



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102015766 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 16

(21) 申请号 200980116708. 0

(22) 申请日 2009. 03. 10

(30) 优先权数据

61/068, 798 2008. 03. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 11. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/036706 2009. 03. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/114560 EN 2009. 09. 17

(73) 专利权人 特罗科隆科学有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 O·奥尔森

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 93/21952 A1, 1993. 11. 11,

John W. Schrader. Location, location, timing: Analysis of cytomegalovirus epitopes for neutralizing antibodies. 《Immunology Letters》. 2007, 第 112 卷

M. Ohlin, et al. Fine specificity of the human immune response to the major neutralization epitopes expressed on cytomegalovirus gp58/116 (gB), as determined with human monoclonal antibodies. 《Journal of Virology》. 1993, 第 67 卷 (第 2 期),

审查员 金武

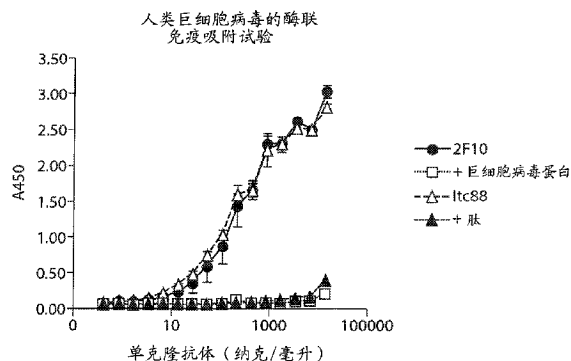
权利要求书2页 说明书85页 附图14页

(54) 发明名称

用于对巨细胞病毒感染进行治疗以及诊断的组合物以及方法

(57) 摘要

本发明提供了新的抗巨细胞病毒的抗体以及相关的组合物以及方法, 其中所述的抗体能够对 gB 的抑制性表位抗原决定簇 2- 位点 1 (AD2-S1) 进行识别。这些抗体可以被用在巨细胞病毒感染的诊断、预防、以及治疗之中。



1. 一种分离的抗巨细胞病毒抗体,其中所述的抗体包括:
I:
(a) 一种重链可变区域,所述的区域包括:
(i) 一种重链可变的互补决定区域 1 区域,其由所述的氨基酸序列 SSNGIH(序列识别号:57)组成;
(ii) 一种重链可变的互补决定区域 2 区域,其由所述的氨基酸序列 VISSDANDKQYADSVKG(序列识别号:58)组成;
(iii) 一种重链可变的互补决定区域 3 区域,其由所述的氨基酸序列 DGTCSSGGNCYSGLIDY(序列识别号:59)组成;以及
(b) 一种轻链可变区域,所述的区域包括:
(i) 一种轻链可变的互补决定区域 1 区域,其由所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA(序列识别号:43)组成;
(ii) 一种轻链可变的互补决定区域 2 区域,其由所述的氨基酸序列 ASIRAT(序列识别号:64)组成;
(iii) 一种轻链可变的互补决定区域 3 区域,其由所述的氨基酸序列 HQRSNPPLT(序列识别号:65)组成。
2. 一种分离的抗巨细胞病毒抗体,其中所述的抗体包括:
(a) 一种重链可变区域,所述的区域包括:
(i) 一种重链可变的互补决定区域 1 区域,其由所述的氨基酸序列 GFTFSS(序列识别号:60)组成;
(ii) 一种重链可变的互补决定区域 2 区域,其由所述的氨基酸序列 VISSDANDKQ(序列识别号:61)组成;
(iii) 一种重链可变的互补决定区域 3 区域,其由所述的氨基酸序列 DGTCSSGGNCYSGLIDY(序列识别号:59)组成;以及
(b) 一种轻链可变区域,所述的区域包括:
(i) 一种轻链可变的互补决定区域 1 区域,其由所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA(序列识别号:43)组成;
(ii) 一种轻链可变的互补决定区域 2 区域,其由所述的氨基酸序列 ASIRAT(序列识别号:64)组成;
(iii) 一种轻链可变的互补决定区域 3 区域,其由所述的氨基酸序列 HQRSNPPLT(序列识别号:65)组成。
3. 一种分离的抗巨细胞病毒抗体,所述的抗体包括:一种重链序列以及一种轻链序列,其中在所述的重链序列中包括如序列识别号 56 中所示的氨基酸序列,在所述的轻链序列中包括如序列识别号 63 中所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1、2 或者 3 中所述的抗巨细胞病毒抗体,其中所述的抗体能够与所述的巨细胞病毒的糖蛋白 b 包膜蛋白的一种表位进行结合。
5. 根据权利要求 4 中所述的抗巨细胞病毒抗体,其中所述的表位包括所述糖蛋白 b 的抗原决定簇 2 位点 1。
6. 一种组合物,其中包括权利要求 1、2、3、4 或者 5 中所述的抗体。

7. 根据权利要求6中所述的组合物,其中进一步的包括一种抗病毒治疗剂。
8. 根据权利要求7中所述的组合物,其中所述的抗病毒治疗剂是更昔洛韦,膦甲酸,西多福韦,缙更昔洛韦,以及静脉内免疫球蛋白。
9. 根据权利要求6中所述的组合物,其中进一步的包括第二种抗巨细胞病毒抗体。
10. 根据权利要求1、2、3、4或者5中所述的抗体,其中所述的抗体与一种治疗剂或者一种可探测性的标记进行了可操作性的连接。
11. 权利要求6中所述的组合物在制备用于在宿主体内对巨细胞病毒的感染进行治疗或者预防的药物中的应用。
12. 根据权利要求11中所述的应用,其中所述的组合物进一步的包括施用一种抗病毒治疗剂。
13. 根据权利要求11中所述的应用,其中所述的抗病毒治疗剂是更昔洛韦,膦甲酸,西多福韦,缙更昔洛韦,以及静脉内免疫球蛋白。
14. 根据权利要求11中所述的应用,其中所述的组合物是在被暴露于巨细胞病毒之前或者之后被进行施用的。
15. 根据权利要求11中所述的应用,其中所述的抗体是以足够对巨细胞病毒的感染产生抑制作用的剂量来进行施用的。
16. 一种诊断试剂盒,其中包括权利要求1、2、3、4或者5中所述的抗体。

用于对巨细胞病毒感染进行治疗以及诊断的组合物以及方法

[0001] 相关申请

[0002] 本发明要求享有申请日为 2009 年 3 月 10 日的临时申请 USSN 61/068798 的权益，上述临时申请作为一种整体在本发明中被引入作为参考。

[0003] 发明的领域

[0004] 本发明总体来说涉及到对巨细胞病毒 (CMV) 感染的治疗、诊断以及监控。本发明更为具体的涉及到人类巨细胞病毒 (HCMV) 特异性抗体以及对它们的制造以及使用。这样的抗体能够被有效的应用于药物组合物之中，用以对巨细胞病毒 (CMV) 感染进行预防以及治疗，并且用以对巨细胞病毒 (CMV) 感染进行诊断以及监控。

[0005] 发明的背景

[0006] 巨细胞病毒 (CMV) 与广泛存在的发病率以及死亡率存在关联。发生巨细胞病毒 (CMV) 的感染是常见的，并且已经估算出在美国有 50% 至 85% 的人在四十岁的时候发生过巨细胞病毒 (CMV) 的感染。尽管巨细胞病毒 (CMV) 的感染一般而言不会在健康的成人中产生症状，但在那些具有高度危险性的人群中存在着发展成为巨细胞病毒 (CMV) 相关性疾病的危险，其中所述的具有高度危险性的人群包括免疫受损的器官移植接受者以及感染有人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的个体。除此之外，在发展中国家，巨细胞病毒 (CMV) 是先天性感染的一种重要原因，能够导致头脑迟钝以及发育性残基。

[0007] 在任何的物种中，巨细胞病毒 (CMV) 是所述的疱疹病毒家族中的一种成员。在人类中，巨细胞病毒 (CMV)，也被称为人类巨细胞病毒 (HCMV)，被指定为人类疱疹病毒 5 (HHV-5)。巨细胞病毒 (CMV) 是所述的疱疹病毒家族中最大的成员，其具有超过 240kbp 的双链 DNA 染色体组，能够编码超过 200 种可能的蛋白质产品。巨细胞病毒 (CMV) 同样也被称之为 β 疱疹病毒亚属，因为它是一种能够对单核细胞以及淋巴细胞进行感染的疱疹病毒。尽管其他的哺乳动物能够被其他形式的巨细胞病毒 (CMV) 进行感染，人类是巨细胞病毒 (CMV) 感染的唯一的天然宿主。

[0008] 对患有巨细胞病毒 (CMV) 相关性疾病的患者所进行的医学治疗是由下述手段构成的：营养支持，对终末器官综合症（特别是在免疫受损的患者中患有的肺炎）所进行的支持性治疗，以及特异性的抗病毒治疗。至少有三种抗病毒治疗方法得到了美国食品药品监督管理局 (FDA) 的批准，用以对巨细胞病毒 (CMV) 的感染进行治疗或者预防。这些包括所述的核苷：更昔洛韦 (ganciclovir) (GCV) 以及西多福韦 (cidofovir)，以及膦甲酸 (foscarnet)。更昔洛韦 (GCV) 通常被用来作为移植接受者的优先治疗方法，其中所述的移植接受者存在着发展成为疾病的高度危险。阿昔洛韦 (acyclovir) 同样已经被用来在固体器官的移植中进行预防作用，但是所述的生物可利用率很差，并且没有在儿童中进行使用的数据支持。免疫球蛋白同样被用来作为被动免疫，用于对巨细胞病毒 (CMV) 相关性疾病进行预防。总而言之，尽管这些试剂已经在巨细胞病毒 (CMV) 感染的治疗或者预防中显示出了功效，但特别是核苷，与严重的副作用相关联，其中所述的副作用包括贫血以及其他的血液问题。因此，它们在儿童中的使用受到了限制。

[0009] 显然,在所述的领域中对新的试剂存在需求,其中所述的试剂能够有效的用于有症状的巨细胞病毒 (CMV) 感染以及相关疾病的治疗以及预防之中,特别是用于对儿童进行治疗之中。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了一种分离的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体或者所述抗体的片段,其中所述的抗体包括:I:(a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 SNHGIH(序列识别号:36);(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISSDGGDDRYADSVKG(序列识别号:37);(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DGRCGEPKCYSGLPDY(序列识别号:38);以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA(序列识别号:43);(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DASNRAT(序列识别号:44);(iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 LQRNTWPPLT(序列识别号:45);II:(a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 SNYGMH(序列识别号:48);(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISSDGSNEHYADSVKG(序列识别号:49);(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DGRCPDVNCYSGLIDY(序列识别号:50);以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGRYLA(序列识别号:53);(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DASNRAT(序列识别号:44);(iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 QQRSNWPPPLT(序列识别号:54);III:(a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 SSNGIH(序列识别号:57);(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISSDANDKQYADSVKG(序列识别号:58);(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DGTCSGGNCYSGLIDY(序列识别号:59);以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA(序列识别号:43);(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 ASIRAT(序列识别号:64);(iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 HQRSNWPPPLT(序列识别号:65);IV:(a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 SNHGIH(序列识别号:36);(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISKDGTAHYADSVRG(序列识别号:68);(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 EGRCIEENCYSGQIDY(序列识别号:69);以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGRYMA(序列识别号:74);(ii) 一种轻链

可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 DASIRAT (序列识别号 :75); (iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 QQRSSWPPLT (序列识别号 :76); V : (a) 一种重链可变 (V_H) 区域, 所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 SNHGIH (序列识别号 :36); (ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 VISKDGTNAHYADSVRGR (序列识别号 :79); (iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 EGRCIEEKCYSGQIDY (序列识别号 :80); 以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域, 所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGRYMA (序列识别号 :74); (ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 DASIRAT (序列识别号 :75); (iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 QQRSSWPPLT (序列识别号 :76); VI : (a) 一种重链可变 (V_H) 区域, 所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 SDYGMH (序列识别号 :85); (ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 VISKDGTNTHYADSVRG (序列识别号 :86); (iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 DGKCPDLKCYSGLIDY (序列识别号 :87); 以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域, 所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA (序列识别号 :43); (ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 DASKRAT (序列识别号 :92); (iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 HQRSSWPPLT (序列识别号 :93); VII : (a) 一种重链可变 (V_H) 区域, 所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 SXXGXH (序列识别号 :95), SXXGIH (序列识别号 :96), 或者 SXYGMH (序列识别号 :101); (ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 VISXDXXXXXYADSVRG (序列识别号 :96) 或者 VISXDGXNXHYADSVXG (序列识别号 :99); (iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 DGXCSXXCYSGGLXDY (序列识别号 :100), EGRCIEEXCYSGQIDY (序列识别号 :102), 或者 DGXCPDXXCYSGGLIDY (序列识别号 :103); 以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域, 所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGXYYA (序列识别号 :111) 或者 RASQSVGXYYLA (序列识别号 :114); (ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 XASXRAT (序列识别号 :112) 或者 DASXRAT (序列识别号 :115); (iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 XQRXXWPPLT (序列识别号 :113), HQRXXWPPLT (序列识别号 :116), 或者 QQRXXWPPLT (序列识别号 :117)。

[0012] 本发明同样提供了一种分离的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体或者是所述抗体的片段, 其中所述的抗体包括 : I : (a) 一种重链可变 (V_H) 区域, 所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 GFTFSN (序列识别号 :39); (ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域, 其中包括所述的氨基酸序列 VISSDGDDDR (序列识别号 :40); (iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域, 其

中包括所述的氨基酸序列 DGRGCEPKCYSGLPDY (序列识别号 :38) ;以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA (序列识别号 :43) ;(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DASNRAT (序列识别号 :44) ;(iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 LQRNTWPPLT (序列识别号 :45) ;II : (a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 GLTFSN (序列识别号 :118) ;(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISSDGSNEH (序列识别号 :51) ;(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DGRCPDVNCYSGLIDY (序列识别号 :50) ;以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGRYLA (序列识别号 :53) ;(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DASNRAT (序列识别号 :44) ;(iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 QQRSNWPPLT (序列识别号 :54) ;III : (a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 GFTFSS (序列识别号 :57) ;(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISSDANDKQ (序列识别号 :61) ;(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DGTCSGGNCYSGLIDY (序列识别号 :59) ;以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA (序列识别号 :43) ;(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 ASIRAT (序列识别号 :64) ;(iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 HQRSNWPPLT (序列识别号 :65) ;IV :

[0013] (a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 KFIFSN (序列识别号 :70) ;(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISKDGTNAH (序列识别号 :71) ;(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 EGRCIEENCYSGQIDY (序列识别号 :69) ;以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGRYMA (序列识别号 :74) ;(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 DASIRAT (序列识别号 :75) ;(iii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 QQRSSWPPLT (序列识别号 :76) ;V : (a) 一种重链可变 (V_H) 区域,所述的区域包括 (i) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 KFIFSN (序列识别号 :70) ;(ii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 2 区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISKDGTNAH (序列识别号 :71) ;(iii) 一种重链可变 (V_H) 的互补决定区域 (CDR) 3 区域,其中包括所述的氨基酸序列 EGRCIEEKCYSQIDY (序列识别号 :80) ;以及 (b) 一种轻链可变 (V_L) 区域,所述的区域包括 (i) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 1 区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGRYMA (序列识别号 :74) ;(ii) 一种轻链可变 (V_L) 的互补决定区域 (CDR) 2 区

域,其中包括所述的氨基酸序列 DASIRAT(序列识别号:75);(iii)一种轻链可变(V_L)的互补决定区域(CDR)3区域,其中包括所述的氨基酸序列 QQRSSWPPLT(序列识别号:76);VI:(a)一种重链可变(V_H)区域,所述的区域包括(i)一种重链可变(V_H)的互补决定区域(CDR)1区域,其中包括所述的氨基酸序列 GLTFSD(序列识别号:88);(ii)一种重链可变(V_H)的互补决定区域(CDR)2区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISKDGTNTH(序列识别号:89);(iii)一种重链可变(V_H)的互补决定区域(CDR)3区域,其中包括所述的氨基酸序列 DGKCPDLKCYSGGLIDY(序列识别号:87);以及(b)一种轻链可变(V_L)区域,所述的区域包括(i)一种轻链可变(V_L)的互补决定区域(CDR)1区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGGYLA(序列识别号:43);(ii)一种轻链可变(V_L)的互补决定区域(CDR)2区域,其中包括所述的氨基酸序列 DASKRAT(序列识别号:92);(iii)一种轻链可变(V_L)的互补决定区域(CDR)3区域,其中包括所述的氨基酸序列 HQRSSWPPLT(序列识别号:93);VII:(a)一种重链可变(V_H)区域,所述的区域包括(i)一种重链可变(V_H)的互补决定区域(CDR)1区域,其中包括所述的氨基酸序列 XXXFSX(序列识别号:104),或者 GXTFSX(序列识别号:107);(ii)一种重链可变(V_H)的互补决定区域(CDR)2区域,其中包括所述的氨基酸序列 VISXDXXXXX(序列识别号:105)或者 VISXDGXNXH(序列识别号:108);(iii)一种重链可变(V_H)的互补决定区域(CDR)3区域,其中包括所述的氨基酸序列 XGXCXXXXCYSGXXDY(序列识别号:106),DGXCXXXXCYSGLXDY(序列识别号:109),或者 EGRClEEEXCYSGQIDY(序列识别号:110);以及(b)一种轻链可变(V_L)区域,所述的区域包括(i)一种轻链可变(V_L)的互补决定区域(CDR)1区域,其中包括所述的氨基酸序列 RASQSVGXYYA(序列识别号:111)或者 RASQSVGXYLA(序列识别号:114);(ii)一种轻链可变(V_L)的互补决定区域(CDR)2区域,其中包括所述的氨基酸序列 XASXRAT(序列识别号:112)或者 DASXRAT(序列识别号:115);(iii)一种轻链可变(V_L)的互补决定区域(CDR)3区域,其中包括所述的氨基酸序列 XQRXXWPPLT(序列识别号:113),HQRSXWPPLT(序列识别号:116),或者 QQRSXWPPLT(序列识别号:117)。

[0014] 本发明进一步的提供了一种分离的抗巨细胞病毒(CMV)抗体,所述的抗体包括:(a)一种重链序列以及一种轻链序列,其中所述的重链序列中包括如序列识别号35中所示的氨基酸序列,所述的轻链序列中包括如序列识别号42中所示的氨基酸序列,或者(b)一种重链序列以及一种轻链序列,其中所述的重链序列中包括如序列识别号47中所示的氨基酸序列,所述的轻链序列中包括如序列识别号52中所示的氨基酸序列,或者(c)一种重链序列以及一种轻链序列,其中所述的重链序列中包括如序列识别号56中所示的氨基酸序列,所述的轻链序列中包括如序列识别号63中所示的氨基酸序列,或者(d)一种重链序列以及一种轻链序列,其中所述的重链序列中包括如序列识别号67中所示的氨基酸序列,所述的轻链序列中包括如序列识别号73中所示的氨基酸序列,或者(e)一种重链序列以及一种轻链序列,其中所述的重链序列中包括如序列识别号78中所示的氨基酸序列,所述的轻链序列中包括如序列识别号82中所示的氨基酸序列,或者(f)一种重链序列以及一种轻链序列,其中所述的重链序列中包括如序列识别号84中所示的氨基酸序列,所述的轻链序列中包括如序列识别号91中所示的氨基酸序列。

[0015] 本发明中所述的抗巨细胞病毒(CMV)抗体能够与所述的巨细胞病毒(CMV)病毒的糖蛋白b(gB)包膜蛋白的表位进行结合。在本发明中的一种方面,所述的表位包括糖蛋白

b 的抗原决定簇 2 位点 1, 糖蛋白 (gp) 116。

[0016] 本发明提供了一种组合物, 所述的组合物中包括一种或者多种在本发明中描述的所述抗体。在某些实施方式中, 所述的组合物中同样包括一种抗病毒的治疗。抗病毒治疗的非限制性的例子是更昔洛韦 (ganciclovir), 膦甲酸 (foscarnet), 西多福韦 (cidofovir), 缙更昔洛韦 (valganciclovir), 以及静脉内免疫球蛋白 (IVIG)。在其他的实施方式中, 所述的组合物中进一步的包括第二种抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体。

[0017] 本发明进一步的提供了一种抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体, 例如是那些在本发明中所描述的抗体, 其中所述的抗体与一种治疗性的试剂或者一种可探测性的标记进行了可操作性的连接。

[0018] 本发明提供了一种方法, 用以在宿主中对一种巨细胞病毒 (CMV) 感染进行治疗或者预防, 所述的方法包括向所述的宿主施用在本发明中所描述的所述组合物。在一种方面, 这个方法中进一步的包括施用一种抗病毒的治疗。抗病毒的治疗包括, 但不局限于, 下述的例子: 更昔洛韦 (ganciclovir), 膦甲酸 (foscarnet), 西多福韦 (cidofovir), 缙更昔洛韦 (valganciclovir), 以及静脉内免疫球蛋白 (IVIG)。在上述方法中的另外一种方面, 所述的含有一种抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体的组合物是在被暴露于巨细胞病毒 (CMV) 之前或者之后来进行施用的, 其中所述的化合物的施用剂量足以对巨细胞病毒 (CMV) 的感染产生抑制作用。

[0019] 为了确定在患者中是否存在巨细胞病毒 (CMV) 的感染, 提供了本发明中的另外的方法, 其中所述的方法包括下述的步骤: (a) 将一种来自于所述患者的生物学样本与本发明中所描述的抗体进行接触; (b) 对与所述的生物学样本进行结合的所述抗体的剂量进行探测; 以及 (c) 将与所述的生物学样本进行结合的所述抗体的剂量与一种对照值进行比较, 并且据此确定在所述的患者中是否存在所述的巨细胞病毒。

[0020] 本发明同样提供了一种试剂盒, 所述的试剂盒中包含了在本发明中所描述的抗体。

[0021] 可供选择的, 或者除此之外的, 本发明提供了一种分离的人类单克隆抗体, 其中所述的单克隆抗体能够与一种表位进行结合, 所述的表位存在于一种巨细胞病毒 (CMV) 的所述的糖蛋白 gB 复合体的细胞外结构域中。在一种优选的实施方式中, 所述的巨细胞病毒 (CMV) 是一种人类巨细胞病毒 (HCMV)。在另外一种优选的实施方式中, 所述的抗体是从一种 B 细胞中分离出来的, 其中所述的 B 细胞来自于一种人类供体。

[0022] 在本发明中的某些方面, 所述的分离的人类单克隆抗体的表位包括所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 B 复合体中的抗原决定簇 (AD)-2 区域。具体的, 所述的表位包括存在于一种巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 B 多肽的位置 70-88 上的所述氨基酸, 其中所述的氨基酸位置的编号与序列识别号 30 中的编号相一致。或者可供选择的, 所述的表位包括存在于一种巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 B 复合体的位置 65-93 上的所述氨基酸, 其中所述的氨基酸位置的编号与序列识别号 30 中的编号相一致。一种进一步的可供选择的表位包括存在于一种巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白复 B 复合体的位置 60-98 上的所述氨基酸, 其中所述的氨基酸位置的编号与序列识别号 30 中的编号相一致。

[0023] 在本发明的某些实施方式中, 在本发明中描述到的所述抗体的所述表位包括下述氨基酸序列中的全部或者一部分: NETIYNTTLKYGDVVGVN (序列识别号: 32) 或者 NIX₃NX₄TX₅

$X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (序列识别号 :33), 其中 X_1 为氨基酸 E 或者 T, X_2 为 T 或者 V, X_3 为 Y 或者 R, X_4 为 T 或者 L, X_5 为 L 或者 A, X_6 为 K 或者 S, X_7 为 Y 或者 V, X_8 为 G 或者 D, X_9 为 D 或者 F, X_{10} 为 V 或者 S, X_{11} 为 V 或者 Q, X_{12} 为 G 或者不存在, X_{13} 为 V 或者不存在, 并且 X_{14} 为 N 或者不存在。在一种进一步的实施方式中, 所述的表位包括下述氨基酸序列中的全部或者一部分 :SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK (序列识别号 :31)。

[0024] 本发明中所述的分离的人类单克隆抗体是 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 4P12, 5P9, 或者 9C16。可供选择的, 或者除此之外的, 本发明提供了一种抗体, 所述的抗体能够与 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 4P12, 5P9, 或者 9C16 在相同的表位上进行结合。在一种优选的实施方式中, 本发明提供了一种分离的人类单克隆抗体, 所述的单克隆抗体能够与 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 4P12, 5P9, 或者 9C16 在相同的表位上进行结合。

[0025] 本发明同样提供了一种分离的人类单克隆抗巨细胞病毒 9 (CMV) 抗体或者上述抗体的片段, 其中所述的抗体包括一种重链可变区域 (V_H), 所述的重链可变区域 (V_H) 包括互补决定区域 (CDR) 1 以及互补决定区域 (CDR) 2, 其中所述的区域是由一种人类免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 的重链可变区域 (V_H) 生殖系序列进行编码的, 或者是由一种与所述的重链可变区域 (V_H) 生殖系基因序列具有同源性的核酸序列进行编码的。在一种方面, 与所述的生殖系序列具有同源性的所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 生殖系序列之间具有至少 90% 的同源性。本发明中所述的抗体进一步的包括一种轻链可变区域 (V_L), 其中所述的区域是由一种人类免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 的轻链可变区域 (V_L) 生殖系序列进行编码的, 或者是由一种与所述的轻链可变区域 (V_L) 生殖系基因序列具有同源性的核酸序列进行编码的。在一种方面, 与所述的生殖系序列具有同源性的所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 生殖系序列之间具有至少 90% 的同源性。

