



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106349390 A

(43)申请公布日 2017.01.25

(21)申请号 201610726305.X	A61K 39/395(2006.01)
(22)申请日 2009.03.25	A61P 35/00(2006.01)
(30)优先权数据	A61P 29/00(2006.01)
61/041,659 2008.04.02 US	A61P 37/02(2006.01)
(62)分案原申请数据	A61P 1/00(2006.01)
200980119622.3 2009.03.25	A61P 17/00(2006.01)
(71)申请人 宏观基因有限公司	A61P 11/06(2006.01)
地址 美国马里兰州	A61P 3/10(2006.01)
(72)发明人 莱斯利·S·约翰逊 菱·黄	A61P 9/14(2006.01)
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所	A61P 19/02(2006.01)
11313	A61P 17/06(2006.01)
代理人 郝文博 王建秀	A61P 25/00(2006.01)
	A61P 37/06(2006.01)

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

权利要求书2页 说明书63页

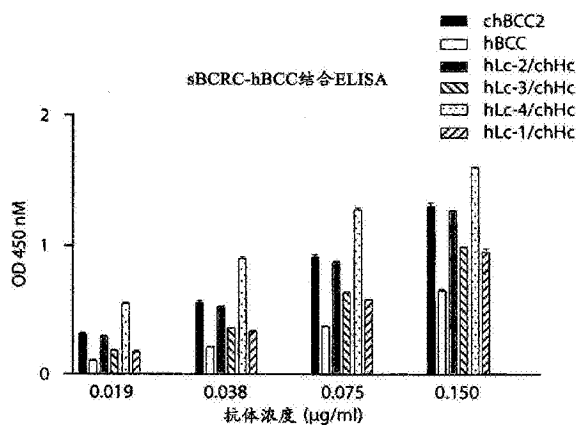
序列表29页 附图4页

(54)发明名称

BCR-复合体-特异性抗体和其使用方法

(57)摘要

本发明涉及特异性结合BCR复合体的嵌合抗体和人源化抗体,并且尤其是BCR复合体的嵌合抗体和人源化抗体。本发明还涉及抗体和包含它们的组合物用于下列疾病的诊断、预后和治疗的方法:例如,癌症、自身免疫疾病、炎症疾患和传染病。



1. 一种多肽,所述多肽结合人B-细胞受体(BCR)复合体,其中所述多肽包含:

(I) 免疫球蛋白轻链可变区(V_L)的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区(V_L)是天然BCR复合体抗体的轻链可变区的(BCC V_L)人源化变体,其中所述免疫球蛋白轻链可变区(V_L)的所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:20;和

(II) 免疫球蛋白重链可变区(V_H)的氨基酸序列,所述免疫球蛋白重链可变区(V_H)是天然BCR复合体抗体的重链可变区(BCC V_H)的人源化变体,其中所述免疫球蛋白重链可变区(V_H)的所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:34。

2. 如权利要求1所述的多肽,其中所述免疫球蛋白轻链可变区(V_L)的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:12。

3. 如权利要求1所述的多肽,其中所述免疫球蛋白轻链可变区(V_L)的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:18。

4. 如权利要求1所述的多肽,其中所述免疫球蛋白轻链可变区(V_L)的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:20。

5. 如权利要求1-4任一项所述的多肽,其中所述免疫球蛋白重链可变区(V_H)的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:24。

6. 如权利要求1-4任一项所述的多肽,其中所述免疫球蛋白重链可变区(V_H)的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:32。

7. 如权利要求1-4任一项所述的多肽,其中所述免疫球蛋白重链可变区(V_H)的所述氨基酸序列是SEQ ID NO:34。

8. 如权利要求1-4任一项所述的多肽,其中所述多肽包含变体Fc结构域,所述变体Fc结构域在所述Fc结构域中包含相对于野生型Fc结构域的至少一个修饰。

9. 如权利要求8所述的多肽,其中所述修饰包含:

(A) 至少一个取代,所述一个取代选自F243L、D270E、R292P、S298N、Y300L、V305I、A330V和P396L;

(B) 至少两个取代,所述两个取代选自:F243L和P396L;F243L和R292P;和R292P和V305I;

(C) 至少三个取代,所述三个取代选自:F243L、R292P和Y300L;F243L、R292P和V305I;F243L、R292P和P396L;和R292P、V305I和P396L;

(D) 至少四个取代,所述四个取代选自:F243L、R292P、Y300L和P396L;和F243L、R292P、V305I和P396L;或

(E) 至少F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L取代。

10. 如权利要求9所述的多肽,其中所述变体Fc结构域与野生型Fc结构域相比表现出改变的效应子功能,其中所述改变的效应子功能选自由下列组成的组:

(A) 增强的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)功能;

(B) 增强的补体依赖性细胞毒性(CDC)功能;

(C) 与野生型Fc结构域相比与激活性Fc γ R的增加的结合;

(D) 与野生型Fc结构域相比与Fc γ RIIB的降低的结合;或者

(E) 与野生型Fc结构域相比与Fc γ RIIB的增加的结合。

11. 如权利要求1-4任一项所述的多肽,其中所述多肽是F(ab')₂片段、单克隆抗体、F

(ab) 片段、单链抗体或双抗体。

12. 如权利要求11所述的多肽,其中所述多肽与异源多肽可操作地连接。

13. 编码如权利要求1-4任一项所述的多肽的多核苷酸。

14. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-12任一项所述的多肽和药学上可接受的载体。

15. 如权利要求1-12任一项所述的多肽在制备用于治疗癌症或自身免疫疾病或免疫介导的炎性疾病的药物中的用途。

16. 如权利要求15所述的用途,其中所述癌症是造血性癌症。

17. 如权利要求15所述的用途,其中所述自身免疫疾病或免疫介导的炎性疾病选自由下列组成的组:克罗恩病、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、1型糖尿病、血管炎;哮喘、湿疹和特发性皮炎、纤维化、移植排斥、移植物抗宿主病和炎性肠病。

18. 如权利要求15所述的用途,其中所述药物另外包含第二治疗剂。

BCR-复合体-特异性抗体和其使用方法

[0001] 本申请是PCT申请号为PCT/US2009/038171,发明名称为“BCR-复合体-特异性抗体和其使用方法”的PCT申请进入中国国家阶段后申请号为200980119622.3的中国国家阶段申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2008年4月2日提交的美国专利申请系列第61/041,659号(待决)的优先权,通过引用将其整体并入本文。

[0004] 序列表的引用:

[0005] 根据37C.F.R.1.821以及其下列,本申请包含一个或多个序列表,它们已在纸件和计算机可读介质中公开,并且所述纸件和计算机可读公开内容通过引用整体并入本文。

[0006] 发明背景

发明领域

[0007] 本发明涉及特异性结合BCR复合体的嵌合抗体和人源化抗体,并且尤其是BCR复合体的嵌合抗体和人源化抗体。本发明还涉及抗体和包含它们的组合物用于下列疾病的诊断、预后和治疗的方法:例如,癌症、自身免疫疾病、炎症疾患和传染病。

[0008] 相关技术说明

[0009] B细胞受体 (BCR) & BCR复合体

[0010] B细胞是负责产生抗体的免疫系统细胞。B细胞对抗原的反应是正常免疫系统的基本组成。B细胞拥有特化的细胞表面受体 (B细胞受体;“BCR”)。如果B细胞遇到能够结合该细胞的BCR的抗原,则B细胞将被刺激而增殖并产生对所结合的抗原特异性的抗体。为了产生对抗原的有效反应,还需要BCR相关蛋白和T辅助细胞。抗原/BCR复合体是内化的,并且抗原被蛋白水解加工。一小部分的抗原保持与B细胞表面上的主要组织相容性复合体-II (“MHCII”) 分子复合,这时复合体可以被T细胞识别。被这种抗原呈递激活的T细胞分泌诱导B细胞成熟的多种淋巴因子。

[0011] 通过BCR进行的信号传导在产生抗体、自身免疫性和免疫耐受的建立中起重要的作用 (Gauld等人 (2002) Science 296 (5573):1641-1642)。仍在骨髓中的结合自身抗原的未成熟的B细胞被凋亡清除。相反,结合在成熟B细胞上的抗原导致激活、增殖、无反应性和凋亡。观察到的具体功能反应取决于B细胞是否接收到通过其它表面受体的共刺激信号和激活的特定信号转导途径。

[0012] BCR由膜免疫球蛋白与非共价缔合的CD79的 α 和 β 亚基(分别为“CD79a”和“CD79b”)一起形成BCR复合体而构成。CD79a和CD79b是信号转导亚基,它们含有信号转导所需的保守的基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (“ITAM”) (Dy1ke等人 (2007) Immunol.Lett.112 (1):47-57;Cambier (1995) Immunol.Today 16:110)。多价抗原引起的BCR复合体聚集启动CD79a和CD79b ITAM的转磷酸作用以及受体相关激酶的激活 (DeFranco (1997) Curr.Opin.Immunol.9:296-308;Kurosaki (1997) Curr.Opin.Immunol.9:309-318;Kim等人 (1993) Immun.Rev.132:125-146)。磷酸化的ITAM募集其他的效应子,例如PI₃K、PLC- γ 和

Ras/MAPK途径的成员。这些信号传导事件负责B细胞增殖和激活标记物(例如MHCII和CD86)的表达增加,这些是初免B细胞以便它们随后与T-辅助(“T_h”)细胞相互作用所需的。

[0013] CD79表达限制在B细胞中并且在非霍奇金淋巴瘤细胞(NHL)中表达(Olejniczak等人(2006) *Immunol. Invest.* 35:93-114; D' Arena等人(2000) *Am. J. Hematol.* 64:275-281; Cabezudo等人(1999) *Haematologica* 84:413-18)。CD79a和CD79b以及可溶性免疫球蛋白(“sIg”)全部都是CD79的表面表达所需要的。NHL上的CD79b的平均表面表达与在正常B细胞上所观察到的类似,但是具有更大的范围(Matsuuchi等人(2001) *Curr. Opin. Immunol.* 13(3):270-277)。慢性淋巴细胞性白血病细胞中的CD79b表达与免疫球蛋白重链基因中的突变相关,但是似乎不充当临床严重程度的独立预测(Cajiao等人(2007) *Am. J. Hematol.* 82(8):712-720)。CD79a和CD79b均参与非抗原依赖性(强直的(tonic))和抗原依赖性的BCR信号传导(Fuentes-Pananá等人(2006) *J. Immunol.* 177(11):7913-7922)。

[0014] 已显示结合BCR复合体的抗体(“抗-BCR复合体抗体”)通过引起BCR解离或通过阻抑(下调)BCR功能而破坏BCR信号传导(参见,例如美国专利第6,503,509号;Polson等人(2007) *Blood* 110(2):616-623;Zhang等人(1995) *Ther. Immunol.* 2(4):191-202)。阻抑一般是更可取的,因为它避免了可能不期望的B细胞损耗和所引起的副作用。这种抗-BCR复合体抗体在自身免疫疾病、癌症、炎性疾病和移植的治疗中具有治疗用途。然而,由于人免疫系统攻击抗-BCR复合体鼠抗体,因此其使用引发减少的人抗-小鼠抗体(“HAMA”)反应的改进的抗体是期望的。同样,表现出改善的结合亲和力或改变的效应子功能的抗-BCR复合体抗体是期望的。

[0015] Fc受体

[0016] 抗体-抗原复合体与免疫系统的细胞的相互作用导致了广泛的一系列的反应,其范围从效应子功能如抗体依赖性细胞毒性、肥大细胞脱颗粒和吞噬作用到免疫调节信号,如调节淋巴细胞增殖和抗体分泌。所有这些相互作用均是通过抗体或免疫复合体的Fc结构域与Fc受体的结合启动的,Fc受体是造血细胞上的特化的细胞表面受体。由抗体和免疫复合体所触发的细胞反应的多样性是由Fc受体的结构不均一性产生的。Fc受体共同拥有结构上相关的配体结合结构域,该结构域大概介导细胞内信号传导。

[0017] 免疫球蛋白基因超家族的蛋白成员Fc受体是可以结合免疫球蛋白分子的Fc部分的表面糖蛋白。该家族的每个成员通过Fc受体的 α 链上的识别结构域识别一种或多种同种型的免疫球蛋白。Fc受体是由他们对免疫球蛋白亚型的特异性定义的。IgG的Fc受体称为“Fc γ R”,IgE的Fc受体称为“Fc ϵ R”并且IgA的Fc受体称为“Fc α R”。不同的佐细胞拥有不同同种型抗体的Fc受体,并且抗体的同种型决定了哪些佐细胞将参与给定的反应(Billadeau等人(2002) *J. Clin. Investigat.* 2(109):161-81;Gerber等人(2001) *Microbes Infection* 3:131-139;Ravetch等人(2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-90;Ravetch等人(2000) *Science* 290:84-89;Ravetch(1994) *Cell* 78(4):553-560;Ravetch等人(1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492;还参见, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (免疫生物学:健康与疾病中的免疫系统)(第4版,1999年), Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York)。各种受体的总括呈现在表1中。

表 1

免疫球蛋白同种型的 Fc 区的受体

受体	结合	细胞类型	接合的作用
FcγRI (CD64)	IgG1 10^8 M^{-1}	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞 树突细胞	摄取 刺激 呼吸爆发激活 杀伤诱导
FcγRII-A (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞 树突细胞 血小板 朗格汉斯细胞	摄取 颗粒释放
FcγRII-B1 (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	B 细胞 肥大细胞	不摄取 刺激抑制
FcγRII-B2 (CD32)	IgG1 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞	摄取 刺激抑制
FcγRIII	IgG1	NK 细胞	杀伤诱导

[0018]

[0019]

表 1 免疫球蛋白同种型的 Fc 区的受体			
受体	结合	细胞类型	接合的作用
(CD16)	$5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	嗜酸性粒细胞 巨噬细胞 嗜中性粒细胞 肥大细胞	
FcεRI	IgE 10^{10} M^{-1}	肥大细胞 嗜酸性粒细胞 嗜碱性粒细胞	颗粒分泌
FcαRI (CD89)	IgA1、IgA2 10^7 M^{-1}	巨噬细胞 嗜中性粒细胞 嗜酸性粒细胞	摄取 杀伤诱导

[0020] 每个 Fc γ 受体 (“Fc γ R”) 是整合膜糖蛋白, 具有与 C2-set 免疫球蛋白相关结构域相关的胞外结构域、单个跨膜结构域和长度可变的胞质内结构域。有四种已知的 Fc γ R, 它们称为 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16) 和 Fc γ RIV。受体由不同的基因编码; 然而, 家族成员之间的广泛同源性表明它们可能通过基因复制由共同的祖先产生。

[0021] 激活和抑制信号二者都是在接合之后通过 Fc γ R 转导的。这些完全相反的功能是由不同受体亚型之间的结构差异引起的。受体的胞质信号传导结构域内的两种不同的结构域负责不同的反应, 这两种不同的结构域称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序 (ITAM) 或基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM)。不同的胞质酶向这些结构的募集指示 Fc γ R-介导的细胞反应的结果。含 ITAM 的 Fc γ R 复合体包括 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA 和 Fc γ RIV, 而含 ITIM 的复合体仅包括 Fc γ RIIB。

[0022] Fc γ RI 表现出对抗体恒定区的高亲和力和有限的同种型特异性 (Hulet 和 Hogarth (1994) Adv Immunol 57:1-127)。Fc γ RII 蛋白是 40KDa 的整合膜糖蛋白, 它由于对单体 Ig 的低亲和力 (10^6 M^{-1}) 而只结合复合的 IgG。这种受体是表达最广泛的 Fc γ R, 它存在于所有造血细胞上, 包括单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、NK 细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞和血小板。Fc γ RII 在其免疫球蛋白结合链上仅具有两个免疫球蛋白样区, 因此与 Fc γ RI 相比, 它对 IgG 的亲和力低得多。有三种已知的人 Fc γ RII 基因 (Fc γ RII-A、Fc γ RII-B、Fc γ RII-C), 它们全部都与 IgG 结合成聚集体或免疫复合体。人嗜中性粒细胞表达 Fc γ RIIA 基因。Fc γ RIIB 基因在 B 淋巴细胞上表达; 它的胞外结构域与 Fc γ RIIA 96% 相同并且以不能辨别的方式结合 IgG 复合体。

[0023] Fc γ RII-A 与 Fc γ RII-B 的胞质结构域内的明显不同产生了对受体接合的两种功

能上不均一的反应。 $\text{Fc}\gamma\text{RII-A}$ 亚型启动导致细胞激活的细胞内信号传导,如吞噬作用和呼吸爆发,而 $\text{Fc}\gamma\text{RII-B}$ 亚型启动抑制性信号,例如,抑制B细胞激活。经由免疫复合物或特异性抗体交联的 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 群集用于将ITAM与促进ITAM磷酸化的受体相关激酶聚集在一起。ITAM磷酸化充当Syk激酶的停靠位点,Syk激酶的激活导致下游底物(例如,PI3K)的激活。细胞激活导致促炎性介质的释放。当与具有ITAM的激活性 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 如 $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 或 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 一起共接合或共聚集时, $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 中的ITIM被磷酸化并且募集含src同源2的肌醇磷酸酶(SHIP)的SH2结构域,肌醇磷酸酶继而被磷酸化并与Shc缔合(Ott(2002) *J. Immunol.* 162(9):4430-4439; Yamanshi等人(1997) *Cell* 88:205; Carpino等人(1997) *Cell* 88:197)。SHIP水解作为含ITAM的 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -介导的酪氨酸激酶激活的结果而释放的磷酸肌醇信使,从而阻止胞内 Ca^{++} 的流入,并且减缓对 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 接合的细胞反应。因此,B细胞激活、B细胞增殖和抗体分泌被中止并且 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -介导的吞噬作用被下调(Tridandapani等人(2002) *J. Biol. Chem.* 277(7):5082-89)。

[0024] 具体地, $\text{Fc}\gamma\text{RIIA}$ 与 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 的共聚集导致了Akt磷酸化的下调,Akt是参与细胞调节并用于抑制凋亡的丝氨酸-苏氨酸激酶,并且肥大细胞中 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 与高亲和力IgE受体 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 的共聚集导致抗原诱导的脱粒、钙动员和细胞因子产生的抑制(Long(1999) *Annu Rev. Immunol.* 17:875; Metcalfe等人(1997) *Physiol. Rev.* 77:1033)。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 和B细胞受体(BCR)的共聚集导致BCR介导的信号传导的抑制以及细胞周期进展和细胞存活的抑制。尽管 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 介导的BCR信号传导抑制的大量效应子功能是通过SHIP介导的,最近已证明来自SHIP缺陷型小鼠的脂多糖(LPS)激活的B细胞表现出显著的 $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ 介导的钙动员、 $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 产生以及Erk和Akt磷酸化的抑制(Brauweiler等人(2001) *Journal of Immunology* 167(1):204-211)。

[0025] 在小鼠和人类中, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 的大小由于此类别中的不均一性而介于40与80kDa之间。两种人基因编码两种转录物,整合膜糖蛋白 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 和糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接的形式 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ 。一种鼠基因编码与跨膜的人 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 同源的 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 。 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 具有与其他两种 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 的每一种相同的结构特征。如同 $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ 一样, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 以低亲和力结合IgG并且含有相应的两个胞外Ig样结构域。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIA}$ 在巨噬细胞、肥大细胞中表达,并且是NK细胞中唯一的 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 。目前已知GPI-连接的 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ 仅在人嗜中性粒细胞中表达。

[0026] $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ (也称为 mFcRIV)需要 $\text{Fc}\gamma\text{R}\gamma$ -链的缔合以便最佳地表达并对髓样细胞起作用;它的信号传导潜能还被募集衔接子分子Crk-L和磷脂酰肌醇-3-OH激酶的胞质“YEEP”基序增强。 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 优先结合b同种异型的免疫球蛋白E抗体(IgEb)以及IgG2a和IgG2b抗体。抗原-IgEb免疫复合物对 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 的接合促进巨噬细胞介导的吞噬作用、抗原呈递至T细胞、促炎性细胞因子的产生和晚期的皮肤过敏反应(Hirano等人(2007) *Nature Immunology* 8:762-771)。 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 是最近鉴定的受体,它在所有的哺乳动物物种中是保守的,具有居中的亲和力和有限的亚类特异性(Nimmerjahn等人(2005) *Immunity* 23:41-51; Mechetina等人(2002) *Immunogenetics* 54:463-468; Davis等人(2002) *Immunol Rev* 190:23-36)。 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 和 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 是用于介导细胞毒性抗体或病原免疫复合物所触发的炎症疾病的生理上重要的激活 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 。 $\text{Fc}\gamma\text{RIV}$ 存在于树突细胞、巨噬细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞上。

[0027] 除了所有的这些进展之外,仍然需要在自身免疫病、癌症、炎症疾病和/或移植的治疗中具有治疗用途并且表现出介导Fc受体的效应子功能的改善的能力的抗BCR复合物抗

体。本发明针对于这种和其他的需要。

[0028] 发明概述

[0029] 本发明的实施方案提供具有轻链可变结构域(V_L)的多肽,所述轻链可变结构域包含人源化BCC V_L或嵌合BCC V_L,所述人源化BCC V_L或嵌合BCC V_L具有在Kabat残基37处的亮氨酸或在Kabat残基45处的赖氨酸或天冬酰胺;选自由:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:20组成的组的氨基酸序列;或SEQ ID NO:37的氨基酸序列。本发明的其他实施方案提供具有重链可变结构域(V_H)的多肽,所述重链可变结构域包含人源化BCC V_H或嵌合BCC V_H,所述人源化BCC V_H或嵌合BCC V_H具有下列修饰的一种或多种:M48I、M62K、K66R、A67V、L69M、V71T和K73T;选自由下列组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36;或SEQ ID NO:38的氨基酸序列。其他实施方案提供具有轻链可变结构域和重链可变结构域的多肽的组合。

[0030] 多肽可以是抗体,并且可以特异性地结合人BCR复合体。多肽包含含有一种或多种修饰的变体Fc结构域,所述修饰赋予多肽表型改变,包括改变的效应子功能、增加或降低的与Fc γ R的结合等。本发明的实施方案还提供了编码所述多肽和抗体的多核苷酸、包含所述多核苷酸的载体和包含所述载体的宿主细胞。还提供了制备所述多肽和抗体的方法以及治疗各种疾病和疾患的方法。

[0031] 详细地,本发明提供结合人BCR复合体的多肽,其中所述多肽包含免疫球蛋白轻链可变区(V_L)的氨基酸序列,所述免疫球蛋白轻链可变区为包含下列的BCC V_L的人源化变体:

[0032] (A) 在Kabat残基37处的修饰;

[0033] (B) 在Kabat残基45处的修饰;或

[0034] (C) (A) 和 (B) 两者。

[0035] 本发明还提供其中BCC V_L的人源化变体具有下列特征的这种多肽的实施方案:

[0036] (A) 在Kabat残基37处的亮氨酸取代;

[0037] (B) 在Kabat残基45处的赖氨酸或天冬酰胺取代;或

[0038] (C) (A) 和 (B) 两者。

[0039] 本发明还提供其中BCC V_L的人源化变体具有在Kabat残基37处的亮氨酸和在Kabat残基45处的赖氨酸的这种多肽的实施方案。

[0040] 本发明还提供其中人源化变体BCC V_L具有在Kabat残基37处的亮氨酸和在Kabat残基45处的天冬酰胺的这种多肽的实施方案。

[0041] 本发明还提供其中所述多肽包含选自由下列组成的组的氨基酸序列的这种多肽的实施方案:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:20。

[0042] 本发明另外提供结合人BCR复合体的多肽,其中所述多肽包含免疫球蛋白重链可变区(V_H)的氨基酸序列,所述免疫球蛋白重链可变区是BCC V_H的人源化变体,所述变体包含在Kabat残基48、62、66、67、68、69、70、71和73的一处或多处的修饰。

[0043] 本发明还提供其中BCC V_H的人源化变体包含选自由下列组成的组的一种或多种修饰的这种多肽的实施方案:

[0044] (A) 在Kabat残基48处的异亮氨酸取代;

- [0045] (B) 在Kabat残基62处的赖氨酸取代;
- [0046] (C) 在Kabat残基66处的赖氨酸取代;
- [0047] (D) 在Kabat残基67处的丙氨酸取代;
- [0048] (E) 在Kabat残基69处的亮氨酸取代;
- [0049] (F) 在Kabat残基71处的缬氨酸取代;和
- [0050] (G) 在Kabat残基73处的赖氨酸取代。
- [0051] 本发明还提供其中所述多肽包含选自由下列组成的组的氨基酸序列的这种多肽的实施方案:SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36。
- [0052] 本发明还提供其中所述多肽是单链抗体或双体(diabody)的所有这些多肽的实施方案。
- [0053] 本发明还提供包含至少两个抗体可变结构域的多肽:
- [0054] (I) 其中所述抗体可变结构域的第一个是轻链可变结构域(V_L),所述轻链可变结构域是包含下列的BCC V_L的人源化变体:
- [0055] (A) 在Kabat残基37处的修饰;
- [0056] (B) 在Kabat残基45处的修饰;或
- [0057] (C) (A) 和(B)两者;并且
- [0058] (II) 其中所述抗体可变结构域的第二是重链可变结构域(V_H),所述重链可变结构域是BCC V_H的人源化变体,所述变体包含在Kabat残基48、62、66、67、68、69、70、71和73的一处或多处的修饰。
- [0059] 本发明还提供其中特征如下的这种多肽的实施方案:
- [0060] (I) 第一抗体可变结构域包含:
- [0061] (A) 在Kabat残基37处的亮氨酸取代;
- [0062] (B) 在Kabat残基45处的赖氨酸或天冬酰胺取代;或
- [0063] (C) (A) 和(B)两者;并且
- [0064] (II) 第二抗体可变结构域包含选自由下列组成的组的一种或多种修饰:
- [0065] (A) 在Kabat残基48处的异亮氨酸取代;
- [0066] (B) 在Kabat残基62处的赖氨酸取代;
- [0067] (C) 在Kabat残基66处的赖氨酸取代;
- [0068] (D) 在Kabat残基67处的丙氨酸取代;
- [0069] (E) 在Kabat残基69处的亮氨酸取代;
- [0070] (F) 在Kabat残基71处的缬氨酸取代;和
- [0071] (G) 在Kabat残基73处的赖氨酸取代。
- [0072] 本发明还提供其中特征如下的这种多肽的实施方案:
- [0073] (I) 第一抗体可变结构域包含选自由下列组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:20;
- [0074] (II) 第二抗体可变结构域包含选自由下列组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36。

