



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103709250 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 09

(21) 申请号 201310412401. 3	A61P 35/02 (2006. 01)
(22) 申请日 2003. 10. 17	A61P 17/06 (2006. 01)
(30) 优先权数据	A61P 17/00 (2006. 01)
60/419, 163 2002. 10. 17 US	A61P 19/02 (2006. 01)
60/460, 028 2003. 04. 02 US	A61P 1/00 (2006. 01)
(62) 分案原申请数据	A61P 1/04 (2006. 01)
200380106690. 9 2003. 10. 17	A61P 11/00 (2006. 01)
(71) 申请人 根马布股份公司	A61P 11/00 (2006. 01)
地址 丹麦哥本哈根	A61P 13/12 (2006. 01)
(72) 发明人 J. 特伊龄 S. 鲁尔斯 M. 格兰尼	A61P 11/06 (2006. 01)
J. G. J. 范德温克尔 P. 帕仁	A61P 9/10 (2006. 01)
J. 比得森 O. D. M. S. 巴德斯伽德	A61P 25/28 (2006. 01)
H. 黄	A61P 9/14 (2006. 01)
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司	A61P 27/02 (2006. 01)
司 72001	A61P 7/04 (2006. 01)
代理人 刘健 万雪松	A61P 7/06 (2006. 01)
(51) Int. Cl.	A61P 7/00 (2006. 01)
C07K 16/28 (2006. 01)	A61P 21/04 (2006. 01)
C12N 15/13 (2006. 01)	A61P 37/02 (2006. 01)
C12N 5/20 (2006. 01)	A61P 29/00 (2006. 01)
C12N 5/10 (2006. 01)	A61P 43/00 (2006. 01)
A01H 5/00 (2006. 01)	A61P 31/18 (2006. 01)
A01K 67/027 (2006. 01)	A61P 31/22 (2006. 01)
C07K 16/46 (2006. 01)	G01N 33/68 (2006. 01)
A61K 39/395 (2006. 01)	G01N 33/577 (2006. 01)
A61K 47/48 (2006. 01)	C12N 15/85 (2006. 01)
A61K 48/00 (2006. 01)	C07K 16/42 (2006. 01)
A61P 35/00 (2006. 01)	

权利要求书8页 说明书67页
序列表21页 附图62页

(54) 发明名称 抗 CD20 的人单克隆抗体 和杂交瘤, 以及利用所述人抗体的治疗和诊断方法。

(57) 摘要

公开了分离的结合并抑制人 CD20 的人单克隆抗体, 以及相关的基于抗体的组合物和分子。所述人抗体可以通过转染瘤或在非人转基因动物, 例如, 转基因小鼠中进行生产, 所述转基因动物能够通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生多同种型的人单克隆抗体。还公开了含有所述人抗体的药物组合物, 产生所述人抗体的非人转基因动物

1. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合人 CD20。
2. 权利要求 1 的抗体,所述抗体选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、分泌型 IgA、IgD 和 IgE 抗体。
3. 权利要求 2 的抗体,其中所述抗体为 IgG1 抗体。
4. 权利要求 2 的抗体,其中所述抗体为 IgG3 抗体。
5. 权利要求 2 的抗体,其中所述抗体为 IgG4 抗体。
6. 权利要求 2 的抗体,其中所述抗体为 IgA1 或 IgA2 抗体。
7. 上述权利要求任一项的抗体,其中所述抗体以大约 10^{-5} 秒⁻¹ 或更小的解离速率常数从人 CD20 上解离下来。
8. 上述权利要求任一项的抗体,其中所述抗体以大约 5nM 或更小的亲和常数 (K_D) 结合人 CD20。
9. 上述权利要求任一项的抗体,其中所述抗体具有一种或多种选自下列的特性:
 - (i) 能够在补体存在时诱导表达 CD20 的细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC);
 - (ii) 能够在补体存在时诱导表达 CD20 的细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和高水平的 CD55 和 / 或 CD59;
 - (iii) 能够诱导表达 CD20 的细胞的凋亡;
 - (iv) 能够在效应细胞存在时诱导表达 CD20 的细胞的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC);
 - (v) 能够诱导表达 CD20 的细胞的同型粘着;
 - (vi) 能够在结合 CD20 后转位至脂筏中;
 - (vii) 能够延长患表达 CD20 的肿瘤细胞的个体的存活;
 - (viii) 能够消除表达 CD20 的细胞;和
 - (ix) 能够消除表达低水平的 CD20 的细胞 (CD20^{Low} 细胞)。
10. 权利要求 9 的抗体,其中所述抗体具有一种或多种选自下列的特性:
 - (i) 能够在 33vol/vol% 血浆存在时在 3 小时内于 37°C 以 10 μ g/ml 的抗体浓度诱导至少 20%, 优选至少 30% 的 CDC 介导的 B-CLL 细胞的裂解;
 - (ii) 能够在 33vol/vol% 全血细胞存在时在 3 小时内于 37°C 以 10 μ g/ml 的抗体浓度诱导至少 20%, 优选至少 30% 的 B-CLL 细胞的裂解;
 - (iii) 能够以 20 μ g 的剂量延长用 Daudi 细胞注射的 SCID 小鼠的 50% 存活率超过 30%;和
 - (iv) 能够于 6. 25mg/kg 每天的剂量连续给药 4 天,在食蟹猴中消除表达低水平的 CD20 的外周 B 细胞 (CD20^{Low} B 细胞) 至不能检测到的水平持续超过 50 天。
11. 权利要求 10 的抗体,所述抗体能够在 33vol/vol% 血浆存在时在 3 小时内于 37°C 以 10 μ g/ml 的抗 CD20 抗体浓度诱导至少 20%, 优选至少 30% 的 CDC 介导的 B-CLL 细胞的裂解。
12. 由人重链和人 κ 轻链核酸所编码的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链核酸在其可变区分别包含如 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :3 所示的核苷酸序列,及其保守性序列修饰物。
13. 由人重链和人 κ 轻链核酸所编码的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链核酸在其可变区分别包含如 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :7 所示的核苷酸序

列,及其保守性序列修饰物。

14. 由人重链和人 κ 轻链核酸所编码的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链核酸在其可变区分别包含如 SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :11 所示的核苷酸序列,及其保守性序列修饰物。

15. 具有人重链和人 κ 轻链可变区的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链可变区分别包含如 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列,及其保守性序列修饰物。

16. 具有人重链和人 κ 轻链可变区的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链可变区分别与如 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列至少 90% 同源,优选至少 95% 同源,更加优选至少 98% 或至少 99% 同源。

17. 具有人重链和人 κ 轻链可变区的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链可变区分别包含如 SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列,及其保守性序列修饰物。

18. 具有人重链和人 κ 轻链可变区的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链可变区分别与如 SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列至少 90% 同源,优选至少 95% 同源,更加优选至少 98% 或至少 99% 同源。

19. 具有人重链和人 κ 轻链可变区的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链可变区分别包含如 SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸序列,及其保守性序列修饰物。

20. 具有人重链和人 κ 轻链可变区的上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述人重链和人 κ 轻链可变区分别与如 SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :12 所示的氨基酸序列至少 90% 同源,优选至少 95% 同源,更加优选至少 98% 或至少 99% 同源。

21. 上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述抗体包含至少一种选自:

(i) SEQ ID NOs :2、4、6、8、10 或 12 ;和

(ii) 一种与上面 (i) 中所示氨基酸序列的任一项至少 90% 同源,优选至少 95% 同源,更加优选至少 98% 或至少 99% 同源的序列的人可变区。

22. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合人 CD20 上的抗原表位,所述抗原表位由权利要求 12-21 任一项的抗体所定义。

23. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合 CD20 上的抗原表位,所述抗原表位

(i) 不包含或不需要位置 172 上的氨基酸残基脯氨酸;

(ii) 不包含或不需要位置 170 上的氨基酸残基丙氨酸或位置 172 上的脯氨酸;

(iii) 不包含或不需要位置 163 上的氨基酸残基天冬酰胺或位置 166 上的天冬酰胺;

(iv) 不包含或不需要位置 172 上的氨基酸残基脯氨酸,但包含或需要位置 163 上的氨基酸残基天冬酰胺或位置 166 上的天冬酰胺;或

(v) 不包含或不需要位置 170 上的氨基酸残基丙氨酸或位置 172 上的脯氨酸,但包含或需要位置 163 上的氨基酸残基天冬酰胺或位置 166 上的天冬酰胺。

24. 一种结合 CD20 的分离的人单克隆抗体,其中该抗体具有一种或多种下列特性:

(i) 以至少与结合人 CD20 相同的亲和力结合突变体 P172S CD20 (位置 172 上的脯氨酸突变为丝氨酸);

(ii) 以至少与结合人 CD20 相同的亲和力结合突变体 AxP(位置 170 上的丙氨酸突变为丝氨酸,并且位置 172 上的脯氨酸突变为丝氨酸);

(iii) 与人 CD20 相比于 10 μ g/ml 的抗体浓度显示减弱 50% 或更多的结合突变体 N166D(位置 166 上的天冬酰胺突变为天冬氨酸);或

(iv) 与人 CD20 相比于 10 μ g/ml 的抗体浓度显示减弱 50% 或更多的结合突变体 N163D(位置 163 上的天冬酰胺突变为天冬氨酸)。

25. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合人 CD20 的小的第一胞外环上的抗原表位。

26. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合 CD20 上的不连续抗原表位。

27. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合 CD20 上的不连续抗原表位,其中该抗原表位包含第一小胞外环的部分和第二胞外环的部分。

28. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合 CD20 上的不连续抗原表位,其中该抗原表位具有小的第一胞外环的残基 AGIYAP 和第二胞外环的残基 MESLNFIRAHTPYI。

29. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体具有权利要求 11-28 任一项的抗体的结合特性。

30. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合包含至少一种选自:

(i) SEQ ID NOs :13、14、15、16、17 或 18 ;

(ii) (i) 中所列序列的保守性序列修饰物 ;和

(iii) 保留结合人 CD20 能力的在 (i) 或 (ii) 中定义的任一种序列的片段的 CDR 序列的人 CD20。

31. 权利要求 30 的抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO :15。

32. 权利要求 30 的抗体,所述抗体包含选自:

(i) SEQ ID NOs :13、14、15、16、17 或 18 ;

(ii) (i) 中所列序列的保守性序列修饰物 ;和

(iii) 保留结合人 CD20 能力的在 (i) 或 (ii) 中定义的任一种序列的片段的至少四种 CDR 序列。

33. 权利要求 30 的抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO :13、14、15、16、17 和 18。

34. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合包含至少一种选自:

(i) SEQ ID NOs :19、20、21、22、23 或 24 ;

(ii) (i) 中所列序列的保守性序列修饰物 ;和

(iii) 保留结合人 CD20 能力的在 (i) 或 (ii) 中定义的任一种序列的片段的 CDR 序列的人 CD20。

35. 权利要求 34 的抗体,所述抗体包含选自:

(i) SEQ ID NOs :19、20、21、22、23 或 24 ;

(ii) (i) 中所列序列的保守性序列修饰物 ;和

(iii) 保留结合人 CD20 能力的在 (i) 或 (ii) 中定义的任一种序列的片段的至少四种 CDR 序列。

36. 权利要求 34 的抗体,所述抗体包含 SEQ ID NOs :19、20、21、22、23 和 24。

37. 一种分离的人单克隆抗体,所述抗体结合包含至少一种选自:

(i) SEQ ID NOs :25、26、27、28、29 或 30 ;
(ii) (i) 中所列序列的保守性序列修饰物 ;和
(iii) 保留结合人 CD20 能力的在 (i) 或 (ii) 中定义的任一种序列的片段的 CDR 序列的人 CD20。

38. 权利要求 37 的抗体,所述抗体包含 SEQ ID NO :27。

39. 权利要求 37 的抗体,所述抗体包含选自 :

(i) SEQ ID NOs :25、26、27、28、29 或 30 ;
(ii) (i) 中所列序列的保守性序列修饰物 ;和
(iii) 保留结合人 CD20 能力的在 (i) 或 (ii) 中定义的任一种序列的片段的至少四种 CDR 序列。

40. 权利要求 39 的抗体,所述抗体包含 SEQ ID NOs :25、26、27、28、29 和 30。

41. 上述权利要求 1-11 任一项的抗体,所述抗体包含选自 :

(i) SEQ ID NOs :13、19 或 25,或具有 SEQ ID NOs :13、19 或 25 序列的 1 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(ii) SEQ ID NOs :14、20 或 26,或具有 SEQ ID NOs :14、20 或 26 序列的 1-4 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(iii) SEQ ID NOs :15 或 27,或具有 SEQ ID NOs :15 或 27 序列的 1-4 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(iv) SEQ ID NO :16,或具有 SEQ ID NOs :16 序列的 1-2 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(v) SEQ ID NO :17,或具有 SEQ ID NOs :17 序列的 1-2 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(vi) SEQ ID NOs :18 或 30,或具有 SEQ ID NOs :18 或 30 序列的 1-2 个氨基酸取代、缺失或添加的序列的至少一种 CDR。

42. 权利要求 41 的抗体,所述抗体包含选自 :

(i) SEQ ID NOs :13、19 或 25,或具有 SEQ ID NOs :13、19 或 25 序列的 1 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(ii) SEQ ID NOs :14、20 或 26,或具有 SEQ ID NOs :14、20 或 26 序列的 1-4 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(iii) SEQ ID NOs :15 或 27,或具有 SEQ ID NOs :15 或 27 序列的 1-4 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(iv) SEQ ID NO :16,或具有 SEQ ID NOs :16 序列的 1-2 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(v) SEQ ID NO :17,或具有 SEQ ID NOs :17 序列的 1-2 个氨基酸取代、缺失或添加的序列 ;

(vi) SEQ ID NOs :18 或 30,或具有 SEQ ID NOs :18 或 30 序列的 1-2 个氨基酸取代、缺失或添加的序列的至少四种 CDR。

43. 权利要求 41 的抗体,所述抗体包含一种选自

SEQ ID NOs :15 或 27,或具有 SEQ ID NOs :15 或 27 序列的 1-4 个氨基酸取代、缺失或

添加的序列。

44. 上述权利要求任一项的抗体,该抗体为选自:完整的 IgG1 抗体、完整的 IgG2 抗体、完整的 IgG3 抗体、完整的 IgG4 抗体、完整的 IgM 抗体、完整的 IgA1 抗体、完整的 IgA2 抗体、完整的分泌型 IgA 抗体、完整的 IgD 抗体和完整的 IgE 抗体的完整抗体,其中所述抗体在真核细胞中进行糖基化。

45. 上述权利要求任一项的抗体,所述抗体是一个抗体片段或单链抗体。

46. 上述权利要求任一项的抗体,所述抗体是一种结合结构域免疫球蛋白融合蛋白,包含 (i) 以融合到免疫球蛋白铰链区多肽上的如权利要求 24 中所定义的重链可变区或轻链可变区形式存在的结合结构域多肽, (ii) 融合到铰链区上的免疫球蛋白重链 CH2 恒定区,和 (iii) 融合到 CH2 恒定区上的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区。

47. 上述权利要求任一项的抗体,所述抗体由包括获自转基因非人动物并且与永生化细胞融合的 B 细胞的杂交瘤产生,在所述非人动物中 V-(D)-J 基因片段重排导致功能性人重链转基因和功能性人轻链转基因的形成。

48. 一种杂交瘤,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的获自转基因非人动物的 B 细胞,其中所述杂交瘤产生上述权利要求任一项的可检测量的单克隆抗体,在所述非人动物中 V-(D)-J 基因片段重排导致功能性人重链转基因和功能性人轻链转基因的形成。

49. 一种杂交瘤,所述杂交瘤产生由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码的人单克隆抗体,所述人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸在其可变区分别包含如 SEQ ID NO:1、5 或 9 和 SEQ ID NO:3、7 或 11 所示的核苷酸序列,及其保守性序列修饰物。

50. 一种杂交瘤,所述杂交瘤产生具有 IgG 重链和 κ 轻链可变区的人单克隆抗体,所述 IgG 重链和 κ 轻链可变区分别包含如 SEQ ID NO:2、6 或 10 和 SEQ ID NO:4、8 或 12 所示的氨基酸序列,及其保守性序列修饰物。

51. 由转染瘤产生的权利要求 1-45 任一项的抗体,所述转染瘤包含编码人重链和人轻链的核酸。

52. 一种包含编码人重链和人轻链的核酸的转染瘤,其中该转染瘤产生可检测量的权利要求 1-45 任一项的抗体。

53. 一种转染瘤,它产生由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码的人单克隆抗体,所述人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸在其可变区分别包含如 SEQ ID NO:1、5 或 9 和 SEQ ID NO:3、7 或 11 所示的核苷酸序列,及其保守性序列修饰物。

54. 一种转染瘤,它产生具有 IgG 重链和 κ 轻链可变区的人单克隆抗体,所述 IgG 重链和 κ 轻链可变区分别包含如 SEQ ID NO:2、6 或 10 和 SEQ ID NO:4、8 或 12 所示的氨基酸序列,及其保守性序列修饰物。

55. 一种真核或原核宿主细胞,它产生具有重链和轻链可变区的人单克隆抗体,所述重链和轻链可变区分别包含如 SEQ ID NO:2、6 或 10 和 SEQ ID NO:4、8 或 12 所示的氨基酸序列,及其保守性序列修饰物。

56. 一种转基因非人动物或植物,它产生具有重链和轻链可变区的人单克隆抗体,所述重链和轻链可变区分别包含如 SEQ ID NO:2、6 或 10 和 SEQ ID NO:4、8 或 12 所示的氨基酸序列,及其保守性序列修饰物。

57. 一种生产结合人 CD20 的人单克隆抗体的方法,包括:

用人 CD20 或表达人 CD20 的细胞免疫一种转基因非人动物,所述转基因非人动物具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组,从而通过所述动物的 B 细胞来生产抗体;

分离所述动物的 B 细胞;

将所述 B 细胞与骨髓瘤细胞融合以形成永生的杂交瘤细胞,所述杂交瘤细胞分泌对人 CD20 特异性的人单克隆抗体;和

从杂交瘤培养物上清液或源自这种杂交瘤的转染瘤中分离对 CD20 特异性的人单克隆抗体。

58. 一种根据权利要求 57 的方法,其中用已经以人 CD20 转染过的细胞进行免疫。

59. 一种分离的结合人 CD20 的人单克隆抗体,所述抗体是通过如下方法获得的:

用人 CD20 或表达人 CD20 的细胞免疫一种转基因非人动物,所述转基因非人动物具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组,从而通过所述动物的 B 细胞来生产抗体;

分离所述动物的 B 细胞;

将所述 B 细胞与骨髓瘤细胞融合以形成永生的杂交瘤细胞,所述杂交瘤细胞分泌对人 CD20 特异性的人单克隆抗体;和

从杂交瘤培养物上清液或源自这种杂交瘤的转染瘤中分离对 CD20 特异性的人单克隆抗体。

60. 一种分离的人抗体,所述抗体包含源自人 V_H3-13/DP-44 种系序列 (SEQ ID NO :54) 的重链可变区氨基酸序列和源自人 L6/JK4-CK (SEQ ID NO :55) 种系序列的轻链可变区氨基酸序列,其中人抗体结合人 CD20。

61. 一种分离的人抗体,所述抗体包含源自人 V_H3-09/JH6b 种系序列 (SEQ ID NO :56) 的重链可变区氨基酸序列和源自人 V_L-L6/JK5 种系序列 (SEQ ID NO :57) 的轻链可变区氨基酸序列,其中人抗体结合人 CD20。

62. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 1-45 任一项的人抗体和可药用的载体。

63. 一种组合物,所述组合物包含两种或多种根据权利要求 1-45 任一项的人抗体的组合,所述抗体具有互补的功能活性。

64. 一种根据权利要求 61 的组合物,所述组合物包含根据权利要求 15 的第一抗体和根据权利要求 19 的第二抗体。

65. 根据权利要求 63-64 任一项的组合物,所述组合物还包含治疗剂。

66. 根据权利要求 1-45 任一项的抗体,所述抗体还包含螯合剂连接物以附着放射性同位素。

67. 一种免疫结合物,它包含连接细胞毒性剂、放射性同位素或药物的根据权利要求 1-45 任一项的抗体。

68. 一种双特异性分子,它包含根据权利要求 1-45 任一项的抗体和对于人效应细胞的结合特异性。

69. 一种双特异性分子,它包含根据权利要求 1-45 任一项的抗体和对于人 Fc 受体的结合特异性或对于 T 细胞受体,如 CD3 的结合特异性。

70. 一种抑制表达 CD20 的细胞的生长的方法,包括将所述细胞与有效量的根据权利要求 1-45 任一项的抗体相接触,从而抑制所述细胞的生长。

71. 一种杀伤表达 CD20 的细胞的方法,包括将所述细胞与根据权利要求 1-45 任一项的

抗体相接触,从而杀伤表达 CD20 的细胞。

72. 权利要求 70 或 71 任一项的方法,其中所述细胞为 B 淋巴细胞或肿瘤细胞。

73. 一种治疗或预防涉及表达 CD20 细胞的疾病或病症的方法,包括以对于治疗或预防疾病有效的量向个体给药根据权利要求 1-45 或 60-69 任一项的人抗体、组合物、免疫结合物或双特异性分子,根据权利要求 94-97 任一项的表达载体。

74. 权利要求 73 的方法,其中所述疾病为 B 细胞淋巴瘤。

75. 权利要求 73 的方法,其中所述疾病为 B 细胞非霍奇金淋巴瘤。

76. 权利要求 73 的方法,其中所述疾病选自前体 B 细胞成淋巴细胞白血病 / 淋巴瘤和成熟 B 细胞瘤,如 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL) / 小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、B 细胞原淋巴细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (MCL)、滤泡淋巴瘤 (FL)、皮肤毛囊中心淋巴瘤、边缘区 B 细胞淋巴瘤 (MALT 型、结节和脾型)、毛细胞白血病、扩散大 B 细胞淋巴瘤、Burkitt 淋巴瘤、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、移植后淋巴增生性疾病、Waldenstrom 巨球蛋白血症和退行发育性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。

77. 权利要求 76 的方法,其中所述疾病为滤泡淋巴瘤 (FL)。

78. 权利要求 76 的方法,其中所述疾病为 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL) / 小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)。

79. 权利要求 73 的方法,其中所述疾病选自淋巴瘤样肉芽肿病、原发性外渗淋巴瘤、血管内大 B 细胞淋巴瘤、纵隔大 B 细胞淋巴瘤、重链疾病 (包括 γ 、 μ 和 α 疾病)、用免疫抑制剂进行治疗所诱发的淋巴瘤,如环孢霉素诱发的淋巴瘤和氨甲蝶呤诱发的淋巴瘤。

80. 一种治疗或预防涉及表达 CD20 的免疫细胞的免疫疾病的方法,包括以对于治疗或预防所述免疫疾病有效的量向个体给药根据权利要求 1-45 或 60-67 任一项的人抗体、组合物、免疫结合物或双特异性分子或根据权利要求 94-97 任一项的表达载体。

81. 权利要求 80 的方法,其中治疗包括杀伤产生抗自身抗原的抗体的 B 细胞。

82. 权利要求 73 的方法,其中所述疾病或病症选自牛皮癣、牛皮癣性关节炎、皮炎、系统性硬皮病和硬化、炎症性肠疾病 (IBD)、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、色素层炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉粥样硬化、白细胞粘连缺乏、多发性硬化症、Raynaud 综合征、**Sjögren** 综合征、青少年起病型糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症,如急性特发性血小板减少性紫癜和慢性特发性血小板减少性紫癜,溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎 (RA)、特应性皮炎、天疱疮、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿病、Omenn 氏综合征、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多症、HIV 和疱疹病毒相关疾病。

83. 权利要求 82 的方法,其中所述自身免疫疾病为类风湿性关节炎 (RA)。

84. 权利要求 73 的方法,其中所述疾病为选自溃疡性结肠炎、局限性回肠炎、青少年起病型糖尿病、多发性硬化症、免疫介导的血小板减少症,如急性特发性血小板减少性紫癜和慢性特发性血小板减少性紫癜,溶血性贫血、重症肌无力、系统性硬化病和寻常性天疱疮的炎症性、免疫和 / 或自身免疫病症。

85. 权利要求 73 的方法,其中所述疾病为选自炎症性肠疾病 (IBD)、溃疡性结肠炎、局限性回肠炎、和多发性硬化症的炎症性、免疫和 / 或自身免疫病症。

86. 权利要求 70-85 任一项的方法,进一步包括单独向个体给药另一种治疗剂。
87. 权利要求 86 的方法,其中所述治疗剂为细胞毒性剂或放射毒性剂。
88. 权利要求 86 的方法,其中所述治疗剂为免疫抑制剂。
89. 权利要求 86 的方法,其中所述治疗剂为免疫调节剂,如细胞因子或趋化因子。
90. 权利要求 86 的方法,其中所述治疗剂选自阿霉素、顺铂、博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥和环磷酰胺。
91. 权利要求 86 的方法,其中所述治疗剂选自抗 CD25 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD21 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD37 抗体、抗 CD38 抗体、抗 IL6R 抗体、抗 IL8 抗体、抗 IL15 抗体、抗 IL15R 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD11a 抗体、抗 α -4/ β -1 整联蛋白 (VLA4) 抗体、CTLA4-Ig 和抗 C3b(i) 抗体。
92. 一种检测样品中 CD20 抗原或表达 CD20 的细胞存在的体外方法,包括:
在允许形成抗体和 CD20 之间复合物的条件下将样品与权利要求 1-45 任一项的抗体相接触;和检测复合物的形成。
93. 一种检测个体中 CD20 抗原或表达 CD20 的细胞存在的试剂盒,其包含权利要求 1-45 任一项的抗体。
94. 一种检测 CD20 抗原或表达 CD20 的细胞的体内方法,包括:
在允许形成抗体和 CD20 之间复合物的条件下给药权利要求 1-45 任一项的抗体;和检测形成的复合物。
95. 一种表达载体,所述表达载体包含编码结合 CD20 的人抗体的轻链、重链、或轻链和重链可变区的核苷酸序列。
96. 权利要求 95 的载体,所述表达载体还包含编码结合 CD20 的人抗体的轻链、重链、或轻链和重链恒定区的核苷酸序列。
97. 一种表达载体,所述表达载体包含编码含有选自 SEQ ID Nos :1、5 和 9 所示核苷酸序列的核苷酸的重链可变区,和含有选自 SEQ ID Nos :3、7 和 11 所示核苷酸序列的核苷酸序列的轻链可变区的核苷酸序列,及其保守性修饰物。
98. 一种表达载体,所述表达载体包含编码含有选自 SEQ ID Nos :2、6 和 10 所示氨基酸序列的氨基酸序列的重链可变区,和含有选自 SEQ ID Nos :4、8 和 12 所示氨基酸序列的氨基酸序列的轻链可变区的核苷酸序列,及其保守性修饰物。
99. 一种药物组合物,所述组合物包含权利要求 95-98 任一项的表达载体和可药用的载体。
100. 一种结合权利要求 1-45 任一项的抗体的抗独特型抗体。
101. 一种结合 2F2、11B8 或 7D8 的抗独特型抗体。
102. 权利要求 100 或 101 的抗独特型抗体在检测样品中抗 CD20 人单克隆抗体的水平中的应用。

抗 CD20 的人单克隆抗体

[0001] 本申请是申请号为“200380106690.9”，发明名称为“抗 CD20 的人单克隆抗体”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求递交于 2002 年 10 月 17 日的美国临时申请号 60 / 419163, 和递交于 2003 年 4 月 2 日的美国临时申请号 60 / 460028 的优先权, 二者标题都是抗 CD20 的人单克隆抗体, 本文将二者的全部内容并入作为参考。

[0004] 发明背景

[0005] CD20 分子 (也称为人 B 淋巴细胞限制性分化抗原或 Bp35) 是前 B 细胞和成熟 B 淋巴细胞上的疏水性跨膜蛋白, 分子量大约 35kD (Valentine 等 1989) J. Biol. Chem. 264(19) : 11282-11287 ; 和 Einfield 等 1988) EMBO J. 7(3) : 711-717)。CD20 在超过 90% 的来自外周血或淋巴组织的 B 细胞的表面被发现并且在早期前 B 细胞发育过程中表达并且保持到浆细胞分化时。CD20 存在于正常 B 细胞以及恶性 B 细胞上。特别地, CD20 在超过 90% 的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 上表达 (Anderson 等 (1984), 血液 63(6) : 1424-1433), 但在造血干细胞、原 B 细胞、正常浆细胞或其它正常组织中未发现 (Tedder 等 (1985), 免疫学杂志 135(2) : 973-979)。

[0006] CD20 蛋白的 85 个氨基酸的羧基末端区位于细胞质中。该区的长度与其它 B 细胞特异性表达结构如 IgM、IgD 和 IgG 重链或组织相容性抗原 II 类 α 或 β 链相反, 所述结构分别具有相对短的 3、3、28、15 和 16 个氨基酸的胞质内区 (Komaromy 等 (1983) NAR 11 : 6775-6785)。在羧基端的最后 61 个氨基酸中, 21 个为酸性残基, 只有 2 个是碱性的, 提示该区具有净余的负电荷。GenBank 登录号为 NP_690605。

[0007] 据认为 CD20 可能参与 B 细胞的激活和分化过程中的早期步骤 (Tedder 等 (1986) Eur. J. Immunol. 16 : 881-887) 并且可以作为一种钙离子通道起作用 (Tedder 等 (1990) J. Cell. Biochem. 14D : 195)。

[0008] 尽管并不确定关于 CD20 在促进 B 细胞的增殖和 / 或分化中的实际作用, 它还是为抗体介导的治疗提供了一种重要的靶以控制或杀死参与癌症或自身免疫病症的 B 细胞。尤其是, 在肿瘤细胞, 例如, NHL 上的 CD20 的表达使其成为一种重要的靶以特异性地靶向针对 CD20 阳性瘤细胞的治疗剂。但是, 尽管到目前为止所获得的结果清楚地证实 CD20 为一种对于免疫疗法有用的靶, 它们还显示目前现有的鼠和嵌合抗体并未构成理想的治疗剂。

[0009] 因此, 存在对于抗 CD20 的治疗性抗体的需求, 所述抗体能够有效预防和 / 或治疗多种涉及表达 CD20 细胞的疾病。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供改进的抗体疗法以治疗和 / 或阻止与表达 CD20 细胞相关的疾病, 包括肿瘤相关疾病, 和免疫疾病, 包括自身免疫疾病。对本发明包括的抗体进行了改进, 它们是完全地人的并且因而, 在患者中可能有较小的免疫原性。

[0012] 如本文所例示的, 发明的人抗体通过许多机制介导表达 CD20 的 B 细胞的死亡。在一个实施方案中, 在细胞, 如慢性 B 淋巴细胞白血病 (B-CLL) 细胞中本发明的人抗体诱导补

体依赖的细胞毒性 (CDC), 例如, 至少大约 20% 的 CDC 介导的裂解, 优选大约 30% 的 CDC 介导的裂解, 更加优选大约 40% 的 CDC 介导的裂解。在另一个实施方案中, 本发明的人抗体诱导表达 CD20 的细胞的凋亡。在另一个实施方案中, 本发明的人抗体诱导表达 CD20 的细胞的同型粘着。而且, 本发明的人抗体在人效应细胞 (例如, 单核细胞、单核的细胞、NK 细胞和多形核细胞) 存在时可以诱导表达 CD20 的细胞的抗体依赖细胞的细胞毒性 (ADCC)。而且, 本发明的人抗体在巨噬细胞存在时可以诱导表达 CD20 的细胞的吞噬作用。本发明的人单克隆抗体可以通过这些机制中的一种或多种起作用。可以被本发明的人抗体杀死的细胞的例子包括, 但不限于, 表达 CD20 的 B 细胞, 如致瘤 B 细胞和参与免疫疾病的 B 细胞。在一个特定的实施方案中, 利用人抗体介导在淋巴瘤, 例如非霍奇金淋巴瘤处理中的 B 淋巴细胞的杀伤。

[0013] 本发明的人抗体包括 IgG1 (例如, IgG1, κ), IgG3 (例如, IgG3, κ) 和 IgG4 (例如, IgG4, κ) 抗体。但是, 本发明还包括其它的抗体同种型, 包括 IgG2、IgM、IgA1、IgA2、分泌型 IgA、IgD 和 IgE。抗体可以是完整的抗体或其抗原结合片段, 包括, 例如, Fab、F(ab')₂、Fv、单链 Fv 片段或双特异性抗体。而且, 抗原结合片段包括结合结构域免疫球蛋白融合蛋白, 它包含 (i) 融合到免疫球蛋白铰链区多肽上的一种结合结构域多肽 (如重链可变区或轻链可变区), (ii) 融合到铰链区上的一种免疫球蛋白重链 CH2 恒定区, 和 (iii) 融合到 CH2 恒定区上的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区。这类结合结构域免疫球蛋白融合蛋白在 US2003 / 0118592 和 US2003 / 0133939 中得到进一步介绍。

[0014] 本发明的特定人抗体包括那些称为 11B8、2F2 和 7D8 的抗体, 为人重链和人 κ 轻链核酸及其保守的序列修饰物所编码, 所述核酸分别在它们的可变区包含如 SEQ ID NOs : 1、5 或 9 和 SEQ ID NOs : 3、7 或 11 中所示的核苷酸序列。在另一个实施方案中, 人抗体的特征在于, 具有人重链和人 κ 轻链可变区及其保守的序列修饰物, 所述可变区分别包含如 SEQ ID NOs : 2、6 或 10 和 SEQ ID NOs : 4、8 或 12 中所示的氨基酸序列。

[0015] 仍然在另一个实施方案中, 人抗体的特征在于, 具有人重链和人 κ 轻链可变区, 所述可变区分别与 SEQ ID NO : 2 和 SEQ ID NO : 4 ; 分别与 SEQ ID NO : 6 和 SEQ ID NO : 8 ; 分别与 SEQ ID NO : 10 和 SEQ ID NO : 12 中所示的氨基酸序列至少 90% 同源, 优选至少 95% 同源, 更加优选至少 98%, 或至少 99% 同源。

[0016] 本发明的其它特定人抗体包括那些包含具有人重链和轻链 CDR1 区、人重链和轻链 CDR2 区和人重链和轻链 CDR3 区的 CDR 结构域的抗体, 其中

[0017] (a) CDR1、CDR2 和 CDR3 人重链包含选自图 53、55 或 57 (SEQ ID NOs : 13-15、19-21 和 25-27) 中所示的氨基酸序列 CDR1、CDR2 和 CDR3, 及其保守的序列修饰物的氨基酸序列, 和

[0018] (b) CDR1、CDR2 和 CDR3 人轻链包含选自图 53、55 或 57 (SEQ ID NOs : 16-18、22-24 和 28-30) 中所示的氨基酸序列 CDR1、CDR2 和 CDR3, 及其保守的序列修饰物的氨基酸序列。

[0019] 在本发明中还包括以大约 1-10nM 或更低的解离平衡常数 (K_D) 由 CD20 中解离出来的抗体。这种抗体还包括那些与相关的细胞表面抗原不交叉反应并且因而不抑制它们的功能的抗体。

[0020] 在另一个实施方案中, 本发明的抗 CD20 抗体可以通过一种或多种下列特性进行特征描述:

- [0021] a) 对于人 CD20 的特异性；
- [0022] b) 如通过本文实施例 5(图 9) 中公开的结合实验所测定的, 大约 10nM 或更低, 优选大约 5nM 或更低, 更加优选大约 1-3nM 或更低的对 CD20 的结合亲和性 (K_D)；
- [0023] c) 如通过本文实施例 5(图 9) 中公开的解离速率实验所测定的, 大约 10^{-4}sec^{-1} 或更低, 优选大约 10^{-5}sec^{-1} 或更低, 更加优选大约 10^{-6}sec^{-1} 或更低的由 CD20 中的解离速率常数 (K_d)；
- [0024] d) 在 CD55 / 59 阴性或 CD55 / 59 阳性细胞上介导高水平 CDC 的能力；
- [0025] e) 结合 CD20 后转位于脂筏上的能力；
- [0026] f) 抑制表达 CD20 的细胞生长的能力；
- [0027] g) 诱导表达 CD20 的细胞凋亡的能力；
- [0028] h) 诱导表达 CD20 的细胞同型粘着的能力；
- [0029] i) 在效应细胞存在时诱导表达 CD20 的细胞的 ADCC 的能力；
- [0030] j) 延长具有表达 CD20 的肿瘤细胞的个体存活的能力；
- [0031] k) 消除表达 CD20 细胞的能力 ; 和 / 或
- [0032] l) 消除表达低水平的 CD20 的细胞 (CD20^{Low}) 的能力。

[0033] 本发明的人抗 CD20 抗体可以衍生自、连接于或者与其它结合特异性共表达。在一个特定的实施方案中, 发明提供一种双特异性或多特异性分子, 它包含至少一种对于 CD20 的第一结合特异性 (例如, 人抗 CD20 抗体或其模拟物) 和一种对于人效应细胞的第二结合特异性, 如对于 Fc 受体 (例如, 人 Fc γ RI 受体, 如 Fc γ RI 或人 Fc α 受体) 或 T 细胞受体, 例如 CD3 的结合特异性。

[0034] 因此, 本发明包括结合人 CD20 和 Fc 受体或 T 细胞受体, 例如 CD3 的双特异性或多特异性分子。Fc 受体的例子为, 例如, 人 IgG 受体, 例如, Fc γ 受体 (Fc γ R), 如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16)。其它的 Fc 受体, 如人 IgA 受体 (例如, Fc γ RI), 也可以作为靶目标。Fc 受体优选位于效应细胞, 例如单核细胞、巨噬细胞或激活的单核细胞。在一个优选的实施方案中, 双特异性或多特异性分子在不同受体上的免疫球蛋白 Fc (例如, IgG 或 IgA) 结合位点上结合到 Fc 受体上。所以, 双特异性或多特异性分子的结合不被免疫球蛋白的生理水平所阻抑。

[0035] 仍然在另一个方面, 发明的人抗 CD20 抗体可以衍生自、连接于或者与其它功能性分子, 例如, 另一种肽或蛋白质 (例如, Fab' 片段) 共表达。例如, 本发明的抗体可以功能性连接于 (例如, 通过化学偶合、基因融合、非共价连接或其它) 一种或多种其它分子实体, 如另一种抗体 (例如, 产生一种双特异性或多特异性抗体)、细胞毒素、细胞配体或抗原 (例如, 产生一种免疫共轭物, 如免疫毒素)。本发明的抗体可以连接于其它治疗部分上, 例如, 放射性同位素、小分子抗癌药物、抗炎剂或免疫抑制剂。因此, 本发明包括大量的抗体共轭物、双特异性和多特异性分子和融合蛋白, 它们都结合表达 CD20 的细胞并且能够用于向这些细胞靶向其它分子。

[0036] 仍然在另一个方面, 本发明提供组合物, 例如, 药学性和诊断性组合物 / 试剂盒, 包含一种或一组本发明的人单克隆抗体一起配剂的可药用的载体。在一个特定的实施方案中, 该组合物包括一组结合不同抗原表位或者具有不同功能特性, 如诱导 CDC 和诱导凋亡的抗体。

[0037] 通过将有效量的抗体、免疫共轭物、双特异性 / 多特异性分子或组合物与细胞接触从而抑制该细胞的生长和 / 或杀死该细胞, 可以将本发明的人抗体、免疫共轭物、双特异性或多特异性分子和组合物用于多种方法中以抑制表达 CD20 的细胞的生长和 / 或杀死表达 CD20 的细胞。在一个实施方案中, 该方法包括在效应细胞存在时杀死表达 CD20 的细胞, 例如, 通过 CDC、凋亡、ADCC、吞噬作用, 或这些机制的两种或多种的组合。优选杀死或抑制这些细胞, 而不杀死或抑制不表达 CD20 但可能例如表达一种结构相关的细胞表面抗原的 (即, 没有相关的交叉反应性但功能性地区分细胞表面抗原) 细胞的活性。利用本发明的人抗体可以抑制或杀死的表达 CD20 的细胞包括, 例如, 致瘤 B 细胞。

[0038] 因此, 通过向患有这类疾病的患者给药, 可以用本发明的人抗体治疗和 / 或预防许多涉及表达 CD20 的细胞的疾病。可以治疗 (例如, 改善) 或预防的例示性的疾病包括, 但不限于, 致瘤性疾病和免疫疾病, 例如, 自身免疫疾病。可以治疗和 / 或预防的致瘤性疾病的例子包括 B 细胞淋巴瘤, 例如, NHL, 包括前体 B 细胞成淋巴细胞白血病 / 淋巴瘤和成熟 B 细胞瘤, 如 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL) / 小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、B 细胞原淋巴细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (MCL), 滤泡淋巴瘤 (FL), 包括低级、中级和高级 FL, 皮肤毛囊中心淋巴瘤, 边缘区 B 细胞淋巴瘤 (MALT 型, 结节和脾型), 毛细胞白血病, 扩散大 B 细胞淋巴瘤, Burkitt 淋巴瘤, 浆细胞瘤, 浆细胞骨髓瘤, 移植后淋巴增生性疾病, Waldenstrom 巨球蛋白血症和退行发育性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。可以治疗和 / 或预防的涉及表达 CD22 细胞的免疫疾病的例子包括牛皮癣、牛皮癣性关节炎、皮炎、系统性硬皮病、炎症性肠疾病 (IBD)、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、色素层炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉粥样硬化、白细胞粘连缺乏、多发性硬化症、Raynaud 综合征、Sjgren 综合征、青少年起病型糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症, 如急性特发性血小板减少性紫癜和慢性特发性血小板减少性紫癜, 溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎 (RA)、特应性皮炎、天疱疮、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿病、Omenn 氏综合征, 慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多症、HIV 和疱疹病毒关联疾病。进一步的例子为急性呼吸窘迫综合征和 choreoretinitis。还有进一步的例子是由病毒, 如 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 感染 B 细胞引发的疾病和病症。

[0039] 在发明的一个特定的实施方案中, 用化疗剂、辐射或药剂对给药抗体的个体作进一步处理, 所述药剂调节, 例如, 增强或抑制 Fc 受体, 例如, Fc α 受体或 Fc γ 受体的表达或活性, 如一种细胞因子。在治疗中用作给药的典型细胞因子包括粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒 - 巨噬细胞集落刺激因子、 γ 干扰素 (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF)。在其它药剂中典型的治疗剂包括抗癌剂如阿霉素、顺铂、博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥和环磷酰胺。

[0040] 仍然在另一个方面, 本发明提供一种优选在早期, 体外或体内检测样品或个体中 CD20 的存在, 从而例如诊断 CD20 相关疾病的方法。这还可以对于监测疾病和治疗效果以及对于确定和调整施用抗体的剂量有用。体内方法可以利用成像技术如 PET (正电子发射断层照相术) 或 SPECT (单光子发射计算机 X 线断层扫描术) 进行。在一个实施方案中, 这通过将待测样品, 优选和对照样品一起, 与本发明的人单克隆抗体在允许形成抗体和 CD20 间的复合物的条件下接触而实现。随后检测复合物的形成 (例如, 利用 FACS 分析或蛋白质印

迹)。当和测试样品一起使用一种对照样品时,在两种样品中都对复合物进行检测并且在样品之间复合物形成中的任何统计学显著的差异都是测试样品中 CD22D 存在的指征。

[0041] 仍然在另一个方面中,本发明提供一种转基因非人动物,如转基因小鼠,它表达结合 CD20 的人单克隆抗体。在一个特定的实施方案中,转基因非人动物是一种转基因小鼠,它具有编码本发明抗体的全部或部分的包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组。可以用纯化的或高浓度的 CD20 抗原制品和 / 或表达 CD20 的细胞对该转基因非人动物进行免疫。优选地,通过进行 V-D-J 重组和同种型转化,该转基因非人动物,例如转基因小鼠,能够产生多种 CD20 的人单克隆抗体同种型(例如, IgG, IgA 和 / 或 IgM) 同种型转化可以是经典的或非经典的同种型转化。

[0042] 因此,仍然在另一个方面,本发明提供了从如上所述的表达人抗 CD20 抗体的转基因非人动物,例如,转基因小鼠中分离的 B 细胞。分离的 B 细胞随后可以通过与永生细胞融合而进行永生,以提供一和人抗 CD20 抗体的来源(即,杂交瘤)。这种杂交瘤(即,产生人抗 CD20 的)也包括在本发明的范围之内。

[0043] 如本文所例示的,本发明的抗体可以直接从表达该抗体的杂交瘤中获得,或者可以在宿主细胞(例如, CHO 细胞、NS / 0 细胞或淋巴细胞)中进行克隆和重组表达。宿主细胞的另外的例子为微生物,如大肠杆菌 (*E. coli*),和真菌,如酵母。或者,它们可以通过在转基因非人动物或植物中进行重组生产。因此,在另一个方面,本发明提供了生产结合到人 CD20 上的人单克隆抗体的方法。在一个实施方案中,该方法包括用纯化的或高浓度的人 CD20 抗原制品和 / 或表达人 CD20 的细胞免疫一种如前所述的转基因非人动物,例如,转基因小鼠(例如,具有包含编码抗 CD20 抗体的全部或部分的人重链转基因和人轻链转基因的基因组)。随后获得 B 细胞(例如,脾 B 细胞)并且与骨髓瘤细胞融合以形成分泌抗 CD20 人单克隆抗体的永生的杂交瘤细胞。

[0044] 仍然在另一个方面,本发明提供编码人抗 CD20 抗体(例如,其可变区)的核酸分子,以及包含本发明的核酸的重组表达载体,和用载体转染的宿主细胞。本发明还包括通过培养这些宿主细胞来生产抗体的方法。本发明所提供的特定核酸包含 SEQ ID NOs :1、5 或 9 和 SEQ ID NOs :3、7 或 11 中所示的核苷酸序列,它们分别编码人抗 CD20 抗体 2F2、7D8 和 11B8 的重链和轻链。

[0045] 由下面的详细介绍和权利要求书,本发明的其它特征和益处将是显而易见的。

[0046] 附图简述

[0047] 图 1 显示用作重组生产人单克隆抗体 2F2 和 11B8 的 pCON γ 1f / 可变重载体。

[0048] 图 2 显示用作重组生产人单克隆抗体 2F2 和 11B8 的 pCON κ 1f / 可变轻载体。

[0049] 图 3 显示用作重组生产人单克隆抗体 2F2 和 11B8 的二基因克隆载体 (pCON γ 1f / κ 2F2)。

[0050] 图 4 是利用流式细胞分析比较人单克隆抗体 2F2、7D8 和 11B8 结合到 Raji, Daudi, 和 CD20 转染的 NS / 0 细胞和亲本 NS / 0 细胞的图。

[0051] 图 5A 和 5B 利用流式细胞分析显示 2F2 与来自三个人供体的 PBMC 的结合。

[0052] 图 6 是比较 ^{125}I - 标记的 2F2 和 ^{125}I - 标记的 11B8 与 Ramos-EHRB 细胞的结合亲和性的图。

[0053] 图 7A 和 7B 显示与 ^{125}I - 标记的利妥希玛(嵌合性抗 CD20 抗体, IDEC) 和 ^{125}I - 标记

的 B1 (术语 B1 相应于 Bexxar™ 的未标记形式,它是 ¹³¹I- 标记的鼠抗人 CD20 抗体, Coulter) 比较 ¹²⁵I- 标记的 2F2 和 ¹²⁵I- 标记的 11B8 对于 Ramos-EHRB 细胞 (A) 和 Daudi 细胞 (B) 的结合。

[0054] 图 8 是比较 ¹²⁵I- 标记的 11B8T、¹²⁵I- 标记的 2F2、¹²⁵I- 标记的利妥希玛和 ¹²⁵I- 标记的 B1 的解离速率的图。

[0055] 图 9 显示在 Ramos-EHRB 细胞中 2F2、11B8T 和利妥希玛的 F(ab')₂ 片段的解离速率。

[0056] 图 10A 和 10B 利用流式细胞分析显示由 2F2T、11B8T、7D8、利妥希玛和 Daudi 细胞 (A) 以及 SU-DHL-4 细胞 (B) 的同型对照抗体 (HuMab-KLH) 在不同的时间点进行的 CDC (功能性 off-rate)。

[0057] 图 11A-E 利用流式细胞分析显示在不同细胞系中由 2F2 和利妥希玛诱导的 CDC 的动力学。

[0058] 图 12A-D 利用流式细胞分析显示在不同细胞系中由 2F2 和利妥希玛诱导的 CDC 作为在两种不同抗体浓度上的补体浓度 (正常的人血清 (NHS)) 的功能。

[0059] 图 13A-D 利用流式细胞分析显示在不同细胞系中由 2F2 和利妥希玛进行的 CDC 的浓度依赖性诱导。

[0060] 图 14A 和 14B 显示在 Daudi 细胞 (A) 和 Raji 细胞 (B) 中由 2F2、2F2T、11B8T、B1 和利妥希玛进行的 CDC 的浓度依赖性诱导。

[0061] 图 15A 和 15B 是比较由人单克隆抗体 2F2、7D8 和 11B8 以及利妥希玛进行的 Daudi 细胞 (表达低水平 CD55 / 59 的细胞) 的 CDC 的图; (A) 显示未洗涤细胞的百分比裂解而 (B) 显示在加入血清之前进行洗涤的细胞的裂解。

[0062] 图 16A 和 16B 是比较由人单克隆抗体 2F2、7D8 和 11B8 以及利妥希玛进行的 Raji 细胞 (表达高水平 CD55 / 59 的细胞) 的 CDC 的图; (A) 显示未以抗 CD55 和抗 CD59 抗体阻抑的细胞的裂解而 (B) 显示以抗 CD55 和抗 CD59 抗体阻抑的细胞的裂解。

[0063] 图 17A-C 显示在 Raji 细胞中由 2F2 和利妥希玛诱导的 CDC 中 CD55 和 CD59 的作用。(A) 显示在加入抗 CD55 抗体之后裂解细胞的百分率, (B) 显示在加入抗 CD59 抗体之后裂解细胞的百分率, 而 (C) 显示加入抗 CD55 和抗 CD59 抗体二者之后裂解细胞的百分率。

[0064] 图 18A-D 显示通过流式细胞分析所测定的在不同细胞系中由 2F2 和利妥希玛进行的补体因子 C1q 的结合。

[0065] 图 19A-D 显示通过流式细胞分析所测定的在不同细胞系中由 2F2 和利妥希玛进行的补体因子片段 C4c 的沉积。

[0066] 图 20 显示在 PMNs、MNCs、血浆或全血存在时由 2F2、利妥希玛和 11B8T 进行的 ARH-77 细胞的裂解。

[0067] 图 21 显示在 PMNs、MNCs、血浆或全血存在时由 2F2、利妥希玛和 11B8T 进行的 B-CLL 细胞的裂解。

[0068] 图 22 显示在 PMNs、MNCs、血浆或全血存在时由 2F2、利妥希玛和 11B8T 进行的 HCL (毛细胞白血病) 细胞的裂解。

[0069] 图 23 显示在 PMNs、MNCs、血浆或全血存在时由 2F2 和利妥希玛进行的 B-ALL 细胞的裂解。

[0070] 图 24 显示在 PMNs、MNCs、血浆或全血存在时由 2F2、利妥希玛和 11B8T 进行的滤泡淋巴瘤 (FL) 细胞的裂解。

[0071] 图 25 显示在 PMNs、MNCs、血浆或全血存在时由 2F2、利妥希玛和 11B8T 进行的套细胞的裂解。

[0072] 图 26 显示在全血存在时由 2F2 和利妥希玛进行的 ARH-77 细胞的浓度依赖性裂解。

[0073] 图 27 显示由 2F2T、11B8T 和利妥希玛进行的 ARH-77 细胞的 MNC 介导的裂解。

[0074] 图 28 显示由 2F2T、11B8T 和利妥希玛进行的 Raji 细胞的 MNC 介导的裂解。

[0075] 图 29A、B 和 C 是利用 FRET 分析和 Triton-X 不溶性测试显示在用 2F2、7D8 或 11B8 温育之后脂筏中 CD20 的集聚的图。

[0076] 图 30 利用 FRET 分析显示在用 2F2、利妥希玛或 11B8T 温育之后脂筏中 CD20 的集聚。

[0077] 图 31 显示在用 TritonX-100 (TX) 处理和用 2F2、利妥希玛或 11B8T 温育之后保留在不可溶的筏部分中的 CD20 的比例。

[0078] 图 32 显示在用 2F2、利妥希玛或 11B8T 刺激 Daudi 细胞之后在筏和非筏膜部分之间 CD20 的分布。

[0079] 图 33A-G 利用流式细胞分析显示由 2F2、7D8 和 11B8 进行的 Daudi 细胞的凋亡。

[0080] 图 34 利用流式细胞分析显示由 2F2、11B8T、利妥希玛或 B1 进行的 Raii 细胞凋亡的诱导。

[0081] 图 35A 利用流式细胞分析显示由 2F2T、11B8T、利妥希玛或 B1 进行的 Daudi 细胞凋亡的诱导。

[0082] 图 35B 利用流式细胞分析显示由人单克隆抗体 2F2T、11B8T、利妥希玛和 B1 进行的 Daudi 细胞的早期和晚期凋亡。

[0083] 图 36A-E 利用光学显微镜显示由 2F2、7D8 和 11B8 进行的 Ramos-EHRB 细胞的同型粘着。

[0084] 图 37 利用光学显微镜显示由 2F2、利妥希玛和 B1 进行的 Daudi 细胞的同型粘着。

[0085] 图 38 是显示用 Daudi 细胞注射并且用 2F2 或 7D8 处理的 SCID 小鼠百分比存活率的图。

[0086] 图 39 显示用 Tanoue 细胞注射并且用 2F2、利妥希玛或 B1 处理的 SCID 小鼠的百分比存活率。

[0087] 图 40 显示用 Daudi 细胞注射并且用不同浓度的 2F2 或利妥希玛处理的 SCID 小鼠的百分比存活率。

[0088] 图 41 显示用 Daudi 细胞注射并且用 11B8T 或 B1 处理的 SCID 小鼠的百分比存活率。

[0089] 图 42 显示在 39 天 (用 10 μ g 的 B1、利妥希玛、11B8T、2F2T 或 huIgG1 处理之后 31 天) 时 SCID 小鼠中肿瘤细胞的生物发光图像。如在小鼠的黑色和白色身体图像中所涂布的生物发光以红色代表 (小鼠中的暗区域) (光强度 > 50 光子每分钟)。

[0090] 图 43 通过整合身体表面的光信号显示在给药 10 μ g B1、利妥希玛、11B8T、2F2T 或 huIgG1 之后的第 25、32、39 和 46 天, 以及第 8 天量化的每只小鼠中的肿瘤质量。

[0091] 图 44A-C 显示以不同的剂量 $4 \times 1.25 \text{mg} / \text{kg}$ (A)、 $4 \times 6.25 \text{mg} / \text{kg}$ (B) 或 $4 \times 12.50 \text{mg} / \text{kg}$ (C) 静脉内给药 2F2 或利妥希玛之后在食蟹猴外周血中 $\text{CD}20^+$ 细胞的流式细胞分析。

[0092] 图 45A-C 显示以不同的剂量 $4 \times 1.25 \text{mg} / \text{kg}$ (A)、 $4 \times 6.25 \text{mg} / \text{kg}$ (B) 或 $4 \times 12.50 \text{mg} / \text{kg}$ (C) 静脉内给药 2F2 或利妥希玛之后在食蟹猴外周血中 $\text{CD}21^+$ 细胞的流式细胞分析。

[0093] 图 46A-C 显示以不同的剂量 $4 \times 1.25 \text{mg} / \text{kg}$ (A)、 $4 \times 6.25 \text{mg} / \text{kg}$ (B) 或 $4 \times 12.50 \text{mg} / \text{kg}$ (C) 静脉内给药 2F2 或利妥希玛之后在食蟹猴淋巴结中 $\text{CD}20^+$ 细胞的流式细胞分析。

[0094] 图 47A-C 显示以不同的剂量 $4 \times 1.25 \text{mg} / \text{kg}$ (A)、 $4 \times 6.25 \text{mg} / \text{kg}$ (B) 或 $4 \times 12.50 \text{mg} / \text{kg}$ (C) 静脉内给药 2F2 或利妥希玛之后在食蟹猴外周血中表达 $\text{CD}20^{\text{low}}\text{CD}23^+\text{CD}40^{\text{high}}\text{CD}20^+$ 的细胞的流式细胞分析。

[0095] 图 48A-E 显示如流式细胞分析所测定的利妥希玛 (A)、2F2 (B)、11B8 (C)、B1 (D) 或同种型对照抗体 (E) 与表达野生型 (WT) $\text{CD}20$ 、突变体 $\text{CD}20$ (AxP) 或 WT $\text{CD}20$ 以及突变体 $\text{CD}20$ (AxP) 二者的 CHO 细胞的结合。

[0096] 图 49A-F 显示 2F2、11B8T、B1 或利妥希玛与突变体 P172S vs. WT $\text{CD}20$ (A) 的百分比结合, 2F2T、11B8T、B1、CAT (CAT13.6E12, 一种小鼠单克隆 IgG2A 抗 $\text{CD}20$ 抗体, Diatec. Com)、对照同种型抗体 (KLH) 或利妥希玛与突变体 $\text{CD}20$ (AxP) vs. WT $\text{CD}20$ (B) 的百分比结合, 2F2、11B8T、B1 或利妥希玛与突变体 N166D vs. WT $\text{CD}20$ (C) 的百分比结合, 2F2T、CAT 或利妥希玛与突变体 N166D vs. WT $\text{CD}20$ (D) 的百分比结合, 2F2T、2F2、11B8T、B1 或利妥希玛与突变体 N163D vs. WT $\text{CD}20$ (E) 的百分比结合, 和 2F2T、CAT 或利妥希玛与突变体 N163D vs. WT $\text{CD}20$ (F) 的百分比结合。

[0097] 图 50 显示如通过 ELISA 所测定的 2F2T、7D8 和同种型对照抗体与三种抗独特型抗体的结合, 所述三种抗体是相对于 2F2 培育的抗 2F2sab1.1, 抗 2F2sab1.2 和抗 2F2sab1.3。

[0098] 图 51 显示如通过 ELISA 所测定的 11B8T 与抗独特型抗体的结合, 所述抗体是相对于 11B8T 培育的但不结合抗独特型抗 2F2 抗体的抗 11B8T sab2.2、抗 11B8T sab2.3、抗 11B8T sab2.4、抗 11B8T sab2.5 和抗 11B8T sab2.6。

[0099] 图 52A-C 显示如通过 ELISA 所测定的 2F2T 与三种抗独特型抗体的剂量依赖型结合, 所述三种抗体是相对于 2F2 培育的抗 2F2sab1.1 (A)、抗 2F2sab1.2 (B) 和抗 2F2sab1.3 (C)。

[0100] 图 53 显示人单克隆抗体 2F2 重链 V 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2) 和轻 (κ) 链 V 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :4), 标明了 CDR 区。

[0101] 图 54 显示人单克隆抗体 2F2 重链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :1) 和轻 (κ) 链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :3)。

[0102] 图 55 显示人单克隆抗体 7D8 重链 V 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :6) 和轻 (κ) 链 V 区的氨基酸序列 (SEQ ID NO :8), 标明了 CDR 区。

[0103] 图 56 显示人单克隆抗体 7D8 重链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :5) 和轻 (κ) 链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :7)。

[0104] 图 57 显示人单克隆抗体 11B8 重链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :10) 和轻 (κ)

链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :12)。

[0105] 图 58 显示人单克隆抗体 11B8 重链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :9) 和轻 (κ) 链 V 区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :11)。

[0106] 发明详述

[0107] 本发明提供治疗和诊断各种涉及表达 CD20 细胞的病症的改良的基于抗体的疗法。本发明的疗法使用特异性结合存在于 CD20 上的抗原表位的分离的人单克隆抗体。本发明包括的分离的人单克隆抗体包括 IgA、IgG1-4、IgE、IgM 和 IgD 抗体。

