



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102174108 B

(45) 授权公告日 2016.06.29

(21) 申请号 201110042106.4

A61K 45/00(2006.01)

(22) 申请日 2003.03.03

A61P 35/00(2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/02(2006.01)

60/360259 2002.03.01 US

A61P 37/02(2006.01)

A61P 37/06(2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 31/00(2006.01)

03809863.6 2003.03.03

G01N 33/53(2006.01)

(73) 专利权人 免疫医疗公司

(56) 对比文件

地址 美国新泽西州

W0 0074718 A, 2000.12.14,

(72) 发明人 H·汉森 S·-O·梁 Z·屈

W0 9850435 A, 1998.11.12,

D·M·戈登伯格

W0 0067795 A, 2000.11.16,

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

QU Z ET AL.. Internalization and Cytotoxic Effects of a Humanized Anti-CD74 Antibody, LL1. 《Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research》. 2002, 第 43 卷 255.

代理人 郭文洁

审查员 潘浩

(51) Int. Cl.

C07K 16/46(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

权利要求书4页 说明书30页

序列表20页 附图14页

(54) 发明名称

内在化抗-CD74 抗体和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了人源化、嵌合和人抗-CD74 抗体, CD74 抗体融合蛋白, 免疫缀合物, 疫苗和与 CD74, 主要组织相容性复合物 (MHC) II 类恒定链, Ii 结合的双特异性抗体, 其可用于诊断和治疗 B 细胞病症例如 B 细胞恶性肿瘤, 其中细胞可与 CD74 反应的其它恶性肿瘤和自身免疫性疾病, 以及治疗和诊断方法。

1. 嵌合抗-CD74单克隆抗体(mAb)或其抗原结合片段,其中包含含有鼠抗-CD74 mAb的互补决定区(CDR)和鼠抗-CD 74 mAb的构架区(FR)的轻链和重链可变区和人抗体的轻链和重链恒定区,其中所述嵌合抗-CD74 mAb的轻链可变区包含鼠抗-CD74 mAb轻链可变区的CDR,所述CDR包括由RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列组成的CDR1,由TVSNRFS氨基酸序列组成的CDR2,和由SQSSHVPPT氨基酸序列组成的CDR3,而其中所述嵌合mAb的重链可变区包含鼠抗-CD74 mAb重链可变区的CDR,所述CDR包括由NYGVN氨基酸序列组成的CDR1,由WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列组成的CDR2和由SRGKNEAWFAY氨基酸序列组成的CDR3,其中,所述的抗原结合片段为F(ab')₂、Fab、scFv或Fv。

2. 权利要求1的嵌合抗-CD74 mAb或其抗原结合片段,其中所述mAb或其抗原结合片段包括下述的嵌合LL1重链可变区(cLL1VH)和下述的嵌合LL1轻链可变区(cLL1Vk)

cLL1VH

```

      PstI
CAGGTCCAACTGCACTAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGTCACTGCAAGACTTCTGGATATACCTTCACA
90
GTCCAGGTTTACGCTCTCAGACCTGGACTCGACTTCTTCGGACCTCTCTGTCTAGTTCAGTGGACGTTCTGAAGACCTATATGGAAGTGT
Q V Q L Q Q S G P E L K K P G E T V K Y T C R T S G Y T F T 30

AACTATGGAGTGAAGTGAATAAGCAGACTCCAGGAGAGGGTTTACAGTGGATGGGCTGGATAAACCACACTGGAGAGCCAACATTT
180
TTGATACCTCACTTGACCTATTTCGTCTGAGGGTCTCTCCCAATGTCACTACCCGACCTATTGGGGTTGTGACCTCTCGGTTGTAAA
N Y G V N W I K Q T P G E G L Q W M G W I N P N T G E P T F 59
      CDR1      CDR2

GATGATGACTTCAAGGGACGATTTCCTTCTTTGGATCCTCTGCGAGCACTGCCTTTTTCAGATCAGCAACCTCAAAAATGAGGAC
270
CTACTACTGAAGTTCCTCTGTAACCGGAGAGAAOCTTAGGAGACGGTCTGTGACGAAAAACGTCTAGTCTGTGGAGTTTACTCTCTG
D D D F E K S R F A F S L E S S A S T A E L Q I S N L K N E D 89

ATGGGTACATATTTCTGTTCAAGATCGAGGGGTAAAAACGAAGCCTGGTTTGCTTATTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTCTCTCTCA
360
TACCCATGTATAAGACAGTTCTAGCTCCCATTTTTCCTCGGACCAACGAATAACCCCGTTCCTGAGTCACTGGTGAAGGAGT
M G T Y F C S R S R G K N E A W F A Y W G Q G T L V T V S S 113
      CDR3
  
```

cLL1Vk

```

      PvuII
GACATCTTCAGACCCCAAACTCCACTCTCCCTGCTCTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTTTCAGATCTAGTCAGAGCCTTGT
90
CTGTAGTCTGCTCTGGGTTTGAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAAGACCTCTAGTTCGGAGGTAGAGAACGTCTAGATCAGTCTCGGAACAT
D I Q L T Q T P L S L P V S L G Q A S I S C R S S Q S L V 270

CACAGAAATGGAARACCTATTACATTGGTACCTGCAGAGCCAGGOCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACACAGTTTCCACCGATT
180
GTGTCTTACCTTTTGGATAAATGTACCATGGACGTCTTCGGTCCGGTCAGAGGTTTCGAGGACTAGATGTCTCAAGGTTGGCTAAA
H R N G N T Y L R W Y L Q K P G Q S F K L L I Y T V S N E F 55
      CDR1      CDR2

TCTGGGTTCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTACACTCAAGATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTT
270
AGACCCAGGGTCTGTCCAGTCAACGTCACCTAGTCCCTGTCTAAAGTGTAGTCTAGTCACTCCCTCCGACTCCCTAGACCTGAA
S G V P D R F S G S G S G T D F T L R I S R V E A E D L G L 85

TATTTCTGCTCTCAAGTTCACATGTCTCTCCACGTTCTGGTCTGGGACCAAGCTCTGCTCAACGT
339
ATAAAGACGAGAGTTTCAAGTGTACAGGAGGCTCAAGCCAGCAACCTGGTTCGACCTCTAGTTTGA
Y F C S Q S S H V P P F F G A G T K L E I K R 108
      CDR3
  
```

3. 权利要求1的嵌合抗-CD74 mAb或其抗原结合片段,其中所述嵌合抗-CD74 mAb或其

抗原结合片段是嵌合IgG1。

4. 权利要求1-3任一项的嵌合抗-CD74 mAb或其抗原结合片段,其中所述片段与CD74结合。

5. 权利要求3的嵌合抗-CD74 mAb或其抗原结合片段,其中所述IgG1的恒定区被人IgG2a、IgG3或IgG4的人恒定区置换。

6. 包含一个或多个权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段的抗体融合蛋白。

7. 权利要求6的抗体融合蛋白,其还含有一个或多个来自特异性针对不是CD74的肿瘤细胞标记物的抗体的Fv或Fab'片段。

8. 权利要求7的抗体融合蛋白,其中所述肿瘤细胞标记物选自B细胞家族抗原。

9. 权利要求7的抗体融合蛋白,其中所述肿瘤细胞标记物是选自CD19,CD20,CD22,HLA-DR,CD30,CD33,CD52,MUC1和TAC的抗原。

10. 一种免疫缀合物,其中包括包含至少一种权利要求1-5任一项的与CD74结合的抗体或其抗原结合片段或至少一种权利要求6-9任一项的与CD74结合的抗体融合蛋白的抗体成分,其中将所述抗体成分连接于诊断剂或治疗剂上。

11. 一种治疗组合物在制备用于一种治疗疾病或病症的方法的药剂中的用途,所述治疗组合物包含药学上可接受的载体和至少一种权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段或至少一种权利要求6-9任一项的抗体融合蛋白或权利要求10的免疫缀合物,其中所述疾病或病症选自恶性肿瘤,免疫失调病,自身免疫性疾病,器官移植排斥和移植物抗宿主病,其中所述疾病或病症与表达CD74的细胞相关。

12. 权利要求11的用途,其中所述恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。

13. 权利要求11的用途,其中所述恶性肿瘤是实体瘤。

14. 权利要求13的用途,其中所述实体瘤选自非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

15. 权利要求12的用途,其中所述恶性肿瘤是癌。

16. 权利要求11的用途,其中所述恶性肿瘤选自黑素瘤、肉瘤、肾癌、肺癌、肠癌、胃癌、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、低度恶性B细胞淋巴瘤、侵袭性B细胞淋巴瘤、慢性淋巴性白血病、急性淋巴性白血病和多发性骨髓瘤。

17. 权利要求11-16任一项的用途,其中所述抗体或其抗原结合片段或其抗体融合蛋白以20~2000mg的剂量经静脉内或肌肉内施用。

18. 权利要求11-16中任一项的用途,其中所述抗体或其Fv或Fab片段或包含所述抗体或其Fv或Fab片段的融合蛋白或免疫缀合物在施用至少一种治疗剂之前、期间或之后施用,其中所述治疗剂选自抗体、免疫调节剂、激素、细胞毒害剂和酶。

19. 权利要求18的用途,其中所述抗体与至少一种免疫调节剂、放射性核素、酶、激素、细胞毒害剂、反义寡核苷酸或其组合缀合。

20. 权利要求18或19的用途,其中所述细胞毒害剂是药物或毒素。

21. 权利要求18或19的用途,其中所述免疫调节剂包含细胞因子。

22. 权利要求18或19的用途,其中所述免疫调节剂选自淋巴毒素、血细胞生成因子、集落刺激因子、干扰素、促红细胞生成素、促血小板生成素或其组合。

23. 权利要求21的用途,其中所述细胞因子包含干细胞生长因子。

24. 权利要求22的用途,其中所述淋巴毒素包含肿瘤坏死因子。

25. 权利要求22的用途,其中所述血细胞生成因子是选自IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21及其组合的白介素。

26. 权利要求22的用途,其中所述干扰素选自 α -干扰素、 β -干扰素、 γ -干扰素及其组合。

27. 权利要求22的用途,其中所述集落刺激因子包含粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)及其组合。

28. 权利要求19的用途,其中所述抗体选自可与CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD80, CD126, B7, MUC1、腱生蛋白、Ia、HM1.24和HLA-DR反应的抗体或其抗原结合片段,在药学上可接受的载体中配制。

29. 一种治疗组合物在制备用于一种治疗除淋巴瘤或白血病外的表达CD74的恶性肿瘤的方法的药剂中的用途,所述治疗组合物包含药学上可接受的载体和至少一种权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段或至少一种权利要求6-9任一项的抗体融合蛋白或权利要求10的免疫缀合物。

30. 权利要求29的用途,其中抗体或其抗原结合片段或其抗体融合蛋白或免疫缀合物在施用至少一种用于治疗恶性肿瘤的治疗剂之前、期间或之后施用。

31. 权利要求30的用途,其中所述治疗剂包括抗体、免疫调节剂、激素、细胞毒害剂、药物、毒素、酶或放射性核素。

32. 权利要求31的用途,其中所述抗体与至少一种免疫调节剂、放射性核素、酶、激素、细胞毒害剂、反义寡核苷酸或其组合缀合。

33. 权利要求31或32的用途,其中所述抗体选自可与除CD74外的,由包含要被治疗的恶性肿瘤的细胞所表达的肿瘤标记物反应的mAb或其抗原结合片段,所述mAb或其抗原结合片段在药学上可接受的载体中配制。

34. 一种治疗组合物在制备用于一种治疗患有至少一种按免疫失调病和自身免疫性疾病进行诊断的疾病的个体的方法的药剂中的用途,所述治疗组合物包含药学上可接受的载体和至少一种权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段或至少一种权利要求6-9任一项的抗体融合蛋白或权利要求10的免疫缀合物,其中所述疾病与表达CD74的细胞相关。

35. 权利要求34的用途,其中抗体或其抗原结合片段或其抗体融合蛋白或免疫缀合物在施用至少一种用于治疗疾病的治疗剂之前、期间或之后施用。

36. 权利要求35的用途,其中所述治疗剂包括抗体、免疫调节剂、激素或细胞毒害剂。

37. 权利要求36的用途,其中所述抗体与至少一种免疫调节剂、放射性核素、酶、激素、细胞毒害剂、反义寡核苷酸或其组合缀合。

38. 权利要求36或37的用途,其中所述抗体选自可与除CD74外的,由包含要被治疗的恶性肿瘤的细胞所表达的肿瘤标记物反应的mAb或其抗原结合片段,所述mAb或其抗原结合片段在药学上可接受的载体中配制。

39. 一种治疗组合物在制备用于一种治疗选自淋巴瘤、白血病、其它表达CD-74的恶性肿瘤、免疫失调病,自身免疫性疾病及其组合的疾病的药剂中的用途,所述治疗组合物包含药学上可接受的载体和至少一种权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段或至

少一种权利要求6-9任一项的抗体融合蛋白,其中通过化学缀合或基因融合将至少一种治疗剂连接于抗体或其抗原结合片段或其抗体融合蛋白的Fv或Fab'上,其中所述疾病与表达CD74的细胞相关。

40. 权利要求39的用途,其中所述治疗剂包括免疫调节剂、放射性标记物、激素、酶、细胞毒害剂、药物或毒素。

41. 一种诊断组合物在制备用于一种疾病诊断方法的药剂中的用途,所述疾病选自淋巴瘤、白血病、其它表达CD-74的恶性肿瘤、免疫失调病和自身免疫性疾病,所述诊断组合物包含药学上可接受的载体和至少一种权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段或至少一种权利要求6-9任一项的抗体融合蛋白,其中通过化学结合将诊断剂连接于抗体或其抗原结合片段或其抗体融合蛋白的Fv或Fab'上,其中所述疾病与表达CD74的细胞相关。

42. 权利要求41的用途,其中所述诊断剂是放射性同位素,金属,或脂质体,其中脂质体可通过超声扫描装置检测。

43. 权利要求42的用途,其中所述脂质体包含充气的脂质体。

44. 一种包含权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求6-9任一项的融合蛋白共价连接于I类或II类MHC抗原肽而形成的抗体缀合物的疫苗,其中疫苗用于治疗癌症患者或感染性疾病患者。

45. 权利要求44的疫苗,其中I类或II类抗原肽通过蛋白水解消化而通过抗原呈递细胞从与所述抗体或其抗原结合片段相连的较大肽或蛋白质中释放。

46. 权利要求44或45的疫苗,其中通过融合编码抗体或其抗原结合片段的cDNA和编码抗原肽的cDNA,和在细菌、酵母或哺乳动物细胞中表达抗体融合蛋白来制备抗体缀合物。

47. 一种多特异性抗体,其中将权利要求1-5任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求6-9任一项的抗体融合蛋白连接于特异性针对癌症或炎性细胞标记物、感染性疾病生物体表面上的表位或血液或其它体液中的有毒物质的抗体或抗体片段上。

48. 权利要求47所述的多特异性抗体,其为双特异性抗体。

49. 包含核酸的DNA序列,所述核酸编码的抗体或其抗原结合片段选自

(a) 权利要求1-5任一项的抗-CD74抗体或其抗原结合片段;

(b) 权利要求6-9任一项的所述的抗体融合蛋白;

(c) 权利要求10的免疫缀合物;

(d) 包含至少两种权利要求1-5任一项的所述抗-CD74抗体或其抗原结合片段的抗体融合蛋白或其抗原结合片段;

(e) 权利要求44-46任一项的疫苗;和

(f) 权利要求47或48的多特异性抗体。

50. 含有权利要求49的DNA序列的表达载体。

51. 含有权利要求49的DNA序列的宿主细胞。

内在化抗-CD74抗体和使用方法

[0001] 本申请是申请日为2003年3月3日,申请号为03809863.6的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 1.发明领域

[0004] 本发明涉及人源化、嵌合和人抗-CD74抗体或其片段或包含至少一种抗-CD74抗体,尤其是单克隆抗体(mAb)的抗体融合蛋白,人源化、嵌合和人抗-CD74mAb或其片段的治疗性和诊断性缀合物,和使用这些人源化、嵌合和人抗-CD74mAb或其片段来治疗和诊断B细胞淋巴瘤和白血病,除淋巴瘤和白血病以外的其中细胞是CD74抗原阳性的恶性肿瘤和多种自身免疫病和免疫失调病的方法。本发明涉及多价和/或多特异性抗-CD74mAb或其片段,其包含抗-CD74mAb或其片段的至少一个臂和针对毒性物质,如病原生物体,如癌细胞、寄生虫或感染因子的多特异性mAb的至少一个臂。本发明还涉及与抗原肽缀合的抗-CD74mAb或其片段。所述人源化、嵌合和人抗-CD74mAb,其片段,及其缀合物可单独或作为多元治疗方案的部分进行施用。本发明涉及编码人源化、嵌合和人抗-CD74抗体,和多价和/或多特异性抗-CD74mAb及其片段,及其治疗性,诊断性和抗原性缀合物的DNA序列,包含所述DNA序列的载体和宿主细胞,和制备人源化、嵌合和人抗-CD74抗体的方法。

[0005] 2.发明背景

[0006] 免疫疗法的一个主要目标是固定防御肿瘤细胞或感染性生物体的患者免疫系统。关于癌症治疗,该目标涉及防御肿瘤细胞的患者免疫系统。非霍奇金淋巴瘤(NHL),多发性骨髓瘤和慢性和急性淋巴细胞性白血病是仍为癌症死亡重要原因的B细胞恶性肿瘤。这些恶性肿瘤对多种治疗的应答是混合性的。

[0007] 诱导T-淋巴细胞应答是个体的免疫应答中的关键初始步骤。T细胞活化导致T细胞增殖,T细胞产生细胞因子和T细胞-介导的效应子作用的产生。T细胞活化需要通常被称为初级活化信号的抗原-特异性信号,该信号由存在于T细胞表面的同源分布的T细胞受体(TcR)的刺激生成。该抗原-特异性信号通常的形式是与抗原呈递细胞(APC)的表面上呈递的主要组织相容性复合体(MHC)I类蛋白质或MHC II类蛋白质结合的抗原肽。人类的MHC分子被称为HLA(人白细胞抗原)分子。

[0008] 发现II类分子存在于有限数量的细胞类型,主要是B细胞,单核细胞/巨噬细胞和树突细胞上,在大多数情况下,其呈递源自细胞外环境的蛋白的肽。MHC II类位于与细胞外环境交通的细胞区室中。在人中,MHC-II分子包含HLA-DR,HLA-DQ和HLA-DP分子,其存在于多种遗传编码的等位基因上。因此,例如,来自细胞外环境的细菌抗原可被摄取和被抗原呈递细胞的细胞内处理后呈递在其细胞表面上。CD4+T细胞识别与II类分子相关的肽。

[0009] 与放射性核素或其它细胞毒害剂缀合的靶向性单克隆抗体的使用提供了将所述药剂直接递送至肿瘤位点的可能性,从而限制了正常组织暴露于毒性药剂(GoIdenberg, Semin.NucI.Med.,19:332(1989))。近年来,基于抗体的治疗的潜能及其在肿瘤相关抗原定位中的准确度已经在实验室和临床研究中得到证实(例如,参见Thorpe,TIBTECH,11:42(1993);GoIdenberg,Scientific American,Science & Medicine,1:64(1994);BaIdwin等

U.S.4,925,922和4,916,213;Young,U.S.4918163;U.S.5,204,095;Irie等U.S.5,196,337;HeIIstrom等U.S.5,134,075和5,171,665)。一般而言,抗肿瘤相关标记物的放射标记的抗体或抗体片段在肿瘤定位中的应用要比治疗更成功,部分因为肿瘤对抗体的摄取通常低,仅为总注射剂量的0.01%~0.001%(Vaughan等Brit.J.Ra dio.,60:567(1987))。增加放射性标记物的浓度来增加对肿瘤的剂量通常起反作用,因为其也增加了健康组织对放射能的暴露量。

[0010] 鼠LL1(mLL1或鼠抗-CD74抗体)是与CD74,II类HLA样抗原,即,B-淋巴细胞,单核细胞和组织细胞,人B-淋巴瘤细胞系,黑素瘤,T细胞淋巴瘤和多种其它肿瘤细胞类型表面上的不变链(Ii决定子)发生反应的特异性单克隆抗体(mAb)(Hansen等Biochem.J.320:293(1996))。结合于细胞表面的LL1被溶酶体区室快速内在化然后被快速地分解,速度要远快于其它mAb,如抗-CD19和抗-CD22。同前。LL1的该固有特性克服了免疫治疗的某些前述困难。

[0011] 鼠LL1由小鼠骨髓瘤细胞和来自用源自Raji B-淋巴瘤细胞系的制剂(在Pawlak-Byczkowska等Can.Res.,49:4568(1989)中称为EPB-1)免疫的BALB/c小鼠的脾细胞融合发展而来。mLL1的临床应用,如同大多数其它确信的鼠抗体一样,由于人抗-小鼠抗体(HAMA)响应在人中的发展而受到局限。在注射了mLL1Fab'后,通常不能检测到HAMA响应,如通过利用^{99m}Tc标记的mLL1Fab'骨髓成像研究所示。Juweid等Nuc.Med Comm.18:142-148(1997)。然而,在某些治疗性和诊断性用途中,可优选全长抗-CD74mAb。该全长抗-CD74mAb的用途可限制所述抗体和抗体缀合物的诊断和治疗有效性,不仅仅是因为潜在的致过敏问题,还可能是因为其作为循环缀合物的主要部分可与循环抗-小鼠抗体复合并被隔离。