[0075] 本发明还提供其中第一抗体可变结构域包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列并且第二抗体可变结构域包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列的这种多肽的实施方案。

[0076] 本发明还提供其中所述多肽是抗体的这种多肽的实施方案,并且具体地,其中这种抗体包含变体Fc结构域,所述变体Fc结构域与野生型Fc结构域相比包含在Fc结构域中的至少一种修饰。

[0077] 本发明还提供这种多肽的实施方案,其中所述修饰包括:

[0078] (A) 选自由下列组成的组的至少一个取代:F243L、D270E、R292P、S298N、Y300L、V305I、A330V和P396L;

[0079] (B) 选自由下列组成的组的至少两个取代:F243L和P396L;F243L和R292P;以及R292P和V305I;

[0080] (C) 选自由下列组成的组的至少三个取代:F243L、R292P和Y300L;F243L、R292P和V305I;F243L、R292P和P396L;以及R292P、V305I和P396L;

[0081] (D) 选自由下列组成的组的至少四个取代:F243L、R292P、Y300L和P396L;以及F243L、R292P、V305I和P396L;或

[0082] (E) 至少F243L、R292P、Y300L、V305I和P396取代。

[0083] 本发明还提供其中变体Fc结构域与野生型Fc结构域相比表现出改变的效应子功能的这种多肽的实施方案,其中所述改变的效应子功能选自由下列组成的组:

[0084] (A) 增强的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)功能;

[0085] (B) 增强的补体依赖性细胞毒性(CDC)功能;

[0086] (C) 与野生型Fc结构域相比与激活性Fc γ R的结合增加;

[0087] (D) 与野生型Fc结构域相比与Fc γ RIIB的结合降低;或者

[0088] (E) 与野生型Fc结构域相比与Fc γ RIIB的结合增加。

[0089] 本发明还提供其中所述抗体是F(ab')₂片段、单克隆抗体、F(ab)片段、单链抗体或双体,和/或所述抗体与异源多肽可操作地连接的这种抗体的实施方案。

[0090] 本发明还提供编码上述多肽的任一种的多核苷酸。

[0091] 本发明还包括上述多肽的任一种在制备用于治疗癌症(尤其是造血性癌症,如淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤)、白血病或骨髓瘤)或治疗自身免疫疾病或免疫介导的炎性疾病(具体地,克罗恩病、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、1型糖尿病、血管炎、哮喘、湿疹和特应性皮炎、纤维化、移植排斥、移植物抗宿主病和炎性肠病)的药物中的用途。

[0092] 本发明还包括其中所述药物用于治疗癌症的这种用途的实施方案,并且所述治疗包括与抗体同时或顺序施用第二治疗剂的步骤。

[0093] 本发明还涉及治疗患者的癌症(尤其是造血性癌症,如淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤)、白血病或骨髓瘤)的方法,所述方法包括给患者施用治疗有效量的任何上述抗体。本发明另外涉及其中所述治疗包括与抗体同时或顺序施用第二治疗剂的步骤的这种方法的实施方案,并且具体地其中所述第二治疗剂选自抗血管发生剂、抗肿瘤剂(anti-neoplastic agent)、化疗剂和细胞毒性剂。

[0094] 本发明还涉及治疗患者的自身免疫疾病或免疫介导的炎性疾病(具体地,克罗恩病、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、1型糖尿病、血管炎、哮喘、湿疹

和特应性皮炎、纤维化、移植排斥、移植物抗宿主病和炎性肠病)的方法,所述方法包括给患者施用治疗有效量的任何上述抗体。

[0095] 本发明的其他优点和特征将通过下列详细说明、附图和说明本发明的优选实施方案的实施例而明显可见。

[0096] 附图简述:

[0097] 图1描绘比较本发明的嵌合BCC1抗体(SEQ ID NO:37)和人源化BCC2抗体(SEQ ID NO:10)与天然BCC2抗体(SEQ ID NO:6)的轻链可变区的比对。突出为灰色的残基表示与共有序列不同的残基;Kabat 37和45以粗体和下划线显示(编号在序列下面)。

[0098] 图2是描绘本发明的人源化BCC2抗体的轻链和重链中的多个修饰的残基的图。

[0099] 图3描绘比较本发明的嵌合BCC1抗体(SEQ ID NO:38)和人源化BCC2抗体(SEQ ID NO:22)与天然BCC2抗体(SEQ ID NO:8)的重链可变区的比对。突出为灰色的残基表示与共有序列不同的残基;在48、62、66、67、69、71和73处的Kabat残基以粗体和下划线显示(编号在序列下面)。

[0100] 图4描绘为测定具有不同轻链的抗体的结合而进行的结合ELISA结果,所述抗体包括chBCC2、hBCC、hLc-2/chHc、hLc-3/chHc、hLc-4/chHc和hLc-1/chHc抗体。

[0101] 图5描绘为测定具有不同重链的抗体的结合而进行的结合ELISA结果,所述抗体包括chLc/hHc-1、chLc/hHc-2、chLc/hHc-3、chLc/hHc-4、chLc/hHc-5、chLc/hHc-6、chBCC2和hBCC抗体。

[0102] 图6描绘为测定具有不同轻链和重链的抗体的结合而进行的结合ELISA结果,所述抗体包括:hLc-4/hHc-2、hLc-4/hHc-7、hLc-4/hHc-8、hLc6/hHc-2、hLc-6/hHc-7、hLc-6/hHc-8、chBCC1和chBCC2。

[0103] 发明详述

[0104] 本发明提供抗BCR复合体的嵌合抗体和人源化抗体。本发明还提供所述抗体和包含它们的组合物用于下列疾病的诊断、预后和治疗的方法:例如,癌症、自身免疫疾病、炎症疾患和传染病。

[0105] 下面将详细地参考本发明目前的优选实施方案,它们与附图和下列实施例一起用于解释本发明的原理。这些实施方案描述得足够详细以使本领域技术人员能够实施本发明,并且应理解可以采用其他的实施方案,并且可以在不背离本发明的主旨和范围的情况下进行结构的、生物的和化学的改变。除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的意思。本领域技术人员可以参考一般参考教科书对本文所讨论的技术的这些定义或详细说明。这些教科书包括:例如 Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学实验技术) (Ausubel等人,编辑,John Wiley&Sons以及到2008年3月的补充材料)、Molecular Cloning:A Laboratory Manual (分子克隆:实验室手册) (Sambrook和Russell,第三版,2001); Single-Molecule Techniques:A Laboratory Manual (单分子技术:实验室手册) (Selvin&Ha,编辑,Cold Spring Harbor Press,2008); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry (现代核酸化学实验方案) (Beaucage等人,编辑,John Wiley&Sons, Inc., 2000); Current Protocols in Immunology (现代免疫学实验方案) (Coligan等人,编辑,John Wiley&Sons, N.Y., 以及到2008年3月的补充材料)、Making and Using Antibodies:A Practical

Handbook (制备和使用抗体:实用手册) (Howard&Kaser, 编辑, CRC, 2006); Using Antibodies: A Laboratory Manual (使用抗体:实验室手册) (Harlow&Lane, Cold Spring Harbor Press, 1999); Binding and Kinetics for Molecular Biologists (用于分子生物学家的结合和动力学) (Goodrich&Kugel, Cold Spring Harbor Press, 2007); Current Protocols in Pharmacology (现代药理学实验方案) (Enna等人, 编辑, John Wiley&Sons, N.Y., 以及到2008年3月的补充材料), The Pharmacological Basis of Therapeutics (治疗学的药理学基础) (Goodman&Gilman, 第11版, 2006), 和 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (雷明顿: 药学科学和实践) (Lippincott Williams&Wilkins, 第21版 (2005))。

[0106] A. 定义

[0107] 如本文所用术语“ADCC”是指抗体依赖性细胞毒性, 它是体外细胞介导的反应, 其中表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞(例如, 单核细胞, 如自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体并随后引起靶细胞裂解。

[0108] 如本文所用术语“抗体”是指单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、合成抗体、嵌合抗体、多克隆抗体、骆驼源化抗体(camelized antibodies)、单链Fv(scFv)、单链抗体、免疫活性抗体片段(例如, 能够结合表位的抗体片段, 例如, Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、Fv片段、含有VL或VH结构域或免疫特异性结合抗原的互补决定区(CDR)的片段等)、双功能或多功能抗体、二硫键连接的双特异性Fv(sdFv)、内抗体(intrabodies)和双体, 以及上述任一种的表位结合片段。具体地, 术语抗体旨在涵盖免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段, 即含有抗原结合位点的分子。免疫球蛋白分子可以是任何类型的(例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、任何种类的(例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂)或任何亚类的(参见美国专利公布第20040185045号; 20050037000号; 20050064514号; 20050215767号; 20070004909号; 20070036799号; 20070077246号; 和20070244303号)。

[0109] “B细胞抗原受体”或“BCR”的含义旨在指B细胞抗原受体, 它包括膜免疫球蛋白(mIg)抗原结合组分或其生物活性部分(即, 能够结合配体和/或能够与转导蛋白组分缔合的部分)。术语“BCR复合体”旨在指BCR与转导蛋白CD79a和CD79b组分的复合体或其生物活性部分(即, 能够转导胞内信号和/或能够与胞外配体结合部分缔合的部分)。

[0110] 如本文所用术语“癌症”是指由细胞的异常的不受控制的生长引起的赘生物或肿瘤。如本文所用, 癌症明确地包括白血病和淋巴瘤。在一些实施方案中, 癌症是指良性肿瘤, 它仍然是局部性的。在其他实施方案中, 癌症是指恶性肿瘤, 它已经侵入和破坏邻近的身体结构并向远的部位扩散。在一些实施方案中, 癌症与特异性癌抗原相关。

[0111] 术语“细胞增殖性疾患”和“增殖性疾患”是指与某种程度的异常细胞增殖相关的疾患。在一个实施方案中, 细胞增殖性疾患是癌症。

[0112] 术语“嵌合的”在指抗体时是指其中重链和/或轻链的一部分与来自一个物种(例如, 小鼠)或抗体种类或亚类的抗体相同或同源, 而剩余部分与另一物种(例如, 人)或抗体种类或亚类的抗体相同或同源的抗体, 只要他们表现出期望的生物活性即可。本文感兴趣的嵌合抗体包括“灵长源化的(primatized)”嵌合抗体, 其包含源自非人的灵长类(例如, 旧大陆猴(Old World Monkey)、猿等)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0113] 如本文所用术语“互补决定区”或“CDR”是指抗原结合所必需的抗体可变结构域的

氨基酸残基。每个可变结构域通常具有三个CDR区，它们被标为CDR₁、CDR₂和CDR₃。

[0114] 如本文所用术语“双体分子”是指两种或更多种多肽链或蛋白的复合体，所述两种或更多种多肽链或蛋白各自包含至少一个V_L结构域和一个V_H结构域或它们的片段，其中两种结构域均包含在单个多肽链中。在某些实施方案中，“双体分子”包括包含Fc或铰链-Fc结构域分子。复合体中的所述多肽链可以是相同的或不同的，即，双体分子可以是同源多聚体或异源多聚体。在具体的方面，“双体分子”包括二聚体或四聚体或所述多肽链含有V_L和V_H结构域二者。构成多聚体蛋白的各多肽链可以通过链间二硫键共价地连接到多聚体的至少一个其他肽上。

[0115] 如本文所用术语“疾患”和“疾病”可互换使用，是指受治疗者的病症。具体地，术语“自身免疫疾病”与术语“自身免疫疾患”可互换使用，是指由受治疗者对其自身的细胞、组织和/或器官的免疫反应引起的细胞、组织和/或器官损伤表征的受治疗者的病症。术语“炎性疾病”与术语“炎性疾患”可互换使用，是指由炎症，优选慢性炎症表征的受治疗者的病症。自身免疫疾患可以伴随或不伴随有炎症。此外，炎症可以是或不是由自身免疫疾患引起的。因此，某些疾患可以表征为自身免疫疾患和炎性疾患二者。

[0116] 如本文所用的术语“效应子细胞”是指表达一种或多种Fc受体并介导一种或多种效应子功能的免疫系统的细胞。效应子细胞包括但不限于单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格汉斯细胞、自然杀伤(NK)细胞，并且可以来自任何生物体，包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔和猴。

[0117] 术语“效应子细胞”是指可归因于抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用的生物活性。抗体可以具有一种或多种效应子功能。抗体效应子功能的非限制性实例包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、细胞表面受体(例如，B-细胞受体;BCR)的下调、调理作用、调理吞噬作用(opsonophagocytosis)、细胞结合和花结和(rosetting)。效应子功能包括在抗原结合之后起作用的那些和不依赖于抗原结合的那些。

[0118] 如本文所用术语“表位”是指多肽或蛋白或非蛋白分子被抗体免疫特异性结合的那部分。表位可以具有免疫原活性，以使其在动物中引发抗体产生反应。表位免疫特异性结合抗体的能力可以通过例如免疫测定来确定。表位不需要必须是免疫原性的。

[0119] 术语“Fc受体”或“FcR”用于本文以描述结合抗体Fc区的受体。示例性的FcR是天然序列的人FcR。FcR可以是结合IgG抗体的FcR(γ 受体)，并且包括Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII和Fc γ RIV亚类的受体，包括这些受体的等位基因变体和替代地剪接的形式，例如至少有两种已知的Fc γ RII受体，Fc γ RIIA和Fc γ RIIB。术语FcR还包括新生儿受体FcRn，它负责将母体的IgG转移给胎儿。

[0120] 如本文所用术语“Fc区”用于定义IgG重链的C-末端区。尽管界限可能轻微变化，但人IgG重链Fc区被定义为从羧基末端的Cys226延伸。IgG的Fc区包含两个恒定结构域C_{H2}和C_{H3}。人IgG Fc区的C_{H2}结构域(也称为“C γ 2”结构域)通常从氨基酸231延伸至氨基酸338，并且人IgG Fc区的C_{H3}结构域通常由氨基酸342延伸至氨基酸447。

[0121] 术语“糖基化位点”是指被哺乳动物细胞识别为糖残基的附连位置的氨基酸残基。碳水化合物如寡糖所附连的氨基酸残基通常是天冬酰胺(N-连接)、丝氨酸(O-连接)和苏氨酸(O-连接)残基。附连的特异性位点具有特征氨基酸序列，称为“糖基化位点序列”。N-连接

的糖基化的糖基化位点序列是：Asn-X-Ser/Thr，其中X可以是除脯氨酸以外的任何常见氨基酸。人IgG的Fc区具有两个N-连接的糖基化位点，在每个C_{H2}结构域上各一个，位于位置297的天冬酰胺(Asn 297)处。

[0122] 如本文所用术语“HAMA反应”是指人抗小鼠抗体反应，这是当人免疫系统识别鼠抗体为外来物并攻击它时发生的一种有害的免疫原性反应。HAMA可能引起中毒性休克或死亡。嵌合抗体和人源化抗体通过减少施用抗体的非人部分而降低HAMA反应的可能，但是仍存在对这种抗体的人抗人抗体反应(“HAHA反应”)免疫反应的可能。

[0123] 术语“重链”、“轻链”(“C_L”)、“轻链可变区”(“V_L”)、“重链可变区”(“V_H”)、“框架区”(“FR”)、“重链恒定结构域”(“C_H”)、“轻链恒定结构域”(“C_L”)是指天然存在的免疫球蛋白的结构域和合成的(例如，重组体)结合蛋白(例如，人源化抗体)的相应结构域。天然存在的免疫球蛋白(例如，IgG)的基本结构单位是具有两条轻链和两条重链的四聚体。天然存在的免疫球蛋白通常表达为约150KDa的糖蛋白，尽管IgG也可以以非糖基化形式产生。各链的氨基末端(“N”)部分包括约100至110个或更多个氨基酸的可变区，该可变区主要负责抗原识别。各链的羧基末端(“C”)部分定义了恒定区，其中轻链具有单个恒定结构域并且重链通常具有三个恒定结构域和一个铰链区。因此，天然存在的IgG分子的轻链结构是N-V_L-C_L-C，并且IgG重链的结构是N-V_H-C_{H1}-H-C_{H2}-C_{H3}-C(其中H是铰链区)。IgG分子的可变区由互补决定区(CDR)和称为框架区段的非CDR区段构成，互补决定区含有与抗原接触的残基，非CDR区段保持结构并决定CDR环的定位。因此，V_L和V_H结构域具有结构-FR₁-CDR₁-FR₂-CDR₂-FR₃-CDR₃-FR₄-C。

[0124] 如本文所用术语“异源的”核酸表示被引入宿主细胞的DNA、RNA等。核酸可以源自多种来源的任一种，包括基因组DNA、mRNA、cDNA、合成的DNA和融合体或这些的组合。核酸可以包括来自与宿主或受者细胞相同的细胞或细胞类型的多核苷酸或来自不同细胞类型的多核苷酸，例如，来自哺乳动物或植物，并且可以任选地包括标记基因或选择基因，例如抗生素抗性基因、耐温度基因等。

[0125] 术语“铰链区”一般被定义为从人IgG1的Glu216延伸至Pro230。其他IgG同种型的铰链区可以通过将形成重链间S-S键的第一个和最后一个半胱氨酸残基放置在同一位置而与IgG1序列比对。

[0126] 如本文所用术语“人源化”具有其在本领域内的常用意思。一般地，非人抗体的人源化包括将来自非人免疫球蛋白V_L和V_H区的CDR序列取代到人框架区中。此外，如本文所用“人源化”抗体可以包括CDR和/或框架区中被引入来增加亲和力或用于其他目的的其他取代和突变。例如，人序列中非人框架残基的取代可以增加亲和力。所得的可变结构域具有非人CDR序列和源自人抗体框架序列或人共有序列的框架序列。多种不同的人框架区可以单独或组合使用作为人源化抗体的基础。

[0127] 如本文所用术语“免疫调节剂”及其变化形式是指调节宿主免疫系统的药剂。在某些实施方案中，免疫调节剂是免疫抑制剂。在某些其他实施方案中，免疫调节剂是免疫刺激剂。免疫调节剂包括但不限于：小分子、肽、多肽、融合蛋白、抗体、无机分子、模拟药剂和有机分子。

[0128] 如本文所用术语“免疫特异性结合”是指在抗体与其所识别的表位之间表现出的特异性结合。这种结合将通常表现出至少约0.1mM，更通常至少约1μM，优选至少约0.1μM或

更低,并且最优选0.01 μ M或更低的 K_D 。优选地,本发明的抗体以高亲和力(例如,低 K_D)免疫特异性结合蛋白。

[0129] 如通过例如免疫测定、BIAcore或本领域内已知的其他测定所测定的,免疫特异性结合抗原的抗体可以以较低的亲和力结合其他肽或多肽。优选地,特异性结合抗原的分子不与其他蛋白交叉反应。例如可以通过免疫测定、BIAcore或本领域技术人员已知的其他技术鉴定特异性结合抗原的分子。

[0130] 如本文所用的术语“抗体工程化技术领域(Antibody Engineering Technology Art)”是指在下列专利中公开的技术:美国临时专利申请第60/781,564号;60/945,523号;2007年12月19日提交的61/015,106号;和2008年1月4日提交的61/019,051号;US 20040185045号;US 20040197347号;US 20040197866号;US 20050037000号;US 20050064514号;US 20050215767号;US 20060134709号;US 20060177439号;US 20070004909号;US 20070036799号;US 20070037216号;US 20070077246号;US 20070244303号;US 20080044429号;US 20080050371号;11/869,410号;11/952,568号;美国专利第7,112,439号;WO 04/063351;WO 06/088494;WO 07/024249;WO 06/113665;WO 07/021841;WO 07/106707;或PCT/US07/86793。

[0131] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指由基本上均一的抗体群获得的抗体,即除了可能少量存在的天然存在的突变外,构成群的单个抗体是相同的,并且如本文所用的术语“多克隆抗体”是指由不均一的抗体群获得的抗体。单克隆抗体是高度特异的,针对单个表位。除了它们的特异性外,单克隆抗体的优势在于它们可以被合成而不受其他抗体污染。术语“单克隆”表示由基本上均匀的抗体群获得的抗体的特征,并且不应解释为需要通过任何特定的方法制备抗体。

[0132] 如本文所用术语“核酸”和“核苷酸序列”包括DNA分子(例如,cDNA或基因组DNA)、RNA分子(例如,mRNA)、DNA和RNA分子的组合或杂交DNA/RNA分子,以及DNA或RNA分子的类似物。这种类似物可以使用例如核苷酸类似物产生,所述核苷酸类似物包括但不限于肌昔或三苯甲基化碱基。这种类似物还可以包含含有修饰的骨架的DNA或RNA分子,所述修饰的骨架给分子带来有益的属性,例如核酸酶抗性或增加的跨细胞膜的能力。核酸或核苷酸序列可以是单链的、双链的,可以含有单链部分和双链部分二者,并且可以含有三链部分,但优选是双链DNA。

[0133] 如本文所用的“基本的序列同一性”是指两个或更多个序列或亚序列(例如,结构域)在最大对应性的比较和比对时具有至少约80%的氨基酸残基同一性,优选至少约90%、或至少约95%的同一性。两个相似序列(例如,抗体可变区)之间的序列同一性可以通过如下的算法测量:例如Smith&Waterman,1981,Adv. Appl. Math. 2:482 [local homology algorithm (局部同源性算法)]、Needleman&Wunsch,1970,J. Mol. Biol. 48:443 [homology alignment algorithm (同源性比对算法)]、Pearson&Lipman,1988,Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 [search for similarity method (相似性方法的检索)]或Altschul等人,1990,J. Mol. Biol. 215:403-10 [BLAST algorithm (BLAST算法)]。当使用上述算法的任一种时,使用缺省参数(如单位比对长度(Window length)、空位罚分(gap penalty)等)。当序列同一性的程度为至少约70%相同、优选至少约80%或至少约90%或甚至至少约95%相同时,认为氨基酸序列“基本上类似于”第二序列。在下列任一种情况时认为核酸序列“基本

上类似于”第二序列：(1) 序列同一性的程度是至少约70%相同, 优选至少约80%或至少约90%或甚至至少约95%相同, 或核酸序列编码与第二序列所编码的多肽至少约70%相同, 优选至少约80%或至少约90%或甚至至少约95%相同的多肽。基本上相同的序列也是基本上相似的。

[0134] 当提到抗体时, 各结构域的氨基酸的分配是根据Kabat, Sequences Of Proteins Of Immunological Interest (免疫学上重要蛋白的序列) (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987和1991), 其以引用方式清楚地并入本文。遍及本说明书, IgG重链中残基的编号是Kabat中EU索引的编号并且是指人IgG1EU抗体的编号。

[0135] B. 抗体

[0136] 本发明具体涵盖特异性结合BCR复合体, 且更优选结合人BCR复合体的嵌合的(“Ch”)和人源化的(“h”)抗体和多肽。优选地, 抗体对BCR复合体具有增强的结合亲和力, 并且更优选地, 抗体具有增强的效应子功能, 两者都是与天然BCR复合体(“BCC”)抗体比较的。在优选的实施方案中, 这种嵌合抗体或人源化抗体是鼠抗-BCR复合体抗体BCC1和BCC2的嵌合形式和人源化形式, 分别被称为“ChBCC”或“hBCC”。嵌合的和人源化的抗体和多肽与天然BCC1和BCC2抗体相比对BCR复合体具有增强的结合亲和力, 并且可以包含Fc变体或其他修饰。

[0137] 本文公开了编码BCC1和BCC2抗体(本文统称为“BCC”)的可变区的氨基酸序列的核酸分子。这些核酸和氨基酸序列呈现如下:

[0138] BCC1V_H核酸序列 (SEQ ID NO:1):

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgagge ctggggcttc agtgaagctg 60

tcttgaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120

cctggacaag gccttgaatg gattggtatg gttgatcctt cagacagtga aactcactac 180

[0139]

aatcaaatgt tcaaggacaa ggccacattg actgttgaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagagctatg 300

ggctactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctca 339

[0140] BCC1V_H氨基酸序列 (SEQ ID NO:2):

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGM

VDPSDSETHY 60

[0141]

NQMFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARAM GYWGQGTSVT VSS

113

[0142] BCC1V_L核酸序列 (SEQ ID NO:3):