[0108] 在一个实施方案中抗体为 IgG1 抗体,更特定地是一种 IgG1, κ 或 IgG1, λ 同种型。在另一个实施方案中抗体为 IgG3 抗体,更特定地是一种 IgG3, κ 或 IgG3, λ 同种型。还在另一个实施方案中抗体为 IgG4 抗体,更特定地是一种 IgG4, κ 或 IgG4, λ 同种型。仍然在另一个实施方案中抗体为 IgA1 或 IgA2 抗体。

[0109] 仍然在另一个实施方案中抗体为 IgM 抗体。

[0110] 在一个实施方案中,通过进行 V-D-J 重组和同种型转化在能够产生多种 CD20 的人单克隆抗体同种型的非人类转基因动物,例如,转基因小鼠中生产人抗体。因此,本发明的方面不仅包括抗体、抗体片段及其药物组合,还包括非人类转基因动物、B 细胞、宿主细胞和产生单克隆抗体的杂交瘤。这种转基因动物还可以是产生如在 US2003 / 0017534 中公开的抗体的转基因兔。因此,本发明还包括特异性结合 CD20 的人多克隆抗体。在一个实施方案中发明涉及结合 CD20 上表位的多克隆抗体,所述多克隆抗体 (i) 不包含或需要 172 位置上的氨基酸残基脯氨酸;(ii) 不包含或需要 170 位置上的氨基酸残基丙氨酸或 172 位置上的脯氨酸;(iii) 包含或需要 163 位置上的氨基酸残基天冬酰胺或 166 位置上的天冬酰胺;(iv) 不包含或需要 172 位置上的氨基酸残基脯氨酸,但包含或需要 163 位置上的氨基酸残基天冬酰胺或 166 位置上的天冬酰胺;或 (v) 不包含或需要 170 位置上的氨基酸残基丙氨酸或 172 位置上的脯氨酸,但包含或需要 163 位置上的氨基酸残基天冬酰胺或 166 位置上的天冬酰胺。

[0111] 在另一个实施方案中发明涉及具有一种或多种下列特性的人多克隆抗体:(i) 以至少与人 CD20 相同的亲和性结合突变体 P172S CD20(172 位置上的脯氨酸突变为丝氨酸)(ii) 以至少与人 CD20 相同的亲和性结合突变体 AxP(170 位置上的丙氨酸突变为丝氨酸,172 位置上的脯氨酸突变为丝氨酸);(iii) 与人 CD20 相比于 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的抗体浓度显示与突变体 N166D 的减弱 50%或更多的结合;和 / 或 (iv) 与人 CD20 相比于 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的抗体浓度显示与突变体 N163D 的减弱 50%或更多的结合。

[0112] 还在另一个实施方案中发明涉及结合人 CD20 的第一胞外小环中的抗原表位的人多克隆抗体。仍然在另一个实施方案中发明还包括结合 CD20 上不连续抗原表位的人多克隆抗体。在进一步的实施方案中发明涉及结合 CD20 上不连续抗原表位的人多克隆抗体,它具有部分第一细胞外小环和部分第二细胞外环。仍然在进一步的实施方案中发明涉及结合 CD20 上不连续抗原表位的人多克隆抗体,它具有第一细胞外小环的残基 AGIYAP 和第二胞外环的残基 MESLNFIRAHTPYI。

[0113] 发明包括利用发明的抗体检测表达 CD20 的细胞的方法。还提供利用发明的抗体阻抑或抑制 CD20 诱导的活性,例如增殖和 / 或分化活性的方法,它在与 CD20 相关的病症,如致瘤性疾病(例如,B 细胞淋巴瘤)和自身免疫疾病(例如,RA、Crohn 氏病和 Wegener

氏肉芽肿病)的治疗中是有用的。

[0114] 为了可以更加容易地理解本发明,首先定义某些术语。其它的定义在整个详述中给出。

[0115] 术语“CD20”和“CD20 抗原”在本文中可以交换使用,包括人 CD20 的任何变异体、亚型和物种同源物,它被细胞天然地表达或表达于用 CD20 基因转染的细胞上。本发明的抗体结合到 CD20 抗原上介导通过灭活 CD20 杀死表达 CD20 的细胞。可以通过一种或多种下列机制杀死表达 CD20 的细胞:

[0116] 表达 CD20 的细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC);

[0117] 表达 CD20 的细胞的凋亡;

[0118] 表达 CD20 的细胞的效应细胞吞噬作用;或

[0119] 表达 CD20 的细胞的效应细胞抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

[0120] 如本领域中所认识的,CD20 的同义词包括 B 淋巴细胞抗原 CD20、B 淋巴细胞表面抗原 B1、Leu-16、Bp35、BMS 和 LF5。

[0121] 如本文所用的,术语“抑制生长”(例如,指细胞的)意在包括与不和抗 CD20 抗体接触的相同细胞的生长比较,当与抗 CD20 抗体接触时细胞生长的可测量的降低,例如至少大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99% 或 100% 的细胞培养物生长的抑制。这种细胞生长的降低能够以多种机制发生,例如,效应细胞吞噬作用、ADCC、CDC 和 / 或凋亡。

[0122] 术语“筏”指位于细胞质膜外片区的富含鞘磷脂和富含胆固醇的膜微域。某些蛋白质在这种域内联合的能力可以影响蛋白质的功能。例如,在用本发明的抗体结合之后,将 CD20 易位到脂筏中,在质膜中产生了高密度的 CD20 抗原-抗体复合物。这种高密度的 CD20 抗原-抗体复合物可以使得在 CDC 期间有效激活补体系统成为可能。

[0123] 如本文所称的术语“抗体”包括完整的抗体及其任何抗原结合片段(即,“抗原结合部分”)或单链。抗体表示包括通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白。每一个重链由一个重链可变区(在本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。每一个轻链由轻链可变区(在本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。所述 VL 和 VH 区可以进一步划分成被称为互补决定区(CDR)的高变区,和散布在其中的被称为构架区(FR)的更保守的部分。每一个 VH 和 VL 都由三个 CDRs 和四个 FRs 组成,从氨基末端到羧基末端的排列顺序如下:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。所述重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。所述抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一种组分(C1q)。

[0124] 如本文所使用的术语抗体的“抗原结合部分”(或者简称为抗体部分)表示保留了与一种抗原(例如,CD20)特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已经显示,抗体的抗原结合功能可以通过完整长度抗体的片段实施。术语抗体的“抗原结合部分”所包括的结合片段的例子包括(i) Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的一价片段;(ii) F(ab')₂ 片段,在铰链区通过二硫键连接的包括两个 Fab 片段的二价片段;(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iv) 由抗体的一个臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(v) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等,(1989), Nature341:544-546);(vi) 分离的互补决定区(CDR),和(vii) 优选通过合成的连接子联结的两种或多种分离的 CDRs 的组合。而且,尽

管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是由分离的基因编码的,但可以利用重组方法通过合成的连接子将它们结合在一起,以使它能够产生单一的蛋白链,其中,VL 和 VH 区配对形成单价分子(被称为单链 Fv(scFv);参见例如,Bird 等,(1988),*Science*242:423-426;和 Huston 等,(1988),*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*85:5879-5883)。这种单链抗体同样被认为包括在术语抗体的“抗原结合部分”的含义范围内。另一个例子是结合结构域免疫球蛋白融合蛋白,包含(i)融合到免疫球蛋白铰链区多肽上的一种结合结构域多肽(如重链可变区或轻链可变区),(ii)融合到铰链区上的一种免疫球蛋白重链 CH2 恒定区,和(iii)融合到 CH2 恒定区上的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区。这类结合结构域免疫球蛋白融合蛋白在 US2003 / 0118592 和 US2003 / 0133939 中得到进一步介绍。这些抗体片段是利用本领域技术人员所公知的常规技术获得的,并且以筛选完整抗体的相同方法筛选所述片段的用途。

[0125] 术语“抗原表位”意为一种能够特异性结合到一种抗体上的蛋白质决定簇。抗原表位通过由分子的化学活性表面簇如氨基酸或糖侧链组成并且通过具有特异性的三维结构特性,以及特异性的电荷特性。构象性和非构象性抗原表位的区别在于在变性溶剂存在时前者的结合丧失,而后者则不然。

[0126] 如本文所用的术语“不连续抗原表位”,意为一种由蛋白质原始序列中的两个独立区所形成的构象性抗原表位。

[0127] 术语“双特异性分子”意在包括诸如蛋白质、肽、或蛋白质或肽复合物的具有两种不同的结合特异性的任何制剂。例如,所述分子可以结合(a)细胞表位抗原和(b)位于效应细胞表面上的 Fc 受体,或与之相互作用。术语“多特异性分子”或“异特异性分子”意在包括诸如蛋白质、肽、或蛋白质或肽复合物的具有两种以上不同的结合特异性的任何制剂。例如,所述制剂可以结合(a)细胞表面抗原,(b)效应细胞表面上的 Fc 受体,和(c)至少一种其它成分,或与之相互作用。因此,本发明包括,但不限于针对细胞表面抗原,如 CD20 和针对效应细胞上的其它靶,如 Fc 受体的双特异性、三特异性、四特异性和其它多特异性分子。

[0128] 术语“双特异性抗体”还包括双抗体(diabodies)。双抗体是二价双特异性抗体,其中,VH 和 VL 结构域是在单一的多肽链上表达的,但是所使用的连接子太短,以至于不能使这两个结构域在同一个链上配对,从而迫使这两个结构域与另一个链上的互补结构域配对,并产生两个抗原结合部位(参见例如,Holliger, P. 等,(1993)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*90:6444-6448;Poljak, R. J. 等,(1994)*Structure*2:1121-1123)。

[0129] 术语“人抗体衍生物”指该抗体的任何修饰形式,例如该抗体和另一种制剂或抗体的共轭物。

[0130] 如本文所用的,如果该抗体获自一种使用人免疫球蛋白序列的系统的話,例如,通过免疫一种携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或通过筛选人免疫球蛋白基因文库,人抗体“源自”特定的种系序列,并且其中选择的人抗体在氨基酸序列上与由该种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列至少 90%,更加优选至少 95%,甚至更加优选至少 96%、97%、98%或 99%相同。一般地,源自特定人种系序列的人抗体会显示与该种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列不超过 10 个氨基酸的差异,更加优选地,不超过 5 个,或甚至更加优选地,不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸的差异。

[0131] 如本文所用的,术语“异源抗体”是指两种或多种抗体、其衍生物或连接在一起的抗原结合区,至少其中的两个具有不同的特异性。这种不同的特异性包括对效应细胞上 Fc

受体的结合特异性,和诸如肿瘤细胞的靶细胞上的抗原或表位的结合特异性。

[0132] 如本文所用的,术语“人抗体”意在包括具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机的或位点特异性的诱变或通过体内体细胞突变导入的突变)。不过,本文所使用的术语“人抗体”并不包括这样的抗体:其中,源于另一种哺乳动物,如小鼠的 CDR 序列业已嫁接到人框架序列上。

[0133] 如本文所使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”表示具有单一分子组合物的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物表现出对一种特定表位的单一的结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”表示具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的表现出单一结合特异性的抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体是通过杂交瘤产生的,所述杂交瘤包含获自转基因或转染色体非人动物,例如转基因小鼠的 B 细胞,所述 B 细胞具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组并且融合于一种永生化细胞。

[0134] 如本文所用的术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体,如 (a) 从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如,小鼠)体内或由该基因制备的杂交瘤分离的抗体(在下面的 I 节中进一步说明);(b) 由表达该抗体的转化的宿主细胞,例如,由一种转染瘤中分离的抗体,(c) 从重组的组合人抗体文库中分离的抗体和 (d) 通过涉及到将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它 DNA 序列上的任何其它方法制备、表达、产生或分离的抗体。这种重组人抗体具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。不过,在某些实施方案中,可以将这类重组人抗体进行体外诱变(或在使用人 Ig 序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因此,所述重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列:尽管所述序列源于并相关于人种系 VH 和 VL 序列,但是它可能并非天然体内存在于人抗体种系成分中。

[0135] 如本文所用的,术语“转染瘤”包括表达所述抗体的重组真核宿主细胞,如 CHO 细胞、NS / 0 细胞、HEK293 细胞、植物细胞或真菌,包括酵母。

[0136] 如本文所用的,术语“异源抗体”是相对产生这种抗体的转基因非人生物定义的。该术语表示这样一种抗体:该抗体的氨基酸序列或编码核酸序列对应发现于不包括所述转基因非人动物的生物中的序列,并且通常来自除了所述转基因非人动物之外的物种。

[0137] 如本文所用的,“异源杂合抗体”表示具有不同生物的轻链和重链的抗体。例如,具有与鼠类轻链结合的人重链的抗体就是异源杂合抗体。这种异源杂合抗体的例子包括嵌合抗体和人源化抗体,如上所述。

[0138] 如本文所用的,“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,特异性结合 CD20 的分离的抗体基本上不含能特异性结合除了 CD20 的抗原的抗体)。不过,特异性结合人 CD20 的抗原表位、亚型或变异体的分离的抗体可能具有对其它相关抗原,例如来自其它物种的抗原(例如,CD20 物种同源物)的交叉反应性。而且,分离的抗体可能基本上不含其它细胞物质和/或化合物。在本发明的一个实施方案中,在一种充分定义的组合物中将具有不同特异性的“分离的”单克隆抗体组合在一起。

[0139] 如本文所用的,术语“特异性结合”表示抗体与预定的抗原结合。一般,所述抗体的结合亲和力相应于大约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小的 K_D ,并且与预定抗原的结合亲和力比与除了所述预定抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原(例如,BSA,酪蛋白)的结合亲和力高至

少两个数量级。在本文中,短语“识别一种抗原的抗体”和“对一种抗原特异的抗体”可以与术语“特异性结合一种抗原的抗体”互换使用。

[0140] 如本文所用的,术语“ K_d ” (sec^{-1}) 意指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称为 K_{off} 值。

[0141] 如本文所用的,术语“ K_a ” ($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$) 意指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率常数。所述值也称为 K_{off} 值。

[0142] 如本文所用的,术语“ K_D ” (M) 意指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0143] 如本文所用的,术语“ K_A ” (M^{-1}) 意指特定抗体-抗原相互作用的缔合平衡常数,并且它通过 K_a 除以 K_d 来获得。

[0144] 如本文所用的,“同种型”表示由重链恒定区基因编码的抗体类型(例如, IgM 或 IgG1)。

[0145] 如本文所用的,“同种型转换”表示一种抗体的类型或同种型从一种 Ig 类型转变成另一种 Ig 类型的现象。

[0146] 如本文所用的,“非转换同种型”表示在没有发生同种型转换时所产生的重链的同种型类型;编码非转换同种型的 CH 基因一般紧挨着功能性重排 VDJ 基因下游的第一个 CH 基因。业已将同种型转换划分成经典的或非经典的同种型转换。经典的同种型转换是通过重组事件发生的,它包括位于所述转基因上的至少一个转换序列区。非经典同种型转换可以通过诸如人 $\sigma \mu$ 和 $\Sigma \mu$ (δ -相关的缺失) 之间的同源重组完成。其它的非经典转换机制,如转基因间和 / 或染色体间的重组也可能发生,并实现同种型转换。

[0147] 如本文所用的,术语“转换序列”表示负责转换重组的 DNA 序列。一般为 μ 转换区的“转换供体”序列将会在转换重组期间将要缺失的构建体区的 5' 末端(即上游)。“转换受体”区将位于将要缺失的构建体区和置换的恒定区(例如, γ 、 ϵ 等)之间。由于没有经常发生重组的特定位置点,一般无法根据所述构建体预测最终的基因序列。

[0148] 如本文所用的,“糖基化形式”被定义为与蛋白,更具体的是与免疫球蛋白共价结合的糖基化形式。当本领域普通技术人员认为异源抗体的糖基化形式与来自获得所述转基因的 CH 基因的物种相比更类似于所述非人转基因动物物种的糖基化形式时,异源抗体的糖基化形式可以被鉴定为基本类似于由所述非人转基因动物物种所产生的抗体上天然存在的糖基化形式。

[0149] 如本文所用的,用在一种客体上的术语“天然存在的”表示一种物体可以在自然界中找到的事实。例如,可以从天然来源分离,并且没有在实验室中做过人为有意修饰的、存在于一种生物(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0150] 如本文所用的术语“重排的”表示重链或轻链免疫球蛋白基因座的一种构象,其中在编码基本完整的 VH 或 VL 结构域的构象中, V 片段的位置分别紧挨着 D-J 或 J 片段。可以通过与种系 DNA 比较确定重排的免疫球蛋白(抗体)基因座;重排的基因座具有至少一个重组的七聚体 / 九聚体同源元件。

[0151] 如本文所用的关于 V 片段的术语“未重排的”或“种系构象”表示这样一种构象,其中 V 片段不是重组的,以便它紧挨着 D 或 J 片段。

[0152] 如本文所用的,术语“核酸分子”意在包括 DNA 和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选双链 DNA。

[0153] 如本文所用的关于与 CD20 结合的抗体或抗体部分（例如， V_H 、 V_L 、CDR3）的核酸的术语“分离的核酸分子”意在表示这样一种核酸分子，其中编码完整抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码能结合除了 CD20 以外的抗原的完整抗体或抗体部分的核苷酸序列，其它序列可以天然存在于人基因组 DNA 上的核酸侧翼。在一个实施方案中，人抗 CD20 抗体包括 2F2、7D8 或 11B8 的核苷酸或氨基酸序列，以及分别具有 SEQ ID Nos :1、5 或 9 和 SEQ ID Nos :3、7 或 11 所示序列的重链 (V_H) 和轻链 (V_L) 可变区。

[0154] 如本文所公开和要求的，SEQ ID Nos :1-30 中所示的序列包括“保守性序列修饰物”，即，不显著影响或改变由该核苷酸序列编码或包含该氨基酸序列的抗体结合特性的核苷酸和氨基酸序列修饰物。这类保守性序列修饰物包括核苷酸和氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术，如定点突变和 PCR 介导的突变将修饰引入 SEQ ID Nos :1-30 中。保守性氨基酸取代包括这种取代，其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域进行定义。这些家族包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸），酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸），不带电荷的极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸），非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸）， β 分支的侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，优选来自相同侧链家族的另一种氨基酸残基来代替在人抗 CD20 抗体中预定的非必需氨基酸残基。

[0155] 本发明还包括 SEQ ID Nos :1-30 中所示的氨基酸序列的“衍生物”及其保守性序列修饰物，其中例如通过酰化或糖基化作用对一种或多种氨基酸残基进行衍化，而不显著地影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特性。

[0156] 另外，本发明包括这样的抗体，其中在 Fc 区进行变换以便改变所述抗体的功能特性或药物动力学特性。这类变换可能导致 C1q 结合和 CDC 或 Fc γ R 结合 ADCC 的降低或增强。例如，在重链恒定区的位置 234、235、236、237、297、318、320 和 322 可以进行取代，由此引发效应物功能的变化，同时与未修饰的抗体相比（参看 US5, 624, 821 和 US5, 648, 260）保持结合抗体的能力。

[0157] 通过修饰 Ig 恒定区或类 Ig 恒定区的补救受体表位使得该分子不包含完整的 CH2 区或完整的 Ig Fc 区，参见 US6, 121, 022 和 US6, 194, 551，也可以提高抗体的体内半衰期。另外体内半衰期还可以通过 Fc 区中制造突变，例如，通过在位置 252 取代苏氨酸为亮氨酸，通过在位置 254 取代苏氨酸为丝氨酸，或通过在位置 256 取代苏氨酸为苯丙氨酸，参见 US6, 277, 375，而得以提高。

[0158] 另外，可以修饰抗体的糖基化形式以便改变抗体的效应物功能。例如，可以在一种转染瘤中表达抗体，所述转染瘤不添加正常情况下附于 Fc 区的位置 297 上的天冬酰胺的岩藻糖，从而导致在 NK 细胞存在时抗体的增强的 ADCC，参见 Shield 等 (2002) JBC, 277 : 26733。另外，可以进行半乳糖基化修饰以便改进 CDC。

[0159] 或者，在另一个实施方案中，可以通过如饱和诱变在全部和部分抗 CD20 抗体编码序列上随机引入突变，并且可以筛选得到的修饰抗 CD20 抗体的结合活性。

[0160] 因此，由本文公开的（重链和轻链可变区）核苷酸序列编码的和 / 或包含本文公开的（重链和轻链可变区）氨基酸序列（即，SEQ ID Nos :1-30）的抗体，包括由已经进行

过保守性修饰的相似序列编码的或包含相似序列的基本上相似的抗体。可以在如下面提供的 SEQ ID NOs :1-30 所公开的部分序列（即，重链和轻链可变区）的基础上进一步讨论如何能够生成这类基本上相似的抗体。

[0161] 对于核酸来说，术语“基本同源性”表示在对两种核酸或其设计的序列进行优化排列和比较时，在具有适当的核苷酸插入和缺失情况下，其核苷酸的相同性至少为大约 80%，通常至少为大约 90-95%，更优选至少为大约 98-99.5%。或者，当所述片段在选择性杂交条件下与所述链的互补体杂交时，就存在基本同源性。对于核苷酸和氨基酸序列来说，术语“同源性”表示在具有适当的核苷酸插入和缺失情况下进行优化排列和比较时两种核酸或氨基酸序列之间的相同性。或者，当 DNA 片段在选择性杂交条件下与所述链的互补体杂交时，就存在基本同源性。

[0162] 两种序列之间的相同性百分比是这两种序列所共有的相同位点的数量的函数（即 %同源性 = 相同位点的数量 / 位点的总数量 × 100），考虑到了为了对这两种序列进行优化比对而需要引入的空位数量和每一个空位的长度。两种序列之间的序列比较和相同性百分比的确定，可

[0163] 以利用在下面的非限定性实施例中所公开的数学算法完成。

[0164] 两种核苷酸序列之间的相同性百分比可以利用 GCG 软件包中的 GAP 程序（可以在 <http://www.gcg.com> 获得）确定，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权数为 40、50、60、70 或 80，长度权数为 1、2、3、4、5 或 6。两种核苷酸或氨基酸序列之间的相同性百分比还可以用 E. Meyers 和 W. Miller 的算法确定 (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, (1988))，该方法业已整合到 ALIGN 程序 (2.0 版) 中，使用 PAM120 加权残基表，空位长度罚分为 12，而空位罚分为 4。另外，两种氨基酸序列之间的相同性百分比可以用 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, (1970)) 算法确定，该方法业已整合到 GCG 软件包中的 GAP 程序中（可以从 <http://www.gcg.com> 获得），使用 Blossum62 矩阵或 PAM250 矩阵，空位权数为 16、14、12、10、8、6 或 4，而长度权数为 1、2、3、4、5 或 6。

[0165] 还可以将本发明的核酸和蛋白序列用作“查询序列”对公共数据库进行检索，以便，例如，鉴定相关的序列。所述检索可以用 Altschul 等的 NBLAST 和 XBLAST 程序 (2.0 版) 完成 (1990. J. Mol. Biol. 215:403-10)。BLAST 核苷酸检索可以通过 NBLAST 程序完成，得分等于 100，字长等于 12，以便获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白检索可以通过 XBLAST 程序完成，得分 =50，字长 =3，以便获得与本发明蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有空位的排列，可以使用 Altschul 等所公开的空位 BLAST (1997, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402)。在采用 BLAST 和空位 BLAST 程序时，可以使用相应程序（例如，XBLAST 和 NBLAST）的默认参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0166] 所述核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中，或者以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术使核酸从诸如其它细胞核酸或蛋白的其它细胞成分或其它污染物中纯化出来时，它就是“分离的”或“成为基本上纯的”，所述标准技术包括碱 / SDS 处理、氯化铯带型、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其它技术。参见 F. Ausubel 等，编辑. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987。

[0167] 尽管本发明的核酸组成经常是来自 cDNA、基因组或其混合物的天然序列（修饰过的限制位点等除外）存在，但可以用标准技术对其进行诱变，以便提供基因序列。对于编码序列来说，所述诱变可以按照需要影响氨基酸序列。具体地讲，包括大体上同源或源于本文所述的天然 V、D、J、恒定、转换和其它诸如此类的序列的 DNA 序列（其中，“源于”表示一种序列与另一种序列相同或者是由另一种序列修饰物而成）。

[0168] 当一种核酸分子与另一种核酸序列置于功能性关系时，它就是“可操作地连接的”。例如，如果启动子或增强子能影响编码序列的转录的话，它们就是与编码序列可操作地连接的。就转录调控序列而言，可操作地连接意味着所连接的 DNA 序列是相邻的，并且有必要连接两个蛋白编码区，相邻并且存在于读框内。对于转换序列来说，可操作地连接表示有关序列能够影响转换重组。

[0169] 如本文所用的，术语“载体”意在表示能够转运业已连接在它上面的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”，它表示在它上面可以连接其它 DNA 片段的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中，可以将其它 DNA 片段连接在病毒基因组上。某些载体能够在导入了这种载体的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其它载体（例如，非附加型哺乳动物载体）在导入宿主细胞时能够整合到宿主细胞的基因组中，并因此与宿主基因组一起复制。另外，某些载体能够指导与它可操作地连接的基因的表达。在本文中，所述载体被称为“重组表达载体”（或简单地称之为“表达载体”）。一般，应用于重组 DNA 技术中的表达载体通常是质粒形式的。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以互换使用，因为质粒是最常使用载体的形式。不过，本发明还包括所述其它形式的表达载体，如病毒载体（例如，复制缺陷型逆转录病毒，腺病毒和腺相关病毒），这些病毒行使等同的功能。

[0170] 如本文所用的，术语“重组宿主细胞”（或简单地称之为宿主细胞）意在表示业已导入了重组表达载体的细胞。应当理解的所述术语不仅仅表示特定的个体细胞，而且还包括所述细胞的后代。由于在延续的世代中因为突变或环境影响可能发生某些修饰，事实上，所述后代可能与亲代细胞不相同，但这种细胞仍然属于本文所使用的术语“宿主细胞”的范围。重组宿主细胞包括，例如，转染瘤，如 CHO 细胞、NS / 0 细胞和淋巴细胞。

[0171] 如本文所用的，术语“个体”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物，例如哺乳类和非人哺乳类，如非人灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。

[0172] 术语“转基因的，非人动物”表示一种非人动物，它具有包含一种或多种人重链和 / 或轻链转基因或转染色体（整合或非整合入动物的天然基因组 DNA 中）的并且能够表达完整人抗体的基因组。例如，转基因小鼠可以具有人轻链转基因和人重链转基因或人重链转染色体，从而小鼠在用 CD20 抗原和 / 或表达 CD20 的细胞进行免疫时产生人抗 CD20 抗体。人重链转基因可以整合入小鼠的染色体 DNA 中，如转基因的，例如，HuMAb 小鼠，如 HCo7 或 HCo12 小鼠的情况，或者人重链转基因可以保持于染色体外，如 W002 / 43478 中所述的转染色体（例如，KM）小鼠的情况。通过进行 V-D-J 重组和同种型转换这类转基因和转染色体小鼠能够产生相对于 CD20 的多同种型的人单克隆抗体（例如，IgG、IgA 和 / 或 IgE）。

[0173] 在下面的各小节中将对本发明的各个方面作更详细的说明。

[0174] I. 抗 CD20 的人抗体的生产

[0175] 可以通过多种技术，包括传统的单克隆抗体方法，例如 Kohler 和 Milstein，

Nature256 :495, (1975) 的标准体细胞杂交技术来生产本发明的人单克隆抗体。尽管体细胞杂交法在理论上是优选的,但是可以利用生产单克隆抗体的其它技术,例如 B 淋巴细胞的病毒或致癌转化或利用人抗体基因文库的噬菌体呈现技术。

[0176] 用于制备分泌人单克隆抗体的杂交瘤的优选动物体系是鼠类体系。在鼠中生产杂交瘤是一种业已完善的方法。免疫方案和分离用于融合的免疫化的脾细胞的技术为本领域所公知。融合配偶体(例如,鼠骨髓瘤细胞)和融合方法同样是众所周知的。

[0177] 在一种优选实施方案中,抗 CD20 的人单克隆抗体可以用携带所述人免疫系统的一部分而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠来产生。这些转基因或转染色体小鼠在本文中分别称为“HuMAb”小鼠和 KM 小鼠,并且在本文中总称为“转基因小鼠”。

[0178] HuMAb 小鼠含有编码未重排的人重链(μ 和 γ) 和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座,同时还含有使内源 μ 和 κ 链基因座失活的定向突变(Lonberg, N. 等, (1994), Nature368(6474) :856-859)。因此,所述小鼠表现出小鼠 IgM 或 κ 的表达减弱,并且在免疫应答时,所导入的人重链和轻链转基因发生类型转换和体细胞突变,产生高亲和力 IgG κ 单克隆抗体(Lonberg, N. 等, (1994), 同上;综述见于 Lonberg, N. 等, (1994), Handbook of Experimental Pharmacology113 :49-101;Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995), Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 :65-93, 和 Harding, F. 和 Lonberg, N., (1995), Ann. N. Y. Acad. Sci764 :536-546)。在 Taylor, L. 等, (1992)Nucleic Acids Research20 :6287-6295;Chen, J. 等, (1993)International Immunology5 :647-656;Tuailon 等, (1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA90 :3720-3724;Choi. 等, (1993)Nature Genetics4 :117-123;Chen, J. 等, (1993)EMBO J. 12 :821-830;Tuailon 等, (1994)J. Immunol. 152 :2912-2920;Lonberg 等, (1994)Nature368(6474) :856-859;Lonberg, N., (1994)Handbook of Experimental Pharmacology113 :49-101;Taylor, L. 等, (1994)International Immunology6 :579-591;Lonberg, N. and Huszar, D. (1995)Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 :65-93;Harding, F. 和 Lonberg, N., (1995)Ann. N. Y. Acad. Sci764 :536-546;Fishwild, D. 等(1996)Nature Biotechnology14 :845-851 中详细介绍了 HuMAb 小鼠的制备。还参见美国专利 5545806 ;5569825 ;5625126 ;5633425 ;5789650 ;5877397 ;5661016 ;5814318 ;5874299 ;和 5770429 ;以上所有专利均属于 Lonberg ;以及属于 Surani 等的美国专利 5545807 ;W098 / 24884、W094 / 25585、W093 / 1227、W092 / 22645、W092 / 03918 和 W001 / 09187。

[0179] KM 小鼠包含人重链转染色体和人 κ 轻链转基因。还在 KM 小鼠中破裂内源性小鼠重链和轻链基因,从而小鼠的免疫导致产生人免疫球蛋白而非小鼠免疫球蛋白。KM 小鼠的构建以及它们培育人免疫球蛋白的应用在 W002 / 43478 中进行了详细介绍。

[0180] 免疫

[0181] 为了制备 CD20 的完整的人单克隆抗体,可以通过 Lonberg, N. 等(1994) 同上 :856-859;Fishwild, D. 等(1996) 同上和 W094 / 24884 中所述的方法用富集的 CD20 抗原制品和 / 或表达 CD20 的细胞对包含免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠(例如, HCo12、HCo7 或 KM 小鼠)进行免疫。或者,可以用编码人 CD20 的 DNA 免疫小鼠。优选地,在第一次输注时,所述小鼠为 6-16 周龄。例如,可以通过腹膜内注射方式用 CD20 抗原的富集制品(5-50 μ g) 对 HuMAb 小鼠进行免疫。在用 CD20 抗原的纯化或富集制剂进行免疫能产生抗体

时,还可以用表达 CD20 的细胞,例如,一种细胞系来免疫小鼠以促进免疫反应。

[0182] 用各种抗原积累的经验业已表明,当用存在于完全弗氏佐剂中的表达 CD20 的细胞通过腹膜内 (IP) 或皮下 (SC) 起始免疫,然后每隔一周用存在于 PBS 中的表达 CD20 的细胞进行 IP 免疫 (一共多达 10 次) 时,所述 HuMAb 转基因小鼠应答最强。在免疫接种过程中,可以通过眼眶后取血获得的血浆样品监测免疫应答。可以通过 FACS 分析对所述血浆进行筛选 (如下所述的),并且可以将具有足够滴度的抗 CD20 人免疫球蛋白的小鼠用于融合。在宰杀并取出脾脏之前 3 天,可以通过静脉内注射表达 CD20 的细胞对所述小鼠进行加强免疫。

[0183] 制备产生抗 CD20 的人单克隆抗体的杂交瘤

[0184] 为了制备生产抗人 CD20 的人单克隆抗体的杂交瘤,可以从免疫小鼠中分离脾细胞和淋巴节细胞并且与合适的免疫化细胞系相融合,如小鼠骨髓瘤细胞系。随后可以对得到的杂交瘤筛选抗原特异性抗体的生产。例如,通过 50% 的 PEG 使来自免疫过的小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮液与 SP2 / 0-Ag8.653 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL1580) 融合。以大约 2×10^5 每孔的密度将细胞铺在平底微量滴定板上,然后在选择培养基中孵育 2 周,该培养基含有 10% 胎克隆血清,5-10% origen 杂交瘤克隆因子 (IGEN) 和 $1 \times \text{HAT}$ (Sigma)。大约 2 周之后在 HAT 被 HT 取代的培养基中培养细胞。然后通过 ELISA 筛选每一个孔中的包含人 κ 轻链的抗体,并且通过 FACS 利用表达 CD20 的细胞筛选 CD20 的特异性。一旦发生了广泛的杂交瘤的生长,通常在 10-14 天之后对培养基进行观察。将抗体分泌杂交瘤重新铺平板,再次筛选,并且如果人 IgG 抗 CD20 单克隆抗体仍然呈阳性的话,可以通过限制稀释亚克隆至少 2 次。然后在体外培养稳定的亚克隆,以便在组织培养基中制备抗体用于鉴定。

[0185] 生产抗 CD20 的人单克隆抗体的转染瘤的制备

[0186] 利用,例如本领域公知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合,还可以在宿主细胞转染瘤中生产本发明的人抗体 (Morrison, S. (1985) Science 229 :1202)。

[0187] 例如,在一个实施方案中,可以将目的基因,例如,人抗体基因连接入一种表达载体中,如在 W087 / 04462、W089 / 01036 和 EP338841 中公开的 GS 基因表达系统或其它本领域公知的表达系统所用的真核表达质粒。可以将纯化的具有克隆的抗体基因的质粒导入真核宿主细胞如 CHO 细胞、NS / 0 细胞或 HEK293 细胞或其它真核细胞像源于植物的细胞、真菌或酵母的细胞中。用于导入这些基因的方法可以是本领域所公开的方法,如电转化、脂染、脂转染胺或其它的方法。将这些抗体基因导入宿主细胞中后,可以鉴定并筛选表达该抗体的细胞。这些细胞代表转染瘤,随后可以对其进行扩增以增加它们的表达水平并进行提高以生产抗体。

[0188] 生产抗 CD20 的人单克隆抗体的其它重组方法

[0189] 选择性地,可以将克隆的抗体基因表达于其它表达系统中,包括原核细胞,如微生物,如大肠杆菌 (*E. coli*) 以生产单链 Fv 抗体,藻类以及昆虫细胞。另外,抗体可以在转基因非人动物,如在羊和兔的奶中或在鸡蛋中,或在转基因植物中进行生产。见,例如 Verma, R. 等 (1998). Antibody engineering : Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunozol. Meth.* 216 :165-181 ; Pollock 等 (1999). Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies.

J. Immunol. Meth. 231 :147-157; 和 Fischer, R. 等 (1999). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. Biol. Chem. 380 :825-839.

[0190] 利用部分抗体序列表达完整抗体

[0191] 抗体主要经位于 6 个重链和轻链互补决定基区域 (CDR) 中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此, 单个抗体间 CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列有更多变化。因为 CDR 序列负责大多数抗体-抗原的相互作用, 所以通过构建表达载体表达重组抗体是可能的, 这些载体包括来自特殊的自然发生的抗体的 CDR 序列, 其移植到来自带有不同性质的不同抗体的框架序列上, 这些抗体模仿特定的天然发生的抗体的性质 (见, 例如, Riechmann, L. 等 (1998) Nature 332 :323-327 ; Jones, P. 等 (1986) Nature 321 :522-525 ; 和 Queen, C. 等 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10029-10033)。该框架序列能从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库中获得。这些种系序列将区别于成熟抗体基因序列, 因为它们将不包括完整装配的可变基因, 这些可变基因在 B 细胞成熟过程中由 V(D)J 连接形成。种系基因序列在个别的甚至是整个可变区也将区别于高亲和性所有二级抗体。但是, 体细胞突变不是均匀分布在可变区。例如, 体细胞突变在框架区域 1 的氨基端部分和在框架区域 4 的羧基端部分相对不常见。而且, 许多体细胞突变不会显著地改变抗体的结合特性。为此, 没有必要为了再生出一种完整的含有与原始抗体相似的结合特性的重组抗体, 获得特定抗体的完整 DNA 序列 (参见 W099 / 45962)。跨越 CDR 区的部分重链和轻链序列通常足够用于本目的。部分序列用于测定哪些种系可变的和连接的基因区段有助于重组抗体可变基因。种系序列然后用在填充可变区域的丢失部分。重链和轻链的前导序列在蛋白成熟过程中被切下, 因而不为最终抗体的性质作贡献。为了加入丢失的序列, 可以将克隆的 cDNA 序列与合成的寡核苷酸通过连接或 PCR 扩增进行结合。或者, 整个可变区能合成为一组短小、重叠的寡核苷酸合成并由 PCR 扩增组合从而产生一个完整的合成可变区克隆。本方法具有某些益处如消除或包括特定的限制性位点, 或特定密码子的最优化。

[0192] 来自杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列被用于设计一重叠组的合成寡核苷酸从而产生合成的带有与天然序列相同氨基酸编码能力的 V 序列。合成的重链和 κ 轻链序列能在三个方面与自然序列相区别: 重复核苷酸碱基的链被中断以便有利于寡核苷酸合成和 PCR 扩增; 依据 Kozak 规则引入最佳翻译起始位点 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266, 19867-19870,); 和翻译起始位点上游的 HindIII 位点改造。

[0193] 对于重链和轻链可变区, 最佳的编码和对应的非编码链的序列分裂成 30-50 个核苷酸区段, 所述分裂大致发生于对应非编码寡核苷酸的中点。因此, 对每个链来说, 寡核苷酸都能装配成跨越 150-400 个核苷酸区段的重叠双链组。随后使用该组作为模板生产 150-400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。一般, 一个单一可变区寡核苷酸组将裂解为两个组, 这两个组单独扩增以生成两个重叠的 PCR 产物。然后这些重叠产物由 PCR 扩增组合形成完整的可变区。它还有可能在 PCR 扩增中包括重链或轻链恒定区域的重叠片段 (包括 κ 轻链的 BbsI 位点或 γ 重链的 AgeI 位点), 从而生成能够轻易克隆到表达载体构建体中的片段。

[0194] 随后将重构的重链和轻链可变区与克隆的启动子、引导序列、翻译起始序列、恒定区、3' 未翻译序列、多腺苷酸化序列和转录终止序列组合形成表达载体构建体。重链和轻链表达构建体能组合成一个单一载体, 将该载体共转染、按顺序转染或单独转染进宿主细胞中, 然后融合形成表达两个链的宿主细胞。

[0195] 用于构建表达载体表达人 IgG κ 的质粒描述如下。构建质粒以使得 PCR 扩增的 V 重链和 V κ 轻链 cDNA 序列能用于重构完整的重链和轻链小基因。这些质粒能用作完整地表达人或嵌合 IgG1 κ 或 IgG4 κ 抗体。构建相似的质粒用于表达其它重链同种型,或用于表达含有入轻链的抗体。

[0196] 因而,在发明的另一方面,将发明的人抗 CD20 抗体,例如,11B8、2F2 或 7D8 的结构特征用于产生结构相关的人抗 CD20 抗体,它至少保留本发明抗体的一种功能特征,如结合 CD20。更具体地,可以将 11B8、2F2 或 7D8 的一种或多种 CDR 区与已知的人框架区和 CDRs 重组结合以产生本发明的其它的、重组性设计的人抗 CD20 抗体。

[0197] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供一种制备抗 CD20 抗体的方法,包括:(1) 人重链框架区和人重链 CDR,其中至少一种人重链 CDRs 包含选自图 53、55 或 57 中所示的 CDR 氨基酸序列的氨基酸序列(或对应 SEQ ID NOs:13-15、19-21 或 25-27 中的氨基酸序列);和(2) 人轻链框架区和人轻链 CDR,其中至少一种人轻链 CDR 包含选自图 53、55 或 57 中所示的 CDRs 氨基酸序列的氨基酸序列中所示的氨基酸序列(或对应 SEQ ID NOs:16-18、22-24 或 28-30 中的氨基酸序列);其中该抗体保留结合 CD20 的能力。

[0198] 利用标准的结合测试,如在实施例给出的那些(例如,FACS 分析)来测定抗体结合 CD20 的能力。

[0199] 由于在本领域中众所周知抗体重链和轻链 CDR3 区在抗体对抗原的结合特异性/亲和性中发挥着特别重要的作用,所以如上制备的本发明的重组抗体优选包含 2F2、7D8 或 11B8 的重链和轻链 CDR3。另外该抗体可以包含 2F2、7D8 或 11B8 的 CDR2。另外该抗体可以包含 2F2、7D8 或 11B8 的 CDR1。因此,本发明进一步提供抗 CD20 抗体,包含:(1) 人重链框架区、人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区和人重链 CDR3 区,其中人重链 CDR3 区是如图 53、55 或 57 中所示的 2F2、7D8 或 11B8 的 CDR3(或对应 SEQ ID NOs:15、21 或 27 中的氨基酸序列);(2) 人轻链框架区、人轻链 CDR1 区、人轻链 CDR2 区和人轻链 CDR3 区,其中人轻链 CDR3 区是如图 53、55 或 57 中所示的 2F2、7D8 或 11B8 的 CDR3(或对应 SEQ ID NOs:18、24 或 30 中的氨基酸序列),其中该抗体结合 CD20。该抗体可以进一步包含 2F2、7D8 或 11B8 的重链 CDR2 和/或轻链 CDR2。该抗体可以进一步包含 2F2、7D8 或 11B8 的重链 CDR1 和/或轻链 CDR1。

[0200] 优选地,上述工程化的抗体的 CDR1、2 和/或 3 包含本文公开的 2F2、7D8 或 11B8 的 CDR 确切氨基酸序列。不过,普通技术人员会理解从 2F2、7D8 或 11B8 的 CDR 确切氨基酸序列而来的一些偏差是可能的,同时仍然保持有效结合 CD20 的抗体的能力(例如,保守性取代)。因此,在另一个实施方案中,工程化的抗体可以由与一种或多种 2F2、7D8 或 11B8 的 CDR 例如 90%、95%、98%或 99.5%相同的一种或多种 CDR 组成。

[0201] 除了简单地结合 CD20 之外,工程化的抗体如即些上述的抗体可以对于它们保有其它本发明的抗体的功能特性进行选择,如

[0202] (1) 从 CD20 上的低解离速率;

[0203] (2) 结合 CD20 的高亲和力;

[0204] (3) 结合 CD20 上的独特表位,和/或特异性定向结合 CD20,和/或结合 CD20 的特异性形式;

[0205] (4) 在 CD55 / 59 阴性或 CD55 / 59 阳性细胞上介导高水平的 CDC;

[0206] (5) 结合 CD20 后转位到脂筏中;

- [0207] (6) 抑制表达 CD20 的细胞生长；
- [0208] (7) 诱导表达 CD20 的细胞凋亡；
- [0209] (8) 诱导表达 CD20 的细胞同型粘着；
- [0210] (9) 延长具有表达 CD20 的肿瘤细胞的个体存活；
- [0211] (10) 与效应细胞混合时介导 CD20 靶的 ADCC；
- [0212] (11) 消除表达 CD20 细胞的能力；和 / 或
- [0213] (12) 消除表达低水平的 CD20 的细胞 (CD20^{Low}) 的能力。

[0214] 人单克隆抗体结合 CD20 的鉴定

[0215] 为了纯化人抗 CD20 抗体,可以将选择的杂交瘤生长于两升的旋转烧瓶中,用于单克隆抗体纯化。在用蛋白 A-琼脂糖(针对 IgG1 抗体)(Pharmacia, Piscataway, NJ) 或抗人 IgG 涂布的琼脂糖或对于 IgG3 的蛋白质 G-琼脂糖进行亲和层析之前,可以对上清液进行过滤并浓缩。可以通过凝胶电泳和高效液相层析检查洗脱的 IgG,以确保纯度。可以将所述缓冲液换成 PBS,并且可以通过 OD280 使用 1.43 的消光系数测定浓度。可以将所述抗体分装,并且在 -80°C 下保存。

[0216] 为了确定所选择的人抗 CD20 单克隆抗体是否结合独特的表位,可以使用定点突变和多点突变。

[0217] 为了确定纯化抗体的同种型,可以进行同种型 ELISAs。可以在 4°C 下用 10 微克 / 毫升的抗人 Ig 将微量滴定板孔涂布过夜。在用 5% BSA 封闭之后,在环境温度下让所述平板与 10 微克 / 毫升单克隆抗体或纯化的同种型对照反应 2 小时。然后用人 IgG1 或人 IgM 特异性碱性磷酸酶共轭的探针与所述孔反应。在洗涤之后,用 pNPP 底物 (1 毫克 / 毫升) 使所述平板显影,并在 405-6500D 下分析。

[0218] 为了证明抗 CD20 抗体在免疫小鼠血清中的存在或单克隆抗体与表达 CD20 的活细胞的结合,可以使用流式细胞分析。简单地讲,将表达 CD20 的细胞系(生长于标准生长条件下)与各种浓度的在包含 0.1% BSA 和 0.02% 叠氮化钠的 PBS 中的单克隆抗体混合,于 4°C 孵育 30 分钟。在洗涤之后,将细胞与荧光素标记的抗人 IgG 抗体在与一抗染色相同的条件下进行反应。可以通过 FACSscan 仪器利用单一活细胞上的光散射和侧面散射特性分析所述样品。可以利用使用荧光显微镜的其它测定方法,作为流式细胞仪测定的补充或替代。可以按上述方法对细胞进行染色,并且通过荧光显微镜检查。该方法可以观察单细胞,但根据抗原密度灵敏度可能降低。

[0219] 可以通过 western 印迹进一步检验抗 CD20 的人 IgGs 与 CD20 抗原的反应性。简单地讲,可以制备来自表达 CD20 的细胞的细胞提取物,并且进行十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳之后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用 20% 的小鼠血清封闭,并且用待试验的单克隆抗体作探针检测。可以用抗人 IgG 碱性磷酸酶检测人 IgG 结合,并且用 BCIP / NBP 底物片 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) 显影。

[0220] 抗 CD20 的人单克隆抗体的吞噬作用和细胞杀伤活性

[0221] 除了能特异性结合 CD20 之外,还可以检测人单克隆抗 CD20 抗体介导对表达 CD20 细胞的吞噬作用和杀伤作用的能力。在体外对单克隆抗体活性的检测,可以在体内模型试验之前提供初步的筛选。简单地讲,可以通过 Ficol1 Hypaque 密度离心,然后裂解污染红细胞纯化来自健康供体的多型核细胞 (PMN)、NK 细胞或其它效应细胞。可以将洗涤过的 PMNs

悬浮在添加了 10% 加热灭活的胎牛血清的 RPMI 中, 并且以各种效应细胞与肿瘤细胞的比例 (效应细胞 : 肿瘤细胞) 与 ^{51}Cr 标记过的表达 CD20 的细胞混合。然后可以以各种浓度添加纯化的人抗 CD20 IgGs。可以用无关的人 IgG 作阴性对照。根据所用的效应细胞, 测定可以在 37°C 下进行 4-20 小时。可以通过测定释放到培养上清液中的 ^{51}Cr 分析样品的细胞裂解作用。还可以通过相互组合的方式测定抗 CD20 单克隆抗体, 以便确定多种单克隆抗体是否增强细胞裂解。

[0222] 也可以在活体模型 (例如, 小鼠) 上检验与 CD20 结合的人单克隆抗体, 以便测定它们控制表达 CD20 的肿瘤细胞的生长的效力。例如, 这些抗体可以根据以下标准进行选择, 这些标准并不是排他性的:

[0223] 1. 与活的表达 CD20 的细胞结合;

[0224] 2. 从 CD20 上的低解离速率;

[0225] 3. 结合 CD20 的高亲和力;

[0226] 4. 结合 CD20 上的独特表位, 和 / 或特异性定向结合 CD20, 和 / 或结合 CD20 的特异性形式;

[0227] 5. 表达 CD20 的细胞的调理;

[0228] 6. 在人效应细胞存在时介导表达 CD20 的细胞的生长抑制、吞噬作用和 / 或杀伤;

[0229] 7. 在 CD55/59 阴性或 CD55/59 阳性细胞上介导高水平 CDC 的能力;

[0230] 8. 诱导同型粘着的能力;

[0231] 9. 结合 CD20 后诱导转位到脂筏中的能力

[0232] 10. 诱导凋亡的能力;

[0233] 11. 在表达 CD20 的细胞上诱导 ADCC 的能力;

[0234] 12. 消除表达 CD20 细胞的能力; 和 / 或

[0235] 13. 消除表达低水平的 CD20 的细胞 (CD20^{Low}) 的能力。

[0236] 本发明优选的人单克隆抗体满足这些标准中的一条或多条。利用多种已知的技术, 可以测试人单克隆抗 CD20 抗体介导 CDC 的能力。例如, 可以从健康个体的血液中获得补体血清, 所述血液可以进行离心和收集。为了测定各种 mAbs 的 CDC 活性, 可以使用不同的方法。例如可以测量 ^{51}Cr 释放或者可以利用碘化丙锭 (PI) 排除测试来评估提升的膜渗透性。简言之, 可以洗涤靶细胞并且在 RPMI-1% BSA 中重悬为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。可以向细胞中加入各种浓度的 mAb 并且允许在室温结合 10-15 分钟。随后加入血清至终浓度 20% (v/v) 并且将细胞在 37°C 温育 45 分钟。可以在 FACS 管中将所有来自每个样品的细胞加至 PI 溶液。混合物随后可以立即利用 FACScalibur 流式细胞仪通过流式细胞分析进行评估并且利用 CellQuest pro 软件 (BD Biosciences, Mountain view, CA) 进行分析。

[0237] 为了检测启动凋亡的能力, 可以, 例如, 将人单克隆抗 CD20 抗体与 CD20 阳性肿瘤细胞, 例如, Daudi 一起于 37°C 温育约 20 小时。可以收集细胞并在膜联蛋白 V-FITC 结合缓冲液 (BD biosciences) 中洗涤, 并且以膜联蛋白 V-FITC (BD biosciences) 于 4°C 黑暗中标记 15 分钟。可以在 FACS 管中将所有来自每个样品的细胞加至 PI 溶液 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 于 PBS 中) 并且立即通过流式细胞分析进行评估 (如上)。

[0238] 在本发明的一个特定实施方案中, 将人单克隆抗体组合使用, 例如, 作为一种包含一种或多种抗 CD20 单克隆抗体的药物组合物。可以将具有不同但互补的活性的人抗 CD20

单克隆抗体组合于单个治疗以达到预期的治疗或诊断效果。在一个优选的实施方案中,该组合物包括一种介导 CDC 的抗 CD20 人单克隆抗体,组合以另一种诱导凋亡的人抗 CD20 单克隆抗体。在另一实施方案中,该组合物包括一种介导高效杀伤靶细胞的抗 CD20 人单克隆抗体,组合以另一种抑制表达 CD20 细胞生长的人抗 CD20 单克隆抗体。

[0239] II. 制备产生人单克隆抗 CD 抗体的转基因非人动物

[0240] 在另一方面,本发明提供了诸如转基因或转染色体小鼠的转基因和转染色体非人动物,它能够表达可以特异性结合 CD20 的人抗体。在一种特定的实施方案中,发明提供一种具有包含人重链转基因的基因组的转基因或转染色体小鼠,从而当用表达 CD20 的细胞进行免疫时该小鼠产生人抗 CD20 抗体。人重链转基因可以整合入小鼠的染色体 DNA 中,如转基因的,例如本文详细描述和示例的 HuMab 小鼠的情况一样。或者,人重链转基因可以保持于染色体外,如 W002/43478 中所述的转染色体(例如, KM)小鼠的情况一样。这类转基因和转染色体动物能够通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生抗 CD20 的人单克隆抗体的多种同种型(例如 IgG、IgA 和 / 或 IgE)。以异源抗体集合应答外源抗原刺激的转基因或转染色体非人动物的设计,需要包含在转基因动物中的异源免疫球蛋白转基因在整个 B 细胞发育途径中正确地发挥作用。这包括,例如,异源重链转基因的同种型转换。因此,构建本发明的转基因,以便能诱导同种型转换和下列抗体基因特性的一种或多种:(1) 高水平的和细胞类型特异性的表达,(2) 功能性基因重排,(3) 活化等位排斥并对等位排斥作出反应,(4) 表达足够的一级成分,(5) 信号转导,(6) 体细胞高变,和(7) 在免疫应答中所述转基因抗体基因座的支配作用。

[0241] 并不需要满足上述所有标准。例如,在转基因动物的内源免疫球蛋白基因座被功能性破坏的实施方案中,所述转基因不必活化等位排斥。另外,在所述转基因包括功能性重排的重链和 / 或轻链免疫球蛋白基因的实施方案中,第二个标准即功能性基因重排是不需要的,至少对于业已重排的转基因来说是如此。关于分子免疫学的背景知识,参见 *Fundamental Immunology*, 2nd edition (1989), Paul, William E., ed. Raven Press, N. Y.。

[0242] 在某些实施方案中,本发明用于制备人单克隆抗体的转基因非人动物在转基因动物种系中含有重排的、未重排的或重排的和未重排的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因的组合。每一个重链转基因包含至少一个 C_H 基因。另外,所述重链转基因可以包含有功能的同种型转换序列,该序列能支持编码多个 C_H 基因的异源转基因在所述转基因动物的 B 细胞中的同种型转换。所述转换序列可以天然存在于被用作转基因 C_H 基因来源的物种的种系免疫球蛋白基因座上,或者所述转换序列可以来源于存在于接受所述转基因构建体的物种(转基因动物)中的序列。例如,用于产生转基因小鼠的人转基因构建体如果结合类似于天然存在于小鼠重链基因座上的转换序列的话,就能产生高频率的同种型转换事件,因为小鼠转换序列可能进行了优化,能和小鼠转换重组酶系统一起发挥作用,而所述人转换序列则不能。可以分离转换序列并通过传统克隆方法克隆,或者通过根据公开的与免疫球蛋白转换区序列相关的序列信号设计重叠的合成寡核苷酸从头合成 (Mills 等, *Nucl. Acids Rev.* 15 :7305-7316, 1991 ; Sideras 等, *Intl. Immunol.* 1 :631-642, 1989)。对上述每一种转基因动物来说,在显著比例(至少 10%)的所述转基因动物 B 细胞中发现了功能性重排的异源重链和轻链免疫球蛋白转基因。

[0243] 用于产生本发明转基因动物的转基因包含一个重链转基因,该转基因包含编码至

少一个可变基因片段,一个多样性基因片段,一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的DNA。免疫球蛋白轻链转基因包含编码至少一个可变基因片段,一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的DNA。编码所述轻链和重链基因片段的基因片段相对于转基因动物而言是异源的,因为它们来源于或者相应于来自不包含所述转基因非人动物的物种中编码免疫球蛋白重链和轻链基因片段的DNA。在本发明的一个方面,构建所述转基因,以便单个的基因片段是未重排的,即没有进行重排,以便编码有功能的免疫球蛋白轻链或重链。所述未重排的转基因支持V、D和J基因片段的重组(功能性重排),并优选支持在接触CD20抗原时,在所述转基因动物体内将D区基因片段的全部或一部分掺入到所得到的重排免疫球蛋白重链上。

[0244] 在另一个实施方案中,所述转基因包含一个未重排的“微型基因座”。所述转基因通常包含C、D和J片段的主要部分,以及V基因片段的亚型。在所述转基因构建体中,诸如启动子、增强子、类型转换区、RNA加工的剪接供体和剪接受体序列和重组信号之类的各种调控序列,包含来自所述异源DNA的相应序列。所述调控序列可以整合到来自用于本发明的非人转基因动物的相同或相关物种的转基因上。例如,可以将人免疫球蛋白基因片段与啮齿类动物免疫球蛋白增强子序列组合在一个转基因上以便用于转基因小鼠。另外,可以将合成的调控序列整合到所述转基因上,其中,所述合成的调控序列与已知天然存在于哺乳动物基因组中的功能性DNA序列不同源。合成的调控序列是按照公认的规则设计的,例如,规定剪接-受体位点或启动子/增强子基序的容许序列的规则。例如,与天然存在的种系Ig基因座相比,微型基因座包含具有至少一个非必需DNA部分(例如,间隔序列;内含子或其部分)内部(即不在该部分的末端)缺失的基因组免疫球蛋白基因座的一部分。

[0245] 优选的转基因和转染色体非人动物,例如,小鼠,具有免疫球蛋白产物的大部分成分,理想的是在调整体积后基本上类似于人的免疫球蛋白组成成分。通常至少占大约10%,优选25-50%或更多的多样性。一般,根据导入小鼠基因组中的V、J和D区的数量会产生至少大约1000种不同的免疫球蛋白(优选IgG),优选 10^4 - 10^6 或更多,并且由在连接区上的V(-D-)J基因片段重组随机核苷酸添加所产生的其它多样性所驱动。一般地,免疫球蛋白对预先确定抗原的亲和力(K_D)为小于 10^{-7} M,如小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或 10^{-10} M或甚至更低。

[0246] 如上所述的转基因的和染色体的非人动物,例如,小鼠可以用,例如,表达CD20的细胞进行免疫。或者,该转基因动物可以用编码人CD20的DNA进行免疫。这些动物随后将产生通过转换重组(顺式转换)进行类型转换的B细胞并且表达与CD20反应的免疫球蛋白。该免疫球蛋白可以是人抗体(也称为“人序列抗体”),其中重链和轻链多肽由人转基因序列所编码,它可以包括源于体细胞突变和V区重组连接的序列,以及种系编码序列;这些人抗体可以称作基本上与由人 V_L 和 J_L 或 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段所编码的多肽序列相同,即使其它种系序列可以作为体细胞突变和不同的V-J和V-D-J重组连接的结果存在。每个抗体链的可变区一般与人种系V、J至少80%相似,并且对于重链来说,与D基因片段相似;经常是与存在于转基因上的人种系序列至少85%相似;常常与存在与转基因上的人种系序列90%或95%或更高地相似。不过,由于非种系序列是由体细胞突变和VJ以及VDJ连接引入的,人序列抗体经常会具有一些可变区序列,它不是由小鼠种系的人转基因中发现的人V、D或J基因片段所编码的。一般地,这种非种系序列(或个别的核苷酸位置)将在CDR中或附近聚集,或在聚类已知体细胞突变的区域聚集。

[0247] 本发明的另一方面包括源自如本文所述的转基因或转染色体非人动物的 B 细胞。所述 B 细胞可以用于产生表达人单克隆抗体的杂交瘤,所述单克隆抗体以高亲和力(例如,低于 10^{-7} M 的解离平衡常数 (K_D)) 结合人 CD20。因而,在一个实施方案中,本发明提供一种杂交瘤,它产生具有低于 10^{-7} M 的亲和力 (K_D) 的人抗体,如低于 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或甚至更低,所述亲和力是当通过利用放射活性标记的单克隆抗体进行表达 CD20 的细胞的 scatchard 分析或通过利用 FACS 分析测定半最大结合浓度而进行测定时得到的。

