



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103003309 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 27

(21) 申请号 201180034972. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 07. 15

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006. 01)

10169795. 1 2010. 07. 16 EP

A61P 35/02 (2006. 01)

10175586. 6 2010. 09. 07 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 01. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/062133 2011. 07. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02012/007576 EN 2012. 01. 19

(71) 申请人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 德国英格海姆

(72) 发明人 S. 施蒂根鲍尔 T. 曾兹 K-H. 海德

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元

权利要求书 3 页 说明书 13 页

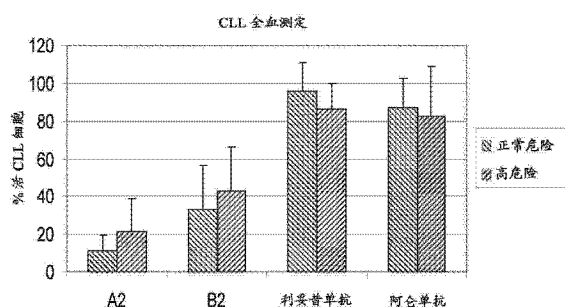
序列表 14 页 附图 4 页

(54) 发明名称

CD37 抗体在 CLL 血液样品中的优良效力

(57) 摘要

本发明公开了 CD37 抗体,特别是 A2 和 B2,用于治疗患有 CLL 的患者,特别是属于“高危”或“超高危”患者群的患者。所述患者或者是氟达拉滨难治的患者,或者是携带指示不良预后或者治疗失败危险较高的遗传标记的患者,例如 TP53 功能障碍或染色体 17p13 缺失的患者,或者对先前抗-CD20 治疗失败的患者。在来自正常危险患者和高危险患者(“高危”患者)的患者样品中,A2 和 B2 清除 CLL 细胞的能力均较高,并且明显优于利妥昔单抗和阿仑单抗。



1. 一种 CD37 抗体,其用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者。
2. 一种 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物,其用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者,优选地用于治疗慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 高危患者。
3. 一种 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物,其用于患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的治疗方法,优选地用于慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 高危患者的治疗方法。
4. 根据权利要求 1-3 的 CD37 抗体,其中所述高危患者选自:氟达拉滨难治的患者, TP53 功能障碍的患者,17p13 缺失的患者,和不再对利妥昔单抗治疗发生响应的患者。
5. 根据权利要求 1-4 的 CD37 抗体,其中所述高危患者的预期寿命中值为 2-3 年,特别是不超过 2 年。
6. 根据权利要求 1-5 的 CD37 抗体,其中所述抗体是包含如下的抗体:
 - a. 如 SEQ ID NO:2 所示的可变重链内所含有的 CDR,优选地所述 CDR 具有 SEQ ID NO:15,16 或 21,和 17,和
 - b. 如 SEQ ID NO:4 所示的可变轻链内所含有的 CDR,优选地所述 CDR 具有 SEQ ID NO:18,19 和 20。
7. 根据权利要求 1-6 的 CD37 抗体,其中所述 CD37 抗体是一种如下限定的嵌合抗体:
 - a. 可变重链包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列,和
 - b. 可变轻链包含如 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列,其中恒定重链和恒定轻链优选地是人源的。
8. 根据权利要求 6 的 CD37 抗体,其中所述抗体是人化抗体,由来自人抗体的支撑所述 CDR 的框架限定,并且其中恒定重链和恒定轻链来自人抗体。
9. 根据权利要求 6 的 CD37 抗体,其中所述抗体具有包含 SEQ ID NO:5 氨基酸序列的重链,且优选具有包含 SEQ ID NO:6 氨基酸序列的轻链。
10. 根据权利要求 6 的 CD37 抗体,其中所述抗体具有包含 SEQ ID NO:7 氨基酸序列的重链,且优选具有包含 SEQ ID NO:8 氨基酸序列的轻链。
11. 根据权利要求 6 的 CD37 抗体,其中所述抗体具有包含 SEQ ID NO:9 氨基酸序列的重链,且优选具有包含 SEQ ID NO:10 氨基酸序列的轻链。
12. 根据权利要求 6 的 CD37 抗体,其中所述抗体具有包含 SEQ ID NO:11 氨基酸序列的重链,且优选具有包含 SEQ ID NO:12 氨基酸序列的轻链。
13. 根据权利要求 6 的 CD37 抗体,其中所述抗体具有包含 SEQ ID NO:13 氨基酸序列的重链,且优选具有包含 SEQ ID NO:14 氨基酸序列的轻链。
14. 根据权利要求 1-13 的 CD37 抗体,其中所述 B 细胞恶性肿瘤选自:B 细胞淋巴瘤、侵袭性 B 细胞淋巴瘤、霍奇金病、B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症 (也称作淋巴浆细胞淋巴瘤或免疫细胞瘤)、中枢神经系统淋巴瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL;也称作 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 BCLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、B 细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关 (MALT) 淋巴组织结外边缘区 B 细胞淋巴瘤、结边缘区 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤、纵隔 (胸腺) 大 B 细胞性淋巴瘤、血管内大 B 细胞性淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤 / 白血病、灰区淋巴瘤、恶

性潜能未定型B细胞增生、淋巴瘤样肉芽肿病和移植后淋巴增生性疾病,其中所述B细胞恶性肿瘤优选地是CLL。

15. 一种用于治疗B细胞恶性肿瘤的方法,包括向有此需要的高危或超高危患者给药治疗有效量的

- a. 根据权利要求1-14的CD37抗体,或
- b. 包含CD37抗体的药物组合物。

16. 根据权利要求15的方法,其中所述抗体是如下的抗体,包括:

a. 如SEQ ID NO:2所示的可变重链内所含有的CDR,优选地所述CDR具有SEQ ID NO:15,16或21,和17,和

b. 如SEQ ID NO:4所示的可变轻链内所含有的CDR,优选地所述CDR具有SEQ ID NO:18,19和20。

17. 根据权利要求15或16的方法,其中所述CD37抗体是一种如下限定的嵌合抗体:

- a. 可变重链包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,和
 - b. 可变轻链包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列,
- 其中恒定重链和恒定轻链优选地是人源的。

18. 根据权利要求16的方法,其中所述抗体是人化抗体,由来自人抗体的支撑所述CDR的框架限定,并且其中恒定重链和恒定轻链来自人抗体。

19. 根据权利要求16的方法,其中所述抗体具有包含SEQ ID NO:5氨基酸序列的重链,且优选具有包含SEQ ID NO:6氨基酸序列的轻链。

20. 根据权利要求16的方法,其中所述抗体具有包含SEQ ID NO:7氨基酸序列的重链,且优选具有包含SEQ ID NO:8氨基酸序列的轻链。

21. 根据权利要求16的方法,其中所述抗体具有包含SEQ ID NO:9氨基酸序列的重链,且优选具有包含SEQ ID NO:10氨基酸序列的轻链。

22. 根据权利要求16的方法,其中所述抗体具有包含SEQ ID NO:11氨基酸序列的重链,且优选具有包含SEQ ID NO:12氨基酸序列的轻链。

23. 根据权利要求16的方法,其中所述抗体具有包含SEQ ID NO:13氨基酸序列的重链,且优选具有包含SEQ ID NO:14氨基酸序列的轻链。

24. 根据权利要求15-23的方法,其中所述B细胞恶性肿瘤选自:B细胞淋巴瘤、侵袭性B细胞淋巴瘤、霍奇金病、B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)、淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症(也称作淋巴浆细胞淋巴瘤或免疫细胞瘤)、中枢神经系统淋巴瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL;也称作B细胞慢性淋巴细胞白血病BCLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆胞性骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关(MALT)淋巴组织结外边缘区B细胞淋巴瘤、结边缘区B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞性淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞性淋巴瘤、血管内大B细胞性淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤/白血病、灰区淋巴瘤、恶性潜能未定型B细胞增生、淋巴瘤样肉芽肿病和移植后淋巴增生性疾病,其中所述B细胞恶性肿瘤优选地是CLL。

25. 权利要求15-24的方法,其中所述高危患者选自氟达拉滨难治的患者,TP53功能障

碍的患者,17p13 缺失的患者,和不再对利妥昔单抗治疗发生响应的患者。

26. 权利要求 15-25 的方法,其中所述高危患者的预期寿命中值为 2-3 年,特别是不超过 2 年。

27. 一种用于从 TP53 缺陷细胞的群体中除去表达 CD37 的 B 细胞的方法,包括向所述细胞的群体给药 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物,以及药学上可接受的赋形剂或载体,其中所述方法优选地在体外进行。

CD37 抗体在 CLL 血液样品中的优良效力

[0001] 发明背景

技术领域

[0002] 本发明涉及基于 B 细胞清除的免疫治疗。特别地,本发明涉及 CD37 抗体分子,特别是 A2 和 B2,用于在这些治疗中使用,例如在 B 细胞恶性肿瘤和自身免疫疾病的治疗中使用。

[0003] 背景

[0004] 使用单克隆抗体 (mAb) 的免疫疗法已经显现为一种安全而具有选择性的用于治疗癌症和其它疾病的方法。特别地,自从引入了利妥昔单抗(Rituxan®,一种定向针对 B 细胞表面上 CD20 抗原的抗体)之后,单克隆抗体在基于 B 细胞清除的疗法中,例如在 B 细胞恶性肿瘤的治疗中的作用得到了扩展。大量的研究证实了利妥昔单抗作为单一制剂和在组合疗法中对如下疾病的效力,例如低度 NHL(Hiddemann W, et al.Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone(CHOP)significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone:results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study.Group.Blood2005;106:3725-3732(2005))、外套细胞淋巴瘤(Forstpointner R, et al.The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone(FCM)significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas:results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group.Blood,2004;104:3064-3071.)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)(Coiffier B, et al.Rituximab(anti-CD20monoclonal antibody)for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma:a multicenter phase II study.Blood1998;92:1927-1932)、和伯基特淋巴瘤(Thomas DA, et al.Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia.Cancer2006;106:1569-1580)。

