



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101842389 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 22

(21) 申请号 200880100872. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 06. 12

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

60/934, 341 2007. 06. 12 US

A61P 35/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 01. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/007464 2008. 06. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02008/156713 EN 2008. 12. 24

(71) 申请人 惠氏有限责任公司

地址 美国新泽西

申请人 特鲁比昂制药公司

(72) 发明人 N·K·达姆勒 L·特奇斯蒂亚科娃

K·邓努斯-琼诺波罗斯

S·A·西蒙 W·布拉迪

L·S·戈罗斯迈尔 J·A·莱德柏特

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

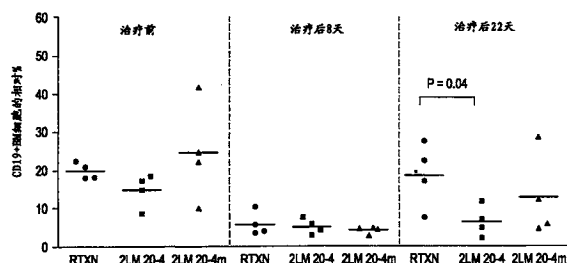
权利要求书 3 页 说明书 81 页 附图 38 页

(54) 发明名称

抗 CD20 治疗组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了使用 CD20 特异性结合分子,特别是抗体或其抗原结合片段用于治疗涉及异常 B 细胞活性的疾病的材料和方法。本文公开的组合物用于治疗 and 诊断 B 细胞病症,例如 B 细胞恶性肿瘤和自身免疫疾病。



1. 人源化 CD20 结合分子,其包含含有构架区以及 CDR1、CDR2 和 CDR3 区的免疫球蛋白重链可变结构域 (VH) 和免疫球蛋白轻链可变结构域 (VL),,其中所述构架区是人免疫球蛋白构架区,并且其中:

(a) 所述 VH 结构域氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的重链 CDR3 的氨基酸序列;或

(b) 所述 VL 结构域氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的轻链 CDR3 的氨基酸序列;或

(c) 所述人源化 CD20 结合分子包含 (a) 的 VH 氨基酸序列和 (b) 的 VL 氨基酸序列;或

(d) 所述人源化 CD20 结合分子包含 (a) 的 VH 氨基酸序列和 (b) 的 VL 氨基酸序列,并且其中所述 VH 和 VL 是在相同参考序列中发现的,

或者所述结合分子的 CD20 结合片段。

2. 权利要求 1 的人源化 CD20 结合分子,其进一步包含:

(a) 包含与 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VH 结构域氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列的 VH 结构域氨基酸序列;或

(b) 包含与 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VL 结构域氨基酸序列至少 90% 相同的氨基酸序列的 VL 结构域氨基酸序列;或

(c) (a) 的 VH 和 (b) 的 VL;或

(d) 在相同参考序列中发现的 (a) 的 VH 和 (b) 的 VL。

3. 权利要求 1 的人源化 CD20 结合分子,其进一步包含:

(a) 包含与 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VH 结构域氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列的 VH 结构域氨基酸序列;或

(b) 包含与 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VL 结构域氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列的 VL 结构域氨基酸序列;或

(c) (a) 的 VH 和 (b) 的 VL;或

(d) 在相同参考序列中发现的 (a) 的 VH 和 (b) 的 VL。

4. 权利要求 1 的人源化 CD20 结合分子,其进一步包含:

(a) 包含 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VH 结构域氨基酸序列的 VH 结构域氨基酸序列;或

(b) 包含 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VL 结构域氨基酸序列的 VL 结构域氨基酸序列;或

(c) (a) 的 VH 和 (b) 的 VL;或

(d) 在相同参考序列中发现的 (a) 的 VH 和 (b) 的 VL。

5. 权利要求 1-4 中任一项的人源化 CD20 结合分子,其为抗体或其抗原结合片段。

6. 权利要求 1-4 中任一项的人源化 CD20 结合分子,其为人源化小分子免疫药物 (SMIP)。

7. 人源化 SMIP,其特异性结合 CD20。

8. 权利要求 7 的人源化 SMIP,其结合与人源化 CD20 结合分子相同的表位,与人源化 CD20 结合分子竞争或交叉竞争,所述人源化 CD20 结合分子包含 SEQ ID NO:1-59 任何一个中所示的氨基酸序列。

9. 权利要求 6-8 中任一项的人源化 SMIP,其包含具有 SEQ ID NO:60 中所示的氨基酸序列的铰链结构域。

10. 权利要求 9 的人源化 SMIP,其包含含有 SEQ ID NO:61 中所示的氨基酸序列的效应子结构域。

11. 权利要求 7 的人源化 SMIP,其中所述 SMIP 具有至少一种下述性质:

- (a) ADCC 活性;
- (b) CDC 活性;
- (c) 减少异种移植物肿瘤的生长;
- (d) 减少体内播散的淋巴瘤的进展;
- (e) 耗尽外周血、骨髓和淋巴结中的 CD19+B 细胞。

12. 权利要求 11 的人源化 SMIP,其中所述 SMIP 具有至少 3 种所述性质。

13. 权利要求 1-6 中任一项的 CD20 结合分子或权利要求 7-12 中任一项的人源化 SMIP,其进行可检测地标记。

14. 组合物,其包含权利要求 1-6 中任一项的 CD20 结合分子或权利要求 7-12 中任一项的人源化 SMIP。

15. 试剂盒,其包含权利要求 1-6 中任一项的 CD20 结合分子、权利要求 7-12 中任一项的人源化 SMIP 或权利要求 14 的组合物和使用说明书。

16. 核酸,其编码权利要求 1-6 中任一项的 CD20 结合分子或抗原结合片段或者权利要求 7-12 中任一项的人源化 SMIP。

17. 权利要求 16 的核酸,其编码所述 VH 结构域,并且包含编码 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VH 氨基酸序列的核苷酸序列。

18. 权利要求 17 的核酸,其包含 SEQ ID NO:118-126 任何一个的核苷酸序列。

19. 权利要求 16 的核酸,其编码所述 VL 结构域,并且包含编码 SEQ ID NO:1-59 任何一个中发现的 VL 氨基酸序列的核苷酸序列。

20. 权利要求 19 的核酸,其包含 SEQ ID NO:67-116 任何一个的核苷酸序列。

21. 权利要求 16-20 中任一项的核酸,其与表达控制序列可操作地连接。

22. 载体,其包含权利要求 16-21 中任一项的核酸。

23. 宿主细胞,其包含权利要求 16-21 中任一项的核酸或权利要求 22 的载体。

24. 用于产生人源化 CD20 结合分子或其抗原结合片段的方法,其包括培养权利要求 23 的宿主细胞并回收所述人源化 CD20 结合分子或抗原结合片段的步骤。

25. 检测来自受试者的生物样品中的 CD20 的方法,其包括使所述样品与权利要求 13 的 CD20 结合分子或人源化 SMIP 接触并检测结合的步骤。

26. 治疗具有或怀疑具有与异常 B 细胞活性相关的疾病的受试者的方法,其包括给所述受试者施用治疗有效量的权利要求 1-6 中任一项的人源化 CD20 结合分子、权利要求 7-12 中任一项的人源化 SMIP 或权利要求 14 的组合物。

27. 权利要求 26 的方法,其中与异常 B 细胞活性相关的所述疾病是类风湿性关节炎、红斑狼疮或多发性硬化症。

28. 减少有此需要的受试者中的 B 细胞数目的方法,其包括给所述受试者施用治疗有效量的权利要求 1-6 中任一项的人源化 CD20 结合分子、权利要求 7-12 中任一项的人源化

SMIP 或权利要求 14 的组合物。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述受试者患有类风湿性关节炎、红斑狼疮或多发性硬化症。

抗 CD20 治疗组合物和方法

发明领域

[0001] 本发明提供了使用 CD20 特异性结合分子用于治疗涉及异常 B 细胞活性的疾病的材料和方法。本文公开的组合物用于治疗 and 诊断 B 细胞病症,例如 B 细胞恶性肿瘤和自身免疫疾病。

[0002] 发明背景

[0003] 以其通常作用,人免疫系统保护机体不受外源物质和病原体的损害。免疫系统保护机体的一种方法是通过产生称为 B 淋巴细胞或 B 细胞的专门细胞。B 细胞产生与外源物质或病原体结合并且在某些情况下介导外源物质或病原体的破坏的抗体。

[0004] 然而,在某些情况下,人免疫系统和特别地人免疫系统的 B 淋巴细胞出错并且导致疾病。存在涉及 B 细胞不受控制的增殖的众多癌症。还存在涉及 B 细胞抗体产生的众多自身免疫疾病,所述抗体不是与外源物质和病原体结合而是与机体的部分结合。此外,存在众多自身免疫疾病和炎症疾病,在其病理学中涉及 B 细胞,例如通过不适当的 B 细胞抗原呈递给 T 细胞或通过涉及 B 细胞的其他途径。例如,在 B 细胞方面有缺陷的自身免疫倾向小鼠不发展自身免疫肾疾病、脉管炎或自身抗体。(Shlomchik 等人, *J Exp. Med.* 1994, 180 : 1295-306)。有趣的是,当实验诱导时,具有 B 细胞但在免疫球蛋白产生方面有缺陷的这些自身免疫倾向小鼠的确发展自身免疫疾病 (Chan 等人, *J Exp. Med.* 1999, 189 : 1639-48),指出 B 细胞在自身免疫疾病发展中起整体所需的作用。

[0005] 可以通过在其细胞表面上的分子鉴定 B 细胞。CD20 是通过单克隆抗体鉴定的第一种人 B 细胞谱系特异性表面分子。它是非糖基化的、疏水性 35kDa B 细胞跨膜磷蛋白,其氨基和羧基末端位于细胞内。Einfeld 等人, *EMBO J.* 1988, 7 : 711-17。CD20 由所有正常成熟的 B 细胞表达,但不由前体 B 细胞或浆细胞表达。CD20 的天然配体仍未鉴定,并且仍未完全了解 CD20 在 B 细胞生物学中的作用。

[0006] 特定抗 CD20 单克隆抗体可以影响 B 细胞的活力和生长。(Clark 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83 : 4494-98)。CD20 的广泛交联可以在 B 淋巴瘤细胞系中诱导凋亡 (Shan 等人, *Blood* 1998, 91 : 1644-52),并且已报告 CD20 在细胞表面上的交联增加信号转导的量级并且增强信号转导的动力学,例如,如通过测量细胞基质的酪氨酸磷酸化所检测出的。(Deans 等人, *J. Immunol.* 1993, 146 : 846-53)。因此,除通过补体和 ADCC 机制的细胞耗尽外,在体内通过特定 CD20 单克隆抗体的 Fc 受体结合可以通过 CD20 交联促进恶性 B 细胞的凋亡,与 SCID 小鼠模型中人淋巴瘤的 CD20 治疗的有效性可能依赖于通过 CD20 单克隆抗体的 Fc 受体结合的理论一致 (Funakoshi 等人, *J. Immunotherapy* 1996, 19 : 93-101)。在 CD20 多肽中的多个跨膜结构域的存在 (Einfeld 等人, *EMBO J.* 1988, 7 : 711-17 ; Stamenkovic 等人, *J. Exp. Med.* 1988, 167 : 1975-80 ; Tedder 等人, *J. Immunol.* 1988, 141 : 4388-4394) 阻止抗体结合后的 CD20 内在化,并且这被认为是关于 B 细胞恶性肿瘤治疗的重要特征,当将鼠类 CD20 单克隆抗体 1F5 注入具有 B 细胞淋巴瘤的患者内时,导致恶性细胞的显著耗尽和部分临床应答 (Press 等人, *Blood* 1987, 69 : 584-91)。

[0007] 因为正常成熟 B 细胞也表达 CD20,所以抗 CD20 抗体疗法耗尽正常 B 细胞 (Reff 等

人, Blood 1994, 83 :435-445)。然而, 治疗完成后, 正常 B 细胞可以通过 CD20 阴性 B 细胞前体得到再生; 因此, 用抗 CD20 疗法治疗的患者不经历显著的免疫抑制。

[0008] CD20 由 B 细胞起源的恶性细胞表达, 包括 B 细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)。CD20 不由前 B 细胞的恶性肿瘤表达, 例如急性成淋巴细胞性白血病。CD20 因此是用于治疗 B 细胞淋巴瘤、CLL 和其中 B 细胞涉及疾病病因学的其他疾病的良好靶。其他 B 细胞病症包括其中自身抗体在 B 细胞分化成浆细胞的过程中产生的自身免疫疾病。

[0009] 靶向优先在肿瘤细胞表面上表达的分子的单克隆抗体 (mAb) 的使用目前是良好确定的治疗策略, 其中至少 7 种不同的 mAb 治疗得到批准并且目前用于癌症疗法中: **Rituxan®** (RITUXAN)、曲妥珠单抗、阿仑珠单抗、西妥昔单抗、帕木单抗、贝伐珠单抗和吉妥珠单抗奥佐米星。此种 mAb 治疗经由 2 种不同机制介导其抗肿瘤活性。第一种机制涉及 mAb 介导的关键受体 - 配体 / 反受体 (counter-receptor) 相互作用的抑制, 所述相互作用促成肿瘤生长, 并且第二种机制依赖于宿主的免疫系统的效应子组分 (例如能够介导抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的 $Fc\gamma R$ 效应子细胞) 和人因子 (例如能够介导补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的补体) 的参与。在后面一种情况下, mAb 治疗必须具有与效应子细胞和补体上的 $Fc\gamma Rs$ 相互作用的能力。除 EGFR 靶向的帕木单抗外, 目前在癌症疗法中使用的 5 种免疫治疗 mAb 各自具有衔接免疫系统的效应子组分的能力。

[0010] RITUXAN 是批准在癌症中临床使用的第一种 mAb。RITUXAN 是重组小鼠人 IgG1 嵌合 mAb, 其中鼠类抗 CD20mAb 的重链和轻链的可变结构域与人 IgG1 的恒定区融合。

[0011] 此外, CD20 也已被放射免疫治疗试剂靶向以治疗 B 细胞相关疾病。一种治疗由以用于治疗 B 细胞淋巴瘤的放射性核素形式 (例如, ^{131}I 标记的抗 CD20 抗体) 以及用于减轻由前列腺和乳腺癌转移引起的骨痛的 ^{89}Sr 标记形式制备的抗 CD20 抗体组成 (Endo, Gan To Kagaku Ryoho 1999, 26 :744-748)。

[0012] 在一项研究中, RITUXAN 就用于治疗具有系统性红斑狼疮 (SLE) 的 18 个患者 (其为非免疫抑制患者) 的安全性、耐受性和初步临床功效进行测试。在治疗的 18 个患者中, 6 个患者接受 $100mg/m^2$ 的 RITUXAN 的 1 次输注 (低剂量), 6 个患者接受 $375mg/m^2$ 的 RITUXAN 的 1 次输注 (中等剂量), 并且 6 个患者接受 $375mg/m^2$ 的 RITUXAN 的 每周 4 次输注 (高剂量)。即使在低或中等剂量下, 12 个患者中的 3 个 (25%) 在 2 个月时发展升高水平的人抗嵌合抗体 (HACA)。

[0013] 因此, 需要发展用于治疗的新型 CD20 特异性结合分子, 优选地, 当施用于并非免疫抑制的患者时, 不引起 HACA 反应或引起 HACA 反应的潜力减少的新型 CD20 特异性结合分子。此外, 尽管已存在对抗体的疗法进行的广泛研究, 但本领域仍需要治疗与异常 B 细胞活性相关的疾病的组合物和方法。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及在有此需要的受试者中诊断和治疗 B 细胞介导疾病和病状中有用的新型 CD20 结合分子, 所述疾病和病状包括但不限于 B 细胞癌症、类风湿性关节炎和红斑狼疮。在各种实施方案中, 本发明提供了新型重链 CDR 序列, 轻链 CDR 序列, 包含 CDR 序列的新型可变结构域序列和包含新型 CDR 或可变结构域序列的 CD20 结合分子, 包含 CDR、含其的结合结构域或分子的核酸、载体、宿主细胞、组合物和试剂盒。在某些实施方案中, 包含新型 CDR 序列或可变结构域的 CD20 结合分子是抗体或其抗原结合片段。在其他实施方案中,

CD20 结合分子是小分子免疫药物 SMIP。在某些实施方案中,抗体或 SMIP 是人源化的,并且包含人序列构架和恒定区序列。本发明的 CD20 结合分子结合在细胞上的 CD20,显示 CDC 和 ADCC 活性,耗尽血液、骨髓和淋巴结中的 CD19+B 细胞,减少 B 细胞淋巴瘤肿瘤生长,和 / 或减少播散性淋巴瘤的进展和作用。本发明的 CD20 结合分子还用于例如在来自受试者的生物样品中检测和定量 CD20 或表达其的细胞的存在。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1。抗 CD20SMIP 与原代 B 细胞的结合。如说明的,将从血沉棕黄层 (buffy coat) 中分离的原代 B 细胞与指示浓度的各种抗 CD20SMIP 一起温育。通过流式细胞术 (MFI) 使用标记的抗人 IgG-PE 抗体 (Fc 特异性的) 分析 SMIP 的结合。相应地,计算每种 SMIP 的 Ec50。

[0018] 图 2。针对人 B 细胞淋巴瘤的 018011 (也称为 18011 或 011,这是相同分子) 的体外生长抑制作用。

[0019] 图 3A-3B。抗 CD20SMIP 的补体依赖性细胞毒性测定法。A:将 RamosB 细胞与抗 CD20SMIP 在 10% 人血清 (Quidel) 的存在下一起于 37°C 温育 3.5 小时。通过由细胞释放的 LDH (Promega 试剂盒) 测量细胞死亡。B:将从血沉棕黄层中分离的原代人 B 细胞 (5×10^5) 与抗人 CD55 抗体 ($2 \mu\text{g/ml}$) 一起于 37°C 温育 10 分钟。随后添加指示浓度的抗 CD20SMIP 和血清 (10%)。温育 3.5 小时后,通过 7-AAD 染色和流式细胞术分析评估细胞死亡。

[0020] 图 4A-4B。这些体外研究证实 018011 以剂量依赖性方式与 CD20+B 细胞淋巴瘤细胞结合,并且能够造成针对 CD20+B 细胞淋巴瘤靶细胞的 Fc 介导的细胞毒性以及补体依赖性细胞毒性。效应子功能能力的这种证实对于 018011 抑制人 B 细胞淋巴瘤生长的能力是重要的。A. 018011 针对 SU-DHL4B 细胞淋巴瘤细胞的补体依赖性细胞毒性。B. 018011 针对 BJAB B 细胞淋巴瘤细胞的补体依赖性细胞毒性。

[0021] 图 5。抗 CD20SMIP 的抗体依赖性细胞毒性测定法。BJAB 淋巴瘤细胞用 CFSE 进行标记,随后与 SMIP 和活化的人 PBMC 一起温育。细胞用 PI 进行染色并且通过流式细胞术进行分析。仅 CFSE⁺ 细胞就细胞死亡进行评估。

[0022] 图 6A-6B。A. 018011 针对 SU-DHL4B 细胞淋巴瘤的 Fc 介导的细胞的细胞毒性。B. 018011 针对 Ramos B 细胞淋巴瘤的 Fc 介导的细胞的细胞毒性。

[0023] 图 7。CD20-SMIP 针对 Ramos B 细胞的 ADCC。

[0024] 图 8。在非人灵长类动物中外周 CD19+B 细胞的耗尽。2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 都证实在非人灵长类动物中至少与 Rituxan 相当的外周 CD19+B 细胞的有效耗尽。

[0025] 图 9。在非人灵长类动物中骨髓 CD19+B 细胞的耗尽。2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 都证实在非人灵长类动物中至少与 Rituxan 相当的骨髓 CD19+B 细胞的有效耗尽。

[0026] 图 10。在非人灵长类动物中淋巴结 CD19+B 细胞的耗尽。2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 都证实在非人灵长类动物中至少与 Rituxan 相当的淋巴结 CD19+B 细胞的有效耗尽。

[0027] 图 11。IV 施用后,在食蟹猴中 2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 的药代动力学 (PK) 分析。2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 的 PK 曲线都与 Rituxan 的 PK 曲线相当。

[0028] 图 12。018011 和利妥昔单抗对 Balb/c 裸鼠中建立的 Ramos 皮下异种移植物的作用。

[0029] 图 13。018011 和利妥昔单抗对 Balb/c 裸鼠中建立的 Ramos 皮下异种移植物的存

活分析。

[0030] 图 14。018011、TRU-015 和利妥昔单抗对 nu/nu 裸鼠中建立的 Ramos 皮下异种移植物的作用。

[0031] 图 15。018011、TRU-015 和利妥昔单抗对 nu/nu 裸鼠中建立的 Ramos 皮下异种移植物的存活分析。

[0032] 图 16。018011、TRU-015 和利妥昔单抗治疗的具有播散性 Ramos B 细胞淋巴瘤的 Scid 小鼠的存活分析。

[0033] 图 17。在具有播散性疾病的 Scid 小鼠的骨髓中对人 B 淋巴瘤细胞的检测。

[0034] 图 18。018011、TRU-015 和利妥昔单抗治疗的具有播散性 WSU-DLCL2 弥漫性大细胞淋巴瘤的 Scid 小鼠的存活分析。

[0035] 图 19。静脉内或腹膜内施用 018011 对 Ramos 皮下异种移植植物生长的作用。

[0036] 图 20。018011 和利妥昔单抗对未照射和照射的 Ramos 皮下异种移植植物的作用。

[0037] 图 21A-21C。随着时间的平均肿瘤体积。在研究第 0 天时,将具有可触知 Ramos 肿瘤的裸鼠分成处理组 ($n = 8$ 只 / 组),从而使得每个组的平均肿瘤体积是相当的。在第 0、2、4、6 和 8 天时用 $100 \mu\text{g}$ 人 IgG、TRU-015、018008 (也称为 18008 或 008,这是相同分子)、018011 或 2Lm20-4 来 I V 处理小鼠。在指示天数时用测径器测量肿瘤,并且使用下式计算肿瘤体积: $V = 1/2[\text{长度} \times (\text{宽度})^2]$ 。一旦动物由于肿瘤体积超过指定限制而从研究中取出,就推进关于最后一次肿瘤体积的值。结果仅显示到最后一只对照小鼠处死时的第 10 天。

[0038] 图 22A-22C。在早期时间点时个别小鼠的肿瘤体积。对小鼠进行处理且监控,并且如关于图 21 中的图例所述测定肿瘤体积。就在第 8 天 (其中所有小鼠都活着的最后时间点) 时个别小鼠的肿瘤体积 (i) 或相对于第 0 天在第 8 天时个别小鼠的相对肿瘤体积 (ii) 而言显示结果。使用单向 ANOVA 用 Dunnett's 多重比较事后检验 (用于与 huIgG 处理的对照的比较) 和 Tukey's 多重比较事后检验 (用于所有其他配对比较) 测定组间的显著性差异;指出了关于所有配对比较的 p 值。

[0039] 图 23A-23C。用 TRU-015 或 HuCD20SMIP 处理的小鼠的存活百分比。小鼠进行处理且监控,并且如关于图 21 中的图例所述测定肿瘤体积。每周至少 3 次测定肿瘤体积 (MWF),除当研究中剩余的所有小鼠都不具有可触知肿瘤时的时间段期间监控转变成每周一次外。当肿瘤体积达到超过 1500mm^3 (或在星期五时 1200mm^3) 时,处死小鼠。未发现小鼠由于其他原因而死亡或处死。

[0040] 图 24A-24C。随着时间的无肿瘤小鼠百分比。小鼠进行处理且监控,并且如关于图 21 中的图例所述测定肿瘤体积。如果小鼠不具有可触知肿瘤,那么它视为“无肿瘤的”。每周至少 3 次测定肿瘤体积 (MWF),除当研究中剩余的所有小鼠都不具有可触知肿瘤时的时间段期间监控转变成每周一次外。

[0041] 图 25A-25C。随着时间的的小鼠平均体重。如关于图 21 中的图例所述处理且监控小鼠。在研究的指示天数时测定体重。

[0042] 图 26。与从 Ramos B 细胞淋巴瘤异种移植植物中分离的细胞结合的 018011 或利妥昔单抗的流式细胞术评估。

[0043] 图 27。018011 针对人 B 细胞淋巴瘤的体外生长抑制作用。

[0044] 图 28。018011 的交联对 Ramos B 细胞淋巴瘤细胞的活化诱导死亡的作用。

[0045] 图 29 是概括示例性人源化 SMIP 的几个关键位置处的氨基酸残基的表。在“铰链”列下列出的残基描述了关于 SEQ ID NO :60 的位置 220、226、229 和 230 的残基。在“IgG1Fc”列中的残基 331 指在 SEQID NO :61 中的残基 331。

[0046] 发明详述

[0047] I. 定义

[0048] 为了本发明可以更容易理解,首先定义了特定术语。其他定义在详述的说明书中阐述。

[0049] 根据本发明的各种实施方案的“CD20 结合分子”是包含本文特别例示的人源化 CD20 结合分子的 CD20 结合部分的分子。本发明所包括的 CD20 结合分子类型是抗体或其 CD20 结合片段。结合分子可以根据本领域的标准方法进行修饰,例如以改善其结合亲和力、改善其特异性、减少其免疫原性、改变其效应子功能和 / 或改善其在个体体内的可用性。此种修饰可以包括例如氨基酸序列修饰或作为融合蛋白表达。此种融合蛋白也是根据本发明的结合分子。本发明的示例性结合分子是小分子免疫药物 (SMIP)。

[0050] 术语“抗体”指免疫球蛋白或其片段,并且包括包含抗体的抗原结合片段的任何此种多肽。该术语包括但不限于多克隆、单克隆、单特异性、多特异性、人源化、人、单链、嵌合、合成、重组、杂交、突变、移植和体外产生的抗体。

[0051] 术语“抗体”还包括抗体的抗原结合片段。抗原结合片段的例子包括但不限于 Fab 片段 (由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成);Fd 片段 (由 V_H 和 C_H1 结构域组成);Fv 片段 (指以紧密、非共价结合的 1 个重链可变结构域和 1 个轻链可变结构域的二聚体);dAb 片段 (由 V_H 结构域组成);分离的 CDR 区;(Fab')₂ 片段、二价片段 (包含通过在铰链区处的二硫桥连接的 2 个 Fab 片段)、scFv (指用短接头连接在一起的 V_L 和 V_H 结构域的融合物)和保留抗原结合功能的其他抗体片段。由抗体特异性识别并结合的抗原部分称为“表位”。

[0052] 本发明的抗 CD20 抗体的抗原结合片段通过常规生物化学技术产生,例如酶切割、或本领域已知的重组 DNA 技术。这些片段可以如下产生:通过本领域众所周知的方法蛋白酶解切割完整抗体,或通过使用定点诱变在载体中的所需位置处插入终止密码子,例如在 C_H1 后以产生 Fab 片段,或在铰链区后以产生 (Fab')₂ 片段。例如,抗体的木瓜蛋白酶消化产生 2 个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有单个抗原结合位点,和残留的“Fc”片段。抗体的胃蛋白酶处理产生 F(ab')₂ 片段,其具有 2 个抗原结合位点并且仍能够交联抗原。单链抗体可以通过用 DNA 使 V_L 和 V_H 编码区连接而产生,所述 DNA 编码使 V_L 和 V_H 蛋白质片段连接的肽接头。

[0053] “体外产生的抗体”指其中所有或部分可变区 (例如,至少一个 CDR) 在非免疫细胞选择中 (例如,体外噬菌体展示、蛋白质芯片或其中候选序列可以就其与抗原结合的能力进行测试的任何其他方法) 产生的抗体。这个术语排除了在免疫细胞中通过基因组重排产生的序列。

[0054] 抗原结合片段 / 结构域可以包含抗体轻链可变区 (V_L) 和抗体重链可变区 (V_H);然而,它不必包含两者。例如,Fd 片段具有 2 个 V_H 区,并且通常保留完整抗原结合结构域的某些抗原结合功能。抗体的抗原结合片段的例子包括 (1)Fab 片段,具有 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域的单价片段;(2)(Fab')₂ 片段,具有通过在铰链区处的二硫桥连接的 2 个 Fab 片段的

二价片段；(3) 具有 2 个 V_H 和 C_H1 结构域的 Fd 片段；(4) 具有抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域的 Fv 片段，(5) 具有 V_H 结构域的 dAb 片段 (Ward 等人, (1989) *Nature* 341 :544-546)；(6) 分离的互补决定区 (CDR)，和 (7) 单链 Fv (scFv)。尽管 Fv 片段的 2 个结构域 V_L 和 V_H 由分离基因编码，但它们可以使用重组 DNA 方法通过合成接头进行连接，所述合成接头使得它们能够制备为其中 V_L 和 V_H 区配对以形成单价分子的单条蛋白质链（称为单链 Fv (scFv)；参见例如，Bird 等人 (1988) *Science* 242 :423-426；和 Huston 等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :5879-5883)。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得，并且片段以与完整抗体相同的方式就功能进行评估。

[0055] 术语“人抗体”包括具有与本领域已知的人种系免疫球蛋白序列基本上相对应的的可变和恒定区的抗体，包括例如，由 Kabat 等人描述的那些（参见 Kabat, 等人 (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242）。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过随机或体外的位点特异性诱变或通过体内的体细胞突变引入的突变）。人抗体可以具有至少 1、2、3、4、5 或更多个位置的氨基酸残基被不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基替换。CDR 如由 Kabat 或在 Chothia C, Lesk AM, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins, *J Mol Biol.* 1987 Aug 20 ;196 (4) :901-17 中定义。CDR 一般指在序列中高变和 / 或形成结构上限制的环的区域，例如 Kabat CDR 基于序列变异性，如在 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services (1991), 编辑. Kabat 等人中描述的，或备选地，指如由 Chothia 描述的高变结构环的位置。参见例如，Chothia, D. 等人 (1992) *J. Mol. Biol.* 227 :799-817；和 Tomlinson 等人 (1995) *EMBO J.* 14 :4628-4638。另外一个标准是由 Oxford Molecular's AbM 抗体模拟软件使用的 AbM 定义，这基于晶体结构限定了完整高变区。一般参见例如，*Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. In: *Antibody Engineering Lab Manual* (Ed. : Duebel, S. 和 Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)。就 Kabat CDR 而言描述的实施方案可以备选地使用就 Chothia 高变环或 AbM 限定的环而言相似描述的关系来实现。

[0056] 术语“有效量”指经过治疗过程足以减少任何 CD20 活性、改善一种或多种临床症状或达到所需生物后果的剂量或量。

[0057] 短语“抑制”或“对抗”CD20 活性及其同源物指由于结合 CD20 特异性结合分子而减少、抑制或以其他方式降低 CD20 的至少一种活性，其中减少是相对于在不存在相同分子的情况下的 CD20 活性。抑制或对抗不一定指示 CD20 生物活性的总体消除。活性中的减少可以是至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。

[0058] 术语“分离的”指基本上不独立于其天然环境的分子。例如，分离的蛋白质基本上不含来自衍生其的细胞或组织来源的细胞材料或其他蛋白质。该术语还指其中分离的蛋白质对于药物组合物足够纯的制剂；或至少 70% (w/w) 纯；或至少 80% (w/w) 纯；或至少 90% 纯；或至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% (w/w) 纯。

[0059] 术语“治疗剂”是治疗或帮助治疗医学病症的物质。治疗剂可以包括但不限于抗增殖试剂、抗癌剂包括化学治疗剂、抗病毒剂、抗感染药、免疫调节剂等，其以补充通过本发

明的 CD20 特异性结合分子减少 CD20 活性的方式调节免疫细胞或免疫应答。治疗剂的非限制性例子和用途在本文中描述。

[0060] 如本文所使用的,“治疗有效量”的 CD20 特异性结合分子指一定量的 CD20 特异性结合分子,其在单次或多次剂量施用于受试者(例如,人患者)后,有效治疗、阻止、治愈、延迟、减少病症或复发病症的严重性,和/或改善病症或复发病症的至少一种症状,或延长受试者的存活超过在没有治疗情况下的预期。当应用于单独施用的个别活性成分时,治疗有效量指单独的那种成分。当应用于组合时,治疗有效量指无论以组合、顺次还是同时施用,导致疗效的活性成分的组合量。本发明特别包括一种或多种 CD20 特异性结合分子可以各自以有效剂量根据本发明的方法施用。

[0061] 术语“治疗”或“处理”指治疗、预防或防病措施。治疗处理可以改善接受治疗的个体中的至少一种疾病症状,或可以延迟个体中的进行性疾病的恶化,或阻止其他相关疾病的发作。治疗可以施用于具有医学病症或最终可能获得病症的受试者,以阻止、治愈、延迟、减少病症或复发病症的严重性,和/或改善病症或复发病症的至少一种症状,或以便延长受试者的存活超过在没有治疗情况下的预期。

[0062] 术语“人 CD20”意指人 B 淋巴细胞限制的分化抗原(也称为 Bp35)。CD20 在早期前 B 细胞发育过程中表达,并且保留直至浆细胞分化。CD20 分子可以调节活化过程中的步骤,这是细胞周期起始和分化所需的,并且通常以极高水平在肿瘤 B 细胞上表达。CD20 存在于“正常”B 细胞以及“恶性”B 细胞(即,不衰退增殖的那些 B 细胞可以导致 B 细胞淋巴瘤)。

[0063] II. CD20 特异性结合分子

[0064] 根据本发明,CD20 结合分子结合在原代 B 细胞和 B 细胞淋巴瘤细胞系上的 CD20,所述细胞系包括 NU-DHL1、Ramos、SU-DHL4、SU-DHL5 和 WSU-DLCL2。在各种实施方案中,CD20 结合分子以与图 1 中所示的 EC50 相当的 EC50 结合 CD20 表达细胞和/或以剂量依赖性方式结合。在各种实施方案中,CD20 结合分子具有选自下述的一种或多种性质:在原代 B 细胞以及至少 Ramos、SU-DHL4 和 BJAB 细胞中的补体介导的细胞毒性(CDC),在某些情况下具有至少 40%的细胞毒性;在至少 Ramos、BJAB 和 SU-DHL4 细胞中的抗体依赖性(或 Fc 依赖性细胞毒性(ADCC 或 FcCC),其为剂量依赖性的,并且在某些情况下具有至少 40%的细胞毒性;在骨髓和淋巴结中维持 CD19+B 细胞耗尽比 RITUXAN®更长的持续时间,或超过 8 天并且至少 10、12、14、16、18、20 或 21 天;如实施例所述在小鼠模型中减少生长建立的异种移植肿瘤,并且当在各种小鼠模型中在播散性淋巴瘤的早期中施用是保护性的,如实施例中所述。

[0065] 在某些实施方案中, α -CD20 结合分子是小分子免疫药物(Small Modular-Immuno Pharmaceutical, SMIP)。在一个方面,本发明提供了人源化 CD20 特异性结合分子。申请人已提供了 57 种新型 CD20 特异性结合分子,其对于治疗哺乳动物受试者包括人和驯养动物有用。本发明还提供了编码 CD20 特异性结合分子的核酸序列。

[0066] 在特定实施方案中,本发明的 CD20 特异性结合分子具有高结合亲和力、低离解速率且与人 CD20 特异性结合。

[0067] 在特定实施方案中,本发明的人源化 CD20 特异性结合分子是抗体,特别是抗 CD20 单克隆抗体(mAb)或其抗原结合片段。

[0068] 嵌合抗体是具有衍生自不同抗体的部分的抗体。例如，嵌合抗体可以具有衍生自 2 种不同抗体的可变区和恒定区。供体抗体可以来自相同或不同物种。在特定实施方案中，本发明的嵌合抗 CD20 抗体的可变区是非人的，例如鼠类的，（或非人和人的组合），并且恒定区是人的。

[0069] 本发明的人源化 CD20 结合分子还包括 CDR 移植的人源化抗 CD20 抗体。在一个实施方案中，人源化抗体包含本发明的人源化抗 CD20SMIP 的重链 CDR 和 / 或轻链 CDR (SEQ ID NO :1-59)，以及人受体免疫球蛋白的重链和轻链构架和恒定区。制备人源化抗体的方法公开于美国专利号 5,530,101 ;5,585,089 ;5,693,761 ;5,693,762 ;和 6,180,370 中，所述专利各自通过引用整体合并入本文。

[0070] 保留完整抗体的结合特异性的本发明抗体的抗原结合片段也包括在本发明中。抗原结合片段包括本文描述的任何 CD20 特异性抗体的部分或全部重链或轻链、可变区或 CDR 区。

[0071] 在某些实施方案中，本发明的人源化 CD20 特异性抗体包含本申请的序列表中例示的任何结合分子的重链 CDR3、轻链 CDR3 或两者。在包含 HCDR3 和 LCDR3 的实施方案中，它们可以来自本申请的序列表中的相同分子或不同分子。在某些实施方案中，本发明的人源化 CD20 特异性抗体包含本申请的序列表中例示的结合分子的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3，轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3，或所有 6 个 CDR，或者 HCDR1-3 和 LCDR1-3 可以来自本申请的序列表中的不同结合分子。在某些实施方案中，本发明的人源化 CD20 特异性抗体是包含本申请的序列表中例示的结合分子的重链可变结构域、轻链可变结构域或两者的抗体。本发明还包括的是包含本申请的序列表中显示的任何 V_H 、本申请的序列表中显示的任何 V_L 、本申请的序列表中显示的此种 V_H 和 V_L 的任何组合或任何 V_H/V_L 对的人源化抗 CD20 抗体，或此种抗体的抗原结合部分。

[0072] 在特定实施方案中，本发明的 CD20 特异性结合分子是 CD20 特异性的、小分子免疫药物 (SMIP)。

[0073] 本发明的人源化抗 CD20SMIP 包含 3 个模块结构域：结合结构域、铰链结构域和效应子结构域。在某些实施方案中，本发明的抗 CD20SMIP 的结合结构域包含 V_H 结构域和 V_L 结构域。本发明的抗 CD20SMIP 的铰链结构域通过提供在结合结构域和效应子结构域之间的弹性连接形成 2 种互补功能，同时还控制 SMIP 的结合或多聚化。本发明的人源化抗 CD20SMIP 的效应子结构域可以包含例如人抗体 Fc 结构域、或具有效应子功能的非抗体蛋白质。效应子结构域决定活化何种类型的免疫细胞，并且调节所采用的效应子功能的平衡，包括抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的相对活性。效应子结构域还可以进行改造，以调节 SMIP 药物多聚化。

[0074] 本发明的 SMIP 的结合结构域可以具有一个或多个结合区，例如衍生自一种或多种免疫球蛋白的可变轻链和可变重链结合区。这些区域一般通过接头肽分开，所述接头肽可以是与结构域相容的本领域已知的任何接头肽或区域连接者。示例性接头是基于 Gly_4Ser 接头基序的接头，例如 $(Gly_4Ser)_n$ ，其中 $n = 1-5$ ，或本申请的序列表中显示的任何接头。任何合适的接头可以在本发明的上下文中使用，它的例子描述在 WO 2007/146968 中。

[0075] 在某些实施方案中，结合结构域包含人源化单链免疫球蛋白衍生的 Fv 产物，其可

以包括通过接头连接的,至少一个免疫球蛋白轻链可变区的全部或部分以及至少一个免疫球蛋白重链可变区的全部或部分。

[0076] 本发明的人源化抗 CD20SMIP 的铰链结构域可以是天然存在的肽、突变或遗传改造的肽、或人工肽。例如,铰链区可以衍生自免疫球蛋白铰链区(例如,负责形成 C_H1 和 C_H2 区中的链内免疫球蛋白结构域二硫键的免疫球蛋白重链序列的部分)。铰链区还可以是在分类上视为具有铰链功能的免疫球蛋白多肽链区域的片段(例如,5-65 个氨基酸,10-50 个氨基酸,15-35 个氨基酸,18-32 个氨基酸,20-30 个氨基酸,21、22、23、24、25、26、27、28 或 29 个氨基酸)。铰链结构域还可以包括位于相邻的免疫球蛋白结构域,例如 C_H1 结构域、C_H2 结构域或可变结构域中的氨基酸(根据用于对特定残基指定特定结构域的结构标准,如本领域已知的,所述标准可以改变)。

[0077] 本发明的人源化抗 CD20SMIP 的铰链结构域可以是人铰链区,即人抗体的重链的铰链区。在包含人铰链区的实施方案中,铰链区可以来自任何人免疫球蛋白同种型,例如人 IgG 免疫球蛋白(即,人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)。在特定实施方案中,铰链结构域包含零或 1 个半胱氨酸残基。在某些实施方案中,本发明的人源化抗 CD20SMIP 包含 SEQ ID NO: 60 或 63 至 66 中的任何一个中所示的铰链。

[0078] 本发明的人源化抗 CD20SMIP 包含免疫球蛋白的恒定区的足够氨基酸序列,以提供效应子功能,优选 ADCC 和 / 或 CDC。例如,效应子结构域可以包含人免疫球蛋白 C_H2 结构域的序列,或可以包含人免疫球蛋白 C_H2 和 C_H3 结构域。在包含 C_H2 和 C_H3 结构域的实施方案中,结构域可以来自相同或不同人免疫球蛋白。在其他实施方案中,效应子结构域可以包含人免疫球蛋白 IgE C_H3 和 C_H4 区的序列。

[0079] 在特定实施方案中,本发明的 SMIP 的 CD20 结合结构域包含 SEQ ID NO: 1-59 中所示的 V_H 氨基酸序列、V_L 氨基酸序列、V_H 和 V_L 氨基酸序列中的任何或 V_H/V_L 对。在特定实施方案中,本发明的 SMIP 的铰链结构域包含如 SEQ ID NO: 60 中所示的氨基酸序列。在特定实施方案中,本发明的 SMIP 的效应子结构域包含如 SEQ ID NO: 60 或 61 中所示的氨基酸序列。

[0080] 在特定实施方案中,本发明的 SMIP 的 CD20 结合结构域包含具有人免疫球蛋白构架序列的 V_H 区,以及选自 SEQ ID NO: 1-59 的 SMIP 的 CD20 结合结构域的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 氨基酸序列轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 氨基酸序列或两者。在特定实施方案中,SMIP 铰链结构域进一步包含 SEQ ID NO: 60,并且效应子结构域包含 SEQ ID NO: 61。

[0081] 本发明提供了用于产生 CD20 特异性结合分子的众多重链 V_H、轻链 V_L、和 CDR 序列。例如,本申请的序列表中显示的一个或多个 CDR 可以与人构架亚区(例如,全人 FR1、FR2、FR3 或 FR4)组合,以产生 CD20 特异性结合分子。在特定实施方案中,本发明的 CD20 特异性结合分子包含来自轻链可变区的 3 个 CDR 和来自重链可变区的 3 个 CDR,其中重链 CDR 和轻链 CDR 来自相同参考序列。本发明的 CDR 可以移植至任何类型的免疫球蛋白构架。

[0082] 本发明还提供了包含如下氨基酸序列的人源化 CD20 特异性结合分子,所述氨基酸序列与本申请的序列表中显示的序列基本上相同或基本上同源,和包含如下 CDR 的人源化 CD20 特异性结合分子,所述 CDR 与本申请的序列表中显示的 CDR 序列(有下划线的)基本上相同或基本上同源。例如,许多氨基酸或核苷酸碱基可以在本申请的序列表中显示的序列中加以改变,特别是在一个或多个 CDR、构架区或两者中。因此,在某些实施方案中,