[0012] 虽然mLL1的抗体片段的应用可以绕过免疫原性问题,仍存在更需要完整IgG和诱导用于治疗或增强的抗体存活时间的情况。一般而言,HAMA响应是对鼠抗-CD74mAb的全部诊断和治疗潜能认识的障碍。因此,嵌合、人源化和人抗-CD74mAb及其片段,其抗体融合蛋白及其片段,免疫缀合物用于治疗或诊断的发展,多价和/或多特异性mAb,及其片段及其疫苗缀合物将在降低人抗-小鼠抗体制备的情况下非常适用于治疗或诊断。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明涉及可被快速内在化进入细胞的抗-CD74抗体及其片段及其抗体融合蛋白,尤其是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0015] 本发明还涉及包含彼此融合和/或与本发明的其它抗体及其片段融合的抗体或其片段的抗-CD74抗体融合蛋白。

[0016] 本发明还涉及包含连接于诊断剂或治疗剂上的本发明的抗-CD74抗体或其片段或抗体融合蛋白或其片段的免疫缀合物。

[0017] 本发明还涉及包含抗体缀合物的疫苗,所述抗体缀合物含有连接于抗原肽的本发明的抗-CD74抗体或其片段或抗体融合蛋白或其片段。

[0018] 本发明还涉及双特异性或多特异性抗体,其包含抗体缀合物,所述缀合物包含连接于特异性针对癌标记物、感染性疾病生物体上的表位或血液或其它体液中毒性物质的抗体或抗体片段的本发明的抗-CD74抗体或其片段或抗体融合蛋白或其片段。

[0019] 本发明还涉及使用本发明的CD74抗体及其片段或其抗体融合蛋白及其缀合物治疗和诊断疾病的方法。

[0020] 本发明还涉及编码CD74抗体或其片段或抗体融合蛋白或其片段,免疫缀合物和抗体缀合物及其多特异性抗体的DNA序列,包含该DNA序列的表达载体和宿主细胞,和表达本发明的这些CD74抗体的方法。

附图简介

[0021] 图1显示了鼠LL1重和轻链可变区的DNA和氨基酸序列。图1A显示了由RT-PCR获得的LL1VH的DNA和氨基酸序列。图1B显示了由5'-RACE获得的LL1Vk的DNA和氨基酸序列。由相应DNA序列编码的氨基酸序列以核苷酸序列下的单字母代码表示。核苷酸序列的编号位于右侧。CDR区中的氨基酸残基以粗体和下划线显示。将Kabat's Ig分子编号法用于氨基酸残基,如氨基酸残基顶部的编号所示。用特定数字后跟字母进行编号的残基表示用Kabat编码方案确定的插入残基。用字母进行编号的插入残基具有相同的在前数字。例如,将图1A中的残基82A,82B和82C表示为82A,B和C。

[0022] 图2显示了在Sp2/0细胞中表达的嵌合LL1(cLL1)重和轻链可变区的DNA和氨基酸序列。图2A显示了cLL1VH的DNA和氨基酸序列。图2B显示了cLL1Vk的双链DNA和氨基酸序列。由相应DNA序列编码的氨基酸序列以单字母代码表示。CDR区中的氨基酸残基以粗体和下划线显示。核苷酸和氨基酸的编号与图1中相同。将用于构建cLL1的限制性位点用方框标出显示。

[0023] 图3显示了人抗体,cLL1和hLL1的轻链和重链可变区的氨基酸序列的比对。图3A显示了人抗体RF-TS3,cLL1和hLL1的VH氨基酸序列比对而图3B显示了人抗体HF-21/28,cLL1和hLL1的Vk氨基酸序列比对。圆点表示cLL1中与人抗体中相应残基相同的残基。框区代表CDR区。cLL1的N-和C-末端残基(下划线)用所使用的staging载体固定而无法与人抗体进行比较。使用如图1的Kabat's Ig分子编号方案。

[0024] 图4显示了在Sp2/0细胞中表达的人源化LL1(hLL1)重和轻链可变区的DNA和氨基酸序列。图4A显示了hLL1VH的DNA和氨基酸序列而图4B显示了hLL1Vk的DNA和氨基酸序列。由相应DNA序列编码的氨基酸序列以单字母代码表示。CDR区中的氨基酸残基以粗体和下划线显示。将如图1A和图1B的Kabat's Ig分子编号方法用于氨基酸残基。

[0025] 图5显示了构建hLL1VH基因的示意图。用作模板和引物的寡核苷酸以箭头线表示。箭头表示3'-末端。有义DNA链(模板,引物和PCR产物)用实线表示而反义链用虚线表示。Vk基因以相似的方法构建。

[0026] 图6显示了竞争性细胞表面结合测试法比较cLL1和鼠LL1的结合亲和力的结果。将变化浓度的cLL1(三角形)或mLL1(菱形)与恒量的¹²⁵I标记的mLL1混合,然后和Raji细胞在40℃孵育1小时。在洗涤后计数结合于细胞表面的放射性标记的mLL1。cLL1和鼠LL1对放射性标记的LL1与Raji细胞的结合的竞争完全相同,证实了克隆的V基因是可信的。

[0027] 图7显示了在Raji细胞膜包被的微孔中比较cLL1和hLL1的结合亲和力的竞争性结合检测法的结果。将变化浓度的hLL1(三角形)或cLL1(菱形)与恒量的HRP缀合的LL1混合,然后在用Raji细胞膜提取物包被的96孔微量滴定板中于室温孵育1小时。检测膜结合的HRP-LL1。hLL1和cLL1对HRP-LL1缀合的竞争完全相同,显示出mAbLL1的特异性和亲和力在人源化LL1中得以保存。

[0028] 图8显示了与Raji细胞表面结合的¹²⁵I-标记的hLL1和mLL1的结局。将放射性标记

的hLL1(带有标记的实线)或mLL1(带有标记的虚线)与Raji细胞一起孵育然后通过洗涤除去未结合的Ab。然后正常培养细胞并在所示时间点检测与细胞相关的(菱形线),在培养基中的分泌的(三角线)或降解的(圆形线)放射性标记的Abs。图8A显示了结合的Ab在3日后的结局。图8B显示了在早期时间点(少于3小时)hLL1加工研究的结果。将两个实验的数据平均。

[0029] 图9显示了交联的LL1Abs对Raji细胞的细胞毒性作用。将 5×10^5 Raji细胞在0日接种于包含(如图顶部所示)5 μ g/ml mLL1, cLL1或hLL1, 或无任何Ab(NiI), 含有50 μ g/ml α -mFc或 α -hFc Ab, 或无任何交联剂(NiI)的1ml培养基中, 如图右侧所示。全部和存活细胞的数量以每日一次计数3日。计算存活细胞百分数(正方形)和存活细胞占在时间点0的存活细胞的比例(菱形)并以培养时间绘图。

[0030] 图10显示了交联的hLL1对Daudi细胞的细胞毒性作用。将 5×10^5 Daudi细胞在0日接种于包含(如图顶部图所示)5 μ g/ml hLL1或hLL2(抗-CD22, 内在化Ab), 或无任何Ab(NiI), 含有50 μ g/ml α -hFcAb, 或无(NiI)的1ml培养基中, 如图右侧所示。全部和存活细胞的数量以每日一次计数3日。计算存活细胞百分数(正方形)和存活细胞占在时间点0的存活细胞的比例(菱形)并以培养时间绘图。

[0031] 发明详述

[0032] 除非另有特指, 术语“a”或“an”是指“一个或多个”。

[0033] 1. 概述

[0034] 本发明提供了单独、作为缀合物或与其它治疗剂(包括其它作为多元治疗法部分的裸抗体和抗体治疗性缀合物)联合用于治疗哺乳动物个体(人和家畜)的人源化、嵌合和人抗-CD74mAb, 其片段, 抗体融合蛋白, 及其治疗性和诊断性缀合物。还公开了治疗和诊断B细胞恶性肿瘤, 其它CD74阳性恶性肿瘤和自身免疫性疾病的方法。

[0035] 2. 定义

[0036] 在下面描述中, 使用了多个术语, 提供如下定义以便于理解本发明。

[0037] 如本说明书所述, 抗体是指全长(即, 天然存在的或由正常免疫球蛋白基因片段重组方法形成的)免疫球蛋白分子(例如, IgG抗体)或免疫球蛋白分子的免疫活性(即, 特异性结合)部分, 如抗体片段。

[0038] 抗体片段是抗体的一部分, 如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、sFv等。不考虑结构, 抗体片段与由完全抗体识别的相同抗原结合。例如, 抗-CD74单克隆抗体片段与CD74的表位结合。术语“抗体片段”还包括任何一种合成的或基因工程改造的蛋白, 该蛋白通过与特异性抗原结合形成复合物而象抗体一样发挥作用。例如, 抗体片段包括由可变区组成的分离片段, 如由重链和轻链可变区组成的“Fv”片段, 其中的轻链和重链可变区通过肽联结子(“scFv蛋白”)连接的重组单链多肽分子, 和由模拟高可变区的氨基酸残基组成的最小识别单位。

[0039] 裸抗体通常是一种不与治疗剂缀合的完全抗体。这样是因为抗体分子的Fc部分提供了效应子作用, 如补体结合和ADCC(依赖抗体的细胞毒性), 其启动可导致细胞裂解的机制。然而, Fc部分可能不是治疗作用所需要的, 而其它机制, 如凋亡开始活动。裸抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体, 以及某些重组抗体, 如嵌合抗体, 人源化抗体或人抗体。

[0040] 嵌合抗体是一种重组蛋白, 其含有来源于一种物种的抗体优选是啮齿动物抗体的

包含互补决定区(CDR)的可变域,而抗体分子的恒定域则来源于人抗体。为了兽医学上的应用,嵌合抗体的恒定区可来源于其它物种,如猫或犬。

[0041] 人源化抗体是重组蛋白,其中将来源一个物种的抗体,例如,啮齿动物抗体的CDR从啮齿动物抗体的重链可变区和轻链可变区转移至人的重链可变域和轻链可变域。该抗体分子的恒定域来源于人抗体。

[0042] 人抗体是获自己已被“工程处理”以响应抗原性激发而产生特异性人抗体的转基因小鼠的抗体。在该方法中,将人重和轻链基因座的元件导入源自包含内源重链和轻链基因座的靶向断裂的胚胎干细胞系的小鼠品系中。该转基因小鼠能合成特异性针对人抗原的人抗体,该小鼠可用于制备分泌人抗体的杂交瘤。Green等Nature Genet.7:13(1994), Lonberg等Nature368:856(1994)和Taylor等Int.Immun.6:579(1994)描述了从转基因鼠中获得人抗体的方法。完全人抗体还可以用基因或染色体转染法,以及噬菌体展示技术(phage display technology)进行构建,所有这些方法均为本领域已知的。例如,参见McCafferty等Nature 348:552-553(1990)从来自未免疫的供者的免疫球蛋白可变区基因库中于体外制备人抗体及其片段。在该方法中,将抗体可变区基因的框架内克隆至丝状噬菌体的主要或次要外膜蛋白质基因,并被显示为噬菌体微粒表面上的功能性抗体片段。

[0043] 因为丝状微粒包含噬菌体基因组的单股DNA拷贝,基于抗体功能特性的选择还会导致选择编码表现出这些特性的抗体的基因。在该方法中,噬菌体模拟了B细胞的某些特性。可以多种形式实施噬菌体展示,对其的综述,可参见例如Johnson和Chiswell,Current Opinion in Structural Biology3:5564-571(1993)。

[0044] 还可以用体外活化的B细胞产生人抗体。参见美国专利5,567,610和5,229,275,将其全文引入作为参考。

[0045] 治疗剂是与抗体部分分开、同时或顺序施用的或缀合于抗体部分,即抗体或抗体片段或亚片段,并可用于疾病治疗中的分子或原子。治疗剂的实例包括抗体、抗体片段、药物、毒素、酶、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、螯合剂、硼化合物、光活化剂或染料和放射性同位素。

[0046] 诊断剂是一种可与抗体部分即,抗体或抗体片段或亚片段结合施用,且可通过定位包含抗原的细胞而用于疾病诊断中的分子或原子。可用的诊断剂的包括,但不限于,放射性同位素、染料(如含有生物素-链亲和素复合物),造影剂,荧光化合物或用于磁共振成像(MRI)的分子和增强剂(例如,顺磁性离子)。美国专利6,331,175公开了MRI技术和与MRI增强剂缀合的抗体的制备,将其全文引入作为参考。优选地,诊断剂选自放射性同位素,用于磁共振成像的增强剂和荧光化合物。为了用放射性金属或顺磁性离子加载抗体成分,或许必需将其与具有附用于结合所述离子的多种螯合基团的长尾的试剂进行反应。所述尾可以是聚合物如聚赖氨酸,多糖或其它具有悬吊基团的衍生的或可衍生的链,所述悬吊基团可结合于螯合基团,例如乙二胺四醋酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、卟啉,聚胺,冠醚,二-缩氨基硫脲,泊咯沙姆(polyoxime)和已知可用于该目的类似基团。利用标准化学法将螯合剂与肽抗原偶联。螯合剂通常经由能形成与所述分子的键,且具有免疫反应性最少丢失和最大聚合和/或内部交联的基团与抗体相连。Hawthorne的美国专利4,824,659(名为“Antibody Conjugates”,1989年4月25日公布)描述了用于将螯合剂与抗体结合的其它,更不常见的,方法和试剂,将所述专利的公开内容全文引入此处作为参考。特别适用的金属螯

合剂组合包括与一般能量为60~4,000keV的诊断性同位素,如 ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{18}F , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{76}Br 一起用于放射成像的2-苄基-DTPA及其一甲基和环己基类似物。当与本发明的抗体一起使用时,相同的螯合剂,当与非放射性金属如锰,铁和钆复合时适用于MRI。大环螯合剂如NOTA,DOTA和TETA适用于多种金属和放射性金属,最特别地是分别适于镱,钆和铜的放射性核素。可通过按选取的金属定制环的大小从而制备非常稳定的所述金属螯合复合物。本发明还包括适于稳定结合核素,如用于RAIT的 ^{223}Ra 的其它环型螯合螯合剂如大环聚醚。

[0047] 免疫缀合物是抗体成分与治疗剂或诊断剂的缀合物。诊断剂可包括放射性或非放射性的标记物、造影剂(如用于磁共振成像,计算机控制断层扫描术或超声),而放射性标记物可以是发射 γ , β , α ,俄歇电子或正电子的同位素。

[0048] 表达载体是包含在宿主细胞中表达的基因的DNA分子。通常,将基因表达置于包括组成型或可诱导的启动子,组织-特异性调节元件和增强子的特定调节元件的调控之下。所述基因被称为“操作性连接于”调节元件。

[0049] 重组宿主可以是任何含有克隆载体或表达载体的原核细胞或真核细胞。该术语还包括那些原核细胞或真核细胞,如细菌、酵母和哺乳动物细胞以及转基因动物,其已被实施了基因工程操作以便宿主细胞的染色体或基因组中包含克隆的基因。适用的哺乳动物宿主细胞包括骨髓瘤细胞,如SP2/0细胞和NS0细胞,以及中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、杂交瘤细胞系及其它可用于表达抗体的哺乳动物宿主细胞。人细胞系,PER.C6同样特别适用于表达mAb及其它融合蛋白,该细胞系公开于WO 0063403A2中,其与常规哺乳动物细胞系,如CHO、COS、Vero、HeLa、BHK和SP2-细胞系相比可制备高于2~200倍的重组蛋白质。具有修饰的免疫系统的特定转基因动物尤其适用于制备完全人抗体。

[0050] 如本说明书所使用的,术语抗体融合蛋白是重组制备的抗原-结合分子,其中两个或多个具有相同或不同特异性的相同或不同的单链抗体或抗体片段相连接。融合蛋白的效价显示了抗体融合蛋白具有多少针对单个抗原或表位的结合臂或位点;即,单价、二价、三价或多价。抗体融合蛋白的多效价是指其能利用与抗原的结合中的多重相互作用,由此增加了结合抗原的亲和力。特异性显示了一个抗体融合蛋白能够结合多少抗原或表位;即,单特异性,双特异性,三特异性,多特异性。使用这些定义,天然抗体,例如,IgG,是二价的,因为其具有两个结合臂,但若是单特异性的,因为其具有一个表位结合。单特异性,多价融合蛋白具有针对表位的超过一个的结合位点但仅结合一个表位,例如具有两个可与相同抗原反应的结合位点的双特异性抗体。抗体融合蛋白可包含单个抗体成分,不同抗体成分或相同抗体成分的多个拷贝的多价或多特异性的组合。抗体融合蛋白还可包含抗体或抗体片段和治疗剂。适用于所述融合蛋白的治疗剂的实例包括免疫调节剂(“抗体-免疫调节剂抗体融合蛋白”)和毒素(“抗体-毒素抗体融合蛋白”)。一种优选的毒素包括核糖核酸酶(RNase),优选为重组RNase。

[0051] 多特异性抗体是能同时与至少两个具有不同结构的靶位,例如,两个不同的抗原,相同抗原上的两个不同的表位,或半抗原和/或抗原或表位结合的抗体。一个特异性应针对B细胞,T细胞,骨髓细胞,浆细胞和肥大细胞抗原或表位。另一个特异性可是针对相同细胞类型上的不同抗原,如B-细胞上的CD20,CD19,CD21,CD23,CD46,CD80,HLA-DR,CD74和CD22。多特异性,多价的抗体的结构具有多于一个结合位点,且所述结合位点具有不同特异性。例

如,双特异性抗体,其一个结合位点与一种抗原反应而另一结合位点与另一抗原反应。

[0052] 双特异性抗体是同时结合两个具有不同结构的靶位的抗体。双特异性抗体(bsAb)和双特异性抗体片段(bsFab)具有至少一个特异性结合,例如B细胞,T细胞,骨髓细胞,浆细胞和肥大细胞细胞抗原或表位的臂和至少另一个特异性结合可靶向的携带有治疗剂或诊断剂的缀合物的臂。利用分子工程操作可制备多种双特异性融合蛋白。一种形式中,双特异性抗体融合蛋白是单价的,包含,例如具有针对一种抗原的单个结合位点的scFv和具有针对第二种抗原的单个结合位点的Fab片段。在另一形式中,双特异性抗体融合蛋白是二价的,包含,例如具有针对一种抗原的结合位点的IgG和具有针对第二种抗原的两个结合位点的两个scFv。

[0053] 犬源化(caninized)或猫源化(felinized)抗体是其中已将啮齿动物(或另一物种)的单克隆抗体的互补决定区从啮齿动物(或另一物种)免疫球蛋白的重和轻可变链分别转移至犬或猫的免疫球蛋白可变区的重组蛋白质。

[0054] 家畜包括大型动物如马,牛,绵羊,山羊,骆驼,羊驼和猪,以及宠物。在优选的实施方案中,家畜是马。

[0055] 宠物包括作为宠物的动物。其主要是犬和猫,而小型啮齿动物,如豚鼠,仓鼠,大鼠和白鼯也是被包括的,如低于人的灵长类动物如猴。在优选的实施方案中,宠物是犬或猫。

[0056] 3.包括嵌合、人源化和人抗体在内的单克隆抗体的制备

[0057] 单克隆抗体(MAb)是针对特定抗原的均一类型的抗体且该抗体仅包括一种类型的抗原结合位点并仅与一种抗原性决定位点上的表位结合。针对特异性抗原的啮齿动物单克隆抗体可用本领域技术人员已知的方法获得。例如,参见Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975),和Coligan等(eds.),CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,VOL.1,2.5.1-2.6.7页(John Wiley&Sons 1991)[在下文中“Coligan”]。简言之,单克隆抗体的制备可以通过用包含抗原的组合物注射小鼠,通过取血清样品鉴定抗体产生的存在,取脾获得B-淋巴细胞,融合B-淋巴细胞和骨髓瘤细胞来制备杂交瘤,克隆杂交瘤,选择产生针对所述抗原的抗体的阳性克隆,培养该产生针对所述抗原的抗体的克隆,和从杂交瘤培养物中分离抗体。

[0058] 可采用多种已良好建立的方法从杂交瘤培养物中分离和纯化MAb。所述分离方法包括使用A蛋白琼脂糖凝胶的亲和层析,大小排阻层析和离子交换层析。例如,参见Coligan 2.7.1-2.7.12页和2.9.1-2.9.3页。同样,参见Baines等,“Purification of Immunoglobulin G(IgG)”METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,VOL.10,79-104页(The Humana Press,Inc.1992)。

[0059] 在针对免疫原的抗体初始生成后,可对抗体进行测序并随后用重组技术进行制备。鼠抗体和抗体片段的人源化和嵌合化是本领域技术人员所熟知的。例如,将小鼠互补决定区通过从小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链转移至人可变区中,然后用鼠相对物置换构架区中的人类残基从而制备人源化单克隆抗体。源自人源化单克隆抗体的抗体成分的应用避免了与鼠恒定区免疫原性相关的潜在问题。

[0060] 克隆鼠免疫球蛋白可变区的一般方法描述于,例如Orlandi等Proc.NAT'L Acad.SCI USA 86:3833(1989)中,将其全文引入作为参考。构建嵌合抗体的方法是本领域技术人员熟知的。例如,Leung等,Hybridoma 13:469(1994)描述了他们如何通过将编码LL2单克隆抗体,一种抗-CD22抗体的V_K和V_H区的DNA序列,分别与人K和IgG1恒定区重组而制备

