(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101007851 B
(45)授权公告日 2012.09.12

(21)申请号 200610090084.8
(22)申请日 1993.11.12
(30)优先权数据
07/978,891 1992.11.13 US
(62)分案原申请数据
93121424.6 1993.11.12
(73)专利权人 生物基因 IDEC 公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 D·R·安德逊 N·汉纳
J·E·里安纳 R·A·纽曼
M·E·列夫 W·M·拉斯泰特
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 巫肖南 封新琴
(51)Int.Cl.
C07K 16/46(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

审查员 李影

权利要求书 1 页 说明书 39 页 附图 21 页

(54)发明名称

抗人类 B 淋巴细胞限制分化抗原的嵌合及放射标记抗体

(57)摘要

本文公开了为治疗 B 细胞淋巴瘤设计的治疗学处理方法。这些方法基于包括使用免疫活性鼠/人嵌合抗 -CD20 抗体、放射性标记抗 -CD20 抗体给药的治疗策略，以及包括使用嵌合抗 -CD20 抗体及放射标记抗 -CD20 抗体的协作策略。

CN 101007851 B

1. 一种免疫学活性嵌合抗 CD20 抗体，其包含抗体轻链和重链，其中抗体的轻链包含图 4 所示氨基酸序列的轻链可变区和人轻链不变区，且抗体的重链包含图 5 所示氨基酸序列的重链可变区和人重链不变区。

2. 权利要求 1 的免疫学活性嵌合抗 CD20 抗体，其中所述人轻链不变区是人 κ 轻链不变区，且其中所述人重链不变区是人 IgG1 不变区。

3. 一种分离的核酸，其编码权利要求 1 的嵌合抗 CD20 抗体的轻链和重链，其中所述分离的核酸包含图 4 所示编码轻链可变区的核酸序列和图 5 所示编码重链可变区的核酸序列，且其中该嵌合抗 CD20 抗体的轻链和重链包含人轻链和重链不变区。

4. 权利要求 3 的分离的核酸，其中所述人轻链不变区是人 κ 轻链不变区，且其中所述人重链不变区是人 IgG1 不变区。

5. 一种表达载体 TCAE8，其包含权利要求 3 或 4 的分离的核酸。

6. 一种生成嵌合抗 CD20 抗体的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系，其中所述细胞系包含编码权利要求 1 的嵌合抗 CD20 抗体的轻链和重链的 DNA，其中所述 DNA 包含图 4 所示编码轻链可变区的核酸序列和图 5 所示编码重链可变区的核酸序列，且其中该嵌合抗 CD20 抗体的轻链和重链包含人轻链和重链不变区。

7. 权利要求 6 的 CHO 细胞系，其中所述人轻链不变区是人 κ 轻链不变区，且其中所述人重链不变区是人 IgG1 不变区。

8. 一种生成嵌合抗 CD20 抗体的 SP2/0 细胞系，其中所述细胞系包含编码权利要求 1 的嵌合抗 CD20 抗体的 DNA，其中所述 DNA 包含图 4 所示编码轻链可变区的核酸序列和图 5 所示编码重链可变区的核酸序列，且其中该嵌合抗 CD20 抗体的轻链和重链包含人轻链和重链不变区。

9. 权利要求 8 的 SP2/0 细胞系，其中所述人轻链不变区是人 κ 轻链不变区，且其中所述人重链不变区是人 IgG1 不变区。

10. 一种生产嵌合抗 CD20 抗体的方法，该方法包括在生成嵌合抗 CD20 抗体的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或 SP2/0 细胞系中表达抗体的轻链和重链，其中所述细胞系包含编码权利要求 1 的嵌合抗 CD20 抗体的轻链和重链的 DNA，其中所述 DNA 包含图 4 所示编码轻链可变区的核酸序列和图 5 所示编码重链可变区的核酸序列，且其中该嵌合抗 CD20 抗体的轻链和重链包含人轻链和重链不变区。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述人轻链不变区是人 κ 轻链不变区，且其中所述人重链不变区是人 IgG1 不变区。

12. 权利要求 10 或 11 的方法，其中所述细胞系是 CHO 细胞系。

13. 权利要求 10 或 11 的方法，其中所述细胞系是 SP2/0 细胞系。

14. 权利要求 10-13 任一项的方法，其中所述抗体的轻链和重链是自 TCAE8 载体表达的。

抗人类 B 淋巴细胞限制分化抗原的嵌合及放射标记抗体

[0001] 此案是申请日为 1993 年 11 月 12 日、中国申请号为 93121424.6、发明名称为“抗人类 B 淋巴细胞限制分化抗原的嵌合及放射标记抗体”的发明申请的分案申请。

[0002] 所列的整个本文件准备讨论的参考文献，仅为本文描述本文件申请日以前的情报所用，本文不构成承认（或者表示，或者暗示）这些参考文献为“先有技术”，或这些发明人无权由于先发明的优势或根据较早递交申请的优先权把这些描述的日期说得早于实际日期。

[0003] 本发明针对使用抗 B 细胞表面抗原 Bp35(CD20) 的嵌合及放射标记抗体治疗 B 细胞淋巴瘤。

[0004] 脊椎动物（例如灵长目，包括人、猿、猴等）的免疫系统由许多器官和细胞类型组成。这些器官及细胞类型进化出以下功能：准确和特异性地识别侵入脊椎动物宿主的外来微生物（抗原）；特异性地与这些外来微生物结合；并且清除 / 破坏这些外来微生物。在其它一些类型中，淋巴细胞对于免疫系统来说是关键性的。淋巴细胞在胸腺，脾脏及骨髓（成年的）中产生，并相当于人（成年人）循环系统中存在的总白血细胞的 30％。有二种主要的淋巴细胞的亚群体：T 细胞和 B 细胞。T 细胞在细胞介导免疫中起作用，而 B 细胞在抗体产生（体液免疫）中起作用。然而 T 细胞和 B 细胞被认为在典型免疫反应中是相互依赖的，当 T 细胞受体结合于抗原片段（该片段结合于抗原呈递细胞表面上的主要组织相容性复合物 (MHC) 糖蛋白上）上时 T 细胞被激活；此种激活作用引起生物学介体（白细胞介素）释放，该介体实质上能刺激 B 细胞分化并产生抗该抗原的抗体（免疫球蛋白）。

[0005] 在宿主中每种 B 细胞在其表面表达不同的抗体，因此，一种 B 细胞将表达对一种抗原特异性的抗体，而另一种 B 细胞将表达对不同的抗原特异性的抗体。由此，B 细胞是十分多样性的，此种多样性对免疫系统来说是至关重要的。在人体中，每种 B 细胞可产生巨大数量的抗体分子（即约 10^7 至 10^8）。当外来抗原被中和时，一般停止这种抗体产生（或者大大降低）。然而 偶然地特定 B 细胞的繁殖也会继续不断进行；这种繁殖可产生称为“B 细胞瘤”的癌。

[0006] T 细胞和 B 细胞二者均含表面蛋白，这些表面蛋白可被用作分化及鉴定的“标记”。一种这样的人 B 细胞标记是人 B 淋巴细胞限制分化抗原 Bp35，称为“CD20”，“CD20”在 B 细胞发育前期的早期表达，并保持直至浆细胞分化。特别是该 CD20 分子可以调节激活过程中的步骤（该步骤为细胞周期启动及分化所要求的），并且通常在肿瘤 B 细胞中高水平表达。由定义可知 CD20 即存在于“正常”B 细胞上，也存在于“恶性”B 细胞上（即这些 B 细胞不停地繁殖可导致 B 细胞淋巴瘤）。因此，CD20 表面抗原有可能作为对 B 细胞淋巴瘤“定靶”的候选物。

[0007] 实质上，这样的定靶过程可归纳如下：将对 CD20B 细胞表面抗原特异性的抗体（例如）注射入患者体内，这些抗 -CD20 抗体便特异性结合到（明显地）正常及恶性 B 细胞二者的 CD20 细胞表面抗原上；结合于 CD20 表面抗原的抗 -CD20 抗体可引起肿瘤 B 细胞破坏并消耗掉。此外能破坏肿瘤的化学试剂或放射性标记也可与该抗 -CD20 抗体相连，以便该试剂能特异地输送到（例如）肿瘤 B 细胞处。不管采用什么方法，基本目的是破坏肿瘤，具

体方法可由所使用的具体抗-CD20抗体来决定，因此定靶CD20抗原的可使用的方法是十分不同的。

[0008] 例如已有多种定靶CD20表面抗原的尝试被报道过。鼠（小鼠）单克隆抗体1F5（一种抗-CD20抗体）已报道过以连续静脉输注到B细胞淋巴瘤患者的方式给药。据报道要耗尽循环的肿瘤细胞，要求极高的1F5水平（>2g），而其结果据说是“暂时的”(Press等人“Monoclonal Antibody子1F5(Anti-CD20)Serotherapy of Human B-CellLymphomas”Blood69/2:584-591(1987))。该方法的潜在问题是非人单克隆抗体（例如鼠单克隆抗体）一般缺乏人效应物功能，即它们不能介导补体依赖性溶解或通过抗体依赖性细胞毒性或Fc-受体介导的吞噬作用来溶解人靶细胞。而且非人单克隆抗体可由人宿主识别为外来蛋白，因此，反复注射此类外来抗体可产生导致有害过敏反应的免疫反应诱导作用。有关基于鼠的单克隆抗体，通常称为人抗-鼠抗体反应，或“HAMA”反应。此外，这些外来抗体可能受到宿主免疫系统的攻击，其结果使得它们在到达靶位之前被中和掉。

[0009] 淋巴细胞和淋巴瘤对放射疗法的固有敏感性有如下几个原因：放射性标记抗体的离子化射线的局部发射，可以杀死带或不带与结合抗原的抗体靠得很近的靶抗原（例如CD20）的细胞；穿透的射线可以消除在巨大的或不良的血管化肿瘤中有限地接近抗体的问题；而且所需的抗体总数可减少。放射性核素发射放射性粒子，该粒子可损害细胞DNA到细胞修复机制不能使细胞继续存活的程度；因此，假如靶细胞是肿瘤，放射性标记物可有利地杀死肿瘤细胞。根据定义，放射性标记抗体包括使用放射性物质，患者（即可能的骨髓移植）以及保健医生（即在带有放射性的条件下工作时需高度警惕）可能都需要采取预防措施。

[0010] 因此，一种改进鼠单克隆抗体使之在治疗B细胞紊乱中有效的方法是将放射性标记或毒素连接到抗体上，以使标记或毒素位于肿瘤部位。例如，上面提到的IF5抗体已以碘-131(^{131}I)做标记，并据报道在两个患者中进行过生物学分布评价，见Eary, J.F. 等人“Imaging and Treatment of B-CellLymphoma”J.Nuc.Med.31/8:1257-1268(1990)；也参见Press, O.W. 等人，“Treatment of RefractoryNon-Hodgkin′s Lymphoma With Radiolabled MB-1(Anti-CD37)Antibody”J.Clin.Onc.7/8:1027-1038(1989)（表明一个经^{131}I标记过的IF5治疗的患者达到部分反应）；Goldenberg, D.M. 等人，“Targeting, Dosimetry and Radioimmuno therapy of B-Cell Lymphomas WithIodine-131-Labeled LL2 Monoclonal antibody”J.Clin.Onc.9/4:548-564(1991)（接受多次注射的8个病人中的三个据报道产生了HAMA反应）；Appelbaum, F.R. “Radiolabled Monoclonal Antibodies in the Treatment ofNon-Hodgkin′s Lymphoma”Hem./Onc.Clinics of N.A.5/5:1013-1025(1991)（文献综述），Press, O.W. 等人“Radiolabled-Antibody Therapy of B-CellLymphoma With Autologous Bone Marrow Support”New England Journal of Medicine329/17:1219-12223(1993)（碘-131标记抗-CD20抗体IF5和B1）；以及Kaminski, M.G. 等人，“Radioimmuno-therapy of B-Cell Lymphoma With[^{131}I] Anti-B1(Anti-CD20)Antibody”NEJM329/7(1993)（碘-131标记抗-CD20抗体B1；本文下面称之为“Kaminski”）。

[0011] 也已将毒素（即羟柔毛霉素或丝裂霉素C之类的化疗剂）连接于抗体，参见例如PCT公开申请WO92/07466(1992年5月14日公开)。

[0012] “嵌合”抗体，即含有来自两种或多种不同物种（例如鼠和人）的各部分的抗体，已被开发为另一种连接抗体。例如Liu,A.Y.等人“Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 With PotentFc-Dependent Biologic Activity”J. Immun.139/10:3521-3526(1987)，介绍了一种抗CD20抗原的鼠－人嵌合抗体。也参见PCT公开申请WO88/04936。然而在这篇参考文献中没有资料提供有关使用这类嵌合抗体治疗B细胞紊乱的能力、效力或实用性的内容。应注意，体外的功能性检测（例如补体依赖性溶胞(CDC)；抗体依赖性细胞毒(ADCC)等）不可能当然地预料嵌合抗体破坏或消耗表达特异抗原的靶细胞的体内能力。参见例如Robinson,R.D.等人“Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate differentanti-tumor cell biological activities”Hum Antibod Hybridomas2:84-93(1991)（检测不出ADCC活性的嵌合鼠－人抗体）。因此只有通过体内实验才可真正评价嵌合抗体的可能的治疗效力。

[0013] 本技术领域所需的，可成为重大进展的工作是定靶CD20抗原以治疗灵长类包括（但不限于）人的B细胞淋巴瘤的治疗方法。

[0014] 本文所公开的是为治疗B细胞紊乱，特别是B细胞淋巴瘤所设计的治疗方法。这些方法是基于施用免疫学活性的嵌合抗-CD20抗体用以消耗掉外周血B细胞，包括与淋巴瘤相关的B细胞；施用放射性标记抗-CD20抗体，用以定靶与局部和外周B细胞相关的肿瘤；以及用合作治疗策略，施用嵌合抗-CD20抗体和放射性标记抗-CD20抗体。

[0015] 本发明包括：

[0016] 第一项，治疗B细胞淋巴瘤的方法，包括给人施用治疗有效量的至少一种免疫活性嵌合抗-CD20抗体。

[0017] 第二项，根据第一项的方法，其中施用于所说人的所说抗体量是所说人的每公斤体重约0.001至约30mg抗体之间(mg/kg)。

[0018] 第三项，根据第一项的方法，其中所说抗体衍生自TCAE8中含抗-CD20的转染瘤，该TCAE8中的抗-CD20贮存于美国典型培养物中心，是ATCC贮存号69119的微生物的一部分。

[0019] 第四项，根据第一项的方法，进一步还包括施用第二种治疗学上有效量的至少一种免疫活性嵌合抗-CD20抗体。

[0020] 第五项，根据第四项的方法，其中所说的抗体附加给药于所说人，是在所说抗体对所说人的所说第一次给药之后的约7天内进行。

[0021] 第六项，治疗B细胞淋巴瘤的方法，包括下述步骤：

[0022] 1)在第一次给药期间，第一次给人治疗有效量的免疫活性嵌合抗-CD20抗体；

[0023] 2)在第二次随后给药期间，给与第二次治疗有效量的所说抗体；

[0024] 3)在第三次随后给药期间，给与第三次治疗有效量的所说抗体。

[0025] 第七项，根据第六项的方法，其中所说的第1、第2和第3次所说抗体治疗有效量为约0.001mg/kg至约30mg/kg之间。

[0026] 第八项，根据第六项的方法，其中所说第二次给药期是在所说第一次给药期的约7天内。

[0027] 第九项，根据第六项的方法，其中所说第三次给药期是在所说第一次给药期的约14天内。

[0028] 第十项，根据第六项的方法，其中所说的抗体衍生自 TCAE8 中含抗 -CD20 的转染瘤 (ATCC 贮存号 69119)。

[0029] 第十一项，免疫活性嵌合抗 -CD20，它从含有 TCAE8 中的抗 -CD20(ATCC 保藏号 69119) 的转染瘤产生。

[0030] 第十二项，分泌抗 -CD20 抗体的杂交瘤，所说杂交瘤是美国典型培养物保藏中心保藏号为 HB11388 的微生物。

[0031] 第十三项，从第十二项的杂交瘤分泌的单克隆抗体。

[0032] 第十四项，根据第十二项的放射性标记抗体。

[0033] 第十五项，根据第十四项的放射性标记抗体，其中的放射性标记物选自钇 [90]，铟 [111] 及碘 [131] 所组成的一组之中。

[0034] 第十六项，治疗 B 细胞淋巴瘤的方法，包括给人施用治疗有效量的第十四项的抗体。

[0035] 第十七项，根据第十六项的方法，其中所说抗体的放射性标记物是钇 [90]。

[0036] 第十八项，治疗 B 细胞淋巴瘤的方法，包括下述步骤：

[0037] 1) 在第一次给药期，给人施用免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体；及

[0038] 2) 在第二次给药期，给人施用放射性标记抗 -CD20 抗体。

[0039] 第十九项，根据第十八项的方法，其中嵌合抗 -CD20，衍生自 TCAE8 中的抗 -CD20 的转染瘤，该抗 -CD20 贮存于美国典型培养物收藏中心，是 ATCC 贮存号 69119 的微生物的一部分。

[0040] 第二十项，根据第八项的方法，其中所说放射性标记抗体含由杂交瘤 分泌的单克隆抗体，该杂交瘤是美国典型培养物收藏中心贮存号为 HB11388 的微生物的等同物。

[0041] 对附图的简要说明：

[0042] 图 1 是适用于生产免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体 (TCAE8) 的串联嵌合抗体表达载体的图示。

[0043] 图 2A 至 2F 是图 1 载体的核酸序列；

[0044] 图 3A 至 3F 是图 1 载体的核酸序列，该序列进一步含鼠轻链和重链可变区 (TCAE8 中的抗 -CD20)；

[0045] 图 4 是来自鼠抗 -CD20 单克隆抗体 2B8 的鼠可变区轻链的核酸及氨基酸序列 (包括 CDR 和构架区)；

[0046] 图 5 是来自鼠抗 -CD20 单克隆抗体 2B8 的鼠可变区重链的核酸及氨基酸序列 (包括 CDR 和构架区)；

[0047] 图 6 是证明萤光标记人 C1q 与嵌合抗 -CD20 抗体结合的流式细胞计数结果，包括作为对照的标记 C1q，标记 C1q 与鼠抗 -CD20 单克隆抗体 2B8，以及标记 C1q 与人 IgG1，k；

[0048] 图 7 表示嵌合抗 -CD20 抗体和鼠抗 -CD20 单克隆抗体 2B8 相比较的补体相关的溶胞结果；

[0049] 图 8 表示嵌合抗 -CD20 抗体和 2B8 相比对体内人效应细胞的抗体介导的细胞毒性结果；

[0050] 图 9A，9B 和 9C 给出分别输注免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体 0.4mg/kg(A)，1.6mg/kg(B)，及 6.4mg/kg(C) 之后，非人灵长类外周血 B 淋巴细胞消耗的结果；

[0051] 图 10 给出输注 0.01mg/kg 免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体后，非人灵长类外周血 B 淋巴细胞消耗的特别结果；

[0052] 图 11 给出在使用 B 细胞成淋巴肿瘤的小鼠体异物记录模式中 Y2B8 产生的杀肿瘤结果；

[0053] 图 12 给出在使用 B 细胞成淋巴肿瘤的小鼠体异物记录模式中，C2B2 产生的杀肿瘤结果；

[0054] 图 13 给出在使用 B 细胞成淋巴肿瘤的鼠体异物记录模式中，Y2B8 和 C2B8 相结合所产生的杀肿瘤结果；

[0055] 图 14A 和 14B 给出得自 C2B8 的 I/II 期临床分析的结果，表明患者 B 细胞群体随时间的消耗，证明病患部分缓解 (14A) 及病患轻度缓解 (14B)。

[0056] 一般来说，抗体由两轻链和两重链分子组成，这些链形成一个普通的 Y 型，轻链和重链共同构成 Y 的两臂，重链构成 Y 的下部。轻链和重链被分成结构和功能同源区。轻链 (V_L) 和重链 (V_H) 二者的可变区决定了识别能力和特异性。轻链 (C_L) 和重链 (C_H) 的不变区赋于其重要的生物学性质，例如抗体链结合，分泌，经胎盘的流动性、Fc 受体结合、补体结合等等。导致免疫球蛋白基因在产抗体细胞中表达的一系列活动是十分复杂的。可变区域基因序列位于不同种系基因片段（称之为“V_H”“D”和“J_H”或“V_L”和“J_L”。这些基因片段由 DNA 重排被连接形成在重链和轻链分别表达的完全 V 区域。该经重排连接的 V 片段 (V_L-J_L 和 V_H-D-J_H) 然后编码完全可变区或者分别编码轻链和重链的抗原结合区域。

[0057] 使用抗 -CD20 鼠单克隆抗体 (IF5) 进行的人 B 细胞淋巴瘤的血清免疫疗法已由 Press 等人介绍过 (69 Blood 584，1987，见上面)，但遗憾的是据载其治疗反应只是暂时的。此外，据报道有 25％的经试验的患者显示出对血清疗法的人抗鼠抗体 (HAMA) 反应。Press 等人指出，这些抗体与毒素或放射性同位素结合，比起未结合的抗体来说，可产生更持久的临床效果。

[0058] 由于 B 细胞淋巴瘤的效果衰减效应，并确实需要对付该疾病的可行治疗方法，我们已着手研究带有一种特殊抗体 2B8（作为各方法之间的共同纽带）的不同的方法。一个这样的方法有益地利用了哺乳动物体系容易和有效地恢复外周血 B 细胞的能力；使用该方法，我们试图实际上消除或消耗外周血和淋巴组织中的 B 细胞，以作为除去 B 细胞淋巴瘤的手段。我们利用特殊的免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体达到了这一目的。在另一个方法中，我们探索以放射性标记定靶肿瘤细胞使之破坏。

[0059] 本文所使用术语“抗 -CD20 抗体”是特异性识别 35000 道尔顿的细胞表面非糖基化磷酸蛋白的抗体，该蛋白一般叫作人 B 淋巴细胞限制分化抗原 Bp35，通常称之为 CD20。本文所用术语“嵌合”，当针对抗 -CD20 抗体使用时，包括最优选的利用重组脱氧核糖核酸技术得到，并含人（包括免疫学相关物种例如黑猩猩）和非人成份的抗体；嵌合抗体的不变区最优选地基本上等同于天然人抗体的不变区；该嵌合抗体的可变区最优选地来源于非人源，且具有所需的对 CD20 细胞表面抗原的致免疫性和特异性。非人来源 可以是任何可用于产生抗人 CD20 细胞表面抗原的抗体的任何脊椎动物源，或含有人 CD20 细胞表面抗原的材料。此类非人来源包括（但不限于）啮齿动物（例如兔、大鼠、小鼠等等）和非人灵长类动物（例如 Old World 猴、猿等）。最优选的非人成分（可变区）来源于鼠类。当针对嵌合抗 -CD20 抗体时本文所用短语“免疫学活性”意指结合人 C1q，介导人 B 淋巴样细胞系补体