[0248] 在本文中单克隆抗体包含一种人序列轻链,所述轻链由 (1) 具有与由人 V_L 基因片段和人 J_L 片段所编码的多肽序列基本上相同的多肽序列的轻链可变区,和 (2) 由人 C_L 基因片段编码的轻链恒定区;和一种人序列重链,所述轻链由 (1) 具有与由人 V_H 基因片段、D 区和人 J_H 片段所编码的多肽序列基本上相同的多肽序列的重链可变区,和 (2) 由人 C_H 基因片段编码的重链恒定区。

[0249] 通过一种在具有包含整合的人免疫球蛋白转基因的基因组的转基因非人动物中扩增人可变区基因片段集合的方法可以促进抗 CD20 的高亲和力人单克隆抗体的发展,所述方法包括将一种包含 V 区基因片段的 V 基因转基因导入基因组中,所述 V 区基因片段不存在于所述整合的人免疫球蛋白转基因中。通常,所述 V 区转基因是包含一部分人 V_H 或 V_L (V_K) 基因片段排列的酵母人工染色体,该基因片段排列可以天然存在于人基因组中,或者可以通过重组方法分别剪接在一起,它可以包含失调的 (out of order) 或省略的 V 基因片段。通常在 YAC 上包含至少 5 个或更多个功能性 V 基因片段。在这种变化形式中,可能通过 V 集合扩增方法制备一种转基因小鼠,其中,该小鼠表达的免疫球蛋白链包含由存在于 V 区转基因上的 V 区基因片段编码的可变区序列和由人 Ig 转基因上编码的 C 区。通过 V 集合扩增方法,可以产生具有至少 5 个不同 V 基因的转基因小鼠。因为小鼠可以包含至少大约 24 个 V 基因或更多。某些 V 基因片段可能是无功能的(例如,假基因等);所述片段可以保留,或者如果需要的话,可以通过技术人员现有的重组方法选择性地删除这些片段。

[0250] 一旦将所述小鼠种系工程改造成包含具有基本上不存在于含有 J 和 C 基因片段的人 Ig 转基因上的扩增的 V 片段组成成分的有功能的 YAC,就可以将该性状繁殖并转育到其它遗传背景中,包括具有扩增的 V 片段组成成分的有功能的 YAC 被转育到具有不同的人 Ig 转基因的小鼠种系中的背景。可以将具有扩增的 V 片段组成成分的多个有功能的 YACs 转育到一个种系中,以便与人 Ig 转基因(或多个人 Ig 转基因)一起起作用。尽管在本文中被称为 YAC 转基因,这种转基因在整合到所述基因组之后可能基本上缺乏酵母序列,如缺乏在酵母中自主复制所需要的序列;在酵母中复制之后一旦不再需要(即在导入小鼠 ES 细胞或小鼠原合子中之前),可以通过遗传工程(例如,限制性消化和脉冲场凝胶电泳或其它合适方法)选择性地除去所述序列。繁殖人序列免疫球蛋白表达性状的方法,包括培育具有人 Ig 转基因,并且还选择性地具有包含扩增的 V 片段组成成分的有功能的 YAC 的转基因小鼠。 V_H 和 V_L 基因片段都可以存在于 YAC 上。操作者可以将所述转基因小鼠转育到任何背景,包含具有其它人转基因的背景,包含人 Ig 转基因和/或编码其它人淋巴细胞蛋白的转基因。本发明还提供了一种由具有扩增的 V 区成分 YAC 转基因的转基因小鼠产生的高亲和力人序列免疫球蛋白。尽管上面公开了本发明转基因动物的优选实施方案,其它实施方案也是可行

[0251] 的,可以将这些实施方案划分成三种类型:

[0252] I. 含有未重排的重链和重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

[0253] II. 含有未重排的重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

[0254] III. 含有重排的重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。

[0255] 在这些类型的转基因动物中,其优选的顺序如下:II>I>III,其中,业已通过同源重组(或其它方法)敲除了内源轻链基因(或至少是K基因);I>II>III,其中,并未敲除内源轻链基因,并且必须经过等位排斥成为显性。

[0256] III. 能结合 CD20 的双特异性 / 多特异性分子

[0257] 在本发明的另一个实施方案中,可以将抗 CD20 的人单克隆抗体衍生化,或者与诸如另一种肽或蛋白质(例如,Fab,片段)的另一种功能性分子偶联,以便制备能结合多个结合位点或靶表位的双特异性或多特异性分子。例如,本发明的抗体或其抗原结合部分功能性地连接于(例如,通过化学连接、基因融合、非共价结合或其它方式)诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物的

[0258] 一种或多种其它结合分子上。

[0259] 因此,本发明包括含有至少一种对 CD20 的第一结合特异性和对第二种靶表位的第二结合特异性的双特异性和多特异性分子。在本发明的一种特定实施方案中,所述第二靶表位是 Fc 受体,例如人 Fc γ RI (CD64) 或人 Fc α 受体 (CD89),或 T 细胞受体,例如 CD3。因此,本发明包括能够同时结合表达 Fc γ R、Fc α R 或 Fc ϵ R 的效应细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞或多型核细胞 (PMNs)) 和表达 CD20 的靶细胞的双特异性和多特异性分子。这些双特异性和多特异性分子将 CD20 引导至效应细胞,并且象本发明的人单克隆抗体一样,诱导 Fc 受体介导的效应细胞的活性,如吞噬表达 CD20 的细胞、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、细胞因子释放、或产生超氧化物阴离子。

[0260] 本发明的双特异性和多特异性分子除了抗 Fc 结合特异性或抗靶细胞抗原和抗 CD20 结合特异性之外,还可以包括第三种结合特异性。在一个实施方案中,所述第三种结合特异性是抗增强因子 (EF) 部分,例如,结合参与细胞毒性活性的表面蛋白,并因此增强对所述靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是一种抗体、功能性抗体片段或结合诸如抗原或受体的特定分子的配体,并因此导致 Fc 受体或靶细胞抗原的结合决定因子效果的增强。“抗增强因子部分”可以结合 Fc 受体或靶细胞抗原。另外,所述抗增强因子部分可以结合在与所述第一和第二结合特异性结合的实体不同的实体上。例如,抗增强因子部分可以结合一种细胞毒性 T 细胞(例如,通过 CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1 或其它免疫细胞,它们导致针对所述靶细胞的免疫应答增强)。

[0261] 在一个实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包括至少一种抗体,或其抗体片段作为结合特异性,包括,例如, Fab、Fab₂、F(ab')₂、Fv、或单链 Fv。所述抗体也可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,如 Fv 或公开于 Ladner 等 US4,946,778 中的单链构建体。该抗体还可以是一种公开于 US2003/0118592 和 US2003/0133939 的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。

[0262] 在一个实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包含对存在于效应细胞表达上的 Fc γ R 或人 Fc α R 的结合特异性,以及对靶细胞抗原,例如,CD20 的第二结合特异性。

[0263] 在一个实施方案中,对 Fc 受体的结合特异性是由人单克隆抗体提供的,它的结合不受人免疫球蛋白 G (IgG) 阻断。如本文所用的,术语“IgG 受体”表示位于 1 号染色体上的

8 个 γ 链基因中的任一个。这些基因一共编码 12 种跨膜或可溶性受体同种型,这些同种型被划分成三种类型的

[0264] Fc γ 受体 :Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16)。在一种优选实施方案中,Fc γ 受体是人高亲和力 Fc γ RI。

[0265] Fanger 等在 W088/00052 和 US4954617 中介绍了这些优选单克隆抗体的产生和特征分析。这些抗体与 Fc γ RI、Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的表位结合的位点,与所述 Fc γ 的受体结合位点不同,因此,其结合基本上不会受到 IgG 生理水平的抑制。在本发明中有用的特异性抗 Fc γ RI 抗体是 mAb22、mAb32、mAb44、mAb62 和 mAb197。在其它实施方案中,所述抗 Fc γ 受体抗体是单克隆抗体 22 (H22) 的人源化形式。H22 抗体的产生和特征分析公开在 Graziano R. F. 等 (1995) J. Immunol1155 (10) :4996-5002 和 W094/10332 中。H22 抗体生产细胞系以 HA022CL1 的名称,于 1992 年 11 月 4 日保存在美国典型培养物保藏中心,保藏号为 CRL11177。

[0266] 仍然在另一种优选实施的方案中,对 Fc 受体的结合特异性是由结合诸如 Fc- α 受体 (Fc α RI (CD89)) 的人 IgA 受体的抗体提供的,所述抗体的结合优选不会受到人免疫球蛋白 A (IgA) 的阻断。术语“IgA 受体”意在包含位于 19 号染色体上的一个 α 基因 (Fc α RI) 的基因产物。已知该基因编码 55-110kDa 的若干种不同剪接的跨膜同种型。Fc α RI (CD89) 是在单核细胞 / 巨噬细胞、嗜伊红性和嗜中性粒细胞上组成型表达的,但不能在非效应性细胞群体上表达。Fc α RI 对 IgA1 和 IgA2 具有中等亲和力,该亲和力在接触诸如 G-CSF 或 GM-CSF 的细胞因子之后会提高 (Morton, H. C. 等,1996, Critical Reviews in Immunology16 :423-440)。业已介绍了能在 IgA 配体结合结构域之外结合 Fc α RI 的四种 Fc α RI 特异性单克隆抗体,这些抗体被确定为 A3、A59、A62 和 A77 (Monteiro, R. C. 等,1992, J. Immunol. 148 :1764)。

[0267] Fc α RI 和 Fc γ RI 是用于本发明的优选的触发受体,因为它们是 (1) 主要在诸如单核细胞、PMNs、巨噬细胞和树突细胞的免疫效应细胞上表达的 ;(2) 以高水平表达 (例如,每个细胞 5,000-100,000) ;(3) 细胞毒性活性的介体 (例如,ADCC,吞噬作用) ;(4) 介导靶向它们的包括自身抗原在内的抗原的增强了的抗原呈递。

[0268] 在另一个实施方案中,双特异性分子由两种根据本发明的单克隆抗体组成,这两种单克隆抗体具有互补的活性,如一种抗体主要通过诱导 CDC 起作用而另一种抗体主要通过诱导凋亡起作用,例如,2F2 结合以 11B8。

[0269] 在其它实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子还包括识别,例如,结合诸如 CD20 的靶细胞抗原的结合特异性。在一种优选的实施方案中,所述结合特异性是由本发明的人单克隆抗体提供的。

[0270] 如本文所用的“效应细胞特异性抗体”表示结合效应细胞的 Fc 受体的抗体或功能性抗体片段。用于本发明的优选抗体与效应细胞 Fc 受体在一个内源免疫球蛋白不能结合的位点结合。

[0271] 如本文所用的,术语“效应细胞”表示参与免疫应答的效应期的免疫细胞,所述效应期与免疫应答的识别期和激活期相反。例示性的免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如,淋巴细胞 (例如, B 细胞和 T 细胞,包括溶细胞 T 细胞 (CTLs))、杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜伊红性粒细胞、嗜中性粒细胞、多型核细胞、粒细胞、肥大细胞

和嗜碱性粒细胞。某些效应细胞表达特异性 Fc 受体,并且执行特定的免疫功能。在优选的实施方案中,效应细胞能够诱导体液依赖性细胞毒性 (ADCC),例如,嗜中性粒细胞能够诱导 ADCC。例如,表达 FcR 的单核细胞、巨噬细胞参与靶细胞的特异性杀伤和将抗原呈递给免疫系统的其它成分或者结合到呈递抗原的细胞上。在其它实施方案中,效应细胞可以吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。可以通过诸如细胞因子的体液因子调控特定 FcR 在效应细胞上的表达。例如,业已发现干扰素 γ (IFN- γ) 上调 Fc γ RI 的表达。这种增强的表达提高了具有 Fc γ RI 的细胞对靶的细胞毒性。效应细胞可以吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

[0272] “靶细胞”意为个体(例如,人或动物)体内的能够由本发明的组合物(例如,人单克隆抗体,双特异性或多特异性分子)靶向的任何不需要的细胞。在一种优选的实施方案中,所述靶细胞是表达或过表达 CD20 的细胞。表达 CD20 的细胞一般包括 B 细胞和 B 细胞肿瘤。

[0273] 尽管人单克隆抗体是优选的,可以用于本发明的双特异性或多特异性分子中的其它抗体为鼠类、嵌合型和人源化的单克隆抗体。这些鼠类、嵌合型和人源化的单克隆抗体可以通过本领域已知的方法进行制备。

[0274] 可以利用化学技术(参见,例如 D. M. Kranz 等,1981,Proc. Natl. Acad. Sci. USA78 : 5807)、“多瘤”技术(参见授予 Reading 的 US4474893)或重组 DNA 技术制备本发明的双特异性和多特异性分子。

[0275] 具体地讲,可以利用本领域公知的、并且在本文所提供的实施例中所介绍的方法,通过结合组成性结合特异性,例如,抗 FcR 和抗 CD20 的结合特异性,制备本发明的双特异性和多特异性分子。例如,可以分别制备所述双特异性和多特异性分子的每一种结合特异性,然后再彼此结合在一起。当所述结合特异性是蛋白或肽时,可以将多种偶联剂或交联剂用于共价结合。交联剂的例子包括蛋白 A、碳化二亚胺、N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰基-硫代乙酸酯 (SATA)、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、邻-亚苯基二马来酰亚胺 (oPDM)、N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯 (SPDP) 和磺基琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(参见例如, Karpovsky 等,1984, J. Exp. Med. 160 :1686 ;Liu, MA 等,1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA82 :8648)。其它方法包括由 Paulus (Behring Ins. Mitt., 1985, No. 78 :118-132); Brennan 等 (Science, 1985, 229 : 81-83) 和 Glennie 等 (J. Immunol., 1987, 139 :2367-2375) 所介绍的方法。优选的结合制剂是 SATA 和磺基-SMCC,这两种制剂都可以从 Pierce 化学公司 (Rockford, IL) 购买。

[0276] 当所述结合特异性是抗体时,可以通过两个重链的 C-末端铰链区的巯基键将它们结合。在一种特别优选的实施方案中,在结合之前对所述铰链区进行修饰,以使其包含奇数数量的巯基残基,优选一个残基。

[0277] 或者,两种结合特异性可以编码在同一个载体中,并且在同一个宿主细胞中表达和组装。当所述双特异性和多特异性分子是 mAb \times mAb、mAb \times Fab、Fab \times F(ab')₂ 或配体 \times Fab 融合蛋白时,该方法特别适用。本发明的双特异性和多特异性分子,例如,双特异性分子可以是单链分子,如单链双特异性抗体,包括一个单链抗体和一个结合决定子的单链双特异性分子,或包括两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性和多特异性分子还可以是单链分子或者可以包括至少两个单链分子。例如,制备双特异性和多特异性分子的方法在例如 US5260203 ;US5455035 ;US4881175 ;US5132405 ;US5091513 ;US5476786 ;

US5013653 ;US5258498 ;和 US5482858 中进行了介绍。

[0278] 可以通过酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA)、FACS 分析、生物测定 (例如,生长抑制) 或 Western 印迹测定证实所述双特异性和多特异性分子对其特异性靶的结合。上述每一种测定通常通过采用对目标复合物特异性的标记过的试剂 (例如,抗体), 来检测特定目标的蛋白-抗体复合物的存在。例如,可以用能识别、并特异性结合抗体-FcR 复合物的诸如酶联抗体或抗体片段检测 FcR 抗体复合物。或者,可以用多种其它免疫测定方法中的任一种检测复合物。例如,可以对所述抗体进行放射性标记,并用于放射免疫测定 (RIA) (参见,例如,Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986。可以利用诸如 γ 计数器或闪烁计数器或通过放射性自显影检测所述放射性同位素。

[0279] IV. 抗体结合物

[0280] 在另一方面,本发明描述了与诸如细胞毒素、药物 (例如,免疫抑制剂) 或放射性同位素的治疗成分结合的人抗 CD20 单克隆抗体。在本文中这种结合物称为“免疫结合物”。包括一种或多种细胞毒素的免疫结合物称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的 (例如,杀伤性) 的任何试剂。其例子包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、足叶乙甙、tenoposide、长春新碱、长春花碱、秋水仙素、阿霉素、道诺红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、和嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0281] 用于形成免疫结合物的合适的治疗剂包括,但不限于抗代谢物 (例如,氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂 (例如,氮芥、thioepa 苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀 (BSNU) 和洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消胺、二溴甘露糖醇、链脲菌素、丝裂霉素 C 和顺二氯二胺铂 (II) (DDP) 顺铂)、蒽环类 (例如,道诺红霉素 (以前称之为道诺霉素) 和阿霉素)、抗生素 (例如,放线菌素 (以前称之为更生霉素)、博来霉素、普卡霉素和氨基霉素 (AMC)), 以及抗有丝分裂剂 (例如,长春新碱和长春花碱)。在一个优选的实施方案中,治疗剂是一种细胞毒性剂或放射毒性剂。在另一个实施方案中,治疗剂是一种免疫抑制剂。还在另一个实施方案中,治疗剂是 GM-CSF。在一个优选的实施方案中,治疗剂是阿霉素、顺铂、博来霉素、硫酸盐、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺或蓖麻毒素 A。

[0282] 可以将本发明的抗体与放射性同位素,例如 I-131、钷-90 或铟-111 结合,以便制备细胞毒性放射性药物,用于治疗与 CD20 相关的疾病,如癌症。本发明的抗体结合物可用于修饰特定的生物学反应,并且所述药物成分并不被视为局限于传统的化学治疗剂。例如,所述药物成分可以是具有所需生物学活性的蛋白或多肽。例如,所述蛋白可以包括酶促活性的毒素或其活性片段,如相思豆毒素、蓖麻毒素 A、假单胞菌外毒素、或白喉毒素;诸如肿瘤坏死因子或干扰素 γ 的蛋白;或生物学反应修饰剂,如淋巴因子、白介素-1 (“IL-1”)、白介素-2 (“IL-2”)、白介素-6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子 (“G-CSF”) 或其它生长因子。

[0283] 将所述治疗成分结合在抗体上的技术是众所周知的,参见,例如,Arnon 等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 等 (编辑), pp. 243-56 (Alan

R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等, “Antibodies For Drug Delivery”, in *Controlled Drug Delivery* (第二版), Robinson 等 (编辑), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera 等 (编辑), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 等 (编辑), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe 等, “The Preparation And Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982)。

[0284] 在另一方面, 将根据本发明的人单克隆抗体附于联结整合剂上, 如 tiuxetan, 它允许将抗体结合到放射性同位素上。

[0285] V. 药用组合物

[0286] 在另一方面, 本发明提供了一种组合物, 例如, 一种含有本发明的一种或组合的人单克隆抗体的药物组合物。该药物组合物可以与可药用的载体或溶剂以及任何其它已知的佐剂和赋形剂以传统技术如那些在 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第 19 版, Gennaro, 编辑, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995 中公开的技术在一起配制。在一个实施方案中, 该组合物包括多种 (例如, 两种或更多种) 分离的本发明的人抗体的组合, 所述抗体以不同的机制起作用, 例如, 一种抗体主要通过诱导 CDC 起作用, 组合以另一种主要通过诱导凋亡起作用的抗体。

[0287] 本发明的药物组合物还可以以组合疗法的形式进行给药, 即组合以其它药物。例如, 组合疗法可以包括本发明的一种组合物和至少一种抗炎剂或至少一种免疫抑制剂。在一个实施方案中这类治疗剂包括一种或多种抗炎剂, 如甾体药物或 NSAID (非甾体抗炎药物)。优选的药剂包括, 例如阿司匹林和其它水杨酸盐, Cox-2 抑制剂, 如 rofecoxib (Vioxx) 和 celecoxib (Celebrex), NSAIDs 如布洛芬 (Motrin, Advil), 非诺洛芬 (Nalfon), 萘普生 (Naprosyn), 舒林酸 (Clinoril), 二氯芬酸 (Voltaren), 吡罗昔康 (Feldene), 酮洛芬 (Orudis), 二氟尼柳 (Dolobid), 萘丁美酮 (Relafen), 依托度酸 (Lodine), 噁丙秦 (Daypro), 和吲哚美辛 (Indocin)。

[0288] 在另一个实施方案中, 这类治疗剂包括一种或多种 DMARDs, 如氨甲蝶呤 (Rheumatrex), 羟氯喹 (Plaquenil), 水杨酸偶氮磺胺吡啶 (Asulfidine), 嘧啶合成抑制剂, 例如, 来氟米特 (Arava), IL-1 受体阻抑剂, 例如, anakinra (Kineret), 和 TNF- α 阻抑剂, 例如, etanercept (Enbrel), infliximab (Remicade) 和 adalimumab。

[0289] 在另一个实施方案中, 这类治疗剂包括一种或多种免疫抑制剂, 如环孢霉素 (Sandimmune, Neoral) 和义美仁 (Imural)。

[0290] 还在另一个实施方案中, 这类治疗剂包括一种或多种化疗剂, 如阿霉素 (Adriamycin)、顺铂 (Platinol)、博来霉素 (Blenoxane)、卡莫司汀 (Gliadel)、环磷酰胺 (Cytosan, Procytox, Neosar) 和苯丁酸氮芥 (Leukeran)。

[0291] 在另一个实施方案中, 本发明的人抗体可以结合苯丁酸氮芥和泼尼松龙; 环磷酰胺和泼尼松龙; 环磷酰胺, 长春新碱和泼尼松; 环磷酰胺, 长春新碱, 阿霉素和泼尼松; 氟达拉滨和葱环霉素; 或结合其它普通的对于 NHL 的多药物方案, 如, 例如在 Non-Hodgkin's

Lymphomas :Making sense of Diagnosis, Treatment, and Options, Lorraine Johnston, 1999, O' Reilly and Associates, Inc 中公开的方案一起进行给药。

[0292] 还在另一个实施方案中,人抗体可以结合放疗和 / 或自体外周血干细胞或骨髓移植进行给药。

[0293] 仍然在另一个实施方案中,人抗体可以结合一种或多种选自人抗 CD25 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD21 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD37 抗体、抗 CD38 抗体、抗 IL6R 抗体、抗 IL8 抗体、抗 IL15 抗体、抗 IL15R 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD11a 抗体 (例如 natalizumab)、抗 α -4/ β -1 整联蛋白 (VLA4) 抗体 (例如, natalizumab) 和 CTLA4-Ig 的抗体进行给药。

[0294] 在一个特定的实施方案中,人单克隆抗体结合抗 CD25 抗体进行给药来治疗例如在移植物抗宿主病患者中的大疱性类天疱疮。

[0295] 在另一个特定的实施方案中,人单克隆抗体结合一种或多种选自抗 CD19 抗体、抗 CD21 抗体、抗 CD22 抗体、抗 CD37 抗体、抗 CD38 抗体的抗体进行给药来治疗恶性疾病。

[0296] 仍然在另一个特定的实施方案中,人抗体结合一种或多种选自抗 IL6R 抗体、抗 IL8 抗体、抗 IL15 抗体、抗 IL15R 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD11a 抗体 (例如 natalizumab)、抗 α -4/ β -1 整联蛋白 (VLA4) 抗体 (例如, natalizumab) 和 CTLA4-Ig 的抗体进行给药来治疗炎症疾病。

[0297] 还在另一个实施方案中,人抗体可以结合抗 C3b(i) 抗体进行给药以便增强补体激活。

[0298] 如本文所用的,“可以药用的载体”包括在生理学上可混溶兼容的任一种和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸附延迟剂等。优选地,所述载体适合通过静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮途径使用 (例如,通过注射或输注)。根据给药途径,可以用一种材料对活性化合物,即抗体、双特异性或多特异性分子进行包衣,以便保护该化合物免受有可能使该化合物失活的酸和其它自然条件的作用。

[0299] “可以药用的盐”表示能保留亲本化合物的理想生物学活性,并且不会产生任何不需要的毒理学作用的盐 (例如,参见 Berge, S. M. 等,1977, J. Pharm. Sci. 66 :1-19)。所述盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括源于诸如氢氯酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸之类的无毒无机酸的盐,以及源于诸如脂肪族一和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳香族磺酸之类的无毒有机酸的盐。碱加成盐包括源于诸如钠、钾、镁、钙之类的碱土金属盐,以及源于诸如 N,N'-二苯基乙二胺、N-甲基谷胺酰胺、盐酸普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺和普鲁卡因之类的无毒有机胺的盐。

[0300] 本发明的组合物可以通过本领域已知的多种方法给药。正如技术人员可以理解的,给药途径和 / 或方式可以根据需要的结果改变。所述活性化合物可以和能够防止该化合物迅速释放的载体一起制备,如控释制剂,包括移植物、经皮贴膏,和微型胶囊化输送系统。可以使用能生物降解的、生物兼容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备所述制剂的很多方法已经具有专利或者为本领域技术人员所普遍公知。例如,参见 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0301] 为了通过某些给药途径使用本发明的化合物 gcg,可能有必要用一种材料对该化合物进行包衣,或者与该化合物共给药,以防止其失活。例如,所述化合物可以在诸如脂质

体或稀释剂的合适载体中给予个体。可药用的稀释剂包括盐水和含水的缓冲液。脂质体包括水包油包水 CGF 乳液,以及传统的脂质体 (Strejan 等,1984, J. Neuroimmunol. 7 :27)。

[0302] 可以药用的载体包括无菌水溶液或分散剂,以及用于临时制备无菌注射溶液或分散剂的无菌粉末。所述介质和制剂作为药用活性物质的用途在本领域中都是公知的。任何传统介质或试剂都可将其用于本发明的药用组合中,除非与所述活性化合物不配伍。还可将补充性活性化合物掺入所述组合中。

[0303] 治疗组合物一般必须是无菌的,并且在产生和储存条件下是稳定的。可以将所述组合物制备成溶液、微乳液、脂质体、或其它适合高药物浓度的有序结构。所述载体可以是含有诸如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的包衣剂,对于分散剂来说通过保持需要的粒度,以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。在很多情况下,在所述组合物中优选包括等渗剂,例如,糖、聚醇,如甘露糖醇、山梨醇或氯化钠。通过在所述组合物中添加诸如单硬脂酸盐和明胶的能延长吸收的制剂,实现所述可注射组合物的延长吸收。

[0304] 无菌注射溶液可以通过以下方法制备:将所需量的活性化合物掺入合适的溶剂中,该溶剂根据需要含有上面所列举的一种成分或几种成分的组合,然后进行消毒微量过滤。通常,分散剂是通过将所述活性化合物添加到含有基本分散介质和来自上文所列举的其它必需成分的无菌载体中而制备的。对于用来制备无菌注射溶液的无菌粉末来说,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冷冻干燥),它获得所述活性成分的粉末,和来自它的事先无菌过滤的溶液的任何其它必需成分。

[0305] 对剂量方案进行调整,以便提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以给予单一的药团,可以隔一定时间给予若干分开的剂量,或者根据表现出来的治疗状况紧急程度的需要,相应地减少或增加剂量。将肠胃外组合物制成剂量单位形式是特别有利的,它可以方便服用,并保持剂量的一致性。本文所用的剂量单位形式表示适合作为接受治疗的个体的单一剂量的在物理形式上独立的单位;每个单位含有计算出来的、产生所需治疗效果的预定数量的活性化合物,和需要的药用载体。本发明剂量单位形式的确定直接取决于和依赖于(a)所述活性化合物的独特特征和要获得的具体治疗效果,和(b)为了个体的治疗灵敏度制备这样一种活性化合物的领域中所固有的限制。

[0306] 可以药用的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、镓酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0307] 对于治疗组合物来说,本发明的制剂包括适合口服、鼻腔、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外给药用的制剂。所述制剂能以单位剂量形式方便地提供,并且可以通过药物学领域的任何已知方法制备。用于产生单一剂量形式的可以与载体材料组合的活性成分的量,根据被治疗的个体和特定的给药方式而改变。可以与载体材料组合以产生单一剂量形式的活性成分的量,通常是能产生治疗效果的组合物的量。一般,以百分比衡量,活性成分的用量在大约0.01%到大约99%之间,优选大约0.1%到大约70%,最优选大约1%到大约30%。

[0308] 适合阴道使用的本发明的制剂还包括含有本领域已知合适的载体的子宫托、止血

棉塞、乳剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。用于本发明组合物的局部或经皮给药的剂量形式包括粉末、喷雾剂、软膏、糊剂、乳剂、洗液、凝胶、溶液、膏贴和吸入剂。可以在无菌条件下将活性化合物与可以药用的载体和可能需要的任何防腐剂、缓冲剂和推进剂混合。

[0309] 本文所使用的短语“肠胃外给药”和“经肠胃外给药”表示除了肠道和局部给药以外的用药方式,通常是通过注射给药,并且包括,但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0310] 可用于本发明的药用组合物中的合适的含水载体和无水载体的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油,如橄榄油,可注射的有机酯,如油酸乙酯。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣材料,对于分散剂来说通过保持需要的粒度,以及通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。

[0311] 这些组合物还可以含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过上述消毒方法,并通过添加各种抗菌剂和抗真菌剂确保防止出现微生物,例如,添加对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、和酚山梨酸等。可能还需要向所述组合物中添加等渗剂,如糖类、氯化钠等。另外,通过添加能延长吸收时间的诸如单硬脂酸铝和明胶的制剂,实现可注射药用制剂的延长吸收。

[0312] 在一个实施方案中,本发明的人单克隆抗体通过皮下注射以晶体形式进行给药,参见, Yang 等 (2003) PNAS, 100 (12) :6934-6939。

[0313] 当本发明的化合物在作为药物给人和动物施用,可以单独使用,或者作为药用组合物使用,例如,0.01-99.5% (更优选 0.1-90%) 的活性成分与可以药用的载体组合。

[0314] 无论选择什么样的给药途径,可以以合适的水化形式应用的本发明的化合物和/或本发明的药用组合物,能通过本领域技术人员所公知的传统方法制备成可以药用的剂量形式。

[0315] 本发明药用组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变,以便获得一种治疗组分的用量,它有效地实现预期的对特定患者、组合物、和给药模式的治疗反应,而又对患者没有毒性。选择的剂量水平取决于多种药物动力学因素,包括所使用的本发明的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,所采用的特定化合物的排出速度,治疗时间,与所采用的特定组合物组合使用的其它药物,化合物和/或材料,接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、一般健康情况以及以前的医疗史,以及医学领域众所周知的类似因素。

[0316] 具有本领域普通技能的医生或兽医能方便地确定并开出有效量的所需药用组合物。例如,医生或兽医开始使用的所述药用组合物中采用的本发明的化合物的量,低于获得理想治疗效果所需要的量,并逐渐增加剂量,直到获得理想的效果。一般地,本发明组合物的合适的每日剂量是有效产生治疗效果所需要的所述化合物的最低剂量。所述有效剂量通常取决于上述因素。优选通过静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下途径使用,优选在靠近靶位点处给药。如果需要,治疗组合物的每日有效剂量可以按 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个或更多个小剂量,在 1 天内以适当的时间间隔分别使用,选择性地以单位剂量形式使用。本发明的化合物尽管可以单独给药,但优选以药用制剂(组合物)形式给药该化合物。

[0317] 在一个实施方案中,根据本发明的人单克隆抗体可以通过每周输注 10-500mg /

m², 如 200-400mg / m² 的剂量进行给药。这种给药可以重复, 例如 1-8 次, 如 3-5 次。所述给药可以通过在 2-24 小时的时间上, 如 2-12 小时的持续输注而进行。

[0318] 在另一个实施方案中, 通过长时间, 如超过 24 小时的缓慢持续输注来给药人单克隆抗体, 从而减少毒性副作用。

[0319] 仍然在另一个实施方案中, 以每周 250mg-2000mg, 如例如 300mg、700mg、1000mg、1500mg 或 2000mg 的剂量多达 8 次, 如 4-6 次对人单克隆抗体进行给药。所述给药可以通过在 2-24 小时的时间上, 如 2-12 小时的持续输注而进行。如果必要的话可以在 6 个月或 12 个月后重复这种方案一次或多次。在通过利用靶向抗 CD20 抗体的抗独特型抗体, 可以在生物样品的给药之后通过测量循环中的单克隆抗 CD20 抗体来测定或调节剂量。

[0320] 还在另一个实施方案中, 人单克隆抗体通过维持治疗, 如, 例如, 每周一次持续 6 个月或更久进行给药。

[0321] 仍然在一个实施方案中, 根据本发明的人单克隆抗体可以通过一种方案进行给药, 所述方案包括一次抗 CD20 的人单克隆抗体的输注和随后的结合到放射性同位素上的抗 CD20 人单克隆抗体的输注。该方案可以例如在 7-9 天之后进行重复。

[0322] 治疗组合物可以用本领域公知的医疗器械给药。例如, 在一种优选的实施方案中, 本发明的治疗组合物可以用无针头的皮下注射装置给药, 如使用公开于以下美国专利中的装置: US5399163 ; US5383851 ; US5312335 ; US5064413 ; US4941880 ; US4790824 或 US4596556。可用于本发明中的众所周知的移植物和组件的例子包括: US4487603, 它公开了一种用于以受控制的流量分配药物的可植入的微型输注泵; US4486194, 它公开了一种用于通过皮肤给药的治疗装置; US4447233, 它公开了一种用于以精确的输注流量输送药物的药物输注泵; US4447224, 它公开了一种用于连续药物输送的流量可变的可植入的输注装置; US4439196, 它公开了一种具有多个腔室的渗透性药物输送系统; 和 US4475196, 它公开了一种渗透性药物输送系统。很多其它这样的植入物、输送系统、和组件是本领域技术人员所公知的。

[0323] 在某些实施方案中, 可以对本发明的人单克隆抗体进行配剂, 以便确保在体内正确地分配。例如, 血脑屏障 (BBB) 排斥很多高度亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物能通过 BBB (如果需要的话), 可以对所述化合物进行配剂, 例如, 包在脂质体中。有关产生脂质体的方法参见, 例如: US4522811 ; US5374548 ; 和 US5399331。脂质体可以包括一种或多种成分, 这些成分被选择性地输送到特定的细胞或器官, 因而增强定向药物输送 (参见, 例如, V. V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29 :685)。示例性的靶向成分包括叶酸或生物素 (参见, 例如, 授予 Low 等的 US5416016) ; 甘露糖苷 (Umezawa 等, 1988, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 :1038) ; 抗体 (P. G. Bloeman 等, 1995, FEBS Lett. 357 : 140 ; M. Owais 等, 1995, Antimicrob. Agents Chemother 39 :180) ; 表面活性剂蛋白 A 受体 (Briscoe 等, 1995, Am. J. Physiol. 1233 :134), 其中的不同种类可以包括本发明的制剂, 以及本发明分子的成分 ; p120 (Schreier 等, 1994, J. Biol. Chem. 269 :9090) ; 还可参见 K. Keinanen ; M. L. Laukkanen, 1994, FEBS Lett. 346 :123 ; J. J. Killion ; I. J. Fidler, 1994, Immunomethods 4 :273。在本发明的一个实施方案中, 本发明的治疗化合物是在脂质体中制备的 ; 在一种更优选的实施方案中, 所述脂质体包括一种靶向成分。在一种最优选的实施方案中, 所述脂质体中的治疗化合物是通过药团注射的方式输送到靠近目标部位的。所述组

合物的流动性必须达到可以注射的程度。在生产和储存条件下,它必须是稳定的,并且必须能防止诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。

[0324] 在另一个实施方案中,可以对本发明的单克隆抗体进行配制以阻止或减少它们通过胎盘的传输。这可以通过本领域已知的方法进行,例如,通过抗体的 PEG 化或通过利用 F(ab)2' 片段。还可以参见另外的参考文献" Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. *J Immunol Methods*. 152 : 177-190 ; 和 " Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, *Ann Allergy Asthma Immunol* 174 : 279-283。当抗体用于治疗或预防复发的自发性流产时这特别有效。

[0325] 对于肿瘤治疗的“治疗有量剂量”能够通过可以是完全的或部分的客观肿瘤反应进行测量。完全反应 (CR) 定义为没有疾病的临床、放射线学或其它迹象。部分反应 (PR) 缘自超过 50% 的总体肿瘤大小的减小。进程的中间时间是描述客观肿瘤反应的耐久性的测量值。

[0326] 对于肿瘤治疗的“治疗有量剂量”还可以通过其稳定疾病进程的能力进行测量。可以在一种动物模型中评估一种化合物抑制癌症的能力以预测其在人肿瘤中的效力。或者,可以通过熟练技术人员已知的体外测试法检测该化合物抑制细胞生长或凋亡的能力来评估该化合物的特性。一种治疗性化合物的治疗有效量可以减少肿瘤大小,或者在个体中改善症状。本领域的普通技术人员能够基于诸如个体大小、个体症状的严重性和所选的特定组合物或给药途径的因素来确定这种量。

[0327] 对于类风湿性关节炎的“治疗有效剂量”优选导致患者中的 ACR20 Preliminary Definition of Improvement, 更加优选 ACR50 Preliminary Definition of Improvement 并且甚至更加优选 ARC70 Preliminary Definition of Improvement。

[0328] ACR20 Preliminary Definition of Improvement 定义为: 在 Tender Joint Count (TCJ) 和 Swollen Joint Count (SWJ) 中 $\geq 20\%$ 的改善, 和在下列 5 种评估中: 患者疼痛评估 (VAS)、患者整体评估 (VAS)、医生整体评估 (VAS)、患者自我评估的失能 (HAQ)、Acute Phase Reactant (CRP 或 ESR) 的 3 种中 $\geq 20\%$ 的改善。

[0329] ACR50 和 ACR70 分别以相同的方式定义为 $\geq 50\%$ 和 $\geq 70\%$ 的改善。进一步的细节参见 Felson 等. in American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; *Arthritis Rheumatism* (1995) 38 : 727-735。

[0330] 所述组合物必须是无菌的, 并且其流动性必须达到使该组合物能够通过注射器输送的程度。除了水之外, 所述载体可以是等渗缓冲的盐溶液、乙醇、多元醇 (例如, 甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等) 及其合适的混合物。例如, 合适的流动性可以通过使用诸如卵磷脂的包衣剂, 对于分散剂来说通过保持需要的粒度, 以及通过使用表面活性剂来保持。在许多情况下, 优选在所述组合物中添加等渗剂, 例如, 糖类, 诸如甘露糖醇或山梨醇的聚醇, 和氯化钠。可注射组合物的长期吸收, 可以通过在该组合物中添加诸如单硬脂酸铝或明胶的能延长吸收的制剂而实现。

[0331] 当所述活性化合物如上所述受到适当保护时, 该化合物就可以口服使用, 例如, 用一种惰性稀释剂或可同化的食用载体进行保护。

[0332] VI. 本发明的用途和方法

[0333] 本发明的人抗体（包括本文所述的免疫结合物、双特异性 / 多特异性组合物和其它衍生物）具很多体外和体内的诊断和治疗用途，包括涉及表达 CD20 细胞的病症的诊断和治疗。例如，可以将抗体施用于培养中的，例如体外或来自体内的细胞，或用于人个体，例如，体内，以便治疗、预防或诊断多种疾病。如本文所用的，术语“个体”意在包括对于抗 CD20 的人抗体产生应答的人和非人动物。优选的个体包括患有能够通过抑制或控制 B 细胞（正常的或恶性的）进行修正或改善的病症的人患者。

[0334] 例如，在一个实施方案中，可以使用本发明的人抗体来治疗致癌病症患者，例如特征为存在表达 CD20 的细胞，例如，B 细胞淋巴瘤的病症，例如，NHL。可以治疗和 / 或预防的致癌疾病的例子包括 B 细胞淋巴瘤，例如 NHL，包括前体 B 细胞成淋巴细胞白血病 / 淋巴瘤和成熟 B 细胞瘤，如 B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL) / 小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、B 细胞原淋巴细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (MCL)，滤泡淋巴瘤 (FL)，包括低级、中级和高级 FL，皮肤毛囊中心淋巴瘤，边缘区 B 细胞淋巴瘤 (MALT 型，结节和脾型)，毛细胞白血病，扩散大 B 细胞淋巴瘤，Burkitt 淋巴瘤，浆细胞瘤，浆细胞骨髓瘤，移植后淋巴增生性疾病，**Waldenström** 巨球蛋白血症和恢复性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。

[0335] B 细胞非霍奇金淋巴瘤的其它例子是淋巴瘤样肉芽肿病、原发性扩散淋巴瘤、静脉内大 B 细胞淋巴瘤、纵隔大 B 细胞淋巴瘤、重链疾病（包括 γ 、 μ 和 α 疾病）、由免疫抑制剂疗法所诱导的淋巴瘤，如环孢霉素诱导的淋巴瘤和氨甲蝶呤诱导的淋巴瘤。

[0336] 在另一个实施方案中，可以利用本发明的人抗体治疗霍奇金淋巴瘤。

[0337] 可以治疗和 / 或预防的涉及表达 CD22 细胞的免疫疾病的例子包括自身免疫疾病，如牛皮癣、牛皮癣性关节炎、皮炎、系统性硬皮病、炎症性肠疾病 (IBD)、局限性回肠炎、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、色素层炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉粥样硬化、白细胞粘连缺乏、多发性硬化症、Raynaud 综合征、**Sjögren** 综合征、青少年起病型糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症，如急性特发性血小板减少性紫癜和慢性特发性血小板减少性紫癜，溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎 (RA)、特应性皮炎、天疱疮、格雷夫斯病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿病、Omenn 氏综合征，慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多症、HIV 和疱疹病毒相关疾病。进一步的例子为急性呼吸窘迫综合征和 choreoretinitis。另外，其它的疾病和病症包括那些由病毒，如 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 感染 B 细胞所引发或介导的疾病和病症。

[0338] 其中自身抗体和 / 或过度的 B 细胞活性是显著的并且可以治疗和 / 或预防的炎症性、免疫和 / 或自身免疫病症的其它例子，包括下列：

[0339] 血管炎和其它血管病症，如血管炎和其它脉管病症，如细微多脉管炎、Churg-Strauss 综合征和其它 ANCA 关联的脉管炎、结节性多动脉炎、原发性冷球蛋白血症性脉管炎、皮肤白细胞分裂性脉管炎、川崎病、大动脉炎、巨大细胞关节炎、Henoch-Schnlein 紫癜、原发的或分离的脑脉管炎、结节性红斑、血栓闭塞性脉管炎、血栓性血小板减少性紫癜（包括溶血性尿毒症综合征），和次级血管炎，包括皮肤白细胞分裂性脉管炎（例如，乙肝、丙肝、**Waldenström's** 巨球蛋白血症、B 细胞瘤、类风湿性关节炎、

Sjögren's综合征或系统性红斑狼疮继发的);其它例子为结节性红斑、变应性脉管炎、脂膜炎、Weber-Christian 病、紫癜多球蛋白血症和 Buerger's 病;

[0340] 皮肤病症,如接触性皮炎、线性 IgG 皮肤病、白斑、坏疽性脓皮病、后天性大疱性表皮松解、寻常性天疱疮(包括疤痕性类天疱疮和大疱性类天疱疮)、疱疹样皮炎、多形红斑和慢性自身免疫性风疹(包括血管神经性水肿和风疹性脉管炎);

[0341] 免疫介导的血细胞减少症,如自身免疫性嗜中性白血球减少症和纯红细胞再生障碍;

[0342] 结缔组织病症,如 CNS 狼疮、盘状红斑狼疮、肢端硬皮综合征、混合性结缔组织病、多肌炎/皮肌炎、包涵体肌炎、继发性淀粉样变性 I 和 II 型、冷球蛋白血症、纤维肌痛、磷脂抗体综合征、继发性血友病、复发性多软骨炎、类肉瘤病、强直人综合征、风湿热;其它例子为嗜酸性筋膜炎;关节炎,如强直性脊柱炎、幼年期慢性关节炎、成人 Still's 病、SAPHO 综合征;其它例子为骶髂关节炎、反应性关节炎、Still's 病和痛风;血液病症,如再生障碍性贫血、原发性溶血性贫血(包括冷凝集素综合征)、CLL 或系统性红斑狼疮继发的溶血性贫血;POEMS 综合征、恶性贫血、**Waldenström's**紫癜多球蛋白血症;其它例子为粒细胞缺乏、自身免疫性中性粒细胞减少症、Franklin's 病、Seligmann's 病、 μ 链病、胸腺瘤和淋巴瘤继发的癌旁综合征和因子 VIII 抑制剂形成;内分泌病,如多内分泌腺病、Addison's 病;自身免疫性低血糖症、自身免疫性甲状腺功能低下、自身免疫性胰岛素综合征、de Quervain's 甲状腺炎和胰岛素受体抗体介导的胰岛素耐受性;肝-胃肠道病症,如乳糜泻、惠普尔病、原发性胆汁性肝硬变、慢性活动性肝炎和原发性胆管炎;其它例子为自身免疫性胃炎;肾病,如急性肾小球肾炎、后链球菌肾炎、Goodpasture's 综合征、膜性肾小球肾炎和冷球蛋白血症;其它例子为微小病变疾病;神经障碍,如自身免疫性神经障碍、多发性单神经炎、Lambert-Eaton's 肌无力综合征、Sydenham's 舞蹈症、脊髓痨和 Guillain-Barre's 综合征;其它例子为脊髓病/热带强直性下肢轻瘫、重症肌无力、急性炎性脱髓鞘性多神经病和慢性炎性脱髓鞘性多神经病;心肺病症,如成纤维性组织肺泡炎、细支气管炎 obliterans、变应性曲霉病、囊性纤维化、单纯性肺嗜酸细胞浸润症、心肌炎和心包炎;其它例子为过敏性肺炎和肺癌继发的癌旁综合征;变应性病症,如支气管哮喘和高 IgE 综合征;其它例子为一时性黑蒙;眼科病症,如特发性脉络膜视网膜炎;感染性疾病,如细小病毒 B 感染(包括 hands-and-socks 综合征);和

[0343] 妇产科病症,如习惯性流产、复发性习惯性流产和子宫内生长障碍;其它例子为妇科瘤继发的癌旁综合征;男性生殖病症,如睾丸瘤继发的癌旁综合征;和源自移植的病症,如同种异基因移植物和异种移植物排斥,和移植物对抗宿主疾病。

[0344] 在一个实施方案中,所述疾病为炎症性的、免疫和/或自身免疫性的病症,选自溃疡性结肠炎,局限性回肠炎,幼年期初期糖尿病,多发性硬化症,免疫介导的血小板减少症,如急性特发性血小板减少性紫癜和慢性特发性血小板减少性紫癜,溶血性贫血(包括自体免疫性溶血性贫血),重症肌无力,系统性硬化病和寻常性天疱疮。

[0345] 在另一个实施方案中,本发明的人抗体可以用于检测 CD20 的水平,或在其膜表面包含 CD20 的细胞的水平,随后可以将所述水平与某些疾病症状联系起来。或者,可以将所述抗体用于消除表达 CD20 的细胞或与表达 CD20 的细胞相互作用,由此显示这些细胞为该疾病的重要介体。这可以通过将样品与对照样品与抗 CD20 抗体在允许形成抗体和 CD20 间

复合物的条件进行接触而实现。在样品和对照样品中检测和比较抗体和 CD20 间形成的任何复合物。

[0346] 开始可以对本发明的人抗体测试其与体外治疗性和诊断性用途相关联的结合活性。例如,可以利用在下面实施例中所述的流式细胞分析测试所述抗体。而且,可以测试抗体诱发至少一种效应物介导的效应细胞活性的活性,包括抑制和 / 或杀死表达 CD20 的细胞。例如,可以测定抗体诱发 CDC 和 / 或凋亡的能力。测定 CDC、同质型粘附、分子聚集或凋亡的方案在下面实施例中进行介绍。

[0347] 本发明的人抗体在多种 CD20 相关疾病的治疗和诊断中还有其它的用途。例如,所述人抗体可以用于在体内或体外诱发一种或多种下列生物学活性:抑制表达 CD20 的细胞的生长和 / 或分化;杀死表达 CD20 的细胞;在人效应细胞存在时介导表达 CD20 的细胞的吞噬作用或 ADCC;在补体存在时介导表达 CD20 的细胞的 CDC;介导表达 CD20 的细胞的凋亡;诱导同质型粘附;和 / 或在结合 CD20 后诱导向脂筏的转位。

[0348] 在一个特定的实施方案中,所述人抗体用于在体内或体外治疗、预防或诊断多种 CD20 相关疾病。CD20 相关疾病的例子包括其它疾病中的 B 细胞淋巴瘤,例如, NHL, 和免疫疾病,例如自身免疫疾病,如上所列的那些。

[0349] 在一个特定的实施方案中,本发明的人抗体用于治疗或预防 NHL,因为所述抗体消除载有 CD20 的肿瘤细胞。

[0350] 非霍奇金淋巴瘤是一种 B 细胞淋巴瘤类型。淋巴瘤,例如, B 细胞淋巴瘤,是一组当淋巴细胞(一种血细胞)变为恶性时发生的相关肿瘤。淋巴细胞的正常功能是防御身体的外侵物:细菌、病毒、真菌,甚至是肿瘤。有许多淋巴细胞的亚型和突变期,所以,有许多种类的淋巴瘤。像正常细胞一样,恶性淋巴细胞能够移至身体的许多部分。一般,淋巴瘤细胞在淋巴系统中形成肿瘤:骨髓、淋巴结、脾和血液。但是,这些细胞可以转移到其它器官中。某些类型的淋巴瘤趋于在正常细胞生长的地方生长。例如,滤泡 NHL 肿瘤普遍在淋巴结中发育。

[0351] 在与 NHL 相关联的瘤(即,致癌的)B 细胞中通常以提高的水平表达 CD20。因此,本发明的 CD20 结合抗体可以用于消除导致 NHL 的载有 CD20 的肿瘤细胞,因而可以用于预防或治疗这种疾病。

[0352] 本发明的人抗体(例如,人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子)还可以用于阻抑或抑制 CD20 的其它效应。例如,已知 CD20 表达于 B 淋巴细胞上并且参与这些细胞的增殖和 / 或分化。由于 B 淋巴细胞作为一种免疫调节物而起作用,所以 CD20 是靶向 B 淋巴功能的抗体介导的治疗的重要靶目标,例如,灭活或杀死参与自身免疫病症的 B 淋巴细胞。这类自身免疫病症包括,例如,上面所列的疾病。

[0353] 体内和体外给药本发明的组合物(例如,人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子以及免疫结合物)的合适途径是本领域所公知的并且可以为普通技术人员所选择。例如,可以通过注射(例如,静脉内或皮下)来给药所述抗体组合物。所用分子的合适剂量依赖于个体的年龄和体重以及抗体组合物的浓度和 / 或剂型。而且,可以确定肿瘤位置并用于计算合适的剂量。

[0354] 如前所述,本发明的人抗 CD20 抗体可以与一种或多种其它治疗剂,例如细胞毒性剂、放射毒性剂或免疫抑制剂一起共给药。该抗体可以连接到抗原上(作为免疫复合物)

或可以独立于药剂进行给药。在后一种情况中（独立给药），可以在该药剂之前、之后或同时给药该抗体或可以与其它已知的疗法一起共给药，例如，一种如放射的抗癌疗法。这类治疗剂包括在其它治疗剂中的抗癌剂如阿霉素、顺铂、博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥和环磷酰胺。本发明的人抗 CD20 与化疗剂的共给药提供两种通过不同机制起作用的抗癌剂，所述机制产生对人肿瘤细胞的细胞毒效应。这种共给药可以解决由于抗药性的发展或肿瘤抗原性的变化产生的问题，所述肿瘤抗原性的变化会使得它们与所述抗体不反应。

[0355] 靶特异性效应细胞，例如，连接到本发明的组合物上的效应细胞也可以用作治疗剂。靶向的效应细胞可以是人淋巴细胞，如巨噬细胞、嗜中性细胞或单核细胞。其它的细胞包括嗜曙红细胞、天然杀伤细胞和其它载有 IgG 或 IgA 受体的细胞。如果需要，可以从要治疗的个体中获得效应细胞。靶特异性效应细胞可以作为生理上可接受的溶液中的细胞悬液进行给药。给药细胞的数目可以在 10^8 - 10^9 的数量级但是将根据治疗目的变化。通常，所述量将足以获得靶细胞，例如，表达 CD20 的肿瘤细胞的定位，并且通过吞噬作用影响细胞杀伤。给药的途径也可以变化。

[0356] 用靶特异性效应细胞的治疗可以结合其它去除靶细胞的技术一起进行。例如，利用本发明的组合物（例如，人抗体、多特异性和双特异性分子）的和以装备这些组合物的细胞的抗肿瘤治疗可以与化疗结合使用。另外，可以使用组合治疗来将两种不同的细胞毒性效应群体定向于肿瘤细胞排斥。例如，连接到抗 Fc- γ RI 或抗 CD3 的抗 CD20 抗体可以与 IgG 或 IgA 受体特异性结合剂结合使用。

[0357] 本发明的双特异性和多特异性分子还可以用于调节效应细胞上的 Fc γ R 或 Fc α R 水平，如细胞表面上的受体加帽和消除。抗 Fc 受体的混合物也可以用作此目的。

[0358] 在补体存在的情况下，还可以使用具有补体结合位点的本发明组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子），例如，来自 IgG-1、2 或 3 或 IgM 的结合补体的部分。在一个实施方案中，用本发明的结合制剂和合适的效应细胞对包括靶细胞的细胞群体进行的来自体内的治疗，可以通过添加补体或含有补体的血清进行补充。通过结合补体蛋白，可以改善对由本发明的结合制剂包被的靶细胞的吞噬作用。在另一个实施方案中，由本发明组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子）包被的靶细胞还可以被补体裂解。还在另一个实施方案中，本发明的组合物不激活补体。

[0359] 本发明的组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子）还可以与补体一起施用。因此，包括人抗体、多特异性或双特异性分子和血清或补体的组合物属于本发明的范畴。这种组合物的优点是，所述补体紧邻所述人抗体、多特异性或双特异性分子。另外，可以分别施用本发明的人抗体、多特异性或双特异性分子以及补体或血清。本发明的靶向细胞的组合物的结合引发 CD20 抗原 - 抗体复合物转位至细胞膜的脂筏中。这种转位产生高密度的可以激活和 / 或增强 CDC 的抗原 - 抗体复合物。

[0360] 包括本发明组合物（例如，人抗体，多特异性或双特异性分子）的试剂盒以及使用的说明书也属于本发明的范畴。该试剂盒可以进一步包括一种或多种其它制剂，如免疫抑制剂、细胞毒性剂或放射毒性剂，或一种或多种其它本发明的人抗体（例如，具有互补活性的人抗体）。

[0361] 因此，用本发明的抗体组合物治疗的患者可以另外给药（在本发明的人抗体给药之前、同时或之后）另一种治疗剂，如细胞毒性剂或放射毒性剂，它增强或增大人抗体的治

疗效果。

[0362] 在其它的实施方案中,还可以用调节,例如,增强或抑制免疫细胞活性和 / 或 Fc γ 或 Fc α 受体的表达或活性的制剂治疗所述个体,通过例如,用细胞因子治疗所述个体。在用所述多特异性分子治疗期间给药的优选细胞因子,包括粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、干扰素 γ (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF)。

[0363] 本发明的组合物(例如,人抗体,多特异性和双特异性分子)还可以用于靶向于表达 Fc γ R 或 CD20 的细胞,例如,用于标记所述细胞。对这种用途来说,所述结合制剂可以与一种可以检测的分子连接。因此,本发明提供了用于定位来自体内的或体外的表达 Fc 受体,如 Fc γ R 或 CD20 的细胞的方法。例如,所述可检测的标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅助因子。

[0364] 在一个特定的实施方案中,本发明提供在样品中检测 CD20 抗原的存在,或测量 CD20 抗原量的方法,包括将样品和对照样品与特异性结合 CD20 的人单克隆抗体在允许形成抗体或其部分与 CD20 间的复合物的条件下进行接触。随后检测复合物的形成,其中在样品与对照样品比较之间的差异复合物形成是样品中存在 CD20 的表征。

[0365] 在其它的实施方案中,本发明提供通过向个体给药上述的人抗体,在个体中治疗涉及表达 CD20 细胞的病症,例如,非霍奇金淋巴瘤或类风湿性关节炎的方法。这种抗体或其衍生物用于抑制与某些病症相关联的 CD20 诱导的活性,例如,增殖和 / 或分化。通过将抗体与 CD20 接触(例如,通过向个体给药抗体),CD20 诱导这种活性的能力得以抑制并且,因而,相关联的病症得到治疗。

[0366] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗或预防涉及表达 CD20 细胞的致瘤性病症,例如,NHL 的方法。该方法包括以足以治疗或预防该病症的量向个体给药一种本发明的抗体组合物。该抗体组合物可以单独地或与另一种治疗剂一起进行给药,所述另一种治疗剂如一种细胞毒性剂或放射毒性剂,它与所述抗体组合物结合或协同起作用来治疗或预防涉及表达 CD20 细胞的疾病。在一个特别优选的实施方案中,本发明提供一种治疗非霍奇金淋巴瘤的方面。

[0367] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗或预防涉及人表达 CD20 细胞的自身免疫病症,例如,那些上面所列的疾病。该方法包括以足以治疗或预防该病症的量向个体给药一种本发明的抗体组合物。该抗体组合物可以单独地或与另一种治疗剂一起进行给药,所述另一种治疗剂如一种细胞毒性剂或放射毒性剂,它与所述抗体组合物结合或协同起作用来治疗或预防涉及表达 CD20 细胞的疾病。

[0368] 仍然在另一个实施方案中,本发明提供一种体内或体外检测表达 CD20 的细胞的存在或量化该细胞的方面。该方法包括(i)向个体给药一种结合到可检测标记上的本发明的组合物(例如,一种多特异性或双特异性分子);(ii)将该个体暴露于检测所述可检测标记的工具以便鉴定包含表达 CD20 的细胞的区域。

[0369] 还在另一个实施方案中,本发明的免疫结合物可以用于通过将所述化合物连接所述抗体上,将所述化合物(例如,治疗剂、标记、细胞毒素、放射毒素、免疫抑制剂等)靶向表面有 CD20 表达的细胞上。因而,本发明还提供定位来自体内或体内的表达 CD 的细胞,如 Reed-Sternberg 细胞(例如,用一种可检测的标记,如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅助因子)的方法。或者,所述免疫结合物可以通过将细胞毒素或放射毒素靶向 CD20 用于

杀死表面有 CD20 表达的细胞。

[0370] 通过以下实施例对本发明作进一步说明,不应当将这些实施例理解成是进一步的限定。

实施例

[0371] 用于实施例中的 B 细胞系

[0372]

细胞系	起源	获自
Daudi	Negroid Burkitt's 淋巴瘤	ECACC (85011437)
ARH-77	IgG 血浆细胞淋巴瘤	DSMZ (ACC 512)
DOHH	顽固性免疫成纤维 B 细胞淋巴瘤	DSMZ (ACC 47)
Raji	Negroid Burkitt's 淋巴瘤	ECACC (85011429)
SU-DHL-4	B-NHL, 扩散性组织细胞淋巴瘤	DSMZ (ACC 495)
Ramos-EH RB	Burkitt's 淋巴瘤	ECACC (85030804)
Tanoue	人 B 细胞淋巴瘤	DSMZ (ACC 399)

[0373] Daudi、ARH-77、DOHH、Raji、Ramos-EHRB 和 Tanoue B 细胞系在添加了 10% 的胎牛血清 (FCS) (Optimum C241, Wisent Inc., st. Bruno, Canada)、2mM L- 谷氨酰胺、100IU / ml 青霉素、100 μg / ml 链霉素和 1mM 丙酮酸钠 (都来自 Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) 的 RPMI1640 培养基中进行培养。

[0374] SU-DHL-4B 细胞系在相同但没有丙酮酸钠的培养基中进行培养。

[0375] 将培养物保持在 37°C 下于加湿的 5% CO₂ 培养箱中,吹散并收集 80-90% 的汇集物。每周更换培养基两次。此时将细胞吹散并以 1-1.5 × 10⁶ 细胞 / ml 进行接种以确保生存力和最佳生长。

