



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102766210 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201210037538. 0

A61K 39/00(2006. 01)

(22) 申请日 2000. 08. 24

A61K 45/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00(2006. 01)

60/150, 452 1999. 08. 24 US

A61P 31/00(2006. 01)

A61P 33/00(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

审查员 尹军团

00812037. 4 2000. 08. 24

(73) 专利权人 E. R. 施贵宝 & 圣斯有限责任公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 艾伦·J·科曼 爱德华·L·霍克

尼尔斯·朗伯格

亚什万特·M·德奥

蒂博尔·P·凯莱尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书3页 说明书65页

序列表19页 附图17页

(54) 发明名称

人 CTLA-4 抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及人 CTLA-4 抗体及其应用。具体而言,本发明提供了新型抗人 CTLA-4 的人序列抗体以及应用这些抗体治疗人类疾病、感染和其他病症的方法。

1. 分离的人单克隆抗体,或其抗原结合部分,其
 - (i) 与抗 CTLA-4 抗体 10D1 竞争与人 CTLA-4 多肽的结合,所述抗 CTLA-4 抗体 10D1 包括含有具有 SEQ ID NO:17 所示的序列的氨基酸的重链可变区,以及具有 SEQ ID NO:7 所示的序列的氨基酸的轻链可变区,并且
 - (ii) 具有 10^8M^{-1} 或更高的结合亲和性。
2. 权利要求 1 的抗体,其中竞争性抗体或其抗原结合部分能够以 10^9M^{-1} 或更高的结合亲和性结合人 CTLA-4 多肽。
3. 权利要求 1 的抗体,其中竞争性抗体或其抗原结合部分与非淋巴组织不发生交叉反应。
4. 权利要求 1 的抗体,其中竞争性抗体或其抗原结合部分不结合小鼠 CTLA-4 多肽。
5. 权利要求 1 的抗体,其中竞争性抗体或其抗原结合部分能够结合猕猴 CTLA-4 多肽。
6. 分离的核酸,其编码权利要求 1 的竞争性抗体或其抗原结合部分的轻链可变区。
7. 分离的核酸,其编码权利要求 1 的竞争性抗体或其抗原结合部分的重链可变区。
8. 载体,其包括权利要求 6 或 7 的核酸。
9. 权利要求 8 的载体,其中所述载体为质粒或病毒载体。
10. 分离的重组宿主细胞,其转化有权利要求 8 或 9 的载体。
11. 用于诱导、增强或延长对抗原的免疫应答的药物组合物,包括:
 - (a) 权利要求 1 的竞争性抗体或其抗原结合部分,其量有效诱导,增强或延长对抗原的免疫应答;以及
 - (b) 可药用载体。
12. 权利要求 11 的药物组合物,其中抗原为:
 - (a) 肿瘤抗原,或
 - (b) 病原体抗原。
13. 权利要求 12 的药物组合物,其中抗原来自病原体,所述病原体选自病毒,细菌,真菌或寄生虫。
14. 权利要求 13 的药物组合物,其中病原体为 HIV。
15. 权利要求 12 的药物组合物,其中抗原为选自前列腺癌肿瘤,黑色素瘤和上皮癌肿瘤的肿瘤抗原。
16. 权利要求 11,12 或 15 任一项的药物组合物,其进一步包括化疗剂。
17. 权利要求 11 的药物组合物,其进一步包括抗原。
18. 权利要求 17 的药物组合物,其中抗原来自病原体。
19. 权利要求 18 的药物组合物,其中所述病原体为病毒,细菌,真菌或寄生虫。
20. 权利要求 19 的药物组合物,其中抗原衍生自选自下列的病毒:HIV,甲肝病毒,乙肝病毒,丙肝病毒,疱疹病毒,腺病毒,流感病毒,黄病毒,艾柯病毒,鼻病毒,柯萨奇病毒,coronavirus,呼吸道合胞病毒,腮腺炎病毒,轮状病毒,麻疹病毒,风疹病毒,细小病毒,牛痘病毒,HTLV 病毒,登革热病毒,乳头瘤病毒,软疣病毒,脊髓灰质炎病毒,狂犬病毒,JC 病毒和虫媒病毒性脑炎病毒。
21. 权利要求 19 的药物组合物,其中抗原衍生自选自下列的细菌:衣原体,立克次氏体细菌,分枝杆菌,葡萄球菌,链球菌,肺炎球菌,脑膜炎球菌和 conococci,克雷白氏杆菌,变

形菌,沙雷氏菌,假单胞菌,军团菌,白喉菌,沙门氏菌,芽孢杆菌,霍乱菌,破伤风菌,波特淋菌,炭疽热菌,疫病菌,细螺旋体病菌,和莱姆 (lymes) 病菌。

22. 权利要求 19 的药物组合物,其中抗原衍生自选自下列的真菌:假丝酵母,新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*),曲霉,毛霉,孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*),牙生菌 (*Blastomyces dermatitidis*),副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*),粗球孢菌 (*Coccidioides immitis*) 和荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)。

23. 权利要求 19 的药物组合物,其中抗原衍生自选自下列的寄生虫:内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*),结肠小袋虫 (*Balantidium coli*),福氏耐格里 (*Naegleria fowleri*),棘阿米巴原虫 (*Acanthamoeba*),贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*),似隐孢菌 (*Cryptosporidium*),间质性浆细胞 (*Pneumocystis carinii*),疟原虫 (*Plasmodium vivax*),巴贝西虫 (*Babesia microti*),布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*),枯西锥虫 (*Trypanosoma cruzi*),利什曼虫 (*Leishmania donovani*),弓浆虫 (*Toxoplasma gondii*),和巴西日圆线虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*)。

24. 权利要求 17 的药物组合物,其中抗原为肿瘤抗原。

25. 权利要求 24 的药物组合物,其中抗原为 gp100。

26. 权利要求 24 的药物组合物,其中抗原为 MAGE。

27. 权利要求 24 的药物组合物,其中抗原为 Trp-2。

28. 权利要求 24 的药物组合物,其中抗原为端粒酶。

29. 权利要求 24 的药物组合物,其中抗原为热休克蛋白 (HSP)。

30. 权利要求 17 的药物组合物,其中抗原为阿尔茨海默氏病患者的淀粉样 A β 肽。

31. 权利要求 17 的药物组合物,其进一步包含全细胞制剂。

32. 权利要求 31 的药物组合物,其中全细胞制剂的细胞为全肿瘤细胞的制剂。

33. 权利要求 31 或 32 的药物组合物,其中全细胞制剂的细胞表达 GM-CSF。

34. 权利要求 31 或 32 的药物组合物,其中全细胞制剂的细胞表达 GCSF。

35. 权利要求 31 或 32 的药物组合物,其中全细胞制剂的细胞表达 IL-2。

36. 权利要求 31 或 32 的药物组合物,其中全细胞制剂的细胞表达 IL-1。

37. 权利要求 31 或 32 的药物组合物,其中全细胞制剂的细胞表达 IL-6。

38. 权利要求 1 的竞争性抗体或其抗原结合部分在制备用于诱导、增强或延长个体对抗原的免疫应答的药物中的应用。

39. 权利要求 38 的应用,其中抗原为:

(a) 肿瘤抗原,或

(b) 病原体抗原。

40. 权利要求 39 的应用,其中抗原来自病原体,所述病原体为病毒,细菌,真菌或寄生虫。

41. 权利要求 40 的应用,其中抗原为 HIV。

42. 权利要求 39 的应用,其中抗原为肿瘤抗原。

43. 权利要求 38-42 任一项的应用,其中抗原与竞争性抗体或其抗原结合部分一起用于所述药物中。

44. 权利要求 38,39 和 42 任一项的应用,其中化疗剂与竞争性抗体或其抗原结合部分

一起用于所述药物中。

45. 权利要求 44 的应用,其中化疗剂与竞争性抗体或其抗原结合部分一起用于所述药物中。

46. 权利要求 42 的应用,其中肿瘤抗原为前列腺癌抗原。

47. 权利要求 42 的应用,其中肿瘤抗原为黑色素瘤抗原。

48. 权利要求 42 的应用,其中肿瘤抗原为上皮癌抗原。

49. 权利要求 1 的抗体,其中所述竞争性抗体或其抗原结合部分抑制人 CTLA-4 与 B7-1 或与 B7-2 的结合。

50. 权利要求 49 的抗体,其中当竞争性抗体或其抗原结合部分的浓度为至少 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,竞争性抗体或其抗原结合部分使人 CTLA-4 与 B7-1 的结合降低至少 50%。

51. 权利要求 49 的抗体,其中当竞争性抗体或其抗原结合部分的浓度为至少 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,竞争性抗体或其抗原结合部分使人 CTLA-4 与 B7-2 的结合降低至少 50%。

人 CTLA-4 抗体及其应用

[0001] 本申请是 2000 年 8 月 24 日提交的申请号为 00812037.4(PCT/US00/23356), 发明名称为“人 CTLA-4 抗体及其应用”申请的分案申请。

[0002] 相关申请引用

[0003] 本申请要求美国临时专利申请序列号 60/150.452 的权利, 该临时专利内容以其全文在此引用。

发明领域

[0004] 本发明一般涉及分子免疫学和人类疾病的治疗。本发明尤其涉及新型抗人 CTLA-4 的人序列抗体以及应用这些抗体治疗人类疾病、感染的方法。

[0005] 发明背景

[0006] 脊椎动物免疫系统需要多种信号才能获得最佳的免疫活化, 参见, 例如 Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 54:1-14(1989); Paul William E 主编, Raven Press, N. Y., Fundamental Immunology, 4th edition(1998), 特别是第 12 和 13 章, 411-478 页。T 淋巴细胞(T 细胞) 和抗原呈递细胞(APC) 间的相互作用对免疫应答是必需的。许多在 T 细胞和 APC 上发现的内聚分子的水平在免疫应答过程中增加(Springer 等, A. Rev. Immunol. 5:223-252(1987); Shaw 和 Shimizu, Current Opinion in Immunology, Kindt 和 Long 主编, 1:92-97(1988); Hemler, Immunology Today 9:109-113(1988))。这些分子水平的增加可帮助解释为什么活化的 APC 比休眠的 APC 在刺激抗原特异的 T 细胞增殖更有效(Kaiuchi 等, J. Immunol. 131:109-114(1983); Kreiger 等, J. Immunol. 135:2937-2945(1985); McKenzie, J. Immunol. 141:2907-2911(1988); 和 Hawrylowicz 和 Unanue, J. Immunol. 141:4083-4088(1988))。

[0007] T 细胞免疫应答是一个复杂过程, 它包含细胞-细胞的相互作用(Springer 等, A. Rev. Immunol. 5:223-252(1987)), 尤其是 T 细胞和佐细胞如 APC 间的相互作用, 以及可溶性免疫介质(细胞因子或淋巴因子) 的产生(Dinarello(1987), New Engl. Jour. Med 317:940-945; Sallusto (1997), J. Exp. Med. 179:1109-1118)。这种应答受到几种 T 细胞表面受体的调节, 包括 T-细胞受体复合体(Weiss(1986), Ann. Rev. Immunol. 4:593-619) 和其他“附属”表面分子(Allison(1994), Curr. Opin. Immunol. 6:414-419; Springer(1987), 同上)。许多附属分子是自然产生的细胞表面分化(CD) 抗原, 这些 CD 抗原由细胞表面的单克隆抗体的反应性所定义(McMichael 主编, Leukocyte Typing III, Oxford Univ. Press, Oxford, N. Y. (1987))。

[0008] 早期研究暗示 B 淋巴细胞活化需要两种信号(Bretscher(1970), Science 169:1042-1049), 现在认为所有淋巴细胞的最佳活化都需要两种信号, 一种是抗原特异或克隆信号以及第二种抗原非特异信号(Janeway, 同上)。Freeman (Freeman(1989), J. Immunol. 143:2714-2722) 分离出了编码 B 细胞活化抗原的 cDNA 克隆并进行了测序, 该活化抗原被 MA b B7 识别(Freeman(1987), J. Immunol. 138:3260)。用这种 cDNA 转染的 COS 细胞已显示被两种标记的 MA b B7 和 MA b BB-1 染色(Clark(1986), Human

Immunol. 16:100-113; Yokochi (1981), J. Immunol. 128:823; Freeman 等 (1989), 同上; Freeman 等 (1987), 同上)。此外, 这种抗原的表达已在其他谱系的细胞上发现, 如单核细胞 (Freeman 等, 同上)。

[0009] T 辅助细胞 (Th) 抗原应答需要由 APC 提供的信号。第一个信号由 T 细胞受体复合体 (Weiss, J. Clin. Invest. 86:1015 (1990)) 与抗原的相互作用启动, 该抗原在 APC 上 II 型主要组织相容性复合体 (MHC) 分子的情况下呈现 (Allen, Immunol. Today 8:270 (1987))。这种抗原特异的信号不够产生完全反应, 并且在缺少第二种信号时实际可导致克隆失活或无细胞免疫反应性 (Schwartz, Science 248:1349 (1990))。在许多实验系统中都已经要求 MHC 提供第二种共刺激信号 (Schwartz, 同上; Weaver 和 Unanue, Immunol. Today 11:49 (1990))。尽管在有些情况下清楚可溶性分子如白介素 (IL) -1 (Weaver 和 Unanue, 同上) 和参与细胞间粘连的膜受体 (Springer, Nature 346:425 (1990)) 都能提供共刺激信号, 但这个第二种信号的分子本性并未完全了解。

[0010] CD28 抗原为一种免疫球蛋白超家族中同型二聚体糖蛋白 (Aruffo 和 Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:8573-8577 (1987)), 是一种在大多数成熟 T 细胞中发现的附属分子 (Damle 等, J. Immunol. 131:2296-2300 (1983))。现时证据暗示这种分子在可选择的 T 细胞活化途径中的功能与由 T 细胞受体复合体启动的分子功能有明显区别 (June 等, Mol. Cell. Biol. 7:4472-4481 (1987))。与 CD28 抗原相反应的单克隆抗体 (MAb) 能增加由各种多克隆刺激物启动的 T 细胞应答 (由 June 等, 同上综述)。MAb 诱导产生细胞因子 (Thompson 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:1333-1337 (1989); 和 Lindsten 等, Science 244:339-343 (1989)) 可造成这些刺激作用, 原因是增加了 mRNA 的稳定性 (Lindsten 等 (1989), 同上)。抗 CD28 MAb 也能具有抑制作用, 即它们能阻断自身的混合淋巴细胞反应 (Damle 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 78:5096-6001 (1981)) 和抗原特异 T 细胞克隆的活化 (Lesslauer 等, Eur. J. Immunol. 16:1289-1296 (1986))。

[0011] 一些研究表明 CD28 是 B 细胞活化抗原 B7/BB-1 的反受体 (Linsley 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5031-5035 (1990))。B7/BB-1 抗原下简称“B7 抗原”。B7 配体也是免疫球蛋白的超家族的成员, 但与 CD28 对照, B7 配体在细胞外区域有两个 Ig 结构域, N 端可变区 (V) - 样结构域后跟着恒定区 (C) - 样结构域。

[0012] 将非特异共刺激信号传递给 T 细胞至少需要两个在 APC 上发现的同源性 B7 家族成员, 即 B7-1 (又称 B7, B7.1 或 CD80) 和 B7-2 (又称 B7.2 或 CD86), 这两种 B7 都能通过 CD28 将共刺激信传递给 T 细胞。通过 CD28 共刺激促进了 T 细胞活化。

[0013] 通过遗传融合 B7 抗原和 CD28 受体的胞外部分, 以及免疫球蛋白 (Ig) C. γ .1 (重链恒定区), 已表征了 CD28 和 B7 抗原间相互作用的特征 (Linsley 等, J. Exp. Med. 173:721-730 (1991))。固定化的 B7 Ig 融合蛋白以及 B7 阳性 CHO 细胞都已显示共刺激 T 细胞增殖。

[0014] 以 B7 阳性 CHO 细胞刺激 T 细胞也特异性地刺激了 IL-2 转录物水平的增加。另外的研究已表明抗 CD28 MAb 在某些 T 细胞白血病细胞系中能抑制通过与 B 细胞白血病系间的细胞相互作用诱导产生 IL-2 (Kohno 等, Cell. Immunol. 131:1-10 (1990))。

[0015] CD28 具有单一胞外可变区 (V) - 样结构域 (Aruffo 和 Seed, 同上)。同源分子 CTLA-4 已由鼠细胞溶解 T 细胞 cDNA 库示差筛选进行了鉴定 (Brunet (1987), Nature

328:267-270)。

[0016] CTLA-4 为一种 T 细胞表面分子,原先已由鼠细胞溶解 T 细胞 cDNA 库示差筛选进行了鉴定(Brunet(1987), Nature 328:267-270)。CTLA-4 也是免疫球蛋白(Ig)超家族的一员,含有单一胞外 Ig 结构域。CTLA-4 转录物已在带有细胞毒活性的 T 细胞种群中发现,这暗示 CTLA-4 在细胞溶解反应中可能发挥作用(Brunet 等,同上;Brunet 等, Immunol. Rev. 103:21-36(1988))。研究者已经报道了人类 CTLA-4 对应物的基因作图和克隆(Dariavach 等, Eur. J. Immunol. 18:1901-1905(1988)),如同 CD28 定位在相同的染色体区域(2q33-34)(Lafage-Pochitaloff 等, Immunogenetics 31:198-201(1990))。人 CTLA-4DNA 和编码 CD28 蛋白基因间的序列对比揭示了序列极其明显的同源性,并在近膜和胞质区域有最大程度的同源性(Brunet 等,1988,同上;Dariavach 等,1988,同上)。

[0017] 一些研究暗示 CTLA-4 具有二级共刺激物类似的功能(Linsley 等, J. Exp. Med. 176:1595-1604(1992);Wu 等, J. Exp. Med. 185:1327-1335(1997);Lindsley, P. 等, 美国专利号 5,977,318;5,968,510;5,885,796;和 5,885,579)。但是其他研究报道了 CTLA-4 是 T 细胞活化的衰减因子,具有反作用(Krummel(1995), J. Exp. Med. 182:459-465;Krummel 等, Int'l Immunol. 8:519-523(1996);Chambers 等, Immunity. 7:885-895(1997))。有报道 CTLA-4 缺失的小鼠遭受大量的淋巴增殖(Chambers 等,同上)。有报道封闭 CTLA-4 能增强体外和体内的 T 细胞应答(Walunas 等, Immunity. 1:405-413(1994);Kearney(1995), J. Immunol. 155:1032-1036),恶化抗肿瘤免疫(Leach(1996), Science. 271:1734-1736)以及提高诱导的自身免疫疾病(Luhder(1998), J. Exp. Med. 187:427-432)。还有报道 CTLA-4 对 T 细胞免疫应答的初始特性有选择性的或额外的影响(Chambers(1997), Curr. Opin. Immunol. 9:396-404;Bluestone(1997), J. Immunol. 158:1989-1993;Thompson(1997), Immunity 7:445-450)。这与观察到的现象一致,即一些自身免疫病人含有针对 CTLA-4 的自身抗体。这可能 CTLA-4 封闭抗体在这些病人中有致病作用(Matsui(1999), J. Immunol. 162:4328-4335)。

[0018] 非人类 CTLA-4 抗体已经应用在上述讨论的各种研究中。然而开发抗体在人体内治疗和诊断应用所面临的主要障碍之一是非人类免疫球蛋白内在的免疫原性。例如,当具有免疫能力的病人施用啮齿类动物单克隆抗体的治疗剂量时,病人则产生抗啮齿类动物免疫球蛋白序列的抗体,这些人类抗小鼠抗体(HAMA)中和了治疗抗体并能引发急性毒性。以前抗体的这些和其他缺陷由本发明提供的针对 CTLA-4 的人抗体所克服。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明提供了一种人序列抗体,其能特异性地结合到人 CTLA-4 上,以及提供了一种能特异性地结合到 CTLA-4 上的人序列抗体,该抗体基本没有非免疫球蛋白相关人类蛋白。

[0021] 在相关方面,本发明也提供了一种有疗效的人类序列抗体,其特异性地结合到人 CTLA-4 上。在一些实施方案中,治疗有效的人类序列抗体结合到位于正常人 T 细胞细胞表面的 CTLA-4 上。在其他实施方案中,由 CD 抗原 CD4、CD8、CD25 和 CD69 标记的 T 细胞亚种群在施用有疗效的人类序列抗体过程中和施用后都保持稳定。在其他实施方案中,有疗效的人类序列抗体在正常人 T 细胞的细胞表面上结合 CTLA-4。在其他实施方案中,人序列抗体在病人中耐受性良好。在相关实施方案中。

[0022] 还提供了多克隆抗体的组合物,其包含多个能特异性地结合到人 CTLA-4 的人类序列抗体。多克隆抗体组合物至少包括约 2、5、10、50、100、500 或 1000 个能特异性地结合到人 CTLA-4 的不同人类序列抗体。

[0023] 本发明还提供了能特异性地结合到人 CTLA-4 上的人类序列抗体,这些抗体阻断人 CTLA-4 与人 B7 的结合或不阻断人 CTLA-4 与人 B7 的结合。

[0024] 本发明还提供了结合到人 CTLA-4 上的人类序列抗体,其平衡缔合常数(K_a)至少为 $10^8 M^{-1}$ 。还提供了结合到人 CTLA-4 上的人类序列抗体,其平衡缔合常数(K_a)至少为 $10^9 M^{-1}$ 。

[0025] 本发明还提供了特异性地结合到人 CTLA-4 上的人类序列抗体,该抗体阻断了人 CTLA-4 与人 B7 的结合,至少阻断约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99% 或 100%。

[0026] 本发明还提供了特异性地结合到人 CTLA-4 上的人类序列抗体,该抗体含有 IgG 或 IgM 的抗体重链。IgG 抗体重链能是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。本发明还提供了人类序列抗体,其中抗体轻链是 κ 轻链。人类序列抗体能由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码,这些核酸含有如在 SEQ ID NO:2 至 SEQ ID NO:23 中分别阐述的重链和轻链可变区的核苷酸序列。

[0027] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码,这些核酸含有如在 SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:6 中分别阐述的重链和轻链可变区的核苷酸序列。

[0028] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码,这些核酸含有如在 SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:8 中分别阐述的重链和轻链可变区的核苷酸序列。

[0029] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码,这些核酸含有如在 SEQ ID NO:22 和 SEQ ID NO:12 中分别阐述的重链和轻链可变区的核苷酸序列。

[0030] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由重链和轻链可变区氨基酸序列编码,这些氨基酸序列分别在 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:7 中阐述。

[0031] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由重链和轻链可变区氨基酸序列编码,这些氨基酸序列分别在 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:9 中阐述。

[0032] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由重链和轻链可变区氨基酸序列编码,这些氨基酸序列分别在 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:13 中阐述。

[0033] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码,这些核酸分别含有来自 V 基因区段 VH 3-30.3 和 VK A-27 可变的重链和轻链序列。

[0034] 本发明还提供了人类序列抗体,其中人类序列抗体由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码,这些核酸分别含有来自 V 基因区段 VH 3-33 和 VK L-15 可变的重链和轻链序列。

[0035] 本发明的一些人类序列抗体包含重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列,分别是 SYTMH(SEQ ID NO:27),FISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID NO:32)和 TGWLGPFDY (SEQ ID NO:37),以及轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列,分别是 RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO:24),GAFSRAT (SEQ ID NO:29)和 QQYGSSPWT (SEQ ID NO:35)。

[0036] 本发明的一些人类序列抗体包含重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列,分别是 SYTMH(SEQ

ID NO:27), FISYDGSNKHYADSVKG (SEQ ID NO:33) 和 TGWLGPFYD (SEQ ID NO:37), 以及轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 RASQSVSSSFLA (SEQ ID NO:25), GASSRAT (SEQ ID NO:30) 和 QQYGSSPWT (SEQ ID NO:35)。

[0037] 本发明的一些人类序列抗体包含重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 SYGMH (SEQ ID NO:28), VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:34) 和 APNYIGAFDV (SEQ ID NO:38), 以及轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 RASQGISSWLA (SEQ ID NO:26), AASSLQS (SEQ ID NO:31) 和 QQYNSYPPT (SEQ ID NO:36)。

[0038] 本发明还提供了特异性地结合到人 CTLA-4 的人类序列抗体, 其中所述人类序列抗体由转基因的非人类动物生产。转基因非人类动物能是小鼠。

[0039] 本发明还提供了特异性地结合到人 CTLA-4 的人类序列抗体, 该抗体是 Fab 片段。

[0040] 本发明还提供了多价复合物, 其至少含有两种人类序列抗体, 每一种抗体特异性地结合到人 CTLA-4。两种不同抗体能相互共价连接或非共价连接。

[0041] 本发明提供了核酸, 其编码人类序列抗体重链。该核酸能包含如 SEQ ID NO:1 中所阐述的核苷酸序列。

[0042] 本发明提供了转基因非人类动物, 其具有的基因组包含人类序列重链转基因和人类序列轻链转基因, 该动物已用人 CTLA-4 或其片段或类似物免疫, 由此该动物表达针对人 CTLA-4 的人类序列抗体。转基因非人类动物能是转基因小鼠。转基因小鼠能包含 HCo7 或 HCo12。

[0043] 本发明提供了一个杂交瘤细胞系, 其包括从具有基因组的转基因非人类动物获得的 B 细胞, 该基因组含有人类序列重链转基因和人类轻链转基因, 其中该杂交瘤生产特异性结合到人 CTLA-4 的人类序列抗体。在一个相关的实施方案中, 杂交瘤分泌人类序列抗体, 该抗体特异性结合人 CTLA-4 或结合其片段, 其中抗体选自: 人类序列抗体, 其包含重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 SYTMH (SEQ ID NO:27), FISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:32) 和 TGWLGPFYD (SEQ ID NO:37), 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO:24), GAFSRAT (SEQ ID NO:29) 和 QQYGSSPWT (SEQ ID NO:35), 以及重链和轻链可变区氨基酸序列, 如分别在 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:7 中阐述; 人类序列抗体, 其包含重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 SYTMH (SEQ ID NO:27), FISYDGSNKHYADSVKG (SEQ ID NO:33) 和 TGWLGPFYD (SEQ ID NO:37), 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 RASQSVSSSFLA (SEQ ID NO:25), GASSRAT (SEQ ID NO:30) 和 QQYGSSPWT (SEQ ID NO:35), 以及重链和轻链可变区氨基酸序列, 如分别在 SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:9 中阐述; 或权利要求 1 的人类序列抗体, 其包含重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 SYGMH (SEQ ID NO:28), VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:34) 和 APNYIGAFDV (SEQ ID NO:38), 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, 分别是 RASQGISSWLA (SEQ ID NO:26), AASSLQS (SEQ ID NO:31) 和 QQYNSYPPT (SEQ ID NO:36), 以及重链和轻链可变区氨基酸序列, 如分别在 SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:13 中阐述。

[0044] 本发明提供含有人类序列抗体和可药用载体的药物组合物, 该抗体特异性地结合到人 CTLA-4。该药物组合物能进一步包含一种作用物, 其能有效诱导抗体的抗原的免疫应答。本发明还提供了化疗剂。此外还提供了针对免疫抑制分子的抗体。

[0045] 本发明提供了一种方法用于对病人抗原的诱导、增强或延长免疫应答, 包括给病人施用有效量的特异性结合到人 CTLA-4 的人类序列抗体, 其中抗体阻断人 CTLA-4 结合到

人 B7 上。抗原能是肿瘤抗原,或来自病原体。肿瘤抗原也能是端粒酶。病原体能是病毒、细菌、真菌或寄生虫。病原体还能是爱滋病病毒。该方法进一步包括给病人施用抗原或其片段或类似物,由此抗原与人类序列抗体组合诱导、增强或延长免疫应答。该抗原能是病人肿瘤抗原或淀粉状蛋白群系的一个组份,如病人患老年性痴呆以及其抗原为 AB 肽。该方法能进一步包括给病人施用细胞因子。

[0046] 本发明提供了在病人体内抑制免疫应答的方法,包括给病人施用有效量的多价制剂,该制剂至少含有两种相互连接针对人 CTLA-4 的人类序列抗体。本发明还提供了在病人体内抑制免疫应答的方法,包括给病人施用有效量的多克隆制剂,该制剂至少含有两种针对人 CTLA-4 的人类序列抗体。

[0047] 本发明进一步提供了分离的或重组的人类序列抗体和人单克隆抗体,这些抗体特异性结合到人 CTLA-4,以及提供了含有一种或一组这种抗体的组合物。本发明的一些人类序列抗体具有下列一些特征:高亲和性地结合到人 CTLA-4 上,和/或阻断人 CTLA-4 与其配体、人 B7-1 和 B7-2 分子的相互作用。相应地,本发明的人类序列抗体和人单克隆抗体能用作体内和体外的诊断和治疗剂。

[0048] 本发明的人类序列抗体能包括多种抗体同型或其混合物,如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE。通常它们包括 IgG1 (如 IgG1k) 和 IgM 同型。人类序列抗体能是全长(如 IgG1 或 IgG4 抗体)或仅包括抗原结合部分(如 Fab、F(ab)'2、Fv 或单一链 Fv 片段)。这些人类序列抗体是重组人类序列抗体。一些人类序列抗体由杂交瘤生产,该杂交瘤包括从转基因非人类动物如转基因小鼠中所获得的 B 细胞,其携带一个包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组。该杂交瘤的制备是将 B 细胞融合到一个无限增殖化细胞中。一些本发明的人类序列抗体由杂交瘤生产,这些杂交瘤指 4C8、4E10、4E10.5、5A8、5C4、5C4.1、3、5D7、5D7.1、5E10、5E10.12、5G1、5G1.4、6A10、6C9、6C9.6、6D9、6D9.7、6G4、7E4、7E4.4、7E6、7H8、8E8、8E8.4、8F8、8F8.19、8H1、9B9、9C1、9G5、105B、10B5.8、10B9、10B9.2、10D1、10D1.3、10E11、10E4、10E4.5、11B4、11D10、11E4、11E4.1、11E8、11F10、11F11、11F9、11G1、11G1.5、1C7、1H8.8、2A7、2A7.6、2E2、2E2.7、2E7、2E7.2、2G1、2G1.2、3C12、3E10、3E10.5、3E6、3E6.0、3F10、4A1、4B6 和 4B6.12。小数点后的尾标表示同种杂交瘤细胞系的不同克隆分离群。

[0049] 本发明的一些人类序列抗人 CTLA-4 抗体能够具有下列一个或多个特性:a) 对人 CTLA-4 的特异性(特异性地结合到人 CTLA-4 上);b) 对人 CTLA-4 结合亲和性,平衡缔合常数(K_a)至少为约 $10^7 M^{-1}$,或约 $10^9 M^{-1}$,或约 $10^{10} M^{-1}$ 到 $10^{11} M^{-1}$ 或更高;c) 动力学缔合常数(k_a)至少为约 10^3 ,约 10^4 或约 $10^5 m^{-1} s^{-1}$;和/或,d) 动力学解离常数(k_d)至少为约 10^3 ,约 10^4 ,或约 $10^5 m^{-1} s^{-1}$ 。

[0050] 在另一方面,本发明提供了核酸分子,其编码本发明的人类序列抗体或抗原结合部分。相应地,如通过培养这些宿主细胞制备本发明抗体的方法包括在本发明中一样,重组表达载体和用这些载体转染的宿主细胞也包括在本发明中,重组表达载体包括本发明编码抗体的核酸。

[0051] 仍然在另一方面,本发明从转基因非人类动物如转基因小鼠中提供了分离的 B 细胞,这些 B 细胞能表达特异性地结合到人 CTLA-4 上单克隆抗体的多种同型 Ig (如 IgG、IgA 和/或 IgM)。分离的 B 细胞能从转基因非人类动物如转基因小鼠中获得,该小鼠已用纯化

的或富集的人 CTLA-4 抗原(或其抗原片段)制剂和 / 或表达人 CTLA-4 的细胞免疫。转基因非人类动物如转基因小鼠携带一基因组,该基因组含有人重链转基因和人轻链转基因。分离的 B 细胞能无限增殖从而提供针对人 CTLA-4 的人类单克隆抗体源(如杂交瘤)。

[0052] 相应地,本发明还提供了杂交瘤,该杂交瘤能生产特异性结合到人 CTLA-4 上的人单克隆抗体。该杂交瘤包括从转基因非人类动物如转基因小鼠中所获得的 B 细胞,其携带一个包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组,该基因组融合到一个无限增殖化的细胞中。转基因非人类动物能用纯化的或富集的人 CTLA-4 抗原制剂和 / 或表达人 CTLA-4 的细胞免疫从而生成产抗体的杂交瘤。

[0053] 仍在另一方面,本发明提供了转基因非人类动物如转基因小鼠,其表达特异性地结合到人 CTLA-4 上的人单克隆抗体(本发明又称为“HuMAb- 小鼠TM”)。转基因非人类动物是转基因小鼠,其携带一个包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组。转基因非人类动物能用纯化的或富集的人 CTLA-4 抗原(或其抗原片段)制剂和 / 或表达人 CTLA-4 的细胞免疫。转基因非人类动物如转基因小鼠经 V-D-J 重组和同型转换能生产多种抗人 CTLA-4 人单克隆抗体的同型 Ig (如 IgG、IgA 和 / 或 IgM)。同型转换可如通过经典或非经典同型转换发生。

[0054] 在另一方面,本发明提供了用于人类序列抗体和人序列单克隆抗体的方法,这些抗体特异性地与人 CTLA-4 反应。本发明的一些方法包括用纯化的或富集的人 CTLA-4 抗原制剂和 / 或表达人 CTLA-4 的细胞免疫转基因非人类动物,如转基因小鼠,该动物携带一个包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组。然后能获得该动物的 B 细胞(如脾 B 细胞)并与骨髓瘤细胞融合,从而形成无限增殖化的杂交瘤细胞,该细胞分泌抗人 CTLA-4 的人单克隆抗体。

[0055] 本发明的抗人 CTLA-4 单克隆抗体或其抗原结合部分(如 Fab)能够衍生出或连接到另一个功能分子上,如另一个肽或蛋白(如 Fab' 片段)。例如,本发明的抗体或抗原结合部分功能性地连接到一个或多个其他分子实体上(如通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或其他连接方法)。例如,人序列抗 CTLA-4 抗体或其抗原结合部分能够结合到治疗组成成分上,如细胞毒性药物、酶活性毒素或其片段、放射性同位素或小分子抗癌药。本发明的抗体能结合到细胞毒性的药物上,如用细胞毒性剂进行了放射性标记,如 ¹³¹I (如, Shen(1997) 等, Cancer80(12Suppl):2553-2557), Cu-67 (如, Deshpande(1988) 等, J. Nucl. Med. 29:217-225) 或如结合到核糖体失活蛋白 gelonin 上(如, Boyle(1996) J. of Immunol. 18:221-230 等)。

[0056] 在另一方面,本发明提供了组合物如药物和诊断组合物,包括可药用载体和本发明至少一个人单克隆抗体或其抗原结合部分,这种抗体或抗原结合部分能特异性地结合到人 CTLA-4 上。一些组合物含有一组人类序列抗体或其抗原结合部分,每一种该抗体或抗原结合部分优选地结合到截然不同的表位上。组合物如药物组合物含有本发明一组至少一种人类序列抗体,或至少一种人单克隆抗体,或它们的抗原结合部分,以及本发明至少一个双特异性或多特异性分子也都包含在本发明的权利要求范围内。

[0057] 对体内方法,抗体或其抗原结合部分(或本发明的双特异性或多特异性分子)能够给被试病人施用,该病人患有 T 细胞相关疾病或患有通过增强或抑制或延长免疫应答可改善或预防的疾病。

[0058] 本发明的人序列单克隆抗体和人类序列抗体组合物能与其他已知的治疗组合施用,如抗癌治疗。相应地,本发明提供了用于治疗被试病人癌症的方法,包括给被试者一起施用治疗有效量的人类序列抗体的药物组合物和药用载体。这样一些方法包括疫苗。这样一些方法包括肿瘤细胞疫苗,GM-CSF 修饰的肿瘤细胞疫苗,或装载抗原的树突细胞疫苗。在这样一些方法中,癌症是前列腺癌、黑素瘤或上皮癌。

[0059] 针对人 CTLA-4 的人类序列抗体能用在需要刺激免疫应答或抑制的治疗方法中。前者适应症使用阻断人 CTLA-4 结合到人 B7 上的抗体进行治疗。采用刺激、增强或延长免疫应答可适合治疗的疾病包括癌症如前列腺癌、肾癌和结肠癌,致病感染;与自身抗原相关的疾病如产生淀粉状蛋白的疾病包括老年性痴呆病以及带有炎症和过敏成分的疾病。使用多价制剂获得免疫抑制,该制剂至少含有两个相互连接的针对人 CTLA-4 的不同抗体。适合治疗的疾病包括移植物对宿主排斥反应疾病、宿主对移植物排斥反应疾病、自身免疫病和炎症。

[0060] 仍在另一方面,本发明提供了体外或体内检测样品中是否存在人 CTLA-4 抗原的方法,如诊断人 CTLA-4 相关疾病。在一些方法中,与对照样品一起,将待测样品和本发明的人序列抗体或人单克隆抗体,或其抗原结合部分(或者双特异性或多特异性分子)相接触,在允许抗体和人 CTLA-4 间形成复合体的条件下,可获得诊断结果。随后在两样品中检测复合物的形成(如使用 ELISA 方法),在复合物形成方面样品间统计学上的明显差别是测试样品中是否存在人 CTLA-4 抗原的指征。