[0026] 附图的简要描述

[0027] 附图 1 表示的是所指示出的人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体的可变区域中的所述的氨基酸序列之间进行的比对。附图 1A 提供了所述的 γ 重链可变区域之间的比对, 并且附图 1B 提供了所述的 κ 轻链可变区域之间的比对。在每一种比对下面表示出的是保守序列。红色的是 A, D, F, W, Y, S 或者 T; 淡绿色的是 P; 淡蓝色的是 N 或者 Q; 黄色的是 C 或者 M, 极淡的蓝色是 A, G, I, L 或者 V; 深蓝色的是 R, H 或者 K。这仅仅是用来进行序列比较的直观教具。

[0028] 附图 2 是一种图表, 描述的是: 正如所指示出的, 在存在或者不存在竞争肽的情况下, 所述的 2F10 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体与所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 (gp) 116 表位抗原决定簇 2 (AD2) 肽之间所进行的结合。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的荧光性。

[0029] 附图 3 是一种图表, 描述的是: 正如所指示出的, 在存在或者不存在竞争肽的情况下, 所述的 2M16 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体与所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 (gp) 116 表位抗原决定簇 2 (AD2) 肽之间所进行的结合。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的荧光性。

[0030] 附图 4 是一种图表, 描述的是: 正如所指示出的, 在存在或者不存在竞争肽的情况下, 所述的 2N9 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体与所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 (gp) 116

表位抗原决定簇 2(AD2) 肽之间所进行的结合。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的荧光性。

[0031] 附图 5 是一种图表,描述的是:正如所指示出的,在存在或者不存在竞争肽的情况下,所述的 3C21 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体与所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 (gp) 116 表位抗原决定簇 2(AD2) 肽之间所进行的结合。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的荧光性。

[0032] 附图 6 是一种图表,描述的是:正如所指示出的,在存在或者不存在竞争肽的情况下,所述的 3G7 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体与所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 (gp) 116 表位抗原决定簇 2(AD2) 肽之间所进行的结合。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的荧光性。

[0033] 附图 7 是一种图表,描述的是:正如所指示出的,在存在或者不存在竞争肽的情况下,所述的 4P12 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体与所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 (gp) 116 表位抗原决定簇 2(AD2) 肽之间所进行的结合。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的荧光性。

[0034] 附图 8 是一种图表,描述的是:正如所指示出的,在存在或者不存在竞争肽的情况下,所述的 5J12 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体与所述的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白 (gp) 116 表位抗原决定簇 2(AD2) 肽之间所进行的结合。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的荧光性。

[0035] 附图 9 是一种图表,描述的是所述的 2F10 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体对所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒所产生的抑制作用。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的所述的病毒抑制作用的剂量。

[0036] 附图 10 是一种图表,描述的是所述的 2M16 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体对所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒所产生的抑制作用。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的所述的病毒抑制作用的剂量。

[0037] 附图 11 是一种图表,描述的是所述的 2N9 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体对所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒所产生的抑制作用。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的所述的病毒抑制作用的剂量。

[0038] 附图 12 是一种图表,描述的是所述的 3C21 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体对所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒所产生的抑制作用。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的所述的病毒抑制作用的剂量。

[0039] 附图 13 是一种图表,描述的是所述的 3G7 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体对所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒所产生的抑制作用。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的所述的病毒抑制作用的剂量。

[0040] 附图 14 是一种图表,描述的是所述的 4P12 人类抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体对所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒所产生的抑制作用。所述的图表表示的是与所述的抗体的指示浓度相关联的所述的病毒抑制作用的剂量。

[0041] 附图 15 是一系列的图表,表示的是在三种人类细胞系中所述的相对感染性%与所说的人类巨细胞病毒 (HCMV) 病毒菌株 (VR1814) 的浓度之间的关系,其中使用了六种抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体(上面的两行)以及两组对照(下面的一行),是在 30 微克/

毫升至 0.003 微克 / 毫升的稀释范围之内进行的。

[0042] 附图 16 是一系列的图表,表示的是在人类纤维原细胞系中所述的相对感染性%与所述的人类巨细胞病毒 (HCMV) 病毒菌株 (8818,8819,以及 8824) 的浓度之间的关系,其中使用了六种抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体 (上面的两行) 以及两组对照 (下面的一行),是在 30 微克 / 毫升至 0.003 微克 / 毫升的稀释范围之内进行的。

[0043] 附图 17 是一系列的图表,表示的是在人类内皮细胞系以及上皮细胞系中所述的相对感染性%与所述的人类巨细胞病毒 (HCMV) 临床分离物 (8819) 的浓度之间的关系,其中使用了六种抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体 (上面的两行) 以及两组对照 (下面的一行),是在发生改变的浓度下进行的。

[0044] 附图 18 是一系列的图表,表示的是在 JH4 细胞中所述的相对感染性%与所述的豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 病毒菌株 (V545/32) 的浓度之间的关系,其中使用了六种抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体 (上面的两行) 以及两组对照 (下面的一行),是在发生改变的浓度下进行的。

[0045] 发明的详细描述

[0046] 本发明总体上涉及组合物以及它们在对所述的巨细胞病毒 (CMV) 感染所进行的诊断、预防、以及治疗中的用途。正如将在下文中进一步的描述到的,例证性的本发明所述的组合物包括,但不局限于,人类巨细胞病毒 (HCMV) 特异性抗体,以及上述抗体的片段以及衍生物。

[0047] 在一种实施方式中,本发明中所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体能够与下述氨基酸序列进行完全结合或者部分结合:SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK (序列识别号:31) 或者 NETIYNTTLKYGDVVGVN (序列识别号:32)。最为优选的,本发明中所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体能够与下述氨基酸序列进行完全结合或者部分结合:NIX₃NX₄TX₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄ (序列识别号:33),其中 X₁ 为氨基酸 E 或者 T, X₂ 为 T 或者 V, X₃ 为 Y 或者 R, X₄ 为 T 或者 L, X₅ 为 L 或者 A, X₆ 为 K 或者 S, X₇ 为 Y 或者 V, X₈ 为 G 或者 D, X₉ 为 D 或者 F, X₁₀ 为 V 或者 S, X₁₁ 为 V 或者 Q, X₁₂ 为 G 或者不存在, X₁₃ 为 V 或者不存在,并且 X₁₄ 为 N 或者不存在。能够在这个表位上进行结合的范例性的抗巨细胞病毒 (CMV) 单克隆抗体是在本发明中所描述到的 2F10, 2M16, 2N9, 4P12, 5P9, 9C16 抗体。

[0048] 在本发明中的实施例中所描述的序列中,将含有按照 Chothia, C. 等人 (于 1989 年在 Nature 《自然》 342 :877-883 中发表的文章) 所定义的互补决定区域 (CDR) 的所述的氨基酸用斜体表示,并且那些按照 Kabat E. A. 等人 (于 1991 年发表的 Sequences of Proteins of Immunological Interest 《具有免疫学兴趣的蛋白质序列》,第 5 版, NIH Publication 美国国立卫生研究所出版社,第 91-3242 号, U. S. Department of Health and Human Services 美国卫生与人类服务部) 所定义的用粗体下划线表示。本领域普通技术人员应当能够容易的知晓存在几种在抗体的可变区域内对互补决定区域 (CDR) 进行定义的标准方法。在本发明中提供了两种最为广泛使用的方法。本领域普通技术人员将同样能够容易的知晓,其他本领域知晓的用以描述互补决定区域 (CDR) 的方法是被涵盖在本发明的范围内的。

[0049] 所述的 2F10 抗体包括一种重链可变区域 (序列识别号:35) 以及一种轻链可变区域 (序列识别号:42),其中所述的重链可变区域是由下文中在序列识别号 34 中所示的核酸

序列进行编码的,所述的轻链可变区域是由在序列识别号 41 中所示的核酸序列进行编码的。

[0050] 所述的 2F10 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列:SNHGIH(序列识别号:36), VISSDGDDDRYADSVKG(序列识别号:37),以及 DGRCGEPCYSGLPDY(序列识别号:38)。所述的 2F10 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列:RASQSVGYLA(序列识别号:43), DASNRAT(序列识别号:44),以及 LQRNTWPPLT(序列识别号:45)。

[0051] 所述的 2F10 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列:GFTFSN(序列识别号:39), VISSDGDDDR(序列识别号:40),以及 DGRCGEPCYSGLPDY(序列识别号:38)。所述的 2F10 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列:RASQSVGYLA(序列识别号:43), DASNRAT(序列识别号:44),以及 LQRNTWPPLT(序列识别号:45)。

[0052] 所述的 2M16 抗体包括一种重链可变区域(序列识别号:47)以及一种轻链可变区域(序列识别号:52),其中所述的重链可变区域是由下文中在序列识别号 46 中所示的核酸序列进行编码的,所述的轻链可变区域是由在序列识别号 94 中所示的核酸序列进行编码的。

[0053] 所述的 2M16 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列:SNYGMH(序列识别号:48), VISSDGSNEHYADSVKG(序列识别号:49),以及 DGRCPDVNCYSGLIDY(序列识别号:50)。所述的 2M16 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列:RASQSVGRYLA(序列识别号:53), DASNRAT(序列识别号:44),以及 QQRSNWPLT(序列识别号:54)。

[0054] 所述的 2M16 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列:GLTFSN(序列识别号:118), VISSDGSNEH(序列识别号:51),以及 DGRCPDVNCYSGLIDY(序列识别号:50)。所述的 2M16 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列:RASQSVGRYLA(序列识别号:53), DASNRAT(序列识别号:44),以及 QQRSNWPLT(序列识别号:54)。

[0055] 所述的 2N9 抗体包括一种重链可变区域(序列识别号:56)以及一种轻链可变区域(序列识别号:63),其中所述的重链可变区域是由下文中在序列识别号 55 中所示的核酸序列进行编码的,所述的轻链可变区域是由在序列识别号 62 中所示的核酸序列进行编码的。

[0056] 所述的 2N9 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列:SSNGIH(序列识别号:57), VISSDANDKQYADSVKG(序列识别号:58),以及 DGTCSGGNCYSGLIDY(序列识别号:59)。所述的 2N9 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列:RASQSVGYLA(序列识别号:43), ASIRAT(序列识别号:64),以及 HQRSNWPLT(序列识别号:65)。

[0057] 所述的 2N9 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列:GFTFSS(序列识别号:60), VISSDANDKQ(序列识别号:61),以及 DGTCSGGNCYSGLIDY(序列识别号:59)。所述的 2N9 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列:RASQSVGYLA(序列识别号:43), ASIRAT(序列

识别号 :64), 以及 HQRSNWPPLT (序列识别号 :65)。

[0058] 所述的 4P12 抗体包括一种重链可变区域 (序列识别号 :67) 以及一种轻链可变区域 (序列识别号 :73), 其中所述的重链可变区域是由下文中在序列识别号 66 中所示的核酸序列进行编码的, 所述的轻链可变区域是由在序列识别号 72 中所示的核酸序列进行编码的。

[0059] 所述的 4P12 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列 :SNHGIH (序列识别号 :36), VISKDGTNAHYADSVRG (序列识别号 :68), 以及 EGRCIEENCYSGQIDY (序列识别号 :69)。所述的 4P12 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列 :RASQSVGRYMA (序列识别号 :74), DASIRAT (序列识别号 :75), 以及 QQRSSWPPLT (序列识别号 :76)。

[0060] 所述的 4P12 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列 :KFIFSN (序列识别号 :70), VISKDGTNAH (序列识别号 :71), 以及 EGRCIEENCYSGQIDY (序列识别号 :69)。所述的 4P12 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列 :RASQSVGRYMA (序列识别号 :74), DASIRAT (序列识别号 :75), 以及 QQRSSWPPLT (序列识别号 :76)。

[0061] 所述的 5P9 抗体包括一种重链可变区域 (序列识别号 :78) 以及一种轻链可变区域 (序列识别号 :82), 其中所述的重链可变区域是由下文中在序列识别号 77 中所示的核酸序列进行编码的, 所述的轻链可变区域是由在序列识别号 81 中所示的核酸序列进行编码的。

[0062] 所述的 5P9 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列 :SNHGIH (序列识别号 :36), VISKDGTNAHYADSVRGR (序列识别号 :79), 以及 EGRCIEEKCYSGQIDY (序列识别号 :80)。所述的 5P9 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列 :RASQSVGRYMA (序列识别号 :74), DASIRAT (序列识别号 :75), 以及 QQRSSWPPLT (序列识别号 :76)。

[0063] 所述的 5P9 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列 :KFIFSN (序列识别号 :70), VISKDGTNAH (序列识别号 :71), 以及 EGRCIEEKCYSGQIDY (序列识别号 :80)。所述的 5P9 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列 :RASQSVGRYMA (序列识别号 :74), DASIRAT (序列识别号 :75), 以及 QQRSSWPPLT (序列识别号 :76)。

[0064] 所述的 9C16 抗体包括一种重链可变区域 (序列识别号 :84) 以及一种轻链可变区域 (序列识别号 :91), 其中所述的重链可变区域是由下文中在序列识别号 83 中所示的核酸序列进行编码的, 所述的轻链可变区域是由在序列识别号 90 中所示的核酸序列进行编码的。

[0065] 所述的 9C16 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列 :SDYGMH (序列识别号 :85), VISKDGTNTHYADSVRG (序列识别号 :86), 以及 DGKCPDLKCYSGLIDY (序列识别号 :87)。所述的 9C16 抗体所具有的轻链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Kabat 的定义中具有下述的序列 :RASQSVGYLA (序列识别号 :43), DASKRAT (序列识别号 :92), 以及 HQRSSWPPLT (序列识别号 :93)。

[0066] 所述的 9C16 抗体所具有的重链互补决定区域 (CDR) 中在经由 Chothia 的定

义中具有下述的序列:GLTFSD(序列识别号:88), VISKDGTNTH(序列识别号:89), 以及 DGKCPDLKCYSGLIDY(序列识别号:87)。所述的 9C16 抗体所具有的轻链互补决定区域(CDR)中在经由 Chothia 的定义中具有下述的序列:RASQSVGYLA(序列识别号:43), DASKRAT(序列识别号:92), 以及 HQRSSWPPLT(序列识别号:93)。

[0067] 一种抗巨细胞病毒(CMV)抗体含有一种重链可变区域以及一种轻链可变区域,其中所述的重链可变区域中含有序列识别号:35,47,56,67,78,或者84所示的氨基酸序列,所述的轻链可变区域中含有序列识别号:42,52,63,73,82,或者91所示的氨基酸序列。优选的,所述的三个重链互补决定区域(CDR)中包括一种氨基酸序列,所述的氨基酸序列与下述的氨基酸序列之间具有至少90%、92%、95%、97%、98%、99%或者更高的同一性:SNHGIH(序列识别号:36), VISSDGDDDRYADSVKG(序列识别号:37), DGRCGEPKCYSGLPDY(序列识别号:38), SNYGMH(序列识别号:48), VISSDGSNEHYADSVKG(序列识别号:49), DGRCPDVNCYSGLIDY(序列识别号:50), SSNGIH(序列识别号:57), VISSDANDKQYADSVKG(序列识别号:58), DGTCSGGNCYSGLIDY(序列识别号:59), VISKDGTNAHYADSVRG(序列识别号:68), EGRCIEENCYSQGIDY(序列识别号:69), VISKDGTNAHYADSVRGR(序列识别号:79), EGRCIEEKCYSGQIDY(序列识别号:80), SDYGMH(序列识别号:85), VISKDGTNTHYADSVRG(序列识别号:86), DGKCPDLKCYSGLIDY(序列识别号:87)(按照所述的 Kabat 方法来确定的)或者 GFTFSN(序列识别号:39), VISSDGDDDR(序列识别号:40), DGRCGEPKCYSGLPDY(序列识别号:38), GLTFSN(序列识别号:39), VISSDGSNEH(序列识别号:51), DGRCPDVNCYSGLIDY(序列识别号:50), GFTFSS(序列识别号:60), VISSDANDKQ(序列识别号:61), DGTCSGGNCYSGLIDY(序列识别号:59), KFIFSN(序列识别号:70), VISKDGTNAH(序列识别号:71), EGRCIEENCYSQGIDY(序列识别号:69), EGRCIEEKCYSGQIDY(序列识别号:80), GLTFSD(序列识别号:88), VISKDGTNTH(序列识别号:89), DGKCPDLKCYSGLIDY(序列识别号:87), GLTFSN(序列识别号:118)(按照所述的 Chothia 方法来确定的),并且带有三个互补决定区域(CDR)的轻链中包括一种氨基酸序列,所述的氨基酸序列与下述的氨基酸序列之间具有至少90%、92%、95%、97%、98%、99%或者更高的同一性:RASQSVGGYLA(序列识别号:43), DASNRAT(序列识别号:44), LQRNTWPPLT(序列识别号:45), RASQSVGRYLA(序列识别号:53), QQRSNWPPLT(序列识别号:54), ASIRAT(序列识别号:64), HQRSNWPPLT(序列识别号:65), RASQSVGRYMA(序列识别号:74), DASIRAT(序列识别号:75), QQRSSWPPLT(序列识别号:76), DASKRAT(序列识别号:92), HQRSSWPPLT(序列识别号:93)(按照所述的 Kabat 方法来确定的)或者 RASQSVGGYLA(序列识别号:43), DASNRAT(序列识别号:44), LQRNTWPPLT(序列识别号:45), RASQSVGRYLA(序列识别号:53), QQRSNWPPLT(序列识别号:54), ASIRAT(序列识别号:64), HQRSNWPPLT(序列识别号:65), RASQSVGRYMA(序列识别号:74), DASIRAT(序列识别号:75), QQRSSWPPLT(序列识别号:76), DASKRAT(序列识别号:92), HQRSSWPPLT(序列识别号:93)(按照所述的 Chothia 方法来确定的)。所述的抗体能够与巨细胞病毒(CMV)糖蛋白B进行结合。

[0068] 所述的抗巨细胞病毒(CMV)抗体的重链来自于一种生殖系V(可变)基因,例如是,所述的免疫球蛋白重链可变区域(IGHV)3生殖系基因。

[0069] 本发明中所述的抗巨细胞病毒(CMV)抗体中包括一种可变的轻链(V_L)区域,所述的重链区域是由一种人类免疫球蛋白重链可变区域(IGHV)3生殖系基因序列进行编码

的。免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 生殖系基因序列以例如为 M99663、X92214、L06616、L06617、M77327 以及 M77339 的编号 (Accession numbers) 进行了表示。本发明中所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体包括一种重链可变 (V_H) 区域, 所述的区域是由一种核酸序列进行编码的, 其中所述的核酸序列与所述的 X 生殖系基因序列之间具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 生殖系基因序列之间具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 并且更为优选的, 与所述的免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 生殖系基因序列之间具有至少 98%、99% 的同源性。所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体所具有的重链可变 (V_H) 区域与由所述的免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 重链可变区域 (V_H) 生殖系基因序列进行编码的所述的重链可变 (V_H) 区域的氨基酸序列之间具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体的重链可变 (V_H) 区域的氨基酸序列与所述的氨基酸序列之间具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 其中所述的氨基酸序列是由所述的免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 生殖系基因序列进行编码的, 并且更为优选的, 与由所述的免疫球蛋白重链可变区域 (IGHV) 3 生殖系基因序列进行编码的所述序列之间具有至少 98%、99% 的同源性。

[0070] 本发明中所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体中同样包括一种可变的轻链 (V_L) 区域, 所述的轻链区域是由一种人类免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 生殖系基因序列进行编码的。人类免疫球蛋白 κ 链可变区域 (IGKV) 3 的轻链可变区域 (V_L) 生殖系基因序列以例如为 X01668、K02768、X17264、L19271 以及 L19272 的编号 (Accession numbers) 进行了表示。可供选择的, 所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体包括一种轻链可变 (V_L) 区域, 所述的区域是由一种核酸序列进行编码的, 其中所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 生殖系基因序列之间具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的核酸序列与所述的免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 生殖系基因序列之间具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 并且更为优选的, 与所述的免疫球蛋白 κ 链可变区域 (IGKV) 3 生殖系基因序列之间具有至少 98%、99% 的同源性。所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体所具有的轻链可变 (V_L) 区域与由所述的免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 轻链可变区域 (V_L) 生殖系基因序列进行编码的所述的轻链可变 (V_L) 区域的氨基酸序列之间具有至少 80% 的同源性。优选的, 所述的抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体的轻链可变 (V_L) 区域的氨基酸序列与所述的氨基酸序列之间具有至少 90%、95%、96%、97% 的同源性, 其中所述的氨基酸序列是由所述的免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 生殖系基因序列进行编码的, 并且更为优选的, 与由所述的免疫球蛋白 κ 可变区域 (IGKV) 3 生殖系基因序列进行编码的所述序列之间具有至少 98%、99% 的同源性。

[0071] 除非另外定义, 在本发明中所使用到的科学术语以及技术术语具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。进一步的, 除非上下文中另有需要, 单数的术语包括其复数形式并且复数的术语包括其单数形式。一般而言, 在本发明中所描述的细胞及组织培养、分子生物学、以及蛋白质和寡核苷酸或者多核苷酸化学以及杂交中所利用到的术语以及技术是那些本领域熟知的并且通常被使用的术语以及技术。标准的技术被用来进行重组 DNA、寡核苷酸的合成, 以及组织的培养及转化 (例如, 电穿孔, 脂质转染)。酶学反应以及纯化技术是按照制造商的说明书来完成的, 或者依照本领域通常完成的方法或者依照本发明中所描述的方法来完成。

[0072] 除非具有明确的相反指示, 对本发明进行的实践将利用病毒学、免疫学、微生物

学、分子生物学以及重组 DNA 技术中的常规方法,这些方法在所属领域的技术范围之内,为了进行描述,它们之中的许多方法将在下文中进行描述。这些技术在下述的文献中被进行了充分的解释。参见,例如, Sambrook 等人发表的 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 《分子克隆实验室手册》(第 2 版,1989 年);Maniatis 等人发表的 Molecular Cloning: A Laboratory Manual 《分子克隆实验室手册》(1982 年);DNA Cloning: A Practical Approach 《DNA 克隆实践方法》,第 I&II 卷 (D. Glover 编辑);Oligonucleotide Synthesis 《寡核苷酸的合成》(N. Gait 编辑,1984 年);Nucleic Acid Hybridization 《核酸的杂交》(B. Hames & S. Higgins 编辑,1985 年);Transcription and Translation 《转录以及翻译》(B. Hames & S. Higgins 编辑,1984 年);Animal Cell Culture 《动物细胞的培养》(R. Freshney 编辑,1986 年);Perbal 发表的 A Practical Guide to Molecular Cloning 《分子克隆实践指南》(1984 年)。

[0073] 在本发明中所描述的分析化学、合成有机化学、以及药物和制药化学中所利用到的所述术语以及实验室操作方法以及技术是那些本领域熟知的并且通常被使用的术语以及技术。标准的技术被用来进行化学合成,化学分析,药物制备,配制,以及递送,以及对患者的治疗。

[0074] 下述的定义可以被有效的用来对本发明进行理解:

[0075] 所述的术语“抗体”(Ab) 包括单克隆抗体,多克隆抗体,多重特异性抗体(例如,双重特异性抗体),以及抗体的片段,只要它们能够表现出所期望的生物学活性即可。所述的术语“免疫球蛋白”(Ig) 在本发明中可以与“抗体”进行交替使用。

[0076] 一种“分离的抗体”指的是一种已经从其天然环境的组分中被分离和/或回收出来的抗体。其天然环境中的污染组分是那些能够对所述抗体的诊断用途或者治疗用途产生干扰的物质,并且可以包括酶,激素,以及其他的蛋白质溶解物或者非蛋白质溶解物。在优选的实施方式中,所述的抗体被纯化至:(1) 按照所述的 Lowry 方法确定出至少占抗体重量的 95%,并且最为优选占超过 99% 的重量;(2) 达到一定的程度,使得通过使用一种旋杯式序列分析仪足以获得至少 15 个残基的 N-末端或者中间的氨基酸序列;或者(3) 在使用考马斯亮蓝染色或者优选的银染色的还原条件下或者非还原条件下,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 检测达到均匀性。分离的抗体包括本身存在于重组细胞中的所述抗体,因为所述抗体的天然环境中的至少一种组分将不复存在。然而,普遍来看,分离的抗体是通过至少一种纯化的步骤来进行制备的。

[0077] 所述的基础的四链抗体单元式一种异四聚体糖蛋白,所述的异四聚体糖蛋白是由两条相同的轻链(L) 以及两条相同的重链(H) 组成的。一种免疫球蛋白 M(IgM) 抗体是由 5 个上述的基础异四聚体单元以及一种额外的多肽所构成的,其中所述的额外的多肽被称之为 J 链,并且因此含有 10 个抗原结合位点,同时分泌的免疫球蛋白 A(IgA) 抗体能够发生聚合从而形成多价的集合体,其中包括 2-5 个所述的基础的四链单元以及 J 链。如果是免疫球蛋白 G(IgG),所述的四链单元一般而言为大约 150000 道尔顿。每一条轻链(L) 通过一种共价的二硫键与一条重链(H) 进行连接,而所述的两条重链(H) 之间通过一种或者多个二硫键进行彼此间的连接,这取决于所述的重链(H) 的同型体。每一条重链(H) 以及轻链(L) 中同样含有具有规定间隔的链内二硫桥接。每一条重链(H) 在所述的 N-末端上具有一种可变的结构域(V_H),对于所述的 α 链以及 γ 链中的每一种而言,在所述的可变结构域之