- gatgttgga tgaccagac tccactcact ttgtcggta acattggaca accagcctcc 60
- atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatactgatg gaaagacata ttgaattgg 120
- ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac cgcctaactc atctgggtgc taaactggac 180
- [0143] tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagattcac actgaaaatc 240
- agcagagtgg aggctgagga ttgggaatt tattattgct ggcaaggtac acatttccg 300
- ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336
- [0144] BCC1_{V_L}氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) :
- [0145] DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPGQSPN
- RLIYLVSKLD 60
- [0146] SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP LTFGAGTKLE LK
- 112
- [0147] BCC2_{V_L}核酸序列 (SEQ ID NO:5) :
- gatgttggtg tgaccagac tccactcact ttgtcggta ccattggaca accagcctcc 60
- atctcttgta agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata ttgaattgg 120
- ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atctgggtgc taaactggac 180
- [0148] tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagattcac actgaaaatc 240
- agcagagtgg aggctgagga ttgggaggt tattattgct ggcaaggtac acatttccg 300
- ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336
- [0149] BCC2_{V_L}氨基酸序列 (SEQ ID NO:6) :
- DVVLTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQRPGQSPK
- [0150] RLIYLVSKLD 60
- SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP LTFGAGTKLE LK
- 112
- [0151] BCC2_{V_H}核酸序列 (SEQ ID NO:7) :

- caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgagge ctggggcttc agtgaagctg 60
- tctgcaagg ctctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
- [0152] cctggacaag gccttgaatg gattggatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
- aatcaaatgt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
- atgcagetca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagagctatg 300
- ggctactggg gtcaaggaac ctgagtcacc gtctcctca 339
- [0153] BCC2V_H氨基酸序列 (SEQ ID NO:8) :
- [0154] QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWKQR PGQGLEWIGM
IDPSDSETHY 60
- [0155] NQMFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARAM GYWGQGTSVT VSS
113
- [0156] 在本发明的优选实施方案中,构建并研究了7种不同的BCC轻链可变区。这些轻链可变区的核酸和氨基酸序列呈现如下:
- [0157] hBCC VL-1核酸序列 (SEQ ID NO:9) :
- gatgttgta tgactcagtc tcaactctcc ctgcccgtca ccttggaca gccggcctcc 60
- atctctgca agtcaagtc gagectctta gatagtgatg gaaagacata ttgaattgg 120
- tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180
- [0158] tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
- agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300
- ctcacttgc gcggaggac caagcttgag atcaaaa 336
- [0159] hBCC VL-1氨基酸序列 (SEQ ID NO:10) :
- [0160] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLI DSDGKTYLNW FQQRPGQSPR
RLIYLVSKLD 60
- SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP LTFGGGTKLE IK
112
- [0161] hBCC VL-2核酸序列 (SEQ ID NO:11) :

- gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
- atctctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata ttggaattgg 120
- ttctgcaga ggccaggcca atctccaagg cgctaattt atctggtgac taaactggac 180
- [0162] tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaac 240
- agcagggtgg aggctgagga tgtgggggtt tattactgct ggcaaggtaac acatttccg 300
- ctcacgttcg gccgaggac caagcttgag atcaaaa 336
- [0163] hBCC VL-2氨基酸序列 (SEQ ID NO:12) :
 DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FLQRPQGQSPR
 RLIYLVSKLD 60
- [0164] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP LTFGGGKLE IK
 112
- [0165] hBCC VL-3核酸序列 (SEQ ID NO:13) :
 gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60
- atctctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata ttggaattgg 120
- tttcagcaga ggccaggcca atctccaaag cgctaattt atctggtgac taaactggac 180
- [0166] tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaac 240
- agcagggtgg aggctgagga tgtgggggtt tattactgct ggcaaggtaac acatttccg 300
- ctcacgttcg gccgaggac caagcttgag atcaaaa 336
- [0167] hBCC VL-3氨基酸序列 (SEQ ID NO:14) :
 DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FQQRPGQSPK
 RLIYLVSKLD 60
- [0168] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP LTFGGGKLE IK
 112
- [0169] hBCC VL-4核酸序列 (SEQ ID NO:15) :

- gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc 60
- atctcctgca agtcaagtca gaggctctta gatagtgatg gaaagacata ttgaattgg 120
- ttcagcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgic taaactggac 180
- [0170] tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaatc 240
- agcagggtgg aggctgagga tgtgggggtt tattactgct ggcaaggtac acatttccg 300
- ctcacttgc gccgaggac caagcttgag atcaaa 336
- [0171] hBCC VL-4氨基酸序列 (SEQ ID NO:16) :
- [0172] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLI DSDGKTYLNW FQQRPGQSPN
RLIYLVSKLD 60
- [0173] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHP LTFGGGTKLE IK
112
- [0174] hBCC VL-5核酸序列 (SEQ ID NO:17) :
- gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgta cccttggaca gccggcctcc 60
- atctcctgca agtcaagtca gaggctctta gatagtgatg gaaagacata ttgaattgg 120
- ttctgcaga ggccaggcca atctccaaag cgcctaattt atctggtgic taaactggac 180
- [0175] tctgggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaatc 240
- agcagggtgg aggctgagga tgtgggggtt tattactgct ggcaaggtac acatttccg 300
- ctcacttgc gccgaggac caagcttgag atcaaa 336
- [0176] hBCC VL-5氨基酸序列 (SEQ ID NO:18) :
- DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLI DSDGKTYLNW FLQRPGQSPK
RLIYLVSKLD 60
- [0177] SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHP LTFGGGTKLE IK
112
- [0178] hBCC VL-6核酸序列 (SEQ ID NO:19) :

	gatgttgga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgca cccctggaca gccggcctcc	60
	atctcctgca agtcaagtc gagcctctta gatagtgatg gaaagacata ttggaattgg	120
	ttctgcaga ggccaggcca atciccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac	180
[0179]	tctgggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgattcac actgaaaac	240
	agcagggtgg aggetgagga tgtgggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg	300
	ctcacgttcg gcggaggac caagcttgag atcaaaa	336
[0180]	hBCC VL-6氨基酸序列 (SEQ ID NO:20) :	
[0181]	DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW FLQRPQGSPN RLIYLVSKLD 60	
[0182]	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP LTFGGGTKLE IK 112	
[0183]	chBCC1VL氨基酸序列 (SEQ ID NO:37) :	
[0184]	DVVMTQTPLT LSVNIGQPAS ISCKSSQSLL DTDGKTYLNW LLQRPQGSPN RLIYLVSKLD 60	
	SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGI YYCWQGTHFP LTFGAGTKLE LK 112	

[0185] 天然BCC2抗体 (SEQ ID NO:6) 与本发明的嵌合BCC1抗体 (SEQ ID NO:37) 和人源化BCC2抗体 (SEQ ID NO:10) 的轻链可变区 (VL) 之间的比较描绘在图1中。尽管可以看到在这些具体的嵌合序列和人源化序列中改变了大量的残基,但是在工程化本发明的嵌合的和人源化的抗体和多肽时,不是必须修饰这些残基的全部或大部分。对于轻链可变区,优选修饰位置37和45处的一个或多个残基,所述残基在图1中通过粗体和残基下划线标注 (Kabat编号显示在这些残基序列的下面)。在优选的实施方案中,人源化BCC VL包含:(1) Q37L取代;或(2) R45K或R45N取代;或(1)和(2)两者,尽管可以进行大量其他修饰(即,除取代以外的修饰)。图2是描绘本发明人源化BCC抗体的轻链和重链中的多种修饰的残基的图,可以在本发明的抗体和多肽中进行所述修饰的任一种。

[0186] 在多个实施方案中,抗体包含是人源化BCC VL的免疫球蛋白轻链可变区 (VL),该人源化BCC VL优选具有Q37L取代、或R45K或R45N取代、或两者。在优选的实施方案中,抗体包含是人源化BCC VL的免疫球蛋白VL,该人源化BCC VL优选包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20的序列,或由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:19的核酸序列编码。在其他实施方案中,抗体包含含有人源化BCC VL的免疫球蛋白轻链,该轻链优选包含选自自由SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:20组成的组的序列,或由选自自由SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:19组成的组的核酸序列编码。

[0187] 在多个实施方案中,抗体包含是嵌合BCC VL的免疫球蛋白轻链可变区 (VL),该嵌合

BCC VL优选具有Q37L取代、或R45K或R45N取代、或两者。在优选的实施方案中,抗体包含是嵌合BCC VL的免疫球蛋白VL,该嵌合BCC VL优选包含SEQ ID NO:37的序列。

[0188] 在本发明的优选实施方案中,构建并研究了9种不同的BCC重链可变区。这些重链可变区的核酸和氨基酸序列呈现如下:

- [0189] hBCC VH-1核酸序列 (SEQ ID NO:21) :
- caggttcagc tggtcgagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc 60
- tcctgcaagg ctctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
- cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
- [0190] aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
- atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300
- ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctctca 339
- [0191] hBCC VH-1氨基酸序列 (SEQ ID NO:22) :
- QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWMGM
IDPSDSETHY 60
- [0192] NQMFKDRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTIVT VSS
113
- [0193] hBCC VH-2核酸序列 (SEQ ID NO:23) :
- caggttcagc tggtcgagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc 60
- tcctgcaagg ctctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
- [0194] cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
- aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
- atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300
- [0195] ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctctca 339
- [0196] hBCC VH-2氨基酸序列 (SEQ ID NO:24) :
- QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
IDPSDSETHY 60
- [0197] NQMFKDRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTIVT VSS
113
- [0198] hBCC VH-3核酸序列 (SEQ ID NO:25) :

	caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc	60
	tcttcaagg ctctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt ggcacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac	180
[0199]	aatcaaatgt tcaaggacaa agccaccctg accgtagaca catccacgag cacagcctac	240
	atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg	300
	ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtcctctca	339
[0200]	hBCC VH-3氨基酸序列 (SEQ ID NO:26) :	
	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWMGM	
	IDPSDSETHY 60	
[0201]	NQMFKDKATL TVDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTIVT VSS	
	113	
[0202]	hBCC VH-4核酸序列 (SEQ ID NO:27) :	
	caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc	60
	tcttcaagg ctctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt ggcacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac	180
[0203]	aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accgtagaca catccacgag cacagcctac	240
	atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg	300
	ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtcctctca	339
[0204]	hBCC VH-4氨基酸序列 (SEQ ID NO:28) :	
	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWMGM	
	IDPSDSETHY 60	
[0205]	NQMFKDRVIM TVDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTIVT VSS	
	113	
[0206]	hBCC VH-5核酸序列 (SEQ ID NO:29) :	
	caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc	60
	tcttcaagg ctctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt ggcacaggcc	120
	cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac	180
[0207]	aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accgtagaca aatccacgag cacagcctac	240
	atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg	300
	ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtcctctca	339

- [0208] hBCC VH-5氨基酸序列 (SEQ ID NO:30) :
 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWMGM
 IDPSDSETHY 60
- [0209] NQMFKDRVIM TVDKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTTVT VSS
 113
- [0210] hBCC VH-6核酸序列 (SEQ ID NO:31) :
 caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctctgggta caccittacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
- [0211] aatcaaaaagt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagctatg 300
 ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtcctceta 339
- [0212] hBCC VH-6氨基酸序列 (SEQ ID NO:32) :
 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWMGM
 IDPSDSETHY 60
- [0213] NQKFKDRVIM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTTVT VSS
 113
- [0214] hBCC VH-7核酸序列 (SEQ ID NO:33) :
 caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctctgggta caccittacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
- [0215] aatcaaaaagt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccctgt attactgtgc gagagctatg 300
 ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtcctceta 339
- [0216] hBCC VH-7氨基酸序列 (SEQ ID NO:34) :
 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGM
 IDPSDSETHY 60
- [0217] NQKFKDRVIM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTTVT VSS
 113
- [0218] hBCC VH-8核酸序列 (SEQ ID NO:35) :

- caggltcagc tggtagcagc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc 60
- tctgcaagg ctctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt ggcacaggcc 120
- cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
- [0219] aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accgtagaca catccacgag cacagcctac 240
- atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300
- ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gctcctca 339
- [0220] hBCC VH-8氨基酸序列 (SEQ ID NO:36) :
- [0221] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMNWVVRQA PGQGLEWIGM
IDPSDSETHY 60
- [0222] NQMFKDRVTM TVDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARAM GYWGQGTITV VSS
113
- [0223] chBCC1VH氨基酸序列 (SEQ ID NO:38) :
- QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGM
VDPSDSETHY 60
- [0224] NQMFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARAM GYWGQGTISV VSS
113

[0225] 天然BCC2抗体 (SEQ ID NO:8) 与本发明的嵌合BCC1抗体 (SEQ ID NO:38) 和人源化BCC2抗体 (SEQ ID NO:22) 的重链可变区 (V_H) 之间的比较描绘在图3中。尽管可以看到在这些具体的嵌合序列和人源化序列中改变了大量的残基,但是在工程化本发明的嵌合的和人源化的抗体和多肽时,不是必须修饰这些残基的全部或大部分。对于重链可变区,优选修饰位置48、62、66、67、68、69、70、71和73处的一个或多个残基,所述残基在图3中通过粗体和残基下划线标注 (Kabat编号显示在这些残基序列的下面)。在优选的实施方案中,人源化的或嵌合的BCC V_H包含下列修饰的一种或多种:M48I、M62K、R66K、V67A、M69L、T71V或T71V和T73K、图2中所示的任何修饰或任何其他修饰 (即,除取代之外的修饰)。

[0226] 在多个实施方案中,抗体包含是人源化BCC V_H的免疫球蛋白重链可变区 (V_H),所述人源化BCC V_H优选具有一个或多个M48I、M62K、R66K、V67A、M69L、T71V或T71V和T73K修饰。在优选的实施方案中,抗体包含是人源化BCC V_H的免疫球蛋白V_H,该人源化BCC V_H优选包含SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:36的序列,或由SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:35的核酸序列编码。在其他实施方案中,抗体包含含有人源化BCC V_H的免疫球蛋白重链,该重链优选包含选自由SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:36组成的组的序列,或由选自由SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:35组成的组的核酸序列编码。

[0227] 在多个实施方案中,抗体包含是嵌合BCC V_H的免疫球蛋白重链可变区(V_H),所述嵌合BCC V_H优选包含一个或多个M48I、M62K、R66K、V67A、M69L、T71V或T71V和T73K修饰。在优选的实施方案中,抗体包含是嵌合BCC V_H的免疫球蛋白V_H,该嵌合BCC V_H优选包含SEQ ID NO:38的序列。

[0228] 在又其他的实施方案中,抗体包含是人源化的或嵌合的BCC V_L的免疫球蛋白轻链可变区(V_L),并且还包含是人源化的或嵌合的BCC V_H的免疫球蛋白重链可变区(V_H)。抗体可以包含本文所述的V_L和V_H区的任何组合,例如具有人源化V_H的天然V_L、具有嵌合V_H的天然V_L、具有人源化V_H的人源化V_L、具有嵌合V_H的人源化V_L、具有天然V_H的人源化V_L、具有人源化V_H的嵌合V_L、具有嵌合V_H的嵌合V_L、或具有天然V_H的嵌合V_L。这些组合的每一个可以通过如下的理解进一步变化:在某些实施方案中,V_L区可以是BCC1抗体形式(嵌合的、人源化的或天然的)并且V_H区可以是BCC2抗体形式(嵌合的、人源化的或天然的),或者反之亦然。

[0229] 在多个实施方案中,抗体包含下列组合之一:hBCC VL-1/chBCC VH、hBCC VL-2/chBCC VH、hBCC VL-3/chBCC VH、hBCC VL-4/chBCC VH、chBCC VL/hBCC VH-1、chBCC VL/hBCC VH-2、chBCC VL/hBCC VH-3、chBCC VL/hBCC VH-4、chBCC VL/hBCC VH-5、chBCC VL/hBCC VH-6、hBCC VL-4/hBCC VH-2、hBCC VL-4/hBCC VH-7、hBCC VL-4/hBCC VH-8、hBCC VL-6/hBCC VH-2、hBCC VL-6/hBCC VH-7、或hBCC VL-6/hBCC VH-8。在优选的实施方案中,抗体包含表2中所列的V_L区和V_H区的组合之一。

[0230]

表 2: VL 区和 VH 区的示例性组合			
轻链可变区 (VL)	重链可变区(VH)		
	天然的	人源化的	嵌合的
天然的	--	选自 BCC1 VL 或 BCC2 VL 的 VL 和 选自下列的 VH: hBCC VH-1、hBCC VH-2、hBCC VH-3、 hBCC VH-4、hBCC VH-5、hBCC VH-6、 hBCC VH-7 或 hBCC VH-8	选自 BCC1 VL 或 BCC2 VL 的 VL 和 选自 chBCC1 VH 或 chBCC2 VH 的 VH
人源化的	选自下列的 VL: hBCC VL-1、hBCC VL-2、hBCC VL-3、 hBCC VL-4、hBCC VL-5 或 hBCC VL-6 和 选自 BCC1 VH 或 BCC2 VH 的 VH	选自下列的 VL:hBCC VL-1、hBCC VL-2、 hBCC VL-3、hBCC VL-4、hBCC VL-5 或 hBCC VL-6 和 选自下列的 VH: hBCC VH-1、hBCC VH-2、hBCC VH-3、 hBCC VH-4、hBCC VH-5、hBCC VH-6、 hBCC VH-7 或 hBCC VH-8	选自下列的 VL: hBCC VL-1、hBCC VL-2、hBCC VL-3、 hBCC VL-4、hBCC VL-5 或 hBCC VL-6 和 选自 chBCC1 VH 或 chBCC2 VH 的 VH

[0231]

表 2: VL 区和 VH 区的示例性组合			
轻链可变区 (VL)	重链可变区(VH)		
	天然的	人源化的	嵌合的
嵌合的	选自 chBCC1 VL 或 chBCC2 VL 的 VL 和 选自 BCC1 VH 或 BCC2 VH 的 VH	选自 chBCC1 VL 或 chBCC2 VL 的 VL 和 选自下列的 VH: hBCC VH-1、hBCC VH-2、hBCC VH-3、 hBCC VH-4、hBCC VH-5、hBCC VH-6、 hBCC VH-7 或 hBCC VH-8	选自 chBCC1 VL 或 chBCC2 VL 的 VL 和 选自 chBCC1 VH 或 chBCC2 VH 的 VH

[0232] 本发明所设想的多肽(尤其是抗体)可以与彼此形成复合体或与其他非免疫球蛋白多肽(例如,酶、激素、结构蛋白等)形成复合体。例如,一种实施方案可以提供包含两种多肽的多肽复合体,其中所述多肽之一包含重链并且另一多肽包含变体轻链,或其中两种多肽均含有相同的序列。复合体形成可以通过任何合适的技术介导,包括通过在如本文所述的那些的二聚化/多聚化结构域的二聚化/多聚化或共价相互作用(例如通过二硫键)(它在一些背景下是二聚化结构域的一部分,例如二聚化结构域可以含有亮氨酸拉链序列和半胱氨酸)。在另一实施方案中,组合物可以包含本发明的多肽和/或多核苷酸,例如,组合物可以包含多个本文所述的任一多肽。包含多核苷酸或多肽的组合物可以是药盒或制品的形式(任选地与说明书、缓冲液等一起包装)。

[0233] 还设想可以制备多肽变体(并且尤其是抗体变体)。多肽变体与天然氨基酸序列相比可以在它们的氨基酸序列内的期望位置具有序列修饰(例如,取代、缺失和/或添加)。本领域技术人员将了解,氨基酸改变可以改变抗体或多肽的翻译后加工,如改变糖基化位点的数目或位置或改变膜锚定特征。在优选的实施方案中,抗体和多肽变体是Fc区变体。

[0234] 变体与天然抗体或多肽相比可以具有相同的或改变的活性。例如,可能期望的是变体具有相同的活性但是以使得其更稳定或具有更长的体内半衰期的方式被修饰,例如,通过将抗体与白蛋白或补救受体结合表位耦联,如在例如美国专利第5,739,277中描述的。或者,例如,可能期望的是抗体对抗原具有增加的结合亲和力,但是具有与天然抗体相同的效应子功能,或者可能期望的是抗体对抗原具有相同的结合亲和力但是具有降低的效应子功能。可以通过例如使用体外测定如ELISA测定、表面等离子体共振测定、放射性标记的蛋

白结合测定 (RIA) 或免疫沉淀测定来测试活性。

[0235] 在功能或免疫同一性上的实质修饰可以通过选择在维持下列方面的作用方面显著不同的修饰来完成: (a) 修饰区域的多肽骨架的结构, 例如, 为片层或螺旋构象; (b) 在靶位点的分子的电荷或疏水性; 或 (c) 侧链堆积。还可以采用扫描氨基酸分析来鉴定沿着连续序列的一个或多个氨基酸, 例如Cunningham和Wells (1989) Science 244:1081-1085所述的。优选的扫描氨基酸是相对较小的中性氨基酸, 例如丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸在这个组中通常是优选的扫描氨基酸, 因为它是最常见的氨基酸, 并且常见于隐藏的和暴露的位置二者中, 并且因为它消除了 β -碳以外的侧链并且不太可能改变变体的主链构象。如果丙氨酸取代没有产生足够量的变体, 则可以使用等构 (isoteric) 氨基酸。此外, 可以取代不参与维持抗体或多肽的正确构象的任何半胱氨酸残基, 一般用丝氨酸进行, 以改善分子的氧化稳定性并阻止异常的交联。然而, 在某些情况下, 尤其在抗体是诸如Fv片段等抗体片段时, 可以添加半胱氨酸键至抗体或多肽以改善其稳定性。

[0236] B1.Fc结构域变体

[0237] 本发明的多肽可以具有变体Fc结构域。Fc结构域的修饰通常导致改变的表型, 例如改变的血清半衰期、改变的稳定性、改变的对细胞酶的敏感性或改变的效应子功能。可能期望的是在关于效应子功能方面修饰本发明的抗体以便增强抗体在例如治疗癌症中的效力。降低或消除效应子功能在某些情况下是期望的, 例如在抗体的作用机制包括阻断或拮抗作用但是不杀伤具有靶抗原的细胞的情况下。增加的效应子功能在针对不期望的细胞时一般是期望的, 例如针对其中低水平表达Fc γ R的肿瘤细胞和外来细胞, 例如具有低水平的Fc γ RIIB的肿瘤特异性B细胞 (例如, 非霍奇金淋巴瘤、CLL和伯基特淋巴瘤) 时。在所述实施方案中, 具有被赋予的或改变的效应子功能活性的本发明的分子可用于治疗和/或预防其中期望效应子功能活性功效增强的疾病、疾患或感染。

[0238] 在某些实施方案中, 本发明的分子包含对Fc结构域的氨基酸的一种或多种修饰, 该修饰降低Fc区对一种或多种Fc γ R受体的亲和力和亲抗原性 (avidity) 并且, 因此降低本发明的分子对一种或多种Fc γ R受体的亲和力和亲抗原性。在其他实施方案中, 本发明的分子包含对Fc区的氨基酸的一种或多种修饰, 该修饰增加Fc区对一种或多种Fc γ R受体的亲和力和亲抗原性并且, 因此增加本发明的分子对一种或多种Fc γ R受体的亲和力和亲抗原性。在其他实施方案中, 分子包含变体Fc结构域, 其中所述变体赋予或介导与不包含Fc结构域或包含野生型Fc结构域分子相比增加的ADCC活性和/或增加的与Fc γ RIIA的结合。在可选的实施方案中, 分子包含变体Fc结构域, 其中所述变体赋予或介导与不包含Fc结构域或包含野生型Fc结构域分子相比减少的ADCC活性 (或其他效应子功能) 和/或增加的与Fc γ RIIB的结合。

[0239] 在一些实施方案中, 本发明涵盖包含变体Fc区的分子, 该变体Fc区与包含野生型Fc区的相应分子相比不显示与任何Fc γ R的可检测的结合。在其他实施方案中, 本发明涵盖包含变体Fc区的分子, 该变体Fc区仅结合单个Fc γ R, 优选Fc γ RIIA、Fc γ RIIB或Fc γ RIIA之一。

[0240] 本发明的多肽可以包含对激活性和/或抑制性Fc γ 受体的改变的亲和力。在一个实施方案中, 抗体或多肽包含具有与具有野生型Fc区的相应分子相比增加的Fc γ RIIB亲和力和降低的Fc γ RIIA和/或Fc γ RIIA亲和力的变体Fc区。在另一实施方案中, 本发明的多

肽包含具有与具有野生型Fc区的相应分子相比降低的Fc γ RIIB亲和力和增加的Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA亲和力的变体Fc区。在又一个实施方案中,本发明的多肽包含具有与具有野生型Fc区的相应分子相比降低的Fc γ RIIB亲和力和降低的Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA亲和力的变体Fc区。在再一个实施方案中,本发明的多肽包含具有与具有野生型Fc区的相应分子相比未改变的Fc γ RIIB亲和力和降低(或增加)的Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA亲和力的变体Fc区。

[0241] 在某些实施方案中,本发明涵盖包含具有改变的Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA亲和力的变体Fc区的免疫球蛋白,以便使免疫球蛋白具有增强的效应子功能,例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。效应子细胞功能的非限制性实例包括:抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性吞噬作用、吞噬作用、调理作用、调理吞噬作用、细胞结合、花结形成、C1q结合和补体依赖性细胞介导的细胞毒性。