[0376] 实施例 1 抗 CD20 人抗体的生产

[0377] HCo7 和 KM 小鼠:利用表达人抗体基因的 HCo7 和 KM 小鼠来制备抗 CD20 的完整人单克隆抗体。在 KM 小鼠系中,如 Chen 等 (1993)EMBO J12 :811-820 所述的对内源性的小鼠 κ 轻链进行同型结合地裂解并且如 PCT 公开出版物 W001 / 09187 的实施例 1 中所述的对内源性小鼠重链基因进行裂解。如 Fishwild 等 (1996)Nature Biotechnology14 :845-851 中所述的,这种小鼠系携带人 κ 轻链转基因 KCo5。如在 W002 / 43478 中所述的,这种小鼠系不携带由染色体 14 片段 h CF (SC20) 所组成的人重链转染色体。

[0378] HCo7 小鼠在其内源性轻链 (κ) 基因中具有一个 JKD 断裂 (如在 Chen 等 (1993)EMBO J. 12 :821-830 中所述的),在其内源性重链基因中具有一个 a CMD 断裂 (如在 W001 / 14424 的实施例 1 中所述的),一个 HCo5 人重链转基因 (如在 Fishwild 等 (1996)Nature Biotechnology14 :845-851 中所述的),和一个 HCo7 人重链转基因 (如在 US5, 770, 429 中所述的)。

[0379] HGo7 和 KM 小鼠的免疫:用人 CD20 转染的 NS / 0 对 HCo7 和 KM 小鼠进行免疫。对于首次免疫,每只小鼠, 1×10^7 细胞于 $150 \mu\text{l}$ PBS 以 1:1 混合以完全弗氏佐剂并且进行腹膜内注射 (i. p.)。随后的 i. p. 免疫利用相似量的无佐剂的细胞进行。在输注之前的三天和两天对小静脉内加强以 0.5×10^7 悬浮于 PBS 中的细胞。

[0380] 通过利用 FACS 分析,利用人 CD20 转染的 NS / 0 细胞以及 CD20 阴性亲本 NS / 0 细胞的流式细胞分析监测小鼠血清中抗人 CD20 抗体的存在。

[0381] 产生抗 CD20 人单克隆抗体的杂交瘤的制备:从 HCo7 和 KM 小鼠中分离小鼠脾细胞并且基于标准方法以 PEG 与一种小鼠骨髓瘤细胞系相融合。随后通过 ELISA 对得到的杂交瘤筛选人 IgG, κ 生产并且通过 FACS 分析利用人 CD20 转染的 NS / 0 和 SKBR3 细胞筛选 CD20 特异性。将来自免疫过的小鼠的脾淋巴细胞单细胞悬浮液以 50% PEG (Sigma) 融合于四分之一数目的 SP2 / 0 非分泌小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL1581)。以大约 1×10^5 / 孔将细胞涂于平底微滴定板上,随后在选择性培养基上温育大约两周,所述培养基包含 10% 胎牛血清、10% P388D1 (ATCC, CRLTIB-63) 限制性培养基、3-5% 于 DMEM 中的 origen (IGEN) (Mediatech, CRL10013, 具有高葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠) 加上 5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50mg / ml 庆大霉素和 $1 \times \text{HAT}$ (Sigma, CRL P-7185)。1-2 周后,将细胞培养于 HAT 被 HT 的代替的培养基中。随后通过流式细胞分析对单个孔筛选人抗 CD20 单克隆 IgG 抗体。一旦出现广泛的杂交瘤生长,通过在 10-14 天后对培养基进行监测。对抗体分泌杂交瘤重新涂布,再次筛选,并且如果依然对人 IgG 呈阳性,则通过限制性稀释对抗 CD20 单克隆抗体进行亚克隆。随后在体外培养稳定的亚克隆以在组织培养基中产生小量的抗体进行鉴定。从每种杂交瘤中选择一个保持亲本细胞反应性 (通过 FACS) 的克隆。对每个克隆制成 5-10 小瓶的细胞库并保存于液氮中。

[0382] 结合 CD20 的人单克隆抗体的筛选 / 一级筛选:为了测定抗体的同种型,进行一种同种型 ELISA。将微滴定板的小孔涂布以 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的小鼠抗人 κ 轻链, $50 \mu\text{l}$ / 孔于 PBS 中 4°C 温育过夜。在以 5% 鸡血清封闭之后,将培养板用上清液和纯化的同种型对照进行反应。随后在环境温度下将培养板温育 1-2 小时。随后将孔用人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4-特异性的辣根过氧化物酶结合的探针进行反应。将培养板显色并且如上所述进行分析。

[0383] 制成了四种杂交瘤细胞系,三种来自 KM 小鼠的融合而一种来自 HCo7 小鼠的融合,表示下列抗体:

[0384] 2F2:人单克隆 IgG1, κ 抗体,具有核苷酸序列:SEQ ID NOs:1 和 3 以及氨基酸序列:SEQ ID NOs:2 和 4。

[0385] 4C9:人单克隆 IgG1, κ 抗体,具有与 2F2:SEQ ID NOs:2 和 4 完全相同的氨基酸序列。

[0386] 7D8:人单克隆 IgG1, κ 抗体,具有核苷酸序列:SEQ ID NOs:5 和 7 以及氨基酸序列:SEQ ID NOs:6 和 4。

[0387] 11B8:人单克隆 IgG3, κ 抗体,具有核苷酸序列:SEQ ID NOs:9 和 11 以及氨基酸序列:SEQ ID NOs:10 和 12。

[0388] 术语“2F2”这里用来表示源自杂交瘤克隆 2F2 的抗体和源自杂交瘤 4C9 的抗体。

[0389] 如通过转基因的或转染色体的非人动物所测定的,本发明的抗体可以转换到其它的同种型,其中所述抗体源自所述非人动物。在本发明的一个实施方案中,11B8 人单克隆

IgG3, κ 抗体可以转换为具有完全相同 V_H 和 V_L 序列的人单克隆 IgG1, κ 同种型。在另一个实施方案中, 2F2IgG1, κ 抗体或 7D8IgG1, κ 抗体可以转换为具有完全相同 V_H 和 V_L 序列的人单克隆 IgG2、IgG4、IgA1、IgA2 或 IgE 同种型。

[0390] 实施例 2 抗 CD20 人抗体的抗体测序

[0391] V_H 和 V_L 区的测序

[0392] RNA 的制备: 根据生产商的方法以 RNeasy 试剂盒 (Qiagen, Westburg, Leusden, Netherlands) 由所有 HuMAb CD20 杂交瘤细胞系 (2F2, 7D8 和 11B8) 的 5×10^6 细胞制备总 RNA。

[0393] 2F2 和 7D8cDNA 的制备: 根据生产商的方法, 利用 SMART RACEcDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 由 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 制备 RNA 的 5' -RACE-Ready 互补 DNA (cDNA)。

[0394] 利用有效的 HF2PCR Kit (Clontech, BD) 并且利用下列引物:

[0395] V_K RACE2 5' GCA GGC ACA CAA CAG AGG CAG TTC CAG ATT TC 在 C_K 中退火

[0396] V_H RACE2 5' GCT GTG CCC CCA GAG GTG CTC TTG GAG G 在 C_H 中退火

[0397] 对 V_H 和 V_L 区进行扩增。

[0398] 11B8 的 cDNA 制备: 用 AMV 反转录酶、缓冲液 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)、oligo d(T)₁₅ (Promega, Madison, WI, USA)、dNTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 和 RNAsin (Promega) 根据生产商的方法 (2000, 3 版) 由 $3 \mu\text{g}$ 总 RNA 制备来自 11B8 细胞的 RNA 的互补 DNA (cDNA)。

[0399] 用于扩增 V_H 和 V_L 区进行克隆的 PCR 引物:

[0400] 所用的引物对:

[0401] V_H :FR1 5' 引物

[0402] AB62 CAg gTK CAg CTg gTg CAg TC

[0403] AB63 SAg gTg CAg CTg KTg gAg TC

[0404] AB65 gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC

[0405] V_H 前导 5' 引物

[0406]

AB85 ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC

AB86 ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg

AB87 ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg

AB88 ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC

AB89 ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT

[0407] V_H 3' 引物

[0408] AB90 TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg

[0409] V_K :FR1 5' 引物

[0410]

AB8	RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC
AB9	gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC
AB10	gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC
AB11	gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC
AB12	gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC
AB13	gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC
AB14	gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC

[0411] V_k 前导 5' 引物

[0412]

AB123	CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg
AB124	CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC
AB125	CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC
AB126	ATg gAA CCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC

[0413] V_k 3' 引物

[0414] AB16 Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg

[0415] 其中 K=T 或 G, S=C 或 G, R=AorG, Y=C 或 T, 而 W=A 或 T。

[0416] 用于扩增 V_H 和 V_L 区以克隆 2F2 和 7D8 的 PCR 条件: 以 HF 聚合酶混合物 (Clontech.) 在 T1 循环仪 (Biometra, Westburg) 上进行聚合酶链式反应 (PCR)。

[0417] PCR 条件:

[0418] 94°C 30 秒 5 个循环

[0419] 72°C 1 分钟

[0420] 94°C 30 秒

[0421] 70°C 30 秒 5 个循环

[0422] 72°C 1 分钟

[0423] 94°C 30 秒

[0424] 68°C 30 秒 27-30 个循环

[0425] 72°C 1 分钟

[0426] 于扩增 V_H 和 V_L 区以克隆 11B8 的 PCR 条件: 以 AmpliTaq 聚合酶 (Perkin Elmer) 在 T1 循环仪 (Biometra, westburg, Leusden, Netherlands) 上进行聚合酶链式反应 (PCR)。

[0427] PCR 循环方案:

[0428] 94°C 2 分钟

[0429] 11 个循环 94°C 30 秒

[0430] 65°C 30 秒, 每个循环减 1°C

[0431] 72°C 30 秒

[0432] 30 个循环 94°C 30 秒

[0433] 55°C 30 秒

[0434] 72°C 30 秒

[0435] 72°C 10 分钟

[0436] 冷却至 4°C

[0437] 在 pGEMT- 载体系统 II (2F2, 7D8 和 11B8) 中克隆 V_H 和 V_L : 在琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物之后, 用 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Westburg, Leusden, Netherlands) 纯化所述产物。根据生产商的方法 (1999, 6 版) 在 pGEMT- 载体系统 II (Promega) 中克隆每个 V_H 和 V_L 区的两种独立扩增的 PCR 产物。

[0438] 转化到大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 中后, 利用 T7 和 SP6 引物、30 个于 55°C 的退火循环通过菌落 PCR 筛选单个菌落。利用 Qiaprep Spin miniprep 试剂盒 (Qiagen) 纯化来自菌落的质粒 DNA。为了进一步分析 V_H 和 V_L 区, 进行 NcoI/NotI (NE Biolabs, Westburg, Leusden, Netherlands) 消化并在琼脂糖凝胶上进行分析。

[0439] 测序 (2F2, 7D8 和 11B8) : 在 pGEMT- 载体系统 II 克隆之后对 V 区进行测序。在 Baseclear (Leiden, Netherlands) 上进行测序。通过在 V base (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm). <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901> 中比对种系 V 基因序列对所述序列进行分析。

[0440] 获得的序列显示于图 53-58。

[0441] 实施例 3 在 GS-NS/0 细胞系中 2F2 和 11B8 的重组生产

[0442] 2F2T : 使用引物由标准克隆载体 pGem-5Zf (Promega) 利用 PCR 扩增 2F2 抗体的重链和轻链可变区, 所述引物包括优选的 Kozak 序列和合适的限制性位点以克隆在 GS 恒定区载体 pCON γ 1f 和 PCON κ (Lonza) 中的片段。

[0443] 扩增后, 将所述片段进行纯化并以限制酶进行消化以进行克隆并连接于两种载体中。重链可变片段用 Hind III 和 BsiW I 消化并且连接入已用 Hind III 和 BsiW I 消化并用碱性磷酸酶去磷酸化的 pCON γ 1f 载体中。重链可变片段用 Hind III 和 Apa I 消化并且连接入已用 Hind III 和 Apa I 消化并用碱性磷酸酶去磷酸化的 PCON κ 载体中。pCON γ 1f/ 可变重链和 PCON κ / 可变轻链载体分别显示于图 1 和 2 中。通过菌落 PCR 检测转化的大肠杆菌菌落并且将每个重链 (HC) 和轻链 (LC) 构建体的 2 个阳性菌落进行生长以作质粒分离。对这 4 个克隆的分离质粒进行测序以确定序列。两个 HC 克隆和一个 LC 克隆被发现具有正确的序列。

[0444] 将所述两个 HC 克隆和一个 LC 克隆进行组合以给出两种 LC-HC 的组合并且在 CHO-K1 细胞进行瞬时共转染以对所述构建体检测正确的 2F2 抗体生产。在该表达实验中所有的组合都达到正常生产的水平并且选择每个 HC 和 LC 构建体的一个克隆进行双基因载体的构建。

[0445] 通过将来自重链载体 pCON γ 1f/ 可变重链的完整表达盒连接至轻链载体 PCON κ / 可变轻链中, 使用标准克隆方法将 HC 和 LC 构建体组合于一个命名为 pCON γ 1f/ κ 2F2 的双基因克隆载体中。pCON γ 1f/ κ 2F2 载体显示于图 3 中。

[0446] 在 CHO-K1 细胞的瞬时转染中再次对该构建体进行功能性测试, 并且显示正常的表达水平。

[0447] 对 pCON γ 1f/ κ 2F2 质粒的可变区进行测序以再次确认正确的序列。

[0448] 通过用独特的限制性酶 PvuI 对 pCON γ 1f/ κ 2F2 进行消化来制备线性质粒以进行稳定的转染, 所述限制性酶 PvuI 剪切对于表达非常重要的外侧区。通过琼脂糖凝胶电泳确认完全线性化并且将 DNA 纯化并保存于 -20°C 待用。

[0449] 利用上面的线性 DNA 质粒通过质粒 DNA 电转化进行六次 NS/0 宿主细胞的转染。

转染后,将细胞分入 96 孔板中并进行温育。加入选择性培养基(包含 10%透析过的胎牛血清(dFCS)和 10 μ M 的 GS- 抑制剂 L- 甲硫氨酸砒亚胺,但缺少谷氨酰胺)并且检测培养板以确定非转染细胞何时死亡以聚集转染的细胞。对于有关 GS 载体的进一步的细节,参见 W087/04462。产转染的培养板温育大约 3 周以便形成菌落。对得到的菌落进行显微镜检测以确证这些菌落为适于进行测试的大小(覆盖超过 60%的孔底),以及在每一孔中只存在一个菌落。通过 IgG, κ -ELISA 对来自 436 个转染瘤的细胞上清液筛选聚集的抗体。利用这种数据,选择 111 个转化子进行处理并且在静态培养物中进行进一步的评估。对选择细胞系的培养物进行传代并且使之适应含有低血清的培养基(包含牛血清白蛋白(BSA)和加入的 1% dFCS),并且在静态培养物中进行产率的进一步评估(ELISA 和百分比汇集的测量)。选择 65 个最高等级的细胞系进行处理。在含有低血清的培养基(包含牛血清白蛋白(BSA)和 1% dFCS)中于批量摇瓶悬浮液培养物中进行选择细胞系产率的初步评估。基于收获抗体的浓度(通过 ELISA)和可接受的生长特性,选择 30 个细胞系利用批量摇瓶悬浮液培养物在无血清的培养基中作进一步评估。将产生最高抗体浓度的 10 个细胞系进一步在无血清的培养基的重复添加的批量摇瓶悬浮液培养物中进行评估。根据公知的标准方法,通过蛋白 A 高效液相色谱(HPLC)测定收获的产物浓度。如通过蛋白 A HPLC 测定的,所有的细胞系都产生 671-1333mg/L 的良好产量的 2F2 抗体(表示为 2F2T)。

[0450] 11B8T:以相似的方式如下稍微改进转染过程建立 GS-NS/0 细胞系以进行 11B8(表示为 11B8T)的重组生产。

[0451] 利用上面的线性 DNA 质粒通过质粒 DNA 电转化进行四次 NS/0 宿主细胞的转染。转染后,将细胞分入 96 孔板中并进行温育。对得到的菌落进行显微镜检测以确证这些菌落为适于进行测试的大小(覆盖超过 60%的孔底),以及在每一孔中只存在一个菌落之后,通过 IgG, κ -ELISA 对来自 596 个转染瘤的细胞上清液筛选聚集的抗体。利用这种数据,选择 100 个转化子进行处理并且在静态培养物中进行进一步的评估。对选择细胞系的培养物进行传代并且使之适应含有低血清的培养基(包含牛血清白蛋白(BSA)和加入的 1% dFCS),并且在静态培养物中进行产率的进一步评估(ELISA 和百分比汇集的测量)。选择 60 个最高等级的细胞系进行处理,并且还对没有产率数据的另外 13 个细胞系进行处理。在含有低血清的培养基(包含牛血清白蛋白(BSA)和 1% dFCS)中于批量摇瓶悬浮液培养物中进行选择细胞系产率的初步评估。基于收获抗体的浓度(通过 ELISA)和可接受的生长特性,选择 10 个细胞系进一步在含有低血清的培养基(包含牛血清白蛋白(BSA)和 1% dFCS)的重复添加的批量摇瓶悬浮液培养物中进行评估。根据公知的标准方法,通过蛋白 A 高效液相色谱(HPLC)测定收获的产物浓度。如通过蛋白 A HPLC 测定的,得到的 9 个细胞系全都产生 354-77mg/L 的良好产量的 11B8 抗体(表示为“11B8T”)。

[0452] 实施例 4 源自杂交瘤的 2F2 和源自转染瘤的重组 2F2T 的比较

[0453] 通过利用凝胶电泳(SDS-PAGE 和天然琼脂糖凝胶电泳)显示 2F2 和 2F2T 大小相同,仅在电荷上有稍许差异。

[0454] 而且,如通过利用 FACScalibur(Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)的流式细胞分析所测量的,2F2 和 2F2T 以相似的亲和力与 CD20 转染的 NS/0 细胞和 Raji 细胞相结合。没有观察到结合于未转染的 NS/0 细胞上,这表明 2F2 和 2F2T 的特异性。通过流式细胞分析(FACScalibur)测量细胞裂解(PI 阳性细胞的数目),2F2 和 2F2T 还与 ARH-77 细

胞 (IgG 血浆细胞白血病)、Daudi 细胞、DOHH 细胞 (源于滤泡中心母细胞 /centrolytic 淋巴瘤、DSMZ 的顽固性免疫成纤维 B 细胞淋巴瘤 Braunschweig, Germany) 和 Raji 细胞相同程度地以浓度依赖性的方式诱导 CDC。在第二个实验中,当以不同浓度加入血清时,2F2 和 2F2T 的浓度保持恒定。在 2F2 和 2F2T 之间没有观察到显著的差异。

[0455] 最后,结合细胞关联的 CD20 的 2F2 和 2F2T 强烈地和同等程度地结合补体因子。利用荧光素结合的抗 C1q 多克隆抗体在 Daudi 细胞、DOHH 细胞和 Raji 细胞中进行所述实验以检测 C1q 的结合。

[0456] 实施例 5 抗 CD20 的人抗体的结合特性

[0457] 结合不同细胞系:将用人 CD20 转染的 NS/0、NS/0, Daudi 和 Raji 细胞以含有人抗体 2F2、7D8 和 11B8 的培养物上清液于 4°C 温育 30 分钟,随后与结合 FITC 的抗人 IgG Ab 一起温育。通过利用 FACScalibur 流式细胞仪进行流式细胞分析来评估结合。将荧光强度与阴性对照同种型匹配样品相比较。如图 4 中所示,三种抗体都结合以人 CD20 转染的 NS/0 细胞,但是对于亲本的未转染 NS/0 细胞则没有观察到结合。三种抗体也都结合两种不同的 Burkitt 淋巴瘤 B 细胞系 (Raji 和 Daudi),这表明 2F2、7D8 和 11B8 是 CD20 特异性的。在非饱和的条件下测试包含 7D8 或 11B8 的上清液,所以,观察到与 2F2 相比较低的荧光强度。

[0458] 通过流式细胞分析测定的 2F2 的 EC_{50} 值:为了测定 2F2 对表达于人 B 细胞上的 CD20 的显而易见的亲和力,利用来自三个人供体的分离的 PBMCs 和 CD3 阴性细胞的选通,制作了 2F2 的结合曲线。将分离的 PBMCs 与一个浓度范围的 FITC 标记的 2F2 一起温育 1 小时,并且对于 FACS 和平均荧光强度 (MFI) 进行测定。MFI 值显示于图 5A 和 5B 中作为抗体浓度的功能。通过非线性回归利用 Graph Pad Prism3.02 计算 EC_{50} 值。人 2F2 的 EC_{50} 值对于三个供体来说都是相似的,平均值 (\pm s. e. m.) 为 287 ± 12.7 ng/ml (1.9 ± 0.1 nM)。

[0459] 125 I 标记的 mAbs 结合表达 CD20 的细胞:利用 Iodobeads (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 对 mAbs 进行碘化。将 125 I 标记的 mAbs 进行连续稀释并且在叠氮化钠和 2-去氧葡萄糖存在时与 Ramos-EHRB 细胞于 37°C 下温育 2 小时以防止胞饮作用。随后通过于 $14,000 \times g$ 离心 2 分钟通过苯二甲酸盐油的混合物以分离结合细胞和游离的 125 I 标记的 mAbs,允许快速分离而不干扰结合平衡。随后利用 γ 计数器 (Wallac UK Ltd, Milton Keynes, UK) 对沉淀的细胞和结合抗体一起进行计数。

[0460] 如图 6 中所示,2F2 和 11B8 显示相似的 KD (或相似的饱和点),这显示两种抗体都以相似的亲和力进行结合。不过,11B8 比 2F2 在一个较低的水平饱和,这显示它识别不同形式的 CD20。这还与一个进一步的实验一致,所述实验显示相类数目的 2F2 和利妥希玛抗体分子结合 Ramos-EHRB 细胞和 Daudi 细胞上的 CD20,如由结合饱和的相似水平所显示的 (大约 $2-3 \times 10^5$ 抗体分子 / 细胞)。相反地,11B8 和 B1,在该水平的一半处饱和并且仅有大约 $1-2 \times 10^5$ 抗体分子结合到 Ramos-EHRB 细胞 (图 7A) 和 Daudi 细胞 (图 7B)。

[0461] 为了排除碘化抗体通过 Fc 受体结合的可能性,通过利用抗 CD20F(ab')₂ 片段确定结合曲线。再一次,相似数目的 2F2 和利妥希玛 -F(ab')₂ 片段结合到 Ramos-EHRB 和 Daudi 细胞上。也是在这些实验中,结合到 Ramos-EHRB 和 Daudi 细胞上的 2F2 或利妥希玛抗体分子在结合在所述细胞上的 11B8 和 B1 分子的大约两倍处饱和。

[0462] 解离速率:为了测定 mAbs 的解离速率,将 Ramos-EHRB 细胞 (在叠氮化物 /2DOG 存在的情况下于 1ml 的终体积) 与 2μ g/ml 的 125 I mAbs 一起于 37°C 温育 2 小时以实现最大

结合。在微离心管中离心后 (2000rpm 2 分钟), 去除上清液, 将沉淀迅速在 1ml 培养基中重悬, 立即转移到 37°C 的于 15ml 锥形管中的 9ml 培养基中。在随后的 2 小时于不同的时间, 取 0.4ml 样品并且在苯二甲酸盐油上分离以测定在细胞表面剩余的放射性标记的 mAbs 的水平。如图 8 中所示, 2F2 和 11B8 都比利妥希玛或 B1 显著更加缓慢地从 CD20 上解离下来。

[0463] 抗 CD20F(ab)₂ 片段的解离速率: 分别用 2 μg/ml 2F2、11B8 和利妥希玛的 ¹²⁵I 标记的 F(ab)₂ 片段对 Ramos-EHBR 细胞进行饱和化。洗涤所述 Ramos-EHBR 细胞并在高浓度未标记抗体的存在下进行温育。对 Ramos-EHRB 细胞的最大 (起始) 结合设定于 100%。在上样之后的 3 小时中的几个时间点, 取 0.4ml 样品并且在苯二甲酸盐油上分离以测定在细胞表面剩余的放射性标记的 mAbs 的水平。由图 9 可见, 2F2 和 11B8 比利妥希玛慢得多地从 CD20 上解离下来。在 90 分钟时, 大约 50% 的 F(ab)₂ 利妥希玛分子结合到细胞上, 而半数的 F(ab)₂ 2F2 分子在 3 小时后解离。2F2、11B8T 和利妥希玛分子的 k_d (k_{off}) 值计算如下:

$$[0464] \quad F(ab)_2 2F2 : k_d = \ln 2 / t_{1/2} (\text{sec}) = \ln 2 / 10800 (\text{sec}) = 6.4 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$$

$$[0465] \quad F(ab)_2 11B8T : k_d = \ln 2 / t_{1/2} (\text{sec}) = \ln 2 / 9000 (\text{sec}) = 7.7 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$$

$$[0466] \quad F(ab)_2 \text{ 利妥希玛} : k_d = \ln 2 / t_{1/2} (\text{sec}) = \ln 2 / 5400 (\text{sec}) = 1.3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$$

[0467] 抗 CD20mAb 功能关闭速率: 在功能性 CDC 测试中评估与利妥希玛相比缓慢的 2F2 解离速率的影响。之后, 将 Daudi 或 SU-DHL4 细胞以 10 μg / ml 抗 CD20mAb 或一种同种型对照抗体预温育, 洗涤并在培养基中温育不同的时间是。在测试开始后的这些时间点, 将样品与补体一起进行温育 (正常的人血清 20vol / vol%) 并且随后在 37°C 再温育 45 分钟。随后, 通过利用 PI (碘化丙锭) 染色法在 FACS 上测定细胞裂解。裂解细胞 (PI 阳性细胞) 的百分比显示于图 10A (Daudi 细胞) 或图 10B (SU-DHL4 细胞) 中作为温育时间的功能。2F2 在两种细胞系中都诱导高度 CDC, 并且在 6 小时之后仍裂解多达 90% 的细胞, 提示这些细胞的 CDC 饱和和保持得足够高以诱导大多数细胞的补体介导的解离。相反地, 利妥希玛与上面的解离速率研究一致, 从细胞上快速解离并且在 6 小时的温育期后不能诱导特异性裂解。11B8 被用作对照并且不诱导 CDC。

[0468] 实施例 6 抗 CD20 的人抗体的 CDC

[0469] 血清制备: 通过将来自健康志愿者的血液引入已在室温放置 30-60 分钟的 autosep 胶和凝活血活化剂 vacutainer 管 (BD biosciences, Rutherford, NJ) 中来制备用于补体裂解的血清, 随后于 3000rpm 离心 5 分钟。收集血清并保存于 -80°C。

[0470] 流式细胞分析: 使用 FACScalibur 流式细胞仪以 CellQuest pro 软件 (BD Biosciences, Mountain view, CA) 进行流式细胞分析。收集至少 5000 次事件以细胞碎屑进行分析, 包括调节前侧向分散 (forward sideward scatter) (FCS) 阈值。

[0471] CDC 动力学: 在第一组实验 (n=3) 中, 在加入人血清之前的 10 分钟, 通过加入 10 μg / ml 的 2F2、利妥希玛和 IgG 对照抗体分别测定五种不同 B 细胞系, 即, Daudi、SU-DHL-4、Raji、DOHH 和 ARH-77 的动力学。在 CDC 诱导之后的 7 个时间间隔 (高达 1 小时), 将所述细胞重悬于 PI 溶液中并且通过流式细胞分析测量细胞裂解 (PI 阳性细胞的数目)。结果显示于图 11A (ARH-77 细胞), 11B (Daudi 细胞), 11C (Raji 细胞), 11D (DOHH) 和 11E (SU-DHL-4) 中。如所见, 加入抗体在 5 分钟之内诱导细胞裂解。有趣的是, 加入 2F2 导致所有五个 B 细胞系中超过 80% 的标记细胞的裂解。利妥希玛仅在 SU-DHL-4 和 Daudi 细胞系中诱导超过 80% 的细胞裂解, 而 DOHH 细胞系的细胞裂解为 ~ 50%, 并且在 ARH-77 和

Raji 细胞系中小于 20%。用 IgG 对照抗体没有观察到裂解（数据仅显示于图 11B 中）。

[0472] CDC 血清滴定：在一组独立的实验中 (n=5)，于两种不同的抗体浓度 0.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 和 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 对 NHS（正常人血清）进行滴定。在加入一个浓度范围的 NHS 之前，用 2F2 或利妥希玛对细胞进行预温育 10 分钟。在 CDC 诱导后的 45 分钟，将细胞重悬于 PI 溶液中。通过流式细胞分析测量细胞裂解（PI 阳性细胞的数目）。图 12A-D 显示裂解细胞（PI 阳性细胞的数目）的百分比作为 NHS 浓度的功能。图 12A 显示 Daudi 细胞的细胞裂解，图 12B 显示 ARH-77 细胞的细胞裂解，图 12C 显示 DOHH 细胞的细胞裂解，而图 12D 显示 Raji 细胞的细胞裂解。用提高的 NHS 浓度观察到增强的细胞裂解。加入 2F2 于最高的 NHS 和抗体浓度引发 Daudi 细胞的最大裂解。利妥希玛于最高的 NHS 浓度诱导大约 50% 的 Daudi 细胞的细胞裂解。

[0473] 在 ARH-77 细胞中，只有最高浓度的 NHS 和 2F2 导致大约 75% 的细胞裂解。较低的抗体浓度不足以诱导 ARH-77 细胞裂解。利妥希玛在该实验中不能诱导诱导 ARH-77 细胞的细胞裂解。

[0474] 2F2 能够于高浓度和低浓度下诱导 DOHH 细胞的 NHS 浓度依赖性细胞裂解，而利妥希玛则不能在这些条件下诱导裂解。

[0475] 最后，2F2 诱导 Raji 细胞的 NHS 浓度依赖性细胞裂解，只有通过利用 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的 mAb 它才是明显的。用利妥希玛没有观察到裂解。

[0476] 在这些实施方案中，用同种型对照抗体（数据未显示）没有观察到裂解。

[0477] CDC 抗体滴定：为了测量抗 CD20 抗体在低浓度诱导 CDC 的能力，进行滴定抗体的实验 (n=6)。在加入 NHS 之前，用一个浓度范围的 2F2 或利妥希玛分别对各种细胞系进行预温育 10 分钟。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 45 分钟之后（最大裂解发生之时），将细胞重悬于 PI 溶液中并且通过流式细胞分析测量细胞裂解（PI 阳性细胞的数目）。图 13A (Daudi 细胞)，13B (DOHH 细胞)，13C (ARH-77 细胞) 和 13D (Raji 细胞) 显示裂解（PI 阳性的）细胞的百分比作为抗体浓度的功能。2F2 和利妥希玛都诱导细胞裂解的温度依赖性的增强。加入 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的 2F2 诱导 Daudi 细胞的超过 80% 的裂解，而用利妥希玛即使在加入 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 之后也没有达到这一水平。另外，2F2 于 0.4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 诱导 DOHH 细胞的超过 80% 的裂解，而用利妥希玛于该浓度只观察到极微的裂解。用利妥希玛于 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 达到 DOHH 细胞的最大裂解（全部分析细胞的 $\sim 30\%$ ）。由 2F2 进行的 ARH-77 和 Raji 细胞裂解的诱导更低，但于 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 的抗体浓度仍达到 70% 的裂解。在其最高浓度上，利妥希玛仅在 $\sim 23\%$ 的 ARH-77 细胞中和仅在 $\sim 6\%$ 的 Raji 细胞中诱导裂解。

[0478] 在一个相似的实验中，研究 2F2、2F2T、11B8T 和利妥希玛的诱导 Daudi 和 Raji 细胞系的 CDC 的能力，参见图 14A 和 14B。在该实验中还观察到以（源于转染瘤的）2F2T 于 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 进行的 Daudi 细胞的 80% 的裂解，而利妥希玛即使于 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 也只达到 60% 的裂解，见图 14A。用 2F2T 进行的 Daudi 细胞裂解与用源于杂交瘤的 2F2 所获得的裂解相同。

[0479] Raji 细胞的裂解更加困难，但是 2F2 和 2F2T 再次在相似的程度诱导 Raji 细胞的裂解（图 14B）。利妥希玛不能诱导 Raji 细胞的 CDC，这与图 13D 中所示的实验一致。

[0480] 由图 14A 和 14B 可见，Daudi 和 Raji 细胞都不对 11B8T 的 CDC 敏感。B1 诱导 Daudi 的裂解，但是程度很小，并且不能诱导 Raji 细胞的裂解。

[0481] 在 Daudi 细胞中抗 CD20 的 CDC 活性:为了测定每种抗体的 CDC 活性,利用碘化丙锭 (PI) 染色的细胞的分析评估提高的膜通透性。简言之,将 Daudi 细胞洗涤并以 1×10^6 细胞 / ml 重悬于 RPMI / 1% BSA。向 Daudi 细胞中加入各种浓度的人单克隆抗体并且于室温使其结合到细胞上的 CD20 10-15 分钟。随后,将血清作为一种补体来源加入至终浓度 20% (v / v) 并将混合物于 37°C 温育 45 分钟。随后将细胞保持于 4°C 直至分析。随后将每种样品 (150 μ l) 加至于 FACS 管中的 10 μ l PI 溶液 (10pg / ml 于 PBS 中) 中。立即通过流式细胞分析对混合物进行评估。如图 15A 中所示,2F2 和 7D8 与利妥希玛相比显示较高 CDC 活性。

[0482] 在第二种实验中,用如上的人单克隆抗体来标记所述细胞,随后在加入人血清之前进行洗涤并在 PBS 中于 37°C 温育 45 分钟。这确保了在加入血清时只有结合细胞的抗体可激活补体进行细胞裂解。如图 15B 中所示,与 2F2 和 7D8 相比发现对于利妥希玛的降低的 CDC 活性,这显示人抗体 (2F2 和 7D8) 并不被在加入血清之前洗涤细胞所影响。

[0483] 在 Raji 细胞中的抗 CD20 的 CDC 活性:利用 Raji 细胞来评估 CDC 活性,所述 Raji 细胞具有 CD55 和 CD59 的相对高的表面表达,并且因此更加耐受补体攻击。将人抗体加至 Raji 细胞并且让其结合 15 分钟。加入人血清 (20%) 并且将混合物于 37°C 温育 45 分钟。如图 16A 中所示,利妥希玛对于介导 Raji 细胞的 CDC 是无效的,而用 2F2 或 7D8 处理的 Raji 细胞中则发生显著水平的细胞裂解。因此,2F2 和 7D8 具有裂解 CD55 / 59 阳性靶细胞的独特能力。

[0484] 在一个单独的实验中,将 Raji 细胞与饱和浓度的抗 CD55mAb (终浓度 5 μ g / ml) 和抗 CD59mAb (终浓度 5 μ g / ml) 一起进行预温育以阻抑这些补体防御分子的效应。随后将人抗 CD20 抗体与如上的血清 (20%) 一起加入于 37°C 持续 45 分钟。如图 16B 中所示,CD55 和 CD59 的封闭作用导致使用人抗体 2F2 或 7D8 的 Raji 细胞的几乎 100% 的裂解,而使用利妥希玛只观察到细胞裂解的 25% 的增长。

[0485] 补体抑制剂 I 的作用 - 表面分子的表达:由于补体抑制剂如 CD55 和 CD59 好像在对于利妥希玛诱导的 CDC 中发挥重要作用,所以进行一种实验以测定这些分子在所研究的 B 细胞系上的表达, (Raji, Daudi, DOHH, ARH-77 和 SU-DHL-4)。

[0486] 用结合 FITC 的抗 CD55、抗 CD59 和抗 CD20 抗体对细胞染色并且通过流式细胞分析术来分析分子表达。结果示于下表 1 中。

[0487] 表 1

[0488]

表达	CD20	CD55	CD59
ARH-77	++	++++	++
Raji	+	++	+++
DOHH	++	+++	++
SU-DHL-4	+++	+	++

Daudi	++	+	+
-------	----	---	---

[0489] 补体抑制剂 I 的作用 -CD55 和 CD59 的封闭作用 :为了进一步研究 CD55 和 CD59 在抗 CD20 诱导的 CDC 中的作用,在诱导 CDC 之前通过特异性抗体对两种补体抑制剂分子进行封闭 (n=3)。使用 Raji 细胞,因为单独的 2F2 只诱发部分裂解。在加入集取的 NHS(20%) 之前,将 Raji 细胞 (1×10^5 细胞 / $50 \mu\text{l}$) 与一个浓度范围的 2F2 和利妥希玛以及抗 CD55 ($5 \mu\text{g} / \text{ml}$) 或抗 CD59 ($5 \mu\text{g} / \text{ml}$) 一起进行预温育 10 分钟。在 CDC 诱导之后的 45 分钟,将细胞重悬于 PI 溶液中。通过流式细胞分析测量细胞裂解 (PI 阳性细胞的数目)。图 17A-C 显示裂解 (PI 阳性) 细胞的百分比作为抗体浓度的功能,并且显示一种实验,它是三种实验的示例。图 17A 显示 Raji 细胞与抗 CD55 抗体一起进行的温育,图 17B 显示显示 Raji 细胞与抗 CD59 抗体一起进行的温育,而图 17C 显示显示 Raji 细胞与抗 CD55 和抗 CD59 抗体一起进行的温育。

[0490] 如图 17A 中所能见到的,加入抗 CD55 并不影响 2F2 或利妥希玛诱导的 CDC。加入抗 CD59 抗体提高所述细胞对 2F2 和利妥希玛的敏感性约 30% (图 17B)。加入抗 CD55 和抗 CD59 抗体进一步增强抗 CD20 诱导的裂解约 30% (图 17C)。

[0491] 如流式细胞分析所测定的补体因子的作用 I-C1q 结合 :将抗 CD20 抗体 (2F2 和利妥希玛) 和一种同种型对照抗体加至各种 B 细胞系中。10 分钟的温育之后,加入 NHS(1vol / vol%)。进一步于 37°C 温育 10 分钟并且洗涤所述细胞之后,弃去上清液并将细胞沉淀物与结合 FITC 的抗 C1q 抗体一起进行温育。数据显示以 C1q 染色的细胞的平均荧光强度并显示于图 18A(Daudi), 18B(ARH-77), 18C(DOHH), 和 18D(Raji) (n=6) 中。结果提示 2F2 结合 C1q 的抗体浓度依赖性增长与所研究的 B 细胞系无关。而且,在所有的测试细胞系中,2F2 的 C1q 结合通常比利妥希玛的结合更高。用同种型对照抗体 (数据未显示) 没有观察到平均荧光的增强。

[0492] 如流式细胞分析 II 所测定的补体因子的作用 - 通过传统途径的补体激活 :C4c 固定于抗体包被的细胞上是通过传统途径激活补体的指征。将抗 CD20 抗体 (2F2 和利妥希玛) 和一种同种型对照抗体加至各种 B 细胞系中。 37°C 温育 10 分钟之后,加入 NHS(1vol / vol%)。在进一步温育并且洗涤所述细胞之后,弃去上清液并将细胞沉淀物与结合 FITC 的抗 C4c 抗体一起进行温育。数据显示以 C4c 染色的细胞的平均荧光强度并显示于图 19A(Daudi), 19B(ARH-77), 19C(DOHH), 和 19D(Raji) (n=6) 中。在全部测试的 B 细胞系中 (n=3) 阐明补体因子 C4c 对 2F2 的固定,最大达到约 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 的抗体。在 2F2 结合之后的固定远大于在利妥希玛结合之后的固定,与测试的细胞系无关。用同种型对照抗体 (数据未显示) 没有观察到平均荧光的增强。

[0493] 热灭活血清中的 CDC :在加入 NHS (有活性的或在 57°C 热灭活 30 分钟的) 之前,将细胞 (Daudi 细胞、ARH-77 细胞或 Raji 细胞) 和抗体 (利妥希玛、2F2、2F2T、11B8 和同种型抗体 HuMab-KLH IgG1) 以一个浓度范围的抗 CD20 抗体进行预温育 10 分钟。。在 CDC 诱导之后的 45 分钟,将细胞重悬于 PI 溶液中。通过流式细胞分析测量细胞裂解 (PI 阳性细胞的数目)。在热灭活的血清存在时没有观察到细胞的裂解,无所用细胞系和 CD20 抗体无关,在热灭活的血清存在时没有观察到 CDC。

[0494] 实施例 7 抗 CD20 的人抗体的 ADCC ADCC 测试 I

[0495] 人嗜中性细胞的富集:从加肝素的全血中富集多形核细胞(嗜中性细胞, PMNs)。将血液在 RPMI1640 中稀释两次并且在 Ficoll(Lymphocyte Separation Medium1077g / ml, 710g, RT, 20 分钟; BioWhittaker, cat. 17-829E, lot no. 014832) 上分层并且于 2000rpm 离心 20min。去除单核细胞层,利用冰冷的 NH_4Cl 溶液(155mM NH_4Cl , 10mM NaHCO_3 , 0.1mM EDTA, pH7.4) 将包含嗜中性细胞的沉淀物中的红细胞低渗裂解。将剩下的嗜中性细胞洗涤两次并在添加了 10% FCS(RPMI-10) 的 RPMI1640 中重悬。

[0496] 人外周血单核细胞的富集:将人血在 RPMI1640 中稀释两次并将血细胞于 Ficoll(Lymphocyte Separation Medium1077g / ml, 710g, RT, 20 分钟; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgium, cat. 17-829E, lot no. 0148 32) 上进行分层。从中间相中收集外周血单核细胞(MNCs),进行洗涤并在添加了 10% FCS、2mM L-谷氨酰胺、5U / ml 青霉素、50pg / ml 链霉素(全部来自 BioWhittaker) 和加入了 25mM HEPES(BioWhittaker) 的 RPMI1640 培养基中进行重悬。

[0497] ADCC 设定:用 $20 \mu\text{Ci}^{51}\text{Cr}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 标记靶 B 细胞(新分离的 B 细胞或来自 B 细胞系)2 小时。在 RPMI-10 中充分洗涤后,将细胞调节到 1×10^5 细胞 / ml。将全血或分离的效应细胞($50 \mu\text{l}$; MNCs, PMNs) 或血浆($50 \mu\text{l}$)、致敏抗体($50 \mu\text{l}$) 和 RPMI-10($50 \mu\text{l}$) 加到圆底微量滴定板(Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) 上。通过加入靶细胞($50 \mu\text{l}$) 至终体积 $200 \mu\text{l}$ 来开始测试。对于分离的效应细胞,使用一种靶(E:T) 比率为 40:1 的效应细胞。对于全血,相应于一种靶比率为 40:1 的评估的效应细胞使用 33vol / vol% 的量。温育后(3 小时, 37°C), 通过离心停止测试,并且在闪烁计数器中以每分钟计数(cpm) 来测量从三份样品中释放出来的 ^{51}Cr 。利用下列公式来计算细胞毒性的百分比:

[0498] %特异性裂解 = (实验 cpm - 基本 cpm) / (最大 cpm - 基本 cpm) \times 100

[0499] 通过向靶细胞中加入高氯酸(3%终浓度)测定最大的 ^{51}Cr 释放,在致敏抗体和效应细胞不存在时测量基本释放量。

[0500] 统计:通过单向 ANOVA, 随后通过 Tukey's 多重比较 post-hoc 测试来分析数据。利用 Graph Pad Prism(version 3.02 for Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) 进行分析。

[0501] ARH-77 细胞的裂解:在第一组实验中,将 ARH-77 细胞用作靶细胞(图 20)。加入 2F2(n=3)、利妥希玛(n=3) 或 11B8T(n=1) 导致大约 50% 的 ARH-77 细胞的 MNC 介导的裂解。在嗜中性细胞存在时没有观察到特异性的裂解。在与 2F2 一起温育后加入血浆(为了评估补体的作用)诱导 ARH-77 细胞的裂解,但在与利妥希玛($p < 0.05$, 2F2 对无抗体, ANOVA) 或 11B8T 一起温育后则不然。在全血存在的情况下,在与 2F2 一起温育后 ARH-77 细胞的裂解增强($p < 0.05$, 2F2 vs. 利妥希玛和 2F2 vs. 无抗体, ANOVA),但在与利妥希玛一起温育后则不然。由利妥希玛诱导的特异性裂解事实上在全血存在的情况下非常低。11B8T 在全血存在的情况下诱导大约 25% (n=1) 的细胞裂解。在抗体不存在时,观察到 10-15% 的非特异性裂解。

[0502] B-CLL 细胞的裂解:在第二组实验中,将从 B-CLL 患者(n=12) 中获得的 B 淋巴细胞白血病(B-CLL) 亚克隆 5 轮并且随后在实验中用作靶细胞(图 21)。在抗体不存在时,没有观察到特异性的裂解,但是加入 2F2、11B8T 或利妥希玛($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) 将 MNC 介导的特异性

裂解提高到 10-20% ($p < 0.001$, ANOVA)。靶细胞与血浆和 2F2 一起温育诱导 BCLL 细胞的特异性裂解, 而用 11B8T 或利妥希玛 ($p < 0.001$, ANOVA) 则没有观察到特异性裂解。而且, 2F2 在于全血中温育之后介导 B-CLL 细胞的特异性裂解。用 11B8T ($p < 0.01$, ANOVA) 或利妥希玛 ($p < 0.001$, ANOVA) 没有观察到全血的 B-CLL 细胞的特异性裂解。在嗜中性细胞存在的情况下没有观察到特异性裂解。

[0503] 由于利妥希玛能够介导有效的 ADCC 但不能介导测试肿瘤细胞的 CDC, 由 2F2 进行的全血诱导的 B 细胞裂解有可能是通过补体介导的。

[0504] 毛细胞白血病 (HCL) 细胞的裂解: 在第三组实验中测定通过 ADCC 或在血浆或全血存在时由 2F2、11B8T 和利妥希玛进行的 HCL 细胞裂解。数据显示于图 22 中。尽管嗜中性细胞不能介导与所用 mAb 不相关的 ADCC, 但 11B8T 能够比 2F2 ($p < 0.001$, ANOVA) 或利妥希玛 ($p < 0.05$, ANOVA) 更有效地诱导 MNC 介导的 HCL 细胞裂解。2F2 和利妥希玛不能诱导 MNC 介导的 HCL 细胞裂解。与利妥希玛 ($p < 0.05$, ANOVA)、11B8T ($p < 0.01$, ANOVA) 或无抗体 ($p < 0.001$, ANOVA) 相比, 用 2F2 强烈地增强血浆介导的细胞裂解。在全血存在的情况下研究抗 CD20 诱导的裂解时, 2F2 诱导细胞的完全裂解, 比利妥希玛 ($p < 0.01$, ANOVA)、11B8T 或无抗体加入 ($p < 0.001$, ANOVA) 程度更高。

[0505] B-ALL 细胞的裂解: 利用来自两位患者的细胞研究 2F2 和利妥希玛通过 ADCC 或补体诱导 B-ALL 细胞的能力 (图 23)。如在之前的实验中所观察的, 2F2 和利妥希玛以相似的程度诱导 B-ALL 细胞的 MNC 介导的 ADCC。但是 2F2 还能够诱导 B-ALL 细胞的血浆和全血介导的裂解, 而利妥希玛则不能。

[0506] 滤泡淋巴瘤细胞的裂解: 当研究滤泡淋巴瘤细胞 ($n=2$) 的裂解时, 出现了一种不同的画面 (图 24)。用 2F2 观察到较小的 PMN 介导的细胞裂解, 而 2F2 和利妥希玛都不能诱导 MNC 介导的 ADCC。11B8T 仍然能够诱导大约 20% 的 MNC 介导的裂解。尽管利妥希玛诱导相对高的血浆介导的裂解, 但用 2F2 观察到完全的血浆介导的裂解。还是用全血, 以 2F2 观察到完全的裂解, 而用血浆介导的裂解观察到 70% 的裂解。用 11B8T 观察到极小的血浆或全血介导的裂解。

[0507] 原发性套细胞淋巴瘤的裂解: 套细胞淋巴瘤细胞的特异性裂解更加难以诱导 ($n=1$, 图 25)。用 2F2、11B8T 或利妥希玛在加入 PMN 或 MNC 和 CD20mAbs 之后观察到极小的或观察不到裂解。不过, 2F2 仍然能够诱导 40% 的通过血浆或全血进行的裂解, 而用利妥希玛只有 10-20% 的细胞被裂解。11B8T 不能够诱导初级套细胞淋巴瘤的裂解。

[0508] 在全血中 ARH-77 细胞的抗体浓度依赖性裂解: 在进一步的实验中 ($n=4$) 分析了有关在全血存在时 ARH-77 细胞上的 ADCC 的诱导的剂量依赖性。如图 26 中所能见到的, 2F2 的滴定诱发了 ARH-77 细胞的特异性裂解百分比的剂量依赖性的增长 ($p < 0.05$: 治疗 - 效果, 双向 ANOVA)。用利妥希玛没有观察到 ARH-77 细胞的特异性裂解。

[0509] ADCC 测试 II

[0510] 制备 ^{51}Cr 标记的靶细胞: 将 ARH-77 细胞和 Raji 细胞收集 (3×10^6 细胞) 于 RPMI++ 中, 离心下去 (1500rpm; 5 分钟), 重悬于 $140 \mu\text{l}$ 的 ^{51}Cr (Chromium-51; CJS11-1mCi, 批量 12; $140 \mu\text{l}$ 约为 $100 \mu\text{Ci}$) 并且进行温育 (37°C 水浴; 1 小时)。洗涤细胞之后 (1500rpm, 5 分钟, 于 PBS 中, $3 \times$), 将细胞重悬于 RPMI++ 并通过锥虫蓝排除法计数。将细胞调整为 2×10^4 细胞 /ml 的浓度。

[0511] 效应细胞的制备:通过生产商的说明书用 Ficoll (Bio Whittaker ;淋巴细胞分离培养基, cat17-829E) 从 40ml 的肝素血中分离新鲜的外周血单核细胞。在将细胞于 RPMI++ 中重悬之后,通过锥虫蓝排除法计数细胞并且调整为 2×10^6 细胞 /ml 的浓度。

[0512] ADCC 设定 :将 $50 \mu\text{l}$ RPMI++ 滴定于 96 孔板中,加入 $50 \mu\text{l}$ 的 ^{51}Cr 标记的靶细胞。随后,加入 $50 \mu\text{l}$ 的抗体,稀释于 RPMI++ 中 (终浓度 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$)。温育细胞 (RT, 10 分钟),加入 $50 \mu\text{l}$ 效应细胞,产生 50 :1 的效应子对靶的比率 (为了进行最大裂解的测定,加入 $50 \mu\text{l}$ 15% 的 Triton-X-100 而非效应细胞)。将细胞离心 (500rpm, 5 分钟),温育 (37°C , 5% CO_2 , 4 小时)。细胞离心之后 (1500rpm, 5 分钟),将 $100 \mu\text{l}$ 的上清液收集至微电子管中,并且在 γ 计数仪中进行计数。百分比特异性裂解计算如下:

[0513] %特异性裂解 = $(\text{cpm 样品} - \text{cpm 仅靶细胞}) / (\text{cpm 最大裂解} - \text{cpm 仅靶细胞}) \times 100$

[0514] 统计 :通过单向 ANOVA, 随后通过 Tukey's 多重比较 post-hoc 测试来分析数据。利用 Graph Pad Prism (version 3.02 for Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) 进行分析。

[0515] ARH-77 和 Raji 细胞的抗体浓度依赖性裂解 :对 2F2T 和 11B8T 测试其与利妥希玛相比诱导 ARH-77 和 Raji 细胞 ($n=3$) 的 ADCC 的能力。

[0516] 利用 MNC 作为效应细胞在 ARH-77 细胞的 ADCC 中观察 CD20mAbs 的剂量 - 效应关系。2F2T 和 11B8T 都诱导 ARH-77 细胞的特异性裂解,所述裂解于 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 mAbs 上为最大 (50%)。利妥希玛仅诱导靶细胞 25% 的裂解。加入同种型对照抗体 (HuMab-KLH) 并不诱发 ADCC。不加入 MNCs 观察不到特异性裂解 (数据未显示)。

[0517] 当 Raji 细胞被用作靶细胞时,出现了与 ARH-77 细胞相似的图像 (图 28)。2F2T 和 11B8T 都诱导 MNC 介导的 Raji 细胞裂解,虽然 2F2T 于低浓度下好像比 11B8T 更加有效。用 2F2T 和 11B8T 达到的最大裂解大约为 35%。利妥希玛诱导 MNC 介导的 Raji 细胞裂解,尽管只有 20% 的靶细胞对利妥希玛敏感。加入同种型对照抗体 (HuMab-KLH) 并不诱导 ADCC。不加入 MNCs 观察不到特异性裂解 (数据未显示)。

[0518] 实施例 8FRET 和 Triton-X 不溶性分析

[0519] 用作荧光共振能量转移 (FRET) 的 Cy3- 和 Cy5- 结合的 mAb 的制备 :如生产商的说明书中所述将单克隆抗体直接结合到 Cy3 和 Cy5 的双功能性 NHS- 酯衍生物 (Amserham Biosciences UK Ltd)。简单地说,将 mAb 相对于 0.1M 碳酸盐 / 重碳酸盐缓冲液 (pH9) 进行透析。随后,将染料溶于水中,立即加至 1mg 的 mAb 中,并且于室温黑暗温育 45 分钟。利用在 PBS 中平衡的 PD10- 葡聚糖 G25 柱通过凝胶层析将标记的 mAbs 从未结合的染料上分离。利用分光光度测定结合的摩尔比为 $\text{CY3 } \epsilon_{552} = 150/\text{mM}/\text{cm}$, $\text{Cy5 } \epsilon_{650} = 250/\text{mM}/\text{cm}$, 和蛋白质 $\epsilon_{280} = 170/\text{mM}/\text{cm}$, 变化幅度为 5-8 倍的过量染料 :蛋白质。

[0520] FRET 分析 :将 Daudi 细胞以 5×10^6 细胞 /ml 重悬于 PBS/0.1% BSA 中,将等摩尔的供体 (Cy3)- 结合的 mAb 和受体 (Cy5)- 结合的 mAb 组合并加到细胞悬浮液中 (终浓度 $10 \mu\text{g/ml}$)。将细胞在黑暗中于 4°C 或 37°C 温育 30 分钟。在与 20 倍过量的未结合 mAb 一起温育之后,每一个实验都包括用供体 - 和受体 - 结合的 mAb 标记的细胞,以及用供体 - 和受体 - 结合的 mAb 在等摩尔的 mAb 存在时标记的细胞。为了评估标记过的抗原的解离,利用 FACScalibur (BD Biosciences) 进行流式细胞 FRET 测量。检测于 585nm (FL2) 和 650nm (FL3) 的荧光强度,二者都在 488nm 处激发,以及于 635nm 处激发的 661nm (FL4) 的荧光强度,并用

于根据下面的等式计算 FRET, 其中 A 是受体 (Cy5), D 是供体 (Cy3)。利用下面的公式校正得到的所有值进行自发荧光:

[0521] $FRET = FL3(D, A) - FL2(D, A) / a - FL4(D, A) / b$

[0522] 其中 $a = FL2(D) / FL3(D)$, $b = FL4(A) / FL3(A)$

[0523] 利用从单一标记的细胞中收集的数据得到校正参数, 并且使用侧角光散射来排除碎片和死亡细胞。在双重标记的细胞上的供体和受体 mAb 衍生物之间的 FRET 以对于 488nm 处发射敏感的受体的方式进行表达。较大的 FRET 值表示供体和受体标记的抗体的较近的物理关联, 或接近于供体标记的 mAb 的较高密度的受体标记的 mAb。

[0524] 通过 Triton X-100 (TX) 不溶性评估筏关联的抗体: 为了快速评估抗原在筏微区中的存在, 如前所述使用基于 Triton X-100 (TX) 不溶性的流式细胞分析方法。简单地说, 将 Daudi 细胞在 RPMI/1% BSA 中洗涤并以 2.5×10^6 /ml 进行重悬。随后将所述细胞 (100 μ l) 与 10 μ g/ml 的 FITC 结合的 mAb 一起于 37°C 温育 15 分钟, 在冷 PBS/1% BSA/20mM 叠氮化钠 (PBS-BS) 中洗涤, 将样品分为两半。在整个余下的测试中将所有样品都保持于冰上。一半保持于冰上以允许计算 100% 的表达抗原水平, 同时另一半以 0.5% TX 于冰上处理 15 分钟以测定保留在不溶性筏部分上的抗原的比例。随后在整个余下的测试中将细胞保持于 4°C, 在 PBS-BS 中洗涤一次, 重悬于 PBS-BS 中并通过流式细胞分析进行评估。为了测定靶抗原的筏关联的组成水平, 首先在冰上用 0.5% TX 处理细胞 15 分钟并在 FITC 标记的 mAb 结合之前在 PBS-BS 中洗涤。

[0525] 如图 29A, 29B 和 29 中所示, 荧光共振能量转移 (FRET) 分析显示在与 2F2 或 7D8 一起温育之后 CD20 的集聚。在与 11B8 一起温育之后没有观察到这种集聚。这些结果与 TX 处理数据一致, 见图 29C, (即, 2F2 和 7D8, 不像 11B8, 在结合后与细胞的不溶性部分保持在一起), 并且支持这种概念, 即, 2F2 和 7D8 在结合后将 CD20 转位至 B 细胞膜的脂筏区。

[0526] 如图 30 中所示 (FRET 值和利用单向 ANOVA, 随后通过 Tukey's 多重比较 post-hoc 测试得到的这些实验的 s. e. m.), FRET 值显示利妥希玛和 2F2 的集聚, 而用 11B8T 没有观察到集聚。如图 31 (n=2) 所示, 这些数据与在用 0.5% TX 处理之后所获得的数据一致, 所述处理是在 FITC 标记的 mAbs 结合之前进行的。

[0527] 脂筏片段的制备和蛋白质印迹: 检测 CD20 与脂筏关联的另一种方式, 是利用 Deans, J. P. 等, J. Biol. Chem., 1998. 273(1): 344-348 页所公开的蔗糖梯度分段法研究筏和非筏膜片段之间 CD20 的分布, 不同的是使用 Optiprep (Sigma) 而非蔗糖。让靶向 CD20 (10 μ g/ml) 的单克隆抗体于 37°C 结合 Daudi 细胞 (1×10^7) 20 分钟。在这种温育之后, 将细胞进行沉淀, 以 PBS 洗涤两次并在冰冷的裂解缓冲液 (1.0% TX 于 MES-缓冲盐水 (25mM MES, pH6.5, 150mM NaCl, 1mM 苯甲磺酰氟, 5 μ g/ml 抑肽酶, 5 μ g/ml 白胃素, 10mM EDTA)) 中裂解。将细胞沉淀完全重悬并于冰上温育 20 分钟。随后, 将裂解物与 400 μ l 冷的 60% Optiprep (Sigma) 一起混合。用 600 μ l 的每种裂解缓冲液中的 35%, 30%, 25%, 20%, 0% Optiprep 覆盖样品。将所述梯度于 4°C 40,000rpm 离心 18 小时。从上部收集 6 种馏分, 置于 4-15% 的 SDS-PAGE 凝胶上, 转移至硝化纤维膜上并与一抗 (小鼠抗 CD20 polyclonal; Serotec, UK) 一起温育, 随后用 HRP 结合的二抗 (鼠抗小鼠 HRP; Jackson, Bar Harbor, Maine, USA)。利用 Supersignal West Dura 延时底物 (Pierce, Woburn, MA, USA) 来显像印迹。