依赖性溶胞 (CDC)，并且通过抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 溶解人靶细胞的嵌合抗体。本文中所用短语“间接标记”和“间接标记法”意指螯合剂共价连接到抗体上，并且至少有一个放射性核素插入该螯合剂中。优选的螯合剂和放射性核素列举在 Srivagtava S.C. 和 Mease, S.C. 的“Progress in Researchon Ligands, Nuclides and Techniques for Laleling Monoclonal Antibodies”Nucl. Med.Bio.18/6 :589-603(1991)(Srivagtava) 一文中，该文引入本文作为参考。一种特别优选的螯合剂是 1- 异硫氰酸根合苯甲基 -3- 甲基二 (1, 2- 亚乙基) 三胺五乙酸 (MX-DTPA) ；间接标记所用特别优选的放射性核素包括铟 [111] 和钇 [90]。本文中所用短语“直接标记”和“直接标记法”意指放射性核素共价直接连接到抗体上 (一般借助氨基酸残基)。优选的放射性核素在 Srivagtava 中提供 ；一种特别优选的用于直接标记的放射性核素是碘 [131]，借助酪氨酸残基共价连接。间接标记法特别优选。

[0060] 本文所公开的治疗方法是基于灵长类动物免疫系统很快恢复或复原外周血 B 细胞的能力。此外，因为灵长类动物的基本免疫反应是由 T 细胞引起的，所以当免疫系统有外周血 B 细胞缺损时，不一定需要额外的预防措施 (即隔离病人等)。由于灵长类动物免疫系统的以上这些及其它细微差别，我们的治疗 B 细胞紊乱的方法允许使用免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体清除外周血 B 细胞。

[0061] 根据定义，因为外周血 B 细胞紊乱可表明需要进入 (access) 血的治疗，所以免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体和放射标记抗 -CD20 抗体的给药途径优选非肠道进行 ；本文使用的术语“非肠道”包括静脉、肌内、皮下、直肠、阴道或腹膜给药。这些给药方式中，最优选静脉给药。

[0062] 免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体及放射标记抗 -CD20 抗体一般由标准技术提供，将其加入药用可接受的缓冲剂，例如无菌盐水、无菌缓冲水、丙二醇，或上述缓冲液的混合物中给药。制备非肠道给药药剂的方法见 Pharmaceutical Carriers & Formulations，Martin Remington′ s Pharmaceutical Sciences，15th Ed.(Mack Pub.Co.，Easton，PA1975)(引入本文作为参考)。

[0063] 用于在任何给定患者中产生独特治疗效果的免疫学活性嵌合抗 -CD20 抗体的特定治疗有效量，可以由本领域普通技术人员熟知的标准技术来确定。

[0064] 有效剂量 (即治疗有效量) 免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体是约 0.001- 约 30mg/kg 体重，更优选约 0.01- 约 25mg/kg 体重，而最优选约 0.4- 约 20.0mg/kg 体重。其它剂量也可用 ；影响剂量的因素包括 (但不限于) 患病严重程度，以前用过的治疗方法，患者的总的健康状况，是否存在其它疾病等等。技术人员通过评估具体病人很容易确定落入上述范围内的适当剂量，假如需要，也可在该范围之外。

[0065] 按这些剂量引入免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体，可以以一次治疗完成，也可以以多次治疗完成。对于嵌合抗体来说，优选分多次治疗引入 ；优选方法由与该病相关的治疗方法来预测。虽然不希望受任何具体理论所束缚，但因为免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体既具有免疫活性，又能与 CD20 结合，一旦开始引入该免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体到个体中，则外周血 B 细胞消耗便开始了 ；我们观察到在治疗输注后 24 小时内几乎完全消耗掉。由此，该免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体 (或放射性标记抗 -CD20 抗体) 随后引入 (一次或多次) 患者体内时，则可推定 ：a) 消除保留的外周血 B 细胞 ；b) 开始从淋巴节消耗 B 细胞 ；c) 开始从其它组织源，例如骨髓、肿瘤等等消耗 B 细胞。当反复引入免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体时再次表

明，出现一系列现象，每种现象我们都认为对有效治疗疾病是很重要的。第一现象可以看作原则上针对基本上消耗患者的外周血 B 细胞；随后的各现象可认为是原则上针对同时或者分步从系统中清除剩余的 B 细胞，清除淋巴节 B 细胞，或清除其它组织 B 细胞。

[0066] 实际上，虽然单剂量也提供效益，并能有效利用于病患治疗 / 控制，但优选的治疗过程可分几步进步；最优选将免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体以约 0.4- 约 20mg/kg 体重，每周给患者施用一次，持续 2-10 个星期（最优选持续 4 星期左右）。

[0067] 对于放射性标记抗 -CD20 抗体的使用来说，优选抗体是非嵌合的，该优选是根据与鼠抗体相比，嵌合抗体的循环半衰期明显要长些来预测出的（即由于循环半衰期较长时，放射性核素在患者体内存在时间增长）。但是，如果相对于鼠抗体来说，与嵌合抗体相结合使用时，采用较低毫居里 (mCi) 剂量，则放射性标记抗体可以有益地施用。该情况使得在保持治疗效益的同时，骨髓毒性可降至能接受的水平。

[0068] 不同的放射性核素都可用于本发明，相信本领域技术人员能很容易地决定哪种放射性核素在不同情况下是最为适合的。例如，碘 [131] 是已知用于定靶免疫治疗的放射性核素，但由于下述原因碘 [131] 的临床应用可能受到限制：8 天的物理半衰期；在血液中和肿瘤部位碘化抗体都发生脱卤素作用；以及发射特性（例如大量 γ 成分），它可使肿瘤中的局部剂量积累处于次优化状况。

[0069] 随着优良螯合剂的出现，将金属螯合基团连于蛋白上的可能性，提高了使用其它放射性核素（例如铟 [111] 和钇 [90]）的机会。钇 [90] 用于放射性免疫治疗有几个优点：它的 64 小时的半衰期足以使得抗体沉积于肿瘤周围，并且不像碘 [131] 之类，钇 [90] 是高能量的纯 β 发射源，其衰变时无 γ 射线相随，在组织中，它的作用范围为 100-1000 细胞直径。而且，它的射线穿透量极小，使得门诊病人可以施用钇 [90] 标记抗体。再有，标记抗体的内化对于杀死细胞来说并不需要，而离子化射线的局部发射对于无靶抗原的相邻肿瘤细胞来说应是致命的。

[0070] 钇 [90] 的一种非治疗性限制是因为它缺乏明显的 γ 射线，使得以此造影很困难，为避免这一问题，在以钇 [90] 标记抗 -CD20 治疗给药之前，将诊断“造影”放射性核素（例如铟 [111]）用来测定肿瘤的位置和相对尺寸。铟 [111] 用作特别优选的诊断放射性核素，因为：在约 1- 约 10mCi 之间可安全给药无明显毒性；并且从其影像资料一般可预知随后的钇 [90] 标记抗体的分布。大部分造影研究采用 5mCi 铟 [111] 标记抗体，因为该剂量既安全又比起较低剂量来说提高了造影效果，在施用抗体之后 3-6 天出现最优影像。参见例如 Murray, J.L., 26 J.Nuc.Med. 3328(1985) and Carraguillo, J.A. 等人 26 J.Nuc.Med. 67(1985)。

[0071] 钇 [90] 标记抗 -CD20 的有效单治疗剂量（即治疗学上有效量）在约 5- 约 75mCi 之间，更优选约 10- 约 40mCi 之间。碘 [131] 标记抗 -CD20 抗体的有效单治疗非骨髓剥离剂量在约 5- 约 70mCi 之间，更优选约 5- 约 40mCi 之间。碘 [131] 标记抗 -CD20 抗体的有效单治疗剥离剂量（即可以要求自体骨髓移植）在约 30- 约 600mCi 之间，更优选约 5- 小于 500mCi。在与嵌合抗 -CD20 抗体 相结合时，由于比鼠抗体有较长的循环半衰期，碘 [131] 标记嵌合抗 -CD20 抗体的有效单治疗非骨髓剥离剂量在约 5- 约 40mCi 之间，更优选小于约 30mCi。成像标准（例如对铟 [111] 标记物来说）一般小于约 5mCi。

[0072] 对于放射性标记抗 -CD20 抗体，其治疗可采用单次治疗法或多次治疗法。因为使

用放射性核素成分，因此优选治疗之前，收集经受由放射性引起的潜在的致命骨髓毒性的病人的外周干细胞 (PSC) 或骨髓 (BM)，使用标准技术收集 BM 和 / 或 PSC，为能够再输注将其净化和冷冻。此外，最优选治疗之前对病人进行使用诊断标记抗体（例如用铟 [111]）的诊断剂量测量法研究，其目的在于保证在任何正常器官或组织中，治疗标记抗体（例如使用钇 [90]）将不致于变得不必要的“过浓”。

[0073] 已介绍过嵌合鼠 - 人抗体，例如见 Morrison, S. L. et al., PNAS 11 : 6851-6854(1984 年 11 月）；欧洲专利公开 No. 173494 ; Boulianne, G. L. et al., Nature 312 :643(1984 年 12 月）；Neuleiger, M. S. et al., Nature 314 :268(1985 年 3 月）；欧洲专利公开 No. 125023 ; Tan et al., J. Immunol. 135 :8564(1985 年 11 月）；Sun, L. K. et al., Hybridoma5/1 :517(1986) ; Sahagan et al., J. Immunol. 137 :1066-1074(1986)。总的参见 Muron, Nature 312 :597(1984 年 12 月）；Dickson, Genetic Engineering News5/3(1985 年 3 月）；Marx, . Science 229 :455(1985 年 8 月）；以及 Morrison Science 229 : 1202-1209(1985 年 9 月）。Robinsonet al. 在 PCT 公开号 WO88/04936 中介绍了一种带有人不变区及鼠可变区的嵌合抗体，对 CD20 的一个抗原决定基有特异性。Robinson 参考文献的嵌合抗体的鼠部分来源于 2H7 小鼠单克隆抗体 (gamma2b, kappa)。虽然该文献指出所述嵌合抗体是治疗 B 细胞紊乱的“首选候选物”，但可以认为该论点只不过是一种建议，对本领域研究人员来说要确定该建议是否对该特定抗体来说是正确的，特别因为该文献缺乏任何支持治疗效果的数据，更重要的是缺乏使用高等哺乳动物例如灵长目或人所得到的数据。

[0074] 产生嵌合抗体的方法本领域技术人员是已知的。例如，在不同的质粒中使用免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链，其轻链和重链可以分开表达。然后可以将其提纯并于体外组装成完全的抗体。完成此种组装的方法已有人介绍过，见例如 Scharff, M., Harvey Lectures, 69 :125(1974)。从还原分离的轻链和重链形成 IgG 抗体的体外反应参数也已有人介绍过，例如见 Beychok, S. Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, p. 69, 1979。将重链和轻链在同样细胞中共表达使达到细胞内协同并将重链和轻链连接成完全的 H_2L_2 IgG 抗体也是可能的。该共表达在相同宿主细胞中使用相同质粒，或者使用不同质粒均可行。

[0075] 另一方法，即我们为形成嵌合非人 / 人抗 -CD20 抗体的最优选方法是基于使用包括（从头开始）来自人源的编码重链和轻链不变区的 DNA 的表达载体。该载体能插入编码非人可变区的 DNA，以产生各种非人抗 -CD20 抗体，筛选并分析各种特性（例如结合特异性种类，抗原决定基结合区等等）。此后可将来自优选的或所需的抗 -CD20 抗体的编码轻链和重链可变区的 cDNA 掺入载体中。我们称这些类型的载体为串联嵌合抗体表达 (TCAE) 载体。一种最为优选的，被用于产生治疗淋巴瘤的免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体的 TCAE 载体是 TCAE8。TCAE8 是本专利文件受让人所拥有的称作 TCAE5.2 的载体的衍生物，其区别在于 TCAE5.2 中显性可选择标志（新霉素磷酸转移酶“NEO”）的转译起始位点是一个一致 Kozak 序列，而 TCAE8 中，该区域是一个部分损伤的一致 Kozak 序列。有关 TCAE 载体（也称为 ANEX 载体）的显性可选择标志的起始位点对蛋白质表达的影响的详细内容已详细公开在本申请的共同未决申请中。

[0076] TCAE8 包含四个 (4) 转录盒，这些按序串联，即无可变区的人免疫球蛋白轻链；无

可变区的人免疫球蛋白重链；DHFR；以及 NEO。每一转录盒包含其本身的真核生物启动子及多聚腺苷化区（参考图 1，该图以图形表示 TCAE8 载体），特别是：

[0077] 1) 免疫球蛋白重链前面的 CMV 启动子 / 增强子是轻链前面的启动子 / 增强子，从 -350 位的 Nhe I 位点到 -16 位的 Sst I 位点的截短部分（见 41Cell521，1985）；

[0078] 2) 通过 PCR 反应由 cDNA 扩增衍生出人免疫球蛋白轻链不变区。在 TCAE8 中，这是人免疫球蛋白轻链 K 不变区 (Kabat 编号，氨基酸 108-214，异型 Km8（见 Kabat，E.A.“Sequences of proteins of immunological interest”NIH Publication，Fifth Ed.No.91-3242，1991)），和人免疫球蛋白重链 γ1 不变区 (Kabat 编号氨基酸 114-478，异型 Gmla、Gmlz)。该轻链从正常人血中分离 (IDEC Pharmaceuticals Corporation，La Jolla，CA)；其 RNA 被用于合成 cDNA，然后用 PCR 技术将其扩增（引物来自 Kabat 一致序列）。重链从以 RNA 制备的 cDNA 分离出（使用 PCR 技术），所述 RNA 则从以人 IgG1 载体（见，3 Prot.Eng.531，1990；vector $pN_{\gamma 1}62$) 转染的细胞衍生的。在该分离人 IgG1 中有二个氨基酸被改变使之与来自 Kabat 的一致氨基酸序列相匹配，即氨基酸 225 由缬氨酸变为丙氨酸 (GTT 到 GCA)，而氨基酸 287 由蛋氨酸变为赖氨酸 (ATG 到 AAG)；

[0079] 3) 该人免疫球蛋白轻链和重链盒含有分泌免疫球蛋白链的合成信号序列；

[0080] 4) 该人免疫球蛋白轻链和重链盒含特异性 DNA 限制位点，该位点允许插入维持转换读码，并且不改变免疫球蛋白链中发现的正常氨基酸的轻链和重链免疫球蛋白可变区；

[0081] 5) 该 DHFR 盒包含其本身的真核生物启动子（小鼠 β 球蛋白主启动子，“BETA”）及多聚腺苷化区域（牛生长激素多聚腺苷化区，“BGH”）；以及

[0082] 6) 该 NEO 盒含其本身的真核生物启动子及多聚腺苷化区域 (SV_{40} 早期多聚腺苷化区“SV”)。

[0083] 就 TCAE8 载体和 NEO 盒来说，该 Kozak 区是部分损伤的一致 Kozak 序列（它包括一上游 Cla I 位点）：

[0084]

	Cla I	-3	+1
GGGAGCTTGG	ATCGAT	ccTct	ATG Gtt

[0086] （在 TCAE5.2 载体中，该变化是在 ClaI 和 ATG 区之间，即 ccAcc。）

[0087] TCAE8 的完全序列表（包括四个转录盒的特异成分）列于图 2 中 (SEQ.ID NO.1)。

[0088] 正如将被本领域技术人员所认识的，TCAE 载体在生产免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体时有益于大大缩短时间。生产和分离非人轻链和重链可变区，接着将其掺入人轻链不变转录盒及人重链不变转录盒中，使其生产出免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体。

[0089] 使用鼠源及杂交瘤技术，我们衍生出最优选的，对 CD20 抗原具特异性的非人可变区。使用聚合酶链反应 (PCR) 技术，该鼠轻链和重链可变区被直接克隆进 TCAE8 载体 - 这是将非人可变区掺进 TCAE 载体的最优选途径。该优选方法主要是根据 PCR 反应的效力及插入的精确性来预测出的。但是其它完成该目的的等同方法也是可采用的。例如使用 TCAE8（或等同载体）可获得非人抗 -CD20 抗体的可变区序列，接着合成序列各部分的寡核苷酸，如果适合合成整个序列，然后，将整个合成序列的各部分插入载体的 适当位置。相信本领域技术人员能完成该工作。

[0090] 我们的最优选免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体，从使用包括来自单克隆抗 -CD20 抗体的鼠可变区的 TCAE8 载体衍生而来；该抗体（下面将详细讨论）称为“2B8”。在 TCAE8 从

2B8(TCAE8 中的抗 -CD20) 所获得的可变区完全序列列在图 3 中 (SEQ. ID. NO. 2)。

[0091] 用于蛋白表达的宿主细胞系最优选哺乳动物源 ;相信本领域的技术人员有能力优选决定最适合于表达本文所需基因产物的具体宿主细胞系。典型的宿主细胞系包括 (但不限于)DG44 和 DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系,DHFR-),HELA(人宫颈癌),CVI(猴肾细胞系),COS(带有 SV40T 抗原的 CVI 衍生物),R1610(中国仓鼠成纤维细胞),BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞),HAK(仓鼠肾细胞系),SP2/0(小鼠骨髓瘤),P3x63-Ag3.653(小鼠骨髓瘤),BFA-1c1BPT(牛内皮细胞),RAJI(人淋巴细胞) 以及 293(人肾)。宿主细胞系一般可从市场购得,从美国组织培养收藏中心或从公开的文献索取。

[0092] 优选的宿主细胞系是DG44(CHO) 或SP2/0,分别参见Urland,G. et al.,“Effect of gamma rays and the dihydrofolate reductase locus :deletions andinversions”Som. Cell & Mol. Gen. 12/6 :555-566(1986) 和 Shulman, M. et al.,“A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies.”Nature276 :269(1978)。最优选的细胞系是 DG44。可利用本领域任何现有技术来将质粒转染进宿主细胞。这些方法包括 (但不限于) 转染 (包括电泳及电穿孔)、与包膜 DNA 细胞融合、微注射及以完整病毒感染。参见 Ridgway, A. A. G. “Mammalian Expression vectors”Chapter24. 2, pp. 470-472Vectors, Rodriguezand Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, MA1988)。最优选的质粒引入宿主中的方法是借助电穿孔。

[0093] 实施例

[0094] 下述实施例不试图 (也不构成) 对本发明的限制。这些实施例试图说明 :使用放射性标记抗 -CD20 抗体 (I2B8) 剂量造影 ;放射性标记抗 -CD20 抗体 (Y2B8) ;及利用特定载体 (TCAE8) 和来自鼠抗 -CD20 单克隆抗体 (2B8) 的可变区衍生的免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体 (C2B8)。

[0095] I. 放射性标记抗 -CD20 抗体 2B8

[0096] A. 抗 -CD20 单克隆抗体 (鼠) 的生产 (2B8)

[0097] 用人成淋巴细胞样细胞系 SB 给 BALB/C 小鼠反复接种 (见 Adams, R. A. et al., “Direct implantation and serial transplantation of human acutelymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2”Can. Res. 28 :1121-1125(1968) ;该细胞系可取自美国组织培养物收藏中心, Rockville, MD. 其保藏号为 ATCCCCL 120), 于 3-4 个月内每周注射一次。正如由已知 CD20- 特异性抗体的抑制作用所测定的 (所用抗 -CD20 抗体是 Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA, Cat. NO. 7670 ;和 B1 Coulter Corp., Hialeah. FL. Cat. NO. 6602201), 鉴定出表现出高抗 -CD20 抗体血清效价的小鼠。然后移除该鼠脾脏。按照 Einfeld, D. A. et al(1988 EMBO 7 :711) 所述方法,将脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 相融合 (SP2/0 在 ATCC 的保藏号为 ATCC CRL 8006)。

[0098] 用放射免疫测试法测试 CD20 的特异性,简要说来,使用 Valentine, M. A. 等人 (1989) 在 J. Biol. Chem. 264 :11282 所述的碘珠法以 I^{125} 放射标记经提纯的抗 -CD20B1(I^{125} 碘化钠 ICN. Irvine, CA. Cat No. 28665H)。通过来自各融合孔的 0.05ml 培养基与 1% BSA, PBS(pH7.4) 中的 0.05ml I^{125} 标记抗 -CD20B1(10ng) 和含 100,000SB 细胞的 0.5ml 相同缓冲液一起共保温来筛选杂交瘤。室温下保温 1 小时之后,将细胞转移到 96 孔滴定平板上 (V&PScientific, San Diego, CA) 来收集细胞并彻底洗涤。含未标记抗 -CD20B1 的平行孔

和不含抑制抗体的孔分别作为阳性和阴性对照。将含大于 50％抑制作用的孔放大并克隆。表现出最高抑制作用的抗体来自本文称作“2B8”的克隆细胞系。

[0099] B. 2B8-MX-DTPA 结合物的制备

[0100] i. MX-DTPA

[0101] 碳 -14- 标记的 1- 异硫氰酸根合苯甲基 -3- 甲基二 (1,2- 亚乙基) 三胺五乙酸 (碳 -14 标记 MX-DTPA) 用作将放射性标记连接到 2B8 上的螯合剂。操作 MX-DTPA 要保持在无金属条件下进行，即要采用无金属试剂，若可能，同时采用 Alconox 洗涤，并用 Milli-Q 水漂洗的聚丙烯塑料容器 (烧瓶、烧杯、量筒、移液管)。从 Dr. Otto Gansow 处获得干燥固态 MX-DTPA(NationalInstitue of Health,Bethesda,MD) 并于 4℃干燥贮存 (避光)，按 2-5mM 浓度在 Milli-Q 水中配制原液，于 -70℃贮存。也从 Coulter Immunology(HialeahFlorida) 获得 MX-DTPA 的二钠盐水溶液并于 -70℃贮存。

[0102] ii. 制备 2B8

[0103] 采用以 CENTRICON30™ 旋转过滤器 (30000D，MWCO ;Amicon) 反复缓 冲交换的方法，将抗体转移到无金属的含 150mM NaCl 的 50mM 二羟乙基甘氨酸 -NaOff(pH8.6) 中来制备供与 MX-DTPA 连接用的纯化 2B8。一般是将 50-200μl 蛋白质 (10mg/nl) 加入到过滤元件中，接着加入 2ml 二羟乙基甘氨酸缓冲液。于 4℃，在 Sorval SS-34 转子中上 (6000rpm，45min) 将过滤器离心处理，保留液体积约 50-100μl。使用同样过滤器将该过程重复二次，将保留液转移到聚丙烯 1.5ml 螺丝帽试管中检测蛋白质，稀释至 10.0mg/ml 并于 4℃贮存直到使用。将蛋白质同样使用前述方法转移到含 150mM NaCl 和 0.05％叠氮钠的 50mM 柠檬酸钠 (pH5.5) 中。

[0104] iii. 2B8 与 MX-DTPA 的连接

[0105] 于室温下在聚丙烯试管中将 2B8 与 MX-DTPA 连接。冷冻的 MX-DTPA 原液临使用前再解冻。按 MX-DTPA 对 2B8 的摩尔比为 4:1 的比例，将 10mg/ml 的蛋白质 50-200ml 与 MX-DTPA 反应。加入 MX-DTPA 原液并慢慢搅拌混合物，反应便开始，该连接过程于室温下过夜进行 (14-20 小时)。通过渗析或反复超滤将未反应的 MX-DTPA 从连接物中移至 (如实施例 I.B.ii 所述) 无金属含 0.05％叠氮钠的生理盐水 (0.9％ w/v) 中。将蛋白质浓度调节到 10mg/ml 并在聚丙烯试管中于 4℃贮存直至放射标记。