[0005] 然而,只有少量的患者对治疗有响应,并且其中大部分在利妥昔单抗治疗后最终复发。因此,需要发现比利妥昔单抗效力更高的免疫疗法,特别是对利妥昔单抗治疗响应差的患者亚群的效力更高的免疫疗法。

发明概要

[0006] 本发明公开了 CD37 抗体,特别是 A2 和 B2,用于治疗患有 CLL 的患者,特别是属于“高危”或“超高危”患者群的患者。那些患者或者是氟达拉滨(Fludarabine)难治(refractory)的患者,或者是携带指示不良预后或者治疗失败危险较高的遗传标记的患

者,例如 TP53 突变或染色体 17p13 缺失的患者。在来自 CLL 患者的全血样品中对抗体 A2 和 B2 进行试验,考察其清除恶性 CLL 细胞的能力。将利妥昔单抗 (rituximab,一种 CD20 抗体) 阿仑单抗 (alemtuzumab,一种 CD52 抗体) 作为平行比较的抗体进行测试。在这些样品中,A2 和 B2 均介导了高度的 CLL 细胞清除,明显优于 CD20 抗体利妥昔单抗和 CD52 抗体阿仑单抗。根据遗传状态和对氟达拉滨治疗的响应(临床暴露和体外测试之后),对来自不同患者的一系列 21 个血液样品进行了表征。这些患者的亚群分析显示,A2 和 B2 在所分析的所有亚群中均显示优良的 CLL 清除活性。特别地,在携带有染色体 17p13 缺失、TP53 突变或氟达拉滨难治的“高危”患者中,A2 和 B2 比利妥昔单抗和阿仑单抗更优。而且,A2 和 B2 的 CLL 清除效果在正常危险患者以及在“高危”患者中均较突出,表明 CD37 抗体(特别是 A2 和 B2)的优良 CLL 清除活性并不限于具有正常的治疗失败危险的患者,而是可以特别应用于具有更高治疗失败危险的患者。与标准治疗相比,CD37 抗体,特别是 A2 和 B2 抗体,在体外对不同 CLL 患者亚群均显示优异的 CLL 清除活性,惊人地明显优于已批准的抗体利妥昔单抗和阿仑单抗。

[0007] 目前为止,将 CD37 在体外靶定于原发性 CLL 细胞的唯一现有实验数据表明,CD37 抗体或抗-CD37SMIP 分子能够诱导原发性 CLL 细胞凋亡和 ADCC,然而没有证据显示在体外全血测定中观察到 CLL 细胞清除(Zhao XB, Lapalombella R, Joshi T, Cheney C, Gowda A, Hayden-Ledbetter MS, Baum PR, Lin TS, Jarjoura D, Lehman A, Kussewitt D, Lee RJ, Caligiuri MA, Tridandapani S, Muthusamy N, Byrd JC. Targeting CD37+lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical 2007; BLOOD, 10 OCTOBER 2007, VOLUME 110, NUMBER 7, Epub ahead of print. Blood. 2007 Apr 17)。而且,没有证据显示,在患者来源的血液样品中,使用 CD37 抗体清除 CLL 细胞优于使用其它 B 细胞定向的抗体。在 Zenz 等 (Abstract 2379, ASH2009, New Orleans) 和 Platz 等 (Abstract 2365, ASH2009, New Orleans) 新近发表的文献中,用可比较的测定形式在来自 CLL 患者的血液样品中对利妥昔单抗和 Fc- 工程化新型 CD20 抗体 GA101 的效力进行了测试。这些报告中公开的结果表明,新型 Fc- 工程化 CD20 抗体 GA101 优于利妥昔单抗,然而 GA101 所观察到的最大效果显著低于 A2 和 B2 所观察到的效果。因此,出人意料的是,Fc- 工程化的 CD37 抗体显示出甚至比 Fc- 工程化的 CD20 抗体更高的活性。

[0008] 优势

[0009] 在患有 CLL 的患者中高度清除 CLL 细胞被认为对 CLL 患者的治疗是有利的,并且被认为使用这种药物对患者进行治疗可获得更高的临床利益。抗体 A2 和 B2 在全血测定中显示出这种高度的 CLL 细胞清除,并优于 CD20 抗体利妥昔单抗(见本申请中公开的数据)和 GA101 (Zenz et al., 2009, Abstract 2379, ASH2009, New Orleans) 的效果。在来自属于高危群患者(例如氟达拉滨难治的患者,或者携带可预测使用当前标准疗法(例如组合 CD20 抗体和含有氟达拉滨的化疗方案的疗法)治疗效果较差的遗传标记(例如 TP53 突变或 17p13 缺失)的患者)的患者样品中,A2 和 B2 的优良效力特别明显。此外,先前抗-CD20 治疗失败的患者需要改善治疗方式。因此,应用与 CD20 无关的治疗方式(例如特异针对 CD37 的抗体,特别是 A2 和 B2)被预期可以为患有 CLL 的患者,特别是属于高危群患者的患者,提供一种改进的治疗方法。在来自正常危险和更高危险患者(“高危”或“超高危”患者)的患者样品中,CD37 抗体,特别是 A2 和 B2,清除 CLL 细胞的能力均较高,并且显著优于

利妥昔单抗和阿仑单抗。

[0010] 适用性和方法的治疗用途

[0011] 根据本发明,提供了如本发明所述的 CD37 抗体的新适应症。因此,本发明的 CD37 抗体可用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的“高危”或“超高危”患者。

[0012] 为了在治疗中使用,CD37 抗体被包含在便于给药于动物或人的药物组合物中。CD37 抗体分子的典型制剂可以通过将 CD37 抗体分子与生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合,形成冻干制剂或干燥制剂,或者水溶液或水相或非水相悬浮液。

[0013] 与根据本发明的 CD37 抗体一起使用的药学上可接受的载体和佐剂包括例如离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白、缓冲物质、水、盐或电解质和纤维素基物质。

[0014] 载体、赋形剂、修饰剂或稳定剂在所用剂量和浓度下无毒性。它们包括:缓冲系统,例如磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐和其它无机或有机酸及其盐;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);蛋白质,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮或聚乙二醇(PEG);氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸;单糖、二糖、寡糖或多糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、蔗糖、海藻糖、糊精或葡聚糖;螯合剂例如 EDTA;糖醇例如甘露醇或山梨醇;成盐反离子(salt-forming counter-ion)例如钠;金属络合物(例如 Zn-蛋白络合物);和/或离子或非离子表面活性剂例如 TWEEN™(聚山梨醇酯)、PLURONICS™或脂肪酸酯、脂肪酸醚或糖酯。抗体制剂中也可以包含有机溶剂,例如乙醇或异丙醇。赋形剂也可以具有释放调节或吸附调节功能。这并不是可能的药学上可接受载体和佐剂的完整列表,本领域的普通技术人员会知道其它可能的物质,它们在本领域中是很多的。

[0015] CD37 抗体分子也可以是干燥的(冻干、喷雾干燥、喷雾冷冻干燥、近临界或超临界气体干燥、真空干燥、风干)、沉淀或结晶的,或者包封在微囊中(所述微囊通过例如凝聚技术制备,或者通过分别使用例如羟丙基甲基纤维素或明胶和聚-(甲基丙烯酸甲酯)的界面聚合在胶体给药系统中制备;例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊),或包封在粗乳液中,或者沉淀或固定在载体或表面上,例如通过 pcmc 技术(蛋白涂布微结晶)。这些技术是本领域已知的。

[0016] 自然地,用于体内给药的药物组合物/制剂必须是无菌的;灭菌可以通过传统的技术实现,例如通过无菌滤膜过滤。

[0017] 增加 CD37 抗体的浓度实现所谓的高浓度液体制剂(HCLF)可能是有用的;已经公开了多种方法用于产生这种 HCLF。

[0018] CD37 抗体分子也可以被包含在缓释制剂中。这些制剂包括疏水或亲水聚合物的固体、半固体或液体基质,并且可以为成形物(shaped article)的形式,例如膜、棍或微胶囊,并可以通过施用装置施用。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(甲基丙烯酸 2-羟基乙基酯)或醋酸-异丁酸蔗糖酯)、或聚乙烯醇、聚交酯(US3,773,919)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酰胺共聚物、非可降解乙烯-醋酸乙烯酯(ethylene-vinyl acetate)、可降解乳酸-乙醇酸共聚物例如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球)、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管聚合物如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇

酸能够缓释分子超过 100 天,但是某些水凝胶可以缓释蛋白质较短的时间周期。当包封的抗体长期保留在体内时,它们可能因为暴露于 37° C 的潮湿环境中而变性或凝集,导致生物活性损失并可能改变免疫原性。可以根据所涉及的机制设计合理的稳定策略。例如,如果发现凝集机制是通过硫-二硫化物互换导致分子间形成 S-S 键,则可以通过修饰硫氢残基、从酸性溶液冻干、控制湿度、使用合适的添加剂和开发特异的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0019] CD37 抗体分子,特别是 A2 和 B2,也可以整合到其它施用形式中,例如分散剂、悬浮剂或脂质体、片剂、胶囊、粉剂、喷雾剂、具有或没有渗透增强装置的透皮或皮内贴片或乳膏,晶片,鼻、口腔或肺部制剂,或者其可以通过移植细胞或者在基因治疗后通过个体自身的细胞加以产生。