LL2嵌合体。该出版物还提供了LL2轻链和重链可变区, V_K 和 V_H ,各自的核苷酸序列。制备人源化MAb的方法描述于,例如Jones等, *Nature* 321:522(1986), Riechmann等, *Nature* 332:323(1988), Verhoeyen等, *Science* 239:1534(1988), Carter等, *Proc. NAT'L Acad. SCI USA* 89:4285(1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437(1992), 和Singer等 *J. Immun.* 150:2844(1993), 由此将上述每一文件均引入作为参考。

[0061] 为了该目的, 本发明描述了可与CD74抗原结合并能用于诊断和治疗方法的嵌合、人源化和人抗体及其片段。人源化抗体和抗体片段描述于名为“抗-CD20抗体和其融合蛋白及使用方法”的, 代理人卷号18733/1073的美国临时申请, 美国临时申请号60/356,132, 美国临时申请60/416,232和代理人卷号18733/1155中; hMN-14抗体, 如公开于美国申请号.5,874,540中的那些抗体, 其是III类抗-癌胚抗原抗体(抗-CEA抗体); Mu-9抗体, 如公开于美国申请号.10/116,116中的那些抗体; AFP抗体, 如公开于美国临时申请60/399,707的那些抗体; PAM4抗体, 如公开于名为“单克隆抗体”的美国临时申请, 代理人卷号18733/1102中的那些抗体; RS7抗体, 如公开于美国临时申请60/360,229中的那些抗体; 和CD22抗体, 如公开于美国专利5,789,554和6,187,287和美国申请09/741,843和09/988,013中的那些抗体, 上述全部文件均全文引入此处作为参考。

[0062] 嵌合抗体是含有包括源自一种动物物种, 如啮齿动物抗体的CDR的可变区, 而抗体分子的其余部分, 即恒定区, 源自人抗体的重组蛋白质。因此, 嵌合单克隆抗体还可通过用一个或多个不同的人FR置换嵌合mAb可变区中鼠FR的序列的方法进行人源化。具体地, 将小鼠CDR从小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链转移至人抗体的相应的可变区。因为将小鼠CDR简单转移至人FR通常会导致抗体亲和力的降低甚至丧失, 故可能需要额外的修饰以便恢复鼠抗体的原始亲和力。这可通过将FR区中一个或多个某些人类残基用其鼠相对物置换从而获得具有对其表位良好结合亲和力的抗体的方法来实现。例如, 参见Tempest等 *Biotechnology* 9:266(1991)和Verhoeyen等 *Science* 239:1534(1988)。此外, 人源化, 嵌合和人Mab针对特异性表位的亲和力可通过CDR的诱变而得增加, 从而较少剂量的抗体可产生与在诱变前较低亲和力Mab的较高剂量相同的效果。例如, 参见W00029584A1。

[0063] 制备本发明的抗体的另一种方法是通过在转基因的牲畜的乳液中制备。例如, 参见CoIman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63:141-147, 1998; 美国专利5,827,690, 将此二者文件全文引入作为参考。制备分别包含编码配对免疫球蛋白重和轻链的DNA片段的两个DNA构建体。将该DNA片段克隆至包含优选在哺乳动物上皮细胞中表达的启动子序列的表达载体中。实例包括, 但不限于, 来自兔, 母牛和绵羊的酪蛋白基因, 母牛 α -乳球蛋白基因, 绵羊 β -乳球蛋白基因和小鼠乳清酸蛋白基因的启动子。优选地, 插入片段在其3'侧与来自乳腺-特异性基因的同源基因组序列侧接。其提供了聚腺苷酸位点和转录稳定化序列。将表达盒共注射至受精的哺乳动物卵的前核中, 然后将卵移植至磁性受体的子宫内并使之孕育。出生后, 用Southern分析筛选同时存在两种转基因的子代。为了呈现抗体, 必需将重和轻链基因二者在相同细胞中同时表达。采用本领域已知的标准免疫学方法分析来自转基因雌性动物的乳液中抗体或抗体片段的的存在和功能性。可采用本领域已知的标准方法从乳液中纯化抗体。

[0064] 本发明的完全人抗体, 即, 用于与人源化, 嵌合或人抗-CD74抗体联合治疗的人抗-CD74MAb或其它人抗体, 如抗-CD22, 抗-CD19, 抗-CD23, 抗-CD20或抗-CD21MAb, 可获自转基因的非-人类的动物。例如, 参见Mendez等 *Nature Genetics*, 15:146-156(1997); 美国专利

号5,633,425,其全文引入作为参考。例如,人抗体可从具有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中回收。通过灭活内源免疫球蛋白基因和导入人免疫球蛋白基因座将该小鼠体液免疫系统人源化。人免疫球蛋白基因座非常复杂且包含大量的不连续区段,其总共几乎占人基因组的0.2%。为确保转基因小鼠能够产生足够抗体库,必须将大部分人重链和轻链基因座导入小鼠基因组。这要用分步法来完成,开始要构建含有以种系构型的人重链轻链的免疫球蛋白基因座的酵母人工染色体(YAC)。因为每个插入物的大小大约是1Mb,故构建YAC需要免疫球蛋白基因座重复片段的同源重组。将两种YAC,一种含有重链基因座而一种含有轻链基因座,经由含YAC-酵母球芽与小鼠胚胎干细胞的融合而分别导入小鼠。然后将胚胎干细胞克隆显微注射至小鼠胚泡。根据经由其种系传输YAC的能力筛选结果得到的嵌合雄性然后将其与鼠抗体产生缺陷的小鼠进行繁殖。培养这两个转基因品系,一个含有人重链基因座而其它含有人轻链基因座,产生响应免疫而生成成人抗体的子代。

[0065] 更为新近的制备双特异性mAb的方法包括工程化重组mAb,其中含有附加半胱氨酸残基从而使得其交联比普通的免疫球蛋白同种型强。例如,参见FitzGerald等Protein Eng.10(10):1221-1225,1997。另一方法是连接两个或多个不同单链抗体或抗体片段的具有所需双特异性的工程化重组融合蛋白。例如,参见CoIoma等Nature Biotech.15:159-163,1997。利用分子工程操作可制备多种双特异性融合蛋白。一种形式中,双特异性抗体融合蛋白是单价的,包含,例如具有针对一种抗原的单个结合位点的scFv和具有针对第二种抗原的单个结合位点的Fab片段。在另一形式中,双特异性抗体融合蛋白是二价的,包含,例如具有针对一种抗原的两个结合位点的IgG和具有针对第二种抗原的两个结合位点的两个scFv。

[0066] 连接两个或多个不同单链抗体或抗体片段的双特异性融合蛋白用相似的方法制备的。可将重组方法用于制备多种融合蛋白。例如,可制备包含源自人源化单克隆抗-CD74抗体的Fab片段和源自鼠抗-diDTPA的scFv的融合蛋白。柔性连接子,如GGGS将scFv与抗-CD74抗体重链的恒定区相连。或者,scFv可与另一人源化抗体轻链的恒定区相连。重链Fd与scFv框架内连接所需的适宜的连接子序列经PCR反应而导入V λ 和V κ 区。然后编码scFv的DNA片段连接至包含编码CH1区的DNA序列的staging载体。剪切结果得到的scFv-CH1构建体然后连接至包含编码抗-CD74抗体的VH区的DNA序列的载体。得到的载体可用于转染适宜的宿主细胞,如用于表达双特异性抗体融合蛋白的哺乳动物细胞。

[0067] 4. 抗体片段的制备

[0068] 识别特异性表位的抗体片段可通过已知方法生成。抗体片段是抗体的抗原结合部,如F(ab')₂,Fab',Fab,Fv,sFv等。其它抗体片段包括,但不限于:可通过抗体分子的胃蛋白酶消化制备的F(ab')₂片段,和可通过将F(ab')₂片段的二硫键还原而产生的Fab'片段。或者,可构建Fab'表达文库(Huse等1989,Science,246:1274-1281)以便快速和简便的鉴定具有所需特异性的单克隆Fab'片段。本发明包括抗体和抗体片段。

[0069] 单链Fv分子(scFv)包括VL区和VH区。VL和VH区联合形成靶结合位点。这两个区进一步由肽连接子(L)共价连接。如果VL区是scFv分子的N-端部分则将scFv分子表示为VL-L-VH,或如果VH区是scFv分子的N-端部分则表示为VH-L-VL。用于制备scFv分子和设计适宜的肽连接子的方法描述于美国专利号4,704,692,美国专利号4,946,778,R.Raag和M.Whitlow,"SINGLE Chain FVS."FASEB Vol 9:73-80(1995)和R.E.Bird和B.W.Walker,"

Single Chain antibody Variable Regions,”TIBTECH, Vol 9:132-137(1991)中。这些参考文献全文引入此处作为参考。

[0070] 抗体片段可通过全长抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或另一宿主中表达编码所述片段的DNA而制备。可采用常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶裂解全长抗体而获得抗体片段。例如,抗体片段可通过用胃蛋白酶酶法裂解抗体而提供表示为F(ab')₂的5S片段而制备。该片段还可使用巯基还原剂,和可任选地用于由二硫键的裂解而产生的巯基的阻断剂进一步裂解,以产生3.5S Fab'单价片段。或者,利用木瓜蛋白酶酶法裂解直接生成两个单价Fab片段和Fc片段。这些方法描述于,例如,Goldenberg,美国专利号4,036,945和4,331,647和其中包括的参考文献,所有专利均全文引入此处作为参考。还可参见NISONOFF等Arch Biochem. Biophys. 89:230(1960);Porter, Biochem. J 73:119(1959),EdeIman等METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, 422页中(Academic Press 1967),和Coligan 2.8.1-2.8.10和2.10.-2.10.4页

[0071] 抗体片段的另一形式是编码单个互补决定区的(CDR)的肽。CDR是抗体的可变区的片段,其在结构上与抗体所结合表位互补且其比可变区的其它部分更可变。因此,CDR有时是指高可变区。可变区包括三个CDR。可通过构建编码所需要抗体的CDR的基因来获得CDR肽。所述基因可通过,例如使用聚合酶链反应以从产生抗体的细胞的RNA合成可变区来制备。例如,参见Larrick等方法:A COMPANION TOMETHODS IN ENZYMOLOGY 2:106(1991);Courtenay-Luck,“Genetic Manipulation of单克隆抗体”,MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter等(eds.), 166-179页中(Cambridge University Press 1995);和Ward等“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies”, MONOCLONAL: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch等(eds.), 137-185页中(Wiley-Liss, Inc. 1995)。

[0072] 其它剪切抗体的方法,如分离重链以便形成单价轻链-重链片段,片段的进一步剪切,或其它酶,化学或遗传技术也是可以使用的,只要片段能与被完整抗体识别的抗原结合。

[0073] 5. 抗-CD74抗体

[0074] 本发明的抗-CD74mAb包含具有针对CD74抗原特异性的特异性鼠CDR。本发明的抗-CD74mAb是人源化,嵌合或人mAb且其包含鼠抗-CD74mAb,鼠LL1MAB的CDR的氨基酸。人源化抗-CD74单克隆抗体(mAb)或其片段包含鼠抗-CD74mAb的轻链可变区的CDR,所述CDR包括含有RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3,此外,人源化抗-CD74单克隆抗体或其片段包括所述人源化mAb的重链可变区,所述重链可变区包括鼠抗-CD74mAb的重链可变区的CDR,所述CDR包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。此外,人源化mAb基本保持导致这些mAb,其片段或mAb缀合物快速内在化和分解的针对CD74的特异性,其中CD74即为MHCII类可变链, Ii, 其在细胞,如B-淋巴细胞,单核细胞和组织细胞,以及B细胞淋巴瘤和白血病,以及骨髓瘤细胞上呈递的。

[0075] 在一个实施方案中,本发明CD74抗体是包含含有鼠抗-CD74(mLL1)的互补决定区(CDR)和人抗体的构架区(FR)的轻链和重链可变区的人源化抗-CD74单克隆抗体(mAb)或其片段,其中人源化mAb的轻链可变区包括鼠抗-CD74mAb轻链可变区的CDR,所述CDR包括含有

RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3,而其中人源化mAb的重链可变区包括鼠抗-CD74mAb重链可变区的CDR,所述CDR包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。重和轻链可变区的鼠CDR分别显示于图1A和1B中。轻链和重链可变区的人FR可通过取代至少一种从相应的鼠mAb FR中取代的氨基酸进行修饰而保持其对CD74的特异性。更具体地,与图.3B的CLLI Vk序列的鼠轻链可变区的氨基酸残基2,3,4,46,87和100,和图.3A的cLL1 VH序列的鼠重链可变区的氨基酸残基5,37,38,46,68,91和93等同的来自鼠mAb的一个或多个特异性氨基酸可保持在人源化抗-CD74的人FR中以便保持特异性。

[0076] 在优选的实施方案中,将包含图.4A的重链可变区和图.4B的轻链可变区的人源化抗-CD74mAb、人源化LL1(hLL1)或其片段用于本发明披露的方法中。更具体地,人源化抗-CD74mAb或其片段包含人抗体的轻链和重链恒定区或其部分。此外,本文所描述的任何一种人源化抗-CD74mAb或其片段的人源化抗-CD74mAb或其片段可以是人源化IgG1。

[0077] 虽然人源化抗-CD74mAb是优选的,本发明还包括嵌合抗-CD74(cCD74)mAb或其片段。在一个实施方案中,嵌合抗-CD74(cCD74)单克隆抗体、(mAb)或其片段包括鼠抗-CD74mAb的轻链可变区,所述轻链可变区包括含有RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3。在另一实施方案中,嵌合抗-CD74单克隆抗体或其片段包括鼠抗-CD74mAb的重链可变区,所述重链可变区包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。在另一实施方案中,嵌合抗-CD74mAb包括含有鼠抗-CD74mAb的互补决定区(CDR)和鼠抗-CD74mAb的构架区(FR)的轻链和重链可变区和人抗体的轻链和重链恒定区,其中嵌合mAb的轻链可变区包括鼠抗-CD74mAb轻链可变区的CDR,所述CDR包括含有RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3,并且其中所述嵌合mAb的重链可变区包括鼠抗-CD74mAb重链可变区的CDR,所述CDR包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。优选的嵌合抗-CD74mAb或其片段包括图.2A的重链可变区和图.2B的轻链可变区。

[0078] 本发明还包括人抗-CD74(huCD74)单克隆抗体(mAb)或其片段,其包含人抗-CD74mAb轻链可变区,所述轻链可变区包括含有RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3。此外,还包括人抗-CD74(huCD74)单克隆抗体(mAb)或其片段,其包含所述人mAb的重链可变区,所述重链可变区包括鼠抗-CD74mAb重链可变区的CDR,所述CDR包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。更优选地,本发明公开了包含人抗体的轻链和重链可变区和恒定区的人抗-CD74(huCD74)单克隆抗体(mAb)或其片段,其中人抗-CD74mAb轻链可变区的huCD74CDR包括含有RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3,并且其中人mAb的重链可变区包括鼠抗-CD74mAb重链可变区的CDR,所述CDR包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。

[0079] 本发明的每个人、嵌合或人源化抗-CD74mAb优选是IgG1,其中恒定区优选是人IgG1,但IgG1可分别指人IgG1、嵌合IgG1或人源化IgG1。特别地,人源化CD74mAb,hLL1,含有来自人IgG1的恒定区和铰链区。优选地,嵌合和人LL1mAb均含有相同的恒定区和铰链区。然而,可进行修饰以使用人IgG2a、IgG3或IgG4的人恒定区置换IgG1的恒定区。

[0080] 本发明还涉及鼠抗-CD74单克隆抗体或其片段,其包含鼠抗-CD74mAb轻链可变区的CDR,所述CDR包括含有RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3,此外,鼠抗-CD74单克隆抗体或其片段,包含鼠抗-CD74mAb重链可变区的CDR,所述CDR包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。更优选地,鼠抗-CD74单克隆抗体或其片段包含鼠抗-CD74(mLL1)的互补决定区(CDR)和鼠抗-CD74抗体的构架区(FR),其中所述鼠mAb的轻链可变区包括含有RSSQSLVHRNGNTYLH氨基酸序列的CDR1,含有TVSNRFS氨基酸序列的CDR2,和含有SQSSHVPPT氨基酸序列的CDR3,及其中所述鼠mAb的重链可变区包括含有NYGVN氨基酸序列的CDR1,含有WINPNTGEPTFDDDFKG氨基酸序列的CDR2和含有SRGKNEAWFAY氨基酸序列的CDR3。

[0081] 本发明的每个人、嵌合、人源化或鼠抗-CD74mAb或其片段均具有至少一种下述特性:其与抗原,CD74特异性结合和反应,其与CD-74的结合被特异性针对或与CD74反应的抗体或其片段阻断;其被培养物中的Raji淋巴瘤细胞内化;和当其与具有与鼠IgG1 mAb的Fc反应性的山羊抗血清交联时其诱导细胞培养物中Raji细胞的凋亡。

[0082] 人、嵌合或人源化抗-CD74mAb的片段可以是片段,如是F(ab')₂、Fab、scFv、Fv或F(ab')₂、Fab、scFv或Fv的部分或全部轻链和重链的融合构建体。重要的是所述片段要与CD74结合。

[0083] 6.多特异性和多价的抗体

[0084] 用于联合治疗的抗-CD74抗体,以及其它具有不同特异性的抗体,如本文所述,还可制备为多特异性抗体(包含至少一个对CD74表位或抗原的结合位点和至少一个对CD74上另一表位的或另一抗原的结合位点)和多价的抗体(包含对相同表位或抗原的多个结合位点),或该抗体可同时具有多价的和多特异性。

[0085] 本发明优选的抗体融合蛋白包括本文所述的人源化、嵌合、人或鼠抗-CD74mAb或其片段的四个或多个Fv,或Fab'。此外,另一优选的抗体融合蛋白包含本文所述的人源化、嵌合、人或鼠抗-CD74mAb或其片段的一个或多个Fv,或Fab',和一个或多个来自另外抗体的Fv或Fab',所述另外抗体特异性针对另一抗原,所述另一抗原具有对肿瘤细胞标记物的特异性,所述肿瘤细胞标记物不是CD74抗原,由表达CD74的细胞表达,如,用于治疗B细胞恶性肿瘤的选自B细胞家族抗原,如CD 19,CD20或CD22的肿瘤标记物;以及导致其它类型恶性肿瘤其它CD74阳性细胞,如黑素瘤中的S100等。此外,肿瘤细胞标记物可以是选自HLA-DR, CD30,CD33,CD52MUC1和TAC的非-B细胞家族抗原。

[0086] 本发明还提供了双特异性或多特异性抗体,其中本发明的抗-CD74mAbs或其片段或其抗体融合蛋白联于特异性针对癌症或炎性细胞标记物、感染性疾病生物体表面上的表位或血液或其它体液中的有毒物质的抗体或抗体片段。本发明的双特异性和多特异性抗体特别适用于诱导多种毒性物质清除的方法中,其中双特异性抗体具有至少一种针对有毒物质如病原生物体的特异性,和至少一种针对CD74(HLA II类非可变链(II),如提交于1999年

5月19日的,名为“Therapeutic Using a Bispecific antibody”的美国序列号09/314,135(其全文引入此处作为参考)所详述的)的特异性。

[0087] 本发明还提供了含有至少一个特异性结合靶定细胞标记物的结合区和至少一种特异性结合可靶向的缀合物的其它结合区的双特异性抗体或抗体片段。所述可靶向的缀合物包括包含或携带至少一个由双特异性抗体或抗体片段至少一个结合区所识别的表位的载体部分。

[0088] 可使用多种重组方法制备上述双特异性抗体和抗体片段。

[0089] 本发明中还涉及抗-CD74多价抗体。该多价的靶位结合蛋白质通过联合第一和第二个多肽进行构建。第一个多肽包括共价连于第一个免疫球蛋白-样区,优选是免疫球蛋白轻链可变区的第一个单链Fv分子。第二个多肽包括共价连于第二个免疫球蛋白-样区,优选是免疫球蛋白重链可变区的第二个单链Fv分子。每个第一和第二个单链Fv分子形成靶位结合位点,而第一和第二个免疫球蛋白-样区联合而形成第三靶位结合位点。

[0090] 具有VL-L-VH构型,其中L是连接子的单链Fv分子,可与另一具有VL-L-VH构型的单链Fv分子联合以形成二价二聚物。在这种情况下,第一个scFv的VL区和第二个scFv分子的VH区联合以形成一个靶位结合,而第一个scFv的VH区和第二个scFv分子的VL区联合以形成其它靶位结合位点。

[0091] 本发明的另一实施方案是CD74双特异性,三特异性靶向蛋白质,其包含非共价联合从而形成三个结合位点的两个异种肽链,其中两个结合位点具有对一个靶位的亲和力而第三个具有对可制备并连于载体而用作诊断剂和/或治疗剂的半抗原的亲和力。优选地,结合蛋白质含有两个CD20结合位点和一个CD22结合位点。双特异性,三价靶向剂含有两个不同的scFv,一个scFv包含两个来自第一个经由短连接子与另一抗体的VL区相连的抗体的VH区,而第二个scFv包含两个来自第一个经由短连接子与另一抗体的VH区相连的抗体的VL区。从VH和VL区制备多价的,多特异性试剂的方法提供了由在宿主生物体中的DNA质粒合成的独立链完全由VH区(VH-链)或完全由VL区(VL-链)以任何多价和多特异性的试剂可通过一个VH链和一个VL链的非共价联合而制备的方式组成。例如,构建三价,三特异性试剂,VH-链将由三个VH区的氨基酸序列构成,每个VH区来自具有不同特异性的抗体,由多种长度的肽连接子相连,而VL-链将由互补的VL区组成,由与用于VH链的相似的肽连接子相连。因为抗体的VH和VL区以反-平行模式联合,本发明中的优选方法含有以与VH链中的VH区相反顺序排列的VL链中的VH区。