后存在三个恒定结构域 (C_H), 并且对于 μ 同型体以及 ϵ 同型体而言, 存在四个恒定结构域 (C_H)。每一条轻链 (L) 在所述的 N- 末端上具有一种可变的结构域 (V_L), 在所述的可变结构域之后在另外一种末端处存在一种恒定的结构域 (C_L)。所述的轻链可变结构域 (V_L) 与所述的重链可变结构域 (V_H) 相对应并且所述的轻链恒定结构域 (C_L) 与所述的重链的第一种恒定结构域 (C_{H1}) 相对应。特定的氨基酸残基在所述的轻链可变结构域与所述的重链可变结构域之间形成了一种分界面。所述的重链可变结构域 (V_H) 以及轻链可变结构域 (V_L) 之间的配对共同形成了一种单个的抗原结合位点。关于不同类别的抗体所具有的结构以及性质, 可以参见, 例如, Basic and Clinical Immunology 《基础临床免疫学》, 第 8 版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr 以及 Tristram G. Parslow (编辑), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994 年, 第 71 页, 以及第 6 章。

[0078] 来自于任何的脊椎动物物种的所述轻链 (L) 被分配为两种具有明显区别的类型中的一种, 被称为 kappa (κ) 以及 lambda (λ), 这种分配是以它们的恒定结构域 (C_L) 中所具有的氨基酸序列为基础的。依据它们的重链恒定结构域 (C_H) 中所具有的氨基酸序列, 免疫球蛋白可以被分配为不同的类型或者同型体。存在五种类型的免疫球蛋白: 免疫球蛋白 A, 免疫球蛋白 D, 免疫球蛋白 E, 免疫球蛋白 G, 以及免疫球蛋白 M, 它们分别具有被指定为 alpha (α)、delta (δ)、epsilon (ϵ)、gamma (γ) 以及 mu (μ) 的重链。所述的 γ 类型以及 α 类型又根据存在于重链恒定结构域 (C_H) 的序列以及功能上的相对较小的差异而被进一步的划分成亚类型, 例如, 人类能够对下述的亚类型进行表达: 免疫球蛋白 G1, 免疫球蛋白 G2, 免疫球蛋白 G3, 免疫球蛋白 G4, 免疫球蛋白 A1, 以及免疫球蛋白 A2。

[0079] 所述的术语“可变的”指的是下述的事实: 在抗体之间, 在所述的可变 (V) 结构域的某些片段中广泛的存在着序列上的差异。所述的可变 (V) 结构域能够对抗原的结合进行介导并且对一种特定的抗体对其特定抗原所具有的特异性进行定义。然而, 所述的可变性并不是均匀的分布在所述的可变结构域中的 110 个氨基酸的范围之内的。取而代之的是, 所述的可变 (V) 区域是由相对无变化的几段构成的, 其中所述的几段被称之为骨架区域 (FR), 具有 15-30 个氨基酸, 所述的骨架区域 (FR) 被更短的区域分离开来, 所述的更短的区域具有极强的可变性, 被称之为“超变区域”, 每一种所述的“超变区域”具有 9-12 个氨基酸的长度。天然的重链以及轻链中的所述的可变结构域均是由四个骨架区域 (FR) 构成的, 所述的骨架区域 (FR) 很大程度上采用一种 β 板状构象, 是由三个超变区域进行连接的, 从而形成了环形的连接, 并且在某些情况中形成了所述的 β 板状结构的一部分。存在于每一条链上的所述的超变区域通过所述的骨架区域 (FR) 紧密的连接在一起, 并且通过来自于另外一条链上的所述的超变区域, 促成了所述抗体的抗原结合位点的形成 (参见 Kabat 等人 (于 1991 年) 发表的文章 Sequences of Proteins of Immunological Interest 《具有免疫学兴趣的蛋白质序列》, 第 5 版, Public Health Service 公共卫生服务部, National Institutes of Health 美国国立卫生研究院, Bethesda, Md.)。所述的恒定结构域不直接参与抗体与抗原之间的结合, 但是其表现出各种不同的效应器功能, 例如所述的抗体在抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 中的参与作用。

[0080] 所述的术语“超变区域”指的是一种抗体中的所述的氨基酸残基, 其中所述的氨基酸残基负责进行抗原的结合。所述的超变区域一般而言包括来自于一种“互补决定区域”或者“CDR”中的氨基酸残基 (例如, 当依照所述的 Kabat 编号系统进行编号时, 存在于所述

的轻链可变区域 (V_L) 中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 以及 89-97 (L3) 周围的残基, 以及存在于所述的重链可变区域 (V_H) 中的残基 31-35 (H1)、50-65 (H2) 以及 95-102 (H3) 周围的残基; 参见 Kabat 等人 (于 1991 年) 发表的文章 *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (《具有免疫学兴趣的蛋白质序列》, 第 5 版, Public Health Service 公共卫生服务部, National Institutes of Health 美国国立卫生研究院, Bethesda, Md.) ; 和 / 或那些来自于一种“超变环”中的残基 (例如, 当依照所述的 Chothia 编号系统进行编号时, 存在于所述的轻链可变区域 (V_L) 中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 以及 89-97 (L3) 上的残基, 以及存在于所述的重链可变区域 (V_H) 中的残基 26-32 (H1)、52-56 (H2) 以及 95-101 (H3) 上的残基; 参见 Chothia 以及 Lesk (于 1987 年) 在 *J. Mol. Biol.* 《分子生物学杂志》196 : 901-917 中发表的文章); 和 / 或那些来自于一种“超变环”/ 互补决定区域 (CDR) 中的残基 (例如, 当依照所述的 IMGT 编号系统进行编号时, 存在于所述的轻链可变区域 (V_L) 中的残基 27-38 (L1)、56-65 (L2) 以及 105-120 (L3) 上的残基, 以及存在于所述的重链可变区域 (V_H) 中的残基 27-38 (H1)、56-65 (H2) 以及 105-120 (H3) 上的残基; 参见 Lefranc, M. P. 等人 (于 1999 年) 在 *Nucl. Acids Res.* 《核酸研究》27 : 209-212 中发表的文章, Ruiz, M. 等人 (于 2000 年) 在 *Nucl. Acids Res.* 《核酸研究》28 : 219-221 中发表的文章)。任选的, 所述的抗体在下述的一种或者多个位点上存在对称的插入: 当依据 Aho ; Honneger, A. 以及 Plunkthun, A. (于 2001 年) 在 *J. Mol. Biol.* 《分子生物学杂志》309 : 657-670 中发表的文章中记载的内容进行编号时, 存在于所述的轻链可变区域 (V_L) 中的 28, 36 (L1)、63, 74-75 (L2) 以及 123 (L3) 上的残基, 以及存在于所述的重链可变区域 (V_H) 中的 28, 36 (H1)、63, 74-75 (H2) 以及 123 (H3) 上的残基。

[0081] “生殖系核酸残基”指的是天然存在于一种生殖系基因中的所述的核酸残基, 其中所述的基因编码一种恒定区域或者可变区域。“生殖系基因”指的是存在于一种生殖细胞 (例如, 一种注定要成为卵细胞或者精子的细胞) 中的 DNA。“生殖系变异”指的是在一种特定的 DNA 上发生的具有遗传性的变化, 其中所述的变化发生在一种生殖细胞中或者处于所述的单细胞时期的受精卵之中, 并且当传播至后代时, 这样的一种变异被导入到所述机体的每一种细胞之中。生殖系变异与体细胞变异相反, 体细胞变异是在单个的身体细胞中获得的。在某些情况中, 存在于一种生殖系 DNA 序列中的核苷发生了变异 (即, 一种体细胞变异) 并且被一种不同的核苷进行了取代, 其中所述的生殖系 DNA 序列编码一种可变区域。

[0082] 所述的术语“单克隆抗体”指的是一种从一种具有本质上的同源性的抗体种群中获得的抗体, 即, 被包含在所述种群之中的所述的各个抗体是相同的, 其不同之处仅在于可能存在天然发生的变异, 这种变异是以微小的剂量存在的。单克隆抗体具有高度的特异性, 能够直接作用于一种单一的抗原位点。此外, 与多克隆抗体制剂相反的是, 每一种单克隆抗体直接作用于存在于所述的抗原之上的单个的决定簇, 而所述的多克隆抗体制剂中包括了各种不同的抗体, 所述的抗体能够直接作用于不同的决定簇 (表位)。除了它们所具有的特异性之外, 所述的单克隆抗体所具有的优势在于: 它们可以在不被其他抗体进行污染的情况下进行合成。所述的修饰语“单克隆”不应当被解释为需要通过任何特定的方法来进行所述抗体的制备。例如, 在本发明中可以被有效的进行使用的所述的单克隆抗体是通过所述的杂交瘤方法学来进行制备的, 其中所述的杂交瘤方法学是在 Kohler 等人 (于 1975 年) 在 *Nature* 《自然》256 : 495 中发表的文章中首次进行描述的, 或者可以使用重组 DNA 方法在细

菌细胞、真核动物细胞或者植物细胞中对所述的单克隆抗体进行制备（参见，例如，美国专利 No. 4816567）。所述的“单克隆抗体”同样可以从噬菌体抗体文库中分离得到，其中使用的所述技术是例如在 Clackson 等人（于 1991 年）在 Nature《自然》352:624-628 中发表的文章中以及 Marks 等人（于 1991 年）在 J. Mol. Biol.《分子生物学杂志》222:581-597 中发表的文章中所描述的。

[0083] 所述的单克隆抗体包括“嵌合”抗体，在所述的“嵌合”抗体中，所述的重链和/或轻链上的一部分与存在于一类抗体中的相应的序列相同或者具有同源性，其中所述的抗体来自于一种特定的物种或者属于一种特定的抗体类型或者亚类型，而所述链上的其余部分与存在于另外一类抗体中的相应的序列相同或者具有同源性，其中所述的另外一类抗体来自于另外一种物种或者属于另外一种抗体类型或者亚类型，所述的单克隆抗体也包括这样的“嵌合”抗体的片段，只要它们能够表现出所期望的生物学活性即可（参见美国专利 No. 5816567；以及 Morrison 等人（于 1984 年）在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA《美国科学院院刊》81:6851-6855 中发表的文章）。本发明中提供了来自于人类抗体的可变结构域抗原结合序列。因此，令人最感兴趣的嵌合抗体包括这样的抗体：所述的抗体中含有一种或者多个人类抗原结合序列（例如，互补决定区域）以及含有一种或者多个来自于一种非人类抗体的序列，例如，一种骨架区域（FR）序列或者恒定（C）区域序列。除此之外，本发明中所述的令人最感兴趣的嵌合抗体包括那样的抗体：所述的抗体中包括一种来自于一种抗体类型或者亚类型的人类可变结构域抗原结合序列以及另外一种序列，其中所述的另外一种序列例如是一种骨架区域（FR）序列或者恒定（C）区域序列，所述的序列来自于另外一种抗体类型或者亚类型。令人感兴趣的嵌合抗体同样包括那些含有可变结构域抗原结合序列的抗体，其中所述的可变结构域抗原结合序列与在此所描述的那些相关或者来自于一种不同的物种，所述的物种例如是一种非人类的灵长动物类（例如，旧大陆猴，猩猩，等等）。嵌合抗体同样包括灵长动物源化的抗体以及人源化的抗体。

[0084] 此外，嵌合抗体中可以包括这样的残基，所述的残基并不存在于所述的受体抗体中或者并不存在于所述的供体抗体中。进行这样的修饰是为了进一步的对抗体的性能进行精制。需要获得更进一步的细节，请参见 Jones 等人（于 1986 年）在 Nature《自然》321:522-525 中发表的文章；Riechmann 等人（于 1988 年）在 Nature《自然》332:323-329 中发表的文章；以及 Presta（于 1992 年）在 Curr. Op. Struct. Biol.《结构生物学的当前观点》2:593-596 中发表的文章。

[0085] “人源化的抗体”一般而言被认为是一种人类抗体，所述的人类抗体中被导入了一种或者多个氨基酸残基，所述的氨基酸残基来自于一种非人类的来源。这些非人类的氨基酸残基通常被称之为“进口”残基，通常是从一种“进口”的可变结构域中取得的。传统意义上，人源化是按照 Winter 及其同事提供的方法（参见 Jones 等人（于 1986 年）在 Nature《自然》321:522-525 中发表的文章；Reichmann 等人（于 1988 年）在 Nature《自然》332:323-327 中发表的文章；Verhoeyen 等人（于 1988 年）在 Science《科学》239:1534-1536 中发表的文章）来进行的，通过采用进口的超变区域序列对一种人类抗体上的相应的序列进行取代。因此，这些“人源化的”抗体属于嵌合抗体（参见美国专利 No. 4816567），其中在本质上少于一种完整的人类可变结构域的区域被来自于一种非人类物种的相应序列进行了取代。

[0086] “人类抗体”指的是这样的一种抗体,所述的抗体中仅存在有由人类天然产生的序列。而且,在本发明中所述的一种人类抗体指的是一种天然的人类抗体,其中所述的抗体是天然的存在于人类之中的,与一种重组的人类抗体相反的是,所述的重组的人类抗体中的各条重链以及轻链是从人类中分离出来的,但是被进行了随机的装配,从而形成了所有形式的天然抗体以及非天然抗体(在其中从人类中分离得到的组合的数量是可以忽略的)。

[0087] 具体的,天然的人类抗体是那些作为一种完整的人类免疫系统发挥功能的结果而自然引发的抗体。所述的天然抗体在所述的人类病毒性疾病的治疗中所起到的效用已经得到了确认,这种确认是经由与超免疫人类球蛋白之间打交道而建立的。天然抗体,作为一种类型,在某些方面与那些通过重组文库方法(噬菌体或者转基因小鼠)获得的抗体存在差异并且具有截然不同的性质,这些使得它们成为用以进行人类疾病治疗的理想的治疗剂。(参见Dessain等人(于2008年)在Current Topics in Microbiology and Immunology《微生物学以及免疫学的当前议题》317:155-183中发表的文章Exploring the Native Human Antibody Repertoire to Create Antiviral Therapeutics《用以创建抗病毒治疗方法的天然人类抗体功能的探索》,© Springer-Verlag,纽约)。具体的,由人类B细胞进行表达的天然抗体的文库相对于来源于噬菌体的抗体而言有一种特殊的优势:由于在所述的噬菌体途径中在重新建立所有的初始的或者天然的重链:轻链对方面存在着局限性,因此妨碍了重要的抗体结构向一种噬菌体建立的文库中的导入。因此,期望获得高质量的天然的人类抗体,用以通过一种高生产力的方法对病原体进行探测、诊断、处置以及治疗,其中所述的天然的人类抗体是由人类B细胞进行表达的。

[0088] 然而,在本发明中所述的人类抗体中含有这样的残基或者修饰,所述的残基或者修饰不存在于一种天然存在的人类抗体之中,包括在本发明中所描述的那些修饰以及变体序列。这样做的目的通常是为了进一步的对抗体的性能进行进一步的精制或者加强。

[0089] “完整的”抗体包括这样的一种抗体,所述的抗体中包括一种抗原结合位点以及一种轻链恒定结构域(C_L)以及至少下述的重链恒定结构域:重链恒定结构域1(C_H1),重链恒定结构域2(C_H2)以及重链恒定结构域3(C_H3)。所述的恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人类天然序列恒定结构域),或者是其氨基酸序列变体。优选的,所述的完整的抗体具有一种或者多种效应器功能。

[0090] “抗体片段”包括一种完整抗体的一部分,优选的是所述的完整抗体的抗原结合区域或者可变区域。抗体片段的例子包括Fab,Fab';F(ab')₂,以及Fv片段;双重功能抗体;线性抗体(参见美国专利No. 5641870;Zapata等人[于1995年]在Protein Eng.《蛋白质工程》8(10):1057-1062中发表的文章);单链抗体分子;以及通过抗体片段来形成的多重特异性抗体。

[0091] 所述的术语抗体的“功能性片段或者类似物”指的是这样的一种化合物,所述的化合物具有与一种完整长度的抗体相一致的定性的生物学性质。例如,抗免疫球蛋白E(IgE)抗体的一种功能性片段或者类似物指的是能够与一种免疫球蛋白E(IgE)分子进行结合的片段或者类似物,所述的结合是以一种特定的方式来实现的,从而能够对这样的分子所具有的能力进行阻碍或者本质上的降低,使其不具备与所述的高亲和力受体Fc ϵ RI进行结合的能力。

[0092] 抗体的木瓜蛋白酶消化作用生成了两个相同的抗原结合片段,被称为“Fab”片段,

以及一种剩余的“Fc”片段,所述的“Fc”片段的命名反映出了能够容易的进行结晶的能力。所述的 Fab 片段是由一条完整的轻链 (L) 与所述的重链 (H) 的可变区域结构域 (V_H) 以及所述的一条重链上的第一种恒定结构域 (C_{H1}) 所构成的。每一种 Fab 片段就抗原的结合而言是单价的,即,其具有一种单一的抗原结合位点。对抗体进行的胃蛋白酶的处理能够生成一种单一的大的 $F(ab')_2$ 片段,所述的片段大致上与由两个二硫键连接的 Fab 片段相符,并且仍然能够进行抗原的交联,其中所述的由两个二硫键连接的 Fab 片段具有二价的抗原结合活性。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于其在所述的第一种重链恒定结构域 (C_{H1}) 的羧基末端上具有额外的几个残基,包括一种或者多个来自于所述的抗体铰链区域中的半胱氨酸。Fab'-SH 是在本发明中对 Fab' 的一种命名,其中在所述的 Fab' 中的所述的恒定结构域上的半胱氨酸残基上承载有一种游离的硫醇基团。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是以 Fab' 片段对的形式来进行制备的,其中在所述的 Fab' 片段之间存在有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他种化学偶联同样是已知的。

[0093] 所述的“Fc”片段包括两条重链 (H) 的所述的羧基末端的部分,其中所述的重链 (H) 通过二硫键被连接在一起。所述的抗体所具有的效应器功能是由存在于所述的 Fc 区域内的序列来决定的,所述的区域同样是所述的 Fc 受体 (FcR) 用以进行识别的区域,其中所述的 Fc 受体 (FcR) 是存在于某些类型的细胞之上的。

[0094] “Fv”是含有一种完整的抗原识别位点以及抗原结合位点的最小的抗体片段。这种片段是由一种二聚物构成的,所述的二聚物是由一种重链可变区域结构域与一种轻链可变区域结构域之间通过紧密的、非共价的连接而形成的。通过这两个结构域的折叠,形成了六个超变环 (每个重链以及轻链上分别有三个环),所述的超变环构成了所述的氨基酸残基,用以进行抗原的结合并且向所述的抗体提供抗原结合特异性。然而,一种单个的可变结构域 (或者一种 Fv 的一半,仅仅包括三个互补决定区域,所述的互补决定区域对一种抗原具有特异性) 也具有所述的能够识别抗原以及结合抗原的能力,尽管其具有比所述的完整的结合位点低的亲和性。

[0095] “单链 Fv”,也被缩写为“sFv”或者“scFv”,是含有所说的重链可变区域 (V_H) 结构域以及轻链可变区域 (V_L) 结构域的抗体片段,其中所述的结构域与一条单个的多肽链进行了连接。优选的,所述的单链 Fv 中进一步的包括了一种多肽连接物,所述的多肽连接物存在于所述的重链可变区域 (V_H) 结构域与轻链可变区域 (V_L) 结构域之间,从而使得所述的单链 Fv 能够形成用以进行抗原的结合所期望的结构。对于单链 Fv 所进行的回顾,可以参见 Pluckthun 在 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 《单克隆抗体药理学》第 113 卷中发表的文章,Rosenburg 以及 Moore 编辑,Springer-Verlag,纽约,第 269-315 页 (1994 年);Borrebaeck 于 1995 年发表的文章,见下。

[0096] 所述的术语“双重功能抗体”指的是通过下述方法来进行制备的小的抗体片段:使用短连接物 (大约 5-10 个残基) 在所述的重链可变区域 (V_H) 结构域以及轻链可变区域 (V_L) 结构域之间构建单链 Fv 片段 (参见前述的自然段),这样一来,得到的是所述的可变 (V) 结构域的链间配对而不是链内配对,从而形成了一种二价的片段,即,具有两个抗原结合位点的片段。双重特异性的双重功能抗体是两个“交叉 (crossover)”的单链 Fv 片段的异源二聚物,其中所述的两个抗体的重链可变区域 (V_H) 结构域以及轻链可变区域 (V_L) 结构域存在于不同的多肽链之上。双重功能抗体在例如下述文献中有更为完整的描述:EP 404097;WO

93/11161 ;以及 Hollinger 等人 (于 1993 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》 90 :6444-6448 中发表的文章。

[0097] “被内在化”的抗体指的是一种这样的抗体,所述的抗体通过与一种抗原所进行的结合而被吸收到(即,进入)所述的细胞之中,其中所述的抗原是存在于一种哺乳动物细胞之上的(例如,是一种细胞表面多肽或者受体)。所述的被内在化的抗体包括抗体片段,人类抗体或者嵌合抗体,以及抗体共轭物。所述的发生内在化的抗体分子的数量足够或者适于对一种细胞进行杀灭或者对其生长进行抑制,其中所述的细胞特别是一种被感染的细胞。在某些情形下,依据所述的抗体或者抗体共轭物所具有的效能,一种单一的抗体分子在所述的细胞之中的吸收足以对所述的目标细胞进行杀灭,其中所述的目标细胞是与所述的抗体进行结合的细胞。例如,某些毒素在杀灭方面具有高度的效能,这样一来,与所述的抗体发生共轭的所述毒素的一种分子所发生的内在化作用足以对所述的被感染细胞进行杀灭。

[0098] 如果一种抗体能够以一种可探测的水平与所述的抗原发生反应,则所述的抗体被认为是该抗原具有“免疫特异性”,“特异性”或者能够与该抗原进行“特异性的结合”,优选的其所具有的亲和性常数 K_a 大于或者等于大约 $10^4 M^{-1}$, 或者大于或者等于大约 $10^5 M^{-1}$, 大于或者等于大约 $10^6 M^{-1}$, 大于或者等于大约 $10^7 M^{-1}$, 或者大于或者等于大约 $10^8 M^{-1}$ 。一种抗体对其关联抗原所具有的亲和性在通常情况下也用一种解离常数 K_d 来表示,并且在某些实施方式中,如果人类甲型流感病毒 M2 蛋白胞外功能区 (HuM2e) 抗体能够以小于或者等于大约 $10^4 M$, 小于或者等于大约 $10^5 M$, 小于或者等于大约 $10^6 M$, 小于或者等于大约 $10^7 M$, 或者小于或者等于大约 $10^8 M$ 的解离常数与甲型流感病毒 M2 蛋白胞外功能区 (M2e) 进行结合,则认为所述的人类甲型流感病毒 M2 蛋白胞外功能区 (HuM2e) 抗体能够与甲型流感病毒 M2 蛋白胞外功能区 (M2e) 进行特异性的结合。使用常规的技术能够容易的确定出抗体的亲和性,例如,那些由 Scatchard 等人 ((于 1949 年) 在 Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 《纽约科学研究所院年报》 51 :660 中发表的文章中) 所描述的方法。

[0099] 可以利用免疫探测方法对一种抗体针对抗原、细胞或其组织所具有的结合性质进行确定以及评价,其中所述的免疫探测方法包括,例如,基于免疫荧光性的检测,例如免疫-组织化学 (IHC) 和 / 或荧光激活的细胞分选器 (FACS)。

[0100] 具有一种指定抗体所具有的“生物学特征”的抗体指的是一种这样的抗体,所述的抗体拥有所述指定抗体所具有的生物学特征中的一种或者多种,从而使其能够从其他的抗体中被区别开来。例如,在某些实施方式中,一种具有指定抗体所具有的生物学活性的抗体能够在与所述的指定抗体所结合的不同表位上进行结合,和 / 或与所述的指定抗体具有共同的效应器功能。

[0101] 所述的术语“拮抗剂”抗体是以其最宽泛的含义来进行使用的,并且包括这样的抗体,所述的抗体能够对一种表位、多肽、或者细胞所具有的生物学活性进行一定程度上的或者完全的阻滞、抑制、或者压制,其中所述的表位、多肽、或者细胞是与所述的抗体发生特异性的结合的。用以对拮抗剂抗体进行识别的方法包括:使一种多肽或者细胞与一种候选的拮抗剂抗体进行接触,其中所述的多肽或者细胞能够与所述的候选的拮抗剂抗体发生特异性的结合,并且对正常情况下由所述的多肽或者细胞所产生的一种或者多种生物学活性所发生的可探测性的改变进行测量。

[0102] 能够“诱导细胞凋亡”的抗体指的是这样的一种抗体,所述的抗体能够诱导程序性的细胞死亡,这是由下述因素来确定的:磷脂结合蛋白 annexin V 的结合,DNA 的断裂,细胞的收缩,内质网的膨胀,细胞的破裂,和 / 或膜囊(也被称为细胞凋亡小体)的形成。优选的,所述的细胞是一种被感染的细胞。可以利用各种不同的方法来对与细胞凋亡相关的所述的细胞事件进行评价。例如,可以通过磷脂结合蛋白 annexin 的结合来对磷脂酰丝氨酸(PS)的外翻进行测量;可以经由 DNA 的梯状电泳(laddering)来对 DNA 的断裂进行评价;以及可以通过亚二倍体细胞的任何的增加来对伴随着 DNA 的断裂而产生的核/染色质的浓缩进行评价。优选的,所述的能够诱导细胞凋亡的抗体是这样的一种抗体:在一项磷脂结合蛋白 annexin 结合检测中,相对于未经过处理的细胞而言,所述的抗体能够产生大约 2 至 50 倍的、优选为大约 5 至 50 倍的、并且最为优选为大约 10 至 50 倍的磷脂结合蛋白 annexin 结合的诱导作用。

