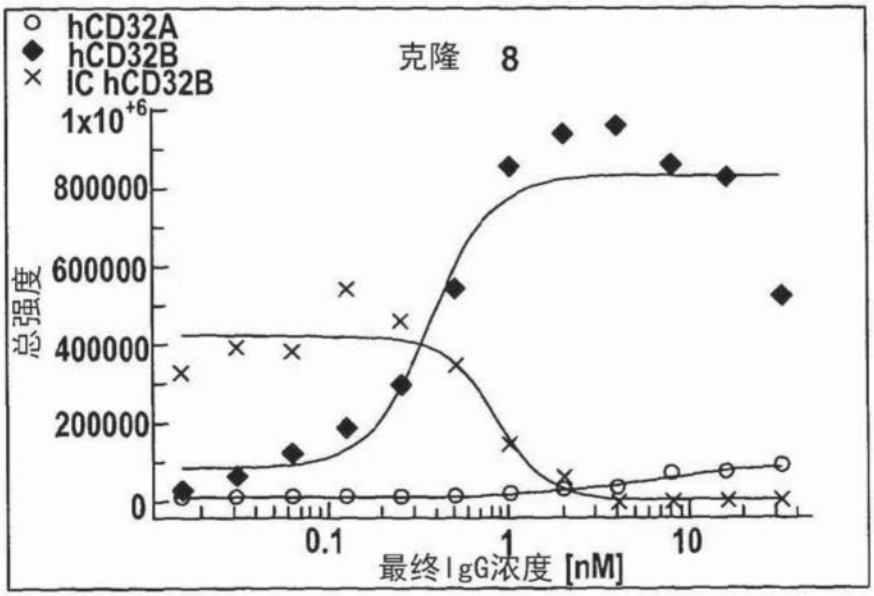

hCD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 8
1x10+6
800000
600000
400000
200000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图22

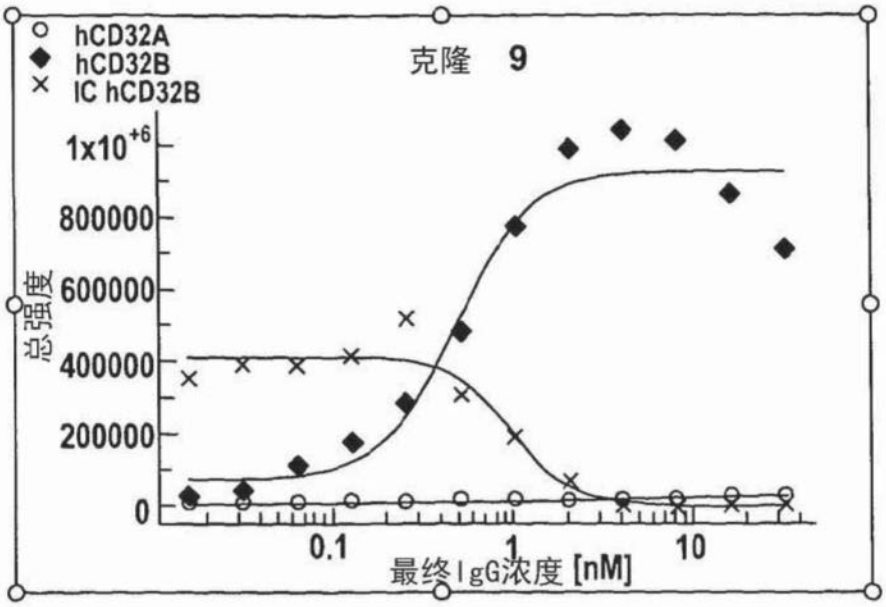

hCD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 9
1x10+6
800000
600000
400000
200000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图23

