



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1902231 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 200480039946. 3

(22) 申请日 2004. 11. 05

(30) 优先权数据

60/517, 096 2003. 11. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2006. 07. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2004/003896 2004. 11. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02005/044859 EN 2005. 05. 19

(73) 专利权人 罗氏格黎卡特股份公司

地址 瑞士施利伦 - 苏黎士

(72) 发明人 P · 乌马纳 P · 布伦克尔

C · 费拉拉 T · 苏特 U · 蓬特纳

E · 默斯纳

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03011878 A2, 2003. 02. 13, 全文.

审查员 吴永庆

权利要求书2页 说明书51页

序列表36页 附图26页

(54) 发明名称

具有增加的 Fc 受体结合亲和性和效应子功能的 CD20 抗体

(57) 摘要

本发明涉及抗原结合分子 (ABMs)。在特定的实施方案中,本发明涉及重组单克隆抗体,其包括特异于人 CD20 的嵌合的、primatized 或人源化的抗体。此外,本发明涉及编码这些 ABMs 的核酸分子,和包括这些核酸分子的载体和宿主细胞。本发明还涉及用于产生本发明的 ABMs 的方法,并且涉及使用这些 ABMs 治疗疾病的方法。此外,本发明涉及具有修饰的糖基化的 ABMs,所述 ABMs 具有改善的治疗性质,包括具有增加的 Fc 受体结合和增加的效应子功能的抗体。

1. 一种人源化的 Fc-糖改造的 II 型抗-CD20 抗体,其包含

i)SEQ ID NO:32 或 40 的重链可变区;

ii)SEQ ID NO:76 的轻链可变区,

其中作为所述 Fc-糖改造的结果,所述抗体具有增加的 ADCC,其中 Fc 区具有增加比例的等分的、非岩藻糖化的寡糖。

2. 按照权利要求 1 的抗体,其中所述重链可变区包含分别由 SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:26 和 SEQ ID NO:28 表示的 B-Ly1 的重链 CDR1, CDR2 和 CDR3。

3. 按照权利要求 1-2 任一项的抗体,其中所述抗体已经被 Fc-糖改造以与未进行 Fc-糖改造的抗体相比使 Fc 区的等分的复合寡糖的量增加。

4. 按照权利要求 1-2 任一项的抗体,其中所述抗体已经被 Fc-糖改造以与未进行 Fc-糖改造的抗体相比使 Fc 区的岩藻糖残基的量减少。

5. 按照权利要求 1 的抗体,其中所述重链可变区是 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列。

6. 按照权利要求 1-2 任一项的抗体,其中所述重链可变区是 SEQ ID NO:40 的序列,所述轻链可变区是 SDQ ID NO:76 的序列。

7. 按照权利要求 1 的抗体,其中所述抗体已经被糖改造以与未进行糖改造的抗体相比,在 Fc 区具有减少量的岩藻糖残基。

8. 按照权利要求 1 的抗体,其中所述多肽 Fc 区中至少 20%的寡糖是等分的,非岩藻糖基化的。

9. 按照权利要求 1 的抗体,其中在所述 Fc 区域中至少 50%的寡糖是非岩藻糖基化的。

10. 按照权利要求 1-2 任一项的抗体,其中作为所述糖改造的结果,所述抗体表现出增加的 Fc 受体结合亲和性。

11. 按照权利要求 10 的抗体,其中所述 Fc 受体是 Fc γ RIIIA 受体。

12. 按照权利要求 1-2 任一项的抗体,其中作为所述糖改造的结果,所述抗体表现出增加的效应子功能。

13. 按照权利要求 12 的抗体,其中所述增加的效应子功能是增加的定向信号传导诱导的程序性细胞死亡。

14. 按照权利要求 1-2 任一项的抗体,其中所述抗体是完整的抗体。

15. 一种宿主细胞,其以一定量表达至少一种编码具有 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III 活性的多肽的核酸,所述量足以糖改造由所述宿主细胞产生的抗体的 Fc 区域,其中所述抗体是权利要求 1-14 任一项的定义的抗体。

16. 按照权利要求 15 的宿主细胞,其中作为所述改造的结果,由所述宿主细胞产生的所述抗体显示增加的 Fc 受体结合亲和性。

17. 按照权利要求 16 的宿主细胞,其中所述 Fc 受体是 Fc γ RIIIA 受体。

18. 按照权利要求 15 的宿主细胞,其中由所述宿主细胞产生的所述抗体显示作为所述改造的结果的增加的效应子功能。

19. 按照权利要求 18 的宿主细胞,其中所述增加的效应子功能是增加的定向信号传导诱导的程序性细胞死亡。

20. 按照权利要求 15 的宿主细胞,其还包括至少一种编码按照权利要求 1-5 任一项的抗体的被转染的多核苷酸,并且其中所述核酸包括编码一个区域的序列,所述区域等价于

人免疫球蛋白的 Fc 区域。

21. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求 1-14 任一项的抗体。

22. 一种表达载体,其包括按照权利要求 21 的多核苷酸。

23. 宿主细胞,其包含权利要求 21 的分离的多核苷酸。

24. 按照权利要求 1-14 任一项的抗体在制备通过 B 细胞消减来治疗的病症的药物中的应用。

25. 按照权利要求 24 的抗体的应用,其中所述疾病是血液学恶性肿瘤或自体免疫疾病。

26. 按照权利要求 25 的抗体的应用,其中所述血液学恶性肿瘤是 B 细胞淋巴瘤,非霍奇金氏淋巴瘤或 B 细胞慢性淋巴细胞白血病。

27. 按照权利要求 25 的抗体的应用,其中所述自体免疫疾病是类风湿性关节炎或狼疮。

28. 一种用于在宿主细胞中产生具有 Fc 区的抗 -CD20 抗体的方法,所述 Fc 区具有修饰的寡糖并被改造以具有增加的效应子功能,所述方法包括:

a. 在容许所述抗体产生,并容许对存在于所述抗体的 Fc 区域上的寡糖进行修饰以使所述 Fc 区具有增加比例的等分、非岩藻糖化的寡糖的条件下,培养宿主细胞,所述宿主细胞被进行改造从而表达编码具有 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III 活性的多肽的至少一种核酸;和

b. 分离所述抗体,其中所述抗体是融合蛋白,所述融合蛋白具有重链可变区序列 SEQ ID No :32 或 SEQ ID No :40,和轻链可变区序列 SEQ ID NO :76。

29. 按照权利要求 28 的方法,其中所述修饰的寡糖与未修饰的寡糖相比,具有减少的岩藻糖基化。

30. 按照权利要求 28 的方法,其中由所述宿主细胞产生的所述抗体在所述多肽的 Fc 区域中具有增加的比例的等分的、非岩藻糖基化的寡糖。

31. 一种药物组合物,其包括按照权利要求 1-14 任一项的抗体,和药用载体。

32. 生产特异性结合人 CD20 的抗体的方法,包括:

i) 在允许编码所述抗体的多核苷酸表达的条件下在培养基中培养权利要求 15-20 任一项的宿主细胞;和

ii) 从所得到的培养物中回收所述抗体。

具有增加的 Fc 受体结合亲和性和效应子功能的 CD20 抗体

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本发明涉及抗原结合分子 (ABMs)。在特别的实施方案中,本发明涉及重组单克隆抗体,包括特异于人 CD20 的嵌合的, primatized 或人源化的抗体。此外,本发明涉及编码这些 ABMs 的核酸分子,和包括这些核酸分子的载体和宿主细胞。本发明还涉及产生本发明的 ABMs 的方法,和将这些 ABMs 用在治疗疾病中的方法。此外,本发明涉及具有修饰的糖基化作用和具有改善的治疗特性的 ABMs,包括具有增加的 Fc 受体结合和增加的效应子功能的抗体。

[0003] 背景领域

[0004] 免疫系统和抗 -CD20 抗体

[0005] 包括人的脊椎动物的免疫系统,由许多器官和细胞类型组成,它们逐渐发展到准确和特异性识别,结合和破坏入侵的异种微生物 (“抗原”)。淋巴细胞对于免疫系统的正确功能是关键。这些细胞在胸腺,脾和骨髓 (成人) 中产生并且代表了在成人循环系统中存在的全部白血细胞的约 30%。存在淋巴细胞的两个主要的亚群:T 细胞和 B 细胞。T 细胞对细胞介导的免疫负责,而 B 细胞对抗体产生 (体液免疫) 负责。然而,在典型的免疫应答中,T 细胞和 B 细胞相互依赖地发挥作用:当 T 细胞受体与抗原片段结合时,T 细胞被激活,所述抗原片段与在抗原呈递细胞表面上的主要组织相容性复合物 (“MHS”) 糖蛋白结合;这种激活导致生物介质 (“白介素”) 的释放,其刺激 B 细胞分化和产生针对抗原的抗体 (“免疫球蛋白”)。

[0006] 在宿主中的每种 B 细胞表达一种特定类型和特异性的抗体,并且不同的 B 细胞表达特异于不同抗原的抗体。B 细胞增殖和抗体产生作为对异源抗原的反应而强化 (spike), 并且一旦异源抗原已经被中和,两者典型地停止 (或相当大地减少)。然而,有时候,特定 B 细胞增殖将持续不减弱;这种增殖可以导致被称为 “B 细胞淋巴瘤” 的癌症。

[0007] T 细胞和 B 细胞都包括细胞表面蛋白,其可以被用作用于分化和鉴定的 “标志物”。一种这样的人 B 细胞标志物是人 B 淋巴细胞 - 局限性分化抗原 Bp35,其被称为 “CD20”。CD20 在早期前 B 细胞发展中表达并且保持到血浆细胞分化。特异性地,CD20 分子可以调节在激活过程中的步骤,所述激活过程是细胞周期起始和分化所必需的,并且通常在肿瘤性转化 (“肿瘤”) B 细胞上以非常高的水平表达。因为 CD20 在 “恶性” B 细胞,即那些未减弱的增殖会导致 B 细胞淋巴瘤的 B 细胞上以高水平存在,CD20 表面抗原具有充当 “靶向” B 细胞淋巴瘤的候选物的潜能。

[0008] 本质上,这些靶向可以如下进行概括:例如,通过注射将特异于 B 细胞的 CD20 表面抗原的抗体引入患者。这些抗 -CD20 抗体特异性地结合正常和恶性 B 细胞两者 (表面上) 的 CD20 细胞表面抗原;与 CD20 表面抗原结合的抗 -CD20 抗体可以导致肿瘤性转化 B 细胞的破坏和减少。此外,具有破坏肿瘤的潜能的化学试剂或放射性标记可以与抗 -CD20 抗体缀合从而使该试剂特异性地 “递送” 给,例如肿瘤性转化 B 细胞。无论方法如何,主要的目

的是破坏肿瘤:具体的方法可以通过所用的具体的抗-CD20 抗体来确定,并因此靶向 CD20 抗原的可获得的方法可以相当大地改变。

[0009] 未缀合的单克隆抗体 (mAbs) 可以是用于治疗癌症的药,如由美国食品和药物管理局 (U.S. Food and Drug Administration) 所批准的下列药物所证明:用于治疗 CD20 阳性 B 细胞,低级或滤泡性非霍奇金氏淋巴瘤的利妥昔单抗 (RituxanTM; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, 和 Genentech Inc., San Francisco, CA), 用于治疗晚期乳腺癌 (Grillo-Lopez, A.-J., et al., Semin. Oncol. 26 :66-73(1999) ;Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21 :309-18(1999)) 的曲妥单抗 (HerceptinTM; Genentech Inc.), 用于治疗复发性急性骨髓白血病的吉姆单抗 (MylotargTM, Celltech/Wyeth-Ayerst), 和用于治疗 B 细胞慢性淋巴细胞白血病的阿仑单抗 (CAMPATHTM, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG)。这些产品的成功不仅依赖于它们的功效,还依赖于它们突出的安全模式 (Grillo-Lopez, A.-J., et al., Semin. Oncol. 26 :66-73(1999) ;Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21 :309-18(1999))。尽管在这些药物上所取得的成就,目前在获得更高特异性抗体活性中存在巨大的目标,所述特异性活性比典型地由未缀合的 mAb 疗法所提供的要高。鼠单克隆抗体, B-Ly1, 是另一种已知特异于人 CD20 的抗体 (Poppema, S. 和 Visser, L., Biotest Bulletin 3 :131-139(1987))。

[0010] 许多研究的结果显示 Fc- 受体依赖性机制相当大地有利于对针对肿瘤的细胞毒性抗体的作用,并且指示针对肿瘤的最佳抗体将优先结合激活 Fc 受体,并且与抑制性配偶体 Fc γ RIIB 结合程度最小 (Clynes, R. A., et al., Nature Medicine 6(4) : 443-446(2000) ;Kalergis, A. M., 和 Ravetch, J. V., J. Exp. Med. 195(12) :1653-1659(June 2002)。例如,至少一项研究的结果显示 Fc γ RIIa 受体特别地与抗体疗法的功效紧密相关 (Cartron, G., et al., Blood 99(3) :754-757(February 2002))。该研究显示对于 Fc γ RIIa 是纯合的患者,与对于 Fc γ RIIa 是杂合的患者相比,具有更好的针对利妥昔单抗的应答。作者得出结论为更优的应答是由于抗体与 Fc γ RIIa 的更好的体内结合,其导致了针对淋巴瘤细胞的更好的 ADCC 活性 (Cartron, G., et al., Blood 99(3) :754-757(February 2002))。

[0011] 已经报道了对靶向 CD20 表面抗原的各种尝试。据报道,鼠(小鼠)单克隆抗体 1F5(抗-CD20 抗体)通过持续的静脉内输注被施用给 B 细胞淋巴瘤患者。据报道,需要极高水平(> 2 克)的 1F5 来减少循环的肿瘤细胞,并且该结果被描述为“瞬时的”。Press et al., " Monoclonal Antibody 1F5(Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas. " Blood 69/2 :584-591(1987)。关于该方法的潜在问题是非人单克隆抗体(即,鼠单克隆抗体)典型地缺乏人效应子功能度,即它们不能,特别是通过抗体依赖性细胞毒性或 Fc- 受体介导的吞噬作用来介导补体依赖性的裂解或溶解人靶标细胞。此外,非人单克隆抗体可以被宿主识别为异源蛋白质;因此重复注射这些异源抗体可以导致免疫应答的诱导,其导致有害的过敏反应。对于基于鼠的单克隆抗体,这经常被称为人抗小鼠抗体应答,或“HAMA”应答。此外,这些“异源”抗体可以被宿主的免疫系统所攻击从而使它们,在达到它们的靶位点前被有效地中和。

[0012] 报道的提高鼠单克隆抗体有效治疗 B 细胞疾病的能力的另一种方法是将放射性标记或毒素与抗体结合从而使标记或毒素位于肿瘤位点。例如,上述 1F5 抗体已

经用碘-131(^{131}I)进行标记,并且据报道进行了在两个患者中关于生物分布的评价。见 Eary, J.F. et al., "Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" J.Nuc. Med. 31/8:1257-1268(1990); 还见, Press, O.W. et al., "Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1(Anti-CD37)Antibody" J.Clin. Onc. 7/8:1027-1038(1989)(指示用 ^{131}I -标记的 IF-5 处理的一个患者获得了“部分应答”); Goldenberg, D.M. et al., "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody" J.Clin. Onc. 9/4:548-564(1991)(据报道接受多次注射的 8 个患者中有 3 个已经发展了 HAMA 应答); Appelbaum, F.R. "Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma" Hem./Onc.Clinics of N.A. 5/5:1013-1025(1991)(综述文章); Press, O.W. et al. "Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support." New England J. Med. 329/17:1219-12223(1993)(碘-131 标记的抗-CD20 抗体 IF5 和 B1); 和 Kaminski, M.G. et al. "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with ^{131}I Anti-B1(Anti-CD20)Antibody". New England J. Med. 329/7(1993)(碘-131 标记的抗-CD20 抗体 B1; 下文“Kaminski”)。毒素(即,化疗试剂诸如多柔比星或丝裂霉素 C)也与抗体缀合。见,例如, PCT 公布的申请 W092/07466(公布于 1992 年 5 月 14 日)。

[0013] 已经将包括来自两种或更多种不同物种(例如,小鼠和人)的抗体的部分的嵌合抗体发展为“缀合”抗体的备选。例如, Liu, A.Y. et al., "Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity" J. Immun. 139/10:3521-3526(1987), 描述了定向针对 CD20 抗原的小鼠/人嵌合抗体。还见, PCT 出版号 W0 88/04936。例如,已经批准将利妥昔单抗(RITUXAN®),一种嵌合的抗-CD20 抗体用于治疗非霍奇金氏淋巴瘤。

[0014] 假定 CD20 由 B 细胞淋巴瘤表达,这种抗原可以充当“靶向”这些淋巴瘤的候选物。本质上,这种靶向可以如下进行归纳:将特异于 B 细胞上 CD20 表面抗原的抗体施用于患者。这些抗-CD20 抗体特异性地结合于正常和恶性 B 细胞两者(表面上)的 CD20 抗原,并且结合在细胞表面上的 CD20 的抗体导致了肿瘤发生 B 细胞的破坏和减少。此外,化学试剂,细胞毒素或放射性试剂可以直接或间接连接于抗-CD20 抗体从而使该试剂选择性地“递送”给 CD20 抗原表达 B 细胞。关于这两种方法,主要的目标都是破坏肿瘤。该特异性的方法将取决于所用的特定抗-CD20 抗体。因此,显而易见的是靶向 CD20 抗原的各种方法可以相当大地变化。

[0015] 该利妥昔单抗(RITUXAN®)抗体是遗传改造的嵌合人 $\gamma 1$ 鼠恒定结构域,所述结构域包含定向针对人 CD20 抗原的单克隆抗体。该嵌合抗体包含人 $\gamma 1$ 不变结构域并在美国专利号 5,736,137(Andersen et. al.)中以名称“C2B8”进行鉴别,所述专利在 1998 年 4 月 17 日被授权,并被转让给 IDEC Pharmaceuticals Corporation。RITUXAN®被批准用于治疗具有复发性或折射性低级或滤泡性, CD20 阳性, B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤的患者。体外的作用机制研究已经显示 RITUXAN®展示了人补体依赖性细胞毒性(CDC)(Reff et. al, Blood 83(2):435-445(1994))。此外,其显示了测量抗体依赖性细胞的细胞

毒性 (ADCC) 的测定中的明显活性。RITUXAN® 已经显示具有在胸苷结合测定中的抗增殖活性和直接诱导程序性细胞死亡的有限能力,而 CD20 抗体则没有显示 (Maloney et al., Blood 88(10):637a(1996))。

[0016] 抗体糖基化

[0017] 寡糖成分可以显著地影响与治疗性糖蛋白的功效有关的特性,包括物理稳定性,对蛋白酶攻击的抗性,与免疫系统的相互作用,药物代谢动力学,和特异性生物活性。这些特性可以不仅依赖于寡糖的存在或缺乏,还依赖于寡糖的特异性结构。可以在寡糖结构和糖蛋白功能之间进行一些总结。例如,某些寡糖结构通过与特异性糖结合蛋白相互作用介导糖蛋白从血流中快速清除,而其它的可以被抗体结合并且触发不需要的免疫反应。(Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81(1996))。

[0018] 哺乳动物细胞是用于产生治疗性糖蛋白的优选宿主,由于它们具有以对于人应用的最相容的形式使蛋白质糖基化的能力。(Cumming et al., Glycobiology 1:115-30(1991); Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81(1996))。细菌极少使蛋白质糖基化,并且类似的其它类型的常见宿主,诸如酵母,丝状真菌,昆虫和植物细胞,产生糖基化模式,所述糖基化模式与从血流中快速清除,不理想的免疫相互作用有关,并且在一些特别的情形中,减少生物学活性。在哺乳动物细胞中,中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞是过去的 20 年间最常用的细胞。除了给出适合的糖基化模式之外,这些细胞容许持续的产生遗传稳定性,高生产性的克隆细胞系。使用无血清培养基,它们可以在简单生物反应器中被培养到高密度,并且容许开发安全和可再现的生物工艺。其它常用的动物细胞包括幼仓鼠肾 (BHK) 细胞,NS0- 和 SP2/0- 小鼠骨髓瘤细胞。最近,还已经测试了来自转基因动物的产物。(Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81(1996))。

[0019] 所有的抗体在重链恒定区的保守区域含糖结构,其中每种同种型都具有 N- 连接的糖结构的独特阵列,其可变地影响蛋白质排列,分泌或功能活性。(Wright, A., 和 Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32(1997))。连接的 N- 连接糖的结构取决于加工的程度而相当大地变化,并且可以包括高-甘露糖,多支链以及双触角的复合物寡糖 (Wright, A., 和 Morrison, S. L., Trends Biotech. 15:26-32(1997))。典型地,存在在特定糖基化位点连接的核心寡糖结构的不均匀加工从而使均一的单克隆抗体作为多种糖形存在。类似地,已经显示在抗体糖基化中的主要不同发生在不同细胞系之间,并且在不同培养条件下,甚至观察到对于给定细胞系的微小差异。(Lifely, M. R. et al., Glycobiology 5(8):813-22(1995))。

[0020] 获得潜能的大增加,同时维持简单的生产过程并潜在地避免明显的,不理想的副作用的一种方式是通过改造它们的寡糖成分增加单克隆抗体的天然的、细胞介导的效应子功能,如在 Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180(1999) 和美国专利号 6,602,684 中所述,将它们全部内容并入作为参考。IgG1 型抗体,在癌症的免疫疗法中最常用的抗体是在每个 CH2 结构域的 Ash297 具有保守 N- 连接糖基化位点的糖蛋白。与 Asn297 连接的两个复合双触角寡糖隐藏在 CH2 结构域之间,形成了与多肽主链的广泛接触,并且它们的存在对于抗体介导效应子功能诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 是必要的。(Lifely, M. R., et al., Glycobiology 5:813-822(1995); Jefferis, R., et al., Immunol Rev. 163:59-76(1998); Wright, A. and Morrison, S. L., Trends Biotechnol. 15:

26-32(1997))。

[0021] 本发明者在前面显示了 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III (“GnTIII”), 其是催化等分寡糖的形成的糖基转移酶, 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的过量表达, 显著增加了由改造的 CHO 细胞产生的抗 - 成神经细胞瘤嵌合单克隆抗体 (chCE7) 的体外 ADCC 活性。(见

Umaña, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180(1999); 和国际公开号 WO 99/54342, 将其全部内容并入作为参考)。抗体 chCE7 属于未缀合的 mAbs 的大类, 其具有高肿瘤亲和性和特异性, 但是当在缺乏 GnTIII 酶的标准工业化细胞系中生产时, 潜能过低而无法进行临床应用 (Umaña, P., et al., Nature Biotechnol. 17:176-180(1999))。该研究首先显示 ADCC 活性的大量增加可以通过将产生抗体的细胞改变为表达 GnTIII 而获得, 其也导致了恒定区 (Fc) - 关联的, 等分的寡糖的比例增加到在天然存在的抗体中发现水平以上, 所述寡糖包括等分的, 非岩藻糖基化的寡糖。

[0022] 仍旧存在对于靶向 CD20 抗原以治疗灵长类动物中的 B 细胞淋巴瘤的增加了的治疗性方法的需要, 所述灵长类动物包括, 但不限于, 人。

[0023] 发明简述

[0024] 认识到抗原结合分子 (ABMs) 的巨大治疗潜能, 本发明人开发了生产这些 ABMs 的方法, 所述 ABMs 具有鼠 B-Ly1 抗体的结合特异性并且已经进行了糖改造 (glycoengineer) 以增加 Fc 受体结合亲和性和效应子功能。特别地, 该方法包括产生重组的, 嵌合抗体或其嵌合片段。这些 ABMs 的功效还通过改变抗体 Fc 区域的糖基化模式而增加。

[0025] 因此, 在一方面, 本发明涉及分离的多核苷酸, 其包括: (a) 选自由 SEQ ID NO. :5, SEQ ID NO. :6 和 SEQ ID NO. :7. (CDRs V_{H-1}) 组成的组的序列; (b) 选自由 SEQ ID NO. :21, SEQ ID NO. :22 和 SEQ ID NO. :23. (CDRs V_{H-2}) 和 SEQ ID NO :24 组成的组的序列。在另一个方面, 本发明涉及分离的多核苷酸, 其包括: SEQ ID NO. :8, SEQ ID NO. :9 和 SEQ ID NO. :10. (CDRs V_L)。在一个实施方案中, 这些多核苷酸的任一个编码融合的多肽。

[0026] 在另一个方面, 本发明涉及包括 SEQ ID No. :2 的分离的多核苷酸。在另一个方面, 本发明涉及包括 SEQ ID No. :4 的分离的多核苷酸。在又一个方面, 本发明涉及分离的多核苷酸, 其包括选自由 SEQ ID No :29 ; SEQ ID No :31 ; SEQ ID No :33 ; SEQ ID No :35 ; SEQ ID No :37 ; SEQ ID No :39 ; SEQ ID No :41 ; SEQ ID No :43 ; SEQ ID No :45 ; SEQ ID No :47 ; SEQ ID No :49 ; SEQ ID No :51 ; SEQ ID No :53 ; SEQ ID No :55 ; SEQ ID No :57 ; SEQ ID No :59 ; SEQ ID No :61 ; SEQ ID No :63 ; SEQ ID No :65 ; SEQ ID No :67 ; SEQ ID No :69 ; 和 SEQ ID No :71 组成的组的序列。在另一个方面, 本发明涉及包括 SEQ ID No. :75 的分离的多核苷酸。在一个实施方案中, 这些多核苷酸编码融合的多肽。

[0027] 本发明还涉及包括与 SEQ ID NO :2 具有至少 80% 同一性的序列的分离的多核苷酸, 其中所述分离的多核苷酸编码融合的多肽。在另一个方面, 本发明涉及包括与 SEQ ID NO :4 具有至少 80% 同一性的序列的分离的多核苷酸, 其中所述分离的多核苷酸编码融合的多肽。本发明还涉及包括与选自由 SEQ ID No :29 ; SEQ ID No :31 ; SEQ ID No :33 ; SEQ ID No :35 ; SEQ ID No :37 ; SEQ ID No :39 ; SEQ ID No :41 ; SEQ ID No :43 ; SEQ ID No :45 ; SEQ ID No :47 ; SEQ ID No :49 ; SEQ ID No :51 ; SEQ ID No :53 ; SEQ ID No :55 ; SEQ ID No :57 ; SEQ ID No :59 ; SEQ ID No :61 ; SEQ ID No :63 ; SEQ ID No :65 ; SEQ ID No :67 ; SEQ ID No :69 ; 和 SEQ ID No :71 组成的组的序列具有至少 80% 同一性的序列的分离的多核苷酸, 其中

所述分离的多核苷酸编码融合的多肽。在另一个方面,本发明涉及包括与 SEQ ID NO:75 具有至少 80% 同一性的序列的分离的多核苷酸,其中所述分离的多核苷酸编码融合的多肽。

[0028] 本发明还涉及包括 SEQ ID NO:11 (整个重链) 的多核苷酸,或与 SEQ ID NO:11 具有 80%, 85%, 90%, 95% 或 99% 同一性的多核苷酸。本发明还涉及包括 SEQ ID NO:12 (整个轻链) 的多核苷酸,或与 SEQ ID NO:12 具有 80%, 85%, 90%, 95% 或 99% 同一性的多核苷酸。

[0029] 本发明还涉及编码具有 SEQ ID No.:1 的序列的嵌合多肽的分离的多核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸包括编码具有 SEQ ID No.:1 的序列的多肽的序列;和来自除了小鼠之外的物种的序列,所述序列编码具有抗体 Fc 区域序列的多肽,或其片段。本发明还涉及编码具有选自由 SEQ ID No.:30;SEQ ID No.:32;SEQ ID No.:34;SEQ ID No.:36;SEQ ID No.:38;SEQ ID No.:40;SEQ ID No.:42;SEQ ID No.:44;SEQ ID No.:46;SEQ ID No.:48;SEQ ID No.:50;SEQ ID No.:52;SEQ ID No.:54;SEQ ID No.:56;SEQ ID No.:58;SEQ ID No.:60;SEQ ID No.:62;SEQ ID No.:64;SEQ ID No.:66;SEQ ID No.:68;SEQ ID No.:70;和 SEQ ID No.:72 组成的组的序列的嵌合多肽的分离的多核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸包括编码具有选自由 SEQ ID No.:30;SEQ ID No.:32;SEQ ID No.:34;SEQ ID No.:36;SEQ ID No.:38;SEQ ID No.:40;SEQ ID No.:42;SEQ ID No.:44;SEQ ID No.:46;SEQ ID No.:48;SEQ ID No.:50;SEQ ID No.:52;SEQ ID No.:54;SEQ ID No.:56;SEQ ID No.:58;SEQ ID No.:60;SEQ ID No.:62;SEQ ID No.:64;SEQ ID No.:66;SEQ ID No.:68;SEQ ID No.:70;和 SEQ ID No.:72 组成的组的序列的多肽的序列;和来自除了小鼠之外的物种的序列,所述序列编码具有抗体 Fc 区域序列的多肽,或其片段。

[0030] 在另一个方面中,本发明涉及编码具有 SEQ ID No.:3 的序列的嵌合多肽的分离的多核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸包括编码具有 SEQ ID No.:3 的序列的多肽的序列;和来自除小鼠外的物种的序列,所述序列编码具有抗体 Fc 区域的序列的多肽,或其片段。在另一个方面中,本发明涉及编码具有 SEQ ID No.:76 的序列的嵌合多肽的分离的多核苷酸。在一个实施方案中,多核苷酸包括编码具有 SEQ ID No.:76 的序列的多肽的序列;和来自除了小鼠之外的物种的序列,所述序列编码具有抗体 Fc 区域的序列的多肽,或其片段。

[0031] 本发明还涉及分离的多核苷酸,其包括一段序列,所述序列编码具有鼠 B-Ly1 抗体的 V_H 区域的多肽,或其功能变体,和一段序列,所述序列来自除小鼠之外的物种,编码具有抗体 Fc 区域序列的多肽,或其片段。在另一个方面,本发明涉及分离的多核苷酸,其包括一段序列,所述序列编码具有鼠 B-Ly1 抗体的 V_L 区域的多肽,或其功能变体,和一段序列,所述序列来自除小鼠之外物种,编码具有抗体 Fc 区域的序列的多肽,或其片段。

[0032] 本发明还涉及包括上述分离的多核苷酸的任一种的表达载体,并且涉及包括这样的表达载体的宿主细胞。在另一个方面,本发明涉及包括上述分离的多核苷酸的任一种的宿主细胞。

[0033] 在一个方面,本发明涉及分离的多肽,其包括:(a) 选自由 SEQ ID NO.:15, SEQ ID NO.:16 和 SEQ ID NO.:17 (CDRs V_{H-1}) 组成的组的序列;(b) 选自由 SEQ ID NO.:25, SEQ ID NO.:26 和 SEQ ID NO.:27 (CDRs V_{H-2});和 SEQ ID NO.:28 组成的组的序列,其中所述多肽是融合多肽。在另一个方面,本发明涉及分离的多肽,所述多肽包括 SEQ ID NO.:18, SEQ

ID NO. :19 和 SEQ ID NO. :20. (CDRs V_L), 其中所述多肽是融合的多肽。

[0034] 本发明还涉及嵌合多肽, 其包括 SEQ ID NO. :1 的序列, 或其变体。本发明还涉及嵌合多肽, 其包括 SEQ ID NO. :3 的序列, 或其变体。在一个实施方案中, 这些多肽的任何一个还包括人 Fc 区域。本发明还涉及嵌合的多肽, 其包括选自 SEQ ID No :30 ;SEQ ID No :32 ;SEQ ID No :34 ;SEQ ID No :36 ;SEQ ID No :38 ;SEQ ID No :40 ;SEQ ID No :42 ;SEQ ID No :44 ;SEQ ID No :46 ;SEQ ID No :48 ;SEQ ID No :50 ;SEQ ID No :52 ;SEQ ID No :54 ;SEQ ID No :56 ;SEQ ID No :58 ;SEQ ID No :60 ;SEQ ID No :62 ;SEQ ID No :64 ;SEQ ID No :66 ;SEQ ID No :68 ;SEQ ID No :70 ;和 SEQ ID No :72 组成的组的序列, 或其变体。本发明还涉及嵌合多肽, 其包括 SEQ ID NO. :76 的序列, 或其变体。在一个实施方案中, 这些多肽的任何一个还包括人 Fc 区域。

[0035] 在另一个方面, 本发明涉及这样的多肽, 所述多肽包括来自鼠 B-Ly1 抗体的序列和来自异源多肽的序列, 并且涉及包括这样的多肽的抗原结合分子。在一个实施方案中, 抗原结合分子是抗体。在优选的实施方案中, 所述抗体是嵌合的。在另一个优选的实施方案中, 该抗体是人源化的或 primatized。

[0036] 在另外的方面中, 本发明涉及分离的多肽, 其包括 SEQ ID NO :13, 或其变体。在另一个方面中, 本发明涉及包括 SEQ ID NO :14 的分离的多肽。