[0092] 6. 双抗体,三抗体和四抗体

[0093] 本发明的抗-CD74抗体还可用于制备功能性双特异性单链抗体(bscAb),也称为双抗体,且可使用重组方法在哺乳动物细胞中制备。例如,参见Mack等Proc.NatI.ACAD.SCI., 92:7021-7025,1995,引入的。例如,通过经甘氨酸-丝氨酸连接子连接两个单链Fv片段利用重组方法制备bscAb。利用标准PCR方法分离两个所需要抗体的V轻链(VL)和V重链(VH)区。然后将获自各杂交瘤的VL和VH cDNA连接从而在两步融合PCR中形成单链片段。第一个PCR步骤导入(Gly₄-Ser)₃连接子,而第二步连接VL和VH扩增子。然后将每个单链分子克隆至细菌表达载体中。扩增后,切离一个单链分子然后亚克隆至其它包含第二个单链所需分子载体中。将得到的bscAb片段亚克隆至真核表达载体中。功能性蛋白质的表达可通过将所述载体转染至中国仓鼠卵巢细胞中而获得。采用相似方法制备双特异性融合蛋白。双特异性单

链抗体和双特异性融合蛋白包括于本发明范围之内。

[0094] 例如,人源化,嵌合或人抗-CD74单克隆抗体可用于制备抗原特异性双抗体,三抗体和四抗体。单特异性双抗体,三抗体和四抗体选择性结合靶定的抗原且随着分子上结合位点数目的增加,对靶细胞的亲和力增加并在所需位置观察到更长的停留时间。对于双抗体,使用包含经五个氨基酸残基连接子而将人源化CD74 mAb的V_H多肽与人源化CD74mAb的V_x多肽相连接的两条链。每条链形成半个人源化CD74双抗体。在三抗体的情况下,使用包含不经连接子而将人源化CD74mAb的V_H多肽与人源化CD74mAb的V_r多肽相连接的三条链。每条链形成三分之一hCD74三抗体。

[0095] 本文描述的双抗体的最终用途是预靶定CD74阳性肿瘤以便随后特异性递送诊断性或治疗剂。这些双抗体选择性的与靶定的抗原结合能产生亲和力增加且在所需位置更长的驻留时间。此外,无抗原结合的双抗体可被快速从体内清除且将正常组织的暴露量最小化。诊断剂和治疗剂可包括同位素,药物,毒素,细胞因子,激素,酶,寡核苷酸,生长因子,缀合物,放射性核素和金属。例如,用于磁共振成像(MRI)的钆金属。放射性核素的实例是²²⁵Ac, ¹⁸F, ⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga, ⁹⁰Y, ⁸⁶Y, ¹¹¹In, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁷⁷Lu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ³²P, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁶Br, 和²¹¹At。其它放射性核素也可用作诊断剂和治疗剂,尤其是那些用作诊断剂的能量为60~4,000keV和用作治疗剂的能量为60~700的放射性核素。

[0096] 更为近来,具有双特异性的四价串联双抗体(称为tandab)也已经被报道(CochIovius等Cancer Research(2000)60:4336-4341)。双特异性tandab是两个相同多肽的二聚物,每个多肽包含两个不同抗体的以便于形成两个潜在结合位点的方向连接的四个可变区(V_{H1}, V_{L1}, V_{H2}, V_{L2}),其中每两个不同特异性自相连。

[0097] 7. 缀合的多价的和多特异性抗-CD74抗体

[0098] 在本发明的另一实施方案中是缀合的多价的抗~CD74抗体。可将附加的氨基酸残基加至第一或第二个多肽的N末端或C末端。附加的氨基酸残基可包含肽标签,信号肽,细胞因子、酶(例如,前药活化酶)、激素,肽毒素,如假单胞菌外毒素,肽药物,细胞毒性蛋白质或其它功能性蛋白质。如本文所使用的,功能性蛋白质是具有生物学功能的蛋白质。

[0099] 在一个实施方案中,药物,毒素,放射性化合物,酶,激素,细胞毒性蛋白质,螯合剂,细胞因子及其它功能性试剂可与多价的靶结合蛋白质缀合,优选经由与多价的靶结合蛋白质的氨基酸残基的侧链例如氨基,羧基,苯基,巯基或羟基共价连接。多种常规连接子可用于该目标,例如,二异氰酸酯,二异硫氰酸酯,二(羟基琥珀酰亚胺)酯,碳二亚胺,马来酰亚胺~羟基琥珀酰亚胺酯,戊二醛等。试剂与多价蛋白质的缀合优选不显著影响该蛋白质的对其靶位结合特异性或亲和力。如本文所使用的,功能性试剂是具有生物学功能的试剂。优选的功能性试剂是细胞毒害剂。

[0100] 在其它实施方案中,将治疗性或前药聚合物至体内靶位的双特异性抗体~导向的递送可与放射性核素的双特异性抗体递送联合,以便实现化学治疗和放射性免疫治疗的联合。每个治疗剂可与可靶向的缀合物缀合并同时施用,或核素作为第一个可靶向的缀合物的部分给予而药物在随后的步骤中以第二个可靶向的缀合物的部分给予。

[0101] 在另一实施方案中,细胞毒害剂可与聚合载体缀合,而多聚载体可随后与多价的靶结合蛋白质缀合。对于该方法,参见Ryser等Proc.NatI.Acad.Sci.USA,75:3867-3870,

1978,美国专利号4,699,784和美国专利号4,046,722,其全文引入此处作为参考。缀合优选不会显著影响多价结合蛋白质的结合特异性或亲和力。

[0102] 8.人源化,嵌合和人抗体用于治疗 and 诊断

[0103] 人源化,嵌合和人单克隆抗体,即,本文描述的抗-CD74mAb及其它MAb,根据本发明适用于治疗性方法和诊断性方法中。因此,本发明涉及本发明的人源化,嵌合和人抗体作为裸抗体单独施用或作为多元的治疗施用,暂时根据给药方案,但不与治疗剂缀合。免疫缀合物是缀合物,其包括包含本发明所述的与CD74结合的人源化,嵌合或人CD74mAb的至少一种与诊断剂或治疗剂相连接的mAb或其片段或其抗体融合蛋白的抗体成分。

[0104] 裸抗-CD74mAb的功效可通过用以下物质补充裸抗体而得到提高:一种或多种其它裸抗体,即,针对特异性抗原,如CD4,CD5,CD8,CD14,CD15,CD19,CD21,CD22,CD23,CD25,CD30,CD33,CD37,CD38,CD40,CD40L,CD46,CD52,CD54,CD80,CD126,B7,MUC1,Ia,髓生蛋白, HM1.24,或HLA-DR,优选成熟HLA-DR二聚物的mAb,一种或多种抗-CD74的免疫缀合物,或针对这些列举的抗原,与治疗剂,包括药物、毒素、免疫调节剂、激素、酶、治疗性放射性核素等缀合的抗体,一种或多种与mAb一起同时或次序或按所述剂量方案进行给药的治疗剂,包括药物、毒素、免疫调节剂、激素、酶、治疗性放射性核素等。优选的B细胞-相关抗原包括与人CD19,CD20,CD21,CD22,CD23,CD46,CD52,CD74,CD80,和CD5抗原等效的那些抗原。优选的T细胞抗原包括与人CD4,CD8和CD25(IL-2受体)抗原等效的那些抗原。HLA-DR抗原的等效物可用于治疗B细胞和T细胞病症。特别优选的B细胞抗原是与人CD19,CD22,CD21,CD23,CD74,CD80,和HLA-DR抗原等效的那些抗原。特别优选的T细胞抗原是与人CD4,CD8和CD25抗原等效的那些抗原。CD46是癌细胞表面上阻断补体依赖的细胞裂解(CDC)的抗原。优选的恶性黑色素瘤相关抗原是与MART-1,TRP-1,TRP-2和GPL00等效的那些抗原。此外,优选的多发性骨髓瘤-相关抗原是与MUC1和CD38等效的那些抗原。

[0105] 此外,本发明涉及免疫缀合物的施用在诊断和治疗B细胞淋巴瘤及其它疾病或病症中的用途。免疫缀合物,如本文所述,是包含抗体成分和治疗剂或诊断剂的分子,包括可以载有诊断剂或治疗剂的肽。免疫缀合物保持了抗体成分的免疫反应性,即抗体部分在缀合后仍具有与缀合前大致相同的和轻微降低的对同类抗原的结合能力。

[0106] 多种诊断和治疗试剂可方便地与本发明的抗体结合。此处提及的治疗剂是也可用于与上述裸抗体分开施用的那些试剂。治疗剂包括,例如,化学治疗药物如长春花生物碱,蒽环类抗生素,表鬼臼毒素(epidophyllotoxin),紫杉烷类,抗代谢物,烷化剂,抗生素,Cox-2抑制剂,抗有丝分裂物,抗血管生成剂和调亡剂,特别是阿霉素,甲氨蝶呤,紫杉醇,CPT-11,喜树碱和来自这些及其它类抗癌药等的其它药物。用于制备免疫缀合物和抗体融合蛋白的其它有用的癌症化学治疗药物包括氮芥,烷基磺酸盐类,亚硝基脲,三氮烯,叶酸类似物,COX-2抑制剂,嘧啶类似物,嘌呤类似物,铂配位络合物,激素等。适用的化学治疗剂描述于REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,19TH Ed.(Mack Publishing Co.1995),和GOODMAN和GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF 治疗性S,7th Ed.(MacMillan Publishing Co.1985)中以及这些出版物的修订版。其它适宜的化学治疗剂,如实验药物,是本领域技术人员已知的。

[0107] 此外,螯合剂如DTPA、DOTA、TETA或NOTA或适宜的肽,可检测的标记物,如荧光分子,或细胞毒害剂,如重金属或放射性核素可与其结合。例如,通过将光活化剂或染料与抗

体复合物可获得治疗上有用的免疫缀合物。荧光组合物,如荧光染料,和其它色原,或染料,如对可见光敏感的卟啉已经通过将适宜的光对准损害处而用于检测和治疗损害。在治疗中,其被称为光辐射,光照疗法或光动力疗法(Jori等(eds.),PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto 1985);van den Bergh,Chem.Britain 22:430(1986))。而且,单克隆抗体已经偶联于光活化的染料以便获得光治疗。Mew等Y Immunol.130:1473(1983);Idem.,Cancer Res.45:4380(1985);Oseroff等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8744(1986);Idem.,Photochem.Photobiol.46:83(1987);Hasan等Proc.ClinBioI.Res.288:471(1989);Tatsuta等LasersSurg.Med19:422(1989);Pelegri等Cancer 67:2529(1991)。然而,这些早期的研究未包括内窥镜疗法的使用,特别是抗体片段或亚片段的使用。因此,本发明涉及含光活化剂或染料的免疫缀合物的治疗用途。

[0108] 本发明还涉及放射性和非放射性试剂作为诊断剂的用途。适用的非放射性诊断剂是适用于磁共振成像,计算机控制断层扫描术或超声的造影剂。磁成像剂包括,例如非放射性金属,如锰,铁和钆,当与本发明的抗体一起使用时,其与包括2-苄基-DTPA及其一甲基和环己基类似物的金属-螯合剂组合物复合。参见与2001年10月10日提交的美国序号09/921,290,其全文引入作为参考。

[0109] 此外,放射性标记的抗体或免疫缀合物可包含用于诊断性成像的 γ -发射性放射性同位素或正电子-发射体。适用的,特别是能量为60~4,000keV的放射性同位素,包括 ^{131}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{86}Y , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{76}Br 等。例如,参见名为"Labeling Targeting Agents with Gallium-68"发明人为G.L.Griffiths和W.J.McBride的美国专利申请(美国临时申请号60/342,104),其公开了为了成像目的正电子发射体,如 ^{18}F , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等,所述申请全文引入作为参考。

[0110] 还可将毒素,如假单胞菌外毒素复合于或形成本发明的抗-CD74抗体的抗体融合蛋白的治疗剂部分。其它适用于制备所述缀合物或其它融合蛋白的毒素包括蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶(RNase)、DNase I,葡萄球菌肠毒素-A,美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。例如,参见Pastan等CELL47:641(1986),和Goldenberg,CA-A Cancer Journal For Clinicians44:43(1994)。适用于本发明的其它毒素是本领域技术人员已知的并被描述于美国专利6,077,499中,所述美国专利全文引入作为参考。

[0111] 还可将免疫调节剂,如细胞因子缀合于,或形成抗体融合蛋白的治疗剂部分或与本发明的人源化抗-CD20抗体一起施用。适用于本发明的细胞因子包括,但不限于,干扰素和白介素,如下述。

[0112] 本发明还涉及包含人源化、嵌合或人CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白与I类或II类MHC抗原肽共价连接而形成抗体缀合物的疫苗,其中所述疫苗用于治疗患有癌症或感染性疾病的患者。当抗体缀合物被包含CD74标记物的细胞内在化时,I类或II类MHC抗原肽可通过由抗原呈递细胞,如树突细胞细胞蛋白水解消化而从连接于mAb或其片段的较大肽或蛋白质上释放出来。该抗体缀合物通过融合编码mAb或其片段cDNA和编码抗原肽或蛋白质的cDNA,然后在细菌、酵母或哺乳动物细胞中表达抗体融合蛋白来制备。包含本发明的人源化,嵌合或人CD74mAb或其片段或抗体融合蛋白的抗体缀合物特别适用于提交于1995年

12月22日,名为“Use of Immunoconjugates to Enhance the Efficacy of Multi-Stage Cascade Boosting Vaccines”的未决美国序列号08/577,106描述的治疗方法,所述申请全文引入此处作为参考。本发明的人源化抗-CD74mAb特别适用于实施例5中鼠LL1的情况下。

[0113] 9. 免疫缀合物的制备

[0114] 本发明的任何抗体或抗体融合蛋白可与一种或多种治疗剂或诊断剂缀合。通常,一种治疗剂或诊断剂缀合至每个抗体或抗体片段,但可将超过一种治疗剂或诊断剂缀合至相同的抗体或抗体片段上。本发明的抗体融合蛋白包含两个或多个抗体或其片段其每个包括该抗体融合蛋白的抗体可包含治疗剂或诊断剂。此外,抗体融合蛋白的一个或多个抗体可具有与其缀合的诊断剂的超过一种治疗性。此外,治疗剂无须相同而可以是不同的治疗剂。例如,一个可将药物和放射性同位素结合相同的抗体融合蛋白。特别地,IgG可以用I放射性标记的并与药物缀合。¹³¹I可被掺至IgG的酪氨酸和与IgG赖氨酸的ε氨基连接的药物。治疗剂和诊断剂均还可与还原的巯基缀合和与糖侧链缀合。

[0115] 本发明的双特异性抗体可用于预先靶定的方法并提供了将两种治疗剂或两种诊断剂递送给个体的优选方式。美国序列号09/382,186公开了利用双特异性抗体预先靶定的方法,其中双特异性抗体被标记的且递送给个体,然后用^{99m}Tc标记的二价肽。递送导致了非常好的LESS和^{99m}Tc的肿瘤/正常组织比率,因此显示了两中诊断性放射性同位素的实用性。已知治疗剂或诊断剂的任何组合可用于标记抗体和抗体融合蛋白。mAb缀合物的抗体成分的结合特异性,治疗剂或诊断剂功效和抗体的Fc部分的效应子活性可通过对缀合物的标准检测进行测定。

[0116] 治疗剂或诊断剂可通过二硫键的形成在还原抗体成分的铰链区连接。作为一种选择,还可利用异双官能交联剂,如N-琥珀酰3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP)将所述肽合抗体连接。Yu等,Int.J.Cancer.,56:244(1994)。用于所述缀合的一般方法是本领域众所周知的。例如,参见例如,参见Wong,CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING (CRC Press 1991);Upeslacis等,“Modification of Antibodies by Chemical Methods,”在MONOCLONAL ANTIBODIES:PRINCIPLES AND APPLICATIONS,Birch等(eds.)中,187-230页(Wiley-Liss,Inc.1995);Price,“Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,”in MONOCLONAL ANTIBODIES:PRODUCTION,ENGINEERING and CLINICAL APPLICATION,Ritter等(eds.)中,60-84页(Cambridge University Press 1995)。或者,治疗剂或诊断剂可经由抗体Fc区中的糖部分进行缀合。糖基团可用于增加肽与巯基结合的相同肽的装载,或糖基团可用于结合不同的肽。

[0117] 肽经由抗体糖部分与抗体成分结合的方法是本领域技术人员熟知的。例如,参见Shih等Int.J.Cancer 41:832(1988);Shih等Int.J.Cancer 46:1101(1990);和Shih等美国专利号5,057,313,所述文件均全文引入作为参考。一般方法包括使具有氧化糖部分的抗体成分与载体聚合物反应,所述载体聚合物具有至少一个游离的胺官能团并转载多种肽。该反应可产生起始席夫碱(亚胺)键,其通过还原成仲胺形成最终的缀合物而稳定。

[0118] 如果用作免疫缀合物抗体成分的抗体是抗体片段,则缺少Fc区。然而,可以将糖部分导入全长抗体或抗体片段的轻链可变区中。例如,参见Leung等J.Immunol.154:5919(1995);Hansen等美国专利号5,443,953(1995),Leung等美国专利号6,254,868,其均全文

引入作为参考。将工程改造的糖部分用于缀合治疗剂或诊断剂。

[0119] 10. 药学上可接受的赋形剂

[0120] 将被递送给个体的人源化,嵌合和人抗-CD74mAb可仅包含mAb,免疫缀合物,抗体融合蛋白或可包含一种或多种药学上适用的赋形剂,一种或多种附加成分,或这些的某些组合。

[0121] 本发明的免疫缀合物或裸抗体可按已知方法配制成药学上有用的组合物,由此免疫缀合物或裸抗体和药学上适用的赋形剂在混合物中组合。无菌磷酸盐-缓冲盐水是药学上适用的赋形剂的一个实例。其它适用的赋形剂是本领域技术人员众所周知的。例如,参见Ansel等PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS和DRUG DELIVERY SYSTEMS,5TH Edition(Lea&Febiger 1990),和Gennaro(ed.),REMMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,18TH Edition(Mack Publishing Company1990)及其修订版。

[0122] 本发明的免疫缀合物或裸抗体可被配制成借助,例如弹丸注射或连续输注的静脉内给药。用于注射的配方可以是单位剂型,例如,安瓿中或多剂量容器中,和附加的保存剂。组合物可采用所述剂型如在油性或水性在中的悬液,溶液或乳液,并可包含配方剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是在使用前用适宜的载体,例如,无热原灭菌水配制的粉剂形式。

[0123] 可使用额外的药学方法控制治疗性或诊断性缀合物或裸抗体的作用时间。通过使用聚合物来复合或吸收免疫缀合物或裸抗体可制成控释剂。例如,生物相容性聚合物包括聚(乙烯共聚乙酸乙烯酯)基质和硬脂酸二聚物和癸二酸的聚醚共聚物基质。Sherwood等,Bio/Technology 10:1446(1992)。免疫缀合物或抗体从所述基质中释放的速率取决于免疫缀合物或抗体的分子量、基质内免疫缀合物,抗体的量和分散的颗粒的大小。Saltzman等,Biophys.J.55:163(1989);Sherwood等,如上。其它固体剂型描述于Ansel等,PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS,5TH Edition(Lea&Febiger 1990)和Gennaro(ed.),REMMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES,18TH Edition(Mack Publishing Company1990)及其修订版中。

[0124] 免疫缀合物、抗体融合蛋白或裸抗体还可采取皮下或甚至是其它胃肠外途径而施用于哺乳动物。而且,可采取连续输注,或单次或多次大丸剂进行施用。通常,免疫缀合物,抗体融合蛋白或裸抗体对人的施用剂量根据诸如患者年龄、体重、身高、性别、一般医学状况和既往医学史等因素而改变。典型地,合乎需要的是将免疫缀合物,抗体融合蛋白或裸抗体以剂量约1mg/kg~20mg/kg,单次静脉内输注提供给受者,但也可以根据环境需要施用较低或较高的剂量。该剂量可按需重复施用,例如,一周一次持续4~10周,优选一周一次持续8周,更优选地,一周一次持续4周。其还可以以较低频率给予,如隔周一次持续数月。剂量可用多种胃肠外途径给予,可对剂量和方案进行适宜的调整。

[0125] 为了治疗的目的,将免疫缀合物、抗体融合蛋白或裸抗体以治疗有效量施用于哺乳动物。本发明所针对的适宜个体一般是人类,但非人类的动物个体也是可预期的。如果所施用的量是生理学上显著的,则抗体制剂被称为以“治疗有效量”进行施用。如果一种药剂的存在导致受体哺乳动物生理学上可检测的变化,则该药剂就是生理学上的显著的。特别地,如果本发明的抗体制剂的存在能引起抗肿瘤应答或减轻了自身免疫性疾病状态的体征和症状,则其就是生理学上的显著的。生理学上的显著的作用还可以是在受体哺乳动物中