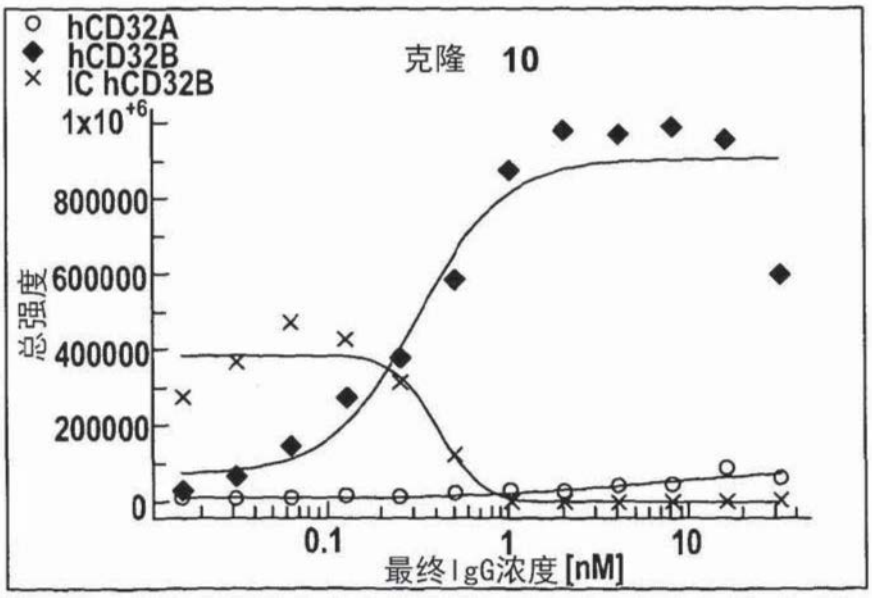

hCD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 10
1x10+6
800000
600000
400000
200000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图24

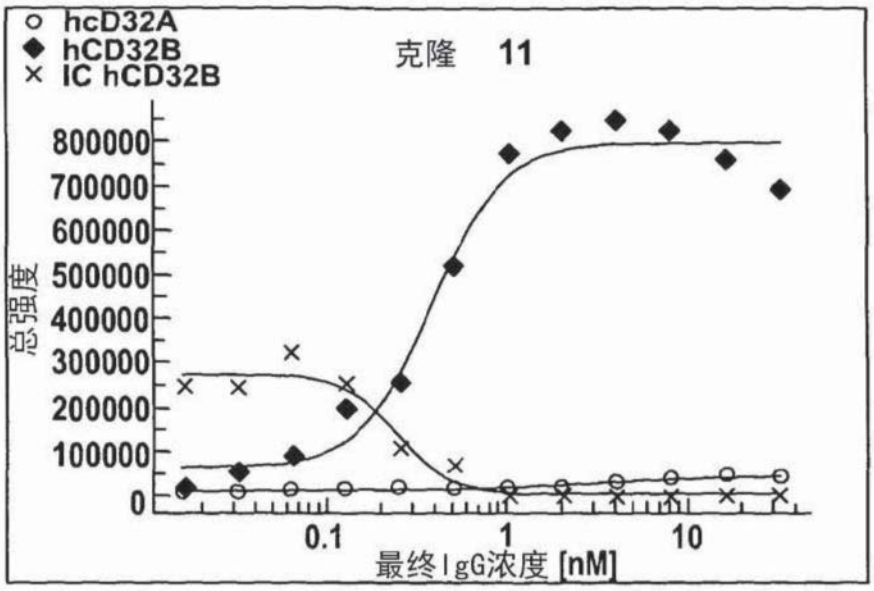

hcD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 11
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图25

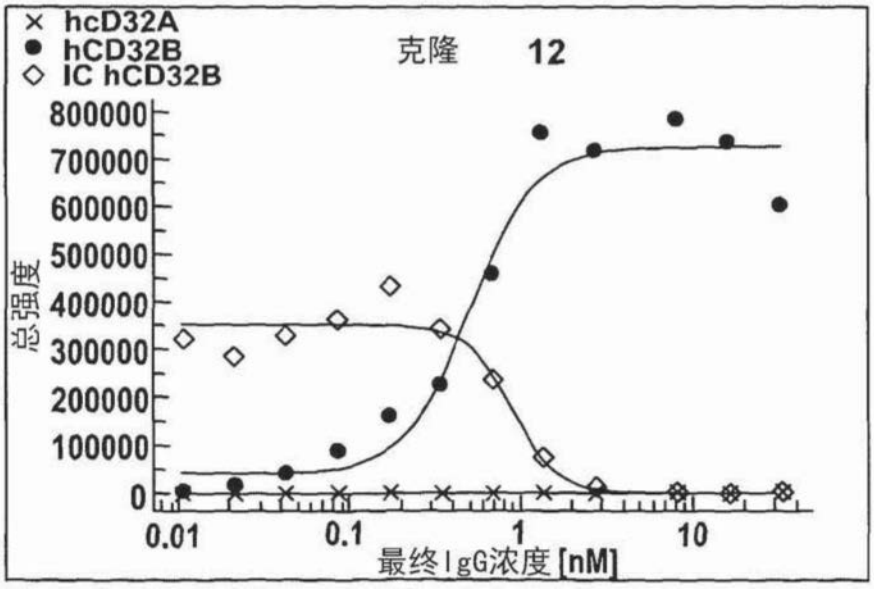

hcD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 12
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
总强度
0.01
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图26

