



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104582717 B

(45)授权公告日 2018.03.13

(21)申请号 201380043847.1

(22)申请日 2013.07.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104582717 A

(43)申请公布日 2015.04.29

(30)优先权数据
61/673,630 2012.07.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.02.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/050489 2013.07.15

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/014821 EN 2014.01.23

(73)专利权人 雷德伍德生物科技股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 D·兰布卡 R·G·E·霍尔盖特
F·J·卡尔

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

代理人 肖鹏 王君

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1646161 A, 2005.07.27,
US 2009/0305411 A1, 2009.12.10,
CN 101626782 A, 2010.01.13,
刘黎. 抗CD22抗体与淋巴瘤的治疗.《医学综述》.2006,第12卷(第6期),339-341.
Robert J. Kreitman等. Antibody Fusion Proteins: Anti-CD22 Recombinant Immunotoxin Moxetumomab Pasudotox.《Clin Cancer Res》.2011,第17卷(第20期),6398-6405.

审查员 张丽华

权利要求书3页 说明书36页
序列表36页 附图20页

(54)发明名称

对CD22有特异性的抗体及其使用方法

(57)摘要

本公开提供对存在于CD22上的表位有特异性的抗体。所述抗体可用于多种治疗、诊断和监测应用,其也一并提供。本公开的抗-CD22抗体可在一些情况下在于其细胞表面上表达CD22的细胞中诱导凋亡。主题抗体特异性结合CD22多肽,其中表位包含CD22抗原内的氨基酸残基(例如,在CD22氨基酸序列的氨基酸1-847,氨基酸1-759,氨基酸1-751,或氨基酸1-670内)。

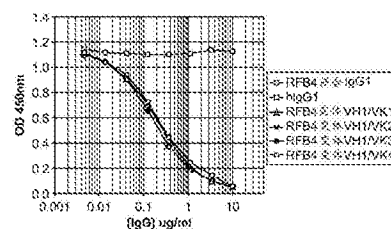


图 2A

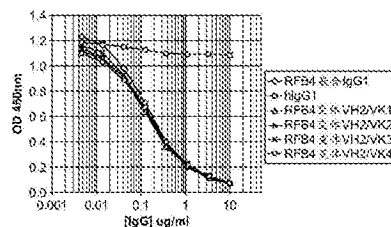


图 2B

1. 一种特异性结合CD22中的表位的抗体,其中所述抗体包含:

a) 免疫球蛋白重链,其包含氨基酸序列
EVQLVESGGGLVKPGGSLX₁LSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AK
NX₂LYLQMX₃SLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:1) 所示的VH区,其中
X₁是K或R;X₂是S或T;且X₃是N或S;和

b) 免疫球蛋白轻链,其包含氨基酸序列
DIQMTQSPSSX₄SASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAX₅KLLIYYTSILHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTIS
SLQX₆EDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:2),其中X₄是L (Leu) 或V (Val);X₅是V或P;
且X₆是Q或P。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中所述免疫球蛋白轻链包含氨基酸序列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISS
LQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7;VK1)。

3. 如权利要求1所述的抗体,其中所述免疫球蛋白轻链包含氨基酸序列
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8;VK2)。

4. 如权利要求1所述的抗体,其中所述免疫球蛋白轻链包含氨基酸序列
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9;VK4)。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述免疫球蛋白重链包含选自以下的氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNTLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:3;VH3);

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:4;VH4);

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:5;VH5);和

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:6;VH6)。

6. 如权利要求2-4中任一项所述的抗体,其中所述免疫球蛋白重链包含选自以下的氨基酸序列:

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNTLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:3;VH3);

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:4;VH4);

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:5;VH5);和

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN
NAKNSLYLQMSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:6;VH6)。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体,其中所述轻链区和所述重链区存在于分开的

多肽中。

8. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体,其中所述轻链区和所述重链区存在于单个多肽中。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的抗体,其中所述抗体以 10^7M^{-1} 至 10^{12}M^{-1} 的亲合力与所述表位结合。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中所述重链区属于同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的抗体,其中所述抗体是可检测地标记的。

12. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中所述抗体是Fv、scFv、Fab、F(ab')₂、或Fab'。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含共价连接的非肽合成聚合物。

14. 如权利要求13所述的抗体,其中所述合成聚合物是聚(乙二醇)聚合物。

15. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含共价连接的脂质或脂肪酸部分。

16. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含共价连接的碳水化合物部分。

17. 如权利要求16所述的抗体,其中所述碳水化合物是多糖。

18. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含造影剂。

19. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含亲和结构域。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的抗体,其中所述抗体被固定于固体支持物上。

21. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体,其中所述抗体是单链Fv(scFv)抗体。

22. 如权利要求21所述的抗体,其中所述scFv是多聚化的。

23. 如权利要求1-22中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含共价连接的细胞毒素。

24. 如权利要求1-23中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含恒定区氨基酸序列,所述恒定区氨基酸序列包含硫酸酯酶基序的氨基酸序列。

25. 如权利要求1-23中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含恒定区氨基酸序列,所述恒定区氨基酸序列包含硫酸酯酶基序的氨基酸序列,且所述硫酸酯酶基序被修饰以包含2-甲酰甘氨酸(FG1y)部分。

26. 如权利要求25所述的抗体,其中所述抗体包含经由所述FG1y部分与所述抗体共价连接的异源部分。

27. 如权利要求26所述的抗体,其中所述异源部分选自药物、毒素、可检测标记、水溶性聚合物和合成肽。

28. 一种包含编码如权利要求1所述的抗体的核苷酸序列的重组表达载体,其中所述核苷酸序列与在真核细胞中有活性的转录控制元件可操作地连接。

29. 一种药物组合物,其包含:

a) 如权利要求1所述的抗体;和

b) 药学上可接受的载体。

30. 如权利要求29所述的药物组合物,其中所述抗体被包封于脂质体中。

31. 权利要求1-27中任一项的抗体在制备用于治疗B细胞恶性肿瘤的药物组合物中的用途。

对CD22有特异性的抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年7月19日提交的美国临时申请系列no.61/673,630的优先权权益,该申请以其整体通过引用并入本文。

[0003] 前言

[0004] CD22,一种属于Ig超家族的谱系限制性B细胞抗原,在许多类型的恶性B细胞以及正常成熟B淋巴细胞的表面上表达。

[0005] 发明概述

[0006] 本公开提供对CD22有特异性的抗体。所述抗体可用于多种治疗、诊断和监测应用,其也一并提供。

[0007] 附图简述

[0008] 图1A和1B示出编码嵌合或人源化抗-CD22抗体重链(图1A)和轻链(图1B)的构建体。

[0009] 图2A-E为示出人源化抗-CD22抗体与生物素化亲本嵌合抗-CD22抗体竞争结合固定的CD22的图。

[0010] 图3A-D示出健康供体T细胞对测试抗体的增殖应答。

[0011] 图4示出人源化抗-CD22抗体与Raji细胞的结合,以及所述抗体被所述Raji细胞的内化。

[0012] 图5示出变体抗体对人CD22的结合亲和力。

[0013] 图6A-6D示出人源化抗-CD22变体的聚集。

[0014] 图7A和7B提供抗-CD22重链(图7A)和轻链(图7B)可变区的氨基酸序列。

[0015] 图8A-E提供抗-CD22抗体的变体抗体9-20的氨基酸序列。

[0016] 图9A-C提供CD22同种型(isoform)的氨基酸序列(上至下:SEQ ID NO:35-38)。

[0017] 定义

[0018] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白,保留与抗原的特异性结合的抗体片段,(包括但不限于Fab、Fv、scFv、和Fd片段),嵌合抗体,人源化抗体,单链抗体,及包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合抗体。抗体可以例如用放射性同位素、产生可检测产物的酶、荧光蛋白等可检测地标记。抗体可以进一步与其它部分缀合,例如特异性结合对的成员,如生物素(生物素-亲和素特异性结合对的成员)等。抗体也可以与固体支持物结合,包括但不限于,聚苯乙烯板或珠等。该术语还涵盖的是Fab'、Fv、F(ab')₂,和或其它保留与抗原特异性结合的抗体片段,以及单克隆抗体。抗体可以是单价或二价的。

[0019] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,例如,完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995));单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的称作“Fab”片段的抗原结合片段,所述“Fab”片段各自具有单一抗原结合位点以及剩余的“Fc”片段(该名称反映了容易结晶的能力)。胃蛋白酶处理产

生了具有两个抗原结合位点并且仍然能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0020] “Fv”是最小的抗体片段,其含有完整的抗原识别位点和结合位点。该区域由紧密非共价连接的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在该构型中,各可变结构域的三个CDR相互作用以在所述V_H-V_L二聚体表面上限定抗原结合位点。共同地,该六个CDR赋予所述抗体抗原结合特异性。然而,即使单一可变结构域(或抗原特异性的仅包含三个CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,不过亲和力低于整个结合位点。

[0021] “Fab”片段还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH₁)。Fab片段与Fab'片段的不同在于其重链CH₁结构域的羧基端添加了若干残基,包括来自抗体铰链区的一或多个半胱氨酸。本文中Fab'-SH是其中恒定结构域的半胱氨酸残基携带游离巯基的Fab'的名称。F(ab')₂抗体片段原来是作为Fab'片段对产生的,其中Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。也已知抗体片段的其它化学偶联。

[0022] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”,基于它们的恒定结构域的氨基酸序列,可被分至两种明显不同类型(称作κ和λ)中的一种。基于它们的重链恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被分为不同类型。有五种主要类型的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM,并且这些中的几种可以被进一步划分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。

[0023] “单链Fv”或“sFv”抗体片段包括抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。在一些实施方案中,Fv多肽还包括在V_H和V_L结构域之间的多肽接头,其使得sFv形成抗原结合所需的结构。针对sFv的综述,请参见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg and Moore编辑,Springer-Verlag,New York,第269-315页(1994)。

[0024] 术语“双抗体”指的是具有两个抗原结合位点的小的抗体片段,其片段包含在同一多肽链(V_H-V_L)中与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)。通过使用太短而不能使得同一链上的两个结构域配对的接头,迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双抗体更全面地描述于例如EP 404,097、WO 93/11161、和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)。

[0025] 如本文所用,术语“亲和力”指的是两种试剂可逆结合的平衡常数,并且表达为解离常数(K_d)。亲和力可以比抗体对不相关氨基酸序列的亲和力高至少1倍、高至少2倍、高至少3倍、高至少4倍、高至少5倍、高至少6倍、高至少7倍、高至少8倍、高至少9倍、高至少10倍、高至少20倍、高至少30倍、高至少40倍、高至少50倍、高至少60倍、高至少70倍、高至少80倍、高至少90倍、高至少100倍、或高至少1000倍、或更高。抗体对靶蛋白的亲和力可以是例如约100纳摩尔(nM)至约0.1nM,约100nM至约1皮摩尔(pM),或约100nM至约1飞摩尔(fM)或更高。如本文所用,术语“亲合力(avidity)”指的是两种或更多种试剂的复合物在稀释后对解离的抗性。就抗体和/或抗原结合片段而言,术语“免疫反应性”和“优先结合”在本文中可互换使用。

[0026] 术语“结合”指的是由于例如共价、静电、疏水、和离子和/或氢键相互作用(包括例如盐桥和水桥相互作用)两个分子间的直接连接其。主题抗-CD22抗体特异性结合CD-22多肽内的表位。非特异性结合将指的是具有小于约10⁻⁷M的亲合力的结合,例如具有10⁻⁶M、10⁻⁵M、10⁻⁴M等亲和力的结合。

[0027] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”意指在重链和轻链多肽两者的可变区内发现的非连续抗原结合位点。CDR描述于Kabat等人,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of proteins of immunological interest”(1991);Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);和MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),其中所述定义包括当相互比较时重叠的氨基酸残基或氨基酸残基的子集。然而,应用两种定义之一来指代抗体或接枝的抗体或其变体的CDR意在属于如本文定义和所用的该术语的范围内。涵盖由如上面所引用文献各自定义的CDR的氨基酸残基示于下表1以作比较。

[0028] 表1:CDR定义

[0029]

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

[0030] ¹残基编号遵循上述Kabat等人的命名,

[0031] ²残基编号遵循上述Chothia等人的命名,

[0032] ³残基编号遵循上述MacCallum等人的命名,

[0033] 如本文所用,当用于提到抗体可变区时,术语“框架”意指抗体可变区内CDR区域之外的全部氨基酸残基。可变区框架通常是长达约100-120个氨基酸的不连续氨基酸序列,但是旨在仅仅指代CDR之外的那些氨基酸。如本文所用,术语“框架区”意指框架被CDR隔开的每个结构域。

[0034] “分离的”抗体是已经从其天然环境的组分中鉴别并分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且包括酶、激素、和其它蛋白质的或非蛋白质的溶质。在一些实施方案中,(1)抗体将被纯化以通过Lowry法测定的抗体重量计的大于90%,大于95%或大于98%,例如,以重量计大于99%,(2)抗体将被纯化足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N端或内部氨基酸序列的程度,或(3)通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或银染将抗体纯化以达到均化。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为所述抗体天然环境的至少一种组分将不存在。在一些例子中,分离的抗体将通过至少一个纯化步骤制备。

[0035] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等指的是获得所需的药理学和/或生理学效果。所述效果就完全或部分地预防疾病或其症状而言可以是预防性的,和/或就部分或全部治愈疾病和/或由疾病引起的不良影响而言可以是治疗性的。如本文所用,“治疗”涵盖在哺乳动物,特别是人中的疾病的任何治疗,并且包括:(a)在可能对疾病易感但是仍未被诊断为患有该疾病的受试者中预防该疾病的出现;(b)抑制疾病,即,阻止其发展;和(c)缓解疾病,即,导致疾病的消退。

[0036] 本文可互换使用的术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”指的是哺乳动物,包括

但不限于,鼠科动物(大鼠、小鼠)、非人灵长类动物、人、犬、猫、有蹄类动物(如马、牛、绵羊、猪、山羊)等。

[0037] “治疗有效量”或“有效量”指的是主题抗-CD22Ab的量,当给哺乳动物或其它受试者施用以治疗疾病时,足以实现此种对疾病的治疗。“治疗有效量”将根据抗-CD22Ab、疾病及其严重性以及待治疗受试者的年龄、体重等变化。

[0038] “生物学样品”涵盖获得自个体的多种样品类型并且可以用于诊断或监测测定。该定义涵盖血液和其它生物学来源的液体样品,固体组织样品例如活检样本或组织培养物或从其衍生的细胞及其后代。该定义还包括在其获得后被以任何方式进行操作的样品,例如用试剂处理、溶解、或富集某些组分如多核苷酸。术语“生物学样品”涵盖临床样品,且还包括培养中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物学流体、和组织样品。在一些情况下,生物学样品将包括B细胞。

[0039] 在进一步描述本发明之前,应当理解本发明不限于所描述的具体实施方案,因此当然可以有所不同。也应当理解本文所用术语仅是出于描述具体实施方案的目的,而不旨在进行限制,因为本发明的范围仅受限于所附权利要求。

[0040] 在提供值的范围时,应理解在该范围上限值和下限值之间的各插入值(除非上下文清楚另外指明,否则为下限值单位的十分之一),或所述范围内任何其它指明的值或插入值,涵盖在本发明内。这些较小范围的上限值和下限值可以独立地包括于所述较小范围内,且也涵盖于本发明中,受限于所指明范围任何具体排除的限值。当指定的范围包括限值中的一个或两个时,排除那些被包括的限值中的任一者或两者的范围也包括在本发明内。

[0041] 除非另外定义,否则本文所用全部技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管也可在本发明的实践或测试中使用与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料,现在描述了优选的方法和材料。本文提及的全部出版物通过引用并入本文以公开和描述所引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0042] 应当指出除非上下文另外清楚指明,否则如本文所用以及在所附权利要求所用中,单数形式的“一个/种(a)”、“一个/种(an)”和“所述”包括复数指代。因此,例如,提及“一种抗体”包括多个这样的抗体,且提及“所述CDR”包括提及一个或多个CDR及本领域技术人员已知的其等同物,等。进一步指出权利要求可以被撰写为排除任何任选的元素。因此,本声明旨在作为用于如“唯一地”、“仅仅”等与引用权利要求元素相关的排他性术语或用于“负”限定的前提条件。

[0043] 本文讨论的出版物仅因为它们公开早于本申请的申请日才提供。本文全部内容都不应被解释为承认本发明不能由于较早发明而比这样的出版物居先。此外,所提供的出版日期可能不同于实际的出版日期,其需要独立确认。

[0044] 发明详述

[0045] 本公开提供CD22特异性抗体。所述抗体可用于多种治疗、诊断和监测应用中,其也一并提供。

[0046] 抗体

[0047] 主题抗体特异性结合CD22多肽,其中表位包含CD22抗原内的氨基酸残基(例如,在图9A-C所示的CD22氨基酸序列的氨基酸1-847,氨基酸1-759,氨基酸1-751内,或氨基酸1-670内)。

[0048] CD22表位可以与由图9A-C所示的人CD22同种型4氨基酸序列的约500个氨基酸至约670个氨基酸的连续区段(stretch)具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的多肽形成。CD22表位可以由与图9A-C所示的人CD22同种型3氨基酸序列的约500个氨基酸至约751个氨基酸的连续区段(stretch)具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的多肽形成。CD22表位可以由与图9A-C所示的人CD22同种型2氨基酸序列的约500个氨基酸至约759个氨基酸的连续区段(stretch)具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的多肽形成。CD22表位可以由与图9A-C所示的人CD22同种型1氨基酸序列的约500个氨基酸至约847个氨基酸的连续区段(stretch)具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的多肽形成。

[0049] 主题抗体展现出结合CD22的高亲和力。例如,主题抗体以至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、或至少约 10^{-12} M、或高于 10^{-12} M的亲和力结合CD22。主题抗体以约 10^{-7} M至约 10^{-8} M、约 10^{-8} M至约 10^{-9} M、约 10^{-9} M至约 10^{-10} M、约 10^{-10} M至约 10^{-11} M、或约 10^{-11} M至约 10^{-12} M、或高于 10^{-12} M的亲和力结合存在于CD22上的表位。

[0050] 在一些情况中,本公开的抗-CD22抗体可以在于其细胞表面上表达CD22的细胞中诱导凋亡。

[0051] “CD22抗原”或“CD22多肽”可以包含与图9A-C所示的CD22同种型1、2、3或4氨基酸序列的约500个氨基酸(aa)至约847个aa(同种型1),至约759个aa(同种型2),至约751个aa(同种型3),或至670个aa(同种型4)的连续区段(stretch)具有至少约75%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0052] 术语“抗体”指的是包含一或多个(如一个或两个)重链可变区(VH)和/或一或多个(如一个或两个)轻链可变区(VL)的蛋白质,或其能够结合表位的亚片段。VH和VL区可以被进一步细分为称作“互补决定区(CDR)”的超变区,由更加保守的称作“框架区(FR)”的区域间隔开。FR和CDR的范围已经被精确定义(参见,Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242;Chothia等人(1987)J.Mol.Biol.196:901-917)。VH可包含以下列顺序从N端至C端排列的三个CDR和四个FR:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。类似地,VL可包含以下列顺序从N端至C端排列的三个CDR和四个FR:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。

[0053] 抗体的VH或VL链还可以包括重链或轻链恒定区的全部或部分,由此分别形成免疫球蛋白重链或轻链。在一实施方案中,抗体是两条重链和两条轻链的四聚体,其中所述重链和轻链通过例如二硫键相互连接。重链恒定区包括三个结构域,CH1、CH2和CH3。轻链恒定区包含一个结构域,CL。重链和轻链的可变区包含和抗原相互作用的结合区。抗体的恒定区一般介导抗体与宿主组织和因子(包括免疫系统的多种细胞和补体系统的第一组分)的结合。术语“抗体”包括IgA、IgG、IgE、IgD、IgM型及其亚型的完整免疫球蛋白。在一些实施方案中,主题抗体是IgG同种型。在一些实施方案中,主题抗体是IgG1同种型。

[0054] 如本文所用,术语“免疫球蛋白”指的是由基本上由免疫球蛋白基因编码的一或多

个多肽组成的蛋白质。公认的人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1和IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因；以及大量免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白轻链(约25kD或214个氨基酸)由N端的可变区基因(约110个氨基酸)和C端的 κ 或 λ 恒定区编码。全长免疫球蛋白重链(约50kD或446个氨基酸)由N端的可变区基因(约116个氨基酸)和C端的其它前述恒定区基因之一(如 γ ，编码约330个氨基酸)编码。在一些实施方案中，主题抗体包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链。

[0055] 在一些实施方案中，主题抗体不包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链，而包含全长免疫球蛋白重链和全长免疫球蛋白轻链的抗原结合片段。在一些实施方案中，所述抗原结合片段包含于分开的多肽链上；在其它实施方案中，所述抗原结合片段包含于单一多肽链中。术语“抗原结合片段”指的是全长抗体的一或多个片段，其能够如上所述特异性结合CD22。结合片段的实例包括(i) Fab片段(由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段)；(ii) F(ab')₂片段(包含通过较链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段)；(iii) Fd片段(由VH和CH1结构域组成)；(iv) Fv片段(由抗体单一臂的VH和VL结构域组成)；(v) dAb片段(由VH结构域组成)；(vi) 分离的CDR；(vii) 单链Fv(scFv)(由抗体单一臂的VH和VL结构域组成，所述VH和VL结构域使用重组手段通过合成接头连接，使得所述VH和VL结构域对形成单价分子)；(viii) 双抗体(由两个scFv组成，其中VH和VL被连接使得它们不配对形成单价分子；scFv对中每一个的VH结构域与另一scFv的VL结构域配对形成二价分子)；(ix) 双特异性抗体(由至少两个抗原结合区组成，每个区结合不同表位)。在一些实施方案中，主题抗体片段是Fab片段。在一些实施方案中，主题抗体是单链抗体(scFv)。

[0056] 在一些实施方案中，主题抗体是重组的或修饰的抗体，例如，嵌合的、人源化的、去免疫化的(deimmunized)或体外生成的抗体。如本文所用的术语“重组的”或“修饰的”抗体旨在包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的全部抗体，例如(i) 使用转染进宿主细胞的重组表达载体表达的抗体；(ii) 从重组的组合抗体文库分离的抗体；(iii) 从转人免疫球蛋白基因的动物(如小鼠)分离的抗体；或(iv) 通过涉及将人免疫球蛋白基因剪接至其它DNA序列的任何其它手段制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组抗体包括人源化的、CDR接枝的、嵌合的、去免疫化的、和体外生成的抗体；且可任选地包括衍生自人种系免疫球蛋白序列的恒定区。

[0057] 在一些实施方案中，主题抗体包含：a) 重链，其包含具有氨基酸序列 EVQLVESGGGLVKPGGSLX¹LSCAAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPDIVKGRFTISRDNKX²LYLQMX³SLRAEDTAMYCARHSGYGSYGVLFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1) 的VH区，其中X¹是K(Lys)或R(Arg)；X²是S(Ser)或T(Thr)；且X³是N(Asn)或S(Ser)；以及b) 免疫球蛋白轻链。

[0058] 轻链可以具有任何合适的VL氨基酸序列，只要所得的抗体特异性结合CD22。

[0059] 示例性VL氨基酸序列包括：

[0060]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7;VK1)；

[0061]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSL

LQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8;VK2);和

[0062]

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISS
LQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9;VK4)。

[0063] 因此,例如,主题抗-CD22抗体可以包含:a)重链,其包含具有SEQ ID NO:1)所示氨基酸序列的VH区;和轻链,其包含VK1的VL区。在其它情况下,主题抗-CD22抗体可以包含:a)重链,其包含具有SEQ ID NO:1)所示氨基酸序列的VH区;和轻链,其包含VK2的VL区。在另一些其它情况下,主题抗-CD22抗体可以包含:a)重链,其包含具有SEQ ID NO:1)所示氨基酸序列的VH区;和轻链,其包含VK4的VL区。

