



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102459628 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 16

(21) 申请号 201080031266. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 05. 13

C12P 21/08 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 39/00 (2006. 01)

61/177, 837 2009. 05. 13 US

A61K 39/395 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 11

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/034704 2010. 05. 13

(87) PCT申请的公布数据

W02010/132659 EN 2010. 11. 18

(71) 申请人 基酶有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 B. L. 罗伯茨 S. 尚卡拉

W. H. 布龙迪克 W. M. 西德尔斯

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 龙淳

权利要求书 5 页 说明书 119 页 附图 82 页

(54) 发明名称

抗人 CD52 免疫球蛋白

(57) 摘要

本发明涉及一种对人类 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白、小鼠单克隆抗体及嵌合抗体。本发明进一步涉及一种人源化免疫球蛋白轻链和人源化免疫球蛋白重链。本发明还涉及包含编码人源化免疫球蛋白或免疫球蛋白轻链或重链的序列的分离核酸、重组载体及宿主细胞, 并涉及人源化免疫球蛋白的制备方法。该人源化免疫球蛋白可用于治疗用途以治疗, 例如, 自体免疫疾病、癌症、非何杰金氏淋巴瘤、多发性硬化症及慢性淋巴细胞白血病。

1. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的轻链和重链包括在以下中找到的三个互补决定区(CDRs):

- a) 分别在 SEQ ID NOs :3 和 16 中;
- b) 分别在 SEQ ID NOs :4 和 17 中;
- c) 分别在 SEQ ID NOs :5 和 18 中;
- d) 分别在 SEQ ID NOs :6 和 19 中;
- e) 分别在 SEQ ID NOs :7 和 20 中;
- f) 分别在 SEQ ID NOs :8 和 21 中;
- g) 分别在 SEQ ID NOs :9 和 22 中;
- h) 分别在 SEQ ID NOs :10 和 23 中;
- i) 分别在 SEQ ID NOs :11 和 24 中;
- j) 分别在 SEQ ID NOs :12 和 25 中;
- k) 分别在 SEQ ID NOs :12 和 137 中;或
- l) 分别在 SEQ ID NOs :13 和 26 中。

2. 一种单克隆抗人 CD52 抗体,或其抗原结合部分,其结合至与权利要求 1 所述的单克隆抗体或抗原结合部分所结合的人类 CD52 上的表位相同的表位。

3. 一种单克隆抗人 CD52 抗体,或其抗原结合部分,其与权利要求 1 所述的单克隆抗体或抗原结合部分竞争或交叉竞争。

4. 如权利要求 1、2、或 3 所述的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体是人源化抗体、鼠抗体、或嵌合抗体。

5. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述重链的骨架区利用 VH3-72 或 VH3-23 人类生殖系序列,并且其中所述轻链的骨架区利用 VK2 A18b 人类生殖系序列。

6. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体包括重链(H)-CDR1、H-CDR2、H-CDR3,和轻链(L)-CDR1、L-CDR2、和 L-CDR3,其氨基酸序列为:

- a) 分别为 SEQ ID NOs :51、59、69、29、36、和 43;
- b) 分别为 SEQ ID NOs :50、60、69、29、37、和 43;
- c) 分别为 SEQ ID NOs :50、61、68、29、38、和 43;
- d) 分别为 SEQ ID NOs :50、61、69、29、36、和 43;
- e) 分别为 SEQ ID NOs :50、62、69、29、39、和 43;
- f) 分别为 SEQ ID NOs :52、61、70、30、40、和 43;
- g) 分别为 SEQ ID NOs :53、63、71、31、36、和 44;
- h) 分别为 SEQ ID NOs :54、64、71、31、36、和 45;
- i) 分别为 SEQ ID NOs :55、63、72、31、36、和 46;
- j) 分别为 SEQ ID NOs :56、65、73、32、41、和 47;
- k) 分别为 SEQ ID NOs :56、65、294、32、41、和 47;或
- l) 分别为 SEQ ID NOs :56、66、74、33、41、和 48。

7. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体的轻链和重链:

- a) 分别包括 SEQ ID NOs :3 和 16 的氨基酸序列;

- b) 分别包括 SEQ ID NOs :4 和 17 的氨基酸序列 ;
 - c) 分别包括 SEQ ID NOs :5 和 18 的氨基酸序列 ;
 - d) 分别包括 SEQ ID NOs :6 和 19 的氨基酸序列 ;
 - e) 分别包括 SEQ ID NOs :7 和 20 的氨基酸序列 ;
 - f) 分别包括 SEQ ID NOs :8 和 21 的氨基酸序列 ;
 - g) 分别包括 SEQ ID NOs :9 和 22 的氨基酸序列 ;
 - h) 分别包括 SEQ ID NOs :10 和 23 的氨基酸序列 ;
 - i) 分别包括 SEQ ID NOs :11 和 24 的氨基酸序列 ;
 - j) 分别包括 SEQ ID NOs :12 和 25 的氨基酸序列 ;或
 - k) 分别包括 SEQ ID NOs :13 和 26 的氨基酸序列。
8. 如权利要求 1 所述的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述重链和所述轻链 :
- a) 分别包括 SEQ ID NOs :103 和 102 的氨基酸序列 ;
 - b) 分别包括 SEQ ID NOs :136 和 138 的氨基酸序列 ;
 - c) 分别包括 SEQ ID NOs :137 和 138 的氨基酸序列 ;
 - d) 分别包括 SEQ ID NOs :139 和 147 的氨基酸序列 ;
 - e) 分别包括 SEQ ID NOs :149 和 155 的氨基酸序列 ;
 - f) 分别包括 SEQ ID NOs :149 和 156 的氨基酸序列 ;
 - g) 分别包括 SEQ ID NOs :158 和 165 的氨基酸序列 ;
 - h) 分别包括 SEQ ID NOs :158 和 166 的氨基酸序列 ;
 - i) 分别包括 SEQ ID NOs :159 和 165 的氨基酸序列 ;
 - j) 分别包括 SEQ ID NOs :159 和 166 的氨基酸序列 ;
 - k) 分别包括 SEQ ID NOs :161 和 166 的氨基酸序列 ;或
 - l) 分别包括 SEQ ID NOs :163 和 166 的氨基酸序列。
9. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链和轻链分别包括 SEQ ID NOs :272 和 273 的氨基酸序列,且无信号序列。
10. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链和轻链分别包括 SEQ ID NOs :274 和 275 的氨基酸序列,且无信号序列。
11. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链和轻链分别包括 SEQ ID NOs :276 和 278 的氨基酸序列,且无信号序列。
12. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链和轻链分别包括 SEQ ID NOs :277 和 278 的氨基酸序列,且无信号序列。
13. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链和轻链分别包括 SEQ ID NOs :279 和 280 的氨基酸序列,且无信号序列。
14. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链和轻链分别包括 SEQ ID NOs :281 和 282 的氨基酸序列,且无信号序列。
15. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的轻链包括选自 SEQ ID NOs :102、138、145-148、153-157、和 164-168 的氨基酸序列。
16. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的轻链包括选自 SEQ ID NOs :273、275、278、280、和 282 的氨基酸序列,且无信号序列。

17. 一种抗体轻链或其部分,包括选自 SEQ ID NOs :102、138、145-148、153-157、164-168、273、275、278、280、和 282 的氨基酸序列,且无信号序列若其存在。

18. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链包括选自 SEQ ID NOs :103、136、137、139-144、149-152、和 158-163 的氨基酸序列。

19. 一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体的重链包括选自 SEQ ID NOs :272、274、276、277、279、和 281 的氨基酸序列,且无信号序列。

20. 一种抗体重链或其部分,包括选自 SEQ ID NOs :103、136、137、139-144、149-152、158-163、272、274、276、277、279、和 281 的氨基酸序列,且无信号序列若其存在。

21. 如权利要求 1-8、15、16、和 18 中任一项所述的单克隆抗体,其中所述抗体是 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 分子。

22. 如权利要求 1-16、18 和 19 中任一项所述的抗原结合部分,其中所述抗原结合部分是单链抗体、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链 Fv 分子(scFv)、双特异性单链 Fv 二聚体、双抗体、区域缺失抗体或单域抗体(dAb)。

23. 如权利要求 1、2 或 3 所述的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分结合至包括 SEQ ID NO :104 的氨基酸序列,并且任选地,所述抗体或抗原结合部分至 SEQ ID NO :104 的结合通过在 SEQ ID NO :104 的残基 4、7、8、和 11 中的一个或多个处的丙氨酸取代而减少。

24. 如权利要求 1-16、18、和 19 中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合部分,其中所述抗体或抗原结合部分具有选自以下的一个或多个性质:

- a) 消减 T 或 B 淋巴细胞,或二者;
- b) 与 B 淋巴细胞相比,优先地消减 T 淋巴细胞;
- c) 增加 TNF- α 、IL-6、或 MCP-1 的循环血清水平;
- d) 介导 CD52 表达细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);
- e) 介导 CD52 表达细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC);
- f) 在阿仑单抗的中和抗体的存在下结合至人 CD52;和
- g) 促进人类 T 或 B 淋巴细胞中的细胞内信号传导,或促进二者中的细胞内信号传导。

25. 一种分离的核酸,其编码权利要求 1-16、18、和 19 中任一项所述的抗体的重链或其抗原结合部分,或所述抗体的轻链或其抗原结合部分。

26. 如权利要求 25 所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包括:

- a) 选自 SEQ ID NOs :283、285、287、288、290、和 292 的重链核苷酸序列,或不具有编码信号肽的序列的所述核苷酸序列;
- b) 选自 SEQ ID NOs :284、286、289、291、和 293 的轻链核苷酸序列,或不具有编码信号肽的序列的所述核苷酸序列;或
- c) a) 和 b) 二者的核苷酸序列。

27. 如权利要求 26 所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包括选自以下的重链核苷酸序列和轻链核苷酸序列:

- a) 分别选自 SEQ ID NO :283 和 SEQ ID NO :284,二者均不具有编码信号肽的序列;
- b) 分别选自 SEQ ID NO :285 和 SEQ ID NO :286,二者均不具有编码信号肽的序列;
- c) 分别选自 SEQ ID NO :287 和 SEQ ID NO :289,二者均不具有编码信号肽的序列;

- d) 分别选自 SEQ ID NO :288 和 SEQ ID NO :289,二者均不具有编码信号肽的序列;
- e) 分别选自 SEQ ID NO :290 和 SEQ ID NO :291,二者均不具有编码信号肽的序列;和
- f) 分别选自 SEQ ID NO :292 和 SEQ ID NO :293,二者均不具有编码信号肽的序列。

28. 一种包含重链核苷酸序列的分离的核酸和一种包含轻链核苷酸序列的分离的核酸用于制备药物中的用途,所述药物用来治疗需要治疗的病人,其中所述重链核苷酸序列和所述轻链核苷酸序列:

- a) 分别选自 SEQ ID NO :283 和 SEQ ID NO :284,二者均不具有编码信号肽的序列;
- b) 分别选自 SEQ ID NO :285 和 SEQ ID NO :286,二者均不具有编码信号肽的序列;
- c) 分别选自 SEQ ID NO :287 和 SEQ ID NO :289,二者均不具有编码信号肽的序列;
- d) 分别选自 SEQ ID NO :288 和 SEQ ID NO :289,二者均不具有编码信号肽的序列;
- e) 分别选自 SEQ ID NO :290 和 SEQ ID NO :291,二者均不具有编码信号肽的序列;和
- f) 分别选自 SEQ ID NO :292 和 SEQ ID NO :293,二者均不具有编码信号肽的序列。

29. 一种重组载体,其包括 (1) 编码权利要求 1-16、18、和 19 中任一项所述的单克隆抗体的重链或其抗原结合部分的核酸序列、(2) 编码权利要求 1-16、18、和 19 中任一项所述的单克隆抗体的轻链或其抗原结合部分的核酸序列、或 (3) 二者。

30. 一种宿主细胞,其包括编码权利要求 1-16、18、和 19 中任一项所述的单克隆抗体的重链或其抗原结合部分的第一核酸序列,所述第一核酸序列可操作地连接至表达控制元件,和编码所述单克隆抗体的轻链或其抗原结合部分的第二核酸序列,所述第二核酸序列可操作地连接至表达控制元件。

31. 一种制造抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分的方法,包括将权利要求 30 所述的宿主细胞维持在适合所述抗体或其抗原结合部分表达的条件下。

32. 如权利要求 31 所述的方法,进一步包括分离所述抗体或其抗原结合部分。

33. 一种组合物,包括权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合部分,以及药学上可接受的媒介物或载体。

34. 一种用于治疗需要治疗的病人的方法,包括对所述病人施用有效量的权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的抗体或抗原结合部分、或权利要求 33 所述的组合物。

35. 如权利要求 34 所述的方法,其中所述病人正接受移植。

36. 一种用于治疗需要治疗的病人中的自体免疫疾病的方法,包括对所述病人施用有效量的权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的抗体或抗原结合部分、或权利要求 33 所述的组合物。

37. 如权利要求 36 所述的方法,其中所述自体免疫疾病为多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、或血管炎。

38. 一种用于治疗需要治疗的病人中的癌症的方法,包括对所述病人施用有效量的权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合部分、或权利要求 33 所述的组合物。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述癌症为白血病。

40. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述癌症为淋巴瘤。

41. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述癌症为 T 细胞恶性肿瘤,并且相较于 B 细胞,所述抗体或抗原结合部分优先地消滅 T 细胞。

42. 如权利要求 38 所述的方法,其中所述癌症为实体肿瘤。
43. 如权利要求 34、36、或 38 所述的方法,进一步包括对所述病人施用嗜中性粒细胞或 NK 细胞刺激剂。
44. 如权利要求 42 所述的方法,其中所述刺激剂为 G-CSF 或 GM-CSF。
45. 如权利要求 34、36、或 38 所述的方法,进一步包括对所述病人施用 T 调节细胞刺激剂。
46. 如权利要求 45 所述的方法,其中所述刺激剂为雷帕霉素。
47. 一种在需要的病人中抑制血管生成的方法,包括对所述病人施用有效量的权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合部分。
48. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述病人有实体肿瘤。
49. 如权利要求 47 所述的方法,其中所述病人有新血管形成。
50. 如权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的单克隆抗体或抗原结合部分用于制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗需要治疗的病人中的自体免疫疾病。
51. 如权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的抗体或抗原结合部分用于制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗需要治疗的病人中的癌症。
52. 如权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的抗体或抗原结合部分用于制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗需要移植的病人。
53. 如权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的抗体或抗原结合部分用于制备药物中的用途,其中所述药物用于治疗需要治疗的病人中的新血管形成。
54. 如权利要求 1-16、18、19、和 21-24 中任一项所述的抗体或抗原结合部分用作药物的用途。

抗人 CD52 免疫球蛋白

[0001] 本申请要求于 2009 年 5 月 13 日申请的美国临时申请第 61/177,837 号的优先权。该申请的公开内容完整地引入本文以供参考。

背景技术

[0002] CD52 是一种在各种正常和恶性淋巴样细胞（例如 T 和 B 细胞）上大量（500,000 分子/细胞）发现的糖基化的糖基化磷脂酰肌醇（GPI）- 锚定的细胞表面蛋白。参考，例如，Hale 等人，J Biol regul Homeost Agents 15:386-391(2001)；Huh 等人，Blood 92: Abstract 4199(1998)；Elsner 等人，Blood 88:4684-4693(1996)；Gilleece 等人，Blood 82:807-812(1993)；Rodig 等人，Clin Cancer Res 12:7174-7179(2006)；Ginaldi 等人，Leuk Res 22:185-191(1998)。CD52 在髓样细胞例如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞上以较低水平表达，并且发现在成熟自然杀手（NK）细胞、嗜中性粒细胞和造血干细胞上几乎不表达。Id. CD52 也由附睾及输精管中的上皮细胞产生，并由精子在通过生殖道期间获得（Hale 等人，2001，上文；Domagala 等人，Med Sci Monit 7:325-331(2001)）。CD52 的确切生物功能仍不清楚，但一些证据暗示其可能涉及 T 细胞迁移和共刺激（Rowan 等人，Int Immunol 7:69-77(1995)；Masuyama 等人，J Exp Med 189:979-989(1999)；Watanabe 等人，Clin Immunol 120:247-259(2006)）。

[0003] Campath-1H®（阿仑单抗（alemtuzumab），Campath®，MabCampath®）是一种人源化抗人 CD52 单克隆抗体，其显现有效力的体外细胞毒作用（抗体依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）和补体依赖的细胞毒性（CDC））。Campath®识别由成熟 CD52 蛋白的羧基端四个氨基酸及带负电的 GPI 锚区的一部分所构成的表位。因为其显著的细胞毒作用，Campath®能够在体内消减 CD52 阳性细胞，并且其已被批准用于慢性淋巴细胞白血病（CLL）的一线及三线治疗。已对 Campath®在治疗数种自身免疫疾病包括类风湿性关节炎、血管炎、肌炎和 Wegener's 疾病中的效用进行了评价。然而，Campath®的最先进研究在于治疗复发缓解型多发性硬化症（MS）。相对于活性对照（Rebif®（即干扰素 β -1a）），这些研究显示出对复发时间的显著改善。

[0004] 存在对额外治疗剂和靶向 CD52 的途径的需求。

发明内容

[0005] 人源化免疫球蛋白

[0006] 本发明涉及一种对人类 CD52（huCD52）具有结合特异性的人源化免疫球蛋白。其可包括鼠抗人 CD52 抗体的互补决定区（CDRs）。本发明的人源化免疫球蛋白具有与其它人源化免疫球蛋白不同，并且特别是与包括鼠抗人 CD52 抗体的 CDRs 的其它人源化免疫球蛋白不同的氨基酸序列。本发明的人源化免疫球蛋白与人源化免疫球蛋白 Campath®不同。在一些实施方式中，它们提供超过含有 Campath®的 CDRs 的人源化抗体的优点。

[0007] 本文所述的人源化免疫球蛋白可包括人源化重链和人源化轻链。在一个实施方式中，人源化免疫球蛋白包括含有 SEQ ID NO:3 的一个或多个 CDRs（例如，所有三个 CDRs）的

轻链和含有 SEQ ID NO :16 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :4 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :17 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :5 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :18 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :6 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :19 的一个或多个 CDRs 的重链;含有 SEQ ID NO :7 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :20 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :8 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :21 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :9 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :22 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :10 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :23 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :11 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :24 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :12 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;或含有 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :26 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链序列。上述 SEQ ID NOs 中的 CDRs 由图 2 和图 3 指出并且在本文提供的表 1-6 中提及。

[0008] 在另一个实施方式中,对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白包括轻链,其含有一个或多个(例如,所有三个)选自 SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47 和 SEQ ID NO :48 的 CDRs ;以及重链,其含有一个或多个(例如,所有三个)选自 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68、SEQ ID NO :69、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :74 和 SEQ ID NO :294 的 CDRs ;或此种轻链和此种重链;其中该人源化免疫球蛋白不是 Campath®。

[0009] 在另一个实施方式中,对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白包括轻链,其含有 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) ;重链,其含有 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26 或 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) ;或此种轻链和此种重链;其中该人源化免疫球蛋白不是 Campath®。

[0010] 在一些实施方式中,该人源化免疫球蛋白的骨架区相对于免疫球蛋白(由其得到

轻链 CDRs 和重链 CDRs) 的骨架区具有至少 50% 的同源性。例如, 该人源化免疫球蛋白的骨架区可与生殖系人类免疫球蛋白序列至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%、或者甚至 100% 相同。在一个实施方式中, 该人源化免疫球蛋白的骨架区可衍生自或从 IgG 人类抗体可变区得到。在另一个实施方式中, CD52 为野生型人 CD52。在又一实施方式中, 该人源化免疫球蛋白可与阿仑单抗竞争以结合至人 CD52, 例如, 其可结合至与阿仑单抗所要结合的表位相同的表位, 或是与之重叠的表位。

[0011] 本发明还涉及本发明的人源化免疫球蛋白的人源化轻链。在一个实施方式中, 人源化轻链包括选自 SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47、和 SEQ ID NO :48、或其组合的一个或多个 CDRs, 其中人源化轻链不是 Campath® 的人源化轻链。

[0012] 在另一个实施方式中, 人源化轻链包括 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs (例如, 所有三个 CDRs), 其中该人源化轻链不是 Campath® 的人源化轻链。

[0013] 本发明还涉及本发明的人源化免疫球蛋白的人源化重链。在一个实施方式中, 人源化重链包括选自 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68、SEQ ID NO :69、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :74、和 SEQ ID NO :294、或其组合的 Ig 可变域的一个或多个 CDRs, 其中该人源化重链不是 Campath® 的人源化重链。

[0014] 在其它实施方式中, 该人源化重链包括 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、或 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs (例如, 所有三个 CDRs), 其中该人源化重链不是 Campath® 的人源化重链。

[0015] 优选地, 本发明的人源化免疫球蛋白包括本发明的人源化轻链和本发明的人源化重链二者。

[0016] 在其它实施方式中, 本发明提供一种人源化免疫球蛋白, 该人源化免疫球蛋白结合至人 CD52 上的与小鼠单克隆抗体所结合表位相同的表位或与小鼠单克隆抗体竞争或与其交叉竞争, 该小鼠单克隆抗体包括 SEQ ID NO :3 的轻链可变区和 SEQ ID NO :16 的重链可变区; SEQ ID NO :4 的轻链可变区和 SEQ ID NO :17 的重链可变区; SEQ ID NO :5 的轻链可变区和 SEQ ID NO :18 的重链可变区; SEQ ID NO :6 的轻链可变区和 SEQ ID NO :19 的重链可变区; SEQ ID NO :7 的轻链可变区和 SEQ ID NO :20 的重链可变区; SEQ ID NO :8 的轻链可变区和 SEQ ID NO :21 的重链可变区; SEQ ID NO :9 的轻链可变区和 SEQ ID NO :22 的重链可变区; SEQ ID NO :10 的轻链可变区和 SEQ ID NO :23 的重链可变区; SEQ ID NO :11 的轻链可变区和 SEQ ID NO :24 的重链可变区; SEQ ID NO :12 的轻链可变区和 SEQ ID NO :25 的重链可变区; 或 SEQ ID NO :13 的轻链可变区和 SEQ ID NO :26 的重链可变区。在其它实

施方式中,人源化免疫球蛋白结合至人 CD52 上的表位,该表位与这样的小鼠单克隆抗体所结合的表位重叠。

[0017] 在其它实施方式中,本发明提供一种结合至人 CD52(例如,SEQ ID NO:104) 上的表位的人源化免疫球蛋白,其包括至少成熟人类 CD52 序列的残基 1(其中残基 1 是成熟人类 CD52 序列的 N 端,即, N 端甘氨酸 [G] 残基;参见图 4)。该人源化免疫球蛋白可结合至包括至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、3、4 和 5 的表位(这些残基分别是甘氨酸 [G]、天冬酰胺 [N]、天冬氨酸 [D]、和苏氨酸 [T])。该人源化免疫球蛋白可结合至包括至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、2、3、4 和 5 的表位(这些残基分别为甘氨酸 [G]、谷氨酰胺 [Q]、天冬酰胺 [N]、天冬氨酸 [D]、及苏氨酸 [T])。在其它实施方式中,本发明提供一种结合至人 CD52 上的表位的人源化免疫球蛋白,该表位包括至少成熟人类 CD52 序列的残基 7、8 和 9(这些残基分别为谷氨酰胺 [Q]、苏氨酸 [T]、和丝氨酸 [S])。在一些实施方式中,表位包括至少成熟人类 CD52 序列的残基 7(Q)、8(T) 和 11(P)。在一些实施方式中,表位包括至少成熟人类 CD52 序列的残基 4(D) 和 11(P)。

[0018] 在一些实施方式中,本发明提供一种结合至人 CD52 的人源化免疫球蛋白,其包括含有选自 SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、和 SEQ ID NO:121 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个所述 CDRs) 的轻链,或含有选自 SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:127、和 SEQ ID NO:130 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个所述 CDRs) 的重链,或此种轻链和此种重链二者。在其它实施方式中,本发明提供一种结合至人 CD52 的人源化免疫球蛋白,且其包括含有选自 SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119、和 SEQ ID NO:122 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个所述 CDRs) 的轻链,或含有选自 SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:128、和 SEQ ID NO:131 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个所述 CDRs) 的重链,或此种轻链和重链二者。在进一步的实施方式中,本发明提供一种结合至人 CD52 的人源化免疫球蛋白,且其包括含有选自 SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:120、和 SEQ ID NO:123 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个所述 CDRs) 的轻链,或含有选自 SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:129、和 SEQ ID NO:132 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个所述 CDRs) 的重链,或此种轻链和此种重链二者。

[0019] 在某些实施方式中,人源化免疫球蛋白包括含有 SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118 和 SEQ ID NO:121 的 CDRs 的轻链,以及含有 SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:127 和 SEQ ID NO:130 的 CDRs 的重链。在其它实施方式中,人源化免疫球蛋白包括含有 SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119 和 SEQ ID NO:122 的 CDRs 的轻链,以及含有 SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:128 和 SEQ ID NO:131 的 CDRs 的重链。在其它实施方式中,人源化免疫球蛋白包括含有 SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:120 和 SEQ ID NO:123 的 CDRs 的轻链,以及含有 SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:129 和 SEQ ID NO:132 的 CDRs 的重链。

[0020] 本发明的人源化免疫球蛋白与人源化免疫球蛋白 Campath®不同。

[0021] 上述 SEQ ID NOs:115-132 的氨基酸序列提供于下文,并且是基于本文他处提供的表 1-6 中所报告的氨基酸序列。在这些氨基酸序列中,“X”表示任意氨基酸,且符号“/”表示相邻该符号的氨基酸的其中一个(或任一个)可存在于所指出位置(例如, K/R 表示赖氨酸或精氨酸残基存在于所指出位置, F/L/V 指出苯丙氨酸、亮氨酸或缬氨酸残基存在于所指出位置)。

[0022] 轻链 CDR-1 序列

- [0023] K/RSSQSLL/V/IXS/TN/DGXS/TYLYX(SEQ ID NO :115)
[0024] K/RSSQSLL/V/IHS/TNGXS/TYLYH(SEQ ID NO :116)
[0025] RSSQSLVHTNGNS/TYLYH(SEQ ID NO :117)
[0026] 轻链 CDR-2 序列
[0027] XVSXXXS(SEQ ID NO :118)
[0028] XVSXRXS(SEQ ID NO :119)
[0029] MVSXRFS(SEQ ID NO :120)
[0030] 轻链 CDR-3 序列
[0031] XQXXH/R/KF/L/V/IXX(SEQ ID NO :121)
[0032] SQSXH/R/KF/L/V/IPX(SEQ ID NO :122)
[0033] SQSXHVPF/P(SEQ ID NO :123)
[0034] 重链 CDR-1 序列
[0035] GFXXFYW/YMX(SEQ ID NO :124)
[0036] GFTFYW/YMX (SEQ ID NO :125)
[0037] GFTFDYW/YMS(SEQ ID NO :126)
[0038] 重链 CDR-2 序列
[0039] XIRKXBXXTXYXXSVKG(SEQ ID NO :127)
[0040] XIRKXNXYTTEYXXSVKG(SEQ ID NO :128)
[0041] FIRKANGYTTEYXXSVKG(SEQ ID NO :129)
[0042] 重链 CDR-3 序列
[0043] TXXY/F/W(SEQ ID NO :130)
[0044] TRYXY/F/WFDY(SEQ ID NO :131)
[0045] TRYIF/WFDY(SEQ ID NO :132)

[0046] 本发明还涉及一种人源化轻链,其含有选自 SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :118、和 SEQ ID NO :121 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs);一种人源化轻链,其含有选自 SEQ ID NO :116、SEQ ID NO :119、和 SEQ ID NO :122 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs);或一种人源化轻链,其含有选自 SEQ ID NO :117、SEQ ID NO :120、和 SEQ ID NO :123 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)。

[0047] 本发明还涉及一种人源化重链,其含有选自 SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :127、和 SEQ ID NO :130 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs);一种人源化重链,其含有选自 SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :128、和 SEQ ID NO :131 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs);或一种人源化重链,其含有选自 SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :129、和 SEQ ID NO :132 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)。

[0048] 本发明的人源化轻链和人源化重链与人源化免疫球蛋白 Campath®的人源化轻链和人源化重链不同。

[0049] 在本发明的一些实施方式中,本发明的人源化免疫球蛋白(不考虑它们可能被另外限定的方式,例如,不考虑它们是否也以其 CDRs 的一个或多个的序列的方式来限定和/或通过它们与小鼠单克隆抗体或另一人源化免疫球蛋白的交叉反应性来限定):(1) 显示出结合至糖基化和去糖基化 CD52 而无明显偏好;(2) 显示出对糖基化 CD52 的特异性结合;

(3) 显示出对去糖基化 CD52 的特异性结合 ;或 (4) 相对于糖基化 CD52 显示出对去糖基化者的结合偏好。在某些实施方式中,本发明的人源化免疫球蛋白对糖基化的人 CD52 相比于对非糖基化或去糖基化的人 CD52 具有更高的结合亲和性。的确,在本发明的某些实施方式中,本发明的人源化免疫球蛋白显示出对糖基化的人 CD52 的特异性结合。对非糖基化或去糖基化的人 CD52 的结合亲和性可使用已经用糖苷酶,例如使用内切糖苷酶 PNGase-F 去糖基化的成熟人类 CD52 来确定。在本发明的某些实施方式中,本发明的人源化免疫球蛋白结合至包含其 N-连接的碳水化合物部分的成熟人类 CD52 上的表位。此碳水化合物部分是一种唾液酸化的、含聚乳糖胺的核心岩藻糖化的四天线型 N-连接的低聚糖 (Treumann, A. 等人, (1995) J. Biol. Chem. 270 :6088-6099)。此表位也可包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1,至少成熟人类 CD52 序列的残基 3,至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、3、4 和 5,或至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、2、3、4 和 5。在一些实施方式中,本发明的鼠或嵌合抗体可具任意这些结合特征。

[0050] 还提供如在本文他处所定义的编码本发明的人源化免疫球蛋白、人源化轻链或人源化重链的分离的核酸分子。在一些实施方式中,本发明为一种(一个或多个)分离的核酸分子,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中人源化轻链包含 SEQ ID NO :3 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)且重链包含 SEQ ID NO :16 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs);包含 SEQ ID NO :4 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :17 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :5 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :18 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :6 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :19 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :7 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :20 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :8 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :21 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :9 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :22 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :10 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :23 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :11 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :24 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :12 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :25 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;包含 SEQ ID NO :12 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;或包含 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和包含 SEQ ID NO :26 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链序列。

[0051] 在一些实施方式中,本发明是一个或多个分离的核酸分子,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白结合至与小鼠单克隆抗体所结合的人 CD52 上的表位相同的表位,该小鼠单克隆抗体包含 SEQ ID NO :3 的轻链可变区和 SEQ ID NO :16 的重链可变区;SEQ ID NO :

4的轻链可变区和SEQ ID NO:17的重链可变区;SEQ ID NO:5的轻链可变区和SEQ ID NO:18的重链可变区;SEQ ID NO:6的轻链可变区和SEQ ID NO:19的重链可变区;SEQ ID NO:7的轻链可变区和SEQ ID NO:20的重链可变区;SEQ ID NO:8的轻链可变区和SEQ ID NO:21的重链可变区;SEQ ID NO:9的轻链可变区和SEQ ID NO:22的重链可变区;SEQ ID NO:10的轻链可变区和SEQ ID NO:23的重链可变区;SEQ ID NO:11的轻链可变区和SEQ ID NO:24的重链可变区;SEQ ID NO:12的轻链可变区和SEQ ID NO:25的重链可变区;或SEQ ID NO:13的轻链可变区和SEQ ID NO:26的重链可变区。在其它实施方式中,本发明是一个或多个分离的核酸分子,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人CD52具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白结合至人CD52上的表位,此表位与这样的小鼠单克隆抗体所结合的表位重叠。

[0052] 在其它实施方式中,本发明是一个或多个分离的核酸分子,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人CD52具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白结合至包含至少成熟人CD52的残基1的表位;该人源化免疫球蛋白结合至包含至少成熟人CD52的残基1、3、4和5的表位;该人源化免疫球蛋白结合至包含至少成熟人CD52的残基1、2、3、4和5的表位;或者该人源化免疫球蛋白结合至包含至少成熟人CD52的残基7、8和9的表位。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类CD52序列的残基7、8和11。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类CD52序列的残基4和11。

[0053] 在其它实施方式中,本发明是一个或多个分离的核酸分子,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人CD52具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白包括:包含选自SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118、和SEQ ID NO:121的一个或多个CDRs(例如,所有三个该CDRs)的轻链,和/或包含选自SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:127、和SEQ ID NO:130的一个或多个CDRs(例如,所有三个该CDRs)的重链;包含选自SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119、和SEQ ID NO:122的一个或多个CDRs(例如,所有三个该CDRs)的轻链,和/或包含选自SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:128、和SEQ ID NO:131的一个或多个CDRs(例如,所有三个该CDRs)的重链;或者,包含选自SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:120、和SEQ ID NO:123的一个或多个CDRs(例如,所有三个该CDRs)的轻链,和/或包含选自SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:129、和SEQ ID NO:132的一个或多个CDRs(例如,所有三个该CDRs)的重链。

[0054] 在某些实施方式中,本发明是一个或多个分离的核酸分子,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人CD52具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白包括,包含SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:118和SEQ ID NO:121的CDRs的轻链,以及包含SEQ ID NO:124、SEQ ID NO:127和SEQ ID NO:130的CDRs的重链;包含SEQ ID NO:116、SEQ ID NO:119和SEQ ID NO:122的CDRs的轻链,以及包含SEQ ID NO:125、SEQ ID NO:128和SEQ ID NO:131的CDRs的重链;或包含SEQ ID NO:117、SEQ ID NO:120和SEQ ID NO:123的CDRs的轻链,以及包含SEQ ID NO:126、SEQ ID NO:129和SEQ ID NO:132的CDRs的重链。

[0055] 本发明的该一个或多个核酸不编码人源化免疫球蛋白 Campath®。

[0056] 在其它实施方式中,本发明是一个或多个分离的核酸分子,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人CD52具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中

该人源化免疫球蛋白对糖基化的人 CD52 相比于对非糖基化或去糖基化的人 CD52 具有更大的结合亲和性,例如,显现出对糖基化的人 CD52 的特异性结合。人源化免疫球蛋白可结合至包含其 N-连接的碳水化合物部分的成熟人 CD52 上的表位。此表位也可包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1,至少成熟人类 CD52 序列的残基 3,至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、3、4 和 5,或是至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、2、3、4 和 5。

[0057] 在其它实施方式中,本发明是一种分离的核酸分子,其编码人源化轻链,该人源化轻链包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个该 CDRs),其中该人源化轻链不是 Campath®的人源化轻链。

[0058] 在其它实施方式中,本发明是一种分离的核酸分子,其编码人源化重链,该人源化重链包含 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、或 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs),其中该人源化重链不是 Campath®的人源化重链。

[0059] 在其它实施方式中,本发明是一种分离的核酸分子,其编码人源化轻链,该人源化轻链包含选自 SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47、和 SEQ ID NO :48 或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化轻链不是 Campath®的人源化轻链。

[0060] 在其它实施方式中,本发明是一种分离的核酸分子,其编码人源化重链,该人源化重链包含选自 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68、SEQ ID NO :69、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :74、和 SEQ ID NO :294、或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化重链不是 Campath®的人源化重链。

[0061] 在其它实施方式中,本发明是一种分离的核酸分子,其编码包含选自 SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :118、和 SEQ ID NO :121 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个该 CDRs) 的人源化轻链;包含选自 SEQ ID NO :116、SEQ ID NO :119、和 SEQ ID NO :122 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个该 CDRs) 的人源化轻链;或包含选自 SEQ ID NO :117、SEQ ID NO :120、和 SEQ ID NO :123 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个该 CDRs) 的人源化轻链。

[0062] 在其它实施方式中,本发明是一种分离的核酸分子,其编码包含选自 SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :127、和 SEQ ID NO :130 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个该 CDRs) 的人源化重链;包含选自 SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :128、和 SEQ ID NO :131 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个该 CDRs) 的人源化重链;或包含选自 SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :129、和 SEQ ID NO :132 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个该 CDRs) 的人源化重链。

[0063] 本发明还涉及一种重组载体 (例如,表达载体,包括哺乳动物细胞表达载体),其包含编码本发明的人源化免疫球蛋白 (例如,人源化轻链和人源化重链)、人源化轻链、或

人源化重链的核酸。在一些实施方式中,本发明为一种重组载体,其包含编码人源化免疫球蛋白的核酸,该人源化免疫球蛋白包含含有 SEQ ID NO :3 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :16 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :4 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :17 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :5 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :18 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :6 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :19 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :7 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :20 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :8 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :21 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :9 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :22 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :10 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :23 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :11 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :24 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :12 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :25 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;含有 SEQ ID NO :12 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;或含有 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和含有 SEQ ID NO :26 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链。

[0064] 在其它实施方式中,重组载体包含编码人源化轻链的核酸,其中该人源化轻链包含选自 SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47、和 SEQ ID NO :48、或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化轻链不是 Campath® 的人源化轻链。

[0065] 在其它实施方式中,重组载体包含编码人源化重链的核酸,其中该人源化重链包含选自 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68、SEQ ID NO :69、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :74、和 SEQ ID NO :294、或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化轻链不是 Campath® 的人源化轻链。

[0066] 在一些实施方式中,本发明提供包含一个核酸分子的一个重组载体,或包含多个核酸分子的一对重组载体,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白结合至与小鼠单克隆抗体所结合的人 CD52 上的表位相同的表位,该小鼠单克隆抗体包含 SEQ ID NO :3 的轻链可变区和 SEQ ID NO :16 的重链可变区;SEQ ID NO :4 的轻链可变区和 SEQ ID NO :17 的重

链可变区 ;SEQ ID NO :5 的轻链可变区和 SEQ ID NO :18 的重链可变区 ;SEQ ID NO :6 的轻链可变区和 SEQ ID NO :19 的重链可变区 ;SEQ ID NO :7 的轻链可变区和 SEQ ID NO :20 的重链可变区 ;SEQ ID NO :8 的轻链可变区和 SEQ ID NO :21 的重链可变区 ;SEQ ID NO :9 的轻链可变区和 SEQ ID NO :22 的重链可变区 ;SEQ ID NO :10 的轻链可变区和 SEQ ID NO :23 的重链可变区 ;SEQ ID NO :11 的轻链可变区和 SEQ ID NO :24 的重链可变区 ;SEQ ID NO :12 的轻链可变区和 SEQ ID NO :25 的重链可变区 ;或 SEQ ID NO :13 的轻链可变区和 SEQ ID NO :26 的重链可变区。在其它实施方式中,本发明提供包含一个核酸分子的一个重组载体,或包含多个核酸分子的一对重组载体,其编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白结合至人 CD52 上的表位,此表位与这样的小鼠单克隆抗体所结合的表位重叠。

[0067] 在其它实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,或一对重组载体包含多个核酸分子,这些核酸分子编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 1 的表位;结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 1、3、4 和 5 的表位;结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 1、2、3、4 和 5 的表位;或结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 7、8 和 9 的表位。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 7、8 和 11。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 4 和 11。

[0068] 在一些实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,或一对重组载体包含多个核酸分子,这些核酸分子编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白包含含有选自 SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :118、和 SEQ ID NO :121 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的一种轻链,和/或含有选自 SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :127、和 SEQ ID NO :130 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的一种重链;含有选自 SEQ ID NO :116、SEQ ID NO :119、和 SEQ ID NO :122 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的一种轻链,和/或含有选自 SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :128、和 SEQ ID NO :131 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的一种重链;或含有选自 SEQ ID NO :117、SEQ ID NO :120、和 SEQ ID NO :123 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的一种轻链,和/或含有选自 SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :129、和 SEQ ID NO :132 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的一种重链。

[0069] 在某些实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,或一对重组载体包含多个核酸分子,这些核酸分子编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白包含含有 SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :118 和 SEQ ID NO :121 的 CDRs 的轻链,和含有 SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :127 和 SEQ ID NO :130 的 CDRs 的重链;含有 SEQ ID NO :116、SEQ ID NO :119 和 SEQ ID NO :122 的 CDRs 的轻链,和含有 SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :128 和 SEQ ID NO :131 的 CDRs 的重链;或含有 SEQ ID NO :117、SEQ ID NO :120 和 SEQ ID NO :123 的 CDRs 的轻链,和含有 SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :129 和 SEQ ID NO :132 的 CDRs 的重链。

[0070] 在本发明的重组载体中的该一个或多个核酸不编码人源化免疫球蛋白 Campath®。

[0071] 在其它实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,或一对重组载体包含多个核

酸分子,这些核酸分子编码人源化重链和人源化轻链(其结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白),其中该人源化免疫球蛋白对糖基化的人 CD52 相比于对非糖基化或去糖基化的人 CD52 具有更大的结合亲和性,例如,显现出特异于糖基化人 CD52 的结合。人源化免疫球蛋白可结合至包含其 N-连接碳水化合物部分的成熟人类 CD52 上的表位。此表位也可包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1,至少成熟人类 CD52 序列的残基 3,至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、3、4 和 5,或至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、2、3、4 和 5。

[0072] 在其它实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,其编码包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化轻链,其中该人源化轻链不是 Campath®的人源化轻链。

[0073] 在其它实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,其编码包含 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、或 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化重链,其中该人源化重链不是 Campath®的人源化重链。

[0074] 在其它实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,其编码包含选自 SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :118、和 SEQ ID NO :121 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化轻链;包含选自 SEQ ID NO :116、SEQ ID NO :119、和 SEQ ID NO :122 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化轻链;或包含选自 SEQ ID NO :117、SEQ ID NO :120、和 SEQ ID NO :123 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化轻链,其中该人源化轻链不是 Campath®的人源化轻链。

[0075] 在其它实施方式中,该重组载体包含一个核酸分子,其编码包含选自 SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :127、和 SEQ ID NO :130 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化重链;包含选自 SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :128、和 SEQ ID NO :131 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化重链;或包含选自 SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :129 和 SEQ ID NO :132 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)的人源化重链,其中该人源化重链不是 Campath®的人源化重链。

[0076] 在特定的实施方式中,本发明的重组载体为表达载体,例如哺乳动物细胞表达载体。在某些实施方式中,该载体是一种质粒或是病毒载体(例如,腺病毒或 AAV 载体)。

[0077] 本发明还涉及一种包含编码本发明的人源化免疫球蛋白(人源化轻链和人源化重链)、人源化轻链或人源化重链的(一个或多个)核酸(例如,重组)的宿主细胞。在一些实施方式中,宿主细胞包含一种本发明的重组载体(例如,表达载体,包括哺乳动物细胞表达载体)。

[0078] 在特定的实施方式中,该宿主细胞包含一种编码人源化轻链和人源化重链的核酸(一个或多个核酸),其中人源化轻链和人源化重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白,并且其中该人源化免疫球蛋白包含含有 SEQ ID NO :3 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链和含有 SEQ ID NO :16 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO :4 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)

的轻链,和含有 SEQ ID NO:17 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:5 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:18 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:6 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:19 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:7 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:20 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:8 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:21 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:9 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:22 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:10 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:23 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:11 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:24 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:12 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:25 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;含有 SEQ ID NO:12 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:137 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链;或含有 SEQ ID NO:13 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的轻链,和含有 SEQ ID NO:26 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)的重链序列。

[0079] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链和人源化轻链的一个或多个核酸分子,其中人源化轻链和人源化重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白,其中该人源化免疫球蛋白结合至与小鼠单克隆抗体所结合的人 CD52 上的表位相同的表位,该小鼠单克隆抗体包含 SEQ ID NO:3 的轻链可变区和 SEQ ID NO:16 的重链可变区;SEQ ID NO:4 的轻链可变区和 SEQ ID NO:17 的重链可变区;SEQ ID NO:5 的轻链可变区和 SEQ ID NO:18 的重链可变区;SEQ ID NO:6 的轻链可变区和 SEQ ID NO:19 的重链可变区;SEQ ID NO:7 的轻链可变区和 SEQ ID NO:20 的重链可变区;SEQ ID NO:8 的轻链可变区和 SEQ ID NO:21 的重链可变区;SEQ ID NO:9 的轻链可变区和 SEQ ID NO:22 的重链可变区;SEQ ID NO:10 的轻链可变区和 SEQ ID NO:23 的重链可变区;SEQ ID NO:11 的轻链可变区和 SEQ ID NO:24 的重链可变区;SEQ ID NO:12 的轻链可变区和 SEQ ID NO:25 的重链可变区;或 SEQ ID NO:13 的轻链可变区和 SEQ ID NO:26 的重链可变区。在其它实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链和人源化轻链的一个或多个核酸分子,其中人源化轻链和人源化重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白,其中该人源化免疫球蛋白结合至人 CD52 上的与此种小鼠单克隆抗体所结合的表位重叠的表位。

[0080] 在其它实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链和人源化轻链的一个或多个核酸分子,其中人源化轻链和人源化重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白,其中该人源化免疫球蛋白结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 1 的表位;结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 1、3、4 和 5 的表位;结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 1、2、3、4 和 5 的表位;或者结合至包含至少成熟人类 CD52 的残基 7、8 和 9 的表位。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 7、8 和 11。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 4 和 11。

[0081] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链和人源化轻链的一个或多个核酸分子,其中人源化轻链和人源化重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白,其中该人源化免疫球蛋白包含一种轻链,其含有选自 SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :118、和 SEQ ID NO :121 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs),和 / 或一种重链,其含有选自 SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :127、和 SEQ ID NO :130 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs);一种轻链,其含有选自 SEQ ID NO :116、SEQ ID NO :119、和 SEQ ID NO :122 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs),和 / 或一种重链,其含有选自 SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :128、和 SEQ ID NO :131 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs);或一种轻链,其含有选自 SEQ ID NO :117、SEQ ID NO :120、和 SEQ ID NO :123 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs),和 / 或一种重链,其含有选自 SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :129、和 SEQ ID NO :132 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个该 CDRs)。

[0082] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链和人源化轻链的一个或多个核酸分子,其中人源化轻链和人源化重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白,其中该人源化免疫球蛋白包含含有 SEQ ID NO :115、SEQ ID NO :118 和 SEQ ID NO :121 的 CDRs 的轻链和含有 SEQ ID NO :124、SEQ ID NO :127 和 SEQ ID NO :130 的 CDRs 的重链;含有 SEQ ID NO :116、SEQ ID NO :119、和 SEQ ID NO :122 的 CDRs 的轻链和含有 SEQ ID NO :125、SEQ ID NO :128 和 SEQ ID NO :131 的 CDRs 的重链;或含有 SEQ ID NO :117、SEQ ID NO :120 和 SEQ ID NO :123 的 CDRs 的轻链和含有 SEQ ID NO :126、SEQ ID NO :129 和 SEQ ID NO :132 的 CDRs 的重链。

[0083] 在其它实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链和人源化轻链的一个或多个核酸分子,其中人源化轻链和人源化重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白,其中该人源化免疫球蛋白对糖基化的人 CD52 相比于对非糖基化或去糖基化的人 CD52 具有更大的结合亲和性,例如,显现出对糖基化的人 CD52 特异性结合。人源化免疫球蛋白可结合至包含其 N-连接的碳水化合物部分的成熟人 CD52 上的表位。此表位也可包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1,至少成熟人类 CD52 序列的残基 3,至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、3、4 和 5,或至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、2、3、4 和 5。

[0084] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化轻链的一种核酸分子,该人源化轻链包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)。该人源化轻链不是 Campath®的人源化轻链。

[0085] 在其它实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链的一种核酸分子,该人源化重链包含 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、或 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs(例如,所有三个 CDRs)。该人源化重链不是 Campath®的人源化重链。

[0086] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化轻链的一种核酸,其中该人源化轻链包含选自 SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ

ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47、和 SEQ ID NO :48 或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化轻链不是 Campath®的人源化轻链。

[0087] 在其它实施方式中,该宿主细胞包含编码人源化重链的一种核酸,其中该人源化重链包含选自 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68、SEQ ID NO :69、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :74、和 SEQ ID NO :294 或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化重链不是 Campath®的人源化重链。

[0088] 本发明还涉及一种对人 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(例如,包含编码本发明人源化免疫球蛋白(例如,本发明的人源化轻链和人源化重链)的一个或多个重组核酸的宿主细胞)维持在适合人源化免疫球蛋白表达的条件下,借以表达人源化免疫球蛋白链并产生人源化免疫球蛋白。在一些实施方式中,该方法还包括纯化或分离人源化免疫球蛋白。在一些实施方式中,该方法还包括将纯化或分离的人源化免疫球蛋白与生理上可接受的媒介物或载体结合以制备药物组合物。

[0089] 本发明还涉及一种对人 CD52 具有结合特异性的人源化轻链的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(例如,包含编码本发明人源化轻链的一个或多个重组核酸的宿主细胞)维持在适合人源化轻链表达的条件下,借以表达人源化轻链并产生人源化轻链。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离人源化轻链。

[0090] 本发明还涉及一种对人 CD52 具有结合特异性的人源化重链的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(例如,包含编码本发明人源化重链的一个或多个重组核酸的宿主细胞)维持在适合人源化重链表达的条件下,借以表达人源化重链并产生人源化重链。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离人源化重链。

[0091] 本发明还涉及一种药物组合物,其包含本发明的人源化免疫球蛋白(例如,包含本发明的人源化轻链和/或本发明的人源化重链)和生理学上可接受的媒介物或载体。在一些实施方式中,该药物组合物包含一种单位剂量组合物。

[0092] 本发明还涉及一种会分泌对人 CD52 具有结合特异性的单克隆抗体的杂交瘤的生产方法,其包括将人 CD52 转基因小鼠的淋巴细胞施用至品系与人 CD52 转基因小鼠相同或类似的(例如,CD1)的非转基因小鼠,由此得到免疫的非转基因小鼠。该免疫的非转基因小鼠的脾细胞与永生细胞融合,从而制得杂交瘤。将该杂交瘤保持在其会分泌对人 CD52 具有结合特异性的单克隆抗体的条件下。在一些实施方式中,使用 FACS 分析以检测会分泌对人 CD52 具有结合特异性的单克隆抗体的杂交瘤。在其它实施方式中,转基因小鼠的品系和非转基因小鼠的品系是相同的。在某些实施方式中,CD52 是野生型人 CD52。在一些实施方式中,CD52 转基因小鼠和非转基因小鼠是 CD1 鼠。在一些实施方式中,用于免疫的淋巴细胞是从人 CD52 转基因小鼠的脾脏中得到的。在一些实施方式中,永生细胞选自 SP2/0 Ag14 细胞和 NS1 骨髓瘤细胞。本发明还涉及一种通过本发明的方法所生产的杂交瘤。选择性地,由杂交瘤所分泌的单克隆抗体被收集,并可被进一步纯化(例如,大体上纯化的,分离的)。在其它实施方式中,该方法进一步包括确定由杂交瘤所分泌的单克隆抗体的核苷酸序列。

[0093] 本发明还涉及一种治疗需要治疗的病人中的自体免疫疾病(例如,多发性

硬化症 (MS)、类风湿性关节炎 (RA) (参见例如, Nature Reviews Drug Discovery 6 : 75-92(2007))、血管炎 (参见例如, Rheumatology 39 :229-237(2000))、贝西氏病 (Behcet' s disease) (BD) (参见例如, Rheumatology 42 :1539-1544(2003))、狼疮及乳糜泻 (Vivas, S., 等人, N. Engl. J. Med. , 354(23) :2514-2515(2006))、血管炎、干癣、肌炎、硬皮病、再生障碍性贫血、及结肠炎) 的方法, 其包括对病人施用有效量的本发明的人源化免疫球蛋白。

[0094] 在另一方面, 有效量的本发明的人源化免疫球蛋白可与一种或多种免疫抑制剂一起施用以使需要此种治疗的病人准备进行实体器官移植 (Agarwal 等人, Transplant Immunol. , 20 :6-11(2008)) 或 CD34+ 干细胞移植 (Burt 等人, The Lancet, published online January 30, 2009)。

[0095] 本发明还涉及一种治疗需要治疗的病人中的癌症的方法, 其包括对病人施用有效量的本发明的人源化免疫球蛋白。

[0096] 本发明还涉及一种治疗需要治疗的病人中的多发性硬化症的方法, 其包括对病人施用有效量的本发明的人源化免疫球蛋白。

[0097] 本发明还涉及一种治疗需要治疗的病人中的慢性淋巴细胞白血病的方法, 其包括对病人施用有效量的本发明的人源化免疫球蛋白。

[0098] 本发明的人源化免疫球蛋白的给药可包括人源化免疫球蛋白本身的给药 (例如, 以药物组合物形式), 编码人源化免疫球蛋白的一个或多个重组载体的给药, 或是包含编码人源化免疫球蛋白的一个或多个核酸 (例如, 一个或多个重组载体) 和表达人源化免疫球蛋白的宿主细胞的给药。

[0099] 本发明还涉及一种诊断选自自体免疫疾病 (例如, 多发性硬化症、狼疮、血管炎)、癌症 (例如白血病 (例如慢性淋巴细胞白血病), 和淋巴瘤 (例如, 非何杰金氏淋巴瘤))、移植 (例如实体器官移植 (例如肾脏移植) 和干细胞移植) 的疾病的方法, 其包括使用本发明的人源化免疫球蛋白在体外检定病人样品。

[0100] 本发明还涉及一种本发明的人源化免疫球蛋白 (例如, 包含本发明的人源化轻链和 / 或本发明的人源化重链)、本发明的重组载体、或是本发明的宿主细胞, 用于药物, 例如用于疾病治疗和 / 或诊断, 例如用于治疗本文所叙述的疾病或病症比如自体免疫疾病 (例如, 多发性硬化症、类风湿性关节炎、和狼疮)、癌症、淋巴细胞过度增殖症状 (例如 T 或 B 细胞恶性肿瘤, 包括例如 B 细胞慢性淋巴细胞白血病的白血病和例如非何杰金氏淋巴瘤的淋巴瘤)。参见, 例如, Lundin, J., 等人, Blood, 101 :4267-4272(2003) ;Rodig, S.J., 等人, Clinical Cancer Research, 12(23) :7174-7179(2006)。本发明还涉及本发明的人源化免疫球蛋白、人源化轻链或人源化重链、本发明的重组载体、或本发明的宿主细胞用于制造用来治疗本文所述的疾病或病症 (例如, 自体免疫疾病 (例如, 多发性硬化症、狼疮、血管炎)、癌症 (例如白血病 (例如慢性淋巴细胞白血病), 和淋巴瘤 (例如, 非何杰金氏淋巴瘤))、和移植 (例如实体器官移植 (例如肾脏移植) 和干细胞移植)) 的药物中的用途。

[0101] 本发明还提供一种人源化抗人 CD52 抗体, 包括人轻链骨架区, 其利用残基 36(Y) 和 46(L) (Kabat 编号) 已被替代的人 Vk2-A18b 基因。在一些实施方式中, 残基 36 为 V 或 L 且残基 46 为 R。本发明还提供人源化抗人 CD52 抗体, 包括人重链骨架区, 其利用残基 47(W) (Kabat 编号) 已被替代的人 VH 3-23 基因。在一些实施方式中, 残基 47(W) 和 49(S) (Kabat

编号) 均被替代。在一些实施方式中, 残基 47 为 L 且残基 49 为 S。在其它实施方式中, 残基 47 为 L 且残基 49 为 A。

[0102] 在一些实施方式中, 本发明的人源化抗人 CD52 抗体的 EC_{50} 值, 如在细胞结合检定 (例如在实施例 29 中描述的检定) 中所确定, 两倍低于 Campath-1H® 抗体的 EC_{50} 值。在多个实施方式中, 人源化抗人 CD52 抗体的 EC_{50} 值为 11nM 或更低。

[0103] 在一些实施方式中, 在来源于经 Campath-1H® 治疗的病人的血清的抗 Campath-1H® 抗体的存在下, 本发明的人源化抗人 CD52 抗体结合至细胞上的 CD52。也就是说, 在这样的抗 Campath-1H® 抗体的存在下, 本发明的人源化抗人 CD52 抗体在细胞上与 CD52 的结合相比于 Campath-1H® 与 CD52 的结合并未降低, 或者其在这样的抗 Campath-1H® 抗体的存在下相比于 Campath-1H® 与 CD52 的结合更少降低。

[0104] 本发明还提供一种人源化抗人 CD52 抗体以及本文提供的人源化抗人 CD52 抗体的血液和 / 或脾脏中淋巴细胞消减概况。

[0105] 在一些实施方式中, 本发明的人源化抗人 CD52 抗体使受试者的血清中 TNF α 、IL-6 和 MCP-1 中的一个或多个的循环水平增加。

[0106] 在一些实施方式中, 本发明的人源化抗人 CD52 抗体降低受试者中的淋巴细胞水平至少 30 天、至少 50 天、至少 60 天、至少 70 天、至少 80 天、或 80 天以上。

[0107] 在一些实施方式中, 本发明的人源化抗人 CD52 抗体延迟疾病发病和 / 或降低疾病的严重度, 如在小鼠 EAE 模型中通过临床评分所测定。

[0108] 在一些实施方式中, 在免疫原性检定例如在实施例 69 或 70 中所描述的检定中, 本发明的人源化抗人 CD52 抗体的免疫原性比 Campath-1H® 低。

[0109] 小鼠单克隆免疫球蛋白

[0110] 本发明还涉及对人 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆抗体 (小鼠单克隆免疫球蛋白)。在一个实施方式中, 本发明涉及对人 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆抗体, 其包含含有 SEQ ID NO :3 的轻链和含有 SEQ ID NO :16 的重链; 含有 SEQ ID NO :4 的轻链和含有 SEQ ID NO :17 的重链; 含有 SEQ ID NO :5 的轻链和含有 SEQ ID NO :18 的重链; 含有 SEQ ID NO :6 的轻链和含有 SEQ ID NO :19 的重链; 含有 SEQ ID NO :7 的轻链和含有 SEQ ID NO :20 的重链; 含有 SEQ ID NO :8 的轻链和含有 SEQ ID NO :21 的重链; 含有 SEQ ID NO :9 的轻链和含有 SEQ ID NO :22 的重链; 含有 SEQ ID NO :10 的轻链和含有 SEQ ID NO :23 的重链; 含有 SEQ ID NO :11 的轻链和含有 SEQ ID NO :24 的重链; 含有 SEQ ID NO :12 的轻链和含有 SEQ ID NO :25 的重链; 或含有 SEQ ID NO :13 的轻链和含有 SEQ ID NO :26 的重链。

[0111] 在一个实施方式中, 对人 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆抗体包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的轻链可变区, 或选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的重链可变区, 或者此种轻链可变区和此种重链可变区二者。

[0112] 本发明还涉及一种小鼠免疫球蛋白轻链, 其包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、或 SEQ ID NO :13 的可变区。

[0113] 本发明还涉及一种小鼠免疫球蛋白重链,其包含 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、或 SEQ ID NO:26 的可变区。

[0114] 优选地,本发明的小鼠单克隆抗体包含本发明的鼠抗体轻链和本发明的鼠抗体重链。在一些实施方式中,本发明提供一种小鼠单克隆免疫球蛋白,其结合至与一种小鼠单克隆抗体所结合的人 CD52 上的表位相同的表位,该小鼠单克隆抗体包含 SEQ ID NO:3 的轻链可变区和 SEQ ID NO:16 的重链可变区;SEQ ID NO:4 的轻链可变区和 SEQ ID NO:17 的重链可变区;SEQ ID NO:5 的轻链可变区和 SEQ ID NO:18 的重链可变区;SEQ ID NO:6 的轻链可变区和 SEQ ID NO:19 的重链可变区;SEQ ID NO:7 的轻链可变区和 SEQ ID NO:20 的重链可变区;SEQ ID NO:8 的轻链可变区和 SEQ ID NO:21 的重链可变区;SEQ ID NO:9 的轻链可变区和 SEQ ID NO:22 的重链可变区;SEQ ID NO:10 的轻链可变区和 SEQ ID NO:23 的重链可变区;SEQ ID NO:11 的轻链可变区和 SEQ ID NO:24 的重链可变区;SEQ ID NO:12 的轻链可变区和 SEQ ID NO:25 的重链可变区;或 SEQ ID NO:13 的轻链可变区和 SEQ ID NO:26 的重链可变区。在其它实施方式中,本发明提供一种小鼠单克隆免疫球蛋白,其结合至人 CD52 上的表位,该表位与这样的小鼠单克隆抗体所结合的表位重叠。

[0115] 在其它实施方式中,本发明提供一种小鼠单克隆免疫球蛋白,其结合至人 CD52 上的包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1 的表位。该小鼠单克隆免疫球蛋白可结合至包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、3、4 和 5 的表位,可结合至包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、2、3、4 和 5 的表位,或者可结合至包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 7、8 和 9 的表位。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 7、8 和 11。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 4 和 11。

[0116] 本发明还涉及分离的核酸分子,其编码本发明的小鼠单克隆免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白轻链或小鼠免疫球蛋白重链。在一些实施方式中,本发明为一种分离的核酸分子,其编码小鼠免疫球蛋白重链和小鼠免疫球蛋白轻链,它们结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆免疫球蛋白,其中该小鼠免疫球蛋白轻链包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、和 SEQ ID NO:13 的可变区,或者该小鼠免疫球蛋白重链包含选自 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、和 SEQ ID NO:26 的可变区,或者此种轻链和此种重链二者。

[0117] 在一些实施方式中,该分离的核酸编码小鼠免疫球蛋白轻链,其包含选自 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、和 SEQ ID NO:13 的可变区。

[0118] 在其它实施方式中,该分离的核酸编码小鼠免疫球蛋白重链,其包含选自 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、和 SEQ ID NO:26 的可变区。

[0119] 本发明还涉及一种重组载体(例如,表达载体,包括哺乳动物细胞表达载体),其包含编码本发明的小鼠单克隆免疫球蛋白(例如,小鼠免疫球蛋白轻链和小鼠免疫球蛋白重链)、小鼠免疫球蛋白轻链、或小鼠免疫球蛋白重链的核酸。在一些实施方式中,本发明为

包含一个编码小鼠单克隆免疫球蛋白的核酸的一个重组载体,或包含多个编码小鼠单克隆免疫球蛋白的核酸的一对重组载体,该小鼠单克隆免疫球蛋白包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的轻链可变区,或选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的重链可变区,或者此种轻链可变区和此种重链可变区二者。

[0120] 在其它实施方式中,该重组载体包含编码小鼠免疫球蛋白轻链的核酸,其中该小鼠免疫球蛋白轻链包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、或 SEQ ID NO :13。

[0121] 在其它实施方式中,该重组载体包含编码小鼠免疫球蛋白重链的核酸,其中该小鼠免疫球蛋白重链包含 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、或 SEQ ID NO :26。

[0122] 在其它实施方式中,该重组载体包含编码小鼠免疫球蛋白轻链和小鼠免疫球蛋白重链的核酸,其中该小鼠免疫球蛋白轻链和小鼠免疫球蛋白重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆免疫球蛋白。在一个实施方式中,该小鼠免疫球蛋白轻链包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的可变区,且该小鼠免疫球蛋白重链包含选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的可变区。

[0123] 在特定的实施方式中,本发明的重组载体为一种表达载体,例如哺乳动物细胞表达载体。在某些实施方式中,载体为一种质粒或是病毒载体(例如,腺病毒或 AAV 载体)。

[0124] 本发明还涉及一种宿主细胞,其包含一个或多个编码本发明的小鼠单克隆免疫球蛋白(小鼠免疫球蛋白轻链和小鼠免疫球蛋白重链)、小鼠免疫球蛋白轻链或小鼠免疫球蛋白重链的核酸。例如,在一些实施方式中,该宿主细胞包含一种本发明的重组载体(例如,表达载体,哺乳动物细胞表达载体)。

[0125] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含一种编码小鼠免疫球蛋白轻链和小鼠免疫球蛋白重链的核酸,其中该小鼠免疫球蛋白轻链和该小鼠免疫球蛋白重链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆免疫球蛋白,并且其中该小鼠免疫球蛋白轻链包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的可变区,且 / 或该小鼠免疫球蛋白重链包含选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的可变区,或二者皆具。

[0126] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含一种编码小鼠免疫球蛋白轻链的核酸,其中该小鼠免疫球蛋白轻链包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、

SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的轻链可变区。

[0127] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含一种编码小鼠免疫球蛋白重链的核酸,其中该小鼠免疫球蛋白重链包含选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的重链可变区。

[0128] 本发明还涉及一种小鼠单克隆免疫球蛋白的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(例如,包含编码本发明的小鼠单克隆免疫球蛋白(例如,小鼠免疫球蛋白轻链和小鼠免疫球蛋白重链)的一个或多个重组核酸(例如,重组载体)的宿主细胞)维持在适合小鼠单克隆免疫球蛋白表达的条件下,借以表达小鼠单克隆免疫球蛋白链并制备小鼠单克隆免疫球蛋白。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离小鼠单克隆免疫球蛋白。

[0129] 本发明还涉及一种小鼠单克隆免疫球蛋白轻链的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(包含编码本发明的小鼠免疫球蛋白轻链的核酸)维持在适合该小鼠免疫球蛋白轻链表达的条件下,借以表达轻链。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离该轻链。

[0130] 本发明还涉及一种小鼠单克隆免疫球蛋白重链的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(包含编码本发明的小鼠免疫球蛋白重链的核酸)维持在适合该小鼠免疫球蛋白重链表达的条件下,借以表达小鼠免疫球蛋白重链。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离该小鼠免疫球蛋白重链。

[0131] 本发明还涉及一种疾病(例如,自体免疫疾病(例如,多发性硬化症、狼疮、血管炎),癌症(例如白血病(例如慢性淋巴细胞白血病),和淋巴瘤(例如,非何杰金氏淋巴瘤)),移植(例如实体器官移植(例如肾脏移植)和干细胞移植))的诊断方法,其包括使用本发明的小鼠单克隆免疫球蛋白在体外分析病人样品(例如, Lundin, J. 等人, Blood, 101 :4267-4272 (2003) ;Rodig, SJ 等人, Clin. Cancer res., 12 (23) ;7174-717179 (2006))。

[0132] 嵌合免疫球蛋白

[0133] 本发明还涉及一种对人 CD52 具有结合特异性的嵌合免疫球蛋白。此种嵌合免疫球蛋白可包含本发明的任何小鼠单克隆免疫球蛋白的可变区。在一个实施方式中,本发明的嵌合免疫球蛋白包含 SEQ ID NO :3 的轻链可变区和 SEQ ID NO :16 的重链可变区 ;SEQ ID NO :4 的轻链可变区和 SEQ ID NO :17 的重链可变区 ;SEQ ID NO :5 的轻链可变区和 SEQ ID NO :18 的重链可变区 ;SEQ ID NO :6 的轻链可变区和 SEQ ID NO :19 的重链可变区 ;SEQ ID NO :7 的轻链可变区和 SEQ ID NO :20 的重链可变区 ;SEQ ID NO :8 的轻链可变区和 SEQ ID NO :21 的重链可变区 ;SEQ ID NO :9 的轻链可变区和 SEQ ID NO :22 的重链可变区 ;SEQ ID NO :10 的轻链可变区和 SEQ ID NO :23 的重链可变区 ;SEQ ID NO :11 的轻链可变区和 SEQ ID NO :24 的重链可变区 ;SEQ ID NO :12 的轻链可变区和 SEQ ID NO :25 的重链可变区 ;或 SEQ ID NO :13 的轻链可变区和 SEQ ID NO :26 的重链可变区。

[0134] 本发明还涉及一种对人 CD52 具有结合特异性的嵌合抗体,其包含选自 :SEQ ID NO :3 的轻链可变区、SEQ ID NO :4 的轻链可变区、SEQ ID NO :5 的轻链可变区、SEQ ID NO :6 的轻链可变区、SEQ ID NO :7 的轻链可变区、SEQ ID NO :8 的轻链可变区、SEQ ID NO :9 的轻链可变区、SEQ ID NO :10 的轻链可变区、SEQ ID NO :11 的轻链可变区、SEQ ID NO :12 的

轻链可变区和 SEQ ID NO :13 的轻链可变区的轻链可变区序列,和 / 或选自 :SEQ ID NO :16 的重链可变区、SEQ ID NO :17 的重链可变区、SEQ ID NO :18 的重链可变区、SEQ ID NO :19 的重链可变区、SEQ ID NO :20 的重链可变区、SEQ ID NO :21 的重链可变区、SEQ ID NO :22 的重链可变区、SEQ ID NO :23 的重链可变区、SEQ ID NO :24 的重链可变区、SEQ ID NO :25 的重链可变区和 SEQ ID NO :26 的重链可变区的重链可变区序列。

[0135] 本发明还涉及一种嵌合轻链,其包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的可变区。

[0136] 本发明还涉及一种嵌合重链,其包含选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的可变区。

[0137] 优选地,本发明的嵌合免疫球蛋白包含本发明的嵌合轻链和本发明的嵌合重链二者。

[0138] 在一些实施方式中,本发明提供一种结合至与小鼠单克隆抗体所结合的人 CD52 上的表位相同的表位的嵌合免疫球蛋白,该小鼠单克隆抗体包含 SEQ ID NO :3 的轻链可变区和 SEQ ID NO :16 的重链可变区 ;SEQ ID NO :4 的轻链可变区和 SEQ ID NO :17 的重链可变区 ;SEQ ID NO :5 的轻链可变区和 SEQ ID NO :18 的重链可变区 ;SEQ ID NO :6 的轻链可变区和 SEQ ID NO :19 的重链可变区 ;SEQ ID NO :7 的轻链可变区和 SEQ ID NO :20 的重链可变区 ;SEQ ID NO :8 的轻链可变区和 SEQ ID NO :21 的重链可变区 ;SEQ ID NO :9 的轻链可变区和 SEQ ID NO :22 的重链可变区 ;SEQ ID NO :10 的轻链可变区和 SEQ ID NO :23 的重链可变区 ;SEQ ID NO :11 的轻链可变区和 SEQ ID NO :24 的重链可变区 ;SEQ ID NO :12 的轻链可变区和 SEQ ID NO :25 的重链可变区 ;或 SEQ ID NO :13 的轻链可变区和 SEQ ID NO :26 的重链可变区。在其它实施方式中,该嵌合免疫球蛋白结合至人 CD52 上的表位,此表位与这样的小鼠单克隆抗体所结合的表位重叠。

[0139] 在其它实施方式中,本发明提供一种嵌合免疫球蛋白,其结合至人 CD52 上的表位,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1。该嵌合免疫球蛋白可结合至包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、3、4 和 5 的表位,可结合至包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 1、2、3、4 和 5 的表位,或者可结合至人 CD52 上的包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 7、8 和 9 的表位。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 7、8 和 11。在一些实施方式中,该表位包含至少成熟人类 CD52 序列的残基 4 和 11。

[0140] 本发明还涉及一种分离的核酸分子,其编码本发明的嵌合免疫球蛋白、嵌合轻链或嵌合重链。在一些实施方式中,本发明为一种编码嵌合重链和嵌合轻链的分离的核酸分子(一个或多个核酸分子),嵌合重链和嵌合轻链结合在一起而形成对人 CD52 具有结合特异性的嵌合免疫球蛋白,其中该嵌合轻链包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的可变区 ;且 / 或该嵌合重链包含选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的可变区。

[0141] 在一些实施方式中,本发明为一种编码嵌合轻链的分离的核酸分子,该嵌合轻链

包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、或 SEQ ID NO :13 的可变区。

[0142] 在一些实施方式中,本发明为一种编码嵌合重链的分离的核酸分子,该嵌合重链包含 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、或 SEQ ID NO :26 的可变区。

[0143] 本发明还涉及一种重组载体(例如,表达载体,哺乳动物细胞表达载体),其包含编码本发明的嵌合免疫球蛋白(嵌合轻链和嵌合重链)、嵌合轻链、或嵌合重链的核酸。在一些实施方式中,本发明为一种包含编码嵌合免疫球蛋白的核酸的重组载体(或包含多个核酸的一对重组载体),该嵌合免疫球蛋白包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 和 SEQ ID NO :13 的轻链可变区;或选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的重链可变区;或此种轻链和重链二者。

[0144] 在其它实施方式中,该重组载体包含编码嵌合轻链的核酸,其中该嵌合轻链包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、或 SEQ ID NO :13 的可变区。

[0145] 在其它实施方式中,该重组载体包含编码嵌合重链的核酸,其中该嵌合重链包含 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、或 SEQ ID NO :26 的可变区。

[0146] 在特定的实施方式中,本发明的重组载体为一种表达载体,例如哺乳动物细胞表达载体。在某些实施方式中,载体为一种质粒或病毒载体(例如,腺病毒或 AAV 载体)。

[0147] 本发明还涉及一种包含编码本发明的嵌合免疫球蛋白(嵌合轻链和嵌合重链)、嵌合轻链或嵌合重链的一个或多个核酸(例如,一个或多个重组载体)的宿主细胞。例如,在一些实施方式中,宿主细胞包含一种本发明的重组载体(例如,表达载体,哺乳动物细胞表达载体)。

[0148] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码嵌合轻链和嵌合重链的一个重组核酸(或一对重组核酸),其中该嵌合轻链和该嵌合重链结合在一起而形成对人类 CD52 具有结合特异性的嵌合免疫球蛋白,并且其中该嵌合轻链包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的可变区;且/或该嵌合重链包含选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25 和 SEQ ID NO :26 的可变区。

[0149] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码嵌合轻链的重组核酸,其中该嵌合轻链包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的轻

链可变区。

[0150] 在一些实施方式中,该宿主细胞包含编码嵌合重链的重组核酸,其中该嵌合重链包含选自 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、和 SEQ ID NO:26 的重链可变区。

[0151] 本发明还涉及一种嵌合免疫球蛋白的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(例如,包含一个或多个编码本发明的嵌合免疫球蛋白(例如,嵌合轻链和嵌合重链)的分离的核酸的宿主细胞)维持在适合嵌合免疫球蛋白表达的条件下,借以表达嵌合免疫球蛋白链并制备嵌合免疫球蛋白。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离嵌合免疫球蛋白。

[0152] 本发明还涉及一种嵌合轻链的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(例如,包含编码本发明的嵌合轻链的核酸的宿主细胞)维持在适合该嵌合轻链表达的条件下,借以表达嵌合轻链并制备嵌合轻链。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离该嵌合轻链。

[0153] 本发明还涉及一种嵌合重链的制备方法,其包括将本发明的宿主细胞(例如,包含编码本发明的嵌合重链的核酸的宿主细胞)维持在适合该嵌合重链表达的条件下,借以表达嵌合重链并制备嵌合重链。在一些实施方式中,该方法进一步包括纯化或分离该嵌合重链。

[0154] 本发明还涉及一种选自自体免疫疾病(例如,多发性硬化症、狼疮、血管炎)、癌症(例如白血病(例如慢性淋巴细胞白血病),和淋巴瘤(例如,非何杰金氏淋巴瘤))、和移植(例如实体器官移植(例如肾脏移植)和干细胞移植)的疾病的诊断方法,其包括使用本发明的嵌合免疫球蛋白在体外分析病人样品。

[0155] 本发明的进一步实施方式在以下描述。一方面,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的轻链和重链分别包含:在 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:16 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:17 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:18 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:19 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:20 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:21 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:22 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:23 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:24 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:25 中找到的三个互补决定区(CDRs);在 SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:137 中找到的三个互补决定区(CDRs);或在 SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:26 中找到的三个互补决定区(CDRs)。在一些实施方式中,本发明涉及一种结合至与上述单克隆抗体或抗原结合部分所结合的人 CD52 上的表位相同的表位的抗体。在一些实施方式中,本发明涉及一种与上述的单克隆抗体或抗原结合部分竞争的抗体。在一些实施方式中,本发明涉及一种与上述的单克隆抗体或抗原结合部分交叉竞争的抗体。

[0156] 在一些实施方式中,任何上述抗体或抗原结合部分结合至包含 SEQ ID NO:104 的氨基酸序列。在一些相关的实施方式中,该抗体或部分至 SEQ ID NO:104 的结合可通过在

SEQ ID NO:104 的残基 4、7、8、或 11 中的一个或多个处的丙氨酸取代而减少。

[0157] 在一些实施方式中,抗体为一种人源化抗体、小鼠抗体、或嵌合抗体。在某些实施方式中,该抗体重链的骨架区利用 VH3-72 或 VH3-23 人类生殖系序列,且该抗体轻链的骨架区利用 VK2A18b 人类生殖系序列。

[0158] 在一些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体包含重链(H)-CDR1、H-CDR2、H-CDR3,以及轻链(L)-CDR1、L-CDR2、和 L-CDR3,其氨基酸序列分别为 SEQ ID NOs:51、59、69、29、36、和 43;分别为 SEQ ID NOs:50、60、69、29、37、和 43;分别为 SEQ ID NOs:50、61、68、29、38、和 43;分别为 SEQ ID NOs:50、61、69、29、36、和 43;分别为 SEQ ID NOs:50、62、69、29、39、和 43;分别为 SEQ ID NOs:52、61、70、30、40、和 43;分别为 SEQ ID NOs:53、63、71、31、36、和 44;分别为 SEQ ID NOs:54、64、71、31、36、和 45;分别为 SEQ ID NOs:55、63、72、31、36、和 46;分别为 SEQ ID NOs:56、65、73、32、41、和 47;分别为 SEQ ID NOs:56、65、294、32、41、和 47;或分别为 SEQ ID NOs:56、66、74、33、41、和 48。

[0159] 在一些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的轻链和重链分别包含 SEQ ID NOs:3 和 16 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:4 和 17 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:5 和 18 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:6 和 19 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:7 和 20 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:8 和 21 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:9 和 22 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:10 和 23 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:11 和 24 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:12 和 25 的氨基酸序列;或者分别包含 SEQ ID NOs:13 和 26 的氨基酸序列。

[0160] 在一些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链和轻链分别包含 SEQ ID NOs:103 和 102 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:136 和 138 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:137 和 138 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:139 和 147 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:149 和 155 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:149 和 156 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:158 和 165 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:158 和 166 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:159 和 165 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:159 和 166 的氨基酸序列;分别包含 SEQ ID NOs:161 和 166 的氨基酸序列;或分别包含 SEQ ID NOs:163 和 166 的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明涉及一种结合至与上述单克隆抗体或其抗原结合部分所结合的人 CD52 上的表位相同的表位的抗体。在一些实施方式中,本发明涉及一种与上述单克隆抗体或抗原结合部分竞争的抗体。在一些实施方式中,本发明涉及一种与上述单克隆抗体或抗原结合部分交叉竞争的抗体。

[0161] 在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆人源化抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链和轻链分别包含 SEQ ID NOs:272 和 273 的氨基酸序列,且无信号序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链和轻链分别包含 SEQ ID NOs:274 和 275 的氨基酸序列,且无信号序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链和轻链分别包含 SEQ ID NOs:276 和 278 的氨基酸序列,且无信号序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链和轻链分

别包含 SEQ ID NOs :277 和 278 的氨基酸序列,且无信号序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链和轻链分别包含 SEQ ID NOs :279 和 280 的氨基酸序列,且无信号序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链和轻链分别包含 SEQ ID NOs :281 和 282 的氨基酸序列,且无信号序列。本发明还提供结合至与这些人源化抗体的其中之一所结合的 CD52 上的表位相同的表位的抗体,和与这些人源化抗体的其中之一竞争或交叉竞争的抗体。在相关的实施方式中,本发明提供包含一种这些人源化抗体的组合物和药学上可接受的载体。

[0162] 在一些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的轻链包含选自 SEQ ID NOs :102、138、145-148、153-157、和 164-168 的氨基酸序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的轻链包含选自 SEQ ID NOs :273、275、278、280、和 282 的氨基酸序列,且无信号序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种抗体轻链或其部分,其包含选自 SEQ ID NOs :102、138、145-148、153-157、164-168、273、275、278、280、和 282 的氨基酸序列,且无信号序列若其存在。

[0163] 在一些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链包含选自 SEQ ID NOs :103、136、137、139-144、149-152、和 158-163 的氨基酸序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种单克隆抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分,其中该抗体的重链包含选自 SEQ ID NOs :272、274、276、277、279、和 281 的氨基酸序列,且无信号序列。在某些实施方式中,本发明涉及一种抗体重链或其部分,其包含选自 SEQ ID NOs :103、136、137、139-144、149-152、158-163、272、274、276、277、279、和 281 的氨基酸序列,且无信号序列若其存在。

[0164] 在一些实施方式中,任何上述抗体可以为 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE 分子。在某些实施方式中,该 IgG 为 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4。

[0165] 在一些实施方式中,任何上述抗原结合部分可为单链抗体、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链 Fv 分子 (scFv)、双特异性单链 Fv 二聚体、双抗体 (diabody)、区域缺失抗体或单域抗体 (dAb)。

[0166] 本发明还涉及任何上述抗体或抗原结合部分,其中该抗体或抗原结合部分消减 T 或 B 淋巴细胞,或其二者;与 B 淋巴细胞相较,优先消减 T 淋巴细胞;增加 TNF- α 、IL-6、或 MCP-1 的循环血清水平(例如,以至少 5%、至少 10%、至少 50%、至少 100%、或至少 200% 的水平);介导 CD52 表达细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC);介导 CD52 表达细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC);尽管在阿仑单抗的中和抗体存在于病人中的情况下,结合至人 CD52;并且/或促进人类 T 和/或 B 细胞的细胞内信号传导(参见例如,Hederer 等人,International Immunology 12 :505-616 (2000);Watanabe 等人,Clinical Immunology 120 :247-259 (2006))。

[0167] 本发明还涉及一种编码任何上述抗体的重链或其抗原结合部分或任何上述抗体的轻链或其抗原结合部分的分离的核酸。在一些实施方式中,该分离的核酸包含选自 SEQ ID NOs :283、285、287、288、290、和 292 的重链核苷酸序列,或不具有编码信号肽的序列的该核苷酸序列;选自 SEQ ID NOs :284、286、289、291、和 293 的轻链核苷酸序列,或是不具

有编码信号肽的序列的该核苷酸序列；或该重链核苷酸序列和该轻链核苷酸序列皆包含。在某些实施方式中，该分离的核酸包含重链核苷酸序列与轻链核苷酸序列，其分别选自 SEQ ID NO:283 和 SEQ ID NO:284，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:285 和 SEQ ID NO:286，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:287 和 SEQ ID NO:289，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:288 和 SEQ ID NO:289，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:290 和 SEQ ID NO:291，二者皆不具有编码信号肽的序列；以及分别选自 SEQ ID NO:292 和 SEQ ID NO:293，二者皆不具有编码信号肽的序列。