引起体液和/或细胞免疫应答。

[0126] 11. 治疗方法

[0127] 本发明预期了本发明的裸抗-CD74抗体作为主要组合物用于治疗表达CD74的恶性肿瘤的用途,其中疾病或病症选自免疫失调病、身免疫性疾病、器官移植排斥和移植物抗宿主病。表达CD74的恶性肿瘤选自实体瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤,另一B细胞恶性肿瘤和T细胞恶性肿瘤。实体瘤选自黑素瘤、癌和肉瘤而癌选自肾癌、肺癌、肠癌、胃癌和黑素瘤。B细胞恶性肿瘤选自非霍奇金淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,低度恶性B细胞淋巴瘤,侵袭性B细胞淋巴瘤,慢性淋巴性白血病,急性淋巴性白血病,和多发性骨髓瘤,B细胞失调及其它疾病。特别地,本文所述的组合物特别适用于治疗多种自身免疫病以及低度恶性B细胞淋巴瘤,侵袭性B细胞淋巴瘤,慢性淋巴性白血病,急性淋巴性白血病,多发性骨髓瘤,和**Wadlenström**氏巨球蛋白血症。例如,人源化抗-CD74抗体成分和免疫缀合物可用于治疗低度恶性和侵袭性非霍奇金淋巴瘤。

[0128] 更具体地,本发明预期了治疗B细胞恶性肿瘤的方法,包含给予对患有B细胞相关的恶性肿瘤,包含药学上可接受的载体和至少一种本发明的人源化、嵌合或人抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白的治疗组合物,其中B细胞恶性肿瘤是淋巴瘤或白血病。更具体地,B细胞恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤,低度恶性B细胞淋巴瘤,侵袭性B细胞淋巴瘤,多发性骨髓瘤,慢性淋巴性白血病,或急性淋巴性白血病。CD74mAb或其片段以20~2000mg的剂量静脉内或肌内施用。本方法还包括在施用至少一种治疗剂治疗B细胞恶性肿瘤之前、同时或之后施用抗-CD74mAb或其片段。所述治疗剂包括裸抗体、免疫调节剂、激素、细胞毒害剂、酶、与至少一种免疫调节剂结合的抗体、放射性标记物、激素、酶或细胞毒害剂或其组合。所述免疫调节剂优选是细胞因子而所述细胞毒害剂是药物或毒素。作为裸抗体或作为补充性免疫缀合物而联合给药的抗体可与CD4,CD5,CD8,CD14,CD15,CD19,CD20,CD21,CD22,CD23,CD25,CD30,CD33,CD37,CD38,CD40,CD40L,CD46,CD52,CD54,CD80,CD126,B7,MUC1,Ia, HM1.24, 腱生蛋白和HLA-DR,优选成熟HLA-DR二聚物反应,并在药学上可接受的载体中配制。

[0129] 本发明还涉及治疗恶性肿瘤的方法,包含对患有淋巴瘤或白血病以外的CD74抗原-阳性的恶性肿瘤的个体给予包含药学上可接受的载体和至少一种如本发明所述的抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白的治疗组合物。抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白以20~2000mg的剂量静脉内或肌内给药。此外,抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白在给予至少一种用于治疗恶性肿瘤的治疗剂之前、期间或之后给药。该治疗剂,如上述以及贯穿本说明书全文,包括抗体、免疫调节剂、激素、细胞毒害剂、与至少一种免疫调节剂结合的抗体、放射性标记物、酶、激素、细胞毒害剂、反义寡核苷酸或其组合,其中免疫调节剂是细胞因子和所述细胞毒害剂是药物或毒素。当将抗体与抗-CD74mAb或其片段联合施用以治疗非B细胞恶性肿瘤的恶性肿瘤,其应与除CD74外的肿瘤标记物反应,由包含被治疗的恶性肿瘤的细胞所表达的,并在药学上可接受的载体中配方制备。可施用于恶性黑素瘤相关抗原的抗体的实例是与MART-1,TRP-1,TRP-2和gp100反应的那些抗体。此外,针对多发性骨髓瘤-相关抗原的优选抗体是与MUC1和CD38反应的那些抗体。

[0130] 用于治疗组合物包含至少一种单独的人源化、嵌合或人单克隆抗-CD74抗体或与其它抗体,如其它人源化、嵌合或人抗体,治疗剂或免疫调节剂的组合。特别地,使用完全

人抗体的联合治疗也是被预期的,被用上述方法制备。

[0131] 针对相同或不同表位或抗原的裸或缀合的抗体还可与本发明的一个或多个的抗体联合。例如,人源化、嵌合或人裸抗-CD74抗体可与另一裸人源化,裸嵌合或裸人抗-CD74mAb联合;人源化、嵌合或人裸抗-CD74抗体可与抗-CD74免疫缀合物联合;裸抗-CD74抗体可与抗-CD22放射性缀合物联合;或抗-CD22裸抗体可与缀合于同位素或一种或多种化学治疗剂、细胞因子、酶、毒素或其组合的人源化、嵌合或人抗-CD74抗体联合。人源化、嵌合或人CD20抗体和毒素或免疫调节剂的抗体融合蛋白,或至少两种不同B细胞抗体(例如,CD74和CD22mAb,CD20mAb或CD19mAb)的抗体融合蛋白也可用于本发明。参照提交于2001年10月1日的名为“Immunotherapy of B-Cell Malignancies Using Anti-CD-22 Antibodies”的未决美国序号09/965,796,该申请是美国专利号6,306,393的接续,二者均全文引入此处作为参考,其公开了抗-CD22抗体联合其它裸抗体的治疗方法。多种不同的抗体组合,靶向至少两个与B细胞失调相关的不同抗原,如上述,可或作为裸抗体或作为部分裸的和部分与治疗剂或免疫调节剂缀合的,或仅与另一治疗剂,如细胞毒性药物或与放射联合构建。

[0132] 如本文所使用的,术语“免疫调节剂”包括细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素,如肿瘤坏死因子(TNF)和血细胞生成因子,如白介素(例如,白介素-1(IL-1)、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18,和IL-21)、集落刺激因子(例如,粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF))、干扰素(例如,干扰素S-A,-P和-Y)、被称为“S1因子的”干细胞生长因子,促红细胞生成素、促血小板生成素或其组合。适宜的免疫调节剂部分的实例包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、IL-21,及其组合,和干扰素- γ ,TNF- α 等。或者,个体可接受裸抗-CD74抗体和单独施用的细胞因子,其可在施用裸抗-CD74抗体之前、同时或之后进行施用。如上所述,抗-CD74抗体还可与免疫调节剂缀合。免疫调节剂还可以与含有与不同抗原结合的一个或多个抗体的杂合抗体缀合。

[0133] 本发明的多元治疗还包括以施用抗-CD22,抗-CD19,抗-CD21,抗-CD20,抗-CD80,抗-CD23,抗-CD46或HLA-DR,优选成熟HLA-DR二聚物抗体以裸抗体,融合蛋白的形式或以免疫缀合物作为补充的采用裸抗-CD74抗体的免疫治疗。这些抗体包括识别这些抗原性决定子上的至少一种表位的多克隆、单克隆、嵌合、人或人源化抗体。抗-CD19和抗-CD22抗体是本领域技术人员已知的。例如,参见Ghetie等Cancer Res.48:2610(1988);Hekman等Cancer Immunol.Immunother.32:364(1991);Longo,CURR.Opin.ONCOL.8:353(1996)和美国专利5,798,554和6,187,287,全文引入作为参考。

[0134] 在多元治疗的另一形式中,个体接受裸抗-CD74抗体,和/或免疫缀合物,联合标准癌化学治疗。例如,“CVB”(1.5G/M2环磷酰胺,200-400MG/M2足叶乙甙,和150-200MG/M2卡氯芥)是用于治疗非霍奇金淋巴瘤的疗法。Patti等Eur.J:Haematol.51:18(1993)。其它适宜的联合化学治疗是本领域技术人员熟知的。例如,参见Freedman等“NON-Hodgkin's Lymphoma”,CANCER MEDICINE,VOLUME2,3rd Edition中,Holland等(eds.),2028-2068页(Lea&Febiger1993)。作为说明,用于治疗中级的非霍奇金淋巴瘤(NHL)的第一代化学治疗包括C-MOPP(环磷酰胺,长春新碱,甲基苄肼和强的松)和CHOP(环磷酰胺,阿霉素,长春新碱和强的松)。有效的第二代化学治疗是M-BACOD(甲氨蝶呤,博来霉素,阿霉素,环磷酰胺,长春新碱,地塞米松和甲酰四氢叶酸),而适用的第三代化学治疗是MACOP-B(甲氨蝶呤,阿霉素,环磷酰胺,长春新碱,强的松,博来霉素和甲酰四氢叶酸)。其它有用的药物包括丁酸苯

酯和brostatin-1。在优选的多元治疗中,将化学治疗药物和细胞因子与根据本发明的抗体,免疫缀合物或抗体融合蛋白共同给药。细胞因子,化学治疗药物和抗体或免疫缀合物可按任何顺序或一起给药。

[0135] 在优选的实施方案中,以4个每周一次的输注的方式用人源化抗-CD74抗体以200~400mg/m²的剂量每周一次连续4周或隔周一次(2~8小时静脉注射)治疗NHL,下一月/年按需重复。还优选,以上述4个半月一次的输注,但不在同一日联合依帕珠单抗(抗-CD22人源化抗体),以360mg/M²的剂量,或以1小时静脉输注,或在抗-CD74单克隆抗体输注之前、同时或之后的方法治疗NHL。还优选,NHL用上述抗-CD74抗体的4周一次的输注的4个每周一次的输注,联合一个或多个含有用于治疗性同位素如钇-90(Y⁹⁰的剂量为5~5mCi/m²)作为在一周或月期间内一个或多个注射剂的标记的CD22mAb注射剂进行治疗。

[0136] 此外,本发明的治疗组合物可包含导向不同的,非阻滞性的CD74表位的单克隆裸抗-CD74抗体的混合物或杂合分子。因此,本发明涉及包含与至少两个CD74表位结合的单克隆抗-CD74抗体的混合物的治疗组合物。此外,本文所述的治疗组合物可包含具有变化的CDR序列的抗-CD74抗体的混合物。

[0137] 虽然裸抗-CD74抗体是治疗B细胞淋巴瘤和自身免疫性疾病的基本治疗组合物,所述抗体治疗的功效可通过补充裸抗体,补充剂,如免疫调节剂,如干扰素,包括IFN α , IFN β 和IFN γ ,白介素包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21,及其组合,和细胞因子包括G-CSF和GM-CSF而得到增强。因此,CD74抗体可不仅与或作为混合物(分开或以某些预先确定的剂量方案给予)或与抗-CD74抗体的作为缀合物或融合蛋白的抗体和细胞因子联合,还可以与药物和反义寡核苷酸联合给药。例如,抗-CD74抗体可与作为4种药物的化学治疗法的CHOP联合。此外,裸抗-CD74抗体可与裸抗-CD22抗体和CHOP或氟达拉滨联合作为NHL治疗的联合用药。补充性治疗组合物可在给予抗-CD74抗体之前、同时或之后给药。裸抗-CD74mAb还可与反义bc1寡核苷酸联合。

[0138] 如上所述,本发明的抗体可用于治疗B细胞淋巴瘤和白血病,及其它B细胞疾病或病症以及其它被作用的或相关的恶性细胞与CD74反应的恶性肿瘤。例如,抗-CD74抗体可用于治疗免疫失调病和相关的自身免疫性疾病,包括III类自身免疫性疾病如免疫-介导的血小板减少症,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,干燥综合征,多发性硬化,西登哈姆氏舞蹈病,重症肌无力,系统性红斑狼疮,狼疮肾炎,风湿热,狼疮肾炎,大疱性类天疱疮,糖尿病,亨-舍二氏紫癜,链球菌感染后肾炎,结节性红斑,高安氏动脉炎,阿狄森氏综合征,类风湿性关节炎,结节病,溃疡性结肠炎,多形性红斑,IgA肾病,结节性多动脉炎,结节性多动脉炎,结节性多动脉炎,thromboangitis obliterans,原发性胆汁性肝硬化,桥本甲状腺炎,桥本甲状腺炎,硬皮病,慢性活动性肝炎,多肌炎/多肌炎,寻常天疱疮(pamphigus vulgaris),韦格纳氏肉芽肿病,膜性肾病,肌萎缩侧索硬化,脊髓痨,巨细胞动脉炎/脊髓痨,恶性贫血,急进性肾小球肾炎和纤维化肺泡炎。

[0139] 特别地,将本发明的人源化,嵌合或人抗-CD74mAb或其片段或抗体融合蛋白给予患有的一种或多种这些自身免疫性疾病的个体。本发明的抗-CD74抗体特别适用于治疗自体免疫失调的方法,如2000年6月9日提交的名为“Immunotherapy of Autoimmune Disorder using antibodies that Target B-cell”的未决美国序列号09/590,284所描述的,其全文引入作为参考。优选地,抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白以20~2000mg的剂量静脉内

或肌内给药。此外,抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白在用于治疗病症的至少一种治疗剂给药之前、同时或之后给药。治疗剂,如上述和贯穿本说明书全文,包括抗体、免疫调节剂、激素、酶、细胞毒害剂、与至少一种免疫调节剂结合的抗体、放射性标记物、激素,酶,或细胞毒害剂,反义寡核苷酸或其组合,其中免疫调节剂是细胞因子而所述细胞毒害剂是药物或毒素。作为裸抗体或作为补充性免疫缀合物联合给药的抗体可与CD4,CD5,CD8,CD14,CD15,CD19,CD20,CD21,CD22,CD23,CD25,CD 30,CD33,CD 37,CD38,CD40,CD40L,CD46,CD52,CD54,CD80,CD126,B7,MUC1,Ia,HLA-DR,优选成熟HLA-DR二聚物反应,在药学上可接受的载体中配制。

[0140] 此外治疗选自淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、其它表达CD-74的恶性肿瘤、免疫失调病、自身免疫性疾病及其组合的疾病的方法,包括施用包含药学上可接受的载体和至少一种本发明的抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白的治疗组合物,其中至少一种治疗剂通过化学缀合或基因融合与mAb或其片段或其抗体融合蛋白的Fv或Fab'相连。治疗剂可以是免疫调节剂、放射性标记、激素、酶,或细胞毒害剂,免疫调节剂是细胞因子而所述细胞毒害剂是药物或毒素。

[0141] 抗-CD74抗体还可以在表达CD74抗原的细胞中诱导凋亡。该诱导证据在本发明的样品中得到支持。其它抗体以及正面凋亡可通过具有与CD20mAb交联的IgG1-FC反应的Fc-受体的淋巴样细胞诱导。参见Shan等CANCER IMMUNOL. IMMUNOTHER. 48(12):673-683(2000)。此外,已经报道了嵌合CD20MAb的聚集物,即,同聚物,能诱导凋亡。参见Ghetie等Blood 97(5):1392-1398(2000)和Ghetie等Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94(14):7509-7514(1997)。

[0142] 可将特异性针对B细胞的CD74表面抗原的抗体注射至哺乳动物个体,其然后与正常和恶性B细胞的CD74细胞表面抗原结合。哺乳动物个体包括人和家畜动物,包括宠物,如犬和猫。本发明的抗-CD74mAb,即,人源化,嵌合,人,犬源化和猫源化和甚至鼠抗-CD74mAbs,可用于治疗非人类哺乳动物个体,所述个体是具有与CD74抗原交叉反应性的物种。在人中具有免疫原性的鼠mAb,通常在非人类的哺乳动物个体中具有较低的免疫原性。与CD74表面抗原结合的抗-CD74抗体导致肿瘤B细胞的破坏和减少。

[0143] 12. 诊断方法

[0144] 本发明还提供了诊断已诊断为或疑为患有至少一种选自淋巴瘤、白血病、其它表达CD-74的恶性肿瘤、免疫失调病,自身免疫性疾病及其组合的个体中疾病的方法,包括对所述个体施以诊断有效量的诊断性缀合物与药学上可接受的载体和至少一种抗-CD74mAb或其片段或其抗体融合蛋白,其中通过化学缀合将诊断剂连接于mAb或其片段或其融合蛋白的Fv或Fab'上。用于本发明的诊断剂是放射性同位素,其中通过放射闪烁照相或PET检测放射性同位素的光子,或可通过MRI检测的金属,或脂质体或气充脂质体,其中脂质体可通过超声扫描设备检测。

[0145] 鼠抗-CD74mAb,嵌合抗-CD74mAb和人源化抗-CD74mAb进入靶细胞的内在化可发生在基本上根据Pirker等J. Clin. Invest., 76:1261(1985)(其引入作为参考)的方法进行的荧光标记之前。离心培养的Raji细胞然后在新鲜培养基中将细胞重悬至浓度约 5×10^6 细胞/mL。将100 μ L的细胞悬液加入96-孔微量滴定板的每个孔中。将抗体,40 μ g/mL,以100 μ L的体积以时间间隔加入反应孔中以便同时终止全部反应。将滴定板在CO₂细胞培养箱中于37

℃下培养。在培养结束时用冷1%FCS/PBS冲洗细胞三次以除去未结合的抗体。然后用1mIFormaid-Fresh[10%福尔马林溶液(Fisher,Fair Lawn,NJ)]40℃处理细胞15分钟。冲洗后,通过用FITC-标记的山羊抗-小鼠抗体(Tago,Burlingame,CA),或FITC-标记的山羊抗-人抗体(JacksonIMMUNORESEARCH,West Grove,PA)处理来检测或细胞表面上或细胞内存在的抗体,这要依赖于进行检测的抗体是否分别是鼠、嵌合或人源化的。利用BH-2荧光显微镜(Olympus,Lake Success,NY)评估荧光分布。

[0146] 在相关静脉中,Juweid等1999描述了用于筛选/诊断骨癌的方法,其可受益于本发明的优良抗-CD74mAb。因此,预期了包含^{99m}Tc-标记的人源化抗体或嵌合抗-CD74mAb的方法。

[0147] 13. 表达载体

[0148] DNA序列编码人源化,嵌合或人抗-CD74mAb。更具体地DNA序列包括编码选自下述的mAb或其片段的核酸,(a)本文描述的抗-CD74mAb或其片段;(b)包含本文描述的任一种抗-CD74mAb或其片段的免疫缀合物,(c)包含至少两种本文描述的所述抗-CD74mAb或其片段的抗体融合蛋白或其片段;(d)本文的抗体融合蛋白或其片段;(e)本文描述的疫苗;和本文描述的双特异性或多特异性抗体。本发明的任何DNA序列可用重组工程操作而进入多种已知的提供核酸复制的宿主载体中。这些载体可采用已知方法进行设计从而包含所述核酸在其递送的细胞中导向转录、翻译或二者所需要的元件。可使用已知的方法来制备包含操作性连接于适宜的转录/翻译控制信号的蛋白质编码序列的表达构建体。这些方法包括体外重组DNA技术和合成技术。例如,参见Sambrook等1989,MOLECULAR CLONING:A LABORATORYMANUAL,CoId Spring Harbor Laboratory(New York);Ausubel等1997,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons(New York)。本发明还提供了不与载体相关的多核苷酸的递送。

[0149] 本发明中适用的载体可以是病毒载体或非病毒载体。病毒载体的具体实施包括腺病毒、AAV、单纯疱疹病毒、慢病毒和逆转录病毒载体。非病毒载体的实例是质粒。在优选的实施方案中,载体是质粒。

[0150] 如此处所述,表达载体是包含在宿主细胞中表达的基因的多核苷酸。表达载体是包含在宿主细胞中表达的基因的DNA分子。通常,将基因表达置于包括组成型或可诱导的启动子,组织-特异性调节元件和增强子的特定调节元件的调控之下。所述基因被称为“操作性连接于”调节元件。优选的表达载体是PDH12和GS载体。

[0151] 优选地,本发明的表达载体包括编码包括重链和轻链可变区和恒定区的人源化,嵌合或人抗-CD74mAb的DNA序列。然而,可使用两个表达载体,其中一个包含重链可变区和恒定区而另一个包含轻链可变区和恒定区。更优选地,表达载体还包括启动子。因为可使用任何强启动子,编码分泌信号肽的DNA序列,编码人IgG1重链恒定区的基因组序列,Ig增强子元件和至少一种编码选择标记的DNA序列。

[0152] 一种使用本发明表达抗-CD74mAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的方法,包含:(a)用编码抗-CD74mAb或其片段或其免疫缀合物,抗体融合蛋白或双特异性或多特异性抗体的DNA序列转染宿主细胞;和(b)培养分泌该抗-CD74mAb或其片段或抗体融合蛋白或其片段的细胞。宿主细胞来源于细菌细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞。更优选地,来源于哺乳动物细胞,在一个实施方案中其是淋巴细胞性细胞,如骨髓瘤细胞。

[0153] 本文还涉及表达人源化抗-CD74mAb的方法,包含(i)线性化至少一种包含编码人源化、嵌合或人抗-CD74mAb的DNA序列的表达载体,(ii)用至少一种所述线性化载体转染哺乳动物细胞,(iii)选择表达标记基因的转染细胞,和(iv)从转染细胞中鉴别分泌人源化抗-CD74mAb的细胞。

[0154] 发明人分离了编码鼠抗-CD74单克隆抗体(mLL1mAb)的VL和VH区的cDNA并将其重组亚克隆至包含分别编码人抗体的 κ 和IgG1,恒定区的基因的哺乳动物表达载体中。用这两个表达嵌合抗-CD74mAb(cLL1)的重组DNA共转染哺乳动物细胞,所述嵌合抗-CD74mAb(cLL1),类似亲本mLL1mAb,强结合于B-淋巴瘤细胞,并被其快速内在化。

[0155] VK和VH DNA的CDR已经用相似的重组方法分别连接于人V K和VH区的构架区(FR)序列,其随后分别连接于人 κ 和IgG1恒定区,以便如上述在哺乳动物细胞中表达人源化抗-CD74mAb(hLL1)。

[0156] 其它剪切抗体的方法,如分离重链以便形成单价轻链-重链片段,片段的进一步剪切,或其它酶,化学或遗传技术也是可以使用的,只要片段能与被完整抗体识别的抗原结合。