[0242] 在优选的实施方案中,与包含野生型Fc区的相应分子相比,亲和力或效应子功能的改变为至少2-倍,优选至少4-倍、至少5-倍、至少6-倍、至少7-倍、至少8-倍、至少9-倍、至少10-倍、至少50-倍或至少100-倍。在本发明的其他实施方案中,变体Fc区与包含野生型Fc区的分子相比以增加至少65%,优选至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、175%、200%、225%或250%的亲和力免疫特异性结合一个或多个FcR。这种测量可以是体内或体外测定,并且在优选的实施方案中是体外测定,如ELISA或表面等离子体共振测定。

[0243] 在不同的实施方案中,分子包含变体Fc结构域,其中所述变体激动Fc γ R受体的至少一种活性或拮抗Fc γ R受体的至少一种活性。在优选的实施方案中,分子包含激动(或拮抗)Fc γ RIIB的一种或多种活性的变体,例如,B细胞受体介导的信号传导、B细胞的激活、B细胞增殖、抗体产生、B细胞的细胞内钙流入、细胞周期进展、Fc γ RIIB-介导的Fc ϵ RI信号传导的抑制、Fc γ RIIB的磷酸化、SHIP募集、SHIP磷酸化和与Shc缔合,或Fc γ RIIB信号转导途径中的一种或多种下游分子(例如,MAP激酶、JNK、p38或Akt)的活性。在另一实施方案中,分子包含激动(或拮抗)Fc ϵ RI的一种或多种活性的变体,例如肥大细胞激活、钙动员、脱粒、细胞因子产生或血清素释放。

[0244] 在某些实施方案中,分子包含具有来自两种或更多种IgG同种型(例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的结构域或区的Fc结构域。多种IgG同种型表现出不同的物理和功能特性,包括血清半衰期、补体结合、Fc γ R结合亲和力和效应子功能活性(例如,ADCC、CDC等),这是由于他们的铰链和/或Fc结构域的氨基酸序列的不同所致的,例如如下列文献中所述的:Flesch和Neppert(1999) *J. Clin. Lab. Anal.* 14:141-156;Chappel等人(1993) *J. Biol. Chem.* 33:25124-25131;Chappel等人(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 88:9036-9040;或Brüggemann等人(1987) *J. Exp. Med* 166:1351-1361。这种类型的变体Fc结构域可以单独使用或与氨基酸修饰组合使用以影响Fc介导的效应子功能和/或结合活性。在组合时,氨基酸修饰和IgG铰链/Fc区可以表现相似的功能(例如,增加的Fc γ RIIA亲和力),并且与包含野生型Fc区的本发明的分子相比可以加和地或更优选地协同地作用以修改本发明的分子的效应子功能。在其他实施方案中,氨基酸修饰和IgG Fc区可以表现相反的功能(例如,分别增加的和降低的Fc γ RIIA亲和力),并且可以用于选择性地升高或减少本发明的分子与不包含Fc区或包含相同同种型的野生型Fc区的本发明分子相比的特定功能。

[0245] 在优选的具体实施方案中,分子包含变体Fc区,其中所述变体Fc区包含与野生型Fc区相比的至少一个氨基酸修饰,以便使所述分子具有改变的FcR亲和力,前提条件是根据Fc-FcR相互作用的结晶学分析和结构分析,所述变体Fc区在直接接触Fc γ R的位置不具有取代,如Sondermann等人(2000) Nature 406:267-73中所公开的那些。在Fc区内与Fc γ R直接接触的位置的实例是氨基酸残基234-239(铰链区)、氨基酸残基265-269(B/C环)、氨基酸残基297-299(C'/E环)和氨基酸残基327-332(F/G环)。在一些实施方案中,本发明的分子包含具有至少一个残基的修饰的变体Fc区,根据结构分析和结晶学分析,该至少一个残基不直接接触Fc γ R,即,不在Fc-Fc γ R结合位点之内。

[0246] 变体Fc结构域是本领域中所熟知的,并且任何已知的Fc变体可用于本发明以赋予或修饰包含Fc结构域(或其片段)的本发明分子所表现的效应子功能,如在例如NK依赖性或巨噬细胞依赖性测定中功能测定的。例如,鉴定为改变效应子功能的Fc结构域变体公开于抗体工程化技术领域中,并且本文所公开的任何合适的变体均可用于本发明的分子。

[0247] 在某些实施方案中,分子包含在一个或多个区内具有一个或多个氨基酸修饰的变体Fc区,所述修饰改变(与野生型Fc区相比)变体Fc区对激活性Fc γ R(例如Fc γ RIIA或Fc γ RIIIA)的亲和力与对抑制性Fc γ R(例如Fc γ RIIB)的亲和力的亲和力比率:

$$[0248] \quad \text{亲和力比率} = \frac{\text{野生型至变体的Fc}\gamma\text{R}_{\text{***}} \text{的亲和力改变}}{\text{野生型至变体的Fc}\gamma\text{R}_{\text{***}} \text{的亲和力改变}}$$

[0249] 在Fc变体具有大于1的亲和力比率时,本发明的方法特别可用于提供其中期望增强Fc γ R介导的效应子细胞功能(例如,ADCC)的功效的疾病、疾患或感染(例如,癌症或传染病)的治疗性或预防性治疗或其症状改善。在Fc变体具有小于1的亲和力比率时,本发明的方法特别可用于提供其中期望降低Fc γ R介导的效应子细胞功能的功效的疾病或疾患(例如自身免疫疾患或炎性疾患)的治疗性或预防性治疗或其症状改善。表3列出了亲和力比率大于1或小于1的示例性单突变、双突变、三突变、四突变和五突变。各突变的特异性结合数据列在表4中,并且关于这些突变的更多信息可见于抗体工程化技术领域中。

[0250]

表 3: 按亲和力比率所列的示例性单突变和多突变						
比率	单突变	双突变	三突变	四突变	五突变	
>1	F243L	F243L &	F243L、P247L &	L234F 、 F243L 、	L235V 、	
	D270E	R292P	N421K	R292P & Y300L	F243L 、	
	R292G	F243L &	F243L、R292P &	L235I 、 F243L 、	R292P 、	
	R292P	Y300L	Y300L	Y300L	R292P & Y300L	Y300L &
		F243L &	F243L、R292P &	F243L、R292P &	L235Q 、 F243L 、	P396L
		P396L	V305I	R292P & Y300L	L235P 、	
		D270E &	F243L、R292P &	F243L 、 P247L 、	F243L 、	
		P396L	P396L	D270E & N421K	R292P 、	
		R292P &	F243L、Y300L &	F243L 、 R255L 、	Y300L &	
		Y300L	P396L	D270E & P396L	P396L	
		R292P &	P247L、D270E &	F243L 、 D270E 、	F243L 、	
		V305I	N421K	G316D & R416G	R292P 、	
		R292P &	R255L、D270E &	F243L 、 D270E 、	V305I 、	
		P396L	P396L	K392T & P396L	Y300L &	
		Y300L &	D270E、G316D &	F243L 、 D270E 、	P396L	
	P396L	R416G	P396L & Q419H			
	P396L &	D270E、K392T &	F243L 、 R292P 、			
	Q419H	P396L	Y300L、 & P396L			
		D270E、P396L &	F243L 、 R292P 、			
		Q419H	V305I & P396L			
		V284M、R292L &	P247L 、 D270E 、			
		K370N	Y300L & N421K			
		R292P、Y300L &	R255L 、 D270E 、			
		P396L	R292G & P396L			

[0251]

表3: 按亲和力比率所列的示例性单突变和多突变					
比率	单突变	双突变	三突变	四突变	五突变
				R255L、D270E、 Y300L & P396L D270E、G316D、 P396L & R416G	
<1	Y300L P396L	F243L & P396L P247L & N421K R255L & P396L R292P & V305I K392T & P396L P396L & Q419H	F243L、R292P & V305I		

[0252]

表4: 示例性Fc变体的详细结合信息					
Fc序列	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	亲和力比率	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
亲和力比率 > 1					
I类: 与CD16结合增加; 与CD32B结合降低					

[0253]

表4: 示例性Fc变体的详细结合信息					
Fc序列	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	亲和力比率	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
F243L	4.79	3.44	0.84	5.70	4.10
F243L P247L D270E N421K	2.30	3.45	0.32	7.19	10.78
F243L P247L N421K	1.89	1.71	0.17	11.12	10.06
F243L R255L D270E P396L	1.75	1.64	0.38	4.61	4.32
F243L D270E G316D R416G	1.50	1.34	0.20	7.50	6.70
F243L D270E K392T P396L	3.16	2.44	0.44	7.18	5.55
F243L D270E P396L Q419H	1.46	1.15	0.26	5.62	4.42
F243L R292P	4.73		0.12	39.4	
F243L R292P	4	1.67	0.16	25	10.44
F243L R292P P300L	6.69	2.3	0.32	20.9	7.19
F243L R292P V305I	2.56	1.43	ND	>25	>25
F243L R292P V305I P396L	5.37	2.53	0.40	13.43	6.33
P247L D270E N421K	1.89	2.46	0.58	3.26	4.24
R255L D270E R292G P396L	1.39	1.30	0.65	2.14	2.00
R255L D270E Y300L P396L	1.52	1.74	0.87	1.75	2.00
R255L D270E P396L	1.34	1.65	0.87	1.54	1.90
D270E	1.25	1.48	0.39	3.21	3.79
D270E G316D R416G	2.18	2.49	0.78	2.79	3.19
D270E K392T P396L	1.81	2.28	0.79	2.29	2.89

[0254]

表4: 示例性Fc变体的详细结合信息					
Fc序列	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	亲和力比率	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
D270E P396L	1.38	1.65	0.89	1.55	1.85
D270E P396L G316D R416G	1.22		1.07	1.14	
D270E P396L Q419H	1.64	2.00	0.68	2.41	2.94
V284M R292P K370N	1.14	1.37	0.37	3.1	3.7
R292G	1.54		0.25	6.2	
R292P	2.90		0.25	11.60	
R292P V305I	1.32	1.28	0.37	3.6	3.46
II类: 与CD16结合降低; 与CD32B结合大大降低					
R292P		0.64	0.25		2.56
R292P F243L		0.6	0.12		5.00
III类: 与CD16结合增加; 与CD32B结合未改变					
F243I R292P Y300L V305I P396L	10.9	3.12	1.05	10.4	2.97
F243L R292P Y300L P396L	10.06	5.62	1.07	9.40	5.25
R292P V305I P396L	1.85	1.90	0.92	2.01	2.07
IV类: 与CD16结合大大增加; 与CD32B结合增加					
F243L R292P Y300L V305I P396L	10.06	8.25	1.38	7.29	5.98
D270E G316D P396L R416G	1.22		1.07	1.14	
亲和力比率 < 1					
V类: 与CD16结合未改变; 与CD32B结合增加					

[0255]

表4: 示例性Fc变体的详细结合信息					
Fc序列	CD16A V158	CD16A F158	CD32B	亲和力比率	
				CD16A/CD32B	
				V158	F158
R255L P396L	1.09		2.22	0.49	
Y300L	1.01		1.18		0.99
VI类: 与CD16结合增加; 与CD32B结合大大增加					
F243L P396L	1.49	1.60	2.22	0.67	0.72
P247L N421K	1.29	1.73	2.00	0.65	0.87
R255L P396L		1.39	2.22	0.49	0.63
R292P V305I	1.59	2.11	2.67	0.60	0.79
K392T P396L	1.49	1.81	2.35	0.63	0.77
P396L	1.27	1.73	2.58	0.49	0.67
P396L Q419H	1.19	1.19	1.33	0.89	0.89
VII类: 与CD16结合降低; 与CD32B结合增加/未改变					
D270E G316D P396L R416G		0.94	1.07		0.88

[0256] 在其他实施方案中,分子包含具有一个或多个氨基酸取代的变体Fc区,该取代改变(与野生型Fc区相比)变体Fc区的结合,例如,增强与激活性Fc γ R(例如Fc γ RIIA或Fc γ RIIIA)的结合和/或降低与抑制性Fc γ R(例如Fc γ RIIB)的结合。工程化了具有一个或多个氨基酸改变的多种Fc突变,并通过表面等离子体共振分析了它们的 k_{off} ,如表5中所示。结合各种Fc γ R的解离速率常数通过BIAcore分析测定,并且直接与野生型Fc的解离速率常数相比,关于所测试的各Fc γ R的比率($x = \text{野生型}k_{off} / \text{突变体}k_{off}$)显示在表5右栏中。

[0257]

表 4: Fe 突变体与野生型 Fe 的 k_{off} 之比												
M	氨基酸改变								CD16A ^V	CD16A ^F	CD32A ^H	CD32B
一种氨基酸												
1	F243L								4.8	3.4	0.6	0.8
2		D270E							1.3	1.5	2.2	0.4
3			R292P						2.4	1.6	0.7	0.3
4				S298N					nd	nd	nt	0.2
5					Y300L				1.0	1.2	2.9	1.2
6						V305I			0.9	0.6	1.3	1.2
7							A330V		0.6	1.2	0.4	0.3
8								P396L	1.3	1.7	1.6	2.6
两种氨基酸												
9	F243L							P396L	2.2	2.0	1.5	1.6
10	F243L		R292P						4.0	1.7	0.5	0.2
11			R292P			V305I			1.3	1.3	0.8	0.4
三种氨基酸												
12	F243L		R292P		Y300L				7.4	4.6	1.0	0.6
13	F243L		R292P			V305I			2.6	1.4	0.2	0.1
14	F243L		R292P					P396L	6.3	3.4	1.4	0.4
15			R292P			V305I		P396L	1.9	1.9	1.5	0.9
四种氨基酸												
16	F243L		R292P		Y300L			P396L	10.1	5.6	1.7	1.1
17	F243L		R292P			V305I		P396L	4.0	2.3	0.8	0.4
五种氨基酸												

[0258]

表 4: Fc 突变体与野生型 Fc 的 k_{off} 之比												
M	氨基酸改变							CD16A ^V	CD16A ^F	CD32A ^H	CD32B	
18	F243L		R292P		Y300L	V305I		P396L	10.1	8.3	3.2	1.4

缩写: M, 突变体编号; nd, 没有可检测的结合; nt, 未检测。在任一方向与野生型的差异 $\geq 80\%$ (≥ 0.8 倍) 的值以粗体表示。阴影表示直接通过酵母展示鉴定的 Fc 突变体; 所有其他突变体均通过定点诱变构建。

[0259] 在抗体工程化技术领域内也具有关于期望的修饰的广泛指南。在某些情况下可能期望的示例性修饰在下面列出:

[0260] 在具体的实施方案中,在变体Fc区中,具有在下列任何位置处的任何氨基酸修饰(例如,取代):235、240、241、243、244、247、262、263、269、298、328或330,并且优选具有下列残基的一个或多个:A240、I240、L241、L243、H244、N298、I328或V330。在不同的具体实施方案中,在变体Fc区中具有在下列任何位置处的任何氨基酸修饰(例如,取代):268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438或439,并且优选具有下列残基的一个或多个:H280、Q280、Y280、G290、S290、T290、Y290、N294、K295、P296、D298、N298、P298、V298、I300或L300。

[0261] 在优选的实施方案中,在以改变的亲和力结合Fc γ R的变体Fc区,具有在下列任何位置处的任何氨基酸修饰(例如,取代):255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438或439。优选地,变体Fc区具有下列残基的任一种:A256、N268、Q272、D286、Q286、S286、A290、S290、A298、M301、A312、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、N326、S326、K330、T339、A333、A334、E334、H334、L334、M334、Q334、V334、K335、Q335、A359、A360或A430。

[0262] 在不同的实施方案中,在以降低的亲和力结合Fc γ R(经由其Fc区)的变体Fc区中,具有在下列任何位置处的任何氨基酸修饰(例如,取代):252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438或439。

[0263] 在不同的实施方案中,在以增强的亲和力结合Fc γ R(经由其Fc区)的变体Fc区中,具有在下列任何位置处的任何氨基酸修饰(例如,取代):280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398或430。在不同的实施方案中,在以增强的亲和力结合Fc γ RIIA的变体Fc区中,具有下列残基的任一种:A255、A256、A258、A267、A268、N268、A272、Q272、A276、A280、A283、A285、A286、D286、Q286、S286、A290、S290、M301、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、S326、K330、A331、Q335、A337或A430。

[0264] 在其他实施方案中,本发明涵盖本领域中已知的任何Fc变体的使用,例如在下列文献中公开的那些:Jefferis等人(2002) *Immunol Lett* 82:57-65;Presta等人(2002) *Biochem Soc Trans* 30:487-90;Idusogie等人(2001) *J Immunol* 166:2571-75;Shields等人(2001) *J Biol Chem* 276:6591-6604;Idusogie等人(2000) *J Immunol* 164:4178-84;Reddy等人(2000) *J Immunol* 164:1925-33;Xu等人(2000) *Cell Immunol* 200:16-26;Armour等人(1999) *Eur J Immunol* 29:2613-24;Jefferis等人(1996) *Immunol Lett* 54:101-04;Lund等人(1996) *J Immunol* 157:4963-69;Hutchins等人(1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 92:11980-84;Jefferis等人(1995) *Immunol Lett* 44:111-17;Lund等人(1995) *FASEB J* 9:115-19;Alegre等人(1994) *Transplantation* 57:1537-43;Lund等人(1992) *Mol Immunol* 29:53-59;Lund等人(1991) *J. Immunol* 147:2657-62;Duncan等人(1988) *Nature* 332:563-64;美国专利第5,624,821号;5,885,573号;6,194,551号;7,276,586号;和7,317,091号;以及PCT公布WO 00/42072和PCT WO 99/58572。

[0265] 优选的变体包括在下列任何位置处的一种或多种修饰:228、230、231、232、233、234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、271、273、275、281、284、291、296、297、298、299、302、304、305、313、323、325、326、328、330或332。

[0266] 尤其优选的变体包括选自组A-AI的一种或多种修饰:

[0267] A. 228E、228K、228Y或228G;

[0268] B. 230A、230E、230Y或230G;

[0269] C. 231E、231K、231Y、231P或231G;

[0270] D. 232E、232K、232Y、232G;

[0271] E. 233D;

[0272] F. 234I或234F;

[0273] G. 235D、235Q、235P、235I或235V;

[0274] H. 239D、239E、239N或239Q;

[0275] I. 240A、240I、240M或240T;

[0276] J. 243R、243Y、243L、243Q、243W、243H或243I;

[0277] K. 244H;

[0278] L. 245A;

[0279] M. 247G、247V或247L;

[0280] N. 262A、262E、262I、262T、262E或262F;

[0281] O. 263A、263I、263M或263T;

[0282] P. 264F、264E、264R、264I、264A、264T或264W;

[0283] Q. 265F、265Y、265H、265I、265L、265T、265V、265N或265Q;

[0284] R. 266A、266I、266M或266T;

[0285] S. 271D、271E、271N、271Q、271K、271R、271S、271T、271H、271A、271V、271L、271I、271F、271M、271Y、271W或271G;

[0286] T. 273I;

[0287] U. 275L或275W;

[0288] V. 281D、281K、281Y或281P;

- [0289] W. 284E、284N、284T、284L、284Y或284M；
- [0290] X. 291D、291E、291Q、291T、291H、291I或291G；
- [0291] Y. 299A、299D、299E、299F、299G、299H、299I、299K、299L、299M、299N、299P、299Q、299R、299S、299V、299W或299Y；
- [0292] Z. 302I；
- [0293] AA. 304D、304N、304T、304H或304L
- [0294] AB. 305I；
- [0295] AC. 313F；
- [0296] AD. 323I；
- [0297] AE. 325A、325D、325E、325G、325H、325I、325L、325K、325R、325S、325F、325M、325T、325V、325Y、325W或325P；
- [0298] AF. 328D、328Q、328K、328R、328S、328T、328V、328I、328Y、328W、328P、328G、328A、328E、328F、328H、328M或328N；
- [0299] AG. 330L、330Y、330I或330V；
- [0300] AH. 332A、332D、332E、332H、332N、332Q、332T、332K、332R、332S、332V、332L、332F、332M、332W、332P、332G或332Y；和
- [0301] AI. 336E、336K或336Y。
- [0302] 仍然更尤其优选的变体包括选自组1-105的一种或多种修饰：
- [0303]

组	变体	组	变体
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E

[0304]

2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N

[0305]

20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N / S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E

[0306]

42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

[0307] 效应子功能可以通过诸如抗体工程化技术领域所述的那些技术或通过其他方法来修饰。例如,可以将半胱氨酸残基引入Fc区,从而容许此区中链间二硫键形成,导致可能具有改善的内化能力和/或增加的补体介导的细胞杀伤以及ADCC的同源二聚体抗体产生。参见Caron等人(1992) *J. Exp. Med.* 176:1191-1195;和B. Shopes (1992) *J. Immunol.* 148:2918-2922。具有增强的抗肿瘤活性的同源二聚体抗体还可以使用如Wolff等人(1993) *Cancer Research* 53:2560-2565中所述的异双功能(heterobifunctional)交联剂制备。可选择地,抗体可以被工程化为具有双Fc区,并且因此可以具有增强的补体裂解和ADCC能力。Stevenson等人(1989) *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230。

[0308] B2. 序列修饰

[0309] 一般地,序列修饰可以是抗体或多肽中一个或多个残基的取代、缺失或添加,该取代、缺失或添加导致了与天然序列相比的氨基酸序列改变。决定哪个氨基酸残基可以被插入、取代或缺失而不会不利地影响期望的活性的指南可以通过比较抗体或多肽的序列与同源已知的蛋白分子的序列并将在高同源性区域中进行的氨基酸序列改变数目最小化来发现。所容许的变化可以通过在序列中系统地制造氨基酸插入、缺失或取代并对所得变体测试全长或成熟的天然序列所表现的活性来确定。

[0310] 氨基酸取代可以包括一个或多个残基的保守取代或非保守取代。这种取代是本领域中熟知的,例如,保守取代需要用具有相似的结构特性和/或化学特性的另一氨基酸取代氨基酸,例如用丝氨酸取代亮氨酸。非保守取代一般需要用具有不同的结构特性和/或化学特性的另一氨基酸取代氨基酸,例如用碱性氨基酸(例如,Asn)取代酸性氨基酸(例如,

Glu)。

[0311] 取代变体的尤其优选的类型包括取代亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基以获得与亲本抗体相比具有改善的生物特性的变体抗体。产生这种取代的变体的方便方法包括使用噬菌体展示的亲合力成熟。简言之,突变几个高变区位点以产生在各位点的所有可能的氨基酸取代,将由此产生的抗体变体在噬菌体上展示,并然后筛选噬菌体展示的变体的生物活性(例如,结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以进行丙氨酸扫描诱变来鉴定显著促进抗原结合的高变区残基。可选择地或另外地,可能有利的是分析抗原-抗体复合体的晶体结构以鉴定抗体与其抗原之间的接触点。这种接触残基和相邻残基是用于根据本文所阐述的技术取代的候选物。产生了这种变体后,便如本文所述将变体组进行筛选,并且选择在一个或多个相关测定中具有优异特性的抗体用于进一步的开发。

[0312] 修饰还可以包括掺入(例如,通过取代或添加)非天然氨基酸,例如通过诸如在下列文献中描述的那些方法:例如,Wang等人(2002) Chem. Comm. 1:1-11;Wang等人(2001) Science 292:498-500;和van Hest等人(2001) Chem. Comm. 19:1897-1904。替代的策略关注的是负责氨酰基-tRNA生物合成的酶,如在例如Tang等人(2001) J. Am. Chem. 123(44):11089-11090;和Kiick等人(2001) FEBS Lett. 505(3):465中所描述的。

[0313] 在优选的实施方案中,修饰至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45或50个氨基酸残基。另外地或可选地,这种修饰可以表征为具有不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45或50个修饰的氨基酸残基。在具体的优选实施方案中,修饰了至少1个但是不超过10个残基。另外地或可选地,这种修饰可以表征为具有不超过15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2个修饰的氨基酸残基。修饰可以为全部取代、全部缺失、全部添加或取代、缺失或添加的任何组合。

[0314] 可以通过本领域中已知的多种方法来制备编码氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下),或通过对较早早期制备的变体或非变体形式的抗体进行寡核苷酸介导的(或定点的)诱变、限制性选择诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

[0315] B3. 其他修饰

[0316] 本发明的多肽变体(并且特别是抗体变体)包括经过通过例如任何类型的分子的共价附连而修饰的类似物和衍生物,只要这种共价附连允许抗体保留其表位结合免疫特异性即可。例如但是绝不旨在限制,抗体的衍生物和类似物包括被进一步修饰的那些,例如,通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、被已知保护基团/阻断基团衍生化、蛋白水解裂解、与细胞抗体单元或其他蛋白连接等。大量化学修饰的任一种均可通过已知的技术实施,包括但不限于:特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、在衣霉素存在下的代谢合成等。另外,类似物或衍生物可以含有一种或多种非天然氨基酸。

[0317] 抗体和多肽可以通过下列过程来修饰:将一个或多个糖基化位点引入抗体中、从抗体中缺失一个或多个糖基化位点或转移抗体上现有的糖基化位点,所述修饰优选不改变抗体的期望功能,例如结合活性。可以通过本领域内已知的方法将糖基化位点引入抗体的可变区和/或恒定区,或从抗体的可变区/恒定区缺失。例如,可以通过修饰或突变抗体的氨基酸序列来将糖基化位点引入本发明的抗体中以便获得期望的序列(例如,Asn-X-Thr/