本发明的 CD20 特异性结合分子具有如下氨基酸序列,其与 SEQ ID NO 1-59 中所示的序列至少 80%相同。在其他实施方案中,氨基酸序列与如 SEQ ID NO 1-59 中所示的序列至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%相同。任何合适的接头可以在本发明的上下文中使用,所述接头的例子在 WO 2007/146968 中描述。

[0083] 与本文公开的序列基本上相同或同源(例如,至少约 85%序列同一性)的序列也是本申请的部分。在某些实施方案中,序列同一性可以是约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。备选地,与核酸相关,当核酸区段在选择性杂交条件(例如,高严格杂交条件)下与链的互补体杂交时,存在基本同一性或同源性。核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中、或以部分纯化或基本上纯的形式存在。

[0084] 通过改变编码氨基酸序列的核酸序列可以产生对氨基酸序列的改变。可以通过本领域已知的方法,使用本说明书关于特定序列的指导制备编码给定 CDR 的变体的核酸序列。这些方法包括但不限于,通过较早制备的编码 CDR 的核酸的定点(或寡核苷酸介导的)诱变、PCR 诱变和盒式诱变制备,所有这些都是本领域众所周知的技术。例如,定点诱变可以用于制备置换变体(参见例如,Carter 等人,(1985)Nucleic Acids Res. 13 :4431-4443 和 Kunkel 等人,(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :488-492,所述 2 个参考文献都通过引用在此合并)。

[0085] 在另一个方面,本发明提供了编码本发明的抗 CD20 结合分子的核酸。在某些实施方案中,核酸编码包含 SEQ ID NO :1-59 中的任何一个中所示的 V_H 或 V_L 氨基酸序列的多肽,或编码包含 SEQ ID NO :1-59 中的任何一个的氨基酸序列的多肽。在某些实施方案中,核酸是 SEQ ID NO :67-126 中的任何一个或者编码 V_H 区或 V_L 区的那些序列之一的片段。

[0086] III. 产生 CD20 结合分子

[0087] 本发明的人源化 CD20 特异性结合分子可以例如通过重组 DNA 技术进行制备。例如,在本发明的抗体或其抗原结合片段的情况下,可以用一种或多种重组表达载体转染宿主细胞,所述重组表达载体携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链,或抗体的抗原结合片段的 DNA 片段,从而使得轻链和重链在宿主细胞中表达,并且优选地分泌到培养宿主细胞的培养基内,可以从所述培养基中回收抗体。在 SMIP 的情况下,将编码 SMIP 的核酸引入宿主细胞内并且在宿主细胞中表达。

[0088] 标准重组 DNA 技术可以用于获得抗体重链和轻链基因或编码 SMIP 的核酸,将这些基因掺入重组表达载体内,并且将载体引入宿主细胞内,例如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(编辑),Molecular Cloning ;A Laboratory Manual,第 2 版,Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel, F. M. 等人(编辑)Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) 和 Boss 等人的美国专利号 4,816,397 中所述的那些,所述所有参考文献通过引用合并入本文。

[0089] 例如,为了表达本发明的抗体或其抗原结合片段,可以首先获得编码轻链和重链可变区的核酸。这些核酸可以通过使用聚合酶链式反应(PCR)获得和修饰人种系轻链和重链可变区基因来获得。关于人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列是本领域已知的。一旦获得 V_H 和 V_L 片段,这些序列就可以进行遗传改造,以编码例如一个或多个 SMIP 序列、SMIP 序列的 V_H 和 V_L 片段、或本文公开的 SMIP 序列的 CDR(参见例如,本申请的序列表)。

[0090] 为了表达本发明的抗体或其抗原结合片段,编码部分或全长轻链和重链的一种或

多种核酸或在 SMIP 的情况下,可以将编码 SMIP 的核酸插入一种或多种表达载体内,从而使得核酸与转录和翻译控制序列可操作地连接。一般选择与所使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。

[0091] 除抗体重链和 / 或轻链基因外,本发明的重组表达载体可以另外携带调节序列,所述调节序列控制一条或多条抗体链 (或片段) 或 SMIP 在宿主细胞中的表达,例如启动子、增强子或其他表达控制元件 (例如,多腺苷酸化信号), 其控制编码本发明的结合分子的一种或多种核酸的转录或翻译。此种调节序列是本领域已知的 (参见例如,通过引用合并入本文的 Goeddel, Gene Expression Technology :Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))。本领域技术人员应当理解表达载体的设计,包括调节序列的选择可以依赖于如下因素,如待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质表达水平等。用于哺乳动物宿主细胞表达的示例性调节序列包括在哺乳动物细胞中指导高水平蛋白质表达的病毒元件,例如衍生自巨细胞病毒 (CMV) (例如, CMV 启动子 / 增强子)、猴病毒 40 (SV40) (例如, SV40 启动子 / 增强子)、腺病毒 (例如,腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP)) 和多瘤病毒的启动子和 / 或增强子。关于病毒调节元件及其序列的进一步描述,参见例如 Stinski 的美国专利号 5,168,062、Bell 等人的美国专利号 4,510,245 和 Schaffner 等人的美国专利号 4,968,615,所述所有专利通过引用合并入本文。

[0092] 除编码本发明的抗体重链和 / 或轻链或 SMIP 的序列和调节序列外,本发明的重组表达载体可以携带另外的序列,例如调节载体在宿主细胞中的复制的序列 (例如,复制起点) 和可选标记基因。可选标记基因促进对载体已引入其内的宿主细胞的选择 (参见例如, Axel 等人的美国专利号 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017)。例如,一般地可选标记基因对已将载体引入其内的宿主细胞赋予针对药物的抗性,所述药物例如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤。其他合适的可选标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因 (用于在用氨甲蝶呤选择 / 扩增的 dhfr⁻ 宿主细胞中使用) 和新霉素基因 (用于 G418 选择)。

[0093] 为了表达,编码抗体重链和轻链或 SMIP 的一种或多种表达载体可以通过标准技术转染到宿主细胞内,所述标准技术例如电穿孔、磷酸钙沉淀、或 DEAE- 葡聚糖转染。在特定实施方案中,用于表达本发明的 CD20 特异性结合分子的表达载体是病毒载体,例如逆转录病毒载体。此种病毒载体还可以用于产生稳定的细胞系 (作为 CD20 特异性结合分子的连续供应的来源)。

[0094] 用于表达本发明的重组人源化抗 CD20 结合分子的合适哺乳动物宿主细胞包括 PER.C6 细胞 (CruceCell, The Netherlands)、中国仓鼠卵巢 (CHO 细胞) (包括 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216-4220 中描述的 dhfr-CHO 细胞,与 DHFR 可选标记一起使用,例如,如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159 :601-621 中描述的)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。此外,还可以使用表达 GnT_{II} 的宿主细胞 (W09954342 和美国专利公开 20030003097 中描述的,所述 2 个专利通过引用合并入本文),从而使得表达的 CD20 特异性结合分子具有增加的 ADCC 活性。

[0095] 当将编码抗体或 SMIP 的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞内时,一般如下产生抗体和 SMIP :通过培养宿主细胞足够的时间段以允许蛋白质在宿主细胞中表达,更优选地,抗体或抗原结合片段或 SMIP 分泌到宿主细胞在其中生长的培养基内。抗 CD20 结合分子可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0096] 应当理解关于上述操作的变化在本发明的范围内。例如,重组 DNA 技术可以用于去除对于与 CD20 结合不需要的编码轻链和重链中的任一或两者的某些或全部 DNA。此外,可以产生双功能抗体,其中一条重链和一条轻链是本发明的抗体,并且另一条重链和轻链对于除 CD20 外的抗原特异(例如,通过经由标准化学交联方法使本发明的抗体与第二种抗体交联)。

[0097] 用于制备 SMIP 的方法已在美国专利公开 2003/0133939、2003/0118592 和 2005/0136049 号中得到描述,所述专利通过引用整体合并入本文。在特定实施方案中,本发明的 SMIP 是结合结构域-免疫球蛋白融合蛋白,其特征在于(1)关于同源结构(例如,抗原、反受体等)的结合结构域,(2)具有零、1 或 2 个半胱氨酸残基的 IgG1、IgA 或 IgE 铰链区或突变的 IgG1 铰链区,和(3)免疫球蛋白 C_H2 和 C_H3 结构域。在特定实施方案中,结合结构域包含在铰链区中的 1 或 2 个半胱氨酸(Cys)残基。在特定实施方案中,当结合结构域包含 2 个 Cys 残基时,涉及重链和轻链之间的结合的 Cys 不缺失或不被另一个氨基酸置换。

[0098] 本发明的人源化抗 CD20SMIP 与嵌合抗 CD20SMIP, TRU-015 相关,所述 TRU-015 是与 CD20 抗原结合的重组(鼠类/人)单链蛋白质,如 US 2007/0213293 中所述。TRU-015 的结合结构域基于可公开获得的 2H7 结合结构域。结合结构域通过经修饰的 CSS 铰链区与效应子结构域,人 IgG1 的 C_H2 和 C_H3 结构域连接。

[0099] IV. 治疗用途

[0100] 在另一个方面,本发明提供了治疗具有或怀疑具有与异常 B 细胞活性相关的疾病的受试者的方法,其包括给患者施用治疗有效量的本发明的人源化 CD20 特异性结合分子。在一个实施方案中,CD20 特异性结合分子是 CD20 特异性小分子免疫药物(SMIP)。

[0101] “异常 B 细胞活性”指偏离正常、合适或预期过程的细胞活性。例如,异常细胞活性可以包括不适当的细胞增殖,所述细胞的 DNA 或其他细胞组分已变得损害或有缺陷。异常 B 细胞活性可以包括其特征与如下疾病相关的细胞增殖,所述疾病由不适当高水平的细胞分裂、不适当低水平的凋亡或两者引起,由不适当高水平的细胞分裂、不适当低水平的凋亡或两者介导,或导致不适当高水平的细胞分裂、不适当低水平的凋亡或两者。此种疾病的特征在于例如下文更全面地描述的,细胞、细胞群体或组织的单次或多次局部异常增殖,无论是癌性还是非癌性的、良性还是恶性的。异常 B 细胞活性还可以包括异常抗体生产,例如自身抗体产生,或一般希望在正常水平下的抗体的过量生产。包括异常 B 细胞活性可以在 B 细胞的特定亚群中并且不在其他亚群中发生。异常 B 细胞活性还可以包括 T 细胞的不适当刺激,例如通过不适当的 B 细胞抗原呈递给 T 细胞或通过涉及 B 细胞的其他途径。

[0102] “具有或怀疑具有与异常 B 细胞活性相关的疾病的受试者”是如下受试者,其中疾病或疾病的症状可以由异常 B 细胞活性引起,可以通过异常 B 细胞活性恶化,或可以通过调节 B 细胞活性得到缓解。此种疾病的例子是 B 细胞癌症(例如, B 细胞淋巴瘤、B 细胞白血病、B 细胞骨髓瘤),特征在于自身抗体产生的疾病或特征在于不适当的 T 细胞刺激的疾病,例如通过不适当的 B 细胞抗原呈递给 T 细胞或通过涉及 B 细胞的其他途径。

[0103] 在一个方面,通过本发明的方法治疗的个体证实对用本文描述的 CD20 特异性结合分子的治疗的改善应答,这改善超过对其他治疗的应答,例如,用于治疗 RA 的 **ENBREL®** (Amgen/Wyeth)、**HUMIRA®** (Abbott)、**REMICADE®** (Johnson&Johnson/

Schering-Plough)、**RITUXAN®** (Genentech/Roche)、ocrelizumab (Genentech/Roche)、**ORENCIA®** (BMS)、**ACTEMRA®** (Roche/Chugai)、**CIMZIA®** (UCB Pharma), 以及用于治疗狼疮 (SLE) 的 **RITUXAN®** (Genentech/Roche)、ocrelizumab (Genentech/Roche)、贝利木单抗 (HGS)、依帕珠单抗 (Immunomedics/UCB)、Humax **CD20®** (Genmab/GSK)、atacicept (Zymogenetics)、**ORENCIA®** (BMS) 和 **ACTEMRA®** (Roche/Chugai)。经改善超过其他治疗的应答指如下临床应答, 其中通过本发明的方法的治疗导致患者中优于单独或与其他试剂组合的其他治疗的临床应答。改善的应答通过本领域众所周知和本文描述的临床标准的比较进行评估。示例性标准包括但不限于, B 细胞耗尽的持续时间、B 细胞数目总体中的减少、生物样品中 B 细胞数目中的减少、肿瘤大小中的减少、在治疗后存在和 / 或出现的肿瘤数目中的减少, 以及如通过患者其自身和医生评估的改善的总体应答, 例如, 使用国际预后指数 (International Prognostic Index)。改善可以以一个或超过一个临床标准。用本发明的方法改善的应答可以是由于对先前或目前治疗不足够的应答, 例如因为其他治疗的毒性 (例如, 输注相关不利事件) 和 / 或不足够的功效。此外, 可以存在改善的本发明的结合分子的给药方案或时间表 (例如, 皮下施用)。

[0104] 例如, 与 **RITUXAN®** 比较, 在用人源化 CD20SMIP 治疗 21 天后, 用人源化的 CD20SMIP 的治疗产生骨髓和淋巴结中的 CD19+B 细胞中的显著减少。参见图 9 和 10 以及实施例 4。

[0105] 在类风湿性关节炎中, 负责关节中的慢性炎症以及后续软骨破坏和骨质侵蚀的主要细胞类型是巨噬细胞、滑液成纤维细胞、嗜中性粒细胞和淋巴细胞 (Marrack 等人, Nat Med. 2001 ;7 :899-905)。已证实浸润发炎滑液组织的 T 和 B 淋巴细胞通常被组织成类似淋巴样滤泡的结构 (Berek 和 Kim, Semin Immunol. 1997 ;9 :261-268 ;Berek 和 Schroder, Ann N Y Acad Sci. 1997 ;815 :211-217 ;Kim 和 Berek, Arthritis Res. 2000 ;2 :126-131)。在类风湿性关节炎过程中从滑液滤泡结构中分离的 B 细胞的分子分析证实 B 细胞在局部抗原驱动的特异性免疫应答和类风湿因子 (RF) — 具有自身反应性的高亲和力抗体的增加产生中的重要性 (Weyand 和 Goronzy, Ann N Y Acad Sci. 2003 ;987 :140-149 ;Gause 等人, BioDrugs. 2001 ;15 :73-79)。关于 RF 的阳性与更具侵袭性的关节疾病和更高频率的关节外表现相关 (van Zeben 等人, Ann Rheum Dis. 1992 ;51 :1029-1035)。

[0106] 关于 B 细胞在 RA 中的致病性的证据近期已从在具有难治疾病的患者中的临床试验获得, 通过使用由利妥昔单抗 (**Rituxan®**) — 人嵌合抗 CD20 单克隆抗体的 B 细胞消融 (Leandro 等人, Ann Rheum Dis. 2002 ;61 :883-888 ;Edwards 等人, N Engl J Med. 2004 ;350 :2572-2581)。在用利妥昔单抗治疗的所有组中, 显著更高比例的患者具有根据 ACR 标准的疾病症状中的 20% 改善。所有 ACR 应答在利妥昔单抗 — 氨甲蝶呤组中在 48 周时维持。在涉及具有活性 RA 的 161 个患者中的这个研究中, 在对照组中的 1 个患者 (2.5%) 中以及在利妥昔单抗组中的 4 个患者 (3.3%) 中发生严重感染, 指出 B 细胞耗尽在 RA 中是相对安全的疗法。

[0107] CD20 是 35KD 非糖基化四次跨细胞膜嵌入磷蛋白, 限制于 B 细胞谱系中, 并且在前 B 细胞、未成熟 B 细胞、成熟的天然和记忆 B 细胞上表达, 但在早期前 B 细胞和浆细胞上不表达。目前, 去除致病 B 细胞及其前体而不是抗体分泌浆细胞导致临床改善的机制仍是令人困惑的 (Cragg 等人, Therapy. Curr Dir Autoimmun 2005 ;8 :140-17410)。包括到 B 细胞

作为淋巴样聚集物在 RA 患者的滑液内存在,除抗体产生外的 B 细胞功能(例如,细胞因子产生、抗原呈递、给 T 细胞提供共刺激信号)也可能在疾病发病机理中起重要作用(Martin 和 Chan, *Immunity*. 2004 ;20 :517-527)。

[0108] 体外研究暗示利妥昔单抗通过 3 种可能机制诱导 CD20 阳性淋巴瘤细胞的裂解: ADCC、CDC 和导致凋亡的直接信号传导(Clark 和 Ledbetter, *Ann Rheum Dis* 2005 ;64 :77-8012)。在人中的证据暗示在 SLE 中的 B 细胞裂解可能通过在天然杀伤细胞和巨噬细胞上的 Fc γ RIIIIa(CD16) 衔接经由 ADCC 和凋亡而发生,因为在 SLE 中的 B 细胞耗尽程度以及淋巴瘤的临床应答依赖于 Fc γ RIIIIa 多态性(Anolik 等人, *Arthritis Rheum* 2003 ;48 :455-459)。

[0109] 抗 CD20 疗法也已在几种其他自身免疫病症包括系统性红斑狼疮(SLE)中进行测试,提供 B 细胞在自身免疫中的作用的新了解(Eisenberg R., *Arthritis Res Ther*. 2003 ;5 :157-159)。接受利妥昔单抗的大多数 SLE 患者证实完全 B 细胞耗尽和临床改善(Anolik 等人, *Curr Rheumatol Rep*. 2003 ;5 :350-356)。相比之下,不含 B 细胞耗尽的那些对治疗不应答。B 细胞数目通常在初始给药后 1-3 个月最低,并且这种耗尽持续 3-12 个月。

[0110] 患者可能在治疗后发展人抗嵌合抗体(HACA),因为利妥昔单抗是嵌合抗体。在一个研究中,用利妥昔单抗治疗的患者中 33% 具有高 HACA 滴度(Looney 等人, *Curr Opin Rheumatol*. 2004 ;16 :180-185)。有趣的是,这些包括仅接受单次剂量的利妥昔单抗的患者。发现 HACA 与较不有效的 B 细胞耗尽以及在初次输注后 2 个月时较低的利妥昔单抗血清水平相关。

[0111] 利妥昔单抗治疗诱导具有 RA 的患者中所有外周血 B 细胞群体的几乎完全耗尽(Leandro 等人, *Arthritis Rheum* 2006 ;54 :613-620)。在 1 个患者中至少 3 个月无法达到循环 B 细胞的 97% 耗尽与缺乏对治疗的应答相关。外周血的 B 细胞再增殖依赖于原初 B 细胞的形成而不是记忆 B 细胞的扩增。与其复发较后发生的患者相比较,在 B 细胞恢复时经历较早疾病复发的患者趋于在再增殖时显示更高数目的循环记忆 B 细胞。实体组织中较少的广泛 B 细胞耗尽因此可能与 RA 的较早复发相关。

[0112] 利妥昔单抗在自身免疫中的近期临床成功指出需要开发备选 B 细胞靶向治疗,所述治疗将是更少免疫原性的,并且可能潜在耗尽希望重建免疫耐受的病理性自体反应 B 细胞的所有克隆残留部分。

[0113] 尽管在用现有 CD20 靶向疗法治疗的患者中可见显著的临床应答,但这些试剂的疗效并不持久,并且特别是在淋巴瘤患者中的疾病复发频率保持很高。CD20 靶向治疗在耗尽来自循环的正常和转化的 B 细胞方面高度有效。然而,它们消除组织或淋巴管中包埋的 B 细胞的能力更有限,可能是由于大生物分子接近这些部位的能力减少或通过组织微环境提供的靶细胞抗性增加。无论是什么原因,这些环境可以提供关于存活 B 细胞或淋巴瘤细胞的保护储库,所述存活 B 细胞或淋巴瘤细胞可以在表面上成功的治疗方案后再度出现并且引起疾病复发。

[0114] 与对照治疗比较,用人源化 SMIP 治疗非人灵长类动物随后为切除术和组织分析已证实 CD20SMIP 消除组织包埋的 B 细胞的极佳能力。这与消除来自循环的 B 细胞的明确能力组合指出用这种试剂治疗的患者在短期将有利地响应有效的 B 细胞消除,但此外,与目前的 CD20 靶向治疗比较,治疗后的功效将具有显著更大的持续时间。对于这些试剂,看

起来在骨髓和淋巴结组织中的深度耗尽是显著的,指出这些分子可能能够有效耗尽在免疫活性的相关区域中的B细胞。因此,这些分子可能提供治疗更广泛的患者组,包括其中需要增强此种功效的那些的优选疗法。

[0115] 在相关方面,对通过本发明的方法治疗的个体还施用 RITUXAN。在一个实施方案中,RITUXAN可以已作为第一线治疗进行施用,并且当用本发明的方法的治疗已开始时继续。在另一个实施方案中,RITUXAN治疗在用本发明的方法的治疗开始后中断。

[0116] “具有或怀疑具有风湿性疾病的受试者”是受关节起源或肌肉骨骼系统的疾病或病症侵袭的受试者或个体,所述疾病或病症影响此种区域如关节、软骨、肌肉、神经和腱。进一步包括具有或怀疑具有风湿性疾病的受试者可能先前已接受治疗风湿性疾病的疗法。在一个实施方案中,风湿性疾病包括但不限于,类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、皮炎、亨-许二氏(Henoch Schonlein)紫癜、幼年型类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、雷诺氏(Raynaud's)综合征、莱特氏(Reiter's)综合征、肉瘤样病、脊椎关节病变、进行性系统性硬化症和肌炎。

[0117] “具有或怀疑具有中枢神经系统自身免疫疾病的受试者”或“中枢神经系统病症”是受影响中枢神经系统的疾病或病症侵袭的受试者或个体,所述中枢神经系统包括脑和脊髓,或此种区域如视神经。进一步包括具有或怀疑具有中枢神经系统病症的受试者可能先前已接受治疗中枢神经系统病症的疗法。在一个实施方案中,中枢神经系统自身免疫疾病包括但不限于,多发性硬化症、变应性脑脊髓炎、视神经脊髓炎、狼疮脊髓炎和狼疮大脑炎。

[0118] “脉管炎”指与血管中的炎症相关的疾病或病症。示例性脉管炎病症包括但不限于,贝切特氏(Behcet's)病、中枢神经系统脉管炎、丘-斯二氏(Churg-Strauss)综合征、冷球蛋白血症、巨细胞动脉炎、亨-许二氏紫癜、超敏性脉管炎/血管炎、川崎病、白细胞破坏性脉管炎、多血管炎、结节性多发性动脉炎、多肌痛、多软骨炎、类风湿性脉管炎、高安氏(Takayasu's)关节炎、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、由于肝炎的脉管炎、家族性地中海热、显微镜下多血管炎、科甘(Cogan's)综合征、韦-奥二氏(Whiskott-Aldrich)综合征和血栓闭塞性血管炎。

[0119] 本发明包括的方法对于治疗疾病有用,例如B细胞癌症(例如,B细胞淋巴瘤、B细胞白血病、B细胞淋巴瘤),特征在于自身抗体产生的疾病或特征在于不适当的T细胞刺激,例如通过不适当的B细胞抗原呈递给T细胞或通过涉及B细胞的其他途径。

[0120] B细胞癌症包括B细胞淋巴瘤(例如各种形式的霍奇金氏(Hodgkin's)病、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)或中枢神经系统淋巴瘤)、白血病(例如急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病和慢性成肌细胞性白血病)和骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)。另外的B细胞癌症包括小淋巴细胞性淋巴瘤、B细胞早幼淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、骨的孤立性浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关淋巴样组织结节外边缘区B细胞淋巴瘤(MALT)、结节边缘区B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤/白血病、原因不明的恶性潜在的B细胞增殖、淋巴瘤样肉芽肿病、和移植后淋巴增生性病症。

[0121] 特征在于自身抗体产生的病症通常视为自身免疫疾病。自身免疫疾病包括但不限于:关节炎、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎、多软骨炎、牛皮癣关节

炎、牛皮癣、皮炎、多肌炎 / 皮肌炎、包涵体肌炎、炎性肌炎、中毒性表皮坏死松懈症、系统性硬皮病和硬化症、CREST 综合征、与炎性肠病相关的应答、克罗恩氏 (Crohn' s) 病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、结肠炎、肾小球肾炎、变应性病状、湿疹、哮喘、涉及 T 细胞浸润和慢性炎症应答的病状、动脉粥样硬化、自身免疫性心肌炎、白细胞粘附缺陷、系统性红斑狼疮 (SLE)、亚急性皮肤红斑狼疮、盘状狼疮、狼疮脊髓炎、狼疮大脑炎、幼年型糖尿病、多发性硬化症、变应性脑脊髓炎、视神经脊髓炎、风湿热、西德纳姆氏 (Sydenham' s) 舞蹈病、与由细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫应答、肺结核、结节病、肉芽肿病包括韦格纳氏肉芽肿病和许 - 斯二氏病、粒细胞缺乏症、脉管炎 (包括超敏性脉管炎 / 血管炎、ANCA 和类风湿性脉管炎)、再生障碍性贫血、戴 - 布二氏 (Diamond Blackfan) 贫血、免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血 (AIHA)、恶性贫血、单纯红细胞再生障碍 (PRCA)、因子 VIII 缺陷、血友病 A、自身免疫性嗜中性白血球减少症、全血细胞减少症、白血球减少症、涉及白细胞渗出的疾病、中枢神经系统 (CNS) 炎性病、多器官损伤综合征、重症肌无力 (myasthenia gravis)、抗原 - 抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基膜疾病、抗磷脂抗体综合征、变应性神经炎、贝切特氏病、卡斯尔曼氏 (Castleman' s) 综合征、古德帕斯彻氏 (Goodpasture' s) 综合征、朗 - 伊二氏 (Lambert-Eaton) 肌无力综合征、雷诺氏 (Reynaud' s) 综合征、Sjogren' s 综合征、斯 - 约二氏 (Stevens-Johnson) 综合征、实体器官移植排斥、移植抗宿主病 (GVHD)、类天疱疮、天疱疮、自身免疫性多内分泌腺疾病、血清阴性脊柱关节病、莱特氏 (Reiter' s) 病、僵人综合征、巨细胞动脉炎、免疫复合物肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病或 IgM 介导的神经病、特应性血小板减少性紫癜 (ITP)、血栓血小板减少性 (thrombocytopenic) 紫癜 (TTP)、亨 - 许二氏紫癜、自身免疫性血小板减少症、睾丸和卵巢的自身免疫疾病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺机能减退 ; 自身免疫性内分泌疾病包括自身免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎 (桥本氏 (Hashimoto' s) 甲状腺炎)、亚急性甲状腺炎、特发性甲状腺机能减退、阿狄森氏 (Addison' s) 病、格雷夫斯氏 (Grave' s) 病、自身免疫性多内分泌腺综合征 (或多腺内分泌病综合征)、I 型糖尿病也称为胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) 和席汉氏 (Sheehan' s) 综合征 ; 自身免疫性肝炎、淋巴样间质性肺炎 (HIV)、闭塞性细支气管炎 (非移植) 对 NSIP、格 - 巴二氏 (Guillain-Barre') 综合征、大血管脉管炎 (包括风湿性多肌痛和巨细胞 (高安氏) 动脉炎)、中等血管脉管炎 (包括川崎氏病和结节性多发性动脉炎)、结节性多发性动脉炎 (PAN) 强直性脊柱炎、Berger' s 病 (IgA 肾病)、急进性肾小球肾炎、原发性胆汁性肝硬变、口炎性腹泻 (麸质肠病)、冷球蛋白血症、与肝炎相关的冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化 (ALS)、冠状动脉病、家族性地中海热、显微镜下多血管炎、科甘氏综合征、韦 - 奥二氏综合征和血栓闭塞性血管炎。

[0122] 类风湿性关节炎 (RA) 是特征在于关节炎的慢性疾病, 导致肿胀、疼痛和功能缺失。具有延长时期的 RA 的患者通常显示进行性关节破坏、变形、残疾且甚至早产儿死亡。

[0123] 系统性红斑狼疮 (SLE) 是通过对多器官中的血管的复发损伤引起的自身免疫疾病, 所述多器官包括肾、皮肤和关节。在具有 SLE 的患者中, T 细胞和 B 细胞之间的错误相互作用导致攻击细胞核的自身抗体的产生。一般同意自身抗体负责 SLE 的至少某些方面。包括耗尽 B 细胞谱系允许免疫系统重新设定为新 B 细胞由前体产生的新疗法, 将提供 SLE 患者中的长期利益的希望。

[0124] 克罗恩氏病和相关疾病溃疡性结肠炎是属于称为炎性肠病 (IBD) 的一组疾病的 2 个主要疾病类别。克罗恩氏病是引起消化或胃肠 (GI) 道的炎症的慢性病症。尽管它可以涉及从口腔到肛门的 GI 道的任何区域,但它最通常影响小肠和 / 或结肠。在溃疡性结肠炎中,GI 牵涉局限于结肠。多发性硬化症 (MS) 也是自身免疫疾病。它的特征在于中枢神经系统的炎症和髓磷脂的破坏,所述髓磷脂使脑、脊髓和体内的神经细胞纤维绝缘。尽管 MS 的原因不明,但广泛相信自身免疫 T 细胞是该疾病的发病机理的主要贡献者。然而,高水平的抗体存在于具有 MS 的患者的脑脊髓液中,并且某些理论预测导致抗体产生的 B 细胞应答对于介导该疾病是重要的。MS 的原因难以预测,并且该疾病可能有时静止休眠或稳定进展。几个亚型或进展模式已得到描述,这不仅与预后相关还与治疗决定相关。复发 - 缓解型描述了 85% -90% 具有 MS 的个体的初始过程。这个亚型的特征在于不可预测的发作 (复发) 随后为数月至数年的相对平静 (缓解) 时期,无疾病活性的新征兆。在发作过程中遭受的缺陷可能消退或可能是持久的。当缺陷总是在发作之间消退时,这称为“良性”MS。继发进展型描述了具有初始复发 - 缓解型 MS 的约 80%,其随后开始具有在其急性发作之间的神经病学减退,无任何确定的缓解期。这种减退可能包括新神经病学症状、恶化认知功能、或其他缺陷。继发进展型是最常见类型的 MS,并且引起最大量的残废。原发进展型描述了在其初始 MS 症状后从未缓解的个体的约 10%。减退持续发生,无明确发作。原发进展亚型趋于影响在疾病发作时年龄较大的人。进展复发型描述了从其 MS 发作开始具有稳定的神经病学减退但也遭受重叠发作的那些个体;并且是所有亚型中最不常见的。

[0125] 克罗恩氏病的特征可能在于针对嗜中性粒细胞抗原 (即“核周抗嗜中性粒细胞抗体” (pANCA)),和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (即“抗酿酒酵母抗体” (ASCA)) 的抗体。具有溃疡性结肠炎的许多患者在其血液中具有 pANCA 抗体而不是 ASCA 抗体,而许多克罗恩氏病患者显示 ASCA 抗体而不是 pANCA 抗体。评估克罗恩氏病的一种方法是使用克罗恩氏病活性指数 (Crohn's disease Activity Index) (CDAI),基于由医生收集的 18 个预测变量得分。150 和更低的 CDAI 值与休眠性疾病相关;高于其的值指示活动性疾病,并且超过 450 的值可见极其严重的疾病 (Best, 等人, " Development of a Crohn's disease activity index. " *Gastroenterology* 70 :439-444, 1976。然而,自最初研究以来,某些研究者使用 200-250 的‘主观值’作为健康得分。

[0126] 自身免疫性甲状腺病起因于如下自身抗体的产生,所述自身抗体刺激甲状腺以引起甲状腺功能亢进 (格雷夫斯氏病),或破坏甲状腺以引起甲状腺机能减退 (桥本氏甲状腺炎)。甲状腺的刺激由结合且激活促甲状腺激素 (TSH) 受体的自身抗体引起。甲状腺的破坏通过与其他甲状腺抗原反应的自身抗体引起。

[0127] Sjogren's 综合征是特征在于破坏机体的湿气产生腺体的自身免疫疾病。

[0128] 免疫性血小板减少性紫癜 (ITP) 通过与血液血小板结合且引起其破坏的自身抗体引起。

[0129] 重症肌无力 (MG) 是特征在于如下自身抗体的慢性自身免疫性神经肌肉障碍,所述自身抗体与在神经肌肉连接处表达的乙酰胆碱受体结合,导致随意肌群的虚弱。

[0130] 牛皮癣特征在于皮肤中的自身免疫炎症,并且在 30% 的病例中也与关节炎相关。

[0131] 还包括特发性炎症性肌病 (IIM),包括皮肌炎 (DM) 和多肌炎 (PM) 的治疗。炎症性肌病已使用许多分类方案进行分类。Miller's 的分类方案 (Miller, *Rheum Dis Clin*

North Am. 1994, 20 :811-826) 鉴定了 2 种特发性炎症性肌病 (IIM) -- 多肌炎 (PM) 和皮肌炎 (DM)。

[0132] 多肌炎和皮肌炎是慢性、虚弱炎性疾病,其涉及肌肉并且在 DM 的情况下涉及皮肤。这些病症是罕见的,具有在美国报告的每年发生率是每年约 5-10 个病例 / 百万成人和 0.6-3.2 个病例 / 百万儿童 (Targoff, Curr Probl Dermatol. 1991, 3 :131-180)。特发性炎症性肌病与显著的发病率和死亡率相关,其中高达一半的受累成人已遭受显著损害 (Gottdiener 等人, Am J Cardiol. 1978, 41 :1141-49)。Miller (Rheum Dis Clin North Am. 1994, 20 :811-826 和 Arthritis and Allied Conditions, 第 75 章, 编辑 Koopman 和 Moreland, Lippincott Williams and Wilkins, 2005) 阐述了用于诊断 IIM 的 5 组标准,即特发性炎症性肌病标准 (IIMC) 评估,包括肌无力、退化的肌肉活组织检查证据、肌肉相关酶的血清水平升高、肌病的电磁三联、在皮肌炎中的皮疹证据,并且还包括自身抗体的证据作为次级标准。

[0133] IIM 相关因子,包括肌肉相关酶类和自身抗体包括但不限于,肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶、醛缩酶、C 反应蛋白、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、以及抗核自身抗体 (ANA)、肌炎特异性抗体 (MSA) 和针对可提取核抗原的抗体。

[0134] V. 药物组合物和施用方法

[0135] 在本发明的另一个方面,本发明的 CD20 特异性结合分子作为药物组合物施用。为了给人或测试动物施用 CD20 特异性结合分子,优选在包含一种或多种药学上可接受的载体的组合物中配制结合分子。短语“药学或药理学上可接受的”指这样的分子实体和组合物,其当使用本领域众所周知的途径施用时,不产生过敏或其他不良反应,如下所述。“药学上可接受的载体”包括任何和所有临床上有用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。

[0136] 此外,化合物可能与水或常见有机溶剂形成溶剂化物。还包括此种溶剂化物。

[0137] CD20 特异性结合分子组合物可以经口、局部、经皮、肠胃外、通过吸入喷雾、经阴道、经直肠或通过颅内注射进行施用。如本文所使用的,术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌肉内、脑池内注射或输注技术。还包括通过静脉内、真皮内、肌肉内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射的施用和或在特定部位处的手术植入。一般地,组合物基本上不含热原,以及可能对接受者有害的其他杂质。在特定实施方案中,注射特别是静脉内的是优选的。

[0138] 包含在本发明方法中使用的 CD20 特异性结合分子的本发明药物组合物可以取决于施用途径包含药学上可接受的载体或添加剂。此种载体或添加剂的例子包括水、药学上可接受的有机溶剂、胶原、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性右旋糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯树胶、酪蛋白、明胶、琼脂、双甘油、甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂醇、硬脂酸、人血清白蛋白 (HAS)、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、药学上可接受的表面活性剂等。适当地取决于本发明的剂型,所使用的添加剂选自但不限于:上述或其组合。

[0139] 药物组合物的配制将根据所选择的施用途径而改变(例如,溶液、乳状液)。例如,待施用的包含抗 CD20 抗体(或其 CD20 结合片段,例如 SMIP)的合适组合物可以在生理学上可接受的媒介物或载体中进行制备。对于溶液或乳状液,合适的载体包括例如水溶液或醇 / 水溶液、乳状液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物可以包括氯化钠溶液、

林格氏 (Ringer's) 右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏或不挥发性油。静脉内媒介物可以包括各种添加剂、防腐剂、或液体、营养或电解质补充剂。

[0140] 各种水载体例如水、缓冲水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸, 或水悬浮液, 可以包含与适合于制造水悬浮液的赋形剂混合的活性化合物。此种赋形剂是悬浮剂, 例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄耆胶和阿拉伯树胶; 分散或湿润剂可以是天然存在的磷脂, 例如卵磷脂, 或烯基氧化物与脂肪酸的缩合产物, 例如聚氧乙烯硬脂酸酯, 或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物, 例如十七氧乙基鲸蜡醇 (heptadecaethyl-eneoxycetanol), 或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物, 例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯, 或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物, 例如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。水悬浮液还可以包含一种或多种防腐剂, 例如乙基或正丙基、对羟基苯甲酸酯。

[0141] CD20 特异性结合分子组合物可以冻干用于贮藏并且在使用前在合适载体中进行重构。已显示这种技术对于常规免疫球蛋白有效。可以采用任何合适的冻干和重构技术。本领域技术人员应当理解冻干和重构可以导致各种程度的抗体活性丧失, 并且使用水平可能必须进行调整以补偿。

[0142] 适合于通过添加水制备水悬浮液的可分散粉剂和粒剂提供与分散或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性化合物。合适的分散或湿润剂和悬浮剂通过上文已提及的那些示例。

[0143] CD20 特异性结合分子在这些制剂中的浓度可以广泛变化, 例如从小于约 0.5 重量% 通常为或至少约 1 重量% 到多达 15 或 20 重量%, 并且将主要基于流体体积、粘度等进行选择, 依照所选择的具体施用方式。因此, 用于肠胃外注射的一般药物组合物可以构建为包含 1ml 无菌缓冲水和 50mg 抗体。用于静脉内输注的一般组合物可以构建为包含 250ml 无菌林格氏溶液和 150mg 抗体。用于制备可肠胃外施用的组合物的实际方法将是本领域技术人员已知的或显而易见的, 并且在例如 Remington's Pharmaceutical Science, 第 15 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980) 中更详细地描述。抗体的有效剂量为 0.01mg-1000mg/kg 体重 / 施用。

[0144] 药物组合物可以为无菌可注射水悬浮液、油悬浮液、分散系或无菌粉末的形式, 用于临时制备无菌可注射溶液或分散系。悬浮液可以根据已知技术, 使用上文已提及的那些合适的分散或湿润剂和悬浮剂进行制备。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液, 例如作为在 1,3-丁二醇中的溶液。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇 (例如, 甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物、蔬菜油、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液的溶剂或分散介质。此外, 无菌、不挥发性油照常规用作溶剂或悬浮介质。为了这个目的, 可以采用任何温和的不挥发性油, 包括合成甘油单或二酯。此外, 脂肪酸例如油酸在注射剂的制备中 useful。

[0145] 在所有情况下, 形式必须是无菌的并且必须是流动的至具有容易注射性 (syringability) 的程度。合适的流动性可以如下得到维持, 例如通过使用包衣例如卵磷脂、在分散系的情况下通过维持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂。其在制造和贮藏条件下必须是稳定的, 并且必须针对微生物例如细菌和真菌的污染作用进行保存。对微生物作用的预防可以通过各种抗菌和抗真菌剂来达到, 例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯

酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下,将希望包括等渗剂,例如,糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂来达到,所述试剂例如单硬脂酸铝和明胶。

[0146] 对于施用有用的组合物可以用摄取或吸收促进剂进行配制,以增加其功效。此种促进剂包括例如水杨酸盐、甘胆酸盐 / 亚油酸盐、glycholate、抑肽酶、杆菌肽、SDS、癸酸盐等。参见例如,Fix(J. Pharm. Sci., 85 :1282-1285, 1996) 以及 Oliyai 和 Stella(Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32 :521-544, 1993)。

[0147] 此外,包括在本发明中使用的组合物的亲水性和疏水性性质是良好平衡的,由此增强其用于在体外且特别是体内使用的效用,而缺乏此种平衡的其他组合物具有基本上更少的效用。特别地,包括在本发明中使用的组合物在水介质中具有合适程度的溶解性,这允许在体内的吸收和生物利用度,同时还具有在液体中具有一定溶解性程度以允许化合物穿过细胞膜至假定作用部位。因此,当包括的抗体组合物可以递送至靶抗原活性部位时,它们是最大限度有效的。

[0148] 在一个方面,本发明的方法包括施用包含本发明的 CD20 特异性结合分子的药物组合物的步骤。

[0149] 本发明的方法使用用于将治疗剂直接或间接引入哺乳动物受试者内的任何医学上可接受的方法来执行,包括但不限于注射、口服摄入、鼻内、局部、经皮、肠胃外、吸入喷雾、阴道或直肠施用。如本文所使用的,术语肠胃外包括皮下、静脉内、肌肉和脑池内注射,以及导管和输注技术。还包括通过真皮内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射、硬膜外施用和或在特定部位处的手术植入。用于口部或经粘膜施用的药物组合物可以为液体或固体组合物形式。

[0150] 在特定实施方案中,药物组合物经配制与其预期施用途径相容。用于肠胃外、真皮内或皮下应用的溶液或悬浮液可以包含下述组分:无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂例如乙二胺四乙酸;缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调整张力的试剂例如氯化钠或右旋糖。pH 可以用酸或碱例如盐酸或氢氧化钠进行调整。肠胃外制剂可以封入由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0151] 用于皮下应用的溶液或悬浮液一般包含一种或多种下述组分:无菌稀释剂例如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂例如乙二胺四乙酸;缓冲剂例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和用于调整张力的试剂例如氯化钠或右旋糖。pH 可以用酸或碱例如盐酸或氢氧化钠进行调整。此种制剂可以封入由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。在某些实施方案中,CD20 结合分子为冻干剂型,并且可以进一步包含一种或多种下述赋形剂:L- 组氨酸、L- 甲硫氨酸、蔗糖和聚山梨醇酯 80。

[0152] 还包括的是使用本发明的药物组合物的皮下疗法。这些疗法可以每天、每周、或更优选地每 2 周或每月施用。最终主治医生将决定使用本发明的药物组合物的静脉内或皮下疗法的合适持续时间,或用小分子的疗法、和疗法的施用时间测定。

[0153] 在一个示例性实施方案中,为了皮下提供高剂量,其中体积限制很小(例如,约

1-1.2ml/注射), CD20 结合分子的浓度一般为 100mg/ml 或更大。

[0154] 在其他实施方案中,施用在需要治疗的癌症或受累组织部位处进行,通过直接注射到部位内或经由持续递送或持续释放机制,这可以内部递送制剂。例如,能够持续递送组合物(例如,可溶性多肽、抗体或小分子)的生物可降解的微球体或胶囊或其他生物可降解聚合物构型可以包括在癌症附近植入的本发明的制剂中。