[0064] 在一些情况中,主题抗-CD22抗体包含:a)免疫球蛋白轻链,其包含氨基酸序列
D I Q M T Q S P S S X¹ S A S V G D R V T I T C R A S Q D I S N Y L N
WYQQKPGKAX²KLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQX³EDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO:2),其中X¹是L (Leu) 或V (Val);X²是V (Val) 或P (Pro);且X³是Q (Gln) 或P (Pro);
以及b)免疫球蛋白重链。所述重链可以包含选自以下的氨基酸序列:

[0065]

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AKN
TLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3;VH3);

[0066]

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AKN
SLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4;VH4);

[0067] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGT |
TYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:
5;VH5);和

[0068]

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTYYPD TVKGRFTISRDN AKN
SLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:6;VH6)。

[0069] 适合用于主题抗体的接头包括“柔性接头”。如果存在,则接头分子通常具有足够的长度以允许所连接的区域间的一些柔性运动。接头分子通常长约6-50个原子。接头分子也可以是,例如,芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇低聚体、二胺、二酸、氨基酸、或其组合。根据本公开,可以使用其它能够结合多肽的接头分子。

[0070] 主题抗体可以是“人源化的”。术语“人源化抗体”指的是抗体,其包含至少一条链,所述链含有基本上来自人抗体链(称作受体免疫球蛋白或抗体)的可变区框架残基,和至少一个基本上来自小鼠抗体(称作供体免疫球蛋白或抗体)的CDR。参见Queen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1002910033 (1989)、美国专利No.5,530,101、美国专利No.5,585,089、美国专利No.5,693,761、WO 90/07861、和美国专利No.5,225,539。如果存在,则恒定区也可以基本上或全部来自人免疫球蛋白。制备人源化抗体的方法是本领域已知的。参见,例如美国专利No.7,256,273。

[0071] 将小鼠CDR置换进人可变结构域框架可以使得保留它们的正确空间朝向,其中,例如所述人可变结构域框架采用与所述CDR来源的小鼠可变框架相同或类似的构象。这可以

通过从其框架序列展现与所述CDR所来源的鼠科动物可变框架结构域具有高度序列同一性的人抗体获得所述人可变结构域来实现。重链和轻链可变框架区可以衍生自相同或不同的人抗体序列。所述人抗体序列可以是天然存在的人抗体的序列或可以是若干人抗体的共有序列。参见Kettleborough等人, *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger等人, *Protein Engineering* 6:971 (1993)。

[0072] 鉴别出鼠科动物供体免疫球蛋白的互补决定区和合适的人受体免疫球蛋白后, 下一步是确定这些组分的哪些残基(如果有的话)应当被置换以优化所得的人源化抗体的特性。一般而言, 用鼠科动物置换人氨基酸残基应当最小化, 因为引入鼠科动物残基增加了抗体在人中引起人-抗-小鼠-抗体(HAMA)应答的风险。可以进行本领域公认的测定免疫应答的方法来监测特定患者中或临床试验期间的HAMA应答。施用了人源化抗体的患者可以在所述治疗施用的开始和全程进行免疫原性评估。例如, 通过使用本领域技术人员已知的方法在来自患者的血清样品中检测针对人源化治疗剂的抗体来测量所述HAMA应答, 所述方法包括表面等离子共振技术(BIACORE)和/或固相ELISA分析。在许多实施方案中, 本发明的人源化抗体并不实质地在人受试者中引发HAMA应答。

[0073] 基于其对CDR构象和/或与抗原的结合的可能的影响, 从所述人可变区框架残基中选择某些氨基酸进行置换。鼠科动物CDR区和人可变框架区的非天然并置可导致非天然的构象约束(conformational restraint), 除非通过置换某些氨基酸残基来校正, 否则其导致丧失结合亲和力。

[0074] 进行置换的氨基酸残基的选择可以部分地通过计算机建模确定。本领域已知用于产生免疫球蛋白分子三维图像的计算机硬件和软件。一般而言, 从免疫球蛋白链或其结构域已解析的结构开始产生分子模型。比较待建模的链与具有已解析的三维结构的链或结构域的氨基酸序列相似性, 而显示最高序列相似性的链或结构域被选择作为用于构建分子模型的起点。选择共有至少50%序列同一性的链或结构域用于建模, 且优选地选择共有至少60%、70%、80%、90%或更高的序列同一性的那些用于建模。将已解析的起始结构修饰以使得在建模的免疫球蛋白链或结构域中的实际氨基酸与起始结构中的那些之间有差异。修饰的结构然后被组装成复合免疫球蛋白。最后, 通过能量最小化并且通过验证全部原子相互在合适的距离内以及键长和键角在化学可接受的限度内, 对模型微调。

[0075] CDR和框架区通过Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987和1991)定义。Chothia等人, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); *Nature* 342:878 (1989); 和 *J. Mol. Biol.* 186:651 (1989) (一并称作“Chothia”)曾提出可选的结构定义。当如通过上文Kabat所定义的框架残基构成如上文Chothia定义的结构环残基时, 可以选择存在于小鼠抗体中的氨基酸用于置换进入源化抗体。“邻近CDR区”的残基包括在人源化免疫球蛋白链一级序列中紧邻一或多个CDR的位置处的氨基酸残基, 例如, 在紧邻如通过Kabat定义的CDR或通过如Chothia定义的CDR的位置处(参见例如Chothia和Lesk *JMB* 196:901 (1987))。这些氨基酸特别可能与CDR中的氨基酸相互作用, 且如果选自受体, 很可能扭曲供体CDR并降低亲和力。此外, 所述邻近氨基酸可以直接和抗原相互作用(Amit等人, *Science*, 233:747 (1986)), 并且从供体选择这些氨基酸可为期望的以保持在原始抗体中提供亲和力的全部抗原接触。

[0076] 在一些实施方案中, 主题抗体包括scFv多聚体。例如, 在一些实施方案中, 主题抗

体是scFv二聚体(如,包含两个串联scFv(scFv₂)),scFv三聚体(如,包含三个串联scFv(scFv₃)),scFv四聚体(如,包含四个串联scFv(scFv₄)),或是多于四个(如,串联的)scFv的多聚体。所述scFv单体可以经由接头串联连接,所述接头长约2个氨基酸至约10个氨基酸,例如长2aa、3aa、4aa、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、或10aa。合适的接头包括,例如,(Gly)_x,其中x是2-10的整数。其它合适的接头为上面讨论的那些。在一些实施方案中,主题scFv多聚体中的每个scFv单体是如上所述的人源化的。

[0077] 在一些实施方案中,主题抗体包含免疫球蛋白的恒定区(如,Fc区)。所述Fc区,如果存在,可以是人Fc区。如果恒定区存在,抗体可以含有轻链和重链恒定区两者。合适的重链恒定区包括CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。本文描述的抗体包括具有全部类型恒定区的抗体,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。合适的重链Fc区的实例是人同种型IgG1Fc。轻链恒定区可以是λ或κ。主题抗体(如主题人源化抗体)可以包含来自多于一类或同种型的序列。抗体可被表达为含有两条轻链和两条重链的四聚体,表达为分开的重链、轻链,表达为Fab、Fab'F(ab')₂和Fv,或表达为其中重链和轻链可变结构域通过间隔子连接的单链抗体。

[0078] 在一些实施方案中,主题抗体在羧基端包含游离巯基(-SH),其中所述游离巯基可用于将所述抗体连接至第二多肽(如,另一抗体,包括主题抗体)、支架、载体等。

[0079] 在一些实施方案中,主题抗体包含一或多个非天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,所述非天然编码的氨基酸包含羰基、乙酰基、氨氧基、胍基、酰胍基、氨基脒基、叠氮基、或炔基。合适的非天然存在的氨基酸参见例如美国专利No.7,632,924。包括非天然存在的氨基酸可提供与聚合物、第二多肽、支架等的连接。例如,与水溶性聚合物连接的主题抗体可以通过使包含羰基的水溶性聚合物(如PEG)与包含非天然编码的氨基酸的主题抗体反应来制备,所述非天然编码的氨基酸包含氨氧基、胍基、酰胍基或氨基脒基。作为另一实例,与水溶性聚合物连接的主题抗体可以通过使包含炔基氨基酸的主题抗体与包含叠氮部分的水溶性聚合物(如PEG)反应来制备;在一些实施方案中,所述叠氮基或炔基通过酰胺键与所述PEG分子连接。“非天然编码的氨基酸”是指不是20种普通氨基酸或吡咯赖氨酸或硒代胱氨酸之一的氨基酸。其它可以与术语“非天然编码的氨基酸”同义使用的术语为“非天然氨基酸(non-natural amino acid)”、“非天然氨基酸(unnatural amino acid)”、“非天然存在的氨基酸”,以及其带有不同连字符号和不带连字符号的版本。术语“非天然编码的氨基酸”还包括但不限于,通过修饰天然编码的氨基酸(包括但不限于20种普通氨基酸或吡咯赖氨酸和硒代胱氨酸)而出现的氨基酸,但其本身并不天然地通过翻译复合物掺入生长中的多肽。这样的非天然存在的氨基酸的实例包括但不限于,N-乙酰葡萄糖胺基-L-丝氨酸、N-乙酰葡萄糖胺基-L-苏氨酸和O-磷酸酪氨酸。

[0080] 本公开还提供抗-CD22抗体,其具有目标连接部分,例如可检测标记、药物、延长半衰期的部分等。抗体的修饰可以通过多种合成和/或重组方法实现。连接至抗体的一个部分或多个部分可以提供多种功能或特征中的一或多种。示例性部分包括可检测标记(如,染料标记(如生色团、荧光团))、生物物理学探针(自旋标记、核磁共振(NMR)探针)、Förster共振能量转移(FRET)-型标记(例如,FRET对的至少一个成员,包括荧光团/猝灭剂对的至少一个成员)、生物发光共振能量转移(BRET)-型标记(如,BRET对的至少一个成员)、免疫可检测的标记(如,FLAG、His(6)等);水溶性聚合物(如PEG化);纯化标记(如,有利于通过亲和层析促

进分离(如连接FLAG表位);膜定位结构域(如,脂质或糖磷脂酰肌醇(GPI)-型锚定物);固定化标记(如,有利于多肽连接于表面,包括选择性连接);药物(如,有利于药物靶向,例如,通过将药物与抗体连接);等。

[0081] 在一些实施方案中,主题抗体与聚合物(如除多肽外的聚合物)连接(如共价连接)。合适的聚合物包括,例如,生物相容性聚合物,以及水溶性生物相容性聚合物。合适的聚合物包括合成聚合物和天然存在的聚合物。合适的聚合物包括例如,取代的或未取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化烯基聚合物,或者支链或直链的多糖,如同多糖或杂多糖。合适的聚合物包括,例如,乙烯-乙醇共聚物(通常称作通用名EVOH或商品名EVAL);聚甲基丙烯酸丁酯;聚(羟基戊酸);聚(聚左旋乳酸);聚己酸内酯;聚(丙交酯-共-乙交酯);聚(羟基丁酸酯);聚(羟基丁酸酯-共-戊酸酯);聚二恶烷酮;聚原酸酯(polyorthoester);聚酸酐;聚(羟乙酸);聚(D,L-乳酸);聚(羟乙酸-共-碳酸亚丙基酯);聚磷酸酯;聚磷酸酯氨基甲酸乙酯;聚(氨基酸);氰基丙烯酸酯类;聚(碳酸亚丙基酯);聚(亚氨基碳酸酯);共聚(醚-酯)(如,聚(环氧乙烷)-聚(乳酸)(PEO/PLA)共聚物);聚亚烷基草酸酯;聚偶磷氮;生物分子,例如成纤维蛋白、纤维蛋白原、纤维素、淀粉、胶原和透明质酸;聚氨基甲酸酯;硅酮;聚酯;聚烯烃;聚异丁烯和乙烯- α 石蜡共聚物;丙烯酸聚合物和共聚物;卤乙烯聚合物和共聚物,例如聚氯乙烯;聚乙烯醚,例如聚乙烯基甲基醚;聚偏二卤乙烯,例如聚偏二氟乙烯和聚偏二氯乙烯;聚乙烯酮;聚乙烯芳香族化合物,例如聚苯乙烯;聚乙烯酯,例如聚乙烯醋酸酯;乙烯基单体相互间和石蜡的共聚物,例如乙烯-甲基丙烯酸甲酯共聚物、丙烯腈-苯乙烯共聚物、ABS树脂和乙烯-乙酸乙烯酯共聚物;聚酰胺、例如Nylon 66和聚己内酰胺;醇酸树脂;聚碳酸酯;聚甲醛;聚酰亚胺;聚醚;环氧树脂;聚氨基甲酸酯;螺紫(rayon);螺紫-三乙酸酯;纤维素;醋酸纤维素;丁酸纤维素;醋酸丁酸纤维素;赛璐玢;硝酸纤维素;丙酸纤维素;纤维素醚类;无定形Teflon;聚(乙二醇)和羧甲基纤维素。

[0082] 合适的合成聚合物包括未取代的和取代的直链或支链聚(乙二醇)、聚(丙二醇)聚(乙醇醇)、及其衍生物,例如,取代的聚(乙二醇)如甲氧基聚(乙二醇),及其衍生物。合适的天然存在的聚合物包括,例如,白蛋白、直链淀粉、葡聚糖、糖原、及其衍生物。

[0083] 合适的聚合物可以具有500Da-50000Da,如5000Da-40000Da或25000-40000Da范围内的平均分子量。例如,在其中主题抗体包含聚(乙二醇)(PEG)或甲氧基聚(乙二醇)聚合物的一些实施方案中,所述PEG或甲氧基聚(乙二醇)聚合物可具有约0.5千道尔顿(kDa)至1kDa,约1kDa至5kDa,5kDa至10kDa,10kDa至25kDa,25kDa至40kDa,或40kDa至60kDa范围内的分子量。

[0084] 如上所指出,在一些实施方案中,主题抗体共价地与PEG聚合物连接。在一些实施方案中,主题scFv多聚体共价地与PEG聚合物连接。适合于蛋白质PEG化的方法和试剂是本领域公知的并且可以在如美国专利No.5,849,860中找到。适合于与蛋白质缀合的PEG通常在室温可溶于水,并且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R是氢或保护基团例如烷基或烷醇基,且其中n是1-1000的整数。如果R是保护基团,其通常具有1-8个碳。

[0085] 与主题抗体缀合的PEG可以是直链的。与主题蛋白缀合的PEG也可以是支链的。支链PEG衍生物(例如美国专利No.5,643,575中描述的那些),“星型-PEG衍生物”和多臂PEG衍生物(例如Shearwater Polymers, Inc.目录“Polyethylene Glycol Derivatives 1997-1998”描述的那些衍生物)。本领域包括例如在美国专利No.6,046,305中描述了星型PEG。

[0086] 主题抗体可以被糖基化,例如,主题抗体可以包括共价连接的碳水化合物或多糖部分。抗体的糖基化一般是N-连接或O-连接的。N-连接的指的是碳水化合物部分与天冬酰胺残基侧链的连接。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任意氨基酸)是用于所述碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促连接的识别序列。因此,多肽中这些三肽序列之一的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接糖基化指的是糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖与羟基氨基酸的连接,所述羟基氨基酸最通常是丝氨酸或苏氨酸,不过也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。可以通过例如在具有所需糖基化细胞器的宿主细胞中重组产生来实现糖基化。

[0087] 通过改变氨基酸序列使得其含有一或多个上述的三肽序列(对于N-连接糖基化位点),方便地实现向抗体添加糖基化位点。所述改变还可以通过对原始抗体序列添加一或多个丝氨酸或苏氨酸残基或者用一或多个丝氨酸或苏氨酸取代来实现(对于O-连接的糖基化位点)。类似地,通过抗体天然糖基化位点内的氨基酸改变可以实现糖基化位点的去除。

[0088] 使用例如戊二醛、同型双功能交联剂或异型双功能交联剂,主题抗体可以共价连接至第二部分(如,脂质、除主题抗体外的多肽、合成聚合物、碳水化合物等)。戊二醛经由它们的氨基部分与多肽交联。同型双功能交联剂(同型双功能亚氨酸酯、同型双功能N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、或同型双功能巯基反应性交联剂)含有两个或更多个相同的反应性部分,且可以用于一步反应程序中,其中所述交联剂被添加至含有待连接的多肽的混合物的溶液中。同型双功能NHS酯和亚氨酸酯交联含胺的多肽。在温和的碱性pH,亚氨酸酯仅和伯胺反应形成亚氨酰胺,且不影响所交联的多肽的总电荷。同型双功能巯基反应性交联剂包括双马来酰亚胺己烷(BMH)、1,5-二氟-2,4-二硝基苯(DFDNB)、和1,4-二-(3',2'-吡啶二硫代)丙酰胺基丁烷(DPDPB)。

[0089] 异型双功能交联剂具有两个或更多个不同的反应性部分(如胺反应性部分和巯基反应性部分),且经由胺或巯基反应性部分与多肽之一交联,然后经由未反应的部分与其它多肽反应。可获得多种异型双功能卤乙酰基交联剂,例如吡啶基二硫化物交联剂。碳二亚胺是用于交联羰基与胺进而形成酰胺键的异型双功能交联试剂的经典实例。

[0090] 主题抗体可以固定于固体支持物上。合适的支持物为本领域公知的,且尤其包括可商购获得的柱材料、聚苯乙烯珠、乳胶珠、磁珠、胶体金属颗粒、玻璃和/或硅片及表面、硝酸纤维素条、尼龙膜、薄片、duracyte、反应盘(如多孔板)的孔、塑料管等。固体支持物可包含多种物质中的任一种,包括例如,玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、葡聚糖、尼龙、直链淀粉、天然的和改性的纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖和磁铁矿。将主题抗体固定于固体支持物上的合适的方法是公知的,且包括但不限于离子、疏水性、共价相互作用等。固体支持物例如在水性溶液中可以是可溶的或不可溶的。在一些实施方案中,合适的固体支持物一般在水性溶液中是不可溶的。

[0091] 在一些实施方案中,主题抗体可以包含可检测的标记。合适的可检测的标记包括可通过分光光度、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学或化学手段监测的任何组分。合适的包括但不限于,磁珠(如Dynabeads™)、荧光染料(如,异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等)、放射性标记(如,³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、或³²P)、酶(如,辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶、荧光素酶、和在美联免疫吸附测定(ELISA)中常用的其它酶),以及比色标记如胶体金或有色玻璃或塑料(如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)

珠。

[0092] 在一些实施方案中,主题抗体包含造影剂或放射性同位素,其中所述造影剂或放射性同位素适合于例如在成像(例如在人上执行的成像程序)中用作可检测的标记。标记的非限制性实例包括放射性同位素例如¹²³I(碘)、¹⁸F(氟)、⁹⁹Tc(锝)、¹¹¹In(铟)和⁶⁷Ga(镓),以及造影剂例如钆(Gd)、镓和铁。放射性Gd同位素(¹⁵³Gd)也是可用的且适用于在非人哺乳动物中的成像程序。

[0093] 主题抗体可以使用标准技术标记。例如,主题抗体可以使用氯胺T或1,3,4,6-四氯-3 α ,6 α -二苯基甘脲(dephenylglycouril)碘化。对于氯化,通过氯离子置换反应在合成期间将氯添加至主题抗体。参见,Muller-Gartner,H.,TIB Tech.,16:122-130(1998)和Saji,H.,Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.,16(2):209-244(1999)关于用此类放射性同位素合成蛋白质的综述。主题抗体也可以用造影剂通过标准技术标记。例如,主题抗体可以通过将低分子Gd螯合物例如Gd二亚乙基三胺五乙酸(GdDTPA)或Gd四氮杂环十二烷四乙酸(GdDOTA)缀合至所述抗体用Gd标记。参见,Caravan等人,Chem.Rev.99:2293-2352(1999)和Lauffer等人,J.Magn.Reson.Imaging,3:11-16(1985)。主题抗体可以通过例如将聚赖氨酸-Gd螯合物缀合至所述抗体用Gd标记。参见,例如,Curtet等人,Invest.Radiol.,33(10):752-761(1998)。或者,主题抗体可以通过将包括具有亲和素的Gd螯合物脂质的顺磁性聚合脂质体与亲和素和生物素化的抗体孵育用Gd标记。参见,例如,Sipkins等人,Nature Med.,4:623-626(1998)。

[0094] 可以连接至主题抗体的合适的荧光蛋白包括但不限于如在美国专利No.6,066,476;6,020,192;5,985,577;5,976,796;5,968,750;5,968,738;5,958,713;5,919,445;5,874,304中所描述的来自维多利亚多管发光水母(Aequoria victoria)的绿色荧光蛋白或其变体或衍生物;例如增强GFP,许多这样的GFP例如从Clontech,Inc.可商购获得;红色荧光蛋白;黄色荧光蛋白;如在例如Matz等人(1999)Nature Biotechnol.17:969-973中所描述的来自珊瑚虫物种的多种荧光和有色蛋白中的任一种;等。

[0095] 在一些实施方案中,主题抗体包含“不透射线的(radiopaque)”标记,例如,能够容易地使用例如x-射线可视化的标记。不透射线的材料是本领域技术人员熟知的。最常见的不透射线的材料包括碘化物、溴化物或钡盐。其它不透射线的材料也是已知的且包括但不限于有机铋衍生物(参见例如美国专利No.5,939,045)、不透射线的聚氨酯(multiurethane)(参见美国专利No.5,346,981)、有机铋复合物(参见例如美国专利No.5,256,334)、不透射线的钡多聚体复合物(参见例如美国专利No.4,866,132)等。

[0096] 在一些实施方案中,主题抗体将和融合配偶体,例如,配体、表位标记、多肽、除抗体外的蛋白质等连接(例如共价地或非共价地连接)。合适的融合配偶体包括肽和多肽,其赋予增强的体内稳定性(如增强的血清半衰期);提供纯化的便利性等;提供所述融合蛋白从细胞的分泌;提供表位标记,如(His)_n,如6His等;提供所述融合蛋白从细胞的分泌;提供表位标记,如GST、血凝素(HA;如,CYPYDVPDYA;SEQ ID NO:10)、FLAG(如,DYKDDDDK;SEQ ID NO:11)、c-myc(如,CEQKLISEEDL;SEQ ID NO:12)等;提供可检测的信号,例如生成可检测产物的酶(如, β -半乳糖苷酶、荧光素酶),或本身可检测的蛋白质,例如绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等;提供多聚化,如多聚化结构域(例如免疫球蛋白的Fc部分);等。

[0097] 所述融合还可以包括亲和结构域,包括可与结合配偶体相互作用的肽序列,如,例

如固定于固体支持物的、可用于鉴定或纯化的结构域。连续的单一氨基酸,例如组氨酸,当与蛋白质融合时,可用于通过与树脂柱(例如镍琼脂糖)的高亲和力结合而一步纯化所述融合蛋白。亲和结构域的实例包括包括His5(HHHHH)(SEQ ID NO:13)、HisX6(HHHHHH)(SEQ ID NO:14)、C-myc(EQKLISEEDL)(SEQ ID NO:15)、Flag(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:16)、StrepTag(WSHPQFEK)(SEQ ID NO:17)、血凝素(如HA标记(YPYDVPDYA;SEQ ID NO:18))、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白、纤维素结合结构域、RYIRS(SEQ ID NO:19)、Phe-His-His-Thr(SEQ ID NO:20)、几丁质结合结构域、S-肽、T7肽、SH2结构域、C-端RNA标记、WEAAAREACCRECCARA(SEQ ID NO:21)、金属结合结构域如锌结合结构域或钙结合结构域(例如来自钙结合蛋白的那些结构域,所述钙结合蛋白例如钙调蛋白、肌钙蛋白C、钙调磷酸酶B、肌球蛋白轻链、恢复蛋白、S-调控蛋白、视锥蛋白、VILIP、神经钙蛋白、海马钙结合蛋白、恢复性蛋白(frequenin)、钙牵蛋白、钙蛋白酶大亚基、S100蛋白、细小白蛋白、钙结合蛋白D9K、钙结合蛋白D28K和钙视网膜蛋白))、内含肽、生物素、链霉亲和素、MyoD、亮氨酸拉链序列和麦芽糖结合蛋白。