[0037] 在另一方面, 本发明涉及 ABM, 其能够与鼠 B-Ly1 抗体竞争结合 CD20 并且是嵌合的。在一个实施方案中, 该 ABM 是抗体或其片段。在另一个实施方案中, ABM 是重组抗体, 其包括具有选自 SEQ ID NO. :1 ;SEQ ID No :30 ;SEQ ID No :32 ;SEQ ID No :34 ;SEQ ID No :36 ;SEQ ID No :38 ;SEQ ID No :40 ;SEQ ID No :42 ;SEQ ID No :44 ;SEQ ID No :46 ;SEQ ID No :48 ;SEQ ID No :50 ;SEQ ID No :52 ;SEQ ID No :54 ;SEQ ID No :56 ;SEQ ID No :58 ;SEQ ID No :60 ;SEQ ID No :62 ;SEQ ID No :64 ;SEQ ID No :66 ;SEQ ID No :68 ;SEQ ID No :70 ;和 SEQ ID No :72 组成的组的氨基酸序列的 V_H 区域。在另一个实施方案中, ABM 是重组抗体, 其包括具有选自 SEQ ID NO. :3 和 SEQ ID NO :76 组成的组的氨基酸序列的 V_L 区域。在另一个实施方案中, ABM 是 primatized 的重组抗体。在另一个实施方案中, ABM 是人源化的重组抗体。在另一个实施方案中, ABM 是包括人 Fc 区域的重组抗体。在另一个实施方案中, 上述讨论的 ABMs 的任一个可以缀合于诸如毒素或放射性标记的部分。

[0038] 本发明还涉及本发明的 ABM, 所述 ABM 具有修饰的寡糖。在一个实施方案中, 与未修饰的寡糖相比, 修饰的寡糖具有减少的岩藻糖基化。在其它的实施方案中, 修饰的寡糖是杂合的或复合的。在另一个实施方案中, ABM 在所述分子的 Fc 区域中具有增加比例的非岩藻糖基化的寡糖或等分的非岩藻糖基化的寡糖。在一个实施方案中, 等分的, 非岩藻糖基化的寡糖是杂合的。在另一个实施方案中, 该等分的, 非岩藻糖基化的寡糖是复合的。在一个实施方案中, 在所述多肽的 Fc 区域中, 寡糖的至少 20% 是非岩藻糖基化的或等分的, 非岩藻糖基化的。在更优选的实施方案中, 寡糖的至少 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 或 75% 或更多是非岩藻糖基化的或等分的, 非岩藻糖基化的。

[0039] 本发明还涉及编码上述讨论的 ABMs 的任一种的多核苷酸, 并涉及包括这样的多核苷酸的表达载体和细胞。

[0040] 本发明还涉及生产 ABM 的方法, 其能够与鼠 B-Ly1 抗体竞争结合 CD20, 并且其中所述 ABM 是嵌合的 ;所述方法包括 : (a) 在容许编码所述 ABM 的所述多核苷酸表达的条件下,

在培养基中培养包含编码本发明的 ABM 的多核苷酸的宿主细胞 ; 和 (b) 从得到的培养物中回收所述 ABM。

[0041] 在另一个方面, 本发明涉及包括本发明的 ABM 的药物组合物。意欲该药物组合物还可以包含药用载体, 佐剂或其组合。

[0042] 在另一个方面, 本发明涉及治疗可通过 B 细胞消减治疗的疾病的方法。所述方法包括将治疗有效量的本发明的 ABM 施用给需要其的人受试者。在优选的实施方案中, 通过施用 ABM 来治疗所述疾病, 所述 ABM 是嵌合抗体, 或抗体的嵌合片段。

[0043] 在另一个方面, 本发明涉及宿主细胞, 所述宿主细胞被改造从而以足以修饰由该宿主细胞产生的 Fc 区域中寡糖的量, 表达编码具有 GnTIII 活性的多肽的至少一种核酸, 其中所述 ABM 能够与鼠 B-Ly1 抗体竞争结合 CD20, 并且其中 ABM 是嵌合的。在一个实施方案中, 具有 GnTIII 活性的多肽是融合多肽。在另一个实施方案中, 由宿主细胞产生的 ABM 是抗体或抗体片段。在另一个实施方案中, 该 ABM 包括与人 IgG 的 Fc 区域等价的区域。

[0044] 本发明还涉及分离的多核苷酸, 其包括鼠 B-Ly1 抗体的至少一个互补决定区, 或包含所述互补决定区的至少特异性决定残基的其变体或截短形式, 其中所述分离的多核苷酸编码融合的多肽。优选地, 这种分离的多核苷酸编码作为抗原结合分子的融合多肽。在一个实施方案中, 多核苷酸包括鼠 B-Ly1 抗体的三个互补决定区, 或包含所述三个互补决定区的每个的至少特异性决定残基的其变体或截短形式。在另一个实施方案中, 多核苷酸编码嵌合 (例如, 人源化) 抗体的轻链或重链的整个可变区。本发明还涉及由这些多核苷酸编码的多肽。

[0045] 在另一个实施方案中, 本发明涉及包括鼠 B-Ly1 抗体的至少一个互补决定区的抗原组合分子, 或包含所述互补决定区的至少特异性决定残基的其变体或截短形式, 并包含来自异源多肽的序列。在一个实施方案中, 抗原结合分子包括鼠 B-Ly1 抗体的三个互补决定区, 或包含所述三个互补决定区的每个的至少特异性决定残基的其变体或截短形式。在另一个方面, 抗原结合分子包括抗体轻链或重链的可变区。在一个特别有用的实施方案中, 抗原结合分子是嵌合的, 例如人源化的抗体。本发明还涉及制备这些抗原结合分子的方法, 和将这些分子用在治疗疾病中的应用, 所述疾病包括 B 细胞淋巴瘤。

[0046] 本发明是对 II 型抗 -CD20 抗体进行了改造从而增加其效应子功能诸如 ADCC, 同时仍旧保持有效的程序性细胞死亡能力的第一个已知实例。因此, 本发明涉及改造的 II 型抗 -CD20 抗体, 其因为所述改造而具有增加的 ADCC 并且没有丧失诱导程序性细胞死亡的基本能力。在一个实施方案中, II 型抗 -CD20 抗体已经被改造从而具有在 Fc 区域中的改变的糖基化模式。在特别的实施方案中, 改变的糖基化包括在 Fc 区域中增加水平的的等分的复合残基。在另一个特别的实施方案中, 改变的糖基化包括在 Fc 区域中减少水平的岩藻糖残基。在另一个实施方案中, II 型 - 抗 CD20 抗体已经进行了多肽改造。本发明还涉及制备这样的被改造的 II 型抗体的方法, 和涉及使用这些抗体治疗各种 B 细胞疾病, 包括 B 细胞淋巴瘤的方法。

[0047] 本发明的宿主细胞可以选自这样的组, 所述组包括, 但不限于, CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞。在一个实施方案中, 本发明的宿主细胞还包括转染的多核苷酸, 其包括编码鼠 B-Ly1 抗体的 V_L 区域或其变体的多核苷酸和编码等价于人免疫球蛋白的 Fc 区域的区

域的序列。在另一个实施方案中,本发明的宿主细胞还包括转染的多核苷酸,其包括编码鼠 B-Ly1 抗体的 V_H区域或其变体的多核苷酸和编码等价于人免疫球蛋白的 Fc 区域的区域的序列。

[0048] 在另一个方面,本发明涉及这样的宿主细胞,其产生由于修饰了其寡糖而显示增加的 Fc 受体结合亲和性和 / 或增加的效应子功能的 ABM。在一个实施方案中,增加的结合亲和性针对 Fc 受体,特别地针对 Fc γ RIIIA 受体。本文考虑的效应子功能可以选自这样的组,所述组包括,但不限于,增加的 Fc- 介导的细胞毒性;增加的与 NK 细胞的结合;增加的与巨噬细胞的结合;增加的与多形核细胞的结合;增加的与单核细胞的结合;增加的定向信号传导诱导程序性细胞死亡;增加的树突细胞成熟;和增加的 T 细胞引发。

[0049] 在另一个实施方案中,本发明的宿主细胞包括至少一个编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸,其与组成型启动子元件可操作地连接。

[0050] 在另一个方面中,本发明涉及在宿主细胞中产生 ABM 的方法,其包括:(a) 在容许所述 ABM 产生和容许在所述 ABM 的 Fc 区域上存在的寡糖的修饰的条件下,培养这样的宿主细胞,所述宿主细胞被改造从而表达至少一个编码具有 GnTIIH 活性的融合多肽的多核苷酸;和 (b) 分离所述 ABM;其中所述 ABM 能够与鼠 B-Ly1 抗体竞争结合 CD20 并且其中所述 ABM 是嵌合的。在一个实施方案中,具有 GnTIII 活性的多肽是融合多肽,优选地包括 GnTIII 的催化结构域和异源高尔基体定居 (resident) 多肽的高尔基体定位结构域,所述定位结构域选自由下列组成的组:甘露糖苷酶 II 的定位结构域, β (1,2)-N- 乙酰葡萄糖胺转移酶 I (“GnTI”) 的定位结构域,甘露糖苷酶 I 的定位结构域, β (1,2)-N- 乙酰葡萄糖胺转移酶 II (“GnTII”) 的定位结构域,和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。优选地,该高尔基体定位结构域来自甘露糖苷酶 II 或 GnTI。

[0051] 在另一个方面,本发明涉及改进由宿主细胞产生的抗 -CD20 ABM 的糖基化模式的方法,所述方法包括向该宿主细胞引入至少一个本发明的核酸或表达载体。在一个实施方案中,该 ABM 是抗体或其片段;优选地包括 IgG 的 Fc 区域。或者,多肽是融合蛋白质,其包括等价于人 IgG 的 Fc 区域的区域。

[0052] 在一个方面,本发明涉及重组的,嵌合抗体,或其片段,其能够与鼠 B-Ly1 抗体竞争结合 CD20 并具有减少的岩藻糖基化。

[0053] 在另一个方面,本发明涉及通过使用融合多肽,来改进本发明的重组抗体或其片段的糖基化的方法,所述融合多肽具有 GnTIII 活性并包括异源高尔基体定居多肽的高尔基体定位结合域。在一个实施方案中,本发明的融合多肽包括 GnTIII 的催化结构域。在另一个实施方案中,高尔基体定位结构域选自由下列组成的组:甘露糖苷酶 II 的定位结构域,GnTI 的定位结构域,甘露糖苷酶 I 的定位结构域,GnTII 的定位结构域,和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。优选地,该高尔基体定位结构域来自甘露糖苷酶 II 或 GnTI。

[0054] 在一个实施方案中,本发明的方法涉及产生具有修饰的寡糖的重组的,嵌合的抗体或其片段,其中所述修饰的寡糖与未修饰的寡糖相比具有减少的岩藻糖基化。按照本发明,这些修饰的寡糖可以是杂合的或复合的。在另一个实施方案中,本发明的方法涉及产生重组的,嵌合的抗体或其片段,其在所述多肽的 Fc 区域中具有增加比例的等分的,非岩藻糖基化的寡糖。在一个实施方案中,等分的,非岩藻糖基化的寡糖是杂合的。在另一个实施方案中,等分的,非岩藻糖基化的寡糖是复合的。在另一个实施方案中,本发明的方法涉及

产生重组的,嵌合的抗体或其片段,其在所述多肽的 Fc 区域中具有至少 20% 的寡糖,所述寡糖是等分的,非岩藻糖基化的。在优选的实施方案中,在所述多肽的 Fc 区域中至少 30% 的寡糖是等分的,非岩藻糖基化的。在另一个优选的实施方案中,其中在所述多肽的 Fc 区域中,至少 35% 的寡糖是等分的,非岩藻糖基化的。

[0055] 在另一个方面,本发明涉及重组的,嵌合的抗体或其片段,其由于其寡糖的修饰而显示增加的 Fc 受体结合亲和性和 / 或增加的效应子功能。在一个实施方案中,增加的结合亲和性针对 Fc 激活受体。在另一个实施方案中, Fc 受体是 Fc γ 激活受体,特别地 Fc γ RIIIA 受体。本文考虑的效应子功能可以选自这样的组,所述组包括,但不限于,增加的 Fc- 介导的细胞的细胞毒性;增加的与 NK 细胞的结合;增加的与巨噬细胞的结合;增加的与多形核细胞的结合;增加的与单核细胞的结合;增加的定向信号传导诱导程序性细胞死亡;增加的树突细胞成熟;和增加的 T 细胞引发。

[0056] 在另一个方面,本发明涉及重组的,嵌合的抗体片段,其具有鼠 B-Ly1 抗体的结合特异性并包含 Fc 区域,所述抗体片段被进行了改造从而具有由本发明的方法的任一个所产生的增加的效应子功能。

[0057] 在另一个方面,本发明涉及融合蛋白,其包括具有 SEQ ID NO :1 的序列的多肽和等价于免疫球蛋白的 Fc 区域的区域,并且所述融合蛋白被改造从而具有由本发明的任一方法所产生的增加的效应子功能。

[0058] 在另一个方面,本发明涉及融合蛋白,其包括具有 SEQ ID NO :3 的序列的多肽和等价于免疫球蛋白的 Fc 区域的区域,并且所述融合蛋白被改造从而具有由本发明的任一方法所产生的增加的效应子功能。

[0059] 在一方面,本发明涉及药物组合物,其包括由本发明的任一方法所产生的重组的嵌合的抗体,和药用载体。在另一个方面,本发明涉及药物组合物,其包括由本发明的任一方法所产生的重组的嵌合的抗体片段,和药用载体。在另一个方面,本发明涉及药物组合物,其包括由本发明的任一方法所产生的融合蛋白和药用载体。

[0060] 本发明还涉及治疗可通过 B 细胞消减来治疗的疾病的方法,所述方法包括将治疗有效量的通过本发明的方法的任一种产生的重组的,嵌合抗体或其片段施用于需要其的人受试者。

[0061] 附图简述

[0062] 图 1 鼠 B-Ly1 的 V_H 区域的核苷酸 (SEQ ID NO :2) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :1)。

[0063] 图 2 鼠 B-Ly1 的 V_L 区域的核苷酸 (SEQ ID NO :4) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :3)。

[0064] 图 3 利妥昔单抗® (○) 和 ch-B_Ly1 (Δ) 与在 Raji B- 淋巴瘤细胞上的 CD20 的结合。

[0065] 图 4 在下列三种不同种类的 Fc γ RIIIa-158V/F 基因型的全血中,利妥昔单抗® (○) 和 ch-B_Ly1 (Δ) 导致的 B 细胞消减:(A) 来自对于较低亲和性受体纯合的 F/F 供体的全血;(B) 来自对于亲和性受体是杂合的 F/V 供体的全血;和 (C) 来自对于较高亲和性受体纯合的 V/V 供体的全血。

[0066] 图 5 嵌合的,抗 -CD20 抗体的重链的核苷酸 (SEQ ID NO :11) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :13)。

[0067] 图 6 嵌合的,抗 -CD20 抗体的轻链的核苷酸 (SEQ ID NO :12) 和氨基酸序列 (SEQ

ID NO:14)。

[0068] 图 7 鼠 B-Ly1 抗体 CDRs 的核苷酸和氨基酸序列。(A) V_H 区域的预期 CDRs。(B) V_L 区域的预期 CDRs。

[0069] 图 8 糖改造的,嵌合 B-Ly1 抗体的 MALDI-TOF 模式。(A) 详述特异性峰的百分比的表;(B) 糖改造的嵌合 B-Ly1 的光谱;(C) 用 Endo-H 处理的糖改造的嵌合 B-Ly1 的光谱。

[0070] 图 9 不同的人源化的抗 -CD20 抗体与 Raji B 细胞的结合。在 B-HH2 构建体和 B-HL8 和 B-HL11 构建体之间的差异存在于构架 1 和 2 区域中,其中所有的三个 CDRs 是相同的。B-HL8 和 B-HL11 的 FR1 和 FR2 序列来自人 VH3 类,而完整的 B-HH2 构架是人 VH1 来源的。B-HL11 是具有单一突变 Glu1Gln 的 B-HL8 的衍生物,其中 Gln 是 B-HH2 构建体的氨基酸残基。这意味着 Glu1Gln 交换没有改变结合亲和性或强度。在 B-HH2 和 B-HL8 之间的其它差异是 14 FR 残基,其中一个或多个将影响该抗体的抗原结合行为。

[0071] 图 10 在 Raji 靶细胞上的人源化的抗 -CD20 抗体 BHL4-KV1 的结合。通过用人种系序列 VH1_45 的 FR1 替换 B-HH2 的 FR1,该 B-HL4 构建体来自 B-HH2 抗体。该构建体显示大大减少的抗原结合能力,尽管在 FR1 中的仅三个位点上具有不同的氨基酸。这些残基位于按照 Kabat 编号方式的位点 2,14,和 30 处。其中,位点 30 似乎是最有影响的位点,因为其是 CDR1 的 Chothia 限定的部分。

[0072] 图 11. 在 B-HH1,B-HH2,B-HH3 和母体抗体 B-ly1 之间的结合行为的比较。该数据显示所有的 Abs 显示相似的 EC50 值,但是与变体 B-HH2 和 B-HH3 相比,B-HH1 构建体以更低的强度/化学计量结合。B-HH1 可以通过其部分人 CDR1 和 CDR2 区域(Kabat 定义),以及在位点 28(Kabat 编号方式)上的 Ala/Thr 多态性,与 B-HH2 和 B-HH3 区分。这显示位点 28,完整的 CDR1,和/或完整的 CDR2 的任一对于抗体/抗原相互作用是重要的。

[0073] 图 12 B-HL1,B-HH1,和 B-ly1 母体抗体的比较。该数据显示在 B-HL1 构建体中的任何结合活性的缺乏,和与 B-ly1 相比,大约一半的 B-HH1 结合强度/化学计量。B-HL1 以及 B-HH1 两者,基于来自人 VH1 类的受体构架进行设计。在其它的差异中,B-HL1 的位点 71(Kabat 编号方式)构建体是显著差异,显示其对于抗原结合的推定的重要性。

[0074] 图 13 抗 -CD20 抗体与其抗原的 capacity 的荧光细胞计量(Flow cytometric)分析。该数据显示 B-HL2 和 B-HL3 构建体没有显示 CD-20 结合活性。

[0075] 图 14 在 Z-138 MCL 细胞上的抗 -CD20 抗体的程序性细胞死亡。

[0076] 图 15 抗 -CD20 抗体导致程序性细胞死亡。测定详述:将 5×10^5 细胞/孔接种在 24 孔板 (5×10^5 细胞/ml) 的培养基中。将用于阴性对照的 10mg 的各个 Ab,PBS 或 5mM 喜树碱(CPT)阳性对照加入孔中。将样品温育 o/n(16 小时),用 AnnV-FITC 染色,并通过 FACS 进行分析。测定以三次重复进行(*):减去对于单独的 PBS 的信号(单独的 PBS 对于 PR-1 和 Z-138 细胞分别给出 8%和 2%的 AnnV+)。所用的抗体是:C2B8(嵌合的,非糖改造的);BHH2-KV1(人源化的,非糖改造的)。注意:该测定不包括任何另外的效应细胞,仅是靶加上抗体或对照。

[0077] 图 16 以免疫效应细胞造成的抗 -CD20 抗体的靶细胞杀伤。测定详述:在过夜温育的正常全血细胞中的 B 细胞消减和通过 FACS 分析 CD19+/CD3+。使用 PBMCs 作为效应物的 ADCC,4 小时温育,25:1 的效应物:靶标比率,通过钙荧光素-保留相对于去污剂-裂解(100%)和无 Ab 的裂解(0%)测量的靶标杀伤。所用的抗体:C2B8(嵌合的,非糖改造

形式) ;BHH2-KV1-wt (BHH2-KV1 的人源化的, 非糖改造形式) ;BHH2-KV1-GE (BHH2-KV1 的人源化的, 非糖改造形式) 。

[0078] 图 17 未修饰的, 非糖改造的 BHH2-KV1 人源化的 IgG1 B-1y1 抗-人 CD20 抗体的 PNGaseF- 释放的 Fc- 寡糖的 MALDI/TOF-MS 模式。

[0079] 图 18 糖改造的 BHH2-KV1g1 人源化的 IgG1 B-1y1 抗-人 CD20 抗体的 PNGaseF- 释放的 Fc- 寡糖的 MALDI/TOF-MS 模式。糖改造通过在宿主细胞中的抗体基因和编码具有 β -1,4-N- 乙酰葡萄糖胺转移酶 III (GnT-III) 催化活性的酶的基因的共表达来进行。

[0080] 图 19 糖改造的 BHH2-KV1g2 人源化的 IgG1 B-1y1 抗-人 CD20 抗体的 PNGaseF- 释放的 Fc- 寡糖的 MALDI/TOF-MS 模式。糖改造通过在宿主细胞中的抗体基因和编码具有 β -1,4-N- 乙酰葡萄糖胺转移酶 III (GnT-III) 催化活性的酶的基因以及编码具有高尔基体 α - 甘露糖苷酶 II 催化活性的酶的基因的共表达来进行。

[0081] 图 20 非糖改造和糖改造的抗体与在重组 CHO-CD16 细胞表面展示上的人 Fc γ RIIIa 受体的结合。

[0082] 图 21 非-Fc 改造的和 Fc 改造的抗-CD20 抗体对 Z-138 MCL 细胞造成的程序性细胞死亡。测定详述: 将 5×10^5 细胞 / 孔接种在 24 孔板 (5×10^5 细胞 / ml) 的培养基中。将用于阴性对照的 10mg 的各个 Ab, PBS 加入孔中。将样品温育 o/n (16 小时), 用 AnnV-FITC 染色, 并通过 FACS 进行分析。测定以三次重复进行。所用的 Abs : C2B8 = 利妥昔单抗 (嵌合的, 非糖改造形式, 与商业形式相同) ; BHH2-KV1 (人源化的, 非糖改造的 - 见图 6 糖基化模式) ; BHH2-KV1g1 (人源化的, 糖改造的 - 见图 7 糖基化模式) ; BHH2-KV1g2 (人源化的, 糖改造的 - 见图 8 糖基化模式)。注意: 这种测定不包括任何另外的效应细胞, 仅是靶标加抗体或对照。(*) : 减去单独的 PBS 的信号。

[0083] 发明详述

[0084] 本文所用的术语如本领域通常所用的, 除非如下另外指出。

[0085] 用于本文时, 术语抗体意欲包括整个抗体分子, 以及具有 Fc 区域并保留结合特异性的抗体片段, 和融合蛋白, 所述融合蛋白包括等价于免疫球蛋白的 Fc 区域的区域并保留结合特异性, 所述整个抗体分子包括单克隆抗体, 多克隆抗体和多特异性 (例如, 二特异性) 的抗体。还包括人源化, primatized 和嵌合的抗体。

[0086] 用于本文时, 术语 Fc 区域意欲指 IgG 重链的 C- 末端区域。尽管 IgG 重链的 Fc 区域的范围可以轻微变化, 人 IgG 重链 Fc 区域通常限定为从位点 Cys226 的氨基酸残基延伸到羧基末端一段。

[0087] 用于本文时, 术语“等价于免疫球蛋白的 Fc 区域的区域”意欲包括免疫球蛋白的 Fc 区域的天然存在的等位基因变体以及具有改变的变体, 所述改变产生置换, 添加, 或缺失, 但是基本不会减少免疫球蛋白介导效应子功能 (诸如抗体依赖性的细胞的细胞毒性) 的能力。例如, 在免疫球蛋白的 Fc 区域的 N- 末端或 C 末端可以缺失一个或多个氨基酸, 而基本不丧失生物学功能。可以按照本领域已知的一般规则来选择这些变体从而对活性具有最小的影响。(见, 例如 Bowie, J. U. et al., Science 247 :1306-10(1990)。

[0088] 用于本文时, 在其最广义上讲, 术语抗原结合分子指特异性结合抗原决定簇的分子。更具体地, 结合 CD20 的抗原结合分子是特异性结合 35,000 道尔顿的细胞表面的非糖基化磷蛋白的分子, 所述细胞表面的非糖基化磷蛋白典型地指通常被称为 CD20 的人 B 淋巴

细胞限制性分化抗原 Bp35。所谓“特异性结合”指结合对于抗原是选择性的并且可以与不需要的或非特异性相互作用区别开。

[0089] 用于本文时,当用在涉及多肽诸如 ABMs 中时,术语融合的和嵌合的,指这样的多肽,所述多肽包括来自两个或更多异源多肽的氨基酸序列,诸如来自不同物种的抗体的部分。例如,对于嵌合 ABMs 而言,非抗原结合成分可以来自广泛种类的物种,包括灵长类动物诸如黑猩猩和人。最优选嵌合 ABM 的恒定区与天然人抗体的恒定区基本相同;最优选嵌合抗体的可变区与重组抗 CD-20 抗体的可变区基本相同,所述抗 CD-20 抗体具有鼠 B-Ly1 的可变区的氨基酸序列。人源化的抗体是融合或嵌合抗体的特别优选的形式。

[0090] 用于本文时,具有“GnTIII 活性”的多肽指这样的多肽,所述多肽能够催化以 β -1-4 连接将 N-乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc) 残基添加到 N-连接的寡糖中的三甘露糖基核心的 β 连接的甘露糖苷上。这包括融合多肽,所述多肽显示类似于但不必须相同于, β (1, 4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III 的活性的酶活性,如在特别的生物测定中所测量的,具有或不具有剂量依赖性,按照国际生化和分子生物学命名委员会 (NC-IUBMB),其也被称为 β -1, 4-甘露糖基-糖蛋白 4- β -N-乙酰基葡萄糖胺基-转移酶 (EC 2.4.1.144)。在其中确实存在剂量依赖性的情形中,其不需要与 GnTIII 的剂量依赖性相同,但是与 GnTIII 活性相比,基本类似于在给定活性中的剂量依赖(即,相对于 GnTIII,候选多肽将显示更大的活性或不超过约 25 倍更少,并且优选地,不超过约 10 倍更少的活性,并且最优选地,不超过约三倍更少的活性)。

[0091] 用于本文时,术语变体(或类似物)指通过使用,例如重组 DNA 技术产生的氨基酸插入,缺失,和置换而与本发明特别陈述的多肽区别开的多肽。本发明的 ABMs 的变体包括嵌合的, primatized 或人源化的抗原结合分子,其中氨基酸残基的一个或数个通过以这样的方式置换,添加和/或缺失进行修饰,所述方式基本上不影响抗原(例如, CD20)结合亲和性。可以通过将特定多肽的序列与同源肽的序列进行比较并使在高同源性的区域(保守区域)中所作的氨基酸序列变化的数量最少化,或通过用共有序列来替代氨基酸来发现确定哪种氨基酸可以被取代,添加,或缺失而不会破坏目标活性的指导。

[0092] 或者,编码这些相同或类似多肽的重组变体可以通过使用在遗传密码中的“冗余性”来合成或选择。各种密码子置换,诸如产生各种限制性位点的沉默改变可以被引入从而优化克隆到质粒或病毒载体中,或在特定原核或真核系统中的表达。在多核苷酸序列中的突变可以反映在多肽或被加入多肽的其它肽的结构域中从而修饰多肽的任何部分的特性,从而改变特性诸如配体结合亲和性,链间亲和性,或降解/更新率。

[0093] 优选地,氨基酸“置换”是用具有相似结构和/或化学性质的另一个氨基酸取代的结果,即保守性氨基酸取代。“保守性”氨基酸置换可以在涉及的残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性性质的相似性基础上进行。例如,非极性(疏水)氨基酸包括丙氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,缬氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,色氨酸和甲硫氨酸;极性中性氨基酸包括甘氨酸,丝氨酸,苏氨酸,半胱氨酸,酪氨酸,天冬酰胺,和谷氨酰胺;带正电荷(碱性)的氨基酸包括精氨酸,赖氨酸和组氨酸;并且带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。“插入”或“缺失”优选地在约 1 到 20 个氨基酸的范围内,更优选在 1-10 个氨基酸范围内。容许的变化可以使用重组 DNA 技术和测定得到的重组变体的活性,通过系统性在多肽分子中进行氨基酸插入,缺失或置换来实验性地进行确定。

[0094] 用于本文时,术语人源化用于指来自非人抗原结合分子,例如,鼠抗体的抗原结合分子,其保持或基本保持母体分子的抗原结合特性,但是在人中具有更少的免疫原性。这可以通过各种方法来实现,所述方法包括 (a) 将整个非人的可变结构域移植到人恒定区上从而产生嵌合抗体, (b) 仅将非人 CDRs 移植到人构架和恒定区上,保留或不保留关键的构架残基 (例如,对于保持良好的抗原结合亲和性或抗体功能是重要的那些),或 (c) 移植整个非人的可变结构域,但是通过表面残基的取代用人样切片来“遮蔽”它们。这些方法公开于 Jones et al., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855(1984); Morrison 和 Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92(1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536(1988); Padlan, Molec. Immun., 28: 489-498(1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3): 169-217(1994), 将它们全部并入本文作为参考。在抗体的重链和轻链可变结构域中的每一个通常存在 3 个互补决定区,或 CDRs, (CDR1, CDR2 和 CDR3), 其侧面是抗体的重链和轻链可变结构域的每个中的四个构架亚区域 (即, FR1, FR2, FR3, 和 FR4): FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。人源化抗体的讨论可以,见于特别是美国专利号 6, 632, 927, 和公开的美国申请号 2003/0175269 中,将它们两者全文并入本文作为参考。

[0095] 类似地,用于本文时,术语 primatized 用于指来自非灵长类动物抗原结合分子的抗原结合分子,例如,鼠抗体,其保留或基本保留母体分子的抗原结合性质,但是在灵长类动物中具有更少的免疫原性。

[0096] 在本领域使用和 / 或接受的术语存在两个或多个定义的情形中,用于本文时的术语的定义倾向于包括所有的这些含义,除非明确地以相反的意思指出。具体的实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链和轻链多肽的可变区中发现的非连续抗原结合位点。这种特别的区域已经在 Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) 和 Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917(1987) 中进行了描述,将它们并入本文作为参考,其中当针对彼此比较时,所述定义包括氨基酸残基的重叠或子集。但是,将任一定义用于指抗体或其变体的 CDR 的应用倾向于在本文所限定和使用的术语的范围内。构成如上面引用的参考文献的每个所定义的 CDRs 的适合的氨基酸残基在下面的表 I 中提出作为比较。构成特定 CDR 的精确残基数目将根据 CDR 的序列和大小而变化。假定抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规确定那一种残基构成特定的 CDR。

[0097] 表 1. CDR 定义¹

[0098]

	Kabat	Chothia	AbM
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	

V _L CDR2	50-56	50-52	
V _L CDR3	89-97	91-96	

[0099] ¹表 1 中的所有的 CDR 定义的编号是按照 Kabat 等（见下）的编号方式进行的

[0100] Kabat 等还详细说明了用于可变结构域序列的编号系统，其可应用于任何抗体。本领域普通技术人员之一可以明确地将这种“Kabat 编号”系统用于任何可变结构域序列，而不依赖于超出序列本身之上的任何实验数据。用于本文时，“Kabat 编号”指由 Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983) 提出的编号系统。除非另外指出，对于在 ABM 中特定氨基酸残基位点的编号的参考是按照 Kabat 编号系统进行的。序列表的序列（即，SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:78）不是按照 Kabat 编号系统进行编号的。

[0101] 至于具有与本发明的参比核苷酸序列存在至少，例如 95% “同一性”的核苷酸序列的核酸或多核苷酸，意指多核苷酸的核苷酸序列与参比序列相同，除了多核苷酸序列可以包括参比核苷酸序列的每 100 个核苷酸中多到 5 个的点突变。换言之，为了获得具有与参比核苷酸序列有至少 95% 同一性的核苷酸序列的多核苷酸，在参比序列中多到 5% 的核苷酸可以缺失或被另一个核苷酸所置换，或在参比序列中多到 5% 的总核苷酸数目的核苷酸可以插入参比序列中。查询序列可以是在图 24 或图 25 任一中显示的整个序列。

[0102] 作为实践的问题，可以使用已知的计算机程序来常规确定是否任何特定的核酸分子或多肽与本发明的核苷酸序列或多肽序列具有至少 80%，85%，90%，95%，96%，97%，98% 或 99% 的同一性。确定在查询序列（本发明的序列）和目标序列之间的最佳全面匹配的优选方法，也被称为全域序列比对 (global sequence alignment)，可以使用基于 Brutlag 等, Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990) 的算法的 FASTDB 计算机程序进行确定。在序列比对中，查询序列和目标序列都是 DNA 序列。RNA 序列可以通过将 U' s 转化为 T' s 进行比较。所述全域序列比对的结果以百分比同一性表示。用在 DNA 序列的 FASTDB 比对中计算百分比同一性的优选参数是：矩阵=单式，k- 字长= 4，不匹配罚分= 1，合并罚分 (Joining Penalty) = 30，随机组长= 0，截断值评分= 1，空隙罚分= 5，空隙大小罚分 0.05，窗口大小= 500 或目标核苷酸序列的长度，无论哪一个更短。

[0103] 如果目标序列比查询序列更短是因为 5' 或 3' 缺失，而不是因为内部缺失，可以对结果进行手工校正。这是因为当计算百分比同一性时，该 FASTDB 程序并不说明目标序列的 5' 和 3' 截短。对于相对于查询序列，在 5' 或 3' 末端被截短的目标序列，通过将不匹配 / 比对的在目标序列的 5' 和 3' 的查询序列的碱基的数量计算为查询序列的总碱基百分比来对百分比同一性进行校正。通过 FASTDB 序列排列的结果来确定是否核苷酸匹配 / 比对。接着，将该百分比从使用指定参数通过上述 FASTDB 程序进行计算的百分比同一性中减去来达到最终的百分比同一性评分。这种校正评分用于本发明的目的。如通过 FASTDB 比对展示，仅有不与查询序列匹配 / 比对的，在目标序列的 5' 和 3' 碱基外侧的碱基出于手工调整百分比同一性评分的目的进行计算。

[0104] 例如，将 90 个碱基的目标序列与 100 个碱基的查询序列进行比对来确定百分比同一性。该缺失发生在目标序列的 5' 末端，并且因此，FASTDB 比对没有显示在 5' 末端首先的 10 个碱基的匹配 / 比对。这 10 个未配对碱基代表序列的 10%（未匹配的在 5' 和 3'