[0020] CD37 分子,特别是 A2 和 B2,也可以用化学基团衍生化,所述基团例如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙基、或者碳水化合物基团。这些基团有利于改善抗体的生物学性质,例如提高血清半衰期或提高组织结合。

[0021] 施用的优选方式是胃肠外,通过输液或注射(静脉内、肌内、皮下、腹膜内、皮内),但是也可以采用其它的给药方式,例如吸入、透皮、鼻内、口腔、口服。

[0022] 对于治疗性使用,化合物可以用任何传统方式以任何传统的剂量形式以治疗有效量给药。给药途径包括,但不仅限于,静脉内、肌内、皮下、滑膜内、输液、舌下、透皮、口服、局部或通过吸入、片剂、胶囊、囊片、液体、溶液、悬浮剂、乳剂、锭剂、糖浆、可重组(reconstituable)粉末、颗粒、栓剂和透皮贴剂。制备这些剂量形式的方法是已知的(见例如 H. C. Ansel and N. G. Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5th ed., Lea and Febiger(1990))。治疗有效量可以通过技术人员根据例如体重、代谢和疾病的严重程度等因素加以确定。

[0023] 优选地,活性化合物的剂量为每天每千克体重大约 1mg 至大约 500mg。更优选地,活性化合物的剂量为每天每千克体重大约 1mg 至大约 100mg。

[0024] 为了预防或治疗疾病,抗体的合适剂量取决于待治疗疾病的类型,疾病的严重程度和病程,抗体给药的目的是预防性还是治疗性,先前的治疗情况,患者的病史和对抗体的响应,以及主治医师的判断。抗体可适合于一次给药或者一系列地治疗给药。

[0025] 根据疾病的类型和严重程度,给患者给药抗体(特别是 A2 和 B2)的初始候选剂量为大约 0.01 μ g/kg 至 40mg/kg(例如 0.1 至 20mg/kg),可以通过例如一次或多次分别给药或者通过连续的输液给药。对于在多天或更长时间内重复给药,根据病症,治疗应持续到发生期望的症状抑制为止。然而,也可以使用其它的剂量方案。这种治疗的进展可以通过传统技术和测定容易地加以监视,例如通过确定 B 细胞消除的程度(例如使用流式细胞术)来监视。

[0026] 对于 A2,70kg 体重人的估算周剂量范围是 86-184mg。对于 B2,70kg 体重人的估算周剂量范围是 189-404mg。

[0027] 待给药的抗体“治疗有效量”是预防、减轻或治疗疾病或病症所需的最小量。

[0028] B 细胞恶性肿瘤包括,但不仅限于,B 细胞淋巴瘤(例如各种形式的霍奇金病,B 细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)和相关淋巴瘤(例如华氏巨球蛋白血症(也称作淋巴浆细胞淋巴瘤或免疫细胞瘤)或中枢神经系统淋巴瘤),白血病(例如急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢

性淋巴细胞白血病 (CLL ; 也称作 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 BCLL)、毛细胞白血病和慢性成肌细胞白血病) 和骨髓瘤 (例如多发性骨髓瘤)。其它的 B 细胞恶性肿瘤包括小淋巴细胞淋巴瘤、B 细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关 (MALT) 淋巴组织结外边缘区 B 细胞淋巴瘤、结边缘区 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤、纵隔 (胸腺) 大 B 细胞性淋巴瘤、血管内大 B 细胞性淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤 / 白血病、灰区淋巴瘤、恶性潜能未定型 B 细胞增生 (Bcell proliferations of uncertain malignant potential)、淋巴瘤样肉芽肿病和移植后淋巴增生性疾病。

[0029] CD37 抗体可以单独给药或者与佐剂组合给药, 在一些实施方案中佐剂可以提高含有它们的药物组合物的稳定性、便于给药、增加溶解性或分散性、提高活性、提供辅助治疗等。有利地, 这些组合可以使用更低剂量的活性成分, 从而减少可能的毒性和不良副作用。

[0030] 根据待治疗的疾病, CD37 抗体分子, 特别是 A2 和 B2, 可以单独使用或者与一种或多种额外的治疗剂组合使用, 特别是选自以下的治疗剂: DNA 损伤或微管蛋白结合剂, 或者可抑制血管生成、信号传导途径和癌细胞有丝分裂检查点的治疗活性化合物。

[0031] 其他的治疗剂可以与 CD37 抗体分子同时给药 (其任选作为同一药物制剂的组分), 或者在给药 CD37 抗体分子 (特别是 A2 和 B2) 之前或之后给药。

附图说明

[0032] 图 1 : 全血测定 : 抗体 A2 和 B2 对活 CLL 细胞的效力

[0033] 将来自 CLL 患者的全血样品与浓度递增 ($0.001 \mu\text{g/ml}$ – $100 \mu\text{g/ml}$) 的抗体 A2 和 B2 孵育 3 小时。将孵育周期结束时活 CLL 细胞百分比相对于抗体浓度作图, 曲线代表 11 个单独患者样品的平均值。显示了每个测试浓度的标准差。A2 : 实心三角形 ; B2 : 空心三角形。虚线代表同种型匹配对照抗体的活性。

[0034] 图 2 : CLL 患者样品的全血测定 : 不同抗体的比较

[0035] 血液样品与 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗体 A2、B2、利妥昔单抗、阿仑单抗和同种型匹配对照抗体孵育 3 小时。对孵育周期结束时活 CLL 细胞的百分比进行作图, 柱状图代表 11 个患者样品的平均值。指示了标准差。虚线代表同种型匹配对照抗体的活性。

[0036] 图 3 : CLL 患者样品的全血测定 : 不同患者亚群的比较

[0037] (A) 血液样品与 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗体 A2、B2、利妥昔单抗和阿仑单抗孵育 3 小时。对不同的患者亚群, 将孵育周期结束时活 CLL 细胞百分比作图, 柱状图代表指定数目患者样品的平均值。指示了标准差。

[0038] (B) 将来自正常危险患者 ($n=11$) 的血液样品和来自高危患者 ($n=10$) 的血液样品与 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗体 A2、B2、利妥昔单抗和阿仑单抗孵育 8 小时。对两个患者亚群, 将孵育周期结束时活 CLL 细胞百分比作图, 柱状图代表平均值, 指示了标准差。

[0039] 图 4 : 与 Fc- γ 受体 3a 的结合

[0040] 抗体 A2 和 B2 与 Fc- γ 受体 3a 的亲合性通过表面等离子体共振分析 (SPR) 加以确定 (Edwards and Leatherbarrow, Analytical Biochemistry 246, 1997 ; Nieba et al., Analytical Biochemistry 234, 1996)。

[0041] Fc- γ 受体 3a 蛋白高亲和性同种异型 : V158。

[0042] Fc- γ 受体 3a 蛋白低亲和性同种异型 :F158。

[0043] 使用非 Fc 工程化 IgG1 型抗体作为对照抗体。

[0044] 将抗体涂布在传感器表面,并用通过 SFP 确定的复合物形成率 (k_a) 和解离率 (k_d) 计算抗体 A2 和 B2 的解离常数 K_D 。柱状图代表 3 次独立测量的平均值,指示了标准差。

[0045] 序列列表注释

[0046] SEQ ID N01 :可变重链 (Vh) 核酸序列

[0047] SEQ ID N02 :可变重链氨基酸序列

[0048] SEQ ID N03 :可变轻链 (Vl) 核酸序列

[0049] SEQ ID N04 :可变轻链氨基酸序列

[0050] SEQ ID N05 :A2 重链氨基酸序列

[0051] SEQ ID N06 :A2 轻链氨基酸序列

[0052] SEQ ID N07 :恒定重链氨基酸序列

[0053] SEQ ID N08 :恒定轻链氨基酸序列

[0054] SEQ ID N09 :A4 重链氨基酸序列

[0055] SEQ ID N010 :A4 轻链氨基酸序列

[0056] SEQ ID N011 :B2 重链氨基酸序列

[0057] SEQ ID N012 :B2 轻链氨基酸序列

[0058] SEQ ID N013 :B4 重链氨基酸序列

[0059] SEQ ID N014 :B4 轻链氨基酸序列

[0060] SEQ ID N015 :CDR1 重链 (H1)

[0061] SEQ ID N016 :CDR2 重链 (H2)

[0062] SEQ ID N017 :CDR3 重链 (H3)

[0063] SEQ ID N018 :CDR1 轻链 (L1)

[0064] SEQ ID N019 :CDR2 轻链 (L2)

[0065] SEQ ID N020 :CDR3 轻链 (L3)

[0066] SEQ ID N021 :替代性 CDR2 重链 (H2b)