[0155] 治疗组合物还可以在多个部位处递送给患者。多次施用可以同时给予或可以经过连续时间段施用。

[0156] 在本发明中还包括与第二种试剂结合的 CD20 特异性结合分子组合物的施用。本发明包括的第二种试剂在下文段落中列出。

[0157] 第二种试剂可以是 B 细胞关联分子。本发明包括的其他 B 细胞关联分子包括与并非 CD20 的 B 细胞表面分子结合的结合分子。B 细胞关联分子包括但不限于 CD19(B 淋巴细胞抗原 CD19,也称为 B 淋巴细胞表面抗原 B4 或 Leu-12)、CD21、CD22(B 细胞受体 CD22,也称为 Leu-14、B 淋巴细胞细胞粘附分子或 BL-CAM)、CD23、CD 37、CD40(B 细胞表面抗原 CD40,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员 5、CD40L 受体或 Bp50)、CD80(T 淋巴细胞活化抗原 CD80,也称为活化 B7-1 抗原、B7、B7-1 或 BB1)、CD86(T 淋巴细胞活化抗原 CD86,也称为活化 B7-2 抗原、B70、FUN-1 或 BU63)、CD137(也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员 9)、CD152(也称为细胞毒性 T 淋巴细胞蛋白质 4 或 CTLA-4)、L6(肿瘤相关抗原 L6,也称为跨膜 4 超家族成员 1,膜组分表面标记 1 或 M3S1)、CD30(淋巴细胞活化抗原 CD30,也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员 8、CD30L 受体或 Ki-1)、CD50(也称为细胞间粘附分子-3(ICAM3)或 ICAM-R)、CD54(也称为细胞间粘附分子-1(ICAM1)或主要组鼻病毒受体)、B7-H1(由活化的 T 细胞、B 细胞和骨髓样细胞表达的免疫抑制受体的配体,也称为 PD-L1;参见 Dong, 等人, " B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion, " Nat. Med. 1999, 5 :1365-1369)、CD134(也称为肿瘤坏死因子受体超家族成员 4、OX40、OX40L 受体、ACT35 抗原或 TAX 转录活化的糖蛋白 1 受体)、41BB(4-1BB 配体受体、T 细胞抗原 4-1BB 或 T 细胞抗原 ILA)、CD153(也称为肿瘤坏死因子配体超家族成员 8、CD30 配体或 CD30-L)、CD154(也称为肿瘤坏死因子配体超家族成员 5、TNF 相关的活化蛋白质、TRAP 或 T 细胞抗原 Gp39)和 To11 受体。构建体靶和 / 或靶抗原的上述列表仅是示例性的并且不是完全的。

[0158] 作为第二种试剂而包括的化学治疗剂的例子包括但不限于烷化剂,例如氮芥(例如,二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑和苯丁酸氮芥);亚硝基脲(例如,卡莫司汀(BCNU)、罗莫司汀(CCNU)和司莫司汀(甲基-CCNU));乙烯亚胺和甲基-蜜胺(例如,三乙撑蜜胺)(TEM)、三乙撑硫代磷酰胺(噻替派)和六甲基蜜胺(HMM,六甲蜜胺));烷基磺酸盐(例如,白消安(busulfan,));和三嗪(例如,达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC));抗代谢药例如叶酸类似物(例如,氨甲蝶呤、三甲曲沙和培美曲塞(多靶向抗叶酸剂));嘧啶类似物(例如,5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟脱氧尿苷、吉西他滨、胞嘧啶阿拉伯糖苷(AraC,阿糖胞苷)、5-氮胞苷和 2,2'-二氟脱氧胞苷);和嘌呤类似物(例如,6-巯嘌呤、6-巯鸟嘌呤、硫唑嘌呤、2'-脱氧肋间型霉素(喷司他丁)、红羟基壬基腺嘌呤(EHNA)、磷酸氟达拉滨、2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨,2-CdA);I 型拓扑异构酶抑制剂例如喜树碱(CPT)、托泊替康和伊立替康;特定天然产物例如表鬼臼毒素(epipodophyllotoxins)(例如,依托泊苷和替尼泊苷);

和长春花生物碱（例如，长春碱、长春新碱和长春瑞滨）；抗肿瘤抗生素例如放线菌素 D、多柔比星和博来霉素；特定放射致敏剂例如 5- 溴脱氧尿苷（5-bromodeoxyuridine）、5- 碘脱氧尿苷和溴脱氧胞苷；铂配位络合物例如顺铂、卡铂和奥沙利铂；取代的尿素例如羟基脲；和甲基胍衍生物例如 N- 甲基胍（MIH）和丙卡巴胍。

[0159] 化学治疗剂、放射治疗剂以及其他活性和辅助试剂的非限制性例子也在表 1 中显示。

[0160]	表 1
[0161] <u>烷化剂</u>	<u>天然产物</u>
[0162] <u>氮芥</u>	<u>抗有丝分裂药</u>
[0163] 二氯甲基二乙胺	
[0164] 环磷酰胺	
[0165] 异环磷酰胺	<u>紫杉烷</u>
[0166] 美法仑	紫杉醇
[0167] 苯丁酸氮芥	长春花生物碱
[0168]	长春碱（VLB）
[0169] <u>亚硝基脲</u>	长春新碱
[0170] 卡莫司汀（BCNU）	长春瑞滨
[0171] 罗莫司汀（CCNU）	Taxotere® （多西他赛）
[0172] 司莫司汀（甲基-CCNU）	雌氮芥
[0173]	磷酸雌莫司汀
[0174] <u>乙烯亚胺 / 甲基-蜜胺</u>	
[0175] 三乙撑蜜胺（TEM）	<u>表鬼臼毒素</u>
[0176] 三乙撑硫代磷酰胺（噻替派）	依托泊苷
[0177] 六甲基蜜胺	替尼泊苷
[0178] （HMM, 六甲蜜胺）	
[0179]	<u>抗生素</u>
[0180] <u>烷基磺酸盐</u>	放线菌素 D
[0181] 白消安	道诺霉素（柔红霉素）
[0182]	多柔比星（阿霉素）
[0183] <u>三嗪</u>	mitoxantroneidarubicin
[0184] 达卡巴嗪（DTIC）	博来霉素
[0185]	splicamycin（光神霉素）
[0186] <u>抗代谢药</u>	丝裂霉素 C
[0187] <u>叶酸类似物</u>	更生霉素
[0188] 氨甲蝶呤	阿非科林
[0189] 三甲曲沙	
[0190] 培美曲塞	<u>酶</u>
[0191] （多靶向抗叶酸剂）	L- 天冬酰胺酶
[0192]	L- 精氨酸酶

[0193]	<u>嘧啶类似物</u>	
[0194]	5- 氟尿嘧啶	<u>放射致敏剂</u>
[0195]	氟脱氧尿苷	甲硝唑
[0196]	吉西他滨	米索硝唑
[0197]	胞嘧啶阿拉伯糖苷	去甲基醚醇硝唑
[0198]	(AraC, 阿糖胞苷)	哌莫硝唑
[0199]	5- 氮胞苷	依他硝唑
[0200]	2,2' - 二氟脱氧胞苷	尼莫唑
[0201]		RSU 1069
[0202]	<u>嘌呤类似物</u>	E09
[0203]	6- 硫嘌呤	RB 6145
[0204]	6- 硫鸟嘌呤	SR4233
[0205]	硫唑嘌呤	烟酰胺
[0206]	2' - 脱氧肋间型霉素	5- 溴脱氧尿苷
[0207]	(喷司他丁)	5- 碘脱氧尿苷
[0208]	红羟基壬基腺嘌呤 (EHNA)	溴脱氧胞苷
[0209]	磷酸氟达拉滨	
[0210]	2- 氯脱氧腺苷	
[0211]	(克拉屈滨, 2-CdA)	<u>混杂试剂</u>
[0212]		<u>铂配位络合物</u>
[0213]		顺铂
[0214]	<u>I 型拓扑异构酶抑制剂</u>	卡铂
[0215]	喜树碱	奥沙利铂
[0216]	托泊替康	蒽二酮
[0217]	伊立替康	米托蒽醌
[0218]	<u>生物应答调节剂</u>	<u>取代尿素</u>
[0219]	G-CSF	羟基脲
[0220]	GM-CSF	
[0221]		<u>甲基胍衍生物</u>
[0222]	<u>分化试剂</u>	N- 甲基胍 (MIH)
[0223]	视黄酸衍生物	丙卡巴胍
[0224]	<u>激素和拮抗剂</u>	<u>肾上腺皮质抑制剂</u>
[0225]	<u>肾上腺皮质类固醇 / 拮抗剂</u>	米托坦 (o, p' -DDD)
[0226]	泼尼松和等价物	ainoglutethimide
[0227]	地塞米松	
[0228]	ainoglutethimide	<u>细胞因子</u>
[0229]		干扰素 (α , β , γ)
[0230]	<u>孕激素</u>	白介素 -2
[0231]	己酸羟孕酮	

[0232]	乙酸甲羟孕酮	光敏剂
[0233]	乙酸甲地孕酮	血卟啉衍生物
[0234]		Photofrin®
[0235]	<u>雌激素</u>	苯卟啉衍生物
[0236]	己烯雌酚	Npe6
[0237]	乙炔雌二醇 / 等价物	初卟啉锡 (SnET2)
[0238]		pheoboride-a
[0239]	<u>抗雌激素药</u>	细菌叶绿素 -a
[0240]	他莫西芬	萘醌菁
[0241]		酞菁
[0242]	<u>雄激素</u>	酞菁锌
[0243]	丙酸睾酮	
[0244]	氟甲睾酮 / 等价物	放射
[0245]		X 射线
[0246]	<u>抗雄激素药</u>	紫外线
[0247]	氟他胺	γ 射线
[0248]	促性腺激素	可见光
[0249]	激素类似物	红外线辐射
[0250]	亮丙瑞林	微波辐射
[0251]	<u>非类固醇类抗雄激素药</u>	
[0252]	氟他胺	

[0253] 本发明包括的用于治疗自身免疫疾病的第二种试剂还可以包括免疫抑制剂,其作用于抑制或掩蔽待治疗个体的免疫系统。免疫抑制剂包括例如非类固醇抗炎药 (NSAID)、镇痛药 (analgesics)、糖皮质激素、用于治疗关节炎的疾病缓解抗风湿性药物 (DMARD)、或生物应答调节剂。DMARD 描述中的组合物也在治疗除 RA 外的许多其他自身免疫疾病中 useful。

[0254] 示例性 NSAID 选自布洛芬、萘普生、萘普生钠、Cox-2 抑制剂例如 **VIOXX®** 和 **CELEBREX®**、以及唾液酸盐。示例性镇痛药选自对乙酰氨基酚、羟可酮、盐酸丙氧芬 (propoxyphene hydrochloride) 的曲马多。示例性糖皮质激素选自可的松、地塞米松 (dexamethasone)、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙或泼尼松。示例性生物应答调节剂包括但不限于,针对细胞表面标记的分子 (例如, CD4、CD5、CTLA4 等)、阿巴西普、细胞因子抑制剂例如 TNF 拮抗剂 (例如依那西普 (**ENBREL®**))、阿达木单抗 (**HUMIRA®**) 和英夫利昔单抗 (**REMICADE®**))、趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物应答调节剂包括单克隆抗体以及重组形式的分子。示例性 DMARD 包括但不限于硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、氨甲蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、羟氯喹、金 [口服 (金诺芬) 和肌肉] 和米诺环素。因此,例如,本发明的结合蛋白质可以与 DMARD 组合用于治疗 RA,所述 DMARD 例如氨甲蝶呤 (MTX)、柳氮磺胺吡啶 (SSZ) 或来氟米特 (LEF); 与 DMARD、类固醇、环磷酰胺或 **CELLCEPT®** 组合用于治疗狼疮 (SLE); 以及与各种疾病缓解试剂组合用于治

疗 MS, 所述疾病缓解试剂例如干扰素 (干扰素 β -1a (**AVONEX®** 和 **REBIF®**) 或干扰素 β -1b (**BETASERON®** 或 **BETAFERON®**))、乙酸格拉替雷 (glatiramer acetate) (**COPAXONE®**)、米托蒽醌或那他珠单抗 (**TYSABRI®**)。

[0255] 包括 CD20 特异性结合分子组合物和第二种试剂可以同时相同制剂中给予。备选地, 试剂在分开制剂中施用, 并且同时施用, 其中同时指试剂在彼此 30 分钟内给予。

[0256] 在另一个方面, 在 CD20 特异性结合分子组合物施用前施用第二种试剂。在施用前指第二种试剂的施用在用抗体治疗前一周直到抗体施用前 30 分钟的范围内。进一步包括第二种试剂在 CD20 特异性结合分子组合物施用后施用。在施用后意欲描述从抗体治疗后 30 分钟直到抗体施用后 1 周的施用。

[0257] 进一步包括当 CD20 特异性结合分子与第二种试剂组合施用, 其中第二种试剂是细胞因子或生长因子、或化学治疗剂, 施用还包括使用放射治疗剂或放射疗法。对与 CD20 特异性结合分子组合物和第二种试剂施用组合的放射疗法的需要可以由治疗医生决定。

[0258] CD20 特异性结合分子组合物在给定剂量中的量将根据治疗所施用的个体的大小以及待治疗病症的特征而变。在示例性治疗中, 可能必须施用约 1mg/ 天、约 5mg/ 天、约 10mg/ 天、约 20mg/ 天、约 50mg/ 天、约 75mg/ 天、约 100mg/ 天、约 150mg/ 天、约 200mg/ 天、约 250mg/ 天、约 400mg/ 天、约 500mg/ 天、约 800mg/ 天、约 1000mg/ 天、约 1600mg/ 天或约 2000mg/ 天。剂量还可以基于患者的体重以 0.01-50mg/kg 的剂量施用。在一个相关实施方案中, CD20 特异性结合分子可以以 0.015-30mg/kg 的剂量范围施用。在一个另外实施方案中, CD20 特异性结合分子以约 0.015、约 0.05、约 0.15、约 0.5、约 1.5、约 5、约 15 或约 30mg/kg 的剂量施用。

[0259] 首先在动物模型中随后在临床测试中的标准剂量应答研究可以揭示关于特定疾病和患者群体的最佳剂量。

[0260] 在特定实施方案中, CD20 特异性结合分子组合物的施用使 B 细胞群体在治疗后降低或减少至少约 20%。在一个实施方案中, B 细胞群体降低或减少至少约 20、约 30、约 40、约 50、约 60、约 70、约 80、约 90 或约 100%。B 细胞耗尽定义为绝对 B 细胞计数的减少低于正常范围下限。B 细胞回收定义为绝对 B 细胞计数恢复至下述任一: 1) 70% 的受试者基线值; 或 2) 正常范围。

[0261] 在特定实施方案中, CD20 特异性结合分子组合物的施用还导致特定 B 细胞子集中凋亡的增强。凋亡指细胞的程序性细胞死亡的诱导, 通过 DNA 断裂、细胞收缩、细胞碎裂、膜囊泡形成或如通过膜联蛋白 V 染色评估的膜脂质组成的改变显示且评估的。

[0262] 在特定实施方案中, CD20 特异性结合分子组合物的施用导致待治疗的疾病或病症中的所需临床效应。例如, 在受类风湿性关节炎侵袭的患者中, 本发明的 CD20 分子的施用使患者的病状改善了临床显著的量 [例如, 达到美国风湿病学会的改善初步检测 (American College of Rheumatology Preliminary Detection of Improvement) (ACR20)], 和 / 或触痛和肿胀关节中 20% 的改善以及 3/5 其余 ACR 测量中 20% 的改善 (Felson 等人, Arthritis Rheum. 1995, 38 :727-35)。关于 CD20 特异性结合分子施用后 RA 患者中的改善的生物测量包括经由蛋白质或 RNA 水平测量的细胞因子水平中的改变的测量。目的细胞因子包括但不限于, TNF- α 、IL-1、干扰素、Blys 和 APRIL。细胞因子改变可以是由于减少的 B 细胞数目或减少的活化 T 细胞。在 RA 患者中, 在 CD20 特异性结合分子

施用前和后测量与骨更新（骨质吸收或侵蚀）相关的标记。相关标记包括但不限于，碱性磷酸酶、骨钙素、胶原断裂片段、羟脯氨酸、抗酒石酸盐酸性磷酸酶和 RANK 配体（RANKL）。与 RA 改善相关的其他读数包括 C 反应蛋白（CRP）水平、红细胞沉降率（ESR）、类风湿性因子、CCP（瓜氨酸环肽）抗体的测量以及经由流式细胞术的全身性 B 细胞水平和淋巴细胞计数的评估。特异性因子还可以根据 RA 患者的滑膜进行测量，包括在来自滑膜活组织检查的滑膜中 B 细胞水平的评估，RANKL 和其他骨因子以及上文所述的细胞因子的水平。关于 RA 的另外生物标记包括 CRP 和 SAA。

[0263] 在一个相关方面，CD20 特异性结合分子治疗对其他疾病的作用根据本领域已知的标准进行测量。例如，包括接受用 CD20 特异性结合分子的治疗的克罗恩氏病患者达到克罗恩氏病活性指数（Crohn's Disease Activity Index, CDAI）中约 50 至约 70 单位的改善，其中缓解为 150 单位（Simonis 等人，Scand. J Gastroent. 1998, 33 :283-8）。150 或 200 的得分视为正常的，而 450 的得分视为严重疾病得分。进一步希望 CD20 特异性结合分子的施用导致受炎症肠病侵袭的个体中核周抗嗜中性粒细胞抗体（pANCA）和抗酿酒酵母抗体（ASCA）中的减少。

[0264] 进一步包括接受用本发明 CD20 特异性结合分子的治疗的成人和青少年肌炎患者达到核心评估组中的改善，例如测量的 6 个核心组中的 3 个改善约 20%，其中不超过 2 个核心测量恶化约 25%（参见 Rider 等人，Arthritis Rheum. 2004, 50 :2281-90）。

[0265] 进一步包括接受用本发明 CD20 特异性结合分子的治疗的 SLE 患者达到系统性红斑狼疮活性测量（Systemic Lupus Activity Measure）（SLAM）或 SLE 疾病活性指数（SLE Disease Activity Index）（SLEDAI）得分中至少 1 点的改善（Gladman 等人，J Rheumatol 1994, 21 :1468-71）（Tan 等人，Arthritis Rheum. 1982, 25 :1271-7）。> 5 的 SLAM 得分或 > 2 的 SLEDAI 得分视为临床上活性疾病。对治疗的应答可以定义为在 2 种疾病活性测量（SLE 疾病活性指数 [SLEDAI] 和系统性红斑狼疮活性测量）和 2 种生活质量测量（患者的整体评价和 Krupp 疲劳严重度量表（Fatigue Severity Scale））中的改善或稳定（Petri 等人，Arthritis Rheum. 2004, 50 :2858-68.）。进一步希望 CD20 特异性结合分子对 SLE 患者的施用导致抗双链 DNA 抗体中的减少。备选地，改善可以使用大不列颠群岛狼疮评估组标准（British Isles Lupus Assessment Group Criteria）（BILAG）进行测量。关于 SLE 的其他生物标记包括 B 细胞子集（新生、记忆、过渡）；CD40L；补体、抗 ds-DNA、C1q；尿生物标记（TWEAK、MIF）。此外，就分化标记而言，Fc γ RIII 状态（高或低亲和力）可以用于使 B 细胞耗尽和功效关联。减少的补体激活还可以赋予安全优点（基于 C3a、C4a、Bb 结合）。

[0266] 进一步包括接受用本发明 CD20 特异性结合分子的治疗的多发性硬化症患者在 Kurtzke 扩展残废状态量表（EDSS）（Kurtzke, F., Neurology 1983, 33 :1444-52）上达到临床得分中至少 0.5 的改善，或在 Kurtzke 量表上临床疾病恶化中至少 1.0 的延迟（Rudick 等人，Neurology 1997, 49 :358-63）。

[0267] 进一步包括接受用本发明 CD20 特异性结合分子的治疗的患有 IIM 的患者达到特发性炎症性肌病标准（Idiopathic Inflammatory Myopathy Criteria）（IIMC）评估中所述的 5 个标准中至少一个减少（Miller, F., 同上）。进一步包括给 IIM 患者施用本发明的 CD20 特异性结合分子导致选自下述的 IIM 相关因子的减少：肌酸激酶（CK）、乳酸脱氢酶、醛缩酶、C 反应蛋白、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、以及抗核自身抗

体 (ANA)、肌炎特异性抗体 (MSA) 和针对可提取核抗原的抗体。备选地,符合 Rider 等人, Arthritis Rheum. 2004, 50 :2281-90 中所述的 6 个标准中的 3 个的患者可以是根据本发明的治疗的受试者,伴随在不超过 2 个标准中的恶化。

[0268] 在一个再进一步的实施方案中,患有 B 细胞癌症的患者接受用本发明的 CD20 特异性结合分子的治疗,并且证实对 CD20 特异性结合分子的总体有利应答,基于本领域众所周知且通常使用的临床标准,并且如下所述,例如肿瘤大小中的减少、肿瘤数目中的减少和 / 或疾病症状中的改善。

[0269] 例如,美国国家癌症研究所 (U. S. National Cancer Institute) (NCI) 已将某些类别的癌症分成“惰性”和“侵袭性”淋巴瘤的临床种类。惰性淋巴瘤包括滤泡细胞淋巴瘤、弥漫性小淋巴细胞性淋巴瘤 / 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、淋巴浆细胞样淋巴瘤 / 沃尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom' sMacroglobulinemia)、边缘区淋巴瘤和毛细胞白血病。侵袭性淋巴瘤包括弥漫性混合和大细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤 / 弥漫性小无裂细胞淋巴瘤、成淋巴细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和 AIDS 相关淋巴瘤。在某些情况下,国际预后指数 (IPI) 在侵袭性和滤泡型淋巴瘤的情况下使用。在 IPI 中考虑的因素包括年龄 (年龄 < 60 岁对年龄 > 60 岁)、血清乳酸脱氢酶 (正常水平对升高水平)、体力状态 (0 或 1 对 2-4) (参见下文定义)、疾病分期 (I 或 II 对 III 或 IV)、和结节外部位牵涉 (0 或 1 对 2-4)。具有 2 种或更多危险因素的患者具有小于 50% 的无复发机率和 5 年的总体存活。

[0270] 侵袭性 IPI 中的体力状态如下定义:级别描述:0 完全能动,能够从事所有疾病前行为而无限制;1 在身体上的重体力作业方面有限制,但能走动并且能够从事轻或静坐状态的工作,例如轻室内工作、办公室工作;2 能走动并且能够全部自我护理,但不能从事任何工作作业高达且约超过 50% 的清醒时间;3 仅能够有限的自我护理,卧床不起或不能站立超过 50% 的清醒时间;4 完全残废,无法从事任何自我护理,完全卧床不起或不能站立;和 5,死亡。(参见, TheInternational Non-Hodgkin' s Lymphoma Prognostic FactorsProject. A predictive model for aggressive non-Hodgkin' slymphoma. N Engl J Med. 329 :987-94, 1993)

[0271] 一般地,淋巴瘤的级别使用低度淋巴瘤通常呈现为结节疾病并且通常无痛或缓慢生长的标准进行临床评估。中度和高度疾病通常呈现为侵袭性大得多的疾病,伴随大结节外庞大肿瘤。

[0272] Ann Arbor 分类系统也用于测量肿瘤特别是非霍奇金氏淋巴瘤的进展。在这个系统中,成人 NHL 的 I、II、III 和 IV 期可以分成 A 和 B 类,这取决于患者具有 (B) 且不具有 (A) 定义明确的泛发症状。B 名称给予具有下述症状的患者:在诊断前 6 个月内无法解释的超过 10% 体重减轻,体温超过 38°C 的无法解释的发烧,和湿透性盗汗。分期的定义如下:I 期 - 单个淋巴结区域的牵涉或单个淋巴外器官或部位的局限性牵涉。II 期 - 在横膈膜同一侧上的 2 个或更多淋巴结区域的牵涉,或单个关联淋巴外器官或部位及其区域淋巴结伴随或不伴随在横膈膜同一侧上的其他淋巴结区域的局限性牵涉。III 期 - 在横膈膜两侧上的淋巴结区域的牵涉,可能伴随淋巴外器官或部位的局限性牵涉,脾脏的牵涉,或两者。IV 期 - 一个或多个淋巴外部位的播散性 (多病灶) 牵涉伴随或不伴随关联淋巴结的牵涉,或分离的淋巴外器官牵涉伴随遥远的 (非区域) 结节牵涉。关于进一步的细节,参见 TheInternational

Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma, *New England J. Med.* (1993) 329:987-994.

[0273] 在一个方面, CD20 特异性结合分子的疗效通过应答水平进行测定, 例如部分应答定义为肿瘤减少至小于其原始大小的一半。完全应答定义为通过临床或放射学评估证实的疾病的完全消除。在一个实施方案中, 接受用本发明 CD20 特异性结合分子的治疗的个体证实对治疗的至少部分应答。

[0274] 根据与美国国家癌症研究所合作开发的用于评估 NHL 的 Cheson 标准 (Cheson 等人, *J Clin Oncol.* 1999, 17:1244; Grillo-Lopez 等人, *Ann Oncol.* 2000, 11:399-408), 当存在疾病和疾病相关症状的所有可检测的临床和 X 线照片证据的完全消失, 所有淋巴结回复正常大小, 脾的大小已回归, 并且骨髓没有淋巴瘤时, 获得完全应答。

[0275] 当患者显示疾病的完全消失并且脾的大小回归, 但淋巴结已回归超过 75% 并且骨髓不确定时, 获得未经证实的完全应答。未经证实的完全应答符合且超过关于部分应答的标准。总体应答定义为总体肿瘤负荷中至少 50% 的减少。

[0276] 已开发相似标准用于各种其他形式的癌症或过度增生性疾病, 并且对于本领域技术人员容易获得。参见例如, Cheson 等人, *Clin Adv Hematol Oncol.* 2006, 4:4-5, 其描述了用于评估 CLL 的标准; Cheson 等人, *J Clin Oncol.* 2003, 21:4642-9, 其描述了用于 AML 的标准; Cheson 等人, *Blood* 2000, 96:3671-4, 其描述了用于骨髓增生异常综合征的标准。

[0277] 在另一个方面, 在具有 B 细胞癌症的患者中对 CD20 结合分子的治疗性应答表现为与未接受治疗的患者想比较疾病进展缓慢。对缓慢的疾病进展或任何上述因素的测量可以使用本领域众所周知的技术进行, 包括骨扫描、CT 扫描、镓扫描、淋巴管造影照片、MRI、PET 扫描、超声等。

[0278] 在一个相关方面, 为了测定 CD20 结合分子治疗的功效, 测量个体的生物样品中的 B 细胞数目。在一个实施方案中, 生物样品选自血液、肿瘤活组织检查、淋巴结、扁桃体、骨髓、胸腺和其他富含淋巴细胞的组织。富含淋巴细胞的组织是特别富含淋巴细胞的组织, 包括但不限于, 淋巴结和相关器官 (脾、骨髓、扁桃体、胸腺、粘膜淋巴组织)、肿瘤和炎症区域。

[0279] 还显而易见的是, 如果将常规治疗与本发明的治疗组合施用, 可以修改剂量。

[0280] 进一步包括待通过本发明的方法治疗的个体可以是进行再治疗, 例如如果疾病的症状再现或治疗的药代动力学和 / 或药效学 (pharmacodynamics) 使得此种再治疗可行。在一个实施方案中, 对用本发明的 CD20 结合分子治疗的个体施用另一种 CD20 特异性结合分子。基于本领域的普通技术, 临床医生将能够确定何时指定再治疗, 基于例如疾病症状的再现或个体的 B 细胞恢复至需要再治疗的水平。临床标准和后果的其他测量或标记的例子在本文中进一步描述。可以将通过本发明的方法治疗的个体置于维持治疗时间表上, 其中个体用 CD20 特异性结合分子进行再治疗, 这基于 CD20 特异性结合分子的药代动力学 / 药效学性质。此种维持治疗一般从初次治疗后约 3 个月到约 2 年的任何地方施用。示例性药效学数据包括但不限于, 如本文所述的关于疾病改善的生物学测量, 例如在血清中的 CD20 特异性结合分子水平, 疾病评估中的改善 (例如, 通过 ACN、SLAM 或 IPI), 细胞因子或表面标记表达中的改变、自身抗体水平、和肿瘤大小的改变。本领域进一步理解对通过本发明的方法治疗的个体应答中的差异可以使得用 CD20 特异性结合分子的再治疗的时间选择中的差

异成为必需。

[0281] 作为一个另外的方面,本发明包括试剂盒,所述试剂盒包含以促进其用于实施本发明的方法的方式包装的一种或多种化合物或组合物。在一个实施方案中,此种试剂盒包括本文描述的 CD20 特异性结合分子化合物或组合物(例如,包含单独或与第二种试剂组合的 CD20 特异性结合分子的组合物),包装在容器例如密封瓶或小瓶中,具有描述化合物或组合物在实施该方法中的用途的、附着于容器或包括在包装中的标签。优选地,化合物或组合物以单位剂型包装。试剂盒可以进一步包括适合于根据特定施用途施用组合物或用于实施筛选测定法的装置。优选地,试剂盒包含描述抗体组合物的用途的标签。

[0282] 本发明还包含了制造物品。此种物品包含至少一种 CD20 特异性结合分子,任选连同药物载体或稀释剂,和描述根据本发明的 CD20 特异性结合分子的使用方法的至少一个标签。此种制造物品还可以任选包含用于与 CD20 特异性结合分子结合施用的至少一种第二种试剂。

实施例

[0283] 实施例 1:抗 CD20SMIP 与原代 B 细胞的结合

[0284] 原代人 B 细胞

[0285] 为了测定抗 CD20SMIP 与原代 B 细胞的结合,我们使用阴性选择 B 细胞分离试剂盒(StemCell Technologies)从血沉棕黄层中分离原代 B 细胞。使收获的细胞与多种浓度的抗 CD20SMIP 一起在冰上温育 30 分钟。随后在 0.5% BSA/PBS 中洗涤细胞,并且用抗人 IgG-PE 染色 30 分钟,并且通过流式细胞术(MFI)在 FacsCalibur 上进行分析。

[0286] 如图 1 中证实的,在这个实施例中分析的所有抗 CD20SMIP(TRU-015、018008csc、018008sccp、2LM19-3csc、2LM19-3sccp、2LM20-4csc、2LM16csc、2LM16scc、2LM16sccp、2LM20-4sccp、009csc、009scc、009sccp、018011csc、018011scc、018011sccp)对于在人 B 细胞上的 CD20 具有相当的结合亲和力。

[0287] 表 2- 在原代 B 细胞上与 P/S 突变 SMIP 的结合

[0288]

10 ug/ml		1.1ug/ml		0.37 ug/ml		0.12 ug/ml	
	MFI		MFI		MFI		MFI
Rituxan	198.7	Rituxan	172.9	Rituxan	137.3	Rituxan	105.7
TRU-015	149.3	TRU-015	88.0	TRU-015	64.8	TRU-015	42.8
2Lm 20-4 sccp	80.1	2Lm 20-4 sccp	66.0	2Lm 20-4 sccp	43.2	2Lm 20-4 sccp	25.6
18008 sccp	79.5	2LM 20-4 sccp p/s	48.8	2LM 20-4 sccp p/s	33.4	2Lm 19-3 sccp	17.7
2Lm 19-3 sccp	61.4	2Lm 19-3 sccp	48.7	2Lm 19-3 sccp	31.0	2LM 20-4 sccp p/s	17.6
2Lm 16 sccp p/s	54.3	18008 sccp	44.8	009 sccp	28.4	009 sccp	17.0
2Lm 16 csc p/s	52.2	2Lm 16 sccp p/s	42.8	2Lm 16 sccp p/s	25.0	2Lm 16 sccp p/s	13.5
009 sccp	51.9	2Lm 19-3 sccp p/s	41.8	18008 sccp	24.8	18008 sccp	13.0
2LM 20-4 sccp p/s	50.6	009 sccp	39.8	2Lm 19-3 sccp p/s	22.4	2Lm 19-3 sccp p/s	12.7
2Lm 19-3 sccp p/s	43.5	009 sccp p/s	32.7	009 sccp p/s	20.2	009 sccp p/s	10.4
009 csc p/s	42.2	009 csc p/s	31.6	009 csc p/s	19.0	009 csc p/s	9.8
009 sccp p/s	40.4	2Lm 16 csc p/s	30.5	2Lm 16 csc p/s	15.2	2Lm 16 csc p/s	9.3

[0289]

10 ug/ml		1.1 ug/ml		0.12 ug/ml		0.04 ug/ml	
Rituxan	171.6	Rituxan	93.0	Rituxan	82.3	Rituxan	43.1
TRU-015	123.6	TRU-015	53.4	2LM 20-4 sccp p/s	38.3	TRU-015	19.9
2Lm 20-4 sccp	67.8	2LM 20-4 sccp p/s	39.2	TRU-015	31.4	2LM 20-4 sccp p/s	16.2
2LM 20-4 sccp p/s	66.8	2Lm 19-3 sccp p/s	35.9	2Lm 19-3 sccp p/s	31.0	2LM 20-4 sccp	14.4
18008 sccp	64.7	2Lm 19-3 sccp	35.2	2Lm 20-4 sccp	27.8	2Lm 16 sccp p/s	14.0
2Lm 19-3 sccp	60.7	2Lm 16 sccp p/s	34.9	2Lm 16 sccp p/s	26.4	2Lm 19-3 sccp	13.4
2Lm 16 csc p/s	59.6	2LM 20-4 sccp	34.1	2Lm 19-3 sccp	23.4	2Lm 19-3 sccp p/s	13.0
009 csc p/s	56.8	009 csc p/s	31.0	009 csc p/s	21.5	009 csc p/s	11.7
2Lm 19-3 sccp p/s	56.1	009 sccp p/s	28.1	009 sccp p/s	21.4	009 sccp p/s	10.2
009 sccp	50.7	2Lm 16 csc p/s	26.1	009 sccp	16.8	2Lm 16 csc p/s	8.8
2Lm 16 sccp p/s	48.2	009 sccp	25.1	2Lm 16 csc p/s	16.0	009 sccp	8.5
009 sccp p/s	46.9	18008 sccp	20.7	18008 sccp	12.9	18008 sccp	6.1

[0290] 恶性 B 淋巴样细胞

[0291] 使用 5 种人 B 淋巴瘤细胞系 (BCL) 的实验对象组检查抗 CD20018011、TRU-015 和 **RITUXAN®** 的结合: NU-DHL1、Ramos、SU-DHL4、SU-DHL5 和 WSU-DLCL2。这些细胞系各自来自不同的非霍奇金氏 B 细胞淋巴瘤患者。简言之, 使浓度渐增的 CD20 结合剂与 100,000 BCL 一起于 4°C 温育 30 分钟。细胞随后用包含 1% BSA 的 PBS 洗涤 2 次, 以去除未结合的抗体, 并且随后在 4°C 下加入 FITC 标记的山羊抗人 (H+L) 次级抗体 (100 倍稀释) 30 分钟。细胞再次洗涤 2 次, 以去除未结合的次级抗体, 并且随后重悬浮于具有 1% BSA 的 1% 甲醛 (在 PBS 中) 中。使用 Becton Dickinson FACSORT 流式细胞仪测量每种样品的荧光强度。结果表示为荧光强度的几何平均值 (GeoMean)。

[0292] 图 2 显示了在 5 种细胞系中的结果。018011 证实与这些细胞系中每个的剂量依赖性结合。018008 和 2Lm20-4 也与 5 种细胞系结合 (数据未显示)。018011 与 Ramos 和 SWU-DLCL2 细胞的结合根据实施例 5 中的方案通过免疫荧光法 (IFA) 加以证实

[0293] 实施例 2: 抗 CD20SMIP 的补体依赖性细胞毒性测定法

[0294] Ramos 细胞

[0295] 为了测定人抗 CD20SMIP 的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 水平, 使 Ramos 细胞与抗 CD20SMIP 在 10% 人血清 (Quidel) 的存在下一起于 37°C 温育 3.5 小时。通过测量从细胞的 LDH 释放评估细胞死亡 (Promega 试剂盒)。

[0296] 如图 3A 中所示, **RITUXAN®**、TRU-015、2LM 20-4、018008 和 018011 具有针对人 Ramos B 细胞的相当的 CDC 活性。

[0297] 表 3- 对具有 P/S 突变 SMIP 的 Ramos 细胞的 CDC

[0298]

10 ug/ml		1.1ug/ml		0.37 ug/ml		0.12 ug/ml	
	裂解%		裂解%		裂解%		裂解%
2Lm 16 sccp p/s	85.7	2Lm 19-3 sccp	58.1	Rituxan	60.2	Rituxan	56.5
009 sccp p/s	83.0	18008 sccp	57.1	18008 sccp	47.9	18008 sccp	32.2
Rituxan	82.5	Rituxan	57.1	2Lm 20-4 sccp	45.4	2Lm 19-3 sccp	30.5
2Lm 19-3 sccp p/s	80.3	TRU-015	56.1	2Lm 19-3 sccp	40.8	2LM 20-4 sccp	20.0
18008 sccp	72.5	2Lm 20-4 sccp	52.9	TRU-015	38.8	TRU-015	16.3
TRU-015	67.7	009 sccp	50.3	009 sccp	26.1	009 sccp p/s	11.4
2Lm 20-4 sccp p/s	66.3	2Lm 20-4 sccp p/s	28.3	009 csc p/s	18.8	009 sccp	11.2
2Lm 20-4 sccp	63.2	009 sccp p/s	23.4	009 sccp p/s	12.7	2Lm 16 sccp p/s	9.5
2Lm 19-3 sccp	60.1	2Lm 19-3 sccp p/s	21.3	2Lm 19-3 sccp p/s	12.4	009 csc p/s	9.3
2Lm 16 csc p/s	56.6	2Lm 16 sccp p/s	18.3	2Lm 20-4 sccp p/s	12.3	2Lm 20-4 sccp p/s	8.9
009 sccp	56.4	2Lm 16 csc p/s	16.5	2Lm 16 sccp p/s	11.5	2Lm 16 csc p/s	8.9
009 csc p/s	40.9	009 csc p/s	16.2	2Lm 16 csc p/s	9.2	2Lm 19-3 sccp p/s	8.8

[0299]

100 nm		11 nm		4 nm		1 nm	
裂解%		裂解%		裂解%		裂解%	
2Lm 16 sccp p/s	107.1	18008 sccp	66.7	Rituxan	65.1	Rituxan	67.6
009 sccp p/s	98.5	Rituxan	66.3	18008 sccp	61.4	18008 sccp	50.0
2Lm 19-3 sccp p/s	92.7	2Lm 20-4 sccp	65.5	2Lm 20-4 sccp	56.9	2Lm 20-4 sccp	36.1
009 sccp	88.3	2Lm 19-3 sccp	61.3	2Lm 19-3 sccp	51.7	2Lm 19-3 sccp	29.7
2Lm 20-4 sccp p/s	87.2	009 sccp	55.7	009 sccp	38.0	009 sccp p/s	27.0
TRU-015	86.1	TRU-015	49.7	TRU-015	26.2	2Lm 16 sccp p/s	22.9
2Lm 20-4 sccp	82.0	2Lm 20-4 sccp p/s	27.1	009 sccp p/s	21.3	2Lm 16 csc p/s	22.5
Rituxan	81.9	2Lm 16 sccp p/s	24.7	2Lm 16 sccp p/s	19.6	009 sccp	20.9
2Lm 19-3 sccp	79.7	009 sccp p/s	23.8	2Lm 19-3 sccp p/s	18.5	2Lm 19-3 sccp p/s	20.5
18008 sccp	73.9	2Lm 19-3 sccp p/s	22.2	2Lm 20-4 sccp p/s	17.4	TRU-015	19.8
2Lm 16 csc p/s	69.2	2Lm 16 csc p/s	17.0	009 csc p/s	16.4	009 csc p/s	18.7
009 csc p/s	64.3	009 csc p/s	16.0	2Lm 16 csc p/s	14.3	2Lm 20-4 sccp p/s	15.1

[0300] 原代 B 细胞

[0301] 同样使用阴性选择 B 细胞分离试剂盒 (StemCell Technologies) 从血沉棕黄层中分离原代 B 细胞。使 5×10^5 个 B 细胞与抗 hCD55 抗体 (2ug/ml) 一起于 37°C 预温育 10 分钟。随后加入抗 CD20SMIP 和血清 (10%:Quidel)。温育 3.5 小时后,通过 7-AAD 染色和 FACS 分析评估细胞死亡。

[0302] 如图 3B 中所示,TRU-015、**RITUXAN®**和 2LM 20-4 具有针对原代 B 细胞的相当的 CDC 活性。当加入 IgG 对照时,未检测出针对原代 B 细胞的 CDC 活性。

[0303] SU-DHL4B 细胞和 BJAB 细胞

[0304] 还研究了人源化抗 CD20SMIP 介导针对 SU-DHL4B 细胞淋巴瘤细胞的 CDC 的能力,其中使用新鲜的人血清作为补体来源。收集人全血并且允许在室温下凝固 60 分钟,这之后离心试管以收集血清用于 CDC 分析。在这个研究中,CD20 特异性 TRU-015 和**RITUXAN®**用作阳性对照,并且 HER2 特异性曲妥珠单抗用作同种型匹配的非结合对照。

[0305] SU-DHL4B 细胞在 96 孔平板中与多种量的 CD20 结合剂一起铺平板。向每个孔中加入由健康志愿者的血液制备的稀释人补体 (1 : 100)。测试以 100 μ l/孔的最终体积一式三份地进行,其中单独的培养基、单独的细胞、单独的 CD20 结合剂和单独的补体全都用作对照。于 37°C 温育 4 小时后,从培养箱中取出平板并且平衡至 22°C (约 20-30 分钟)。

[0306] LDH 释放测定法

[0307] CYTOTOX-ONE™ 荧光测定法估计在细胞毒性测定法中的非存活细胞数目。它允许快速荧光测量从具有损害细胞膜的细胞中释放的乳酸脱氢酶 (LDH)。释放到培养基内的 LDH 用 10 分钟偶联酶促测定法进行测量,所述测定法导致刃天青转换成试卤灵。荧光试卤灵产物的产生与 LDH 的量成比例。

[0308] 简言之,将等体积的 CYTOTOX-ONE™ 加入每个孔中,轻轻振荡 30 秒,并且进一步于 22°C 温育 10 分钟。作为阳性对照,加入 2 μ l 裂解缓冲液/孔 (一式三份地),以产生来自细胞的最大 LDH 释放。温育 10 分钟后,通过添加 50 μ l 停止液来停止酶促反应,并且使平板轻轻振荡 10 秒。用荧光计在 560nm 的激发波长和 590nm 的发射波长处测量荧光。

[0309] 通过下式计算细胞毒性百分比:

[0310]

$$\text{裂解 \%} = 100 \times \frac{(\text{实验释放} - \text{本底释放})}{(\text{最大释放} - \text{本底释放})}$$

[0311] 如图 4 中所示,018011 能够与来自 2 个分开供体的人补体和 SU-DHL4B 细胞一起介导 CDC。这个 CDC 效应与 018011、TRU-015 和 **RITUXAN®** 的浓度成比例。来自 2 个供体之一的补体较不支持 018011 的 CDC 活性,这看起来低于 **RITUXAN®** 的情况。对于 018011 这个观察的意义不明。

[0312] 在使用 BJAB 细胞作为靶细胞群体的相似研究中,018011 和 TRU-015 都产生针对 BJAB 细胞的、等价的浓度依赖性补体介导的细胞毒性 (图 4)。

[0313] 实施例 3:抗 CD20SMIP 的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 测定法

[0314] 使用许多不同的靶细胞测定抗 CD20SMIP 的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) (也称为 FcCC) 的水平。