[0106] iv. 测定 MX-DTPA 掺入量

[0107] 用闪烁计数法测定 MX-DTPA 掺入量，将从纯化连接物所得结果与碳 [14] 标记的 MX-DTPA 的比活进行比较。对于某些使用非放射性 MX-DTPA(Coulter Immunology) 的研究，则将连接物与已知浓度和比活的过量钇 [90] 放射性载体溶液一起培养来测定 MX-DTPA 的掺入量。

[0108] 已知浓度的氯化钇原液以加入无载体钇 [90](氯化物盐) 的无金属 0.05NHCl 来配制。将该溶液的等分样以闪烁计数分析测定该试剂的精确比活性。将相当于预期将连接到抗体上的螯合物摩尔数的三倍量的氯化钇试剂 (一般为 2mol/mol 抗体) 加入到聚丙烯试管中，并用 2M 乙酸钠调节 pH 到 4.0-4.5。然后将连接抗体加入并于室温下保温 15-30 分钟。加入 20mM EDTA 至终浓度为 1mM 来使反应骤冷，并将溶液 pH 值用 2M 乙酸钠调节到约 6。

[0109] 保温 5 分钟后，将整个内容物用高效排阻色谱 (见下文) 进行纯化，将洗脱出的含

蛋白质级分合并，测定蛋白质浓度，并以等分样测定放射性。用氯化钇 [90] 制剂的比活性及蛋白质浓度来计算出螯合物的掺入量。

[0110] v. 2B8-MX-DTPA 的免疫活性

[0111] 使用整细胞 ELISA 测定连接 2B8 的免疫活性。通过离心收集培养物中的对数中期的 SB 细胞，并用 1X HBSS 洗涤二次。将细胞在 HBSS 中稀释至 1-2×10^6 个细胞 /ml，并按 50,000-100,000 个细胞 / 孔将其等分进 96 孔聚苯乙烯微滴平板上。将该板真空干燥 2 小时 (40-50℃) 使细胞固定于塑料上，这些板于 -20℃贮存干燥直至使用，检测时，临使用才将板加热至室温，然后用含 1％ BSA pH7.2-7.4 的 1X PBS 封闭 (2 小时)。将检测样品在 1X PBS/1％ BSA 中稀释，施于板上并以同样缓冲液连续稀释 (1:2)。于室温下将板保温 1 小时。用 1X PBS 洗板三次。将第二抗体 (山羊抗小鼠 IgG1- 特异性 HRP 结合物 50μl) 加入各孔中 (在 1X PBS/1％ BSA 中按 1:1500 稀释) 并于室温下保温 1 小时。用 1X BPS 洗板 4 次，接着加入 ABTS 底物溶液 (50mM 柠檬酸钠，含 0.01％ ATBS 及 0.001％ H_2O_2，pH4.5)。保温 15-30 分钟后在 405nm 波长处测定该板，在检测试验中包括抗原阴性 HSB 细胞以检测非特异性结合。将吸收率值分别对稀释倍数作图，并将其与在同样板上使用天然抗体试验所获值 (代表 100％免疫活性) 相比较计算出连接物的免疫活性，在滴定图的线性部分上取几个值进行比较并测出平均值 (数据未显示出)。

[0112] vi. 制备铟 [111] 标记的 2B8-MX-DTPA(I2B8)

[0113] 将连接物用无载体铟 [111] 放射标记。将 0.05M HCl 中的同位素 (0.1-2mCi/mg 抗体) 等分样移进聚丙烯管中并加入约十分之一体积的无金属 2M HCl。保温 5 分钟后，加入无金属 2M 乙酸钠调节 pH 到 4.0-4.4。加入从在生理盐水或含 0.05％叠氮钠的 50mM 柠檬酸钠 /150mM NaCl 中的 10.0mg/ml DTPA 的原液来源的约 0.5mg2B8-MX-DTPA，立即将混合物轻轻搅拌。用 pH 试纸检查溶液的 pH 值，证实该值在 4.0-4.5 之间，并将混合物于室温保温 15-30 分钟。然后加入 20mM EDTA 至终浓度为 1mM 而使反应停止，再用 2M 乙酸钠将反应混合物调节到约为 pH6.0。

[0114] 保温 5-10 分钟后，将未结合的放射同位素用排阻色谱除去。HPLC 单元由 Waters Model6000 或 TosoHaas Model TSK-6110 溶剂传输体系分别配以 Waters U6K 或 Rheodyne700 注射阀组成。使用凝胶渗透柱 (BioRadSEC-250 ;7.5×300mm 或相近的 TosoHaas 柱) 和 SEC-250 防护柱 (7.5×100mm) 来进行色谱分离。该体系并装有级分收集器 (Pharmacia Frac200) 及配有 280nm 滤光器的 UV 检测器 (Pharmacia ModelUV-1)。将样品上样，并以 1.0ml/min 的流动速度，用 1×PBS(pH7.4) 匀速洗脱。收集半毫升各级分在玻璃试管中，并将这些等分样在 γ 计数器上计数。将低窗及高窗分别定于 100 和 500KeV。

[0115] 将相应于洗脱出的蛋白峰的放射活性相加，用从柱中洗脱出的总放射性来除该数，来计算出放射性掺入量，该值表达为百分数 (未列出数据)。在某些情况下，可用瞬息薄层色谱 (ITLC) 来测定放射性掺入量。将放射性标记的连接物用 1X PBS 或 1X PBS/1mM DTPA 以 1:10 或 1:20 比例加以稀释，然后将其 1μl 点在距 1×5cm ITLC SG 纸条的一端 1.5cm 处，使用 10％乙酸铵甲醇液 : 水 (1:1v/v) 进行上行色谱使纸展开。将该纸条干燥，从中部横切开，用 γ 计数法测定相应各部分的放射活性。将与纸条下半部相对应的放射活性 (与蛋白质结合放射活性) 以总的放射性的百分数表示，该总放射活性系将上下两半的值相加而得 (数据未列出)。

[0116] 通过测量放射性标记连接物的适当等分样的放射性来测定比活性，该值对计数器效率（一般 75％）进行校正，并与前面利用 280nm 波长处的吸收率所测的连接物蛋白质浓度相关，该结果值表达为 mCi/mg 蛋白。

[0117] 在某些实验中，采用相似于上面所述方法但不用 HPLC 提纯来用铟 [111] 放射性标记 2B8-MX-DTPA，该方法称之为“混合速标”法 (mix-and-shoot)。

[0118] vii. 制备钇 [90] 标记的 2B8-MX-DTPA(Y2B8)

[0119] 遵循已介绍过的制备 I2B8 相同的方法用以制备钇 [90] 标记的 2B8-MX-DTPA(Y2B8) 连接物，不同的是未采用 2ng HCl ；如上所述，所用钇标记连接物制剂均用排阻色谱提纯。

[0120] C. 非人动物研究

[0121] I. 放射性标记 2B8-MX-DTPA 的生物学分布

[0122] 以 6-8 周龄的 BALB/C 小鼠进行 I2B8 的组织生物学分布评定。按照上述“混合速标”法，使用临床级 2B8-MX-DTPA 制备放射性标记连接物。该连接物的比活是 2.3mCi/mg，并将该连接物在含 50mg/ml HSA 的 PBS(pH7.4) 中配制。用 100μl I2B8(约 21μCi) 给小鼠静脉注射，将三只一组的各组小鼠于 0、24、48 及 72 小时以颈离位的方式杀死。杀死之后将尾、心脏、肺、肝、肾、脾、肌肉及大腿取下，洗涤并称重 ；并将血液样品取出用于分析。由 γ 计数法测定相应各样品的放射性，并且随后测定出每克组织所注射剂量的百分比。未扣除各器官所带的血液所代表的活性量。

[0123] 另一个不同的方法是，分别将于 4℃和 30℃保温 10 星期的 2B8-MX-DTPA 等分样用铟 [111] 标记，使二制剂中比活为 2.1mCi/mg。然后按上述方法研究这些连接物在小鼠体内的生物学分布。

[0124] 对于剂量测定法测定来说，是用铟 [111] 标记 2B8-MX-DTPA，使其比活达 2.3mCi/mg，以约 1.1μCi 量注射入 20 只 BALB/C 小鼠的各鼠体内。然后分别于 1、24、48 及 72 小时将 5 只一组的各组鼠杀死，将其器官取出准备用于分析。此外，也将皮肤，肌肉和骨各部分取出并处理以进行分析 ；也于 24-72 小时各时间点收集尿和粪便加以分析。

[0125] 使用相似方法，用钇 [90] 放射标记 2B8-MX-DTPA，并在 BALB/C 小鼠体内评估 72 小时期间其生物学分布。用 HPLC 排阻色谱提纯之后，用约 1μCi 的临床配制连接物 (比活为 12.2mCi/mg)，给五只一组的四组鼠分别进行静脉注射。然后于 1、24、48 及 72 小时将各组分别杀死，按上面所述分析其器官及组织。通过用 γ 闪烁计数器测量其韧致放射能量，从而测量相应各组织样品的放射活性，然后将活性值表达为每克组织注射剂量的百分数或每器官注射剂量的百分数。因为各器官及其它组织经反复漂洗除去了表面血液，这样各器官不充盈血液，因此各器官活性值未减去内部所带的血液所代表的活性分布。

[0126] ii. I2B8 的肿瘤定位

[0127] 在患 Ramos B 细胞肿瘤的无胸腺小鼠体内测定放射标记 2B8-MX-DTPA 的定位作用。用含有 1.2×10^7Ramos 肿瘤细胞的 0.1mlRPMI-1640，经皮下注射 (左后胁) 给予 6-8 周龄的无胸腺小鼠，所说肿瘤细胞事先适应在无胸腺小鼠体内生长。两星期中肿瘤长出，其重从 0.07 至 1.1g。然后用 100μl 铟 [111] 标记 2B8-MX-DTPA(16.7μCi) 给鼠静脉注射，并将三只一组的各组鼠分别于 0、24、48 及 72 小时以断颈方式杀死。杀死之后，取出尾、心、肺、肝、肾、脾、肌肉、大腿及肿瘤，洗涤并称重，也取出血液样品用于分析。用 γ 计数法测定

相应各样品的放射活性，并算出每克组织所注射剂量的百分数。

[0128] iii. 用放射性标记 2B8-MX-DTPA 进行生物学分布和肿瘤定位研究

[0129] 遵循上述（实施例 I.B.Viii.a）初步生物学分布实验，用铟 [111] 放射标记连接物 2B8，使其比活性达 2.3mCi/mg，将约 1.1μCi 注射入 20 只 BALB/C 小鼠的各只，测定放射性标记物的生物学分布。随后于 1、24、48 及 72 小时分别杀死五只一组的各组鼠，然后将其各器官及部分皮肤、肌内及骨取出 并处理以进行分析。此外，在 24-72 小时各时间点也收集尿及粪便加以分析。血中的放射性水平从 1 小时时所占每克注射剂量的 40.3％降至 72 小时时的 18.9％（未列出数据）。而整个实验中，心、肾、肌肉和脾各值则保持在 0.7-9.8％的范围内。肺中的放射性水平发现从 1 小时时的 14.2％降至 72 小时时的 7.6％。而相似的肝每克注射剂量值分别为 10.3％和 9.9％。这些数据如下述用于测定放射吸收剂量估算 I2B8。

[0130] 在 BALB/C 小鼠体内评估比活为 12.2mCi/mg 抗体的钇 [90] 标记连接物的生物学分布。放射性掺入达 >90％，并用 HPLC 提纯该放射性标记的抗体。72 小时内评估主要器官及皮肤、肌肉、骨、以及尿和粪便中的放射性的组织积沉，并表达为注射剂量 /g 组织的百分数。结果（未列出）表明，相应于血液的放射性水平从 1 小时时的每克注射剂量的约 39.2％降至 72 小时时的约 15.4％，而相应于尾、心、肾、肌肉及脾的放射性水平，在整个实验过程中却大致保持 10.2％不变或稍小。重要的是相应于骨的放射性是在 1 小时时的每克注射剂量的 4.4％至 72 小时时的 3.2％范围内。总的来说，这些结果表明该连接物中很少有游离钇与之共存，在研究过程中很少有游离放射性金属释放出。这些数据将如下述用于测定放射吸收剂量估算 Y2B8。

[0131] 制备 2B8-MX-DTPA 并用铟 [111] 标记，使其比活达 2.7mCi/mg，用于肿瘤定位研究。然后给 12 只患 Ramos B 细胞肿瘤的无胸腺小鼠每只注射 100μl 标记的连接物（约 24μCi）。肿瘤重量为 0.1-1.0g 范围。注射后的第 0、24、48 及 72 小时各时间点，通过后眼窝穿刺抽取 50μl 血，断颈杀死鼠，将尾、心、肺、肝、肾、脾、大腿及肿瘤取出，将组织处理并称重，使用 γ 计数器测定相应于各组织样品的放射性，将其值表达为每克所注射剂量的百分数。

[0132] 结果（未列出）证明铟 [111]2B8-MX-DTPA 在肿瘤中的浓度在整个实验过程中稳定增加。72 小时之后注射剂量的 13％沉积在肿瘤中。相反的在血液中的水平，在实验过程中由零小时时的超过 30％降至 72 小时时的 13％。实验结束时，所有其它组织（除肌肉外）含每克组织的注射剂量的 1.3％至 6.0％之间；肌肉组织含有每克的注射剂量的约 13％。

[0133] D. 人类研究

[0134] i. 2B8 和 2B8-MX-DTPA：用人组织作免疫组织学研究

[0135] 使用一组用丙酮固定的 32 种不同人组织来评价鼠单克隆抗体 2B8 的组 织反应活性。抗体 2B8 与具高度限制性组织分布形式的抗 -CD20 抗原反应，该组织分布形式仅在淋巴样组织（包括造血源的组织）中的细胞亚群中观察到。

[0136] 在淋巴节中，免疫活性在成熟外皮 B- 淋巴细胞群体以及胚层中心繁殖细胞中观察到。阳性反应也在外周血，扁桃体 B 细胞面、脾的白髓以及胸腺中发现的 40-70％髓质淋巴细胞中观察到。阳性反应也在大肠的固有层的滤泡 (Peyer 氏斑）中看到。最后，聚集或散布于各种器官的基质中（这些器官包括膀胱、乳房、宫颈、食管、肺、腮腺、前列腺、小肠及

胃）的淋巴样细胞与抗体 2B8 反应也是阳性的（数据未列出）。

[0137] 发现所有简单的上皮细胞、以及分层的上皮及不同器官的上皮都不与之反应。同样，与神经外胚层细胞（包括脑，脊椎及外周神经的外胚层细胞）也不反应。间质元件，例如骨胳和平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞以及多形态核炎性细胞也发现是阴性的（未列出数据）。

[0138] 使用用丙酮固定的一组 16 种不同人组织来评价 2B8-MX-DTPA 连接物组织反应活性。正如前面用天然抗体所证明的（未列出数据），该 2B8-MX-DTPA 连接物也识别表现出高度限制性分布形式的 CD20 抗原，该分布形式仅在淋巴样来源细胞亚群中发现。在淋巴节中，免疫活性在 B 细胞群体中观察到。在脾的白髓及胸腺髓质淋巴细胞中发现很强反应活性。在膀胱、心脏、大肠、肝、肺及子宫中散布的淋巴细胞中也观察到免疫活性，这归结于这些组织中存在炎性细胞所致。正如与天然抗体一样，神经外胚层细胞或间质元件也未发现反应活性（未列出数据）。

[0139] ii. I2B8（造影）及 Y2B8（治疗）的临床分析

[0140] a. I/II 期临床试验单剂量治疗研究

[0141] 现进行 I/II 期 I2B8（造影）临床分析，接着进行 Y2B8 单剂量治疗临床分析。对单剂量研究，采用下述方案

[0142] 1. 收集外周干细胞 (PSC) 或骨髓 (BM) 并净化；

[0143] 2. I2B8 造影；

[0144] 3. Y2B8 治疗（三种剂量水平）；及

[0145] 4. PSC 或自体 BM 移植（假如必要，则根据连续 3 天绝对中性白细胞计数低于 500/mm^3 或血小板低于 20000/mm^3，同时骨髓检查时无骨髓复原迹象来决定）。

[0146] Y2B8 的剂量水平如下：

[0147] 剂量水平	剂量 (mCi)
[0148] 1	20
[0149] 2	30
[0150] 3	40

[0151] 每个剂量水平用来治疗 3 个患者，以确定最大耐受剂量 (MTD)。

[0152] 造影（剂量测量法）研究进行如下：使用 I2B8 对每个患者进行二次体内生物学分布研究。第一次实验中，以 1 小时内静脉输注 (i.v.) 给药 2mgI2B8(5mCi)；一星期后由静脉给药 2B8（即非连接抗体），其输入速率不超过 250mg/hr，紧接着在 1 小时期间静脉给药 2mg I2B8(5mCi)。在上述两次实验中 I2B8 输注之后立即给每个患者造影，在时间 t = 14-18 小时（假如指明）、t = 24 小时、t = 72 小时及 t = 96 小时（假如指明）重复造影。测定整个身体铟 [111] 标记的平均保留时间；也对可识别器官或肿瘤患部（有意义区域）作此种测定。

[0153] 将这些有意义区域与整个身体的标记物浓度进行比较。根据该比较结果，使用标准方法可测定 Y2B8 的估计位置及浓度。假如 Y2B8 的估计累积剂量比估计的整个身体的剂量大 8 倍、或假如肝中的估计累积剂量超过 1500cGy，那么不应以 Y2B8 来处理。

[0154] 假如该造影研究可以接受，那么先按 0.0 或 1.0mg/kg 患者体重的 2B8 量，由静脉输注给药，其输入速率不超过 250mg/ 小时。然后以 20mCi/ 小时的速度静脉输注 Y2B8(10、

20 或 40mCi) 给药。

[0155] b. I/II 期临床试验 :多剂量治疗研究

[0156] 现进行 Y2B8 的 I/II 期临床分析,对于多剂量研究,按下述方案 :

[0157] 1. 收集 PSC 或 BM ;

[0158] 2. I2B8 造影 ;

[0159] 3. Y2B8 治疗 (三种剂量水平) 采用 4 次剂量或者总累积剂量为 80mCi ;及

[0160] 4. PSC 或自体 BM 移植 (根据医生的决定)

[0161] Y2B8 的剂量水平如下 :

[0162] 剂量水平	剂量 (mCi)
[0163] 1	10
[0164] 2	15
[0165] 3	20

[0166] 每个剂量水平治疗三个患者确定其 MTD。

[0167] 造影 (剂量测量法) 研究按如下进行 :用头二个患者测定未标记抗体 (即 2B8) 的优选造影剂量。四小时期间,这头两个患者将接受 250CC 生理盐水中的未标记 2B8 100mg,接着给予 0.5mCi I2B8。于时间 t = 0, t = 10min, t = 120min, t = 24hr, t = 48hr 收集血样供生物学分布测定用。分别在 t = 2hr, t = 24hr 及 t = 48hr 用多区域 γ 照相机摄取影象。在第 48 小时摄影后,给病人如上述输入 250mg 2B8,接着给予 4.5mCi I2B8,然后按上面所述取血及摄影。假如 100mg 2B8 产生优良影象,那么随后两个病人按上面所述给予 50mg 2B8,接着给予 0.5mCi I2B8,48 小时后再给予 100mg2B8,然后再给 4.5mCi I2B8。假如 250mg2B8 产生优良影像,然后下两个病人将按上述给予 250mg2B8,接着给予 0.5mCi I2B8, 48 小时之后再给予 500mg2B8 并给予 4.5mCi I2B8。后面的病人将以提供最优造影的最低量 2B8 处理。最优造影定义如下 :(1) 使抗体消失最慢的最有效造影 ;(2) 在单一器官中分隔最小的最好分布状况 ;(3) 患处的最佳主观分辨度 (肿瘤 / 背景对比)。

[0168] 对于前 4 个病人, Y2B8 的第一次治疗剂量将在 I2B8 最后剂量后的第 14 天开始,而后面的病人 Y2B8 第一次治疗剂量将在 I2B8 后的 2-7 天开始。

[0169] 用 Y2B8 治疗之前,除了前面的 4 个病人外其余的病人按上面所述给予 2B8,接着静脉输注 Y2B8(在 5-10 分钟期间输完)。在 t = 0 分钟, t = 10 分钟, t = 120 分钟, t = 24 小时, t = 48 小时分别取血样用于生物学分布。约每 6-8 星期患者将收到重复 Y2B8 剂量 (与第一次剂量相同的剂量给药) 最多共 4 次,或总累计剂量 80mCi。最优选患者的 WBC 大于或等于 3000,且 AGC 大于或等于 100,000 之后再接受随后的 Y2B8 剂量。

[0170] 三种剂量水平研究完成之后,将确定 MTD 值,然后其它的患者再进入研究,这些患者将接受 MTD。

[0171] II. 嵌合抗 -CD20 抗体的生产 (C2B8)

[0172] A. 嵌合抗 -CD20 免疫球蛋白 DNA 表达载体的构建

[0173] 从 2B8 小鼠杂交瘤细胞分离出 RNA(如 Chomczynki, P. 等人在“Singlestep method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction”Anal. Biochem. 162 :156-159(1987) 中所述),并由此制备 cDNA。通过聚合酶链反应,使用与小鼠轻链信号序 列 5′ 端和小鼠轻链 J 区 3′ 端同源的一套 DNA 引物,从

cDNA 中分离小鼠免疫球蛋白轻链可变区 DNA。引物序列如下：

[0174] 1. V_L 有意义 (SEQ. ID. NO. 3)

[0175] 5′ ATC AC AGATCT CTC ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG

[0176] ATT ATC AGC TTC 3′

[0177] （下面划线的部分是 BglII 位点；上面划线的部分是起始密码子）

[0178] 2. V_L 反义 (SEQ. ID. NO. 4)

[0179] 5′ TGC AGC ATC CGTACG TTT GAT TTC CAG CTT 3′

[0180] （下面划线部分是 Bsi WI 位点）

[0181] TCAE8 中的相应 BglII 和 Bsi WI 位点见图 1 和 2，TCAE8 中抗 -CD20 中的相应位点见图 3。

[0182] 将这些得到的 DNA 片段直接克隆进 TCAE8 载体中人 kappa 轻链不变区的前面并测序。所测定的鼠可变区轻链的 DNA 序列绘于图 4 中 (SEQ. ID. NO. 5)，也见图 3 核苷酸 978 至 1362。图 4 也提供来自该鼠可变区的氨基酸序列以及 CDR 和构架区。来自 2B8 的小鼠轻链可变区是小鼠 kappa VI 家族，见前面所述 Kabat 的文献。

[0183] 按相似方法分离出小鼠重链可变区并克隆到人 IgG1 不变区之前。引物如下：

[0184] 1. V_L 有意义 (SEQ. ID. NO. 6)

[0185] 5′ GCG GCT CCC ACGCGT GTC CTG TCC CAG 3′

[0186] （底下划线的部分是 Mlu I 位点）

[0187] 2. V_L 反义 (SEQ. ID. NO. 7)

[0188] 5′ GG(G/C)TGT TGT GCTAGC TG(A/C)(A/G)GA GAC(G/A)GT GA 3′

[0189] （下面划线的部分是 Nhe I 位点）

[0190] TCAE8 中的相应 Mlu I 和 Nhe I 位点见图 1 及图 2，TCAE8 中抗 -CD20 中的相应位点见图 3。

[0191] 该小鼠重链的序列绘于图 5(SEQ. ID. NO. 8)，也参见图 3，核苷酸 2401 至 2820。图 5 也提供来自该鼠可变区的氨基酸序列以及 CDR 和构架区。来自 2B8 的小鼠重链可变区是小鼠 VH2B 家族，见前面所述 Kabat 的文献。