[0061] 参照说明书剩余部分、附图和权利要求可进一步理解本发明特点和优势。

[0062] 所有在此引用的出版物、附图、GenBank 登记参考(序列)、ATCC 保藏、专利和专利申请为全部目的据此特别引作参考,如同每一个是单个引用,程度相同。

[0063] 附图简述

[0064] 图 1 示意描述了一个 neo 弹夹靶向插入到 $\mu 1$ 外显子的 Sma I 位点。图 1A)为 μ 基因座基因组结构的示意图。填充框代表 μ 外显子;图 1B)为 CmD 靶向载体的示意图。点线表示包含在构建体中的基因组 μ 序列。质粒序列未显示;图 1C)为靶 μ 基因座的示意图,其中 neo 弹夹已插入到 $\mu 1$ 中。右下方框表示了靶向构建体和 μ 基因座间同源性重组的 RFLP 诊断。RFLP 使用探针 A 由 Southern 印迹杂交检测,915bp 的 Sac I 片段在图 1C 中表示。

[0065] 图 2 显示了实验结果,说明可溶性抗人 CTLA-4 人类序列抗体抑制了重组可溶性人 CTLA-4 结合到表达小鼠 B7.1 的细胞上,如下详述。

[0066] 图 3 显示了竞争性结合分析结果,这些分析用来鉴定本发明的人类序列抗体,这些抗体识别在人 CTLA-4 上的非重叠表位,如下详述。

[0067] 图 4 显示了抗 CTLA-4 抗体 10D1.3 的重链和轻链片段的一级核苷酸序列数据。

[0068] 图 5 显示了抗人 CTLA-4 抗体的轻链可变区(V_k)的核苷酸序列。衍生自 $V_k A-27$ 种系序列(SEQ ID NO:4)的抗 CTLA-4 抗体 10D1 (SEQ ID NO:6)和 4B6 (SEQ ID NO:8)描述在图上方。衍生自 $V_k L-15$ 种系序列(SEQ ID NO:10)的抗 CTLA-4 抗体 1E2(SEQ ID NO:12)显示在图下方。三个抗 CTLA-4 抗体的 V_k 序列与它们的种系所编码的 V_k 基因序列对比。互补决定残基(CDR)标记出来。破折号表示序列同一性。

[0069] 图 6 显示了抗人 CTLA-4 抗体的重链可变区(V_H)的核苷酸序列。衍生自 $V_H 3-30.3$

种系序列(SEQ ID NO:14)的抗 CTLA-4 抗体 10D1 (SEQ ID NO:16)和 4B6 (SEQ ID NO:18)描述在图上方。衍生自 V_H 3-33 种系序列(SEQ ID NO:20)的抗 CTLA-4 抗体 1E2 (SEQ ID NO:22)显示在图下方。三个抗 CTLA-4 抗体的 V_H 序列与它们的种系所编码的序列并列。互补决定残基(CDR)标记出来。破折号表示序列同一性。

[0070] 图 7 显示所预测的抗人 CTLA-4 抗体轻链可变区氨基酸序列,并且显示了预测的图 5 描述的抗人 CTLA-4 抗体的氨基酸 V_K 序列。衍生自 V_K A-27 种系序列(SEQ ID NO:5)的抗 CTLA-4 抗体 10D1 (SEQ ID NO:7)和 4B6 (SEQ ID NO:9)描述在图上方。衍生自 V_K L-15 种系序列(SEQ ID NO:11)的抗 CTLA-4 抗体 1E2 (SEQ ID NO:13)显示在图下方。

[0071] 图 8 显示所预测的抗人 CTLA-4 抗体重链可变区氨基酸序列,并且显示了预测的图 6 描述的抗 CTLA-4 抗体的氨基酸 V_H 序列。衍生自 V_H 3-30.3 种系序列(SEQ ID NO:15)的抗 CTLA-4 抗体 10D1 (SEQ ID NO:17)和 4B6 (SEQ ID NO:19)描述在图上方。衍生自 V_H 3-33 种系序列(SEQ ID NO:21)的抗 CTLA-4 抗体 1E2 (SEQ ID NO:23)显示在图下方。

[0072] 图 9 显示了采用 ELISA 分析 MAb 10D1 结合到重组人 CTLA-4 上的实验结果。MAb 10D1 以剂量依赖和饱和动力学方式结合到纯化的重组 CTLA-4 上。

[0073] 图 10 显示了将 10D1 结合到 CTLA-4 表达性 T 细胞系上。这些数据显示 MAb 10D1 以剂量依赖和饱和动力学方式结合到表达 CTLA-4 的细胞上。

[0074] 图 11 显示了抑制人 B7.2 Ig 结合到 CTLA-4 表达性 T 细胞上。这些数据显示与对照 MAb 相比,MAb 10D1 能有效阻断 B7.2 结合到 CTLA-4 上。

[0075] 图 12 显示了阻断 CTLA4-FITC 结合到鼠 B7.1 表达性细胞上的结果。这些数据显示与对照 MAb 相比,MAb 10D1 能有效阻断 CTLA-4 结合到 B7.1 上。

[0076] 图 13 显示抗 CTLA-4 人 MAb 的竞争性 ELISA,表明了表位组分类。

[0077] 图 14 显示了在 PHA 刺激的 T 细胞上的 CTLA-4 表达。在细胞表面活化的而不是休眠的 T 细胞表达 CTLA-4 水平低但可检测到。

[0078] 图 15 显示了 MAb 10D1 在活化 T 细胞的补体依赖裂解中的结果。未观察到 PHA 活化的 T 细胞的裂解。

[0079] 图 16 显示了 MAb 10D1 在活化 T 细胞的抗体依赖裂解中的结果。用 10D1 和单核细胞未观察到 PHA 活化的 T 细胞的裂解。

[0080] 图 17 显示了抗 10D1 IgM 和 IgG 在猕猴中的反应,该猴用 10D1 抗体注射过。未观察到明显的针对 10D1 的抗体反应。

[0081] 发明详述

[0082] 本发明提供了新型以抗体为基础的疗法用于治疗 and 诊断疾病,这些疾病的特征在于表达尤其过表达,或活化尤其过活化人 CTLA-4 和 / 或相关分子。本发明疗法采用人类序列抗体、人序列单克隆抗体或其抗原结合部分,这些抗体或抗原结合部分结合到表位上,该表位存在于人 CTLA-4。这些人序列抗 CTLA-4 抗体能够充当功能性的拮抗物(如抑制 CTLA-4 结合配体的能力或抑制活化细胞的能力,如通过抑制其传递信号到细胞上的能力)或兴奋剂(如刺激配体效应)。

[0083] 本发明的人类序列抗体能由非人类转基因动物如转基因小鼠生产,该动物经过 V-D-J 重组和同型转换能够生产多种针对人 CTLA-4 的同型 Ig (如 IgG、IgA 和 / 或 IgE)人抗体(如单克隆或多克隆)。相应地,本发明的各个方面包括抗体和抗体片段及其药物组合

物,以及非人类转基因动物,B细胞和杂交瘤,用于制备这些单克隆抗体。使用本发明抗体检测表达人 CTLA-4 的细胞或检测相关交叉反应的生长因子受体,或者使用抗体体外或体内抑制表达人 CTLA-4 细胞的生长、分化和 / 或运动,上述这些方法都包含在本发明中。

[0084] 除非提示,术语“病人”或“被试者”交换使用,并指哺乳动物如人类病人和非人类灵长类动物以及实验动物如兔子、大鼠和小鼠以及其他动物。

[0085] 术语“治疗”包括施用本发明的化合物或作用物从而预防或拖延疾病症状、并发症或生化指征的初起,缓解症状,或停滞或抑制疾病、状况或失调(如自身免疫病)的进一步发展。治疗可以是预防的(以防止或拖延疾病的发作,或预防临床现象或其亚临床症状的出现)或在表现疾病后治疗性抑制或缓解症状。

[0086] 一般而言,短语“良好耐受”指的是在健康状态下没有不利变化,这些变化作为治疗结果发生并影响治疗决定。

[0087] 术语“淋巴细胞”如本文所用,在本领域中有正常意思,指单核、非吞噬细胞白细胞的任一个,这些细胞在血液、淋巴和淋巴组织即 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞中发现。

[0088] 短语“T 淋巴细胞亚群”或“T 细胞亚组”指 T 淋巴细胞或 T 细胞,这些细胞具有表达特定细胞表面标记的特性(参见 Barclay, A. N. 等主编,1997, The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd edition, Academic Press, London, United Kingdom)。术语关于 T 细胞“稳定”指的是这样一种事实即 T 细胞亚组的出现频率或百分比不随施用作用物过程或延续时间而改变。

[0089] 术语“细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 -4”、“CTLA-4”、“CTLA4”、“CTLA-4 抗原”、“CD152”(参见如 Murata(1999) Am. J. Pathol. 155:453-460) 交换使用,并包括人 CTLA-4 的变体、同种型(isoform)和种同源物,以及至少含有一个 CTLA-4 表位的类似物(参见如 Balzano(1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:28-32)。

[0090] 人 CTLA-4 完整 cDNA 序列 Genbank 登记号 L15006。氨基酸 1-37 区域为前导肽;38-161 为胞外 V-样结构域;162-187 为跨膜结构域;和 188-223 为胞质结构域。核苷酸的变体已有报道,包括在 49 位从 G 到 A 的转换,在 272 位从 C 到 T 的转换,在 439 位从 A 到 G 的转换。小鼠 CTLA-4 的完整 DNA 序列 EMBL 登记号为 X05719 (Brunet 等 (1987), Nature 328:267-270)。氨基酸 1-35 区域为前导肽。

[0091] 人 B7-1 (CD80) 的完整 DNA 序列 Genbank 登记号为 X60958;对小鼠序列登记号为 X60958;对大鼠序列登记号为 U05593。人 B7-2 (CD86) 的完整 cDNA 序列 Genbank 登记号为 L25259;对小鼠序列登记号为 L25606。

[0092] 编码 CD28 的基因已被广泛表征。鸡 mRNA 序列 Genbank 登记号为 X67915。大鼠 mRNA 序列 Genbank 登记号为 X55288。人 mRNA 序列 Genbank 登记号为 J02988。小鼠 mRNA 序列 Genbank 登记号为 M34536。

[0093] 术语“表位”意思是能特异性结合到抗体上的蛋白决定基。表位通常由化学活性表面定群分子组成,如氨基酸或糖侧链,并通常含有特殊的三维结构特征和特殊的电荷特征。构象与非构象表位区别在于当存在变性溶剂时与前者而非后者的结合发生丢失。

[0094] 完整“抗体”至少包括由二硫键相内联的两个重链(H)两个轻链(L)。每个重链包括一个重链可变区(本发明缩写为 HCVR 或 VH)和一个重链恒定区。重链恒定区包括 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域。每个轻链包括轻链可变区(本发明缩写为 LCVR 或 VL)和一个轻链

恒定区。轻链恒定区包括 CL 一个结构域。VH 和 VL 区能进一步细分成高变异度区,术语称为互补决定区(CDR),并用更保守区域点缀,术语称为构架区(FR)。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成,并按下列顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括各种免疫系统细胞(如效应细胞)和经典补体系统中的第一组份(C1q)。术语“抗体”包括完整抗体的抗原结合部分,这些部分保留有结合 CTLA-4 的能力。结合实例包括(i) Fab 片段,为单价片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成;(ii) F(ab')₂ 片段,为二价片段,由两个在铰链区通过二硫桥相连的 Fab 片段组成;(iii) Fd 片段,由 VH 和 CH1 结构域组成;(iv) Fv 片段,由单一抗体臂的 VL 和 VH 结构域组成;(v) dAb 片段(Ward 等(1989), Nature 341:544-546),由 VH 结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。进一步,尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由单独基因编码,这两个结构域能通过一合成接头使用重组方法连接,该接头能使它们制成单一蛋白链,其中 VL 和 VH 区域配对形成单价分子(已知为单链 Fv (scFv);参见如 Bird 等(1988), Science 242:423-426;和 Huston 等(1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。参考术语“抗体”包括这种单个链抗体。片段制备采用重组技术或完整抗体的酶法或化学法裂解。

[0095] 双特异性抗体有两个不同的结合专一性,参见如美国专利 5,922,845 和 5,837,243;Zeilder(1999) J. Immunol. 163:1246-1252;Somasundaram(1999) Hum. Antibodies 9:47-54;Keler(1997) Cancer Res. 57:4008-4014。例如,本发明提供了双特异性抗体,该抗体具有细胞表面抗原如人 CTLA-4 的一个结合位点,以及第二个结合位点即效应细胞表面上 Fc 受体的结合位点。本发明还提供了至少含有三个结合位点的多特异性抗体。术语“双特异性抗体”进一步包括 diabodies。diabodies 是二价双特异性抗体,其中 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达,但使用接头,接头太短不允许相同链上的两个结构域配对,由此逼迫结构域与另一个链的互补结构域配对从而产生两个抗原结合位点(参见如 Holliger, P. 等(1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448;Poljak, R. J. 等(1994), Structure 2:1121-1123)。

[0096] 术语“人类序列抗体”包括含有衍生自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在)的抗体。本发明的人类序列抗体可包括不被人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如通过体外随机诱变或位点特异性诱变诱导或通过体内体细胞突变诱导的突变)。然而,本发明所用的术语“人类序列抗体”意在不欲包括这样的抗体,其中衍生自另一个哺乳动物种如小鼠的种系的 CDR 序列已被移植到人类构架序列上(即,人源化抗体)。

[0097] 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组合物的抗体分子制剂。单克隆抗体组合物展示了对特定表位的单一结合特异性和亲和性。相应地,术语“人单克隆抗体”是指展示单一结合特异性的抗体,这些抗体含有衍生自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在)。在一实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤生产,该杂交瘤包括了从转基因动物如转基因小鼠中获得的 B 细胞,该动物携带一个基因组,其包括了人重链转基因和轻链转基因,融合到无限增殖化细胞中。

[0098] 术语“双克隆抗体”是指至少两种针对人 CTLA-4 抗体的制剂。典型地,指不同抗体结合不同表位。

[0099] 术语“寡克隆(oligoclonal)抗体”是指针对人 CTLA-4 3-100 种不同抗体的制剂。

典型地,指在这种制剂中的抗体结合到一系列不同的表位上。

[0100] 术语“多克隆抗体”是指一种以上(两种或更多种)针对人 CTLA-4 的不同抗体。这种制剂包括结合到一系列不同表位上的制剂。

[0101] 本发明提供了针对人 CTLA-4 的人类序列抗体,这些抗体阻断或对抗由人 CTLA-4 受体转导的信号。为了抑制 CTLA-4 与人 B7 反受体的相互作用,这一些抗体能结合到人 CTLA-4 上的表位。因为人 CTLA-4 与人 B7 的相互作用转导了一种信号,该信号引导了携带人 CTLA-4 受体的 T 细胞的失活,所以拮抗相互作用有效诱导、增强或延长了携有人 CTLA-4 受体 T 细胞的活化,并由此延长或增强了免疫应答。“封闭抗体”指一种能降低可溶性人 CTLA-4 与细胞所表达的人 B7 配体结合的抗体,在一些条件下降低至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99% 或 99.9%,这些条件是抗体结合位点与人 CTLA-4 配体结合位点的比率大于 1:1,并且抗体浓度大于 10^{-8} M。

[0102] 其他抗体制剂有时亦称为多价制剂,以在相同细胞上交联多种人 CTLA-4 受体的方式结合到人 CTLA-4 上。受体的交联对人 CTLA-4 结合到人 B7 上具有相同或相近作用。因此,受体的交联有效地对抗人 CTLA-4 反应,导致免疫抑制。

[0103] 交联通过组合可溶性二价抗体也能实现,该二价抗体具有不同表位的专一性。这些多克隆抗体制剂至少包括两对重链和轻链,其与人 CTLA-4 上的不同表位相结合,因此免疫抑制信号能作为人 CTLA-4 交联的结果转导。

[0104] 术语“重组人抗体”包括本发明所有人序列抗体,这些抗体的制备、表达、创造或分离采用重组方法,如抗体分离自动物(如小鼠),其对人免疫球蛋白基因是转基因的(下列节 1 进一步描述);下列抗体:抗体表达使用重组表达载体转染进宿主细胞,抗体分离自重组的组合人抗体文库,或抗体制备、表达、创造或分离采用任何其他方法,其包含人免疫球蛋白基因序列与其他 DNA 序列的剪接。这些重组人抗体具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(如果存在)。然而这些抗体能置于体外诱变(或当使用对人 Ig 序列转基因的动物时,体内体细胞诱变),因此重组抗体的 VH 和 VL 区域的氨基酸序列当衍生自或涉及人种系 VH 和 VL 序列时,不可在人抗体种系所有组成成分内体内自然存在。

[0105] “异源抗体”定义涉及产该种抗体的转基因非人类生物。该术语指一种抗体,具有氨基酸序列或编码的核酸序列,此序列对应于在生物中发现的序列,该生物不是转基因非人类动物组成,并且一般不来自转基因非人类的动物种。

[0106] “异杂交抗体”是指含有不同生物起源的重链和轻链的抗体。例如,含有人重链与鼠轻链相连的抗体即是一个异杂交抗体。异杂交抗体的例子还包括如上讨论的嵌合和人源化抗体。

[0107] 术语“基本纯”或“分离的”意指一个目的物种(如本发明的抗体)已从其自然环境的组份中鉴定、分离和/或回收以至于该目的物种是存在的超优势种(即在组合物中以摩尔为基础该种比其他任何个体种更丰富);“基本纯”或“分离的”组合物还意味着在所存在的所有大分子物种中目的物种包含了至少约 50%(以摩尔为基础)。基本纯或分离的组合物在所有存在于组合物中的大分子物种中也能含有超过约 80-90 (wt.)%。分离的目的物种(如本发明的抗体)还能纯化到具有本质均一性(污染物种采用常规检测方法在组合物中不能检测到),其中,组合物基本由单一大分子物种的衍生物组成。分离的针对人 CTLA-4 抗体能够基本无其他抗体,这些其他抗体缺乏与人 CTLA-4 结合的能力,并且能够结合到不同的

抗原上。然而能特异性与人 CTLA-4 结合的表位、同种型或变体相结合的分离的抗体具有和其他相关抗原的交叉反应性,如相关抗原来自其他物种(如 CTLA-4 物种同系物)。此外,本发明的分离抗体基本上无其他细胞物质(如非免疫球蛋白相关蛋白)和 / 或化学制剂。

[0108] “特异性结合”指抗体结合到一个预定抗原上。短语“特异性地(或选择性地)结合”到抗体上指结合反应,通过其确定在蛋白和其他生物制品的异源种群中是否存在该种蛋白。通常抗体结合的缔合常数(K_a)至少约 $1 \times 10^6 M^{-1}$ 或 $10^7 M^{-1}$, 或约 $10^8 M^{-1}$ 到 $10^9 M^{-1}$, 或约 $10^{10} M^{-1}$ 到 $10^{11} M^{-1}$ 或更高,并且抗体结合到预定抗原的亲和力比结合到非特异性抗原(如 BSA, 酪蛋白)的亲和力至少高 2 倍,所述非特异性抗原不是预定抗原或密切相关抗原。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本发明中与术语“特异性与抗原结合的抗体”交换使用。

[0109] 当指称肽时,短语“特异性地结合”或“结合特异性地”意指一个肽分子,其含有中等或高度的与靶分子的结合亲和力,这种结合是唯一或绝对占优的。短语“特异性地结合到”指结合反应,通过其确定在蛋白和其他生物制品的异源种群中是否存在靶蛋白。因此,在指定分析条件下,指定的结合组成成分优先地结合到一个特定靶蛋白上,并不以显著量结合到存在于测试样品中的其他组份上。在这种条件下与靶蛋白的特异性结合可能需要结合组成成分,该成分是根据对特定靶抗原的特异性来选择的。各种分析形式可用于选择配体,这些配体特异性地与特定蛋白反应。例如,固相 ELISA 免疫分析、免疫沉淀、Biacore 和 Western 印迹用于鉴定与 CTLA-4 特异性反应的肽。通常特异性或选择性的反应将是背景信号或噪音的至少 2 倍,更通常地是背景的 10 倍以上。

[0110] 术语 IgG 抗体的“高亲和性”指平衡缔合常数(K_a)至少约 $10^7 M^{-1}$, 至少 $10^8 M^{-1}$, 至少约 $10^9 M^{-1}$, 至少约 $10^{10} M^{-1}$, 至少约 $10^{11} M^{-1}$ 或至少 $10^{12} M^{-1}$ 或更高,如最高达 $10^{13} M^{-1}$ 或 $10^{14} M^{-1}$ 或更高。然而“高亲和性”结合能依据其他抗体同型 Ig 而发生变化。

[0111] 术语“ K_a ”,如本发明所使用,意欲指特定抗体抗原相互作用的平衡缔合常数。此常数单位为 $1/M$ 。

[0112] 术语“ K_d ”,如本发明所使用,意欲指特定抗体抗原相互作用的平衡解离常数。此常数单位为 M 。

[0113] 术语“ k_a ”,如本发明所使用,意欲指特定抗体抗原相互作用的动力学缔合常数。此常数单位为 $1/Ms$ 。

[0114] 术语“ k_d ”,如本发明所使用,意欲指特定抗体抗原相互作用的动力学解离常数。此常数单位为 $1/s$ 。

[0115] “特定抗体抗原相互作用”是指实验条件,在该条件下测定平衡常数和动力学常数。

[0116] “同型 Ig”指抗体类型(如 IgM 或 IgG1),其由重链恒定区基因编码。

[0117] “同型 Ig 转换”指一种现象,即抗体类型或同型 Ig 从一种 Ig 类型转变为一种其他 Ig 类型。

[0118] “非转换同型 Ig”指同型 Ig 类型重链,当同型 Ig 转化不发生则产生这种重链;编码非转化同型 Ig 的 CH 基因通常是位于功能性重排的 VDJ 基因的紧下游的第一个 CH 基因。同型 Ig 转换已分类成经典或非经典同型 Ig 转换。通过重组事件发生经典同型 Ig 转换,该事件在转基因中至少涉及一种转换序列区域。通过如人 σ_μ 和人 Σ_μ (δ 相关缺失)

间同源重组可发生非经典同型 Ig 转换。在机理中,可选择的非经典转换机理如转基因间和/或染色体间重组,可发生并实现同型转换。

[0119] “转换序列”指那些负责转换重组的 DNA 序列。“转换供体”序列,通常是一个 μ 转换区,为在转换重组过程中待缺失的构建区域的 5' 端(即上游)。“转换受体”区介于待缺失构建区和替代恒定区(如 γ , ϵ 等)之间。因为没有总发生重组的特异性位点,最终基因序列通常不可从构建体预测。

[0120] “糖基化模式”定义为碳水化合物单元模式,这些模式单元共价连接到蛋白上,更具体地,连接到免疫球蛋白上。异源抗体的糖基化模式与自然发生在抗体上的糖基化模式比较具有基本相似特征,此抗体由非人类转基因动物产生,一个本领域的普通专业技术人员将认识到与衍生出转基因的 CH 基因的物种中的糖基化模式比较,异源抗体的糖基化模式更相似于非人类转基因动物物种中所述糖基化模式。

[0121] 术语“自然发生”如使用到物体上,指这样一种事实即自然界中能发现的物体。例如生物(包括病毒)中存在的多肽或多核苷酸序列,其能从自然界源中分离出来,且未经实验室人为修饰,其即为自然发生的。

[0122] 术语“重排”指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构象,其中 V 区段在构象中紧临 D-J 或 J 区段,实际分别编码完整 VH 或 VL 结构域。重排的免疫球蛋白基因座能与种系 DNA 比较进行鉴定,重排基因座至少具有一个重组的七聚体/九聚体同源元件。

[0123] 术语“未重排”或“种系构象”关于 V 区段是指构象,其中 V 区段未发生重组以使得紧临 D 或 J 区段。

[0124] 术语“核酸”意包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸能是单链或双链。

[0125] 术语“分离的核酸”,关于编码与 CTLA-4 结合的抗体或抗体部分(如 VH、VL 和 CDR3)的核酸,意指一种核酸,其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码如下抗体或抗体部分的其他核苷酸序列,该抗体或抗体部分与除 CTLA-4 以外的抗原结合,而其他序列可自然分布在人基因组 DNA 核苷酸的侧翼。SEQ ID Nos :4-23 包括核苷酸序列和氨基酸序列,该序列含有本发明 10D1、4B6 和 1E2 人抗 CTLA-4 单克隆抗体的重链(VH)和轻链(VL)的可变区。

[0126] 术语“基本相同”,在两个核酸或多肽的情况下,当进行最大相符性序列对比排列时,指两个或更多序列或亚序列,其至少具有约 80%、约 90%、约 95% 或更高核苷酸或氨基酸残基同一性,如使用下列序列比较方法和/或通过肉眼检查所测定。例如,本发明提供了含如下序列的核酸,所述序列与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 基本相同。这种“基本相同”序列通常认为是同源性的。“基本同一性”存在于至少约 50 个残基的序列区域上,也存在于至少约 100 个残基的区域上,或存在于至少约 150 个残基的区域上,或存在于待比较的两个序列的全长度上。如下所描述,任何两个抗体序列通过使用在 Kabat 中的编号制只能以一种方式排列。因此,对抗体而言,百分同一性具有唯一且定义明确的含义。

[0127] 来自免疫球蛋白成熟重链和轻链可变区的氨基酸分别指定为 Hx 和 Lx, X 为一个数,其根据 Kabat 编码制标明氨基酸位置, Kabat 编码制为免疫目的蛋白序列(NIH, Bethesda, MD, 1987 和 1991)。Kabat 列举了每个亚组抗体的许多氨基酸序列,以及列举了对那种亚组中每个残基位置最经常出现的氨基酸以便生成共有序列。Kabat 使用了一种方法用于给所列举序列中的每个氨基酸分派残基号码,这种给残基分派号码的方法已经成为

本领域标准。Kabat 编码制可适用其他抗体,但这些抗体不包括在他的纲要中,参照保守氨基酸将该抗体与 Kabat 的一种共有序列一起排列对比。使用 Kabat 编码系统很容易鉴定不同抗体相等位置上的氨基酸。例如,人抗体 L50 位置上的氨基酸占住小鼠抗体氨基酸位置 L50 的对等位置上。同样地,当依据 Kabat 编号惯例排列由各自氨基酸编码的氨基酸序列时,排列编码抗体链的核酸。

[0128] 短语“选择性地(或特异性地)杂交到”指当序列存在于复合体混合物中(如,总细胞或文库 DNA 或 RNA)时,一个分子在严格杂交条件下与特定核苷酸序列结合、形成双链体(duplex)或杂交,其中特定核苷酸序列至少在约 10 倍背景时检测到。在一个实施方案中,通过其在严格条件下与已确定在本发明的范围内的核酸(如本发明所描述的作例证的序列)杂交的能力,能决定核酸在本发明的范围内(如与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 基本相同)。

[0129] 短语“严格杂交条件”指在本条件下探针将与其靶序列杂交,靶序列通常在核酸复合体的混合物中,但探针不与其他具有显著量的序列杂交(正信号(如本发明核酸的鉴定)为约 10 倍背景杂交)。严格条件是序列依赖的,并在不同环境中各不相同。较长序列特定地在更高温度下杂交。应用广泛的核酸杂交指南有如 Sambrook 主编, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel 主编, John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen 主编, Elsevier, N. Y. (1993)。

[0130] 严格条件一般选为在限定的离子强度和 pH 下,比特异性序列的热熔点(T_m)低约 5-10°C。 T_m 是平衡时与靶基因互补的探针有 50% 杂交到靶序列上的温度(在限定离子强度、pH 和核酸浓度)(当靶序列过量时,在 T_m , 平衡点有 50% 的探针)。严格条件通过将是盐浓度小于约 1.0M 钠离子,通常为约 0.01 到 1.0M 钠离子浓度(或其他盐), pH 7.0-8.3 和温度对短探针(如 10-50 核苷酸)至少约 30°C 以及对长探针至少约 60°C (如大于 50 个核苷酸)。严格条件加入去稳定剂如在 Sambrook (下文引用)中所描述的甲酰胺也可获得。对高度严格性杂交,阳性信号至少是 2 倍的背景,优选为 10 倍背景杂交。作例证的高度严格性或严格杂交条件包括: 50% 甲酰胺, 5×SSC 和 1%SDS 温育在 42°C 或 5×SSC 和 1%SDS 温育在 65°C, 并在 0.2×SSC 和 0.1%SDS 温育在 65°C 下洗涤。对选择性或特异性杂交,阳性信号(如本发明核酸鉴定)为约 10 倍的背景杂交。严格杂交条件用于在本发明范围内鉴定核酸,包括如在含有 50% 甲酰胺, 5×SSC 和 1%SDS 的缓冲液中 42°C 杂交,或在含有 50% 甲酰胺, 5×SSC 和 1%SDS 的缓冲液中 65°C 杂交,两者皆用 0.2×SSC 和 0.1%SDS 在 65°C 下洗涤。在本发明中,含有本发明核酸的基因组 DNA 或 cDNA 在严格条件下使用标准 Southern 印迹和本文公开的核酸序列进行鉴定。其他用于这种杂交(用来在本发明内鉴定核酸)的严格条件包括那些在 40% 甲酰胺, 1M NaCl 和 1%SDS 的缓冲液在 42°C 杂交。

[0131] 然而,杂交形式的选择不是关键性的,是洗涤条件的严格性规定了决定一个核酸是否在本发明范围内的条件。用于在本发明范围内鉴定核酸的洗涤条件包括如盐浓度约 0.02M、pH 为 7 和温度至少约 50°C 或约 55°C 到约 60°C; 或盐浓度约 0.15M NaCl 72°C 约 15 分钟; 或盐浓度约 0.2×SSC、温度至少约 50°C 或约 55°C 到约 60°C 约 15 到约 20 分钟; 或

杂交复合体用溶液洗 2 次,溶液是盐浓度约 $2\times\text{SSC}$,含有 0.1%SDS,室温 15 分钟,然后用含有 0.1%SDS 的 $0.1\times\text{SSC}$ 68°C 15 分钟洗涤两次;或同等条件。参见 Sambrook、Tijssen 和 Ausubel 描述 SSC 缓冲液和同等条件。

[0132] 本发明核酸存在于整个细胞和细胞裂解液中,或以部分纯化或基本纯化形式。当采用标准技术包括碱/SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶、电泳和其他本领域已知的方法,与其他细胞组份或其他污染物如其他细胞核酸或蛋白分离纯化出来时,核酸是“分离的”或“基本纯的”。参见 Sambrook、Tijssen 和 Ausubel。实施本发明所用的本发明核酸序列和其他核酸,不管是 RNA、cDNA、基因组 DNA 或其杂化物可从多种来源分离出来,如用遗传学方法改造的、基因扩增的和/或重组表达的。能够使用任何重组表达系统,除细菌以外,还包括如酵母、昆虫或哺乳动物系统。可选择地,这些核酸能在体外化学合成。核酸操作技术如亚克隆到表达载体,标记探针,测序和杂交都在科学和专利文献中很好描述,参见如 Sambrook、Tijssen 和 Ausubel。核酸分析和定量可采用任一种本领域专业技术人员所熟知的一般办法。这些办法包括生化分析方法如 NMR、分光光度法、放射显影法、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC),薄层层析法(TLC)和超扩散层析法,各种免疫方法如流体或凝胶沉淀反应、免疫扩散(单或双向)、免疫电泳、放射免疫分析(RIA)、酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫荧光分析、Southern 分析、Northern 分析、斑点印迹分析、凝胶电泳(如 SDS-PAGE)、RT-PCR、定量 PCR、其他核酸或靶或信号扩增法、放射标记、闪烁计数和亲和层析。

[0133] 本发明的核酸组合物,经常在天然序列(除了修饰的限制性位点等)中,来自 cDNA、基因组或混合物,可根据标准技术突变产生基因序列。对编码序列而言,这些突变可影响所需的氨基酸序列。尤其是可期望制备 DNA 序列,其与天然 V、D、J、恒定区、转换序列和其他这种在此描述的序列基本同源或衍生自上述这些序列(这里“衍生的”表示一个序列与另一个序列相同或从另一个序列修饰而来)。

[0134] 当使一个核酸与另一个核酸序列存在功能性关系时,则该核酸就是“可操作连接”。例如,如果一个启动子或增强子影响了一个编码序列转录,它就可操作连接到该序列中。关于转录调节序列,可操作连接表示连接的 DNA 序列是相邻的,在有必要连接蛋白编码区域时是相邻的且位于阅读框架中。对转换序列而言,可操作连接表示序列能够影响转换重组。

[0135] 术语“载体”意指核酸分子,其能转移它已连接的核酸分子。一种载体类型是“质粒”,其指环状双链 DNA 环,其他 DNA 区段可连接进去。另一类载体是病毒载体,其中其他 DNA 区段可连接到病毒基因组内。某些载体能在引入了这些载体的宿主细胞中自我复制(如具有细菌的复制起始点的细菌载体以及游离型哺乳动物载体)。其他载体(如非游离型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中后能够整合到宿主细胞的基因组中,因此随宿主基因组复制。此外,某些载体能够指导表达它们操作地连接的基因。一些载体本发明称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。总的来说,重组 DNA 技术所使用的表达载体经常是质粒形式。本说明书的“质粒”和“载体”交换使用,因为质粒是载体最普遍使用的形式。但是,本发明意包括这种表达载体的其他形式,如病毒载体(如复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒),其充当同等作用。

[0136] 术语“重组宿主细胞”(或简称“宿主细胞”)是指重组表达载体已转入的细胞。应

理解为这种术语不仅意指特定的被试细胞也意指这种细胞的子代。由于突变或环境影响,某些修饰可出现在以后代中,这种子代实际上与亲本细胞可不同,但仍包括在本发明所用术语“宿主细胞”的范围内。

[0137] 术语“小基因座转基因”指一种转基因,与自然出现的种系 Ig 基因座比较,其含有部分基因组免疫球蛋白基因座,该基因座至少携带非必需 DNA 部分的一种内(即不是在该部分的端点)缺失(如干扰序列;内含子或其部分)。

[0138] “标记”是一种组合物,可由光谱学、光化学、生化、免疫化学或化学方法检测。例如,有用的标记包括 ^{32}P 、荧光染料、电子致密试剂、酶(如通常在 ELISA 中使用)、生物素、地高辛配基,或半抗原和蛋白,针对其的抗血清或单克隆抗体是可得的(如本发明多肽能制成可检测的,如将放射标记掺入肽中,然后用作检测特异性与肽反应的抗体)。

[0139] 术语“分选”,就本发明所用细胞而言,既指细胞物理分选,使用如荧光活化细胞分选仪能实现,又指基于细胞表面标记物表达分析细胞,如在没有分选时 FACS 分析。

[0140] 短语“免疫细胞应答”指免疫系统细胞对外来刺激物或内在刺激物(如抗原、细胞因子、趋化因子和其他细胞)的反应,在免疫细胞中发生生化变化,从而导致免疫细胞迁移、靶细胞杀伤、吞噬作用、产生抗体、其他免疫应答可溶性效应物等等。

[0141] 术语“T 淋巴细胞应答”和“T 淋巴细胞活性”在此交换使用,指依赖于 T 淋巴细胞免疫应答的组份(即 T 淋巴细胞增殖和/或分化成辅助细胞、细胞毒性杀伤细胞、或抑制 T 淋巴细胞,由辅助 T 淋巴细胞将信号提供给 B 淋巴细胞导致或预防:抗体生产,由细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤特殊靶细胞,和可溶性因子的释放如调节其他免疫细胞功能的细胞因子)。

[0142] 术语“免疫应答”指淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和可溶性大分子的协同作用,这些可溶性大分子由上述细胞或肝脏产生(包括抗体、细胞因子和补体),并导致选择性的对人体的伤害、破坏或消除侵入了该人体的病原体、已感染了病原体的细胞或组织、癌细胞,或在自身免疫或病理炎症的情况下,对正常人细胞或组织的伤害、破坏,或消除。

[0143] 免疫应答组份可在体外用各种方法检测出来,这些方法对本领域的普通专业技术人员已熟知。如,(1)细胞毒性 T 淋巴细胞能用放射活性标记的靶细胞温育,然后这些靶细胞的溶解由放射活性的释放检测,(2)辅助 T 淋巴细胞能与抗原和抗原呈递细胞温育,细胞因子的合成和分泌由标准方法测定(Windhagen A 等,1995, Immunity 2(4):373-80), (3)抗原呈递细胞能与整个蛋白抗原温育,该抗原在 MHC 上的展示由 T 淋巴细胞活化分析或生物物理方法测定(Harding 等,1989, Proc. Natl. Acad. Sci., 86:4230-4234), (4)肥大细胞能与交联它们的 $\text{Fc}-\epsilon$ 受体的试剂温育,组胺的释放由酶免疫分析测定(Siraganian 等,1983, TIPS 4:432-437)。