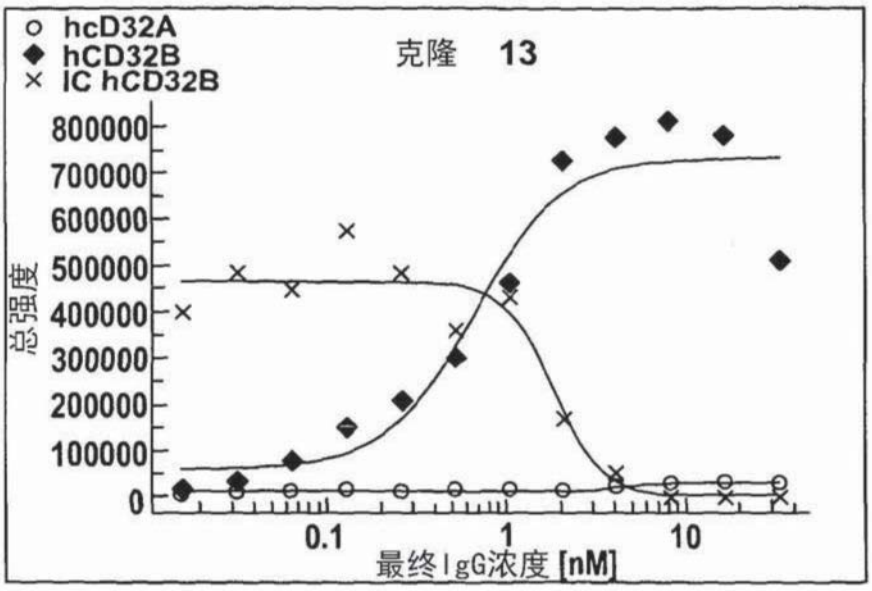

hcD32A
hCD32B
IC hCD32B
克隆 13
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
总强度
0.1
1
10
最终IgG浓度 [nM]