[0168] 本发明还涉及包含重链核苷酸序列的分离核酸以及包含轻链核苷酸序列的分离核酸用于制造治疗需要此种治疗的病人的药物中的用途，其中该重链核苷酸序列和该轻链核苷酸序列分别选自 SEQ ID NO:283 和 SEQ ID NO:284，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:285 和 SEQ ID NO:286，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:287 和 SEQ ID NO:289，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:288 和 SEQ ID NO:289，二者皆不具有编码信号肽的序列；分别选自 SEQ ID NO:290 和 SEQ ID NO:291，二者皆不具有编码信号肽的序列；以及分别选自 SEQ ID NO:292 和 SEQ ID NO:293，二者皆不具有编码信号肽的序列。

[0169] 本发明还涉及一种重组载体，其包含 (1) 编码任何上述抗体的重链或其抗原结合部分的核酸序列，(2) 编码任何上述抗体的轻链或其抗原结合部分的核酸序列，或 (3) 二者。本发明还涉及一种宿主细胞，其包含编码任何上述抗体的重链或其抗原结合部分的第一核酸序列，该第一核酸序列可操作地连接至表达控制元件，和编码该抗体的轻链或其抗原结合部分的第二核酸序列，该第二核酸序列可操作地连接至表达控制元件。本发明涉及一种抗人 CD52 抗体或其抗原结合部分的制造方法，其包括将该宿主细胞维持在适合该抗体或部分表达的条件下，并且还涉及进一步包括分离该抗体或部分的步骤的该方法。

[0170] 本发明涉及一种组合物，其包含根据权利要求第 1-24 项中任一项的单克隆抗体或抗原结合部分以及药学上可接受的媒介物或载体。

[0171] 在一些实施方式中，本发明涉及一种对需要的病人进行治疗的方法，其包括对病人施用有效量的任何上述的抗体或抗原结合部分，或上述组合物。在某些实施方式中，该病人正接受移植。

[0172] 在一些实施方式中，本发明涉及一种对需要自体免疫疾病治疗的病人进行治疗的方法，其包括对病人施用有效量的任何上述的抗体或抗原结合部分，或上述组合物。在某些实施方式中，该自体免疫疾病为，例如，多发性硬化症、类风湿性关节炎、或系统性红斑狼疮。

[0173] 在一些实施方式中，本发明涉及一种对需要癌症治疗的病人进行治疗的方法，其包括对病人施用有效量的任何上述抗体或抗原结合部分，或上述组合物。在某些实施方式中，该癌症为，例如，淋巴瘤比如非何杰金氏淋巴瘤；白血病比如 B 细胞慢性淋巴细胞白血病；T 细胞恶性肿瘤，其中与 B 细胞相较，该抗体或部分优先地消减 T 细胞；或实体肿瘤。

[0174] 在一些实施方式中，任一种上述治疗方法进一步包括对病人施用嗜中性粒细胞刺激剂或 NK 细胞刺激剂。在某些实施方式中，该刺激剂为 G-CSF 或 GM-CSF。在一些实施方式中，任一种上述治疗方法进一步包括对病人施用 T 调节细胞刺激剂。在某些实施方式中，该

刺激剂为雷帕霉素 (rapamycin)。

[0175] 在一些实施方式中,本发明涉及一种对需要的病人抑制血管生成的方法,其包括对病人施用有效量的任何上述抗体或抗原结合部分。在某些实施方式中,该病人有实体肿瘤。在某些实施方式中,该病人有新血管形成。在某些实施方式中,该新血管形成在眼睛中。

[0176] 本发明还涉及任何上述抗体或抗原结合部分用于制造用来治疗有需要病人中的自体免疫疾病的药物中的用途。而且,本发明涉及任何上述抗体或抗原结合部分用于制造用来治疗有需要病人中的癌症的药物中的用途。本发明涉及任何上述抗体或抗原结合部分用于制造用来治疗需要移植的病入的药物中的用途。本发明涉及任何上述抗体或抗原结合部分用于制造在需要的病人中治疗新血管形成的药物中的用途。

[0177] 本发明还涉及任何上述抗体或抗原结合部分作为药物的用途。

附图说明

[0178] 图 1A-1B 是一种新的抗 CD52 单克隆抗体的发展的示意表示。一般方案描述于图 1A 中,且鼠抗人 CD52 抗体克隆及其同种型 (isotype) 的名称显示于图 1B 中。

[0179] 图 2 是多个鼠抗人 CD52 κ 轻链序列 (SEQ ID NOS :1-13) 的氨基酸序列的排列。Campath-1G 是一种大鼠单克隆抗体,由此得到人源化 Campath-1H 抗体。

[0180] 图 3 是多个鼠抗人 CD52 重链序列 (SEQ ID NOS :14-26) 的氨基酸序列的排列。

[0181] 图 4 是野生型 CD52 和 10 种突变的 CD52 蛋白 (SEQ ID NOS :104-114, 自上到下) 的排列。

[0182] 图 5A 说明抗体 4B10 和 7F11 在表达 CD52 丙氨酸扫描突变体的细胞上的基于 FACS 的 N 端结合概况。

[0183] 图 5B 说明抗体 CF1D12、3G7、9D9、5F7、4G7、和 11C11 在表达 CD52 丙氨酸扫描突变体的细胞上的基于 FACS 的中间区域结合概况。

[0184] 图 5C 说明抗体 Campath-1H[®] (“Campath 1H”)、2C3、12G6、和 23E6 在表达 CD52 丙氨酸扫描突变体的细胞上的基于 FACS 的结合概况。

[0185] 图 5D 描述使用嵌合单克隆抗体组探查的 CD52+/-N- 连接糖基化的免疫印迹。“C1H”表示 Campath-1H[®]。

[0186] 图 6 是显示对于在 CHO-K1CD52#67 细胞上筛选的各种嵌合抗 CD52 抗体的 1.5 小时 CDC 检定结果的图。结果显示嵌合抗体 4B10 和 7F11 与 Campath-1H[®]可比较或者优于 Campath-1H[®] (“Campath 1H”)。

[0187] 图 7 是显示对于在 CHO-K1CD52#67 细胞上筛选的针对 CD52 的各种嵌合 IgG1 抗体的 14 小时 ADCC 检定结果的图。结果显示嵌合抗体 2C3 和 12G6 与 Campath-1H[®]可比较或者优于 Campath-1H[®] (“Campath 1H”)。

[0188] 图 8A-8C 说明各种抗 CD52 抗体与 Campath-1H[®] (“C-1H”) 抗体至规定的人类淋巴细胞群的比较结合。这些图显示通过 FACS 检定所筛选的嵌合抗体的结合能力的级别。向最右端的曲线显示最高结合能力,而向最左端的曲线则具有较低亲和性。

[0189] 图 9A-9C 是说明在用嵌合抗体 7F11、8G3、23E6、12G6、4B10、或 5F7、或 Campath-1H[®] (“Cam”) 给药之后 72 小时在血液中的 CD4T 细胞 (图 9A)、CD8T 细胞 (图 9B) 和 CD19B 细胞 (图 9C) 的水平图。

[0190] 图 10A-10C 是说明在用嵌合抗体 7F11、8G3、23E6、12G6、4B10、或 5F7、或 Campath-1H® (“Cam”) 给药之后 72 小时在脾脏中的 CD4T 细胞 (图 10A)、CD8T 细胞 (图 10B) 和 CD19B 细胞 (图 10C) 的水平图。

[0191] 图 11A-11C 是显示在用嵌合抗体 2C3、9D9、4B10、3G7、或 11C11、或 Campath-1H® (“Cam”) 给药之后 72 小时在血液中的 CD4T 细胞 (图 11A)、CD8T 细胞 (图 11B) 和 CD19B 细胞 (图 11C) 的水平图。

[0192] 图 12 是说明在使用 7F11、4B10、或 12G6 嵌合单克隆抗体、或 Campath-1H® (“Campath”) 处理之后的存活小鼠百分比的 Kaplan Meier 存活图。

[0193] 图 13 是说明在使用 2C3、8G3、或 23E6 嵌合单克隆抗体、或 Campath-1H® (“Campath”) 处理之后的存活小鼠百分比的 Kaplan Meier 存活图。

[0194] 图 14 是说明在使用 9D9 或 4B10 嵌合单克隆抗体、或 Campath-1H® (“Campath”) 处理之后的存活小鼠百分比的 Kaplan Meier 存活图。

[0195] 图 15 是说明在使用 2C3 或 11C11 嵌合单克隆抗体、或 Campath-1H® (“Campath”) 处理之后的存活小鼠百分比的 Kaplan Meier 存活图。

[0196] 图 16 是鼠抗人 CD52 抗体 4B10 重链可变区 (SEQ ID NO :96) 序列以及最接近匹配的人类生殖系序列 (SEQ ID NO :97) 和人源化重链可变区序列 (SEQ ID NO :98) 的排列。还示出鼠抗人 CD52 抗体 4B10 轻链可变区 (SEQ ID NO :99) 序列以及最接近匹配的人类生殖系序列 (SEQ ID NO :100) 和人源化轻链可变区序列 (SEQ ID NO :101) 的排列。

[0197] 图 17 显示人源化 4B10 重链 (SEQ ID NO :103) 和轻链 (SEQ ID NO :102) 可变区的序列。

[0198] 图 18 是显示人源化抗体 4B10-H1/K1 (“4B10-人源化”) 和嵌合抗体 4B10 同等地结合至表达 CD52 的细胞的图。

[0199] 图 19 是显示人源化抗体 4B10-H1/K1 (“4B10-人源化”) 和嵌合抗体 4B10 对表达 CD52 的细胞介导同等的 ADCC 活性的图。

[0200] 图 20 是显示人源化抗体 4B10-H1/K1 (“4B10-人源化”) 和嵌合抗体 4B10 对表达 CD52 的细胞介导同等的 CDC 活性的图。

[0201] 图 21 是说明嵌合抗 CD52 抗体 (12G6、7F11 和 4B10)、Campath-1H® (“Campath”)、和人源化抗 CD52 抗体 4B10-H1/K1 (“4B10 人源化 (H1/K1)”) 在杂合的 huCD52 转基因小鼠中的药物动力学特性的图。

[0202] 图 22A-22C 是显示在使用嵌合抗体 4B10 或人源化抗体 4B10-H1/K1 (“4B10-Hu”) 或 Campath-1H® (“Campath”) 给药之后 72 小时血液中的 CD4T 细胞 (图 22A)、CD8T 细胞 (图 22B) 及 CD19B 细胞 (图 22C) 的水平图。

[0203] 图 23 是显示抗 CD52 单克隆抗体的相对结合亲和性的概括图。

[0204] 图 24 显示人源化 7F11 重和轻 (κ) 链可变区序列。回复突变为鼠残基的氨基酸残基其下面划线, 且 CDRs 以粗体表示。

[0205] 图 25 是显示嵌合和人源化 7F11 抗体同等地结合至表达 CD52 的细胞的统计图。X 轴表示由结合的抗 CD52 抗体所放出的荧光, 其中每一个峰的面积表示总细胞群。

[0206] 图 26A 显示人源化 2C3 重链可变区序列。回复突变为鼠残基的氨基酸残基其下面划线, 且 CDRs 以粗体表示。图 26B 显示人源化 2C3 轻 (κ) 链可变区序列。回复突变为鼠

残基的氨基酸残基其下面划线,且 CDRs 以粗体表示。

[0207] 图 27A 为显示人源化和嵌合 2C3 抗体结合至表达 CD52 的细胞的统计图。X 轴表示由结合的抗 CD52 抗体所放出的荧光,其中每一个峰的面积表示总细胞群。图 27B 是显示嵌合 2C3 抗体和一部分 (subset) 人源化 2C3 抗体同等地结合至表达 CD52 的细胞的统计图。X 轴表示由结合的抗 CD52 抗体所放出的荧光,其中每一个峰的面积表示总细胞群。

[0208] 图 28A 显示人源化 12G6 重链可变区序列。回复突变为小鼠残基的氨基酸残基其下面划线,且 CDRs 以粗体表示。图 28B 显示人源化 12G6 轻 (κ) 链可变区序列。回复突变为鼠残基的氨基酸残基其下面划线,且 CDRs 以粗体表示。

[0209] 图 29 是显示嵌合 12G6 抗体和一部分人源化 12G6 抗体同等地结合至表达 CD52 的细胞的统计图。X 轴表示由结合的抗 CD52 抗体所放出的荧光,其中每一个峰的面积表示总细胞群。

[0210] 图 30A 显示人源化 9D9 重链可变区序列。回复突变为鼠残基的氨基酸残基其下面划线,且 CDRs 以粗体表示。图 30B 显示人源化 9D9 轻 (κ) 链可变区序列。回复突变为鼠残基的氨基酸残基其下面划线,且 CDRs 以粗体表示。

[0211] 图 31 是显示嵌合的 9D9 抗体和一部分人源化 9D9 抗体同等地结合至表达 CD52 的细胞的统计图。X 轴表示由结合的抗 CD52 抗体所放出的荧光,其中每一个峰的面积表示总细胞群。

[0212] 图 32A 显示 Campath-1H® (“C1H”)、嵌合 2C3 抗体、及人源化 2C3-SFD1/K12 抗体至初始人类 T 细胞和 huCD52 转基因小鼠 T 细胞的结合曲线。图 32B 显示 Campath-1H® (“C1H”)、嵌合 9D9 抗体、及人源化 9D9 抗体至初始人类 T 细胞和 huCD52 转基因小鼠 T 细胞的结合曲线。图 32C 显示 Campath-1H® (“C1H”)、嵌合 12G6 抗体、及人源化 12G6 抗体至初始人类 T 细胞和 huCD52 转基因小鼠 T 细胞的结合曲线。

[0213] 图 33 是显示 Campath-1H®、嵌合 2C3 及 12G6 抗体、和人源化 2C3 及 12G6 抗体至 huCD52 表达的人类和转基因小鼠 T 细胞的相对结合效率的表。

[0214] 图 34 通过流式细胞术说明人源化抗 CD52 Campath-1H®、2C3、12G6、和 9D9 抗体至人类外周血单核细胞群的规定亚型的相对结合形式 (pattern)。这些统计图显示,对于各种表达 CD52 的人 PBMC 亚型,人源化抗 CD52 抗体结合与 Campath-1H® 的结合相当。X 轴表示由结合的抗 CD52 抗体所放出的荧光,其中每一个峰的面积表示总细胞群。

[0215] 图 35 是显示嵌合及人源化 7F11 抗体对表达 CD52 的细胞介导同等的 ADCC 活性的图。

[0216] 图 36 是显示嵌合及人源化 7F11 抗体对表达 CD52 的细胞介导 CDC 活性的图。

[0217] 图 37 是显示嵌合及人源化 2C3 抗体对表达 CD52 的细胞介导 ADCC 活性的图。

[0218] 图 38 是显示嵌合及人源化 2C3 抗体对表达 CD52 的细胞介导 CDC 活性的图。

[0219] 图 39 是显示嵌合及人源化 12G6 抗体对表达 CD52 的细胞介导 ADCC 活性的图。

[0220] 图 40 是显示嵌合及人源化 12G6 抗体对表达 CD52 的细胞介导 CDC 活性的图。

[0221] 图 41 是显示嵌合及人源化 9D9 抗体对表达 CD52 的细胞介导 ADCC 活性的图。

[0222] 图 42 是显示嵌合及人源化 9D9 抗体对表达 CD52 的细胞介导 CDC 活性的图。

[0223] 图 43 是显示人源化抗 CD52 抗体在初始 T 细胞上的 ADCC 活性的图。

[0224] 图 44 是显示人源化抗 CD52 抗体在初始 T 细胞上的 CDC 活性的图。

[0225] 图 45 是显示 Campath-1H 而非其它抗 CD52 抗体的中和的图,其使用包含抗 Campath-1H®中和抗体的 CAMMS223 研究人类血清样品。血清样品在第 12 个月 (M12) 和第 13 个月 (M13) 取自代表性病人 (MS-1)。

[0226] 图 46A-46E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、骨髓样细胞、和嗜中性粒细胞的水平。

[0227] 图 47A-47E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、骨髓样细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞的水平。

[0228] 图 48A-48E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子的水平。

[0229] 图 49A 和 49B 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体 (mg/kg) 给药之后一段时期内的循环淋巴细胞的再增殖。

[0230] 图 50A-50E 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、骨髓样细胞、和嗜中性粒细胞的水平。

[0231] 图 51A-51E 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、骨髓样细胞、和嗜中性粒细胞的水平。

[0232] 图 52A-52F 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子的水平。

[0233] 图 53A 和 53B 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药 (mg/kg) 之后循环淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0234] 图 54A 和 54B 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、7F11-嵌合抗体、和人源化 7F11-SFD1/K2 及 7F11-SFD2/K2 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。

[0235] 图 55 显示给药之后血液中 Campath-1H® (“Campath”)、7F11-嵌合抗体和人源化 7F11-SFD1/K2 及 7F11-SFD2/K2 抗体在一段时间内的水平。

[0236] 图 56A-56E 显示在使用 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、和嗜中性粒细胞的水平。

[0237] 图 57A-57E 显示在使用 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、和嗜中性粒细胞的水平。

[0238] 图 58A-58F 显示在使用 2C3-SFD1/K12 (“2C3”) 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子的水平。

[0239] 图 59 显示在使用 2C3-SFD1/K12 抗体给药 (mg/kg) 之后循环的淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0240] 图 60A-60E 显示在使用 12G6-SFD1/K11 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、骨髓样细胞、巨噬细胞、和嗜中性粒细胞的水平。

[0241] 图 61A-61E 显示在使用 12G6-SFD1/K11 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细

胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、和骨髓样细胞的水平。

[0242] 图 62A-62F 显示在使用 12G6-SFD1/K11 (“12G6hu”) 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子的水平。

[0243] 图 63 显示在使用 12G6-SFD1/K11 抗体给药 (mg/kg) 之后循环的淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0244] 图 64A-64C 显示给药之后血液中 2C3- 嵌合、2C3-SFD1/K12、12G6- 嵌合、12G6-SFD1/K11、9D9- 嵌合、及 9D9-H10/K12 抗体在一段时间内的水平。

[0245] 图 65A-65E 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、骨髓样细胞、巨噬细胞、和嗜中性粒细胞的水平。

[0246] 图 66A-66E 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、骨髓样细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞的水平。

[0247] 图 67A-67F 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。

[0248] 图 68 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体 (mg/kg) 给药之后循环的淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0249] 图 69A-69D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、12G6-SFD1/K11 (“12G6”)、和 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时血液中的整体 (bulk) 淋巴细胞群 (CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、和 B 细胞) 和 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+B 细胞及 NK 细胞亚型的水平。

[0250] 图 70A-70D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、12G6-SFD1/K11 (“12G6”)、及 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的整体淋巴细胞群 (CD4+T 细胞、CD8+ T 细胞、及 B 细胞) 和 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞及 NK 细胞亚型的水平。

[0251] 图 71A-71F 显示在使用 Campath-1H®、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、和 9D9-H10/K12 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。

[0252] 图 72 显示在使用 9D9-H10/K12 及 9D9-H11/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、和 NK 细胞的水平。

[0253] 图 73 显示在使用 9D9-H10/K12 及 9D9-H11/K12 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、和 NK 细胞的水平。

[0254] 图 74A-74D 显示在使用 12G6-SFD1/K11 (“12G6K11”) 和 12G6-SFD1/K12 (“12G6K12”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、和骨髓样细胞的水平。

[0255] 图 75A-75D 显示在使用 12G6-SFD1/K11 (“12G6K11”) 和 12G6-SFD1/K12 (“12G6K12”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、NK 细胞、和骨髓样细胞的水平。

[0256] 图 76 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、和 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时血液中的整体淋巴细胞群 (CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、和 B220+ B 细胞) 的水平。

[0257] 图 77A-77D 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、NK 细胞、和骨髓样细胞亚型的水平。

[0258] 图 78 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时脾脏中的整体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、和 B220⁺ B 细胞) 的水平。

[0259] 图 79A-79D 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、NK 细胞、和骨髓样细胞亚型的水平。

[0260] 图 80A-80F 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。

[0261] 图 81A 和 81B 显示给药之后血液中 2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 和 9D9-H18/K13 抗体在一段时间内的水平。

[0262] 图 82A-82F 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K11、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 或 9D9-H18/K13 抗体给药之后血液中的细胞因子在 48 小时时间内的水平。

[0263] 图 83A-83E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K11、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 或 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时脾脏中的整体淋巴细胞、CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、NK 细胞、和骨髓样细胞的水平。

[0264] 图 84A-84G 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后循环的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞、调节 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞在一段时间内的再增殖。

[0265] 图 85 显示 FITC 标记的 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12 (“2C3 K12”)、12G6-SFD1/K11 (“12G6 K11”)、12G6-SFD1/K12 (“12G6 K12”)、9D9-H16/K13 (“9D9 H16”)、及 9D9-H18/K13 (“9D9 H18”) 抗体在脾脏中特异性地结合至 huCD52 淋巴细胞群的能力。

[0266] 图 86A-86E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时血液中的整体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、和 B220⁺ B 细胞) 和 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、NK 细胞及骨髓样细胞亚型的水平。

[0267] 图 87A-87E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时脾脏中的整体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、和 B220⁺ B 细胞) 和 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、NK 细胞及骨髓样细胞亚型的水平。

[0268] 图 88A-88F 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。

[0269] 图 89A-89D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、及 NK/ 骨髓样细胞亚型的水平。

[0270] 图 90A-90D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13

及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、及 NK/骨髓样细胞亚型的水平。

[0271] 图 91A-91D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时淋巴结中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、及 NK/骨髓样细胞亚型的水平。

[0272] 图 92A 显示 huCD52-KI/KO 和非转基因对照小鼠中 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、及 NK/骨髓样细胞亚型上的 huCD52 表达水平。图 92B 显示 huCD52-KI/KO 和 huCD52 CD1 转基因小鼠中 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、及 B 细胞上的 huCD52 表达水平。

[0273] 图 93 显示相对于 Campath-1H®对照组的来自各种制造来源 (“小规模”和“大规模”) 的 12G6-SFD1/K12 与 2C3-SFD1/K12 抗体对 huCD52 的结合。

[0274] 图 94 显示在使用来自各种制造来源 (“小规模”和“大规模”) 的 12G6-SFD1/K12 和 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的整体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞和 NK 细胞) 的水平。

[0275] 图 95 显示在给药之后血液中的 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 和 12G6-SFD1/K12 抗体在一段时间内的水平。

[0276] 图 96 显示在疾病进展时期内的 2C3-SFD1/K12 和 12G6-SFD1/K12 的 EAE 临床评分。

[0277] 图 97A 和 97B 显示 Campath1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、His435Ala 2C3-SFD1/K12 (“H435A 2C3”) 和 His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12 (“H310A/H435Q 2C3”) 结合至小鼠 FcRn 分子和人类 FcRn 分子的能力。

[0278] 图 98 显示在非转基因小鼠中 2C3-SFD1/K12 (“2C3 未修饰”)、2C3-SFD1/K12-修饰 1 (“2C3-Fc 突变体 1”) 和 2C3-SFD1/K12-修饰 2 (“2C3-Fc 突变体 2”) 的体内清除。

[0279] 图 99 显示在 huCD52 转基因小鼠中 2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、2C3-SFD1/K12-修饰 1 (“2C3-Fc 突变体 1”) 和 2C3-SFD1/K12-修饰 2 (“2C3-Fc 突变体 2”) 的体内清除。

[0280] 图 100A 和 100B 显示在使用 2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、2C3-SFD1/K12-修饰 1 (“2C3-Fc 突变体 1”)、和 2C3-SFD1/K12-修饰 2 (“2C3-Fc 突变体 2”) 抗体给药之后 72 小时血液和脾脏中的整体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、和 NK 细胞) 的水平。

[0281] 图 101A 和 101B 是 Biacore T100 检定的代表性传感图 (sensorgrams) 以确定人源化 12G6-SFD1/K12 抗体和通过丙氨酸扫描而产生的突变肽的表位特异性。图 101A 显示 12G6-SFD1/K12 与 MUT 8 肽之间没有结合, 而图 101B 显示 12G6-SFD1/K12 与 MUT 9 肽之间存在结合。

[0282] 图 102 显示对供体 BMS486 的 TCR V β 分析。使用 Campath-1H®肽组 986-989 驯化 (educated) 的 CD4⁺ T 细胞表现出单一 V β (V β 3) 的优先增加。

[0283] 图 103 显示对供体 BMS928 的 TCR V β 分析。使用 12G6-SFD1/K12 肽组 1066-67-68 和 1083-84-85 驯化的 CD4⁺ T 细胞表现出单一 V β (V β 20) 的优先增加。

[0284] 图 104A-104J 显示 Campath-1H®免疫原性评估。对于单独供体 A-J 的增殖反应以 CPM 显示。X 轴描述用于刺激自体 CD4⁺ T 细胞三次的肽组。各组 T 细胞使用以驯化抗原/肽组 (特异性反应, 左边条状物, 白色)、不相关的 DR 结合肽 (中间条状物, 加条纹的)、或介质 (右边条状物, 黑色) 脉冲的自体 DCs 重复检定三次。

[0285] 图 105A-105J 显示 12G6-SFD1/K12 免疫原性评估。对于单独供体 A-J 的增殖反应以 CPM 显示。X 轴描述用于刺激自体 CD4⁺ T 细胞三次的肽组。各组 T 细胞使用以驯化肽组（特异性反应, 左边条状物, 白色）、不相关的 DR 结合肽（中间条状物, 加条纹的）、或介质（右边条状物, 黑色）脉冲的自体 DCs 重复检定三次。在没有介质对照检定的小组中, 左边条状物（白色）表示用驯化肽脉冲的 DCs, 右边条状物（加条纹的）表示用不相关肽脉冲的 DCs。

[0286] 图 106 显示 2C3-SFD1 (SEQ ID NO :272) 的全长人源化重链氨基酸序列和 2C3-K12 (SEQ ID NO :273) 的全长人源化轻链氨基酸序列。信号序列以粗体及斜体表示, 且 CDRs 下面划线。

[0287] 图 107 显示 7F11-SFD1 (SEQ ID NO :274) 的全长人源化重链氨基酸序列和 7F11-K2 (SEQ ID NO :275) 的全长人源化轻链氨基酸序列。信号序列以粗体及斜体表示, 且 CDRs 下面划线。

[0288] 图 108 显示 9D9-H16 (SEQ ID NO :276) 和 9D9-H18 (SEQ ID NO :277) 的全长人源化重链氨基酸序列, 以及 9D9-K13 (SEQ ID NO :278) 的全长人源化轻链氨基酸序列。信号序列以粗体及斜体表示, 且 CDRs 下面划线。

[0289] 图 109 显示 12G6-SFD1 (SEQ ID NO :279) 的全长人源化重链氨基酸序列和 12G6-K12 (SEQ ID NO :280) 的全长人源化轻链氨基酸序列。信号序列以粗体及斜体表示, 且 CDRs 下面划线。

[0290] 图 110 显示 4B10-H1 (SEQ ID NO :281) 的全长人源化重链氨基酸序列和 4B10-K1 (SEQ ID NO :282) 的全长人源化轻链氨基酸序列。信号序列以粗体及斜体表示, 且 CDRs 下面划线。

[0291] 图 111 显示 2C3-SFD1 (SEQ ID NO :283) 的全长人源化重链核酸序列和 2C3-K12 (SEQ ID NO :284) 的全长人源化轻链核酸序列。信号序列下面划线, 可变区为粗体, 恒定区为斜体。

[0292] 图 112 显示 7F11-SFD1 (SEQ ID NO :285) 的全长人源化重链核酸序列和 7F11-K2 (SEQ ID NO :286) 的全长人源化轻链核酸序列。信号序列下面划线, 可变区为粗体, 恒定区为斜体。

[0293] 图 113 显示 9D9-H16 (SEQ ID NO :287) 和 9D9-H18 (SEQ ID NO :288) 的全长人源化重链核酸序列。信号序列下面划线, 可变区为粗体, 恒定区为斜体。

[0294] 图 114 显示 9D9-K13 (SEQ ID NO :289) 的全长人源化轻链核酸序列。信号序列下面划线, 可变区为粗体, 恒定区为斜体。

[0295] 图 115 显示 12G6-SFD1 (SEQ ID NO :290) 的全长人源化重链核酸序列和 12G6-K12 (SEQ ID NO :291) 的全长人源化轻链核酸序列。信号序列下面划线, 可变区为粗体, 恒定区为斜体。

[0296] 图 116 显示 4B10-H1 (SEQ ID NO :292) 的全长人源化重链核酸序列和 4B10-K1 (SEQ ID NO :293) 的全长人源化轻链核酸序列。信号序列下面划线, 可变区为粗体, 恒定区为斜体。

具体实施方式

[0297] CD52 是一种糖基化的、GPI 锚定的细胞表面富含蛋白（每个细胞约 5×10^5 个抗体结合部位），其存在于至少 95% 的所有人类外周血淋巴细胞和单核细胞 / 巨噬细胞 (Hale G, 等人 “The CAMPATH-1 antigen(CD52),” *Tissue Antigens*, 35 :178-327(1990)), 但是不存在于造血干细胞。本发明涉及对人 CD52 或其部分具有结合特异性（例如，表位特异性）或者选择性地结合至人 CD52 或其部分的免疫球蛋白（抗 CD52）。这些免疫球蛋白特异性地结合至 CD52, 并且不会特异性地结合至非 CD52 分子。抗 CD52 免疫球蛋白和 CD52 之间的特异性结合可通过, 例如, 使用流式细胞术测定免疫球蛋白结合至 CD52+ 细胞的 EC_{50} 而确定。特异性结合可通过 EC_{50} 范围例如 0.5-10 μ g/ml 所表明。本文所叙述的免疫球蛋白可对所有或部分的人 CD52 具有结合特异性, 其中人 CD52 是分离的和 / 或重组的人 CD52, 或是在表达人 CD52 的细胞表面上。此外, 免疫球蛋白可对一种或多种形式的人 CD52 (例如, 糖基化的人 CD52 ; 去糖基化的人 CD52 ; 非糖基化的人 CD52 ; 和等位基因变体 (allelic variants)) 具有结合特异性。在一个实施方式中, 免疫球蛋白对自然生成的、内源的或野生型的人 CD52 具有结合特异性。野生型人 CD52 的氨基酸序列说明于图 4 中 (SEQ ID NO :104)。

[0298] 本文所述的免疫球蛋白可使用已知技术纯化或分离。“纯化”或“分离”的免疫球蛋白已与其来源（例如, 细胞上层清液 ; 在混合物中, 例如在文库的免疫球蛋白混合物中）的分子（例如, 肽）分开, 并且包含由本文所述方法或其它合适的方法所得到的免疫球蛋白。分离的免疫球蛋白包含大体上纯的（基本上纯的）免疫球蛋白, 和通过化学合成、重组技术及其组合所制备的免疫球蛋白。

[0299] 更具体而言, 本发明涉及抗人 CD52 免疫球蛋白、免疫球蛋白的抗原结合片段（即, 部分）、免疫球蛋白的轻链、免疫球蛋白的重链、和这些轻链或重链的片段。本发明还涉及成熟的免疫球蛋白或其链, 例如糖基化免疫球蛋白。本发明还涉及未成熟的或前体免疫球蛋白（蛋白）。本发明还涉及编码这些未成熟或成熟蛋白的核酸分子（例如, 载体）, 涉及包含此种核酸的载体及宿主细胞, 涉及未成熟和成熟蛋白的制备方法, 并且涉及免疫球蛋白的使用方法。

[0300] 本发明的免疫球蛋白可用于治疗需要的受试者（例如, 病人）, 以根据需要消减受试者的淋巴细胞和其它 CD52+ 细胞（例如, CD52+ 癌细胞）。本文所用的“淋巴细胞消减”是一种通过减少循环的淋巴细胞群（例如, T 细胞和 / 或 B 细胞）而造成淋巴细胞减少的免疫抑制类型。本发明的免疫球蛋白还可用于抑制血管生成, 如下文进一步所叙述。本发明的免疫球蛋白还可用于, 例如, 在先体外后体内 (ex vivo) 应用中使造血干细胞增加（参见, 例如, Lim 等人, *J Hematology & Oncology* 1 :19(2008)）。

[0301] 自然产生的免疫球蛋白具有共同的核心结构, 其中两个相同轻链（约 24kD）和两个相同重链（约 55 或 70kD）形成一个四聚物。已知每一个链的氨基端部分是可变 (V) 区, 并可以区分于各个链其余部分的更保守的恒定 (C) 区。在轻链的可变区（也称为 V_L 域）内是已知为 J 区的 C 端部分。在重链的可变区（也称为 V_H 域）内, 除了 J 区还有 D 区。免疫球蛋白中的大部分氨基酸序列变异限制在 V 区域中三个单独的位置, 其称为高可变区或互补决定区 (CDRs), 其直接涉及抗原结合。自氨基端开始, 这些区域分别命名为 CDR1、CDR2 和 CDR3。这些 CDRs 由更保守的骨架区 (FR) 保持于所在处。自氨基端开始, 这些区域分别命名为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。CDR 和 FR 区的位置以及编号系统已由 Kabat 等人 (Kabat, E. A., 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of

Health and Human Services, U.S. Government Printing Office(1991), Chothia & Lesk, Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins, *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917(1987)), 和 IMGT® 编号系统 (The International ImMuNoGeneTics Information Ssystem®, Lefranc, M.-P., *The Immunologist* 7, 132-136(1999) 定义。可进行视觉检查和序列分析以鉴定 CDR 边界 (boundaries)。对于本发明, CDR 序列通过使用 Kabat 系统和 IMGT 系统而定义; 也就是说, 当由该两个系统定义的 CDRs 没有完全重叠时, 我们包括来自通过该两个系统所定义的序列的所有残基。

[0302] 依据重链的同种型, 人类免疫球蛋白可分为类 (classes) 及亚类 (subclasses)。类包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE, 其中重链分别为 gamma(γ)、mu(μ)、alpha(α)、delta(δ) 或 epsilon(ϵ) 型。亚类包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2, 其中重链分别为 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4、 α 1 和 α 2 型。选择的类或亚类的人类免疫球蛋白分子可包含 kappa(κ) 或 lambda(λ) 轻链。参见例如 *Cellular and Molecular Immunology*, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA 91991); Nisonoff, A., *Introduction to Molecular Immunology*, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45-65, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA(1984)。

[0303] 本文所用的术语“免疫球蛋白”和“抗体”, 其可互换使用, 表示整体抗体和抗原结合片段(即, “抗原结合部分”——除非另外指出, 否则这两个术语在本文中可互换使用)。抗体的抗原结合片段可以是以, 例如, 单链抗体、Fv 片段、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fd 片段、单链 Fv 分子(scFv)、双特异性单链 Fv 二聚体(PCT/US92/09665)、双抗体、区域缺失抗体和单域抗体(dAbs) 的形式。参见, 例如, *Nature Biotechnology* 22(9): 1161-1165(2004)。包含 VH 和 / 或 VL 的抗原结合分子也在本发明之内。在 VH 的情况下, 该分子还可包含一个或多个 CH1、铰链(hinge)、CH2 和 CH3 区。此种单链抗体也意在被包括在抗体的“抗原结合部分”该术语以内。

[0304] 抗体部分或片段可通过酶催化裂解或通过重组技术而制备。例如, 可使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶裂解以分别产生 Fab 或 F(ab')₂ 片段。也可使用在天然终止部位的上游已引入一个或多个终止密码子的抗体基因将抗体制备为各种截短形式。例如, 可将编码 F(ab')₂ 片段的重链的重组构建体设计为包含编码重链的 CH₁ 域和铰链区的 DNA 序列。优选的抗原结合片段对野生型人 CD52 具有结合特异性。

[0305] 在另一方面, 本发明提供一种本文所述的抗体或其部分的变体, 其中该变体特异性地结合至人 CD52, 但以 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸取代(例如, 在 CDR 区、FR 区、或恒定区中) 而与参考抗体或其部分不同。例如, 变体抗体在重链、重链可变区、轻链、或轻链可变区以至少 90%、至少 91%、至少 93%、至少 95%、至少 97% 或至少 99% 与参考抗体相同。

[0306] 多肽的序列相似性或一致性, 其也称为序列一致性, 通常使用序列分析软件来对其测定。蛋白分析软件使用分配为各种取代、缺失和其它修饰(包括保守型氨基酸取代) 的相似性度量来匹配类似序列。举例而言, GCG 包含诸如“Gap”及“Bestfit”的程序, 其可以以预设参数使用, 以确定紧密相关的多肽(例如来自不同生物体种类的同源多肽) 之间或是野生型蛋白与其突变蛋白之间的序列同源性或序列一致性。参见例如 GCG 6.1 版。也可使用 FASTA(GCG 6.1 版中的程序) 利用预设或推荐参数来比较多肽序列。FASTA(例如,

FASTA2 和 FASTA3) 提供查询序列与搜寻序列之间最佳重叠区域的比对 (alignment) 和序列一致性百分比 (Pearson, *Methods Enzymol.* 183 :63-98(1990) ;Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132 :185-219(2000))。当将本发明的序列与包含大量来自不同生物体的序列的数据库比较时,另一种较佳的算法是计算机程序 BLAST,特别是 blastp 或 tblastn,其使用预设参数。参见例如 Altschul 等人, *J. Mol. Biol.* 215 :403-410(1990) ;Altschul 等人, *Nucleic Acids Res.* 25 :3389-402(1997) ;本文中将其引入作为参考。

[0307] 根据本发明,可进行的一种类型的氨基酸取代是将抗体中的一个或多个半胱氨酸(其可为化学反应性的)变成另一种残基(例如,但不限于丙氨酸或丝氨酸)。在一个实施方式中,存在非经典(non-canonical)半胱氨酸的取代。取代可在抗体的可变区中的 CDR 或骨架区中,或在抗体的恒定域中进行。在一些实施方式中,半胱氨酸为经典的。可进行的另一种类型的氨基酸取代是将抗体中的潜在蛋白分解部位移除。此种部位可出现于抗体的可变区中的 CDR 或骨架区中或出现于抗体的恒定区中。半胱氨酸残基的取代和蛋白分解部位的移除会降低抗体产物中不均一性的风险,从而增加其均一性。另一种类型的氨基酸取代是通过改变残基的一个或其二者而消除天门冬酰胺-甘氨酸对,其形成潜在的去酰胺化部位。在本发明的另一方面,可使用叙述于例如 PCT 公开 W098/52976 和 W000/34317 中的技术将抗体去免疫化,以降低其免疫原性。

[0308] 可在根据本发明的一个变型中进行的另一种类型的氨基酸取代为保守型氨基酸取代。“保守型氨基酸取代”是一种氨基酸残基被具有类似化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链 R 基的另一个氨基酸残基所取代的取代。一般而言,保守型氨基酸取代大体上不会改变蛋白的功能性质。在两个或更多个氨基酸序列因保守型取代而彼此不同的情况下,可向上调整序列一致性百分率或相似度,以修正取代的保守本质。进行此调整的方法是本领域内技术人员所公知的。参见,例如 Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243 :307-31(1994)。

[0309] 具有类似化学性质侧链的氨基酸组的实例包括 1) 脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、和异亮氨酸;2) 脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;3) 含酰胺侧链:天门冬酰胺和谷氨酰胺;4) 芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸、和色氨酸;5) 碱性侧链:赖氨酸、精氨酸、和组氨酸;6) 酸性侧链:天门冬氨酸和谷氨酸;及 7) 含硫侧链:半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守型氨基酸取代组为:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸、以及天门冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守型置换是在于 Science 256 :1443-45(1992) (Gonnet 等人) 中所公开的 PAM250 对数似然矩阵(log-likelihood matrix) 中具有正值的任何改变。“中度保守型”置换是在 PAM250 对数似然矩阵中具有非负值的任何改变。

[0310] 在某些实施方式中,本发明的抗体或抗原结合部分的氨基酸取代为以下那些:(1) 降低对蛋白质水解的敏感性,(2) 减少对氧化反应的敏感性,(3) 改变对于形成蛋白复合物的结合亲和性,例如,以增强抗体的 ADCC 和 CDC 活性,(4) 赋予或修饰此种类似物的其它物理化学或功能性质,但仍保留有对人 CD52 的特异性结合,(5) 移除 C 端赖氨酸,以及(6) 增加或移除糖基化部位。

[0311] 在一方面,本发明提供一种新型和新型多肽,其是本发明的抗体的重链或轻链,或者其是重链或轻链的含可变区的部分。此种多肽由于其可与相对(轻或重)抗体链配对以形成 CD52- 结合分子而是有用的。

[0312] 人源化免疫球蛋白

[0313] 本文所述的是包含新颖的鼠抗人 CD52 抗体的 CDRs 的人源化免疫球蛋白。在一个实施方式中,该人源化免疫球蛋白包含人源化轻链和人源化重链,其具有不同于抗 CD52 抗体的其它人源化类型(例如, Campath®)的氨基酸序列的 CDR 氨基酸序列。

[0314] 本文所用的术语“人源化免疫球蛋白”表示一种免疫球蛋白,其包含含有非人类来源的抗 CD52 抗体(此处也称为供体抗体(例如,鼠的抗 CD52 抗体))的一个或多个轻链 CDRs(CDR1、CDR2 和 CDR3) 和一个或多个重链 CDRs(CDR1、CDR2 和 CDR3) 的链,以及至少一部分人类来源的免疫球蛋白(例如,来自人类来源的轻链和 / 或重链的骨架区,或骨架区与恒定区,例如具有或不具有骨架改变的 CDR 移植抗体)。本发明的人源化免疫球蛋白包含至少一个 CDR,该 CDR 不同于 Campath®中存在的至少一个 CDR(例如,不同于相对应的 CDR)。参见,例如, Cabilly 等人,美国专利第 4,816,567 号;Cabilly 等人,欧洲专利第 0,125,023B1 号;Boss 等人,美国专利第 4,816,397 号;Boss 等人,欧洲专利第 0,120,694B1 号;Neuberger, M. S. 等人,WO 86/01533;Neuberger, M. S. 等人,欧洲专利第 0,194,276B1 号;Winter, 美国专利第 5,225,539 号;Winter, 欧洲专利第 0,239,400B1 号;Padlan, E. A. 等人,欧洲专利申请第 0,519,596 A1 号。关于单链抗体,还可参见:Ladner 等人,美国专利第 4,946,778 号;Huston, 美国专利第 5,476,786 号;以及 Bird, R. E. 等人, Science, 242:423-426(1988)。在一些实施方式中,人源化免疫球蛋白是一种去免疫化的抗体。参见,例如 Carr 等人,美国专利第 7,264,806 号,其关于已被修饰以减少潜在 T 细胞表位的数量的去免疫化免疫球蛋白,由此减少免疫球蛋白在对人施用时引发免疫反应的倾向。

[0315] 在特定的实施方式中,该人源化免疫球蛋白包含一个或多个下列鼠单克隆抗体的一个或多个轻链 CDRs 和一个或多个重链 CDRs:小鼠 8G3.25.3.5、小鼠 4G7.F3、小鼠 9D9.A2、小鼠 11C11.C5、小鼠 3G7.E9、小鼠 5F7.1.1.4、小鼠 12G6.15.1.2、小鼠 23E6.2.2.1、小鼠 2C3.3.8.1、小鼠 7F11.1.9.7、和小鼠 4B10.1.2.4。

[0316] 在另一实施方式中,该人源化免疫球蛋白以相似于或者优于 Campath®的亲合性结合至人 CD52。在一个特定的实施方式中,本发明的人源化免疫球蛋白具有本发明的鼠抗人 CD52 抗体的结合特异性(例如,具有对人 CD52 的特异性,具有相同或相似的表位特异性),并且 / 或者其具有相同的抑制作用。人源化免疫球蛋白可具有本文所述的鼠抗人 CD52 抗体或人源化抗人 CD52 抗体的结合特异性和 / 或抑制活性,以及 / 或本文所述的鼠抗人 CD52 抗体或人源化抗人 CD52 抗体的表位特异性(例如,其可与鼠抗人 CD52 抗体竞争,或另一种人源化抗 CD52 抗体(例如, Campath®)竞争以结合至 CD52,且 / 或其可具有鼠或人源化抗人 CD52 抗体的抑制作用)。在一个特定的实施方式中,人源化免疫球蛋白具有鼠抗体 8G3、4G7、9D9、11C11、3G7、5F7、12G6、23E6、2C3、7F11、和 4B10 中任一个的结合特异性、表位特异性和 / 或抑制活性。

[0317] 人类来源的人源化免疫球蛋白部分或免疫球蛋白链的部分(例如,骨架区;恒定区)可从任何合适的人免疫球蛋白或免疫球蛋白链获得。例如,在人源化或嵌合抗体中的人类恒定区或其部分可从人类 κ 或 λ 轻链基因获得,和 / 或从人类 γ (例如, γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4)、 μ 、 α (例如, α 1、 α 2)、 δ 或 ϵ 重链基因获得,包括等位基因变体。特定的恒定区(例如, IgG1),其变体或其部分可被选择以适合效应功能(effector function)。例如,突变的恒定区(变体)可被引入免疫球蛋白或免疫球蛋白链中从而使得对 Fc 受体的结

合和 / 或固定补体的能力最小化。(参见,例如, Winter 等人, GB 2, 209, 757 B; Morrison 等人, WO 89/07142; Morgan 等人, WO 94/29351, December 22, 1994)。在一个实施方式中, 人类骨架区在其结构或序列中没有变异或突变。在一个特定的实施方式中, 骨架区为一种其序列中不具有突变或变异的生殖系骨架序列。

[0318] 本文所用的术语“生殖系”(germline)表示在抗体基因和基因片段经由生殖细胞从母代传至子代时抗体基因和基因片段的核苷酸序列和氨基酸序列。此生殖系序列与编码成熟 B 细胞中抗体的核苷酸序列不同, 成熟 B 细胞中抗体的核苷酸序列在 B 细胞成熟期间已被重组和超突变事件改变。“利用”特定生殖系的抗体具有与该生殖系核苷酸序列或是与其指定的氨基酸序列最相配的核苷酸或氨基酸序列。与生殖系序列相比, 此种抗体经常是突变的。

[0319] 在其它实施方式中, 人类骨架在其结构或序列上具有来自生殖系序列的最少变异或突变(例如, 少于 3、4、5、6、7、8、9、或 10 个受体骨架残基已被供体骨架残基取代, 以改善结合亲和性, 参见 Queen 等人, 美国专利第 5, 530, 101 号)。在一个特定的实施方式中, 人源化免疫球蛋白链的骨架中有限数量的氨基酸(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、或 10 个氨基酸)被选择为与供体序列中这些位置的氨基酸相同(即, “回复突变”), 而不是与受体序列相同, 以增加包含人源化免疫球蛋白链的抗体对人类 CD52 的亲合力。

[0320] 人类骨架区(例如, 重链可变区和 / 或轻链可变区的)优选得自或衍生自与供体免疫球蛋白(鼠抗 CD52 抗体)的抗原结合区域的类似或相当区域(例如, 重链可变区或轻链可变区)具有序列相似性的人类抗体可变区。人源化免疫球蛋白的人类来源部分的骨架区其它来源包括人类可变区一致性序列(参见例如, Kettleborough, C. A. 等人, Protein Engineering 4:773-783(1991); Carter 等人 WO 94/04679; Carter 美国专利第 6, 407, 213 号)。例如, 用于得到非人类部分的抗体供体序列的区域(例如, 可变区的序列)可与人类序列相比较, 如 Kabat, E. A. 等人 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office(1991)中所述, 以选择人源化免疫球蛋白的人类部分的特定来源, 例如, 骨架区来源。

[0321] 在一个实施方式中, 人源化免疫球蛋白链的骨架区得自, 或衍生自与非人类供体的可变区具有至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90% 或至少约 95% 的总序列一致性的人类 Ig 可变区。在一个特定的实施方式中, 人源化免疫球蛋白链的骨架区得自或衍生自与非人类供体免疫球蛋白可变区的骨架区具有至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、或至少约 95% 的总序列一致性的人类可变区骨架区。

[0322] 在一个实施方式中, 人源化免疫球蛋白的至少一个骨架区(FR)从人类来源抗体的一个或多个链获得或由其衍生。于是, FR 可包含由人类来源的一个或多个抗体(例如, 由人类免疫球蛋白链, 由人类一致性序列)获得或衍生的 FR1 和 / 或 FR2 和 / 或 FR3 和 / 或 FR4。

[0323] 用于本发明的免疫球蛋白部分具有与它们的衍生来源免疫球蛋白或其变体相同或类似的序列。此种变体包含因一个或多个残基的加入、缺失或取代(例如, 保守型取代)

而不同的突变体,例如,通过一个或多个加入、缺失或取代而与亲本序列相差多至 3、4、5、6、7、8、9、或 10 个残基。如上文所指出,本发明的人源化免疫球蛋白包含来自本文所述的一个或多个鼠抗 CD52 抗体(供体抗体)的一个或多个 CDRs。可产生骨架区中的变化,例如用来自供体抗体相对应位置的残基来取代人类来源骨架区的残基的那些变化。可产生一个或多个突变,其包括骨架区中的一个或多个氨基酸的缺失、插入和取代。如果需要,可使用任何合适的方法(例如在 WO 98/06248 中所述,其整个教导并入本文做为参考)使人源化抗体或链中包含骨架突变,以及选择突变部位。

[0324] 本领域的技术人员将会理解,在一些情况下,鼠抗 CD52 抗体的一个或多个 CDRs 侧面相接的残基可能起作用,在一些情况下,可能直接或间接地为功能(例如,结合)所需要。因此,在一些实施方式中,与鼠骨架的一个或多个 CDRs 侧面相接的一个或多个氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个侧翼氨基酸)也包含于人源化免疫球蛋白中。

[0325] 在一些实施方式中,本发明的人源化抗体的人类重链骨架区利用人类 VH3-72 或 VH3-23 生殖系序列。在一些实施方式中,本发明的人源化抗体的人类轻链骨架区利用人类 Vk2-A18b 生殖系序列。可在这些 FR 区域中一个或多个残基处选择性地作出回复突变,如下文工作实施例所述,以改善人源化抗体的 CD52 结合亲和性。

[0326] “亲和性”是一种专业术语,其描述结合相互作用的强度,并且通常是指免疫球蛋白对人类 CD52 的结合整体强度。

[0327] 在一个特定的实施方式中,免疫球蛋白具有测得 EC_{50} 值为小于 $10 \mu\text{g/ml}$ (例如,通过流式细胞术所确定)的结合活性。在另一实施方式中,免疫球蛋白具有测得 EC_{50} 值小于 $5.0 \mu\text{g/ml}$,或小于 $1.0 \mu\text{g/ml}$ (例如,通过流式细胞术所确定)的结合活性。

[0328] 在一些实施方式中,免疫球蛋白以 300nM 至 1pM (即, 3×10^{-7} 至 $1 \times 10^{-12}\text{M}$),优选为 50nM 至 1pM ,更优选为 5nM 至 1pM 且最优选为 1nM 至 1pM 的亲和性 (K_D ; $K_D = K_{\text{off}}(\text{kd}) / K_{\text{on}}(\text{ka})$) 结合至人 CD52,例如, $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更小、优选为 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更小、更优选为 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更小、有利地是 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更小且最优选为 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 或更小的 K_D ; 和 / 或 $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ 、优选为 $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 、更优选为 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 至 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速率常数,例如 $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ 或更小、优选为 $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 或更小、有利地是 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或更小、更优选为 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 或更小、更优选为 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或更小,且最优选为 $1 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 或更小,如通过表面等离子共振(surface plasmon resonance)所确定。

[0329] 显然对于本领域的技术人员而言,可使用各种方法以确定根据本文所提供的和本领域内已知的方法所制备的免疫球蛋白具有必要的特异性(例如,结合特异性,表位特异性)。例如,对人 CD52 具有结合特异性的本发明的人源化抗 CD52 免疫球蛋白的结合功能可使用任何合适的方法检测,例如,监测人源化免疫球蛋白与人类 CD52 之间复合物的形成(例如,包含人类 CD52 的膜部分;携带人类 CD52 的细胞,例如人类 T 细胞、人类 B 细胞;包含并表达编码人类 CD52 的核酸的 CHO 细胞或重组宿主细胞;具有 CD52 氨基酸序列的肽(例如,合成肽);包含人类 CD52 的实体支撑(support))的检定。

[0330] 本发明的免疫球蛋白(例如,本发明的人源化免疫球蛋白)结合至与特定的鼠、嵌合或人源化单克隆抗体所结合的人 CD52 上的表位相同的表位,或是结合至与特定的鼠、嵌合、或人源化单克隆抗体所结合的人类 CD52 上的表位重叠的人类 CD52 上表位的能力,可使用本领域的技术人员所知的各种技术(包括,例如竞争性结合检定)而容易地确定。这些

可能涉及使用该特定抗体的标记形式的使用,以及在本发明的免疫球蛋白存在和不存在的条件下对标记的抗体对于人 CD52 的结合的检测。

[0331] 本文所用的“表位”包含能够特异性结合至免疫球蛋白的任何蛋白决定基。表位决定基一般由分子例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链的化学活性表面基 (groupings) 组成,并且一般具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。表位可以是“线性的”或“构象性的”。在线性表位中,在蛋白和相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用点沿蛋白的一级氨基酸序列线性地出现。在构象表位中,相互作用点跨越蛋白上彼此分开的氨基酸残基而出现。一旦确定了抗原上的期望表位,例如使用本发明所描述的技术,可以产生针对该表位的抗体。或者,在发现过程中,抗体的产生和特征化可说明关于期望表位的信息。由此信息,可以接着竞争性地筛选结合至相同表位的抗体。达到此目的的一个方法是,进行竞争性研究以发现彼此竞争性结合的抗体,即,竞争结合至抗原的抗体。

[0332] 在一个实施方式中,为确定测试抗体是否结合至本发明人源化抗体的相同或重叠表位,我们使得本发明的抗 CD52 抗体在饱和条件下结合至 CD52,接着测定测试抗体结合至 CD52 的能力。如果测试抗体能够与参考抗 CD52 抗体在同时间结合至 CD52,则测试抗体相对于参考抗 CD52 抗体结合至不同的表位。然而,如果测试抗体不能在同时间结合至 CD52,则测试抗体结合至相同表位、重叠表位、或是紧邻由本发明抗 CD52 抗体所结合的表位的表位。此实验可使用 ELISA、RIA、BIACORE™、或流式细胞术来进行。为测试抗 CD52 抗体是否与其它抗 CD52 抗体交叉竞争,我们可在两个方向使用上文所述的竞争方法,即,确定参考抗体是否阻碍测试抗体,以及反之。在某个实施方式中,实验使用 BIACORE™ 进行。

[0333] 表位分级 (epitope binning) 也可用于特征化本发明的抗体。术语“分级”是指基于抗体的抗原结合特征以将抗体分组的方法。一种基于其交叉竞争而“分级”抗体的高通量方法在国际专利申请第 W0 03/48731 号中描述。可以通过允许未标记形式的抗 CD52 抗体“A”结合至对应于 CD52 序列的合成肽或 CD52 阳性细胞而对“表位分级”进行调查。接着加入标记的第二抗 CD52 抗体“B”,我们可评价相对于其中细胞或合成肽未预先暴露于抗 CD52 抗体“A”的对照样品的标记抗体量。或者,抗 CD52 抗体“A”和“B”均可标记有不同的荧光染料或能够检测的化学剂,我们可使用能够检测标记的设备来测定能够同时吸引 CD52 肽的两种标记抗体的量,或通过流式细胞术测定同时吸引 CD52 阳性细胞的两种抗体的量。Biacore 和 Octet 技术使我们可以研究未标记形式抗体的竞争性结合。未标记抗体的这种利用是希望的,因为某些抗体的化学修饰可折中结合活性。还可参见, Jia 等人, J Immunol Methods 288 91-98 (2004) 中所描述的技术,其在进行抗体分级中也有用。

[0334] 本文还提供人源化免疫球蛋白的部分,例如轻链、重链以及轻和重链的部分。这些免疫球蛋白部分可得自或衍生自免疫球蛋白(例如,通过还原和/或裂解),或由编码具有期望性质(例如,结合人类 CD52,序列相似性)的免疫球蛋白或其链的部分的核酸来制备或表达。它们可由,例如,相关部分的重新合成而制备。包含人类和非人类来源的期望部分(例如,抗原结合区、CDR、FR、C 区)的人源化免疫球蛋白可使用合成和/或重组核酸来制备,以制得编码期望的人源化链的构建体(例如, cDNA)。例如,为制备一部分免疫球蛋白(例如,一部分链),可在期望的位置引入一个或多个终止密码子。为人源化可变区编码的核酸(例如, DNA)序列可使用 PCR 突变诱发方法来构建,以改变现有的 DNA 序列(参见例如, Kamman, M., 等人, Nucl. Acids Res. 17 :5404 (1989))。为新 CDRs 编码的 PCR 引物可杂

交至先前人源化可变区的 DNA 模板,其基于相同的或非常相似的人类可变区 (Sato, K., 等人, *Cancer Research* 53:851-856(1993))。如果没有相似的 DNA 序列用做模板,可由合成的寡核苷酸来构建包含编码可变区序列的序列的核酸 (参见例如, Kolbinger, F., *Protein Engineering* 8:971-980(1993))。编码信号肽的序列也可引入核酸 (例如,在合成时,在插入载体时)。如果没有信号肽序列 (例如,通常而言不存在),可使用来自其它抗体的信号肽序列 (参见例如, Kettleborough, C. A., *Protein Engineering* 4:773-783(1991))。使用这些方法、本文所述的方法或其它合适方法,变体可容易地被制造。

[0335] 本发明涉及一种人源化免疫球蛋白,其对人类 CD52 具有结合特异性,且包含人源化轻链和人源化重链和 / 或其部分。在一个实施例中,人源化免疫球蛋白包含一种含有 SEQ ID NO:3 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:16 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:4 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:17 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:5 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:18 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:6 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:19 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:7 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:20 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:8 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:21 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:9 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:22 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:10 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:23 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:11 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:24 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;一种含有 SEQ ID NO:12 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:25 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链;或一种含有 SEQ ID NO:13 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的轻链和一种含有 SEQ ID NO:26 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs) 的重链。

[0336] 在一个实施例中,本发明的人源化免疫球蛋白包含重链 (H)-CDR1、H-CDR2、H-CDR3,轻链 (L)-CDR1、L-CDR2、和 L-CDR3,其氨基酸序列:a) 分别是 SEQ ID NOs:51、59、69、29、36、和 43;b) 分别是 SEQ ID NOs:50、60、69、29、37、和 43;c) 分别是 SEQ ID NOs:50、61、68、29、38、和 43;d) 分别是 SEQ ID NOs:50、61、69、29、36、和 43;e) 分别是 SEQ ID NOs:50、62、69、29、39、和 43;f) 分别是 SEQ ID NOs:52、61、70、30、40、和 43;g) 分别是 SEQ ID NOs:53、63、71、31、36、和 44;h) 分别是 SEQ ID NOs:54、64、71、31、36、和 45;i) 分别是 SEQ ID NOs:55、63、72、31、36、和 46;j) 分别是 SEQ ID NOs:56、65、73、32、41、和 47;k) 分别是 SEQ ID NOs:56、65、294、32、41、和 47,或 l) 分别是 SEQ ID NOs:56、66、74、33、41、和 48。

[0337] 在另一实施例中,本发明的人源化免疫球蛋白包含 H-CDR3 和 L-CDR3,其序列 a) 分别是 SEQ ID NOs:69 和 43;b) 分别是 SEQ ID NOs:68 和 43;c) 分别是 SEQ ID NOs:70 和 43;d) 分别是 SEQ ID NOs:71 和 44;e) 分别是 SEQ ID NOs:71 和 45;f) 分别是 SEQ ID

NOs :72 和 46 ;g) 分别是 SEQ ID NOs :73 和 47 ;h) 分别是 SEQ ID NOs :294 和 47 ;或 i) 分别是 SEQ ID NOs :74 和 48。

[0338] 在另一实施方式中,人源化免疫球蛋白对人类 CD52 具有结合特异性,且包含一种轻链,该轻链包含选自 SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47、和 SEQ ID NO :48、或其组合的一个或多个 CDRs ;和一种重链,其包含选自 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68、SEQ ID NO :69、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :74、和 SEQ ID NO :294、或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化免疫球蛋白不是 Campath®。

[0339] 在另一实施例中,对人类 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白包含一种轻链,该轻链包含 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12 或 SEQ ID NO :13 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs),和一种重链,该重链包含 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :26、或 SEQ ID NO :137 的一个或多个 CDRs (例如,所有三个 CDRs),其中该人源化免疫球蛋白不是 Campath®。

[0340] 本发明还涉及一种本文所述的人源化免疫球蛋白的人源化免疫球蛋白轻链。在一个实施例中,该人源化免疫球蛋白轻链包含选自 SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :31、SEQ ID NO :32、SEQ ID NO :33、SEQ ID NO :34、SEQ ID NO :35、SEQ ID NO :36、SEQ ID NO :37、SEQ ID NO :38、SEQ ID NO :39、SEQ ID NO :40、SEQ ID NO :41、SEQ ID NO :42、SEQ ID NO :43、SEQ ID NO :44、SEQ ID NO :45、SEQ ID NO :46、SEQ ID NO :47、和 SEQ ID NO :48、和其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化免疫球蛋白轻链不是 Campath®的轻链。例如,该人源化抗体具有 L-CDR1、L-CDR2、和 L-CDR3,其氨基酸序列 :a) 分别为 SEQ ID NOs :29、36、和 43 ;b) 分别为 SEQ ID NOs :29、37、和 43 ;c) 分别为 SEQ ID NOs :29、38、和 43 ;d) 分别为 SEQ ID NOs :29、36、和 43 ;e) 分别为 SEQ ID NOs :29、39、和 43 ;f) 分别为 SEQ ID NOs :30、40、和 43 ;g) 分别为 SEQ ID NOs :31、36、和 44 ;h) 分别为 SEQ ID NOs :31、36、和 45 ;i) 分别为 SEQ ID NOs :31、36、和 46 ;j) 分别为 SEQ ID NOs :32、41、和 47 ;或 k) 分别为 SEQ ID NOs :33、41、和 48。

[0341] 本发明还涉及一种人源化重链,其包含选自 SEQ ID NO :49、SEQ ID NO :50、SEQ ID NO :51、SEQ ID NO :52、SEQ ID NO :53、SEQ ID NO :54、SEQ ID NO :55、SEQ ID NO :56、SEQ ID NO :57、SEQ ID NO :58、SEQ ID NO :59、SEQ ID NO :60、SEQ ID NO :61、SEQ ID NO :62、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :67、SEQ ID NO :68、SEQ ID NO :69、SEQ ID NO :70、SEQ ID NO :71、SEQ ID NO :72、SEQ ID NO :73、SEQ ID NO :74、和 SEQ ID NO :294、或其组合的一个或多个 CDRs,其中该人源化免疫球蛋白重链不

是 Campath®的重链。例如,该人源化抗体具有 H-CDR1、H-CDR2、和 H-CDR3,其氨基酸序列:
a) 分别为 SEQ ID NOs :51、59、和 69 ;b) 分别为 SEQ ID NOs :50、60、和 69 ;c) 分别为 SEQ ID NOs :50、61、和 68 ;d) 分别为 SEQ ID NOs :50、61、和 69 ;e) 分别为 SEQ ID NOs :50、62、和 69 ;f) 分别为 SEQ ID NOs :52、61、和 70 ;g) 分别为 SEQ ID NOs :53、63、和 71 ;h) 分别为 SEQ ID NOs :54、64、和 71 ;i) 分别为 SEQ ID NOs :55、63、和 72 ;j) 分别为 SEQ ID NOs :56、65、和 73 ;k) 分别为 SEQ ID NOs :56、65、和 294 ;或 l) 分别为 SEQ ID NOs :56、66、和 74。

[0342] 在一个实施方式中,本发明的人源化抗体包含一种轻链,其包含 SEQ ID NOs :102、138、145-148、153-157、和 164-168 其中一个的可变区 (V_L) 序列。在一个相关实施方式中,该人源化抗体包含一种轻链,其氨基酸序列包含 SEQ ID NOs :273、275、278、280、和 282 其中之一或由其组成。

[0343] 在一个实施方式中,本发明的人源化抗体包含一种重链,其包含 SEQ ID NOs :103、136、137、139-144、149-152、和 158-163 其中一个的可变区 (V_H) 序列。在一个相关实施方式中,该人源化抗体包含一种重链,其氨基酸序列包含 SEQ ID NOs :272、274、276、277、279、和 281 其中一个或由其组成。

[0344] 在一些实施方式中,本发明的人源化抗体包含 V_H 和 V_L ,其氨基酸序列包含或由下列组成

[0345] a) 分别为 SEQ ID NOs :103 与 102 (4B10-H1/K1) ;

[0346] b) 分别为 SEQ ID NOs :136 与 138 (7F11-SFD1/K2) ;

[0347] c) 分别为 SEQ ID NOs :137 与 138 (7F11-SFD2/K2) ;

[0348] d) 分别为 SEQ ID NO :139 与 SEQ ID NOs :145-148 其中一个 (例如,分别为 SEQ ID NOs :139 与 146 (2C3-SFD1/K11) ;和分别为 SEQ ID NOs :139 与 147 (2C3-SFD1/K12)) ;

[0349] e) 分别为 SEQ ID NO :140 与 SEQ ID NOs :145-148 其中一个 ;

[0350] f) 分别为 SEQ ID NO :141 与 SEQ ID NOs :145-148 其中一个 ;

[0351] g) 分别为 SEQ ID NO :142 与 SEQ ID NOs :145-148 其中一个 ;

[0352] h) 分别为 SEQ ID NO :143 与 SEQ ID NOs :145-148 其中一个 ;

[0353] i) 分别为 SEQ ID NO :144 与 SEQ ID NOs :145-148 其中一个 ;

[0354] j) 分别为 SEQ ID NO :149 与 SEQ ID NOs :153-157 其中一个 (例如,分别为 SEQ ID NOs :149 与 155 (12G6-SFD1/K11) ;分别为 SEQ ID NOs :149 与 156 (12G6-SFD1/K12) ;和分别为 SEQ ID NOs :149 与 157 (12G6-SFD1/K13)) ;

[0355] k) 分别为 SEQ ID NO :150 与 SEQ ID NOs :153-157 其中一个 ;

[0356] l) 分别为 SEQ ID NO :151 与 SEQ ID NOs :153-157 其中一个 ;

[0357] m) 分别为 SEQ ID NO :152 与 SEQ ID NOs :153-157 其中一个 ;

[0358] n) 分别为 SEQ ID NO :158 与 SEQ ID NOs :164-168 其中一个 (例如,分别为 SEQ ID NOs :158 与 165 (9D9-H10/K12) ;和分别为 SEQ ID NOs :158 与 166 (9D9-H10/K13)) ;

[0359] o) 分别为 SEQ ID NO :159 与 SEQ ID NOs :164-168 其中一个 (例如,分别为 SEQ ID NOs :159 与 165 (9D9-H11/K12) ;和分别为 SEQ ID NOs :159 与 166 (9D9-H11/K13)) ;

[0360] p) 分别为 SEQ ID NO :160 与 SEQ ID NOs :164-168 其中一个 ;

[0361] q) 分别为 SEQ ID NO :161 与 SEQ ID NOs :164-168 其中一个 (例如,分别为 SEQ ID NOs :161 与 166 (9D9-H16/K13)) ;

[0362] r) 分别为 SEQ ID NO:162 与 SEQ ID NOs:164-168 其中一个 ;或

[0363] s) 分别为 SEQ ID NO:163 与 SEQ ID NOs:164-168 其中一个 (例如,分别为 SEQ ID NOs:163 与 166(9D9-H18/K13))。

[0364] 包含于括号的抗体在下列工作实施例中进一步叙述。

[0365] 在一个实施方式中,本发明的人源化抗体包含轻链 (LC) 和重链 (HC),其氨基酸序列包含或由下列组成 a) 分别为 SEQ ID NOs:273 和 272 ;b) 分别为 SEQ ID NOs:275 和 274 ;c) 分别为 SEQ ID NOs:278 和 276 ;d) 分别为 SEQ ID NOs:278 和 277 ;e) 分别为 SEQ ID NOs:280 和 279 ;或 f) 分别为 SEQ ID NOs:282 和 281。

[0366] 本发明还提供一种抗人 CD52 抗体 (除了在现有技术中已知的那些 (如果有)),其结合至与本文举例说明的抗体所结合的表位相同的表位,或与其竞争或交叉竞争。这些抗体可以是,例如,人源化的、嵌合的、或鼠抗体。例如,本发明提供一种抗人 CD52 抗体,其结合至与鼠抗体 8G3、4F7、9D9、11C11、3G7、5F7、12G6、23E6、2C3、7F11 和 4B10 以及这些鼠抗体的人源化和嵌合抗体的其中一个所结合的表位相同的表位,或与其中一个抗体竞争或交叉竞争。抗体结合至与参考抗体所结合的表位相同的表位的能力或与其竞争或交叉竞争的能力可如上文所述而确定。例如,我们发现由人源化抗体 2C3-SFD1/K12 和 12G6-SFD1/K12 所结合的 CD52 表位包含 SEQ ID NO:104 中的残基 7、8、和 11,且由人源化抗体 9D9-H16/K13 所结合的表位包含 SEQ ID NO:104 中的残基 4 和 11。因此,在一些实施方式中,本发明提供一种抗 CD52 抗体,其结合至与那些人源化抗体所结合的表位相同的表位,或与其竞争或交叉竞争。

[0367] 如果希望,例如,为诊断或检测目的 (例如,成像以允许,比如治疗监测),人源化免疫球蛋白 (例如,其抗原结合片段) 可包含可检测的标记。合适的可检测标记和人源化免疫球蛋白或其抗原结合片段的标记方法为本领域所已知。合适的可检测标记包括,例如,放射性同位素 (例如,铟 -111、镅 -99m 或碘 -131)、正电子发射型标记 (例如,氟 -19)、顺磁离子 (例如,钆 (III)、锰 (II))、表位标记 (标签)、亲和性标记 (例如,生物素、抗生物素蛋白)、自旋标记、酶、荧光基团或化学发光基团。当未使用标记时,复合物形成 (例如,在人源化免疫球蛋白和人类 CD52 之间) 可通过表面等离子共振、ELISA、FACS、或其它合适方法来确定。

[0368] 用于本发明的抗 CD52 抗体也可经由例如,化学反应或基因修饰而共轭至其它部分 (moieties) (例如,聚乙二醇化部分),上述部分改善抗体的药物动力学特性,例如半衰期。在一些实施方式中,用于本发明的抗 CD52 抗体可经由例如,化学共轭或基因修饰 (例如,将框内细胞因子的编码序列附加至抗体编码序列,由此产生抗体:细胞因子融合蛋白) 而连接至合适的细胞因子。

[0369] 本发明还涉及一种免疫偶联,其中本发明的人源化免疫球蛋白 (例如,其抗原结合片段) 偶合至另一治疗剂,例如生物活性化合物 (例如,细胞因子、超抗原、细胞毒性剂和毒素)。例如,对人类 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白 (例如,其抗原结合片段) 可偶合至生物蛋白,植物或细菌来源的分子 (或其衍生物)、白介素 -2 抗体或白喉毒素抗体。

[0370] 小鼠单克隆免疫球蛋白

[0371] 如本文所述,已制造出对人类 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆免疫球蛋白。本

发明的人源化和嵌合抗体可衍生自本发明的小鼠单克隆抗体。也就是说,在一些实施方式中,本发明的人源化和嵌合抗 CD52 抗体包含取自本发明小鼠单克隆抗体的序列,例如一个或多个 CDR 序列。本发明的小鼠单克隆免疫球蛋白包含具有与已知的鼠抗 CD52 单克隆抗体的 CDR 氨基酸序列(例如,与 CF1D12)不同的 CDR 氨基酸序列的轻链和重链。

[0372] 本文所用的术语“小鼠单克隆免疫球蛋白”表示一种包含鼠抗人 CD52 抗体的轻链 CDRs(L-CDR1、L-CDR2 和 L-CDR3) 和重链 CDRs(H-CDR1、H-CDR2 和 H-CDR3) 以及鼠来源的骨架区和恒定区的免疫球蛋白。小鼠单克隆免疫球蛋白是一种例如通过使用杂交瘤技术或重组方法所制备的单一特异性的均质性(homogeneous) 抗体。

[0373] 本发明涉及一种本文所述的小鼠单克隆免疫球蛋白,其包含小鼠单克隆免疫球蛋白的抗原结合片段(即,部分)、小鼠单克隆免疫球蛋白的轻链、小鼠单克隆免疫球蛋白的重链、以及这些重链和轻链的片段。在一个特定的实施方式中,小鼠单克隆抗体是鼠 8G3.25.3.5(也称为 GENZ 8G3.25.3.5 或 8G3)、鼠 GMA 4G7.F3(也称为 4G7.F3 或 4G7)、鼠 GMA 9D9.A2(也称为 9D9.A2 或 9D9)、鼠 GMA 11C11.C5(也称为 11C11.C5 或 11C11)、鼠 GMA3G7.E9(也称为 3G7.E9 或 3G7)、鼠 5F7.1.1.4(也称为 GENZ 5F7.1.1.4 或 5F7)、鼠 12G6.15.1.2(也称为 GENZ 12G6.15.1.2 或 2G6)、鼠 23E6.2.2.1(也称为 GENZ 23E6.2.2.1 或 23E6)、鼠 2C3.3.8.1(也称为 GENZ 2C3.3.8.1 或 2C3)、鼠 7F11.1.9.7(也称为 GENZ 7F11.1.9.7 或 7F11)、或是鼠 4B10.1.2.4(也称为 GENZ 4B10.1.2.4 或 4B10)。本发明涉及一种成熟小鼠单克隆免疫球蛋白,例如经过处理以移除重链和轻链信号肽之后的小鼠单克隆免疫球蛋白和/或涉及糖基化免疫球蛋白。本发明还涉及一种未成熟或前体蛋白,例如包含信号肽的小鼠免疫球蛋白轻链或小鼠免疫球蛋白重链。本发明还涉及一种编码这些未成熟或成熟蛋白的核酸分子(例如,载体),涉及包含此种核酸的宿主细胞,并涉及这些未成熟和成熟蛋白的制造方法。

[0374] 对人类 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆免疫球蛋白的结合功能可使用任何合适方法检测,例如,使用监测小鼠单克隆免疫球蛋白与人类 CD52(例如,包含人类 CD52 的膜部分,或携带人类 CD52 的细胞,例如人类 T 细胞、人类 B 细胞、包含编码人类 CD52 的核酸的 CHO 细胞或重组宿主细胞;具有 CD52 氨基酸序列的肽(例如,合成肽))之间复合物形成的检定。

[0375] 本文还提供鼠免疫球蛋白的部分,其包含轻链、重链以及轻链和重链的部分。这些免疫球蛋白部分可得自或衍生自免疫球蛋白(例如,通过还原和/或裂解),或者编码具有期望性质(例如,结合人类 CD52,序列相似性)的一部分免疫球蛋白或其链的核酸可被制备或表达。它们可通过,例如相关部分的重新合成所制备。包含鼠来源的期望部分(例如,抗原结合区域、CDR、FR、和/或 C 区)的小鼠单克隆免疫球蛋白可使用合成和/或重组的核酸来制备,以制得编码期望的单克隆免疫球蛋白链的构建体(例如,cDNA)。为制备一部分链,可在期望位置引入一个或多个终止密码子。也可将编码信号肽的序列引入核酸(例如,在合成时,在插入载体中时)。如果没有天然信号肽序列,可使用来自其它抗体的信号肽序列(参见例如,Kettleborough, C. A., Protein Engineering 4:773-783(1991))。使用这些方法、本文所述的方法或其它合适方法,可以很容易地制备出变体。

[0376] 在一个实施方式中,本发明的小鼠单克隆免疫球蛋白包含含有 SEQ ID NO:3 的轻链和含有 SEQ ID NO:16 的重链;含有 SEQ ID NO:4 的轻链和含有 SEQ ID NO:17 的重链;

含有 SEQ ID NO :5 的轻链和含有 SEQ ID NO :18 的重链 ;含有 SEQ ID NO :6 的轻链和含有 SEQ ID NO :19 的重链 ;含有 SEQ ID NO :7 的轻链和含有 SEQ ID NO :20 的重链 ;含有 SEQ ID NO :8 的轻链和含有 SEQ ID NO :21 的重链 ;含有 SEQ ID NO :9 的轻链和含有 SEQ ID NO :22 的重链 ;含有 SEQ ID NO :10 的轻链和含有 SEQ ID NO :23 的重链 ;含有 SEQ ID NO :11 的轻链和含有 SEQ ID NO :24 的重链 ;含有 SEQ ID NO :12 的轻链和含有 SEQ ID NO :25 的重链 ;或含有 SEQ ID NO :13 的轻链和含有 SEQ ID NO :26 的重链。

[0377] 在另一实施方式中,本发明还涉及一种对人类 CD52 具有结合特异性的小鼠单克隆抗体,其包含选自 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、和 SEQ ID NO :13 的轻链可变区 ;以及选自 SEQ ID NO :16、SEQ ID NO :17、SEQ ID NO :18、SEQ ID NO :19、SEQ ID NO :20、SEQ ID NO :21、SEQ ID NO :22、SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :24、SEQ ID NO :25、和 SEQ ID NO :26 的重链可变区。

[0378] 如果希望,例如,为诊断或检定目的(例如,成像),小鼠单克隆免疫球蛋白(例如,其抗原结合片段)可包含可检测标记。合适的可检测标记和小鼠单克隆免疫球蛋白的标记方法是本领域内所已知的。合适的可检测标记包括,例如,放射性同位素(例如,铟-111、锝-99m 或碘-131)、正电子放射型标记(例如,氟-19)、顺磁离子(例如,钆(III)、锰(II))、表位标记(标签)、亲和性标记(例如,生物素、抗生物素蛋白)、自旋标记、酶、荧光基团或化学发光基团。当未使用标记时,复合物形成(例如,在小鼠单克隆免疫球蛋白和 CD52 之间)可通过表面等离子共振或其它合适的方法来确定。上述针对本发明的人源化抗体的所有合适方法和技术也可在本文中使用。

[0379] 嵌合免疫球蛋白

[0380] 如本文所叙述,已制造对人类 CD52 具有结合特异性的嵌合免疫球蛋白。该嵌合免疫球蛋白包含嵌合轻链和 / 或嵌合重链,其氨基酸序列不同于对人类 CD52 具有结合特异性的已知嵌合抗体的氨基酸序列。

[0381] 本文所用的术语“嵌合免疫球蛋白”是指一种重组蛋白,其包含含有衍生自一种物种的抗体的互补决定区(CDRs)的可变区,该抗体优选为鼠抗人 CD52 单克隆抗体,而抗体分子的恒定区衍生自不同物种的抗体,例如来自人类抗体。

[0382] 本发明涉及本文所述的嵌合免疫球蛋白,其包含嵌合免疫球蛋白的抗原结合片段(即,部分)、嵌合免疫球蛋白的嵌合轻链和嵌合重链以及这些嵌合轻链和重链的片段。本发明涉及一种成熟嵌合免疫球蛋白,例如经过处理以移除重链和轻链信号肽之后的嵌合免疫球蛋白和 / 或涉及糖基化免疫球蛋白。本发明还涉及一种未成熟或前体蛋白质,例如包含信号肽的嵌合重链。本发明还涉及编码这些未成熟或成熟蛋白的核酸分子(例如,载体),涉及包含此种核酸的宿主细胞,并且涉及这些未成熟及成熟蛋白的制备方法。

[0383] 对人类 CD52 具有结合特异性的嵌合免疫球蛋白的结合功能可使用任何合适方法检测,例如使用监测嵌合免疫球蛋白与人类 CD52(例如,包含人类 CD52 的膜部分,或在携带人类 CD52 的细胞上,例如人类 T 细胞、人类 B 细胞、包含编码人类 CD52 的核酸的 CHO 细胞或重组宿主细胞、具有 CD52 氨基酸序列的肽(例如,合成肽))之间复合物形成的检定。

[0384] 本文还提供嵌合免疫球蛋白的部分,其包含轻链、重链以及轻链和重链的部分。这些免疫球蛋白部分可得自或衍生自免疫球蛋白(例如,通过还原和 / 或裂解),或者编码具

有期望性质（例如，结合人类 CD52，序列相似性）的一部分免疫球蛋白或其链的核酸可被制造或表达。它们可通过例如一部分的重新合成所制备。包含人类及非人类来源的期望部分（例如，抗原结合区、CDR、FR、和 / 或 C 区）的嵌合免疫球蛋白可使用合成和 / 或重组核酸来制备，以制得编码期望的嵌合链的构建体（例如，cDNA）。为制备一部分链，可在期望位置引入一个或多个终止密码子。也可将编码信号肽的序列引入核酸（例如，在合成时，在插入载体中时）。如果没有天然信号肽序列（例如，通常不存在），可使用来自其它抗体的信号肽序列（参见例如，Kettleborough, C. A., Protein Engineering 4:773-783(1991)）。使用这些方法、本文所述的方法或其它合适方法，可以容易地制造出变体。

[0385] 在一个实施方式中，本发明的嵌合免疫球蛋白包含 SEQ ID NO:3 的轻链可变区和 SEQ ID NO:16 的重链可变区；SEQ ID NO:4 的轻链可变区和 SEQ ID NO:17 的重链可变区；SEQ ID NO:5 的轻链可变区和 SEQ ID NO:18 的重链可变区；SEQ ID NO:6 的轻链可变区和 SEQ ID NO:19 的重链可变区；SEQ ID NO:7 的轻链可变区和 SEQ ID NO:20 的重链可变区；SEQ ID NO:8 的轻链可变区和 SEQ ID NO:21 的重链可变区；SEQ ID NO:9 的轻链可变区和 SEQ ID NO:22 的重链可变区；SEQ ID NO:10 的轻链可变区和 SEQ ID NO:23 的重链可变区；SEQ ID NO:11 的轻链可变区和 SEQ ID NO:24 的重链可变区；SEQ ID NO:12 的轻链可变区和 SEQ ID NO:25 的重链可变区；或是 SEQ ID NO:13 的轻链可变区和 SEQ ID NO:26 的重链可变区。