[0144] 相似地,在模型生物(如小鼠)或病人中的免疫应答产物能采用多种方法检测,这些方法都为本领域普通专业技术人员所熟知。例如,(1)对种痘应答产生的抗体采用当前在临床实验室中的标准方法很容易进行检测,如 ELISA;(2)免疫细胞迁移到炎症位点的检测方法包括皮肤表面划痕,并将无菌容器放置到划痕位点上捕获迁移细胞(Peters 等,1988, Blood 72:1310-5);(3)在促细胞分裂剂或混合淋巴细胞反应的应答中,外周血单核细胞的增殖能用 ^3H -胸腺嘧啶核苷测定;(4)PBMC 中的粒细胞、巨噬细胞和其他吞噬细胞的吞噬能力能够通过将 PMBC 与标记颗粒一起放到孔中进行测定(Peters 等,1988);(5)免疫

系统细胞分化的检测是用 CD 分子如 CD4 和 CD8 的抗体将 PBMC 标记,并测定能表达这些标记的 PBMC 组份。

[0145] 如本发明所用,短语“信号转导途径”或“信号转导事件”指至少一个生化反应,但更普遍是一系列生化反应,这些反应产生于细胞与刺激化合物或作用物的相互作用。因此,刺激化合物与细胞的相互作用产生“信号”,其通过信号转导途径传递,最终导致细胞应答,例如,如上所述的免疫应答。

[0146] 信号转导途径是指各种信号转导分子间的生化关系,这些分子在信号从细胞的一部分传递到细胞的另一部分中发挥作用。本发明的信号转导分子包括例如,本发明的 MA b 147.1。如本发明所用,短语“细胞表面受体”包括分子和分子的复合物,能够接受信号并传递此种信号跨越细胞质膜。本发明“细胞表面受体”的一个实例是 T 细胞受体(TCR)或 CTLA-4 B7 配体。

[0147] 细胞中的信号转导途径能由细胞和刺激物的相互作用启动,刺激物在细胞内或在细胞外。如果外在(即在细胞外)刺激物(如抗原呈递细胞上的 MHC- 抗原复合体)与细胞表面受体(如 T 细胞受体)相互作用,信号转导途径能够传递信号跨越该细胞的细胞膜,通过细胞的胞质,并在一些情况下到达细胞核。如果内在(即在细胞内)刺激物与胞内信号转导分子相互作用,信号转导途径能够导致传递信号通过细胞的胞质,并在一些情况下到达细胞核。

[0148] 通过下列途径能够产生信号转导,如分子的磷酸化;非共价变构的相互作用;分子的复合;分子构象的变化;钙释放;磷酸肌醇的产生;蛋白水解切割;环核苷酸的产生以及二酰甘油酯的产生。通常信号转导通过信号转导分子的磷酸化作用产生。

[0149] 术语“非特异性 T 细胞活化”指不依赖抗原特异性的对 T 细胞的刺激。

[0150] 针对 CTLA-4 人抗体的生产

[0151] 本发明的单克隆抗体(mAb)和人类序列抗体的生产能使用多种方法,包括常规单克隆抗体方法学如标准体细胞杂交技术, Kohler 和 Milstein, Nature 256:495(1975)。生产单克隆抗体的任何技术能采用如 B 淋巴细胞的病毒或致癌转化。制备杂交瘤的一种动物系统是鼠系统。小鼠生产杂交瘤是普遍确认的方法。用于融合的免疫脾细胞分离的免疫方案和技术在本领域中已知。融合参与者(如鼠骨髓瘤细胞)和融合步骤也已知(参见如 Harlow 和 Lane(1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York)。

[0152] 抗人 CTLA-4 的人单克隆抗体和人类序列抗体能使用转基因小鼠生产,该小鼠携带人免疫系统而非小鼠系统。这些转基因小鼠,本发明也称为“HuMAb- 小鼠TM”,含有人免疫球蛋白基因小基因座,其编码未重排的人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列,带有靶向突变,这些突变使内源性的 μ 和 γ 链基因座失活(Lonberg, N. 等(1994), Nature 368(6474):856-859 和美国专利 5,770,429)。相应地,小鼠表现出小鼠 IgM 或 κ 的表达下降,并在对免疫作用的应答中,引入的人重链和轻链转基因经历类型转换和体细胞突变从而产生高亲和性的人 IgG κ 单克隆抗体(Lonberg, N. 等(1994), 同上;综述为 Lonberg, N. (1994), Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995), Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93, Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995), Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546)。制备转基因小鼠方法详细描述在下列部分 II

和参考文献中:Taylor, L. 等 (1992), *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295;Chen, J. 等 (1993), *International Immunology* 5:647-656;Tuailon 等 (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724;Choi 等 (1993), *Nature Genetics* 4:117-123;Chen, J. 等 (1993), *EMBO J.* 12:821-830;Tuailon 等 (1994), *J. Immunol.* 152:2912-2920;Lonberg 等 (1994), *Nature* 368(6474):856-859;Lonberg, N. (1994), *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101;Taylor, L. 等 (1994), *International Immunology* 6:579-591;Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995), *Intern. Rev. Immunol. Vol.* 13:65-93;Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546;Fishwild, D. 等 (1996), *Nature Biotechnology* 14:845-851。进一步参见, Lonberg 和 Kay 和 GenPharm International 美国专利号 5, 625, 126 和 5, 770, 429;Surani 等, 美国专利号 5, 545, 807;国际公开号 WO 98/24884, 公开日 1998 年 6 月 11 日;WO 94/25585, 公开日 1994 年 11 月 10 日;WO 93/1227, 公开日 1993 年 6 月 24 日;WO 92/22645, 公开日 1992 年 12 月 23 日;WO 92/03918, 公开日 1992 年 3 月 19 日。可选择地, 如下列实施例 1 和 2 所描述的, CMD 和 Hco12 转基因能用于生产人抗 CTLA-4 抗体。

[0153] 详细过程用于充分生产针对 CTLA-4 的人单克隆抗体描述在下列实施例中。采用各种抗原积累的经验已经显示当用完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内初始免疫, 随后每隔一周用不完全佐剂中的抗原腹膜内免疫(最多达总数 6)时, 转基因小鼠产生应答。然而, 除弗氏佐剂外的佐剂也发现是有效的。此外, 在缺乏佐剂的完整细胞发现具有高度的免疫原性。免疫应答能用眼眶取血获得血浆样品在免疫流程过程中监控。血浆能用 ELISA 筛选(如下描述), 并且有足够效价的抗 CTLA-4 人免疫球蛋白的小鼠能用作融合。小鼠在处死和去除脾脏前 3 天用抗原静脉加强免疫。可预期每种免疫需要完成 2-3 个融合。每个抗原通常免疫 6-24 只小鼠。经常使用 Hco7 和 Hco12 株。此外, Hco7 和 Hco12 两个转基因能一起培养到单一小鼠中, 该小鼠具有两个不同人重链转基因。

[0154] 为了纯化人抗 CTLA-4 抗体, 所选择的杂交瘤在 2L 摇瓶生长用于纯化单克隆抗体。上清液过滤并浓缩后进行蛋白 A-琼脂糖亲和层析(Pharmacia, Piscataway, NJ)。洗脱的 IgG 用凝胶电泳和高效液相层析检查以确保纯度。缓冲溶液换成 PBS, 在 OD280 用 1.43 消光系数测定其浓度。单克隆抗体分成等份并储存于 -80°C。

[0155] 为测定所选择的人抗 CTLA-4 单克隆抗体是否结合到唯一表位上, 每个抗体使用商品化提供的试剂(Pierce, Rockford, IL)生物素酰化。如上所述采用 CTLA-4 包被的 ELISA 板, 并采用未标记的单克隆抗体和生物素酰化的单克隆抗体进行竞争研究。生物素酰化 MAB 的结合用链霉素-抗生物素蛋白-碱性磷酸酶探针检测。

[0156] 为测定纯化抗体的同型性 Ig, 进行同型 ELISA。微量滴定板用 1 μ g/ml 抗人 IgG 包被 4°C 过夜。1%BSA 封闭后, 板与 1 μ g/ml 或更少的单克隆抗体或纯化的同型性对照反应, 室温下反应 1-2 小时。然后板孔与人 IgG1 或人 IgM 特异的碱性磷酸酶-结合的探针反应。板如上所述进行显影和分析。

[0157] 为显示单克隆抗体与表达 CTLA-4 的活细胞结合, 使用了流式细胞分析。简而言之, 表达 CTLA-4 的细胞系(生长在标准生长条件)与 PBS 中多种浓度的单克隆抗体混合, 37°C 温育 1 小时, PBS 含有 0.1%BSA 和 10%胎牛血清。洗涤后, 细胞在如一级抗体染色的同样条件下与荧光素标记的抗人 IgG 抗体反应。样品分析采用 FACScan 仪使用光和边散射

(side scatter) 性质对单一细胞进行门控。除流式细胞仪分析外,附加或替代性的分析方法可使用荧光显微术。细胞染色正如上所述,并由荧光显微术检查。该方法允许单个细胞的显色,但依赖抗原密度的灵敏度已经降低。

[0158] 抗 CTLA-4 人 IgG 采用 Western 印迹能进一步测试与 CTLA-4 抗原的反应性。简而言之,来自表达 CTLA-4 细胞的细胞抽提物得以制备和置于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,分离的抗原转移到硝酸纤维素膜,用 10% 胎牛血清封闭,用待测的单克隆抗体作探针检测。人 IgG 的结合能使用抗人 IgG 碱性磷酸酶检测并用 BCIP/NBT 底物片剂显色(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)。

[0159] 产生人单克隆抗 CTLA-4 抗体的转基因非人类动物的生产

[0160] 本发明也提供了转基因非人类动物如转基因小鼠,其能表达特异性地结合到 CTLA-4 的人单克隆抗体。还提供了高亲和性人类序列抗体。一些转基因非人类动物如转基因小鼠携带一个基因组,该基因组含有人重链转基因和轻链转基因。一些转基因非人类动物用纯化的或富集的 CTLA-4 抗原制剂或表达 CTLA-4 的细胞免疫。一些转基因非人类动物经历 V-D-J 重组和同型 Ig 转换能够生产针对 CTLA-4 人单克隆抗体的多种同型 Ig(如 IgG、IgA 和 / 或 IgE)。同型转换可如经典或非经典同型转换出现。

[0161] 用异源抗体库设计应答外抗原刺激的转基因非人类动物,这要求含在转基因动物内的异源免疫球蛋白转基因贯穿 B 细胞发育途径正确发挥功用。一些小鼠中异源重链转基因的正确功用包括同型转换。相应地,本发明的转基因被构建使得产生同型转换以及一个或多个下列过程:(1)高水平 and 细胞型特异性表达,(2)功能基因重排,(3)等位排斥的活化和反应,(4)表达足够初级库,(5)信号转导,(6)体细胞超突变,和(7)免疫反应过程中转基因抗体基因座的显性化。

[0162] 非所有上述标准都需要满足。例如,在转基因动物中,其中这些动物的内源性免疫球蛋白基因座功能性地破裂,转基因不需要活化等位排斥。进一步在转基因动物中,其中转基因包含功能性地重排重链和 / 或轻链免疫球蛋白基因,至少对那种已经重排的转基因,功能性基因重排的第二个标准不是必需的。对于分子免疫学的背景,参见如 Fundamental Immunology, 4th edition(1998), Paul, William E., ed. Lippencott-Raven Press, N. Y.。

[0163] 一些转基因非人类动物用于生成本发明的人单克隆抗体,含有在转基因动物种系中重排、未重排或重排和未重排异源免疫球蛋白重链和轻链转基因的组合。每一个重链转基因至少包含一个 CH 基因。此外,重链转基因含有功能性的同型 Ig 转换序列,这些序列在转基因动物中的 B 细胞中能支持异源转基因的同型转换,该转基因编码多种 CH 基因。这种转换序列能是那些在种系免疫球蛋白基因座中自然出现的,该基因座来自充当转基因 CH 基因源的物种,或这种转换序列能衍生自那些发生在必定接受转基因构建体的物种(转基因动物)中。例如,人转基因构建体用于生产转基因小鼠,可产生更高频率的同型转换事件,如果该转基因构建体掺入与那些在小鼠重链基因座中自然发生的序列相似的转换序列,因假设小鼠转换序列优化为用小鼠转换重组酶系统发挥作用,而人转换序列则不行。转换序列能采用常规克隆方法分离和克隆,或能从重叠合成寡核苷酸中从头开始合成,重叠的合成寡核苷酸以公开的免疫球蛋白转换区域序列的序列信息为基础进行设计(Mills 等, Nucl. Acids Res. 15:7305-7316(1991); Sideras 等, Intl. Immunol. 1:631-642(1989))。

[0164] 对于每一个上述转基因动物,功能性地重排的异源性的重链和轻链免疫球蛋白转

基因发现于转基因动物的 B 细胞的显著部分(至少 10%)。

[0165] 转基因用于生成本发明的转基因动物,包括含有 DNA 的重链转基因,该 DNA 编码至少一个可变的基因区段,一个多样性基因区段,一个连接基因区段和至少一个恒定区基因区段。免疫球蛋白轻链转基因含有 DNA,编码至少一个可变的基因区段,一个连接基因区段和至少一个恒定区基因区段。编码轻链和重链基因区段的基因区段,对于转基因非人类动物是异源性的,原因在于这些基因区段衍生自或对应于 DNA,这种 DNA 编码免疫球蛋白重链和轻链基因区段,该区段来自不是由转基因非人类动物的物种。在本发明的一个方面,转基因被构建使得单个基因区段是未重排的,即不重排使得编码功能性的免疫球蛋白轻链或重链。这种未重排的转基因支持 V、D 和 J 基因区段的重组(功能性重排)和当动物暴露给 CTLA-4 抗原时,优选地支持将作为结果而发生的重排免疫球蛋白重链的全部或部分 D 区域基因区段掺入到转基因非人类动物内。

[0166] 该种转基因通常含有 C、D 和 J 区段的实质部分以及 V 基因区段的亚组。在这种转基因构建体中,多种调节序列例如启动子、增强子、类型转换区域、用于 RNA 加工的剪接受体供体和剪接受体序列、重组信号等含有衍生自异源 DNA 的对应序列。这种调节序列可掺入到转基因中,该转基因来自本发明使用的相同物种或相关物种的非人类动物。例如人免疫球蛋白基因区段可在转基因中与啮齿动物免疫球蛋白增强子序列组合用于转基因小鼠。可选择地,合成的调节序列可掺入到转基因中,其中这种合成调节序列与功能性 DNA 序列不同源,该种功能性 DNA 序列已知在哺乳动物基因组中自然发生。合成的调节序列依据共有序列规则设计,例如那些具体说明了剪接受体位点或启动子/增强子基元的容许序列的规则。转基因可包含小基因座。

[0167] 一些转基因动物用于生成针对 CTLA-4 的人抗体,含有至少一个,通常 2-10 个,和有时 25-50 个或更多个拷贝的转基因,该基因描述在美国专利 5,770,429 实施例 37 中,或下列实施例 2 所描述的转基因(如 HCo12),至少一个拷贝的轻链转基因,该基因描述在美国专利 5,770,429 实施例 38 中,两个拷贝的 Cmu 缺失,该缺失描述在下列实施例 1 中,和两个拷贝的 J κ 缺失,该缺失描述在美国专利 5,770,429 实施例 9 中。作为结果而发生的动物被注射抗原并用于生产抗这些抗原的人单克隆抗体。

[0168] 一些转基因动物显示以显著量产生免疫球蛋白,理想地基本与天生小鼠生产的相似。因此例如动物,其中内源性 Ig 基因已经失活,总免疫球蛋白水平范围从约 0.1 到约 10mg/ml 血清。

[0169] 转基因小鼠表达的免疫球蛋白通常识别约一半或更多的高抗原性蛋白,如葡萄球菌蛋白 A。通常免疫球蛋白表明了预选抗原的缔合常数至少约 10^7M^{-1} , 10^8M^{-1} , 10^9M^{-1} , 10^{10}M^{-1} , 10^{11}M^{-1} , 10^{12}M^{-1} , 10^{13}M^{-1} , 或更多。

[0170] 本发明的转基因小鼠用纯化的或富集的人 CTLA-4 抗原(或其抗原片段)制剂和/或如前所述表达人 CTLA-4 的细胞免疫。小鼠生产 B 细胞,该 B 细胞通过转基因内转换重组(顺式转换)经历类型转换,并且表达与 CTLA-4 反应的免疫球蛋白。免疫球蛋白能是人类序列抗体,其中重链和轻链多肽由人转基因序列编码,这些转基因序列可包括源自体细胞突变和 V 区重组源联合的序列以及种系编码的序列;这些人序列免疫球蛋白能视作与多肽序列基本相同,该多肽序列由人 VL 或 VH 基因区段和人 JL 或 JH 区段编码,即使其他非种系序列作为体细胞突变和不同 V-J 和 V-D-J 重组联合的结果出现。关于这些人类序列抗体,每

个链的可变区通常至少 80% 是由人种系 V、J 和(在重链情况下)D 基因区段编码的;常常至少 85% 的可变区是由存在于转基因上的人种系序列编码;经常 90% 或 95% 或更多的可变区序列是由存在于转基因上的人种系序列编码。但是,非种系序列自从由体细胞突变和 VJ 和 VDJ 联合导入后,人类序列抗体常常有一些可变区序列(和较少有恒定区序列),这些序列不是由人 V、D 或 J 基因区段编码,如在小鼠种系人转基因中发现的一样。通常,这些非种系序列(或个别核苷酸位置)簇在 CDR 内或靠近 CDR,或在体细胞突变已知为簇的区域。

[0171] 人类序列抗体结合到预定抗原,能够从同型 Ig 转换产生,以此生产了人抗体,包含人序列 γ 链(如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 或 $\gamma 4$)和人序列轻链(如 κ 或 λ)。这种同型转换人类序列抗体经常含有一个或多个体细胞突变,通常在可变区和经常在约 10 个 CDR 残基上或之内,原因是亲合力成熟和用抗原选择 B 细胞,尤其是之前对二级(或随后)抗原的攻击。一些高亲和性人类序列抗体平衡缔合常数为至少约 $1 \times 10^7 M^{-1}$,或至少约 $1 \times 10^8 M^{-1}$,或大于约 $1 \times 10^9 M^{-1}$,或 $5 \times 10^9 M^{-1}$ 到 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 或更多。

[0172] 本发明的另一个方面有关来自一种小鼠的 B 细胞,该种小鼠能用于生成表达人单克隆抗体的杂交瘤,该抗体以高亲和性结合到 CTLA-4 上(如缔合常数大于 $10^7 M^{-1}$)。这些杂交瘤用于生成组合物,该组合物包含免疫球蛋白,其结合 CTLA-4 的缔合常数(K_a)至少为 $10^7 M^{-1}$ 。该种免疫球蛋白含有人序列轻链,由轻链可变区和轻链恒定区组成,轻链可变区的多肽序列与人 V κ 或 V λ 基因区段及人 J κ 或 J λ 区段编码的多肽序列基本相同,轻链恒定区的多肽序列与人 C κ 或 C λ 基因区段编码的多肽序列基本相同。它还包含了人序列重链,由重链可变区以及重链恒定区组成,重链可变区的多肽序列与人 VH 基因区段、任选择地 D 区域和人 JH 区段编码的多肽序列基本一致,重链恒定区的多肽序列与人 CH 基因区段编码的多肽序列基本一致。

[0173] 本发明还提供了针对人 CTLA-4 的人单克隆抗体和人类序列抗体,这些抗体衍生或连接到另一个功能性分子如另一个多肽或蛋白(如细胞因子、细胞毒性剂、免疫刺激或抑制剂、Fab' 片段等,如上论述)从而产生双特异性的或多特异性的分子,该分子结合到多种结合位点或靶表位上。例如,本发明的抗体或抗原结合部分能功能性地连接(如通过化学偶联、遗传学方法融合、非共价缔合或其他)到一个或多个其他结合分子上,如另一个抗体,抗体片段,肽或结合模拟物。

[0174] 相应地,本发明包括双特异性的和多特异性的组合物,含有至少一种人类序列抗体或抗原结合片段,并带有针对人 CTLA-4 的第一结合特异性和针对第二个靶表位的第二个结合特异性。第二个靶表位能是 Fc 受体,如人 Fc γ RI 或人 Fc γ 受体。因此,本发明包括双特异性和多特异性分子,能既结合到表达效应细胞的 Fc γ RI、Fc γ R 或 Fc ϵ R (如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN)),又结合到表达人 CTLA-4 的靶细胞上。这些多特异性(如双特异性或多特异性)分子将表达人 CTLA-4 的细胞靶向到效应细胞上,并引发 Fc 受体-介导的效应细胞活性,如人 CTLA-4 表达细胞的吞噬作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、细胞因子释放或产生超氧负离子。

[0175] 本发明双特异性和多特异性分子包括一个结合特异性,至少一个抗体,或其抗体片段,包括如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或单链 Fv。抗体也可以是轻链或重链二聚体,或二聚体的任何最小片段如 Fv 或单链构建体,如 Ladner 等在美国专利号 4,946,778 中所描述。本发明的双特异性和多特异性分子包括对 Fc γ R 或存在于效应细胞表面上的 Fc γ R 的结合

特异性,以及对靶细胞抗原如人 CTLA-4 的第二个结合特异性。

[0176] 对 Fc 受体的结合特异性由单克隆抗体提供,这种结合不被人免疫球蛋白 G (IgG) 所封闭。如本发明所用,术语“IgG 受体”针对位于染色体 1 中的 8 个 γ 链基因中的任一个。这些基因编码共 12 个跨膜或可溶性受体同种型,这些同种型分成 3 个 Fc γ 受体类型: Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16)。例如, Fc γ 受体能是人高亲和性的 Fc γ RI。人 Fc γ RI 是 72kD 的分子,对单体 IgG 表现了高亲和性(10^8 到 $10^9 M^{-1}$)。

[0177] 这些优选的单克隆抗体的生产和特征由 Fanger 等在 PCT 申请 W088/00052 和美国专利 4,954,617 中描述。这些抗体在一位点结合到 Fc γ RI、Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的表位上,该位点明显区别于受体的 Fc γ 的结合位点,因此它们的结合基本不受到 IgG 生理水平封闭。本发明中有用的特异性抗 Fc γ RI 抗体为 MAb22、MAb32、MAb44、MAb62 和 MAb197。生产 MAb32 的杂交瘤由 ATCC 提供,ATCC 保藏号 HB9469。MAb22 的抗 Fc γ RI MAb22 和 F(ab')₂ 片段能从 Medarex Inc. (Annandale, N. J.) 获得。在其他实施方案中,抗 Fc γ 受体的抗体为单克隆 22 的人源化形式(H22)。H22 抗体的生产和特征由 Graziano 在 J. Immunol 155:4996-5002 (1995)和 PCT/US93/10384 中描述。H22 抗体生产细胞系保藏在 ATCC,保藏日 1992 年 11 月 4 日,指定号 HA022CL1,保藏号 CRL11177。

[0178] Fc 受体的结合特异性也能由结合到人 IgA 受体的抗体提供,如 Fc- α 受体(Fc α R (CD89))。优选地,抗体在一位点结合到人 IgA 受体上,该位点不受内源性 IgA 的封闭。术语“IgA 受体”欲包括位于染色体 19 上一个 α 基因的基因产物(Fc α RI)。该基因已知编码几种 55 到 110kD 可选择地剪接的跨膜同种型。Fc α RI (CD89) 组成地表达在单核细胞/巨噬细胞,嗜酸性和嗜中性粒细胞,而非在非效应细胞种群。Fc α RI 对 IgA1 和 IgA2 具有中度亲和性($\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$),其随着暴露给细胞因子如 G-CSF 或 GM-CSF 而增加(Morton (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。四个 Fc α RI 特异性单克隆抗体鉴定为 A3、A59、A62 和 A77,在 IgA 配体结合结构域外结合 Fc α RI,已由如 Monteiro(1992) J. Immunol. 148:1764 描述。

[0179] 本发明的双特异性的和多特异性的分子能进一步包含结合特异性,该结合特异性识别如结合到靶细胞抗原如人 CTLA-4。结合特异性由本发明的人类序列抗体或人单克隆抗体提供。

[0180] 如本发明所用“效应细胞特异性抗体”指能结合效应细胞的 Fc 受体的抗体或功能性抗体。用于主题发明中的优选抗体在一位点结合效应细胞的 Fc 受体,该位点不结合内源性的免疫球蛋白。

[0181] 如本发明所用,术语“效应细胞”指一种免疫细胞,其参与免疫应答的效应阶段,如相对于免疫应答的识别和活化阶段。作例证的免疫细胞包括骨髓或淋巴起源的细胞,如淋巴细胞(如 B 细胞和 T 细胞包括细胞溶解性 T 细胞(CTL))、杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。效应细胞表达特定 Fc 受体并执行特定的免疫功能。效应细胞能诱导依赖抗体的细胞介导的细胞毒性(ADCC),如嗜中性粒细胞能诱导 ADCC。例如,单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞表达 Fc α R,参与靶细胞的特异性杀伤和呈递抗原到免疫系统的其他组分上,或结合到呈递抗原的细胞上。效应细胞也能吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。

[0182] 效应细胞上特定 FcR 的表达受到体液因子如细胞因子的调节。例如,已发现 Fc γ RI 的表达受到干扰素 γ (IFN- γ) 的正调节。该增强的表达通过携带 Fc γ RI 细胞增加了抗靶细胞细胞毒性活性(包括如吞噬作用)。

[0183] “靶细胞”意味被试者中任何不需要的细胞(如人或动物),能由组合物所靶向(如本发明的人序列抗体或人单克隆抗体,本发明的双特异性或多特异性分子)。靶细胞能是个表达或过表达人 CTLA-4 的细胞。表达人 CTLA-4 的细胞能包括肿瘤细胞如淋巴瘤。

[0184] 除了本发明的人类序列抗体和人单克隆抗体以外,其他抗体也能在本发明的双特异性或多特异性分子中使用,包括如鼠、嵌合和人源化的单克隆抗体。

[0185] 嵌合小鼠-人单克隆抗体(即嵌合抗体)能由本领域已知的重组 DNA 技术生产。例如,编码鼠(或其他物种)单克隆抗体分子的 Fc 恒定区域的基因用限制酶消化以去除编码鼠 Fc 的区域,并且用编码人 Fc 恒定区域的相当部分替代。(参见如 Robinson 等,国际专利公开 PCT/US86/02269;Akira 等,欧洲专利申请 184,187;Taniguchi,M., 欧洲专利申请 171,496;Morrison 等,欧洲专利申请 173,494;Neuberger 等,国际申请 WO 86/01533;Cabilly 等,美国专利 4,816,567;Cabilly 等,欧洲专利申请 125,023;Better(1988),Science 240:1041-1043;Liu(1987),PNAS 84:3419-3443;Liu(1987),J. Immunol. 139:3521-3526;Sun(1987),PNAS 84:214-218;Nishimura(1987)Canc. Res. 47:999-1005;Wood(1985),Nature 314:446-449;Shaw(1988),J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559)。

[0186] 嵌合抗体通过替代 Fv 可变区序列能进一步人源化,这些序列不直接参与抗原与来自人 Fv 可变区的相当序列结合。人源化嵌合抗体综述由 Morrison(1985)Science 229:1202-1207 和 Oi(1986)BioTechniques4:214 提供。这些方法包括分离、操作和表达核酸序列,所述核酸序列编码全部或部分来自至少其中一个重链或轻链的免疫球蛋白 Fv 可变区。该种核酸源为本领域专业技术人员所熟知和,例如可从 7E3 中获得,7E3 为抗 -GPII_bIII_a抗体生产杂交瘤。编码嵌合抗体或其片段的该种重组 DNA 然后能克隆到一个合适的表达载体中。适宜的人源化抗体选择性地能由 CDR 替代生产。参见美国专利 5,225,539;Jones(1986),Nature 321:552-525;Verhoeyan 等,1988 Science 239:1534;和 Beidler(1988),J. Immunol. 141:4053-4060。

[0187] 特定人抗体的所有 CDR 可用至少部分非人类 CDR 替代或只有一些 CDR 可用非人类 CDR 替代。只需要替换 CDR 数目,这对人源化抗体与 Fc 受体的结合是需要的。抗体能采用任何方法人源化,该方法用衍生自非人类抗体的 CDR 能代替人抗体的至少一部分 CDR。Winter 描述了一种方法,可用于制备本发明的人源化抗体,参见英国专利申请 GB2188638A,提交日 1987 年 3 月 16 日。人 CDR 可用非人类 CDR 代替,采用寡核苷酸定点诱变如在,如 WO 94/10332,题目为 Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes 所描述。

[0188] 特定氨基酸已被替代、缺失或添加的嵌合抗体和人源化抗体也在本发明的范围内。如,人源化抗体在框架区域中有氨基酸替代,以便于提高与抗原的结合。在一个含有小鼠 CDR 的人源化抗体中,位于人框架区域的氨基酸用位于小鼠抗体中对应位置的氨基酸替代。这些替代在一些情况下已知提高人源化抗体与抗原的结合。氨基酸已被添加、缺失或替代的抗体在本发明中指修饰的抗体或改变的抗体。

[0189] 除了抗-Fc 结合特异性和抗-人 CTLA-4 结合特异性以外,本发明的双特异性和多特异性分子能进一步包括第三种结合特异性。第三种结合特异性部分能是抗-增强因子(EF)部分,如与表面蛋白结合的分子,该表面蛋白参与细胞毒性活性,因而增加了抗靶细胞的免疫应答。“抗增强因子部分”能是抗体,功能性抗体片段或与给定分子如抗原或受体结合的配体,因此导致了结合决定基对 Fc 受体或靶细胞抗原效果的增强。“抗增强因子部分”能够结合 Fc 受体或靶细胞抗原。可选择性地,抗增强因子部分能与一个实体结合,该实体与第一和第二个结合特异性部分结合的实体相区别。例如,抗增强因子部分能通过如 CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1 或其他免疫细胞分子结合细胞毒性 T 细胞,这些分子参与增加抗靶细胞的免疫应答。

[0190] 本发明的双特异性和多特异性分子的制备能使用化学技术(参见如 Kranz (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807),“polydome”技术(参见如美国专利 4,474,893)或重组 DNA 技术。本发明的双特异性和多特异性分子的制备还能通过连接组分的结合特异性部分,如抗 FcR 和抗人 CTLA-4 结合特异性部分,使用本领域已知的方法和如本发明所描述的方法。例如,每一个双特异性和多特异性分子的结合特异性能够单独产生,然后相互连接。当结合的特异性部分是蛋白或肽时,各种偶联或交联剂能用于共价连接。交联剂的实例包括蛋白 A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),和磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基环乙烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(如参见 Karpovsky (1984), J. Exp. Med. 160:1686; Liu (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括那些由 Paulus 描述的方法(Behring Ins. Mitt. (1985), No. 78, 118-132; Brennan (1985), Science 229:81-83; Glennie (1987), J. Immunol. 139:2367-2375)。其他偶联剂是 SATA 和磺基-SMCC,两者皆由 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 提供。

[0191] 当结合特异性部分是抗体(如两个人源化抗体)时,它们通过两个重链的 C 端铰合区域的硫氢键连接。该铰合区域在连接前修饰成含有奇数的硫氢残基,如一个。

[0192] 可选择地,两个结合特异性部分能由同一个载体编码并在同样宿主细胞中表达和装配。本方法尤其有用,这里双特异性和多特异性分子是 MAb×MAb, MAb×Fab, Fab×F(ab')₂ 或配体×Fab 融合蛋白。本发明的双特异性和多特异性分子如双特异性分子能是单一链分子,如单一链双特异性抗体,单一链双特异性分子含有一个单链抗体和结合决定基,或单一链双特异性分子含有两个结合决定基。双特异性和多特异性分子还能是单链分子或可至少包含两个单链分子。双特异性和多特异性分子的制备方法,例如在美国专利 5,260,203; 美国专利 5,455,030; 美国专利 4,881,175; 美国专利 5,132,405; 美国专利 5,091,513; 美国专利 5,476,786; 美国专利 5,013,653; 美国专利 5,258,498; 和美国专利 5,482,858 所描述。

[0193] 双特异性和多特异性分子与它们特异性靶的结合能由酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射性免疫分析(RIA)或 Western 印迹分析确认。每种分析一般检测是否存在特定的目的蛋白-抗体的复合物,采用对目的复合物特异性的标记试剂(如抗体)。例如, FcR-抗体复合物的检测能采用如酶联抗体或抗体片段,该抗体识别和特异性结合到抗体-FcR 复合物上。可选择性地,复合物的检测能使用任意各种其他免疫分析。例如,抗体能放射性地标记和使用放射免疫分析(RIA)(参见如 Weintraub, B., Principles of

Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 在此引作参考)。放射性同位素检测能采用此种方法如 γ 计数器或闪烁计数器或放射自显影术。

[0194] 本发明还包括修饰抗体。术语“修饰抗体”包括抗体,如单克隆抗体,嵌合抗体和人源化抗体,这些抗体已由如缺失、添加或替代部分抗体而得以修饰。例如,抗体能由缺失恒定区和用一种意图增加半衰期如血清半衰期、抗体的稳定性或亲和性的恒定区替代它的而修饰。

[0195] 本发明的抗体偶联物能用于修饰给定的生物应答或创造生物应答(如募集效应细胞)。药物组成成分不能被认作限定于传统的化学治疗剂。例如,药物组成成分可是个拥有所需的生物活性的蛋白或多肽。该蛋白可包括例如,酶活性毒素或其活性片段,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白如肿瘤坏死因子或干扰素- α ;或生物应答修饰剂如淋巴因子,白介素-1 (“IL-1”)、白介素-2 (“IL-2”)、白介素-6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子 (“G-CSF”) 或其他生长因子。

[0196] 这种组成成分与抗体的偶联技术是熟知的,参见如 Arnon 等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, 于 Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 等 主编, 243-56 页 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等, “Antibodies For Drug Delivery”, 于 Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson 等 (主编), 623-53 页 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, 于 Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera 等 (主编), 475-506 页 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin 等 (主编), 303-16 页 (Academic Press 1985), and Thorpe 等, “The Preparatin And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

[0197] 药物组合物

[0198] 本发明提供了药物组合物, 包含一个或一组人单克隆抗体和 / 或人类序列抗体 (完整的或结合片段), 并按配方与可药用载体一起制成制剂。一些组合物包括一组本发明的多种 (如两个或更多个) 分离的人抗体和 / 或人类序列抗体或其抗原结合部分。在一些组合物中, 每一个组合物的抗体或其抗原结合部分是单克隆抗体或人类序列抗体, 该抗体与一个截然不同的预选的人 CTLA-4 表位结合。

[0199] A 有效量

[0200] 调节剂量方案以提供最佳所需的应答 (如治疗应答)。例如, 单一大丸剂可用于给药, 可随时间分开几种剂量用于给药, 或如由治疗情况危急程度所显示的, 可成比例的降低或增加剂量。特别优势的是按配方制成经肠胃外的组合物制剂, 为方便给药和剂量的均一性采用合适的剂量单位形式。本发明所用剂量单位形式指物理上分离的单位, 适用作待治被试者的单位剂量, 每个单位含有经计算的预定数量的活性化合物与要求的药物载体以便产生所需的治疗效果。本发明剂量单位形式的详情受到下列支配并直接依赖于下列 (a) 活

性化合物的独特特性和特定的有待获得的疗效,和(b)在这种活性化合物配药用于处理个体中敏感性的领域中所固有限制。

[0201] 可药用抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性的抗氧化剂如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、二硫酸钠、偏二硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂如抗坏血酸基化棕榈酸酯(ascorbyl palmitate)、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、酸丙酯、 α -生育酚等;(3)金属螯合剂如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0202] 不管选择的给药途径,可用在合适的水合物的形式中的本发明的化合物和/或本发明的药物组合物采用常规方法制成可药用的剂量形式,常规方法为本领域专业技术人员所知晓。

[0203] 本发明药物组合物中的活性组分的实际剂量水平能发生变化以致获得活性组分的量,该量对特定病人、组合物和给药方式获得所需的治疗应答是有效的。该种选择的剂量水平依赖于多种药物动力学因素,包括本发明所使用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、使用中的特定化合物的排泄速率、治疗时间长短、与使用的特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或物质、治疗中的病人的年龄、性别、体重、条件、身体总状况和以前的药物史等其他因素。

[0204] 大夫或兽医以低于要求获得所需的治疗效果的水平启动应用在药物组合物中的本发明的化合物剂量,并逐渐增加剂量直到达到所需的效果。一般本发明组合物每日的合适剂量是能产生疗效的最低剂量化合物的量。这种有效量一般依赖于如上所述的要素。优选的给药可是静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下,或在靠近靶位点处给药。如果需要,治疗组合物每日的有效剂量全天以合适间隔,以任意的单位剂量形式,分2次、3次、4次、5次、6次或更多次给药。当本发明的化合物单独给药是可能的时候,优选的以药物制剂(组合物)施用化合物。

[0205] 本发明组合物的有效量对本发明描述的免疫相关病症和疾病的治疗,会依赖许多不同因素而发生变化,包括给药方法、靶位点、病人的生理状态、患者是人还是动物、其他施用的药疗法和是否治疗是预防或是治疗。治疗剂量需要确定效价从而保证最安全和最有效。