图27

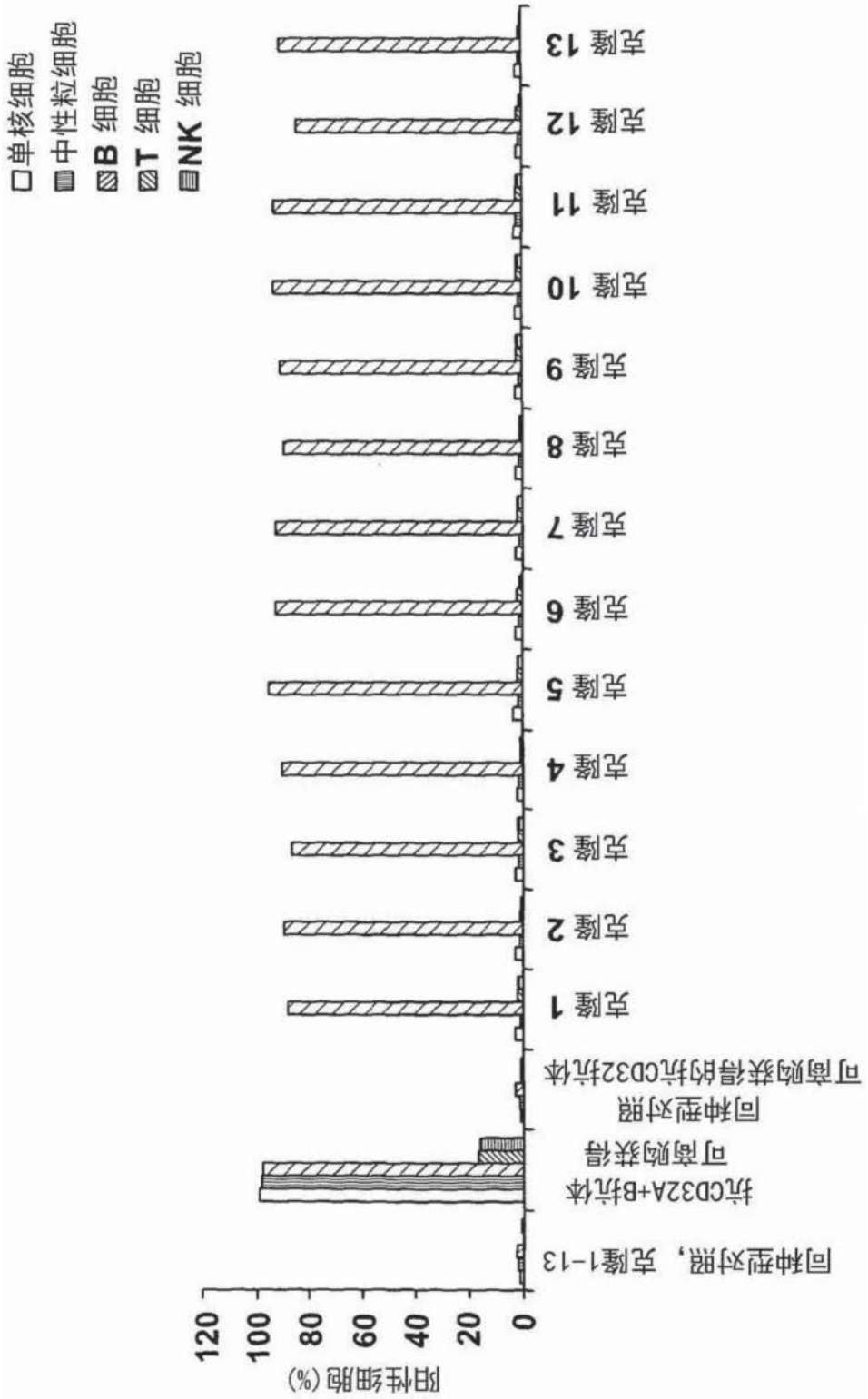

单核细胞
中性粒细胞
B 细胞
T 细胞
NK 细胞
阳性细胞(%)
0
20
40
60
80
100
120
同种型对照，克隆1-13
抗CD32A+B抗体
可商购获得
同种型对照
可商购获得的抗CD32抗体
克隆 1
克隆 2
克隆 3
克隆 4
克隆 5
克隆 6
克隆 7
克隆 8
克隆 9
克隆 10
克隆 11
克隆 12
克隆 13