[0157] 此处所述的抗体是单克隆抗体(mAb)。单克隆抗体是针对特定抗原的抗体的同质群而该抗体仅包括一种类型核酸特异性地与之结合的抗原结合位点。可通过本领域技术人员已知的方法获得针对特异性抗原的啮齿动物单克隆抗体。例如,参见Kohler和Milstein, Nature 256:495(1975),和Coligan等(eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL.1, 页2.5.1-2.6.7(John Wiley&Sons 1991)[下文中为“Coligan”]。简言之,单克隆抗体的制备可以通过用包含抗原的组合物注射小鼠,通过取血清样品鉴定抗体制备的存在,取脾获得B-淋巴细胞,融合B-淋巴细胞和骨髓瘤细胞来制备杂交瘤,克隆杂交瘤,选择产生针对所述抗原的抗体的阳性克隆,培养该产生针对所述抗原的抗体的克隆,和从杂交瘤培养物中分离抗体。

[0158] 可采用多种已良好建立的方法从杂交瘤培养物中分离和纯化MAb。所述分离方法包括使用A蛋白琼脂糖凝胶的亲和层析、大小排阻层析和离子交换层析。例如,参见Coligan 2.7.1-2.7.12页和2.9.1-2.9.3页。还可参见, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL.10, 79-104页(The Humana Press, Inc.1992)中的Baines等“Purification of Immunoglobulin G(IgG)”。

[0159] 14. 制备方法

[0160] 用于嵌合或人源化抗-CD74mAb的Vk和VH序列可采用PCR进行扩增,如Orlandi等(Proc.NatI.Acad.Sci.,USA,86:3833(1989))(将其引入作为参考)所述。Vk序列可利用引物CK3BH和Vk5-3进行扩增(Leung等BioTechniques,15:286(1993),其引入作为参考,VH序列可利用引物与鼠IgG的CH1区退火的CH1B,和VHIBACK进行扩增(Orlandi等1989如上)。将包含10 μ I 第一链cDNA产物,9 μ I 10 $\times$ PCR缓冲液[500mM KCl,100mM Tris-HCl(pH 8.3),15mM MgCl₂和0.01%(W/V)明胶](Perkin Elmer Cetus,Norwalk,CT)的PCR反应混合物实施30个PCR循环。每个PCR循环优选包括94 $^{\circ}$ C变性1分钟,50 $^{\circ}$ C退火1.5分钟,和72 $^{\circ}$ C聚合1.5分钟。扩增的Vk和VH片段可在2%琼脂糖上纯化(BioRad,Richmond,CA)。参见实施例3的在自动化Cyclone Plus DNA synthesizer(Milligan-Bioscience)上合成的用于构建人源化V基因的oIigo A(149-mer)和oIigo B(140-mer)的方法。

[0161] 可将Vk的PCR产物亚克隆至staging载体,如基于pBR327的staging载体VkpBR,其包含Ig启动子,信号肽序列和便于Vk PCR产物的框架内连接方便的限制性位点。可将VH的PCR产物亚克隆至相似staging载体,如基于pBluescript的VHpBS。包含各PCR产物的各克隆可用,被引入作为参考的Sanger等Proc.NatI.Acad.Sci.USA,74:5463(1977)的方法进行测序。

[0162] 本文所描述的DNA序列应被理解为包括所有其等位基因,突变体和变体,无论是天然存在的还是诱导的。

[0163] 可将两种质粒共转染至适宜的细胞中,例如,骨髓瘤Sp2/0-AGL4,选择潮霉素抗性的克隆,和采用例如,ELISA检测法,如下述检测上清液中嵌合抗体或人源化抗-CD74mAb的产生。

[0164] 转染,和通过ELISA对分泌抗体的克隆的检测,可按下述方法实施。根据被引入作为参考的Co等J.Immunol.,148:1149(1992),可将约10 μ g hLL 1pKh(轻链表达载体)和20 μ g hLL1 pGIg(重链表达载体)通过电穿孔而用于转染 5×10^6 SP2/0骨髓瘤细胞(BioRad, Richmond, CA)。转染后,可在96-孔微量滴定板上于完全HSFM培养基(GIBCO, Gaithersburg, MD)中以37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂培养细胞。可在加入终浓度500 μ g/ml潮霉素的潮霉素选择培养基(Calbiochem, San Diego, CA)中2日后开始选择步骤。克隆通常在电穿孔后2~3周出现。然后将培养物扩展以用于进一步的分析。

[0165] 用ELISA测试法鉴别分泌嵌合抗体或人源化重链的阳性转染瘤克隆。简言之,将来自转染瘤培养物的上清样品(100 μ I)以三份加入用山羊抗-人(GAH)-IgG, F(ab')₂片段-特异性抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)预包被的ELISA微量滴定板上。滴定板室温下孵育1小时。用洗涤缓冲液(含0.05%聚山梨醇酯-20的PBS)洗板三次以除去未结合的蛋白质。将辣根过氧化物酶(HRP)缀合的GAH-IgG, Fc片段-特异性抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)加入孔内, (100 μ I抗体稀释储存液 $\times 10^4$, 用未结合的抗体补充至终浓度1.0g/ml)。孵育1小时后,通常洗板三次。每孔加入反应液[100 μ I含有167 μ g邻苯二胺(OPD)(Sigma, St. Louis, MO), 0.025%过氧化氢的PBS]。在黑暗中显色30分钟。在每孔中加入50 μ I 4M HCl溶液终止反应,然后用自动化ELISA读数仪(Bio-Tek instruments, Winooski, VT)测定490nm处吸光度。然后相对无关联的嵌合抗体标准(可获自Scotgen, Ltd., Edinburg, Scotland)测定结合的嵌合抗体。

[0166] 抗体可按下述方法从细胞培养基中分离。转染瘤培养物适于无血清培养基。为制备嵌合抗体,利用HSFM在滚瓶中将细胞生长为500ml培养物。将培养物离心使细胞成团,上清液经0.2 μ m膜过滤。使过滤的培养基以1ml/分的速度通过A蛋白柱(1 $\times$ 3cm)。然后用约10个柱体积的PBS洗柱,用含10mM EDTA的0.1M甘氨酸的缓冲液(pH 3.5)从柱上洗脱蛋白A结合的抗体。在10 μ I 3M Tris(pH 8.6)的存在下,搜集1ml洗脱部分,测定280/260nm处吸光度确定蛋白质浓度。将峰值洗脱级分集中,对PBS透析,用例如,Centricon 30(Amicon, Beverly, MA)浓缩蛋白质。用ELISA测定抗体浓度,如前,用PBS将其浓度调整至约1mg/ml。0.01%(w/v)的叠氮化钠益于加入样品作为保存剂。

[0167] 本文中引用的所有出版物,专利以及专利申请均以全文引入作为参考。参照下述实施例进一步描述本发明,所述实施例仅用于举例说明。本发明并不局限于实施例,而还包括根据此处提供的教导可明显得出的所有变化形式。

实施例

[0168] 实施例1LL1重和轻链可变区的分子克隆和序列阐明。

[0169] 采用如Leung等1993和Orlandi等(PNAS86:3833-3837(1989))分别描述的VK5'-4和VK1FOR引物通过RT-PCR获得mLL1的V κ 基因,然后将其克隆至pCR2.1A T-克隆载体(Invitrogen)。对多个克隆测序以消除由PCR反应导致的可能误差。多数克隆(6)包含同样的鼠V κ 序列,其被命名为LL1V κ ,然后将该序列显示于图1B中。与其它小鼠V κ 序列的比较显示出LL1V κ 是 κ 轻链II亚类的成员。

[0170] 因为RT-PCR未能生成编码小鼠VH基因的全长序列,故使用第二种克隆方法,cDNA 5'-末端(5'-RACE)的快速扩增。采用通用锚引物(Life Technologies)和与鼠重链的CH1区退火的基因特异性引物,CH-1B(Leung等1994)通过PCR扩增经由LL1杂交瘤细胞制备结合体连接的cDNA。将PCR得到的~650bp的主要PCR种类克隆至pCR2.1A T-克隆载体并用DNA测序对多个克隆测序。PCR产物包含由非编码序列和'5-端的分泌信号肽和 γ 1链的CH1区的部分编码序列侧接的全长VH序列(图1A)。在编码VH的被命名为LL1VH的序列中未发现缺陷突变。hLL1VH与其它小鼠VH序列的比较显示出其属于小鼠重链亚型多样性(Kabat等1991)。通过LL1VH和V κ 的氨基酸序列与Kabat数据库中的鼠Ab V基因的比较并参照Kabat的定义,hLL1VH和V κ 的CDR区分别如图1A和B中所示进行鉴别。通过LL1VH和V κ 的氨基酸序列与Kabat数据库中的鼠Ab V基因的比较并参照Kabat的定义,hLL1VH和V κ 的CDR区分别如图1A和B中所示进行鉴别。

[0171] 实施例2嵌合LL1的表达载体的构建。

[0172] 为评估克隆的Fv对LL1的真实性,构建并表达嵌合LL1(cLL1)。采用引物为LL1VK-PvuII和VK1FOR的PCR,将LL1V κ 的核苷酸残基7~12修饰为PvuII限制性位点,CAGCTG。所得PCR产物用PvuII和BgIII进行酶切消化(部分地,因为V κ 中存在内在BgIII位点)然后将其强制克隆至基于pBR327的staging载体(用PvuII和BcII酶切消化),VkpBR2,其包括如Orlandi等1989和Leung等1994所使用的相同的Ig启动子,信号肽序列和便于V κ PCR产物框内连接的适宜的限制性位点。

[0173] LL1VK-PvuII 5'-GAT GTT CAG CTG ACC CAA ACT CCA CTC TCC-3,

[0174] 相似的,采用引物为LL1B-1和LL1F-1的PCR,将LL1VH的10-15和345-351位核苷酸序列分别转变为PstI和BstEII。然后VH PCR产物用PstI和BstEII进行酶切消化然后将其连接至用PstI和BstEII酶切消化的VHpBS2,基于pBluescript的staging载体,其包括信号肽序列和便于VH PCR产物框内连接的适宜的限制性位点{Orlandi,Gussow,等1989741/ID},其由VHpBS修饰而来(Leung,S.O.,Shevitz,J.,Pelleggrini,M.C.,Dion,A.S.,Shih,L.B.,GoIdenberg,D.M.,和Hansen,H.J.(1994))。

[0175] LL1B-1 5'-CAG ATC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG-3'

[0176] LL1F-1 5'-GA GAC GGT GAC CAG AGT CCC TTG GCC CCA A-3'

[0177] cLL1VH和V κ 的序列均用DNA测序进行证实然后分别示于图2A和2B中。

[0178] 通过XbaI和BamHI双限制性酶切消化将包含cLL1的V κ 序列的片段与信号肽序列一起从LL1VkpBR2中切下。然后将~550bp V κ 片段亚克隆至哺乳动物表达载体,pdHL2的XbaI/BamHI位点。将所得载体命名为cLL1Vkp dHL2。相似的,通过XhoI和BamHI双限制性酶切消化

将包含LL1VH的约750bp的片段与信号肽序列一起从LL1VHPBS2中切下然后在琼脂糖凝胶中通过电泳进行分离。采用可与BamHI和HindIII二者的末端相比的连接子将该片段亚克隆至cLL1VkPDHL2的XhoI和HindIII位点,得到最终表达载体,将其命名为cLL1PDHL2。

[0179] 实施例3 cLL1的转染和表达

[0180] 将约30 μ g的cLL1PDHL2通过SaII酶切消化而线性化然后用电穿孔转染至SP2/0-AGL4细胞。将转染的细胞铺于96-孔板2日然后选择MTX抗性。用ELISA测试法检测来自存活于用于筛选人嵌合抗体分泌的选择的克隆的上清。扩展阳性细胞克隆然后在A蛋白柱上通过亲和层析从细胞培养物上清中纯化cLL1。

[0181] 实施例4结合活性检测。

[0182] 实施竞争细胞结合检测以便评估cLL1相对亲本mLL1的免疫反应性。将恒量的¹²⁵I-标记的mLL1(100,000cpm)和Raji细胞在存在变化浓度的cLL1或mLL1的情况下于40℃孵育1-2h。洗涤后测定与细胞相关的放射活性。如图中所示5,cLL2抗体表现出与mLL1相差不大的结合活性,证实了克隆的V基因的真实性。

[0183] 该结果由基于流式细胞计数的第二个竞争检测得以证实。简言之,使用前述Raji细胞和相对其它抗体而改变一种抗体的浓度,如前,结合的mLL1或cLL1的量用FITC-标记的抗-小鼠Fc或抗-人Fc抗体然后利用流式细胞计数的分析进行测定。

[0184] 在Raji细胞膜包被平板中实施ELISA竞争性结合检测以便评估cLL1相对亲本mLL1的免疫反应性。通过超声裂解和离心准备Raji细胞膜碎片。将粗制膜提取物在96-孔平底PVC板上通过离心而包被并用0.1%戊二醛固定。将与变化浓度的mLL1或cLL1混合的恒量生物素化mLL1加至膜包被的孔中然后于室温孵育1-2h。洗涤后,加入HRP-缀合的链霉抗生物素蛋白,然后于室温孵育1h。通过在加入包含4mM邻苯二胺二盐酸盐和0.04%H₂O₂的底物溶液后于A490nm读数来显示HRP-缀合的链霉抗生物素蛋白与膜结合的生物素化mLL1结合的量。

[0185] 实施例5人构架区的选择和LL1单克隆抗体的人源化的序列设计。

[0186] 通过将cLL1的可变(V)区构架区(FR)序列和Kabat数据库中人抗体的进行比较,发现cLL1VH和Vk的FR表现出分别与人抗体,RF-TS3VH和HF-21/28Vk最高的序列同一性程度。将氨基酸序列显示于图3A和3B中并与cLL1VH和Vk序列比较。因此,分别选择RF-TS3 VH的FR和HF-21/28Vk的FR作为LL1VH和Vk的CDR将移植至其上的人构架区。然而,NEWM的FR4序列,而非RF-TS3的,用于替换用于LL1重链人源化的RF-TS3 FR4序列。参见图3A。LL1FR中靠近潜在CDR的少量氨基酸残基保留在在基于前述指导(Qu等CIin.Cancer Rec.5:3095S-3100S(1990))的hLL1中。这些残基是Vk的L46,F87和Q100(图3B)和VH的I36,K 37,Q46,A68,F91和S93(图3A)。图3A和3B比较了人、嵌合和人源化VH和Vk的氨基酸序列。圆点显示了cLL1和hLL1中与人VH和Vk序列中相应残基相同的残基。图4A和4B中分别显示了hLL1VH和Vk的DNA和氨基酸序列。

[0187] 实施例6人源化V基因的PCR/基因合成。

[0188] 将Leung等(Leung等1994)所描述的改良策略利用联合长寡核苷酸合成和PCR如图5中所述而用于构建hLL1的设计Vk和VH基因。为构建hLL1VH区,在自动化DNA合成仪(Applied Biosystem)上合成两个长寡核苷酸,hLL1VHA(176-mer)和HLUVHB(165-mer)。hLL1VHA序列代表hLL1VH区的20~195nt:

- [0189] 5'-GGTCTGAGTT GAAGAAGCCT GGGGCCTCAG TGAAGGTTTC
- [0190] CTGCAAGGCT TCTGGATACACCTTCACTAA CTATGGAGTG AACTGGATAA
- [0191] AGCAGGCCCC TGGACAAGGG CTTCACTGGA TGGGCTGGATAAACCCCAAC
- [0192] ACTGGAGAGC CAACATTTGA TGATGACTTC AAGGGA-3'
- [0193] hLL1VHB序列代表与173~337nt互补的hLL1VH区的负链:
- [0194] 5'-TCCCTTGGCC CCAATAAGCA AACCAGGCTT CGTTTTTACC CCTCGATCTT
- [0195] GAACAGAAAT ACACGGCAGT GTCGTCAGCC TTTAGGCTGC TGATCTGGAG
- [0196] ATATGCCGTG CTGACAGAGGTGTCCAAGGAGAAGGCAAAT CGTCCCTTGA
- [0197] AGTCATCATC AAATG-3'
- [0198] hLL1VHA和B的3'-末端序列(22nt残基)彼此互补。在所述PCR条件下,hLL1VHA和B 3'-末端退火而形成由长寡核苷酸的剩余部分侧接的双链DNA。每个退火的末端均作为单链DNA转录的引物,结果得到包含hLL1VH的nt 20~337的双链DNA。该DNA在存在两个短寡核苷酸,hLL1VHBACK和hLL1VHFOR下进一步扩增以形成全长hLL1VH。
- [0199] hLL1VHBACK 5'-GTG GTG CTG CAG CAA TCTGGG TCT GAG TTC AAG AAGCC-3'
- [0200] hLL1VHFOR 5'-AAG TGG ATC CTA TAA TCA TTC CTA GGA TTA ATG-3'
- [0201] 以10 μ I 10 $\times$ PCR缓冲液(500mM KCl,100mM Tris.HCl缓冲液,pH 8.3,15mM MgCl₂),2 μ moI hLL1VHBACK和hLL1VHFOR,和2.5单位Taq DNA聚合酶(Perkin Elmer Cetus, Norwalk,Ct)扩增hLL 1 VHA和B的最小量(经验确定的)。将该反应混合物进行3个循环的PCR反应:94 $^{\circ}$ C变性1分钟,45 $^{\circ}$ C退火1分钟,和72 $^{\circ}$ C聚合1.5分钟,然后进行27个循环的PCR反应:94 $^{\circ}$ C变性1分钟,55 $^{\circ}$ C退火1分钟,和72 $^{\circ}$ C聚合1分钟。凝胶纯化hLL1VH的双链PCR-扩增的产物,用PstI和BstEII限制性酶切然后克隆至重链staging载体,VHpBS2的互补PstI/BstEII位点。
- [0202] 为构建人源化Vk序列的全长DNA,按上述方法合成hLL1 VkA(159-mer)和hLL1VkB(169-mer)。通过如上述的两个短寡核苷酸hLL1VkBACK和hLL1VkFOR扩增hLL1VKA和B。
- [0203] hLL1VHA序列代表hLL1VH区的16~174nt。
- [0204] 5'-CAGTCTCCAC TCTCCCTGCC CGTCACCTT GGACAGCCGG CCTCCATCTC
- [0205] CTGCAGATCA AGTCAGAGCC TTGTACACAG AAATGGAAAC ACCTATTTAC
- [0206] ATTGTTTTCA GCAGAGGCCA GGCCAATCTC CAAGGCTCCT GATCTACACA
- [0207] GTTTCCAAC-3'
- [0208] hLL1VHB序列代表与153~321nt互补的hLL1VH区的负链。
- [0209] 5'-TGTCCCAGCA CCGAACGTGG GAGGAACATG TGAACCTTGA
- [0210] GAGCAGAAAT AAACCCCAAC ATCCTCAGCC TCCACCCTGC TGATTTTCAG
- [0211] TGTGAAATCA GTGCCTGACC CACTGCCGCT GAATCTGTCT GGGACCCAG
- [0212] AAAATCGGTT GGAAACTGTG TAGATCAGG-3'
- [0213] hLL1VKBACK 5'-GAT GTT CAG CTG ACT CAG TCT CCA CTC TCC CTG-3'
- [0214] hLL1VKFOR 5'-G TTA GAT CTC CAG TCG TGT CCC AGC ACC GAA CG-3'
- [0215] 凝胶纯化的hLL1Vk PCR产物用PvuII和BgLIII进行限制性酶切然后克隆至轻链staging载体,VkpBR2的互补PvuI/BcII位点。通过分别将hLL1Vk和VH的XbaI-BamHI和XhoI/BamHI片段次序亚克隆至上述pdHL2而构建最终的表达载体hLL1pdHL2。

[0216] 实施例7hLL1的转染、表达和结合活性测定。

[0217] hLL1表达和结合活性测定的方法与关于cLL1所描述的相同。

[0218] 利用Raji细胞膜提取物包被的平板实施ELISA竞争性结合检测以便评估hLL1免疫反应性。通过超声裂解和离心准备Raji细胞膜碎片。将粗制膜提取物在96-孔平底PVC板上通过离心而包被并用0.1%戊二醛固定。

[0219] 将与变化浓度的mLL1或cLL1混合的恒量生物素化mLL1加至膜包被的孔中然后于室温孵育1-2h。洗涤后,加入HRP-结合的链霉抗生物素蛋白然后于室温孵育1h。通过在加入包含4mM邻苯二胺二盐酸盐和0.04% H_2O_2 的底物溶液后于 $A_{490\text{ nm}}$ 读数来显示HRP-缀合的链霉抗生物素蛋白与膜结合的生物素化mLL1结合的量。如图6中的竞争检测所示,mLL1和cLL1抗体表现出相似的结合活性。同样的,图7中的竞争检测,hLL1和cLL1抗体表现出相似的结合活性。