[0315] BJAB 淋巴瘤细胞

[0316] 在一个实验中,用 0.5uM CFSE 标记 BJAB 淋巴瘤细胞。随后使标记细胞与抗 CD20 结合剂一起温育 15 分钟,随后添加活化的 PBMC (其先前用 IL-2 和 IL-12 刺激过夜)。温育 6 小时后,用 PI 染色 CFSE 靶细胞 (CFSE⁺),并且使用流式细胞术评估细胞死亡。

[0317] 如图 5 中证实的,**RITUXAN®**、TRU-015 和 2LM20-4 介导相当的 ADCC 活性。使用 ⁵¹Cr 标记的 BJAB 细胞的其他实验证实 018008 和 018011 的 ADCC 活性 (数据未显示)。

[0318] Ramos B 细胞和 SU-DHL4

[0319] 效应子细胞的制备

[0320] 通过密度梯度离心使用 (Lymphoprep™ Axis-Shield PoC AS, Norway) 分离 PBMC。将全血收集在包含抗凝剂 (肝素) 的试管中。通过添加等体积的 0.9% NaCl 稀释血液,并且随后将 6ml 稀释血液铺层在 15ml 圆锥管中的 3ml Lymphoprep 溶液上,并且以 800xg 在室温下离心 20 分钟。从界面处回收的单核细胞进行洗涤,并且在 ADCC 和 FcCC 测定法中使用。

[0321] ADCC 方案

[0322] 效应子和靶细胞以 50 : 1 的比在 96 孔平板中铺平板,其中将多种浓度的 CD20 结合剂加入合适孔中。以 100 μl/孔的最终体积一式三份地进行测试,其中单独的培养基、单独的效应子细胞、单独的靶细胞和单独的 CD20 结合剂作为对照。如上文在 CDC 测定法中所述测量荧光信号。

[0323] 结果

[0324] 将 018011 促进 Fc 介导的细胞毒性 (FcCC) 的能力针对 CD20+SU-DHL4 和 Ramos BCL 进行评估。此外,在这个评估中使用 TRU-015、**RITUXAN®** 和抗 HER2 曲妥珠单抗 (用作同种型匹配的非结合对照 Fc)。来自正常健康供体的新鲜分离的 PBMC 在这个评估中用作效应子细胞的来源。PBMC 包括能够介导 FcCC 的 Fc γ R3/CD16+NK 细胞。除 NK 细胞外,在 PBMC 中的单核细胞也表达 Fc γ R,并且具有造成 FcCC 的能力。图 6 呈现来自使用 CD20+SU-DHL4 和 Ramos B 淋巴瘤细胞的实验的结果。CD20 结合试剂各自能够使用人效应子细胞以剂量依赖性方式介导 FcCC。

[0325] 使用其他人源化 CD20 结合分子的相似实验显示对 Ramos B 细胞的 ADCC 活性 [图

11]。

[0326] 表 4 人源化抗 CD20SMIP 的排序

[0327]

Ramos ADCC	Farage ADCC
TRU-015	2 LM 16 SCCP
2LM 19-3 SCCP	018008 SCCP
018008 SCCP	TRU-015
2LM 19-3 CSCS	2 LM 19-3 CSCS
2 LM 16 SCCS	2 LM 19-3 SCCP
2 LM 20-4 CSCS	2 LM 20-4 CSCS
2 LM 16 CSCS	2 LM 16 CSCS
RITUXIMAB	2 LM 16 SCCS
018009 SCCS	RITUXIMAB
018009 CSCS	018011 CSCS
018009 SCCP	2 LM 20-4 SCCP
018011 SCCS	018011 SCCS
018011 CSCS	018011 SCCP
2 LM 16 SCCP	018009 CSCS
018011 SCCP	018009 SCCS
2 LM 20-4 SCCP	018009 SCCP
018008 CSCS	018008 CSCS

[0328] 实施例 4 抗 CD20SMIP 的药代动力学和药效学研究。

[0329] 为了研究抗 CD20SMIP 的药代动力学和药效学,在食蟹猴中进行 26 周 IV 推注药代动力学研究。根据下述处理成年雌性食蟹猴:

[0330] 表 5

[0331]

处理组	测试物品	剂量水平 (mg/kg)
1	Rituxan	1
2		10 (动物经历 BM 抽吸, LN 活组织检查)
3		10
4	2LM 20-4	1
5		10 (动物经历 BM 抽吸, LN 活组织检查)
6		10
7	2LM 20-4	1
8	mut Fc (减弱的 CDC)	10 (动物经历 BM 抽吸, LN 活组织检查)
9		10

[0332] 从动物组中获得血液样品、淋巴结活组织检查和骨髓抽吸物,以研究测试物品药代动力学。对全血和血清样品实施血液学、流式细胞术和 PK 分析;对淋巴结活组织检查实施流式细胞术和免疫组织化学分析;通过流式细胞术分析骨髓抽吸物。

[0333] 动物的临床观察是正常的,测试物品无一与不利征候相关。此外,注意到血红素水平以及血小板、单核细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞计数不受测试物品影响。

[0334] 外周血的流式细胞术分析显示用 10mg/kg 2LM 20-4(野生型)或 2LM 20-4mut Fc 处理的那些组显示 CD19⁺B 细胞的强和长效消除(图 8)。用 2LM 20-4、2LM 20-4mut Fc 和 Rituxan 处理的组显示外周 CD19⁺B 细胞的相当的耗尽。

[0335] 骨髓的流式细胞术分析揭示用 2LM 20-4、2LM 20-4mut Fc 和 Rituxan 处理的组证实第 8 天时骨髓 CD19⁺B 细胞的相当的耗尽(图 9)。然而,在第 22 天时,与用 2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 处理的组比较,Rituxan 处理的组具有显著更高数目的 CD19⁺B 细胞(图 9)。

[0336] 淋巴结的流式细胞术分析揭示在第 8 天和第 22 天时,与 2LM 20-4mut Fc 比较,2LM 20-4 证实更佳的功效(图 10)。2LM 20-4 显著减少淋巴结 CD19⁺B 细胞的相对百分比。

[0337] 在 IV 施用后在食蟹猴中还获得 2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 的药代动力学(PK)数据。当以 10mg/kg 施用时,2LM 20-4 和 2LM 20-4 都显示缓慢的消除速率,伴随对于 2LM 20-4 的 7.2 ± 0.6 天半衰期,和对于 2LM 20-4mut Fc 的 5.5 ± 2.4 天半衰期(图 11)。分配的体积很小,约 40-70ml/kg。存在关于 1-20mg/kg 剂量范围的非线性 PK 的某些证据。2LM 20-4 和 2LM 20-4mut Fc 的 PK 谱与 Rituxan 和 TRU-015 的 PK 谱相当。

[0338] 总之,我们证实人源化抗 CD20SMIP,特别是 2LM 20-4,显示如果不比 Rituxan 更佳,也与 Rituxan 相当的 B 细胞耗尽功效。

[0339] 实施例 5. 体外研究

[0340] A. CD20 特异性 018011 针对皮下或系统性播散性人 B 细胞淋巴瘤异种移植物的体外评估

[0341] 检查 018011 针对在裸鼠中生长的人 B 细胞淋巴瘤异种移植物的临床前抗瘤功效。018011 抑制建立的皮下 B 淋巴瘤异种移植物的生长,并且引起在小鼠中建立的 B 细胞淋巴瘤异种移植物的退行。在 018011 的抗瘤活性中不存在明确的剂量应答关系。在播散性 B 细胞淋巴瘤的小鼠模型中,当在疾病过程的早期施用时,018011 保护具有系统性播散性 B 细胞淋巴瘤的 scid 小鼠不受后肢麻痹和死亡。

[0342] 测试和对照分子

[0343] CD-20 结合分子

[0344] 使 018011(溶解于 20mM 磷酸钠、240mM 蔗糖, pH 6.0 中的 3.1mg/ml 或溶解于 10mM 组氨酸、5% 蔗糖, pH 6.0 中的 4.09mg/ml) 和 TRU-015 贮藏于 -80℃。利妥昔单抗(**RITUXAN®**) 得自 MedWorldPharmacy(Chestnut Ridge, NY)。在使用前使药物在磷酸盐缓冲盐水中稀释。

[0345] 细胞系

[0346] B 细胞淋巴瘤(BCL)系 Ramos(CRL-1596)得自美国典型培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA)。弥散性大 B 细胞淋巴瘤系 WSU-DLCL2(ACC-575)得自 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ Braunschweig, Germany)。通过 DNA 荧光染料染色测定法(Bionique Testing Laboratories, Saranac Lake, NY)测定细胞不含支原体。使细胞维持在补充有 10% 胎牛血清(FBS)、10mM HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸)、1mM 丙酮酸钠、0.2% 葡萄糖、青霉素 G 钠(100U/ml)、硫酸链霉素(100 μg/ml)和 L-谷

氨酰胺 (2mM) 的 RPMI 1640 培养基中。在使用前,使用 Lymphoprep (Axis Shield PoC AS, Oslo, Norway) 密度梯度通过离心 (在 1000xg 下 30 分钟) 分离活细胞。

[0347] 动物

[0348] 雌性、BALB/c 和 nu/nu (裸) 鼠 (18-23g) 和 CBL7scid 雄性小鼠 (18-23g) 得自 Charles River Laboratories, Wilmington, MA。所有小鼠饲养在微型隔离单元中,并且在研究自始至终无限地提供无菌食物和水。

[0349] 皮下 BCL 异种移植

[0350] 对雌性、无胸腺 (裸) 鼠植入 Ramos 或 WSU-DLCL2 皮下异种移植。在 Ramos BCL 的肿瘤植入前,使另外一组小鼠暴露于全身照射 (400rads),以进一步抑制其残留免疫系统。在背侧、右肋腹中给小鼠注射悬浮在 Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, 在 RPMI 1640 培养基中 1 : 1 稀释) 中的 1×10^7 个 Ramos 细胞或 5×10^6 个 WSU-DLCL2 细胞。当肿瘤达到合适的质量 (通常 $> 100\text{mg}$) 时,在施用治疗前,给它们分期以使肿瘤质量的一致性达到最大 ($n = 8-10$ 只小鼠 / 处理组)。化合物在无菌盐水 (0.2ml/小鼠) 中 iv 或 ip 施用。为了考虑 018011 和 **RITUXAN®** 之间在分子量上的差异,调整给小鼠施用的每种药物的剂量,以使得每种蛋白质的摩尔等价。因此,施用的 **RITUXAN®** 量是施用的 018011 量的约 137%。每周至少一次测量肿瘤的长度和宽度 (以 cm 表示),并且通过下述计算肿瘤质量: 肿瘤质量 (g) = $[0.5 \times (\text{肿瘤宽度}^2) (\text{肿瘤长度})]$ 。计算关于每个处理组的平均 ($\pm \text{sem}$) 肿瘤质量,并且使用 ANOVA 就统计显著性与媒介物处理组比较和通过单尾 t 检验与媒介物处理组的后续配对比较,其中关于 t 检验的误差项基于跨越所有处理组的合并方差。记录关于每个处理组的肿瘤质量值直至处理开始后 100 天或直至肿瘤生长至体重的 15%,在这时根据机构规程对这些小鼠实施安乐死。记录在每个研究结束时无肿瘤小鼠的数目。描绘小鼠的存活,并且通过肿瘤质量进行测定;对于存活曲线的计算,具有肿瘤质量 $\geq 1.5\text{g}$ 的任何小鼠视为死亡,即使小鼠直到肿瘤质量达到小鼠体重的 15% 才根据机构指导方针被杀死。

[0351] 针对播散性 BCL 的抗癌功效的评估

[0352] 用 3×10^6 个 Ramos 细胞或 5×10^6 个 WSU-DLCL2 细胞以 0.2ml 的体积在尾静脉中对雄性 scid 小鼠进行静脉内注射。在药物疗法开始前,允许细胞的散布和生长的发生经过 3 天 (命名为发展模型)、6 天 (命名为中间模型) 或 9 天 (命名为建立模型) 的时间段。在指定天数时给具有播散性疾病的小鼠 (9-13 只小鼠 / 处理组) iv 施用媒介物 (PBS)、018011、TRU-015 或 **RITUXAN®**。每天就后肢麻痹或死亡的出现监控具有播散性疾病的小鼠直至 100 天。根据机构规程,对显示后肢麻痹的小鼠通过 CO_2 窒息实施安乐死。

[0353] 对于每个组计算平均存活时间 (天数 $\pm \text{SD}$)。通过使用非参数法测定在组间在存活分布中的差异,比较患病小鼠的存活分布。使用级转化操作 (rank transformation procedure) 执行多重比较。级转化操作由用其级替换存活时间并对级应用通常的参数 F 检验组成。使用 Tukey's 方法对级执行多重比较。Tukey's 方法指示小鼠中在存活时间中的差异,其中报告的显著性在 0.05 水平。使用 Kaplan-Meier 方法 (J Am Stat Assoc 1958; 53:457-81) 构建存活曲线。

[0354] 从具有播散性 Ramos BCL 的某些 scid 小鼠中收集来自股骨的骨髓细胞,并且就人 CD19 或鼠类 CD45 抗原的表达进行评估,这是通过与对照 FITC 标记的大鼠 IgG2A、FITC 标

记的小鼠 IgG1、FITC 标记的大鼠抗小鼠 CD45 或 FITC 标记的小鼠抗人 CD19 (所有 FITC 标记的试剂都来自 BD Pharmingen, San Diego, CA) 一起温育。使细胞形成团块,用 PBS-1% BSA 洗涤,并且随后用 1% 甲醛固定。在 FACSsort 流式细胞仪上就人 CD19 表达细胞的存在或不存在分析样品。人 CD19+ 细胞的数目显示为基于通过表达 CD45 常见白细胞抗原而鉴定的淋巴样细胞的正面和侧面光散射性质特征门控的细胞群体总数目百分比。

[0355] 在这个研究中使用的动物在表 5 中列出。

[0356] 表 6 :所使用的小鼠的说明

特征	说明
物种:	小鼠
品系:	Balb/c, nu/nu, CB17 scid
来源:	Charlse River, Wilmington, MA
动物数目/组:	8-13
[0357] 动物总数目:	492
年龄和性别:	6-8 周大, Balb/c 和 nu/nu(雌性), CB17 scid (雄性)
重量:	18g 25g
接受日期:	2006 年 4 月 10 日
顺应期:	最低限度 1 周

[0358] 结果

[0359] 018011 对 Ramos 皮下异种移植物的作用

[0360] 媒介物、018011 (4mg/kg iv) 或 **RITUXAN®** (5.5mg/kg iv) 以摩尔等价剂量施用于具有建立的 Ramos 异种移植物的 Balb/c 小鼠。随着时间的个别小鼠的肿瘤质量显示于图 12 中 (描绘的结果合并自 2 个分开研究) 和存活 (基于肿瘤质量 < 1.5g) 显示于图 13 中。在使用 nu/nu 裸鼠进行的另一个研究中,媒介物、018011 (8mg/kg ip)、TRU-015 (8mg/kg ip) 或 **RITUXAN®** (11mg/kg ip) 以摩尔等价剂量施用于具有建立的 Ramos 异种移植物的 nu/nu 小鼠。

[0361] 在 Balb/c 小鼠中建立的 Ramos 异种移植植物模型中检查 018011 和 **RITUXAN®** 的剂量应答活性,并且在 nu/nu 小鼠中建立的 WSU-DLCL2 异种移植植物模型中检查 018011、**RITUXAN®** 和 TRU-015 的剂量应答活性 (表 7)。在 2 个研究中,所有化合物以每隔一日 5 个剂量 (周末除外) 通过药物施用的 ip 途径进行施用。记录无肿瘤小鼠的数目 (对于 Ramos 研究第 50 天,并且对于 WSU-DLCL2 研究第 100 天)。

[0362] 表 7 018011、TRU-015 和利妥昔单抗对 Ramos 和 WSU-DLCL2 异种移植物的作用

[0363]

处理	Ramos		WSU-DLCL2	
	第 50 天		第 100 天	
	剂量 (mg/kg ip)	无肿瘤小鼠 (无肿瘤/全部小鼠)	剂量 (mg/kg ip)	无肿瘤小鼠 (无肿瘤/全部小鼠)
媒介物		1/10		3/10
018011	2	3/10	1	7/9
	4	0/10	2	2/9
	8	5/10	4	7/8
	16	3/10	8	6/8
利妥昔单抗	2.8	1/10	1.4	6/8
	5.5	3/10	2.5	4/8
	11	3/10	5	7/8
	22	3/10	11.6	5/8
TRU-015			1	4/8
			2	4/9
			4	6/8
			8	3/8

[0364] 018011、TRU-015 和利妥昔单抗对 Scid 小鼠中的播散性淋巴瘤的作用

[0365] 评估了 018011、TRU-015 和 **RITUXAN®** 延长具有系统性播散性 B 淋巴瘤的 CB17scid 小鼠的存活的能力。在这个模型中, CD19+CD20+Ramos B 淋巴瘤细胞的静脉内注射允许它们快速播散到各个器官包括中枢神经系统内, 最终引起后肢麻痹和死亡 (Clin Can Res 2004 ;10 :8620-9)。在发展 (早) 期过程中 (治疗在 Ramos 细胞播散后 3 天开始)、在疾病的中间期 (治疗在肿瘤细胞播散后 6 天开始) 或播散疾病的建立 (晚) 期 (治疗在播散后 10 天开始) 过程中, 在具有播散性 Ramos B 淋巴瘤的 scid 小鼠中 iv 施用化合物。如图 16 中所示, 在播散性疾病的发展期 (第 3 天开始) 过程中, 等摩尔剂量的 018011、TRU-015 或 **RITUXAN®** (分别为 2mg/kg、2mg/kg 和 2.8mg/kg) 的施用导致针对发展的播散性疾病的显著保护。018011、TRU-015 或 **RITUXAN®** 的施用延迟至播散后 10 天导致每种蛋白质的保护活性的显著丧失。在疾病的建立时期过程中, 每种化合物给予 5 个剂量 (与发展期中的 3 个剂量和中间期的 4 个剂量形成对比), 并且 4 倍于发展期中施用的剂量 (对于 018011、TRU-015 和 **RITUXAN®** 分别为 8mg/kg、8mg/kg 和 11.2mg/kg)。即使在这些更高和更延长的给药下, 每种化合物在建立的疾病中的活性显著小于在播散模型的发展期过程中的活性。这些结果说明 018011、TRU-015 和 **RITUXAN®** 在 Ramos 播散性疾病模型中, 针对发展疾病比建立疾病更有效。

[0366] 从具有 Ramos 播散性疾病的小鼠中收集的骨髓就播散性人 CD19+Ramos 细胞的存在进行检查。来自具有播散性疾病的、媒介物处理的小鼠的大多数骨髓衍生的淋巴样细胞表达 CD19 抗原, 指示在骨髓中存在人淋巴样细胞。在播散性疾病过程的早期中 (BCL 播散后 3 天开始), 用 018011、TRU-015 或 **RITUXAN®** 处理使骨髓中的人 CD19+ 细胞百分比减

少至 < 10% (图 17)。在早期处理组中的这些小鼠无一呈现后肢麻痹。从疾病过程的建立期 (BCL 播散后 10 天开始) 中处理的小鼠骨髓中分离的淋巴样细胞接近 30% 表达人 CD19 抗原。在这个晚期处理组中的小鼠经历后肢麻痹。人 B 淋巴瘤细胞在骨髓中的扩展可能指示这些患病小鼠中的疾病进展程度。

[0367] 在 WSU-DLCL2 弥散性大 B 细胞淋巴瘤播散性疾病模型中研究 018011、**RITUXAN®** 和 TRU-015 的作用。对于发展模型在肿瘤细胞注射后第 3 天时开始 iv 施用治疗性蛋白质, 总共 3 个剂量, 而对于建立模型在第 10 天开始 iv 施用治疗性蛋白质, 总共 5 个剂量。蛋白质以等价摩尔剂量进行施用。当在疾病过程中早期 (发展期) 施用时, 018011 显著 ($p < 0.05$ 对媒介物处理的小鼠) 保护小鼠不受肿瘤细胞诱导的后肢麻痹 (图 18), 而 TRU-015 的作用接近统计显著性 ($p = 0.073$ 对媒介物处理的小鼠)。**RITUXAN®** 的作用在发展期中不显著, 当在疾病的建立期施用时, 3 种蛋白质中任何一种的作用都不显著。这些结果类似于当化合物在疾病的建立期过程中施用时在 Ramos 播散性模型中观察到的那些。

[0368] 静脉内和腹膜内施用的 018011 对 Ramos 皮下异种移植物的作用

[0369] 在 iv 和 ip 药物施用后比较 018011 (8mg/kg) 的抗癌活性。在肿瘤分期 (Balb/c 小鼠) 后每隔一日 5 次给予 018011, 并且监控它的抗癌活性。2 种药物施用途径都显著 ($p < 0.05$) 抑制肿瘤生长 (图 19)。将 ip 施用的 018011 的抗癌活性维持比 iv 施用的 018011 的抗癌活性更长的时间。这个研究证实 ip 或 iv 施用的 018011 在抑制人 B 细胞淋巴瘤异种移植物的生长方面有效。

[0370] 018011 和利妥昔单抗对照射和未照射的裸鼠中的皮下异种移植物的作用

[0371] γ 照射可以抑制先天免疫系统, 促进肿瘤异种移植在免疫缺乏的裸鼠中的建立。根据照射还可以影响能够介导治疗性抗体的抗癌活性的效应子细胞的可能性, 在照射 (4Gy 等价于 400rads) 或未照射的 Balb/c 裸鼠中评估 018011 和 **RITUXAN®** 针对 Ramos B 淋巴瘤异种移植物的抗癌活性。在照射和未照射的小鼠中都建立 Ramos 异种移植。在照射和未照射的小鼠中, 018011 (8mg/kg ip) 和 **RITUXAN®** (11.2mg/kg ip) 各自能够显著 ($p < 0.05$ 对媒介物处理的小鼠) 抑制 Ramos B 淋巴瘤异种移植物的生长 (图 20)。与在未照射的小鼠中观察到的比较, 在照射小鼠中肿瘤更快速地生长并且每种化合物的抑制作用不够强。这些结果暗示宿主的照射可能负面影响免疫治疗剂例如 018011 或 **RITUXAN®** 的治疗活性, 所述免疫治疗剂依赖于免疫系统的效应子细胞的功能完整性。照射影响 018011 的治疗活性的机制仍未研究。

[0372] 结论

[0373] 018011 在临床前模型中作为抗肿瘤剂起作用。它抑制建立的皮下 B 淋巴瘤异种移植物的生长, 并且当在疾病过程中较早而不是较晚施用时, 保护具有播散性 B 细胞淋巴瘤的小鼠。

[0374] B. HuCD20SMIP 在裸鼠中建立的 Ramos 肿瘤异种移植模型中的功效

[0375] 下述实验测试了人源化 CD20 特异性 SMIPS (HuCD20SMIPS) 在裸鼠中建立的 Ramos 肿瘤异种移植模型中的功效。实验一式三份地进行 (在此称为 (A)、(B) 和 (C))。使用 7.5-8 周大的 Athymic Nude-Foxn1nu 小鼠 (Harlan Livermore, CA)。

[0376] Ramos 肿瘤异种移植物的建立且分选成处理组

[0377] Ramos 细胞是衍生自伯基特淋巴瘤的 CD20⁺ 人 B 类成淋巴细胞细胞系。将五百万

Ramos 细胞皮下注入雌性无胸腺 nu/nu 小鼠的胁腹内。在肿瘤接种后第 6 天时,在大多数小鼠中出现可触知肿瘤。将荷瘤小鼠分选成具有等价平均肿瘤体积的组 ($n = 8/\text{组}$; 对于每个组 2 个笼,每笼 4 只小鼠)。分选当天定义为研究的第 0 天。用测径器测量肿瘤,并且使用下式计算肿瘤体积: $V = 1/2[\text{长度} \times (\text{宽度})^2]$ 。关于这个实验的基线平均肿瘤体积是 228mm^3 (A) 和 (B) 或 227mm^3 (C); 中值基线肿瘤大小是 228mm^3 (A)、 233 (B) 或 225mm^3 (C); 并且范围是 $180\text{--}281\text{mm}^3$ (A)、 $168\text{--}300\text{mm}^3$ (B) 或 $157\text{--}300\text{mm}^3$ (C)。

[0378] 用于体内使用的试剂。

[0379]

试剂	来源和批号	浓度和内毒素	用于注射的制剂
PBS	Gibco, 14190	1X 浓度 <0.03 EU/mL	NA
人 IgG (huIgG)	Sigma, I 4506	10 mg/mL 内毒素 = 10 EU/mg	在研究的第 0 天 时,在左侧列出的 每种蛋白质试剂在
018008	内部的	2.79 mg/mL 内毒素 <0.25 EU/mg	PBS 中稀释至 0.5 mg/mL。
2Lm20-4	内部的	2.79 mg/mL 内毒素 <0.25 EU/mg	
018011	内部的	3.1 mg/mL 内毒素 <0.25 EU/mg	
TRU-015	内部的	10.2 mg/mL 内毒素 <0.05 EU/mg	

[0380]

[0381] 不知情方案 (blinding protocol)

[0382] 以相似体积制备 PBS 和蛋白质 (药物) 溶液,并且在可去除标记上注明试管的内容物。未处理或评估小鼠的研究者在每个试管上放置颜色编码,并且在实验室笔记中注明试管内容物的编码和身份。用这种设计减少但并未消除研究者偏见的可能性,因为执行研究的研究者仅是部分“不知情的”,因为他们不了解特定小鼠组接受何种处理,但的确了解在一组 2 个笼内的所有小鼠都属于相同组。在研究结束时揭开编码;然而,知道编码的研究

者能够在中间基础上监控研究结果。

[0383] 体内处理

[0384] 在第 0、2、4、6 和 8 天,用在 0.2mL 体积中的 100 μ g 人 IgG、TRU-015、018008、018011 或 2Lm20-4 静脉内 (IV) 注射小鼠。PBS 和药物溶液如上所述进行颜色编码。

[0385] 监控和终末点

[0386] 通过目视检查每天监控小鼠。测定重量,并且通过对处理组不知情的观察者(参见上文)用一对测径器每周至少 3 次测量肿瘤 (M、W、F)。如上所述计算肿瘤体积。在所有组中的所有小鼠都活着的最后一天时的肿瘤体积也就相对于第 0 天的肿瘤体积而言进行表示,使用下式:

[0387]

$$\text{目的天数时的相对肿瘤体积} = \frac{(\text{目的天数时的体积} - \text{第 0 天时的体积})}{\text{第 0 天时的体积}}$$

第 0 天时的体积

[0388] 在研究中的其余小鼠不具有可触知肿瘤时,重量和肿瘤监控天数变成每周一次。如果肿瘤达到超过 1500mm³,那么处死小鼠。应注意死亡不是肿瘤方案中的终末点,并且除非另有说明,小鼠的“存活”由其处死的时间决定。

[0389] 研究在第 90 天时结束。

[0390] 统计分析

[0391] 所有统计分析使用 GraphPad Prism 软件来进行。使用单向 ANOVA 用 Dunnett's 多重比较事后检验(用于与 huIgG 对照的比较)和 Tukey's 多重比较事后检验(用于所有其他配对比较)测定在第 8 天时的平均肿瘤体积或平均相对肿瘤体积中的显著性差异。使用 Kaplan-Meier 存活分析、用于比较存活曲线的时序检验测定随着时间的小鼠存活中的显著性差异。使用 Fisher's 精确检验测定在观察期结束时的无肿瘤小鼠发生率中的显著性差异。p 值 < 0.05 视为显著的。

[0392] 结果

[0393] 用 TRU-015 或用 3 种 HuCD20SMIPS (018008、018011 和 2Lm20-4) 中的任何一种处理小鼠导致相对于对照的肿瘤生长减慢和 / 或相对于基线测量的肿瘤体积减少(图 21-23)。在第 8 天时 huIgG 处理组的平均肿瘤体积和平均相对肿瘤体积显著不同于 TRU-015、018008 和 2Lm20-4(仅 (C)) 处理组,这是所有小鼠都活着的最后一天(图 22A-22B)。huIgG 处理组和其他 HuCD20SMIP 处理组之间或在任何 2 个 HuCD20SMIP 处理组之间在平均肿瘤体积或相对肿瘤体积中不存在显著性差异。在第 8 天时开始处死小鼠;因此在稍后时间点时未进行肿瘤体积的比较。

[0394] 当肿瘤体积达到上文提及的限制时,处死小鼠。未发现小鼠死亡并且没有一只由于极端重量减轻、肿瘤溃疡形成或活动性受损而处死,因此“存活”时间是肿瘤生长速率的另一个量度。如图 23 中显示和表 8 中概括的, huIgG 对照组中的中值存活时间为 10 天。相反,相对于对照组,在各其他小鼠组中的中值存活时间显著增加。在 TRU-015、018008、018011 和 2Lm20-4 处理组中小鼠的中值存活时间分别为 24.0、88.5、20.5 和 20.5 天 (A), 22.0、50.0、11.5 和 13.5 天 (B), 或 40.5、52、16 和 83 天 (C)。这些组的任何 2 个之间在中值存活时间中不存在显著性差异(表 8)。

[0395] 8 只 huIgG 处理的小鼠在 90 天观察期结束时无一活着,并且因此在第 90 天时这个

组的无肿瘤发生率是 0/8 (图 24 和表 8)。在观察期结束时的无肿瘤小鼠发生率在 TRU-015 处理组中是 2/8(25%) (A) 或 1/8(12.5%) (B) 和 (C); 在 018008 处理组中是 4/8(50%) (A)、3/8(37.5%) (B) 和 (C); 在 018011 处理组中是 1/8(12.5%) (A) 和 (B) 或 2/8(25%) (C), 并且在 2Lm20-4 处理组中是 1/8(12.5%) (A) 和 (B) 或 4/8(50%) (C)。huIgG 对照组的任何处理组之间或任何 2 个其他小鼠组之间在无肿瘤小鼠发生率中不存在显著性差异 (表 8 和 9)。

[0396] 在任何处理组中未观察到明显的毒性症状或重量减轻 (图 25)。

[0397] 表 8 在观察期结束时的中值存活时间和无肿瘤小鼠发生率

[0398]

处理组	中值存活时间 (天数) ^a	来自时序检验的 p 值 ^b	在第 90 天时的无肿瘤小鼠 ^c	来自 Fisher's 精确检验的 p 值 ^b
HuIgG (200 μg)	10	---	0/8(0%) ---	
TRU-015 (200 μg)	24 (A) 22 (B) ^d 40.5 (C)	0.0023 (A) 0.0001 (B) 0.0006 (C)	2/8(25%) (A) 1/8(12.5%) (B) 1/8(12.5%) (C)	0.4667 (A) 1.0000 (B, C)
018008 (200 μg)	88.5 (A) 50 (B) 52 (C)	0.0007 (A) 0.0079 (B) 0.0090 (C)	4/8(50%) (A) 3/8(37.5%) (B, C)	0.0769 (A) 0.2000 (B, C)
018011 (200 μg)	20.5 (A) 11.5 (B) 16 (C)	0.0470 (A) 0.0198 (B) 0.0006 (C)	1/8(12.5%) (A, B) 2/8(25%) (C)	1.0000 (A, B) 0.4667 (C)
2Lm20-4 (200 μg)	20.5 (A) 13.5 (B) 83 (C)	0.0061 (A) 0.0198 (B) 0.0001 (C)	1/8(12.5%) (A, B) 4/8(50%) (C)	1.0000 (A, B) 0.0769 (C)

[0399] ^a 通过根据肿瘤生长的其处死时间测定小鼠的“存活”。未发现小鼠由于其他原因死亡或处死。研究在第 90 天时结束。

[0400] ^b 每个组与 HuIgG 处理组进行比较。关于其他比较, 参见下表 9。

[0401] ^c “无肿瘤”小鼠不具有可触知肿瘤。肿瘤细胞的不存在未通过组织学加以证实。

[0402] ^d 粗体字的值显著不同于 HuIgG 处理组的那些。

[0403] 表 9 关于在 TRU-015 和 HuCD20SMIP 处理组之间的存活曲线和无肿瘤发生率比较的 p 值

[0404]

	关于指示比较的 p 值 ^a	
HuCD20 SMIP 组	时序检验 (存活曲线的比较)	在第 90 天时的 Fisher's 精确 检验 (无肿瘤发生率的比较)
TRU-015 vs. 018008	0.3594 (A) 0.4405 (B) 0.4452 (C)	0.6084 (A) 0.5692 (B) 0.5692 (C)
TRU-015 vs. 018011	0.6727 (A) 0.8367 (B) 0.9165 (C)	1.0000 (A, B, C)
TRU-015 vs. 2Lm20-4	0.4535 (A) 0.7089 (B) 0.1069 (C)	1.0000 (A, B) 0.2821 (C)
018008 vs. 018011	0.0806 (A) 0.2421 (B) 0.6302 (C)	0.2821 (A) 0.5692 (B) 1.0000 (C)
018008 vs. 2Lm20-4	0.1225 (A) 0.2421 (B) 0.5243 (C)	0.2821 (A) 0.5692 (B) 1.0000 (C)
018011 vs. 2Lm20-4	0.7614 (A) 0.7766 (B) 0.1274 (C)	1.0000 (A, B) 0.6084 (C)

[0405] ^a 关于组的信息参见表 8 的图例

[0406] 在研究第 0 天时,将具有可触知 Ramos 肿瘤的裸鼠分选成处理组 ($n = 8/\text{组}$),从而使得关于每个组的平均肿瘤体积是等价的。在第 0、2、4、6 和 8 天时用 $100\mu\text{g}$ 人 IgG、TRU-015、018008、018011 或 2Lm20-4 来 IV 处理小鼠。在指示天数时用测径器测量肿瘤,并且使用下式计算肿瘤体积: $V = 1/2[\text{长度} \times (\text{宽度})^2]$ 。一旦动物由于肿瘤体积超过指定限制而从研究中取出,就推进关于最后一次肿瘤体积的值。结果仅显示到最后一只对照小鼠处死时的第 10 天。

[0407] 就第 8 天 (其中所有小鼠都活着的最后时间点) 时个别小鼠的肿瘤体积 (A) 或相对于第 0 天在第 8 天时个别小鼠的相对肿瘤体积 (B) 而言显示结果。使用单向 ANOVA 用

Dunnett's 多重比较事后检验（用于与 huIgG 处理的对照的比较）和 Tukey's 多重比较事后检验（用于所有其他配对比较）测定组间的显著性差异；指出了关于所有配对比较的 p 值。

[0408] 处理且监控小鼠，并且如图 21 的图例中所述测定肿瘤体积。每周至少 3 次测定肿瘤体积 (MWF)，除在研究中的其余所有小鼠都不具有可触知肿瘤的时间段期间监控转变成每周一次。当肿瘤体积达到超过 1500mm³（或在星期三时 1200mm³）时，处死小鼠。未发现小鼠由于其他原因死亡或处死。

[0409] C. 人源化 CD20 结合分子的瘤内累积

[0410] 通过直接免疫荧光分析 (IFA) 和流式细胞术评估 018011 在裸鼠中建立的皮下人 B 细胞淋巴瘤异种移植植物中的瘤内累积，并且与 **RITUXAN®** — 基准 CD20 特异性抗体治疗的情况进行比较。2 种试剂都以单次静脉内剂量进行施用。如通过流式细胞术评估的，**RITUXAN®** 与 Ramos 或 WSDLCL2 细胞在体外更大程度结合。这种差异通过 IFA 分析不明显。WSU-DLCL2 皮下异种移植植物的 IFA 分析（试剂 iv 施用 0.5mg）证实关于 018011 的染色趋于在肿瘤中更分散，而 **RITUXAN®** 染色看起来更加强，并且不象 018011 那样一样分散。当试剂以 1mg/ 小鼠的剂量施用并且在施用后 24 小时或 96 小时分析时，在 Ramos 异种移植植物中观察到相似结果。从异种移植植物中分离的淋巴瘤细胞的流式细胞术分析证实了这个观察。

[0411] 测试和对照物品

[0412] CD-20 结合分子

[0413] 使 018011（溶解于 20mM 磷酸钠、240mM 蔗糖，pH 6.0 中的 3.1mg/ml 或 L37852-001 溶解于 10mM 组氨酸、5% 蔗糖，pH 6.0 中的 4.09mg/ml）贮藏于 -80 °C。利妥昔单抗（**RITUXAN®**）、曲妥珠单抗（**HERCEPTIN®**）和西妥昔单抗（**ERBITUX®**）得自 MedWorld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY)。在使用前将药物在磷酸盐缓冲盐水中稀释。

[0414] 细胞系

[0415] B 细胞淋巴瘤系 Ramos (CRL-1596) 得自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA)。弥散性大 B 细胞淋巴瘤系 WSU-DLCL2 (ACC-575) 得自 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig, Germany)。通过 DNA 荧光染料染色测定法 (Bionique Testing Laboratories, Saranac Lake, NY) 测定所有细胞系不含支原体。将每种细胞系维持在补充有 10% 胎牛血清 (FBS)、10mM HEPES (N-2-羟乙基哌嗪 -N'-2-乙磺酸)、1mM 丙酮酸钠、0.2% 葡萄糖、青霉素 G 钠 (100U/ml)、硫酸链霉素 (100 μg/m) 和 L-谷氨酰胺 (2mM) 的 RPMI 1640 培养基中。在使用前，使用 Lymphoprep (Axis Shield PoCAS, Oslo, Norway) 密度梯度通过离心（在 1000x g 下 30 分钟）分离活细胞。

[0416] 动物

[0417] 雌性、BALB/c、nu/nu（裸）鼠 (18-23g) 得自 Charles River Laboratories, Wilmington, MA。所有小鼠饲养在微型隔离单元中，并且在研究自始至终无限制地提供无菌食物和水。

[0418] 在这个研究中使用的动物在表 10 中列出。

[0419] 表 10：使用的小鼠的说明

[0420]

参数	细节
物种:	小鼠
品系:	Balb/c 裸
来源:	Charles River, Wilmington, MA
动物数目/组:	1-4
动物总数目:	26
年龄和性别:	6-8 周大, Balb/c 裸 (雌性)
重量:	18g-25g
接收日期:	2007 年 2 月 5 日
顺应期:	最低限度 1 周

[0421] 免疫荧光 (IFA)

[0422] 将 Ramos 或 WSU-DLCL2 细胞以 500,000 个细胞 / 孔在聚-D-赖氨酸 8 孔培养载玻片 (BD BioCoat 目录 #354632) 上进行铺平板, 并且培养过夜。第二天, 在 5% CO₂ 的存在下使细胞与 100nM **RITUXAN®**、曲妥珠单抗或 018011 一起于 37°C 温育 30 分钟。细胞随后用在 PBS 中的 3.75% 甲醛和 0.2M 蔗糖进行固定。通过用 PBS 洗涤 (3x5 分钟) 以及随后在溶于 PBS 的 0.1M 甘氨酸中温育 10 分钟使细胞再水合。细胞用 3% BSA/PBS 封闭 1 小时。所有后续步骤在黑暗中进行。使用在 1% BSA/PBS 中稀释度为 1 : 100 的 Fc γ 片段特异的荧光素 (FITC) 山羊抗人 IgG 于 37°C 30 分钟来分析特异性结合 (Jackson ImmunoResearch Labs 目录 #109-095-008)。某些载玻片也用 R-PE 抗小鼠 CD31 (Caltag Laboratories) 进行染色。为了分离小室和载玻片, 将小室浸泡在 70% MEOH 中 2 分钟, 小心不使细胞暴露。向具有盖玻片的每个室中加入 1 滴具有 DAPI 复染剂 (ProLong anti-fade reagent with DAPI, Invitrogen 目录 #P36931) 的封固剂 (mounting media)。使用荧光显微镜 (Nikon Eclipse E400) 评估免疫荧光。为了允许直接比较, 使用相同参数 (亮度、对比度、40x 放大倍数等) 获得所有图像。用 Spot RT Slider (Diagnostics Instruments, Sterling heights, MI) 数码相机获取图像, 并且使用 Spot Advanced (版本 4.0.9) 数字软件进行加工。

[0423] 瘤内累积到皮下异种移植体内

[0424] 在背侧、右胁腹中给雌性、无胸腺 (裸) 鼠注射在 Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, 在 RPMI 1640 培养基中 1 : 1 稀释) 中悬浮的 1×10^7 个 Ramos 细胞。当肿瘤达到合适大小时, 将媒介物 (PBS)、018011、**RITUXAN®**、曲妥珠单抗 (用作同种型匹配的、非结合对照) 或西妥昔单抗 (用作同种型匹配的、非结合对照) iv 施用 (0.2ml / 小鼠) 到小鼠的尾静脉内。在 24 或 96 小时后摘除肿瘤用于分析。在尸检时对肿瘤称重。摘除的肿瘤在包埋剂 (O.T.C. 化合物, Tissue-Tek 目录 #4583, Sakura Finetek Torrance, CA) 中进行速冻, 并且贮藏于 -80°C。用切片机 (Tissue-Tek Cryo 2000) 切割 4 微米冷冻切片。使切片风干 30 分钟并且贮藏于 -80°C。切片随后如根据 IFA 方案 (3.1) 所述的进行固定和加工。

[0425] 肿瘤组织消化和流式细胞术

[0426] 摘除肿瘤并并将其切碎成 1-2mm 小片。通过于 37℃ 将 2ml 的 2mg/ml 母液加入肿瘤小片中 30 分钟,用 4 型胶原酶处理 (Worthington, Lakewood, NJ) 消化肿瘤小片。滴定 (titerate) 细胞,旋转以收集细胞,并且随后将其重悬浮于新鲜培养基中。随后如实施例 1 中所述,通过流式细胞术评估经由 018011、**RITUXAN®**或曲妥珠单抗与分散的肿瘤细胞的结合。

[0427] 结果

[0428] 瘤内累积到皮下异种移植物内

[0429] 给具有 WSU-DLCL2 皮下异种移植物 (肿瘤质量 130mg-270mg) 的小鼠施用 018011、**RITUXAN®**或曲妥珠单抗 (0.5mg/ 小鼠 iv), 并且 24 小时后摘除肿瘤用于 IFA。关于 018011 的染色趋于比**RITUXAN®**的情况更分散。**RITUXAN®**染色看起来更加强和浓厚,并且不象 018011 的情况一样分散。切片还就血管进行染色 (CD31)。无一试剂看起来在脉管周围累积,两者都能够深度分散到肿瘤内。还用 0.2mg/ 小鼠剂量的 018011 和 **RITUXAN®iv**处理小鼠。取自 0.2mg 处理组的肿瘤的 IFA 证实 018011 和**RITUXAN®**两者的染色 (数据未呈现),尽管无一试剂在其染色中与在 0.5mg 处理组中观察到的一样浓厚或分散。