[0206] 对于用抗体给药,剂量范围从约0.0001到100mg/kg,更经常0.01到5mg/kg宿主体重。例如剂量能是1mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg范围内。一个作例证的治疗方式需要给药每两周一次或每月一次或每3-6月一次。在一些方法中具有不同结合特异性的两个或多个单克隆抗体同时给药,在这种情况下,每个抗体给药的剂量归属在所显示的范围内。抗体通常以多种方式给药。单一剂量间时间间隔能是一周、一月或一年。根据病人对CTLA-4的血液抗体水平的测定所显示,间隔时间也能是不规则的。在一些方法中调整剂量以便血浆抗体浓度达到1-1000 μ g/ml以及在一些方法中达到25-300 μ g/ml。可选择的,抗体能作为持续的释放制剂给药,在这种情况下,需要降低给药频率。剂量和频率依赖于病人中抗体的半衰期而变化。一般人抗体表现最长的半衰期,随后是人源化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。给药的剂量和频率依赖于处理是否是预防还是治疗而变化。如预防应用,给药剂量相对低,给药间隔时间相对长。一些病人余生继续接受治疗。如治疗应用,有时要求给药剂量相对高,给药间隔时间相对短,直到病情的发展降低或终止,以及优选的直到病人表现出病症部分或完全改善。此后病人给药按照预防方案进行。

[0207] 编码免疫原的核酸剂量每个病人范围从约 10ng 到 1g, 100ng 到 100mg, 1 μ g 到 10mg, 或 30–300 μ g DNA。感染性病毒载体每个剂量从 10 个到 100 个或更多个病毒粒发生变化。

[0208] 一些本发明的人类序列抗体和人单克隆抗体能制成制剂以确保体内合适分布。例如, 血脑屏障(BBB) 排除了许多高度亲水性的化合物。为确保本发明的治疗化合物跨过 BBB (如果需要), 它们能制成制剂如脂质体。制备脂质体的方法, 参见如美国专利 4, 522, 811 ; 5, 374, 548 和 5, 399, 331。脂质体可包含一种或多种组成成分, 这些成分选择性地运输到特定细胞或器官中, 因此增强了靶药的传递(参见如 V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。作例证的靶向组成成分包括叶酸或生物素(参见如 LOW 等, 美国专利 5, 416, 016); 甘露糖苷(Umezawa 等 (1988), Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 抗体(P. G. Bloeman 等 (1995), FEBS Lett. 357:140 ; M. Owais 等 (1995), Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 表面活性剂蛋白 A 受体(Briscoe 等 (1995), Am. J. Physiol. 1233:134), 组成本发明制剂的不同物质以及发明的分子的成分 ; p120 (Schreier 等 (1994), J. Biol. Chem. 269:9090); 还参见 K. Keinänen ; M. L. Laukkanen (1994), FEBS Lett. 346:123 ; J. J. Killian ; I. J. Fidler (1994), Immunomethods 4:273。在一些方法中, 本发明的治疗化合物制成脂质体; 在一个更优选实施方案中, 脂质体包括寻靶组成成分。在一些方法中, 脂质体中的治疗化合物由浓注传递到靠近肿瘤或感染的位点。该组合物应是流体, 其程度应便于注射。它在制造和储存条件下应是稳定的, 并应抵御微生物如细菌和真菌污染。

[0209] 如应用在治疗上, 药物组合物给药于患确定的病的病人, 给药量足够阻止或抑制进一步进展, 或反转或消除疾病、其症状或生化标记物。如应用在预防上, 药物组合物给药于易感染疾病或存在疾病危险的病人, 给药量足够延迟、抑制或预防疾病、症状和生化标记物的发展。足能达到上述结果的量定义为“治疗有效量”或“预防有效量”。剂量依赖于治疗中的疾病, 被试者的大小, 被试者症状的严重程度, 特定组合物或选择的给药途径。具体而言, 在治疗肿瘤中, “治疗有效量”相对于未处理的被试者能够抑制肿瘤生长至少约 20%, 或至少约 40%, 或至少约 60%, 或至少约 80%。化合物抑制癌症的能力能在动物模型系统中评估, 该系统能预测治疗人类肿瘤的有效性。可选择地, 组合物的这种特点能由体外常规分析检查化合物抑制能力进行评估。治疗有效量的治疗化合物可减小肿瘤尺寸, 或改善被试者的症状。

[0210] 组合物应是无菌的且具有流动性, 其程度到组合物能用注射器递送。除水以外, 载体能是等渗的缓冲盐溶液、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等), 及其合适的混合物。维持合适的流动性, 例如通过使用包衣如卵磷脂, 在分散情况下通过维持要求的颗粒大小以及通过使用表面活性剂。在许多情况下组合物中优选地包括等渗剂如糖, 多元醇如甘露醇或山梨醇, 以及氯化钠。可注射组合物的长期吸收能由通过组合物中包括延迟吸收的作用物如一硬脂酸铝或明胶而带来。

[0211] 当活性化合物被适当保护时, 如上所述, 化合物可口服给药, 如用惰性稀释剂或可吸收的食用载体。

[0212] B 给药途径

[0213] 本发明的药物组合物也能以组合疗法给药即与其他作用物组合。例如, 在肿瘤治

疗中,组合疗法包括本发明的组合物和至少一种抗肿瘤剂或其他常规疗法如辐射处理。

[0214] 可药用载体包括溶剂、分散媒介、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸附延迟剂等生理上相容的物质。载体适用于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮给药(例如通过注射或输液)。依赖给药途径,活性化合物即抗体,双特异性和多特异性分子,被包裹在一个物质中以便保护化合物免遭酸作用以及其他使化合物失活的自然条件。

[0215] “可药用盐”是指这样的盐,其维持亲本化合物所需的生物活性,并不传递任何不需要的毒理效果(参见如 Berge, S. M. 等 (1977), J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这些盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些源自非毒性的无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的盐,以及那些源自非毒性有机酸如脂肪族的单羧酸和二羧酸,苯基替代的链烷酸,羟基链烷酸,芳香族酸,脂肪族和芳香族磺酸等的盐。碱加成盐包括那些衍生自碱性土金属如钠、钾、镁、钙等的盐,以及衍生自非毒性有机胺如 N, N' - 二苄基乙二胺, N- 甲基葡糖胺,氯代普鲁卡因,胆碱,二乙醇胺,乙二胺,普鲁卡因等的盐。

[0216] 本发明的组合物采用本领域已知的各种方法给药。给药途径和 / 或方式依赖所需要结果而变化。活性化合物与载体一起制备,载体保护化合物免遭快速释放,如制成控释制剂,包括移植片、透皮小块膜片和微囊包埋运输系统。可生物降解的、生物相容的多聚物能被使用,如乙烯乙酸乙烯酯,聚酐,聚甘醇酸(polyglycolic acid),胶原蛋白,聚原酸酯,和聚乳酸。许多用于制备这些制剂的方法由如在 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 主编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 中描述。药物组合物优选在 GMP 条件下生产。

[0217] 为采用某些给药途径施用本发明的化合物,必须用物质包被化合物,或与该物质共施用化合物以防止其失活。例如,化合物可以合适的载体如脂质体或稀释剂施用给被试者。可药用稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。脂质体包括水中油中水(water-in-oil-in-water) CGF 乳浊液以及常规脂质体(Strejan 等 (1984), J. Neuroimmunol. 7:27)。

[0218] 可药用载体包括无菌的水溶液或分散体和无菌粉末,用于临时准备无菌可注射的溶液或分散体。使用该种媒介和作用物用于药物活性物质为本领域已知。除非任何常规媒介或作用物与活性化合物不相容,其在本发明药物组合物中的应用是可预期的。补充的活性化合物也能掺入到组合物中。

[0219] 治疗组合物通常在生产和储存条件下必须是无菌、基本等渗和稳定的。组合物能制成溶液、微乳剂、脂质体或其他适合于高药物浓度的有序结构。载体能是个溶剂或分散媒介,含有如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和其合适的混合物。保持合适的流动性,如通过使用包衣如卵磷脂,通过在分散情况下维持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。注射组合物的长期吸收能由通过组合物中包括延长吸收的物质如一硬脂酸铝或明胶而带来。

[0220] 无菌注射溶液的制备方法是在一种合适溶剂中将一个或一组上述所列举的组分掺入所要求量的活性化合物中,如需要接着进行无菌微量过滤。分散体的制备一般是将活性化合物掺入到无菌载体中,该载体含有基本的分散介质和所要求的其他成分,这些成分如上面所列举。在无菌粉末用于制备无菌注射溶液的情况下,优选制备方法是真空干燥和

冷冻干燥(冷干),该法从其先前无菌过滤过的溶液中产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。治疗组合物也能用本领域已知的医学装置给药。如在一个优选的实施方案中,本发明的治疗组合物用无针皮下注射装置给药,如公开在如美国专利号 5,399,163,5,383,851,5,312,335,5,064,413,4,941,880,4,790,824 或 4,596,556 的装置。本发明有用的植入物和结构组件实例包括:美国专利 4,487,603,其公开了可植入的微输液泵用于以控制速率分派药物;美国专利号 4,486,194,其公开了从皮肤给药的治疗装置;美国专利 4,447,233,其公开了药物输液泵用于以精确输液速率传递药物;美国专利 4,447,224,其公开了可植入的输液装置用于连续药物传递;美国专利 4,439,196,其公开了渗透药物传递系统,该系统具有多室的间隔间;和美国专利 4,475,196,其公开了渗透药物传递系统。许多其他这些植入物、传递系统和模块已经知晓。

[0221] C 制剂

[0222] 对治疗组合物,本发明的制剂包括那些适合于口服、鼻甲、局部(包括口腔和舌下)、直肠的、阴道的和/或肠胃外的给药。制剂能方便地以单位剂量形式呈现和可采用制药领域已知的方法制备。活性分量依赖治疗中的被试者和特定给药方式而发生变化,该活性成分能与载体物质组合以产生单一剂量形式。能与载体物质组合以产生单一剂量形式的活性成分的量一般是能够产生治疗效果的组合物的量。一般地,从 100% 中,这个量范围从约 0.01% 到约 99% 的活性成分,从约 0.1% 到约 70% 或从约 1% 到约 30%。

[0223] 适用于阴道给药的本发明制剂包括阴道栓剂、棉塞、乳剂、凝胶、浆糊、泡沫或喷雾制剂,含有如本领域所知的合适的载体。用于局部或经皮地施用本发明组合物的剂量形式包括粉末、喷雾、软膏、浆糊、乳剂、洗液、凝胶、溶液、膏药和吸入剂。活性化合物与可药用载体可在无菌条件下混合,以及与任何防腐剂、缓冲液或可能要求的抛射剂混合。

[0224] 短语“肠胃外给药”和“肠胃外施用的”意指除肠的和局部给药以外的给药方式,经常采用注射,包括静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼窝内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内、硬脑膜外和胸骨内注射和输液。

[0225] 合适水和非水载体的实施例可在本发明的药物组合物中使用,包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和聚乙二醇等),和其合适的混合物,植物油如橄榄油,以及可注射的有机酯如油酸乙盐。例如通过使用包衣物质,如卵磷脂,在扩散情况下通过维持所需的颗粒大小,和通过使用表面活性剂,维持合适的流动性。

[0226] 这些组合物也可含有佐剂如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过灭菌程序(同上)和通过内含各种抗细菌和抗真菌介质,如对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苯酚山梨酸等,可确保预防微生物存在。也可理想地将等渗剂如糖,氯化钠等加入到组合物中。此外,可注射药物形式的延长吸收可由包含延长吸收物质产生,如一硬脂酸铝和明胶。

[0227] 当本发明化合物作为药物给药给人和动物时,它们能单独给药,或作为药物组合物给药,其中,含有如 0.01 到 99.5% (或 0.1 到 90%) 的活性成分与可药用载体。

[0228] 药物组合物一般制成如无菌和基本等渗的制剂,并完全依从美国食品与药品管理局(FDA)的药品生产质量管理规范(GMP)条例。

[0229] 本发明的方法和用途

[0230] A 方法

[0231] 本发明的组合物(如人类序列抗体和对人 CTLA-4 的人单克隆抗体和其衍生物/偶

联物)具有体外和体内诊断和治疗用途。例如,这些分子能如体外给药于培养细胞,或如体内给药于被试者内以便治疗、预防或诊断各种失调。术语“被试者”包括人和非人类动物。非人类动物包括全部脊椎动物如哺乳动物和非哺乳动物,如非人类灵长类动物、羊、狗、牛、鸡、两栖动物和爬行类动物。这些方法特别适合于治疗失调症的人类患者,通过增强或降低 T 细胞介导的免疫应答能够治疗该失调。

[0232] 当 CTLA-4 抗体与另一个作用物一起给药时,这两者能按序给药或同时给药。这些方法能用作治疗任一种癌包括黑素瘤、结肠癌、前列腺癌和肾癌。

[0233] 例如,用抗 CTLA-4 抗体包被的胶乳微球(为增加抗体的效价)能抑制 T 细胞增殖和活化。具有相同的抗体组合位点的作用物当作为 Fab 或可溶性 IgG 出现的时候,可充当 CTLA-4 拮抗剂,以及当高度交联时候,充当 CTLA-4 激动剂。因此多价形式的抗 CTLA-4 抗体是有用的治疗剂用作下降调节免疫应答。

[0234] 除了与胶乳微球或其他不溶性颗粒外,抗体能相互交联或以遗传学方法改造形成多聚体。交联能采用直接化学连接、或采用间接连接如抗体-生物素-抗生物素蛋白复合体。交联能是共价的,这里使用化学连接基团,或非共价,这里使用蛋白-蛋白或其他蛋白-配体相互作用。用于连接的遗传工程方法包括如 IgM 表达载体或任何蛋白组成成分(如聚赖氨酸等)中的高亲和性 IgG 抗体可变区的再表达。将高度亲和性 IgG 抗体转化为 IgM 抗体能创造出很高亲合力的十价复合物。IgA₂表达载体也可用作生产多价抗体复合物。IgA₂能与 J 链和分泌的组分一起形成聚集体。IgA₂可具有添加的优势,其能由 IgA 受体 CD89 附加地交联,该受体表达在嗜中性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞中。

[0235] 使用一些对 CTLA-4 多克隆抗体的制剂也能产生拮抗作用,制剂含有对 CTLA-4 上的至少两个非重叠表位的抗体。这种制剂中的一个抗体含有两个结合位点,能与 CTLA-4 的两个分子结合以形成一个小簇。第二个抗体拥有不同的结合位点,然后能连接(聚集)这些小簇以形成大簇,因此形成 CTLA-4 (在细胞表面)的复合物,该复合物能将信号转导到 T 细胞上以便抑制、降低或阻止携带(表达) CTLA-4 的 T 细胞的活化。因此,多克隆抗体的一些制剂与上述的多价制剂显示了相似的拮抗作用。

[0236] 因此,抗 CTLA-4 抗体的多价或多克隆制剂对拮抗 CTLA-4 受体是有用的,因而抑制由携带 CTLA-4 受体的 T 细胞介导的免疫应答。疾病的一些实例能使用这种抗体的多价或多克隆制剂治疗,这些疾病诱导自身免疫疾病,移植排斥和炎症。

[0237] B 用途

[0238] 1. 激活免疫应答

[0239] a. 癌症

[0240] 一些治疗方法治疗癌症病人。用抗体封闭 CTLA-4 能增强病人癌细胞的免疫应答。可选择地,对 CTLA-4 的抗体能与免疫原性剂组合,如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞和以编码免疫刺激细胞因子和细胞表面抗原如 B7 的基因转染的细胞(参见如 Hurwitz, A. 等 (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 10067-10071)。

[0241] 在鼠实验系统中,一些肿瘤的植入接着施用抗 CTLA-4 抗体,能导致肿瘤排斥。在一些情况下,确定的肿瘤的肿瘤排斥发生;在其他情况下,肿瘤的生长因使用抗 CTLA-4 抗体而减慢。CTLA-4 封闭一般对免疫原性肿瘤是有效的。操作上地,这限定为那些肿瘤,使用肿瘤本身的种痘能导致对肿瘤攻击的免疫。在人类中,一些肿瘤已经显示为免疫原性,如黑

素瘤。可以预见采用由 CTLA-4 封闭来提高 T 细胞活化的阈值,我们可期待在宿主中激活肿瘤应答。

[0242] 当与种痘草案组合时,CTLA-4 封闭是最有效的。许多抗肿瘤种痘的实验策略已经设计出来(参见 Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring:60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring:300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring:414-428; Foon, K., 2000, ASCO Educational Book Spring:730-738; 也参见 Restifo, N. 和 Sznol, M., Cancer Vaccines, 第 61 章, 3023-3043 页, 在 DeVita, V. 等主编, 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5th Edition)。这些策略其中一个中, 疫苗制备采用自体的或同种异体的肿瘤细胞。当肿瘤细胞被转导表达 GM-CSF 时, 这些细胞疫苗已经表明是最有效的。GM-CSF 已经表现为抗原呈递肿瘤种痘的一个有力的激活剂(Dranoff 等 (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:3539-43)。

[0243] 抗 CTLA-4 封闭与 GMCSF 修饰的肿瘤细胞疫苗一起使用已经表明是有效的, 其用在许多实验肿瘤模型中如乳腺癌(Hurwitz 等 (1998), 同上), 初级前列腺癌(Hurwitz 等 (2000), Cancer Research 60(9):2444-8) 和黑素瘤(Van Elsas, A. 等 (1999), J. Exp. Med. 190:355-66)。在这些例子中, 已使非免疫原性肿瘤如 B16 黑素瘤易受到免疫系统的破坏。肿瘤细胞疫苗在其他疫苗中也可修饰表达其他免疫激活剂, 如 IL-2 和共刺激的分子。

[0244] 多种肿瘤中基因表达研究和大规模基因表达模式已经导致定义所谓的肿瘤特异性抗原(Rosenberg, SA (1999), Immunity 10:281-7)。在许多情况下, 这些肿瘤特异性抗原是分化抗原, 在肿瘤和肿瘤从中发生的细胞中表达, 例如黑素细胞抗原 gp100, MAGE 抗原, Trp-2。更重要地, 许多这些抗原能显示为在宿主中发现的肿瘤特异性 T 细胞的靶子。为了产生对这些蛋白的免疫应答, CTLA-4 封闭可与许多在肿瘤中表达的重组蛋白和 / 或肽联用。这些蛋白通常被免疫系统判别为自身抗原, 并因此对它们有耐受性。肿瘤抗原也可包括蛋白端粒酶, 其对染色体的端粒合成是必要的, 并在超过 85% 的人癌症中表达和只在限制数目的体细胞组织中表达(Kim, N 等 (1994), Science 266, 2011-2013)。(这些体细胞组织可经多种方法抵御免疫进攻)。肿瘤抗原又可称“neo 抗原”, 在肿瘤细胞中表达, 这是由于体细胞突变改变了蛋白序列或创造了两个非相关序列的融合蛋白(即 bcrab1, 在费城染色体中), 或来自 B 细胞肿瘤的独特型 Ig。其他肿瘤疫苗可包括来自病毒的蛋白, 这些病毒参与人类癌症, 如人乳头状瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV 和 HCV) 和卡波西疱疹肉瘤病毒(KHSV)。肿瘤特异性抗原的另一种形式可与 CTLA-4 封闭联用, 是纯化的热休克蛋白(HSP), 分离自肿瘤组织本身。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞蛋白的片段, 并且这些 HSP 在传递给抗原呈递细胞引发肿瘤免疫中是高效率的(Suot, R 和 Srivastava, P (1995), Science 269:1585-188; Tamura, Y 等 (1997), Science 278:117-120)。

[0245] 树突细胞(DC)是强有力的抗原呈递细胞, 能用于启动抗原特异性应答。DC 能体外生产并装载多种蛋白和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle, F. 等 (1998), Nature Medicine 4:328-332)。DC 也可用遗传学方法转导以表达这些肿瘤抗原。DC 为免疫目的还已经与肿瘤细胞直接融合(Kugler, A. 等 (2000), Nature Medicine 6:332-336)。作为种痘方法, DC 免疫可有效与 CTLA-4 封闭组合以便活化更强有力的抗肿瘤应答。

[0246] CTLA-4 封闭也可与标准癌治疗组合。CTLA-4 封闭可有效地与化疗方法组合。在

这些例子中,可以降低所施用的化疗试剂的剂量(Mokyr, M. 等 (1998), *Cancer Research* 58:5301-5304)。将 CTLA-4 封闭与化疗组合使用的背后,其科学的基本原理是细胞死亡应导致在抗原呈递途径中肿瘤抗原水平增加,细胞死亡是大多数化疗化合物细胞毒性作用的结果。其他组合疗法经细胞死亡可导致与 CTLA-4 封闭的协同作用,这些疗法是辐射、手术和激素剥夺(Kwon, E. 等, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (26):15074-9)。这些每一个草案创造出宿主中肿瘤抗原来源。血管发生抑制剂也可以是与 CTLA-4 封闭组合。血管发生抑制作用导致肿瘤细胞死亡,可将肿瘤抗原加入到宿主抗原呈递途径。

[0247] CTLA-4 封闭抗体能用在与双特异性抗体的组合中,双特异性抗体将 Fc α 或 Fc γ 受体表达性效应细胞靶向到肿瘤细胞上(参见如美国专利号 5,922,845 和 5,837,243)。双特异性抗体能用于靶向两个单独抗原。例如抗 -Fc 受体 / 抗肿瘤抗原(即 Her-2/neu)双特异性抗体已经用于将巨噬细胞靶向到肿瘤位点。这种靶向过程可更有效地激活肿瘤特异性应答。这些应答中的 T 细胞应答将由 CTLA-4 封闭的使用而增强。可选择性地,采用双特异性抗体,抗原可直接传递到 DC,这些双特异性抗体与肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标记结合。

[0248] 肿瘤逃避宿主免疫监督有大量的机理。许多这些机理可由蛋白失活而克服,这些蛋白由肿瘤表达并且是免疫抑制的。其他蛋白包括 Tgf β (Kehrl, J. 等 (1986), *J. Exp. Med.* 163:1037-1050)、IL-10 (Howard, M. 和 O' Garra, A. (1992), *Immunology Today* 13:198-200),和 Fas 配体(Hahne, M. 等 (1996), *Science* 274:1363-1365)。对每一个这些实体的抗体可用在与抗 CTLA-4 抗体的组合中以便抵消免疫抑制剂的效应并促进由宿主产生的肿瘤免疫应答。

[0249] 可用于活化宿主免疫应答的其他抗体能用在与抗 CTLA-4 抗体的组合上。这些其他抗体包括树突细胞表面上的分子,该分子活化 DC 功能和抗原呈递。抗 -CD40 抗体能够有效地替代 T 细胞辅助活性(Ridge, J. 等 (1998), *Nature* 393:474-478),并能用在与 CTLA-4 抗体的组合中(Ito, N. 等 (2000), *Immunobiology* 201(5)527-40)。对 T 细胞共刺激分子如 OX-40 (Weinberg, A. 等 (2000), *J. Immunol.* 164:2160-2169)、4-1BB (Melero, I. 等 (1997), *Nature Medicine* 3:682-685(1997))和 ICOS (Hutloff, A. 等 (1999), *Nature* 397:262-266)的活化抗体也可提供用于增加 T 细胞活化水平。

[0250] 骨髓移植当前正用于治疗各种造血源肿瘤。当这种治疗的结果是移植物对宿主的排斥反应疾病时,治疗的好处就可从移植物对肿瘤应答中获得。CTLA-4 封闭能用作增加由供体移入的肿瘤特异性 T 细胞的有效性(Blazar, B. 等 (1999), *J. Immunol.* 162:6368-6377)。

[0251] 还有几种实验的治疗方案为了抗肿瘤的抗原特异性 T 细胞,包含了抗原特异性 T 细胞的体外活化和扩增以及将这些细胞过继转移给接受者(Greenberg, R. 和 Riddell, S. (1999), 285:546-51)。这些方法也可用于活化对感染性物质如 CMV (见下)的 T 细胞应答。抗 CTLA-4 抗体存在下体外活化可期待增加过继转移 T 细胞的频率和活性。

[0252] b. 传染性疾病

[0253] 本发明其他方法用于治疗已经暴露给特定毒素或病原体的患者。与其应用到如上所述的肿瘤相似,抗体介导的 CTLA-4 封闭能单独或作为佐剂与疫苗组合用于刺激对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。CTLA-4 封闭已经显示在感染下列病原体的急性阶段是有

效的,巴西日本圆线虫(McCoy, K. 等(1997), 186(2):183-187)和杜氏利什曼虫(Murphy, M. 等(1998), J. Immunol. 161:4153-4160)。该治疗方法特别适用的病原体例子包括目前没有有效疫苗的病原体,或常规疫苗不完全有效的病原体。这些病原体包括但不限于 HIV、肝炎病毒(A、B 和 C)、流感病毒、疱疹病毒、贾第鞭毛虫、疟疾、利什曼原虫属、金黄色葡萄球菌、铜绿色假单胞菌。CTLA-4 封闭对于抗确定的传染尤其有用,这些传染由介质如 HIV 引起,并在传染过程中存在改变的抗原。这些新型表位在施用抗人 CTLA-4 的时候被识别为外来表位,因此引起了强力 T 细胞应答,该应答不为经 CTLA-4 的负信号所阻抑。

[0254] 致病病毒引起感染,这些感染可由本发明方法治疗。这样一些致病病毒的例子包括肝炎病毒(A、B 或 C)、疱疹病毒(如 VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II 和 CMV、EB 病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、艾柯病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV 病毒、登革病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC 病毒和虫媒病毒性脑炎病毒。

[0255] 致病细菌引起感染,这些感染可由本发明方法治疗。这样一些致病细菌的例子包括衣原体、立克次氏体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和 *conococci*、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱、破伤风、肉毒中毒、炭疽、鼠疫、钩端螺旋体病、莱姆病菌。

[0256] 致病真菌引起感染,这些感染可由本发明方法治疗。这样一些致病真菌的例子包括念珠菌属(白色念珠菌、克鲁斯念珠菌、平滑念珠菌、热带念珠菌等)、新型隐球菌、曲霉属(烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉菌目的菌种(毛霉菌属、犁头霉属、根霉菌属(*Rhizopus*))、*Sporothrix Schenkii*、皮炎芽生菌、巴西芽生菌、粗球孢子菌和荚膜组织胞浆菌。

[0257] 致病寄生虫引起感染,这些感染可由本发明方法治疗。这样一些致病寄生虫的例子包括痢疾内变形虫、结肠小袋虫、*Naegleria fowleri*、棘变形虫种、蓝氏贾第鞭毛虫、隐孢子虫种、卡氏肺孢子虫、疟原虫、微小巴贝虫、布氏锥体虫、克氏锥体虫、杜氏利什曼虫、冈氏弓形虫、巴西日本圆线虫。

[0258] 在以上所有方法中,CTLA-4 封闭能与免疫疗法的其他形式组合,这些形式如细胞因子治疗(如干扰素、GM-CSF、GCSF 和 IL-2)或双特异性抗体治疗,其提供了增强的肿瘤抗原呈递作用(参见如 Holliger(1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak(1994), *Structure* 2:1121-1123)。

[0259] c. 促进有益的“自身免疫”反应用于疾病治疗和治疗干预

[0260] 抗 CTLA-4 抗体引发和扩增自身免疫应答的能力已被记录在许多实验系统中(EAE- 实验自身免疫脑脊髓炎,为一种鼠模型,针对 MS (Perrin, P. 等(1996), *J Immunol* 157(4):1333-1336);糖尿病(Luhder, F. 等(1998), 同上))。事实上,采用肿瘤细胞和肽疫苗诱导抗肿瘤应答揭示出:许多抗肿瘤应答涉及抗自身反应性(在抗 CTLA-4+GM-CSF 修饰的 B16 黑素瘤中观察到除色素(van Elsas 等, 同上);在 Trp-2 预防接种的小鼠中的除色素(Overwijk, W. 等(1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:2982-2987);由 TRAMP 肿瘤细胞疫苗引发的自身免疫前列腺炎(Hurwitz, A. (2000), 同上))、黑素瘤肽抗原预防接种以及在人类临床实验中所观察的白癜风(Rosenberg, SA 和 White, DE(1996), *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19(1):81-4)。

[0261] 因此与多种自身蛋白协力考虑使用抗 CTLA-4 封闭以设计种痘方案以便有效地生

成用于治疗疾病的抗这些自身蛋白的免疫应答。例如,老年性痴呆症涉及脑中在淀粉样蛋白沉积物中不合适地积累 A β 肽;抗淀粉样蛋白的抗体应答能清除这些淀粉样蛋白沉积物(Schenk 等(1999), Nature 400:173-177)。

[0262] 其他自身蛋白也可用作靶子如 IgE,用于治疗过敏和哮喘,和 TNF 用于治疗风湿性关节炎。最后,对多种激素的抗体应答可采用抗 CTLA-4 抗体诱导。对再生激素的中和抗体应答可用于避孕。对激素和其他可溶性因子的中和抗体应答也可当作可能的种痘靶子,这些激素和可溶性因子对于特定肿瘤生长是必需的。

[0263] 如上描述的类似方法采用抗 CTLA-4 抗体,能用于诱导治疗自身免疫应答来治疗患者,该患者不合适地积累其他自身抗原,如淀粉样蛋白沉积,包括老年痴呆症中的 A β 、细胞因子如 TNF α 和 IgE。

[0264] 2. 使免疫应答失活

[0265] 由免疫应答引起的失调称为超敏性疾病。由自我耐受性失灵引起的疾病和随后抗自我或自体抗原的免疫应答称为自身免疫疾病。超敏性疾病也能由未控制的或过分的抗外源抗原如微生物的应答产生。

[0266] 虽然对人 CTLA-4 的可溶性抗体已经表现为促进 T 细胞的扩充和活化(即当 CTLA-4 功能(如与配体结合)受到抑制;在本情况中抗体是对 CTLA-4 功能的拮抗物),但这些相同抗体价的增加产生了相反的效果(然而现在,相反,抗体充当 CTLA-4 的兴奋剂以便抑制免疫应答)(参见如 Krummel 和 Allison,1996, J. Exp. Med. 183, 2533-2540)。为了使抗原特异性 T 细胞应答失活的目的,如那些是致病性的自身反应性 T 细胞的靶子的应答,对这些 T 细胞特异的靶抗原(即抗原和 / 或 MHC/ 抗原复合物)必须以抗 CTLA-4 抗体的多价形式施用。

[0267] a. 发炎

[0268] 发炎表示毛细管扩张的结果,伴有流体积聚和吞噬细胞白细胞的迁移,如粒细胞和单核细胞。发炎在防卫宿主抗各种传染中是重要的,但在炎症的失调中也能有不合需要的结果,如过敏性休克、关节炎、痛风和局部缺血-再灌注。活化的 T 细胞在发炎中有重要的调节作用,释放干扰素 γ 和集落刺激因子,这些因子又活化吞噬细胞白细胞。活化的吞噬细胞白细胞诱导表达许多特异性细胞表面分子,术语称为归巢受体,适用于将吞噬细胞连接到靶内皮细胞。炎症反应能用本发明治疗剂治疗来降低或消除。例如,抗 CTLA-4 抗体的多价制剂阻断了活化的 T 细胞的活化,由此阻止这些细胞释放活化吞噬细胞类型所要求的分子。

[0269] b. 自身免疫疾病

[0270] 其中免疫抑制为所需的进一步情形是在治疗自身免疫疾病中,如胰岛素依赖的糖尿病、多发性硬化症、僵人综合症、风湿性关节炎、重症肌无力和红斑狼疮。这些病中身体发展出抗一种它自身抗原的细胞和 / 或体液的免疫应答,导致该种抗原的破坏和潜在的致残的和 / 或致命的结果。活化的 T 细胞被认为在许多自身免疫疾病如糖尿病中发挥主要作用。自身免疫疾病由施用本发明的一种治疗剂治疗,该种治疗剂抑制 T 细胞活化。自身免疫疾病针对自身抗原或其片段,可选择地,在施用免疫抑制剂不久前,同时地与免疫抑制剂施用,或施用免疫抑制剂不久后,此自身抗原或其片段能被施用。用这种方式,对自身抗原的耐受性趁着抑制治疗能被诱导出,由此消除对连续免疫抑制的需要。参见如 Cobbold 等, WO 90/15152(1990)。

[0271] c. 移植物对宿主排斥反应疾病

[0272] 本发明治疗剂的相关应用是在于调节包含在“移植物对宿主”排斥反应疾病(GVHD)中的免疫应答。GVHD 是潜在致命的疾病,当免疫活性细胞转移给同种异体的接受者时疾病发生。在这种情形下,供体的免疫活性细胞可进攻接受者的组织。皮肤组织、内脏上皮细胞和肝脏是常见的靶子,并且在 GVHD 过程中可被破坏。该疾病当免疫组织被移植时就出现了一个特别严重的问题,如在骨髓移植时;但在其他案例中较轻的 GVHD 也有报道,包括心脏和肝脏移植。本发明的治疗剂用于抑制供体白细胞活化,由此抑制宿主中溶解靶细胞的能力。

[0273] d. 移植排斥

[0274] 近些年来在组织和器官移植手术技术的效率方面已有相当的改善,如移植皮肤、肾脏、肝脏、心脏、肺、胰腺和骨髓。也许主要的突出问题是缺乏满意的作用物用于诱导接受者对移植的同种异体移植物或器官的免疫耐受性。当同种异体的细胞或器官移植到宿主中时(即供体和受赠者是来自相同种的不同个体),宿主免疫系统可能增强对移植物中的外源抗原的免疫应答(宿主对移植物排斥反应疾病),导致移植的组织受破坏。 $CD8^+$ 细胞、 $CD4^+$ 细胞和单核细胞都参与了移植组织的排斥。本发明的治疗剂在受赠者中用于抑制 T 细胞介导的同种抗原诱导的免疫应答,由此防止这类细胞参加移植组织或器官的破坏。

[0275] B. 检测 / 测定样品中是否存在 CTLA-4 的方法

[0276] 本发明进一步提供了检测样品中是否存在 CTLA-4 抗原或测定人 CTLA-4 抗原的量的方法,包括用人单克隆抗体或其抗原结合部分接触样品和对照样品,在允许形成抗体或其部分和人 CTLA-4 间的复合物的条件下,该抗体与人 CTLA-4 特异性地结合。复合物的形成然后被检测,其中与对照样品比较,样品间复合物形成差别是样品中是否存在人 CTLA-4 抗原的指征。

[0277] C. 试剂盒

[0278] 试剂盒也在本发明的范围内,该试剂盒包括本发明的组合物(如人类序列抗体、人抗体、多特异性和双特异性分子)和使用说明书。该试剂盒能进一步包含至少一种另外试剂,或一种或多种本发明其他人抗体(如人抗体,其具有补充活性,能与 CTLA-4 抗原中表位结合,截然区别于第一个人抗体)。试剂盒通常包括一个标签,简要地说明了试剂盒内容的目的用途。术语标签包括任何字迹或记载的物品,物品是在试剂盒上或与试剂盒一起提供的,或以别的方式伴随试剂盒的东西。

实施例

[0279] 实施例 1Cmu 靶向小鼠的产生

[0280] CMD 靶向载体的构建

[0281] 质粒 pICEmu 含有鼠 Ig 重链基因座的 EcoRI/XhoI 片段,该片段跨越 mu 基因,从 Balb/C 基因组 λ 噬菌体文库中获得(Marcu 等, Cell 22:187, 1980)。这种基因组片段亚克隆到质粒 pICEMI9H 中的 XhoI/EcoRI 位点上(Marsh 等, Gene 32:481-485, 1984)。包括在质粒 pICEmu 中的重链序列从刚好位于 mu 内含增强子 3' 端的 EcoRI 位点的下游延伸到位于 mu 基因最后跨膜外显子下游约 1kb 的 XhoI 位点;但在 E. coli 传代过程中许多 mu 转换重复区已经缺失。

[0282] 靶向载体如下构建(参见图 1):一个 1.3kb 的 HindIII/SmaI 片段从质粒 pICEmu 中切除并亚克隆到 HindIII/SmaI 消化的质粒 pBluescript 中(Stratagene, La Jolla, CA)。该质粒 pICEmu 片段从位于 CmuI 的 5' 端约 1kb 的 HindIII 位点延伸到位于 CmuI 内的 SmaI 位点上。所得的质粒用 SmaI/SpeI 消化,插入来自质粒 pICEmu 约 4kb 的 SmaI/XbaI 片段,其即从 CmuI 3' 端的 SmaI 位点延伸到仅仅位于最后一个 Cmu 外显子的下游的 XbaI 位点。所得质粒 pTAR1 在 SmaI 位点线性化,并且插入一个 neo 表达弹夹。该弹夹由小鼠磷酸甘油酸激酶(pgk)启动子(XbaI/TaqI 片段;Adra 等(1987),Gene 60:65-74)控制下的 neo 基因组成并含有 pgk 的多腺苷酸化位点(PvuII/HindIII 片段;Boer 等(1990),Biochemical Genetics 28:299-308)。该弹夹从质粒 pKJ1 (由 Tybulewicz 等(1991),Cell 65:1153-1163 描述)获得,neo 弹夹从该质粒中切割成 EcoRI/HindIII 片段,并亚克隆到用 EcoRI/HindIII 消化的质粒 pGEM-7Zf (+)生成质粒 pGEM-7 (KJ1)。neo 弹夹从质粒 pGEM-7 (KJ1)中用 EcoRI/SalI 消化切割,产生平末端,并以基因组 Cmu 序列的反方向亚克隆到质粒 pTAR1 的 SmaI 位点上。所得的质粒用 Not I 线性化,单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶(tk)弹夹插入允许富集携带同源性重组子的 ES 克隆,如 Mansour 等(1988)Nature 336:348-352 所描述的。该弹夹由 tk 基因的编码序列组成,该 tk 基因序列用小鼠 pgk 启动子和多腺苷酸化位点括起来,如 Tybulewicz 等(1991)Cell 65:1153-1163 描述。所得 CMD 靶向载体中有共约 5.3kb 重链基因座的同源物,并设计成生成突变 mu 基因,其中在第一个 Cmu 外显子的独特 SmaI 位点已插入了 neo 表达弹夹。靶向载体用 PvuI 线性化,其在电穿孔进入 ES 细胞之前,在质粒序列内切断。

