(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1997670 B
(45)授权公告日 2014.04.30

(21)申请号 200580022633.1

(22)申请日 2005.07.01

(30)优先权数据
PCT/DK2004/000470 2004.07.01 DK
PCT/IB2004/002464 2004.07.01 WO
PA200500025 2005.01.06 DK

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2007.01.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2005/053122 2005.07.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2006/003179 EN 2006.01.12

(73)专利权人 诺和诺德公司
地址 丹麦鲍斯韦
专利权人 伊纳特医药公司
热纳亚大学

(72)发明人 A·莫雷塔 M·德拉齐萨
P·安德烈 L·戈捷 F·罗马格涅
P·A·N·R·瓦格特曼
I·斯文德森 S·扎恩 A·斯温森
M·斯奥夫森 S·贝格佩德凯尔
K·谢尔高 P·施佩 W·迈克尔

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 袁志明

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
G01N 33/52(2006.01)

(56)对比文件
WO 0026671 A,2000.05.11, 全文.
SHIN JEON-SOO ET AL.Monoclonal antibodies with various reactivity to p58 killerinhibitory receptors.HYBRIDOMA18 6.1999,18(6),521-527.
SPAGGIARI GRAZIA MARIA ET AL.Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon theengagement of killer-activating HLA class I receptors throughFasL-Fas interaction..BLOOD100 12.2002,100(12),4098-4107.
WARREN HS et al.Functional analysis of CD158b monoclonal antibodiesrecognizing the killer Ig-like receptors KIR2DS2, KIR2DL2and KIR2DL3.TISSUE ANTIGENS55 Supplement 1.2000,55(Supplement 1),80-81.

审查员 王莉

权利要求书2页 说明书76页
序列表22页 附图14页

(54)发明名称

人类抗-KIR抗体

(57)摘要

本发明描述了用于调节受试者中免疫反应的组合物和方法。更特别地,描述了调节哺乳动物受试者中NK细胞活性并允许增强NK细胞细胞毒性的人类抗体,以及具有与人类单克隆抗体1-7F9或14F1的那些相似的抗原结合特性的抗体。还描述了该抗体的片段和衍生物,以及含有该抗体的药物组合物和它们的用途,尤其用于治疗中,以增加受试者中NK细胞活性或细胞毒性。

CN 1997670 B

1. 一种分离的人类或人源化抗体，其与KIR2DL1、KIR2DL2和KIR2DL3中的每一个结合，但是不结合KIR2DS4并且加强NK细胞对表达I类HLA-C分子的人类靶细胞的裂解活性，该抗体包含：

(a) 重链可变区，其含有由对应于SEQ ID NO:17的残基31-35的氨基酸序列构成的CDR1结构域；由对应于SEQ ID NO:17的残基50-65的氨基酸序列构成的CDR2结构域；和由对应于SEQ ID NO:17的残基99-112的氨基酸序列构成的CDR3结构域；和

(b) 轻链可变区，其含有由对应于SEQ ID NO:15的残基24-34氨基酸序列构成的CDR1结构域；由对应于SEQ ID NO:15的残基50-56的氨基酸序列构成的CDR2结构域；由对应于SEQ ID NO:15的残基89-97的氨基酸序列构成的CDR3。

2. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，其进一步不与KIR2DS3结合。

3. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体阻断KIR2DL1、KIR2DL2和KIR2DL3中的至少一个与I类HLA-C分子结合。

4. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体阻断HLA-Cw4分子与KIR2DL1的结合，以及HLA-Cw3分子与KIR2DL2或KIR2DL3中的至少一个结合。

5. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体在与KIR2DL1、KIR2DL2和KIR2DL3中的至少一个结合中，与含有由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列构成的轻链可变区，和SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列构成的重链可变区的抗体竞争。

6. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体在与KIR2DL1、KIR2DL2和KIR2DL3中的每一个结合中，与含有由SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列构成的轻链可变区，和SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列构成的重链可变区的抗体竞争。

7. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体含有轻链可变区是SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列，和重链可变区是SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。

8. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体对KIR2DL1的解离常数(K_d)不大于大约0.45nM。

9. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体对KIR2DL3的K_d不大于大约0.025nM.

10. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体与KIR2DL1表位结合，该表位含有SEQ ID NO:23的氨基酸残基L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87和Y88。

11. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体结合KIR2DL1表位，该表位包含具有SEQ ID NO:23所示氨基酸序列的KIR2DL1的胞外部分的残基M44、F45和D72。

12. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体为单克隆抗体。

13. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

14. 权利要求1的分离的人类或人源化抗体，该抗体为IgG4抗体。

15. 编码权利要求1至14任意一项的人类或人源化抗体的核酸。

16. 含有权利要求15的核酸的载体。

17. 含有权利要求16的载体的细胞。

18. 一种产生人类或人源化抗KIR抗体的方法，它包括在适于表达抗KIR抗体的条件下培养权利要求17的细胞。

19. 一种药物组合物，它含有可检测地加强患者中 NK 细胞细胞毒性有效量的权利要求 1-14 任意一项的人类或人源化抗体，或通过权利要求 18 的方法产生的人类或人源化抗体，以及药学上可接受的载体或赋形剂。

20. 权利要求 19 的药物组合物，它含有吐温 80、蔗糖，或吐温 80 和蔗糖二者。

21. 权利要求 19 或 20 的组合物在制备用于加强受试者中 NK 细胞活性而治疗癌症的药物中的用途。

22. 权利要求 21 的用途，其中所述癌症选自急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤和非何杰金氏淋巴瘤。

23. 权利要求 22 的用途，其中所述癌症选自结肠直肠癌、肾癌、卵巢癌、肺癌、乳腺癌和恶性黑色素瘤。

24. 权利要求 21 到 23 任意一项的用途，其中所述药物联合治疗剂进行给药，该治疗剂选自免疫调节剂、激素药剂、化学治疗剂、抗血管生成剂、凋亡剂、结合抑制性 KIR 的第二抗体、抗感染剂、导向剂和辅助化合物。

人类抗 -KIR 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及人类抗体，以及其片段和衍生物，其与存在于 NK 细胞表面上的两种或更多种抑制性 KIR 受体交叉反应和 / 或阻断它们，并且增强哺乳动物受试者或生物样品中 NK 细胞细胞毒性。本发明还涉及制备该抗体、片段、变体和衍生物的方法；含有该抗体的药物组合物；以及该分子及组合物的用途，尤其在治疗中的用途，以增加受试者中 NK 细胞活性或细胞毒性。

背景技术

[0002] 自然杀伤 (NK) 细胞是淋巴细胞的一个亚群，涉及免疫和宿主免疫监视系统。

[0003] NK 细胞是在骨髓中从淋巴祖细胞发育的单核细胞，并且形态学特征和生物学特性典型地包括簇决定子 (CDs)CD16，CD56，和 / 或 CD57 的表达；细胞表面上 α / β 或 γ / δ TCR 复合物的缺乏；结合并杀伤未能表达“自我”主要组织相容性复合体 (MHC) / 人白细胞抗原 (HLA) 蛋白质的靶细胞的能力；和杀伤表达活化 NK 受体的配体的肿瘤细胞或其它患病细胞的能力。NK 细胞的特征在于其结合并杀伤几种类型的肿瘤细胞系而不需要预先免疫或活化的能力。NK 细胞也能释放对免疫系统产生调节作用的可溶性蛋白质和细胞因子；而且能经受多轮细胞分裂并产生具有与母细胞相似生物学特性的子细胞。在通过干扰素和 / 或细胞因子的活化后，通过需要在 NK 细胞和靶细胞之间直接的、物理接触的机理，NK 细胞介导肿瘤细胞和由细胞内病原体感染的细胞的裂解。靶细胞的裂解包括细胞毒性颗粒从 NK 细胞释放到结合靶标的表面上，以及效应物蛋白例如穿孔素和粒酶 B 上，穿孔素和粒酶穿透靶标质膜并诱导细胞凋亡或程序化细胞死亡。正常的健康细胞被保护免于被 NK 细胞裂解。

[0004] 基于它们的生物学特性，在本领域已经提议了不同的治疗和疫苗策略，它们依靠 NK 细胞的调节。然而，NK 细胞活性通过包括刺激和抑制信号二者的复杂机制来调节。

[0005] 简要地，NK 细胞的裂解活性是通过不同的细胞表面受体来调节的，该受体在与靶细胞上的配体相互作用后，转导正或负细胞内信号。通过这些受体传输的正和负信号之间的平衡，决定靶细胞是否被 NK 细胞裂解（杀伤）。NK 细胞刺激性信号可以通过自然细胞毒性受体 (NCR) 例如 NKp30、NKp44 和 NKp46；以及 NKG2C 受体、NKG2D 受体、某些活化杀伤免疫球蛋白样受体 (KIRs) 和其他活化 NK 受体进行介导 (Lanier，Annual Review of Immunology 2005；23：225-74)。NK 细胞抑制性信号可以通过受体象 Ly49，CD94/NKG2A，以及某些抑制性 KIRs（其识别主要组织相容性复合体 (MHC) I 类分子）进行介导（**Kärre**等，Nature 1986；319：675-8；**Öhlén**等，Science 1989；246：666-8)。这些抑制性受体结合存在于其他细胞上的 MHC I 类分子（包括 HLA I 类）的多态性决定簇并抑制 NK 细胞介导的裂解。

[0006] KIRs，有时也被称作杀伤抑制性受体，已经在人类和非人灵长类中进行表征，并且是存在于某些淋巴细胞亚类，包括 NK 细胞和一些 T 细胞上的多态性 1 型跨膜分子。KIRs 与 MHC 1 类分子的 α 1 和 2 域中的决定簇相互作用，并且如上所述，对 NK 细胞，独特的 KIRs 为刺激性或抑制性。

[0007] 对KIRs的命名是基于细胞外域的数目(KIR2D和KIR3D分别具有两个和三个细胞外免疫球蛋白域)和胞质尾区是长(KIR2DL或KIR3DL)或短(KIR2DS或KIR3DS)。在存在于单一个体中的NK群体中,所给的KIR的存在或缺少从一个NK细胞到另一个是变化的。在人类中,也存在相对高水平的KIR基因多态性,一些KIR等位基因存在于一些,但不是所有的个体中。在NK细胞上的KIR基因的表达是随机调节的,意思是在所给的个体中,根据个体的基因型,所给的淋巴细胞可以表达一个、两个或更多个不同的KIRs。单一个体的NK细胞典型地表达不同的KIRs组合,为全套NK细胞提供了对MHCI类分子的不同特异性。

[0008] 当结合到合适的配体时,某些KIR基因产物引起淋巴细胞活性的刺激。活化的KIRs全部有带电的跨膜残基的短胞质尾区,其与具有免疫受体基于酪氨酸的活化基序(Motifs)(ITAMs)的衔接分子结合,ITAMs转导刺激性信号到NK细胞。相反,抑制性KIRs具有包含免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序(ITIM)的长胞质尾区,在他们的MHC I类配体结合时,就转导抑制信号到NK细胞。已知的抑制性KIRs包括KIR2DL和KIR3DL亚家族成员。有两个免疫球蛋白域的(KIR2DL)识别HLA-C同种异型:KIR2DL2(原来叫做p58.2)和密切相关的等位基因产物KIR2DL3都识别"1群"HLA-C同种异型(包括HLA-Cw1、-3、-7和-8),而KIR2DL1(p58.1)识别"2群"HLA-C同种异型(例如HLA-Cw2、-4、-5和-6)。KIR2DL1的识别是通过在HLA-C等位基因的第80位存在赖氨酸残基支配的。KIR2DL2和KIR2DL3识别是通过在HLA-C第80位存在天冬酰胺残基支配的。重要地,绝大多数的HLA-C等位基因在第80位有天冬酰胺或赖氨酸残基。因此,KIR2DL1、-2和-3共同地识别基本上所有的在人类中发现的HLA-C同种异型。一个KIR带有三个免疫球蛋白域,KIR3DL1(p70)识别与HLA-Bw4等位基因共享的一个表位。最后,KIR3DL2(p140),带有三个免疫球蛋白域分子的同型二聚体,识别HLA-A3和-A11。

[0009] 虽然多种抑制性KIRs和/或其它MHC I类特异的抑制性受体(Moretta等,Eur J Immunogenet.1997;24(6):455-68;Valiante等,Immunol Rev 1997;155:155-64;Lanier,Annu Rev Immunol 1998;16:359-93)可以通过NK细胞共表达,在任何所给个体的NK全部组成部分中,有仅仅表达单个KIR的细胞,并且因而仅被特异的MHC I类等位基因(或属于同群MHC I类同种异型的等位基因)所抑制。人类MHC I类分子通常被称为人组织相容性抗原(HLA)I类。

[0010] 为相对于他们的靶标不匹配的KIR配体,也就是,表达不识别宿主任何HLA分子KIRs的NK细胞种群或克隆,在白血病患者中在同种异体骨髓移植后已经显示介导强力、挽救生命的抗肿瘤反应(Ruggeri等,Science 2002,295:2097-2100)。人们认为潜在的机理是HLA不匹配的造血移植导致表达KIR的供体来源的NK细胞的扩张,其在接受体中不识别任何HLA配体,并且因而不通过KIR进行抑制。这些同种异体NK克隆发挥强有力地抗肿瘤活性。在诊断为急性骨髓性白血病(AML),并用KIR-MHC不匹配的单倍同一性的移植治疗的患者中,该反应非常强烈。通过药理学治疗患者再现该作用的一个途径是施用阻断KIR/HLA相互作用的试剂以活化患者的内源性NK细胞。

[0011] 对KIR2DL1特异的某些单克隆抗体已经显示阻断KIR2DL1与"2群"HLA-C同种异型,例如HLA-Cw4的相互作用(Moretta等,J ExpMed 1993;178:597-604),并且促进了NK介导的表达那些HLA-C同种异型的靶细胞的裂解。针对KIR2DL2/3,阻断KIR2DL2/3与HLA-Cw3相互作用的单克隆抗体或类似的同种异型已经进行了描述(Moretta等,J Exp Med

1993 ;178 :597-604)。对在临床环境中使用,这样的抗体是不理想的,因为两种治疗性单克隆抗体 (mAbs) 的开发和两种这样的抗体或选择一种这样抗体的施用 (在适当的诊断之后),将根据是否任何所给的患者表达 1 群或 2 群 HLA-C 同种异型,要求其治疗所有潜在患者。

[0012] watzl 等 (Tissue Antigens 2000 ;56 :240-47) 产生识别多种同种型 KIRs 的交叉反应鼠抗体,但那些抗体并不加强 NK 细胞的裂解活性。更进一步,Spaggiari 等 (Blood 2002 ;99 :1706-1714 和 Blood 2002 ;100 :4098-4107) 应用许多针对不同 KIRs 的鼠单克隆抗体进行了实验。已报道那些抗体之一,NKVSF1(也称为 Pan2D) 识别 KIR2DL1(CD158a)、KIR2DL2(CD158b) 和 KIR2DS4(p50.3) 的共同表位。Shin 等 (Hybridoma 1999 ;18 :521-7) 也报道了生产两种单克隆抗体,表示为 A210 和 A803g,能结合所有的 KIR2DL1、KIR2DL3 和 KIR2DS4。然而,对在阻断患者 NK 细胞的抑制性 KIRs 中抗体的治疗用途,抗体与之交叉反应的活化 KIR 分子越少越好,因为活化受体的阻断可能损害 NK 细胞的刺激。因而,具有 NKVSF1、A210 或 A803g 抗原结合特征的抗体在临床环境中将不是最佳的。另外,在治疗人类患者中使用鼠单克隆抗体可能导致宿主对抗该抗体的免疫反应,因而损害治疗的效力。

[0013] 因此在本领域中,到目前为止还没有使用于治疗性调节抑制性 KIRs 的实用和有效的手段成为可利用的手段。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明提供了新的和有用的人类抗体,其特异地结合 KIR2DL1 和 KIR2DL2 和 KIR2DL3 中的至少一个,或结合这些 KIRs 的全部三个,和 / 或通过阻断在一个或多个这种 KIRs 和 HLA-C 之间的相互作用,加强 NK 细胞裂解活性的人类抗体。也提供了这类抗体的片段和衍生物。本发明也与新的、有用的抗体、抗体片段和抗体的衍生物有关,其含有与如在本文描述的人类抗体 1-7F9 和 1-4F1 的那些实质上相同的 VH 和 VL 序列。本发明也提供了含有编码这类抗体的核苷酸序列的核酸、含有这类核酸的载体、含有这类核酸和 / 或载体的宿主细胞和生物体,和组合物,例如药学上可接受的组合物和试剂盒,其含有这些蛋白质、核酸、载体和 / 或细胞和典型地含一种或多种附加成分,这些附加成分可以是促进组合物的配制、输送、稳定性或其他特征的活性或非活性成分 (例如不同的载体)。本发明进一步提供了不同的新的和有用的制造和使用这类抗体、核酸、载体、细胞、生物体和 / 或组合物的方法,例如在 KIR 介导的生物学活性的调节中,例如与其在相关的疾病的治疗中。

[0016] 在一方面,本发明提供了结合 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 中的每一个,但不结合 KIR2DS4 的人类或人源化抗体。在一个具体实施方式中,抗体进一步不结合 KIR2DS3。在另一个具体实施方式中,人类或人源化抗体阻断 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 中的至少一个结合 I 类 HLA-C 分子。在进一步的具体实施方式中,抗体可能阻断 HLA-Cw4 分子结合 KIR2DL1,和 HLA-Cw3 分子结合 KIR2DL2 或 KIR2DL3 中的至少一个。例如,抗体可以阻断 HLA-Cw4 分子结合 KIR2DL1 胞外部分 (SEQ ID NO :23) 的 M44, F45 和 D72 残基。在还有另一个具体实施方式中,抗体加强了 NK 细胞针对表达 I 类 HLA-C 分子的人类靶细胞的裂解活性。

[0017] 在另一方面,本发明提供了在与 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 中的至少一个结合中,与包含含有 SEQ ID NO :15 氨基酸序列的轻链可变区和含有 SEQ ID NO :17 氨基酸序列的重链可变区的抗体竞争的人类或人源化抗体。在一个具体实施方式中,在与 KIR2DL1、

KIR2DL2 和 KIR2DL3 中的每一个结合中，该抗体与包含含有 SEQ ID NO :15 氨基酸序列的轻链可变区和含有 SEQ ID NO :17 氨基酸序列的重链可变区的抗体竞争。在另一个具体实施方式中，该抗体包含含有 SEQ ID NO :15 氨基酸序列的轻链可变区。在还有另一个具体实施方式中，该抗体含有 (a) 对应于 SEQ ID NO :17 的 31-35 残基的重链 CDR1 氨基酸序列 ;(b) 对应于 SEQ ID NO :17 的 50-65 残基的重链 CDR2 氨基酸序列 ;和 (c) 对应于 SEQ ID NO :17 的 99-112 残基的重链 CDR3 氨基酸序列。例如，该抗体可以包含含有 SEQ ID NO :17 氨基酸序列的重链可变区。

[0018] 在另一方面，本发明提供了分离的结合 KIR2DL1 表位的人类或人源化抗体，该表位实质上含有 L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88 氨基酸残基。

[0019] 在另一方面，本发明提供了分离的人类或人源化抗体，其具有对 KIR2DL1 解离常数 (K_d) 不大于大约 0.45nM 和 / 或对 KIR2DL3 的 K_d 不大于大约 0.025nM。

[0020] 本发明也提供了人类或人源化抗体或抗体片段，或其衍生物，其单独或以任意适当的组合具有任意上述特性。在一个具体实施方式中，抗体为单克隆抗体。在另一个具体实施方式中，抗体为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗体。例如，抗体可以为 IgG4 抗体。

[0021] 本发明也提供了编码具有任意上述特性的人类或人源化抗体或抗体片段的核酸、含有这种核酸的载体、含有这种载体的细胞，和生产人类抗 KIR 抗体的方法，包含在适于表达抗 KIR 抗体的条件下培养这种细胞。

[0022] 本发明也提供了药物组合物，它含有具有一种或多种上述特性，或通过任意方法生产，以在患者中有效可检测地加强 NK 细胞细胞毒性的量的人类或人源化抗体或抗体片段，和药学上可接受的载体或赋形剂。该组合物可以，例如含有吐温 -80、蔗糖或吐温 -80 和蔗糖二者。

[0023] 本发明也提供了在需要它的受试者中加强 NK 细胞活性的方法，该方法包括给受试者施用有效量的任意上述的组合物。在一个具体实施方式中，受试者是患有癌症的患者。例如，患者可以患有选自急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤和非何杰金氏 (Hodgkin′ s) 淋巴瘤的癌症。或者，患者可以患有选自结直肠癌、肾癌、卵巢癌、肺癌、乳腺癌和恶性黑色素瘤的癌症。在另一个具体实施方式中，受试者是患有感染性疾病的患者。还有另一个具体实施方式中，该方法进一步包括施用选自免疫调节剂、激素药剂、化学治疗剂、抗血管生成剂、凋亡剂、结合抑制性 KIR 的第二抗体、抗感染药、靶向剂和辅助化合物的治疗药。

[0024] 应该理解，本发明“提供”的抗体或本发明“涉及”抗体等等的描述，也含蓄地，指的是在本文描述的创造性方法的实践中可能有用的抗体，除非另作说明或明显地与上下文相矛盾。

[0025] 本发明的这些和其它方面和特征在本文进一步详细描述。

[0026] 附图简要说明

[0027] 图 1 描述了结合不同人 KIR2DL 受体的共同决定簇的鼠单克隆抗体 DF200。(A) 克隆 CP11、KIR2DL1+、DF200 ;(B) 克隆 CP502、KIR2DL3+ ;(C) 克隆 CP11、KIR2DL1+、抗 KIR2DL1 ;(D) 克隆 CP502、KIR2DL3+、抗 KIR2DL2/3。

[0028] 图 2 描述了鼠单克隆抗体 DF200，其中和 KIR2DL1 介导的 NK 细胞对 Cw4 表达靶细

胞的细胞毒性抑制，显示在C1R-Cw4靶上用抗KIR mAb的裂解的重建，效应物/靶(E/T)比率为4/1。

[0029] 图3描述了对KIR2DL1(mAbs EB6和XA-141)或KIR2DL2/3(mAbs GL183和Y249)特异的鼠单克隆抗体DF200，DF200的Fab片段和常规鼠抗体，其中和KIR2DL1介导的对Cw4阳性靶细胞细胞毒性的抑制，和KIR2DL2/3介导的对Cw3阳性靶细胞的NK细胞细胞毒性的抑制。(A)和(C)KIR2DL1+，靶细胞721.221-Cw4+。(B)KIR2DL2+，靶细胞721.221-Cw3+。(D)KIR2DL3+，靶细胞721.221-Cw3+。

[0030] 图4描述了通过NK细胞的细胞裂解的重建，该NK细胞在DF200和EB6抗体的F(ab')2片段存在时，表达针对HLA-Cw4阳性靶细胞的KIR2DL1。(A)靶细胞721.221-Cw4；E/T比＝1。(B)靶细胞B-EBV细胞表达性Cw4，E/T比＝2。

[0031] 图5描述了通过交叉反应性鼠(DF200和NKVSF1(Pan2D))和人(1-7F9、1-4F1、1-6F5和1-6F1)mAbs，以及鼠常规KIR2DL1特异性mAb(EB6)的NK介导的杀伤作用的诱导。这些mAbs通过用HLA-Cw4转染的721.221靶细胞的表达KIR2DL1的NK细胞(YTS-KIR2DL1)诱导(重建)杀伤作用。E/T比＝1。(A)30μg/ml mAb。(B)10μg/ml mAb。

[0032] 图6描述了通过与图5中相同的抗体诱导NK介导的杀伤作用。mAbs通过表达内源性HLA-Cw4的B-EBV细胞的表达KIR2DL1的NK细胞(YTS-KIR2DL1)诱导(重建)杀伤作用。E/T比＝2。(A)30μg/ml mAb。(B)10μg/ml mAb。

[0033] 图7描述了表位图，其显示了用对KIR2DL1的抗KIR抗体，通过表面细胞质基因共振**(BIAcore®)**分析获得的竞争性结合实验结果，其中在结合KIR2DL1中，重叠环指的是mAbs之中的重叠。结果显示在KIR2DL1上，1-7F9与EB6和1-4F1竞争，但不与NKVSF1(Pan2D)和DF200竞争。抗体1-4F1依次与EB6、DF200、NKVSF1(Pan2D)和1-7F9竞争。在KIR2DL1上，抗体NKVSF1(Pan2D)与DF200、1-4F1和EB6竞争，但不与1-7F9竞争。在KIR2DL1上，DF200与NKVSF1(Pan2D)、1-4F1和EB6竞争，但不与1-7F9竞争。

[0034] 图8描述了表位图，其显示了用对KIR2DL3的抗KIR抗体，通过**BIAcore®**分析获得的竞争性结合实验结果，其中重叠环指的是在结合KIR2DL3中的重叠。结果显示在KIR2DL3上，1-4F1与NKVSF1(Pan2D)、DF200、gl183和1-7F9竞争。在KIR2DL3上，1-7F9与DF200，gl183，和1-4F1竞争，但不与NKVSF1(Pan2D)竞争。在KIR2DL3上，NKVSF1(Pan2D)与DF200、1-4F1和GL183竞争，但不与1-7F9竞争。在KIR2DL3上，DF200与NKVSF1(Pan2D)、1-4F1和1-7F9竞争，但不与GL183竞争。

[0035] 图9描述了表位图，其显示了用对KIR2DS1的抗KIR抗体，通过**BIAcore®**分析获得的竞争性结合实验结果，其中重叠环指的是在结合KIR2DS1中的重叠。结果显示在KIR2DS1上，抗体1-4F1与NKVSF1(Pan2D)、DF200和1-7F9竞争。在KIR2DS1上，抗体1-7F9与1-4F1竞争，但与DF200和NKVSF1(Pan2D)不竞争。在KIR2DS1上，NKVSF1与DF200和1-4F1竞争，但不与1-7F9竞争。在KIR2DS1上，DF200与NKVSF1和1-4F1竞争，但不与1-7F9竞争。

[0036] 图10描述了证明mAb结合猕猴NK细胞的Pan2D(NKVSF1)mAb滴定。猕猴NK细胞(第16天的NK团块)用不同量的NKVSF1(Pan2D)mAb孵育，继之以PE结合的山羊F(ab')2片段抗鼠IgG(H+L)抗体。阳性细胞的百分比用同种型对照(纯化的小鼠IgG1)确定。样品制作一式两份，平均荧光强度＝MFI。

[0037] 图 11 显示了可溶性 KIR2DL1 和 KIR2DL1(R131W) 突变体与细胞的结合。(A) 增加浓度的可溶性 KIR2DL1-Fc,和 KIR2DL1(R131w)-hFc 突变体与表达 HLA-Cw3 或 -Cw4 的细胞的结合。结合的 KIR-Fc 蛋白质使用荧光染料结合的二抗体进行检测,并通过流式细胞仪显示。平均荧光显示于 y 轴。(B) 指示的抗 KIR mAbs(GL183、EB6、DF200 和 Pan2D(NKVSF1)) 结合 KIR2DL1-Fc 和 2DL1(R131w) 突变体蛋白质,使用人免疫球蛋白作为对照。该图显示 DF200 和 Pan2D(NKVSF1) 结合突变体稍差于野生型 KIR2DL1-Fc,提示两个 mAbs 受到 R131w 突变的影响。因此,在 KIR2DL1 上,对 DF200 和 Pan2D,R131 是构成表位的残基之一。

[0038] 图 12 提供了抗体 DF200 和 Pan2D(NKVSF1) 的轻链可变区和轻链 CDRs 氨基酸序列的比对。(A)DF200(SEQ ID NO :1) 和 Pan-2D(SEQ ID NO :2) 的抗 KIR 可变轻 (VL) 区的比对。上述氨基酸序列数目提示了分别对于在未成熟的 (未分泌) 免疫球蛋白中翻译 Met(+1) 的起始的位置。(B)CDR-L1 序列的比对。前残基 :通常为半胱氨酸 (Cys)。之后残基 :色氨酸 (Trp)。典型地 Trp-Tyr-Leu。长度 :10-17 氨基酸 (aa)。(C)CDR-L2 序列的比对。之前残基 :通常为 Ile-Tyr。长度 :7aa。开始 :CDR-L1 末端后大约 16aa。开始 :从分泌蛋白开始大约 24aa。(D)CDR-L3 序列的比对。之前残基 :Cys。之后残基 :Phe-Gly-XXX-Gly。长度 :7-11aa。开始 :CDR-L2 末端后大约 33aa。

[0039] 图 13 提供了抗体 DF200 的重链可变区和重链 CDRs。(A)DF-200VH 区,未成熟蛋白质。分泌的、成熟 VH 开始于 20 位 :残基 Q。VH 区末端为残基 S 而且此后恒定区 (未显示) 继续。(B)CDR-H1。之前残基 :Cys-XXX-XXX-XXX。之后残基 :Trp。通常为 Trp-Val 或 Trp-Ile。长度 :10-14aa。开始 :从分泌的蛋白质开始大约 22-26aa。(C)CDR-H2。之前残基 :Leu-Glu-Trp-Ile-Gly 但是其他变体是可能的。之后残基 :Lys 或 Arg/Leu 或 Ile 或 Val 或 Phe 或 Thr 或 Ala/Thr 或 Ser 或 Ile 或 Ala。长度 :16-20aa。开始 :CDR-H1 末端后大约 15aa。(D)CDR-H3。之前残基 :Cys-XXX-XXX(典型地为 Cys-Ala-Arg)。之后残基 :Trp-Gly-XXX-Gly。长度 :3-25aa。开始 :CDR-H2 末端后大约 33。

[0040] 图 14 描述了人类抗体 1-7F9 的 VH 和 VL 序列的核苷酸和氨基酸序列。(A)HuKIR 1-7F9 成熟可变轻链的翻译。(B) 编码 HuKIR 1-7F9 成熟可变轻链的核苷酸序列。(C)HuKIR 1-7F9 成熟可变重链的翻译。(D) 编码 HuKIR 1-7F9 成熟重链的核苷酸序列。

[0041] 图 15 显示了单克隆抗体 1-7F9、DF200(VH 序列 :SEQ ID NO :19 ;VL 序列 :SEQ ID NO :21) 和 Pan2D(NKVSF1 ;VH 序列 :SEQID NO :20 ;VL 序列 :SEQ ID NO :22) 的 VH 和 VL 的氨基酸序列。CDRs 是盒状的。

[0042] 图 16 描述了流式细胞仪数据,其显示鼠抗体,Pan2D(NKVSF1) 和人类 mAbs 1-7F9 和 1-4F1 结合用 KIR2DL1、KIR2DL3、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3 或 KIR2DS4 转染的细胞,如所提示 (纯化的抗体 :1μg/ml)。(A)-(R)NKVSF1(pan2D)、1-7F9 和 1-4F1 全部结合 KIR2DL1、KIR2DL3、KIR2DS1 和 KIR2DS2。它们都不结合 KIR2DS3。NKVSF1,但不是 1-7F9 或 1-4F1,结合 KIR2DS4。

[0043] 图 17 描述了 FACS 分析结果。(A) 抗体介导的在细胞上可溶性 KIR-Fc 结合 HLA-Cw4 的中和作用,通过流式细胞仪 (FACS) 进行检测。在用不同浓度的交叉反应的 mAb DF200 或 KIR2DL2/3- 特异的 mAb GL183 预孵育后,FACS- 测量 KIR2DL1-mFc 结合 LCL721.221-Cw4 细胞。DF200,但不是 GL183 降低了 KIR2DL1 结合 HLA-Cw4。测量以抑制性抗体缺乏时 KIR2DL1-hFc- 结合百分比进行作图。(B) 在用不同浓度的 1-1F4 和 1-7F9 预孵

育后，结合 LCL721.221-Cw4 细胞的 KIR2DL1-mFc 的 FACS- 测量。测量以抑制性抗体缺乏时 KIR2DL1-mFc- 结合百分比进行绘图。

[0044] 图 18 描述了 ^{51}Cr- 释放细胞毒性试验的结果。(A) 以不同的 E :T 比率，YTS 细胞（菱形）和 YTS-2DL1 细胞（三角）可以有效地杀伤 LCL721.221-Cw3 细胞。与此相反，YTS 细胞（正方形）可以有效地杀伤 LCL 721.221-Cw4 细胞，但是，由于 KIR- 限制，YTS-2DL1 细胞（十字）不能将其杀伤。(B) 在缺乏抗体时，YTS-2DL1 细胞不能杀伤 LCL-721.221-Cw4(E ： T 比率 12 ： 1)。1-7F9 诱导 YTS-2DL1 细胞以剂量依赖方式杀伤 LCL 721.221-Cw4 细胞。

[0045] 图 19 描述了两个晶体复合结构的叠加 ;KIR2DL1/1-7F9Fab’和 KIR2DL1/MHC Ⅰ类，PDB- 编码 1IM9(Fan 等，Nat. Immunol. 2001 ;2 :452-460)，使用普通 KIR 分子（标记‘KIR’）的 Cα- 原子作为模板。KIR2DL1/1-7F9Fab’ 显示为灰色线状带型而 KIR2DL1/MHC Ⅰ类为黑色管状型。1-7F9Fab’ 标记为 ‘1-7F9’ 而 MHC Ⅰ类标记为 ‘MHC’。可以看到在在叠加中 MHC 和 Fab’ 之间的重叠，证明 1-7F9Fab’ 阻碍 MHC Ⅰ类结合 KIR2DL1 受体的能力。见实施例 11。

[0046] 图 20 显示 KIR2DL1 上 1-7F9 的结合表位，如在 KIR2DL1 序列中所提示。从 1-7F9，在**4.0 Å**距离之内的氨基酸以灰色和黑色背景突出。通过黑色背景突出的氨基酸参与氢键结合至 1-7F9。

[0047] 定义

[0048] 为了方便，在本文定义几个术语。然而，在本文提供的定义术语的列表不是全部的。其他术语可以在本发明说明书中进行定义。

[0049] 在本发明的上下文中，“活性的”NK 细胞指的是生物学活性的 NK 细胞，包括具有裂解靶细胞和增强其他细胞免疫功能的能力的 NK 细胞。例如，“活性的”NK 细胞可以能够杀伤表达活化 NK 受体的配体和 / 或不能表达由 NK 细胞上的 KIR 识别的 MHC/HLA 抗原的细胞。NK 细胞可以通过不同的本领域已知技术获得，例如从血液样品、细胞单采法、组织或细胞采集等中分离。在自然杀伤细胞方案 (NaturalKiller Cells Protocols)(Campbell KS 和 Colonna M 编辑）。HumanPress. pp. 219-238(2000) 中可以发现关于涉及 NK 细胞的试验的有用方案。

[0050] 如在本文所使用，“杀伤免疫球蛋白样受体”、“杀伤抑制性受体”或“KIR”指的是由为 KIR 基因家族成员的基因或从这种基因制备的 cDNA 编码的蛋白质或多肽。KIR 基因家族的详细的评论，包括 KIR 基因和 KIR 基因产物命名，和典型 KIRs 的 Genbank 登记号，是 M. Carrington 和 P. Norman 的“KIR 基因簇”（“The KIR Gene Cluster”），其可以在 NCBI 网站称为“书架 (Bookshelf)”中获得（可通过万维网 (WWW) 地址 ncbi.nlm.nih.gov/books 获得）。人类 KIR 基因和 cDNAs 序列，以及他们的蛋白质产物，可以在公共数据库，包括 GenBank 中取得。人类 KIRs 的非限制性代表性 GenBank 入口有下列登记号 :KIR2DL1 :Genbank 登记号 U24076、NM_014218、AAR16197 或 L41267 ;KIR2DL2 :Genbank 登记号 U24075 或 L76669 ;KIR2DL3 :Genbank 登记号 U24074 或 L41268 ;KIR2DL4 :Genbank 登记号 X97229 ;KIR2DS1 :Genbank 登记号 X89892 ;KIR2DS2 :Genbank 登记号 L76667 ;KIR2DS3 :Genbank 登记号 NM_012312 或 L76670（剪接变体）;KIR3DL1 :Genbank 登记号 L41269 ;和 KIR2DS4 :Genbank 登记号 AAR26325。KIR 可以含有从 1 到 3 细胞外域，并可有长（也就是超过 40 个氨基酸）或短（也就是少于 40 个氨基酸）的胞质尾区。在本文如前所述，这些特征决定了

KIR 的命名。代表性的 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3 和 KIR2DS4 分子分别含有下列氨基酸序列：

[0051] KIR2DL1 胞外域：

[0052] HEGVHRKPSLLAHPGXLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLLHREGMFNDTLRLIGEHHDGVSKANFSISRM TQDLAGTYRCYGSVTHSPYQVSAPSDPLDIVIIGLYEKPSLSAQXGPTVLAGENVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAH ERRLPAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFHDSPYEWSKSSDPLLVSVTGNPSNSWPSPTEPSSKTGNPRHL H(SEQ ID NO:23)，其中“X”在 16 位为 P 或 R，并且其中“X”在 114 位为 P 或 L，代表等位基因变体。

[0053] KIR2DL2 胞外域：

[0054] HEGVHRKPSLLAHPGRLVKSEETVILQCWSDVRFEHFLLHREGKFKDTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPM MQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAH ECRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVIGNPSNSWPSPTEPSSKTGNPRHL H(SEQ ID NO:24)

[0055] KIR2DL3 胞外域：

[0056] HEGVHRKPSLLAHPGPLVKSEETVILQCWSDVRFQHFLLHREGKFKDTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPM MQDLAGTYRCYGSVTHSPYQLSAPSDPLDIVITGLYEKPSLSAQPGPTVLAGESVTLSCSSRSSYDMYHLSREGEAH ERRFSAGPKVNGTFQADFPLGPATHGGTYRCFGSFRDSPYEWSNSSDPLLVSVTGNPSNSWPSPTEPSSETGNPRHL H(SEQ ID NO:25).