[0430] 具有 Ramos 皮下肿瘤 (肿瘤质量 100mg-400mg) 的小鼠用 018011、**RITUXAN®**或曲妥珠单抗 (所有人 IgG1) 以 1mg/ 小鼠 iv 进行处理,并且在注射试剂后 24 和 96 小时摘除肿瘤。在 24 或 96 小时后,018011 染色强度和**RITUXAN®**染色强度看起来一样。类似于使用 WSU-DLCL2 异种移植物得到的观察,018011 染色看起来比**RITUXAN®**的情况更分散,所述**RITUXAN®**的染色更加强和浓厚。曲妥珠单抗产生非常小的本底染色。用于 IFA 的每个异种移植物组织的部分在摘除时进行消化,并且随后通过流式细胞术分析与异种移植物衍生细胞结合的 018011、**RITUXAN®**或曲妥珠单抗的存在 (图 26)。流式细胞术谱暗示检测出在异种移植物衍生细胞的细胞表面上结合的 018011 和**RITUXAN®**。018011 和 **RITUXAN®**的结合在量上相似。来自 iv 注射 018011 和**RITUXAN®**后 96 小时分离的异种移植物的细胞具有比在相同处理后 24 小时分离的那些更高水平的 CD20 结合剂。不存在与 iv 注射任一试剂后 2 小时分离的异种移植物衍生细胞结合的可检测 018011 和**RITUXAN®** (数据未呈现)。当每种试剂的剂量减至 0.5mg/ 小鼠 iv 时,看起来相对于**RITUXAN®**,018011 的染色强度在 2 个分开研究中略微增强 (在给药后 24 小时评估),尽管这在研究条件下无法定量。肿瘤质量对于用于产生结果的小鼠为 290mg-420mg,并且对于用于产生结果的小鼠为 820mg-3000mg。因此,看起来肿瘤大小不显著影响任一试剂的肿瘤累积,因为观察到的结果是相当的,而肿瘤质量在第二个研究中明显更大。当小鼠用更低剂量的任一 CD20 靶向试剂 (0.05、0.1 或 0.2mg/ 小鼠 iv) 进行处理时,018011 是检测不到的,而在 0.1 和 0.2mg 剂量组观察到最低限度的**RITUXAN®**染色 (数据未呈现)。

[0431] 实施例 6. 生长抑制

[0432] 生长抑制测定法

[0433] 使用 MTS—活体染料 (Promega, Madison, WI) 评估 BCL 的体外生长。这个测试依赖于 MTS 通过来自活细胞的完整线粒体转变成有色产物,并且是培养中的活细胞的可靠指示剂。对于 6 种 BCL 中的每一种,建立校正曲线 (细胞数目对在与 MTS 约 2 小时的温育时

间后衍生的有色产物的光密度),以估计合适的起始接种密度。细胞随后以 10,000–50,000 个细胞/孔的密度接种在 96 多孔皿中,这取决于细胞系。接种后,使细胞暴露于多种浓度的 018011、TRU-015 或 **RITUXAN®**,并且在 96 小时温育期后,测定在每种培养物中的活细胞数目。

[0434] 使用通过流式细胞术测量的碘化丙啶 (PI) 排除来评估 018011 或 **RITUXAN®** 与抗人 IgG Fc 抗体交联的作用。损害细胞的细胞膜允许 PI 进入细胞并且染色核 DNA,而活细胞的细胞膜对于 PI 是不通透的并且因此 PI 不能对其核 DNA 染色。为此,将三万 BCL 与增加浓度的 018011 或 **RITUXAN®** 一起在 96 孔微孔板中铺平板,随后添加 1 或 10 μ g/ml 的山羊抗人 IgG Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch) 并且于 37°C 温育 24 小时。温育后,通过 PI 排除以流式细胞术测量细胞存活。使用 CellQuest 程序 (Becton-Dickinson) 进行数据分析。

[0435] 018011 针对人 B 淋巴瘤细胞的生长抑制作用

[0436] 在体外评估 018011 抑制各种 B 淋巴瘤细胞系生长的能力,并且与 **RITUXAN®** 和 TRU-015 的情况进行比较。将 6 种人 CD20+B 细胞系与增加浓度的个别 CD20 结合剂一起培养 96 小时,这之后计数每种培养物中的活细胞数目。如图 27 中所示,018011、TRU-015、**RITUXAN®** 在所研究的 6 种 B 淋巴瘤细胞系的 5 种中都不直接引起生物学意义的生长抑制。例外是 SU-DHL4B 细胞系,其生长以剂量依赖性方式被 TRU-015 和 **RITUXAN®** 抑制,但不被 018011 显著抑制。因此,CD20 的表达是必需的但不足以确保 BCL 被任何 CD20 结合剂的直接抑制。除 CD20 的表面表达程度以外的因素控制 B 淋巴瘤细胞对这些抗 CD20 结合剂的敏感性。Ramos 细胞表面上的 018011 或 **RITUXAN®** 与抗人 IgG Fc 的交联增强 2 种试剂的细胞毒性活性 (图 28)。

[0437] 所有出版物、专利和专利申请通过引用整体合并入本文,其程度与每种个别出版物、专利或专利申请特别且个别指出通过引用整体合并入本文一样。

[0438] 序列

[0439] 斜体:接头序列

[0440] 有下划线的:CDR 序列

[0441] 构建体名称

[0442] VK3 VH5

[0443] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIV

[0444] WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGS

[0445] GSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSFNNPPT

[0446] FGQGTKVEIK ***DGGGSGGGGSGGGGTG*** EVQLV

[0447] 2Lm19-

[0448] QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYNMHW

[0449] 18011

[0450] 2H5m3

[0451] 3

[0452] VRQMPGKGLEWMGAIYPCNGDTSYNQKFKG

[0453] QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAR

[0454]				<u>SYYSNSYWF~~DL~~WGRGTLVTVSS</u>
[0455]				(SEQ ID NO :1)
[0456]				EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0457]				WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSGS
[0458]				GTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQW</u> SNPPTFGQ
[0459]				GTKVEIK DGGS <u>SGGGSGGGGTG</u> EVQLVQSGA
[0460]				EVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYNMHWVRQMP
[0461]	18008	2Lm5	2H5	GKGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGQVTISA
[0462]				DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
[0463]				<u>VVYYNSYWF~~DL~~WGRGTLVTVSS</u>
[0464]				(SEQ ID NO :2)
[0465]				EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIV
[0466]				WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSG
[0467]				SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQW</u> SNPPTF
[0468]				GQGTKVEIK DGGS <u>SGGGSGGGGTG</u> EVQLV
[0469]		2Lm19-		
[0470]				QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYNMHW
[0471]	18010			
[0472]			2H5	
[0473]		3		
[0474]				VRQMPGKGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
[0475]				QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
[0476]				<u>VVYYNSYWF~~DL~~WGRGTLVTVSS</u>
[0477]				(SEQ ID NO :3)
[0478]				EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIV
[0479]				WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGS
[0480]				SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQW</u> SNPPT
[0481]				FGQGTKVEIK DGGS <u>SGGGSGGGGTG</u> EVQLV
[0482]				QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYNMHW
[0483]	18009	2Lm5	2H5m3	VRQMPGKGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
[0484]				QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA
[0485]				<u>RVVYYNSYWF~~DL~~WGRGTLVTVSS</u>
[0486]				(SEQ ID NO :4)
[0487]				EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYMH
[0488]				WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSGS
[0489]				GTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQW</u> SNPPTFG
[0490]				QGTKVEIK DGGS <u>SGGGSGGGGTG</u> EVQLLES
[0491]				GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMHWVR
[0492]	2Lm5	2H3m3	2Lm5	2H3m3

[0493]			QAPGKGLEWVSAIYPGNGDTSYNQKFKGRFT
[0494]			ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
[0495]			KSYYSNSYWFYFDLWGRGTLVTVSS
[0496]			(SEQ ID NO :5)
[0497]	构建体名称		
[0498]	VK3	VH1	
[0499]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSSYMHW
[0500]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGTD
[0501]			FTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSENPPTFGQGTKV
[0502]			EIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAEVKKP
[0503]			GASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGGGLE
[0504]	2L	2Hm	
[0505]			WMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTST
[0506]			VYMESSLRSEDFAVYYCARSVYYSN. YWYFDL
[0507]			WGRGTLVTVSS
[0508]			(SEQ ID NO :6)
[0509]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMIW
[0510]			YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT
[0511]			DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK
[0512]			VEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAEVK
[0513]			KPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQ
[0514]	2Lm	2Hm	
[0515]			GLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDT
[0516]			STSTVYMESSLRSEDFAVYYCAR
[0517]			SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS
[0518]			(SEQ ID NO :7)
[0519]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMIW
[0520]			YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT
[0521]			DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK
[0522]			VEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAEVK
[0523]			KPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQ
[0524]	2Lm	2H	
[0525]			GLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDT
[0526]			STSTVYMESSLRSEDFAVYYCAR
[0527]			VVYYSNSYWFYFDLWGRGTLVTVSS
[0528]			(SEQ ID NO :8)
[0529]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSVSYMH
[0530]			WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
[0531]			GTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG
[0531]			TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE

[0532]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0533]	2Lm1 2Hm	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRD
[0534]		TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0535]		<u>SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0536]		(SEQ ID NO :9)
[0537]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSSVSYMH
[0538]		WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0539]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQGTK
[0540]		VEIK DGGS QVQLVQSGAEVKKP
[0541]		GASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGLEW
[0542]	2Lm1 2H	MGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRD TSTSTVY
[0543]		MELSSLRSED TAVYYCARVYYYSNSYWYFDLW
[0544]		GRGTLVTVSS
[0545]		(SEQ ID NO :10)
[0546]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMIW
[0547]		YQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSGSGT
[0548]		DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSNPPTFGQGTK
[0549]		VEIK DGGS QVQLVQSGAEVK
[0550]		KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0551]	2Lm 22Hm	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRV
[0552]		TMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA
[0553]		<u>RSVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0554]		(SEQ ID NO :11)
[0555]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
[0556]		WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
[0557]		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTF
[0558]	2Lm3 2Hm	
[0559]		GQGTKVEIK DGGS QVQLV
[0560]		QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH
[0561]		WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
[0562]		RVTMTRD TSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA
[0563]		<u>RSVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0564]		(SEQ ID NO :12)
[0565]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYMH
[0566]		WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
[0567]		GTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ
[0568]		GTKVEIK DGGS QVQLVQSGA
[0569]		EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0570]	2Lm4 2Hm	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT

[0571]			RDTSTSTVYMELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~
[0572]			<u>SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0573]			(SEQ ID NO :13)
[0574]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0575]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSG
[0576]			SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPPTFG
[0577]			QGKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0578]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0579]	2Lm5	2Hm	RQAPGGGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKF ~~KGRV~~
[0580]			TMTRDTSTSTVYMELSSLRSED ~~TAVYYCA~~
[0581]			<u>RSVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0582]			(SEQ ID NO :14)
[0583]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0584]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGS
[0585]			GTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPPTFGQ
[0586]			GTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0587]			EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0588]	2Lm5-1	2Hm3	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKF ~~KGRVTMT~~
[0589]			RDTSTSTVYMELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~
[0590]			<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0591]			(SEQ ID NO :15)
[0592]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0593]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGS
[0594]			GTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPPTFGQ
[0595]			GTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0596]			EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0597]	2Lm5-2	2Hm4	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKF ~~KGRVTMT~~
[0598]			RDTSTSTVYMELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~
[0599]			<u>V. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0600]			(SEQ ID NO :16)
[0601]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0602]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGS
[0603]			GTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPPTFGQ
[0604]			GTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0605]			EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0606]	2Lm5-3	2Hm5	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKF ~~KGRVTMT~~
[0607]			RDTSTSTVYMELSSLRSED ~~TAVYYCAR~~
[0608]			<u>SVYY. NSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0609]			(SEQ ID NO :17)

[0610]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0611]		WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG
[0612]		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTF
[0613]		GQGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLV
[0614]		QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH
[0615]	2Lm6 2Hm	WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
[0616]		RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0617]		SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS
[0618]		(SEQ ID NO :18)
[0619]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0620]		WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
[0621]		GTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ
[0622]		GTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0623]		EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0624]	2Lm6-1 2Hm3	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT
[0625]		RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0626]		S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS
[0627]		(SEQ ID NO :19)
[0628]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0629]		WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
[0630]		GTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ
[0631]		GTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0632]		EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0633]	2Lm6-2 2Hm4	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT
[0634]		RDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0635]		V. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS
[0636]		(SEQ ID NO :20)
[0637]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0638]		WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG
[0639]		SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFG
[0640]	2Lm6-3 2Hm5	
[0641]		QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0642]		GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0643]		RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0644]		VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0645]		SVYY. NSYWYFDLWGRGTLVTVSS
[0646]		(SEQ ID NO :21)
[0647]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMH
[0648]		WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSG

[0649]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQT SNP PTFG
[0650]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0651]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0652]	2Lm7	2Hm	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0653]			VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0654]			<u>SVYYSN. YWYFDL</u> WGRGTLVTVSS
[0655]			(SEQ ID NO :22)
[0656]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
[0657]			WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
[0658]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPYTF
[0659]			GQGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLV
[0660]			QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH
[0661]	2Lm8	2Hm	WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
[0662]			RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA
[0663]			<u>RSVYYSN. YWYFDL</u> WGRGTLVTVSS
[0664]			(SEQ ID NO :23)
[0665]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
[0666]			WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
[0667]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPFTFG
[0668]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0669]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0670]	2Lm9	2Hm	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0671]			VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0672]			<u>SVYYSN. YWYFDL</u> WGRGTLVTVSS
[0673]			(SEQ ID NO :24)
[0674]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
[0675]			WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
[0676]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPLTFG
[0677]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0678]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0679]	2Lm10	2Hm	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0680]			VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA
[0681]			<u>RSVYYSN. YWYFDL</u> WGRGTLVTVSS
[0682]			(SEQ ID NO :25)
[0683]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMI
[0684]			WYQQKPGQAPRLLIYAISNLASGIPARFSGSG
[0685]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWISNPITFG
[0686]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0687]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV

[0688]	2Lm11	2Hm	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0689]			VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0690]			<u>SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0691]			(SEQ ID NO :26)
[0692]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0693]			WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSG
[0694]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPTFG
[0695]			QGKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0696]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0697]	2Lm12	2Hm	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0698]			VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0699]			<u>SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0700]			(SEQ ID NO :27)
[0701]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0702]			WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGS
[0703]			GTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGG
[0704]			TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0705]			VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0706]	2Lm13	2Hm	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0707]			DTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0708]			<u>SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0709]			(SEQ ID NO :28)
[0710]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[0711]			WYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPARFSGSGS
[0712]			GTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQ
[0713]			GTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0714]			EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0715]	2Lm14	2Hm	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT
[0716]			RDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0717]			<u>SVYYSN. YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0718]			(SEQ ID NO :29)
[0719]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIHW
[0720]			YQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0721]			TDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWISNPPTFGQG
[0722]	2Lm15	2Hm	
[0723]			TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0724]			EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQ
[0725]			APGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVT
[0726]			MTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR

[0727]		SVYYSN. <u>YWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0728]		(SEQ ID NO :30)
[0729]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMH
[0730]		WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSG
[0731]		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFG
[0732]		QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0733]		GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0734]	2Lm16 2Hm3	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0735]		VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
[0736]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0737]		(SEQ ID NO :31)
[0738]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLS
[0739]		WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSG
[0740]		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFG
[0741]		QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0742]		GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0743]	2Lm17-3 2Hm3	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0744]		VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCA
[0745]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0746]		(SEQ ID NO :32)
[0747]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLT
[0748]		WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSG
[0749]		SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFG
[0750]		QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0751]		GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0752]	2Lm17-4 2Hm3	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0753]		VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
[0754]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0755]		(SEQ ID NO :33)
[0756]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLY
[0757]		WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGS
[0758]		GTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFGQ
[0759]		GTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGA
[0760]		EVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQA
[0761]	2Lm17-6 2Hm3	PGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMT
[0762]		RDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR
[0763]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0764]		(SEQ ID NO :34)
[0765]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLH

[0766]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSG
[0767]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFG
[0768]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0769]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0770]	2Lm17-8	2Hm3	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0771]			VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0772]			<u>S. YYSNSYWF</u> DLWGRGTLVTVSS
[0773]			(SEQ ID NO :35)
[0774]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLN
[0775]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSG
[0776]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFG
[0777]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLV
[0778]			QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMH
[0779]	2Lm17-		
[0780]		2Hm3	WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFK
[0781]	12		
[0782]			<u>GRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED</u> TAVYYCA
[0783]			<u>RS. YYSNSYWF</u> DLWGRGTLVTVSS
[0784]			(SEQ ID NO :36)
[0785]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYLA
[0786]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSG
[0787]			SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFG
[0788]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0789]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVR
[0790]	2Lm17-		
[0791]		2Hm3	QAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVT
[0792]	14		
[0793]			MTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0794]			<u>S. YYSNSYWF</u> DLWGRGTLVTVSS
[0795]			(SEQ ID NO :37)
[0796]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLA
[0797]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSG
[0798]			SGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PPTFG
[0799]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0800]			GAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWV
[0801]	2Lm18-2	2Hm3	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0802]			VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAR
[0803]			<u>S. YYSNSYWF</u> DLWGRGTLVTVSS
[0804]			(SEQ ID NO :38)

[0805]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLN
[0806]			WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGS
[0807]			GSQDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSFNPPPT
[0808]	2Lm18-3	2Hm3	
[0809]			FGQGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLV
[0810]			QSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMH
[0811]			WVRQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG
[0812]			RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0813]			<u>S. YYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>
[0814]			(SEQ ID NO :39)
[0815]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLD
[0816]			WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSG
[0817]			SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSFNPPPTFG
[0818]			QGTKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQS
[0819]			GAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHW
[0820]	2Lm18-4	2Hm3	RQAPGQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGR
[0821]			VTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0822]			<u>S. YYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>
[0823]			(SEQ ID NO :40)
[0824]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLSW
[0825]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0826]			TDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSFNPPPTFGQG
[0827]			TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0828]			VKKPGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0829]	2Lm18-5	2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0830]			DTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0831]			<u>S. YYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>
[0832]			(SEQ ID NO :41)
[0833]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYLHW
[0834]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT
[0835]			DFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSFNPPPTFGQGTK
[0836]			VEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAEVKK
[0837]			PGASVKVSKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQGL
[0838]	2Lm18-		
[0839]		2Hm3	EWGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTSTST
[0840]	14		
[0841]			VYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0842]			<u>S. YYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>
[0843]			(SEQ ID NO :42)

[0844]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIDW
[0845]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT
[0846]			DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGTK
[0847]			VEIK DGGS SGGGSGGGSS QVQLVQSGAEVK
[0848]			KPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPGQG
[0849]	2Lm19-1	2Hm3	LEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRDTST
[0850]			STVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0851]			<u>S. YYSNSYWFYDL</u> WGRGTLVTVSS
[0852]			(SEQ ID NO :43)
[0853]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYISW
[0854]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0855]			TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0856]			TKVEIK DGGS SGGGSGGGSS QVQLVQSGAE
[0857]			VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0858]	2Lm19-2	2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0859]			DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0860]			<u>S. YYSNSYWFYDL</u> WGRGTLVTVSS
[0861]			(SEQ ID NO :44)
[0862]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIYW
[0863]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSGT
[0864]			DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQGT
[0865]			KVEIK DGGS SGGGSGGGSS QVQLVQSGAEV
[0866]			KKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAPG
[0867]	2Lm19-3	2Hm3	QGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTRD
[0868]			TSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0869]			<u>S. YYSNSYWFYDL</u> WGRGTLVTVSS
[0870]			(SEQ ID NO :45)
[0871]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIAW
[0872]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0873]			TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0874]			TKVEIK DGGS SGGGSGGGSS QVQLVQSGAE
[0875]			VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0876]	2Lm19-4	2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0877]			DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0878]			<u>S. YYSNSYWFYDL</u> WGRGTLVTVSS
[0879]			(SEQ ID NO :46)
[0880]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYITW
[0881]			YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0882]			TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG

[0883]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0884]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0885]	2Lm19-7 2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0886]		DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0887]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0888]		(SEQ ID NO :47)
[0889]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIIW
[0890]		YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0891]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0892]	2Lm19-9 2Hm3	
[0893]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0894]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0895]		GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0896]		DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0897]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0898]		(SEQ ID NO :48)
[0899]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYIPW
[0900]		YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0901]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0902]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0903]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0904]	2Lm19-	
[0905]	2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0906]	12	
[0907]		DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0908]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0909]		(SEQ ID NO :49)
[0910]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYINW
[0911]		YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG
[0912]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0913]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0914]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0915]	2Lm19-	
[0916]	2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0917]	14	
[0918]		DTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
[0919]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0920]		(SEQ ID NO :50)
[0921]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYISW

[0922]		YQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGSG
[0923]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0924]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0925]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0926]	2Lm20-1 2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0927]		DTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0928]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0929]		(SEQ ID NO :51)
[0930]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLS <u>CRASSSVSYIAW</u>
[0931]		YQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGSG
[0932]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0933]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0934]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0935]	2Lm20-2 2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0936]		DTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0937]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0938]		(SEQ ID NO :52)
[0939]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLS <u>CRASSSVSYIVW</u>
[0940]		YQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGSG
[0941]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0942]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0943]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0944]	2Lm20-4 2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0945]		DTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0946]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0947]		(SEQ ID NO :53)
[0948]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLS <u>CRASSSVNYIYW</u>
[0949]		YQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGSG
[0950]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0951]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE
[0952]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP
[0953]	2Lm20-8 2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR
[0954]		DTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
[0955]		<u>S. YYSNSYWYFDLWGRGTLVTVSS</u>
[0956]		(SEQ ID NO :54)
[0957]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLS <u>CRASSSVSYIDW</u>
[0958]		YQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLASG</u> IPARFSGSGSG
[0959]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPTFGQG
[0960]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE

[0961]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP	
[0962]	2Lm20-		
[0963]	2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR	
[0964]	11		
[0965]		DTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	
[0966]		<u>S. YYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>	
[0967]		(SEQ ID NO :55)	
[0968]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYHW	
[0969]		YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG	
[0970]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPFTFGQG	
[0971]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE	
[0972]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP	
[0973]	2Lm20-		
[0974]	2Hm3	GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR	
[0975]	12		
[0976]		DTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	
[0977]		<u>S. YYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>	
[0978]		(SEQ ID NO :56)	
[0979]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYIYW	
[0980]		YQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGSGSG	
[0981]	2Lm20-		
[0982]		TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPPFTFGQG	
[0983]	2Hm3		
[0984]	13		
[0985]		TKVEIK DGGGSGGGGSGGGGSS QVQLVQSGAE	
[0986]		VKKPGASVKVSCKASGYTFTSYNMHWVRQAP	
[0987]		GQGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKGRVTMTR	
[0988]		DTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCAR	
[0989]		<u>S. YYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>	
[0990]		(SEQ ID NO :57)	
[0991]		EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYM	
[0992]		WYQQKPGQAPRLLIYAPSNLASGIPARFSGS	
[0993]		GSQTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSFNPP	
[0994]		FTGQGTKVEIKDGGGSGGGGSGGGGTGEVQLV	
[0995]	2Lm5		
[0996]		QSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYNMHW	(18009) 2H5m3
[0997]		VRQMPGKGLEWMGAIYPGNGDTSYNQKFKG	
[0998]		QVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCA	
[0999]		<u>RVVYYSNSYWFYDLWGRGTLVTVSS</u>	

[1000]			(SEQ ID NO :58)
[1001]			EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMH
[1002]			WYQQKPGQAPRLLIY <u>APSNLAS</u> GIPARFSGSGS
[1003]			GTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <u>QQWSFN</u> PTFG
[1004]			QGTKVEIKDGGGSGGGGSGGGGTGEVQLLES
[1005]	2Lm5		
[1006]			GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>YNMH</u> WVR (2Lm5 2H3m3
[1007]	2H3m3)		
[1008]			QAPGKGLEWVSAIYPGNGDTSYNQKF ~~KGRFT~~
[1009]			ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
[1010]			KSYYSNSYWYFDLWGRGTLTVSS
[1011]			(SEQ ID NO :59)
[1012]			DQEPKSCDKTHTSPSS
[1013]		铰链	
[1014]	IgG1		
[1015]		CSSS	(SEQ ID NO :60)
[1016]			APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKF
[1017]			N
[1018]			WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKE
[1019]		CH2CH	YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
[1020]	IgG1	3	SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
[1021]		WT	KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[1022]			(SEQ ID NO :61)
[1023]			APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
[1024]			N
[1025]			WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
[1026]		CH2CH	YKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
[1027]	IgG1	3	SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
[1028]		P331S	KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[1029]			(SEQ ID NO :62)
[1030]			DQEPKSCDKTHTCPPCP
[1031]		铰链	
[1032]	IgG1		
[1033]		WT	(SEQ ID NO :63)
[1034]			DQEPKSCDKTHTSPPCS
[1035]		铰链	
[1036]	IgG1		
[1037]		CSCS	(SEQ ID NO :64)
[1038]			DQEPKSSDKTHTCPPCS

[1039]	铰链	
[1040]	IgG1	
[1041]	SCCS	(SEQ ID NO :65)
[1042]		DQEPKSSDKTHTCPPCP
[1043]	铰链	
[1044]	IgG1	
[1045]	SCCP	(SEQ ID NO :66)
[1046]	核苷酸序列	
[1047]		gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagag ccaccctctcctgca
[1048]		gggccagtcagagtgttagcagctacatgcactggtaccaacagaaacctggcca ggctcctaggctc
[1049]		ct
[1050]		catctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagt ggatccgggacaga
[1051]		c
[1052]	2Lm1	ttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtc agcagtggatttcta
[1053]		accctccacgttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaa
[1054]		(SEQ ID NO :67)
[1055]		gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagag ccaccctctcctgca
[1056]		gggccagtcagagtgttagctacatgatctggtaccaacagaaacctggccaggc tcctaggctcctca
[1057]		t
[1058]		ctatgccatatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga tccgggacagacttc
[1059]	2Lm2	actctcaccatcagcagcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtcagc agtggagtTTTtaacc
[1060]		ctccacgttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaa
[1061]		(SEQ ID NO :68)
[1062]		gaaattgtgttgacacagtccccagccaccccgtctttgtctccaggtgaaagag ccaccctctcctgca
[1063]		gggccagttcaagtgttagctacatgatttgggtaccaacagaaacctggccaggc acctaggctcctca
[1064]		t
[1065]		ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga tccgggacagacttc
[1066]	2Lm3	actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtcagc

agtgactagtaacc

[1067] ctccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1068] (SEQ ID NO :69)

[1069] gaaattgtgttgacacagtccccagccaccccgtctttgtctccaggtgaaagag

ccaccctctcctgca

[1070] gggccagttcaagtgttagctcctacatgatttggtaccaacagaaacctggcca

ggcacctaggctcc

[1071] t

[1072] catctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagt

ggatccgggacaga

[1073] c

[1074] 2Lm4 ttcactctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtc

agcagtgactagta

[1075] accctccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1076] (SEQ ID NO :70)

[1077] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagc

caccctctcctgca

[1078] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggct

cctaggctcctc

[1079] at

[1080] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgat

ccgggacagactt

[1081] 2Lm5 c

[1082] actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagca

gtggagttttaacc

[1083] ctccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1084] (SEQ ID NO :71)

[1085] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1086] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctc

[1087] atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagt

ggatccgggacagac

[1088] 2Lm5-1 ttcactctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgt

cagcagtgagttttaacc

[1089] ctccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1090] (SEQ ID NO :72)

[1091] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1092] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccagg
cacctaggctcctc

[1093] atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagt
ggatccgggacagac

[1094] 2Lm5-2 ttcactctcaccatcagcagcttagagcctgaagattttgcagtttattactgt
cagcagtgagggttttaacc

[1095] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1096] (SEQ ID NO :73)

[1097] gaaattgtgttgacacagctctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga
gccaccctctcctgca

[1098] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccagg
cacctaggctcctc

[1099] atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagt
ggatccgggacagac

[1100] 2Lm5-3 ttcactctcaccatcagcagcttagagcctgaagattttgcagtttattactgt
cagcagtgagggttttaacc

[1101] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1102] (SEQ ID NO :74)

[1103] gaaattgtgttgacacagctctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca

[1104] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctc

[1105] at

[1106] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga
tccgggacagactt

[1107] c

[1108] 2Lm6 actctcaccatcagcagcttagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc
agtggaacttctaacc

[1109] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1110] (SEQ ID NO :75)

[1111] gaaattgtgttgacacagctctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca

[1112] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctc

[1113] atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg
gatccgggacagac

[1114] ttcactctcaccatcagcagcttagagcctgaagattttgcagtttattactgtc
agcagtggaactagtaac

[1115] 2Lm6-1

[1116]	cctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1117]	(SEQ ID NO :76)
[1118]	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag ccaccctctcctgca
[1119]	gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggc acctaggctcctc
[1120]	atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg gatccgggacagac
[1121] 2Lm6-2	ttcactctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtc agcagtggaacttctaacc
[1122]	ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1123]	(SEQ ID NO :77)
[1124]	Gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1125]	gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggctcctc
[1126]	atctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg ggatccgggacagac
[1127] 2Lm6-3	ttcactctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgt cagcagtggaactagtaac
[1128]	cctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1129]	(SEQ ID NO :78)
[1130]	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1131]	gggccagttcaagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggctcctc
[1132]	at
[1133]	ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg atccgggacagactt
[1134] 2Lm7	c
[1135]	actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtcag cagtggaactagtaacc
[1136]	ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1137]	(SEQ ID NO :79)
[1138]	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag ccaccctctcctgca
[1139]	gggccagttcaagtgttagctacatgatttgggtaccaacagaaacctggccaggc acctaggctcctca
[1140]	t

[1141] ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga
tccgggacagacttc
[1142] 2Lm8 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcagc
agtggatttctaacc
[1143] cttacactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1144] (SEQ ID NO :80)
[1145] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca
[1146] gggccagttcaagtgttagctacatgatttgggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctca
[1147] t
[1148] ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga
tccgggacagacttc
[1149] 2Lm9 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcagc
agtggatttctaacc
[1150] ctttcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1151] (SEQ ID NO :81)
[1152] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca
[1153] gggccagttcaagtgttagctacatgatttgggtaccaacagaaacctggccagg
cacctaggctcctca
[1154] t
[1155] ctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga
tccgggacagacttc
[1156] 2Lm10 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcagc
agtggatttctaacc
[1157] ctctcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1158] (SEQ ID NO :82)
[1159] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca
[1160] gggccagttcaagtgttagctacatgatttgggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctca
[1161] tctatgcaatctccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgg
atccgggacagactt
[1162] 2Lm11 cactctcaccatcagcagtctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcag
cagtgatttctaaccct
[1163] atcactttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1164] (SEQ ID NO :83)

[1165] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca

[1166] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctc

[1167] at

[1168] ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga
tccgggacagactt

[1169] c

[1170] 2Lm12 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc
agtggagttttaacc

[1171] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1172] (SEQ ID NO :84)

[1173] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca

[1174] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctc

[1175] at

[1176] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga
tccgggacagactt

[1177] c

[1178] 2Lm13

[1179] actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc
agtggatcagtaacc

[1180] caccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1181] (SEQ ID NO :85)

[1182] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca

[1183] gggccagtcagagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctc

[1184] at

[1185] ctatgccacatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga
tccgggacagactt

[1186] c

[1187] 2Lm14 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc
agtggatcagtaaccg

[1188] caccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1189] (SEQ ID NO :86)

[1190] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag
ccaccctctcctgca

[1191] gggccagtcagagtgttagctacatacactggtaccaacagaaacctggccaggc
acctaggctcctc

[1192] at

[1193] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgg
tccgggacagactt

[1194] c

[1195] 2Lm15 actctcaccatcagcagtctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcagc
agtggatcagtaacc

[1196] caccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1197] (SEQ ID NO :87)

[1198] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaaga
gccaccctctcctgca

[1199] gggccagttccagtgttagctacatgcactggtaccaacagaaacctggccagg
cacctaggctcctc

[1200] at

[1201] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgg
atccgggacagactt

[1202] 2Lm16 c

[1203] actctcaccatcagcagtctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcag
cagtggagTTTTaacc

[1204] ctccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1205] (SEQ ID NO :88)

[1206] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaaga
gccaccctctcctgca

[1207] gggccagtcagagtgttagctacctgtctTtggtaccaacagaaacctggccagg
cacctaggctcctca

[1208] t

[1209] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgg
atccgggacagactt

[1210] c

[1211] 2Lm17-3

[1212] actctcaccatcagcagtctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcag
cagtggagTTTTaacc

[1213] ctccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1214] (SEQ ID NO :89)

[1215] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaaga
gccaccctctcctgca

[1216] gggccagtcagagtgttagctacctgactTtggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctc

[1217] at

[1218] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

atccgggacagactt

[1219] 2Lm17-4 c

[1220] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1221] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1222] (SEQ ID NO :90)

[1223] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1224] gggccagtcagagtgtagctacactgtactggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctc

[1225] at

[1226] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

atccgggacagactt

[1227] c

[1228] 2Lm17-6

[1229] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1230] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1231] (SEQ ID NO :91)

[1232] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1233] gggccagtcagagtgtagctacactgcactggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctc

[1234] at

[1235] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

atccgggacagactt

[1236] c

[1237] 2Lm17-8

actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1238] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1239] (SEQ ID NO :92)

[1240] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaag

agccaccctctcctgca

[1241] gggccagtcagagtgtagctacactgaactggtaccaacagaaacctggccag

gcacctaggctcctc

[1242] a t

[1243] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg
gatccgggacagactt
[1244] 2Lm17-12 c
[1245] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtca
gcagtgaggttttaacc
[1246] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1247] (SEQ ID NO :93)
[1248] gaaattgtgttgacacagtcctcagccaccctgtctttgtctccaggtgaaag
agccaccctctcctgca
[1249] gggccagtcagagtgttagctacctggcttggtaccaacagaaacctggccag
gcacctaggtctctc
[1250] at
[1251] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg
gatccgggacagactt
[1252] c
[1253] 2Lm17-14 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtcag
cagtgaggttttaacc
[1254] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1255] (SEQ ID NO :94)
[1256] gaaattgtgttgacacagtcctcagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga
gccaccctctcctgca
[1257] gggccagttccagtgtagctacctggcctggtaccaacagaaacctggccagg
cacctaggtctctc
[1258] at
[1259] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg
atccgggacagactt
[1260] 2Lm18-2 c
[1261] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagtttattactgtcag
cagtgaggttttaacc
[1262] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1263] (SEQ ID NO :95)
[1264] gaaattgtgttgacacagtcctcagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga
gccaccctctcctgca
[1265] gggccagttccagtgtagctacctgaattggtaccaacagaaacctggccagg
cacctaggtctctca
[1266] t
[1267] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg
atccgggacagactt

[1268]	2Lm18-3	c
[1269]		actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcag cagtgagTTTTaacc
[1270]		ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1271]		(SEQ ID NO :96)
[1272]		gaaattgtgttgacacagtcctcagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1273]		gggccagttccagtgtagctacctggattggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggtcctca
[1274]		t
[1275]		ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg atccgggacagactt
[1276]		c
[1277]	2Lm18-4	
[1278]		actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcag cagtgagTTTTaacc
[1279]		ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1280]		(SEQ ID NO :97)
[1281]		gaaattgtgttgacacagtcctcagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1282]		gggccagttccagtgtagctacctgtcctggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggtcctca
[1283]		t
[1284]		ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg atccgggacagactt
[1285]	2Lm18-5	c
[1286]		actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcag cagtgagTTTTaacc
[1287]		ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1288]		(SEQ ID NO :98)
[1289]		gaaattgtgttgacacagtcctcagccaccctgtctTTTgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1290]		gggccagttccagtgtagctacctgcattggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggtcctca
[1291]		t
[1292]		ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg atccgggacagactt
[1293]		c
[1294]	2Lm18-14	actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagatTTTgcagTTTattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1295] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1296] (SEQ ID NO :99)

[1297] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1298] gggccagtcagagtgttagctacattgattggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctca

[1299] t

[1300] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

atccgggacagactt

[1301] 2Lm19-1 c

[1302] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1303] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1304] (SEQ ID NO :100)

[1305] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1306] gggccagtcagagtgttagctacatttctggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctca

[1307] t

[1308] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

atccgggacagactt

[1309] c

[1310] 2Lm19-2

[1311] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtca

gcagtggagttttaacc

[1312] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1313] (SEQ ID NO :101)

[1314] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1315] gggccagtcagagtgttagctacattgtttggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctca

[1316] t

[1317] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

atccgggacagactt

[1318] 2Lm19-3 c

[1319] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1320] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1321]	(SEQ ID NO :102)
[1322]	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1323]	gggccagtcagagtgttagctacattgcttggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggctcctca
[1324]	t
[1325]	ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg atccgggacagactt
[1326] 2Lm19-4	c
[1327]	actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag cagtgaggttttaacc
[1328]	ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1329]	(SEQ ID NO :103)
[1330]	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1331]	gggccagtcagagtgttagctacattacctggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggctcctc
[1332]	at
[1333]	ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg atccgggacagactt
[1334] 2Lm19-7	c
[1335]	actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag cagtgaggttttaacc
[1336]	ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1337]	(SEQ ID NO :104)
[1338]	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga gccaccctctcctgca
[1339]	gggccagtcagagtgttagctacattattttggtaccaacagaaacctggccagg cacctaggctcctca
[1340]	t
[1341]	ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg atccgggacagactt
[1342]	c
[1343] 2Lm19-9	
[1344]	actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag cagtgaggttttaacc
[1345]	ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa
[1346]	(SEQ ID NO :105)
[1347]	gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1348] gggccagtcagagtgttagctacattccctggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctc

[1349] at

[1350] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgg

atccgggacagactt

[1351]

[1352] 2Lm19-12 c

[1353] actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1354] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1355] (SEQ ID NO :106)

[1356] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1357] gggccagtcagagtgttagctacattaactggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctc

[1358] at

[1359] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgg

atccgggacagactt

[1360] c

[1361] 2Lm19-14 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc

agtggagttttaacc

[1362] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1363] (SEQ ID NO :107)

[1364] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1365] gggccagttccagtgtagctacatttcttggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggctcctcat

[1366] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgg

atccgggacagactt

[1367] c

[1368] 2Lm20-1 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1369] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1370] (SEQ ID NO :108)

[1371] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaaga

gccaccctctcctgca

[1372] gggccagttccagtgtagctacattgcctggtaccaacagaaacctggccagg

cacctaggtcctca

[1373] t

[1374] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

atccgggacagactt

[1375] c

[1376] 2Lm20-2 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaacc

[1377] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1378] (SEQ ID NO :109)

[1379] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag

ccaccctctcctgca

[1380] gggccagttccagtgtagctacattgtttgttaccacagaaacctggccaggc

acctaggtcctcat

[1381] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga

tccgggacagactt

[1382] 2Lm20-4 cactctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcag

cagtggagttttaaccc

[1383] tcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1384] (SEQ ID NO :110)

[1385] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag

ccaccctctcctgca

[1386] gggccagttccagtgtaactacattttattgttaccacagaaacctggccaggc

acctaggtcctcat

[1387] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga

tccgggacagactt

[1388] c

[1389] 2Lm20-8 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc

agtggagttttaacc

[1390] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1391] (SEQ ID NO :111)

[1392] gaaattgtgttgacacagtcctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaagag

ccaccctctcctgca

[1393] gggccagttccagtgtagctacattgattgttaccacagaaacctggccaggc

acctaggtcctca

[1394] t

[1395] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtgga

tccgggacagactt

[1396] c

[1397] 2Lm20-11 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtcagc

agtggagttttaacc

[1398] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1399] (SEQ ID NO :112)

[1400] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaa

gagccaccctctcctgca

[1401] gggccagttccagtgtagctccattatctggtaccaacagaaacctggcca

ggcacctaggctcctcat

[1402] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagt

ggatccgggacagactt

[1403] c

[1404] 2Lm20-12 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtc

agcagtgaggattttaacc

[1405] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1406] (SEQ ID NO :113)

[1407] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaa

gagccaccctctcctgca

[1408] gggccagttccagtgtagctacatttattggtaccaacagaaacctggcca

ggcacctaggctcctcat

[1409] ctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagt

ggatccgggacagactt

[1410] c

[1411] 2Lm20-13 actctcaccatcagcagtcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtc

agcagtgaggattttaacc

[1412] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1413] (SEQ ID NO :114)

[1414] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaag

agccaccctctcctgca

[1415] gggccagtcagagtgtagctacatgatctggtaccaacagaaacctggccag

gtccttaggtcctca

[1416] t

[1417] ctatgceatatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtggcagtg

gatccgggacagacttc

[1418] 2Lm actctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattactgtca

gcagtggaatttctaacc

[1419] ctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1420] (SEQ ID NO :115)

[1421] gaaattgtgttgacacagtctccagccaccctgtctttgtctccaggtgaaag

agccaccctctcctgca

[1422] gggccagtcagagtgtagcagctacatgcactggtaccaacagaaacctggc

caggcacctaggct

[1423] cctcatctatgccccatccaacctggcttctggaattccagccaggttcagtgcagtggatccgggac

[1424] 2L agacttcactctcaccatcagcagctctagagcctgaagattttgcagtttatt

actgtcagcagtgaggat

[1425] aaccctcccacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaa

[1426] (SEQ ID NO :116)

[1427] caggcttatctacagcagctctggggctgagctggtgaggcctggggcctcagtgagatgtcctgcaa

[1428] gg

[1429] cttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggttaaagcagacacctagacagggcctggaatg

[1430] gattggagctatttatccaggaaatggtgatacttctacaatcagaagttcaagggaaggccacactg

[1431] actgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaagactctgcggtc

[1432] 2H7_mVK t

[1433] atttctgtgcaagagtgggtgtactatagtaactcttactgggtacttcgatgtctggggcacagggaccac

[1434] ggtcaccgtctct

[1435] (SEQ ID NO :117)

[1436] gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccgagagtctctgaagatttctgttaa

[1437] gg

[1438] gatccggatacagctttaccagctacaacatgcactgggtgcgccagatgccccgggaaaggcctcga

[1439] gtg

[1440] gatgggggctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaagttcaagggccaggtcactatc

[1441] 2H5m3 tcggccgacaagtccatcagcacgcctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcgacaccgcc

[1442] atgtattactgtgcacgcagcgtgtactatagtaactactgggtacttcgatctctggggccgcggcaccct

[1443] ggt

[1444] cactgtctctct

[1445] (SEQ ID NO :118)

[1446] gaggtgcagctggtgcagctctggagcagaggtgaaaaagcccgagagtctctgaagatttctgttaa

[1447] gg

[1448]	gatccggatacagctttaccagctacaacatgcactgggtgcgccaga tgccccgggaaaggcctcga
[1449]	gtg
[1450]	gatgggggctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaa gttcaagggccaggtcactatc
[1451] 2H5	tcggccgacaagtccatcagcaccgcctacctgcaatggagcagcctg aaggcctcggacaccgcc
[1452]	atgtattactgtgcacgcgtcgtgtactatagtaactcttactggtac ttcgatctctggggccgcggcacc
[1453]	ct
[1454]	ggtcactgtctcctct
[1455]	(SEQ ID NO :119)
[1456]	gaggtgcagctgttggagtctggtggaggcttggtacagcctggcgga tccctgagactctcct
[1457]	gtgcagcctctggattcacctttagcagctataacatgcactgggtcc gccaggctccagggaaggga
[1458]	ct
[1459] 2H3m3	ggagtgggtctcagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaa tcagaagttcaagggccggttc
[1460] (huVH3-47 构架中	accatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacac
[1461]	gg
[1462] 的突变CDR3和	ccgtatattactgtgcgaaaagctactatagtaactcctactggtactt cgatctctggggccgcggcac
[1463] JH2)	
[1464]	cctggtcactgtctcctca
[1465]	(SEQ ID NO :120)
[1466]	caggtgcagctggtgcagctctggtgctgagagcaagaagcctggggcc tcagtgaaggtttcctgcaa
[1467]	gg
[1468]	ctageggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacagg cgccctggacaagggtcga
[1469]	gtg
[1470] 2Hm	gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaa gttcaagggcagggtcaccat
[1471]	g
[1472] (huVH1 构架中的	accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctg agatctgaggacacggcc
[1473] CDR3突变和JH2)	gtgtattactgtgcccgaagcgtgtactatagtaactactggtacttc

gatctctggggccgcggcaccct

[1474] ggt

[1475] cactgtctcctct

[1476] (SEQ ID NO :121)