Ser),并且可以通过修饰Fc区的位置296来转移糖基化位点,使得位置296而不是位置297被糖基化。修改蛋白的碳水化合物含量(糖基化)的方法是本领域中熟知的,例如,在美国专利第6,472,511号和6,218,149号;美国专利公布第20030115614号和20020028486号;EP 0359096 B1;和WO 03/035835中所描述的。

[0318] 在一些实施方案中,将本发明的分子工程化为包含改变的糖基化模式或改变的糖形。工程化糖形可用于多种目的,包括但不限于增强效应子功能。工程化糖形可以通过本领域技术人员已知的任何方法产生,例如通过使用工程化或变体表达菌株、通过与诸如N-乙酰葡萄糖氨基转移酶III(GnT-III)等一种或多种酶共表达、通过在多种生物体或来自多种生物体的细胞系中表达本发明的抗体、或通过在抗体表达和纯化之后修饰碳水化合物。用于产生工程化糖形的方法是本领域中已知的,并且包括但不限于在下列文献中所述的那些:例如,Okazaki等人(2004) JMB 336:1239-1249;Shinkawa等人(2003) J Biol Chem 278:3466-3473;Shields等人(2002) J Biol Chem 277:26733-26740;Davies等人(2001) Biotechnol Bioeng 74:288-294;Umana等人(1999) Nat. Biotechnol 17:176-180;美国专利第6,602,684号;美国专利公布第20030157108号、20030115614号和20030003097号;WO 02/311140;WO 02/30954;WO 01/292246;WO 00/61739;可得自Biowa, Inc. (Princeton, NJ)的Potillegent™技术;和可得自GLYCART biotechnology AG (Zurich, Switzerland)的GlycoMAb™糖基化工程技术。

[0319] B4. 多肽轭合物

[0320] 本发明的多肽可以与异源多肽或其部分重组融合或化学轭合(包括共价轭合和非共价轭合二者)以产生融合蛋白。优选地,本发明的多肽(尤其是抗体)与异源多肽的至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90或至少100个氨基酸融合以产生期望的融合蛋白。融合不是必须需要直接的,而是可以通过连接子序列产生。本发明的多肽还可以附连到固体支撑体或半固体基质上,固体支撑体或半固体基质特别可用于靶抗原的免疫测定或纯化。这种支撑体和基质包括但不限于:玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖珠子、丙烯酰胺珠子、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。可以通过例如在Methods in Enzymology (酶学方法), 44 (1976) 中所描述的方法来完成附连。

[0321] 可以将抗体和多肽与治疗剂轭合以便修饰给定的生物反应、影响(例如,增加)治疗剂的血清半衰期或将治疗剂靶向特定亚类的细胞。还可以将它们与标记序列(例如,六-组氨酸肽或“flag”标签)融合以利于纯化。用于将这种治疗部分与抗体轭合的技术是熟知的;参见,例如Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery (用于药物递送的抗体)”,在Controlled Drug Delivery (受控的药物递送) (第2版,Robinson等人(编辑),1987,第623-53,Marcel Dekker, Inc.)中。

[0322] 另外的融合蛋白可以通过下列技术产生:基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)。可以采用DNA改组来改变本发明的分子的活性(例如,具有更高的亲和力和更低的解离速率的抗体)。在本发明的抗体和多肽或它们的编码核酸重组之前,可以通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法对本发明的抗体和多肽或它们的编码核酸重组进行随机诱变以进一步改变它们。可以将编码本发明的分子的多核苷酸的一个或多个部分与一种或多种异源分子的一种或多种组分、基序、区段(section)、部分、结构域、

片段等重组。

[0323] B5. 片段

[0324] 本发明另外提供了抗体片段和其他多肽片段。这种片段在例如与全长的天然抗体或蛋白比较时可以在N-末端或C-末端被截断或者可以缺乏内部残基。某些片段可以缺乏对期望的生物活性不必需的氨基酸残基。这些片段可以通过大量常规技术的任一种制备。可以化学合成期望的肽片段。可选的方法包括：通过酶促消化产生抗体或多肽片段，例如通过用已知在特定氨基酸残基限定的位点裂解蛋白的酶处理蛋白，或通过用合适的限制性酶消化DNA；并分离期望的片段。又一合适的技术包括通过聚合酶链式反应(PCR)分离和扩增编码期望抗体或多肽片段的DNA片段。在PCR中的5'和3'引物中采用限定DNA片段的期望末端的寡核苷酸。优选地，抗体和多肽片段与本文所公开的天然抗体或多肽共同拥有至少一种生物活性和/或免疫活性。

[0325] 在一些实施方案中，本发明的多肽还包含二聚化结构域，该二聚化结构域可以包含二聚化序列和/或包含一个或多个半胱氨酸残基的序列。在一些实施方案中，二聚化结构域位于抗体重链或轻链可变结构域与病毒包膜蛋白的至少一部分之间，并且在二聚化结构域中可以存在一个或多个二硫键和/或单个二聚化序列以提供二价展示。在一些实施方案中，F(ab)₂的重链将在不包括铰链区的二聚化结构域二聚化。二聚化结构域可以包含亮氨酸拉链序列。

[0326] 在另一实施方案中，本发明的多肽片段包含：另一多肽的氨基酸序列的至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少15个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基、至少25个连续氨基酸残基、至少30个连续氨基酸残基、至少40个连续氨基酸残基、至少50个连续氨基酸残基、至少60个连续氨基酸残基、至少70个连续氨基酸残基、至少连续的80个氨基酸残基、至少连续的90个氨基酸残基、至少连续的100个氨基酸残基、至少连续的125个氨基酸残基、至少150个连续氨基酸残基、至少连续的175个氨基酸残基、至少连续的200个氨基酸残基或至少连续的250个氨基酸残基的氨基酸序列。在具体的实施方案中，多肽的片段保留多肽的至少一种功能。

[0327] B6. 双体和DART

[0328] 本发明还提供了双体和双亲和性再导向(retargeting)剂(“DART”)。双体和DART包含一般源自本发明的抗体和多肽的抗原结合结构域。双体和DART的设计和构建描述于：例如2008年1月4日提交的美国临时专利申请第61/019,051号和2007年6月21日提交的美国临时专利申请第60/945,523号；2006年4月17日提交的美国专利申请第11/409,339号；Marvin等人(2005)Acta Pharmacol.Sin.26:649-658；Olafsen等人(2004)Prot.Engr.Des.Sel.17:21-27；Holliger等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)90:6444-6448。双体分子的各多肽链包含来自相同或不同抗体的V_L结构域和V_H结构域，它们共价连接以便结构域不受自组装限定。两条多肽链的相互作用将产生两个V_L-V_H配对，从而形成两个表位结合位点，即，二价分子。V_H或V_L结构域并不限定在多肽链内的任何位置，这两种结构域也不限制在它们相对于彼此的位置上；仅有的限制是可得到互补的多肽链以形成功能双体。这两种结构域可以被肽连接子分隔，并且可以将多肽链工程化为在各链上包含至少一个半胱氨酸残基以便可以形成链间二硫键来稳定双体。

[0329] 在V_L和V_H结构域源自相同的抗体时，两条互补的多肽链可以是相同的，从而产生二

价单特异性抗体;或者两条互补的多肽链可以是不同的,从而产生二价双特异性抗体(例如,结合同一抗原的两种不同表位的抗体)。当 V_L 和 V_H 结构域源自对不同抗原特异性的抗体时,功能性双特异性双体的形成需要两条不同多肽链之间的相互作用,即,异源二聚体的形成。在具体的实施方案中,双体的至少一个表位结合位点对下列特定细胞上的抗原是特异性的:例如B细胞或T细胞、吞噬细胞、自然杀伤(NK)细胞或树突细胞。

[0330] 在多个实施方案中,双体的一条或多条多肽链包含Fc结构域。双体分子的多肽链中的Fc结构域优先地二聚化,从而导致表现出免疫球蛋白样特性如Fc-Fc γ R相互作用的双体分子的形成。包含Fc的双体可以是二聚体,例如由两条多肽链构成,每条包含 V_H 结构域、 V_L 结构域和Fc结构域。在多个实施方案中,双体的一条或多条多肽链包含铰链结构域,该铰链结构域可以源自任何免疫球蛋白同种型或同种异型,包括IgA、IgD、IgG、IgE和IgM。在优选的实施方案中,铰链结构域来源于IgG,其中该IgG同种型是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其同种异型。可以在相对于链的其他结构域或部分的任何位置处将铰链结构域工程化到多肽链中,并且在某些情况下,可以与Fc结构域一起被工程化以便使双体包含铰链-Fc结构域。

[0331] 在其他实施方案中,包含Fc结构域的双体分子可以是四聚体,该四聚体可以包含两条“较重”多肽链(即,包含 V_L 、 V_H 和Fc结构域的多肽链)和两条“较轻”多肽链(即,包含 V_L 和 V_H 的多肽链)。这种较轻链和较重链可以相互作用以形成单体,并且经由它们未配对的Fc结构域相互作用以形成Ig样分子,该分子可以是DART分子。这种Ig样双体是四价的并且可以是单特异性的、双特异性的或四特异性的。Ig样DART物质具有独特的特性,因为其结构域可以被设计成结合相同表位(以便形成能够结合四个相同抗原分子的四价单表位特异性Ig样DART)或者结合不同的表位或抗原。例如,其结构域可以被设计成结合同一抗原的两个表位(以便形成四价的单抗原特异性双表位特异性Ig样DART),或者结合不同的抗原分子的表位以便形成一对结合位点对第一抗原具有特异性并且第二对结合位点对第二抗原具有特异性的四价Ig样DART)。可以容易地制备具有这些属性的组合的杂交分子。

[0332] 尽管不旨在受具体作用机制的限制,但是本发明的双体分子表现出与本领域中已知的治疗抗体相比增强的治疗功效部分是由于双体免疫特异性结合以降低的水平表达特定抗原(例如,Fc γ R)的靶细胞的能力所致,例如,凭借双体由于其双体-表位相互作用的改善的亲抗原性而较长时间保留在靶细胞上的能力。因此,本发明的双体在治疗、预防或管控其中靶抗原在靶细胞群中低水平表达的亚群体的疾病或疾患如癌症中具有特别效用。

[0333] 由于它们增加的效价、低解离速率和从循环中快速清除(对于在约50kDa或低于约50kDa的小尺寸双体),本领域中已知的双体分子还在肿瘤成像的领域中显示了特别用途(Fitzgerald等人(1997)Protein Eng.10:1221)。尤其重要的是不同细胞的交联,例如细胞毒性T细胞与肿瘤细胞的交联(Staerz等人(1985)Nature 314:628-31;Holliger等人(1996)Protein Eng.9:299-305)。双体表位结合结构域还可以指向任何免疫效应子细胞的表面决定簇,例如在T淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞或其他单核细胞上表达的CD3、CD16、CD32或CD64。在许多研究中,还发现与效应子细胞决定簇如Fc γ 受体(Fc γ R)结合的双体激活效应子细胞(Holliger等人(1996)Protein Eng.9:299-305;Holliger等人(1999)Cancer Res.59:2909-2916)。通常,效应子细胞激活是由结合抗原的抗体经由Fc-Fc γ R相互作用与效应子细胞结合而触发的;在这个方面,本发明的双体分子可以表现Ig样功能而不依赖于它们是否包含Fc结构域。通过交联肿瘤细胞与效应子细胞,双体不仅将效应子细胞带入肿

瘤细胞邻近而且还导致有效的肿瘤杀伤。Cao和Lam (2003) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-97。

[0334] 本发明的双体分子可以使用多种方法来制备,包括从头的蛋白质合成和编码结合蛋白的核酸的重组表达。可以通过重组方法(例如,较早制备的期望多核苷酸的变体的PCR诱变)或通过固相DNA合成来制备期望的核酸序列。优选使用重组表达方法。在一个方面,本发明提供包含编码CD16A V_H 和/或 V_L 的序列的多核苷酸;在另一方面,本发明提供包含编码CD32B V_H 和/或 V_L 的序列的多核苷酸。由于遗传密码的简并性,多种核酸序列编码每种免疫球蛋白氨基酸序列,并且本发明包括编码本文所述的结合蛋白的所有核酸。

[0335] B7. 抗体的制备

[0336] 可以通过多种方法的任一种制备或获得本发明的优选实施方案的抗体。例如,这种抗体可以从血浆获得、合成获得、重组或转基因获得、经由细胞(例如,杂交瘤培养物)获得等。合成蛋白的制备已经描述于:例如Dawson等人(2000) *Ann. Rev. Biochem.* 69:923-960; Wilken等人(1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(4):412-426;和Kochendoerfer等人(1999) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(6):665-671中。

[0337] 重组抗体和转基因抗体的制备已经描述于:例如,Wang等人(2007) *IDrugs* 10(8):562-565;Hagemeyer等人(2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33(2):185-195;Rasmussen等人(2007) *Biotechnol. Lett.* 29(6):845-852;Gasser等人(2007) *Biotechnol. Lett.* 29(2):201-212;Aubrey等人(2006) *J. Soc. Biol.* 200(4):345-354;Laffly等人(2006) *J. Soc. Biol.* 200(4):325-343;Jefferis(2005) *Biotechnol. Prog.* 21(1):11-16;Smith等人(2004) *J. Clin. Pathol.* 57(9):912-917;Kipriyanov等人(2004) *Mol. Biotechnol.* 26(1):39-60;Fischer等人(2003) *Vaccine* 21(7-8):820-825;Maynard等人(2000) *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2:339-376;Young等人(1998) *Res. Immunol.* 149(6):609-610;和Hudson(1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(4):395-402中。

[0338] 经由细胞(例如,杂交瘤)培养物的抗体制备已经描述于:例如,Laffly等人(2006),如上;Aldington等人(2007) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 848(1):64-78;S.S.Farid(2006) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 848(1):8-18;Birch等人(2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(5-6):671-685;Even等人(2006) *Trends Biotechnol.* 24(3):105-108;Graumann等人(2006) *Biotechnol. J.* 1(2):164-86;美国专利第7,112,439号;以及美国专利公布第20070037216号和20040197866号。

[0339] 抗体可以经由噬菌体展示方法制备,诸如在下列文献中公开的那些方法:例如Brinkman等人(1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50;Ames等人(1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-86;Kettleborough等人(1994) *Eur. J. Immunol.* 24:952-58;Persic等人(1997) *Gene* 187:9-18;Burton等人(1994) *Advances in Immunology* 57:191-280;PCT公布W0 90/02809;W0 91/10737;W0 92/01047;W0 92/18619;W0 93/11236;W0 95/15982;W0 95/20401;和美国专利第5,698,426号;5,223,409号;5,403,484号;5,580,717号;5,427,908号;5,750,753号;5,821,047号;5,571,698号;5,427,908号;5,516,637号;5,780,225号;5,658,727号;5,733,743号和5,969,108号。还可以使用噬菌体展示技术来增加抗体对其抗原的亲合力。该技术称为亲合力成熟,其采用了诱变或CDR步移(CDR walking)和再选择,该再选择使用关联抗原(cognate antigen)来鉴定与初始抗体或亲本抗体相比以更高的亲合力

结合抗原的抗体。参见,例如Glaser等人(1992) *J. Immunology* 149:3903; Wu等人(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton等人(1995) *J. Immunology* 155:1994; Schier等人(1996) *J. Mol. Biol.* 263:551。

[0340] 单克隆抗体可以通过本领域技术人员已知的多种方法制备,例如下列文献中所述的杂交瘤方法:例如Kohler等人(1975) *Nature* 256:495, Kozbor等人(1983) *Immunology Today* 4:72或Cole等人(1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (单克隆抗体和癌症治疗), Alan R. Liss, Inc., 第77-96页,或例如美国专利第4,816,567号中所述的重组DNA方法;或者抗体可以使用下列文献中所述的技术从噬菌体抗体文库分离:例如Clackson等人(1991) *Nature* 352:624-628和Marks等人(1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597。可以使用本领域中熟知的多种方法来制备所感兴趣的抗原的多克隆抗体。例如,可以通过用感兴趣的抗原或其衍生物注射来免疫多种宿主动物,包括但不限于:兔、绵羊、山羊、狗、小鼠、大鼠和豚鼠,并且在容许进行免疫反应之后,可以从被免疫的动物的血清中鉴定抗体。

[0341] 双特异性抗体还可以如下制备:通过例如两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达来制备,其中所述的两对链具有不同的特异性,随后使用亲和色谱纯化期望的分子,如Milstein等人(1983) *Nature* 305:537-39, WO 93/08829, Traunecker等人(1991) *EMBO J.* 10:3655-59中所描述的。在不同的方法中,将具有期望的结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合,例如与包含铰链区、 C_{H2} 区和 C_{H3} 区的至少一部分的重链恒定结构域融合。可以将编码这些融合体的核酸插入到相同的或不同的表达载体中,并在合适的宿主生物体中表达。

[0342] 可以使用不能够表达内源免疫球蛋白重链和轻链基因但是可以表达人重链和轻链基因的转基因小鼠来制备全长人抗体(也称为完全人抗体)。用所选抗原如本发明的多肽的全部或一部分以正常方式免疫转基因小鼠。转基因小鼠所含有的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,并且随后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术制造治疗上可用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体是可能的。制备人抗体的这种技术的综述描述于:例如Lonberg和Huszar(1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93和美国专利第5,633,425号中。全长人抗体还可以使用本领域中已知的其他技术来制备,包括噬菌体展示文库,如Hoogenboom和Winter(1991) *J. Mol. Biol.* 227:381和Marks等人(1991) *J. Mol. Biol.* 222:581中所描述的。全长人抗体还可以从例如Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 和Genpharm (San Jose, Calif.) 商购获得。可以使用被称为“导向选择(guided selection)”的技术来产生识别所选表位的全长人抗体。在此方法中,使用所选的非人单克隆抗体如小鼠抗体来指导识别同一表位的完全人抗体的选择,诸如Jespers等人(1994) *Biotechnology* 12:899-903所描述的。

[0343] 本发明还包括编码包括多肽和抗体的本发明分子的多核苷酸、以及包含所述多核苷酸的载体和包含所述载体的宿主细胞。编码本发明分子的多核苷酸的获得和所述多核苷酸的核苷酸序列的确定可以通过本领域中已知的任何方法进行,例如,重组DNA技术、定点诱变、PCR等。在一个实施方案中,可以通过本领域中已知的标准技术来筛选本领域中可用的人文库或任何其他文库以克隆编码本发明分子的核酸。

[0344] B8. 抗体的表征

[0345] 本发明的抗体可以用多种方法表征。具体地,可以测定本发明的抗体免疫特异性结合抗原如HER2/neu的能力,或者在分子包含Fc结构域(或其部分)时测定表现Fc-Fc γ R相互作用的能力,即,Fc结构域(或其部分)与Fc γ R的特异性结合。这种测定可以在溶液中(例如,Houghten(1992) *Bio/Techniques* 13:412-421)、珠子上(Lam(1991) *Nature* 354:82-84)、芯片上(Fodor(1993) *Nature* 364:555-556)、细菌上(美国专利第5,223,409号)、孢子上(美国专利第5,571,698号;5,403,484号;和5,223,409号)、质粒上(Cu11等人(1992) *Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 89:1865-1869)或噬菌体上(Scott和Smith(1990) *Science* 249:386-390;Devlin(1990) *Science* 249:404-406;Cwirla等人(1990) *Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 87:6378-6382;和Felici(1991) *J.Mol.Biol.* 222:301-310)进行。然后可以对被鉴定为免疫特异性结合抗原的分子进行其对抗原的特异性和亲和力的测定。

[0346] 可用于分析免疫特异性结合、交叉反应性和Fc-Fc γ R相互作用的免疫测定包括但不限于使用下列技术的竞争性和非竞争性测定系统:例如蛋白质印迹、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀反应、凝胶扩散沉淀反应、免疫色谱测定、免疫扩散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定和蛋白A免疫测定等(参见,例如Ausubel等人,2008, *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学实验方案))。

[0347] 对靶抗原的结合亲和力通常通过标准抗体-抗原测定来测量或确定,例如Biacore竞争性测定、饱和测定或诸如ELISA或RIA等免疫测定。

[0348] 优选地,使用采用本领域技术人员已知的任何技术的荧光激活细胞分选(FACS)进行基于免疫或功能的测定以表征本发明的分子。流式分选仪能够快速检测被本发明的分子结合(例如调理)的大量单个细胞(例如,1千万-1亿个细胞/小时)。另外,用于优化抗体行为的特定参数包括但不限于:抗原浓度、动力学竞争时间或FACS严谨性,可以改变它们的每一个以便选择表现出特异性结合特性的抗体分子。用于分选和检测生物细胞的流式细胞仪是本领域中熟知的。已知的流式细胞仪描述于:例如美国专利第4,347,935号;5,464,581号;5,483,469号;5,602,039号;5,643,796号;和6,211,477号中。其他已知的流式细胞仪是Becton Dickinson and Company出售的FACS Vantage™和Union Biometrica出售的COPAS™系统。

[0349] 可以使用基于表面等离子体共振的测定来表征抗原结合结构域或Fc-Fc γ R结合的动力学参数。可以使用本领域技术人员已知的任何方法,例如,在下列文献中所描述的:例如Dong等人(2002) *Review in Mol.Biotech.* 82:303-323;Mullet等人(2000) *Methods* 22:77-91;Rich等人(2000) *Current Opinion in Biotechnology* 11:54-61;Fivash等人(1998) *Current Opinion in Biotechnology* 9:97-101;和美国专利第6,373,577号;6,289,286号;5,322,798号;5,341,215号;和6,268,125号。使用数据绘制结合曲线并确定速率常数,例如, K_{on} 、 K_{off} 和表观平衡结合常数 K_d ,例如在下列文献中所描述的,例如Myszka(1997) *Current Opinion in Biotechnology* 8:50-57;O' Shannessy等人(1996) *Analytical Biochemistry* 236:275-283;Morton等人(1995) *Analytical Biochemistry* 227:176-185;Fisher等人(1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:389-95;O' Shannessy(1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:65-71;和Chaiken等人(1992) *Analytical*

Biochemistry 201:197-210。在优选的实施方案中,使用SPR分析确定的动力学参数可以用作分子如何在功能测定(如ADCC)中起作用的预测性量度。

[0350] 包含Fc结构域(或其部分)和/或包含对Fc γ R特异性的表位结合结构域分子与Fc γ R结合的表征可以根据抗体工程化技术领域中所描述的方法进行。用于效应子细胞功能的测定是熟知的,例如在下列文献中所描述的:Abdul-Majid等人(2002) Scand.J.Immunol.55:70-81;Perussia等人(2000) Methods Mol.Biol.121:179-192; Lehmann等人(2000) J.Immunol.Methods 243(1-2):229-242;Ding等人(1998) Immunity 8:403-411;Baggiolini等人(1998) Experientia 44(10):841-848;Brown(1994) Methods Cell Biol.45:147-164;和Munn等人(1990) J.Exp.Med.172:231-237。

[0351] 例如,可以如下进行Fc γ R介导的吞噬作用的测定:使用人单核细胞,通过先前在Tridandapani等人(2000) J.Biol.Chem.275:20480-20487中所描述的方法测量THP-1细胞吞噬荧光素化的IgG调理的绵羊红细胞(SRBC)的能力;或使用抗体依赖性调理吞噬测定(ADCP),如Bedzyk等人(1989) J.Biol.Chem.264(3):1565-1569所描述的。可以使用本领域技术人员已知的标准方法来表征包含Fc结构域(或其部分)的本发明分子与C1q的结合和对补体依赖性细胞毒性(CDC)的介导。例如,为确定C1q结合,可以进行结合C1q的ELISA;为估计补体激活,可以进行补体依赖性细胞毒性(CDC)测定,例如在Gazzano-Santoro等人(1996) J.Immunol.Methods 202:163中所描述的。

[0352] 在另一实施方案中,可以使用本领域技术人员已知的任何标准方法来测定本发明的分子在效应子细胞如自然杀伤细胞中的Fc γ R-介导的ADCC活性,并且这些方法描述于:例如Weng等人(2003) J.Clin.Oncol.21:3940-3947;Perussia等人(2000) Methods Mol.Biol.121:179-192;Ding等人(1998) Immunity 8:403-411中。在具体的优选实施方案中,使用时间分辨荧光测定来测量对荧光标记的靶细胞的ADCC活性,如在例如Blomberg等人(1996) Journal of Immunological Methods 193:199-206中所描述的。用于本发明的ADCC测定的靶细胞包括但不限于:乳癌细胞系,例如ATCC登录号为HTB-30的SK-BR-3(Tremp等人(1976) Cancer Res.33-41);B淋巴细胞;来源于伯基特淋巴瘤的细胞,例如ATCC登录号为CCL-86的Raji细胞(Epstein等人(1965) J.Natl.Cancer Inst.34:231-240);和ATCC登录号为CCL-213的Daudi细胞(Klein等人(1968) Cancer Res.28:1300-1310)。靶细胞必须被待测定的分子的抗原结合位点识别。优选地,用于本发明的ADCC测定的效应子细胞是外周血单核细胞(PBMC),其优选是使用本领域技术人员已知的标准方法从正常的人血纯化的,例如使用Ficoll-Paque密度梯度离心。