[0067] 发明详述

[0068] CLL 患者血液样品的全血测定 :在初始实验中,来自 11 位 CLL 患者的全血样品用浓度递增 (0.001-100 μ g/ml) 的 CD37 抗体 A2 和 B2 处理 3 小时。在全血测定中,两种抗体均显示有效的且浓度依赖的 CLL 细胞清除。如图 1 所示,A2 和 B2 均极强地清除 CLL 细胞, EC_{50} 值为大约 1000ng/ml。与血液样品孵育 3 小时后,将 10 μ g/ml 的抗体浓度的 A2 和 B2 与相同抗体浓度的利妥昔单抗和阿仑单抗的 CLL 细胞清除效果进行对比。如图 2 所示,在 10 μ g/ml 的抗体浓度下,A2(9% 活细胞)和 B2(26% 活细胞)对 CLL 细胞的清除显著优于阿仑单抗 (71% 活细胞)和利妥昔单抗 (80% 活细胞)。总之,这些数据清晰地证明,抗体 A2 和 B2 在体外可以有效并且浓度依赖地从全血清除 CLL 细胞。CLL 细胞的清除程度明显优于使用利妥昔单抗和阿仑单抗所观察到的结果。

[0069] 在本发明的一个具体实施方案中,研究了 CD37 抗体 A2 和 B2 对基因组变异病例 (例如 TP53 突变或 17p13 缺失)、氟达拉滨难治病例、和先前抗 -CD20 治疗失败的患者的效果 (图 3A 和 3B)。这些病例一般被认为是高危或超高危患者群体,使用现有治疗方法的生

存中值为大约 2 年。为此,对来自 21 位患者的血液样品进行了表征,包括 10 名高危或超高危群患者和 11 个没有任何特殊危险特征的样品(图 3B)。我们比较了高危群(17p13 缺失、TP53 突变、氟达拉滨难治)和其余没有任何特殊危险的患者中的 CLL 细胞清除。对于两种抗体 A2 和 B2,在两种危险群体中的 CLL 细胞清除均较高,即在 $10 \mu\text{g/ml}$, A2 平均剩余 CLL 细胞:正常危险 11.1%(8 小时)和高危 21.3%; $10 \mu\text{g/ml}$ B2 的平均剩余 CLL 细胞:正常危险 33.2%(8 小时)和高危 43.1%(图 3B)。

[0070] 总之, CD37 抗体,特别是 A2 和 B2,在来自 CLL 患者的全血样品中显示高度有效且强效的 CLL 细胞清除。这个效果在所有测试的危险群体患者中均较高,特别是在来自高危患者的血液样品中 CLL 细胞清除程度较高,与来自正常危险群体的血液样品相似。因此, CD37 抗体,特别是 A2 和 B2,对所有测试 CLL 样品均高度有效,并且与遗传危险无关,因此特别适合于治疗治疗失败危险更高的患者,即所谓的“高危”患者或患者群体(例如 TP53 突变、17p13 缺失、氟达拉滨难治或抗 -CD20 治疗失败)或者“超高危”患者或患者群体。

[0071] 定义

[0072] 一般的示例“包括”或“包含”包括更具体的示例“由……构成”。而且,单数和多数形式的使用没有限制意义。本发明内容中使用的术语具有如下含义。

[0073] “CD37”是四旋蛋白超家族中的一个成员,是一种高度糖基化的细胞表面分子,具有 4 个跨膜结构域和两个胞外环。CD37 主要在 B 细胞和 B 细胞恶性肿瘤上表达,在 T 细胞、粒细胞和单核细胞上也报道有低水平表达。在患有慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和不同亚型的非霍奇金淋巴瘤 (NHL) (包括外套细胞淋巴瘤 (MCL)) 的患者样品中观察到了高水平的 CD37 表达 (Schwartz-Albiez et al, Journal Immunol 140:905-914, 1988; Barrena et al., Leukemia 19:1376-1383, 2005)。这种表达模式使 CD37 成为抗体介导的癌症治疗的引人注目的靶点。CD37 特异性 mAb 与癌细胞的结合可以触发多种作用机制:首先,在抗体与 CD37 抗原的细胞外结构域结合之后,它可能激活补体级联并裂解靶细胞。其次,抗 CD37 抗体可以介导针对靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC),这发生于所结合抗体的 Fc 部分被免疫系统细胞毒细胞上的合适受体识别之后。第三,抗体可以改变 B 细胞对抗原和其它刺激物的响应能力。最后,抗 -CD37 抗体可以触发程序性细胞死亡 (细胞凋亡)。

[0074] 术语“CD37 抗体”、“CD37 抗体分子”、“抗 -CD37 抗体”和“抗 -CD37 抗体分子”在本发明中具体指对 CD37 抗原具有结合特异性的抗体。这些抗体的实例是本领域已知的并且在下文中进一步的公开。

[0075] 术语“CD37 抗体”、“CD37 抗体分子”、“抗 -CD37 抗体”和“抗 -CD37 抗体分子”可以互换使用。

[0076] 术语“高危患者”或“高危”患者群体的意思是这个患者群体的生命预期非常短(中值为 2-3 年),并且对当前标准治疗的响应显著差于没有这些高危特征的患者。更具体地,这个组包括患有氟达拉滨不响应疾病的患者,这意味着患者在接受氟达拉滨的单独或组合治疗时或者没有响应(不能获得部分响应或者完全响应)或者在治疗后 6 个月内没有响应。此外,这些高危患者包括“TP53 功能障碍”患者和具有染色体异常如 17p13 缺失的患者。

[0077] “TP53 功能障碍”患者意味着患者的肿瘤抑制基因 TP53 或 p53 蛋白的功能受损。这通常与 p53 蛋白的失活有关,所述失活是由于 TP53 基因的一个拷贝发生突变或缺失或者

其组合而发生的。这些异常均与难治性 CLL、对标准治疗响应差以及自由生存和整体生存期短有关。

[0078] 17p13 缺失意味着染色体 17p13 或其部分由于遗传事件（例如基因组不稳定）而缺失。

[0079] 术语“超高危”患者或“超高危”患者群体具体包括预后特别差或具有例如 TP53 功能障碍和 17p13 缺失以及氟达拉滨难治等危险因素组合的高危患者群体。超高危患者的中值寿命预期低于高危患者，例如中值存活小于 2 年。而且，超高危患者可以定义为开始就难治，例如氟达拉滨难治的患者。

[0080] 术语“抗体”包括单克隆、多克隆、多特异性和单链抗体及其片段，例如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fc 和 Fc' 片段，免疫球蛋白轻链 (L) 和重链 (H) 和其恒定区、可变区或超变区，以及 Fv 和 Fd 片段。术语“抗体”包括人源或非人源抗体、人化抗体以及嵌合抗体，以及 Fc 工程化抗体和 Fc 融合分子。

[0081] Fab 片段（阶段抗原结合 = Fab）由通过相邻恒定区固定在一起的两条链的可变区构成。它们可以通过用蛋白酶例如木瓜蛋白酶处理或者通过 DNA 克隆从例如传统抗体产生。其它的抗体片段是 F(ab')₂ 片段，其可以通过用胃蛋白酶进行蛋白消化产生。

[0082] 通过基因克隆，还有可能制备截短的抗体片段，其仅由重链 (VH) 和轻链 (VL) 的可变区构成。它们称作 Fv 片段（可变片段 = 可变部分的片段）。在这些 Fv 片段中不可能存在通过恒定链的半胱氨酸基团实现的共价结合，因此它们经常通过一些其它方法被稳定。出于这个目的，重链和轻链的可变区经常通过大约 10-30 个氨基酸（优选 15 个氨基酸）的短肽片段连接在一起。这产生一个多肽单链，其中 VH 和 VL 通过肽连接子连接在一起。这些抗体片段也称作单链 Fv 片段 (scFv)。scFv 抗体的实例是本领域已知的。

[0083] 早年间已经开发了各种用于产生多亚基 scFv 衍生物的策略。这个目的是产生具有改良药代动力学性质和更高结合亲抗原性的重组抗体。为了实现 scFv 片段的多亚基化，将其制成具有多亚基结构域的融合蛋白。多亚基结构域可以是，例如，IgG 或螺旋结构（“螺旋卷曲结构 (coiled coil structures)”）例如亮氨酸拉链结构域的 CH3 区。在其它策略中，scFv 片段 VH 和 VL 区之间的相互作用用于多亚基化（例如双价、三价和五价抗体）。

[0084] 本领域中使用的术语“双价抗体”表示双价同源二聚体 scFv 衍生物。将 scFv 分子中的肽连接子缩短到 5-10 个氨基酸，可以通过叠加 VH/VL 链形成同源二聚体。二价抗体可以通过插入二硫桥被进一步稳定。二价抗体的实例可以在文献中发现。

[0085] 术语“微型抗体 (minibody)”在本领域中用于表示双价同源二聚体 scFv 衍生物。它由融合蛋白构成，包含免疫球蛋白、优选 IgG、更优选 IgG1 的 CH3 区，作为二聚体化区。这使得铰链区以及 IgG 和连接区将 scFv 片段连接起来。这些微型抗体的实例是本领域已知的。

[0086] 本领域中使用的术语“三价抗体”表示三价同源三聚体 scFv 衍生物。VH-VL 的直接融合而不使用连接子序列即可以形成三聚体。

[0087] 本领域已知的作为微型抗体的具有二、三或四价结构的片段也是 scFv 片段的衍生物。多亚基化通过二、三或四个螺旋卷曲结构实现。

[0088] 本领域还已知有“脚手架蛋白”或“脚手架抗体”。使用该术语，脚手架蛋白的意思是任何蛋白（特别是抗体）的任何功能域，所述功能域通过基因克隆或通过具有其它功