[0192] B. 创建产生嵌合抗 -CD20 的 CHO 和 SP2/0 转染瘤

[0193] 将中国仓鼠卵 (CHO) 细胞 DG44 于减次黄嘌呤和胸苷的 SSFM II 培养基 (Gibco, Grand Island, NY, Form No. 910456PK) 中培养；而将 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞在 Dulbecco 氏改良伊格尔培养基 (DMEM)(Irvine Scientific, Santa Ana, Ca., Cat. No. 9024) 并加有 5% 胎牛血清及 20ml/l 谷氨酰胺的培养基中培养。使用 BTX600 电穿孔体系 (BTX. San Diego. CA) 在 0.4ml 一次性电穿孔池中，以由 Not I 所限制过的 25μg CHO 或 50μg SP2/0 质粒 DNA 将 4 百万细胞电穿孔，条件是 CHO 用 210 伏，SP2/0 用 180 伏，400 微法，13 欧姆。各电穿孔物铺于 6 个 96 孔的平皿（约 7000 个细胞 / 孔）上。各平皿加以含 G418(GENETICIN, Gibco, Cat. No. 860-1811) 的培养基，其加入方式是对于 CHO 来说，以 400μg/ml 活性化合物比例（培养基中还包括 50μM 次黄嘌呤和 8μM 胸苷）加入，或对 SP2/0 来说按 800μg/ml 加入，于电穿孔后两天加入，此后 2 或 3 天加一次直至菌落产生为止。将菌落的上清液用对人抗体特异性的 ELISA 来检测其嵌合免疫球蛋白的存在。将产生最高量免疫球蛋白的菌落展开，并铺于含加氨甲蝶呤 (25nM 为 SP2/0，5nM 为 CHO) 的培养基的 96 孔平板上。2-3

天添加一次。按上面所述检测上清液并检查产生最大量免疫球蛋白的菌落。使用蛋白 A 亲和色谱将嵌合抗 -CD20 抗体从上清液中提纯。

[0194] 采用聚丙烯酰胺电泳法分析提纯的嵌合抗 -CD20，并估计纯度超过 95％。根据 2B8 确定嵌合抗体的亲和性及特异性。以直接和竞争结合测试法试验嵌合抗 -CD20 抗体，与鼠抗 -CD20 单克隆抗体 2B8 相比，证明对许多 CD20 阳性 B 细胞系有差不多的亲合性及特异性（数据未列出）。通过 I^{125} 放射标记嵌合抗 -CD20 直接结合来测定嵌合抗体的表观亲和常数 (Kap) 并且以 Scatchard 作图法来与放射性标记 2B8 相比较。估测出的 CHO 产生的嵌合抗 -CD20 的 Kap 是 5.2×10^{-9}M，而 SP2/0 产生的抗体为 7.4×10^{-9}M，2B8 估测的 Kap 是 3.5×10^{-9}M。放射免疫测试的直接竞争用来通过比较其与 2B8 有效竞争的能力确认嵌合抗体的免疫活性的特异性及保留程度。产生对 B 细胞上 CD20 抗原结合作用 50％抑制作用所需的嵌合抗 -CD20 和 2B8 抗体的量基本相等（数据未列出），即设想由于嵌合作用所引起的抗 -CD20 抗体的抑制活性损失极小。

[0195] 实施例 II.B 的结果特别表明，使用 TCAE8 载体从 CHO 和 SP2/0 转染瘤产生嵌合抗 -CD20 抗体，该嵌合抗体基本上与鼠抗 -CD20 单克隆抗体 2B8 有相同的特异性和结合能力。

[0196] C. 嵌合抗 -CD20 抗体的免疫活性测试

[0197] i. 人 Clq 分析

[0198] 以流式细胞计数测试法，使用萤光素标记 Clq(Clq 从 Quidel，Mira Mesa，CA.Prod.No.A400 获得，而 FITC 标记从 Sigma，St.Louis MO，Prod.No.F-7250 获得，按照 Selected Methods In Cellular Immunology，Michell&Shiigi，Ed.(W.H.Freeman & Co.San Francisco，CA,1980，p.292) 一书所述方法进行 Clq 的 FITC 标记）来评价由 CHO 和 SP2/0 细胞系产生的嵌合抗 -CD20 抗体对人 Clq 的结合作用。使用 Becton Dickinson FACScan™ 流式细胞计数器（在 515-545nm 范围内测量萤光素）来得到分析结果。相等量的嵌合抗 -CD20 抗体，人 IgG1,K 骨髓瘤蛋白 (Binding site,San Diego,Ca,Prod.No.BP078) 和 2B8 与相当数量的 CD20- 阳性 SB 细胞共培养，接着用 FACS 缓冲液 (.2％ BSA 于 PSA 中，pH7.4，.02％叠氮钠）洗涤，除去未连接的抗体，接着与 FITC 标记的 Clq 一起培养，保温 30-60 分钟之后，再次洗涤细胞。用 FACScan™，遵循厂商的说明对三种条件（包括 FITC 标记 Clq 作为对照）进行分析。结果绘于图 6 中。

[0199] 正如图 6 所显示的，仅仅对于嵌合抗 -CD20 抗体条件才观察到显著的萤光增强，即仅仅与嵌合抗 -CD20 抗体结合的 SB 细胞才呈 Clq 阳性，而其它条件则得到与对照物相同的图形。

[0200] ii. 补体依赖性细胞溶解

[0201] 在人血清存在下（补体源）分析嵌合抗 -CD20 抗体溶解淋巴瘤细胞系的能力。于 37℃，将 100μCi ^{51}Cr 与 1×10^{6}SB 细胞混合 1 小时，由此以 ^{51}Cr 标记 CD20 阳性 SB 细胞。然后在相等量的人补体及相当量的 (0-50μg/ml) 嵌合抗 -CD20 抗体或 2B8 存在下，于 37℃，将标记 SB 细胞培养 4 小时（见 Brunner,K.T.et al.,“Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoidcells on ^{51}Cr-labeled allogeneic target cells in vitro”Immunology14 :181-189(1968))，结果绘于图 7。

[0202] 图 7 的结果特别表明，在这些条件下，嵌合抗 -CD20 抗体产生显著溶胞作用

(49%)。

[0203] iii. 抗体依赖性细胞毒性效应细胞检测

[0204] 利用CD20阳性细胞(SB)和CD20阴性细胞(T细胞白血病系HSB,见Adams,Richard,"Formal Disussion"Can.Res.27:2479-2482(1967);ATCC保藏号ATCC CCL 120.1)进行该项研究,该两细胞用^{51}Cr标记。分析按照Brunner,K.T.et al.,"Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoidcells on ^{51}Cr-labeled allogeneic target cells in vitro;inhibition by isoantibodyand drugs."Immunology14:181-189(1968)所述方法进行。于37℃保温4小时后,观察到CD20阳性SB靶细胞(^{51}Cr-标记)的嵌合抗-CD20抗体依赖性细胞介导的显著的溶胞作用,并且该效果也由CHO和SP2/0产生的抗体所观察到(效应细胞是人外周淋巴细胞,效应细胞:靶的比例是100:1)。靶细胞的有效溶解于3.9μg/ml获得。相反的,在同样情况下,鼠抗-CD20单克隆抗体2B8从统计学上看无明显效果,而CD20阴性HSB细胞则不溶解。结果示于图8中。

[0205] 实施例II的结果特别表明,实施例I的嵌合抗-CD20抗体具免疫学活性。

[0206] III. 使用嵌合抗-CD20抗体体内消耗B细胞

[0207] A. 非人灵长类动物研究

[0208] 分别进行三个非人灵长类动物研究。为方便起见,这三个研究分别称之为"嵌合抗-CD20:CHO & SP2/0","嵌合抗-CD20:CHO"及"高剂量嵌合抗-CD20",其条件如下:

[0209] 嵌合抗-CD20:CHO & SP2/0

[0210] 将6只体重在4.5到7公斤范围内的猕猴(White Sands Research Center,Alamogordo,NM)按2只一组分成三组。每组中的两个动物均给予相同剂量的免疫活性嵌合抗-CD20抗体,而每组一个动物给予CHO转染瘤产生的纯化抗体,另一个给予SP2/0转染瘤产生的抗体。三个组接受的抗体剂量相应为每天0.1mg/kg,0.4mg/kg及1.6mg/kg持续连续4天。该嵌合免疫活性抗-CD20抗体与无菌盐水混合,通过静脉输注给药,每次输注前取血样。另外在最后一次注射后开始的24小时(T=0)及此后的第1、3、7、14和28天均抽取血样,并且此后按二星期的间隔再抽血样直至第90天研究完成为止。

[0211] 于2000RPM将约5ml来自各动物的全血离心5分钟。取出血浆用于检测可溶的嵌合抗-CD20抗体水平。其沉淀(含外周血白细胞和红血细胞)再悬浮于胎牛血清中用于萤光标记抗体分析(见"Fluorescent Antibody Labeling ofLymphoid Cell Population"如后面所述)。

[0212] 嵌合抗-CD20:CHO

[0213] 将6只体重4-6公斤的猕猴(White Sands)按2只一组分成三组,所有的动物均给注射从CHO转染瘤产生的免疫活性嵌合抗-CD20抗体(于无菌盐水中)。该三组再按下法分开:第一组每日静脉注射0.01mg/kg抗体持续4天;第二组每日静脉注射0.4mg/kg抗体持续4天;第三组单次静脉注射6.4mg/kg抗体。三个组均在治疗开始前抽取血样,此后于最后注射之后的T=0、1、3、7、14和28天如上所述分别抽血样,这些血样均都加工用于萤光标记抗体分析(见后面"Fluorescent Antibody Labeling")。除进行外周血B细胞定量分析外,还在最后一次注射之后的第7、14及28天取淋巴节活检,并且为用流式细胞计数器进行淋巴细胞总数定量分析而作单细胞制剂染色。

[0214] 高剂量嵌合抗 -CD20

[0215] 给 2 只猕猴 (White Sands) 每周输注 16.8mg/kg 从 CHO 转染瘤得到的免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体（于无菌盐水中）持续连续 4 周。治疗结束时，将两动物麻醉取出骨髓，并取淋巴节活检。用 Leu16 将两份组织染色用流式细胞计数器测定 B 淋巴细胞的存在，此测定遵从 Ling, N.R. 等人的“B-cell andplasma cell antigens”Leucocyte Typing III White Cell Differentiations Antigens, A.J.McMichael, Ed.(Oxford University Press, Oxford UK1987)p.302 所述方法进行。

[0216] 淋巴样细胞总体的萤光抗体标记

[0217] 除去血浆之后，用 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 洗白细胞二次，并再悬浮于与血浆等体积的胎牛血清 (56℃热失活 30 分钟）中。将该细胞制剂 0.1ml 体积分配于 6 支 15ml 圆锥形离心管的每支中。将对人淋巴细胞表面标志 CD2(AMAC, Westbrook, ME), CD20(Becton Dickinson) 及人 IgM(Binding Site, San Diego, CA) 具特异性的萤光素标记单克隆抗体加入到这些管的 3 支中，用以鉴定 T 和 B 淋巴细胞总数。所有的试剂预先试验过对相应的猴淋巴细胞抗原呈阳性。嵌合抗 -CD20 抗体与猴 B 细胞表面 CD20 的结合作用，在第 4 个管中使用与藻红素偶联的多克隆山羊抗 - 人 IgG(AMAC) 来测量。该试剂被预先吸附在猴 Ig- 琼脂糖柱上以阻斥对猴 Ig 的交叉反应活性，由此可进行连接于细胞的嵌合抗 -CD20 抗体的特异性检测并定量分析。第 5 支管既包含抗 -IgM 又包含抗 - 人 IgG 试剂用于 B 细胞群双染色。第 6 支管中的样品未加试剂用于测定自体萤光。将细胞与萤光抗体保温 30 分钟，用 0.5ml 固 定缓冲液 (0.15M NaCl, 1％多聚甲醛 pH7.4) 洗涤和固定，并在 BectonDickinson FACScan™ 仪上分析。淋巴细胞总数一开始由前右夹角光散射在点绘图上与未标记的白细胞一起鉴定出。然后排除所有其它的作用，分离出总淋巴细胞总数，随后的萤光测量值仅反映剩下的淋巴细胞特异性作用。外周血 B 淋巴细胞的消耗

[0218] 虽然用 CHO 转染瘤衍生的嵌合抗 -CD20 抗体，以 1.6mg/kg 及 6.4mg/kg 的剂量水平给猴注射后 7 天，而用 SP2/0 产生的抗体以 0.4mg/kg 剂量水平给猴注射后 7 天，B 细胞恢复开始稍增，但 CHO 及 SP2/0 产生的抗体之间在效力上没有看出有明显差别。图 9A、B 及 C 提供源于嵌合抗 -CD20:CHO 及 SP2/0 研究的结果，其中图 9A 针对 0.4mg/kg 剂量水平，图 9B 针对 1.6mg/kg 剂量水平，而图 9C 针对 6.4mg/kg 剂量水平。

[0219] 正如图 9 所证明的，在所有试验过的剂量范围内，治疗处理之后，外周血 B 细胞水平出现急剧下降 (>95％)，并且这些水平保持到输注后 7 天，经过这一期间后，B 细胞开始恢复，而开始恢复的时间与剂量水平无关。

[0220] 在嵌合抗 -CD20:CHO 研究中，每日 4 次注射（共 0.04mg/kg) 期间，采用 10 倍较低抗体剂量浓度 (0.01mg/kg)。图 10 给出这一研究结果，该剂量消耗外周血 B 细胞总数至正常水平的约 50％（以抗 - 表面 IgM 或 Leu16 抗体估测）。该结果也表明，对非人灵长类动物来说，以免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体在该剂量浓度，在该时间内，便使得 CD20 抗原在 B 淋巴细胞群体上达到饱和的情况不会出现，治疗处理之后最初 3 天内，在血样中检出抗体包被的 B 淋巴细胞，然而在第 7 天时，便检不出抗体包被细胞了。

[0221] 表 I 归纳了单剂量或多剂量免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体对外周血细胞总数影响的结果，单剂量条件是 6.4mg/kg，多剂量条件是 0.4mg/kg 连续 4 天（这些结果来源于上面所述对猴的研究）。

[0222] 表 I

[0223] C2B8 灵长类动物研究得出的外周血总数

[0224] 猴	剂量	天数	CD2	抗 -Hu IgG
[0225] A	0.4mg/kg	预先抽血	81.5	-
[0226]	(4 剂)	0	86.5	0.2
[0227]		7	85.5	0.0
[0228]		21	93.3	-
[0229]		28	85.5	-
[0230] B	0.4mg/kg	预先抽血	81.7	-
[0231]	(4 剂)	0	94.6	0.1
[0232]		7	92.2	0.1
[0233]		21	84.9	-
[0234]		28	84.1	-
[0235] C	6.4mg/kg	预先抽	77.7	0.0
[0236]	(1 剂)	7	85.7	0.1
[0237]		21	86.7	-
[0238]		28	76.7	-
[0239] D	6.4mg/kg	预先抽血	85.7	0.1
[0240]	(1 剂)	7	94.7	0.1
[0241]		21	85.2	-
[0242]		28	859	-

[0243]	抗 -Hu IgG+		
[0244] 猴	抗 -Hu IgM*	Leu-16	% B 细胞消耗
[0245] A	-	9.4	0
[0246]	0.3	0.0	97
[0247]	0.1	1.2	99
[0248]	-	2.1	78
[0249]	-	4.1	66
[0250] B	-	14.8	0
[0251]	0.2	0.1	99
[0252]	0.1	0.1	99
[0253]	-	6.9	53
[0254]	-	8.7	41
[0255] C	0.2	17.0	0
[0256]	0.1	0.0	99
[0257]	-	14.7	15
[0258]	-	8.1	62
[0259] D	0.1	14.4	0
[0260]	0.2	0.0	99

[0261] - 9.2 46

[0262] - 6.7 53

[0263] * 双染色总数，它表明嵌合抗 -CD20 包被 B 细胞的程度。

[0264] 归纳于表 I 中的数据表明，不管单剂量或多剂量水平，在抗体过剩的情况下外周血中 B 细胞的消耗都很快且效果很好。此外，至少最后一次注射后 7 天都能观察到消耗作用，到 21 天时观察到部分 B 细胞恢复。

[0265] 表 II 归纳采用表 I 的治疗制式 (0.4mg/kg4 次日剂量或 6.4mg/kg1 次）时，免疫活性嵌合抗 -CD20 对淋巴结中细胞总数的影响，也提供正常淋巴结（对照猴、腋下和腹股沟的）和正常骨髓（二只猴）的比较值。

[0266] 表 II

[0267] 淋巴节的细胞总数分析

	猴	剂量	天数	CD2	抗 -Hu IgM
[0268]					
[0269]	A	0.4mg/kg	7	66.9	-
[0270]		(4 剂）	14	76.9	19.6
[0271]			28	61.6	19.7
[0272]	B	0.4mg/kg	7	59.4	-
[0273]		(4 剂）	14	83.2	9.9
[0274]			28	84.1	15.7
[0275]	C	6.4mg/kg	7	75.5	-
[0276]		(1 剂）	14	74.1	17.9
[0277]			28	66.9	23.1
[0278]	D	6.4mg/kg	7	83.8	-
[0279]		(1 剂）	14	74.1	17.9
[0280]			28	84.1	12.8

[0281] 表 II（续）

		抗 -Hu IgG+		
[0282]				
[0283]	猴	抗 -Hu IgM*	Leu-16	% B 淋巴细胞消耗
[0284]	A	7.4	40.1	1
[0285]		0.8	22.6	44
[0286]		-	26.0	36
[0287]	B	29.9	52.2	0
[0288]		0.7	14.5	64
[0289]		-	14.6	64
[0290]	C	22.3	35.2	13
[0291]		1.1	23.9	41
[0292]		-	21.4	47
[0293]	D	12.5	19.7	51
[0294]		0.2	8.7	78
[0295]		-	12.9	68

[0296] 表 II(续)

[0297] | | | 抗 -Hu IgG+ | | | % B 淋巴细胞 |
|---|---|---|---|---|---|
[0298] | | CD2 | 抗 -Hu IgM | 抗 -Hu IgM | Leu16 | 消耗 |
[0299] | 正常淋巴节 | | | | | |
[0300] | 对照 1 | | | | | |
[0301] | 腋下 | 55.4 | 25.0 | - | 41.4 | NA |
[0302] | 腹股沟 | 52.1 | 31.2 | - | 39.5 | NA |
[0303] | 正常骨髓 | | | | | |
[0304] | 对照 2 | 65.3 | 19.0 | - | 11.4 | NA |
[0305] | 对照 3 | 29.8 | 28.0 | - | 16.6 | NA |

[0306] 表 II 的结果表明,两种治疗制式均有效地消耗掉 B 淋巴细胞。表 II 还表明,对于非人灵长类动物来说,使用免疫活性嵌合抗 -CD20 抗体,则 B 细胞在淋巴组织中的完全饱和状态不会达到。此外在治疗后第 7 天观察到抗体包被细胞,接着在第 14 天明显地观察到消耗掉淋巴结 B 细胞。

[0307] 根据这些数据,进行上述单次高剂量嵌合抗 -CD20 研究,主要是测定药理学 / 毒理学。该研究用以评价随着嵌合抗体的给药所引起的毒性,以及 B 细胞从外周血淋巴结和骨髓中消耗的效力。此外,因为表 II 数据表明,在那些实验中淋巴结 B 细胞大部分在治疗后的 7-14 天消耗掉,因此可以证明采用周剂量制式会获更佳效果。表 III 归纳出高剂量嵌合抗 -CD20 研究的结果。

[0308] 表 III

[0309] 淋巴结和骨髓的细胞总数分析淋巴细胞总数 (%)

[0310] | 猴 | CD2 | CD20[a] | mIgM+ 抗 -C2B8[b] | C2B8[c] | 天数 [d] |
|---|---|---|---|---|---|
[0311] | | 腹股沟淋巴节 | | | | |
[0312] | E | 90.0 | 5.3 | 4.8 | 6.5 | 22 |
[0313] | F | 91.0 | 6.3 | 5.6 | 6.3 | 22 |
[0314] | G | 89.9 | 5.0 | 3.7 | 5.8 | 36 |
[0315] | H | 85.4 | 12.3 | 1.7 | 1.8 | 36 |
[0316] | 骨髓 | | | | | |
[0317] | E | 46.7 | 4.3 | 2.6 | 2.8 | 22 |
[0318] | F | 41.8 | 3.0 | 2.1 | 2.2 | 22 |
[0319] | G | 35.3 | 0.8 | 1.4 | 1.4 | 36 |
[0320] | H | 25.6 | 4.4 | 4.3 | 4.4 | 36 |

[0321] a 表示以 Leu16 染色的总数。

[0322] b 表示双染色总数,对表面 IgM 细胞和嵌合抗体包被的细胞均为阳性。

[0323] c 表示对嵌合抗体 [包括双染色表面 IgM 阳性细胞及单染色 (表面 IgM 阴性) 细胞] 染色的总计数量。

[0324] d 最后一次 16.8mg/kg 剂量注射后的天数。

[0325] 被评价的两动物在治疗停止后第 22 天含有的 B 细胞少于 5%,而对照的淋巴结中为 40% (见上表 II)。同样,在以嵌合抗 -CD20 抗体治疗的动物骨髓中,CD20 阳性细胞水

平小于 3%，而正常动物为 11-15%（见上表 II）。被评价的动物在治疗停止后第 36 天，其中 1 只 (H) 在淋巴结中有约 12% B 细胞，在骨髓中有 4.4% B 细胞，而另外 1 只 (G) 的淋巴结中有约 5%细胞，骨髓中有 0.8%，该数据表明了显著的 B 细胞消耗作用。

[0326] 实施例 IIIA. 的结果特别证明了低剂量免疫活性嵌合抗 -CD20 可产生长效灵长类动物体内的外周血 B 细胞消耗。这些数据也证明，当反复高剂量抗体给药时，在外周淋巴结和骨髓中也能引起 B 细胞总数的显著消耗。继续跟踪试验动物表明，即使在治疗的第一星期产生如此严重的外周 B 淋巴细胞消耗，也未观察到不利的健康影响。而且，还观察到 B 细胞总数的恢复，由此得出结论，通过治疗，这些灵长类动物的多能干细胞不会受到不利影响。

[0327] B. C2B8 的临床分析

[0328] i. C2B8 的 I/II 期临床试验 :单剂量治疗研究

[0329] 将组织学记载复发 B 细胞瘤的 15 个病人，在 I/II 期临床试验中以 C2B8 治疗。以剂量逐步升级实验方式给每个病人以单剂量 C2B8，即以 10mg/m^2，50mg/m^2，100mg/m^2，250mg/m^2 及 500mg/m^2 量，每种剂量分别给予 3 个病人，通过 0.22 微米孔衬里滤器经静脉输注进行治疗，输注用生理盐水稀释至最终体积 250cc 或最大浓度 1mg/ml 的 C2B8。第 1 小时内初始输入速度为 50cc/hr，若未发现毒性反应，则剂量输入速度可逐渐加大直至最大值 200cc/hr。

[0330] 毒性（由临床医生指明的）分级为从“无”，到“发热”，到“中度”（两个病人）直至“严重”（一个病人），所有病人均完成了此治疗处理过程。分析外周血淋巴细胞，特别测定 C2B8 对 T 细胞和 B 细胞的影响。所有的病人得到一致结果，用 C2B8 输注之后消耗外周血 B 淋巴细胞，此种消耗维持两星期以上。