[0353] C. 治疗方法&药物组合物

[0354] 本发明组合物(例如,抗体和多肽)的施用可以用于“预防性”或“治疗性”目的,或者可选择地可用于诊断目的。如果施用的量对于提供对实际表现的疾病的治疗是生理上显著的,则认为本发明的组合物是为“治疗性”目的施用的。当治疗性提供时,化合物优选在鉴定实际疾病症状时(或其后不久)提供。化合物的治疗性施用用于减轻这种疾病的严重程度或逆转其进展。如果施用的量对于提供对可能疾病或病症的治疗是生理上显著的,则认为本发明的组合物是为“预防性”目的施用的。当预防性提供时,化合物优选在其任何症状之前提供。化合物的预防性施用用于防止或减轻疾病的任何后续进展或复发。

[0355] 提供治疗(therapy)或“治疗(treating)”是指在损伤、病理或病症的治疗或改善

方面的任何成功迹象,包括任何客观参数或主观参数,例如症状的减轻、减缓、减少;或使患者对损伤、病理或病症更加耐受;减缓退化或衰弱的速率;使退化的终点不太衰弱;或改善患者的身体或精神健康。症状的治疗或改善可以基于客观参数或主观参数,包括身体检查、神经精神检测和/或精神病学评定的结果。

[0356] 治疗的优选受治疗者包括经受疾病和其他病理状态的动物,最优选哺乳动物物种例如人或其他灵长类;和家畜,例如狗、猫和类似动物。“患者”是指受治疗者,优选哺乳动物(包括人)。

[0357] 本发明的某些实施方案涉及包含一种或多种治疗剂的药物组合物和施用治疗有效量的一种或多种治疗剂的方法,所述一种或多种治疗剂能够预防性和/或治疗性地治疗疾患。术语“治疗剂”是指对预防性或治疗性治疗疾患具有治疗作用的任何药剂。示例性治疗剂包括本发明的抗体和多肽以及可以与抗体或多肽组合施用或轭合的其他治疗剂。在优选的实施方案中,治疗剂是本发明的抗体,并且优选是抗体片段、双体、Ig样DART或融合蛋白。

[0358] 本发明的分子尤其可用于治疗和/或预防其中期望Fc γ R介导的效应子细胞功能(例如,ADCC)的疾病、疾患或感染(例如,癌症、传染病)。例如,本发明的分子可以结合免疫效应子细胞(例如,NK细胞)上的细胞表面抗原和Fc γ R(例如,Fc γ RIIIA),刺激针对所述细胞的效应子功能(例如,ADCC、CDC、吞噬作用、调理作用等)。在一些实施方案中,本发明的抗体和多肽特别适于治疗癌症。标准单克隆抗体治疗的功效取决于受治疗者的Fc γ R多态性。Carton等人(2002)Blood 99:754-758;Weng等人(2003)J Clin Oncol.21(21):3940-3947。这些受体在效应子细胞表面上表达并介导ADCC。高亲和力等位基因改善效应子细胞介导ADCC的能力。本发明的抗体和多肽可以包含表现出对效应子细胞上的Fc γ R亲和力增强(相对于野生型Fc结构域)的变体Fc结构域,因此为患者提供了更好的免疫治疗剂而与他们的Fc γ R多态性无关。

[0359] 对于诊断目的,抗体或多肽可以与可检测物质偶联以便使它们可用于例如监测疾病、疾患或感染的发展或进展。可检测物质的实例包括多种酶(例如,辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶等)、辅基(例如,抗生物素蛋白/生物素)、荧光材料(例如,伞形酮、荧光素或藻红蛋白)、发光材料(例如,鲁米诺)、生物发光材料(例如,萤光素酶或水母发光蛋白)、放射活性材料(例如,碳-14、锰-54、锶-85或锌-65)、正电子发射金属和非放射活性的顺磁性金属离子。可检测物质可以使用本领域中已知的技术直接与本发明的分子偶联或轭合或通过中间物(例如,连接子)间接偶联或轭合。

[0360] C1.可治疗的疾患

[0361] 可以通过本发明的多个实施方案治疗的示例性疾患包括但不限于增殖性疾患、细胞增殖性疾患和癌症、自身免疫疾病、炎性疾患和传染病。在多个实施方案中,本发明涵盖用于治疗、预防或管控受治疗者的疾病或疾患的方法和组合物,包括向受治疗者施用治疗有效量的结合疾病抗原的一种或多种分子(抗体或多肽)。例如,本发明的分子尤其可用于预防、抑制、减轻原发性肿瘤的生长或退化、癌细胞的转移和传染病。尽管不旨在受具体作用机制限制,但是本发明的分子介导导致肿瘤清除、肿瘤减小或其组合的效应子功能。在可选的实施方案中,本发明的双体通过细胞表面抗原和/或受体的交联和增强的凋亡或负生长调节信号传导而介导治疗活性。

[0362] 对Fc γ RIIB具有降低的亲合力并且对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA具有增加的亲合力的抗体可以导致在Fc γ R结合后增强的激活反应,并且因此对治疗和/或预防癌症具有治疗功效。可以通过本文的方法治疗的癌症的非限制性实例包括:急性髓细胞性淋巴瘤、肾上腺癌、腺癌、基底癌、膀胱癌、骨癌、骨和结缔组织肉瘤、脑癌、乳癌、支气管癌、子宫颈癌、绒毛膜癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia)、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、眼癌、输卵管癌、胆囊癌、胃肠癌、胶质瘤、毛细胞性白血病、肝细胞瘤、霍奇金病、肝内胆管癌、关节癌、卡波济氏肉瘤、肾癌、喉癌、肝癌、白血病、肺癌、成淋巴细胞白血病、淋巴瘤、恶性间皮瘤、成神经管细胞瘤(medulloblastoma)、黑色素瘤、间皮瘤、中耳癌、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、粘液肉瘤、鼻腔癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、鼻癌、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌(penal cancer)、腹膜癌、咽癌、垂体腺癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、唾液腺癌、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、泌尿系癌、子宫癌、阴道癌、前庭癌(vesticular cancer)、外阴癌和维尔姆斯瘤。

[0363] 在一些实施方案中,癌症是造血性癌症或血液相关的癌症,例如淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、恶性淋巴瘤、脾脏癌症和淋巴结癌症。在优选的实施方案中,癌症是B细胞相关的癌症,诸如高、中或低级淋巴瘤(包括B细胞淋巴瘤,例如伯基特淋巴瘤、弥漫性大细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、外套细胞淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤;和T细胞淋巴瘤)和白血病(包括诸如B细胞白血病(CD5+B淋巴细胞)等慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、诸如急性成淋巴细胞白血病的淋巴系白血病、脊髓发育不良、诸如急性髓细胞性白血病等髓细胞性白血病和继发性白血病);多发性骨髓瘤,例如浆细胞恶性肿瘤;和其他造血性癌症或者B细胞或T细胞相关的癌症。其他示例性癌症是包括下列的其他造血细胞的癌症:多形核白细胞,例如嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞;以及单核细胞;树突细胞;血小板;红细胞和自然杀伤细胞。

[0364] 在一些实施方案中,待治疗的癌症是乳癌、前列腺癌、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、子宫内膜癌、肾上腺癌或非小细胞肺癌。在一些实施方案中,癌症是乳癌或前列腺癌。在一些实施方案中,癌症是其中HER2/neu过表达的癌症。在特定的实施方案中,与不存在本发明的抗体或多肽时的癌细胞的生长相比,本发明的抗体或多肽将癌细胞生长抑制或减少至少99%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少45%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%或至少10%。

[0365] 对Fc γ RIIB具有增加的亲合力并且对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA具有降低的亲合力的抗体可以导致在Fc γ R结合后减少的激活反应并且因此对治疗和/或预防炎症和自身免疫疾病具有治疗功效。可以通过本文的方法治疗的自身免疫疾病或自身免疫相关病症包括但不限于:变应性疾病,变应性脑脊髓炎、变应性神经炎、变应性鼻炎、斑秃(alopecia areata)、ALS;贫血,包括再生障碍性贫血、库氏试验阳性贫血(Coombs positive anemia)、戴-布二氏贫血(Diamond Blackfan anemia)、包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA)的免疫性溶血性贫血、恶性贫血和纯红细胞再生障碍(PRCA);强直性脊椎炎;抗原-抗体复合体介导的疾病;抗肾小球基底膜病;抗磷脂抗体综合征;关节炎(例如,类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、幼年型关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎);哮喘;动脉粥样硬化;肾上腺的自

身免疫疾病;睾丸和卵巢的自身免疫疾病,包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎;自身免疫性内分泌疾病,包括自身免疫性甲状腺炎;慢性甲状腺炎(桥本甲状腺炎);亚急性甲状腺炎;特发性甲状腺机能减退;阿狄森氏病;格雷夫斯病(Grave's disease);自身免疫性多腺体综合征(或多腺体内分泌病综合征);1型糖尿病(也称为胰岛素依赖性糖尿病(IDDM))和席汉氏综合征;自身免疫性肝炎;自身免疫性心肌炎;自身免疫性嗜中性白细胞减少症;自身免疫性多内分泌腺病;自身免疫性血小板减少症;贝切特氏病;贝格尔氏病(IgA肾病);梗阻性细支气管炎(非移植);心肌病,包括冠状动脉疾病;Castleman综合征;口炎性腹泻(麸质肠病);慢性自身免疫性荨麻疹;慢性疲劳性免疫功能紊乱综合征(CFIDS);慢性炎性脱髓鞘性多神经病;CNS炎性疾病;冷凝集素病;结肠炎;涉及T细胞浸润和慢性炎症反应的病症;冷球蛋白血症;皮肤红斑狼疮;皮炎,包括特异性皮炎;涉及白细胞渗出(leukocyte diapedesis)的疾病;湿疹;脑炎;特发性混合型冷球蛋白血症;VIII因子缺陷;纤维肌痛-纤维肌炎;肾小球肾炎;古德帕斯彻综合症(Goodpasture's syndrome);移植物抗宿主疾病(GVHD);肉芽肿病,包括韦格纳氏肉芽肿病和粒细胞缺乏症;格林-巴利综合征;血友病A;特发性肺纤维化;原发性血小板减少性紫癜(ITP);IgA肾病;IgM多神经病;IgA神经病和IgM介导的神经病;免疫复合体肾炎;伴有由细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应的免疫反应;幼发型糖尿病;Lambert-Eaton肌无力综合征;白细胞粘附缺陷;白血球减少症;扁平苔藓;狼疮(包括肾炎性、非肾炎性、盘状、脱发性);淋巴细胞间质性肺炎(HIV);梅尼埃病;脑膜炎、混合性结缔组织病;多发性器官损伤综合征;多发性硬化;重症肌无力;非特异性间质性肺炎(NSIP);全血细胞减少症;类天疱疮(例如,大疱性类天疱疮和疤痕性类天疱疮);天疱疮(例如,寻常性、落叶型和副肿瘤性天疱疮);多软骨炎(polychondritis);风湿性多肌痛;多肌炎和皮肌炎;原发性无丙种球蛋白血症;原发性胆汁性肝硬变;原发性甲状腺机能低下;银屑病;急进性肾小球肾炎;莱特氏病;呼吸窘迫综合征,包括成人型呼吸窘迫综合征(ARDS);与炎性肠病(IBD)相关的反应(例如,克罗恩病、溃疡性结肠炎);雷诺氏现象(Reynauld's phenomenon);结节病;舍格伦综合征;实体器官移植排斥(包括高群体反应性抗体效价的预处理、组织中IgA沉积等);斯-约二氏综合征;僵人综合征;系统性红斑狼疮(SLE);硬皮病,包括系统性硬皮病;CREST综合征和硬化症;血栓性血小板减少性紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura)(TTP);中毒性表皮坏死松解症;结核病;葡萄膜炎;血管炎,如疱疹样皮炎性血管炎、ANCA相关性血管炎(AAV)、大血管血管炎(包括风湿性多肌痛、巨细胞动脉炎和高安氏动脉炎)、中血管血管炎(包括川崎病、韦格纳氏肉芽肿病和结节性多动脉炎)和小血管血管炎(包括丘-施二氏动脉炎、显微镜下多动脉炎/多脉管炎(microscopic polyarteritis/polyangiitis)、超敏性/变应性血管炎;亨-舍二氏紫癜和原发性冷球蛋白血症性血管炎)和白癜风。在优选的实施方案中,自身免疫疾患选自自由下列组成的组:克罗恩病、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、1型糖尿病和血管炎。

[0366] 可以通过本文的方法治疗的炎性疾患的非限制性实例包括免疫介导的炎性疾患(IMID),它是由抗原特异性病理免疫反应引起和维持的炎性病症。在这些疾患中尤其是多种类型的变应性疾病,如哮喘、枯草热和荨麻疹;关节炎,如骨关节炎和类风湿性关节炎;慢性炎症;慢性阻塞性肺疾病(COPD);结缔组织疾患;湿疹和特应性皮炎;纤维化;移植排斥和移植物抗宿主疾病;炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎);炎性骨质溶解;胰岛素依

赖性糖尿病;肺纤维化;视网膜炎;未分化关节病;未分化脊椎关节病和葡萄膜炎。包含对Fc γ RIIB特异性的至少一个表位结合结构域和/或对Fc γ RIIB的亲合力增强并且对Fc γ RIIBIA的亲合力降低的变体Fc结构域的本发明分子还可以用于预防移植排斥。在优选的实施方案中,IMID选自由下列组成的组:哮喘、湿疹和特应性皮炎、纤维化、移植排斥、移植物抗宿主病和炎性肠病。

[0367] 与不接受本发明的抗炎性多肽的动物的炎症相比,本发明的抗炎性多肽将优选将动物的炎症降低至少99%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少45%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%、或至少10%。

[0368] 在某些实施方案中,本发明的多肽对传染原是有毒的,与不存在所述分子时的免疫反应相比,其增强抗所述传染原的免疫反应或增强抗所述传染原的效应子功能。可以通过本发明的分子治疗或预防的传染病是由传染原引起的,所述传染原包括但不限于:细菌、真菌、原生动物和病毒。非限制性的示例性细菌疾病包括由下列细菌引起的那些:炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*) (炭疽)、博氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*) (莱姆病)、念珠菌属(*Candida*)、衣原体、霍乱、白喉、大肠杆菌(*E. coli*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecialis*)、幽门螺旋菌(*Helicobacter pylori*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、军团杆菌属(*Legionella*)、分支杆菌属(*Mycobacterium*)、支原体、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、百日咳、鼠疫、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎球菌(*S. pneumoniae*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和破伤风。非限制性原生动物疾病包括由利什曼原虫、疟疾(*malaria*)或锥虫引起的那些。

[0369] 病毒性疾病的非限制性实例包括由下列病毒引起的那些:腺病毒、虫媒病毒、冠状病毒、柯萨奇病毒、巨细胞病毒、埃博拉、棘状病毒、艾柯病毒、内毒素(LPS)、肠道病毒、埃巴病毒、肝炎病毒(例如,甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、鼠肝炎)、疱疹病毒(例如,I型单纯疱疹病毒(HSV-I)、II型单纯疱疹病毒(HSV-II)、鼠 γ 疱疹病毒)、I型人免疫缺陷病毒(HIV-I)、II型人免疫缺陷病毒(HIV-II)、汉坦病毒(hantavirus)、流感病毒、白血病毒(例如,鼠白血病、猫白血病等);麻疹病毒、腮腺炎病毒、乳头瘤病毒、乳多泡病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒、反转录病毒、鼻病毒、牛痘病毒、轮状病毒、风疹病毒、天花、T细胞淋巴瘤病毒1、牛痘(*vaccinia*)、水痘(*varicella*)和诸如病毒性脑膜炎、脑炎或登革热等病毒性疾病的传染原。

[0370] C2. 制剂

[0371] 药物组合物可以根据用于制备药学上可用的组合物的已知方法配制,并且可以包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。组合物可以为任何合适的形式,例如,片剂、丸剂、粉剂、锭剂、囊剂、扁囊剂、酞剂、悬浮液、乳液、溶液、糖浆、气雾剂(作为固体或在液体介质中)、含有例如最多按重量计10%的活性化合物的软膏、软明胶和硬明胶胶囊、栓剂、无菌注射溶液以及无菌包装粉末等。这种组合物可以通过任何已知的方法制备,例如通过在无菌条件下将活性成分与载体或赋形剂混合。

[0372] 还可以通过采用本领域中已知的方案配制活性成分以便施用给患者之后提供活性成分的快速释放、持续释放或缓慢释放。本发明组合物的物理特征和化学特征可以依据

施用模式和待治疗的具体疾病或疾患根据本领域的技术修饰或优化。组合物可以以单位剂型、密封容器或作为药盒的一部分提供,药盒可以包含使用说明书和/或多个单位剂型。

[0373] 在具体的实施方案中,可以通过下列方法将治疗剂掺入到组合物中:例如,在脂质体、微粒、微胶囊中封装、能够表达抗体或融合蛋白的重组细胞、受体介导的内吞作用(参见,例如Wu和Wu(1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432)、构建作为反转录病毒或其他载体的一部分的核酸等。在另一具体实施方案中,治疗剂以干燥的无菌冻干粉末或无水浓缩物在紧密密封的容器中提供,并且可以用例如水或盐水将其重构为施用给受治疗者的适当浓度。

[0374] 优选地,治疗剂作为干燥的无菌冻干粉末在紧密密封的容器中以下列单位剂量提供:至少5mg,更优选至少10mg、至少15mg、至少25mg、至少35mg、至少45mg、至少50mg或至少75mg。冻干粉末应在2°C与8°C之间储存在其原始容器中,并且分子应在重构之后的12小时内,优选6小时内、5小时内、3小时内或1小时内肠胃外地施用。在可选的实施方案中,治疗剂在紧密密封的容器中以液体形式提供,该紧密密封的容器标出了治疗剂的量和浓度。优选地,液体形式在紧密密封的容器中以至少1mg/ml,更优选至少2.5mg/ml、至少5mg/ml、至少8mg/ml、至少10mg/ml、至少15mg/kg、至少25mg/ml、至少50mg/ml、至少100mg/ml、至少150mg/ml、至少200mg/ml分子提供。

[0375] C3. 药盒

[0376] 组合物还可以包含在药盒中。药盒可以在非限制性方面包含:包含治疗剂的药物组合物、施用说明书和/或其他组分。在优选的实施方案中,药盒可以包含即刻施用的组合物。药盒的容器可以包括瓶、分配器、包装、隔室或组分可放置于其中的其他类型的容器。容器可以在其表面包括标记。标记可以是例如字、短语、缩写、图片或符号。容器可以分配预定量的组分(例如,本发明的组合物)。组合物可以以喷雾、气溶胶或以液体形式或半固体形式分配。容器可以具有喷雾、泵和挤压机构。在某些方面,药盒可以包含用于施用本发明组合物的注射器。

[0377] 在药盒中具有不止一种组分(它们可以包装在一起)时,药盒一般还将含有额外的组分可以单独放置于其中的第二、第三或其他额外的容器。本发明的药盒还可以包含严紧密密封的容纳组分的容器外壳以供商业销售。这种容器可以包括注塑成型或吹塑成型的塑料容器,在该塑料容器中保存期望的瓶、分配器或包装。药盒还可以包括应用药盒组件和使用任何其他组合物、化合物、药剂、活性成分或药盒中未包含的物品的说明书。说明书可以包括可以实施的变型。说明书可以包括例如如何应用、使用和维持产品或组合物的解释。

[0378] C4. 施用和剂量

[0379] 本发明组合物的多种施用途径是可用的。所选的具体模式当然将取决于所选的具体治疗剂、施用是用于疾病的预防、诊断还是治疗、被治疗的医学疾患的严重程度和治疗功效所需的剂量。可以使用医学上可接受的并且产生有效水平的活性化合物而不引起临床上不可接受的不利影响的任何施用模式来实践本发明的方法。这种施用模式包括但不限于:口服、含服、舌下、吸入、经粘膜、直肠、鼻内、局部、眼部、眼周、眼内、经皮、皮下、动脉内、静脉内、肌内、肠胃外或输注方法。在具体的实施方案中,可能期望的是将本发明的药物组合物局部施用于需要治疗的区域;这可以通过例如但绝不限于通过注射或借助于植入物的局部输注达成,所述植入物是多孔的、非多孔的或凝胶状的材料,包括膜,如硅橡胶

(sialastic)膜或纤维。

[0380] 如本文所用的术语“治疗有效量”意指药物组合物或方法足以显示出有意义的患者有益效果的各活性组分的总量,所述有益效果即,慢性病症的治愈或改善、症状的减少、这种病症治愈速率的增加或在治疗组织或周围组织中某种物质水平的可检测的改变。当应用于单独施用的单个活性成分时,该术语是指该单独的成分。当组合应用时,该术语是指组合施用、连续施用或同时施用导致治疗效果的各活性成分的组合量。

[0381] 对治疗和预防用途有效的剂量日程和量即“给药方案”将取决于多种因素,包括疾病或病症的阶段、疾病或病症的严重程度、患者的总体健康状态和患者的身体状况、年龄和类似因素。可以通过标准的药物、药理和毒理方案在细胞培养物或实验动物中确定组合物的治疗功效和毒性。例如,存在确定ED₅₀(在群体的50%中治疗有效的剂量)和LD₅₀(对群体的50%致死的剂量)的大量方法。治疗效果和毒性效果之间的剂量比率是治疗指数,并且它可以表示为比率ED₅₀/LD₅₀。优选表现高的治疗指数的组合物。由细胞培养测定或动物研究获得的数据可用于配制一系列的人使用剂量。该剂量优选在包括ED₅₀的具有极小的毒性或没有毒性的浓度范围内,并且可以依据所采用的剂型、患者敏感性和施用途径而在此范围内变化。

[0382] 剂量方案还考虑本领域内熟知的药代动力学参数,即,吸收速率、生物可用性、代谢、清除和类似参数(参见,例如,Hidalgo-Aragones(1996) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 58:611-617; Groning(1996) *Pharmazie* 51:337-341; Fotherby(1996) *Contraception* 54:59-69; Johnson(1995) *J. Pharm. Sci.* 84:1144-1146; Rohatagi(1995) *Pharmazie* 50:610-613; Brophy(1983) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:103-108; 最新版的Remington(雷明顿),如上)。现有技术使得临床医师能够对各单独的患者、治疗剂和所治疗的疾病或病症确定剂量方案。本发明组合物的单次或多次施用可以依据患者所需的和耐受的剂量和频率来施用。预防性治疗和治疗性治疗的持续时间将依据所治疗的具体疾病或病症而变化。一些疾病使得它们需要急性治疗,而其他的疾病则需要长期治疗。如果施用不是基于每天进行的,例如,如果注射是每隔几天、每隔几周或每隔几个月给予的,那么在每次施用中可以包括更多的治疗剂,以便药剂的每天释放足以满足治疗需要。

[0383] 在优选的实施方案中,本发明的治疗剂以节律性(metronomic)给药方案通过连续输注或频繁施用而不延长休息期(rest period)施用。这种节律性施用可以包括以恒定间隔而没有休息期的给药。通常以较低的剂量使用治疗剂,尤其是细胞毒性剂。这种给药方案涵盖在延长的时间期内相对较低剂量的慢性每日施用,这种施用可以最小化毒副作用并消除休息期。Kamat等人(2007) *Cancer Research* 67:281-88。在某些实施方案中,治疗剂通过在下列时间范围内的慢性低剂量或连续输注递送:约24小时至约2天、至约1周、至约2周、至约3周至约1个月至约2个月、至约3个月、至约4个月、至约5个月、至约6个月。这种剂量方案的安排可以由熟练的肿瘤学家优化。

[0384] 对于本发明所涵盖的抗体,施用给患者的剂量通常为0.0001mg/kg至100mg/kg患者体重。优选地,施用给患者的剂量为0.0001mg/kg患者体重与20mg/kg患者体重之间、0.0001mg/kg患者体重与10mg/kg患者体重之间、0.0001mg/kg患者体重与5mg/kg患者体重之间、0.0001与2mg/kg患者体重之间、0.0001与1mg/kg患者体重之间、0.0001mg/kg患者体重与0.75mg/kg患者体重之间、0.0001mg/kg患者体重与0.5mg/kg患者体重之间、0.0001mg/

kg患者体重至0.25mg/kg患者体重之间、0.0001至0.15mg/kg患者体重之间、0.0001至0.10mg/kg患者体重之间、0.001至0.5mg/kg患者体重之间、0.01至0.25mg/kg患者体重或0.01至0.10mg/kg患者体重之间。施用的剂量和频率可以通过诸如脂化等修饰增强抗体的摄取和组织渗透来降低或改变。在一个实施方案中,施用给患者的抗体剂量在用作单药剂治疗时为0.01mg至1000mg/天。在另一实施方案中,抗体与其他治疗组合物组合使用,并且施用给患者的剂量低于所述分子用作单药剂治疗时的剂量。在优选的实例中,用在约0.1至30mg/kg体重之间的范围内的抗体每周一次治疗受治疗者持续约1至10周、优选2至8周更优选约3至7周并且甚至更优选约4周、5周或6周。

[0385] C5. 组合治疗

[0386] 本发明还涵盖与本领域技术人员已知的用于治疗或预防癌症、自身免疫疾病、炎症或传染病的其他治疗组合施用本发明的抗体或多肽,所述其他治疗包括但不限于:当前的标准的和实验性化疗、激素治疗、生物治疗、免疫治疗、放射治疗或手术。在一些实施方案中,本发明的抗体或多肽可以与治疗有效量或预防有效量的本领域技术人员已知的用于治疗和/或预防癌症、自身免疫疾病、传染病或中毒的一种或多种治疗剂组合施用。