[0283] 靶 ES 细胞的生成和分析

[0284] AB-1ES 细胞 (McMahon, A. P. 和 Bradley, A. (1990), Cell 62:1073-1085) 生长在有丝分裂失活 SNL76/7 细胞饲养层(参考同上),实质上如 Robertson (Robertson(1987), Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson 主编)Oxford: IRL Press, 71-112 页)所描述。线性化的 CMD 靶向载体采用 Hasty 等 (Hasty, P. R. 等(1991), Nature 350:243-246) 描述的方法电穿孔到 AB-1 细胞中。电穿孔细胞以 $1-2 \times 10^6$ 细胞 / 皿的密度铺到 100mm 的培养皿上。24 小时后, G418 ($200 \mu\text{g/ml}$ 活性组分) 和 FIAU ($5 \times 10^{-7}\text{M}$) 加入到培养基中,抗药物的克隆允许生长发育 8-9 天。挑出克隆,胰蛋白酶消化,分成二部分并进一步扩充。衍生自每个克隆的细胞一半冷冻,另一半分析用于载体和靶序列间的同源性重组。

[0285] DNA 分析通过 Southern 印迹杂交进行。DNA 从克隆中分离如 Laird 等所描述 (Laird, P. W. 等(1991), Nucleic Acids Res. 19:4293)。分离的基因组 DNA 用 SpeI 消化,并用 915bp 的 SacI 片段探针 A (图 1)作探针,其与介于 mu 内含增强子和 mu 转换区域间的序列杂交。探针 A 检测到一个来自野生型基因座的 9.9kb 的 SpeI 片段和一个来自 mu 基因座的诊断性的 7.6kb 的条带,该基因座已经同源性地与 CMD 靶向载体重组(neo 表达弹夹含一个 SpeI 位点)。在由 Southern 印迹分析所筛选的 1132 个 G418 和 FIAU 抗性克隆中就有 3 个表现出 7.6kb 的 SpeI 条带,这是 mu 基因座中同源性重组的指征。这三个克隆进一步用酶 BglI、BstXI 和 EcoRI 消化以便证实载体同源性地整合到 mu 基因中。当与探针 A 杂交时,野生型 DNA 的 Southern 印迹用 BglI、BstXI 或 EcoRI 消化分别产生 15.7、7.3 和 12.5kb 的片段,而靶向的 mu 等位基因的存在分别由 7.7、6.6 和 14.3kb 的片段指出。所有 3 个阳

性克隆由 SpeI 消化检测到,显示了所预料的 BglI、BstXI 和 EcoRI 限制性片段,通过它们可诊断已将 neo 弹夹插入到 Cmu1 外显子中。

[0286] 携带突变 mu 基因小鼠的产生

[0287] 三个靶向的 ES 克隆,指定编号为 264、272 和 408,解冻并注射到 C57BL/6J 囊胚泡如由 Bradley 所描述(Bradley, A. (1987), Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson 主编) Oxford: IRL Press, 113-151 页)。将注射的囊胚泡转移到假孕雌性的子宫中从而产生嵌合小鼠,表现为衍生自输入 ES 细胞和宿主囊胚泡的细胞混合物。ES 细胞贡献给嵌合体的含量,在黑色 C57BL/6J 背景上,能由衍生自 ES 细胞系的野灰色层的显色量进行视觉评估。克隆 272 和 408 只产生低百分比的嵌合体(即低百分比的野灰色色素形成),但克隆 264 产生高百分比的雄性嵌合体。这些嵌合体与 C57BL/6J 雌性一起繁殖,由此生成野灰色的子代,这是 ES 细胞基因组的种系传输的指征。筛选靶向 mu 基因由 Southern 印迹分析用 BglI 消化来自尾巴活体解剖的 DNA 来进行(如上所述用于分析 ES 细胞 DNA)。除野生型条带 15.7kb 外,有约 50% 的野灰色子代显示杂交 BglI 条带 7.7kb,这表明靶向 mu 基因的种系传输。

[0288] 转基因小鼠用于 mu 基因功能性失活的分析

[0289] 为了测定 neo 弹夹插入到 Cmu1 是否已使 Ig 重链基因失活,克隆 264 嵌合体与为 JHD 突变纯合的小鼠繁殖,该嵌合体因缺失 JH 基因区段结果使重链表达失活(Chen 等(1993), Immunol. 5:647-656)。四个野灰色子代产生。血清从年龄一个月的这些动物中获得,并由 ELISA 进行分析用于证实是否存在鼠 IgM。四个子代中的两个完全缺乏 IgM (表 1)。通过 Southern 印迹分析用 BglI 消化和用探针 A 杂交来自尾巴活体解剖的 DNA 来确定四个动物基因型(图 1),和通过 Southern 印迹分析用 StuI 消化和用 475bp 的 EcoRI/StuI 片段杂交来自尾巴活体解剖的 DNA 来确定四个动物基因型(同上图 1),表明不能表达血清 IgM 的动物是那些动物,其中重链基因座的一个等位基因携带 JHD 突变,另一个等位基因携带 Cmu1 突变。为 JHD 突变杂合的小鼠展示了血清 Ig 的野生型水平。这些数据表明 Cmu1 突变使 mu 基因表达失活。

[0290]

小鼠	血清 IgM (μ g/ml)	Ig H 链基因型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+ /JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+ /JHD
129×BL6F1	153	+ / +
JHD	<0.002	JHD/JHD

[0291] 表 1. 血清 IgM 的水平,由 ELISA 检测,对携带 CMD 和 JHD 突变(CMD/JHD)的小鼠,对为 JHD 突变杂合(+ /JHD)的小鼠,对野生型(129Sv×C57BL/6J)F1 小鼠(+ / +),和对

为 JHD 突变纯合 (JHD/JHD) 的 B 细胞缺损的小鼠进行检测。

[0292] 实施例 2. HCo12 转基因小鼠的产生

[0293] HCo12 人重链转基因

[0294] HCo12 转基因由 pHC2 (Taylor 等, 1994, *Int. Immunol.*, 6:579-591) 的 80kb 插入物和 pVx6 的 25kb 插入物共注射产生。质粒 pVx6 如下所述构建。

[0295] 8.5kb HindIII/SalI DNA 片段, 包括与约 2.5kb 的 5' 侧翼基因组序列和 5kb 的 3' 侧翼基因组序列一起的种系人 VH1-18 (DP-14) 基因, 亚克隆进质粒载体 pSP72 (Promega, Madison, WI) 从而生成质粒 p343.7.16。7kb BamHI/HindIII DNA 片段, 包括与约 5kb 的 5' 侧翼基因组序列和 1kb 的 3' 侧翼基因组序列一起的种系人 VH5-51 (DP-73) 基因, 克隆进基于 pBR322 基质粒克隆载体 pGP1f 中 (Taylor 等, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:6287-6295) 从而生成质粒 p251f。衍生自 pGP1f, pGP1k (Seq. ID#1) 的新克隆载体, 用 EcoRV/BamHI 消化并连接到一个 10kb 的 EcoRV/BamHI DNA 片段, 其包括与约 4kb 的 5' 侧翼基因组序列和 5kb 的 3' 侧翼基因组序列一起的种系人 VH3-23 (DP-47) 基因。所得质粒 p112.2RR.7 用 BamHI/SalI 消化并与 7kb 纯化的 p251fBamHI/SalI 插入物相连接。所得质粒 pVx4 用 XhoI 消化并与 8.5kb 的 p343.7.16XhoI/SalI 插入物连接。获得以如其他两个 V 基因相同方向带有 VH1-18 基因的克隆。该克隆指定为 pVx6, 用 NotI 消化并纯化, 纯化所得的 26kb 插入物与纯化的 80kb pHC2 的 NotI 插入物一起以 1:1 摩尔比率共注射到一个半天 (C57BL/6J×DBA/2J) F2 胚胎的前核中, 如由 Hogan 等描述 (*B. Hogan 等, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 2nd edition, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY*)。三个独立的转基因小鼠系含有来自 Vx6 和 HC2 的序列, 从接受注射的胚胎发育来的小鼠建立。这些系指定为 (HCo12) 14881, (HCo12) 15083 和 (HCo12) 15087。三个系的每一个然后与含有 CMD 突变 (实施例 1 中描述)、JKD 突变 (Chen 等, 1993, *EMBO J.* 12:811-820) 和 (KCo5) 9272 转基因 (Fishwild 等, 1996, *Nature Biotechnology* 14:845-851) 的小鼠繁殖。所得的小鼠在纯合的用于内源性小鼠重链和 κ 轻链基因座破裂的背景下表达人重链和 κ 轻链转基因。

[0296] 实施例 3. 人 IgG κ 抗人 CTLA-4 单克隆抗体的产生

[0297] 基于细胞的抗原

[0298] 编码融合蛋白的 DNA 区段含有来自人 CTLA-4 和鼠 CD3 ζ 基因, 由 PCR 扩增带有桥接成寡核苷酸的 cDNA 克隆构建。编码的融合蛋白含有下列序列: i. 编码氨基酸 1-190 的人 CTLA-4 序列 (含有信号肽, 人 CTLA-4 的胞外结构域和全部人 CTLA-4 假定的跨膜序列) 和 ii. 鼠 CD3 ζ 从氨基酸 52 到羧基端序列 (Weissman 等 (1988), *Science* 239:1018-1021)。扩增的 PCR 产物克隆到质粒载体中, 并测定 DNA 序列。然后克隆插入物亚克隆到载体 pBABE (含有基因, 其编码嘌呤霉素抗性 (Morganstern, JP 和 Land, H *Nucl. Acids Res.* 18:3587-96 (1990))) 从而创造 pBABE-huCTLA-4/CD3 ζ 。pBABE-huCTLA-4/CD3 ζ 转染到反转录病毒包装系, Ψ -2, 筛选出一组嘌呤霉素抗性细胞。这些细胞与鼠 T 细胞杂交瘤 BW5147 (ATCC#TIB-47) 共培养。共培养 2 天后, 非粘着性 BW5147 细胞被取出并筛选出嘌呤霉素抗性细胞。嘌呤霉素抗性的细胞组由限制稀释亚克隆并由 FACS 用于人 CTLA-4 表面表达测试。高水平表达细胞表面上人 CTLA-4 的克隆被筛选出来。

[0299] 可溶性抗原

[0300] 重组 CTLA-4 融合蛋白含有人 CTLA-4 的胞外结构域, 购自 R&DSYSTEMS (Cat. #325-CT-200)。胞外 CTLA-4 片段的制备采用在位于 CTLA-4 胞外结构域的 C 末端后的因子 Xa 蛋白酶切割位点上蛋白水解切割 CTLA-4 融合蛋白。融合蛋白用因子 Xa 以融合蛋白与因子 Xa 50:1 的比率处理, 并将 CTLA-4 片段通过蛋白 G-琼脂糖传代和 Mono Q HPLC 分离。柱层析组分采用 SDS-PAGE 和与表达小鼠 B7 分子的细胞 (LtkmB7.1: 用小鼠 B7.1 cDNA 克隆表达载体转染的小鼠 Ltk (-) 细胞) 结合检测是否存在人 CTLA-4 二聚体。收集阳性组分并在 PBS 缓冲液中透析。

[0301] 转基因小鼠

[0302] 两个不同品系的小鼠用于生成 CTLA-4 反应性单克隆抗体。品系 ((CMD)++ ; (JKD)++ ; (HCo7)11952+/++ ; (KCo5)9272+/++), 和品系 ((CMD)++ ; (JKD)++ ; (HCo12)15087+/++ ; (KCo5)9272+/++)。这些品系的每一个对于内源性小鼠重链和 κ 轻链基因座破裂是纯合的。两品系皆包括人 κ 轻链转基因 (KCo5), 并且个体动物对插入 #11952 是半合的或纯合的。两品系在所用的人重链转基因中有区别。小鼠对 HCo7 或 HCo12 转基因是半合的或纯合的。CMD 突变描述在上的实施例 1 中。(HCo12)15087 小鼠的产生在实施例 2 中描述。JKD 突变 (Chen 等, 1993, EMBO J. 12:811-820) 和 (KCo5)9272 (Fishwild 等, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851) 和 (HCo7)11952 小鼠在美国专利号 5,770,429 (Lonberg & Kay, 6/23/98) 中描述。

[0303] 免疫

[0304] 转基因小鼠用 $1-3 \times 10^7$ 个磷酸缓冲液 (PBS) 中的细胞或佐剂中 (完全弗氏佐剂或 Ribi 氏佐剂) 的 $10-50 \mu\text{g}$ 可溶性蛋白初始经腹膜内免疫。免疫小鼠随后每隔 2-4 周用 $1-3 \times 10^7$ 个 PBS 中的细胞经腹膜内加强免疫。对动物执行该方案 2-5 个月。融合前, 动物在第 -3 天和 -2 天用大约 10^6 个细胞或 $10-20 \mu\text{g}$ 可溶性抗原 (融合蛋白或融合蛋白和胞外部分) 经静脉注射加强免疫。成功的融合导致 CTLA-4 反应性 IgG κ 单克隆抗体, 从免疫小鼠采用多种方案获得, 包括只有细胞、只有可溶性抗原, 和细胞免疫跟着融合前静脉注射可溶性抗原。

[0305] 融合

[0306] 脾脏细胞采用标准步骤融合到小鼠杂交瘤细胞中 (系 P3 X63 Ag8.6.53, ATCC CRL 1580, 或 SP2/0-Ag14, ATCC CRL 1581) (Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York; Kennett 等, 1980, Monoclonal Antibodies Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis. Plenum, New York; Oi 和 Hertenzenberg, 1980, Immunoglobulin Producing Hybrid Cell Lines, 在 Selected Methods In Cellular Immunology, Mishell 和 Shiigi 主编, 357-372 页. Freeman, San Francisco; Halk, 1984, Methods in Enzymology: Plant Molecular Biology, Weissbach 和 Weissbach 主编, 766-780 页, Academic Press, Orlando, FL)。细胞培养在 DMEM、10%FBS、OPI (Sigma 0-5003)、BME (Gibco 21985-023)、3%起源杂交瘤克隆因子 (Igen IG50-0615), 和 5%P388d1 (ATCC TIB63) 的条件培养基中。HAT 或 HT 补充物在初始生长和选择过程中加到培养基中。

[0307] 杂交瘤筛选

[0308] 为鉴定分泌人 IgG κ 抗体的杂交瘤, ELISA 板 (Nunc MaxiSorp) 用 $100 \mu\text{l}$ /孔的

PBS 中 $1 \mu\text{g/ml}$ 的羊抗人 $\text{Fc}\gamma$ 特异性抗体 (Jackson Immuno Research #109-006-098) 包被 4°C 过夜。洗涤板并用 $100 \mu\text{l}$ /孔含 1%BSA 的 PBS- 吐温封闭。加入 $50 \mu\text{l}$ 细胞培养上清液接着温育 1-2 小时。洗涤板然后用 $100 \mu\text{l}$ /孔与碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶 (Sigma #A-3813, 或 #A-7164) 偶联的羊抗 κ 轻链温育 1 小时。每步间用 PBS- 吐温洗涤板三次。类似的分析用于鉴定分泌与人 CTLA-4 反应的人抗体的杂交瘤。除了 ELISA 板用重组 CTLA-4 融合蛋白而不是羊抗人 $\text{Fc}\gamma$ 抗体包被外, 本分析是相同的。

[0309] 单克隆抗体的特性

[0310] 72 个杂交瘤由 ELISA 显示为分泌与人 CTLA-4 结合的人 IgG κ , 进行亚克隆。这些亚克隆中的 47 个被检测确定分泌的人抗体是否与 CTLA-4 表达细胞结合, 和抗体是否抑制可溶性 CTLA-4 与表达 B7 的细胞结合。结合采用流式细胞仪测定。为测定抑制, 每个上清液 $50 \mu\text{l}$ 用 10^5 个 LtkmB7.1 细胞和 25ng 重组 CTLA-4 融合蛋白温育。平均通道荧光然后用流式细胞仪测定。图 2 显示了抑制可溶性 CTLA-4 与表达 B7.1 的细胞结合。用重组人 CTLA-4 融合蛋白染色 LtkmB7.1 细胞, 测定杂交瘤上清液存在下该细胞的平均通道荧光 (MCF)。分泌封闭抗体的杂交瘤导致较低的 MCF 值。BNI3.1 (Cat. #34580D, Pharmingen, San Diego, CA) 用作阻断 CTLA-4/B7 结合的阳性对照小鼠单克隆抗体。

[0311] 大约 40% 的杂交瘤出现强力地抑制 CTLA-4 与 B7 配体的结合。

[0312] 来自克隆 10D1.3, 4B6.12 和 11E8 的抗体由 BIAcore (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 分析以测定结合动力学。纯化的重组 CTLA-4 胞外片段连接到 CM5 传感器芯片 @1200RU 上。结合以流速为 $5 \mu\text{l}/\text{分钟}$ 加入浓度为 0.25, 0.5, 1, 2.5 和 $5 \mu\text{g/ml}$ 抗体进行测定。结合曲线采用 BIAevaluation 软件 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) 与 Langmuir 结合模型拟合。抗体用蛋白 A 琼脂糖层析纯化。测定的开和关速率显示在表 2 中:

[0313]

杂交瘤	k_a ($1/\text{Ms}$)	k_d ($1/\text{s}$)	K_a ($1/\text{M}$)
10D1.3	4.1×10^5	1.0×10^{-4}	4×10^9
4B6.12	5.1×10^5	1.3×10^{-4}	4×10^9
11E8	4.3×10^5	1.8×10^{-4}	2×10^9

[0314] 表 2. 人 IgG κ 抗体与固定在表面上的重组 CTLA-4 结合的动力学。

[0315] 10 种不同人 IgG κ 抗人 CTLA-4 单克隆抗体 (3A4, 9A5, 2E2, 2E7, 4B6, 4E10, 5C4, 5G1, 11E8 和 11G1) 的系列稀释液加入到用重组 CTLA-4 融合蛋白包被的微量滴定孔中。温育 2 小时后, 生物素酰化的抗体 11E8 以浓度为 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 加到每个孔中。样品温育 30 分钟, 洗涤, 结合抗体用碱性磷酸酶 / 链霉抗生物素偶联物检测。效价显示在图 3 中。抗体 11E8 结合反应由自身和 7 种其他人抗体阻断。然而结合不受到抗体 3A4 或 9A5 的阻断。交互结合实验显示 11E8 结合不阻断 3A4 或 9A5 与 CTLA-4 的结合。

[0316] DNA 序列

[0317] RNA 从大约 2×10^6 个每种亚克隆杂交瘤细胞系的细胞中抽提, 并采用来自 Invitrogen 的试剂和方案用于合成 cDNA (Micro-FastTrack 和 cDNA Cycle: Cat. #L1310-01, 和 #K1520-02, Invitrogen, Carlsbad, CA)。人免疫球蛋白重链和 κ

轻链 V 区片段由 PCR 采用 pfu 聚合酶(Stratagene, La Jolla, CA)、简并的 FR1 引物和唯一的恒定区引物扩增。所得的 PCR 片段克隆到 pCR-Blunt 载体(Intitrogen, Carlsbad, CA)测定插入的序列。对于杂交瘤 10D1.3 重链和轻链片段的初步序列显示在图 4 中。对于杂交瘤 10D1.3 重链和轻链片段的已测定序列显示在图 5 至图 8。

[0318] 表 3. 对于 MA b 10D1、4B6 和 1E2 轻链和重链的 CDR 序列

	链	HuMAb	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
[0319]	轻链	10D1	RASQSVGSS YLA	24	GAFSRAT	29	QQYGSSPWT	35
		4B6	RASQSVSSS FLA	25	GASSRAT	30	QQYGSSPWT	35
		1E2	RASQGISSW LA	26	AASSLQS	31	QQYNSYPPT	36
	重链	10D1	SYTMH	27	FISYDGNNK YYADSVKG	32	TGWLGPFDY	37
		4B6	SYTMH	27	FISYDGSNK HYADSVKG	33	TGWLGPFDY	37
		1E2	SYGMH	28	VIWYDGSNK YYADSVKG	34	APNYIGAFDV	38

[0320] 实施例 4. 采用部分抗体序列表达完整抗体

[0321] 抗体主要经位于 6 个重链和轻链互补决定基区域(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为本原因,单个抗体间 CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列有更多变化。因为 CDR 序列负责大多数抗体-抗原的相互作用,所以经构建表达载体,表达重组抗体是可能的,这些载体包括来自特殊的自然发生的抗体的 CDR 序列,其嫁接到来自带有不同性质的不同抗体的框架序列上,这些抗体模仿特殊的自然发生的抗体的性质(Jones 等,1986, Nature 321, 522-525)。该框架序列能从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库中获得。这些种系序列将区别于成熟抗体基因序列,因为它们将不包括完整装配的可变基因,这些可变基因在 B 细胞成熟过程中由 V(D)J 连接形成。种系基因序列由于体细胞突变在单个核苷酸也将区别于高亲和性二级所有组成成分抗体序列。但是,体细胞突变不是均匀分布在可变区。例如,体细胞突变在框架区域 1 的氨基端部分和在框架区域 4 的羧基端部分相对不常见。此外,许多体细胞突变不会显著地改变抗体的结合特性。为本原由,没有必要为了再创造出一个完整的含有与原始抗体相似的结合特性的重组抗体,获得特定抗体的完整 DNA 序列(参见 PCT/US99/05535,提交日 1999 年 3 月 12 日,为所有目的该专利在此引用作为参考)。跨越 CDR 区域的部分重链和轻链序列通常足够用于本目的。部分序列用于测定哪些种系可变的和连接的基因区段有助于重组抗体可变基因。种系序列然后用在填充可变区域的丢失部分。重链和轻链的前导序列在蛋白成熟过程中被切下,因而不为最终抗体的性质作贡献。为本原因没有必要使用相对应的种系前导序列用于表达构建体。为了添加丢失序列,克隆的 cDNA 序列能与合成的寡核苷酸通过连接或 PCR 扩增而组合。可选择地,整个可变区能合成为一组短小、重叠的寡核苷酸合成并由 PCR 扩增组合从而创造出一个完整的合

成可变区克隆。本方法具有某些优势如消除或包括特定的限制性位点,或特定密码子的最优化。

[0322] 来自杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列被用于设计一重叠组的合成寡核苷酸从而创造出合成的带有同样氨基酸编码能力的 V 序列,该序列如同自然序列。合成的重链和 κ 轻链序列能在三个方面与自然序列相区别:重复核苷酸碱基的链被中断以便有利于寡核苷酸合成和 PCR 扩增;依据 Kozak 规则引入最佳翻译起始位点(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266, 19867-19870,);和翻译起始位点上游的 HindIII 位点改造。

[0323] 对于重链和轻链可变区,最佳的编码和对应的非编码的链序列分裂成 30-50 个核苷酸区段,这样用于编码链序列的核苷酸间断裂在靠近对应非编码寡核苷酸的中点发生了。因此,对每个链,寡核苷酸能装配成完全跨越所需序列的重叠双链组。这些寡核苷酸组合成跨越 150-400 个核苷酸区段的组。然后该组用作模板生产 150-400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。通常,一个单一可变区寡核苷酸组将裂解为两个组,这两个组单独扩增以生成两个重叠的 PCR 产物。然后这些重叠产物由 PCR 扩增组合形成完整的可变区。也可合意的是在 PCR 扩增中包括重链或轻链恒定区域的重叠片段(包括 κ 轻链的 BbsI 位点或 γ 重链的 AgeI 位点),从而生成能易克隆到表达载体构建体中的片段。

[0324] 然后重建的重链和轻链可变区与克隆的启动子、翻译起始、恒定区、3' 未翻译区、多腺苷酸化和转录终止序列组合形成表达载体构建体。重链和轻链表达构建体能组合成一个单一载体,将该载体共转染、连续转染或单独转染进宿主细胞中,然后融合形成表达两个链的宿主细胞。

[0325] 用于构建表达载体表达人 IgGk 的质粒描述如下。质粒构建以使得 PCR 扩增的 V 重链和 V κ 轻链 cDNA 序列能用于再构建完整的重链和轻链小基因。这些质粒能用作完整地表达人或嵌合 IgG1k 或 IgG4k 抗体。构建相似的质粒用于表达其他重链同型 Ig 或用于表达含有 λ 轻链的抗体。

[0326] κ 轻链质粒 pCK7-96 (SEQ ID NO:39)包括 κ 恒定区和多腺苷酸化位点,以使得用 5' 引物(包括起始密码子甲硫氨酸上游 HindIII 位点)扩增的 κ 序列用 HindIII 和 BbsI 消化,并克隆到用 HindIII 和 BbsI 消化的 pCK7-96 中以再构建一个完整的轻链编码序列和多腺苷酸化位点。该弹夹以 HindIII/NotI 片段分离并连接到转录启动子序列从而创造出功能性小基因转染到细胞中。

[0327] γ 1 重链质粒 pCG7-96 (SEQ ID NO:41)包括人 γ 1 恒定区和多腺苷酸化位点,以使得用 5' 引物(包括起始密码子甲硫氨酸上游 HindIII 位点)扩增的 γ 序列用 HindIII 和 AgeI 消化,并克隆到用 HindIII 和 AgeI 消化的 pCG7-96 中以再构建一个完整的 γ 1 重链编码序列和多腺苷酸化位点。该弹夹以 HindIII/SalI 片段分离并连接到转录启动子序列从而创造出功能性小基因转染到细胞中。

[0328] γ 4 重链质粒 pG4HE (SEQ ID NO:42)包括人 γ 4 恒定区和多腺苷酸化位点,以使得用 5' 引物(包括起始密码子甲硫氨酸上游 HindIII 位点)扩增的 γ 序列用 HindIII 和 AgeI 消化,并克隆到用 HindIII 和 AgeI 消化的 pG4HE 中以再构建一个完整的 γ 4 重链编码序列和多腺苷酸化位点。该弹夹以 HindIII/EcoRI 片段分离并连接到转录启动子序列从而创造出功能性小基因转染到细胞中。

[0329] 许多不同的启动子(包括但不限于 CMV、泛素、SR α 和 β 肌动蛋白)能用于表达再

构建的重链和轻链基因。例如载体 pCDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, CA), 能用 HindIII 和 NotI、XhoI 或 EcoRI 切割用于同上述的 κ 、 $\gamma 1$ 或 $\gamma 4$ 弹夹连接以形成表达载体, 能直接转染进哺乳动物中。

[0330] 实施例 5. 10D. 1 与 CTLA-4 结合

[0331] A. 10D1 与纯化的重组人 CTLA-4 结合

[0332] 10D1 与纯化的重组人 CTLA-4 结合由 ELISA 采用标准方法和程序显示出来(图 9 和图 10)。微量滴定板用纯化的 CTLA-4 包被, 与变化浓度的 10D1 温育, 然后用偶联了碱性磷酸酶的羊抗人 IgG F(ab')₂ 显色。数据表明了剂量依赖的 10D1 结合, 很好拟合于 4 参数曲线(相关系数为 -1.0)。在 15ng/ml 处的半数最大结合反映了 10D1 与 CTLA-4 高的结合能力。在约 0.1 μ g/ml 处观察到结合饱和。

[0333] B. 10D. 1 与表达在 T 细胞质膜上的 CTLA-4 结合

[0334] 为了表明 10D1 与表达在 T 细胞质膜上的 CTLA-4 结合, 来自流式细胞仪分析的结果显示在图 10 中。流式细胞仪分析用于表达高水平的人 CTLA-4 (指定为 58 α β CTLA-4/CD3 ζ 细胞) 转染的 T 细胞系。变化浓度的荧光素化的 10D1 (10D1-FITC) 与 58 α β CTLA-4 细胞温育。细胞相关的荧光由流式细胞仪测定。如用纯化的 CTLA-4 所见, 10D1 以剂量依赖方式与 CTLA-4 表达性细胞结合, 很好适合于 4 参数方程(相关系数为 -.999)。半数最大结合为 190ng/ml, 在 2 μ g/ml 处达到饱和。10D1 不与测试的任何 CTLA-4 阴性细胞系结合, 包括 SKBR-3、BT474 和 MCF10A 乳房上皮肿瘤和 L540 Hodgkin 肿瘤细胞, 也不与表达鼠 CTLA-4 的细胞结合。这些数据表示 10D1 对人 CTLA 的特异性。但是, 10D1 表现为与猕猴 CTLA-4 的交叉反应(下见)。

[0335] C. 10D1 与正常人组织的交叉反应性

[0336] 在本研究中, 测试物品(10D1-FITC)的荧光素化形式用于评估结合。研究的目标是评估 10D1-FITC 与正常人组织的冷冻切片潜在的交叉反应性。没有观察到不期待的交叉反应性。

[0337] 研究依据食品和药品管理局(FDA)的 Good Laboratory Practice (GLP) 规则(21 CFR 第 58 部分) 进行。人组织系列包括在“用于交叉反应性的免疫组织化学研究待使用的人类组织建议单”上面的所有组织, 该建议单列在 EC CPMP 方针 III/5271/94 “单克隆抗体的生产和量控制”的附件 II 中, 以及包括所有在 1997US FDA/CBER “在为人所用单克隆抗体产物的制造和测试中考虑的几点”中建议的组织。

[0338] 采用间接的免疫过氧化物酶方法, 10D1-FITC 特异性地染色阳性对照, 人 CTLA-4 表达性 58 α β CTLA-4/CD3 ζ 细胞以及在人扁桃腺中的阳性对照淋巴细胞。10D1-FITC 反应性是中等到强烈的, 两个抗体浓度被测定(10 μ g/ml 和 2.5 μ g/ml)。在阳性对照 58 α β CTLA-4/CD3 ζ 和阳性对照人扁桃腺的淋巴细胞中, 10D1-FITC 特异性地染色在细胞膜上和细胞膜紧下方的细胞质中的不连续的、圆的颗粒。用偶然的滤泡、滤泡间和上皮淋巴细胞观察反应性。所有扁桃腺的淋巴细胞中少于 1-2% 是与 10D1-FITC 反应的。

[0339] 10D1-FITC 不与阴性对照人脑(小脑)反应。同型 Ig 匹配的阴性对照抗体(Hu1gG1-k-FITC)既不特异性地与阳性对照人 CTLA4- 表达性 58 α β CTLA-4/CD3 ζ 或人扁桃腺结合; 也不特异性地与阴性对照人脑(小脑)结合。

[0340] 为测定交叉反应性, 10D1-FITC 以两个浓度(10 μ g/ml 和 2.5 μ g/ml) 应用到一系

列正常人组织。观察对扁桃腺中淋巴细胞(3/3 供体)、结肠中粘膜下层淋巴结(胃肠道 - 结肠 [1/3 供体])和血液污点(2/3 供体)特异性的 10D1-FITC 反应性。

[0341] 在典型形态学(圆的分子细胞带有大核:细胞质比率和缺乏的细胞质,缺乏树突加工,直径 10-15 μm)和组织内位置(如淋巴组织内通常的位置)基础上,免疫反应性细胞被鉴定为淋巴细胞。在来自所有 3 个供体(测试组织)的扁桃腺中,淋巴细胞,10D1-FITC 特异性地染色在细胞膜上和细胞膜紧下方的细胞质中的不连续的、圆的颗粒。用偶然的滤泡、滤泡间和上皮淋巴细胞观察反应性。所有扁桃腺的淋巴细胞中少于 1-2% 的细胞是与 10D1-FITC 反应的。

[0342] 在检查的 1/3 供体中,10D1-FITC 特异性地在偶然的滤泡、滤泡间淋巴细胞中染色不连续颗粒,该淋巴细胞位于结肠中粘膜下层淋巴结(胃肠道 - 结肠 [大肠])。再次,染色不连续的细胞膜颗粒。

[0343] 在来自 3 个检查的供体中 2 个的外周血液污点中,10D1-FITC 特异性地染色不连续、直径约 1 μm 的颗粒,这些颗粒与稀少的淋巴细胞的细胞膜联合。颗粒以环状或曲线模式排列。所有外周血液白细胞中少于 1-2% 是与 10D1-FITC 反应的。

[0344] 表 4. MAbs 10D1 与正常人组织的交叉反应性

[0345]

	测试项 10D1-FITC		阴性对照 抗体 HulG1-k-FITC			
组织	10 $\mu\text{g/ml}$	2.5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	2.5 $\mu\text{g/ml}$	分析 对照*	β_2 -微 球蛋白
阳性对照 58 α β CTLA-4CD3 ζ 细胞	3-4+	2-4+	阴性	阴性	阴性	阳性
人扁桃腺中阳性对照淋巴细胞	2-3+	2-3+	阴性	阴性	阴性	阳性
阴性对照人脑-小脑	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
肾上腺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性

[0346]

血液	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
嗜中性粒细胞	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
淋巴细胞	2+(稀少)	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
嗜酸性粒细胞	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
单核细胞	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
血小板	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
血管(内皮)所有组织中测定	在单个组织下详述					
骨髓	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
脑-小脑	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
脑-小脑(皮层)	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
乳房(乳腺)	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
眼	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
胃肠道-结肠(大肠)黏膜下层淋巴节结(偶尔滤泡和滤泡间淋巴细胞)	2-3+	2-3+	阴性	阴性	阴性	阳性
胃肠道-结肠(大肠)其他要素	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
胃肠道-食道	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
胃肠道-小肠	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
胃肠道-胃	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
	测试项 10D1-FITC		阴性对照 抗体 HulG1-k-FITC			
组织	10 μ g/ml	2.5 μ g/ml	10 μ g/ml	2.5 μ g/ml	分析对照*	β_2 -微球蛋白
心脏	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
肾(肾小球, 小管)	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
肝脏	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
肺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
淋巴结	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
卵巢	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
输卵管(产卵管)	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
胰腺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
副甲状腺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
外周神经	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
垂体	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
胎盘	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
前列腺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
唾液腺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
皮肤	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
脊髓	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
脾脏	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
横纹(骨骼)肌	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
睾丸	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性

[0347]	胸腺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
	甲状腺	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
	扁桃腺淋巴细胞（滤泡、滤泡间和上皮下淋巴细胞）	2+	1-2+	阴性	阴性	阴性	阳性
	扁桃腺其他要素	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
	输尿管	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
	膀胱	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
	子宫-体（子宫内膜）	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
	子宫-子宫颈	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性
*省略测试抗体							

[0348] D. 10D. 1 与猕猴 CTLA-4 特异的反应性

[0349] 使用被转染的 T 细胞来高水平表达猕猴 CTLA-4，利用其证明与猕猴 CTLA-4 特异的反应性(表 5)。这些数据显示对 10D1 的 CTLA-4 表位在猕猴和人间是保守的，因此猕猴是体内评价抗 CTLA4 HuMAb10D1 安全性的好模型。

[0350] 表 5

[0351]	物种	同型 Ig 对照的反应性 (MFI)	10D1 的反应性 (MFI)
	人 CTLA4	3	662
	猕猴 CTLA4	4	606
	鼠 CTLA4（阴性对照）	5	5

[0352] MAb 10D1 (10 μg/ml) 与表达来自各物种的重组 CTLA-4 的细胞系温育，并由 FITC- 抗人 IgG 检测。细胞相关的荧光由 FACScan 测定并报道为平均荧光强度(MFI)。这些数据显示 MAb 10D1 与猕猴和人 CTLA-4 反应良好，但不与鼠 CTLA-4 反应。

[0353] 实施例 6. 10D1 阻断 CTLA-4 与 B7 配体的结合

[0354] 为了显示 10D1 与 CTLA-4 结合阻断了 CTLA-4 与 CTLA-4 配体 B7. 1 和 B7. 2 的相互作用，竞争分析由流式细胞仪进行(图 11 和图 12)。如图 11 所示，FITC 标记的人 B7. 2-Ig 融合蛋白与 58 α β CTLA-4T 细胞和多种浓度的 10D1 MAbs 温育。在图 12 中，FITC 标记的 CTLA4-Ig 融合蛋白与鼠 B7. 1 转染的细胞和多种浓度的 10D1 MAbs 温育。

[0355] 竞争分析表明了 10D1 在低浓度(1-10 μg/ml) 时有效抑制 CTLA4-B7 相互作用的能力。有效浓度将可能在生理条件下更低，这将有较低浓度的 CTLA-4 和 B7 分子。相似数据由 ELISA 分析中采用生物素酰化试剂获得。

[0356] 这些体外研究表明 MAb 10D1 以高亲和性和特异性结合人 CTLA-4 以及表明 10D1 的结合废除了 B7 共刺激分子和 CTLA-4 间的相互作用。这些对 10D1 的数据与对抗鼠 CTLA-4 抗体的体外活性轮廓是一致的，已经表明在鼠肿瘤模型中的功效。

[0357] 实施例 6. 10D. 1 的表位图谱

[0358] 竞争性 ELISA 方法采用生物素标记和未标记抗体以检测 CTLA-4 表位的特异性。人抗体中鉴定出 4 个抗 CTLA-4 表位结合组，其他两个表位定义为商品化的鼠单克隆抗体 BNI3 (Pharmingen, San Diego, Ca)，和 8H5(Ancell Corp. Bayport, Mn)。图 3 和 13A-13G 显示了竞争性结合分析的结果，表明了用于和 CTLA-4 结合的抗体中差别竞争。这些结果总结在表 6 中。

[0359] 在抗 CTLA-4 表位结合组 4a 和 4b 中的抗体具有相似的结合特征, 又是强的 CTLA-4-Ig 与细胞表面表达 B7.1 结合的阻断剂(表 6)。例如, 图 3 显示了用生物素标记的 11E8 抗体和 10 个未标记抗体(3A4, 9A5, 2E2, 2E7, 4B6, 4E10, 5C4, 5G1, 11E8 和 11G1) 的结果。抗体 11E8 结合由自身和表位组 4a 和 4b 中的 7 个其他人抗体阻断。然而, 11E8 的结合不由抗体 3A4 或 9A5(表位组 1 和 2)阻断。交互结合实验表明 11E8 结合不阻断 9A5 或 3A4 与 CTLA-4 的结合(图 13A 和图 13B)。对表位组 4a 抗体 10D1 和鼠抗体 147 显示了相似的结果(图 13D 和 13F)。表位组 4b 中的抗体(图 13E)与组 4a 抗体相似, 除了表位 4b 抗体在交互结合实验中与表位组 2 抗体竞争(图 13B)。属于表位组 3、4a 和 4b 的人抗体是 CTLA-4/B7.1 结合的有效阻断剂(图 3 和表 6)。

[0360] 表 5. CTLA-4MAB :表位和 CTLA-4/B7.1 阻断特性

表位	单克隆抗体	对 CTLA-4 结合的竞争	阻断 CTLA-4-Ig 与在 Ltk mB7.1 上的 B7.1 结合
1	9A5	来自组 3、4a、4b、5 和 6 无竞争 来自组 2 弱竞争	否
2	3A4 1E2	来自组 1、4b、5 和 6 的一种方式竞争 与 4a 无竞争 来自组 3 弱竞争	否
3	5A8	与 4a 和 4b 竞争。和 2 有一些竞争。 来自 1 和 5 无竞争	是
4a	10D1 147* 11E8 11G1 4E10 5C4 3F10	与 4b 的所有成员交叉竞争。 来自 6 竞争(非交互) 与 1、2 和 5 无竞争。 和 3 弱竞争。	是
4b	4B6 4A1 2E2 2E7 2G1	与 4a 所有成员交叉竞争 和 2 竞争 与 3 弱竞争。 与 1 和 5 无竞争。 来自 6 竞争(非交互)	是
5	BNI3**	与 6 竞争, 与组 1 到 4 无竞争	是
6	8H5***	与 5 竞争, 与组 1 到 4 无竞争 和组 3 的竞争未测试	是

[0362] *鼠单克隆抗体

[0363] **购自 Pharmingen, BNI3 Cat#34580D, San Diego CA.