[0331] 一个病人（接受 100mg/m^2C2B8）表现出对 C2B8 治疗的部分反应（持续四周以上，所有可测量显示的患部两垂直直径之积相加，共降低了 50%以上，在此期间无新患部出现且已有的患部无增大现象），至少另一个病人（接受 500mg/m^2）表现出对 C2B8 治疗的较差反应（所有可测量显示的患部两最大垂直直径之积相加，共降低不到 50%，但至少有 25%）。对于有代表性的效率，其 PBL 结果示于图 14 中，表现出 PR 的病人其数据在图 14A 中，表现出 MR 的病人其数据示于图 14B。图 14 中，下述符号表示 :■= 淋巴细胞，⊟= $CD3^+$ 细胞 (T 细胞），▲= $CD20^+$ 细胞，●= $CD10^+$ 细胞，⊖= κ，△= λ 及 ◆= C2B8。正如所表明的，B 细胞标志 CD20 和 CD19，κ 和 λ，在两星期之上均被消耗，而 T 细胞数量只开始有稍许下降，并在相当快的时间内便回复到近似基线水平。

[0332] ii. C2B8 的 I/II 期临床试验 :多剂量治疗研究

[0333] 有明显进行性症状的，组织学上证实患 B 细胞淋巴瘤的病人适于作此项实验，将其分为二部分 :在 I 期，包括剂量递增至有限毒性特性剂量，并确定其生物学活性耐受剂量水平，每 3 个病人一组的各组，每周静脉输注 C2B8 共分为 4 次。三种水平的累积剂量如下 :500mg/m^2(125mg/m^2/ 输注）、1000mg/m^2(250mg/m^2/ 输注）、1500mg/m^2(375mg/m^2/ 输注，定义生物学活性 耐受剂量并确定之，其定义为既具有可耐受的毒性又具有足够的活性的最低剂量）。在 II 期，其它病人将得到生物学活性可耐受剂量，但侧重测定 C2B8 四种剂量活性。

[0334] IV. 结合治疗 :C2B8 和 Y2B8

[0335] 使用 C2B8 及 Y2B8 的结合治疗法在小鼠异记录模式 (nu/nu 小鼠，雌性，约 10 周

龄）中使用 B 细胞成淋巴瘤（Ramos 肿瘤细胞）进行研究。为进行比较，其它小鼠也用 C2B8 和 Y2B8 治疗。

[0336] 在 37℃和 5% CO_2 条件下将 Ramos 肿瘤细胞（ATCC，CRL 1596）维持在使用补充有 10％胎牛血清及谷氨酰胺的 RPMI-1640 的培养物中。给 9 只约 7-10 周龄的雌性裸鼠，使用装有 25 号针头的 1cc 注射器，经皮下注射 1.7×10^6Ramos 细胞（体积为 0.10ml，HBSS），使其引发肿瘤。所有动物控制在层流通风厨中，并且所有的笼子，垫子，食物及水都经高压灭菌处理。通过割切肿瘤使肿瘤细能过筛，并将其通过 40 目筛，用 IX HBSS(50mi) 通过离心处理（1300RPM）将细胞洗二次，再悬浮于 IX HBSS 至 10×10^6 细胞 /ml，于 -70℃冷冻直至使用。

[0337] 为满足不同实验条件，将细胞分几批将其解冻，用离心法（1300RPM）将其沉淀并用 IX HBSS 洗二次。然后再将细胞悬浮至约 2.0×10^6 细胞 /ml。使用装有 25 号针头的 1cc 注射器给约 9-12 只小鼠皮下注射 0.10mi 细胞悬浮液，注射在动物的左边，接近中部区。在约两周后肿瘤扩展。将肿瘤切下并按上面所述处理，所试动物按前述注射 1.67×10^6 细胞的 0.10ml HBSS 悬浮液。

[0338] 根据初步的剂量实验，确定采用 200mg C2B8 和 100μCi Y2B8 用于此项研究。给 90 只雌性 nu/nu 小鼠（约 10 周龄）注射肿瘤细胞。约 10 天后，将 24 只鼠分成四个实验组（六只一组）同时努力在各组中维持差不多的肿瘤大小分布（平均肿瘤大小，以肿瘤的长 × 宽之积表示，约为 $80mm^2$）。使用装有 25 号针头的 100μl Hamilton 注射器，按下述剂量，通过尾静脉注射法对下列各组进行处理：

[0339] A. 生理盐水

[0340] B. Y2B8(100μCi)

[0341] C. C2B8(200μg) 及

[0342] D. Y2B8(100μCi)+C2B8(200μg)

[0343] 初次注射后，以 C2B8 治疗的组给予第二次 C2B8 注射（200μg/ 鼠），用测径器每 2 天或 3 天测量肿瘤一次。

[0344] 按如下方法制备治疗材料：

[0345] A. 制备 Y2B8

[0346] 将氯化钇 [90](6mCi) 移入聚丙烯试管，并用无金属 2M 乙酸钠调节 pH 值 4.1-4.4。加入 2B8-MX-DTPA（于生理盐水中 0.3mg，见上面 2B8-MX-DTPA 的制备），并以涡旋方式轻轻混合。保温 15 分钟之后，加入 0.05× 体积 20mMEDTA 及 0.05× 体积 2M 乙酸钠使反应骤冷。将 5.0μl 该反应混合物在含 75mg/ml HSA 及 1mM DTPA 的 2.5ml1×PBS（配制缓冲液）中稀释，测定其放射活性浓度，通过加入 10.0μl 到 20ml EcolumeTM 闪烁混合液中进行计数。将剩余的反应混合物加到 3.0ml 配制缓冲液中，无菌过滤并于 2-8℃贮存直至使用。比活性（注射时为 14mCi/mg）根据加到反应混合物中的抗体量使用放射性浓度和计算出的蛋白质浓度来计算。使用瞬息薄层色谱来测定蛋白相关放射性。放射性掺入为 95％。使用之前将 Y2B8 在配制缓冲液中稀释，并无菌过滤（最后的放射性浓度是 1.0mCi/ml）。

[0347] B. 制备 C2B8

[0348] 按上述方法制备 C2B8。C2B8 在生理盐水中以 5.0mg/ml 浓度作为无菌试剂提供。注射之前，该 C2B8 在生理盐水中稀释至 2.0mg/ml 并无菌过滤。

[0349] C. 结果

[0350] 治疗之后，肿瘤大小表达为长宽之积。按图 11(Y2B8 与盐水相比)，图 12(C2B8 与盐水相比)，图 13(Y2B8+C2B8 与盐水相比）所示日期测量，也测定标准误差。

[0351] 正如图 13 所示，Y2B8 和 C2B8 结合使用表现出与单独使用 Y2B8 或者 C2B8 所获差不多的杀肿瘤效果。

[0352] V. 其它治疗方案

[0353] 以前述实施例的观点来找出其它治疗方案是显而易见的，一个这类方案是在约一星期内使用 C2B8 所用的治疗剂量，以 2B8 和放射性标记 2B8(例如 Y2B8) 结合给药，或以 2B8、C2B8 及例如 Y2B8 一起给药，或者以 C2B8 和例如 Y2B8 一起给药。另一个方案是利用放射性标记的 C2B8—该方案使得采用 C2B8 的免疫活性部分的优点加上了相应的放射性标记的优点。优选的放射性标记物包括钇 [90]，它可给出与 C2B8 与鼠抗体 2B8 相比较大的循环半衰期。由于 C2B8 消耗 B 细胞的能力及可从放射标记物得到的优点，因此一个优选的替代方案是用 C2B8(以单剂量或多剂量）治疗病人，使得大部分（假如不是全部）外周 B 细胞消耗掉，然后再用放射性标记 2B8，因为外周 B 细胞已消耗掉，那么放射性标记 2B8 便增加了定靶肿瘤细胞的机会。由于已在文献中报道过以碘 [131] 标记的各种结果（见 Kaminski 的文献)，故优选碘 [131] 标记的 2B8。一个其它优选方案是首先使用放射性标记 2B8(或 C2B8)，努力增加肿瘤的通透性，接着以单剂量或多剂量 C2B8 治疗。该方案的意图是增加 C2B8 达到肿瘤块的外边和里边的机会。一个进一步的方案是包括使用化疗剂与 C2B8 结合使用。该方案包括所谓“交错”治疗法，即用化疗剂治疗，接着用 C2B8 治疗，然后再重复此法。此外，开始用单剂或多剂量 C2B8 治疗，此后用化疗治疗也是可行的。优选的化疗剂包括（但不限于）环磷酰胺，阿霉素，长春新碱，及强的松（见 Armitage, J. O. et al., Cancer50：1695(1982) 列入本文作为参考）。

[0354] 前面列举的替代治疗方案并不作为一种限制范围，而应看作是有代表性的实例。

[0355] VI. 有关保藏情况

[0356] 抗 -CD20 于 TCAE8 中（为保藏起见在大肠杆菌中转化）保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC)(12301Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852)，该保藏是遵从国际承认用于专利程序的微生物保藏，布达佩斯条约（简称布达佩斯条约）的规定而履行的。该微生物由 ATCC 于 1992 年 11 月 9 日进行过试验证明其该日期仍存活。ATCC 指定该微生物的 ATCC 保藏号为 :ATCC69119(抗 -CD20 于 TCAE8 中)。按布达佩斯条约规定，杂交瘤 2B8 于 1993 年 6 月 22 日 [保藏于 ATCC。该培养物的存活力于 1993 年 6 月 25 日测定过，ATCC 指定该杂交瘤的 ATCC 保藏号为 :HB11388。

[0357] 序列表

[0358] (1) 总的情况 :

[0359] (i) 申请人 :生物基因 IDEC 公司 (Biogen Idec Inc.)

[0360] (ii) 发明题目 :抗人类 B 淋巴细胞限制分化抗原的嵌合及放射标记抗体

[0361] (iii) 序列数 :8

[0362] (iv) 通讯地址 :

[0363] (A) 收信人 :

[0364] (B) 街道 :

[0365] (C) 城市：

[0366] (D) 州：

[0367] (E) 国家：

[0368] (F) 邮编：

[0369] (v) 计算机可读类型：

[0370] (A) 媒介类型：

[0371] (B) 计算机：

[0372] (C) 操作系统：

[0373] (D) 软件：

[0374] (vi) 现申请情况：

[0375] (A) 申请号：

[0376] (B) 申请日：

[0377] (C) 分类：

[0378] (vii) 代理人 / 代理机构情报：

[0379] (A) 姓名：

[0380] (B) 登记号：

[0381] (C) 案卷号：

[0382] (viii) 电讯情报：

[0383] (A) 电话：

[0384] (B) 传真：

[0385] (2)SEQ ID NO:1 情报：

[0386] (i) 序列特征：

[0387] (A) 长度:8540 碱基

[0388] (B) 类型:核酸

[0389] (C) 链型:单链

[0390] (D) 拓扑结构:环型

[0391] (ii) 分子类型:DNA(基因组的)

[0392] (iii) 假设的:是

[0393] (iv) 反义:否

[0394] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:1：

[0395] GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60

[0396] AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120

[0397] GGAGAATGGG CGGAACTGGG CGGAGTTAGG GGCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180

[0398] ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240

[0399] GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300

[0400] GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCT 360

[0401] AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420

[0402] GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480

[0403] ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540

[0404] TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600

[0405] AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTA TGCCCAGTAC 660

[0406] ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720

[0407] ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780

[0408] TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840

[0409] GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900

[0410] CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960

[0411] CATCACAGAT CTCTCACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020

[0412] CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1080

[0413] TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG 1140

[0414] TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC 1200

[0415] CTCCAATCGG GTAACTCCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260

[0416] AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320

[0417] TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380

[0418] TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCGT GACAACATGC 1440

[0419] GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1500

[0420] GTTTGCCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCTTTCC 1560

[0421] TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1620

[0422] GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1680

[0423] GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 1740

[0424] ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800

[0425] TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 1860

[0426] GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 1920

[0427] CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 1980

[0428] GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2040

[0429] TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2100

[0430] ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CGCTAGCACC 2160

[0431] AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG 2220

[0432] GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAACTCA 2280

[0433] GGCGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC 2340

[0434] TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400

[0435] AACGTGAATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460

[0436] GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC 2520

[0437] TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA 2580

[0438] TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640

[0439] GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 2700

[0440] CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGACTACAAG 2760

[0441] TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820

[0442] GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAGG 2880

[0443] AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG 2940

[0444] TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC 3000

[0445] GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060

[0446] AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120

[0447] CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180

[0448] TCGTGACAAC ATGCGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT 3240

[0449] GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3300

[0450] CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT 3360

[0451] CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA 3420

[0452] GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG AACCAGCTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT 3480

[0453] CCCGATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 3540

[0454] AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600

[0455] AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660

[0456] GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720

[0457] GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780

[0458] GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840

[0459] CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTCGCGC 3900

[0460] CAAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATG 3960

[0461] GTTCGACCAT TGAACTGCAT CGTCGCCGTG TCCCAAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA 4020

[0462] GACCTACCCT GGCCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080

[0463] TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140

[0464] CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA 4200

[0465] GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260

[0466] GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGGA TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320

[0467] TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380

[0468] GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440

[0469] GAATACCCAG GCGTCCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

[0470] GTCTACGAGA AGAAAGACTA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560

[0471] TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCCT CGACTGTGCC 4620

[0472] TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG 4680

[0473] TGCCACTCCC ACTGTCCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740

[0474] GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800

[0475] CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCTAC 4860

[0476] TAGCTTTGCT TCTCAATTTC TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAT TAATTTTAAC 4920

[0477] ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980

[0478] TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040

[0479] GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCGA AGCCTGATTC 5100

[0480] CGTAGAGCCA CACCTTGGTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCC 5160

[0481] AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220

[0482] TTGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GGTTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTC 5280

[0483] TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340

[0484] CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGCGC CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400

[0485] CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC 5460

[0486] CACGACGGGC GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520

[0487] GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCCTGCCGA 5580

[0488] GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CGGCTACCTG 5640

[0489] CCCATTCGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAGCCGG 5700

[0490] TCTTGTCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760

[0491] CGCCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820

[0492] CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG ACTGTGGCCG 5880

[0493] GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940

[0494] GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTCCCGATTC 6000

[0495] GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC 6060

[0496] GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCACGAG ATTTCGATTC CACCGCCGCC 6120

[0497] TTCTATGAAA GGTTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180

[0498] CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT 6240

[0499] GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTCACTGCAT 6300

[0500] TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGTCTGGAT CGCGGCCGCG 6360

[0501] ATCCCGTCGA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420

[0502] CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT 6480

[0503] AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TGCGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540

[0504] ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA 6600

[0505] TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC 6660

[0506] GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720

[0507] CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT 6780

[0508] TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840

[0509] GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCGTTTCCC CCTGGAAGCT 6900

[0510] CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC 6960

[0511] CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020

[0512] TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT 7080

[0513] TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140

[0514] CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200

[0515] AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260

[0516] AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG 7320

[0517] GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380

[0518] AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG 7440

[0519] GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

[0520] GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT 7560

[0521] TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC 7620

[0522] TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680

[0523] TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740

[0524] GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 7800

[0525] GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA 7860

[0526] TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920

[0527] CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980

[0528] TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG 8040

[0529] CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 8100

[0530] AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 8160

[0531] CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 8220

[0532] AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT 8280

[0533] AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTTCTGGGT 8340

[0534] GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 8400

[0535] GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460

[0536] TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520

[0537] TTCCCCGAAA AGTGCCACCT 8540

[0538] (2)SEQ ID NO:2 情报：

[0539] (i) 序列特征：

[0540] (A) 长度:9209 碱基

[0541] (B) 类型:核酸

[0542] (C) 链型:单链

[0543] (D) 拓扑结构:环型

[0544] (ii) 分子类型:DNA(基因组的)

[0545] (iii) 假设的:是

[0546] (iv) 反义:否

[0547] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:2：

[0548] GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60

[0549] AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120

[0550] GGAGAATGGG CGGAACTGGG CGGAGTTAGG GGCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180

[0551] ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240

[0552] GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300

[0553] GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCT 360

[0554] AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420

[0555] GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480

[0556] ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540

[0557] TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600

[0558] AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTA TGCCCAGTAC 660

[0559] ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720

[0560] ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780

[0561] TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840

[0562] GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900

[0563] CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960

[0564] CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020

[0565] GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080

[0566] GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTCAAGTGT AAGTTACATC 1140

[0567] CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200

[0568] CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTACTCTCTC 1260

[0569] ACAATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320

[0570] AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380

[0571] TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG 1440

[0572] TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC 1500

[0573] CTCCAATCGG GTAACTCCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1560

[0574] AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620

[0575] TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1680

[0576] TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCGT GACAACATGC 1740

[0577] GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800

[0578] GTTTGCCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCTTTCC 1860

[0579] TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1920

[0580] GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1980

[0581] GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2040

[0582] ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100

[0583] TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 2160

[0584] GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 2220

[0585] CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 2280

[0586] GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2340

[0587] TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2400

[0588] ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CCTGTCCCAG 2460

[0589] GTACAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520

[0590] TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2580

[0591] GGTCGGGGCC TGGAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 2640

[0592] CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700

[0593] CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2760

[0594] TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GGCGCAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA 2820

[0595] GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2880

[0596] GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG 2940

[0597] TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA 3000

[0598] GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060

[0599] TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3120

[0600] AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180

[0601] CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240

[0602] GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300

[0603] TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3360

[0604] AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420

[0605] GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480

[0606] AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG 3540

[0607] CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600

[0608] GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660

[0609] CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720

[0610] CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780

[0611] CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840

[0612] AGACTGGATT CGTGACAACA TGCGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900

[0613] CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960

[0614] GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020

[0615] GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080

[0616] ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC 4140

[0617] GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200

[0618] AGGAAAATTA ATTTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAAGG 4260

[0619] ATGCTTTAGA GACAGTGTTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTCAG AGGGAGTACC 4320

[0620] CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380

[0621] ATCACCGAAG CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGGTAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440

[0622] ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500

[0623] CATTTGCTTC TGACATAGTT GTGTTGGGAG CTTGGATAGC TTGGACAGCT CAGGGCTGCG 4560

[0624] ATTTCGCGCC AAACTTGACG GCAATCCTAG CGTGAAGGCT GGTAGGATTT TATCCCCGCT 4620

[0625] GCCATCATGG TTCGACCATT GAACTGCATC GTCGCCGTGT CCCAAAATAT GGGGATTGGC 4680

[0626] AAGAACGGAG ACCTACCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAAGAATG 4740

[0627] ACCACAACCT CTTCAGTGGA AGGTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAAACCTGG 4800

[0628] TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA 4860

[0629] GAACTCAAAG AACCACCACG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTGGA TGATGCCTTA 4920

[0630] AGACTTATTG AACAACCGGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC 4980

[0631] AGTTCTGTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG 5040

[0632] ATCATGCAGG AATTTGAAAG TGACACGTTT TTCCCAGAAA TTGATTTGGG GAAATATAAA 5100

[0633] CTTCTCCCAG AATACCCAGG CGTCCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAGG CATCAAGTAT 5160

[0634] AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC 5220

[0635] CTCCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA GATCAGCCTC 5280

[0636] GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCCTTGAC 5340

[0637] CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG 5400

[0638] TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460

[0639] TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGAAC CAGCTGGGGC 5520

[0640] TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 5580

[0641] AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 5640

[0642] AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 5700

[0643] GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5760

[0644] GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 5820

[0645] GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 5880

[0646] CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATCG ATCCTCTATG GTTGAACAAG ATGGATTGCA 5940

[0647] CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000

[0648] AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCCG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT 6060

[0649] TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAACTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 6120

[0650] GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG 6180

[0651] AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC 6240

[0652] TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC 6300

[0653] GGCTACCTGC CCATTCGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT 6360

[0654] GGAAGCCGGT CTTGTCGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420

[0655] CGAACTGTTC GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA 6480

[0656] TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA 6540

[0657] CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT 6600

[0658] TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660

[0659] TCCCGATTCG CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT 6720

[0660] CTGGGGTTCG AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTCGATTCC 6780

[0661] ACCGCCGCCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG 6840

[0662] ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCCAACTT GTTTATTGCA 6900

[0663] GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960

[0664] TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC 7020

[0665] GCGGCCGCGA TCCCGTCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080

[0666] ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAAGCCT 7140

[0667] GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC 7200

[0668] AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG 7260

[0669] GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTC 7320

[0670] GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380

[0671] GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440

[0672] AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC 7500

[0673] GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC 7560

[0674] CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620

[0675] CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 7680

[0676] CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC 7740

[0677] GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 7800

[0678] CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860

[0679] AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG 7920

[0680] CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA 7980

[0681] CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAAG 8040

[0682] GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT 8100

[0683] CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA 8160

[0684] ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT 8220

[0685] ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT TCATCCATAG 8280

[0686] TTGCCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340

[0687] GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC 8400

[0688] AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460

[0689] CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG 8520

[0690] TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580

[0691] GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640

[0692] TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA 8700

[0693] TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760

[0694] TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820

[0695] CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880

[0696] TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940

[0697] GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000

[0698] TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060

[0699] GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120

[0700] ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC 9180

[0701] CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT 9209

[0702] (2)SEQ ID NO:3 情报：

[0703] (i) 序列特征：

[0704] (A) 长度:47 碱基

[0705] (B) 类型:核酸

[0706] (C) 链型:单链

[0707] (D) 拓扑结构:线型

[0708] (ii) 分子类型:DNA(基因组的)

[0709] (iii) 假设的:是

[0710] (iv) 反义:否

[0711] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:3：

[0712] ATCACAGATC TCTCACCATG GATTTTCAGG TGCAGATTAT CAGCTTC 47

[0713] (2)SEQ ID NO:4 情报：

[0714] (i) 序列特征：

[0715] (A) 长度:30 碱基

[0716] (B) 类型 :核酸

[0717] (C) 链型 :单链

[0718] (D) 拓扑结构 :线型

[0719] (ii) 分子类型 :DNA(基因组的)

[0720] (iii) 假设的 :是

[0721] (iv) 反义 :是

[0722] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :4 :

[0723] TGCAGCATCC GTACGTTTGA TTTCCAGCTT 30

[0724] (2)SEQ ID NO :5 情报 :

[0725] (i) 序列特征 :

[0726] (A) 长度 :384 碱基

[0727] (B) 类型 :核酸

[0728] (C) 链型 :单链

[0729] (D) 拓扑结构 :线型

[0730] (ii) 分子类型 :DNA(基因组的)

[0731] (iii) 假设的 :是

[0732] (iv) 反义 :否

[0733] (ix) 特征 :

[0734] (A) 名称 / 要点 :CDS

[0735] (B) 位置 :1..384

[0736] (ix) 特征 :

[0737] (A) 名称 / 要点 :mat peptide

[0738] (B) 位置 :67..384

[0739] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :5 :

[0740] ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA 48

[0741] Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser

[0742] -22 -20 -15 -10

[0743] GTC ATA ATG TCC AGA GGG CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC 96

[0744] Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile

[0745] -5 -1 1 5 10

[0746] CTG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC 144

[0747] Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser

[0748] 15 20 25

[0749] TCA AGT GTA AGT TAC ATC CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC 192