[0098] 在一些实施方案中,主题抗体包括多胺修饰。主题抗体可以用天然存在的或合成的多胺修饰。参见例如美国专利No.5,670,477。有用的天然存在的多胺包括腐胺、亚精胺、精胺、1,3-丙二胺(deaminopropane)、降亚精胺、对称-高亚精胺、热胺、热精胺、嗜热性五胺(caldopentamine)、高嗜热性五胺(homocaldopentamine)和刀豆四胺(canavalmine)。腐胺、亚精胺和精胺尤其有用。合成的多胺由经验通式 $C_xH_yN_z$ 组成,可以是环状的或无环的、支链或直链的3-12个碳原子的烃链,还进一步包括1-6NR或 $N(R)_2$ 部分,其中R是H、 (C_1-C_4) 烷基、苯基或苯甲基。多胺可以使用任何标准交联方法与抗体连接。

[0099] 在一些实施方案中,主题抗体被修饰以包括碳水化合物部分,其中所述碳水化合物部分可以与所述抗体共价连接。在一些实施方案中,主题抗体被修饰以包括脂质部分,其中所述脂质部分可以与所述抗体共价连接。合适的脂质部分包括,例如N-脂酰基如N-月桂酰基、N-油酰基等;脂肪胺例如月桂基胺、油基胺等;C3-C16长链脂肪族脂质;等。参见例如美国专利No.6,638,513。在一些实施方案中,主题抗体被掺入至脂质体。

[0100] 如果本公开的抗-CD22抗体包含共价连接的异源部分,所述异源部分可以直接地或经由接头与所述抗-CD22抗体重链和/或轻链连接。合适的接头可以容易地选出并且可以具有任何合适的不同长度,例如1个氨基酸(如Gly)至20个氨基酸,2个氨基酸至15个氨基酸,3个氨基酸至12个氨基酸,包括4个氨基酸至10个氨基酸、5个氨基酸至9个氨基酸、6个氨基酸至8个氨基酸、或7个氨基酸至8个氨基酸,且可以是1、2、3、4、5、6或7个氨基酸。

[0101] 柔性接头的实例包括甘氨酸聚合物 $(G)_n$ 、甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如, $(GS)_n$ 、 $GS GG S_n$ (SEQ ID NO:22)和 $GG GS_n$ (SEQ ID NO:23),其中n是至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物以及其它本领域已知的柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是令人感兴趣的,因为这两种氨基酸相对不定型(unstructured),并因此可以作为组分之间的中性系链。对甘氨酸聚合物尤其感兴趣,因为甘氨酸甚至比丙氨酸具有显著更多的phi-psi空间,并且比具有较长侧链的残基受到的限制少得多(参见Scheraga, Rev.Computational Chem.11173-142(1992))。示例性的柔性接头包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:24)、GGSGG(SEQ ID NO:25)、GSGSG(SEQ ID NO:26)、GSGGG(SEQ ID NO:27)、GGGSG(SEQ ID NO:28)、GSSSG(SEQ ID NO:29)等。本领域普通技术人员将知晓与如上所描述的任

意元件缀合的肽的设计可以包括全部或部分柔性的接头,使得所述接头可以包括柔性接头以及一或多个赋予较少柔性结构的部分。

[0102] 修饰抗体的方法

[0103] 通过使用多种方法的任一种,抗体可以被修饰以具有共价连接的异源部分(如可检测的标记、药物等)。本公开提供与目标部分缀合的抗-CD22抗体,其中与目标部分缀合的抗-CD22抗体被称作“抗-CD22抗体缀合物”。本公开的抗-CD22抗体缀合物可以包括:1)与目标部分缀合的Ig重链恒定区;以及与目标部分缀合的Ig轻链恒定区;2)与目标部分缀合的Ig重链恒定区;以及不与目标部分缀合的Ig轻链恒定区;或3)不与目标部分缀合的Ig重链恒定区;以及不与目标部分缀合的Ig轻链恒定区。主题抗-CD22抗体缀合物也可以包括VH和/或VL结构域。

[0104] 在一实例中,所述抗体可以被修饰以包括2-甲酰甘氨酸残基,这可以作为用于连接异源部分的化学处理。例如,本公开的抗-CD22的重链和/或轻链恒定区可以被修饰以包括硫酸酯酶基序的氨基酸序列,其能够通过2-甲酰甘氨酸生成酶(FGE)的作用被转化为含有2-甲酰甘氨酸(FGly)。这样的硫酸酯酶基序在本文也可以被称作FGE-修饰位点。FGE的作用以序列特异性的方式定向,其中FGE作用于定位在免疫球蛋白多肽内的硫酸酯酶基序。目标部分作为反应性配偶体的组分提供,以用于和所述标记的Ig多肽的经转化的醛标记的FGly残基的醛基反应。多种可商购获得的试剂可用于实现目标部分与醛标记的Ig多肽的FGly残基的连接。例如,大量目标部分的氨基氧基、酰肼、或氨基硫脲衍生物是合适的反应性配偶体,并且是容易获得的或可以使用标准化学方法生成。

[0105] 例如,为了将聚(乙二醇)(PEG)部分连接至标记的Ig多肽,可以使用标准方案从单氨基-PEG和氨基氧基甘氨酸生成氨基氧基-PEG。然后可以使所述氨基氧基-PEG与经转化的(如,FGly-修饰的)醛标记的Ig多肽反应以提供所述PEG部分的连接。将生物素部分递送至经转化的醛标记的多肽可以使用氨基氧基生物素、生物素酰肼或2,4-二硝基苯肼完成。

[0106] 醛标记的最小硫酸酯酶基序通常长5或6个氨基酸残基,长度通常不超过6个氨基酸残基。Ig多肽中提供的硫酸酯酶基序为至少5或6个氨基酸残基,且可以例如长5-16、6-16、5-15、6-15、5-14、6-14、5-13、6-13、5-12、6-12、5-11、6-11、5-10、6-10、5-9、6-9、5-8、或6-8个氨基酸残基,从而将硫酸酯酶基序的长度限定为小于16、15、14、13、12、11、10、9、8或7个氨基酸残基。在某些实施方案中,所使用的硫酸酯酶基序可以如下通式所描述:

[0107] $X^1Z^1X^2Z^2X^3Z^3$ (1)

[0108] 其中

[0109] Z^1 是半胱氨酸或丝氨酸(其也可以由(C/S)表示);

[0110] Z^2 是脯氨酸或丙氨酸残基(其也可以由(P/A)表示);

[0111] Z^3 是碱性氨基酸(如,精氨酸(R),且可以是赖氨酸(K)或组氨酸(H),通常是赖氨酸),或脂肪族氨基酸(丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、或脯氨酸(P),通常是A、G、L、V、或I);

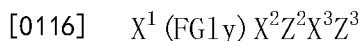
[0112] X^1 存在或不存在,且,当存在时,可以是任意氨基酸,不过通常是脂肪族氨基酸、含硫氨基酸或极性不带电氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电氨基酸外),通常是L、M、V、S或T,更通常是L、M、S或V,条件是当硫酸酯酶基序位于靶肽N-端时, X^1 存在;且

[0113] X^2 和 X^3 独立地可以是任意氨基酸,不过通常是脂肪族氨基酸、极性不带电的氨基

酸、或含硫氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电氨基酸外),例如S、T、A、V、G或C;例如,S、T、A、V或G。在一个实例中,所述醛标记具有通式L(C/S)TPSR(SEQ ID NO:30),例如,LCTPSR(SEQ ID NO:31)或LSTPSR(SEQ ID NO:32)。因此,本公开提供抗体,其包括醛标记的Ig重链和/或醛标记的Ig轻链,其中所述醛标记的Ig抗体包含含有这样的硫酸酯酶基序的重链和/或轻链的Ig恒定区氨基酸序列。

[0114] 一般而言,用于促进靶多肽的醛标记中的硫酸酯酶基序中的半胱氨酸或丝氨酸转化为FGly的FGE根据所述醛标记中存在的硫酸酯酶基序进行选择。FGE对于其中表达所述醛标记的多肽的宿主细胞可以是天然的,或者宿主细胞可以被遗传修饰以表达合适的FGE。在一些实施方案中,可能期望使用与人FGE相容的硫酸酯酶基序,并且在表达所述FGE的人细胞或在经遗传学修饰以表达人FGE的宿主细胞(通常是哺乳动物细胞)中表达所述醛标记的蛋白质。一般而言,适用于生成FGly修饰的抗体的FGE可以从天然存在的来源获得或是合成产生的。例如,合适的FGE可以衍生自天然地产生FGE或被遗传学修饰以表达编码FGE的重组基因的生物来源。本领域已知编码许多FGE的核酸。

[0115] 在FGE对硫酸酯酶基序的作用后, Z_1 被氧化生成2-甲酰甘氨酸(FGly)残基。此外,在FGE介导的转化和与包含目标部分的反应性配偶体反应后,上述通式中 Z_1 处的FGly被共价地连接至目标部分(如,可检测的标记、水溶性聚合物、多肽、药物等)。因此,本公开提供被修饰以包含FGly部分的抗-CD22抗体,其中所述抗-CD22抗体包含下式的FGly转化的硫酸酯酶基序:



[0117] 其中:

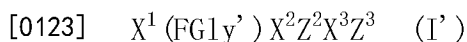
[0118] X^1 存在或不存在,且,当存在时是任意氨基酸,条件是当所述硫酸酯酶基序位于所述多肽的N-端时, X^1 存在;

[0119] X^2 和 X^3 各自独立地是任意氨基酸;和

[0120] Z^3 是碱性氨基酸;和

[0121] 其中当处于折叠状态时,所述FGly修饰的抗-CD22抗体将所述FGly基团呈现于溶剂可及表面。在一些实施方案中,所述FGly转化的硫酸酯酶具有式L(FGly)TPSR(SEQ ID NO:33)。

[0122] 如上所述,被修饰以包括FGly部分的主题抗-CD22抗体可以被进一步修饰以包括经由所述FGly部分共价连接于所述抗-CD22抗体的目标异源部分(如可检测的标记、水溶性聚合物、多肽、药物等)。因此,本公开提供抗-CD22抗体缀合物(本文也称作“抗-CD22缀合物”),所述抗-CD22缀合物包含:



[0124] 其中

[0125] FGly'是具有共价连接的部分的2-甲酰甘氨酸残基;

[0126] Z^2 是脯氨酸或丙氨酸残基(其也可以由(P/A)表示); Z^3 是碱性氨基酸(如,精氨酸(R),且可以是赖氨酸(K)或组氨酸(H),通常是赖氨酸),或脂肪族氨基酸(丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)、或脯氨酸(P),通常是A、G、L、V或I);

[0127] X^1 可以存在或不存在,且,当存在时,可以是任意氨基酸,不过通常是脂肪族氨基酸(含硫氨基酸)或极性的不带电氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电氨基酸外),通常是

L、M、V、S或T,更通常是L、M或V,条件是当硫酸酯酶基序位于靶肽N-端时, X^1 存在;且

[0128] X^2 和 X^3 独立地可以是任意氨基酸,不过通常是脂肪族氨基酸、含硫氨基酸、或极性不带电的氨基酸(即,除了芳香族氨基酸或带电氨基酸外),通常是S、T、A、V、G或C,更通常是S、T、A、V或G。在一些实施方案中,所述基序具有式L(FGly')TPSR(SEQ ID NO:34)。

[0129] 药物

[0130] 在一些情况下,本公开的抗-CD22抗体包含与所述抗体重链和/或轻链共价连接的药物。“药物”包括小分子药物、肽药物、毒素(如细胞毒素)等。

[0131] “小分子药物”,如本文所用,指的是化合物,例如有机化合物,其展现目标药理学活性且其通常具有不超过800Da,或不超过2000Da的分子量,但可包含高达5kDa的分子且可以如约10kDa一般大。小无机分子指的是不含碳原子的分子,而小有机分子指的是含至少一个碳原子的化合物。

[0132] 如本文所用的“肽药物”指的是含氨基酸的聚合化合物,且旨在涵盖天然存在的和非天然存在的肽、寡肽、环肽、多肽和蛋白质,以及肽模拟物(peptide mimetic)。肽药物可以通过化学合成获得或遗传编码的来源(如重组来源)产生。肽药物可以有一定分子量范围,且可以为200Da至10KDa或更高的分子量。

[0133] 在一些情况下,所述药物是毒素,如,细胞毒素。核糖体失活蛋白(RIP),其是高等植物中普遍存在的一类蛋白质,是这样的细胞毒素的实例。RIP,分为I型和II型,由于它们作为真核生物蛋白质合成的有效抑制剂的活性而有细胞毒性。I型RIP由具有核糖体失活活性的单一肽链组成,而II型蛋白由连接至具有细胞结合特性的B-链的基本上等同于I型蛋白的A-链二硫键组成。在真核生物核糖体的28S rRNA高度保守的环区中,特定腺嘌呤碱基的N-糖苷键被RIP水解切除,由此灭活真核细胞中的翻译。参见例如美国专利No.5,744,580。白树毒素、商陆毒蛋白(dodecandrin)、天花粉蛋白(tricosanthin)、tricokirin、异株泻根毒蛋白(bryodin)、紫茉莉抗病毒蛋白(MAP)、大麦核糖体失活蛋白(BRIP)、美洲商陆抗病毒蛋白(PAPS)、皂草素、丝瓜素和苦瓜蛋白是I型RIP的实例;而蓖麻毒蛋白和相思豆毒蛋白是II型RIP的实例。合适的细胞毒素包括但不限于,蓖麻毒蛋白、相思豆毒蛋白、白喉毒素、假单胞菌外毒素(如PE35、PE37、PE38、PE40等)、皂草素、白树毒素、美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)、肉毒毒素、异株泻根毒蛋白、苦瓜蛋白和三角梅毒蛋白(bouganin)。

[0134] 在一些情况下,所述药物是癌症化疗剂。癌症化疗剂包括减少癌症细胞的增殖的非肽(即非蛋白)化合物且涵盖细胞毒性剂和细胞抑制剂。化疗剂的非限制性实例包括烷化剂、亚硝基脲、抗代谢药、抗肿瘤抗生素、植物(长春花属)生物碱、和类固醇激素。也可以使用肽化合物。

[0135] 合适的癌症化疗剂包括多拉司他汀和其活性类似物及衍生物;以及澳瑞司他汀和其活性类似物及衍生物。参见例如,WO 96/33212、WO 96/14856和USPN 6,323,315。例如,多拉司他汀10或澳瑞司他汀PE可以被包括在本公开的抗体-药物缀合物中。合适的癌症化疗剂还包括美登木素生物碱和其活性类似物及衍生物(参见例如,EP1391213;和Liu等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623);以及倍癌霉素和其活性类似物及衍生物(例如,包括合成类似物KW-2189和CB 1-TM1)。

[0136] 用作为减少细胞增殖的药剂在本领域已知并广泛使用。此类药剂包括烷化剂,例如氮芥(nitrogen mustard)、亚硝基脲、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐和三氮烯,包括但不

限于,氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺(CytosanTM)、美法仑(L-溶肉瘤素)、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、司莫司汀(甲基-CCNU)、链脲菌素、氯脲菌素、尿嘧啶氮芥、甲川氯、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、三乙撑蜜胺、三亚乙基硫代磷胺、白消安、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0137] 抗代谢药包括叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂,包括但不限于,阿糖胞苷(CYTOSAR-U)、胞嘧啶阿糖核苷、氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(FudR)、6-巯鸟嘌呤、6-巯嘌呤(6-MP)、喷司他丁、5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲氨蝶呤、10-炔丙基-5,8-二脱氮叶酸(dideazafolate) (PDDF, CB3717)、5,8-二脱氮四氢叶酸(dideazatetrahydrofolic acid) (DDATHF)、甲酰四氢叶酸、磷酸氟达拉滨、喷司他丁和吉西他滨。

[0138] 合适的天然产物及它们的衍生物,(如,长春花生物碱、抗肿瘤抗生素、酶、淋巴因子和表鬼臼毒素),包括但不限于,Ara-C、紫杉醇(Taxol®)、多西他赛(Taxotere®)、脱氧助间型霉素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤;布喹那;生物碱,例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛等;鬼臼毒素,如依托泊苷、替尼泊苷等;抗生素,如蒽环类抗生素、盐酸柔红霉素(道诺霉素、红比霉素、正定霉素)、伊达比星、多柔比星、表柔比星及吗啉代衍生物等;吩噻嗪酮二环肽(phenoxizone biscyclopeptide),如放线菌素D;碱性糖肽,如博来霉素;蒽醌苷,如普卡霉素(光辉霉素);蒽二酮,如米托蒽醌;氮丙啶并吡咯基吲哚二酮,如丝裂霉素;大环免疫抑制剂,如环孢霉素、FK-506(他克莫司、普乐可复)、雷帕霉素等;等。

[0139] 其它的抗增殖细胞毒性剂为诺维本、CPT-11、阿那曲唑、来曲唑、卡培他滨、雷洛昔芬、环磷酰胺、异环磷酰胺和屈洛昔芬(droloxafine)。

[0140] 具有抗增殖活性的微管影响剂也是适用的且包括但不限于,别秋水仙碱(allocolchicine) (NSC 406042),软海绵素B(NSC 609395),秋水仙碱(NSC 757),秋水仙碱衍生物(如,NSC 33410),dolstatin 10(NSC376128),美登素(NSC 153858),根霉素(NSC 332598),紫杉醇(Taxol®), Taxol®衍生物,多西他赛(Taxotere®),硫代秋水仙碱(NSC 361792),三苯甲基半胱氨酸(trityl cysterin),硫酸长春碱,硫酸长春新碱,天然和合成的埃博霉素,包括但不限于埃博霉素A、埃博霉素B、海绵内酯(discodermolide);雌莫司汀,诺考达唑,等。

[0141] 适于使用的激素调节剂和类固醇(包括合成类似物)包括但不限于,肾上腺皮质类固醇,例如泼尼松、地塞米松等;雌激素和孕激素,例如己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雌二醇、克罗米酚、他莫昔芬等;和肾上腺皮质抑制剂,例如氨鲁米特;17 α -炔雌醇;二乙基己烯雌酚,睾酮,氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮,睾内酯,甲基泼尼松龙,甲基-睾酮,泼尼松龙,曲安西龙,氯烯雌醚,羟孕酮,氨鲁米特,雌氮芥,醋酸甲羟孕酮,亮丙瑞林,氟他胺(Drogenil),托瑞米芬(法乐通),和Zoladex®。雌激素刺激增殖和分化;因此结合雌激素受体的化合物用于阻断该活性。

[0142] 其它合适的化疗剂包括,金属螯合物,如顺铂(顺式-DDP)、卡铂等;脲,如,羟基脲;和胍,如N-甲基胍;替尼泊苷;拓扑异构酶抑制剂;丙卡巴肼;米托蒽醌;甲酰四氢叶酸;替加氟;等。其它目标抗增殖剂包括免疫抑制剂,例如,霉酚酸、沙利度胺、脱氧精脒菌素(desoxyspergualin)、氮杂孢菌素(azasporine)、来氟米特、咪唑立宾、氮杂螺烷(azaspirane) (SKF 105685); Iressa® (ZD 1839, 4-(3-氯-4-氟苯胺)-7-甲氧基-6-(3-(4-

吗啉基)丙氧基)喹唑啉);等。

[0143] 紫杉烷适于使用。“紫杉烷”包括紫杉醇,以及任何活性紫杉烷衍生物或前药。“紫杉醇 (Paclitaxel)” (其在本文应当理解为包括类似物、配制物和衍生物,例如,如多西他赛、TAXOL□、TAXOTERE□ (多西他赛的配制物)、紫杉醇的10-去乙酰类似物和紫杉醇的3’N-去苯甲酰基-3’N-叔丁氧羰基类似物)使用本领域技术人员已知的技术可以容易地制备 (也参见W0 94/07882、W0 94/07881、W0 94/07880、W094/07876、W0 93/23555、W0 93/10076;美国专利No.5,294,637;5,283,253;5,279,949;5,274,137;5,202,448;5,200,534;5,229,529和EP 590,267),或者从多种商业来源获得,包括例如Sigma Chemical Co.,St.Louis,Mo. (来自短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的T7402;或来自云南红豆杉 (*Taxus yunnanensis*) 的T-1912)。

[0144] 紫杉醇应当理解为不仅仅指的是常见的化学可得形式的紫杉醇,还指类似物和衍生物 (如,如上所述的泰索帝多西他赛,) 和紫杉醇缀合物 (如,紫杉醇-PEG、紫杉醇-葡聚糖或紫杉醇-木糖)。

[0145] 还包括在术语“紫杉烷”内的是多种已知的衍生物,包括亲水性衍生物和疏水性衍生物。紫杉烷衍生物包括但不限于,描述于国际专利申请No.W0 99/18113的半乳糖和甘露糖衍生物;描述于W099/14209的哌嗪子基 (piperazino) 和其它衍生物;描述于W0 99/09021、W0 98/22451和美国专利No.5,869,680的紫杉烷衍生物;描述于W098/28288的6-硫代衍生物;描述于美国专利No.5,821,263的亚磺酰胺衍生物;和描述于美国专利No.5,415,869的泰素衍生物。其还包括紫杉醇的前药,包括但不限于,描述于W0 98/58927、W0 98/13059和美国专利No.5,824,701的那些。

[0146] 产生抗体的方法

[0147] 主题抗体可以通过任何已知的方法 (例如,常规用于蛋白质合成的合成方法、重组DNA方法等) 产生。

[0148] 如果主题抗体是单链多肽,其可以使用标准化学肽合成技术合成。如果多肽是化学合成的,合成可以经由液相或固相进行。固相多肽合成 (SPPS) 是适用于化学合成主题抗体的方法的一个实例,其中序列的C-端氨基酸连接至不可溶支持物上,随后依序添加序列中剩余的氨基酸。多种形式的SPPS,例如Fmoc和Boc,可用于合成主题抗体。用于固相合成的技术描述于Barany和Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*;第3-284页 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. 第2卷: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Part A., Merrifield, 等人 *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2156 (1963); Stewart等人, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 第2版, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); 和 Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem*. 6:3-10 和 Camarero JA 等人 2005 *Protein Pept Lett*. 12:723-8 中。简言之,用功能单元 (肽链构建于其上) 处理小的不可溶的多孔珠。在重复的偶联/去保护循环后,所附着的固相的游离N-端胺与单个N-保护的氨基酸单元偶联。然后对该单元去保护,露出另外的氨基酸可连接其上的新的N-端胺。肽保持固定于所述固相上并且在被切割下来前进行过滤工艺。

[0149] 可以使用标准重组方法产生主题抗体。例如,将编码任选地与恒定区连接的轻链和重链可变区的核酸插入至表达载体中。轻链和重链可以被克隆到相同的或不同的表达载体种。编码免疫球蛋白链的DNA区段与表达载体中确保免疫球蛋白多肽表达的控制序列可