[0057] KIR2DS4 胞外域：

[0058] QEGVHRKPSFLALPGHLVKSEETVILQCWSDVMFEHFLLHREGKFNNTLHLIGEHHDGVSKANFSIGPM MPVLAGTYRCYGSVPHSPYQLSAPSDPLDMV(SEQ ID NO:38)

[0059] 术语“KIR2DL2/3”指的是 KIR2DL2 和 KIR2DL3 两个受体或其任一受体。这两个受体具有很高的同源性，它们是相同基因的等位基因形式，并且本领域技术人员认为功能上是相似的。

[0060] 除非另有说明，术语“MHC”包含所有哺乳动物的 MHC 分子，而“HLA”分子指的是人类 MHC 分子。

[0061] 在本发明上下文中，声明抗体“结合”决定簇（也就是在抗体上下文中单词“结合”：决定簇相互作用）指的是抗体带有特异性和 / 或亲和力结合决定簇。例如 GL183 是结合 KIR2DL2/3 的常规单克隆抗体。EB6 是结合 KIR2DL1 的常规单克隆抗体。EB6 和 GL183 两个可以在商业上取得 (Beckman Coulter Inc.，Fullerton，CA)。

[0062] “交叉反应性”抗 -KIR 抗体是带有特异性和 / 或亲合性结合超过一个 KIR 分子的抗体。例如，DF200 和 1-7F9 是与 KIR2DL1、-2 和 -3 交叉反应的单克隆抗体。产生抗体 DF200 的杂交瘤已经在 CNCM 培养物收集中心保藏，鉴定号″ DF200″，注册号 CNCM I-3224，2004 年 6 月 10 日注册，Collection Nationale de Cultures deMicroorganismes，Institut Pasteur，25，Rue du Docteur Roux，F-75724Paris Cedex 15，法 国。NKVSF1，在本文也称“Pan2D”，与 KIR2DL1、-2 和 -3 和 KIR2DS4 交叉反应。该抗体可从 Serotec(CergySainte-Christophe，France) 商业获得，目录参考号码为 MCA2243。

[0063] “特异结合”或“特异性”指抗体或其他物质可检测到的结合存在于抗原，例如 KIR 上的表位的能力，而同其他蛋白质或结构（例如存在于 NK 细胞，或其他细胞类型上的其

他蛋白质）有相对很小的可检测到的反应性。特异性可以通过结合或竞争性结合试验，使用例如在本文别处描述的 Biacore 仪器，相对地进行确定。在结合特异性抗原相对非特异性结合其他不相关分子（在这种情况下特异性抗原是 KIR），特异性可以通过例如大约 10 ： 1、大约 20 ： 1、大约 50 ： 1、大约 100 ： 1、10000 ： 1 或更大比率的亲和力 / 亲合力来显示。对存在于特殊生物，例如人类的 NK 细胞上 KIR 特异的 KIR 结合抗体，有时可以显示对其他物种类似的 KIRs 结合（也就是，KIR 结合抗体，或其他 KIR 结合性物质，可以与不同物种的 KIRs 交叉反应）。

[0064] “选择性”指的是与一个或多个其他生物学分子、结构、细胞、组织等对比，蛋白质优先结合特殊区域、靶标或肽。KIR 结合抗体对在特殊生物中（例如与在灵长类中对比，在人类中）产生的 KIR，和 / 或对特殊类型的 KIR（例如带有长胞质尾区的 KIR），特别是该抗体与在特殊生物中产生的超过一种类型的 KIR 交叉反应，和 / 或 KIR 的特殊部分（例如特殊表位或抗原决定簇区域）也可以是选择性的。例如，选择性可以通过竞争性 ELISA 或 Biacore 测试进行确定。标记选择性的亲和力 / 亲合力中差异可以是任意可检测到的优选（例如，超过 1 ： 1.1，或超过大约 1 ： 5 的比率，如果可检测到，将是适合的，包括 1 ： 10、1 ： 100、1 ： 1000 或更多）。除非另有说明，在本文介绍的对“亲和力”的任何定量资料指的是二价（与单价对比）结合的测量。

[0065] “表位”或“结合部位”是抗原上抗原结合肽（例如抗体）特异地结合的范围或区域。蛋白质表位可以含有直接参与结合的氨基酸残基（也称作表位的优势免疫成分）和其他氨基酸残基，其不直接参与结合，例如由特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基（换句话说，氨基酸残基是在特异性抗原结合肽的“足迹”内）。根据本发明，在本文术语表位包括 KIR 的任意特殊区域中两种类型的氨基酸结合部位，该部位特异地结合抗 KIR 抗体，或另外的 KIR 特异性物质，除非另作说明（例如，在本发明的一些上下文中涉及直接结合特殊氨基酸残基的抗体）。KIRs 可以含有许多不同的表位，其可以包括，不限于，(1) 线型肽抗原决定簇，(2) 在成熟 KIR 构象中，由一个或多个位置互相接近非毗连氨基酸组成的构象抗原决定簇；和 (3) 翻译后抗原决定簇，其存于共价连接到 KIR 的在全部或部分分子结构中，例如碳水化合物基团。

[0066] 短语第一抗体与第二抗体结合“实质上”或“至少部分地”相同表位，意思是第一抗体的表位结合部位含有构成第二抗体表位结合部位的至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更多抗原上的氨基酸残基。同样，如上所述，第一抗体与第二抗体结合实质上或部分相同的表位，意思是在结合抗原时第一和第二抗体竞争。因而，术语与单克隆抗体 1-7F9 一样“结合实质上相同的表位或决定簇”，意思是抗体与 1-7F9 “竞争”。通常，与目标单克隆抗体结合“实质上相同表位或决定簇”的抗体（例如 DF200、NKVSF1、1-7F9），意思是抗体与所述目标抗体“竞争”结合一个或多个 KIR 分子，优选地选自由 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 组成组的 KIR 分子。在另一个例子中，与目标抗体结合 KIR2DL1 分子上的实质上相同表位或决定簇的抗体与目标抗体“竞争”结合 KIR2DL1。与目标抗体结合 KIR2DL2/3 分子上的实质上相同表位或决定簇的抗体与目标抗体“竞争”结合 KIR2DL2/3。

[0067] 短语与目标抗体“结合基本上相同的表位或决定簇”，意思是抗体与所述目标抗体“竞争”与所述目标抗体特异地结合的至少一个，或任意和所有 KIR 分子。短语与单克隆抗体 1-7F9 “结合基本上相同的表位或决定簇”，意思是抗体与 1-7F9 “竞争”与 1-7F9 特异地

结合的至少一个，优选地任意和所有 KIR 分子。例如，与单克隆抗体 1-7F9 或 NKVSF1 结合基本上相同的表位或决定簇的抗体能分别地与所述 1-7F9 或 NKVSF1“竞争”结合 KIR2DL1、KIR2DL2/3、KIR2DS1 和 KIR2DS2。

[0068] 抗 KIR 抗体“阻断”KIR 分子和 HLA 分子结合的能力意思是，在使用可溶性或细胞表面结合的 KIR 和 HLA 分子的试验中，抗体能以剂量依赖的方式可检测地降低 KIR 分子与 HLA 分子的结合，其中在缺乏抗体时，KIR 分子可检测地结合 HLA 分子。测定抗 KIR 抗体是否能够进行这种阻断的代表性的试验在实施例 8 中提供。

[0069] 抗 KIR 抗体“降低 KIR 抑制活性”、“促进 NK 细胞活性”、“促进 NK 细胞细胞毒性”、“促进 NK 细胞”、“加强 NK 细胞活性”、“加强 NK 细胞细胞毒性”或“加强 NK 细胞”的能力意思是当与抗体接触时，表达 KIR 的 NK 细胞能够裂解靶细胞，靶细胞在其表面表达为所述 KIR 配体的特殊 MHC 或 HLA I 类。例如，术语“NK 细胞毒性增强”意思为 NK 细胞毒性的任何实质性增强，或至少 5％、10％、20％、30％或更大的增强，例如，当与对照比较时，NK 细胞毒性至少增强大约 50％（例如，至少大约 60％、至少大约 70％、至少大约 80％、至少大约 85％、至少大约 90％，或至少大约 95％）。这包括，例如，当与对照比较时大约 55-100％、大约 65-100％、大约 75-100％、大约 80-100％或大约 90-100％ NK 细胞细胞毒性的增强。同样包括细胞毒性超过大约 100％、超过大约 500％、超过大约 1000％、超过大约 2000％或更高的增加。这可以例如在试验，例如标准细胞毒性试验中测量，其中在存在 NK 增强剂（例如抗 KIR mAb）比缺乏该增强剂（也就是对照）时，NK 细胞裂解靶细胞更高的数量，达到更高的百分比。

[0070] 如在本文使用，术语“中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性的抑制作用”或“中和 KIR 的抑制活性”意思是当用经典的细胞毒性的铬释放试验测量时，增加特异性裂解至超过大约 20％，优选地至少大约 30％，至少大约 40％，至少大约 50％，至少大约 100％或更多的以相同的效应物：靶细胞比率，用不能被它们的 KIR 阻断的 NK 细胞或 NK 细胞系获得的特异性裂解。“中和 KIR 介导的抑制作用”同样意思为在铬释放试验，或其他细胞毒性试验中，使用表达一种或几种抑制性 KIRs 的 NK 细胞克隆或转染子，和表达被 NK 细胞上的一种 KIRs 所识别的至少一个 HLA I 类等位基因的靶细胞，用抗体获得的特异性裂解超过大约 100％、优选地至少大约 101％、至少大约 150％、至少大约 200％或更多（例如大约 101-150％、大约 120-150％、大约 120-200％、大约 150-200％或大约 200-1000％），或更多的用相同浓度的 NKVSF1（可从 Serotec 商业上获得），使用相同的 NK 细胞和靶细胞，以相同效应物：靶细胞比率获得的特异性裂解。

[0071] 如在本文使用，术语“人类抗体”打算包括具有等于、基本上等于，或来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。这类人类抗体可以包括不是由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如通过体外随机或点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。然而，如在本文使用，术语“人类抗体”，不打算包括其中来源于另一哺乳动物物种种系，例如小鼠的 CDR 序列已经移植到人框架序列中的抗体。

[0072] 在本发明的上下文中，除非另作说明，“治疗”指的是预防、减轻、管理、治愈或减少疾病或障碍的一种或多种症状或临床相关表现，除非同上下文相矛盾。例如其中没有鉴定疾病或障碍的症状或临床相关表现的患者的“治疗”是预防性治疗，而其中已经鉴定疾病或障碍的症状或临床相关表现的患者的“治疗”通常不构成预防性治疗。尽管如此，应该理解

本发明不同的治疗和预防方法和使用方面在许多方面彼此不同（例如输送到受试者的化合物剂量、应用时机、应用动力等）而且可以各自认为是本发明独特的方面。

[0073] 在本发明的上下文中，“癌症”指的是任何肿瘤疾患，包括，但不限于这类细胞疾患象肉瘤、癌、黑色素瘤、白血病和淋巴瘤，其可以包括乳腺、头颈部、卵巢、膀胱、肺、咽、喉、食管、胃、小肠、肝、胰腺、结肠、女性生殖道、男性生殖道、前列腺、肾和中枢神经系统中的癌症。

[0074] 如在本文使用的术语“生物样品”包括但不限于来源于人类或非人类哺乳动物的生物流体（例如血清、淋巴和血液），细胞样品或组织样品（例如骨髓或肿瘤组织）。

[0075] 在两个氨基酸序列的上下文中，术语“实质上相同”意思是该序列，当最佳地比对时，例如通过使用默认间隙重量 (gap weights) 的 GAP 或 BESTFIT 程序，共有至少大约 50％、至少大约 60％、至少大约 70％、至少大约 80％、至少大约 90％、至少大约 95％、至少大约 98％或至少大约 99％的序列同一性。在一个具体实施方式中，位置不相同的残基，因保守氨基酸取代而不同（在本文在别处进一步描述）。序列同一性典型地使用序列分析软件进行测量。蛋白质分析软件，使用分配给不同的取代、缺失和其他修饰，包括保守性氨基酸取代的相似性测量，匹配相似序列。例如可公开取得的 GCG 软件包含序列例如″ Gap″和″ BestFit″，其能以默认的参数使用以确定密切相关的多肽，例如来自不同生物的物种的同源性多肽之间，或野生型蛋白质和其突变蛋白之间的序列同源性或序列同一性。见，例如 GCG 6.1 版。多肽序列也可以使用 FASTA，应用默认或推荐的参数进行比较。GCG 6.1 版，FASTA（例如 FASTA2 和 FASTA3）中的程序提供了查询和检索序列之间最佳重叠的区域的比对和序列同一性百分比 (Pearson，MethodsEnzymol. 1990 ；183 ：63-98 ；Pearson，Methods Mol. Biol. 2000 ；132 ：185-219)。当将序列与包含大量来自不同生物的序列的数据库进行比较时，另一个优选的算法是计算机程序 BLAST，特别是 blastp，使用默认参数。见，例如，Altschul 等，J. Mol. Biol. 1990 ；215 ：403-410 ；Altschul 等，Nucleic Acids Res. 1997 ；25 ：3389-402(1997) ；在本文通过参考将上述每一篇文献并入本申请。在两个实质上相同的氨基酸序列中，“对应的”氨基酸位置是通过在本文提及的任意蛋白质分析软件，使用默认参数比对的那些。

[0076] 如在本文使用的“1-7F9 样”或“1-4F1 样”抗体意思是 (1) 与分别含有 1-7F9 或 1-4F1 的 VH 和 VL 序列的抗体实质上结合相同表位的抗体，例如例如分别地为单克隆抗体 1-7F9 或 1-4F1，和 / 或 (2) 含有分别与 1-7F9 或 1-4F1 的 VH 和 VL 序列相同或实质上相同的 VH 和 VL 序列的抗体。

[0077] “保守性”氨基酸取代是其中氨基酸残基被有具有相似化学特性（例如，带电或疏水性）的侧链（“R- 基团”）的另外氨基酸残基取代的取代。通常，保守性氨基酸取代将不实质上改变蛋白质的功能特性。在通过保守性取代而导致氨基酸序列相互不同的情况下，序列同一性百分比可以因为取代的保守特性而向上调节校正。产生这种调整的方法对本领域的技术人员是众所周知的。见，例如，Pearson，MethodsMol. Biol. 1994 ；243 ：307-31。有相似化学特性的侧链的氨基酸基团的例子包括 1) 脂肪族侧链 ：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸 ；2) 脂肪族 - 羟基侧链 ：丝氨酸和苏氨酸 ；3) 包含酰胺的侧链 ：天冬酰胺和谷氨酰胺 ；4) 芳香侧链 ：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 ；5) 碱性侧链 ：赖氨酸、精氨酸和组氨酸 ；6) 酸性侧链 ：天冬氨酸和谷氨酸 ；和 7) 含硫侧链 ：半胱氨酸和蛋氨酸。代表性的保守氨

基酸取代基团包括：缬氨酸－亮氨酸－异亮氨酸、苯丙氨酸－酪氨酸、赖氨酸－精氨酸、丙氨酸－缬氨酸、谷氨酸－天冬氨酸和天冬酰胺－谷氨酰胺。

[0078] 发明详述

[0079] 本发明基于结合抑制性 KIRs 的新交叉反应性和中和抗体的产生，该抗体允许在人群中的大多数或所有个体中 NK 细胞的有效地活化。

[0080] 在本文所描述的是，例如结合 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 中的全部并通过阻断在这些 KIRs 和 HLA-C 之间的相互作用，加强 NK 细胞裂解活性的抗体。在本文将这类抗体称为“交叉反应和中和抗 KIR mAbs”。

[0081] 在特别方面，本发明涉及新的交叉反应性、中和性或交叉反应性和中和性二者、完全的人类抗 KIR 抗体，以及含有这种抗体的组合物和使用这种抗体或组合物的方法。这些抗体包括在申请于 2004 年 7 月 1 日的 PCT/DK2004/000470 中描述的人类抗体 1-7F9 和 1-4F1，在本文通过参考将其全部并入本申请。

[0082] 在本文描述的抗体、组合物和方法可以，除了其他方面之外，克服当前与 KIR 的治疗性调节和治疗性 NK 细胞活化有关的局限性，并提供附加的有利特征和益处。例如抗体能够与多种抑制性 KIRs 交叉反应并降低或中和他们的抑制信号，通过表达这种抑制性 KIR 受体的 NK 细胞，导致 NK 细胞细胞毒性的增强。与多种 KIR 基因产物交叉反应的能力可允许有效地使用本发明的抗体，在大多数或所有人类受试者中增加 NK 细胞活性，而没有预先测定受试者的 KIR 或 HLA 类型的负担或花费。在具体实施方式中，抗体不结合 KIR2DS4，因此避免了与活化 KIR2DS4 受体的中和有关的刺激性潜能的降低。另外地或可选择地，抗体不结合 KIR2DS3。

[0083] 关于本发明的抗体，从这种抗体中，不同的抗体片段和衍生物同样可以产生并用于在本文描述的相同或相似的目的，并且关于抗体所述的本发明的方面同等地应用于抗体片段和衍生物，除非另作说明或明显地与上下文相矛盾。换句话说，除非另外指出，在本文描述的本发明关于抗体的特征应该，也含蓄地被理解为描述关于抗体片段或衍生物的相似特征，其中抗体片段或衍生物就特异性来说有相似功能性。然而，应该认识到“全长”抗体和抗体“片段”，由于它们的生物学和物理化学特性可能明显不同，能被表征为本发明的区别性方面。

[0084] 本发明的一些抗体能表征为“人类”，其典型地与对于被施用该抗体的人类受试者对该抗体的免疫反应的低危险有关。在代表性的方面，描述了在实际上所有人中促进人类 NK 细胞的活化的分离的抗体。在代表性的具体实施方式中，抗体为人类抗体 1-7F9 或人 1-7F9 样抗体。

[0085] 抗体、其片段或衍生物能与 NK 细胞表面的至少两种抑制性 KIR 受体交叉反应，减少或中和 NK 细胞的抑制性信号，并加强 NK 细胞的活性。例如抗体、抗体片段或衍生物可以结合人 KIR2DL 受体的共同决定簇，所以抗体、抗体片段或衍生物结合至少 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 受体。为了本发明的目的，术语“KIR2DL2/3”指的是 KIR2DL2 和 KIR2DL3 受体中任一种和二者。

[0086] 如在本文描述，抗 KIR mAbs 1-7F9 和 1-4F1 相对于先前生产的抗 KIR 抗体有几个优势。例如 1-7F9 和 1-4F1 是完全人类的，因而一旦给受试者施用，减少或最小化任何针对抗体的免疫反应。此外，如下面所述，1-7F9 和 1-4F1 二者对于治疗性抗 KIR 抗体具有合适

的同种型（分别为 IgG4 和 IgG2）。在诱导表达 KIR2DL1、-2 和 / 或 -3 的 NK 细胞杀伤时，1-7F9 比鼠 mAbs EB6、GL183、DF200 和 NKVSF1(Pan2D) 还更加有效得多。例如，如图 5 和 6 所示，1-7F9 比 EB6、DF200 或 NKVSF1(Pan2D) 诱导更高的由表达 HLA-Cw4 的靶细胞的表达 KIR2DL1 的 NK 细胞产生的特异性裂解水平。1-7F9 与以前已知的抗 KIR mAbs 比较还具有更高的亲和力。例如，1-7F9 结合 KIR2DL1 和 KIR2DL3，其解离常数 (K_d' s) 分别为 0,43nM 和 0.025nM，表示对两种抗原的亲和力比，例如 DF200 更高（见实施例 3 和 8）。与鼠抗体 NKVSF1(Pan2D)、A210 和 A208g 相反，1-7F9 和 1-4F1 中没有一个结合 KIR2DS4，使其更好地适于治疗目的。如同 NKVSF1(Pan2D) 和 DF200，1-7F9 和 1-4F1 也结合 KIR2DS1 和 KIR2DS2，但认为 KIR2DS1 和 KIR2DS2 在抗白血病功效中是不重要的。因此根据本发明的特殊抗体具有与 1-7F9 和 / 或 1-4F1 相同或相似的抗原特异性。例如与 1-7F9 含有相同或相似的 VH 和 VL 区的抗体可以具有与 1-7F9 相同或相似的抗原结合和 / 或 NK 刺激性特性；并且与 1-4F1 含有相同或相似 VH 和 VL 区的抗体可以具有与 1-4F1 相同或相似的抗原结合特性。

[0087] 如图 14 所示，1-7F9 的 VL 和 VH 区的氨基酸序列已经确定：

[0088] 1-7F9VL 区 (SEQ ID NO:15)：

[0089] EIVLTQSPVTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWMYTFGQGTKLEIKRT

[0090] 1-7F9VH 区 (SEQ ID NO:17)：

[0091] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRVT ITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTTVTVSS

[0092] 1-4F1VL 和 VH 区的氨基酸序列分别以 SEQ ID NOS:39 和 41 提供，并且编码 1-4F1VL 和 VH 区的核苷酸序列分别以 SEQ IDNOS:40 和 42 提供。在一个具体实施方式中，SEQ ID NO:39 的残基 3、4、9、24、32、41、47、50、55、71 和 74 分别为 Q、L、S、R、A、G、L、D、E、F 和 A。在另一个具体实施方式中，SEQ ID NO:39 的残基 3、4、9、24、32、41、47、50、55、71 和 74 分别为 R、M、F、W、Y、A、F、Y、Q、Y 和 T。

[0093] 如图 15 所示，1-7F9CDRs 的氨基酸序列已经鉴定如下：轻链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:15 的残基 24-34；轻链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:15 的残基 50-56；轻链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:15 的残基 89-97；重链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:17 的残基 31-35；重链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:17 的残基 50-65；重链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:17 的残基 99-112。1-4F1CDRs 的氨基酸序列已经鉴定如下：轻链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:39 的残基 24-34；轻链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:39 的残基 50-56；轻链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:39 的残基 89-97；重链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:41 的残基 31-35；重链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:41 的残基 50-66；重链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO:41 的残基 99-113。

[0094] 完整的 1-7F9 轻和重链氨基酸序列分别以 SEQ ID NOS:36 和 37 提供。

[0095] 因此，基于该信息，另外的抗体，例如不同的人类抗体亚类、抗体片段、抗体衍生物和其它结合 KIR 的肽，可以通过例如重组技术容易地进行生产。例如，在一方面，本发明提供了具有分别基本上由 SEQID NO:15 和 SEQ ID NO:17 组成的 VL 和 VH 序列的抗体，和 / 或具有分别基本上由 SEQ ID NO:39 和 SEQ ID NO:41 组成的 VL 和 VH 序列的抗体。在另一

方面，本发明提供了含有基本上由上述描述的 1-7F9 或 1-4F1VH CDR1-3 和 VL CDR1-3 组成的 CDR 区的抗体。在另一方面，本发明提供了含有如下 CDR 区的抗体：轻链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：15 的大约残基 24-34；轻链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：15 的大约残基 50-56；轻链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：15 的大约残基 89-97；重链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：17 的大约残基 31-35；重链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：17 的大约残基 50-65 和重链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：17 的大约残基 99-112。在另一方面，本发明提供了含有如下 CDR 区的抗体：轻链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ IDNO：39 的大约残基 24-34；轻链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ IDNO：39 的大约残基 50-56；轻链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ IDNO：39 的大约残基 89-97；重链 CDR1 氨基酸序列对应于 SEQ IDNO：41 的大约残基 31-35；重链 CDR2 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：41 的大约残基 50-66 和重链 CDR3 氨基酸序列对应于 SEQ ID NO：41 的大约残基 99-113。在另一方面，本发明提供了含有基本上由 SEQID NO：15 的残基 24-34 组成的轻链 CDR1 氨基酸序列的抗体；含有由 SEQ ID NO：15 的残基 50-56 组成的轻链 CDR2 氨基酸序列基本上；含有基本上由 SEQ ID NO：15 的残基 89-97 组成的轻链 CDR3 氨基酸序列；含有基本上由 SEQ ID NO：17 的残基 31-35 组成的重链 CDR1 氨基酸序列；含有基本上由 SEQ ID NO：17 的残基 50-65 组成的重链 CDR2 氨基酸序列和重链 CDR3 氨基酸序列基本上由 SEQID NO：17 的残基 99-112 组成。在另一方面，本发明提供了含有如下 CDR 区的抗体：基本上由 SEQ ID NO：39 的残基 24-34 组成的轻链 CDR1 氨基酸序列；基本上由 SEQ ID NO：39 的残基 50-56 组成的轻链 CDR2 氨基酸序列；基本上由 SEQ ID NO：39 的残基 89-97 组成的轻链 CDR3 氨基酸序列；基本上由 SEQ ID NO：41 的残基 31-35 组成的重链 CDR1 氨基酸序列；基本上由 SEQ ID NO：41 的残基 50-66 组成的重链 CDR2 氨基酸序列；和基本上由 SEQ ID NO：41 的残基 99-113 组成的重链 CDR3 氨基酸序列。

[0096] 本发明也包含抗 KIR 抗体、抗体片段或抗体衍生物或结合 KIR 的多肽，其含有至少一个与 1-7F9 或 1-4F1VH 或 VL 序列，或与其中的 CDR- 区实质上相同的变异的氨基酸序列。变异的氨基酸序列可以含有或基本上由与 1-7F9 或 1-4F1CDR，VH 或 VL 区至少大约百分之 50、80、90、95、98 或 99（例如大约 50-99％、大约 65-99％、大约 75-99％或大约 85-99％）相同的氨基酸序列组成。变异的氨基酸序列也可以或可选择地含有 1、2 或 3 个 CDRs，其含有或由与 1-7F9 或 1-4F1CDRs 至少大约 80％、至少大约 90％或至少大约 95％相同的氨基酸序列组成。因而，在一方面，本发明提供了人类抗体，该抗体含有与 SEQ ID NO：15 或 SEQ ID NO：39 的残基 24-34 至少大约 80％、至少大约 90％或至少大约 95％相同的轻链 CDR1 氨基酸序列；与 SEQ ID NO：15 或 SEQ ID NO：39 的残基 50-56 至少大约 80％、至少大约 90％或至少大约 95％相同的轻链 CDR2 氨基酸序列；与 SEQ IDNO：15 或 SEQ ID NO：39 的残基 89-97 至少大约 80％、至少大约 90％或至少大约 95％相同的轻链 CDR3 氨基酸序列；与 SEQ IDNO：17 或 SEQ ID NO：41 的残基 31-35 至少大约 80％、至少大约 90％或至少大约 95％相同的重链 CDR1 氨基酸序列；与 SEQ IDNO：17 的残基 50-65 或 SEQ ID NO：41 的残基 50 到 66 至少大约 80％、至少大约 90％或至少大约 95％相同的重链 CDR2 氨基酸序列；与 SEQ ID NO：17 的残基 99-112 或 SEQ ID NO：41 的残基 99 到 113 至少大约 80％、至少大约 90％或至少大约 95％相同的重链 CDR3 氨基酸序列。1-7F9- 或 1-4F1- 衍生的结合 KIR 的氨基酸序列的基本特性（其保留在这种变异的氨基酸序列中）期望地包括 1-7F9 或 1-4F1 序列对一个或

多个 KIRs 的特异性和 / 或亲合力，并且还可以或可选择性地包括 1-7F9 在阻断 KIR/HLA-C 相互作用并加强 NK 细胞的裂解活性中的能力。

[0097] 在另一方面，本发明提供了抗 KIR 抗体、抗体片段、或抗体衍生物、或结合 KIR 的多肽，其包含结合 KIR 的氨基酸序列，该氨基酸序列通过一个或多个的残基插入、缺失和 / 或取代，在一个或多个氨基酸残基（例如至少 2、3、5，至少大约 10、至少大约 15、至少大约 20、至少大约 25、至少大约 30、至少大约 35、至少大约 40、至少大约 50 或更多个的氨基酸残基）与 1-7F9 或 1-4F1 结合 KIR 的序列不同。在一个具体实施方式中，这种变异的结合 KIR 的序列给予了变异序列更大的亲和力；更大或不同的特异性；更小的免疫原性（根据对该序列的宿主反应）；在体内更大的稳定性；和 / 或相对于含有天然 1-7F9 或 1-4F1 序列的基本相同氨基酸序列的其它有益特性。在本文别处进一步描述了适当的序列变异。抗 KIR 抗体、抗体片段、或抗体衍生物、或结合 KIR 的多肽的结合 KIR 的部分也可以含有任意适当数量的非氨基酸成分或取代基，例如非氨基酸有机部分，其促进 KIR 结合和 / 或提供其它有利的物理化学或免疫学特性。

[0098] 本发明的一些抗体还可以或选择性地通过其对一个或多个 KIRs 的结合亲和力表征。例如如在实施例 3 和 8 中所示，根据二价结合，DF200 对 KIR2DL1 的 K_d 为大约 11nM；和对 KIR2DL3 的 K_d 为大约 2.0nM，和 1-7F9 对 KIR2DL1 的 K_d 为大约 0.43nM，对 KIR2DL3 的 K_d 为大约 0.025nM。因此，在一方面，本发明提供了在与 KIR2DL1 二价结合中，K_d 不大于大约 20nM、不大于大约 11nM、不大于大约 5nM、不大于大约 1nM、不大于大约 0.5nM 或不大于大约 0.43nM 的人类或非人类（例如鼠、嵌合的或人源化的）抗体。另外地或可选择地，本发明的人类或非人类（例如鼠、嵌合的或人源化的）抗体对 KIR2DL3 的 K_d 可能不大于大约 20nM、不大于大约 2nM、不大于大约 1nM、不大于大约 0.1nM、或不大于大约 0.05nM 或不大于大约 0.025nM。在特殊方面，该抗体对 KIR2DL1 和 KIR2DL3 的二价结合的 K_d 值与 1-7F9 大约相同。如在实施例 13 所示，根据单价结合，1-7F9 和 1-4F1 对 KIR2DL3 的 K_d 值分别为大约 3.5 和 7nM。因此，在一方面，本发明提供了人类或非人类（例如鼠、嵌合的或人源化的）抗体，其单价结合 KIR2DL3 的 K_d 不大于大约 20nM、不大于大约 10nM、不大于大约 7nM 或不大于大约 3.5nM。

[0099] 在适当条件（例如，关于温度、pH 等，其将典型地反应人类正常或 NK 细胞相关疾病状态下，并且在含有所述序列或组合的合适的蛋白质的上下文中的生理状态）下，抗 KIR 抗体、抗体片段、或抗体衍生物、或结合 KIR 的多肽选择地和 / 或特异地（典型地特异地）结合至少一种 KIR，并且更特殊地结合至少一种 KIR 的抗原决定簇区或表位。例如，在一方面，本发明涉及可以用（除了其它事情之外）与 1-7F9、1-4F1 或 1-7F9- 或 1-4F1 样抗体竞争的能力表征的抗体，和涉及该抗体的不同方法。本发明的其它抗体（和 / 或在实践在本文描述创造性方法中有用的抗体）还可以或可选择地在具有与抗体 DF200、抗体 NKVSF1、抗体 EB6 和抗体 GL183 中的一个或多个竞争的能力方面进行表征。

[0100] 通过特异地抑制 MHC 和 / 或 HLA 分子结合至少两种抑制性 KIR 受体并促进 NK 细胞活性，本发明的交叉反应性和中和性抗 KIR 抗体、抗体片段或衍生物降低或中和 KIR 的抑制活性，这意思是指这类抗体、片段或衍生物允许在其表面表达抑制性 KIR 受体的 NK 细胞能裂解细胞，该细胞表达与所述特殊的抑制性 KIR 受体相应的 HLA 配体（例如特殊的 HLA 抗原）。在一方面，本发明提供了特异性抑制 HLA-C 分子与 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 受体结

合的抗体。在另一方面，本发明提供了抑制KIR2DL1和/或KIR2DL2/3结合HLA-C的抗体。还有另一方面，本发明提供了在体内和/或体外促进NK细胞活性的抗体。

[0101] KIR2DL1或KID2DL2/3的至少一个存在于至少90％或更多的人口中，并且本发明更优选的抗体能加强表达这些KIR任一或二者的NK细胞活性。因此，本发明的组合物可以在大多数的人类个体中，典型地在大约90％或更多的人类个体中，用于有效地活化或加强NK细胞。因此，根据本发明的单一抗体组合物可以用于治疗大多数人类受试者，并且很少需要确定KIR-或HLA-等位基因组或使用两个或更多个抗KIR mAbs的混合物。

[0102] 在一方面，抗体特异地结合KIR2DL1和KIR2DL2/3两个人类受体，并且逆转由这些KIRs介导的NK细胞细胞毒性抑制。抗体同样可以为人类而且与单克隆抗体1-7F9和/或1-4F1竞争。术语“竞争”当指的是特殊的成对抗体（例如选自DF200、NKVSF1(Pan2D)、1-7F9、EB6和GL183的一个或更多抗体）时，意思是在结合试验中，使用重组KIR分子或细胞表面表达的KIR分子，第一抗体可检测地与第二抗体（或其它分子）竞争。例如，在一方面，不管那个抗体用作第一抗体，当对某抗体对的抑制百分比超过大约20％、超过大约30％、超过大约40％、超过大约50％时，该抗体竞争。可选择地，如果对某抗体对的抑制作用百分比平均为至少大约29％、至少大约30％、至少大约40％或至少大约50％，该抗体竞争。第一抗体对第二抗体结合KIR2D蛋白质的抑制百分比可以按照100 *（1-（检测到的结合第二抗体）/（检测到的第一抗体的结合））计算。相同的应用于抗体片段和抗体衍生物。除非另有说明，与1-7F9、1-4F1或1-7F9-或1-4F1样抗体“竞争”的抗体可以与1-7F9、1-4F1或1-7F9-或1-4F1样抗体竞争结合人类KIR2DL1、人类KIR2DL2/3或人类KIR2DL1和KIR2DL2/3二者。例如，抗体DF200与1-7F9和1-4F1竞争结合到KIR2DL3。

[0103] 任选地，与1-7F9或1-4F1竞争的抗体分别地不是1-7F9或1-4F1自身（也就是本发明提供了不是1-7F9和1-4F1的抗体，其特征为，尤其是在结合这些KIRs中的一个或两个中与1-7F9和/或1-4F1竞争的能力）。

[0104] 在另一方面，该抗体结合KIR2DL1和KIR2DL2/3两个人类受体，降低或中和或逆转这些KIRs介导的NK细胞细胞毒性的抑制，并且与1-7F9竞争结合KIR2DL1人类受体，KIR2DL2/3人类受体，或KIR2DL1和KIR2DL2/3两个人类受体。任选地，所述抗体为嵌合的、人类的或人源化抗体。

[0105] 在另一方面，抗体结合KIR2DL1和KIR2DL2/3两个人类受体，降低或中和或逆转这些KIRs介导的NK细胞细胞毒性的抑制，并且与EB6竞争结合KIR2DL1人类受体，或与GL183和/或DF200竞争结合KIR2DL2/3人类受体，或既与EB6竞争结合KIR2DL1人类受体而且又与GL183和/或DF200竞争结合KIR2DL2/3人类受体。在一个具体实施方式中，抗体不是NKVSF1(Pan2D)，不是A210，不是A803g和/或不是DF200。抗体可以是例如鼠的、嵌合的、人类的或人源化抗体。

[0106] 在另一方面，抗体含有至少实质上与1-7F9或1-4F1的VH和/或VL区相同的VH，VL，或VH和VL两个区。抗体可以具有任意亚类，包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在特殊方面，抗体为人类IgG4抗体。在另外特殊方面，抗体为人类IgG2抗体。抗体可以为嵌合的、人类的或人源化的抗体。

[0107] 在另一方面，抗体为人类的，与1-7F9或1-4F1竞争，并且如单克隆抗体1-7F9或1-4F1，对至少部分相同或相同KIR分子上的表位或“表位部位”识别、结合或具有免疫特异

性。优选地，所述 KIR 分子为人类 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 受体。

[0108] 在另一方面，抗体结合存在于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 两个人类受体中的共同决定簇，并且降低、中和或逆转这些 KIRs 介导的 NK 细胞细胞毒性的抑制作用。如单克隆抗体 1-7F9，抗体可更加特异地结合至少部分相同、实质上相同，或相同的 KIR 上的表位。

[0109] 在特殊方面，抗体为显示一个或更多上述特征的单克隆抗体。

[0110] 在另一方面，在本文描述的抗体的功能性片段和衍生物可以进行制备，其有实质相似的抗原结合、特异性和 / 或活性，包括不限于 Fab 片段、Fab' 2 片段、免疫粘附素、双抗体、camelized 抗体、Janusins、小体、CDRs 和 ScFv 片段。

[0111] 除非另有说明，抗体或其二价片段或衍生物是单特异性的，也就是抗体，片段，或衍生物的两个“臂”结合相同抗原。

[0112] 在还有另外的方面，可以制备含有本发明抗体、缀合或共价结合毒素、放射性核素、可检测到的部分（例如氟石）或固体载体的抗体衍生物。

[0113] 本发明也包含含有上述公开的抗体，其片段，或其任一衍生物的药物组合物。因此，本发明也涉及在本文公开的抗体在生产药物方法中的用途。在优选的具体实施方式中，药物或药物组合物用来治疗癌症或其它增殖性障碍、感染或用于移植。

[0114] 在一方面，本发明涉及含有抗体的组合物（例如为药物施用配制的组合物，制备这种组合物的试剂盒，分析试剂盒或介质，纯化介质等），其中所述抗体结合至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物，并能中和 KIR 介导的 NK 细胞的抑制细胞毒性，该 NK 细胞表达至少所述两种不同人类抑制性 KIR 受体中的一种，其中抗体合并入脂质体中。脂质体也可以含有附加物质，例如例如，传输基因用于基因治疗的核酸分子；传输反义 RNA，RNAi，或 siRNA 来抑制 NK 细胞中基因的核酸分子；或用来 NK 细胞靶向杀伤的毒素或药物。

[0115] 在本文也描述了在体外、离体或在体内调节人类 NK 细胞活性的方法，它包括用有效量的本发明抗体、这种抗体的片段、其任一的衍生物，或包含其任意至少一种的药物组合物接触人类 NK 细胞。优选的方法包括施用有效量的本发明药物组合物并指向增加人类 NK 细胞的细胞毒活性，最优选离体或在体内，在患有癌症、感染性疾病或免疫疾病的受试者中。例如，施用可以通过给有癌症或感染性疾病（例如病毒病）的患者静脉内输注在适当缓冲剂中的抗体来实现。

[0116] 本发明也提供了组合物，该组合物含有结合至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的抗体，其中抗体能中和在表达该两种不同的人类抑制性 KIR 受体中的至少一种的 NK 细胞中 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性的抑制作用，该抗体以可以以有效可检测地加强患者或含有 NK 细胞的生物样品中的 NK 细胞细胞毒性的量存在；和药学上可接受的载体或赋形剂。优选地，该抗体结合存在于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 上的共同决定簇。含有本发明抗体的组合物可以任选地进一步含有第二种治疗药（诱导、促进和 / 或增强宿主中的疗效的药剂，该宿主与为之而施用抗体的病症或障碍相关 - 例如与癌症、移植、感染性疾病、病毒感染等相关的病症）。在一方面，可以与本发明的抗体以这种联合组合物共同施用的第二治疗药可以选自，例如免疫调节剂、激素药剂、化学治疗剂、抗血管生成剂、凋亡剂、对非 KIR 抗原特异的第二抗体，任选地结合并抑制并中和抑制性 KIR，或减少来自抑制性 KIR 的信号的第二抗体，抗感染剂、靶向剂或辅助化合物。有利的免疫调节剂可以选自 IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、

TGF-β、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF-α、TNF-β、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN-α、IFN-β 或 IFN-γ。化学治疗剂的例子包括烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、阿霉素、放线菌素 D、丝裂霉素、洋红霉素、道诺霉素、阿霉素、他莫昔芬、紫杉醇、泰索帝、长春新碱、长春碱、长春烯碱、依托泊苷 (VP-16)、5- 氟尿嘧啶 (5FU)、阿糖胞苷、环磷酰胺、三胺硫磷、甲氨蝶呤、喜树碱、放线菌素 -D、丝裂霉素 C、顺铂 (CDDP)、氨喋呤、考布他汀、其它长春花属生物碱类 (alkyloids) 和其衍生物或前药。激素药剂的例子包括亮丙瑞林、戈舍瑞林、曲普瑞林、布舍瑞林、他莫昔芬、托瑞米芬、氟利坦、尼鲁米特、环丙孕酮酯比卡鲁胺阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、甲羟 (medroxy) 法倔唑、氯地孕酮、甲地孕酮、其它 LHRH 激动剂、其它抗雌激素类、其它抗雄激素、其它芳香酶抑制剂和其它结合孕激素类。优选地，结合和抑制抑制性 KIR 受体的第二抗体是结合抑制性 KIR 受体的表位的抗体或其衍生物或片段，该表位不同于与存在于至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物上的共同抗原决定簇结合的抗体结合的表位。在另一方面，第二抗体可以指向与疾病状态相关的靶标，该疾病状态通过施用本发明的抗体至少可部分地治疗（例如与癌症相关的抗原，病毒感染相关抗原等）。

[0117] 本发明进一步提供了在需要其的患者中可检测地加强 NK 细胞活性的方法，它包括给患者施用根据本发明的组合物的步骤。需要 NK 细胞活性增强的患者可以为诊断为患有疾病或障碍的任何患者，在该疾病或障碍中这种增强可以促进、增强和 / 或诱导疗效（或促进、增强和 / 或诱导这样一种效果，至少在相当比例的患有所述疾病或障碍和与所述患者实质上相似特征的患者中 - 如可以通过例如临床试验确定）。需要这种治疗的患者可以患有，例如癌症、另外的增殖性障碍、感染性疾病或免疫障碍。优选地，该方法包括给患者施用适当的附加治疗药的附加步骤，该附加的治疗药选自免疫调节剂、激素药剂、化学治疗剂、抗血管生成剂、凋亡剂、对不同于 KIR 的抗原特异的第二抗体，任选地结合并抑制并中和抑制性 KIR 受体，或减少来自抑制性 KIR 的信号的第二抗体、抗感染剂、靶向剂或辅助化合物，其中所述附加治疗药作为与所述抗体一起的单一剂量形式或作为分离的剂量形式给所述患者施用。抗体（或抗体片段 / 衍生物）的剂量和附加治疗药的剂量共同地足够可检测地诱导、促进和 / 或增强患者的治疗反应，其包含 NK 细胞活性的增强。当分别地施用时，抗体、片段或衍生物和附加治疗药是在对患者引起可检测到的联合治疗益处的情况下合乎需要地施用。

[0118] 本发明进一步包括能在非人类灵长类，优选猴中特异地结合 NK 细胞和 / 或 KIR 受体的抗体。也包括用来评价为候选药物的本发明抗体的毒性、剂量和 / 或活性或功效的方法。在一方面，本发明包括通过对具有 NK 细胞的非人类灵长类动物接受者施用本发明的抗体，并评价该药剂对动物或优选地对靶组织的任何有毒的或有害的或不良效果，来确定对动物或靶组织有毒的抗体剂量的方法。在另一方面，本发明是通过对具有 NK 细胞的非人类灵长类动物接受者施用本发明的抗体，并评价该药剂对动物或优选地对靶组织任何有毒的或有害的或不良效果，来鉴别对动物或靶组织有毒的抗体的方法。在另一方面，本发明是用来鉴别有效治疗感染、疾病或肿瘤的抗体的方法，其是通过给非人类灵长类感染、疾病或癌症模型施用本发明的抗体，并鉴别改善感染、疾病或癌症，或其症状的抗体进行的。在一个实施方式中，本发明所述抗体是 (a) 与人类 NK 细胞表面上至少两种抑制性人类 KIR 受体交叉反应的抗体，和 (b) 与非人类灵长类的 NK 细胞或 KIR 受体交叉反应的抗体。

[0119] 本发明进一步包括在生物样品或活生物中，检测在其细胞表面上具有抑制性 KIR 的 NK 细胞存在的方法，所述方法包括如下步骤：

[0120] a) 用本发明的抗体接触所述生物样品或活体，其中所述抗体缀合或共价结合可检测的部分；并且

[0121] b) 在所述生物样品或活生物中检测所述抗体的存在；

[0122] 本发明也提供了从样品中纯化在其细胞表面上具有抑制性 KIR 的 NK 细胞的方法，它包括如下步骤：

[0123] a) 在允许所述在其细胞表面上具有抑制性 KIR 的 NK 细胞结合所述抗体的条件下，用本发明的抗体接触所述样品，其中所述抗体缀合或共价结合到固体载体（例如，珠，基质等）；并且

[0124] b) 从所述缀合或共价结合到固体载体的所述抗体中，洗脱所述结合的 NK 细胞。

[0125] 已发现，抗体 NKVSF1(Pan2D) 也结合来自猕猴的 NK 细胞，见图 10。

[0126] 因此本发明提供抗体，以及其片段和衍生物，其中所述抗体、片段或衍生物与人类 NK 细胞表面上的至少两种抑制性人类 KIR 受体交叉反应，并且此外它还结合来自猕猴的 NK 细胞。在这方面的一个实施方式中，抗体不是抗体 NKVSF1、不是 A210 和 / 或不是 A802g。本发明也提供了测试抗体、以及其片段和衍生物毒性的方法，其中所述抗体、片段或衍生物与在人类 NK 细胞表面上的至少两种抑制性人类 KIR 受体交叉反应，其中该方法包含检测猕猴中的抗体。

[0127] 在进一步方面，本发明提供了抗体、抗体片段或其任一的衍生物，其包含抗体 1-7F9 或 1-4F1 的轻链可变区或一个或更多的轻链可变区 CDRs。还有另一方面，本发明提供了抗体、抗体片段或其任一的衍生物，其包含与 1-7F9 或 1-4F1 的全部或基本全部轻链可变区序列高度相似的序列。

[0128] 在进一步方面，本发明提供了抗体、抗体片段或其任一的衍生物，其包含抗体 1-7F9 或 1-4F1 的重链可变区或一个或更多的重链可变区 CDRs。还有另一方面，本发明提供了抗体、抗体片段或其任一的衍生物，其包含与 1-7F9 或 1-4F1 的全部或基本全部重链可变区序列高度相似的序列。

[0129] 抗体

[0130] 本发明提供了新的抗体和其片段或衍生物，其结合在人类抑制性 KIR 受体中保受的的共同决定簇，优选地包括存在于至少两种不同的 KIR2DL 基因产物上，但是不在 KIR2DS4 上的决定簇，并且其引起表达至少那些 KIR 受体之一的 NK 细胞的增强。本发明首次公开了，可以生产这种交叉反应和中和抗体，并有效地用于 NK 细胞活性的调节，其代表意想不到的结果并打开了一条通往新的和有效的基于 NK 的治疗，特别是在人类受试者中的治疗的大道。