[0387] 如本文所用,术语“组合”是指使用不止一种治疗剂。术语“组合”的使用并不限制治疗剂施用给患疾患的受治疗者的顺序,也不是意指药剂准确地在同一时间施用,而是意指本发明的抗体或多肽与其他药剂以某一顺序并且在某一时间间隔内施用给哺乳动物,以便使本发明的抗体或多肽可以与其他药剂一起作用从而提供比它们以其他方式施用增加的有益效果。例如,各治疗剂(例如,化疗、放射治疗、激素治疗或生物治疗)可以在同一时间施用或者在不同的时间点以任何顺序顺序地施用;然而,如果不在同一时间施用,则他们应在足够接近的时间施用以便提供期望的治疗或预防效果。各治疗剂可以以任何适当的形式并且通过任何合适的途径单独施用,例如一种通过口服途径,另一种通过肠胃外途径。

[0388] 在多个实施方案中,第一治疗剂可以在将第二(或后续)治疗剂施用给患疾患的受治疗者之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之前)、同时或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周之后)施用。在优选的实施方案中,两种或更多种药剂在同一患者随访中施用,或在不超过12小时的间隔、不超过24小时的间隔或不超过48小时的间隔内施用。

[0389] 在某些实施方案中,将治疗剂循环施用给受治疗者。循环治疗包括施用第一药剂一段时间,然后施用第二药剂和/或第三药剂一段时间并重复这种顺序施用。循环治疗可以降低对一种或多种治疗发展抗性,避免或降低治疗之一的副作用和/或改善治疗的功效。示例性的循环是约每周一次、约每10天一次、约每两周一次和约每3周一次。各循环可以包含至少一周的休息、至少2周的休息、至少3周的休息。所施用的循环数是约1至约12个循环,更通常约2至约10个循环,并且更通常约2至约8个循环。

[0390] 在治疗细胞增殖性疾患的实施方案中,本发明的抗体或多肽与另一治疗剂轭合或与另一治疗剂组合施用,所述另一治疗剂例如但不限于:烷化剂(例如,氮芥或顺铂)、血管发生抑制剂、葱环类抗生素(例如,柔红霉素/道诺霉素或多柔比星)、抗生素(例如,放线菌素D、博来霉素或安曲霉素)、抗体(例如,抗-VEGF抗体如贝伐单抗(由Genentech, Inc.以

AVASTIN®出售)、抗-EGFR抗体如帕木单抗(由Amgen, Inc.以VECTIBIX™出售)或抗-整联蛋白抗体如那他珠单抗(由Biogen Idec and Elan Pharmaceuticals, Inc.以TYSABRI®出售)、抗代谢药(例如,氨甲喋呤或5-氟尿嘧啶)、抗有丝分裂剂(例如,长春新碱或紫杉醇)、细胞毒素(例如,细胞抑制剂或杀细胞剂)、激素治疗剂(例如,选择性雌激素受体调节剂(例如,他莫昔芬或雷洛昔芬)、芳香酶抑制剂、黄体生成素-释放激素类似物、促孕剂、肾上腺皮质类固醇、雌激素、雄激素、抗-雌激素剂、雄激素受体阻断剂、5- α 还原酶抑制剂、肾上腺素产生抑制剂等)、基质金属蛋白酶抑制剂、放射活性元素(例如, α -发射体、 γ -发射体等)或任何其他化疗剂。

[0391] 合适的血管发生抑制剂的非限制性实例包括:ABT-627;血管他丁(纤溶酶原片段);血管发生酶(angiozyme);抗血管发生的抗凝血酶III;Bay 12-9566;氟草胺;贝伐单抗;BMS-275291;二膦酸盐;软骨衍生抑制剂(CDI);CAI;CD59补体片段;CEP-7055;Co1 3;考布他汀A-4;内皮他丁(XVIII型胶原片段);法呢基转移酶抑制剂(FTI);纤连蛋白片段;gro- β ;卤夫酮;肝素酶;肝素己糖片段;HMV833;人绒毛膜促性腺激素(hCG);IM-862;干扰素 $\alpha/\beta/\gamma$;干扰素诱导蛋白(IP-10);白细胞介素-12;kringle 5(纤溶酶原片段);马立马司他;金属蛋白酶抑制剂(TIMP);2-甲氧雌二醇;MMI 270(CGS 27023A);MoAb IMC-1C11;新伐司他;NM-3;panzem;PI-88;胎盘核糖核酸酶抑制剂;纤溶酶原激活物抑制剂;血小板因子-4(PF4);普淋司他;催乳素16kDa片段;增殖素相关蛋白(PRP);PTK 787/ZK 222594;类视黄醇;索利司他;角鲨胺;SS 3304;SU 5416;SU6668;SU11248;四氢皮质醇-S;四硫钼酸盐;沙利度胺;血小板反应蛋白-1(TSP-1);TNP-470;转化生长因子- β (TGF- β);血管抑制素(vasculostatin);血管形成抑制素(钙网织蛋白片段);ZD6126;和ZD 6474。

[0392] 治疗细胞增殖性疾患的其他抗体的非限制性实例包括下列物质的抗体:17-1A、 $\alpha\text{v}\beta_3$ 、AFP、CD3、CD18、CD20、CD22、CD33、CD44、CD52、CEA、CTLA-4、DNA-结合蛋白、EGF受体、Ep-CAM、GD2-神经节苷脂、gp IIIb/IIIa、gp72、HER2、HLA-DR 10 β 、HLA-DR抗原、IgE、神经节苷脂GD3、MUC-1、nuC242、PEM抗原、SK-1抗原、肿瘤抗原CA125、肿瘤抗原MUC1、VEGF和VEGF-受体。

[0393] 在不同的实施方案中,本发明的抗体或多肽可以与用于治疗炎性疾患的治疗剂组合施用,所述治疗剂例如但不限于:抗体、抗胆碱能药剂(anticholinergic agent)、 β -激动剂、甲基黄嘌呤、非类固醇抗炎药(NSAID)(例如,阿司匹林、布洛芬、塞来考昔或双氯芬酸)和类固醇抗炎药(例如,糖皮质激素、地塞米松、可的松、泼尼松或类花生酸)。其他抗体可以是用于治疗炎性疾病的任何合适的抗体,例如但不限于下列物质的抗体: $\alpha 4\beta 7$ 、 $\beta 2$ -整联蛋白、CBL、CD2、CD3、CD4、CD11a、CD11/18、CD14、CD18、CD23、CD25、CD40L、CD64(FcR)、CD80、CD147、补体(C5)、E-选择素、VII因子、gpIIbIIIa、ICAM-3、IgE、IL-4、IL-5、IL-8、TNF- α 和VLA-4。

[0394] 在又一实施方案中,本发明的抗体或多肽可以与用于治疗自身免疫疾患的治疗剂组合施用,所述治疗剂例如但是不限于:抗体、布喹那、环磷酰胺、环孢霉素A、细胞因子受体调节剂、脱氧精胍菌素、来氟米特、大环内酯类抗生素、丙二腈酰胺(malononitriloamides)(例如,来氟米特(leflunamide))、氨甲喋呤(methothrexate)、甲泼尼龙、咪唑立宾、麦考酚酸莫酯、雷帕霉素(西罗莫司)、类固醇和T细胞受体调节剂。其他的抗体可以是用于治疗自身免疫疾患的任何合适抗体,并且非限制性实例包括下列物质的

抗体:a4b7整联蛋白受体、CBL抗原、CD2、CD4、CD23、CD40、CD80、FcRI、 γ 干扰素、IL-8、肌苷一磷酸脱氢酶、ICE白细胞介素-1 β 、P38MAP激酶和TNF。

[0395] 在又一实施方案中,本发明的抗体或多肽可以与用于治疗传染病的治疗剂组合施用,所述治疗剂例如但不限于:抗生素、抗真菌剂或抗病毒剂。可以与本发明的分子组合使用的抗生素包括但不限于:2,4二氨基嘧啶类(例如,溴莫普林)、氨基糖苷类(例如,安普霉素、新霉素或大观霉素)、酰胺醇类(例如,氯霉素)、安福霉素类、安沙霉素类(例如,利福米特和利福平)、杆菌肽类、碳头孢烯类(例如,氯碳头孢)、碳青霉烯类(例如,比阿培南和亚胺培南)、头孢菌素类(例如,头孢氨苄或头孢羟氨苄)、头霉素类(例如,头孢拉宗、头孢美唑、和头孢米诺)、克拉霉素类、红霉素类、林可酰胺类(例如,克林霉素和林可霉素)、大环内酯类(例如,妥布霉素)、单酰胺菌素类(例如,卡芦莫南)、硝基呋喃类(例如,呋喃他酮、和呋唑氯铵)、氧头孢烯类(例如,氟氧头孢和拉氧头孢)、青霉素类、喹诺酮类(例如,氧氟沙星或环丙沙星)、磺胺类(例如,苄磺胺、和磺胺乙胞嘧啶)、砒类(例如,地百里砒、葡萄糖氨苯砒钠和苯丙砒)、和四环素类(例如,阿哌环素和金霉素)。

[0396] 可以与本发明的分子组合使用的抗真菌剂包括但不限于:两性霉素B、布康唑、环吡酮、克霉唑、益康唑、氟康唑、氟胞嘧啶、灰黄霉素(griseofulfin)、卤普罗近(haloprogrin)、鞘内(intrathecal)、伊曲康唑、酮康唑、咪康唑、萘替芬、制霉菌素、特比萘芬、特康唑、噻康唑和十一烯酸酯。可以与本发明的分子组合使用的可用抗病毒剂包括但不限于:非核苷反转录酶抑制剂、核苷类似物、核苷反转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂。这类药剂的非限制性实例是阿昔洛维、阿德福韦、 α 干扰素、金刚烷胺、安泼那韦、克来夫定(clevadine)、恩替卡韦、膦甲酸、更昔洛韦(gancyclovir)、碘苷、茆地那韦、洛匹那韦、普来可那立、利巴韦林、金刚乙胺、利托那韦、沙奎那韦、曲氟尿苷、阿糖腺苷和齐多夫定。

[0397] C6. 治疗效用证明

[0398] 本发明的药物组合物、预防剂或治疗剂在用于人之前优选在体外、细胞培养系统中或动物模型生物体(例如啮齿动物模型系统)中进行期望的治疗活性的测试。例如,可用于确定是否期望特定药物组合物施用的测定包括细胞培养测定,其中患者组织样品在培养物中生长,并且暴露于或以其它方式接触本发明的药物组合物,并且观察这种组合物对组织样品的作用。可以通过患者的活组织检查获得组织样品。这种测试容许鉴定对每个单独的患者治疗最有效的预防性或治疗性分子。在多个具体实施方案中,用参与自身免疫疾患或炎性疾患的细胞类型的代表性细胞(例如,T细胞)进行体外测定以确定本发明的药物组合物对这种细胞类型是否具有期望的作用。

[0399] 合适的动物模型系统包括但不限于:大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、猪、狗、兔等。可以使用本领域中熟知的任何动物系统。在本发明的具体实施方案中,在小鼠模型系统中测试预防剂和/或治疗剂的组合。用于本发明方法的优选的动物模型是例如在小鼠效应子细胞上表达人Fc γ R的转基因小鼠,例如在U.S.5,877,396中所描述的任何小鼠模型均可用于本发明。

[0400] 抗炎活性可以通过使用本领域内已知的和Crofford L.J.和Wilder R.L., "Arthritis and Autoimmunity in Animals(动物中的关节炎和自身免疫性)", (在Arthritis and Allied Conditions:A Textbook of Rheumatology(关节炎和相关病症:风湿病学教科书),McCarty等人(编辑),第30章(Lee和Febiger,1993)中)中描述的炎性关

节炎等多种实验动物模型和自发动物模型来确定。例如,佐剂诱导的关节炎模型如大鼠、仓鼠、兔、狗和猪中角叉菜胶、酵母聚糖(xymosan)或胶原诱导的关节炎可用于研究抗炎活性,并且在大鼠中角叉菜胶诱导的爪子水肿的抑制是大部分NSAID的抗炎活性的主要体内筛选方式,并且被认为是人功效的预示。这些模型描述于:例如Winter等人(1962) Proc.Soc.Exp.Biol Med.111:544-47;和Hansra等人(2000) Inflammation 24(2):141-155。用于炎性肠病的动物模型也可用于估计本发明的治疗功效,例如在如Strober(1985) Dig.Dis.Sci.30(12增刊):3S-10S;Kim等人(1992) Scand.J.Gastroentrol.27:529-537)中描述的模型。在这些模型中,可以通过口服施用硫酸化多糖、硫酸葡聚糖或化学刺激物诱导动物中的溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)和克罗恩病。

[0401] 治疗自身免疫疾患的功效可以使用用于如下的自身免疫疾患的动物模型来估计:1型糖尿病、甲状腺自身免疫病、系统性红斑狼疮和肾小球肾炎,例如在下列文献中所描述的模型:Flanders等人(1999) Autoimmunity29:235-246;Krogh等人(1999) Biochimie 81:511-515;Foster(1999) Semin.Nephrol.19:12-24等。

[0402] 还可以通过使用用于癌症研究的多种实验动物模型来确定治疗剂的抗癌活性,例如SCID小鼠模型、具有人异种移植物的转基因小鼠或裸鼠、以及本领域已知的和在下列文献中描述的其他动物模型如仓鼠、兔等:Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development (用于抗癌药物开发的肿瘤模型的实用性)(1999,Fiebig和Burger编辑);Contributions to Oncology (对肿瘤学的贡献)(1999,Karger);The Nude Mouse in Oncology Research (肿瘤学研究中的裸鼠)(1991,Boven和Winograd编辑);和Anticancer Drug Development Guide (抗癌药物开发指南)(1997Teicher编辑)。优选的动物模型是小鼠异种移植物模型。可用作异种移植物肿瘤来源的肿瘤细胞系包括但不限于:SKBR3和MCF7细胞,它们可源自于患乳腺癌的患者。这些细胞具有erbB2和催乳素受体二者。本领域中常使用SKBR3细胞作为ADCC和异种移植物肿瘤模型。可选择地,源自人卵巢腺癌的OVCAR3细胞可以用作异种移植物肿瘤来源。

[0403] 在用于人之前,优选先后在体外和体内测试本发明的治疗剂的期望治疗活性或预防活性。可以使用肿瘤细胞或恶性细胞系筛选治疗剂和治疗方法。本领域中的许多标准测定可用于估计这种存活和/或生长;例如,细胞增殖可以如下测定:通过测量³H-胸苷掺入、通过直接细胞计数、通过检测诸如原癌基因(例如, fos、myc)等已知基因或细胞周期标记物的转录活性改变;细胞活力可以通过台盼兰染色估计;分化可以根据在软琼脂上的形态改变、生长减少和/或集落形成或者在三维基底膜上或胞外基质制剂上的管状网络形成来在视觉上估计;等等。

[0404] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制用于人的一系列治疗剂剂量。这种药剂的剂量优选处于具有极少或没有毒性的循环浓度的范围内,该范围包括ED₅₀。剂量可以依据所采用的剂型和利用的施用途径在此范围内变化。对于用于本发明方法中的任何药剂,治疗有效剂量可以由细胞培养测定初步估计。可以在动物模型中配制剂量以到达循环血浆浓度范围,该范围包括如细胞培养物中确定的IC₅₀(即,达成症状最大抑制的一半的测试化合物浓度)。这种信息可用于更准确地确定人中的可用剂量。可以通过例如高效液相色谱来测量血浆中的水平。

[0405] D. 其他方法

[0406] D1. 基因治疗

[0407] 在具体的实施方案中,施用包含编码本发明分子的序列的核酸以借助于基因治疗来治疗、预防或改善与疾病、疾患或感染相关的一种或多种症状。基因治疗是指通过给受治疗者施用表达的或可表达的核酸来进行的治疗。在本发明的这种实施方案中,核酸产生它们编码的抗体或融合蛋白,该抗体或融合蛋白介导治疗或预防作用。可以使用本领域中可用的那些用于基因治疗的任何方法,例如,在下列文献中描述的方法:例如Goldspiel等人(1993) *Clinical Pharmacy* 12:488-505;Wu和Wu(1991) *Biotherapy*3:87-95;Tolstoshev(1993) *Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.*32:573-596;Mulligan(1993) *Science* 260:926-932;以及Morgan和Anderson(1993) *Ann.Rev.Biochem.*62:191-217。

[0408] 在优选的方面,本发明的组合物包含编码本发明的抗体、双体或融合蛋白的核酸,所述核酸是在合适的宿主中表达所述抗体的表达载体的一部分。具体地,这些核酸具有启动子,优选与抗体编码区可操作地连接的异源启动子,所述启动子是诱导型的或组成型的并且任选为组织特异性的。在另一具体实施方案中,使用的核酸分子中抗体编码序列和任何其他期望序列的两侧为促进在基因组的期望位点同源重组的区域,从而提供了编码抗体的核酸的染色体内表达,如在Koller和Smithies(1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 86:8932-35;和Zijlstra等人(1989) *Nature* 342:435-438中所描述的。

[0409] 核酸递送至受治疗者中可以是直接的,在这种情况下受治疗者直接暴露于核酸或携带核酸的载体;或者是间接的,在这种情况下,首先在体外用核酸转化细胞,然后将细胞移植到受治疗者中。这两种方法分别称为体内(in vivo)基因治疗或离体(ex vivo)基因治疗。

[0410] 在具体的实施方案中,编码本发明多肽的多核苷酸在体内施用,在体内多核苷酸被表达产生编码的多肽。这可以通过大量方法的任一种来完成,例如通过使用反转录病毒载体或其他病毒载体感染(如描述于下列文献中的:例如美国专利第4,980,286号;Miller等人(1993) *Meth.Enzymol.*217:581-599;Salmons和Gunzberg(1993) *Human Gene Therapy* 4:129-141;Grossman和Wilson(1993) *Curr.Opin.in Genetics and Devel.*3:110-114;Kozarsky和Wilson(1993) *Current Op.in Genetics and Dev.*3:499-503;Walsh等人(1993) *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*204:289-300;Bout等人(1994) *Human Gene Therapy* 5:3-10;Boesen等人(1994) *Biotherapy* 6:291-302;Clowes等人(1994) *J.Clin.Invest.*93:644-651;Klein等人(1994) *Blood*83:1467-1473;和美国专利第5,436,146号);通过直接注射裸DNA;通过使用微粒轰击(例如,基因枪);或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被、封装在脂质体、微粒或微胶囊中;或通过与已知进入核的肽连接或与经受体介导的内吞作用的抗原连接而施用它们(如在下列文献中描述的:例如Wu和Wu(1987) *J.Biol.Chem.*262:4429-4432;Joliot等人(1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.)* 88:1864-1868;W0 92/06180;W0 92/22635;W092/20316;W093/14188;W0 93/20221)(它可用于靶向特异性表达受体的细胞类型)。

[0411] 可以将核酸引入细胞中,然后体内施用所得重组细胞,例如在下列文献中描述的:W0 94/08598;Rheinwald(1980) *Meth.Cell Bio.*21A:229;Pittelkow和Scott(1986) *Mayo Clinic Proc.*61:771;Stemple和Anderson(1992) *Cell* 7 1:973-985。可以通过本领域中已知的多种方法将所得重组细胞递送给受治疗者。重组血细胞(例如,造血干细胞或造血祖细

胞) 优选静脉内施用。预期使用的细胞量取决于期望的作用、患者状态等, 并且可以由本领域技术人员确定。核酸可以引入其中的用于基因治疗目的的细胞涵盖任何期望的可用的细胞类型, 并且包括但不限于: 上皮细胞、内皮细胞、角质形成细胞、成纤维细胞、肌肉细胞、肝细胞; 血细胞, 例如T淋巴细胞、B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨核细胞、粒细胞; 各种干细胞或祖细胞, 尤其造血干细胞或造血祖细胞, 如由骨髓、脐带血、外周血、胎儿肝等所获得的等。在优选的实施方案中, 用于基因治疗的细胞是受治疗者自体的。

[0412] D2. 疫苗治疗

[0413] 在一些实施方案中, 本发明的抗体可用于诱导针对抗原剂或免疫原性剂的免疫反应, 所述抗原剂或免疫原性剂包括但不限于癌症抗原和传染病抗原。本发明的疫苗组合物包含期望对其发生免疫反应的一种或多种抗原剂或免疫原性剂, 其中所述一种或多种抗原剂或免疫原性剂被用本发明的抗体包被。本发明的疫苗组合物在引发免疫反应, 优选针对抗原剂或免疫原性剂的保护性免疫反应中尤其有效, 所述抗原剂或免疫原性剂可以是期望对其发生免疫反应的病毒或源自其他病毒或非病毒病原体的抗原。

[0414] 在又一实施方案中, 本发明涵盖在其表面上表达抗体的病原性细胞或病毒, 优选减毒病毒。本发明还涵盖通过施用本发明的组合物诱导受治疗者的耐受的方法。优选地, 适于诱导受治疗者耐受的组合物包含用本发明的抗体包被的抗原剂或免疫原性剂。

[0415] D3. 靶向脂质体或其他微载体 (Microcarrier) 和纳米载体 (Nanocarrier)

[0416] 在一些实施方案中, 本发明的抗体可用于制备用于将期望的治疗组合物 (例如, 抗癌剂) 递送给靶细胞的靶向的脂质体。用于抗肿瘤药物的靶向的递送的免疫脂质体的制备和使用在Mastrobattista等人 (1999) *Advanced Drug Delivery Reviews* 40:103-127中综述。脂质体是基于脂质双层的囊状结构。它们的直径可以小至20nm并且大至10 μ m。它们可以是单层的 (仅有一层双层环绕水性核心) 或多层的 (两层或更多层双层环绕水性核心同心地定向)。使用多种靶向剂 (例如, 本发明的抗体) 进行脂质体靶向是本领域中熟知的。参见, 例如美国专利第4,957,773号和4,603,044号。可以使用用于将靶向剂与脂质体偶联的标准方法。可以使用例如掺入蛋白A的脂质体来构建抗体靶向的脂质体。参见Renneisen等人 (1990) *J. Biol. Chem.* 265:16337-16342; 和Leonetti等人 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 87:2448-2451。

[0417] 在优选的实施方案中, 脂质体由标准的成囊泡脂质 (vesicle-forming lipid) 形成, 该成囊泡脂质通常包括中性的和负电荷的磷脂和固醇, 如胆固醇。脂质的选择一般由例如脂质体大小和脂质体在血流中的稳定性的考虑来指导。多种方法可用于制备脂质体, 如在下列文献中所描述的: 例如, Szoka等人 (1980) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467; 美国专利第4,235,871号; 4,501,728号和4,837,028号。一种方法产生不均一尺寸的多层囊泡。在此方法中, 将形成囊泡的脂质溶解在合适的有机溶剂或溶剂系统中并在真空或惰性气体下干燥以形成薄的脂膜。如果期望, 可以将膜再溶解在诸如叔丁醇等合适的溶剂中, 并然后将其冻干以形成呈更容易水合的粉末样形式的更加均匀的脂质混合物。用靶向的药物和靶向组分 (抗体) 的水溶液覆盖这种膜, 并容许其水合, 通常是在搅拌下进行15-60分钟的时间段。可以通过在更剧烈搅拌的条件下水合脂或通过添加诸如脱氧胆酸盐等增溶性去垢剂来将所得多层囊泡的尺寸分布转化成较小的尺寸。

[0418] D4. 免疫测定

[0419] 本发明的抗体可用于检测BCR复合体、BCR、CD79a、CD79b或表达这些分子的细胞。可以使用大量方法的任一种来达成这种检测。例如,可以使用免疫结合测定(参见,例如美国专利第4,366,241号;4,376,110号;4,517,288号;和4,837,168号)。对于一般免疫测定的综述还参见Asai(编辑1993)Methods in Cell Biology(细胞生物学中的方法)第37卷,Academic Press,New York;Stites&Terr(编辑1991)Basic and Clinical Immunology(基础和临床免疫学)第7版。

[0420] 因此,本发明提供检测表达BCR和相关蛋白的细胞的方法。在一个方法中,对受治疗者进行活组织检查并体外测试所收集的组织。然后用本发明的抗体接触组织或来自组织的细胞。所得的任何免疫复合体表明活组织检查样品中靶蛋白的存在。为了易化这种检测,可以放射性标记抗体,或将其与为可检测标记如放射性标记的效应子分子偶联。在另一方法中,可以使用通常的成像系统体内检测细胞。然后,通过用于检测标记的任何已知方法确定标记的定位。可以使用用于显现诊断成像的常规方法。例如,可使用顺磁同位素进行MRI。抗体内化对于将其在生物体中的寿命延长至超过胞外结合所提供的寿命是很重要的,胞外结合对于被与循环清除偶联的胞外酶环境清除是敏感的。

[0421] 还可以使用免疫测定方法和本发明的抗体检测BCR蛋白。标准方法包括:例如,放射免疫测定、免疫色谱法、夹心免疫测定(包括ELISA)、免疫荧光测定、蛋白质印迹、亲和色谱(与固相结合的亲和配体)和用标记抗体进行的原位检测。