图28

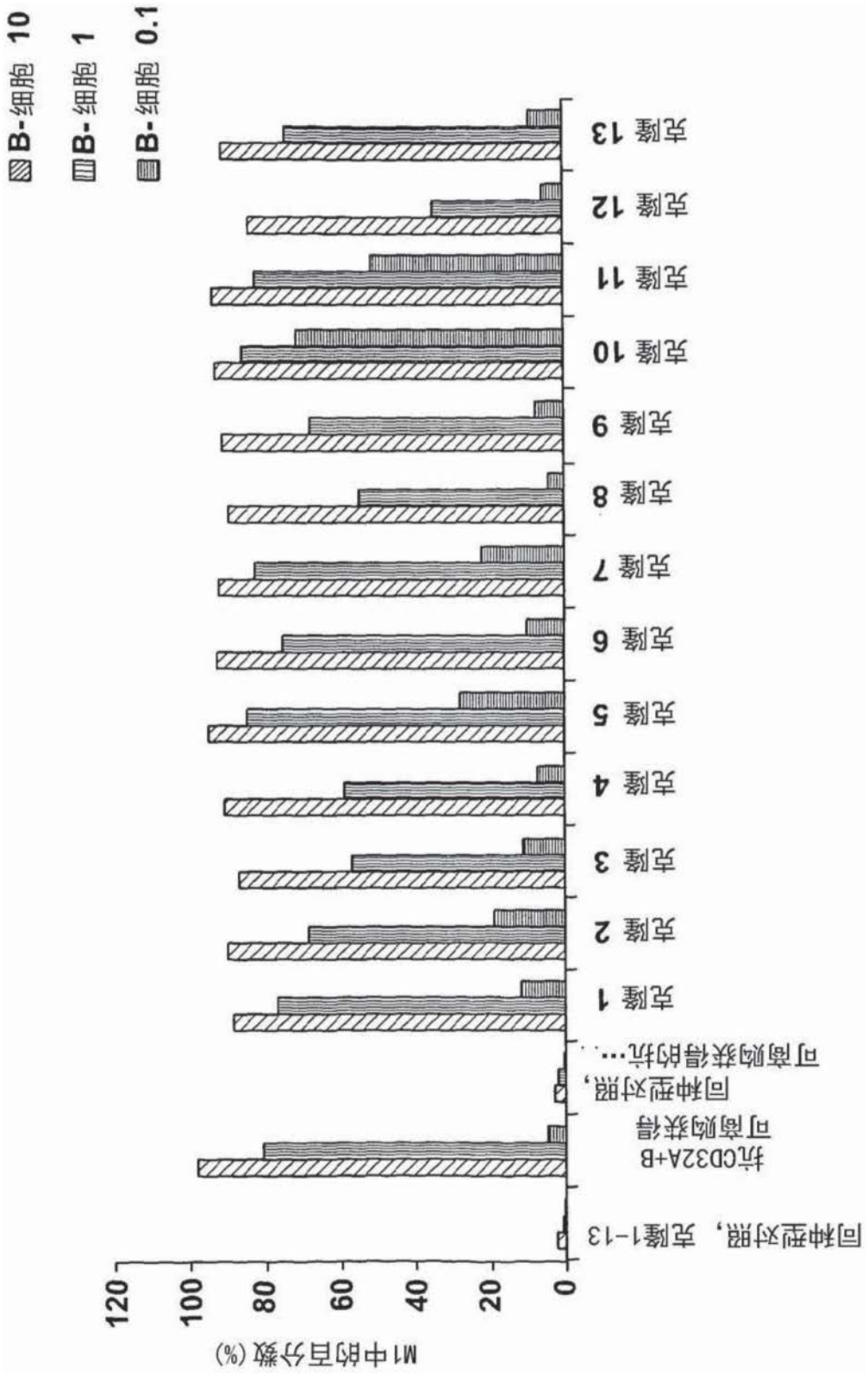

B-细胞 10
B-细胞 1
B-细胞 0.1
M1中的百分数(%)
120
100
80
60
40
20
0
同种型对照，克隆1-13
抗CD32A+B可商购获得
同种型对照，可商购获得的抗…
克隆 1
克隆 2
克隆 3
克隆 4
克隆 5
克隆 6
克隆 7
克隆 8
克隆 9
克隆 10
克隆 11
克隆 12
克隆 13