[0364] ***购自 Ancell, ANC 152.2/8H5 Cat#359-020, Ancell Corp.

[0365] Bayport, Mn.

[0366] 实施例 7. 10D1 与人活化 T 细胞结合

[0367] 10D1 抗体与由正常人 T 细胞表达的 CTLA-4 结合的能力由流式细胞仪分析休眠和活化的 T 细胞进行研究(图 14)。新鲜分离的人外周血单核细胞以 2×10^6 个 /ml 在存在或缺少 $2 \mu\text{g/ml}$ T 细胞的促细胞分裂剂, 植物凝集素(PHA)下温育。温育 4 天后, 洗涤细胞并用下列抗体染色: 1) 无抗体; 2) HuIgG1-FITC, 人 IgG1 抗 EGF 受体抗体; 3) 10D1-FITC, 人 IgG1 抗 CTLA-4 抗体; 4) 147-FITC- 小鼠抗人 CTLA-4 抗体。温育 1 小时后, 洗涤细胞, 并用

兔抗 FITC IgG 接着用羊抗兔 PE 染色。在淋巴细胞上进行分析,通过正向对侧面扩散来门控(gated by forward versus side scatter)。如图 14 显示,休眠的淋巴细胞不结合 10D1 抗体,而 PHA 活化的 T 细胞在细胞表面表达低水平的 CTLA-4。

[0368] 实施例 8. 10D1 不介导补体依赖或抗体依赖的活化 T 细胞的溶解

[0369] MAbs 10D1 介导 CTLA-4 表达细胞的补体依赖细胞毒性(CDCC)或抗体依赖细胞毒性(ADCC)的能力进行了研究。

[0370] 对 CDCC 实验,为了给 CDCC 提供最佳条件,兔血清用作补体来源。兔补体已经显示在用人 IgG₁介导 CDCC 中比人补体更有效(Jurianz, Maslak 等,1999)。PHA 刺激的 T 细胞用 ⁵¹Cr 标记并与各种浓度的抗 CTLA-4 MAbs 10D1 或抗 CD3 MAbs、用或不用兔血清作补体来源温育。温育 1 小时后,由死亡细胞释放的 ⁵¹Cr 采用 γ 计数器测定。与 2%SDS 温育的靶细胞当作 100% 溶解对照。抗 CTLA-4MAbs 10D1 不介导活化 T 细胞的 CDCC (图 15)。在相同条件下,鼠 IgG2_a抗 CD3 MAbs 导致显著的 CDCC。鼠 IgG2_a和人 IgG₁两者皆有效活化兔补体;因此这些差别最可能反映了与活化 T 细胞上的 CD3 比较时,CTLA-4 的表达极大地降低了。

[0371] 相似地,采用自体的单核细胞作效应细胞没有观察到对 MAbs 10D1 的 ADCC 活性(图 16)。PHA 刺激的 T 细胞用 ⁵¹Cr 标记并与各种浓度的抗 CTLA-4MAbs 10D1 或抗 CD3 MAbs 和新鲜自身单核细胞温育。效应细胞和靶细胞比率为 100:1。温育 4 小时后,由死亡细胞释放的 ⁵¹Cr 采用 γ 计数器测定。与 2%SDS 温育的靶细胞当作 100% 溶解对照。尽管抗 CD3MAbs 是鼠 IgG2_a,其能与入效应细胞介导有效的 ADCC,只观察到低水平的 ADCC。这些数据与在靶细胞表面上对有效的 ADCC 要求高水平表达抗原一致。由于 MAbs 10D1 是人 IgG₁,同型 Ig 一般能介导 CDCC 和 ADCC,这些活性的缺乏可能是由于活化 T 细胞上 CTLA-4 表达很低。此外,在灵长类动物毒理学研究中活化 T 细胞数增加(见下),该观察结果与由 MAbs 10D1 体内活化的 T 细胞缺乏 ADCC 和 CDCC 活性一致。

[0372] 实施例 9. 10D1 在猕猴中的临床前毒性研究

[0373] 进行 10D1 抗体和恒河猴两个独立的毒理学研究。共分析 8 只猴子。4 只猴子(两雄两雌)耐受 3 个静脉浓注剂量的 3mg/kg 人抗 CTLA-4,和 4 只猴子(两雄两雌)耐受 3 个静脉浓注剂量的 10mg/kg 人抗 CTLA-4,没有显著的临床、免疫毒理学或组织病理学的发现。

[0374] A. 10D1 灵长类动物毒理学研究(3.0mg/kg)

[0375] 为了研究 10D1 体内效果,用两只恒河猴进行灵长类动物毒理学研究。在 MAbs 10D1 多剂量毒性研究中,该抗体通过静脉注射恒河猴给药。本研究的目的是测定 MAbs 10D1 在两个猴子中的耐受性,所给定的剂量和时间表与鼠肿瘤消退模型中的有效治疗和人临床研究中建议的剂量一致。两只雌性猕猴(Macaca fascicularis)用三个静脉浓注剂量 3.0mg/kg 的 10D1 在第 1 天、第 4 天和第 7 天治疗以便评价这些动物中的安全性和 T 细胞活化。观察动物任何副反应,体重降低/增加、发病率和致死率,直到施用第 1 次剂量后 14 天。最后一次剂量后 7 天,处死动物,单个解剖检查它们的器官。每次给药和解剖前收集血样,采用流式细胞仪检查 T 细胞种群和活化标记物的表达。从血样中也收集血浆,采用 ELISA 法测定 10D1 抗体水平和抗 10D1 抗体应答。

[0376] 动物耐受 3 个剂量的抗体 10D1,在治疗过程中没有任何临床症状。这些动物的体重也没有显著变化。对每个动物解剖时所检查的 47 个器官/组织没有记录明显发现。

[0377] 组织病理学的研究在 Redfield 实验室(Redfield, AR)进行。这些研究结果显示

在检查的任何器官和组织中多剂量的 MA b 10D1 不产生急性毒性。

[0378] 药物代谢动力学分析揭示在两个猴子的血浆中存在显著水平的 10D1 MA b (最高达 97.3 $\mu\text{g/ml}$) (参见表 7)。血浆中 10D1 水平采用流式细胞仪和 58 α β CTLA-4T 细胞由与 FITC-10D1 竞争分析测定。

[0379] 表 7. 10D1 血浆水平

[0380]

时间点	猴 #1	猴 #2
第一次服药前	0.0 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)	0.0 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)
第 4 天, 第二次服药前	17.4 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)	43.6 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)
第 7 天, 第三次服药前	83.6 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)	97.3 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)
第 14 天	90.2 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)	70.9 ($\mu\text{g/ml}$ 血浆)

[0381] 评价抗 10D1 抗体应答由 ELISA 进行。在研究过程中任何动物都未观察到显著的抗 10D1 应答(图 17)。微量滴定板用 10D1 MA b (对 IgM 分析)或 10D1F (ab')₂ (对 IgG 分析)包被。来自各种时间点的血浆样品稀释液与板温育,抗 10D1 抗体用抗 IgM 或 IgG Fc 特异性的碱性磷酸酶试剂检测。IgM 抗 10D1 抗体到第 14 天时显象,但效价很低。这些数据表明猴子服用 3 次抗体后没有产生抗 10D1 抗体应答。

[0382] 这些数据表明动物在研究过程中没有出现显著的抗 MA b 10D1 的抗体应答。

[0383] 免疫毒物学研究在研究过程中采用流式细胞仪分析淋巴细胞种群。检查的淋巴细胞亚组包括 CD3 作为总 T 细胞标记和 CD20 作为总 B 细胞标记。T 细胞进一步细分为表达 CD4 (辅助 T 细胞标记)和 CD8 (细胞毒性 T 细胞标记),以及细分为活化标记 CD25、CD29、CD69 和 HLA-DR。在 T 细胞种群或表达活化标记中未注意到明显的变化。结果归纳在下列表 8 中。

[0384] 表 8. 流式细胞仪分析淋巴细胞种群

时间点	猴#1	猴#2
第一次剂量前	%CD3=61, %CD20=16 %CD4=43, %CD8=50 %CD25≤1, %CD29=41 %CD69≤1, %HLA-DR=4	%CD3=54, %CD20=22 %CD4=59, %CD8=36 %CD25≤1, %CD29=29 %CD69≤1, %HLA-DR=1
第 4 天, 第二次剂量前	%CD3=58, %CD20=13 %CD4=38, %CD8=52 %CD25≤1, %CD29=52 %CD69≤1, %HLA-DR=2	%CD3=56, %CD20=16 %CD4=62, %CD8=37 %CD25≤1, %CD29=36 %CD69≤1, %HLA-DR≤1
第 7 天, 第三次剂量前	%CD3=59, %CD20=15 %CD4=47, %CD8=59 %CD25=2, %CD29=44 %CD69=1, %HLA-DR=4	%CD3=51, %CD20=17 %CD4=51, %CD8=39 %CD25=1, %CD29=39 %CD69=1, %HLA-DR=2
第 14 天	%CD3=64, %CD20=14 %CD4=49, %CD8=44 %CD25=1, %CD29=44 %CD69≤1, %HLA-DR=15	%CD3=59, %CD20=20 %CD4=60, %CD8=35 %CD25≤1, %CD29=34 %CD69≤1, %HLA-DR=1

[0386] 肝素化血样使用 FITC 或 PE 标记的抗淋巴细胞试剂由流式细胞仪在新鲜时分析。%CD3 和 %CD20 是基于淋巴细胞门。其他 T 细胞标记和活化标记都是以 CD3 阳性细胞为基础的。这些数据显示多剂量的 Mab 10D1 对 B 和 T 细胞种群或 T 细胞活化标记不会具有显著的作用。

[0387] B. 10D1 灵长类动物毒理学研究 (3.0 和 10.0mg/kg)

[0388] 6 只实验上非首次用于实验的猕猴 (4 雄和 2 雌), 在研究开端体重为 2.4 到 3.8kg, 被分配到如下表 9 所显示的治疗组中。

[0389] 表 9

组号	雄性/雌性数目	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (ml/kg)	剂量溶液浓度 (mg/ml)
1	2/0	3	0.6	5.0
2	2/2	10	2.0	5.0

[0391] 每个动物一周每 3 天 (即第 1、4 和 7 天) 通过静脉注射 (即“缓慢推进”浓注) 接受一定剂量的人抗 CTLA4 (浓度为 5mg/ml)。每天至少两次进行详细的临床观察 (“笼边 (cageside) 观察”), 所有动物在研究前和第 21 天进行彻底的体检。每周测定体重 (研究前和第 7 和 14 天), 在研究前和第 12 天对所有动物进行检眼镜检查。在研究前和第 14 天, 从所有动物中收集血样用于评价血清化学、血液学和凝结参数。在每一服药天 (第 1、4 和 7 天) 服药前收集其他样品用于选择的血液学参数 (只有总白细胞和分化白细胞)。在服药前和第 13 天, 从专门设计的笼盘 (cage-pan) 中的排泄物获得尿样用于标准尿分析。每次服药 (第 1、4 和 7 天) 和终止 (第 14 天) 前收集血样用于由 Medarex 进行的多种分析。这些包括测试物品浓度的分析 (药代动力学)、抗测试物品的抗体的存在测定以及流式细胞仪分析。所有动物在第 14 天安乐死, 这时进行完整的总解剖, 称重主要器官, 从每个动物中收集标准完

整的一套组织并加工用于光显微镜检查。

[0392] 以 3mg/kg 和 10mg/kg 剂量水平,按每 3 天施用 1 剂共 3 剂静脉施用人抗 CTLA-4,猕猴很好耐受。从笼边观察和体检中没有毒性临床症状,也没有对体重、视力检查发现、临床病理学参数、总解剖发现、器官重量和组织组织形态学作用。

[0393] 分析血清样品中测试物品浓度的结果(即在第 4 和 7 天服药和第 14 天解剖前获得样品,测定样品中的波谷水平)显示剂量依赖地暴露于测试物品。在第 7 天,服药前平均浓度对 3 和 10mg/kg 剂量组分别约为 84 和 240 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0394] 采用每 3 天服药时间表,从第 4 天和第 7 天波谷水平间的差别中可看出在猴子血清中测试物品的积累潜力是显然的(即第 7 天的平均浓度大约是第 4 天的 2 倍),以及从第 14 天(最后一次服药后一周)高的残基水平,其与第 7 天的波谷水平相似,也可看出。抗测试物品的抗体形成的证据在 6 只研究动物中的 2 只检测出(1 只来自组 1 和另一只来自组 2)。在前者情况下,似乎抗体应答也许影响测试物品从循环中清除。淋巴细胞亚组的流式细胞仪分析揭示了第 1 和第 14 天总 CD3 阳性细胞中等程度的增加,这与 CD3/CD4 阳性细胞增加相关联,以及揭示了分别减少 CD3/CD8 阳性细胞(只有组 2)。在研究过程中表达 CD29 和 HLA-DR 的 CD3 细胞的百分比中等程度地增加,这与早先的发现(抗 CTLA4 抗体能增强抗原特异性 T 细胞)一致。

[0395] 总之,除了循环淋巴细胞亚群中的较小变化以外,本研究中所测试的最高剂量水平(即间隔 3 天给予 3 个剂量的 10mg/kg)是猕猴中绝对的无效剂量水平。

[0396] 实施例 10. 前列腺癌(MDXCTLA4-01)和黑素瘤(MDXCTLA4-02)中 MAb 10D1 的第 1 阶段人临床试验

[0397] MDXCTLA4-01 是进行性、转移性、激素难治的前列腺癌患者中抗细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4(抗 CTLA-4)单克隆抗体 10D1(MAb10D1)的开放标记研究。治疗是单一剂量的 MAb 10D1,以输液方式及剂量为 3.0mg/kg 静脉给药。

[0398] 本实验的目的是测定 i. 施用 MAb 10D1 是否引起非特异性 T 细胞活化,ii. 在这些患者中建立对 MAb 10D1 安全性/耐受性分布图,和 iii. 测定 MAb 10D1 的药代动力学分布图以及评估对 MAb 10D1 的宿主免疫应答的发展。此外,研究将试图鉴定初步的功效证据。本研究是在 14 个被试者中单一剂量的 MAb 10D1 的多中心、开放标记研究。本研究由四阶段组成:筛选、灌输、灌输后和随访(参见下列表 10)。

[0399] 表 10

[0400]	阶段	筛 选	灌输	灌输后											随访
	时间	第 14 到 0 天	第 30 到 130 分钟	第 145 分 钟	第 160 分 钟	第 190 分 钟	第 250 分 钟	第 370 分 钟	第 24 小 时	第 48 小 时	第 72 小 时	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天

[0401] 在剥夺男性荷尔蒙和至少一种系统性的非激素操作后组织学诊断带有前列腺初级腺癌的和进行性转移性前列腺癌的患者正被筛选为参与本研究。被试者必须有进行性可测定的疾病,进行性 PSA, PSA>5ng/ml,睾丸激素 <50ng/dl,初级性腺男性荷尔蒙抑制,预期

寿命 >12 周,和卡夫诺夫斯基行为状态 $\geq 60\%$ 。

[0402] 被试者经历体检, ECG, 胸部 X 光透视, 诊断成像和血取样用于血液学, 生化和免疫功能评估, 并有至关重要的受监控的病征。每月的电话见面用作收集和记载不良事件亚组的信息, 包括疾病进展后的自身免疫不良事件, 直到治疗后 6 个月。PSA (下降, 下降持续时间, 进展, 进展时间) 和疾病应答 (完全的, 部分的, 稳定的, 进行性的) 受到监控。紧临灌注前, 在灌注过程中, 和灌注后最长达 2 个月评估 MAb 10D1 的血浆浓度。

[0403] 经治疗的四个前列腺癌被试者的数据显示在表 11 中。无不良事件记载。对治疗的所有被试者, MAb 10D1 看来良好耐受。

[0404] 由于试验中监控患者免疫状态的重要性的和由抗 CTLA-4 抗体监控对 T 细胞活化的全面化作用的特殊目标, 本研究的进入标准包括最低水平的 CD4 和 CD8 分别为 T 细胞 $\geq 500/\text{ml}$ 和 $\geq 500/\text{ml}$ 。然而, 在本研究中初始自然增长观察到前列腺癌患者已显著降低了 T 细胞数, 虽然 CD4 和 CD8 T 细胞清楚存在。基于上面进入标准许多患者开始就被拒绝 (参见表 11)。观察的明显降低的 T 细胞计数是前列腺癌患者中以前未被记录的观察, 这些患者可与治疗有相关性, 治疗涉及这些患者中的癌症免疫接种。在这些观察之后, 进入标准修正为包括 CD4 和 CD8 分别计数 $\geq 300/\text{ml}$ 和 $\geq 200/\text{ml}$ 的患者。

[0405] 为了评价施用 MAb 10D1 是否能诱导不合需要的非特异性 T 细胞活化, 来自前列腺癌被试者的外周血淋巴细胞由流式细胞仪分析下列每一个标记: CD4, CD8, CD25, CD44, CD69 和 HLA-DR。血样在表 10 中所显示的时间点取出。在治疗过程中, 对至今所治疗的每一个前列腺癌被试者未观察到显著的任何这些标记的频率变化。本分析的一个实例显示在表 12 中, 这表明了两个被试者中在 MAb 10D1 施用前、施用过程中和施用后的时间点上 CD4, CD25, CD69 阳性细胞和 CD8, CD25, CD69 阳性细胞的出现频率。这些数据显示了 MAb 10D1 不导致非特异性 T 细胞活化。

[0406] 表 12. 在用 3.0mg/kg MAb 10D1 处理的前列腺癌被试者中用流式细胞仪分析 T 细胞活化标记

患者编号	时间点	CD (4+25+69) %	CD (8+25+69) %
3	筛选	1.7	0.8
3	-30 分钟 (灌输前)	2.6	0.8
3	40 分钟	2.5	0.7
3	130 分钟	1.9	0.9
3	145 分钟	1.7	0.5
3	160 分钟	1.7	1
3	190 分钟	1.5	1.5
3	250 分钟	2.1	1.2
3	370 分钟	1.3	0.9
3	24 小时	1.6	1.6
3	48 小时	2.7	3
3	72 小时	0.9	0.5
3	第 7 天	0.9	0.1
3	第 14 天	0.4	0.5
3	第 21 天	2.3	1.9
4	筛选	1.4	0.8
4	-30 分钟 (灌输前)	0.5	0.3
4	40 分钟	0.3	0.1
4	130 分钟	0.3	0.1
4	145 分钟	0.4	0.2
4	160 分钟	0.2	0.2
4	190 分钟	0.8	0.3
4	250 分钟	0.1	0
4	370 分钟	0.3	0.1
4	24 小时	0.2	0.3
4	48 小时	0.4	0.6
4	72 小时	0.8	0.3
4	第 7 天	1	0.7
4	第 14 天	1.1	0.8

[0408] 在患有第 4 阶段恶性黑素瘤的被试者中采用 MAb 10D1 的第 2 个临床试验 (MDXCTLA4-02) 也已经起始。单一剂量的 MAb 10D1 作为灌输物以剂量为 3.0mg/kg 静脉施用。本研究也由四阶段组成(筛选,灌输,灌输后和随访)如在上面表 9 所描述。

[0409] 本研究的目的是如在前列腺癌中有关上述的研究的那些目的以及在患有第 4 阶段恶性黑素瘤的患者中对 MAb 10D1 特异性地建立了安全性 / 耐受性分布图。一个患者已经在本研究中接受治疗(参见表 13)。如在前列腺癌研究中一样,MAb 10D1 表现出良好的耐受性。在该被试者中流式细胞仪分析 T 细胞活化标记,同对前列腺肿瘤试验操作相类似,也

没有现出非特异性 T 细胞活化的证据。

[0410]

研究号MDXCTLA4-01																					
筛选的实验值归纳																					
筛选号	被试者号	原始体	修正#	天	日期	PSA ng/ml	血小板 x10 ³ /ul	巨细胞 %	嗜中性粒细胞 x10 ³ /ul	淋巴细胞 %	单核细胞 x10 ³ /ul	嗜酸性粒细胞 %	嗜中性粒细胞 x10 ³ /ul	嗜酸性粒细胞 %	嗜中性粒细胞 x10 ³ /ul	CD4 /ul	CD8 /ul	ESR mm/hr	Hgb g/dl	Hct %	
02001	001	JGR		筛选		144.80	263	8.12	73.00	5.90	18.00	1.47	5.60	0.46	1.80	0.15	670	367	71	10.4	30
02001	001	JGR		0		185.20	267	5.74	66.00	3.79	22.00	1.32	6.60	0.38	3.10	0.18	704	376		10.6	32
02001	001	JGR		1			259	6.31	69.00	4.38	20.00	1.29	8.70	0.55	0.90	0.00	A	A		9.5	30
02001	001	JGR		2			240	6.59	70.00	4.66	19.00	1.31	6.70	0.44	1.80	0.12	556	303		9.5	28
02001	001	JGR		3			270	6.53	71.00	4.63	21.00	1.36	5.50	0.36	2.20	0.14	608	254		9.3	28
02001	001	JGR		7		257.40	299	6.70	68.00	4.56	23.00	1.53	6.00	0.40	2.50	0.17	A	A		9.5	28
02001	001	JGR		14		332.30	308	6.87	71.90	7.94	21.20	1.39	5.21	0.36	1.90	0.13	A	A		8.8	25
02001	001	JGR		21			286	9.72	74.00	7.20	19.70	1.91	4.80	0.46	1.00	0.10	A	A		9.1	28
02001	001	JGR		28		351.00	304	5.38	63.00	3.40	26.00	1.44	5.80	0.31	2.90	0.16				8.7	25
01002		JWF		筛选		28.30	271	11.60	75.40	8.75	13.60	1.58	5.70	0.66	4.60	0.53	399	189	41	13.9	37
01003		MZB		筛选		12.70	178	5.49	69.00	3.79	19.60	1.08	6.30	0.35	2.70	0.24	325	168	19	12.7	36
01004		TEQ		筛选		1459.00	264	6.26	75.10	4.70	14.40	0.90	7.70	0.48	2.40	0.15	365	129	61	12.8	36
01005		WMN		筛选		192.40	212	6.85	73.70	5.05	17.40	1.20	6.20	0.43	2.20	0.15	483	217			
01006		MRS		筛选		4503.00	140	7.55	76.70	5.79	15.90	1.20	6.20	0.47	0.80	0.06	319	363	83		
01007		TAB		筛选		1394.00	205	5.78	73.00	4.24	13.00	0.76	6.50	0.37	6.00	0.35	376	127		14.1	43
01008		CHB		筛选		70.70	229	4.67	54.00	2.56	32.00	1.52	8.30	0.39	3.40	0.16	461	499		15.6	45
01009	003	RAB		筛选		238.60	144	3.70	78.00	2.88	14.00	0.55	5.40	0.20	1.20	0.04	211	162	43	9.8	30
01009	003	RAB		0		336.90	123	3.92	68.00	2.67	21.00	0.83	8.70	0.34	1.50	0.06	374	188		10.9	31
01009	003	RAB		1			122	3.35	71.00	2.38	22.00	0.74	4.00	0.14	1.80	0.06	307	192		11.3	32
01009	003	RAB		2			109	4.05	74.00	2.99	19.00	0.77	4.80	0.20	1.20	0.05	328	220		11.3	33
01009	003	RAB		3			114	3.79	70.00	2.67	21.00	0.81	6.20	0.23	1.30	0.05	313	265		10.9	31
01009	003	RAB		7		249.30	69	3.38	75.00	2.54	17.00	0.60	5.60	0.19	0.70	0.02	244	161		10.4	30
01009	003	RAB		14		269.80	101	3.68	69.00	2.54	21.20	0.78	8.50	0.31	1.00	0.04	308	173		8.8	25
01009	003	RAB		21			122	4.82	78.00	3.76	13.20	0.84	7.70	0.37	0.60	0.03	218	195		7.4	20
01012	004	CEH		筛选		112.90	172	5.85	64.00	3.74	28.00	1.69	5.60	0.33	1.00	0.06	746	451	10	13.2	40
01012	004	CEH		1													642	475			
01012	004	CEH		2			150	4.82	67.70	3.26	26.40	1.28	4.60	0.22	1.10	0.05	552	390		12.2	36
01012	004	CEH		3			147	4.36	63.70	2.78	29.30	1.28	5.10	0.22	1.30	0.06	544	441		13.1	37
01012	004	CEH		7		190.00	159	4.95	58.60	2.90	32.70	1.61	5.90	0.29	2.50	0.12	842	506		12.6	35
01012	004	CEH		14		207.60	199	5.64	63.10	3.55	29.30	1.65	5.70	0.32	1.60	0.09				13.5	38
01013		KJF		筛选		48.10	228	8.53	65.00	5.62	26.00	2.23	5.30	0.46	2.30	0.20	1213	398		13.4	37
02014	002	L-S		筛选		12.70	222	5.65	53.00	3.01	34.00	1.92	7.40	0.42	3.90	0.22	721	439		13.6	40
02014	002	L-S		0		27.50	217	5.88	57.00	3.36	32.00	1.88	8.60	0.50	1.50	0.09	676	389		13.5	38
02014	002	L-S		1			226	5.74	55.00	3.19	35.00	2.04	7.00	0.40	1.40	0.08	632	405		13.6	38
02014	002	L-S		2			223	5.59	55.00	3.09	32.00	1.84	9.80	0.55	1.40	0.08	590	339		13.5	39
02014	002	L-S		3			219	4.89	54.00	2.66	34.00	1.68	7.50	0.37	2.70	0.13	529	358		13.2	37
01016	不合格	G-F		筛选		4856.00	106	7.31	86.00	6.29	5.00	0.33	6.90	0.49	1.90	0.14	57.6	7		10.3	31
				正常范围				低													
						7.00		高													
							150		40.50	1.96	15.40	0.80	2.60	0.12							
							10.70		75.00	7.23	46.50	3.00	10.00	0.92	6.80	0.57					
							</														

表13

[0411]

研究号 MDXCTLA4-02																		
筛选的实验值归纳																		
筛选号	被试者号	原始体	修正#	天	日期	血小板 x10 ³ /ul	白细胞 x10 ³ /ul	%	中性粒细胞 x10 ³ /ul	淋巴细胞 %	单核细胞 x10 ³ /ul	%	嗜酸性粒细胞 x10 ³ /ul	CD4 /ul	CD8 /ul	ESR mm/hr	Hgb g/dl	Hct %
02001	001	SAH	0	筛选		216	6.28	56.60	3.52	35.60	2.23	5.90	0.37	1.80	631		14.4	39
02001	001	SAH	0	0		230	5.58	59.70	3.33	32.30	1.80	5.70	0.32	1.80	502		14.9	43
02001	001	SAH	0	1		202	5.12	61.80	3.16	30.20	1.55	5.00	0.26	2.30	407		13.4	37
			正常范围		低	150	3.80	40.50	1.96	15.40	0.80	2.60	0.12		220			
					高		10.70	75.00	7.23	48.50	3.00	10.10	0.92	6.80	1129	30		

表13

[0412] AGGAGAATGAATAAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTTCCTCAATTTAATAATTATT
ATCTGT

[0413] TGTTTACCAACTACTCAATTTCTCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATT
TATAAA

[0414] AATCATCCTTCATTCTATTTTACCCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCCTCCCTCAAACCCACAAGCCTT
CTGTCC

[0415] TCACAGTCCCCTGGGCCATGGATCCTCACATCCCAATCCGCGGCCGCAATTCTGTAATCATGGTCATAGC
TGTTTC

[0416] CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT
GGGGTG

[0417] CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGT
CGTGCC

[0418] AGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGC

[0419] pCG7-96 (SEQ ID NO :41)

[0420] GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTCTGGGGCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCT
AAGGTG

[0421] AGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGAACCTCGCG
GACAGT

[0422] TAAGAACCCAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACACCTC
TCTTGC

[0423] AGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC
GGCCCT

[0424] GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGT

[0425] GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC
CAGCAG

[0426] CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
TGGTGA

[0427] GAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCATCCCG
GCTATG

[0428] CAGCCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCCGTCTGCCTCTTACCCGGAGGCCTCTGCCCCCCCCAC
TCATGC

[0429] TCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCCTAACCCAG
GCCCTG

[0430] CACACAAAGGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCCTGACC
TAAGCC

[0431] CACCCCAAAGGCCAAACTCTCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCCTCCCAGATTCCAGTAACTC
CCAATC

[0432] TTCTCTCTGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGGTAAGCCAGCCC
AGGCCT

[0433] CGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGT
GCTGAC

[0434] ACGTCCACCTCCATCTCTTCCCTCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA

AAACCC

[0435] AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAG

[0436] GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAAC

[0437] AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG
TGCAAG

[0438] GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCGTGGG
GTGCGA

[0439] GGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTCGGCCCCACCTCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGT
CCCTAC

[0440] AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT
CAGCCT

[0441] GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAA

[0442] CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
CAAGAG

[0443] CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAG

[0444] CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGGCAAGCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGCGGTG
CACGAG

[0445] GATGCTTGGCACGTACCCCTGTACATACTTCCCGGGCGCCCAGCATGGAAATAAAGCACCCAGCGCTG
CCCTGG

[0446] GCCCCGCGAGACTGTGATGGTTCTTCCACGGGTCAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGGCATGAGGGA
GGCAGA

[0447] GCGGGTCCCACTGTCCCCACACTGGCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCCCCTAGGGTGGGGCTCA
GCCAGG

[0448] GGCTGCCCTCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCACCTGCCCTGGGCTGG
GCCACG

[0449] GGAAGCCCTAGGAGCCCCCTGGGGACAGACACAGCCCCCTGCCTCTGTAGGAGACTGTCTGTTCTGTG
AGCGCC

[0450] CCTGTCTCCCGACCTCCATGCCCACTCGGGGGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTA
CCGAGC

[0451] TCGAATTCATCGATGATATCAGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTGATAAGCCAG
GTTAAC

[0452] CTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCG
CTCACT

[0453] GACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA
TCCACA

[0454] GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAG
GCCGCG

[0455] TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGG
TGGCGA

[0456] AACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCG
ACCTG

[0457] CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGT
AGGTAT

[0458] CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGC
TGCGCC

[0459] TTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACT
GGTAAC

[0460] AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGA

[0461] AGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGA
TCCGGC

[0462] AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGA
TCTCAA

[0463] GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTG
GTCATG

[0464] AGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGT
ATATAT

[0465] GAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTT
CGTTCA

[0466] TCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGT
GCTGCA

[0467] ATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGAAGGGCC
GAGCGC

[0468] AGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGT
AGTTTCG

[0469] CCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGT
ATGGCT

[0470] TCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
AGCTCC

[0471] TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTG
CATAAT

[0472] TCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
GAATAG

[0473] TGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACT

TTAAAA

[0474] GTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT
TCGATG

[0475] TAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAA
ACAGGA

[0476] AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTT
CAATAT

[0477] TATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAA
CAAATA

[0478] GGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTA
ACCTAT

[0479] AAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACAC
ATGCAG

[0480] CTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCA
GCGGGT

[0481] GTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATG
GACATA

[0482] TTGTGCTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATAACACATACGATTTAGGTGACAC
TATA

[0483] pG4HE (SEQ ID NO :42)

[0484] GAACTCGAGCAGCTGAAGCTTCTGGGGCAGGCCGGGCCTGACTTTGGCTGGGGGCAGGGAGGGGGCTA
AGGTGA

[0485] CGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACCCTGCATGGACCAT
CGCGGA

[0486] TAGACAAGAACCGAGGGGCCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTCCCACACCGCGGTACATGGCACCA
CCTCTC

[0487] TTGCAGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA
CAGCCG

[0488] CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGA
CCAGCG

[0489] GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC
CCTCCA

[0490] GCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA
GAGTTG

[0491] GTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCAC
CCCGGC

[0492] TGTGCAGCCCCAGCCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCCATCTGTCTCCTCACCCGGAGGCCTCTGACCACC
CCACTC

[0493] ATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACCAGGCTCCGGGCAGCCACAGGCTGGATGCCCCTAC

CCCAGG

[0494] CCCTGCGCATACAGGGGCAGGTGCTGCGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCTGCCCC
TGACCT

[0495] AAGCCCACCCCAAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGCTCAGACACCTTCTCTCCTCCCAGATCTGAGT
AACTCC

[0496] CAATCTTCTCTCTGCAGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCATCATGCCCAGGTAAGCCAACCCAGGC
CTCGCC

[0497] CTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTG
ACGCAT

[0498] CCACCTCCATCTCTTCTCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCACCCCAAAAC
CCAAGG

[0499] ACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCG
AGGTCC

[0500] AGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCA
ACAGCA

[0501] CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCT

[0502] CCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACCCACGGGGTGC
GAGGGC

[0503] CACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCCCACCTCTGCCCTGGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCT
ACAGGG

[0504] CAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGC
CTGACC

[0505] TGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC
AACTAC

[0506] AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG
AGCAGG

[0507] TGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG
AGCCTC

[0508] TCCCTGTCTCTGGGTAAATGAGTGCCAGGGCCGGCAAGCCCCCGCTCCCCGGGCTCTCGGGGTGCGCGG
AGGATG

[0509] CTTGGCACGTACCCCGTCTACATACTTCCCAGGCACCCAGCATGGAAATAAAGCACCCACCACTGCCCT
GGGCCC

[0510] CTGTGAGACTGTGATGGTTCTTTCCACGGGTGAGGCCGAGTCTGAGGCCTGAGTGACATGAGGGAGGCA
GAGCGG

[0511] GTCCCACTGTCCCCACACTGGCCCAGGCTGTGCAGGTGTGCCTGGGCCACCTAGGGTGGGGCTCAGCCA
GGGGCT

[0512] GCCCTCGGCAGGGTGGGGGATTTGCCAGCGTGGCCCTCCCTCCAGCAGCAGCTGCCCTGGGCTGGGCCA
CGGGAA

[0513] GCCCTAGGAGCCCCTGGGGACAGACACACAGCCCCTGCCTCTGTAGGAGACTGTCTGTCTGTGAGCG
CCCTGT

[0514] CCTCCGACCCCCCATGCCACTCGGGGGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCATCGATGATATCAGA
TCTGCC

[0515] GGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGCCAGGTAACTGCATTAATGAATCGGCCAACG
CGCGGG

[0516] GAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTCG
GCTGCG

[0517] GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
GAACAT

[0518] GTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCT
CCGCCC

[0519] CCCTGACGAGCATCAGCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATA
CCAGGC