[0386] 本发明还涉及一种对人类 CD52 具有结合特异性的嵌合抗体，其包含选自以下部分的轻链可变区序列：SEQ ID NO:3 的轻链可变区、SEQ ID NO:4 的轻链可变区、SEQ ID NO:5 的轻链可变区、SEQ ID NO:6 的轻链可变区、SEQ ID NO:7 的轻链可变区、SEQ ID NO:8 的轻链可变区、SEQ ID NO:9 的轻链可变区、SEQ ID NO:10 的轻链可变区、SEQ ID NO:11 的轻链可变区、SEQ ID NO:12 的轻链可变区和 SEQ ID NO:13 的轻链可变区，以及选自以下部分的重链可变区序列：SEQ ID NO:16 的重链可变区、SEQ ID NO:17 的重链可变区、SEQ ID NO:18 的重链可变区、SEQ ID NO:19 的重链可变区、SEQ ID NO:20 的重链可变区、SEQ ID NO:21 的重链可变区、SEQ ID NO:22 的重链可变区、SEQ ID NO:23 的重链可变区、SEQ ID NO:24 的重链可变区、SEQ ID NO:25 的重链可变区和 SEQ ID NO:26 的重链可变区。

[0387] 本发明还涉及一种嵌合轻链，其包含 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、或 SEQ ID NO:13 的可变区。

[0388] 本发明还涉及一种嵌合重链，其包含 SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26 的可变区。

[0389] 如果希望，例如，为诊断或检定目的（例如，成像），嵌合免疫球蛋白（例如，其抗原结合片段）可包含可检测的标记。合适的可检测标记和嵌合免疫球蛋白的标记方法是本领域内所已知的。合适的可检测标记包含，例如，放射性同位素（例如，铟 -111、镓 -99m 或碘 -131）、正电子放射型标记（例如，氟 -19）、顺磁离子（例如，钆 (III)、锰 (II)）、表位标记（标签）、亲和性标记（例如，生物素、抗生物素蛋白）、自旋标记、酶、荧光基团或化学发光基团。当未使用标记时，复合物形成（例如，在嵌合免疫球蛋白和人类 CD52 之间）可通过表面等离子共振或其它合适的方法而确定。上文针对本发明的人源化抗体所叙述的所有

合适方法和技术可在本文中使用的。

[0390] 核酸和重组载体

[0391] 本发明还涉及一种分离的和 / 或重组的 (包含, 例如, 基本上纯的) 核酸, 其包含编码本发明的人源化免疫球蛋白、人源化轻链、人源化重链、小鼠单克隆免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白轻链、小鼠免疫球蛋白重链、嵌合免疫球蛋白、嵌合轻链或嵌合重链的序列。

[0392] 本文称为“分离”或“纯化”的核酸是已从其起源的基因组 DNA 或细胞 RNA 的核酸 (例如, 在它们存在于细胞中或存在于例如文库的核酸混合物中时) 分离的核酸, 并且包含通过本文所述的方法或其它合适方法所得到的核酸, 包括大体上纯的核酸, 通过化学合成、通过生物和化学方法的组合所制备的核酸, 和分离的重组核酸 (参见例如, Daugherty, B. L. 等人, *Nucleic Acids Res.*, 19(9) :2471-2476(1991) ; Lewis, A. P. and J. S. Crowe, *Gene*, 101 :297-302(1991)) 。

[0393] 本文称为“重组”的核酸是通过重组 DNA 方法所制备的核酸, 其包含通过依赖于人工重组方法的步骤而产生的那些核酸 (例如聚合酶链反应 (PCR) 和 / 或使用限制性酶克隆至载体中) 。“重组”核酸也为那些产生于在细胞自然机制过程中发生的重组事件, 但在将设计的核酸引至细胞之后对其进行选择, 以允许并使得期望的重组事件可发生。

[0394] 本发明还更具体地涉及一种分离的和 / 或重组的核酸, 其包含编码对人类 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白或嵌合免疫球蛋白的核苷酸序列 (例如, 本发明的人源化免疫球蛋白, 其中非人类部分 (例如, CDRs) 衍生自鼠抗 CD52 单克隆抗体 ; 本发明的小鼠免疫球蛋白 ; 或本发明的嵌合免疫球蛋白, 其中非人类部分 (例如, V_H 和 V_L) 衍生自鼠抗 CD52 单克隆抗体) 或其 (例如, 其重链或轻链) 部分 (例如, 抗原结合部分)) 。

[0395] 本发明的核酸可用于制备对人类 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白、对人类 CD52 具有结合特异性的小鼠免疫球蛋白和对人类 CD52 具有结合特异性的嵌合免疫球蛋白。例如, 一种核酸 (例如, DNA (例如 cDNA), 或 RNA) 或一个或多个编码本发明的人源化免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白或嵌合免疫球蛋白的核酸可引入合适的构建体 (例如, 重组载体), 以在合适的宿主细胞中进一步操作序列或制备所编码的免疫球蛋白。

[0396] 本发明还提供适合用于表达对人类 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白、对人类 CD52 具有结合特异性的小鼠免疫球蛋白或对人类 CD52 具有结合特异性的嵌合免疫球蛋白的构建体或载体 (例如, 表达载体) 。多种载体为可得到的, 其包括在宿主细胞中以单拷贝或多拷贝维持的载体, 或整合至宿主细胞的染色体的载体。可将构建体或载体引入至合适的宿主细胞中, 可制备出表达本发明的人源化免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白或嵌合免疫球蛋白的细胞并将其保持在培养物中。单个载体或多个载体可用于表达对人类 CD52 具有结合特异性的人源化免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白或嵌合免疫球蛋白。

[0397] 合适的表达载体, 例如哺乳动物细胞表达载体, 也可包含数个组成部分, 包括, 但不限于下列的一种或多种 : 复制起点 ; 选择性标记基因 ; 一个或多个表达控制元件, 例如转录控制元件 (例如, 启动子、增强子、终止子) 、和 / 或一个或多个翻译信号 ; 用于膜靶向或分泌的信号序列或前导序列。在一个构建体或载体中, 信号肽序列可由构建体或载体或其它来源提供。例如, 可使用免疫球蛋白的转录和 / 或翻译信号来指导表达。

[0398] 可提供启动子用于在合适的宿主细胞中表达。启动子可以是组成型或是诱导型。

例如,启动子可以可操作地连接至编码人源化免疫球蛋白或免疫球蛋白链的核酸,使得其指导所编码的多肽的表达。多种适合于原核生物宿主的启动子(例如,大肠杆菌的 lac、tac、T3、T7 启动子)和多种适合于真核生物宿主的启动子(例如,酵母醇脱氢酶 (ADH1)、SV40、CMV) 是可得到的。本领域的技术人员能够选择适当的启动子以表达本发明的抗 CD52 抗体或其部分。

[0399] 此外,载体(例如,表达载体)通常包含选择性标记,以选择携带载体的宿主细胞,并且在可复制载体的情况下,包含复制起点。编码赋予抗生素抗性或抗药性的产物的基因是通常的选择性标记并且可用于原核生物中(例如, β -内酰胺酶基因(氨苄青霉素抗性)、Tet 基因(四环素抗性))和真核细胞中(例如,新霉素(neomycin)(G418 或遗传霉素(geneticin))、gpt(霉酚酸)、氨苄青霉素、或潮霉素抗性基因)。二氢叶酸还原酶标记基因允许在多种宿主中的甲氨蝶呤选择。编码宿主的营养缺陷标记的基因产物的基因(例如,LEU2、URA3、HIS3)常用作酵母菌中的选择性标记。还包含病毒(例如,杆状病毒)或噬菌体载体、和能够整合至宿主细胞基因组的载体(例如反转录病毒载体)的使用。

[0400] 因此,本发明涉及一种分离的核酸分子,其编码本发明的人源化免疫球蛋白、人源化轻链、人源化重链、小鼠免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白轻链、小鼠免疫球蛋白重链、嵌合免疫球蛋白、嵌合轻链或嵌合重链。本发明还涉及一种分离的核酸分子,其编码免疫球蛋白的抗原结合部分及其链。由本发明的核酸所编码的多肽序列在上文和以下工作实施例中描述。

[0401] 在一些实施方式中,本发明的核酸和载体编码本发明的重链(或其抗原结合部分)或轻链(或其抗原结合部分)。可使用包含编码重链的核酸与编码轻链的核酸的宿主细胞以制备包含重链和轻链(或抗体的抗原结合部分)的抗体。可将编码重链的核酸与编码轻链的核酸置于单独的表达载体中。也可将它们置于单个表达载体,受相同或不同的表达控制。参见例如,Cabilly 美国专利第 6,331,415 号;Fang 美国专利第 7,662,623 号。

[0402] 对人类 CD52 具有特异性的免疫球蛋白的制造方法

[0403] 本发明的另一方面涉及一种本发明的抗人 CD52 抗体的制造方法。本发明的抗体可,例如通过在适合的宿主细胞中表达编码抗体的一个或多个重组核酸而制备。宿主细胞可使用任何合适的方法制造。例如,可将本文所叙述的表达构建体(例如,该一个或多个载体,例如,哺乳动物细胞表达载体)引入至合适的宿主细胞,并且可在适合构建体或载体表达的条件下维持所产生的细胞(例如,在培养物中,在动物中,在植物中)。合适的宿主细胞可以是原核生物的,包括细菌细胞例如大肠杆菌(例如,菌种 DH5 α TM(Invitrogen, Carlsbad, CA)),枯草杆菌(*B. subtilis*)和/或其它合适的细菌;真核生物细胞,例如真菌或酵母菌细胞(例如,巴氏毕赤酵母菌(*Pichia pastoris*)、曲霉菌(*Aspergillus* sp.)、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母菌(*Schizosaccharomyces pombe*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)),或其它低级真核细胞,和高级真核细胞例如来自昆虫的那些细胞(例如,*Drosophila* Schnieder S2 细胞、Sf9 昆虫细胞 W0 94/26087(0' Connor)、TN5B1-4(HIGH 5)昆虫细胞(Invitrogen),哺乳动物(例如,COS 细胞,例如 COS-1(ATCC Accession No. CRL-1650)和 COS-7(ATCC Accession No. CRL-1651)、CHO(例如,ATCC Accession No. CRL-9096)、CHO DG44(Urlaub, G. 和 Chasin, LA., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 77(7):4216-4220(1980))、293(ATCC Accession No. CRL-1573)、

HeLa(ATCC Accession No. CCL-2)、CV1(ATCC Accession No. CCL-70)、WOP(Dailey, L., 等人, J. Virol., 54 :739-749(1985))、3T3、293T(Pear, W. S., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90 :8392-8396(1993))、NS0 细胞、SP2/0 细胞、HuT 78 细胞和类似细胞)),或植物(例如,烟草、浮萍属(浮萍)(Lemna(duckweed))、和藻类),(参见,例如,Ausubel, F. M. 等人, eds. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993))。在一些实施方式中,该宿主细胞不是多细胞生物(例如,植物或动物)的一部分,例如,其是分离的宿主细胞或者是细胞培养物的一部分。

[0404] 本发明还涉及包含本发明的核酸例如载体(例如,表达载体)的细胞。例如,可将编码人源化免疫球蛋白的重链和轻链、小鼠免疫球蛋白的重链和轻链、或嵌合免疫球蛋白的重链和轻链的核酸(即,一个或多个核酸),或包含此种核酸的构建体(即,一个或多个构建体,例如,一个或多个载体)通过适合于所选择宿主细胞的方法(例如,转化、转染、电穿孔法、感染)引入至合适的宿主细胞中(其中所编码的免疫球蛋白对人类 CD52 具有结合特异性),且核酸被或变为可操作地连接至一个或多个表达控制元件(例如,在载体中,在通过细胞中的处理所产生的构建体中,整合至宿主细胞基因组中)。可将宿主细胞维持在适合表达的条件下(例如,在诱导物、添加有适当盐类、生长因子、抗生素、营养补充物等的合适培养基的存在下),由此制备所编码的多肽。如果希望,可将所编码的蛋白(例如,人源化免疫球蛋白、小鼠免疫球蛋白、嵌合免疫球蛋白)从,例如,宿主细胞、培养基、或乳液中分离。此方法包含在转基因动物或植物(例如,烟草)的宿主细胞(例如,乳腺细胞)中的表达(参见,例如,WO 92/03918)。

[0405] 可制备融合蛋白,其中免疫球蛋白部分(例如,人源化免疫球蛋白;免疫球蛋白链)在 N 端位置、C 端位置或融合蛋白内部连接至非免疫球蛋白部分(即,在自然界未发现存在于免疫球蛋白的部分)。例如,一些实施方式中,可通过将编码免疫球蛋白序列的核酸插入至合适的表达载体,例如 pET 载体(例如, pET-15b, Novagen)、噬菌体载体(例如, pCANTAB 5E, Pharmacia)、或其它载体(例如, pRIT2T 蛋白 A 融合载体, Pharmacia)而制备。可将得到的构建体引入合适的宿主细胞中以表达。在表达时,可通过合适的亲和基质(affinity matrix)从细胞溶解产物分离或纯化一些融合蛋白(参见,例如, Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel, F. M. 等人, Eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8(1991))。

[0406] 本发明涉及一种宿主细胞,其包含编码本文提供的免疫球蛋白(例如,本发明的人源化免疫球蛋白、人源化轻链或人源化重链、小鼠免疫球蛋白、鼠轻链或鼠重链、嵌合免疫球蛋白、嵌合重链、或嵌合轻链)的重组核酸。本发明还涉及一种宿主细胞,其包含编码免疫球蛋白的抗原结合部分或其链的重组核酸。在一些实施方式中,该宿主细胞包含本文所提及的本发明的重组载体(例如,表达载体,哺乳动物细胞表达载体)。

[0407] 本发明还涉及一种本发明的免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽链的制备方法。在一个实施方式中,该方法包括将本文所叙述的本发明的宿主细胞(例如,包含一个或多个编码免疫球蛋白或多肽链(例如,本发明的轻链和重链、仅轻链、或仅重链)的分离的核酸的宿主细胞)维持在适合免疫球蛋白或多肽链表达的条件下。例如,宿主细胞可培养于基质上或于悬浮液中。在一些实施方式中,该方法进一步包含纯化或分离免疫球蛋白或多肽链的步骤。

[0408] 本发明还涉及一种通过噬菌体呈现法来制备免疫球蛋白的方法。例如,可淘选 CD52 抗原上的天然抗体噬菌体展示库。或者,可使用通过导向选择的免疫球蛋白制备方法(美国专利申请 US 2006-0251658 A1.)。可产生围绕例如已知的抗 CD52 抗体的固定重链(和/或轻链)CDR3 区域建立的定制库(custom library)。重链和轻链的 CDR1 和 CDR2 区域可来源于天然集合(naïve repertoire)(Osburn 等人, Methods, 36 :61-68(2005))。在一个实施方式中,抗 CD52ScFvs 可由 ScFv 天然抗体库产生,此抗体库用于获得具有期望的结合性质的鼠-人嵌合抗体。可对这些抗体库进行筛选以得到具有期望的结合性质的抗体。可使用 ScFv 噬菌体库。例如,如在 Vaughan 等人(1996)中所述,可基本上依循一系列的重组人类 CD52 上的重复选择循环而从 scFv 引导选择库分离出识别人类 CD52 的 ScFvs。简而言之,在与抗体库培养之后,预先偶合至顺磁珠的固定化抗原,以及结合的噬菌体可通过磁分离而回收,而未结合的噬菌体则被冲掉。接着可将结合的噬菌体挽回,如在 Vaughan 等人(1996)中所述,并重复选择过程。

[0409] 在一个特定的实施方式中,文库构建为,由以单链形式融合至天然人类轻链可变区集合的鼠抗 CD52 抗体的整个重链可变区所组成。在选择之后,鉴定出互补于小鼠重链可变区的人类轻链可变区池(pool)。接着构建文库,该文库由以上选择的人类轻链可变区集合所组成,该人类轻链可变区集合以单链形式融合至由天然人类 CDR1 和 CDR2 区域以及来自鼠抗 CD52 抗体重链可变区的固定 CDR3 区域所组成的嵌合重链可变区。在选择 CD52 结合物之后,选择最佳结合克隆。6 个 CDR 区域中的五个可以是人类来源,而重链可变区的 CDR-3 可以与小鼠重链可变区的原先 CDR3 相同。

[0410] 根据制造商建议,可使用偶合至 DYNABEADS M-270 胺(Dyna1)的 CD52 进行选择。或者,使用生物素化 CD52 的选择可使用一级胺特定试剂琥珀酰亚胺基-6-(生物素氨基)己酸酯(succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate)依循制造商说明书(EZ link NHS LC Biotin, Pierce)而制备。

[0411] 来自选择的输出可基于竞争检定在高通量筛选中以细胞周质制备品进行测试,此竞争检定测量存在于细胞周质制备品中的 scFvs 竞争结合至 CD52 的能力。

[0412] 可将能够在高通量筛选中竞争的样品进行 DNA 测序,如在 Vaughan 等人(1996)及 Osburn 等人(1996)所叙述。克隆接着将会被表达和纯化为 scFvs 或 IgGs,并评估其结合 CD52、中和 CD52 或其组合的能力,例如,使用检定如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)检定和补体依赖性细胞毒性(CDC)检定。经纯化的 scFv 制备品可接着如 WO 01/66754 的实例 3 中所述来制备。纯化 scFv 制备品的蛋白浓度使用 BCA 方法(Pierce)来测定。可使用类似方法以筛选固定免疫球蛋白重链或轻链(或 V_H 或 V_L)的最佳配对者(相对链)。

[0413] 在一个特定的实施方式中,本发明涉及一种分泌对人类 CD52 具有结合特异性的单克隆抗体的杂交瘤的制造方法,其包括将 CD52 转基因小鼠的淋巴细胞施用至具有与人类 CD52 转基因小鼠相同的品系(例如,CD1)的非转基因小鼠,由此产生免疫型非转基因小鼠。该免疫型非转基因小鼠的脾细胞与永生细胞接触,由此产生融合细胞,并将该融合细胞维持在产生分泌对人类 CD52 具有结合特异性的单克隆抗体的杂交瘤的条件下,由此产生分泌对人类 CD52 具有结合特异性的单克隆抗体的杂交瘤。

[0414] 包含毒素部分或毒素的免疫球蛋白

[0415] 本发明还涉及包含毒素部分或毒素的免疫球蛋白。合适的毒素部分包含毒素（例如，表面活性毒素，细胞毒素）。毒素部分或毒素可使用任何合适的方法连接或结合至免疫球蛋白。例如，毒素部分或毒素可直接或经由合适的连接体（linker）共价地结合至免疫球蛋白。合适的连接体可包含不可裂解或可裂解的连接体，例如，pH 可裂解的连接体或包含细胞酶（例如，细胞酯酶、细胞蛋白酶例如组织蛋白酶 B）裂解部位的连接体。此种可裂解连接体可用于制备在免疫球蛋白内化后能释出毒素部分或毒素的免疫球蛋白。

[0416] 可使用多种方法以将毒素部分或毒素连接或结合至免疫球蛋白。所选择的特定方法将取决于毒素部分或毒素以及所要连接或结合的免疫球蛋白。如果需要，可使用包含末端官能团的连接体来连接免疫球蛋白与毒素部分或毒素。一般，结合是通过将包含反应官能团（或被修饰以包含反应官能团）的毒素部分或毒素与连接体或是直接与免疫球蛋白反应而完成。共价键通过使包含（或被修饰以包含）化学部分或官能团（其在适当的条件下可与第二化学基团反应由此形成共价键）反应而形成。如果需要，可使用任何合适的方法将适当的反应化学基团加至免疫球蛋白或至连接体。（参见，例如，Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press; San Diego, CA(1996).)。许多合适的反应化学基团组合为本领域内所已知，例如胺基可与亲电子基团例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素（氯、溴、氟、碘）、N-羟基琥珀酰亚胺酯（NHS）、及其类似物反应。硫醇可与马来酰亚胺、碘乙酰（iodoacetyl）、丙烯酰、吡啶基二硫化物、5-硫代-2-硝基苯甲酸硫醇（5-thiol-2-nitrobenzoic acid thio）（TNB-硫醇）、及其类似物反应。醛官能团可偶合至含胺或含酰肼分子，且叠氮基可与三价磷基团反应以形成氨基磷酸酯或磷酰亚胺连接。向分子中引入活化基团的合适方法为本领域内所已知（参见例如，Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press; San Diego, CA(1996)）。

[0417] 合适毒素部分和毒素包括，例如，类美坦素（maytansinoid）（例如，美登素醇（maytansinol），例如，DM1, DM4）、紫杉烷、加利车霉素（calicheamicin）、倍癌霉素（duocarmycin）、或其衍生物。类美坦素可以为，例如，美登素醇或美登素醇类似物。美登素醇类似物的实例包含具有经修饰的芳香环（例如，C-19-去氯基（dechloro）、C-20-去甲氧基、C-20-酰氧基）的那些和在其它位置具有修饰（例如，C-9-CH₃、C-14-烷氧基甲基、C-14-羟甲基或乙酰氧基甲基、C-15-羟基/酰氧基、C-15-甲氧基、C-18-N-去甲基、4, 5-脱氧基）的那些。美登素醇和美登素醇类似物叙述于，例如，美国专利第 5, 208, 020 号和第 6, 333, 410 号中，其内容并入本文做为参考。美登素醇可使用，例如，N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶二硫基)丙酸酯（也已知为 N-琥珀酰亚胺基 4-(2-吡啶二硫基)戊酸酯（或 SPP））、4-琥珀酰亚胺基-氧代羰基-a-(2-吡啶二硫基)-甲苯（SMPT）、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫基)丁酸酯（SDPB）、2-亚氨基硫烷（2-iminothiolane）、或 S-乙酰基丁二酸酐而偶合至抗体或抗体片段。紫杉烷可以是，例如，紫杉醇、泰索帝（taxotere）、或新颖紫杉烷（参见，例如，WO 01/38318）。加利车霉素可以是，例如，一种溴-复合加利车霉素（例如， α 、 β 、或 γ 溴-复合）、一种碘-复合加利车霉素（例如， α 、 β 、或 γ 碘-复合），或是其类似物和模拟物。溴-复合加利车霉素包含 I1-BR、I2-BR、I3-BR、I4-BR、J1-BR、J2-BR 和 K1-BR。碘-复合加利车霉素包含 I1-I、I2-I、I3-I、J1-I、J2-I、L1-I 和 K1-I。加利车霉素及其变体、类似物、模拟物在，例如美国专利第 4, 970, 198 ; 5, 264, 586 ; 5, 550, 246 ; 5, 712, 374、和 5, 714, 586 号中描述，其各自内容均并入本文做为参考。倍癌霉素类似物

(例如, KW-2189、DC88、DC89 CBI-TMI、及其衍生物) 在, 例如美国专利第 5,070,092 号、美国专利第 5,187,186 号、美国专利第 5,641,780 号、美国专利第 5,641,780 号、美国专利第 4,923,990 号、和美国专利第 5,101,038 号中描述, 其各自内容均并入本文做为参考。

[0418] 其它毒素的实例包含, 但不限于抗代谢物(例如, 甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氮烯咪胺(5-fluorouracil decarbazine)), 烷化剂(例如, 二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、thioepa 苯丁酸氮芥、CC-1065(参见美国专利第 5,475,092、5,585,499、5,846,545 号)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)及洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素 C、和顺式-二氯二氨铂(II)(DDP)顺铂)、葱环类(例如, 柔红霉素(先前为道诺霉素)和阿霉素), 抗生素(例如, 更生霉素(先前为放线菌素)、博莱霉素、光神霉素、丝裂霉素、嘌呤霉素氨基茴霉素(puromycin anthramycin)(AMC)、倍癌霉素及其类似物或衍生物, 和抗有丝分裂剂(例如, 长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、紫杉醇、auristatins(例如, auristatin E)和类美坦素, 及其类似物或同系物)。

[0419] 毒素也可以是表面活性毒素, 例如是自由基产生者(例如, 含硒毒素部分)的毒素, 或是含放射性核素部分的毒素。合适的含放射性核素部分包括, 例如包含放射性碘(¹³¹I 或 ¹²⁵I)、钇(⁹⁰Y)、镱(¹⁷⁷Lu)、镅(²²⁵Ac)、镭、砒(²¹¹At)、铼(¹⁸⁶Re)、铋(²¹²Bi 或 ²¹³Bi)、铟(¹¹¹In)、锝(^{99m}Tc)、磷(³²P)、铑(¹⁸⁸Rh)、硫(³⁵S)、碳(¹⁴C)、氚(³H)、铬(⁵¹Cr)、氯(³⁶Cl)、钴(⁵⁷Co 或 ⁵⁸Co)、铁(⁵⁹Fe)、硒(⁷⁵Se)、或镓(⁶⁷Ga)的部分。

[0420] 毒素可以是来自细菌来源的蛋白、多肽或肽, 例如, 白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)和植物蛋白, 例如, 蓖麻毒素 A 链(RTA)、核糖体失活蛋白(RIPs)白树毒素(gelolin)、商陆抗病毒蛋白、肥皂草素(saporin)、和 dodecandron, 考虑用作毒素。

[0421] 设计以结合、使失去作用、促进负责产生特定的靶蛋白的 mRNA 的降解或是防止其生成的核酸反义化合物也可用作毒素。反义化合物包含单或双链的反义 RNA 或 DNA、寡核苷酸、或是其类似物, 其可特定地杂交至单独的 mRNA 种类, 并防止该 mRNA 种类的转录和 / 或 RNA 加工和 / 或编码的多肽的翻译, 由此造成各编码多肽的量减少。Ching, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10006-10010(1989); Broder, 等人, Ann. Int. Med. 113 :604-618(1990); Loreau, 等人., FEBS Letters 274 :53-56(1990)。有用的反义疗法包括例如: Veglin™(VasGene) 和 OGX-011(Oncogenix)。

[0422] 毒素也可以是一种光活性剂。合适的光活性剂包括卟啉类物质, 例如卟吩姆钠、绿卟啉、二氢卟吩 E6、血卟啉衍生物本身、酞菁、初卟啉(etiopurpurins)、替沙林(texaphrin)、及其类似物。

[0423] 毒素可以是一种结合细胞内目标的抗体或抗体片段。此种抗体或抗体片段可指向指定的亚细胞区室或目标。例如, 抗体或抗体片段可结合一种细胞内目标, 其选自 erbB2、EGFR、BCR-ABL、p21Ras、半胱天冬氨酸酶 3、半胱天冬氨酸酶 7、Bcl-2、p53、细胞周期蛋白 E、ATF-1/CREB、HPV16 E7、HP1、IV 型胶原酶、组织蛋白酶 L 以及其它叙述于 Kontermann, R. E., Methods, 34 :163-170(2004) 中(其全文内容并入本文做为参考)的细胞内目标。

[0424] 治疗方法和组合物

[0425] 本发明的抗体有用于免疫抑制和免疫消融。抗体靶向 CD52 表达细胞(例如, T 和 B 细胞)并减少(或如本文所用的“消减”)需要的受试者中它们的数量。淋巴细胞消减

可用于治疗多种疾病和症状,例如发炎、自体免疫疾病和癌症(例如,淋巴细胞(B或T细胞)恶性肿瘤)。参见,例如,Reiff, A., *Hematology*, 10(2):79-93(2005)。可使用本发明的抗体或抗原结合部分治疗的疾病和症状的实例包括但不限于,多发性硬化症、狼疮、类风湿性关节炎、移植体抗宿主疾病(GVHD)、炎性肠道疾病、血管炎、贝西氏病、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、修格兰氏症候群(Sjogren's syndrome)、葡萄膜炎、干癣、硬皮病、多肌炎、I型(自体免疫类)糖尿病、自体免疫细胞减少症(例如,自体免疫嗜中性粒细胞减少症、输血依赖性难治型PRCA、白血病和淋巴瘤例如具有巨大肿瘤的非何杰金氏淋巴瘤和B细胞慢性淋巴细胞白血病)。

[0426] 据此,本发明的方面为通过对需要的受试者(例如,具有自体免疫疾病、血癌的病人,或是将要接受移植的病人)施用有效量的本发明的抗体,用于淋巴细胞消减的方法和用于治疗发炎、自体免疫疾病或癌症的方法。还可预防性地施用该抗体以防止发炎开始或是自体免疫疾病或癌症的复发。例如,可施用本发明的抗体作为调理疗法的一部分,以使病人准备进行移植(例如,干细胞移植、同种异体T细胞自体移植输注、或实体器官移植)。

[0427] 本发明的一些抗CD52抗体优选靶向某些CD52+细胞群。一个可能的解释是,这些抗体所结合的表位包含CD52蛋白上的一个或多个碳水化合物基团,并且此种碳水化合物基团在一种细胞类型所表达的CD52上比在另一种类型所表达的CD52上更为普遍。例如,我们已经发现,相对于B细胞,抗体7F11、5F7、3G7、和11C11以更大的程度消减T细胞。因此,这些抗体的人源化和嵌合形式可用于治疗T细胞恶性肿瘤,且免疫抑制副作用比较温和。

[0428] 因为本发明的抗体靶向CD52表达细胞,抗体也可用于消减T细胞和B细胞以外的CD52+细胞类型。例如,研究已显示,血管白细胞(VLC)和Tie2+单核细胞-表达高水平CD52的髓样细胞-促进肿瘤血管新生并且有助于针对抗VEGF疗法的肿瘤抗性。Pulaski等人, *J. Translational Med.* 7:49(2009)。本发明的抗CD52抗体由此可通过靶向VLC和Tie2+单核细胞而用于抑制肿瘤血管新生。为此目的,抗CD52抗体可系统地或局部地在新血管形成部位,例如肿瘤部位给药。抗CD52抗体治疗可与标准癌症治疗例如化疗、手术、或放射共同使用,或与另一种靶向治疗例如抗VEGF抗体治疗共同使用。抗CD52抗体治疗可用于治疗,例如,乳腺癌、肺癌、神经胶质瘤、结肠直肠癌、和任何其它抗VEGF抗体的症状。抗CD52抗体治疗也可用于其它新血管形成病症,包括非肿瘤血管新生症状。

[0429] 本发明的抗体可单独施用至个体(例如,人类)或与另一种制剂(例如,免疫抑制剂)在联合治疗中共同施用。该抗体可在施用额外的制剂之前,一起或之后施用。在一些实施方式中,额外的制剂为,例如,消炎化合物例如柳氮磺吡啶(sulfasalazine),另一种非类固醇消炎化合物,或类固醇消炎化合物。在一些实施方式中,该额外制剂为另一种淋巴消减抗体,例如另一种抗CD52抗体、抗CD20抗体、抗BAFF抗体、抗BAFF-R抗体、和类似物。在一些实施方式中,该额外制剂为,例如,细胞因子(例如,IL-7)、抗细胞因子受体抗体,或可溶性受体,其扭转、操作、和/或加强在抗CD52抗体所介导的淋巴细胞消减之后发生的重建过程(参见,例如,Sportes等人, *Cytokine Therapies: Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1182:28-38(2009))。在另一实施方式中,合成肽模拟物可与本发明的免疫球蛋白共同给药。

[0430] 研究已显示,阿仑单抗引起的淋巴细胞消减由嗜中性粒细胞和NK细胞所介导(Hu等人, *Immunology* 128:260-270(2009))。因此,在联合治疗的实施方式中,可在抗CD52抗体疗法之前、期间或之后对病人施用刺激嗜中性粒细胞和NK细胞的制剂,以增强抗体治疗。

刺激嗜中性粒细胞和 / 或 NK 细胞包括,但不限于,(1) 增加其分裂速率,(2) 增加对应于抗 CD52 抗体的同种型的 Fc 受体 (例如, Fc γ RIIIa 和 Fc γ RIIIb、Fc γ RII、Fc γ RI、和 Fc α RI) 的细胞表面表达,(3) 调动并增加循环细胞的数量,(4) 募集细胞至靶部位 (例如,肿瘤、发炎、或组织损伤部位),(5) 以及增加其细胞毒性活性。刺激嗜中性粒细胞和 / 或 NK 细胞的制剂的实例包括,例如,粒细胞单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF) (例如, LEUKINE[®] 或沙格司亭 (sargramostim) 和莫拉司亭 (molgramostim)); 粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) (例如, NEUPOGEN[®] 或非格司亭 (filgrastim)、聚乙二醇化非格司亭、和来格司亭 (lenograstim)); 干扰素 - γ (例如, ACTIMMUNE[®]); CXC 趋化因子受体 4 (CXCR4) 拮抗剂 (例如, MOZOBIL[™] 或普乐沙福 (plerixafor)); 和 CXC 趋化因子受体 2 (CXCR2) 拮抗剂。可定期监测病人的嗜中性粒细胞数以确保最佳的治疗效果。也可在抗 CD52 抗体治疗开始之前测量病人的嗜中性粒细胞数。可基于病人的嗜中性粒细胞数调整刺激物的量。如果病人的嗜中性粒细胞数较正常者较低,则可使用较高剂量的刺激物。在嗜中性粒细胞减少症 (其可由使用抗 CD52 抗体治疗而引起) 期间,也可使用较高剂量的嗜中性粒细胞刺激物以最大化抗 CD52 抗体的效果。

[0431] 因为嗜中性粒细胞和 / 或 NK 刺激改善抗 CD52 抗体治疗的效力,联合治疗的此实施方式使得我们对病人使用较少的抗体并维持相似的治疗效果。使用较少的抗 CD52 抗体同时维持治疗效果可帮助减少抗 CD52 抗体的副作用,其包括病人对施用的抗体的免疫反应以及二次自体免疫 (在抗 CD52 抗体治疗期间或之后出现的自体免疫) 的发展。联合治疗的此实施方式也可用于肿瘤环境,例如,在病人具有嗜中性粒细胞减少症时。

[0432] 在联合治疗的另一实施方式中,我们可使用调节 T 细胞的刺激物来增强抗 CD52 抗体治疗。我们的数据显示,相较于其它 CD4⁺T 细胞,抗 CD52 抗体以更低的程度消减 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节 T 细胞。调节 T 细胞 (也已知为 “Treg” 或抑制 T 细胞) 是一种能够通过接触依赖性或非依赖性 (例如,细胞因子产生) 机制抑制其它淋巴细胞的增殖和 / 或功能的细胞。已叙述数种类型的调节 T 细胞,包括 γ δ T 细胞、自然杀手 T (NKT) 细胞、CD8⁺T 细胞、CD4⁺T 细胞、和双阴性 CD4⁻CD8⁻T 细胞。参见,例如, Bach 等人, Immunol. 3 : 189-98 (2003)。CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节 T 细胞曾称为 “自然发生” 调节 T 细胞; 它们表达 CD4、CD25 和叉头 (Forkhead) 家族转录因子 FoxP3 (叉头盒 p3)。因此,在联合治疗的此实施方式中,我们可在抗 CD52 抗体治疗之前、期间或之后施用刺激 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 调节 T 细胞的制剂,以在淋巴细胞消减之后扭转免疫系统的组成。制剂可,例如,活化那些 T 细胞,稳定和 / 或扩充细胞群,移动和增加细胞循环,和 / 或募集细胞至靶部位。此种制剂的实例为雷帕霉素、活性或潜伏性 TGF- β (例如, TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、和 TGF- β 5)、IL-10、IL-4、IFN- α 、维生素 D3、地塞米松 (dexamethasone)、和霉酚酸酯 (mycophenolate mofetil) (参见,例如, Barrat 等人, J. Exp. Med. 195 : 603-616 (2002); Gregori 等人, J Immunol. 167 : 1945-1953 (2001); Battaglia 等人, Blood 105 : 4743-4748 (2005); Battaglia 等人, J. Immunol. 177 : 8338-8347 (2006))。

[0433] 在本发明中,治疗疾病的抗 CD52 抗体的有效量为帮助治疗的受试者达到一个或多个期望临床终点的量。例如,对于狼疮 (其表现包括系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、皮肤红斑狼疮、CNS 狼疮、心血管表现、肺表现、肝表现、血液表现、胃肠表现、肌肉骨骼表现、新生儿红斑狼疮、儿童全身性红斑狼疮、药物诱发性红斑狼疮、抗磷脂症候群、和引起

狼疮症状的补体缺乏症候群；参见，例如，Robert G. Lahita, Editor, *Systemic Lupus Erythematosus*, 4th Ed., Elsevier Academic Press, 2004), 临床终点可通过监测受影响的器官系统（例如，狼疮性肾炎的血尿及 / 或蛋白尿）和 / 或使用提供数个器官系统间的疾病严重性的综合分数的疾病活动指数（例如，BILAG、SLAM、SLEDAI、ECLAM）来测定。参见，例如，Mandl 等人，“Monitoring patients with systemic lupus erythematosus” in *Systemic Lupus Erythematosus*, 4th edition, pp. 619-631, R. G. Lahita, Editor, Elsevier Academic Press, (2004)。

[0434] 在自体免疫疾病、多发性硬化症（其包含复发缓解型、二次进展型、原发进展型和进展复发型多发性硬化症（Lublin 等人, *Neurology* 46 (4), 907-11 (1996)）的另一实施例中，诊断是通过，例如在检测例如核磁共振成像（MRI）、脊髓穿刺、诱发电位检测、和血液样品实验室分析的协助下通过征状史和神经检查而作出的。在 MS 中，治疗目标是降低复发的频率和严重性、预防因疾病进展而产生的障碍、和促进组织修复 (Compston and Coles, 2008)。因此，帮助达到与该目标一致的临床终点的抗 CD52 抗体量是用于治疗抗体的有效量。

[0435] 为了使免疫原性降至最低，优选通过本发明的治疗方法和组合物使用人源化抗体来治疗患者。在不需要重复给药的情况下，对患者施用本发明的鼠：人类嵌合抗体也是合适的。

[0436] 可使用本发明的抗体来治疗先前已经用 Campath-1H® 治疗并且已经形成 Campath-1H® 的中和抗体的个体（例如，Campath-1H® - 难治疗的个体）。例如，人们可以治疗患有自体免疫疾病（例如，多发性硬化症、狼疮、血管炎）和 / 或癌症（例如，白血病（例如，慢性淋巴细胞白血病）、淋巴瘤（例如，非何杰金氏淋巴瘤）、先前已用 Campath-1H® 治疗（例如，使用一个或多个 Campath-1H® 治疗疗程）和已经形成 Campath-1H® 中和抗体的个体，其中中和抗体会降低进一步的 Campath-1H® 治疗效力。我们已经显示，本发明的人源化抗体（例如，人源化 2C3、12G6 和 9D9）尽管在阿仑单抗的中和抗体的存在下也可结合至人类 CD52。在另一个实施方式中，人们可以用本文所述的特定的人源化抗体与一种本文所述的其它人源化抗体来治疗已经变得难以治疗的个体。

[0437] 本发明的抗体可以以单一的单位剂量或多剂量在健康照顾提供者认为合适的任何时间点给药。剂量可通过本领域内已知的方法所决定，并可依据，例如个体年龄、敏感性、耐受度和整体健康情况而定。可使用各种给药路径，其包括，但不限于，肠胃外（例如，静脉内、动脉内、肌肉内、鞘内、腹膜内、皮下注射）、口服（例如，饮食）、局部 (locally)、表面 (topical)、吸入（例如，支气管内、鼻内或口部吸入、鼻内滴剂）、或直肠，依据要治疗的疾病或病症而定。肠胃外给药可以是一种优选的给药模式。

[0438] 在一个实施方式中，使用与 Campath-1H® 相同的给药方案对患者施用本发明的抗体（例如，针对慢性淋巴细胞白血病的 Campath-1H® 给药方案）。在另一个实施方式中，以一种方案对患有自体免疫疾病（例如，多发性硬化症 (MS)）的患者施用本发明的抗体，其中该方案包括第一周期的抗体给药，接着至少再一个抗体周期，其中各个治疗周期包括连续数天应用 1-5 个剂量，并且其中各个治疗周期与下一个周期分隔至少 1-24 个月（例如，12 个月）。例如，在一个实施方式中，通过包括 5 个每日剂量抗体的第一周期抗体接着至少再一抗体治疗周期（其中该治疗在第一周期之后 12 个月发生，并且治疗包括连续数天

施用的 3 个剂量的抗体) 来治疗患有多发性硬化症的患者。在另一个实施方式中, 患有 MS 的病人仅再治疗一次, 已经观察到重新开始的 (renewed) MS 活动性的迹象 (参见, 例如 WO 2008/031626, 其教导整体地并入本文以作参考)。在一些实施方式中, 如果患有更晚期形式的 MS 或更恶化形式的其它自体免疫疾病 (例如血管炎; 参见, 例如, Walsh 等人, *Ann Rheum Dis* 67 1322-1327 (2008)) 的患者早在他们最后的疗程之后经历复发, 可能需要进行更频繁的治疗疗程 (例如, 每四个月、每六个月)。可根据治疗临床医生的职业判断, 使用这样的临床医生可获得的任何方法确定重新开始的 MS 活动性的迹象。对于临床医生, 目前有多种技术来诊断重新开始的 MS 活动性, 包括但不限于, 通过临床方法 (神经性障碍的复发或恶化) 或通过大脑或脊髓的核磁共振成像 (MRI)。如医学从业者所公知, 通过 MRI 检测的疾病活动性可通过 T1 (加强或非加强的) 或 T2 加权成像上新的脑或脊椎病变的出现, 或通过这样的病变的体积增长而显示出。因为 MS 的诊断方法在不断发展, 预期未来可能有另外的方法将检测到重新开始的 MS 活动性 (例如, 磁化传递率或 MR- 光谱)。用于检测重新开始的 MS 活动性的特定诊断方法不是对主张权利的本发明的限制。在某些实施方式中, 为了确定任何给定患者是否需要再治疗和对该患者再治疗的最佳时间点, 在治疗周期之后以固定的间隔重复进行 MRIs。通常而言, 在疾病临床地再次显现之前进行再治疗是有利的。

[0439] 制剂可依据所选择的给药途径而不同 (例如, 溶液、乳液)。包含将施用的抗体的适当组合物可以生理上可接受的媒介物或载体而制备。组合物可包括多剂量或者可以是单一单位剂量的组合物。对于溶液或乳液, 合适的载体包括, 例如, 水溶液或醇 / 水溶液、乳液或悬浮液, 包含盐水或缓冲介质。肠胃外媒介物可包括氯化钠溶液、林格氏葡萄糖 (Ringer's dextrose)、葡萄糖与氯化钠、乳酸林格氏或不挥发性油 (fixed oil)。静脉内媒介物可包括各种添加剂、防腐剂、或流体、营养或电解质补充剂 (参见, 通常而言, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, Mack Publishing Co., PA, 1985)。对于吸入, 化合物可以是溶解的或是装载至合适的给药用分配器 (例如, 雾化器 (atomizer)、气雾器 (nebulizer) 或压力气雾剂分配器)。

[0440] 诊断方法和组合物

[0441] 本发明的免疫球蛋白也可用于研究和诊断应用的多种方法。例如, 它们可用于检测、分离、和 / 或纯化人类 CD52 或其变体 (例如, 通过悬浮液中亲合纯化或其它合适方法例如流式细胞术, 例如, 用于细胞, 例如淋巴细胞), 和研究人类 CD52 结构 (例如, 构象) 和功能。对于体外应用, 其中抗体的免疫原性不是考虑的重点, 除了人源化抗体, 本发明的鼠抗体和嵌合抗体将是有益的。

[0442] 本发明的免疫球蛋白可用于诊断应用 (例如, 体外、先体外后体内)。例如, 可使用本发明的人源化免疫球蛋白来检测和 / 或测量样品中 (例如, 在组织或体液 (比如带有人类 CD52 的發炎渗出物、血液、血清、肠液、组织) 中表达人类 CD52 的细胞上) 人类 CD52 的水平。样品 (例如, 组织和 / 或体液) 可从个体获得, 且本文所述的免疫球蛋白可以以合适的免疫学方法使用以检测和 / 或测量人类 CD52 表达, 包括方法比如流式细胞术 (例如, 用于悬浮液中的细胞, 例如淋巴细胞), 酶联免疫吸附检定 (ELISA), 包括化学发光检定、放射免疫检定、和免疫组织学方法。

[0443] 在一个实施方式中, 提供一种检测样品中人类 CD52 的方法, 其包含在适合免疫球蛋白对人类 CD52 特异性结合的条件下将样品与本发明的免疫球蛋白接触并检测所形成的

抗体-CD52 复合物。在应用该方法时,本文所述的免疫球蛋白可用于分析正常组织相对于发炎组织(例如,来自人类)的人类 CD52 反应性和/或表达(例如,免疫组织学地),以检测例如,炎性肠道疾病(IBD)、自体免疫疾病(例如多发性硬化症和狼疮)、癌症(例如非何杰金氏淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病)、或其它症状与增加的人类 CD52 表达(例如,在受感染的组织中)之间的关联。因此,本发明的免疫球蛋白允许在正常组织和发炎组织中进行评估人类 CD52 的存在的免疫方法,通过该方法可评估疾病存在、疾病进程和/或抗人 CD52 治疗在疾病(例如,发炎性疾病)治疗中的效用。

[0444] 此外,在通过消减性抗 CD52 治疗抗体的治疗之后,可使用免疫球蛋白来检查组织,以估计该消减多有效以及以确定 CD52 表达是否有任何的下调(Rawstrom 等人., Br. J. Heam., 107:148-153(1999))。

[0445] 除非另外定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域内的普通技术人员所普遍理解的意义相同的意义。示例方法和物质在下文中叙述,尽管与本文所述的方法和物质相似或等同的方法和物质也可用于本发明的实践或测试中。本文所提及的所有出版物和其它参考文献整体地并入本文做为参考。在冲突情况下,本说明书包括定义为优先。虽然本文引用数个文件,此引用并不构成以下认可:任何这些文件构成本领域内公知常识的一部分。本说明书和权利要求通篇中,词语“包含(comprise)”或变形例如“包含(comprises、comprising)”将被理解为包含所述整体或整体组但不排除任何其它整体或整体组。材料、方法、和实施例仅仅是说明性的而不意在限制。

[0446] 示例

[0447] 实施例 1:鼠抗人 CD52 抗体的产生

[0448] 下列工作实施例中的鼠抗人 CD52 抗体通过使用来自 CD1 背景的人类 CD52 转基因小鼠的脾细胞免疫 CD1 株小鼠而产生(图 1A),其中转基因小鼠的鼠 B 细胞和 T 细胞表面上的人类 CD52 呈现通过流式细胞术而证实。因为转基因小鼠具有与免疫小鼠相同的背景(CD1),来自转基因小鼠的脾细胞在细胞表面上以天然形式呈现人类 CD52 为独特的、非己抗原,免疫的非转基因小鼠初始朝人类 CD52 发起抗体反应。

[0449] 为收集人类 CD52 转基因小鼠的脾细胞,将小鼠安乐死,取出脾脏并经由通过注射器而制备单细胞悬浮液。接着通过腹膜内(i.p.)注射用收集的人类 CD52 阳性脾细胞以每只小鼠 100 μ l 中 5×10^6 个与或者不与弗氏完全佐剂(Freund's Complete Adjuvant)一起对 CD1 小鼠免疫。在使用弗氏不完全佐剂,腹膜内注射,用转基因小鼠人类 CD52 阳性脾细胞以每只鼠 100 μ l 中 5×10^6 个第一次免疫之后,每两周对小鼠给予两次加强剂量(booster dose)。

[0450] 对于所有小鼠,在免疫之前对每只小鼠收集眼出血 100-200 微升于黄色盖血清分离管中,以确定基础水平反应性,在每轮免疫之后一周收集以确定基础水平反应性,并在每轮免疫之后一周收集以确定抗人 CD52 特异性免疫反应。将对 CHO K1 细胞(被改造以表达人类 CD52 蛋白),而不对亲代 CHO K1 细胞表现出高水平的抗人 CD52 反应性(通过 FACS 检测)的小鼠处死,在无菌条件下收集血液并收集脾脏以产生杂交瘤。通过在免疫之后 3-4 天使用非分泌性小鼠骨髓瘤细胞-系 SP2/0 Ag14 或 NS1 骨髓瘤细胞作为融合伴侣(fusion partner)而产生杂交瘤。将融合细胞放置于包含次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷的完全生长培养基中以产生杂交瘤。对许多杂交瘤上清液筛选后,选择数个产生特异性抗人 CD52 抗体的

克隆,并对其进行进一步亚克隆以得到克隆群体。按比例增加产生抗人 CD52 抗体的杂交瘤克隆以进行进一步发展。

[0451] 实施例 2:鼠抗人 CD52 抗体的重链和轻链的 PCR 分析

[0452] 通过测试杂交瘤上清液其抗人 CD52 反应性的存在而鉴定数个鼠抗人 CD52 单克隆抗体(图 1B)。选择单独的克隆并通过 PCR 克隆和测序来鉴定小鼠的重链可变序列和轻链可变序列。与 YTH 34.5 HL(即, Campath IG κ (大鼠)和试剂抗体 CF1D12(CF1D12 κ)(Invitrogen Life Science Technologies)相比较的轻链序列示于图 2 中。类似地,与 YTH 34.5HL 和试剂抗体 CF1D12 相比较的重链序列示于图 3 中。

[0453] 鉴定出总共 10 个独特的轻链可变序列和 11 个独特的重链可变序列。如果包括 Campath®和 CF1D12,则在抗人 CD52 抗体的轻链内,鉴定出 7 个独特的 CDR-1 区(表 1),8 个独特的 CDR-2 区(表 2)和 7 个独特的 CDR-3 区(表 3)。

[0454] 表 1:轻链 CDR-1 序列

[0455]

轻链 CDR-1	序列
A	KASQNIDKYLN (SEQ ID NO :27)
B	KSSQSLES DGR TYLN (SEQ ID NO :28)
C	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO :29)
D	KSSQSLLDSDGRTYLN (SEQ ID NO :30)
E	KSSQSLLYSNGKTYLN (SEQ ID NO :31)
F	RSSQSLVHTNGNSYLH (SEQ ID NO :32)
G	RSSQSLVHTNGNTYLH (SEQ ID NO :33)

[0456] 表 2:轻链 CDR-2 序列

[0457]

轻链 CDR-2	序列
A	NTNNLQT (SEQ ID NO :34)
B	LVSNLDS (SEQ ID NO :35)
C	LVSKLDS (SEQ ID NO :36)
D	LVSNLGS (SEQ ID NO :37)
E	LVSALDS (SEQ ID NO :38)
F	LVSNLNS (SEQ ID NO :39)

G	LVSHLDS (SEQ ID NO :40)
H	MVSNRFS (SEQ ID NO :41)

[0458] 表 3 :轻链 CDR-3 序列

[0459]

轻链 CDR-3	序列
A	LQHISRPT (SEQ ID NO :42)
B	WQGTHFPWT (SEQ IDNO :43)
C	VQGSHPHT (SEQ ID NO :44)
D	VQGTRFHT (SEQ IDNO :45)
E	VQGTHLHT (SEQ ID NO :46)
F	SQSTHVPFT (SEQ ID NO :47)
G	SQSAHVPPLT (SEQ ID NO :48)

[0460]

[0461] 如果包括 Campath®和 CF1D12,则在抗人 CD52 抗体的重链内已经鉴定出总共 8 个独特的 CDR-1 区 (表 4), 10 个独特的 CDR-2 区 (表 5) 和 8 个独特的 CDR-3 区 (表 6)。

[0462] 表 4 :重链 CDR-1 序列

[0463]

重链 CDR-1	序列
A	GFTFTDFYMN (SEQ ID NO :49)
B	GFTFSDAWMD (SEQ ID NO :50)
C	RFTFSDAWMD (SEQ ID NO :51)
D	GLTFSDAWMD (SEQ ID NO :52)
E	GFPFSNYWMN (SEQ ID NO :53)
F	GFTFNKYWMN (SEQ ID NO :54)
G	GFTFNTRYWMN (SEQ ID NO :55)
H	GFTFTDYYS (SEQ ID NO :56)

[0464] 表 5 :重链 CDR-2 序列

[0465]

重链 CDR-2	序列
A	FIRDKAKGYTTEYNPSVKG (SEQ ID NO :57)
B	EIRNKAKNHVAYYAESVKG (SEQ ID NO :58)
C	EIRNKANNHATYYAESVKG (SEQ ID NO :59)
D	EIRNKAKNHVKYYAESVKG (SEQ ID NO :60)
E	EIRNKAKNHATYYAESVKG (SEQ ID NO :61)
F	EIRKKVNNHATYYAESVKG (SEQ ID NO :62)
G	QIRLKSNNYATHYAESVKG (SEQ ID NO :63)
H	QIRLKSDNYATHYAESVKG (SEQ ID NO :64)
I	FIRNKANGYTTEYNASVKG (SEQ ID NO :65)
J	FIRNKANGYTTEYSASVKG (SEQ ID NO :66)

[0466] 表 6 :重链 CDR-3 序列

[0467]

重链 CDR-3	序列
A	AREGHTAAPFDY (SEQ ID NO :67)
B	TTLDS (SEQ ID NO :68)
C	TSLDY (SEQ ID NO :69)
D	TGLDY (SEQ ID NO :70)
E	TPIDY (SEQ ID NO :71)
F	TPVDF (SEQ ID NO :72)
G	TRYIFFDY (SEQ ID NO :73)
H	TRYIWFY (SEQ ID NO :74)

[0468]

[0469] 13 个不同的抗人 CD52 抗体内特定的轻链 CDR 区和重链 CDR 区的关系说明于表 7。

[0470] 表 7 :基于 CDR 组成的抗人 CD52 抗体的分类

克隆名	重链 CDR-1			轻链		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3	CDR-1	CDR-2	CDR-3
Campath	A	A	A	A	A	A
CF1D12	B	B	B	B	B	B
8G3.25.3.5	C	C	C	C	C	B
GMA 4G7.F3	B	D	C	C	D	B
GMA 9D9.A2	B	E	B	C	E	B
[0471] GMA 11C11.C5	B	E	C	C	C	B
GMA 3G7.E9	B	F	C	C	F	B
5F7.1.1.4	D	E	D	D	G	B
12G6.15.1.2	E	G	E	E	C	C
23E6.2.2.1	F	H	E	E	C	D
2C3.3.8.1	G	G	F	E	C	E
7F11.1.9.7	H	I	G	F	H	F
4B10.1.2.4	H	J	H	G	H	G

[0472] 克 隆 8G3. 25. 3. 5、4G7. F3、9D9. A2、11C11. C5、3G7. E9、5F7. 1. 1. 4、12G6. 15. 1. 2、23E6. 2. 2. 1、2C3. 3. 8. 1、7F11. 1. 9. 7 和 4B10. 1. 2. 4 在后文分别称为 8G3、4G7、9D9、11C11、3G7、5F7、12G6、23E6、2C3、7F11 和 4B10。

[0473] 表 7.1 :抗人 CD52 抗体的 CDRs 的 SEQ ID NOs

克隆名称	重链			轻链		
	CDR-1	CDR-2	CDR-3	CDR-1	CDR-2	CDR-3
[0474] Campath	49	57	67	27	34	42
CF1D12	50	58	68	28	35	43
8G3	51	59	69	29	36	43
4G7	50	60	69	29	37	43
9D9	50	61	68	29	38	43
11C11	50	61	69	29	36	43
3G7	50	62	69	29	39	43
5F7	52	61	70	30	40	43
12G6	53	63	71	31	36	44
23E6	54	64	71	31	36	45
2C3	55	63	72	31	36	46
7F11	56	65	73	32	41	47
4B10	56	66	74	33	41	48

[0475]

[0476] 实施例 3 :从小鼠杂交瘤细胞克隆鼠 IgG 可变区基因以产生鼠 / 人类嵌合 IgG1 抗体

[0477] 依照制造商推荐的步骤流程,使用 Trizol 试剂 (Gibco/BRL) 用活跃增殖且分泌抗体的杂交瘤细胞来分离 RNA。通过使用 Nanodrop 测量 OD 来对 RNA 定量,并且通过使其在

凝胶上移动或通过使用生物分析仪来确定 RNA 的完整性。将总 RNA 反转录为 cDNA, 并通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增重链和轻链的可变区。依照制造商的步骤流程, 使用 BD Sprint PowerScript 反转录酶 (Clontech) 和 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 Oligo(dT) 引物 (Invitrogen Cat# Y01212) 及 $10 \mu\text{M}$ 的反向引物 (位于重链和轻链的恒定区) (于下文以数字列出) 来产生 cDNA。具体而言, 使用编号 3 (SEQ ID NO :77)、11 (SEQ ID NO :85)、19 (SEQ ID NO :93)、20 (SEQ ID NO :94) 和 21 (SEQ ID NO :95) 的引物。使用如上所述产生的 cDNA 来进行重链和轻链可变区的 PCR 扩增。对于重链和轻链, 将 $1 \mu\text{l}$ cDNA 与正向引物和反向引物 (各 $10 \mu\text{M}$) 混合, 并在 $2 \mu\text{l}$ 25mM 的 MgCl_2 的存在下与 PCR super mix (Invitrogen) 混合。PCR 程序按照下列步骤运行: 1) 95°C 进行 2 分钟; 2) 95°C 进行 30 秒; 3) 56°C 进行 30 秒; 4) 68°C 进行 45 秒; 5) 重复步骤 2 至 425 次; 6) 68°C 进行 10 分钟并维持于 16°C 。在 2% 凝胶上分析 PCR 产物, 以检测大小约 300-400bp 的可变区序列产物的存在, 并依照制造商说明书将适当的条带克隆至 pCR2.1-TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen), 并使用 M13 引物确认经克隆的序列。提供用于反转录和用于轻链和重链序列 PCR 扩增的引物:

[0478] 轻链引物

[0479] 1) Lead-ML κ = 5' ATGGGCWTCAARATGRARWCWCAT 3' (前导序列中的正向引物) (SEQ ID NO :75)

[0480] 2) FR1-ML κ = 5' GAYATTGTGMTRACMCARKMTCAA 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :76)

[0481] 3) ML κ const = 5' ACTGGATGGTGGGAAGATGGA 3' (恒定区中的反向引物) (SEQ ID NO :77)

[0482] 4) VK-MK = 5' GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :78)

[0483] 5) MKC-Const = 5' GGATACAGTTGGTGCAGCATC 3' (恒定区中的反向引物) (SEQ ID NO :79)

[0484] 重链引物

[0485] 6) MH-SP-ALT1 = 5' ATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTT 3' (前导序列中的正向引物) (SEQ ID NO :80)

[0486] 7) MH-SP-ALT2 = 5' ATGRAATGSASCTGGGTYWYCTCT 3' (前导序列中的正向引物) (SEQ ID NO :81)

[0487] 8) MH-FR1 = 5' SAGGTSMARCTGCAGSAGTCT 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :82)

[0488] 9) MH-FR1-1 = 5' SAGGTGMAGCTCSWRSARYCSGGG 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :83)

[0489] 10) MH-J2 = 5' TGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC 3' (J 区中的反向引物) (SEQ ID NO :84)

[0490] 11) MH- γ -const = 5' AYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC 3' (恒定区中的反向引物) (SEQ ID NO :85)

[0491] 12) VH MH1 = 5' SARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :86)

[0492] 13) VH MH2 = 5' SARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :87)

[0493] 14) VH MH3 = 5' CAGGTTACTCTGAAAGWGTSTG 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :88)

[0494] 15) VH MH4 = 5' GAGGTCCARCTGCAACARTC 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :89)

[0495] 16) VH MH5 = 5' CAGGTCCAACACTVCAGCARCC 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :90)

[0496] 17) VH MH6 = 5' GAGGTGAASSTGGTGAATC 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :91)

[0497] 18) VH MH7 = 5' GATGTGAACTTGGAAGTGTC 3' (骨架 1 中的正向引物) (SEQ ID NO :92)

[0498] 19) IgG1 = 5' ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC 3' (鼠 IgG1 CH1 恒定区中的反向引物) (SEQ ID NO :93)

[0499] 20) IgG2A = 5' CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA 3' (鼠 IgG2A CH1 恒定区中的反向引物) (SEQ ID NO :94)

[0500] 21) IgG2B = 5' AGGGCCAGTGGATAGAGTGATGG 3' (鼠 IgG2B CH1 恒定区中的反向引物) (SEQ ID NO :95)

[0501] 简并引物导致在重链和轻链的骨架 1 区域的 5' 端的一些简并性。使用来自数个独立重链可变区克隆和来自轻链可变区克隆的共有 DNA 序列以得到氨基酸序列。

[0502] 通过将重链和轻链可变区分别结合至编码人类 IgG1 重链 (序列与在 Campath-1H® 中发现的序列相同) 和人类 κ 轻链恒定区 (序列与在 Campath-1H® 中发现的序列相同) 的 DNA 来产生功能性嵌合抗 CD52 抗体。为产生编码 CD52 抗体轻链的 pCEP4 (Invitrogen) 轻链载体, 对轻链可变序列进行 PCR 扩增, 并通过不依赖连接酶的克隆将其构建至 pCEP4 LIC 轻链载体, 以使人类 κ 链信号序列在 5' 端并使轻链恒定区在 3' 端。类似地, 为产生 pCEP4 重链载体, 通过不依赖连接酶的克隆将重链序列的可变区构建至 pCEP4 LIC 重链载体, 以使人类 κ 链信号序列在 5' 端, 并使包含 CH1 区、铰链区、CH2 区和 CH3 区的重链恒定区在 3' 端。重链和轻链的恒定区氨基酸序列与存在于 Campath 1H 抗体中存在的恒定区氨基酸序列相同。

[0503] 简而言之, 依照制造商建议在合适的缓冲液中用 BfuA1 (New England Biolabs-NEB) 消化 pCEP4 LIC 载体, 在完全消化之后, 使用 PureLink PCR 纯化试剂盒 (Invitrogen) 纯化载体。接着用 T4 DNA 聚合酶 (New England Biolabs) 处理线性质粒以产生单链末端并将其用来克隆可变区片段。将重链特定 pCEP4 LIC 载体用于克隆重链可变区, 并且将轻链特定 pCEP4 LIC 载体用于克隆轻链可变区。使用包含 pCR2.1-TOPO 重链可变区的质粒或包含 pCR2.1-TOPO 轻链可变区的质粒作为模板和包含可变链特定序列及载体悬突 (overhang) 的引物, 通过 PCR 产生可变区插入物。使用 VENT DNA 聚合酶 (New England Biolabs) 以对插入物进行 PCR 扩增。将 PCR 扩增的插入物凝胶纯化, 并用 T4DNA 聚合酶处理以产生单链末端。将为重链和轻链制备的载体与各自的可变区插入片段合并并于室温培育 10 分钟, 用于转化 TOP010 细胞 (Invitrogen), 挑选氨苄青霉素抗性的克隆并验证其序

列。对具有框内插入 (inserted in-frame) 的正确重链和轻链序列的 pCEP4 重链和 pCEP4 轻链克隆进行扩增并用于蛋白制备。使用阳离子脂质 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) 将重链构建体与对应的轻链构建体以 1 : 1 的比例共转染至 HEK293 细胞 (Invitrogen)。转染后三天收集条件培养基 (conditioned medium), 并使用蛋白 A 层析来纯化嵌合抗体。为进行此层析方法, 将培养基加至蛋白 A, 并以 50 管柱体积的 PBS 清洗。使用 5 管柱体积的 12.5mM 柠檬酸 (pH 3.0) 对嵌合抗体进行洗提。经过洗提的抗体的 pH 通过加入 0.5M HEPES 来中和。通过使用 PD-10 凝胶过滤柱将缓冲液交换为 PBS。

[0504] 实施例 4 : 嵌合抗人 CD52 单克隆抗体的表位特异性分析

[0505] 通过评估嵌合抗体结合至被改造以表达人类 CD52 突变体的一组细胞系的能力而确定克隆的表位特异性 (图 4), 其中该细胞系通过丙氨酸扫描突变技术产生。使用 STRATAGENE QUIKCHANGE II XL 定点诱变试剂盒, 在 pcDNA3.1 表达载体 (Invitrogen) 中人类 CD52cDNA 上进行 CD52 的 12 个氨基酸细胞外区域中的前 10 个氨基酸的抗体取代。编码野生型或突变型 CD52 序列的 pcDNA3.1 载体的序列被证实, 并使用 Lipofectamine™ 转染至 CHO 细胞, 并通过在含有 G418 的培养基中选择以产生表达野生型或丙氨酸突变型 CD52 的 CHO 细胞系。使用 FACS 通过测量抗体对野生型和突变型 CD52 表达细胞的结合而确定抗人 CD52 嵌合抗体的表位特异性结合。使用结合有 PE 的羊抗人二级抗体 (Jackson ImmunoResearch Labs) 通过检测嵌合抗 CD52 抗体的结合而进行 FACS 分析。图 5A-5C 显示抗 CD52 单克隆抗体对野生型和突变型 CD52 表达细胞系的平均荧光强度 (MFI)。即使 CD52 非常短的 12 个氨基酸的 GPI 锚定蛋白, FACS 结果清楚地确定出存在三组抗体: (1) N-端结合组 (例如 4B10); (2) 中间结合组 (例如 4G7、9D9 和 11C1) 与 (3) C-端结合组 (例如 23E6、12G6、和 2C3)。抗人 CD52 单克隆抗体 (通过实施例 2 最后所叙述的简写名称识别) 的表位特异性概括于表 8 中。

[0506] 表 8 : 11 种鼠抗人 CD52 单克隆抗体的特征

[0507]

克隆	同种型	表位特异性
大鼠 YTH34.5HL	IgG2a	9-10-11-12
小鼠 CF1D12	IgG3	3-4-5-6-7
8G3.25.3.5	IgG3	未确认
4G7.F3	IgG3	3-4-5-6-7
9D9.A2	IgG3	3-4-5-6-7
11C11.C5	IgG3	1-3-4-5-6-7
3G7.E9	IgG2b	1-3-4-5-6-7
5F7.1.1.4	IgG3	1-3-4-5-6-7-10

12G6. 15. 1. 2	IgG3	7-8-9
23E6. 2. 2. 1	IgG3	7-8-9
2C3. 3. 8. 1	IgG3	7-8-9-10
7F11. 1. 9. 7	IgG1	1-2-3-4-5
4B10. 12. 4	IgG2a	1-2-3-4-5

[0508] CD52 为一种极小的抗原但拥有相当大的、亲水性 N-连接聚糖部分以及疏水性 GPI 锚区。为探究糖可能构成所有或部分被抗 CD52 抗体所识别的表位的可能性,用内切糖苷酶、PNGase-F 处理来自 CHO-CD52 细胞的经过亲和纯化的 CD52 样品,以从抗原中完全移除 N-连接糖。接着将经过处理和模拟处理的对照样品用 SDS-PAGE 解析,转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Invitrogen),用 $3\mu\text{g/ml}$ 最终的被指出的各个抗 CD52 嵌合单克隆抗体进行探测,接着根据标准蛋白质印迹 (western blotting) 步骤使用增强化学发光检测显影。使用 Campath-1H® (C1H) 和仅使用二级抗体 (2° Alone) 的印迹分别作为阳性和阴性对照来运行,并使用各个单克隆抗体检测 (图 5D)。结果显示抗体对糖基化 CD52 相对于对去糖基化 CD52 之间的不同结合偏好。此特性使得将十一种抗体分类为四种类型的结合组:

[0509] 1. 对糖基化 CD52 相对于对去糖基化 CD52 表现出没有明显偏好的结合的抗体 (4G7、9D9)

[0510] 2. 表现出特异性结合至糖基化 CD52 的抗体 (7F11、4B10)

[0511] 3. 表现出特异性结合至去糖基化 CD52 的抗体 (8G3)

[0512] 4. 表现出对去糖基化 CD52 优先于糖基化 CD52 的结合的抗体 (12G6、5F7、23E6、2C3、11C11、3G7)。

[0513] 实施例 5 :嵌合抗 CD52 抗体的 CDC 活性

[0514] 如下文所述进行补体依赖的细胞毒性 (CDC) 检定。简而言之,将被改造以表达 CD52 蛋白的 CHO K1 细胞 (CHO-CD52) 用作靶细胞,并用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) 在 37°C 标记 1-2 小时。洗涤细胞,使用 X-Vivo 介质 (medium) 使其重悬,并与抗人 CD52 抗体混合至 $2.2\mu\text{g/ml}$ 的最终浓度。向实验孔加入人类补体 (Sigma) 至 10% 的最终浓度。在 1-5 小时培养之后,自各孔中收集 $25\mu\text{l}$ 无细胞的上层清液,并在 MICROBETA TRILUX Scintillation Counter (Wallac, Gaithersburg, MD) 中计数。通过单独在介质中培养靶细胞而得到自发释出的 ^{51}Cr 的量。来自靶细胞的自发释出通常少于 20%。通过加入 1% Triton X-100 至蒸馏水中而确定引入的 ^{51}Cr 总量,且裂解百分率如下计算: $[(\text{每分钟样品数 (c. p. m.)} - \text{自发的 c. p. m.}) / (\text{总 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.})] \times 100$ 。

[0515] 在 CHO-CD52 细胞上使用人类补体在 CDC 检定中对十二种不同的嵌合抗 CD52 抗体 (鼠可变区和人类 IgG1 恒定区) 进行测试。将 Campath-1H® 人源化抗体用作阳性对照。阴性对照为 Campath-1H® 空白 (null) (一种 Campath-1H® 的非细胞结合的最少突变体——在 H2 环 - 重链 CDR2 区域中两点突变 (K52bD 和 K53D ;Gilliland LK 等人, Journal of Immunology, 162 :3663-3671 (1999))。结果表明嵌合抗体能够对 CD52 表达细胞介导 CDC 杀伤。一些嵌合抗体介导相当于或优于 Campath® 的强力杀伤 (图 6)。

[0516] 实例 6 :嵌合抗 CD52 抗体的 ADCC 活性

[0517] 如下文所述进行抗体依赖性的细胞毒性 (ADCC) 检定。简而言之,将被改造以表达 CD52 蛋白的 CHO K1 细胞 (CHO-CD52) 用作靶细胞,并用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) 在 37°C 标记 1-2 小时。洗涤细胞,使用 X-Vivo 介质重悬,并与抗人 CD52 抗体混合至 1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的最终浓度。人类 PBMC 用作效应细胞,并以 1 : 100 的靶细胞比效应细胞的比例加入。在 6 小时过夜培养之后,从各孔收集 25 微升无细胞的上层清液,并在 MICROBETA TRILUX Scintillation Counter (Wallac, Gaithersburg, MD) 中计数。通过单独在介质中培养靶细胞而得到自发释出的 ^{51}Cr 的量。来自靶细胞的自发释出通常小于 20%。通过加入 1% Triton X-100 至蒸馏水中而确定引入的 ^{51}Cr 总量,且裂解百分率如下计算: $[(\text{样品 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.}) / (\text{总 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.})] \times 100$ 。

[0518] 使用人类 PBMC 作为效应细胞,在 ADCC 检定中对十二种不同的嵌合抗 CD52 抗体 (鼠可变区和人类 IgG1 恒定区) 进行检测。将 Campath-1H® 人源化抗体用作阳性对照。用作阴性对照的是 Campath-1H® 空白 (一种非细胞结合的 Campath-1H® 最少突变体——在 H2 环 - 重链 CDR2 区域中两点突变 (K52bD 和 K53D ;Gilliland, 1999, 上文)。结果表明嵌合抗体能够对 CD52 表达细胞介导 ADCC 杀伤。一些嵌合抗体介导相当于或优于 Campath® 的强力杀伤 (图 7)。

[0519] 实施例 7 :嵌合抗 CD52 抗体至限定的淋巴细胞群的结合评估

[0520] 使用下列结合有荧光染剂的抗体用于流式细胞分析:抗 -CD3-FITC、抗 -CD27-PE、抗 -CD62L-PE Cy5、抗 -CD56-PE Cy7、抗 -CD 16-APC Cy7 (BD Biosciences, San Diego, CA)、抗 -CD45RA-ECD (Beckman Coulter)、抗 -CD19-Pacific Blue、抗 -CD4-APC Cy5.5 和抗 -CD8 pacific orange (Invitrogen, CA)。所有小鼠嵌合抗人 CD52 抗体以及人源化 Campath-1H® 都结合至 Alexa fluor 647 (BD Pharmingen)。健康人类外周血单核细胞从冷藏保存的淡黄色层 (buffy coats) 获得或从自商业供应商 (Bioreclamation, NY, USA) 得到的正常捐赠者的血液中分离的单核细胞获得。为了富集单核细胞,使用无菌的磷酸缓冲盐水 (PBS) 以 1 : 1 稀释人类外围血,并小心地将其叠加于 Ficoll-hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) 上,于室温离心 30 分钟。取出单核细胞的相间层,并于包含 5% 胎牛血清 (FACS 缓冲液) 的 PBS 中洗涤。污染的红血球细胞 (RBCs) 用 RBC 裂解液 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 裂解。使细胞在冷 FACS 缓冲液中重悬,并使用 40 微米过滤器移除碎屑。进行十色流式细胞术以评估 9 种嵌合抗人 CD52 抗体 (4B10、7F11、9D9、5F7、2C3、4G7、23E6、8G3、3G7) 相较于 Campath-1H® 的结合能力。

[0521] 简而言之,将 1×10^6 PBMC' s 于 FACS 缓冲液的重复物 (replicates) 与针对 CD3、CD27、CD45RA、CD62L、CD56、CD19、CD8、CD4、CD16 的抗体连同 9 种嵌合抗人 CD52 抗体 (4B10、7F11、9D9、5F7、2C3、4G7、23E6、8G3、3G7) 的其中一种的预滴定稀释液的混合物于 4°C 培养 30 分钟。洗涤细胞并在包含 1% 多聚甲醛的 PBS 中固定。在 BD LSR-II (BD Biosciences, San Jose, CA) 上得到 100,000 个染色细胞,并使用 FlowJo 7.2 版软件 (Tree Star, Inc, Oregon, USA) 对数据进行分析。具有明显的表型特征的多个亚型已在 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞之间限定,并且已经显示 CD52 在所有人类淋巴细胞上表达。进行十色流式细胞分析以鉴定淋巴细胞亚型,和评估抗 CD52 抗体对所限定亚型上的细胞表面 CD52 的结合特征方面的相似点和不同点。使用标记组合,对应于 B、T 和 NK 细胞系的 11 个表型不同的细胞群先

从淋巴细胞门 (lymphocyte gate) 中确定出。接着对染色强度进行评估,其对应于抗 CD52 抗体检测 CD52 表达的能力。统计图 (图 8A-8C) 显示使用各种抗体在单独淋巴细胞群上的 CD52 检测水平的比较。数据显示抗体在结合至 CD52 方面展现出显著差异。4B10、9D9、7F11 和 Campath-1H®的检测水平是可比较的,尽管在几乎所有检查的细胞亚群上,相对于包括 Campath-1H®的其它抗体,4B10 始终显示最高的检测水平。另一方面,使用 3G7、4G7、8G3 和 23E6 抗体的 CD52 检测水平显著较低。结果显示抗体对于识别不同细胞群上 CD52 的能力的层次,其中 4B10 为最高,且 3G7 为最低。令人有兴趣的是,在 CD4 效应细胞上,这些差别比较不明显,并且在 CD52 显示出以相对较低的水平表达的 NK 细胞亚群上更明显。结合特征的差异显示嵌合抗体的性质不仅与 Campath-1H®显著不同,而且也反映出抗体之间性质的差别。

[0522] 实施例 8:人类 CD52 转基因小鼠中嵌合抗 CD52 抗体的分析 (7F11、8G3、23E6、12G6、4B10 和 5F7)

[0523] 对人类 CD52 转基因小鼠施用 Campath®或嵌合抗 CD52 抗体 (7F11、8G3、23E6、12G6、4B10 和 5F7),以检查淋巴细胞消减的水平。将 100 微升体积的 Campath®或嵌合抗 CD52 抗体以 1mg/kg 的剂量腹腔内注射至小鼠。三天之后处死小鼠,并收集血液和脾脏以确定 B 细胞和 T 细胞消减的水平。利用流式细胞术以评估存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞、细胞毒性 T 细胞、和 B 细胞的绝对数量。这些淋巴细胞群由下列蛋白抗原的细胞表面表达而定义:CD4 表达鉴定 T 辅助细胞群,CD8 表达鉴定细胞毒性 T 细胞群且 CD19 表达鉴定所有的成熟 B 细胞群。对于 12G6 和 4B10 抗体均观察到显著水平的 T 细胞和 B 细胞消减,其可与使用 Campath®所观察到的消减相比较。使用 Campath®、嵌合 12G6 或嵌合 4B10 抗体的处理使得以此剂量水平处理的小鼠血液和脾脏中的 T 细胞和 B 细胞显著降低。7F11 和 5F7 嵌合抗体导致血液和脾脏中显著水平的 T 细胞消减水平,但在血液和脾脏中对于消减 B 细胞没那么有效。使用 23E6 抗体处理在此剂量下产生中等水平的消减,而使用较低亲合 8G3 抗体则观察到略微甚至没有消减。

[0524] 图 9A-9C 显示在使用嵌合抗体给药之后 72 小时的血液中 CD4 T 细胞、CD8 T 细胞和 CD19 B 细胞的水平。图 10A-10C 显示在给药之后 72 小时脾脏中 CD4 T 细胞、CD8 T 细胞和 CD19 B 细胞的水平。

[0525] 实施例 9:人类 CD52 转基因小鼠中嵌合抗 CD52 抗体的分析 (2C3、3G7、4B10、9D9、和 11C11)

[0526] 对人类 CD52 转基因小鼠施用 Campath®或嵌合抗 CD52 抗体 (2C3、3G7、4B10、9D9 和 11C11),以检查淋巴细胞消减的水平。将 100 微升体积的 Campath®或嵌合抗 CD52 抗体以 1mg/kg 的剂量静脉注射至小鼠。三天之后处死小鼠,并收集血液和脾脏以确定 B 细胞和 T 细胞消减的水平。利用流式细胞术以评估存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血中的全部 T 辅助细胞、细胞毒性 T 细胞、和 B 细胞的绝对数量。这些淋巴细胞群通过下列蛋白抗原的细胞表面表达而定义:CD4 表达鉴定 T 辅助细胞群,CD8 表达鉴定细胞毒性 T 细胞群,且 CD19 表达鉴定所有的成熟 B 细胞群。对于多种抗体,在血液和脾脏中均观察到显著水平的 T 细胞和 B 细胞消减。对于 2C3 和 9D9 的消减活性与使用 Campath®所观察到的消减活性是可比较的,显著水平的 CD4 和 CD8 T 细胞以及 CD19 B 细胞减少。使用嵌合 4B10 的处理也使得转基因小鼠的血液中淋巴细胞的数目显著降低。尽管使用嵌合抗体 3G7 或 11C11 抗体

的处理显著消滅血液中 T 细胞,但存在的 B 细胞的水平在此剂量下并未受显著影响。

[0527] 图 11A-11C 显示在使用嵌合抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4 T 细胞、CD8 T 细胞和 CD19 B 细胞的水平。

[0528] 实施例 10 :抗 CD52 抗体的效力分析 (7F11、4B10 和 12G6)

[0529] 将 100 微升体积的 1×10^6 个 B104 肿瘤细胞注射至四十只 SCID 小鼠 (每组 $n = 8$) 的右侧肋腹。肿瘤细胞注射后第 11 天,开始使用 Campath[®]、7F11、4B10 或 12G6 嵌合抗体处理。在剩余实验全程以 10mg/kg 每周一次通过腹膜内注射来施用抗体。未处理组的所有小鼠逐渐形成成长的肿瘤需要处死,中位生存期 29 天。相对于未处理组,使用 Campath[®] 的处理引起统计上显著增加的存活 (中位生存期 (MS) 50 天, $p < 0.0001$)。相对于未处理的小鼠,使用嵌合抗 CD52 抗体的处理也产生统计上显著增加的存活 (对于 7F11 和 4B10, $p < 0.0001$, 且对于 12G6, $p = 0.0020$)。基于存活率,7F11 与 4B10 抗体的活性显得均大于 Campath[®] (相较于 Campath[®] 的 50% 存活,7F11 为 63% 存活和 4B10 为 75% 存活)。图 12 显示处理后小鼠的存活百分比。

[0530] 实施例 11 :抗 CD52 抗体的效力分析 (2C3、8G3 和 23E6)

[0531] 将 100 微升体积的 1×10^6 个 B104 肿瘤细胞注射至四十只 SCID 小鼠 (每组 $n = 8$) 的右侧腹。肿瘤细胞注射后第 11 天,开始使用 Campath[®]、2C3、8G3 或 23E6 嵌合抗体处理。在剩余实验全程以 10mg/kg 每周一次腹膜内注射来施用抗体。未处理组的所有小鼠逐渐形成成长的肿瘤需要处死,中位生存期 26 天。使用 Campath[®]、23E6、和 2C3 抗体的处理产生统计上显著增加的存活 (分别为 $p = 0.0025$ 、 $p = 0.0007$ 、和 $p = 0.0002$)。图 13 显示处理后小鼠的存活百分率。

[0532] 实施例 12 :异种移植肿瘤模型中嵌合抗 CD52 抗体的效力分析 (9D9 和 4B10)

[0533] 将 100 微升体积的 1×10^6 个 B104 肿瘤细胞注射至四十只 SCID 小鼠 (每组 $n = 8$) 的右侧腹。肿瘤细胞注射后第 11 天,开始使用 Campath[®]、9D9 或 4B10 嵌合抗体处理。在剩余实验全程以 10mg/kg 每周一次通过腹膜内注射来施用抗体。未处理组的所有小鼠逐渐形成成长的肿瘤需要处死,中位生存期 27 天。相对于未处理组,使用 Campath[®] 处理产生统计上显著增加的存活 (中位生存期未达到,且 $p < 0.0001$)。相对于未处理的小鼠,使用嵌合抗 CD52 抗体处理也产生统计上显著增加的存活 (对于 9D9 和 4B10, $p < 0.0001$)。存活曲线的统计分析显示,9D9 嵌合抗体在此实验中显示出可与 Campath[®] 相比较的活性 ($p = 0.0675$)。图 14 显示处理后小鼠的存活百分率。

[0534] 实施例 13 :异种移植肿瘤模型中嵌合抗 CD52 抗体的效力分析 (2C3 和 11C11)

[0535] 将 100 微升体积的 1×10^6 个 B104 肿瘤细胞注射至四十只 SCID 小鼠 (每组 $n = 8$) 的右侧腹。肿瘤细胞注射后第 11 天,开始使用 Campath[®]、2C3 或 11C11 嵌合抗体处理。在剩余实验全程以 10mg/kg 每周一次通过腹膜内注射来施用抗体。未处理组的所有小鼠逐渐形成成长的肿瘤需要处死,中位生存期 32 天。相对于未处理组,使用 Campath[®] 的处理产生统计上显著增加的存活 (中位生存期未达到,且 $p < 0.0001$)。相对于未处理的小鼠,使用嵌合抗 CD52 抗体的处理也产生统计上显著增加的存活 (对于 2C3, $p < 0.0001$; 对于 11C11, $p = 0.0004$)。存活曲线的统计分析显示 2C3 和 11C11 嵌合抗体均显示出可与 Campath[®] 相比较的活性 (对于 2C3, $p = 0.3173$, 且对于 11C11, $p = 0.9703$)。图 15 显示使用 Campath[®]、2C3 嵌合抗体或 11C11 嵌合抗体处理后小鼠的存活百分率。