能的蛋白或蛋白部分的共翻译过程偶联在一起。

[0089] 术语抗体 / 抗体分子的“互补决定区”或“CDR”意思是免疫球蛋白的超变区（也称作互补决定区，缩写为“CDR”）。CDR 最初是由 Kabat 等根据大量抗体序列的序列可变性内容定义的（“Sequences of Proteins of Immunological Interest”Kabat, E., of al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983) and Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th Ed.). NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991）。CDR 被认为与抗体的靶抗原接触并主要负责结合。Chothia 等 (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)) 给出了超变区或 CDR 的一个替代性定义。Chothia 的定义是根据构成抗体三维结构的环的残基定义的。

[0090] 在本发明的具体内容中，CDR 根据 Kabat 系统确定。从如 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所示的可变区序列，可以根据序列特征搜索 Kabat 序列数据库常规地确定 CDR 序列。如 SEQ ID NO:2 所示的可变重链内含有的 3 个 CDR 优选地包括位置 31-35 (H1, SEQ ID NO:15)，50-66 (H2, SEQ ID NO:16) 或 50-62 (H2b, SEQ ID NO:21)，和 99-105 (H3, SEQ ID NO:17)，如 SEQ ID NO:4 所示的可变轻链内含有的 3 个 CDR 优选地包括位置 24-34 (L1, SEQ ID NO:18)，50-56 (L2, SEQ ID NO:19) 和 89-97 (L3, SEQ ID NO:20)。

[0091] 实施方案

[0092] 本发明涉及用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的 CD37 抗体。

[0093] 在另一个实施方案中，本发明涉及包含用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的 CD37 抗体以及药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0094] 本发明还涉及使用 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物在制备用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的药物中的用途。

[0095] 本发明还涉及用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物。本发明具体地涉及用于治疗慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 高危患者的 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物。

[0096] 本发明还涉及 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物，其用于患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的治疗方法。本发明具体地涉及用于慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 高危患者的治疗方法中的 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物。

[0097] 本发明还涉及用于治疗 B 细胞恶性肿瘤的方法，包括向有此需要的高危患者给药治疗有效量的 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物。

[0098] 本发明还涉及用于治疗患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的方法，该方法包括向所述患者给药治疗有效量的 CD37 抗体。

[0099] 在另一个实施方案中，本发明涉及用于治疗 B 细胞恶性肿瘤或患有 B 细胞恶性肿瘤的高危患者的方法，包括 (i) 鉴定需要所述 B 细胞恶性肿瘤治疗的高危或超高危患者，和 (ii) 向所述高危或超高危患者给药治疗有效量的 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物。

[0100] 在上述发明的具体实施方案中，所述高危患者选自：氟达拉滨难治的患者，TP53 功能障碍的患者，17p13 缺失的患者，和不再对利妥昔单抗治疗发生响应的患者。在一个具

体的实施方案中,高危患者的预期寿命中值为 2-3 年,特别是不超过 2 年。

[0101] 在本发明的一个具体实施方案中,所述患者是超高危患者。

[0102] 在一个具体实施方案中,所述抗体是包含如下的抗体:a) 如 SEQ ID NO:2 所示的可变重链内所含有的 CDR,和 b) 如 SEQ ID NO:4 所示的可变轻链内所含有的 CDR。优选地,所述可变重链内含有的所述 CDR 具有 SEQ ID NO:15,16 或 21,和 17。优选地,所述可变轻链内含有的所述 CDR 具有 SEQ ID NO:18,19 和 20。

[0103] 在本发明的一个具体实施方案中,抗 -CD37 抗体分子 /CD37 抗体是一种如下限定的嵌合抗体:

[0104] i) 可变重链包含如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列,

[0105] ii) 可变轻链包含如 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。

[0106] 优选地,恒定重链和恒定轻链是人源的。该嵌合小鼠 / 人抗体的构建和产生是本领域众所周知的。

[0107] 优选地, i) 恒定重链是 IgG1 链,和 ii) 恒定轻链是 κ 链。在一个具体实施方案中,抗体分子在 Fc 结构域中具有一个或多个突变,其调节一种或多种效应器功能,优选地,效应器功能的所述调节是增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,优选地, Fc 结构域中的所述一个或多个突变是位置 239 和 332,或 236 和 332,或 236、239 和 332 的组合替换,该编码是根据 Kabat EU 编码索引,优选地,所述替换是 I332E 和 S239D 或 I332E 和 G236A,或 S239D、I332E 和 G236A。

[0108] 优选地, CD37 抗体具有包含 SEQ ID NO:5 氨基酸序列的重链且优选具有包含 SEQ ID NO:6 氨基酸序列的轻链。更优选的是, CD37 抗体具有包含 SEQ ID NO:7 氨基酸序列的重链且优选具有包含 SEQ ID NO:8 氨基酸序列的轻链。另外优选的是, CD37 抗体具有包含 SEQ ID NO:9 氨基酸序列的重链且优选具有包含 SEQ ID NO:10 氨基酸序列的轻链。

[0109] 在本发明的另一个具体实施方案中,所述抗 -CD37 抗体分子与人 CD37 结合,并且得自于如下限定的鼠科动物单克隆抗体:

[0110] i) 包含如 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的可变重链;和

[0111] ii) 包含如 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列的可变轻链,

[0112] 其中所述抗体是如下限定的人化抗体:

[0113] a) 如 SEQ ID NO:2 所示可变重链内所含有的 CDR,

[0114] b) 如 SEQ ID NO:4 所示可变轻链内所含有的 CDR,

[0115] c) 来自人抗体的支撑所述 CDR 的框架,

[0116] 其中该恒定重链和恒定轻链来自人抗体。优选地,所述可变重链内含有的所述 CDR 具有 SEQ ID NO:15,16 或 21,和 17。优选地,所述可变轻链内含有的所述 CDR 具有 SEQ ID NO:18,19 和 20。

[0117] 在一个具体的实施方案中,抗体分子在 Fc 结构域中具有一个或多个突变,其调节一种或多种效应器功能,优选地,效应器功能的所述调节是增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,优选地, Fc 结构域中的所述一个或多个突变是位置 239 和 332,或 236 和 332,或 236、239 和 332 的组合替换,该编码是根据 Kabat EU 编码索引,优选地,所述替换是 I332E 和 S239D 或 I332E 和 G236A,或 S239D、I332E 和 G236A。

[0118] 在一个优选实施方案中, CD37 抗体具有包含 SEQ ID NO:11 氨基酸序列的重链且

优选具有包含 SEQ ID NO:12 氨基酸序列的轻链。更优选的是, CD37 抗体具有包含 SEQ ID NO:13 氨基酸序列的重链且优选具有包含 SEQ ID NO:14 氨基酸序列的轻链。

[0119] 本发明抗体中的 Fc 变异体根据构成它们的氨基酸修饰加以定义。因此, 例如, I332E 是相对于亲本 Fc 多肽具有 I332E 替换的 Fc 变异体。类似地, S239D/I332E 是相对于亲本 Fc 多肽具有 S239D 和 I332E 替换的 Fc 变异体, 而 S239D/I332E/G236A 是相对于亲本 Fc 多肽具有 S239D、I332E 和 G236A 替换的 Fc 变异体。

[0120] 编码是根据 EU 编码方案 (Kabat et al., 1991, 见上文), 其参考 EU 抗体的编码 (Edelman et al. Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, 1969)。本领域的技术人员会意识到, 这些规则 (convention) 由免疫球蛋白序列特定区域内的非顺序编码构成, 从而能够对免疫球蛋白家族中的保守位置实现标准化参考。

[0121] 在上述抗体中, 替换位置 236, 239 和 332 分别相应于 SEQ ID NO:7 所示 IgG1 重链的位置 119、122 和 215。在 SEQ ID NO:5、9、11 和 13 所示抗体 A2、A4、B2 和 B4 的重链全长序列中, 被替换的氨基酸位于 235、238 和 331 位。

[0122] 在本发明的一个具体实施方案中, 所述 B 细胞恶性肿瘤选自: B 细胞淋巴瘤、霍奇金病、B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症 (也称作淋巴浆细胞淋巴瘤或免疫细胞瘤)、中枢神经系统淋巴瘤、白血病、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL; 也称作 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 BCLL)、毛细胞白血病、慢性成肌细胞白血病、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、B 细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞性骨髓瘤、孤立性骨浆细胞瘤、骨外浆细胞瘤、粘膜相关 (MALT) 淋巴组织结外边缘区 B 细胞淋巴瘤、结边缘区 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、侵袭性 B 细胞淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞性淋巴瘤、纵隔 (胸腺) 大 B 细胞性淋巴瘤、血管内大 B 细胞性淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤 / 白血病、灰区淋巴瘤、恶性潜能未定型 B 细胞增生、淋巴瘤样肉芽肿病和移植后淋巴增生性疾病。优选地, 所述 B 细胞恶性肿瘤是 CLL。

[0123] 本发明还涉及从 TP53 缺陷细胞的群体清除表达 CD37 的 B 细胞的方法, 包括向所述细胞的群体给药 CD37 抗体或包含 CD37 抗体的药物组合物以及药学上可接受的赋形剂或载体。优选地, 所述方法在体外进行。

[0124] 在一个具体实施方案中, 所述方法的所述 CD37 抗体是包含如下的抗体: a) 如 SEQ ID NO:2 所示可变重链内所含有的 CDR, 和 b) 如 SEQ ID NO:4 所示可变轻链内所含有的 CDR。可用于所述清除方法的这些 CD37 抗体的具体实施例如上所述。