[0750] Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser

[0751] 30 35 40

[0752] CCC AAA CCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT 240

[0753] Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

[0754] 45 50 55

[0755] GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT CTC ACA ATC 288

[0756] Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile

[0757] 60 65 70

[0758] AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG 336

[0759] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

[0760] 75 80 85 90

[0761] ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA 384

[0762] Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0763] 95 100 105

[0764] (2)SEQ ID NO:6 情报：

[0765] (i) 序列特征：

[0766] (A) 长度:27 碱基

[0767] (B) 类型:核酸

[0768] (C) 链型:单链

[0769] (D) 拓扑结构:线型

[0770] (ii) 分子类型:DNA(基因组的)

[0771] (iii) 假设的:是

[0772] (iv) 反义:否

[0773] (xi) 序列描述:SEQ ID NO:6：

[0774] GCGGCTCCCA CGCGTGTCCT GTCCCAG 27

[0775] (2)SEQ ID NO:7 情报：

[0776] (i) 序列特征：

[0777] (A) 长度:29 碱基

[0778] (B) 类型:核酸

[0779] (C) 链型:单链

[0780] (D) 拓扑结构:线型

[0781] (ii) 分子类型:DNA(基因组的)

[0782] (iii) 假设的:是

[0783] (iv) 反义:是

[0784] (ix) 特征：

[0785] (A) 名称/要点:misc_feature

[0786] (B) 位置:3

[0787] (D) 其它情报:/note ＝" 第 3 位的核苷酸是 N,N 为 G 或 C。"

[0788] (ix) 特征：

[0789] (A) 名称/要点:misc_feature

[0790] (B) 位置:18

[0791] (D) 其它情报:/note ＝" 第 18 位的核苷酸是 N,N 为 A 或 C。"

[0792] (ix) 特征：

[0793] (A) 名称/要点:misc_feature

[0794] (B) 位置 :19

[0795] (D) 其它情报 :/note ＝" 第 19 位的核苷酸是 N,N 为 A 或 G。"

[0796] (ix) 特征 :

[0797] (A) 名称 / 要点 :misc_feature

[0798] (B) 位置 :25

[0799] (D) 其它情报 :/note ＝" 第 25 位的核苷酸是 N,N 是 G 或 A。"

[0800] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :7 :

[0801] GGNTGTTGTG CTAGCTGNNG AGACNGTGA 29

[0802] (2)SEQ ID NO :8 情报 :

[0803] (i) 序列特征 :

[0804] (A) 长度 :420 碱基

[0805] (B) 类型 :核酸

[0806] (C) 链型 :单链

[0807] (D) 拓扑结构 :线型

[0808] (ii) 分子类型 :DNA(基因组的)

[0809] (iii) 假设的 :是

[0810] (iv) 反义 :否

[0811] (ix) 特征 :

[0812] (A) 名称 / 要点 :CDS

[0813] (B) 位置 :1..420

[0814] (ix) 特征 :

[0815] (A) 名称 / 要点 :mat_peptide

[0816] (B) 位置 :58..420

[0817] (xi) 序列描述 :SEQ ID NO :8 :

[0818] ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT 48

[0819] Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg

[0820] -19 -15 -10 -5

[0821] GTC CTG TCC CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG 96

[0822] Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys

[0823] -1 1 5 10

[0824] CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT 144

[0825] Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

[0826] 15 20 25

[0827] ACC AGT TAC AAT ATG CAC TGG GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG 192

[0828] Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu

[0829] 30 35 40 45

[0830] GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCC GGA AAT GGT GAT ACT TCC TAC AAT 240

[0831] Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn

[0832] 50 55 60

[0833] CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC 288

[0834] Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

[0835] 65 70 75

[0836] ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC 336

[0837] Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

[0838] 80 85 90

[0839] TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TTC AAT 384

[0840] Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn

[0841] 95 100 105

[0842] GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCT GCA

[0843] Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

[0844] 110 115 120

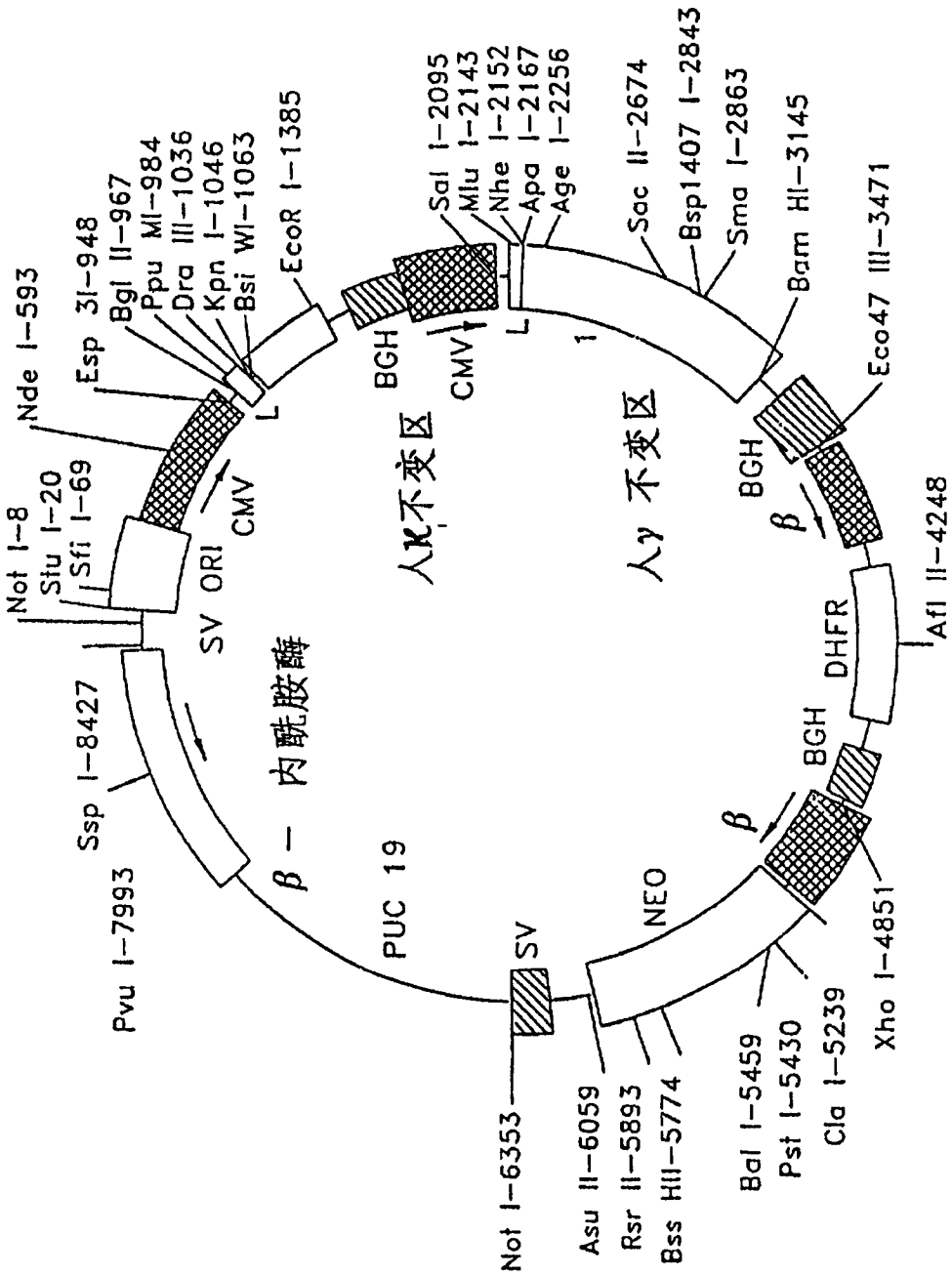

Nde I-593
Esp 3I-948
Bgl II-967
Ppu MI-984
Dra III-1036
Kpn I-1046
Bsi WI-1063
EcoR I-1385
Sal I-2095
Mlu I-2143
Nhe I-2152
Apa I-2167
Age I-2256
Sac II-2674
Bsp1407 I-2843
Sma I-2863
Bam HI-3145
Eco47 III-3471
Afl II-4248
Xho I-4851
Cla I-5239
Pst I-5430
Bal I-5459
Bss HII-5774
Rsr II-5893
Asu II-6059
Not I-6353
SV
NEO
PUC 19
β-内酰胺酶
Pvu I-7993
Ssp I-8427
Not I-8
Stu I-20
Sfi I-69
SV ORI
CMV
BGH
人κ不变区
人γ不变区
DHFR
β
1

图 1

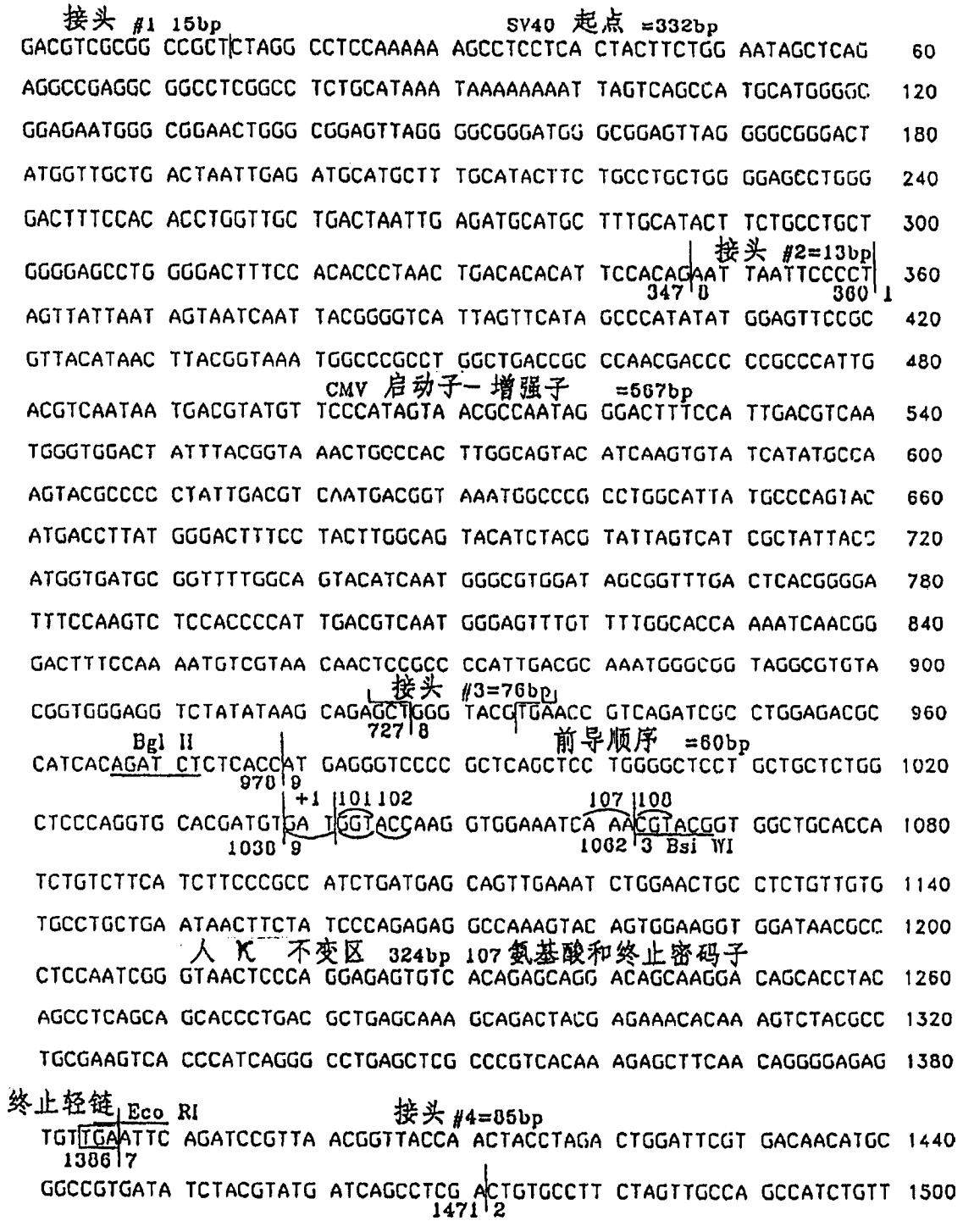

接头 #1 15bp
SV40 起点 =332bp
接头 #2=13bp
CMV 启动子－增强子 =567bp
接头 #3=76bp
Bgl II
前导顺序 =60bp
Bsi WI
人 K 不变区 324bp 107 氨基酸和终止密码子
终止轻链
Eco RI
接头 #4=85bp

图 2A

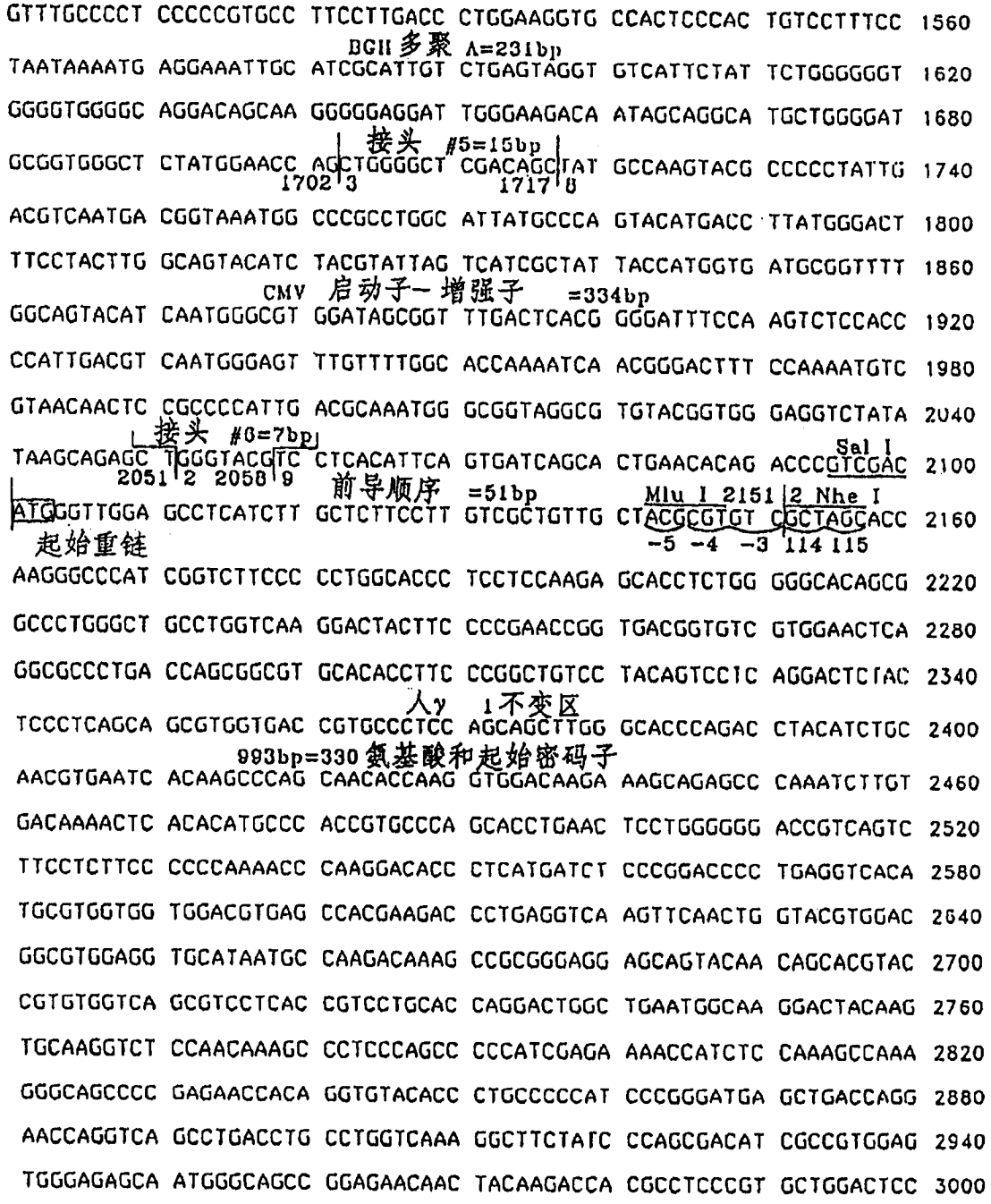

BGH多聚 A=231bp
接头 #5=15bp
1702 3 1717 8
CMV 启动子—增强子 =334bp
接头 #6=7bp
2051 2 2058 9
前导顺序 =51bp
Mlu I 2151 2 Nhe I
Sal I
起始重链
-5 -4 -3 114 115
人γ 1不变区
993bp=330氨基酸和起始密码子

图 2B

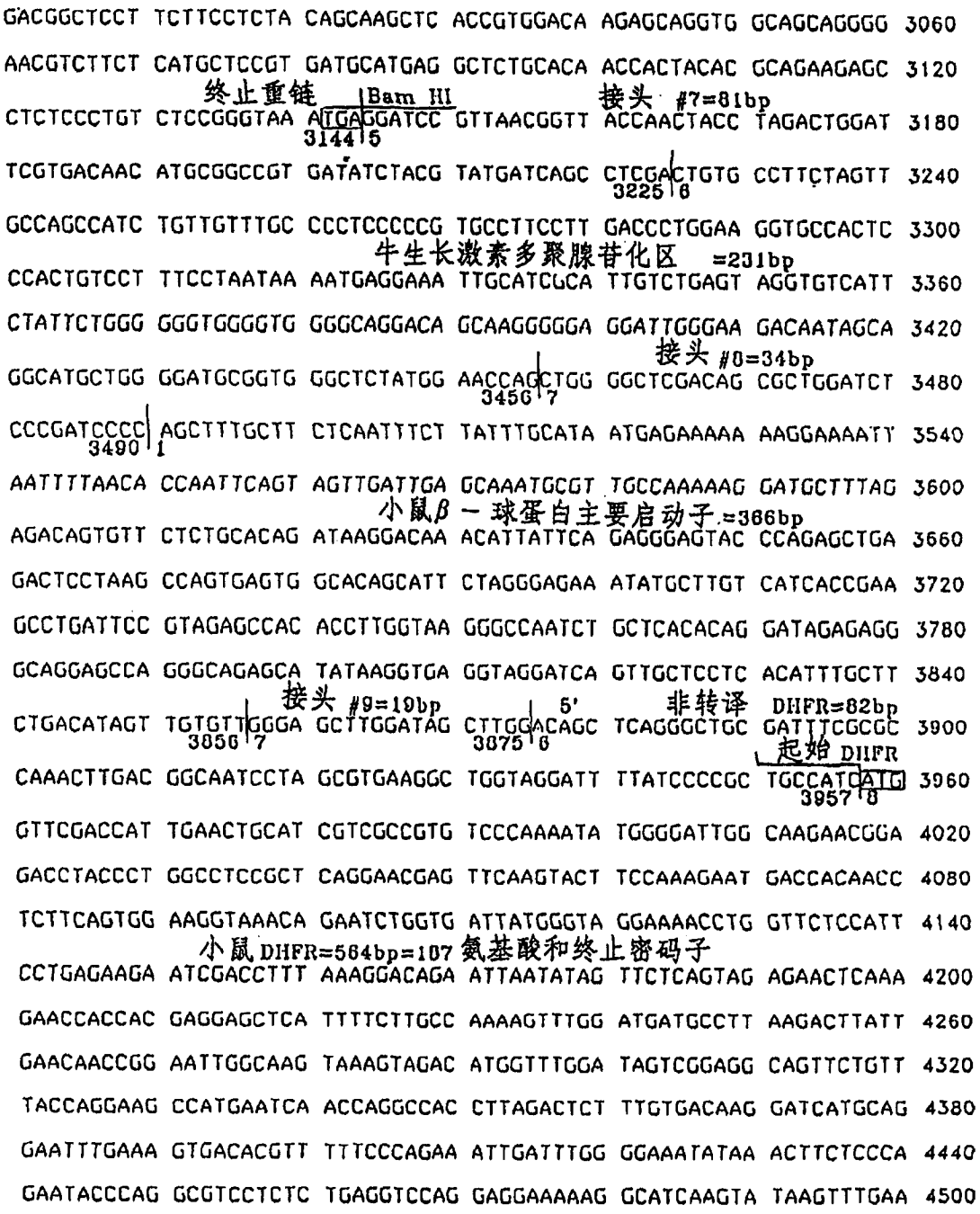

GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060
AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120
终止重链
Bam HI
接头 #7=81bp
CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
3144 5
TCGTGACAAC ATGCGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT 3240
3225 6
GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3300
牛生长激素多聚腺苷化区 =231bp
CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT 3360
CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA 3420
接头 #8=34bp
GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG AACCAGCTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT 3480
3456 7
CCCGATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 3540
3490 1
AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600
小鼠β－球蛋白主要启动子=366bp
AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660
GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720
GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780
GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840
接头 #9=19bp
5'
非转译 DHFR=82bp
CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTCGCGC 3900
3856 7
3875 6
起始 DHFR
CAAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATG 3960
3957 8
GTTCGACCAT TGAACTGCAT CGTCGCCGTG TCCCAAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA 4020
GACCTACCCT GGCCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080
TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140
小鼠DHFR=564bp=107氨基酸和终止密码子
CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA 4200
GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260
GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGGA TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320
TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380
GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440
GAATACCCAG GCGTCCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