[0131] 在本发明的上下文中，“共同决定簇”表示由人类抑制性 KIR 受体的多种基因产物共享的决定簇或表位。优选地，共同决定簇由 KIR2DL 受体群的至少两个成员共享。更优选地，决定簇由至少 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 共享。本发明的某些抗体，可以除了识别 KIR2DL 类型的多种基因产物之外，也识别存在于其他抑制性 KIRs 上的决定簇，例如 KIR3DL 受体群的基因产物；例如 KIR3DL1 和 / 或 KIR3DL2。决定簇或表位可以代表由所述成员共享的肽片段或构象表位。在更为具体的实施方式中，本发明的抗体特异地结合单克隆抗体 DF200 识

别的实质上相同的表位。该决定簇存在于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 二者上。在另一个优选的具体实施方式中，本发明抗体特异地结合由人类 mAb 1-7F9 识别的实质上相同表位，或人类 mAb 1-4F1 识别的表位，所述表位存在于 KIR2DL1、-2 和 -3 上，但不在 KIR2DS4 上。

[0132] 除非另作说明或明显地与上下文相矛盾，如在本文所使用，术语“抗体，”指的是多克隆和单克隆抗体，以及所述多克隆和单克隆抗体的片段和衍生物。根据重链恒定区的类型，全长抗体典型地分配到五个主要类型之一：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。这些中的几个进一步分为亚类或同种型，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为“α、”δ、”“ε、”“γ”和“μ”。不同类的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型已经众所周知。IgG 和 / 或 IgM 为本发明中使用的优选种类抗体，因为它们是生理状态下最普通的抗体，并且因为它们最易于在实验室环境中制备。典型地，本发明上下文中的“抗体”指的是单克隆抗体，更优选“人类”单克隆抗体。

[0133] 为了治疗目的，本发明的一个具体实施方式提供了阻断抑制性 KIR 和其在体内对应的 HLA 配体相互作用的方法，其包括内源性 NK 细胞的活化。在这种环境中，避免耗尽 NK 细胞可能是有利的，因为如果耗尽，NK 细胞不能发挥其治疗的有益效果。因此，抗体同种型例如 IgG4 和 IgG2，其显示对 Fc- 受体的很少结合，并且不活化补体系统，为典型的优选。1-7F9 的同种型为 IgG4。也通常认为 IgG2 抗体是非耗尽的，并可能也是比 IgG4 抗体更稳定的分子，因此具有更长的体内半衰期。1-4F1 是 IgG2 同种型。

[0134] 抗体生产

[0135] 本发明的抗体可以通过本领域已知的多种技术进行生产。典型地通过用包含抑制性 KIR 多肽，优选 KIR2DL 多肽，更优选人类 KIR2DL 多肽的免疫原免疫非人类动物，优选小鼠进行生产。抑制性 KIR 多肽可以含有人类抑制性 KIR 多肽的全长序列，或其片段或衍生物，典型地为免疫原性片段，也就是含有暴露在表达抑制性 KIR 受体的细胞表面上的表位的多肽部分。这种片段典型地包含成熟多肽序列的至少大约 7 个连续氨基酸，甚至更优选地它的至少大约 10 连续的氨基酸。典型地，片段基本上来源于受体的胞外域。甚至更优选的是人类 KIR2DL 多肽，其包括至少一个，更优选地两个全长 KIRDL 多肽的细胞外免疫球蛋白域，并且能模仿存在于 KIR2DL 受体内至少一个构象表位。在其他具体实施方式，所述多肽含有 KIR2DL1 多肽的 1-224 位氨基酸的细胞外免疫球蛋白域的至少大约 8 个连续氨基酸（根据 Wagtmann 等，Immunity 1995 ;2 :439-449 的氨基酸编号，其在本文通过参考以其全部并入本申请，或根据在万维网 (www) 地址 ncbi.nlm.nih.gov/prow/guide/1326018082.htm 发现的 PROW 互联网站点）。

[0136] 在一个具体实施方式中，免疫原含有脂膜中，典型地在细胞表面上的野生型人类 KIR2DL 多肽。在特殊的具体实施方式中，免疫原含有完整的 NK 细胞，特别是完整的人类 NK 细胞。在另一个具体实施方式中，细胞经过裂解和以其它方式被处理，以致不是完整的。在给非人类哺乳动物，例如小鼠、兔、山羊、马、狗、绵羊、豚鼠、大鼠、仓鼠等施用前，免疫原可以，例如悬浮或溶解于缓冲液中，该缓冲液任选地含有佐剂，例如完全弗氏佐剂。

[0137] 用抗原免疫非人类哺乳动物的步骤可以以本领域众所周知的任何刺激小鼠中抗体的产生的方式进行（见，例如 E.Harlow 和 D.Lane,Antibodies :A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor LaboratoryPress,Cold Spring Harbor,NY(1988)）。然后免疫原悬浮或溶解于缓冲液，任选地有佐剂，例如完全弗氏佐剂。确定免疫原数量、缓冲液类型和佐

剂数量的方法对本领域技术人员是众所周知的，并且不以任何方式对本发明进行限制。这些参数对不同的免疫原可以是不同的，但可容易地阐明。

[0138] 相似地，与足够刺激抗体产生的免疫部位和频率的选择相关的原理，在本领域也是众所周知的。在有代表性的免疫方案中，在第一天和大约一周后再次用抗原腹膜内注射非人类动物。然后在大约 20 天，任选地与不完全弗氏佐剂一起，恢复注射抗原。该恢复注射静脉内进行而且可以重复几个连续日。然后在第 40 天，静脉内或腹膜内，典型地不用佐剂，加强注射。该方案导致大约 40 天后产生抗原特异的产生抗体的 B 细胞。也可以应用其他的方案，只要他们导致表达抗体的 B 细胞的产生，该抗体针对在免疫中使用的抗原。

[0139] 对于多克隆抗体制备，从免疫的非人类动物中获得血清，并且将其中存在的抗体通过众所周知的技术进行分离。血清可以使用上面陈述的连接到固体载体的任意免疫原进行亲和纯化，以便获得与抑制性 KIR 受体反应的抗体。

[0140] 在可替代的具体实施方式中，从未免疫的非人类哺乳动物中分离淋巴细胞，在细胞培养物中在体外生长，并然后暴露于免疫原。然后收获淋巴细胞并进行下面描述的融合步骤。

[0141] 对于单克隆抗体，下一个步骤是从免疫的非人类哺乳动物中分离脾细胞，并且随后为了形成产生抗体的杂交瘤，这些脾细胞与免疫的细胞融合。从非人类哺乳动物中分离脾细胞在本领域是众所周知的，并且典型地包括从麻醉的非人类哺乳动物中取出脾，将它切为小块并从脾被膜挤出脾细胞并通过尼龙筛网的细胞过滤器进入适当的缓冲液中以产生单细胞悬液。洗涤细胞，离心并在裂解任何红细胞的缓冲液中重悬。该溶液再一次离心而且在颗粒沉淀中保留的淋巴细胞最终在新鲜缓冲液中重悬。

[0142] 一旦得以分离并存在于单细胞悬液中，淋巴细胞可以与无限增殖细胞系融合。这典型的是小鼠骨髓瘤细胞系，虽然本领域已知许多其它对产生杂交瘤有用的无限增殖细胞系。优选的鼠骨髓瘤细胞系包括，但不限于来源于 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些（从 SalkInstitute Cell Distribution Center，San Diego，Calif. 美国可以得到）或 X63Ag8653 和 SP-2 细胞系（可从美国典型培养物保藏中心，Rockville，Mary 美国获得）。细胞融合是使用聚乙二醇或类似物实现的。然后将得到的杂交瘤生长于包含一种或更多抑制未融合的、亲代骨髓瘤细胞的生长或存活的物质的选择性培养基中。例如如果亲代骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT)，杂交瘤的培养基典型地将包括次黄嘌呤，氨基喋呤，和胸腺嘧啶 (HAT 培养基)，该物质预防缺乏 HGPRT 的细胞的生长。

[0143] 杂交瘤典型地在巨噬细胞饲养层上生长。巨噬细胞优选地来自用于分离脾细胞的非人类哺乳动物同窝仔，并且典型地在平板接种杂交瘤之前数天用不完全弗氏佐剂处理。融合方法在 Goding，“MonoclonalAntibodies：Principles and Practice，”pp. 59-103(Academic Press，1986) 中进行了描述，在本文公开内容通过参考合并入本申请。

[0144] 为了克隆形成和抗体产生，允许细胞在选择培养基中生长足够的时间。这通常在大约 7 到大约 14 天之间。然后分析杂交瘤克隆的与多种抑制性 KIR 基因产物交叉反应的抗体的产生。虽然可以使用多种其它类型的测定，包括免疫沉淀法和放射免疫测定法或 FACS、Biacore、闪烁亲近测定法 (SPA) 或本领域众所周知的其它类型的测定，该测定典型地为比色性 ELISA 类测定。检查含有具有期望特异性的抗体的孔以确定是否存在一个或更多区别

性的杂交瘤细胞克隆。如果超过一个克隆存在，细胞可以进行再克隆并生长以保证只有单个细胞产生生产期望抗体的克隆。具有单一明显克隆的阳性孔典型地再克隆并再分析以确保只有一种单克隆抗体被检测到并产生。

[0145] 在优选的具体实施方式中，根据本发明可应用的方法用于产生抗体的非人类动物是哺乳动物，例如啮齿动物（例如小鼠、大鼠等）、牛、猪、马、兔、山羊、绵羊等。另外，非人类哺乳动物可以通过基因修饰或基因工程产生“人类”抗体，例如 Xenomouse™(Abgenix) 或 HuMAb-Mouse™(Medarex)，如下所描述。

[0146] 抗体也可以转基因地通过对目标免疫球蛋白重链和轻链序列来说为转基因的脊索动物（例如哺乳动物或禽）或植物的传代产生，并从中产生可回收形式的抗体（见，例 如 Ma 等，Nature Rev.Genetics 4:794-805(2003)；Nolke 等，Expert Opin Biol Ther.20030ct;3(7):1153-62;Schillberg 等，Cell Mol Life Sci.2003Mar;60(3):433-45;Tekoah 等，Arch Biochem Biophys.2004Jun 15;426(2):266-78;Fischer 等，Eur.J.of Biochem.,262(3):810(1999)；和关于在植物中产生抗体和抗体样蛋白质的美国专利申请 20030084482)。关于在哺乳动物中的转基因生产，可以在山羊、奶牛或其它哺乳动物中生产抗体和其他蛋白质，并且从山羊、奶牛或其他哺乳动物中回收。见，例如，美国专利 5,827,690,5,756,687,5,750,172，和 5,741,957。抗体也可以在禽蛋中生产并从其中回收。见，例如，Tini 等，Comp BiochemPhysiol A Mol Integr Physiol.2002Mar;131(3):569-74 和美国专利 4,550,019。

[0147] 抗体也可以通过免疫球蛋白的组合文库的选择进行生产，如例如在 Ward 等，Nature,341(1989)p.544 中所公开。

[0148] 根据另外的具体实施方式，本发明提供了来源于非人类宿主 B 细胞的杂交瘤，其中所述 B 细胞产生结合存在于至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物上的决定簇的抗体，并且所述抗体能中和所述受体的抑制活性。更为优选地，本发明这方面的杂交瘤不是产生单克隆抗体 NKVSF1、不是 A210 和 / 或不是 A802g 的杂交瘤。根据本发明这方面的杂交瘤，可以如上所述，通过来自免疫的非人类哺乳动物的脾细胞与无限增殖细胞系融合产生。如在本文在别处所描述，可以对该融合产生的杂交瘤进行筛选这种交叉反应抗体的存在。优选地，杂交瘤产生识别存在于至少两种不同的 KIR2DL 基因产物上的决定簇的抗体，并引起表达至少那些 KIR 受体之一的 NK 细胞的增强。甚至更加优选地，杂交瘤产生与 1-7F9 结合实质上相同表位或决定簇而且加强 NK 细胞活性的抗体，或与 1-4F1 结合实质上相同表位的抗体。最优选地，杂交瘤是产生单克隆抗体 1-7F9 的杂交瘤 1-7F9，或产生单克隆抗体 1-4F1 的杂交瘤 1-4F1。

[0149] 证实产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤可以在适当的培养基，例如 DMEM 或 RPMI-1640 中大量生长。可选择地，杂交瘤细胞可以在动物体内作为腹水瘤生长。

[0150] 在足够生长以产生期望的单克隆抗体之后，包含单克隆抗体的生长培养基（或腹水）可以与细胞分离，并且纯化单克隆抗体。纯化典型地通过使用蛋白 A 或蛋白 G-Sepharose，或连接固体载体例如琼脂糖或 Sepharose 珠的抗小鼠免疫球蛋白的色谱法（全部描述，例如在 theAntibody Purification Handbook，Amersham Biosciences，publicationNo.18-1037-46，AC 版中，公开的内容通过参考将它并入本申请），或通过其它已知技术例如电泳或透析完成。结合的抗体典型地通过使用低 pH 缓冲液 (pH3.0 或更低的

甘氨酸或醋酸盐缓冲液），用包含抗体部分的立即中和从蛋白质 A/ 蛋白质 G 柱洗脱。这些部分可以根据需要进行混合、透析和浓缩。

[0151] 人类抗体

[0152] 在一方面，本发明提供了人类抗 KIR 抗体。" 人类" 抗体与" 人源化的" 抗体是有区别的（其分别描述如下）。这种" 人类" 抗体可以包括不被人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如在体外由随机或位点特异的诱变或通过在体内体细胞突变引入的突变），例如在 CDRs 内，例如 CDR3 内。然而，如在本文所使用，术语" 人类抗体"，不打算包括人源化的抗体或人类 / 小鼠嵌合抗体，其中来源于另外的哺乳动物物种，例如小鼠的种系的 CDR 序列已经移植到人类框架序列上。

[0153] 含有人免疫球蛋白基因的转基因动物能够而且已经开发，免疫后，在没有小鼠免疫球蛋白产生的情况下，产生全套人类抗体。可以应用这种人类免疫球蛋白转基因小鼠产生人类抗体。这种人类抗体可以在含有人类免疫球蛋白基因座和天然的免疫球蛋白基因缺失的人类免疫球蛋白转基因动物（例如小鼠、大鼠、绵羊、猪、山羊、牛、马等）中，例如在 Xeno Mouse™(Abgenix-Fremont，CA，USA) 中产生（见，例如 Green 等 Nature Genetics 7 :13-21(1994) ;Mendez 等 NatureGenetics 15 :146-156(1997) ;Green 和 Jakobovits J.Exp.Med.188 :483-495(1998) ；欧洲专利 No.EP 0463151B1 ；国际专利申请 Nos.WO 94/02602、WO 96/34096、WO 98/24893、WO 99/45031、WO99/53049 和 WO 00/037504 和美国专利 5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、5,994,619、6,075,181、6,091,001、6,114,598 和 6,130,364) 或在含有人类免疫球蛋白编码基因的微卫星基因座的转基因动物，例如 HuMab-Mouse™(Medarex-Princeton，NJ，USA) 中产生（见，例如 EP 0546073，EP0546073 ；美国专利 Nos.5,545,807、5,545,806、5,625,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016、5,770,429、5,789,650、5,814,318、5,591,669、5,612,205、5,721,367、5,789,215、5,643,763 和国际专利申请 Nos.WO 92/03918、WO 92/22645、WO 92/22647、WO92/22670、WO 93/12227、WO 94/00569、WO 94/25585、WO 96/14436、WO 97/13852 和 WO 98/24884)。如在本文所述，根据熟知技术，可以使用来自这种转基因小鼠的脾细胞以产生分泌人类单克隆抗体的杂交瘤。相似的技术和原理在，例如 Jakobovits 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90 :2551-255(1993) ;Jakobovits 等，Nature,362 :255-258(1993) ;和 Bruggemaun 等，Year in Immuno.,7 :33(1993)) 中进行了描述。

[0154] 进一步，人类抗体或来自其它物种的抗体可以通过展示类技术，包括不限于，噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示和其它相关技术，使用本领域众所周知的方法产生，并且得到的分子可以进行附加的成熟方法，例如亲和力成熟，因为这种技术也是众所周知的（见，例如 (Hoogenboom 等 . , J.Mol.Biol.227 :381(1991)（噬菌体展示）;Vaughan，等，Nature Biotech 14 :309(1996)（噬菌体展示）;Hanes 和 Plucthau PNAS USA 94 :4937-4942(1997)（核糖体展示）;Parmley 和 Smith Gene 73 :305-318(1988)（噬菌体展示）;Marks 等，J.Mol.Biol.,222 :581(1991)，Scott TIBS 17 :241-245(1992) ;Cwirla 等 PNAS USA87 :6378-6382(1990) ;Russel 等 Nucl.Acids Research 21 :1081-1085(1993) ;Hoganboom 等 Immunol.Reviews 130 :43-68(1992) ;Chiswell 和 McCafferty TIBTECH 10 :80-84(1992)，和美国专利 5,733,743)。如果利用展示技术生产不是人类的抗体，这种抗体可以被人源化，例如如在本文在别处所描述。

[0155] 因此，如在本文所述，抗 KIR mAbs 对治疗癌症和病毒感染和其它疾病和障碍是有前途的物质。抗 KIR mAbs 可以通过不同的方法，例如鼠 mAbs 的人源化或通过来自人类免疫球蛋白转基因小鼠 (XenoMouse 或 HuMab 小鼠）的脾细胞融合，通过噬菌体展示或通过人类产生 Ab 的 B 细胞的无限增殖化，或通过其它方法产生。在任一情况下，在需要它时，抗体可以通过细胞系产生并以适于配制、包装和注入患者的数量进行纯化。

[0156] 重组产生

[0157] 抗KIR抗体也可以通过在单细胞生物，例如酵母中；或在细菌细胞培养物（例如在大肠杆菌 (E.coli) 中）；或在真核细胞培养物中（例如在哺乳动物细胞培养物中），使用标准技术重组表达进行制备。

[0158] 因而，根据备择的具体实施方式，编码交叉反应和中和性抗 KIR 抗体重链和轻链的 DNA（所述抗体结合存在于至少两种不同的人类抑制性 KIRs 上的决定簇）从本发明的杂交瘤中分离并为了转染到适当的宿主中，放于适当的表达载体中。然后该宿主用于抗体，或其变体的重组生产，例如所述单克隆抗体的人源化形式、抗体的活性片段或含有抗体的抗原识别部分的嵌合抗体。优选地，用于该具体实施方式中的 DNA 编码识别存在于至少两种不同的 KIR2DL 基因产物上，但不在 KIR2DS3 或 -4 上的决定簇的抗体，并且该抗体引起表达那些 KIR2DL 受体中的至少一种 NK 细胞的增强。甚至更为优选地，DNA 编码与 1-7F9 的抗体结合实质上相同表位或决定簇，并且加强 NK 细胞活性的抗体。最优选地，DNA 编码单克隆抗体 1-7F9。

[0159] 编码本发明单克隆抗体的 DNA 使用常规步骤，容易地分离和测序（例如通过使用能特异地结合编码鼠或人类抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针）。一旦分离，DNA 可以放入表达载体中，然后将表达载体转染入不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞，以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。在细菌中重组表达编码抗体片段的 DNA 在本领域是众所周知的（见，例如 Skerra 等，Curr.Opinion inImmunol.，5，pp.256(1993)；和 Pluckthun，Immunol. Revs.130，pp.151(1992)）。

[0160] 另外，由已知可变重链 (VH) 区和可变轻链区 (VL) 和人类恒定区重组生产抗体已经通过下面文献进行了描述，例如 Ruker 等 (Annals ofthe New York Academy of Sciences.1991；646：212-219)，他报告了人类单克隆抗 HIV-1 抗体在 CHO 细胞中的表达；Bianchi 等 (Biotechnology 和 Bioengineering.2003；84：439-444)，他描述了使用反式互补表达载体的全长抗体的高水平表达；No Soo Kim 等 (Biotechnol.Prog.2001；17：69-75)，他描述了在二氢叶酸还原酶介导基因扩增中，在 CHO 细胞的人源化的抗体表达中克隆变异存在的关键决定簇；King 等 (Biochemical Journal.1992；281：317-323)，他报告了小鼠 - 人类嵌合的抗体和嵌合的 Fab' 片段的表达，纯化和特征；WO 2003064606 描述了分离的人类单克隆抗体，该抗体含有人重链和轻链可变区，两者含有 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 序列；和 WO 2003040170 描述了嵌合的或人类单克隆抗体和抗原结合部分，其特异地结合并活化人类 CD40。

[0161] 编码人类 IgG 恒定区的全部 cDNA 序列可以在下面 GenBank 条目中发现，其每一项在本文通过参考将其并入本申请中，获取在 2005 年 1 月 6 日登入。

[0162] 人类 IgG1 恒定重链区：GenBank 登记入册号 #：J00228

[0163] 人类 IgG2 恒定重链区 :GenBank 登记入册号 # :J00230

[0164] 人类 IgG3 恒定重链区 :GenBank 登记入册号 # :X04646

[0165] 人类 IgG4 恒定重链区 :GenBank 登记入册号 # :K01316

[0166] 人类 κ 轻链恒定区 :GenBank 登记入册号 # :J00241。

[0167] 在代表性具体实施方式中,为生产从 1-7F9 或 1-4F1VH 和 VL 序列产生的重组 mAb,可以应用下列方案。步骤 1-3 描述了从杂交瘤或其他产生 1-7F9 或 1-4F1 的细胞中检索 VH 和 VL 区。然而,用于步骤 4 中的编码 1-7F9 或 1-4F1VH 和 VL 序列(或其突变体或衍生物)的 cDNA,也可以使用建立好的合成 DNA 片段的技术,从图 14 或 15 中提供的序列信息进行制备。备择地,为了表达全长抗体,1-7F9 或 1-4F1,或其突变体或衍生物的 VH 和 VL 片段可以克隆入包含期望的免疫球蛋白亚类恒定区的科学文献中描述的许多表达载体的任一和 / 或商业上可获得的表达载体。另外地,为了表达抗体片段(例如 Fab 片段),1-7F9 或 1-4F1,或其突变体或衍生物的 VH 和 VL 片段可以克隆入编码截短的恒定区的载体。商业上可获得载体的一个例子是 pASK84,可以从 ATCC(美国典型培养物保藏中心,目录号 87094) 得到。

[0168] (1) 从杂交瘤细胞中分离总 RNA

[0169] 使用 Qiagen 的 RNeasy 小试剂盒,根据厂商说明书,分泌针对人类 KIR 抗体的 $4x10^6$ 杂交瘤细胞(例如 1-7F9 或 1-4F1)用于分离总 RNA,并简要略述如下 :细胞通过 1000rpm 离心 5 分钟而成粒状并通过添加包含 10μl/ml β- 巯基乙醇的 350μl RLT 缓冲液破裂。将裂解物转移到来自 Qiagen 的 QIA shredder 柱并以最大速度离心 2 分钟。流通物与等量的 70% 乙醇混合。每个 Rneasy 旋转柱 (Qiagen) 适用至多 700μl 样品并以 14000rpm 离心,并丢弃流通物。每一柱适用 700μlRW1 缓冲液,以 14000rpm 离心 15 秒洗涤柱。用 500μl RPE 缓冲液洗涤柱两次并以 14000rpm 离心 15 秒。为了干燥柱,以 14000rpm 另外离心 2 分钟。柱转移到新的收集管,并且用 50μl 无核酸酶的水洗脱 RNA 并以 14000rpm 离心 1 分钟。通过 OD = 260nm 的吸光度测量 RNA 浓度。RNA 储存于 -80℃,直到需要时为止。

[0170] (2)cDNA 合成 :

[0171] 使用 Clontech 的 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒,使用 1μgRNA 合成第一链 cDNA。为了制备 5'-RACE-Ready cDNA,制备包含如上所述分离的 RNA、反向引物 5'-CDS 引物背和 SMART II A 寡核苷酸的反应混合物,和该混合物在 72℃孵育大约 2 分钟,并且随后在冰上冷却大约 2 分钟,然后加 1x 第一链缓冲液、DTT(20mM)、dNTP(10mM) 和 PowerScript 反转录酶。反应混合物在 42℃孵育 1.5 小时,并且加三(羟甲基)甲基甘氨酸 (Tricine)-EDT 缓冲液并在 72℃孵育 7 分钟。在这点上,样品可以储存在 -20℃。

[0172] (3) 人类可变轻链 (VL) 区和人类可变重链 (VH) 区的克隆和 PCR 扩增 :

[0173] 为了从上面制备的 cDNA 中分离扩增 VL 和 VH 二者的可变区,建立了包含 1x Advantage HF 2PCR 缓冲液、dNTP(10mM) 和 1xAdvantage HF 2 多聚酶混合物的 PCR(多聚酶链反应) 反应混合物。

[0174] 为了扩增 VL,使用了下列引物 :

[0175] UPM (通用引物混合物) :

[0176] 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (SEQ ID NO :26)

[0177] 5'-CTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SE Q ID NO :27)

[0178] VK RACE2 :

[0179] 5’-GCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTTC-3’(SEQID NO:28)

[0180] 为了扩增VH,使用了下列引物:

[0181] UPM(通用引物混合物):

[0182] 5’-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3’(SEQ ID NO:29)

[0183] 5’-CTAATACGACTCACTATAGGG-3’(SEQ ID NO:30)

[0184] AB90RACE:

[0185] 5’-GTGCCAGGGGGAAGACCGATGGG-3’(SEQ ID NO:31)

[0186] 进行三轮PCR。第一轮:PCR进行5循环的94℃5秒和72℃3分钟。第二轮:PCR进行5循环的94℃5秒,70℃10秒和72℃1分钟。第三轮:PCR进行28循环的94℃5秒,68℃10秒和72℃1分钟。

[0187] 通过1%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行分析而且使用Qiagen的QIAEX11琼脂糖凝胶提取试剂盒,从凝胶中纯化DNA。

[0188] 使用Invitrogen的TOPO TA克隆试剂盒将纯化的PCR产物引入PCR4-TOPO载体并用来转化TOP10感受态细胞。

[0189] 通过集落PCR,使用Taq多聚酶、1xTaq多聚酶缓冲液、dNTP(10mM)和下列引物和PCR程序,对适当数量的菌落进行分析:

[0190] M13正向引物:5’-GTAAAACGACGGCCAG-3’(SEQ ID NO:32)

[0191] M13反向引物:5’-CAGGAAACAGCTATGAC-3’(SEQ IDNO:33)

[0192] PCR程序:

[0193] 进行25循环的94℃30秒、55℃30秒和72℃1分钟。

[0194] 对来自分别含有VL和VH插入片段的克隆的质粒DNA,进行提取并使用上面列出的M13正向引物和M13反向引物进行测序。就人类抗KIR mAb 1-7F9来说,编码重链和轻链可变区的序列如图15所示。

[0195] (4)抗体基因亚克隆进入哺乳动物表达载体

[0196] 基于对编码mAb的重链和轻链可变区的cDNAs的序列数据,分别设计引物来扩增可变轻(VL)链和可变重(VH)链基因。通过PCR对可变区进行设计(format)以包括Kozak序列、前导序列和独特的限制酶位点。对于VL,这是通过设计5’PCR引物,以引入HindIII位点、Kozak序列而且与可变轻链区的前导序列的5’端同源来实现的。3’引物与可变区的3’端是同源的,并且在可变区的3’边界引入BsiWI位点。VH区以相似的方式产生,除了将NotI和NheI位点分别引入5’和3’端,代替HindIII和BsiWI之外。

[0197] 使用标准技术,将扩增的基因产物各自克隆进入一个包含轻链和重链恒定区的真核表达载体。用HindIII和BsiWI消化VL DNA片段,并连接入真核表达载体,该载体包含编码氨苄青霉素抗性的β-内酰胺酶基因和大肠杆菌复制起点(pUC);得到的质粒命名为VLCL。用NotI和NheI消化VH DNA片段,并引入由如上所述引入VL片段产生的VLCL载体。得到的质粒包含编码相同质粒上抗体的重链和轻链二者的功能性表达盒。连接的质粒用以转化大肠杆菌。质粒DNA从这些氨苄青霉素抗性细菌群落中制备并用来转染到中国仓鼠卵巢细胞,或其他哺乳动物细胞系中。通过例如在“Molecular Cloning”Sambrook等中所述标准方法,完成转染和细胞培养。结果为稳定地表达并分泌目标抗体分子,例如1-7F9或1-4F1人类抗KIR mAb或含有1-7F9或1-4F1的VH和VL区的mAb,或另外人类抗KIR mAb

的转染的细胞系。

[0198] 抗体的变体可以容易地产生。例如，与 1-7F9 或 1-4F1 具有精确相同特异性，但与 IgG4 或 IgG2 相比分别地为不同的同种型的抗体，可以通过亚克隆编码 1-7F9 或 1-4F1 的 VL 和 VH 的 cDNA 进入包含编码 κ 轻链恒定区和选自 IgG1 或 IgG2 或 IgG3 或 IgG4 重链恒定区的重链恒定区 cDNA 的质粒获得。因而，如所产生的抗体能具有任意的同种型而且然后该抗体可以使用本领域常规技术进行同种型转换。这种技术包括使用直接重组技术（见，例如美国专利 4,816,397），细胞 - 细胞融合技术（见例如美国专利 5,916,771），和本领域已知的其他适合的技术。因此，通过同种型转换为，例如用于包括治疗用途的不同用途的 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE 或 IgM 抗体，本发明提供的抗体效应物功能相对于亲本抗体的同种型可以“变化”。

[0199] 因而，在进一步方面，本发明提供了杂交瘤，其含有：(a) 来自哺乳动物宿主（典型地非人类哺乳动物宿主）的 B 细胞，该宿主已经用抗原进行了免疫，其中抗原含有存在于抑制性 KIR 多肽上的表位，其融合至 (b) 无限增殖化细胞（例如骨髓瘤细胞），其中所述杂交瘤产生结合至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体的单克隆抗体，并在表达所述至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体的 NK 细胞的群体中，能至少实质上中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性的抑制作用。在一个具体实施方式中，哺乳动物宿主是能产生人类抗体的转基因动物。任选地，所述杂交瘤不产生单克隆抗体 NKVSF1、不产生 A210 和 / 或不产生 A802g。在不同的具体实施方式中，抗体结合存在于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 二者上的 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 受体或共同决定簇。杂交瘤可以产生抗体，该抗体抑制在 80 位有赖氨酸残基的 HLA-C 等位基因分子与人类 KIR2DL1 受体结合，抑制在 80 位有天冬酰胺残基的 HLA-C 等位基因分子与人类 KIR2DL2/3 受体结合。例如，在杂交瘤可以产生与单克隆抗体 1-7F9 或 1-4F1 结合实质上相同的在任一 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 或 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 二者上的表位。

[0200] 本发明也提供了产生与多个 KIR2DL 基因产物交叉反应而且降低或中和这种 KIRs 抑制活性的抗体的方法，所述方法含有如下步骤：

[0201] (a) 用含有 KIR2DL 多肽的免疫原免疫非人类哺乳动物；

[0202] (b) 从所述免疫的哺乳动物中制备抗体，其中所述抗体结合所述的 KIR2DL 多肽，

[0203] (c) 选择 (b) 的与至少两种不同的 KIR2DL 基因产物交叉反应的抗体，和

[0204] (d) 选择 (c) 的加强 NK 细胞的抗体。在一个具体实施方式中，所述非人类哺乳动物被设计以表达人类抗体所有组成成分的转基因动物（例如非人类含有人类免疫球蛋白基因座和天然的免疫球蛋白基因缺失的哺乳动物，例如 Xeno mouse™(Abgenix-Fremont, CA, USA) 或含有人类免疫球蛋白编码基因的微卫星基因座的非人类哺乳动物，例如 HuMab mouse™(Medarex-Princeton, NJ, USA)）。任选地，可以用获得抗 KIR mAbs 的备择的方法代替步骤 a 和 b，包括不限于，使用噬菌体展示或人类 B 细胞的病毒转导，或本领域已知的其它方法。任选地，该方法进一步含有选择在灵长类，优选结合猕猴中 KIR 的抗体，NK 细胞或 KIR 多肽。任选地，本发明进一步含有评价抗 KIR 抗体的方法，其中根据上面方法产生的抗体给灵长类，优选猕猴施用，优选地其中观察猴抗体毒性指示的存在或缺乏。

[0205] 本发明也提供了生产结合至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的抗体的方法，其中该抗体通过表达至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的 NK 细胞的群体，能中和 KIR 介导的细胞毒性的抑制（或加强 NK 细胞毒性），该方法含有如下步骤：

[0206] (a) 用含有抑制性 KIR 多肽的免疫原免疫非人类哺乳动物；

[0207] (b) 从免疫的动物中制备抗体，其中抗体结合 KIR 多肽，

[0208] (c) 选择 (b) 的与至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物交叉反应的抗体，和

[0209] (d) 选择 (c) 的抗体，该抗体能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性对表达至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的 NK 细胞的群体的抑制作用，其中步骤 (c) 和 (d) 的顺序任意地颠倒，并且任选地重复任意数目的步骤一次或多次。在一个具体实施方式中，用于免疫的抑制性 KIR 多肽可以为一个或更多的 KIR2DL 多肽而且在步骤 (c) 中选择的抗体与至少 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 交叉反应。优选地，抗体识别存在于至少两种不同的 KIR 受体基因产物上的共同决定簇；最优选地，KIRs 是 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3。在一个具体实施方式中，步骤 (c) 含有选择与至少一种 KIR2DL 和一种 KIR3DL 受体基因产物交叉反应的抗体。例如选择的抗体能与 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 以及 KIR3DL1 和 / 或 KIR3DL2 反应。任选地，该方法进一步含有选择结合灵长类，优选猕猴，NK 细胞或 KIR 多肽的抗体。任选地，本发明还包括评价抗体的方法，其中将根据上述方法生产的抗体给予灵长类，优选猕猴，优选地其中观察猴抗体毒性指示的存在或缺乏。

[0210] 任选地，上面描述的方法中，在步骤 c) 或 d) 中选择的抗体不是 NKVSF1，不是 A210 和 / 或不是 A802g。优选地，在在上面方法中的步骤 (b) 中制备的抗体是单克隆抗体。优选地在上面方法的步骤 (c) 中选择的抗体抑制一个或更多在 80 位有赖氨酸残基的 HLA-C 同种异型结合人类 KIR2DL1 受体，和一个或更多在 80 位有天冬酰胺残基的 HLA-C 同种异型结合人类 KIR2DL2/3 受体。优选地，在上面方法的步骤 (d) 中选择的抗体引起 NK 细胞毒性的增强，或 KIR 介导的抑制 NK 细胞毒性的中和作用。优选地，该抗体与单克隆抗体 1-7F9 结合实质上相同的 KIR2DL1 和 / 或 KIR2DL2/3 上的表位。任选地，该方法还或备择地含有如下附加步骤：制造选择的单克隆抗体的片段，制造选择的单克隆抗体的衍生物（例如通过与放射性核素、细胞毒性药剂、报道分子或类似物缀合），或制造从中产生的抗体片段，或含有对应于这种单克隆抗体序列的序列抗体片段的衍生物。在另一方面，这种抗体的变体可以通过制备含有，通过上面描述的方法，通过使用已知的基因工程方法获得的抗体的变异的氨基酸序列（例如被修饰以便改变该抗体的结合特性，增加或减少该抗体的稳定性，增强抗体的纯化，增强抗体的检测，和 / 或改变抗体对于将被施用该抗体的宿主的免疫学特性的序列）。

[0211] 本发明进一步提供了生产结合至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的抗体的方法，其中该抗体能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性对表达至少一种所述不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的 NK 细胞的群体的抑制作用（或加强 NK 细胞毒性），该方法含有如下步骤：

[0212] (a) 从文库或全部组成部分中，选择与至少两种不同的人类抑制性 KIR2DL 受体基因产物交叉反应的单克隆抗体或抗体片段，并且

[0213] (b) 选择能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性在表达至少两种不同的人类抑制性 KIR2DL 受体基因产物的 NK 细胞的群体中的抑制作用的 (a) 的抗体。优选地，该抗体结合存在于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 上的共同决定簇。任选地，在步骤 (b) 中选择的抗体不是 NKVSF1。优选地，在步骤 (b) 中选择的抗体抑制在 80 位有赖氨酸残基的 HLA-c 等位分子结

合人类 KIR2DL1 受体，和在 80 位有天冬酰胺残基的 HLA-C 等位分子结合人类 KIR2DL2/3 受体。优选地，在步骤 (b) 中选择的抗体引起 NK 细胞毒性的增强。优选地，该抗体与单克隆抗体 1-7F9 结合实质上相同的 KIR2DL1 和 / 或 KIR2DL2/3 上的表位。备择地，该抗体与单克隆抗体 1-4F1 结合实质上相同表位。任选地，该方法含有如下附加步骤：制造选择的单克隆抗体的片段，制造选择的单克隆抗体的衍生物，或制造选择的单克隆抗体片段的衍生物。

[0214] 另外，本发明也提供了生产结合至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的抗体的方法，其中该抗体能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性在表达两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物中至少一种的 NK 细胞的群体中的抑制作用，该方法含有如下步骤：

[0215] a) 在允许生产单克隆抗体的条件下培养本发明的杂交瘤；并且

[0216] b) 从杂交瘤细胞中分离单克隆抗体。任选地该方法含有如下附加步骤：制造单克隆抗体的片段、制造单克隆抗体的衍生物或制造这种单克隆抗体片段的衍生物。优选地，该抗体结合存在于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 上的共同决定簇。

[0217] 本发明也提供了一种生产结合至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物的抗体，其中该抗体能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性在表达两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物中至少一种的 NK 细胞的群体中的抑制作用，该方法含有如下步骤：

[0218] (a) 从本发明的杂交瘤中分离编码单克隆抗体的核酸；

[0219] (b) 任选地修饰该核酸以便获得修饰的核酸，该修饰的核酸含有编码修饰的或衍生的抗体的序列，该修饰或衍生的抗体含有对应于单克隆抗体的功能序列或与其实质上相似的（例如与这种序列为至少大约 65％、至少大约 75％、至少大约 85％、至少大约 90％、至少大约 95％（例如大约 70-99％）相同）的氨基酸序列，其选自人源化抗体、嵌合的抗体、单链抗体、抗体的免疫活性片段或含有这种免疫活性片段的融合蛋白；

[0220] (c) 将核酸或修饰的核酸（或编码相同氨基酸序列的相关核酸）插入到表达载体中，其中当表达载体存在于在适当的条件下生长的宿主细胞中时，编码的抗体或抗体片段能进行表达；

[0221] d) 用表达载体转染宿主细胞，其中宿主细胞不另外产生免疫球蛋白；

[0222] e) 在引起抗体或抗体片段表达的条件下，培养转染的宿主细胞；而且

[0223] f) 分离由转染的宿主细胞的产生的抗体或抗体片段。优选地该抗体结合存在于 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 上的共同决定簇。

[0224] 抗体筛选和选择

[0225] 本发明特别的抗体能够降低或中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性的抑制作用；特别是由 KIR2DL 受体介导的抑制作用而且更特别地是至少 KIR2DL1- 和 KIR2DL2/3- 二者介导的抑制作用。因而，这些抗体是“中和”、“阻断”或“抑制性”抗体，在这个意义上，当这些与 MHC I 类分子相互作用时，他们至少部分或可检测地降低、中和和 / 或阻断由 KIR 受体介导的抑制性信号通路。更重要地，关于几种类型的抑制性 KIR 受体，优选几种 KIR2DL 受体基因产物，并且更优选地至少 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 二者，展示了该中和作用活性，以便这些抗体可以高功效地用于大多数或全部人类受试者中。KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性抑制作用的中和，如在本文所述，可以通过不同的分析或试验，例如标准的体外细胞毒性分析进行评估。

[0226] 一旦鉴别与多种抑制剂 KIR 受体交叉反应的抗体，就可以测定其在完整的 NK 细

胞中降低或中和那些KIR受体的抑制作用的能力。在特定变体中，中和活性可以通过所述抗体通过表达HLA-C的靶标的KIR2DL表达性NK细胞重建裂解的能力来阐明。在另一个特定具体实施方式中，抗体的中和活性是通过该抗体阻断或降低HLA-C分子结合KIR2DL1和KIR2DL3（或密切相关的KIR2DL2）受体的能力定义的，进一步优选地的是用该抗体改变KIR2DL2/3结合选自Cw1、Cw3、Cw7和Cw8的HLA-C分子（或在80位有天冬酰胺残基的另外的HLA-C分子）和/或KIR2DL1结合选自Cw2、Cw4、Cw5和Cw6的HLA-C分子（或在80位有赖氨酸残基的另外的HLA-C分子）的能力来定义它。

[0227] 在另外的变体中，如在本文提供的实施例中过公开的，本发明抗体的中和活性可以在基于细胞的细胞毒性试验中进行评估。

[0228] 在另外的变体中，本发明的抗体的中和活性可以在释放细胞因子的试验中进行评估，其中NK细胞用检测抗体和表达NK群体的KIR分子识别的一种HLA-C等位基因的靶细胞系孵育，以刺激NK细胞因子产生（例如IFN-γ和/或GM-CSF产生）。在代表性的方案中，在培养基中大约4天后，从PBMC产生IFN-γ通过细胞表面和胞质内染色，和由流式细胞仪的分析进行评估。简要地，布雷菲德菌素A(SigmaAldrich)可以以大约5μg/ml的终浓度添加用于培养最少大约4小时。然后，细胞可以在透化(IntraPrep™;Beckman Coulter)之前与抗CD3和抗CD56mAb孵育，并且用PE-抗IFN-γ或PE-IgG1(Pharmingen)染色。可以使用ELISA进行测量上清中从多克隆活化的NK细胞中产生GM-CSF和IFN(GM-CSF:DuoSet Elisa,R&D Systems,Minneapolis,MN;IFN-γ:OptE1A set,Pharmingen)。