[0103] 抗体的“效应器功能”指的是那些归因于所述抗体中的 Fc 区域(一种天然序列的 Fc 区域或者氨基酸序列变化的 Fc 区域)的生物学活性,并且伴随所述抗体的同型体而发生变化。抗体效应器功能的例子包括:与 C1q 的结合以及补体依赖的细胞毒作用;与 Fc 受体的结合;抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC);噬菌作用;细胞表面受体(例如,B 细胞受体)的去调节作用;以及 B 细胞的活化作用。

[0104] “抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用”或者“ADCC”指的是一种形式的细胞毒作用,在所述的细胞毒作用中,分泌的免疫球蛋白与存在于某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞,嗜中性粒细胞,以及巨噬细胞)之上的 Fc 受体(FcR)进行结合,从而使这些细胞毒性效应器细胞能够与一种承载抗原的目标细胞发生特异性的结合并且随后利用细胞毒素对所述的目标细胞进行杀灭。所述的抗体“环抱”所述的细胞毒性细胞并且这对于这样的杀伤而言是需要的。用以介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)的所述的最主要的细胞,自然杀伤(NK)细胞,仅仅能够表达 Fc γ 受体 III(Fc γ RIII),而单核细胞能够表达 Fc γ 受体 I(Fc γ RI),Fc γ 受体 II(Fc γ RII)以及 Fc γ 受体 III(Fc γ RIII)。Ravetch 以及 Kinet(于 1991 年)在 Annu. Rev. Immunol.《免疫学年度回顾》9:457-92 中发表的文章中的第 464 页的表格 3 中对在造血细胞上表达的 Fc 受体(FcR)进行了总结。为了对一种感兴趣的分子所具有的抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)活性进行评价,可以进行一项体外的抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)检测,例如在美国专利 No. 5500362 或者美国专利 No. 5821337 中所描述的。在这类检测中所使用的有效的效应器细胞包括外周血单核细胞(PBMC)以及自然杀伤(NK)细胞。可供选择的,或者除此之外的,可以在体内对所述的感兴趣的分子所具有的抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)活性进行评价,例如,在一种动物模型中,例如在 Clynes 等人(于 1998 年)在 PNAS(USA)《美国科学院院刊》95:652-656 中发表的文章中所公开的。

[0105] “Fc 受体”或者“FcR”描述的是这样的一种受体,所述的受体能够与一种抗体中的所述的 Fc 区域进行结合。在某些实施方式中,所述的 Fc 受体(FcR)是一种天然序列的人类 Fc 受体(FcR)。而且,一种优选的 Fc 受体(FcR)是这样的一种受体,所述的受体能够与一种免疫球蛋白 G(IgG) 抗体进行结合(一种 γ 受体)并且包括所述的 Fc γ 受体 I(Fc γ RI),Fc γ 受体 II(Fc γ RII)以及 Fc γ 受体 III(Fc γ RIII) 受体亚类型,包括这些受体的等位基因变体以及可供选择的这些受体的拼接(spliced)形式。Fc γ 受体 II(Fc γ RII)包括

Fc γ 受体 IIA(Fc γ RIIA) (一种“激活受体”) 以及 Fc γ 受体 IIB(Fc γ RIIB) (一种“抑制受体”), 两者具有相类似的氨基酸序列, 其差异主要存在于它们的细胞质结构域中。激活受体 Fc γ 受体 IIA(Fc γ RIIA) 在其细胞质结构域中含有一种基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制受体 Fc γ 受体 IIB(Fc γ RIIB) 在其细胞质结构域中含有一种基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见 Daeron(于1997年)在 *Annu. Rev. Immunol.* 《免疫学年度回顾》15:203-234 中发表的文章中的 review M.)。在下述文献中对 Fc 受体 (FcR) 进行了回顾: Ravetch 以及 Kinet(于1991年)在 *Annu. Rev. Immunol.* 《(免疫学年度回顾》9:457-92 中发表的文章; Capel 等人(于1994年)在 *Immunomethods* 《免疫方法》4:25-34 中发表的文章; 以及 de Haas 等人(于1995年)在 *J. Lab. Clin. Med.* 《实验室医学及临床医学杂志》126:330-41 中发表的文章。其他的 Fc 受体 (FcR), 包括那些即将在未来被识别出来的, 被涵盖在本发明所述的术语“Fc 受体 (FcR)”的范围之内。所述的术语同样包括了所述的新生儿受体, FcRn, 其中所述的受体负责进行母体免疫球蛋白 G 向所述胎儿的传递(参见 Guyer 等人(于1976年)在 *J. Immunol.* 《免疫学杂志》117:587 中发表的文章以及 Kim 等人(于1994年)在 *J. Immunol.* 《免疫学杂志》24:249 中发表的文章。

[0106] “人类效应器细胞”是能够表达一种或者多种 Fc 受体 (FcR) 并且执行效应器功能的白细胞。优选的, 所述的细胞至少表达 Fc γ 受体 III(Fc γ RIII) 并且执行抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的效应器功能。能够介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 的人类白细胞的例子包括外周血单核细胞 (PBMC), 自然杀伤 (NK) 细胞, 单核细胞, 细胞毒性 T 细胞以及嗜中性粒细胞; 其中外周血单核细胞 (PBMC) 以及自然杀伤 (NK) 细胞是优选的。所述的效应器细胞是从一种天然的来源中分离得到的, 例如, 是从血液中分离得到的。

[0107] “补体依赖的细胞毒作用”或者“CDC”指的是在有补体存在的情况下, 一种目标细胞的分解。所述的经典的补体途径的激活作用是通过所述的补体系统中的第一种组分 (C1q) 与抗体 (具有适宜的亚类型) 之间进行的结合来触发的, 其中所述的抗体与它们的关联抗原进行了结合。为了对补体的激活作用进行评价, 可以进行一项补体依赖的细胞毒作用 (CDC) 检测, 例如, 按照 Gazzano-Santoro 等人(于1996年)在 *J. Immunol. Methods* 《免疫学方法杂志》202:163 中发表的文章中所描述的。

[0108] 所述的术语“巨细胞病毒”, 也被称之为 CMV, 代表的是存在于任何物种之中的所述的疱疹病毒家族中的一种成员, 其中所述的物种包括人类。巨细胞病毒 (CMV) 同样也被称之为 β 疱疹病毒亚属, 因为它是一种能够对单核细胞以及淋巴细胞进行感染的疱疹病毒。

[0109] 所述的术语“人类巨细胞病毒, 或者 HCMV”代表的是能够对人类进行感染的所述的巨细胞病毒 (CMV) 家族中的一种成员。人类巨细胞病毒 (HCMV) 是一种 β 人类疱疹病毒, 其具有 230Kbp 的基因组大小, 编码超过 70 个病毒蛋白。人类巨细胞病毒 (HCMV) 同样也被命名为人类疱疹病毒 5 (HHV-5)。

[0110] 用于达到治疗感染的目的的“哺乳动物”, 指的是任何的哺乳动物, 包括人类, 家养动物以及畜牧动物, 以及动物园动物, 竞技动物, 或者宠物动物, 例如狗, 猫, 牛, 马, 羊, 猪, 山羊, 兔, 等等。优选的, 所述的哺乳动物是人类。

[0111] “治疗”或者“处置”或者“缓解”指的是治疗性的处置以及防御性的或者预防性的措施; 其中所述的目标是对所述的目标病态状况或者障碍进行预防或者减缓 (减轻)。那

些需要接受治疗的客体包括那些已经患有所述的障碍的客体以及那些趋向于患有所述的障碍的客体或者那些需要预防所述的障碍产生的客体。如果依照本发明中所述的方法,在接受了治疗剂量的一种抗体之后,所述的患者表现出一种或者多种下述列出的可观察到的和 / 或可测量到的减轻或者消失,则认为所述的宿主或者哺乳动物的感染被成功的“治愈”了:所述的被感染细胞的数量减少或者所述的被感染细胞的消失;所述的被感染细胞占细胞总数的百分含量的减少;和 / 或由所述的具体感染所带来的一种或者多种所述症状在一定程度上的减轻;降低的发病率以及死亡率,以及生活质量问题的改善。可以通过常规的操作方法对上述用以评价成功的治疗以及疾病的改善的参数进行容易的测量,其中所述的常规的操作方法是内科医师所熟知的。

[0112] 所述的术语“治疗有效剂量”指的是一种抗体或者药物所使用的剂量,所述的剂量能够有效的对宿主或者哺乳动物的疾病或者障碍进行“治疗”。参见前述对于“治疗”的定义。

[0113] “慢性”施用指的是以一种连续的模式对所述的试剂进行施用,这与一种急性的模式相反,其目的在于在一段延长的时期内维持所述的初始的治疗作用(活性)。“间歇性”施用指的是一种这样的治疗方式,所述的治疗不是在不存在中断的情况下被连续完成的,而是在其实质上是周期性的。

[0114] 与一种或者多种进一步的治疗试剂进行“联合”施用包括同时(一致)施用以及以任意的顺序进行连续的施用。

[0115] “载体”包括药物可接受性载体,赋形剂,或者稳定剂,当以一定的剂量以及浓度对其进行使用时,所述的载体、赋形剂、或者稳定剂对于被暴露在其中的所述的细胞或者哺乳动物而言是无毒的。通常情况下所述的生理可接受性载体包括缓冲剂例如磷酸,柠檬酸,以及其他的有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(小于大约 10 个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白,凝胶,或者免疫球蛋白;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸或者赖氨酸;单糖,二糖,以及其他的碳水化合物包括葡萄糖,甘露糖,或者糊精;螯合试剂例如乙二胺四乙酸(EDTA);糖醇例如甘露醇或者山梨醇;成盐平衡离子例如钠;和 / 或非离子型表面活性剂例如 TWEEN™ 聚乙二醇(PEG),以及 PLURONICS™(聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物)。

[0116] 在本发明中所使用到的所述术语“细胞毒性试剂”指的是这样的一种物质,所述的物质能够对所述细胞的功能进行抑制或者阻止和 / 或引发细胞的破坏。所述的术语意在包括放射性同位素(例如,At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 以及 Lu 的放射性同位素),化学治疗试剂,例如,甲氨蝶呤(methotrexate),阿霉素(adriamycin),长春花生物碱类(长春新碱(vincristine),长春碱(vinblastine),依托泊甙(etoposide)),多柔比星(doxorubicin),美法仑(melphalan),丝裂霉素(mitomycin)C,苯丁酸氮芥(chlorambucil),道诺霉素(daunorubicin)或者其他插入试剂,酶及其片段例如核裂解酶,抗生素,以及毒素例如小分子毒素或者起源于细菌、真菌、植物或者动物的酶活性毒素,包括它们的片段和 / 或变体,以及将在下文中公开的所述的各种不同的抗肿瘤试剂或者抗癌剂。其他的细胞毒性试剂将在下文中进行描述。

[0117] “生长抑制性试剂”指的是这样的一种化合物或者组合物,所述的化合物或者组合物能够在体外或者在体内对一种细胞的生长进行抑制。生长抑制性试剂的例子包括能够

对细胞周期的进程进行阻滞的试剂,例如能够诱导 G1 停滞以及 M- 期停滞。经典的 M- 期阻滞剂包括所述的长春生物碱类(长春新碱(vincristine),长春瑞滨(vinorelbine)以及长春碱(vinblastine)),紫杉醇类(taxanes),以及拓扑异构酶 II 抑制剂例如多柔比星(doxorubicin),表阿霉素(epirubicin),道诺霉素(daunorubicin),依托泊甙(etoposide),以及博来霉素(bleomycin)。那些能够对 G1 进行停滞的试剂同样能够溢出进入到所述的 S- 期停滞,例如, DNA 烷基化试剂例如他莫昔芬(tamoxifen),强的松(prednisone),氮烯咪胺(dacarbazine),氮芥(mechlorethamine),顺铂(cisplatin),甲氨蝶呤(methotrexate),5- 氟尿嘧啶,以及 ara-C。进一步的信息可以在 The Molecular Basis of Cancer 《癌症的分子基础》中找到,该书由 Mendelsohn 以及 Israel 编辑,参见第 1 章,是由 Murakami 等人编写的,标题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs 《细胞周期的调节,致癌基因,以及抗肿瘤药物》”(W B Saunders: Philadelphia,1995 年),特别是第 13 页。所述的紫杉醇类(紫杉醇(paclitaxel)以及多烯紫杉醇(docetaxel))是抗癌症药物,它们均来自于所述的紫杉树。多烯紫杉醇(TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer),来自于所述的欧洲紫杉,是一种紫杉醇(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇(paclitaxel)以及多烯紫杉醇(docetaxel)能够促进所述的来自于微管蛋白二聚物的微管的聚集并且通过对解聚合作用产生的阻止而对微管进行稳定,这导致了对所述细胞中的有丝分裂的抑制。

[0118] “标记”指的是一种可探测的化合物或者组合物,其中所述的化合物或者组合物与所述的抗体之间发生了直接的或者间接的共轭,从而生成了一种“被标记的”抗体。所述的标记本身是可以探测的(例如,放射性同位素标记或者荧光标记),或者,在其为一种酶标记的情形中,所述的标记能够催化一种底物化合物或者组合物发生化学变化,其中所述的底物化合物或者组合物是可以探测的。

[0119] 所述的术语“带标签的表位”指的是一种嵌合多肽,其中所述的嵌合多肽中包括一种与一种“标签多肽”发生融合的多肽。所述的标签多肽中具有足够的残基用以提供一种表位,可以针对这个表位形成一种抗体,但是所述的标签多肽也需要足够短,这样一来不会对与其发生融合的所述多肽所具有的活性产生影响。所述的标签多肽优选的是完全唯一的,这样一来,所述的抗体在本质上不会与其他的表位发生交叉反应。适合的标签多肽一般而言具有至少六个氨基酸残基并且通常具有大约 8 个至 50 个氨基酸残基(优选的,具有大约 10 个至 20 个氨基酸残基)。

[0120] “小分子”被定义为具有低于大约 500 道尔顿的分子量。

[0121] 所述的术语“核酸”与“多核苷酸”之间可以进行交替使用,指的是单链或者双链的 RNA, DNA, 或者混合的聚合物。多核苷酸包括基因组序列,基因组外序列以及质粒序列,以及那些能够表达多肽、或者适合表达多肽的更小的工程化基因片段。

[0122] “分离的核酸”指的是这样的一种核酸,所述的核酸本质上是从其他的基因组 DNA 序列以及蛋白质或者复合体中分离出来的,其天然的伴随着一种天然序列,其中所述的复合体是例如核糖体以及聚合酶。所述的术语包含了一种这样的核酸序列,所述的核酸序列是从其天然存在的环境中被分离开来的,并且包括重组的或者克隆的 DNA 分离物以及化学合成的类似物或者那些生物合成的类似物,其中所述的生物合成的类似物是由异源系统进行合成的。一种本质上纯的核酸包括所述核酸的分离形式。当然,这指的是最初被分离得

到的所述核酸并且并不排除后期通过人工向所述被分离的核酸中添加的基因或者序列。

[0123] 所述的术语“多肽”是以其常规的含义来进行使用的,即,一种氨基酸序列。所述的多肽并不被限制为具有一种特定长度的产品。肽,寡肽,以及蛋白质均被包含在所述的多肽的定义范围之内,并且除非具体指明,这些术语之间是可以进行交替使用的。这个术语并不指的是或者并不排除在表达之后对所述多肽所进行的修饰,例如,糖基化,乙酰基化,磷酸化以及类似的修饰,以及本领域已知的其他的修饰,所述的修饰可以是天然存在的以及非天然存在的。多肽可以是一种完整的蛋白质,或者是所述蛋白质中的一种序列。在本发明中特别感兴趣的多肽是这样的氨基酸序列,所述的序列中包括互补决定区域(CDR)并且能够与巨细胞病毒(CMV)或者一种感染有巨细胞病毒(CMV)的细胞进行结合。

[0124] “分离的多肽”指的是这样的一种多肽,它是从其天然环境的组分中被识别以及分离出来的和/或回收出来的。在优选的实施方式中,所述的分离的多肽将被纯化至:(1)按照所述的Lowry方法确定出至少占多肽重量的95%,并且最为优选占超过99%的重量;(2)达到一定的程度,使得通过使用一种旋杯式序列分析仪足以获得至少15个残基的N-末端或者中间的氨基酸序列;或者(3)在使用考马斯亮蓝染色或者优选的银染色的还原条件下或者非还原条件下,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测达到均匀性。分离的多肽包括本身存在于重组细胞中的所述多肽,因为所述多肽的天然环境中的至少一种组分将不复存在。然而,普遍来看,分离的多肽是通过至少一种纯化的步骤来进行制备的。

[0125] “天然序列”的多核苷酸指的是这样的一种多核苷酸,其与一种来自于天然的多核苷酸具有相同的核苷酸序列。“天然序列”的多肽指的是这样的一种多肽,其与一种来自于天然(例如,来自于任何的物种)的多肽(例如,抗体)具有相同的氨基酸序列。这样的天然序列的多核苷酸以及多肽是从天然中被分离出来的,或者是通过重组的方式或者合成的方式制备得到的。

[0126] 一种多核苷酸“变体”指的是这样的一种多核苷酸,所述的多核苷酸与一种具体公开的多核苷酸之间所具有的差异通常在于具有一种或者多种取代,缺失,添加和/或插入。这样的变体是天然存在的或者是通过合成产生的,例如,通过下述的方式:对本发明中所述的一种或者多个多核苷酸序列进行修饰,并且按照本发明中所描述的和/或使用在本领域中熟知的各种技术中的任何一种,对所述被编码的多肽所具有的一种或者多种生物学活性进行评价。

[0127] 一种多肽“变体”指的是这样的一种多肽,所述的多肽与一种具体公开的多肽之间所具有的差异通常在于具有一种或者多种取代,缺失,添加和/或插入。这样的变体可以是天然存在的或者可以通过合成产生的,例如,通过下述的方式:对本发明中所述的上述多肽序列中的一种或者多个进行修饰,并且按照本发明中所描述的和/或使用在本领域中熟知的各种技术中的任何一种,对所述的多肽所具有的一种或者多种生物学活性进行评价。

[0128] 对本发明中所述的多核苷酸以及多肽所具有的结构进行修饰并且仍然能够获得一种功能性分子,其中所述的功能性分子能够编码一种变体多肽或者衍生的多肽,所述的变体多肽或者衍生的多肽具有所期望的特征。当期望对一种多肽中的所述氨基酸序列进行改变从而生成一种等价的、或者甚至一种改进的、本发明中所述多肽的变体或者一部分时,本领域技术人员通常会对所述的编码DNA序列中的一种或者多个密码子进行改变。

[0129] 例如,某些氨基酸被用来对存在于一种蛋白结构之中的其他氨基酸进行取代,这不会对其与其他多肽(例如,抗原)或者细胞进行结合的能力带来可感知的损失。由于一种蛋白质所具有的结合能力以及性质定义了所述蛋白质的生物学功能活性,可以在一种蛋白质序列中并且当然包括其基础的 DNA 编码序列进行某些氨基酸序列的取代,并且仍然能够获得一种蛋白质,所述的蛋白质具有相类似的性质。因此可以预期的是,在不使本发明所公开的所述组合物所具有的生物学效用或者活性发生可感知的损失的前提下,可以在所述组合物中的肽序列中进行各种改变,或者在编码所述肽的相应的 DNA 序列中进行各种改变。

[0130] 在许多情形下,在一种多肽变体中含有一种或者多种保守性的取代。“保守性的取代”指的是这样的一种取代,其中使用一种氨基酸对另外一种氨基酸进行取代,所述的氨基酸具有相类似的性质,这样一来肽化学领域的技术人员可以预料到,所述多肽所具有的二级结构以及亲水性质在本质上是未发生变化的。

[0131] 在进行这样的改变时,所述的氨基酸所具有的亲水指数应当被考虑的。所述的亲水性氨基酸指数在为蛋白质提供交互式的生物学功能方面所具有的重要性是本领域大体所能够理解的(参见 Kyte 以及 Doolittle 于 1982 年发表的文章)。可以被接受的是,所述的氨基酸所具有的相对的亲水特性构成了所获得的蛋白质的二级结构,所述的二级结构继而定义了所述的蛋白质与其他分子之间的相互作用,其中所述的其他分子是例如,酶,底物,受体, DNA, 抗体, 抗原, 以及类似的分子。依据氨基酸所具有的疏水特性以及电荷特征,为每一种氨基酸指定了一种亲水指数(参见 Kyte 以及 Doolittle 于 1982 年发表的文章)。这些数值是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸盐(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸盐(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);以及精氨酸(-4.5)。

[0132] 本领域已知的是,某些氨基酸可以被具有与之相类似的亲水指数或者得分的其他氨基酸进行取代,并且仍然能够获得一种具有类似的生物学活性的蛋白质,即,仍然能够获得一种生物学功能等价的蛋白质。在进行这样的改变时,那些亲水指数在 ± 2 的范围内的氨基酸的取代是优选的,那些在 ± 1 的范围内的氨基酸的取代是格外优选的,并且那些在 ± 0.5 的范围内的氨基酸的取代甚至是更加格外优选的。在本领域中同样能够被理解的是,可以依据疏水性质,有效的进行相似氨基酸的取代。在美国专利 4554101 中陈述,一种蛋白质所具有的最大的局部平均疏水性质与所述蛋白质所具有的生物学性质相关联,其中所述的局部平均疏水性质是由其邻近的氨基酸所具有的疏水性质来支配的。

[0133] 正如在美国专利 4554101 中详细描述到的,已经为氨基酸残基指定了下述的疏水性数值:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸盐(+3.0 $\pm$ 1);谷氨酸盐(+3.0 $\pm$ 1);丝氨酸(+3.0);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 $\pm$ 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。可以理解的是,一种氨基酸可以被具有与之相类似的疏水性数值的另外一种氨基酸进行取代,并且仍然能够获得一种生物学等价的蛋白质,并且特别的,能够获得一种免疫学等价的蛋白质。在这样的改变中,那些疏水性数值在 ± 2 的范围内的氨基酸的取代是优

选的,那些在 ± 1 的范围内的氨基酸的取代是格外优选的,并且那些在 ± 0.5 的范围内的氨基酸的取代甚至是更加格外优选的。

[0134] 正如上文中所概述的,氨基酸的取代因此一般而言依据的是所述的氨基酸侧链取代基所具有的相对的相似性,例如,它们的亲水性,疏水性,电荷,大小,以及类似的性质。将前述各种不同的特征考虑在内的范例性的取代对于本领域技术人员而言是熟知的并且包括:精氨酸与赖氨酸;谷氨酸盐与天冬氨酸盐;丝氨酸与苏氨酸;谷氨酰胺与天冬酰胺;以及缬氨酸,亮氨酸与异亮氨酸。

[0135] 可以进一步的依据所述的残基在下述方面所具有的相似性来进行氨基酸的取代:所述残基的极性,电荷,溶解性,亲水性,疏水性和/或所述的两性性质。例如,带有阴性电荷的氨基酸包括天冬氨酸以及谷氨酸;带有阳性电荷的氨基酸包括赖氨酸以及精氨酸;并且带有不带电荷的顶端基团的具有相类似的疏水性数值的氨基酸包括亮氨酸,异亮氨酸以及缬氨酸;甘氨酸以及丙氨酸;天冬酰胺以及谷氨酰胺;以及丝氨酸,苏氨酸,苯丙氨酸以及酪氨酸。可以代表保守性改变的其他的氨基酸组包括:(1) 丙氨酸,脯氨酸,甘氨酸,谷氨酸,天冬氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,丝氨酸,苏氨酸;(2) 半胱氨酸,丝氨酸,酪氨酸,苏氨酸;(3) 缬氨酸,异亮氨酸,亮氨酸,甲硫氨酸,丙氨酸,苯丙氨酸;(4) 赖氨酸,精氨酸,组氨酸;以及(5) 苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸,组氨酸。一种变体中同样可以,或者可供选择的,含有非保守性的改变。在一种优选的实施方式中,变体多肽与一种天然序列之间存在的差异是发生了五个氨基酸或者更少个氨基酸的取代、缺失或者添加。同样(或者可供选择的)可以利用下述的方式对变体进行修饰,例如,进行某些氨基酸的缺失或者添加,其中所述的缺失或者添加对所述的多肽所具有的免疫原性、二级结构以及亲水性质将会产生最低程度的影响。

[0136] 多肽中包括一种信号(或者前导)序列,所述的序列存在于所述蛋白质的N-末端处,所述的序列能够在翻译时或者在经过翻译作用之后指挥所述蛋白质的传递。为了便于进行所述多肽(例如,聚组氨酸)的合成,纯化或者识别,或者为了增强所述多肽与一种固体支持物之间进行的结合,所述的多肽同样可以是共轭的,例如,在骨架内融合一种连接物或者其他的序列。例如,多肽可以是与一种免疫球蛋白的Fc区域发生共轭的。

[0137] 在对多核苷酸序列以及多肽序列进行比较时,正如下文中所描述的,当以最大程度的一致性进行比对时,如果存在于所述的两个序列中的核苷酸序列或者氨基酸序列是相同的,则认为所述的两个序列是“具有同一性的”。在两个序列之间所进行的比较一般而言是通过下述方式来实现的:在一种比较窗口内对所述的序列进行比较,从而识别并且比较局部区域所具有的序列相似性。“比较窗口”指的是一种具有至少大约20个连续位置的片段,通常具有30至大约75个连续位置,40至大约50个连续位置,在所述的片段内,将一条序列与一条与其具有相同数量的连续位置的参考序列进行比较,其中所述的比较是在将所述的两条序列进行最佳比对之后进行的。