末端碱基的数量 / 与查询序列的碱基总数), 因此将 10% 从通过 FASTDB 程序计算的百分比同一性评分中减去。如果剩余的 90 个碱基完全匹配, 最终的百分比同一性将是 90%。在另一个实例中, 将 90 个碱基的目标序列与 100 个碱基的查询序列进行比较。这次, 缺失是内部缺失从而使在目标序列的 5' 或 3' 上不存在与查询序列不匹配 / 比对的碱基。在该情形中, 通过 FASTDB 计算的百分比同一性没有进行手工校正。再一次, 只对在不与查询序列匹配 / 比对的的目标序列的 5' 和 3' 碱基进行手工校正。出于本发明的目的, 没有进行其它的手工校正。

[0105] 至于具有与本发明的查询氨基酸序列有至少例如 95% “同一性”的氨基酸序列的多肽而言, 意指目标多肽的氨基酸序列与查询序列相同, 除了目标多肽序列可以在查询氨基酸序列的每 100 个氨基酸中包括多到 5 个氨基酸改变。换言之, 为了获得具有与查询氨基酸序列有至少 95% 同一性的氨基酸序列的多肽, 在目标序列中多到 5% 的氨基酸残基可以被插入, 缺失, 或被另一个氨基酸置换。参比序列的这些改变可以发生在参比氨基酸序列的氨基或羧基末端位点, 或在那些末端位点之间的任何地方, 其单独散在参比序列的残基中或在参比序列的一个或多个连续组中。

[0106] 作为实践的问题, 可以使用已知的计算机程序来常规确定是否任何特定的多肽与参比多肽具有至少 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 的同一性。确定在查询序列 (本发明的序列) 和目标序列之间的最佳全面匹配的优选方法, 也被称为全域序列比对, 可以使用基于 Brutlag 等, *Comp. App. Biosci.* 6 :237-245(1990) 的算法的 FASTDB 计算机程序进行确定。在序列比对中, 查询序列和目标序列都是核苷酸序列或都是氨基酸序列。所述全域序列比对的结果以百分比同一性表示。用在 FASTDB 氨基酸比对中的优选参数是: 矩阵 = PAM 0, k- 字长 = 2, 不匹配罚分 = 1, 合并罚分 (Joining Penalty) = 20, 随机组长 = 0, 截断值评分 = 1, 窗口大小 = 序列长度, 空隙罚分 = 5, 空隙大小罚分 0.05, 窗口大小 = 500 或目标氨基酸序列的长度, 无论哪一个更短。

[0107] 如果目标序列比查询序列更短是因为 N 端或 C 端缺失, 而不是因为内部缺失, 可以对结果进行手工校正。这是因为当计算全域百分比同一性时, 该 FASTDB 程序并不说明目标序列的 N 端和 C 端截短。对于相对于查询序列, 在 N 端和 C 端被截短的目标序列, 通过将相应的目标残基不匹配 / 比对的在目标序列的 N 端和 C 端的查询序列的残基的数量计算为查询序列的总碱基百分比来对百分比同一性进行校正。通过 FASTDB 序列比对的结果来确定是否残基是匹配 / 比对的。接着, 将该百分比从使用指定参数通过上述 FASTDB 程序进行计算的百分比同一性中减去来达到最终的百分比同一性评分。这种最终百分比同一性评分用于本发明的目的。出于手工调整百分比同一性评分的目的, 仅考虑不与查询序列匹配 / 比对的, 在目标序列的 N 端和 C 端的残基。即, 仅是在目标序列的最远 N 和 C 端残基外侧的查询残基位点。

[0108] 例如, 将 90 个氨基酸残基的目标序列与 100 个残基的查询序列进行比对来确定百分比同一性。该缺失发生在目标序列的 N 端, 并且因此, FASTDB 比对没有显示在 N 端前 10 个残基的匹配 / 比对。这 10 个未配对残基代表序列的 10% (未匹配的在 N 端和 C 端残基的数量 / 查询序列的残基总数), 因此将 10% 从通过 FASTDB 程序计算的百分比同一性评分中减去。如果剩余的 90 个残基完全匹配, 最终的百分比同一性将是 90%。在另一个实例中, 将 90 个残基的目标序列与 100 个残基的查询序列进行比较。这次, 缺失是内部缺失从

而使在目标序列的 N 端或 C 端上不存在与查询序列不匹配 / 比对的残基。在该情形中,通过 FASTDB 计算的百分比同一性没有进行手工校正。再一次,如通过 FASTDB 比对所显示的,只对在不与查询序列匹配 / 比对的的目标序列的 N 端和 C 末端残基外侧的残基位点进行手工校正。出于本发明的目的,没有进行其它的手工校正。

[0109] 用于本文时,“在严格条件下杂交”于本发明的核酸序列的核酸指在这样的条件下进行杂交的多核苷酸,所述条件为在包括 50% 的甲酰胺的溶液中于 42℃ 进行过夜温育, 5xSSC (750mM NaCl, 75mM 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH 7.6), 5xDenhardt' s 溶液, 10% 硫酸葡聚糖, 和 20 μ g/ml 的变性、已剪切的鲑精 DNA, 随后于约 65℃ 在 0.1xSSC 中洗涤滤器。

[0110] 用于本文时,术语高尔基体定位结构域指负责将多肽锚定在高尔基复合体的位置中的高尔基体定居多肽的氨基酸序列。通常,定位结构域包括酶的氨基末端“尾”。

[0111] 用于本文时,术语效应子功能指可归因于抗体的 Fc 区域 (天然序列 Fc 区域或氨基酸序列变体 Fc 区域) 的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括,但不限于, Fc 受体结合亲和性, 抗体依赖性细胞毒性 (ADCC), 抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP), 细胞因子分泌, 免疫复合物介导的抗原呈递细胞的抗原吸收, 细胞表面受体的下调等。

[0112] 用于本文时,认为术语改造,被改造,进行改造和糖基化改造包括天然存在或重组多肽或其片段的糖基化模式的任何操作。糖基化改造包括细胞的糖基化作用的代谢改造,所述代谢改造包括对寡糖合成途径进行遗传操作从而获得改变的在细胞中表达的糖蛋白的糖基化。此外,糖基化改造包括突变和细胞环境对糖基化的影响。

[0113] 用于本文时,术语宿主细胞包括任何种类的细胞系统,其可以进行改造从而产生本发明的多肽和抗原结合分子。在一个实施方案中,对宿主细胞进行改造从而容许产生具有修饰的糖形的抗原结合分子。在一个优选的实施方案中,抗原结合分子是抗体,抗体片段,或融合蛋白。在某些实施方案中,还对宿主细胞进行操作从而使其表达增加水平的一种或多种具有 GnTIII 活性的多肽。宿主细胞包括培养细胞,例如,哺乳动物培养细胞,诸如 CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, Y0 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞, 酵母细胞, 昆虫细胞, 和植物细胞, 仅举几个例子, 但是还包括被包含在转基因动物, 转基因植物或培养的植物或动物组织中的细胞。

[0114] 用于本文时,术语 Fc- 介导的细胞毒性包括抗体依赖性细胞的细胞毒性和由包含人 Fc- 区域的可溶 Fc- 融合蛋白介导的细胞的细胞毒性。这是一种导致“人免疫效应细胞”裂解“抗体靶向细胞”的免疫机制,其中:

[0115] 人免疫效应细胞是在它们的表面上显示 Fc 受体的白细胞群,通过所述 Fc 受体它们结合于抗体或 Fc- 融合蛋白的 Fc- 区域并且执行效应子功能。这样的群可以包括,但不限于,外周血单核细胞 (PBMC) 和 / 或天然杀伤 (NK) 细胞。

[0116] 抗体靶向细胞是由抗体或 Fc 融合蛋白结合的细胞。抗体或 Fc 融合蛋白通过蛋白将 N 端分配到 Fc 区域来结合于靶细胞。

[0117] 用于本文时,将术语增加的 Fc- 介导的细胞的细胞毒性定义为通过上述定义的 Fc- 介导的细胞的细胞毒性的机制,在围绕靶细胞的培养基中,以给定浓度的抗体,或给定浓度的 Fc- 融合蛋白,在给定时间内裂解的“抗体 - 靶向细胞”的数量的增加,和 / 或将其定义为通过 Fc 介导的细胞的细胞毒性,在给定的时间内,获得给定数量的“抗体靶向细胞”的裂解所需要的在围绕靶细胞的培养基中抗体浓度,或 Fc- 融合蛋白的浓度的减少。Fc- 介

导的细胞的细胞毒性的增加涉及由相同的抗体,或 Fc- 融合蛋白介导的细胞的细胞毒性,所述抗体或 Fc- 融合蛋白使用本领域那些技术人员已知的相同的标准产生,纯化,配制和贮存方法由相同类型的宿主细胞产生,若非不是由通过本文所述的方法进行了改造从而表达糖基转移酶 GnTIII 的宿主细胞产生。

[0118] 所谓具有增加的抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC) 的抗体,意指如本文所定义的术语的抗体,所述抗体如通过本领域那些普通技术人员已知的任何适合方法所确定的具有增加的 ADCC。一种被接受的体外 ADCC 测定如下:

[0119] 1) 该测定使用已知表达靶抗原的靶细胞,所述靶抗原由抗体的抗原结合区域所识别;

[0120] 2) 该测定使用分离自随机选择的健康供体的血液的人外周血单核细胞 (PBMCs),来作为效应细胞;

[0121] 3) 该测定按照下列方法进行:

[0122] i) 使用标准的密度离心方法来分离 PBMCs 并将其以 5×10^6 细胞 /ml 悬浮在 RPMI 细胞培养基中;

[0123] ii) 通过标准的组织培养方法培养靶细胞,在生存力大于 90% 的指数生长阶段来收集细胞,在 RPMI 细胞培养基中将其进行洗涤,用 100 微居的 ^{51}Cr 将其进行标记,并用细胞培养基将其洗涤两次,并以 10^5 细胞 /ml 的密度将其重悬于细胞培养基中;

[0124] iii) 将 100 微升的上述最终靶细胞混悬液转移到 96 孔微量滴定板的每孔中;

[0125] iv) 将抗体从 4000ng/ml 到 0.04ng/ml 在细胞培养基中进行系列稀释,将 50 微升的得到的抗体溶液加入 96 孔微量滴定板中的靶细胞,以三次重复测试各个抗体浓度,所述抗体浓度覆盖整个的上述范围的抗体浓度;

[0126] v) 对于最大释放 (MR) 对照,在包含标记的靶细胞的板中的 3 个另外的孔接受 50 微升的 2% (V/V) 的非离子去污剂 (Nonidet, Sigma, St. Louis) 的水溶液,取代抗体溶液 (上述的第 iv 点);

[0127] vi) 对于自发释放 (SR) 对照而言,在包含标记的靶细胞的板中的 3 个另外的孔接受 50 微升的 RPMI 细胞培养基,取代抗体溶液 (上述的第 iv 点);

[0128] vii) 接着将 96 孔微量滴定板以 $50 \times g$ 离心 1 分钟并在 4°C 温育 1 小时;

[0129] viii) 将 50 微升的 PBMC 混悬液 (上述第 i 点) 加入每个孔中从而产生 25:1 的效应物:靶细胞比率,并将板置于温箱中于 37°C 在 5% CO_2 气氛下达 4 小时。

[0130] ix) 从每个孔中收集无细胞的上清液,并使用 γ 射线计数器来量化实验释放的放射性 (ER);

[0131] x) 按照式 $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR}) \times 100$ 来计算每个抗体浓度的特定裂解的百分比,其中 ER 是对于该抗体浓度量化的平均放射性 (见上述第 ix 点),MR 是对于 MR 对照而言 (见上面的第 v 点) 量化的平均放射性 (见上面的第 ix 点),并且 SR 是对于 SR 对照而言 (见上面的第 vi 点) 量化的平均放射性 (见上面的第 ix 点);

[0132] 4) 将“增加的 ADCC”定义为在上述测试的抗体浓度范围内观察的特定裂解的最大百分比的增加,和 / 或上面测试的抗体浓度范围内观察到的获得特定裂解的最大百分比的一半所需要的抗体的浓度的减少。在 ADCC 中的增加涉及这样的 ADCC,其是在上述测定中测量的,由相同抗体介导的 ADCC,所述抗体使用本领域那些技术人员已知的相同的标准

产生,纯化,配制和贮存方法由相同类型的宿主细胞产生,若非不是由被改造从而过量表达 GnTIII 的宿主细胞所产生。

[0133] 在一个方面,本发明涉及具有鼠 B-Ly1 抗体的结合特异性的抗原结合分子,并涉及它们的效应子功能可以通过改变糖基化来增加的发现。在一个实施方案中,抗原结合分子是嵌合抗体。在一个优选的实施方案中,本发明涉及包括在图 7 中显示的 CDRs 的嵌合抗体,或其片段。具体而言,在优选的实施方案中,本发明涉及分离的多核苷酸,其包括:(a) 选自自由 SEQ ID NO. :5, SEQ ID NO. :6 和 SEQ ID NO. :7. (CDRs V_{H-1}) 组成的组的序列;(b) 选自自由 SEQ ID NO. :21, SEQ ID NO. :22 和 SEQ ID NO. :23. (CDRs V_{H-2}) 和 SEQ ID NO. :24 组成的组的序列。在另一个优选的实施方案中,本发明涉及分离的多核苷酸,其包括:SEQ ID NO. :8, SEQ ID NO. :9 和 SEQ ID NO. :10. (CDRs V_L)。在一个实施方案中,这些多核苷酸的任一个编码融合的多肽。

[0134] 在另一个实施方案中,抗原结合分子包括在图 1 中显示的鼠 B-Ly1 抗体的 V_H 结构域,或其变体和非鼠多肽。在另一个优选的实施方案中,本发明涉及抗原结合分子,其包括在图 2 中显示的鼠 B-Ly1 抗体的 V_L 结构域,或其变体;和非鼠的多肽。

[0135] 在另一个方面,本发明涉及抗原结合分子,其包括一个或多个截短的 BLy-1 的 CDRs。这些截短的 CDRs 将至少包括,给定的 CDR 的特异性决定氨基酸残基。所谓“特异性决定残基”意为直接涉及与抗原的相互作用的那些残基。通常,在给定的 CDR 中只有约 1/5 到 1/3 的残基参与与抗原的结合。在特定的 CDR 中的特异性决定残基可以通过,例如计算来自三维模型的原子间的接触和按照全部内容并入本文作为参考的 Padlan et al., FASEB J. 9(1):133-139(1995) 所述方法在给定的残基位点确定序列可变性来鉴别。

[0136] 因此,本发明还涉及分离的多核苷酸,其包括鼠 B-Ly1 抗体的至少一个互补决定区,或包含至少所述互补决定区的特异性决定残基的其变体或截短形式,其中所述分离的多核苷酸编码融合多肽。优选地,这些分离的多核苷酸编码作为抗原结合分子的融合多肽。在一个实施方案中,多核苷酸包括鼠 B-Ly1 抗体的三个互补决定区,或包含至少所述三个互补决定区的每个的特异性决定残基的其变体或其截短形式。在另一个实施方案中,多核苷酸编码嵌合(例如,人源化)抗体的轻链或重链的整个可变区。本发明还涉及由这些多核苷酸编码的多肽。

[0137] 在另一个实施方案中,本发明涉及抗原结合分子,其包括鼠 B-Ly1 抗体的至少一个互补决定区,或包含至少所述互补决定区的特异性决定残基的其变体或截短形式,并包含来自异源多肽的序列。在一个实施方案中,抗原结合分子包括鼠 B-Ly1 抗体的三个互补决定区,或其变体或截短形式,所述变体或截短形式包含至少所述三个互补决定区的每个的特异性决定残基。在另一个方面,抗原结合分子包括抗体的轻链或重链的可变区。在一个特别有用的实施方案中,抗原结合分子是嵌合的,例如人源化的抗体。本发明还涉及制备这些抗原结合分子的方法,和将其用在治疗疾病中,所述疾病包括 B 细胞淋巴瘤。

[0138] 已知一些机制涉及抗-CD20 抗体的治疗功效,所述机制包括抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC),补体依赖性细胞毒性 (CDC),和生长停滞或程序性细胞死亡的诱导。例如,大多数实验证据显示利妥昔单抗通过由 CDC 和 ADCC 测定所测量的常规效应子机制起作用。类似地,已经显示在体内不同淋巴瘤细胞对利妥昔单抗的抗性是它们在体外对 CDC 敏感性的函数。与此相对,已经被批准用于治疗性应用的另一个抗体, B1, 的体内作用模式既不需

要补体也不需要天然杀伤 (NK) 细胞活性。相反, B1 的体内功效是由于诱导有效的程序性细胞死亡的能力。

[0139] 通常, 抗-CD20 单克隆抗体基于它们在清除淋巴瘤细胞中的作用机制而分成两个不同的类别。I 型抗-CD20 抗体主要使用补体来杀死靶细胞, 而 II 型抗体通过不同的机制, 主要是程序性细胞死亡来起作用。利妥昔单抗和 1F5 是 I 型抗-CD20 抗体的实例, 而 B1 是 II 型抗体的实例。见, 例如 Cragg, M. S. 和 Glennie, M. J., *Blood* 103(7):2738-2743(2004 年 4 月); Teeling, J. L. et al., *Blood* 104(6):1793-1800(2004 年 9 月), 特此将其全部内容并入作为参考。

[0140] 本发明是对 II 型抗-CD20 抗体进行了改造从而增加其效应子功能诸如 ADCC, 同时仍旧保持有效的程序性细胞死亡能力的第一个已知实例。因此, 本发明涉及改造的 II 型抗-CD20 抗体, 其因为所述改造而具有增加的 ADCC 并且没有丧失诱导程序性细胞死亡的基本能力。在一个实施方案中, II 型抗-CD20 抗体已经被改造从而具有在 Fc 区域中的改变的糖基化模式。在特别的实施方案中, 改变的糖基化包括在 Fc 区域中增加水平的等分的复合残基。在另一个特别的实施方案中, 改变的糖基化包括在 Fc 区域中减少水平的岩藻糖残基。见, Shitara 等的美国专利申请公开号 2004 0093621, 将其全部内容并入作为参考。在另一个实施方案中, II 型-抗 CD20 抗体已经进行了多肽改造, 如在 Presta 的美国专利号 6, 737, 056 或美国专利申请公开号 2004 0185045 (Macrogenics) 或美国专利申请公开号 2004 0132101 (Xencor) 所教导, 将其每个的全部内容并入作为参考。本发明还涉及制备这样的被改造的 II 型抗体的方法, 和涉及使用这些抗体治疗各种 B 细胞疾病, 包括 B 细胞淋巴瘤的方法。

[0141] 已经描述了嵌合的小鼠/人抗体。见, 例如, Morrison, S. L. et al., *PNAS* 11: 6851-6854(1984 年 11 月); 欧洲专利公开号 173494; Boulianna, G. L. et al., *Nature* 312: 642(1984 年 12 月); Neubeiger, M. S. et al., *Nature* 314:268(1985 年 3 月); 欧洲专利公开号 125023; Tan et al., *J. Immunol.* 135:8564(1985 年 11 月); Sun, L. K. et al., *Hybridoma* 5(1):517(1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074(1986)。通常见, Muron, *Nature* 312:597(1984 年 12 月); Dickson, *Genetic Engineering News* 5(3)(1985 年 3 月); Marx, *Science* 229:455(1985 年 8 月); 和 Morrison, *Science* 229: 1202-1207(1985 年 9 月)。Robinson 等在 PCT 公开号 W0/88104936 中描述了具有人恒定区和鼠可变区的嵌合抗体, 其对于 CD20 的表位具有特异性; Robinson 参考文献的嵌合抗体的鼠部分来自 2H7 小鼠单克隆抗体 (γ 2b, kappa)。尽管该参考文献注意到所述的嵌合抗体是用于治疗 B 细胞疾病的“最佳候选物”, 可以仅将该陈述视为对于本领域技术人员确定是否该提示对于特定抗体是正确的建议, 特别是因为该参考文献缺乏支持判断治疗有效性的任何数据, 并且最重要的是, 使用更高级哺乳动物诸如灵长类动物或人的数据。

[0142] 本领域技术人员可获得产生嵌合抗体的方法。例如, 轻链和重链可以使用, 例如, 在单独质粒中, 或在单一(例如, 多顺反子)载体上的免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白重链分别进行表达。接着, 这些可以纯化并且在体外被装配成完整的抗体; 已经描述了完成这种装配的方法。见, 例如, Scharff, M., *Harvey Lectures* 69:125(1974)。还已经描述了用于从还原的分离轻链和重链形成 IgG 抗体的体外反应参数。见, 例如, Sears et al., *Biochem.* 16(9):2016-25(1977)。

[0143] 在特别优选的实施方案中,本发明的嵌合 ABM 是人源化的抗体。使非人的抗体人源化的方法是本领域已知的。例如,本发明的人源化 ABMs 可以按照 Winter 的美国专利号 5,225,539, Queen et al 的美国专利号 6,180,370, Adair et al 的美国专利号 6,632,927 的方法来进行制备,将其每个的全部内容特此并入作为参考。优选地,人源化的抗体具有一个或多个从非人的来源被引入其的氨基酸残基。这些非人的氨基酸残基通常被称作“输入”残基,其典型地取自“输入”可变结构域。人源化基本上可以按照 Winter 和合作者的方法 (Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536(1988)), 通过用高变区序列置换人抗体的相应序列来进行。因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中基本上(substantially)小于完整的人可变结构域被非人的物种的相应序列所取代。实际上,人源化的抗体典型地是人抗体,其中一些高变区残基和可能地一些 FR 残基被来自啮齿类动物抗体的类似位点的残基所取代。目标人源化抗-CD20 抗体将包括人免疫球蛋白的恒定区。

[0144] 选择待用于制备人源化抗体的人可变结构域,轻链和重链两者的可变结构域对于减少抗原性是非常重要的。按照所谓的“最佳-拟合”方法,针对已知人可变结构域序列的整个文库来筛选啮齿类动物抗体的可变结构域的序列。接着,最接近于啮齿类动物的序列的人序列被接受作为人源化抗体的人构架区 (FR) (Sims et al., J. Immunol., 151:2296(1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901(1987))。选择人构架序列的另一方法是针对相应于该构架亚区(例如,通过 Kabat 编号所确定)的已知人可变区序列的文库,比较完整啮齿类动物构架的每个单独的亚区(即,FR1, FR2, FR3, 和 FR4)或单独亚区的组合(例如,FR1 和 FR2)的序列,并选择对于每个亚区或组合最接近啮齿类动物的序列的人序列 (Leung 美国专利申请公开号 2003/0040606A1, 2003 年 2 月 27 日公开)。另一种方法使用来自特定亚组的轻链或重链的所有的人抗体的共有序列的特定构架区。相同的构架可以用于一些不同的人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623(1993))。

[0145] 也是重要的是抗体被人源化,同时保持对于抗原的高亲和性和其它有利的生物学性质。为了达到这个目标,按照优选的方法,通过使用母体序列和人源化序列的三维模型分析母体序列和各种概念上的人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可获得的,并且是本领域那些技术人员所熟悉的。可获得举例说明并显示选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。对这些显示的检查容许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,FR 残基可以从受体和输入序列中进行选择和组合从而获得所需的抗体特性,诸如对于靶抗原的增加的亲和性。通常,高变区残基直接和最主要地涉及影响抗原结合。

[0146] 在另一个实施方案中,本发明的抗原结合分子按照一定方法被改造以具有增加的结合亲和性,所述方法例如在 Balint 等的美国专利公开号 2004/0132066 中公开的方法,将其全部内容特此并入作为参考。

[0147] 在一个实施方案中,本发明的抗原结合分子与另外的部分诸如放射性标记或毒素缀合。这些缀合的 ABMs 可以通过本领域众所周知的许多方法来产生。

[0148] 可以将多种放射性核素用于本发明,并且本领域那些技术人员有能力容易地确定哪种核素在多种情况下是最合适的。例如,¹³¹碘是用于靶向免疫疗法的众所周知的放射性核素。然而,¹³¹碘的临床有效性可以被下列一些因素所限制,其包括:8天生理半衰期;在血液和在肿瘤位点的碘化抗体的脱卤;和会对于在肿瘤中的局部化剂量沉积不是最佳的发射特性(例如,大量 γ 组成)。随着更好的螯合剂的出现,将金属螯合基团连接于蛋白质的机会已经增加了使用其它的放射性核素诸如¹¹¹铟和⁹⁰钇的机会。⁹⁰钇提供了用于放射性免疫治疗应用中的一些优点:⁹⁰钇的64小时半衰期足够持久以容许肿瘤聚集抗体,并且不像,例如¹³¹碘,⁹⁰钇是高能量的纯 β 放射体,并且在其衰变中没有伴随 γ 辐射,在100-1000个细胞直径的组织范围内。此外,贯穿辐射的最少量容许给门诊病人施用⁹⁰钇标记的抗体。此外,对于细胞杀伤不需要被标记的抗体的内化,并且电离辐射的局部发射应该对于缺乏靶抗原的邻近肿瘤细胞是致死因子。

[0149] ⁹⁰钇标记的抗-CD20抗体的有效单一治疗剂量(即,治疗有效量)的范围在约5和约75mCi之间;更优选地在约10和约40mCi之间。¹³¹碘标记的抗-CD20抗体的有效单一治疗非骨髓消融剂量在约5和约70mCi之间,更优选地在约5和约40mCi之间。¹³¹碘标记的抗-CD20抗体的有效单一治疗消融剂量(即,可能需要自体骨髓移植)的范围在约30和约600mCi之间,更优选地在约50和少于约500mCi之间。结合嵌合的抗-CD20抗体,由于同鼠抗体相比具有更长的循环半衰期,¹³¹碘标记的嵌合抗-CD20抗体的有效单一治疗非骨髓消融剂量范围在约5和约40mCi之间,更优选地少于约30mCi。对于例如,¹¹¹铟标记的成像标准典型地少于约5mCi。

[0150] 关于放射性标记的抗-CD20抗体,以其进行的疗法也可以使用单次疗法治疗或使用多次治疗来进行。因为放射性核素成分,优选的是在治疗前,“收集”外周干细胞(“PSC”)或骨髓(“BM”)用于经历了由照射引起的潜在致命骨髓毒性的患者。使用标准技术来收集BM和/或PSC,并且接着进行清洗和冷冻用于可能的再输注。此外,最优选的是在治疗前,使用诊断标记的抗体(例如,使用¹¹¹铟)对患者进行诊断剂量学研究,其目的是确保治疗性标记的抗体(例如,使用⁹⁰钇)将不会导致在任何正常器官或组织中的不必要的“浓缩”。

[0151] 在优选的实施方案中,本发明涉及分离的多核苷酸,其包括编码具有在下面的表3中显示的氨基酸序列的多肽。本发明还涉及分离的核酸,其包括与在下面的表2中显示的核苷酸序列具有至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%同一性的序列。在另一个实施方案中,本发明涉及分离的核酸,所述核酸包括编码多肽的序列,所述多肽具有与表3中的氨基酸序列有至少80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或99%的同一性的氨基酸序列。本发明还涵盖分离的核酸,其包括编码多肽的序列,所述多肽具有表3中的构建体的任一个的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有保守性氨基酸置换。

[0152] 表2

[0153]

构建体	核苷酸序列	SEQ ID NO
B-HH1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCACTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATCCAAGGAAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	29
B-HH2	<u>CAGGTGCAATTGGTGCACTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	31
B-HH3	<u>CAGGTGCAATTGGTGCACTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TCTGTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u>	33
B-HH4	<u>CAGGTGCAATTGGTGCACTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGAGCTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>TCTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	35

[0154]

构建体	核苷酸序列	SEQ ID NO
B-HH5	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	37
B-HH6	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATCAATT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	39
B-HH7	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCGTTCAGCTATTCTTGGATCTCGT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCGCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	41
B-HH8	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACATACAGCTGGATGAAC</u> <u>TGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	43

[0155]

构建体	核苷酸序列	SEQ ID NO
B-HH9	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAAC</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	45
B-HL1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATGA</u> <u>CACGGGACACGTCCACTTCCACCGTCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	47
B-HL2	<u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG</u> <u>TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT</u> <u>GGGTGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACGCAGAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATC</u> <u>ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	49
B-HL3	<u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG</u> <u>TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAAC</u> <u>GGGTGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGAAGAGTCACAATC</u> <u>ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	51

[0156]

构建体	核苷酸序列	SEQ ID NO
B-HL4	<u>CAGATGCAATTGGTGCACTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGACCGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATTCCAAGGAAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u>	53
B-HL8	<u>GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT</u> <u>CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG</u> <u>CCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG</u> <u>GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	55
B-HL10	<u>CGGAATTCGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCATTCAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	57
B-HL11	<u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT</u> <u>CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG</u> <u>CCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG</u> <u>GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	59

[0157]

构建体	核苷酸序列	SEQ ID NO
B-HL12	<u>CGGAATTCGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTG</u> <u>GAGCAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	61
B-HL13	<u>CGGAATTCGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTCGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCGTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	63
B-HL14	<u>CGGAATTCGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCG</u> <u>GAGGAGGCTTGAAGAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	65

[0158]

构建体	核苷酸序列	SEQ ID NO
B-HL15	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCTCTTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	67
B-HL16	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>GTCAGCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	69
B-HL17	<u>CGGAATTCGGCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	71
VH 信号 序列	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC</u> <u>AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC</u>	73
B-KV1	<u>GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCC</u> <u>GTCACCCCTGGAGAGCCCGCCAGCATTAGCTGCAG</u> <u>GTCTAGCAAGAGCCTCTTGACAGCAATGGCATCA</u> <u>CTTATTTGTATTGGTACCTGCAAAAGCCAGGGCAG</u> <u>TCTCCACAGCTCCTGATTTATCAAATGTCCAACCTT</u> <u>GTCTCTGGCGTCCCTGACCGGTTCTCCGGATCCGGG</u> <u>TCAGGCACTGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGT</u> <u>GGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCGCTC</u> <u>AGAATCTAGAACTTCCTTACACCTTCGGCGGAGGG</u> <u>ACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTG</u>	75

[0159]

构建体	核苷酸序列	SEQ ID NO
VL 信号 序列	<u>ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCT</u> <u>CCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCCAGGTGT</u>	77

[0160] 表 3

[0161]

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
B-HH1	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSYSWMSWVR</u> <u>QAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYAOKFOGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	30
B-HH2	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	32
B-HH3	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMNWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYLCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	34
B-HH4	<u>QVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSYSWMNWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	36
B-HH5	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWMSWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	38
B-HH6	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVR</u> <u>QAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	40
B-HH7	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWISWVR</u> <u>QAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	42
B-HH8	<u>QVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMNWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	44
B-HH9	<u>QVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSYSWMNWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	46
B-HL1	<u>QVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTYSWMHWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYAOKFOGRVTMTRDT</u> <u>STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	48

[0162]

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
B-HL2	<u>EVOLVOSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMHWV</u> <u>OOAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYAEKFOGRVTITADTS</u> <u>TDAYMELSSLRSED TAVYYCATNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>50</u>
B-HL3	<u>EVOLVOSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMNWV</u> <u>OOAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADTS</u> <u>TDAYMELSSLRSED TAVYYCATNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>52</u>
B-HL4	<u>OMOLVOSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYSWMSWV</u> <u>ROAPGOGLEWMGRIFPGDGD TDYAKFOGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>54</u>
B-HL8	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>56</u>
B-HL10	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>58</u>
B-HL11	<u>QVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>60</u>
B-HL12	<u>EVOLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>62</u>
B-HL13	<u>EVOLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>64</u>
B-HL14	<u>EVOLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>66</u>
B-HL15	<u>EVOLVESGGGLVKPGSSRLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>68</u>
B-HL16	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>70</u>
B-HL17	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>72</u>
VH 信号 序列	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	<u>74</u>

[0163]

构建体	氨基酸序列	SEQ ID NO
B-KV1	<u>DIVMTOTPLSLPVTGPASISCRSSKSLLSNGITYLYWY</u> <u>LQKPGOSPOLLTYOMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS</u> <u>RVEAEDVGVYYCAQNLLELPYTFGGGKVEIKRTV</u>	76
VL 信号 Seq1	<u>MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC</u>	78

[0164] 在另一个优选的实施方案中,本发明涉及分离的多核苷酸,其包括编码具有在图 1 或图 2 中显示的氨基酸序列的多肽。本发明还涉及分离的核酸,其包括与在图 5 或图 6 中显示的核苷酸序列具有至少 80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或 99%同一性的序列。在另一个实施方案中,本发明涉及分离的核酸,其包括编码多肽的序列,所述多肽具有与图 5 或图 6 的氨基酸序列有至少 80%,85%,90%,95%,96%,97%,98%或 99%同一性的氨基酸序列。本发明还涵盖分离的核酸,其包括编码多肽的序列,所述多肽具有与图 1,图 2,图 5 或图 6 的任一个的氨基酸序列,所述氨基酸序列具有保守性氨基酸置换。

[0165] 在另一个实施方案中,本发明涉及表达载体和 / 或宿主细胞,其包括一种或多种本发明的分离的多核苷酸。

[0166] 一般而言,任何类型的培养的细胞系可以用于表达本发明的 ABM。在一个优选的实施方案中,将 CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, YO 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER.C6 细胞或杂交瘤细胞,其它哺乳动物细胞,酵母细胞,昆虫细胞,或植物细胞用作背景细胞系以产生本发明的被改造的宿主细胞。