[0220] 实施例8hLL1的内在化

[0221] 将标准抗体处理检测用于评估hLL1在Raji细胞中的内在化和代谢(Hansen等1996)。将细胞(10^7)1mI包含 ^{125}I -标记的hLL1或LL1(10^7cpm)的组织培养基中于 37°C 孵育1h。为确保Ab结合的特异性,在每个具有和不具有过剩标记的Ab(终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mI}$)的实验中设立1/10样本体积的对照(细胞,放射活性和培养基)。在结合孵育后,通过洗涤除去未结合的放射活性。计数特异性对照。在所有实验中,放射活性与细胞的结合至少90%被未标记的Ab阻滞。然后将细胞在30mI新鲜培养基中重悬然后以 $1.5\text{mI}/\text{孔}$ 分配到24-孔板上。保留 1.5mI 的样品用于确定放射活性,其时起始结合的cpm。在 CO_2 孵育器内孵育平板。在3,24,48和72小时,按下述方法收集细胞。通过反复吸打将细胞再悬浮然后移至锥形瓶。孔和移液管子用1mI新鲜培养基冲洗,将所述新鲜培养液加至初始细胞悬液中。将管以 $600\times g$ 离心10分钟然后小心地收集1mI上清液(全部上清液的40%)然后计数放射活性。加入作为载体蛋白的BSA至终浓度1%然后用5mI冷10%(w/v)的三氯乙酸(TCA)沉淀蛋白质。在于 40°C 孵育30分钟后以 $5000\times g$ 离心15分钟,弃上清液,然后计数沉淀的蛋白质的放射活性。未被TCA沉淀放射性标记的蛋白质被认为发生了降解,而沉淀的放射性蛋白质被认为是完整的。在冲洗后计算细胞片状沉淀物的仍保留在细胞中的放射活性。将每部分中的放射活性以初始结合的放射性的百分数表示。如图8A中所示,hLL1显示出与鼠LL1在与Raji细胞结合后相似的快速内在化和代谢模式,即几乎全部的结合的放射活性被分解代谢然后在3小时内释放至上清中。这要远快于其它Abs的内在化,如抗-CD22和抗-CD19(Hansen等1996)。早期时间点的研究证实了hLL1和mLL1具有相似的加工模式。大部分分解代谢在1小时内完成(图8B)。

[0222] 实施例9hLL1的细胞毒性

[0223] 在Raji细胞,人淋巴瘤细胞系中比较hLL1与mLL1以及cLL1的细胞毒性作用。将山羊抗-人IgG Fc片段特异性Ab($\alpha\text{-hFc}$)用作hLL1和cLL1的交联剂而将山羊抗-小鼠IgG Fc特异性Ab($\alpha\text{-mFc}$)用于mLL1。在第0日将 5×10^5 Raji细胞接种于包含 $5\mu\text{g}/\text{mI}$ LL1 Ab和 $50\mu\text{g}/\text{mI}$ 的适宜交联剂的1mI培养基中。3日内每日计数全部和存活细胞的数量。如图9中所示,正常Raji细胞的总量在3日内增加了4~5倍而在3日结束时细胞存活力保持 $>80\%$ 。单独用交联剂,单独用LL1Ab或用LL1Ab和不能比较的交联剂(例如hLL1和山羊抗-小鼠IgG Fc特异性Ab)进行处理的细胞无法与正常Raji细胞区分。然而,hLL1和抗-人IgG Fc特异性Ab的联合有效地导致细胞死亡:在一日内细胞活力降低 $>40\%$ 而在3日内细胞几乎全部死亡。将hLL1

的效力与mLL1和cLL1的效力比较。当使用Daudi细胞时观测到相似结果(图10)。在用另一内在化Ab,hLL2(人源化抗-CD22Ab)时未观测到所述作用。这些结果证明了hLL1对淋巴瘤细胞系的细胞毒害作用要特别依赖细胞表面上Ab的交联。

序列表

<110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> 内在化抗-CD74 抗体及其使用方法

<130> 018733/1162

<140> PCT/GB03/00890

<141> 2003-03-03

<150> 60/360, 259

<151> 2002-03-01

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 360

<212> DNA

[0001] <213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 1

cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag	48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu	
1 5 10 15	
aca gtc aag gtc acc tgc aag act tct gga tat acc ttc aca aac tat	96
Thr Val Lys Val Thr Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
gga gtg aac tgg ata aag cag act cca gga gag ggt tta cag tgg atg	144
Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Glu Gly Leu Gln Trp Met	
35 40 45	
ggc tgg ata aac ccc aac act gga gag cca aca ttt gat gat gac ttc	192
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe	
50 55 60	

aag gga cga ttt gcc ttc tct ttg gaa tcc tct gcc agc act gcc ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

ttg cag atc agc aac ctc aaa aat gag gac atg ggt aca tat ttc tgt 288
 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Gly Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

tca aga tgc agg ggt aaa aac gaa gcc tgg ttt gct tat tgg ggc caa 336
 Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

ggg act ctg gtc act gtc tct gaa 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Glu
 115 120

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

[0002]

<400> 2

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Gly Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Glu
115 120

<210> 3

<211> 337

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(333)

<400> 3

gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac aga 96
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

[0003]

aat gga aac acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca aag ctc ctg atc tac aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agt aga gtg gag gct gag gat ctg gga ctt tat ttc tgc tct caa agt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

tea cat gtt cct ccc acg ttc ggt got ggg acc aag ctg gag atc taac 337
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

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

1

5

10

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg

20

25

30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85

90

95

[0004]

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100

105

110

<210> 5

<211> 360

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 5

cag gtc caa ctg cag cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag 48

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

aca gtc aag gtc acc tgc aag act tct gga tat acc ttc aca aac tat 96

Thr Val Lys Val Thr Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

	gga gtg aac tgg ata aag cag act cca gga gag ggt tta cag tgg atg	144
	Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Glu Gly Leu Gln Trp Met	
	35 40 45	
	ggc tgg ata aac ccc aac act gga gag cca aca ttt gat gat gac ttc	192
	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe	
	50 55 60	
	aag gga cga ttt gcc ttc tct ttg gaa tcc tct gcc agc act gcc ttt	240
	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Phe	
	65 70 75 80	
	ttg cag atc agc aac ctc aaa aat gag gac atg ggt aca tat ttc tgt	288
	Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Gly Thr Tyr Phe Cys	
	85 90 95	
	tca aga tog agg ggt aaa aac gaa gcc tgg ttt gct tat tgg ggc caa	336
	Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
[0005]	ggg act ctg gtc acc gtc tcc tca	360
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
	<210> 6	
	<211> 120	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
	<400> 6	
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu	
	1 5 10 15	
	Thr Val Lys Val Thr Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
	20 25 30	
	Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Glu Gly Leu Gln Trp Met	
	35 40 45	
	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe	
	50 55 60	

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Met Gly Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 7

<211> 339

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (339)

[0006]

<400> 7

gac atc cag ctg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga 48
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac aga 96
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30
 aat gga aac acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 cca aag ctc ctg atc tac aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 agt aga gtg gag gct gag gat ctg gga ctt tat ttc tgc tct caa agt 288

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

tca cat gtt cct ccc acg ttc ggt got ggg acc aag ctg gag atc aaa 336
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgt 339
Arg

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

[0007]

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

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

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

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

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

Arg

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> 人类

<400> 9

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
50 55 60

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

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

[0008] Ala Arg Glu Asp Ser Asn Gly Tyr Lys Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成构建体 cLL1VH

<400> 10

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

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

Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Glu Gly Leu Gln Trp Met

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

<210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人类

[0009]

<400> 11			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr			
20	25	30	
Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe			
50	55	60	
Thr Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	

Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> 人类

<400> 12

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

[0010]

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 Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Trp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 构建体 cLL1VK

<400> 13

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

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

Arg

[0011] <210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 14
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

	85	90	95
	Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys		
	100	105	110
Arg			
<210> 15			
<211> 360			
<212> DNA			
<213> 人类			
<220>			
<221> CDS			
<222> (1)..(360)			
<400> 15			
	cag gtc caa ctg cag caa tct ggg tct gag ttg aag aag cct ggg gcc	48	
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
	1 5 10 15		
[0012]	tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act aac tat	96	
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr		
	20 25 30		
	gga gtg aac tgg ata aag cag gcc cct gga caa ggg ctt cag tgg atg	144	
	Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met		
	35 40 45		
	ggc tgg ata aac ccc aac act gga gag cca aca ttt gat gat gac ttc	192	
	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe		
	50 55 60		
	aag gga cga ttt gcc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg gca tat	240	
	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr		
	65 70 75 80		
	ctc cag atc agc agc cta aag gct gac gac act gcc gtg tat ttc tgt	288	
	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys		
	85 90 95		
	tca aga tcg agg ggt aaa aac gaa gcc tgg ttt gct tat tgg ggc caa	336	
	Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		

	100	105	110	
	ggg acc ctg gtc acc gtc tcc tca			360
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120		
<210>	16			
<211>	120			
<212>	PRT			
<213>	人类			
<400>	16			
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala			
	1 5 10 15			
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr			
	20 25 30			
	Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met			
	35 40 45			
[0013]	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe			
	50 55 60			
	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr			
	65 70 75 80			
	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
	85 90 95			
	Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln			
	100 105 110			
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115 120			
<210>	17			
<211>	339			
<212>	DNA			
<213>	人类			
<220>				

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<400> 17

gac atc cag ctg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tca agt cag agc ctt gta cac aga 96
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30

aat gga aac acc tat tta cat tgg ttt cag cag agg cca ggc caa tct 144
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

cca agg ctc ctg atc tac aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

[0014] gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

agc agg gtg gag get gag gat gtt ggg gtt tat ttc tgc tct caa agt 288
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

tca cat gtt cct ccc acg ttc ggt get ggg aca cga ctg gag atc aaa 336
 Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

cgt 339
 Arg

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> 人类

<400> 18

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

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

Arg

[0015]

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1

5

10

15

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 21

Ser Gln Ser Ser His Val Pro Pro Thr

1

5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 22

Asn Tyr Gly Val Asn

1

5

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

[0016]

<400> 23

Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 24

Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

	<220>	
	<223> Description of Artificial Sequence: Linker peptide	
	<400> 25	
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	1 5 10 15	
	<210> 26	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<400> 26	
	gatgttcagc tgacccaaac tccactctcc	30
[0017]	<210> 27	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<400> 27	
	cagatccagc tgcagcagtc tggacctgag	30
	<210> 28	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸	
	<400> 28	
	gagacggtga ccagagtccc ttggccccaa	30

<210> 29
<211> 176
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 29
ggtctgagtt gaagaagcct ggggcctcag tgaaggtttc ctgcaaggct tctggataca 60
ccttcactaa ctatggagtg aactggataa agcaggcccc tggacaaggg cttcagtggga 120
tgggctggat aaaccccaac actggagagc caacatttga tgatgacttc aaggga 176

<210> 30
<211> 165
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸

[0018]

<400> 30
tccttggtcc ccaataagca aaccaggctt cgtttttacc cctcgatctt gaacagaaat 60
acaaggcagt gtctgcagcc tttaggotgc tgatctggag atatgccgtg ctgacagagg 120
tgtccaagga gaaggcaaat cgtcccttga agtcatcatc aaatg 165

<210> 31
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸

<400> 31
gtggtgctgc agcaatctgg gtctgagttc aagaagcc 38

<210> 32
<211> 33
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 32

aagtggatcc tataatcatt cctaggatta atg 33

<210> 33

<211> 159

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 33

cagtctccac tctccctgcc cgtcaccctt ggacagcgg cctccatctc ctgcagatca 60
agtcagagcc ttgtacacag aaatggaaac acctatttac attggtttca gcagaggcca 120
ggccaatctc caaggctcct gatctacaca gtttccaac 159

[0019]

<210> 34

<211> 169

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 34

tgtcccagca ccgaacgtgg gaggaacatg tgaactttga gagcagaaat aaaccccaac 60
atcctcagcc tccaccctgc tgattttcag tgtgaaatca gtgcctgacc cactgcoget 120
gaatctgtct gggaccccag aaaatoggtt ggaaactgtg tagatcagg 169

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

	<400> 35	
	gatgttcagc tgactcagtc tccactctcc ctg	33
	<210> 36	
	<211> 33	
[0020]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸	
	<400> 36	
	gtagatctc cagtcgtgtc ccagcacoga acg	33

LL1VH

```

          90
CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGTCACTGCAAGACTTCTGGATATACCTTCACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTCTAGGTCAACCAACGTCAGACCTGGACTCGACTTCTTCGGACCTCTCTGTCACTCCAGTGGACGTTCTGAAGACCTATATGGAAGTGT
          30
Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K V T C K T S G Y T F T
          20

          180
AACTATGGAGTGAAGTGAATAGCAGACTCCAGGAGAGGGTTTACAGTGGATGGGCTGGATTAACCCCAACACTGGAGAGCCACATTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGATACCTCACTGACCTATTTCGTCTGAGTCCCTCTCCCAATGTCACCTACCCGACCTATTGCGGTGTGACCTCTCGGTTGTAA
          50
N Y G V N W I K Q T P G E G L Q W M G W I N P N T G E P T F
          40
          CDR1
          52A
          CDR2
          270
GATGATGACTTCAAGGGACGATTGCCCTTCTCTTTGGATCCTCTGCCAGCACTGCCCTTTTTCAGATCAGCAACCTCAAAAATGAGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTACTACTGAAGTCCCTGCTAAACGGAAGAGAAACCTTAGGAGACGGTCGTGACGGAAAAACGTCCTAGTCGTTGGAGTTTACTCCTG
          60
D D D F K G R F A F S L E S S A S T A F L Q I S N L K N E D
          80
          82A B C
          100A B K
          110
          360
ATGGGTACATATTCTGTCAAGATCGAGGGGTAAACGAGCCCTGTTGCTTATTTGGGCCCAAGGACTCTGTGTCACTGTCTCTGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCAAGTATAAAGACCAAGTCTAGCTCCCATTTTTCCTCGGACCAACGAATAACCCGGTCCCTGAGACCAAGTGCACAGAGACTT
          90
M G T Y F C S R S R G K N E A W F A Y W G Q G T L V T V S E
          CDR3

```

图1A

LL1VK

90
 GATGTTGTGATGACCCAAACCTCCACTCTCCCTGCCTGTCTAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCCTTGTA
 CTACAACACTACTGGGTTTGAGGTGAGAGGACGGACAGTCAGAACCTCTAGTTCGGAGGTAGAGAACGTCTAGATCAGTCTCGGAACAT
 20 27A B C
 D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V
 10
 180
 CACAGAAATGGAACACCTATTACATTGGTACCTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACACAGTTTCCAACCGATT
 GTGCTTTACCTTTGGGATAAATGTAACCATGGACCTCTTCGGTCCGGTCAGAGGTTTCGAGGACTAGATGTGTCAAAGGTGGCTAAA
 40 50
 D E R N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y T V S N R F
 CDR1
 270
 TCTGGGTTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTT
 AGACCCAGGGTCTGTCCAAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCTAGTCACTCCGACTCCCTAGACCCCTGAA
 60 70 80
 S G V P D R F S S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G L
 337
 TATTCTGCTCTCAAAGTTCACATGTTCTCCACGTTCCGTTGCTGGACCAAGCTGGAGATCTAAC
 ATAAACACGAGAGTTTCAAGTGTACAAAGGAGGTGCAAGCCACGACCCCTGGTTGACCTCTAGATTG
 90 100
 Y F C S Q S S H V P P T F G A G T K L E I
 CDR3

图1B

cLL1VH

PstI
 CAGGTCCAACTGCGAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCCTGGAGAGACAGTCAAGGTCACTGCAAGACTTCTGGATATACCTTCACA
 90
 GTCCAGGTTGACGTCCTCAGACCTGGACTCGACTTCTTGGACCTCTCTGTCTCAGTCCAGTGGACGTTCTCTGAGACCTATATGGAAGTGT
 30
 Q V Q L Q Q S G P E L K K P G E T V K V T C K T S G Y T F T
 AACTATGGAGTGAAGTGAAGCAGACTCCAGGAGAGGGTTTACAGTGGATGGGCTGGATAAACCCCAACACTGGAGAGCCACATTT
 180
 TTGATACCTCACTTGACCTATTTCGTCGAGTCTCTCCCAATGTCACTACCCGACCTATTTGGGGTTGTGACCTCTCGGTGTGTAATA
 59
 N Y G V N W I K Q T P G E G L Q W M G W I N P N T G E P T F
 CDR1
 GATGATGACTTCAAGGGACGATTTCCTCTTTGGAAATCCTCTGCCAGCACTGCCTTTTTCAGATCAGCACCTCAAAAATGAGGAC
 270
 CTACTACTGAAGTCCCTGCTAAACGGAAGAGAAACCTTAGGAGACGGTCGTGACGGAATAACGCTCTAGTCGTTGGAGTTTTTACTCTCTG
 89
 D D D F K G R F A F S L E S S A S T A F L Q I S N L K N E D
 BstEII
 ATGGGTACATATTCTGTTCAAGATCGAGGGGTAAACGAAGCCTGGTTGCTTATTGGGGCCCAAGGACTCTGGTCACCGTCTCTCTCA
 360
 TACCCATGTATTAAGACAGTCTAGCTCCCAATTTTGGCTTCGGACCAACGAATACCCCGGTTCCCTGAGTCCAGTGGCAGAGGAGT
 113
 M G T Y F C S R S R G K N E A W F A Y W G Q G T L V T V S S
 CDR3

图2A

cLL1Vk

PvuII
 GACATCTGCAGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTA
 CTGTAGACGCTCTGGGTTTGAGGTGAGAGGACGACAGTCAGAACCTCTAGTTCGGAGGTAGAGAACGCTCTAGATCAGTCTCGGAACAT
 90
 D I Q L T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V 27C
 CACAGAAATGGAACACCTATTACATTGGTACCTGACAGAGCCAGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACACAGTTTCCAACCGATTT
 GTGTCTTACCTTTGTGGATAAATGTAAACATGGACGCTCTCGGTCCGGTCAGAGGTTTCGAGGACTAGATGTGTCAAAGGTTGGCTAAA
 180
 H R N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y T V S N R F 55
 CDR1
 TCTGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTT
 270
 AGACCCAGGGTCTGTCCAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTAAGTGTGAGTTCTAGTCTATCTCACCCTCCGACTCCTAGACCCCTGAA
 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G L 85
 BglII/BclII
 TATTCTGCTCTCAAAGTTCACATGTTCTCTCCACGTTCTGGTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAACGT
 339
 ATAAAGACGAGAGTTTCAAGTGTACAAGGAGGTGCAAGCCACGACCCCTGGTTCGACCTCTAGTTTGA
 Y F C S S Q S S H V P P T F G A G T K L E I K R 108
 CDR3

图2B

RF-TS3	QVQLVQSGSELKKPGASVKVCKASGYTFTSYAMNWVRQA	40
CLL1VH	QVQLQ...P...ET...T...T...N.GV...IK.T	40
hLL1VH	QVQLQ...N.GV...IK...	40
RF-TS3	PGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAY	79
CLL1VH	...E...Q...P...E...FDDD...A...ES.A...F.	79
hLL1VH	...Q...P...E...FDDD...A...	79
RF-TS3	LQISLKAADDTAVYYCAREDSNGYKIFDY	102
CLL1VH	...N...NE.MGT.F.S.SRGNKNEAW.A.	102
hLL1VH	...F.S.SRGNKNEAW.A.	102
NEWNM	WGQGS�VTVSS	113
CLL1VH	...T...TVSS	113
hLL1VH	...TVSS	113

图3A

HF-21/28	DVVM	TQSP	LSL	PVTL	GQPA	SI	SRSS	QSLV	HSDG	NTYL	NW	35			
cLL1Vk	<u>DIQL</u>	•••••	T	•••••	S	DQ	•••••	•••••	•••••	RN	•••••	H	35		
hLL1Vk	<u>DIQL</u>	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	RN	•••••	H	35		
HF-21/28	FQQR	PGQS	PRRL	IYK	VSN	RDS	GVP	DRF	SGSG	GTDF	TLKI	75			
cLL1Vk	YL	•••••	KL	•••••	T	•••••	F	•••••	•••••	•••••	•••••	75			
hLL1Vk	•••••	•••••	L	•••••	T	•••••	F	•••••	•••••	•••••	•••••	75			
HF-21/28	SRVE	AEDV	GVY	YCM	MQGT	HWPF	T	FGQ	GTR	LEI		106			
cLL1Vk	•••••	•••••	L	•••••	F	S	SS	V	P	•••••	A	K	•••••	IKR	108
hLL1Vk	•••••	•••••	•••••	F	S	SS	V	P	•••••	A	•••••	•••••	IKR	108	

图3B

90	CAGGTCCAACTGCAGCAATCTGGGCTGAGTTGAAGAGCCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCAC	
30	GTCCAGGTTGACGTGTTAGACCCAGACTCAACTTCTTGGACCCCGGAGTCACTTCCAAAGGACGTTCCGAGAGACCTATGTGGAAGTGA	
180	AACTATGGAGTGAAGTGAAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTCACTGGATGGCTGGATTAACCCCAACACTGGAGAGCCACACATTT	
59	TTGATACCTCACTTGACCTATTTCGTCGGGGACCTGTTCCCGAAGTCACTACCCGACCTATTGGGGTTGTGACCTCTCGGTTGTANA	
	<u>NYGVNWIKQAPEGQLQWMI NPN TGEPTF</u>	CDR1
		CDR2
270	GATGATGACTTCAAGGACGATTTGCCTTCTCTTGGACACCTCTGTACGACGGCATATCTCCAGATCAGCAGCCTAAAGGCTGACGAC	
89	CTACTACTGAAGTTCCTGCTAACGGAAGAGAACCTGTGGAGACAGTCTGTCGGTATAGAGGCTTAGTCTGTCGGGATTTCCGACTGCTG	
	<u>DDDFKGRFASLDTSVSTAYLQISSLKAD</u>	
360	ACTGCCGTGATTTCTGTTCAAGATCGAGGGGTAAARACGAAGCCTGGTTTGCTTATGGGGCCAAAGGACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA	
113	TGACGGCACATAAGACAAGTTCYAGCTCCCATTTTGTCTTCGGACCAACGAATAACCCCGGTTCCCTGGGACCAAGTGGCAGAGGAGT	
	<u>TAVYFCSSRSRSGKN EAWFA YWGGT LVT VSS</u>	CDR3