[1477] caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcc

tcagtgaaggtttcct

[1478] gcaaggctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgc

gacaggcgcttgacaagg

[1479] gctcgagtggatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatccta

caatcagaagttcaagggcag

[1480] 2H ggtc

[1481] accatgaccagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagc

agcctgagatctgaggaca

[1482] (huVH1 构架中的 cggccgtgtatttctgtgcccagtggtgtactatagtaactcttact

ggtacttcgatctctggggccgcg

[1483] WT 2H7 CDR 和 g

[1484] JH2) caccctggtcactgtctcctct

[1485] (SEQ ID NO :122)

[1486] caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcc

tcagtgaaggtttcctgcaa

[1487] gg

[1488] ctageggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacagg

cgccctggacaagggtcga

[1489] gtg

[1490] 2Hm3 gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaa

gttcaagggcagggtcaccat

[1491] g

[1492] (CDR3 突变) accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctg

agatctgaggacacggcc

[1493] gtgtattactgtgcccgaagctactatagtaactcttactggtacttc

gatctctggggccgcggcaccct

[1494] ggtcactgtctcctct

[1495] (SEQ ID NO :123)

[1496] caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcc

tcagtgaaggtttcctgcaa

[1497] gg

[1498] ctageggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacagg

cgccctggacaagggtcga

[1499] gtg

[1500]	gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaa gttcaagggcagggtcacat
[1501] 2Hm4	g
[1502]	accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctg agatctgaggacacggcc
[1503] (CDR3 突变)	gtgtattactgtgcccagagtgtactatagtaactcttactggtacttc gatctctggggccgcggcaccct
[1504]	ggt
[1505]	cactgtctcctct
[1506]	(SEQ ID NO :124)
[1507]	caggtgcagctggtgcagtctggtgctgagagcaagaagcctggggcc tcagtgaaggtttcctgcaa
[1508]	gg
[1509]	ctagcggatacaccttcaccagctacaatatgcactgggtgcgacagg cgcctggacaagggctcga
[1510] 2Hm5	gtg
[1511]	gatgggagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaatcagaa gttcaagggcagggtcacat
[1512] (huVH1 构架中的	g
[1513]	accagagacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctg agatctgaggacacggcc
[1514] CDR3 突变和 JH2)	gtgtattactgtgcccgaagcgtgtactataactcttactggtacttc gatctctggggccgcggcaccct
[1515]	ggtcactgtctcctct
[1516]	(SEQ ID NO :125)
[1517]	gaggtgcagctgttgagctctggtggaggcttggtacagcctggcgga tcctgagactctcct
[1518] 2H3	gtacagcctctggattcacctttagcagctataacatgcactgggtcc gccaggtccaggggaaggga
[1519]	ct
[1520] (huVH3-47 构架中	ggagtgggtctcagctatctatcctggaaatggtgatacatcctacaa tcagaagttcaagggccggttc
[1521] 的 WT 2H7 CDR 和	accatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaataaac agcctgagagccgaggacac
[1522]	gg
[1523] JH2)	ccgtatattactgtgcgaaagtcgtgtactatagtaactcctactggt acttcgatctctggggccgcgg
[1524]	caccctggtcactgtctcctct
[1525]	(SEQ ID NO :126)

[1526]	caggcttatctacagcagctctggggctgagctggtgaggcctggggcc
tcagtgaagatgtcctgcaa	
[1527]	gg
[1528]	cttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaagcaga
cacctagacagggcctggaatg	
[1529]	gattggagctattttatccaggaaatggtgatacttctacaatcagaa
gttcaagggcaagccacactg	
[1530] 2H7mVH	actgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctg
acatctgaagactctgcggtc	
[1531]	t
[1532]	atttctgtgcaagagtgggtgtactatagtaactcttactggtacttcg
atgtctggggcacaggaccac	
[1533]	ggtcaccgtctct
[1534]	(SEQ ID NO :127)
[1535]	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
[1536]	CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
[1537]	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
[1538] IgG1	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
[1539] 铰链和 CH2CH3	WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
[1540]	NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
[1541]	(SEQ ID NO :128)
[1542]	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFF
[1543]	MRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPLW
[1544]	GGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGMIMNSLSLFAAISGMILSI
[1545]	<u>MDILNLIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNPST</u>
[1546] Human CD20	<u>QYCYSIQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKSNI</u>
[1547] (下划线的是胞外	VLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEET
[1548] 结构域)	ETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
[1549]	(SEQ ID NO :129)