[0167] 本发明的 ABMs 的治疗功效可以通过将它们在这样的宿主细胞中产生来得以增加,所述宿主细胞还表达编码具有 GnTIII 活性的多肽的多核苷酸。在优选的实施方案中,具有 GnTIII 活性的多肽是包括高尔基体定居多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽。在另一个优选的实施方案中,在一定宿主细胞中表达本发明的 ABMs 导致了具有增加的 Fc 受体结合亲和性和增加的效应子功能的 ABMs,所述宿主细胞表达编码具有 GnTIII 活性的多肽的多核苷酸。因此,在一个实施方案中,本发明涉及这样的宿主细胞,所述宿主细胞包括 (a) 包括编码具有 GnTIII 活性的多肽的序列的分离的核酸;和 (b) 编码本发明的 ABM 的分离的多核苷酸,所述 ABM 诸如结合人 CD20 的嵌合的,primatized 或人源化的抗体。在优选的实施方案中,具有 GnTIII 活性的多肽是包括 GnTIII 的催化结构域的融合多肽,并且该高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 的定位结构域。产生这样的融合多肽的方法和使用它们产生具有增加的效应子功能的抗体的方法公开于美国临时专利申请号 60/495,142,将其全部内容特别并入本文作为参考。在另一个优选的实施方案中,嵌合的 ABM 是嵌合的抗体或其片段,其具有鼠 B-LY1 抗体的结合特异性。在特别优选的实施方案中,嵌合抗体包括人 Fe。在另一个优选的实施方案中,该抗体被 primatized 或人源化。

[0168] 在一个实施方案中,一个或多个编码本发明的 ABM 的多核苷酸可以在组成型启动子或备选地调节表达系统的控制下进行表达。适合的调节表达系统包括,但不限于,四环素调节的表达系统,可蜕皮素诱导的表达系统, lac- 转换表达系统,可糖皮质激素诱导的表达系统,可温度诱导的启动子系统,和金属硫蛋白金属可诱导表达系统。如果编码本发明的 ABM 的一些不同核酸被包括在宿主细胞系统中,它们中的一些可以在组成型启动子的控制下进行表达,而其它的可以在调节启动子的控制下进行表达。认为最大表达水平是稳定的

多肽表达的最高可能水平,其对细胞生长速率不具有显著的不利影响,并且将使用常规实验进行测定。表达水平通过本领域通常了解的方法进行确定,所述方法包括使用特异于 ABM 的抗体或特异于融合 ABM 的肽标签的抗体进行的蛋白质印迹分析;和 RNA 印迹分析。在另外的备选,多核苷酸可以操作性地连接于报道基因;具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性的嵌合 ABM 的表达水平通过测量与报道基因的表达水平相关的信号来进行确定。报道基因可以与编码所述融合多肽的核酸一起被转录为单个 mRNA 分子;它们各自的编码序列可以通过内部核糖体进入位点(IRES)或通过不依赖帽的翻译增强子(CITE)进行连接。该报道基因可以与至少一个编码嵌合 ABM 的核酸一起翻译从而形成单一的多肽链,所述 ABM 具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性。编码本发明的 AMBs 的核酸可以在单一启动子控制下操作性地连接于报道基因从而使编码融合多肽的核酸和报道基因转录到 RNA 分子中,所述 RNA 分子选择性地被剪接成两个单独的信使 RNA(mRNA)分子;得到的 mRNAs 之一翻译成所述报道蛋白质,而另一个被翻译成所述融合多肽。

[0169] 本领域那些技术人员众所周知的方法可以用于构建表达载体,所述表达载体包含具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性的 ABM 的编码序列以及适合的转录/翻译控制信号。这些方法包括体外重组 DNA 技术,合成技术和体内重组/遗传重组。见,例如,描述在 Maniatis et al., MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) 和 Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989) 中的技术。

[0170] 多种宿主表达载体系统可以用于表达本发明的 ABMs 的编码序列。优选地,将哺乳动物细胞用作用重组质粒 DNA 或黏粒 DNA 表达载体转染的宿主细胞系统,所述重组质粒 DNA 或黏粒 DNA 表达载体包含目标蛋白质的编码序列和融合多肽的编码序列。最优选地,将 CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, YO 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER. C6 细胞或杂交瘤细胞,其它哺乳动物细胞,酵母细胞,昆虫细胞,或植物细胞用作宿主细胞系统。表达系统和选择方法的一些实例描述在下列参考文献,及其参考文献中:Borth et al., Biotechnol. Bioen. 71(4):266-73(2000-2001), 在 Werner et al., Arzneimittelforschung/Drug Res. 48(8):870-80(1998) 中, 在 Andersen 和 Krummen, Curr. Op. Biotechnol. 13:117-123(2002) 中, 在 Chadd 和 Chamow 中, Curr. Op. Biotechnol. 12:188-194(2001) 中,和在 Giddings, Curr. Op. Biotechnol. 12:450-454(2001) 中。在备选的实施方案中,可以意欲其它的真核生物宿主细胞系统,包括用重组酵母表达载体转化的酵母细胞,所述表达载体包含本发明的 ABM 的编码序列;用重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统,所述病毒表达载体包含嵌合 ABM 的编码序列,所述嵌合 ABM 具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性;用重组的病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV;烟草花叶病毒, TMV)感染的植物细胞系统或用重组质粒表达载体(例如, Ti 质粒)转化的植物细胞系统,所述质粒表达载体包含本发明的 ABM 的编码序列;或用重组病毒表达载体(例如,腺病毒,痘苗病毒)感染的动物细胞系统,其包括被改造从而包含编码嵌合 ABM 的 DNA 的多个拷贝的细胞系,所述嵌合 ABM 具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性,所述 DNA 的多个拷贝稳定扩增(CHO/dhfr)或在双微染色体(例如,鼠细胞系)中不稳定扩增。在一个实施方案中,包含编码本发明的 ABM 的多核苷酸的载体是多顺反子的。此外,在一个实施方案中,上面讨论的 ABM 是抗体或其片段。在一个优选

的实施方案中,该 ABM 是人源化的抗体。

[0171] 对于本发明的方法而言,稳定的表达通常优选进行瞬时表达,因为其典型地获得更可再现的结果并且对于大规模生产也是易于控制的。优于使用包含病毒的复制起点的表达载体,宿主细胞可以用受适合的表达控制元件(例如,启动子,增强子,序列,转录终止子,聚腺苷酸化位点等)控制的各自的编码核酸,和可选择的标志物转化。在引入外源 DNA 后,被改造的细胞可以容许在富集培养基中生长 1-2 天,并接着转到选择性培养基中。在重组质粒中的可选择标志物赋予对于选择的抗性并容许细胞的选择,所述细胞将质粒稳定地整合到它们的染色体中并生长形成转化灶,其又可以克隆和扩增到细胞系中。

[0172] 可以使用许多选择系统,包括,但不限于,单纯疱疹病毒的胸苷激酶(Wigler et al., Cell 11:223(1977)),次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska&Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026(1962)),和腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy et al., Cell 22:817(1980))基因,它们分别可以用在 tk⁻, hgp⁻ 或 ap⁻ 细胞中。此外,抗代谢物抗性可以用作对于下列的选择的基础:赋予针对甲氨蝶呤的抗性的 dhfr 基因(Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:3567(1989); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527(1981));赋予针对霉酚酸的抗性的 gpt 基因(Mulligan&Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072(1981));赋予针对氨基糖苷 G-418 的抗性的 neo 基因(Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1(1981));和赋予针对潮霉素的抗性的 hyg^r 基因(Santerre et al., Gene 30:147(1984))。最近,已经描述了另外的可选择基因,即容许细胞使用吡啶取代色氨酸的 trpB 基因;容许细胞使用组氨酸取代组氨酸的 hisD(Hartman&Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047(1988));谷氨酰胺合成酶系统;和赋予针对鸟氨酸脱羧酶抑制剂,2-(二氟甲基)-DL-鸟氨酸,DFMO 的抗性的 ODC(鸟氨酸脱羧酶)(McConlogue, 在 Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987) 中)。

[0173] 本发明还涉及修饰由宿主细胞产生的本发明的 ABMs 的糖基化模式的方法,所述方法包括在所述宿主细胞中表达编码本发明的 ABM 的核酸和编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸或包括这些核酸的载体。优选地,修饰的多肽是 IgG 或其片段,所述 IgG 或其片段包含 Fc 区域。在特别优选的实施方案中,该 ABM 是人源化的抗体或其片段。

[0174] 由本发明的宿主细胞产生的被修饰的 ABMs 作为修饰的结果,显示增加的 Fc 受体结合亲和性和/或增加的效应子功能。在特别优选的实施方案中,该 ABM 是包含 Fc 区域的人源化的抗体或其片段。优选地,增加的 Fc 受体结合亲和性增加到与 Fc γ 激活受体,诸如 Fc γ RIIIa 受体结合。增加的效应子功能优选地是下列的一个或多个的增加:增加的抗体依赖性细胞的细胞毒性,增加的抗体依赖性细胞的吞噬作用(ADCP),增加的细胞因子分泌,增加的免疫复合物介导的抗原呈递细胞对抗原的吸收,增加的 Fc γ 介导的细胞的细胞毒性,增加的与 NK 细胞的结合,增加的与巨噬细胞的结合,增加的与多形核细胞(PMNs)的结合,增加的与单核细胞的结合,增加的靶结合抗体的交联,增加的定向信号传导诱导的程序性细胞凋亡,增加的树突细胞成熟,和增加的 T 细胞引发。

[0175] 本发明还涉及在宿主细胞中产生具有修饰的寡糖的本发明的 ABM 的方法,所述方法包括(a)在容许按照本发明的 ABM 产生的条件下,培养被改造从而表达至少一个编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸的宿主细胞,其中所述具有 GnTIII 活性的所述多肽以一定量

来进行表达,所述量足以修饰在由所述宿主细胞产生的所述 ABM 的 Fc 区域中的寡糖;和 (b) 分离所述 ABM。在优选的实施方案中,具有 GnTIII 活性的多肽是包括 GnTIII 的催化结构域的融合多肽。在特别优选的实施方案中,该融合多肽还包括高尔基体定居多肽的高尔基体定位结构域。

[0176] 优选地,高尔基体定位结构域是甘露糖苷酶 II 或 GnTI 的定位结构域。或者,高尔基体定位结构域选自由下列组成的组:甘露糖苷酶 I 的定位结构域,GnTII 的定位结构域,和 α 1-6 核心岩藻糖基转移酶的定位结构域。由本发明的方法产生的 ABMs 具有增加的 Fc 受体结合亲和性和 / 或增加的效应子功能。优选地,增加的效应子功能是下列的一个或多个:增加的 Fc- 介导的细胞毒性(包括增加的抗体依赖性细胞的细胞毒性),增加的抗体依赖性细胞的吞噬作用(ADCP),增加的细胞因子分泌,增加的免疫复合物介导的抗原呈递细胞对抗原的吸收,增加的与 NK 细胞的结合,增加的与巨噬细胞的结合,增加的与单核细胞的结合,增加的与多形核细胞的结合,增加的定向信号传导诱导的程序性细胞调亡,增加的靶结合抗体的交联,增加的树突细胞成熟,或增加的 T 细胞引发。优选地,增加的 Fc 受体结合亲和性增加到与 Fc 激活受体,诸如 Fc γ RIIIa 结合。在特别优选的实施方案中,该 ABM 是人源化抗体或其片段。

[0177] 在另一个实施方案中,本发明涉及嵌合的 ABM,其具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性,通过本发明的方法产生,在所述多肽的 Fc 区域中具有增加比例的等分寡糖。意欲这样的 ABM 涵盖包括 Fc 区域的抗体和其片段。在优选的实施方案中,该 ABM 是人源化抗体。在一个实施方案中,在 ABM 的 Fc 区域中的等分的寡糖的百分比是总寡糖的至少 50%,更优选地,至少 60%,至少 70%,至少 80%,或至少 90%,并且最优选地是至少 90-95%。在另一个实施方案中,通过本发明的方法产生的 ABM 作为其通过本发明的方法修饰其寡糖的结果在 Fc 区域中具有增加比例的非岩藻糖基化寡糖。在一个实施方案中,非岩藻糖基化寡糖的百分比是至少 50%,优选地,至少 60%到 70%,最优选地至少 75%。非岩藻糖基化的寡糖可以是杂合的或复合的类型。在特别优选的实施方案中,由宿主细胞和本发明的方法产生的 ABM 在 Fc 区域中具有增加比例的等分的,非岩藻糖基化的寡糖。该等分的,非岩藻糖基化的寡糖可以是杂合的或复合的。具体而言,本发明的方法可以用于产生 ABMs,其中在 ABM 的 Fc 区域中的至少 15%,更优选地至少 20%,更优选地至少 25%,更优选地至少 30%,更优选地至少 35%的寡糖是等分的,非岩藻糖基化的。本发明的方法还可以用于产生多肽,其中在多肽的 Fc 区域中的至少 15%,更优选地至少 20%,更优选地至少 25%,更优选地至少 30%,更优选地至少 35%的寡糖是等分的杂合非岩藻糖基化的。

[0178] 在另一个实施方案中,本发明的方法涉及嵌合 ABM,其具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合亲和性,被改造从而具有增加的效应子功能和 / 或增加的 Fc 受体结合亲和性,通过本发明的方法产生。优选地,增加的效应子功能是下列的一个或多个:增加的 Fc- 介导的细胞的细胞毒性(包括增加的抗体依赖性细胞的细胞毒性),增加的抗体依赖性细胞的吞噬作用(ADCP),增加的细胞因子分泌,增加的免疫复合物介导的抗原呈递细胞对抗原的吸收,增加的与 NK 细胞的结合,增加的与巨噬细胞的结合,增加的与单核细胞的结合,增加的与多形核细胞的结合,增加的定向信号传导诱导的程序性细胞调亡,增加的靶结合抗体的交联,增加的树突细胞成熟,或增加的 T 细胞引发。在优选的实施方案中,增加的 Fc 受体结合亲和性增加到与 Fc 激活受体,最优选地,Fc γ RIIIa 结合。在一个实施方案中,该 ABM 是

包含 Fc 区域的抗体, 抗体片段, 或包括等价于免疫球蛋白的 Fc 区域的区域的融合蛋白。在特别优选的实施方案中, 该 ABM 是人源化抗体。

[0179] 本发明还涉及药物组合物, 其包括本发明的 ABMs 和药用载体。

[0180] 本发明还涉及将这些药物组合物用在治疗癌症的方法中。具体而言, 本发明涉及治疗癌症的方法, 所述方法包括施用治疗有效量的本发明药物组合物。

[0181] 本发明还提供产生和使用宿主细胞系统用于产生本发明的 ABMs 的糖形的方法, 所述 ABM 具有增加的 Fc 受体结合亲和性, 优选地增加的与 Fc 激活受体的结合, 和 / 或具有增加的效应子功能, 所述效应子功能包括抗体依赖性细胞的细胞毒性。可以用于本发明的 ABMs 的糖改造方法详细描述于美国专利号 6, 602, 684 和临时美国专利申请号 60/441, 307 和 W02004/065540, 将其每个的全部内容并入本文作为参考。或者, 本发明的 ABMs 可以进行糖改造从而在 Fc 区域中具有减少的岩藻糖残基, 所述糖改造按照公布于 EP 1 176 195 A1 中的技术进行, 将其全部内容并入本文作为参考。

[0182] 用于制备具有改变的糖基化模式的蛋白质的细胞系的产生

[0183] 本发明提供宿主细胞表达系统, 其用于产生具有修饰的糖基化模式的本发明的 ABMs。特别地, 本发明提供宿主细胞系统, 其用于产生具有提高的治疗价值的本发明的 ABMs 的糖形。因此, 本发明提供被选择或被改造以用于表达具有 GnTIII 活性的多肽的宿主细胞表达系统。在一个实施方案中, 具有 GnTIII 活性的多肽是包括异源高尔基体定居多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽。具体而言, 这样的宿主细胞表达系统可以进行改造从而包括编码具有 GnTIII 的多肽的重组核酸分子, 其操作性地连接于组成型或调节性启动子系统。

[0184] 在一个具体实施方案中, 本发明提供宿主细胞, 其已经被改造从而表达至少一个编码融合多肽的核酸, 所述融合多肽具有 GnTIII 活性并包括异源高尔基体定居多肽的高尔基体定位结构域。在一个方面, 宿主细胞被改造具有核酸分子, 所述核酸分子包括编码融合多肽的至少一个基因, 所述融合多肽具有 GnTIII 活性并包括异源高尔基体定居多肽的高尔基体定位结构域。

[0185] 一般而言, 任何类型的培养的细胞系, 包括上述讨论的细胞系, 可以用作背景来改造本发明的宿主细胞系。在一个优选的实施方案中, 将 CHO 细胞, BHK 细胞, NS0 细胞, SP2/0 细胞, YO 骨髓瘤细胞, P3X63 小鼠骨髓瘤细胞, PER 细胞, PER. C6 细胞或杂交瘤细胞, 其它哺乳动物细胞, 酵母细胞, 昆虫细胞, 或植物细胞用作背景细胞系以产生本发明的被改造的宿主细胞。

[0186] 本发明意欲涵盖任何被改造的宿主细胞, 其表达具有 GnTIII 活性的多肽, 包括包含如本文定义的异源高尔基体定居多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽。

[0187] 一个或数个编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸可以在组成型启动子, 或备选地, 调节性表达系统控制下进行表达。这些系统是本领域众所周知的, 并且包括上面讨论的系统。如果编码具有 GnTIII 活性并包括异源高尔基体定居多肽的高尔基体定位结构域的融合多肽的几种不同核酸被包括在宿主细胞系统中, 它们中的一些可以在组成型启动子的控制下进行表达, 而其它的在调节性启动子的控制下进行表达。具有 GnTIII 活性的融合多肽的表达水平由本领域通常了解的方法所确定, 所述方法包括蛋白质印迹分析, RNA 印迹分析, 报道基因表达分析或测量 GnTIII 活性。或者, 可以使用结合 GnTIII 的生物合成产物的

凝集素,例如,E₄-PHA 凝集素。或者,可以使用功能性测定,其测量由这样的细胞产生的抗体介导的增加的 Fc 受体结合或增加的效应子功能,所述细胞用编码具有 GnTIII 活性的多肽的核酸进行改造。

[0188] 表达具有修饰的糖基化模式的蛋白质的转染子或转化体的鉴定

[0189] 包含嵌合 ABM 的编码序列并表达生物学活性基因产物的宿主细胞可以通过至少下列四个常规方法进行鉴定;(a)DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交;(b)“标志物”基因功能的存在或缺乏;(c)如通过各个 mRNA 转录物在宿主细胞中表达所测量的评估转录的水平;和(d)如通过免疫测定或通过其生物学活性所测量的来检测基因产物,所述嵌合 ABM 具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性。

[0190] 在第一个方法中,嵌合 ABM 的编码序列和具有 GnTIII 活性的多肽的编码序列的存在可以使用包含核苷酸序列的探针,通过 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交来进行检测,所述嵌合 ABM 具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性,所述核苷酸序列与各个编码序列,或其部分或衍生物分别具有同源性。

[0191] 在第二个方法中,重组表达载体/宿主系统可以基于某些“标志物”基因功能(例如,胸苷激酶活性,对抗生素的抗性,对甲氨蝶呤的抗性,转化表型,在杆状病毒中的包含体形成等)来进行鉴定和选择。例如,如果本发明的 ABM 的编码序列,或其片段,和具有 GnTIII 活性的多肽的编码序列被插入载体的标志物基因序列中,包含各个编码序列的重组体可以通过标志物基因功能的缺乏而进行鉴定。或者,标志物基因可以在用于控制编码序列的表达的相同或不同启动子控制下与编码序列一起串联排列。响应于诱导或选择的标志物的表达显示本发明的 ABM 的编码序列和具有 GnTIII 活性的多肽的编码序列的表达。

[0192] 在第三个方法中,本发明的 ABM 的编码区,或其片段,和具有 GnTIII 活性的多肽的编码序列的转录活性可以通过杂交测定进行评估。例如, RNA 可以使用探针通过 RNA 印迹来进行分离和分析,所述探针与本发明的 ABM 的编码序列,或其片段,和具有 GnTIII 活性的多肽的编码序列,或其特定部分具有同源性。或者,可以对宿主细胞的总核酸进行抽提并测定与这些探针的杂交。

[0193] 在第四个方法中,蛋白质产物的表达可以,例如通过蛋白质印迹法,免疫测定诸如放射免疫沉淀法,酶联免疫测定等来进行免疫活性地评估。然而,表达系统成功的最终测试包括检测生物学活性的基因产物。

[0194] 产生和使用具有增加的效应子功能的 ABMs,所述效应子功能包括抗体依赖性细胞的细胞毒性

[0195] 在优选的实施方案中,本发明提供嵌合的 ABMs 的糖形,所述嵌合的 ABMs 具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性并具有增加的效应子功能,所述效应子功能包括抗体依赖性细胞的细胞毒性。已经在前面描述了抗体的糖基化改造。见,例如美国专利号 6,602,684,将其全部内容并入本文作为参考。

[0196] 将未缀合的单克隆抗体(mAbs)用于治疗一些类型的癌症的临床试验最近已经产生了令人鼓舞的结果。Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25(1997); Deo et al., Immunology Today 18:127(1997)。一种嵌合的,未缀合的 IgG1 已经被批准用于低级或滤泡性的 B-细胞非霍奇金氏淋巴瘤。Dillman, Cancer Biother. & Radiopharm. 12:223-25(1997),而另一种未缀合的 mAb,靶向实体乳腺肿瘤的人源化 IgG1 已经显示了在 III

期临床试验中的有前景的结果。Deo et al., *Immunology Today* 18:127(1997)。这两种 mAbs 的抗原在它们各自的肿瘤细胞中高度表达并且抗体在体外和体内通过效应细胞介导有效的肿瘤破坏。与此相对,许多其它的具有优良肿瘤特异性的未缀合 mAbs 不能引发在临床上有用的足够潜能的效应子功能。Frost et al., *Cancer* 80:317-33(1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91(1996)。对于这些弱 mAbs 而言,目前测试了辅助的细胞因子疗法。另外的细胞因子可以通过增加循环淋巴细胞的活性和数量而刺激抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。Frost et al., *Cancer* 80:317-33(1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91(1996)。ADCC, 一种对抗体靶向的细胞的溶胞攻击,在白细胞的受体与抗体的恒定区 (Fc) 结合后得以引发。Deo et al., *Immunology Today* 18:127(1997)。

[0197] 一种增加未缀合的 IgG1s 的 ADCC 活性的不同的,但是补充性的方法是改造抗体的 Fc 区域。蛋白质改造研究已经显示 Fc γ Rs 与 IgG CH2 结构域的低级铰链区相互作用。Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69(1996)。然而, Fc γ R 结合也需要在 CH2 区域中的保守 Asn 297 处共价连接的寡糖的存在。Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69(1996); Wright 和 Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31(1997), 提示寡糖和多肽都直接有利于相互作用的位点或需要寡糖来维持活性 CH2 多肽构象。因此可以开发对寡糖结构的修饰用作增加相互作用亲和性的方式。

[0198] IgG 分子在其 Fc 区域中携带两个 N 连接的寡糖,每个在各自的重链上。如任何糖蛋白,抗体作为糖形的群产生,其共享相同的多肽主链但是具有不同的连接于糖基化位点的寡糖。通常见于血清 IgG 的 Fc 区域中的寡糖是复合的双触角类型 (Wormald et al., *Biochemistry* 36:130-38(1997)), 其具有低水平的末端唾液酸和等分的 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc), 和不同程度的末端半乳糖基化和核心岩藻糖基化。一些研究显示 Fc γ R 结合所需要的最小糖结构位于寡糖核心中。Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69(1996)。

[0199] 用于产生未缀合的治疗性 mAbs 的用在工业和研究中的小鼠或仓鼠来源的细胞系通常将所需的寡糖决定于连接于 Fc 位点。然而,在这些细胞系中表达的 IgGs, 缺乏以低量见于血清 IgGs 的等分 GlcNAc。Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22(1995)。与此相对,最近观察到大鼠的骨髓瘤产生的,人源化 IgG1 (CAMPATH-1H) 在其糖形的一些中携带等分的 GlcNAc。Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22(1995)。大鼠的细胞衍生的抗体与由标准的细胞系产生的 CAMPATH-1H 抗体相比,达到了相似的最大体外 ADCC 活性,但是其以显著更低的抗体浓度存在。

[0200] CAMPATH 抗原通常以高水平存在于淋巴瘤细胞上,并且这种嵌合的 mAb 在缺乏等分的 GlcNAc 时具有高 ADCC 活性。Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22(1995)。在 N-连接的糖基化途径中,等分的 GlcNAc 通过 GnTIII 加入。Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81(1986)。

[0201] 以前的研究使用单一的抗体产生 CHO 细胞系,其被预先改造从而以外部调节的方式,表达不同水平的克隆的 GnT III 基因酶 (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180(1999))。这种方法首次在修饰的抗体的 GnTIII 的表达和 ADCC 活性之间建立严格的关联。因此,本发明意欲这样的重组的,嵌合抗体或其片段,其具有鼠 B-Ly1 抗体的结合特异性,具有由增加的 GnTIII 活性所导致的改变的糖基化。增加的 GnTIII 活性导致在 ABM 的 Fc 区域中,等分的寡糖的百分比中的增加,以及岩藻糖残基的百分比的减少。这种抗体,

或其片段,具有增加的 Fc 受体结合亲和性和增加的效应子功能。此外,本发明涉及抗体片段和融合蛋白,它们包括等价于免疫球蛋白的 Fc 区域的区域。

[0202] 按照本发明的方法产生的 ABMs 的治疗性应用

[0203] 本发明的 ABMs 可以单独用于体内靶向和杀伤肿瘤细胞。ABMs 还可以与适合的治疗剂组合使用以治疗人癌症。例如,该 ABMs 可以与标准或常规治疗方法诸如化学疗法,放射治疗组合使用或可以缀合或连接于治疗性药物,或毒素,以及淋巴因子或肿瘤抑制生长因子,以将治疗剂递送给癌症位点。非常重要的本发明的 ABMs 的缀合物是 (1) 免疫毒素 (ABM 和细胞毒性部分的缀合物) 和 (2) 标记的 (例如,放射性标记的,酶标记的或荧光染料标记的) ABMs,其中该标记提供鉴定包括标记的 ABM 的免疫复合物的方法。该 ABM 还可以用于通过天然补体方法来诱导裂解,并且与正常存在的抗体依赖性细胞毒性细胞相互作用。

[0204] 免疫毒素的细胞毒性部分可以是细胞毒性药物或细菌或植物起源的酶促活性毒素,或这样的毒素的酶促活性片段 (“A 链”)。所用的酶促活性毒素及其片段是白喉毒素 A 链,白喉毒素、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 A 链、相似豆毒蛋白 A 链、塑莲根毒蛋白 IIA 莲、 α -帚曲霉素、光桐蛋白、香石竹毒蛋白、垂序登陆蛋白 (PAPI, PAPII, 和 PAP-S)、苦瓜蛋白抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白, *sapaonaria officinalis* 抑制剂、多花白树毒蛋白、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素,和伊诺毒素的非结合活性片段。在另一个实施方案中,该 ABMs 与小分子抗癌药物缀合。ABM 和这些细胞毒性部分的缀合物使用多种双功能蛋白偶联剂进行制备。这些试剂的实例是 SPDP, IT, 亚氨酸酯的双功能衍生物诸如二甲基 adipimidate 盐酸,活性酯诸如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯,醛诸如戊二醛,二叠氮化合物诸如二-(p-二叠氮苯甲基)己二胺,二重氮化衍生物诸如二-(p-二叠氮苯甲基)-乙二胺,二异硫氰酸酯诸如甲苯基 2,6-二异硫氰酸酯,和双活性氟化合物诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯。毒素的溶解部分可以连接于 ABMs 的 Fab 片段。本领域已知另外的适合毒素,如在例如公开的美国专利申请号 2002/0128448 中显示的,将其全部内容并入本文作为参考。

[0205] 在一个实施方案中,具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性的嵌合的糖改造的 ABM 缀合于蓖麻毒蛋白 A 链。最有利地,蓖麻毒蛋白 A 链是脱糖基化并通过重组方式产生的。制备该蓖麻毒蛋白的免疫毒素的有利方法描述于 Vitetta et al., Science 238, 1098(1987), 将其并入作为参考。

[0206] 当出于诊断目的,体外用于杀伤人癌细胞时,该缀合物将典型地以至少约 10 nM 的浓度加入细胞培养基中。配制和进行体外应用的施用方式不是关键的。将通常使用与培养或灌流介质相容的水性制剂。可以通过常规技术来读出细胞毒性以确定癌症的存在或程度。

[0207] 如上讨论的,可以通过将放射性的放射性核素 (例如, I, Y, Pr) 缀合于嵌合的,糖改造的 ABM 而制备细胞毒性的放射性药物以治疗癌症,所述 ABM 具有与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性。用于本文时,术语“细胞毒性部分”倾向于包括这些放射性核素。

[0208] 在另一个实施方案中,将脂质体填充以细胞毒性药物并将脂质体包被以本发明的 ABMs。因为在恶性 B 细胞的表面上存在许多 CD20 分子,该方法容许将大量药物递送给正确的细胞类型。

[0209] 将这些治疗剂缀合于抗体的技术是众所周知的 (见,例如 Arnon et

al., " Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy " , 在 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc. 1985) 中; Hellstrom et al., " Antibodies For Drug Delivery " , 在 Controlled Drug Delivery (2nd Ed.) 中, Robinson et al. (eds.), 623-53 页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, " Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review " , 在 Monoclonal Antibodies ' 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), 475-506 页 (1985) 中; 和 Thorpe et al., " The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates " , Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)。

[0210] 另外, 本发明的 ABMs 的其它治疗性应用包括, 例如通过重组 DNA 技术缀合或连接于能够将前药转化成细胞毒性药物的酶, 和将抗体-酶缀合物与前药组合使用从而在肿瘤位点将前药转化成细胞毒性剂 (见, 例如 Senter et al., " Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase " , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4842-46 (1988); " Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitomycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates " , Cancer Research 49: 5789-5792 (1989); and Senter, " Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy, " FASEB J. 4: 188-193 (1990))。

[0211] 此外, 本发明的 ABMs 的另外的治疗性应用, 包括, 在存在补体的情况下使用未缀合的, 或作为抗体-药物或抗体毒素缀合物的部分从而从癌症患者的骨髓中去除肿瘤细胞。按照该方法, 可以通过用抗体处理并将骨髓输注回患者来对自体骨髓进行离体清洗 [见, 例如 Ramsay et al., " Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies " , J. Clin. Immunol., 8(2): 81-88 (1988)]。

[0212] 此外, 意欲本发明包括单链免疫毒素, 其包括容许与鼠 B-Ly1 抗体基本相同的结合特异性的抗原结合结构域 (例如, 包括鼠 B-Ly1 抗体的 CDRs 的多肽) 和另外包括毒素多肽。本发明的单链免疫毒素可以用于体内治疗人癌症。

[0213] 类似地, 可以将融合蛋白用于体内治疗人癌症, 所述融合蛋白包括与第二蛋白的至少功能活性部分连接的本发明的 ABM 的至少抗原结合区, 所述第二蛋白具有抗肿瘤活性, 例如淋巴因子或制癌蛋白。

[0214] 本发明提供用于选择性杀伤表达 CD20 的肿瘤细胞的方法。该方法包括将本发明的免疫缀合物 (例如, 免疫毒素) 与所述肿瘤细胞反应。这些肿瘤细胞可以来自人癌症。

[0215] 此外, 本发明提供体内治疗癌症 (例如, 人癌症) 的方法。该方法包括将药用有效量的组合物施用于受试者, 所述组合物包括至少一种本发明的免疫缀合物 (免疫毒素)。

[0216] 在另一个方面, 本发明涉及一种改善的方法, 其用于基于 B 细胞消减治疗包括 B 细胞淋巴瘤的 B 细胞增殖性疾病, 以及由全部或部分病原性自体抗体产生的自体免疫疾病, 所述方法包括将治疗有效量的本发明的 ABM 施用于需要其的人受试者。在优选的实施方案中, 该 ABM 是具有与鼠 -Ly1 抗体的结合特异性基本相同的结合特异性的糖改造的抗 -CD20 抗体。在另一个优选的实施方案中, 该抗体是人源化的。自体免疫疾病或病症的实例包括, 但不限于, 免疫介导的血小板减少症, 诸如急性自发性血小板减少性紫癜和慢