[0422] 现在已经大致描述了本发明,可以通过参考下列实施例更容易地理解本发明,除另外说明外,下列实施例仅通过示例提供并且不旨在限制本发明。

实施例**[0423] 直接结合ELISA**

[0424] 如下进行ELISA:在4°C下将在碳酸盐缓冲液中的0.5μg/ml的sBCRC-Fc(“BCRC”是指BCR复合体)以50μl/孔涂覆到96孔Maxisorp板上过夜。在测试抗体之前,用PBS-T(PBS, 0.1%Tween 20)洗涤板三次并然后在室温下用在PBS-T中的0.5%BSA封闭30分钟。以0.15μg/ml开始以两倍稀释系列稀释变体抗体,并以50μl/孔添加到含有sBCRC-Fc的板中。在室温下孵育板1小时。在用PBS-T洗涤3次之后,添加50μl/孔1:10,000稀释的辣根过氧化物酶(HRP)耦合的F(ab')₂山羊抗人IgG F(ab')₂(Jackson ImmunoResearch)至板中。在室温下孵育板1小时。用PBS-T将板洗涤3次并用80μl/孔的TMB底物显影。孵育5分钟后,用40μl/孔的1%H₂SO₄终止反应。使用96孔读板仪和SOFTmax软件读取OD450nm。使用GraphPadPrism 3.03软件对读数绘图。

[0425] 根据上述方案进行三次不同的ELISA。第一次ELISA检测具有不同的轻链的抗体的结合,所述抗体包括chBCC2、hBCC、hLc-2/chHc、hLc-3/chHc、hLc-4/chHc和hLc-1/chHc抗体。结果显示在图4中。第二次ELISA检测具有不同的重链的抗体的结合,所述抗体包括chLc/hHc-1、chLc/hHc-2、chLc/hHc-3、chLc/hHc-4、chLc/hHc-5、chLc/hHc-6、chBCC2和hBCC抗体。对于chLc/hHc-6抗体,使用单独的培养基代替0.019μg/ml稀释物作为阴性对照。结果显示在图5中。第三次ELISA检测具有不同的轻链和重链的抗体的结合,所述抗体包括:hLc-4/hHc-2、hLc-4/hHc-7、hLc-4/hHc-8、hLc6/hHc-2、hLc-6/hHc-7、hLc-6/hHc-8、chBCC1

和chBCC2。测试的抗体的描述提供在表6中。

[0426]

抗体命名	轻链可变区		重链可变区	
	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO
chBCC1	chBCC1 VL	37	chBCC1 VH	38
chLc/hHc-1	chBCC1 VL	37	hBCC VH-1	22
chLc/hHc-2	chBCC1 VL	37	hBCC VH-2	24
chLc/hHc-3	chBCC1 VL	37	hBCC VH-3	26
chLc/hHc-4	chBCC1 VL	37	hBCC VH-4	28
chLc/hHc-5	chBCC1 VL	37	hBCC VH-5	30

[0427]

抗体命名	轻链可变区		重链可变区	
	名称	SEQ ID NO	名称	SEQ ID NO
chLc/hHc-6	chBCC1 VL	37	hBCC VH-6	32
hLc-1/chHc	hBCC VL-1	10	chBCC1 VH	38
hLc-2/chHc	hBCC VL-2	12	chBCC1 VH	38
hLc-3/chHc	hBCC VL-3	14	chBCC1 VH	38
hLc-4/chHc	hBCC VL-4	16	chBCC1 VH	38
hLc-4/hHc-2	hBCC VL-4	16	hBCC VH-2	24
hLc-4/hHc-7	hBCC VL-4	16	hBCC VH-7	34
hLc-4/hHc-8	hBCC VL-4	16	hBCC VH-8	36
hLc6/hHc-2	hBCC VL-6	20	hBCC VH-2	24
hLc-6/hHc-7	hBCC VL-6	20	hBCC VH-7	34
hLc-6/hHc-8	hBCC VL-6	20	hBCC VH-8	36

[0428] 本说明书中所提到的所有的出版物和专利均通过引用并入本文,其程度如同各单独的出版物或专利申请特定地且单独地指示为通过引用并入本文一样。尽管本发明是与其具体实施方案结合描述的,但应理解本发明能够进一步修改,并且本申请旨在涵盖大体上遵循本发明的原理的任何变化、用途或改进并且包括来自本公开内容的这些偏差,如同本发明所属领域所已知的或惯常的实践和可以应用于本文之前所列的基本特征一样。

序列表

- <110> 宏观基因有限公司
莱斯利·S·约翰逊
黄菱
- <120> BCR-复合体-特异性抗体和其使用方法
- <130> 1301.0020I
- <150> US 61/041,659
<151> 2008-04-02
- <160> 38
- <170> PatentIn 版本 3.4
- <210> 1
<211> 339
<212> DNA
<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)
- [0001] <400> 1
caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgagge ctggggcttc agtgaagctg 60
tctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccittgaatg gattgggatg gttgatcett cagacagtga aactcactac 180
aatcaaatgt tcaaggacaa ggccacattg actgttgaca aatctccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tetgcggtct attactgtgc aagagctatg 300
ggctactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctctca 339
- <210> 2
<211> 113
<212> PRT
<213> 小家鼠
- <400> 2
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

[0002] Ala Arg Ala Met Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 3

<211> 336

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 3

gatgttgtga tgaccagac tccaactcaet ttgtcggtta acattggaca accagectcc 60

atctcttgta agtcaagfca gagectctta gatactgatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaac gcctaatct atctgggtgc taaactggac 180

tetggagtec ctgacaggtt cactggcagt ggatcagga cagatttcac actgaaaate 240

agcagagtgg aggctgagga ttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttccg 300

ctcacgtteg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

[0003]

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 5

<211> 336

<212> DNA

<213> 小家鼠

<400> 5
gatgttgtgt tgaccagac tccactcaact ttgtcggta ccattggaca accagcctcc 60
atctcttgta agtcaagtca gagccctotta gatagtgatg gaaagacata ttggaattgg 120
ttgttacaga ggccaggtea gtctccaaag cgctaatct atctggtgtc taaactggac 180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtaac acattttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 6

[0004] Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
I 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 7

<211> 339

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Ala Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr
 20 25 30

[0005] Gly Gly Thr Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr
 35 40 45

Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr Cys Cys Thr
 50 55 60

Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Ala
 65 70 75 80

Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Ala Cys
 85 90 95

Thr Gly Gly Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Ala
 100 105 110

Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala
 115 120 125

Ala Gly Gly Cys Cys Thr Thr Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Ala Thr Cys Cys Thr Thr
 145 150 155 160

Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Cys Ala
 165 170 175

Cys Thr Ala Cys Ala Ala Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr Cys
 180 185 190

Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Thr
 195 200 205

[0006]

Thr Gly Ala Cys Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys
 210 215 220

Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys
 225 230 235 240

Ala Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys
 245 250 255

Thr Gly Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Cys
 260 265 270

Thr Gly Cys Gly Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
 275 280 285

Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Gly Cys Thr
 290 295 300

Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Cys
 305 310 315 320

Cys Thr Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys
 325 330 335

Thr Cys Ala

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 8

[0007] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 9

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 9

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gceggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata ttgaattgg 120

[0008]

tttcagcaga ggccaggcca atctccaagg cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggctcc cagacagatt cagcggcagt gggteaggca ctgatttcac actgaaaate 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtag acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa 336

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 10

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

[0009]

<210> 11

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 11

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtea ccttggaca gccggctccc 60

atctcctgca agtcaagtca gaccctctta gatagtgatg gaaagacata ttggaattgg 120

tttctgcaga ggccaggcca atctccaagg cgcttaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctggggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaate 240

agcagggtgg aggctgagga tgttggggtt tattaetgct ggcaaggtag acattttccg 300

ctcacgttcg gccgagggac caagcttgag atcaaaa 336

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 13

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca ccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtca gagcctccta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttcagcaga ggccaggcca atctccaaag cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctgggtcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaac 240

agcaggtgg aggctgagga igtgggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgttcg gcggagggac caagcttgag atcaaa 336

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

[0011] <213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 14

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

[0013]

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 17

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式 s

<400> 17

gatgttgtga tgactcagtc tccaactcicc ctgcccgtea ccctiggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtcaagtea gagectctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120

tttctgcaga ggccaggcca atctccaaag cgctaattt atctggtgtc taaactggac 180

tctgggtcc cagacagatt cagcggcagt gggfcaggca ctgatttcac actgaaaate 240

agcaggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgct ggcaaggtac acattttccg 300

ctcacgtteg gcgaggagac caagcttgag atcaaa 336

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 18

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

[0014] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 鼠序列的人源化形式

 <400> 19
 gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc 60

 atctcctgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata ttggaattgg 120

 tttctgcaga ggccaggcca atctccaaac cgcctaattt atctggtgtc taaactggac 180

 tctggggctcc cagacagatt cagcggcagt gggtcaggca ctgatttcac actgaaaate 240

 agcagggtgg aggctgagga igtgggggtt tattactgct ggcaaggtae acattttccg 300

 ctcacgttcg gcggaggac caagcttgag atcaaa 336

[0015]

<210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 鼠序列的人源化形式

 <400> 20

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

 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

- <210> 21
- <211> 339
- <212> DNA
- <213> 人工的

[0016]

- <220>
- <223> 鼠序列的人源化形式

<400> 21
 caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaagtc 60
 tcttgcgaagg ctctctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagfga aactcactac 180
 aatcaaatgt tcaaggacag agtcaaccatg accacagaca catcaagag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggecgtgt attactgtgc gagagctatg 300
 ggctactggg ggcaaggac caeggtcacc gtctcctca 339

- <210> 22
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 22

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

[0017] Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 23

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 23
 caggttcagc tggatcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggte 60
 tcctgcaagg ctctctggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcett cagacagtga aactcactac 180
 aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300
 ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctctca 339

<210> 24
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠序列的人源化形式

[0018]

<400> 24

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

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

Ser

- <210> 25
- <211> 339
- <212> DNA
- <213> 人工的

- <220>
- <223> 鼠序列的人源化形式

[0019] <400> 25
 caggttcagc tggigcagtc tggagctgag gigaagaagc ctggegccctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctitacc agctactgga tgaactgggt gegacaggee 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg atfgatcctt cagacagtga aactcactac 180
 aatcaaagt tcaaggacaa agccaccctg accgtagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagetatg 300
 ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctectca 339

- <210> 26
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> 人工的

- <220>
- <223> 鼠序列的人源化形式

<400> 26

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60

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

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

[0020]

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

Ser

<210> 27

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 27

caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaage ctggcgccctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180
aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccaig accgtagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac aeggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300
ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctctca 339

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 28

[0021] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 29

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 29

caggttcagc tggcgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60

tectgcaagg ctcttggtta cacctttacc agctactgga tgaactgggt ggcacaggcc 120

[0022]

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180

aatcaaatgt tcaaggacag agtcacatg accgtagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300

ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctcctca 339

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 30

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

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

[0023]

Ser

<210> 31

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 31

caggttcagc tggfgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60

tctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180

aatcaaaagt tcaaggacag agtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagctatg 300

ggctactggg ggcaagggac cacggtcacc gtctctca 339

<210> 32

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 32

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

[0024] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 33

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 33

caggttcagc tggatcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggcgcctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180

aatcaaaagt tcaaggacag agtcacatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240

[0025]

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggcctgtt attactgtgc gagagctatg 300

ggctactggg ggcaaggac cacggteacc gtctctca 339

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 34

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

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

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

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Ser

[0026]

<210> 35

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 35

caggttcagc tggatgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctgggccttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc agctactgga tgaactgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatcggaatg attgatcctt cagacagtga aactcactac 180

aatcaaatgt tcaaggacag agtcaccatg accgtagaca catecagcag cacagcctac 240

atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggcctgtg attactgtgc gagagctatg 300

ggctactggg ggcaaggac cacggtcacc gtctctctca 339

<210> 36
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠序列的人源化形式

<400> 36

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

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

[0027] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
 50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 37
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠序列的人源化形式

<400> 37

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Thr
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gln Gly Ser
 35 40 45

[0028]

Pro Asn Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 38
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 鼠序列的人源化形式

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

[0029] Gly Met Val Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Met Phe
50 55 60

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

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

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

Ser

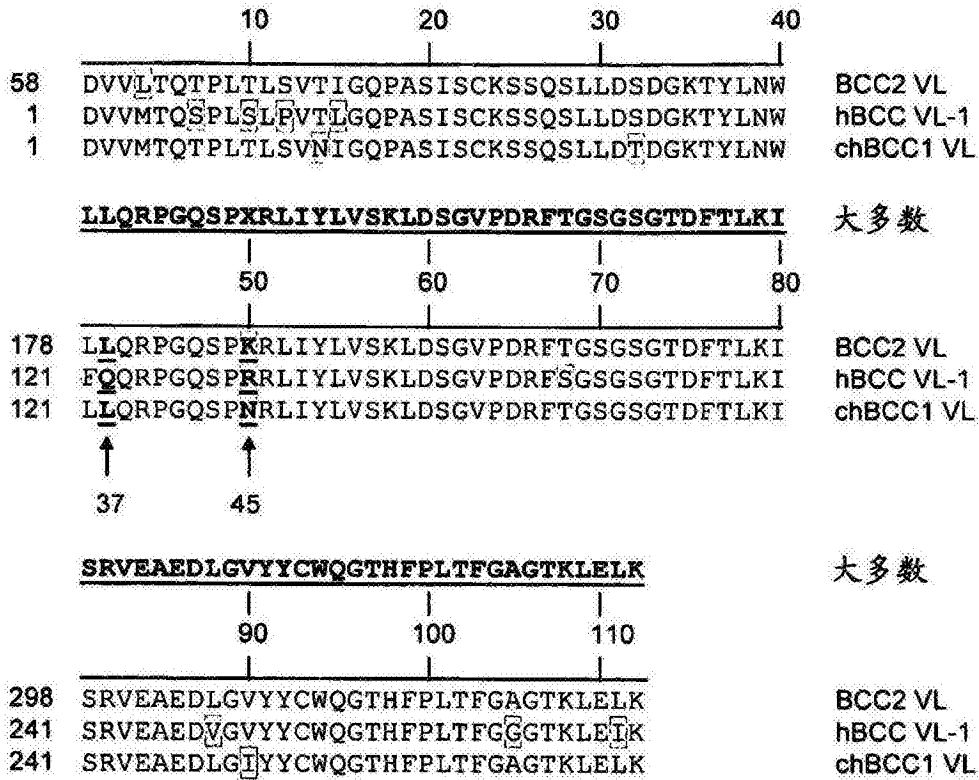


图1

	Kabat #			Kabat #						
	37	45		48	62	66	67	69	71	73
chVL	L	K/N	chVH	I	M	K	A	L	V	K
hVL	Q	R	hVH	M	M	R	V	M	T	T
hVL-2	<u>L</u>	R	hVH-2	<u>I</u>	M	R	V	M	T	T
hVL-3	Q	<u>K</u>	hVH-3	M	M	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	T
hVL-4	Q	<u>N</u>	hVH-4	M	M	R	V	M	<u>V</u>	T
hVL-5*	L	<u>K</u>	hVH-5	M	M	R	V	M	<u>V</u>	<u>K</u>
hVL-6	<u>L</u>	N	hVH-6	M	<u>K</u>	R	V	M	T	T
			hVH-7	I	<u>K</u>	R	V	M	T	T
			hVH-8	I	<u>M</u>	R	V	M	V	T

图2

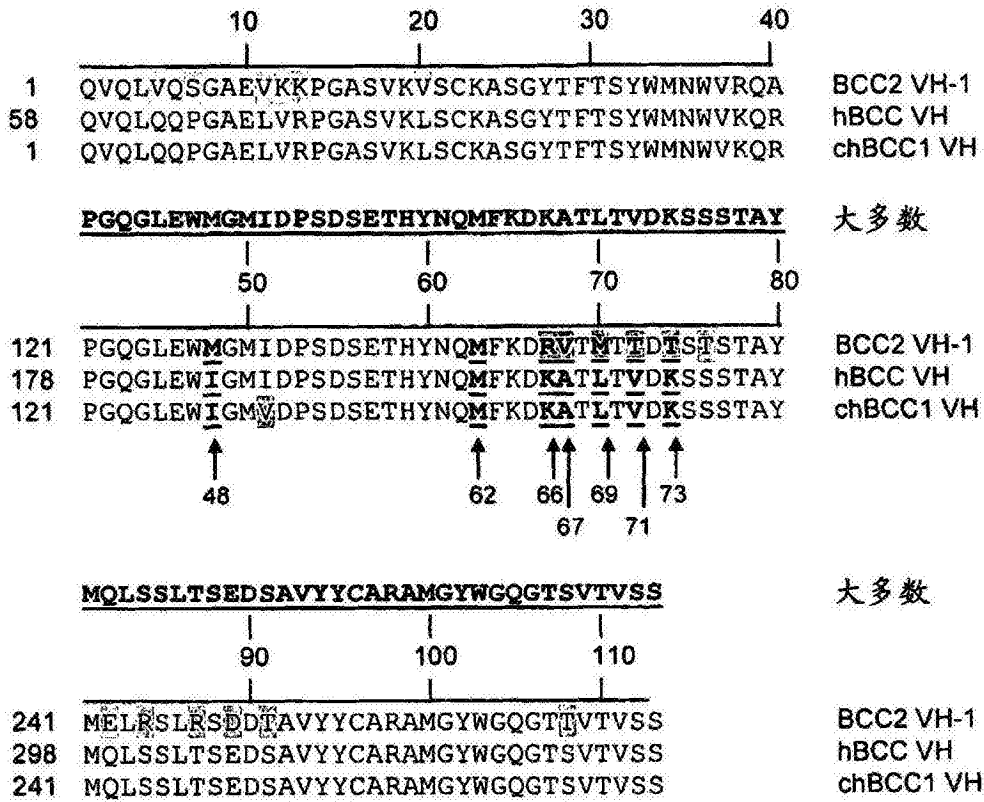


图3

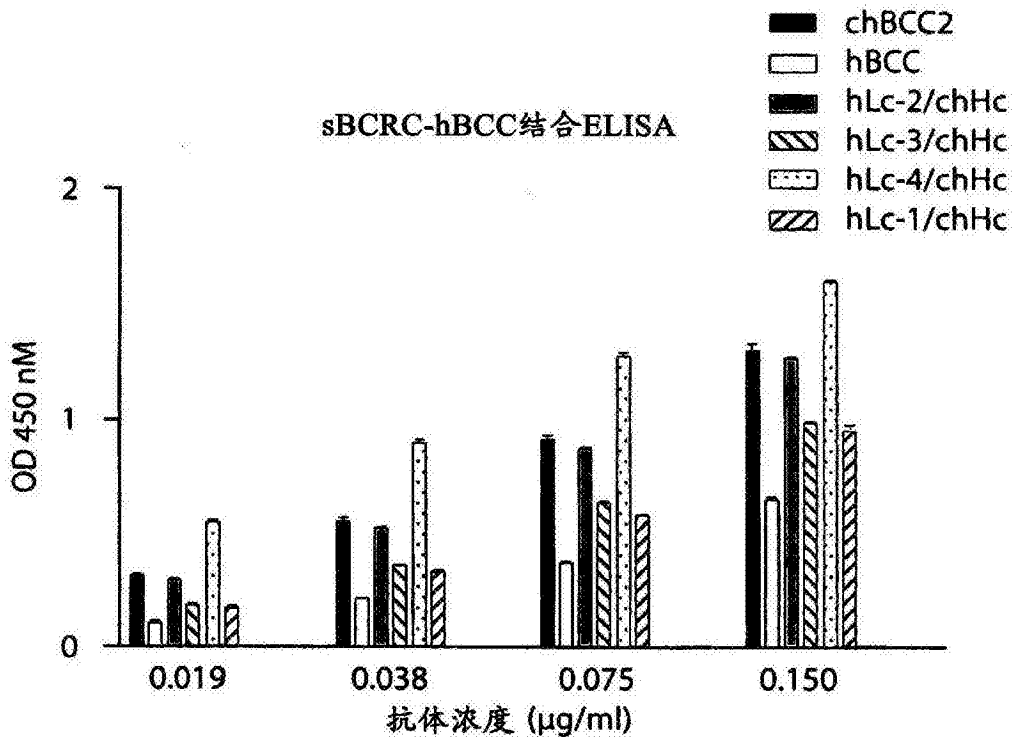


图4

sBCRCFc-hBCC结合ELISA

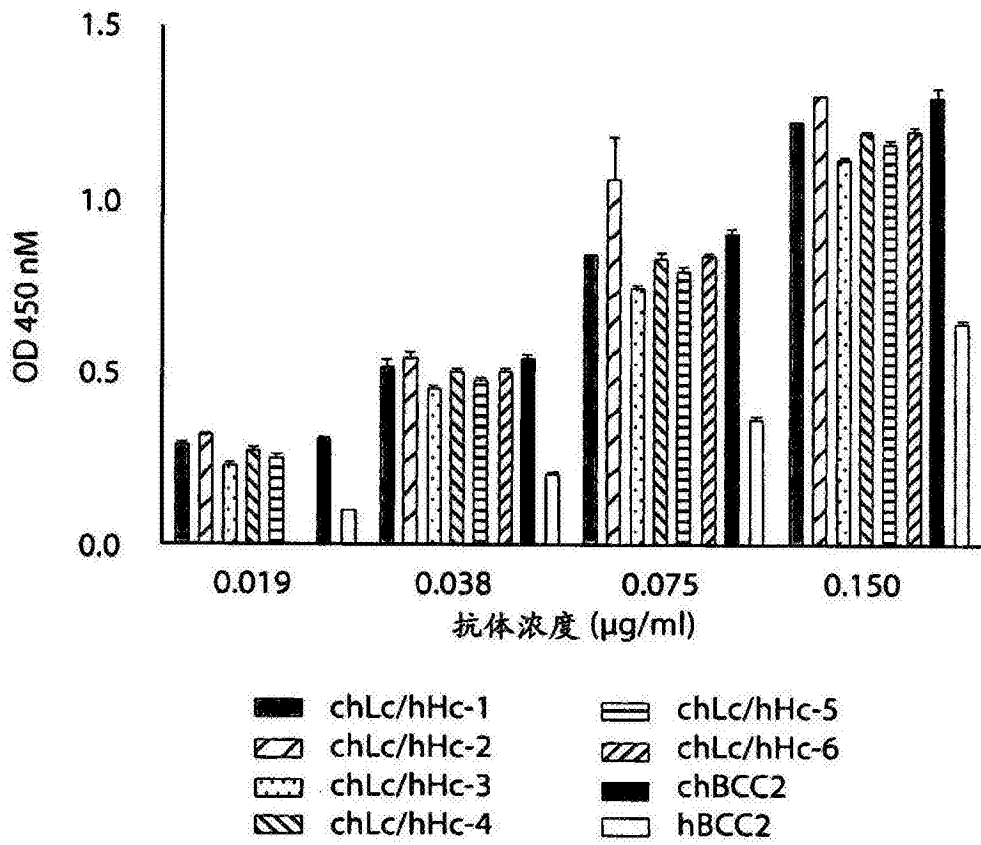


图5

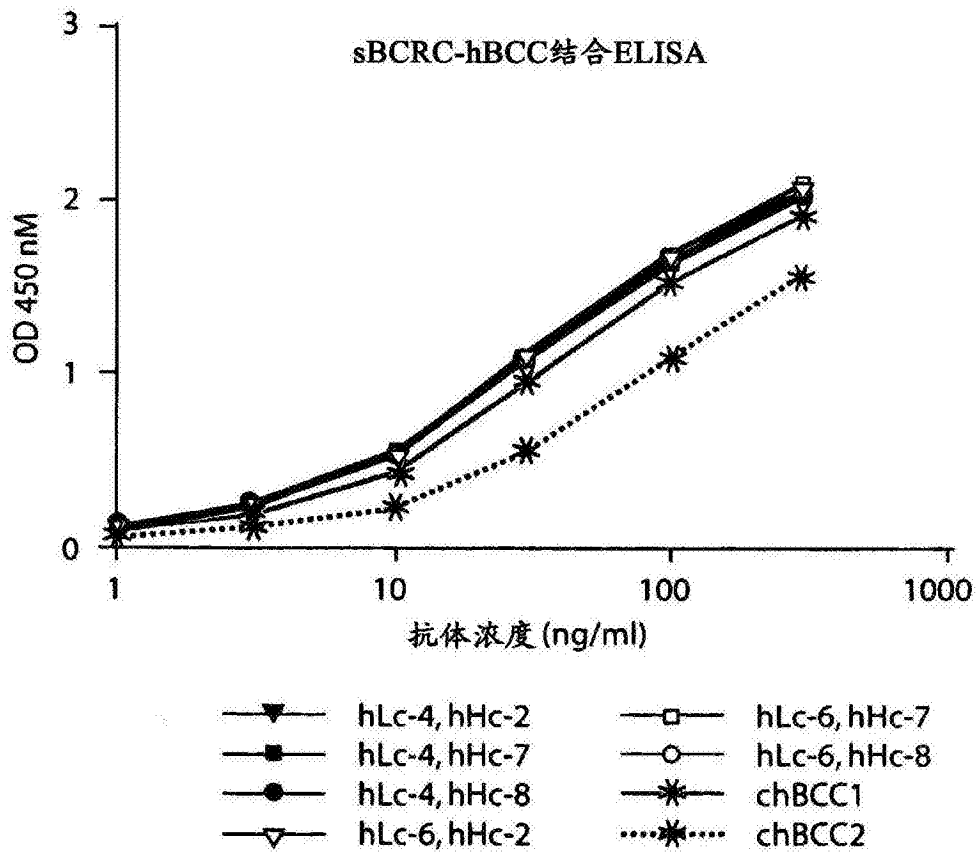


图6