图29

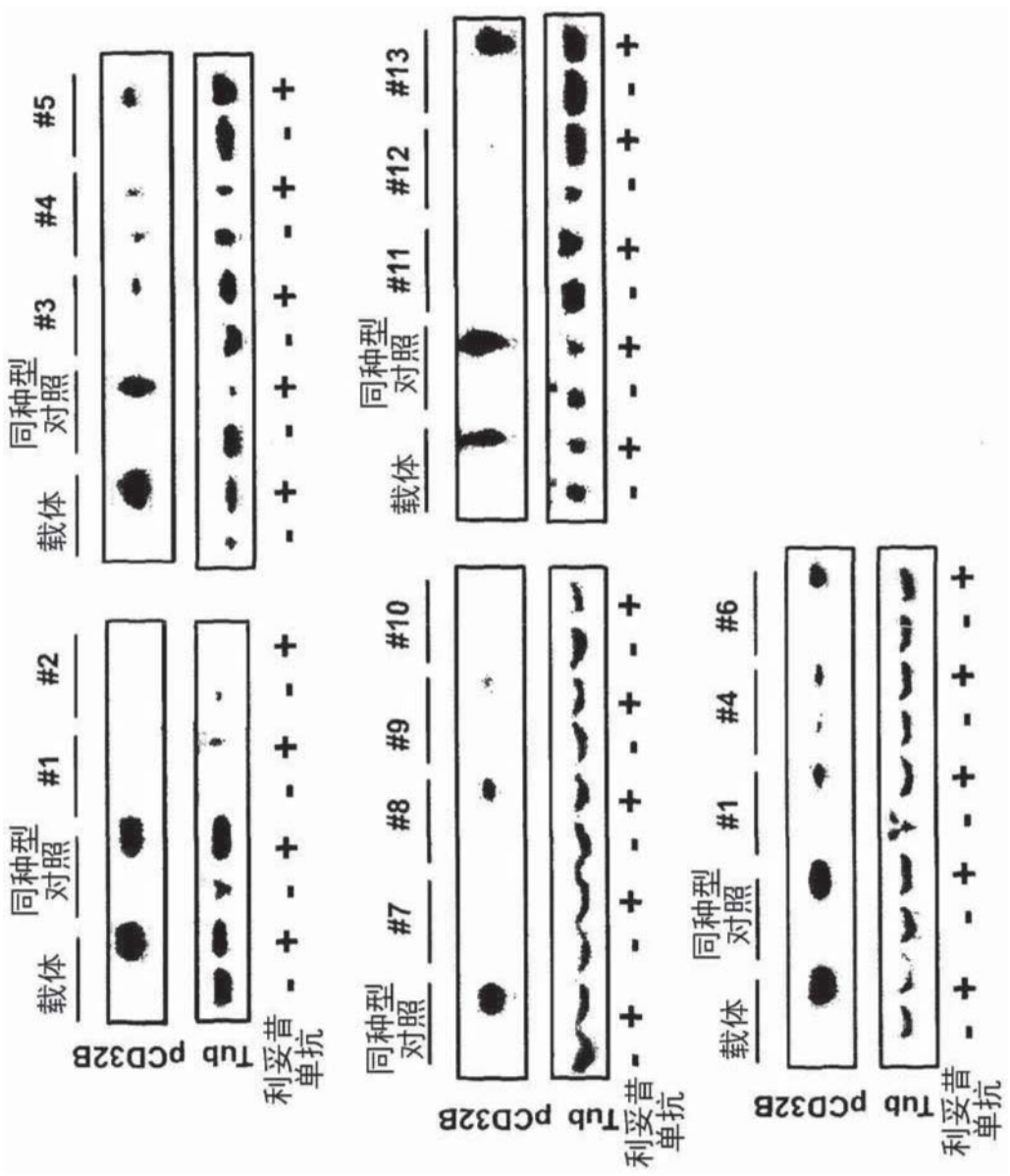



图30

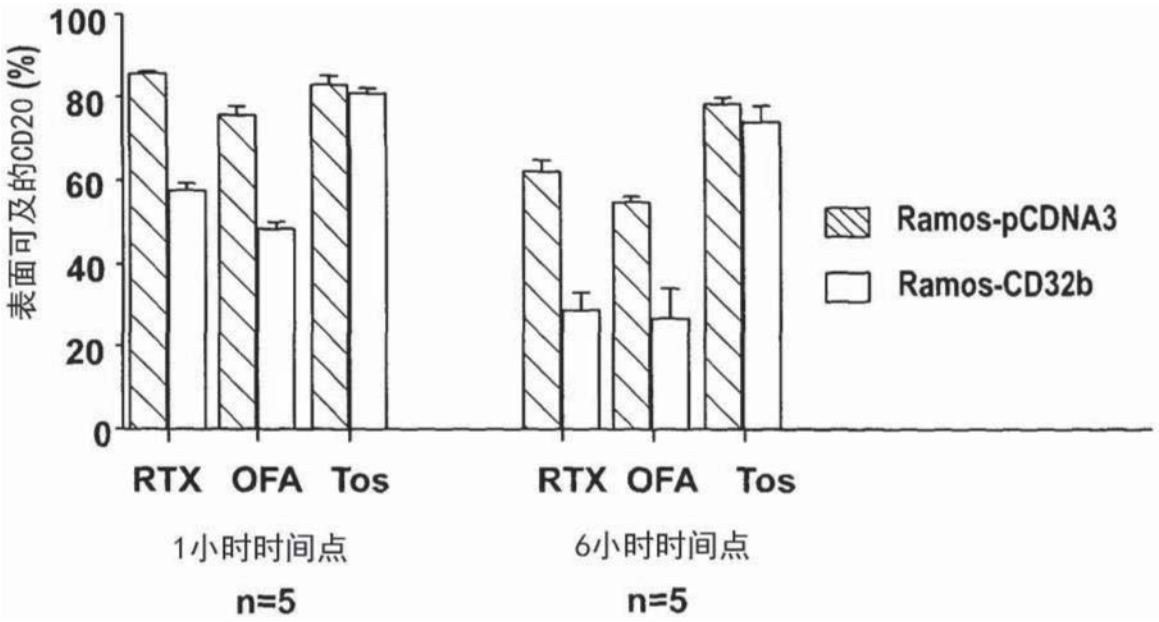

表面可及的CD20 (%)
100
80
60
40
20
0
RTX OFA Tos
RTX OFA Tos
Ramos-pCDNA3
Ramos-CD32b
1小时时间点
n=5
6小时时间点
n=5

图31

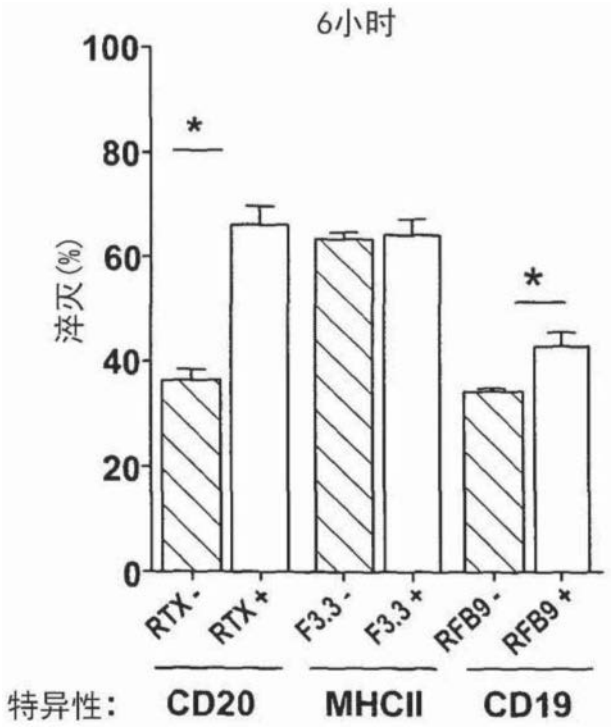

6小时
淬灭 (%)
100
80
60
40
20
0
*
*
RTX-
RTX+
F3.3-
F3.3+
RFB9-
RFB9+
特异性:
CD20
MHCII
CD19