操作地连接。表达控制序列包括但不限于,启动子(如天然相关的或异源启动子)、信号序列、增强子元件、和转录终止序列。表达控制序列可以是能够转化或转染真核宿主细胞(例如COS或CHO细胞)的载体中的真核启动子系统。一旦载体被掺入合适的宿主,所述宿主被保持在适合于所述核苷酸序列高水平表达以及适于所述抗体的收集和纯化的条件下。

[0150] 因为密码子的简并性,多种核酸序列可编码各免疫球蛋白氨基酸序列。所需要的核酸序列可以通过从头固相DNA合成或通过对于较早制备的需要的多核苷酸的变体的聚合酶链式反应(PCR)诱变产生。寡核苷酸介导的诱变是用于制备靶多肽DNA的置换、缺失和插入变体的合适方法的实例。参见Adelman等人,DNA 2:183(1983)。简言之,通过使编码所需要的突变的寡核苷酸与单链DNA模板杂交来改变靶多肽DNA。在杂交后,使用DNA聚合酶合成所述模板的整个第二互补链,其掺入了所述寡核苷酸引物,且编码所述靶多肽DNA中选定的改变。

[0151] 合适的表达载体作为游离基因或宿主染色体DNA的完整部分通常在宿主生物体内是可复制的。通常,表达载体含有选择标记(如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性或不霉素抗性)以允许检测转化了所需要的DNA序列的那些细胞。

[0152] 大肠杆菌是(*Escherichia coli*)是可用于克隆编码主题抗体的多核苷酸的原核宿主细胞的实例。其它适用的微生物宿主包括芽孢杆菌,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),和其它肠杆菌,例如沙门菌属(*Salmonella*)物种、沙雷氏菌属(*Serratia*)物种和多种假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种。也可以在这些原核宿主中制备表达载体,其将典型地含有与所述宿主细胞相容的表达控制序列(如复制起点)。此外,会存在任意数目的多种公知的启动子,例如乳糖启动子系统、色氨酸(*trp*)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统、或来自 λ 噬菌体的启动子系统。启动子一般将任选地和操纵基因序列一起控制表达,且具有核糖体结合位点序列等以启动和完成转录和翻译。

[0153] 其它微生物,例如酵母,也可用于表达。酵母菌属(*Saccharomyce*) (如酿酒酵母(*S.cerevisiae*))和毕赤酵母属(*Pichia*)是具有合适的载体的合适的酵母宿主细胞的实例,所述载体根据需要具有表达控制序列(如启动子)、复制起点、终止序列等。典型地启动子包括3-磷酸甘油酸酯激酶和其它糖酵解酶。可诱导的酵母启动子尤其包括来自醇脱氢酶、异细胞色素C、和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0154] 除了微生物之外,哺乳动物细胞(如,体外细胞培养物中生长的哺乳动物细胞)也可用于表达和产生本发明的多肽(如,编码免疫球蛋白或其片段的多核苷酸)。参见Winnacker,From Genes to Clones,VCH Publishers,N.Y.,N.Y.(1987)。合适的哺乳动物宿主细胞包括CHO细胞系、多种Cos细胞系、HeLa细胞、骨髓瘤细胞系和转化的B-细胞或杂交瘤。用于这些细胞的表达载体可以包括表达控制序列,例如复制起点、启动子和增强子(Queen等人,Immunol.Rev.89:49(1986)),以及必须的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点和转录终止序列。合适的表达控制序列的实例为衍生自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头状瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。参见Co等人,J.Immunol.148:1149(1992)。

[0155] 一旦被合成(化学合成或重组合成),全部抗体、它们的二聚体、单个轻链和重链、或其它形式的主题(如,scFv等)可以根据本领域的标准方法纯化,包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、高效液相色谱(HPLC)纯化、凝胶电泳等(一般参见Scopes,Protein

Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))。主题抗体可以是基本上纯的,如,至少约80%-85%纯、至少约85%-90%纯、至少约90%-95%纯,或98%-99%或更纯,例如,不含例如细胞碎片、除主题抗体外的大分子等污染物。

[0156] 组合物

[0157] 本公开提供包含主题抗体的组合物。主题抗体组合物除主题抗体外还可以包含以下的一或多种:盐,如NaCl、MgCl₂、KCl、MgSO₄等;缓冲剂,如,Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、N-tris[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)等;增溶剂;去污剂,如,非离子去污剂例如Tween-20等;蛋白酶抑制剂;甘油;等。

[0158] 核酸

[0159] 本公开提供包含编码主题抗体的核苷酸序列的核酸。编码主题抗体的核苷酸序列可以可操作地与一或多个调控元件(例如启动子和增强子)连接,所述一或多个调控元件允许所述核苷酸序列在目的靶细胞(如,经遗传修饰以合成所编码的抗体的细胞)中表达。

[0160] 本领域已知合适的启动子和增强子元件。用于在细菌细胞中表达的合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 λ P和trc。用于在真核细胞中表达的合适的启动子包括但不限于,轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒立即早期启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;存在于来自逆转录病毒的长末端重复内的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;和多种本领域已知的组织特异性启动子。

[0161] 在一些实施方案中,例如,用于在酵母细胞中表达,合适的启动子是组成型启动子例如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等;或可调控的启动子例如GAL1启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PHO5启动子、CUP1启动子、GAL7启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子、ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动子、ENO启动子、TP1启动子和AOX1(如,用于毕赤酵母属)。本领域普通技术人员完全有能力选择合适的载体和启动子。

[0162] 适用于原核宿主细胞的启动子包括但不限于,噬菌体T7RNA聚合酶启动子;trp启动子;lac操纵子启动子;杂合启动子,如,lac/tac杂合启动子、tac/trc杂合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子等;araBAD启动子;体内调控启动子,例如ssaG启动子或相关启动子(参见例如,美国专利公开No. 20040131637),pagC启动子(Pulkkinen和Miller, J. Bacteriol., 1991:173(1):86-93;Alpuche-Aranda等人,PNAS, 1992;89(21):10079-83),nirB启动子(Harborne等人(1992) Mol. Micro. 6:2805-2813)等(参见例如,Dunstan等人(1999) Infect. Immun. 67:5133-5141;McKelvie等人(2004) Vaccine 22:3243-3255;和Chatfield等人(1992) Biotechnol. 10:888-892);sigma70启动子,如共有的sigma70启动子(参见例如,GenBank登录号AX798980、AX798961和AX798183);稳定期启动子,如dps启动子、spv启动子等;衍生自致病岛SPI-2的启动子(参见例如,W096/17951);actA启动子(参见例如,Shetron-Rama等人(2002) Infect. Immun. 70:1087-1096);rpsM启动子(参见例如,Valdivia和Falkow(1996) .Mol. Microbiol. 22:367);tet启动子(参见例如,Hillen, W. 和Wissmann, A. (1989) 于Saenger, W. 和Heinemann, U. (编辑), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, 第10卷, 第143-162页);SP6启动子(参见例如,Melton等人(1984) Nucl. Acids

Res.12:7035);等。适用于原核生物例如大肠杆菌的强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7、和 λ 。用于细菌宿主细胞的操纵基因的非限制性实例包括乳糖启动子操纵基因(LacI阻遏蛋白在与乳糖接触时改变构象,由此阻止LacI阻遏蛋白与所述操纵基因的结合),色氨酸启动子操纵基因(当和色氨酸复合时,TrpR阻遏蛋白具有结合所述操纵基因的构象;在缺乏色氨酸时,所述TrpR阻遏蛋白具有不结合所述操纵基因的构象),以及tac启动子操纵基因(参见例如,deBoer等人(1983)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:21-25)。

[0163] 编码主题抗体的核苷酸序列可以存在于表达载体和/或克隆载体中。如果主题抗体包含两条分开的多肽,编码所述两条多肽的核苷酸序列可以被克隆到同一载体或分开的载体中。表达载体可包括可选择的标记,复制起点,和用于所述载体的复制和/或维持的其它特征。

[0164] 本领域技术人员已知大量合适的载体和启动子;许多是商购可得的用于生成主题重组构建体。以下载体作为实例提供:细菌:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)。真核:pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL (Pharmacia)。

[0165] 表达载体通常具有位于启动子序列附近的便利的限制性位点以用于插入编码异源蛋白质的核酸序列。可存在在表达宿主中有效的可选择标记。合适的表达载体包括但不限于,病毒载体(如基于豆苗病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见例如,Li等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 35:25432549,1994;Borras等人,Gene Ther 6:515524,1999;Li和Davidson,PNAS 92:77007704,1995;Sakamoto等人,H Gene Ther5:10881097,1999;WO 94/12649,WO 93/03769;WO 93/19191;WO94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655);腺相关病毒(参见例如,Ali等人,Hum Gene Ther 9:8186,1998,Flannery等人,PNAS 94:69166921,1997;Bennett等人,Invest Ophthalmol Vis Sci 38:28572863,1997;Jomary等人,Gene Ther 4:683690,1997,Rolling等人,Hum Gene Ther10:641648,1999;Ali等人,Hum Mol Genet 5:591594,1996;Srivastava in WO 93/09239,Samulski等人,J.Vir.(1989)63:3822-3828;Mendelson等人,Viol.(1988)166:154-165;和Flotte等人,PNAS(1993)90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人类免疫缺陷病毒(参见例如,Miyoshi等人,PNAS 94:1031923,1997;Takahashi等人,J Virol73:78127816,1999)的病毒载体;逆转录病毒载体(例如,鼠科动物白血病病毒、脾坏死病毒,及衍生自逆转录病毒(例如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽类白血病病毒、人类免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺癌病毒)的载体;等。

[0166] 如上所述,主题核酸包含编码主题抗体的核苷酸序列。主题核酸可包含编码如上所述的抗-CD22重链和轻链的核苷酸序列。

[0167] 细胞

[0168] 本发明提供分离的经遗传修饰的宿主细胞(如,体外细胞),其用主题核酸遗传学修饰。在一些实施方案中,分离的经遗传修饰的主题宿主细胞可产生主题抗体。

[0169] 合适的宿主细胞包括真核宿主细胞,例如哺乳动物细胞、昆虫宿主细胞、酵母细胞;以及原核细胞,例如细菌细胞。将主题核酸引入宿主细胞可通过例如磷酸钙沉淀、DEAE葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、电穿孔或其它已知方法实现。

[0170] 合适的哺乳动物细胞包括原代细胞和永生化细胞系。合适的哺乳动物细胞系包括人细胞系、非人灵长类动物细胞系、啮齿类动物(如小鼠、大鼠)细胞系等。合适的哺乳动物细胞系包括但不限于HeLa细胞(如,美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)No.CCL-2),CHO细胞(如,ATCC No.CRL9618、CCL61、CRL9096),Vero细胞,NIH 3T3细胞(如,ATCC No.CRL-1658),Huh-7细胞,BHK细胞(如,ATCC No.CCL10),PC12细胞(ATCC No.CRL1721),COS细胞,COS-7细胞(ATCC No.CRL1651),RAT1细胞,小鼠L细胞(ATCC No.CCLI.3),人胚肾(HEK)293细胞(ATCC No.CRL1573),HLHepG2细胞等。

[0171] 合适的酵母细胞包括但不限于,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、芬兰毕赤酵母(*Pichia finlandica*)、喜海藻糖毕赤酵母(*Pichia trehalophila*)、*Pichia koclamae*、膜醭毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens*)、仙人掌毕赤酵母(*Pichia opuntiae*)、耐热毕赤酵母(*Pichia thermotolerans*)、柳毕赤酵母(*Pichia salictaria*)、*Pichia guercuum*、皮杰普氏毕赤酵母(*Pichia pijperi*)、树干毕赤酵母(*Pichia stiptis*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、毕赤酵母某种(*Pichia sp.*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酵母菌某种(*Saccharomyces sp.*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、克鲁维酵母菌某种(*Kluyveromyces sp.*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、白色假丝酵母(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、勒克瑙金孢真菌(*Chrysosporium lucknowense*)、镰刀菌某种(*Fusarium sp.*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium gramineum*)、镶片镰刀菌(*Fusarium venenatum*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)等。

[0172] 合适的原核细胞包括但不限于,大肠杆菌、乳杆菌某种(*Lactobacillus sp.*)、沙门菌某种(*Salmonella sp.*)、志贺菌某种(*Shigella sp.*)等的多种实验室菌株中的任一种。参见例如,Carrier等人(1992) *J. Immunol.* 148:1176-1181;美国专利No.6,447,784;和 Sizemore等人(1995) *Science* 270:299-302。可在本发明中采用的沙门菌属菌株的实例包括但不限于伤寒沙门菌(*Salmonella typhi*)和鼠伤寒沙门菌(*S.typhimurium*)。合适的志贺菌属菌株包括但不限于弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、索氏志贺菌(*Shigella sonnei*)和痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)。一般地,所述实验室菌株是一种非致病性的菌株。其它合适的细菌的非限制性实例包括但不限于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、迈氏假单胞菌(*Pseudomonas mevalonii*)、球形红杆菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、荚膜红细菌(*Rhodobacter capsulatus*)、深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、红球菌某种(*Rhodococcus sp.*)等。在一些实施方案中,所述宿主细胞是大肠杆菌。

[0173] 药物组合物

[0174] 本公开提供包含主题抗体的组合物,包括药物组合物。一般而言,配制物(formulation)包含有效量的主题抗体。“有效量”指的是足以产生期望的结果的剂量,所述期望的结果例如减少癌性B细胞的数目、减少自身反应性B细胞的数目和/或活性。在一些情况下,期望的结果为与对照相比,至少减少B细胞恶性肿瘤的症状。

[0175] 配制物

[0176] 在主题方法中,可以使用能够获得期望的治疗效果或诊断效果的任何便利手段向宿主施用主题抗体。因此,药剂可被掺入至多种用于治疗性施用的配制物中。更具体地,主题抗体可通过和合适的药学上可接受的载体或稀释剂组合而配制成药物组合物,并可被配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂。

[0177] 在药物剂型中,主题抗体可以其药学上可接受的盐的形式施用,或其还可以单独使用或合适地与其它药学上活性的化合物联合使用以及组合使用。下面的方法和赋形剂仅是示例性的而绝不是限制性的。

[0178] 对于口服制剂,主题抗体可以单独使用或与合适的添加剂组合使用来制备片剂、粉剂、颗粒剂或胶囊,例如与常规添加剂(例如乳糖、甘露醇、玉米淀粉或马铃薯淀粉)组合;与粘合剂组合,例如微晶纤维素、纤维素衍生物、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;与崩解剂组合,例如玉米淀粉、马铃薯淀粉或羟甲基纤维素钠;与润滑剂组合,例如滑石或硬脂酸镁;且如有需要,与稀释剂、缓冲剂、润湿剂、防腐剂和调味剂组合。

[0179] 主题抗体可以通过将它们溶解、悬浮或乳化进水性或非水性溶剂中而配制成注射用配制物,所述溶剂例如植物油或其它类似的油,合成的脂肪酸甘油酯,高级脂肪酸或丙二醇的酯;且如果需要,使用常规添加剂,如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

[0180] 包含主题抗体的药物组合物通过将具有所需纯度的抗体与任选的生理学可接受的载体、赋形剂、稳定剂、表面活性剂、缓冲剂和/或张度剂混合来制备。可接受的载体、赋形剂和/或稳定剂在采用的剂量和浓度下对受体是非毒性的,且包括例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸的缓冲剂;包括抗坏血酸、谷胱甘肽、半胱氨酸、甲硫氨酸和柠檬酸的抗氧化剂;防腐剂(例如乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯胺、或其组合);例如精氨酸、甘氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、脯氨酸及其组合的氨基酸;单糖、二糖和其它碳水化合物;低分子量(少于10个残基)多肽;例如明胶或血清白蛋白的蛋白质;例如EDTA的螯合剂;例如海藻糖、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、果糖、山梨糖、棉子糖、葡糖胺、N-甲基葡糖胺、半乳糖胺和神经氨酸的糖;和/或例如Tween、Brij普流罗尼类、Triton-X或聚乙二醇(PEG)的非离子表面活性剂。

[0181] 所述药物组合物可以是液体形式、冻干形式或从冻干形式复溶的液体形式,其中所述冻干配制物在施用前用无菌溶液复溶。复溶冻干组合物的标准程序是添加回一定体积的纯水(一般等于冻干过程中去除的体积);然而可以使用包含抗菌剂的溶液来产生用于肠胃外施用的药物组合物;也参见Chen(1992)Drug Dev Ind Pharm 18,1311-54。

[0182] 主题药物组合物中的示例性抗体浓度的范围可以为约1mg/mL至约200mg/mL,或约50mg/mL至约200mg/mL,或约150mg/mL至约200mg/mL的。

[0183] 所述抗体的水性配制物可以在pH缓冲的溶液中制备,例如pH范围为约4.0至约7.0,或约5.0至约6.0,或可选地约5.5。适于该范围内的pH的缓冲液的实例包括磷酸盐缓冲液、组氨酸缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液和其它有机酸缓冲液。缓冲液的浓度可以是约1mM至约100mM,或约5mM至约50mM,取决于例如所述缓冲液和所述配制物所需的张度。

[0184] 所述抗体配制物中可以包括张度剂以调节所述配制物的张度。示例性张度剂包括氯化钠、氯化钾、丙三醇和来自氨基酸组的任何组分、糖以及其组合。在一些实施方案中,所述水性配制物是等张的,不过高张溶液或低张溶液可能也适用。术语“等张的”指的是溶液具有和与其比较的其它一些溶液(例如生理盐溶液或血清)相同的张度。张度剂可以约5mM至约350mM,如100mM至350mM的量使用。

[0185] 也可以向所述抗体配制物添加表面活性剂以减少经配制的抗体的聚集和/或将所述配制物中颗粒的形成最小化和/或减少吸附。示例性表面活性剂包括聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯(Tween)、聚氧乙烯烷基醚(Brij)、烷基苯基聚氧乙烯醚(Triton-X)、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆,Pluronic)和十二烷基磺酸钠(SDS)。合适的聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯的实例是聚山梨醇酯20(以商标Tween 20TM出售)和聚山梨醇酯80(以商标Tween 80TM出售)。合适的聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物的实例是以名字 **Pluronic**® F68或Poloxamer 188TM出售的那些。合适的聚氧乙烯烷基醚的实例是以商标BrijTM出售的那些。表面活性剂的示例性浓度的范围可以是约0.001%至约1%w/v。

[0186] 也可以添加冻干保护剂以保护不稳定的活性成分(如蛋白质)对抗冻干步骤中的失稳条件。例如,已知的冻干保护剂包括糖(包括葡萄糖和蔗糖);多元醇(包括甘露醇、山梨醇和甘油);以及氨基酸(包括丙氨酸、甘氨酸和谷氨酸)。可将冻干保护剂以约10mM至500mM的量包含其中。

[0187] 在一些实施方案中,主题配制物包含主题抗体,和一种或多种上述药剂(如表面活性剂、缓冲液、稳定剂、张度剂)且基本上不含一种或多种防腐剂,例如乙醇、苯甲醇、苯酚、间甲酚、对氯间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、苯扎氯胺及其组合。在其它实施方案中,将防腐剂以约0.001至约2%(w/v)的浓度包含至所述配制物中。

[0188] 例如,主题配制物可以是用于胃肠外施用的液体或冻干配制物,并且可以包含:约1mg/mL至约200mg/mL的主题抗体;约0.001%至约1%的至少一种表面活性剂;约1mM至约100mM的缓冲液;任选地约10mM至约500mM的稳定剂;和约5mM至约305mM的张度剂;并且具有约4.0至约7.0的pH。

[0189] 作为另一实例,主题肠胃外配制物是液体或冻干配制物,其包含:约1mg/mL至约200mg/mL的主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH。

[0190] 作为另一实例,主题肠胃外配制物包含冻干配制物,其包含:1) 15mg/mL的主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH;或2) 75mg/mL的主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH;或3) 75mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH;或4) 75mg/mL的主题抗体;0.04%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH;或6) 75mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH。

[0191] 作为另一实例,主题肠胃外配制物是液体配制物,其包含:1) 7.5mg/mL的主题抗体;0.022%Tween 20w/v;120mM L-组氨酸;和250mM蔗糖;且具有5.5的pH;或2) 37.5mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;且具有5.5的pH;或3) 37.5mg/mL的主题抗体;0.01%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM蔗糖;且具有5.5的pH;或4) 37.5mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;125mM海藻糖;且具有

5.5的pH;或5) 37.5mg/mL的主题抗体;0.01%Tween 20w/v;10mM L-组氨酸;和125mM海藻糖;且具有5.5的pH;或6) 5mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH;或7) 75mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;且具有5.5的pH;或8) 75mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;且具有5.5的pH;或9) 150mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM海藻糖;且具有5.5的pH;或10) 150mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和250mM甘露醇;且具有5.5的pH;或11) 150mg/mL的主题抗体;0.02%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和140mM氯化钠;且具有5.5的pH;或12) 10mg/mL的主题抗体;0.01%Tween 20w/v;20mM L-组氨酸;和40mM氯化钠;且具有5.5的pH.