[0536] 实施例 14 :人源化抗 CD52 抗体 4B10 的产生和分析

[0537] 通过将 CDR 区从小鼠 4B10 抗体移植至人类抗体可变区骨架而产生人源化抗人 CD52 抗体 4B10。为了鉴定可用作 CDR 移植物的合适受体的人类生殖系重链和轻链骨架序列,通过基于网络的序列比对来评估小鼠 4B10 重链和轻链序列(图 16)。将根据 Kabat 和 IMGT®定义 CDR 区域的残基置于附加至高度序列一致性的人类骨架区中,以产生人源化重链和轻链序列。对添加的 4B10 重链和轻链序列进行视觉检查和序列分析以鉴定最合适的受体序列。在具有高度相似性的所有生殖系序列中,用于重链的 VH3-72 生殖系序列和用于轻链的 VK2-A18b(人类生殖系序列可在 Tomlinson, IM, 等人, EMBO J., 14(18) : 4628-4638(1995); Cook, GP., 等人 Nature Genetics, 7 :162-168(1994)) 出版物中叙述的网站找到) 从其与小鼠骨架区的高度同源性和序列相似度,并因其最少的 CDR 环结构破坏而被选择为 CDR 受体序列。用于 4B10 重链和轻链的 CDR1、2、和 3 序列被分别移植至 VH3-72 和 VK2-A18b 人类骨架区,以产生 4B10 的人源化重链和轻链序列(说明于图 17 ;图 110)。

[0538] 实施例 15 :嵌合和人源化 4B10 单克隆抗体的结合活性评估

[0539] 如在实施例 3 中所述制备和纯化嵌合和人源化 4B10 抗体,并分析其结合至 B 细胞系 B104 的能力,根据 FACS, B 细胞系 B104 内源地表达 CD52。简而言之,在包含 5%胎牛血清和 5%羊血清的 PBS 中将 2×10^5 个 B104 细胞系和抗体 ($0.02 \mu\text{g/ml}$ 至 $16.7 \mu\text{g/ml}$) 一起培养。结合的抗体用 FITC 标记的羊抗人二级抗体(其检测嵌合或人源化抗 CD52 抗体)检测。被标记的细胞使用 FACSCalibur 系统(Becton Dickinson)分析。图 18 显示各个样品归一化(除以)至仅 2° 样品的几何平均荧光强度倍数增加。用于该检定的人源化和嵌合抗体的 11 个不同浓度(X 轴上的第 12 个点为仅二级(secondary))示于 X 轴,且平均荧光的几何平均倍数增加示于 Y 轴。结果显示相对于嵌合 4B10 抗体,人源化 4B10 抗体同样地结合或者略微更好地结合至 CD52 表达细胞。

[0540] 实施例 16 :嵌合和人源化 4B10 单克隆抗体的 ADCC 活性评估

[0541] 对人源化和嵌合 4B10 抗体介导 CD52 表达细胞的 ADCC 杀伤的能力进行评估。如上文实施例 6 所述进行 ADCC 检定。简而言之,将改造为表达 CD52 蛋白的 CHO K1 细胞(CHO-CD52)用作靶细胞,并用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) 在 37°C 标记 1-2 小时。洗涤细胞,在具有 10% FCS 的 RPMI 1640 介质中重悬,并与嵌合或人源化 4B10 抗体以范围为从 $10 \mu\text{g/ml}$ 至 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 的各种浓度混合。将人类 PBMC 用作效应细胞,并以 1 : 50 靶细胞比效应细胞的比例加入。在 6 小时过夜培养之后,从各孔收集 25 微升无细胞的上层清液,并在 MICROBETA TRILUX Scintillation Counter(Wallac, Gaithersburg, MD) 中计数。通过单独在介质中培养靶细胞而得到自发释出的 ^{51}Cr 的量。来自靶细胞的自发释出通常小于 20%。通过加入 1% Triton X-100 至蒸馏水中而确定引入的 ^{51}Cr 总量,且裂解百分率如下计算: $[(\text{样品 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.}) / (\text{总 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.})] \times 100$ 。

[0542] 图 19 说明用于检定中的对照、嵌合和人源化 4B10 抗体的浓度(X 轴),Y 轴显示特定杀伤百分比。该结果显示相对于嵌合 4B10 抗体,人源化 4B10 抗体介导相当的或略好的 ADCC 杀伤。IgG1 同种型对照在所测试浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0543] 实施例 17 :嵌合和人源化 4B10 单克隆抗体的 CDC 活性评估

[0544] 在人类补体的存在下,对人源化和嵌合 4B10 抗体介导内源表达 CD52 的 B104 细胞的细胞毒作用的能力进行评估。使用 CellTiter Glo 试剂盒(Promega) 确定检定中剩余

的活细胞。简而言之,将 B104 细胞(靶细胞)以 2.5×10^4 个细胞/孔置于 96 孔板中,并与嵌合或人源化 4B10 抗体以范围为从 $1 \mu\text{g/ml}$ 至 $25 \mu\text{g/ml}$ 的不同浓度混合,以及人类补体至 10% 的最终浓度。仅补体而无抗体以及仅抗体而无补体用作对照以确定背景。在 37°C 培养三小时之后,将培养板以 1500rpm 离心 3 分钟,使用 CellTiter Glo 检定来检测团块(pellet)中存在的活细胞。用 Envision 机器读取培养板。图 20 显示使用 CellTiter Glo 检定所测量的在检定中存在的活细胞。再次,随着增加浓度的人源化和嵌合 4B10 抗体,活细胞数目减少。这些结果表明在 CDC 介导的 B104 细胞杀伤中,人源化抗体相对于嵌合 4B10 抗体表现一样好或者略好。

[0545] 实施例 18:在 CD52 转基因小鼠中嵌合和人源化抗 CD52 抗体的药物动力学特性分析(12G6、7F11、嵌合和人源化 4B10)

[0546] 对人类 CD52 转基因小鼠施用 Campath®、12G6、7F11、和嵌合及人源化 4B10 抗 CD52 抗体的其中一个,以检查淋巴细胞消减水平。用这些抗体之一以 100 微升体积、以 1mg/kg 的剂量静脉内注射至小鼠。为分析抗-抗体反应,在抗体注射后 2 小时、1、2、4、7、和 10 天后通过后眼窝丛穿刺收集 100 微升血液至血清分离管。使用 ELISA 分析确定各个血清样本中循环人类 IgG1 的水平。基于抗体的循环水平,Campath®、7F11、和嵌合及人源化形式的 4B10 之间显得存在很少或没有差异。注射后 12G6 抗体显现出较低的 c_{max} 值,表明此抗体可能很快降解。图 21 显示 Campath®、12G6(嵌合)、7F11(嵌合)、4B10(嵌合)和 4B10(人源化)抗体的药物动力学特性。

[0547] 实施例 19:在 CD52 转基因小鼠中嵌合和人源化抗 CD52 抗体的消减活性分析(嵌合和人源化 4B10)

[0548] 对人类 CD52 转基因小鼠施用 Campath®或嵌合或人源化 4B10 抗人 CD52 抗体,以检查淋巴细胞消减水平。将 Campath®或嵌合或人源化 4B10 抗人 CD52 抗体以 100 微升体积以 0.1mg/kg 的剂量静脉内注射至小鼠。三天之后处死小鼠并收集血液和脾脏,以确定 B 细胞和 T 细胞的消减水平。利用流式细胞术评估存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血中的全部 T 辅助细胞、细胞毒性 T 细胞、和 B 细胞的绝对数量。这些淋巴细胞群由下列蛋白抗原的细胞表面表达而定义:CD4 表达鉴定 T 辅助细胞群,CD8 表达鉴定细胞毒性 T 细胞群,且 CD19 表达鉴定所有的成熟 B 细胞群。脾脏中消减活性的比较显示,在施用 Campath®或嵌合或人源化形式的 4B10 之后消减的 T 细胞水平没有差别。因为所使用的低剂量,在脾脏中观察到仅有中度水平的 B 细胞消减。于每个动物基准,看起来人源化 4B10 抗体相对于 Campath®在介导淋巴细胞消减方面一样好或略好。图 22A-22C 显示在使用嵌合和人源化抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4 T 细胞、CD8 T 细胞和 CD19 B 细胞的水平。

[0549] 实施例 20:抗人 CD52 抗体的相对结合效率

[0550] 使用改造为表达 CD52 的 CHO 细胞来评估所选择的抗 CD52 抗体的 EC_{50} 值。在 0.25% 胰蛋白酶中使 CHO-CD52 细胞胰蛋白化,将其收集,并使用 PBS/5% FBS 漂洗。接着将细胞以每孔 1×10^5 细胞沉积至圆底 96 孔培养板中。使用各个抗 CD52 嵌合抗体的 12 点连续稀释(1:2)以 $50 \mu\text{g/ml}$ 为起始而完成初级抗体染色。使用于 $10 \mu\text{g/ml}$ (Jackson 109-096-098)二级的抗人 $\text{Fc}\gamma$ 的 FITC-结合羊 FAB2 片段。在每次培养之前和之后将细胞于冰-冷 PBS/5% FBS 中洗涤 3 次。使用含有 2% 的无甲醇多聚甲醛的 PBS 固定细胞,并通过流式细胞计数法对其评估。流式细胞术的数据使用 Graph pad Prizm 软件分析以确定

95%置信区间的 EC50 值。

[0551] 结合数据 (图 23) 显示该新的 CD52 抗体不仅具有如先前所述的不同的表位特异性,还具有不同的结合特征,如以下给出的表格所示。Campath-1H®、7F11、4B10、2C3 和 12G6 嵌合抗体显示出在 0.5 至 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 之间的相对类似的 EC50 值。9D9 嵌合抗体显示出略微不同的结合特征,其 EC50 值在约 5 至 7 $\mu\text{g/ml}$ 。4B10 人源化抗体显示出与嵌合 4B10 抗体相似的结合特征,表明人源化抗体保留有与嵌合 4B10 抗体相似的结合特征。

[0552] 表 9 :EC50 ($\mu\text{g/ml}$)

	克隆 ID	平均	STDEV
	C1H*	1.36	0.46
	2C3-Chi	1.32	0.33
[0553]	4B10-Chi	2.18	0.33
	4B10-H1/K1	2.23	0.50
	7F11-Chi	2.22	0.29
	9D9-Chi	6.05	1.18
	12G6-Chi	0.95	0.21

[0554]

[0555] *C1H 表示 Campath-1H®。

[0556] 实施例 21 :抗 CD52 抗体克隆 7F11 的人源化

[0557] 通过将 CDR 区从小鼠 7F11 抗体移植至人类抗体可变区骨架 (如在实施例 14 中对 4B10 抗体人源化所叙述) 而进行抗人 CD52 抗体克隆 7F11 的人源化。将 7F11 重链和轻链的 CDR-1、CDR-2、和 CDR-3 序列分别移植至 VH3-72 和 VK2A18b 人类骨架区。人类 JH6 (WGQGTTVTVSS ;SEQ ID NO :133) 和 JK2 (FGQGTKLEIK ;SEQ ID NO :134) 序列分别选择为人源化重链和轻链的 C 端肽,以产生 7F11 的人源化重链 (7F11-SFD1 和 7F11-SFD2) 和人源化轻链 (7F11-VK2) 可变区序列 (图 24)。这两个人源化重链可变区序列 (7F11-SFD1 和 7F11-SFD2) 不同在于 CDR-3 区域的一个氨基酸残基。7F11-SFD1 版本在 93 位是苏氨酸 (由 Kabat 编号系统表示),而 7F11-SFD2 版本于此位置是丙氨酸。在图 24 中 7F11-SFD1 和 7F11-SFD2 的 93 位下面均划线。

[0558] 7F11-SFD1 (SEQ ID NO :274) 的全长重链氨基酸序列和 7F11-K2 (SEQ ID NO :275) 的全长轻链氨基酸序列示于图 107 中。

[0559] 实施例 22 :嵌合和人源化 7F11 单克隆抗体的结合活性评估

[0560] 使用在实施例 3 中所述的方法制备并纯化嵌合和人源化 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2),并通过流式细胞术分析其结合至 CHO-CD52 细胞 (CHO 细胞被改造为表达人类 CD52) 表面上表达的 CD52 的能力。简而言之,在含有 5%胎牛血清和 5%羊血清的 PBS 中将 2×10^5 个 CHO-CD52 细胞与 10 $\mu\text{g/ml}$ 的抗体一起培养。使用 FITC 标记的羊抗人二级抗体 (其检测嵌合或人源化抗 CD52 抗体) 来检测结合的抗体。使用 FACSCalibur 系统 (Becton Dickinson) 分析被标记的细胞,并使用 FlowJo version 7.2 软件 (Tree Star, Inc, Oregon, USA) 分析数据。图 25 的统计图比较了使用嵌合和人源化 7F11 抗体所检测的

CD52 水平。结果表明相对于嵌合 7F11 抗体,人源化 7F11 抗体同样地结合或者略微更好地结合至 CD52 表达细胞。

[0561] 实施例 23 :抗 CD52 抗体克隆 2C3 的人源化

[0562] 通过将 CDR 区从鼠 2C3 抗体移植至人类抗体可变区骨架(如在实施例 14 中对克隆 4B10 抗体人源化所叙述)而进行抗人 CD52 抗体克隆 2C3 的人源化。将 2C3 重链和轻链的 CDR-1、CDR-2、和 CDR-3 序列分别移植至 VH3-72 和 VK2 A18b 人类骨架区。人类 JH6(WGQGTTVTVSS ;SEQ ID NO :133) 和 JK5(FGQGTRLEIK ;SEQ ID NO :135) 序列分别选择为人源化重链和轻链的 C 端肽,以产生 2C3 的人源化重链(2C3-SFD1) 和轻链(2C3-VK1) 可变区序列(图 26A 和 B)。不像人源化克隆 4B10 和 7F11,移植了 CDR 的人源化 2C3 抗体的结合亲合性大为降低。结合亲合性通过对移植了 CDR 的结构引入回复突变而得到恢复,以将回复突变的数目限制为最小作为目的,以保持重新成型的抗体尽可能地像“人类”,由此降低免疫原性的可能性。对人源化重链可变区和轻链可变区序列均引入单个或多个回复突变。回复突变的位置(如由 Kabat 编号系统所表示)描述于下表 10 和表 11。对通过这些回复突变所产生的抗体其恢复的结合亲合性进行评估。使用标准分子生物技术产生三个轻链变体(2C3-VK1(L46R),也称为 2C3-VK11 ;2C3-VK1(Y36L-L46R),也称为 2C3-VK12 ;和 2C3-VK1(M4I-A19V-Y36L-Q45K-L46R),也称为 2C3-VK13) 以及 5 个重链变体(2C3-SFD1(L78V),也称为 2C3-VH12 ;2C3-SFD1(G49A),也称为 2C3-VH15 ;2C3-SFD1(G49A-L78V),也称为 2C3-VH16 ;2C3-SFD1(L18M-G49A-L78V),也称为 2C3-VH17 ;和 2C3-SFD1(L18M-G42E-G49A-L78V),也称为 2C3-VH19)。移植了 CDR 的重链可变区序列 2C3-SFD1 和回复突变体 2C3-VH12、2C3-VH15、2C3-VH16、2C3-VH17、和 2C3-VH19 的氨基酸序列示于图 26A,且回复突变的氨基酸下面划线并且 CDRs 为粗体。类似地,对于轻链序列,移植了 CDR 的可变区序列 2C3-VK1 和回复突变体 2C3-VK11、2C3-VK12、和 2C3-VK13 示于图 26B,且回复突变的氨基酸下面划线并且 CDRs 为粗体。

[0563] 2C3-SFD1(SEQ ID NO :272) 的全长重链氨基酸序列和 2C3-K12(SEQ ID NO :273) 的全长轻链氨基酸序列示于图 106 中。

[0564] 表 10 :2C3 克隆重链回复突变

克隆 ID	突变 (Kabat 编号位置)
2C3-VH12	L 到 V (78)
2C3-VH15	G 到 A (49)
[0565] 2C3-VH16	G 到 A (49), L 到 V (78)
2C3-VH17	L 到 M (18), G 到 A (49), L 到 V (78)
2C3-VH19	L 到 M (18), G 到 E (42), G 到 A (49), L 到 V (78)

[0566] 表 11 :2C3 克隆轻 (κ) 链回复突变

克隆 ID	突变 (Kabat 编号位置)
[0567] 2C3-VK11	L 到 R (46)
2C3-VK12	Y 到 L (36) 和 L 到 R (46)
2C3-VK13	M 到 I (4), A 到 V (19), Y 到 L (36), QL 到 KR (45, 46)

[0568] 实施例 24 :嵌合和人源化 2C3 单克隆抗体的结合活性评估

[0569] 使用在实施例 3 中所述的方法制造和纯化嵌合和人源化 2C3 抗体。使用实施例 22 中所述的方法,通过流式细胞术分析数种通过将重链变体和轻链变体配对而产生的人源化抗体、和对应的嵌合抗体结合至 CHO-CD52 细胞表面上所表达的 CD52 的能力。结合数据表明通过配对重链变体与轻链变体 2C3-VK1 或 2C3-VK11 所产生的克隆具有降低的结合能力,而通过配对重链变体与 2C3-VK12 或 2C3-VK13 所产生的克隆则显示出与嵌合 2C3 抗体相当或更好的结合。所选择克隆的代表性统计图(图 27A)比较了通过嵌合和人源化 2C3 抗体所检测的 CD52 水平。相对于对应的嵌合抗体的结合,2C3-SFD1/K1 的结合显著降低。在轻链的位置 46 引入单一小鼠残基(亮氨酸到精氨酸)(产生 2C3-VK11),当其与重链 2C3-SFD1 配对以制造抗体 2C3-SFD1/K11 时没有恢复结合。而且,通过在重链引入三个回复突变(产生 2C3-VH17)以制造抗体 2C3-H17/K11,结合并未得到恢复。然而,当 2C3-SFD1 重链与具有两个回复突变的 2C3-VK12 配对以制造抗体 2C3-SFD1/K12 时,结合完全恢复,表明需要引入特定的回复突变以恢复结合亲合力。图 27B 显示所选择的人源化克隆的统计图,其显示出与嵌合 2C3 抗体相当的结合。这些结果表明 2C3-VK12 轻链中两个氨基酸残基的回复突变足以完全恢复抗体亲和力。当与几乎任何重链变体配对时,在残基 36(Y 到 L)和 46(L 到 R)的变化能够恢复结合。这样,具有最少衍生自原来的小鼠抗体的骨架残基且显示出结合恢复的人源化 2C3 克隆为 2C3-SFD1/K12。

[0570] 实施例 25 :抗 CD52 抗体克隆 12G6 的人源化

[0571] 通过将 CDR 区从小鼠 12G6 抗体移植至人类抗体可变区骨架(如在实施例 14 中对克隆 4B10 抗体人源化所叙述)而进行抗人 CD52 抗体克隆 12G6 的人源化。将 12G6 重链和轻链的 CDR-1、CDR-2、和 CDR-3 序列分别移植至 VH3-72 和 VK2 A18b 人类骨架区。人类 JH6(WGQGTTVTVSS;SEQ ID NO:133)和 JK2(FGQGTKLEIK;SEQ ID NO:134)序列分别被选择为人源化重链和轻链的 C 端肽,以产生 12G6 的人源化重链(12G6-SFD1)和轻链(12G6-VK1)可变区序列(图 28A 和 28B)。当 12G6-SFD1 重链可变区和 12G6-VK1 轻链可变区合并于人源化 12G6-SFD1/K1 抗体时,对 CD52 的结合亲合性大为降低。结合亲合性通过对移植了 CDR 的结构引入回复突变而得到恢复。将单个或多个回复突变引入人源化重链可变区序列和轻链可变区序列。这些回复突变的位置(如由 Kabat 编号系统所表示)描述于下表 12 和表 13 中。对通过这些回复突变所产生的抗体其恢复的结合亲合性进行评估。使用标准分子生物技术产生四个轻链变体(12G6-VK1(Y36V),也称为 12G6-VK10;12G6-VK1(Y36V-Q45K-L46R),也称为 12G6-VK11;12G6-VK1(Y36V-L46R),也称为 12G6-VK12;和 12G6-VK1(L46R),也称为 12G6-VK13),以及三个重链变体(12G6-SFD1(L78V),也称为 12G6-VH10;12G6-SFD1(G49A),也称为 12G6-VH11;和 12G6-SFD1(G49A-L78V),也称为 12G6-VH12)。移植了 CDR 的重链可变区序列 12G6-SFD1 和回复突变体 12G6-VH10、12G6-VH11、和 12G6-VH12 的氨基酸序列示于图

28A,且回复突变的氨基酸下面划线,并且 CDRs 为粗体。类似地,对于轻链序列,移植了 CDR 的可变区序列 12G6-VK1 和回复突变体 12G6-VH10、12G6-VH11、12G6-VK12、和 12G6-VK13 示于图 28B,且回复突变的氨基酸下面划线并且 CDRs 为粗体。

[0572] 12G6-SFD1 (SEQ ID NO :279) 的全长重链氨基酸序列和 12G6-K12 (SEQ ID NO :280) 的全长轻链氨基酸序列示于图 109。

[0573] 表 12 :12G6 克隆重链回复突变

[0574]

克隆 ID	突变 (Kabat 编号位置)
12G6-VH10	L 到 V(78)
12G6-VH11	G 到 A(49)
12G6-VH12	G 到 A(49) 和 L 到 V(78)

[0575] 表 13 :12G6 克隆轻 (κ) 链回复突变

克隆 ID	突变 (Kabat 编号位置)
12G6-VK10	Y 到 V (36)
12G6-VK11	Y 到 V (36), QL 到 KR (45, 46)
12G6-VK12	Y 到 V (36), L 到 R (46)
12G6-VK13	L 到 R (46)

[0577] 实施例 26 :嵌合和人源化 12G6 单克隆抗体的结合活性评估

[0578] 使用在实施例 3 中所述的方法制造和纯化嵌合和人源化 12G6 抗体。使用实施例 22 中所述的方法,通过流式细胞术分析数种通过配对重链变体和轻链变体而产生的人源化抗体、和对应的嵌合抗体结合至 CHO-CD52 细胞表面上所表达的 CD52 的能力。结合数据表明通过配对重链变体与轻链变体 12G6-VK1、12G6-VK10、或 12G6-VK13 所产生的克隆具有降低的结合能力,而通过配对重链变体与 12G6-VK11 或 12G6-VK12 所产生的克隆则显示出与对应的嵌合 12G6 抗体相当或更好的结合。所选择克隆的代表性统计图 (图 29) 比较了通过嵌合和人源化 12G6 抗体所检测的 CD52 水平。这些结果表明,12G6 轻链可变区中两个氨基酸残基的回复突变 (克隆 12G6-VK12) 足以完全恢复抗体特异性。当与几乎任何重链变体配对时,在 Kabat 编号残基 36 (Y 到 V) 和 46 (L 到 R) 的变化能够恢复结合。这样,具有最少衍生自原来的小鼠抗体的骨架残基且显示出恢复的结合的人源化 12G6 克隆为 12G6-SFD1/K12。

[0579] 实施例 27 :抗 CD52 抗体克隆 9D9 的人源化

[0580] 通过将 CDR 区从小鼠 9D9 抗体移植至人类抗体可变区骨架 (如在实施例 14 中对克隆 4B10 抗体人源化所叙述) 而进行抗人 CD52 抗体克隆 9D9 的人源化。将 9D9 重链和轻链的 CDR-1、CDR-2、和 CDR-3 序列分别移植至 VH3-23 和 VK2A18b 人类骨架区。人类 JH6 (WGQGTTVTVSS :SEQ ID NO :133) 和 JK2 (FGQGTKLEIK :SEQ ID NO :134) 序列分别被

选择为人源化重链和轻链的 C 端肽,以产生人源化重链 (9D9-VH10) 和轻链 (9D9-VK2) 可变区序列 (图 30A 和 30B)。当 9D9-VH10 重链和 9D9-VK2 轻链合并于人源化 9D9-H10/K2 抗体时,对 CD52 的结合亲合性大为降低。通过对移植了 CDR 的结构引入回复突变,结合亲合性得到恢复。将单个或多个回复突变引入人源化重链可变区序列和轻链可变区序列。这些回复突变的位置 (如由 Kabat 编号系统表示) 描述于下表 14 和表 15 中。对通过这些回复突变所产生的抗体其恢复的结合亲合性进行评估。使用标准分子生物技术产生四个轻链变体 (9D9-VK2 (Y36L-Q45K-L46R), 也称为 9D9-VK12 ;9D9-VK2 (Y36L-L46R), 也称为 9D9-VK13 ;9D9-VK2 (L46R), 也称为 9D9-VK14 ;和 9D9-VK2 (Q45K-L46R), 也称为 9D9-VK15) 以及五个重链变体 (9D9-VH10 (W47L-V48T-S49A-N76S-L78V), 也称为 9D9-VH11 ;9D9-VH10 (W47L-V48T-S49A), 也称为 9D9-VH15 ;9D9-VH10 (W47L), 也称为 9D9-VH16 ;9D9-VH10 (W47L-V48T), 也称为 9D9-VH17 ;和 9D9-VH10 (W47L-S49A), 也称为 9D9-VH18)。移植了 CDR 的重链可变区序列 9D9-VH10 和回复突变体 9D9-VH11、9D9-VH15、9D9-VH16、9D9-VH17、和 9D9-VH18 的氨基酸序列示于图 30A,且回复突变的氨基酸下面划线并且 CDRs 为粗体。类似地,对于轻链序列,移植了 CDR 的可变区序列 9D9-VK2 和回复突变体 9D9-VK12、9D9-VK13、9D9-VK14、和 9D9-VK15 示于图 30B,且回复突变的氨基酸下面划线并且 CDRs 为粗体。

[0581] 9D9-H16 (SEQ ID NO :276) 和 9D9-H18 (SEQ ID NO :277) 的全长重链氨基酸序列和 9D9-K13 (SEQ ID NO :278) 的全长轻链氨基酸序列示于图 108。

[0582] 表 14 :9D9 重链回复突变

[0583]

克隆 ID	突变 (Kabat 编号位置)
9D9-VH11	WVS 到 LTA (47-49)、N 到 S (76), L 到 V (78)
9D9-VH15	WVS 到 LTA (47-49)
9D9-VH16	W 到 L (47)
9D9-VH17	WV 到 LT (47, 48)
9D9-VH18	W 到 L (47) 和 S 到 A (49)

[0584] 表 15 :9D9 轻 (κ) 链回复突变

[0585]

克隆 ID	突变 (Kabat 编号位置)
9D9-VK12	Y 到 L (36) 和 QL 到 KR (45, 46)
9D9-VK13	Y 到 L (36) 和 L 到 R (46)
9D9-VK14	L 到 R (46)

9D9-VK15	QL 到 KR(45, 46)
----------	-----------------

[0586] 实施例 28 :嵌合和人源化 9D9 单克隆抗体的结合活性评估

[0587] 使用在实施例 3 中所述的方法制造并纯化嵌合 9D9 抗体和人源化 9D9 抗体。使用实施例 22 中所述的方法,通过流式细胞术分析数种通过配对重链变体和轻链变体而产生的人源化抗体、和对应的嵌合抗体其结合至 CHO-CD52 细胞(被改造为表达人类 CD52 的 CHO 细胞)表面上所表达的 CD52 的能力。结合数据表明,通过配对重链变体与轻链变体 9D9-VK2、9D9-VK14、或 9D9-VK15 所产生的克隆具有降低的结合能力,而通过配对 9D9-VK12 或 9D9-VK13 轻链变体与回复突变的重链变体 9D9-VH11、9D9-VH15、9D9-VH16、和 9D9-VH18 所产生的克隆则显示出与对应的嵌合 9D9 抗体相当或更好的结合。当轻链变体 9D9-VK12 和 9D9-VK13 与亲本 CDR 移植的重链 9D9-VH10 或回复突变的 9D9-VH17 序列配对时,结合显著降低,表明对于人源化 9D9 克隆,重链和轻链序列均需要被改造为具有回复突变以恢复结合能力。所选择克隆的代表性统计图(图 31)比较了通过嵌合和人源化 9D9 抗体所检测的 CD52 水平。这些结果表明,当与在一个位置突变(例如,W 到 L,47 位处)或在两个位置突变(例如,47 位处 W 到 L 以及 49 位处 S 到 A)的重链配对时,9D9 轻链可变区中的两个氨基酸残基的回复突变(例如,位置 36 处 Y 到 L,和位置 46 处 L 到 R)(克隆 9D9-VK13)对于恢复抗体特异性是必须的。这样,具有最少衍生自原来的小鼠抗体的骨架残基并且显示出恢复的结合的人源化 9D9 克隆为 9D9-VH18/K13。

[0588] 实施例 29 :人源化抗人 CD52 抗体的相对结合效率的确定

[0589] 使用从由商业来源(Bioreclamation, NY, USA)获得的健康捐赠者 PBMCs 所分离的 CD4+ T 细胞来评估嵌合和人源化抗 CD52 抗体的 EC₅₀ 值。使用 EasySep 试剂盒(Stem Cell Technologies)通过负筛而分离 CD4+ T 细胞。根据在实施例 20 中对 CHO-CD52 细胞所叙述的方法也使用(Stem Cell Technologies)由 huCD52 转基因 CD1 小鼠脾脏组织所分离的 CD4+T 细胞。简而言之,从来自健康捐赠者(Bioreclamation)的 50 毫升外周血分离人类 CD4+ T 细胞,从脾脏组织分离 huCD52 转基因小鼠 CD4+ T 细胞。将细胞以 PBS/5% FBS 漂洗,并以每孔 1×10^5 个细胞沉积至圆底 96 孔培养板。使用各个抗 CD52 嵌合和人源化抗体的 8 点连续稀释(1 : 3)以起始浓度 100 μ g/ml 而进行初级抗体染色。使用于 10 μ g/ml(Jackson 109-096-098)二级抗体的抗人 Fc γ 的 FITC-结合羊 F(ab')₂ 片段。在每一次培养之前和之后将细胞在冰-冷 PBS/5% FBS 中洗涤 3 次。使用含有 2% 的无甲醇多聚甲醛的 PBS 固定细胞,并用流式细胞计数法对其评估。流式细胞数据使用 Graph pad Prism 软件分析,以确定 95% 置信区间的 EC₅₀ 值。基于抗 CD52 抗体对由人类 PBMCs 所分离的 CD4+ T 细胞以及对由人类 CD52 转基因小鼠的脾脏组织所分离的 CD4+ T 细胞的结合,得到结合曲线(图 32A、32B、32C)并对 EC₅₀ 值进行评估,示于图 33。所有抗体对人类 CD4+ T 细胞和对由人类 CD52 转基因小鼠所分离的 CD4+ T 细胞显示出相似的结合特性。结合数据显示人源化抗体具有与其亲本嵌合抗体相当或更好的结合亲合性,表明在人源化时结合亲合性被保留或改进。人源化 2C3 和 12G6 抗体相对于 Campath-1H® 抗体具有低至少两倍的 EC₅₀ 值(如通过此细胞结合检定所检测)。

[0590] 实施例 30 :人源化抗 CD52 抗体结合至限定的淋巴细胞群的评估

[0591] 使用在以上实施例 7 中针对嵌合抗 CD52 抗体所叙述的方法,对 Campath-1H®

(C1H) 和 人 源 化 2C3(2C3-SFD1/K12)、9D9(9D9-H16/K13 和 9D9-H18/K13)、 和 12G6(12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12) 抗体结合至正常提供者 PBMCs 中的各种 PBMC 亚型进行评估。使用多种荧光染料结合抗体来进行流式细胞分析。抗 -CD27-PE、抗 -CD19 和 抗 -CD11c-PE Cy5、抗 -CD56 和 抗 -CD123-PECy7、抗 -CD 16-APC Cy7、和 CD4-APC 从 BD Biosciences(San Diego, CA) 获得, 而 抗 -CD54RA-ECD 以及 抗 -HLA-DR-ECD 则从 Beckman Coulter 获得。抗 -CD3-Pacific Blue、抗 -CD8 及 抗 -CD14-Pacific Orange、以及 抗 -CD4-APC cy5.5 从 Invitrogen(CA) 获得。所有的人源化抗人 CD52 抗体 (9D9-H18/K13、9D9-H16/K13、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、及 2C3-SFD1/K12) 以及 Campath-1H® 都结合至 FITC。健康人类外周血单核细胞或是从冷藏保存的淡黄色层 (buffy coats) 获得, 或是来自于由从商业供应商 (Bioreclamation, NY, USA) 获得的正常捐赠者的血液所分离的单核细胞, 如在以上实施例 7 中所叙述。为了富集单核细胞, 使用无菌的磷酸缓冲盐水 (PBS) 以 1 : 1 稀释人类外周血, 并小心地将其叠加于聚蔗糖 - 泛影葡胺 (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) 之上, 并于室温离心 30 分钟。取出单核细胞的相间层, 并在含有 5% 胎牛血清 (FACS 缓冲液) 的 PBS 中洗涤。污染的红血球细胞 (RBCs) 使用 RBC 裂解溶液 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 裂解。使细胞在冷 FACS 缓冲液中重悬, 并使用 40 微米过滤器移除碎屑。进行多色流式细胞术, 以对人源化抗人 CD52 抗体 2C3(2C3-SFD1/K12)、9D9(9D9-H16/K13 和 9D9-H18/K13) 和 12G6(12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1/K12) 相较于 Campath-1H® 的结合能力进行评估。

[0592] 简而言之, 将 1×10^6 个 PBMCs 于 FACS 缓冲液的重复物与抗体的预先滴定稀释液的混合物一起培养, 以检查淋巴细胞或骨髓样的衍生细胞。淋巴细胞混合物包含针对 CD3、CD27、CD45RA、CD56、CD19、CD8、CD4、和 CD16 的抗体。定义髓样细胞群的抗体混合物, 包含针对 HLA-DR、CD11c、CD123、CD4、和 CD14 的抗体。在每一个混合物中, 抗 CD52 抗体中的一种以 $10 \mu\text{g/ml}$ 的浓度包含。在 4°C 下对细胞染色 30 分钟, 将其洗涤, 并在含有 1% 多聚甲醛的 PBS 中固定。在 BD LSR II 流式细胞仪 (BD Biosciences, San Jose, CA) 上得到 100,000 个染色细胞, 并使用 FlowJo 7.2 版软件 (Tree Star, Inc, Oregon, USA) 对数据进行分析。具有明显的表型特征的多个亚型已在 B 和 T 淋巴细胞之间限定, 并且已经显示 CD52 在所有人类淋巴细胞上表达。进行多色流式细胞分析以鉴定淋巴细胞亚型, 和评估人源化抗 CD52 抗体在对所限定亚型上的细胞表面 CD52 的结合特征方面的相似点和不同点。使用标记组合, 先确定出对应于 B、T、NK 及抗原呈递细胞系的表型明显的细胞群。对染色强度进行评估, 其对应于人源化抗 CD52 抗体检测各种确定的细胞群上 CD52 表达的能力, 并将其与 Campath-1H® 的染色强度相比较。统计图 (图 34) 比较了通过各种抗体在各个类群上所检测的 CD52 水平。结果显示, 所有的人源化抗 CD52 抗体以相似程度结合至细胞表面 CD52。而且, 对于细胞表面 CD52 的检测水平, 在 Campath-1H® 与人源化抗 CD52 抗体之间没有观察到差别。在六种不同供体上进行分析。使用衍生自一种供体的细胞所得到的代表性数据示于图 34。使用来自其它供体的细胞观察到类似的结合形式。

[0593] 实施例 31 : 嵌合和人源化 7F11 单克隆抗体的 ADCC 活性评估

[0594] 对人源化和嵌合 7F11 抗体介导 CD52 表达细胞的 ADCC 杀伤的能力进行评估。使用如在上文实施例 6 中所叙述的方法进行 ADCC 检定。简而言之, 将改造为表达 CD52 蛋白的 CHO K1 细胞 (CHO-CD52) 用来作为靶细胞。使用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston,

MA) 于 37°C 对该靶细胞标记 2-3 小时。洗涤该细胞, 将其在具有 10% FCS 的 RPMI 1640 介质中重悬, 并与 IgG 对照抗体、嵌合 7F11 抗体、或人源化 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 或 7F11-SFD2/K2) 以范围为从 5 μ g/ml 至 0.01 μ g/ml 的各种浓度混合。将使用 NK 细胞分离试剂盒 (Stem Cell Technologies) 从 PBMCs 中分离的人类 NK 细胞用来做为效应细胞, 并以 1 : 5 的靶细胞比效应细胞的比例加入。在 2-6 小时培养之后, 从各孔收集 25 微升无细胞的上层清液, 并在 MicroBeta Trilux Scintillation Counter (Wallac, Gaithersburg, MD) 中对其计数。通过单独在介质中培养靶细胞而得到自发释出的 ^{51}Cr 的量。来自靶细胞的自发释出通常小于 20%。通过加入 1% Triton X-100 至蒸馏水中而确定引入的 ^{51}Cr 总量, 且裂解百分率如下计算: $[(\text{样品 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.}) / (\text{总 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.})] \times 100$ 。图 35 说明用于该检定中的对照 IgG、嵌合 7F11 抗体、和人源化 7F11 抗体的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示, 相对于嵌合 7F11 抗体, 人源化 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2) 介导与之相当的或者略好的 ADCC 杀伤。对照 IgG1 同种型在所测试浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0595] 实施例 32 : 嵌合和人源化 7F11 单克隆抗体的 CDC 活性评估

[0596] 对人源化和嵌合 7F11 抗体介导 CD52 表达细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力进行评估。使用如在上文实施例 5 中对于嵌合抗 CD52 抗体所叙述的方法来进行 CDC 检定。简而言之, 将改造为表达 CD52 蛋白的 CHO K1 细胞 (CHO-CD52) 用来作为靶细胞, 并用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) 于 37°C 对其标记 2-3 小时。洗涤该细胞, 将其在 RPMI 1640 介质中重悬, 并与 IgG 对照抗体、嵌合 7F11 抗体、或人源化 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 或 7F11-SFD2/K2) 以范围为从 20 μ g/ml 至 500ng/ml 的各种浓度混合。加入人类补体 (Sigma) 至实验孔中至达到 10% 的最终浓度。在 1-5 小时培养之后, 从各孔收集 25 微升无细胞的上层清液, 并在 MicroBeta Trilux Scintillation Counter (Wallac, Gaithersburg, MD) 中对其计数。通过单独在介质中培养靶细胞而得到自发释出的 ^{51}Cr 的量。来自靶细胞的自发释出通常小于 20%。通过加入 1% Triton X-100 至蒸馏水中而确定引入的 ^{51}Cr 总量, 且裂解百分率如下计算: $[(\text{每分钟样品数 (c. p. m.)} - \text{自发的 c. p. m.}) / (\text{总 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.})] \times 100$ 。图 36 说明用于该检定中的对照 IgG、嵌合 7F11 抗体、和人源化 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2) 的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示, 嵌合 7F11 抗体与人源化抗体 7F11-SFD1/K2 介导同等的杀伤, 而相对于嵌合 7F11 抗体, 人源化抗体 7F11-SFD2/K2 介导显著更好的 CDC 杀伤。对照 IgG1 同种型抗体在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0597] 实施例 33 : 嵌合和人源化 2C3 单克隆抗体的 ADCC 活性评估

[0598] 对人源化和嵌合 2C3 抗体介导 CD52 表达细胞的 ADCC 杀伤的能力进行评估。使用如在上文实施例 6 中所叙述的方法加以略微修改而进行 ADCC 检定。简而言之, 将使用 CD4+T 细胞分离试剂盒 (Stem Cell Technologies) 从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞用来作为靶细胞。用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) 于 37°C 对该靶细胞标记过夜。洗涤该细胞, 将其在具有 10% FCS 的 RPMI 1640 介质中重悬, 并与 IgG 对照抗体、嵌合 2C3 抗体、或人源化 2C3 抗体 (2C3-SFD1/K12) 以范围为从 10 μ g/ml 至 100pg/ml 的不同浓度混合。将从 PBMCs 分离的人类 NK 细胞 (使用来自 Stem Cell Technologies 的 NK 细胞分离试剂盒) 用来作为效应细胞, 并以 1 : 5 的靶细胞比效应细胞的比例加入。在 2-6 小时

培养之后,从各孔收集 25 微升无细胞的上层清液,并在 MicroBeta Trilux Scintillation Counter (Wallac, Gaithersburg, MD) 中对其计数。通过单独在介质中培养靶细胞而得到自发释出的 ^{51}Cr 的量。来自靶细胞的自发释出通常小于 20%。通过加入 1% Triton X-100 至蒸馏水中而确定引入的 ^{51}Cr 的总量,且裂解百分比如下计算: $[\text{样品 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.}] / (\text{总 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.}) \times 100$ 。图 37 说明用于该检定中的对照 IgG、嵌合 2C3 抗体、及人源化 2C3 抗体 (2C3-SFD1/K12) 的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,人源化 2C3 抗体 2C3-SFD1/K12 介导与 2C3 嵌合抗体相当的 ADCC 杀伤。IgG1 同种型对照在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0599] 实施例 34:嵌合和人源化 2C3 单克隆抗体的 CDC 活性评估

[0600] 对人源化和嵌合 2C3 抗体介导 CD52 表达细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力进行评价。使用如在上文实施例 5 中所叙述的方法加以略微修改而进行 CDC 检定。简而言之,将从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞用来作为靶细胞,并用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (New England Nuclear, Boston, MA) 在 37 °C 对其过夜标记。过夜标记之后,洗涤该细胞,将其在含有 10% FCS 的 RPMI 1640 介质中重悬,并与 IgG 对照抗体、嵌合 2C3 抗体、或人源化 2C3 抗体 (2C3-SFD1/K12) 以范围为从 10 $\mu\text{g/ml}$ 至 10ng/ml 的不同浓度混合。向实验孔中加入人类补体 (Sigma) 至达到 10% 的最终浓度。在 1-5 小时培养之后,从各孔收集 25 微升无细胞的上层清液,并在 MicroBeta Trilux Scintillation Counter (Wallac, Gaithersburg, MD) 中对其计数。通过单独在介质中培养靶细胞而得到自发释出的 ^{51}Cr 的量。来自靶细胞的自发释出通常小于 20%。通过加入 1% Triton X-100 至蒸馏水中而确定引入的 ^{51}Cr 的总量,且裂解百分率如下计算: $[(\text{每分钟样品数 (c. p. m.)} - \text{自发的 c. p. m.}) / (\text{总 c. p. m.} - \text{自发的 c. p. m.})] \times 100$ 。图 38 说明用于该检定中的对照 IgG、嵌合 2C3 抗体、及人源化 2C3 抗体 (2C3-SFD1/K12) 的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,嵌合 2C3 抗体和人源化 2C3 抗体 (2C3-SFD1/K12) 介导同等的裂解。对照 IgG1 同种型抗体在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0601] 实施例 35:嵌合和人源化 12G6 单克隆抗体的 ADCC 活性评估

[0602] 对人源化和嵌合 12G6 抗体介导 CD52 表达细胞的 ADCC 杀伤的能力进行评估。如在上文实施例 31 中所述,使用从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞作为靶细胞,并通过铬释出试验而进行 ADCC 检定。图 39 说明用于此检定中的对照 IgG、嵌合 12G6 抗体、及人源化 12G6 抗体 (12G6-SFD1/K11 或 12G6-SFD1/K12) 的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,相对于 12G6 嵌合抗体,人源化 12G6 抗体 12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1/K12 介导与之相当的 ADCC 杀伤。IgG1 同种型对照在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0603] 实施例 36:嵌合和人源化 12G6 单克隆抗体的 CDC 活性评估

[0604] 对人源化和嵌合 12G6 抗体介导 CD52 表达细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力进行评估。如在上文实施例 32 中所叙述,使用从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞作为靶细胞,并通过铬释出试验而进行 CDC 检定。图 40 说明用于此检定中的对照 IgG、嵌合 12G6 抗体、及人源化 12G6 抗体 (12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1/K12) 的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,嵌合 12G6 抗体介导与人源化 12G6 抗体 (12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1/K12) 相当的裂解。对照 IgG1 同种型抗体在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0605] 实施例 37 :嵌合和人源化 9D9 单克隆抗体的 ADCC 活性评估

[0606] 对人源化和嵌合 9D9 抗体介导 CD52 表达细胞的 ADCC 杀伤的能力进行评估。如在上文实施例 31 中所叙述,使用从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞作为靶细胞,并通过铬释出试验而进行 ADCC 检定。图 41 说明用于此检定中的对照 IgG、嵌合 9D9 抗体、和人源化 9D9 抗体 (9D9-H10/K13、9D9-H11/K13、9D9-H16/K13、和 9D9-H18/K13) 的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,嵌合与人源化 9D9 抗体 (9D9-H10/K13 为例外) 介导相当的 ADCC 杀伤。IgG1 同种型对照在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0607] 实施例 38 :嵌合和人源化 9D9 单克隆抗体的 CDC 活性评估

[0608] 对人源化和嵌合 9D9 抗体介导 CD52 表达细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力进行评价。如在上文实施例 32 中所叙述,使用从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞作为靶细胞,并通过铬释出试验而进行 CDC 检定。图 42 说明用于此检定中的对照 IgG、嵌合 9D9 抗体、和人源化 9D9 抗体 (9D9-H10/K13、9D9-H11/K13、9D9-H16/K13、和 9D9-H18/K13) 的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,嵌合 9D9 抗体介导与人源化 9D9 抗体 (9D9-H10/K13 为例外) 相当的裂解。对照 IgG1 同种型抗体在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0609] 实施例 39 :Campath-1H®和人源化抗 CD52 抗体对于初始 T 细胞的 ADCC 活性评估

[0610] 对 Campath-1H®和人源化抗 CD52 抗体介导 CD52 表达细胞的 ADCC 杀伤的能力进行评估。如在上文实施例 31 中所叙述,使用从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞作为靶细胞并通过铬释出试验而进行 ADCC 检定。图 43 说明用于此检定中的对照 IgG、Campath-1H®、和人源化 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13、9D9-H18/K13、12G6-SFD1/K11、及 12G6-SFD1/K12 抗体的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,上述人源化 2C3、9D9 和 12G6 抗体在超过 10ng/ml 的浓度下介导与 Campath-1H®相当的 ADCC 杀伤。IgG1 同种型对照在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0611] 实施例 40 :Campath-1H®和人源化抗 CD52 抗体对于初始 T 细胞的 CDC 活性的评估

[0612] 对 Campath-1H®和人源化抗 CD52 抗体介导 CD52 表达细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的能力进行评估。如在上文实施例 32 中所叙述,使用从健康捐赠者 PBMCs 分离的 T 细胞作为靶细胞并通过铬释出试验而进行 CDC 检定。图 44 说明用于此检定中的对照 IgG、Campath-1H®、和人源化 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13、9D9-H18/K13、12G6-SFD1/K11、和 12G6-SFD1/K12 抗体的浓度 (X 轴) 相对于特定裂解百分比 (Y 轴)。结果显示,人源化 2C3 和 12G6 抗体介导与 Campath-1H®相当的 CDC 杀伤,而人源化 9D9 抗体显示出显著降低的 CDC 活性,与其对应的嵌合抗体相似。IgG1 同种型对照在所测试的浓度下显示仅低水平的背景杀伤。

[0613] 实施例 41 :含有抗 Campath-1H®中和抗体的血清样品阻碍人源化 2C3、12G6、和 9D9 抗 CD52 抗体活性的中和能力的评估

[0614] 为评估在针对 Campath-1H®的中和抗体的存在下人源化抗体结合至 CD52 表达细胞的能力,将抗 CD52 抗体 (Campath-1H®、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 和 12G6-SFD1/K12) 与含有抗 Campath-1H®抗体反应性的人类血清反应,并评估其对于 CD52 表达的 Raji 细胞的结合。从加入 CAMMS223 研究 (The CAMMS223 Trial Investigators,“Alemtuzumab

vs. interferon Beta-1a in early multiple sclerosis,” *N Engl J Med* 359 : 1786-1801 (2008)) 的复发缓解型多发性硬化症病人所得到的血清样品被用于此检定中。在大多数病人中, Campath-1H® 抗体的重复给药引起抗 Campath-1H® 抗体反应的产生。在大多数病人中, 抗 Campath-1H® 抗体滴度在第 12 个月非常低, 并在第二周期的 Campath-1H® 给药时显著增加, 在第 13 个月于血清中产生高滴度抗 Campath-1H® 反应。使用从五个不同的 MS 病人 (MS-1 至 MS-5) (该五个病人已经按照 CAMMS223 步骤流程使用 Campath-1H® 治疗) 获得的第 12 个月和第 13 个月的血清样品进行抗 CD52 抗体中和试验。在不存在或存在一系列的从已使用 Campath-1H 治疗的病人获得的血清稀释液条件下, 使用结合有 FITC 的抗 CD52 抗体 Campath-1H®、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K12、和 9D9-H16/K13 (用于实施例 30 中, 并且已经显示其结合至 CD52 表达细胞) 对表达人类 CD52 的 Raji 细胞进行染色。简而言之, 将 MS 病人血清样品 (第 12 个月和第 13 个月) 制成 6 倍连续稀释物, 并与 10 μg/ml 的结合有 FITC 的抗 CD52 抗体 (Campath-1H®、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K12、和 9D9-H16/K13) 于 37°C 一起培养 1 小时。将 Raji 细胞用包含 HBSS、5% FBS、和 0.1% 叠氮化物的染色缓冲液进行漂洗, 接着以每孔 1×10^5 个细胞使其沉积至圆底 96 孔培养板。使用 10 μg/ml 的人类 IgG Fc 片段在染色缓冲液中在冰上封闭 (block) 细胞 30 分钟。接着用染色缓冲液洗涤细胞, 并且如上所述, 在 100 微升的抗体 - 血清混合物中重新悬浮。在冰上 30 分钟之后, 洗涤细胞并用 BD Cytifix 固定细胞, 并使用 FACSCalibur 系统 (Becton Dickinson) 对经 FITC 标记的抗体覆盖的细胞进行分析, 之后使用 FlowJo version 7.2 软件 (Tree Star, Inc, Oregon, USA) 分析数据。在血清中在抗 Campath-1H® 中和抗体的存在下结合有 FITC 的抗 CD52 抗体的结合通过流式细胞计数法来评估, 作为对抑制的检测, 相对于对照的结合百分比计算为 (具有血清的 MFI/MFI 对照组 (无血清)) 乘以 100。来自于提供者 (MS-1) 其中一个的代表性数据示于图 45。X 轴表示血清稀释因子, 且 Y 轴表示对照结合百分比作为抗体中和活性的检测。数据清楚地显示第 12 个月的血清样品对 Campath-1H® 或其它抗 CD52 抗体不具有抑制作用, 表明血清中存在较低或不存在的抗 Campath-1H® 阻断抗体。第 13 个月的血清样品即使在血清的 1 : 1000 稀释下仍然介导对 Campath-1H® 结合的完全抑制, 但即使在所测试的最高浓度 (1 : 24 稀释) 下也不介导对 2C3、12G6、和 9D9 人源化抗 CD52 抗体的抑制。五个病人中的两个发展出大于 1 : 1000 的抗 Campath-1H® 中和抗体滴度, 而三个其它病人具有约 1 : 100 的 Campath-1H® 中和抗体滴度。即使这些病人中的两个的第 13 个月的血清对于 Campath-1H® 具有大于 1 : 1000 的相对高的中和抗体滴度, 这些血清并不抑制人源化 2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K12、和 9D9-H16/K13 抗体的结合, 表明在使用 Campath-1H® 治疗的病人中抗 Campath-1H® 抗体反应性不会阻断这些人源化抗体对存在于细胞上的 CD52 的结合。

[0615] 实施例 42 : huCD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的消滅和再增殖分析 (4B10-H1/K1)

[0616] 在 huCD52 转基因小鼠中检视 Campath-1H® 和人源化抗 CD52 抗体 (4B10-H1/K1) 在不同剂量水平下的消滅活性。对小鼠静脉内注射 0.1、0.5、1.0 或 5.0mg/kg 的各种抗体。给药之后两小时, 收集血清以检查循环细胞因子的水平。给药之后三天, 处死小鼠, 并从每一只小鼠 (N = 5) 收集血液和脾脏, 以使用流式细胞术分析来测定细胞消滅水平。对样品进行评价, 以测定存在于 huCD52 转基因小鼠中的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 和骨髓样的细胞亚群的相对数目。此外,

进行 T 细胞和 B 细胞亚型分析以测定总体消减效果。保持小鼠 (N = 5) 部分活着以监测再增殖动力。消减在 T 细胞部分最多,且 CD4⁺ T 细胞被消减最多,接着为 CD8⁺ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、及其它髓样细胞。在 CD4⁺ T 细胞部分内,幼稚(**naïve**) CD4⁺T 细胞消减最多,接着为 CD4⁺ 中枢记忆性 (CM)、CD4⁺ 效应记忆性 (EM)、及 CD4⁺ 调节 T 细胞 (Treg)。对于 CD8⁺ T 细胞 (幼稚性的 > CM > EM) 也观察到相似的方式。相反地,成熟 B 细胞相较于未成熟 B 细胞以更高的程度消减。经 Campath-1H® 治疗的小鼠与经 4B10-H1/K1 治疗的小鼠的比较在各个所测试的剂量下在血液和脾脏中显示出相似的细胞式样 (pattern)。

[0617] 血清细胞因子分析显示出 TNF α 、IL-6 及 MCP-1 的剂量依赖性增长。相较于未经治疗的小鼠,在 0.5mg/kg 的剂量下这些细胞因子的循环水平维持升高,并且在 0.1mg/kg 下也如此。在三个最高剂量下在 Campath-1H® 治疗组中也观察到 IL-10 有略微增加,但对于人源化 4B10-H1/K1 治疗组仅在最高剂量观察到略微增加。在循环 IL-12 或 IFN γ (未示出) 水平方面没有注意到显著增加。给药之后 50-60 天,除了 1.0mg/kg 组,在所有 Campath-1H® 给药组中淋巴细胞水平回到未经治疗的小鼠的水平。在 1.0mg/kg 组,给药之后 80 天淋巴细胞回到正常水平。对于经人源化 4B10-H1/K1 抗体治疗的小鼠,也观察到类似的再增殖动力学。在所有经 4B10-H1/K1 治疗组中在给药之后 50 天,除了 0.5mg/kg 水平以外,淋巴细胞回到对照水平。0.5mg/kg 组中的循环淋巴细胞水平在监测期间的过程中自始至终保持减少。监测血液中的整体淋巴细胞的再增殖。

[0618] 图 46A-46E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 B220⁺ B 细胞的水平。图 47A-47E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 B220⁺ B 细胞的水平。图 48A-48E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子水平。图 49A-49B 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”) 和人源化 4B10-H1/K1 (“4B10”) 抗体给药之后循环淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0619] 实施例 43: 在 huCD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的消减和再增殖分析 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2)

[0620] 在 huCD52 转基因小鼠中检视人源化抗体 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2) 在不同剂量水平下的消减活性。对小鼠静脉内注射 0.1、0.5、1.0 或 5.0mg/kg 的各种抗体。给药之后两小时,收集血清以检查循环细胞因子水平。给药之后三天,处死小鼠,并从每一只小鼠 (N = 5) 收集血液和脾脏,以使用流式细胞术分析来测定细胞消减水平。对样品进行评价以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4⁺)、细胞毒性 T 细胞 (CD8⁺)、B 细胞 (B220⁺) 和骨髓样的细胞亚群的相对数目。此外,进行 T 和 B 细胞亚型分析以测定整体消减效果。保持部分小鼠 (N = 5) 活着以监测再增殖动力学。所有剂量下各种人源化 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2) 的给药引起血液中显著数目的 T 细胞和 B 细胞消减。这些数据也显示各种 T 和 B 细胞亚型依据所使用的抗体剂量以不同程度消减。幼稚性 (**naïve**) T 细胞 (CD4 与 CD8 二者) 显示出最多的消减,且其它细胞群 (包括记忆性和 T 调节细胞) 较少程度地消减。在 B 细胞部分,成熟 B 细胞相较于未成熟 B 细胞消减更快。在脾脏中,观察到剂量依赖性的消减,在 5 和 1mg/kg 剂量水平下观察到显著的淋巴细胞消减。与在血液中的情况相似,幼稚性 T 细胞相较于记忆细胞消减更

快。使用人源化 7F11 克隆 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2) 的各个, B 细胞相较于 T 细胞以较低程度消减。在注射的任意剂量下, 在血液或脾脏中对于 NK 细胞或嗜中性粒细胞没有观察到消减。血清细胞因子分析显示出对于 TNF α 和 IL-6 二者的剂量依赖性增长。相较于未经治疗的小鼠, 在 0.5mg/kg 以及在 0.1mg/kg 剂量下这些细胞因子的水平也保持升高。也观察到循环 MCP-1 水平的剂量依赖性增加。

[0621] 给药之后 30 天, 在 0.5 和 0.1mg/kg 给药组中淋巴细胞水平回到未经治疗小鼠的水平。在 1.0 和 5.0mg/kg 组, 对于克隆 7F11-SFD1/K2, 淋巴细胞分别经过给药之后 50 和 80 天回到正常水平, 并且对于克隆 7F11-SFD2/K2 的 1.0 和 5.0mg/kg 组, 淋巴细胞均经过给药之后 80 天回到正常水平。对整体淋巴细胞监测其在血液中的再增殖。

[0622] 图 50A-50E 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。图 51A-51E 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。图 52A-52F 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子水平。图 53A-53B 显示在使用人源化 7F11-SFD1/K2 (“7F11 SFD1”) 和 7F11-SFD2/K2 (“7F11 SFD2”) 抗体给药之后循环淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0623] 实施例 44 : 在 CD52 转基因小鼠中 7F11 人源化抗 CD52 抗体的分析 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2)

[0624] 在 huCD52 转基因小鼠中检视嵌合 7F11 抗体和人源化 7F11-SFD1/K2 及 7F11-SFD2/K2 抗体与 Campath-1H[®] 相比较的消减活性。对小鼠静脉内注射 1.0mg/kg 的各种抗体。给药之后三天, 处死小鼠, 并从每一只小鼠 (N = 5) 收集血液和脾脏, 以使用流式细胞术分析来测定细胞消减水平。对样品进行评价, 以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 和骨髓样的细胞亚群的相对数目。施用 Campath-1H[®] 引起血液和脾脏中显著数目的 T 细胞和 B 细胞消减。虽然对于嵌合和人源化 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2), 在血液中均观察到可比较的水平 T 细胞消减, 但 B 细胞较少程度地消减。此观察在脾脏中亦为明显, 在这里使用 7F11 抗体 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2), 注意到显著的 T 细胞消减, 但仅达到中度水平的 B 细胞消减。

[0625] 图 54A-54B 显示在使用 Campath-1H[®] (“Campath”)、7F11-嵌合抗体、和人源化 7F11-SFD1/K2 及 7F11-SFD2/K2 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。

[0626] 实施例 45 : 在 CD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的 PK 特性分析 (7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2)

[0627] 为确保人源化过程不会改变抗体的清除速率, 在 huCD52 转基因小鼠中对嵌合 7F11 抗 CD52 抗体和人源化 7F11-SFD1/K2 及 7F11-SFD2/K2 抗 CD52 抗体的药物动力学特性进行测定。对小鼠静脉内注射 5mg/kg 的抗体, 并在开始于给药之后两小时的多个时间点收集血液。使用抗人 IgG ELISA 评估各种抗体的循环水平。对于各个人源化克隆, 在给药之后两小时观察到 C_{max} 中存在些微差别。在实验进行期间, 嵌合 7F11 抗体和人源化 7F11-SFD1/

K2 及 7F11-SFD2/K2 抗体的清除速率彼此相似, 并与 Campath-1H® 类似, 表明人源化过程不会显著改变抗体的药物动力学特性。

[0628] 图 55 显示在给药之后血液中的 Campath-1H® (“Campath”)、7F11- 嵌合抗体及人源化 7F11-SFD1/K2 和 7F11-SFD2/K2 抗体在一段时间内的水平。

[0629] 实施例 46: 在 huCD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的消滅和再增殖的分析 (2C3-SFD1/K12)

[0630] 在 huCD52 转基因小鼠中检视 2C3-SFD1/K12 克隆在不同剂量水平下的消滅活性。对小鼠静脉内注射 0.1、0.5、1.0 或 5.0mg/kg 抗体。给药之后两小时, 收集血清以潜在地检测循环细胞因子的水平。给药之后三天, 处死小鼠, 并从每一只小鼠 (N = 5) 收集血液和脾脏, 以使用流式细胞术分析来测定细胞消滅水平。对样品进行评价, 以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 及骨髓样的细胞亚群的相对数目。此外, 进行 T 细胞和 B 细胞亚型分析以确定整体消滅效果。保持部分小鼠 (N = 5) 活着以监测再增殖动力学。以 5、1、和 0.5mg/kg 剂量施用 2C3-SFD1/K12 引起血液中显著数目的 T 细胞和 B 细胞消滅。在 0.1mg/kg 剂量下在血液中观察到不同水平的淋巴细胞消滅, 且 CD4+ T 细胞和 B 细胞相较于 CD8+ T 细胞更大程度地消滅。这些数据也证实各种 T 和 B 细胞亚型根据所使用的抗体剂量有不同程度的消滅。幼稚性 T 细胞 (CD4 与 CD8 两者) 相比于其它细胞群 (包括记忆性和 T 调节细胞) 显示出最大消滅, 其它细胞群较少程度地消滅。在 B 细胞部分中, 成熟 B 细胞相较于未成熟 B 细胞消滅更快。在脾脏中, 观察到剂量依赖性的消滅, 在 5 和 1mg/kg 剂量水平下观察到显著的淋巴细胞消滅。与 Campath-1H® 相似, 幼稚性 T 细胞比记忆细胞消滅更快。在注射的任意剂量下, 在血液中观察到 NK 细胞和嗜中性粒细胞消滅, 但是在脾脏中观察到些微或没有消滅。血清细胞因子分析显示出 TNF α 和 IL-6 的剂量依赖性增加, 且 5mg/kg 剂量诱发各细胞因子的最高水平。对于 TNF α , 在 0.5 和 0.1mg/kg 剂量水平下观察到可与未经治疗的小鼠相比较的水平, 对于 IL-6 则在 0.1mg/kg 剂量水平下观察到可与未经治疗的小鼠相比较的水平。也观察到循环 MCP-1 水平的剂量依赖性增加。

[0631] 给药之后 30 天, 对于 0.1 和 0.5mg/kg 组, 淋巴细胞水平回到未经治疗小鼠的水平。在 1.0 和 5.0mg/kg 组中, 给药之后 80 天淋巴细胞回到正常水平。对整体淋巴细胞监测其在血液中的再增殖。

[0632] 图 56A-56E 显示在使用 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。图 57A-57E 显示在使用 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。图 58A-58F 显示在使用 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。图 59 显示在使用 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后循环淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0633] 实施例 47: 在 huCD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的消滅和再增殖分析 (12G6-SFD1/K11)

[0634] 在 huCD52 转基因小鼠中检视 12G6-SFD1/K11 克隆在不同剂量水平下的消滅活性。对小鼠静脉内注射 0.1、0.5、1.0 或 5.0mg/kg 的抗体。给药之后两小时, 收集血清以潜在地检查循环细胞因子的水平。给药之后三天, 处死小鼠, 并从每一只小鼠 (N = 5) 收集血液和脾脏, 以使用流式细胞术分析来测定细胞消滅水平。对样品进行评价, 以测定存在于 huCD52

转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 及骨髓样的细胞亚群的相对数目。此外,进行 T 细胞和 B 细胞亚型分析以测定整体消滅效果。保持部分小鼠 (N = 5) 活着以监测再增殖动力学。以 5、1、和 0.5mg/kg 剂量施用 12G6-SFD1/K11 引起血液中显著数目的 T 细胞和 B 细胞消滅。在 0.1mg/kg 剂量下,在血液中观察到不同水平的淋巴细胞消滅,且 CD4+T 细胞和 B 细胞相较于 CD8+T 细胞以较大程度消滅。这些数据也显示各种 T 细胞和 B 细胞亚型根据所使用的抗体剂量而不同程度地消滅。幼稚性 T 细胞 (CD4 与 CD8 二者) 相比于其它细胞群 (包括记忆和 T 调节细胞) 显示出最大消滅,其它细胞群较少程度地消滅。在 B 细胞部分中,成熟 B 细胞相较于未成熟 B 细胞消滅更快。在脾脏中,观察到剂量依赖性的消滅,在 5mg/kg 和 1mg/kg 剂量水平下观察到显著的淋巴细胞消滅。与 Campath-1H®相似,幼稚性 T 细胞相较于记忆细胞消滅更快。在任意注射的剂量下,在血液中观察到 NK 细胞和嗜中性粒细胞消滅,但是在脾脏中观察到些微或没有消滅。血清细胞因子分析显示出对于 TNF α 和 IL-6 两者的剂量依赖性增加,且 5mg/kg 剂量诱发各细胞因子的最高水平。对于 TNF α ,在 0.5 和 0.1mg/kg 剂量水平下观察到可与未经治疗的小鼠相比较的水平,对于 IL-6 则在 0.1 的 mg/kg 剂量水平下观察到可与未经治疗的小鼠相比较的水平。也观察到循环 MCP-1 水平的剂量依赖性增加。

[0635] 给药之后 30 天,淋巴细胞水平回到未经治疗小鼠的水平。在 1.0 和 5.0mg/kg 组中,给药之后 80 天淋巴细胞回到正常水平。对整体淋巴细胞监测其在血液中的再增殖。

[0636] 图 60A-60E 显示在使用 12G6-SFD1/K11 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞及 B220+ B 细胞的水平。图 61A-61E 显示在使用 12G6-SFD1/K11 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。图 62A-62F 显示在使用 12G6-SFD1/K11 (“12G6hu”) 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。图 63 显示在使用 12G6-SFD1/K11 抗体给药之后循环淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0637] 实施例 48 :在 CD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的 PK 特性分析 (2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11 及 9D9-H10/K12)

[0638] 在 huCD52 转基因小鼠中测定抗 CD52 抗体的药物动力学特性。此实验比较人源化和嵌合形式的抗体,以确保人源化过程不会改变抗体的清除速率。该比较包括嵌合 2C3、12G6、和 9D9 抗体及人源化 2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、和 9D9-H10/K12 抗体。对小鼠静脉内注射 5mg/kg 的抗体,并在开始于给药之后两小时的多个时间点收集血液。使用抗人 IgG ELISA 来评估各抗体的循环水平。对所分析的各个嵌合 / 人源化抗体对,在给药之后两小时注意到 C_{max} 中有些微差别。对于 2C3 和 12G6 抗体,人源化抗体 (即,2C3-SFD1/K12 和 12G6-SFD1/K11) 的 C_{max} 略高,而对于 9D9 对而言,嵌合抗体略高。在实验进行期间抗体对的清除速率相似,表明人源化过程不会显著改变抗体的药物动力学特性。

[0639] 图 64A-64C 显示给药之后血液中 2C3- 嵌合、2C3-SFD1/K12、12G6- 嵌合、12G6-SFD1/K11、9D9- 嵌合、及 9D9-H10/K12 抗体在一段时间内的水平。

[0640] 实施例 49 :在 huCD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的消滅和再增殖分析 (9D9-H10/K12)

[0641] 在 huCD52 转基因小鼠中检视 9D9-H10/K12 克隆于不同剂量水平下的消滅活性。对小鼠静脉内注射 0.1、0.5、1.0 或 5.0mg/kg 的抗体。给药之后两小时,收集血清以潜在地检查循环细胞因子的水平。给药之后三天,处死小鼠,并从每一只小鼠 (N = 5) 收集血液和脾

脏,以使用流式细胞术分析来测定细胞消减水平。对样品进行评价,以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 及骨髓样的亚群的相对数目。此外,进行 T 细胞和 B 细胞亚型分析以确定整体消减效果。保持部分小鼠 (N = 5) 活着以监测再增殖动力学。以 5、1、和 0.5mg/kg 剂量施用 9D9-H10/K12 引起血液中显著数目的 T 细胞和 B 细胞消减。在 0.1mg/kg 剂量下在血液中仅观察到中度水平的淋巴细胞消减。这些数据也表明各种 T 和 B 细胞亚型根据所使用的抗体剂量以不同程度消减。幼稚性 T 细胞 (CD4 与 CD8 两者) 相比于其它细胞群 (包括记忆性和 T 调节细胞) 显示出最大消减,其它细胞群较少程度地消减。在 B 细胞部分中,成熟 B 细胞相较于未成熟 B 细胞消减更快。在脾脏中,仅仅在 5 和 1mg/kg 剂量水平下观察到这些细胞的显著消减。与 Campath-1H®相似,幼稚性 T 细胞比记忆细胞消减更快。在注射的任意剂量下,在血液中观察到 NK 细胞和嗜中性粒细胞消减,但是在脾脏中观察到些微或没有消减。血清细胞因子分析显示 TNF α 或 IL-6 在所分析的任意剂量水平下没有显著增加。然而,观察到循环 MCP-1 水平的剂量依赖性增加。

[0642] 此实验的再增殖部分早在淋巴细胞 50%至 80%再增殖 (依据剂量而定) 时结束。基于总淋巴细胞数目而非以 T 细胞和 B 细胞为基准对淋巴细胞再增殖进行监测。

[0643] 图 65A-65E 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。图 66A-66E 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞的水平。图 67A-67F 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。图 68 显示在使用 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后循环淋巴细胞在一段时间内的再增殖。

[0644] 实施例 50 :在 huCD52 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的消减和再增殖分析 (2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11 和 9D9-H10/K12)

[0645] 在 huCD52 转基因小鼠中检视 Campath-1H®和人源化 2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11 及 9D9-H10/K12 克隆于不同剂量水平下的消减活性。对小鼠静脉内注射 0.1 或 1.0mg/kg 的抗体。给药之后两小时,收集血清以潜在地检查循环细胞因子水平。给药之后三天,处死小鼠,并从每一只小鼠收集血液和脾脏,以使用流式细胞术分析来确定细胞消减水平。对样品进行评价,以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 及骨髓样细胞亚群的相对数目。此外,进行 T 细胞和 B 细胞亚型分析以确定整体消减效果。当与经 PBS 处理的动物相比较时,所有人源化抗体 (2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11 及 9D9-H10/K12) 在脾脏和血液内介导淋巴细胞消减。对于所有抗体而言,血液中的消减比在脾脏中的消减更为稳健,并且在两种组织中消减均是剂量依赖性的。对于 CD4 和 CD8+ T 细胞的消减最为显著,且在 B 细胞部分具有较少的消减。各种 T 细胞和 B 细胞亚型不同程度地消减。幼稚性 T 细胞 (CD4 与 CD8 二者) 相比于其它细胞群 (包括记忆性和 T 调节细胞) 显示出最大消减,该其它细胞群较少程度地消减。在 B 细胞部分中,成熟 B 细胞比未成熟 B 细胞消减更快。血清细胞因子分析显示在给药之后 2 小时 IL-6、MCP-1 及 TNF α 水平的显著增加。对于所有抗体 (包括 Campath-1H®) 均观察到增加,并且该增加是剂量依赖性的 (即相对于 0.1mg/kg 剂量下观察的细胞因子水平,对于 1.0mg/kg 剂量水平观察到较高的细胞因子水平)。与 Campath-1H®相比,2C3-SFD1/K12 与 12G6-SFD1/K11 引发相似的 IL-6 水平,而 9D9-H10/K12 以显著较低的水平引发 IL-6。对

于 MCP-1 而言,12G6-SFD1/K11 抗体诱发较低水平,与 Campath-1H® 相较而言,12G6-SFD1/K11 与 9D9-H10/K12 均降低 TNF α 水平。

[0646] 图 69A-69D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、12G6-SFD1/K11 (“12G6”)、及 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时的血液中的总体淋巴细胞群 (CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B 细胞) 及 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B/NK 细胞亚型的水平。图 70A-70D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、12G6-SFD1/K11 (“12G6”)、及 9D9-H10/K12 (“9D9”) 抗体给药之后 72 小时的脾脏中的总体淋巴细胞群 (CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B 细胞) 及 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B/NK 细胞亚型的水平。图 71A-71F 显示在使用 Campath-1H®、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、和 9D9-H10/K12 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子水平。

[0647] 实施例 51 :在 huCD52 转基因小鼠中抗 huCD52 的人源化 9D9 克隆的直接比较 (9D9 H10/K12 和 9D9 H11/K12)

[0648] 在 huCD52 转基因小鼠中检视两种人源化抗 CD52 的 9D9 克隆 (9D9-H10/K12 和 9D9-H11/K12) 的消减活性。对小鼠静脉内注射 0.1 或 1.0mg/kg 抗体。给药之后三天,处死小鼠,并从每一只小鼠收集血液和脾脏,以使用流式细胞术分析来确定细胞消减水平。对样品进行评价,以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 及 NK 细胞亚群的相对数目。使用任一种抗体的处理在血液和脾脏中引起类似的淋巴细胞消减,且淋巴细胞消减在血液中更为稳健。而且,在两种组织中 CD4 和 CD8+T 细胞比 B 细胞和 NK 细胞更强烈地消减。虽然使用 9D9-H10/K12 克隆的消减相对于使用 9D9-H11/K12 克隆的消减看起来较不稳健,但此差别并非统计上显著的。

[0649] 图 72 显示在使用 9D9-H10/K12 和 9D9-H11/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、和 NK 细胞的水平。图 73 显示在使用 9D9-H10/K12 和 9D9-H11/K12 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、和 NK 细胞的水平。

[0650] 实施例 52 :在 huCD52 转基因小鼠中抗 huCD52 的人源化 12G6 克隆的直接比较 (12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1-K12)

[0651] 在 huCD52 转基因小鼠中检视两种人源化抗 CD52 的 12G6 克隆 (12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1/K12) 的消减活性。对小鼠静脉内注射 0.1 或 1.0mg/kg 的抗体。给药之后两小时,收集血清以潜在地检查循环细胞因子水平。给药之后三天,处死小鼠,并从每一只小鼠收集血液和脾脏,以使用流式细胞术分析来确定细胞消减水平。对样品进行评价,以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4+)、细胞毒性 T 细胞 (CD8+)、B 细胞 (B220+) 及髓样细胞亚群的相对数目。此外,进行 T 细胞和 B 细胞亚型分析以确定整体消减效果。施用 12G6-SFD1/K11 抗体或 12G6-SFD1/K12 抗体导致血液内显著水平的淋巴细胞消减。该两株克隆的淋巴细胞消减活性看起来存在些微或是没有差异。淋巴细胞消减的方式为,幼稚性 CD4 和 CD8+ T 细胞相比于记忆 T 细胞或 T 调节细胞以更高程度消减。不论克隆 (12G6-SFD1/K11 或 12G6-SFD1/K12) 或是剂量,髓样细胞群较少程度地消减。此实验未进行血清细胞因子分析。

[0652] 图 74A-74D 显示在使用 12G6-SFD1/K11 (“12G6 K11”) 和 12G6-SFD1/K12 (“12G6

K12”) 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B/NK 细胞、和髓样细胞的水平。图 75A-75D 显示在使用 12G6-SFD1/K11 (“12G6 K11”) 和 12G6-SFD1/K12 (“12G6 K12”) 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B/NK 细胞、及髓样细胞的水平。

[0653] 实施例 53 :在 huCD52 转基因小鼠中抗 huCD52 人源化 9D9 克隆的直接比较 (9D9 H11/K12、9D9 H16/K13、和 9D9 H18/K13)

[0654] 在 huCD52 转基因小鼠中比较三种人源化 9D9 抗体 (9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 的消减活性。人类 CD52 转基因小鼠以 PBS 处理作为媒介物对照组,或者用 1mg/kg 或 0.1mg/kg 的各种抗体对其注射。给药之后两小时,收集血清以测定循环细胞因子水平。给药之后三天,处死小鼠,并收集和处理外周血和脾脏,以进行流式细胞术分析。对样品进行评价,以测定存在于 huCD52 转基因小鼠的循环外周血或脾脏中的全部 T 辅助细胞 (CD4⁺)、细胞毒性 T 细胞 (CD8⁺)、B 细胞 (B220⁺) 及髓样细胞亚群的相对数目。此外,进行 T 细胞和 B 细胞亚型分析以确定整体消减效果。所有 9D9 (9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 抗体以相似的程度介导血液和脾脏中的淋巴细胞和髓样细胞群的细胞消减。在血液中观察到比在脾脏中观察到的更为稳健的淋巴细胞和髓样细胞消减。9D9 克隆 (9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 的消减活性比较显示,9D9-H16/K13 引起最稳健的消减,接着为 9D9-H18/K13 和 9D9-H11/K12。此结果在 1mg/kg 剂量下对于脾脏中淋巴细胞最为明显,其中 9D9-H16/K13 处理相对于任何其它克隆 (9D9-H18/K13 和 9D9-H11/K12) 引起更高层次的消减。而且,消减方式为,幼稚性 CD4 和 CD8⁺ T 细胞比记忆 T 细胞或 T 调节细胞更高程度地消减,并且使用 9D9-H16/K13 时 B 细胞群以更高水平消减。髓样细胞群受抗 CD52 处理的影响较小,无论抗体克隆 (9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、或 9D9-H18/K13) 或剂量。所分析的细胞因子中,观察到 IL-6、TNF α 和 MCP-1 上升。注射后,对于所有的 9D9 克隆 (9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 在 0.1 和 1.0mg/kg 的剂量水平下均观察到相似循环水平的 IL6 和 MCP-1。对于循环 TNF α 水平观察到些微差别,其中以 1.0mg/kg 剂量注射 9D9-H16/K13 克隆引起中度的增加。

[0655] 图 76 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时血液中的总体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 B220⁺ B 细胞) 的水平。图 77A-77D 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B/NK 细胞、及髓样细胞亚型的水平。图 78 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、和 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时脾脏中的总体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞和 B220⁺ B 细胞) 的水平。图 79A-79D 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、和 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B/NK 细胞、和髓样细胞亚型的水平。图 80A-80F 显示在使用 9D9-H11/K12、9D9-H16/K13、和 9D9-H18/K13 抗体给药之后 2 小时的循环细胞因子水平。

[0656] 实施例 54 :在 CD52 转基因小鼠中来自 2C3、12G6、和 9D9 家族的抗 CD52 抗体的 PK 特性分析

[0657] 在 huCD52 转基因小鼠中测定人源化 2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 9D9-H18/K13 的药物动力学特性。对小鼠静脉内注射 1mg/kg 的抗体,并在开始于给药之后两小时的多个时间点收集血液。使用抗人 Ig ELISA 评估各种抗体的循环

水平。计算的半衰期为：2C3-SFD1/K1279.0±23.9 小时，12G6-SFD1/K1149.0±14.4 小时，12G6-SFD1/K1275.1±28.5 小时，9D9-H16/K1359.8±26.6 小时以及 9D9-H18/K1342.2±15.7 小时。

[0658] 整体而言，在这些研究中存在显著的动物间暴露差异性。2C3-SFD1/K12 和 12G6-SFD1/K12 的末端消除半衰期相似，而 12G6-SFD1/K11 的半衰期较短但没有显著不同。2C3-SFD1/K12 的清除作用为最快速的，接着为 12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1/K12。对大部分所测量的时间点而言，该两种 12G6 处理彼此反映，而 2C3-SFD1/K12 显示出较少的暴露和较快的清除。对于所有所测量的 PK 参数，9D9-H16/K13 和 9D9-H18/K13 是非常相似的。

[0659] 图 81A-81B 显示给药之后血液中 2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 和 9D9-H18/K13 抗体在一段时间内的水平。

[0660] 表 16

[0661]

PK 参数	2C3-SFD1/K12	12G6-SFD1/K11	12G6-SFD1/K12	9D9-H16/K13	9D9-H18/K13
$t_{1/2}$ (hr)	79.0 ± 23.9	49.0 ± 14.4	75.1 ± 28.5	59.8 ± 26.6	42.2 ± 15.7
Cl (ml/hr/kg)	20.3 ± 2.9	10.6 ± 1.69	7.08 ± 1.80	5.64 ± 1.73	6.65 ± 3.02
Vz (ml/kg)	2251 ± 539	770 ± 294	721 ± 224	445 ± 133	366 ± 100
AUC (ug*hr/ml)	251 ± 37.2	485 ± 104	747 ± 188	196 ± 70.2	174 ± 65.2
Cmax (ug/ml)	4.22 ± 0.54	7.12 ± 1.97	8.96 ± 2.33	3.58 ± 2.16	4.35 ± 1.54

[0662] 实施例 55：对响应于使用抗 CD52 抗体处理的细胞因子风暴 (storm) 的评估

[0663] 在 huCD52 转基因小鼠中对使用抗 CD52 抗体处理之后血清细胞因子的释出进行评估。对动物使用 1mg/kg 的 Campath-1H®、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 或 9D9-H18/K13 进行处理。鉴于先前的结果显示使用 2C3-SFD1/K12 注射相比于其它抗体可引起较低的消减水平，对一组动物使用 5mg/kg 的 2C3-SFD1/K12 处理，从而基于达到相似的消减水平所需的剂量来使该组动物正常化 (normalizing)。在处理 12、4、24、和 48 小时，对所有组放血并对炎性细胞因子进行 CBA 分析。在处理 3 天后处死所有组，并通过流式细胞术对脾脏针对脾脏中的淋巴细胞消减进行评估。使用各种抗体的处理引起各种靶标的消减与使用 Campath-1H® 所观察到的相似。此结果对于 2C3-SFD1/K12 也成立，其中使用 5mg/kg 剂量以引起类似的消减作用。使用 12G6-SFD1/K12 和 9D9-H16/K13 观察到消减中的一些变化，其大部分可能是因为动物的重复取血以得到血清用于细胞因子分析。然而，对于来自 12G6 (12G6-SFD1/K11 和 12G6-SFD1/K12) 及 9D9 (9D9-H16/K13 和 9D9-H18/K13) 家族成员的抗体而言，细胞因子表达减少。此结果在早期 1 小时和 2 小时时间点对于 IL-6、MCP-1 和 TNF α 的释出为最显著的。