图32

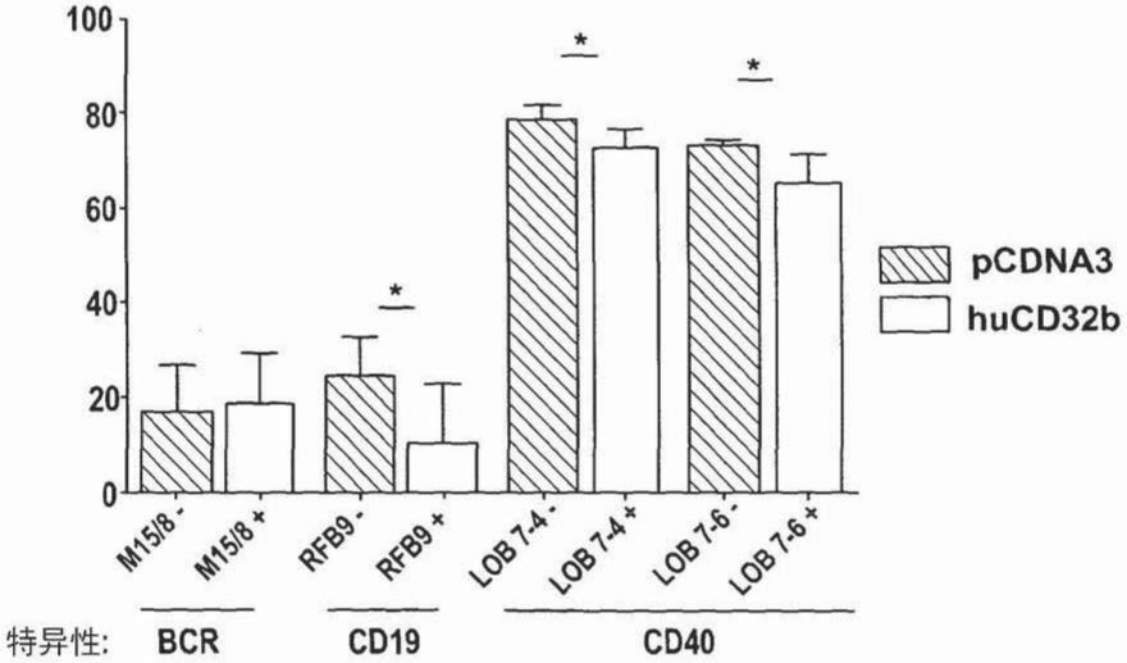



图33

IgG1-CH **[SEQ ID NO: 1]**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK

λ-CL **[SEQ ID NO: 2]**

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV
ETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

图34

克隆1

**VH [SEQ ID NO: 3]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF

FrH1 CDRH1 FrH2 CDRH2

TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWRDAFDIWGQGTLVTVSS

FrH CDRH3 FrH4

**-VL [SEQ ID NO: 16]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG

FrL1 CDRL1 FrL2 CDRL2 FrL3

TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGSWVFGGGTKLTVLG

CDRL3 FrL4

CDR区

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 29]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 30]
CDRH3: EWRDAFDI [SEQ ID NO: 31]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 32]
CDRL2: SDNQRPS [SEQ ID NO: 33]
CDRL3: AAWDDSLSGSWV [SEQ ID NO: 34]

图35

克隆2

**-VH [SEQ ID NO: 4]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIAYDGSKKDYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYRDAFDIWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 17]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSG
TTASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSVSGWMFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: TYGMH [SEQ ID NO: 35]
CDRH2: VIAYDGSKKDYADSVKG [SEQ ID NO: 36]
CDRH3: EYRDAFDI [SEQ ID NO: 37]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 38]
CDRL2: GNSNRPS [SEQ ID NO: 39]
CDRL3: AAWDDSVSGWM [SEQ ID NO: 40]

图36

克隆3

**-VH [SEQ ID NO: 5]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNRYYADSVKGR
FTMSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRWNGMDVWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 18]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNQRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPWVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 41]
CDRH2: VISYDGSNRYYADSVKG [SEQ ID NO: 42]
CDRH3: DRWNGMDV [SEQ ID NO: 43]

CDRL1: SGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 44]
CDRL2: ANNQRPS [SEQ ID NO: 45]
CDRL3: AAWDDSLNGPWV [SEQ ID NO: 46]

图37

克隆4

**-VH [SEQ ID NO: 6]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDTAYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHSVIGAFDIWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 19]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAISGLRSEDEADYYCSSYAGSNNVVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 47]
CDRH2: VISYDGSDTAYADSVKG [SEQ ID NO: 48]
CDRH3: DHSVIGAFDI [SEQ ID NO: 49]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 50]
CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 51]
CDRL3: SSYAGSNNVV [SEQ ID NO: 52]