图 2C

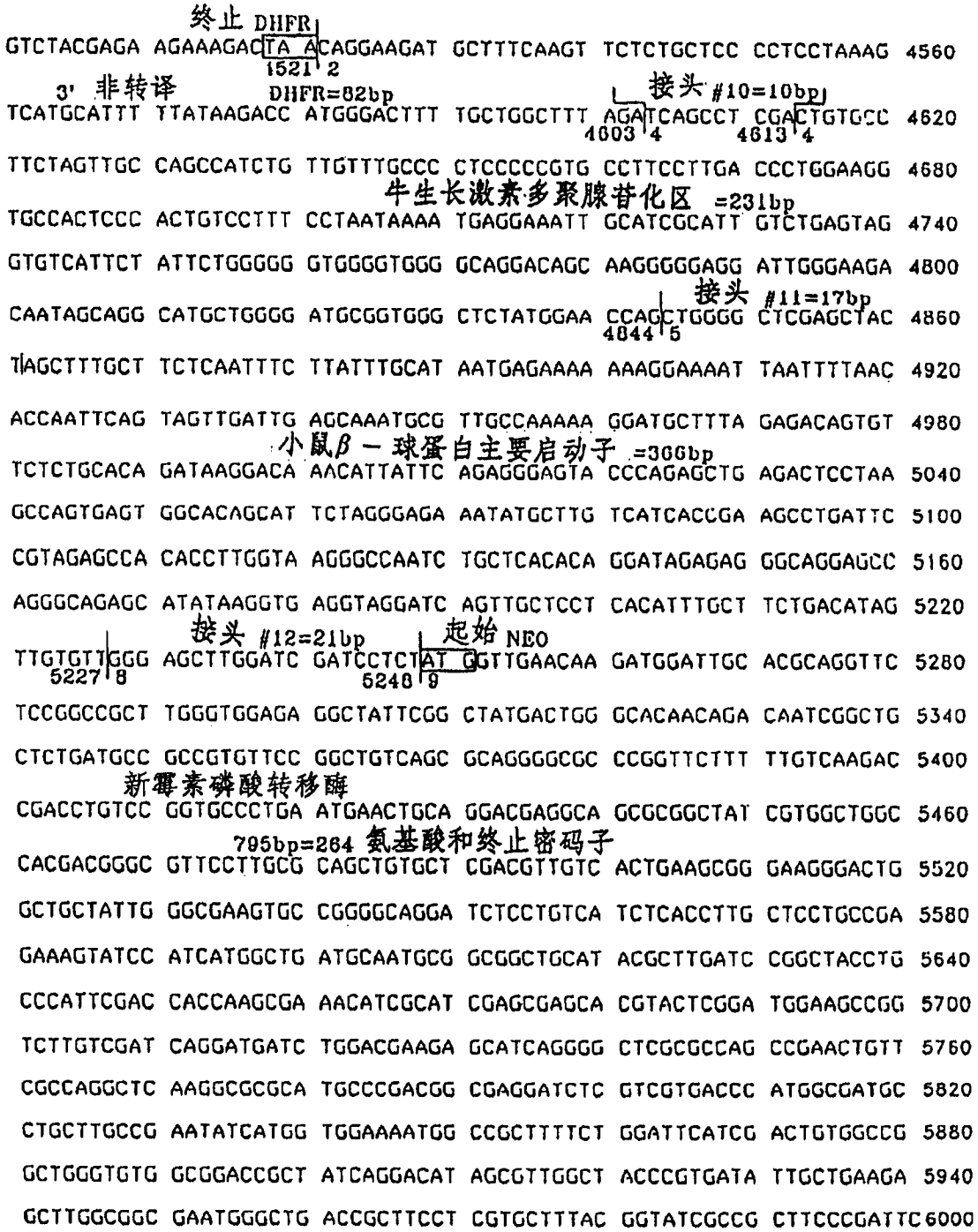
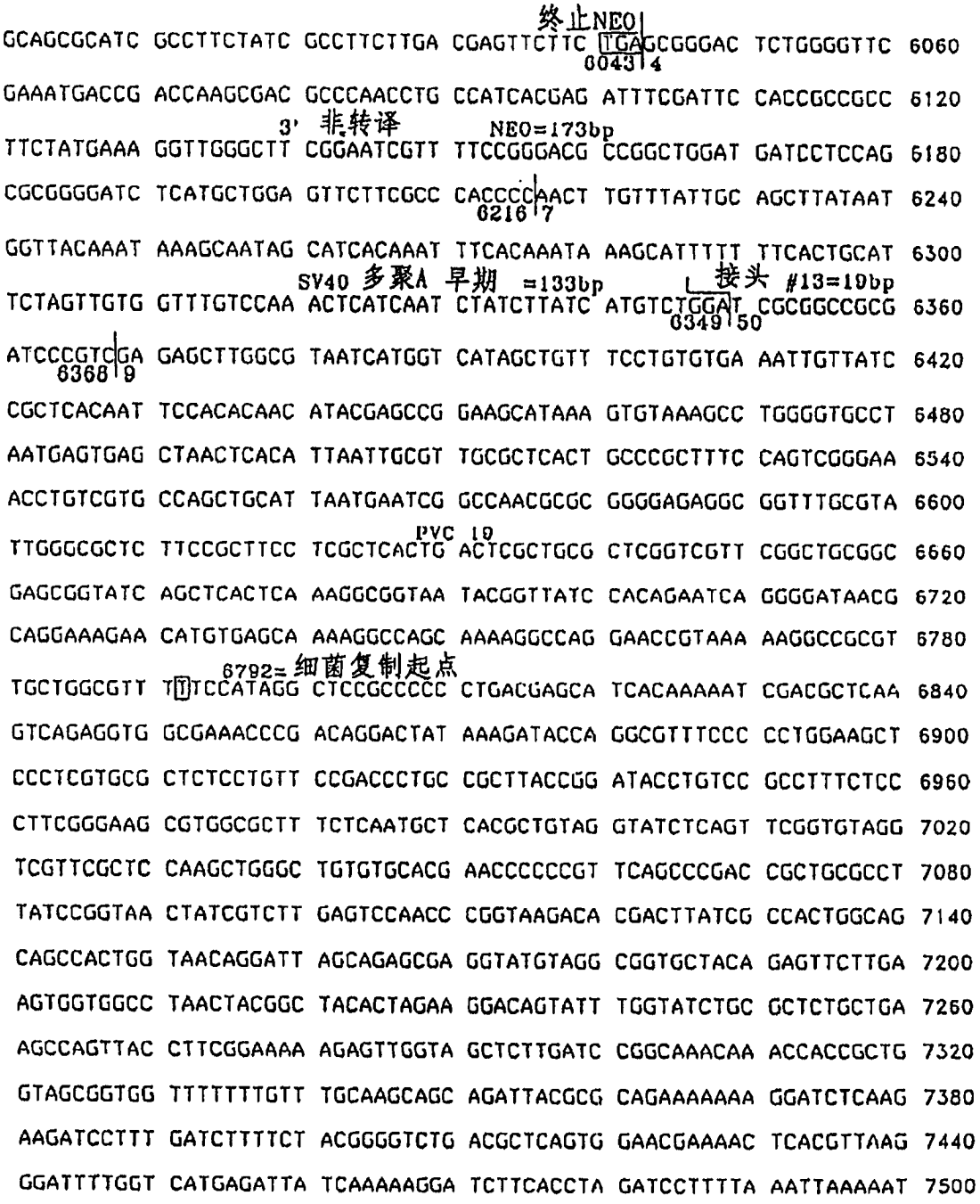

终止 DHFR
1521 2
3' 非转译
DHFR=82bp
接头 #10=10bp
4603 4
4613 4
牛生长激素多聚腺苷化区 =231bp
接头 #11=17bp
4844 5
小鼠β－球蛋白主要启动子 =366bp
接头 #12=21bp
起始 NEO
5227 8
5248 9
新霉素磷酸转移酶
795bp=264 氨基酸和终止密码子

图 2D



GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC 6060

GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCACGAG ATTTCGATTC CACCGCCGCC 6120

TTCTATGAAA GGTTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180

CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT 6240

GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTCACTGCAT 6300

TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGTCTGGAT CGCGGCCGCG 6360

ATCCCGTCGA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420

CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT 6480

AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TGCGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540

ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA 6600

TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC 6660

GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720

CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT 6780

TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840

GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCGTTTCCC CCTGGAAGCT 6900

CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC 6960

CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020

TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT 7080

TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140

CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200

AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260

AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG 7320

GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380

AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG 7440

GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

图 2E



GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT 7560

TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC 7620

TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680

TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740

GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 7800

GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA 7860

TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920

CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980

TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG 8040

CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 8100

AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 8160

CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 8220

AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT 8280

AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTTCTGGGT 8340

GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 8400

GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460

TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520

TTCCCCGAAA AGTGCCACCT

图 2F

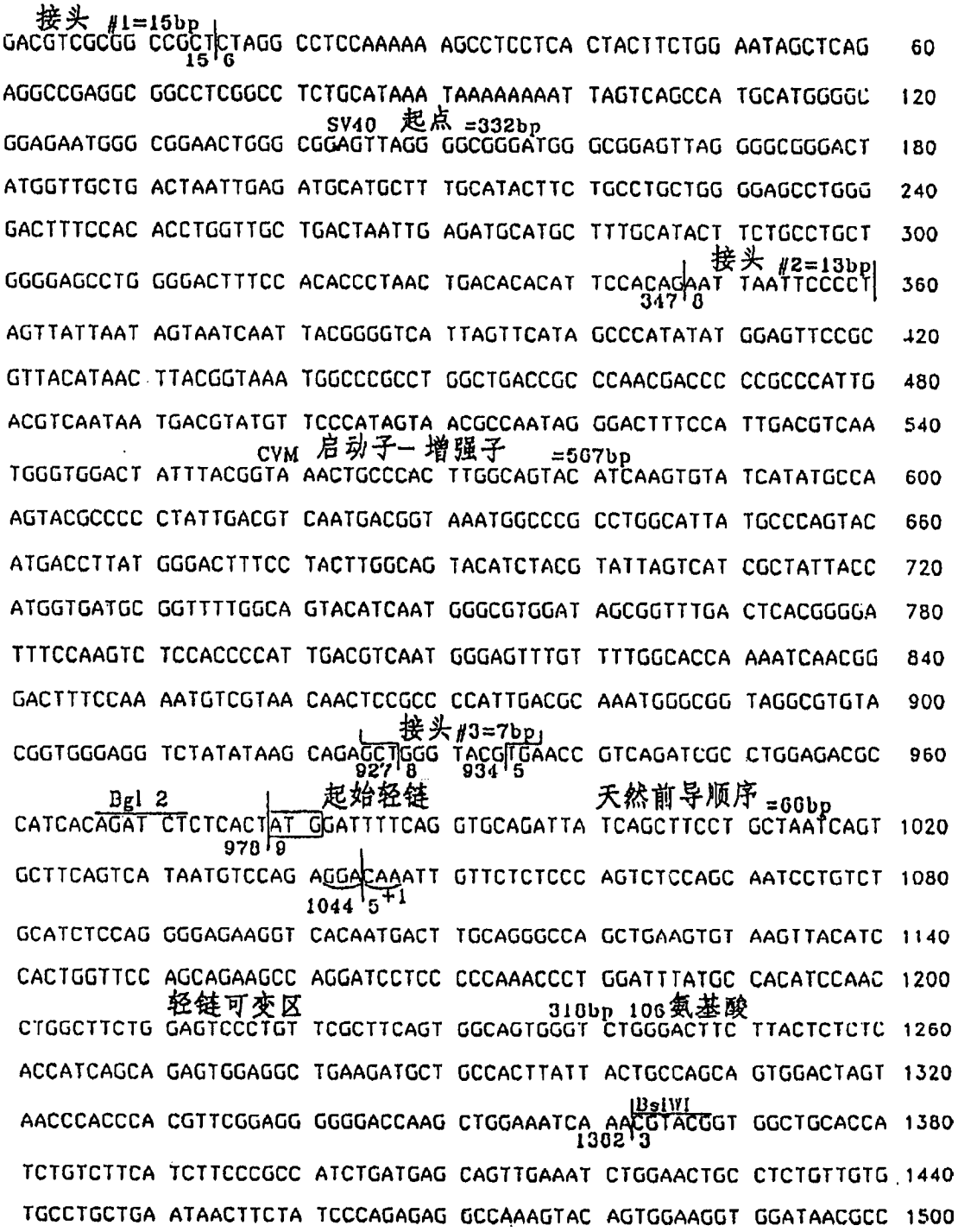

接头 #1=15bp
15 6
GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120
SV40 起点 =332bp
GGAGAATGGG CGGAACTGGG CGGAGTTAGG GGCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
接头 #2=13bp
GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCT 360
347 8
AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480
ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
CVM 启动子—增强子 =567bp
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTA TGCCCAGTAC 660
ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
接头#3=7bp
CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
927 8 934 5
Bgl 2 起始轻链 天然前导顺序 =66bp
CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020
978 9
GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080
1044 5 +1
GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140
CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200
轻链可变区 318bp 106氨基酸
CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTACTCTCTC 1260
ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320
BsiWI
AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380
1302 3
TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG 1440
TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC 1500

图 3A

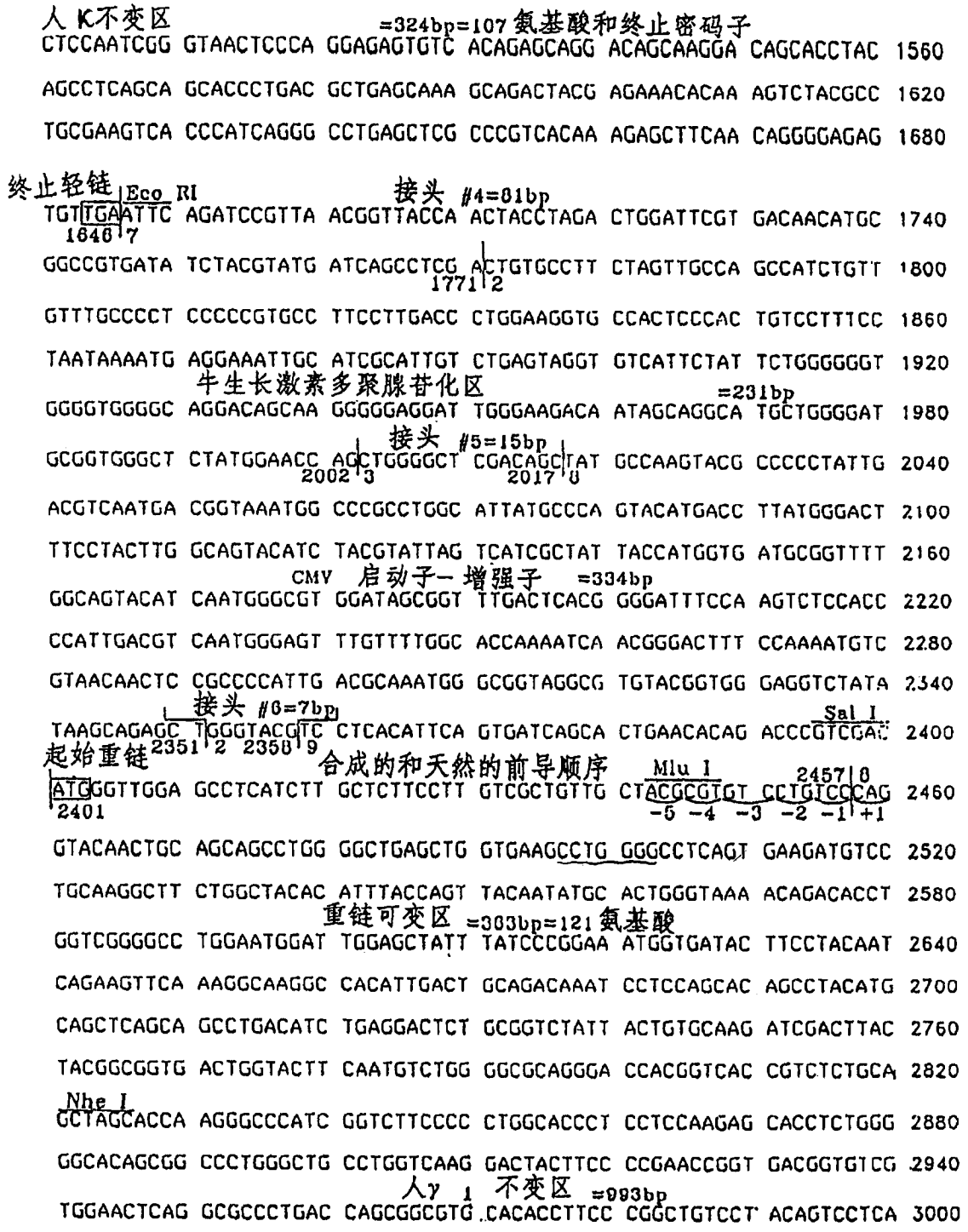

人 K不变区
=324bp=107氨基酸和终止密码子
CTCCAATCGG GTAACTCCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1560
AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620
TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1680
终止轻链
Eco RI
接头 #4=81bp
TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCGT GACAACATGC 1740
1646 7
GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800
1771 2
GTTTGCCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCTTTCC 1860
TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1920
牛生长激素多聚腺苷化区
=231bp
GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1980
接头 #5=15bp
GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2040
2002 3
2017 8
ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100
TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 2160
CMV 启动子－增强子 =334bp
GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 2220
CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 2280
GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2340
接头 #6=7bp
Sal I
TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2400
起始重链
2351 2 2358 9
合成的和天然的前导顺序
Mlu I
2457 8
ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CCTGTCCCAG 2460
2401
-5 -4 -3 -2 -1 +1
GTACAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520
TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2580
重链可变区 =363bp=121氨基酸
GGTCGGGGCC TGGAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 2640
CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700
CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2760
TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GGCGCAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA 2820
Nhe I
GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2880
GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG 2940
人γ 1 不变区 =993bp
TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA 3000

图 3B

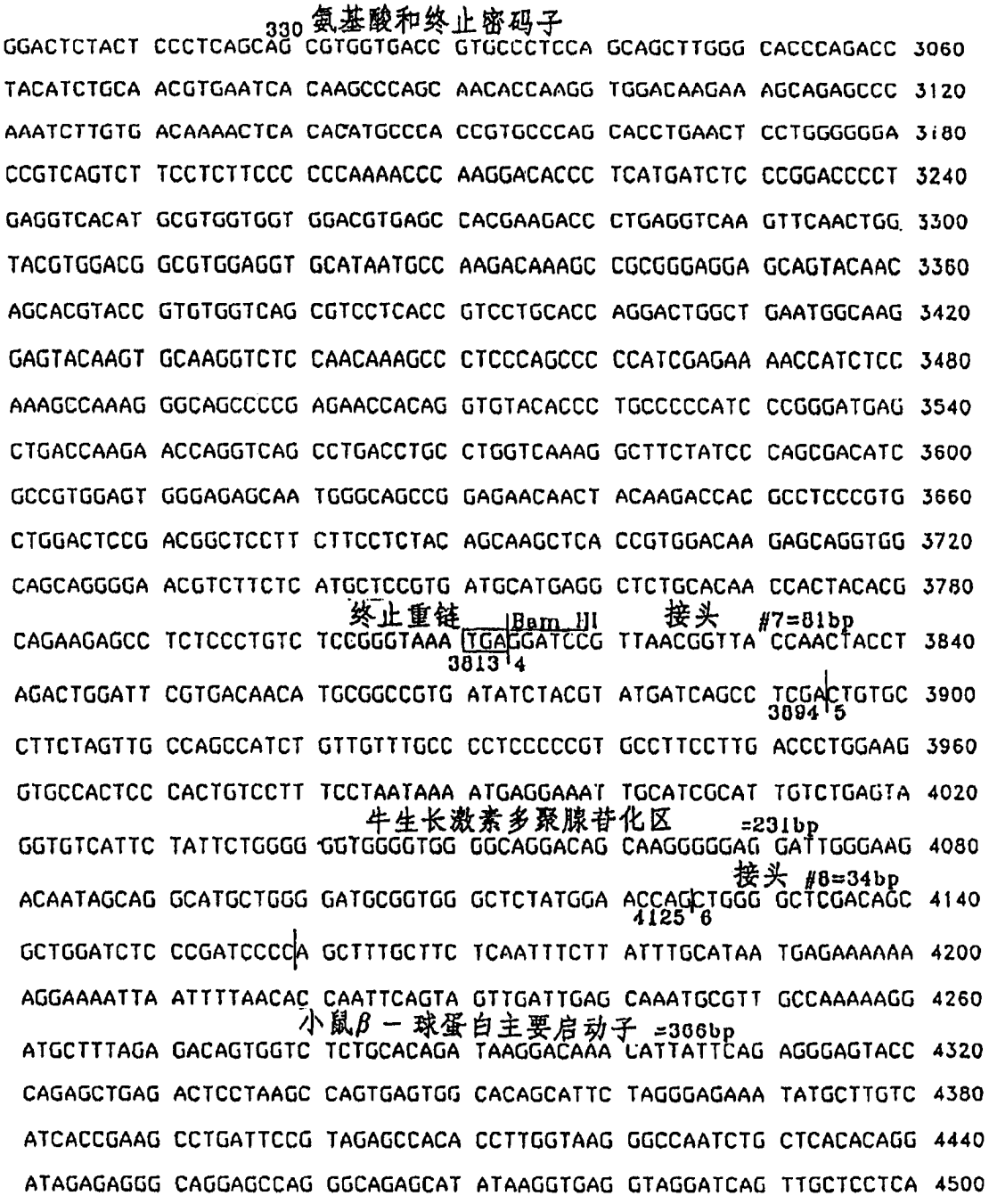

330 氨基酸和终止密码子
GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060
TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3120
AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180
CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240
GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3360
AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480
AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG 3540
CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660
CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720
CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780
终止重链 BamHI 接头 #7=81bp
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840
3813 4
AGACTGGATT CGTGACAACA TGCGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900
3894 5
CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960
GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020
牛生长激素多聚腺苷化区 =231bp
GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080
接头 #8=34bp
ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC 4140
4125 6
GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200
AGGAAAATTA ATTTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAAGG 4260
小鼠β－球蛋白主要启动子 =366bp
ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTCAG AGGGAGTACC 4320
CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380
ATCACCGAAG CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGGTAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440
ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500

图 3C

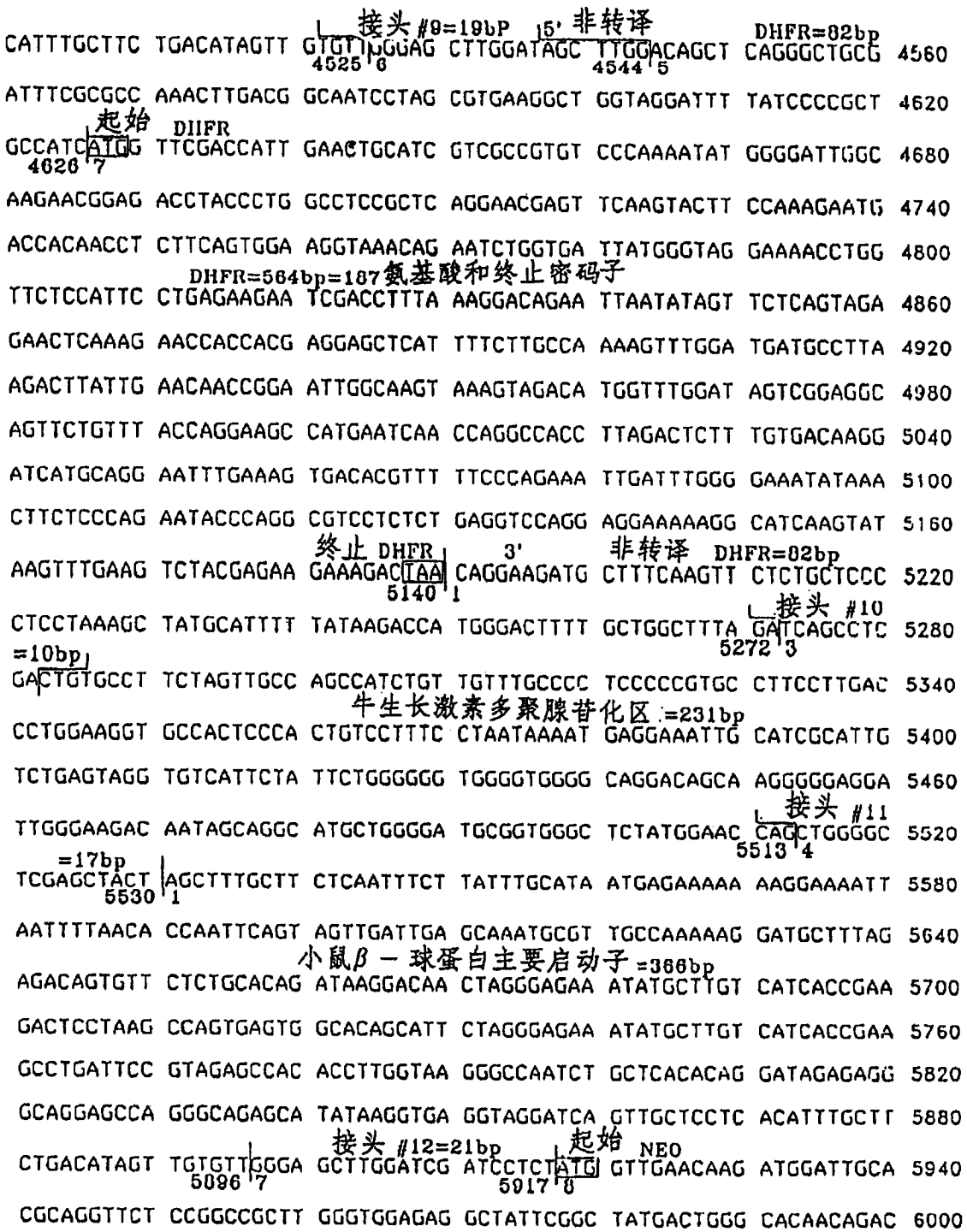

接头#9=19bp
5' 非转译
DHFR=82bp
4525 6
4544 5
起始
DIIFR
4626 7
DHFR=564bp=187氨基酸和终止密码子
终止 DHFR
3'
非转译 DHFR=82bp
5140 1
接头 #10
5272 3
=10bp
牛生长激素多聚腺苷化区=231bp
接头 #11
5513 4
=17bp
5530 1
小鼠β－球蛋白主要启动子=366bp
接头 #12=21bp
起始 NEO
5096 7
5917 8