[0192] 主题抗体可用于气雾配制物以通过吸入施用。主题抗体可被配制入可接受的加压推进剂例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等中。

[0193] 此外,主题抗体可以通过与多种基质如乳化基质或水溶性基质混合而制备成栓剂。主题抗体可经由栓剂直肠施用。栓剂可以包含在体温下融化而在室温固化的媒介物,例如可可脂、碳蜡和聚乙二醇。

[0194] 可以提供用于口服或直肠施用的单位剂型如糖浆剂、酏剂和悬浮剂,其中每一剂量单位,例如一茶匙、一汤勺、片剂或栓剂,含有预定量的含有一或多种抑制剂的组合物。类似地,用于注射或静脉内施用的单位剂型可以包含在如无菌水、生理盐水或另一药学上可接受载体的组合物中的主题抗体。

[0195] 如本文所用,术语“单位剂型”指的是物理上离散的单位,适于作为用于人或动物受试者的单一剂量,每一单位含有预定量(以足以产生期望的效果计)的本发明的化合物以及药学上可接受的稀释剂、载体或媒介物。主题抗体的说明书可取决于具体采用的抗体和待实现的效果,以及与在宿主内的各抗体相关的药代动力学。

[0196] 其它的施用模式也可以用于本发明。例如,主题抗体可配制于栓剂中,以及在一些情况下于气雾剂和鼻内组合物中。对于栓剂,媒介物组合物将包括传统粘合剂和载体例如,聚亚烷基二醇或甘油三酯。这样的栓剂可以从含有约0.5%至约10%(w/w),如约1%至约2%范围内的活性成分的混合物形成。

[0197] 鼻内配制物将通常包含既不导致对鼻粘膜的刺激也不显著扰乱纤毛功能的媒介物。主题发明可以采用例如水、水性盐水或其它已知物质的稀释剂。鼻配制物还可以含有防腐剂,例如但不限于,氯丁醇和苯扎氯铵。可以存在表面活性剂以增强鼻粘膜对主题蛋白质的吸收。

[0198] 主题抗体可以作为可注射配制物施用。一般地,可注射组合物被制备为液体溶液或悬浮液;也可以制备适于在注射前溶解或悬浮于液体媒介物的固体形式。所述配制物还可以被乳化或将抗体包封于脂质体媒介物中。

[0199] 合适的赋形剂媒介物是,例如水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等及其组合。此外,如果需要,所述媒介物可以含有少量辅料例如润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。制备这样的剂型的实际方法是本领域技术人员已知的或将是显而易见的。参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 第17版, 1985。在任何情况下,待施用的组合物或配制物将含有足以在正在治疗的受试者中实现期望状态的量的主题抗体。

[0200] 可容易地公开获得药学上可接受的赋形剂,例如媒介物、佐剂、载体或稀释剂。此外,药学上可接受的辅料,例如pH调节和缓冲剂、张度调节剂、稳定剂、润湿剂等,是容易公开获得的。

[0201] 在一些实施方案中,主题抗体被配制为控释配制物。可以使用本领域熟知的方法制备持续释放的配制物。合适的持续释放的配制物的实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透过性基质,其中所述基质呈成型物品的形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸盐的共聚物,不可降解的乙烯醋酸乙烯酯共聚物,水凝胶,聚交酯,可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。通过使用合适的添加剂,通过控制含水量和通过开发特定的聚合物基质组合物,可以防止包含于持续释放的配制物中的抗体可能的生物学活性损失和可能的免疫原性改变。

[0202] 本发明范围内的控释可以指多种缓释剂型中的任一种。出于本发明的目的,下述术语可被认为是与控释基本上等同的:连续释放、控释、延迟释放、贮库(depot)、逐步释放、长期释放、程序释放、缓释、比例释放、延时(protracted)释放、储库、迟滞、缓慢释放、间隔释放、持续释放、定时包衣(time coat)、定时释放、延迟作用、延长作用、分层时间作用、长效、延长作用、重复作用、缓慢作用、持续作用、持续作用药物和缓释。这些术语的进一步讨论可在Lesczek Krowczynski, Extended-Release Dosage Forms, 1987 (CRC Press, Inc.) 中找到。

[0203] 多种控释技术覆盖了非常广谱的药物剂型。控释技术包括但不限于物理系统和化学系统。

[0204] 物理系统包括但不限于,具有速率控制膜的储库系统,例如微囊化、巨囊化(macroencapsulation)、和膜系统;不具速率控制膜的储库系统,例如空心纤维、超微孔三酰化纤维、及多孔聚合物基材和泡沫;单层系统,包括那些物理上溶于非多孔的、聚的或弹性的基质(如,不易蚀的、易蚀的、环境因素渗入(environmental agent ingress)和可降解的)的那些系统;片层结构,包括与外部控制层化学相似或不相似的储库层;以及其它物理方法,例如渗透泵、或吸附于离子交换树脂。

[0205] 化学系统包括但不限于,聚合物基质的化学侵蚀(如,异源的或同源的侵蚀),或聚合物基质的生物侵蚀(如,异源的或同源的)。关于控释系统的分类的另外讨论可见于Agis F. Kydonieus, Controlled Release Technologies: Methods, Theory and Applications, 1980 (CRC Press, Inc.)。

[0206] 已经开发了多种控释药物配制物用于口服施用。这些包括但不限于渗透压控制的胃肠道递送系统;流体动压控制的胃肠道递送系统;膜渗透控制的胃肠道递送系统,其包括微孔膜渗透控制的胃肠道递送装置;胃液耐受的肠靶向控释胃肠道递送装置;凝胶扩散控制的胃肠道递送系统;和包括阳离子药物和阴离子药物的离子交换控制的胃肠道递送系统。关于控释药物递送系统的额外信息可见于Yie W. Chien, Novel Drug Delivery Systems, 1992 (Marcel Dekker, Inc.)。这些配制物中的一些现在将更详细地讨论。

[0207] 剂量

[0208] 合适的剂量可以由主治医师或其它合格的医务人员基于不同的临床因素确定。如医学领域所公知,对任何一个患者的剂量取决于许多因素,包括患者身材、体表面积、年龄、待施用的具体化合物、患者性别、施用时间和途径、一般健康、和同时施用的其它药物。主题

抗体可以每剂1ng/kg体重至20mg/kg体重的量施用,例如0.1mg/kg体重至10mg/kg体重,例如,0.5mg/kg体重至5mg/kg体重;然而,也考虑低于或高于该示例范围的剂量,尤其是考虑到上述因素。如果方案是连续输注,也可以在每分钟1 μ g至10mg/kg体重的范围内。

[0209] 本领域技术人员将容易理解,剂量水平可以作为特定抗体、症状的严重性和受试者对副作用的易感性的函数而变化。本领域技术人员通过多种方法可以容易地确定给定化合物的优选剂量。

[0210] 施用途径

[0211] 使用任何可用的适于药物递送的方法和途径向个体施用主题抗体,包括体内和离体方法,以及全身性和局部施用途径。

[0212] 常规的和药学上可接受的施用途径包括鼻内、肌内、气管内、皮下、真皮内、局部涂药、静脉内、动脉内、直肠、经鼻、经口及其它肠内和肠胃外施用途径。如果需要,可以组合施用途径,或者根据抗体和/或期望的效果进行调整。主题抗体组合物可以单个剂量或以多个剂量施用。在一些实施方案中,经口施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,经吸入途径施用主题抗体组合物。在一些实施方式中,鼻内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,局部施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,颅内施用主题抗体组合物。在一些实施方案中,静脉内施用主题抗体组合物。

[0213] 可以使用任何可用的适于常规药物递送的常规方法和途径(包括全身性和局部的施用途径)向宿主施用药剂。一般而言,本发明考虑的施用途径包括但不限于,肠内途径、肠胃外途径或吸入途径。

[0214] 除了吸入施用之外的肠胃外施用途径包括但不限于,局部、经皮、皮下、肌内、眶内、囊内、脊柱内、胸骨内和静脉内途径,即,除通过消化道之外的任何途径。可以进行肠胃外施用以实现主题抗体的全身性和局部递送。如果需要全身性递送,施用一般涉及药物配制物的侵入性或全身性吸收的局部或粘膜施用。

[0215] 主题抗体也可以通过肠内施用递送至受试者。肠内施用途径包括但不限于,经口和直肠(如使用栓剂)递送。

[0216] 治疗是指与影响宿主的病理状态相关的症状的至少一定的改善,其中改善以广义使用,指的是与待治疗的病理状态相关的参数如症状的数量级的至少一定的降低,所述待治疗的病理状态例如B细胞恶性肿瘤或B细胞介导的自体免疫疾病。因此,治疗还包括这样的情况,其中所述病理状态,或至少与其相关的症状被完全抑制,例如被预防而没有发生,或被停止,如被终止,使得宿主不再承受所述病理状态或至少表征所述病理状态的症状。

[0217] 在一些实施方案中,主题抗体通过注射施用,例如,用于全身性递送(如,静脉内输注)或施用至局部位点。

[0218] 多种宿主可根据主题方法治疗(其中术语“宿主”在本文与术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用)。通常,这样的宿主是“哺乳动物(mammal)”或“哺乳动物(mammalian)”,其中这些术语广泛用于描述属于哺乳纲的生物体,包括食肉目动物(如,狗和猫),啮齿目动物(如,小鼠、豚鼠和大鼠),和灵长目动物(如,人、黑猩猩和猴)。在一些实施方案中,所述宿主将是人。

[0219] 提供了具有单位剂量(如口服或可注射剂量)的主题抗体的试剂盒。在这样的试剂盒中,除了含有所述单位剂量的容器外,还包括有描述所述抗体在治疗目标病理状态中的

用途和带来的益处的信息包装插页。优选的化合物和单位剂量是本文中上文所描述的那些。

[0220] 治疗方法

[0221] 本公开提供治疗与CD22-阳性B细胞(如癌性CD22-阳性B细胞、自身反应性CD22-阳性B细胞)相关或由其导致的疾病或病症的方法。

[0222] 治疗B细胞恶性肿瘤

[0223] 本公开提供治疗B细胞恶性肿瘤的方法,所述方法大体上包括向有需要的个体(如患有B细胞恶性肿瘤的个体)单独(如在单一疗法中)或与一种或多种额外的治疗剂组合(如在组合疗法中)施用有效量的主题抗体。

[0224] B-细胞恶性肿瘤包括,例如,非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病和幼淋巴细胞白血病。

[0225] 在一些实施方案中,主题抗体的有效量是这样的量,当以一个或多个剂量单独施用(如在单一疗法中)或与一种或多种额外的治疗剂组合施用(如在组合疗法中),与不用所述抗体治疗的个体中癌性B细胞的数目相比,有效降低个体中癌性B细胞的数目至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多。

[0226] 组合疗法

[0227] 在一些实施方案中,治疗B细胞恶性肿瘤的主题方法包括向受试者施用主题抗体和一种或多种额外的治疗剂。合适的额外治疗剂包括但不限于癌症化疗剂(如上所述)。

[0228] 治疗B细胞介导的自体免疫病症

[0229] 本公开提供治疗B细胞介导的自体免疫病症的方法,所述方法大体上包括向有需要的个体(如患有B细胞介导的自体免疫病症的个体)单独(如在单一疗法中)或与一种或多种额外的治疗剂组合(如在组合疗法中)施用有效量的主题抗体。B细胞介导的自体免疫病症是其中病状主要是由存在针对一种或多种自体抗原的抗体所产生的自体免疫病症。因此,B细胞介导的自体免疫病症也可以被称作抗体介导的自体免疫病症。

[0230] B细胞介导的自体免疫病症包括,例如,全身性红斑狼疮、重症肌无力、自体免疫心肌炎、风湿性关节炎等。

[0231] 在一些实施方案中,主题抗体的有效量是这样的量,以一个或多个剂量单独施用(如在单一疗法中)或与一种或多种额外的治疗剂组合施用(如在组合疗法中),与不用所述抗体治疗的个体中的自身反应性B细胞的数目相比,有效降低个体中自身反应性B细胞(产生自身抗体的B细胞)的数目至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或更多。

[0232] 组合疗法

[0233] 在一些实施方案中,治疗B细胞介导的自体免疫疾病的主题方法包括向受试者施用主题抗体和一种或多种额外的治疗剂。合适的额外治疗剂包括但不限于免疫抑制剂、消炎剂等。

[0234] 适于治疗的受试者

[0235] 多种受试者适用于主题方法的治疗。合适的受试者包括任何个体,如人,其患有B细胞恶性肿瘤;其已经被诊断为患有B细胞恶性肿瘤;其曾患过B细胞恶性肿瘤且处于所述B细胞恶性肿瘤复发的风险中;其曾经用除主题抗-CD22抗体外的药剂治疗B细胞恶性肿瘤(如,其已经用癌症化疗剂治疗)且其对所述药剂不应答;或曾经用除主题抗-CD22抗体外的药剂治疗B细胞恶性肿瘤(如,其已经用癌症化疗剂治疗)且其最初对所述药剂应答但随后停止应答(如复发)。

[0236] 适于治疗B细胞介导的自体免疫病症的受试者包括任何个体,如人,其患有B细胞介导的自体免疫病症;其已经被诊断为患有B细胞介导的自体免疫病症;其曾患过B细胞介导的自体免疫病症且处于所述B细胞介导的自体免疫病症复发的风险中;其曾经用除主题抗-CD22抗体外的药剂治疗B细胞介导的自体免疫病症(如,其已经用免疫抑制剂治疗)且其对所述药剂不应答;或曾经用除主题抗-CD22抗体外的药剂治疗B细胞介导的自体免疫病症(如,其已经用免疫抑制剂治疗)且其最初对所述药剂应答但随后停止应答(如复发)。

[0237] 检测方法

[0238] 本公开提供包括使用主题抗体的多种检测方法。检测方法包括诊断方法、预后方法和监测方法。主题检测方法大体上包括检测CD22阳性细胞,如B细胞,如癌性B细胞。

[0239] 在一些实施方案中,主题方法是诊断方法,如,确定个体是否患有B细胞恶性肿瘤。

[0240] 在一些实施方案中,主题方法是监测方法,如监测已被诊断为患有B细胞恶性肿瘤,且正在针对该病症进行治疗的个体对治疗的应答和/或病症的进展/消退。

[0241] 在一些情况下,主题检测方法包括向个体施用本公开的可检测标记的抗-CD22抗体;和检测所述抗体和个体中的组织的结合。检测可以例如通过磁共振成像或其它合适的成像技术实现。

[0242] 在其它实例中,主题检测方法包括使本公开的可检测标记的抗-CD22抗体与获自个体的生物学样品接触;和检测所述抗体与所述生物学样品中的分子的结合。

[0243] 所述抗-CD22可以直接地或间接地标记。间接标记包括包含可检测标记的二抗,其中所述二抗结合主题抗-CD22抗体。其它间接标记包括生物素,其中生物素化的抗-CD22抗体可以使用包含可检测标记的亲合素或链霉亲和素检测。

[0244] 合适的可检测标记包括可通过分光光度手段、光化学手段、生物化学手段、免疫化学手段、电学手段、光学手段或化学手段检测的任何组分。合适的标记包括但不限于,磁珠(如Dynabeads™)、荧光染料(如,异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、黄色荧光蛋白等)、放射性标记(如,³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、或³²P)、酶(如,辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶、荧光素酶、和其它在酶联免疫吸附测定(ELISA)中常用的酶),以及色度法标记如胶体金或有色玻璃或塑料(如聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)珠。

[0245] 在一些实施方案中,主题抗体包含造影剂或放射性同位素,其中所述造影剂或放射性同位素是适用于成像(例如在人上执行的成像程序)的标记。标记的非限制性实例包括放射性同位素例如¹²³I(碘)、¹⁸F(氟)、⁹⁹Tc(锝)、¹¹¹In(铟)和⁶⁷Ga(镓),以及造影剂例如钆(Gd)、镝和铁。放射性Gd同位素(¹⁵³Gd)也是可用的且适用于在非人哺乳动物中的成像程序中。主题抗体可以使用标准技术标记。例如,主题抗体可以使用氯胺T或1,3,4,6-四氯-3 α ,6 α -二苯基甘脲(dephenylglycouril)碘化。对于氟化,通过氯离子置换反应在合成期间将氟添加至主题抗体。参见,Muller-Gartner,H.,TIB Tech.,16:122-130(1998)和Saji,H.,

Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.,16(2):209-244(1999)关于用此类放射性同位素合成蛋白质的综述。主题抗体也可以用造影剂通过标准技术标记。例如,主题抗体可以通过将低分子Gd螯合物例如Gd二亚乙基三胺五乙酸(GdDTPA)或Gd四氮杂环十二烷四乙酸(GdDOTA)缀合至所述抗体用Gd标记。参见Caravan等人,Chem.Rev.99:2293-2352(1999)和Lauffer等人,J.Magn.Reson.Imaging,3:11-16(1985)。主题抗体可以通过例如将聚赖氨酸-Gd螯合物缀合至所述抗体用Gd标记。参见,例如,Curtet等人,Invest.Radiol.,33(10):752-761(1998)。或者,主题抗体可以通过将包括具有亲和素的Gd螯合物脂质的顺磁性聚合脂质体与生物素化的抗体孵育而用Gd标记。参见例如,Sipkins等人,Nature Med.,4:623-626(1998)。

[0246] 可以连接至主题抗体的合适的荧光蛋白包括但不限于,例如在美国专利No.6,066,476;6,020,192;5,985,577;5,976,796;5,968,750;5,968,738;5,958,713;5,919,445;5,874,304中所描述的来自维多利亚多管发光水母(*Aequoria victoria*)的绿色荧光蛋白或其变体或衍生物;例如增强的GFP,许多这样的GFP可例如从Clontech,Inc.商购获得;红色荧光蛋白;黄色荧光蛋白;如在例如Matz等人(1999)Nature Biotechnol.17:969-973中所描述的来自珊瑚虫物种的多种荧光和有色蛋白中的任一种;等。

[0247] 试剂盒

[0248] 本公开提供试剂盒(如测试试剂盒),其包括主题抗体。主题试剂盒可用于执行主题检测方法。

[0249] 主题试剂盒包括主题抗体、编码所述抗体的核酸、或包含主题核酸的细胞中的一种或多种。主题试剂盒中的主题抗体可以是人源化的。主题试剂盒可包括用于标记所述抗体的试剂。在一些实施方案中,主题试剂盒中的所述抗体包含可检测标记。

[0250] 所述试剂盒中其它任选的组分包括:缓冲液;蛋白酶抑制剂;可检测标记等。如果主题试剂盒包含主题核酸,则所述核酸也可以具有限制性位点、多克隆位点、引物位点等。所述试剂盒的不同组分可能存在于分开的容器中或如果需要,某些相容的组分可以预先组合进单个容器中。

[0251] 除了上述组分外,主题试剂盒可以包括使用所述试剂盒的组分实施主题方法的说明书。用于实施主题方法的说明书通常记录在合适的记录介质上。例如,所述说明书可以印刷在例如纸或塑料等的基材上。因此,所述说明书可以作为包装插入页存在于所述试剂盒中,存在于所述试剂盒或其组分的容器的标记中(即,与包装或分装关联)等。在其它实施方案中,所述说明书作为存在于合适的计算机可读储存介质上的电子储存数据文件存在,所述介质例如压缩式光盘存储器(CD-ROM)、数字式多功能光盘(DVD)、磁盘等。在另外的其它实施方案中,所述试剂盒中不存在实际的说明书,但是如经由互联网提供了从远距离来源获得所述说明书的手段。该实施方案的实例是包含网址的试剂盒,其中从该网址可以浏览所述说明书和/或从该网址可以下载所述说明书。与说明书一样,用于获得说明书的该手段记录在合适的基材上。

实施例

[0252] 示出下面的实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开和描述,并且下面的实施例并不旨在限制本发明人认为的其发明的范围,也不旨在代

表下面的实验是已经进行的全部或唯一的实验。已经努力确保所使用的数字(如量、温度等)的精确性,但是应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份数是重量份数,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,以及压力是大气压或接近大气压。可以使用标准缩略语,如,bp,碱基对;kb,千碱基;pl,皮升;s或sec,秒;min,分钟;h或hr,小时;aa,氨基酸;kb,千碱基;bp,碱基对;nt,核苷酸;i.m.,肌内;i.p.,腹膜内;s.c.,皮下;等。

[0253] 除非另外指明,否则实施例提及的可商购获得的试剂根据制造商说明使用。实施例和说明书全文中以ECACC登录号标明的细胞来源是欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC),索尔兹伯里,英格兰。除非另外定义,否则本文所用的全部技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管本发明的实践或测试中也可以使用与本文描述的那些类似或等同的方法和材料,但以下描述了示例性方法和材料。所述材料、方法和实施例只是说明性的而不旨在限制范围。

[0254] 实施例1-生成嵌合抗体

[0255] 合成小鼠RFB4单克隆抗体的重链和轻链可变(V)区序列(Campana等人(1985) J. Immunol., 134, 1524-1530. Mansfield等人(1997) Blood, 90, 2020-2026)并将其亚克隆到pANT抗体表达载体(图1),将重链和轻链V区分别克隆到pANT17和pANT13。将重链V区基因经由框中的MluI和HindIII位点与人 γ 1重链基因一起克隆到pANT17(G1m3(G1m(f))同种异型),和将轻链V区基因经由框中的BssHII和BamHI位点与人 κ 轻链恒定区基因一起克隆到pANT13(Km3同种异型)。重链和轻链基因两者的转录都在CMV I/E启动子(US5168062和US5385839, University of Iowa)的控制下进行,且pANT17质粒含有SV40启动子控制下的突变体dhfr微基因(Simonsen&Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2495-2499)以及多聚腺苷酸序列以用于在真核细胞中的选择。pANT17和pANT13均含有用于原核选择的 β -内酰胺酶(Ap^R)基因和用于在原核细胞中增殖的复制的pMB1复制起点。全部质粒在大肠杆菌DH5 α (Invitrogen目录号18265-017)中增殖。

[0256] 随后,将重链和轻链表达构建体通过基于磷酸钙的转染瞬时共转染进HEK293c18细胞,或者通过电穿孔稳定转染进NS0细胞。通过蛋白A层析从细胞培养物上清液中纯化所得嵌合RFB4抗体(如分泌自HEK293c18或NS0细胞),并将其使用PD-10柱(GE Healthcare目录号17-0851-01)脱盐进磷酸缓冲盐水(PBS)。使用基于每个单独抗体的氨基酸组成的摩尔消光系数,通过280nm处的UV吸光度确定浓度。

[0257] 实施例2-生成人源化抗体

[0258] 使用描述于EP1844074 (Antitope Ltd)的方法生成人源化抗体。使用Swiss PDB产生小鼠RFB4V区的结构模型,并对其分析以鉴定重要的框架氨基酸,所述框架氨基酸对于所述抗体对CD22的结合特性可能是重要的(“限制性残基”)。使用人V区序列数据库鉴别含有每一个待用于设计人源化抗体的限制性残基的人V区序列片段。在设计的人源化抗体序列中保留了RFB4CDR序列。设计出一组有利的V区序列,并通过如Fothergill等人描述的电脑模拟分析针对非种系主要组织相容性复合物(MHC) II类肽结合的预测进行分析(W09859244, assignee Eclagen Ltd),且也使用数据库(包括“The Immune Epitope Database and Analysis Resource”(http://www(dot)immunepitope(dot)org/))针对已知的CD4⁺T-细胞表位进行分析。丢弃具有预测的非种系MHC II类结合肽或在T细胞表位数据库大量浏览的V区序列。这获得缩小的V区序列组。然后合并选定的重链和轻链V区序列以

产生人源化重链和轻链可变区氨基酸序列。选择六条重链和四条轻链序列(分别命名为VH1至VH6和Vk1至Vk4)用于产生人源化RFB4抗体。包含VH序列VH3 (SEQ ID NO:3)、VH4 (SEQ ID NO:4)和VH5 (SEQ ID NO:5)、VH6 (SEQ ID NO:6)的重链与包含VL序列VK1 (SEQ ID NO:7)、VK2 (SEQ ID NO:8)和VK4 (SEQ ID NO:9)的轻链配对。

[0259] 合成编码人源化VH和VK变体的DNA并且如实施例1所描述将其亚克隆到表达载体pANT17和pANT13(图1)。将人源化VH和Vk链的全部组合如实施例1所描述瞬时转染到HEK293c18细胞,并且通过蛋白A层析从培养物上清液纯化抗体,随后脱盐。

[0260] 实施例3-人源化抗体的分析

[0261] 在针对亲本嵌合抗体的竞争性酶联免疫吸附测定(ELISA)中评估HEK衍生的RFB4人源化变体与CD22抗原的结合。亲本RFB4嵌合抗体使用Biotin TagTM Micro Biotinylation试剂盒(Sigma-Aldrich)进行生物素化。将96孔MaxiSorp板(Nunc)用Dulbecco's PBS(PAA Laboratories,Yeovil,UK)中的1.0μg/ml CD22-Fc(R&D Systems目录号1968SL)(60μl终体积)在4℃包被过夜。将板用Dulbecco's PBS-2%BSA在室温封闭1小时。用洗涤缓冲液(Dulbecco's-PBS中的0.05%Tween20)洗涤板3次。将不同浓度的测试人源化抗体和生物素化的亲本嵌合抗体(终浓度0.04μg/ml)预混,然后加至所述CD22-Fc板(60μl终体积)。将全部样品一式两份进行测试。室温孵育板1小时并用洗涤缓冲液洗涤3次。加入60μl 1:1000稀释的链霉亲和素辣根过氧化物酶(HRP)(Sigma-Aldrich)并室温孵育1小时。用洗涤缓冲液洗涤板3次并加入60μl的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物(Invitrogen),并在黑暗中室温孵育以显色。通过加入50μl的3M HCl停止反应。使用Dy nex读板仪在450nm读板。

[0262] 如图2所示,全部先导人源化RFB4变体显示类似于亲本嵌合抗体的竞争性结合谱。嵌合RFB4和人源化RFB4抗体相对于野生型RFB4IgG1抗体的IC₅₀示于如下表2。

[0263] 表2

[0264]

构建体	相对于嵌合 RFB4 IgG1的IC ₅₀
嵌合RFB4	1.0
VH3/VK1	0.8
VH3/VK2	1.0
VH3/VK4	1.1
VH4/VK1	0.9
VH4/VK2	1.1
VH4/VK4	1.0
VH5/VK1	0.9
VH5/VK2	1.0
VH5/VK4	1.0
VH6/VK1	0.9
VH6/VK2	1.0
VH6/VK4	1.0