[0528] 结果示于图 32 中。如可见到的,CD20 分子被限制于高密度的馏分 5(未处理的细胞)中。用利妥希玛处理的细胞显示 CD20 分布的明显变换,在较低密度的膜馏分 2 和 3 中具有显著的比例,与膜筏预计沉淀的馏分相一致。用 2F2 处理的细胞也显示向馏分 2 和 3 的这种转变。相反,用 11B8T 处理 20 分钟的细胞显示与未处理细胞相似分布,CD 分子在馏分 5 中。总之结合 2F2 和利妥希玛诱导 CD20 分子向较低密度膜馏分的转变,而结合 11B8T 则不然。

[0529] 实施例 9 由抗 CD20 的人抗体导致的 Burkitt 细胞系的凋亡

[0530] 凋亡:将 0.5×10^6 于 1ml 组织培养基中的 Daudi 细胞与 1 或 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 mAb 或对照抗体一起置于 24 孔平底培养板中,并在 37°C 温育。20 小时后,收集细胞,在膜联蛋白-V-FITC 结合缓冲液(BD biosciences)中洗涤并以膜联蛋白 V-FITC(BD biosciences)于黑暗中 4°C 标记 15 分钟。将细胞保持于 4°C 直到分析。向在 FACS 管中的每种样品 ($150 \mu\text{l}$) 加入 $10 \mu\text{l}$ 的 PI 溶液 ($10 \mu\text{g/ml}$ 于 PBS 中)。立即利用 FACScalibur 流式细胞仪以 CellQuest pro 软件(BD Biosciences, Mountain view, CA) 通过流式细胞分析对混合物进行评估。收集至少 10,000 次事件进行分析。

[0531] 在 Daudi 细胞中诱导凋亡:在抗 CD20 人抗体存在时 ($1 \mu\text{g/ml}$) 温育 Daudi 细胞 20 小时(不加入第二交联抗体)。利用流式细胞分析通过膜联蛋白 V/PI 染色对凋亡的诱导进行评估。

[0532] 如图 33A-G 中所示,11B8 显示明显的诱导凋亡的证据(与由抗 IgM 抗体诱导的凋亡相似)。2F2 和 7D8 不诱导 Daudi 细胞的凋亡。将诱导凋亡的小鼠抗 CD20 抗体用作对照。

[0533] 在 Raji 细胞中诱导凋亡:用 CD20mAbs 的浓度范围来测试 Raji 细胞凋亡的诱导。图 34 显示膜联蛋白-V-阳性细胞的百分比。如从图 34 中所能见到的,阳性对照小鼠抗人 CD20mAb, B1, 诱导浓度依赖性的 Raji 细胞凋亡增长,于 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 mAb 上具有约 70% 的最大值。11B8 还是凋亡的一种强诱导剂,导致 Raji 细胞的凋亡,于 $10 \mu\text{g/ml}$ 的 mAb 上具有约 53.4% 的最大值。在另一方面,2F2 和利妥希玛在诱导 Raji 细胞凋亡中作用非常小,与阴性对照水平相比有轻微升高的凋亡水平。

[0534] 在 Daudi 细胞中诱导凋亡:在加入 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 的 mAb 后,当 Daudi 细胞用作靶细胞时出现相同的图像(图 35A 和 35B)。图 35A 中的数据显示全部的膜联蛋白-V 阳性细胞,而图 35B(the X-轴显示膜联蛋白-V, Y-轴显示 PI) 显示早期凋亡(膜联蛋白-V 阳性和 PI 阴性)和晚期凋亡(膜联蛋白-V 阳性 PI 阳性)中 Daudi 细胞的百分比。再一次地,当在 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 的浓度上使用, B1 (65.9%) 和 11B8T (56.3%) 都是凋亡的强诱导剂(图 36)。加入 2F2T 产生低水平的凋亡 Daudi 细胞 (17%)。加入利妥希玛产生 Daudi 细胞大约 29% 的凋亡。加入同种型对照抗体 HuMab-KLH 并不诱导 Daudi 细胞的凋亡 (6%)。

[0535] 实施例 10 用抗 CD20 的人抗体导致的同型粘着

[0536] 同型聚集与凋亡的诱导相关。所以,对抗 CD20mAbs 诱导 B 细胞同型聚集的能力进行研究。

[0537] Ramos-EHRB 细胞的同型聚集:在抗 CD20 抗体 11B8、2F2 或 7D8(无交联)存在时于 37°C 温育 Ramos-EHRB 细胞 (0.5×10^6 于 1ml 组织培养基中) 4 小时并通过光学显微镜评估同型粘着的诱导(如上所述)。

[0538] 如图 36A-E 中所示,11B8 引发广泛的 Ramos-EHRB 的聚集(类似于由鼠抗 CD20 抗

体, AT80 所引发的聚集)。2F2 和 7D8 并不诱导 Ramos 细胞的同型粘着。

[0539] Daudi 细胞的同型聚集: 将 Daudi 细胞与 1 或 10 $\mu\text{g/ml}$ 的抗 CD20mAb 或对照抗体一起置于 24 孔平底培养板中, 并在 37°C 温育 4 小时。通过光学显微镜测定同型聚集的程度。如由图 37 中可见到的, 2F2 以 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (和 10 $\mu\text{g/ml}$, 数据未显示) 几乎不诱导 Daudi 细胞的同型粘着。利妥希玛给出稍许的 Daudi 细胞的同型粘着。相反地, B1 抗体是同型粘着的一种强诱导剂。

[0540] 实施例 11 利用抗 CD20 人抗体的免疫治疗

[0541] 使用以 Daudi 细胞侵染的 SCID 小鼠的高剂量 (100 μg) 2F2 和 7D8 进行的治疗: SCID 小鼠获自 Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UK, 培育和保持在无病原的条件下。将 Daudi 细胞 (2.5×10^6) 静脉注射到 12-16 周大的 SCID 小鼠同龄组的尾静脉中, 随后在 7 天后通过同样的途径注射 100 μg 2F2 或 7D8。在呈现四肢麻痹后, 依据动物伦理委员会的指导将动物处死。如图 38 中所示, 在用 2F2 或 7D8 处理之后小鼠的存活延长。

[0542] 使用以 Tanoue 细胞侵染的 SCID 小鼠的高剂量 (100 μg) 2F2 和利妥希玛进行的治疗: 将 Tanoue 细胞 (2.5×10^6 于 200 μl PBS 中) 静脉注射到 12-16 周大的 SCID 小鼠 (Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UK) 同龄组的尾静脉中, 随后在 7 天后通过同样的途径注射 100 μg (于 200 μl PBS 中) 抗 CD20mAb。在该实验中, 将 2F2 与利妥希玛和 B1 相比较。在呈现后肢麻痹后将动物处死。结果示于图 39 中。在第 39 天, 第一批两只对照小鼠死亡, 在该组内的死亡于第 54 天完成。在该时间段于 2F2 处理之后仅有一只小鼠死亡并且该组中其它小鼠的存活显著提高。在注射肿瘤细胞 81 天之后一只小鼠死亡并且剩下的小鼠 (总数目的 60%) 存活超过了肿瘤侵染后的 100 天实验终止之时。相反

[0543] 利妥希玛仅仅提高了 5 只小鼠中的 2 只的存活 (侵染后的 66 和 83 天) 并且没有小鼠存活到实验结束。在 B1 组中, SCID 小鼠的存活类似于 2F2 组的存活, 两只小鼠在第 48 天死亡, 一只小鼠在第 76 天死亡。在该组中, 40% 在实验结束时存活。

[0544] 以 Daudi 细胞侵染的 SCID 小鼠的 2F2 和利妥希玛治疗的剂量反应: 为了评估 2F2 与利妥希玛相比在抗致癌作用保护中的效力, 在以 Daudi 细胞侵染的 SCID 小鼠的治疗中进行剂量滴定。Daudi 细胞比 Tanoue 细胞表达更多的 CD20 并且对于体外杀伤更加敏感。在 0 天用 2.5×10^6 Daudi 细胞 (于 200 μl PBS 中) 静脉内注射 10 组 SCID 小鼠 (4 只/组) 和 1 个对照组 (5 只 SCID 小鼠), 随后在第 7 天以静脉内给与 20、5、2、0.5 或 0.1 μg (于 200 μl PBS 中) 利妥希玛、2F2 或 PBS (对照) 进行处理。在呈现后肢麻痹后将动物处死。结果示于图 40 中。

[0545] 在对照组中, 所有的小鼠都在 26-29 天的时间段死亡。不过, 用 2F2 观察到明显的剂量-效果关系 (图 40, 上图)。虽然用 0.1 μg 和 0.5 μg 2F2 没有观察到效果, 2 μg 的 2F2 基本上将存活延长到 41 天, 5 μg 的 2F2 将存活延长到 47 天, 而 20 μg 的 2F2 甚至将存活延长到 50 天。

[0546] 相反地, 即使是在 20 μg 的最高剂量测试的利妥希玛也只是轻微地提高存活并且因而在较低的测试浓度观察不到剂量-效果关系 (图 40, 下图)。

[0547] 用 11B8T 和 B1 治疗患 Daudi 肿瘤的 SCID 小鼠: 将于 200 μl PBS 中的 Daudi 细胞 (2.5×10^6) 静脉注射到 12-16 周大的 SCID 小鼠同龄组的尾静脉中, 随后在 7 天后通过同样的途径注射 100 μg 11B8 或 B1。在呈现后肢麻痹后将动物处死。在用 PBS 处理的对照小鼠

中,所有的小鼠都在 35-53 天的时间段中死亡(图 41)。11B8T 处理有力地保护了小鼠,小鼠死于肿瘤侵染后的 72 和 98 天之间。在 B1 处理组中,大多数小鼠存活到第 98 天并且 40% 的小鼠存活超过实验结束时,即 100 天。

[0548] 实施例 12 利用 SCID 小鼠评估 Daudi-luc 异种移植模型中的抗 CD20 抗体

[0549] 在一种小鼠模型中评估抗 CD20 抗体的疗效,在所述小鼠模型中利用外部光学成像跟踪人 B 细胞肿瘤细胞的扩散生长。在该模型中用萤火虫荧光素酶转染肿瘤细胞。在向小鼠施用荧光素 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) 之后,可以通过生物发光成像利用高度敏感 CCD 照相机对标记的细胞进行体内检测,见 Wetterwald 等 (2002) American Journal of Pathology, 160(3):1143-1153。

[0550] 用来自 Gene Therapy Systems (San Diego, CA) 的 WIZ 荧光素酶转染 Daudi 细胞并且在具有 10% FCS、Pen/Strep、丙酮酸和 $1 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素 (Sigma) 的 RPMI 中培养。在发光计中对细胞分析荧光素酶的表达 (在 $\text{RLU}/1 \times 10^5$ 细胞中表达) 并且通过 FACS 分析 CD20 的表达。将 2.5×10^6 荧光素酶转染的 Daudi 细胞 / 小鼠静脉注射到 SCID 小鼠中。接种后的第 8 天,所述小鼠接受 2F2T、11B8T、利妥希玛、B1 或同种型对照抗体 (huIgG1) 的单剂量 ($10 \mu\text{g}$) 处理 (6 只小鼠 / 处理组)。为了进行成像,通过静脉注射氯胺酮 / 赛拉嗪 / 阿托品的混合物以小鼠进行麻醉。以 25mg/ml 的剂量静脉给予合成的 D- 荧光素 (钠盐, Molecular Probes)。随后将小鼠置于一只不透光的盒子中,3 分钟后利用 VersArray1300B 液氮冷却的 CCD 检测仪 (Roper Scientific) 来起始成像。在照明下形成黑色和白色的图像用于参考。利用 GraphPad PRISM3.02 版 (Graphpad Software Inc) 以 Newman-Keuls post 试验使用单向偏差分析来确立各组之间差异的统计学显著性。

[0551] 在一周的间隔期进行来自后侧的成像。在第 8 天,处理日,仅在尾部接种位点检测光光放射。在第 14 天对来自同种型对照组 (huIgG1) 的所有小鼠和来自利妥希玛组的一只小鼠检测远端位点上的肿瘤形成。在接下来的一周光放射稳定地增强。图 42 给出了在第 39 天制得的所有小鼠的图像 (处理后的 31 天),其中生物发光以红色代表 (小鼠中的暗色区域) (光强度 > 50 光子 / 5 分钟) 作为小鼠的黑色和白色躯体图像的覆盖。通过将光信号整合到体表上在第 25、32、39 和 46 天对每只小鼠的肿瘤大小进行量化,见图 43。在同种型对照组中观察到最快的肿瘤生长。用利妥希玛处理给予肿瘤生长的显著抑制。不过,由 2F2T、11B8T 和 B1 进行的肿瘤生长抑制显著地更加有力 (见下面表 2 显著性水平)。

[0552] 表 2

[0553] 各组之间于不同时间点整合的光强度差异的显著性水平

[0554]

	第 25 天	第 32 天	第 39 天	第 46 天
B1 对利妥希玛	$P > 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.01$	$P < 0.001$
B1 对 11B8T	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
B1 对 2F2T	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$
B1 对 huIgG1	$P < 0.001$	$P < 0.001$	$P < 0.001$	

利妥希玛对 11B8T	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001
利妥希玛对 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001
利妥希玛对 huIgG1	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.05	
11B8T 对 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
11B8T 对 huIgG1	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	
2F2T 对 huIgG1	P < 0.001	P < 0.01	P < 0.01	

[0555] 实施例 13 在食蟹猴中的预示和药物动力学研究

[0556] 在每天一次静脉内给药（通过隐静脉）连续 4 天之后，目的是为了测定 2F2 在食蟹猴（大约 2 岁大；体重范围 2.1-2.6kg）中的药物动力学模式和药效。研究还比较了利妥希玛的药效从而测定其等效潜力。为此，将 6 只雄性和 6 只雌性食蟹猴分入 6 个剂量组，所述剂量组分别以 10ml/kg 的恒定剂量体积于 1.25、6.25 和 12.5mg/kg/天的剂量水平接受 2F2 或利妥希玛连续 4 天。完成最后一次剂量给药后，将动物保持于一个 130 天的给药后观察期。在本研究过程中所用的操作和方法与英国卫生部提出的良好实验室操作 OECD 理论相一致。定期对所有的动物观察疾病健康的体征或对治疗的反应并且进行体格检查。在研究过程中进行血液学、凝结、临床化学和尿液分析的实验室研究。在整个给药和给药后观察时期获取血液样品和淋巴节活组织（来自表皮淋巴节）以进行流式细胞分析。通过流式细胞术分析流式细胞表型：CD3，CD4，CD8，CD20 和 CD21。给药后观察期结束后将动物处死并进行详细的尸体剖检。

[0557] 没有负面临床体征或任何认为是与 2F2 或利妥希玛处理相关的发现。图 44 和 45 分别显示经过处理的动物的外周血中表达 CD20 和 CD21 的细胞的流式细胞分析。图 46 显示在淋巴节中表达 CD20 细胞的流式细胞分析。总之，两种在研究过程中分析的表型都显示在于 6.25mg/kg/天（25mg/kg 全部）和 12.5mg/kg/天（50mg/kg 全部）给药 2F2 和利妥希玛后强烈和有效的 B 细胞消除。此外，数据显示在 2F2 处理的动物的淋巴节和外周血中表达 CD20 细胞的 repopulation 大约在 25mg/kg 和 50mg/kg 给药 75 天之后重新开始，即，显著晚于利妥希玛处理的动物。

[0558] 而且，图 47A-C 显示在外周血中表达 CD20^{low}CD23⁺CD40^{high} 的细胞亚群的流式细胞分析 (Y. Vugmeyster 等 (2003) Cytometry 52A :101-109)。

[0559] 将获自 2F2 或利妥希玛处理的猴子的外周血细胞与抗人 CD20FITC 鼠单克隆抗体 (Coulter) 一起于室温温育 10 分钟，所述 2F2 或利妥希玛处理是通过于 1.25mg/kg (图 47A)、6.25mg/kg (图 47B) 和 12.5mg/kg (图 47C) 静脉内给药每天一次连续 4 天进行的。随后，将计数珠与 PBS 和洗涤过两次的细胞 (300g 10 分钟) 一起加入，随后立即在流式细胞仪 (Beckman Coulter) 中对表达 CD20^{low}CD23⁺CD40^{high} 对表达 CD20^{high}CD23⁺CD40^{low} 的细胞亚群进行分析。显示的 CD20^{low}CD23⁺CD40^{high} 细胞的结果表示为细胞 / μ l。如由图 47 可见到的，2F2 与利妥希玛相比能够诱导完全的和较长的表达 CD20^{low}CD23⁺CD40^{high} 的细胞的消除。

[0560] 实施例 14 利用定点诱变绘制抗原表位图谱

[0561] 利用定点诱变法的抗原表位图谱研究显示在第二细胞外环中的位置 170 上的丙氨酸 (A170) 和位置 172 上的脯氨酸 (P172) 对于已知的抗 CD20 抗体识别人 CD20 是关键性的。在 Deans 和同事 (M. J. Polyak 等, Blood, (2002) 99 (9) :pp3256-3262 ;M. J. Polyak 等, J. Immunol., (1998) 161 (7) :pp3242-3248) 的研究中所有测试的抗 CD20mAbs 的结合都被将 A170 和 P172 改变为相应的鼠 CD20 残基 S170 和 S172 所消除。已经认识了一些在 AxP 抗原表位识别中的异质性,但是由于大多数抗体像利妥昔玛识别 S170 和 S172 突变为 A170xP172 序列的鼠 CD20,而一些其它的抗体则需要紧邻 AxP 序列 N 端的其它突变。为了验证 A170xP172 对根据本发明的抗体的结合是否也重要,利用定点诱变将 AxP 序列突变为 SxS(AxP 突变体 = A170S, P172S),用 AxP 突变体和野生型 (WT)CD20DNA 转染细胞,比较抗 CD20mAbs 的结合特性。

[0562] 利用定点诱变制备其它的突变体, P172S(位置 172 上的脯氨酸突变为丝氨酸), N166D(位置 166 上的天冬酰胺突变为天冬氨酸),和 N163D(位置 163 上的天冬酰胺突变为天冬氨酸),以评估突变的氨基酸残基对于本发明的抗体的结合是否重要。

[0563] 为了对此进行检测,通过利用合适的引物扩增 CD 编码序列来构建 CD20 表达载体,所述引物引入限制性位点和一个理想的 Kozak 序列以优选表达。消化扩增的片段并且连接于表达载体 pEE13.4 中。转化到大肠杆菌中后,筛选插入片段的克隆并且选择两个克隆进行测序以确认正确的序列。构建体命名为 pEE13.4CD20HS。

[0564] 进行诱变以引入 AxP 突变并且在人 CD20 的细胞外环中引入 20 个小鼠突变。通过限制酶消化和测序来检查诱变。将构建体瞬时转染于 CHO 细胞(对于 AxP 突变)或 HEK293F 细胞中并且在转染后的 24 或 48 小时利用流式细胞术进行分析。

[0565] 寡核苷酸 PCR 引物:合成寡核苷酸 PCR 引物并通过 Isogen BV(Maarssen, The Netherlands) 进行量化。将引物以 100pmol/u1 的浓度重构于水中并且保存于 -20°C 中直到需要。PCR 和测序引物的总结显示于表 3 中。

[0566] 核酸的光密度测定:根据生产商的说明书利用 Ultrospec 2100 pro Classic(Amersham Biosciences,Uppsala,Sweden) 对光密度进行测定。通过 OD260_{nm} 的分析测量 DNA 浓度,其中一个 OD260_{nm} 单位 = 50 μg/ml。参照溶液与用于溶解核酸的溶液相同。

[0567] 从大肠杆菌培养物中分离质粒 DNA:根据生产商的说明书 (Westburg BV, Leusden, The Netherlands) 使用来自 Qiagen 的试剂盒从大肠杆菌培养物中分离质粒 DNA。使用 HiSpeed plasmid Maxi 试剂盒或 Hi-Speed plasmid Midi 试剂盒 (Qiagen) 进行大量质粒的制备。使用 Qiaprep Spin Miniprep 试剂盒 (Qiagen) 进行小量质粒的制备并且将 DNA 溶于 50ul TE(Tris-HCl 10mM pH8.0, EDTA1mM) 中。

[0568] PCR 扩增:根据生产商对于 Pfu-Turbo Hotstart DNA 多聚酶 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) 的说明书进行 PCR 反应。每个 20ul 的反应都包含 1×PCR 反应缓冲液、2000uM 混合 dNTPs、6.7pmol 每种正向和反向引物、大约 1ng 模板 DNA 和 1 单位的 Pfu-Turbo Hotstart DNA 聚合酶。PCR 反应在 T-gradient Thermocycler96 (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) 上利用 30 个循环的程序进行: +95°C 2 分钟,随后进行 30 个循环的: +95°C 30 秒,退火: 45-65°C 的梯度 30 秒,和延伸: +72°C 2 分钟,接着进行最后的延伸步骤于 72°C 10 分钟随后保存于 4°C。通过琼脂糖凝胶电泳分析完成的反应。

[0569] 琼脂糖凝胶电泳:根据 Sambrook(Molecular Cloning Laboratory Manual, 第三版) 利用 50ml 胶, 于 $1\times$ Tris/ 乙酸 /EDTA(TAE) 缓冲液中进行琼脂糖凝胶电泳。通过在胶中加入溴化乙锭来显像 DNA 并在紫外线灯下进行观察。通过 CCD 照相机和图像分析系统(GeneGnome ;Syngene, Cambridge, UK) 记录凝胶图像。

[0570] 限制酶消化:限制酶由 New England Biolabs(Beverly, MA) 提供并且根据供应商的建议进行使用。通常, 用 5 单位的酶于合适的缓冲液内在 10ul 的总体积中消化 100ng。反应体积根据需要适当地调高。在生产商推荐的温度上进行消化温育最少 60 分钟。

[0571] 对于需要用具有不兼容缓冲液或温度需要的限制酶进行双消化的片段, 按顺序进行消化, 从而依次为每种酶提供良好条件。

[0572] 碱性磷酸酶处理:虾碱性磷酸酶(USB, Cleveland, OH) 根据供应商的建议进行使用。碱性磷酸酶将 5' 磷酸基团从 DNA 片段的末端去除, 由此阻止自身连接。当 DNA 的自身连接能够导致有复制能力的载体时这尤其有关联。该酶在大多数限制酶缓冲液中具有活性并且根据需要适当加入。消化后, 通过将温度提高到 70°C 15 分钟来灭活该酶。

[0573] PCR 的纯化和限制酶反应产物:利用 mini-elute PCR 纯化试剂盒(Qiagen 提供), 根据生产商的说明书进行纯化。简言之, 将 DNA 样品稀释于 5 倍体积的结合缓冲液 I(Qiagen) 中并上样至 Eppendorf 离心管中的 mini-elute 柱上。将该装置在 bench-top 微离心机中进行离心。用缓冲液 II(Qiagen) 洗涤柱两次:使用缓冲液后, 将该装置离心并且弃去流过液。通过在没有加入缓冲液的情况下离心来干燥柱。通过向柱中加入洗脱液来溶解洗脱 DNA 并且通过离心收集洗脱物。通过紫外分光镜检查来量化分离的 DNA 并且通过琼脂糖凝胶电泳来评估质量。

[0574] 从琼脂糖凝胶中分离 DNA 片段:在适当的情况下(即当多种片段存在时), 通过凝胶电泳来分离消化的 DNA 样品并且根据生产商的说明书, 将需要的片段从凝胶中切出和利用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒(Qiagen) 进行回收。简言之, 将 DNA 带从琼脂糖凝胶中切出并于 $+55^{\circ}\text{C}$ 溶于适当的缓冲液中。加入 QIAEX II 树脂并且温育 5 分钟。通过短暂离心步骤沉淀 QIAEX II 树脂(1 分钟, $14000g$, 室温) 并且用 $500\ \mu\text{l}$ 的洗涤缓冲液 PE 洗涤两次。将最终的沉淀物于通风橱中干燥并且以适当体积的 TE 和温度溶解 DNA(根据 DNA 的大小)。

[0575] DNA 片段的连接:用 Quick Ligation Kit(New England Biolabs) 根据生产商的说明书进行连接。对于每个连接, 将载体 DNA 与多出大约 3 倍摩尔量的插入 DNA 相混合, 从而使用 DNA 的总量在 $10\ \mu\text{l}$ 中小于 200ng, 根据需要用水来调节体积。向其中加入 $10\ \mu\text{l}$ $2\times$ Quick Ligation Buffer 和 $1\ \mu\text{l}$ Quick T4 DNA 连接酶并且将连接混合物在室温温育 5-30 分钟。

[0576] DNA 转化至细菌中:利用热激法根据生产商的说明书将 DNA 样品用于转化 One ShotDHSa T1R 感受态大肠杆菌细胞(Invitrogen, Breda, The Netherlands)。简言之, 将 $1-5\ \mu\text{l}$ 的 DNA 溶液(一般 $2\ \mu\text{l}$ 的 DNA 连接混合物) 加至一份转化感受态细菌细胞中并将混合的于冰上温育 30 分钟。随后通过转移至 42°C 的水浴中 30 秒, 接着在冰上进一步温育 5 分钟来热激所述细胞。通过非选择性培养基(SOC) 中于 37°C 振荡温育 1 小时来复原细胞并且接下来将其铺到含有合适选择剂($50\ \mu\text{g/ml}$ 的氨苄青霉素) 的琼脂糖平板上。于 $+37^{\circ}\text{C}$ 温育平板 16-18 小时或直到细菌菌落变得明显。

[0577] 通过 PCR 筛选细菌菌落:利用 PCR 菌落筛选技术对细菌菌落筛选含有所需序列

的载体的存在。将含有 0.5 倍体积的 HotStarTaqMaster Mix (Qiagen)、4pmol 的正向和反向引物和用水补满的 20 μ l 的 PCR 反应混合物加到 PCR 管中。用一个 20 μ l 的吸移管头轻轻接触一个菌落,在培养管内的 2ml LB 中接触一次(用作生长含有相应质粒的细菌)并且在 0 μ l 的 PCR 混合物中重悬。PCR 反应在 T-gradient Thermocycler96 (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) 上利用 35 个循环的程序进行: +95 $^{\circ}$ C 15 分钟,随后进行 35 个循环的: +94 $^{\circ}$ C 30 秒,退火: 55 $^{\circ}$ C 30 秒,和延伸: +72 $^{\circ}$ C 2 分钟,接着进行最后的延伸步骤于 72 $^{\circ}$ C 10 分钟随后保存于 4 $^{\circ}$ C。通过琼脂糖凝胶电泳分析完成的反应。用于菌落 PCR 的引物对的细胞参见表 3。

[0578] 表 3

[0579]

名称	用途	长度	寡序列
CD20PI72S	CD20 诱变	36	TGGGGAGTTTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTTCACAGTTGTA
CD20N166D	CD20 诱变	39	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
CD20N163D	CD20 诱变	36	AATCATGGACATACTTAATATTA
cd20exfor	CD20 构建	41	TATAGCCCGGGCCGCCACCATGACAACACCCAGAAATTC
cd20exrev	CD20 构建	38	GCGTCTCATGTACATTAAGGAGAGCTGTCAATTTCTAT
pee13.4seqrev2	菌落 PCR	23	TCGGACATCTCATGACTTTCTTT
pConKseq1	菌落 PCR	23	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
cd20hsapmutr (AxP)	CD20 诱变	42	TGGGGAGTTTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTTCACAGTTGTA
cd20hsapmutf (AxP)	CD20 诱变	42	TACAACGTGAACCATCGAATTCCTCTGAGAAAACTCCCCA
CD20seq2	CD20 测序	23	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
cd20seq1	CD20 测序	23	AATCATGGACATACTTAATATTA

[0580] 诱变: 利用 QuikChange XL 定点诱变试剂盒 (Cat 200517-5, Lot1120630, Stratagene Europe) 根据生产商的说明书进行诱变。

[0581] 利用乙醇沉淀浓缩诱变反应物并且将其转化至 oneshot DH5 α -T1R 感受态大肠杆菌细胞或电穿孔至 **ElectroTen-Blue[®]** 电穿孔感受态细胞中。通过在转染之前进行菌落 PCR 和限制性消化来检查菌落。

[0582] HEK293F 细胞转染: HEK293F 细胞由 Invitrogen 获得并且根据生产商的说明书, 利用 293fectin 进行转染。将 HEK293F 细胞用作所有的单一突变体序列。

[0583] CHO 细胞转染: 当利用 lipofectamine2000 (M668-019, Invitrogen, Breda, Netherlands) 以 CD20 野生型、突变体 cDNA 或两种构建体的组合进行瞬时转染时 CHO 细胞总共生长至约 95%。结束后, 将 24 μ g 的沉淀 DNA 稀释 (1 μ g/ μ l) 于 500 μ l 的 opti-mem 中, 比例为 AxP 100% : WT0% ; AxP33.3% : WT66.6% ; AxP66.6% : WT33.3% ; AxP0% : WT100%。对于每一次转染都将 24 μ l 的 lipofectamine 稀释于 500 μ l opti-mem 中。随后, 将稀释的 lipofectamine 进行温育 (室温, 5 分钟), 并且稀释的 DNA 与稀释的 lipofectamine 组合。轻轻混合并温育所述溶液 (室温, 2 分钟) 后, 向 CHO 细胞加入 1000 μ l DNA/lipofectamine, 完全混合并于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 温育 48 小时。CHO 细胞转染后的两天, 以 FACS 缓冲液洗涤细胞两次 (添加了 0.1% BSA 和 0.002% NaN₃ 的 PBS)。CHO 细胞用 trypsin/EDTA (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) 处理并且移出培养板。

[0584] 抗 CD20 抗体结合 :取 PBS 中的浓度为 2×10^6 /ml 的 HEK293F 细胞和 CHO 细胞,加至圆底培养板中 (1×10^5 /孔)。随后,以 10、5、2.5 或 $0 \mu\text{g}$ 每孔的一系列稀释液加入 $50 \mu\text{l}$ CD20mAb (4°C , 30 分钟)。在 FACS 缓冲液中洗涤之后 (添加了 0.1% BSA 和 0.002% NaN_3 的 PBS),在流式细胞仪上分析所述细胞 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA),在高流速上取得 5,000 次事件 / 样品。

[0585] 如由图 48A-E 可见到的,所有的抗 CD20mAbs 有效地结合表达 WT CD20 的 CHO 细胞。如所预期的,利妥希玛不结合 AxP 突变体 (图 48A), B1 很少地结合这种突变体 (图 48D)。相反,2F2 和 11B8 等同地很好地结合 WT 和 AxP 突变体 CD20 (图 48B 和图 48C)。

[0586] 在表面上滴定 WT CD20 的量确实促进了利妥希玛和 B1 的量。2F2 和 11B8 再一次对突变的缺失或存在是不敏感的。

[0587] 本研究显示 2F2 和 11B8 结合 CD20 对于氨基酸位置 170 和 172 上的突变是不敏感的。所以 2F2 和 11B8 代表一种识别新型 CD20 抗原表位的 CD20mAbs 的新类别。

[0588] 图 49A 显示 2F2、11B8T、B1 或利妥希玛与突变体 P172S 对 WT CD20 的百分比结合,图 49B 显示 2F2T、11B8T、B1、CAT (CAT13.6E12, 小鼠单克隆 IgG2A 抗 CD20 抗体, Diatec. Com)、对照同种型抗体 (KLH) 或利妥希玛与突变体 CD20 (AxP) 对 WT CD20 的百分比结合。

[0589] 对于在位置 166 上的天冬酰胺已被天冬氨酸取代的突变体 (CD20N166D) 2F2 显示非常低的结合,而 B1、利妥希玛和 11B8T 则能够结合,见图 49C。在一个类似的实验中, CAT13.6E12 和利妥希玛能够结合 CD20N166D,而 2F2T 仅仅显示非常低的结合,见图 49D。对于在位置 163 上的天冬酰胺已被天冬氨酸取代的突变体 (CD20N163D),利妥希玛、11B8T 和 B1 仍然能够结合 CD20N163D,而 2F2 和 2F2T 仅仅显示非常低的结合,见图 49E。在一个类似的实验中, CAT13.6E12 和利妥希玛能够结合 CD20N163D,而 2F2T 仅仅显示非常低的结合,见图 49F。

[0590] 这些实验显示 2F2 和 11B8 结合不同的抗原表位。

[0591] 实施例 15 利用 Pepscan 法进行抗原表位图谱绘制

[0592] 肽的合成 :根据标准方法合成 7-、9- 和 15- 姆的肽。在某些情况下 15- 姆肽末端的化学连接有助于识别有可能不连续的抗原表位的氨基酸序列。根据已知的方法 (H. M. Geysen 等 (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :3998 ;J. W. Slootstra 等 (1996) Mol. Divers. 1 : 87 ;和 W001/60769),合成 7-、9- 和 15- 姆的肽,所述肽可以是有关 2F2 或 11B8T 结合人 CD20 分子的可能的结合位点或抗原表位。将 - 和 15- 姆的肽合成为环并且利用信用卡格式的 mini-PEPSCAN 卡 (455 肽格式 / 卡) 进行筛选。在所有环状肽中将不同位置上的氨基酸用半胱氨酸代替 (例如,乙酰基 -xCXXXXXXXXXXCX-minicard)。利用标准的 Fmoc- 化学法合成所述肽并且利用 TFA 以消除剂进行去保护。随后,将去保护的肽在微阵列上与 0.5mM 的碳酸氢铵 (20mM , pH7.9) 中的 1,3- 二 (溴甲基) 苯溶液反应,所述溶液添加了乙腈 (1 : 1 (v/v))。当被所述溶液完全覆盖时,将微阵列在溶液中轻轻摇动 30-60 分钟。最后,用过量的 Millipore H_2O 充分洗涤微阵列并且在含有 1% SDS、0.1% β - 巯基乙醇,于 PBS 中 (pH7.2) 的裂解缓冲液中于 70°C 声波破碎 30 分钟,随后再于 Millipore H_2O 中声波破碎 45 分钟。接下来,微孔已经可以在 ELISA 测试中进行筛选了。

[0593] Pepscan ELISA 测试 :将含有共价连接肽的 455 孔信用卡格式的聚乙烯卡与血清 (在含有 5% 马血清 (v / v) 和 5% 卵清蛋白 (w / v) 的封闭液中稀释 1 :1000) 一起温育

(4°C, 过液)。洗涤后,将所述肽与抗人抗体过氧化物酶一起温育(稀释 1:1000, 1 小时, 25°C),洗涤后加入过氧化物酶底物 2,2'-连氨基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐和 2 μl / ml 3% H₂O₂。一小时后,测量显示的颜色。用 CCD 相机和图像处理系统来量化 ELISA 的颜色显示。所述装置由 CCD 相机和一个 55mm 镜头(Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikk 或 55mm f/2.8 镜头)、摄像机接合器(Sony Camera adaptor DC-77RR)和图像处理软件包 Optimas, 6.5 版(Media Cybernetics, Silver Spring, MD20910, U. S. A.) 所组成。Optimas 在奔腾 II 计算机系统上运行。

[0594] 不同抗体浓度上肽的吸光度(OD 值)显示于下面的表 4 和表 5 中。

[0595]

表 4

	11B8 10 µg/ml	11B8 100 µg/ml	7D8 10 µg/ml	7D8 100 µg/ml	利妥希玛 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml	2F2 100 µg/ml	B1 10 µg/ml	B1 100 µg/ml
KMECLNFIRAHCPYI	763	2997	134	41	90	48	66	147	304
LKMECLNFIRCHTPY	165	738	160	41	120	49	87	179	216
KMESCNFIRACTPYI	625	3090	142	52	123	39	78	170	308
MESLCFIRAHCPYIN	179	956	127	55	102	41	65	119	178
CFIRAHTPC	188	534	181	69	134	91	114	170	212
CIRAHTPYC	151	449	186	60	132	57	92	151	195
CRAHTPYIC	427	1605	188	64	145	48	87	179	216
CAHTPYINC	179	452	174	65	125	42	106	161	172
IPAGIYA	217	950	164	76	177	48	85	165	192
PAGIYAP	449	2501	170	64	111	43	85	165	300
AGIYAPI	251	2207	188	73	110	44	98	187	143
GIYAPIC	99	251	152	64	141	34	93	177	147
IYAPICV	137	313	174	58	159	58	99	175	90
GIYAPIA	172	857	177	96	156	62	96	165	121
IYAPIAV	161	654	181	58	116	62	76	161	106

[0596] 表 5

[0597]

	11B8 10 µg/ml	7D8 10 µg/ml	利妥希玛 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml
PCINIYNAEPANPCE	118	163	152	65
YCNIYNAEPANPSCK	287	181	2418	86
ICIYNAEPANPSECN	138	192	142	78
NCYNAEPANPSEKCS	93	121	2649	49
ICNAEPANPSEKNCP	115	165	3283	43
YCAEPANPSEKNSCS	106	188	3770	65
NCEPANPSEKNSPCT	159	183	3476	61
ACPANPSEKNSPSCQ	146	148	250	77
ECANPSEKNSPSTCY	134	179	188	68

[0598] 由表 4 可见,11B8 显示于 10 µg / ml 和 100 µg / ml 结合到人 CD20 的的小的第一胞外环的 AGIYAP 上,而其它测试的抗体则没有显示明显的结合 AGIYAP。

[0599] 而且,11B8 显示于 10 µg / ml 和 100 µg / ml 结合到人 CD20 的第二胞外环的 MESLNFIRAHTPYI 上,而其它测试的抗体则没有显示明显的结合 MESLNFIRAHTPYI。

[0600] 由表 5 可见,利妥希玛显示于 1 µg / ml 和 10 µg / ml 结合到人 CD20 的第二胞外环的 EPANPSEK 上,而其它测试的抗体则没有显示明显的结合 EPANPSEK。

[0601] 实施例 16 抗独特型抗体

[0602] 抗独特型抗体的制备:通过用 2F2 或 11B8T 免疫 Ba1b / C 小鼠,并且利用标准技术以 NS1 骨髓瘤细胞融合产生来自这些小鼠脾的杂交瘤来制成小鼠抗独特型抗体。产生了下列抗独特型抗体:抗 2F2sab1. 1、抗 2F2sab1. 2、抗 2F2sab1. 3、抗 11B8T sab2. 2、抗 11B8T sab2. 3、抗 11B8T sab2. 4、抗 11B8T sab2. 5 和抗 11B8T sab2. 6。对这些抗体测试对 2F2T、7D8 和 11B8T 的特异性结合。用 2F2T、7D8 或 11B8T 涂布 ELISA 板(溶于 PBS,终浓度为 1-2 µg / ml,37°C,2 小时)。将所述板用含有 0.05% Tween-20 和 2% 鸡血清的 PBS 进行封闭(室温,1 小时)。随后,将所述板与来自抗独特型抗体培养物的上清液一起温育(终浓度调节为 1-10 µg / ml,室温,2 小时)。用兔抗小鼠 IgG-HRP(JacksonImmunoResearch)来检测结合的小鼠抗独特型抗体。

[0603] 如图 50 中所示,抗 2F2sab1. 1、抗 2F2sab1. 2 和抗 2F2sab1. 3 结合 2F2T 和 7D8,但不结合 11B8T 或一种不相关的同种型对照抗体。由于 2F2T 和 7D8 在 V_L 和 V_H 序列中非常同源,预期抗 2F2 独特型抗体与 7D8 反应。

[0604] 图 51 显示抗 11B8T sab2. 2、抗 11B8T sab2. 3、抗 11B8T sab2. 4、抗 11B8T sab2. 5 和抗 11B8T sab2. 6 都以相似的程度结合 11B8T。

[0605] 抗独特型抗体作为免疫诊断工具:2F2 / 7D8 和 11B8T 特异性抗独特型抗体可以用作免疫诊断工具以检测和量化在实验室或患者样品中抗 CD 人单克隆抗体的水平。这可能对于检测抗 CD20 抗体的药物动力学或者对于检测和调节抗 CD20 抗体的剂量或者对于监测疾病和患者治疗的效果是有用的。作为这种测试的一个例子,用 4 µg / ml 抗 2F2sab1. 1、抗 2F2sab1. 2 或抗 2F2sab1. 3 涂布 ELISA 板。将所述板用含有 0.05% Tween-20 和 2% 鸡血清的 PBS 进行封闭(室温,1 小时)。随后,将所述板与系列稀释的 2F2T 一起温育(10,000-9.77ng / ml,室温,2 小时)。小鼠抗人 IgG-HRP 结合的抗体来检测结合的 2F2T。图 52A-C 中也显示了观察到的 2F2T 的剂量依赖结合。

[0606] 等同发明

[0607] 本领域技术人员会认识到并能够确认,使用常规的实验,可以获得许多本文所述发明的具体实施方案的等同发明。这些等同发明为下面的权利要求书所包括。从属权利要求中所公开的实施方案的任何组合也都在本发明的范围之内。

[0608] 并入参考文献

[0609] 特此将本文所引用的全部专利、待决专利申请和其它公开物的全部内容并入作为参考。

序列表

<110> Genmab, Inc. et al.

<120> 抗 CD20 的人单克隆抗体

<130> GMI-055PC

<150> US 60/419,163

<151> 2002-10-17

<150> US 60/460,028

<151> 2002-04-02

<160> 57

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 424

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatth taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttaatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
gggaagggcc tggagtgggt ctcaactatt agttggaata gtggttccat aggctatgcg 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaagtc cctgtatctg 300
caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgatt actgtgcaa agatatacag 360
tacggcaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
tcag 424

```

<210> 2

<211> 141

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Asn Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys

85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met

115 120 125

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

<210> 3

<211> 382

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

atggaagccc cagctcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240

aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300

gaagatattg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggccgatcac cttcggccaa 360

gggacacgac tggagattaa ac 382

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110
 Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 5

<211> 424

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatatt taaaagggtg ccagtggtgaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg acaggctcct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ctttcatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
 gggaagggcc tggagtgggt ctcaactatt agttggaata gtggtaccat aggctatgcg 240
 gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaaa agatatacag 360
 tacggcaact actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
 tcag 424

<210> 6

<211> 141

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

	25		30	
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser				
	35		40	45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro				
	50		55	60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala				
65	70		75	80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser				
	85		90	95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser				
	100		105	110
Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys				
	115		120	125

<210> 9

<211> 433

<212> DNA

<213> 人

<400> 9

```

atggagttgg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtccct gagactctcc 120
tgtacaggct ctggattcac cttcagttac catgctatgc attgggttcg ccaggctcca 180
ggaaaaggtc tggaatgggt atcaattatt gggactgggt gtgtcacata ctatgcagac 240
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgtca agaactcctt gtatcttcaa 300
atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagaga ttactatggt 360
gcggggagtt tttatgacgg cctctacggt atggacgtct gggccaagg gaccacggtc 420
accgtctcct cag 433

```

<210> 10

<211> 144

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His		
20	25	30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Ser Tyr His Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ser Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp		
65	70	75
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Ser		
85	90	95
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr		
100	105	110
Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu		
115	120	125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
130	135	140

<210> 11

<211> 382

<212> DNA

<213> 人

<400> 11