图 3D

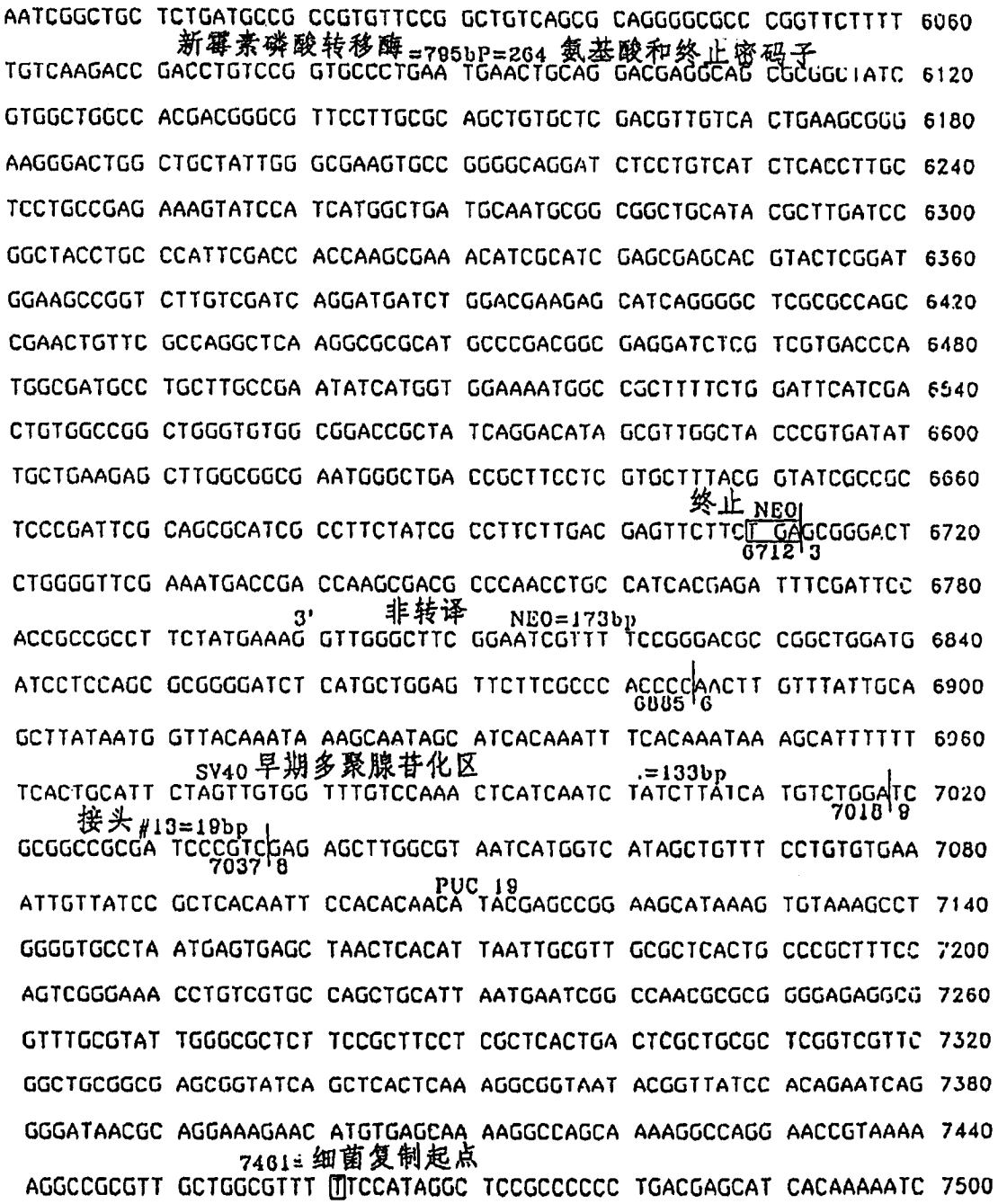

新霉素磷酸转移酶=795bP=264 氨基酸和终止密码子
终止 NEO
6712 3
3' 非转译 NEO=173bp
6005 6
SV40早期多聚腺苷化区 .=133bp
7018 9
接头#13=19bp
7037 8
PUC 19
7461= 细菌复制起点

图 3E

GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC 7560

CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620

CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 7680

CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC 7740

GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 7800

CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860

AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG 7920

CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA 7980

CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAAG 8040

GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT 8100

CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA 8160

ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT 8220

ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT TCATCCATAG 8280

TTGCCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340

GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC 8400

AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460

CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG 8520

TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580

GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640

TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA 8700

TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760

TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820

CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880

TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940

GGTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000

TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060

GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120

ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC 9180

CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT

终止

β－内酰胺酶

β－内酰胺酶

=861bp=286 氨基酸和终止密码子

起始β－内酰胺酶

图 3F

前导顺序

| | | |

前导顺序

```
        -19                 -15                     -10                     -5
      1 Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg Val
        ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT GTC
                2409        2418        2427        2436        2445

     -1| +1      FR1                         10                      15
Leu Ser| Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
CTG TCC| CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA
        2460        2469        2478        2487        2496        2505

          20                  25                  30| 31   CDR1      35 |36
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr|Ser Tyr Asn Met His |Trp
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC|AGT TAC AAT ATG CAC |TGG
        2517        2526        2536        2544    |   2553        2562 |

            40  FR2             45                49 |50      52 52A  53  54
Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly|Ala Ile Tyr Pro Gly Asn
GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG GAA TGG ATT GGA|GCT ATT TAT CCC GGA AAT
        2574        2583        2592        2601    |   2610        2619

55          CDR2    60                  65 |66  FR3         70
Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly|Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC|AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA
        2631        2640        2649        2658        2667        2676

    75                  80      82  82A 82B 82C 83      85
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC
        2688        2697        2706        2715        2724        2733

90                 94|95      CDR3        100 100A 100B 100C 100D 101 |102 103
Tyr Tyr Cys Ala Arg|Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val| Trp Gly
TAT TAC TGT GCA AGA|TCG ACT TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TTC AAT GTC| TGG GGC
        2745        2754        2763        2772        2781        2790

105 FR4             110         113 |
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala|
GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCT GCA|
        2802        2811        2820|
```

图 5

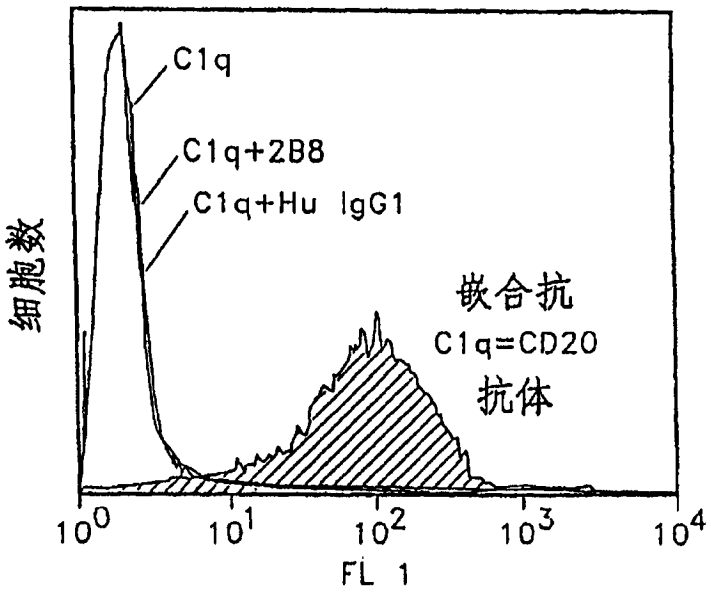

C1q
C1q+2B8
C1q+Hu IgG1
嵌合抗
C1q=CD20
抗体
细胞数
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL 1

图 6

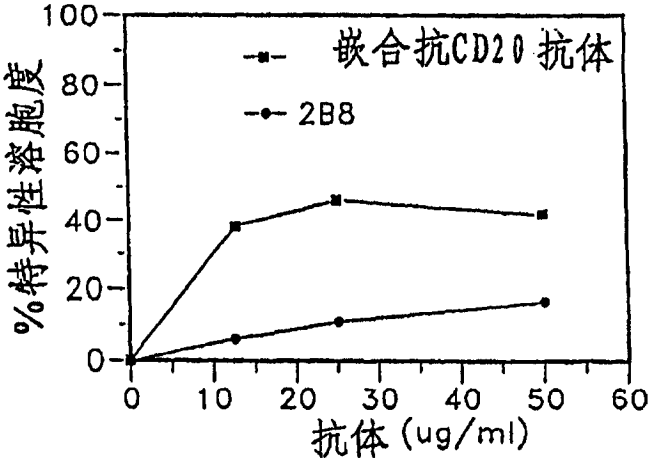

嵌合抗CD20抗体
2B8
%特异性溶胞度
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
抗体 (ug/ml)

图 7

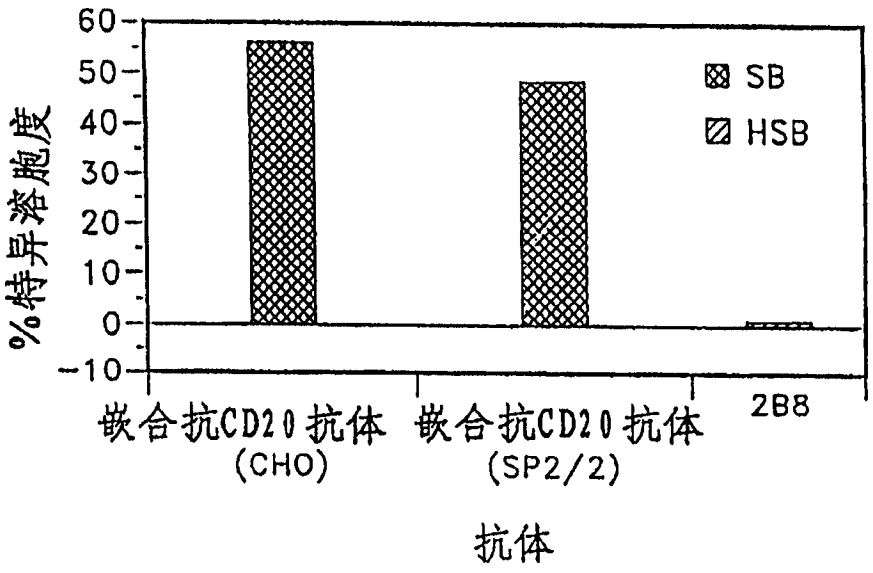

60
50
40
30
20
10
0
-10
%特异溶胞度
SB
HSB
嵌合抗CD20抗体 (CHO)
嵌合抗CD20抗体 (SP2/2)
2B8
抗体

图 8

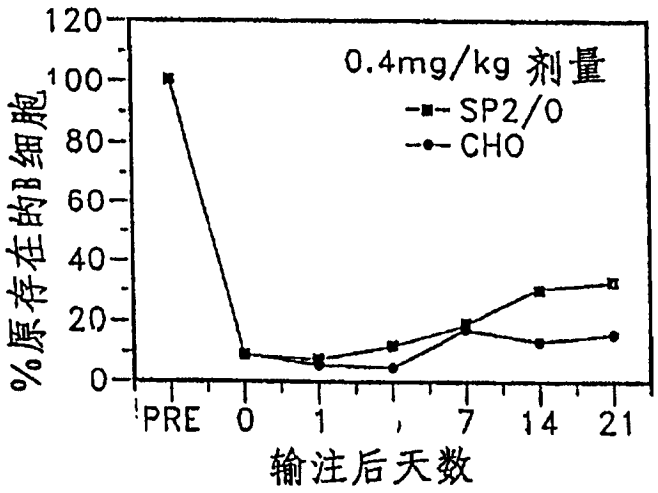

120
100
80
60
40
20
0
%原存在的B细胞
0.4mg/kg 剂量
SP2/0
CHO
PRE
0
1
7
14
21
输注后天数

图 9A

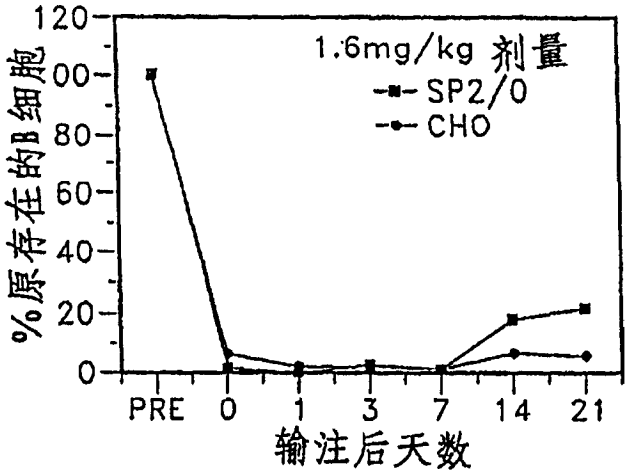

1.6mg/kg 剂量
SP2/0
CHO
%原存在的B细胞
120
100
80
60
40
20
0
PRE
0
1
3
7
14
21
输注后天数

图 9B

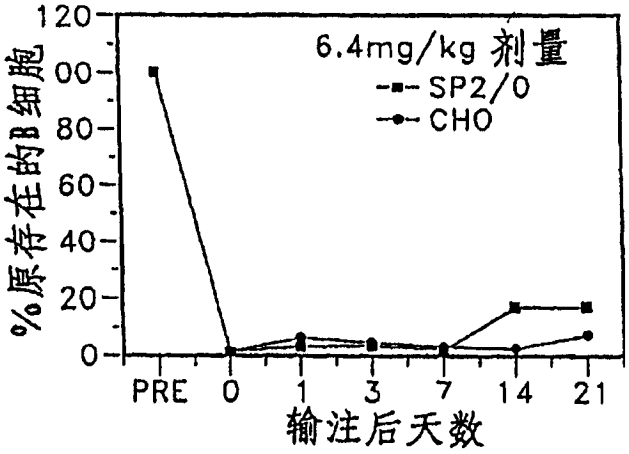

6.4mg/kg 剂量
SP2/0
CHO
%原存在的B细胞
120
100
80
60
40
20
0
PRE
0
1
3
7
14
21
输注后天数

图 9C

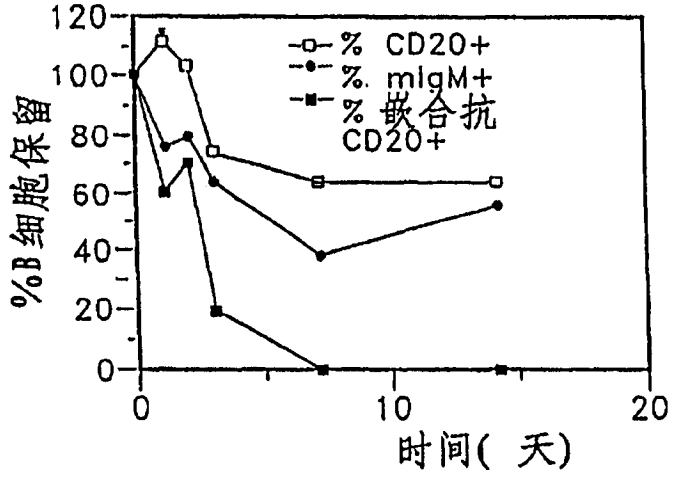

% CD20+
% mIgM+
% 嵌合抗 CD20+
%B细胞保留
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
时间(天)

图 10

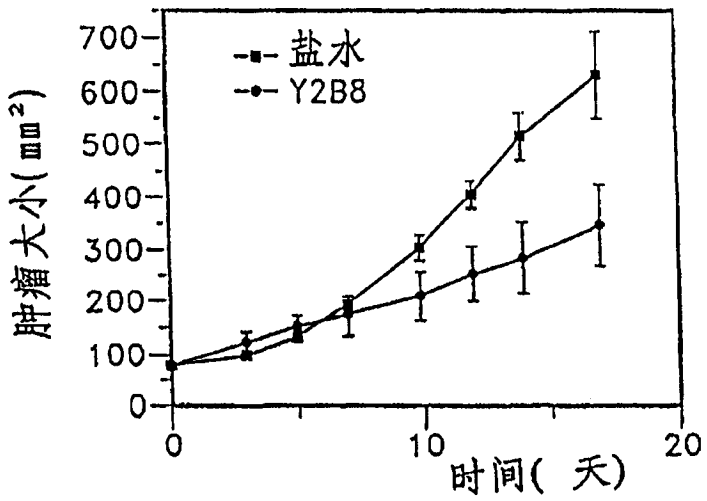

盐水
Y2B8
肿瘤大小(mm²)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
时间(天)

图 11

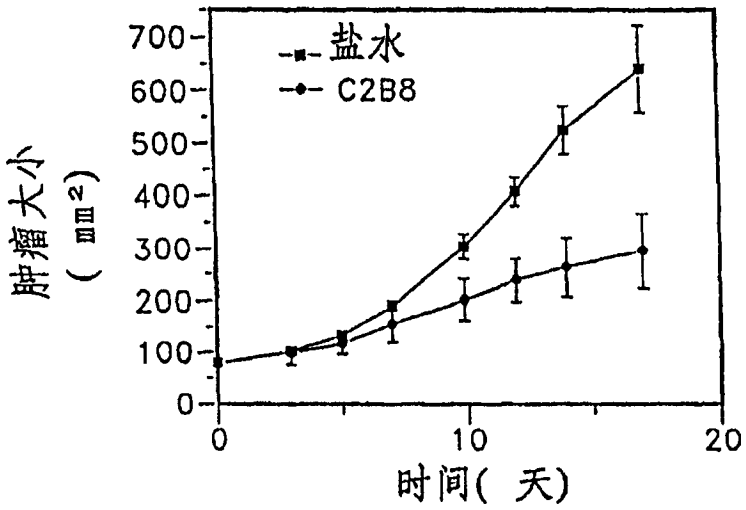

盐水
C2B8
肿瘤大小
(mm²)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
时间(天)

图 12

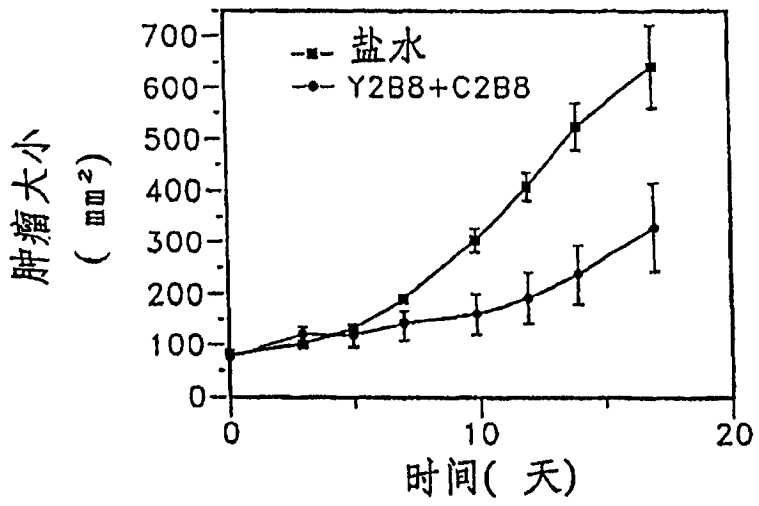

盐水
Y2B8+C2B8
肿瘤大小
(mm²)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
时间(天)

图 13

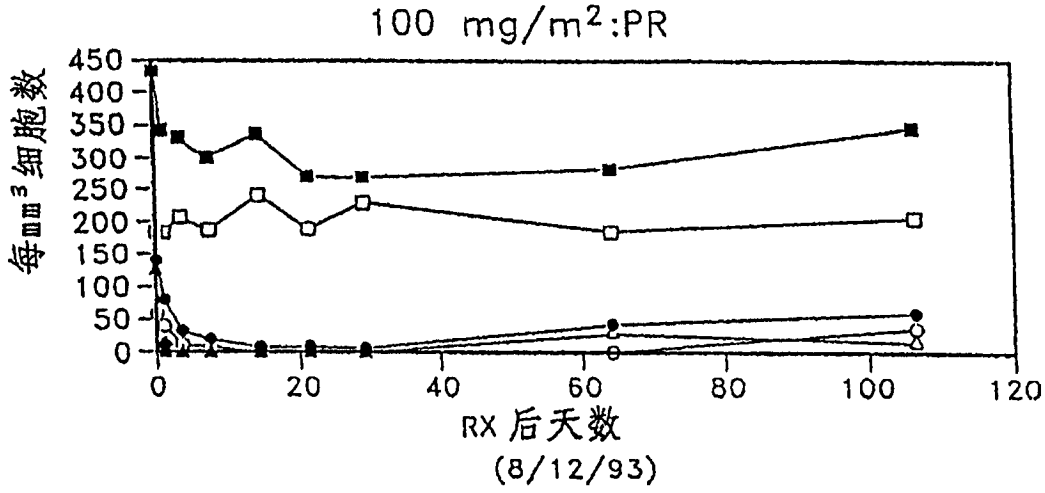

100 mg/m²:PR
每mm³细胞数
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
RX 后天数
(8/12/93)

图 14A

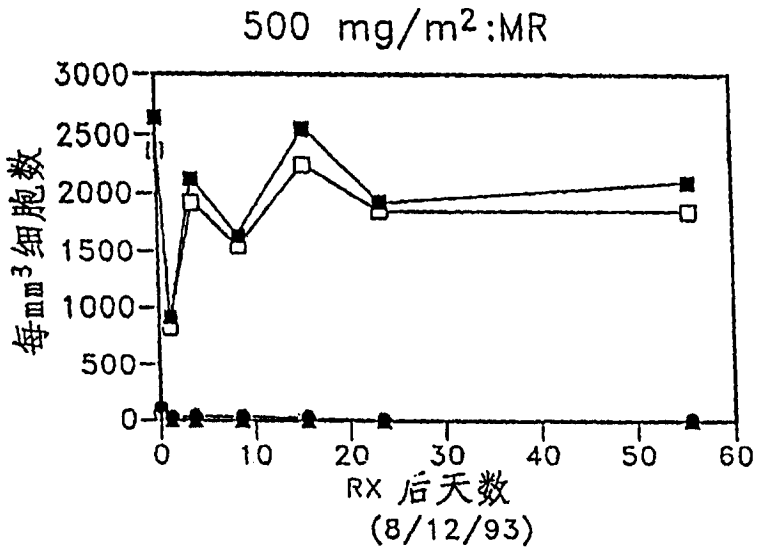

500 mg/m2:MR
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
每mm3细胞数
0
10
20
30
40
50
60
RX 后天数
(8/12/93)

图 14B