[0138] 为了进行比较,序列的最佳比对可以使用在所述的Lasergene suite of bioinformatics软件(DNASTAR, Inc., 麦迪逊,威斯康星州)中的Megalign程序来执行,其中使用到默认的参数。这个程序中收录了几种比对方案,所述的比对方案在下述的参考文献中被进行了描述:Dayhoff, M. O. (于1978年)发表的文章A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships《蛋白质的

进化变化模型——用以探测远端关系的基质》。在 Dayhoff, M. O. (编辑) 的 Atlas of ProteinSequence and Structure 《蛋白质序列以及结构图集》第 5 卷, 增刊 3, 第 345-358 中发表的文章, National Biomedical Research Foundation 全国生物医学研究基金会, 华盛顿; Hein J. (于 1990 年) 在 Methods in Enzymology 《酶学方法》第 183 卷第 626-645 中发表的文章 Unified Approach to Alignment and Phylogenies 《比对的统一方法及其发展史》, Academic Press Inc., 学术出版社有限公司, 圣地亚哥, 加利福尼亚州; Higgins, D. G. 以及 Sharp, P. M. (于 1989 年) 在 CABIOS 《生物科学中的计算机应用》5:151-153 中发表的文章; Myers, E. W. 以及 Muller W. (于 1988 年) 在 CABIOS 《生物科学中的计算机应用》4:11-17 中发表的文章; Robinson, E. D. (于 1971 年) 在 Comb. Theor 《组合理论杂志》11:105 中发表的文章; Santou, N. Nes, M. (于 1987 年) 在 Mol. Biol. Evol. 《分子生物学及其进展》4:406-425 中发表的文章; Sneath, P. H. A. 以及 Sokal, R. R. (于 1973 年) 发表的文章 Numerical Taxonomy——the Principles and Practice of Numerical Taxonomy 《数值分类学的原理以及实践》, Freeman Press, 圣地亚哥, 加利福尼亚州; Wilbur, W. J. 以及 Lipman, D. J. (于 1983 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》80:726-730 中发表的文章。

[0139] 可供选择的, 为了进行比较而进行的序列的最佳比对可以通过下述方式来实现: 通过使用 Smith 以及 Waterman (于 1981 年) 在 Add. APL. Math 《应用数学研究进展》2:482 中发表的文章中描述的局部同一性运算法则, 通过使用 Needleman 以及 Wunsch (于 1970 年) 在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》48:443 中发表的文章中描述的同源性比对运算法则, 通过利用 Pearson 以及 Lipman (于 1988 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》85:2444 中发表的文章中所描述的对于相似度方法所进行的研究, 通过利用这些运算法则的计算机执行 (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 以及 TFASTA, 它们存在于所述的 Wisconsin Genetics Software Package 威斯康星遗传学软件包中, Genetics Computer Group 遗传学计算机集团 (GCG), 575 Science Dr., 麦迪逊, 威斯康星州), 或者通过检查的方法。

[0140] 适合用以确定序列同一性百分数以及序列相似度的运算法则的一种优选的例子是所述的 BLAST (基础局部比对检查工具) 运算法则以及 BLAST (基础局部比对检查工具) 2.0 运算法则, 上述的运算法则分别在下述文章中被进行了描述: Altschul 等人 (于 1977 年) 在 Nucl. Acids Res. 《核酸研究》25:3389-3402 中发表的文章以及 Altschul 等人 (于 1990 年) 在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》215:403-410 中发表的文章。例如通过使用在本发明中所描述的参数来使用 BLAST (基础局部比对检查工具) 以及 BLAST (基础局部比对检查工具) 2.0, 从而确定本发明中所述的多核苷酸以及多肽的序列同一性百分数。用来完成 BLAST (基础局部比对检查工具) 分析的软件是公众可以通过 National Center for Biotechnology Information 美国国家生物技术信息中心处获得的。

[0141] 在一种描述性的例子中, 使用所述的参数 M (一对匹配的残基的奖励得分; 总是 > 0) 以及 N (错配的残基的惩罚得分; 总是 < 0) 为核苷酸序列进行累计得分的计算。当出现下述情况时, 所述的指令 (word) 在每个方面中的延伸出现终止: 所述的累计的比对得分由其所达到的最大值下降了数量 X; 所述的累计得分由于一种或者多个负得分的残基比对的累积而变成零或者零以下; 或者所述的任意一种序列到达了端点。所述的 BLAST 运算法则中的参数 W, T 以及 X 决定了所述的比对所具有的敏感度以及速度。所述的 BLASTN

程序（针对核苷酸序列）设定了下述的默认值：指令长度（wordlength）（W）为 11，并且期望值（expectation）（E）为 10，并且在所述的 BLOSUM62 得分矩阵（参见 Henikoff 以及 Henikoff（于 1989 年）在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》89:10915 中发表的文章）比对中，（B）为 50，期望值（E）为 10，M 为 5，N 为 -4 并且对两条链进行比较。

[0142] 对于氨基酸序列而言，使用一种得分矩阵来计算所述的累计得分。当出现下述情况时，所述的指令（word）在每个方面中的延伸出现终止：所述的累计的比对得分由其所达到的最大值下降了数量 X；所述的累计得分由于一种或者多个负得分的残基比对的累积而变成零或者零以下；或者所述的任意一种序列到达了端点。所述的 BLAST（基础局部比对检查工具）运算法则中的参数 W，T 以及 X 决定了所述的比对所具有的敏感度以及速度。

[0143] 在一种方法中，所述的“序列同一性百分数”是通过下述方式确定的：在比较窗口的范围内对两条经过最佳比对的序列进行比较，其中所述的比较窗口具有至少 20 个位置，为了对所述的两条序列进行最佳的比对，其中，与所述的参考序列（不包括添加或者缺失）相比，存在于所述的比较窗口之内的所述多核苷酸序列或者多肽序列中的部分可以包括 20% 或者更少的添加或者缺失（即，空位），通常为 5 至 15%，或者 10 至 12%。所述的百分数是通过下述方式计算得到的：对位置的数量进行确定，其中在所述的位置上，两条序列具有相同的核酸碱基或者氨基酸残基，从而获得所述的匹配位置的数量，用所述的匹配位置的数量除以存在于所述的参考序列中的位置的总数量（即，所述的窗口大小）并且将所述的结果乘以 100，从而得到所述的序列同一性百分数。

[0144] “同源性”指的是在对序列进行比对并且导入空位之后，在所述的多核苷酸序列变体或者多肽序列变体中，与所述的非变体序列相同的所述残基的百分数，其中导入空位是在必要的情况下进行的，其目的在于达到所述的最大百分数的同源性。在特定的实施方式中，多核苷酸变体以及多肽变体与本发明中所描述的多核苷酸或者多肽相比，具有至少 70%，至少 75%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 98%，或者至少 99% 的多核苷酸同源性或者多肽同源性。

[0145] “载体”包括穿梭载体以及表达载体。通常情况下，所述的质粒构建体还将包括一种复制起点（例如，所述的 ColE1 复制起点）以及一种选择性标记物（例如，氨苄西林或者四环素抗性物质），分别用于进行所述的质粒在细菌中的复制以及筛选。“表达载体”指的是这样的一种载体，所述的载体中含有为使所述的抗体在细菌细胞或者真核细胞中进行表达所必需的控制序列或者调节元件，其中所述的抗体包括本发明中所述的抗体片段。适合的载体将在下文中被公开。

[0146] 除非上下文中另有明确的指示，在本说明书以及后附的权利要求中所使用到的所述的单数形式“一种”、“一种”以及“所述的”包括复数的语义。

[0147] 抗体

[0148] 本发明同样提供了巨细胞病毒（CMV）抗体以及巨细胞病毒（CMV）特异性抗体，其中所述的抗体包括本发明中所述的多肽，其中包括那些由实施例 1 中所列出的多核苷酸序列编码的多肽以及由实施例 1 和附图 1 中所列出的氨基酸序列编码的多肽，以及上述多肽的片段以及变体。在一种实施方式中，所述的抗体是一种在本发明中被命名为下述的抗体：2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 4P12, 5P9, 或者 9C16。与具有相同的细胞类型的未被感染的对照细胞相比，这些抗体能够与感染有巨细胞病毒（CMV）的细胞进行优先的结合或者特异性的结

合。在优选的实施方式中,这些抗体能够与所述的巨细胞病毒(CMV)的糖蛋白B(gB)进行结合。在特定的实施方式中,本发明中所述的抗体能够与所述的巨细胞病毒(CMV)的糖蛋白(gp)116表位抗原决定簇(AD)2位点I进行结合,其中所述的位点I具有下述的氨基酸序列:SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK(序列识别号:31)。

[0149] 正如本领域技术人员将能够理解的,在本发明中对抗体所进行的一般性的描述以及对制备及使用所述抗体的方法所进行的一般性的描述同样能够应用到个体的抗体多肽组分以及抗体片段中。

[0150] 本发明中所述的抗体是多克隆抗体或者单克隆抗体。然而,在优选的实施方式中,它们是单克隆的。在特定的实施方式中,本发明中所述的抗体是人类抗体。用于制备多克隆抗体以及单克隆抗体的方法是本领域已知的并且在例如美国专利 No. 6824780 中对其进行了大致上的表述。通常情况下,本发明中所述的抗体是通过重组方法来制备得到的,使用的是本领域中可以利用的载体以及方法,这将在下文中进行进一步的描述。人类抗体同样能够通过体外激活的B细胞来生成(参见美国专利 No. 5567610 以及 5229275)。

[0151] 同样可以在转基因动物(例如,小鼠)体内进行人类抗体的制备,其中所述的转基因动物能够在不生成内源性免疫球蛋白的条件下生成人类抗体的完整技能。例如,已经描述了在嵌合型以及生殖系变异小鼠中所述的抗体重链结合区域(J_H)基因的纯合子缺失会导致对内源性抗体生成作用的完全抑制。所述的人类生殖系免疫球蛋白基因阵列向这样的生殖系变异小鼠体内的转移会导致在经过抗原挑战之后所述的人类抗体的生成。参见,例如,Jakobovits 等人(于1993年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》90:2551 中发表的文章;Jakobovits 等人(于1993年)在 Nature 《自然》362:255-258 中发表的文章;Bruggemann 等人(于1993年)在 Year in Immuno. 7:33 中发表的文章;美国专利 No. 5545806, 5569825, 5591669(全部属于 GenPharm);美国专利 No. 5545807;以及 WO 97/17852。对这样的动物进行遗传学工程化处理,从而制备包括本发明中所述的多肽的人类抗体。

[0152] 在某些实施方式中,本发明中所述的抗体是嵌合抗体,在所述的嵌合抗体中同时含有来自于人类来源以及非人类来源的序列。在特定的实施方式中,这些嵌合抗体是被人源化的或者灵长动物源化的(primatizedTM)。在实践中,人源化的抗体通常情况下是人类抗体,其中某些超变区域残基以及可能的某些骨架区域(FR)残基被另外的残基进行了取代,其中所述的另外的残基来自于啮齿动物抗体中的相似位点之上。

[0153] 在本发明的上下文中,嵌合抗体同样包括完全人类抗体,其中所述的人类超变区域或者一种或者多个互补决定区域(CDR)被得以保留,但是序列中的一种或者多个其他的区域已经被相应的序列进行了取代,其中所述的相应序列来自于一种非人类的动物。

[0154] 当所述的抗体意在被用来在人类的治疗中进行使用时,对所述的非人类序列的选择,轻链以及重链的选择,对于降低抗原性以及人类抗非人类抗体的应答而言是重要的,其中所述的非人类序列被用来制备所述的嵌合抗体。嵌合抗体能够保持对所述抗原所具有的高度的结合亲和性以及其他有利的生物学活性,这是更为重要的。为了达到这一目标,根据一种优选的方法,嵌合抗体是通过所述的亲本序列以及各种不同的概念上的嵌合产物的分析过程来制备得到的,其中使用的是所述的亲本人类序列以及非人类序列的三维模型。三维的免疫球蛋白分子是本领域技术人员普遍可以利用的并且是本领域技术人员熟知的。

计算机程序是可以利用的,其中所述的计算机程序描述并且展示出了所选择的候选免疫球蛋白序列所具有的可能的三维构象结构。对这些展示内容所进行的检查使得可以对所述的残基在所述的候选免疫球蛋白序列的机能方面所起到的可能的作用进行分析,即,对所述的残基进行的分析,其中所述的残基能够对所述的候选免疫球蛋白所具有的结合其抗原的能力产生影响。通过这种方式,可以从所述的受体序列以及进口序列中对骨架区域 (FR) 的残基进行筛选以及组合,这样一来,能够获得所期望的抗体特征,例如,对所述的目标抗原具有增强的亲和性。一般而言,在对抗原的结合所产生的影响中,直接并且最本质的涉及到所述的超变区域残基。

[0155] 正如上文中所提到的,抗体(或者免疫球蛋白)可以被划分为五种不同的类型,这种划分依据的是存在于所述的重链中的恒定区域内的所述氨基酸序列上存在的差异。在一种给定的类型范围内的所有免疫球蛋白具有非常类似的重链恒定区域。可以通过序列研究来对这些差异进行探测,或者更为普遍的通过血清学方式(即,通过使用呈递这些差异的抗体)来对其进行探测。在本发明中所述的抗体或者抗体片段是任意类型的,并且因此可以具有一种 γ 重链, μ 重链, α 重链, δ 重链,或者 ϵ 重链。 γ 链指的是 $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, 或者 $\gamma 4$; 并且 α 链指的是 $\alpha 1$ 或者 $\alpha 2$ 。

[0156] 在一种优选的实施方式中,本发明中所述的抗体,或者所述抗体的片段,是一种免疫球蛋白 G(IgG)。免疫球蛋白 G(IgG) 被认为是最为万能的免疫球蛋白,因为它能够执行所述的免疫球蛋白分子所具有的全部功能。免疫球蛋白 G(IgG) 是存在于血清之中的主要的免疫球蛋白 (Ig), 并且是唯一一种能够穿透胎盘的免疫球蛋白 (Ig) 类型。免疫球蛋白 G(IgG) 同样能够对补体进行固定,尽管所述的免疫球蛋白 G4(IgG4) 亚类型不能够。巨噬细胞,单核细胞,多形核白细胞 (PMN' s) 以及某些淋巴细胞中具有用于所述的免疫球蛋白 G(IgG) 的 Fc 区域的 Fc 受体。并不是所有的亚类型都能够平等的进行良好的结合;免疫球蛋白 G2 以及免疫球蛋白 G4 不能够与 Fc 受体进行结合。与存在于所述的多形核白细胞 (PMN' s)、单核细胞以及巨噬细胞之上的 Fc 受体进行结合的结果是,所述的细胞就可以更好的对所述的抗原进行内在化。免疫球蛋白 G(IgG) 是一种能够增强噬菌作用的调理素。免疫球蛋白 G(IgG) 与存在于其他的细胞类型之上的 Fc 受体之间所进行的结合能够导致其他功能的激活作用。本发明中所述的抗体可以是任意的免疫球蛋白 G(IgG) 亚类型。

[0157] 在另外一种优选的实施方式中,本发明中所述的抗体,或者所述抗体的片段,是一种免疫球蛋白 E(IgE)。免疫球蛋白 E(IgE) 是所述的血清免疫球蛋白 (Ig) 中最不常见的一种,因为它能够与存在于嗜碱细胞以及肥大细胞之上的 Fc 受体发生非常紧密的结合,即使是在与抗原进行相互作用之前。作为它与嗜碱细胞以及肥大细胞进行结合的结果,免疫球蛋白 E(IgE) 被涉及到过敏性反应中去。所述的过敏原与存在于所述细胞之上的所述免疫球蛋白 E(IgE) 之间进行的结合能够导致各种不同的药理学调节剂的释放,所述的药理学调节剂的释放能够产生过敏性的症状。免疫球蛋白 E(IgE) 同样能够在寄生虫蠕虫疾病中发挥作用。嗜曙红细胞具有针对免疫球蛋白 E(IgE) 的 Fc 受体并且嗜曙红细胞与覆盖有免疫球蛋白 E(IgE) 的蠕虫之间所进行的结合能够导致对所述寄生虫的杀灭。免疫球蛋白 E(IgE) 不能对补体进行固定。

[0158] 在各种不同的实施方式中,在本发明中所述的抗体以及抗体的片段中含有一种可变的轻链,其中所述的轻链可以是 κ 或者 λ 。所述的 λ 链是任意亚类型的,包括,例如,

$\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, 以及 $\lambda 4$ 。

[0159] 正如上文中所提及的, 本发明中进一步的提供了抗体的片段, 其中在所述的抗体片段中包括了本发明所述的多肽。在某些情形下, 与完整的抗体相比, 使用抗体的片段是存在优势的。例如, 所述的片段所具有的较小的尺寸允许其被快速的除去, 并且导致其能够更好的进入到某些组织中去, 其中所述的组织例如是固体肿瘤。抗体片段的例子包括: Fab, Fab', F(ab')₂, 以及 Fv 片段; 双重功能抗体; 线性抗体; 单链抗体分子; 以及通过抗体片段来形成的多重特异性抗体。

[0160] 已经研发出各种不同的技术用于进行所述的抗体片段的制备。传统意义上, 这些片段是经由完整抗体的蛋白水解消化反应而得到的 (参见, 例如, Morimoto 等人 (于 1992 年) 在 *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*《生物化学以及生物物理学方法杂志》24:107-117 中发表的文章; 以及 Brennan 等人 (于 1985 年) 在 *Science*《科学》229:81 中发表的文章)。然而, 这些片段现在可以通过重组的宿主细胞直接制备得到。Fab、Fv 以及单链 Fv (ScFv) 片段均能够在大肠杆菌 (*E. coli*) 中进行表达并且由大肠杆菌 (*E. coli*) 进行分泌, 因此容易对这些片段进行大剂量的制备。Fab'-SH 片段可以直接从大肠杆菌 (*E. coli*) 中进行回收并且对其进行化学偶联从而形成 F(ab')₂ 片段 (参见 Carter 等人 (于 1992 年) 在 *Bio/Technology*《生物技术》10:163-167 中发表的文章)。根据另外一种方法, 可以从重组的宿主细胞培养物中直接分离出 F(ab')₂ 片段。在美国专利 No. 5869046 中描述了一种 Fab 以及 F(ab')₂ 片段, 所述的片段具有增加的体内半衰期, 并且包括一种补救的受体结合表位残基。用于进行所述的抗体片段的制备的其他技术对于本领域技术从业者而言将是显而易见的。

[0161] 在其他的实施方式中, 所选择的所述抗体是一种单链的 Fv 片段 (scFv)。参见 WO 93/16185; 美国专利 No. 5571894; 以及 5587458。Fv 以及单链 Fv (sFv) 是仅有的带有完整的结合位点并且缺乏恒定区域种类。因此, 在进行体内使用的过程中, 它们适合于发生还原性的非特异性结合。可以构建一种单链 Fv (sFv) 融合蛋白, 从而生成一种效应器蛋白质的融合, 其中所述的融合发生在所述的单链 Fv 的氨基末端或者羧基末端上。参见 *Antibody Engineering*《抗体的工程化处理》, 由 Borrebaeck 编辑, 见上文。所述的抗体片段也可以是一种“线性抗体”, 例如, 在美国专利 No. 5641870 中所描述到的。这样的线性抗体片段可以是具有单一特异性的或者是具有双重特异性的。

[0162] 在某些实施方式中, 本发明中所述的抗体是具有双重特异性或者多重特异性的。双重特异性抗体指的是这样的抗体, 其对于至少两个不同的表位具有结合特异性。范例性的双重特异性抗体能够与存在于一种单一抗原上的两个不同的表位进行结合。其他的这类抗体将一种抗原结合位点与另外一种抗原的结合位点进行了组合。可供选择的, 一种抗巨细胞病毒 (CMV) 臂 (arm) 与另外一种臂进行了组合, 其中所述的另外一种臂能够与存在于一种白细胞之上的触发分子进行结合, 从而能够将细胞的防御机制进行集中并且使其停留在所述的被感染细胞之中, 其中所述的触发分子是例如 T 细胞受体分子 (例如, CD3), 或者是针对免疫球蛋白 G (IgG) 的 Fc 受体, 例如 Fc γ 受体 I (CD64), Fc γ 受体 II (CD32) 以及 Fc γ 受体 III (CD 16)。双重特异性抗体同样被用来将细胞毒性试剂停留在所述的被感染细胞之中。这些抗体拥有一种与巨细胞病毒 (CMV) 进行结合的臂以及一种能够与所述的细胞毒性试剂 (例如, 皂草毒素蛋白 (saporin), 抗干扰素 α , 长春树生物碱类, 蓖麻毒素蛋白

(ricin)A 链, 甲氨蝶呤 (methotrexate) 或者放射性同位素半抗原) 进行结合的臂。双重特异性抗体是作为完整长度的抗体或者抗体的片段 (例如, $F(ab')_2$ 双重特异性抗体) 来进行制备的。WO 96/16673 中描述了一种具有双重特异性的抗 ErbB2/ 抗 Fc γ 受体 III 抗体, 并且美国专利 No. 5837234 中公开了一种具有双重特异性的抗 ErbB2/ 抗 Fc γ 受体 I 抗体。在 WO 98/02463 中表示出了一种具有双重特异性的抗 ErbB2/ 抗 Fc α 抗体。美国专利 No. 5821337 中教导了一种具有双重特异性的抗 ErbB2/ 抗 CD3 抗体。

[0163] 用于制备双重特异性抗体的方法是本领域已知的。制备具有完整长度的双重特异性抗体的传统方法是基于所述的两个免疫球蛋白重链 - 轻链对的共表达而进行的, 其中所述的两条链具有不同的特异性 (参见 Millstein 等人 (于 1983 年) 在 Nature《自然》305 : 537-539 中发表的文章)。由于所述的免疫球蛋白的重链以及轻链之间所进行的随机搭配, 这些杂交细胞 (quadromas) 会产生出具有十种不同抗体分子的可能的混合物, 在所述的混合物中只有一种具有所述正确的双重特异性结构。对所述的正确分子所进行的纯化步骤, 是相当麻烦的, 并且所述的产物的产量是很低的, 其中所述的纯化步骤通常是通过亲和色谱步骤来完成的。类似的操作方法在 WO 93/08829 中进行了公开, 以及在 Traunecker 等人 (于 1991 年) 在 EMBO J. 《欧洲分子生物学学会杂志》10 : 3655-3659 中发表的文章中进行了公开。

[0164] 根据一种不同的方法, 将具有所期望的结合特异性的抗体可变结构域 (抗体 - 抗原结合位点) 与免疫球蛋白恒定结构域序列进行融合。优选的, 所述的融合是与一种免疫球蛋白 (Ig) 的重链恒定结构域进行的, 其中所述的重链恒定结构域包括所述的铰链区域、重链恒定结构域 2 (C_H2) 区域、以及重链恒定结构域 3 (C_H3) 区域中的至少一部分。优选的是具有所述的重链恒定结构域 1 (C_H1), 其中含有为进行轻链的结合所必需的位点, 其中所述的重链恒定结构域 1 (C_H1) 是存在于至少一种所述的融合之中的。将编码所述的免疫球蛋白重链融合的 DNA 插入到分离的表达载体之中, 以及如果期望的话将编码所述的免疫球蛋白轻链的 DNA 插入到分离的表达载体之中, 并且将其共转染至一种适合的宿主细胞之内。在当用于进行所述的构建反应的三种多肽链具有不相等的比例的实施方式中, 这在调整所述的三种多肽片段的共有部分的方面提供了更大的机动性, 用以提供最适宜产量的所期望的双重特异性抗体。然而, 当所述的至少两种多肽链以相同的比例所进行的表达能够获得高产量的时候, 或者当所述的比例对于所期望的链的組合的产量并不能产生显著的影响的时候, 将两个或者全部的三个多肽链的编码序列插入到一种单个的表达载体中是可能的。

[0165] 在这个方法的一种优选的实施方式中, 所述的双重特异性抗体是由下述两者组成的: 存在于一种抗原臂上的杂交的免疫球蛋白重链, 其中所述的免疫球蛋白重链具有第一种结合特异性, 以及存在于所述的另外一种抗原臂上的杂交的免疫球蛋白重链 - 轻链对 (提供第二种结合特异性)。已经发现, 这种不对称的结构能够促进所期望的双重特异性化合物从不期望的免疫球蛋白链的混合物中所进行的分离, 因为仅在一半的双重特异性分子中存在的免疫球蛋白轻链提供了一种容易的分离方式。这种方法在 WO 94/04690 中被进行了公开。为了获得生成双重特异性抗体的进一步的细节, 可以参见, 例如, Suresh 等人 (于 1986 年) 在 Methods in Enzymology 《酶学方法》121 : 210 中发表的文章。

[0166] 根据在美国专利 No. 5731168 中描述的另外一种方法, 可以在一对抗体分子之间的分界面进行工程化处理, 从而使得所述的异源二聚物所具有的百分含量最大化, 其中所

述的异源二聚物是从重组的细胞培养物中回收得到的。所述的优选的分界面至少包括所述的重链恒定结构域 3(C_H3) 中的一部分。在这种方法中,利用较大的侧链(例如,酪氨酸或者色氨酸)对存在于所述的第一种抗体分子的分界面之上的一种或者多个小的氨基酸侧链进行取代。可以在所述的第二种抗体分子的分界面之上建立补偿性的“腔”,其中所述的补偿性的“腔”与所述的大侧链具有相同或者相似的大小,所述的“腔”的建立是通过利用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或者苏氨酸)对大的氨基酸侧链进行取代的方式来实现的。这提供了一种机制,用以增加所述的异源二聚物的产量,使其超过其他的不期望的终产物,例如同源二聚物。