[0265] 实施例4-CD4+T细胞应答的分析

[0266] 从获得自英国全国输血服务站 (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK) 的健康群体供体血沉棕黄色层蟾蜍色素 (来自24小时内抽取的血液) 并根据由Addenbrooke's医院当地研究伦理委员会 (Addenbrooke's Hospital Local Research Ethics Committee) 授予的许可, 分离外周血单核细胞 (PBMC)。通过Lymphoprep (Axis-shield, Dundee, UK) 密度离心从血沉棕黄色层蟾蜍色素分离PBMC, 并使用CD8⁺RosetteSep™ (StemCell Technologies Inc, London, UK) 去除CD8⁺T细胞。通过使用基于HLA单特异性引物聚合酶链式反应 (SSP-PCR) 的组织分类试剂盒 (Biotest, Solihull, UK) 鉴别HLA-DR单倍型而对供体进行表征。还测定了对“重现性”对照抗原 (Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH), Pierce (Perbio), Cramlington, UK) 以及衍生自甲型流感病毒和埃波斯坦 (Epstein Barr) 病毒的对照肽的T细胞应答。然后将PBMC冷冻和储存于液氮直至需要。

[0267] 通过蛋白A层析随后通过在1xPBS中使用26/60Superdex S200柱 (GE Healthcare) 的尺寸排阻层析从瞬时转染的HEK293c18细胞系统纯化嵌合和先导VH4/VK1、VH5/VK1、VH6/VK4人源化抗体。收集单体峰级分, 定量, 并且使用Endosafe®-PTS™ (Charles River, Margate, UK) 系统分析全部制剂的内毒素水平。

[0268] 选择20个供体的小组以最好地代表全球人群中表达的HLA-DR同种异型的数目和频率。在小组内表达的同种异型相对于全球人群中表达的那些同种异型的分析显示全部主要HLA-DR等位基因 (在全球人群中具有>5%表达频率的单个同种异型) 均被很好地代表。将来自每个供体的PBMC在AIM-V®培养基 (Invitrogen, Paisley, UK) 中复原, 洗涤并在AIM-V®中重悬至4-6x10⁶PBMC/ml。对于每个供体, 建立成批培养, 其中将1ml增殖细胞储液添加至24孔板中的合适的孔中。向PBMC添加0.5ml培养基以及0.5ml各稀释的测试样品,

以得到每样品50 μ g/ml的终浓度。对于每一个供体,还包括重现性对照(用100 μ g/ml KLH孵育的细胞)和只有培养基的孔。将培养物在37 $^{\circ}$ C与5%CO₂一起孵育总共8天。在第5、6、7和8天,轻轻重悬每孔中的细胞,并且将3x 100 μ l等分试样转移至圆底96孔板的各孔。将培养物在100 μ l AIM-V®培养基中用0.75 μ Ci [³H]-胸苷(Perkin Elmer®, Beaconsfield, UK)脉冲处理并再孵育18小时,然后使用TomTec Mach III细胞收集器收集至过滤垫(Perkin Elmer®)上。各孔的每分钟计数(cpm)通过paralux模式的1450Microbeta Wallac Trilux Liquid Scintillation Counter(Perkin Elmer®)上的Meltilex™(Perkin Elmer®)闪烁计数测定,低本底计数。

[0269] 对于增殖测定,已经预先建立了等于或大于2的刺激指数(SI)经验阈值(SI $\geq$ 2.0),由此诱导增殖性应答高于该阈值的样品被视为阳性(如果包括,突出显示了临界SI $\geq$ 1.90)。对于增殖数据组(n=3),阳性应答通过统计阈值和经验阈值定义:

[0270] 1) 通过使用不配对两样本学生t-检验比较测试孔的cpm相对于培养基对照孔的应答显著性(p<0.05)。

[0271] 2) SI等于或大于2(SI $\geq$ 2.0)。

[0272] 3) 基础cpm>150cpm

[0273] 此外,通过计算重复培养的原始数据的CV和SD评估分析内可变性(intra-assay variation)。

[0274] 图3A-D示出健康供体T细胞对测试抗体的增殖应答。对来自成批培养物的PBMC取样并在,并在与三种测试样品孵育5、6、7和8天后评估其增殖。具有SI $\geq$ 2.0(p<0.05),由虚线指示的使用不配对两样本学生t-检验为显著(p<0.05)的增殖应答被认为是阳性。

[0275] 数据显示在图3A-D中,且总结于下表3中。图3A-D显示了在整个时程针对每个测试抗体的供体SI应答。在增殖测定中,完全人源化的抗-CD22抗体(VH4/VK1、VH5/VK1、VH6/VK4)在任何供体中都不诱导阳性应答(使用SI $\geq$ 2.0, p<0.05阈值),而嵌合抗-CD22抗体在25%供体中诱导阳性T细胞增殖应答。图3A:嵌合抗体;图3B:VH4/VK1;图3C:VH5/VK1;图3D:VH6/VK4。

[0276] 表3

	嵌合	抗-CD22			
		VH4/VK1	VH5/VK1	VH6/VK4	KLH
供体 1	P				
供体 2					
供体 3					P*
供体 4					
供体 5					
供体 6					
供体 7	P				P
供体 8					P
供体 9					P
供体 10					
供体 11					P
供体 12					P
供体 13					P
供体 14					P
供体 15					P
供体 16	P				P
供体 17					P
供体 18	P				P
供体 19	P				P
供体 20					P
增殖%	25	0	0	0	70

[0278] 表3. 健康供体增殖的总结。阳性增殖(“P”)应答,第5-8天($SI \geq 2.0$, 显著性 $p < 0.05$), 整个时程($SI \geq 2.0$, 显著性 $p < 0.05$)。显示了增殖临界应答(P*) (显著性 $p < 0.05$, $SI \geq 1.90$)。供体组群中的应答总频率用百分比显示。

[0279] 实施例5-内化分析

[0280] 生长至 $\sim 0.5 \times 10^6$ 个细胞/mL的Raji细胞以每测试 $0.35-0.5 \times 10^6$ 个细胞使用。将细胞以100 μ L/管重悬于磷酸缓冲盐水+1%牛胎血清(FCS;缓冲液A)中。对照包括仅仅暴露于4 $^{\circ}$ C的细胞,或暴露于4 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C、没有和抗体孵育或仅仅和二抗孵育的细胞。以1 μ g/管添加一抗,且将细胞在冰上孵育30min。然后,洗涤细胞:添加1mL缓冲液A,通过离心轻轻沉淀细胞,并去除上清液。这重复进行共2次洗涤。将待暴露于37 $^{\circ}$ C的细胞重悬于37 $^{\circ}$ C RMPI+10%胎牛血清(FCS)、2mM谷氨酰胺中,并在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂孵育45min。接着,在1mL冰冷的缓冲液A洗涤细胞一次。以在缓冲液A中1:100稀释加入二抗(荧光素缀合的山羊抗-人Fc; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA),并在冰上孵育细胞30min。最后,将细胞在冰冷的缓冲液A中洗涤两次,并重悬于300 μ L缓冲液A中。将细胞在4 $^{\circ}$ C黑暗中保存并且在18h内在Becton Dickinson FACSCanto上使用FACSDiva软件通过流式细胞术分析。

[0281] 数据分析如下:从加入一抗时生成的信号的平均荧光强度(MFI)扣减(用于检测荧光素)FL1通道上的二抗的MFI。然后将所得值称作当前实验的MFI信号。在4 $^{\circ}$ C保持的细胞的MFI值表示抗体与细胞表面的结合。暴露于37 $^{\circ}$ C的细胞的MFI值表示CD22-Ab复合物内化后

由剩余在细胞表面的抗体生成的信号。4℃和37℃下的MFI的区别对应于结合的抗体的内化(图4)。为允许比较不同日期进行的实验,结合和内化值有时候被针对野生型抗体RFB4标准化。

[0282] 实施例6-CD22结合亲和力的分析

[0283] 人CD22获得自R&D Systems(huCD22-Fc形式,产品号1968-SL-050)或获得自Sino Biological Inc(具有His标记的huCD22,产品号11958-H08H),并且使用LC-生物素对Lys进行生物素化。使用ForteBio设备测量变体12-20与huCD22的结合。链霉亲和素衍生的ForteBio生物传感器装载有生物素化的huCD22分子。通过A₂₈₀确认目标抗体的浓度,且经装载的生物传感器暴露于渐增浓度的各个抗体。在pH7.25针对huCD22在4-5种浓度下测定动力学结合速率和解离速率,并且测定K_D's(图5)。

[0284] 实施例7-聚集分析

[0285] 为确定RFB4变体聚集的范围,使用尺寸排阻高效液相色谱分析20μg抗体(Tosoh#08541G300SW_{XL} 7.8mmx30cm;流动相25mM磷酸钠缓冲液,300mM NaCl,pH 6.8;0.8mL/min;监测220nm和280nm处的吸光度)。结果在图6A-6D突出显示。

[0286] 尽管本发明参考其具体的实施方案进行描述,本领域技术人员应当理解可以进行多种变化并且等同物可在不脱离本发明的真正精神和范围的情况下被替换。此外,可以进行许多修改以使具体的情况、材料、物质组成、方法、一种或多种方法步骤适应本发明的目标、精神和范围。全部的这样的修改旨在落在所附权利要求的范围内。

序列表

<110> Rabuka, David
Holgate, Robert G. E.
Carr, Francis J.

<120> 对 CD22 有特异性的抗体及其使用方法

<130> RDWD-004W0

<150> US 61/673,630

<151> 2012-07-19

<160> 38

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>
<223> 合成的氨基酸序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(19)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)..(78)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)..(84)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr			
20	25	30	
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Xaa Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Xaa Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
85	90	95	

[0002]

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr			
100	105	110	
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (11).. (11)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (80)..(80)
 <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Xaa Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

[0003] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Xaa Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Xaa
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3
 <211> 123
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 3

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

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

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

[0004]

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

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

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 4

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

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

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

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

[0005]

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

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

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 5

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

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

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

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

[0006]

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

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 6

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

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

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

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

[0007] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp			
85	90	95	

[0008]

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0009] <210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Ile Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0010]

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 10

Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5 10

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 11

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 12

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的氨基酸序列

<400> 12

Cys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的氨基酸序列

[0011] <400> 13

His His His His His
1 5

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的氨基酸序列

<400> 14

His His His His His His
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 15

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 16

[0012] Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 17

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 18

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 19

Arg Tyr Ile Arg Ser

1 5

[0013]

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 20

Phe His His Thr

1

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 21

Trp Glu Ala Ala Ala Arg Glu Ala Cys Cys Arg Glu Cys Cys Ala Arg
1 5 10 15

Ala

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 22

[0014] Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 23

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 24

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 25

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

[0015]

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 26

Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 27

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 28

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

[0016] <210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<400> 29

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa 是 C 或 S。

<400> 30

Leu Xaa Thr Pro Ser Arg
1 5

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的氨基酸序列

<400> 31

[0017] Leu Cys Thr Pro Ser Arg
1 5

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的氨基酸序列

<400> 32

Leu Ser Thr Pro Ser Arg
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的氨基酸序列

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> 该位置的 G 是 2 甲酰甘氨酸。

<400> 33

Leu Gly Thr Pro Ser Arg

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0018]

<223> 合成的氨基酸序列

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> 该位置的 G 是 2 甲酰甘氨酸残基，其具有共价连接的部分。

<400> 34

Leu Gly Thr Pro Ser Arg

1 5

<210> 35

<211> 759

<212> PRT

<213> 人(智人)

<400> 35

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu

1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
35 40 45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
50 55 60

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

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
85 90 95

[0019] Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
100 105 110

Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp
115 120 125

Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
130 135 140

Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
165 170 175

Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro
195 200 205

Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala
210 215 220

Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
225 230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg
245 250 255

Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro
260 265 270

[0020]

Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys
275 280 285

Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser
290 295 300

Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser
305 310 315 320

Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr
325 330 335

Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu
340 345 350

Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp
355 360 365

Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile
370 375 380

Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn
385 390 395 400

Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala
405 410 415

Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His
420 425 430

Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro
435 440 445

[0021]

Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys
450 455 460

Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser
465 470 475 480

Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala
485 490 495

Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
500 505 510

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys
515 520 525

Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp
530 535 540

	Asn	Asn	Gln	Ser	Leu	Pro	Tyr	His	Ser	Gln	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro
	545					550					555					560
	Val	Lys	Val	Gln	His	Ser	Gly	Ala	Tyr	Trp	Cys	Gln	Gly	Thr	Asn	Ser
					565					570					575	
	Val	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Pro	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Tyr	Tyr	Ser
					580					585					590	
	Pro	Glu	Thr	Ile	Gly	Arg	Arg	Val	Ala	Val	Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu
					595				600						605	
	Ala	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Ile	Cys	Gly	Leu	Lys	Leu	Gln	Arg	Arg	Trp
	610							615					620			
[0022]	Lys	Arg	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Gly	Leu	Gln	Glu	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln
	625					630					635					640
	Ser	Phe	Phe	Val	Arg	Asn	Lys	Lys	Val	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ser	Glu
					645					650					655	
	Gly	Pro	His	Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr	Asn	Pro	Met	Met	Glu	Asp	Gly	Ile
					660					665					670	
	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	Arg	Phe	Pro	Glu	Met	Asn	Ile	Pro	Arg	Thr	Gly
					675					680					685	
	Asp	Ala	Glu	Ser	Ser	Glu	Met	Gln	Arg	Pro	Pro	Pro	Asp	Cys	Asp	Asp
	690							695					700			
	Thr	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala	Leu	His	Lys	Arg	Gln	Val	Gly	Asp	Tyr	Glu
	705					710					715					720

Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu
725 730 735

Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
740 745 750

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
755

<210> 36

<211> 670

<212> PRT

<213> 人(智人)

<400> 36

[0023] Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
35 40 45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
50 55 60

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

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
85 90 95

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
 100 105 110

Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp
 115 120 125

Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
 130 135 140

Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
 165 170 175

[0024] Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser
 180 185 190

Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro
 195 200 205

Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala
 210 215 220

Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
 225 230 235 240

Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg
 245 250 255

Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro
 260 265 270

	Ser	Val	Thr	Arg	Tyr	Glu	Trp	Lys	Pro	His	Gly	Ala	Trp	Glu	Glu	Pro	
		275						280					285				
	Ser	Leu	Gly	Val	Leu	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Gly	Trp	Asp	Asn	Thr	Thr	
		290					295					300					
	Ile	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Asn	Ser	Trp	Cys	Ser	Trp	Ala	Ser	Pro	Val	
	305					310					315					320	
	Ala	Leu	Asn	Val	Gln	Tyr	Ala	Pro	Arg	Asp	Val	Arg	Val	Arg	Lys	Ile	
					325					330					335		
	Lys	Pro	Leu	Ser	Glu	Ile	His	Ser	Gly	Asn	Ser	Val	Ser	Leu	Gln	Cys	
			340						345					350			
[0025]	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Lys	Glu	Val	Gln	Phe	Phe	Trp	Glu	Lys	
		355						360					365				
	Asn	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ser	Gln	Leu	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	
		370					375					380					
	Ser	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Trp	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	
	385					390					395					400	
	Gly	Gln	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Trp	Thr	Leu	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Pro	
					405					410				415			
	Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Met	Ser	Pro	Gly	Asp	Gln	Val	Met	Glu	Gly	
			420						425				430				
	Lys	Ser	Ala	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Pro	Pro	Val	Ser	
		435					440					445					

His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser
450 455 460

Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr
465 470 475 480

Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser
485 490 495

Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala
500 505 510

Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
515 520 525

[0026] Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu
530 535 540

Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys Val
545 550 555 560

Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr Asn
565 570 575

Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu
580 585 590

Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg
595 600 605

Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys
610 615 620

Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp
625 630 635 640

Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg
645 650 655

Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
660 665 670

<210> 37

<211> 846

<212> PRT

<213> 人(智人)

<400> 37

[0027] Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
1 5 10 15

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
35 40 45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
50 55 60

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

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
85 90 95

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
100 105 110

Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp
115 120 125

Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
130 135 140

Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
165 170 175

[0028]

Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser
180 185 190

Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro
195 200 205

Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala
210 215 220

Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
225 230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg
245 250 255

Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro
260 265 270

	Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys	
	275	280 285
	Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser	
	290	295 300
	Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser	
	305	310 315 320
	Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val	
	325	330 335
	Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu	
	340	345 350
[0029]	Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His	
	355	360 365
	Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro	
	370	375 380
	Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn	
	385	390 395 400
	Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln	
	405	410 415
	Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile	
	420	425 430
	Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn	
	435	440 445

	Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu	
	450	455 460
	Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr	
	465	470 475 480
	Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro	
		485 490 495
	Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys	
		500 505 510
	Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln	
		515 520 525
[0030]	Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu	
	530	535 540
	Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser	
	545	550 555 560
	Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser	
		565 570 575
	Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala	
		580 585 590
	Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu	
	595	600 605
	Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val	
	610	615 620

	Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His	
	625	630 635 640
	Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala	
		645 650 655
	Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu	
		660 665 670
	Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val	
		675 680 685
	Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys	
		690 695 700
[0031]	Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly	
	705	710 715 720
	Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys	
		725 730 735
	Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr	
		740 745 750
	Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro	
		755 760 765
	Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln	
		770 775 780
	Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His	
		785 790 795 800

Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
805 810 815

Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
820 825 830

Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys
835 840 845

<210> 38

<211> 751

<212> PRT

<213> 人(智人)

<400> 38

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
1 5 10 15

[0032]

Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
20 25 30

Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
35 40 45

Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
50 55 60

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

Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
85 90 95

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn

100	105	110
Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp		
115	120	125
Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His		
130	135	140
Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr		
145	150	155
160		
Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp		
165	170	175
Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser		
180	185	190
[0033]		
Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro		
195	200	205
Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala		
210	215	220
Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His		
225	230	235
240		
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg		
245	250	255
Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro		
260	265	270
Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys		

275	280	285
Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser		
290	295	300
Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser		
305	310	315 320
Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val		
325	330	335
Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu		
340	345	350
Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His		
355	360	365
[0034]		
Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro		
370	375	380
Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn		
385	390	395 400
Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln		
405	410	415
Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile		
420	425	430
Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn		
435	440	445
Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu		

450	455	460
Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr		
465	470	475 480
Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro		
	485	490 495
Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys		
	500	505 510
Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln		
	515	520 525
Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu		
	530	535 540
[0035]		
Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser		
545	550	555 560
Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser		
	565	570 575
Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala		
	580	585 590
Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu		
	595	600 605
Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val		
	610	615 620
Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His		

625	630	635	640
Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala			
645	650	655	
Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu			
660	665	670	
Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val			
675	680	685	
[0036]			
Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys			
690	695	700	
Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly			
705	710	715	720
Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys			
725	730	735	
Arg Cys Arg Val Leu Arg Asp Ala Glu Thr Ser Pro Gly Leu Arg			
740	745	750	