[0125] 除非特别指出, 本发明的实践将采用本领域技术人员已知的传统的细胞生物学、分子生物学、细胞培养、免疫等技术。这些技术在当前文献中有完全的公开。

[0126] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请指示了本发明所属领域中技术人员的技术水平。本文引入这里所用所有出版物和专利申请的全部内容作为参考, 以便更完全地公开本发明所属领域的现状。通过参考下面的实施例将能够更容易地理解在上面一般性公开的本发明, 这些实施例只是出于对本发明的某些实施方案举例说明的目的。下面的实施例并非限制性。它们仅仅显示了本发明可能的实施方案。本领域的技术人员可以容易地对条件进行调整以便将它应用于其它的实施方案。

[0127] 实验

[0128] 材料和方法

[0129] 在一系列 CLL 患者样品中,对数种抗体(A2、B2、利妥昔单抗、阿仑单抗)的 CLL 细胞清除活性进行了体外研究。根据遗传(遗传异常、TP53 突变、17p13 缺失)以及临床过程和免疫表型对 CLL 样品进行了表征。TP53 突变状态可以通过如 Zenz 等所述的自动荧光测序(Zenz T, **Kröber A**, Scherer K, **Häbe S**, Bühler A, Benner A, Denzel T, Winkler D, Edelmann J, **Schwänen C**, **Döhner H**, Stilgenbauer S. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. Blood. 2008 Oct 15; 112(8):3322-9. Epub 2008 Aug 8.) 或者通过本领域已知的其它合适方法(例如 Coll-Mulet et al., Multiplex ligation-dependent probe amplification for detection of genomic alterations in chronic lymphocytic leukaemia., Br J Haematol. 2008 Sep; 142(5):793-801. Epub 2008 Jun 17 所述的方法)对 p53 DNA 结合结构域的编码外显子(例如外显子 4-10)或其它相关外显子进行测序加以确定。遗传变异(例如染色体 17p13 缺失)和 VH 状态(例如 IGVH 突变状态)的分析可以如文献中所述地进行(例如 **Döhner** et al., Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2000 Dec 28; 343(26):1910-6; **Kröber** et al., Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol. 2006 Feb 20; 24(6):969-75. Epub 2006 Jan 17.)。荧光原位杂交(FISH)是一种本领域已知的广泛使用的方法,用于检测遗传异常和染色体缺失,例如 17p13 缺失(**Döhner** et al., 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. Blood. 1997 Apr 1; 89(7):2516-22.)。

[0130] 为了研究对 CLL 的影响,我们在全血培养系统体外处理之后,平行地对利妥昔单抗和阿仑单抗与 CD37 抗体进行了评估。将 20 μ l 抗体稀释于 PBS 中,并添加到 180 μ l 肝素化或 ACD(酸-柠檬酸盐-葡萄糖)血液中,在恒定振荡下在 48 孔板中室温孵育 3 小时或 8 小时。之后,将等份的血液-抗体混合物转移到 BD TruCount 管中,添加 20 μ l FITC 标记的 CD19 抗体用于鉴定 CLL 细胞。红细胞裂解后,用 FACS Calibur 流式细胞仪对样品进行测量。活 CLL 细胞通过其 CD19 阳性和在侧向散射中的形态加以确定。活 CLL 细胞的定量通过使用荧光标记的珠子作为内标来进行,在 TruCount 管中含有已知数目的所述荧光标记珠子。浓度响应曲线用 GraphPad Prism 软件包 5.02 版计算。

实施例**[0131] 实施例 1: CLL 全血测定**

[0132] 用全血测定评估抗体治疗对来自 CLL 患者全血样品中 CLL 细胞的影响。向肝素化或酸-柠檬酸盐-葡萄糖血液中添加浓度递增(0.001 μ g/ml 至 100 μ g/ml)的抗体 A2 和 B2,并在室温孵育 3 小时。抗体孵育后,通过 FACS 分析用定量测定确定剩余的活 CLL 细胞(CD19 阳性)。如图 1 所示, A2 和 B2 均能强效地清除 CLL 细胞, EC_{50} 值为大约 1000 ng/ml。高抗体浓度下 CLL 细胞的平均最大清除度, A2 为超过 90%, B2 为大约 75%。这些数据证明,

抗体 A2 和 B2 在体外能够强效且浓度依赖性地从 CLL 患者全血样品中清除 CLL 细胞。

[0133] 实施例 2 :CLL 全血测定 :与利妥昔单抗和阿仑单抗比较

[0134] 为了将 A2 和 B2 的效果与已批准的 CLL 治疗抗体进行比较,在同一病人样品中平行地对 CD20 抗体利妥昔单抗和 CD52 抗体阿仑单抗进行了测试。如图 2 所示,在 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗体浓度下孵育 3 小时后,A2(9% 活细胞)和 B2(26% 活细胞)的 CLL 细胞清除明显优于使用阿仑单抗(71% 活细胞)和利妥昔单抗(80% 活细胞)所观察到的结果。这些数据证明,在来自 CLL 患者的全血样品中,A2 和 B2 的 CLL 细胞清除程度明显优于用利妥昔单抗和阿仑单抗所观察到的结果。

[0135] 实施例 3 :CLL 全血测定 :不同患者危险群体的比较

[0136] 我们特别感兴趣于 A2 和 B2 在遗传异常病例(例如 TP53 突变或 17p13 缺失)、氟达拉滨难治病例和在抗-20 治疗失败后的患者中的作用。这些病例一般被认为是“高危”或“超高危”患者群体。为此,对来自 19 位(图 3A)-21 位(图 3B)患者的血液样品进行了表征,包括 10 位高危或超高危群患者和 9 位(图 3A)-11 位(图 3B)没有任何特殊危险特征的患者样品(图 3B)。高危或超高危患者群体包括具有 17p13 缺失、TP53 突变的患者,氟达拉滨难治的患者和抗 CD20 治疗后的患者。我们比较了高危群或超高危群(17p13 缺失、TP53 突变、氟达拉滨难治、抗-CD20 治疗后;图 3B 中 $n=10$)和其余没有任何特殊危险的患者(图 3A 中 $n=9$;图 3B 中 $n=10$)中的 CLL 细胞清除。对于两种抗体 A2 和 B2,在两种危险群体中的 CLL 细胞清除均较高,即在 $10 \mu\text{g/ml}$,A2 平均剩余 CLL 细胞:正常危险 11.1%(8 小时),高危 21.3%; $10 \mu\text{g/ml}$ B2 的平均剩余 CLL 细胞:正常危险 33.2%(8 小时),高危 43.1%(图 3B)。如图 3 所示,特别是图 3B,在所有被研究的患者亚群中,A2 和 B2 的效力均明显优于利妥昔单抗和阿仑单抗。这些分析的结果证明,抗体 A2 和 B2 在所有被研究的患者亚群中均显示优良的 CLL 清除活性,并且特别适合于治疗具有更高治疗失败危险的 CLL 患者。

[0137] 实施例 4 :抗体 A2 和 B2 显示与 Fc γ 受体 3a 高度结合

[0138] 抗体 A2 和 B2 与 Fc- γ 受体 3a 的亲合性通过表面等离子体共振分析(SFP)加以确定(Edwards and Leatherbarrow,Determination of Association Rate Constants by an Optical Biosensor Using Initial Rate Analysis.Analytical Biochemistry246,1-6,1997;Nieba et al.,Competition BIAcore for Measuring True Affinities:Large Differences from Values Determined from Binding Kinetics.Analytical Biochemistry234,155-165,1996)。简而言之,将重组 Fc- γ 受体 3a 蛋白的高亲和性同种异型 V158 或低亲和性同种异型 F158 涂布在传感器表面,并用通过 SFP 确定的复合物形成率(k_a)和解离率(k_d)计算抗体 A2 和 B2 的解离常数 K_D 。非 Fc- 工程化的 IgG1 型抗体用作对照抗体。A2 显示对 V158 同种异型的 K_D 为 8.8nM,对 F158 同种异型的 K_D 为 17.5nM,相似地,B2 显示的 K_D 分别为 9.3 和 21.1nM。不同的是,非 Fc- 工程化的 IgG1 型对照抗体显示与高亲和性同种异型 V158 的 K_D 为 379nM,与低亲和性同种异型 F158 的 K_D 为 1400nM。总之,抗体 A2 和 B2 与 Fc- γ 受体 3a V158 的结合增加大约 40 倍,与 Fc- γ 受体 3a F158 的结合增加大约 60 倍-80 倍,这预期会使抗体依赖性细胞毒性(ADCC)大幅增加,并提高 A2 和 B2 的临床效力。

[0001]

序列表

<110> 贝林格尔,英格海姆国际有限公司 (Boehringer Ingelheim International GmbH)

<120> CD37 抗体在 CLL 血液样品中的优良效力

<130> P01-2642 pct

<160> 21

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 348

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 1

```

gcggtccagc tgcagcagtc tggaccagag ctggaaaagc ctggcgccttc agtgaagatt      60
tcttgaagg ctcttggtta ctcattcact ggcatacata tgaactgggt gaagcagaat      120
aatggaaaga gccttgagtg gatggaaat attgatcctt attatggtgg tactacctac      180
aaccggaagt tcaagggtca gccacattg acgttagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca agagcttgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatcggtc      300
ggccctaagg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcttct      348

```

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

```

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

```

```

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20          25          30

```

```

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35          40          45

```

```

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

```

```

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

```

```

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

```

```

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100         105         110

```

```

Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 3

<211> 324

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 3

```

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga gactgtcacc      60
atcacatgtc gaacaagtga aaatgtttac agttatttgg ctgtgtatca gcagaaacag      120

```

[0002]