性自发性血小板减少性紫癜, 皮炎, 西德纳姆舞蹈病, 狼疮性肾炎, 风湿热, 多腺综合症, 亨-舍紫癜综合症, 链球菌感染后肾炎 (post-streptococcal nephritis), 结节性红斑, 高安动脉炎, 艾迪生病 (肾上腺皮质功能减退), 多形性红斑, 结节性多动脉炎, 关节强直性脊椎炎, 古德帕斯彻氏综合症, 血栓性脉管炎 *ubiterans*, 原发性胆汁性肝硬化, 桥本氏甲状腺炎, 甲状腺毒症, 慢性活动性肝炎, 多发性肌炎 / 皮炎, 多发性软骨炎, *pamphigus vulgaris*, 韦格纳肉芽肿病, 膜性肾病, 肌萎缩性脊髓侧索硬化, 运动性共济失调, 多肌痛, 恶性贫血, 急进性肾小球肾炎和纤维性肺泡炎, 炎性反应诸如炎性皮肤病包括银屑病和皮炎 (例如, 特应性皮炎); 全身性硬皮病和硬化; 反应相关的炎性肠病 (诸如局限性回肠炎和溃疡性结肠炎); 呼吸困难综合症 (包括成人呼吸困难综合症, ARDS); 皮炎; 脑膜炎; 脑炎; 葡萄膜炎; 结肠炎; 肾小球肾炎; 变态反应性疾病诸如湿疹和哮喘和其它疾病包括 T 细胞浸润和慢性炎性反应; 动脉粥样硬化; 白细胞粘连缺陷; 类风湿性关节炎; 全身性红斑狼疮 (SLE); 糖尿病 (例如, 1 型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病); 多发性硬化; Reynaud's 综合症; 自体免疫性甲状腺炎; 变态反应性脑脊髓炎; Sjorgen's 综合症; 幼年发生糖尿病; 和由细胞因子和 T 淋巴细胞介导的免疫应答相关的急性和延滞性过敏性, 其典型地见于结核病, 结节病, 多发性肌炎, 肉芽肿病和脉管炎; 恶性贫血 (艾迪生病); 包括白细胞渗出的疾病; 中枢神经系统 (CNS) 炎性疾病; 多发性器官损伤综合症; 溶血性贫血 (包括, 但不限于 *cryogloblinemia* 或库姆斯阳性贫血); 重症肌无力; 抗原-抗体复合物介导的疾病; 抗肾小球基膜病; 抗磷脂综合症; 变态反应性神经炎; 突眼性甲状腺肿; 兰-伊肌无力综合症; 大疱性类天疱疮; 天疱疮; 自体免疫性多分泌性疾病; 赖特尔病; 全身肌强直综合症; 白塞病; 巨细胞动脉炎; 免疫复合物肾炎; IgA 肾病; IgM 多发性神经病; 免疫血小板减少性紫癜 (ITP) 或自体免疫性血小板减少症等。在本发明的该方面, 本发明的 ABMs 用于将正常 B 细胞的血液减少达延长的时期。

[0217] 按照本发明的实践, 受试者可以是人, 马, 猪, 牛, 鼠, 犬, 猫, 和禽受试者。其它的温血动物也包括在本发明中。

[0218] 本发明还提供用于抑制人肿瘤细胞的生长的方法, 治疗受试者中肿瘤的方法, 和治疗受试者中增生型疾病的方法。这些方法包括向受试者施用有效量的本发明的组合物。

[0219] 因此, 显而易见的是, 本发明涵盖药物组合物, 治疗人癌症, 诸如 B 细胞淋巴瘤的组合和方法。例如, 本发明包括用在治疗人癌症中的药物组合物, 其包括药用有效量的本发明的抗体和药用载体。

[0220] 本发明的 ABM 组合物可以使用常规施用方式进行施用, 所述方式包括, 但不限于, 静脉内、腹膜内、口服、淋巴内或直接施用于肿瘤中。静脉内施用是优选的。

[0221] 在本发明的一个方面, 以冻干制剂或水溶液形式存在的包含本发明的 ABMs 的治疗性制剂通过将具有所需纯度的抗体与任选的药用载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences 第十六版, Osol, A. Ed. (1980)) 混和来进行制备以用于贮存。可以接受的载体, 赋形剂, 或稳定剂在所用的剂量和浓度上对于受者是无毒的, 并且包括缓冲剂诸如磷酸盐, 柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化己烷双胺; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 酚, 丁醇或苄醇; 对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲苯酚); 低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 诸如血清白蛋白, 明

胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物诸如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸,或赖氨酸;单糖,二糖,和其它的糖包括葡萄糖,甘露糖,或糊精;螯合剂诸如 EDTA;糖诸如蔗糖,甘露糖醇,海藻糖或山梨糖醇;盐形成抗衡离子诸如钠;金属复合物(例如,锌-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂诸如 TWEENTM, PLURONICSTM 或聚乙二醇(PEG)。

[0222] 示范性的抗-CD20 ABM 制剂描述在 W098/56418 中,将其特别地并入本文作为参考。该出版物描述了包含 40mg/mL 利妥昔单抗,25mM 乙酸盐,150mM 海藻糖,0.9% 苄醇,0.02% 聚山梨酯 20, pH 5.0 的液体多剂量制剂,其在 2-8°C 具有最少 2 年的保存期限。另一种目标抗-CD20 制剂包括在 9.0mg/mL 的氯化钠中的 10mg/mL 利妥昔单抗,7.35mg/mL 的二水合柠檬酸钠,0.7mg/mL 的聚山梨酯 80,和用于注射的无菌水, pH6.5。在本发明中, RITUXAN® 将被本发明的 ABM 取代。

[0223] 将适合于皮下施用的冻干制剂描述在 W097/04801 中。这些冻干制剂可以用适合的稀释剂重构到高蛋白浓度并且可以将该重构的制剂皮下施用给本文的待治疗的哺乳动物。

[0224] 根据治疗的特殊指示所需要的,本文的制剂还可以包含超过一种的活性化合物,优选地是具有补充活性的那些,所述补充活性不会对彼此造成不利影响。例如,可以是理想的是还提供细胞毒性剂,化学治疗剂,细胞因子或免疫抑制剂(例如,作用于 T 细胞上的免疫抑制剂,诸如环孢素 A 或结合 T 细胞的抗体,例如结合 LFA-1 的抗体)。这些其它试剂的有效量取决于在制剂中存在的拮抗剂的量,疾病或病症或治疗的类型,和上面讨论的其它因素。这些通常以前文所用的相同的剂量和施用路径或以约 1 到 99% 的此前使用的剂量来使用。

[0225] 活性成分还可以被包裹在,例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如,分别在胶体药物递送系统(例如,脂质体,白蛋白微球体,微乳,纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗乳状液中的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(异丁烯酸甲酯)微胶囊。这些技术公开在 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 16 版, Osol, A. Ed. (1980) 中。

[0226] 可以制备持续释放的制剂。持续释放的制剂的适合的实例包括包含拮抗剂的固体疏水聚合物的半透性基质,所述基质以成形制品,例如薄膜,或微胶囊的形式存在。持续释放的基质的实例包括聚酯,水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-异丁烯酸酯),或聚(乙烯醇)),聚丙交酯(美国专利号 3,773,919), L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸盐的共聚物,不可降解的乙烯乙酸乙烯酯,可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物诸如 LUPRON DEPOTTM(由乳酸-羟基乙酸共聚物和醋酸亮丙立德组成的可注射微球体),和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0227] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可以以无菌过滤膜通过过滤来容易地实现。

[0228] 本发明的组合物可以以多种剂型存在,所述剂型包括,但不限于,液体溶液或混悬液,片剂,丸剂,粉末,栓剂,聚合物微胶囊或微泡,脂质体,和可注射的或可输注的溶液。优选的形式取决于施用和治疗应用的方式。

[0229] 本发明的组合物还优选地包括本领域已知的常规药用载体和佐剂诸如人血清白蛋白,离子交换剂,钆土,卵磷脂,缓冲物质诸如磷酸盐,甘氨酸,抗坏血酸,山梨酸钾,和盐或电解质诸如硫酸鱼精蛋白。

[0230] 用于本发明的药物组合物的最有效施用方式和剂量方案取决于疾病的严重性和进程,患者的健康和对治疗的反应,以及治疗的医师的判断。因此,对个体患者应该对该组合物的剂量进行滴定。然而,本发明的组合物的有效剂量将通常在约 0.01 到约 2000mg/kg 的范围内。

[0231] 本文所述的分子可以以多种剂型存在,所述剂型包括,但不限于,液体溶液或混悬液,片剂,丸剂,粉末,栓剂,聚合物微胶囊或微泡,脂质体,和可注射的或可输注的溶液。优选的形式取决于施用和治疗应用的方式。

[0232] 包括本发明的 ABM 的组合物将以与良好的医疗实践保持一致的方式来进行配制,给药和施用。在该环境中考虑的因素包括被治疗的具体疾病或病症,被治疗的具体哺乳动物,个体患者的临床条件,疾病或病症的起因,递送该试剂的位点,施用的方法,施用的时间表,和执业医师已知的其它因素。待施用的拮抗剂的治疗有效量将由这些考虑所支配。

[0233] 作为一般的建议,每剂量中肠胃外施用的抗体的治疗有效量将在约 0.1 到 20mg/kg 患者体重/日范围内,其中所用的拮抗剂的典型起始范围在约 2 到 10mg/kg 的范围内。

[0234] 在一个优选的实施方案中,该 ABM 是抗体,优选地是人源化的抗体。这种未缀合的抗体的适合的剂量在,例如,约 20mg/m²到约 1000mg/m²的范围内。在一个实施方案中,抗体的剂量不同于目前对于 RITUXAN® 所推荐的剂量。例如,可以向患者施用一次或多次基本少于 375mg/m²的抗体的剂量,例如其中该剂量在约 20mg/m²到约 250mg/m²的范围内,例如从约 50mg/m²到约 200mg/m²的范围内。

[0235] 而且,可以施用一次或多次起始剂量的抗体,随后施用一次或多次随后的剂量,其中在随后的剂量中的抗体的 mg/m²剂量的量超过在起始剂量中的抗体的 mg/m²剂量的量。例如,起始剂量可以在约 20mg/m²到约 250mg/m²(例如,从约 50mg/m²到约 200mg/m²) 的范围内,并且随后的剂量可以在约 250mg/m²到约 1000mg/m²的范围内。

[0236] 然而,如上指出,ABM 的这些提示量要进行大量的治疗性判断。在选择适当的剂量和时间表中的关键因素是如上所示的获得的结果。例如,起初可能需要相对更高的剂量用于进行中的和急性疾病的治疗。为了获得最有效的结果,取决于疾病或病症,将拮抗剂在尽可能接近于疾病或病症的首次症状,诊断,征兆或发生的时候施用或在疾病或病症减轻的时候进行施用。

[0237] 通过任何适合的方式来施用本发明的 ABM,所述方式包括肠胃外,皮下,腹膜内, intrapulmonary,和鼻内,和如果对于局部免疫抑制性治疗是需要而言,病灶内施用。肠胃外输注包括肌内,静脉内,动脉内,腹膜内,或皮下施用。此外,拮抗剂可以通过脉冲输注,例如以下降剂量的拮抗剂来适当地施用。部分取决于施用是短暂的还是长期的,优选地,将给药通过输注,最优选地静脉内或皮下注射进行。

[0238] 可以与本文的拮抗剂一起,施用其它的化合物,诸如细胞毒性剂,化学治疗剂,免疫抑制剂和/或细胞因子。组合的施用包括使用单独的制剂或单独的药物组合物的共同施用,和以任一顺序的连续施用,其中优选地,在两种(或所有的)活性剂同时发挥它们的生物学活性的时候,存在时间周期。

[0239] 将清楚的是实现治愈所需要的本发明的组合物的剂量可以随时间表优化进一步地减少。

[0240] 按照本发明的实践,药用载体可以是脂质载体。该脂质载体可以是磷脂。此外,脂

质载体可以是脂肪酸。此外,脂质载体可以是去污剂。用于本文时,去污剂是改变液体的表面张力,通常是降低其的任何物质。

[0241] 在本发明的一个实例中,所述去污剂可以是非离子型去污剂。非离子型去污剂的实例包括,但不限于,聚山梨醇酯 80(也称为 Tween 80 或(聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯),Brij,和 Triton(例如 Triton WR-1339 和 Triton A-20)。

[0242] 或者,所述去污剂可以是离子型去污剂。离子型去污剂的实例包括,但不限于,烷基三甲基溴化铵。

[0243] 另外,根据本发明,所述脂质载体可以是脂质体。如本申请中所用的,“脂质体”是任何膜束缚的囊泡,其包含本发明的任何分子或其组合。

[0244] 下面的实施例更加详细地解释本发明。给出下列制剂(preparations)和实施例以使得本领域技术人员能够更加清楚地理解并实施本发明。不过,本发明的范围并不受例示的实施方案所限制,所述实施方案只是意在作为发明单一方面的举例说明,并且功能上等同的方法在本发明的范围之内。事实上,由前述描述和附图,对于本领域技术人员来说,除了本文所述之外,本发明的各种改进将是显而易见的。这些改进将会落入后附的权利要求书的范围之内。

实施例

[0245] [注:除非另外指定,在下列实施例中的特定氨基酸残基位置的编号是按照 Kabat 编号系统进行的。]

[0246] 实施例 1

[0247] 材料和方法

[0248] 重组抗体 B-Ly1 的克隆和表达

[0249] 将表达 B-Ly1 的杂交瘤细胞培养于包含 10% FBS 和 4mM L-谷氨酰胺的 RPMI 中。收获生存力 > 90% 的 6×10^6 个细胞并利用 Qiagen RNeasy midi 试剂盒分离总 RNA。通过 RT-PCR 扩增编码 B-Ly1 的可变轻链和重链的 cDNAs。利用下列条件进行 RT-PCR 反应:30 分钟 50°C 进行第一链 cDNA 合成;15 分钟 95°C 初始变性;1 分钟 94°C,1 分钟 45°C,1.5 分钟 72°C,共 30 个循环;和于 72°C 持续 10 分钟的最后延伸步骤。通过凝胶电泳确认了 PCR 产物的预期大小。将 PCR 产物克隆入合适的大肠杆菌(E. coli)载体中并且 DNA 测序确认分离了可变轻链和重链的编码基因。

[0250] 为了构建嵌合的 B-Ly1 表达载体,通过另外的 PCR 反应将合成的信号序列和适当的限制性酶切位点融合入可变链中。在最后确认可变链的正确 DNA 序列后,将它们与相应的人 IgG1 恒定区相组合。一旦构建了基因后,利用两种独立的载体,每条链一种,将它们克隆在 MPSV 启动子的控制之下和合成性聚腺苷酸位点的上游,得到质粒 pETR1808(重链表达载体)和 pETR1813(轻链表达载体)。每个载体都携带一种 EBV OriP 序列。

[0251] 通过磷酸钙-转染法以载体 pETR1808 和 pETR1813 共转染 HEK293-EBNA 细胞来产生嵌合的 B-Ly1。通过磷酸钙法转染指数生长的 HEK293-EBNA 细胞。利用添加了 10% FCS 的 DMEM 培养基将细胞在 T 烧瓶中培养为粘附的单层培养物,并且当它们介于 50 和 80% 汇合之间时进行转染。对于 T75 烧瓶的转染,在转染前 24 小时将 8 百万个细胞接种于添加了 FCS(于 10% V/V 终浓度),250 μ g/ml 新霉素的 14ml DMEM 培养基中,并将细胞于 37°C

置于具有 5% CO₂ 气氛的培养箱中过夜。对于每个待转染的 T75 烧瓶,通过将在轻链和重链表达载体之间平分的 47 μg 总质粒载体 DNA, 235 μl 的 1M CaCl₂ 溶液混合,并加水至终体积 469 μl 而制备 DNA、CaCl₂ 和水的溶液。向此溶液中加入 469 μl 的 50mM HEPES, 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄ 溶液 pH 7.05, 立即混合 10 秒并留置于室温 20 秒。用添加了 2% FCS 的 12ml DMEM 稀释混悬液,并加入到 T75 中代替现有的培养基。将细胞于 37°C, 5% CO₂ 温育约 17 到 20 小时,随后以 12ml DMEM, 10% FCS 替换培养基。为了生产未修饰的抗体“chB-Ly1”, 只用抗体表达载体 pETR1808 和 pETR1813 以 1:1 比率转染细胞。为了生产糖改造的抗体“chB-Ly1-ge”, 用四种质粒分别以 4:4:1:1 的比率共转染细胞,两种质粒进行抗体表达(pETR1808 和 pETR1813), 一种质粒进行融合 GnTIII 多肽表达(pETR1519), 一种质粒进行甘露糖苷酶 II 表达(pCLF9)。在转染后的第 5 天,收集上清液,于 1200rpm 离心 5 分钟,随后于 4000rpm 第二次离心 10 分钟并保持于 4°C。

[0252] 利用三种连续的层析步骤,蛋白质 A 层析,阳离子交换层析,和大小排除层析步骤在 Superdex 200 柱 (Amersham Pharmacia) 上交换缓冲液至磷酸盐缓冲溶液并由此最后步骤收集单体抗体峰而从培养物上清液中纯化 chB-Ly1 和 chB-Ly1-ge。利用分光光度计由 280nm 上的吸光度来估计抗体浓度。

[0253] 寡糖分析

[0254] 通过 PNGaseF 消化从抗体中酶促释放出寡糖,其中抗体固定于 PVDF 膜上或在溶液中。

[0255] 对得到的含有释放的寡糖的消化溶液直接进行制备用于 MALDI/TOF-MS 分析或在样品制备之前用 EndoH 糖苷酶进一步消化以进行 MALDI/TOF-MS 分析。

[0256] PVDF 膜固定的抗体的寡糖释放方法

[0257] 用 100 μl 甲醇湿润用 PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) 膜制作的 96 孔板的孔,并且使用被应用到 Multiscreen vacuum manifold (Millipore, Bedford, Massachusetts) 上的真空将液体吸附穿过 PVDF 膜。用 300 μl 水将 PVDF 膜洗涤三次。随后用 50 μl RCM 缓冲液 (8M 尿素, 360mM Tris, 3.2mM EDTA, pH 8.6) 洗涤孔。将 30-40 μg 之间的抗体加载于包含 10 μl RCM 缓冲液的孔中。通过应用真空将孔中的液体吸附穿过膜,随后用 50 μl RCM 缓冲液将膜洗涤两次。通过加入 50 μl 的 0.1M 二硫苏糖醇于 RCM 中并于 37°C 温育 1 小时进行二硫键的还原。

[0258] 还原作用后,应用真空从孔中除去二硫苏糖醇溶液。在通过将 50 μl 的 0.1M 碘乙酸加入 RCM 缓冲液中并于室温避光温育 30 分钟进行半胱氨酸残基的羧甲基化作用之前,用 300 μl 水将孔洗涤三次。

[0259] 在羧甲基化作用之后,将孔抽真空并且随后以 300 μl 水洗涤三次。随后通过于室温温育 100 μl 的 1% 聚乙烯吡咯烷酮 360 的水溶液达 1 小时来封闭 PVDF 膜,以防止内切糖苷酶的吸附作用。随后通过温和真空接下来通过用 300 μl 水洗涤三次来去除封闭剂。

[0260] 随后通过在 25 μl 终体积的 20mM NaHCO₃, pH 7.0 中加入 2.5 mU 肽-N-glycosylase F (重组 N-聚糖酶, GLYK0, Novato, CA) 和 0.1mU 唾液酸酶 (GLYK0, Novato, CA) 以去除任何潜在带电荷的单糖残基来释放 N 连接的寡糖。于 37°C 进行消化 3 小时。

[0261] 溶液中抗体的寡糖释放方法

[0262] 将介于 40 和 50 μg 之间的抗体与 2.5mU 的 PNGaseF (Glyko, U. S. A.) 在 2mM Tris,

pH7.0 中于 25 微升的最终体积中混合,并将混合物于 37℃温育 3 小时。

[0263] 将 PNGaseF 释放的寡糖的内切糖苷酶 H 消化物用于将杂合等分的寡糖结构分配到 MALDI/TOF-MS 中性寡糖峰上

[0264] 随后将 PNGaseF 释放的寡糖用内切糖苷酶 H(EC 3.2.1.96) 进行消化。为了进行 EndoH 消化,将 15mU 的 EndoH(Roche, Switzerland) 加入到 PNGaseF 消化物中(上面抗体溶液方法)以给出 30 微升的终体积,并将混合物于 37℃温育 3 小时。EndoH 在 N 连接的寡糖的几丁二糖核心的 N-乙酰葡萄糖胺残基之间裂解。所述酶只能消化寡甘露糖和大多数杂合型聚糖,而不水解复合型寡糖。

[0265] MALDI/TOF-MS 的样品制备

[0266] 在加入醋酸至终浓度 150mM 后将含有释放的寡糖的酶消化物于室温再温育 3h,并随后通过塞入 micro-bio-spin 层析柱(BioRad, Switzerland) 的 0.6ml 阳离子交换树脂(AG50W-X8 树脂,氢形式,100-200 网眼,BioRad,Switzerland) 以去除阳离子和蛋白质。将一微升的得到的样品施用到不锈钢目标板上,并在所述板上与 1 微升的 sDHB 基质混合。通过溶解 2mg 的 2,5-二羟基苯甲酸加 0.1mg 的 5-甲氧基水杨酸于 1ml 的乙醇/10mM 水性氯化钠 1:1(v/v) 中来制备 sDHB 基质。将样品风干,施用 0.2 微升的乙醇,最后使样品进行空气下的再结晶。

[0267] MALDI/TOF-MS

[0268] 用来获得质谱的 MALDI-TOF 质谱仪是 Voyager Elite(Perspective Biosystems)。以线性构型操作该仪器,其中具有 20kV 的加速和 80ns 延迟。将使用寡糖标准物的外部校准进行离子的质量评定。将来自 200 次激光射击的光谱相加以获得最终的光谱。

[0269] 全血 B 细胞减少

[0270] 将来自健康供体的 495 微升的肝素化的血液等分入 5ml 聚苯乙烯试管中,加入 5 微升的 100 倍浓缩的抗体样品(1-1000ng/ml 的最终浓度)或只加入 PBS 并将试管于 37° 进行温育。24h 后将 50 微升血液转移到新试管中并用抗-CD3-FITC,抗-CD19-PE 和抗-CD45-CyChrome(Becton-Dickinson) 于室温避光染色 15 分钟。分析前,将 500 微升的 FACS 缓冲液(包含 2% FCS 和 5mM EDTA 的 PBS) 加入到试管中。通过设定对于 CD45-CyChrome 的临界值来对血液样品的 CD3-FITC 和 CD19-PE 荧光进行流式细胞计量分析。通过测绘 CD19⁺B 细胞对 CD3⁺T 细胞的比率来确定 B 细胞消减。

[0271] 抗-CD20 抗体与 Raji 细胞的结合

[0272] 将 180 微升的 FACS 缓冲液(包含 2% FCS 和 5mM EDTA 的 PBS) 中的 500.000 转移到 5ml 聚苯乙烯试管中并加入 20 微升 10 倍浓缩的抗-CD20 抗体样品(1-5000 ng/ml 终浓度)或只加入 PBS 并将试管于 4℃温育 30 分钟。随后,用 FACS 缓冲液将样品洗涤两次并于 300xg 沉淀 3 分钟。吸去上清液并使细胞被 100 Φ 1 FACS 缓冲液吸收,加入 1 微升抗-Fc-特异性 F(ab')₂-FITC 片段(Jackson Immuno Research Laboratories,USA) 并将试管于 4℃温育 30 分钟。用 FACS 缓冲液将样品洗涤两次并吸收于包含 0.5 μ g/ml PI 的 500 μ l 的 FACS 缓冲液中以通过流式细胞计量术进行分析。通过相对于抗体浓度测绘几何级数的平均荧光来确定结合。

[0273] 实施例 2

[0274] 高同源性受体方法

[0275] 通过将小鼠 B-1y1 蛋白序列与人种系序列标本收藏 (collection) 进行比对并挑选出显示最高序列同一性的人序列来进行高同源性抗体受体构架搜索。在此,来自 VBase 数据库的序列 VH1_10 被选作重链构架受体序列,而 VK_2_40 序列被选为轻链的构架受体。向这两种受体构架上移植小鼠重链和轻链可变结构域的三种互补决定区 (CDRs)。由于构架 4 区不是种系 V 基因可变区的部分,未对该位置进行个别地比对。对于重链选择 JH4 区,对于轻链选择 JK4 区。设计的免疫球蛋白结构域的分子建模揭示一个点,其可能需要在 CDR 外侧存在鼠氨基酸残基而非人氨基酸残基。将鼠氨基酸残基重新引入人构架将产生所谓的回复突变。例如,位于 Kabat 位点 27 上的人受体氨基酸残基回复突变为酪氨酸残基。设计人源化的抗体变体,其包括或忽略回复突变。人源化的抗体轻链不需要任何回复突变。在已经设计了蛋白质序列后,如下面所详述的来合成编码这些蛋白质的 DNA 序列。

[0276] 混合构架方法

[0277] 为了避免在人受体构架的关键性氨基酸残基位点(对于保持良好的抗原结合亲和性或抗体功能是关键性的)上引入回复突变,研究了完整构架区 1 (FR1),或构架区 1 (FR1) 和 2 (FR2) 一起,是否能够被人抗体序列所替代,所述人抗体序列在天然人种系序列的那些重要位点上已经具有供体残基,或功能等同残基。为此目的,将小鼠 B1y1 序列的 VH 构架 1 和 2 个别地与人种系序列相比对。在此,最高的序列同一性并不重要,并且未被用于选择受体构架,但是却假定几个关键性残基的匹配更加重要。那些关键性残基包含残基 24, 71, 和 94 (Kabat 编号方式),还包含位点 27, 28, 和 30 (Kabat 编号方式) 上的那些残基,其位于 Kabat 的 CDR1 定义之外,但经常涉及抗原结合。将 IMGT 序列 VH_3_15 选作合适的一种序列。在已经设计了蛋白质序列后,如下面所详述的来合成编码这些蛋白质的 DNA 序列。使用这种方法无论是对于轻链或重链都不需要回复突变,以便保持抗原结合的良好水平。

[0278] 抗体基因的合成

[0279] 在已经设计了人源化抗体 V 区的氨基酸序列之后,一定要生成 DNA 序列。在人种系序列的数据库中发现了个别构架区的 DNA 序列资料。由相应的鼠 cDNA 数据取得 CDR 区的 DNA 序列。用这些序列,基本上组装出完整的 DNA 序列。具有这一 DNA 序列数据,通过引入沉默突变,产生限制性核酸内切酶的识别位点,在实际的序列中引入诊断性限制性酶切位点。为了获得物理的 DNA 链,进行基因合成(例如,Wheeler 等 1995)。在此方法中,由目标基因设计寡核苷酸,从而使一系列寡核苷酸源自编码链,而另一系列源自非编码链。每个寡核苷酸的 3' 和 5' 端(除了一行中的第一个和最后一个)总是显示与源自相反链的两条引物的互补序列。当将这些寡核苷酸放入适于任何热稳定聚合酶的反应缓冲液中,并加入 Mg^{2+} , dNTPs 和 DNA 聚合酶时,每个寡核苷酸都从其 3' 端延伸。新形成的一条引物的 3' 端随后与相反链的下一个引物退火,并且在适于模板依赖型 DNA 链延伸的条件下进一步延伸其序列。将最终产物克隆入传统载体中以便在大肠杆菌中进行增殖。

[0280] 抗体生产

[0281] 使用标准分子生物学技术,将人重链和轻链前导序列(用于分泌)加至以上可变区序列的上游并且随后分别将这些连接至人 IgG1 κ 恒定重链和轻链序列的上游。将得到的完整抗体重链和轻链 DNA 序列亚克隆到哺乳动物表达载体(一种对于轻链的,一种对于重链的)在 MPSV 启动子控制之下和合成的聚腺苷酸位点上游,每个载体携带如上面实施例 1 中所述的 EBV OriP 序列。如上面实施例 1 中所述的那样生产抗体,即通过将 HEK293-EBNA

与哺乳动物抗体重链和轻链表达载体共转染,转染后 5-7 天收集条件培养基,并通过蛋白质 A 亲和层析纯化分泌的抗体,随后进行阳离子交换层析和最终的大小排除层析步骤来分离纯的单体 IgG1 抗体。在 pH6.7 的 25mM 磷酸钾、125mM 氯化钠,100mM 甘氨酸溶液中对抗体进行配制。如在上述实施例 1 中对于嵌合抗体所述的,通过抗体表达载体与 GnT-III 糖基转移酶表达载体一起,或与 GnT-III 表达载体及高尔基体甘露糖苷酶 II 表达载体一起共转染来产生人源化抗体变体的糖改造变体。如上对于非糖改造抗体所述的那样对糖改造抗体进行纯化和配制。如下所述通过 MALDI/TOF-MS 对附于抗体 Fc 区域上的寡糖进行分析。

[0282] 寡糖分析

[0283] 溶液中抗体的寡糖释放方法

[0284] 在 25 微升的最终体积中,将 40 和 50 μg 之间的抗体混合以 2.5mU 的 PNGaseF (Glyko, U.S.A.) 于 2mM Tris 中, pH7.0, 并将混合物于 37°C 温育 3 小时。

[0285] MALDI/TOF-MS 的样品制备

[0286] 在加入醋酸至终浓度 150mM 后,将包含释放的寡糖的酶消化物于室温下再温育 3 小时,随后通过 0.6ml 的填充到 micro-bio-spin 层析柱 (BioRad, Switzerland) 中的阳离子交换树脂 (AG50W-X8 树脂, 氢形式, 100-200 网眼, BioRad, Switzerland) 以去除阳离子和蛋白质。将一微升得到的样品施用到不锈钢目标板上,并在所述板上与 1 微升的 sDHB 基质混合。通过溶解 2mg 的 2,5-二羟基苯甲酸加 0.1mg 的 5-甲氧基水杨酸于 1ml 的乙醇/10mM 水性氯化钠 1 : 1 (v/v) 中来制备 sDHB 基质。将样品风干,施用 0.2 μl 的乙醇,最后让样品进行在空气下的再结晶。

[0287] MALDI/TOF-MS

[0288] 用于获得质谱的 MALDI-TOF 质谱仪是 Voyager Elite (Perspective Biosystems)。以线性构型操作该仪器,其中具有 20kV 的加速和 80ns 延迟。使用利用寡糖标准物的外部校准进行离子的质量评定。将来自 200 次激光射击的光谱相加以获得最终的光谱。

[0289] 抗原结合测定

[0290] 如在上面实施例 1 中对于嵌合的 B-1y1 抗体所述的那样,利用基于流式细胞计量术的测定法对纯化的单体人源化抗体变体测试与 Raji B 细胞淋巴瘤靶细胞上人 CD20 的结合。

[0291] 单体 IgG1 糖变体与 NK 细胞和表达 Fc γ RIIIA 的 CHO 细胞系的结合

[0292] 用富集 CD16⁺ 和 CD56⁺ 阳性细胞的阴性选择 (MACS 系统, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach/Germany) 从新分离的外周血单核细胞 (PBMC) 中分离人 NK 细胞。通过 CD56 表达测定的纯度在 88-95% 之间。于 37°C 将新分离的 NK 细胞在不含钙和镁离子的 PBS 中 (3×10^5 细胞/ml) 温育 20 分钟以去除 NK 细胞关联的 IgG。以 10^6 细胞/ml 将细胞温育在 PBS, 0.1% BSA 中的不同浓度的抗 CD20 抗体 (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 $\mu\text{g/ml}$) 中。在几次洗涤之后,通过与 1 : 200 FITC-缀合的 F(ab')₂ 山羊抗人, F(ab')₂ 特异性 IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA/USA) 和抗人 CD56-PE (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland) 一起温育来检测抗体结合。以 10 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入抗 Fc γ RIIIA 3G8 F(ab')₂ 片段 (Ancell, Bayport, MN/USA) 以竞争抗体糖变体 (3 $\mu\text{g/ml}$) 的结合。在 FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland) 上对 CD56 阳性细胞测定关于结合抗体变体的荧光强度。通过用编码 Fc γ RIIIA-Val158 α -链和 γ -链的表达载体进行

电穿孔 (280V, 950 μ F, 0.4cm) 来转染 CHO 细胞。通过加入 6 μ g/ml 嘌呤霉素来选择转染子并通过 FACS 利用 10 μ l FITC- 缀合的抗 Fc γ RIII 3G8 单克隆抗体 (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland) 对 10^6 细胞分析稳定的克隆。类似于上述的 NK 细胞结合, 进行 IgG1 与表达 Fc γ RIIIA-Val158 的 CHO 细胞的结合。

[0293] ADCC 测定

[0294] 将人外周血单核细胞 (PBMC) 用作效应细胞并利用 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 USA) 以及基本上按照生产商的说明书进行制备。简言之, 以肝素化的注射器从志愿者体内取静脉血。用 PBS (不含 Ca^{++} 或 Mg^{++}) 将血液稀释 1 : 0.75-1.3 并铺于 Histopaque-1077 上。将梯度于室温 (RT) 以 400xg 不间断离心 30 分钟。收集含有 PBMC 的中间相并用 PBS 进行洗涤 (来自两种梯度的每一种的细胞 50ml) 并通于 RT 以 300xg 离心 10 分钟进行收集。在用 PBS 重悬沉淀物后, 对 PBMC 计数并通于 RT 以 200xg 离心 10 分钟进行第二次洗涤。随后将细胞重悬于适当的培养基中以便进行接下来的操作。

[0295] 对于 PBMC 和 NK 细胞而言, 用于 ADCC 测定的效应细胞与靶标的比率分别是 25 : 1 和 10 : 1。于适当的浓度在 AIM-V 培养基中制备效应细胞以便加入 50 微升 / 圆底 96 孔板的孔。靶细胞是生长于含有 10% FCS 的 DMEM 中的人 B 淋巴瘤细胞 (例如, Raji 细胞)。在 PBS 中洗涤靶细胞, 计数并以 0.3 百万 /ml 重悬于 AIM-V 中以便以 100 μ l / 微孔加入 30'000 细胞。将抗体稀释在 AIM-V 中, 加入 50 μ l 到预铺板的靶细胞中并让其于 RT 结合靶标 10 分钟。随后加入效应细胞并于 37°C 在含有 5% CO_2 的加湿气氛中将板温育 4 小时。通过使用细胞毒性检测试剂盒 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) 测量由受损细胞释放的乳酸脱氢酶 (LDH) 来评估靶细胞的杀伤。在 4 小时的温育后将板于 800xg 进行离心。将来自每孔中的 100 μ l 上清液转移到新的透明平底 96 孔板中。每孔加入 100 μ l 来自试剂盒的颜色底物缓冲液。使用 SOFTmax PRO 软件 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA), 在 ELISA 读数器中于 490nm 测定颜色反应的 V_{max} 值至少 10min。由只包含靶和效应细胞但不包含抗体的孔测定自发的 LDH 释放。由只包含靶细胞和 1% Triton X-100 的孔测定最大释放。将特异性抗体介导的杀伤百分比计算如下: $((x - \text{SR}) / (\text{MR} - \text{SR}) * 100$, 其中 x 是特异于抗体浓度上 V_{max} 的平均值, SR 是自发释放的 V_{max} 的平均值, 而 MR 是最大释放的 V_{max} 的平均值。