```

atggaagccc cagcacagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagatthtg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcgact ggccgctcac tttcggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa ac 382

```

<210> 12

<211> 127

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser		
25	30	
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser		

35	40	45																			
Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro						
50	55	60																			
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala						
65	70	75	80																		
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser						
85	90	95																			
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser						
100	105	110																			
Asp	Trp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
115	120	125																			

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Asp Tyr Ala Met His

1

5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 19

Asp Tyr Ala Met His

1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr

1

5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 25

Tyr His Ala Met His

1

5

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

Ile Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 27

Asp Tyr Tyr Gly Ala Gly Ser Phe Tyr Asp Gly Leu Tyr Gly Met Asp

1	5	10	15
---	---	----	----

Val

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1	5	10
---	---	----

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 29

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1	5
---	---

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

Gln Gln Arg Ser Asp Trp Pro Leu Thr

1

5

<210> 31

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 31

gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc

32

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 32

gctgtgcccc cagaggtgct cttggagg

28

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 33

caggtkcagc tgggtgcagtc	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 34	
saggtgcagc tgktggagtc	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 35	
gaggtgcagc tgggtgcagtc	20
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 36	
atggactgga cctggagcat c	21
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 引物

<400> 37

atggaattgg ggctgagctg

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 38

atggagtttg grctgagctg

20

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 39

atgaaacacc tgtggttctt c

21

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 40

atggggtcaa ccgccatcct

20

<210> 41	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 41	
tgccaggggg aagaccgatg g	21
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 42	
racatccaga tgayccagtc	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 43	
gycatcyrga tgaccagtc	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 引物

<400> 44

gatattgtga tgacccagac

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 45

gaaattgtgt tgacrcagtc

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 46

gaaatwgtra tgacacagtc

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 47	
gatgttgtga tgacacagtc	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 48	
gaaattgtgc tgactcagtc	20
<210> 49	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 49	
cccgtcagc tcctggggct cctg	24
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 50	
ccctgctcag ctctggggc tgc	23
<210> 51	
<211> 26	
<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 51

cccagcgcag cttctcttcc tectgc

26

<210> 52

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 52

atggaacat ggaagcccca gcacagc

27

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 53

cgggaagatg aagacagatg

20

<210> 54

<211> 116

<212> PRT

<213> 人

<400> 54

Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser
			20					25						30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser
			35					40						45	
Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
			50				55							60	
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala
65					70					75					80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
					85					90					95
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser
					100					105					110
Asn	Trp	Pro	Ile	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys	
					115					120					125

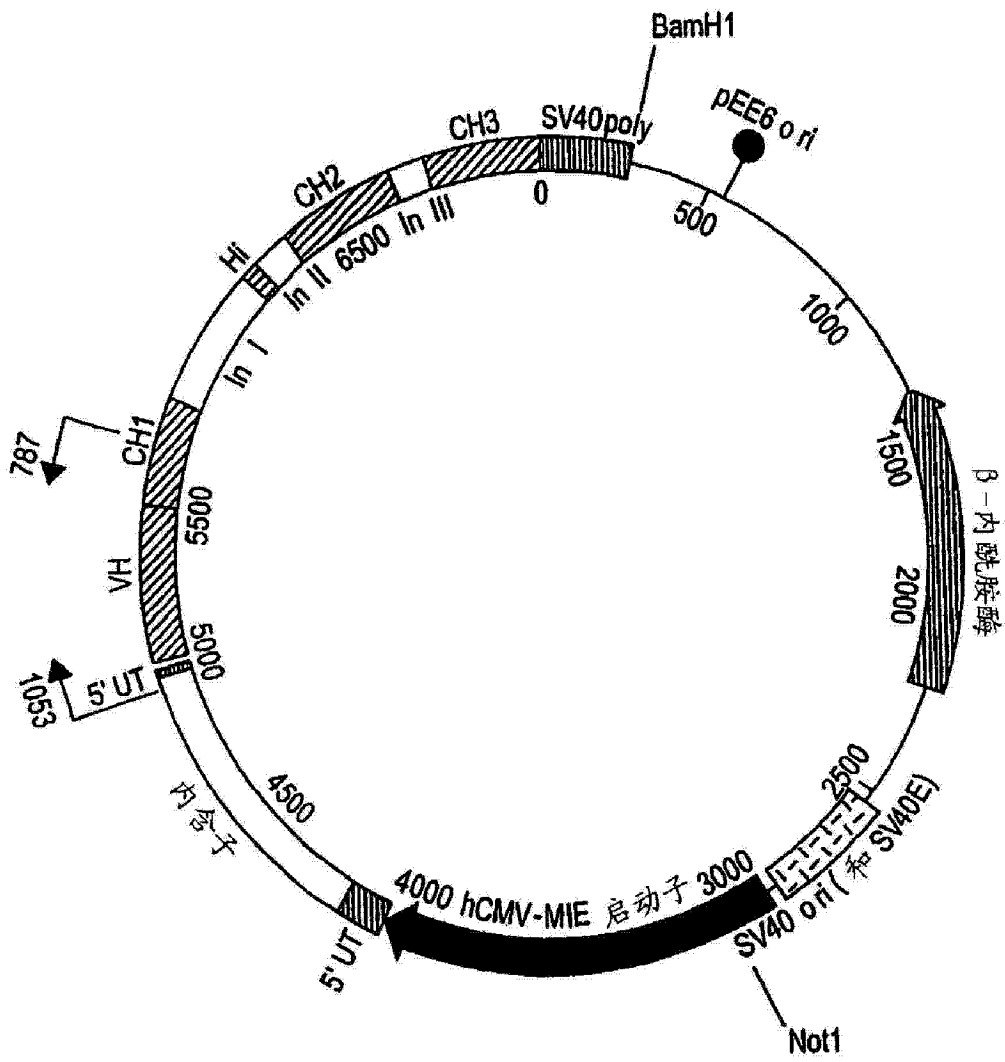


图 1

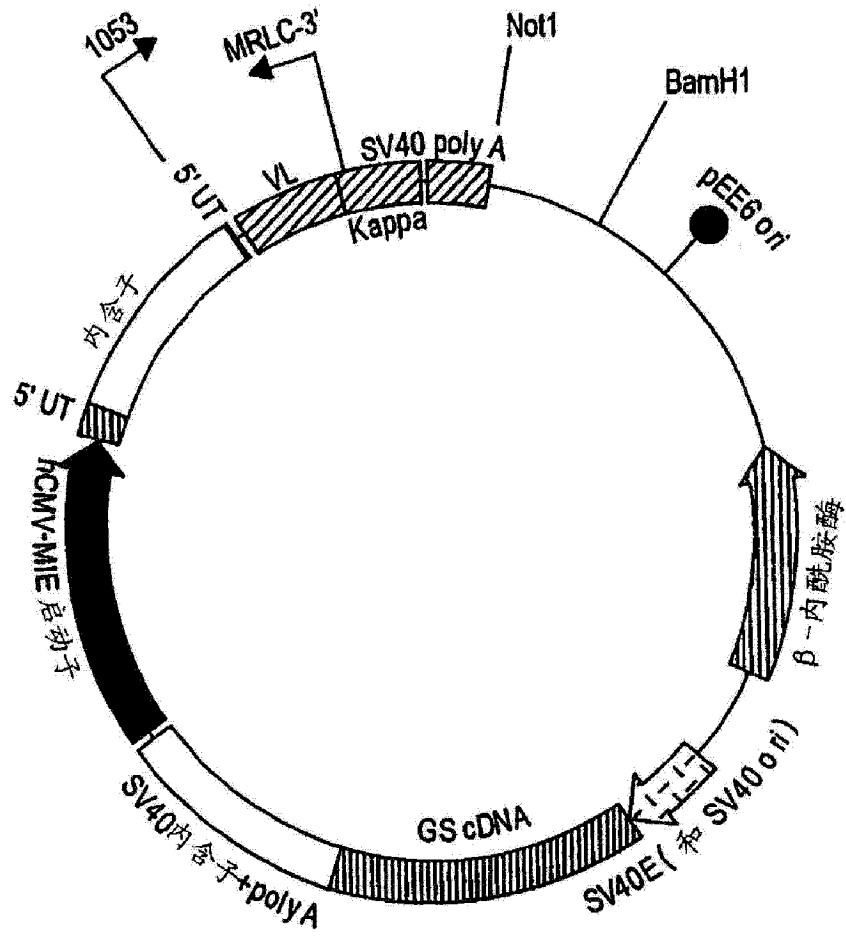


图 2

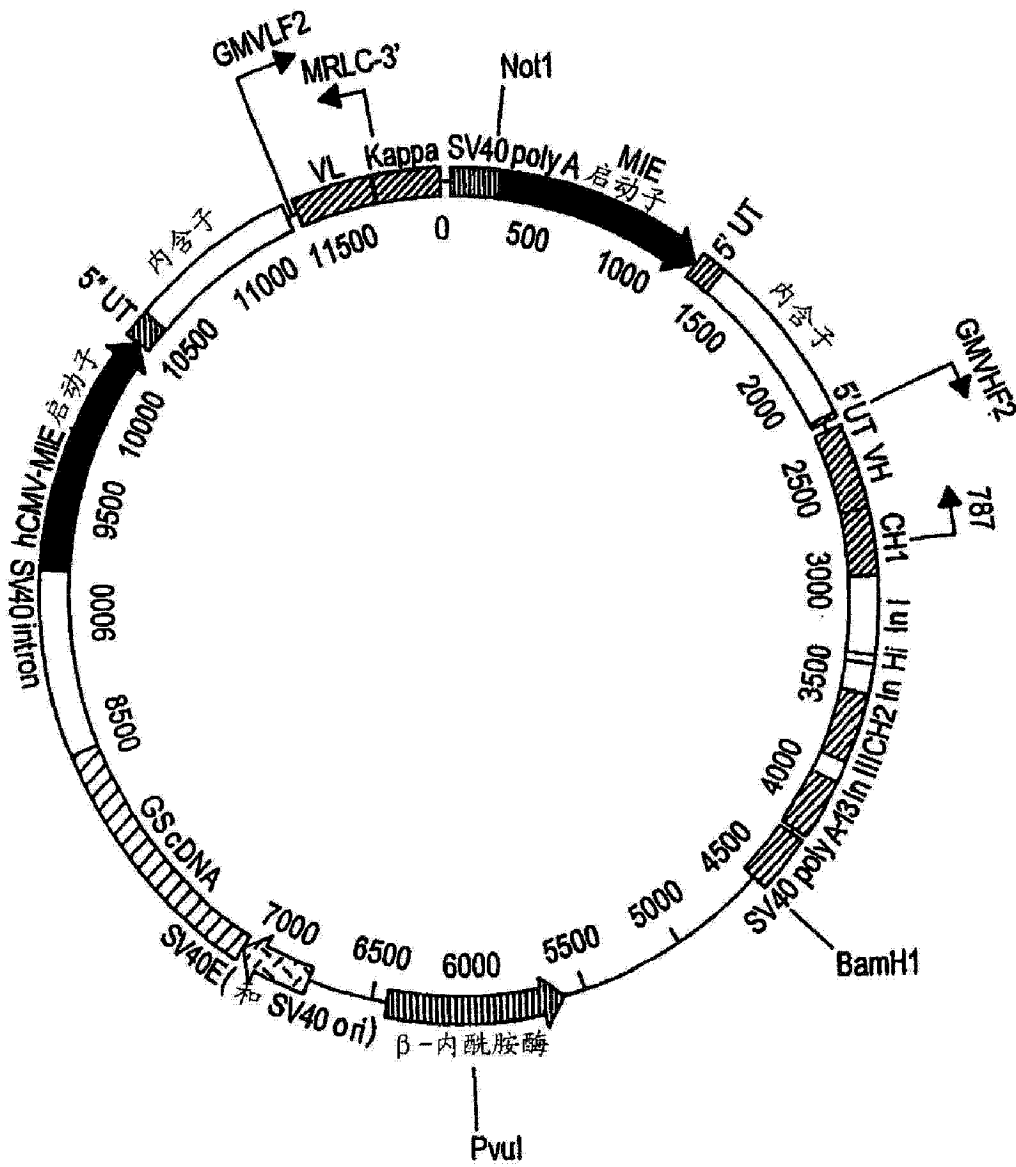


图 3

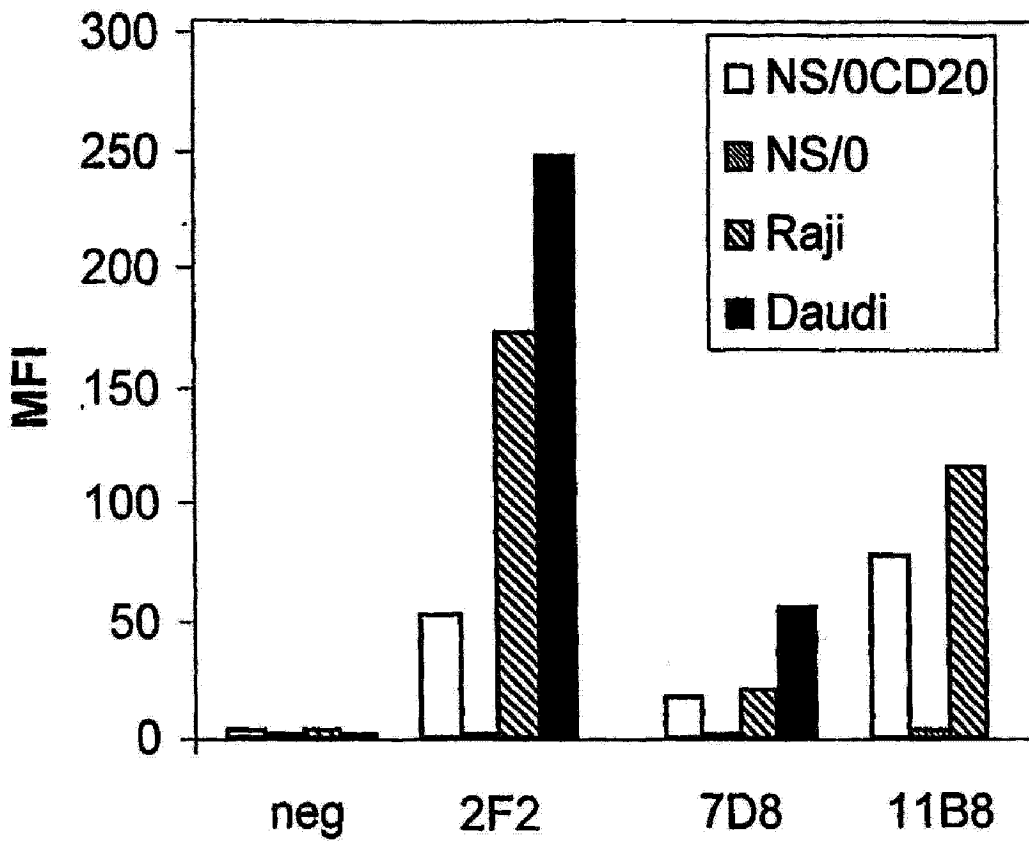


图 4

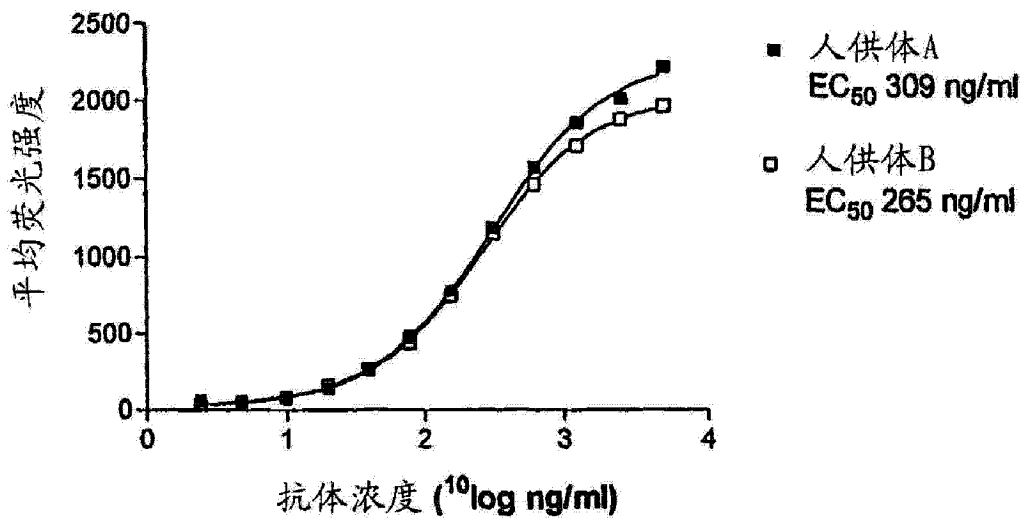


图 5A

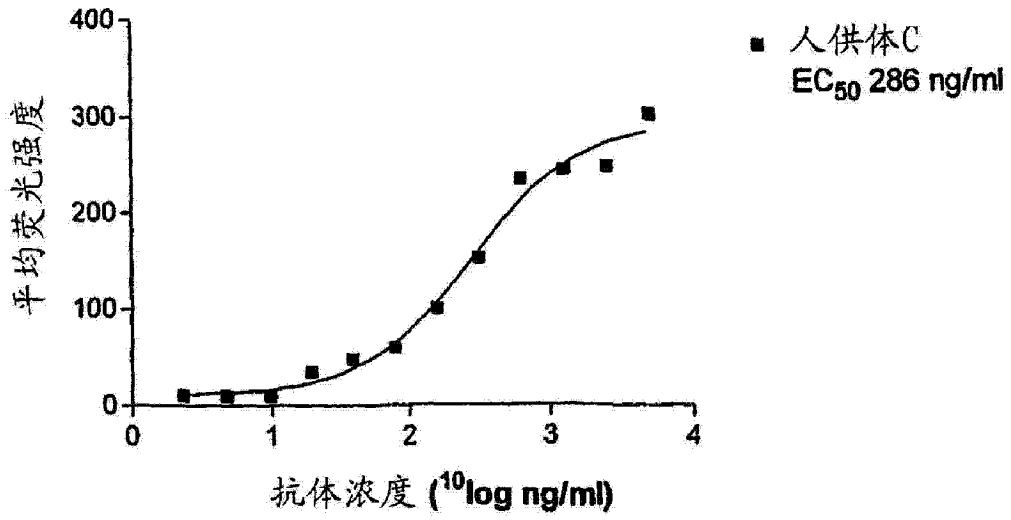


图 5B

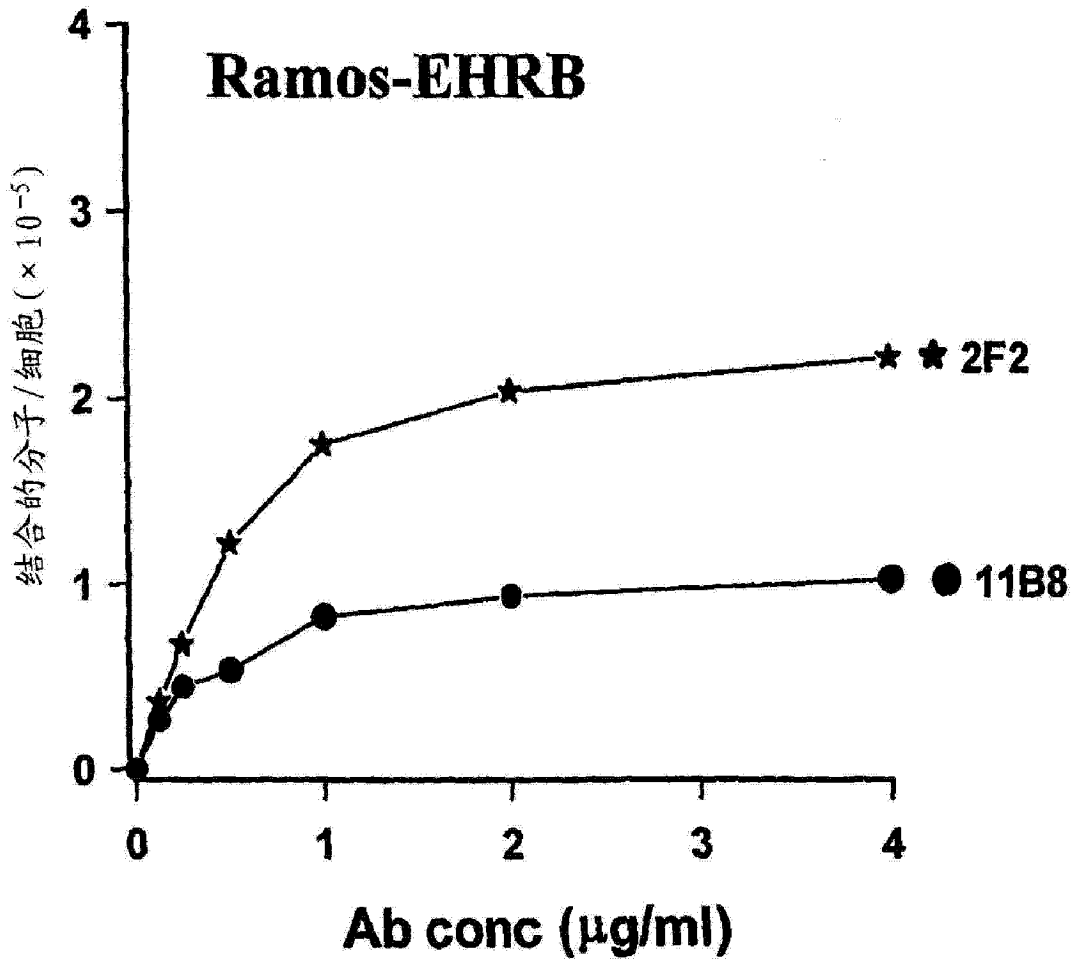


图 6

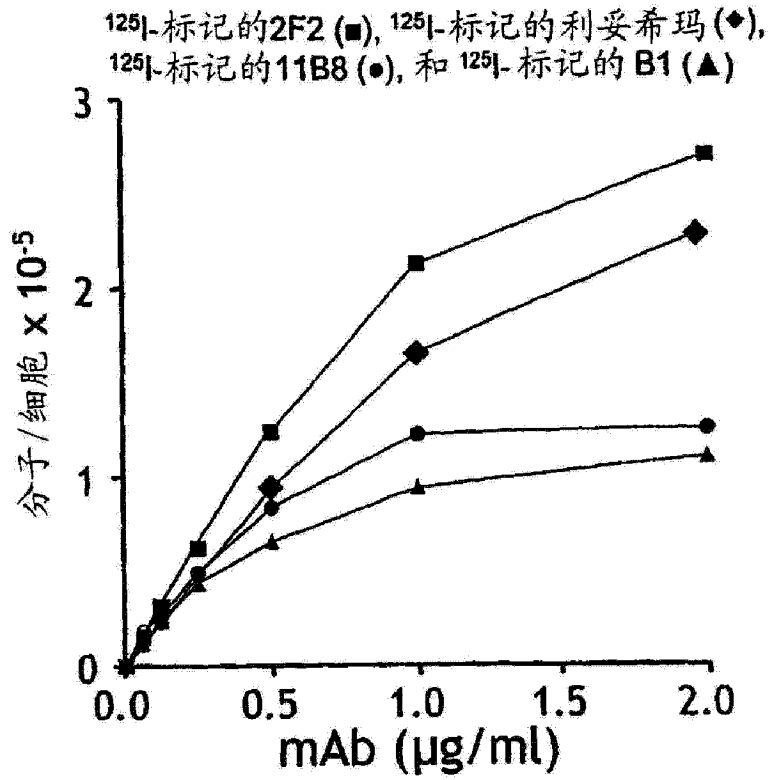


图 7A

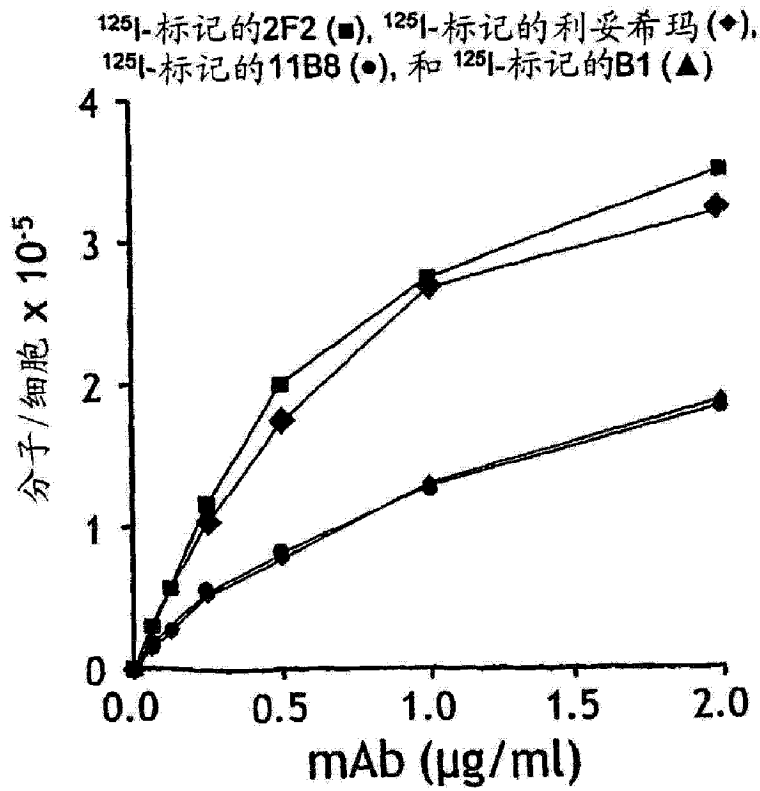


图 7B

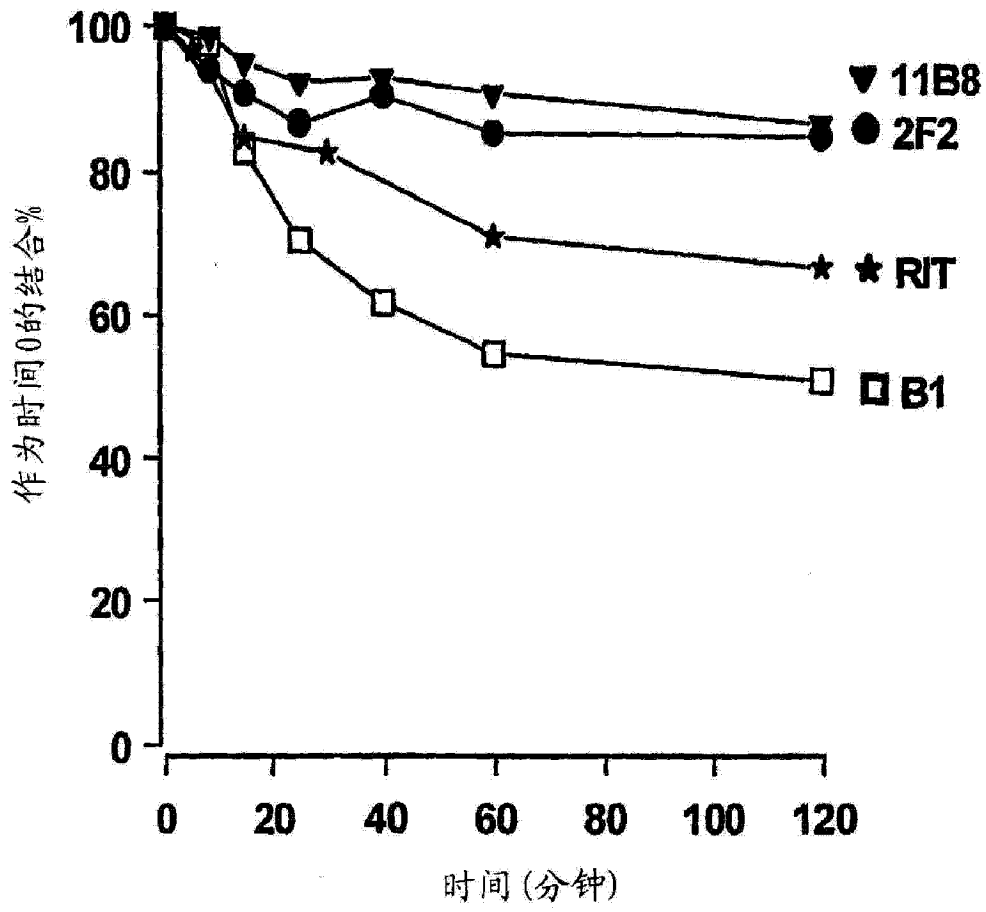


图 8

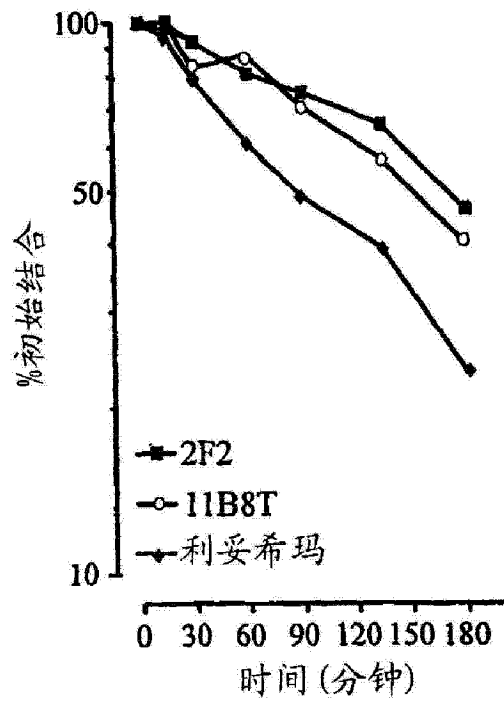


图 9

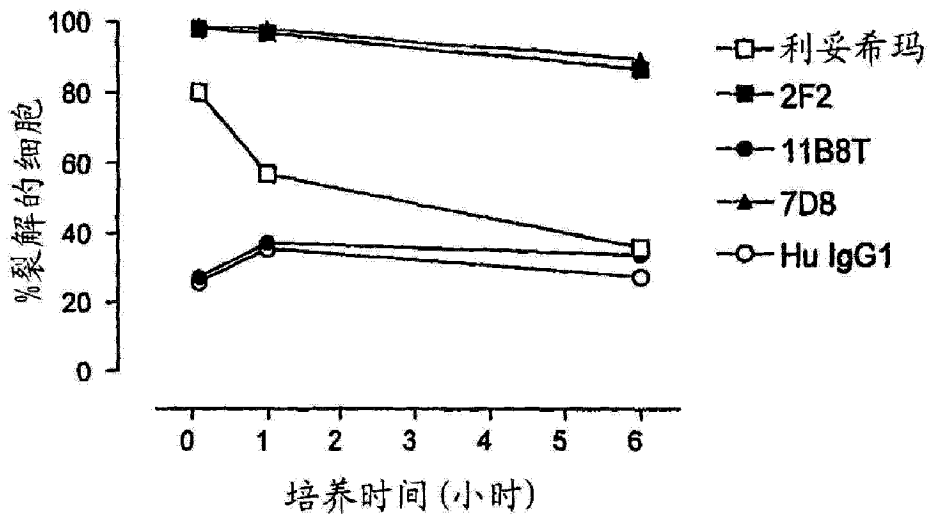


图 10A

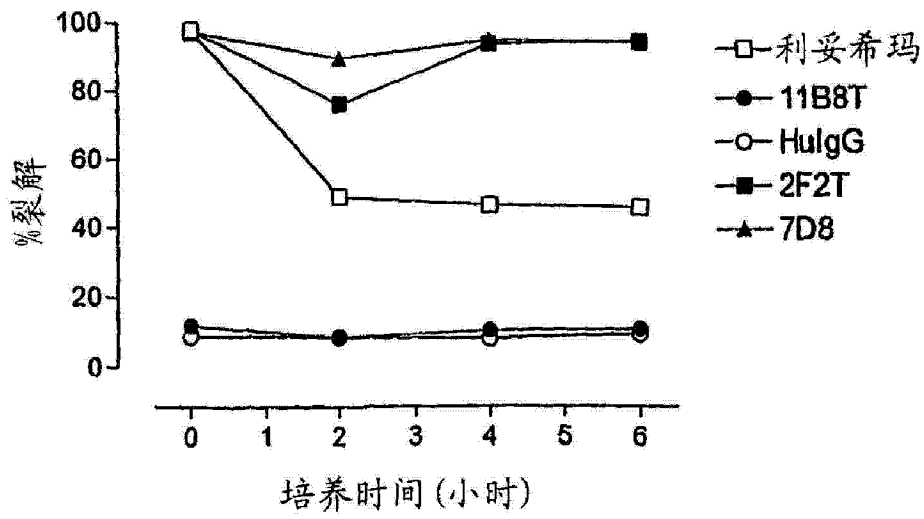


图 10B

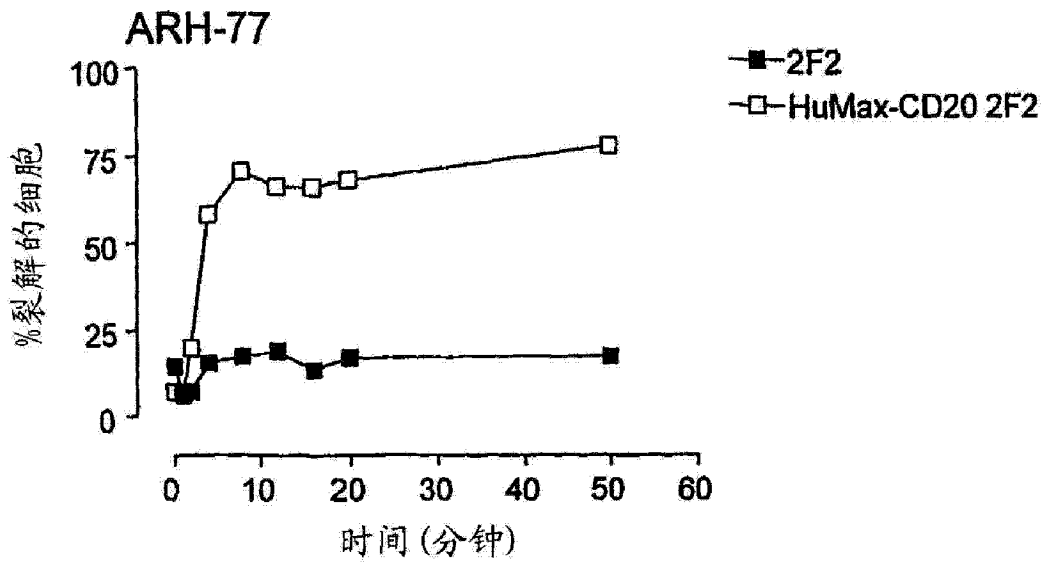


图 11A

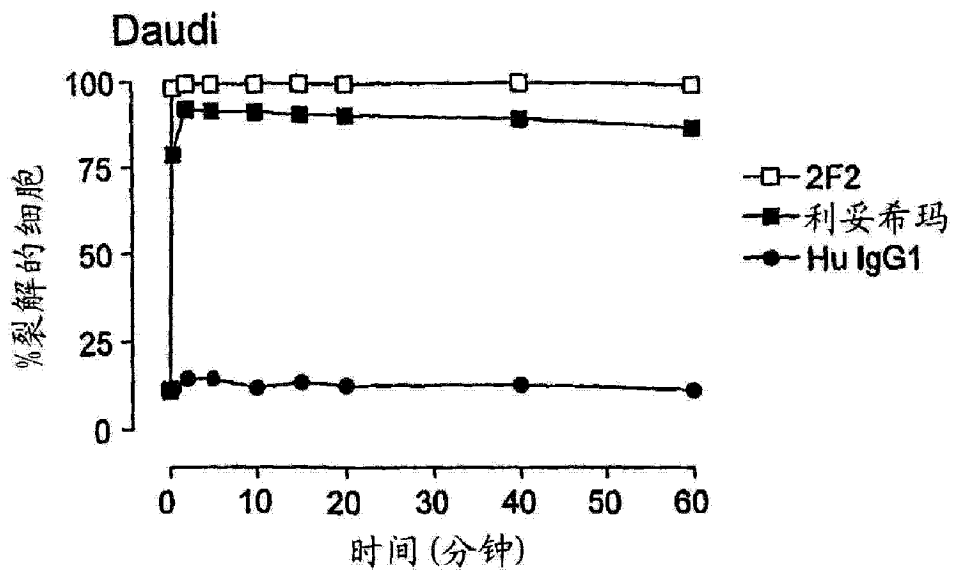