[0229] 本发明的抗体可以部分地（也就是降低）或完全地中和KIR介导的NK细胞细胞毒性的抑制作用。例如本发明优选的抗体能够诱导或增加HLA-匹配的，或HLA-兼容的，或自体靶细胞群，也就是在所述抗体缺乏时，NK细胞不能有效地裂解的细胞群的裂解。因此，本发明的抗体也可以定义为在体内和/或体外促进NK细胞活性。

[0230] 在特定的具体实施方式中，所述抗体与单克隆抗体DF200（由杂交瘤DF200产生），1-7F9，或1-4F1，结合实质上相同的表位。这种抗体在本文分别被称为“DF200样抗体”、“1-7F9-样抗体”和“1-4F1-样抗体”。在进一步优选的具体实施方式中，抗体是单克隆抗体。更优选的本发明的“DF200样抗体”是除单克隆抗体NKVSF1以外的抗体。最优选的是单克隆抗体1-7F9或1-4F1，和含有1-7F9或1-4F1的VH和/或VL区的抗体。

[0231] 与在本文描述的单克隆抗体结合实质上或基本上相同表位的一种或更多抗体的鉴定可以使用其中能评估抗体竞争的多种免疫学筛选试验中的任一种容易地进行测定。许多的这类试验被常规地进行而且为本领域众所周知（见，例如美国专利No.5,660,827，1997,08.26授权，其特别通过引用将其并入本申请）。将要理解，为鉴别与本文描述的单克隆抗体结合相同或实质上相同表位的抗体，并不是任何时候都必需实际测定在本文描述的抗体结合的表位。

[0232] 例如，当将要检查的测试抗体从不同来源动物获得，或甚至具有不同的免疫球蛋白同种型，可以应用简单竞争试验，其中对照抗体（例如DF200）与测试抗体混合，然后应用到含有KIR2DL1和/或KIR2DL2/3任一或二者的样品，已知它们中的每一个与DF200结合。基于ELISAs、放射免疫测定法、免疫印迹和应用BIACORE分析（如所描述，例如在本文实施例部分中）的方案，适于在这种简单竞争研究中使用。

[0233] 在一些具体实施方式中，在应用于KIR抗原样品以前，将对照抗体（例如，1-7F9或

1-4F1）与数量变化的测试抗体（例如以大约 1 ： 1、1 ： 2、1 ： 10 或大约 1 ： 100 比率）预先混合一段时间。在其他的具体实施方式中，在暴露于 KIR 抗原样品期间，对照和数量变化的测试抗体可以简单地分别进行添加并混合。只要能将结合抗体与游离抗体区分（例如通过使用分离或洗涤技术以除去未结合抗体）并区分对照抗体与测试抗体（例如通过使用物种特异性或同种型特异的二抗或通过用可检测到的标记特异地标记对照抗体），将能确定测试抗体是否降低对照抗体结合不同的 KIR2DL 抗原，提示测试抗体与 1-7F9 识别实质上相同表位。（标记的）对照抗体的结合在存在完全不相关的抗体（其不结合 KIR）时能用作对照高值。对照低值能通过用相同但未标记对照抗体孵育标记对照抗体获得，而竞争将发生并降低标记抗体的结合。在测试分析中，存在测试抗体时标记抗体反应性显著降低表现了识别实质上相同表位的测试抗体，也就是与标记的对照抗体竞争的抗体。例如，以大约 1 ： 1 或 1 ： 10 和大约 1 ： 100 之间任何比率的 1-7F9 :测试抗体或 1-4F1 :测试抗体，降低 1-7F9 或 1-4F1 与 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 抗原二者结合至少大约 50％，例如至少大约 60％，或更优选地至少大约 70％（例如大约 65-100％）的任何测试抗体，被认为是分别与 1-7F9 或 1-4F1 结合实质上相同表位或决定簇的抗体。优选地，这种测试抗体将降低 1-7F9 结合至少一个其它的，优选地每一个 KIR2DL 抗原，优选地至少大约 50％、至少大约 60％、至少大约 80％或至少大约 90％（例如大约 95％）的在缺乏测试抗体时观察到的 1-7F9 或 1-4F1 的结合。当然，这种方法可适合于鉴别和 / 或评价与其它抗体和 / 或 KIR 抗原竞争的抗体。

[0234] 竞争能同样或备择地通过，例如流式细胞试验进行评估。在这种试验中，具有给定的 KIR 的细胞可以首先与对照抗体（例如，1-7F9 或 1-4F1）孵育，并且然后与用荧光染料或生物素标记的测试抗体孵育。如果与饱和量的对照抗体预孵化获得的结合为通过测试抗体不与对照抗体进行预孵化获得的结合（如依靠荧光测量）的大约 80％，优选地大约 50％、大约 40％或更低（例如大约 30％），表示该抗体与对照抗体竞争。备择地，如果在用饱和量的测试抗体预孵化的细胞上，用标记对照抗体（通过荧光燃料或生物素）获得的结合为未用测试抗体预孵化获得的结合的大约 80％，优选地大约 50％、大约 40％，或更低（例如大约 30％），表示抗体与对照抗体竞争。

[0235] 其中以饱和浓度预吸附和应用测试抗体到其上固定有 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 任一或二者的表面的简单竞争分析，同样可以方便地利用。简单竞争分析中的表面优选地为 BIACORE 芯片（或其它适于表面胞质基因组共振分析的介质）。测量对照抗体（例如 1-7F9 或 1-4F1）与 KIR- 包被的表面的这种结合。该对照抗体单独与包含 KIR 表面的结合与存在测试抗体时对照抗体的结合比较。存在测试抗体时由对照抗体与包含 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 的表面的结合显著降低，表明测试抗体与对照抗体识别实质上相同表位，这样测试抗体与对照抗体“竞争”。任何降低对照抗体（例如 1-7F9 或 1-4F1）与 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 抗原二者的结合至少大约 20％或更多、至少大约 40％、至少大约 50％、至少大约 70％或更多的测试抗体，可以认为是与对照抗体（例如 1-7F9 或 1-4F1）结合实质上相同表位或决定簇的抗体。优选地，这种测试抗体将降低对照抗体（例如 1-7F9 或 1-4F1）与每一种 KIR2DL 抗原的结合至少大约 50％（例如至少大约 60％，至少大约 70％或更多）。将要理解，对照抗体和测试抗体的顺序可以颠倒进行 ；也就是对照抗体可以首先结合表面而且然后在其后的竞争试验中测试抗体与表面接触。优选地，对 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 抗原具有更高亲和力的抗体首先结合包含 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 的表面，因为预期对于二抗（假

设抗体是竞争性的）所观察到的结合将会更大幅度地减少。在本文的实施例中，和在例如 Saunal 和 Regenmortel，(1995)J. Immunol. Methods 183 :33-41 中提供了这种试验的进一步的例子，其公开内容在本文通过参考并入本申请。

[0236] 尽管为例证的目的，在 1-7F9 或 1-4F1 的上下文中进行了描述，但将要理解上面描述的筛选试验也可以用于鉴别与 NKVSF1、DF200、EB6、GL183 和根据本发明其它抗体、抗体片段和抗体衍生物中一种或多种竞争的抗体。

[0237] 在脊椎动物或细胞中免疫并产生抗体后，可以进行特别的选择步骤以分离所要求保护的抗体。在这点上，在特定的具体实施方式中，本发明也涉及产生这种抗体的方法，它包括如下步骤：

[0238] (a) 用含有抑制性 KIR 多肽的免疫原免疫非人类哺乳动物；

[0239] (b) 从所述免疫的动物中制备抗体，其中所述抗体结合所述 KIR 多肽，

[0240] (c) 选择与至少两种不同的抑制性 KIR 基因产物交叉反应的 (b) 的抗体，和

[0241] (d) 选择能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性对表达所述两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物中至少一种的 NK 细胞的群体的抑制作用的 (c) 的抗体。

[0242] 在某些具体实施方式中，在上面的步骤 (c) 和 (d) 之间，进行附加步骤，以选择不与 KIR2DS4 反应的抗 KIR mAbs。

[0243] 与至少两种不同的抑制性 KIR 基因产物交叉反应的抗体选择可以通过筛选针对两种或更多种不同的抑制性 KIR 抗原的抗体完成。在更优选的具体实施方式中，在步骤 (b) 中制备的抗体是单克隆抗体。因而，如在本文所使用，术语“从所述免疫的动物中制备抗体”，包括从免疫的动物中获得 B 细胞并使用那些 B 细胞以产生表达抗体的杂交瘤，以及直接从免疫动物的血清中获得抗体。在另一个优选具体实施方式中，在步骤 (c) 中选择的抗体是与至少 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 交叉反应的那些。

[0244] 还有在另一个具体实施方式中，当在对表达同源 HLA I 类分子的靶细胞的标准铬释放试验中所测量时，与在缺乏抗 KIR mAb 时特异性裂解比较，在步骤 (d) 中选择的抗体引起由显示至少一个被抗体识别的 KIR 的 NK 细胞介导的至少大约 10％更多的特异性裂解，并且优选地至少大约 40％更多的特异性裂解，至少大约 50％更高的特异性裂解或更优选地至少增加大约 70％特异性裂解（例如大约增加 60-100％特异性裂解）。备择地，在步骤 (d) 中选择的抗体当用于铬释放试验时，该试验应用表达一种或几种抑制性 KIRs 的 NK 细胞克隆和表达至少一个 HLA 等位基因（它被 NK 克隆上的 KIRs 之一识别）的靶细胞，用该抗体获得的细胞毒性水平应为以相同的效应物：靶细胞比率，用相同浓度的 DF200 或用阻断抗 MHC I 类抗体获得的特异细胞毒性的至少大约 20％，优选地至少大约 30％或更多。

[0245] 上面刚刚描述的方法的步骤 (c) 和 (d) 的顺序可以改变。任选地，该方法同样或备择地可以进一步含有制造单克隆抗体片段或单克隆抗体的衍生物或例如在本文别处所描述的这样的片段的附加步骤。

[0246] 在另一个变体中，本发明提供了获得抗体的方法，它包括如下步骤：

[0247] (a) 从文库或全部组成部分中，选择与至少两种不同的人类抑制性 KIR2DL 受体基因产物交叉反应的单克隆抗体、单克隆抗体片段或其任一的衍生物，并且

[0248] (b) 选择能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性对表达所述至少两种不同的人类抑制性 KIR2DL 受体基因产物的 NK 细胞群体的抑制作用的 (a) 的抗体。

[0249] 所有组成成分可能是任何（重组的）抗体或其片段的所有组成成分，任选地通过任何适当结构（例如噬菌体、细菌、合成复合体等）进行显示。抑制性抗体的选择可以如上面所公开的进行，并在实施例中进一步阐明。

[0250] KIR2DL1、-2 和 -3(KIR2DL1-3) 的胞外域的计算机模拟，基于其公布的晶体结构 (Maenaka 等 Structure with Folding and design1999 ;7 :391-398 ;Fan 等，Nature immunology 2001 ;2 :452-460 ;Boyington 等 Nature，2000 ;405 :537-543)，揭示在这些 KIR 和抗 KIR2DL 交叉反应性鼠单克隆抗体 DF200 和 NKVSF1 之间的相互作用中涉及一些区或 KIR2DL1、-2 和 -3。因而，在一个具体实施方式中，本发明提供了在由氨基酸残基 (105、106、107、108、109、110、111、127、129、130、131、132、133、134、135、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、181 和 192) 限定的区域中唯一地结合 KIR2DL1 的抗体。在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 和 KIR 2DL2/3 而不与由残基 (105、106、107、108、109、110、111、127、129、130、131、132、133、134、135、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、181 和 192) 限定的区域外面的氨基酸残基相互作用的抗体。

[0251] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 和不结合其中 R131（也就是在 KIR2DL1 突变体 131 位的精氨酸残基）是丙氨酸残基（也就是被丙氨酸残基取代）的 KIR2DL1 突变体的抗体。

[0252] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 和不结合其中 R157 是丙氨酸的 KIR2DL1 突变体的抗体。

[0253] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 和不结合其中 R158 是丙氨酸的 KIR2DL1 突变体的抗体。

[0254] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 残基 131，157，和 158 的抗体。

[0255] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DS3(R131W)，但不结合野生型 KIR2DS3 的抗体。

[0256] 在特殊的具体实施方式中，所述抗体只在由氨基酸残基 L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88（其中字母指的是氨基酸的单一字母代码，并且数字为 KIR2DL1(SEQ ID NO :23) 的残基位置，使用在 Wagtmann 等，Immunity 1995 ;2 :439-449 中描述的编号系统）限定的区域中结合 KIR2DL1。这些残基已被鉴定为 1-7F9KIR2DL1 表位（见实施例 11）。

[0257] 在另一个具体实施方式中，抗体结合 KIR2DL1 序列中由 SEQ IDNO :23 的 L38 到 Y88 片段组成的抗原表位。在还有一个具体实施方式中，抗体结合 KIR2DL1 序列中含有 SEQ ID NO :23 的 L38 到 Y88 片段的抗原表位。

[0258] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 而不与残基 L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88 限定区域外的氨基酸残基相互作用的抗体。

[0259] 在另一个具体实施方式中，抗体在含有至少 10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更多的氨基酸残基 L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88 的区域中结合 KIR2DL1。在特殊的具体实施方式中，KIR2DL1 对抗体的表位含有氨基酸残基 M44 和 F45（见实施例 9 和 11）。

[0260] 在另一个具体实施方式中，抗体在含有至少 1、2、4、6、8、10 或 12 或全部氨基酸残基 L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88 的区域中结合 KIR2DL1。在特殊的具体实施方式中，该区域含有氨基酸残基 M44 和 F45 和任选地至少 1、2、4、6、8、10 或全部的 L38、R41、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88（见实施例 9 和 11）。在另一个特殊的具体实施方式中，该区域含有至少氨基酸残基 M44、F45 和 D72，其在 1-7F9 表位和 HLA-C 结合部位重叠的 KIR2DL1 区域。

[0261] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1、KIR2DL2/3 和 KIR2DS4 的抗体。

[0262] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 二者但不结合 KIR2DS4 的抗体。

[0263] 在另一个具体实施方式中，本发明提供了结合 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 二者但不结合 KIR2DS3 或 KIR2DS4 的抗体。

[0264] 确定在上面限定的表位区之一内的抗体、抗体片段或抗体衍生物是否结合，可以以本领域技术人员已知的方法进行。见，例如实施例 9 和 11。在这种绘图 / 表征方法的另一个实施例中，对于抗 KIR 抗体的表位区可以通过表位 " 足迹法 "，使用 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 蛋白质中暴露的胺 / 羧基的化学修饰进行确定。这种足迹法技术的一个特定的例子是使用 HXMS（通过质谱法检测到的氢 - 氘交换），其中发生受体和配体蛋白质酰胺质子的氢 / 氘交换，结合，并且反向 (back) 交换，其中参与蛋白质结合的主链酰胺基团被保护不进行反向交换而且因此将仍然是氘化的。有关的区域可以在这点上通过消化性蛋白酶解，快速微孔高效液相色谱法分离，和 / 或电喷射离子化质谱法进行鉴定。见，例如 Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol.267(2)pp.252-259(1999) 和 / 或 Engen, J.R. 和 Smith, D.L.(2001)Anal.Chem.73,256A-265A。另一个适当的表位鉴定技术例子是核磁共振表位作图 (NMR)，其中典型地比较游离抗原和与抗原结合肽，例如抗体复合的抗原的二维 NMR 光谱 (spectres) 中信号的位置。抗原典型地用 15N 选择性地同位素标记，所以只有对应于抗原的信号可以在 NMR- 谱中看到和看不到来自抗原结合肽的信号。起源于参与与抗原结合肽的相互作用的氨基酸的抗原信号，与游离抗原的光谱比较，典型地将移动在复合体中的光谱的位置，并且可以那样确认参与结合的氨基酸。见，例如 Ernst Schering Res Found Workshop.2004 ;(44) :149-67 ;Huang 等，Journal of Molecular Biology, Vol.281(1) pp.61-67(1998) ;和 Saito 和 Patterson, Methods.1996Jun ;9(3) :516-24。

[0265] 表位作图 / 表征也可以使用质谱学方法进行。见，例如 Downward, J Mass Spectrom.2000Apr ;35(4) :493-503 和 Kiselar 和 Downard, Anal Chem.1999May 1 ;71(9) : 1792-801。

[0266] 蛋白酶消化技术也可以用于表位作图和鉴定的范围中。抗原决定簇有关的区 / 序列可以通过蛋白酶消化进行确定，例如通过以与 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 的比率大约 1 ： 50 使用胰蛋白酶，在 37℃和 pH 7-8 进行 (o/n) 消化，继之以质谱法 (MS) 分析进行肽鉴定。由抗 KIR 抗体保护免于胰蛋白酶切割的肽随后进行鉴定，该鉴定是通过比较受到胰蛋白酶消化的样品和用抗体进行孵育然后受到消化例如胰蛋白酶（由此显色抗体的足迹）的样品进行的。其它的酶象胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等，同样或备择地可以用于相似的表位表征方法。而且，酶的消化能提供快速的分析潜在的抗原决定簇序列是否在结合 KIR 多肽的上下

文中 KIR2DL1 的区域内。如果多肽不是表面暴露的，根据免疫原性 / 抗原性最有可能不相关。关于相似技术的讨论，见例如 Manca，Ann Ist Super Sanita. 1991 ;27(1) :15-9。

[0267] 定点诱变是对阐明结合表位有用的另一种技术。例如在“丙氨酸 - 扫描”中，在蛋白质区段内的每一残基用丙氨酸残基取代，并且对结合亲和力的结果进行了测量。如果突变导致结合亲和力显著地降低 (resuction)，它最有可能参与结合。对结构表位特异的单克隆抗体 (也就是不结合未折叠蛋白质的抗体) 可以用于证实，丙氨酸 - 置换不影响蛋白质的全部折叠。见，例如 Clackson 和 Wells，Science 1995 ;267 :383-386 ;和 Wells，Proc Natl Acad Sci USA 1996 ;93 :1-6。

[0268] 电子显微镜术也可以用于表位“足迹法”。例如 Wang 等，Nature1992 ;355 :275-278 使用了冷冻电镜术、三维图像重构和 X- 射线晶体学的协调应用以确定天然豇豆花叶病毒的衣壳表面上 Fab- 片段的物理足迹。

[0269] 对表位评价的其它形式的“无标记”试验包括表面胞质基因组共振 (SPR，BIACORE) 和反射计干涉光谱学 (RifS)。见，例如**Fägerstam**等，Journal Of Molecular Recognition 1990 ;3 :208-14 ;Nice 等，J. Chromatogr. 1993 ;646 :159-168 ;Leipert 等，Angew. Chem. Int. Ed. 1998 ;37 :3308-3311 ; **Kröger** 等，Biosensors 和 Bioelectronics 2002 ;17 :937-944。

[0270] 抗体片段和衍生物

[0271] 本发明的抗体片段和衍生物 (如在本申请中使用，其包含于术语“抗体”和“抗体类”中，除非另作说明或明显地与上下文相矛盾)，优选地 1-7F9- 或 1-4F1- 样抗体，可以通过本领域已知的技术产生。“免疫反应性片段”含有完整抗体的一部分，通常包含抗原结合部位或可变区。抗体片段的例子包括 " κ 体 " (见，例如 I11 等，Protein Eng 10 :949-57(1997)) 和 " janusins " (在本文别处进一步描述)。Fab、Fab′ 、Fab′ -SH、F(ab)2、F(ab′)2、dAb(Ward 等，(1989)Nature 341 :544-546) ;基本上由 VH 域组成)、Fd(基本上由 VH 和 CH1 域组成) 和 Fv(基本上由 VL 和 VH 域组成) 片段 ;双抗体 ;κ 体和 . janusins。例如抗体片段包括具有由毗连氨基酸残基的不间断序列组成一级结构的多肽 (在本文称为 " 单链抗体片段 " 或 " 单链多肽 ")，包括不限于 (1) 单链 Fv(scFv) 分子 (2) 只包含一个轻链可变域的单链多肽，或其包含轻链可变域三个 CDRs 的片段，没有相关重链部分和 (3) 只包含一个重链可变区的单链多肽，或其包含重链可变区三个 CDRs 的片段，没有相关的轻链部分 ;和由抗体片段形成的多特异性抗体。例如，Fab 或 F(ab')2 片段可以根据常规技术，通过分离抗体的蛋白酶消化产生。

[0272] 将要理解，免疫反应性片段可以使用已知方法进行修饰，例如减缓体内清除率并获得更合意的药物动力学特征。例如该片段可以用聚乙二醇 (PEG) 或聚氧乙烯化多元醇进行修饰。偶联和位点特异的缀合 PEG 到 Fab' 片段的方法在，例如 Leong 等，Cytokine 16(3) :106-119(2001) 和 Delgado 等，Br. J. Cancer 73(2) :175-182(1996) 中进行了描述，其公开内容在本文通过参考并入本申请。

[0273] 在特殊的方面，如图 14 所阐明，本发明提供了含有 1-7F9 或 1-4F1 的轻链和 / 或重链可变区序列的抗体、抗体片段和抗体衍生物。在另一方面，如图 15 所阐明或上面所描述，本发明提供了含有一个或更多 1-7F9 或 1-4F1 的轻链和 / 或重链可变区 CDRs 的抗体、其抗体片段和衍生物。这种序列的功能性变体 / 类似物可以使用标准技术，通过制造

适当的取代、添加和/或缺失，在这些公开的氨基酸序列中产生，该标准技术可辅助以序列比较。从 7F9/KIR2DL1 复合体和 KIR2DL1/MHCI 类复合体的晶体结构的重叠 (Fan 等，Nat. Immunol. 2001 ;2 :452-460)，PDB- 代码 1IM9，可以得出结论 1-7F9 的 scFv 衍生物将能阻断 MHC I 类结合 KIR2DL1。同样单独的 1-7F9 的单 L- 链或 1-7F9 的单 VL 域，当结合 KIR2DL1 时，将阻断 MHC I 类结合。

[0274] 这种序列的功能性变体/类似物可以通过在这些公开的氨基酸序列中，通过使用标准技术进行适当的取代、添加和/或缺失产生，该标准技术可辅助以比较序列。在另一方面，其中存在于这些抗体之一的序列中的残基的位置，但不是另一个，可能适于缺失、取代和/或插入。

[0275] 备择地，编码本发明抗体，例如 1-7F9- 或 1-4F1 样抗体的 DNA，可以进行修饰以使编码本发明的片段。然后，将修饰的 DNA 插入表达载体并用以转化或转染适当的细胞，然后其表达期望的片段，如在本文别处所描述。

[0276] 在备择的具体实施方式中，产生本发明的鼠抗体，例如 DF200 样抗体的杂交瘤的 DNA，可以在插入表达载体之前进行修饰，例如通过用人类重链和轻链恒定区的编码序列代替同源的非人类序列（如通过例如 Morrison 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.，81，pp. 6851(1984) 描述）。在另一个具体实施方式中，编码本发明抗体的可变区可以通过重组 DNA 工程结合至免疫球蛋白编码序列对非免疫球蛋白多肽的全部或部分的编码序列。以那种方式，制备了″嵌合的″或″杂交″抗体，其具有原始抗体的结合特异性。典型地，用这种非免疫球蛋白多肽取代本发明抗体的恒定区。

[0277] 因而，根据另一个具体实施方式，本发明的抗体、优选地 DF-200 样抗体是人源化的。根据本发明，″人源化的″形式的抗体是特异性嵌合的免疫球蛋白，免疫球蛋白链或其片段（例如 Fv、Fab、Fab′、F(ab′)2 或抗体的其它抗原结合子序列），其包含来源于鼠免疫球蛋白的最小序列。对大部分来说，人源化抗体是人类免疫球蛋白（接受体抗体），其中来自该接受体互补决定区 (CDR) 的残基被来自原始抗体（供体抗体）CDR 的残基取代，同时保持了原始抗体期望的特异性、亲和力和能力。在一些例子中，人类免疫球蛋白的 Fv 框架残基可以被对应的非人类残基代替。此外，人源化抗体能含有没有在接受体抗体或在输入的 CDR 或框架序列中发现的残基。进行这些修饰以进一步改进和优化抗体性能。通常，人源化抗体将实质上含有全部至少一个，并且典型地两个可变域，其中全部或实质上全部的 CDR 区对应于原始抗体的那些和全部或实质上全部的 FR 区是人类免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最佳地也将含有至少部分的免疫球蛋白恒定区 (Fc)，典型地为人类免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区。更详细的资料见 Jones 等，Nature，321，pp. 522(1986) ;Reichmann 等，Nature，332，pp. 323(1988) ；和 Presta，Curr. Op. Struct. Biol.，2，pp. 593(1992)。

[0278] 人源化本发明的抗体的方法为本领域众所周知。通常地，根据本发明的人源化抗体具有从原始抗体引入其中的一个或更多的氨基酸残基。这些鼠或其它非人类氨基酸残基通常被称为“输入”残基，其典型地取自“输入”可变域。人源化可以基本上按 Winter 和合作者 (Jones 等，Nature，321，pp. 522(1986) ;Riechmann 等，Nature，332，pp. 323(1988) ；Verhoeyen 等，Science，239，pp. 1534(1988)) 的方法进行。因此，这种“人源化”抗体为嵌合抗体 (Cabilly 等，美国专利 No. 4，816，567)，其中实质上小于完整的人类可变域已经被

来自原始鼠抗体的相应序列取代。实际上，根据本发明的人源化抗体典型地为其中一些CDR残基和可能一些FR残基被来自原始鼠抗体中类似部位的残基取代的人类抗体。

[0279] 用于制造人源化抗体的人类可变结构域（轻链和重链二者）的选择对降低抗原性是非常重要的。根据所谓的"最适"方法，针对已知人类可变域序列的全部文库筛选本发明抗体的可变域序列。然后采用最接近于小鼠序列的人类序列作为人源化抗体的人类框架 (FR)(Sims 等，J.Immunol.，151，pp.2296(1993)；Chothia 和 Lesk，J.Mol.Biol.，196，pp.901(1987))。另一个方法使用了来自轻链或重链特殊亚群的全部人类抗体共有序列的特殊框架。相同框架可以用于几种不同的人源化的抗体 (Carter 等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.，89，pp.4285(1992)；Presta 等，J.Immunol.，51，pp.1993))。

[0280] 进一步重要的是，在保留有对多种抑制性KIR受体的高亲和力和其他有利的生物学特性的情况下人源化抗体。为了达到该目的，根据优选的方法，人源化抗体是通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型，分析亲本序列和不同的概念性人源化产物的过程进行制备的。三维免疫球蛋白模型一般可以得到而且对那些本领域技术人员是熟悉的。可以得到计算机程序，其阐明并显示选择的候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构。这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用，也就是分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原能力的残基。这样，FR残基可以从共同序列和输入序列中选择并组合以便获得期望的抗体特征，例如对靶抗原亲和力的增加。通常，CDR残基直接地而且最实质上参与影响抗原结合。

[0281] 如上所述，制造人类单克隆抗体的方法是使用**XenoMouse®** (Abgenix，Fremont，CA)，作为用来免疫的小鼠。根据本发明，XenoMouse是其免疫球蛋白基因被功能性人类免疫球蛋白基因代替的鼠宿主。因而，由该小鼠或在由该小鼠的B细胞制造的杂交瘤中产生的抗体已经是人源化的。XenoMouse在美国专利No.6,162,963中进行了描述，在本文通过参考将其全部并入本申请。类似的方法可以使用 HuMAb-Mouse™(Medarex) 完成。

[0282] 人类抗体也可以根据不同的其它技术产生，例如对于免疫，通过使用其它的转基因动物，其已经设计以表达人类抗体所有组成成分 (Jakobovitz 等，Nature 362(1993)255)，或通过使用噬菌体展示方法，选择抗体全部组成部分。如在本申请中所公开，这种技术对技术人员来说是已知的而且可以从单克隆抗体开始来实现。

[0283] 本发明的抗体，优选地 1-7F9- 或 1-4F1 样抗体，也可以衍生为"嵌合的"抗体（免疫球蛋白），其中重链和/或轻链的一部分与原始抗体中的相应序列相同或同源，而这（些）链的剩余部分与来源于另外物种或属于另外抗体类或亚类的抗体以及这类抗体的片段中相应序列相同或同源，只要它们显示期望的生物学活性 (Cabilly 等，supra；Morrison 等，Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.，81，pp.6851(1984))。

[0284] 本发明范围内的其它衍生物包括功能化的抗体，也就是与毒素，例如蓖麻毒素、白喉毒素、相思豆毒素和假单胞菌外毒素，或治疗性放射性核素，例如，例如 ^{90}Y 或 ^{131}I；与可检测到的部分，例如荧光部分，诊断性放射性同位素或显影剂；或与固体载体，例如琼脂糖珠或类似物缀合或共价结合的抗体。这些其它的药剂缀合或共价结合至抗体的方法在本领域众所周知。

[0285] 与毒素的缀合对显示其细胞表面交叉反应性KIR受体之一的NK细胞的靶向杀伤是有用的。一旦本发明的抗体结合这种细胞的细胞表面，其被内在化而且毒素在细胞内释

放，选择性地杀伤所述细胞。这种使用是本发明备择的具体实施方式。

[0286] 当本发明的抗体用于诊断目的时，与可检测到的部分缀合是有用的。这种目的包括，但不限于分析生物样品中其细胞表面上具有交叉性反应 KIR 的 NK 细胞存在，和检测在活的生物中具有交叉性反应 KIR 的 NK 细胞存在。这种分析和检测方法也是本发明备择的具体实施方式。

[0287] 本发明的抗体缀合到固体载体，作为在其细胞表面上具有交叉反应性 KIR 的 NK 细胞的亲和纯化工具是有用的，NK 细胞来自来源，例如生物学流体。该纯化方法是本发明的另一个备择具体实施方式，得到的纯化的 NK 细胞群体也是本发明的另一个备择具体实施方式。

[0288] 药物组合物和应用

[0289] 本发明也提供了含有人类或人源化抗体，或其片段和衍生物的药物组合物，其中所述抗体、片段或衍生物在患者中或在含有 NK 细胞的生物样品中，在任何适当的媒介中以有效可检测地加强 NK 细胞细胞毒性的量，与 NK 细胞表面的至少两种抑制性 KIR 受体交叉反应，降低或中和它们的抑制性信号并加强那些细胞的活性。用于根据本发明的用途，含有人类或人源化的抗 KIR mAb，任选地和另一种活性剂的药物组合物，按照常规技术例如在 Remington :The Science andPractice of Pharmacy，第 19 版，Gennaro 编，Mack Publishing Co.，Easton，PA，1995 中公开的那些，可以与药学上可接受的载体或稀释剂以及任意其它已知佐剂和赋形剂配制。组合物可以以常规形式，例如胶囊剂、片剂、气雾剂、溶液或悬液、或以冻干粉末出现。

[0290] 因此，本发明的一个目标是提供含有人类或人源化抗体，或其片段或衍生物的药物制剂，其存在浓度从 1mg/ml 到 500mg/ml，并且其中所述制剂 pH 从 2.0 到 10.0。该制剂可以进一步含有缓冲液系统、防腐剂（类）、张力剂（类）、螯合剂（类）、稳定剂和表面活性剂。在本发明的一个具体实施方式中，药物制剂是含水制剂，也就是含有水的制剂。这种制剂典型地是溶液或悬液。在本发明进一步的具体实施方式中，药物制剂为水溶液。如在本文所使用，术语“含水剂型”为含有至少 50％ w/w 水的制剂。同样地，术语“水溶液”为含有至少 50％ w/w 水的溶液，并且术语“含水悬液”为含有至少 50％ w/w 水的悬液。

[0291] 在另一个具体实施方式中，药物制剂为冷冻干燥的制剂，在使用之前，医生或患者向其中加入溶剂和 / 或稀释剂。

[0292] 在另一个具体实施方式中，药物制剂为即时可用而不需要任何预先溶解的干燥制剂（例如冷冻干燥或喷雾干燥）。

[0293] 在进一步方面，本发明涉及含有如在本文所述抗体水溶液和缓冲液的药物制剂，其中所述抗体以 1mg/ml 或更高浓度存在，并且其中所述制剂 pH 从大约 2.0 到大约 10.0。

[0294] 在另一个具体实施方式中，该制剂的 pH 选自由 2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9 和 10.0 组成的列表。

[0295] 在进一步的具体实施方式中，缓冲剂选自由醋酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、双甘氨肽、

组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三（羟甲基）氨基甲烷、N- 二（羟乙基）甘氨酸、三（羟甲基）甲基甘氨酸、苹果酸、琥珀酸盐、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物组成的组。这些具体缓冲剂的每一种构成本发明备择的具体实施方式。

[0296] 在进一步具体实施方式中，制剂也含有药学上可接受的防腐剂。在另一个具体实施方式中，防腐剂选自由苯酚、邻甲酚、间甲酚、对甲酚、甲基对 - 羟基苯甲酸酯、丙基对 - 羟基苯甲酸酯、2- 苯氧乙醇、丁基对 - 羟基苯甲酸酯、2- 苯基乙醇、苯甲醇、氯代丁醇和硫柳汞、2- 溴 -2- 硝基丙烷 -1,3- 二醇、苯甲酸、咪脲、氯己定、脱氢醋酸钠、氯甲酚、对羟基苯甲酸乙酯、苯索氯铵、氯苯甘醚 (3 对氯苯氧基丙 -1,2- 二醇）或其混合物组成的组。在一个具体实施方式中，防腐剂以浓度从 0.1mg/ml 到 20mg/ml 存在。在另一个具体实施方式中，防腐剂以浓度从 0.1mg/ml 到 5mg/ml 存在。在还有另一个具体实施方式中，防腐剂以浓度从 5mg/ml 到 10mg/ml 存在。在另一个具体实施方式，防腐剂以浓度从 10mg/ml 到 20mg/ml 存在。所列出的具体防腐剂的每一种构成本发明备择的具体实施方式。尽管防腐剂在药物组合物中的用途对技术人员是众所周知的；但为了便利，参考 Remington：TheScience and Practice of Pharmacy，第 19 版，1995。

[0297] 在进一步的具体实施方式中，制剂也含有等渗剂。在一个具体实施方式中，等渗剂选自由盐（例如氯化钠）、糖、糖醇、氨基糖、氨基酸（例如 L- 甘氨酸、L- 组氨酸、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸）、糖醇（例如甘油（甘油）、1,2- 丙二醇（丙二醇）、1,3- 丙二醇、1,3- 丁二醇）和聚乙二醇（例如 PEG400）或其混合物组成的群。可以使用任何适当的糖，包括但不限于单 -，双 - 或多糖和水溶性葡聚糖，例如例如果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、右旋糖苷、支链淀粉、糊精、环糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素钠。在一个具体实施方式中，糖添加剂是蔗糖。糖醇定义为有至少一个羟基基团的 C4-C8 碳氢化合物而且包括，例如甘露醇、山梨醇、肌醇、半乳糖醇、卫矛醇、木糖醇和阿糖醇。在一个具体实施方式中，糖醇添加剂为甘露醇。上面提到的糖或糖醇可以单独或结合使用。对使用的数量没有固定的限制，只要糖或糖醇在液体制剂中是可溶的而且不会不利地影响使用本发明的方法获得的稳定效应。在一个具体实施方式中，糖或糖醇浓度在大约 1mg/ml 和大约 150mg/ml 之间。在另一个具体实施方式中，等渗剂以浓度从 1mg/ml 到 50mg/ml 存在。在另一个具体实施方式中，等渗剂以浓度从 1mg/ml 到 7mg/ml 存在。在另一个具体实施方式中，等渗剂以浓度从 8mg/ml 到 24mg/ml 存在。在另一个具体实施方式中，等渗剂以浓度从 25mg/ml 到 50mg/ml 存在。上面列出的每一特定等渗剂构成本发明备择的具体实施方式。尽管药物组合物中等渗剂的使用对技术人员是众所周知的；但为了便利，参考 Remington：The Science andPractice of Pharmacy，第 19 版，1995。

[0298] 在进一步具体实施方式中，制剂也含有螯合剂。在一个具体实施方式中，螯合剂选自乙二胺四乙酸 (EDTA)，柠檬酸，和天冬氨酸，及其混合物的盐类。在另一个具体实施方式中，螯合剂以浓度从 0.1mg/ml 到 5mg/ml 存在。在另一个具体实施方式中，螯合剂以浓度从 0.1mg/ml 到 2mg/ml 存在。在本发明的进一步具体实施方式中，螯合剂以浓度从 2mg/ml 到 5mg/ml 存在。这些特定螯合剂的每一个构成本发明备择的具体实施方式。药物组合物中螯合剂的用途对技术人员是众所周知的。为了方便，参考 Remington：The Science and

Practice ofPharmacy,第 19 版,1995。

[0299] 在进一步具体实施方式中,制剂也含有稳定剂。尽管药物组合物中稳定剂的用途对技术人员是众所周知的;但为了方便,参考 Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第 19 版,1995。

[0300] 本发明的组合物可以,例如为稳定的液体药物组合物,其治疗性活性组分包括可能在液体药物制剂中在储存期间显示聚集体形成的多肽。"聚集形成"意思是在引起寡聚体形成的多肽分子之间物理相互作用,其可以保留可溶性,或从溶液中沉淀的大的可见聚集体。"在储存期间"意思是一旦制备液体药物组合物或制剂,不立即给受试者施用。反而,在制备后,将其包装或以液体形式,以冷冻态或以干燥形式储存,用于后来重建为液体形式或适于给受试者施用的其它形式。"干燥形式"意思是液体药物组合物或制剂通过冷冻干燥(也就是冻干;见,例如 Williams 和 Polli(1984)J.Parenteral Sci. Technol.38:48-59),喷雾干燥(见 Masters(1991)in Spray-Drying Handbook(5thed;Longman Scientific 和 Technical,Essez,U.K.),pp.491-676;Broadhead 等 (1992)Drug Devel.Ind.Pharm.18:1169-1206;和 Mumenthaler 等 (1994)Pharm.Res.11:12-20),或风干 (Carpenter 和 Crowe(1988)Cryobiology 25:459-470; 和 Roser(1991)Biopharm.4:47-53)进行干燥。在液体药物组合物储存期间多肽的聚集形成能不利地影响导致药物组合物治疗性功能丧失的多肽的生物学活性。此外,当使用输注系统施用包含多肽的药物组合物时,聚集形成可以引起其它的问题例如阻塞管、膜或泵。

[0301] 本发明的药物组合物也可以含有足够减少在组合物储存期间多肽引起的聚集形成的量的氨基酸碱。"氨基酸碱"意思是氨基酸或氨基酸组合,其中任意所给的氨基酸以其游离碱形式或以其盐形式存在。当使用氨基酸的组合时,全部的氨基酸可以它们的游离碱形式存在,全部可以它们的盐形式,或一些可以它们游离碱形式而其它以它们的盐形式存在。在一个具体实施方式中,在制备本发明组合物中使用的氨基酸是带有电荷侧链的那些,例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。特定氨基酸(例如蛋氨酸、组氨酸、咪唑、精氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、色氨酸、苏氨酸和其混合物)的任何立体异构体(也就是 L、D 或其混合物)或这些立体异构体的组合,可以在本发明的药物组合物中存在,只要该特定氨基酸以其游离碱形式或其盐形式存在。在一个具体实施方式中,使用了 L- 立体异构体。本发明的组合物也可以与这些氨基酸的类似物配制。"氨基酸类似物"意思是引起降低在本发明的液体药物组合物储存期间由多肽引起的聚集形成期望效果的自然存在的氨基酸衍生物。适当的精氨酸类似物包括,例如氨基胍,鸟氨酸和 N- 一乙基 L- 精氨酸,适当的蛋氨酸类似物包括乙硫氨酸和 buthionine 而且适当的半胱氨酸类似物包括 S- 甲基 -L 半胱氨酸。当用其它的氨基酸时,将氨基酸类似物以它们的游离碱形式或盐形式合并入组合物中。在本发明进一步具体实施方式中,氨基酸或氨基酸类似物以足够预防或延迟蛋白质聚集的浓度使用。

[0302] 在进一步具体实施方式中,当用作治疗药的多肽是含有至少一个对这种氧化敏感的蛋氨酸残基的多肽时,可以添加蛋氨酸(或其它含硫的氨基酸或氨基酸类似物)以抑制蛋氨酸残基氧化为蛋氨酸亚砜。"抑制"意思是随时间蛋氨酸氧化的种类的最小的积聚。抑制蛋氨酸氧化导致多肽以其适当的分子形式更大的保留。可以使用蛋氨酸 (L 或 D) 的任何立体异构体或其组合。要添加的量应为足够抑制蛋氨酸残基氧化的量,这样蛋氨酸亚砜

的量对管理机构来说是可以接受的。典型地，这意味着组合物包含不大于大约 10％到大约 30％的蛋氨酸亚砜。通常地，这可以通过添加蛋氨酸（这样添加的蛋氨酸与蛋氨酸残基的比率范围从大约 1 ： 1 到大约 1000 ： 1，例如 10 ： 1 到大约 100 ： 1）来获得。

[0303] 在进一步具体实施方式中，制剂也含有选自高分子量聚合物或低分子化合物组的稳定剂。在一个具体实施方式中，稳定剂选自聚乙二醇（例如 PEG 3350）、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯吡咯烷酮、羧基 / 羟基纤维素或其衍生物（例如 HPC、HPC-SL、HPC-L 和 HPMC）、环糊精、含硫物质如一硫代甘油、巯基乙酸和 2- 甲硫基乙醇，和不同的盐类（例如氯化钠）。这些特定稳定剂的每一个构成本发明备择的具体实施方式。

[0304] 药物组合物也可以含有进一步增强其中治疗活性多肽的稳定性的附加的稳定剂。为本发明所特有兴趣的稳定剂包括，但不限于，保护多肽免于蛋氨酸氧化的蛋氨酸和 EDTA，和保护多肽免于与冻融或机械剪切有关的聚集的非离子表面活性剂。