[0664] 图 82A-82F 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 或 9D9-H18/K13 抗体给药之后在 48 小时期间内血液中的细胞因子水平。图 83A-83E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13 或 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时在脾脏中的总体淋巴细胞、CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B/NK 细胞、和髓样细胞的水平。

[0665] 实施例 56 :使用抗 CD52 抗体处理之后的 CD52 转基因小鼠血液中的再增殖动力评估

[0666] 在施用人源化抗 CD52 的 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体之后对血液中数种细胞类型的再增殖动力学进行评估。对小鼠静脉内注射 2mg/kg 的各种抗体,以确保稳健的消减水平。在注射后的多个时间点,收集血液以进行流式细胞分析,以测定血液中的循环淋巴细胞水平,包括 CD4+ 和 CD8+ T 细胞、调节 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、嗜中性粒细胞及巨噬细胞。对于各种抗体在初始消减活性方面未观察到差别,该结果在注射后第三天被证实。在第一个月对小鼠每周抽血并在之后每两周对其抽血,以监测再增殖动力。与 Campath-1H® 相较,对于任一种抗 CD52 (2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12) 抗体的淋巴细胞再增殖动力学相似。到第 57 天, B 细胞回到血液中的基线,而 T 细胞到第 84 天接近基线水平。到第 116 天, CD8+ T 细胞尚未回到对照水平,但是使用抗 CD52 (2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12) 抗体和 Campath-1H® 中的每一个,对于所有被监测的其它细胞类型均观察到类似的再增殖动力学。

[0667] 图 84A-84G 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后,循环 CD4+ 和 CD8+ T 细胞、调节 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、嗜中性粒细胞及巨噬细胞在一段时间内的再增殖。

[0668] 实施例 57 :使用抗 CD52 抗体对 CD52 转基因小鼠中 CD52 表达的评估

[0669] 使用人源化抗 CD52 抗体评估 huCD52 的表达,以确定在 huCD52 转基因小鼠中对成熟和发展中的细胞群是否会观察到类似的染色模式。2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体结合有 FITC 以用于流式细胞染色。收集来自 huCD52 转基因小鼠的组织并对其处理以染色。与 Campath-1H® 相似,2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体使来自转基因小鼠脾脏的表达 huCD52 的淋巴细胞被染色。该染色模式于其它淋巴器官(例如胸腺和骨髓)中发现的淋巴细胞群和亚群是有代表性的。

[0670] 图 85 显示 FITC 标记的 Campath-1H®、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体在脾脏中特异性地结合至 huCD52 淋巴细胞群的能力。

[0671] 实施例 58 :在 huCD52 转基因小鼠中使用抗 huCD52 单剂量处理的直接比较

[0672] 在 huCD52 转基因小鼠中比较数种人源化抗 CD52 抗体 (2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 的消减活性。对小鼠静脉内注射 1mg/kg 的抗体。给药之后两小时,收集血清以进行细胞因子分析。三天后,处死小鼠并收集血液和脾脏以比较淋巴细胞消减水平。对于所有的抗 CD52 抗体 (2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 都观察到显著水平的 B 细胞和 T 细胞消减,并且该消减与 Campath-1H® 给药之后所观察到的那些是可相比的。亚型分析也显示

在血液或脾脏中对于各种抗体 (2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 的消减水平没有显著差别。在注射 Campath-1H® 之后, IL-6 和 TNF α 二者的循环水平有显著增加。虽然相对于 Campath-1H®, 各种抗 CD52 抗体 (2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13) 的注射引起 TNF α 的水平显著减少, 但 IL-6 的水平相似。

[0673] 图 86A-86E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时血液中的总体淋巴细胞群 (CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、和 B220+ B 细胞) 和 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B/NK 细胞、及髓样细胞亚型的水平。图 87A-87E 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 72 小时脾脏中的总体淋巴细胞群 (CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞和 B220+ B 细胞) 和 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B/NK 细胞、及髓样细胞亚型的水平。图 88A-88C 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、12G6-SFD1/K11、12G6-SFD1/K12、9D9-H16/K13、及 9D9-H18/K13 抗体给药之后 2 小时循环细胞因子的水平。

[0674] 实施例 59 : 使用抗 huCD52 抗体单剂量处理之后 huCD52 转基因小鼠中淋巴细胞的深度消减 (In Depth Depletion)

[0675] 使用抗 CD52 的 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体在 huCD52 转基因小鼠中进行广泛消减 (extensive depletion) 分析。对小鼠 (N = 4) 以 1mg/kg 静脉内注射单剂量的各种抗体。三天后, 处死小鼠, 并收集血液、脾脏、淋巴结及胸腺, 以使用多色流式细胞分析来比较淋巴细胞消减水平。对于所有抗 CD52 的 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体, 都观察到显著水平的 B 细胞和 T 细胞消减, 并且该消减与在检查的各组织中经 Campath-1H® 给药之后所观察到的那些是可比较的。亚型分析也显示在血液或脾脏中各种抗体的消减水平没有显著差别。在小鼠的淋巴结中也观察到显著水平的淋巴细胞消减。然而, 在抗体活性方面显示出有一些差异度, 特别是在注意到中枢和效应记忆性 T 细胞亚型时。因为关于 LSR-II 和 CD8 染色的技术问题, 不能对胸腺进行评估。

[0676] 图 89A-89D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、及 NK/ 髓样细胞亚型的水平。图 90A-90D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时脾脏中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、及 NK/ 髓样细胞亚型的水平。图 91A-91D 显示在使用 Campath-1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时淋巴结中的 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、B220+ B 细胞、及 NK/ 髓样细胞亚型的水平。

[0677] 实施例 60 : 基于 C57BL/6 背景的 huCD52 敲入 / 剔除 (KI/KO) 型转基因小鼠的产生和评估

[0678] 基于 C57BL/6 背景产生一种新的人类 CD52 敲入 / 剔除的小鼠模型。为产生此小鼠, 将小鼠 CD52 基因序列用人类 CD52 基因序列取代。该用靶向策略允许使用人类序列取代小鼠序列同时保持外显子 - 内含子结构。使用选择标记以鉴别含有新基因序列的后代。通过移除该选择标记仅留下人类 CD52 基因序列而产生最终的等位基因。

[0679] huCD52 KI/KO 小鼠模型的基本特征化涉及测定淋巴细胞上人类 CD52 表达的水

平。针对 hCD52 表达,对来自 huCD52-KI/KO 转基因小鼠 (N = 4) 和 C57BL/6 小鼠 (N = 2) 的血液染色,并使用 Bang's labs Simply Cellular 抗人类抗体检定来计算 CD52 分子/细胞的数目。来自 huCD52-KI/KO 转基因小鼠的外周血细胞的染色证实,huCD52 的表达在来自这些动物的大多数淋巴细胞中是非常高的。表达水平与在人类 CD4、CD8、和 B 细胞群中所观察到的水平相似。在 NK 细胞和巨噬细胞上的表达水平比对于 T 细胞和 B 细胞所观察到的水平低。在这些小鼠的嗜中性粒细胞上检测到水平增加的 huCD52 表达,这与在人类嗜中性粒细胞或是在来自 CD-1 背景 of 原始转基因小鼠系的类似细胞中降低的表达水平相反。在来自原始的 huCD52 CD1 转基因小鼠和 huCD52 KI/KI 小鼠的 T 和 B 细胞上观察到相似水平的 CD52 表达。

[0680] 图 92A 显示在 huCD52-KI/KO 和非转基因对照小鼠中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、和 NK/ 髓样细胞亚型上的 huCD52 表达水平。图 92B 显示在 huCD52-KI/KO 和 huCD52 CD1 转基因小鼠中的 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、和 B 细胞的 huCD52 表达水平。

[0681] 实施例 61 :12G6 和 2C3 的小规模和大规模批次 (lots) 之间消减特性的直接比较

[0682] 对 huCD52KI/KO 转基因小鼠用 12G6-SFD1/K12 或 2C3-SFD1/K12 给药以测定消减活性。此外,使用由 Genzyme 两个不同来源 (小规模和大规模批次) 所产生的抗体来检查活性。以 1mg/kg 对小鼠静脉内注射各种抗体。注射之后三天,处死小鼠,并收集血液以进行流式细胞分析,以测定循环 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞、B 细胞、NK 细胞、嗜中性粒细胞及巨噬细胞的水平。在小规模和大规模批次获得的抗体之间,在 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B 细胞、和 NK 细胞的消减中未观察到有显著差别。

[0683] 还通过流式细胞计数法来评估不同批次的 12G6-SFD1/K12 和 2C3-SFD1/K12 抗体,以比较对来自 huCD52-KI/KO 转基因小鼠的脾细胞上的染色强度。12G6-SFD1/K12 和 2C3-SFD1/K12 抗体在分离的脾细胞上似乎都以与 Campath-1H® 相同的程度识别人类 CD52。此外,对于识别水平,在两个来源 (小规模和大规模批次) 的抗体之间没有差别。

[0684] 图 93A-93B 显示与 Campath-1H® 对照相比较的 12G6-SFD1/K12 和 2C3-SFD1/K12 抗体 (来自不同制造来源) 至 huCD52 的结合。图 94 显示在使用来自不同制造来源的 12G6-SFD1/K12 和 2C3-SFD1/K12 抗体给药之后 72 小时血液中的整体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、和 B220⁺ B 细胞) 的水平。

[0685] 实施例 62 :在 huCD52-KI/KO 转基因小鼠中抗 CD52 抗体的 PK 特性分析

[0686] 在 huCD52 KI/KO 转基因小鼠中测定人源化 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 和 12G6-SFD1/K12 抗体的药物动力学特性。对小鼠静脉内注射 1mg/kg 的抗体,并在开始于给药之后两小时的多个时间点收集血液。使用抗人类 Ig ELISA 评估各种抗体的循环水平。对于人源化抗 CD52 的 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 和 12G6-SFD1/K12 抗体的各个而言,整体清除速率相似,且 2C3-SFD1/K12 显现出潜在较快的动力,而 12G6-SFD1/K12 在血清中存在最长的时间。

[0687] 图 95A-95B 显示在给药之后血液中的 2C3-SFD1/K12、9D9-H16/K13 及 12G6-SFD1/K12 抗体在一段时间内的水平。

[0688] 实施例 63 :在 huCD52-KI/KO 转基因小鼠中 12G6 和 2C3 预处理对于 EAE 的评估

[0689] 在 huCD52KI/KO 小鼠中,对抗 CD52 抗体处理对于降低实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 的整体发病率和严重度的效力进行评估。对 huCD52-KI/KO 小鼠用一程 (course)

的 2C3-SFD1/K12 或 12G6-SFD1/K12 在第 5 至 1 天的期间处理。通过使用在 CFA 中乳化的 MOG35-55 肽免疫化,并使用百日咳毒素在第 0 和 2 天处理而引发 EAE(一种多发性硬化症的模型)。经媒介物处理的小鼠在注射后第 10 天开始显现瘫痪症状,其发展成严重的进展型疾病。对比之下,使用 2C3-SFD1/K12 或 12G6-SFD1/K12 抗体预处理的小鼠发病延缓,并且整体疾病严重度降低。

[0690] 图 96 说明在疾病进展期间内的 2C3-SFD1/K12 和 12G6-SFD1/K12 的 EAE 临床评分。

[0691] 实施例 64 :抗体的 Fc 修饰以改变抗 CD52 抗体的药物动力学特性

[0692] 抗体的 Fc 区中的改变 1) 通过改变与 Fc 受体的相互作用而影响抗体的生物活性,和 / 或 2) 通过改变与 FcRn 新生儿受体的相互作用而改变抗体的药物动力学特性。FcRn 分子表达于血管内皮上,并且据信其是 IgG 再循环的主要部位。FcRn 结合至抗体 Fc 部分,其接着变得内化于细胞中。与 FcRn 具有高亲和力相互作用的抗体会再循环回到细胞表面,并会被释出而回到循环中。具有较低亲和力相互作用的抗体在细胞内分离并最终降解。定点诱变(以提高与 FcRn 的相互作用)产生与未经修饰的抗体相比可维持在循环中较长时间的抗体。相反地,抗体的 Fc 区域内的降低 FcRn 结合的突变使得抗体的循环半衰期缩短。已被叙述为降低对 FcRn 的结合产生较短的循环半衰期的突变包括, His435Ala 单突变和 His310Ala/His435Gln 双突变(参见,例如, Kim 等人,“Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor, FcRn,” *Eur. J. Immunol.*, 29 : 2819-2825(1999) 和 Kenanova 等人,“Tailoring the Pharmacokinetics and Positron Emission Tomography Imaging Properties of Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments,” *Cancer. Res.* 65(2) :622-631(2005))。

[0693] 使 2C3-SFD1/K12 抗体突变以产生具有改变的 PK 特性的 His435Ala 2C3-SFD1/K12(“2C3-SFD1/K12- 修饰 1”)和 His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12(“2C3-SFD1/K12- 修饰 2”)抗体。进行 Biacore 分析以证实对小鼠和人类 FcRn 分子的结合降低。Campath-1H®和 2C3-SFD1/K12 抗体二者以相似的动力学结合至各小鼠和人类 FcRn 分子。对比之下, His435Ala 2C3-SFD1/K12 抗体以低水平结合至小鼠 FcRn 但不结合至人类 FcRn。 His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12 抗体并不结合至小鼠或人类 FcRn 分子,表明引入单突变或双突变至 2C3-SFD1/K12Fc 区显著地影响对小鼠和人类 FcRn 的结合。

[0694] 图 97A-97B 说明 Campath1H® (“Campath”)、2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、His435Ala 2C3-SFD1/K12 (“H435A 2C3”)和 His310Ala/His435Gln 2C3-SFD1/K12 (“H310A/H435Q 2C3”)结合至小鼠和人类 FcRn 分子的能力。

[0695] 实施例 65 :在 C57B1/6 小鼠中静脉内给药之后 Fc 修饰的抗 CD52 抗体的半衰期评估

[0696] 对 2C3-SFD1/K12 主链 (backbone) 引入 Fc 修饰以产生 2C3-SFD1/K12- 修饰 1 和 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体,该抗体对负责将抗体维持于循环中的 FcRn 受体显示出降低的结合。对 2C3-SFD1/K12 抗体和具有降低的 FcRn 结合的 2C3-SFD1/K12- 修饰 1 及 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体测定其药物动力学特性。在没有靶抗原(2C3-SFD1/K12 结合至人类 CD52 但不与小鼠 CD52 交互反应)的情况下使用 C57BL/6 小鼠来评估 PK 特性。对小鼠静脉内注射 1mg/kg 的抗体,在多个时间点收集血液以通过 ELISA 分析小鼠血清中的循环人类 IgG1 水平。2C3-SFD1/K12- 修饰 1 和 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体均比 2C3-SFD1/K12 抗体更快地

从血液中清除。2C3-SFD1/K12 的半衰期为 403 小时，而 2C3-SFD1/K12- 修饰 1 的半衰期为 51 小时且 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 的半衰期为 8 小时。2C3-SFD1/K12 和 2C3-SFD1/K12- 修饰 -1 的 PK 特性与一室模型一致，仅有单相消除。相比之下，2C3-SFD1/K12- 修饰 -2 的特性与二室模型一致，具有 2 个不同的消除相（在表中指定为 α 和 β ）。第一相持续直到给药之后 48 小时（ α ），且第二相（ β ，也称为末端消除相）于给药之后 48 小时开始。

[0697] 图 98 显示在非转基因小鼠中 2C3-SFD1/K12（“2C3 未修饰的”）、2C3-SFD1/K12- 修饰 1（“2C3-Fc 突变体 1”）及 2C3-SFD1/K12- 修饰 2（“2C3-Fc 突变体 2”）的体内清除。

[0698] 表 17- 组间药物动力学数据概括

[0699]	2C3-SFD1/K12	2C3-SFD1/K12- 修饰 1	2C3-SFD1/K12- 修饰 2
$t_{1/2}$ (hr)	403 ± 140	51.0 ± 12.3	8.05 ± 0.74 (α) 282 ± 385 (β)
Cl (ml/hr/kg)	0.29 ± 0.09	1.35 ± 0.36	5.90 ± 4.67
Vz (ml/kg)	156 ± 40.7	94.8 ± 14.3	1932 ± 1341
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)	3748 ± 937	781 ± 171	230 ± 105
Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	9.65 ± 1.72	11.9 ± 0.83	9.64 ± 3.70

[0700]

[0701] 表 18- 个体动物数据

[0702]

组#	动物	HL_Lambda_z (hr)	Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	AUCINF_obs (hr $\cdot\mu\text{g}/\text{ml}$)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/hr/kg)
2C3	2.1	197.26	11.56	2967.86	95.89	0.34
2C3	2.2	494.01	10.54	4635.96	153.73	0.22
2C3	2.3	324.61	10.06	3783.76	123.77	0.26
2C3	2.4	283.68	10.57	3130.92	130.72	0.32
2C3	2.5	330.89	6.15	2025.29	235.71	0.49
2C3	2.6	547.78	10.56	4469.73	176.81	0.22
2C3	2.7	597.92	10.57	4764.75	181.04	0.21
2C3	2.8	320.65	7.61	3415.82	135.43	0.29
2C3	2.9	527.01	9.27	4533.82	167.70	0.22
	AVG	402.65	9.65	3747.55	155.64	0.29
	SD	140.22	1.72	937.38	40.73	0.09

[0703]

组#	动物	HL_Lambda_z (hr)	Cmax (µg/ml)	AUCINF_obs (hr*µg/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/hr/kg)
2C3-M1	3.1	35.20	12.84	513.50	98.89	1.95
2C3-M1	3.2	42.74	11.68	842.55	73.17	1.19
2C3-M1	3.3	50.55	11.39	902.62	80.80	1.11
2C3-M1	3.4	46.61	12.49	717.95	93.67	1.39
2C3-M1	3.5	56.38	12.94	911.32	89.26	1.10
2C3-M1	3.6	63.40	12.41	995.22	91.91	1.00
2C3-M1	3.7	33.86	12.02	513.17	95.19	1.95
2C3-M1	3.8	63.14	10.56	842.79	108.08	1.19
2C3-M1	3.9	66.75	11.02	788.59	122.12	1.27
	AVG	50.96	11.93	780.86	94.79	1.35
	SD	12.30	0.83	170.51	14.33	0.36

[0704]

[0705]

组#	动物	α HL_Lambda (hr)	β HL_Lambda (hr)	Cmax (µg/ml)	AUCINF_obs (hr*µg/ml)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/hr/kg)
2C3-M2	4.1*	8.31	缺少	10.62	177.07	67.74	5.65
2C3-M2	4.2	7.42	994.71	11.35	390.03	3679.37	2.56
2C3-M2	4.3	7.37	703.09	10.48	315.82	3211.80	3.17
2C3-M2	4.4	7.72	227.03	11.78	247.96	1320.92	4.03
2C3-M2	4.5**	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少
2C3-M2	4.6**	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少
2C3-M2	4.7***	77.89	77.89	1.32	61.71	1820.87	16.20
2C3-M2	4.8	8.18	150.98	11.41	221.89	981.64	4.51
2C3-M2	4.9	9.33	77.61	10.49	194.31	576.21	5.15
	AVG	8.05	281.98	9.64	229.83	1931.80	5.90
	SD	0.74	384.82	3.70	104.69	1341.43	4.67

[0706] #-测试组为 2C3-SFD1/K12(“2C3”)、2C3-SFD1/K12-修饰 1(“2C3-M1”)及 2C3-SFD1/K12-修饰 2(“2C3-M2”)

[0707] * 动物 4.1 无 β $t_{1/2}$, V_z 异常

[0708] ** - 动物 4.5 & 4.6, 无足够数据进行 PK 分析。

[0709] *** 动物 4.7 不完全注射

[0710] 实施例 66 : 在杂合 huCD52 转基因小鼠中静脉内给药之后 Fc 修饰的抗 CD52 抗体的半衰期评估

[0711] 体外对 2C3-SFD1/K12 抗体与具有降低的 FcRn 结合的 2C3-SFD1/K12- 修饰 1 和 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体测定其药物动力学特性。在 2C3-SFD1/K12 抗体靶抗原的存在下使用 huCD52 转基因小鼠评估 PK 特性。对小鼠静脉内注射 1mg/kg 的抗体。在多个时间点收集血液以通过 ELISA 测定小鼠血清中的循环人类 IgG1 水平。2C3-SFD1/K12- 修饰 1 和 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体均比 2C3-SFD1/K12 抗体更快地从血液中清除。2C3-SFD1/K12 的半衰期为 64 小时, 而 2C3-SFD1/K12- 修饰 1 的半衰期为 32 小时, 且 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 的半衰期为 6.5 小时。

[0712] 图 99 显示在 huCD52 转基因小鼠中 2C3-SFD1/K12 (“2C3”)、2C3-SFD1/K12 修饰 1 (“2C3-Fc 突变体 1”) 及 2C3-SFD1/K12 修饰 2 (“2C3-Fc 突变体 2”) 的体内清除。

[0713] 表 19- 组间药物动力学数据概括

[0714]

	2C3-SFD1/K12	2C3-SFD1/K12- 修饰 1	2C3-SFD1/K12- 修饰 2
$t_{1/2}$ (hr)	64.2 ± 12.1	32.3 ± 3.25	6.58 ± 2.03
Cl (ml/hr/kg)	2.15 ± 0.31	2.51 ± 0.28	5.41 ± 0.83
V_z (ml/kg)	198 ± 42.8	117 ± 21.1	49.7 ± 11.1
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$)	475 ± 73.4	403 ± 44.5	188 ± 27.2
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	8.88 ± 1.69	12.4 ± 1.67	12.9 ± 1.91

[0715] 表 20- 个体动物数据

[0716]

组#	动物	HL_Lambda_z (hr)	Cmax ($\mu\text{g/ml}$)	AUCINF_obs ($\text{hr}*\mu\text{g/ml}$)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/hr/kg)
2C3	2.1	77.32	8.19	421.87	264.42	2.37
2C3	2.11	61.47	10.38	483.25	183.51	2.07
2C3	2.2	78.28	9.28	496.58	227.42	2.01
2C3	2.3	82.38	6.99	441.98	268.91	2.26
2C3	2.4	53.60	9.08	465.09	166.28	2.15
2C3	2.5	58.02	9.09	526.59	158.95	1.90
2C3	2.6	44.97	6.03	371.17	174.78	2.69
2C3	2.7	56.52	9.38	476.41	171.16	2.10
2C3	2.8	67.99	12.13	641.28	152.97	1.56
2C3	2.9	61.46	8.30	421.65	210.29	2.37
	平均	64.20	8.88	474.59	197.87	2.15
	SD	12.06	1.69	73.40	42.80	0.31

[0717]

组#	动物	HL_Lambda_z (hr)	Cmax ($\mu\text{g/ml}$)	AUCINF_obs ($\text{hr}*\mu\text{g/ml}$)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/hr/kg)
2C3-M1	3.1	28.48	15.19	412.41	99.64	2.42
2C3-M1	3.11	34.64	12.60	468.36	106.69	2.14
2C3-M1	3.2	27.57	14.17	411.82	96.60	2.43
2C3-M1	3.3	34.27	11.96	401.38	123.20	2.49
2C3-M1	3.4	29.10	12.51	400.36	104.85	2.50
2C3-M1	3.5	29.63	11.11	470.98	90.77	2.12
2C3-M1	3.6	32.76	9.75	348.72	135.53	2.87
2C3-M1	3.7	35.68	10.41	328.71	156.61	3.04
2C3-M1	3.8	36.41	13.52	390.24	134.61	2.56
2C3-M1	3.9	34.06	12.39	392.53	125.19	2.55
	平均	32.26	12.36	402.55	117.37	2.51
	SD	3.25	1.67	44.48	21.05	0.28

[0718]

组#	动物	HL_Lambda_z (hr)	Cmax ($\mu\text{g/ml}$)	AUCINF_obs ($\text{hr} \cdot \mu\text{g/ml}$)	Vz_obs (ml/kg)	Cl_obs (ml/hr/kg)
2C3-M2	4.1	7.64	13.45	197.24	55.85	5.07
2C3-M2	4.11	缺少	9.00	缺少	缺少	缺少
2C3-M2	4.2	7.79	14.92	217.80	51.61	4.59
2C3-M2	4.3	7.35	12.79	183.44	57.78	5.45
2C3-M2	4.4	3.54	10.34	152.92	33.44	6.54
2C3-M2	4.5	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少
2C3-M2	4.6	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少
2C3-M2	4.7	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少
2C3-M2	4.8	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少
2C3-M2	4.9	缺少	缺少	缺少	缺少	缺少
	平均	6.58	12.10	187.85	49.67	5.41
	SD	2.03	2.40	27.23	11.12	0.83

[0719] 因为数据不足,未获得 4.11、4.5、4.6、4.7、4.8、和 4.9 的 PK 参数。

[0720] #- 测试组为 2C3-SFD1/K12(“2C3”)、2C3-SFD1/K12- 修饰 1(“2C3-M1”)及 2C3-SFD1/K12- 修饰 2(“2C3-M2”)

[0721] 实施例 67 :在杂合 huCD52 转基因小鼠中静脉内施用 Fc 修饰的抗 CD52 抗体之后的体内消减评估

[0722] 在 huCD52 转基因小鼠中对 2C3-SFD1/K12、2C3-SFD1/K12- 修饰 1、及 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体的消减活性进行测定。对小鼠以 1mg/kg 的 2C3-SFD1/K12、2C3-SFD1/K12- 修饰 1、或 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体处理,并在 72 小时之后评估 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B 细胞、及 NK 细胞的存在。与施用 2C3-SFD1/K12 抗体相比较,施用 2C3-SFD1/K12- 修饰 1 或 2C3-SFD1/K12- 修饰 2 抗体引起血液和脾脏中的消减水平降低。而且,在血液和脾脏中,相对于 2C3-SFD1/K12- 修饰 2,2C3-SFD1/K12- 修饰 1 引起更大的消减。

[0723] 图 100A-100B 显示在使用 2C3-SFD1/K12(“2C3”)、2C3-SFD1/K12 修饰 1(“2C3 Fc 突变体 -1”)及 2C3-SFD1/K12 修饰 2(“2C3 Fc 突变体 -2”)抗体给药之后 72 小时血液和脾脏中的整体淋巴细胞群 (CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、B220⁺ B 细胞、及 NK 细胞)的水平。

[0724] 实施例 68 :人源化抗 CD52 抗体的详细的表位特异性

[0725] 使用 Biacore T100 仪器测定人源化 12G6-SFD1/K12、2C3-SFD1/K12、及 9D9-H16/K13 抗体的详细表位特异性。作为对照,使用相同方法来评估克隆 097(纯化的抗人 CD52 抗体, Biologend)的表位特异性。使用肽 ELISA 方法先前已将克隆 097 的表位特异性特征化 (Hale G, “Synthetic peptide mimotype of the CAMPATH-1 (CD52) antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein,” Immunotechnology, 1 : 175-187 (1995))。在此 Biacore T100 检定中,使用氨基偶联将抗体直接固定在 Biacore CM5 Series S 羧甲基葡聚糖传感芯片 (GE #BR-1006-68) 上。羧甲基葡聚糖表面使用 0.1M 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 0.4M 的 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 的 1 : 1 混合物活化,使该表面可结合抗体上的反应性氨基。因为与 IgGs 相比,

IgM 抗体容易具有较高水平的非特异性结合,因此也研究了小鼠 IgM κ (mIgM κ) 同种型对照 (Biolegend 克隆 #MM-30) 的结合。抗体固定化之后,反应传感芯片表面使用 1M 乙醇胺盐酸盐 /NaOH(pH 8.5) 淬灭。在每一个芯片上的一个流动室为空白参考表面,后续流动室用 10,000RU 的抗体固定。

[0726] 合成一系列包含人类 CD52 序列的丙氨酸扫描突变肽 (MUT 1-MUT 12(分别为 SEQ ID NOS:169-180),表 21)(参见,例如,Hale G,“Synthetic peptide mimotype of the CAMPATH-1(CD52)antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein,”*Immunotechnology*,1:175-187(1995))。在 500nM、100nM、50nM、和 0nM 的浓度下,对抗体结合至这些突变 CD52 肽和结合至野生型人类 CD52 肽进行测试。将肽稀释至检定运行缓冲液, HBS-EP+(10mM HEPES、150mM NaCl、0.05% P20 表面活性剂、3mM EDTA, pH 7.4)。包含 100nM 样品的重复物。还包含轻(κ)链特异性大鼠抗-小鼠 IgM 抗体 (Southern Biotech Clone #1B4B1) 作为 IgM 对照。T100 仪器样品室和检定温度分别设定为 4°C 和 25°C。以 50 μ l/min 的流速注入人类 CD52 肽样品五分钟以测量结合,并在 HBS-EP+ 中以 50 μ l/min 的流速洗涤五分钟以测量解离。对抗体表面以 50 μ l/min 流速使用 10mM 甘氨酸-HCl (pH 2.0) 的六十秒注射来剥除任何残留的结合肽。使用 Biacore T100 Kinetics Evaluation 软件 v2.0 (GE Healthcare) 进行分析。通过参考流动室和 0nM 浓度差减 (双参考差减 (double-reference subtraction)) 将数据拟合至 1:1 模型。12G6-SFD1/K12 抗体阴性 ((-), MUT 8) 和阳性 ((+), MUT 9) 肽表位识别的代表性传感图分别示于图 101A 和图 101B 中。收编的肽结合数据概括于表 21 中。

[0727] 通过使用含有人类 CD52 的 C 端部分六个残基的肽涂布 ELISA 板,接着测量抗体至固定肽的结合,来测定克隆 097 的先前特征化的结合特异性 (Hale G,“Synthetic peptide mimotype of the CAMPATH-1(CD52)antigen, a small glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein,”*Immunotechnology*,1:175-187(1995))。各个残基由所有 20 个氨基酸所取代。因为在此 ELISA 中这些肽依附于固体表面,所以该检定比本文所述的 Biacore T100 检定 (其使用固定于表面的抗体,这些肽在该表面上流动) 可能更受亲和性作用的影响。在 ELISA 研究中,发现在成熟类型的人类 CD52 的 11 和 12 位 (野生型残基分别为脯氨酸和丝氨酸) 的丙氨酸取代使得克隆 097 至肽的强力结合降低。在该 Biacore T100 研究中,发现 11 和 12 位 (以及 7、8、9、和 10 位) 的丙氨酸取代会取消克隆 097 的结合。假定的 ELISA 检定的亲和力作用有可能是为什么通过 ELISA 方法所测定的克隆 097 的图谱化 (mapped) 表位比通过所述 Biacore T100 检定所测得的小的原因。

[0728] 2C3-SFD1/K12 和 12G6-SFD1/K12 人源化抗体至人类 CD52 肽序列的结合均对 7、8、和 11 位的丙氨酸取代敏感,且人源化 9D9-H16/K13 的结合对 4 和 11 位的丙氨酸取代敏感。这些被定义的表位特异性与在实施例 4 中所观察的结果 (概括于表 8 中) 重叠。结果之间的些微差异并不是意料之外的,因为在本案例中用于测定结合的 Biacore T100 方法与在实施例 4 中所使用的方法显著不同。对比于本案例,在实施例 4 中,改造的 CHO 细胞用于表达野生型或丙氨酸取代突变型的人类 CD52。在这些哺乳动物细胞中表达的人类 CD52 可以被糖基化而影响结合。这并不是用于 Biacore T100 检定中的人类 CD52 的情况。

[0729] 表 21 :对丙氨酸扫描突变 hCD52 肽的结合

[0730]

肽	肽序列	2C3- SFD1/K12 结合	9D9- H16/K13 结合	12G6- SFD1/K12 结合	097 结合	对照 mIgM 结合
MUT 1	<u>A</u> QNDTSQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 2	G <u>A</u> NDTSQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 3	GQ <u>A</u> DTSQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 4	GQN <u>A</u> TSTSSPSADC	+	-	+	+	-
MUT 5	GQND <u>A</u> SQTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 6	GQNDT <u>A</u> QTSSPSADC	+	+	+	+	-
MUT 7	GQNDT <u>S</u> TSSPSADC	-	+	-	-	-
MUT 8	GQNDTSQ <u>A</u> SSPSADC	-	+	-	-	-
MUT 9	GQNDTSQT <u>A</u> SPSADC	+	+	+	-	-
MUT 10	GQNDTSQTS <u>A</u> PSADC	+	+	+	-	-
MUT 11	GQNDTSQTSS <u>A</u> SADC	-	-	-	-	-
MUT 12	GQNDTSQTSSP <u>A</u> ADC	+	+	+	-	-
对照						
WT 1	GQNDTSQTSSPSADK- 生物素	+	+	+	+	-
WT 2	生物素 -GQNDTSQTSSPSAD	+	-	+	+	-
大鼠抗 -mIgM	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+

[0731] (+) 检测到结合 :对于 500nM 肽注射,最大响应 (R_{max}) > 2RUs

[0732] (-) 没有检测到结合 :对于 500nM 肽注射,最大响应 (R_{max}) < 2RUs

[0733] 实施例 69 :Campath-1H®或 12G6-SFD1/K12 所引发的 CD4+ T 细胞响应评估

[0734] 在使用预先载入一组重叠的 15-mer 肽 (包含来自 Campath-1H®或人源化 12G6-SFD1/K12 抗体的可变区的序列) 的自体树突状细胞 (DC) 重复体外刺激之后,对 CD4+ T 细胞增殖反应进行评估。这些实验利用正常人类供体 T 细胞和 DCs。通过对响应于经自体肽脉冲的抗原呈递细胞 (APC) 而增殖的人类 CD4+T 细胞的氚标记胸腺嘧啶引入定量来测定结果。

[0735] 细胞制备 :从由 BioMed Supplies (Carlsbad, CA) 获得的正常人类供体血浆分离 (apheresis) 产品分离 PBMCs。通过 Key Biologics, LLC (Memphis, TN) 进行供体血液的 HLA 单倍型筛选 (表 22)。使用 Ficoll-Paque PLUS 密度梯度 (GE Healthcare) 并通过一系列使用磷酸缓冲盐水 (PBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) 的洗涤而分离 PBMCs。依循制造商的推荐方案,使用 Dynal CD4+ 珠基阳性分离试剂盒 (Invitrogen) 将 CD4+ T 细胞从 PBMC 中分离。将分离的 CD4+ T 细胞冷冻于 Recovery Cell Culture Freezing Media (Invitrogen) 并储存于液氮中。通过使用 GM-CSF (Leukine, Bayer, Leverkusen, Germany) 和 IL-4 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) 铺开附着的细胞六天而从 PBMCs 诱导树突状细胞 (DC)。在第 4 天更换补

充有 GM-CSF 和 IL-4 的介质。接着将 DCs 从瓶中分离并冷冻于 Freezing Media, 随后转移至液态氮储罐。

[0736] 表 22 : 供体血液的 HLA 单倍型

供体	HLA DR 单倍型		肽组
BMS170	DRB1_0701	DRB1_1503	Campath
BMS154	DRB1_0301	DRB1_0302	Campath
BMS150	DRB1_1101	DRB1_1302	Campath
BMS167	DRB1_0701	DRB1_1503	Campath
BMS200	DRB1_0804	DRB1_1202	Campath
BMS301	DRB1_1401	DRB1_1503	Campath
BMS352	DRB1_0301	DRB1_1101	Campath
BMS362	DRB1_0302	DRB1_0302	Campath
[0737] BMS484	DRB1_0103	DRB1_1201	Campath/GLD52
BMS486	DRB1_1302	DRB1_1303	Campath/GLD52
BMS640	DRB1_0301	DRB1_1302	GLD52
BMS656	DRB1_301	DRB1_1101	GLD52
BMS902	DRB1_0302	DRB1_0804	GLD52
BMS928	DRB1_1001	DRB1_1503	GLD52
BMS927	DRB1_1001	DRB1_1503	GLD52
BMS963	DRB1_0302	DRB1_1401	GLD52
BMS361	DRB1_1102	DRB1_1401	GLD52
BMS165	DRB1_1102	DRB1_1501	GLD52

[0738] 肽: 在 CLEAR 树脂 (Peptides International, Louisville, KY) 上使用标准 Fmoc-chemistry, 利用 Rainin Symphony 自动化肽合成器来合成包含 Campath-1H® 和 12G6-SFD1/K12 的重链可变区和轻链可变区的肽。通过叔丁氧羰基 (BOC)、叔丁基 (tBu)、2,2,4,6,7-五甲基二氢-苯并呋喃-5-磺酰基 (Pbf)、或三苯甲基 (Trt) 基团正交保护氨基酸 (EMD Biosciences, San Diego, CA 或 Anaspec, San Jose, Ca)。使用摩尔比为 6 : 6 : 3 : 12 : 1 的氨基酸 / HCTU / HOBt / DIEA / 树脂进行偶联。在各个循环期间, 使用 20% 哌啶和 2.5% 1,8-二氮杂双环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (DBU) 于 DMF 中的溶液将 Fmoc 从氨基端移除。使用 2.5% 水 / 2.5% TIS / 5% 苯甲醚 / 90% TFA 体积比的 0.1mM 树脂的 15mls 混合物进行去保护 / 从树脂切割 3 小时。在二乙醚 (-80°C) 中使上层清液沉淀并以 3000rpm 制粒 10 分钟。轻轻倒出乙醚并再次洗涤颗粒。接着将粗肽冻干。使用分析型 HPLC (XBridge C18 4.5x 100mm, Waters Corp., Milford, MA) 和 MALDI-TOF 质谱仪 (Synapt, Waters Corp., Milford, MA) 验证序列并评估纯度。所有试剂均为 HPLC 级 (EMD Biosciences, San Diego, Ca 或 Sigma Aldrich, St. Louis, MO)。将冻干的肽再次悬浮于 100% DMSO (Sigma) 中。将四十三个 Campath-1H® 肽合并至 11 个线性组, 每组各包含 3 或 4 个肽 (表 23 : 从上到下, 轻链肽以 SEQ ID NOs : 187-206 表示, 并且重链肽以 SEQ ID NOs : 207-229 表示)。42 个 12G6-SFD1/K12 肽合并至 8 个线性组, 每组各包含五或六个肽 (表 24 : 从上到下, 轻链肽以 SEQ ID NOs : 230-250 表示, 并且重链肽以 SEQ ID NOs : 251-271 表示)。

[0739] 表 23 : 43 个 Campath-1H® 15-mer 轻链和重链肽, 各重叠 10 个氨基酸

[0740] Campath-1H® 肽

[0741]

轻链		重链	
肽	ID#	肽	ID#
DIQMTQSPSSLSASV	978	QVQLQESGPGGLVRPS	998
QSPSSLSASVGDRT	979	ESGPGGLVRPSQTLSSL	999
LSASVGDRTITCKA	980	LVRPSQTLSSLTCTVS	1000
GDRVTITCKASQNID	981	QTLSSLTCTVSGFTFT	1001
ITCKASQNIDKYLNW	982	TCTVSGFTFTDFYMN	1002
SQNIDKYLNWYQQKP	983	GFTFTDFYMNWVRQP	1003
KYLNWYQQKPGKAPK	984	DFYMNWVRQPPGRGL	1004
YQQKPGKAPKLLIYN	985	WVRQPPGRGLEWIGF	1005
GKAPKLLIYNTNNLQ	986	PGRGLEWIGFIRDKA	1006
LLIYNTNNLQTVPS	987	EWIGFIRDKAKGYTT	1007
TNNLQTVPSRFSGS	988	IRDKAKGYTTEYNPS	1008
TGVPSRFSGSGSGTD	989	KGYTTEYNPSVKGRV	1009
RFSGSGSGTDFFTI	990	EYNPSVKGRVTMLVD	1010
GSGTDFFTISSLQP	991	VKGRVTMLVDTSKNQ	1011
FTFTISSLQPEDIAT	992	TMLVDTSKNQFSLRL	1012
SSLQPEDIATYYCLQ	993	TSKNQFSLRLSSVTA	1013
EDIATYYCLQHISRP	994	FSLRLSSVTAADTAV	1014
YYCLQHISRPRTFGQ	995	SSVTAADTAVYYCAR	1015
HISRPRTFGQGTKVE	996	ADTAVYYCAREGHTA	1016
RTFGQGTKVEIKRTV	997	YYCAREGHTAAPFDY	1017
		EGHTAAPFDYWGQGS	1018
		APFDYWGQGS�TVS	1019
		WGQGS�TVSSASTK	1020

[0742] 表 24 :42 个 12G6-SFD1/K12 15-mer 轻链和重链肽,各重叠 10 个氨基酸

[0743] 12G6-SFD1/K12 肽

轻链		重链	
肽	ID#	肽	ID#
DIVMTQTPLSLSVTP	1027	EVQLVESGGGLVQPG	1048
QTPLSLVTPGQPAS	1028	ESGGGLVQPGGSLRL	1049
LSVTPGQPASISCKS	1029	LVQPGGSLRLSCAAS	1050
GQPASISCKSSQSL	1030	GSLRLSCAASGFPFS	1079
ISCKSSQSLLYSNGK	1031	SCAASGFPFSNYWMN	1080
SQSLLYSNGKTYLNW	1032	GFPFSNYWMNWVRQA	1081
YSNGKTYLNWVLQKP	1072	NYWMNWVRQAPGKGL	1082
TYLNWVLQKPGQSPQ	1073	WVRQAPGKGLEWVGQ	1055
VLQKPGQSPQRLIYL	1074	PGKGLEWVGQIRLKS	1056
GQSPQRLIYLVSKLD	1036	EWVGQIRLKSNNYAT	1060
RLIYLVSKLDGVPD	1037	IRLKSNNYATHYAES	1061
VSKLDGVPDRFSGS	1038	NNYATHYAESVKGRF	1062
SGVPDRFSGSGGTD	1039	HYAESVKGRFTISR	1063
RFGSGSGTDFTLKI	1040	VKGRFTISRDDSKNS	1064
GSGTDFTLKISRVEA	1041	TISRDDSKNSLYLQM	1065
FTLKISRVEAEDVGV	1042	DSKNSLYLQMNSLKT	1066
SRVEAEDVGVYYCVQ	1043	LYLQMNSLKTEDTAV	1067
EDVGVYYCVQGSHFH	1075	NSLKTEDTAVYYCTP	1068
YYCVQGSHFHTFGQG	1076	EDTAVYYCTPIDYWG	1083
GSHFHTFGQGTKLEI	1077	YYCTPIDYWGQTTV	1084
TFGQGTKLEIKRTVA	1078	IDYWGQTTVTVSSA	1085

[0744]

[0745] 体外刺激

[0746] DC 抗原脉冲和成熟:在用肽处理之前,将 DCs 解冻,洗涤并置于添加有 5% 人血清 (HS, Sigma, St. Louis, MO)、1% 青霉素 - 链霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)、100ng/ml GM-CSF、和 20ng/ml IL-4 的 RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中。在 6 孔组织培养板中以 2×10^5 细胞 / 毫升将 DCs 置于 4 毫升介质中,并使其在 37°C 贴壁 1 小时。在细胞贴壁之后,将 10 μ g/ml (总共 40 μ g) 的各个肽加至含有 DCs 的孔中,涉及 120 μ g 或 160 μ g 的总肽加至各个孔中 (Campath-1H[®] 3 肽组或 4 肽组),或者 200 μ g 或 240 μ g 的总肽加至各个孔中 (12G6-SFD1/K125 肽组或 6 肽组)。将 40 μ g 的泛 DR 结合表位 (PADRE) 加至 DCs 的一个孔中并用作阳性对照,因为其可结合至大多数 HLA-DR 分子 (Alexander J, 等人, "Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides," *Immunity*, 1:751-761 (1994))。同样地,将 40 μ g 的三种 HLA-DR 结合破伤风类毒素肽 (DTIMMEPPYCKGLDIYYKA (SEQ ID NO: 183)、SAMLNLIIFGPGPVLNKNEV (SEQ ID NO: 184)、和 NNFTVSFWLRVPKVSASHLE (SEQ ID NO: 185)) 的各种加至 DCs 的一个孔。类似地,使用热灭活的腺病毒作为阳性抗原来源,并将其以 1 μ g/ml 加至 DCs 的一个孔。最后,DCs 的一组维持不用抗原脉冲并用来做为 '空白' 培育组。用各种抗原脉冲的 DCs 在 37°C 培养至少三小时。接着对 DCs 使用含有 50ng/ml TNF- α 、10ng/ml IL-6、25ng/ml IL-1 β (Peprotech, Rocky Hill, NJ) 和 500ng/ml PGE-2 (Sigma

Aldrich, St. Louis, MO) 的“成熟细胞因子混合物”处理。然后使抗原脉冲 DCs 于 37°C 成熟过夜。

[0747] 共培养的建立:在肽装载和成熟化之后,使用 PBS 洗涤 DCs 两次,并再补充添加有 10% HS 的 4ml RPMI。将自体 CD4⁺ T 细胞解冻并将其以 2×10^6 细胞 / 毫升在添加有 10% HS、青霉素、和链霉素的 RPMI 中重悬。接着将 DCs 与幼稚性 (naïve) CD4⁺T 细胞以 T 细胞 : DC 为 10 : 1 的比值 (8×10^6 T 细胞 : 8×10^5 DCs) 在 8 毫升介质中一起培养。接着将共培养物在 37°C 培育 7 天。在共培养开始后约 72 小时,对细胞补充 25IU 重组 IL-2 (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 并且之后每 3-4 天进一步补充于新介质中的 25IU 重组 IL-2。

[0748] 共培养的再刺激:在第 7 天 (Stim #2) 和第 14 天 (Stim #3), 依循下列步骤再刺激共培养物。

[0749] 增殖检定:如上所述,在 24 孔低结合板上,将 DCs 以 5×10^5 细胞 / 毫升铺布于 1ml 介质中,对其抗原脉冲并使其成熟,以便于细胞向 U 型底检定板的后续转移。将一种不相关的 HLA DR 结合肽, CS 378-398 (肽序列 DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS (SEQ ID NO : 186)), 用作阴性对照 (Alexander J, 等人, “Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides,” *Immunity*, 1 : 751-761 (1994))。在 24 小时 DC 成熟之后,使用冰冷 PBS 洗液使细胞从培养板脱离。将 DCs 与经抗原刺激的 T 细胞以 1 : 1 的 T 细胞 : DC 比值 (2.5×10^4 DC / 孔) 一起铺于 U 型底 96 孔培养板中。使用经驯化肽 (特异性反应) 脉冲的 DC 和经不相关肽 (非特异性反应) 脉冲的 DC、以及仅 T 细胞和仅 DC 对照对各个 T 细胞组进行试验,重复三次。在每孔加入 1μ Ci 氚标记胸腺嘧啶 (Perkin Elmer, Waltham, MA) 之前进行检定 72 小时。在 96 孔培养板收集器 (Perkin Elmer) 上收集细胞,并通过在 Wallac Microbeta Trilux 计数器 (Perkin Elmer) 上测量 CPM 而对引入的氚标记胸腺嘧啶的量定量。通过将特异性 CPM 除以非特异性 CPM 而计算刺激指数。

[0750] T 细胞受体 (TCR) V β 用途:将增殖检定建立之后所留下的任何 CD4⁺T 细胞冷冻以进行 T 细胞受体 V β 链表达的最后测定。将细胞解冻并依照制造商说明书在 IOTest Beta Mark 试剂盒 (Beckman Coulter, France) 中用识别 24 种结合的 V β 家族成员的抗体染色 30 分钟。在使用 PBS 洗涤和在 1% 甲醛中重悬之后,在 FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 上分析细胞。计算表达各个被检测的 V- β 链的细胞的百分比,如在图 102 和图 103 中所概括。

[0751] Campath-1H[®] 免疫原性评估

[0752] 如上文所述,使用来自 BioMedSupply (BMS) 的十个正常供体的 PBMCs 来进行 Campath-1H[®] 肽的免疫原性评估。由刺激指数所显示的反应概况描述于表 25A 中。每一个供体列于一列,且每一排列出用于刺激 CD4⁺ T 细胞的肽组。通过将对于驯化肽组的特异性免疫反应除以不相关反应来测定刺激指数 (SI)。SI 值 < 2.0 则未列出。表 25A 中所概括的十个供体中各个的增殖数据报告于图 104A-J 中。六个供体显现出大于 2.0 的刺激指数,因而被称为 ‘Campath-1H[®] 反应者’。当使用两个不同肽组进行检定时,来自反应者其中之一 BMS352 的驯化过的 CD4⁺T 细胞展现出特异性免疫反应。第七个供体, BMS486, 也被分类为 ‘反应者’。在此供体中,使用轻链肽组 986-989 记录到为背景的 1.7 倍的刺激指数。当评估此供体内经驯化的 T 细胞培养物中的 V β 上调时,其显示经 986-989 驯化的 T 细胞显现

出单一 Vβ (Vβ 3) 的高度上调 (图 102)。单一 Vβ 的上调和特异性增殖反应表明 BMS486 为 Campath-1H®反应者。三个未反应的供体, BMS200、BMS154、及 BMS167, 未显示出增殖数据或 Vβ 上调, 此显示肽特异性免疫反应未发生。Campath-1H®数据被定量为 70% (7/10) 反应者比率。引发免疫反应的肽组总数为八。这八个免疫原性肽组中的三个引发个别供体中的强烈反应, 刺激指数为 3.0 或更高 (表 26)。

[0753] 表 25 :刺激指数数据概括

[0754] 表 25A. Campath-1H®刺激指数

[0755]

Campath-1H®刺激指数										
	BMS200	BMS301	BMS154	BMS484	BMS362	BMS486	BMS160	BMS167	BMS170	BMS352
982, 983, 984 & 987										
988, 989 & 990										
985, 986, 991 & 992		2.6								
993, 994, 995 & 996										
997, 998 & 999							nd			
978, 979, 980, 981										
982, 983, 984, 985									2.0	
986, 987, 988, 989				2.1		1.7				
990, 991, 992, 993										
994, 995, 996, 997										2.1
998, 999, 1000, 1001										
1002, 1003, 1004, 1005										
1006, 1007, 1008, 1009							4.2			5.4
1010, 1011, 1012, 1013					3.0					
1014, 1015, 1016, 1017										
1018, 1019, 1020										
PADRE	2.0			2.0		2.5	2.5	2.8	10.5	2.6
Tetanus	11.2					2.3	4.5		2.3	25.9
Ad-Bgal-HI	27.6	4.5	2.6	3.1	13.0	3.8	24.2	44.5	46.6	3.2
空白										

[0756] 表 25B :12G6-SFD1/K12 刺激指数

[0757]

12G6-SFD1/K12 刺激指数										
	BMS484	BMS486	BMS656	BMS640	BMS361	BMS165	BMS902	BMS928	BMS927	BMS963
1027, 1028, 1029, 1030, 1031										
1032, 1072, 1073, 1074, 1036	2.1								2.5	
1037, 1038, 1039, 1040, 1041										
1042, 1043, 1075, 1076, 1077, 1078										
1048, 1049, 1050, 1079, 1080										
1081, 1082, 1055, 1056, 1060	2.1									
1081, 1062, 1063, 1064, 1065	2.0								nd	
1066, 1067, 1068, 1083, 1084, 1085								2.0		
PADRE	3.0	3.6	2.2	9.8	2.4		2.3		4.7	
TT-874, 975, 976	2.9	5.2		3.2	5.7	12.9	3.7	4.3	22.4	
Ad-Bgal	17.6	11.0	10.9	31.7	29.1		29.3	10.3	8.4	6.3
空白										

[0758] 实施例 70 :由 12G6-SFD1/K12 所引发的 CD4+T 细胞反应之评估

[0759] 如在实施例 69 中针对 Campath-1H®所叙述, 进行 12G6-SFD1/K12 可变区的免疫原性评估和 Vβ 分析, 使用来自十个正常供体的细胞。概括于表 25B 中的该十个供体中各个的增殖数据报告于图 105A-J 中。这十个供体中的两个也用于上文所述的 Campath-1H®评估 (BMS486 和 BMS484), 而其余八个供体仅用 12G6-SFD1/K12 肽进行测试。一个供体, BMS484, 对三个肽组反应并被分类为 ‘12G6-SFD1/K12 反应者’ (表 25B)。两个供体, BMS927

和 BMS928, 各对一个肽组反应, 因此也被分类为反应者。供体 BMS928 对包含重链肽 1066、1067、1068、1083、1084、和 1085 的小组显示出 2.0 的弱刺激指数。此反应通过对增殖 T 细胞分析 V β 用途得到证实。反应的 BMS928T 细胞表现出单一 V β (V β 20) 的上调 (图 103)。供体 BMS927 在使用一组轻链肽驯化的 T 细胞中显示 2.5 的刺激指数。反应的 BMS927T 细胞的 V β 分析并未显示出相对于背景的唯一 V β 上调。然而, 此供体保留在‘反应者’类别, 因为 V β 试剂盒表现所有可能的 V β 用途的仅 70%。这 10 个供体中的 12G6-SFD1/K12 免疫原性比率为 30% (3/10), 少于 Campath-1H[®] 反应者比率 (70%) 的一半。总共五个肽组引发反应, 然而五组中没有一组引起大于 3.0 的刺激指数 (表 26)。

[0760] 表 26 :Campath-1H[®]和 12G6-SFD1/K12 免疫反应的概括

	Campath-1H [®]	12G6-SFD1/K12
[0761] 反应者百分比	70% (7/10)	30% (3/10)
引发反应的肽组数目	8	5
刺激指数 ≥ 3.0 的反应肽组	3/8 (38%)	0/3 (0%)

[0762] 概述

[0763] 相比于来自 Campath-1H[®] 的重链可变区和轻链可变区的肽 (70%), 与人源化抗 CD52 单克隆抗体 12G6-SFD1/K12 的重链可变区和轻链可变区相关的肽从十个供体中引发较少的免疫反应 (30%)。使使用 12G6-SFD1/K12 所产生的基于 CD4⁺ T 细胞的免疫反应也比 Campath-1H[®] 所引发的反应具有更小的程度。

[0764] 下表列出本文中所使用的序列识别号码。

[0765] 表 26 :SEQ ID NOs 列表

[0766]

SEQ ID NO	类型	描述
1	轻链可变区 (VL)	Campath-1G®
2		CF1D12
3		8G3 (小鼠)
4		4G7 (小鼠)
5		9D9 (小鼠)
6		11C11 (小鼠)
7		3G7 (小鼠)
8		5F7 (小鼠)
9		12G6 (小鼠)
10		23E6 (小鼠)
11		2C3 (小鼠)
12		7F11 (小鼠)
13		4B10 (小鼠)
14	重链可变区 (VH)	Campath-1G®
15		CF1D12
16		8G3 (小鼠)
17		4G7 (小鼠)
18		9D9 (小鼠)
19		11C11 (小鼠)
20		3G7 (小鼠)
21		5F7 (小鼠)
22		12G6 (小鼠)
23		23E6 (小鼠)
24		2C3 (小鼠)
25		7F11 (小鼠)

[0767]

SEQ ID NO	类型	描述
26		4B10 (小鼠)
27	轻链 CDR-1	Campath-1H®
28		CF1D12 (小鼠)
29		8G3, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7 (小鼠)
30		5F7 (小鼠)
31		12G6, 23E6, 2C3 (小鼠)
32		7F11 (小鼠)
33		4B10 (小鼠)
34	轻链 CDR-2	Campath-1H®
35		CF1D12 (小鼠)
36		8G3, 11C11, 12G6, 23E6, 2C3 (小鼠)
37		4G7 (小鼠)
38		9D9 (小鼠)
39		3G7 (小鼠)
40		5F7 (小鼠)
41		7F11, 4B10 (小鼠)
42	轻链 CDR-3	Campath-1H®
43		CF1D12, 8G3, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7, 5F7 (小鼠)
44		12G6 (小鼠)
45		23E6 (小鼠)
46		2C3 (小鼠)
47		7F11 (小鼠)
48		4B10 (小鼠)
49	重链 CDR-1	Campath-1H®

[0768]

SEQ ID NO	类型	描述
50		CF1D12, 4G7, 9D9, 11C11, 3G7 (小鼠)
51		8G3 (小鼠)
52		5F7 (小鼠)
53		12G6 (小鼠)
54		23E6 (小鼠)
55		2C3 (小鼠)
56		7F11, 4B10 (小鼠)
57		重链 CDR-2
58	CF1D12 (小鼠)	
59	8G3 (小鼠)	
60	4G7 (小鼠)	
61	9D9, 11C11, 5F7 (小鼠)	
62	3G7 (小鼠)	
63	12G6, 2C3 (小鼠)	
64	23E6 (小鼠)	
65	7F11 (小鼠)	
66	4B10 (小鼠)	
67	重链 CDR-3	Campath-1H®
68		CF1D12, 9D9 (小鼠)
69		8G3, 4G7, 11C11, 3G7 (小鼠)
70		5F7 (小鼠)
71		12G6, 23E6 (小鼠)
72		2C3 (小鼠)
73		7F11 (小鼠)
74		4B10 (小鼠)
75	轻链引物	Lead-MLκ (前导序列的正向引物)

[0769]

SEQ ID NO	类型	描述	
76		FR1-ML κ (骨架 1 中的正向引物)	
77		ML κ const (恒定区中的反向引物)	
78		VK-MK (骨架 1 中的正向引物)	
79		MKC-Const (恒定区中的反向引物)	
80	重链引物	MH-SP-ALT1 (前导序列中的正向引物)	
81		MH-SP-ALT2 (前导序列中的正向引物)	
82		MH-FR1 (骨架 1 中的正向引物)	
83		MH-FR1-1 (骨架 1 中的正向引物)	
84		MH-J2 (J 区域中的反向引物)	
85		MH- γ -const (恒定区中的反向引物)	
86		VH MH1 (骨架 1 中的正向引物)	
87		VH MH2 (骨架 1 中的正向引物)	
88		VH MH3 (骨架 1 中的正向引物)	
89		VH MH4 (骨架 1 中的正向引物)	
90		VH MH5 (骨架 1 中的正向引物)	
91		VH MH6 (骨架 1 中的正向引物)	
92		VH MH7 (骨架 1 中的正向引物)	
93		IgG1 (小鼠 IgG1 CH1 恒定区中的反向引物)	
94		IgG2A (小鼠 IgG2A CH1 恒定区中的反向引物)	
95		IgG2B (小鼠 IgG2B CH1 恒定区中的反向引物)	
96		VH (部分)	4B10 (小鼠): 排列
97		人类生殖系 (VH)	VH3-72: 排列
98		VH (部分)	4B10 (人源化): 排列
99		小鼠 VL (部分)	4B10 (小鼠): 排列
100	人类生殖系 (VL)	VK2-A18b: 排列	
101	VL (部分)	4B10 (人源化): 排列	

[0770]

SEQ ID NO	类型	描述
102	VL	4B10-VK1 (人源化)
103	VH	4B10-VH1 (人源化)
104	CD52 丙氨酸扫描突 变肽	WT
105		MUT 1
106		MUT 2
107		MUT 3
108		MUT 4
109		MUT 5
110		MUT 6
111		MUT 7
112		MUT 8
113		MUT 9
114		MUT 10
115	LC CDR-1	K/RSSQSLL/V/IXS/TN/DGXS/TYLX
116		K/RSSQSLL/V/IHS/TNGXS/TYLH
117		RSSQSLVHTNGNS/TYLH
118	LC CDR-2	XVSXXXS
119		XVSXRXS
120		MVSXRFS
121	LC CDR-3	XQXXH/R/KF/L/V/IXX
122		SQSXH/R/KF/L/V/IPX
123		SQSXHVPF/P
124	HC CDR-1	GFXFXXYW/YMX
125		GFTFXXYW/YMX
126		GFTFTDYW/YMS

[0771]

SEQ ID NO	类型	描述	
127	HC CDR-2	XIRXXBXYXTXYXXSVKG	
128		XIRXXNXYTTEYXXSVKG	
129		FIRNKANGYTTEYXXSVKG	
130	HC CDR-3	TXXXY/F/W	
131		TRYXY/F/WFDY	
132		TRYIF/WFDY	
133	JH6	WGQGTTVTVSS	
134	JK2	FGQGTKLEIK	
135	JK5	FGQGTRLEIK	
136	VH	SFD1	7F11
137		SFD2	
138	VL	VK2	
139	VH	SFD1	2C3
140		12	
141		15	
142		16	
143		17	
144		19	
145	VL	VK1	
146		VK11	
147		VK12	
148		VK13	
149	VH	SFD1	12G6

[0772]

SEQ ID NO	类型	描述		
150		VH10		
151		VH11		
152		VH12		
153	VL	VK1		
154		VK10		
155		VK11		
156		VK12		
157		VK13		
158	VH	VH10		9D9
159		VH11		
160		VH15		
161		VH16		
162		VH17		
163		VH18		
164	VL	VK2		
165		VK12		
166		VK13		
167		VK14		
168		VK15		
169	CD52 丙氨酸扫描肽	MUT 1		
170		MUT 2		
171		MUT 3		
172		MUT 4		
173		MUT 5		
174		MUT 6		

[0773]

SEQ ID NO	类型	描述
175		MUT 7
176		MUT 8
177		MUT 9
178		MUT 10
179		MUT 11
180		MUT 12
181		WT1
182		WT2
183		破伤风类毒素 HLA-DR-结合肽
184	SAMLTNLIIFGPGPVLNKNEV	
185	NNFTVSFWLRVPKVSASHLE	
186	“不相关” HLA-DR- 结合肽	CS 378-398
187	用于免疫原性研究的 Campath-1H® LC 重叠 15-mer 肽	978
188		979
189		980
190		981
191		982
192		983
193		984
194		985
195		986
196		987
197		988
198		999
199		990
200		991

[0774]

SEQ ID NO	类型	描述
201		992
202		993
203		994
204		995
205		996
206		997
207	用于免疫原性研究的	998
208	Campath-1H®	999
209	HC 重叠 15-mer 肽	1000
210		1001
211		1002
212		1003
213		1004
214		1005
215		1006
216		1007
217		1008
218		1009
219		1010
220		1011
221		1012
222		1013
223		1014
224		1015
225		1016
226		1017
227		1018

[0775]

SEQ ID NO	类型	描述
228		1019
229		1020
230	用于免疫原性研究的 12G6-SFD1/K12 LC 重叠 15-mer 肽	1027
231		1028
232		1029
233		1030
234		1031
235		1032
236		1072
237		1073
238		1074
239		1036
240		1037
241		1038
242		1039
243		1040
244		1041
245		1042
246		1043
247		1075
248		1076
249		1077
250	1078	
251	用于免疫原性研究的 12G6-SFD1/K12 HC 重叠 15-mer 肽	1048
252		1049
253		1050
254		1079

[0776]

SEQ ID NO	类型	描述	
255		1080	
256		1081	
257		1082	
258		1055	
259		1056	
260		1060	
261		1061	
262		1062	
263		1063	
264		1064	
265		1065	
266		1066	
267		1067	
268		1068	
269		1083	
270		1084	
271		1085	
272	HC	2C3-SFD1	2C3
273	LC	2C3-K12	
274	HC	7F11-SFD1	7F11
275	LC	7F11-K2	
276	HC	9D9-H16	9D9
277		9D9-H18	
278	LC	9D9-K13	
279	HC	12G6-SFD1	12G6
280	LC	12G6-K12	
281	HC	4B10-H1	4B10

[0777]

SEQ ID NO	类型	描述	
282	LC	4B10-K1	
283	HC (核酸)	2C3-SFD1	2C3
284	LC (核酸)	2C3-K12	
285	HC (核酸)	7F11-SFD1	7F11
286	LC (核酸)	7F11-K2	
287	HC (核酸)	9D9-H16	9D9
288		9D9-H18	
289		LC (核酸)	
290	HC (核酸)	12G6-SFD1	12G6
291	LC (核酸)	12G6-K12	
292	HC (核酸)	4B10-H1	4B10
293	LC (核酸)	4B10-K1	
294	HC CDR-3	7F11-SFD2 (ARYIFFDY)	7F11

[0778] 本文所引用的所有专利、公开申请和参考文献的教导以其整体并入本文作为参考。

[0779] 尽管本发明已经参考其示例实施方式而具体地示出和描述,但本领域的技术人员将理解,可以在不偏离由所附权利要求包括的本发明的范围的情况下做出形式和细节上的各种改变。

新的抗CD52单克隆抗体的发展

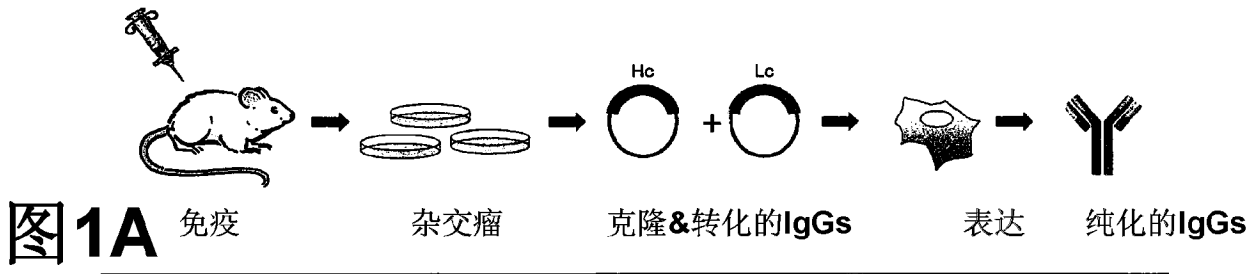


图1B

mAb	原来的同种型
4G7	mIgG ₂
9D9	mIgG ₂
7F11	mIgG ₁
4B10	mIgG _{2a}
8G3	mIgG ₂
11C11	mIgG ₂
3G7	mIgG _{2b}
12G6	mIgG ₂
5F7	mIgG ₂
23E6	mIgG ₂
2C3	mIgG ₂

抗CD52结合剂

鼠抗人CD52抗体的轻链序列

轻链 (Kappa) 序列

```

1) Campath 1G Kappa (大鼠)
2) CF1D12 Kappa
3) 小鼠8G3.25.3.5 Kappa
4) 小鼠GMA 4G7.F3 Kappa
5) 小鼠GMA 9D9.A2 Kappa
6) 小鼠GMA 11C11.C5 Kappa
7) 小鼠GMA 3G7.E9 Kappa
8) 小鼠5F7.1.1.4 Kappa
9) 小鼠12G6.15.1.2 kappa
10) 小鼠23E6.7.2.1 kappa
11) 小鼠C3.3.8.1 kappa
12) 小鼠7F11.1.9.7 kappa
13) 小鼠4B101.2.4 kappa

[-----FR1-----][----CDR1-----][-----FR2-----][CDR2-][-----FR3-----][--CDR3--][JREGION-]
1) DIKMTQSPFLSASVGDRTLNCKASQNIIDK...YLNWYQQKLGESPKLLIYNTNLTQGIPTSRFSGSGSDTFTLTISSLQPEDVATYFCLQHISR.PRTFGGTKLELK (SEQ ID NO:1)
2) DVVMTQTPLASVTIGHPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSNLDSGVPDRFSGSGSDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:2)
3) DIVLTQSTLSVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:3)
4) DIVITQSTLSVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSNLDSGVPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:4)
5) DIVMTQTPLTSLVITIGQPASIFCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSNLDSGVPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)
6) DIVMTQSPILTSLVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:6)
7) DIVMTQSPILTSLVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSNLNSGLPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:7)
8) DIVLTQTTLTSLVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSNLDSGVPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:8)
9) DIVMTQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:9)
10) DIVLTQTPRTLSVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFAGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:10)
11) DIVITQTPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLLES DGRTYLNWLFQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:11)
12) DIVMTQTPILSLPVLSDGQASISCKSSQSLVHTNGNSYLHWYLRKPGQSPKRLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:12)
13) DIVMTQSPILSLTSLVSDGQASISCKSSQSLVHTNGNTYLHWYLRKPGQSPKRLIYLVSNRFSGVPDRFSGSGSDTFTLTKISRVEAEDLGVIYCWQGTTHF.WTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:13)
    
```

图 2

鼠抗人CD52抗体的重链序列

重链序列

1) Campath 1G 重链 (大鼠)	(SEQ ID NO:14)
2) CF1D12 IgG3 重链	(SEQ ID NO:15)
3) 小鼠8G3.25.3.5 IgG3 重链	(SEQ ID NO:16)
4) 小鼠4G7.F3 IgG3 重链	(SEQ ID NO:17)
5) 小鼠9D9.A2 IgG3 重链	(SEQ ID NO:18)
6) 小鼠11C11.C5 IgG3 重链	(SEQ ID NO:19)
7) 小鼠3G7.E9 IgG2b 重链	(SEQ ID NO:20)
8) 小鼠5F7.1.1.4 IgG3 重链	(SEQ ID NO:21)
9) 小鼠12G6.15.1.2 IgG3 重链	(SEQ ID NO:22)
10) 小鼠23E6.2.2.1 IgG3 重链	(SEQ ID NO:23)
11) 小鼠2C3.3.8.1 IgG3 重链	(SEQ ID NO:24)
12) 小鼠7F11.1.9.7 IgG1 重链	(SEQ ID NO:25)
13) 小鼠4B10.1.2.4 IgG2a 重链	(SEQ ID NO:26)


```

[-----FR1-----] [--CDR1--] [----FR2----] [-----CDR2-----] [-----FR3-----] [----CDR3--] [--JREGION-]
1) EVKLEESGGGLVQPGGSMRLSCAGSGFTFDYMNWIRQPAKAPWLGPIRDKAKGYTTEYNPSVKGRFTISRDNQNMVYLQMNVLRAEDTATYYCAREGHTAAPFDYWGQGMVTVSS
2) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRNKAKNHVAYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYC...TTL...DSWGQGTALTVSS
3) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAVSRFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRNKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSRVFLQMNLRPEDTGIYYC...TSL...DYWGQGTTLTVSS
4) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAVSGFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRNKAKNHVYAYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYC...TSL...DYWGQGTALTVSS
5) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRNKAKNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSRVYLQMNLSLRTEDTGIYYC...TTL...DSWGQGTSTVTVSS
6) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAVSGFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRNKAKNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRRAEDTGIYYC...TSL...DYWGQGTTLTVSS
7) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCTASGFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRKKNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLSRAEDTGIYYC...TSL...DYWGQGTTLTVSS
8) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAVSGFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRNKAKNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSGVYLQMNNLRAEDTGIYYC...TGL...DYWGHGTSVTVSS
9) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSDYMNWVRQSPKGLWVAQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYC...TPI...DYWGQGTTLTVSS
10) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFNKYWMNVRQSPDKGLECIAQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYC...TPI...DYWGQGTTLTVSS
11) EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFNKYWMNVRQSPKGLWVAQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYC...TPV...DFWGQGTTLTVSS
12) EVKLEESGGGLVQPGGSLSLSCVSGFTFDYMSWVRQPPKALEWLGPIRDKAKNGYTTTEYNASVKGRFTISRDSQSLIYLQMNALRAEDSATYYC...TRYIF...DYWGQGTTLTVSS
13) EVKLEESGGGLVQPGGSLSLSCAGSGFTFDYMSWVRQPPKALEWLGPIRDKAKNGYTTTEYNASVKGRFTISRDDSKSILYLQMNALRAEDSATYYC...TRYIWF...DYWGQGTTLTVSS
    
```

图 3

CD52蛋白中的点突变

WT	GQNDTSQTSSPS
MUT 1	<u>A</u> QNDTSQTSSPS
MUT 2	<u>G</u> ANDTSQTSSPS
MUT 3	GQ <u>A</u> DTSQTSSPS
MUT 4	GQNA <u>T</u> SQTSSPS
MUT 5	GQND <u>A</u> SQTSSPS
MUT 6	GQNDT <u>A</u> QTSSPS
MUT 7	GQNDTS <u>A</u> TSSPS
MUT 8	GQNDTSQ <u>A</u> SSPS
MUT 9	GQNDTSQT <u>A</u> SPS
MUT 10	GQNDTSQTS <u>A</u> PS

图 4

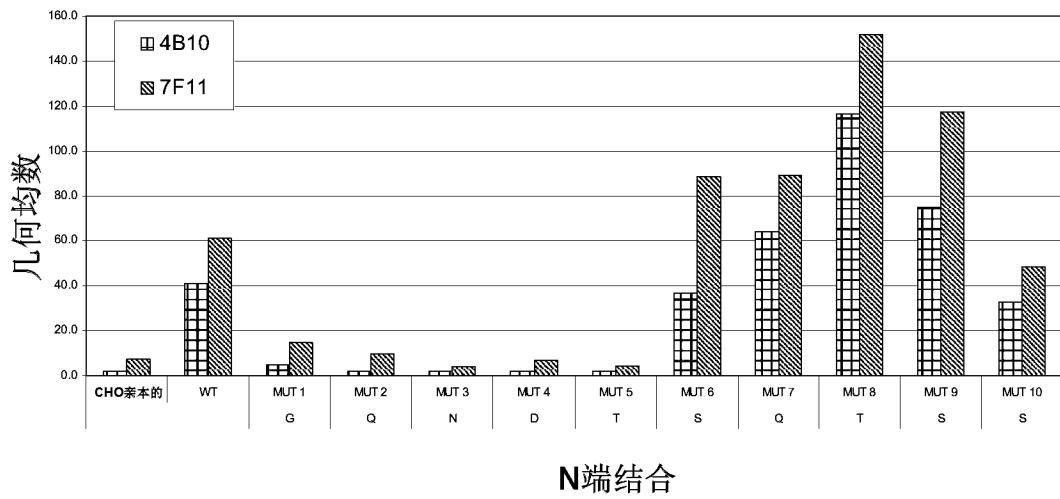


图 5A

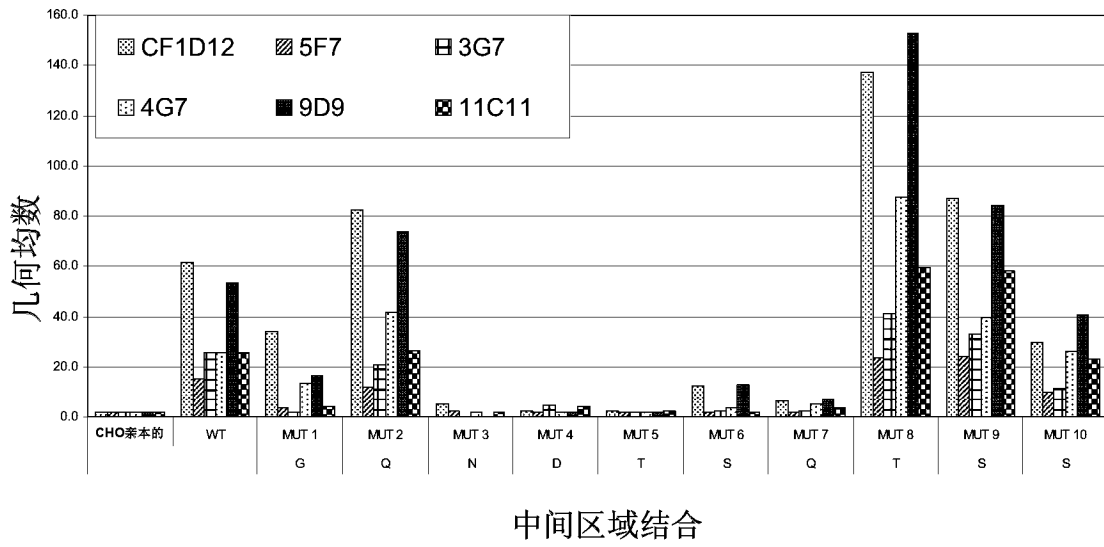


图 5B

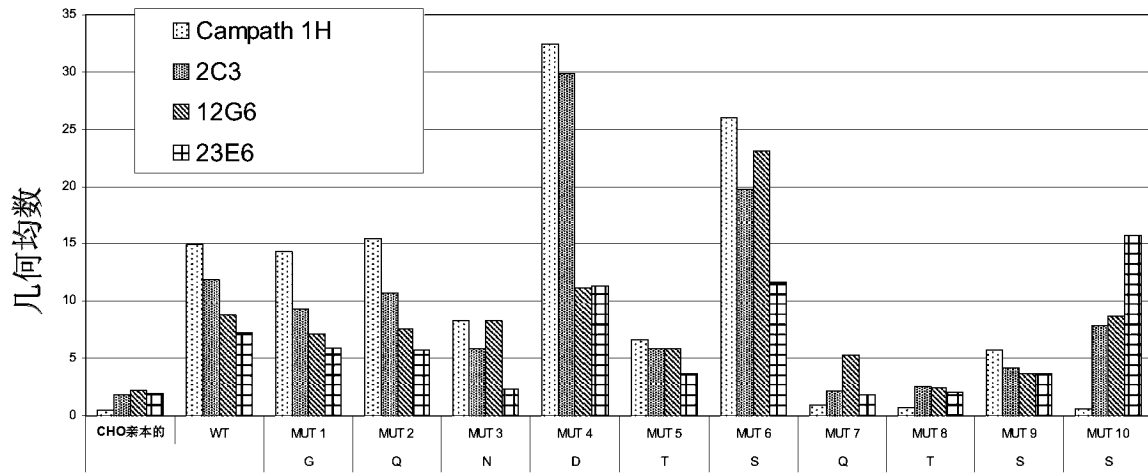


图 5C

CD52+/- N-连接糖基化的免疫印迹

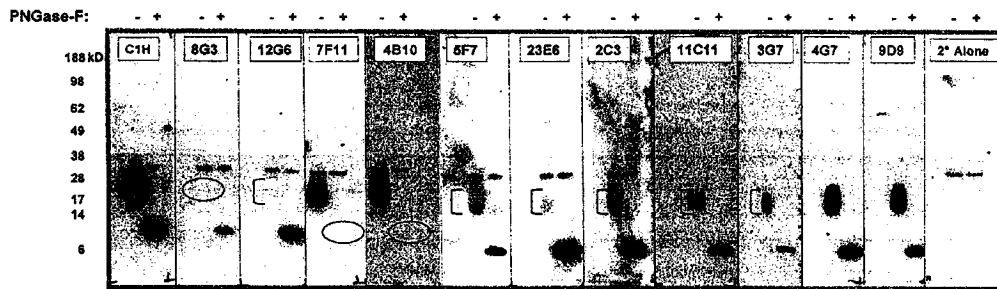


图 5D

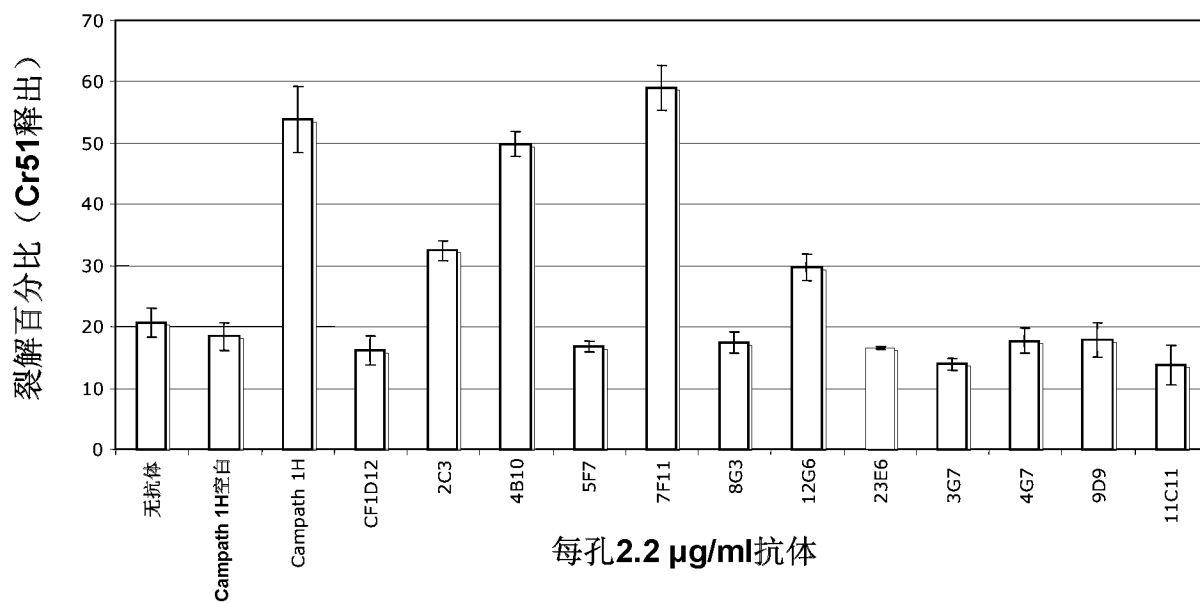


图 6

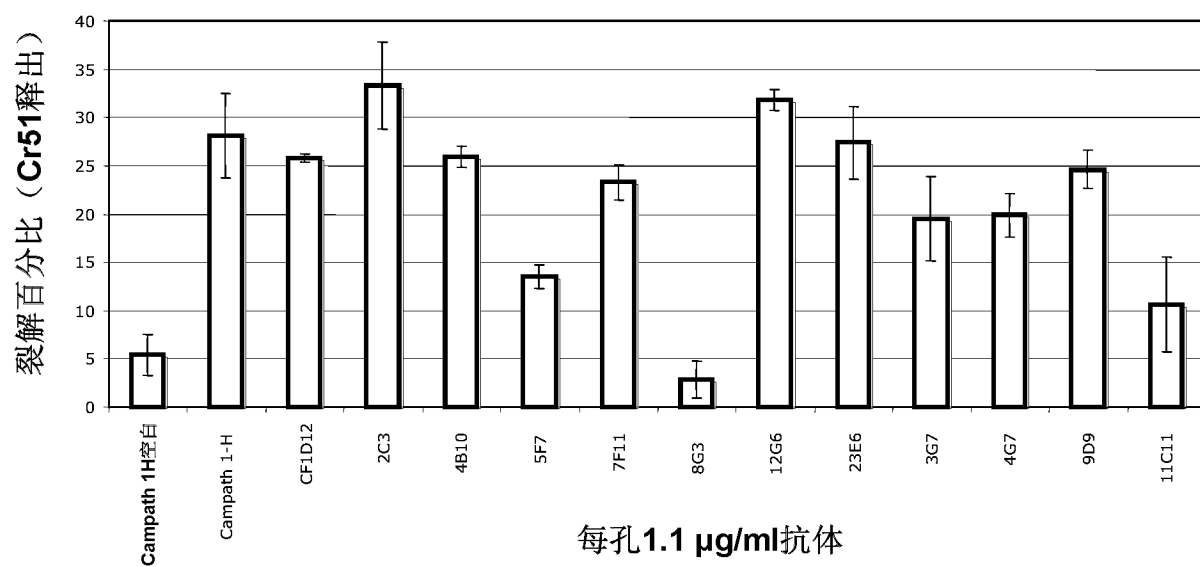


图 7

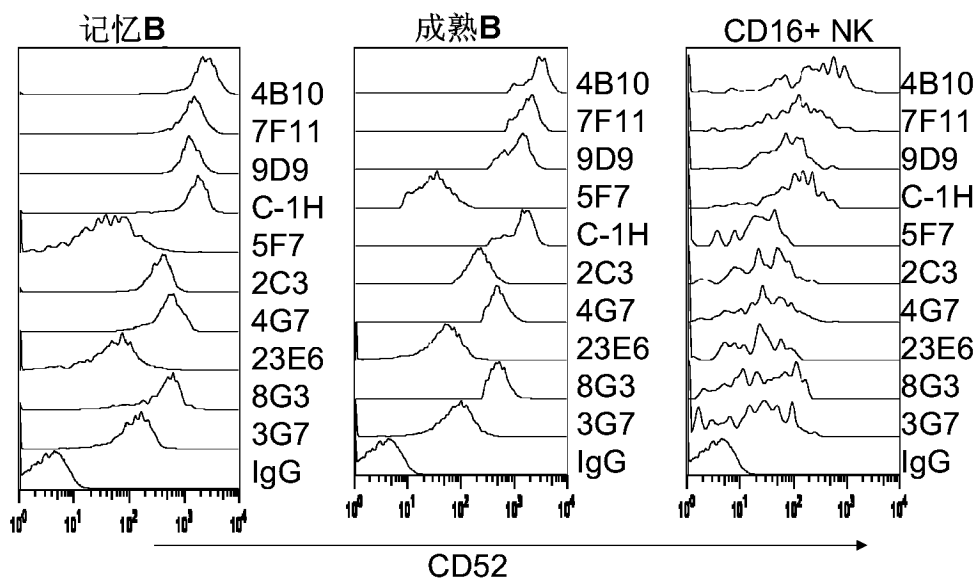


图 8A

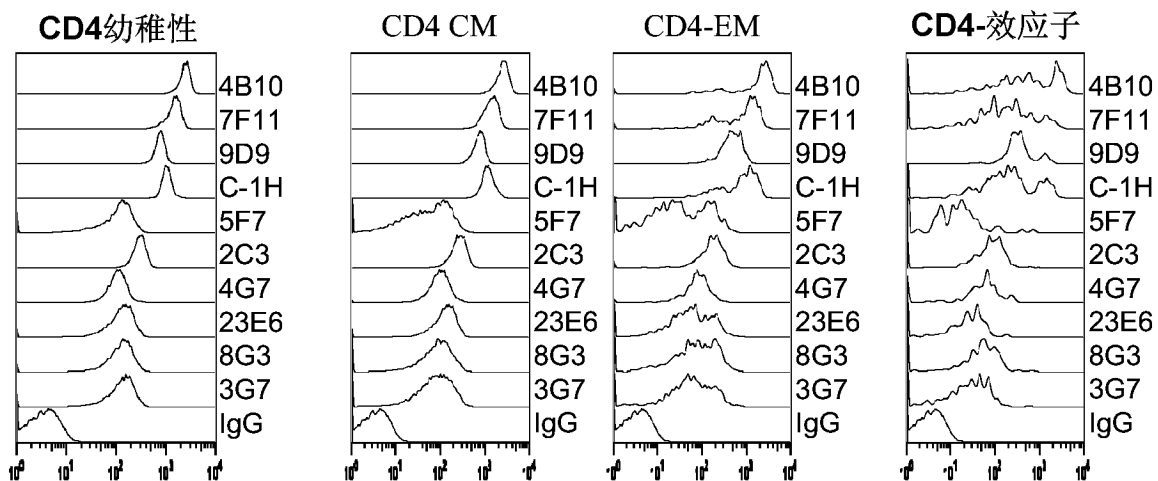


图 8B

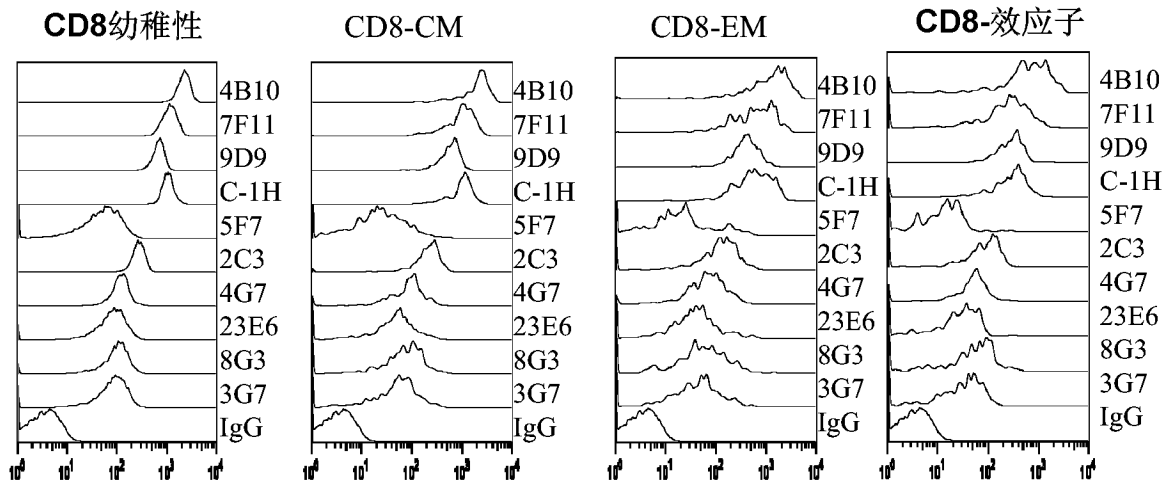


图 8C

图 9A 给药后72小时血液中的CD4 T细胞的水平

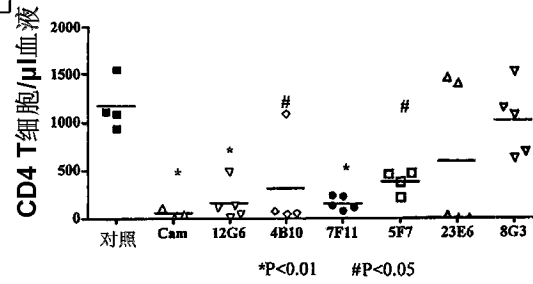


图 9B 给药后72小时血液中的CD8 T细胞的水平

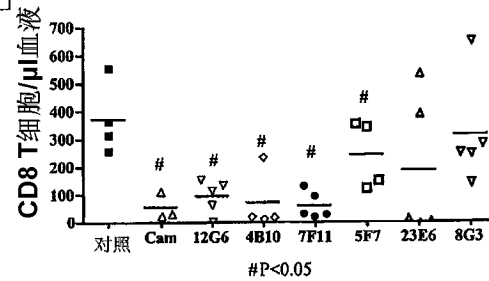
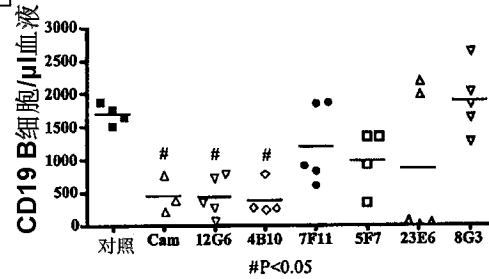