图4A

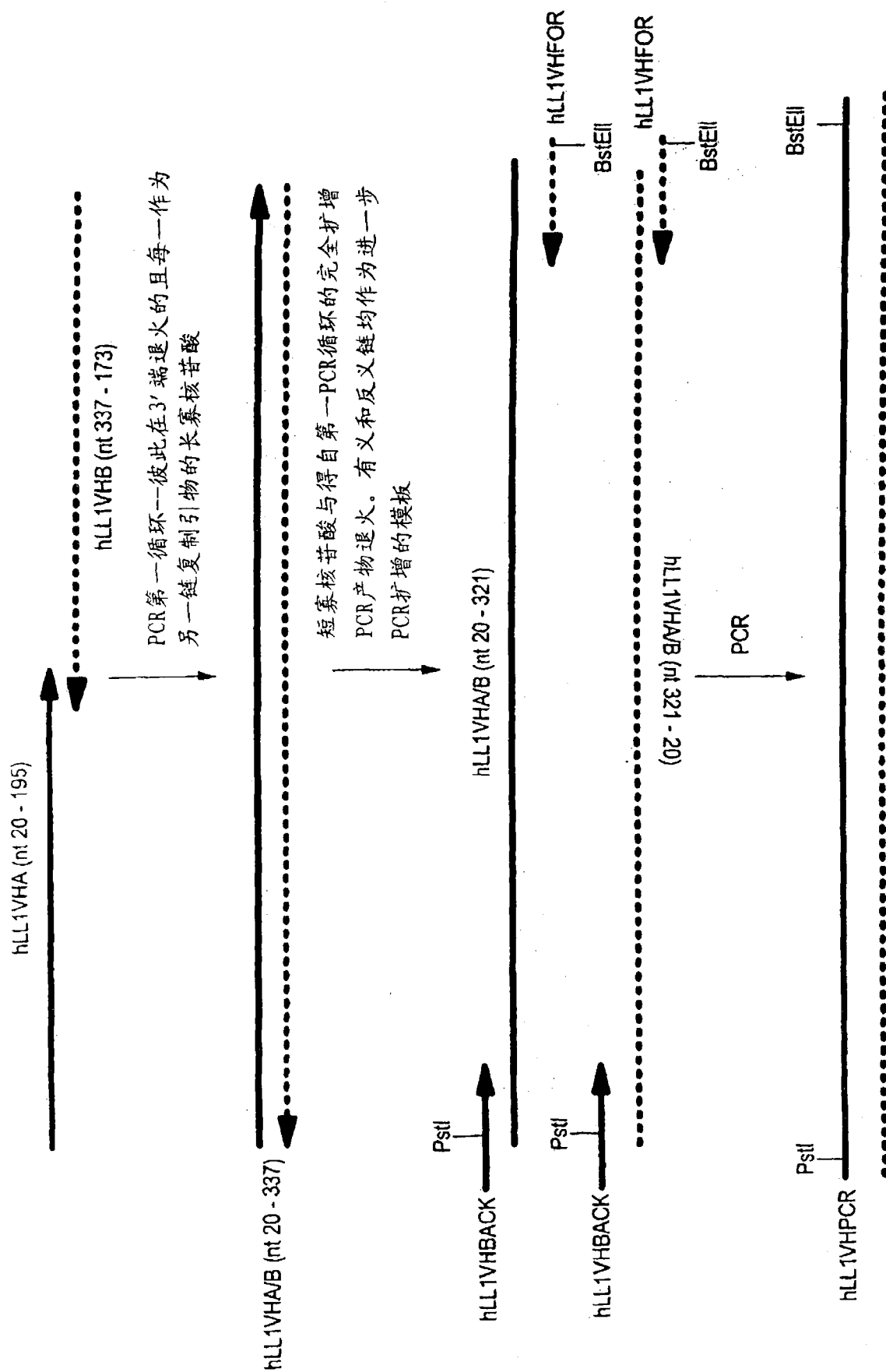


图5

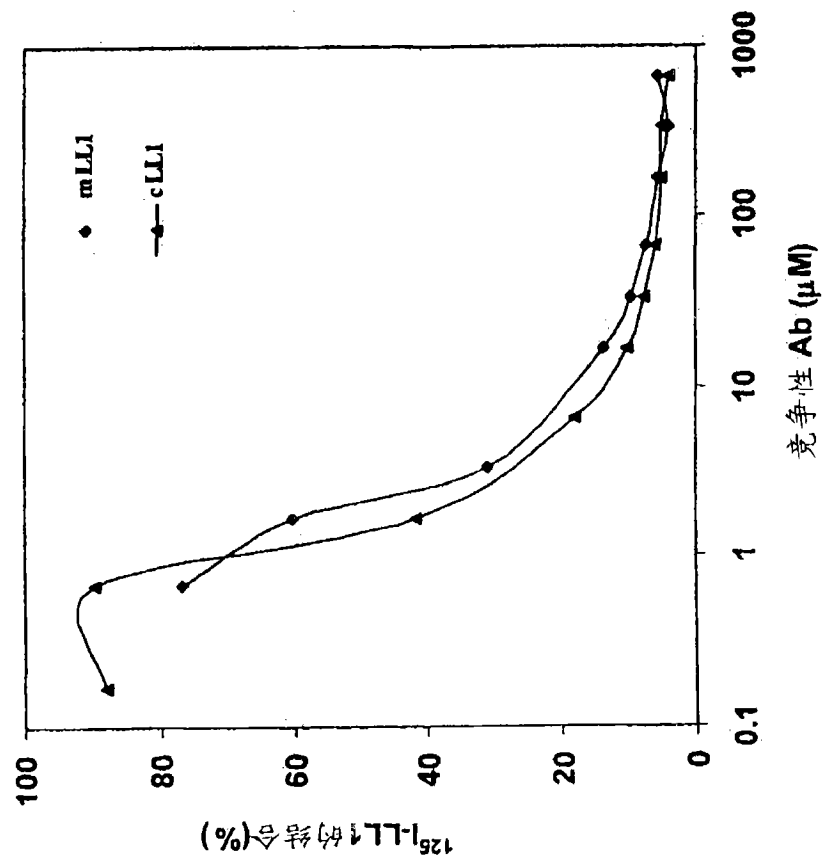


图6

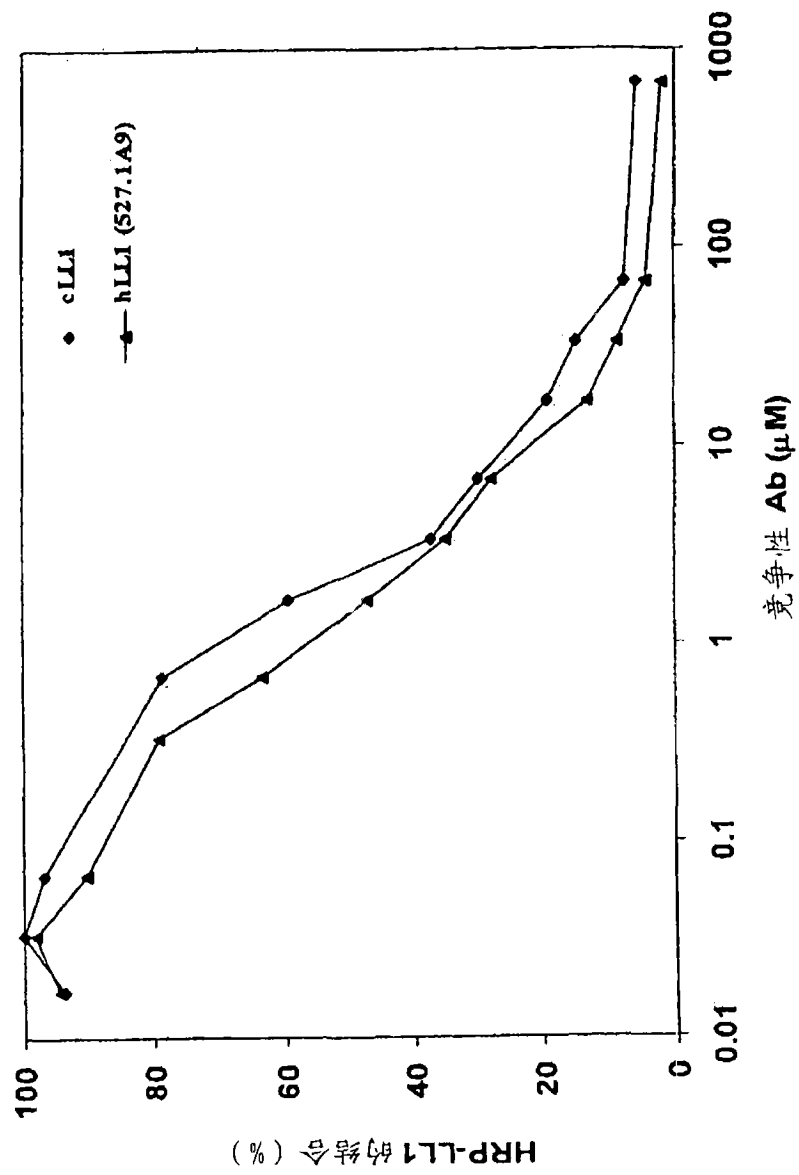


图7

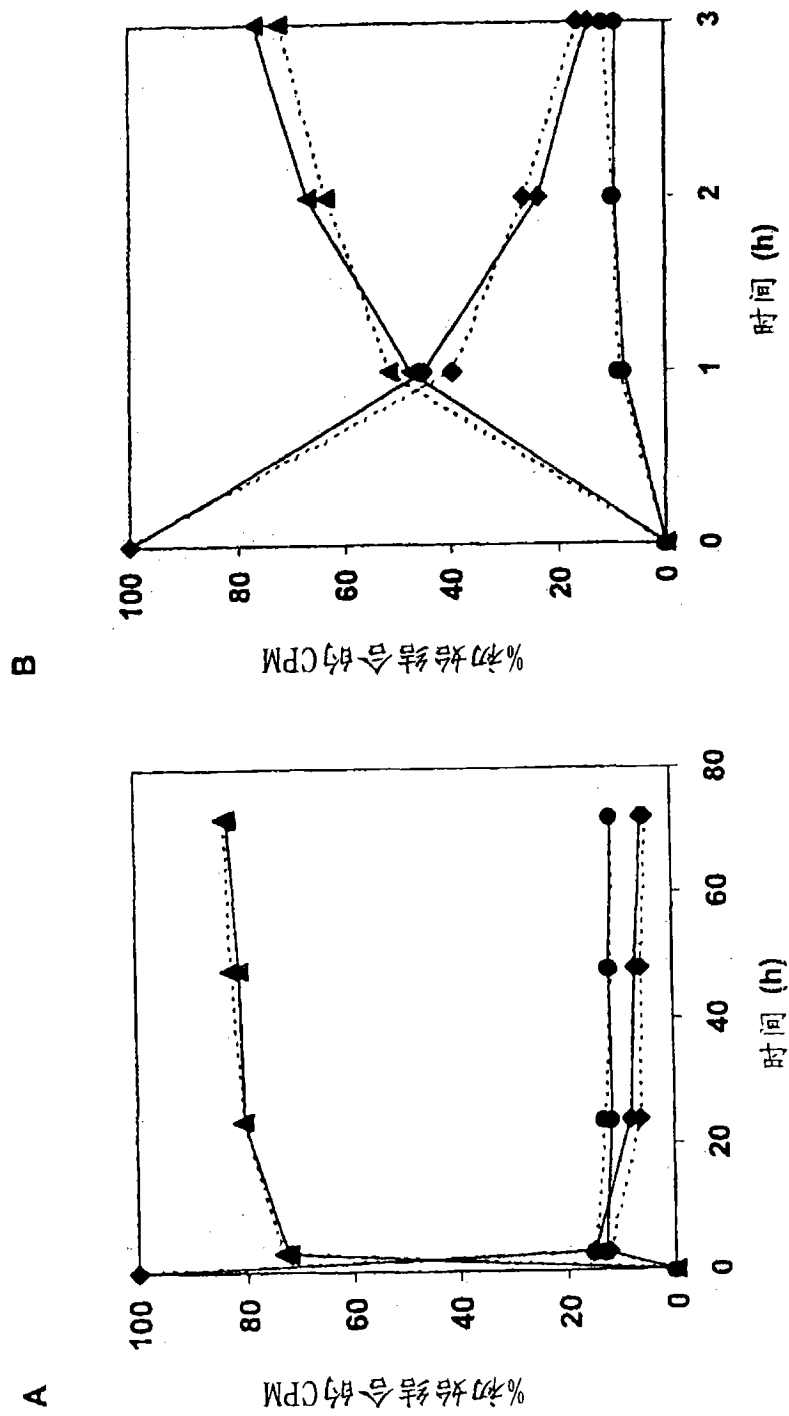


图8

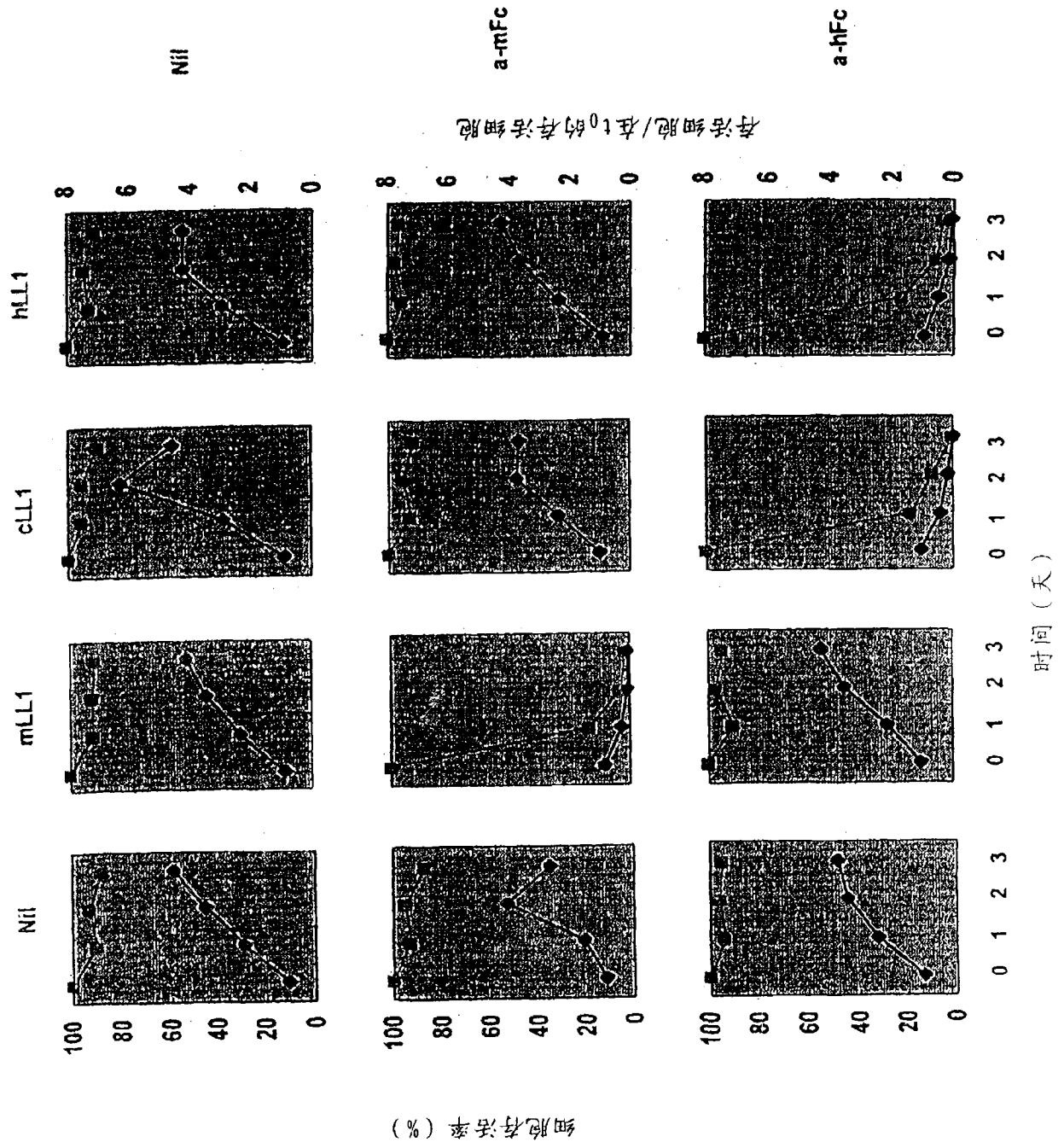


图9

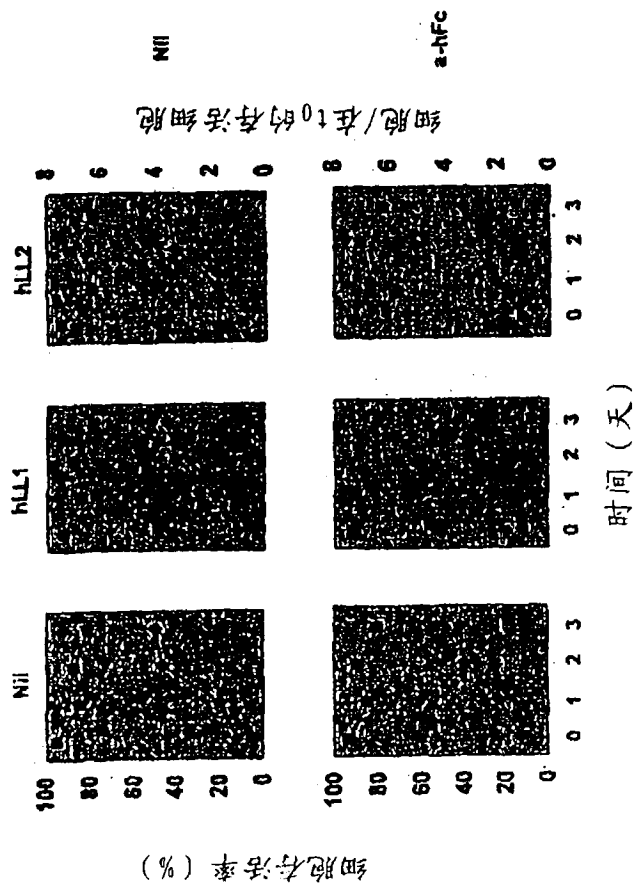


图10

专利名称(译)	内在化抗-CD74抗体和使用方法		
公开(公告)号	CN102174108B	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201110042106.4	申请日	2003-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
[标]发明人	H汉森 S O梁 Z屈 DM戈登伯格		
发明人	H·汉森 S·O·梁 Z·屈 D·M·戈登伯格		
IPC分类号	C07K16/46 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P31/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K45/06 A61K47/6849 A61K51/1027 A61K2039/505 A61P3/10 A61P17/00 A61P21/00 A61P25/14 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/2833 C07K16/2896 C07K2317/24 C07K2317/77		
代理人(译)	郭文洁		
审查员(译)	潘浩		
优先权	60/360259 2002-03-01 US		
其他公开文献	CN102174108A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了人源化、嵌合和人抗-CD74抗体，CD74抗体融合蛋白，免疫缀合物，疫苗和与CD74，主要组织相容性复合物(MHC)II类恒定链，II结合的双特异性抗体，其可用于诊断和治疗B细胞病症例如B细胞恶性肿瘤，其中细胞可与CD74反应的其它恶性肿瘤和自身免疫性疾病，以及治疗和诊断方法。

cL11VH

```

          PstI
CAGGTCCAAATGCAAGCTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGGTCACTGCAAGACTTCTGGATATACCTTCACA 90
-----+-----
GTCAGGTTTACGCTCTCAGACCTGGACTCGACTTCTTCGGACCTCTCTGTCAGTTCAGTGGAGCTTCTGAAGACCTATATGGAGGTGT
Q V Q L Q Q S G P E L K K P G E T V K V T C K T S G Y T F T 30
A A C T A T G A G T G A C T G A T A A G C A G A C T C A G G A G A G G T T T A C A G T G A T G G C T G G A T A A C C C A A C A C T G G A G C C A C A T T T
180
T T G A T A C C T C A C T G A C C T A T T T G T C T G A G T C C T C C C A A T G T C A C C T A C C G A C C T A T T T G G G T T G T G A C C T C G G T T G T A A
N Y G V N W I K Q T P G E G L Q W H G W I N P N T G E P T F 59
CDR1 CDR2
G A T G A C T T C A G G G A C A T T T G C T T C T T T G S A T C C T T G C C A G C A C T G C T T T T G C A G A T C A G A C C T C A A A A T G A G G A C
270
C T A C T A C T G A A G T C C C T G T A A C G G A G A A A C C T T A G G A G A C G T C G T G A C G G A A A C G T A G T C G T T G G A G T T T T A C T C T G
D D D E K G R F A F S L E S S A S T A F L Q I S N L K N E D 89
A T G G T A C A T A T T T C T G A T C A G G G G T A A A A G A G C C T G G T T G C T T A T T G G G G C C A G G A C T T G T C A C C T C T C T C A
360
T A C C C A T G A A G A C A G T C T A G C T C C C A T T T T G C T T G G A C C A A C A A T A A C C C G G T C C C T G A G A C A G T G G C A G A G A G T
H G T Y F C S R S R G K N E A W F A Y W G Q G T L V T V S S 113
CDR3

```