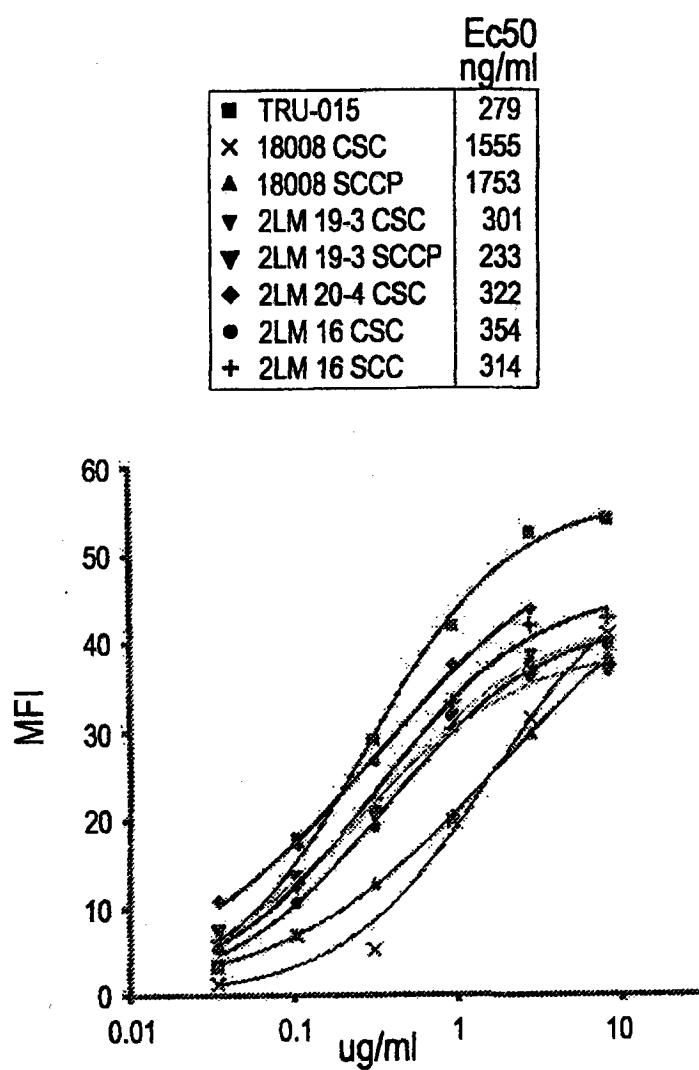


图 1A

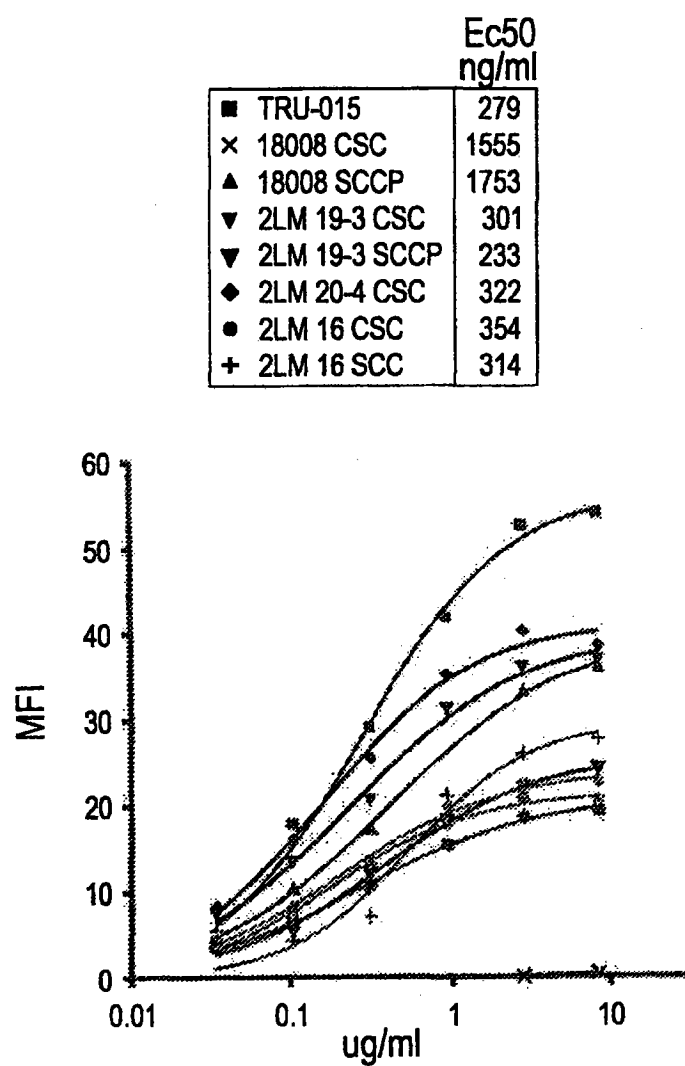


图 1B

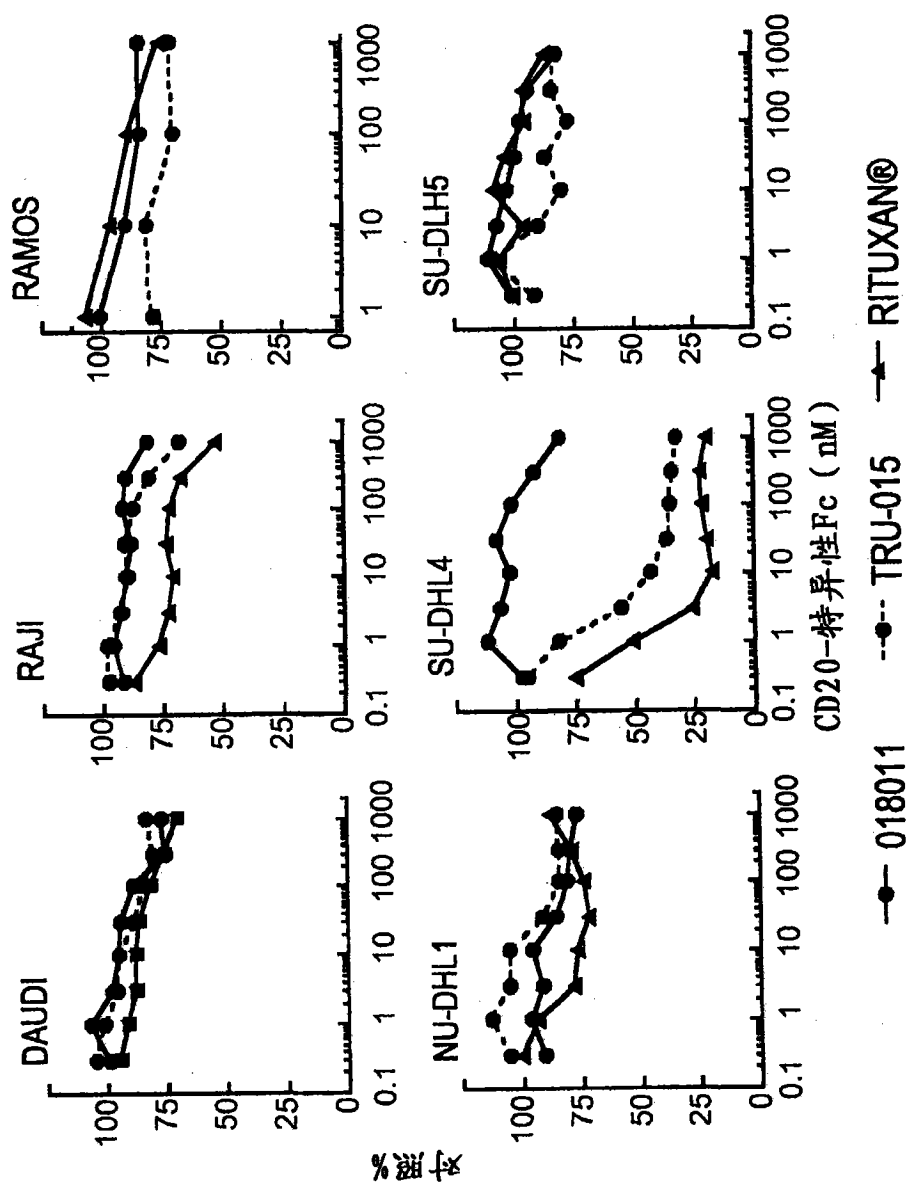


图 2

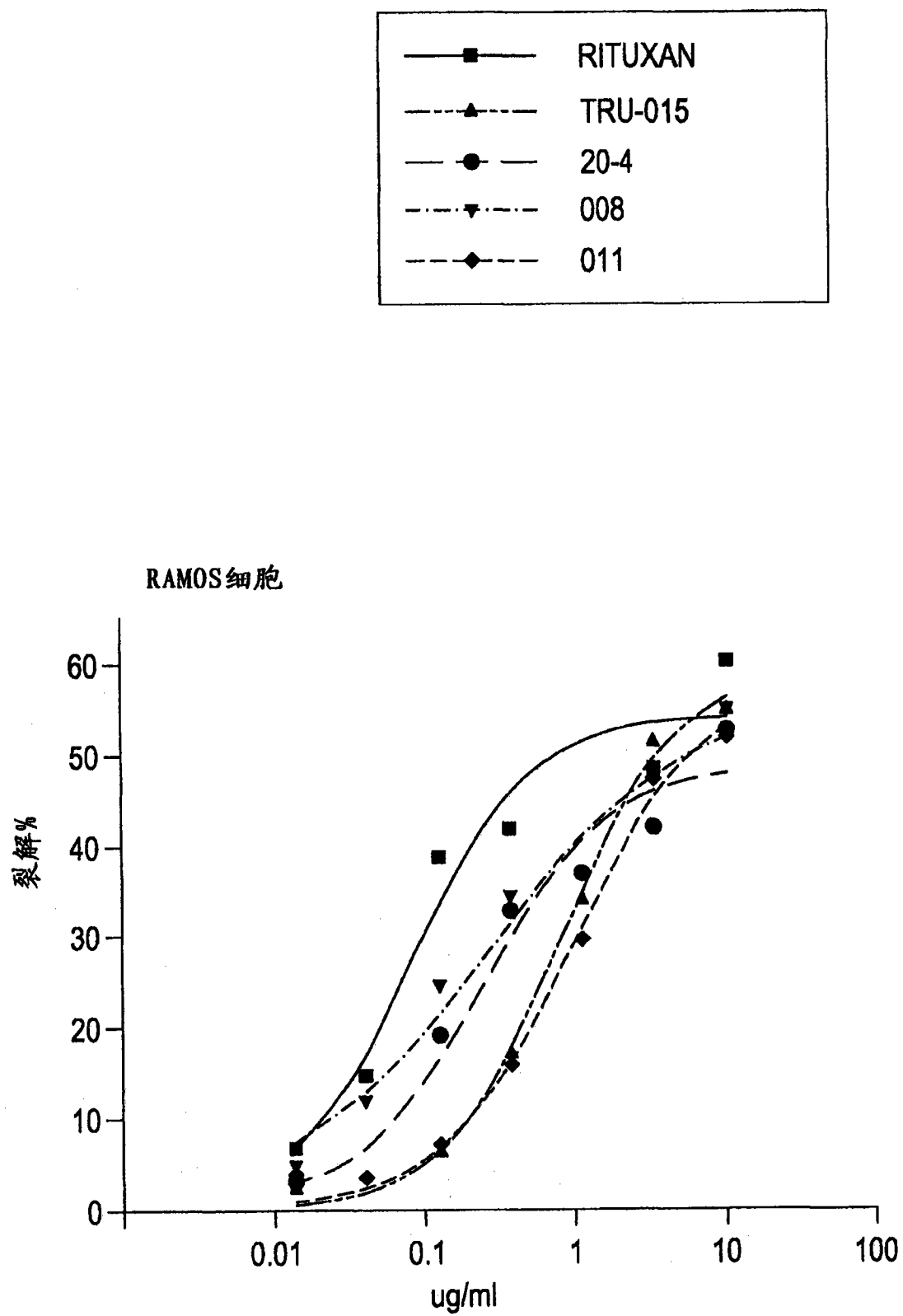


图 3A

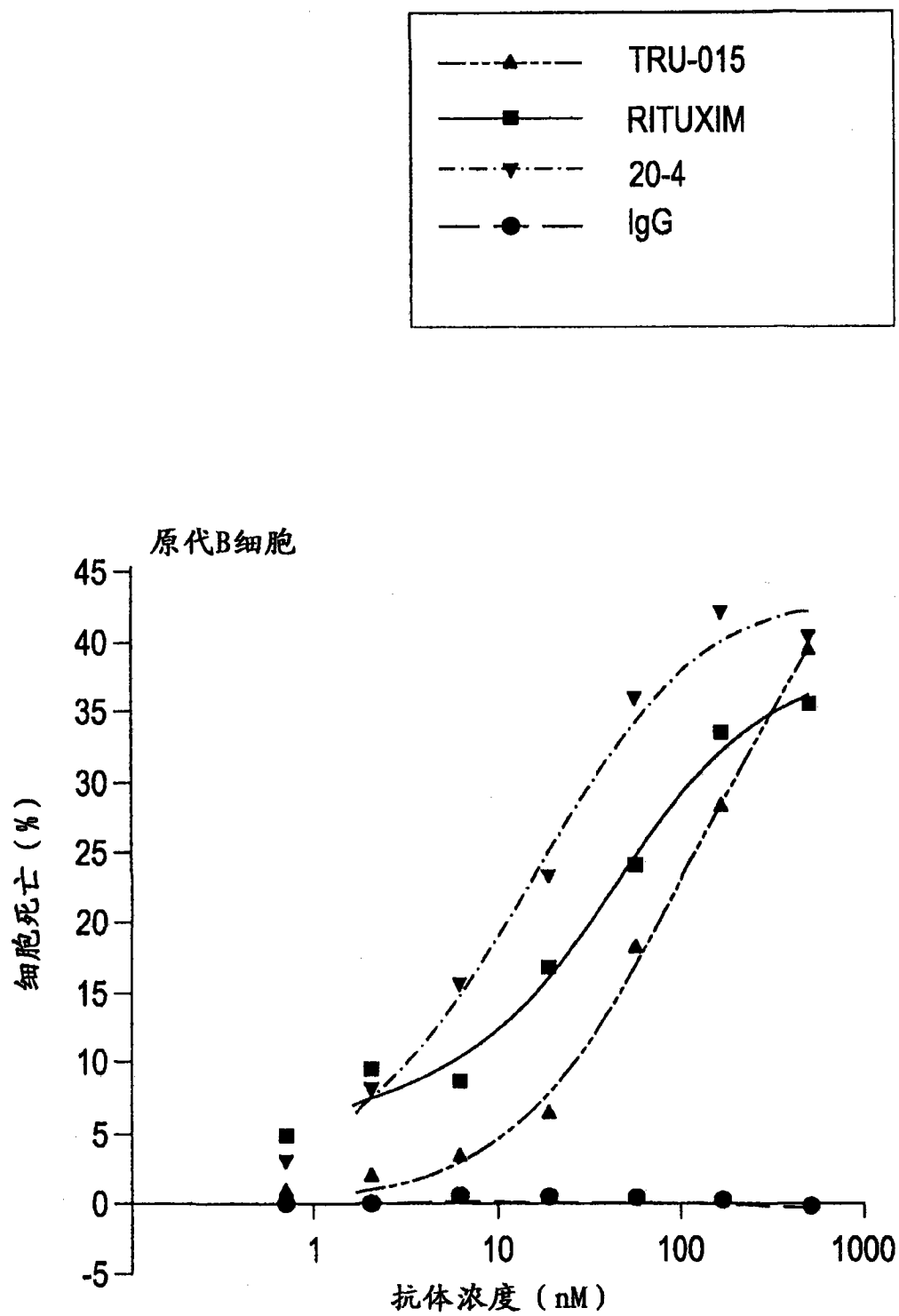


图 3B

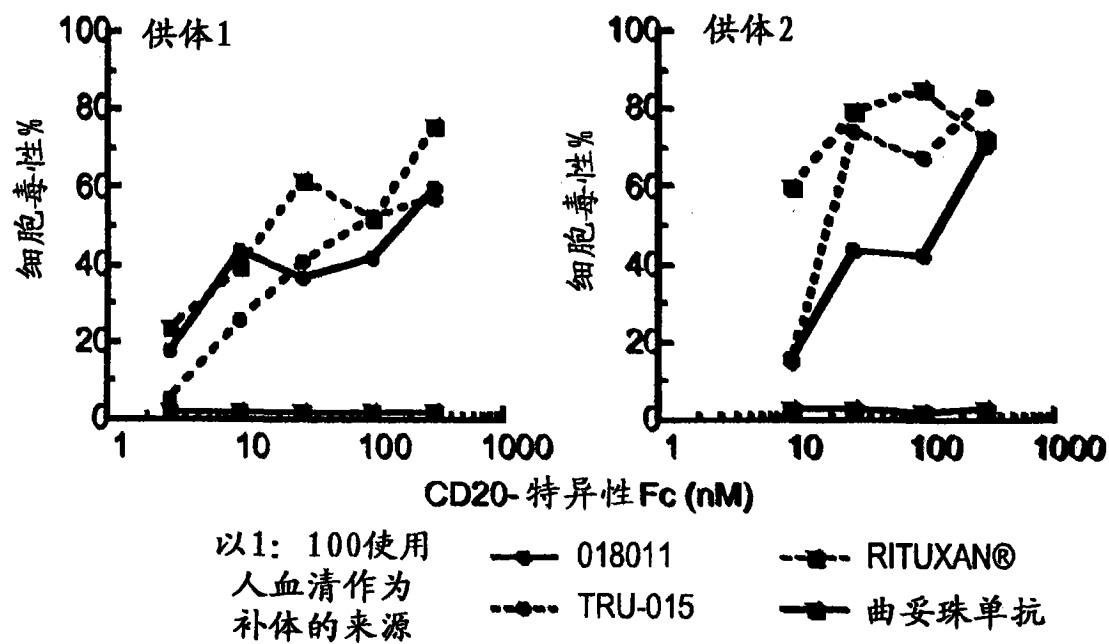


图 4A

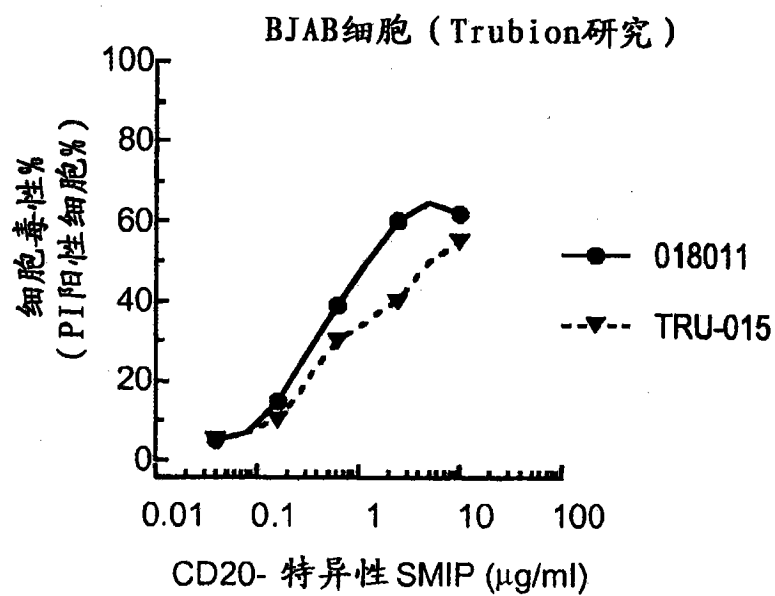


图 4B

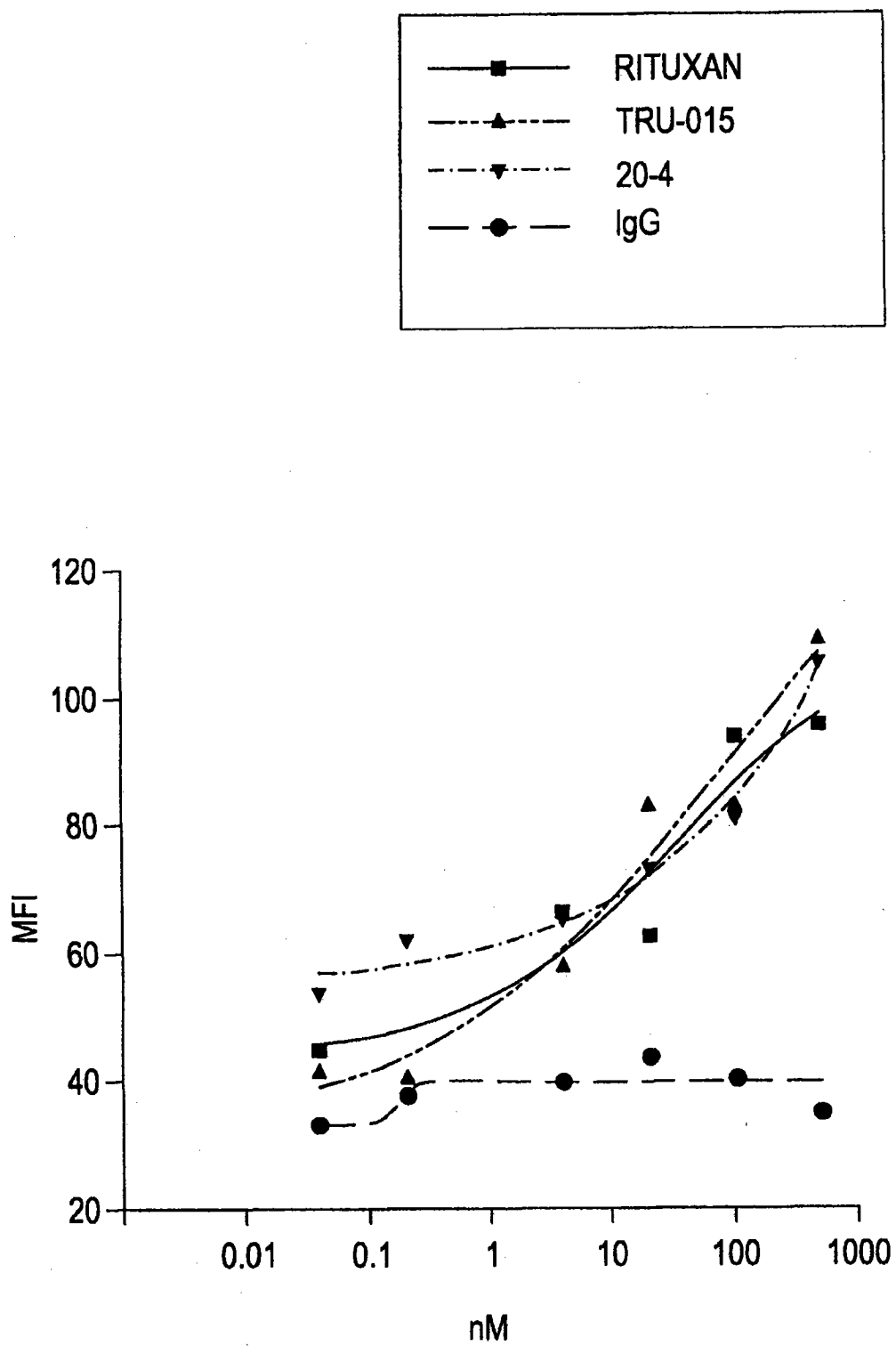


图 5

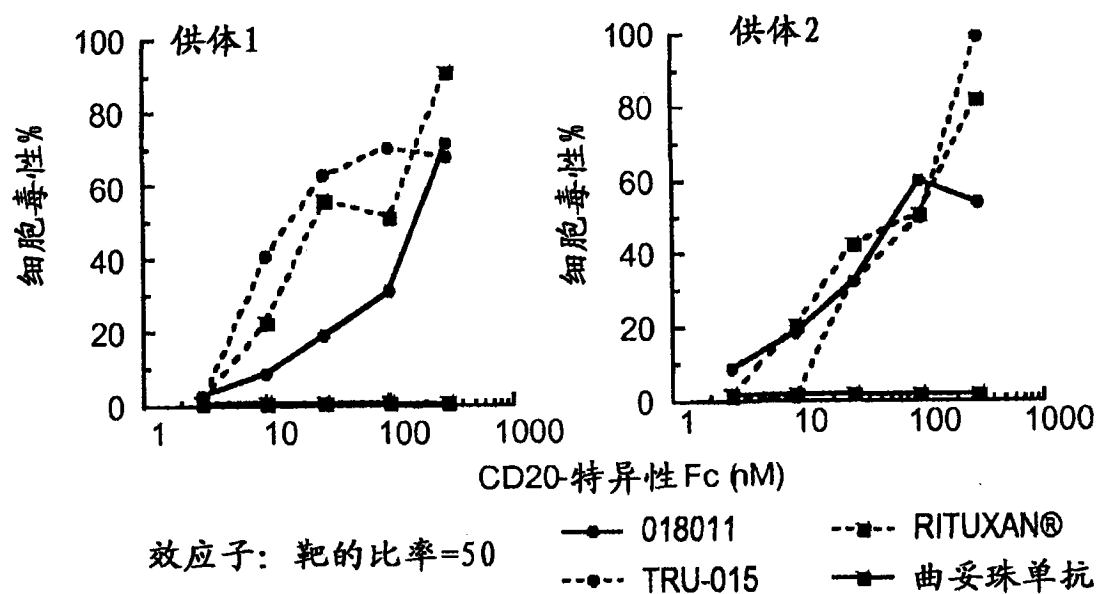


图 6A

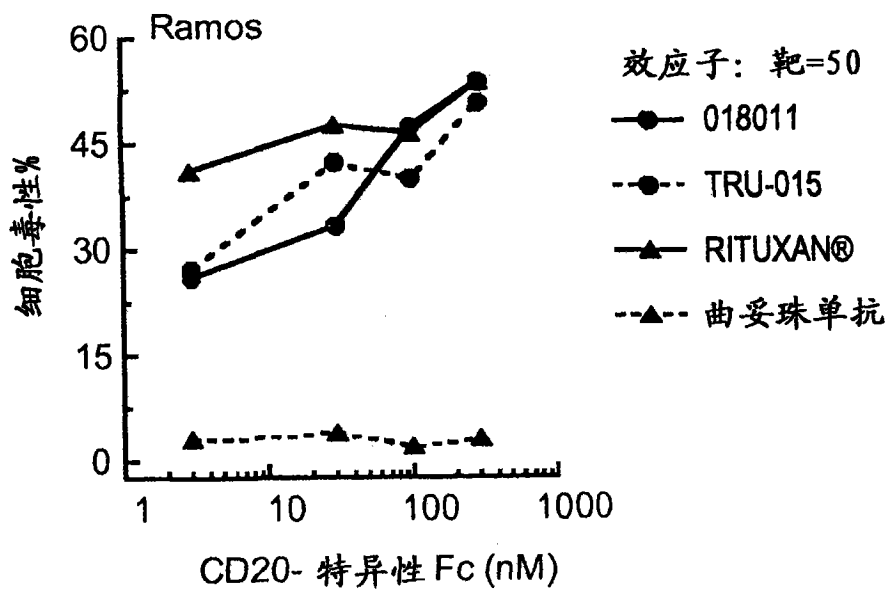


图 6B

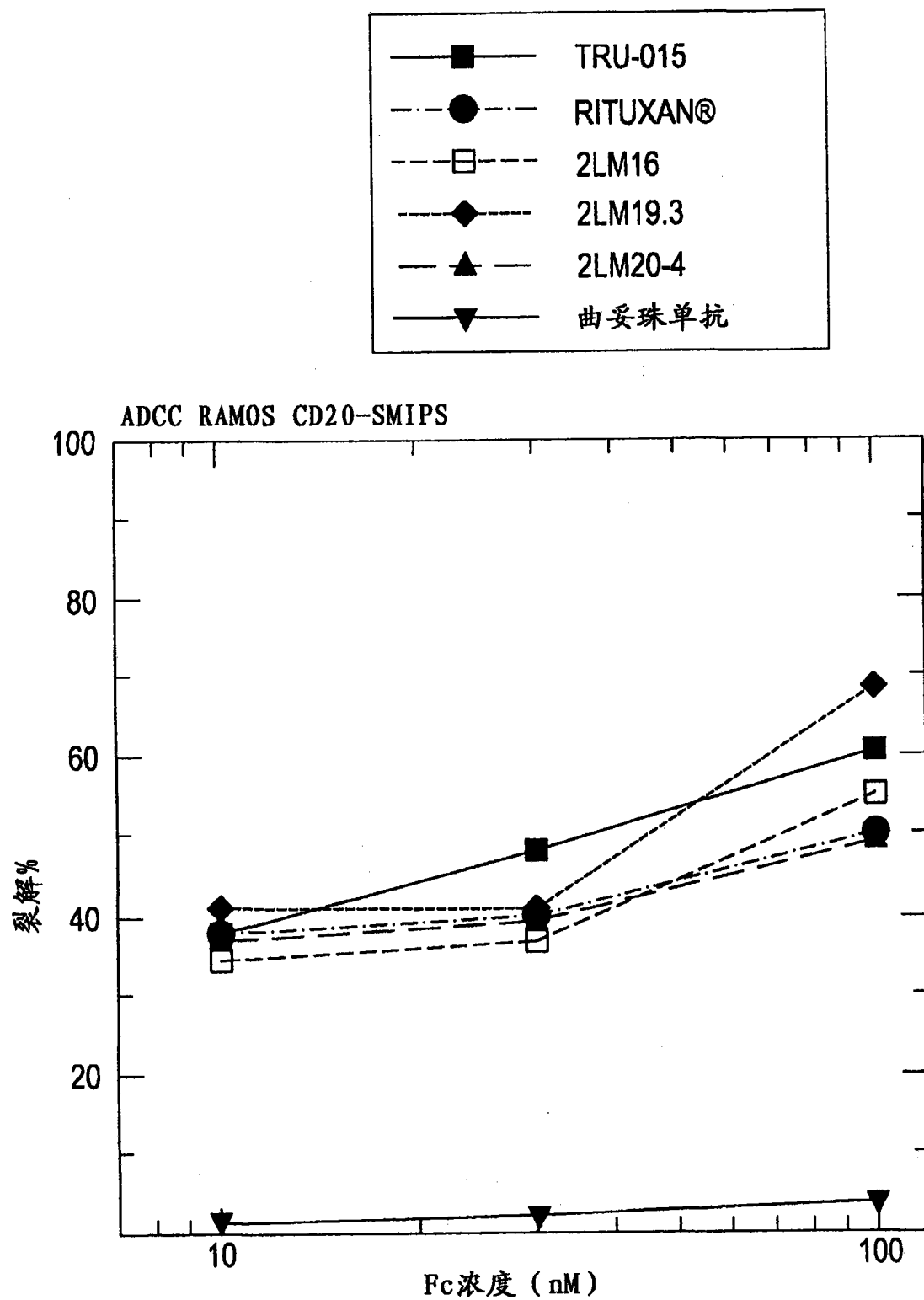


图 7

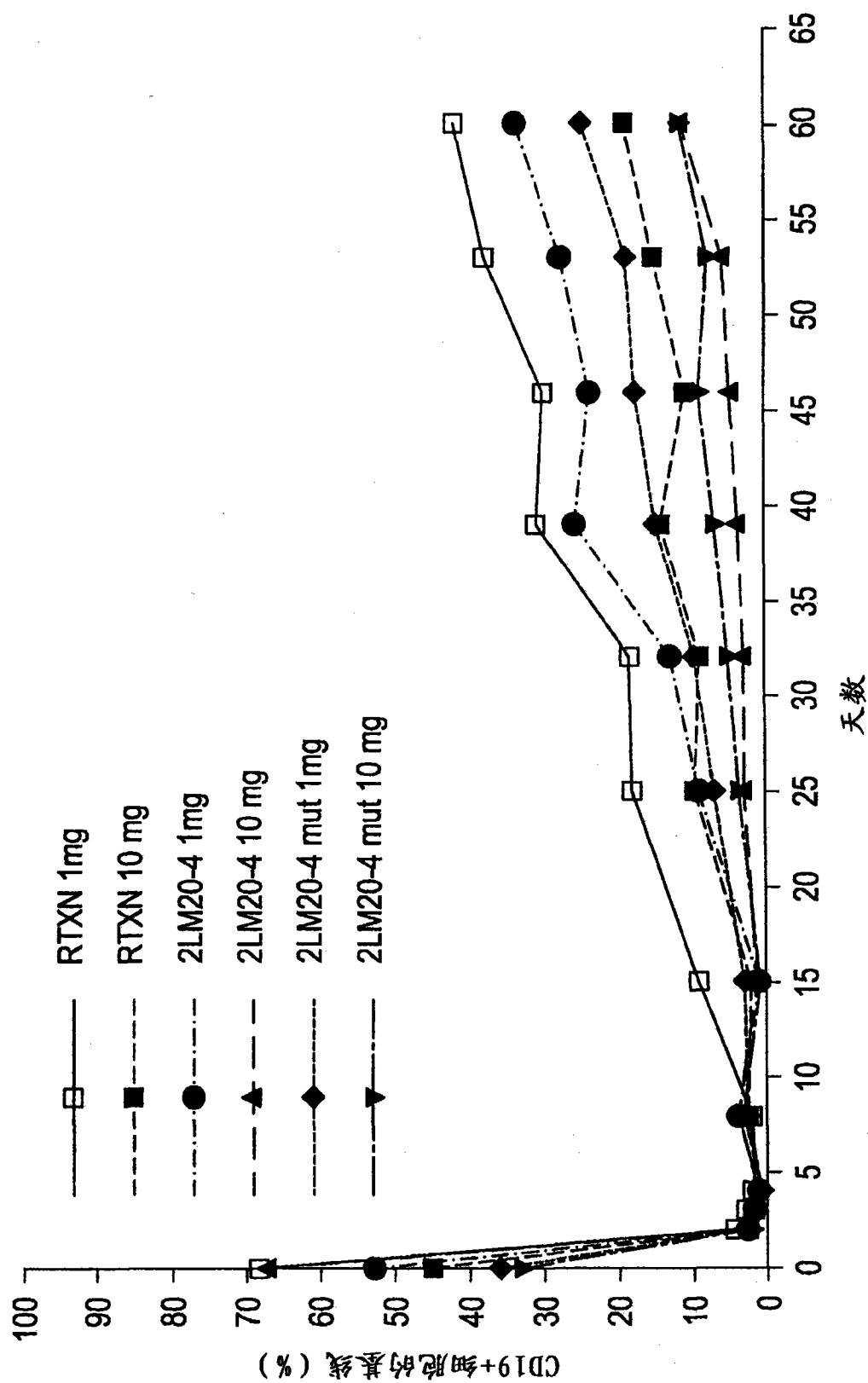


图 8

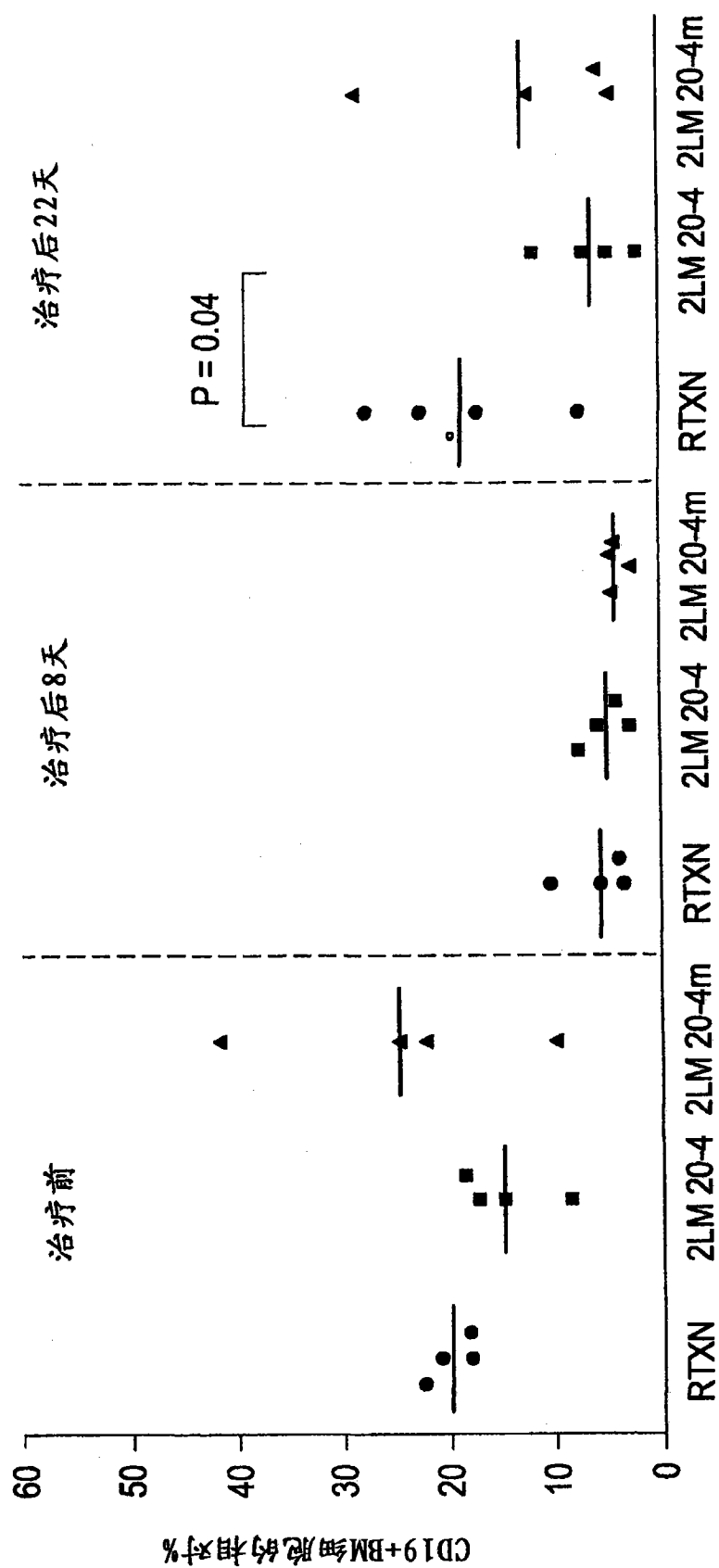


图 9

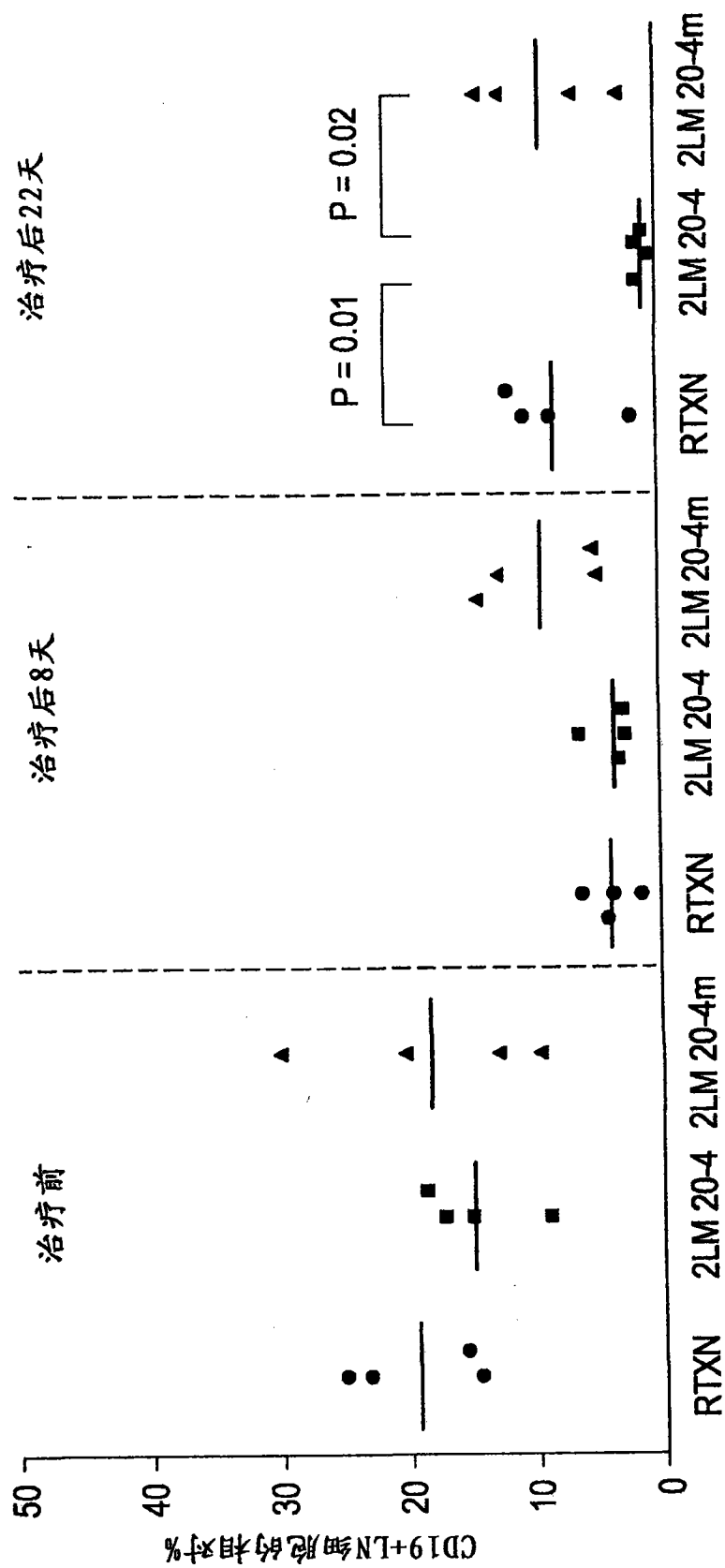


图 10

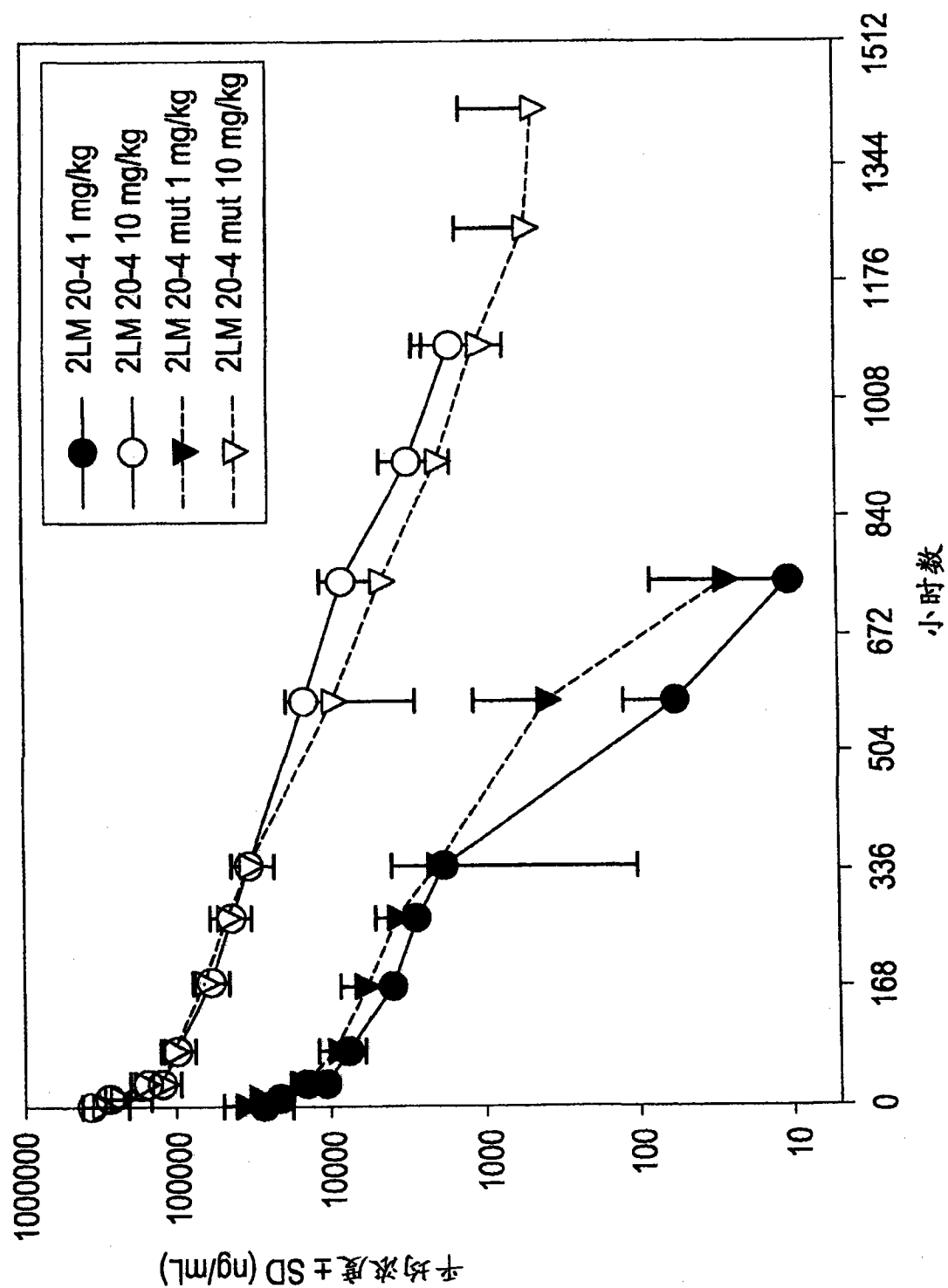


图 11

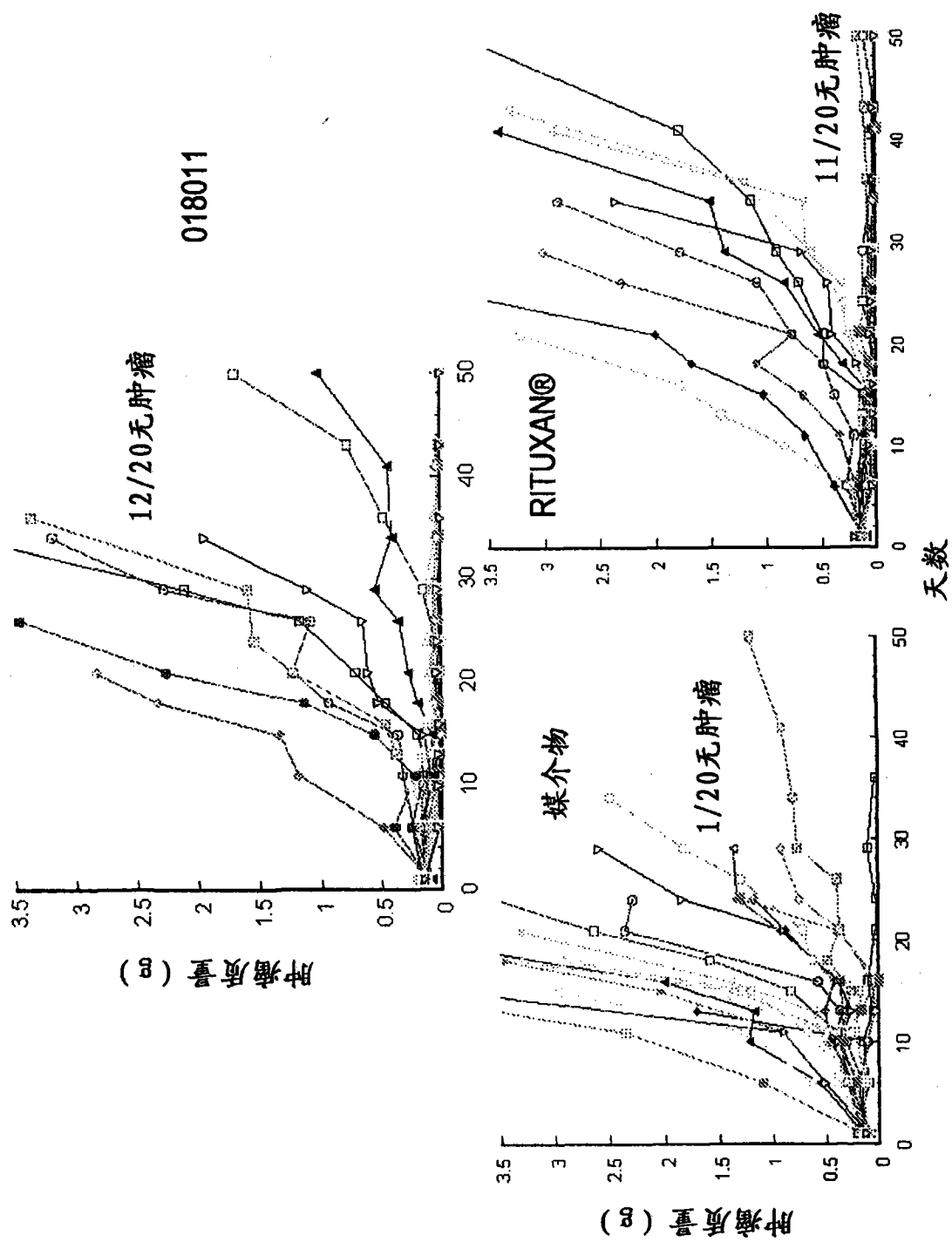


图 12

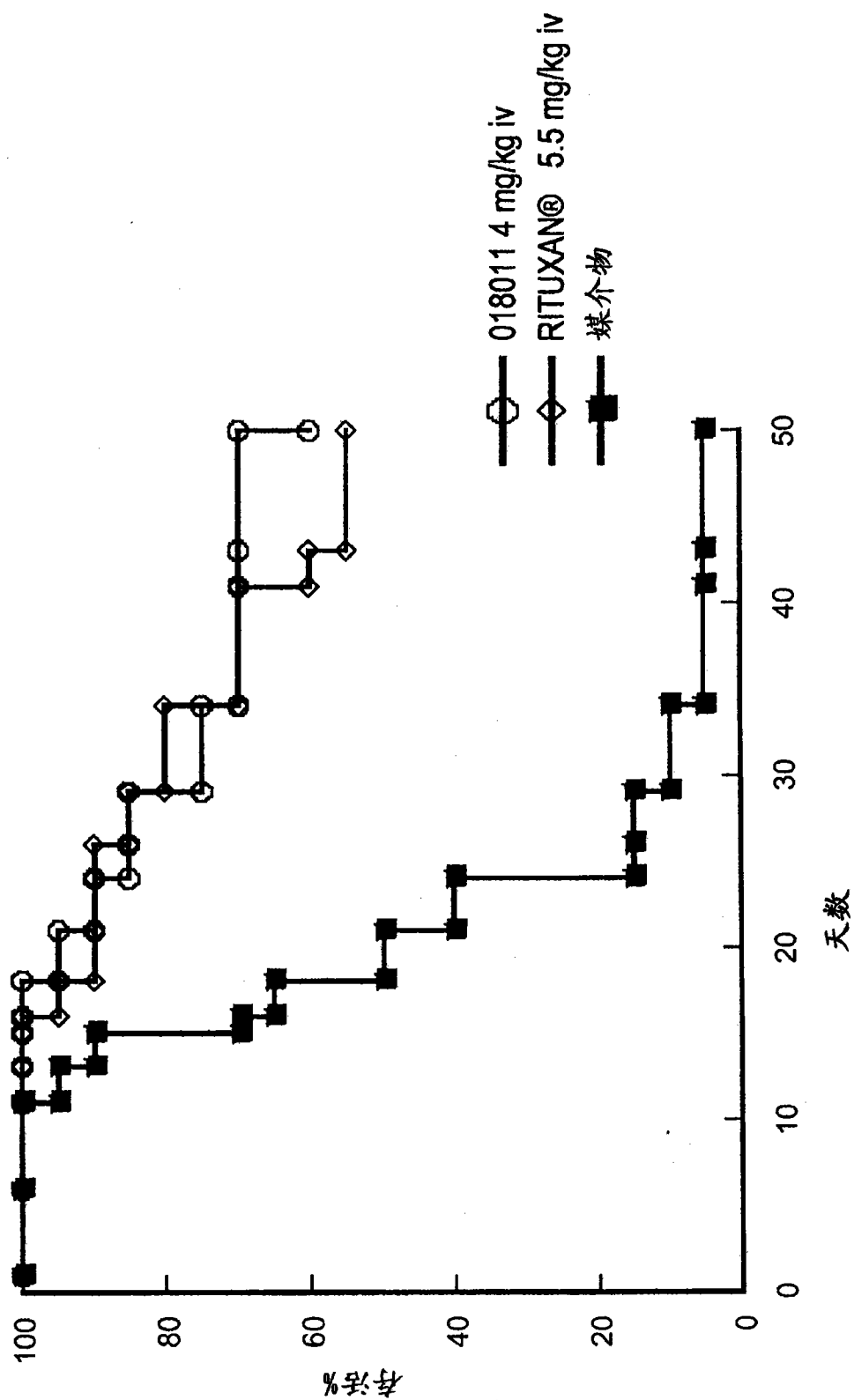


图 13

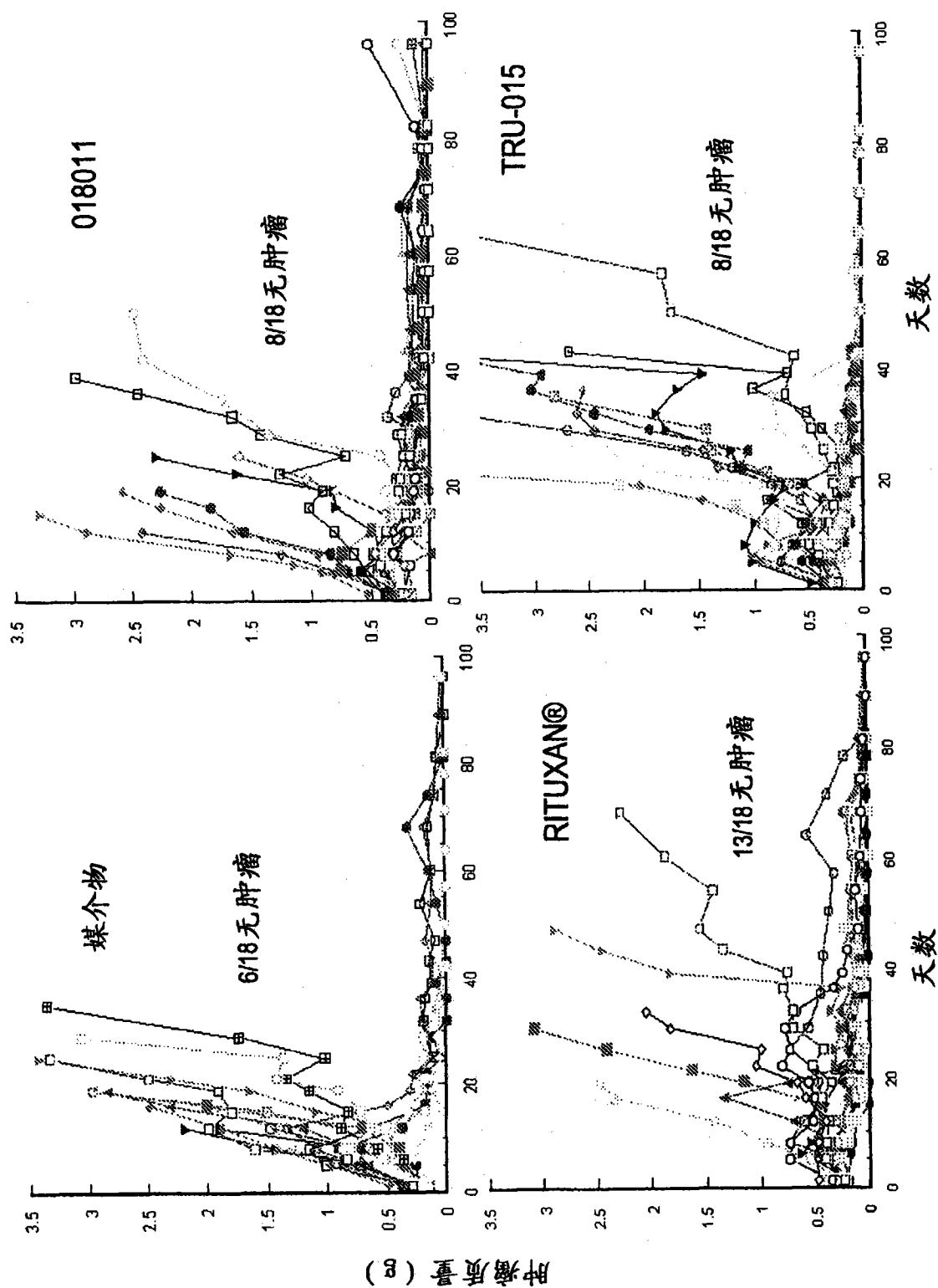


图 14

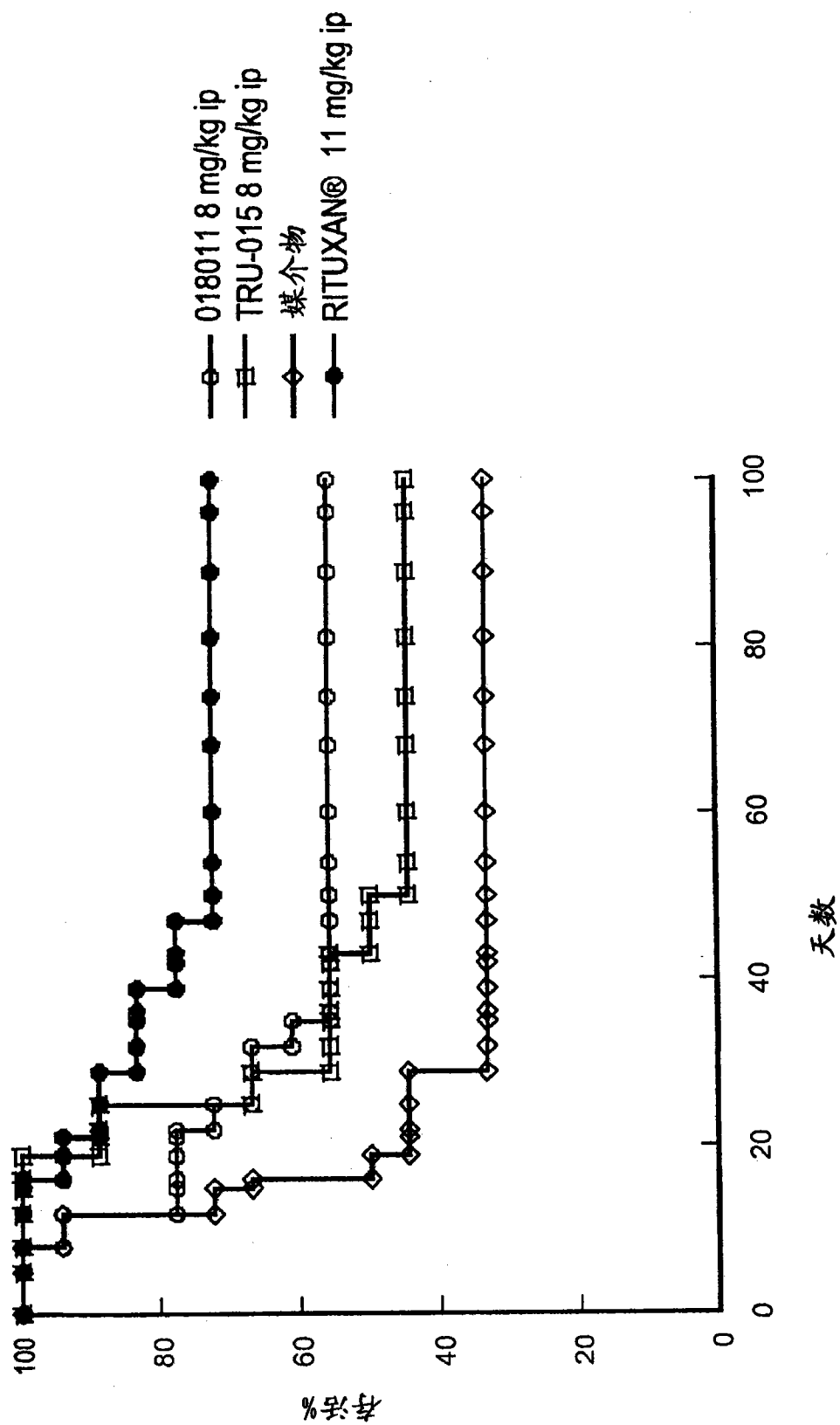


图 15

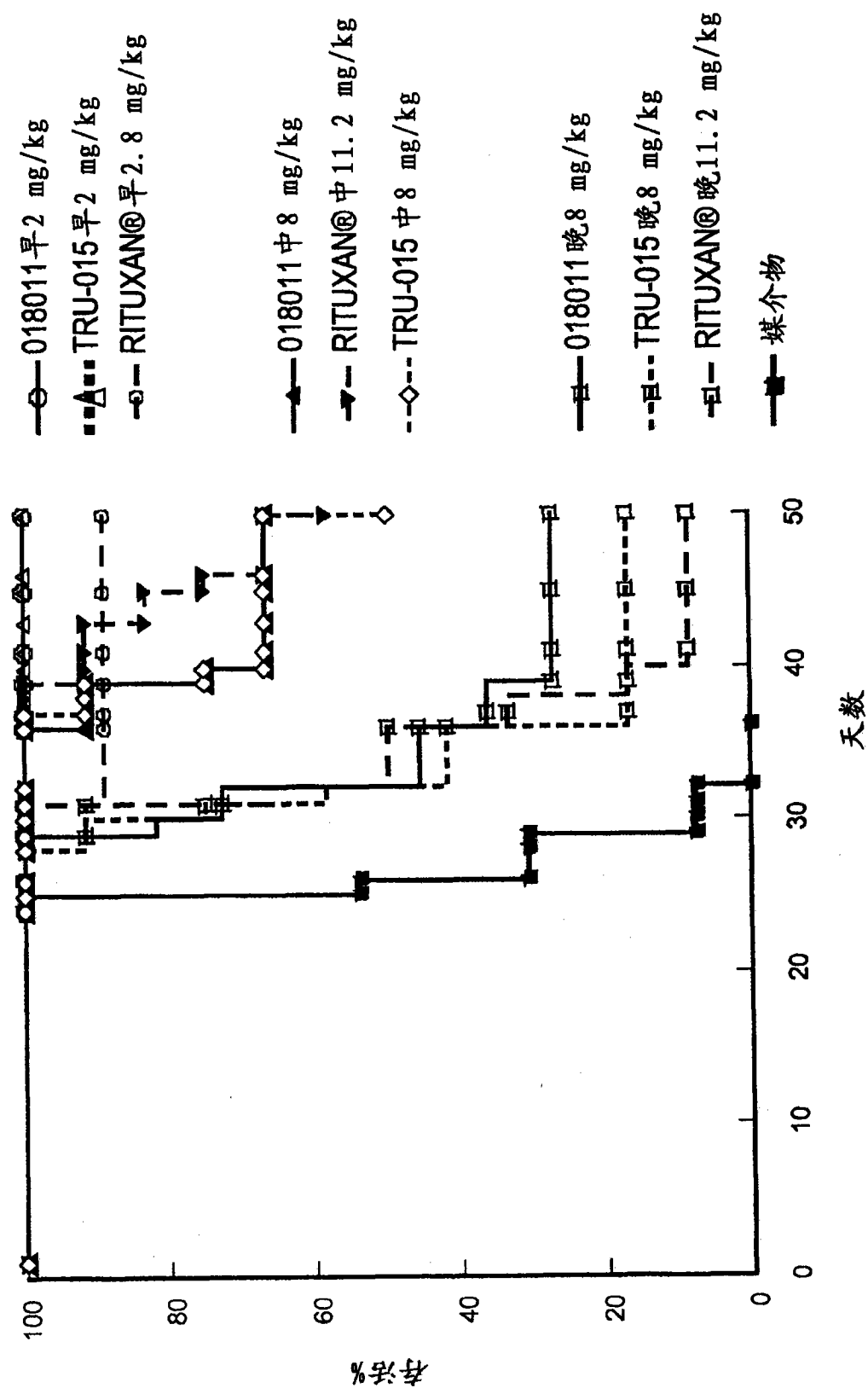


图 16

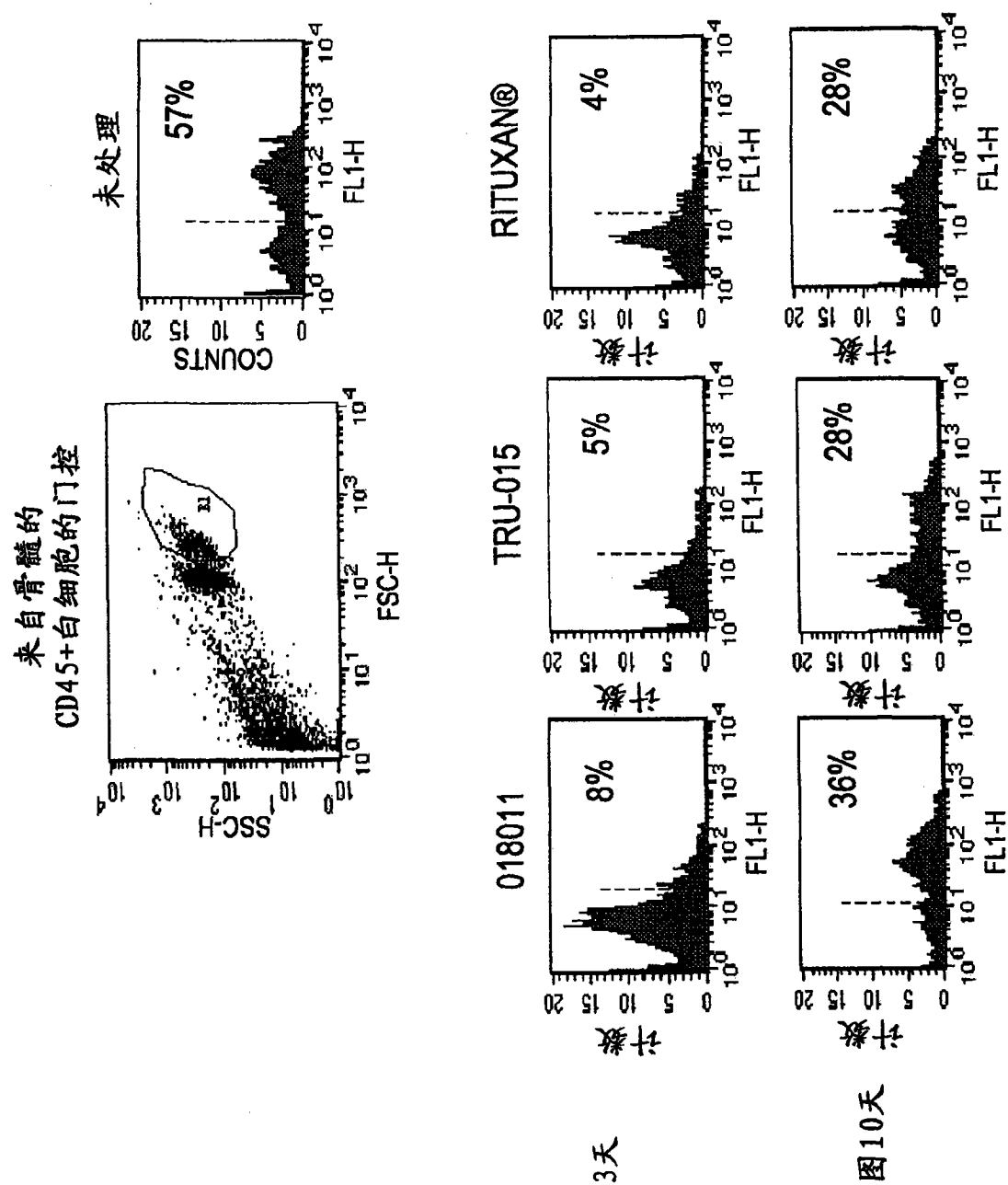


图 17

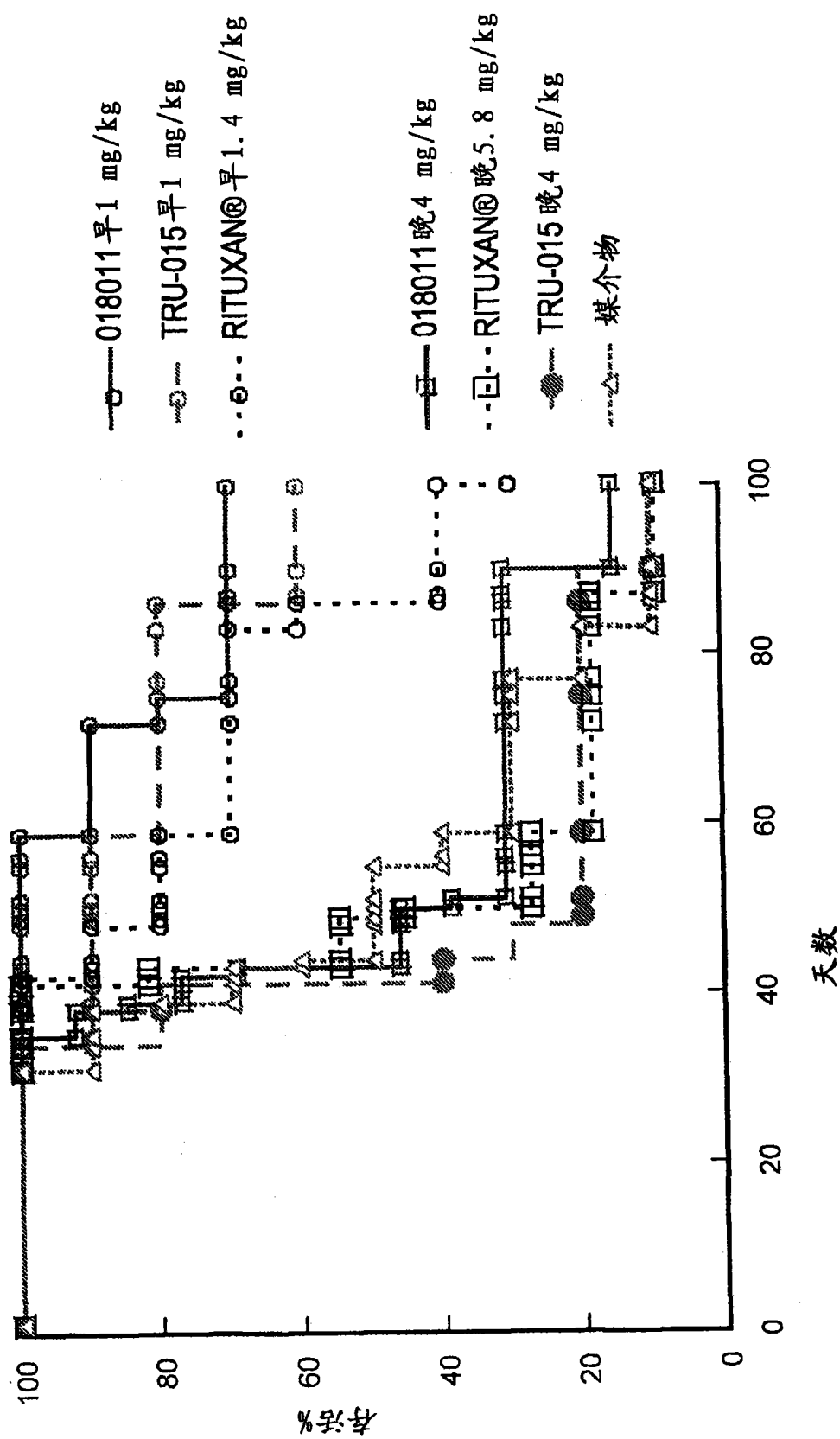


图 18

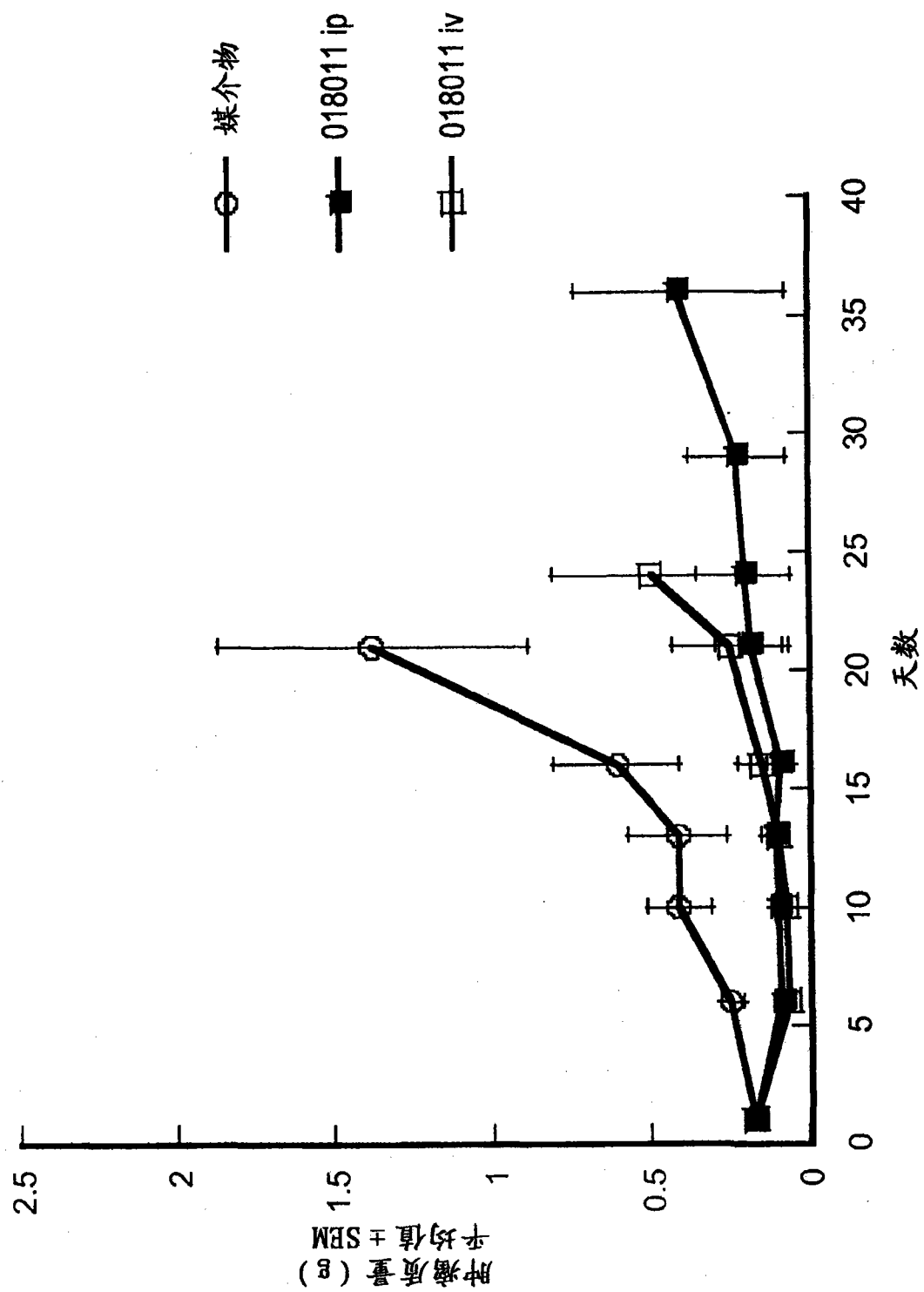


图 19

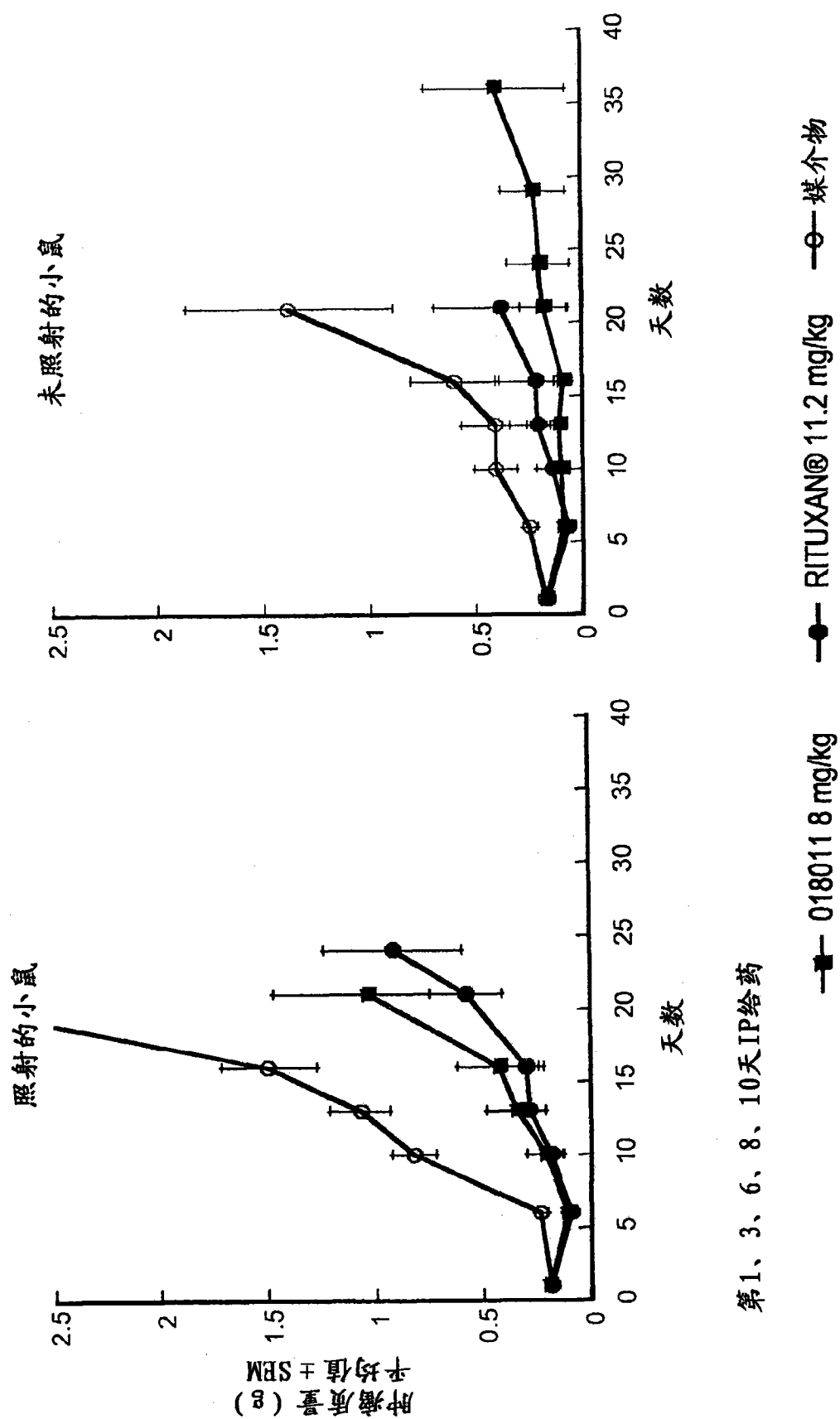


图 20

HuCD20候选物对RAMOS肿瘤的功效

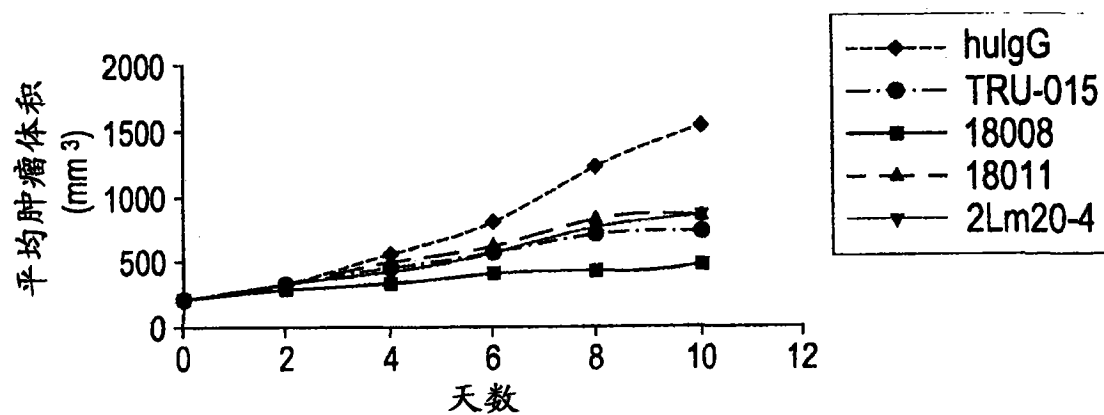


图 21A

HuCD20候选物对RAMOS肿瘤的功效

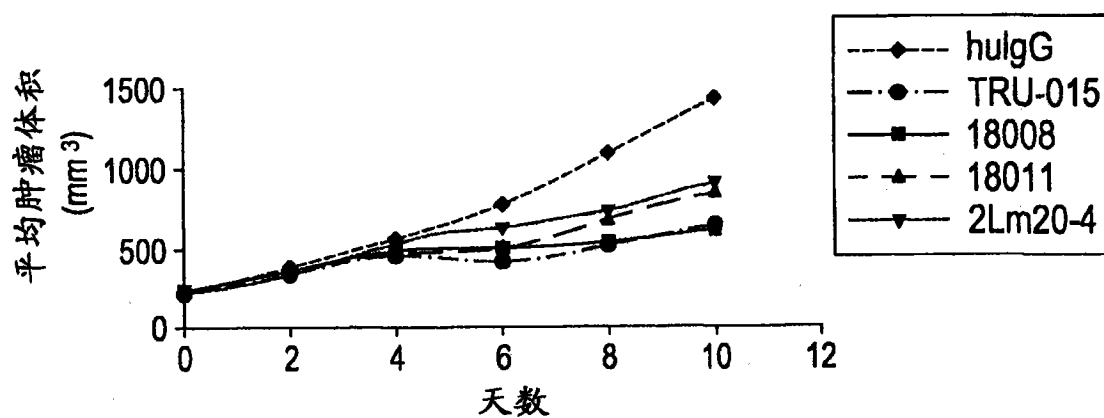


图 21B

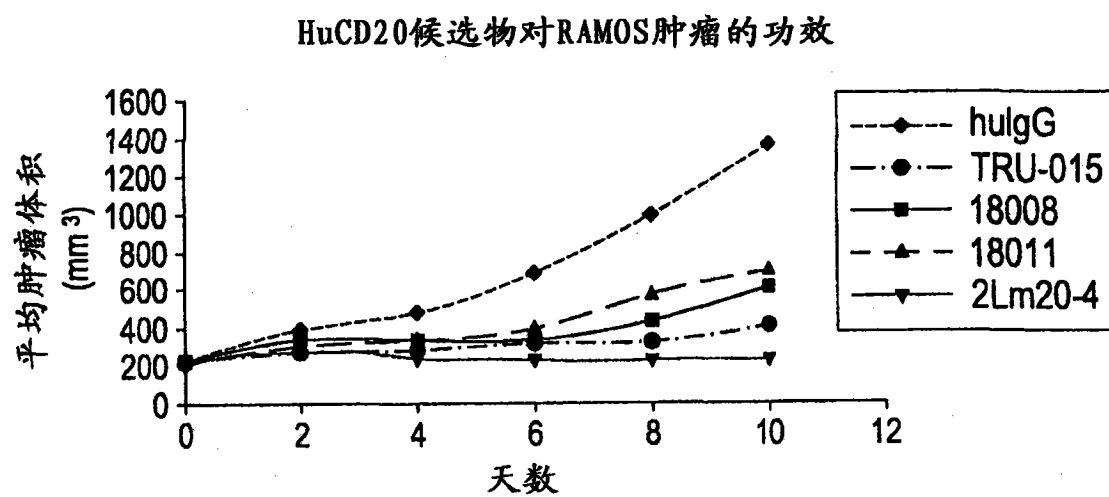


图 21C

使用指定事后检验的单向ANOVA中相关比较中的p值			
使用HulG作为对照的Dunnett's比较		所有组的Tukey's比较	
HulG vs TRU-015	< 0.05	< 0.05	> 0.05
HulG vs 18008	< 0.01	< 0.01	< 0.01
HulG vs 18011	> 0.05	> 0.05	> 0.05
HulG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	---	> 0.05