[0305] 在进一步具体实施方式中，制剂也含有表面活性剂。在一个具体实施方式中，表面活性剂选自去污剂、乙氧基化蓖麻油、聚乙二醇化甘油酯、乙酰单酸甘油乙酯、脂肪酸脱水山梨醇酯、聚氧化丙稀 - 聚氧化乙烯嵌段共聚物（例如泊咯沙姆例如**Pluronic®** F68、泊咯沙姆 188 和 407、TritonX-100）、聚氧化乙烯脂肪酸脱水山梨醇酯、聚氧化乙烯和聚乙烯衍生物例如烷基化和烷氧基化衍生物（吐温，例如吐温 -20、吐温 -40、吐温 -80 和 Brii-35）、单酸甘油酯或其乙氧基化衍生物、甘油二酯或其聚氧化乙烯衍生物、醇类、甘油、凝集素类和磷脂类（例如磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油和鞘磷脂）、磷脂类衍生物（例如棕榈酰磷脂酸）和溶血磷脂类（例如乙醇胺的棕榈酰溶血磷脂酰 -L- 丝氨酸和 1- 酰基 -sn- 丙三醇 -3- 磷酸酯、胆碱、丝氨酸或苏氨酸）和溶血磷脂酰和磷脂酰胆碱类的烷基、烷氧基（烷基酯）、烷氧基（烷基醚）衍生物，例如溶血磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱的月桂酰和肉豆蔻酰衍生物和极性头基团的修饰形式，其为胆碱类、乙醇胺类、磷脂酸、丝氨酸类、苏氨酸类、甘油、肌醇和正电荷的 DODAC、DOTMA、DCP、BISHOP、溶血磷脂酰丝氨酸和溶血磷脂酰苏氨酸和丙三醇磷脂类（例如脑磷脂类）、甘油糖脂类（例如吡喃半乳糖苷）、神经鞘糖脂类（例如神经酰胺类、神经节苷脂类）、十二烷基磷酸胆碱、鸡蛋溶血卵磷脂、梭链孢酸衍生物（例如牛磺二氢梭链孢酸钠等）、C6-C12 的长链脂肪酸和其盐类（例如油酸和辛酸）、酰基肉碱类和衍生物、赖氨酸、精氨酸或组氨酸的 N^{α}- 酰化衍生物、或赖氨酸或精氨酸的侧链酰化衍生物、含有赖氨酸、精氨酸或组氨酸和中性或酸性氨基酸任何组合的二肽类的 N^{α}- 酰化衍生物、含有中性氨基酸和两个带电氨基酸任何组合的三肽的 N^{α}- 酰化衍生物、DSS（琥珀辛酯钠、CAS 登记号 [577-11-7]）、琥珀辛酯钙、CAS 登记号 [128-49-4]）、琥珀辛酯钾、CAS 登记号 [7491-09-0]）、SDS（十二烷基硫酸钠或十二烷基硫酸钠）、辛酸钠、胆酸或其衍生物、胆汁酸类和其盐类与甘氨酸或牛磺酸缀合物、乌素脱氧胆酸、胆酸钠、脱氧胆酸钠、牛磺胆酸钠、甘胆酸钠、N- 十六烷基 -N，N- 二甲基 -3- 氨溶 -1- 丙磺酸盐、阴离子（烷基 - 芳基 - 磺酸盐）单价表面活性剂、两性离子表面活性剂（例如 N- 烷基 -N，N- 二甲氨溶 -1- 丙磺酸盐类、3- 胆酰氨基 -1- 丙基二甲氨溶 -1- 丙磺酸盐、阳离子表面活性剂（季铵碱）（例如十六烷基 - 三甲溴化铵、十六烷基氯化吡啶鎓）、非离子表面活性剂（例如十二烷基 β -D- 吡喃葡萄糖苷）、乙二胺衍生物类 (poloxamines)（例如 Tetronic’s）、其为来源于连续添加环氧丙烷和环氧乙烷到乙二胺的四功能嵌段共聚物，或表面活性剂可以选自咪唑啉衍生物或其混合物的组。这些特定表面

活性剂的每一个构成本发明备择的具体实施方式。

[0306] 虽然药物组合物中表面活性剂的用途对技术人员是众所周知的；但是为了方便，参考 Remington：The Science 和 Practice of Pharmacy，第 19 版，1995。

[0307] 在进一步具体实施方式中，虽然也可以使用其它的商业上可获得和适当的蛋白酶抑制剂，该制剂也含有蛋白酶抑制剂例如 EDTA（乙二胺四乙酸）和苄脒 HCl。为了抑制自催化，蛋白酶抑制剂的用途在含有蛋白酶的酶原的药物组合物中特别有用。

[0308] 其它的成分也可以在本发明的药物制剂中存在。这种附加成分可以包括湿润剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力改进剂、螯合剂、金属离子、含油赋形剂、蛋白质（例如人类血清白蛋白、明胶或蛋白质）和两性离子（例如氨基酸例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸）。这种附加成分优选地不会不利地影响本发明药物制剂的总稳定度。

[0309] 包含根据本发明抗体的药物组合物可以给需要这种治疗的患者，在几个部位施用，例如在局部部位，例如皮肤和粘膜部位，在绕过吸收的部位，例如在动脉、在静脉、在心脏中施用和在包括吸收的部位，例如在皮肤中、在皮下、在肌肉中和腹部中施用。

[0310] 根据本发明药物组合物的施用可以通过几个途径给需要这种治疗的患者施用，例如舌、舌下、颊、口中、口服、胃和肠中、鼻、肺，例如通过细支气管和肺泡或其组合、表皮、真皮、透皮、阴道、直肠、眼睛、例如通过结膜、输尿管和胃肠外。

[0311] 本发明的组合物可以多种剂量形式施用，例如溶液、悬液、乳剂、微乳剂、多重乳剂、泡沫、油膏剂、膏剂、硬膏剂、软膏剂、片剂、包衣片剂、清洗剂、胶囊剂、例如硬明胶胶囊和软明胶胶囊、栓剂、直肠用胶囊、滴剂、凝胶剂、喷雾剂、散剂、气雾剂、吸入剂、滴眼剂、眼用软膏、眼用清洗剂、阴道栓剂、阴道环、阴道软膏剂、注射液、原地转化溶液、例如原地胶凝、原地凝固（setting）、原地沉淀、原地结晶化、输注液和植入物。

[0312] 为了进一步增强抗体稳定性，提高生物利用度，提高溶解度，减少不良作用，达到对本领域技术人员众所周知的择时治疗，和提高患者顺应性或其任何组合，本发明的组合物可以进一步例如通过共价，疏水和静电相互作用，混合在或连接到药物载体，药物传递系统和高级药物传递系统。载体，药物传递系统和高级药物传递系统的例子包括，但不限于聚合体，例如纤维素和衍生物、多糖，例如右旋糖苷和衍生物、淀粉和衍生物、聚（乙烯醇）、丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯聚合物、聚乳酸和聚羟基乙酸和其嵌段共聚物、聚乙二醇、载体蛋白质，例如白蛋白、凝胶，例如热胶凝（thermogelling）系统，例如对那些本领域技术人员众所周知的嵌段共聚物系统、胶束、脂质体、微球体、纳米颗粒、液晶和其分散体、L2 相和其分散体，其对那些脂质 - 水系统中相行为领域技术人员众所周知，聚合胶束、多重乳剂、自乳化、自微乳化、环糊精和其衍生物和树状聚合物（dendrimers）。

[0313] 本发明的组合物在固体、半固体、粉剂和溶液制剂中是有用的，用于使用例如定量吸入器、干粉吸入器和雾化器（所有的装置对那些本领域技术人员是众所周知的）肺给予抗体。

[0314] 本发明的组合物在控制的、持续的、延长的、延迟和缓慢释放药物传递系统的制剂中特别有用。更特别地，但不限于，组合物在本领域技术人员众所周知的胃肠外控制释放和持续释放系统（两系统导致施用次数的多倍减少）制剂中是有用的。甚至更优选地，是皮下施用的控制释放和持续释放系统。不限制本发明的范围，有用的控制释放系统和组合物的例子是水凝胶、油质凝胶、液晶、聚合胶束、微球体、纳米粒子。

[0315] 产生对本发明的组合物有用的控制释放系统的方法包括，但不限于，结晶、浓缩、共结晶、沉淀、共沉淀、乳化、分散、高压匀化、包囊、喷雾干燥、微囊化、凝聚、相分离、溶剂蒸发以产生微球体、挤压和超临界流体过程。通常参考Handbook of PharmaceuticalControlled Release(Wise，D.L. 编，Marcel Dekker，New York，2000) 和 Drug and the Pharmaceutical Sciences vol.99:Protein Formulationand Delivery(MacNally，E.J. 编，Marcel Dekker，New York，2000)。

[0316] 胃肠外施用可以使用注射器，任选地笔样注射器通过皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射进行。备择地，胃肠外施用可以使用输注泵进行。进一步选择是可以是用于以鼻或肺喷雾形式施用抗体溶液或悬液的组合物。作为另外的选择，包含本发明抗体的药物组合物也可以适合于经皮施用，例如通过无针注射或来自贴片，任选地离子电渗贴片，或经粘膜，例如颊施用。

[0317] 抗体可以通过肺途径，使用适于肺部药物输送的任意已知类型的装置，在介质中以溶液、悬液或干粉形式进行施用。

[0318] 这些的例子含有，但不限于，用于肺部药物输送的产生气雾剂的三个通常类型，并且可以包括喷射器或超声波雾化器，定量吸入器，或干粉吸入器 (Cf.Yu J，Chien YW.Pulmonary drug delivery:Physiologic and mechanistic aspects.Crit Rev Ther Drug Carr Sys14(4)(1997)395-453)。

[0319] 基于标准化的测试方法学，将粒子的空气动力直径 (d_a) 定义为单位密度的参考标准球形粒子的几何等价直径 (1g/cm3)。在最简单的情况，对于球形粒子，d_a 与参考直径 (d) 相关，参考直径为密度比率的平方根的函数，如下式所描述：

[0320] $$d_a = \sqrt{\frac{\rho}{\rho_a}} d$$

[0321] 对这种关系的修正发生于非球形粒子（参考文献Edwards DA，Ben-Jebria A，Langer R.Recent advances in pulmonary drug deliveryusing large，porous inhaled particles.J Appl Physiol 84(2)(1998)379-385)。术语“MMAD”和“MMEAD”已经进行了很好的描述而且为本领域所已知（参考文献Edwards DA，Ben-Jebria A，Langer R andrepresents a measure of the median value of an aerodynamic particlesize distribution.Recent advances in pulmonary drug delivery usinglarge，porous inhaled particles.J Appl Physiol 84(2)(1998)379-385)。质量中值空气动力直径 (MMAD) 和质量中值有效空气动力直径 (MMEAD) 可交换地进行使用，是统计学参数，而且凭经验地描述气雾剂粒子的大小与它们潜在地在肺中沉淀有关，与实际形状、大小或密度无关（参考文献Edwards DA，Ben-Jebria A，Langer R.Recentadvances in pulmonary drug delivery using large，porous inhaledparticles.J Appl Physiol 84(2)(1998)379-385)。MMAD通常地从用碰撞器，测量粒子在空气中的惯性行为的仪器得到的测量结果计算。

[0322] 在进一步具体实施方式中，制剂可以通过任何已知的气雾化技术进行气雾化，例如雾化，以获得小于10μm，更优选地为在1-5μm之间和最优选地在1-3μm之间的MMAD的气雾剂粒子。优选的粒子大小基于输送药物到肺深部的最有效大小，其中蛋白质得以最佳地吸收（参考文献Edwards DA，Ben-Jebria A，Langer A，Recent advances

inpulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J ApplPhysiol 84(2)(1998)379-385)。

[0323] 含有抗体的肺用制剂的肺深部沉积可以任选地通过使用吸入技术的改进形式，例如但不限于：缓慢吸入流（例如 30L/min)，屏气和动作定时进行优化。

[0324] 术语“稳定的制剂”指的是具有增加的物理稳定性，增加的化学化学稳定性或增加的物理和化学稳定性的制剂。

[0325] 如在本文所使用，术语蛋白质制剂的“物理稳定性”指的是蛋白质形成生物学无活性和 / 或蛋白质不溶解的聚集体的趋势，作为蛋白质暴露于热 - 机械应激和 / 或与不稳定的界面和表面，例如疏水表面和界面相互作用的结果。含水蛋白质制剂的物理稳定性是将充满于适当容器（例如药筒或小瓶）的制剂在不同的温度下暴露于机械 / 物理性应激（例如搅动）不同时间周期，通过目视检查和 / 或浊度测量进行评价的。剂型的目视检查是以锐聚焦光，用黑暗背景来进行的。制剂的浊度是通过将浊度程度分级的目测评分进行表征的，例如以从 0 到 3 等级（没有显示浊度的制剂对应于目测评分 0，和在日光下显示目测浊度的制剂对应于目测评分 3)。当制剂在日光下显示目测浊度，就蛋白质聚集而论，制剂分类为物理不稳定。备择地，制剂的浊度可以通过技术人员熟知的简单浊度测量进行评价。含水蛋白质制剂的物理稳定性也可以通过使用光谱剂或蛋白质构象状态的探针来评价。探针优选地为小分子，其优先地结合蛋白质的非天然的构象异构体。蛋白质结构的小分子光谱探针的一个例子是硫黄素 T。硫黄素 T 是荧光染料，其已被广泛用来检测淀粉样原纤维。在原纤维，而且可能其它蛋白质构型也存在时，当结合原纤维蛋白质形式时，硫黄素 T 引起在大约 450nm 处新的激发最大值和在大约 482nm 处增强发射。未结合硫黄素 T 在该波长基本上无荧光。

[0326] 其它的小分子可以用作从天然到非天然状态蛋白质结构变化的探针。例如“疏水膜片”探查优先地结合蛋白质暴露的疏水膜片。疏水膜片通常地埋入在其天然状态的蛋白质三级结构，但是当蛋白质开始展开或变性时变为暴露。这些小分子，光谱探针的例子是芳香族，疏水性染料，例如蒽 (antrhacene)、吖啶、菲咯啉或类似物。其它光谱探针是金属 - 氨基酸复合体，例如疏水氨基酸，例如苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、和缬氨酸或类似物的钴金属复合体。

[0327] 如在本文所使用，术语蛋白质制剂“化学稳定性”指的是蛋白质结构中的化学共价变化，其导致与天然的蛋白质结构比较具有潜在的较少的生物学效能和 / 或潜在的增加的免疫原特性的化学降解产物的形成。不同的化学降解产物可以根据天然蛋白质的类型和特性和蛋白质暴露的环境形成。如本领域技术人员众所周知，化学降解的消除最可能地不能完全地避免并且在蛋白质制剂的储存和使用期间，经常可看到化学降解产物量的增加。大多数蛋白质倾向于脱酰胺，它是一个其中谷氨酰胺酰基或天冬酰胺酰残基中的侧链酰胺基水解以形成游离羧酸的过程。其它的降解途径包括高分子量转化产物的形成，其中两个或更多个蛋白质分子通过转酰胺基作用和 / 或二硫化物相互作用相互共价结合，导致共价结合二聚体，寡聚体和多聚体降解产物的形成 (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T. J. &Manning M. C., Plenum Press, New York 1992)。（例如蛋氨酸残基的）氧化作为化学降解的另一个变体可以提及。蛋白质制剂的化学稳定性可以通过暴露于不同的环境条件后，在不同的时间点测量化学降解产物的量进行评价（降解产物的形成通常可以通

过例如升高温度进行加速）。每一个别降解产物的量经常根据分子大小和/或电荷，通过使用不同的色谱法技术（例如 SEC-HPLC 和/或 RP-HPLC），分离降解产物来确定。

[0328] 因此，如上略述，“稳定的制剂”指的是具有增加的物理稳定性，增加的化学稳定性或增加的物理和化学稳定性的制剂。通常，制剂在使用和储存期间一定要稳定（依照推荐的使用和储存条件）直到到达失效期。

[0329] 在本发明的一个具体实施方式中，含有抗体的药物物剂稳定达使用超过 6 周，储存超过 3 年。

[0330] 在本发明的另一个具体实施方式中，含有抗体的药物制剂稳定达使用超过 4 周和储存超过 3 年。

[0331] 在本发明进一步的具体实施方式中，含有抗体的药物制剂稳定达使用超过 4 周和储存超过 2 年。

[0332] 在本发明更进一步的具体实施方式中，含有抗体的药物制剂稳定达使用超过 2 周和储存超过 2 年。

[0333] 因而，如上所述，可以用于这些组合物中的药学上可接受的载体包括，但不限于，离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、磷脂酰胆碱、血清蛋白类例如人类血清白蛋白、缓冲剂物质例如磷酸盐和甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐类或电解质类例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠和锌盐类、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡类、聚乙烯 - 聚氧化丙稀 - 嵌段共聚物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0334] 本发明的组合物可以在加强患者或生物样品中 NK 细胞活性的方法中加以利用。该方法含有使所述组合物与所述患者或生物样品接触的步骤。这种方法对诊断和治疗目的二者将是有用的。

[0335] 为了在与生物样品结合中使用，根据样品（流体或固体）特性，抗体组合物可以通过与样品简单地混合或直接地应用到样品来施用。生物样品可以直接地与在任何适当装置（平板、袋、瓶等）中的抗体进行接触。为用于与患者结合，组合物一定为给患者施用进行配制。

[0336] 如上所述，本发明的组合物可以经口、胃肠外、通过吸入喷雾剂、局部、直肠、鼻、颊、阴道或通过植入储库来施用。如在本文所使用，术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内的、鞘内、肝内、病变内的和颅内注射或输注技术。优选地，组合物经口、腹膜内或静脉内施用。

[0337] 本发明的组合物的无菌注射形式可以为含水的或含油悬液。这些悬液可以根据本领域已知技术，使用适当的分散剂或湿润剂和悬浮剂进行配制。无菌注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬液，例如在 1,3- 丁二醇中的溶液。在可接受的载体和溶剂中可以使用的是水，格林溶液和等渗氯化钠溶液。此外，无菌、固定油类常规地用作溶剂或悬浮介质。为此目的，可以使用包括合成的甘油单酯或甘油二酯的任何温和的固定油。脂肪酸，例如油酸和其甘油酯衍生物在注射剂的制备中是有用的，以及天然药学上可接受的油类，例如橄榄油或蓖麻油，特别地以其聚氧乙烯变型。这些油剂或悬液也可以包含长链醇稀释剂或分散剂，例如羧基甲基纤维素或相似分散剂，其一般用于药学上可接受剂量形式，包括乳剂和悬液的剂型中。其它通常使用的表面活性剂，例如吐

温，司盘类和其它的乳化剂类或生物利用度增强剂类（其一般用于生产药学上可接受的固体，液体，或其它的剂量形式）也可以用于该制剂目的。

[0338] 本发明的组合物可以以任意经口可接受的剂型包括但不限于，胶囊剂、片剂、含水悬液或溶液经口施用。在为经口使用的片剂情况下，通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。润滑剂类，例如硬脂酸镁，也典型地进行添加。为了以胶囊形式经口施用，有用的稀释剂包括乳糖和干燥玉米淀粉。当需要含水悬液来口服使用时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂组合。如果希望，也可以添加一些甜味剂，调味剂或着色剂。

[0339] 备择地，本发明的组合物可以以为直肠施用的栓剂形式施用。这些可以通过将药剂与适当的非刺激性赋形剂混合进行制备，该赋形剂在室温为固体但在直肠温度为液体，并因此将在直肠融化以释放药物。这样的物质包括可可油、蜂蜡和聚乙二醇类。

[0340] 本发明的组合物也可以局部施用，特别地当治疗的目标包括通过局部施用容易接近的区域或器官，包括眼、皮肤或下肠道的疾病。用于这些区域或器官每一个的适当局部制剂可容易地制备。

[0341] 用于下肠道的局部施用可以以直肠栓剂制剂（见上面）或以适当的灌肠剂制剂达到。也可以使用局部地透皮贴片。

[0342] 对局部施用，组合物可以以包含悬浮或溶解于一个或更多载体中的活性成分的适当的软膏进行配制。用于本发明化合物局部施用的载体包括，但不限于，矿物油、液体石蜡、白凡士林、丙二醇、聚氧化乙烯、聚氧化丙稀化合物、乳化蜡和水。备择地，组合物可以以包含悬浮或溶解于一个或更多药学上可接受载体中的活性组分的适当洗剂或乳膏进行配制。适当的载体包括，但不限于，矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、吐温 60、十六烷基酯蜡、鲸蜡醇、2- 辛十二醇、苯甲醇和水。

[0343] 为了眼用，组合物可以配制为在等渗，pH 调节的无菌盐水中的微粉化悬液，或优选在等渗，pH 调节的无菌盐水中的溶液，有或没有防腐剂例如苯甲基 alkonium 氯化物。备择地，为了眼用，组合物可以在软膏例如凡士林中进行配制。

[0344] 本发明的组合物也可以通过鼻气雾剂或吸入进行施用。这种组合物根据药物制剂领域众所周知的技术制备，并且使用苯甲醇或其它适当的防腐剂，吸收促进剂以增加生物利用度，氟碳化合物和 / 或其它的常规增溶剂或分散剂，可以制备为盐水中的溶液。

[0345] 多种单克隆抗体，例如 Rituxan（利妥昔单抗），Herceptin（曲妥单抗）或 Xolair(Omalizumab)，已经显示在临床环境中是有效的，并且用本发明的抗体可以使用相似的施用方案（也就是制剂和 / 或剂量和 / 或施用方案）。本发明药物组合物中的抗体施用的方案和剂量可以根据对这些产物来说已知方法，例如使用厂商说明书进行确定。例如存在于本发明药物组合物中的抗体可以以在 100mg(10mL) 或 500mg(50mL) 单次使用小瓶中 10mg/mL 浓度来供给。在 9.0mg/mL 氯化钠、7.35mg/mL 柠檬酸钠二水合物、0.7mg/mL 吐温 80 和无菌注射水中配制产物用于静脉内给药。pH 调节到 6.5。本发明药物组合物中抗体的代表性的适当剂量范围可以在大约 10mg/m2 和 500mg/m2 之间。然而，将要理解，考虑到在临床试验中必须确定的药物组合物中特殊抗体的亲和力和耐受性，这些方案是代表性的而且最佳方案和方式可以适应性地调整。鉴于在人类和非人类哺乳动物中抗体的亲和力及其药物动力学参数，将确定饱和 NK 细胞 24 小时、48 小时、72 小时或一周或一个月的本发明药物组合物中的抗体注射的数量和方案。

[0346] 根据另一个具体实施方式，本发明的抗体组合物可以进一步含有另外的治疗药，该另外的治疗药包括对使用抗体的特殊治疗性目的而通常应用的药剂。附加治疗药通常地将以在为治疗特殊疾病或病症的单一治疗中药药剂典型使用的量存在于组合物中。这类治疗药包括，但不限于，用于癌症治疗的治疗药、用于治疗感染性疾病的治疗药、在其它免疫治疗中使用的治疗药、细胞因子（例如 IL-2 或 IL-15）、其它抗体和其它抗体的片段。

[0347] 在备择的具体实施方式中，结合存在于至少两种不同的人类抑制性 KIR 受体基因产物上的共同决定簇的抗体（其中所述抗体能中和 KIR 介导的 NK 细胞细胞毒性对表达至少本发明所述两种不同的人类抑制性 KIR 受体之一的 NK 细胞的抑制作用）可以单独或与为靶向递送到人类或其他非人类哺乳动物中肿瘤，或感染部位的其它物质一起合并入脂质体（“免疫脂质体”）。这类其它物质包括用于输送基因治疗的基因或输送抑制 NK 细胞中基因的反义 RNA、RNAi 或 siRNA 的核酸，或靶向杀伤 NK 细胞的的毒素或药物。

[0348] 例如，许多治疗药对癌症的治疗是可以利用的。本发明的抗体组合物和方法可以与通常在特定疾病，特别是肿瘤、癌症疾病或患者表现的其它疾病或障碍的治疗中使用的任何其它方法结合。只要不知道特殊的治疗方法实质上对患者病症有害，并且不显著地抵消本发明药物组合物中抗体的活性，就可以考虑其与本发明的结合。

[0349] 关于实体瘤治疗，本发明的药物组合物可以用于与经典方法，例如手术、放射疗法、化学疗法等等结合。本发明因此提供联合疗法，其中本发明的药物组合物与手术或放射治疗同时、在其之前或之后使用；或与常规化学治疗剂、放射治疗剂或抗血管生成剂或靶向免疫毒素或 coaguligands 一起、在其之前或之后给患者施用。

[0350] 当一个或更多药剂在治疗方案中用于与本发明包含抗体的组合物结合时，对在每一治疗分别进行时观察到的相加作用的结合的结果没有要求。虽然至少相加作用是通常所期望的，任何超过单一治疗之一的增加的抗癌作用是有益的。同样，对联合治疗显示协同效应没有特殊的要求，虽然这是可能的而且是有利的。

[0351] 为实践联合抗癌治疗，人们将以在动物中有效地产生它们的联合抗癌作用的方式，简单地给患者施用结合另一种抗癌剂的本发明的抗体组合物。因此将以有效量和有效地产生肿瘤脉管系统中的联合存在和其在肿瘤环境中的联合作用的一段时间提供药剂。为达到此目的，本发明的抗体组合物和抗癌剂可以，或以单一组合的组合物，或以使用相同或不同施用途径的两个不同的组合物同时给患者施用。

[0352] 备择地，本发明的抗体组合物的施用可以在抗癌剂治疗之前或之后，例如间隔从数分钟到数周和数月。人们将确保抗癌剂和本发明的抗体组合物中的抗体发挥对癌症的有利联合效果。作为例子，本发明的 mAbs 可以给患有非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 的患者施用。这种患者典型地用利妥昔单抗组合和称为 CHOP 的化学治疗药组合进行治疗。因此，本发明的抗 KIR 抗体可以用来治疗 NHL 患者，其正经受通过在治疗方案中组合所有药剂的施用，用利妥昔单抗和 CHOP 治疗，其中药剂以较长的治疗周期，在相同天，或在不同天给予。

[0353] 其它抗癌药可以在施用本发明的抗 KIR 抗体组合物之前、同时或之后给予。然而，当抗体的免疫缀合物用于本发明的抗体组合物中时，不同的抗癌药可以同时或随后施用。

[0354] 在一些情形下，甚至希望显著地延长治疗期间，其中在各自的抗癌剂施用或抗癌治疗和本发明的抗体组合物的施用之间间隔数天 (2、3、4、5、6 或 7)、数周 (1、2、3、4、5、6、7 或 8) 或甚至数月 (1、2、3、4、5、6、7 或 8)。这在其中抗癌治疗打算本质上消灭肿瘤，例如手

术或化学疗法，并且发明的抗体组合物的施用打算预防微小转移或肿瘤再生长的环境中可能是有利的。

[0355] 同样可以预见超过一次本发明基于抗 KIR 抗体的组合物或者抗癌剂的施用将加以利用。这些药剂可以交换地施用，隔几日或隔几周；或一周期的用本发明的抗 KIR 抗体组合物的治疗，继之以一周期的抗癌剂治疗。在任何情况下，使用联合治疗以达到肿瘤退化，所需要的全部是以有效地发挥抗肿瘤作用的组合量传送两种药剂，而不管施用次数。

[0356] 在外科手术方面，任何外科手术干预可以与本发明结合实行。在放射疗法方面，预期任何在癌症细胞内局部地诱导 DNA 损伤的机理，例如 γ- 照射、X- 射线、UV- 照射、微波和甚至电子发射等等。定向输送放射性同位素到癌症细胞也是预期的，并且这可以用于与靶向抗体或其它的靶向手段结合。

[0357] 在其它的方面，免疫调节化合物或方案可以与本发明的抗体组合物结合或作为其一部分进行施用。免疫调节化合物优选的例子包括细胞因子。不同的细胞因子可以应用于这种组合方法中。在由本发明预期的组合中有用的细胞因子的例子包括 IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-21、TGF-β、GM-CSF、M-CSF、G-CSF、TNF-α、TNF-β、LAF、TCGF、BCGF、TRF、BAF、BDG、MP、LIF、OSM、TMF、PDGF、IFN-α、IFN-β、IFN-γ。用于本发明的联合治疗或组合物中的细胞因子根据标准的方案进行施用，与临床指征例如患者的状况和细胞因子的相对毒性一致。可以与本发明的抗体组合物结合或作为其一部分进行施用的其它的免疫调节化合物包括特异地结合淋巴细胞上其它抑制性受体的抗体，包括不限于抗体例如抗 CTLA4 抗体，或抗 CD94/NKG2A 抗体（见，例如美国公布的专利申请 20030095965）。本领域已知的这些分子的变体和衍生物可以同样或备择地用于这类方法中，并且适当时掺入本发明的组合物。

[0358] 在一些具体实施方式中，本发明的含有交叉反应性、阻断性和 / 或抑制性抗 KIR 抗体的治疗性组合物可以与化学治疗或激素治疗药剂结合进行施用或可以进一步含有化学治疗或激素治疗药剂。多种激素治疗剂和化学治疗剂可以用于在本文公开的联合治疗方法中。预期作为代表的化学治疗剂包括，但不限于，烷化剂、抗代谢物、细胞毒性抗生素、长春花属生物碱、例如阿霉素、放线菌素 D、丝裂霉素、洋红霉素、道诺霉素、阿霉素、他莫昔芬、紫杉醇、泰索帝、长春新碱、长春碱、长春烯碱、依托泊苷 (VP-16)、5- 氟尿嘧啶 (5FU)、阿糖胞苷、环磷酰胺、三胺硫磷、甲氨蝶呤、喜树碱、放线菌素 -D、丝裂霉素 C、顺铂 (CDDP)、氨喋呤、考布他汀和其衍生物及前药。

[0359] 激素药剂包括，但不限于，例如 LHRH 激动剂例如亮丙瑞林、戈舍瑞林、曲普瑞林和布舍瑞林；抗雌激素类例如他莫昔芬和托瑞米芬；抗雄激素类例如氟利坦、尼鲁米特、环丙孕酮酯和比卡鲁胺；芳香酶抑制剂类例如阿那曲唑、依西美坦、来曲唑和法倔唑；和结合孕激素类例如 medroxy、氯地孕酮和甲地孕酮。

[0360] 正如那些本领域普通技术人员所理解的，化学治疗剂的适当剂量将大约为已经应用于临床治疗的那些，其中化学治疗剂单独或与其它的化学治疗剂结合进行施用。例如，只有药剂例如顺铂和其它的 DNA 烷化剂可以使用。顺铂已经广泛用于治疗癌症，用在临床应用中使用的有效剂量 20mg/m2，每三周 5 天，持续共三个疗程。顺铂口服不吸收，并且因此必须通过静脉内、皮下、肿瘤内或腹膜内注射进行输送。

[0361] 进一步有用的化学治疗剂包括干扰 DNA 复制、有丝分裂和染色体分离的化合物

和破坏多核苷酸前体合成及保真度的药剂。许多代表性的用于联合治疗的化学治疗剂列于美国专利6,524,583的表C中，其药剂和指征的公开内容在本文特别地通过参考并入本申请。每一个列出的药剂是代表性的而且不是限制性的。对熟练的技术人员指引到" Remington' s Pharmaceutical Sciences" 第15版，33章，特别是624-652页。剂量的变化将可能根据进行治疗的病症发生。用药治疗的医师将能确定对个体受试者的适当剂量。

[0362] 本发明的该交叉反应性、阻断性和/或抑制性抗KIR抗体组合物可以用于与任何一种或更多抗血管生成治疗结合或可以进一步含有抗血管生成剂。这类药剂的例子包括中和性抗体、反义RNA、siRNA、RNAi、RNA适体和核糖酶，各自针对VEGF或VEGF受体（美国专利No.6,524,583，公开内容在本文通过参考并入本申请）。也可以使用具有拮抗特性的VEGF变体，如在WO 98/16551所描述，特别地在本文通过引用并入本申请。进一步代表性的在与联合治疗结合中有用的抗血管生成剂列于美国专利No.6,524,583的表D中，其药剂和指征的公开内容特别地在本文通过引用并入本申请。

[0363] 本发明的抗KIR抗体组合物也可以有利地用于与诱导凋亡方法结合或可以含有凋亡剂。例如已经鉴定许多抑制凋亡，或程序性细胞死亡的癌基因。该种类中代表性的癌基因包括，但不限于，bcr-abl、bcl-2（不同于bcl-1，细胞周期蛋白D1；GenBank登记号M14745，X06487；美国专利Nos.5,650,491和5,539,094；通过引用在本文将每一并入本申请）和家族成员包括Bcl-x1、Mcl-1、Bak、A1和A20。bcl-2的超量表达首先发现于T细胞淋巴瘤中。癌基因bcl-2通过结合和灭活Bax，（一种细胞凋亡途径中的蛋白质）起作用。抑制bcl-2功能防止Bax失活，并允许细胞凋亡途径继续进行。该类癌基因的抑制作用，例如使用反义核苷酸序列、RNAi、siRNA或小分子化学化合物，预期在本发明中使用以引起凋亡的增强（美国专利Nos.5,650,491；5,539,094；和5,583,034；通过引用在本文将每一并入本申请）。

[0364] 本发明的抗KIR抗体组合物也可以含有或用于结合含有靶向部分分子（靶向剂），例如抗体、配体或其缀合物，其指向靶细胞（"靶向剂"），例如靶肿瘤细胞上特异性标记。一般而言，用于这些本发明的附加方面的靶向剂将优选地识别可接近的肿瘤抗原，该抗原优先地，或特异地在肿瘤部位中表达。靶向剂将通常地结合表面表达，表面可接近或表面定位的肿瘤细胞成分。导向剂也将优选地表现出高亲和力特性；而且在体内将不发挥明显的针对维持生命的正常组织的副作用，例如选自心、肾、脑、肝、骨髓、结肠、乳腺、前列腺、甲状腺、胆囊、肺、肾上腺、肌肉、神经纤维、胰腺、皮肤或其它的人体中维持生命器官或组织中的一种或更多组织。如在本文所使用，术语" 不产生显著的副作用" 指的是当在体内施用时，靶向剂将仅仅产生可忽略的或临床上可处理的副作用，例如那些在化学疗法中通常遇到的。

[0365] 在肿瘤的治疗中，本发明的抗体组合物可以另外含有或可以用于结合辅助化合物。辅助化合物可以包括例如抗呕吐药例如5-羟色胺拮抗剂和治疗药例如吩噻嗪类、取代的苯甲酰胺类、抗组胺类、丁酰苯类、皮质激素类、苯二氮䓬类和大麻素类；二膦酸盐类例如唑来膦酸和帕米膦酸和造血生长因子类例如促红细胞生成素和G-CSF，例如非格司亭、来格司亭和darbepoietin。

[0366] 在另一个具体实施方式中，两种或更多种识别不同的表位或决定簇的本发明的抗

体，包括 NKVSF1、DF200、1-4F1 和 / 或 1-7F9，可以结合为单一组合物，以便降低或中和尽可能多 KIR 基因产物的抑制作用。含有本发明交叉反应抑制性 KIR 抗体，或其片段或衍生物组合的组合物，将允许甚至更宽的效用，因为可能存在小百分比的人群，其可能缺少由单一交叉反应抗体识别的每一种抑制性 KIR 基因产物。相似地，本发明的抗体组合物可以进一步含有一种或更多的识别单一抑制性 KIR 亚型的抗体。这种组合在治疗性环境中将再次提供更宽的效用。因此，本发明的抗体可以与另一种结合例如 KIR2DL1、KIR2DLK2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2 和 KIR3DL3 中的一种或多种的抗 KIR 抗体结合。

[0367] 本发明也提供了在需要它的患者中加强 NK 细胞活性的方法，它包括给所述患者施用根据本发明的组合物的步骤。该方法更特异地针对在患有其中增加的 NK 细胞活性是有益的疾病的患者中，增加 NK 细胞活性，该疾病涉及、影响对 NK 细胞的裂解敏感的细胞或由该细胞引起，或由不足的 NK 细胞活性引起或特征在于不足的 NK 细胞活性，例如癌症、增殖性障碍、感染性疾病或免疫障碍。更加特别地，本发明的方法用来治疗治疗多种癌症和其它的增殖性疾病包括但不限于下列癌、包括膀胱、乳腺、结肠、肾、肝、肺、卵巢、前列腺、胰腺、胃、子宫颈、甲状腺和皮肤的癌，包括鳞状细胞癌；淋巴谱系的造血肿瘤、包括白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、多毛细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤；骨髓谱系的造血肿瘤、包括急性和慢性骨髓性白血病和早幼粒细胞性白血病；间充质来源的肿瘤、包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤；其它的肿瘤、包括黑色素瘤、精原细胞瘤、畸胎癌、成神经细胞瘤和神经胶质瘤；中枢和外周神经系统肿瘤、包括星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤；间充质来源的肿瘤、包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤；和其它的肿瘤、包括黑色素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎癌。

[0368] 根据本发明可以治疗的其它优选的障碍包括淋巴谱系的造血肿瘤，例如 T 细胞和 B 细胞肿瘤，包括但不限于 T 细胞障碍，例如包括小细胞和脑形细胞型的 T- 幼淋巴细胞性白血病 (T-PLL)；优选 T 细胞型的大颗粒淋巴细胞白血病 (LGL)、Sezary 综合征 (SS)、成年 T 细胞白血病淋巴瘤 (ATLL)、a/d T-NHL 肝脾淋巴瘤、胸腺外周 / 后 T 细胞淋巴瘤 (多形和免疫母细胞亚型)、血管免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤、血管中心性 (鼻)T 细胞淋巴瘤、退行发育性 (Ki1+) 大细胞淋巴瘤、肠 T 细胞淋巴瘤、T- 淋巴母细胞；和淋巴瘤 / 白血病 (T-Lbly/T-ALL)。

[0369] 根据本发明，其它的增殖性障碍也可以进行治疗，包括例如增生、纤维变性 (特别地肺部的，但是也包括其它类型的纤维变性，例如肾纤维变性)、血管生成、银屑病、动脉粥样硬化和血管中平滑肌增生，例如血管成形术后的狭窄或再狭窄。本发明的交叉反应性抑制性 KIR 抗体可以用于治疗或预防感染性疾病，优选地包括任何由病毒、细菌、原生动物、霉菌或真菌引起的感染。这类病毒感染性生物包括，但不限于，甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、流感、水痘、腺病毒、单纯性疱疹 I 型 (HSV-1)、单纯性疱疹 2 型 (HSV-2)、牛瘟、鼻病毒、埃可病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头瘤病毒、乳头瘤病毒、巨细胞病毒、echinovirus、虫媒病毒、huntavirus、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、埃博拉病毒和人类免疫缺陷病毒 I 型或 2 型 (HIV-1、HIV-2)。

[0370] 根据本发明可以治疗的细菌感染包括，但不限于，由下列引起的感染：葡萄球菌属 (Staphylococcus)；链球菌属 (Streptococcus)，包括化脓葡萄球菌 (S.pyogenes)；肠球菌

(Enterococcl)；芽胞杆菌属(Bacillus)，包括炭疽杆菌(Bacillus anthracis)，和乳杆菌属(Lactobacillus)；利斯特菌属(Listeria)；白喉杆菌(Corynebacteriumdiphtheriae)；加德纳菌属(Gardnerella)包括阴道加德纳菌(G.vaginalis)；奴卡氏菌属(Nocardia)；链霉菌属(Streptomyces)；普通高温放线菌(Thermoactinomyces vulgaris)；密螺旋体属(Treponerna)；弯曲菌属(Camplyobacter)，假单胞菌属(Pseudomonas)包括Raeruginosa；军团菌属(Legionella)；奈瑟球菌属(Neisseria)包括淋病奈瑟球菌(N.gonorrhoeae)和脑膜炎奈瑟球菌(N.meningitides)；黄杆菌属(Flavobacterium)包括脑膜脓毒性黄杆菌(F.meningosepticum)和芳香味黄杆菌(F.odoraturn)；布鲁氏菌属(Brucella)；鲍特菌属(Bordetella)包括百日咳杆菌(B.pertussis)和支气管败血性鲍特菌(B.bronchiseptica)；埃希杆菌属(Escherichia)包括大肠杆菌(E.coli)；克雷伯杆菌属(Klebsiella)；肠杆菌属(Enterobacter)，沙雷菌属(Serratia)包括粘质沙雷菌(S.marcescens)和液化沙雷菌(S.liquefaciens)；爱德华菌属(Edwardsiella)；变形杆菌属(Proteus)包括奇异变形杆菌(P.mirabilis)和普通变形杆菌(P.vulgaris)；链杆菌属(Streptobacillus)；立克次氏体科(Rickettsiaceae)包括R.fickettsfi，衣原体属(Chlamydia)包括鹦鹉热衣原体(C.psittaci)和C.trachornatis；分枝杆菌属(Mycobacterium)包括结核分枝杆菌(M.tuberculosis)，胞内分枝杆菌(M.intracellulare)，偶发分枝杆菌(M.folluiturn)，麻风杆菌(M.laprae)，鸟分枝杆菌(M.avium)，牛结核分枝杆菌(M.bovis)，非洲分枝杆菌(M.africanum)，堪萨斯分枝杆菌(M.kansasii)，胞内分枝杆菌(M.intracellulare)，和鼠麻风分枝杆菌(M.lepraernurium)；和奴卡氏菌属(Nocardia)。

[0371] 根据本发明可以治疗的原生动物感染包括，但不限于，由利什曼原虫属(leishmania)、kokzidioa，和锥虫属(trypanosoma)引起的感染。感染性疾病的完整列表可以在疾病控制中心(CDC)的国家传染病中心(NCID)的网站(万维网在cdc.gov/ncidod/diseases/)上发现，在本文通过参考将该列表并入本申请。所有所述疾病是使用本发明的交叉反应抑制性KIR抗体的治疗的选择物。

[0372] 这种治疗不同感染性疾病的方法可以使用本发明的抗体组合物，单独或结合其它对治疗这种疾病已知的治疗和/或治疗药，包括抗病毒药、抗真菌的药、抗菌药、抗生素、抗寄生虫药和抗原生动物药。当这些方法包括用附加治疗药的附加的治疗时，那些药剂可以以单一剂量形式或以分开的、多倍剂量形式，与本发明的抗体一起施用。当以分开剂量形式进行施用时，附加的药剂可以先于、同时、在施用本发明抗体之后进行施用。