[0167] 双重特异性抗体包括交联的抗体或者“异源共轭”抗体。例如,存在于所述的异源共轭物中的所述抗体中的一种与抗生物素蛋白(avidin)发生偶联,而另外一种与生物素发生偶联。这样的抗体已经,例如,被提议用来使免疫系统的细胞作用于不期望的细胞(参见美国专利 No. 4676980),以及被用来进行人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的治疗(参见 WO 91/00360, WO 92/200373, 以及 EP 03089)。可以使用任何便利的交联方法来进行异源共轭抗体的制备。适合的交联试剂是本领域中熟知的,并且在美国专利 No. 4676980 中对其进行了公开,同时被公开的还有各种不同的交联技术。

[0168] 用于通过抗体片段生成双重特异性抗体的技术也已经在文献中被进行了描述。例如,可以使用化学连接物对双重特异性抗体进行制备。Brennan 等人(于 1985 年)在 Science《科学》229:81 中发表的文章中描述了一种操作方法,其中完整的抗体通过蛋白分解反应被进行了切断,从而生成了 F(ab')₂ 片段。在存在有所述的二硫醇配位试剂亚砷酸钠的条件下,这些片段被进行了还原,从而对邻近的二硫醇进行了稳定并且阻止了所述的分子间二硫键的形成。上述生成的 Fab' 片段在此之后被转化成为硝基苯甲酸硫醇(TNB)的衍生物。通过利用巯基乙基胺所进行的还原反应,所述的 Fab' - 硝基苯甲酸硫醇(TNB)衍生物中的一种在此之后被重新转化成为所述的 Fab' - 硫醇,并且将其与一种等摩尔剂量的另外一种 Fab' - 硝基苯甲酸硫醇(TNB)衍生物进行混合,从而形成了所述的双重特异性抗体。上述制备得到的双重特异性抗体可以被用来作为试剂,用于进行所述的酶的选择性固定化反应。

[0169] 近来的研究进展已经促进了 Fab' -SH 片段从大肠杆菌中的直接回收,其中所述的 Fab' -SH 片段可以进行化学偶联从而形成双重特异性抗体。Shalaby 等人(于 1992 年)在 J. Exp. Med.《实验医学杂志》175:217-225 中发表的文章中描述了一种完全人源化的双重特异性抗体 F(ab')₂ 分子的制备方法。每一种 Fab' 片段都是由大肠杆菌单独进行分泌的并且将所述的片段直接进行体外的化学偶联,从而形成所述的双重特异性抗体。因此而形成的所述的双重特异性抗体能够与这样的细胞进行结合,所述的细胞能够过表达所述的 ErbB2 受体以及正常的人类 T 细胞,并且能够触发所述的人类细胞毒性淋巴细胞针对人类乳腺肿瘤目标的细胞溶解活性。

[0170] 用于直接从重组的细胞培养物中制备以及分离双重特异性抗体的各种不同的技术也已经被进行了描述。例如,已经使用亮氨酸拉链对双重特异性抗体进行了制备。参见 Kostelny 等人(于 1992 年)在 J. Immunol.《免疫学杂志》148(5):1547-1553 中发表的文章。所述的亮氨酸拉链肽与两种不同的抗体的 Fab' 部分进行了连接,其中所述的亮氨酸拉链肽来自于所述的 Fos 蛋白以及 Jun 蛋白,并且所述的连接是通过基因融合的方法来实现

的。所述的抗体同源二聚物在所述的铰链区域处被还原,从而形成了单体,并且在此之后经过重新氧化从而形成了所述的抗体异源二聚物。这种方法同样可以被利用来进行所述的抗体同源二聚物的制备。所述的“双重功能抗体”技术已经提供了另外一种可供选择的机制,用于进行双重特异性抗体片段的制备,其中所述的“双重功能抗体”技术是由 Hollinger 等人(于 1993 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》90 :6444-6448 中发表的文章中进行描述的。所述的片段中包括一种重链可变区域 (V_H),所述的重链可变区域 (V_H) 通过一种连接物与一种轻链可变区域 (V_L) 进行了连接,所述的连接物太短以至于不能够允许在存在于同一条链上的所述的两个结构域之间进行配对。因此,存在于一种片段之上的所述的重链可变结构域 (V_H) 以及轻链可变结构域 (V_L) 不得不与存在于另外一种片段之上的互补的轻链可变结构域 (V_L) 以及重链可变结构域 (V_H) 进行配对,从而形成了两个抗原结合位点。另外一种用于制备双重特异性抗体片段的策略也已经被进行了报道,其中所述的策略是通过使用所述的单链 Fv (sFv) 二聚物来实现的。参见 Gruber 等人(于 1994 年)在 J. Immunol. 《免疫学杂志》152 :5368 中发表的文章。

[0171] 具有超过两个化合价的抗体是可以预期的。例如,可以制备具有三重特异性的抗体。参见 Tutt 等人(于 1991 年)在 J. Immunol. 《免疫学杂志》147 :60 中发表的文章。一种多价的抗体可以以快于一种二价抗体的速度被一种细胞进行内在化(和/或异化),其中所述的细胞表达一种抗原,所述的抗原能够与所述的抗体进行结合。本发明中所述的抗体是多价的抗体,其中带有三个或者更多个抗原结合位点(例如,四价抗体),所述的抗体可以容易的通过核酸的重组表达方式制备得到,其中所述的核酸能够对所述抗体所具有的多肽链进行编码。所述的多价抗体中含有一种二聚作用结构域以及三个或者更多个抗原结合位点。所述的优选的二聚作用结构域中包括一种 Fc 区域或者一种铰链区域。在这个方案中,所述的抗体中含有一种 Fc 区域以及在所述的 Fc 区域的氨基末端上的三个或者更多个抗原结合位点。所述的优选的多价抗体包括三个或者大约八个抗原结合位点,但是优选为四个抗原结合位点。所述的多价抗体包括至少一种肽链(并且优选为两个肽链),其中在所述的肽链中含有两个或者更多个可变的结构域。例如,所述的多肽链中包括 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, 其中 VD1 指的是第一种可变结构域, VD2 指的是第二个可变结构域, Fc 指的是 Fc 区域中的一条多肽链, X1 以及 X2 代表一种氨基酸或者多肽,并且 n 为 0 或者 1。例如,所述的多肽链中包括: $VH-CH1-$ 弹性的连接物 $-VH-CH1-Fc$ 区域链;或者 $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 区域链。所述的多价抗体优选的进一步包括至少两个(并且优选为四个)轻链可变结构域多肽。所述的多价抗体,例如,含有大约两个至大约八个轻链可变结构域多肽。能够在本发明中被预期到的所述的轻链可变结构域多肽包括一种轻链可变结构域并且,任选的,进一步的含有一种轻链恒定 (C_L) 结构域。

[0172] 本发明中所述的抗体进一步的包括单链抗体。

[0173] 在特定的实施方式中,本发明中所述的抗体是经过内在化的抗体。

[0174] 对在本发明中描述的所述抗体所进行的氨基酸序列的修饰是可以预期的。例如,可以对所述的抗体所具有的结合亲和性和/或其他的生物学性质进行提高。所述抗体的氨基酸序列变体可以通过下述方式来进行制备:向一种多核苷酸或者多核苷酸链内导入适当的核苷酸变化,其中所述的多核苷酸负责编码所述的抗体,或者通过肽合成的方法。范例性的修饰包括,例如,存在于所述的抗体的氨基酸序列之中的残基的缺失,和/或插入和/或

取代。可以对缺失、插入、以及取代进行任意的组合,从而获得所述的最终抗体,只要所述的最终构建体具有所期望的特征即可。所述的氨基酸的变化同样可能改变对所述抗体所进行的翻译之后的处理,例如对糖基化位点的数量的改变或者对糖基化位点的位置的改变。在上文中针对本发明中所述的多肽所描述的任何的变化以及修饰被包含在本发明中所述的抗体的内容中。

[0175] 存在一种有效的方法,用以对一种抗体所具有的某些残基或者区域进行识别,其中所述的残基或者区域是用于进行变异的优选的位置,这种方法被称之为“丙氨酸扫描变异”,这是在 Cunningham 以及 Wells(于 1989 年)在 Science 《科学》244:1081-1085 中进行描述的。在这里,一种残基或者一组目标残基被得以识别(例如,带电荷的残基例如精氨酸,天冬氨酸,组氨酸,赖氨酸,以及谷氨酸)并且被一种中性的或者带负性电荷的氨基酸(最为优选的是丙氨酸或者聚丙氨酸)进行取代,从而对所述的氨基酸与前列腺苷细胞抗原(PSCA)抗原之间的相互作用产生影响。在此之后,对那些已经证实了对所述的取代具有功能敏感性的氨基酸位置进行精制,其中所述的精制是通过在所述的取代位点上或者针对所述的取代位点导入进一步的或者其他的变体的方式来实现的。因此,当所述的用以导入一种氨基酸序列变化的位点被预先确定时,就不需要对所述的变异本身所具有的性质进行预先的确定。例如,为了对在一种给定的位点上的一种变异作用所具有的性能,在所述的目标密码子或者区域内进行丙氨酸扫描或者随机变异,并且对上述被表达的抗抗体变体进行筛选,选择出所期望的活性。

[0176] 氨基酸序列的插入包括氨基末端和/或羧基末端上的融合,以及单个的或者多个的氨基酸残基的序列内的插入,其中所述的融合所具有的长度范围在一种残基至含有一百个或者更多个残基的多肽的范围之内。末端插入的例子包括一种带有 N-末端甲二磺酰基残基的抗体,或者是所述的抗体与一种细胞毒性多肽进行了融合。一种抗体所具有的其他的插入性变体包括所述抗体的 N-末端或者 C-末端与一种酶(例如,用来进行抗体依赖性的酶介导的前体药物的治疗(ADEPT))之间进行的融合,或者与一种多肽之间进行的融合,其中所述的多肽能够增加所述抗体所具有的血清半衰期。

[0177] 另外一种类型的变体是一种氨基酸取代变体。这些变体在所述的抗体分子中具有至少一种氨基酸残基被另外一种不同的残基进行了取代。用于进行取代性变异的最感兴趣的位点包括所述的超变区域,但是骨架区域(FR)的改变同样是可以预期的。保守性的取代以及非保守性的取代是可以预期的。

[0178] 对所述的抗体所具有的生物学性质进行的本质上的修饰是通过下述方式来进行的:对取代作用进行选择,选择那些能够对下述方面的作用产生显著性的改变的取代作用:(a)对存在于所述的取代区域内的多肽骨架所具有的结构进行的维持,例如,作为一种板状构象或者螺旋状构象,(b)对所述的分子在所述的目标位点上所具有的电荷或者疏水性质进行的维持,或者(c)对所述的大部分侧链进行的维持。

[0179] 在对所述的抗体所具有的适宜构象进行维持的方面中所不涉及的任何的半胱氨酸残基同样是可以被取代的,一般而言利用丝氨酸对其进行取代,从而对所述的分子所具有的氧化稳定性进行提高并且对异常的交联进行阻止。相反的,向所述的抗体中加入半胱氨酸键,用以改善其稳定性(特别是当所述的抗体是一种抗体片段时,例如是一种 Fv 片段)。

[0180] 在一种类型的取代变体中,涉及到对存在于亲本抗体之上的一种或者多个超变区域残基进行的取代。一般而言,对那些与所述的亲本抗体相比具有提高的生物学性质的上述得到的变体进行选择,用以进行进一步的研发,其中所述的亲本抗体是那些生成了所述变体的亲本抗体。用于生成这样的取代性变体的一种便利的方式包括亲和力成熟,其中使用到了噬菌体展示。简要的说,几个超变区域位点(例如,6-7个位点)发生了变异,从而在每一种位点之上生成了全部可能的氨基取代。因此而生成的所述的抗体变体以一种单价的形式在丝状的噬菌体颗粒中进行展示,其中所述的抗体变体与所述的 M13 的基因 III 产物进行了融合,所述的 M13 的基因 III 产物被包裹在每一种颗粒之中。在此之后,按照本发明中所公开的方法,对所述的噬菌体展示变体所具有的生物学活性(例如,结合亲和性)进行筛选。为了对用来进行修饰的候选的超变区域位点进行识别,可以进行丙氨酸扫描变异,从而识别出能够对抗原的结合产生显著性影响的超变区域残基。可供选择的,或者除此之外的,对所述的抗原-抗体复合体所具有的晶体结构进行分析,从而识别出在所述的抗体以及抗原或者被感染细胞之间的接触位点。这些接触残基及其邻近的残基是用于进行取代反应的候选残基,其中所述的取代反应是依照本发明中详细描述的技术来进行的。一旦生成了这样的变体,则按照本发明中描述的方法对所述的全体变体进行筛选,并且在一项或者几项相关的检测中筛选出具有优异性质的抗体,用以进行进一步的研发。

[0181] 所述抗体所具有的另外一种类型的氨基酸变体能够对所述抗体所具有的初始的糖基化类型进行改变。“改变”指的是对存在于所述抗体之中的一种或者多个碳水化合物半族进行的删除,和/或对不存在于所述的抗体之中的一种或者多个糖基化位点的添加。

[0182] 抗体的糖基化作用一般而言是 N-连接的或者是 O-连接的。N-连接指的是所述的碳水化合物半族与一种天冬酰胺残基所具有的侧链之间所进行的连接。所述的三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸以及天冬酰胺-X-苏氨酸是所述的识别序列,用以进行所述的碳水化合物半族与天冬酰胺侧链之间的酶连接,其中 X 可以是除了脯氨酸之外的任意氨基酸。因此,在一种多肽中,上述这些三肽序列中的任何一种的存在都将建立一种可能的糖基化位点。O-连接的糖基化作用指的是某些糖类中的一种与一种羟基氨基酸之间所进行的连接,其中所述的糖类是 N-乙酰基半乳糖胺,半乳糖,或者木糖,最为常见的所述的羟基氨基酸是丝氨酸或者苏氨酸,尽管 5-羟基脯氨酸或者 5-羟基赖氨酸同样是可以被使用的。

[0183] 可以通过下述的方式便利的实现糖基化位点在所述抗体中的添加:对所述的氨基酸序列进行改变,这样一来,在所述的氨基酸序列中含有一种或者多个上文中描述的三肽序列(用于进行 N-连接的糖基化位点)。所述的改变同样可以通过向所述的初始抗体的序列中进行一种或者多个丝氨酸或者苏氨酸残基的添加、或者取代的方式来完成(用于进行 O-连接的糖基化位点)。

[0184] 可以对本发明中所述的抗体进行效应器功能方面的修饰,例如,这样一来,能够增强所述抗体所具有的抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒作用(CDC)。这可以通过向所述抗体的 Fc 区域内导入一种或者多个氨基酸取代的方式来实现。可供选择的或者除此之外的,向所述的 Fc 区域内导入半胱氨酸残基,从而允许在这个区域内形成链间的二硫键。所述的由此而生成的同源二聚物抗体能够具有提高的内在化作用能力和/或增强的补体介导的细胞杀伤作用以及抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)。参见 Caron 等人(于 1992 年)在 J. ExpMed. 《实验医学杂志》176:1191-1195 中发表的文章

以及 Shopes, B. (于 1992 年) 在 J. Immunol. 《免疫学杂志》148 :2918-2922 中发表的文章。同样可以使用异源双功能交联剂对同源二聚物抗体进行制备,其中所述的同源二聚物抗体具有增强的抗感染活性,正如 Wolff 等人(于 1993 年)在 Cancer Research 《癌症研究》53 :2560-2565 中发表的文章中所描述到的。可供选择的,可以对一种抗体进行工程化处理,并且从而使其能够具有增强的补体溶解能力以及抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)能力,其中所述的抗体具有双重的 Fc 区域。参见 Stevenson 等人(于 1989 年)在 Anti-Cancer Drug Design 《抗癌症药物的设计》3 :219-230 中发表的文章。

[0185] 为了增加所述抗体所具有的血清半衰期,可以向所述的抗体(特别是一种抗体片段)中导入一种补救受体结合表位,例如按照美国专利 No. 5739277 中所描述的那样。所述的术语“补救受体结合表位(salvage receptor binding epitope)”指的是一种存在于免疫球蛋白 G(IgG)分子(例如,免疫球蛋白 G1,免疫球蛋白 G2,免疫球蛋白 G3,或者免疫球蛋白 G4)的所述的 Fc 区域中的表位,其中所述的表位负责增加所述的免疫球蛋白 G(IgG)分子所具有的体内血清半衰期。

[0186] 同样可以对本发明中所述的抗体进行修饰,使其包括一种表位标签或者表位标记物,例如,可以用于进行纯化或者诊断方面的应用。本发明同样涉及到使用免疫共轭物进行治疗,其中所述的免疫共轭物中包括一种与一种抗癌症试剂或者一种生长抑制性试剂进行偶联的抗体,其中所述的抗癌症试剂是例如一种细胞毒性试剂。能够有效的用于这样的免疫共轭物的生成过程中的化学治疗试剂已经在上文中进行了描述。

[0187] 一种抗体与一种或者多种小分子毒素以及这些毒素的衍生物之间形成的共轭物同样是本发明中可以预期到的,其中所述的小分子毒素是例如卡奇霉素(calicheamicin),美登素类(maytansinoids),aurstatin,单端孢霉烯(trichothecene),以及 CC 1065,并且所述的毒素衍生物具有毒素的活性。

[0188] 在一种优选的实施方式中,本发明中所述的一种抗体(完整长度的或者是片段)与一种或者多种美登素类的分子进行了共轭。美登素类是有丝分裂抑制剂,它们通过抑制微管蛋白的聚合而发挥作用。美登素 I(maytansine)是首先从所述的东非灌木丛齿叶美登木(Maytenus serrata)中分离得到的(参见美国专利 No. 3896111)。在此之后,发现某些微生物同样能够制备美登素类,例如美登醇(maytansinol)以及 C-3 美登醇酯(参见美国专利 No. 4151042)。合成性的美登醇及其衍生物以及类似物在例如下述文献中被公开:美国专利 No. 4137230 ;4248870 ;4256746 ;4260608 ;4265814 ;4294757 ;4307016 ;4308268 ;4308269 ;4309428 ;4313946 ;4315929 ;4317821 ;4322348 ;4331598 ;4361650 ;4364866 ;4424219 ;4450254 ;4362663 ;以及 4371533。

[0189] 为了尝试提高它们的治疗指数,将美登素 I 以及美登素类与抗体进行了共轭,其中所述的抗体能够与肿瘤细胞抗原进行特异性的结合。含有美登素类的免疫共轭物以及它们的治疗用途在例如下述文献中进行了公开:美国专利 No. 5208020,5416064 以及欧洲专利 EP 0425235B1。Liu 等人(于 1996 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》93 :8618-8623 中发表的文章中描述了一种免疫共轭物,所述的免疫共轭物中包括一种被命名为 DM1 的美登素类,所述的美登素类与所述的单克隆抗体 C242 进行了偶联,所述的单克隆抗体 C242 能够直接作用于人类的结肠直肠癌。已经发现所述的共轭物对于经过培养的结肠癌细胞而言具有高度的细胞毒性,并且在一项体内肿瘤生长检测中表现出了

抗肿瘤的活性。

[0190] 抗体-美登素类的共轭物是通过下述方式制备得到的：将一种抗体与一种美登素类的分子进行化学连接，其中所述的化学连接是在不显著的消除所述的抗体或者所述的美登素类分子所具有的生物学活性的前提下进行的。在每个抗体分子上进行平均 3-4 个美登素类分子的共轭已经表现出增强了针对目标细胞的细胞毒性的功效，同时不会对所述抗体所具有的功能或者溶解性能产生负面的影响，尽管可以预料到，即使使用一种分子的毒素/抗体也能够产生超越所述的抗体的单独使用效果的增强的细胞毒性。美登素类是本领域中熟知的并且可以通过已知的技术进行合成或者从天然的来源中进行分离。适合的美登素类在例如美国专利 No. 5208020 以及在上文中所提及的其他专利文献以及非专利出版物中有所公开。优选的美登素类是美登醇以及美登醇的类似物，其中所述的类似物是在所述的美登醇分子的芳香环上或者在其他的位置上被进行了修饰，例如各种不同的美登醇酯类。

[0191] 用于制备抗体共轭物的许多连接基团是本领域中已知的，包括，例如，那些在美国专利 No. 5208020 或者欧洲专利 0425236B1 以及 Chari 等人（于 1992 年）在 Cancer Research 《癌症研究》52：127-131 中发表的文章中所公开的。所述的连接基团包括二硫键基团，硫醚基团，酸敏感性基团，光敏感性基团，肽酶敏感性基团，或者酯酶敏感性基团，正如在上述指定的专利中所公开的，二硫键基团以及硫醚基团是优选的。

[0192] 可以使用各种不同的双重功能性蛋白质偶联试剂进行免疫共轭物的制备，其中所述的双重功能性蛋白质偶联试剂是例如 N-琥珀酰基-3-(2-二硫基吡啶)丙酸酯 (SPDP)，4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯，亚氨基硫烷 (IT)，双重功能的亚胺酯衍生物（例如己二亚胺盐酸二甲酯），活性酯（例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯），醛类（例如戊二醛），双-叠氮类化合物（例如双-(对-叠氮苯甲酰基)己二胺），双-重氮衍生物（例如双-(对-二重氮苯甲酰基)乙二胺），二异氰酸酯（例如甲苯 2,6-二异氰酸酯），以及双重活性的含氟化合物（例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。特别优选的偶联试剂包括 N-琥珀酰基-3-(2-二硫基吡啶)丙酸酯 (SPDP)（参见 Carlsson 等人 [于 1978 年] 在 Biochem. J. 《生物化学杂志》173：723-737 中发表的文章）以及 N-琥珀酰基-4-(2-硫基吡啶)戊酸酯 (SPP)，从而提供一种二硫键的连接。例如，可以按照 Vitetta 等人（于 1987 年）在 Science 《科学》238：1098 中发表的文章中所描述的方法制备一种蓖麻毒素免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二乙撑三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是一种范例性的螯合试剂，用于进行放射性核素与所述抗体的共轭。参见 WO 94/11026。所述的连接物可以是一种“可断开的连接物”，方便了所述的细胞毒性药物在所述细胞中的释放。例如，可以使用一种酸敏感性的连接物（参见（于 1992 年）在 Cancer Research 《癌症研究》52：127-131 中发表的文章；美国专利 No. 5208020）。

[0193] 另外一种感兴趣的免疫共轭物中包括一种与一种或者多个卡奇霉素 (calicheamicin) 分子进行共轭的抗体。所述的卡奇霉素抗生素家族能够以亚皮摩尔 (sub-picomolar) 的浓度水平制备双链 DNA 的断裂。关于所述的卡奇霉素家族共轭物的制备，可以参见美国专利 No. 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296（全部属于 American Cyanamid Company 美国氨基氰公司）。可以与所述的抗体进行共轭的另外一种药物是 QFA，它是一种抗叶酸制剂。卡奇霉素以及 QFA 均具有细胞内的作用位点并且不会轻易的穿透所述的质膜。因此，这些试剂的细胞内吸收作用极大

的增强了它们的细胞毒性作用,其中所述的细胞内吸收作用是经由抗体介导的内在化作用来实现的。

[0194] 可以与本发明中所述的抗体进行共轭的其他试剂的例子包括卡氮芥 (BCNU), 链佐星 (streptozocin), 长春新碱 (vincristine) 以及 5- 氟尿嘧啶, 已知共同被称为 LL-E33288 复合物的试剂家族, 以及埃斯佩拉霉素 (esperamicin) (参见美国专利 No. 5877296), 其中所述的 LL-E33288 复合物是在美国专利 No. 5053394, 5770710 中描述的。

[0195] 可以使用的酶活毒素及其片段包括, 例如, 白喉毒素 (diphtheria) A 链, 白喉毒素的非结合活性片段, 外毒素 (exotoxin) A 链 (来自于绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)), 蓖麻毒素 (ricin) A 链, 相思豆毒素 (abrin) A 链, 莫迪素 (modeccin) A 链, α -辛纳毒素 (sarcin), 油桐蛋白 (*Aleurites fordii* proteins), 康乃馨蛋白, 美洲商陆蛋白 (*Phytolacca Americana* proteins) (美洲商陆蛋白 I (PAPI), 美洲商陆蛋白 II (PAPII), 以及美洲商陆蛋白 -S (PAP-S)), 苦瓜抑制剂, 麻疯树毒素 (curcin), 巴豆毒素 (croton), 肥皂草抑制剂, 白树毒素 (gelonin), 米托洁林 (mitogillin), 局限曲菌素 (restritocin), 酚霉素, 依诺霉素, 以及单端孢霉烯。参见, 例如, WO 93/21232。

[0196] 本发明中进一步的包括一种免疫共轭物, 所述的免疫共轭物是在一种抗体与一种具有核溶解活性的化合物 (例如, 一种核糖核酸酶或者一种 DNA 核酸内切酶例如一种脱氧核糖核酸酶; 脱氧核糖核酸酶) 之间形成的。

[0197] 为了对被感染细胞进行选择性的破坏, 所述的抗体含有一种具有高度的放射性活性的原子。可以利用各种不同的放射性同位素来制备所述的放射性共轭的抗 - 前列腺干细胞抗原 (PSCA) 抗体。例子包括 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} 以及 Lu 的放射性同位素。当所述的共轭物被用来进行诊断时, 其可以含有一种用于进行闪烁照相 (scintigraphic) 研究的放射性原子, 或者含有一种用于进行核磁共振 (NMR) 成像 (也被称之为磁共振成像, mri) 的自旋标记物, 其中所述的放射性原子是例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或者 I^{123} , 所述的自旋标记物是例如碘 -123, 碘 -131, 铟 -111, 氟 -19, 碳 -13, 氮 -15, 氧 -17, 钆, 锰或者铁。