图 11B

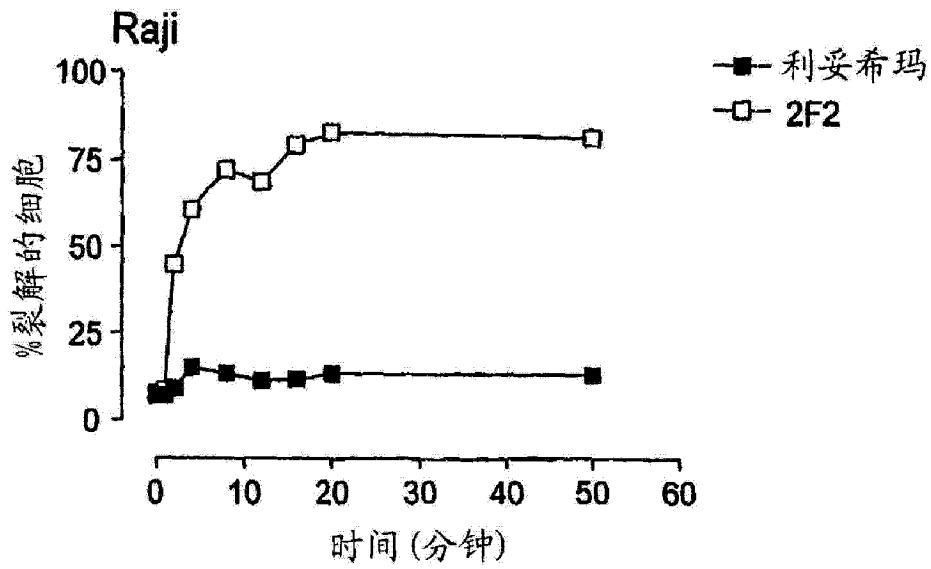


图 11C

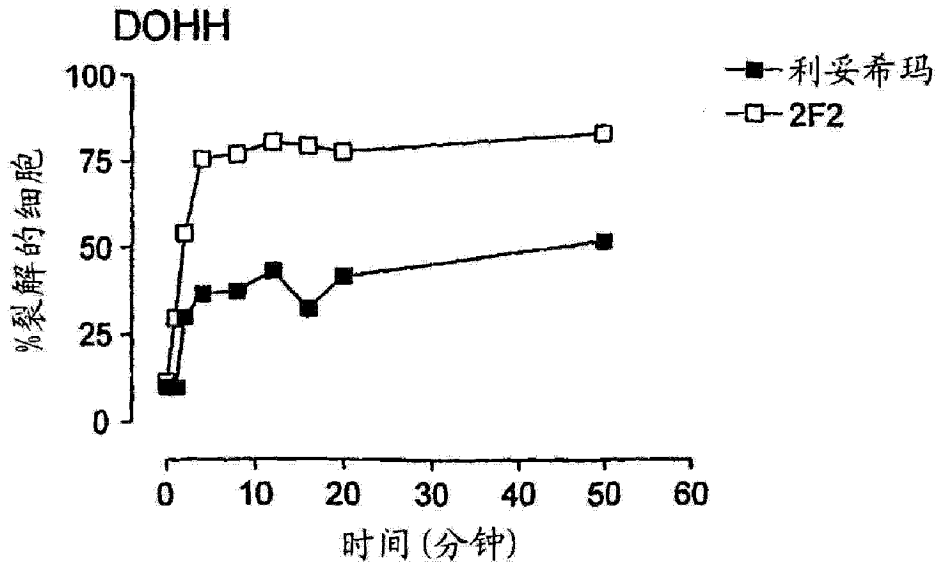


图 11D

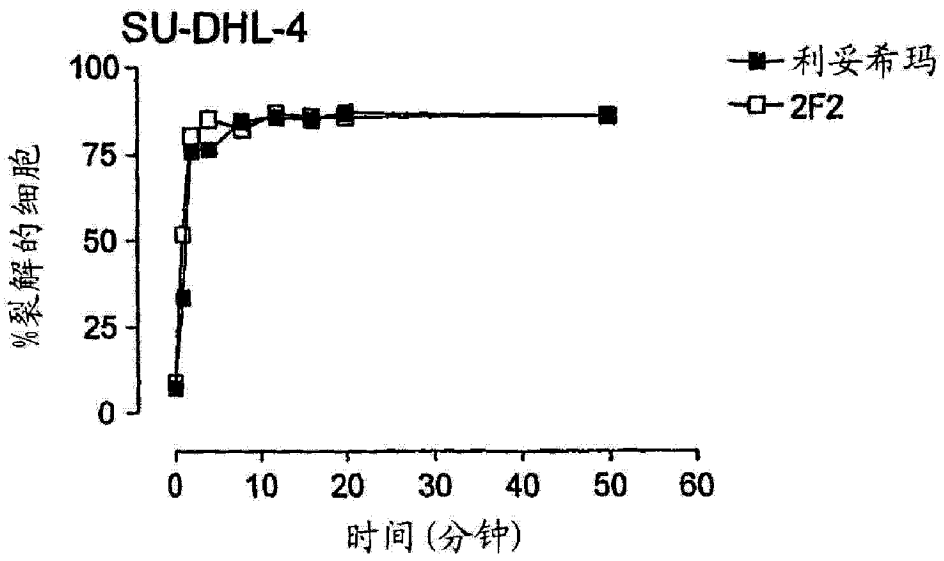


图 11E

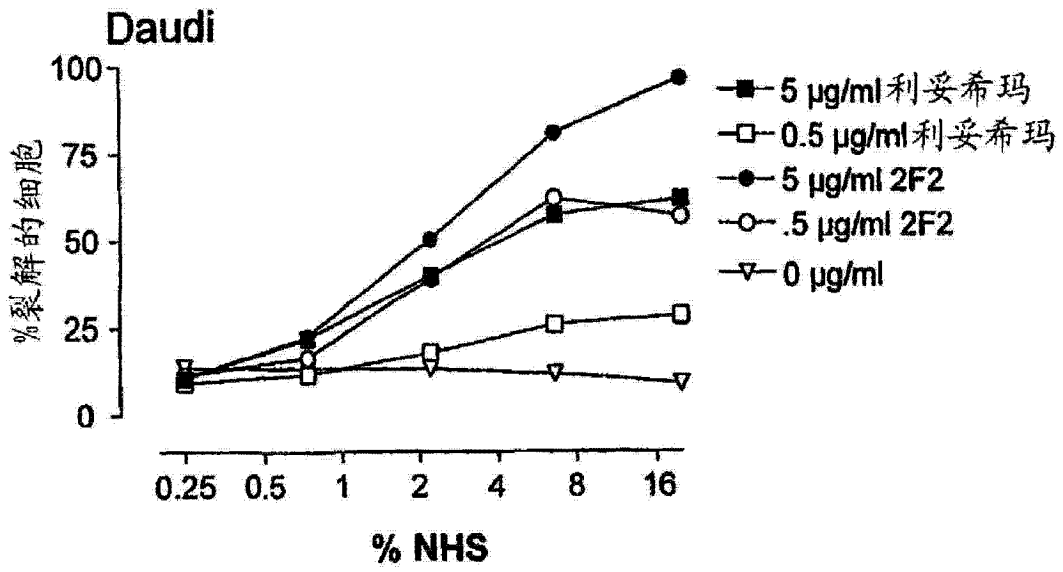


图 12A

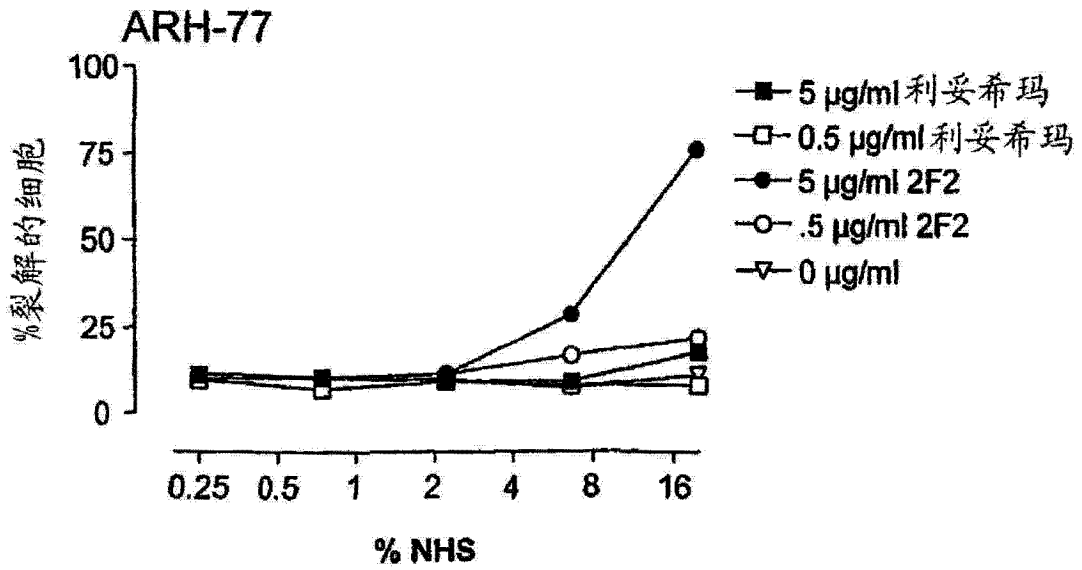


图 12B

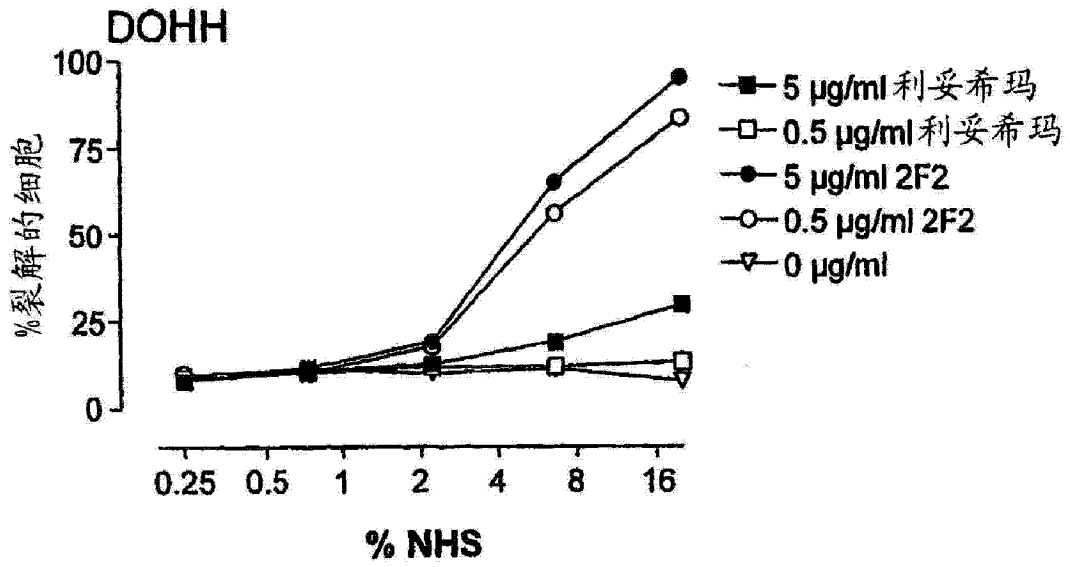


图 12C

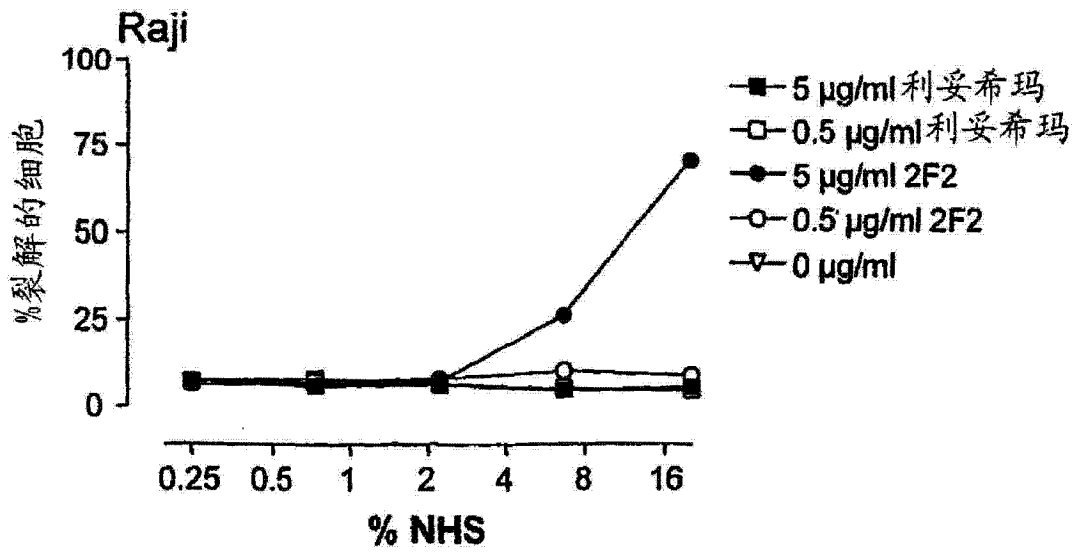


图 12D

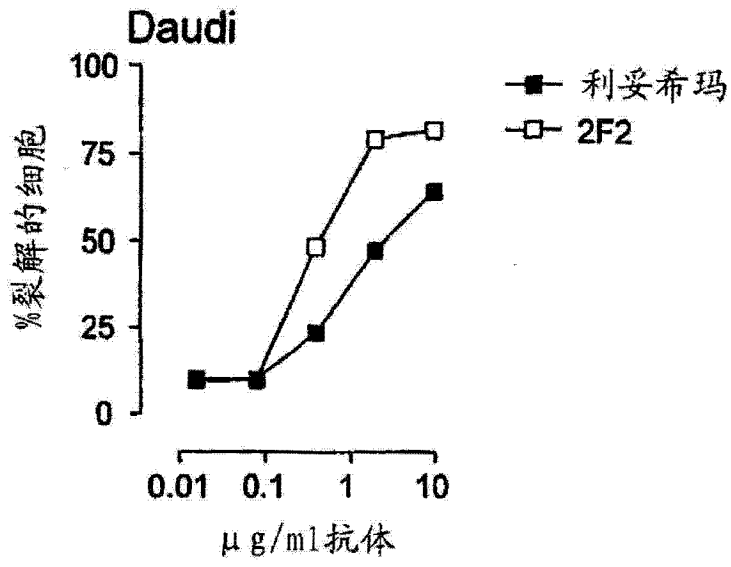


图 13A

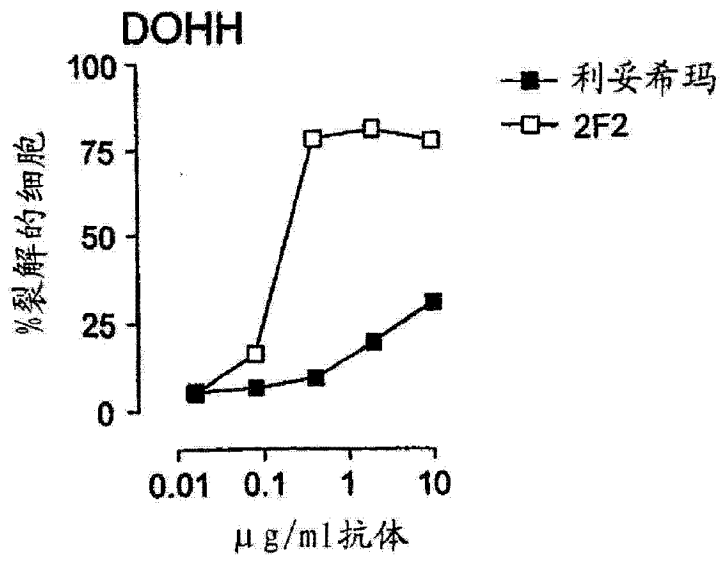


图 13B

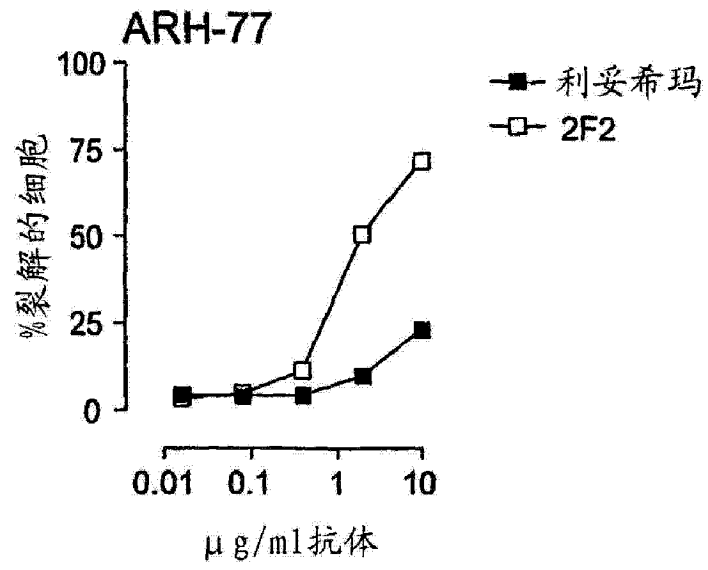


图 13C

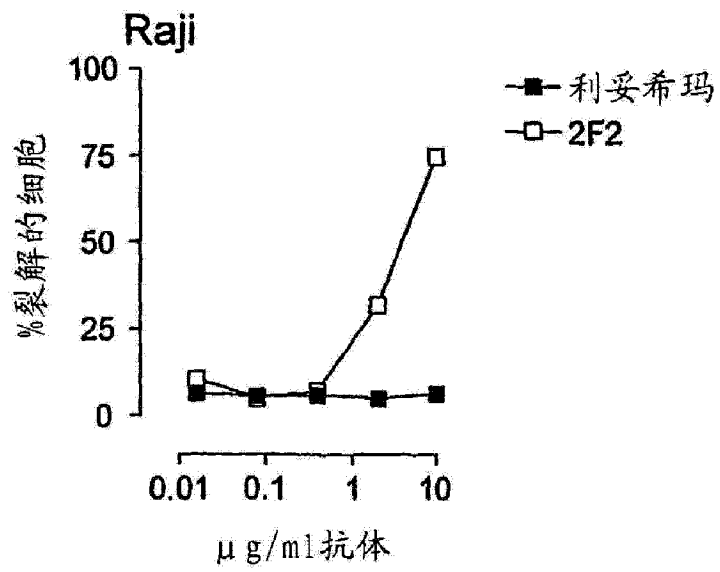


图 13D

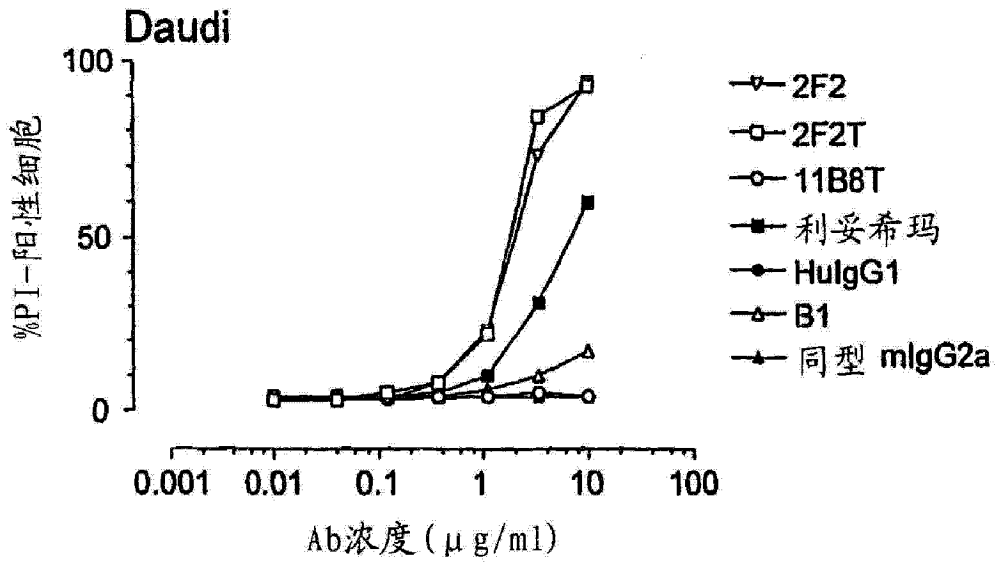


图 14A

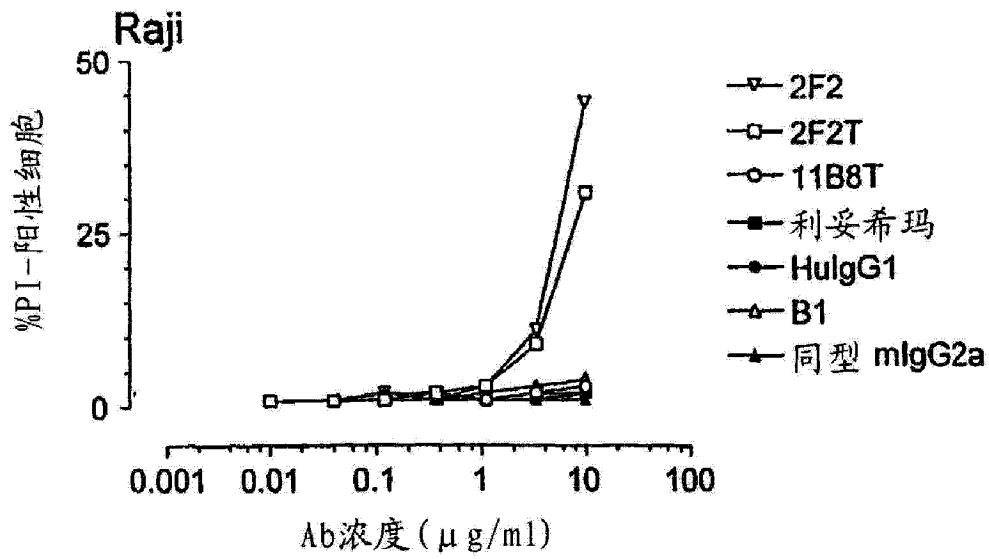


图 14B

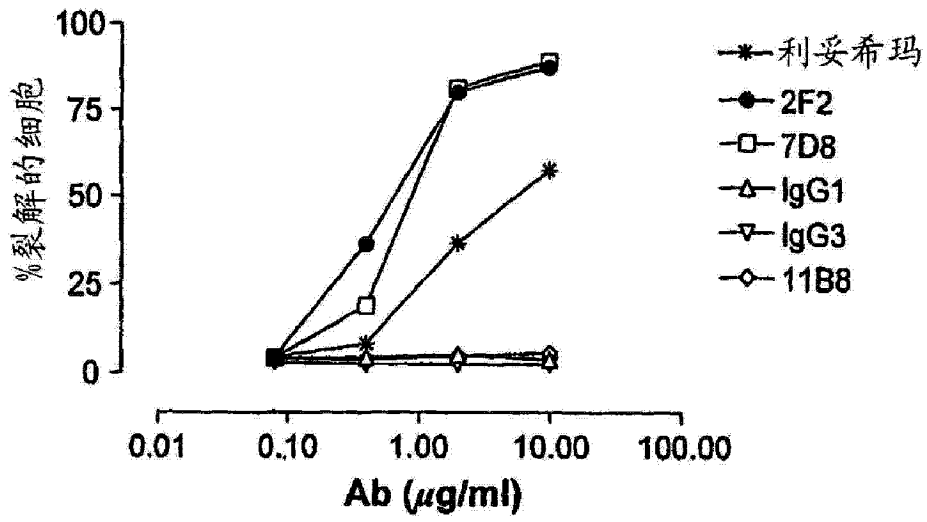


图 15A

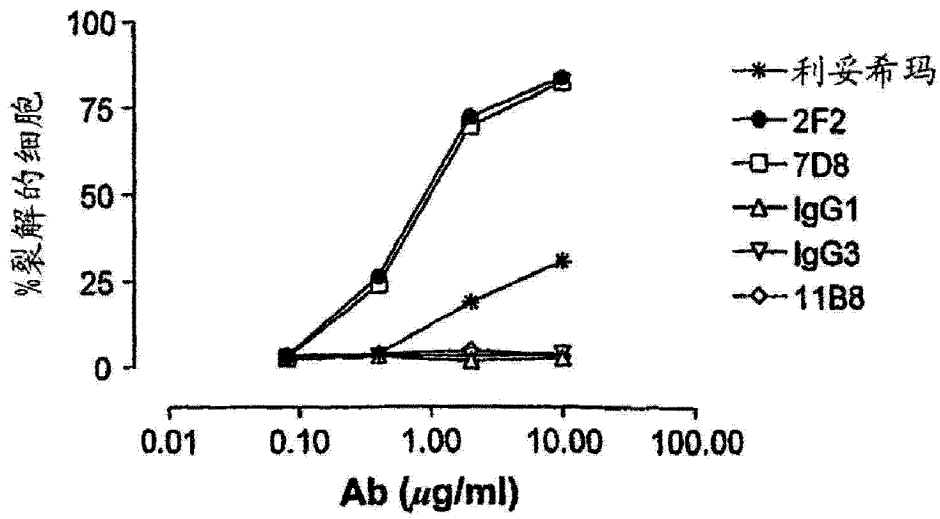


图 15B

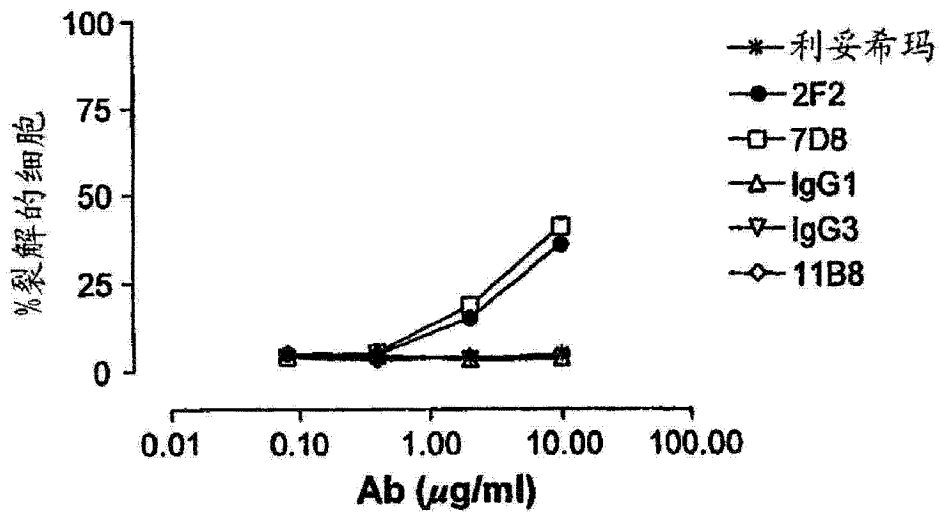


图 16A

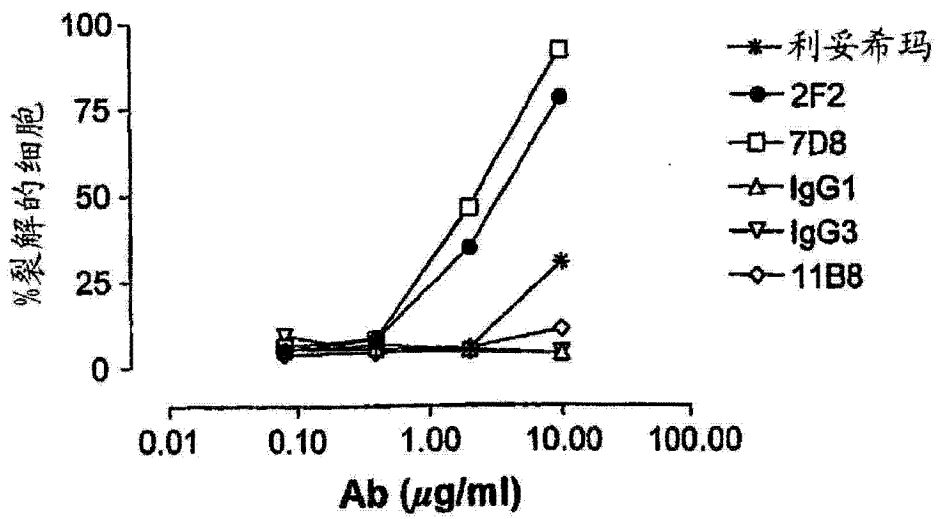


图 16B

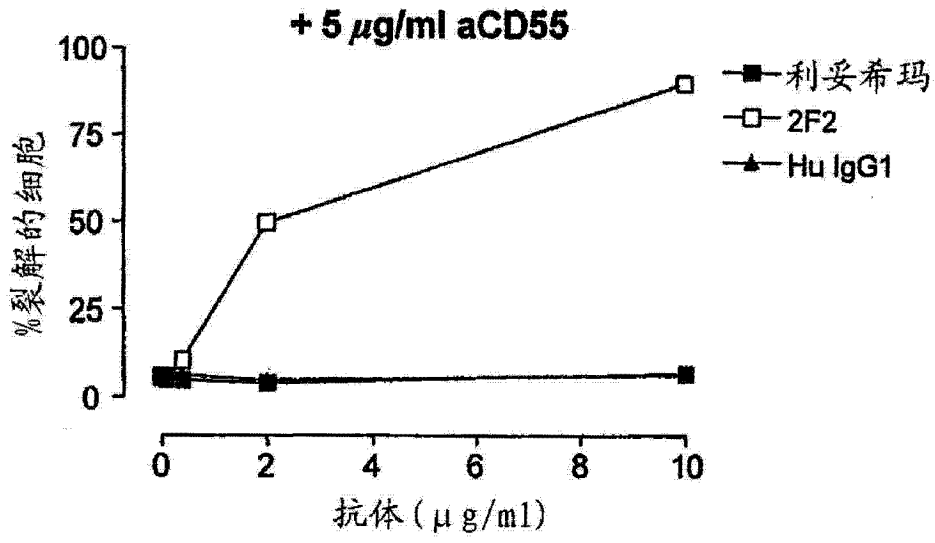


图 17A

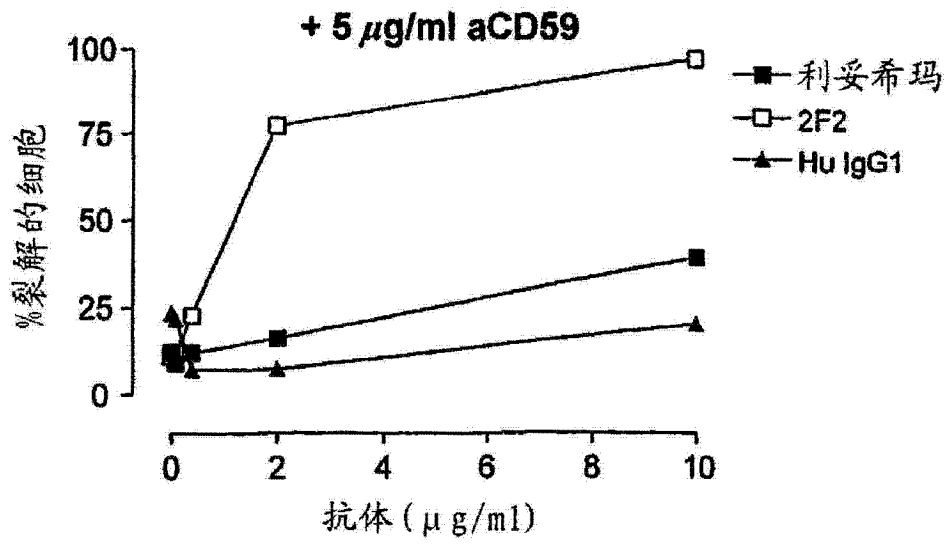


图 17B

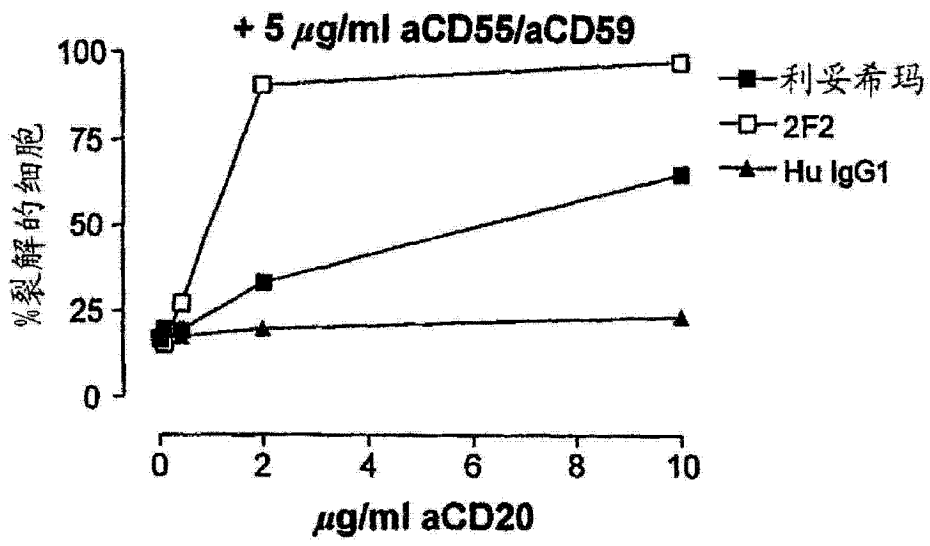


图 17C

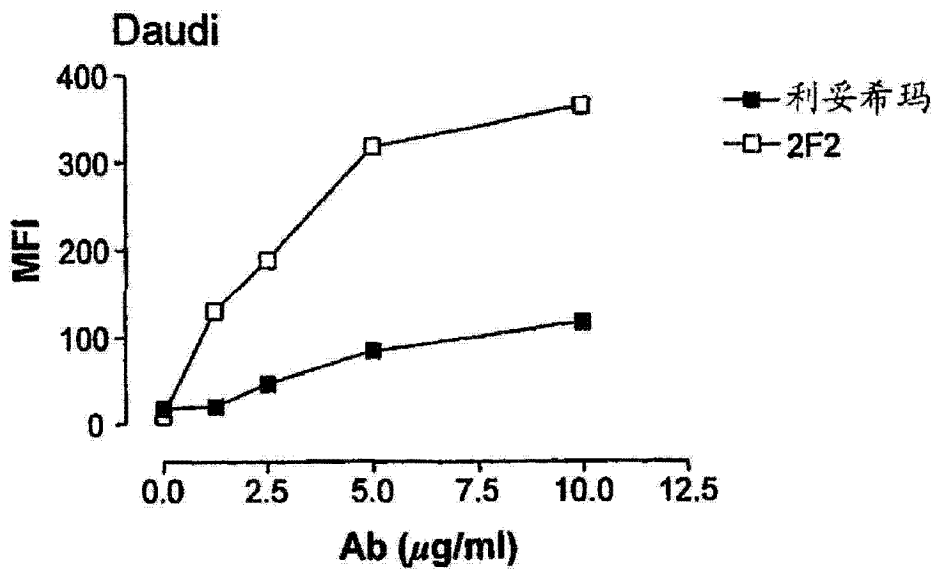


图 18A

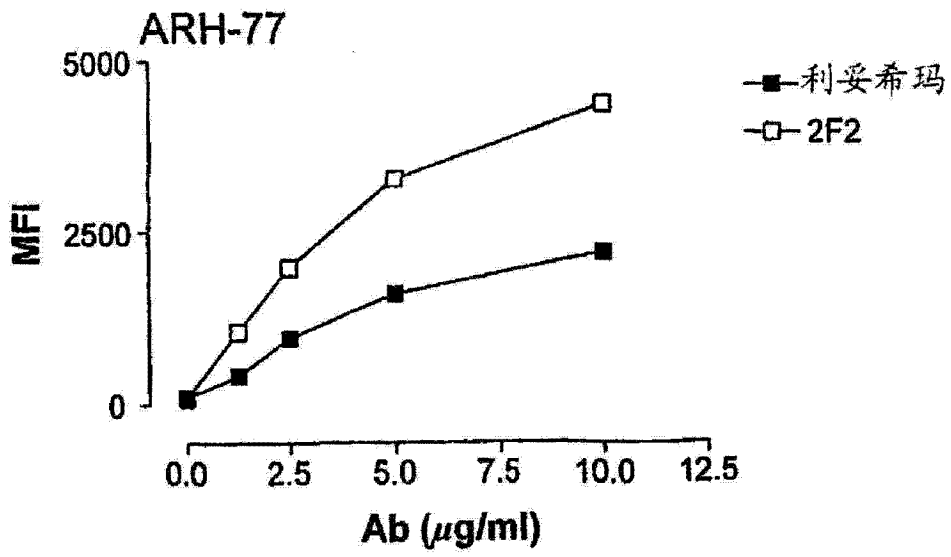


图 18B

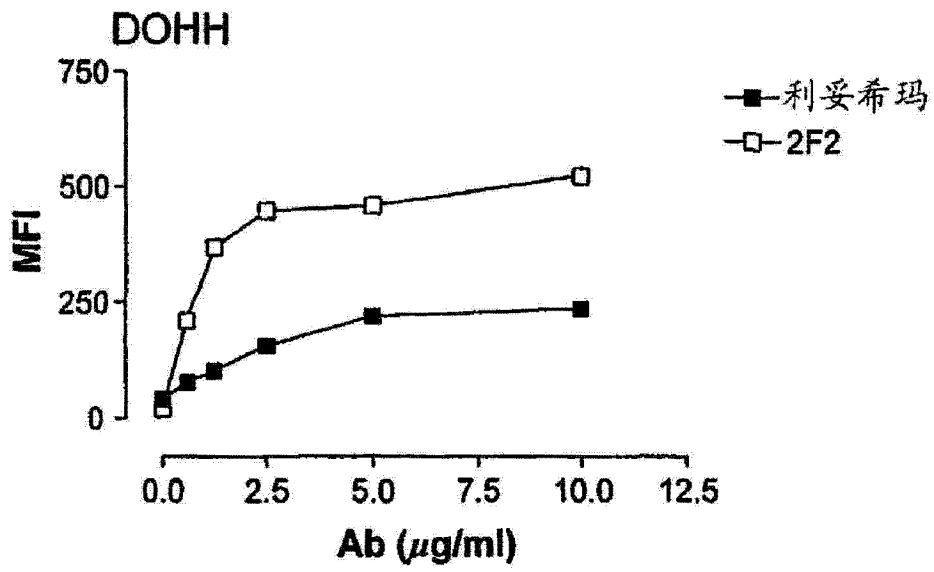


图 18C

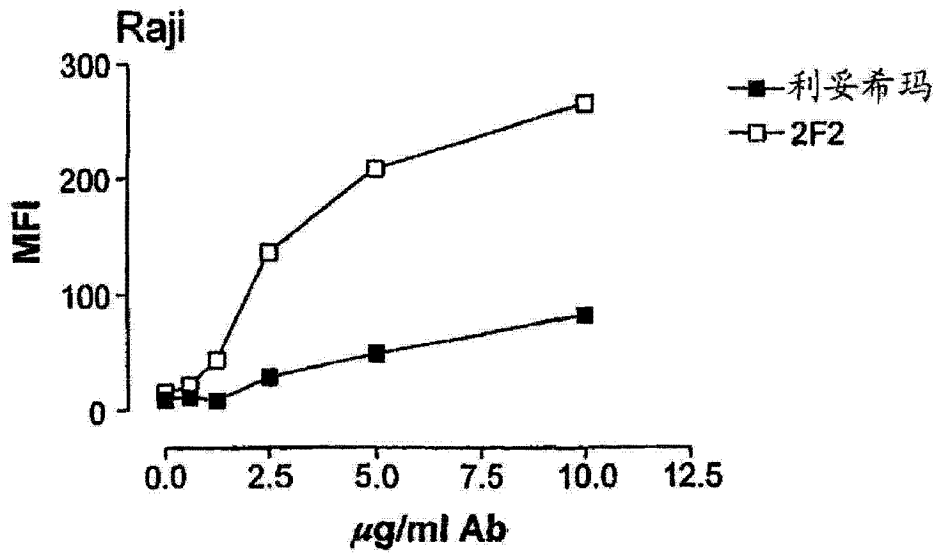


图 18D

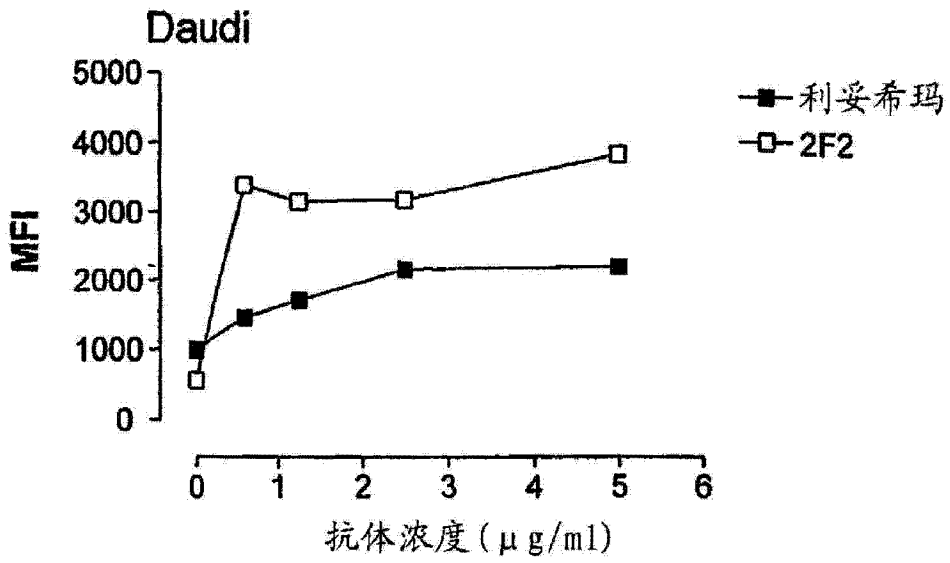


图 19A

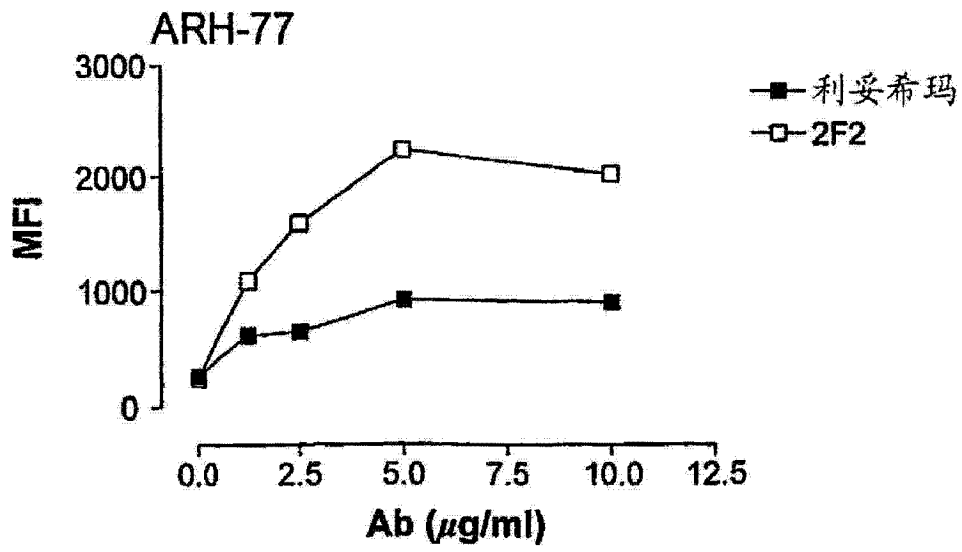


图 19B

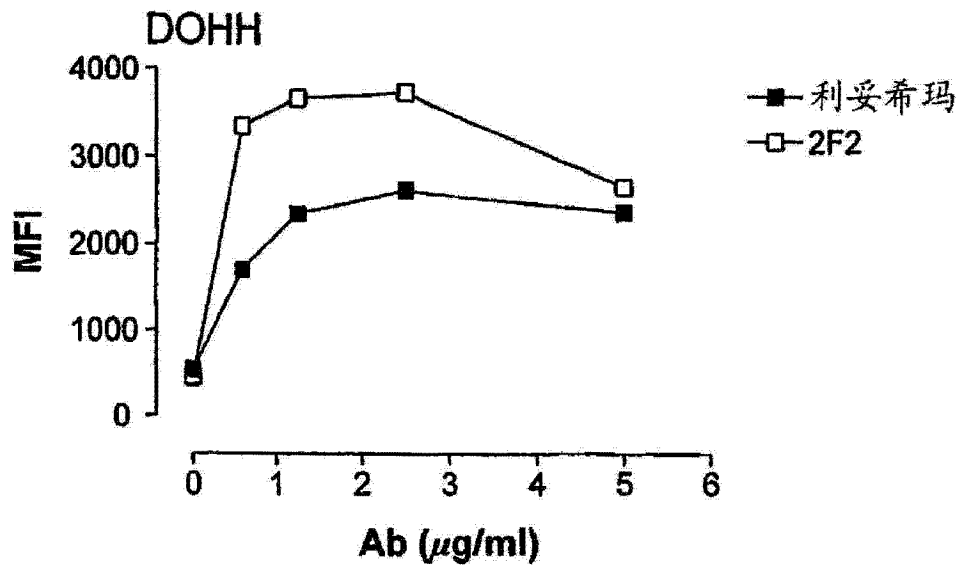


图 19C

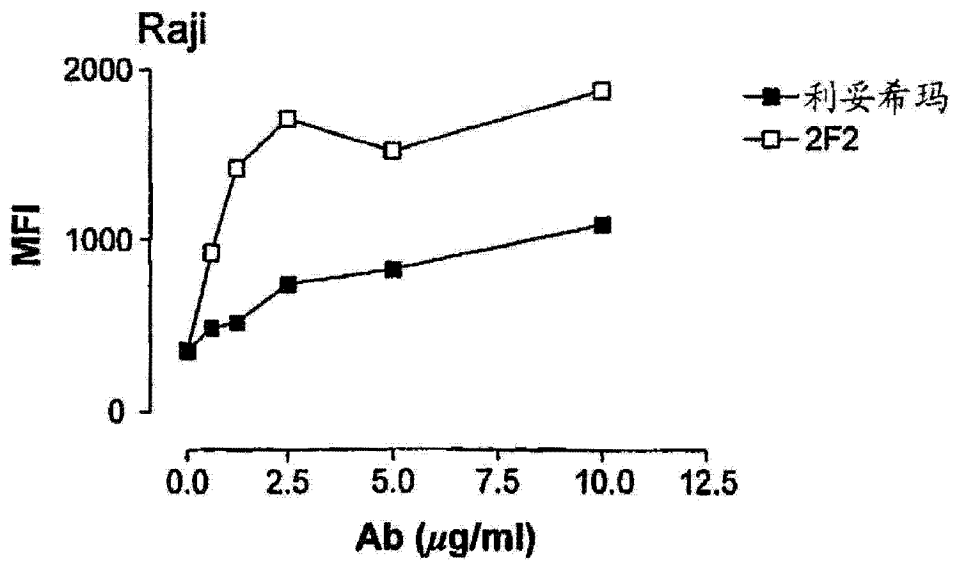


图 19D

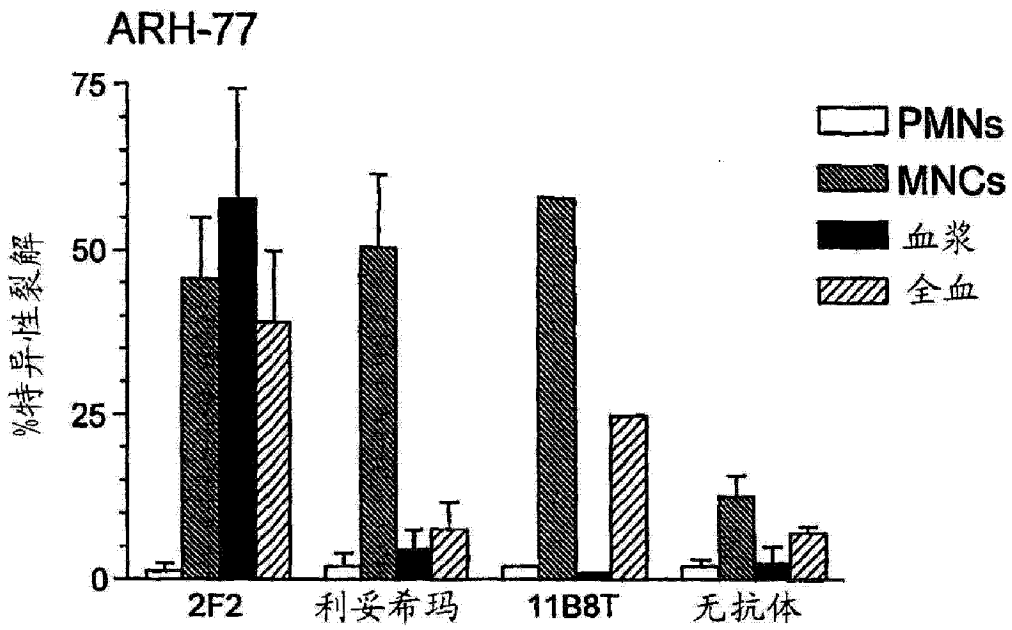


图 20

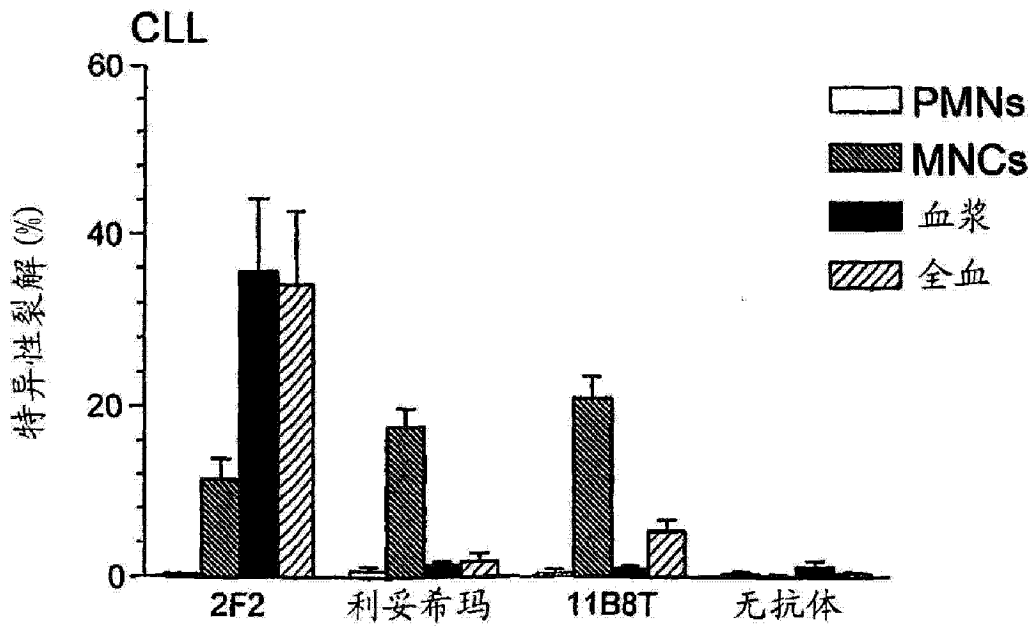


图 21

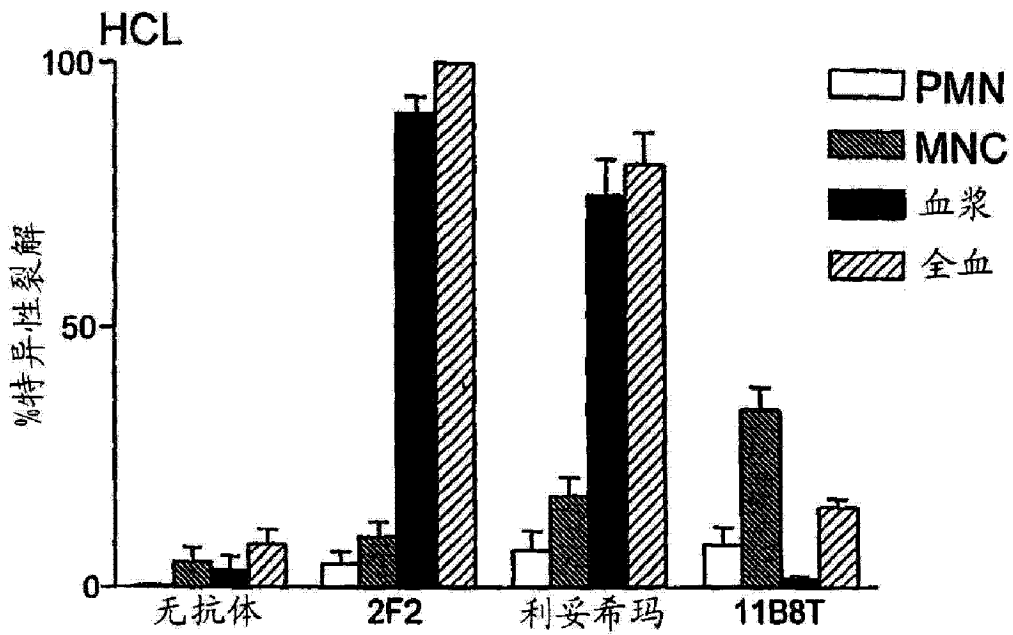


图 22

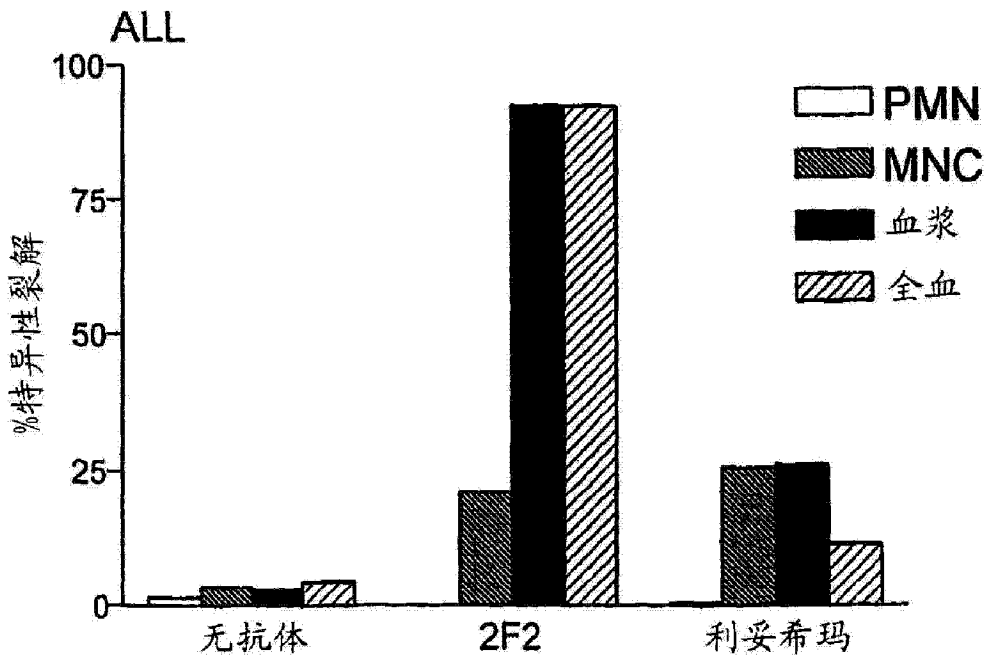


图 23

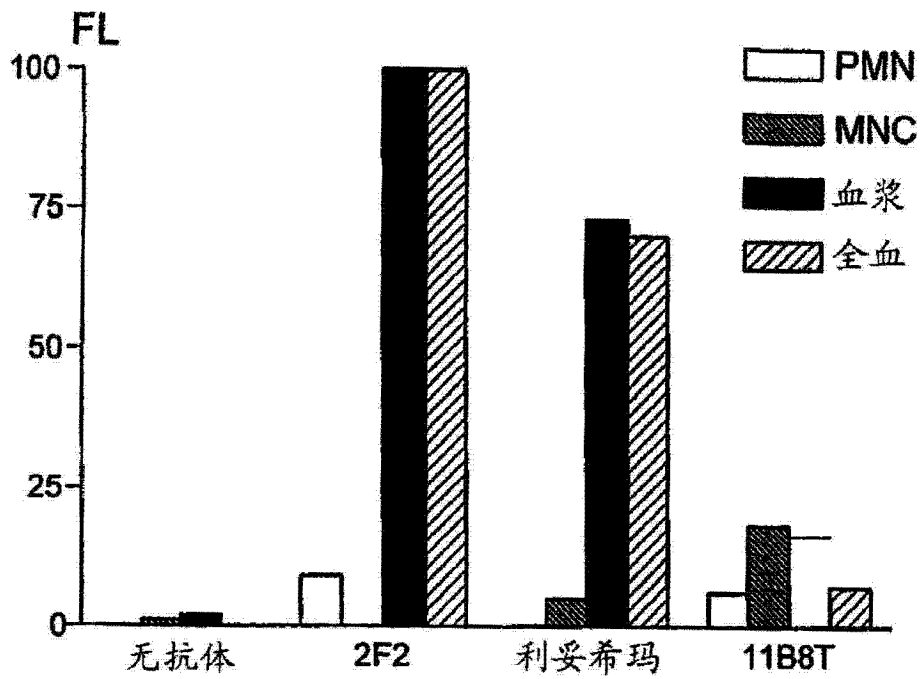


图 24

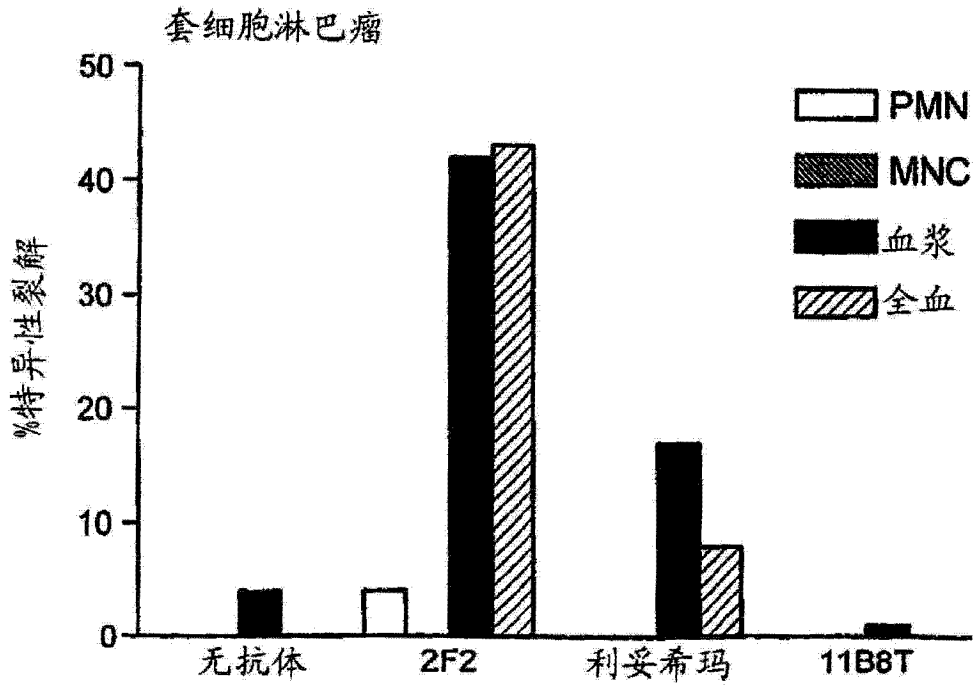


图 25

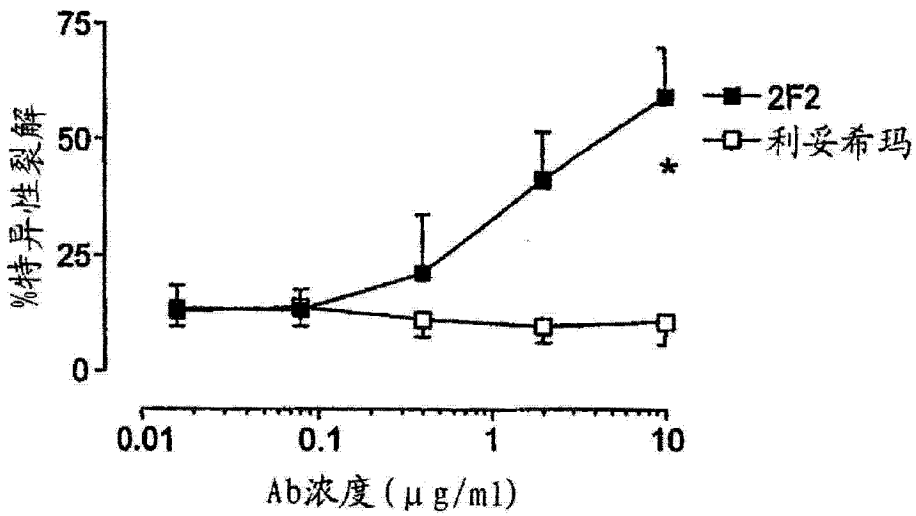


图 26

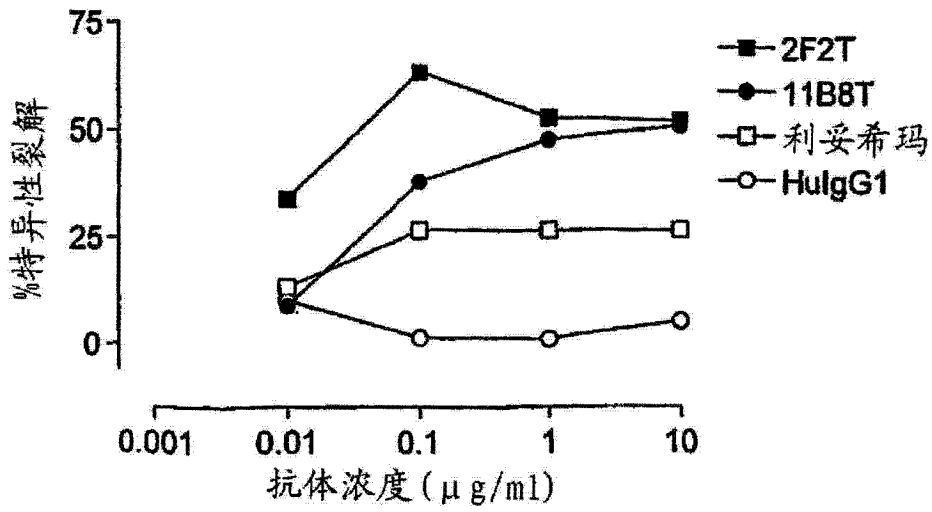


图 27

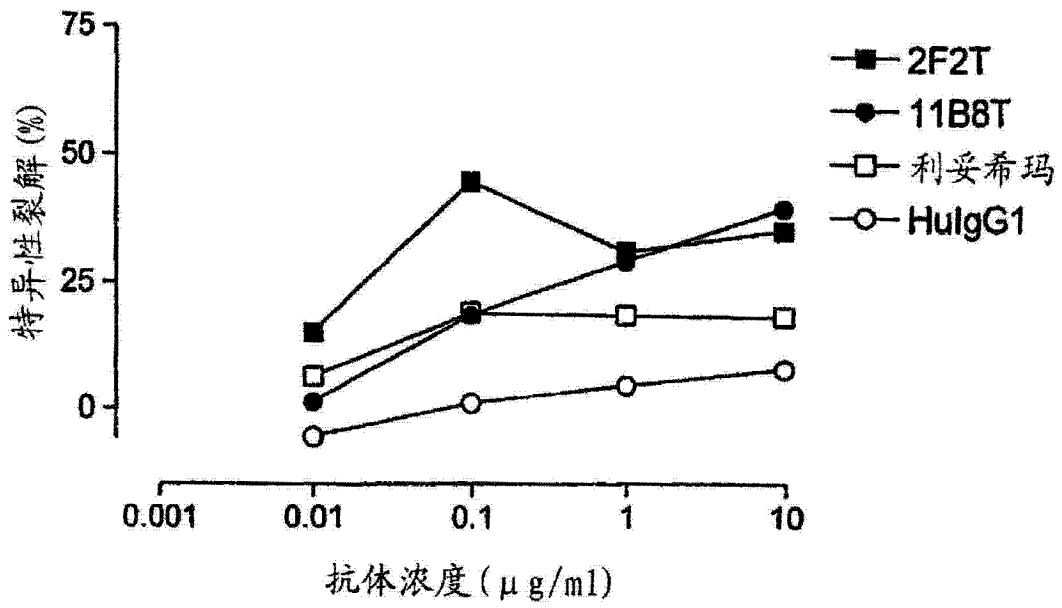


图 28

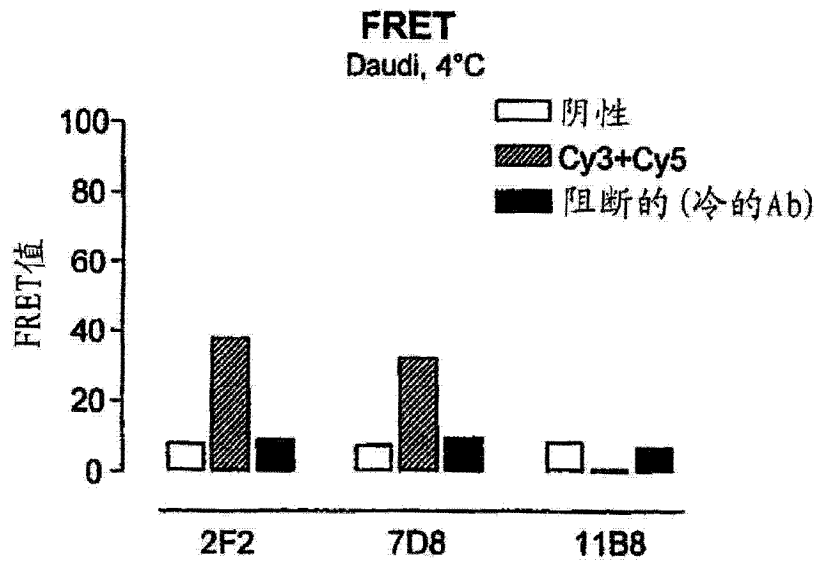


图 29A

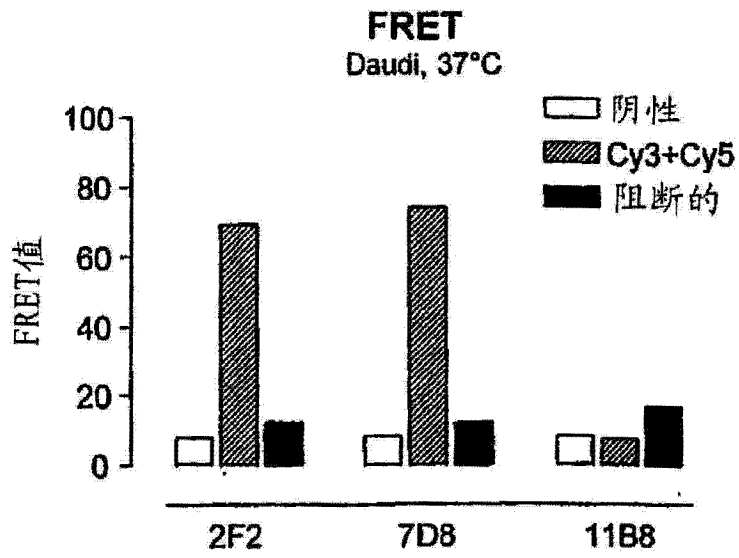


图 29B

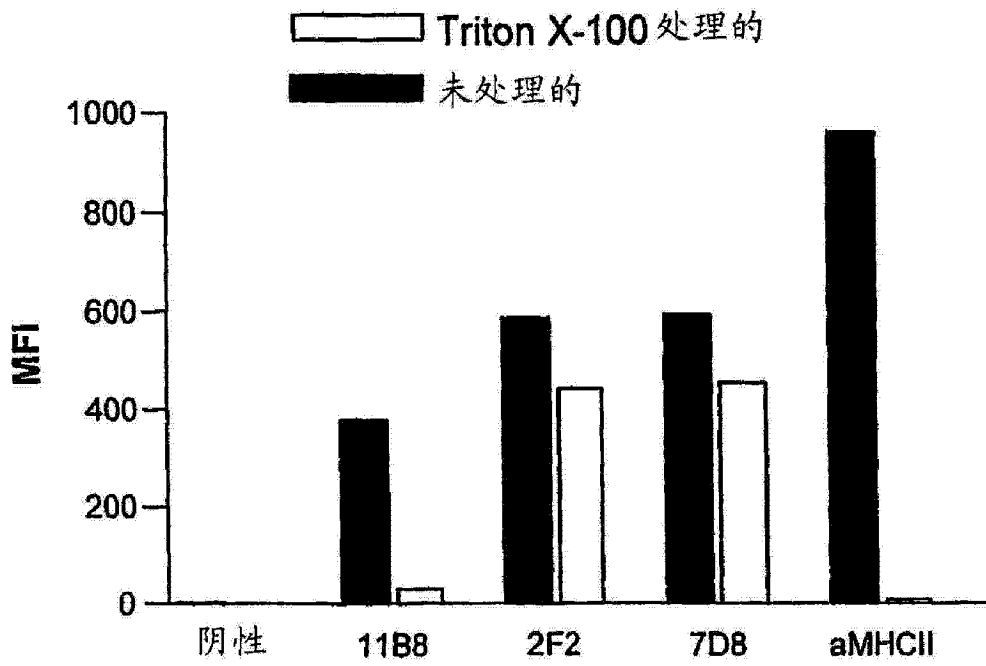


图 29C

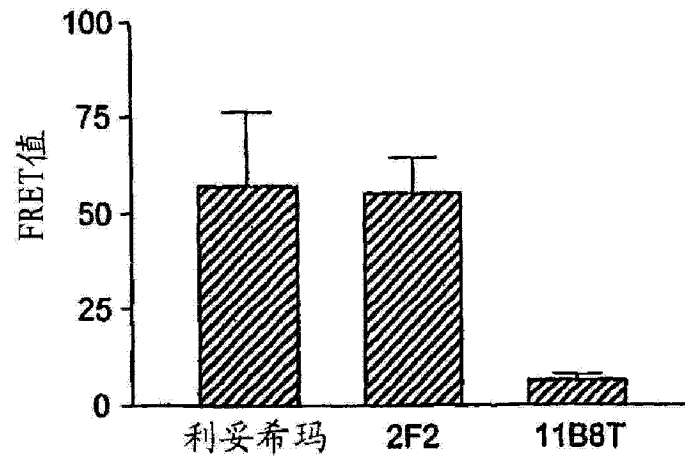
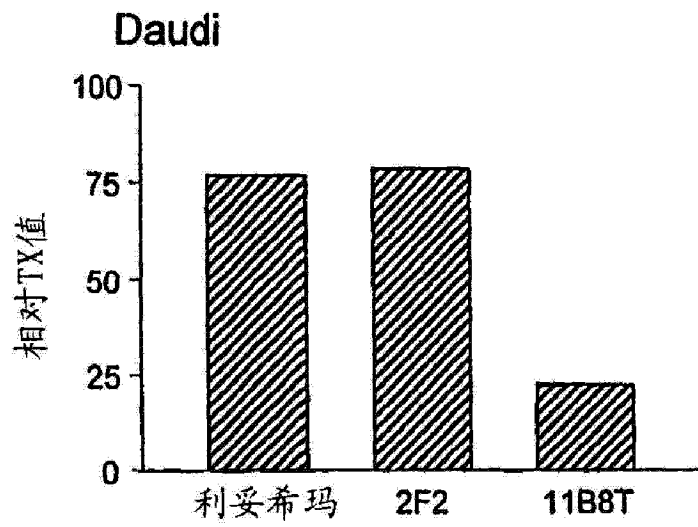


图 30

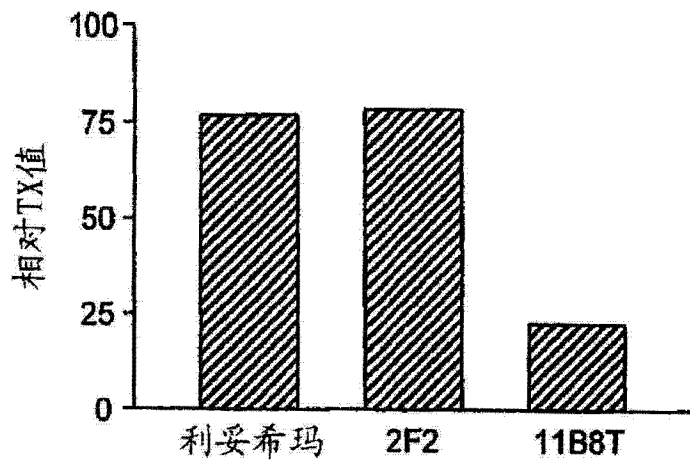


图 31

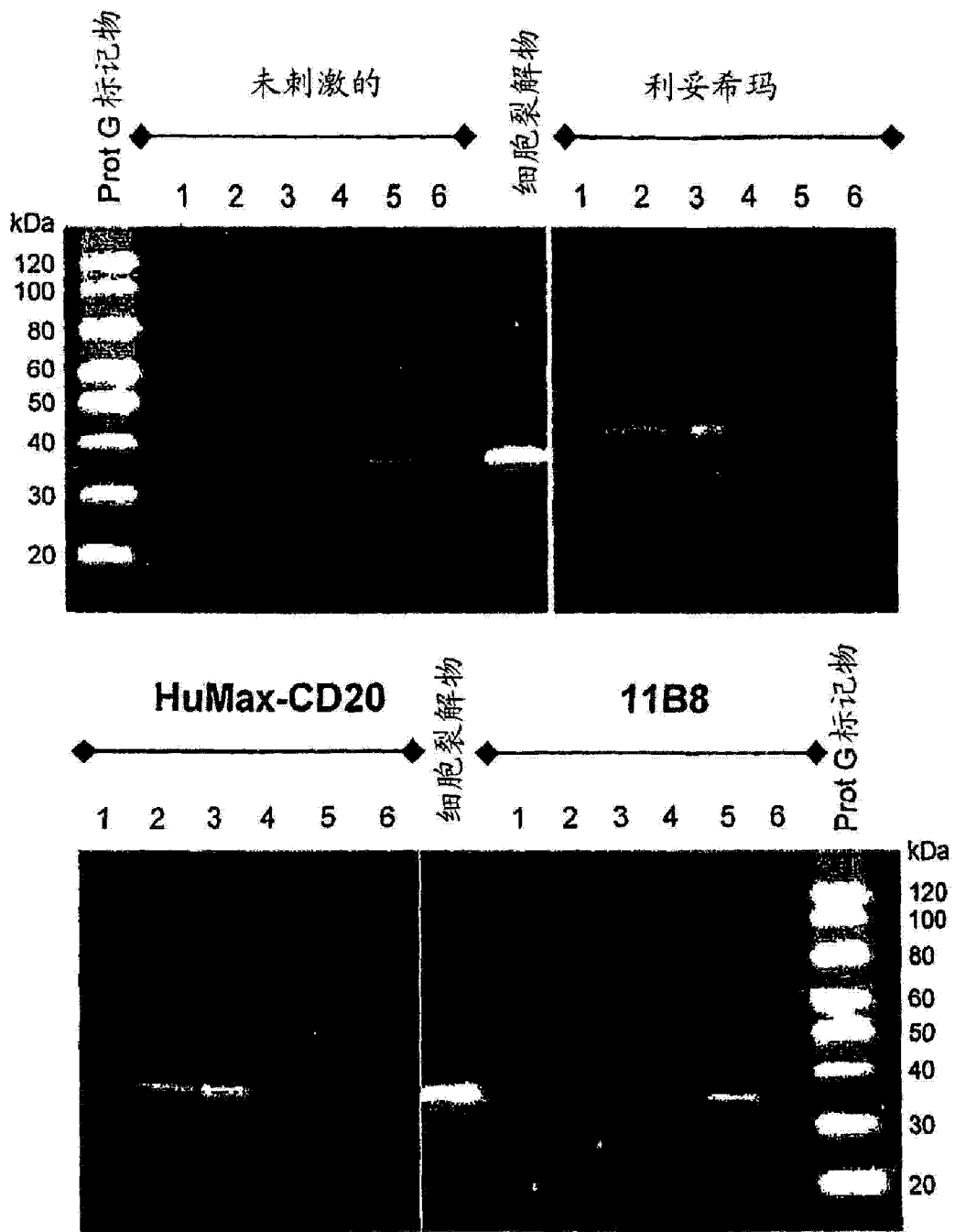


图 32

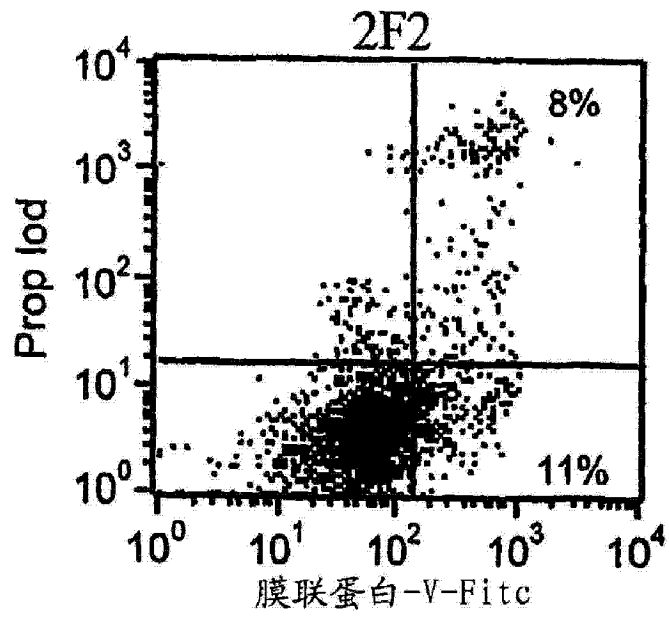


图 33A

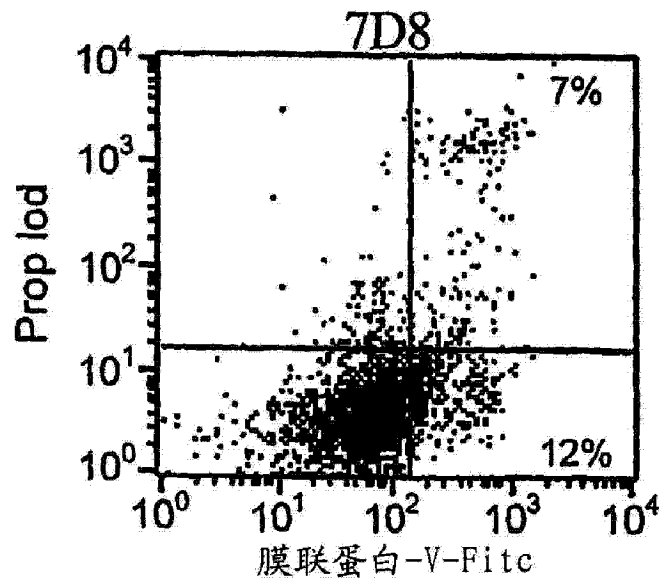


图 33B

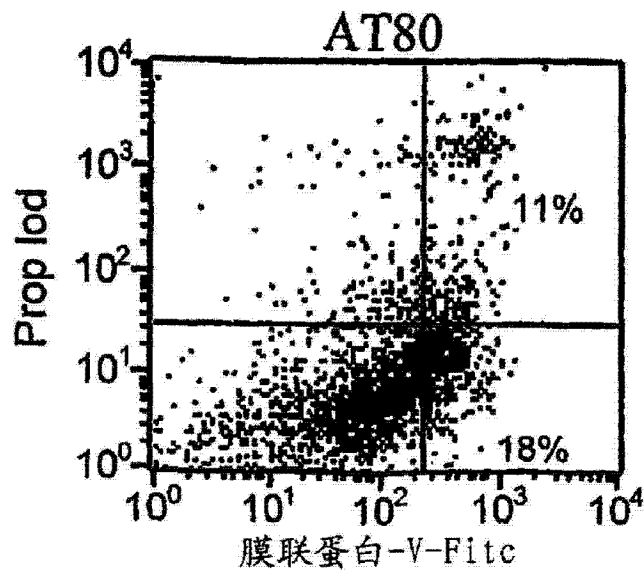


图 33C

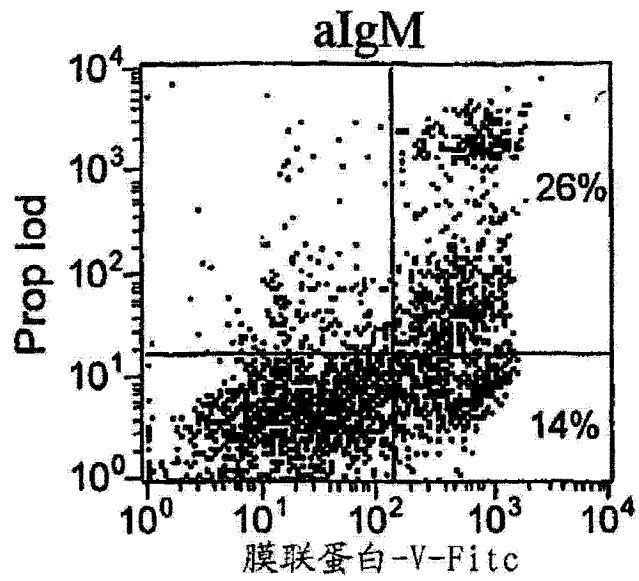


图 33D

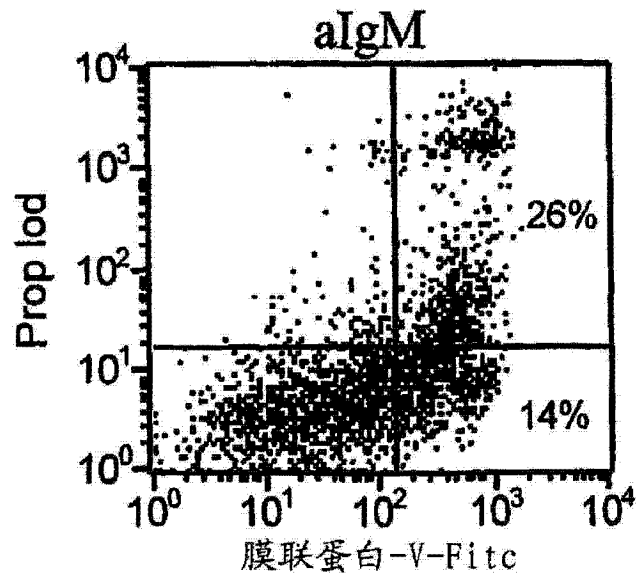


图 33E

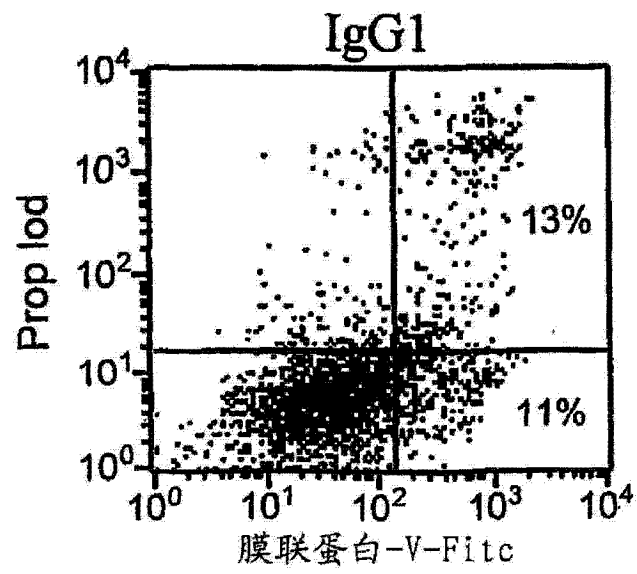


图 33F

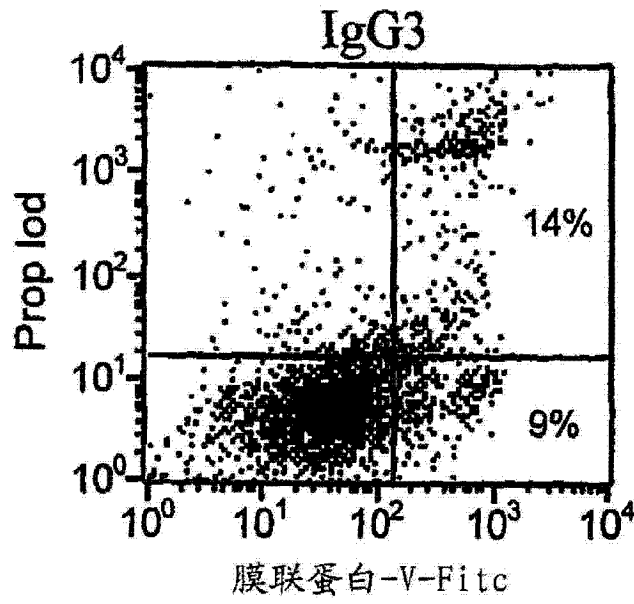


图 33G

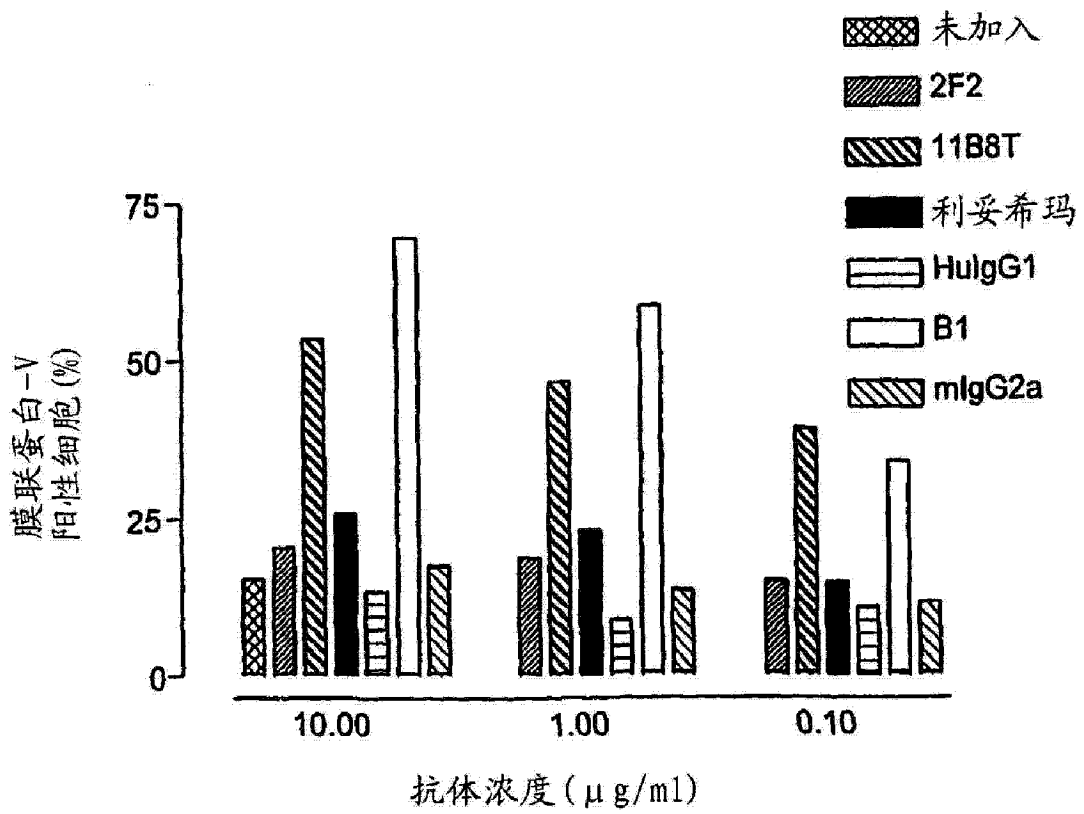


图 34

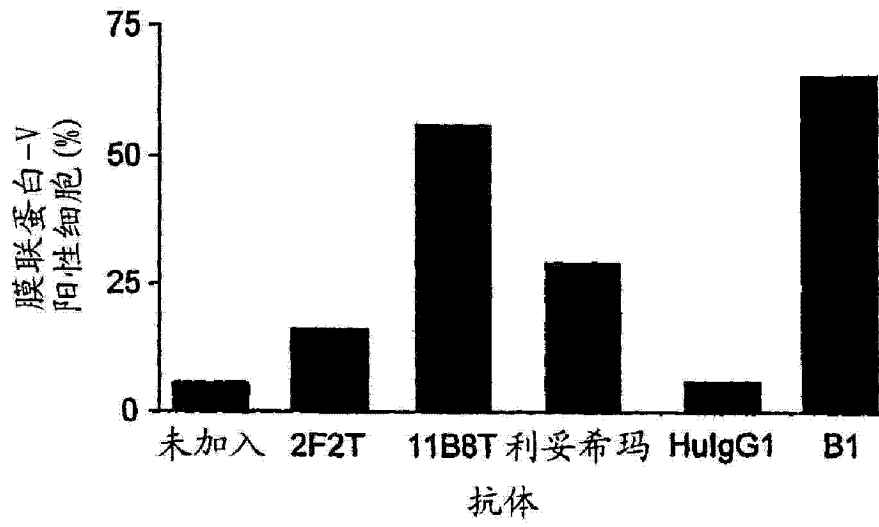


图 35A

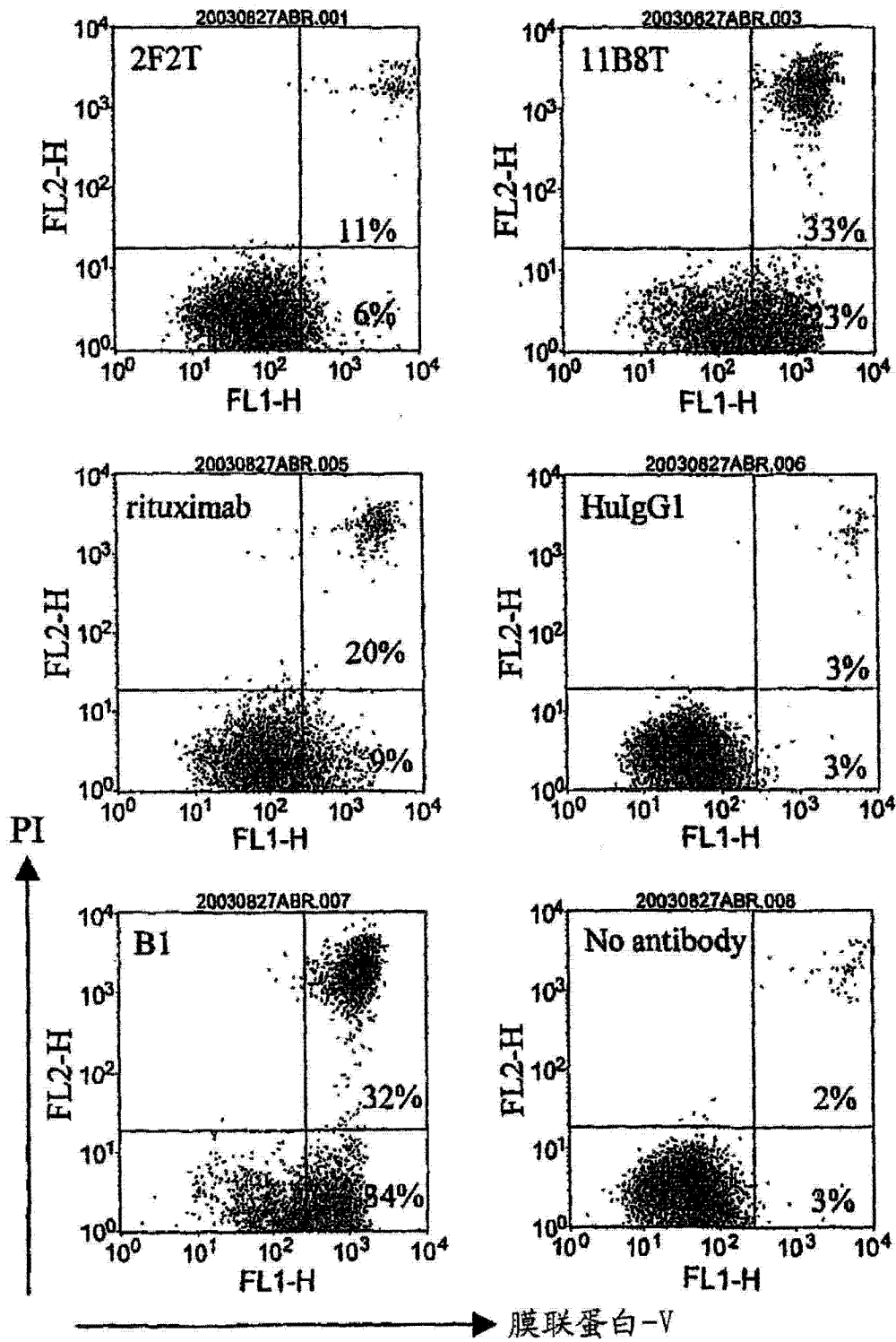


图 35B

Ramos 细胞的同型粘着

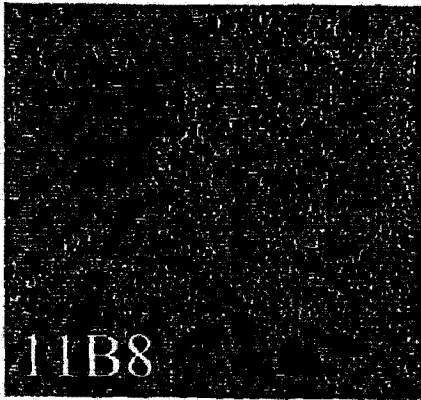


图 36A

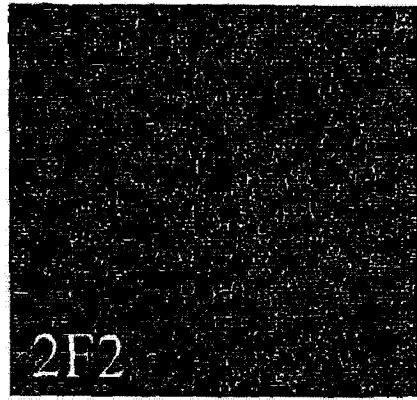


图 36B

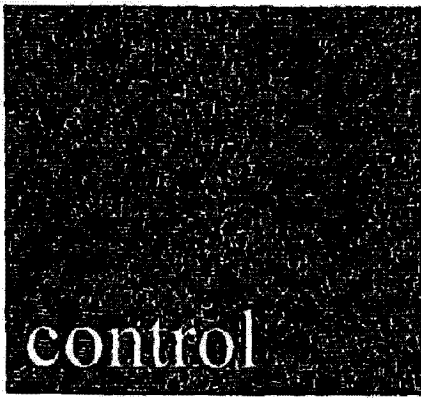


图 36C

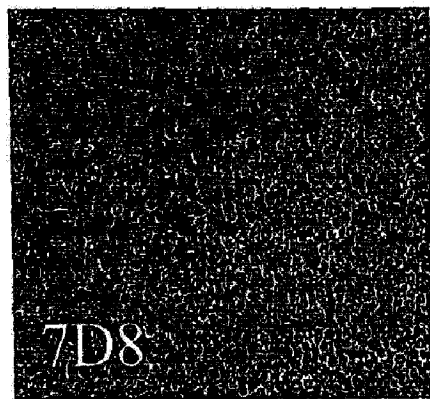


图 36D

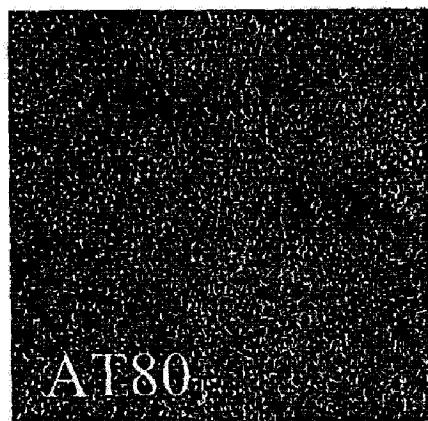


图 36E

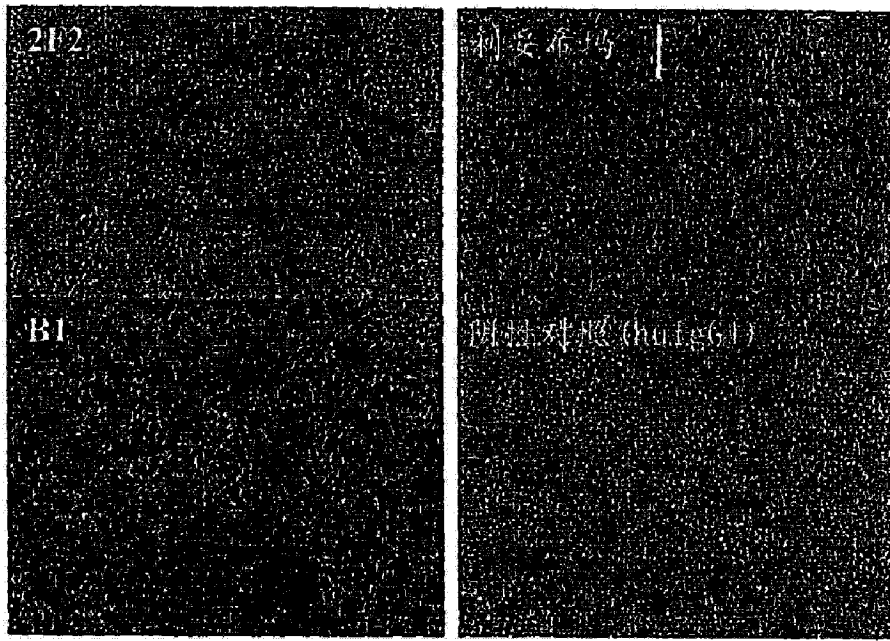


图 37

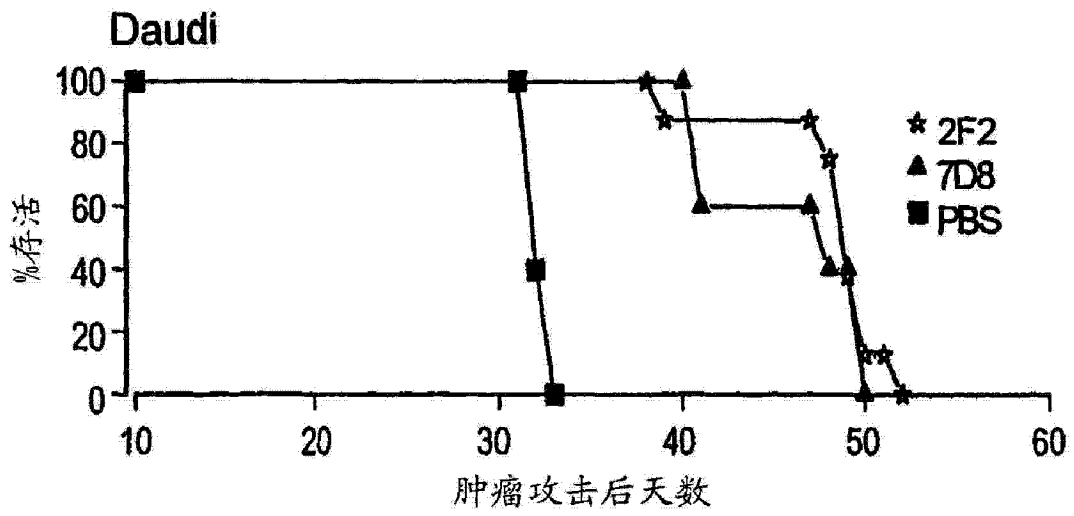


图 38

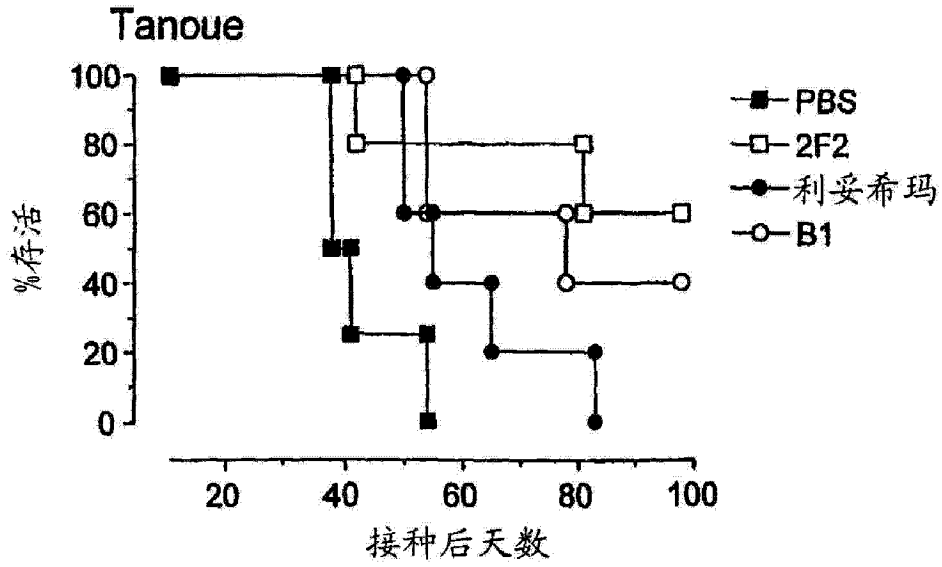


图 39

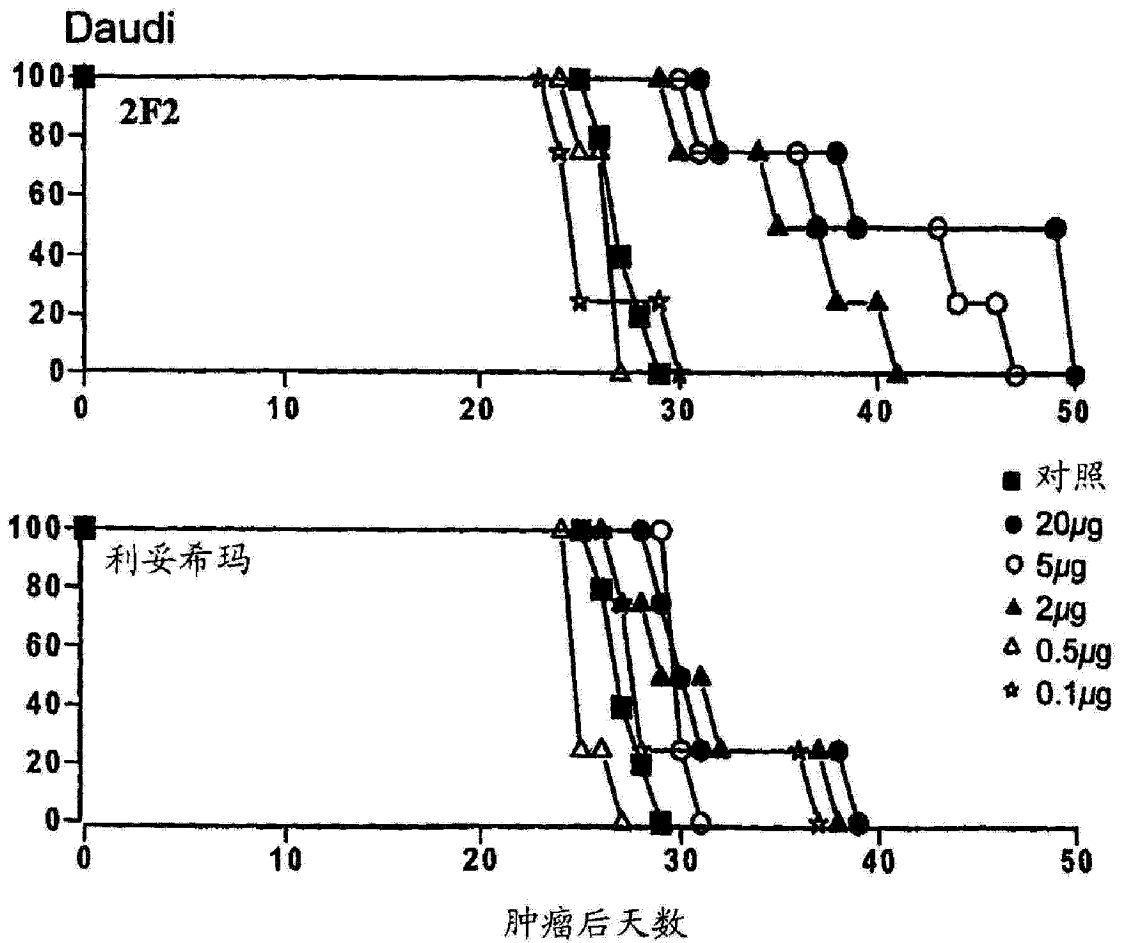


图 40

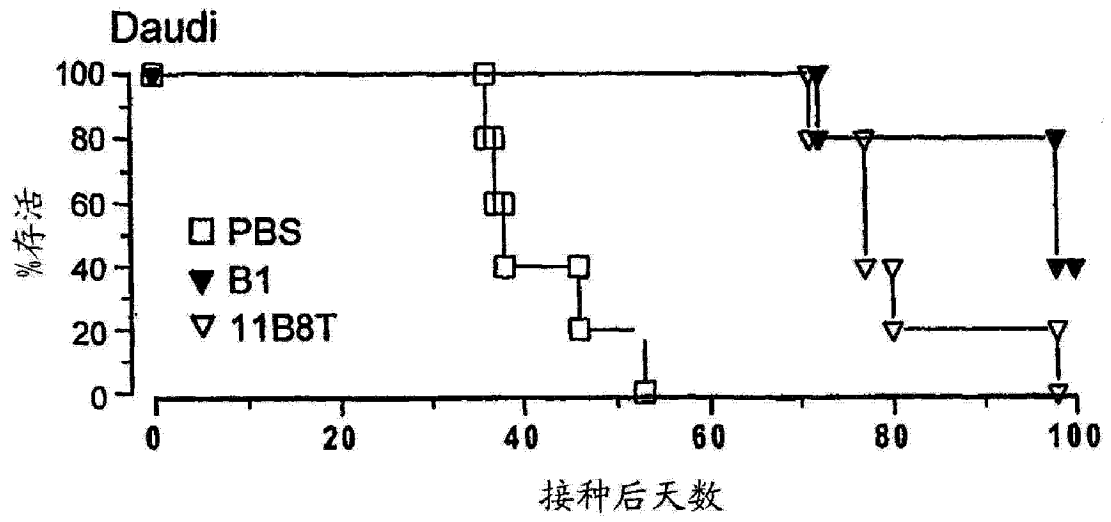


图 41

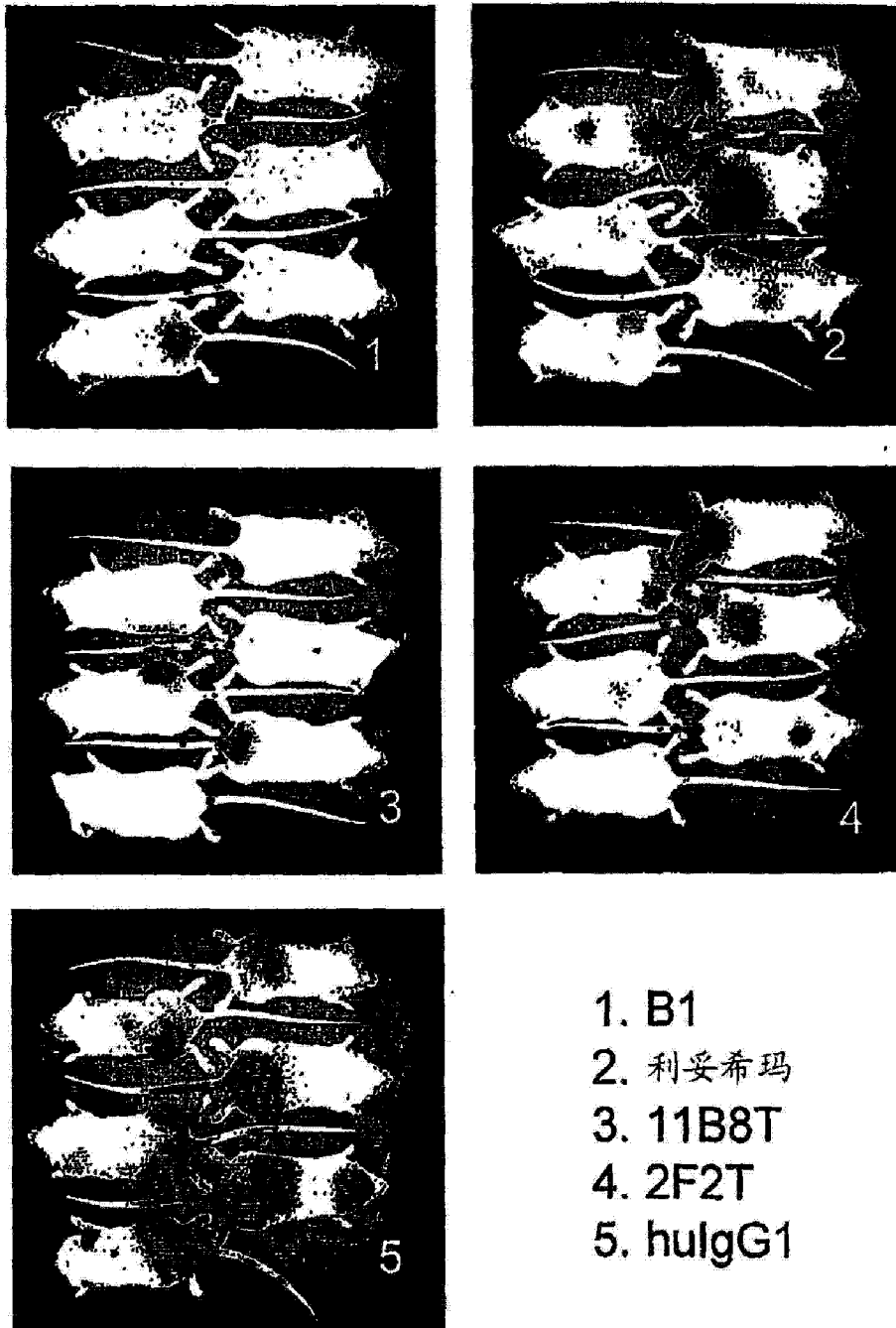


图 42

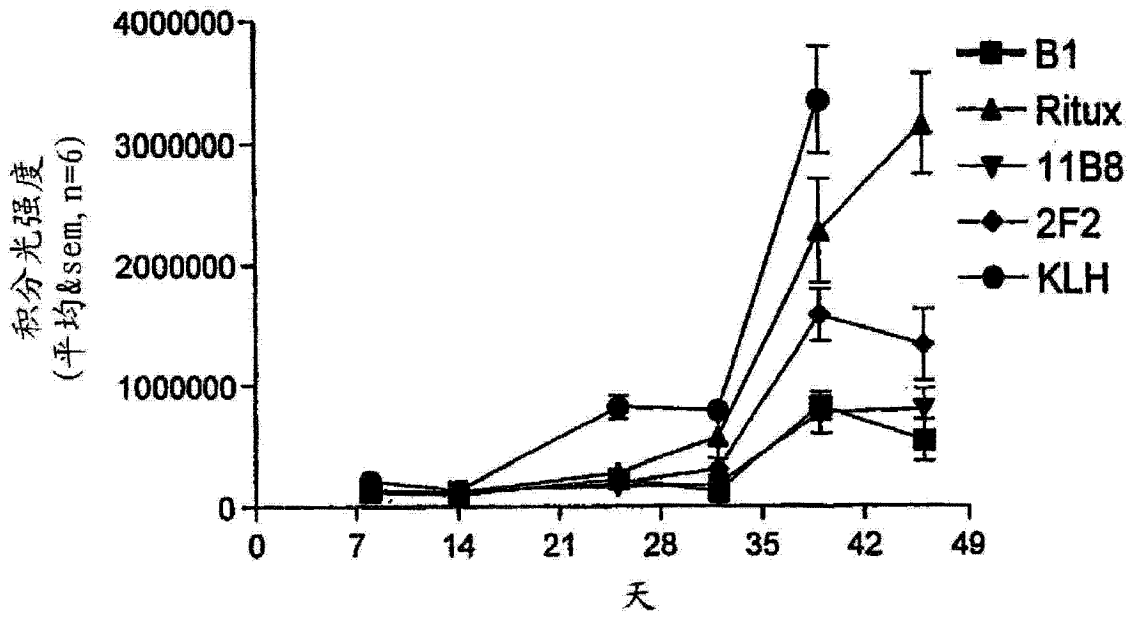


图 43

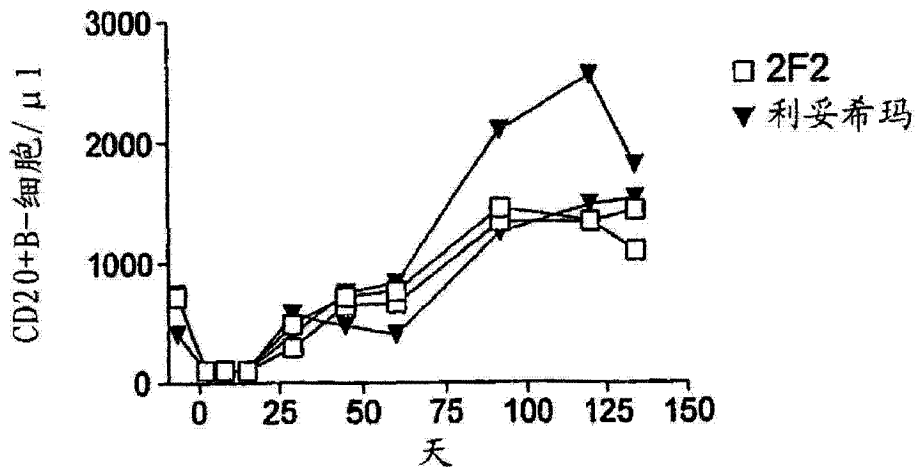


图 44A

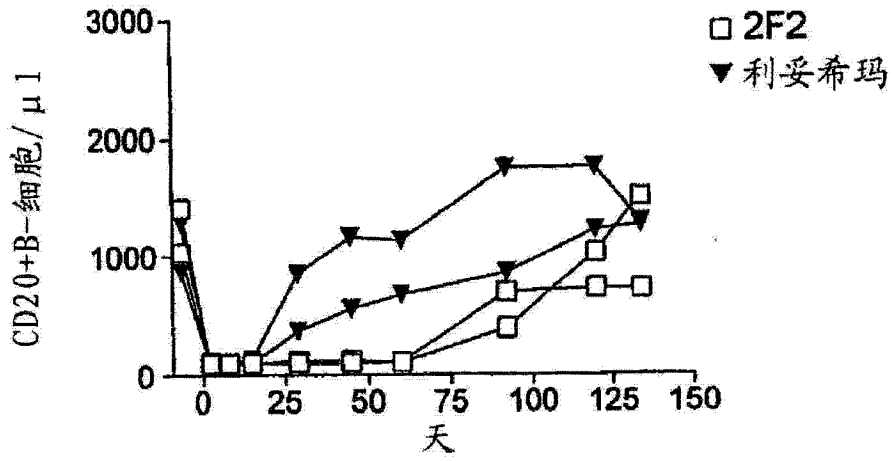


图 44B

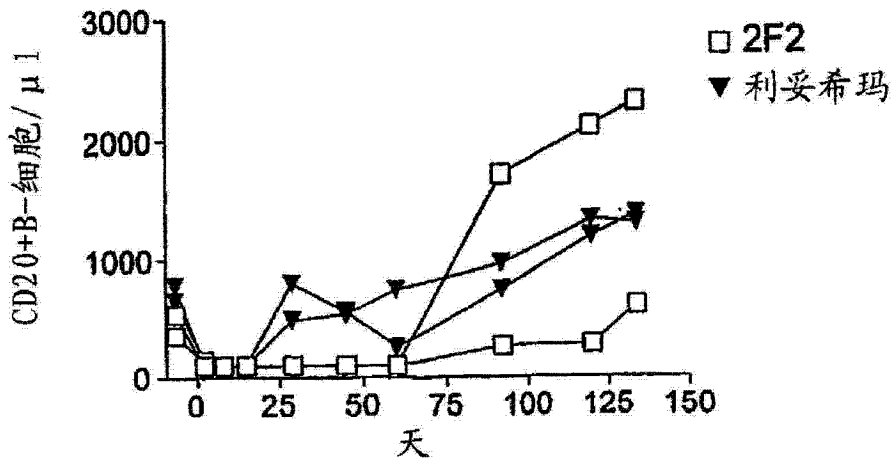


图 44C

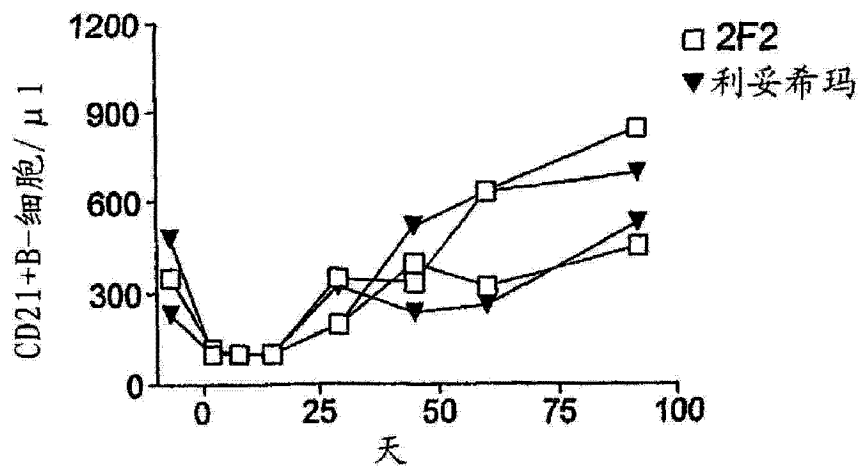


图 45A

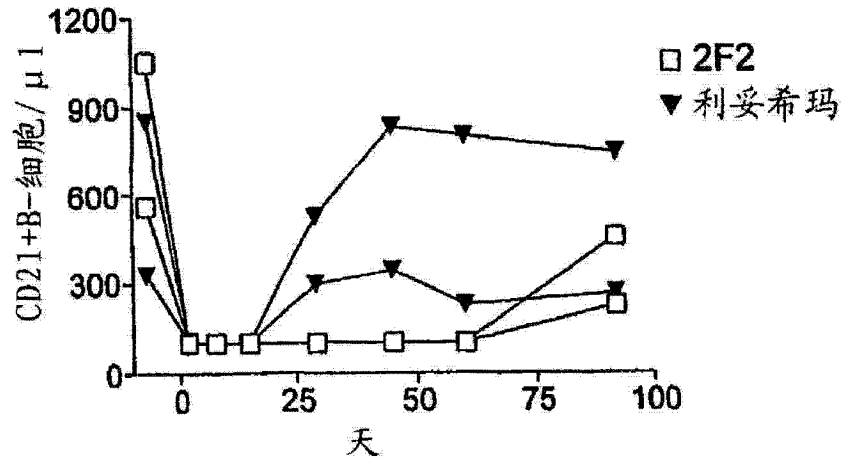


图 45B

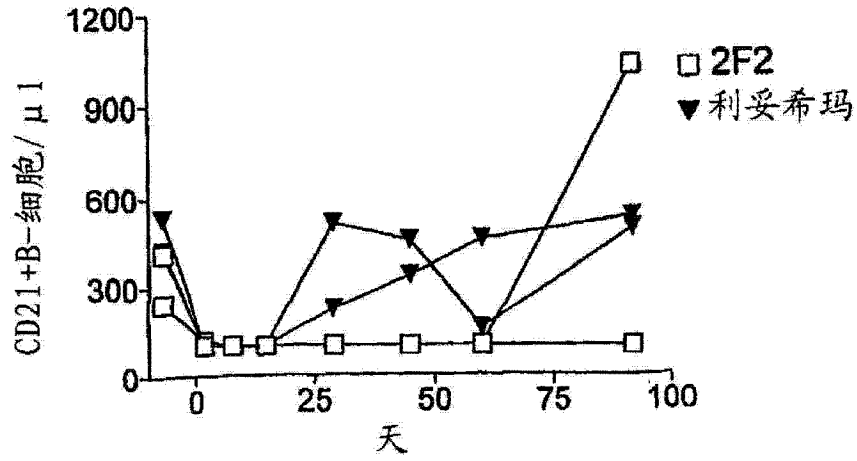


图 45C

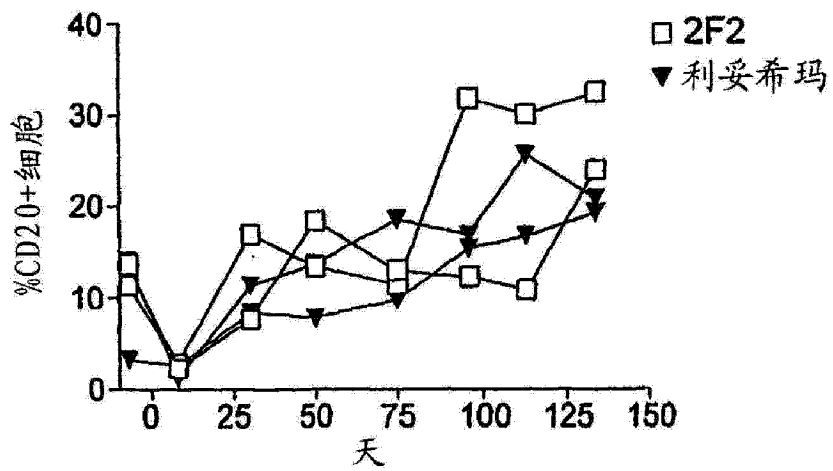


图 46A

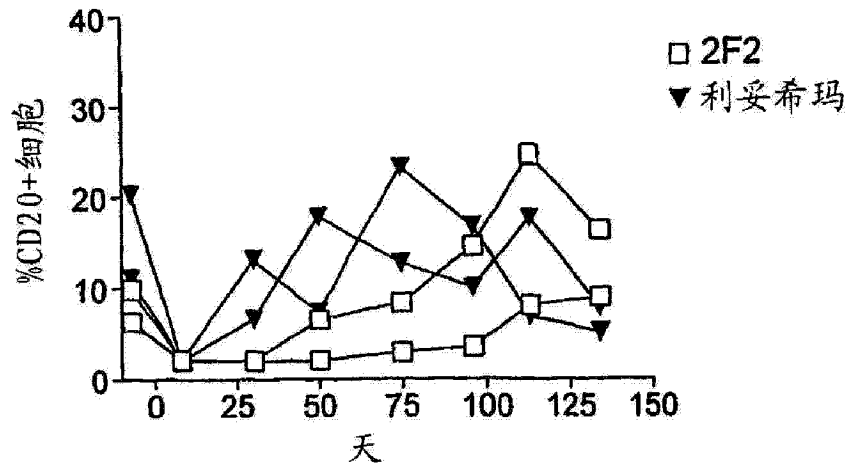


图 46B

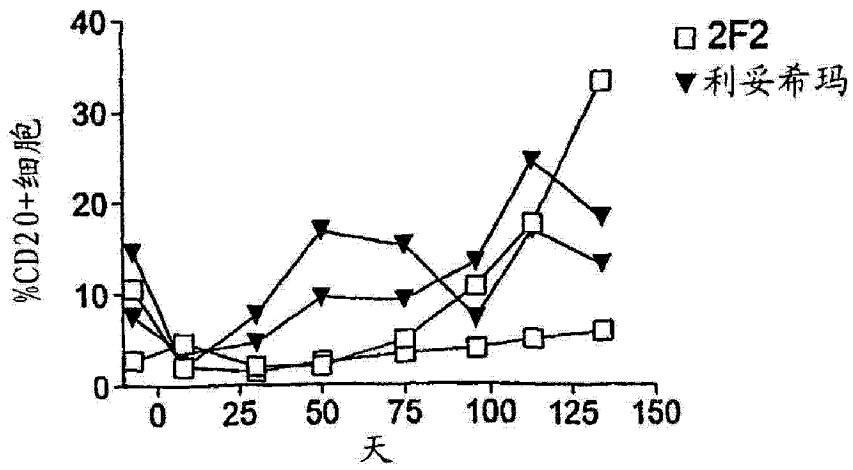


图 46C

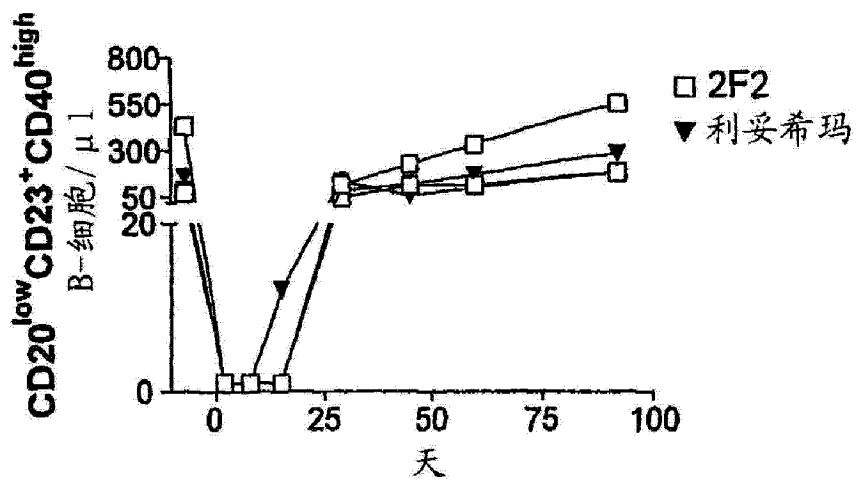


图 47A

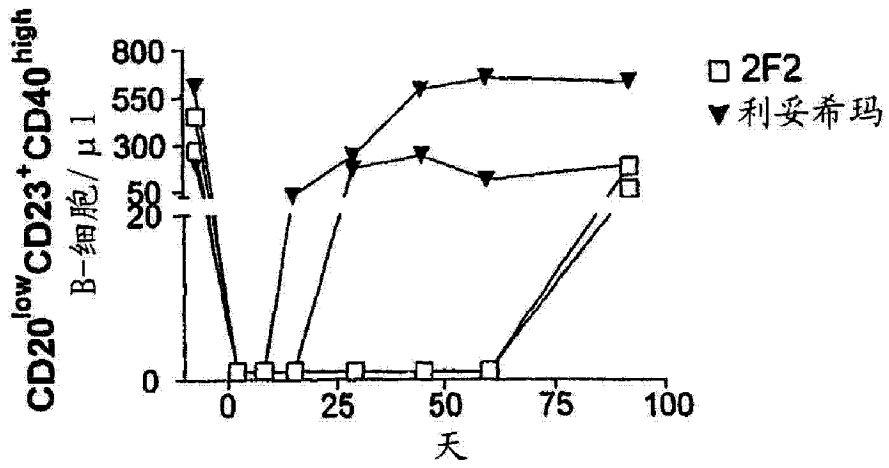


图 47B

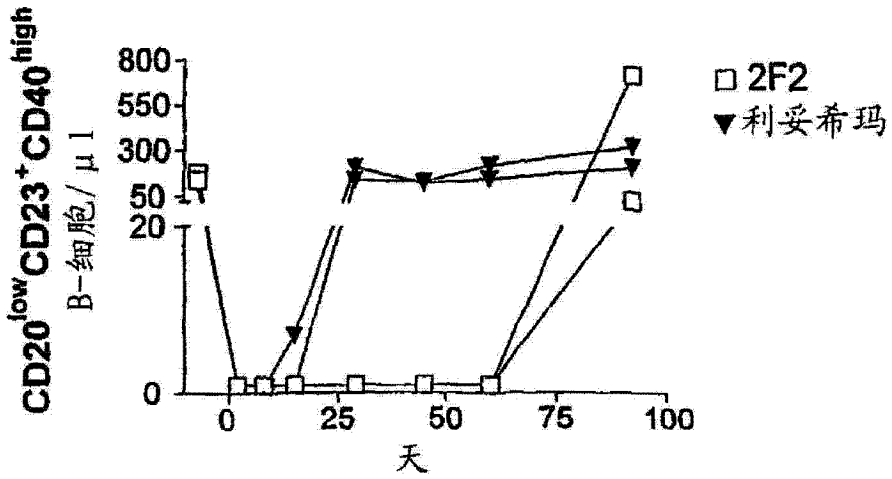


图 47C

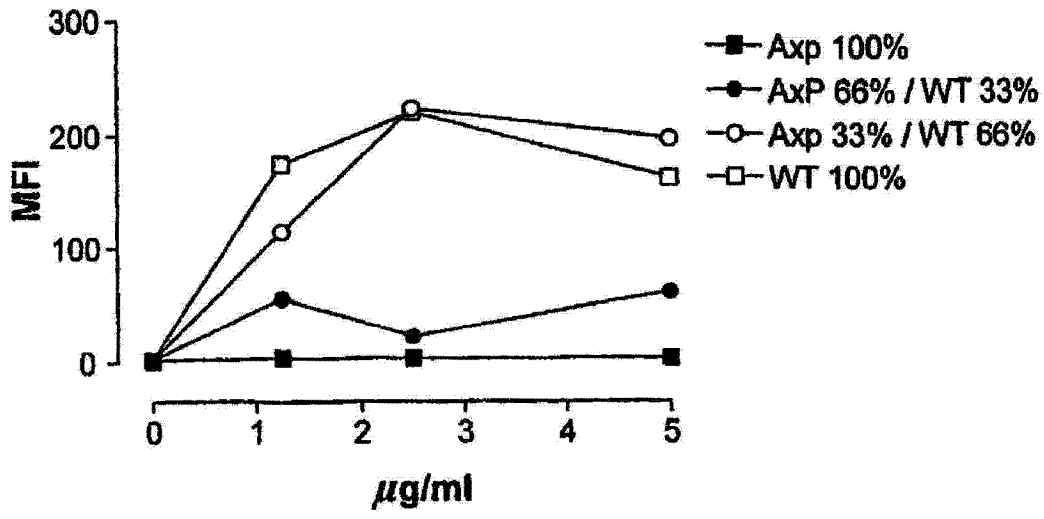


图 48A

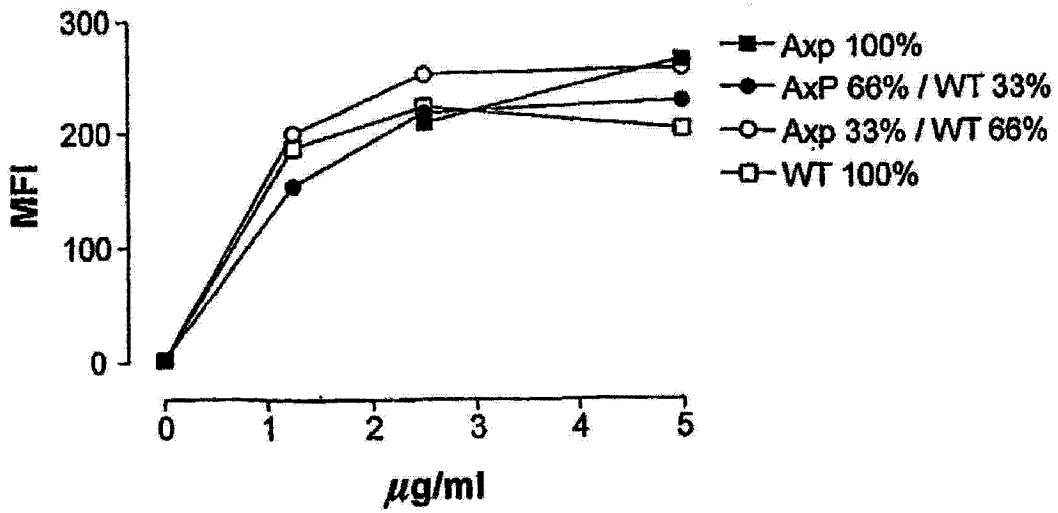


图 48B

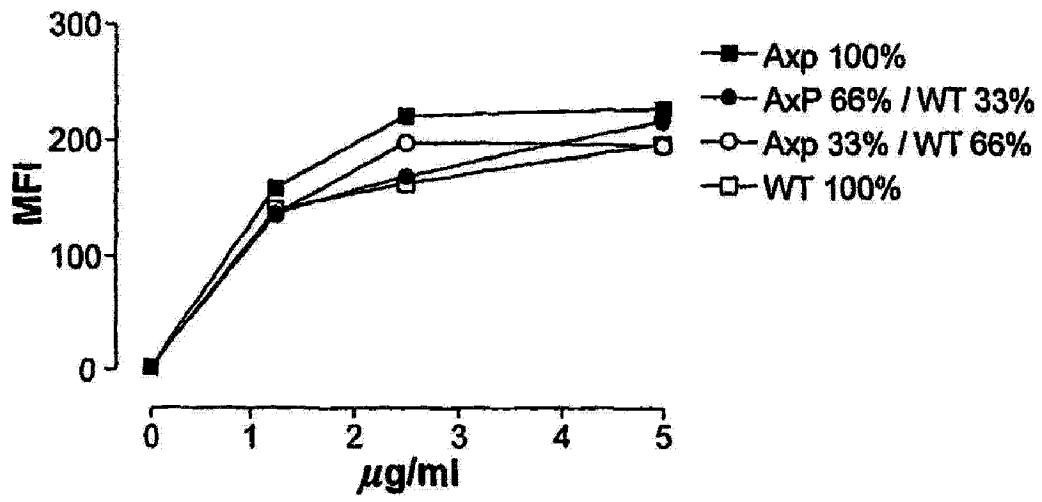


图 48C

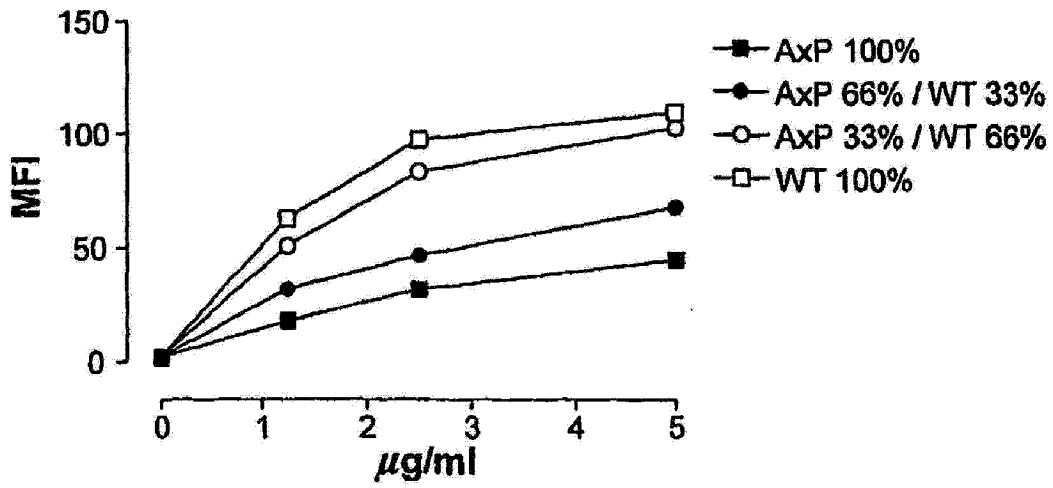


图 48D

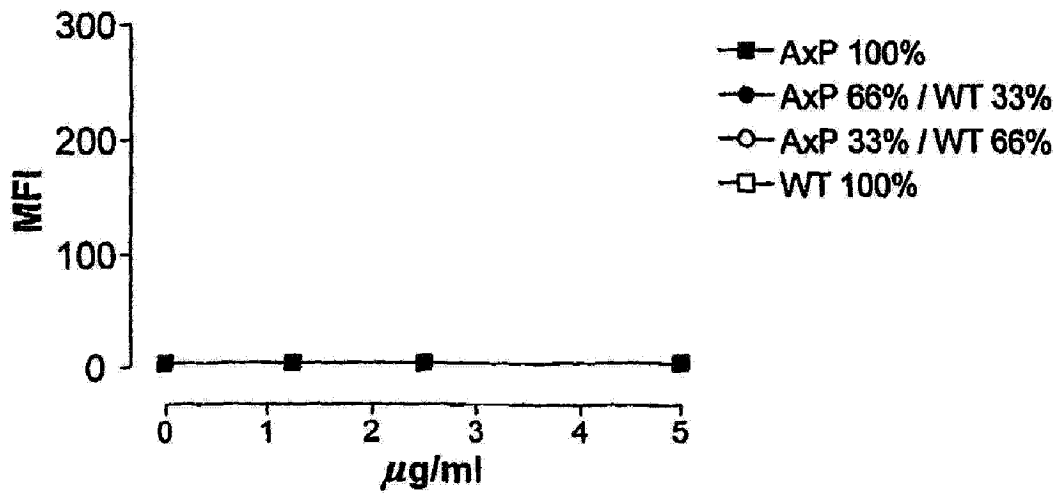


图 48E

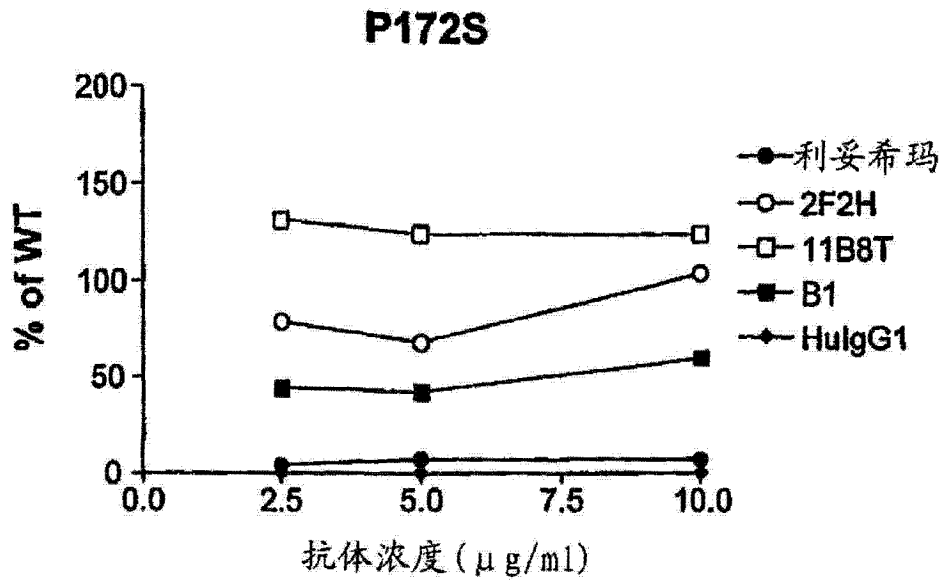


图 49A

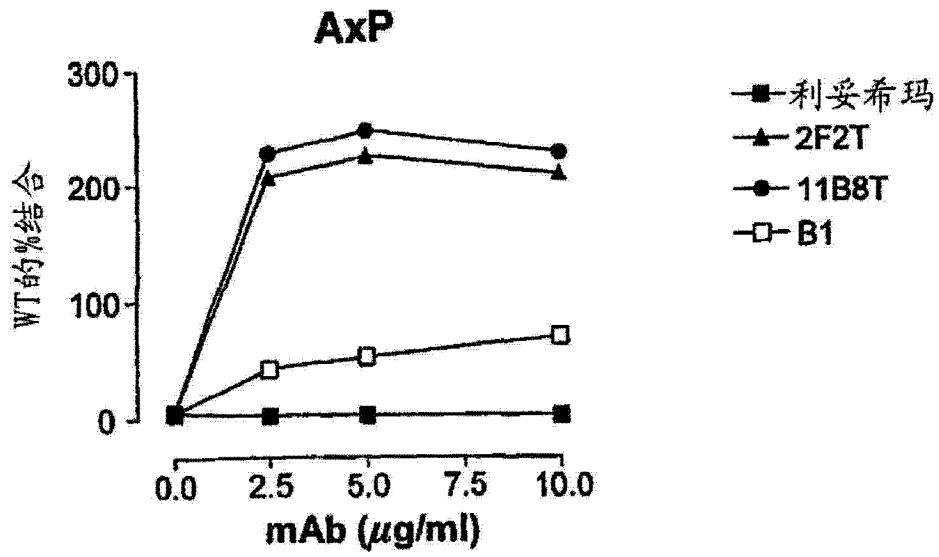


图 49B

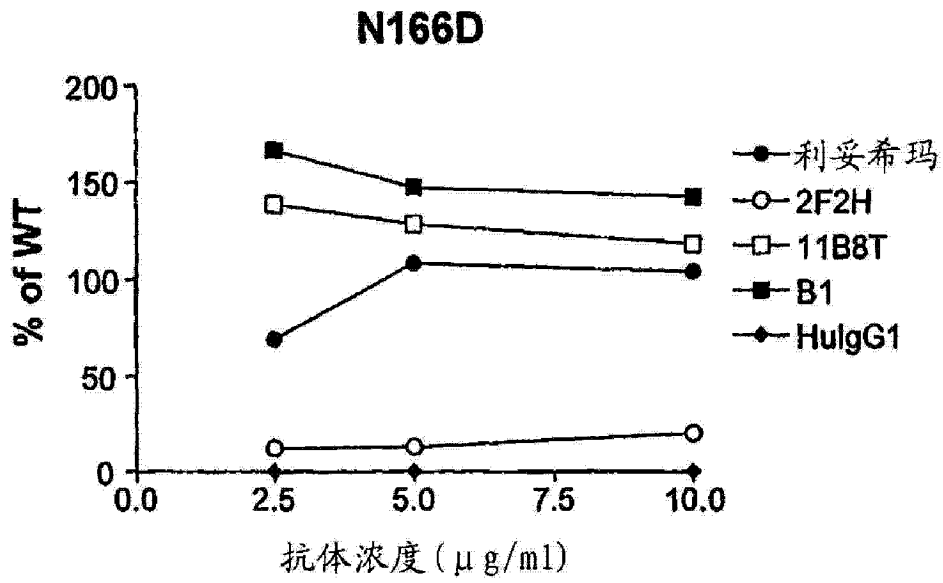


图 49C

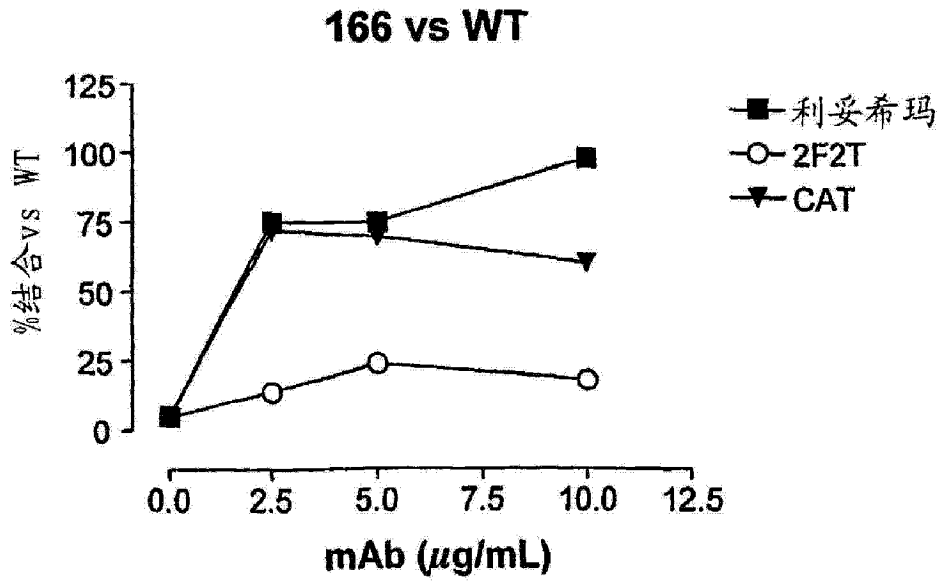


图 49D

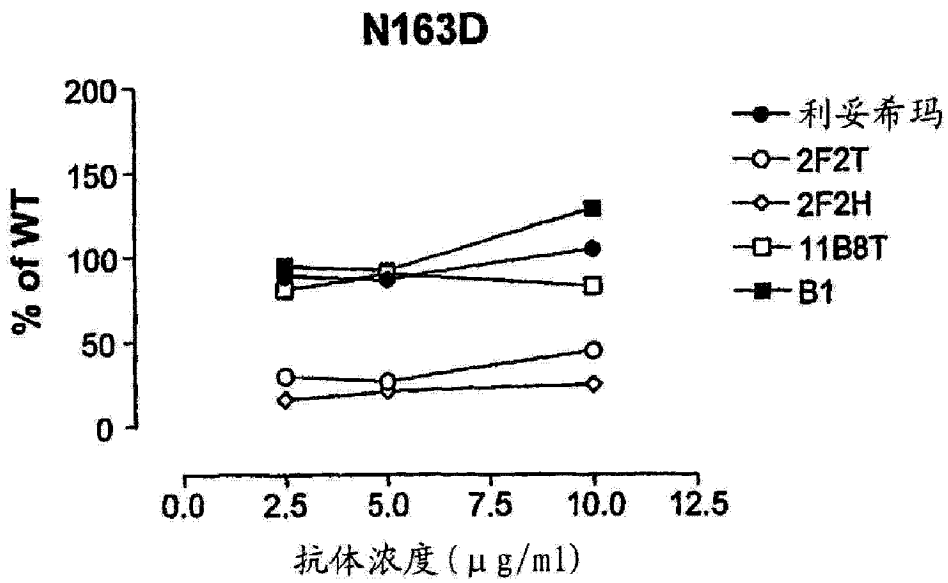


图 49E

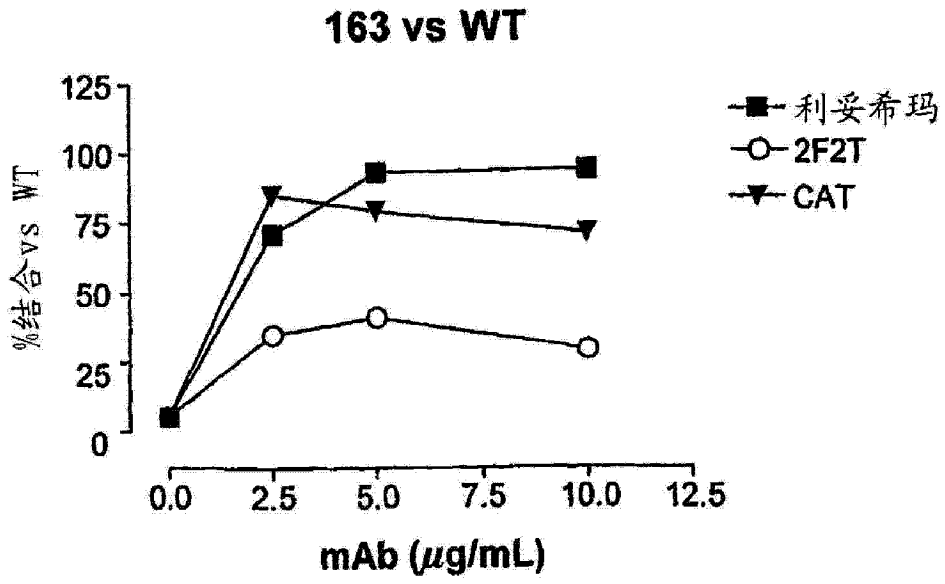


图 49F

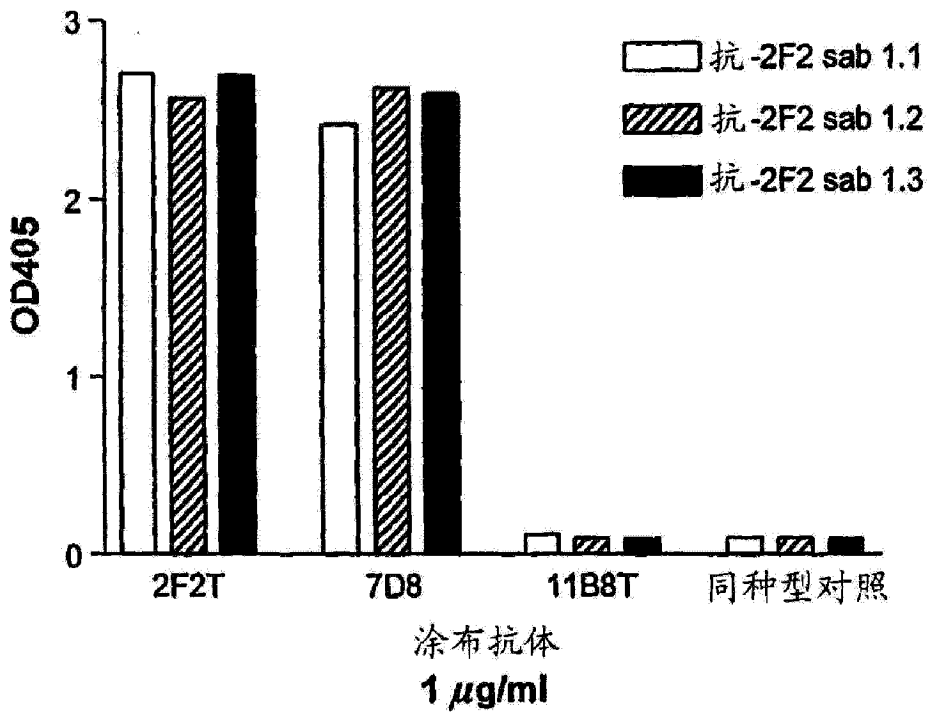


图 50

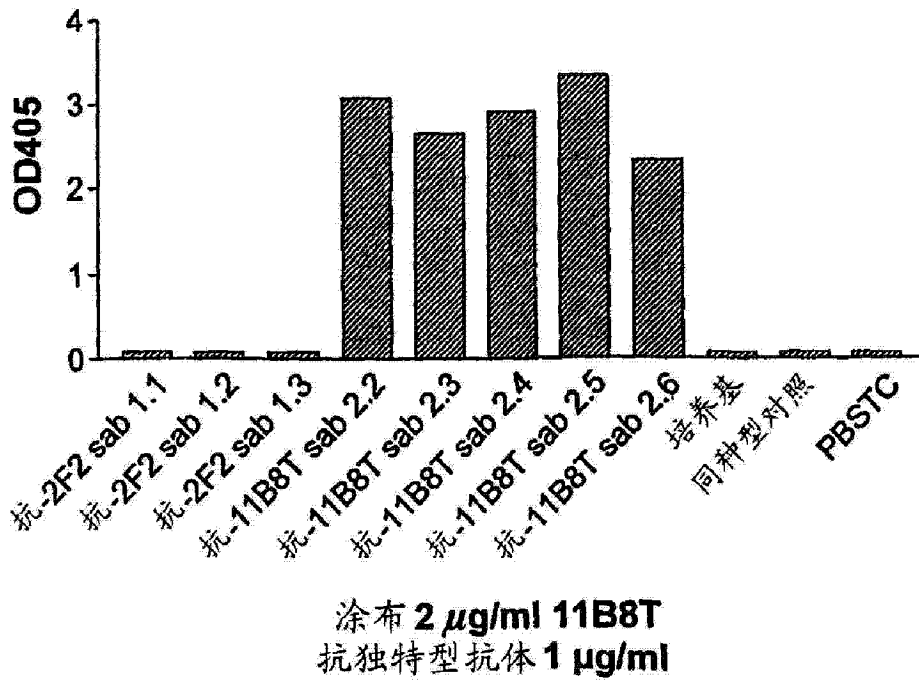


图 51

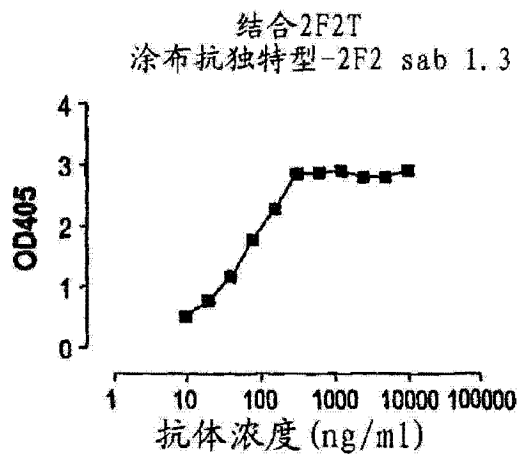
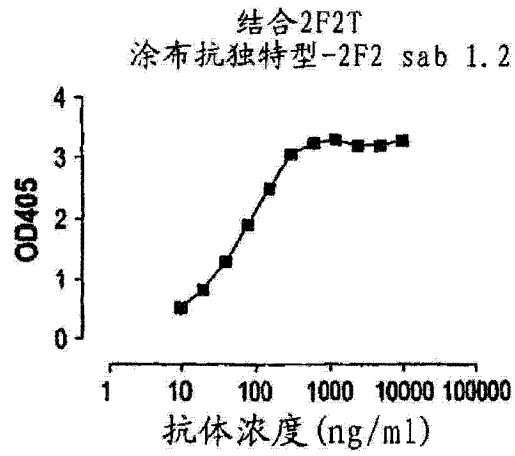
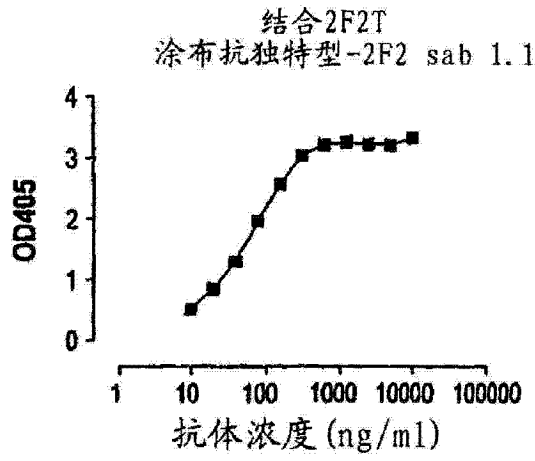


图 52

2F2 VH的翻译

1 MFILGLSWIFL LAILKGVQCE VOLVESGGGL VQGRSLRLS CAASGFTFND
 51 YAMHWVROAP GKLEWVSTI SWNSGSI GYA DSVKGRFTIS RDNAKKSLYL
 101 QMNSLRAEDT ALYYCAKDTQ YGNYYGMDV WGOGTTVTVS S

2F2VL的翻译

1 MEAPAOQLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
 51 SYLAWYQOKP GOAPRLIYD ASNRAIGIPA RFGSGSGTD FTLTISSELP
 101 EDFAVYYCQQ RSNWPELTFGQ GTRLEIK

CDR1
 CDR2
 CDR3

图 53

2F2 VH