使用指定事后检验的单向ANOVA中相关比较中的p值			
使用HulG作为对照的Dunnett's比较		所有组的Tukey's比较	
HulG vs TRU-015	< 0.05	< 0.05	> 0.05
HulG vs 18008	< 0.01	< 0.001	< 0.001
HulG vs 18011	> 0.05	> 0.05	> 0.05
HulG vs 2Lm20-4	< 0.05	< 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---	---	> 0.05
TRU-015 vs 18011	---	---	> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---	---	> 0.05
18008 vs 18011	---	---	> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---	---	> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---	---	> 0.05

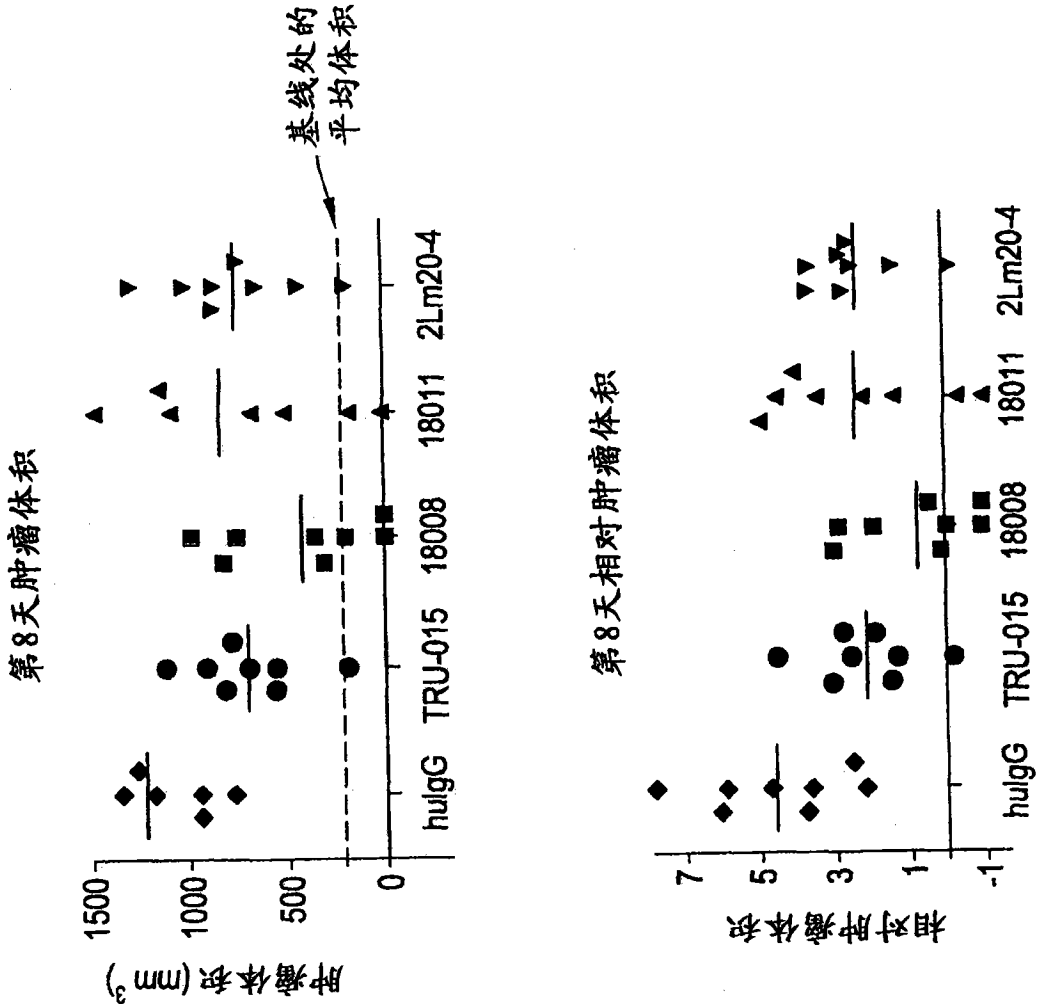


图 22A

使用指定事后检验的单向ANOVA中相关比较中的p值			
使用HulgG作为对照的Dunnett's比较		所有组的Tukey's比较	
HulgG vs TRU-015	< 0.05	< 0.05	< 0.05
HulgG vs 18008	< 0.05	< 0.05	< 0.05
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---		> 0.05
TRU-015 vs 18011	---		> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---		> 0.05
18008 vs 18011	---		> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---		> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---		> 0.05

使用指定事后检验的单向ANOVA中相关比较中的p值			
使用HulgG作为对照的Dunnett's比较		所有组的Tukey's比较	
HulgG vs TRU-015	< 0.05	< 0.05	< 0.05
HulgG vs 18008	< 0.05	< 0.05	< 0.05
HulgG vs 18011	> 0.05	> 0.05	> 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	> 0.05	> 0.05	> 0.05
TRU-015 vs 18008	---		> 0.05
TRU-015 vs 18011	---		> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4	---		> 0.05
18008 vs 18011	---		> 0.05
18008 vs 2Lm20-4	---		> 0.05
18011 vs 2Lm20-4	---		> 0.05

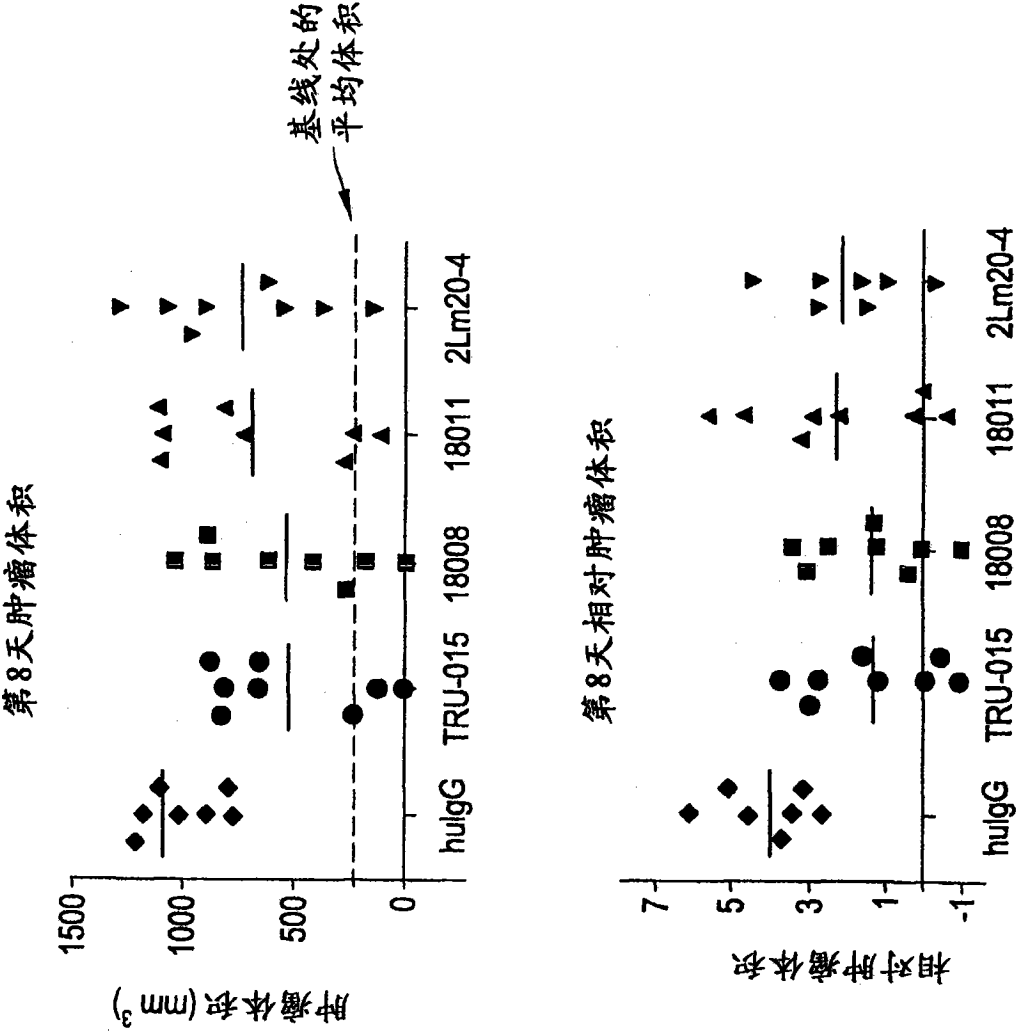


图 22B

使用指定事后检验的单向ANOVA中相关比较中的p值			
	使用HulgG作为对照的Dunnett's比较		所有组的Tukey's比较
HulgG vs TRU-015	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01
HulgG vs 18008	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.05
HulgG vs 18011	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.001
TRU-015 vs 18008			> 0.05
TRU-015 vs 18011			> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4			> 0.05
18008 vs 18011			> 0.05
18008 vs 2Lm20-4			> 0.05
18011 vs 2Lm20-4			> 0.05

使用指定事后检验的单向ANOVA中相关比较中的p值			
	使用HulgG作为对照的Dunnett's比较		所有组的Tukey's比较
HulgG vs TRU-015	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01
HulgG vs 18008	P < 0.05	P < 0.05	P < 0.05
HulgG vs 18011	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
HulgG vs 2Lm20-4	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01
TRU-015 vs 18008			> 0.05
TRU-015 vs 18011			> 0.05
TRU-015 vs 2Lm20-4			> 0.05
18008 vs 18011			> 0.05
18008 vs 2Lm20-4			> 0.05
18011 vs 2Lm20-4			> 0.05

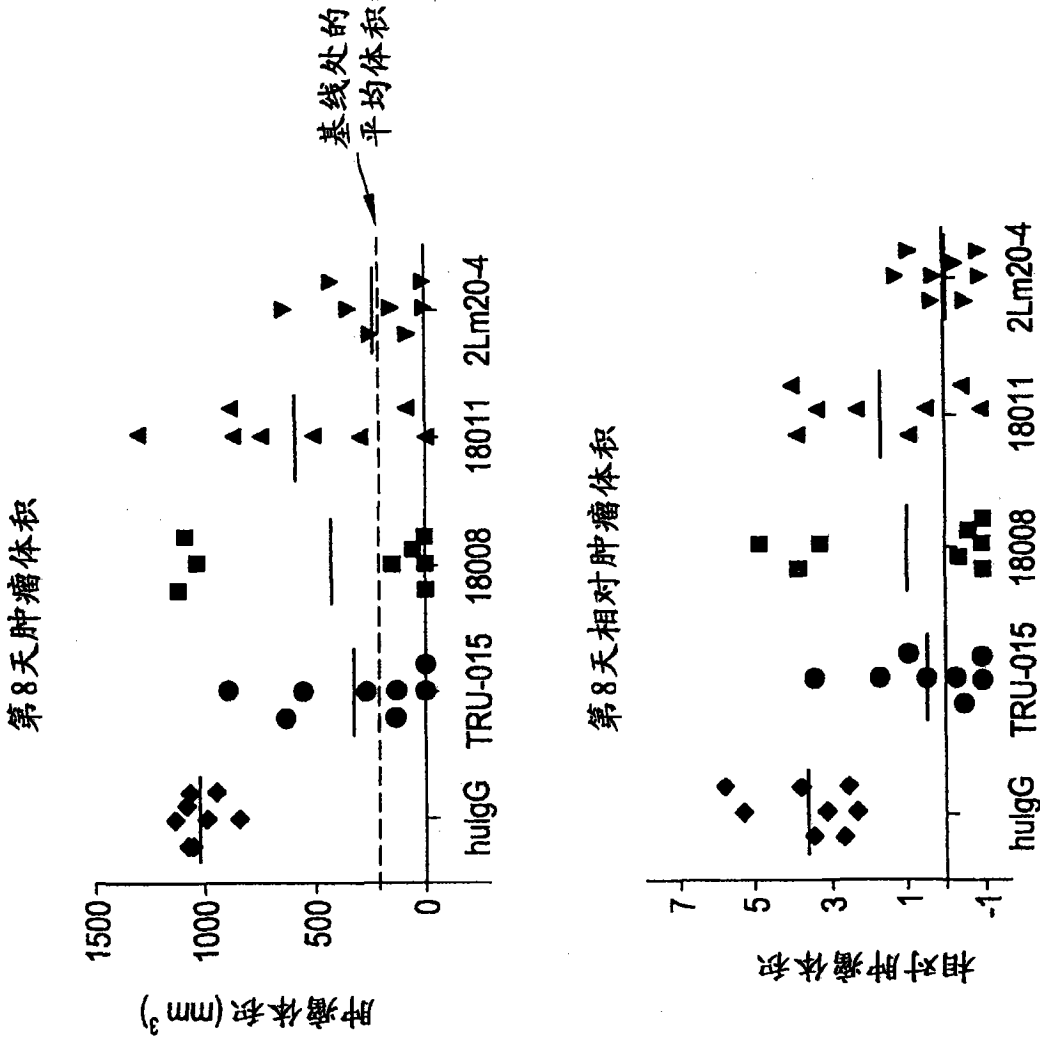


图 22C

112

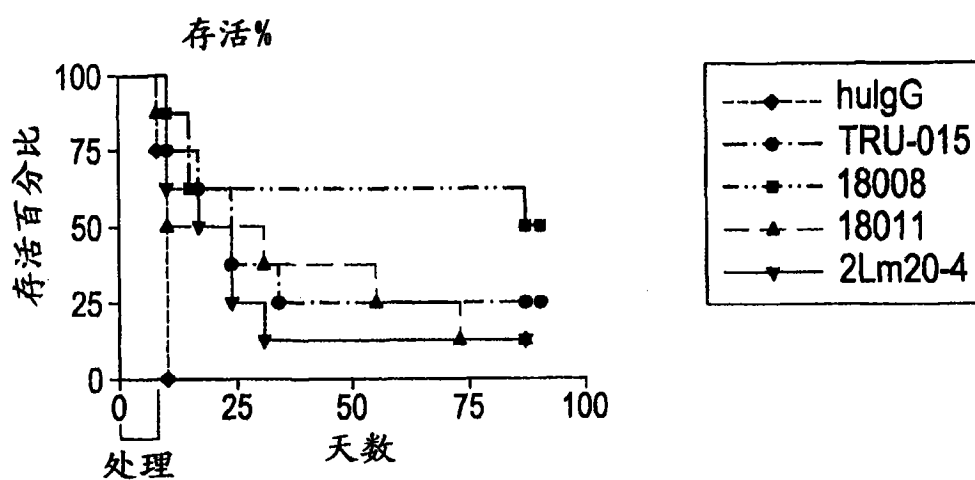


图 23A

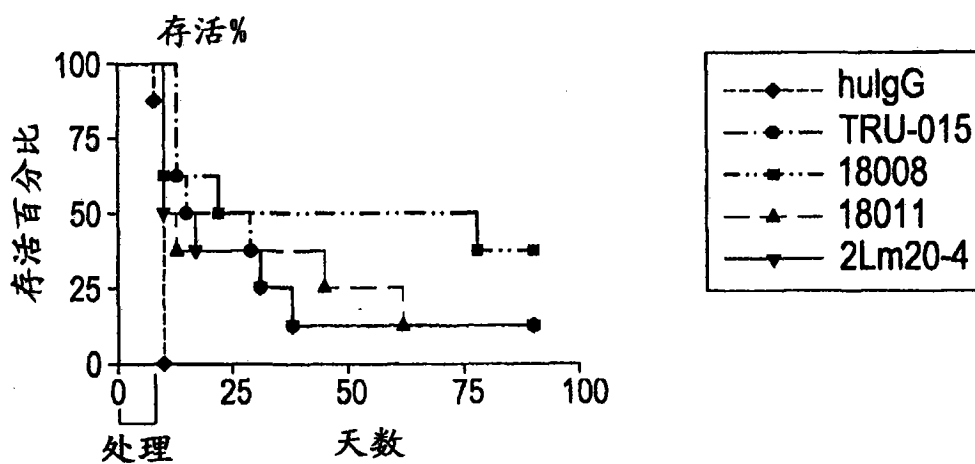


图 23B

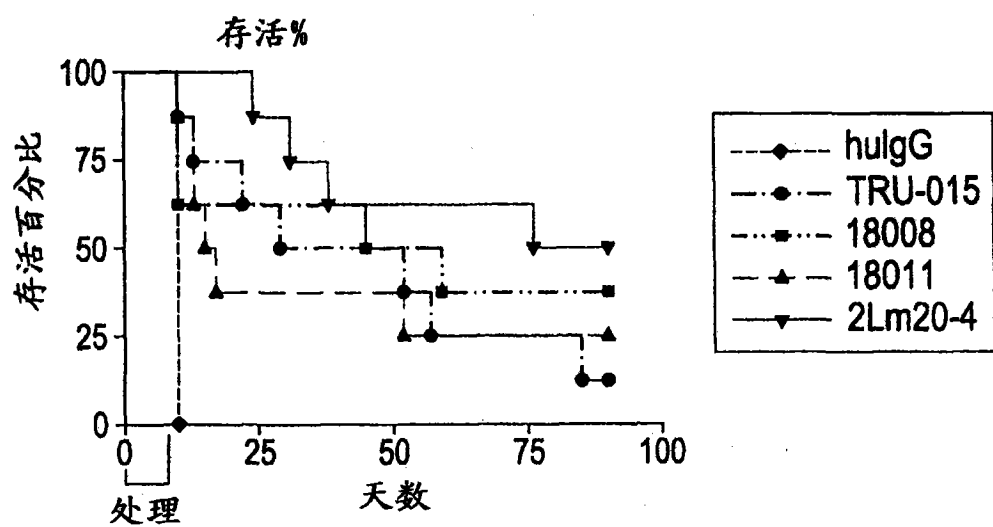


图 23C

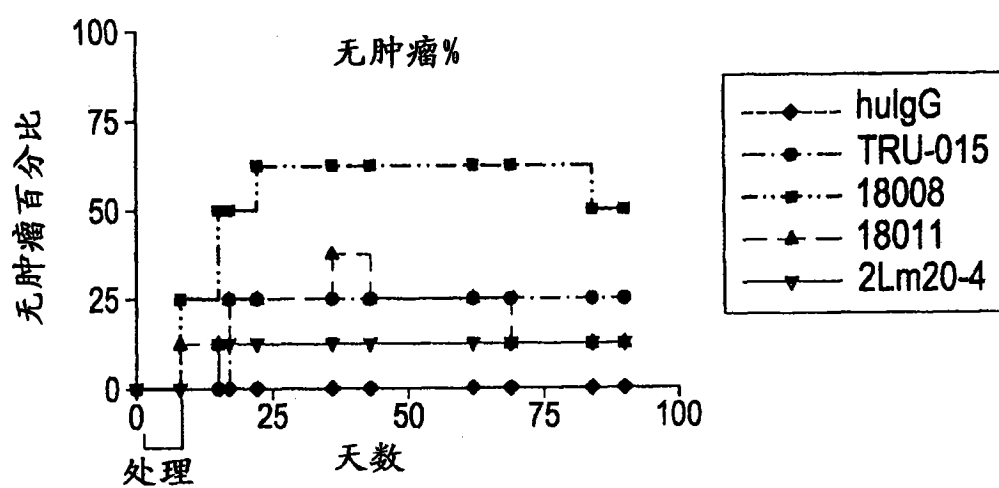


图 24A

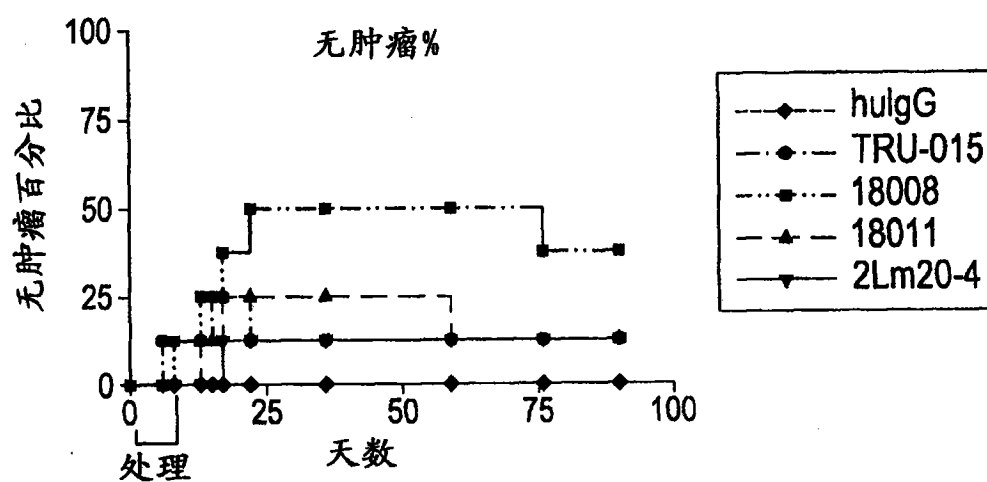


图 24B

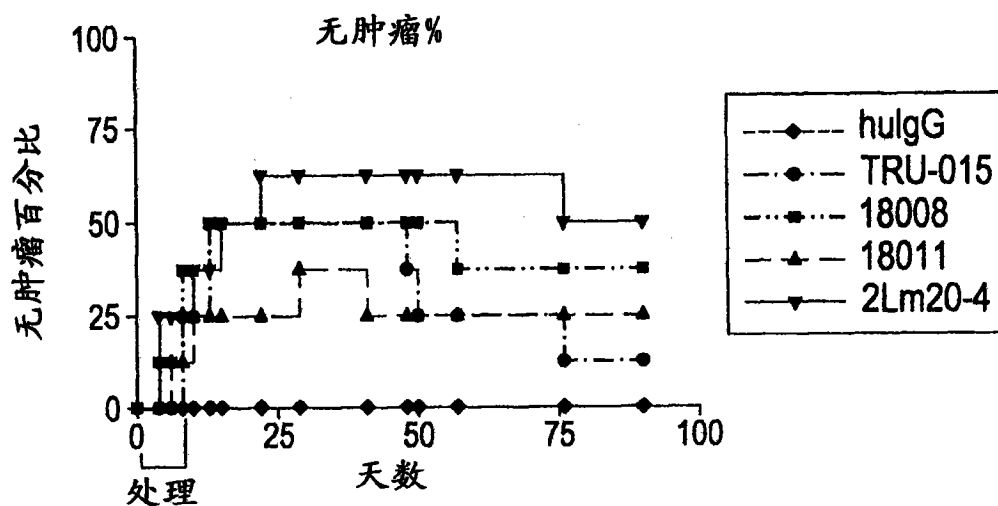


图 24C

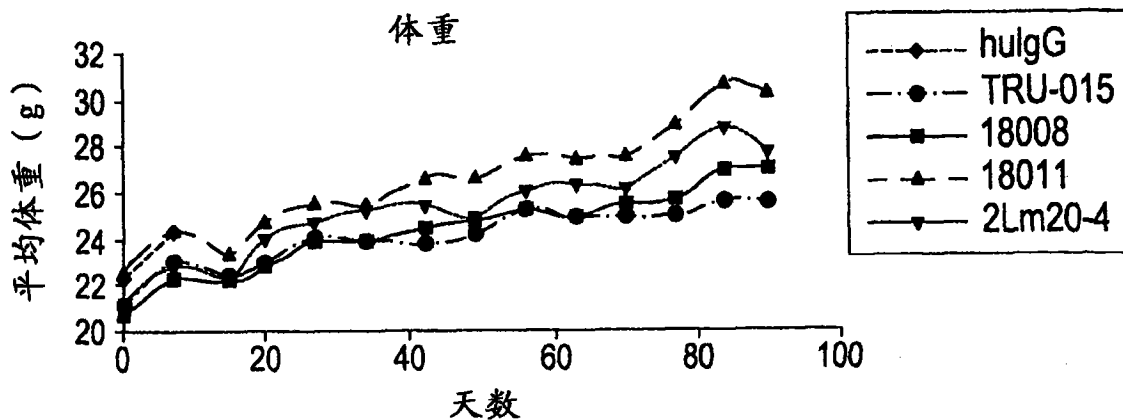


图 25A

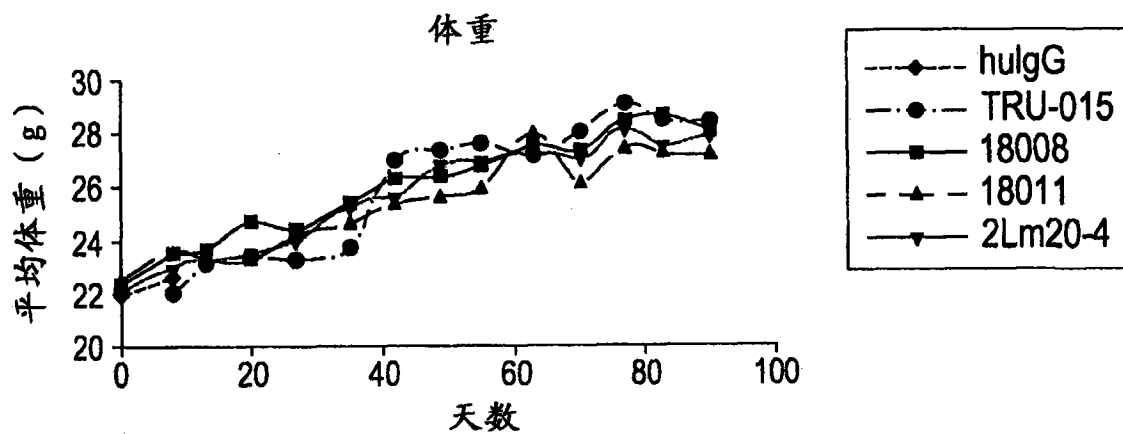


图 25B

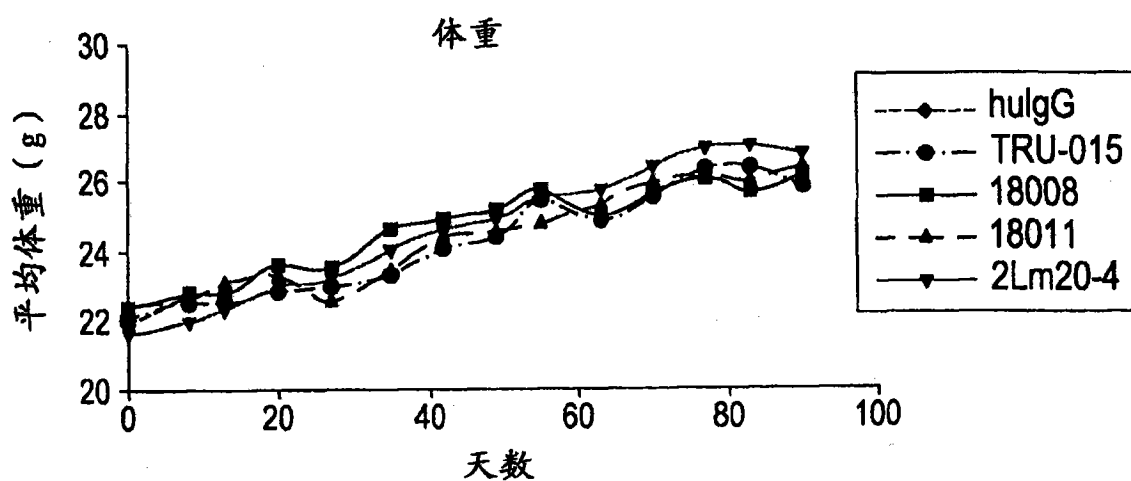


图 25C

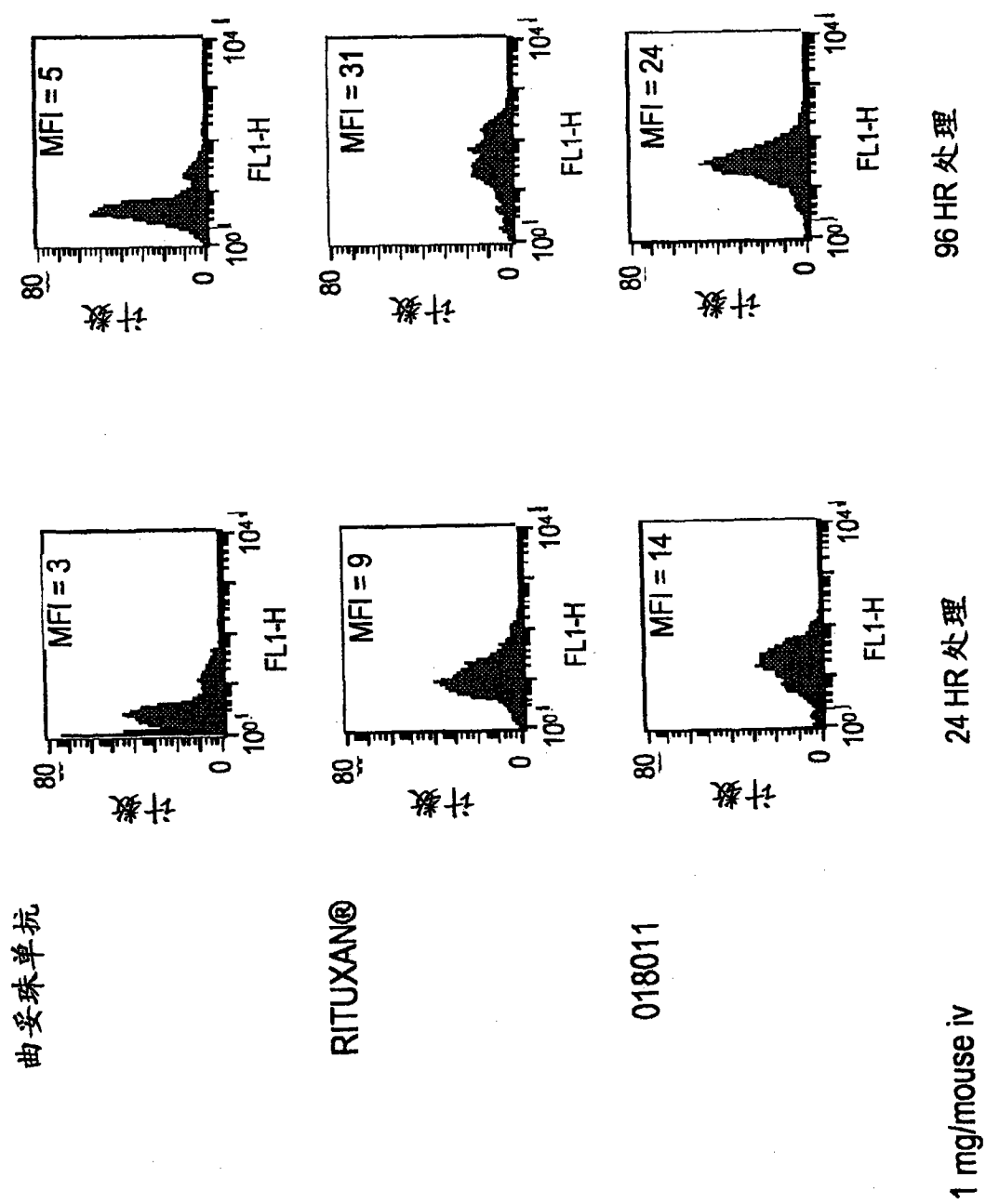


图 26

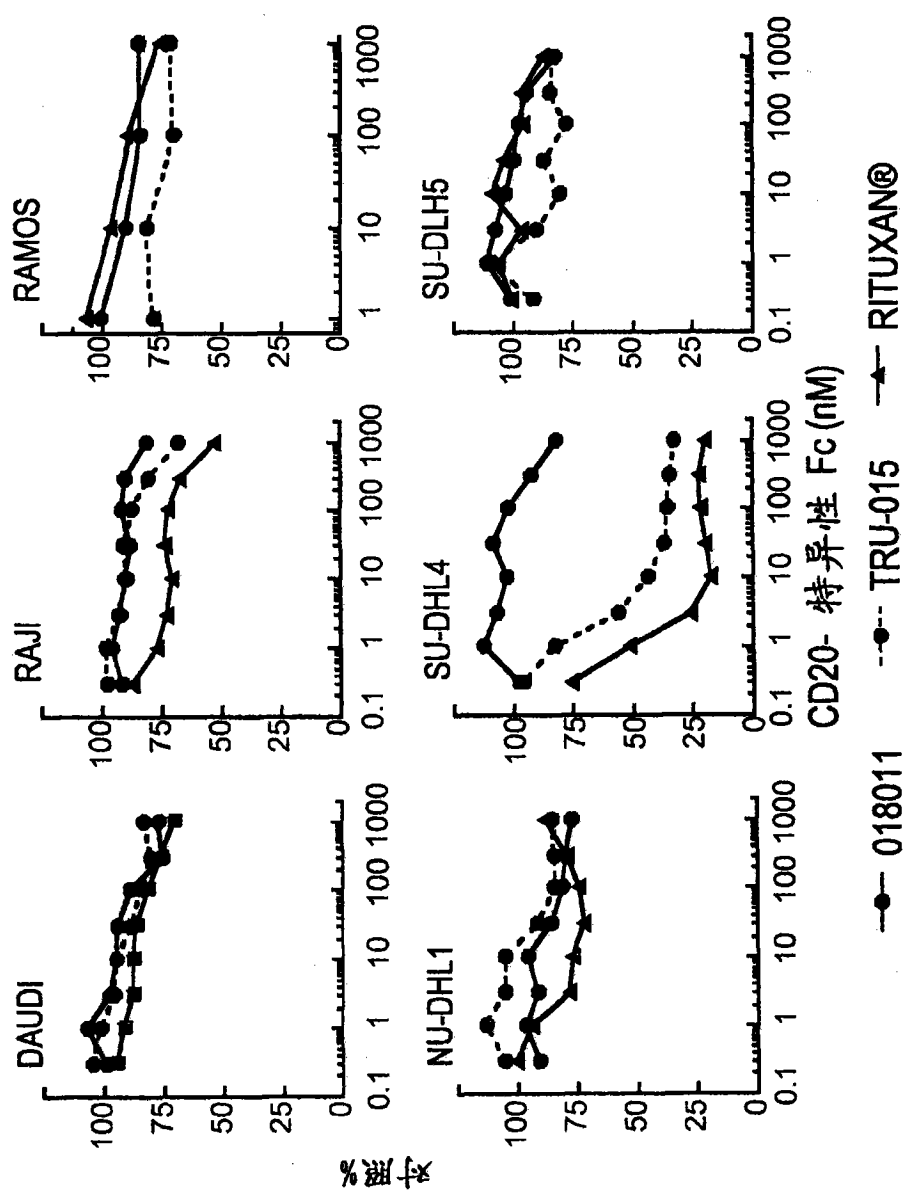


图 27

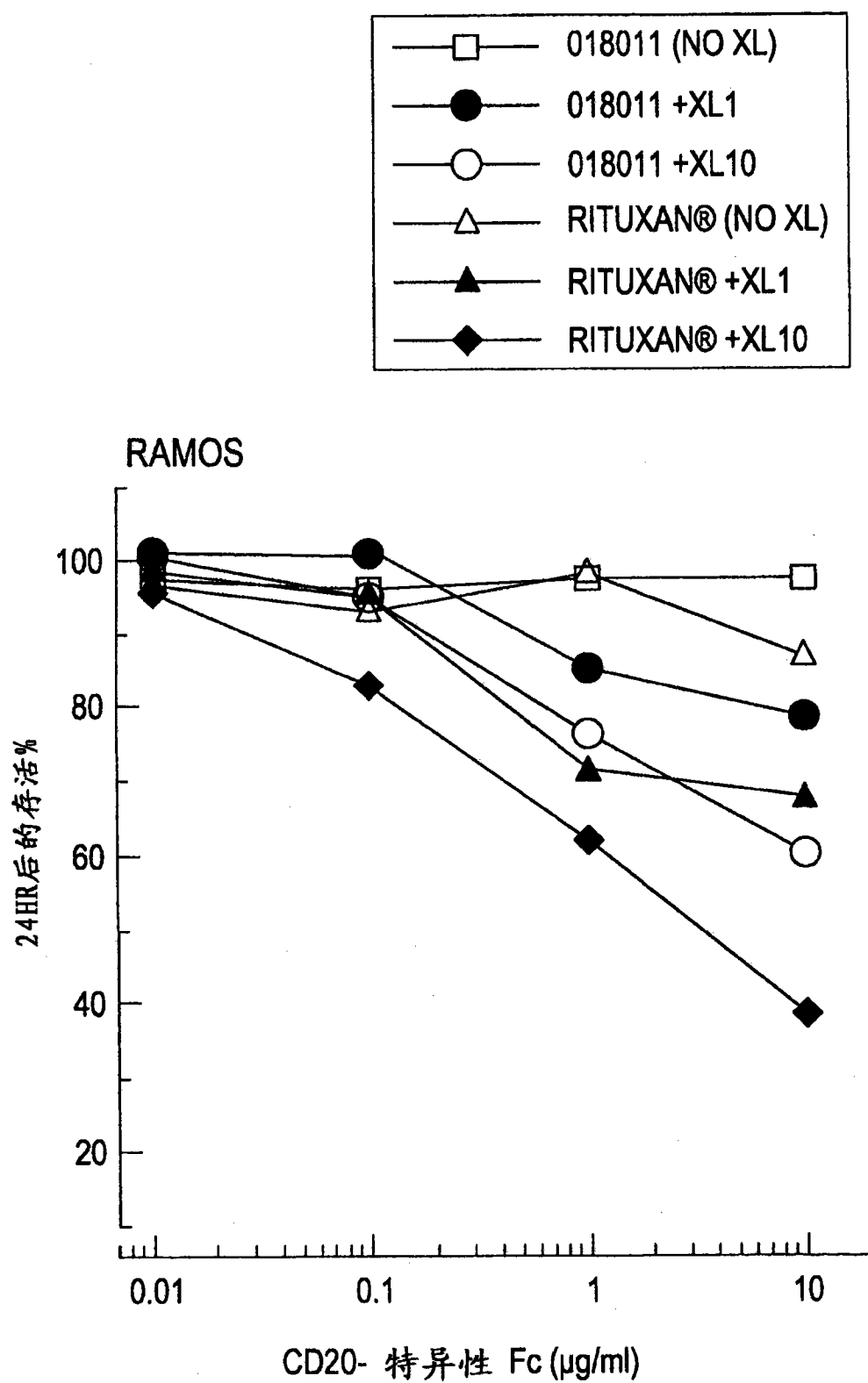


图 28

人源化抗CD20 SMIP总结

名称	变体			FW	铰链 ¹	IgG1 Fc
018008	hVK3	S27Q	-	-	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S	V102L	-		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
018009					S,C,C,P	-
	hVK3	S27Q	-	-	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S ¹	V95Δ V96S V102L	-		
					C,S,C,S	P331S
018010					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
	hVK3	S27Q M33I H34V	-	-	S,C,C,P	P331S
	hVH5	T28S ¹	V102L	-	C,S,C,S	-
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-

¹野生型中的铰链位置: C220, C226, C229和P230

图 29(部分 1)

名称	变体			FW	铰链 ¹	IgG1 Fc
018011	hVK3	S27Q M33I H34V	-	-	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S ¹	V95Δ V96S V102L	-		
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
018014					S,C,C,P	P331S
	mVK	-	-	-	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S ¹	V102L	-		
					C,S,C,S	P331S
018015					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
	mVK	-	-	-	C,S,C,S	-
	hVH5	T28S ¹	V95Δ V96S V102L	-		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-

图 29(部分 2)

名称	变体			FW	铰链 ⁱ	IgG1 Fc
2Lm5	hVK3	S27Q	-	-	C,S,S,S	-
	hVH3	Y27F ¹ T30S ¹	V95Δ V96S V102L	-		
2Lm5-1	hVK3	S27Q	-	-	C,S,S,S	-
	hVH1	-	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm6-1	hVK3	S27Q	S92T F93S	-	C,S,S,S	-
	hVH1	-	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm16	hVK3	-	-	-	C,S,C,S	-
	hVH1	-	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,S	P331S
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S

图 29(部分 3)

名称	变体			FW	铰链 ¹	IgG1 Fc
2Lm16-1	hVK3	S27Q	S92T F93S	-	C,S,S,S	-
	hVH1	-	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm19-3	hVK3	S27Q M33I H34V	-	-	C,S,C,S	-
	hVH1	-	V95Δ V96S V102L	L11S		
2Lm20-4					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S
	hVK3	M33I H34V	-	-	C,S,C,S	-
	hVH1	-	V95Δ V96S V102L	L11S		
					C,S,C,S	P331S
					S,C,C,S	-
					S,C,C,P	-
					S,C,C,P	P331S

图 29(部分 4)