[0296] 补体依赖型细胞毒性测定

[0297] 将靶细胞计数, 用 PBS 洗涤, 以 1 百万细胞 /ml 重悬于 AIM-V (Invitrogen) 中。将 50 μ l 细胞铺于平底 96 孔板的每孔中。在 AIM-V 中制备抗体稀释液并向细胞加入 50 μ l。让抗体于室温结合细胞 10 分钟。新融解人血清补体 (Quidel), 用 AIM-V 稀释 3 倍并向孔加入 50 μ l。如生产商所述的那样制备兔补体 (Cedarlane Laboratories) 用 AIM-V 稀释 3 倍并向孔加入 50 μ l。作为对照, 在加到测定之前于 56°C 将补体源加热 30 分钟。

[0298] 于 37°C 将测定板温育 2h。通过测量 LDH 释放测定细胞的杀伤。简言之, 将板于 300xg 离心 3 分钟。将 50 μ l 上清液 / 孔转移到新的 96 孔板中并加入 50 μ l 来自细胞毒性试剂盒 (Roche) 的测定试剂。用 ELISA 读数器进行的动力学测量确定了与上清液中 LDH 浓度相对应的 V_{max} 。通过在 1% Triton X-100 存在时孵育细胞来确定最大释放。

[0299] 全血 B 细胞消减测定

[0300] 如上面实施例 1 中所述的那样实施由抗 CD20 抗体进行的全血中正常 B 细胞消减。

[0301] 程序性细胞死亡测定

[0302] 通过将 10 μ g/ml (关于抗原结合的饱和条件) 的抗体与靶细胞 (5x10⁵ 细胞 /ml 的靶细胞浓度) 一起过夜温育 (16-24h) 来测定抗体的程序性细胞死亡潜能。用 AnnV-FITC 将样品染色并通过 FACS 进行分析。测定以三次重复进行。

[0303] 通过根据像膜联蛋白 V 和磷脂酰丝氨酸的程序性细胞死亡标志物的出现进行的流式细胞计量术来实施检测。阴性对照 (无程序性细胞死亡诱导) 不包含任何抗体, 但只包含磷酸盐缓冲溶液。阳性对照 (最大程序性细胞死亡) 包含 5 微摩尔的强程序性细胞死亡诱导剂喜树碱 (CPT)。

[0304] 结果和讨论

[0305] 抗体变体 B-HH1, B-HH2, B-HH3, 复合以嵌合性 B-1y1 轻链 (mVL, 如上面实施例 1 中所述的) 或复合以人源化的 B-1y1 轻链 (KV1), 以及母体嵌合性抗体 chB-1y1 (如上面实施例 1 中所述的) 与人 CD20 抗原的结合比较显示所有抗体都具有类似的 EC₅₀ 值, 但 B-HH1 构建体比变体 B-HH2 和 B-HH3 构建体以更低的强度 / 化学计量进行结合 (图 11)。B-HH1 能够通过其部分人 CDR1 和 CDR2 区 (Kabat 定义), 以及位置 28 (Kabat 编号方式) 上的 Ala/Thr 多态性与 B-HH2 和 B-HH3 区别开来。这表明位点 28, 完整 CDR1, 和 / 或完整 CDR2 对于抗体 / 抗原相互作用是重要的。

[0306] B-HL1, B-HH1, 和嵌合性 chB-1y1 母体抗体的比较显示缺少 B-HL1 构建体的任何结合活性, 以及与 B-1y1 相比大约一半的 B-HH1 的结合的强度 / 化学计量 (图 12)。B-HL1 以及 B-HH1 都是基于源自人 VH1 类别的受体构架进行设计的。在其它差异中, B-HL1 构建体的位点 71 (Kabat 编号方式; Kabat 位点 71 对应于 SEQ ID NO:48 的位点 72) 是显著的差异, 表明其对于抗原结合的推定重要性。

[0307] 当将图 9 与图 13 的抗原结合数据相比时, 在测试的不同人源化抗体变体中 BHH2-KV1, BHL8-KV1, 和 BHL11-KV1 变体显示与人细胞表面上的人 CD20 最佳的结合亲和性。在一方面的 B-HH2, 与另一方面的 B-HL8 和 B-HL11 之间的差异仅位于 FR1 和 FR2 区中, 全部三种 CDRs 都是相同的 (比较, 例如, SEQ ID NOs:32, 56, 和 60, 其不是根据 Kabat 进行编号的, 但其 Kabat 编号可以由普通技术人员容易地确定)。B-HL8 和 B-HL11 具有其源自人 VH3 类的 FR1 和 FR2 序列, 而完整 B-HH2 构架是人 VH1 来源的。B-HL11 是具有单一突变 Glu1Gln 的 B-HL8 的衍生物 (位点 1 在 Kabat 编号方式和传统的用于序列表的编码系统中是相同的), 其中 Gln 为 B-HH2 构建体中的氨基酸残基。这意味着 Glu1Gln 交换并不改变结合亲和性或强度。B-HH2 和 B-HL8 之间的其它区别是 14 个构架残基, 其中一个或多个将影响这种抗体的抗原结合行为。

[0308] 通过用人种序列 VH1_45 的 FR1 替换 B-HH2 的 FR1, B-HL4 构建体源自 B-HH2 抗体。这种构建体显示极度减弱的抗原结合能力, 尽管仅在 FR1 内的三个位点上具有不同的氨基酸。这些残基位于位点 2, 14, 和 30 上 (Kabat 编号方式)。其中, 位点 30 可能是有影响的位点, 因为它是 CDR1 的 Chothia 定义的部分。来自图 9 到 13 的所有结合曲线的全部分析表明下列人源化 B-1y1 重链残基 (Kabat 编号方式) 对于结合 CD20:N35 (Kabat CDR1 的末端), 完整 Kabat CDR1, 完整 Kabat CDR2 和完整 Kabat CDR3, 残基 A71 和 R94 (在该情形中, R94 不能被苏氨酸所替代) 和 Y27 是重要的。A28 和 S30 也有助于较小的程度。此

外, Kabat CDR3 和所有规范残基对于抗原结合是重要的。没有回复突变被引入人源化轻链中, 其具有完整的移植 Kabat CDR1, CDR2 和 CDR3。在程序性细胞死亡的诱导中 (图 14, 15 和 21), 最有效的变体是人源化 B-1y1 变体 BHH2-KV1 (甚至比原始 chB-1y1 更加有效并且比具有与利妥昔单抗相同序列的抗体 C2B8 有效得多)。可以恢复增加的程序性细胞死亡的其它人源化变体 (BHL8 的衍生物) 是 :B-HL12 到 B-HL17 (见表) 和 BHH8 (混合构架) 和 BHH9 (具有一个回复突变的“混合构架”, S30T)。位点 9 和 48 (Kabat 编号) 能够接触抗原。变体 BHH4 到 BHH7 是其它的人源化 B-1y1 变体, 其未引入其它的非人序列。

[0309] 人源化 B-1y1 抗体重要特性是它是如在 Cragg, M. S. 和 Glennie, M. J., Blood 103(7):2738-2743 (2004 年 4 月) 中定义的 II 型抗 CD20 抗体。所以使用为此目的在 Polyak, M. J. 和 Deans, J. P., Blood 99(9):3256-3262 (2002) 中所述的测定法, 它在结合 CD20 后不诱导任何明显的针对 CD20 的非离子型去污剂提取物的抗性, 所述 CD20 来自 CD20+ 人细胞的表面。与 C2B8 抗体 (另一种具有与利妥昔单抗相同序列的抗 CD20 抗体) 相比, 它的确诱导显著更少的针对 CD20 的非离子型去污剂提取物的抗性 (见 Reff 的美国专利公开号 2003 0003097)。因为被预期为 II 型抗 CD-20 抗体, 人源化 B-1y1 并不具有任何明显的补体介导的裂解活性并且与抗 CD20 抗体 C2B8 (具有与利妥昔单抗相同序列的嵌合的 IgG1) 相比, 其的确不具有高很多的补体介导的裂解活性。人源化 B-1y1 抗体的另一种重要特性是它在同型聚集测定中非常有效。在这种测定中如在 (Deans 参考文献) 中详述的那样, 将 CD20 阳性人细胞, Daudi 细胞, 在细胞培养基中于 37°C 在哺乳动物细胞培养箱中, 在 5% CO₂ 气氛中孵育多达 24 小时, 抗体浓度为 1 微克 /ml 并且在并行测试中浓度为 5 微克 /ml。作为比较, 对照, 在相同条件下但利用抗 CD20 抗体 C2B8 进行细胞的并行温育。在不同的时间点, 包括温育的 8 小时和 24 小时, 利用显微镜对细胞进行视觉观察。发现人源化的 B-1y1 抗体导致强烈的同型聚集, 其中聚集物比通过添加 C2B8 对照抗体所诱导的聚集物明显更大。此外, 与抗体为抗 CD20 II 型相一致, 它在 CD20 阳性人细胞与人源化 B-1y1 抗体一起孵育时, 相对于利用具有与利妥昔单抗相同序列的 C2B8 嵌合性 IgG1 抗体在相同条件下进行的对照, 诱导出更高水平的程序性细胞死亡。

[0310] 通过在哺乳动物细胞中共表达 GnTIIII 糖基转移酶与抗体基因来生产人源化抗体的糖改造变体。这导致附于抗体 Fc 区的非岩藻糖基化的寡糖级分的增多, 包括如在 WO 2004/065540 (图 17-19) 中所述的等分非岩藻糖基化的寡糖。相对于非糖改造抗体和相对于 C2B8 抗体, 糖改造抗体具有明显更高水平的与人 Fc γ RIIII 受体的结合 (图 20) 以及 ADCC 活性 (图 16)。在全血测定中诱导人 B 细胞消减上人源化 B-1y1 抗体也比对照 C2B8 抗体更加有效。这对于非糖改造 B-1y1 抗体和对于其糖改造形式都是正确的。在全血测定的人 B 细胞消减中, 糖改造抗体比 C2B8 对照抗 CD20 抗体更加有效约 1000 倍。这种比较对于 B-1y1 抗体的非糖改造和糖改造人源化形式都是重要的, 因为它显示在组合 Fc 受体依赖型活性, 如 ADCC, 加补体介导的裂解, 加程序性细胞死亡的诱导的测定中, 两种形式的 B-1y1 都比 C2B8 明显更加有效, 尽管两种形式的 B-1y1 都具有明显较低的补体介导的裂解活性。ADCC, Fc 受体依赖型细胞杀伤活性和程序性细胞死亡诱导存在于人源化 B-1y1 抗体变体的这种优良活性中。另外, 在程序性细胞死亡测定中, 这种 II 型抗 CD20 抗体的糖改造和非糖改造形式都是有效的, 具有提高的与 Fc γ 受体结合亲和性的 Fc 改造的变体在程序性细胞死亡诱导中甚至比非 Fc 改造的变体更加有效, 并且所有变体都比对照抗体 C2B8 明显更加

有效。增强的同型聚集和由 II 型抗 CD20 抗体介导的程序性细胞死亡的诱导的确切机制尚不清楚,并且伴随性结合 CD20 阳性细胞表面上的其它分子,诸如 Fc γ 受体,能够影响这种重要特性。所以重要的是证明 II 型抗 CD20 抗体仍然能够诱导甚至比非 Fc 改造的抗体更高的强烈程序性细胞死亡,并且能够诱导同型聚集,所述 II 型抗 CD20 抗体已经在其 Fc 区中进行改造以提高与 Fc γ 受体,包括 Fc γ RIII 的结合亲和性,并且伴随着 ADCC 活性的相关提高。程序性细胞死亡诱导是重要的,因为在体内,由于身体中有这样的位置,其中能够发现靶 CD20 阳性细胞,但接近 Fc γ RIII 阳性细胞比在血液中更困难,这样的位置为,例如,淋巴结。在那些位置中,由抗 CD20 抗体自身诱导程序性细胞死亡对于人类抗 CD20 抗体疗法的良好功效都可以是至关重要的,所述抗 CD20 抗体疗法通过 B 细胞消减法用于血液学恶性肿瘤诸如非霍奇金氏淋巴瘤和 B 细胞慢性淋巴细胞白血病的治疗,和自身免疫疾病诸如类风湿性关节炎和狼疮的治疗。与 Fc γ RIII 的结合亲和性提高以及较高的人源化的, Fc 改造的 II 型抗 CD20 抗体的 ADCC 也可以是这些疗法的非常重要的属性。最后,这种 II 型抗 CD20 抗体,包括人源化的和 Fc 改造的变体的减弱的或可以忽略的补体介导的裂解活性,也可以是重要的,因为由抗 CD20 抗体产生的较高的补体激活与增多的有害副作用相关。

[0001]

序列表

<110> 格黎卡特生物技术股份公司

P·乌马纳

P·布林克

T·苏特

U·普恩特纳

E·默斯纳

C·费拉拉

<120> 具有增加的Fc受体结合亲和性和效应子功能的抗原结合分子

<130> 1975.029PC01

<160> 78

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 1

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

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
 20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
 35 40 45

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
 65 70 75 80

Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
 85 90 95

Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 100 105 110

<210> 2

<211> 336

<212> DNA

<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 2

ggacctgaac tgggtgaagcc tggggcctca gtgaagattt cctgcaaagc ttctggctac 60

[0002]

```
gcattcagtt actcttggat gaactgggtg aaactgaggc ctggacaggg tcttgagtgg 120
attggacgga tttttcctgg agatggggat actgactaca atgggaaatt caagggcaag 180
gccacactga ctgctgacaa atcctccaac acagcctaca tgcaactcac cagcctgacc 240
tctgtggact ctgcggtcta tttatgtgca agaaatgtct ttgatggtta ctggttagtt 300
tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgca 336
```

<210> 3
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 3

```
Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1          5          10          15
```

```
Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
20          25          30
```

```
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
35          40          45
```

```
Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
50          55          60
```

```
Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
65          70          75          80
```

```
Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
85          90          95
```

```
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100
```

<210> 4
 <211> 309
 <212> DNA
 <213> 鼠物种 (Mus sp.)

```
<400> 4
aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta 60
catagtaatg gcactactta tttgtattgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 120
ctcctgattt atcagatgtc caaccttgtc tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt 180
gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt 240
```

[0003]

tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg tacacgttcg gaggggggac caagctggaa	300
ataaaaacgg	309
<210> 5	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 鼠物种 (Mus sp.)	
<400> 5	
tactcttgga tgaac	15
<210> 6	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 鼠物种 (Mus sp.)	
<400> 6	
ggctacgcat tcagttac	18
<210> 7	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 鼠物种 (Mus sp.)	
<400> 7	
ggctacgcat tcagttactc ttggatgaac	30
<210> 8	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 鼠物种 (Mus sp.)	
<400> 8	
aggtctagta agagtctcct acatagtaat ggcatacatt atttgtat	48
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 鼠物种 (Mus sp.)	
<400> 9	
cagatgtcca accttgctc a	21
<210> 10	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 鼠物种 (Mus sp.)	
<400> 10	
gctcaaaatc tagaacttcc gtacacg	27
<210> 11	
<211> 1407	

[0004]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 鼠-人嵌合 cDNA

<400> 11

```

atggggttga gcctcatctt gctcttcctt gtcgctgttg ctacgcgtgt cctgtccgag      60
gtcaagctgc agcagtcttg acctgaactg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc      120
tgcaaagctt ctggctacgc attcagttac tcttgatga actgggtgaa actgaggcct      180
ggacagggtc ttgagtggat tggacggatt tttcctggag atggggatac tgactacaat      240
gggaaattca agggcaaggc cacactgact gctgacaaat cctccaacac agcctacatg      300
caactcacca gcctgacctc tgtggactct gcggtctatt tatgtgcaag aaatgtcttt      360
gatggttact ggttagttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagctagc      420
accaagggcc catcggtctt cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca      480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac      540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tcctacagtc ctcaggactc      600
tactcctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc      660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccaaattc      720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      780
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc      840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac     1020
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc     1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccgga tgagctgacc     1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg     1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac     1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag     1380
agcctctccc tgtctccggg taaatga                                           1407

```

<210> 12

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 鼠-人嵌合 cDNA

<400> 12

```

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc      60
agaggagaca ttgtgctcac ccaaactaca aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc      120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg      180
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgatth atcagatgtc caaccttgtc      240
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc      300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg      360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtggctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcttg      480
ctgaataact totatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagctc      600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa      660
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag      720

```

<210> 13

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 13

```

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1           5           10           15

Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
          20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
          35           40           45

Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu
          50           55           60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn
65           70           75           80

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn
          85           90           95

```

[0006]

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

[0007]

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 14
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 14

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Thr Asn Pro
 20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

[0008]

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 15

Tyr Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

[0009]

<400> 16

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 17

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn
1 5 10

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 18

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 19

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 20

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 21

oggatttttc ctggagatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg c

51

<210> 22

[0010]

<211> 24
<212> DNA
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 22
tttcctggag atggggatac tgac

24

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 23
cggatttttc ctggagatgg ggatactgac

30

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 24
aatgtctttg atggttactg gttagtttac

30

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 25

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

Gly

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 26

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 27

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5 10

[0011]

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 鼠物种 (Mus sp.)

<400> 28

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 29
 caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ottccggata caccttcagc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atgggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 30

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

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

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

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

[0012]

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 31
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttggga tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 32

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

[0013]

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

<210> 33
 <211> 366
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 33
 caggtgcaat tggcgcagtc tggcgcgtgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atctgtgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctccctcagct 360
 agcacc 366

<210> 34
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 34

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

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

[0014]

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 35
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggagcttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg tctccggata cgcgttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 36

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

[0015]

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

<210> 37
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 37 caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttccggata cgcgttcagc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcg	120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gogatgggga tactgactac	180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgcgcaca aatccactag cacagcctat	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc	300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctctca	357

<210> 38
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 38

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

[0016]

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 39
 cagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttggg tcaattgggt gcggcaggcg 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 40

[0017]

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 41
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tctcgtgggt gcggcaggcg 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0018]

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 43

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgccctc agtgaaggctc 60

tcttgcaagg cttccggata caccttcaca tacagctgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacctg ctctctca 357

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

[0019]

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 44

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 45
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata caccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcacgt ctcctca 357

[0020]

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 46

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 47
 caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgcactgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatg acacgggaca cgtccacttc caccgtctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

[0021]

tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 48

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 49

gagggtgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttgga tgcactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagt gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcagagaaat tccaaggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240

[0022]

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300

tttgatgggt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 50

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

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

Trp Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 51

gaggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttgga tgaactgggt gcagcaggcc 120

[0023]

cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 52
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 52

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 366
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 53
cagatgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaaga ccgggagttc agtgaaggtc 60

[0024]

```

tcctgcaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgagctgggt ggggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctccctcagct 360
agcacc 366

```

<210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 54

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

```

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 55

<211> 357

<212> DNA

<213> 人工的

[0025]

<220>

<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 55

```

gaagtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtcaagc ctggcggggtc cctgagggtc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttgga tgaactgggt gcggcagggt      120
cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac      180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc      300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc caggggaacc ttggtcaccgt ctctca      357

```

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 56

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
                20              25              30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
          100              105              110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 57

<211> 456

[0026]

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 57
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgtg cagcctctgg attcgattc agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 58
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 58
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

[0027]

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 357
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 59
caggtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttggtcaagc ctggcgggtc cctgcggctc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggct 120
cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 60
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 60

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0028]

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 61
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 61
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtgga gtctggagca ggcttggtca 120
agcctggcgg gtccttgccg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gtccttgga agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tggtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 62
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 62

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

[0029]

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 63
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 63
 cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtcga gtctggagga ggcgtggtca 120
 agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 cgggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
 acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 64
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser			
	20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45

[0030]

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 65
cggaattcgg ccacccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctggctga gtccggagga ggcttgaaga 120
agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacatctt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 66
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 66

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

[0031]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67
<211> 456
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 67
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtga gtctggagga ggcttggtca 120
agcctggctc ttccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattott 180
ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 68
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0032]

<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 68

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 456

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 69

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
agcctggcgg gtccctgcgg gtcagctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gtccttgga agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

[0033]

<210> 70
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 70

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71
 <211> 456
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 71
 cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
 agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctcttg attcacattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

[0034]

acaaattccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccctgggtcac cgtctctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 72
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 72

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 73
 atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcc 57

<210> 74
 <211> 19

[0035]

<212> PRT
<213> 人

<400> 74

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 75
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合 DNA

<400> 75
gatatcgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gcccgccagc 60
attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg goatcactta tttgtattgg 120
tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctccctgattt atcaaattgtc caaccttgctc 180
tctggcgctcc ctgaccggtt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg aggctgagga tgttgaggtt tattactgcy ctcagaatct agaacttcc 300
tacaccttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgta cgggtg 345

<210> 76
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 鼠-人嵌合多肽

<400> 76

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

[0036]

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

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

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val
115

<210> 77
<211> 66
<212> DNA
<213> 人

<400> 77
atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggccctcctgc tgctctgggt cccaggtgcc 60
aggtgt 66

<210> 78
<211> 22
<212> PRT
<213> 人

<400> 78

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

接头	SEQ ID NO: 1(氨基酸)和 SEQ ID NO: 2(核苷酸)的起始
1	GAGGTCAAGC TGCAGCAGTC T GGACCTGAA CTGGTGAAGC CTGGGGCCCTC AGTGAAGATT TCCTGCAAAG CTTCGGCTA CGCATTCAGT TACTCTTGGA CTCCAGTTTCG ACGTCGTGAG A CCTGGACTT GACCACTTCG GACCCCGGAG TCACCTCTAA AGGACGTTTC GAAGACCGAT GCGTAAGTCA ATGAGAACCT E V K L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y A F S Y S W >>.....B-Lyl vh.....>
101	TGAACCTGGT GAACTGAGG CCTGGACAGG GTCTTGAGTG GATTGGACGG ATTTTCCTCG GAGATGGGA TACTGACTAC AATGGGAAAT TCAAGGGCAA ACTTGACCCA CTTTGACTCC GGACCTGTCC CAGAACTCAC CTAACCTGCC TAAAAGGAC CTCTACCCCT ATGACTGATG TTACCCCTTA AGTCCCGTT M N W V K L R P G Q G L E W I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G >.....B-Lyl vh.....>
201	GGCCACACTG ACTGCTGACA AATCCTCCAA CACAGCCTAC ATGCAACTCA CCAGCCTGAC CTCTGTGGAC TCTGCGGTCT ATTTATGTGC AAGAAATGTC CCGGTGTGAC TGCAGACTGT TTAGGAGGTT GTGTGGGATG TACGTTGAGT GGTCGGACTG GAGACACCTG AGACGCCAGA TAAATACACG TTCTTTACAG K A T L T A D K S S N T A Y M Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V >.....B-Lyl vh.....>
301	TTGTATGGT ACTGGTTAGT TTACTGGGCG CAAGGACTC TGGTCACTGT CTCTGCA AAACCTACCA TGACCAATCA AATGACCCCG GTTCCCTGAG ACCAGTGACA GAGACGT F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S A >.....B-Lyl vh.....>>

图 1

```

          接头  SEQ ID NO: 3 (氨基酸) 和 SEQ ID NO: 4 (核苷酸) 的起始
          HphI
          -----
1  GACATTGTGC TCACCCAAAC TACA AATCCA GTCACTCTTG GRACATCAGC TTCCATCTCC TGCAGGTCTA GTAGAGTCT CCTACATAGT AATGGCATCA
   CTGTAACACG AGTGGGTTTG ATGT TTAGGT CAGTGAGAAC CTGTAGTCG AAGGTAGAGG ACGTCCAGAT CATTCTCAGA GGATGTATCA TTACCGTAGT
   D I V L T Q T T N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I
   >>.....B-Ly1 v.l.....>

          BseRI
          -----
101 CTTATTGTGA TTGGTATCTG CAGAAGCCAG GCCAGTCTCC TCAGTCTCTG ATTATCAGA TGTCRAACTT TGTCTCAGGA GTCCCAGACA GGTTCAGTAG
   GAATAAACAT AACCATAGAC GTCTTCGGTC CGGTCAGAGG AGTCGAGGAC TAAATAGTCT ACAGGTGGA ACAGAGTCTT CAGGTCGTGT CCAAGTCATC
   T Y L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S
   >.....B-Ly1 v.l.....>

          BtsI
          -----
201 CAGTGGGTCA GGAAGTGATT TCACACTGAG AATCAGCAGA GTGGAGGCTG AGGATGTGGG TGTTATTAC TGTCTCAA ATCTAGAACT TCCGTACACG
   GTCACCCAGT CCTTGACTAA AGTGTGACTC TTAGTCTGCT CACCTCCGAC TCCTACACCC ACAATAATG ACAGAGTTT TAGATCTTGA AGGCATGTGC
   S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T
   >.....B-Ly1 v.l.....>

          AflIII
          -----
301 TTCGGAGGGG GGACCAAGCT GGAATAAAA CGG
   AAGCCTCCCC CCTGGTTCGA CCTTATTTT GCC
   F G G G T K L E I K R
   >.....B-Ly1 v.l.....>

```

图 2

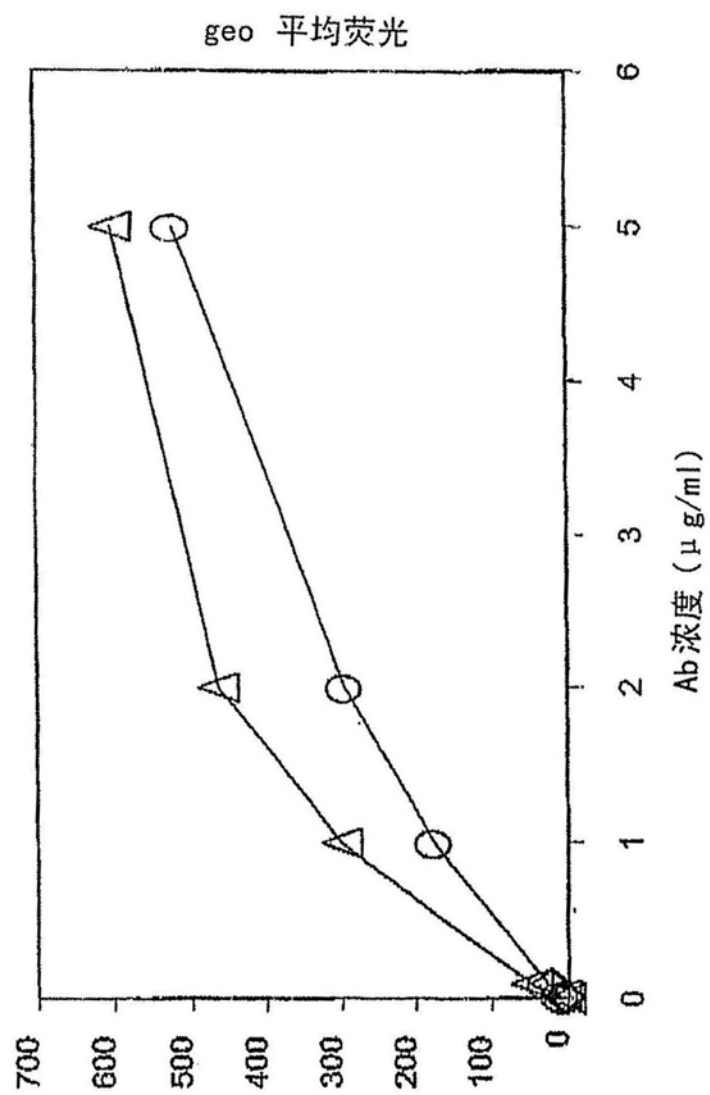


图 3

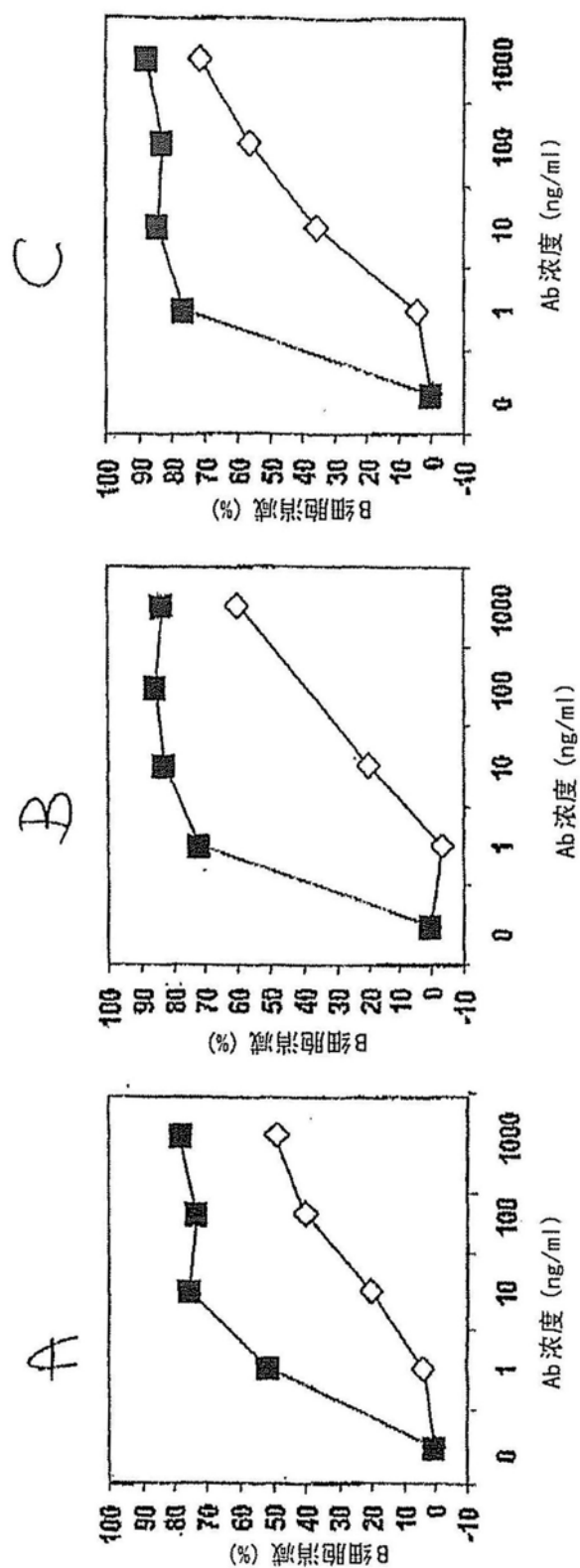


图 4

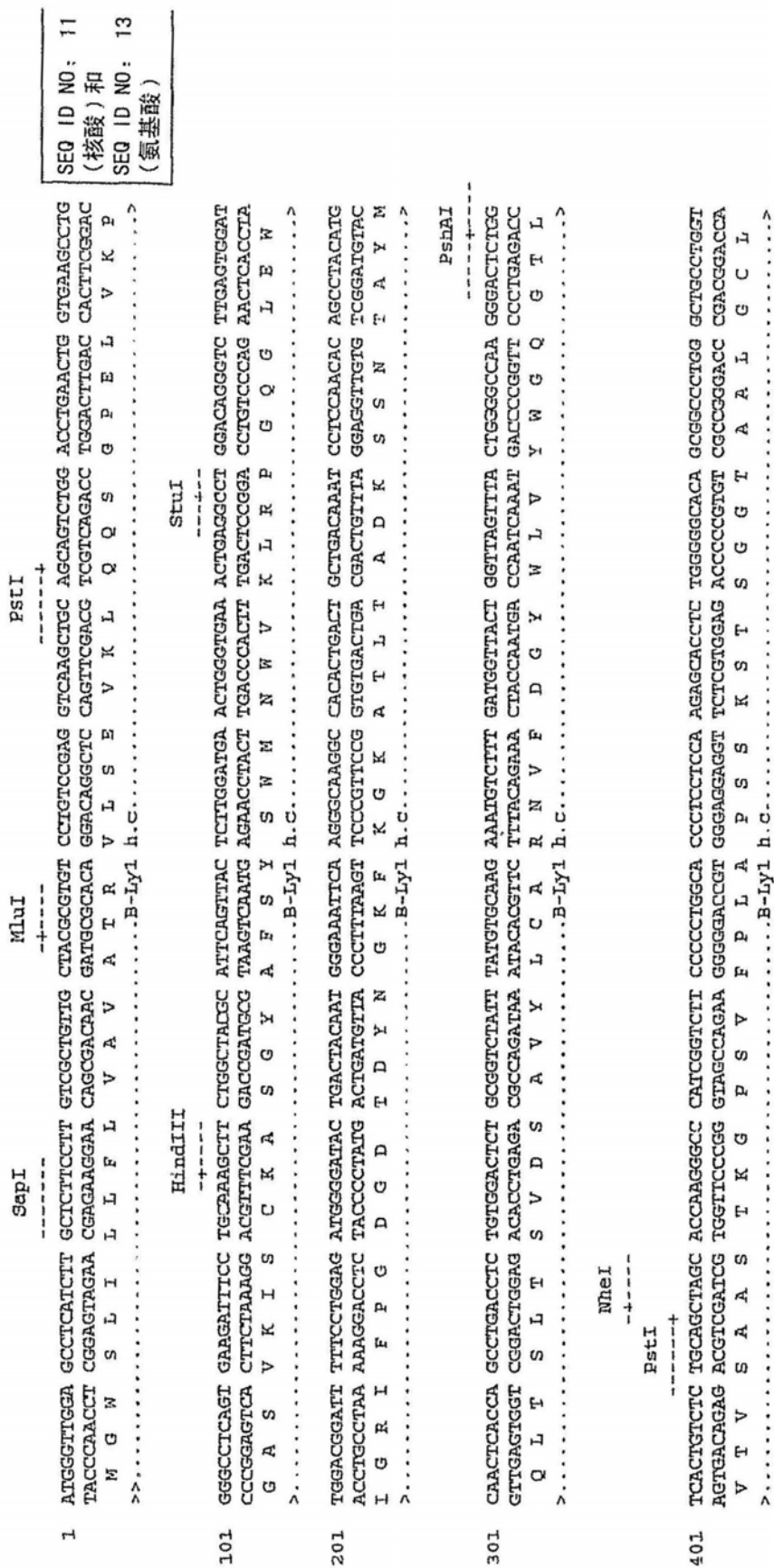


图 5A

501	CAAGGACTAC TTCCCGGAC CGTGACGGT GTCTGGAAC TCAGCGGCC TGACGCGG CGTGACACCC TTCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC GTTCCTGATG AAGGGCTTG GCCACTGCGA CAGACCTTG AGTCGGGGG ACTGGTGCC GCAGGTGGG AAGGCCGAC AGGATGTCAG GAGTCTTGAG V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L >.....B-Ly1 h.c.....>	SEQ ID NO: 11 (核酸)和
601	TACTCCCTCA GCAGCGTGT GACCGTGCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA ATGAGGGAGT CGTCGCACCA CTGGCACGGG AGGTGCTCGA ACCCGTGGT CTGGATGTAG ACGTGCACCT TAGTGTTCGG GTCTGTGGG TTCCACCTGT Y S L S S V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D >.....B-Ly1 h.c.....>	SEQ ID NO: 13 (氨基酸)
701	AGRAAGCAGA GCCCAATCT TGTGACAAA CTACACATG CCCACCGTC CCAGCACCTG AACTCCCTGG GGCACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA TCTTCGTCT CGGGTTTGA ACATGTTT GAGTGTGTAC GGTGGGCACG GGTGCTGGAC TTGAGGACCC CCTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGGTTT K K A E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G P S V F L F P P >.....B-Ly1 h.c.....>	
801	ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCTTAGGTC ACATGCGTGG TGTGGACGT GAGCCACGAA GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGCTACGTG TGGGTTCTTG TGGAGTACT AGAGGGCCTG GGGACTCCAG TGTAGGCACC ACCACTGCA CTGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAGTT GACCATGCAC K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V >.....B-Ly1 h.c.....>	
901	GACGGCTGG AGTGCAATA TGCCAAGACA AAGCGCGGG AGGAGCAGTA CACAGCAGG TACGCTGGG TCAGCGTCTT CACGTCCTG CACCAAGACT CTGCCGCACC TCCACGTATT ACGGTCTGT TTCCGGGCC TCCCTGTCAT GTGTGCTGC ATGGCACACC ATTCGCAGGA GTGGCAGGAC GTGGTCTTGA D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D >.....B-Ly1 h.c.....>	
1001	GGCTGAATGG CAAGGATAC AAGTGCNAGG TCTCCNACAA AGCCCTCCCA GCCCCATCG AGNAAACCAT CTCCAAGCC AAAGGGCAGC CCGAGARACC CCGACTTACC GTTCCTCATG TTCACGTTCC AGAGGTGTT TCGGAGGGT CCGGGGTAGC TCTTTGTA GAGGTTTCGG TTCCCGTCG GGGCTCTGG W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R B >.....B-Ly1 h.c.....>	

AhdI

图 5B

SEQ ID NO: 11 (核酸)和 SEQ ID NO: 13 (氨基酸)
--