```

ggaaaatcgc ctcagctccct ggctctcttt gcaaaaacct tagcagaagg tggccatca 180
aggcticagtg scagtggatc aggcaacacag tttctctga agateagcag cctgcagcct 240
gaagattctg gaagttatit ctgtcaacat cattccgata atccgtggac gttcgggtgga 300
ggcaccgaac tggagatcaa acga 324

```

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 4

```

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

```

```

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
20           25           30

```

```

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

```

```

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

```

```

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
85           90           95

```

```

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg
100          105

```

<210> 5
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成构建体重链 A2

<400> 5

```

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

```

```

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20           25           30

```

```

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35           40           45

```

```

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

```

```

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

```

```

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

```

```

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100          105          110

```

[0003]

```

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115                      120                      125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130                      135                      140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                      150                      155                      160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165                      170                      175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180                      185                      190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195                      200                      205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210                      215                      220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225                      230                      235                      240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245                      250                      255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260                      265                      270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275                      280                      285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290                      295                      300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                      310                      315                      320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
325                      330                      335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340                      345                      350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355                      360                      365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370                      375                      380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                      390                      395                      400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405                      410                      415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420                      425                      430

```

[0004]

```

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
  435                440                445

<210> 6
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体轻链 A2

<400> 6

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
  20                25                30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
  50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                70                75                80

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
  85                90                95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
  115               120               125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
  130               135               140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
  145               150               155               160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
  165               170               175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
  180               185               190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
  195               200               205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210

<210> 7
<211> 330
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体恒定重链

```

[0005]

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0006]

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

<210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成构建体恒定轻链

<400> 8

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

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

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 9
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 合成构建体重链 A4

<400> 9

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110

[0007]

```

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115                      120                      125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130                      135                      140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                      150                      155                      160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165                      170                      175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180                      185                      190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195                      200                      205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210                      215                      220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
225                      230                      235                      240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245                      250                      255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260                      265                      270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275                      280                      285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290                      295                      300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                      310                      315                      320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
325                      330                      335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340                      345                      350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355                      360                      365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370                      375                      380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                      390                      395                      400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405                      410                      415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420                      425                      430

```

[0008]

```

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
  435                440                445

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体轻链 A4

<400> 10
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                5                10                15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
  20                25                30

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

Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
  50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                70                75                80

Glu Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
  85                90                95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
  115               120               125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
  130               135               140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
  145               150               155               160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
  165               170               175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
  180               185               190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
  195               200               205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
  210

<210> 11
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体重链 B2

```

[0009]

<400> 11

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

[0010]

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成构建体轻链 B2
 <400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

[0011]

```

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                150                155                160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165                170                175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180                185                190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195                200                205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 合成构建体重链 B4

<400> 13

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
20     25     30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65     70     75     80