[0373] 本发明的进一步方面和优势将在下列实验部分中公开，其应该看作是说明性的并不限制本申请的范围。

实施例

[0374] 实施例1PBLs的纯化和多克隆或克隆的NK细胞系的产生

[0375] 通过水溶性聚蔗糖(Ficoll)-Hypaque梯度和plastic粘附细胞的缺失，PBLs来源于健康供体。为获得富集的NK细胞，通过本领域已知方法(Pende等，J Exp Med 1999；190:1505-1516)，PBLs与抗CD3、抗CD4和抗HLA-DR mAbs在4℃孵育30分钟，继之以用山羊抗小鼠磁珠(Dynal)孵育(在4℃ 30分钟)和免疫磁性选择。$CD3^-$，$CD4^-$，DR^-细胞在照

射的饲养细胞和 100U/ml 白细胞介素 2(Proleukin, Chiron Corporation) 和 1.5ng/ml 植物凝集素 A(GibcoBRL) 进行培养以获得多克隆 NK 细胞群体。NK 细胞通过有限稀释进行克隆而且 NK 细胞克隆通过流式细胞仪对表达细胞表面受体进行表征。

[0376] 使用的 mAbs 是 JT3A(IgG2a, 抗 CD3)、EB6 和 GL183(IgG1, 分别抗 KIR2DL1 和 KIR2DL3)、XA-141(IgM, 抗 KIR2DL1, 具有与 EB6 相同特异性)、抗 CD4(HP2.6), 和抗 DR(D1.12, IgG2a)。代替 JT3A、HP2.6 和 DR1.12, 可以使用其它商业上可获得的相同特异性的 mAbs。EB6 和 GL183 是商业上可获得的 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA)。XA-141 是商业上不能获得的, 但是 mAb EB6 可以相同地用于控制裂解的重建, 如在本文实施例和图中所示, 如由 Moretta 等, J Exp Med 1993 ;178 :597-604 所描述。

[0377] 细胞用适当的抗体染色 (在 4℃ 30 分钟), 继之以缀合 PE 或 FITC 的多克隆抗小鼠抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc)。通过细胞荧光测定分析 (流式细胞仪), 在 FACScan 仪器 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) 上分析样品。

[0378] 下列的 NK 细胞克隆用于本研究。CP11、CN5 和 CN505 为 KIR2DL1 阳性克隆并由 EB6(IgG1, 抗 KIR2DL1) 或 XA-141(IgM, 抗 KIR2DL1, 与 EB6 抗体比较具有相同特异性) 染色。CN12 和 CP502 是表达 KIR2DL3 的 NK 克隆并由 GL183 抗体 (IgG1, 抗 KIR2DL2/3) 染色。

[0379] NK 克隆的溶细胞活性通过标准的 4 小时 51Cr 释放试验进行评估, 其中测试了效应物 NK 细胞它们杀伤表达 HLA-Cw3 或 -Cw4 靶细胞, 已知其对 NK 细胞裂解敏感性的 HLA 阳性细胞系的能力。所有靶细胞在微量滴定 96 孔板中每孔 5000 细胞使用, 并且效应物 :靶比率 (通常每个靶细胞四个效应物) 显示在图中。用或不用以 1/2(1 ∶ 1) 稀释的指出的单克隆抗体的杂交瘤上清液进行溶细胞试验。程序与在 Moretta 等, J Exp Med 1993 ;178 :597-604 中描述的基本上相同。

[0380] 实施例 2 新 mAbs 的产生

[0381] 如在 (Moretta 等, J Exp Med 1990 ;172 :1589-1598) 中所描述, MAbs 通过用活化的多克隆或单克隆人类 NK 细胞系免疫 5 周龄 Balb/C 小鼠产生。不同的细胞融合之后, 首先选择 mAbs 它们与 EB6- 和 GL183- 阳性 NK 细胞系和克隆交叉反应的能力。进一步筛选阳性单克隆抗体它们分别地通过 Cw4 或 Cw3 阳性靶的 EB6 阳性或 GL183 阳性 NK 克隆重建裂解的能力。

[0382] 细胞染色按如下进行。细胞用一组抗体 (1μg/ml 或 50μl 上清液, 4℃ 30 分钟) 进行染色, 继之以 PE- 缀合的山羊 F(ab')2 片段抗小鼠 IgG(H+L) 或 PE- 缀合的山羊 F(ab')2 片段抗人类 IgG(Fcγ) 抗体 (Beckman Coulter)。在 Epics XL.MCL 仪器 (Beckman Coulter) 上进行细胞荧光测定分析。

[0383] 发现单克隆抗体之一, DF200mAb, 与包括 KIR2DL1, 和 KIR2DL2/3 的 KIR 家族的不同成员反应。KIR2DL1 阳性和 KIR2DL2/3 阳性 NK 细胞二者用 DF200mAb 进行明亮地染色 (图 1)。

[0384] 表达这些 HLA Ⅰ类 - 特异抑制性受体的一种或另一种 (或甚至二者) 的 NK 克隆用作针对表达一个或更多 HLA-C 等位基因的靶细胞的效应物细胞。细胞毒性试验按如下进行。YTS-KIR2DL1 或 YTS-Eco(KIR 阴性) 细胞系的溶细胞活性通过标准的 4 小时 Cr-51 释放试验进行评估。靶细胞为 HLA-Cw4 阳性或阴性 B-EBV 细胞系, 或 HLA-Cw4- 转染的 721.221 细胞。所有靶在微量滴定板中以每孔 3000 细胞使用。效应物 / 靶比率显示于附图中。用

或不用显示的单克隆小鼠或人类抗体的全长或 F(ab')2 片段进行溶细胞试验。如所预料，KIR2DL1 阳性 (KIR2DL1$^+$)NK 克隆显示很少的，如果有的话，针对表达 HLA-Cw4 的靶细胞的溶细胞活性而且 KIR2DL3+NK 克隆对 Cw3 阳性靶显示很少或没有活性。然而，在存在 DF200mAb（用于掩蔽其 KIR2DL 受体）情况下，NK 克隆变得不能识别其 HLA-C 配体并显示针对 Cw3- 或 Cw4- 表达性靶的强溶细胞活性（结果的例子如图 2-6 所示）。

[0385] 例如，C1R 细胞系 (Cw4+EBV 细胞系，ATCC No.CRL-1993)，其表达 HLA-Cw4（但没有 1 群 HLA-C 同种异型），没有被 KIR2DL1 阳性 NK 克隆 (CN5/CN505) 杀伤，但是抑制作用能通过使用 DF200 或常规抗 KIR2DL1mAb 而有效地逆转。另一方面，表达 KIR2DL2/3$^+$KIR2DL1- 表型 (CN12) 的 NK 克隆有效地杀伤 C1R 细胞而且该杀伤不受 DF200mAb 的影响（图 2)。相似的结果可以用 KIR2DL2- 或 KIR2DL3 阳性 NK 克隆对 Cw3 阳性靶获得。

[0386] 相似地，Cw4+221EBV 细胞系不被 KIR2DL1+ 转染的 NK 细胞杀伤，但是抑制作用能通过使用 DF200mAb，DF200 的 Fab 片段，或常规抗 KIR2DL1mAbs EB6 或 XA141 而有效地逆转。同样，Cw3 阳性 721.221 转染子不被 KIR2DL2$^+$NK 细胞杀伤，但是该抑制作用能通过使用 DF200 或 DF200Fab 片段而逆转。最后，Cw3+721.221 转染子不被 KIR2DL3$^+$NK 细胞杀伤，但是该抑制作用能通过使用 DF200Fab 片段或常规抗 KIR2DL3mAb GL183 或 Y249 而逆转。结果如图 3 所示。

[0387] 同样对 F(ab')2 片段测试了其重建裂解 Cw4 阳性靶的能力。DF200 和 EB6Abs 的 F(ab')2 片段二者能逆转由 KIR2DL1- 转染的 NK 细胞对 Cw4 转染的 221 细胞系和 Cw4+TUBO EBV 细胞系裂解的抑制作用。结果如图 4 所示。

[0388] 实施例 3：DF200mAb/KIR2DL1 和 DF200mAb/KIR2DL3 相互作用的 Biacore 分析

[0389] 重组蛋白质的生产和纯化。KIR2DL1 和 KIR2DL3 重组体蛋白质在 E.coli. 中生产。编码 KIR2DL1(SEQ ID NO:23) 和 KIR2DL3(SEQID NO:25) 全部胞外域的 cDNA 通过 PCR，从 pCDM8 克隆 47.11 载体 (Biassoni 等，Eur J Immunol.1993;23:1083-7) 和 RSV.5(gpt)183 克隆 6 载体 (Wagtmann 等，Immunity 1995;2:439-49 和 1995;3:801-809) 中分别地进行扩增，使用下列引物：

[0390] 有义：

[0391] 5'-GGAATTCCAGGAGGAATTTAAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3'(SEQ ID NO:13)

[0392] 反义：5'-CGGGATCCCAGGTGTCTGGGGTTACC-3'(SEQ IDNO:14)

[0393] 将它们克隆进具有编码生物素化信号的序列的框架中的 pML1 表达载体 (Saulquin 等，J Exp Med.2003;197:933-8)。

[0394] 蛋白质表达在 BL21(DE3) 菌株 (Invitrogen) 中进行。转染的细菌在补充有氨苄青霉素 (100μg/ml) 的培养基中，在 37℃生长至 OD600 = 0.6 而且用 1mM IPTG 诱导表达。

[0395] 在变性条件下 (8M 尿素)，从包涵体回收蛋白质。在 20mM Tris，pH 7.8，NaCl150mM，包含 L- 精氨酸 (400mM，Sigma) 和 β- 巯基乙醇 (1mM) 的缓冲液中，在室温，通过以六步透析（分别地 4,3,2,10.5 和 0M 尿素）降低尿素浓度，进行重组蛋白质的重折叠。在 0.5 和 0M 尿素透析步骤期间添加还原的和氧化的谷胱甘肽（分别 5mM 和 0.5mM，Sigma)。最后，将蛋白质用 10mM Tris，pH 7.5，NaCl 150mM 缓冲液深度透析。可溶性、重折叠蛋白质进行浓缩而且然后在 Superdex 200 尺寸排阻柱 (Pharmacia；ÄKTA 系统）上进行纯化。

[0396] 表面胞质基因组共振测量在 Biacore 仪器 (Biacore) 上进行。在全部 Biacore 实

验中，用 0.05％表面活性剂 P20 补充的 HBS 缓冲液用作电泳 (running) 缓冲液。

[0397] 蛋白质固定。如上所述产生的重组 KIR2DL1 和 KIR2DL3 蛋白质共价地固定到传感器芯片 CM5 上右旋糖苷层中的羧基。传感器芯片表面用 EDC/NHS(N- 乙基 -N'-(3- 二甲氨基丙基）碳二亚胺氢氯化物和 N- 羟基琥珀酰亚胺，Biacore) 进行活化。将在偶联缓冲液 (10mM 醋酸盐，pH 4.5) 中的蛋白质注入。残留活化基团的失活作用使用 100mM 乙醇胺 pH 8(Biacore) 进行。

[0398] 亲和力测量。对动力学测量，不同浓度的可溶性抗体 ($1x10^{-7}$ 至 $4x\ 10^{-10}$M) 应用于固定的样品。在 20μl/min 连续流速进行测量。对每一循环，传感器芯片的表面通过注射 5μl 的 10mM NaOH pH 11 进行再生。BIAlogue 动力学评价程序 (BIA 评价 3.1，Biacore) 用于数据分析。在分别包含 500 或 540 反射度单位 (RU)，和 1000 或 700RU 的 KIR2DL1 和 KIR2DL3 的右旋糖苷层上，将在 HBS 缓冲液中可溶性分析物 (40μl，不同的浓度）以 20μl/min 流速注入。数据表示 6 个独立实验。结果如下面表 1 所示。

[0399] 表 1

[0400] 结合固定的 KIR2DL1 和 KIR2DL3 的 DF200mAb 的 BIAcore 分析。K_D：解离常数。

[0401]

蛋白质	$K_D(10^{-9}M)$
KIR2DL1	10.9+/-3.8
KIR2DL3	2.0+/-1.9

[0402] 实施例 4：新的人类抗 KIR mAbs 的产生

[0403] 人类单克隆抗KIR mAbs通过免疫转基因小鼠产生，进行设计以表达人类抗体所有组成成分，具有重组的、可溶性 KIR 蛋白质。在不同的细胞融合以建立杂交瘤之后，首先选择 mAbs 它们与固定的 KIR2DL1 和 KIR2DL3 蛋白质（如上面在实施例 3 中所描述进行生产）交叉反应的能力。发现几种人类单克隆抗体，包括 1-7F9、1-4F1、1-6F5 和 1-6F1，与 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 交叉反应。

[0404] 进一步筛选阳性单克隆抗体它们通过针对 Cw4 阳性靶细胞的 KIR2DL1 阳性 NK 转染子重建裂解的能力。将表达 HLA I 类特异抑制性受体的 NK 细胞用作针对表达一种或更多 HLA-C 等位基因的靶细胞的效应物细胞（图 5 和 6)。如上所述进行细胞毒性试验。效应物 / 靶比率显示于图例中，并且抗体以 10μg/ml 或 30μg/ml 使用。

[0405] 如所预料，KIR2DL1+NK 细胞显示很少的，如果有的话，针对表达 HLA-Cw4 的靶细胞的溶细胞活性。然而，在存在 1-7F9mAb 情况下，NK 细胞变得不能识别它们的 HLA-C（也就是不再由 HLA-C 分子所抑制），并且现在显示了针对 Cw4 阳性靶的强溶细胞活性。例如，测试的两个细胞系 (HLA-Cw4 转染的 721.221 和 CW4+EBV 细胞系）不被 KIR2DL1+NK 细胞杀伤，但是抑制作用可以通过使用 mAb 1-7F9 或常规抗 KIR2DL1mAb EB6 有效地逆转。将鼠 mAbs DF200 和 Pan2D(NKVSF1) 与人类 mAb 1-7F9 比较，并且在全部实验中根据由 NK 细胞诱导的细胞毒性，1-7F9 比任何测试的其它 mAbs 更有效。在另一方面，抗体 1-4F1，1-6F5 和 1-6F1 不能重建由 NK 细胞针对 Cw4 阳性靶细胞的细胞的裂解。

[0406] 实施例 5：鼠和人类抗 KIR 抗体的 Biacore 竞争性结合分析

[0407] 根据以前描述的方法 (Gauthier 等, Journal of Immunology 1999 ;162 :41-50 ; Saunal 和 van Regenmortel, Journal of Immunology 1995 ;183 :33-41), 在固定的 KIR2DL1(900RU),KIR 2DL3(2000RU) 和 KIR2DS1(1000RU) 上,用小鼠抗 KIR 2D 抗体 DF200、NKVSF1(Pan2D)、gl183 和 EB6,和人类抗 KIR2D 抗体 1-4F1、1-6F1、1-6F5 和 1-7F9 进行表位作图分析。

[0408] 全部实验在 HBS 缓冲液中以流速 5μl/min 用 2 分钟注射 15μg/ml 不同的抗体来完成。对每对抗体,分两步进行竞争性结合分析。在第一步中,第一单克隆抗体 (mAb) 注射于 KIR2D 靶蛋白质上,继之以第二 mAb(不清除第一 mAb) 而且监测第二 mAb RU 值 (RU2)。在第二步中,首先直接地注射第二 mAb 于裸露的 KIR2D 蛋白质上,并且监测 mAb RU 值 (RUI)。第一 mAb 对第二 mAb 结合 KIR2D 蛋白质的抑制百分比通过 :100 * (1-RU2/RU1) 计算。

[0409] 结果如表 2,3 和 4 中所示,其中指定为“第一抗体”的抗体列于垂直栏而且‘第二抗体’列于水平栏。对测试的每一抗体结合,抗体与芯片的直接结合水平 (RU) 值列于表中,其中第二抗体对 KIR2D 芯片的直接结合列于图的上部而第一抗体存在时的第二抗体与 KIR2D 芯片的结合值列于图的下部。列于各图右边的是第二抗体结合的抑制的百分比。表 2 显示在 KIR2DL1 芯片上的结合,表 3 显示抗体与 KIR2DL3 芯片的结合,并且表 4 显示抗体与 KIR2DS1 芯片的结合。

[0410] 评估了鼠抗体 DF200、NKVSF1 和 EB6,和人类抗体 1-4F1、1-7F9 和 1-6F1 与固定的 KIR2DL1、KIR2DL2/3 和 KIR2DS1 的竞争性结合。来自用抗 KIR 抗体与 KIR2DL1 结合的实验的表位作图 (图 7) 显示了 (a) 抗体 1-7F9 与 EB6 和 1-4F1 竞争,但是不与 NKVSF1 和 DF200 竞争 ;(b) 抗体 1-4F1 依次与 EB6、DF200、NKVSF1 和 1-7F9 竞争 ;(c)NKVSF1 与 DF200、1-4F1 和 EB6 竞争,但是不与 1-7F9 竞争 ;和 (d)DF200 与 NKVSF1、1-4F1 和 EB6 竞争,但是不与 1-7F9 竞争。来自用抗 KIR 抗体与 KIR2DL3 结合的实验的表位作图 (图 8) 显示了 (a)1-4F1 与 NKVSF1、DF200、gl183 和 1-7F9 竞争 ;(b)1-7F9 与 DF200、gl183 和 1-4F1 竞争,但是不与 NKVSF1 竞争 ;(c)NKVSF1 与 DF200、1-4F1 和 GL183 竞争,但是不与 1-7F9 竞争 ;和 (d)DF200 与 NKVSF1、1-4F1 和 1-7F9 竞争,但是不与 GL183 竞争。来自用抗 KIR 抗体与 KIR2DS1 结合的实验的表位作图 (图 9) 显示了 (a)1-4F1 与 NKVSF1、DF200 和 1-7F9 竞争 ;(b)1-7F9 与 1-4F1 竞争但不与 DF200 和 NKVSF1 竞争 ;(c)NKVSF1 与 DF200 和 1-4F1 竞争,但是不与 1-7F9 竞争 ;和 (d)DF200 与 NKVSF1 和 1-4F1 竞争,但是不与 1-7F9 竞争。

[0411] 表 2

[0412] 使用在第一和第二抗体之间竞争性结合的 KIR2DL1 表位作图 (ND = 未测定)

[0413]

第一抗体 (下面)	第二抗体						
	DF200	Pan2D	EB6	1-4F1	1-7F9	1-6F1	1-6F5
DF200		80%	90%	490 92% 40	480 27% 350	540 15% 460	400 15% 340
Pan2D	90%		90%	900 95% 50	860 2% 840	750 12% 660	600 13% 520
EB6	60%	40%	460 57% 200	370 48% 190	490 65% 170	260 23% 200	Nd
1-4F1							
1-7F9	600 10% 545	545 2% 534	460 60% 180	360 95% 16		330 9% 300	Nd
1-6F1	350 11% 310	475 7% 440	260 18% 320	360 23% 275	490 10% 440		Nd
1-6F5	350 17% 290	475 7% 440	Nd	360 17% 300	Nd	290 40% 170	

[0414] 表 3

[0415] 使用在第一和第二抗体之间竞争性结合的 KIR2DL3 表位作图 (ND ＝未测定)

[0416]

第一抗体	第二抗体						
(下面)	DF200	Pan2D	Gl183	1-4F1	1-7F9	1-6F1	1-6F5
DF200		75%	20%	1270 75% 320	520 62% 200	550 16% 460	440 4% 420
Pan2D	95%		85%	2250 68% 730	880 15% 750	840 8% 770	560 18% 460
gl183	8%	40%		1300 75% 330	670 76% 160	530 18% 430	Nd
1-4F1	1140 82% 210	2400 63% 890	1240 73% 330		1050 87% 140		
1-7F9	770 42% 450	870 5% 830	800 75% 200	1000 63% 270			
1-6F1	790 4% 760	990 0% 1090	620 8% 570				
1-6F5	800 5% 760	990 4% 950	Nd				

[0417] 表 4

[0418] 使用在第一和第二抗体之间竞争性结合的 KIR2DS1 表位作图 (ND ＝未测定)

[0419]

第一抗体 (下面)	第二抗体			
	DF200	Pan2D	1-4F1	1-7F9
DF200		70%	660 87% 80	975 15% 825
Pan2D	100%		650 100% -8	920 45% 500
1-7F9	900 17% 1090	1350 11% 1200	660 96% 23	

[0420] 实施例 6 :用猕猴 NK 细胞滴定抗 KIR mAb

[0421] 对抗 KIR 抗体 NKVSF1 测试了其结合来自猕猴的 NK 细胞的能力。

[0422] 猴 PBMC 的纯化和多克隆 NK 细胞团块 (bulk) 的产生。猕猴 Macaque PBMC 从钠柠檬酸盐 CPT 管 (Becton Dickinson) 制备。NK 细胞纯化通过阴性缺失 (猕猴 (Macaque)NK 细胞富集试剂盒,StemCell Technolog) 进行。NK 细胞在照射的人类饲养细胞上与用 300U/ml 白细胞介素 2(Proleukin, Chiron Corporation) 和 1ng/ml 植物凝集素 A(Invitrogen, Gibco) 进行培养以获得多克隆 NK 细胞群体。

[0423] 用猕猴 NK 细胞滴定 Pan2D mAb。猕猴 NK 细胞 (第 16 天 NK 团块) 用不同量的 Pan2D mAb,继之以缀合 PE 的山羊 F(ab')2 片段抗小鼠 IgG(H+L) 抗体进行孵育。阳性细胞的百分比用同种型对照 (纯化小鼠 IgG1) 进行确定。样品完成一式两份。平均荧光强度 = MFI。

[0424] 抗体与猴 NK 细胞的结合如图 10 所示。

[0425] 实施例 7 :人类抗 KIR mAbs 的筛选

[0426] 如在实施例 4 中所描述,人类单克隆抗 KIR Abs 是通过用重组 KIR 蛋白免疫被设计以表达人类抗体所有组成成分的转基因小鼠产生的。为产生交叉反应性抗 KIR 抗体,动物用不同的 KIRs 顺序地进行免疫,或以如实施例 3 中所描述的可溶形式,或在细胞表面表达。

[0427] 下一步,在不同的细胞融合后,首先通过 ELISA,使用标准的方法,选择 mAbs 它们与固定的 KIR2DL1 和 KIR2DL3 蛋白质交叉反应的能力。通过 ELISA 发现几种人类单克隆抗体,包括 1-7F9、1-4F1、1-6F5 和 1-6F1,与 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 全部反应。与 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 二者反应的 mAbs 指定为“KIR2DL- 交叉反应性 mAbs”。

[0428] 然后通过流式细胞仪对 KIR2DL 交叉反应性 mAbs 测试它们与细胞表面的 KIR 反应的能力。简要地,人类抗 KIR mAbs 的结合是通过与将它们与稳定地过表达 KIRs(例如 YTS-2DL1, BWZ-KIR2DL2 和 BWZ-KIR2DS4) 或不表达 KIRs(例如 YTS 和 BWZ) 的不同的细胞系进行孵育来测试的。简要地,在包含 2% FCS 的 DMEM 培养基中,细胞与不同浓度 (典型地 0-50μg/ml) 的人类抗 KIR mAb 1-7F9 进行孵育。在孵育后,细胞进行洗涤并与缀合 APC 的对人类 IgG 特异的二抗孵育。所有孵育和洗涤步骤在 0-4℃进行。随后,洗涤细胞,重悬于 PBS,并通过流式细胞仪在 FACScalibur 或 FACScanto(二者都来自 Beckton Dickinson) 上进行分析。典型的例子如图 16 所示。例如,发现 1-7F9 和 1-4F1 不结合用 KIR2DS4 转染的细胞,而 NKVSF1(Pan2D) 结合 (图 16)。

[0429] 下一步,对人类抗 KIR mAbs 阻断 KIR 和其 HLA-C 配体之间相互作用的能力通过 1) 生物化学、直接结合实验和 2) 功能性裂解重建试验进行了测试。

[0430] 在生物化学结合试验中,人类抗 KIR mAbs,包括 1-7F9,阻断 HLA-C 和 KIR- 分子之间相互作用的能力通过竞争可溶性、重组 KIR-Fc 融合蛋白与表达 HLA-C 的细胞的结合进行了评估。除了人类 Fc 用鼠 IgG1Fc 代替以外,KIR-Fc 蛋白质根据 (Wagtmann 等, Immunity 1995 ;3(6) :801-9) 所描述进行生产。可溶性 KIR-Fc 结合表达由 KIR2DL1 识别的特异 HLA-C 同种异型的细胞,并且该结合可以使用缀合荧光染料对鼠 KIR-Fc 蛋白质 Fc 部分特异的二抗,通过流式细胞仪进行目测。例如 KIR2DL1-Fc 结合用 HLA-Cw * 0402 转染的细胞 (LCL 721.221-Cw4 转染子)(Litwin 等, J Exp Med. 1993 ;178 :1321-36) 但是不与未转染的 LCL 721.221 细胞 (见图 11A) 结合。为测试抗 KIR mAbs 是否能预防在 KIR2DL1-Fc 和 HLA-Cw4

之间的相互作用，KIR2DL1-FC 蛋白质与增加浓度的抗 KIR mAbs 进行预孵育，并且然后添加到 LCL 721.221-Cw4 细胞中，在 4℃孵育，洗涤，与缀合 APC 的抗鼠 IgG1Fc 孵育，洗涤，并且在FACScalibur，或FACScanto (Beckton Dickinson) 上，通过标准的方法，通过流式细胞仪进行分析。一些鼠抗 KIR mAbs，例如 DF200，和一些人类抗 KIRmAbs，也就是 1-7F9 和 1-4F1，防止 KIR2DL1-Fc 结合表达 HLA-Cw4 的细胞，显示这些 mAbs 阻断 KIR2DL1 和 HLA-Cw4 之间的相互作用。例如，图 17A 显示 DF200 防止 KIR2DL1-Fc 结合表达 HLA-Cw4 的细胞。图 17B 显示 1-7F9mAbs 防止 KIR2DL1 结合 HLA-Cw4。平行地，对抗 KIR mAbs 测试了它们防止 KIR2DL2 结合 HLA-Cw3 的能力。防止 KIR2DL-Fc 以剂量依赖方式结合表达 HLA-C 的细胞的抗体，如图 17 例证，指定为“阻断性 mAbs”而且在功能性细胞毒性试验中进行了进一步测试，如下。

[0431] 人类抗 KIR mAbs 的治疗效用，与它们通过防止经由 KIR 的抑制性信号，诱导表达 KIR 的 NK 细胞杀伤肿瘤细胞的能力相关。因此，评估人类 KIR2DL 交叉反应性和阻断性 mAbs 是否通过表达 KIR2DL 的 NK 细胞，能诱导表达 HLA-C 的靶细胞的裂解是重要的。为该目的进行了下列实验。

[0432] 在 51Cr- 释放细胞毒性试验中，表达 KIR2DL1 的 YTS 细胞 (YTS-2DL1) 能杀伤 LCL 721.221-Cw3，但是不能杀伤 LCL721.221-Cw4 细胞 (图 18A)。与此相反，缺乏 KIRs(YTS) 的 YTS 效应物细胞有效地杀伤两个细胞系。因而，由于经由 KIR2DL1 的 HLA-Cw4- 诱导的抑制性信号，YTS-2DL1 效应物细胞不能杀伤 LCL721.221-Cw4 细胞。在 51Cr- 释放细胞毒性试验中，当 YTS-2DL1 细胞与 1-7F9 预孵育时，LCL 721.221-Cw4 细胞以 1-7F9 浓度依赖的方式被杀伤 (图 18B)。3-1F13(以高亲和力结合 KIR2DL1，但是不能防止 KIR2DL1 和 HLA-Cw4 之间的相互作用的人类交叉反应性抗 KIRmAb) 不能诱导 YTS-2DL1 细胞杀伤 LCL 721.221-Cw4 细胞。因而，通过防止在 NK 细胞和靶细胞之间的 KIR-HLA-C 相互作用，1-7F9 诱导 NK 介导的靶细胞的杀伤。

[0433] 实施例 81-7F9 亲和力测量

[0434] 对 1-7F9 结合 KIR2DL1 和 KIR2DL3 的亲和力，通过 Biacore 分析，使用如实施例 3 所描述产生的可溶性重组 KIR 蛋白质进行了测量。除了使用的抗体是人类 mAb 1-7F9 以外，Biacore 实验如实施例 3 所描述进行。

[0435] 通过 1-7F9 结合 KIR2DL1 和 -3 的这些亲和力测定的结果，如表 5 所示。

[0436] 表 5

[0437] 结合固定的 KIR2DL1 和 KIR2DL3 的 1-7F9mAb 的 BIAcore 分析 K_D :解离常数

[0438]

蛋白质	$K_D(10^{-9}M)$
KIR2DL1	0,43
KIR2DL3	0,025

[0439] 实施例 9 :在 KIR2DL1 上的 1-7F9 的表位作图

[0440] 当通过进行蛋白质 - 蛋白质停靠，抗体和抗原二者的适当的 X- 射线结构 / 同源性模型存在时，所给定的单克隆抗体在所给定抗原上的表位作图可以通过计算机 (in silico) 方法获得。

[0441] 抗体的同源性-模型可以通过分别比对轻链和重链序列，并选择其3D结构存在的抗体而获得。6个互补决定区(CDRs)的长度可以进行计算而且最好的模板选自具有相同CDR长度的抗体。使用标准技术，同源性模型可以从选择的模板中构建。

[0442] 在最近综述的蛋白质-蛋白质停靠方法中(Schneidman-Duhovny等，Curr Med Chem 2004;11:91-107)，表面上的特征代表了两个表面。特征包括氢键结合能力，电荷和疏水性。在基于格栅的方法中，将空间分成立方体而且每个立方体根据其相对于表面的位置(内部，表面，外部)给出一个值并分配有关的特征组。通过记分功能的表面强力匹配现在可以通过搜索全部3个平移的和3个旋转的自由度进行利用。通过快速傅里叶变换处理平移(Translations)而且将旋转处理为在旋转空间中标准离散化之内的个体计算。从最高得分的复合体中，通过一系列方法，例如形状互补性、范德瓦耳斯相互作用、疏水性、静电、去溶剂化、氢键结合、原子接触能、残基-残基配对统计法和亲水基团配对，结果可以进行过滤并记分。最高得分的复合体可以详细进行评价而且相互作用残基和因此的表位可以进行鉴定。

[0443] 方法和分析

[0444] 对KIRs的残基和结构域命名是根据Fan等(Nature 1997;389:96-100)进行的，这样域1含有残基6-101和域2含有氨基酸残基105-200。

[0445] 1-7F9的同源性-模型是使用1OM3作为模板构建的。由Calarese等(Science 2003;300:2065，et seq.)产生的1OM3结构是从PDB(蛋白质数据库，在万维网(WWW)网址rcsb.org/pdb/;1OM3VL序列:SEQ ID NO:34;1OM3VH序列:SEQ ID NO:35)检索到的。使用了Kabat编号和CDR分配。全面比对是好的而且CDR长度相同，所以同源性模型将足够精确以用于蛋白质-蛋白质停靠实验。

[0446] 从1-7F9抗体同源性模型的蛋白质-蛋白质停靠于KIR2DL1结构上，获得了1NKR.pdb 2000溶液。因为它们接近于D183(从CD，**原子＜6 Å**)和R131(从CZ，**原子＜12 Å**)，对它们进行了过滤，并且对133得到的溶液进行详细地分析。

[0447] 对形成的最高得分复合体进行了分析而且对在R131(KIR)和D100C(重链)之间可能的相互作用进行了鉴定和抑制。对F181新的旋转异构体进行了选择而且使能量最小化。该模型预测抗体与KIR2DL1(SEQ ID NO:23)上的下列残基相互作用:S20(Hyd,CB)(Hyd受体,OG)、E21(Hyd,CB,CG)、M44(Hyd,SD,CE)、F45(Hyd,CD1,CD1,CZ,CE2)、R68(Hyd供体,NH2)、T70(Hyd,CB,CG2)、Q71(Hyd,CG)、L104(Hyd,CB,CG,CD1,CD2)、Y105(Hyd,CG,CD2,CE2)、R131(Ion,NH2)(Hyd供体,NH2)、S133(Hyd,CA,CB)(Hyd供体/受体,OG)、Y134(Hyd,CD1,CE1)、F181(Hyd,CB,CG,CD1,CD2,CE1,CE2,CZ)和D183(Hyd,CB)。

[0448] 实施例10:鼠和人类抗KIR抗体的Biacore竞争性结合分析

[0449] 1-7F9、Pan2D(NKVSF1)和DF200的竞争性结合，根据在实施例5中描述的相同方法进行了评价。

[0450] 结果如表6和7所示，其中指定为“第一抗体”的抗体列于垂直栏和‘第二抗体’列于水平栏。对测试的每一抗体组合组合，列出了第二抗体结合的抑制百分比。当对某一抗体对的抑制百分比超过40％，不管哪个抗体用作第一抗体，认为该抗体是竞争性的。表6显示在KIR2DL1芯片的结合，并且表7显示抗体结合KIR2DL3芯片。

[0451] 简要地，对于KIR2DL1结合，结果显示DF200和Pan2D是竞争性的，然而1-7F9不

与 DF200 或 Pan2D 任一竞争。对于 KIR2DL3 结合，DF200 和 Pan2D 是竞争性的，然而 1-7F9 不与 Pan2D 竞争，但是与 DF200 竞争。

[0452] 表 6

[0453] 在第一和第二抗体之间的 KIR2DL1 竞争性结合

[0454]

第一抗体 (下面)	第二抗体		
	1-7F9	Pan2D	DF200
1-7F9	98 %	4 %	15 %
Pan2D	17 %	92 %	90 %
DF200	17 %	85 %	80 %

[0455] 表 7

[0456] 在第一和第二抗体之间的 KIR2DL1 竞争性结合

[0457]

第一抗体 (下面)	第二抗体		
第一 mAb	1-7F9	Pan2D	DF200
1-7F9	95 %	4 %	60 %
Pan2D	0 %	95 %	95 %
DF200	80 %	50 %	85 %

[0458] 实施例 11：与 HuKIR1-7F9-Fab' 复合的 KIR2DL1 的晶体结构用 X- 射线晶体学解决了与 1-7F9 的 Fab' 片段复合的 KIR2DL1 的晶体结构而且改善到**2.35** Å分辨率。结果证实，抗体当结合 KIR2DL1 时，将能阻断结合 MHC I 类分子（图 19）。

[0459] 材料和方法

[0460] 细胞外 KIR2DL1(SEQ ID NO:23 的氨基酸 1-223，其中残基 16 为精氨酸 (R) 和残基 114 为亮氨酸 (L)，并且包括附加的 N 末端的蛋氨酸 (M) 残基）和 HuKIR1-7F9Fab'（具有 SEQ ID NO:36 的轻链序列和 SEQ ID NO:37 残基 1-221 的重链序列）混合，KIR2DL1 轻微过量，并且复合体在凝胶过滤柱上进行纯化。然后复合体进行浓缩到大约 13.5mg/ml。用悬滴技术，在 pH 4.2，10% PEG6000 和 500mM 柠檬酸盐缓冲液中使晶体生长。晶体在液体 N_2 中进行瞬间冻结，并且对**2.35** Å分辨率的晶体学数据，使用 beam-line BL711I，MAX-lab，Lund，Sweden，在 100K 进行收集。数据通过 XDS 程序 (Kabsch，J. Appl. Crystallogr. 1993；26:795-800) 进行集成。对于结构决定分子替换，使用了 CCP4 套件中的 MOLREP 程序 (Bailey，Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 1994；50:760-763) 而且使用了 PDB- 沉积结构 1RZJ(Fab 部分 1) 和 1NKR(KIR)。用 ARP/WARP 程序 (Lamzin 和 Wilson，Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 1993；49:129-147) 进行了相改进而且用 QUANTA

程序（可从Accelrys Inc.,San Diego,CA,USA获得）进行了对X-射线衍生的结构模型的手工修饰。改进用CCP4套件的REFMAC5计算机程序进行。水分子通过ARP/WARP程序添加。模型含有KIR2DL1的6-114和124-200残基,1-7F9轻链的1-212和1-7F9重链的1-136和143-224。此外,放置了330个水分子。模型的R-和无R-分别为0.191和0.253。

[0461] 结果

[0462] 通过CCP4套件的CONTACT计算机程序,使用在Fab'和KIR2DL1分子之间截留距离**4.0 Å**来鉴定接触面。发现得到的人类1-7F9的KIR2DL1表位含有KIR2DL1(SEQ ID NO:23)的下列残基:L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87和Y88(表8和9)。参与与KIR2DL1相互作用的1-7F9的残基包括1-7F9可变轻链(VL)区(SEQ ID NO:15,表8)的S28、V29、S30、Y32、S92、N93和W94和可变重链(VH)区(SEQ ID NO:17)的T28、F29、S30、F31、I54、F55、E74、S77、G102、S103、Y105、Y106、D107和Y108。KIR2DL1表位和参与氢-结合中的残基,同样显示于图20中KIR2DL1的氨基酸序列中。从协同改进中获得的各向同性置换因子(也称为"温度因子"或"B-值")对KIR2DL1的N末端域和1-7F9抗体Fab'片段的可变域显示了相对较低值,所有域直接地参与分子间结合。这显示了晶体复合体中两种分子之间的结合力是强而且稳定的,也支持描绘了稳定的KIR2DL1/1-7F9Fab'复合体的晶体结构。

[0463] 1-7F9Fab'分子在D1域C'CFGA'β-片层的一侧上结合KIR2DL1分子,但是,此外也接触相同域的一个E β-链残基侧链。与D1域的环状结构残基的连接对结合(对于拓扑学命名协定,见Fan等,Nature1997;389:96-100)同样重要。更特别地,进行了与KIR2DL1的下列拓扑学部分的连接:β-链C(氨基酸L38和R41)、β-链C和C'之间的环状结构、L2(M44,F45和N46)、β-链C'(D47,T48,L49,R50和I52)、β-链E(F64)、在E和Fβ-链之间的环状结构、L3(D72)、β-链F(Y80)和在F和Gβ-链(P87和Y88)之间的环状结构。

[0464] 尽管HLA-Cw4分子结合KIR2DL1分子的D1和D2域二者(Fan等Nat. Immunol.2001;2:452-460),但1-7F9抗体只结合KIR2DL1D1域。然而,在结合的1-7F9和结合的HLA-Cw4分子之间存在空间重叠,大的足够使1-7F9抗体成功地替换HLA-Cw4。使用公开的与HLA-Cw4复合的KIR2DL1的结构(PDB登入码1IM9),KIR2DL1和HLA-Cw4之间的接触残基,可以用CONTACT程序进行计算。在使用**4.0 Å**的距离截留值的计算中,可以看到参与与HLA-Cw4残基接触的三个KIR2DL1残基对接触1-7F9/KIR2DL1复合体中的残基是共同的(表8和9)。那三个KIR2DL1残基是M44、F45和D72。

[0465] 没有限于特殊理论,晶体学结果也指出,因为在KIR2DS4序列(SEQ ID NO:38)的胞外部分的氨基酸N47和V72,1-7F9不结合活化的NK受体KIR2DS4。

[0466] 表8

[0467] KIR2DL1-1-7F9Fab'VL链相互作用。使用了**4.0 Å**的截留值。接触面通过CCP4套件的CONTACT计算机程序进行鉴定。在最后栏中,"＊＊＊"表示如通过CONTACT所计算,对在该接触面(**距离<3.3Å**)氢键的强可能性,"＊"表示弱的可能性**(距离＞3.3 Å)**。空白表示该程序认为没有氢键的可能性。

[0468]

KIR2DL1 原子	1-7F9 Fab' VL 原子	距离 (Å)
Arg 41A NH2	Tyr 32L OH	2.73 ***
Met 44A O	Asn 93L CG	3.65
	Asn 93L OD1	3.54 *
	Asn 93L ND2	2.96 ***
Phe 45A CA	Asn 93L OD1	3.50
Phe 45A CB	Tyr 32L CE1	3.59
Phe 45A CG	Tyr 32L CE1	3.93
Phe 45A CE1	Ser 30L CB	3.82
Phe 45A CZ	Ser 28L O	3.77
	Ser 30L CB	3.74
	Ser 28L OG	3.89
	Ser 30L N	3.78
Phe 45A CE2	Ser 28L O	3.76
	Val 29L O	3.98
	Val 29L CA	3.94
	Ser 30L CB	3.87
	Val 29L C	3.72
	Ser 30L N	3.89
Phe 45A CD2	Asn 93L ND2	3.75
	Ser 92L CB	3.85
Phe 45A C	Asn 93L OD1	3.70

[0469]

Asn	46A N	Asn	93L OD1	2.92 ***
Asn	46A CA	Asn	93L OD1	3.82
Asn	46A CB	Asn	93L OD1	3.52
		Trp	94L CH2	3.86
		Trp	94L CZ2	3.52
Asn	46A CG	Asn	93L OD1	3.31
		Trp	94L CH2	3.41
		Trp	94L CZ2	3.65
Asn	46A OD1	Trp	94L CH2	3.85
Asn	46A ND2	Asn	93L CB	3.99
		Asn	93L CG	3.48
		Asn	93L OD1	2.56 ***
		Trp	94L CZ3	3.52
		Trp	94L CH2	3.25
		Trp	94L CZ2	3.76
Asp	47A CB	Tyr	32L OH	3.63
Asp	47A CG	Tyr	32L OH	3.74
		Tyr	32L CE2	3.79
Asp	47A OD2	Tyr	32L CZ	3.88
		Tyr	32L OH	3.34 *
		Tyr	32L CE2	3.54
Asp	72A CB	Ser	30L OG	3.87
Asp	72A CG	Ser	30L OG	3.62
Asp	72A OD2	Ser	30L CB	3.58
		Ser	30L OG	2.93 ***

[0470] 表 9

[0471] KIR2DL1-1-7F9Fab'VH链相互作用。使用了**4.0 Å**的截留值。接触通过CCP4套件的CONTACT 计算机程序进行鉴定。在最后栏中，" * * * " 表示如通过 CONTACT 所计算，对在

该接触处(距离 < 3.3 Å)氢键的强可能性，" * " 表示弱的可能性(距离 > 3.3 Å)。空白表示该程序认为没有氢键的可能性。

[0472]