[0520] GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC
CTTTCT

[0521] CCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGTCG
CTCCAA

[0522] GCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGA
GTCCAA

[0523] CCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGT
AGGCGG

[0524] TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGC
TCTGCT

[0525] GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGG
TGGTTT

[0526] TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGGTC

[0527] TGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAC
CTAGAT

[0528] CCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTA
CCAATG

[0529] CTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGT
CGTGTA

[0530] GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC
ACCGGC

[0531] TCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATC
CGCCTC

[0532] CATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGT

TG

[0533] CATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTCCCAACG

AT

[0534] GCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAG

AA

[0535] GTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGT

AA

[0536] CTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTC

TT

[0537] GGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTC

TT

[0538] GCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTG

AT

[0539] AGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGG

AA

[0540] GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTA

TT

[0541] CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCG

AA

[0542] GCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCAGAGGCC

CT

[0543] TCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTG

TC

[0544] AGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCTGGGGCTGGCT

TA

[0545] TGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAA

TT

[0546] CATAACCTTATGTATCATACACATACGATTTAGGTGACACTATA

[0547] 10D1 VH

[0548] CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC 50

[0549] CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATACTA 100

[0550] TGCACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGCAAGG GGCTGGAGTG GGTGACATTT 150

[0551] ATATCATATG ATGGAAACAA TAAATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200

[0552] ATTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA 250

[0553] ACAGCCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTATAT ATTACTGTGC GAGGACCGGC 300

[0554] TGGCTGGGGC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC 350

[0555] CTCAG

[0556] 10D1 VK

[0557] GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50

[0558]	AAGAGCCACC	CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTGTGGC	AGCAGCTACT	100
[0559]	TAGCCTGGTA	CCAGCAGAAA	CCTGGCCAGG	CTCCCAGGCT	CCTCATCTAT	150
[0560]	GGTGCATTCA	GCAGGGCCAC	TGGCATCCCA	GACAGGTTCA	GTGGCAGTGG	200
[0561]	GTCTGGGACA	GACTTCACTC	TCACCATCAG	CAGACTGGAG	CCTGAAGATT	250
[0562]	TTGCAGTGTA	TTACTGTCAG	CAGTATGGTA	GCTCACCGTG	GACGTTCCGC	300
[0563]	CAAGGGACCA	AGGTGGAAAT	CAAAC	325		
[0564]	4B6	VH				
[0565]	CAGGTGCAGC	TGGTGGAGTC	TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	50
[0566]	CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	CCTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATACTA	100
[0567]	TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGACATTT	150
[0568]	ATATCATATG	ATGGAAGCAA	TAAACACTAC	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	200
[0569]	ATTCACCGTC	TCCAGAGACA	ATTCCAAGAA	CACGCTGTAT	CTGCAAAATGA	250
[0570]	ACAGCCTGAG	AGCTGAGGAC	ACGGCTATAT	ATTACTGTGC	GAGGACCGGC	300
[0571]	TGGCTGGGGC	CCTTTGACTA	CTGGGGCCAG	GGAACCCTGG	TCACCGTCTC	350
[0572]	CTCAG					
[0573]	4B6	VK				
[0574]	GAAATTGTGT	TGACGCAGTC	TCCAGGCACC	CTGTCTTTGT	CTCCAGGGGA	50
[0575]	AAGAGCCACC	CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GAGTGTAGC	AGCAGCTTCT	100
[0576]	TAGCCTGGTA	CCAGCAGAAA	CCTGGCCAGG	CTCCCAGGCT	CCTCATCTAT	150
[0577]	GGTGCATCCA	GCAGGGCCAC	TGGCATCCCA	GACAGGTTCA	GTGGCAGTGG	200
[0578]	GTCTGGGACA	GACTTCACTC	TCACCATCAG	CAGACTGGAG	CCTGAAGATT	250
[0579]	TTGCAGTGTA	TTACTGTCAG	CAGTATGGTA	GCTCACCGTG	GACGTTCCGC	300
[0580]	CAAGGGACCA	AGGTGGAAAT	CAAAC	325		
[0581]	1E2	VH				
[0582]	CAGGTGCAGC	TGGTGGAGTC	TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	50
[0583]	CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	CGTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATGGCA	100
[0584]	TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGGCAGTT	150
[0585]	ATATGGTATG	ATGGAAGTAA	TAAATACTAT	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	200
[0586]	ATTCACCATC	TCCAGAGACA	ATTCCAAGAA	CACGCTGTAT	CTGCAAAATGA	250
[0587]	ACAGCCTGAG	AGCCGAGGAC	ACGGCTGTGT	TTTACTGTGC	GAGAGCTCCC	300
[0588]	AATTATATTG	GTGCTTTTGA	TGTCTGGGGC	CAAGGGACAA	TGGTCACCGT	350
[0589]	CTCTTCAG					
[0590]	1E2	VK				
[0591]	GACATCCAGA	TGACCCAGTC	TCCATCCTCA	CTGTCTGCAT	CTGTAGGAGA	50
[0592]	CAGAGTCACC	ATCACTTGTC	GGGCGAGTCA	GGGTATTAGC	AGCTGGTTAG	100
[0593]	CCTGGTATCA	GCAGAAACCA	GAGAAAGCCC	CTAAGTCCCT	GATCTATGCT	150
[0594]	GCATCCAGTT	TGCAAGTGG	GGTCCCATCA	AGGTTACGCG	GCAGTGGATC	200
[0595]	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	CCTGCAGCCT	GAAGATTTTG	250
[0596]	CAACTTATTA	CTGCCAACAG	TATAATAGTT	ACCTCCGAC	GTTCGGCCAA	300

[0597] GGGACCAAGG TGGAAATCAA AC 322

[0001]

序列表

<110> 梅达里克斯公司
<120> 人 CTLA-4 抗体及其应用
<130> SPI120715-51
<140> 201210037538.0
<141> 2000-08-24
<150> US 60/150,452
<151> 1999-08-24
<160> 41
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> SEQ ID NO 1
<211> LENGTH: 3159
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Artificial Sequence
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence:cloning vector
pGP1k
<400> SEQUENCE: 1

```
aattagcggc cgetgtcgac aagcttcgaa ttcagtatcg atgtggggta cctactgtcc 60
cgggattgag gatcgcgat gatatcggtg atcctcagat gcggccgcag tatgcaaaaa 120
aaageccgct cattaggagg gctcttggea gaacatatcc atcgcgtccg ccattcccag 180
cagecgcacg cggcgcattc cgggcagcgt tgggtcctgg ccacgggtgc geatgatcgt 240
gtctctgtcg ttgaggacce ggctaggctg gcgggggttg cttaactggtt agcagaatga 300
atcacggata cgcgagcgaa cgtgaagcga ctgctgtcgc aaaacgtctg cgacctgagc 360
aacaacatga atggtcttcg gtttcctgtt ttctgaaagt ctggaaaacg ggaagtcagc 420
gccctgcacc attatgttcc ggatctgcat cgcaggatgc tgcctggctac cctgtggaac 480
acctacatct gtattaacga agcgttgcca ttgacctga gtgatttttc tctggtcccg 540
ccgcattccat accgccagtt gtttaccctc acaacgttcc agtaaccggg catgttcate 600
atcagtaacc cgtatcgtga gcatcctctc tcgtttcatt ggtatcatta ccccatgaa 660
cagaaattcc ccttacacg gaggcataca gtgacaaaac aggaaaaaac cgcccttaac 720
atggcccgtt ttatcagaag ccagacatta acgcttcttg agaaactcaa cgagctggac 780
gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg cttaacgacc acgctgatga gcttiaccgc 840
agetgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca gctcccggag 900
acggtcacag ctgtctgtga agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgtca 960
gcgggtgttg gcgggtgtcg ggggcagccc atgacctcgt cagctagcga tagcggagtg 1020
tatactggtt taactatgag gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg 1080
gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgtctt tccgttcct 1140
cgtcacatga ctgcctgcgc tgggtcgttc ggtgcggcgc agcggtatca gctcaactca 1200
aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa 1260
aagccacgca aaagccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcgttt tccatagge 1320
tccgcccccc tgacgagcat caaaaaata gacgtcaag tcagaggtgg cgaaaccgca 1380
caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc 1440
```

[0002]

```

cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttccggaagc gtggcgcttt 1500
ctcatagctc acgtgtagg tatctcagtt cgggttaggt cgttcgctcc aagctgggct 1560
gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 1620
agtecaacc cggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccaggcgc gccttggcct 1680
aagaggccac tggtaacagg attagcagag cgaggtaigt aggcggtgct acagagttct 1740
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttgggtat tgcgtcttgc 1800
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 1860
ctggtagcgg tggllllllt gtligcaage agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 1920
aagaagatcc ttgatcttt tctacggggt ctgacgtca gtggaacgaa aactcacgtt 1980
aagggtatit ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctgatccct ttaaattaaa 2040
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggctctgac agttaccaat 2100
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcaccc atagtgtcct 2160
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggtct accatctggc ccagtgctg 2220
caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 2280
ccggaagggc cgagcgcaga agtgggtcctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta 2340
attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgcagtttaa tagtttgcgc aacgttgttg 2400
ccattgctgc aggcacgtg gtgtcacgtc cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 2460
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct 2520
ccttcggctc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggtta 2580
tggcagcact gcataattct cttactgtca tgcctccgt aagatgcttt tctgtgactg 2640
gtgagtactc aaccaagtoa ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgccttgc 2700
cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagAAC tttaaaagt ctcacattg 2760
gaaaacgttc ttccgggcca aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttgca 2820
tgtaaccac tctgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 2880
ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgcgc caaaaaagg aataaggcgc acacggaaat 2940
gttgaalact catactcttc ctttttcaat attattgaag catllatcag ggttattgtc 3000
tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gtccgcgca 3060
catttccccg aaaagtgcga cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg acattaacct 3120
ataaaaatag gcgtatcacg aggccttttc gtcttcaag 3159

```

<210> SEQ ID NO 2

<211> LENGTH: 349

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: preliminary sequence for heavy chain fragment
10D1.3

<400> SEQUENCE: 2

```

tgggggagge gtggtccage ctgggaggte cctgagaetc tctgtgcag cctctggatt 60
caccttcagt agctatacta tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg 120
ggtgacattt atatcatatg atggaacaaa taaatactac gcagactccg tgaaggccg 180
attcaccatc tccagagaca attccaagaa caogctgtat ctgcaaatga acagcctgag 240
agctgaggac acggtctatat attactgtgc gaggaccggc tggetggggc cctttgacta 300
ctggggccag ggaacctgg tcacctctc ctccagctcc accaagggc 349

```

[0003]

<210> SEQ ID NO 3
 <211> LENGTH: 321
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: preliminary sequence for light chain fragment
 IOD1.3
 <400> SEQUENCE: 3
 ctccaggcac cctgtctttg tctccagggg aaagagccac cctctctgc agggccagtc 60
 agagtgttgg cagcagctac ttagcctggg accagcagaa acctggccag gctcccaggc 120
 tctctatcta tgggtcattc agcagggcca ctggcatccc agacagggtc agtggcagtg 180
 ggtctgggac agacttcact ctcaccatca gcagactgga gcctgaagat ttgcagtgt 240
 attactgtca gcagtatggg agctcacogi ggacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa 300
 tcaaacgaac tgtggttgc c 321

<210> SEQ ID NO 4
 <211> LENGTH: 287
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: Vk A-27 germline sequence
 <400> SEQUENCE: 4
 gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtcg gactgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcateca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagaetggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcacc 287

<210> SEQ ID NO 5
 <211> LENGTH: 95
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: light chain variable region predicted sequence for
 Vk A-27 germline
 <400> SEQUENCE: 5
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0004]

50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser		
85	90	95

<210> SEQ ID NO 6

<211> LENGTH: 325

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: light chain variable region (Vk), 10D1 from Vk A-27

<400> SEQUENCE: 6

```

gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctctctgca gggccagtea gagtgttggc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccagget cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagttg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gtcaccgtg gacgttcggc 300
caagggaacca agtggaat caaac                                     325

```

<210> SEQ ID NO 7

<211> LENGTH: 108

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: light chain variable region predicted sequence for 10D1 from Vk A-27

<400> SEQUENCE: 7

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

[0005]

<210> SEQ ID NO 8
 <211> LENGTH: 325
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: light chain variable region (Vk) 4B6 from Vk A-27
 <400> SEQUENCE: 8
 gaaattgtgt tgaecgagtc tccaggeacc etgtetttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtea gagtgittagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccagget cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gaattcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctaccgtg gaogttcgge 300
 caagggacca aggtggaaat caaac 325

<210> SEQ ID NO 9
 <211> LENGTH: 108
 <212> TYPE: PRT
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: light chain variable region predicted sequence for
 4B6 from Vk A-27
 <400> SEQUENCE: 9
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser
 20 25 30
 Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> SEQ ID NO 10
 <211> LENGTH: 287
 <212> TYPE: DNA
 <213> ORGANISM: Homo sapiens
 <220> FEATURE:
 <223> OTHER INFORMATION: Vk L-15 germline sequence
 <400> SEQUENCE: 10

[0006]

```

gacatecaga tgacccagtc tccatctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcc 287

```

<210> SEQ ID NO 11

<211> LENGTH: 94

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: light chain variable region predicted sequence for
Vk L-15 germline

<400> SEQUENCE: 11

```

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

```

<210> SEQ ID NO 12

<211> LENGTH: 322

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: light chain variable region Vk 1E2 from Vk L-15

<400> SEQUENCE: 12

```

gacatecaga tgacccagtc tccatctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc agctggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctccgac gtteggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa ac 322

```

<210> SEQ ID NO 13

<211> LENGTH: 107

<212> TYPE: PRT

[0007]

<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: light chain variable region predicted sequence for
1E2 from Vk L-15
<400> SEQUENCE: 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO 14
<211> LENGTH: 294
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: VH 3-30.3 germline sequence
<400> SEQUENCE: 14
cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tctgtgtcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcaactgggt ccgccagget 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180
gcagactcgc tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgetgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggetgtgt attactgtgc gaga 294

<210> SEQ ID NO 15
<211> LENGTH: 98
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region predicted sequence for
VH 3-30.3 germline
<400> SEQUENCE: 15
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[0008]


```

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

```

<210> SEQ ID NO 16

<211> LENGTH: 355

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region VH 10D1 from VH 3-30.3

<400> SEQUENCE: 16

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tctgtgtagc cctctggatt cacttcagc agctatactc tgcactgggt ccgccagget 120
ccaggcaagg ggcctggagt ggtgacattt atatcatatg atggaaacaa taaatactac 180
gcagactccg tgaagggcgc attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acgctatat attactgtgc gaggaccggc 300
tggttggggc cctttgacta ctgggggcag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag 355

```

<210> SEQ ID NO 17

<211> LENGTH: 118

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region predicted sequence for 10D1 from VH 3-30.3

<400> SEQUENCE: 17

```

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

```

[0009]

	85	90	95
Ala Arg Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> SEQ ID NO 18

<211> LENGTH: 355

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region VH 4B6 from VH 3-30.3

<400> SEQUENCE: 18

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggagge gtggtccagc ctgggaggtc cctgagaetc 60
tccfgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatacta tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtgacattt atatcatatg atggaagcaa taaacaactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acgctatat attactgtgc gaggaccggc 300
tggtctgggce cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctcag      355

```

<210> SEQ ID NO 19

<211> LENGTH: 118

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region predicted sequence for 4B6 from VH 3-30.3

<400> SEQUENCE: 19

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

[0010]

<210> SEQ ID NO 20
<211> LENGTH: 296
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: VH 3-33 germline sequence
<400> SEQUENCE: 20
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagge gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cgtctggatt cacccttcagt agctatggca tgcactgggt cgcagagct 120
ccaggcaagg ggcctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaga 296

<210> SEQ ID NO 21
<211> LENGTH: 98
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region predicted sequence for
VH 3-33 germline
<400> SEQUENCE: 21
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg

<210> SEQ ID NO 22
<211> LENGTH: 358
<212> TYPE: DNA
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region VH 1E2 from VH 3-33
<400> SEQUENCE: 22
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggagge gtgggtccagc ctgggagggtc cctgagactc 60

[0011]

```

tctgtgtcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt cggccagget 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtgat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acgctgtgtg tttactgtgc gagagctccc 300
aattatattg gtgcttttga tgtctggggc caagggacaa tggtcaccgt ctcttcag 358

```

<210> SEQ ID NO 23

<211> LENGTH: 119

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain variable region predicted sequence for
1E2 from VH 3-33

<400> SEQUENCE: 23

```

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

```

<210> SEQ ID NO 24

<211> LENGTH: 12

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR1 (HuMab 10D1)

<400> SEQUENCE: 24

```

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser Tyr Leu Ala
  1              5              10

```

<210> SEQ ID NO 25

<211> LENGTH: 12

<212> TYPE: PRT

[0012]

<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR1 (HuMab 4B6)
<400> SEQUENCE: 25
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

<210> SEQ ID NO 26
<211> LENGTH: 11
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR1 (HuMab 1E2)
<400> SEQUENCE: 26
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> SEQ ID NO 27
<211> LENGTH: 5
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: heavy chain CDR1 (HuMab 10D1, 4B6)
<400> SEQUENCE: 27
Ser Tyr Thr Met His
1 5

<210> SEQ ID NO 28
<211> LENGTH: 5
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: heavy chain CDR1 (HuMab 1E2)
<400> SEQUENCE: 28
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> SEQ ID NO 29
<211> LENGTH: 7
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR2 (HuMab 10D1)
<400> SEQUENCE: 29

[0013]

Gly Ala Phe Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> SEQ ID NO 30

<211> LENGTH: 7

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR2 (HuMab 4B6)

<400> SEQUENCE: 30

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> SEQ ID NO 31

<211> LENGTH: 7

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR2 (HuMab 1E2)

<400> SEQUENCE: 31

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> SEQ ID NO 32

<211> LENGTH: 17

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain CDR2 (HuMab 10D1)

<400> SEQUENCE: 32

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO 33

<211> LENGTH: 17

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain CDR2 (HuMab 4B6)

<400> SEQUENCE: 33

Phe Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

[0014]

<210> SEQ ID NO 34
<211> LENGTH: 17
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: heavy chain CDR2 (HuMab 1E2)
<400> SEQUENCE: 34
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> SEQ ID NO 35
<211> LENGTH: 9
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR3 (HuMab 10D1, 4B6)
<400> SEQUENCE: 35
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> SEQ ID NO 36
<211> LENGTH: 9
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: light chain CDR3 (HuMab 1E2)
<400> SEQUENCE: 36
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> SEQ ID NO 37
<211> LENGTH: 9
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Homo sapiens
<220> FEATURE:
<223> OTHER INFORMATION: heavy chain CDR3 (HuMab 10D1, 4B6)
<400> SEQUENCE: 37
Thr Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5

<210> SEQ ID NO 38
<211> LENGTH: 10

[0015]

<212> TYPE: PRT

<213> ORGANISM: Homo sapiens

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: heavy chain CDR3 (MuMab 1E2)

<400> SEQUENCE: 38

Ala Pro Asn Tyr Ile Gly Ala Phe Asp Val
1 5 10

<210> SEQ ID NO 39

<211> LENGTH: 506

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence:kappa light
chain plasmid pCK7-96 (partial)

<400> SEQUENCE: 39

aggagaatga ataaataaag tgaatctttg cacctgtggt ttctctcttt cctcaattta 60
ataattatta tctgttggtt accaactact caatttctct tataaggac taaatatgta 120
gtcatcctaa ggcgcataac catttataaa aatcactcct cattctatct taccctatca 180
tctctgcaa gacagtcctc cctcaaacce acaagccttc tgtctcaca gtccctggg 240
ccatggatcc tcacatccca atccggggcc gcaattcgta atcatggta tagctgtttc 300
ctgtgtgaaa ttgttatccg ctacacaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt 360
gtaaagcctg ggggtgctaa tgagttagct aactcacatt aattgcttg cgtcactgc 420
ccgtttcca gtgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatggc caacgcggg 480
ggagaggcgg ttgctgatt gggcgc 506

<210> SEQ ID NO 40

<211> LENGTH: 4723

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence:gamma heavy
chain plasmid pCG-96

<400> SEQUENCE: 40

gaactcgagc agctgaagct ttctggggca gccagggcct gaccttggt ttggggcagg 60
gagggggcta aggtgaggca ggtggcgcca gccaggtgca caccaatgc ccatgagccc 120
agacactgga cgtgaacct cgcgacagt taagaacca ggggcctctg cgcctgggc 180
ccagctctgt ccacacccg gtccacatgg caccacctct cttgcagcct caaccaagg 240
cccctggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc tctggggca cagcgccct 300
gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc 360
cctgaccagc ggcgtgcaca ctttccggc tgtctacag tctcaggac tetactcct 420
cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag ctggggcacc cagacctaca tctgcaacgt 480
gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt ggtgagagc cagcacagg 540
agggagggtg tctgtggaa gccaggctca gcgtccctgc ctggacgat cccgctatg 600

[0016]


```

cagcccccagt ccaggggcagc aaggcaggcc ccgtctgcct cttcaccggg aggeectctgc 660
ccgccccact catgctcagg gagagggtot tctggttttt tccccagget ctgggcagge 720
acaggetagg tccccetaac ccagggccctg cacacaaagg ggcagggtgt gggetcagac 780
ctgccaagag ccataatcgg gaggaccctg cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa 840
actctccact ccctcagetc ggacaccttc tctctccca gattccagta actcccaate 900
ttctctctgc agagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccacgg tgeccaggta 960
agccagccca ggectcgcgc tccagctcaa ggcgggacag gtgcccata gtagcctgca 1020
tccagggaca ggeccagcc gggctgtgac acgtccacct ccctctcttc ctccagacct 1080
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc tccccccaa aaccaagga caccctcatg 1140
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccaaga agaccctgag 1200
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg 1260
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtct gcaccaggac 1320
tggetgaatg gcaaggagta caagtgcagg gtctccaaca aagccctccc agccccate 1380
gagaaaacca tctccaaagc caaagggtgg acccgtgggg tgcgaggggc acatggacag 1440
aggccggctc ggeccacct ctgcccagag agtgaccgt gtaccaacct ctgtccctac 1500
agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgcccaca tcccgggatg agctgaccaa 1560
gaaccaggtc agcctgacct gctgtgtcaa aggtctctat cccagcgaca tgcctgtgga 1620
gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctccc tgctggactc 1680
cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg 1740
gaactgtctc tcatgtctcg tgatgcata ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag 1800
cctctccctg tctccgggta aatgagtgcg accgcccga agccccctg ccccggtctc 1860
tcgcggtcgc acgaggatgc ttggcacgta cccctgtac ataattccc gggeccagc 1920
atggaaataa agcaccagc getgcccgtg gcccctgga gactgtgat gttttttca 1980
cgggtcagge cgagtctgag gctgagtgg catgaggag gcagagcggg tcccactgtc 2040
cccacactgg cccagctgt gcagggtgc ctgggcccc tagggtggg ctccagcagg 2100
ggctgcccctc ggcagggtgg gggatttgc agcgtggccc tccctccagc agcaactgcc 2160
ctgggtggg ccaagggaag cctaggagc cctggggac agacacacag cccctgcctc 2220
tgtaggagac tgtctgttc tgtagcgc cctgtctcc cgacctcat gcccactcgg 2280
gggcatgctc gcaggtcagc tctagaggat ccccggtac cgagctcga ttcctgatg 2340
atctcagatc tgcgggtct cctatagtga gtcgtattaa ttctgataag ccaggttaac 2400
ctgcattaat gaatcgcca acgcggggg agaggcggt tgcgtattg gcctctctc 2460
gcttctctgc tcaactactc gctgcgtctg gtcgtctggc tgcggcagc ggtatcagct 2520
cactcaaagg eggtatcag gtatccaca gaatcagggt ataacgcagg aaagaacatg 2580
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggga cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 2640
cataggctcc gccccctga cgagcctac aaaaaacgac gctcaagtc gagggtggca 2700
aaccgcagac gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgtctc 2760
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccctt ttctccctc gggaagcgtg 2820
gcgttttctc aatgtctacg ctgtaggat ctccagttcg ttaggtcgt tgcctccaag 2880
ctgggtgtg tgcaagaaac cccgttcag cccgaccgt gcgccttatc cggtaactat 2940
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 3000
aggattagca gacgaggta ttaggcgggt gctacagagt tcttgaagt gtggcctaac 3060
tacggtaca ctagaaggac agtatttgg atctgcgtc tctgaagcc agttacctc 3120
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgtggttag cgggtgtttt 3180
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tctttgate 3240

```

[0017]

```

ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 3300
agattatcaa aaaggatett caccatagatc ettttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 3360
atctaaagta tatatgagta aacttgggtct gacagttacc aatgettaat cagtgaggca 3420
ectatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 3480
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 3540
ccacgctcac cggetecaga tttatcagea ataaaccage cagccggaag ggccgagcgc 3600
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 3660
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcaic 3720
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttecca acgatcaagg 3780
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaageggta gctccttcgg tctccgate 3840
gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc actgcataat 3900
tctcttactg tcatgccate cgtaagatgc tttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 3960
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcceggcgct aatacgggat 4020
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 4080
cgaaaactct caaggatett acegetgttg agatccagtt egatgtaacc cactcgtgca 4140
cccaactgat ctccagcate ttttacttcc accagegttt ctgggtgagc aaaaacagga 4200
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgltgaat actcactc 4260
ttccttttcc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 4320
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagt 4380
ccacctgaag tetaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 4440
acgaggccct ttctgtctgc gogtttcggg gatgaagggtg aaaacctctg acacatgcag 4500
ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgcgc ggagcagaca ageccgctcag 4560
ggcgcgctcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggetggetta actatcggc atcagagcag 4620
atgtactga gagtgacca tatggacata ttgtcgttag aacggggcta caattaatac 4680
ataacettat gtatcataca catacgattt aggtgacact ata 4723

```

<210> SEQ ID NO 41

<211> LENGTH: 4694

<212> TYPE: DNA

<213> ORGANISM: Artificial Sequence

<220> FEATURE:

<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence:gamma4 heavy chain plasmid pG4HE

<400> SEQUENCE: 41

```

gaactcgagc agctgaagct ttctggggca ggccgggcct gactttggtt gggggcaggg 60
agggggctaa ggtgacgcag gtggcgccag ccagggtcac acccaatgcc catgagccca 120
gacactggac cctgcatgga ccctcgcgga tagacaagaa ccgaggggce tctgcgcct 180
ggggccagct ctgtcccaca ccggggteac atggcaccac ctctcttga gttccacca 240
agggcccate egtcttccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagcgc 300
ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaactcag 360
gcgcctgac cagcggcggt caccacttcc eggtgtcct acagtctca ggactctact 420
ccctcagcag cgtggtgacc gtgccttcca gcagcttggg caggaagacc tacacctgca 480
acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttggtgag aggccagcac 540
agggagggag ggtgtctgct ggaagccagg ctccagccctc ctgcctggac gcaccccggc 600

```

[0018]

```

tgtgcagccc cagcccaggg cagcaaggca tgccccatct gtctctctcac ceggaggcct 660
ctgaccacccc cactcatgct cagggagagg gtcttttgga tttttccacc aggetccggg 720
cagccacagg ctggatgccc ctaccccagg ccttgcgcat acaggggcag gtgetgcgct 780
cagacctgcc aagagccata tccgggagga ccttgcacct gacctaaacc caccceaaag 840
gccccaaactct ccactccctc agctcagaca cttctctctc tcccagatct gaggtaacct 900
caatcttctc tctgcagagt ccaaatatgg tccccatgc ccatcatgcc caggtaagcc 960
aaccacagggc tgcctctcca gctcaaggcg ggacagggtc cctagagtag cctgcatcca 1020
gggacagggc ccagccgggt gctgacgat ccacctccat ctcttctcca gcacctgagt 1080
tcttgggggg accatcagtc ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct 1140
cccggacccc tgaggtaacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgagggtc 1200
agttcaactg gtaactggat ggctgaggg tgcataatgc caagacaaag ccgctgggag 1260
agcagttcaa cagcagctac cgtgtggtca gctctctcac cgtctctcac caggactggt 1320
tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga 1380
aaaccatctc caaagccaaa gttgggaccc acgggggtgc agggccacat ggacagaggt 1440
cagctcggcc caccctctgc cctgggagtg accgtgtgc caacctctgt cctacaggg 1500
cagcccccag agccacaggt gtacacctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1560
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtg 1620
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgt ggactccgac 1680
ggctccttct tctctacag caggctaacc gtggacaaga gcagggtgca ggaggggat 1740
gtcttctcat gctcctgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagctc 1800
tccctgtctc tgggtaaatg agtgccaggg ccggcaagcc cccgtctccc gggtctctgg 1860
ggctgcgcga ggatgcttgg caagtacccc gtctacatac ttcccaggca cccagcatgg 1920
aataaaagca cccaccactg ccttgggccc ctgtgagact gtgatggtt ttccacggg 1980
tcaggccag tctgaggcct gaggtagatg agggaggcag agcgggtccc acgtctccca 2040
cactggccca ggtgtgag gtgtgcttgg gccacctagg gtggggctca gccaggggt 2100
gcccctggca ggggtgggga ttgccagcg tggccctccc tccagcagca gctgccctgg 2160
gctgggccc ggaagccct aggagccct ggggacagac acacagcccc tgcctctgta 2220
ggagactgtc ctgtctctgt agcgcctgt cctccgaccc cccatgccc ctctgggggga 2280
tcccgggta ccagctctga attcatgat gatatacat ctgcgggtct cctatagtg 2340
agtcgtatta atttcgataa gccaggttaa cctgcattaa tgaatcgcc aacgcgggg 2400
gagaggcggt ttgctattg ggcgtcttc cgttctctg ctactgact cgtgcgtc 2460
ggctgttctg ctgcggcag cggatatcgc tcaactcaag gcgtaatac ggttatccac 2520
agaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggcaggaa 2580
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgtccccctg acgagcatca 2640
caaaaaatga cgtcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggaatataaa gataccagge 2700
gtttccccct ggaagctccc tctgtgcgtc tctgttccg accctgcgc ttaccggata 2760
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgtttct caatgtcac gctgtaggta 2820
tctcagttcg gtgtaggctg ttctctccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccgttca 2880
gcccagccgc tgcgcttat cggtaacta tctcttgag tccaaccgg taagacacga 2940
cttatcgcca ctggcagcag cacttggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg 3000
tgtacacag ttcttgaggt gttggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg 3060
tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttaggtagt cttgatccgg 3120
caaacaaacc accgtggta ggggtggttt tttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 3180
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctac gggctctgac ctcagtggaa 3240

```

[0019]

```

cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 3300
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatetaaagt atatatgagt aaacttggtc 3360
tgacagttac caatgcttaa tcagtgagec acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc 3420
atccatagtt gcctgactcc cegtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 3480
tggecccagt gctgcaatga taccgegaga cccacgetca ccggetccag atttatcage 3540
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt taccgcctc 3600
catccagtct attaattgtt gccgggaago tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 3660
gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggeat cgtgggtgta cgtcgtcgtt ttggtatggc 3720
ttcattcage tcoggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatecccca tgttgtgcaa 3780
aaaagcggtt agctccttcg gtctccgat cgttgteaga agtaagttag ccgcagtgtt 3840
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg 3900
cttttctgtg aciggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccggcacc 3960
gagttgctct tgeccggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa 4020
agtgtctatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgetgtt 4080
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 4140
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gcgcacaaaa aggggaataag 4200
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaageattta 4260
tcagggttat tgtctcatga gcgatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 4320
aggggttcg cgcacatttc ccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 4380
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg 4440
tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta 4500
agcggatgcc gggagcagac aagcccgta ggcccgctca gcgggtgttg ggggtgtcg 4560
gggttggett aactatgagg catcagagea gattgtactg agagtgcacc atatggacat 4620
attgtcgtta gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt 4680
taggtgacac tata 4694