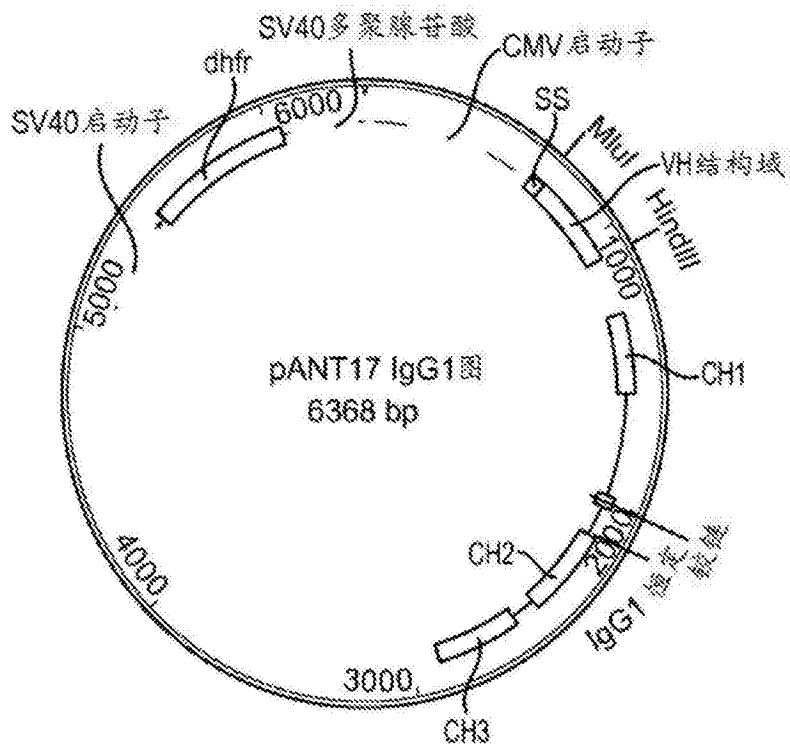


图1A

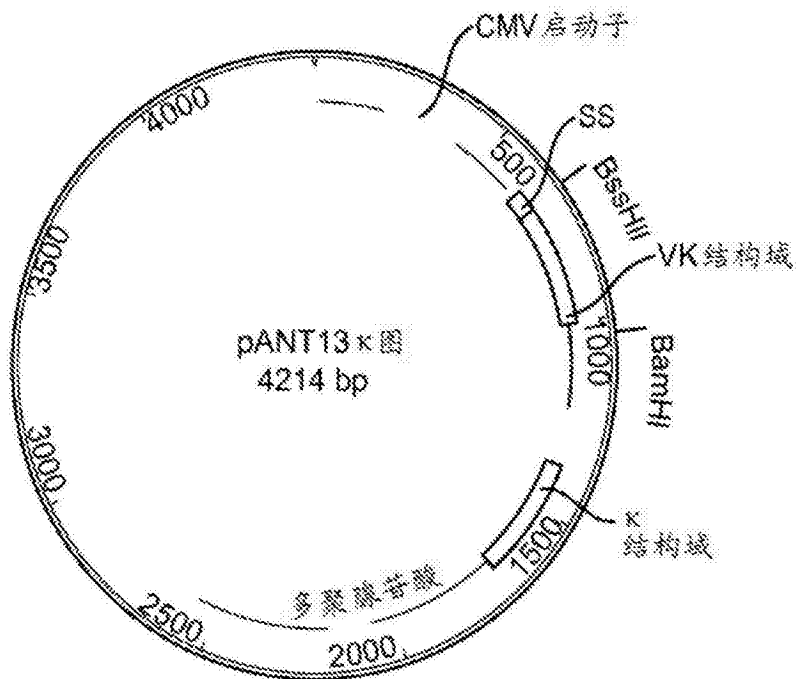


图1B

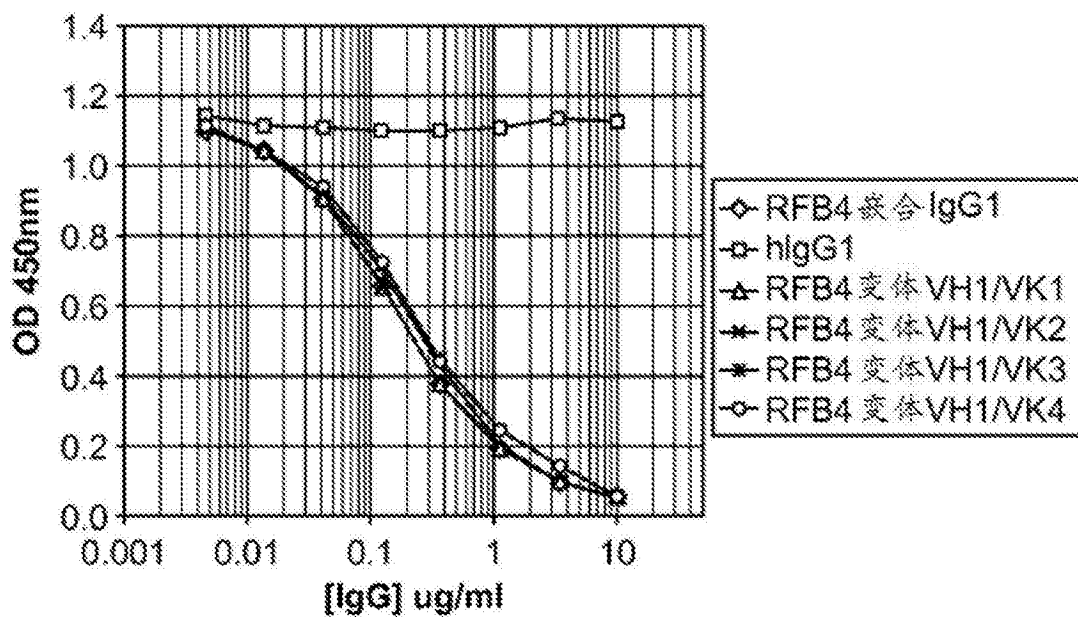


图2A

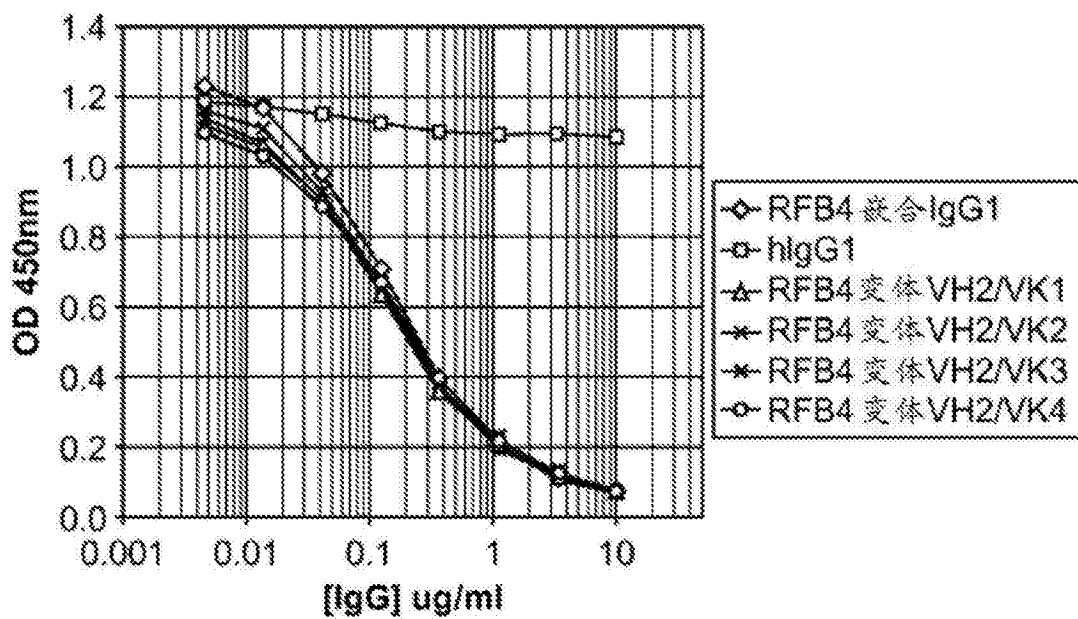


图2B

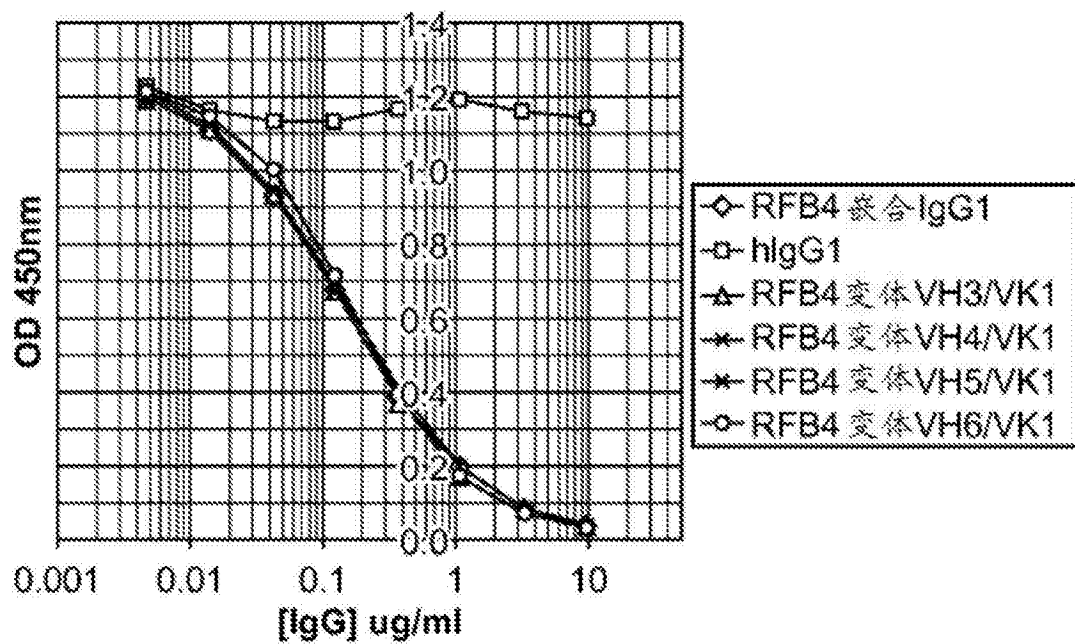


图2C

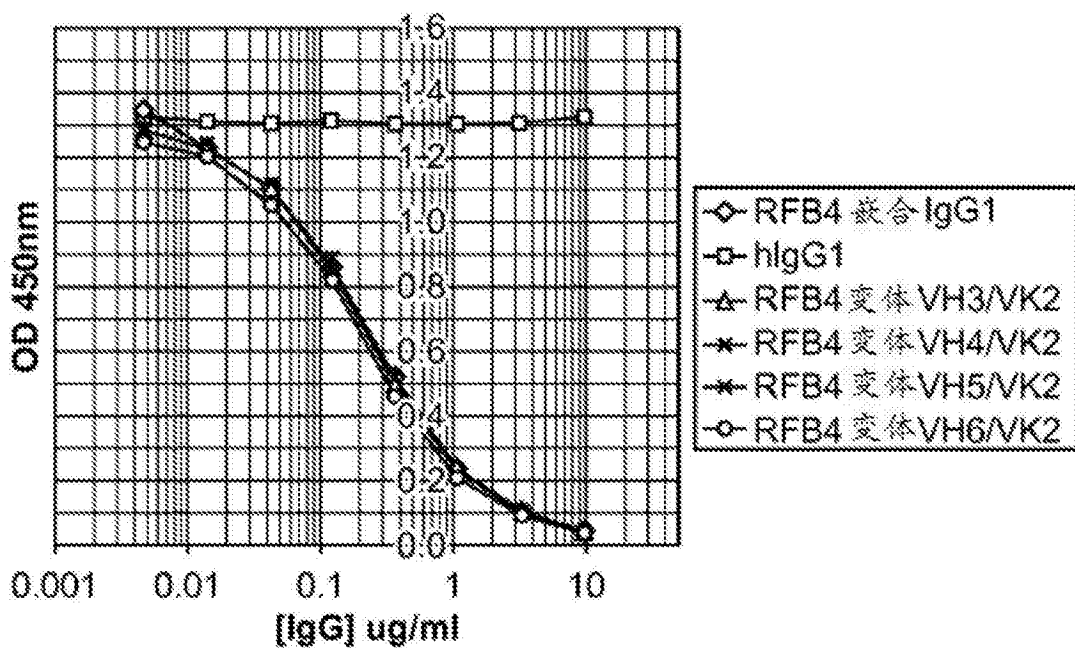


图2D

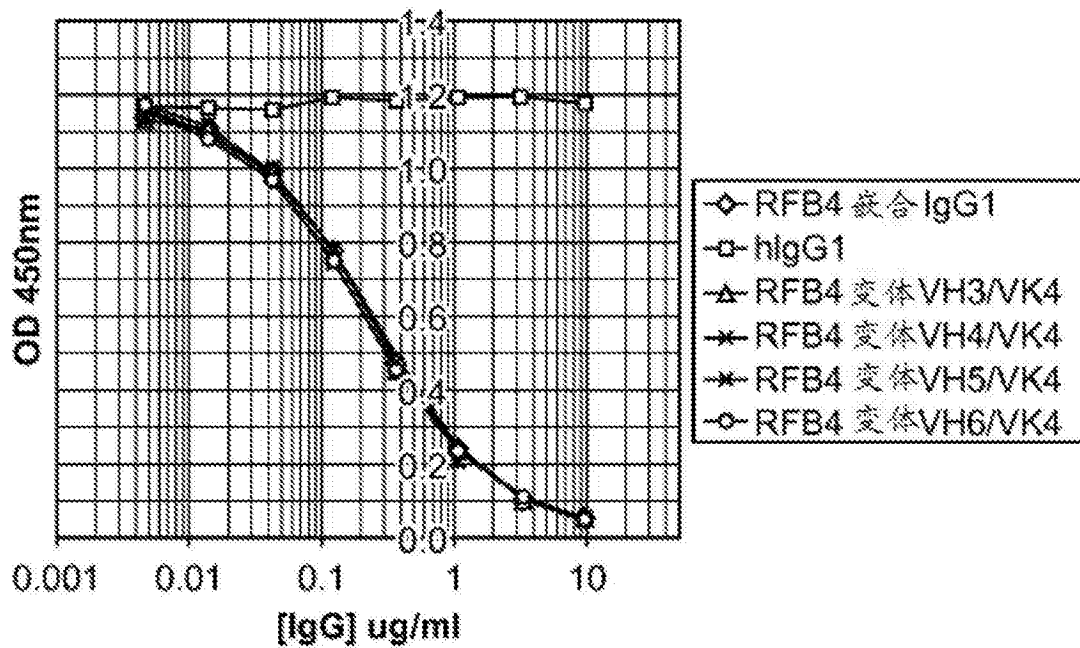


图2E

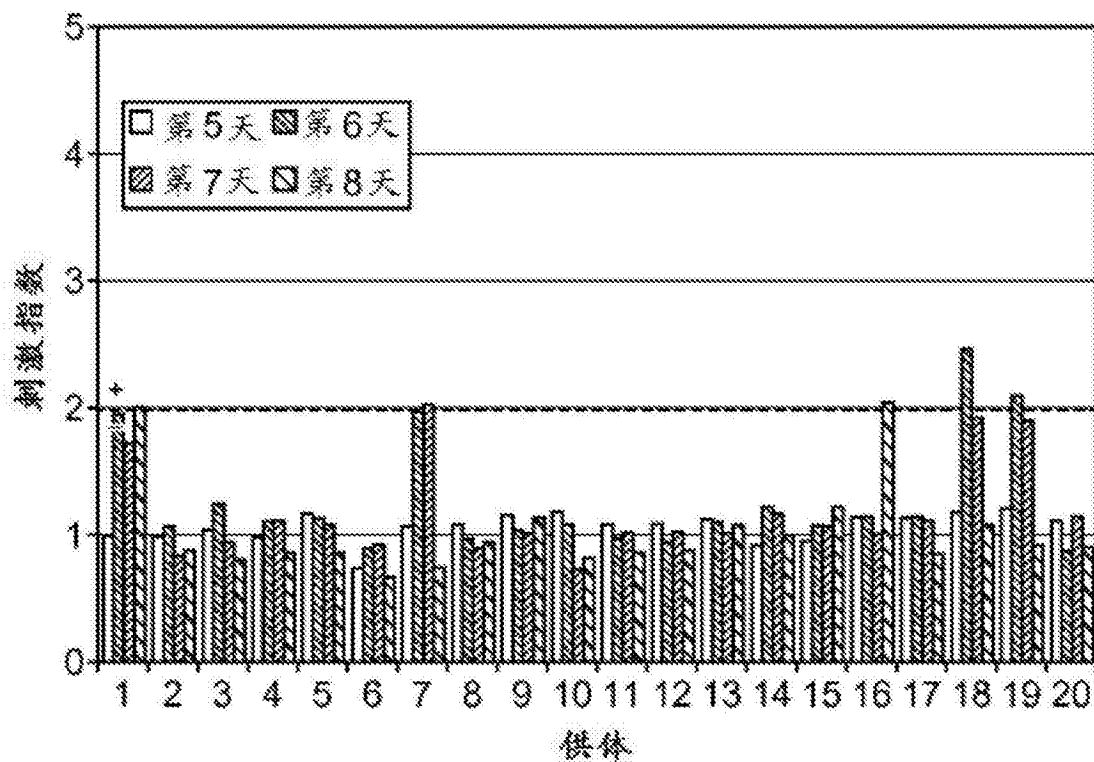


图3A

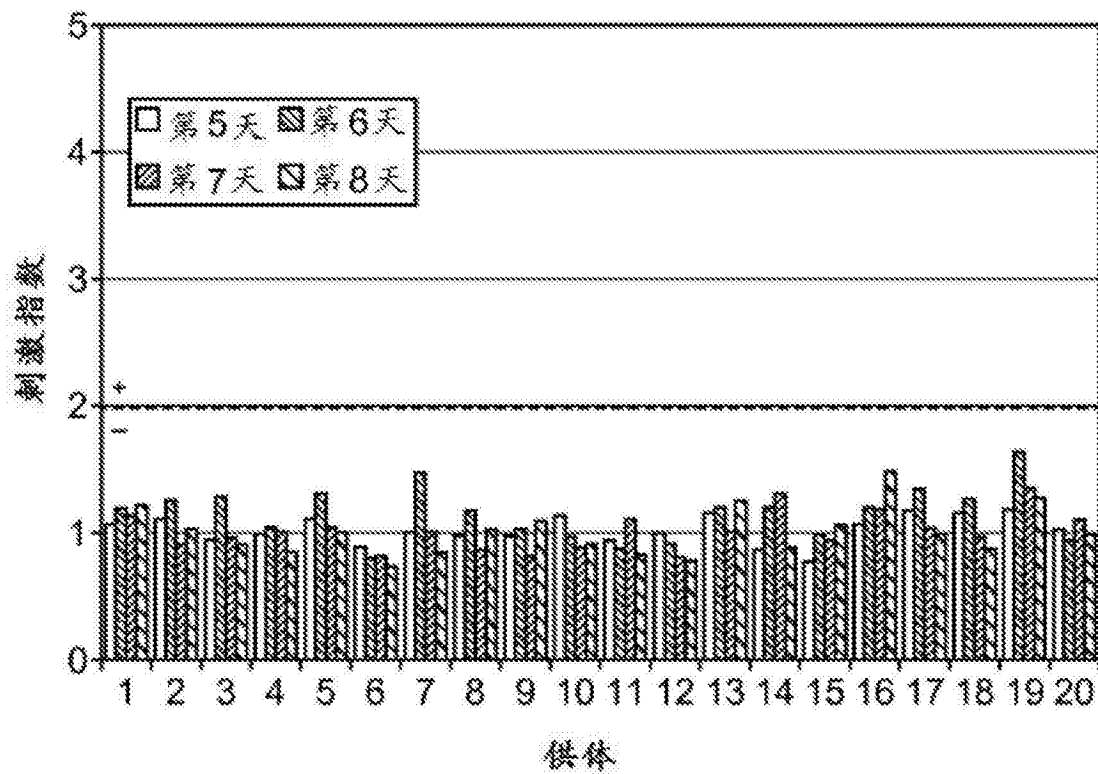


图3B

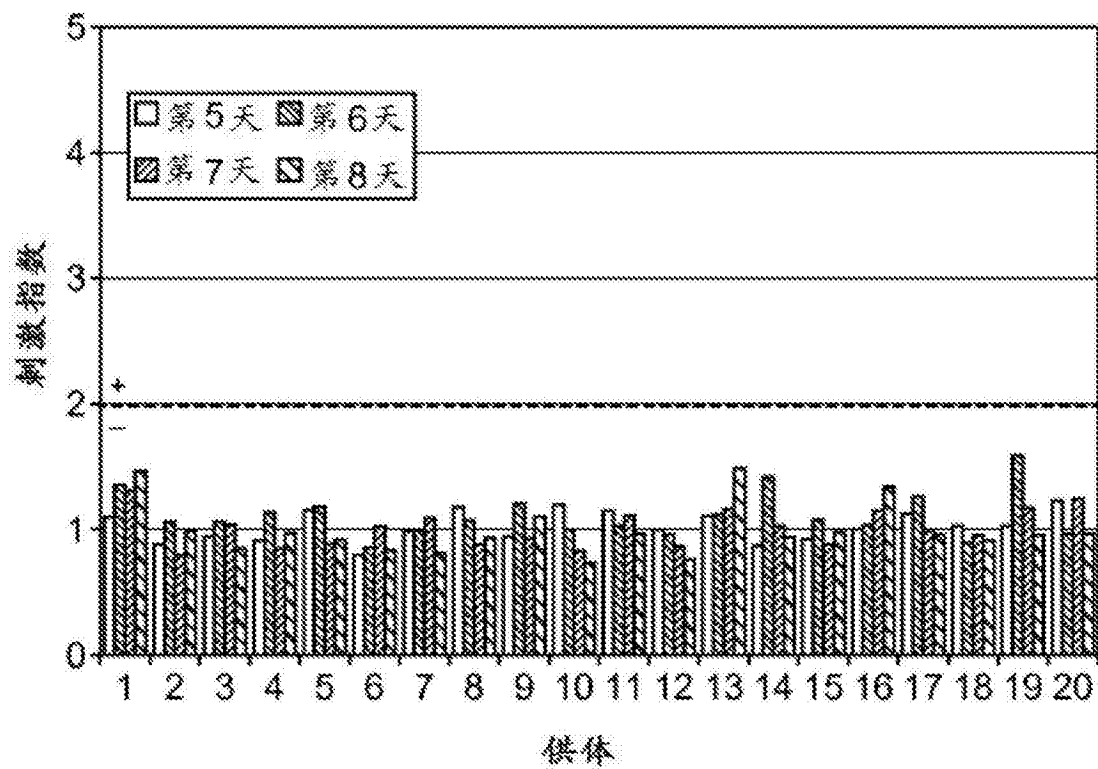


图3C

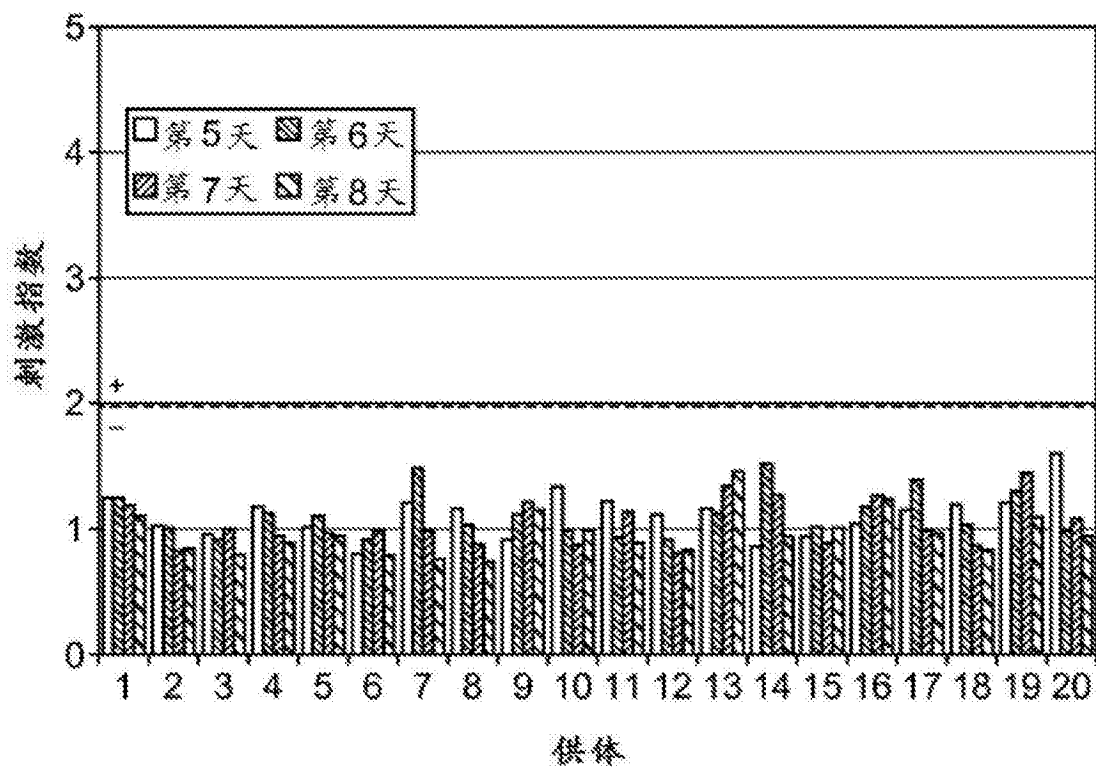


图3D

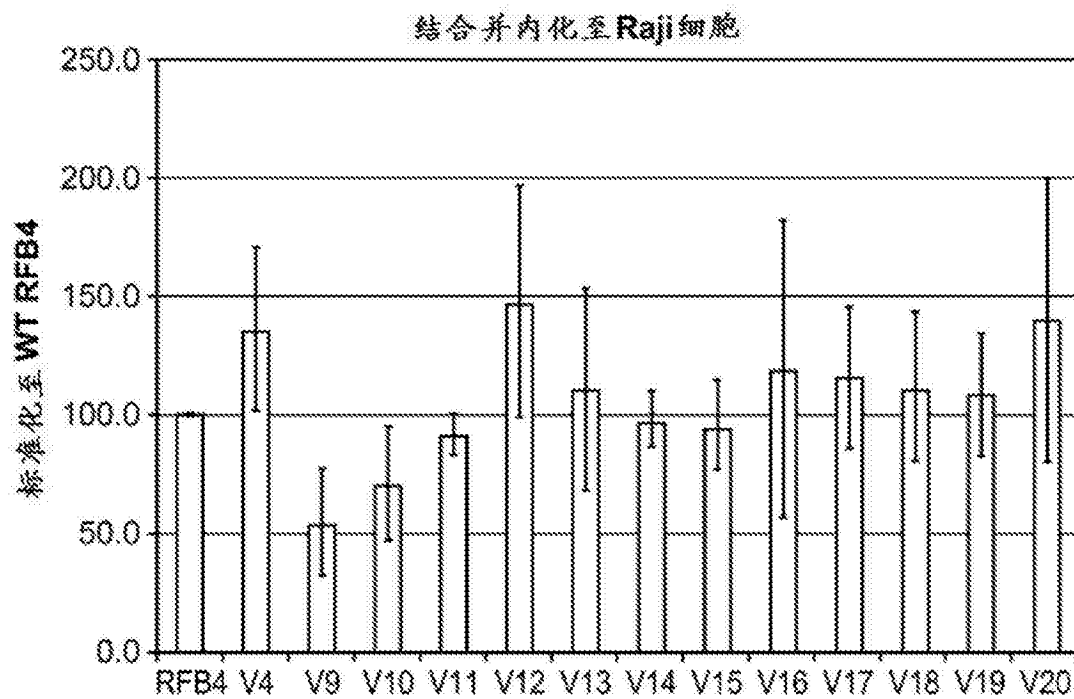


图4

	Kon	Koff	Kd
V12	4.93E+05	9.85E-05	2.00E-10
V13	3.38E+05	1.32E-04	3.90E-10
V14	3.92E+05	2.40E-04	6.14E-10
V15	4.31E+05	2.15E-04	4.97E-10
V16	3.68E+05	1.73E-04	4.71E-10
V17	3.39E+05	2.52E-04	7.42E-10
V18	3.26E+05	1.87E-04	5.72E-10
V19	3.63E+05	2.01E-04	5.53E-10
V20	4.01E+05	2.76E-04	6.89E-10