```

1101  ACAGGTGTAC ACCGTGCCC CATCCGGGA TGAGCTGACC AGRACCAGG TCAGCTGAC CTGCTGGTC AAAGCTTCT ATCCACGGA CATCGCGTG
    TGTCCACATG TGGACGGGG GTAGGCCCTT ACTGACTGG TTCTGGTCC AGTGGACTG GACGGACCAG TTTCGAAGA TAGGTGCT GTAGCGCAC
    P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
    >.....B-Lyl h.c.....>

1201  GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAGA CCACGCTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG
    CTCACCTCT CGTTACCCGT CGGCTCTTG TTGATGTTT GGTGCGGAG GCAGACCTG AGGCTGCCGA GGAAGAAGGA GATGCTGTT GAGTGGCAC
    E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V
    >.....B-Lyl h.c.....>

1301  ACAGAGCAG GTGGCAGCG GGAACGTCT TCTATGCTC CGTGTGCTC GAGGCTCTG ACACCACTA CACGCAAG AGCCTCTCC TGTCTCGGG
    TGTCTCGTC CACGTCGTC CCCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACGTA CTCGAGACG TGTTGGTGAT GTGCTCTTC TCGAGAGGG ACAGAGGCC
    D K S R W Q Q G N V F S C S V M H B A L H N H Y T Q K S L S L S F
    >.....B-Lyl h.c.....>