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

Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100    105    110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115    120    125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130    135    140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145    150    155    160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165    170    175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180    185    190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195    200    205

```

[0012]

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Ala Gly Pro Asp Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 14
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 合成构建体轻链 B4
 <400> 14
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30

[0013]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Ser Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> CDR1 重链 (H1)

<400> 15

Gly Tyr Asn Met Asn
 1 5

<210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> CDR2 重链 (H2)

<400> 16

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

[0014]

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> CDR3 重链 (H3)

<400> 17

Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> CDR1 轻链 (L1)

<400> 18

Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> CDR2 轻链 (L2)

<400> 19

Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> CDR3 轻链 (L3)

<400> 20

Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 替代性 CDR2 重链 (H2b)

<400> 21

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg
 1 5 10

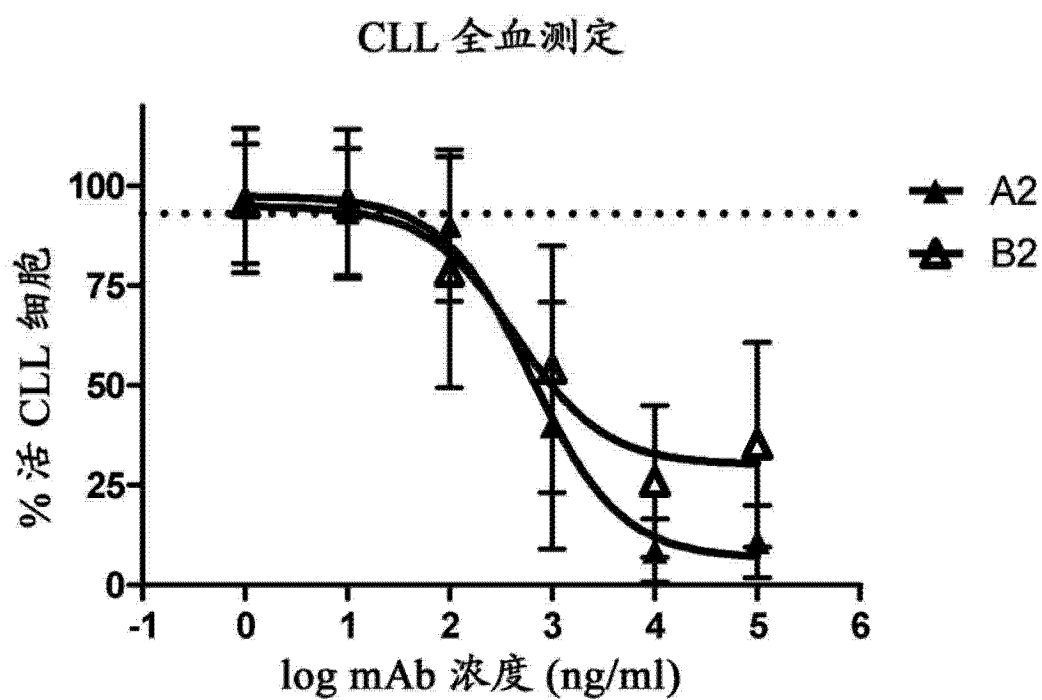


图 1

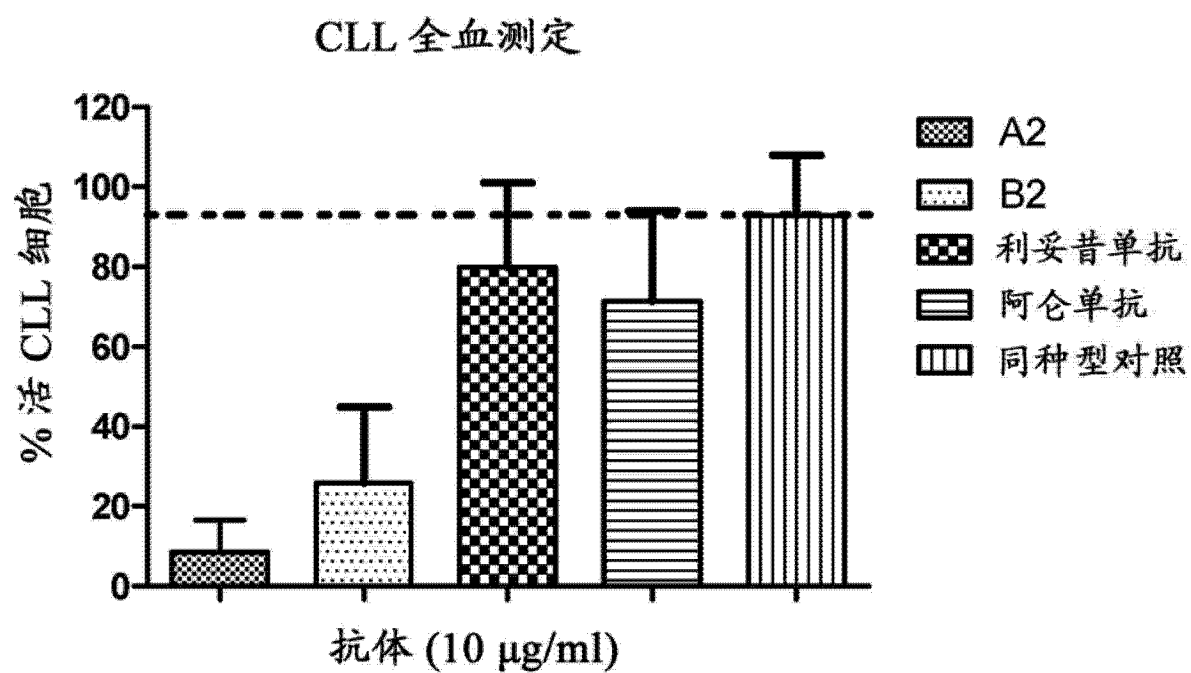


图 2

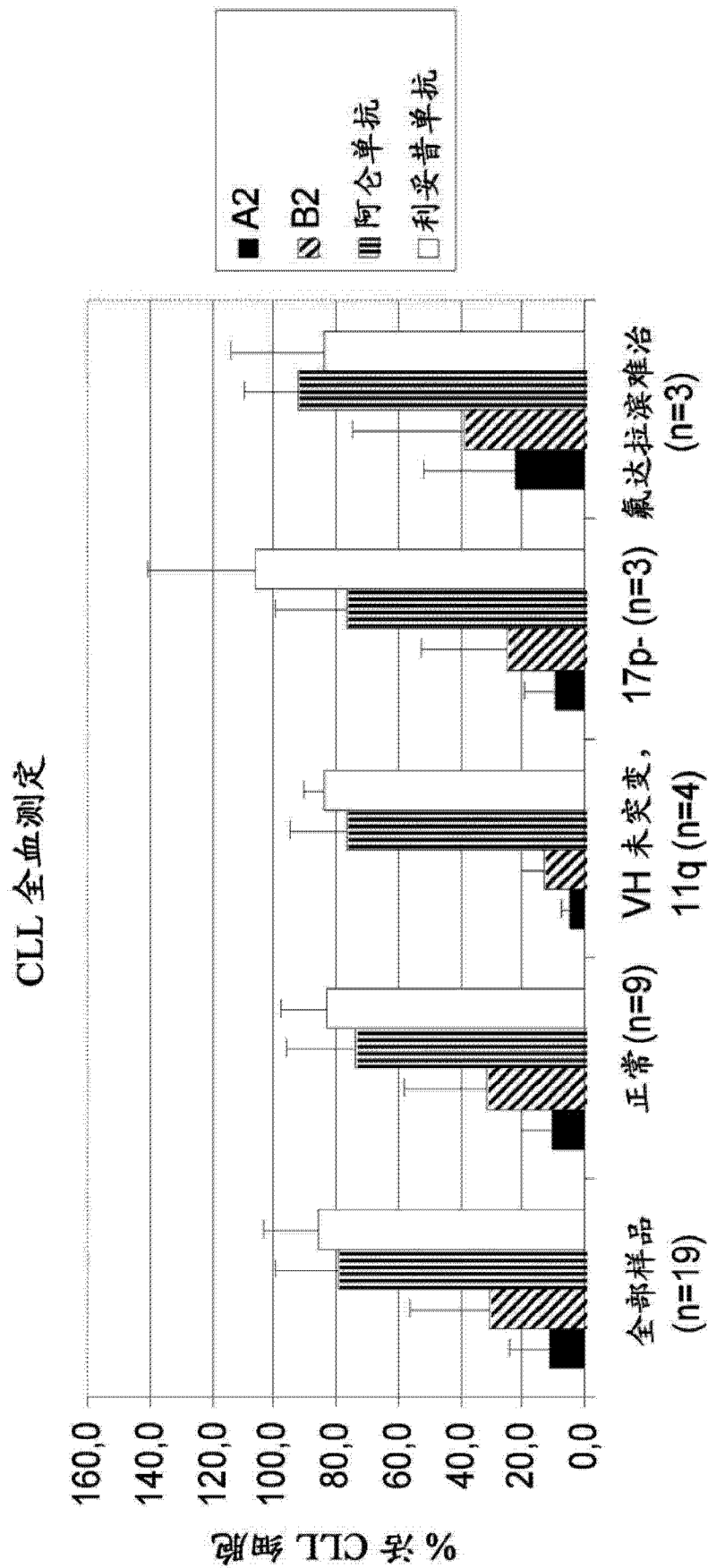


图 3(A)

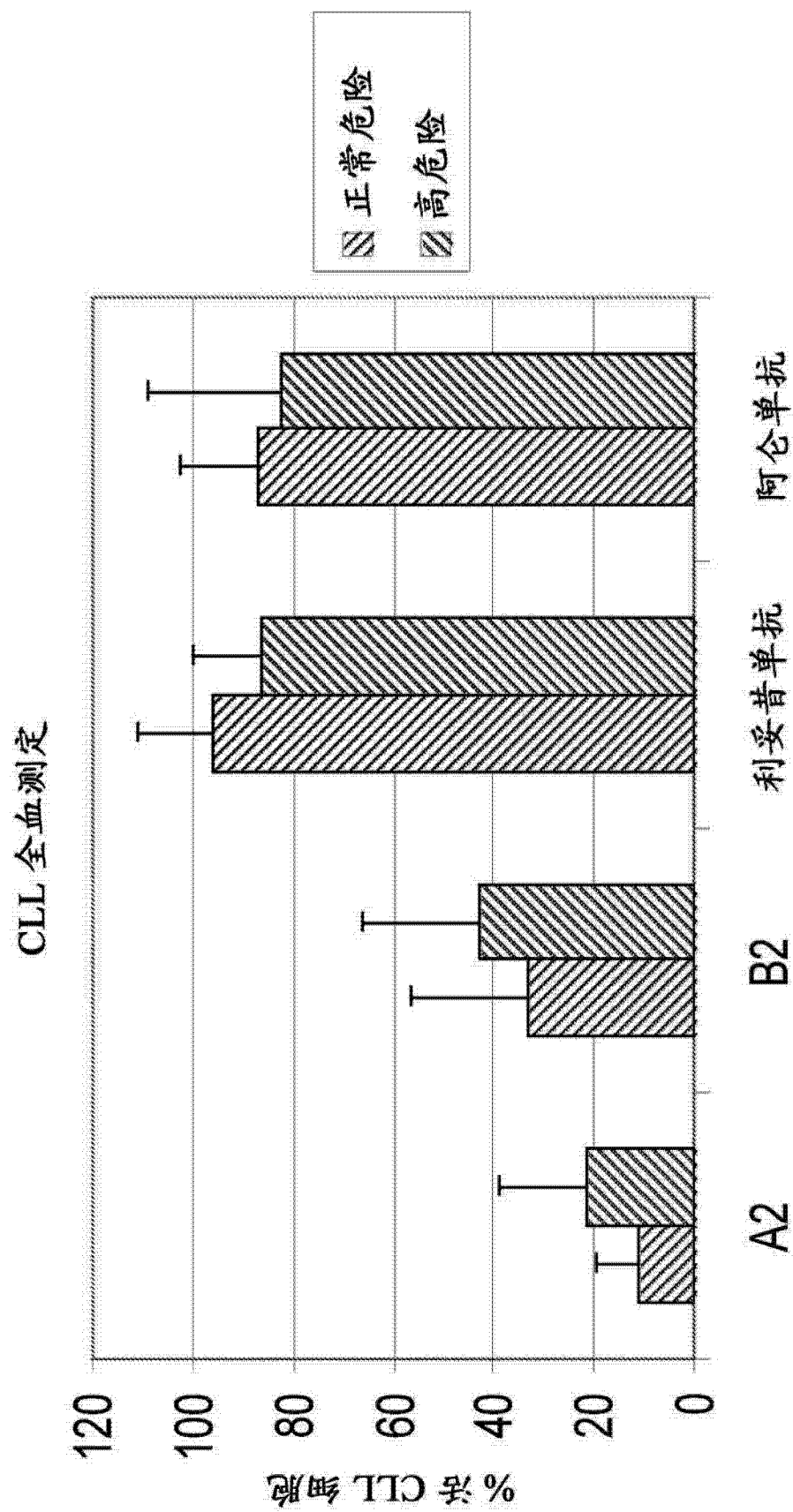


图 3(B)

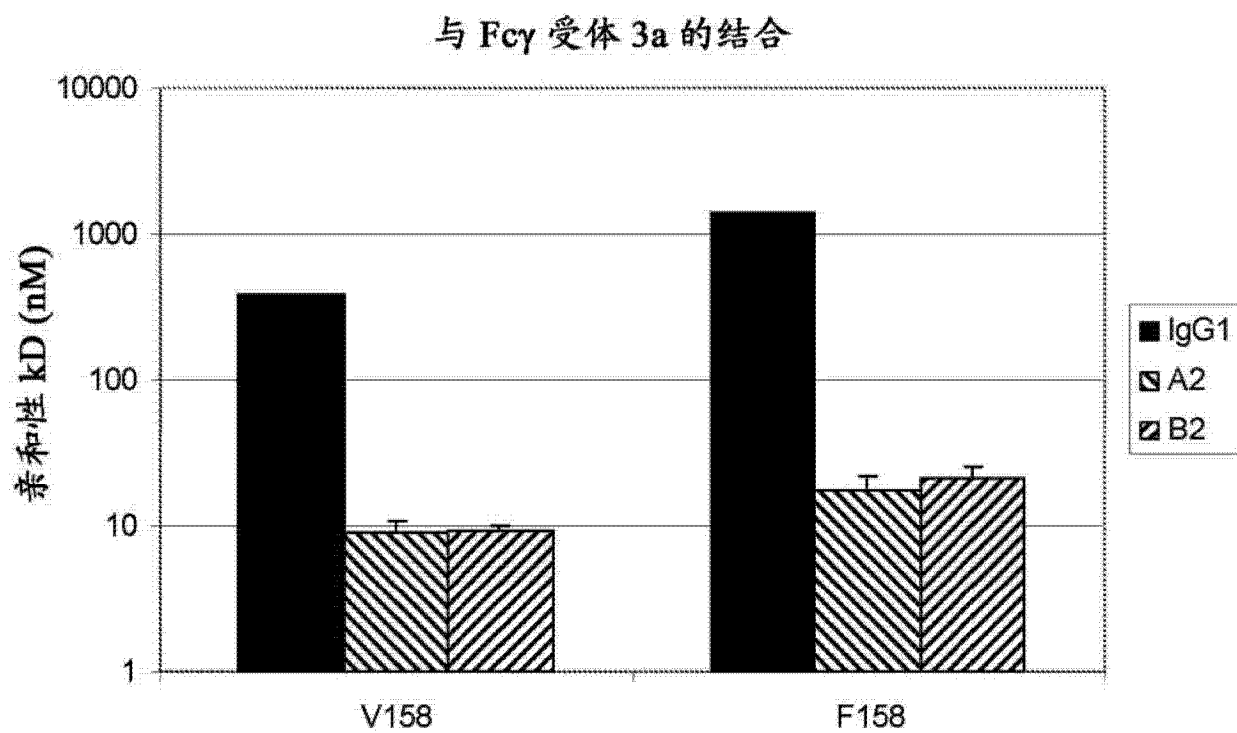


图 4