KIR2DL1 原子	1-7F9 Fab' VH 原子	距离 (Å)
Leu 38A CD1	Ile 54H CD1	3.61
	Phe 31H CB	3.64
Leu 38A CD2	Phe 31H CG	3.70
	Phe 31H CD2	3.74
Asp 47A CG	Ser 103H N	3.73
	Ser 103H OG	3.63
Asp 47A OD1	Gly 102H N	3.99 *
	Gly 102H CA	3.40
	Gly 102H C	3.75
	Ser 103H N	3.09 ***
	Ser 103H OG	3.77 *
Asp 47A OD2	Ser 103H N	3.73 *
	Ser 103H CB	3.36
	Ser 103H OG	2.77 ***
Thr 48A C	Tyr 108H OH	3.74
Thr 48A O	Tyr 108H CZ	3.68
	Tyr 108H OH	2.90 ***
	Tyr 108H CE2	3.65
Leu 49A CA	Tyr 105H O	3.28
Leu 49A CB	Tyr 105H O	3.62
Leu 49A CD2	Tyr 105H O	3.67

[0473]

	Tyr 105H CB	3.71
	Tyr 105H CD1	3.76
	Ser 103H OG	3.91
Leu 49A C	Tyr 105H O	3.59
Arg 50A N	Tyr 105H C	3.80
	Tyr 105H O	2.94 ***
	Tyr 106H N	3.87 *
	Tyr 108H CE2	3.81
Arg 50A CA	Tyr 105H O	3.97
Arg 50A CB	Tyr 106H O	3.88
	Tyr 108H CE2	3.80
Arg 50A CG	Phe 31H CZ	3.65
	Phe 31H CE2	3.90
	Tyr 106H O	3.99
Arg 50A CD	Phe 31H CZ	3.32
	Phe 31H CE2	3.63
	Tyr 106H O	3.71
Arg 50A NE	Tyr 106H O	2.88 ***
	Asp 107H C	3.94
	Asp 107H O	3.58 *
Arg 50A CZ	Tyr 106H O	3.70
	Asp 107H O	3.74
Arg 50A NH2	Tyr 106H O	3.61 *
	Asp 107H CB	3.56
	Asp 107H O	3.86 *
Arg 50A C	Tyr 106H N	3.86
Arg 50A O	Tyr 106H O	3.56 *
	Tyr 105H C	3.68
	Tyr 105H O	3.72 *

[0474]

		Tyr	106H	N	2.86 ***
		Tyr	106H	CA	3.67
		Tyr	106H	CB	3.47
Ile	52A CD1	Tyr	106H	CD1	3.93
		Tyr	106H	CE1	3.68
Phe	64A CD2	Tyr	105H	CE1	3.86
Tyr	80A CZ	Phe	55H	CE2	3.90
Tyr	80A OH	Phe	55H	CE2	3.87
Pro	87A CB	Thr	28H	OG1	3.46
Pro	87A CG	Thr	28H	OG1	3.66
Pro	87A O	Ser	30H	CA	3.87
		Ser	30H	C	3.88
Tyr	88A CB	Glu	74H	CD	3.39
		Glu	74H	OE1	3.38
		Glu	74H	OE2	3.40
Tyr	88A CG	Glu	74H	CG	3.65
		Glu	74H	CD	3.37
		Glu	74H	OE1	3.71
		Glu	74H	OE2	3.55
Tyr	88A CD1	Glu	74H	CB	3.85
		Glu	74H	CG	3.72
		Glu	74H	CD	3.82
		Glu	74H	OE1	3.97
Tyr	88A CE1	Glu	74H	CB	3.93
		Glu	74H	CG	3.91
		Glu	74H	O	3.84
		Ser	77H	OG	3.68
		Thr	28H	CB	3.97
Tyr	88A CZ	Ser	77H	OG	3.51

[0475]

	Ser 30H N	3.87
	Thr 28H CB	3.71
	Phe 29H N	3.86
Tyr 88A OH	Ser 77H CA	3.73
	Ser 77H CB	3.35
	Ser 77H OG	2.49 ***
	Thr 28H CA	3.88
	Thr 28H CB	3.34
	Thr 28H C	3.96
	Phe 29H N	3.07 ***
	Phe 29H CA	3.86
	Phe 29H CB	3.67
	Phe 29H CD2	3.83
Tyr 88A CE2	Ser 30H N	3.32
	Ser 30H O	3.82
	Phe 29H C	3.92
	Phe 29H CB	3.89
Tyr 88A CD2	Glu 74H CG	3.81
	Glu 74H CD	3.77
	Glu 74H OE2	3.64
	Ser 30H N	3.91
	Ser 30H O	3.58
	Pro 53H CB	3.83
Tyr 88A C	Ile 54H CG2	3.93
Tyr 88A O	Ile 54H CG2	3.75

[0476] 实施例 12 :1-7F9 的物理稳定性

[0477] 研究了人类抗体 1-7F9 的生物物理学特性和稳定性。通过圆二色性 (CD) 对蛋白质的折叠和二级结构进行了研究，通过通过动态光散射 (DLS) 对寡聚化和聚集进行了研究。为了模仿 5℃，两年的贮藏条件，蛋白质在 37℃振荡进行孵育 14 天。

[0478] 材料和方法

[0479] 样品制备。制备2mg/ml 1-7F9于(a)50mM磷酸钠,0.001%吐温80(Sigma,P8074),pH7.0;(b)50mM磷酸钠,0.001%吐温80,pH7.0,0.5mM蔗糖;(c)50mM柠檬酸盐,0.001%吐温80,pH 3.0;和d)50mM Tris,0.001%吐温80,pH 8.5中。

[0480] 圆二色性(CD)。在配备有用于温度控制的塞贝克效应(peltier)元件的Chirascan圆二色性分光计(Applied Photophysics)上,在25℃,蛋白质浓度2.0mg/ml,进行CD测量。1-7F9样品是在具有0.1mm路径长度的圆柱形水晶池中。记录缓冲液扫描并从每一样品光谱中扣除。

[0481] 动态光散射(DLS)。使用Dynapro 99温控DLS仪器(ProteinSolutions Inc.),在25℃,蛋白质浓度2.0mg/ml进行DLS。使用随该仪器提供的动态软件(Dynamics software)进行数据分析。

[0482] 结果

[0483] 如通过DLS所评价,尽管对样品在pH 7.0孵育14天后,分子大小没有变化,在pH 3.0和pH 8.5配制的两个样品在14天期间严重地聚集。CD测量结果显示了所有β结构的特征并揭示虽然对只包含吐温80作为赋形剂的样品的信号中存在轻微下降,但在pH 7.0配制的样品在整个加速研究期间,保持了它们的二级结构。这可能是由于样品弱的沉淀所致,因为光谱的整体形式没有变化。包含蔗糖的样品随着时间没有显示这样的下降。在pH 3.0和8.5配制的样品的CD测量结果显示随着时间,光谱特征的强烈变化,可能是由于未折叠或其它构象变化,其能导致非功能性1-7F9蛋白质。这些变化可以立即观察到而且在pH 3.0最明显。

[0484] 总的说来,在应激的条件下(37℃伴有振荡),pH 7.0,吐温80和蔗糖作为赋形剂,1-7F9保持了其物理特性并保持了稳定。

[0485] 实施例13:1-7F9和1-4F1的亲和力测定(单价结合)

[0486] 1-7F9和1-4F1在单价结合KIR2DL1和KIR2DL3抗原中的亲和力(与在实施例3和8中的二价结合亲和力测定相对),通过表面胞质基因组共振技术,使用Biacore 3000进行测定。

[0487] 简要地,以流速20μL/min,使用了抗人类IgG(Dako RAHIgG,#0423)和HBS-EP缓冲液。纯化的抗体稀释到10μg/mL。对每一抗体,注入KIR2DL1或KIR2DL3和缓冲液。以2000、500、200、50或20nM浓度测试抗原。流速保持在20μL/min。通过单次30秒注入pH 1.8的甘氨酸-HCl,完成表面的再生。

[0488] 结果显示于表10中。对1-4F1结合KIR2DL1,基线存在显著的位移。没有受限于任何特殊理论,这可能代表由基质引起的缓冲剂作用,或实际上包括2个步骤的结合反应,例如因为抗原的构象改变。

[0489] 表10

[0490] 1-7F9和1-4F1与KIR2DL1和KIR2DL3的单价结合亲和力。*)表示有全面适合的RI(基质的反应)的配合

[0491]

	k_a(1/Ms)	k_d(1/s)	K_D(M)	Chi2

1-4F1/2DL1	8,33E+03	5,09E-15	6,11E-19	1,24
1-4F1/2DL1*)	2,68E+04	0,0132	4,95E-07	9,1
1-4F1/2DL3	4,16E+05	2,94E-03	7,05E-09	0,398
1-7F9/2DL1	1,51E+05	1,56E-03	1,03E-08	4,02
1-7F9/2DL3	1,51E+05	5,20E-04	3,45E-09	1,55

[0492] 本发明的举例性方面

[0493] 1. 一种抗体，含有包含与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:39至少50％相同的氨基酸序列的轻链可变区，和/或包含与SEQ IDNO:17或SEQ ID NO:41至少50％相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0494] 2. 一种抗体，含有包含与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:39至少80％相同的氨基酸序列的轻链可变区，和/或包含与SEQ IDNO:17或SEQ ID NO:41至少80％相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0495] 3. 一种抗体，含有包含与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:39至少90％相同的氨基酸序列的轻链可变区，和/或包含与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:41至少90％相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0496] 4. 一种抗体，含有包含与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:39至少95％相同的氨基酸序列的轻链可变区，和/或包含与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:41至少95％相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0497] 5. 一种抗体，含有包含与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:39至少98％相同的氨基酸序列的轻链可变区，和/或包含与SEQ IDNO:17或SEQ ID NO:41至少98％相同的氨基酸序列的重链可变区。

[0498] 6. 上述方面任一方面的抗体，其中轻链可变区含有至少一个保守性氨基酸取代，当与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:39中在相应位置的氨基酸比较时，每个氨基酸取代为保守性的。

[0499] 7. 上述方面任一方面的抗体，其中重链可变区含有至少一个保守性氨基酸取代，当与SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:41中在相应位置的氨基酸比较时，每个氨基酸取代为保守性的。

[0500] 8. 上述方面任一方面的抗体，含有以下的至少一个

[0501] (a)与SEQ ID NO:15的残基24-34至少90％相同的轻链CDR1氨基酸序列；

[0502] (b)与SEQ ID NO:15的残基50-56至少90％相同的轻链CDR2氨基酸序列；

[0503] (c)与SEQ ID NO:15的残基89-97至少90％相同的轻链CDR3氨基酸序列；

[0504] (d)与SEQ ID NO:17的残基31-35至少90％相同的重链CDR1氨基酸序列；

[0505] (e)与SEQ ID NO:17的残基50-65至少90％相同的重链CDR2氨基酸序列；和

[0506] (f)与SEQ ID NO:17的残基99-112至少90％相同的重链CDR3氨基酸序列。

[0507] 9. 上述方面任一方面的抗体，含有以下的至少一个

[0508] (a)对应于SEQ ID NO:15的残基24-34的轻链CDR1氨基酸序列；

[0509] (b) 对应于 SEQ ID NO:15 的残基 50-56 的轻链 CDR2 氨基酸序列；

[0510] (c) 对应于 SEQ ID NO:15 的残基 89-97 的轻链 CDR3 氨基酸序列；

[0511] (d) 对应于 SEQ ID NO:17 的残基 31-35 的重链 CDR1 氨基酸序列；

[0512] (e) 对应于 SEQ ID NO:17 的残基 50-65 的重链 CDR2 氨基酸序列；和

[0513] (f) 对应于 SEQ ID NO:17 的残基 99-112 的重链 CDR3 氨基酸序列。

[0514] 10. 上述方面任一方面的抗体，含有以下的至少一个

[0515] (a) 基本上由 SEQ ID NO:15 的残基 24-34 组成的轻链 CDR1 氨基酸序列；

[0516] (b) 基本上由 SEQ ID NO:15 的残基 50-56 组成的轻链 CDR2 氨基酸序列；

[0517] (c) 基本上由 SEQ ID NO:15 的残基 89-97 组成的轻链 CDR3 氨基酸序列；

[0518] (d) 基本上由 SEQ ID NO:17 的残基 31-35 组成的重链 CDR1 氨基酸序列；

[0519] (e) 基本上由 SEQ ID NO:17 的残基 50-65 组成的重链 CDR2 氨基酸序列；和

[0520] (f) 基本上由 SEQ ID NO:17 的残基 99-112 组成的重链 CDR3 氨基酸序列。

[0521] 11. 方面 8-10 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 2 个。

[0522] 12. 方面 8-10 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 3 个。

[0523] 13. 方面 8-10 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 4 个。

[0524] 14. 方面 8-10 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 5 个。

[0525] 15. 方面 8-10 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的全部。

[0526] 16. 上述方面任一方面的抗体，含有包含 SEQ ID NO:15 氨基酸序列的轻链可变区，和包含 SEQ ID NO:17 氨基酸序列的重链可变区。

[0527] 17. 方面 1-7 任一方面的抗体，含有以下的至少一个

[0528] (g) 与 SEQ ID NO:39 的残基 24-34 至少 90％相同的轻链 CDR1 氨基酸序列；

[0529] (h) 与 SEQ ID NO:39 的残基 50-56 至少 90％相同的轻链 CDR2 氨基酸序列；

[0530] (i) 与 SEQ ID NO:39 的残基 89-97 至少 90％相同的轻链 CDR3 氨基酸序列；

[0531] (j) 与 SEQ ID NO:41 的残基 31-35 至少 90％相同的重链 CDR1 氨基酸序列；

[0532] (k) 与 SEQ ID NO:41 的残基 50-66 至少 90％相同的重链 CDR2 氨基酸序列；和

[0533] (l) 与 SEQ ID NO:41 的残基 99-113 至少 90％相同的重链 CDR3 氨基酸序列。

[0534] 18. 任意方面 1-7 和 17 的抗体，含有以下的至少一个

[0535] (g) 对应于 SEQ ID NO:39 的残基 24-34 的轻链 CDR1 氨基酸序列；

[0536] (h) 对应于 SEQ ID NO:39 的残基 50-56 的轻链 CDR2 氨基酸序列；

[0537] (i) 对应于 SEQ ID NO:39 的残基 89-97 的轻链 CDR3 氨基酸序列；

[0538] (j) 对应于 SEQ ID NO:41 的残基 31-35 的重链 CDR1 氨基酸序列；

[0539] (k) 对应于 SEQ ID NO:41 的残基 50-66 的重链 CDR2 氨基酸序列；和

[0540] (l) 对应于 SEQ ID NO:41 的残基 99-113 的重链 CDR3 氨基酸序列。

[0541] 19. 方面 1-7 和 17-18 任一方面的抗体，含有以下的至少一个

[0542] (g) 基本上由 SEQ ID NO:39 的残基 24-34 组成的轻链 CDR1 氨基酸序列；

[0543] (h) 基本上由 SEQ ID NO:39 的残基 50-56 组成的轻链 CDR2 氨基酸序列；

[0544] (i) 基本上由 SEQ ID NO:39 的残基 89-97 组成的轻链 CDR3 氨基酸序列；

[0545] (j) 基本上由 SEQ ID NO:41 的残基 31-35 组成的重链 CDR1 氨基酸序列；

[0546] (k) 基本上由 SEQ ID NO:41 的残基 50-66 组成的重链 CDR2 氨基酸序列；和

[0547] (l) 基本上由 SEQ ID NO:41 的残基 99-113 组成的重链 CDR3 氨基酸序列。

[0548] 20. 方面 17-19 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 2 个。

[0549] 21. 方面 17-19 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 3 个。

[0550] 22. 方面 17-19 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 4 个。

[0551] 23. 方面 17-19 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的至少 5 个。

[0552] 24. 方面 17-19 任一方面的抗体，含有 (a) 到 (f) 的全部。

[0553] 25. 方面 1-7 和 17-24 任一方面的抗体，含有包含 SEQ ID NO:39 的氨基酸序列的轻链可变区，和包含 SEQ ID NO:41 的氨基酸序列的重链可变区。

[0554] 26. 上述方面任一方面的抗体，该抗体不结合 KIR2DS4 和 KIR2DS3 中的至少一个。

[0555] 27. 方面 1-15 和 26 任一方面的抗体，该抗体阻断 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 结合 I 类 HLA-C 分子。

[0556] 28. 方面 1-15 和 26-27 任一方面的抗体，其加强 NK 细胞对表达 I 类 HLA-C 分子的人类靶细胞的裂解活性。

[0557] 29. 方面 1-15 和 26-28 任一方面的抗体，该抗体在加强 NK 细胞对表达 I 类 HLA-C 分子的人类靶细胞的裂解活性中比 DF200 更为有效。

[0558] 30. 方面 1-15 和 26-28 任一方面的抗体，该抗体在加强 NK 细胞对表达 I 类 HLA-C 分子的人类靶细胞的裂解活性中比 NKVSF1(Pan2D) 更为有效。

[0559] 31. 方面 1-15 和 26-28 任一方面的抗体，该抗体在加强 NK 细胞对表达 I 类 HLA-C 分子的人类靶细胞的裂解活性中比 EB6 更为有效。

[0560] 32. 上述方面任一方面的抗体，其为人类或人源化的抗体。

[0561] 33. 上述方面任一方面的抗体，其为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗体。

[0562] 34. 上述方面任一方面的抗体，其为人类 IgG4 抗体。

[0563] 35. 方面 1-34 任一方面的抗体，其为人类 IgG2 抗体。

[0564] 36. 人类 IgG4 抗体，含有包含 SEQ ID NO:15 氨基酸序列的轻链可变区，和包含 SEQ ID NO:17 氨基酸序列的重链可变区。

[0565] 37. 人类 IgG2 抗体，含有包含 SEQ ID NO:39 氨基酸序列的轻链可变区，和包含 SEQ ID NO:41 氨基酸序列的重链可变区。

[0566] 38. 一种与 1-7F9 竞争结合 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 的抗体，其中该抗体不是 1-4F1、DF200、gl183、A210、A803(g) 或 EB6。

[0567] 39. 一种与 1-4F1 竞争结合 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 的抗体，其中该抗体不是 1-7F9、DF200、gl183、A210、A803(g) 或 EB6。

[0568] 40. 方面 38 的抗体，其中抗体不是 1-4F1。

[0569] 41. 方面 39 的抗体，其中抗体不是 1-7F9。

[0570] 42. 方面 38-39 任一方面的抗体，其中抗体不是 DF200。

[0571] 43. 方面 38-39 任一方面的抗体，其中抗体不是 gl183。

[0572] 44. 方面 38-39 任一方面的抗体，其中抗体不是 EB6。

[0573] 45. 上述方面任一方面的抗体，其对 KIR2DL1 的 K_d 不大于大约 20nM。

[0574] 46. 上述方面任一方面的抗体，其对 KIR2DL1 的 K_d 不超过 10.9nM。

[0575] 47. 上述方面任一方面的抗体，其对 KIR2DL1 的 K_d 不超过 0.45nM。

[0576] 48. 上述方面任一方面的抗体，其对 KIR2DL3 的 K_d 不大于大约 20nM。

[0577] 49. 上述方面任一方面的抗体，其对 KIR2DL3 的 K_d 不超过 2.0nM。

[0578] 50. 上述方面任一方面的抗体，其对 KIR2DL3 的 K_d 不超过 0.025nM。

[0579] 51. 上述方面任一方面的抗体，其为人类的。

[0580] 52. 与 1-7F9 竞争结合 KIR2DL1 的人类或人源化的抗体。

[0581] 53. 与 1-4F1 竞争结合 KIR2DL1 的人类或人源化的抗体。

[0582] 54. 与 1-7F9 竞争结合 KIR2DL2 的人类或人源化的抗体。

[0583] 55. 与 1-4F1 竞争结合 KIR2DL2 的人类或人源化的抗体。

[0584] 56. 与 1-7F9 竞争结合 KIR2DL3 的人类或人源化的抗体。

[0585] 57. 与 1-4F1 竞争结合 KIR2DL3 的人类或人源化的抗体。

[0586] 58. 与 1-7F9 竞争结合 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 的人类或人源化的抗体。

[0587] 59. 与 1-4F1 竞争结合 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 的人类或人源化的抗体。

[0588] 60. 方面 52-59 任一方面的人类或人源化的抗体，其不结合 KIR2DS4 和 KIR2DS3 中的至少一个。

[0589] 61. 方面 52-60 任一方面的人类或人源化的抗体，其阻断 KIR2DL1 或 KIR2DL2/3 结合 I 类 HLA-C 分子。

[0590] 62. 方面 52-47 任一方面的人类或人源化的抗体，其加强 NK 细胞对表达 I 类 HLA-C 分子的人类靶细胞的裂解活性。

[0591] 63. 方面 52-62 任一方面的人类或人源化的抗体，该抗体含有包含与 SEQ ID NO：15 至少 90％相同氨基酸序列的轻链可变区，和包含与 SEQ ID NO：17 至少 90％相同氨基酸序列的重链可变区，或与 SEQ ID NO：39 至少 90％相同的轻链可变区，和包含与 SEQ ID NO：41 至少 90％相同氨基酸序列的重链可变区。

[0592] 64. 方面 52-63 任一方面的人类或人源化的抗体，其为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗体。

[0593] 65. 方面 64 的人类或人源化的抗体、其为 IgG4 抗体。

[0594] 66. 方面 64 的人类抗体，其为 IgG2 抗体。

[0595] 67. 结合 KIR2DL1、-2 和 -3 中的每一种，并阻断 KIR2DL1、-2 或 -3 结合 I 类 HLA-C 分子的人类或人源化的抗体。

[0596] 68. 与 KIR2DL1 的残基 M44 和 F45 相互作用的抗体。

[0597] 69. 方面 68 的抗体，其进一步与 KIR2DL1 残基 L38、R41、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88 中的一个或更多相互作用。

[0598] 70. 只在由氨基酸残基 L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88 限定的区域中结合 KIR2DL1 的抗体。

[0599] 71. 结合 KIR2DL1 和 KIR2DL2/3 的抗体，其不与由残基 L38、R41、M44、F45、N46、D47、T48、L49、R50、I52、F64、D72、Y80、P87 和 Y88 限定的区域外的氨基酸残基相互作用。

[0600] 72. 方面 67-71 任一方面的抗体，其为人类抗体 1-7F9。

[0601] 73. 含有上述方面任一方面的抗体的至少一个轻链 CDR 的抗体片段或抗体衍生物。

[0602] 74. 含有上述方面任一方面的抗体的至少两个轻链 CDRs 的抗体片段或抗体衍生

物。

[0603] 75. 含有上述方面任一方面的抗体的至少三个轻链 CDR 的抗体片段或抗体衍生物。

[0604] 76. 含有上述方面任一方面的抗体的 VL 区的抗体片段或抗体衍生物。

[0605] 77. 含有上述方面任一方面的抗体的至少一个重链 CDR 的抗体片段或抗体衍生物。

[0606] 78. 含有上述方面任一方面的抗体的至少两个重链 CDRs 的抗体片段或抗体衍生物。

[0607] 79. 含有上述方面任一方面的抗体的至少三个重链 CDRs 的抗体片段或抗体衍生物。

[0608] 80. 含有上述方面任一方面的抗体 VH 区的抗体片段或抗体衍生物。

[0609] 81. 含有上述方面任一方面的抗体所有 CDRs 的抗体片段或抗体衍生物。

[0610] 82. 含有上述方面任一方面的抗体 VH 和 VL 区的抗体片段或抗体衍生物。

[0611] 83. 产生上述方面任一方面的抗体的杂交瘤。

[0612] 84. 编码方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段的核酸。

[0613] 85. 含有方面 84 的核酸的载体。

[0614] 86. 含有方面 85 的载体的细胞。

[0615] 87. 方面 86 的细胞，其中细胞选自猿 COS 细胞、CHO 细胞和人类骨髓瘤细胞。

[0616] 88. 产生抗 KIR 抗体或抗体片段的方法，包括在分别适于表达抗 KIR 抗体、抗体片段的条件下，培养方面 86 的细胞。

[0617] 89. 产生抗 KIR 抗体或抗 KIR 抗体片段的衍生物的方法，包括提供抗 KIR 抗体或抗体片段并与其缀合至少一个衍生物部分。

[0618] 90. 治疗受试者中癌症的方法，该方法包括给患有癌症的受试者施用有效量的方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物。

[0619] 91. 方面 90 的方法，进一步包括给患者施用选自化学治疗剂、放射治疗剂、抗血管生成剂、免疫调节剂和激素药剂的药剂。

[0620] 92. 治疗受试者中由病毒引起的疾病或障碍的方法，该方法包括给患有由病毒引起的疾病或障碍的受试者施用有效量的方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物。

[0621] 93. 方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0622] 94. 方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物在制备用于治疗由病毒引起的疾病或障碍的药物中的用途。

[0623] 95. 一种组合物，它含有方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物，和药学上可接受的载体或赋形剂。

[0624] 96. 方面 95 的组合物，它含有吐温 80。

[0625] 97. 方面 95 的组合物，它含有蔗糖。

[0626] 98. 方面 95 的组合物，它含有吐温 80 和蔗糖。

[0627] 99. 方面 95-98 任一方面的组合物，进一步含有选自化学治疗剂、放射治疗剂、抗血管生成剂、免疫调节剂和激素药剂的药剂。

[0628] 100. 方面 95-99 任一方面的组合物，其中抗体、抗体片段或抗体衍生物共价地缀合到肿瘤靶向剂。

[0629] 101. 方面任一方面 95-99 的组合物，其中抗体、抗体片段或抗体衍生物包胶于脂质体中。

[0630] 102. 方面 95-99 任一方面的组合物，进一步含有结合 KIR 的抗体，其中 KIR 不是 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DS1 或 KIR2DS2。

[0631] 103. 提高选自淋巴细胞和 NK 细胞的细胞的裂解活性的方法，它包括用方面 1-82 任一方面的抗体，抗体片段或衍生物接触细胞。

[0632] 104. 降低由选自淋巴细胞，T 细胞和 NK 细胞的细胞表达的 KIR，和靶细胞表达的 I 类 HLA-C 分子之间相互作用的方法，该方法包括用方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物接触细胞。

[0633] 105. 中和由 NK 细胞表达的 KIR 的抑制活性的方法，该方法包括用方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物接触 NK 细胞。

[0634] 106. 结合 KIR2DL1、KIR2DL2 和 KIR2DL3 中的每一种的人类抗体，该抗体阻断 HLA-Cw4 分子结合 KIR2DL1，和 HLA-Cw3 分子结合 KIR2DL2 或 KIR2DL3 的至少一种。

[0635] 107. 根据方面 1-82 任一方面的抗体或抗体片段或衍生物，其中 KIR2DL1 含有 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，KIR2DL2 含有 SEQID NO:24 的氨基酸序列，和 / 或 KIR2DL3 含有 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列。

[0636] 108. 一种化合物，它与方面 1-82 任一方面的抗体、抗体片段或抗体衍生物结合实质上相同的 KIR2DL1 表位。

[0637] 109. 一种化合物，它与方面 1-82 任一方面的抗体、抗体片段或抗体衍生物结合基本上相同的 KIR2DL1 表位。

[0638] 110. 含有包含 SEQ ID NO:36 序列的轻链的抗体或抗体衍生物。

[0639] 111. 含有包含 SEQ ID NO:37 序列的重链的抗体或抗体衍生物。

[0640] 112. 含有方面 109 的轻链和方面 110 的重链的抗体或抗体衍生物。

[0641] 113. 由含有 SEQ ID NO:36 序列的轻链和由 SEQ ID NO:37 序列组成的重链组成的抗体。

[0642] 在本文引用的包括出版物、专利申请和专利的所有参考文献，据此通过参考将其并入本申请，达到好像与每一参考文献分别和特别指出，以在本文通过参考并入而且以其全部进行阐述的相同程度。

[0643] 在本文所有标题和副标题仅仅为方便而使用，并且不应解释为以任何方式限制本发明。

[0644] 上面描述要素以其所有可能变体的任何组合包含于本发明中，除非在本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾。

[0645] 术语“a”和“an”和“the”和相似对象当用于本发明描述的上下文中将解释为包含单数和复数二者，除非在本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾。

[0646] 在本文引用的数值范围仅仅打算用作对单独提及的属于该范围的每一分离的数值的速记方法，除非在本文另外指出，并且每一分离的数值并入说明书好象对其在本文单独地列出。除非另作说明，所有在本文提供的准确值表示相应的近似值（例如可以认为提

供的关于特殊因子或测量的所有准确的代表性值也提供了相应的近似测量，在适当的时候，通过“大约”来修饰）。

[0647] 在本文描述的所有方法可以以任何适当的顺序完成，除非在本文另外指出或另外明显地与上下文矛盾。

[0648] 在本文提供的任意和所有例子，或代表性语言（例如“例如”）的使用，仅仅是想更好地阐明本发明而且除非另外指出，不造成对本发明范围的限制。说明书中没有语言应解释为指出任意元素对实践本发明是必需的，除非同样地明确声明。

[0649] 在本文专利文件的引用和并入只为方便而完成，并且不反映任意这种专利文件的有效性、可专利性和／或强制执行性的观点。

[0650] 关于要素使用术语例如“含有”、“具有”、“包括”或“包含”的本发明的任意方面或具体实施方式的本文描述，打算对“由 ... 组成”，“基本上由 ... 组成”，或“实质上含有”该特定元素的本发明相似的方面或具体实施方式提供支持，除非另作说明或明显地与上下文相矛盾（例如在本文描述含有特定要素的组合物应理解为同样描述了由该要素组成的组合物，除非另作说明或明显地与上下文相矛盾）。

[0651] 本发明包括在在本文提供的方面或权利要求中陈述主题的所有修改和等价物到适用法律所允许的最大程度。

序列表

<110>Novo Nordisk A/S

<120> 人类抗 KIR 抗体

<130>7121.504-WO

<150>PCT/DK2004/000470
<151>2004-07-01

<150>PA 200500025
<151>2005-01-06

<160>42

<170>PatentIn version 3.3

<210>1
<211>128
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>1

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

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210>2
<211>131
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>2

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15
Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
20 25 30
Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Ser
35 40 45
Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60
Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80
Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
85 90 95
Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
100 105 110
Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125
Ile Lys Arg
130

<210>3
<211>11
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>3

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210>4
<211>12
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>4

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210>5
<211>7
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>5

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5
<210>6
<211>7
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>6

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210>7
<211>9
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>7

Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210>8
<211>9
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>8

His Gln Tyr His Arg Ser Pro Pro Thr
1 5

<210>9
<211>140
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>9

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45
Thr Pro Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala
65 70 75 80
Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
85 90 95
Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp
115 120 125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210>10
<211>10
<212>PRT

<213>Mus 肌

<400>10

Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr Gly Val His
1 5 10

<210>11
<211>16
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>11

Val Ile Trp Ser Gly Gly Ash Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
1 5 10 15

<210>12
<211>13
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>12

Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210>13
<211>42
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>13
ggaattccag gaggaattta aaatgcatga gggagtccac ag 42

<210>14
<211>26

<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>14
cgggatccca ggtgtctggg gttacc 26
<210>15
<211>109
<212>PRT
<213> 智人

<400>15

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

<210>16
<211>327
<212>DNA
<213> 智人

<400>16
gaaattgtgt tgacacagtc tccagtcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagattttg cagtttatta ttgtcagcag cgtagcaact ggatgtacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acgaact 327

<210>17
<211>123
<212>PRT
<213> 智人

<400>17

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

<210>18
<211>369
<212>DNA
<213> 智人

<400>18
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagt ttctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg ttcatcccta tctttggtgc agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaatccct 300

agtgggagct actactacga ctacgatatg gacgtctggg gccaagggac cacggtcacc 360
gtctcctca 369

<210>19
<211>121
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>19

Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe Thr Pro Tyr
20 25 30
Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60
Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
Lys Met Asn Ser Leu Gln Val Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asn Pro Arg Pro Gly Asn Tyr Pro Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>20
<211>121
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>20

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

<210>21
<211>108
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>21

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

<210>22
<211>109
<212>PRT
<213>Mus 肌

<400>22

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

<210>23
<211>224
<212>PRT
<213> 智人

<220>
<221>MISC_FEATURE
<222>(16)..(16)
<223>Xaa 是 Pro 或 Leu

<220>
<221>MISC_FEATURE
<222>(16)..(16)
<223>Xaa 是 Pro 或 Arg

<220>
<221>MISC_FEATURE
<222>(114)..(114)
<223>Xaa 是 Pro 或 Leu

<400>23

His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Xaa

1 5 10 15
Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
20 25 30
Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Met Phe Asn Asp Thr
35 40 45
Leu Arg Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
50 55 60
Ser Ile Ser Arg Met Thr Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
65 70 75 80
Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Val Ser Ala Pro Ser Asp Pro
85 90 95
Leu Asp Ile Val Ile Ile Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
100 105 110
Gln Xaa Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Asn Val Thr Leu Ser Cys
115 120 125
Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
130 135 140
Ala His Glu Arg Arg Leu Pro Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
145 150 155 160
Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
165 170 175
Cys Phe Gly Ser Phe His Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Lys Ser Ser
180 185 190
Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
195 200 205
Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His
210 215 220

<210>24
<211>224
<212>PRT
<213> 智人

<400>24

His Glu Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala His Pro Gly Arg
1 5 10 15
Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
20 25 30

Arg Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Lys Asp Thr
35 40 45
Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
50 55 60
Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
65 70 75 80
Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
85 90 95
Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
100 105 110
Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Cys
115 120 125
Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
130 135 140
Ala His Glu Cys Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
145 150 155 160
Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala Thr His Gly Gly Thr Tyr Arg
165 170 175
Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asn Ser Ser
180 185 190
Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Ile Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
195 200 205
Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Lys Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His
210 215 220

<210>25
<211>224
<212>PRT
<213> 智人

<400>25

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

50 55 60

Ser Ile Gly Pro Met Met Gln Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
65 70 75 80
Gly Ser Val Thr His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
85 90 95
Leu Asp Ile Val Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Lys Pro Ser Leu Ser Ala
100 105 110
Gln Pro Gly Pro Thr Val Leu Ala Gly Glu Ser Val Thr Leu Ser Cys
115 120 125
Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Asp Met Tyr His Leu Ser Arg Glu Gly Glu
130 135 140
Ala His Glu Arg Arg Phe Ser Ala Gly Pro Lys Val Asn Gly Thr Phe
145 150 155 160
Gln Ala Asp Phe Pro Leu Gly Pro Ala ThrHi s Gly Gly Thr Tyr Arg
165 170 175
Cys Phe Gly Ser Phe Arg Asp Ser Pro Tyr Glu Trp Ser Asn Ser Ser
180 185 190
Asp Pro Leu Leu Val Ser Val Thr Gly Asn Pro Ser Asn Ser Trp Pro
195 200 205
Ser Pro Thr Glu Pro Ser Ser Glu Thr Gly Asn Pro Arg His Leu His
210 215 220

<210>26
<211>45
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>26
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210>27
<211>21
<212>DNA
<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>27
ctaatacgac tcactatagg g 21

<210>28
<211>32
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>28
gcaggcacac aacagaggca gttccagatt tc 32

<210>29
<211>45
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>29
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210>30
<211>21
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>30
ctaatacgac tcactatagg g 21
<210>31
<211>23

<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>31
gtgccagggg gaagaccgat ggg 23

<210>32
<211>16
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>32
gtaaaacgac ggccag 16

<210>33
<211>17
<212>DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400>33
caggaaacag ctatgac 17

<210>34
<211>108
<212>PRT
<213> 智人

<400>34

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

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

<210>35
<211>119
<212>PRT
<213> 智人

<400>35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Ile Leu Ser Cys Gly Val Ser Asn Phe Arg Ile Ser Ala His
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Arg Arg Val Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Thr Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asp Leu Glu Asp Phe Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met His Lys Met Arg Val Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Lys Gly Ser Asp Arg Leu Ser Asp Asn Asp Pro Phe Asp Ala
100 105 110
Trp Gly Pro Gly Thr Val Val
115

<210>36
<211>214

<212>PRT
<213> 智人

<400>36

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Met Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210>37
<211>450
<212>PRT
<213> 智人

<400>37

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 Gly Thr Phe Ser Phe Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Phe Ile Pro Ile Phe Gly Ala Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ile Pro Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Asp Met Asp Val
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
130 135 140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
195 200 205
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215 220
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Gly Lys
450

<210>38
<211>100
<212>PRT
<213> 智人

<400>38

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

Leu Val Lys Ser Glu Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys Trp Ser Asp Val
20 25 30

Met Phe Glu His Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Lys Phe Asn Asn Thr
35 40 45

Leu His Leu Ile Gly Glu His His Asp Gly Val Ser Lys Ala Asn Phe
50 55 60

Ser Ile Gly Pro Met Met Pro Val Leu Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr
65 70 75 80

Gly Ser Val Pro His Ser Pro Tyr Gln Leu Ser Ala Pro Ser Asp Pro
85 90 95
Leu Asp Met Val
100

<210>39
<211>109
<212>PRT
<213> 智人

<220>
<221>MISC_FEATURE
<222>(1)..(109)
<223>Xaa 3 是 Q 或 R. Xaa 4 是 L 或 M. Xaa 9 是 S 或 F. Xaa 24 是 R 或 W. Xaa 32 是 A 或 Y. Xaa 41 是 G 或 A. Xaa 47 是 L 或 F. Xaa 50 是 D 或 Y. Xaa 55 是 E 或 Q. Xaa 71 是 F 或 Y. Xaa 74 是 A 或 T.

<400>39

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

<210>40
<211>327
<212>DNA
<213> 智人

<220>
<221>misc_feature
<222>(1)..(153)
<223>n8 是 a 或 g.n10 是 t 或 a.n26 是 c 或 t.n70 是 c 或 t.
n75 是 a 或 c.n94 是 g 或 t.n95 是 c 或 a.n114 是 g 或 a.
n122 是 g 或 c.n123 是 g 或 a.n129 是 t 或 c.n139 是 c 或
t.n141 是 g 或 c.n148 是 g 或 t.n153 是 c 或 a.