[0198] 使用已知的方式向所述的共轭物中导入所述的放射性标记物或者其他的标记物。例如, 所述的肽可以通过生物合成得到的或者是通过化学的氨基酸合成法合成得到的, 其中在所述的化学氨基酸合成法中使用适合的氨基酸前体对氢进行取代, 其中所述的氨基酸前体是例如氟 -19。标记物可以经由一种存在于所述的肽中的半胱氨酸残基来进行连接, 其中所述的标记物是例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或者 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 以及 In^{111} 。钆 -90 可以经由一种赖氨酸残基来进行连接。可以使用所述的 IODOGEN (碘化法) 方法 (参见 Fraker 等人 (于 1978 年) 在 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 《生物化学与生物物理学研究通讯》80:49-57 中发表的文章) 来进行碘 -123 的导入。“Monoclonal Antibodies in Immunoscinigraphy《免疫闪烁照相法中的单克隆抗体》”(Chatal, 于 1989 年, CRC 出版社) 中详细的描述了其他的方法。

[0199] 可供选择的, 例如, 通过重组技术或者肽的合成法制备一种融合蛋白, 其中所述的融合蛋白中包括所述的抗体以及细胞毒性试剂。所述的 DNA 的长度应当包括编码所述的共轭物中的两个部分的各自区域, 其中所述的区域可以是彼此相邻的或者被一种区域分割开来的, 其中所述的分割区域编码一种连接物肽, 并且不会对所述的共轭物所具有的期望的性质进行破坏。

[0200] 同样可以通过将所述的抗体与一种前体药物-激活酶进行共轭的方式,将本发明中所述的抗体用在抗体依赖性的酶介导的前体药物的治疗(ADEPT)当中,其中所述的前体药物-激活酶能够将一种前体药物(例如,一种肽酰基化学治疗试剂,参见W081/01145)转化成为一种活性的抗癌症药物(参见,例如,W088/07378以及美国专利No. 4975278)。

[0201] 能够有效的用在抗体依赖性的酶介导的前体药物的治疗(ADET)当中的所述的免疫共轭物中的酶组分包括能够以那样的一种方式对前体药物产生作用的任意的酶,从而将所述的前体药物转化成为更加具有活性的、细胞毒性的形式。能够有效的用在本发明中所述的方法之中的酶包括,但不局限于,碱性磷酸酶,所述的酶能够有效的将含有磷酸盐的前体药物转化成为游离的药物;芳基硫酸酯酶,所述的酶能够有效的将含有硫酸酯的前体药物转化成为游离的药物;胞核嘧啶脱氨酶,所述的酶能够有效的将非毒性的5-氟胞核嘧啶转化成所述的抗癌症药物,5-氟尿嘧啶;蛋白酶,例如沙雷氏菌属的蛋白酶,嗜热菌蛋白酶,枯草杆菌蛋白酶,羧肽酶以及组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B以及组织蛋白酶L),所述的酶能够有效的将含有肽的前体药物转化成为游离的药物;D-丙氨酰基羧肽酶,所述的酶能够有效的对含有D-氨基酸取代基的前体药物进行转化;碳水化合物-裂解酶,例如 β -半乳糖苷酶以及神经氨酸苷酶,所述的酶能够有效的将发生糖基化的前体药物转化成为游离的药物; β -内酰胺酶,所述的酶能够有效的将衍生自 β -内酰胺的药物转化成为游离的药物;以及盘尼西林酰胺酶,例如盘尼西林V酰胺酶或者盘尼西林G酰胺酶,所述的酶能够有效的将通过它们的胺态氮原子衍生得到的药物转化成为游离的药物,其中所述的衍生药物是分别与苯氧基乙酰基以及苯基乙酰基进行反应而得到的。可供选择的,可以使用具有酶活性的抗体来将本发明中所述的前体药物转化成为游离的活性药物,其中所述的具有酶活性的抗体在本领域中同样被称之为“抗体酶”(参见,例如,Massey(于1987年)在Nature《自然》328:457-458中发表的文章)。可以按照本发明中所描述的方法,制备抗体-抗体酶的共轭物,用以将所述的抗体酶递送到一种被感染的细胞种群中。

[0202] 本发明中所述的酶可以通过本领域中熟知的技术与所述的抗体进行共价结合,其中所述的熟知的技术是例如使用上文中所讨论的具有异源双重功能的交联试剂。可供选择的,可以使用本领域中熟知的重组DNA技术来构建一种融合蛋白,其中在所述的融合蛋白中包括至少一种本发明中所述抗体的抗原结合区域,所述的抗原结合区域与至少一种本发明中所述的酶的功能活性部分进行了连接。(参见,例如,Neuberger等人(于1984年)在Nature《自然》312:604-608中发表的文章)。

[0203] 对于所述抗体所进行的其他的修饰是本发明中可以预期的。例如,所述的抗体可以与各种不同的非蛋白质源的聚合物中的一种进行连接,其中所述的非蛋白质源的聚合物是,例如,聚乙二醇,聚丙二醇,聚氧化烯,或者聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物。所述的抗体同样可以被包埋在微胶囊中、胶状药物递送系统中(例如,脂质体,白蛋白微球体,微乳液,纳米粒子以及纳米胶囊)、或者大分子乳液中,其中所述的微胶囊是通过例如凝聚技术或者通过分界面聚合作用(例如,分别制成羟甲基纤维素微胶囊或者凝胶-微胶囊以及聚(甲基丙烯酸)微胶囊)来进行制备的。在Oslo, A.(于1980年)编著的Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿氏药物科学》第16版本中对这样的技术进行了公开。

[0204] 在本发明中所公开的所述抗体同样可以被配制成免疫脂质体。“脂质体”是一种小的囊泡结构,是由各种不同类型的油脂、磷脂和/或表面活性剂组成的,其中所述的油脂、

磷脂和 / 或表面活性剂能够有效的将一种药物递送给一种哺乳动物。所述的脂质体中所含有的组分通常是以一种双层的形式来排列的,这与所述的生物膜中所具有的油脂排列相类似。可以通过本领域已知的方法对含有所述抗体的脂质体进行制备,其中所述的方法是例如 Epstein 等人 (于 1985 年) 在 Proc Natl Acad Sci USA《美国科学院院刊》82:3688 中发表的文章中所描述的方法;Hwang 等人 (于 1980 年) 在 Proc Natl Acad Sci USA《美国科学院院刊》77:4030 中发表的文章中所描述的方法;美国专利 No. 4485045 以及 4544545 中所描述的方法;以及公开于 1997 年 10 月 23 日的 WO 97/38731 中所描述的方法。在美国专利 No. 5013556 中公开了具有增加的循环时间的脂质体。

[0205] 可以通过所述的逆相蒸发法利用一种脂质组合物制成特别有效的脂质体,其中所述的脂质组合物包括卵磷脂,胆固醇,以及聚乙二醇 (PEG) 衍生的磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE)。脂质体经由具有规定的孔径尺寸的过滤器被挤出,从而生成了具有所期望的直径的脂质体。按照 Martin 等人 (于 1982 年) 在 J. Biol. Chem.《生物化学杂志》257:286-288 中发表的文章中的描述,经由一种二硫键交换反应,可以将本发明所述的抗体的 Fab' 片段与所述的脂质体进行共轭。在所述的脂质体中,任选的含有一种化学治疗试剂。参见 Gabizon 等人 (于 1989 年) 在 J. National Cancer Inst.《国家癌症学会杂志》81(19)1484 中发表的文章。

[0206] 本发明中所述的抗体,或者是所述抗体的片段,可以具有各种不同的生物学特征或者功能性特征中的任何一种。在某些实施方式中,这些抗体是巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体,这表明,与其他的病毒相比,它们能够分别与巨细胞病毒 (CMV) 或者人类巨细胞病毒 (HCMV) 进行特异性的结合或者优先的结合。

[0207] 在特定的实施方式中,本发明中所述的抗体是一种拮抗剂抗体,所述的抗体能够对与其进行特异性的结合或者优先的结合的多肽或者细胞所具有的生物学活性进行部分的或者完全的阻滞或者抑制。在其他的实施方式中,本发明中所述的抗体是一种生长抑制性抗体,所述的抗体能够对与其进行结合的一种被感染的细胞的生长进行部分的或者完全的阻滞或者抑制。在另外一种实施方式中,本发明中所述的抗体能够对细胞凋亡进行诱导。在另外一种实施方式中,本发明中所述的抗体能够诱导或者促进抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用或者补体依赖的细胞毒作用。

[0208] 多核苷酸

[0209] 本发明在其他的方面提供了一种多核苷酸组合物。在优选的实施方式中,这些多核苷酸能够对本发明中所述的一种多肽进行编码,其中所述的多肽是例如,一种抗体的可变链上的一种区域,其中所述的抗体能够与巨细胞病毒 (CMV) 进行结合。正如本领域技术人员同样能够知晓的,本发明中所述的多核苷酸可以是单链的 (编码 DNA 或者反义 DNA) 或者是双链的,并且可以是 DNA (基因组 DNA, cDNA 或者合成性 DNA) 分子或者是 RNA 分子。RNA 分子包括 HnRNA (不均一核 RNA) 分子以及 mRNA (信使 RNA) 分子,其中所述的 HnRNA (不均一核 RNA) 分子中含有基因内区并且以一种一对一 (one-to-one) 的方式与一种 DNA 分子相对应,所述的 mRNA (信使 RNA) 分子中不含有基因内区。其他的编码序列或者非编码序列可以,但不必需,存在于本发明所述的多核苷酸之中。并且多核苷酸可以,但不必需,与其他分子和 / 或支撑物质之间进行连接。本发明中所述的多核苷酸被用在例如杂交检测中,从而在一种生物学样本中探测所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体的存在,并且可以被用在本

发明所述多肽的重组制备过程中。

[0210] 因此,根据本发明中的另外一种方面,提供了多核苷酸组合物,所述的多核苷酸组合物中包括了下述序列中的一部分或者全部:在实施例 1 中所列出的多核苷酸序列,在实施例 1 中所列出的多核苷酸序列的补体,以及在实施例 1 中所列出的多核苷酸序列的退化变体。在某些优选的实施方式中,在本发明中所列出的所述的多核苷酸序列能够编码一种多肽,与一种普通的未经感染的对照细胞相比,所述的多肽能够优先的与一种感染有巨细胞病毒 (CMV) 的细胞进行结合,其中所述的多肽包括具有在实施例 1 或者附图 1 中所列出的序列的多肽。此外,本发明中包括能够编码本发明所述的任意一种多肽的所有多核苷酸。

[0211] 在其他相关的实施方式中,本发明提供了多核苷酸变体,其中所述的多核苷酸变体与实施例 1 中所列出的所述序列(或者是所述序列中的一部分,所述的部分能够编码一种可变区域或者功能性结构域)具有本质上的同一性,例如,与本发明中所描述的一种多核苷酸序列(或者是所述序列中的一部分,所述的部分能够编码本发明所述的多肽中的一种可变区域或者功能性结构域)相比,它们包括至少 70% 的序列同一性,优选的为至少 75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 或者 99% 或者更高的序列同一性,其中所述的序列同一性是使用本发明中所描述的方法来进行确定的(例如,使用标准参数的 BLAST(基础局部比对检查工具)分析)。本领域技术人员将能够认识到,可以对这些数值进行适当的调整,用以确定由两条核苷酸序列所编码的蛋白质所具有的相应的同一性,其中将密码子的退化、氨基酸的相似性、阅读框的位置、以及类似的因素纳入考虑的范围内。

[0212] 通常情况下,多核苷酸变体中含有一种或者多种取代,添加,缺失和/或插入,优选的,这样一来,相对于由本发明中具体列出多核苷酸序列所编码的多肽而言,由所述的变体多核苷酸所编码的所述多肽的免疫原性结合性质没有发生实质性的削弱。

[0213] 在另外的实施方式中,本发明提供了多核苷酸片段,所述的片段包括一种序列的各种不同长度的连续性的延伸,其中所述的序列与本发明中公开的所述一种或者多种序列是相同的或者是互补的。例如,本发明中所提供的多核苷酸中包括本发明中所公开的所述一种或者多种序列中的至少大约 10 个、15 个、20 个、30 个、40 个、50 个、75 个、100 个、150 个、200 个、300 个、400 个、500 个或者 1000 个或者更多个连续的核苷酸,以及存在于上述数值范围之内的中间长度。可以被容易的理解的是,在本发明中所使用到的所述术语“中间长度”指的是存在于上述引证的数值之间的任意长度,例如 16 个,17 个,18 个,19 个,等等;21 个,22 个,23 个,等等;30 个,31 个,32 个,等等;50 个,51 个,52 个,53 个,等等;100 个,101 个,102 个,103 个,等等;150 个,151 个,152 个,153 个,等等;包括在 200 至 500 之间的所有整数;在 500-1000 之间的所有整数,以及类似的情况。

[0214] 在本发明中的另外一种实施方式中,提供了一种多核苷酸组合物,其中所述的多核苷酸组合物能够在中等严格的条件下至高等严格的条件下与本发明中所提供的一种多核苷酸序列进行杂交,或者与所述的多核苷酸序列的一种片段进行杂交,或者与所述的多核苷酸序列的一种补体序列进行杂交。杂交技术是分子生物学领域中熟知的。为了进行描述,用于测试本发明所述的多核苷酸与其他的多核苷酸进行杂交的适宜的中等严格的条件包括:在 5 倍 (5X) 的 SSC、0.5% 的十二烷基磺酸钠 (SDS)、1.0 毫摩的乙二胺四乙酸 (EDTA) (pH8.0) 的溶液中进行预先洗涤;在 50℃ -60℃ 下,5 倍的 SSC 中,杂交过夜;之后在

65℃下进行两次 20 分钟的洗涤,每一次分别使用 2 倍的、0.5 倍的以及 0.2 倍的 SSC,其中所述的 SSC 中含有 0.1%的十二烷基磺酸钠 (SDS)。本领域技术人员将能够理解,可以容易对所述的杂交条件的严格程度进行操纵,例如通过改变所述的杂交溶液中的盐含量和 / 或改变所述的杂交反应进行的温度的方式。例如,在另外一种实施方式中,适宜的高度严格的杂交条件包括在上文所描述的那些条件,不同之处在于所述的杂交反应的温度被升高了,例如,被升高至 60–65℃或者 65–70℃。

[0215] 在优选的实施方式中,由所述的多核苷酸变体或者片段所编码的所述多肽与由所述的天然多核苷酸所编码的所述多肽具有相同的结合特异性(即,能够对巨细胞病毒(CMV)进行特异性的结合或者优先的结合)。在某些优选的实施方式中,上文中所描述的多核苷酸编码一种多肽,所述的多肽所具有的结合活性的水平为本发明中所具体列出的多肽序列的结合活性水平的至少大约 50%,优选的为至少大约 70%,并且更加优选的为至少大约 90%,其中所述的多核苷酸是例如,多核苷酸变体,片段以及杂交序列。

[0216] 本发明中所述的多核苷酸,或者是所述多核苷酸的片段,可以与其他 DNA 序列进行组合,不考虑所述的编码序列自身所具有的长度,其中所述的 DNA 序列是例如启动子,聚腺苷酸化信号,另外的限制性酶切位点,多个克隆位点,其他的编码片段,以及类似的 DNA 序列,这样一来,它们所具有的整体长度可以发生相当程度的变化。可以使用几乎具有任意长度的核酸片段,为了便于进行制备以及在预先确定的重组 DNA 方案中进行使用,优选对所述的总长度进行限制。例如,在本发明中的多种执行方案中所包括的列举性的多核苷酸片段具有大约 10000、大约 5000、大约 3000、大约 2000、大约 1000、大约 500、大约 200、大约 100、大约 50 个碱基对的长度的总长度,以及类似的长度(包括所有的中间长度)。

[0217] 本领域普通技术人员将能够认识到,作为所述的遗传密码发生退化的结果,存在多种能够编码本发明中所描述的多肽的核苷酸序列。这些多核苷酸中的某一些与任意天然基因所具有的所述核苷酸序列之间具有最小程度的同源性。虽然如此,能够编码本发明中所述的一种多肽但由于在密码子的使用上存在差异而发生变化的多核苷酸是本发明中可以特别预期到的。进一步的,包括本发明中所提供的所述多核苷酸序列在内的所述基因的等位基因是存在于本发明所述的范围内的。等位基因属于内源性基因,它是作为一种或者多种突变的结果而发生变化的,其中所述的突变是例如核苷酸的缺失、添加和 / 或取代。上述得到的 mRNA 以及蛋白可以,但不必须,具有一种改变的结构或者功能。可以使用标准的技术(例如杂交技术,扩增技术和 / 或数据库序列比对技术)对等位基因进行识别。

[0218] 在本发明中的某些实施方式中,为了对所述被编码的多肽所具有的一种或者多种性质进行改变,发明人可以预期到对上述公开的多核苷酸序列实施变异,其中所述的性质是例如所述多肽所具有的结合特异性或者结合强度。用来进行变异的技术是本领域熟知的,并且其被广泛的用于生成多肽变体以及多核苷酸变体。在本发明中所描述的所述多肽的变体和 / 或衍生物的制备方法中,使用到一种例如定点突变的变异方式。通过这种方式,经由对一种多肽序列进行编码的基本的多核苷酸所进行的变异,在所述的多肽序列中进行了特异性的修饰。这些技术提供了一种直截了当的方式来制备并且测试序列变体,例如,考虑到前述的一种或者多种顾虑,向所述的多核苷酸中导入一种或者多种核苷酸序列上的变化。

[0219] 定点突变允许通过使用特异性的寡核苷酸序列来进行突变体的制备,其中所述的

寡核苷酸序列包括带有所期望的变异的核苷酸序列,以及具有足够数量的相邻核苷酸,从而提供一种具有足够大小以及序列复杂性的引物序列,从而在将要被切断的缺失连接处的两侧上形成一种稳定的二倍体 (duplex)。在一种选定的多核苷酸序列上进行变异,从而提高、转变、降低、修饰、或者改变所述的多核苷酸本身所具有的性质,和 / 或转变所述的被编码的多肽所具有的性质、活性、组成、稳定性、或者主要序列。

[0220] 在本发明中的其他实施方式中,将本发明中提供的所述的多核苷酸序列作为探针或者引物,用来进行核酸的杂交,例如,作为一种聚合酶链式反应 (PCR) 引物。这样的核酸探针所具有的与一种目标序列进行特异性的杂交的能力使得它们能够在一种给定的样本中探测所述的互补序列的存在。然而,其他的用途同样是本发明可以预期的,例如作为所述的序列信息,用于进行变异种类的引物的制备,或者用来作为引物,用于制备其他的遗传构建体。这样一来,本发明中所述的包括至少大约 15 个核苷酸长度的连续序列的序列区域的核酸片段是格外有效的,其中所述的 15 个核苷酸长度的连续序列与本发明中所公开的一种具有 15 个核苷酸长度的连续序列属于相同的序列或者是互补的序列。具有更长长度的连续的同源性序列或者互补性序列,例如那些具有大约 20 个、30 个、40 个、50 个、100 个、200 个、500 个、1000 个 (包括所有的中间长度) 并且甚至达到完整长度的序列,同样被用在某些实施方式中。

[0221] 特别可以预期到的是,有些多核苷酸分子能够作为杂交探针,用在例如 Southern 印迹以及 Northern 印迹中,和 / 或作为引物,用在例如聚合酶链式反应 (PCR) 中,其中所述的多核苷酸分子所具有的序列区域中包括由 10-14 个、15-20 个、30 个、50 个、或者甚至是 100-200 个核苷酸或者类似数量 (也包括中间长度) 的连续的核苷酸片段,所述的连续的核苷酸片段与本发明中公开的一种多核苷酸序列是相同的或者是互补的。所述片段所具有的总长度,以及所述的互补片段所具有的长度,将最终取决于所述的特定的核酸片段的预先确定的用途或者应用。较小的片段被用在杂交反应的实施方式中,其中所述的连续的互补区域所具有的长度可以在例如大约 15 至大约 100 个核苷酸之间变化,但是更长的连续的互补片段是可以使用的,这取决于希望进行探测的所述的互补序列所具有的长度。

[0222] 使用一种具有大约 15-25 个核苷酸长度的杂交探针能够形成一种二倍体 (duplex) 分子,其中所述的二倍体分子是稳定的并且是具有选择性的。一般而言,具有超过 12 个碱基长度的片段的连续的互补序列的分子是优选的,尽管,这是为了增强所述的杂交物所具有的稳定性以及选择性,并且从而对获得的特异性的杂交分子所具有的质量以及程度 (degree) 进行改善。具有 15-25 个连续的核苷酸的基因 - 互补片段的核酸分子是优选的,如果需要的话,甚至可以具有更长的互补片段。

[0223] 可以从本发明中公开的任何序列的任何部分中选取杂交探针。所需要的仅仅是对希望被利用来作为一种探针或者引物的本发明中所列出的这些序列进行审核,或者是所述序列中的任意连续的部分,从大约 15-25 个核苷酸的长度直至并且包括所述的完整长度的序列。对于所述的探针序列以及引物序列所进行的选择受到各种不同的因素的支配。例如,可能希望使用来自于邻近所述的完整序列的末端的引物。

[0224] 本发明中所述的多核苷酸、或者是所述多核苷酸的片段或者变体,可以容易的通过例如直接合成的方法来进行制备,其中所述的直接合成指的是通过化学方式对所述的片段进行直接合成,这是普遍被得以实践的,使用到的是一种自动的寡核苷酸合成器。同样

的,可以通过核酸繁殖技术的应用来获得片段,其中所述的核酸繁殖技术是例如在美国专利 4683202 中描述的聚合酶链式反应 (PCRTM) 技术,通过向用于进行重组制备的重组载体之中导入选定的序列的方式来实现,以及通过分子生物学领域的技术人员通常已知的其他重组 DNA 技术来实现。

[0225] 载体,宿主细胞以及重组方法

[0226] 本发明提供了包括本发明中所述的核酸的载体以及宿主细胞,以及重组技术,用于进行本发明中所述的多肽的制备。本发明中所述的载体包括那些能够在任何类型的细胞或者生物体内进行复制的载体,例如,质粒,噬菌体,柯斯载体,以及微型染色体。在各种不同的实施方式中,包括本发明中所述的多核苷酸的载体是适合进行多核苷酸的繁殖或者复制的载体,或者是适合表达本发明中所述的多肽的载体。这样的载体是本领域已知的并且是可以商业购买获得的。

[0227] 对本发明中所述的多核苷酸进行合成,之后将其全部或者部分进行组合,并且使用常规的分子生物学技术以及细胞生物学技术将它们插入到一种载体之中,其中所述的常规技术包括,例如,使用适宜的限制性位点以及限制性酶将所述的多核苷酸亚克隆至一种经过线性化处理的载体之中。可以使用寡核苷酸引物通过聚合酶链式反应对本发明中所述的多核苷酸进行扩增,其中所述的寡核苷酸引物与所述的多核苷酸的每一条链是互补的。这些引物中同样可以包括限制性酶切位点,用以促进在一种载体之中的亚克隆。所述的可复制的载体组分一般而言包括,但不局限于,下述中的一种或者多种:信号序列,复制起点,以及一种或者多种标记物或者选择性基因。

[0228] 为了对本发明中所述的一种多肽进行表达,将表达所述多肽或者功能性等价物的所述的核苷酸序列插入到一种适宜的表达载体之中,即,含有对于上述被插入的编码序列的转录以及翻译而言必不可少的元件的载体。使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体,其中所述的表达载体中含有编码一种感兴趣的多肽的序列以及适宜的转录控制元件以及翻译控制元件。这些方法包括体外重组 DNA 技术,合成技术,以及体内的遗传重组技术。这样的技术在例如下述文章中被进行了描述: Sambrook 等人于 2001 年) 发表的 Molecular Cloning, A Laboratory Manual 《分子克隆实验室手册》, Cold Spring Harbor Press, 冷泉港出版社, Plainview, 纽约, 以及 Ausubel, F. M. 等人 (于 1989 年) 发表的 Current Protocols in Molecular Biology 《分子生物学当代议案》, John Wiley & Sons, 纽约, N. Y.