```

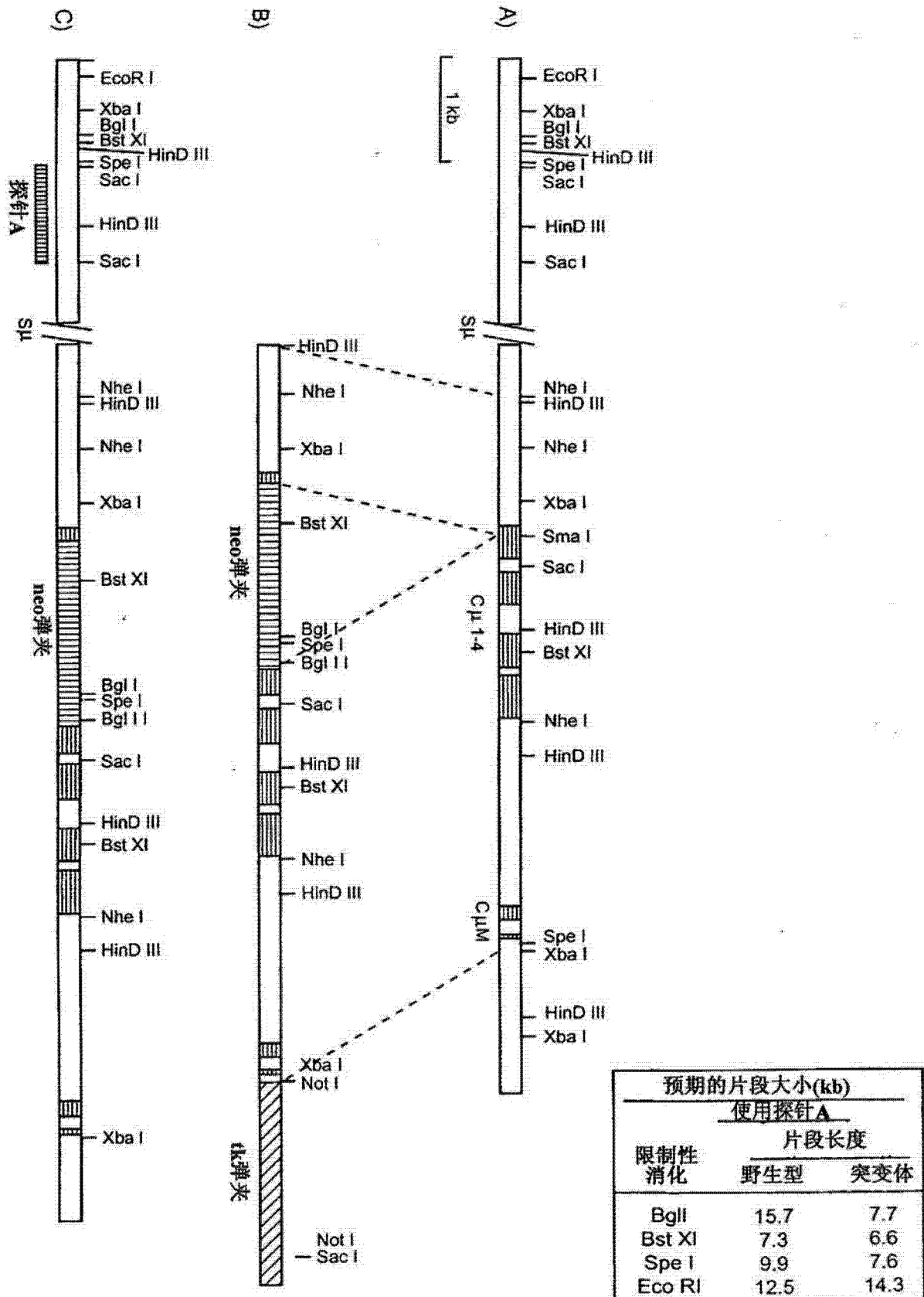


图 1

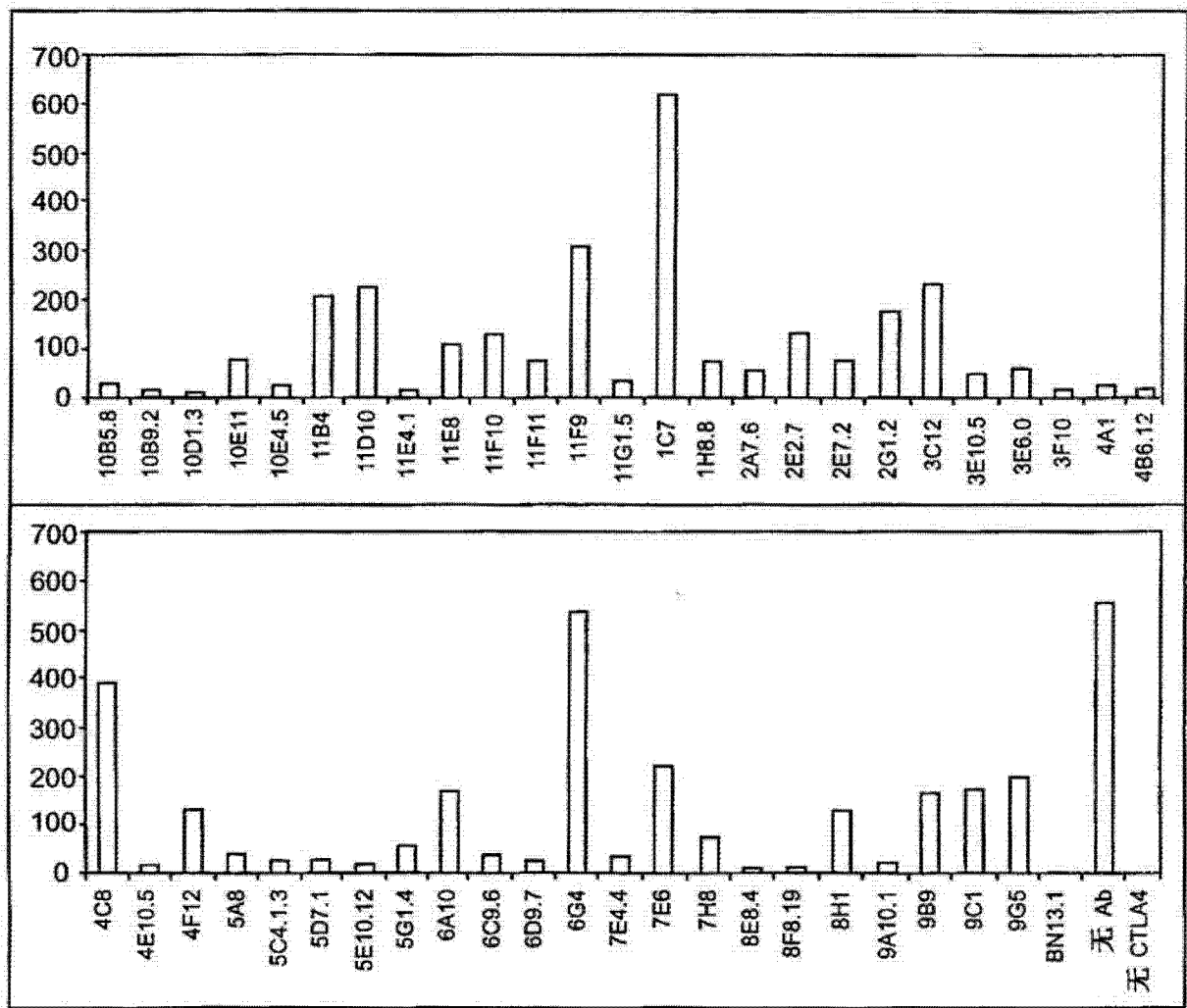


图 2

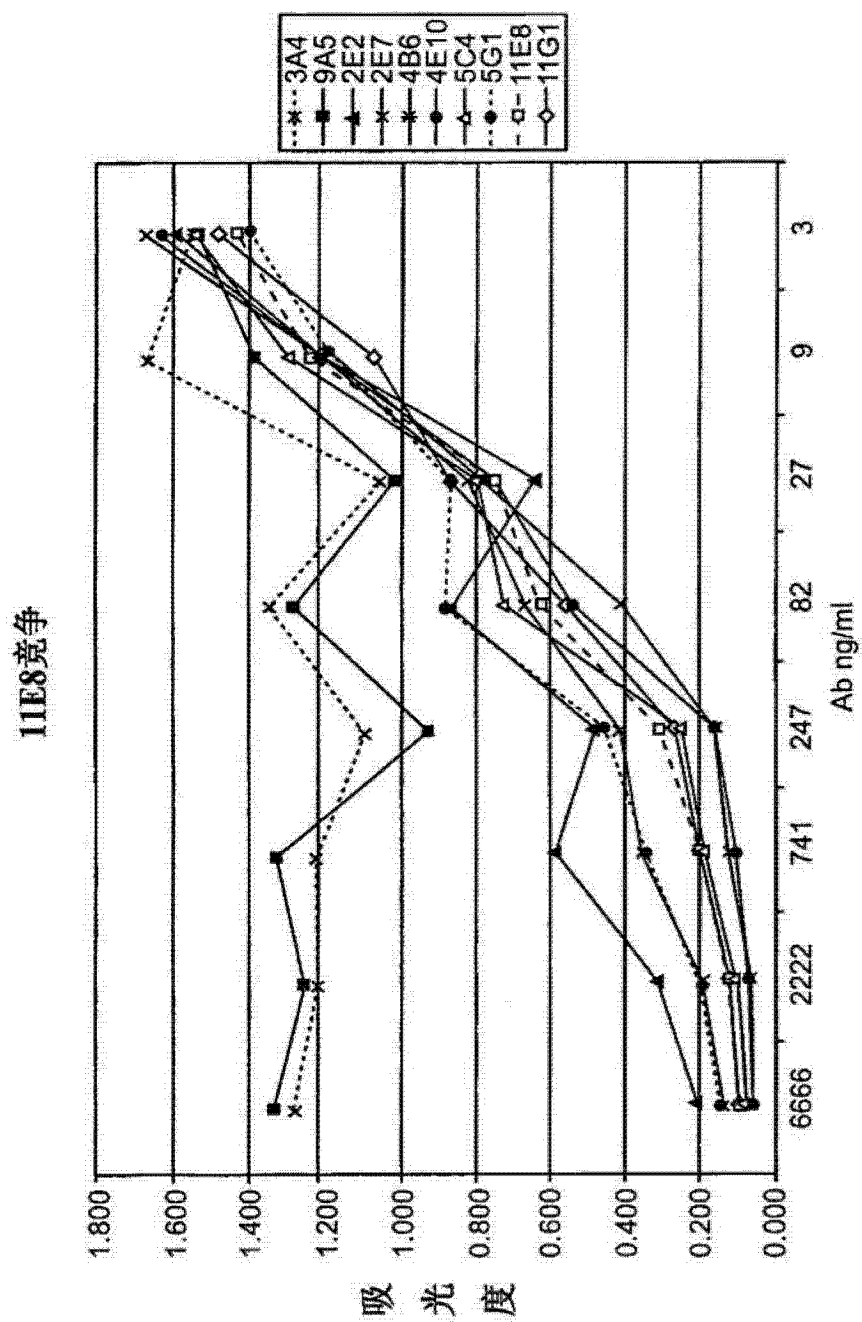


图 3

10D1.3 VH (SEQ ID NO:2)

TGGGGGAGGC	GTGGTCCAGC	CTGGGAGGTC	CCTGAGACTC	TCCTGTGCAG	50
CCTCTGGATT	CACCTTCAGT	AGCTATACTA	TGCACTGGGT	CCGCCAGGCT	100
CCAGGCAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGACATTT	ATATCATATG	ATGGAAACAA	150
TAAATACTAC	GCAGACTCCG	TGAAGGGCCG	ATTCACCATC	TCCAGAGACA	200
ATTCCAAGAA	CACGCTGTAT	CTGCAAATGA	ACAGCCTGAG	AGCTGAGGAC	250
ACGGCTATAT	ATTACTGTGC	GAGGACCGGC	TGGCTGGGGC	CCTTTGACTA	300
CTGGGGCCAG	GGAACCCTGG	TCACCGTCTC	CTCAGCCTCC	ACCAAGGGC	349

10D1.3 VK (SEQ ID NO:3)

CTCCAGGCAC	CCTGTCTTTG	TCTCCAGGGG	AAAGAGCCAC	CCTCTCCTGC	50
AGGGCCAGTC	AGAGTGTTGG	CAGCAGCTAC	TTAGCCTGGT	ACCAGCAGAA	100
ACCTGGCCAG	GCTCCCAGGC	TCCTCATCTA	TGGTGCATTC	AGCAGGGCCA	150
CTGGCATCCC	AGACAGGTTC	AGTGGCAGTG	GGTCTGGGAC	AGACTTCACT	200
CTCACCATCA	GCAGACTGGA	GCCTGAAGAT	TTTGCAGTGT	ATTACTGTCA	250
GCAGTATGGT	AGCTCACCGT	GGACGTTTCG	CCAAGGGACC	AAGGTGGAAA	300
TCAAACGAAC	TGTGGCTGCA	C			321

图 4

SEQ ID NOS: 4, 6&8 (分别地)

VK A-27 种系: 10D1: 4B6:	GAA	ATT	GTG	TTG	ACG	CAG	TCT	CCA	GGC	ACC	CTG	TCT	TTG	TCT	CCA	GGG	GAA	AGA	GCC	ACC	CTC	TCC	TGC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
VK A-27: 10D1: 4B6:	AGG	GCC	AGT	CAG	AGT	GTT	AGC	AGC	AGC	TAC	TTA	GCC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCT	GGC	CAG	GCT	CCC	AGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
VK A-27: 10D1: 4B6:	CTC	CTC	ATC	TAT	GGT	GCA	TCC	AGC	AGG	GCC	ACT	GGC	ATC	CCA	GAC	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
VK A-27: 10D1: 4B6:	ACA	GAC	TTC	ACT	CTC	ACC	ATC	AGC	AGA	CTG	GAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	GTG	TAT	TAC	TGT	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
VK A-27: 10D1: 4B6:	CAG	CAG	TAT	GGT	AGC	TCA	CC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

SEQ ID NOS: 10&12 (分别地)

VK L-15 种系: 1E2:	GAC	ATC	CAG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCA	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
VK L-15: 1E2:	CGG	GCG	AGT	CAG	GGT	ATT	AGC	AGC	TGG	TTA	GCC	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GAG	AAA	GCC	CCT	AAG	TCC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
VK L-15: 1E2:	CTG	ATC	TAT	GCT	GCA	TCC	AGT	TTG	CAA	AGT	GGG	GTC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGC	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

图 5-1

VK L-15:	GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT	CDR3-
1E2:	---	---
VK L-15:	AGT TAC CCT CC	J _{K1}
1E2:	---	---
	--- --G ACG TTC GGC CAA GSG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C/	

图 5-2

SEQ ID NOS:14, 16&18 (分别地)

VH 3-30.3

种系:

10D1:

4B6:

```

CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

CDR1

VH 3-30.3:

10D1:

4B6:

```

TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GCT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

CDR2

VH 3-30.3:

10D1:

4B6:

```

GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGC AAT AAA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
A-- T-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
A-- T-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

VH 3-30.3:

10D1:

4B6:

```

GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

CDR3

D7-27

J_H4b

VH 3-30.3:

10D1:

4B6:

```

GCG AGA
--- --G ACC GGC TGG CTG GGG CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA G/
--- --G --- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

SEQ ID NOS:20&22 (分别地)

VH 3-33

种系:

1E2:

```

CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

CDR1

VH 3-33:

1E2:

```

TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

CDR2

VH 3-33:

1E2:

```

GCA GTT ATA TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA
--- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

```

图 6-1

SEQ ID NOS: 15, 17 & 19 (分别地)

VH 3-30.3
 种系:
 10D1:
 4B6:

	CDR1		CDR2
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYAMH	WVRQAPGKLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG
-----	--T--	-----	F-----N-----
-----	--T--	-----	F-----H-----

CDR3

VH 3-30.3:
 10D1:
 4B6:

	CDR3
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
-----	TGNLGPFDY
-----	WGQGTLLVTVSS
-----	-----

SEQ ID NOS: 21 & 23 (分别地)

VH 3-33
 种系:
 1E2:

	CDR1		CDR2
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKG
-----	-----	-----	-----

CDR3

VH 3-33:
 1E2:

	CDR3
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	
-----	APNYIGAFDV
-----	WGQGTMTVTVSS

图 8

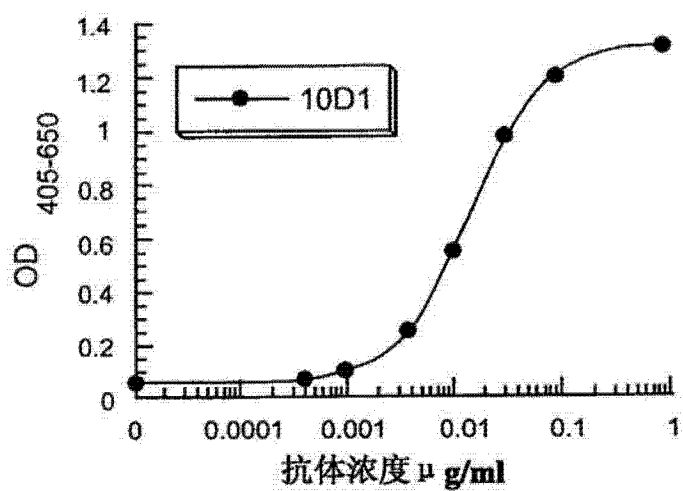


图 9

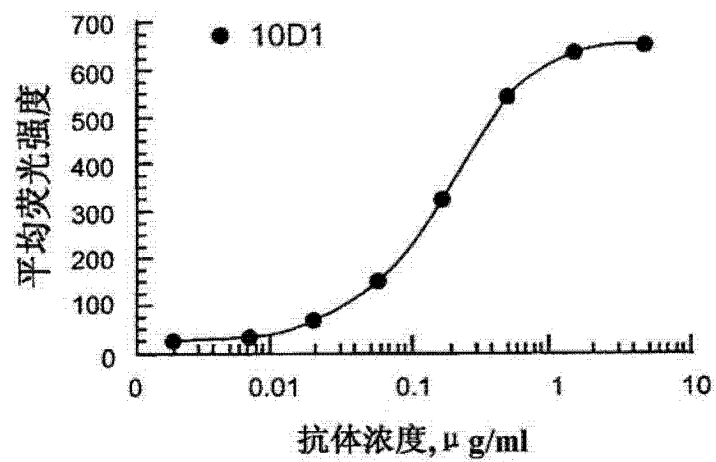


图 10

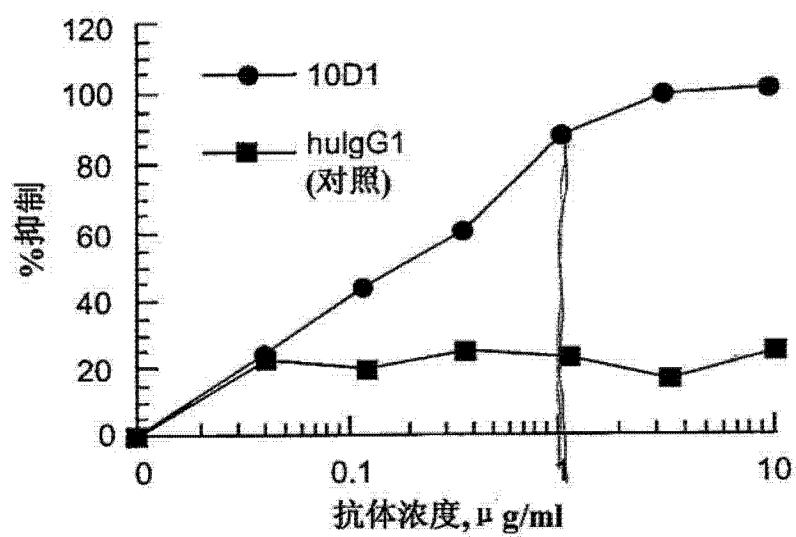


图 11

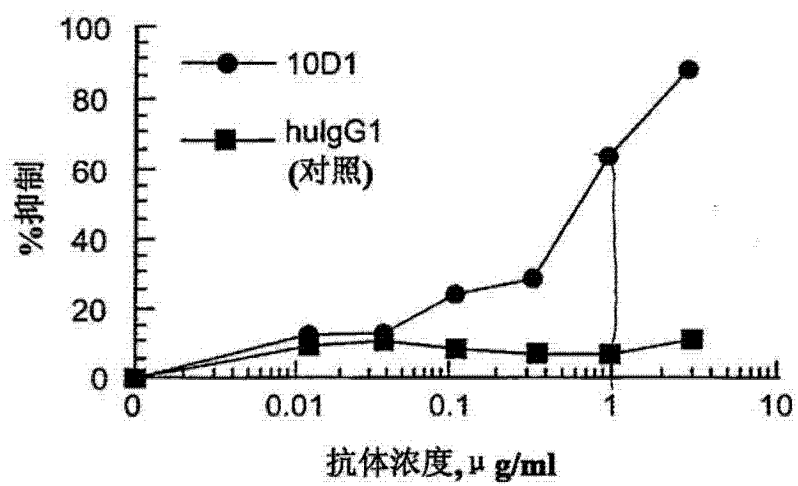


图 12

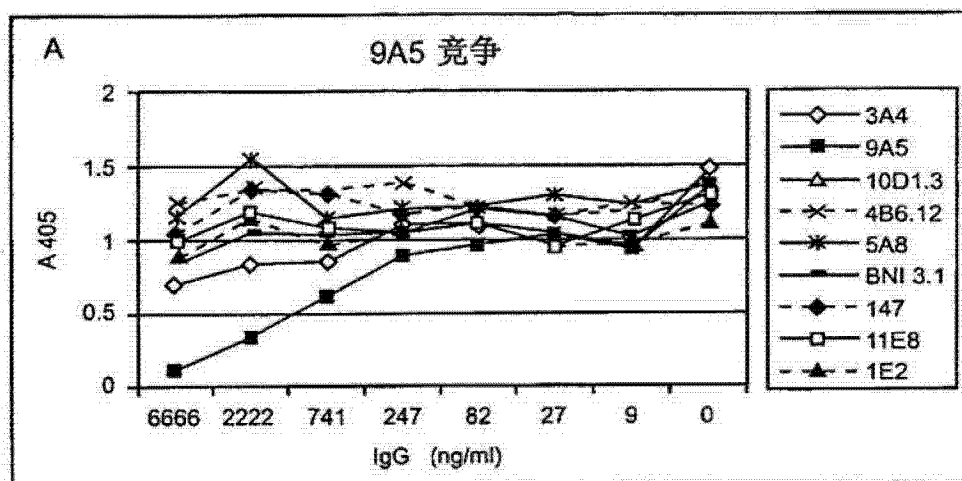


图 13A

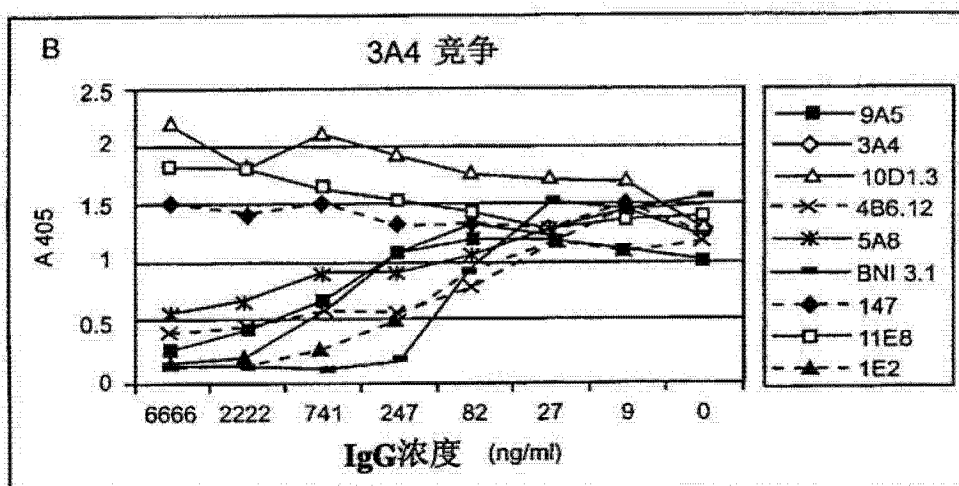


图 13B

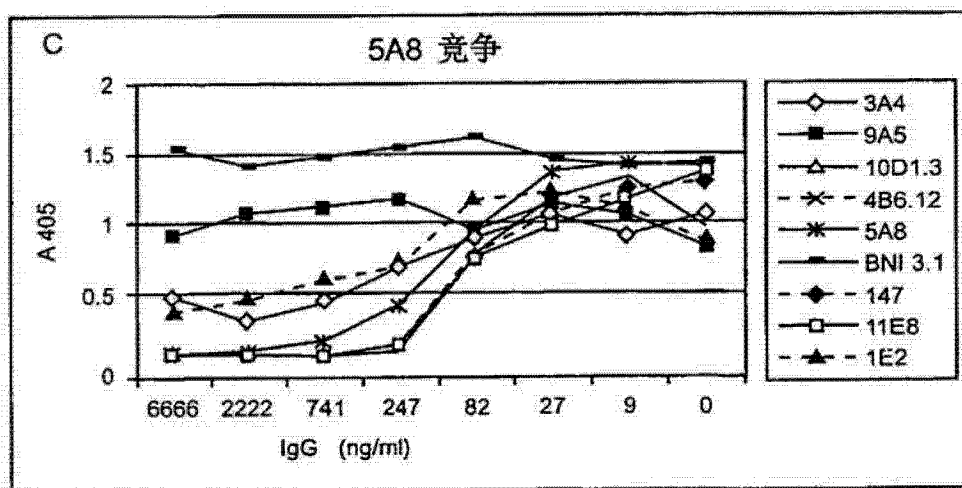


图 13C

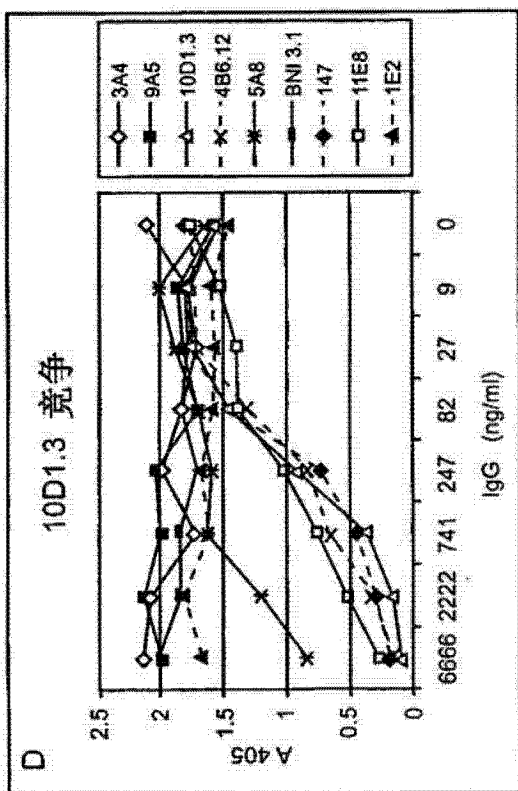


图 13D

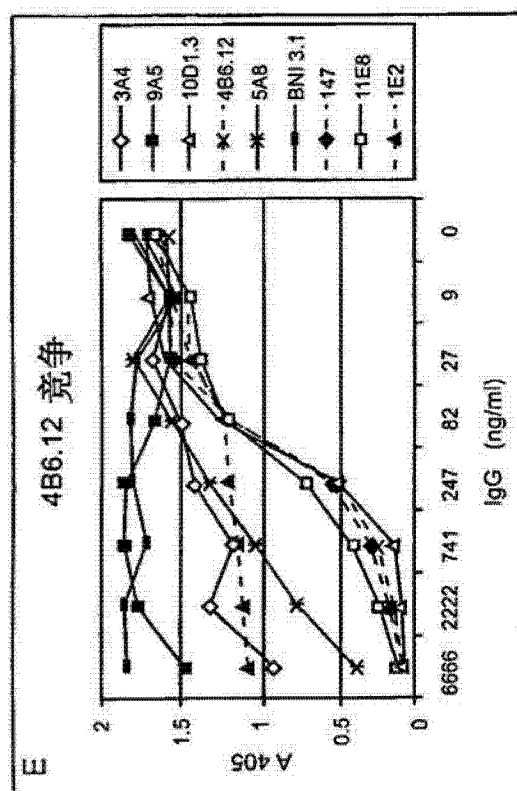


图 13E

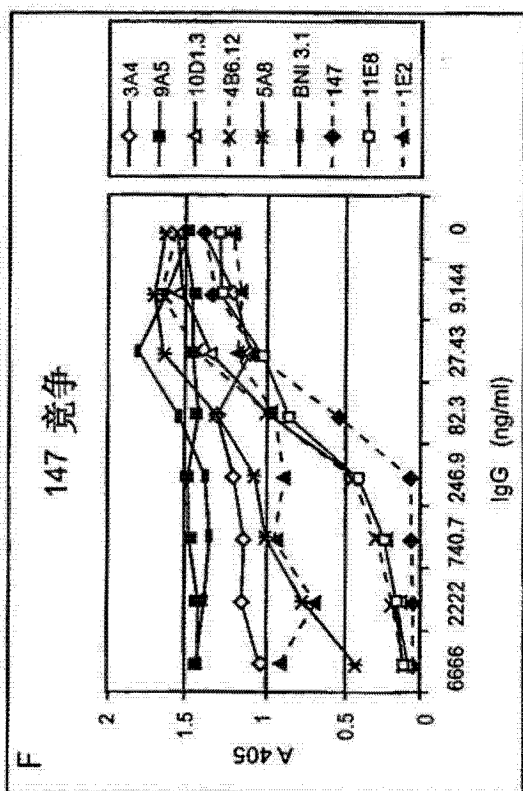


图 13F

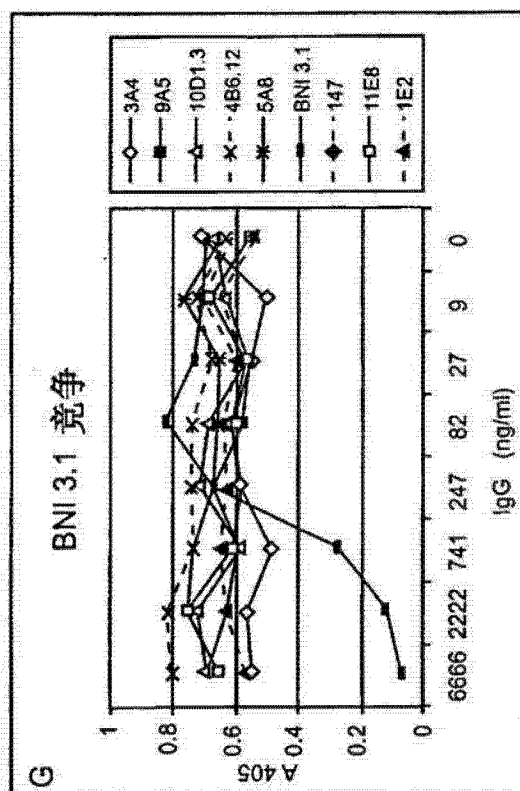


图 13G

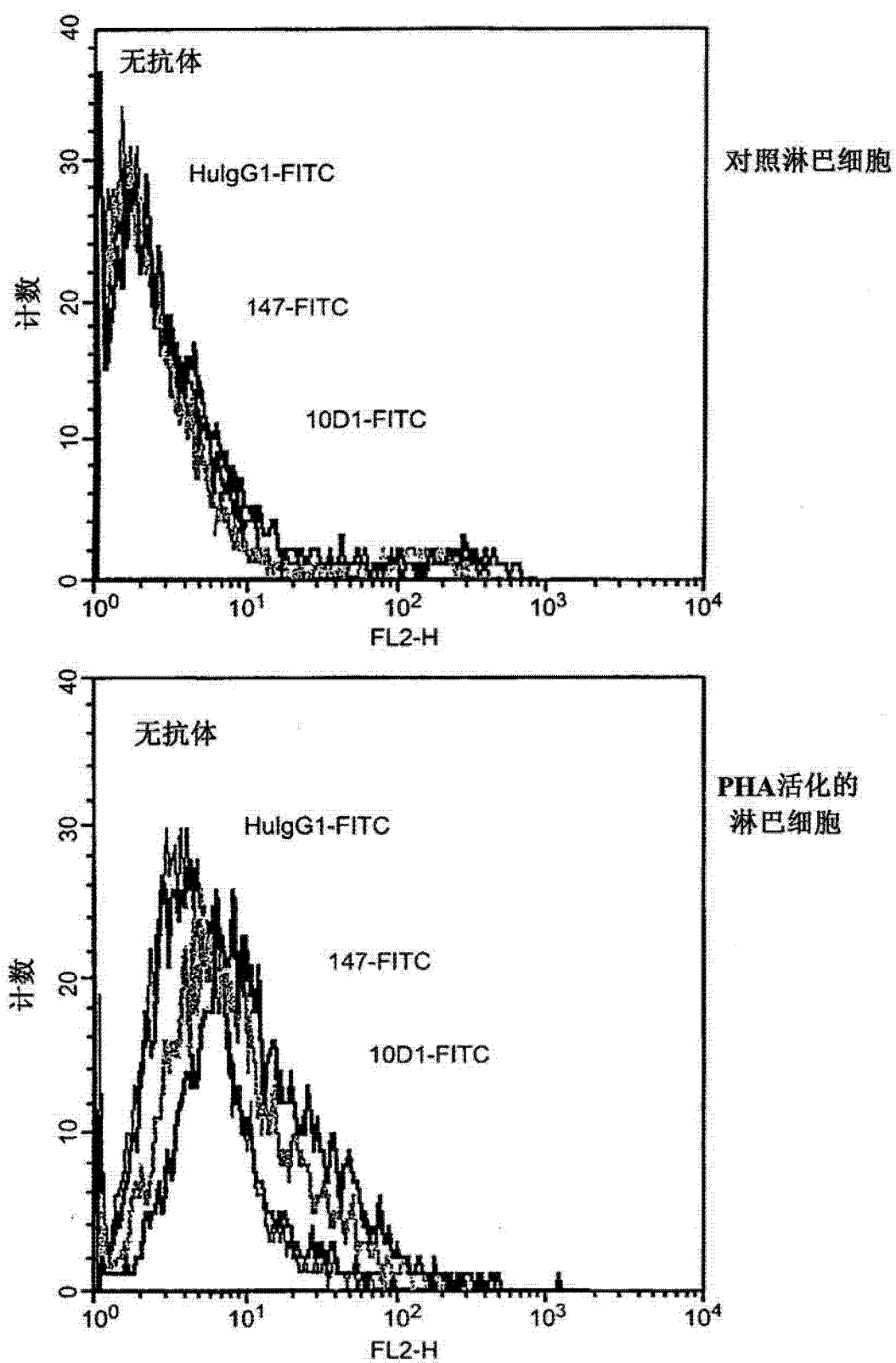


图 14

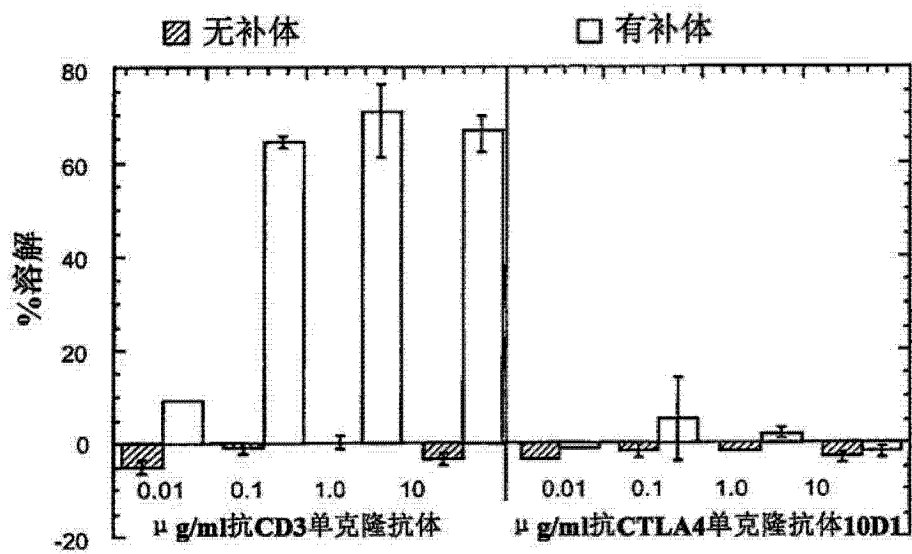


图 15

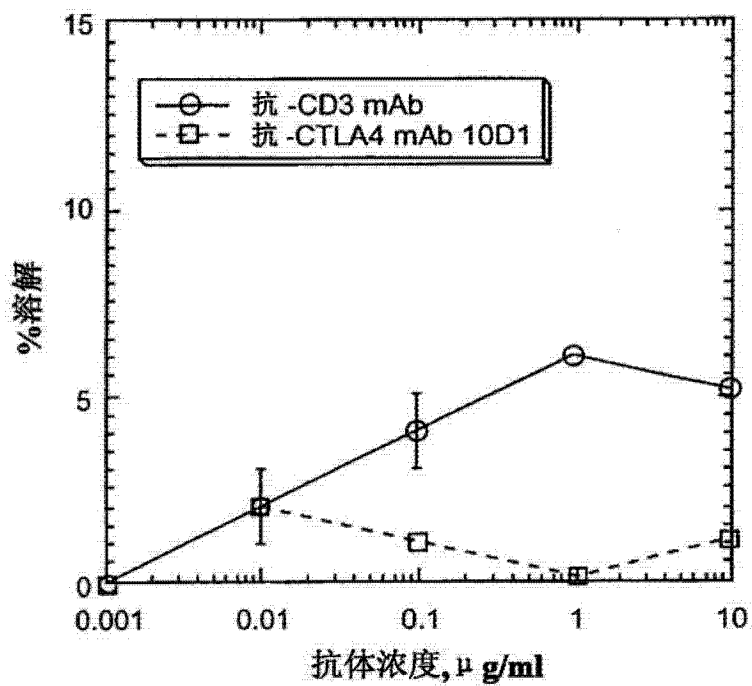


图 16

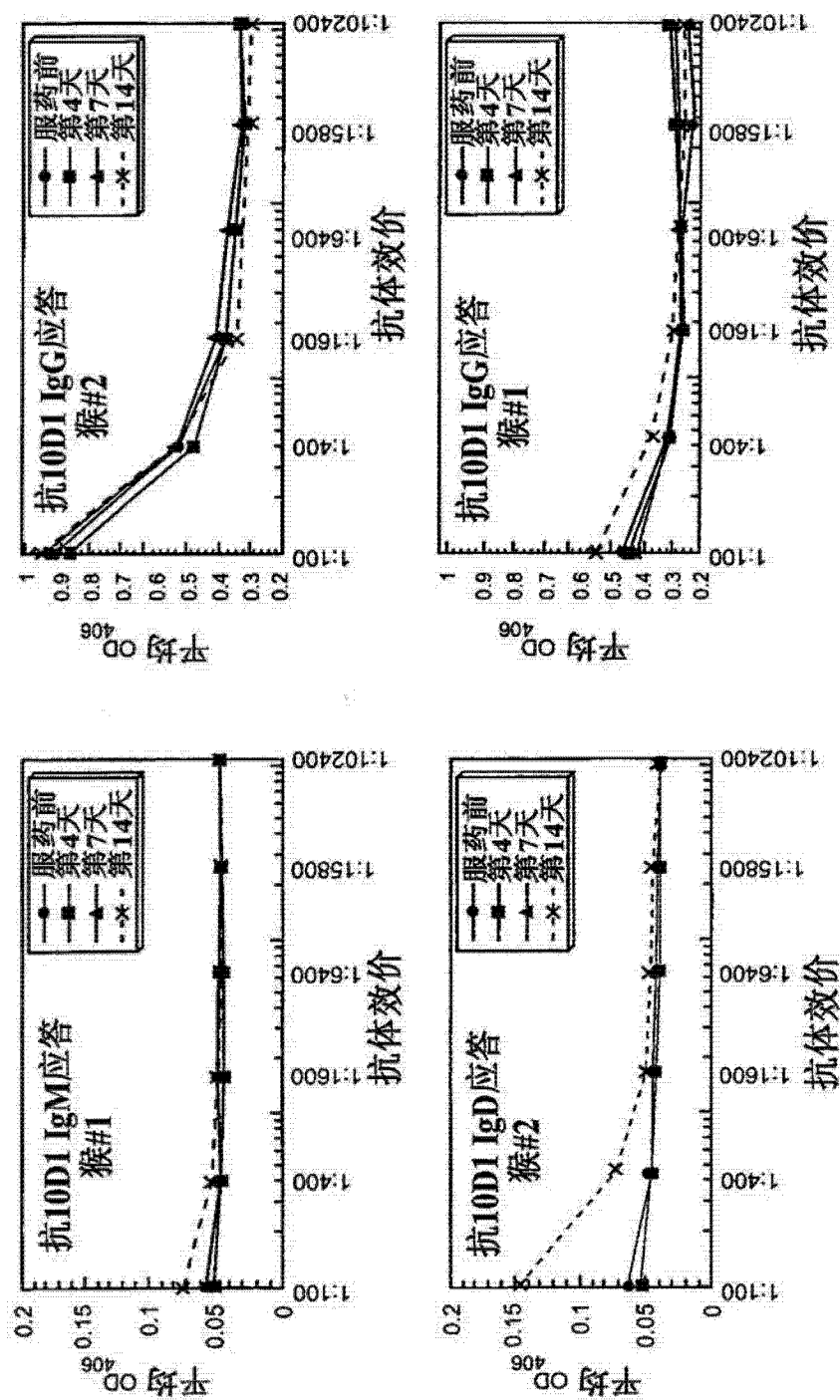


图 17