图 9C 给药后72小时血液中的CD19 B细胞的水平



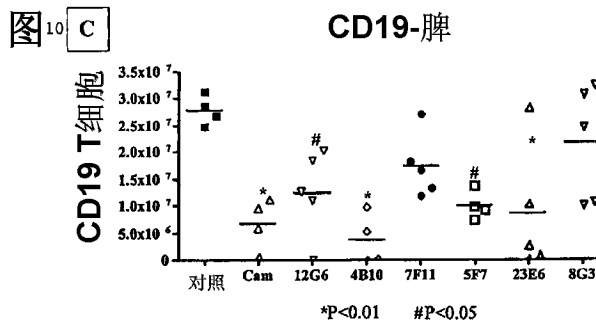
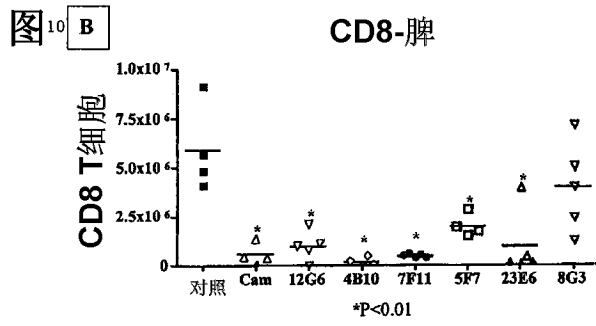
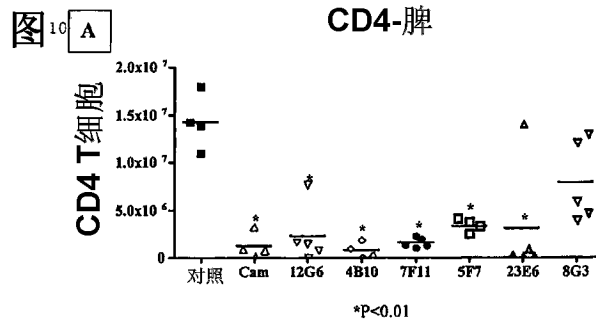


图 11 A 给药后72小时血液中的CD4 T细胞的水平

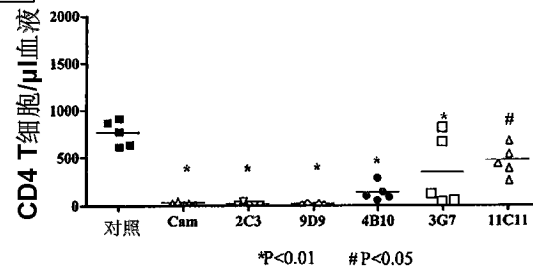


图 11 B 给药后72小时血液中的CD8 T细胞的水平

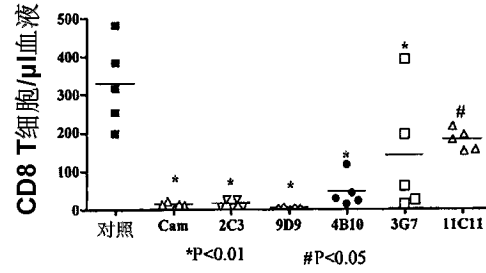
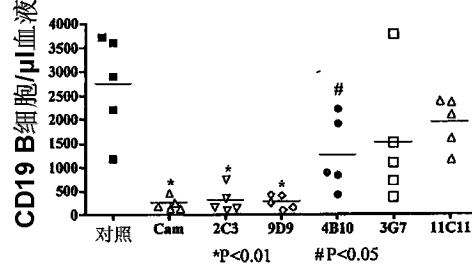


图 11 C 给药后72小时血液中的CD19 B细胞的水平



Kaplan Meier存活

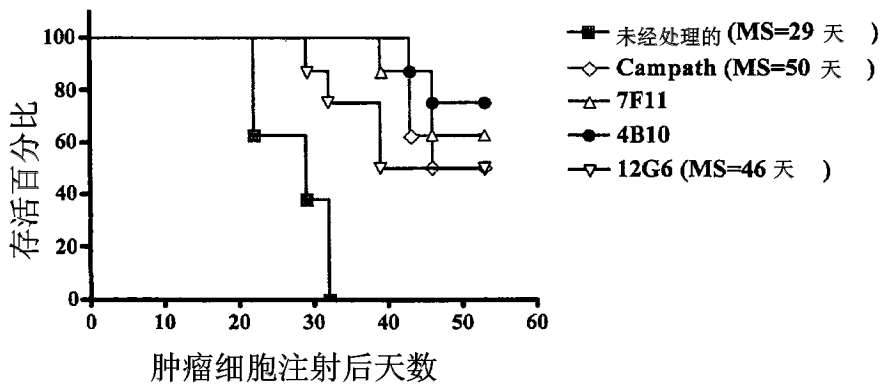


图 12

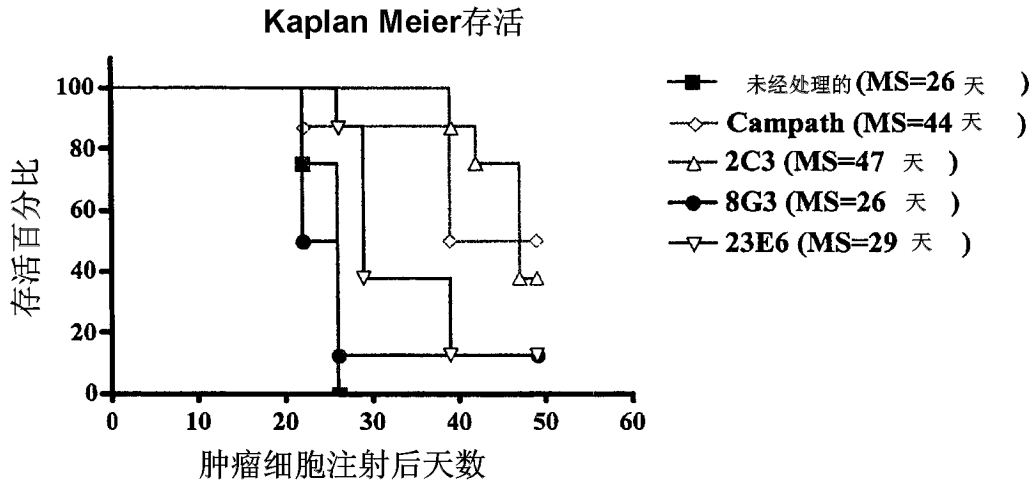


图 13

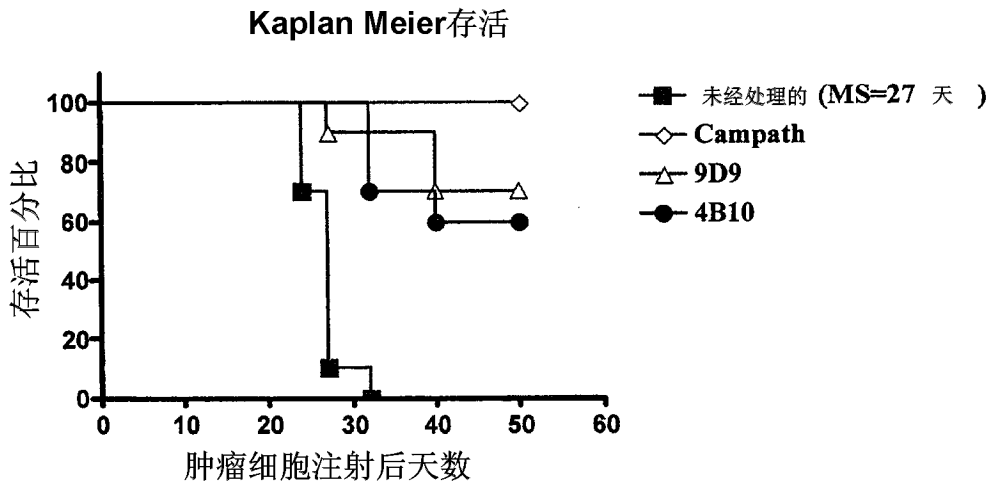


图 14

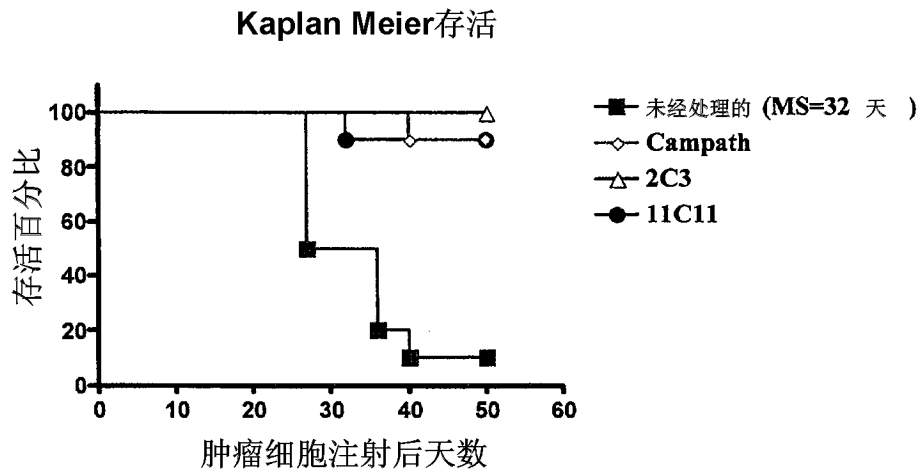


图 15

抗人CD52鼠(m)抗体V区与人类生殖系(h)以及
人源化抗CD52 V区序列的比对

<u>4B10重链V区</u>			
4B10重链(m)	1	EVQLEESGGGLVQPGGALSLSCAGSGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWLG	50 (SEQ ID NO:96)
VH3-72生殖系(h)	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DHYMDWVRQAPGKLEWVGR	50 (SEQ ID NO:97)
4B10人源化HC	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYMSWVRQAPGKLEWVGF	50 (SEQ ID NO:98)

4B10重链(m)	51	IRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDDSQSILYLQMNALRAEDSATYYCTR	100
VH3-72生殖系(h)	51	TRNKANSYTTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCAR	100
4B10人源化HC	51	IRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCAR	100

<u>4B10轻链V区</u>			
4B10轻链(m)	1	DIVMTQSPLSLTVSLGDQASISCRSSQSLVHTNGNTYLHWYLQKPGQSPK	50 (SEQ ID NO:99)
VK2-A18b生殖系(h)	1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYWYLQKPGQSPQ	50 (SEQ ID NO:100)
4B10人源化LC	1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHTNGNTYLHWYLQKPGQSPQ	50 (SEQ ID NO:101)

4B10轻链(m)	51	LLIYMVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGIYFCSQSAHVP	100
VK2-A18b生殖系(h)	51	LLIYEVSSRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQGIHLP	100
4B10人源化LC	51	LLIYMVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCSQSAHVP	100

图 16

人源化4B10 κ (轻链) 可变区

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHTNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYMVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYC
SQSAHVPPPLTFGQGRLEIK
(SEQ ID NO:102)

人源化4B10重链可变区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYMSWVRQAPGKLEWVGFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDT
AVYYCARYIWFDFYWGQGTITVTVSS
(SEQ ID NO:103)

图 17

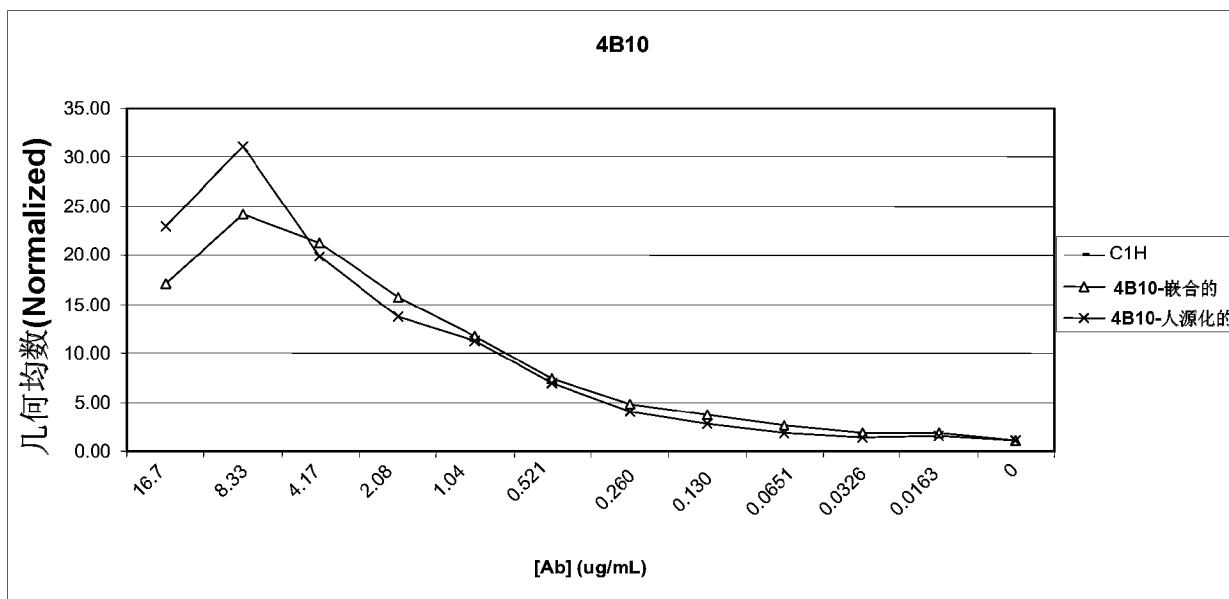


图 18

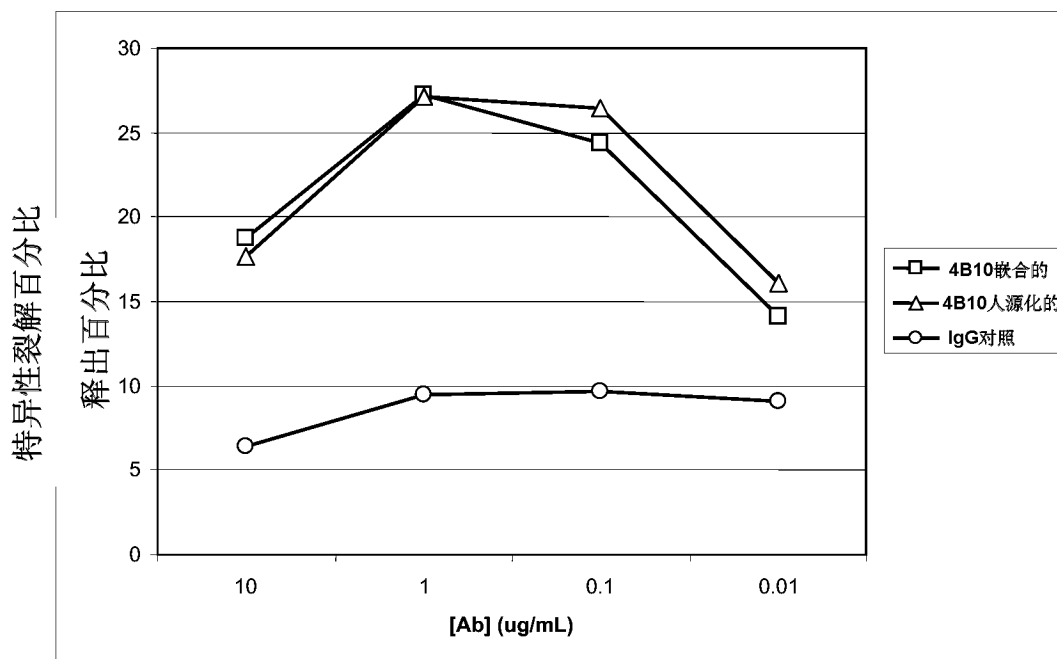


图 19

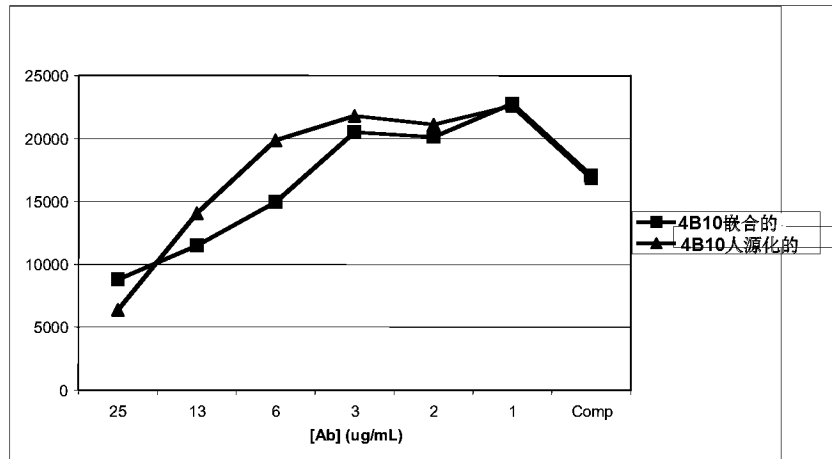


图 20

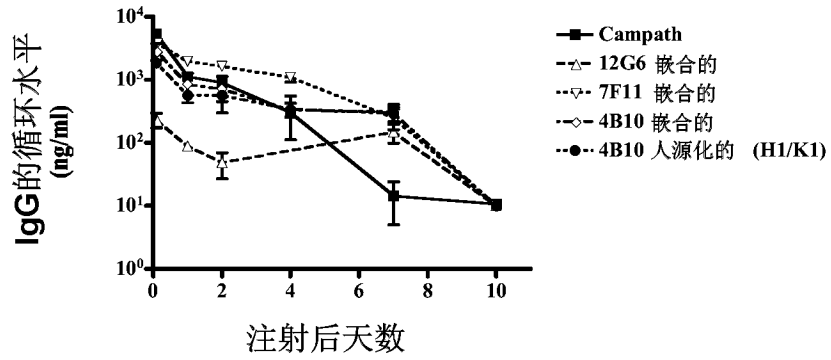


图 21

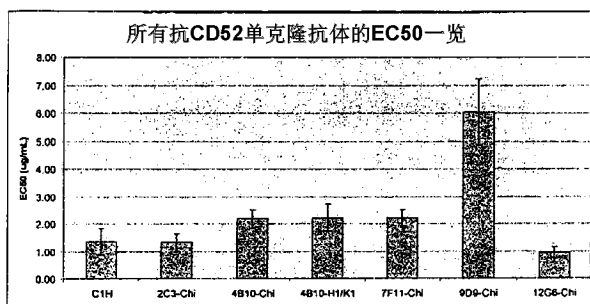
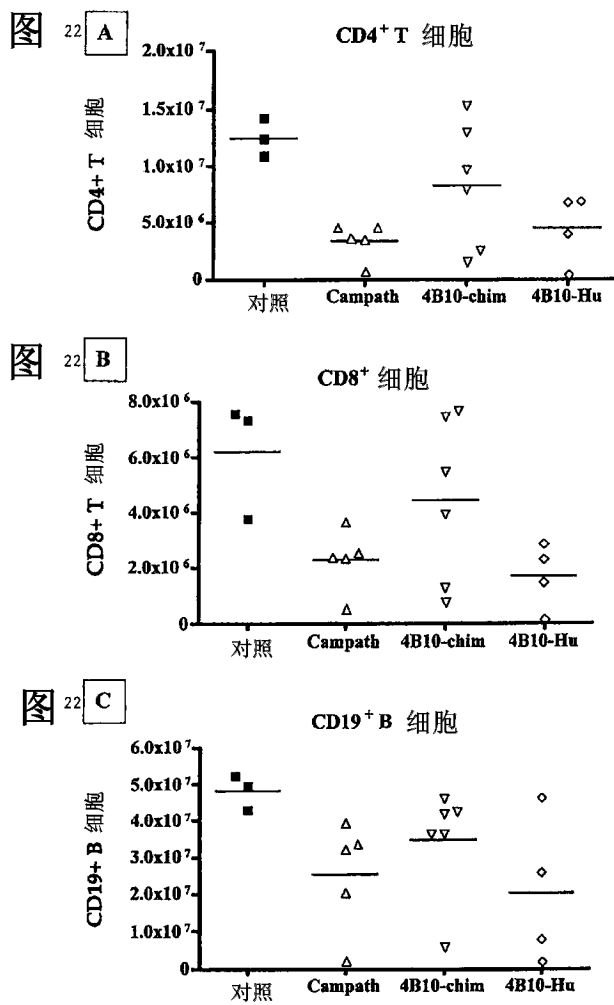


图 23

人源化7F11克隆重链可变区序列

7F11-SFD1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRNK
 ANGYTTEYNASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRYIFFDYWG
 QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 136)

7F11-SFD2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGLEWVGFIRNK
 ANGYTTEYNASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARYIFFDYWG
 QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 137)

人源化7F11克隆轻 (kappa) 链可变区序列

7F11-VK2

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHTNGNSYLHWYLQKPGQSPQLLIYMV
 SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPFTFGQGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 138)

图 24

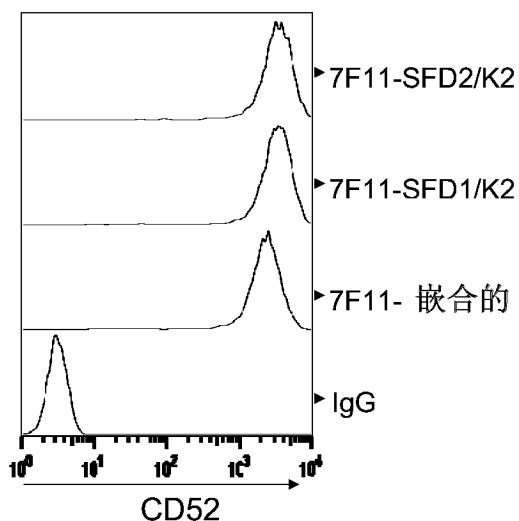


图 25

人源化2C3克隆重链可变区序列

2C3-SFD1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVRQAPGKGLEWVQ**Q**IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQM
NSLKTEDAVYYCT**PVDF**WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 139)

2C3-VH 12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVRQAPGKGLEWVQ**Q**IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQ
MNSLKTEDAVYYCT**PVDF**WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 140)

2C3-VH 15

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVRQAPGKGLEWV**A**QIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQM
NSLKTEDAVYYCT**PVDF**WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 141)

2C3-VH16

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWVRQAPGKGLEWV**A**QIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQ
MNSLKTEDAVYYCT**PVDF**WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 142)

2C3-VH17

EVQLVESGGGLVQPGG**M**RLSCAASGFTFNTYWMNWVRQAPGKGLEWV**A**QIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQ
MNSLKTEDAVYYCT**PVDF**WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 143)

2C3-VH19

EVQLVESGGGLVQPGG**M**RLSCAASGFTFNTYWMNWVRQ**A**PEKGLEWV**A**QIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQ
MNSLKTEDAVYYCT**PVDF**WGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 144)

图 26A

人源化2C3克隆轻 (κ) 链可变区序列**2C3-VK1**

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQ**S**LLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYLV**S**KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE
DVG**V**YYCV**Q**G**T**HLHTFGQGT**R**LEIK (SEQ ID NO: 145)

2C3-VK11

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQ**S**LLYSNGKTYLNWYLQKPGQSP**Q**RLIYLV**S**KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE
DVG**V**YYCV**Q**G**T**HLHTFGQGT**R**LEIK (SEQ ID NO: 146)

2C3-VK12

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQ**S**LLYSNGKTYLNW**L**LQKPGQSP**Q**RLIYLV**S**KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE
DVG**V**YYCV**Q**G**T**HLHTFGQGT**R**LEIK (SEQ ID NO: 147)

2C3-VK13

DIV**I**TQTPLSLSVTPGQP**V**SISCKSSQ**S**LLYSNGKTYLNW**L**LQKPGQSP**K**RLIYLV**S**KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE
DVG**V**YYCV**Q**G**T**HLHTFGQGT**R**LEIK (SEQ ID NO: 148)

图 26B

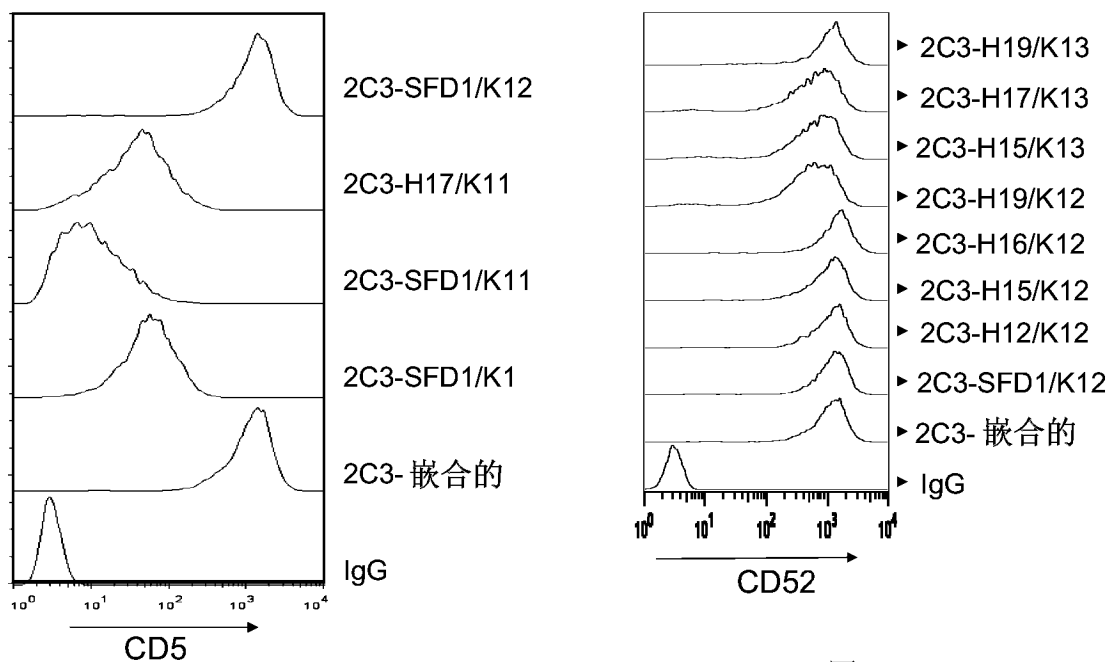


图 27B

图 27A

人源化12G6克隆重链可变区序列

12G6-SFD1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLK
 SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT
 TVVSS (SEQ ID NO: 149)

12G6-VH 10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLK
 SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT
 TVVSS (SEQ ID NO: 150)

12G6-VH 11

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAQIRLK
 SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT
 TVVSS (SEQ ID NO: 151)

12G6-VH12

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVAQIRLK
 SNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLKTEDTAVYYCTPIDYWGQGT
 TVVSS (SEQ ID NO: 152)

图 28A

人源化12G6克隆轻 (κ) 链可变区序列

12G6-VK1

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIY
LVSKLDSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCV**QGSHFHT**FGQGTK
 LEIK (SEQ ID NO: 153)

12G6-VK10

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIY
LVSKLDSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCV**QGSHFHT**FGQGTK
 LEIK (SEQ ID NO: 154)

12G6-VK11

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPKRLIY
LVSKLDSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCV**QGSHFHT**FGQGTK
 LEIK (SEQ ID NO: 155)

12G6-VK12

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPQRLLIY
LVSKLDSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCV**QGSHFHT**FGQGTK
 LEIK (SEQ ID NO: 156)

12G6-VK13

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWYLQKPGQSPQRLLIY
LVSKLDSGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCV**QGSHFHT**FGQGTK
 LEIK (SEQ ID NO: 157)

图 28B

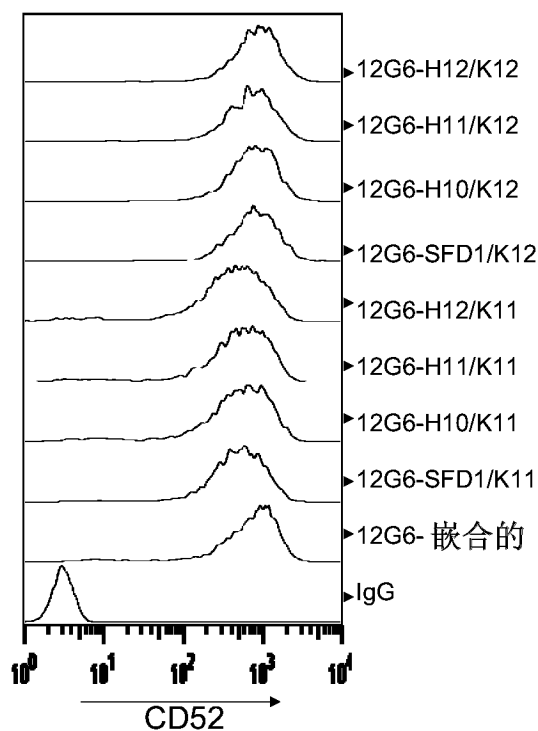


图 29

人源化9D9克隆重链可变区序列

9D9-VH10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVSEIRNKA
KNHATYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLD~~SWGQGT~~
TVSS (SEQ ID NO: 158)

9D9-VH11

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLELTAEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNKSTVY~~LQMNSLRAEDTAVYYCTTLD~~SWGQGT
TVTSS (SEQ ID NO: 159)

9D9-VH15

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLELTAEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLD~~SWGQGT~~
TVTSS (SEQ ID NO: 160)

9D9-VH 16

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLELVSEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLD~~SWGQGT~~
TVTSS (SEQ ID NO: 161)

9D9-VH 17

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLELTSEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLD~~SWGQGT~~
TVTSS (SEQ ID NO: 162)

9D9-VH 18

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLELVAEIRNK
AKNHATYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTTLD~~SWGQGT~~
TVTSS (SEQ ID NO: 163)

图 30A

人源化9D9克隆轻 (κ) 链可变区序列**9D9-VK2**

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYL
VSALDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT~~HFPWTF~~FGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 164)

9D9-VK12

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYL
VSALDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT~~HFPWTF~~FGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 165)

9D9-VK13

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYL
VSALDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT~~HFPWTF~~FGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 166)

9D9-VK14

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPQRLIYL
VSALDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT~~HFPWTF~~FGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 167)

9D9-VK15

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWYLQKPGQSPKRLIYL
VSALDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT~~HFPWTF~~FGQGTK
LEIK (SEQ ID NO: 168)

图 30B

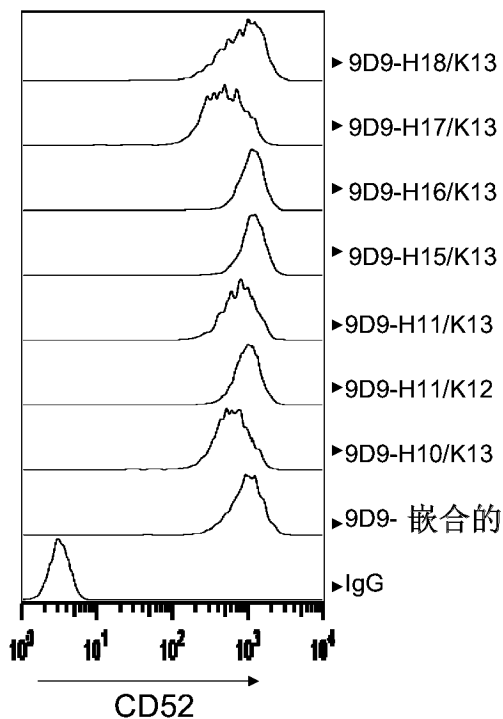


图 31

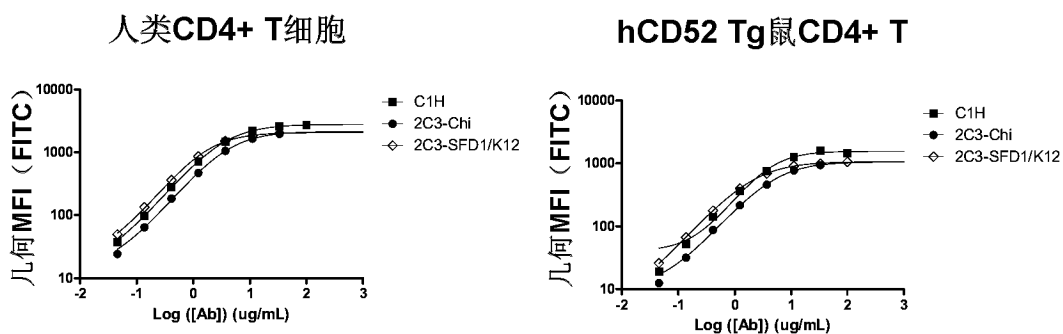


图 32A

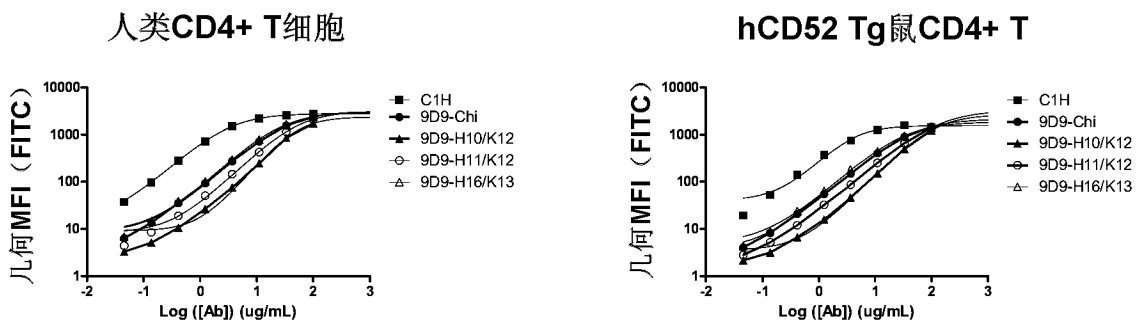


图 32B

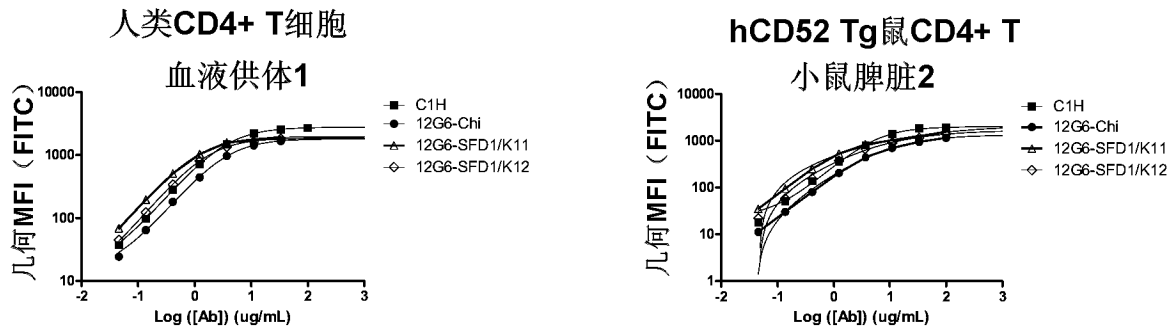


图 32C

	EC ₅₀ (nM)	
	人类CD4+ T 细胞	huCD52 转基因鼠 CD4+ T细胞
-1H®	21.91	25.08
2C3- 嵌合的	25.93	30.81
2C3-SFD1/K12	11.00	13.61
12G6-Chimeric	22.41	34.42
12G6-SFD1/K11	7.30	13.17
12G6-SFD1/K12	10.58	