```

1  ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCTT TTGGCT ATTTA AAAGG GTCCAG
55  TGTGAA GTGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGA GCCTTG GTACAG CCTGGC AGGTCC
109 CTGAGA CTCCTC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT AATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGAAG GGCCTG GAGTGG GTCICA ACTATT AGTGG
217 AATAGT GGTTC ATAGGC TATGCG GACTCT GTGAG GCCCGA TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAG TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA GCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACCTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGCG CAAGGG ACCACG GTCACC GTCCTC TCAG

```

2F2VL

```

1  ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTTCTC TTCCTC CTGCTA CTCGG CTCCTA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCCTC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GCCCAG GCTCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTG CGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACTGG CCGATC ACCTTC GCCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAAC

```

图 54

7D8VH的翻译

```

1  MELGLSWIFL LAILKGVQCE VOLVESGGGL VOPDRSLRLS CAASGFTFHD
51  YAMHWVROAP GKGLEWVSTI SWNSGTIGYA DSVKGRFTIS RDNAKNSLYL
101 OMNSLRAEDT ALYCAKDTG YGNYXGNDY WGQGTIVTVS S

```

7D8VL的翻译

```

1  MEAPAQLLFL LLLWLPDTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
51  SYLAWYQOKP GOAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTSSLEP
101 EDFAVYCCQQRSNWFTEFGQ GTRLEIK

```

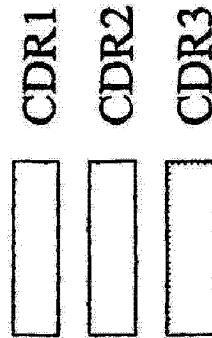


图 55

7D8VH

```

1  ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCTT TTGGCT ATTTTA AAAGGT GTCCAG
55  TGTGAA GTGCAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAG CCTGAC AGGTCC
109 CTGAGA CTCCTC TGTGCA GCCTCT GGATTC ACCTTT CATGAT TATGCC ATGCAC
163 TGGGTC CGGCAA GCTCCA GGAAG GGCCTG GAGTGG GCTCA ACTATT AGTTGG
217 AATAGT GGTACC ATAGGC TATGCC GACTCT GTGAAG GGCCGA TTCACC ATCTCC
271 AGAGAC AACGCC AAGAAC TCCCTG TATCTG CAAATG AACAGT CTGAGA GCTGAG
325 GACACG GCCTTG TATTAC TGTGCA AAAGAT ATACAG TACGGC AACTAC TACTAC
379 GGTATG GACGTC TGGGGC CAAGGG ACCACG GTCACC GTCCTC TCAG

```

7D8VH

```

1  ATGGAA GCCCCA GCTCAG CTTCTC TTCCTC CTGCTA CTCTGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTG ACACAG TCTCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCCTC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GGCCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTG AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC AACTGG CCGATC ACCTTC GGCCAA GGGACA CGACTG GAGATT
379 AAAC

```

图 56

VHCD2011B8的翻译

```

1  MELGLSWVFL VAILKGVQCE VOLVQSGGGL VHPGSLRLS CTGSGFTFSY
51  HAMHWVROAP GKGLEWVSI I GTGGVTYYAD SVKGRFTISR DNVKNSLYLQ
101 MNSLRAEDMA VYICARDYIC AGSFYDGLYG NDVWGOGTTV TVSS

```

VLCD2011B8的翻译

```

1  MEAPAQILFL LLLWLPDTIG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS
51  SYLAWYQOKP GOAPRLLIYD ASNRATGIPA REFSGSGGTD FFLTISSLEP
101 EDFAVYYCQQ RSDWPIIFGG GTKVEIK

```



图 57

VHCD2011B8

```

1  ATGGAG TTGGGG CTGAGC TGGGTT TTCCTT GTTGCT ATATTA AAAGGT GTCCAG
55  TGTGAG GTTCAG CTGGTG CAGICT GGGGGA GGCTTG GTACAT CCI GGG GGGTCC
109 CTGAGA CTCCTC TGTACA GGCTCT GGATTC ACCTTC AGTTAC CATGCT ATGCAT
163 TGGGTT CGCCAG GCTCCA GGAAA GGTCIG GAATGG GTATCA ATTATT GGGACT
217 GGIGGT GTCACA TACTAT GCAGAC TCCGIG AAGGGC CGATTC ACCATC TCCAGA
271 GACAAAT GTC AAG AACTCC TTGTAT CTTCAA ATGAAC AGCCIG AGAGCC GAGGAC
325 ATGGCT GTGTAT TACTGT GCAAGA GATTAC TATGGT GCGGGG AGTTT TATGAC
379 GGCCTC TACGGT ATGGAC GTCIGG GGCCAA GGGACC ACCGTC ACCGTC TCCTCA
433  G

```

VLCD2011B8

```

1  ATGGAA GCCCCA GCACAG CTTCTC TTCCTC CTGCTA CTC TGG CTCCCA GATACC
55  ACCGGA GAAATT GTGTG ACACAG TCITCCA GCCACC CTGTCT TTGTCT CCAGGG
109 GAAAGA GCCACC CTCCTC TGCAGG GCCAGT CAGAGT GTTAGC AGCTAC TTAGCC
163 TGGTAC CAACAG AAACCT GGCCAG GCTCCC AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217 AACAGG GCCACT GGCATC CCAGCC AGGTTT AGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCCT GAAGAT TTTGCA GTTTAT TACTGT
325 CAGCAG CGTAGC GACTGG CCGCTC ACTTTC GCGGGA GGGACC AAGGTG GAGATC
AAC

```

图 58