图5

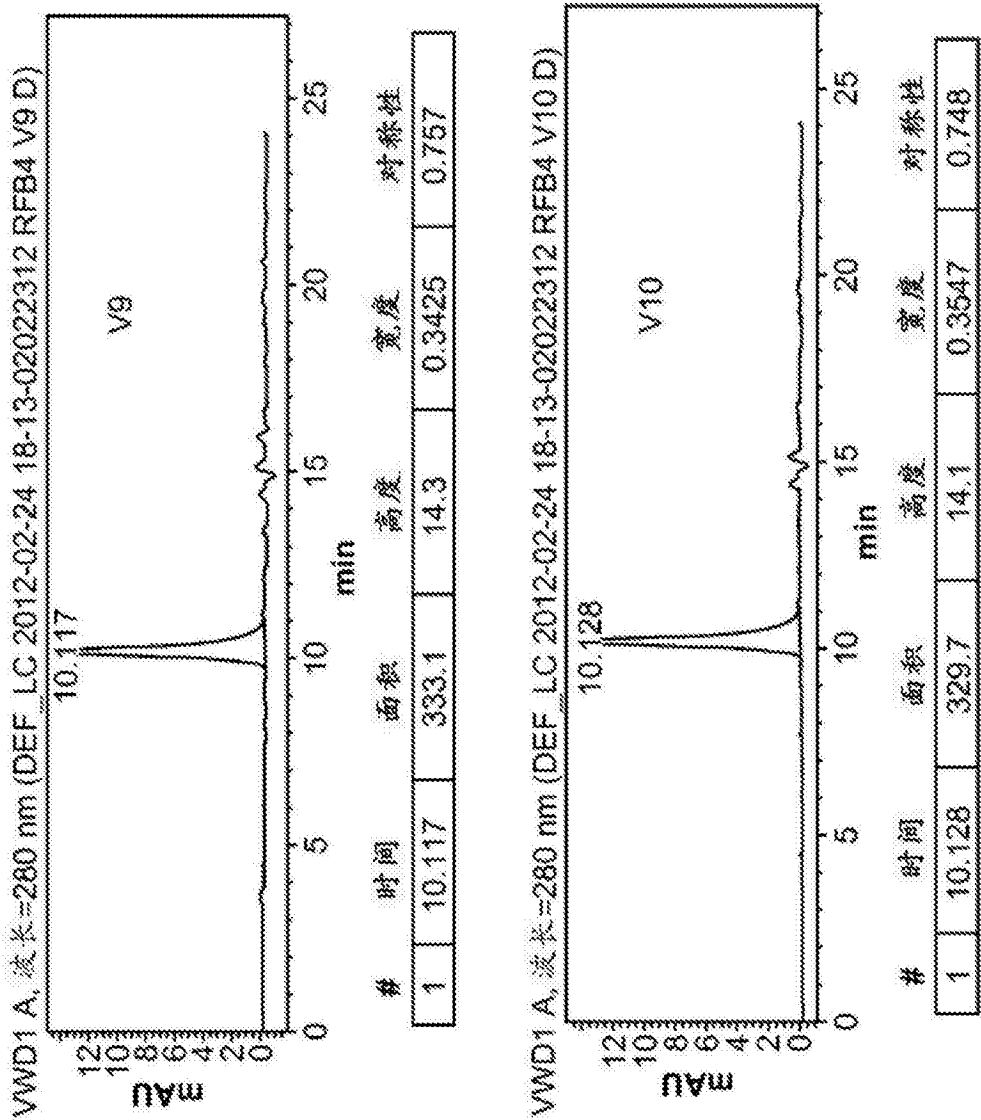


图6A

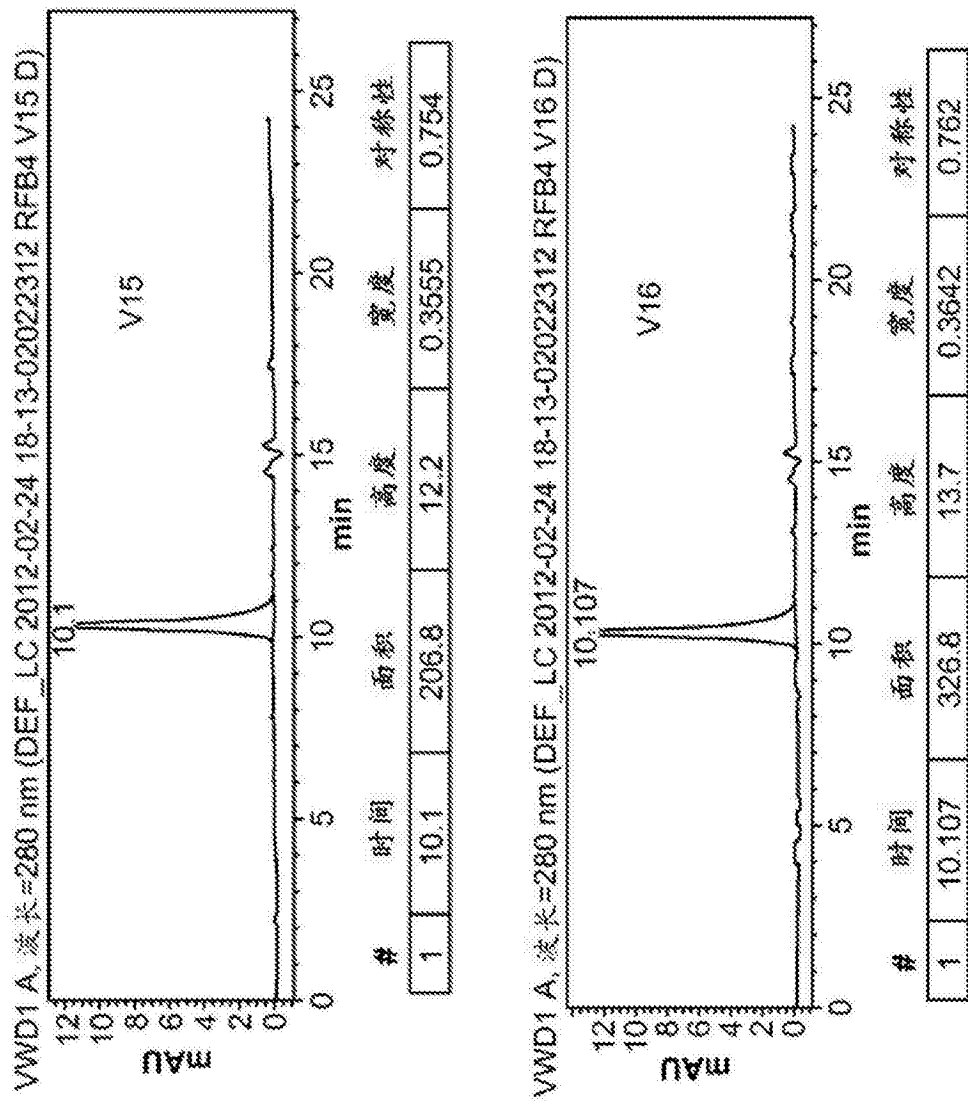


图6B

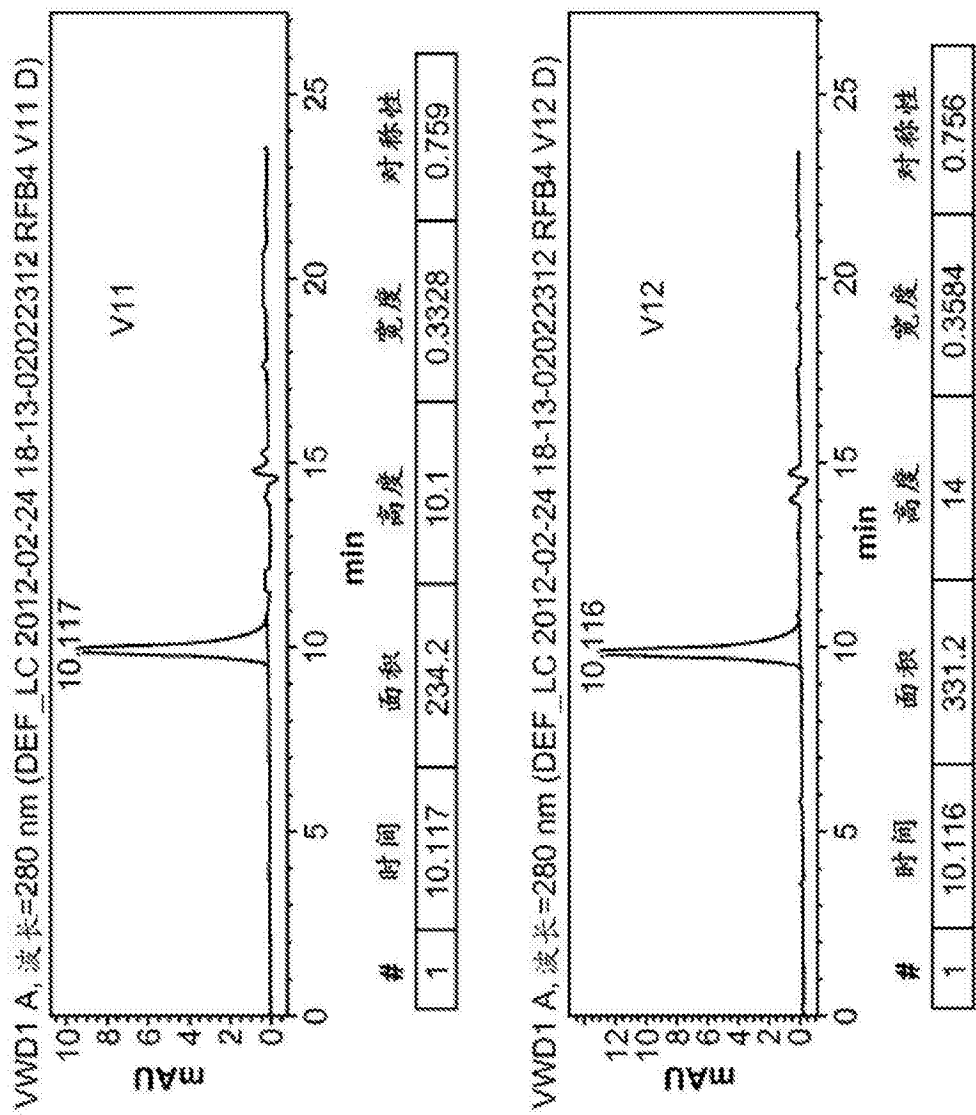


图6C

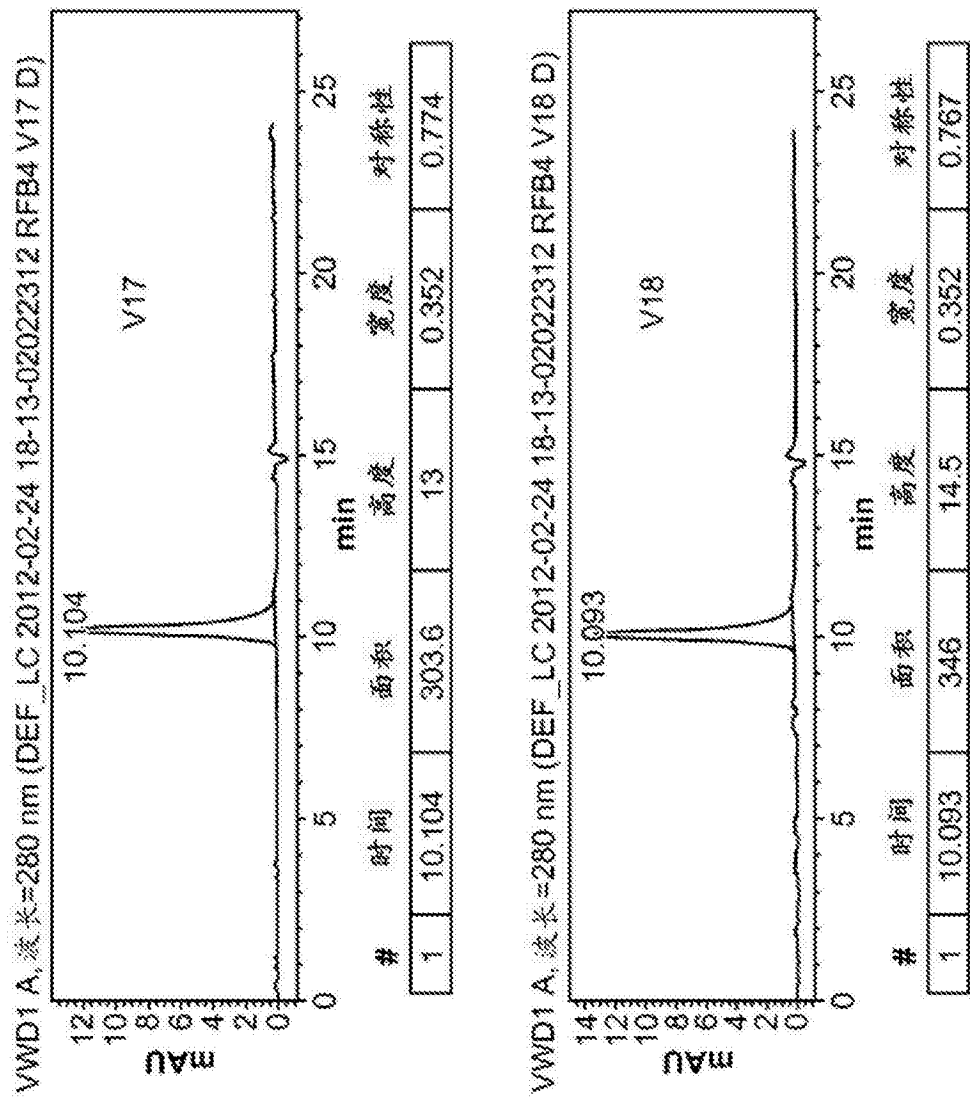


图6D

可变区序列
重链可变区

VH3
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAIYSSGGGTTYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:3)

VH4
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAIYSSGGGTTYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:4)

VH5
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAIYSSGGGTTYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:5)

VH6
EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAIYSSGGGTTYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:6)

图7A

可变区序列
轻链可变区

VK1
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAVKLLIYTSILHSGVPSRFSGSGSGTIDYTLTISSLQQEDFATYFCQQ
GNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)

VK2
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAVKLLIYTSILHSGVPSRFSGSGSGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
NTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)

VK4
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYTSILHSGVPSRFSGSGSGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
NTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)

图7B

变体 9 (VH3/VK1)
VH3
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPDITVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLR
 AEDTAMYYCARHSGYSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)
VK1
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDEATYFCQQ
 GNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)

变体 10 (VH3/VK2)
VH3
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPDITVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLR
 AEDTAMYYCARHSGYSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)
VK2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPVKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
 NTLPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)

变体 11 (VH3/VK4)
VH3
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPDITVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLR
 AEDTAMYYCARHSGYSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:3)
VK4
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQ
 NTLPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)

图8A

变体 12 (VH4/VK1)
VH4
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPDTIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
 EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)
VK1
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL NWYQQKPGKAVKLLIYYTSHSGVPSRFSGSGGTIDYTLTISSLQQEDFATYFCQQG
 GNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)

变体 13 (VH4/VK2)
VH4
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPDTIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
 EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)
VK2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL NWYQQKPGKAVKLLIYYTSHSGVPSRFSGSGGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 NTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)

变体 14 (VH4/VK4)
VH4
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPDTIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSLRA
 EDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)
VK4
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYL NWYQQKPGKAPKLLIYYTSHSGVPSRFSGSGGTIDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 NTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)

图8B

变体 15 (VH5/VK1)
VH5
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR
 AEDTAMY YCARHSGYSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)
VK1
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 GNTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:7)

变体 16 (VH5/VK2)
VH5
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR
 AEDTAMY YCARHSGYSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)
VK2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 NTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:8)

变体 17 (VH5/VK4)
VH5
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLR
 AEDTAMY YCARHSGYSSYGVLFA YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:5)
VK4
 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYFCQQG
 NTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)

图 8C

变体 18 (VH6/VK1)**VH6**

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGGQGLVTVSS (SEQ ID NO:6)

VK1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGGIDYTLTISLQQEDFATYFCQQ
GNILPWTFGGGKVEIK (SEQ ID NO:7)

变体 19 (VH6/VK2)**VH6**

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQMSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFA YWGGQGLVTVSS (SEQ ID NO:6)

VK2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGGIDYTLTISLQPEDFATYFCQQ
NTLPWFGGGKVEIK (SEQ ID NO:8)

图8D

变体 20 (VH6/VK4)**VH6**

EVQILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVA YISSGGGTTYYPD TVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MSSLR
AEDTAMYYCARHSGYGGSSYGVL FAYWGQGT LTVSS (SEQ ID NO:6)

VK4

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYYT SILHSGVPSRFSGSGGTDYTL TISSLQPEDFATYFCQQG
NTLPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:9)

图 8E

同种型2	MHLLGEWLLLLLVLEYLA	FSDSSSKWVFEHPETLY	AWEGACVWIECTYRALDGD	LESEFILFH	60
同种型4	MHLLGEPWLLLLLVLEYLA	FSDSSSKWVFEHPETLY	AWEGACVWIECTYRALDGD	LESEFILFH	60
同种型1	MHLLGEPWLLLLLVLEYLA	FSDSSSKWVFEHPETLY	AWEGACVWIECTYRALDGD	LESEFILFH	60
同种型3	MHLLGEPWLLLLLVLEYLA	FSDSSSKWVFEHPETLY	AWEGACVWIECTYRALDGD	LESEFILFH	60
	*****	*****	*****	*****	*****
同种型2	NPEYNKNTSKFDGTRLYE	STKDGKVPSEQKR	VQFLGDKNKNCTLSI	HPVHLNDSGQ	LGLR
同种型4	NPEYNKNTSKFDGTRLYE	STKDGKVPSEQKR	VQFLGDKNKNCTLSI	HPVHLNDSGQ	LGLR
同种型1	NPEYNKNTSKFDGTRLYE	STKDGKVPSEQKR	VQFLGDKNKNCTLSI	HPVHLNDSGQ	LGLR
同种型3	NPEYNKNTSKFDGTRLYE	STKDGKVPSEQKR	VQFLGDKNKNCTLSI	HPVHLNDSGQ	LGLR
	*****	*****	*****	*****	*****
同种型2	MESKTEKWMERIHLNVSE	RPEPHIQLPPEIQESQ	EVTLTCLLNFS	CYGYPIQLQW	LLEG
同种型4	MESKTEKWMERIHLNVSE	RPEPHIQLPPEIQESQ	EVTLTCLLNFS	CYGYGYPIQLQW	LLEG
同种型1	MESKTEKWMERIHLNVSE	RPEPHIQLPPEIQESQ	EVTLTCLLNFS	CYGYGYPIQLQW	LLEG
同种型3	MESKTEKWMERIHLNVSE	RPEPHIQLPPEIQESQ	EVTLTCLLNFS	CYGYGYPIQLQW	LLEG
	*****	*****	*****	*****	*****
同种型2	VPMRQAAVTSTSLTIKS	VFTRSELKFS	PQWSHHGKI	IVTCQLQDADG	KFLSNDTVQLNVKH
同种型4	VPMRQAAVTSTSLTIKS	VFTRSELKFS	PQWSHHGKI	IVTCQLQDADG	KFLSNDTVQLNVKH
同种型1	VPMRQAAVTSTSLTIKS	VFTRSELKFS	PQWSHHGKI	IVTCQLQDADG	KFLSNDTVQLNVKH
同种型3	VPMRQAAVTSTSLTIKS	VFTRSELKFS	PQWSHHGKI	IVTCQLQDADG	KFLSNDTVQLNVKH
	*****	*****	*****	*****	*****
同种型2	TPKLEIKVTPSDAIV	REGDSVTMTCEVSS	SSSNPEYTTVSWL	KDGTSLKKQNT	FTILNLRVET
同种型4	TPKLEIKVTPSDAIV	REGDSVTMTCEVSS	SSSNPEYTTVSWL	KDGTSLKKQNT	FTILNLRVET
同种型1	TPKLEIKVTPSDAIV	REGDSVTMTCEVSS	SSSNPEYTTVSWL	KDGTSLKKQNT	FTILNLRVET
同种型3	TPKLEIKVTPSDAIV	REGDSVTMTCEVSS	SSSNPEYTTVSWL	KDGTSLKKQNT	FTILNLRVET

图9A

同种型2	KDQSGKYCCQVSN	DVGPGRSEEV	FLOVQ	328
同种型4	KDQSGKYCCQVSN	DVGPGRSEEV	FLOVQ	360
同种型1	KDQSGKYCCQVSN	DVGPGRSEEV	FLOVQ	360
同种型3	KDQSGKYCCQVSN	DVGPGRSEEV	FLOVQ	360
同种型2	PTNYTWYHNGKEM	QGRTEEKVHI	PKILPWHAGTYS	332
同种型4	PTNYTWYHNGKEM	QGRTEEKVHI	PKILPWHAGTYS	243
同种型1	PTNYTWYHNGKEM	QGRTEEKVHI	PKILPWHAGTYS	420
同种型3	PTNYTWYHNGKEM	QGRTEEKVHI	PKILPWHAGTYS	420
同种型2	KVTTVIQNPMP	IREGDTVTLSC	NYNSSNP	392
同种型4	KVTTVIQNPMP	IREGDTVTLSC	NYNSSNP	303
同种型1	KVTTVIQNPMP	IREGDTVTLSC	NYNSSNP	480
同种型3	KVTTVIQNPMP	IREGDTVTLSC	NYNSSNP	480
同种型2	TIACAACNSWC	SWASPV	ALNVQYAPRD	452
同种型4	TIACAACNSWC	SWASPV	ALNVQYAPRD	363
同种型1	TIACAACNSWC	SWASPV	ALNVQYAPRD	540
同种型3	TIACAACNSWC	SWASPV	ALNVQYAPRD	540
同种型2	FFWEKNGRL	LKESQ	LNFD	512
同种型4	FFWEKNGRL	LKESQ	LNFD	423
同种型1	FFWEKNGRL	LKESQ	LNFD	600
同种型3	FFWEKNGRL	LKESQ	LNFD	600
同种型2	SPGDQVMEG	KSATL	TCESDAN	572
同种型4	SPGDQVMEG	KSATL	TCESDAN	483
同种型1	SPGDQVMEG	KSATL	TCESDAN	660
同种型3	SPGDQVMEG	KSATL	TCESDAN	660

图9B

同种型2	GTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPE	632
同种型4	GTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPE	543
同种型1	GTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPE	720
同种型3	GTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPE	720

	LOENSSGQSEFFVRNKKVRRAPL	692
同种型2	LOENSSGQSEFFVRNKKVRRAPL	603
同种型4	LOENSSGQSEFFVRNKKVRRAPL	780
同种型1	LOENSSGQSEFFVRNKKVRRAPL	746
同种型3	LOENSSGQSEFFVRNKKVRRAPL	

	SEMORPPPPDCDDTVTYSALHKKRQVGDYENV	752
同种型2	SEMORPPPPDCDDTVTYSALHKKRQVGDYENV	663
同种型4	SEMORPPPPDCDDTVTYSALHKKRQVGDYENV	840
同种型1	SEMORPPPPDCDDTVTYSALHKKRQVGDYENV	751
同种型3	SPGLR~	

	DYVILKH 759	
同种型2	DYVILKH 670	
同种型4	DYVILKH ~ 846	
同种型1	~ ~ ~ ~ ~	
同种型3	~ ~ ~ ~ ~	

图9C