图 33

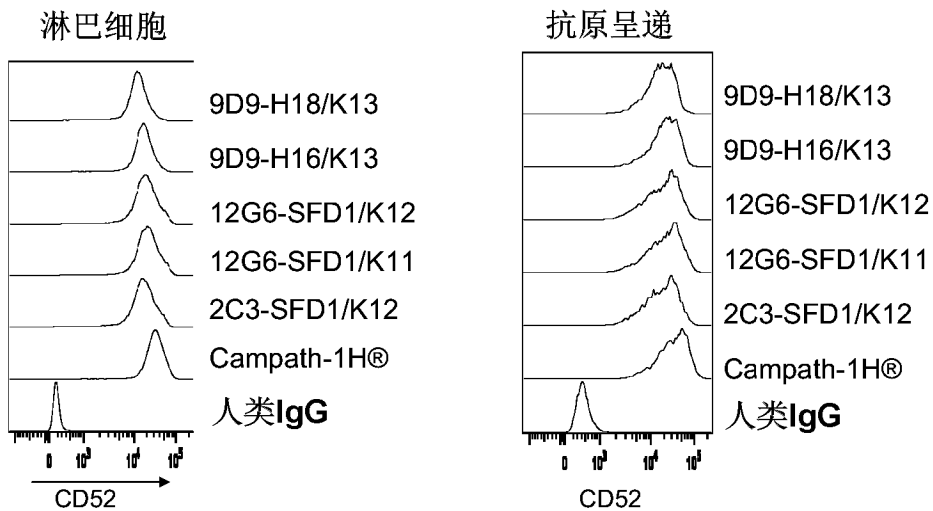


图 34

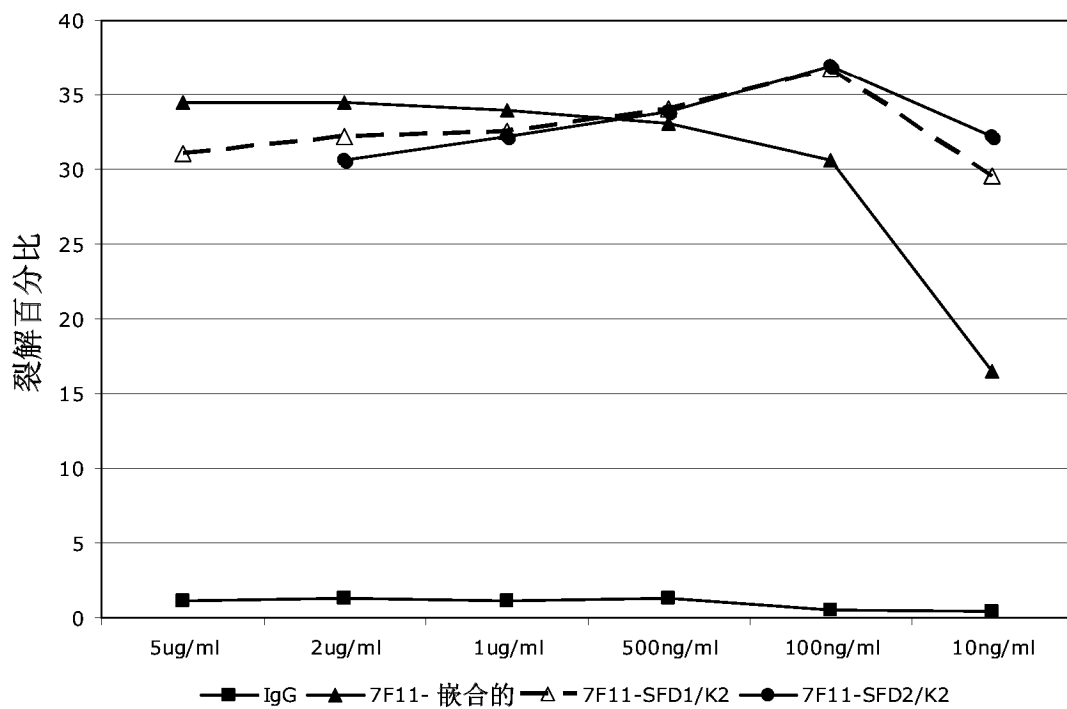


图 35

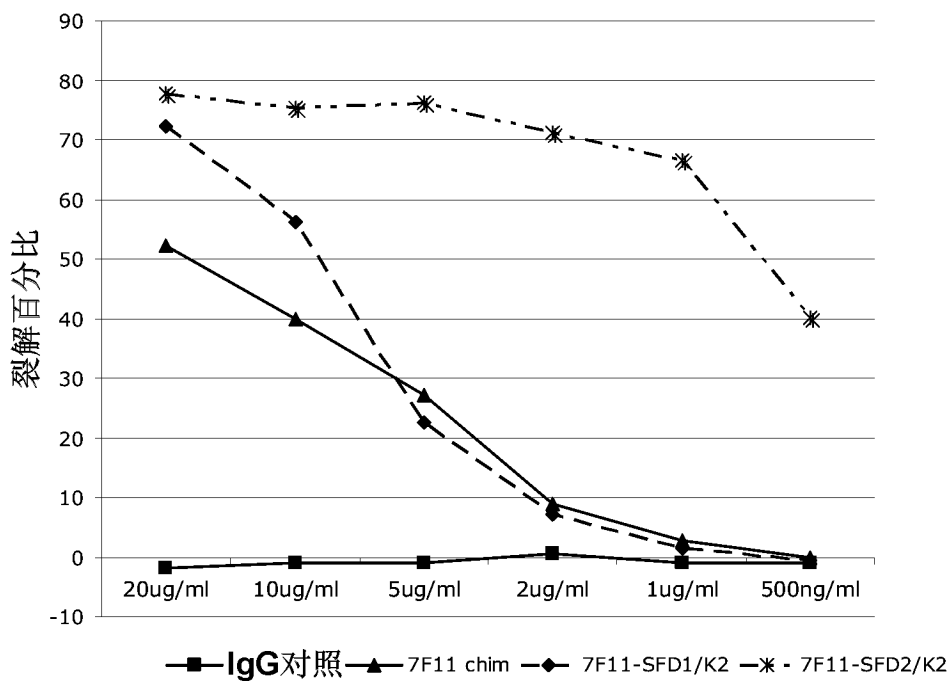


图 36

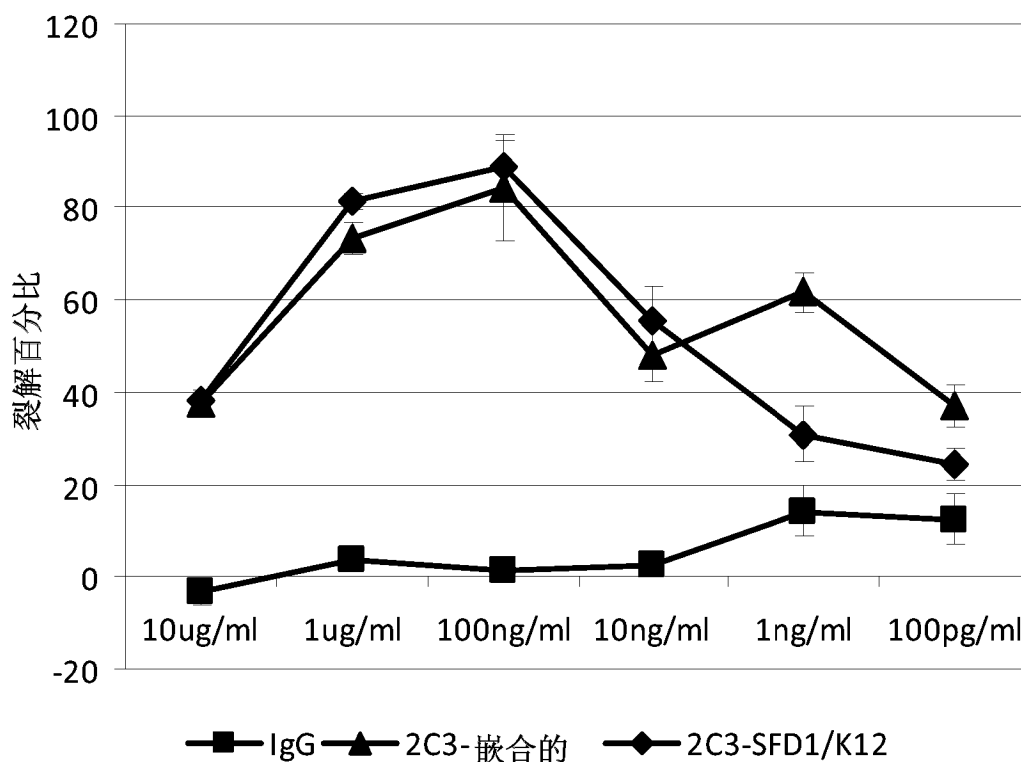


图 37

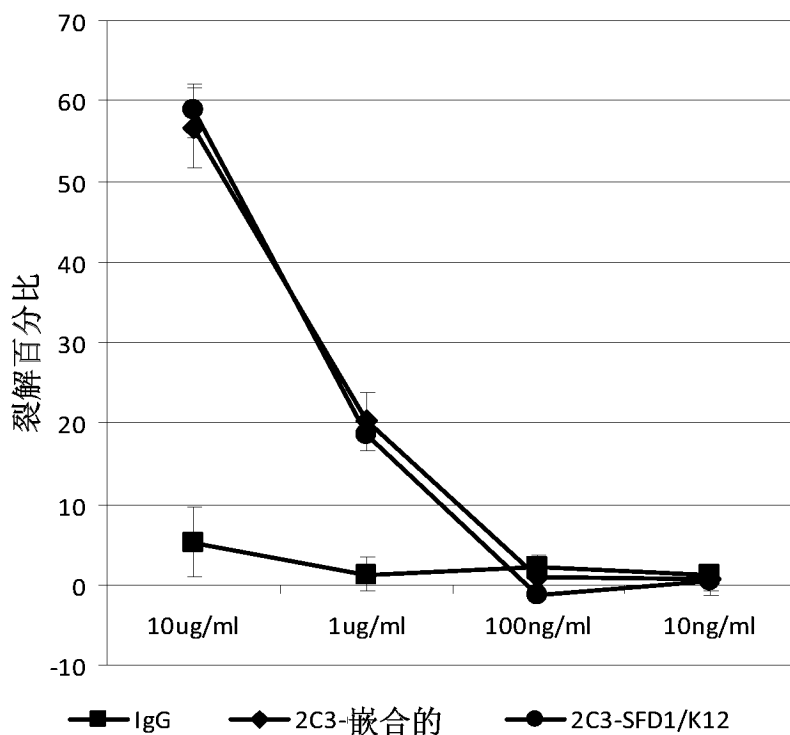


图 38

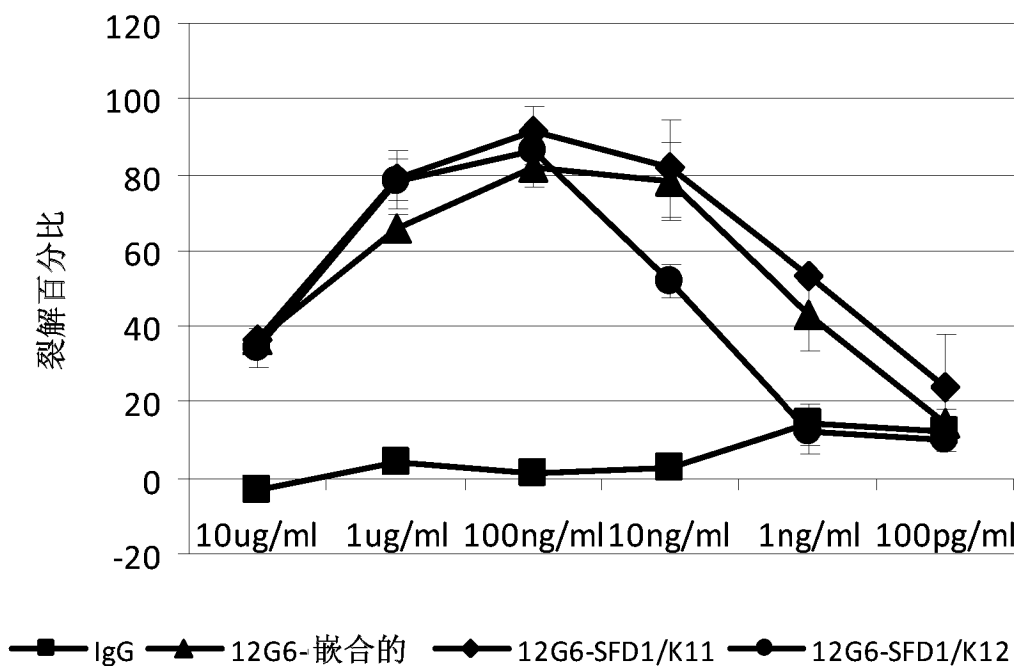


图 39

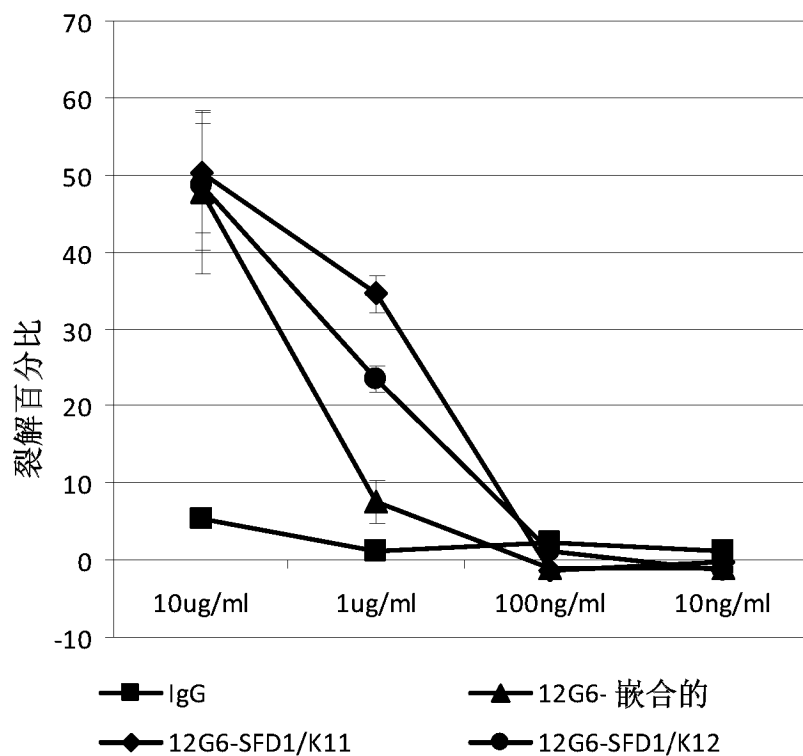


图 40

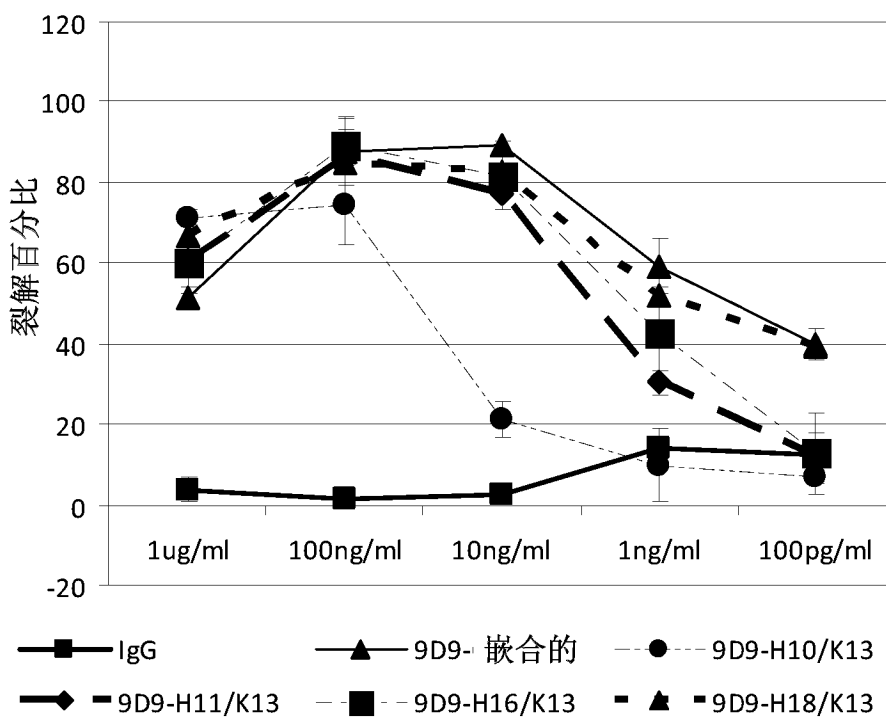


图 41

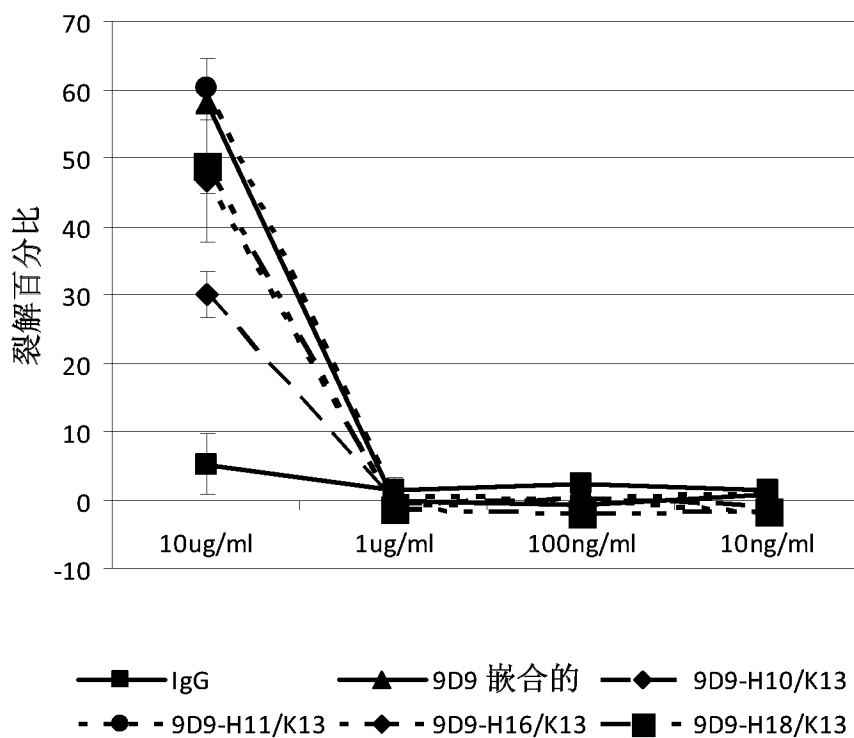


图 42

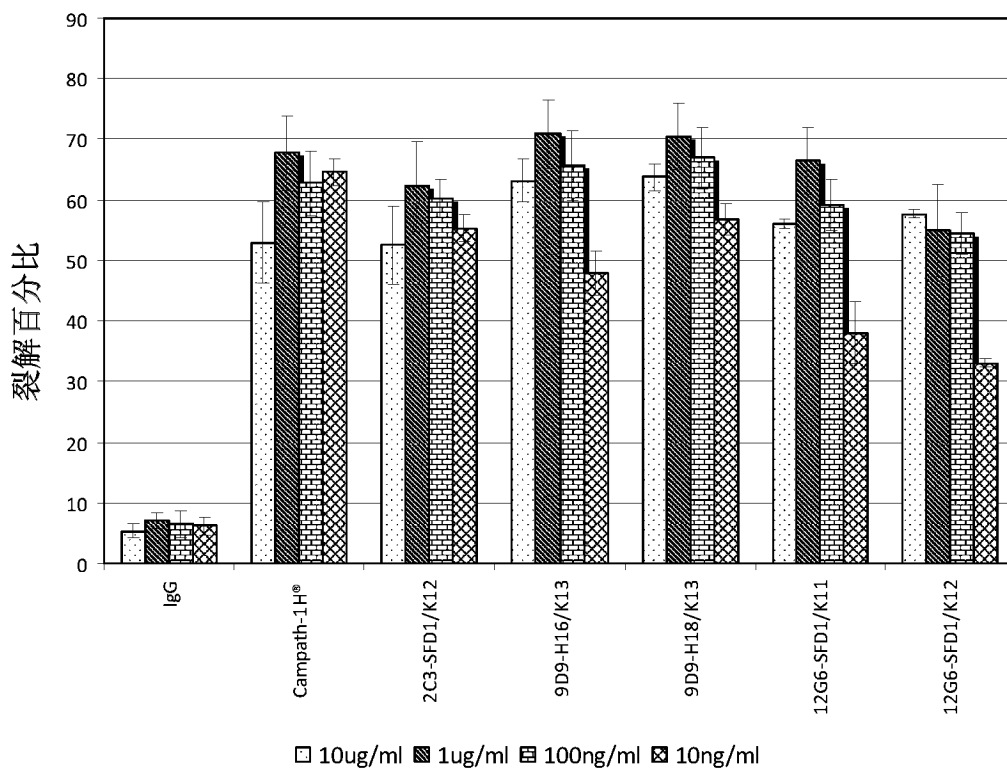


图 43

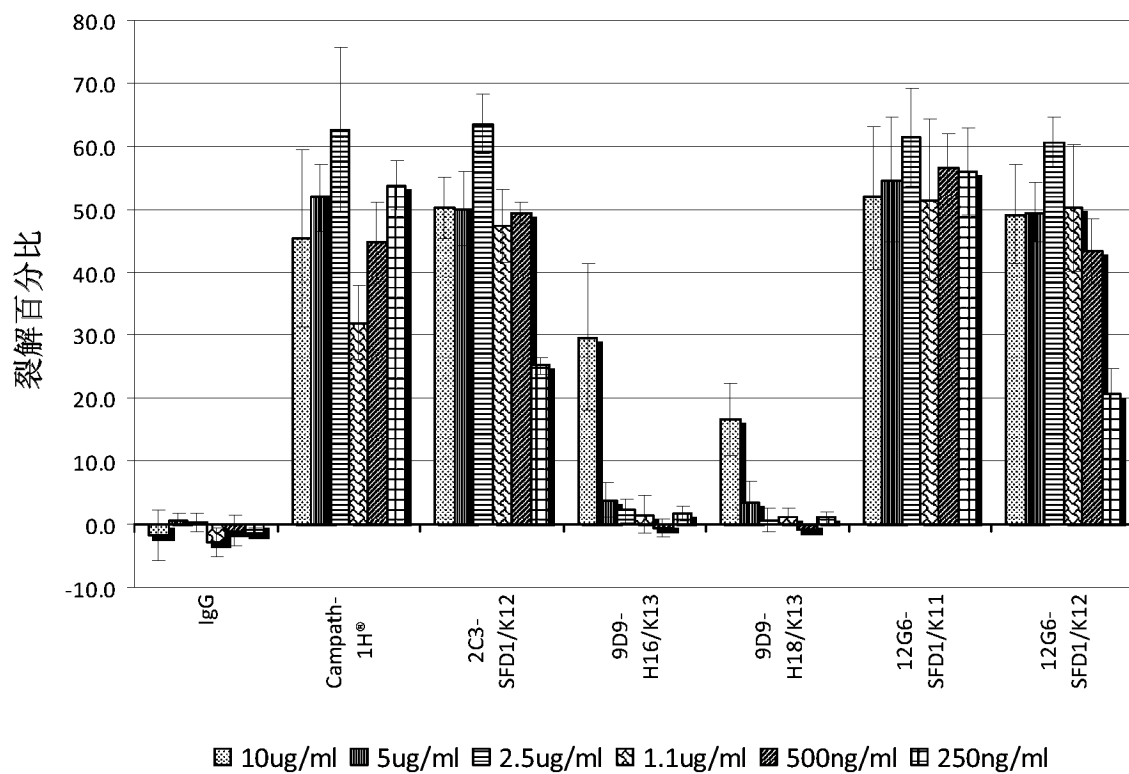


图 44

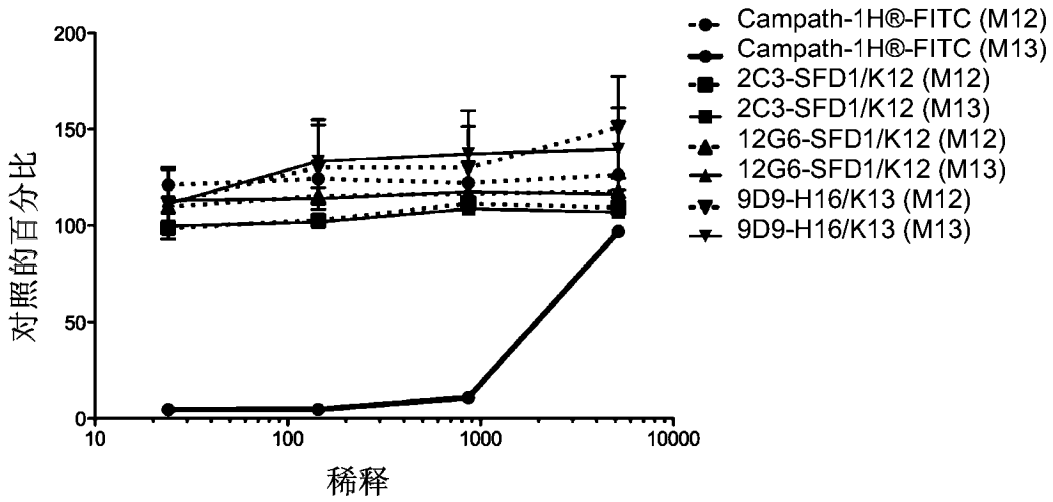


图 45

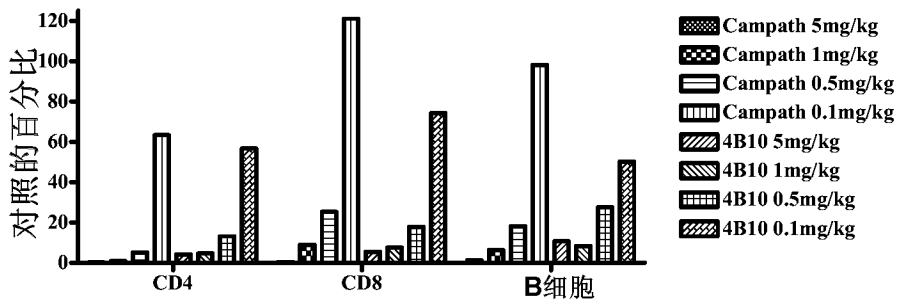


图 46A

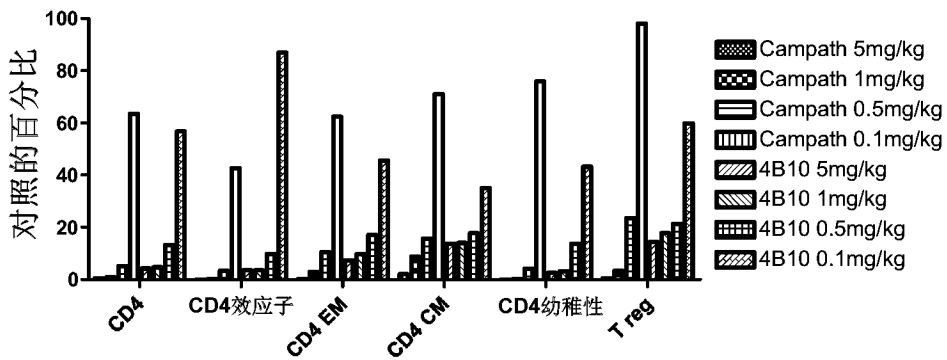


图 46B

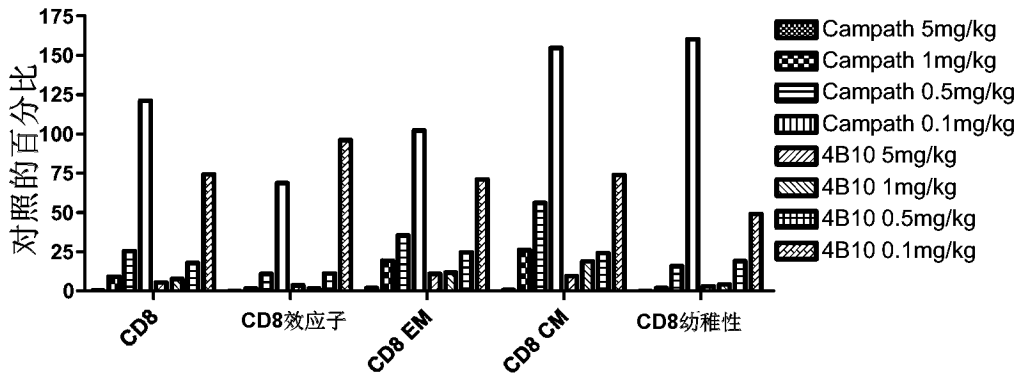


图 46C

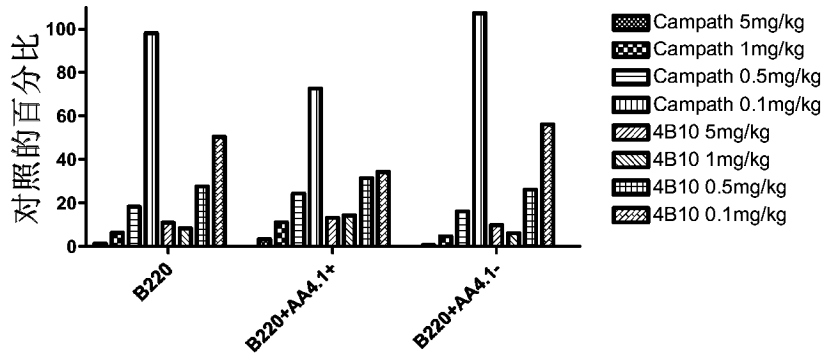


图 46D

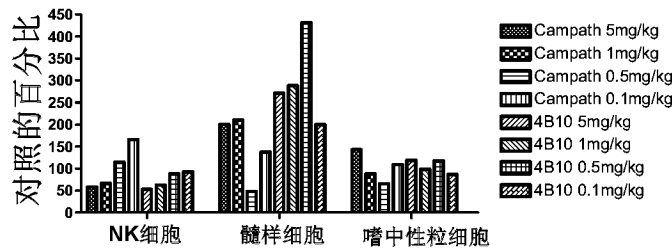


图 46E

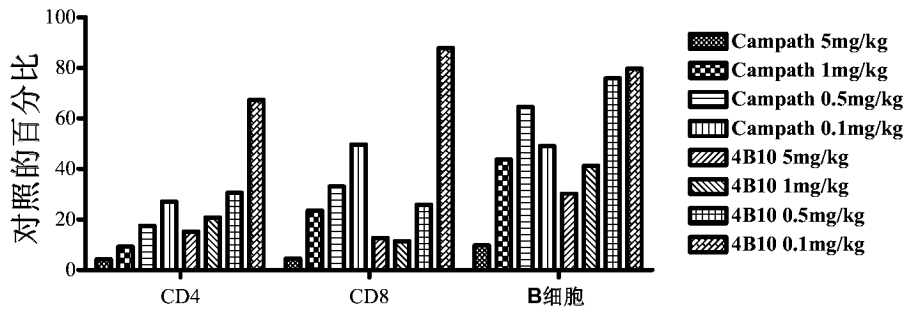


图 47A

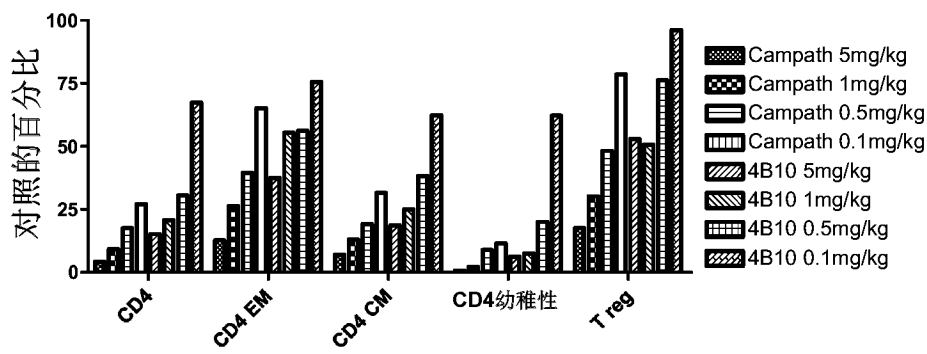


图 47B

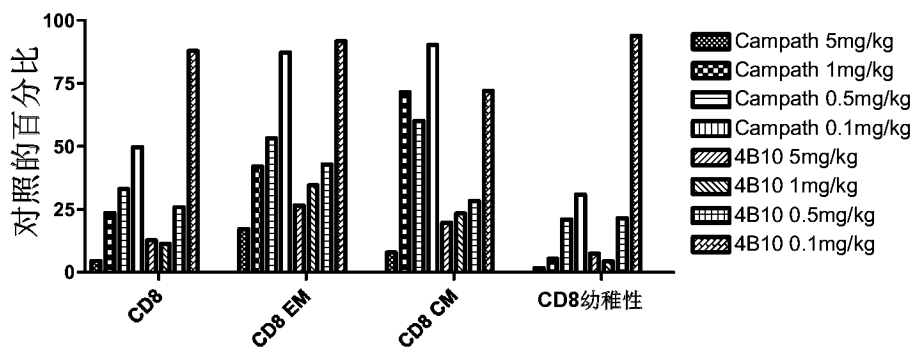


图 47C

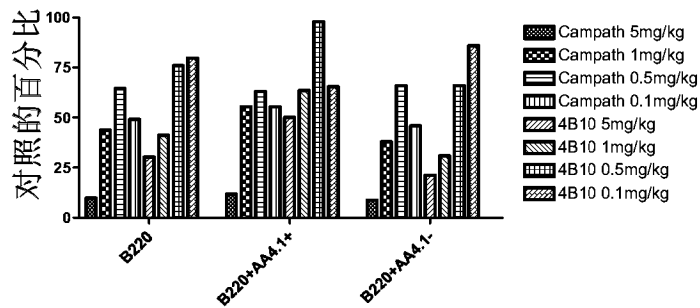


图 47D

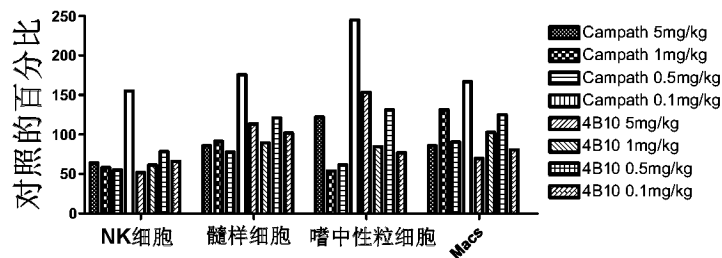


图 47E

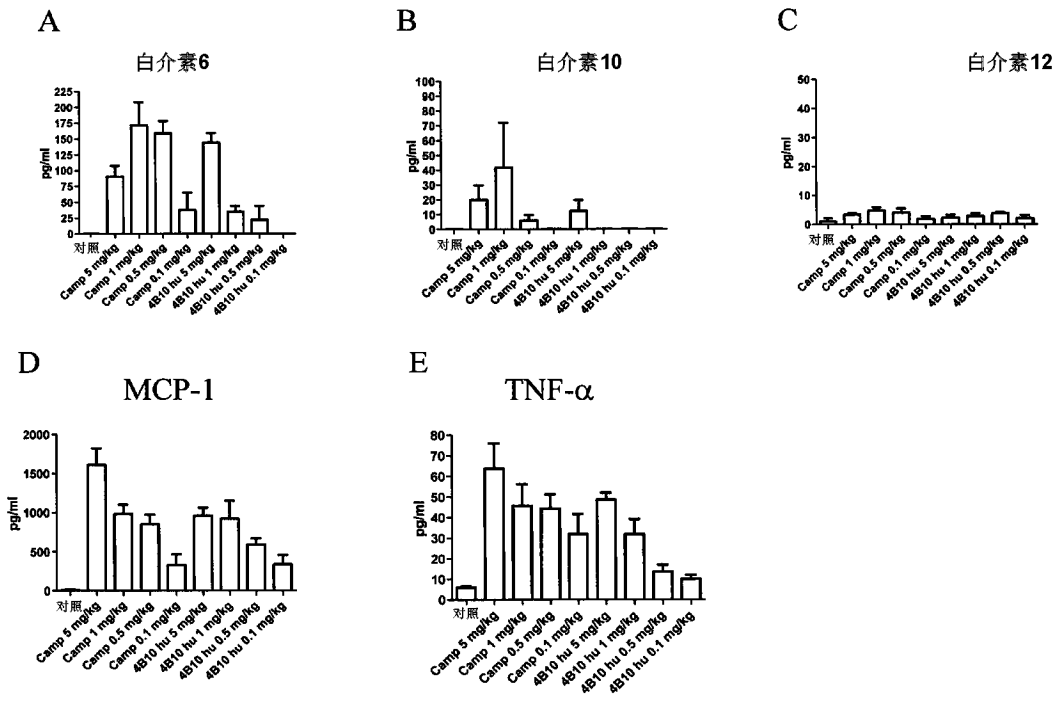


图 48

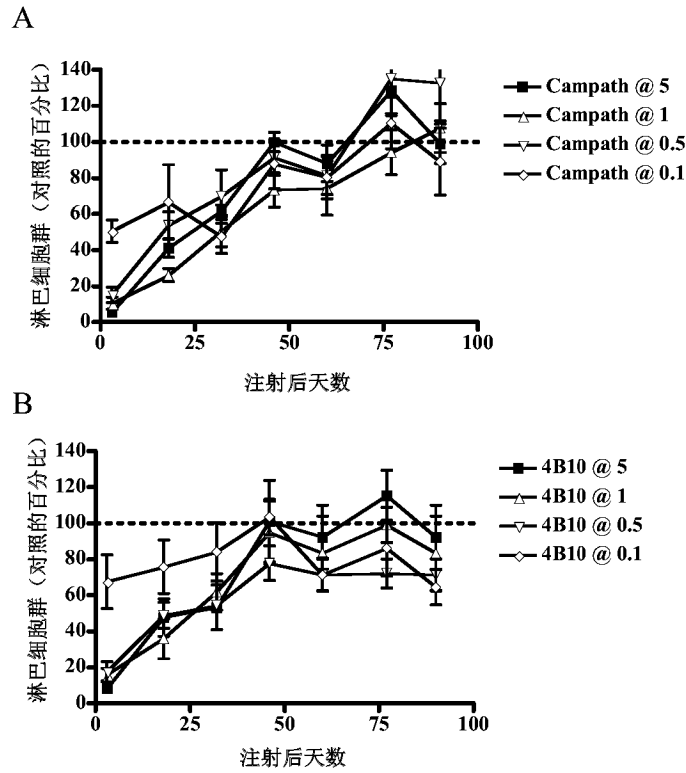


图 49

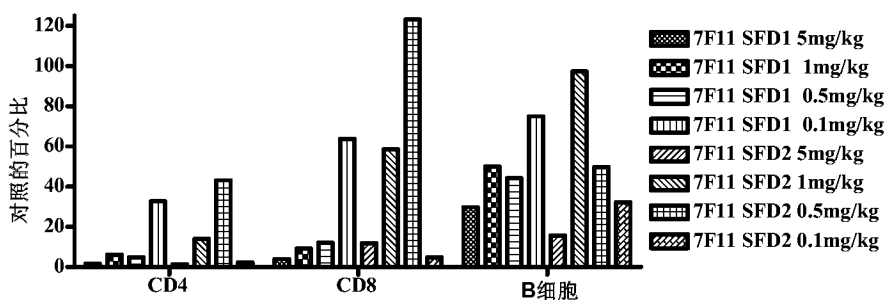


图 50A

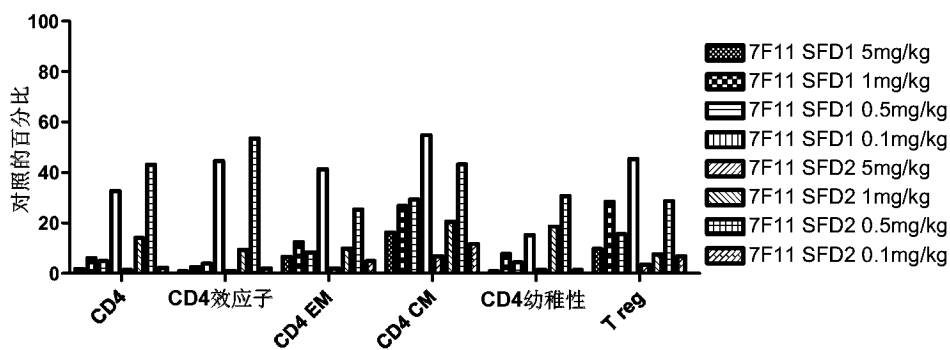


图 50B

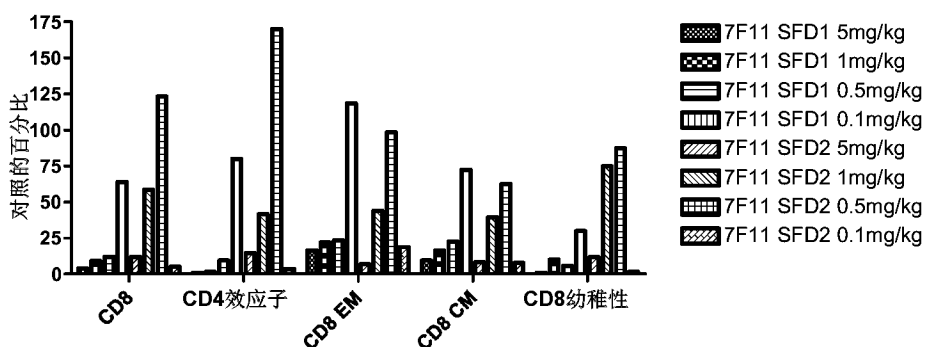


图 50C

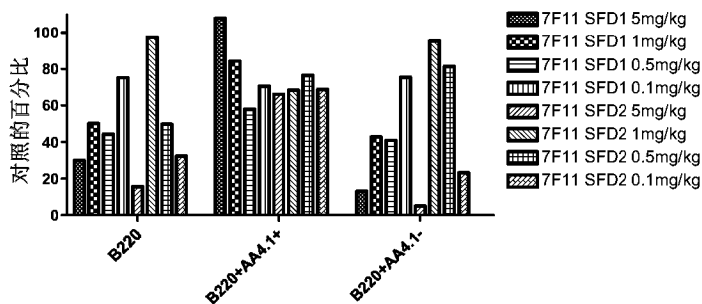


图 50D

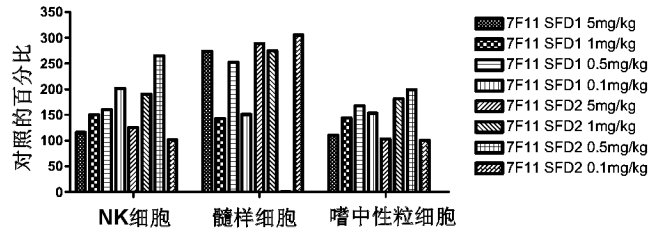


图 50E

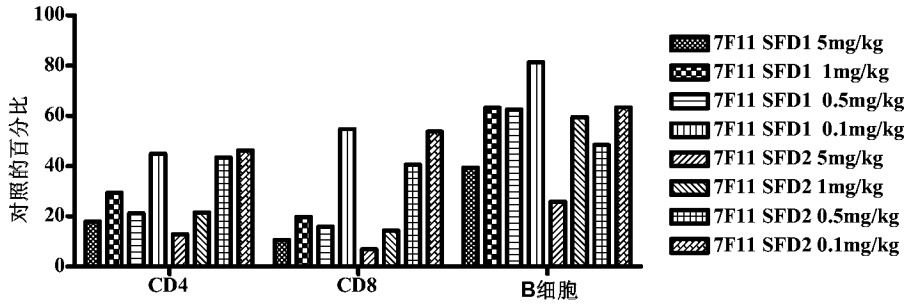


图 51A

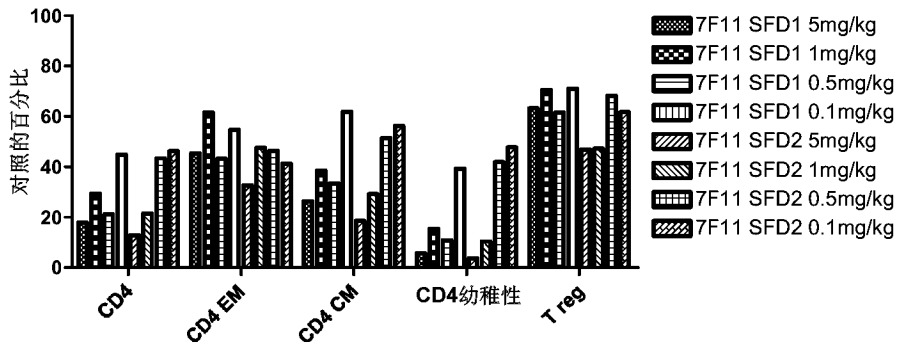


图 51B

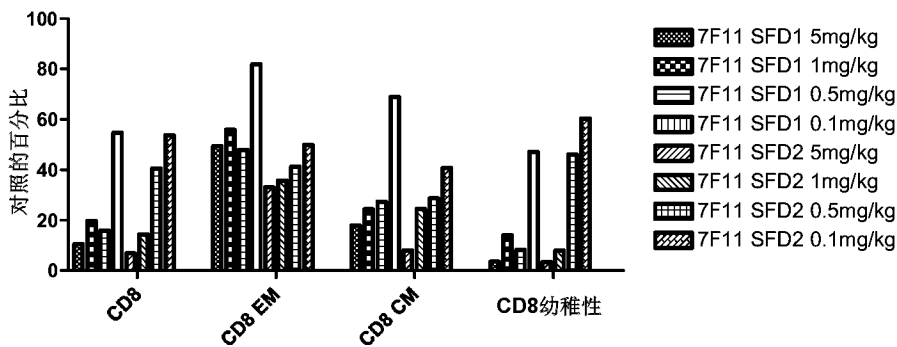


图 51C

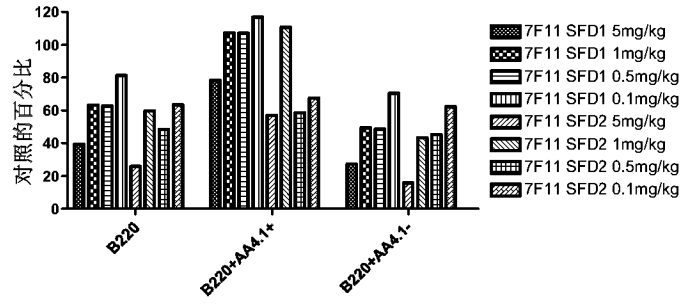


图 51D

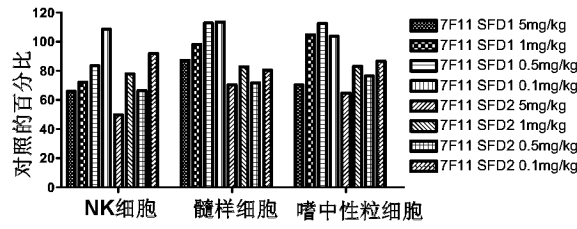


图 51E

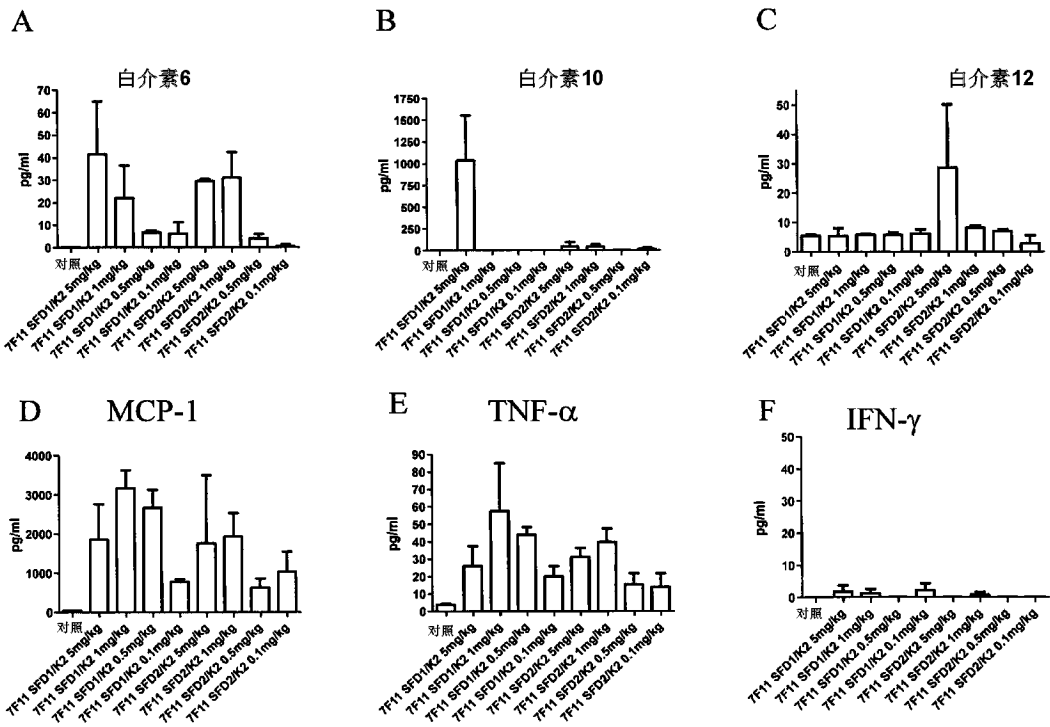


图 52

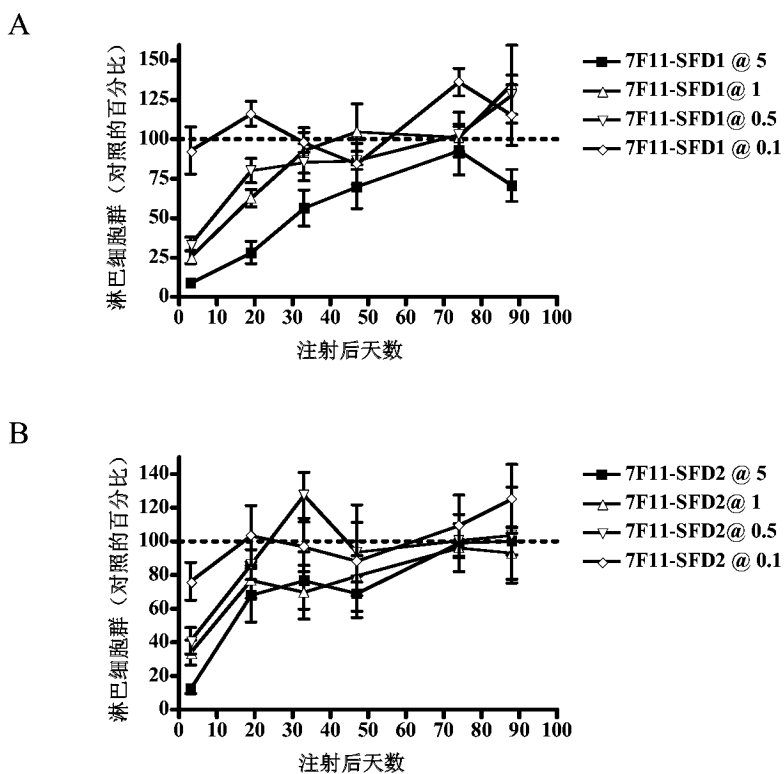


图 53

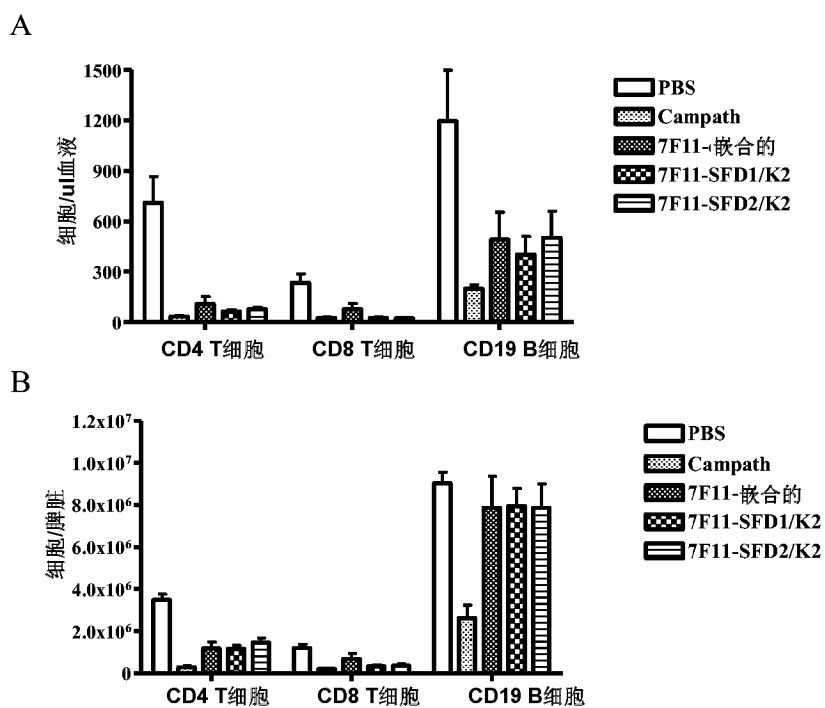


图 54

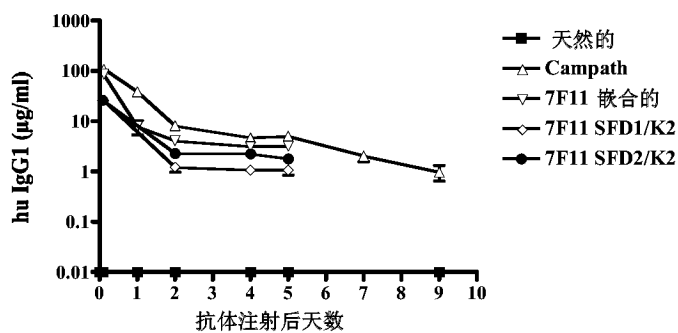


图 55

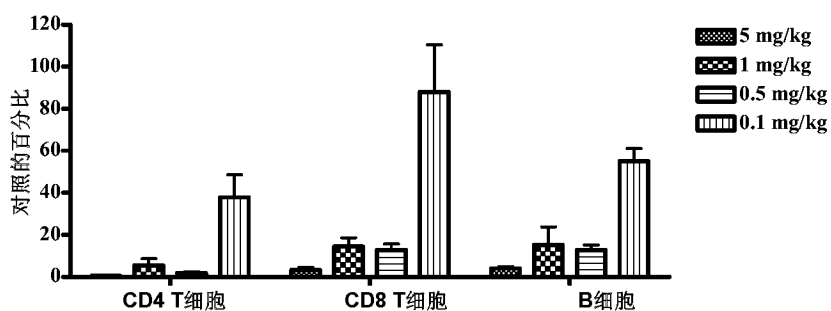


图 56A

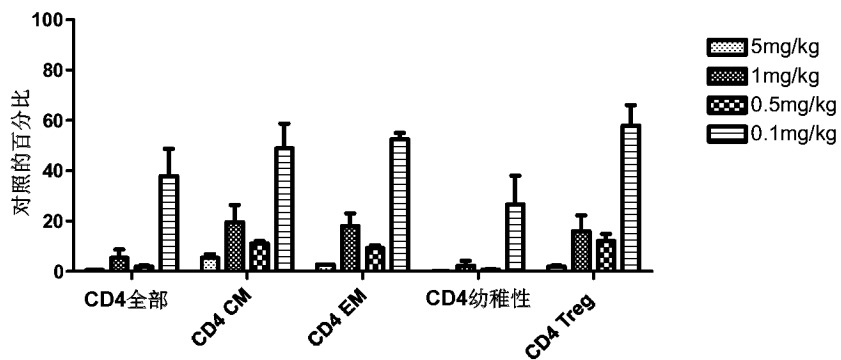


图 56B

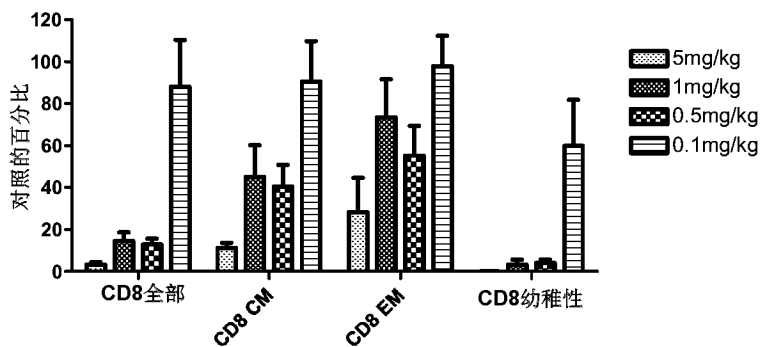


图 56C

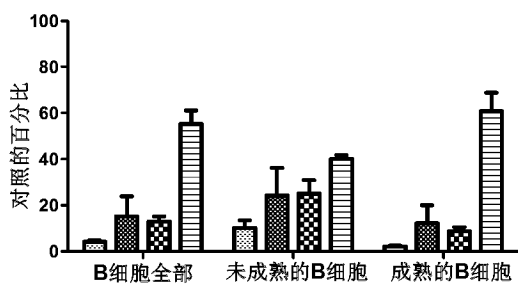


图 56D

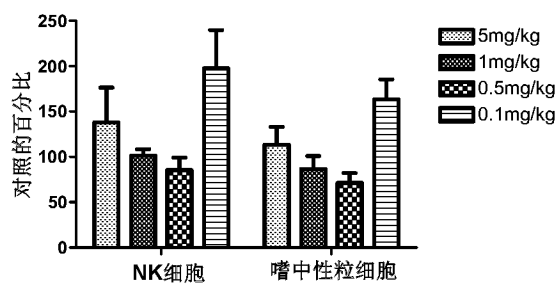


图 56E

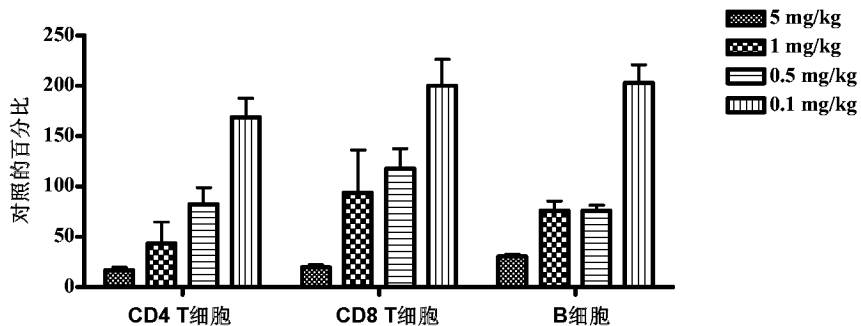


图 57A

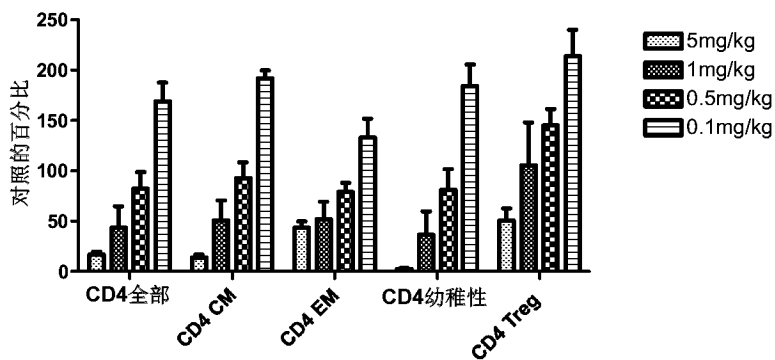


图 57B

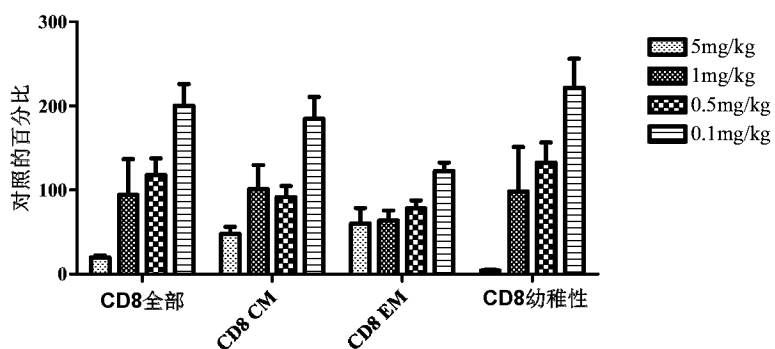


图 57C

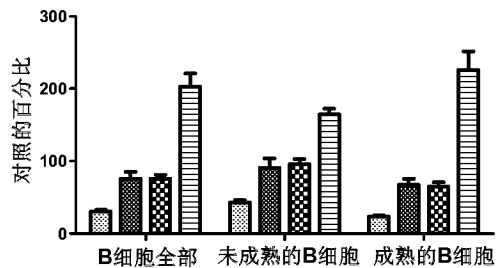


图 57D

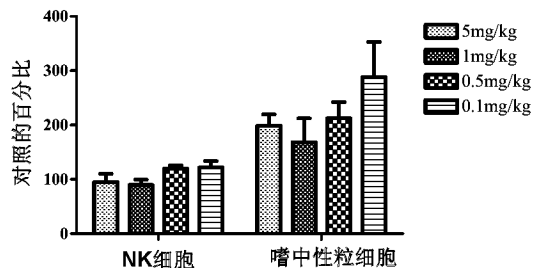


图 57E

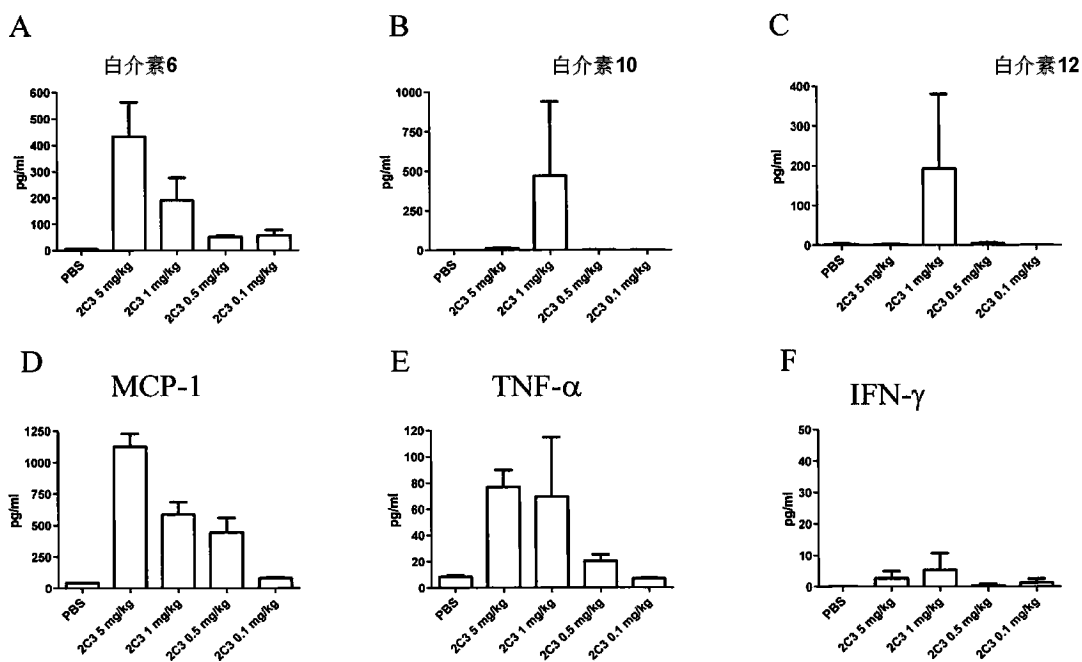


图 58

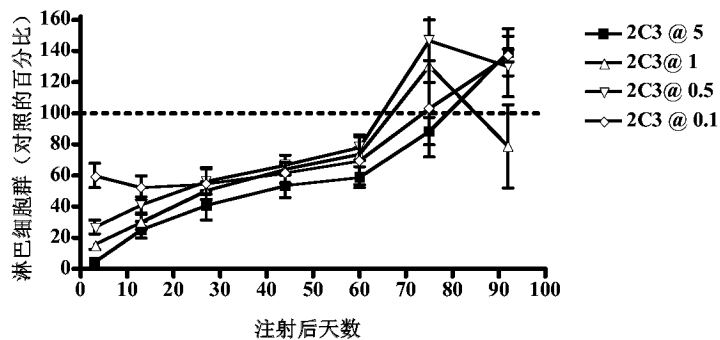


图 59

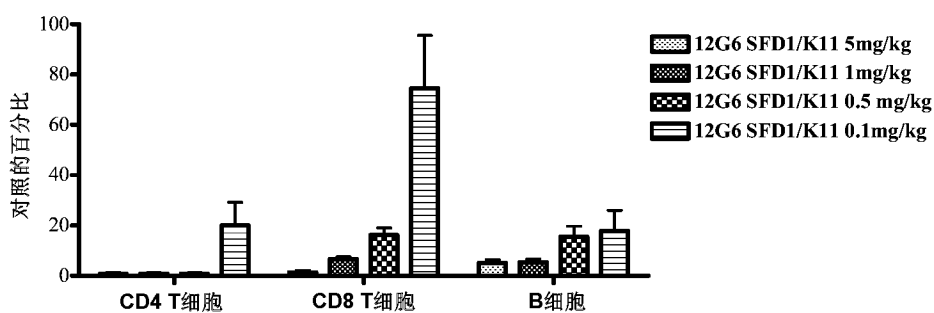


图 60A

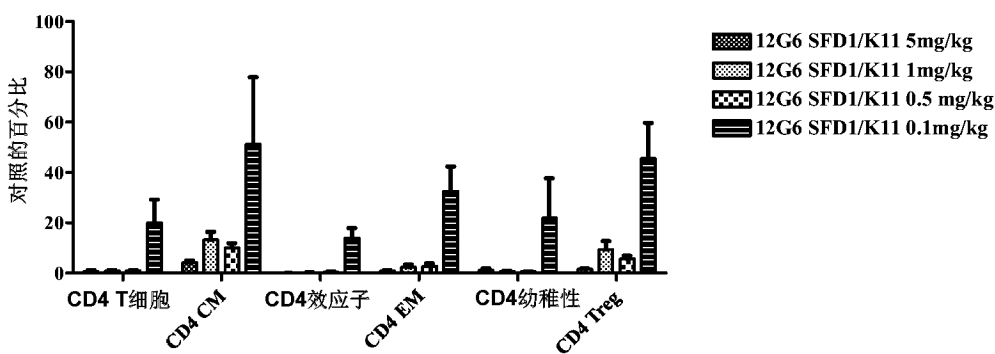


图 60B

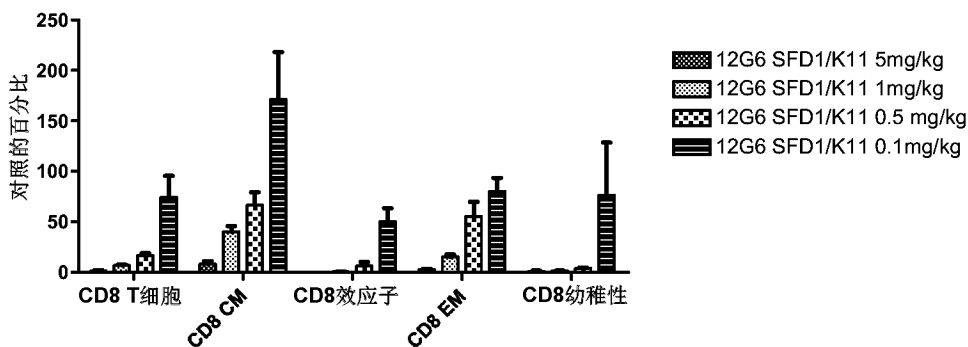


图 60C

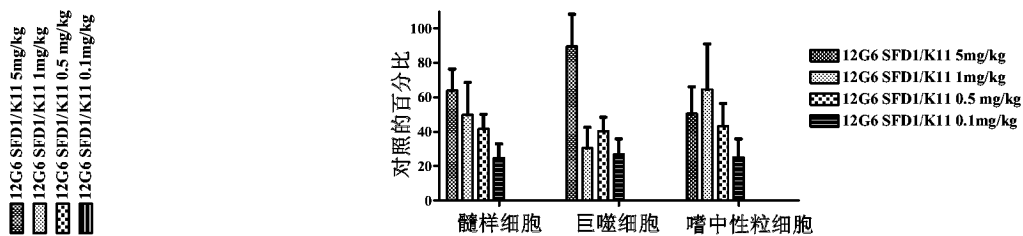


图 60E

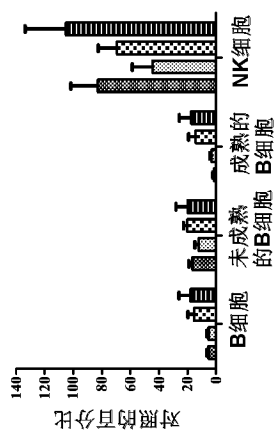


图 60D

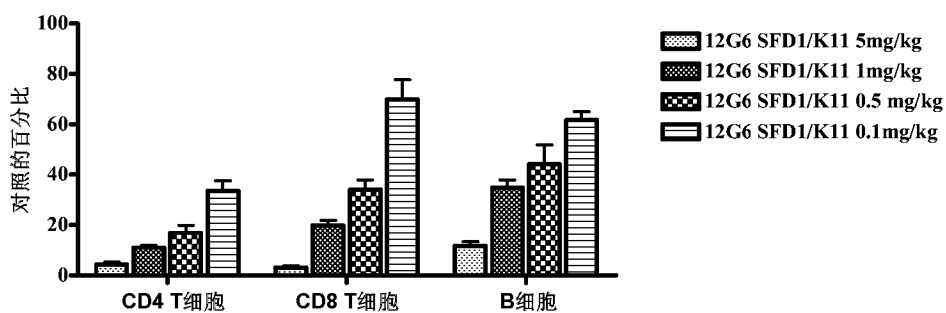


图 61A

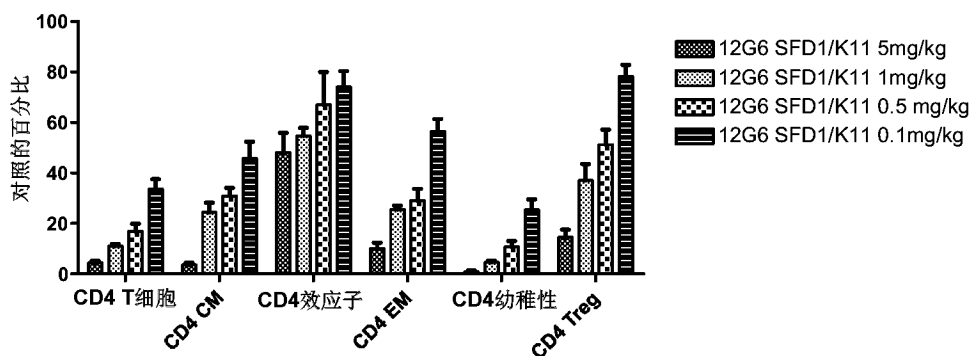


图 61B

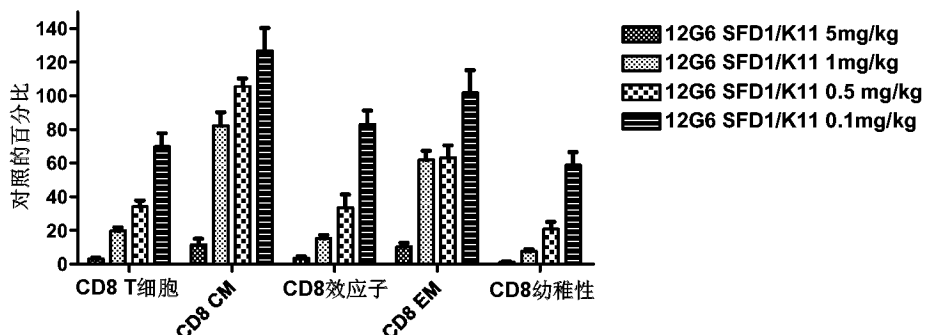


图 61C

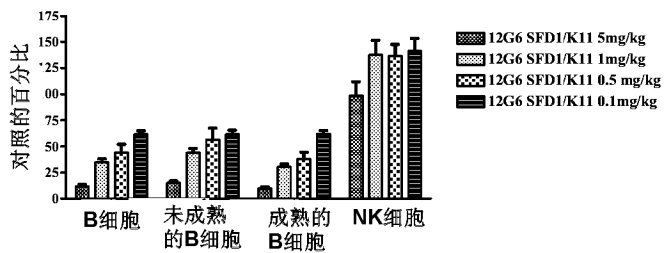


图 61D

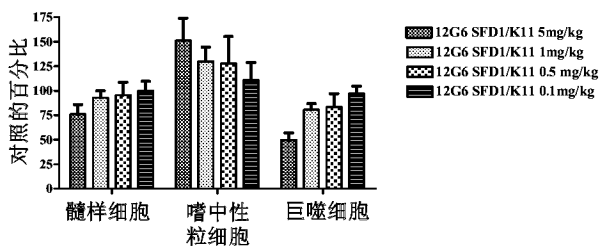


图 61E

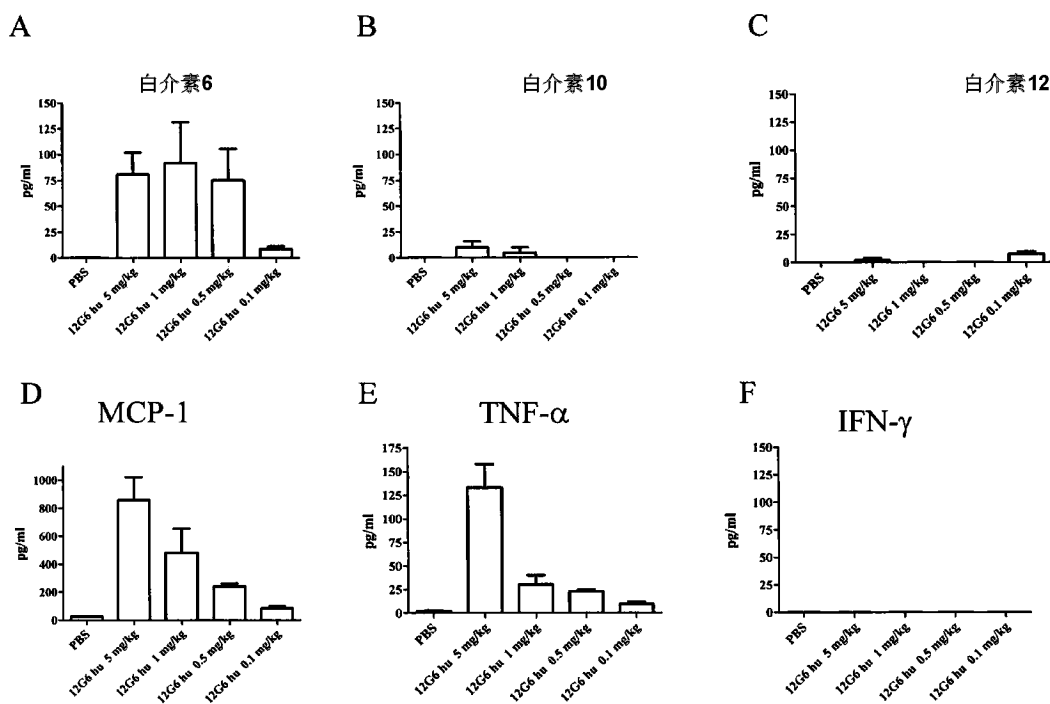


图 62

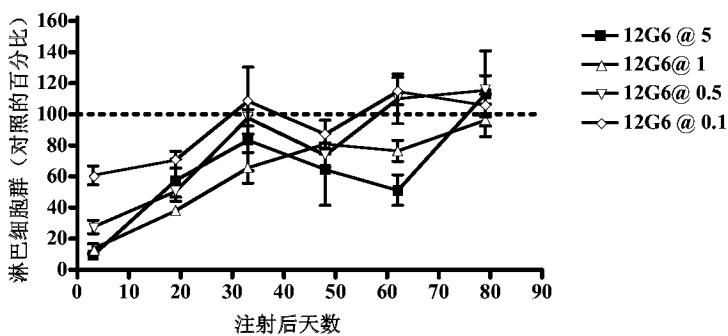


图 63

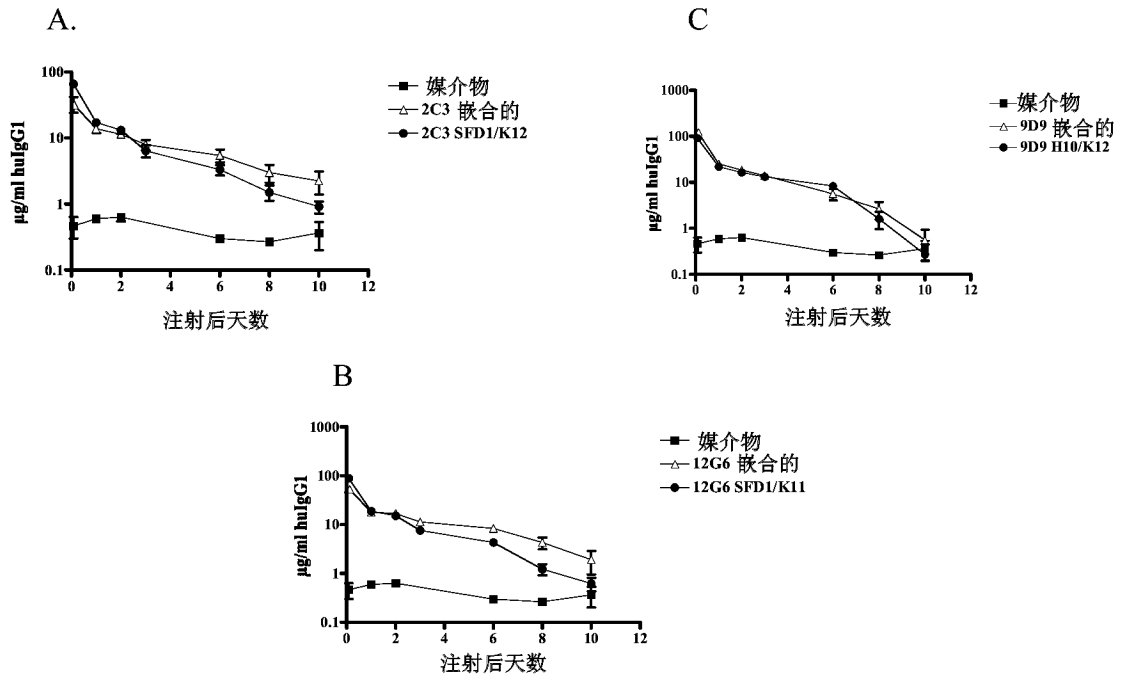


图 64

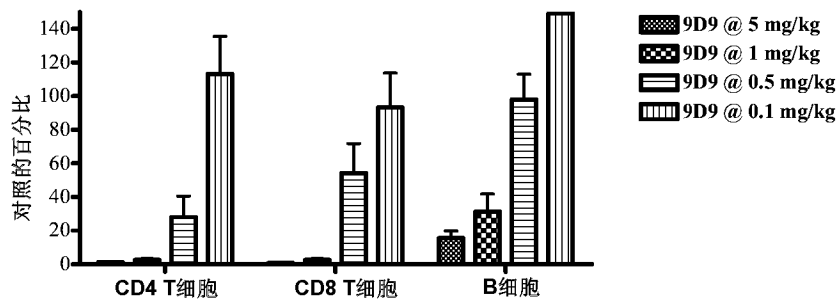


图 65A

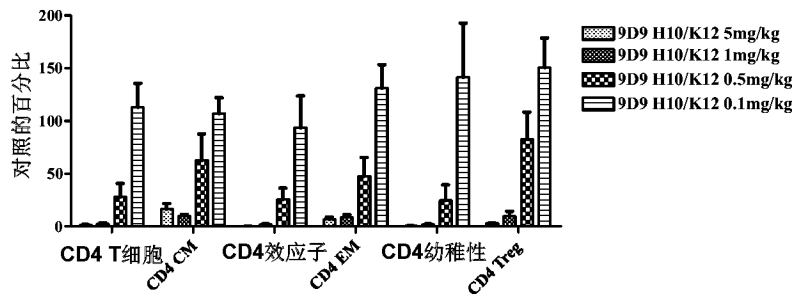


图 65B

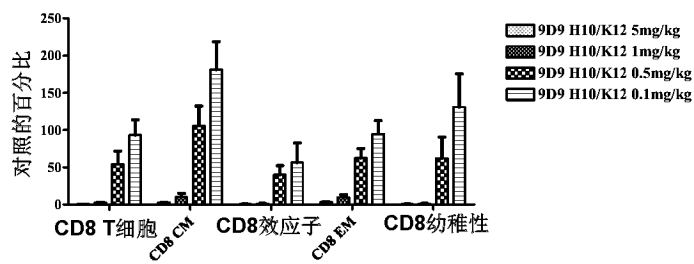


图 65C

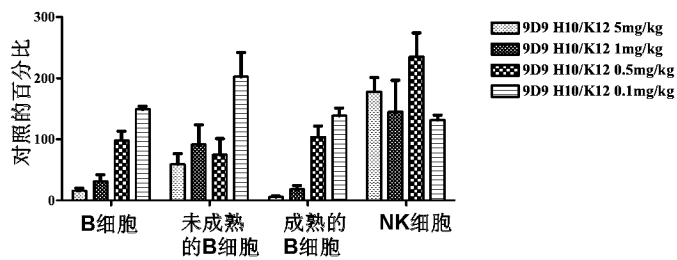


图 65D

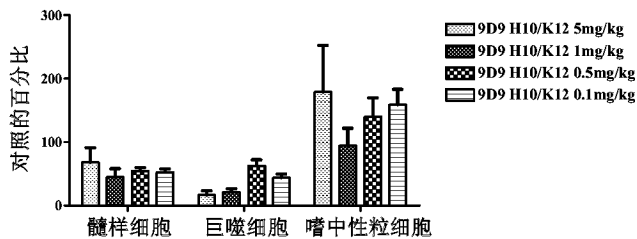


图 65E

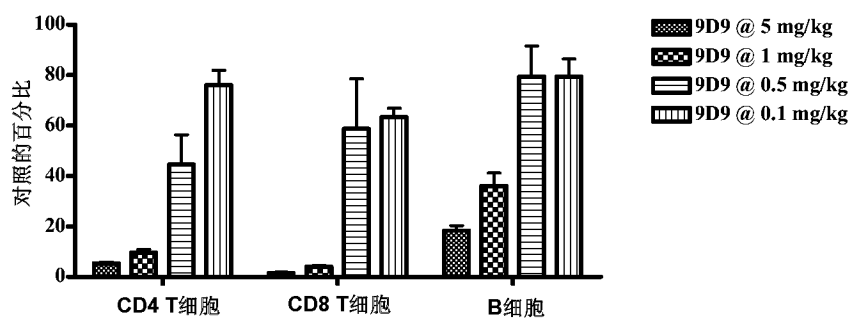


图 66A

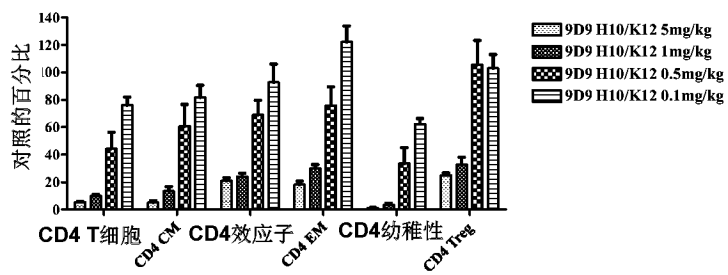


图 66B

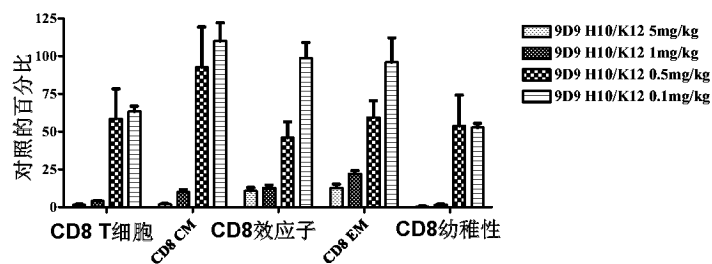


图 66C

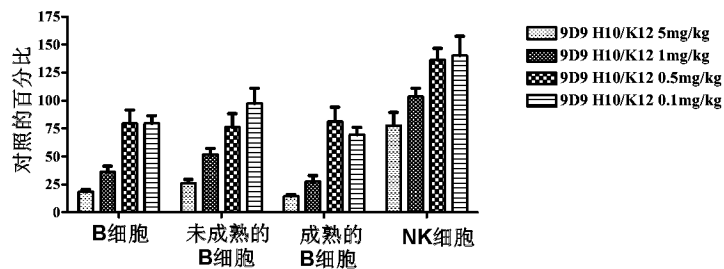


图 66D

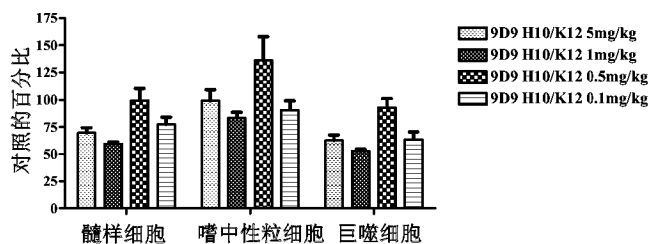


图 66E

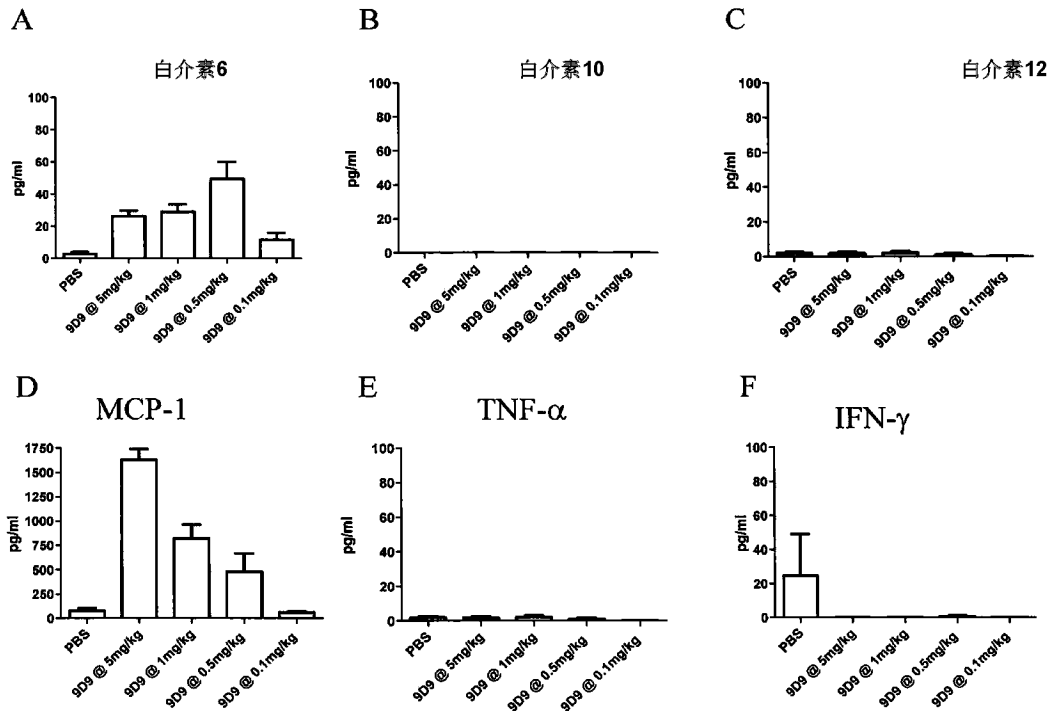


图 67

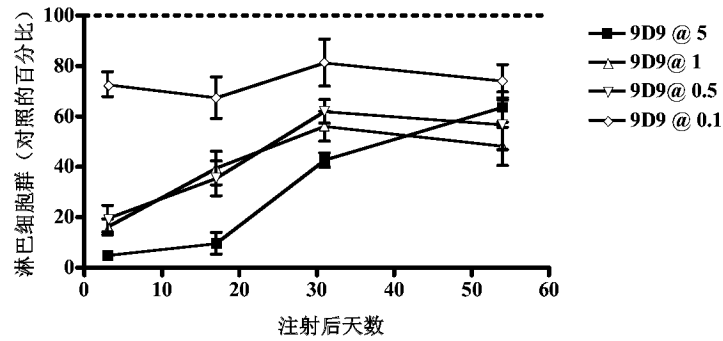


图 68

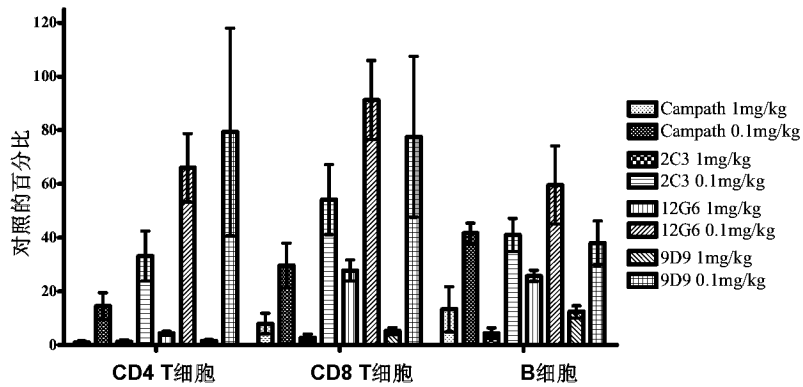


图 69A

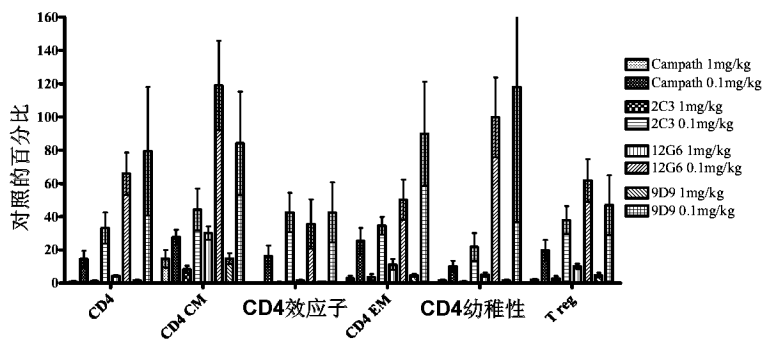


图 69B

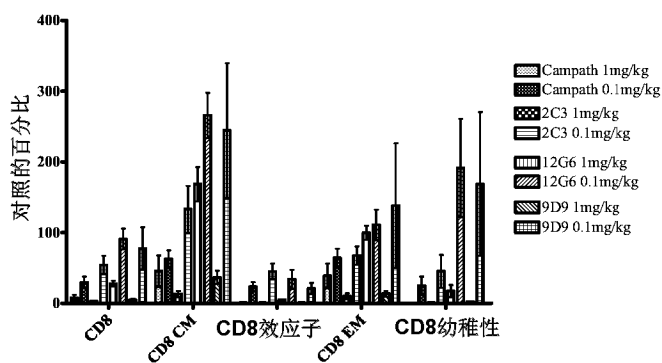


图 69C

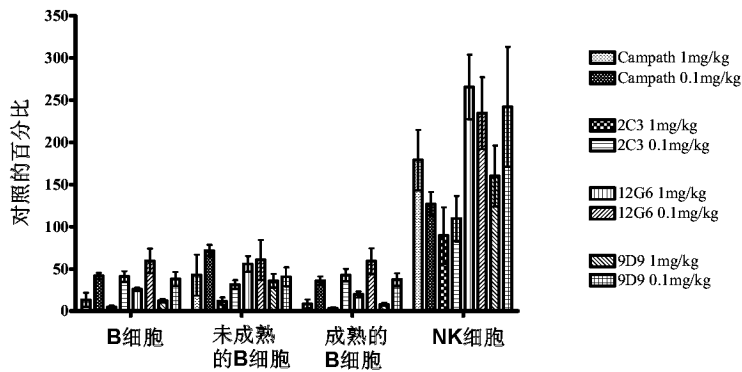


图 69D

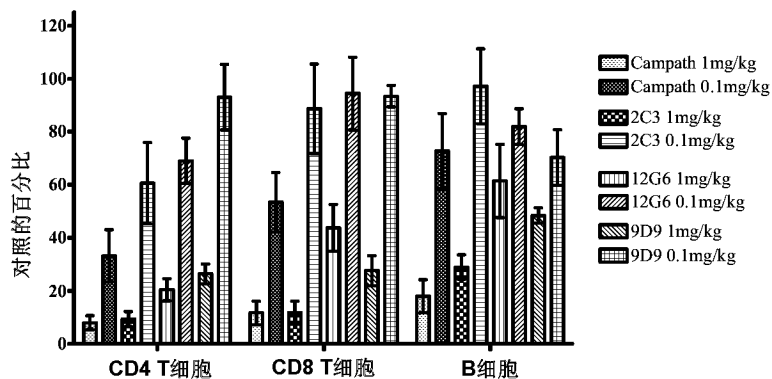


图 70A

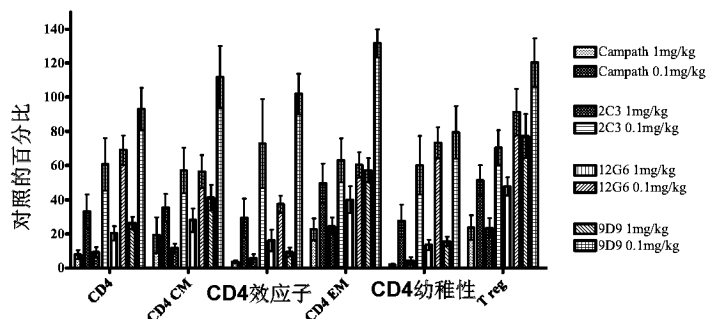


图 70B

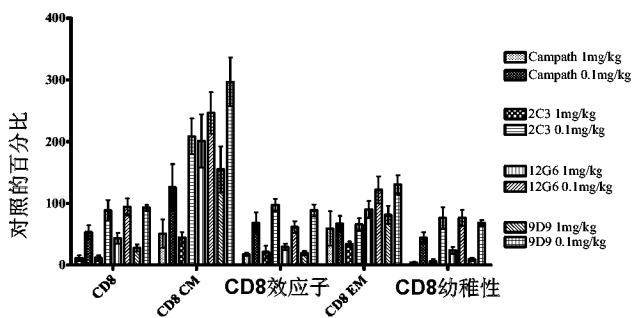


图 70C

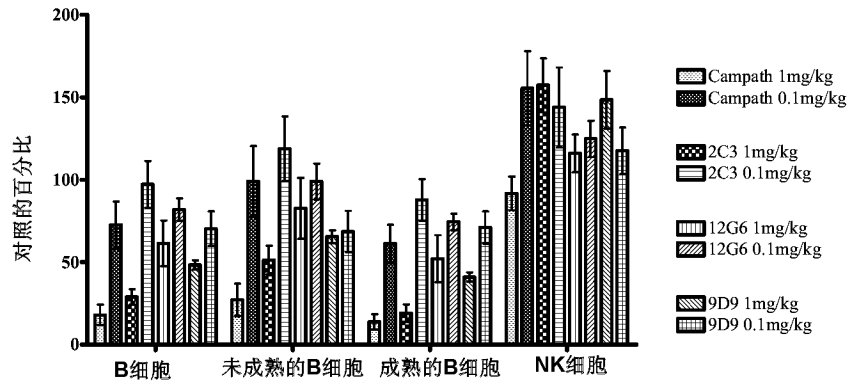


图 70D

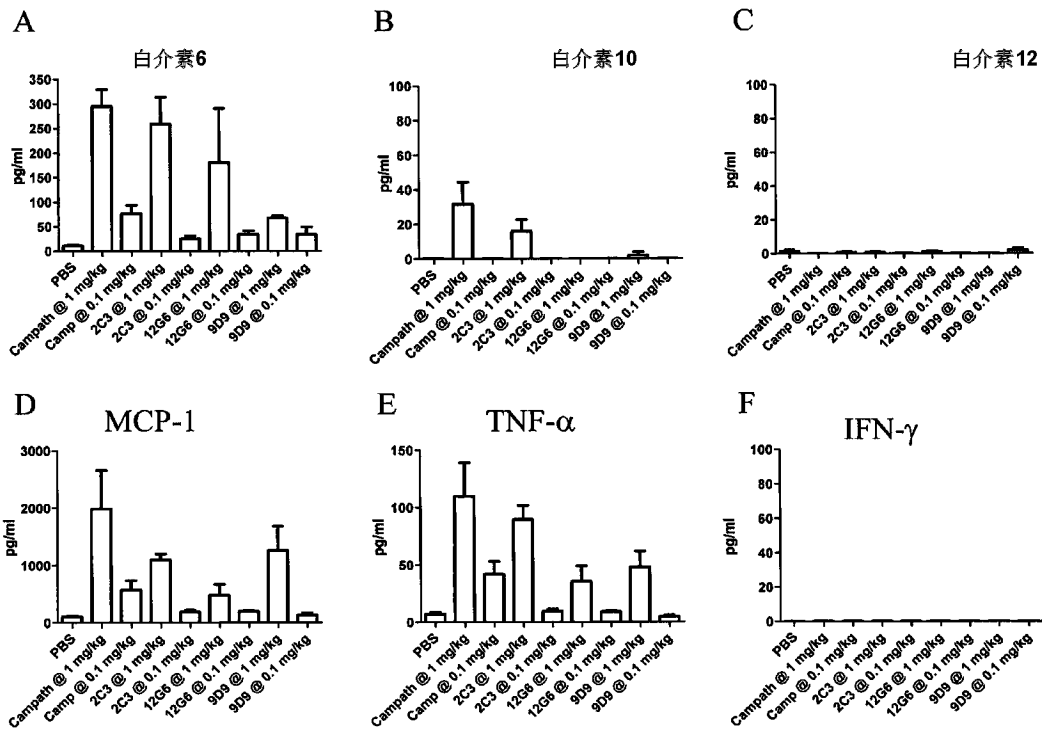


图 71

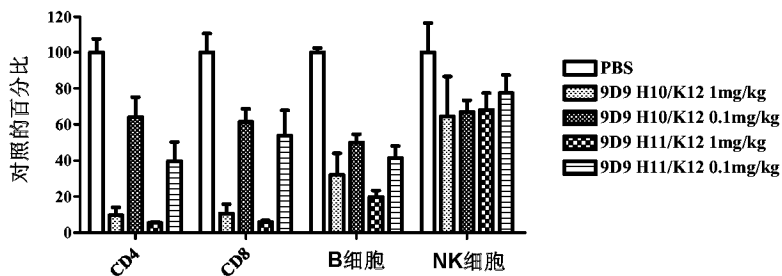


图 72

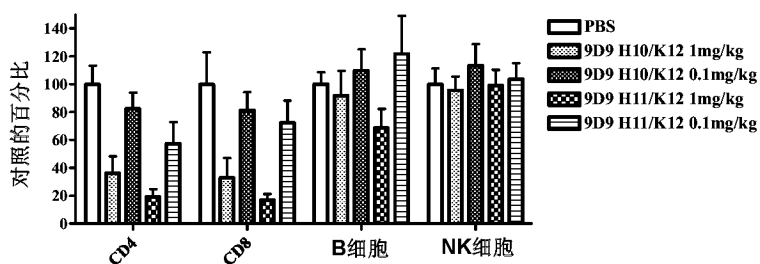


图 73

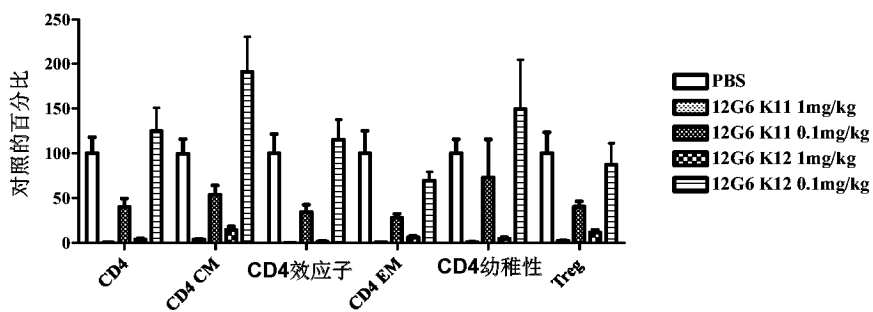


图 74A

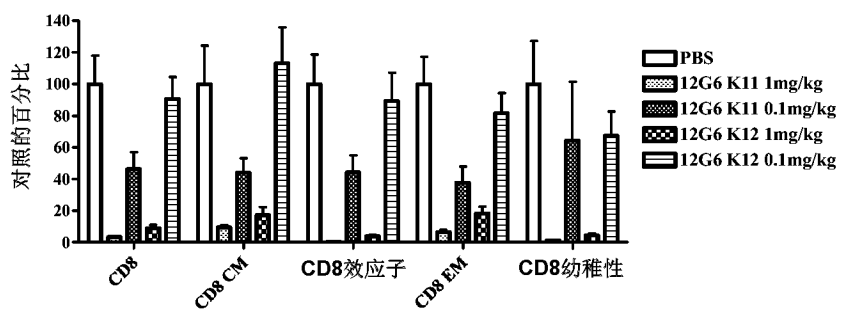


图 74B

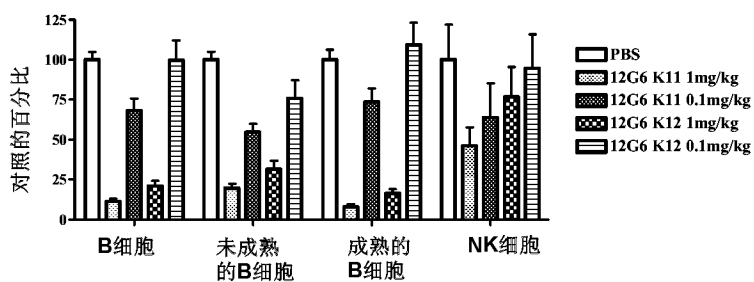


图 74C

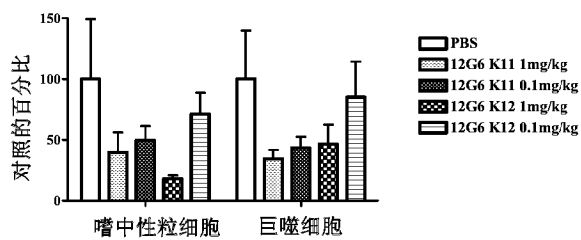


图 74D

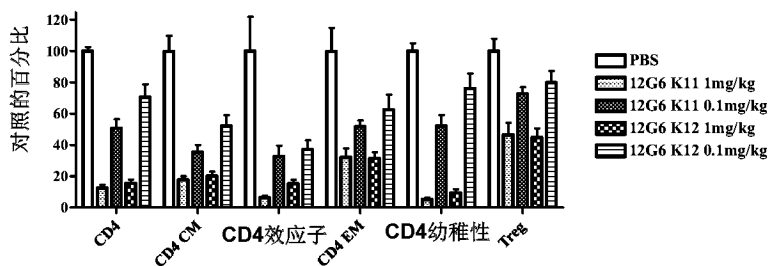


图 75A

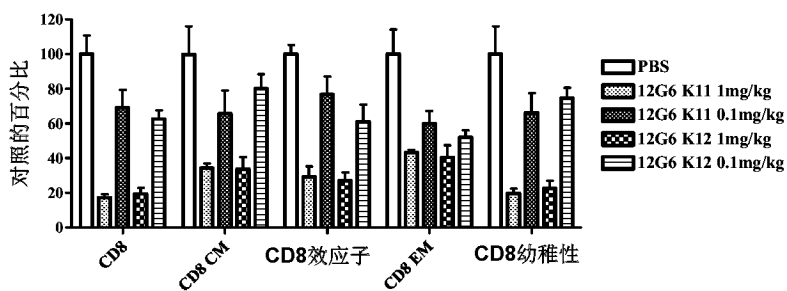


图 75B

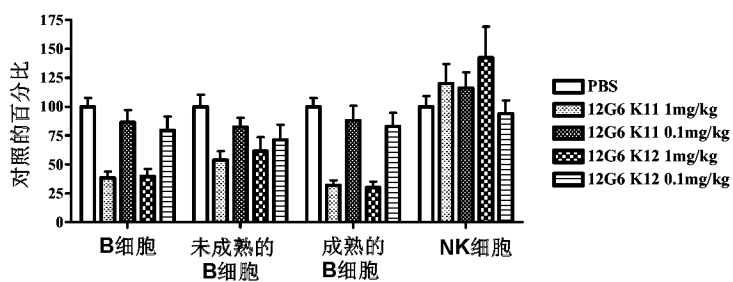


图 75C

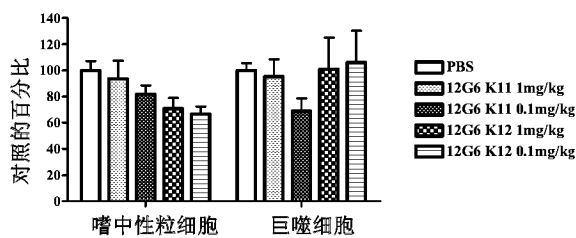


图 75D

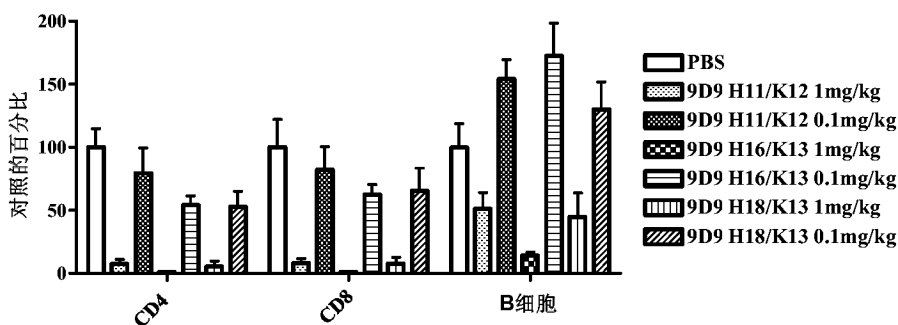


图 76

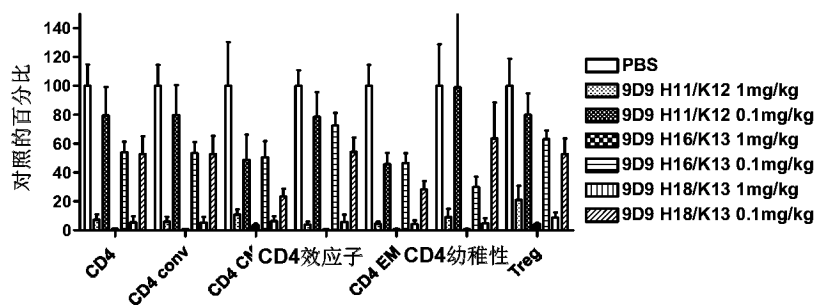


图 77A

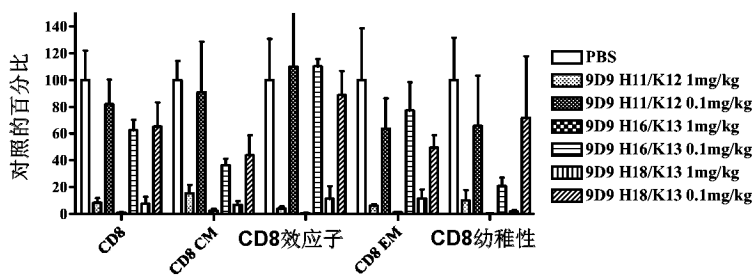


图 77B

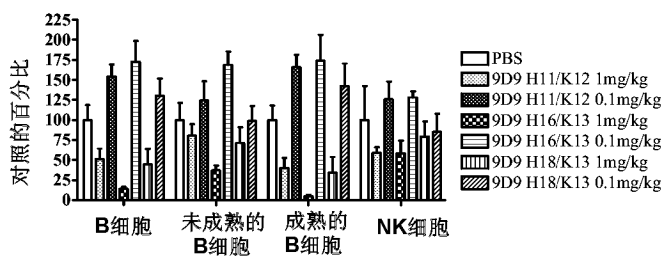


图 77C

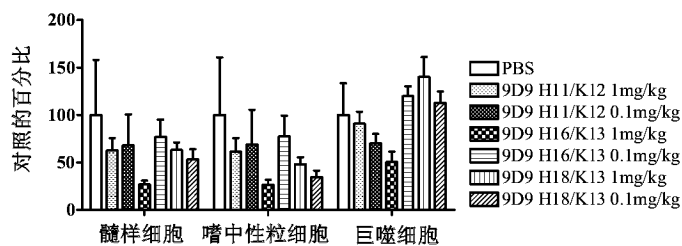


图 77D

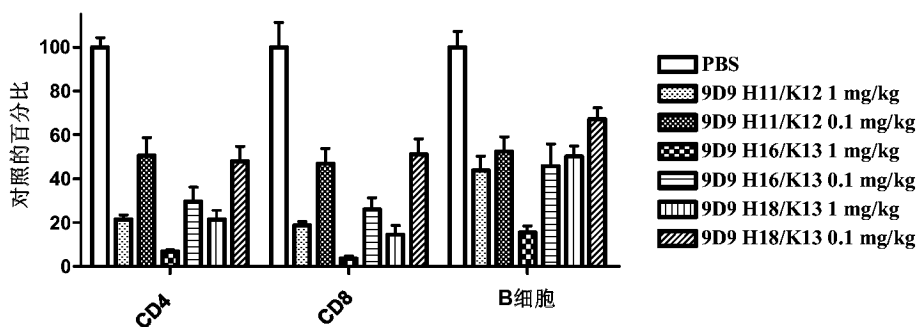


图 78

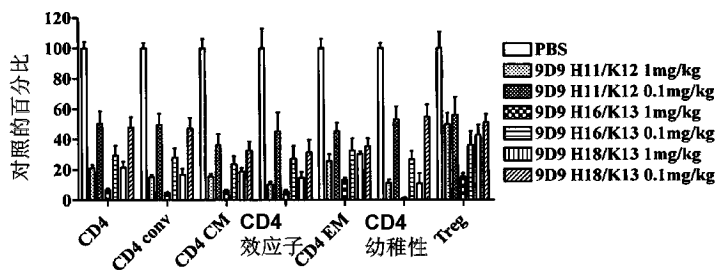


图 79A

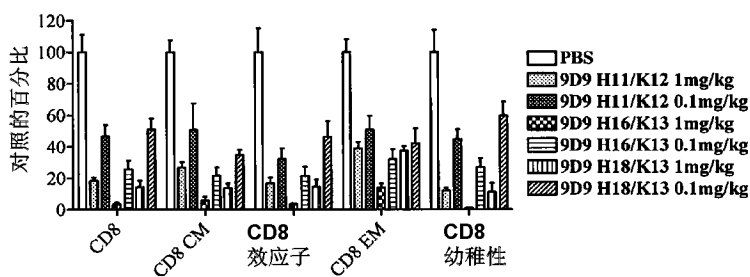


图 79B

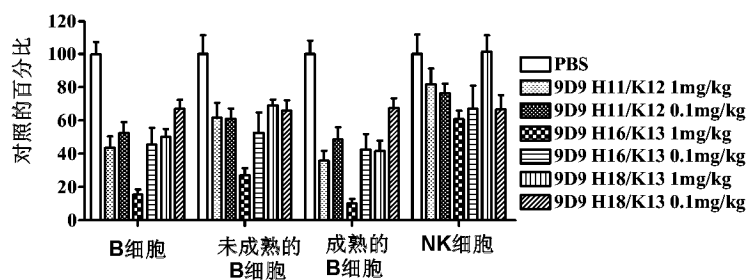


图 79C

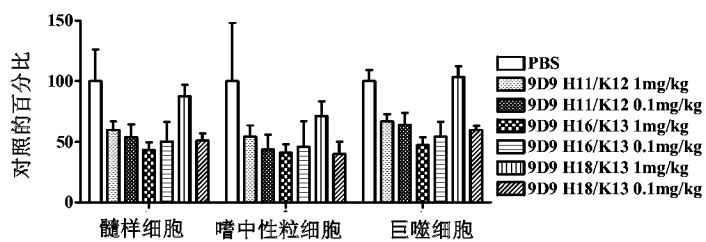


图 79D

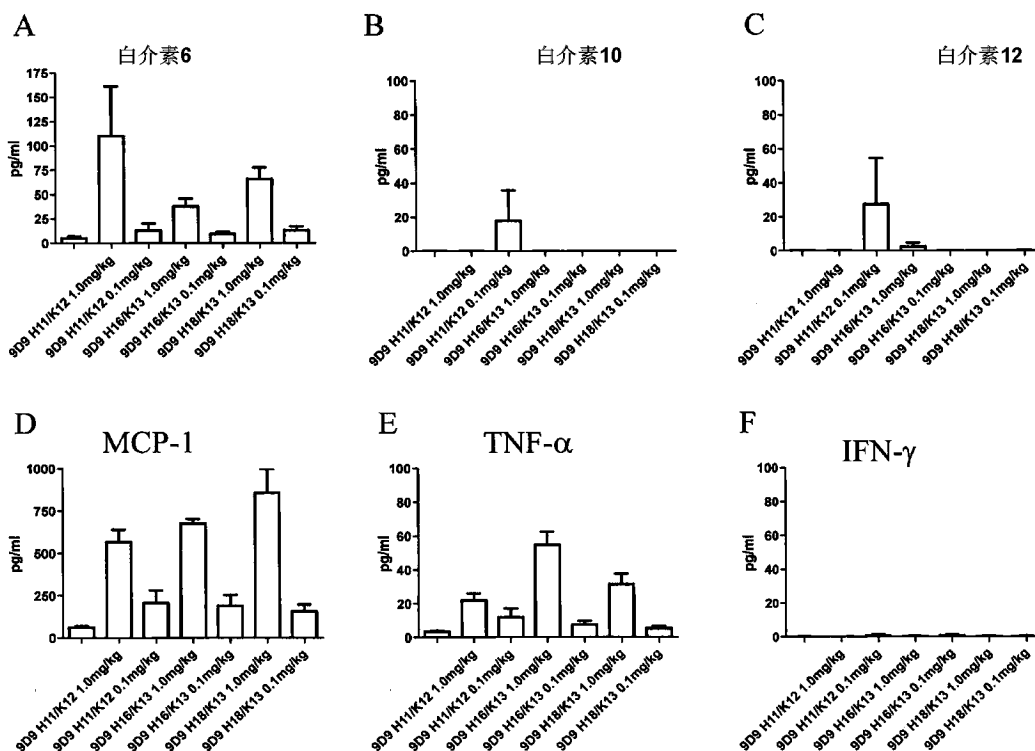


图 80

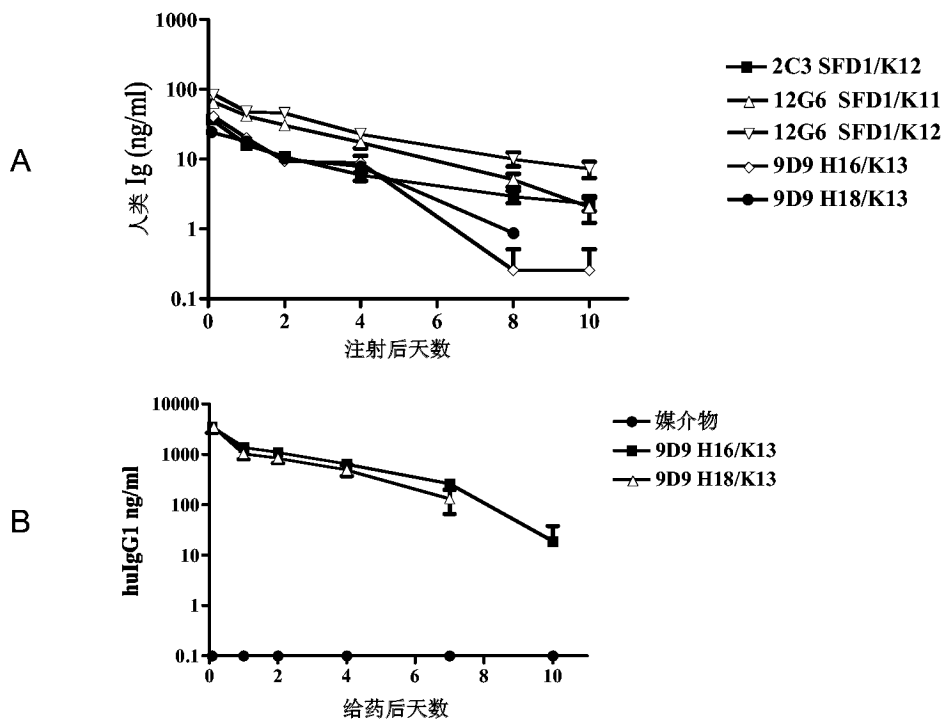


图 81

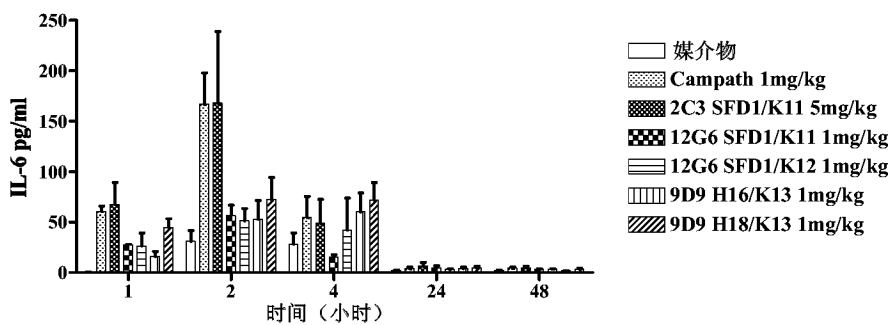


图 82A

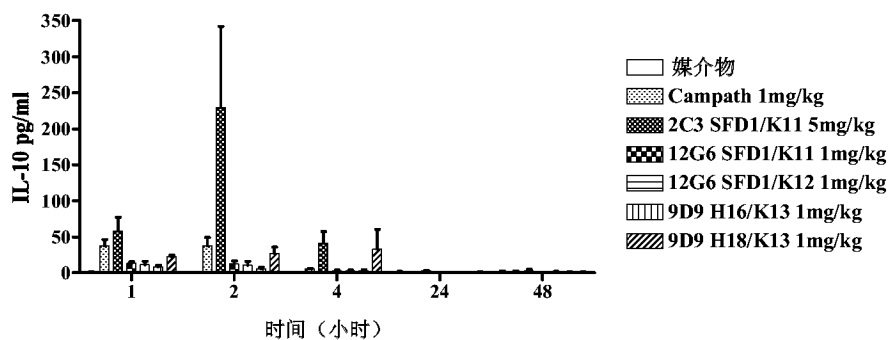


图 82B

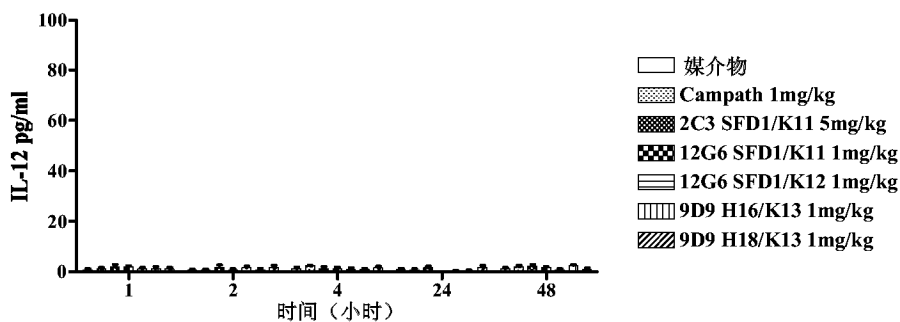


图 82C

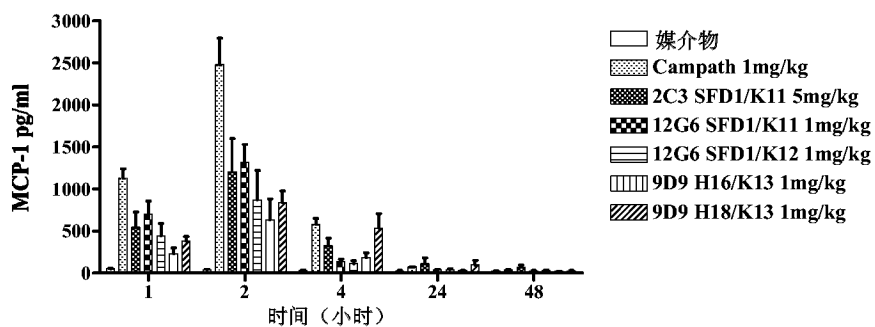


图 82D

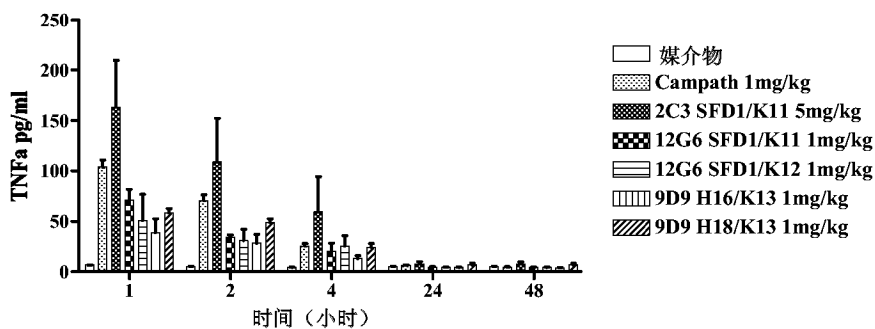


图 82E

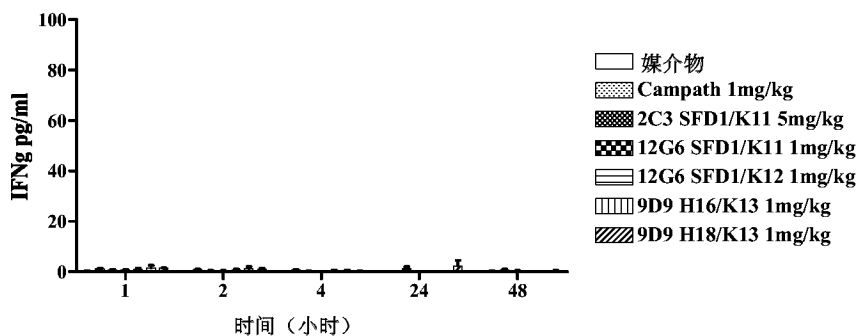


图 82F

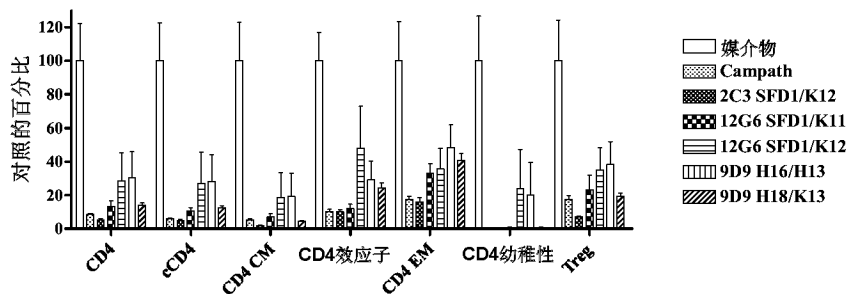


图 83A

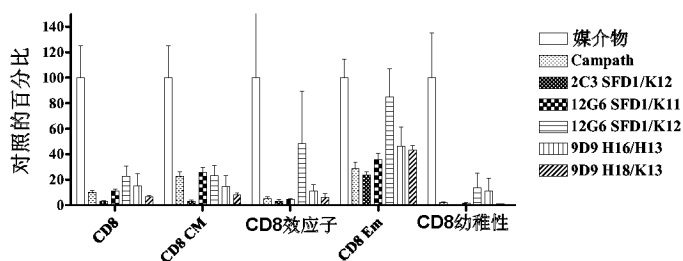


图 83B

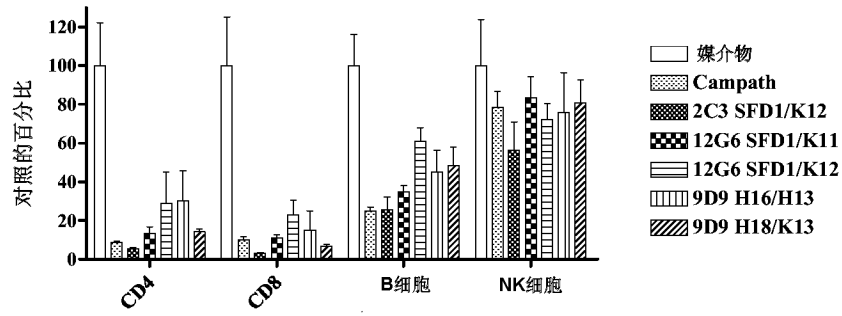


图 83C

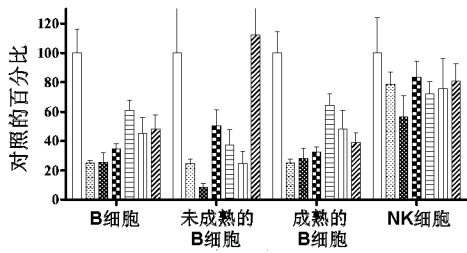


图 83D

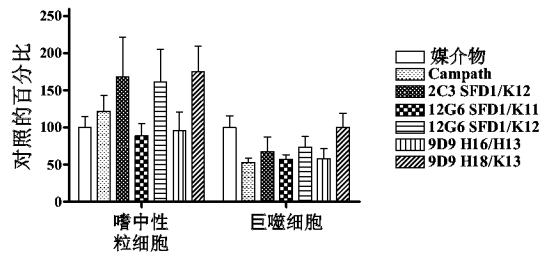


图 83E

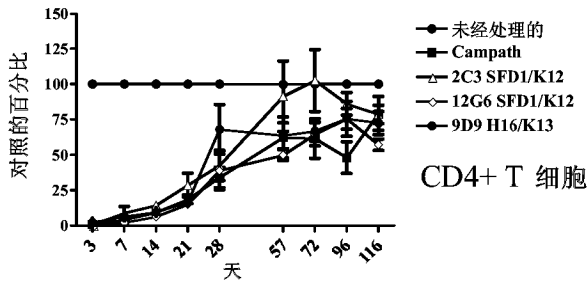


图 84A

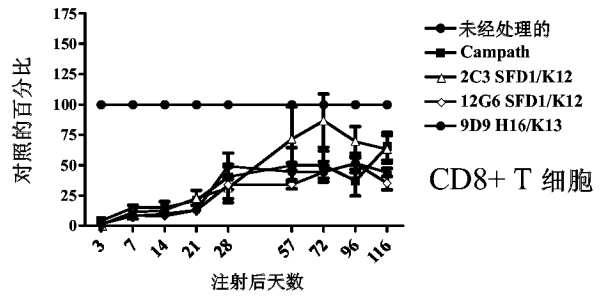


图 84B

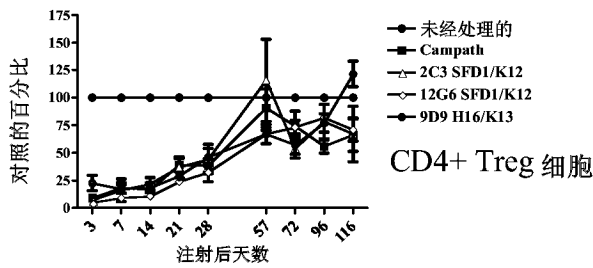


图 84C

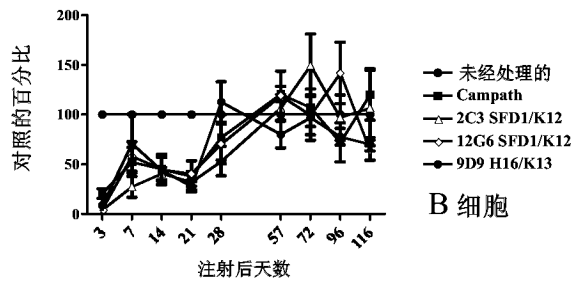


图 84D

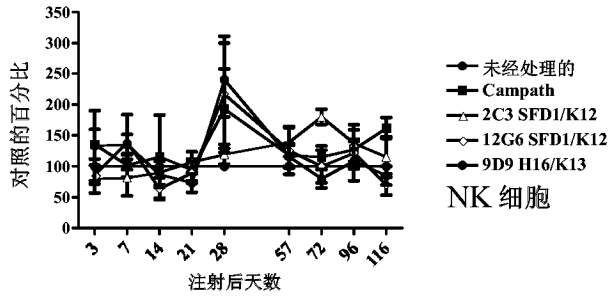


图 84E

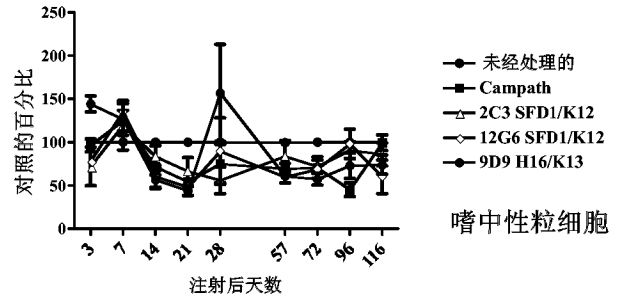


图 84F

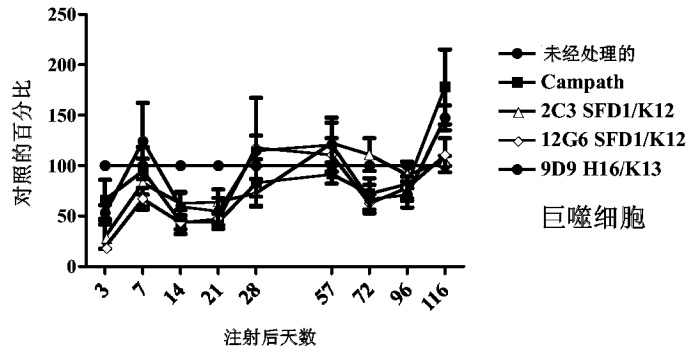


图 84G

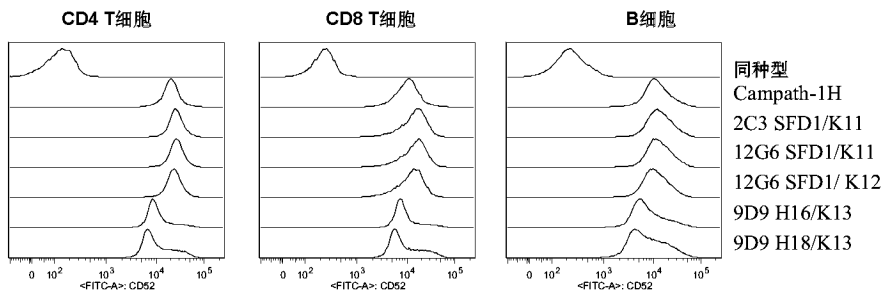


图 85

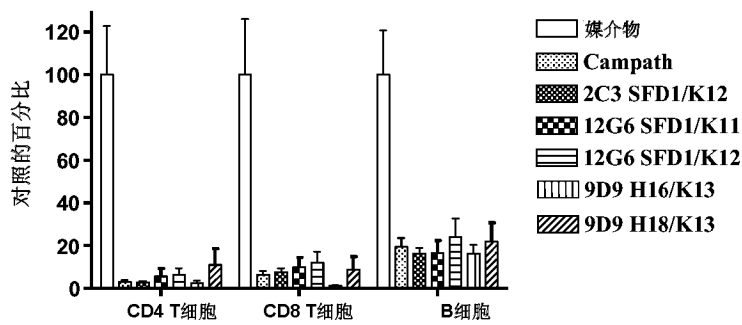


图 86A

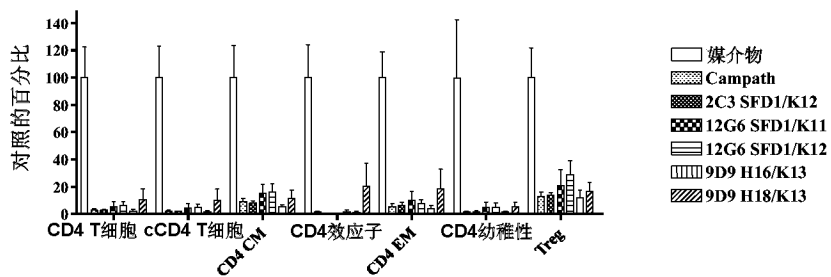


图 86B

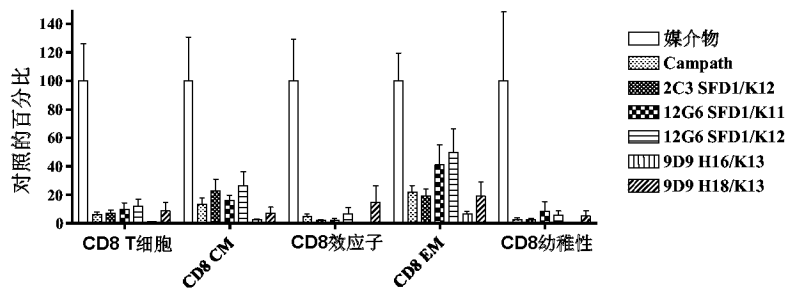


图 86C

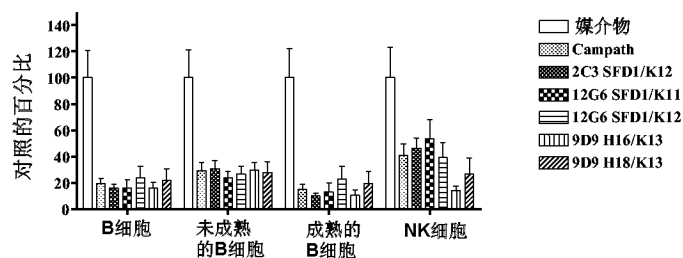


图 86D

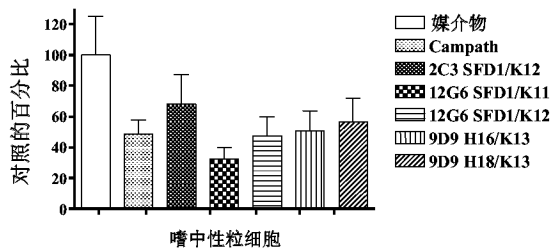


图 86E

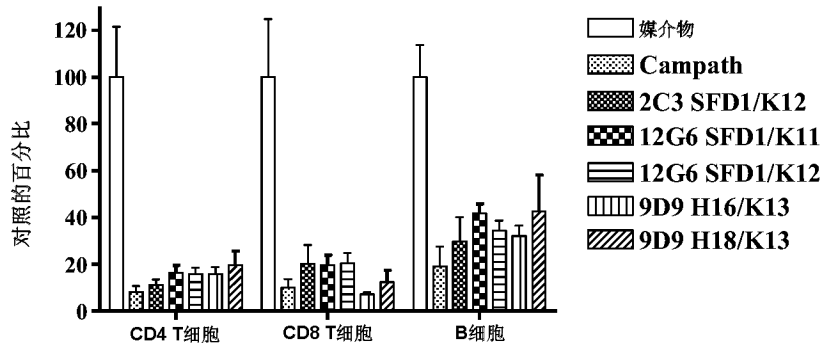


图 87A

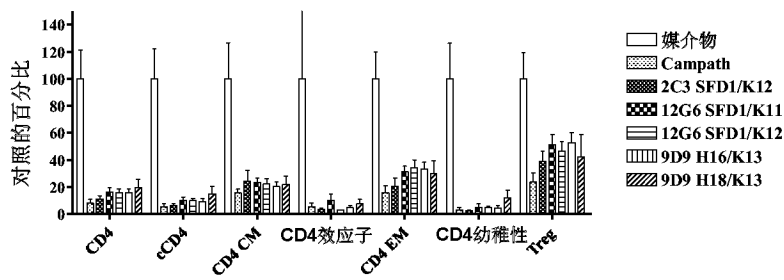


图 87B

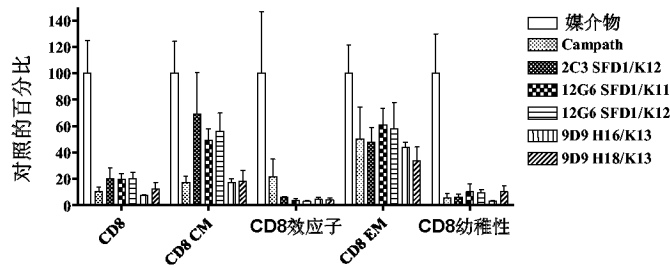


图 87C

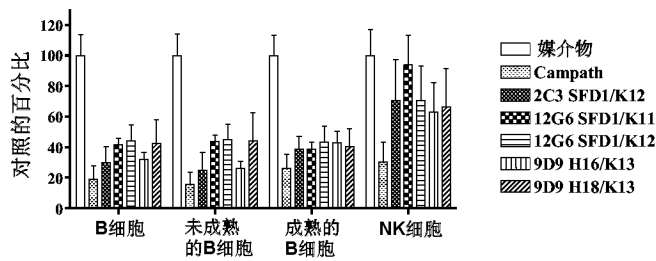


图 87D

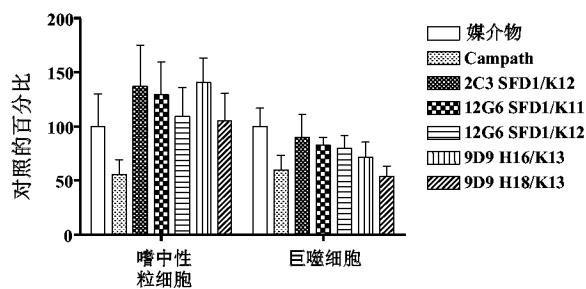


图 87E

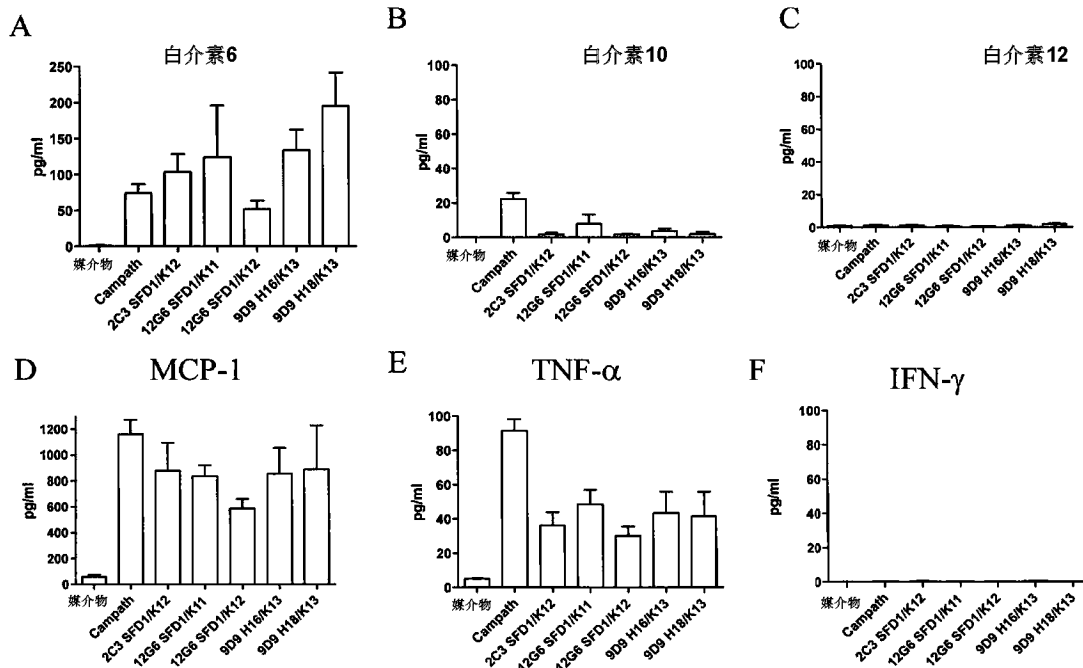


图 88

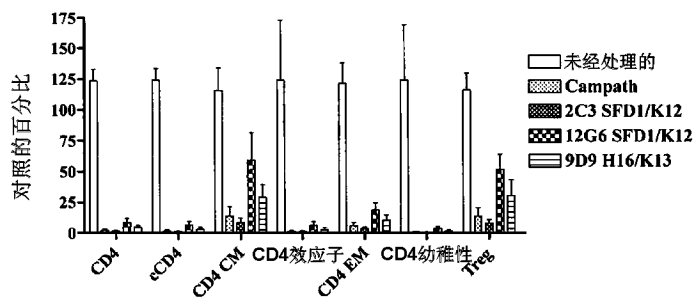


图 89A

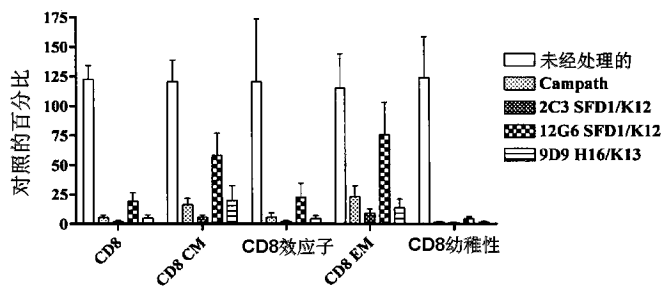


图 89B

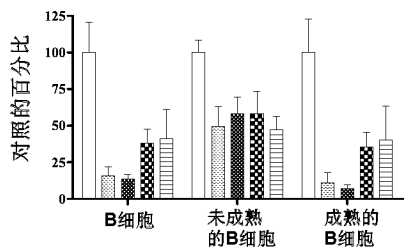


图 89C

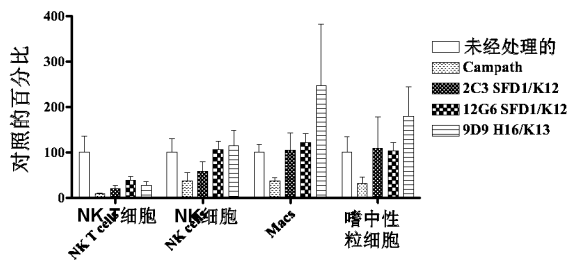


图 89D

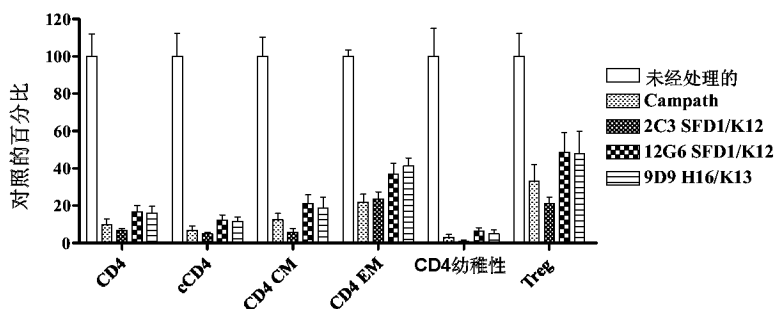


图 90A

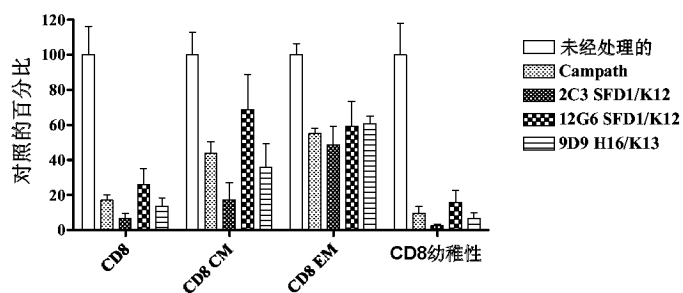


图 90B

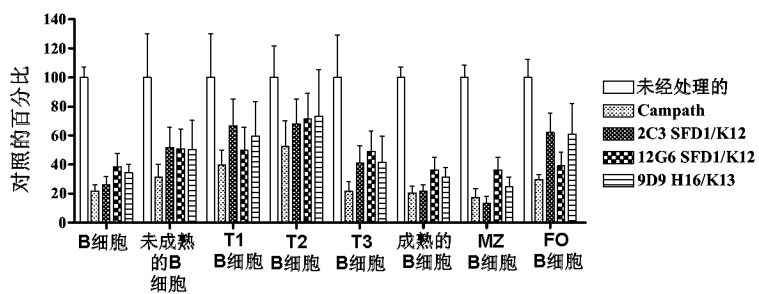


图 90C

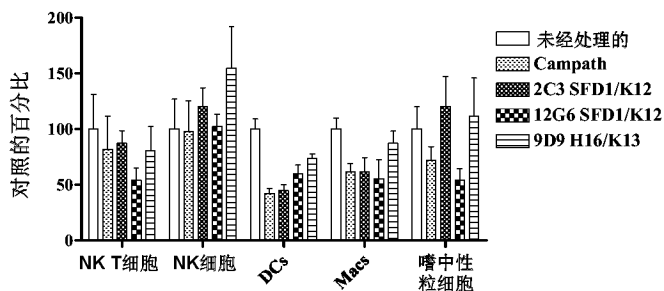


图 90D

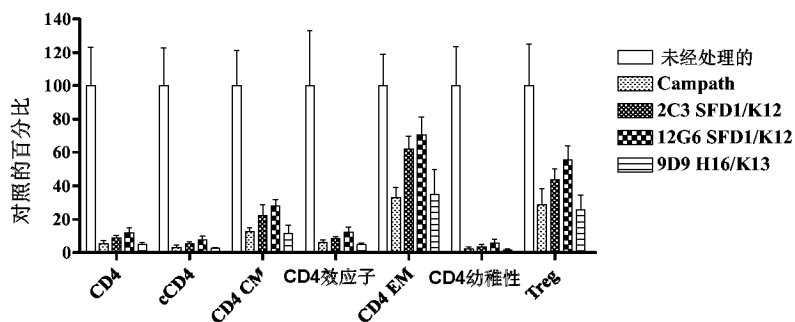


图 91A

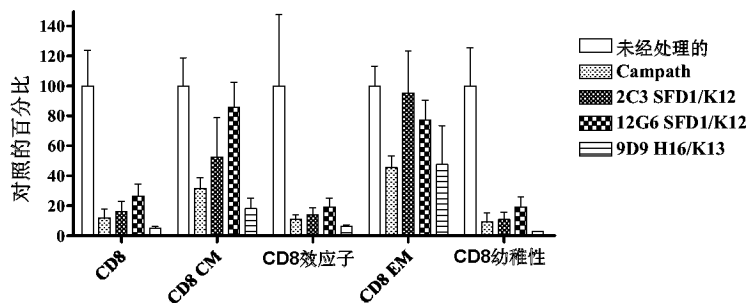


图 91B

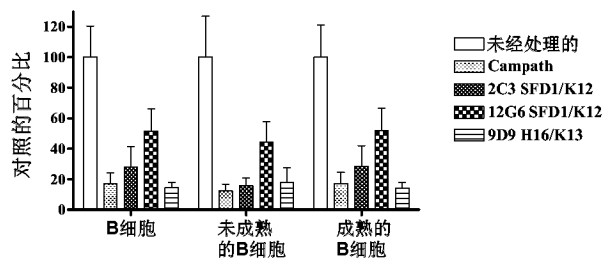


图 91C

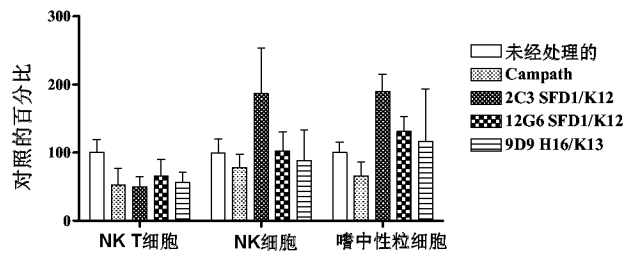
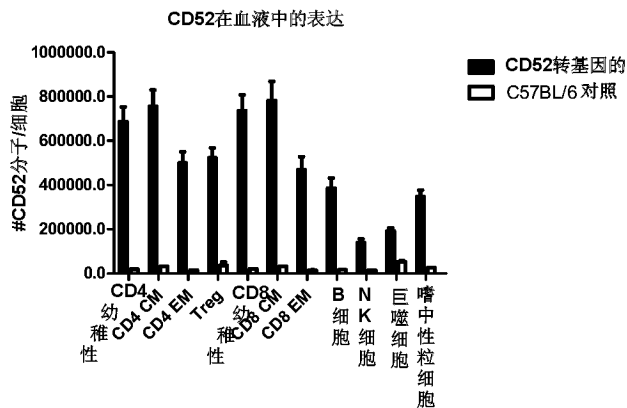


图 91D

A



B

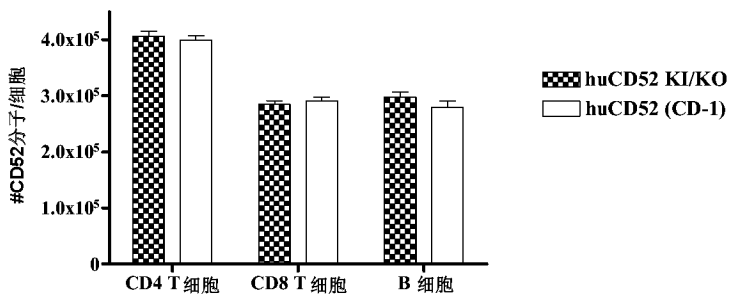


图 92

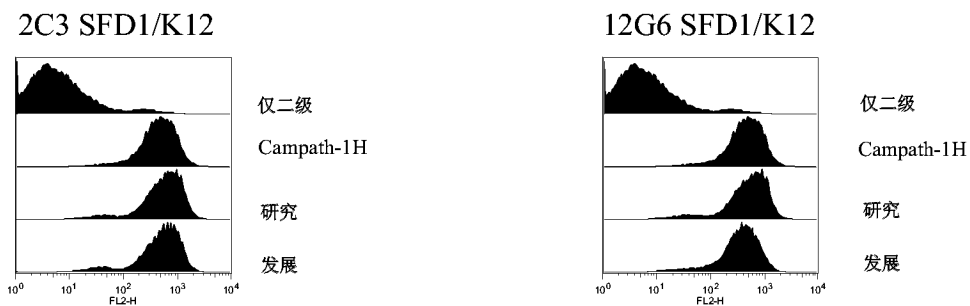


图 93

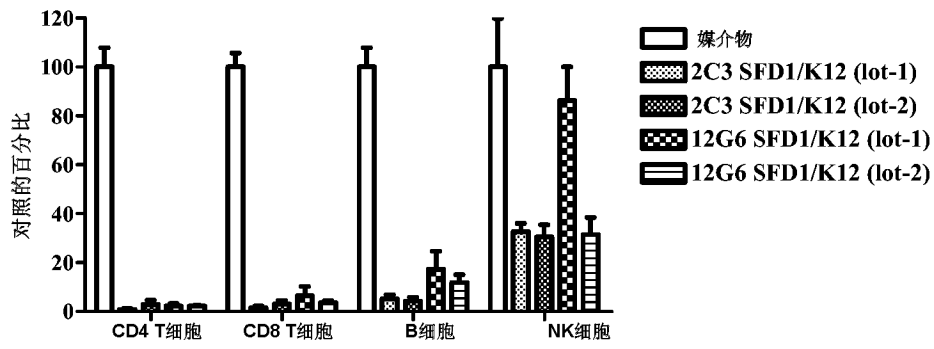


图 94

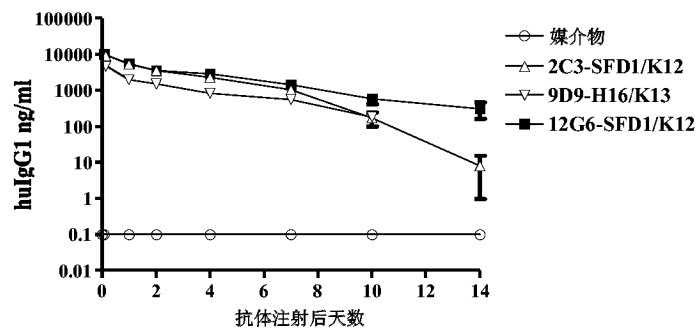


图 95

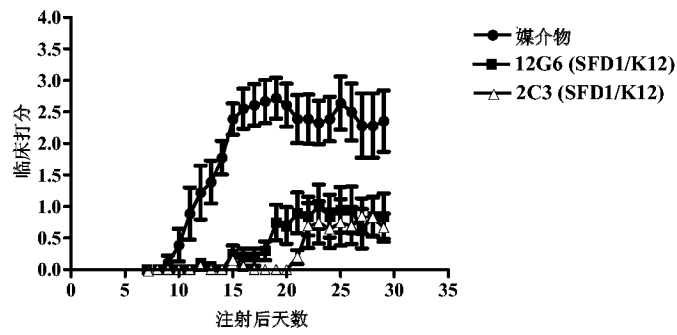


图 96

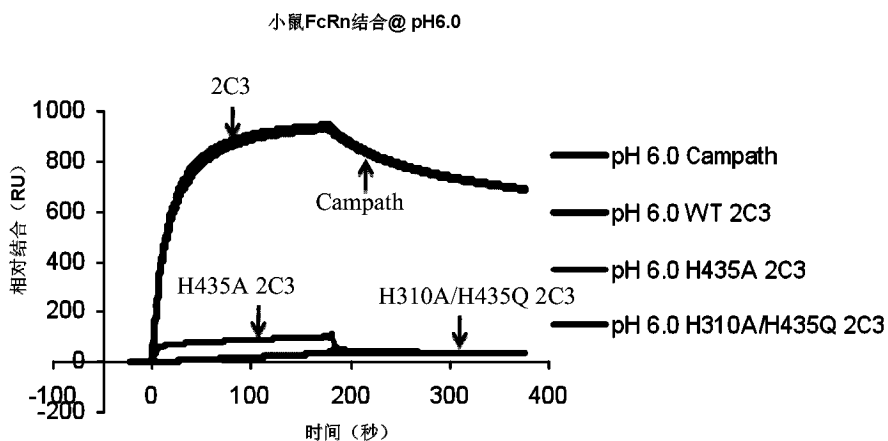


图 97A

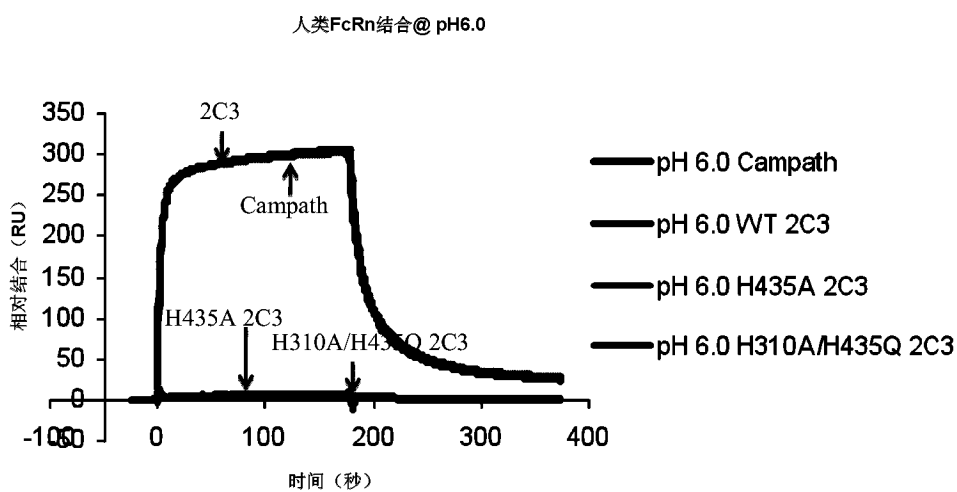


图 97B

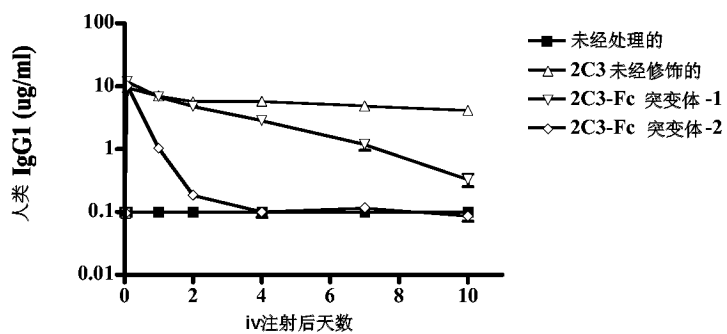


图 98

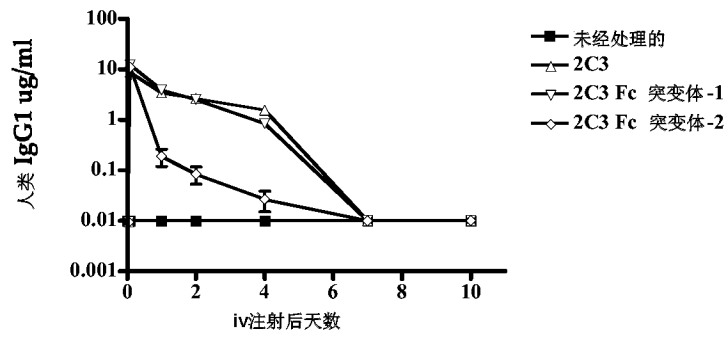
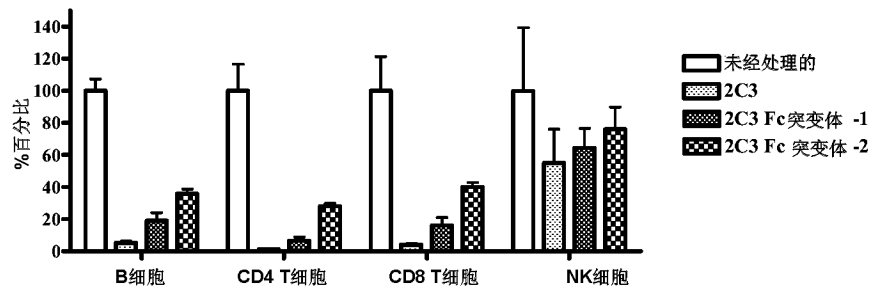


图 99

A



B

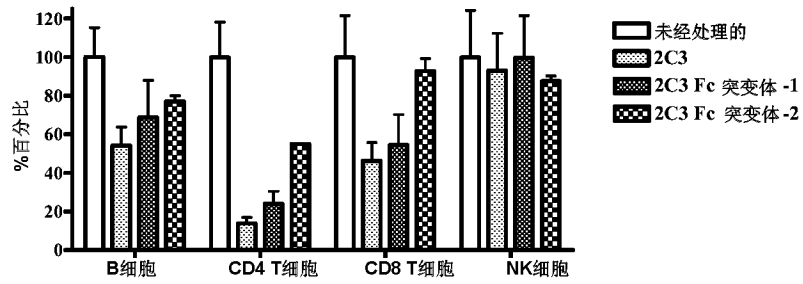


图 100

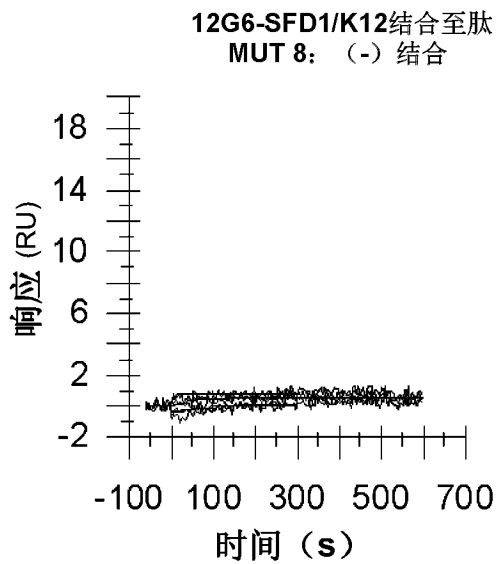


图 101A

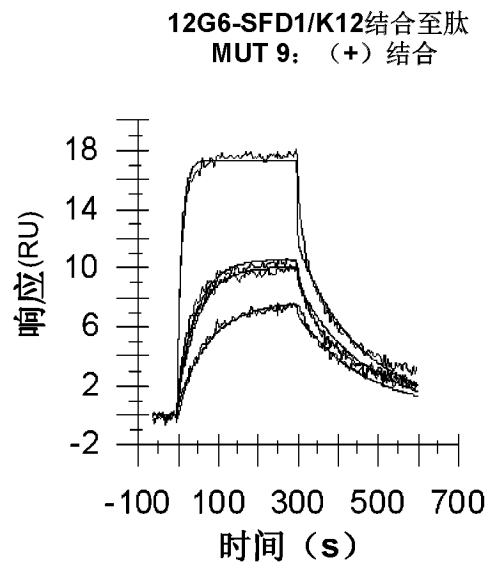


图 101B

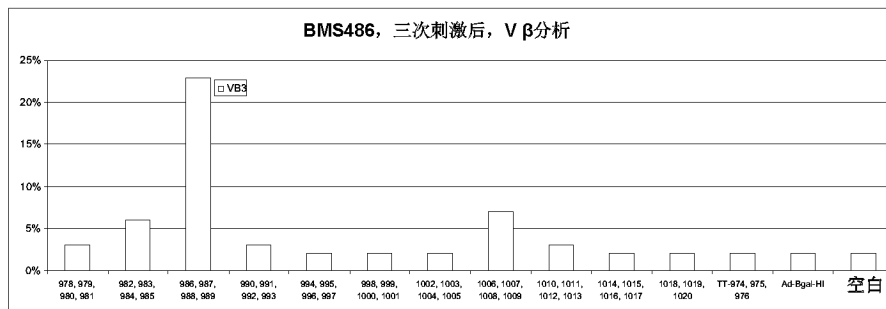


图 102

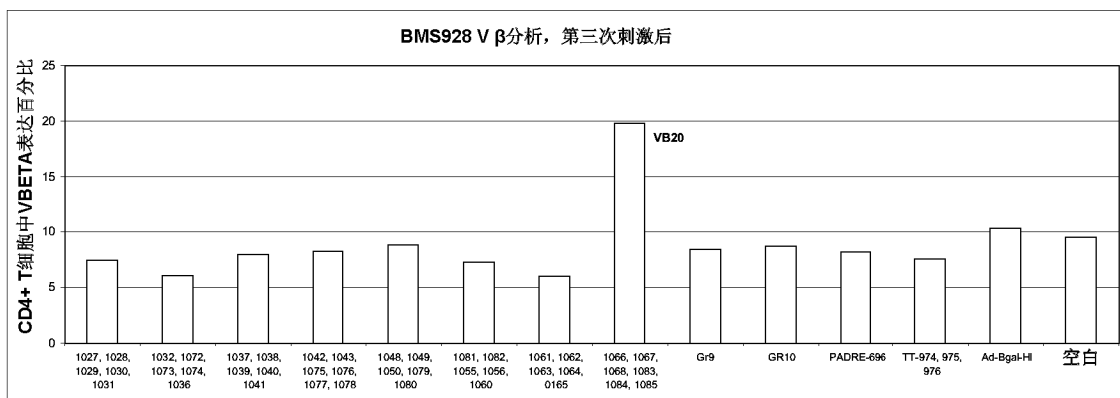


图 103

Campath-1H®分析：供体BMS200

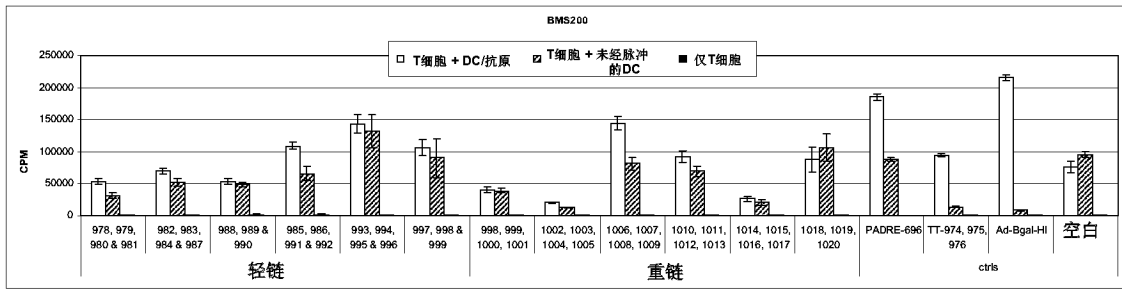


图 104A

Campath-1H®分析：供体BMS301

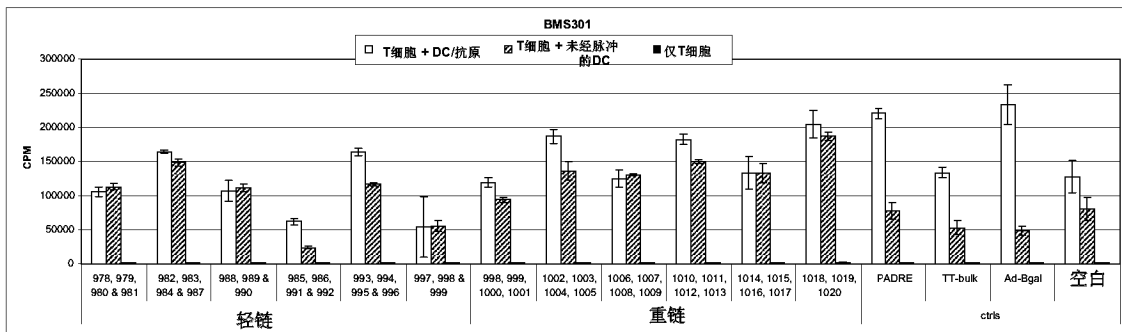


图 104B

Campath-1H®分析：供体BMS154

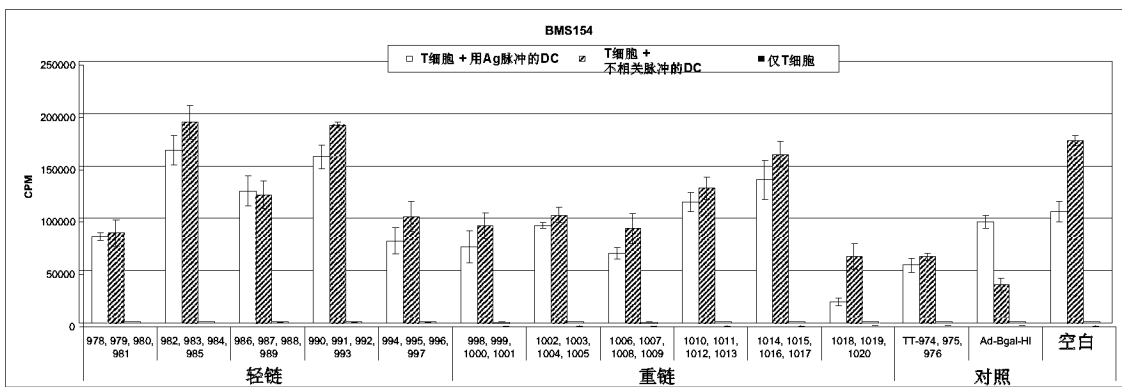


图 104C

Campath-1H®分析: 供体BMS484

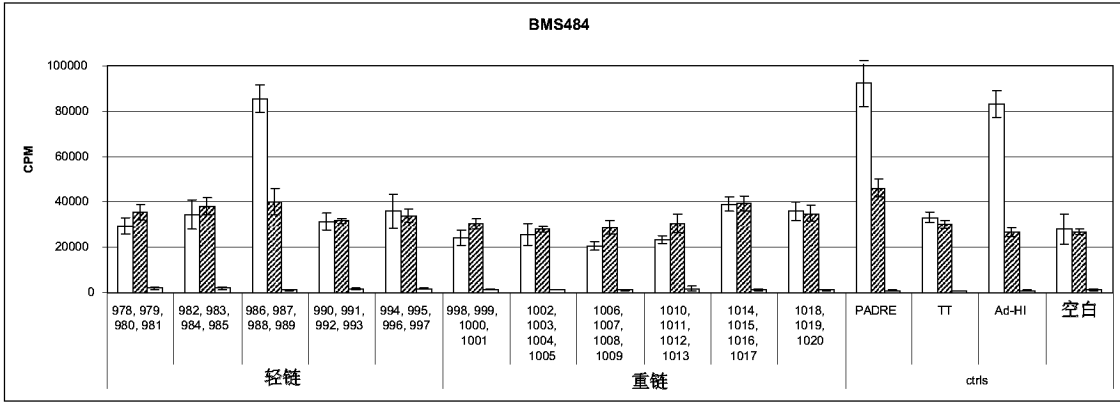


图 104D

Campath-1H®分析: 供体BMS362

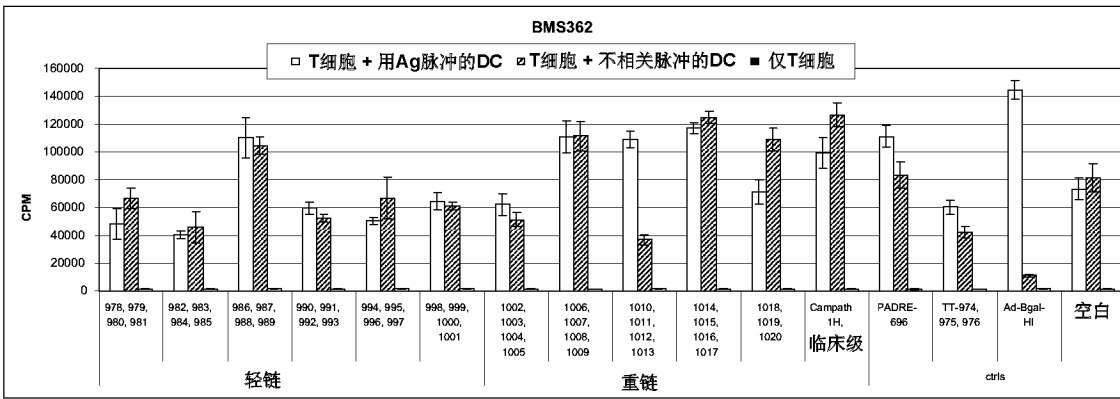


图 104E

Campath-1H®分析: 供体BMS486

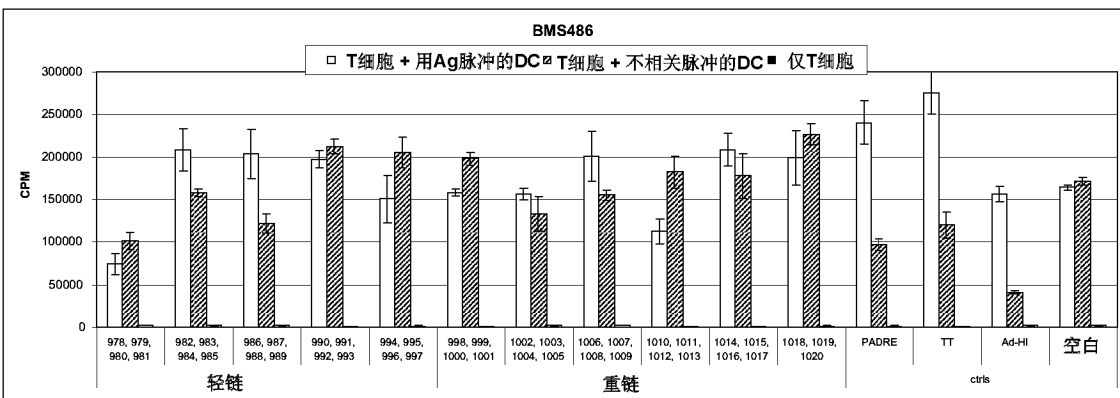


图 104F

Campath-1H®分析: 供体BMS150

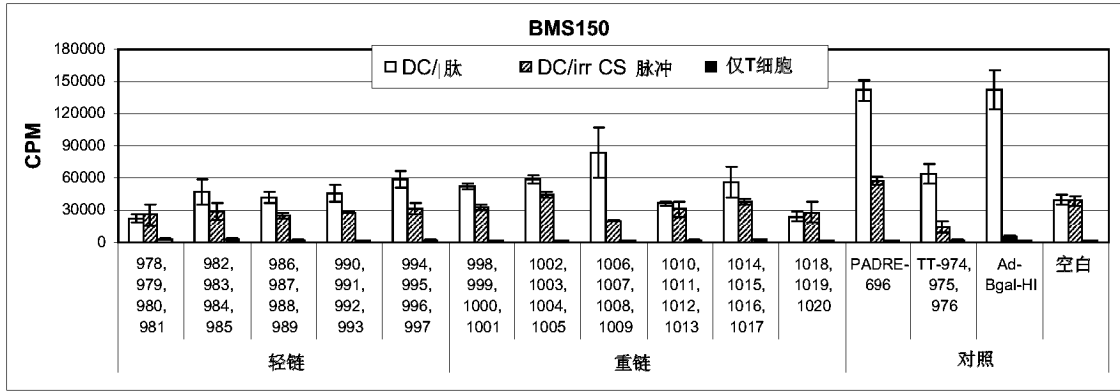


图 104G

Campath-1H®分析: 供体BMS167

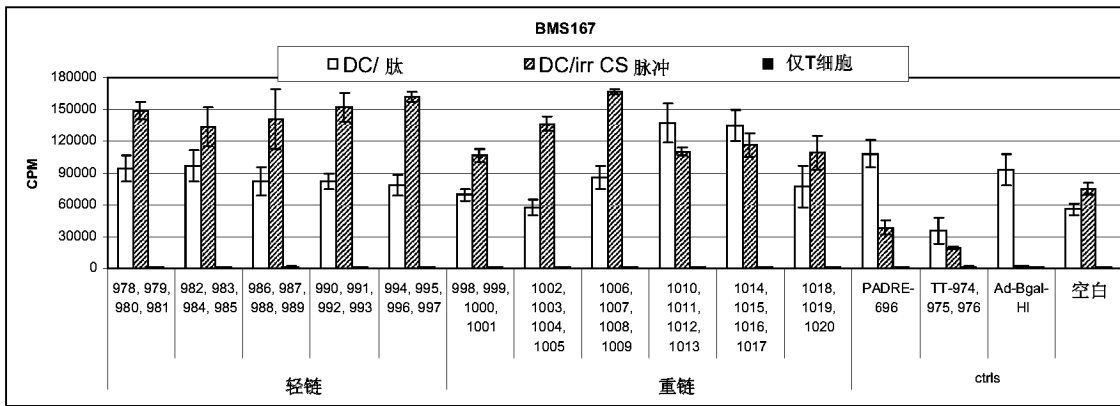


图 104H

Campath-1H®分析: 供体BMS170

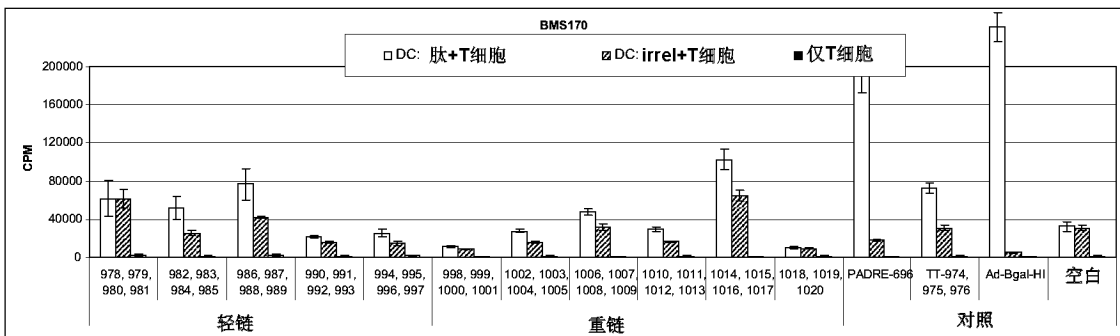


图 104I

Campath-1H®分析: 供体BMS352

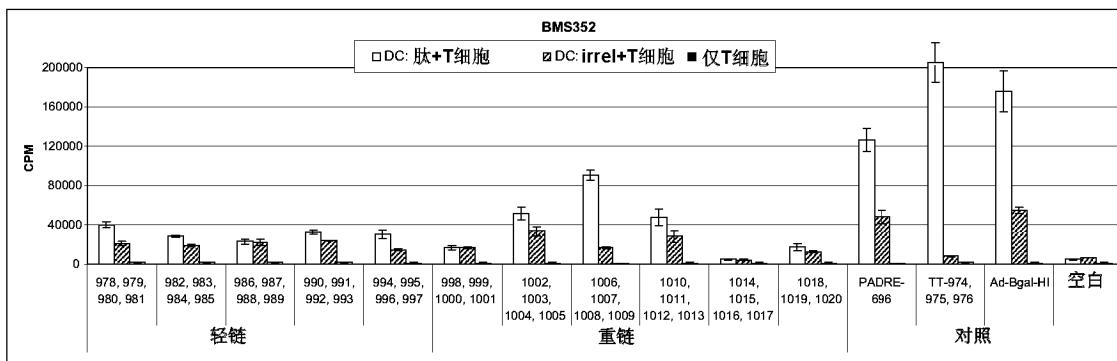


图 104J

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS484

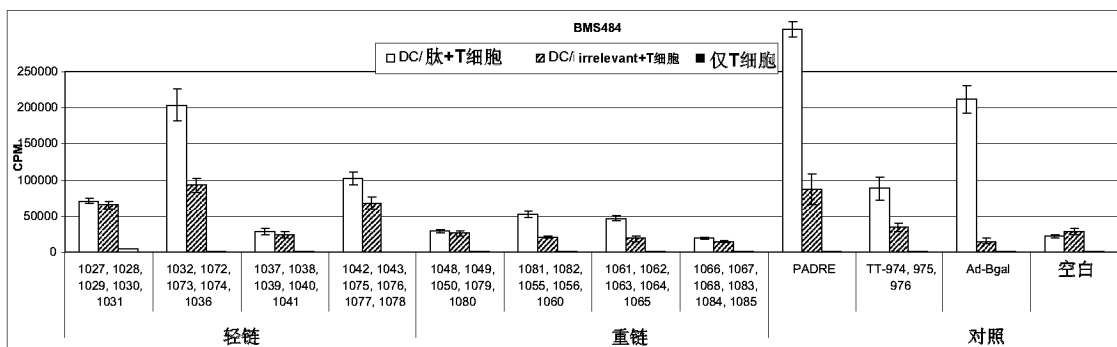


图 105A

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS486

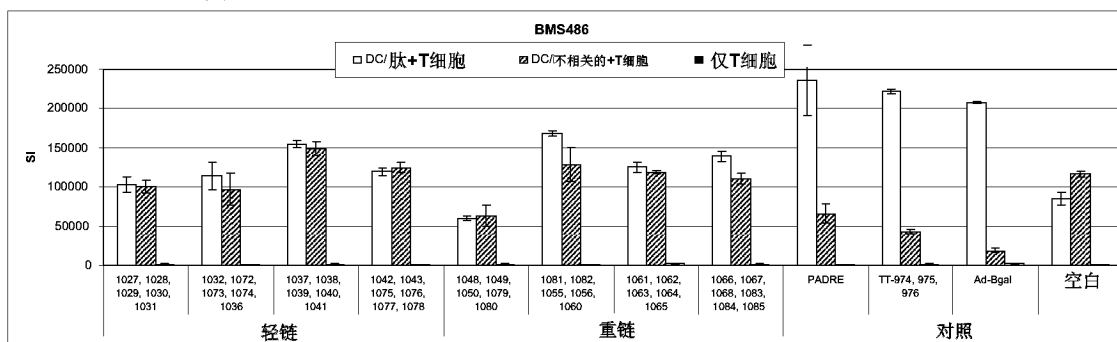


图 105B

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS656

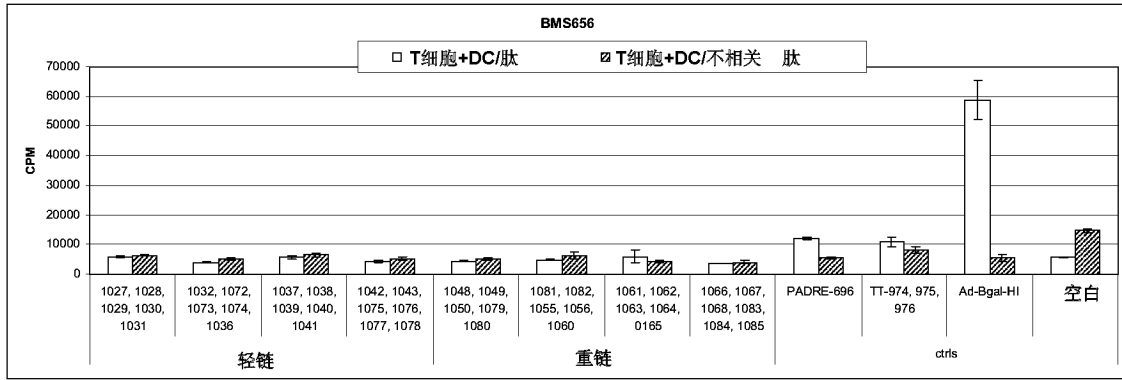


图 105C

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS640

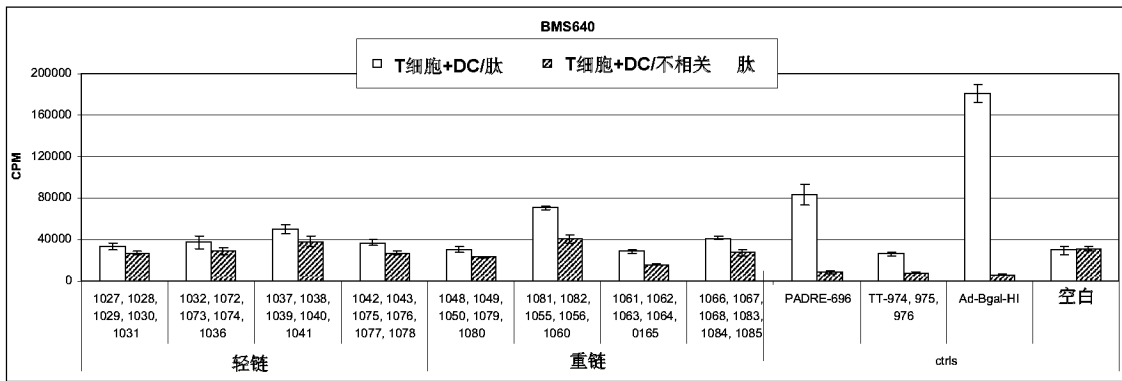


图 105D

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS361

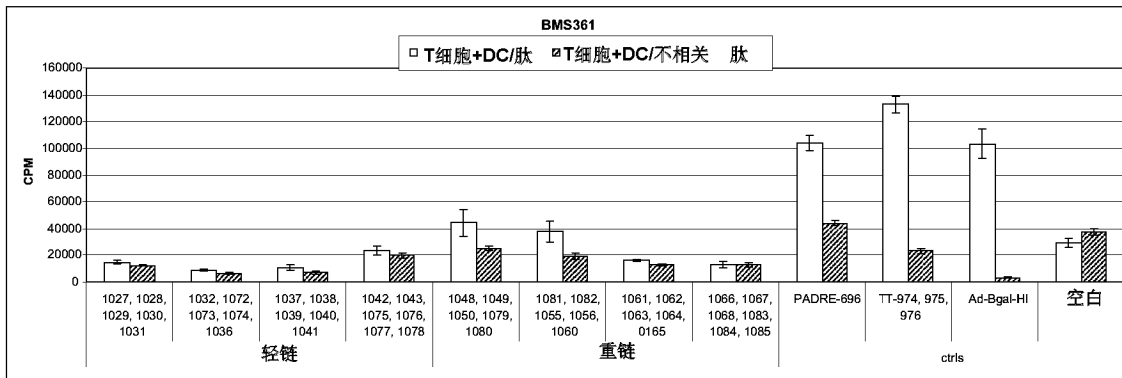


图 105E

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS165

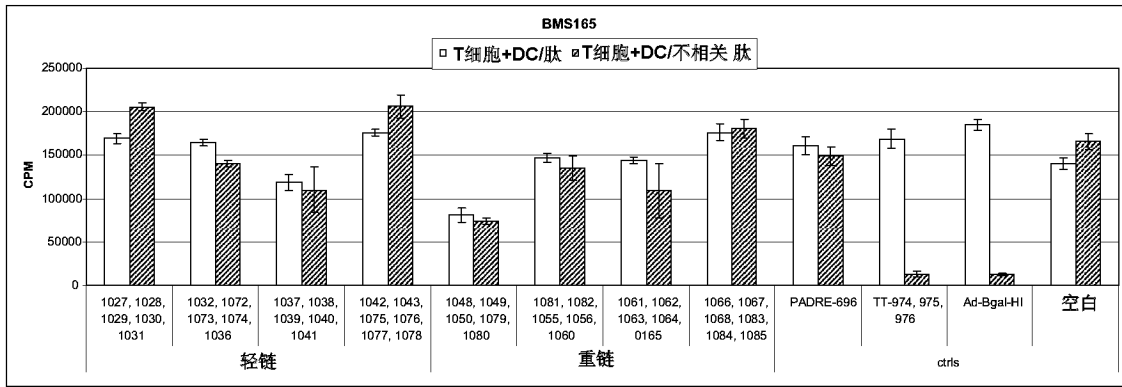


图 105F

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS902

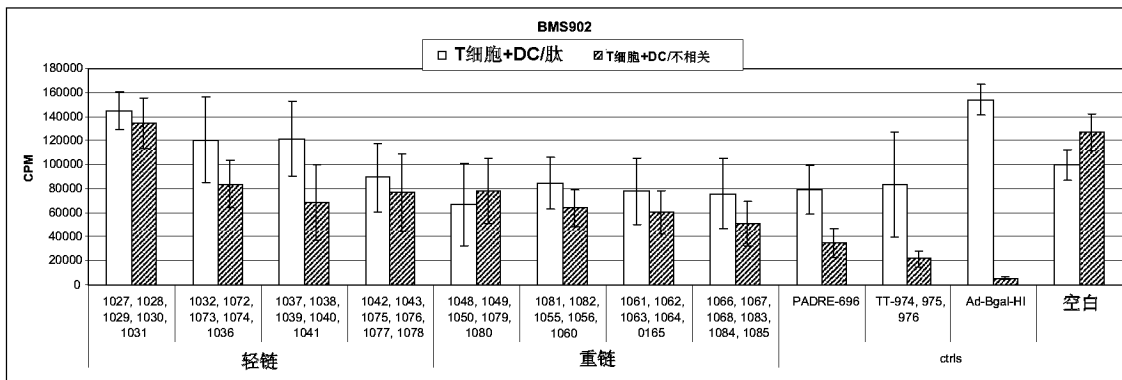


图 105G

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS928

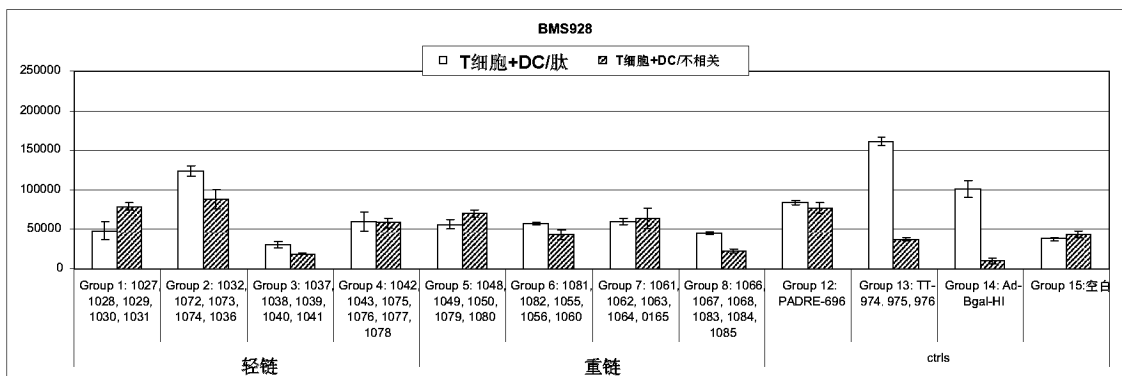


图 105H

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS927

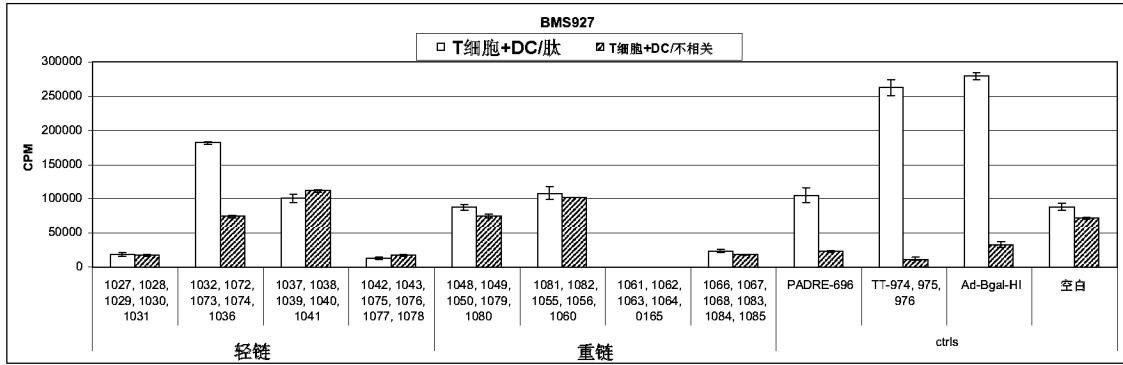


图 105I

12G6-SFD1/K12分析: 供体BMS963

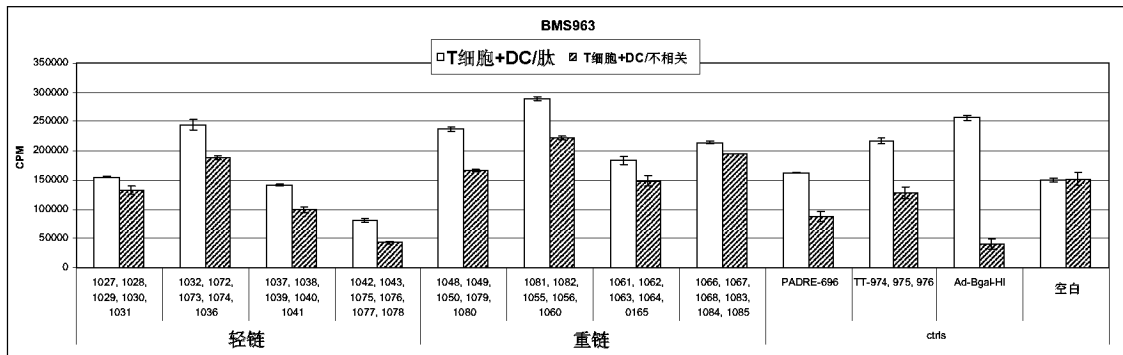


图 105J

人源化2C3克隆全长重链序列

2C3-SFD1

MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYWMNWV
 RQAPGKGLWVWGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAV
 YYCTPVDFWVGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVE
 PKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO: 272)

人源化2C3克隆全长轻链序列

2C3-K12

MEAPAQLLFLLLWLPDTTGDIVMTQTPLSLSVTPGPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNV
 LLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVVYCVQGHLL
 HTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 (SEQ ID NO: 273)

图 106

人源化7F11克隆全长重链序列

7F11-SFD1

MEAPAQLLFLLLLWLPDITTEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMSWV
 RQAPGKGLEWVGFIKANGYTTTEYNASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTA
 VYYCTRIYIFFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK (SEQ ID NO: 274)

人源化7F11克隆全长轻链序列

7F11-K2

MEAPAQLLFLLLLWLPDITTEGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHTNGNSYLH
 WYLQKPGQSPQLLIYMVSNRFSGVDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTH
 VPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
 ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC (SEQ ID NO: 275)

图 107

人源化9D9克隆全长重链序列

9D9-H16

MEAPAQLLFLLLLWLPDITTEGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWV
 RQAPGKLELVSEIRNKAKNHATYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV
 YYCTFLDSWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVE
 PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
 (SEQ ID NO: 276)

9D9-H18

MEAPAQLLFLLLLWLPDITTEGEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAWMDWV
 RQAPGKLELVAEIRNKAKNHATYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV
 YYCTFLDSWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKVE
 PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
 (SEQ ID NO: 277)

人源化9D9克隆全长轻链序列

9D9-K13

MEAPAQLLFLLLLWLPDITTEGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNW
 LLQKPGQSPQRLIYLSALDSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDVGVYYCWWQGTHTF
 PWITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
 EC (SEQ ID NO: 278)

图 108

人源化12G6克隆全长重链序列

12G6-SFD1

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPPSNYWMN
WVRQAPGKGLEWVGGQIRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE
DTAVYYCTPIDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNH
YTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 279)

人源化12G6克隆全长轻链序列

12G6-K12

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYL
NWWLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCVQ
GSHFHTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 280)

图 109

人源化4B10克隆全长重链序列

4B10-H1

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSW
VRQAPGKGLEWVGFIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTED
TAVYYCARYIWFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPK
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEAL
HNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 281)

人源化4B10克隆全长轻链序列

4B10-K1

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHTNGNTYL
HWYLQKPGQSPQLLIYMVSNRFGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQ
SAHVPLPLTFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 282)

图 110

人源化2C3克隆全长重链核酸序列

2C3-SFD1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GAGGTACAGCTGGTGGAGTCCGGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGA
GACTCTCTGTGCAGCTTCTGGATTCACTTTCAATACCTACTGGATGAACTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGACTTGAGTGGGTGGTCAAATTAGATTGAAATCTAAT
AATTATGCAACACATTATGCCGAGTCTGTGAAAGGGCGGTTACCACATCTCCAGAGA
TGATTCCAAAAACAGCCTCTATCTTCAAATGAATTCCTGAAAACTGAAGACACTGC
CGTTTATTACTGTACCCAGTTGACTTTTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTCTC
CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGTACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
TGGAACTCAGGGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGTCTCTACAGTCTCAGG
ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
TGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
TGACAAAACACACATGCCACCGTGCCTGCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGGT
GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTCACCCTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGAC
ATGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTACA
GCAAAGCTACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGGCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA
(SEQ ID NO: 283)

人源化2C3克隆全长轻链核酸序列

2C3-K12

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GACATTGTGATGACCCAGACTCCACTCAGTTTGTCAAGTACCCTGGACAACCAGC
CTCAATCTCTTGAAGTCAAGTCAAGAGCCTTTATATAGTAATGGAAAAACCTATTT
GAACTGGTTATTACAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCGCCTAATCTATCTGGTGT
CTAAATGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGAACAGAT
TTTACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCGT
GCAAGGTACACATCTGCACACGTTTCGGTCAAGGGACCAGGCTGGAGATAAAAACGAA
CTGTGGCAGACCAAGCGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCTG
CTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGTTCAACAGGGGAGAGT
GTTAG (SEQ ID NO: 284)

图 111

人源化7F11克隆全长重链核酸序列

7F11-SFD1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GAGGTACAGCTGGTGGAGTCGGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGA
GACTCTCTGTGCAGCTTCTGGCTTACATTACCGACTATTAATGAGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTTGTAGTGGGTGGGTTTCATAAGGAACAAGGGCTAA
CGGTTATAACAACCGAGTACAACGCTTCCGTTAAAGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG
ATGATTCCAAAAACAGCCTCTATCTTCAAATGAATTCCCTGAAAACTGAAGACTG
CCGTTTATTACTGTACCAGGTATATCTTTTTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCACTG
TCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCCTCAA
GAGCACCTCTGGGGGTACAGCGGCCCTGGGTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGG
TGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTA
CAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCAGCAGCTTGGGCACC
GAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAG
CCCAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCACCGTCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGA
CCGTGAGTCTTCTTCTCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAAGTTCAAATGTTACGTG
GACGCGGTGGAGGTGATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAAGCTCACCCTGCTGACCAGGACTGGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCAAACAAGCCCTCCAGCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGC
AGCCCGGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
GTCAGCTGACATGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT
GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG
GTAATGA (SEQ ID NO: 285)

人源化7F11克隆全长轻链核酸序列

7F11-K2

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GATATTGTAATGACCCAAACACCCCTCTCTTTTCAGTCACACCTGGACAGCCAGCG
TCCATCTCTGCAGGTCTCACAGAGTCTCGTGCACACCAATGGCAATTCTTACCTG
CATTGGTACCTGCAGAAGCCCGGGCAGAGCCCCAGTTGCTGATCTATATGGTGT
TAATCGGTTCTCCGGAGTCCCCGACAGATTTTCTGGTTCAGGGTCTGGAAGTGAAT
TACACTGAAGATTAGTCGGTTCGAGGCCGAGGATGTAGGCGTGTATTACTGCTCAC
AAAGCACACATGTCCGTTCACTTTCCGGCAAGGAACAAGCTCGAAATCAAGCGAA
CTGTGGCAGCACCAAGCGTCTTCTATCTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC
CTCTGTTGTGTGCTGTAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGAT
AACGCCCTCAAATCGGGTAACTCCAGGAGGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCAACCATCAGGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT
GTTAG (SEQ ID NO: 286)

图 112

人源化9D9克隆全长重链核酸序列

9D9-H16

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGAGAG
 GTACAGCTTCTTGAAGTGGAGGTGGCCTTGTCCAACCCGGAGGGTCATTGCGGTTGAG
 CTGTGCGGCAAGTGGCTTACCTTCTCTGACGCTTGGATGGACTGGGTGAGACAAAGCCC
 CCGGTAAGGGACTGGAGTTGGTTTCTGAAATCAGGAACAAGGCCAAGAACCATGCAAC
 ATATTATGCCGAAAGTGTGAAGGGAAGGTTCAACAATCAGTAGAGATAACAGCAAGAACA
 CACTGTACCTCCAGATGAACAGCCTCAGAGCTGAGGACACCCGCGTCTATTATTGTACC
 ACTCTCGATTCAATGGGGGACGGGTACCACCGTTACAGTCAGCAGCGCCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGTACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG
 GCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCGTGCCAGCAC
 CTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCT
 CCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAAACCCCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
 CAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAAT
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
 GTACGCTGACATGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTCTTCTCTCT
 TACAGCAAGCTACCCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ
 ID NO: 287)

9D9-H18

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGAGAG
 GTACAGCTTCTTGAAGTGGAGGTGGCCTTGTCCAACCCGGAGGGTCATTGCGGTTGAG
 CTGTGCGGCAAGTGGCTTACCTTCTCTGACGCTTGGATGGACTGGGTGAGACAAAGCCC
 CCGGTAAGGGACTGGAGTTGGTTGTGAAATCAGGAACAAGGCCAAGAACCATGCAAC
 ATATTATGCCGAAAGTGTGAAGGGAAGGTTCAACAATCAGTAGAGATAACAGCAAGAACA
 CACTGTACCTCCAGATGAACAGCCTCAGAGCTGAGGACACCCGCGTCTATTATTGTACC
 ACTCTCGATTCAATGGGGGACGGGTACCACCGTTACAGTCAGCAGCGCCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGTCTTCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGTACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG
 GCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCA
 AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCGTGCCAGCAC
 CTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCT
 CCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAAACCCCTGAGGTCAAGTTC
 AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
 CAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAAT
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG
 GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG
 GTACGCTGACATGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAAT
 GGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTCTTCTCTCT
 TACAGCAAGCTACCCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ
 ID NO: 288)

图 113

人源化9D9克隆全长轻链核酸序列

9D9-K13

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
 GATATCGTGATGACAAAACTCCCTGTCTGTCTGTAACCTCAGGTCAGCCCGC
 GAGTATTTCAATGTAAGAGCAGCCAATCCCTGCTGGACAGCGGGAAGACCTACC
 TGAACCTGGTTACTCCAAAAGCCAGGACAAAAGTCCCAACGCCTTATTTACCTGGTGT
 CAGCCCTGGACTCTGGCGTGCCCGATCGATTTAGCGGCAGCGGGAGTGGCACAGAT
 TTCACCTGAAAATATCCCGCTCGAGGCCGAAGATGTGGGCGTGTACTACTGCTG
 GCAGGGCACACATTTCCCTGGACATTTGGTCAAGGGGACAAAAGCTGGAATTAAC
 GAACTGTGGCAGCACCAAGCGTCTTCTTCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC
 TGCTCTGTGTGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTG
 GATAACGCCCTCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGGCAG
 CACTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAGTCTA
 CGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG
 AGTGTAG (SEQ ID NO: 289)

图 114

人源化12G6克隆全长重链核酸序列

12G6-SFD1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
 GAGGTACAGCTGGTGGAGTCGGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGTTCTCTGA
 GACTCTCTGTGCAGCTTCTGGATTCCCATTCACTAAGTACTGGATGAACTGGGTCC
 GCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTTGAGTGGGTGGGTCAAATTAGATTGAAATCTAAT
 AATTATGCAACACATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGCGGTTACCATCTCCAGAGA
 TGATTCCAAAAACAGCCTCTATCTTCAAATGAATTCCCTGAAAACTGAAGACACTGC
 CGTTTATTACTGTACCCCAATTGACTATTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTCTC
 CTCAGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTG
 GGGGTACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTG
 TGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGG
 ACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
 CTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG
 TGACAAAATCACACATGCCACCGTGCACAGCCTGAACTCTGGGGGACCGTCAGTCTT
 CCTTCTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGT
 GGTGGTGGACGTGAGCCAGAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
 AGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCTCACCCTGCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCC
 AACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGAC
 ATGCTGTGTAAGGTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
 CGGAGAACAATAAGACCAAGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACA
 GCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
 (SEQ ID NO: 290)

人源化12G6克隆全长轻链核酸序列

12G6-K12

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
 GACATTTGTGATGACCCAGACTCCACTCAGTTTGTGAGTACCCCTGGGCAACCAGC
 CTCTATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTATTT
 GAACCTGGGTTTTACAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCGCTAATCTATCTGGTGT
 CTAAGTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCTCTGGCAGTGGATCAGGAACAGAT
 TTTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCGT
 GCAAGGTTACATTTTACACGTTCCGGTCAAGGGACCAAGCTGGAGATTAACGAAC
 TGTGGCAGCACCAAGCGTCTTCTATCTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTG
 TCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA
 ACGCCCTCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC
 TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCC
 TGGAAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
 TTAG (SEQ ID NO: 291)

图 115

人源化4B10克隆全长重链核酸序列

4B10-H1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GAGGTACAGCTGGTGGAGTCCGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGTTCTCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTACCTTTTCTGATTACTACATGAGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTTGTAGTGGGTGGGTTTTATTAGAAAACAAAGCTAAT
GGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGA
TGATTCCAAAAACAGCCTCTATCTTCAAATGAATTCCCTGAAAACTGAAGACACTGC
CGTTTATTACTGTGCAAGATATATCTGGTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTGT
CACAGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCTCCAAG
AGCACCTCTGGGGGTACAGCGGCCCTGGGCTGCCGTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGT
GACGGTGTCTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACTTCCCGGTGTCTAC
AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCTGGTACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC
CCAAATCTGTGACAAAACACACATGCCACCGTCCCAGCACCTGAATCTCTGGGGGAC
CGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG
TCACATGCGTGGTGGAGTGCAGTACGAAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTAC
CGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTGCTGACCAAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGT
CAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAAACAGG
TCAGCCTGACATGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCCTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGACGCCGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCT
TCCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGACCTCTCCCTGTCTCCGGTA
AATGA (SEQ ID NO: 292)

人源化4B10克隆全长轻链核酸序列

4B10-K1

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCTGATACCACCGGA
GACATTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGTCTGTCACTCCTGGACAACCAAGCC
TCCATCTCTTGCAGATCTAGTACAGCCTTGTACACACTAATGGAAAACACCTATTTA
CATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATTTATATGGTTTCC
AACCAGTTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT
CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGTCTC
AAAGTGCACATGTTCTCCGCTCACGTTCCGGTCAAGGGACCAAGGCTGGAGATTA
CGAACTGTGGCAGCACCAAGCGTCTCATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACA
GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCT
ACGCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGA
GAGTGTAG (SEQ ID NO: 293)

图 116