1401  TAAATGA
    AATTACT
    G K -
    >.....> B-Lyl h.c.

```

图 5C

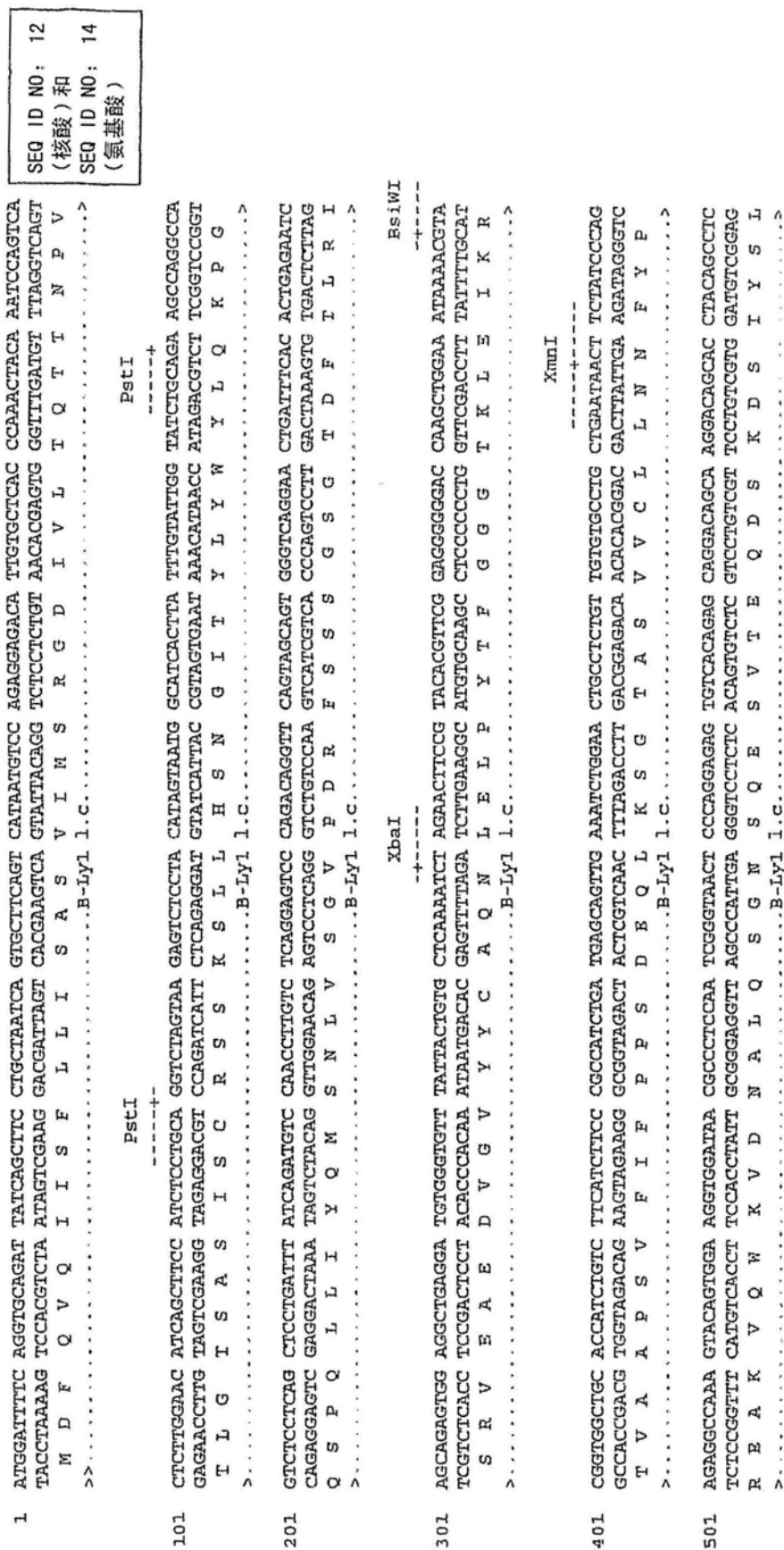


图 6A

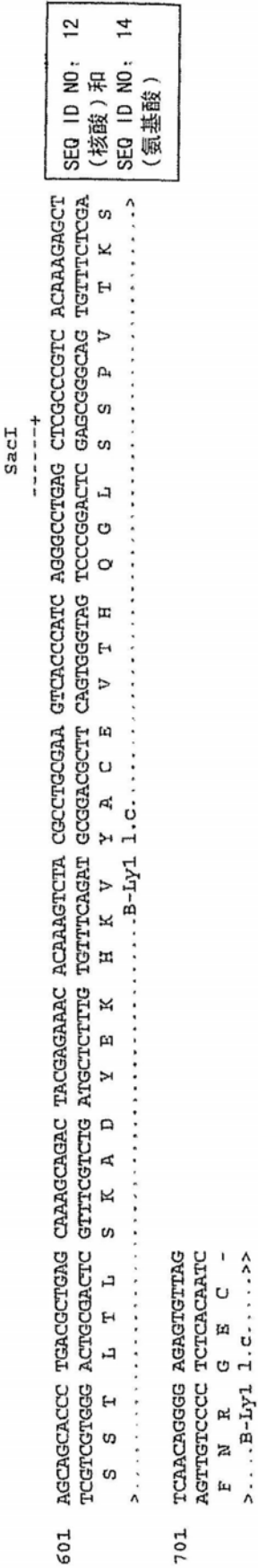


图 6B

A

CDR1(Kabat):

TACTCTTGGATGAAC

TyrSerTrpMetAsn

SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO: 15

CDR1(Chothia):

GGCTACGCATTGAGTTAC

GlyTyrAlaPheSerTyr

SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO: 16

CDR1(AbM):

GGCTACGCATTGAGTTACTCTTGGATGAAC

GlyTyrAlaPheSerTyrSerTrpMetAsn

SEQ ID NO: 7

SEQ ID NO: 17

CDR2(Kabat):

CGGATTTTTCCTGGAGATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAGGGC

ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAspTyrAsnGlyLysPheLysGly

SEQ ID NO: 21

SEQ ID NO: 25

CDR2(Chothia):

TTTCCTGGAGATGGGGATACTGAC

PheProGlyAspGlyAspThrAsp

SEQ ID NO: 22

SEQ ID NO: 26

CDR2(AbM):

CGGATTTTTCCTGGAGATGGGGATACTGAC

ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAsp

SEQ ID NO: 23

SEQ ID NO: 27

CDR3(Kabat, Chothia, AbM):

AATGTCTTTGATGGTTACTGGTTAGTTTAC

AsnValPheAspGlyTyrTrpLeuValTyr

SEQ ID NO: 24

SEQ ID NO: 28

B

CDR1(Kabat):

AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGTAT

ArgSerSerLysSerLeuLeuHisSerAsnGlyIleThrTyrLeuTyr

SEQ ID NO: 8

SEQ ID NO: 18

CDR2(Kabat):

CAGATGTCCAACCTTGTCTCA

GlnMetSerAsnLeuValSer

SEQ ID NO: 9

SEQ ID NO: 19

CDR3(Kabat):

GCTCAAAATCTAGAACTCCGTACACG

AlaGlnAsnLeuGluLeuProTyrThr

SEQ ID NO: 10

SEQ ID NO: 20

图 7

1. 相对百分比

	+ EndoH	
	Bly-1 m1 031024 016	Bly-1 m1 031024 017
1053		
1256		
1282		
1298		3.70%
1339	18.60%	17.90%
1460		4.30%
1486	5.90%	5.50%
1502	5.10%	3.70%
1543	35.00%	39.20%
1622		
1647	4.60%	3.00%
1664	7%	
1680		
1688	11.00%	10.30%
1705	7.20%	7.30%
1810		
1826		
1850	5.90%	5.20%
1972		
2012	100%	100%

图 8A

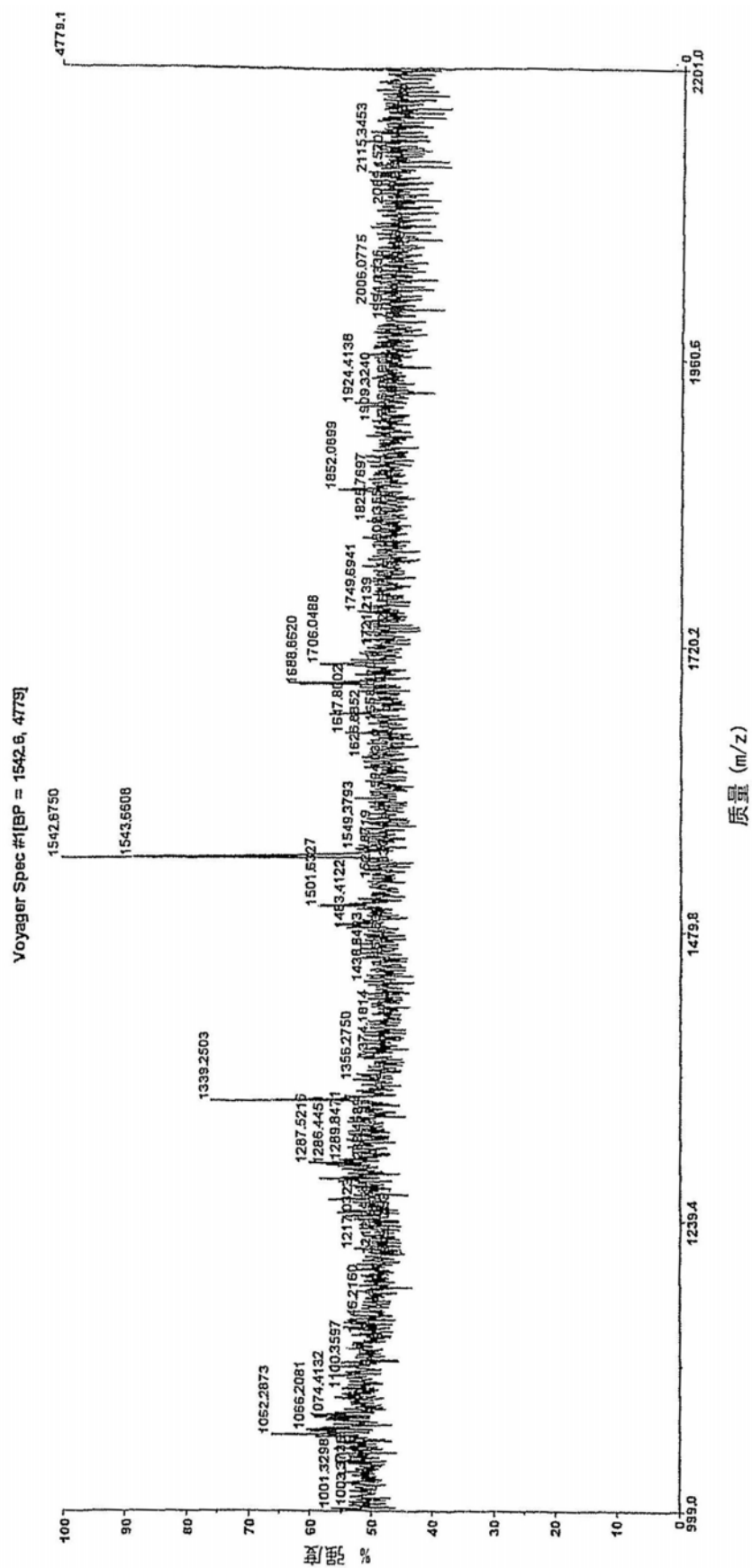


图 8B

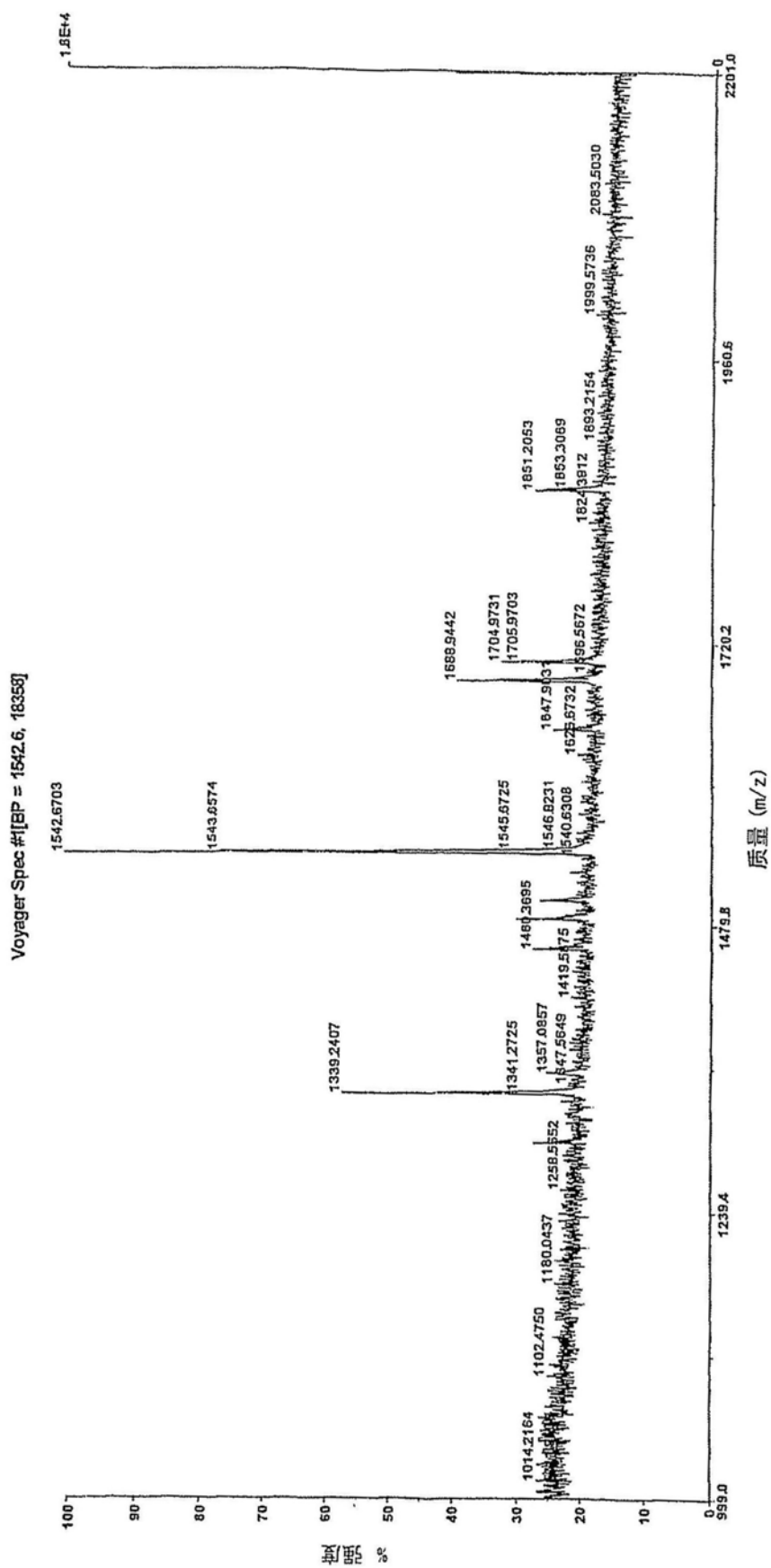


图 8C

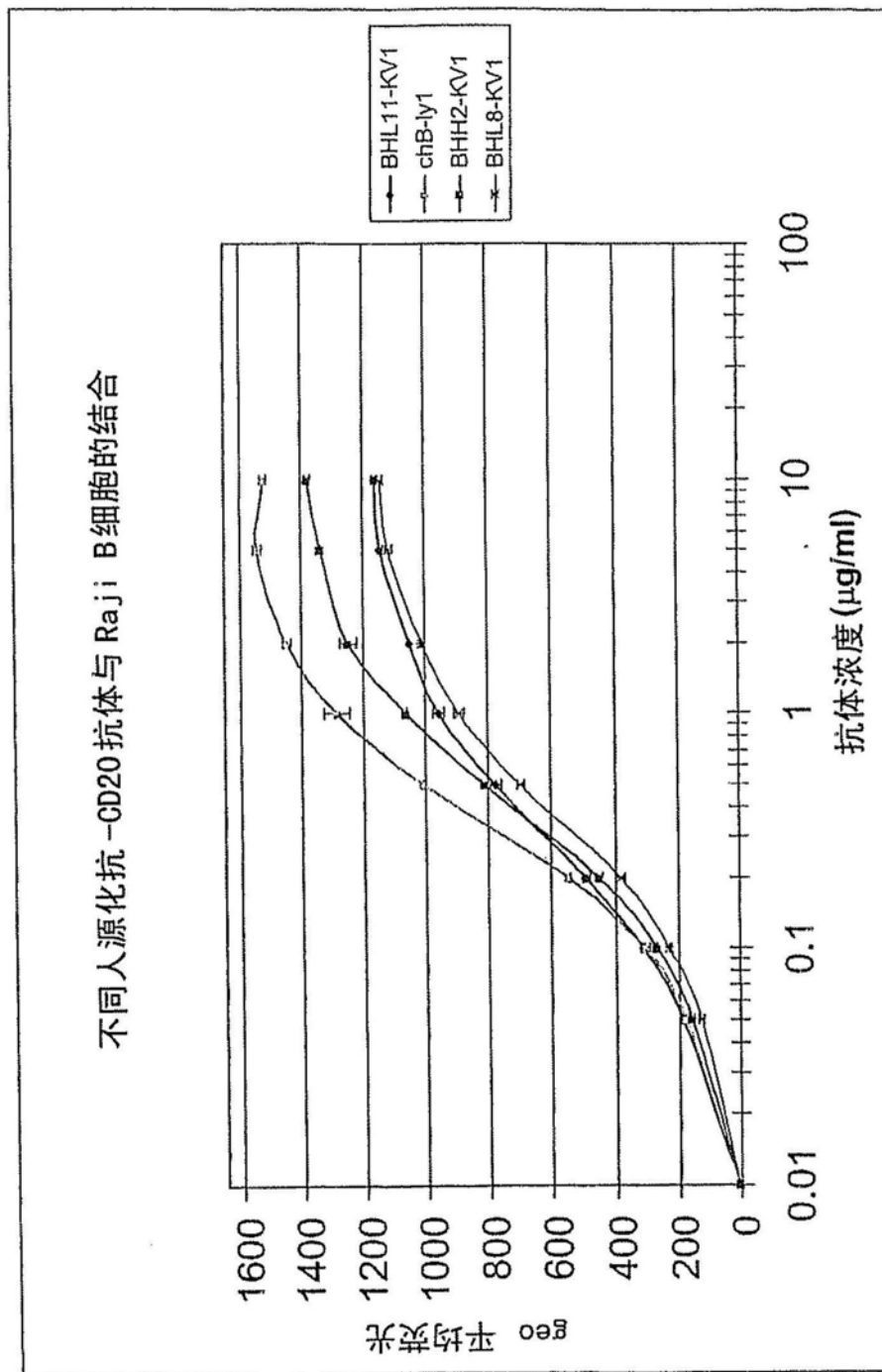


图 9

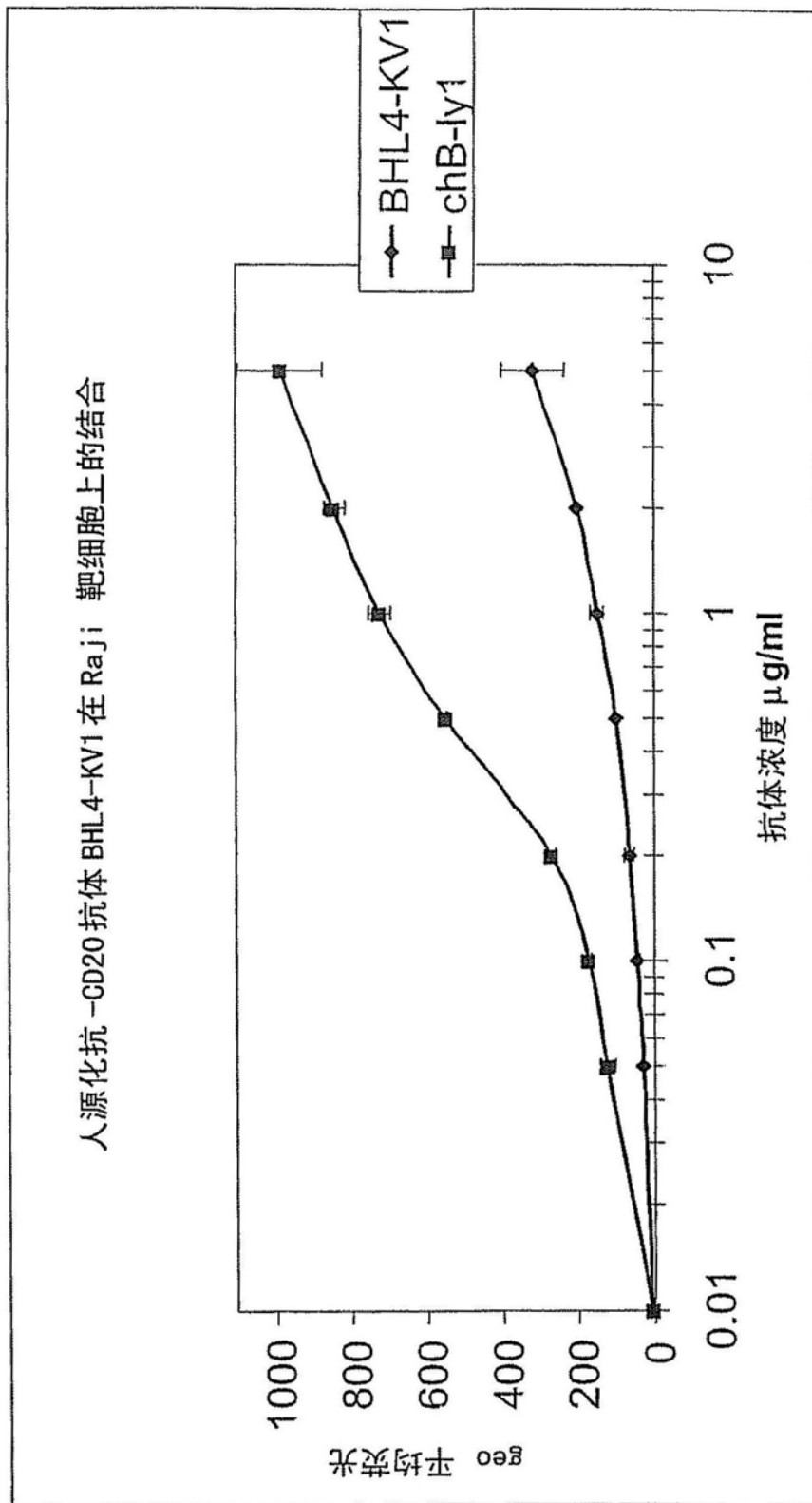


图 10

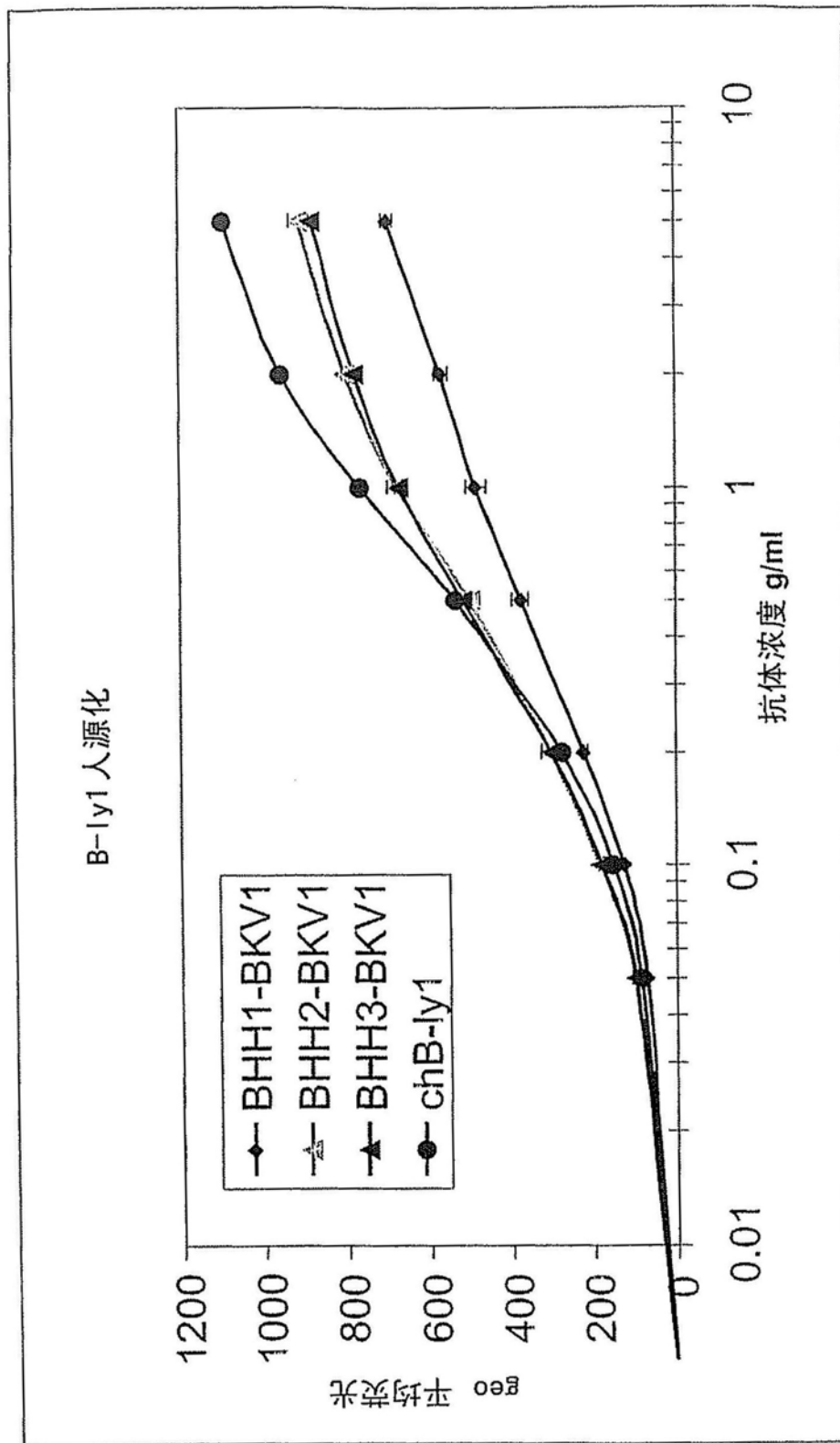


图 11

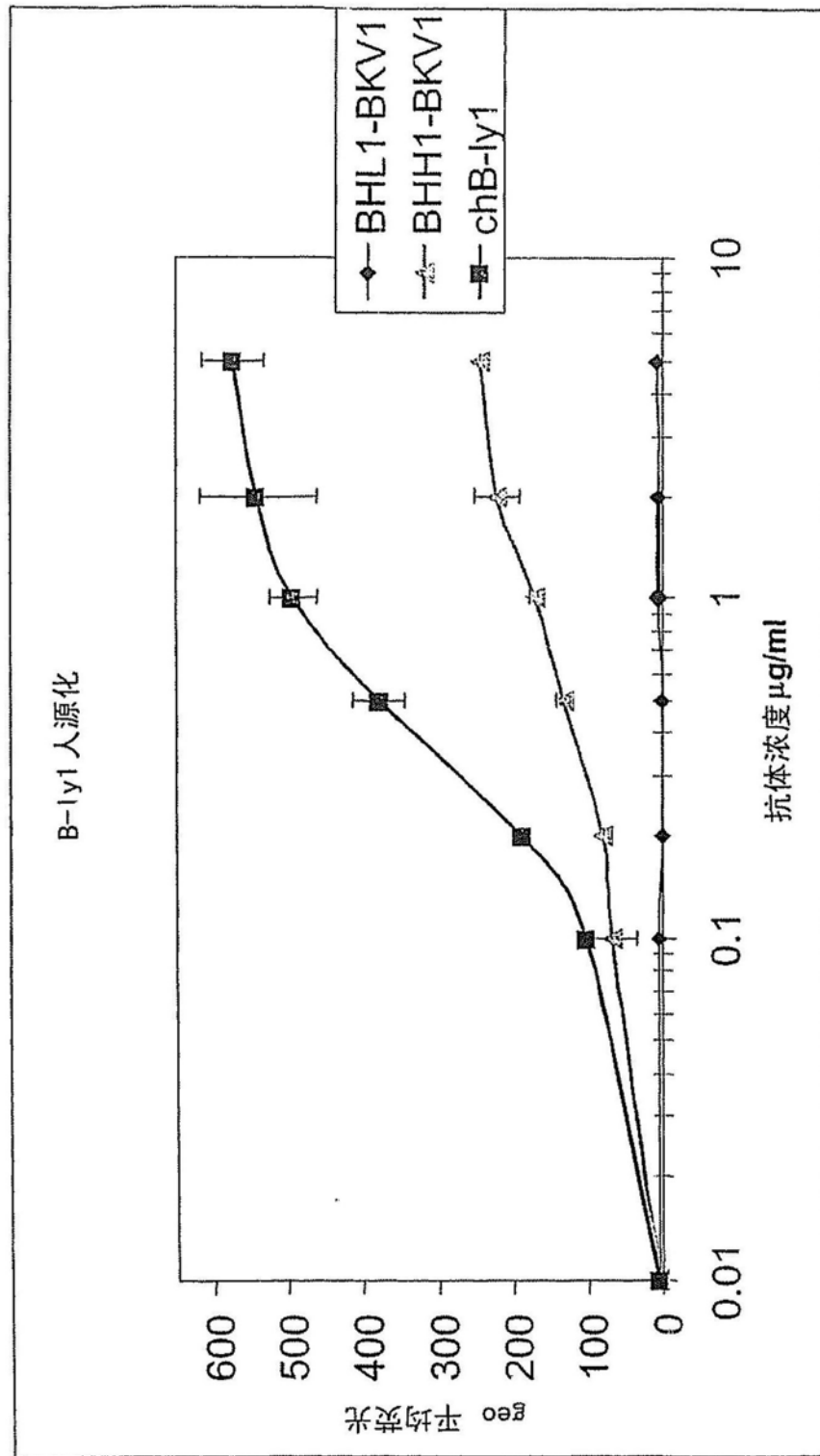


图 12

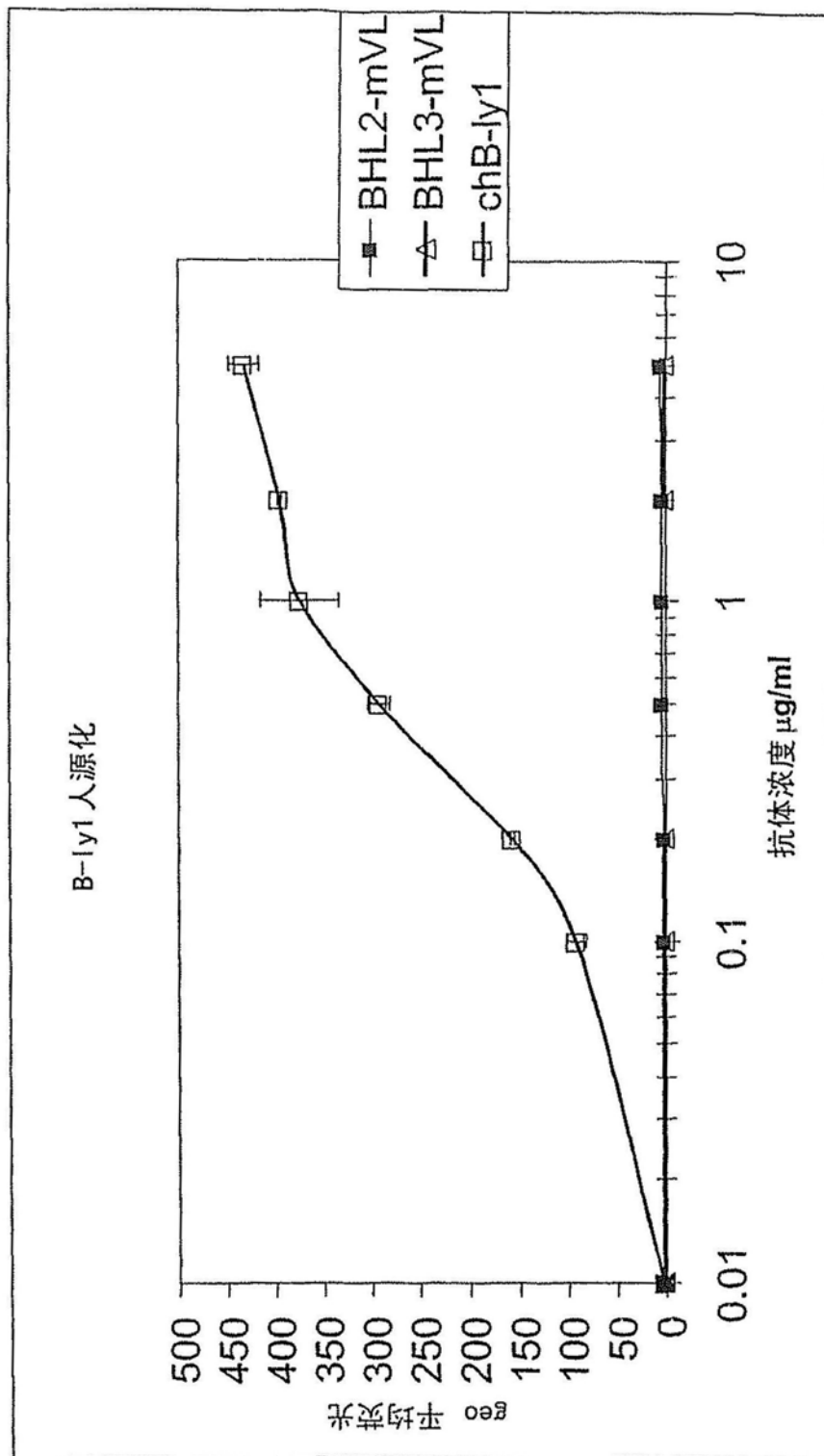


图 13

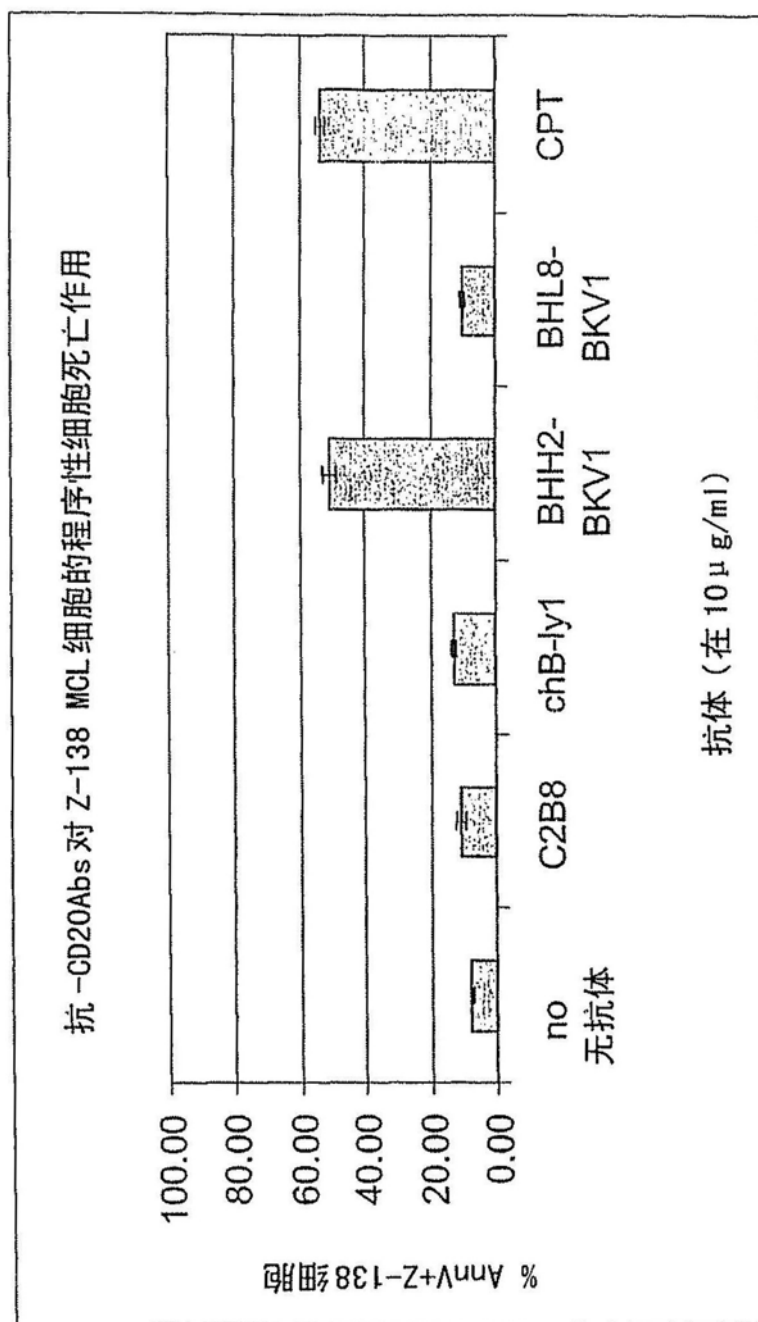


图 14

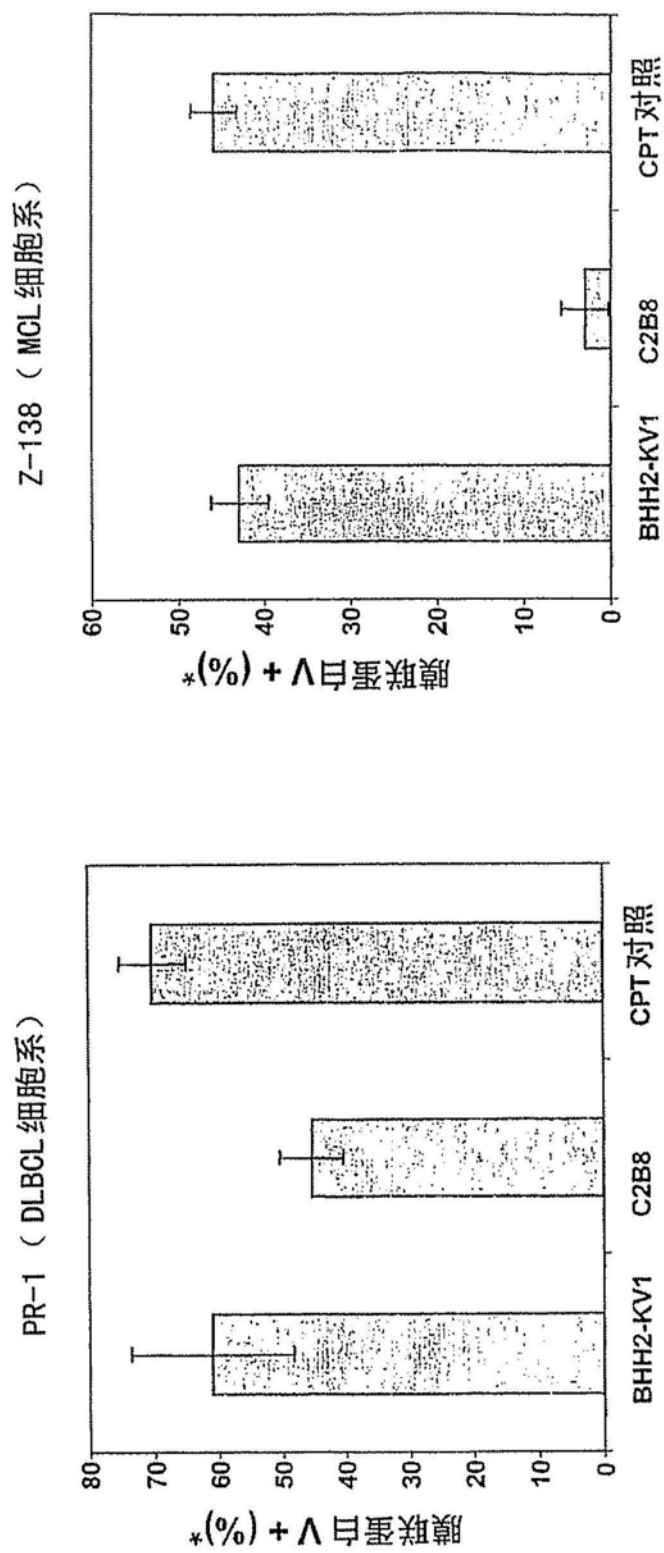


图 15

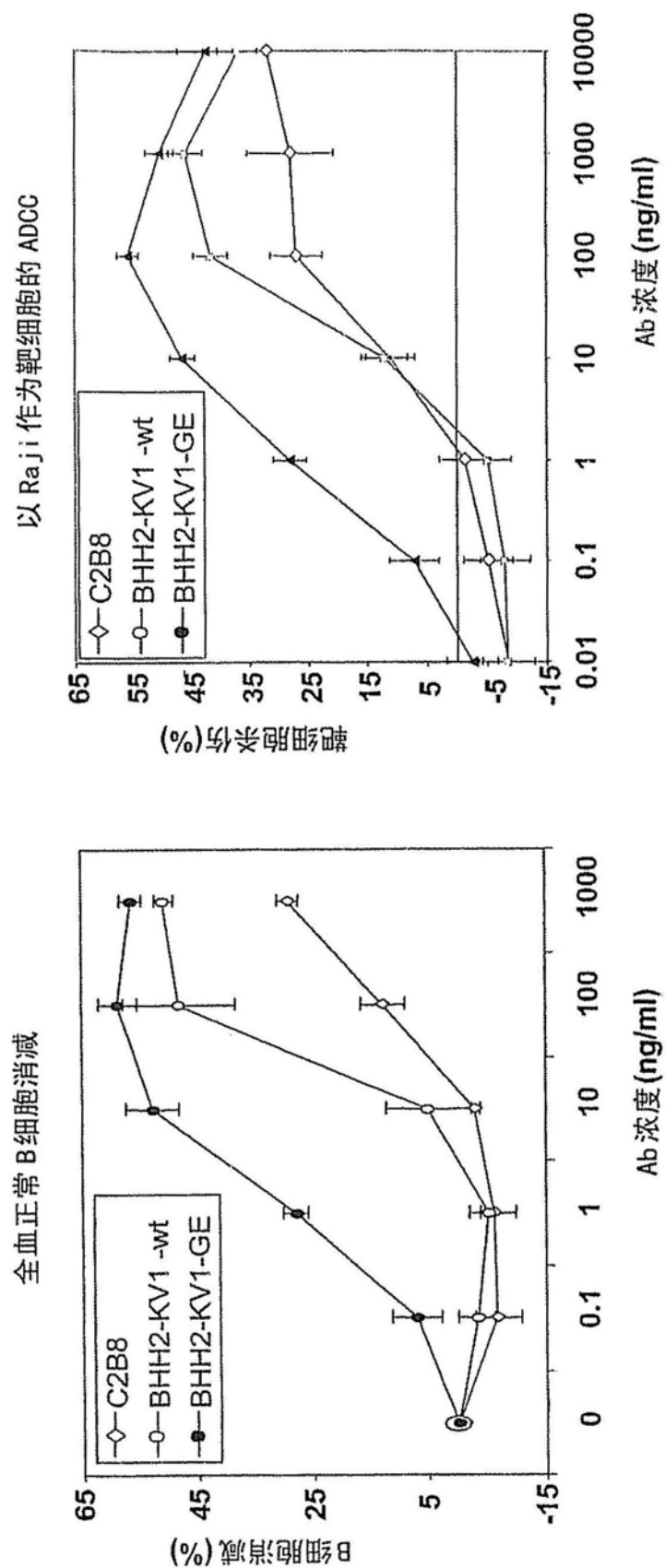


图 16

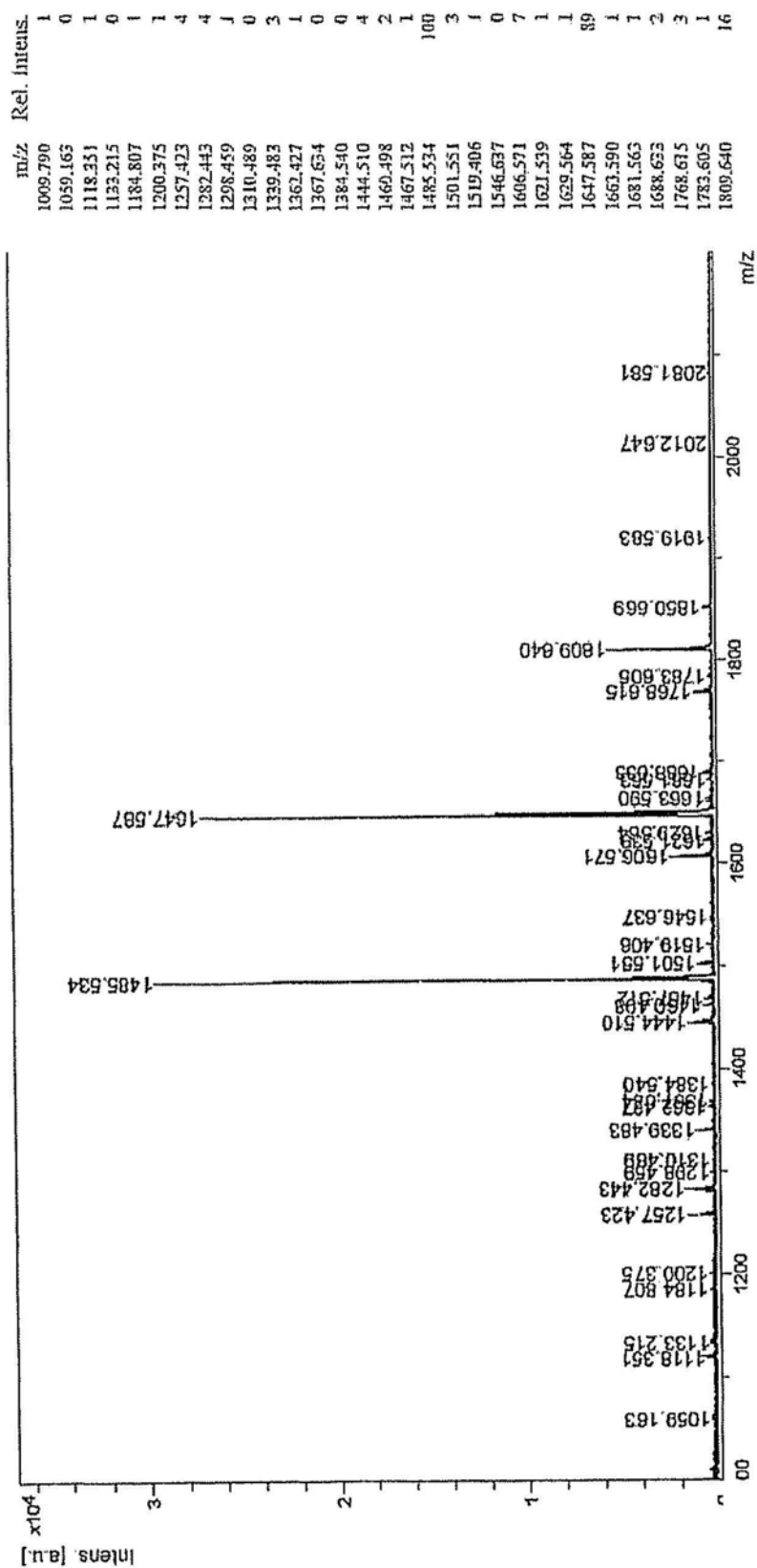


图 17

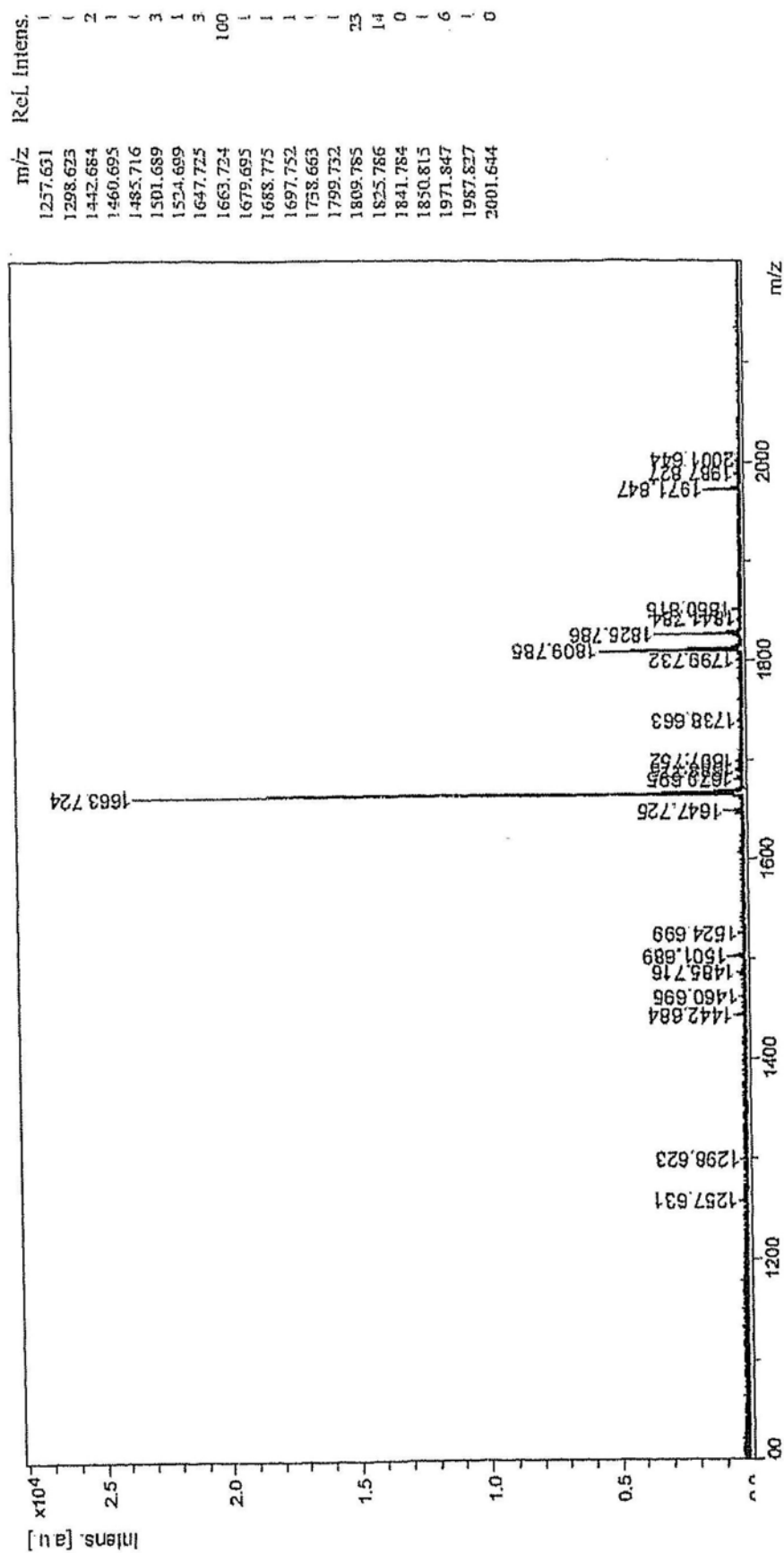


图 18

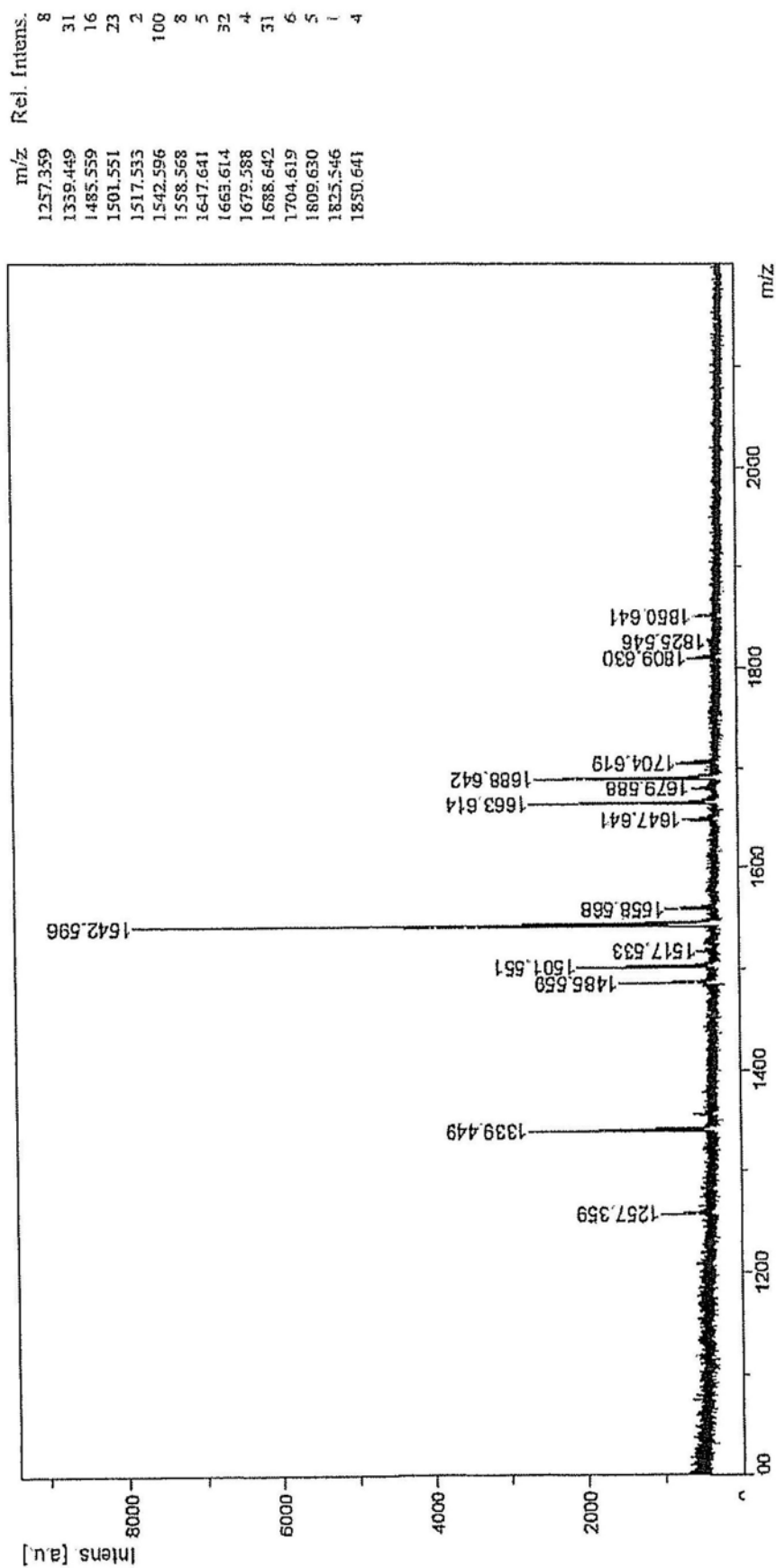


图 19

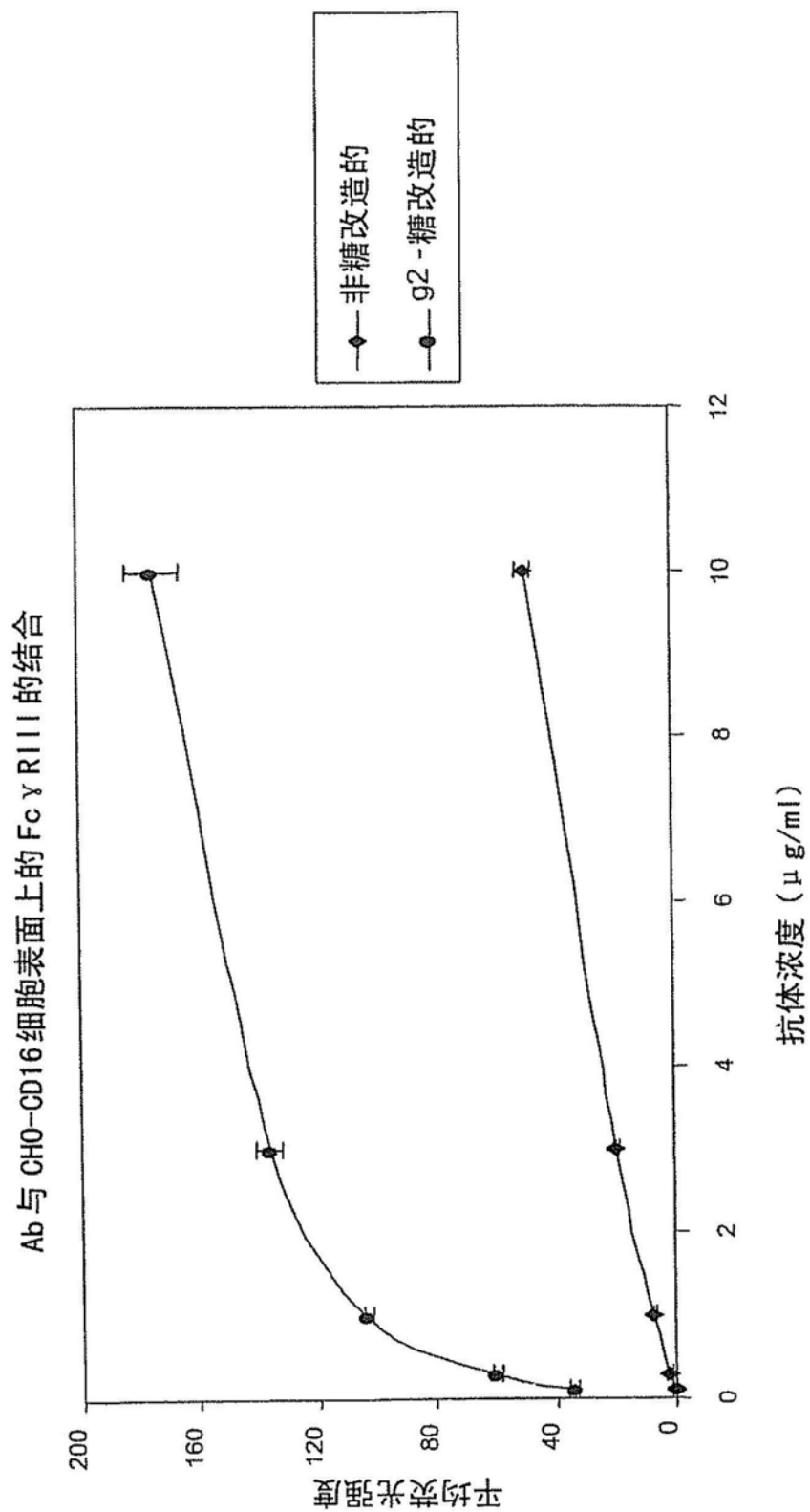


图 20

抗-CD20Abs 导致的程序性细胞死亡

Z-138 套细胞淋巴瘤细胞系

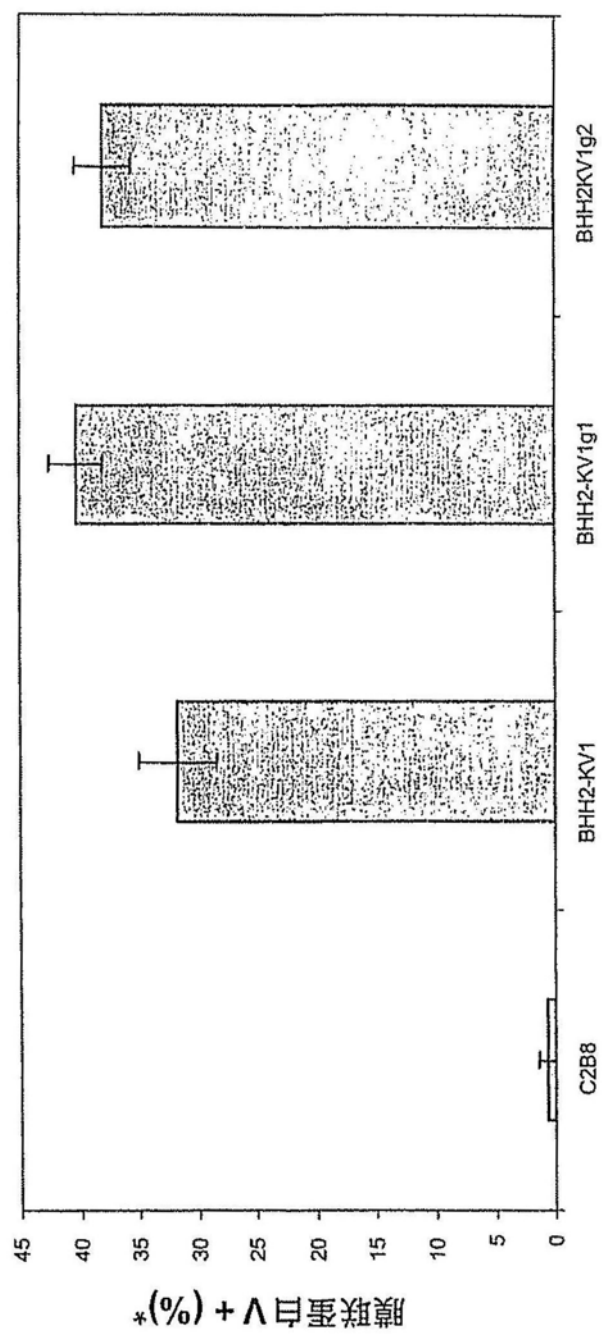


图 21