<220>
<221>misc_feature
<222>(154)..(327)
<223>n162 是 g 或 a.n163 是 g 或 c.n207 是 a 或 g.n212 是 t 或
a.n220 是 g 或 a.
<400>40
gccatccngn tgacccagtc tccatnctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcn gggcnagtca gggcattagc agtnntttag cctggtatca gcanaaacca 120
gnnaaagcnc ctaagctcnt natctatnat gcntccagtt tnnaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacngat tncactctcn ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tattatagta ccccgctcac tttcggcgga 300
gggaccaagg tggagatcaa acgaact 327

<210>41
<211>124
<212>PRT
<213> 智人

<400>41

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 Gly Thr Ser Asn Ser Tyr
20 25 30
Ser Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Glu Ser Thr Arg Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

<210>42
<211>372
<212>DNA
<213> 智人

<400>42
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gttaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg cacctccaac agctattcta ttaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tatttggtac agcaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt tccgcggacg aatccacgcg cacagtctac 240
atggagctga acagtctgag atctgaggat acggccgtgt attactgtgc gagaggatat 300
tacgatattt tcaaggacta ctattacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

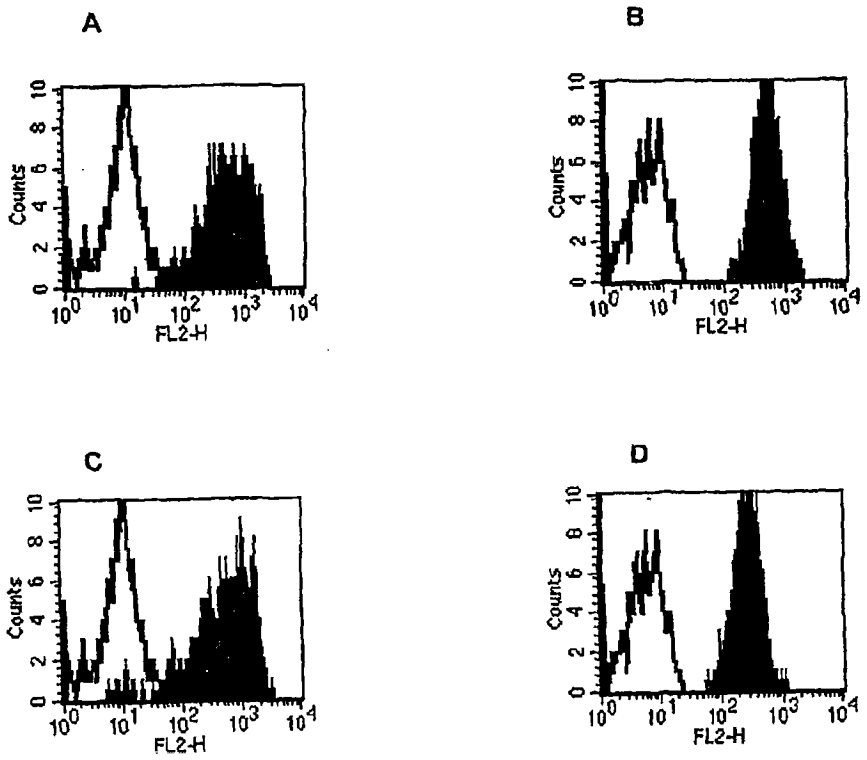

A
B
C
D
Counts
FL2-H

图 1

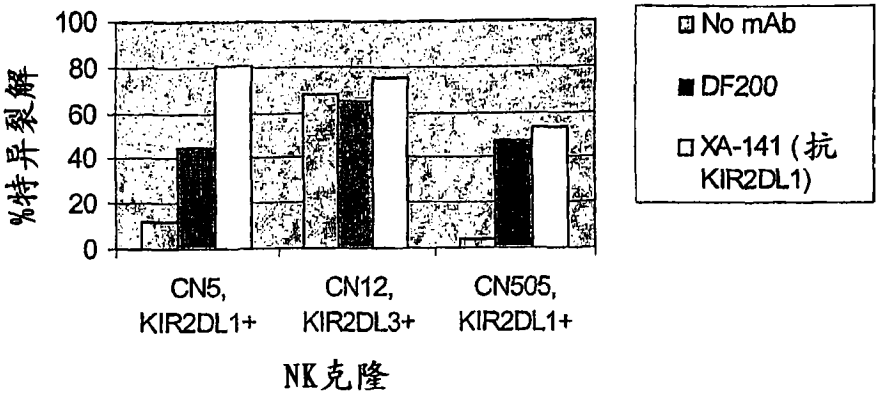

%特异裂解
100
80
60
40
20
0
CN5, KIR2DL1+
CN12, KIR2DL3+
CN505, KIR2DL1+
NK克隆
No mAb
DF200
XA-141 (抗 KIR2DL1)

图 2

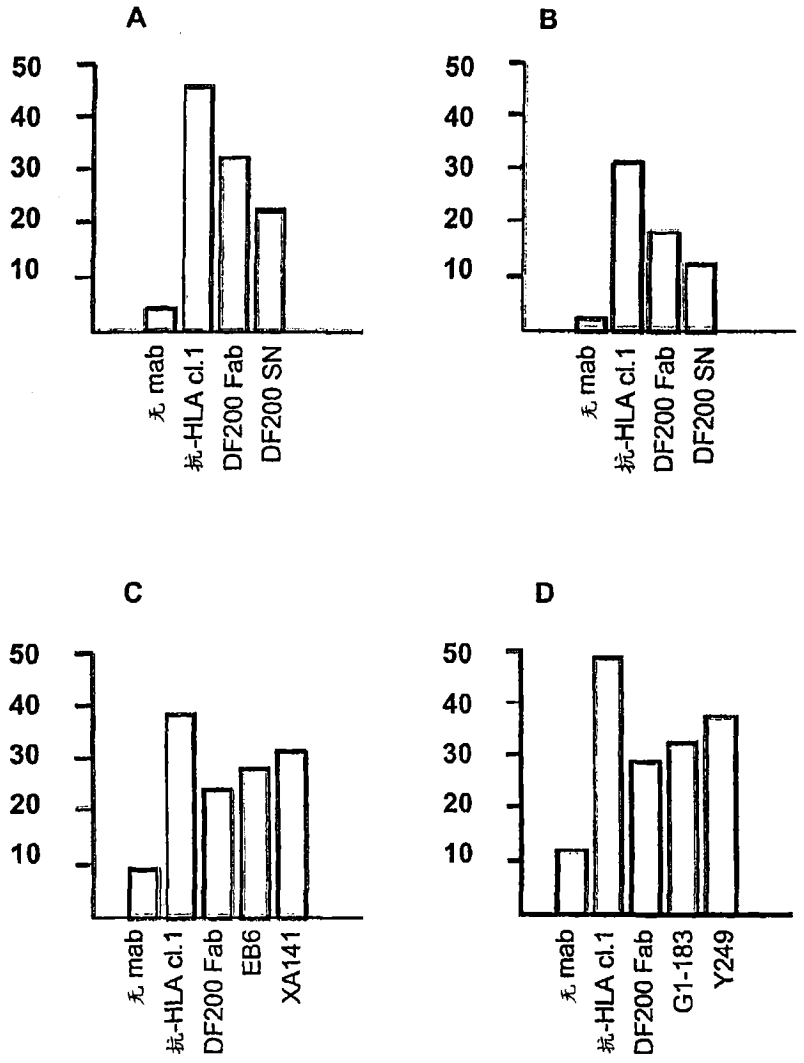
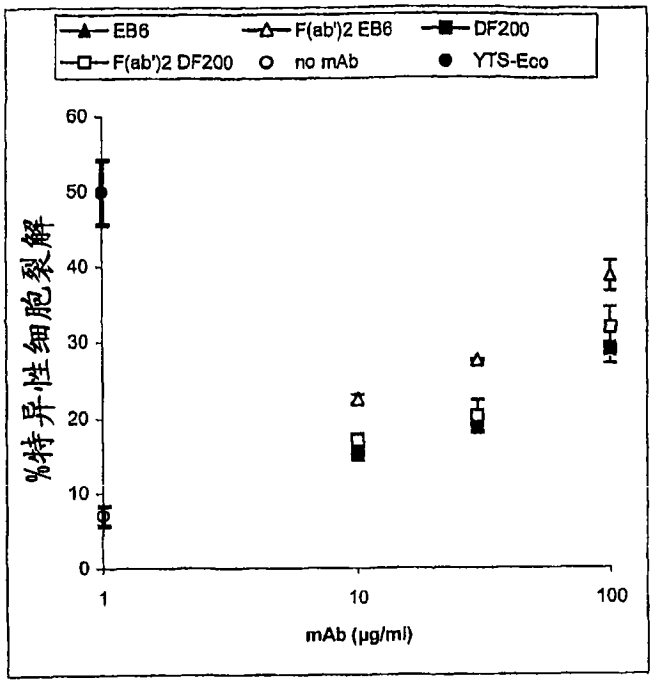

A
50
40
30
20
10
无 mab
抗-HLA cl.1
DF200 Fab
DF200 SN
B
50
40
30
20
10
无 mab
抗-HLA cl.1
DF200 Fab
DF200 SN
C
50
40
30
20
10
无 mab
抗-HLA cl.1
DF200 Fab
EB6
XA141
D
50
40
30
20
10
无 mab
抗-HLA cl.1
DF200 Fab
G1-183
Y249

图 3

A


EB6
F(ab')2 EB6
DF200
F(ab')2 DF200
no mAb
YTS-Eco
%特异性细胞裂解
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
mAb (μg/ml)

B

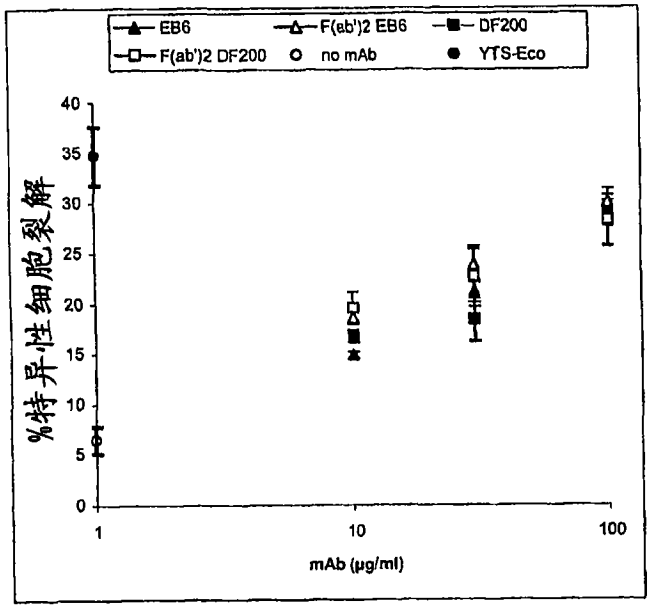
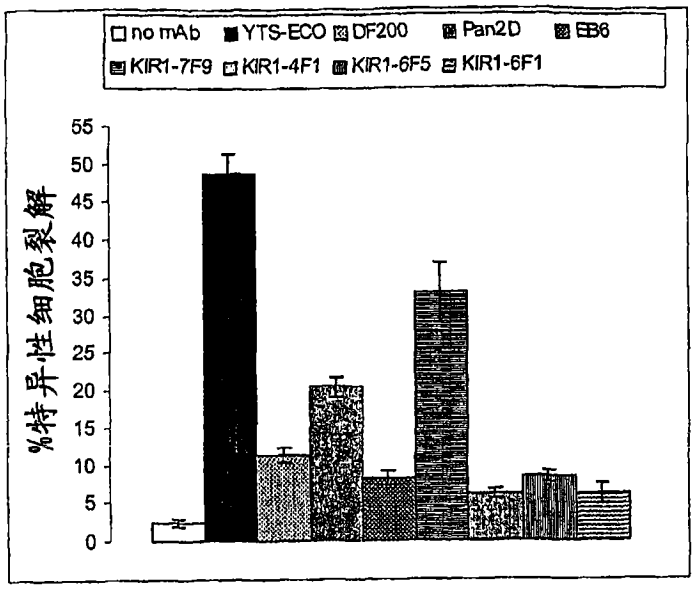

EB6
F(ab')2 EB6
DF200
F(ab')2 DF200
no mAb
YTS-Eco
%特异性细胞裂解
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1
10
100
mAb (μg/ml)

图 4

A


no mAb
YTS-ECO
DF200
Pan2D
EB6
KIR1-7F9
KIR1-4F1
KIR1-6F5
KIR1-6F1
%特异性细胞裂解
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0

B

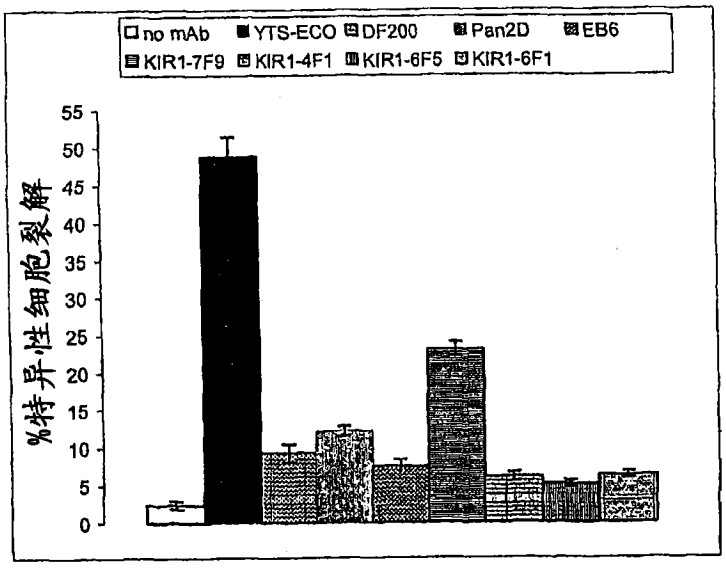
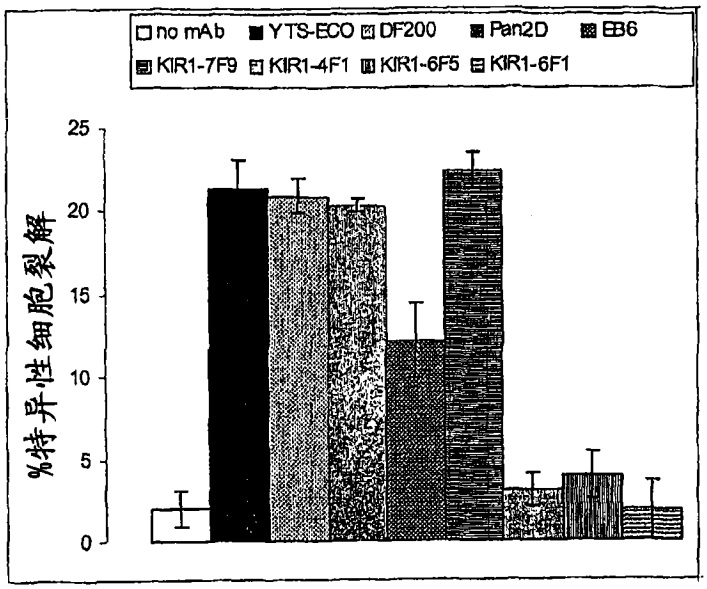

no mAb
YTS-ECO
DF200
Pan2D
EB6
KIR1-7F9
KIR1-4F1
KIR1-6F5
KIR1-6F1
%特异性细胞裂解
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0

图 5

A


no mAb
YTS-ECO
DF200
Pan2D
EB6
KIR1-7F9
KIR1-4F1
KIR1-6F5
KIR1-6F1
%特异性细胞裂解
25
20
15
10
5
0

B

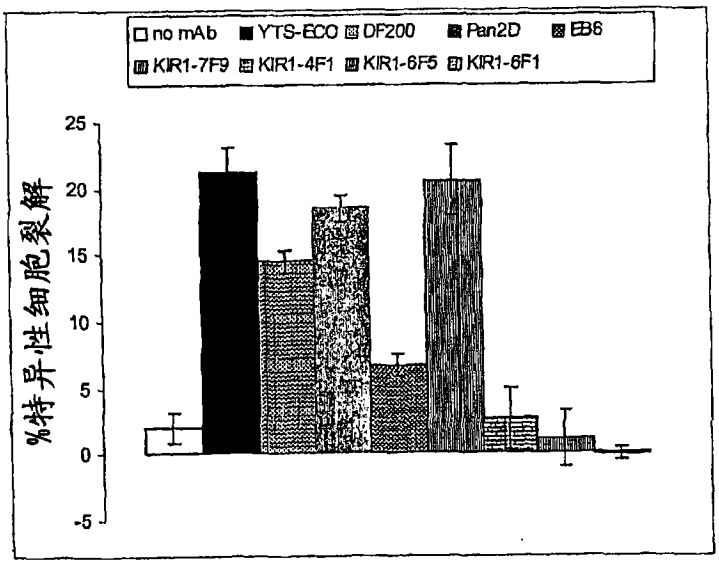

no mAb
YTS-ECO
DF200
Pan2D
EB6
KIR1-7F9
KIR1-4F1
KIR1-6F5
KIR1-6F1
%特异性细胞裂解
25
20
15
10
5
0
-5

图 6

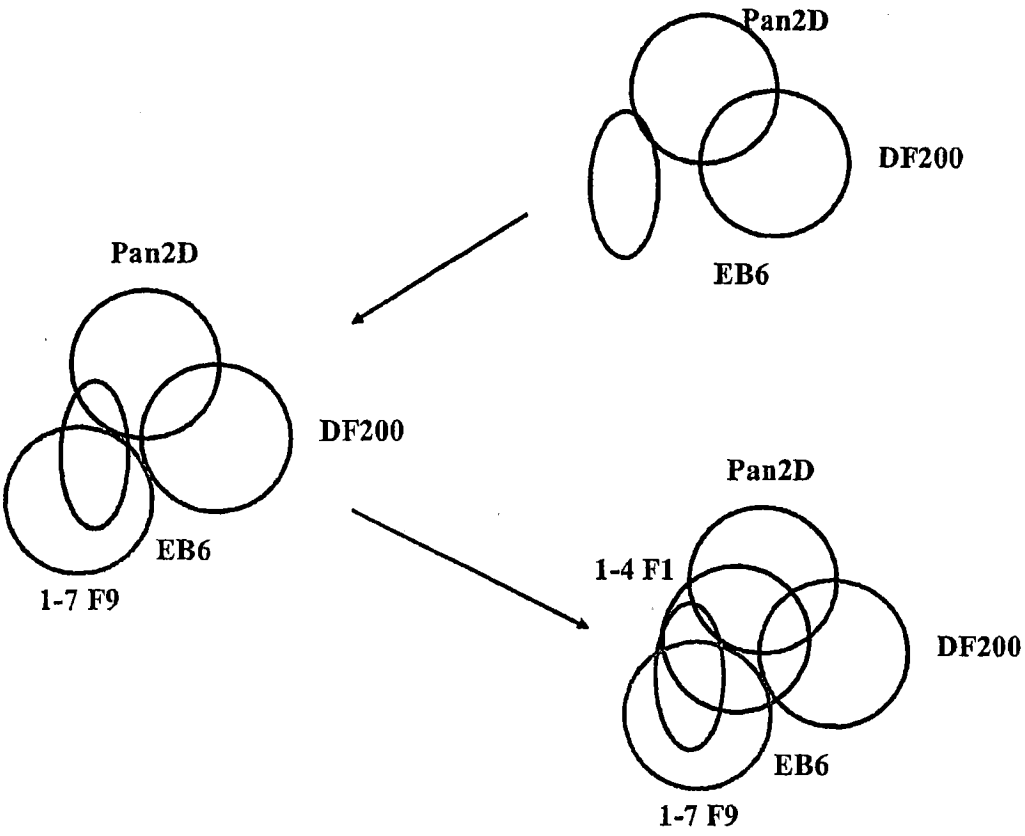

Pan2D
DF200
EB6
Pan2D
DF200
EB6
1-7 F9
Pan2D
1-4 F1
DF200
EB6
1-7 F9

图 7

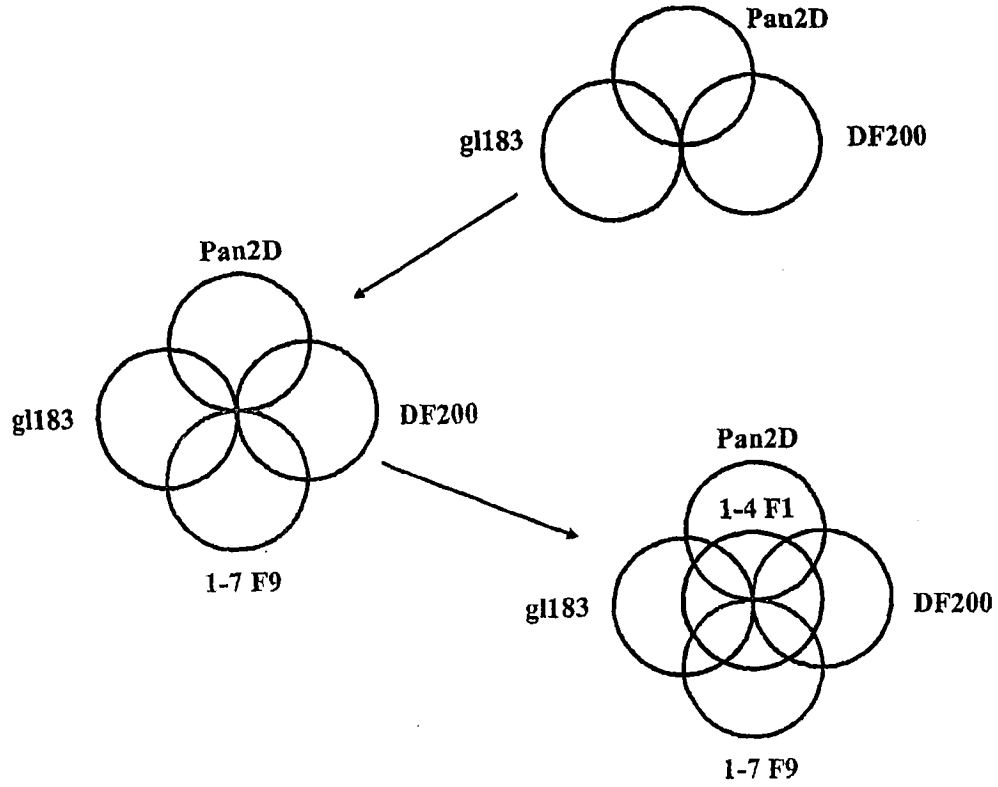

Pan2D
gl183
DF200
Pan2D
gl183
DF200
1-7 F9
Pan2D
1-4 F1
gl183
DF200
1-7 F9

图 8

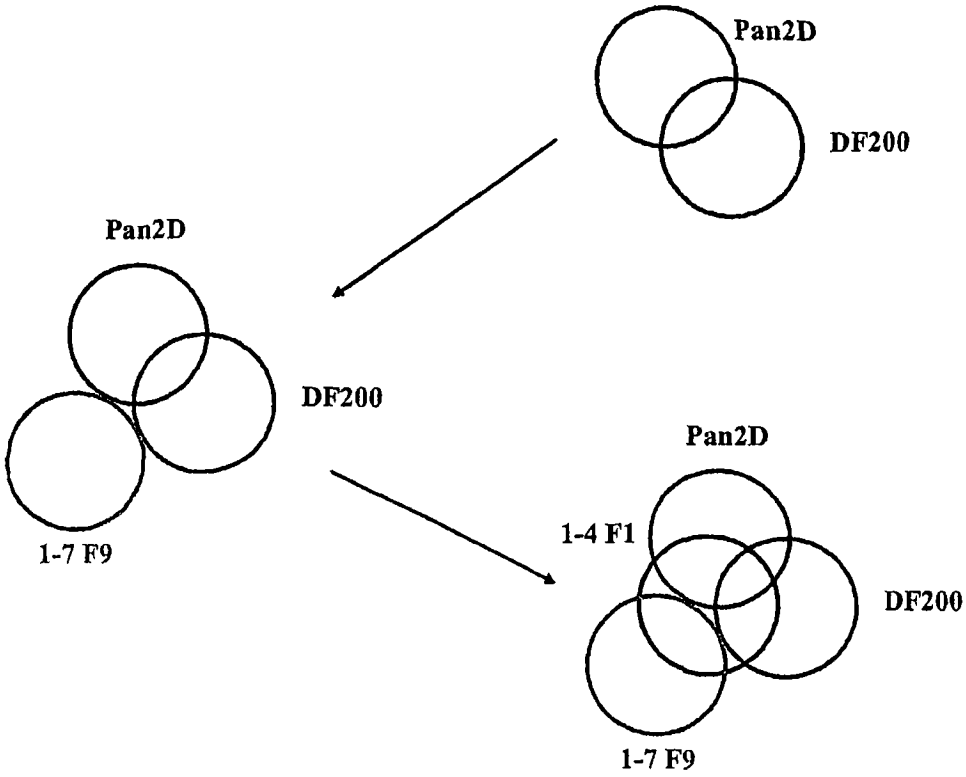

Pan2D
DF200
Pan2D
DF200
1-7 F9
Pan2D
1-4 F1
DF200
1-7 F9

图 9

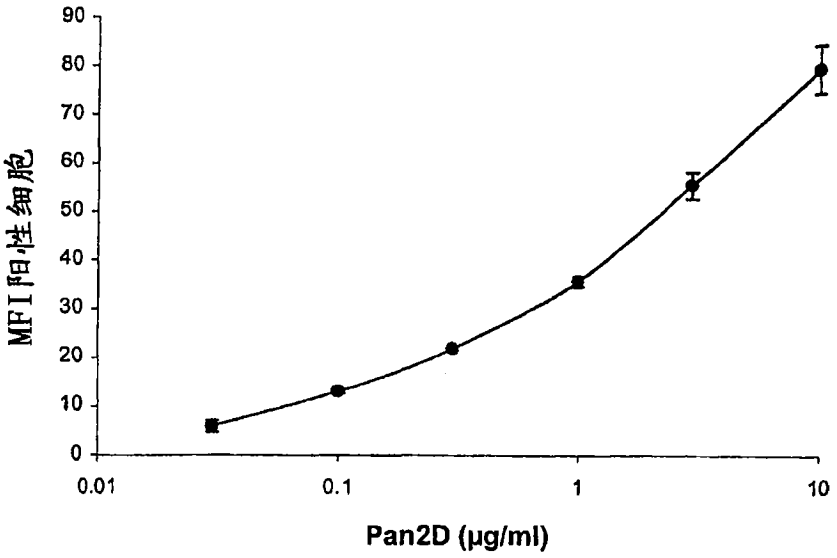


图 10

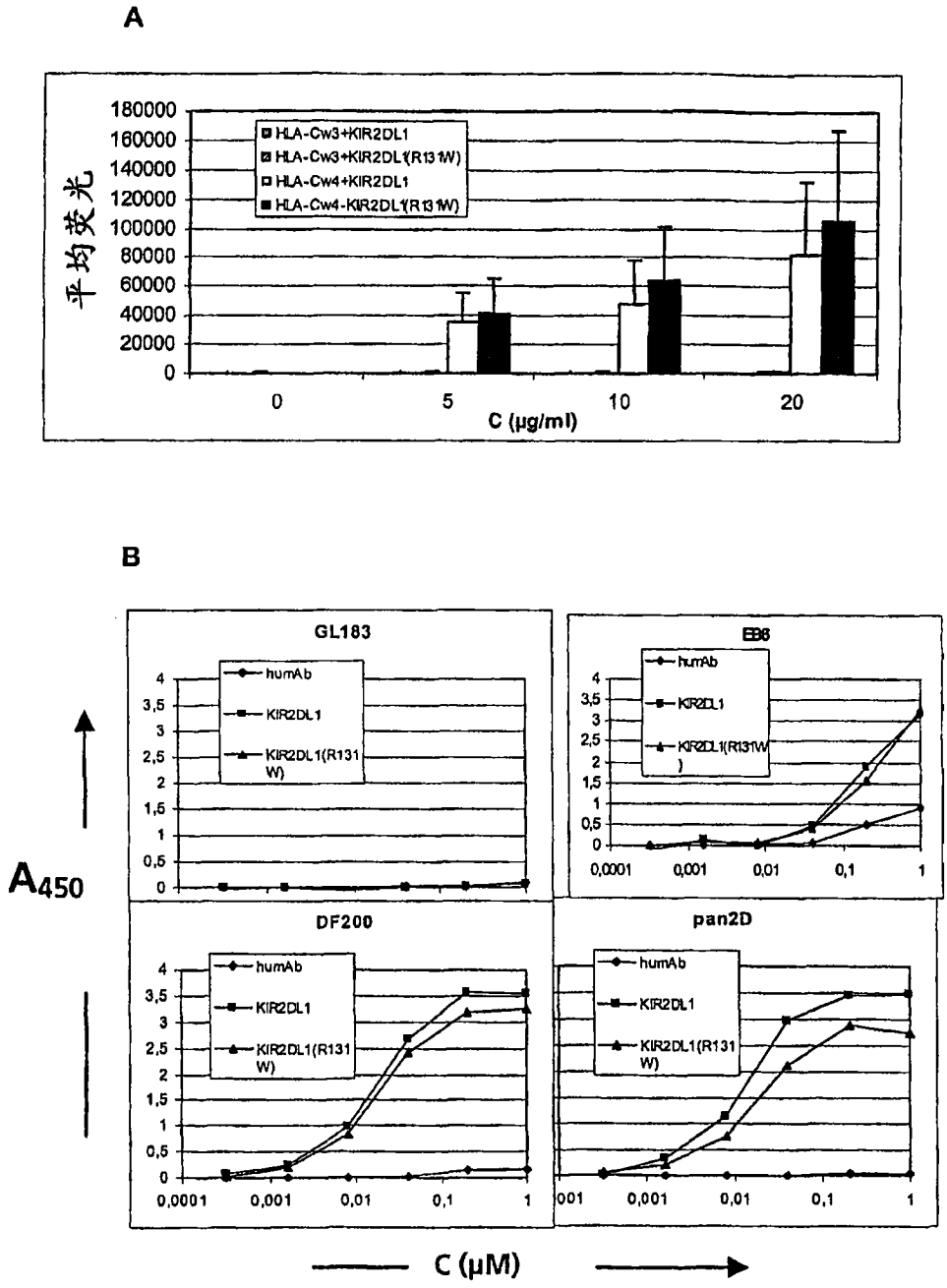

A
平均荧光
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
HLA-Cw3+KIR2DL1
HLA-Cw3+KIR2DL1(R131W)
HLA-Cw4+KIR2DL1
HLA-Cw4-KIR2DL1(R131W)
0
5
10
20
C (μg/ml)
B
A450
GL183
EB6
DF200
pan2D
humAb
KIR2DL1
KIR2DL1(R131W)
0,0001
0,001
0,01
0,1
1
C (μM)

图 11

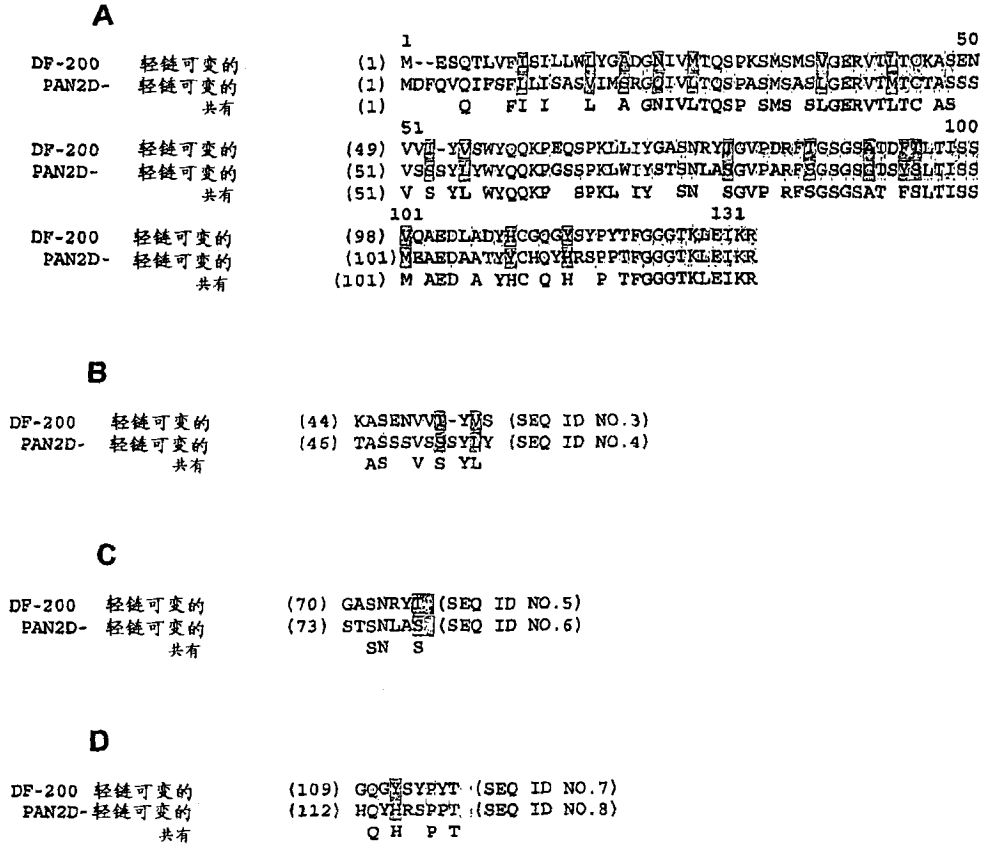


图 12

DF200 VH

A

MAVLGLLFCLVTFPSCVLS

QVQLEQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSFTPYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDY NAAFISRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQVNDTAIYYCARNPRPGNYPYGMDYWGQGTSVT VSS (SEQ ID NO:9)

B

GFSFTPYGVH (SEQ ID NO:10)

C

VIWSGGNTDYNAAFIS (SEQ ID NO:11)

D

NPRPGNYPYGMDY (SEQ ID NO:12)

图 13

1-7F9 VL 和 VH

A

EIVLTQSPVTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWMYTFGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:15)

B

gaaattgtgttgacacagtctccagtcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctg
cagggccagtcagagtgttagcagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggc
tcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggttcagtggcagtgggtctggg
acagacttcactctcaccatcagcagcctagagcctgaagattttgcagtttattattgtcagcagcg
tagcaactggatgtacacttttggccaggggaccaagctggagatcaaacgaact (SEQ ID
NO:16)

C

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSFYAISWVRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRV
TITADESTSTAYMELSSLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID
NO:17)

D

caggtccagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctgggtcctcggtgaaggtctcctgcaa
ggcttctggaggcaccttcagtttctatgctatcagctgggtgcgacaggcccctggacaagggcttg
agtggatgggagggttcatccctatctttggtgcagcaaactacgcacagaagttccagggcagagtc
acgattaccgcggacgaatccacgagcacagcctacatggaactgagcagcctgagatctgacgacac
ggccgtgtattactgtgcgagaatccctagtgggagctactactacgactacgatatggacgtctggg
gccaagggaccacggtcaccgtctcctca (SEQ ID NO:18)

图 14

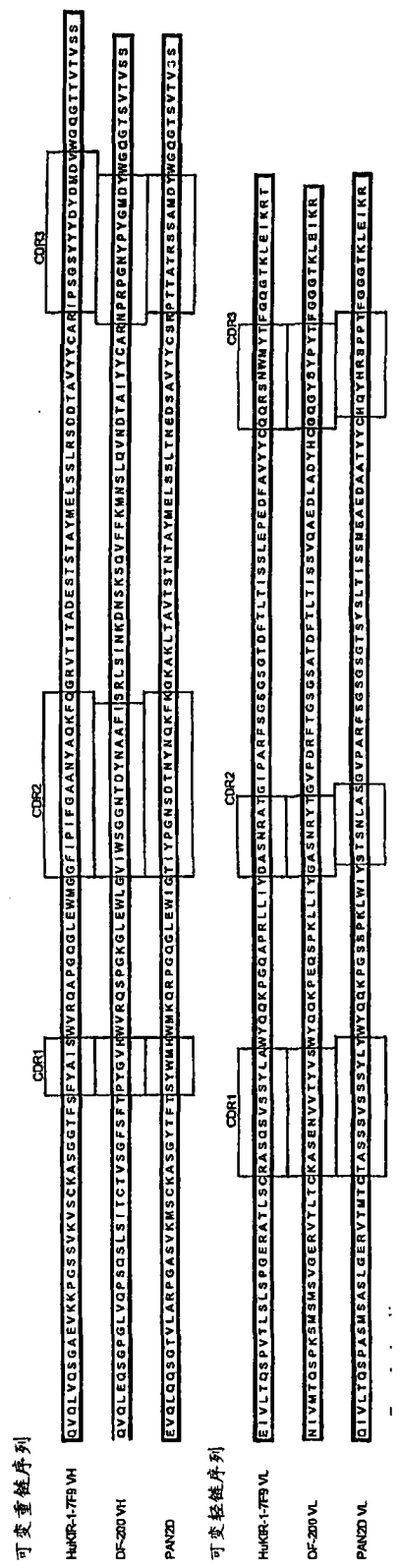

可变重链序列
HuKIR-1-7F9 VH
DF-200 VH
PAN2D
可变轻链序列
HuKIR-1-7F9 VL
DF-200 VL
PAN2D VL
CDR1
CDR2
CDR3

图 15

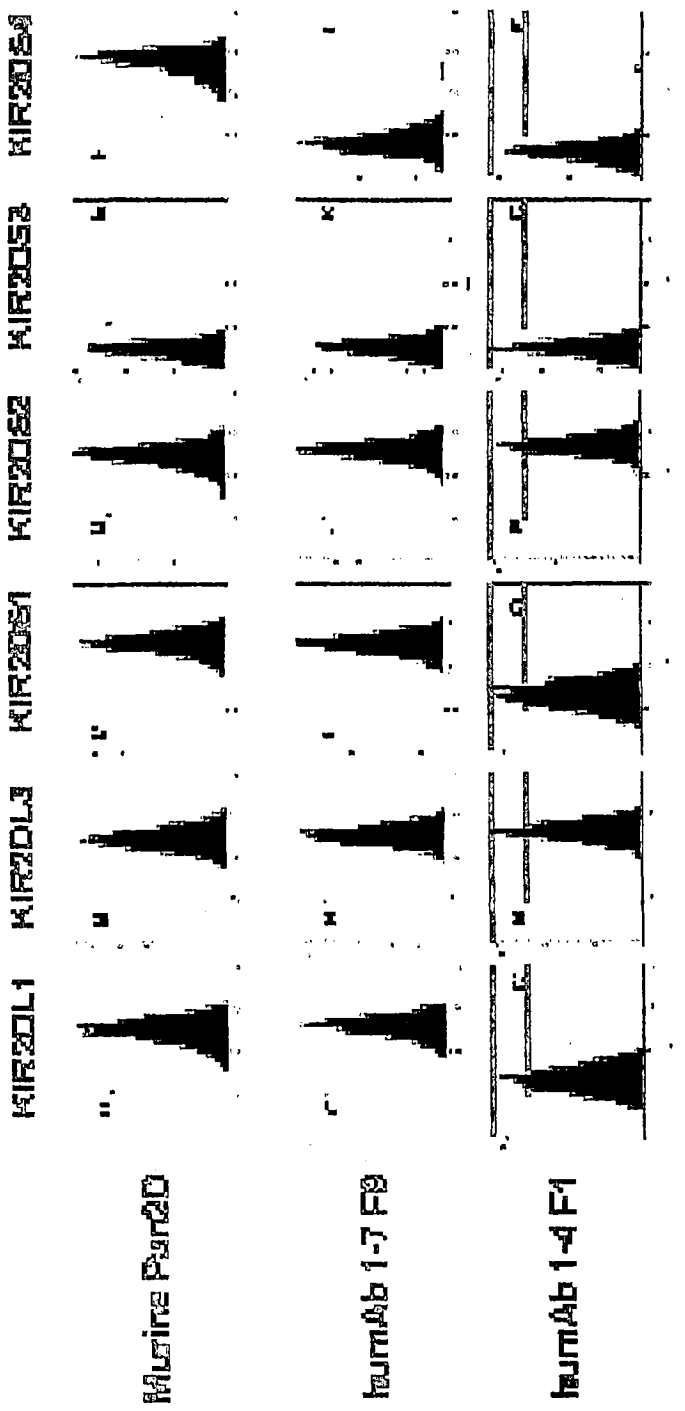

KIR2DL1
KIR2DL3
KIR2DS1
KIR2DS2
KIR2DS3
Murine Pan2D
humAb 1-7 F9
humAb 1-4 F1

图 16

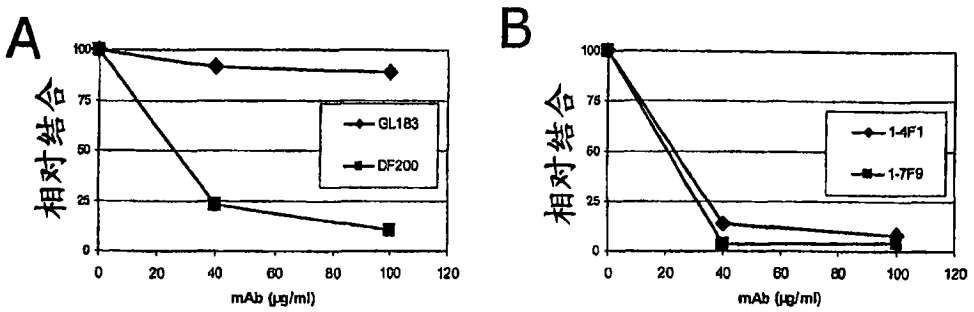

A
相对结合
GL183
DF200
mAb (μg/ml)
B
相对结合
1-4F1
1-7F9
mAb (μg/ml)

图 17

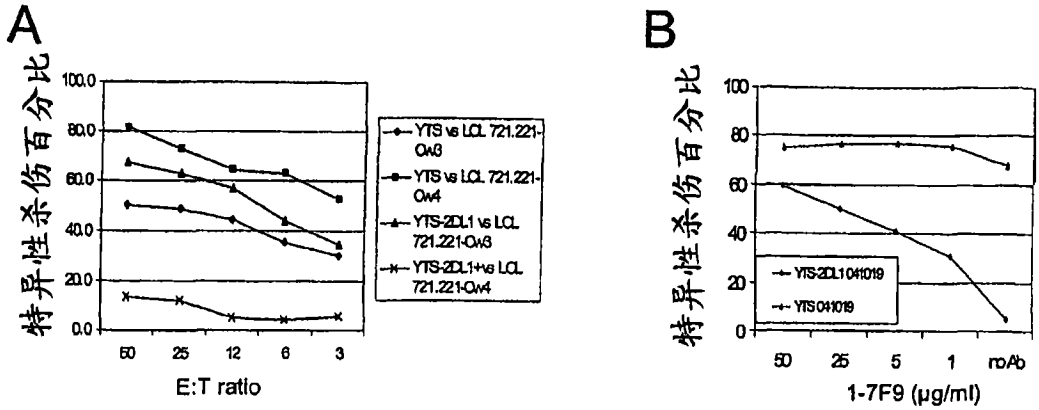

A
特异性杀伤百分比
YTS vs LCL 721.221-Cw3
YTS vs LCL 721.221-Cw4
YTS-2DL1 vs LCL 721.221-Cw3
YTS-2DL1+vs LCL 721.221-Cw4
E:T ratio
B
特异性杀伤百分比
YTS-2DL1041019
YTS041019
1-7F9 (μg/ml)

图 18

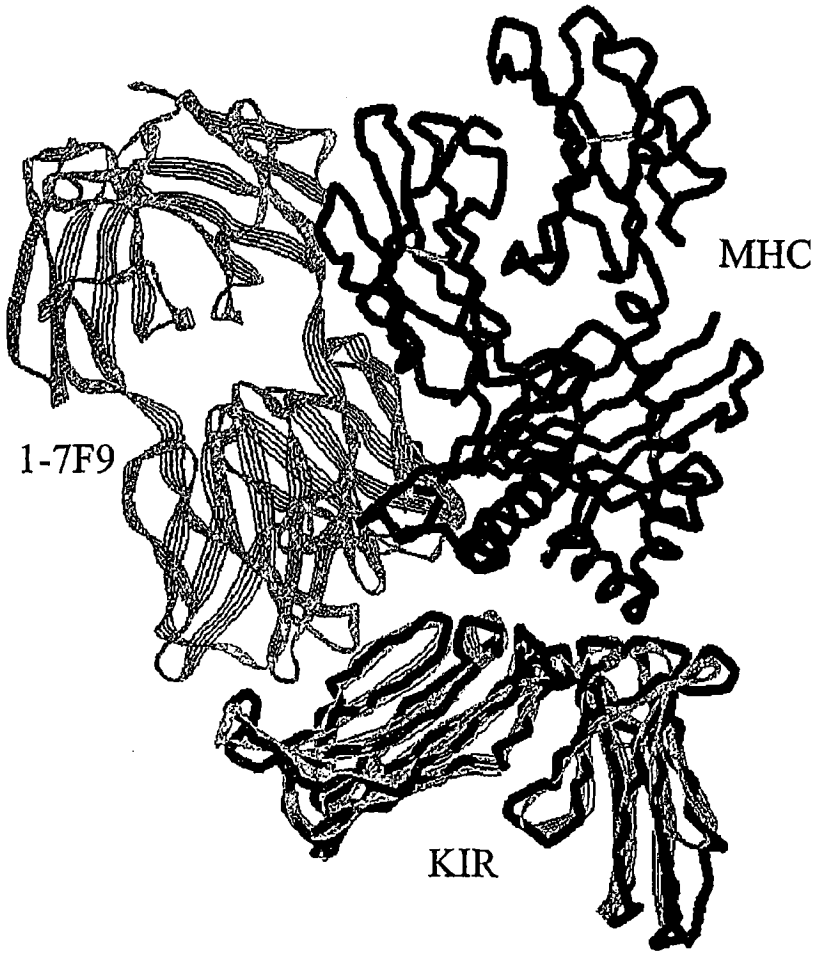


图 19

```
  1   HEGVHRKPSL LAHPGRLVKS EETVILQCWS DVMFEHFLLH REGMFNDTLR
 51   LIGEHHDGVS KANFSISRMT QDLAGTYRCY GSVTHSPYQV SAPSDPLDIV
101   IIGLYEKPSL SAQLGPTVLA GENVTLSCSS RSSYDMYHLS REGEAHERRL
151   PAGPKVNGTF QADFPLGPAT HGGTYRCFGS FHDSPYEWSK SSDPLLVSVT
201   GNPSNSWPSP TEPSSKTGNP RHLH
```

图 20