图38

克隆5

**-VH [SEQ ID NO: 7]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQLGEAFDIWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 20]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLSGPVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: NYGMH [SEQ ID NO: 53]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 54]
CDRH3: DQLGEAFDI [SEQ ID NO: 55]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 56]
CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 57]
CDRL3: ATWDDSLSGPV [SEQ ID NO: 58]

图39

克隆6

**-VH [SEQ ID NO: 8]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSSTYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDIDYFDYWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 21]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNFGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYENNKRPSGVPDRFSGSKS
GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: DYGMS [SEQ ID NO: 59]
CDRH2: AISGSGSSTYYADSVKG [SEQ ID NO: 60]
CDRH3: GDIDYFDY [SEQ ID NO: 61]

CDRL1: TGSSSNFGAGYDVH [SEQ ID NO: 62]
CDRL2: ENNKRPS [SEQ ID NO: 63]
CDRL3: AAWDDSLNGPV [SEQ ID NO: 64]

图40

克隆7

**-VH [SEQ ID NO: 9]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERRDAFDIWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 22]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCATWDSDTPVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 65]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 66]
CDRH3: ERRDAFDI [SEQ ID NO: 67]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 68]
CDRL2: SDNQRPS [SEQ ID NO: 69]
CDRL3: ATWDSDTPV [SEQ ID NO: 70]

图41

克隆8

**-VH [SEQ ID NO: 10]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARDHSAAGYFDYWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 23]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSIRPSGGPDRFSGSKSGTS
ASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSLSSPVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 71]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 72]
CDRH3: DHSAAGYFDY [SEQ ID NO: 73]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 74]
CDRL2: GNSIRPS [SEQ ID NO: 75]
CDRL3: ASWDDSLSSPV [SEQ ID NO: 76]

图42

克隆9

**-VH [SEQ ID NO: 11]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSAIIDYAGSVKGRF
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEAAAGAFDIWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 24]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTDRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 77]
CDRH2: GISWDSAIIDYAGSVKG [SEQ ID NO: 78]
CDRH3: DEAAAGAFDI [SEQ ID NO: 79]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 80]
CDRL2: GNTDRPS [SEQ ID NO: 81]
CDRL3: AAWDDSLSGPVV [SEQ ID NO: 82]

图43

克隆10

**-VH [SEQ ID NO: 12]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISYDGSNKYYADSVKGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARELYDAFDIWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 25]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYADDHRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSQRAVIFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 83]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 84]
CDRH3: ELYDAFDI [SEQ ID NO: 85]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 86]
CDRL2: ADDHRPS [SEQ ID NO: 87]
CDRL3: ASWDDSQRAVI [SEQ ID NO: 88]

图44

克隆11

**-VH [SEQ ID NO: 13]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF
TISRDNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFGYIILDYWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 26]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRDYERPSGVPDRFSGSKSGTS
ASLAISGLRSEDEADYYCMAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: SYGMH [SEQ ID NO: 89]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [SEQ ID NO: 90]
CDRH3: EFGYIILDY [SEQ ID NO: 91]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [SEQ ID NO: 92]
CDRL2: RDYERPS [SEQ ID NO: 93]
CDRL3: MAWDDSLSGVV [SEQ ID NO: 94]

图45

克隆12

**-VH [SEQ ID NO: 14]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTNKYYADSVRGR
FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETWDAFDVWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 27]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNNANWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGT
SASLAISGLRSEDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: NHGMH [SEQ ID NO: 95]
CDRH2: VISYDGTNKYYADSVRG [SEQ ID NO: 96]
CDRH3: ETWDAFDV [SEQ ID NO: 97]

CDRL1: SGSSSNIGSNNAN [SEQ ID NO: 98]
CDRL2: DNNKRPS [SEQ ID NO: 99]
CDRL3: QAWDSSTVV [SEQ ID NO: 100]

图46

克隆13

**-VH [SEQ ID NO: 15]**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYGISWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGNTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSVGAYANDAFDIWGQGTLVTVSS

**-VL [SEQ ID NO: 28]**

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDTNRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

CDR区

CDRH1: SYGIS [SEQ ID NO: 101]
CDRH2: GISGSGGNTYYADSVKG [SEQ ID NO: 102]
CDRH3: SVGAYANDAFDI [SEQ ID NO: 103]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [SEQ ID NO: 104]
CDRL2: GDTNRPS [SEQ ID NO: 105]
CDRL3: AAWDDSLNGPV [SEQ ID NO: 106]

图47