[0229] 可以利用各种不同的表达载体/宿主系统来容纳并且表达多核苷酸序列。这些包括,但不局限于,微生物例如被重组的细菌噬菌体、质粒、或者柯斯载体 DNA 表达载体进行转化了的细菌;被酵母表达载体进行转化了的酵母;被病毒表达载体(例如,杆状病毒)进行感染了的昆虫细胞体系;被病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV; 烟草花叶病毒, TMV) 进行转化了的植物细胞体系或者被细菌表达载体(例如, Ti 质粒或者 pBR322 质粒)进行转化了的植物细胞体系;或者动物细胞体系。

[0230] 在一种实施方式中,使用核苷酸引物从一种杂交瘤细胞中对一种基因的可变区域进行了扩增,其中所述的基因表达一种感兴趣的单克隆抗体。这些引物可以由本领域的普通技术人员进行合成,或者可以通过商业可以利用的途径购买获得(参见,例如, Stratagene (La Jolla, 加利福尼亚), 其出售用于对小鼠的可变区域以及人类的可

变区域进行扩增的引物)。所述的引物被用来对重链可变区域或者轻链可变区域进行扩增,所述的重链可变区域或者轻链可变区域此后分别被插入到例如 ImmunoZAP™ H 或者 ImunoZAP™ L(Stratagene) 这样的载体之中。在此之后将这些载体导入到大肠杆菌(E. coli)、酵母、或者以哺乳动物为基础的系统,用于进行表达。使用这样的方法,可以制备出大量的单链蛋白,其中在所述的单链蛋白中含有所述的重链可变结构域与轻链可变结构域的融合(参见 Bird 等人(于 1988 年)在 Science《科学》242:423-426 中发表的文章)。

[0231] 存在于一种表达载体之中的所述“控制元件”或者“调控序列”指的是所述的载体之中那些未翻译的区域,所述的区域与宿主的细胞蛋白发生相互作用,从而实施了转录以及翻译,其中所述的未翻译的区域是例如,增强子,启动子,5' 以及 3' 未翻译区域。这样的元件可以在它们的强度以及特异性方面进行变化。可以使用任意数量的适宜的转录元件以及翻译元件,包括组成型启动子以及诱导型启动子,这取决于所利用的所述载体系统以及宿主。

[0232] 适合与原核宿主一同进行使用的启动子的例子包括所述的碱性磷酸酶启动子(phoa promoter), β -内酰胺酶以及乳糖启动子系统,碱性磷酸酶启动子,色氨酸(trp)启动子系统,以及杂交启动子例如所述的 tac 启动子。然而,其他已知的细菌性启动子是适合的。通常情况下,用于细菌系统中的启动子中同样含有一种 Shine-Dalgarno 序列,所述的序列可操作性的与编码所述多肽的所述 DNA 进行了连接。诱导型启动子是可以使用的,其中所述的诱导型启动子是例如所述的 pBLUESCRIPT 噬菌粒的杂交 lacZ 启动子(Stratagene, La Jolla, 加利福尼亚)或者 pSPORT1 质粒的杂交 lacZ 启动子(Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 以及类似的启动子。

[0233] 用于真核细胞中的各种不同的启动子序列是已知的并且依照本发明可以使用其中的任何一种。事实上所有的真核基因都具有一种富含 AT 的区域,所述的区域位于所述的转录开始的位点上游大约 25 至 30 个碱基的位置上。另外一种序列,发现位于许多基因的转录开始处的上游的 70 至 80 个碱基的位置上是一种 CNCAAT 区域,其中 N 可以是任意的核苷酸。在大多数真核基因的 3' 末端处,存在一种 AATAAA 序列,所述的 AATAAA 序列可能是所述的 poly A 尾巴进行添加的信号,其中所述的添加发生在所述的编码序列的 3' 末端上。所有这些序列适合被插入到真核的表达载体之中。

[0234] 在哺乳动物的细胞系统中,来自于哺乳动物基因中的启动子或者来自于哺乳动物病毒中的启动子一般而言是优选的。例如通过启动子对来自于载体的多肽的表达进行控制,其中所述的表达发生在哺乳动物的宿主细胞内,所述的启动子来自于所述的病毒基因组,来自于异源的哺乳动物启动子,以及来自于热休克启动子,只要这样的启动子能够与所述的宿主细胞体系相互兼容即可,其中所述的病毒是例如多瘤病毒,禽痘病毒,腺病毒(例如,2 型腺病毒),牛乳突淋瘤病毒,鸟类肉瘤病毒,巨细胞病毒(CMV),逆转录酶病毒,B 型肝炎病毒并且最为优选的是猿猴病毒 40(SV40),所述的来自于异源哺乳动物启动子的启动子是例如所述的肌动蛋白启动子或者免疫球蛋白启动子。如果必须生成一种细胞系,所述的细胞系中含有编码一种多肽的所述序列的多份拷贝,则基于猿猴病毒 40 或者 EB 病毒(EBV)的载体能够有利的与一种适宜的选择性标记物一同进行使用。一种适合的表达载体的一种例子是 pcDNA-3.1(Invitrogen, Carlsbad, CA),所述的表达载体中包括一种巨细胞病毒

(CMV) 启动子。

[0235] 可以利用许多基于病毒的表达系统来进行多肽的哺乳动物表达。例如,在使用腺病毒作为一种表达载体的情形中,可以将编码一种感兴趣的多肽的序列绑定在一种腺病毒转录/翻译复合体之内,其中所述的腺病毒转录/翻译复合体是由所述的晚期启动子以及三重前导序列所构成的。可以通过向所述的病毒基因组的非必需 E1 区域或者 E3 区域内进行的插入来获得一种存活的病毒,所述的病毒能够在被感染的宿主细胞内进行所述多肽的表达(参见 Logan, J. 以及 Shenk, T. (于 1984 年)在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》81:3655-3659 中发表的文章)。除此之外,可以使用转录增强子来增加在哺乳动物宿主细胞中进行的表达,其中所述的转录增强子是例如所述的鲁斯氏肉瘤病毒(RSV)增强子。

[0236] 在细菌系统中,可以选择各种表达载体中的任何一种,这取决于对所述的被表达的多肽预先确定的用途。例如,当期望得到大的数量时,可以使用能够进行高水平的融合蛋白的表达的载体,其中所述的高水平的融合蛋白是很容易被纯化的。这样的载体包括,但不局限于,所述的多功能的大肠杆菌克隆以及表达载体例如 pET(Stratagene),在所述的表达载体中,编码所述的感兴趣的多肽的所述序列可以被绑定在所述的载体之中,存在于编码所述的氨基末端甲硫氨酸(Met)以及随后的 β -半乳糖苷酶的 7 个残基的序列的骨架内,这样一来,生成一种杂交蛋白;pIN 载体(参见 Van Heeke, G. 以及 S. M. Schuster (于 1989 年)在 J. Biol. Chem. 《生物化学杂志》264:5503-5509 中发表的文章);以及类似的载体。pGEX 载体(Promega, 麦迪逊, 威斯康星州)同样可以被用来表达外源多肽,使其作为与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)形成的融合蛋白。一般而言,这样的融合蛋白是可溶性的并且能够容易的从溶解的细胞中被纯化出来,其中所述的纯化是通过吸附至谷胱甘肽-琼脂糖珠子上并且随后在有游离的谷胱甘肽存在的条件下进行洗脱的方式来实现的。在这样的系统中制备得到的蛋白质被设计成为包括肝磷脂、凝血酶、或者 Xa 因子蛋白酶酶切位点,这样一来,所述的感兴趣的克隆多肽可以被随意的从所述的谷胱甘肽 S-转移酶(GST)半族中释放出来。

[0237] 在所述的酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,使用各种不同的含有组成型启动子或者诱导型启动子的载体,其中所述的载体是例如 α 因子,酒精氧化酶,以及 PGH。可以与酵母宿主一同进行使用的其他适合的启动子序列的例子包括与 3-磷酸甘油酯激酶或者其他的糖酵解酶一同进行使用的启动子,其中所述的其他的糖酵解酶是例如,烯醇酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,己糖激酶,丙酮酸脱羧酶,磷酸果糖激酶,葡萄糖-6-磷酸异构酶,3-磷酸甘油酯变位酶,丙酮酸激酶,丙糖磷酸异构酶,磷酸葡萄糖异构酶,以及葡萄糖激酶。为了进行回顾,可以参见 Ausubel 等人发表的文章(见上)以及 Grant 等人(于 1987 年)在 Methods Enzymol. 《酶学方法》153:156-544 中发表的文章。属于诱导型启动子、在转录方面具有额外的优点、受到生长条件的控制的其他的酵母启动子包括与下述酶一同进行使用的所述启动子区域:2 型酒精脱氢酶, isocytochrome C, 酸性磷酸酶,与氮的代谢相关的降解酶,金属硫因,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,以及负责进行麦芽糖以及半乳糖的利用的酶。用于进行酵母的表达的适合的载体以及启动子在 EP 73657 中有进一步的描述。酵母增强子同样可以有利的与酵母启动子一同进行使用。

[0238] 在使用植物表达载体的情形中,通过各种启动子中的任意一种对编码多肽的所述

序列的表达进行驱动。例如,病毒启动子可以被单独使用或者与来自于烟草花叶病毒 (TMV) 的所述的 omega 前导序列进行组合使用 (参见 Takamatsu, N. (于 1987 年) 在 EMBO J. 《欧洲分子生物学学会杂志》6 :307-311 中发表的文章), 其中所述的病毒启动子是例如所述的花椰菜花叶病毒 (CaMV) 的 35S 启动子以及 19S 启动子。可供选择的, 植物启动子是可以使用的, 其中所述的植物启动子是例如 RUBISCO 的小的亚单位或者热休克启动子 (参见 Coruzzi, G. 等人 (于 1984 年) 在 EMBO J. 《欧洲分子生物学学会杂志》3 :1671-1680 中发表的文章; Broglie, R. 等人 (于 1984 年) 在 Science 《科学》224 :838-843 中发表的文章; 以及 Winter, J. 等人 (于 1991 年) 在 Results Probl. Cell Differ. 《由细胞文化而产生的问题》17 :85-105 中发表的文章)。可以通过直接的 DNA 转化作用或者病原体介导的转染作用将这些构建体导入到植物细胞之中。这样的技术在各种通常可以获得的回顾中进行了描述 (参见, 例如 Hobbs, S. 或者 Murry, L. E. (于 1992 年) 在 McGraw Hill Yearbook of Science and Technology 《麦格劳-希尔科学与技术年鉴》中发表的文章, 麦格劳-希尔, 纽约, N. Y. ; 第 191-196 页)。

[0239] 一种昆虫系统同样被用来进行一种感兴趣的多肽的表达。例如, 在一种这样的系统中, 苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa Californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 被用来作为一种载体, 在草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞或者在粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 幼虫中进行外源基因的表达。将编码所述多肽的所述序列克隆至所述病毒的一种非必需区域之内, 并且在所述的多角体启动子的控制下进行安置 (place), 其中所述的病毒的非必需区域是例如所述的多角体基因。所述的编码多肽的序列的成功插入使得所述的多角体基因发生灭活并且生成了重组的病毒缺乏性的外壳蛋白。在此之后所述的重组病毒被用来感染例如草地贪夜蛾 (*S. frugiperda*) 细胞或者粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 的幼虫, 在所述的草地贪夜蛾 (*S. frugiperda*) 细胞或者粉纹夜蛾 (*Trichoplusia*) 的幼虫中, 所述的感兴趣的多肽被进行了表达 (参见 Engelhard, E. K. 等人 (于 1994 年) 在 Proc. Natl. Acad. Sci. 《美国科学院院刊》91 :3224-3227 中发表的文章)。

[0240] 特异性的起始信号同样可以被用来实现所述序列的更为有效的翻译, 其中所述的序列编码一种感兴趣的多肽。这样的信号包括所述的 ATG 起始密码子以及邻近的序列。在编码所述多肽的序列的情形中, 当其起始密码子以及上游序列被插入到所述的适宜的表达载体之中时, 可以不需要额外的转录或者转录控制信号。然而, 在仅仅插入编码序列、或者仅仅插入编码序列中的一部分的情形中, 需要提供外源性的翻译控制信号, 其中所述的翻译控制信号中包括所述的 ATG 起始密码子。此外, 所述的起始密码子存在于所述的正确的阅读框内, 从而确保上述被插入的多核苷酸进行正确的翻译。外源性的翻译元件以及起始密码子可以是各种不同的来源的, 天然的以及合成的。

[0241] 通常通过向所述的载体中插入一种增强子序列, 来增强 DNA 的转录, 其中所述的 DNA 编码本发明中所述的一种多肽。许多增强子序列是已知的, 包括, 例如, 那些在编码球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白、以及胰岛素的基因中识别出的增强子序列。然而, 通常情况下, 使用的是一种来自于真核细胞病毒的增强子。例子包括所述的猿猴病毒 40 (SV 40) 增强子, 所述的细胞巨化病毒早期启动子增强子, 所述的多瘤病毒增强子, 以及腺病毒增强子, 其中所述的猿猴病毒 40 增强子存在于所述的复制起点的后侧 (late side) (bp 100-270), 所述的多瘤病毒增强子存在于所述的复制起点的后侧 (late side)。同样可以

参见 Yaniv (于 1982 年) 在 Nature 《自然》297:17-18 中发表的文章中关于增强元件的描述,其中所述的增强元件用于进行真核启动子的活化。所述的启动子被拼接进入所述的载体之中,位于 5' 或者 3' 至所述的编码多肽的序列的位置上,但是优选的存在于所述的启动子的 5' 位点上。

[0242] 在真核性的宿主细胞(酵母,真菌,昆虫,植物,动物,人类,或者来自于其他的多分子生物体的有核细胞)中使用的表达载体中通常还含有一种序列,所述的序列对于所述转录的终止以及稳定所述的 mRNA 而言是必需的。这样的序列通常可以从所述的 5' 以及偶尔为 3'、未经翻译的真核性的或者病毒性的 DNA 或者 cDNA 处获得。这些区域中含有核苷酸片段,其中所述的核苷酸片段作为经过聚腺苷酸化作用的片段在所述的 mRNA 的未经翻译的区域中进行转录,其中所述的 mRNA 对抗 - 前列腺干细胞抗原 (PSCA) 抗体进行编码。一种有效的转录终止组分是所述的牛生长激素聚腺苷酸化作用区域。参见 WO 94/11026 以及在那里公开的所述表达载体。

[0243] 用于在本发明所述的载体中进行所述 DNA 的克隆或者表达的适合的宿主细胞是上文中所描述的原核细胞,酵母,植物细胞或者更高级的真核细胞。用于这一目的的适合的原核细胞的例子包括真细菌,例如革兰氏阴性生物体或者革兰氏阳性生物体,例如肠内细菌科 (Enterobacteriaceae) 例如埃希氏菌属 (Escherichia),例如大肠杆菌 (E. coli), 肠产气杆菌 (Enterobacter), 欧文菌属 (Erwinia), 克雷伯氏菌 (Klebsiella), 变形杆菌属 (Proteus), 沙门氏菌 (Salmonella), 例如,鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium), 沙雷菌属 (Serratia), 例如,黏质沙雷氏菌 (Serratia marcescans), 以及志贺氏杆菌 (Shigella), 以及杆菌 (Bacilli) 例如枯草芽孢杆菌 (B. subtilis) 以及地衣芽孢杆菌 (B. licheniformis) (例如,在 1989 年 4 月 12 日公开的 DD266710 中公开的地衣芽孢杆菌 41P), 假单胞菌属 (Pseudomonas) 例如铜绿色假单胞菌 (P. aeruginosa), 以及链霉菌属 (Streptomyces)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC 31446), 尽管其他的菌株例如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X 1776 (ATCC 31537), 以及大肠杆菌 W 3110 (ATCC 27325) 是适合的。这些例子是描述性的而不是限制性的。

[0244] 酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae), 或者常见的面包酵母, 是低级的真核宿主微生物中最为广泛使用的。然而, 许多其他的属、种、以及菌株是通常可以利用的并且是可以在本发明中进行使用的, 例如粟酒裂殖酵母 (Schizosaccharomyces pombe); 克鲁维酵母 (Kluyveromyces) 宿主例如, 乳酸克鲁维酵母 (K. lactis), 脆壁克鲁维酵母 (K. fragilis) (ATCC 12424), 保加利亚克鲁维酵母 (K. bulgaricus) (ATCC 16045), 魏氏克鲁维酵母 (K. wickerhamii) (ATCC 24178), K. waltii (ATCC 56500), 果蝇克鲁维酵母 (K. drosophilum) (ATCC 36906), 耐热克鲁维酵母 (K. thermotolerans), 以及马克斯克鲁维酵母 (K. marxianus); 耶罗维亚酵母 (Yarrowia) (EP 402226); 巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris) (EP 183070); 假丝酵母 (Candida); 里氏木霉 (Trichoderma reesei) (EP 244234); 粗糙脉孢菌 (Neurospora crassa); 许旺酵母 (Schwanniomyces) 例如 Schwanniomyces occidentalis; 以及丝状真菌例如, 脉孢菌 (Neurospora), 青霉菌 (Penicillium), 环孢菌素 (Tolypocladium), 以及曲霉属 (Aspergillus) 宿主例如构巢曲霉菌 (A. nidulans) 以及黑曲霉 (A. niger)。

[0245] 在某些实施方式中, 对一种宿主细胞菌株进行选择, 选择所述的菌株对所述的被

插入序列的表达进行调节的能力,或者以所期望的方式对所述表达的蛋白质进行加工的能力。对所述多肽所进行的这样的修饰方式包括,但不局限于,乙酰基化,羧基化,糖基化,磷酸化,脂化,以及酰基化。同样可以使用翻译后的加工 (processing) 来促进正确的插入,折叠和 / 或发挥功能,其中所述的翻译后的加工将所述蛋白质的“前体原 (prepro)”形式切断。可以选择不同的宿主细胞,从而确保对所述的外源蛋白进行正确的修饰以及加工,其中所述的宿主细胞是例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞,猿猴肾细胞 (COS),人类子宫颈癌细胞 (HeLa),MDCK (犬肾细胞),人胚肾细胞 (HEK) 293,以及 WI38 (人肺) 细胞,这些宿主细胞具有特异性的细胞机器以及适合于这种翻译后的活性的特征机制。

[0246] 特别适合于所述抗体的表达或者所述抗体片段的表达的方法以及试剂同样是本领域已知的并且可以利用的,包括那些在例如美国专利 No. 4816567 以及 6331415 中所描述的。在各种不同的实施方式中,抗体的重链以及轻链,或者是所述重链以及轻链的片段,可以在相同的表达载体中进行表达或者在单独的表达载体中进行表达。在一种实施方式中,两条链在相同的细胞中进行表达,从而促进了一种功能性抗体的形成,或者是所述的功能性抗体的片段的形成。

[0247] 完整长度的抗体、抗体片段、以及抗体融合蛋白可以在细菌中进行制备,特别是当不需要进行糖基化反应以及 Fc 效应器功能时,例如,当所述的治疗性抗体与一种细胞毒性试剂 (例如,一种毒素) 发生共轭并且所述的免疫共轭物本身就能够在破坏被感染细胞的方面表现出功效的时候。抗体片段以及多肽在细菌中的表达,可以参见,例如,美国专利 No. 5648237,5789199,以及 5840523,上述文章中描述了用于进行最优化的表达以及分泌所需要的翻译起始区域 (TIR) 以及信号序列。在进行表达之后,将所述的抗体从所述的大肠杆菌细胞中分离出来,其中所述的大肠杆菌细胞粘附在一种可溶性的片段之上,并且可以经由例如一种蛋白质 A 柱或者蛋白质 G 柱对其进行纯化,柱的选择取决于所述的同型体。可以使用一种方法实施最终的纯化,其中所述的方法与用来对在例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中进行表达的抗体的纯化的方法相类似。

[0248] 用于进行所述的糖基化的多肽以及抗体的表达的适合的宿主细胞来自于多细胞有机体。无脊椎细胞的例子包括植物细胞以及昆虫细胞,其中所述的植物细胞例如是浮萍属 (*lemna*)。已经识别出了许多杆状病毒的菌株及其变体以及相应的被许可的昆虫宿主细胞,其中所述的昆虫宿主细胞来自于例如下述的宿主:草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫),埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子),白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子),黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (实蝇),以及桑蚕 (*Bombyx mori*)。用于进行转染的各种不同的病毒菌株是公众可以获得的,例如,所述的苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa Californica*) 核型多角体病毒 (NPV) 的 L-1 变体以及桑蚕 (*Bombyx mori*) 核型多角体病毒 (NPV) 的 Bm-5 菌株,并且依据本发明,这样的病毒可以用来作为本发明中所使用的病毒,特别是用来进行草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞的转染。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛花、西红柿、以及烟草的植物细胞培养物同样可以被利用来作为宿主。

[0249] 用于在培养物 (组织培养物) 中的脊椎细胞中进行抗体多肽的繁殖以及抗体多肽片段的繁殖的方法已经成为一种常规的操作技术。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是利用猿猴病毒 40 (SV 40) 进行转化的猴肾 (CV1) 细胞系 (猿猴肾细胞 -7, ATCC CRL 1651); 人类胚肾细胞系 (293 细胞或者被进行亚克隆从而在悬浮的培养物中进行生长的 293 细胞,参

见 Graham 等人（于 1977 年）在 J. Gen. Virol. 《遗传病毒杂志》36 :59 中发表的文章）；幼地鼠肾细胞（BHK, ATCC CCL 10）；中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR（二氢叶酸还原酶基因）（CHO, 参见 Urlaub 等人（于 1980 年）在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 《美国科学院院刊》77 :4216 中发表的文章）；小鼠赛尔托利细胞（TM4, 参见 Mather（于 1980 年）在 Biol. Reprod. 《繁殖生物学》23 :243-251 中发表的文章）；猴肾细胞（CV1 ATCC CCL 70）；非洲绿猴肾细胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；人类宫颈癌细胞（HELA, ATCC CCL 2）；犬肾细胞（MDCK, ATCC CCL 34）；布法罗大鼠肝细胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；人类肺细胞（WI38, ATCC CCL 75）；人类肝细胞（Hep G2, HB 8065）；小鼠乳腺肿瘤（MMT 060562, ATCC CCL 51）；1 型 T 调节细胞（TR1）（参见 Mather 等人（于 1982 年）在 Annals N. Y. Acad. Sci. 《纽约科学学会年报》383 :44-68 中发表的文章）；MRC 5 细胞；FS4 细胞；以及人类肝细胞瘤细胞系（Hep G2）。

[0250] 使用上文中描述的用于进行多肽的制备的表达载体或者克隆载体对宿主细胞进行转化，并且将其培养于常规的营养培养基中，用于诱导启动子，筛选转化体，或者对编码所述的期望序列的所述基因进行扩增，其中所述的营养培养基是经过适宜的修饰的。

[0251] 为了对重组蛋白质进行长期的、高产量的制备，稳定的表达一般而言是优选的。例如，使用表达载体对能够稳定的表达一种感兴趣的多核苷酸的细胞系进行转化，其中在所述的表达载体中含有病毒的复制起点和 / 或内源性表达元件以及一种选择性的标记物基因，其中所述的标记物基因存在于上述的表达载体之上或者存在于一种单独的载体之上。在完成上述载体的导入之后，允许细胞在富集的培养基中进行 1-2 天的生长，在此之后将它们转移到选择性培养基中。所述的选择性的标记物的作用在于提供对选择的抗性，并且它的存在使得所述的细胞能够进行生长以及回收，其中所述的细胞成功的对上述插入的序列进行了表达。可以使用与所述的细胞类型相适应组织培养技术对经过稳定转化的细胞的抗性克隆进行扩增。

[0252] 可以使用许多的选择系统来回收经过转化的细胞系。这些系统包括，但不局限于，所述的单纯疱疹病毒胸苷激酶（参见 Wigler M. 等人（于 1977 年）在 Cell 《细胞》11 :223-32 中发表的文章）基因以及腺嘌呤磷酸核糖基转移酶（参见 Lowy, I. 等人（于 1990 年）在 Cell 《细胞》22 :817-23 中发表的文章）基因，上述的基因分别被用在 tk- 细胞中或者 aprt- 细胞中。同样的，抗代谢物、抗生素或者除草剂抗性被用来作为进行所述选择的基础；例如，二氢叶酸还原酶基因（dhfr），其提供对于甲氨蝶呤的抗性（参见 Wigler, M. 等人（于 1980 年）在 Proc. Natl. Acad. Sci. 《美国科学院院刊》77 :3567-70 中发表的文章）；npt，其提供对于所述的氨基糖苷类、新霉素以及 G-418 的抗性（参见 Colbere-Garapin, F. 等人（于 1981 年）在 J. Mol. Biol. 《分子生物学杂志》150 :1-14 中发表的文章）；以及 als 或者 pat，其提供分别对于氯磺隆以及膦丝菌素乙酰基转移酶的抗性（参见 Murry 发表的文章，见上）。其他的选择性的基因也已经被进行过描述，例如，trpB，其允许细胞利用吡啶来替代色氨酸，或者 hisD，其允许细胞利用 histinol 来替代组氨酸（参见 Hartman, S. C. 以及 R. C. Mulligan（于 1988 年）在 Proc. Natl. Acad. Sci. 《美国科学院院刊》85 :8047-51 中发表的文章）。所述的可见标记物的使用被得到了普及，这样的标记物例如花青素、 β -葡萄糖苷酸酶及其底物 GUS、以及荧光素酶及其底物虫荧光素不仅被广泛的用来对转化体进行识别，同样也被用来对归结于一种特异性的载体系统的短暂的蛋白表达或者稳定的蛋白表达的量进行量化（参见 Rhodes, C. A. 等人（于 1995 年）在 Methods Mol. Biol. 《分子生

物学方法》55:121-131 中发表的文章)。

[0253] 尽管所述的标记物基因表达的存在 / 不存在表明了所述的感兴趣的基因同样是存在的,它的存在以及表达可能是需要被确定的。例如,如果将编码一种多肽的所述序列插入到一种标记物基因的序列之内,可以通过所述的标记物基因在功能上的缺失来识别出含有序列的重组细胞。可供选择的,在一种单独的启动子的控制下,可以将一种标记物基因与一种编码多肽的序列进行串联放置。所述的标记物基因因为应答诱导作用或者选择作用而进行的表达通常也指示着所述的串联基因的表达。

[0254] 可供选择的,可以通过本领域技术人员已知的各种不同的操作步骤对含有并且表达一种期望的多核苷酸序列的宿主细胞进行识别。这些操作步骤包括,但不局限于,DNA-DNA 杂交技术或者 DNA-RNA 杂交技术以及蛋白质的生物检测技术或者蛋白质的免疫检测技术,其中所述的免疫检测技术包括,例如,基于膜、溶液、或者芯片的技术,用于对核酸或者蛋白质进行探测和 / 或量化。

[0255] 用于对所述的编码多核苷酸的产物的表达进行探测以及测量的各种不同的方案是本领域已知的,其中在所述的方案中,可以使用对所述的产物具有特异性的多克隆抗体或者单克隆抗体中的任何一种。例子包括酶联免疫吸附检测 (ELISA),放射性免疫检测 (RIA),以及荧光激活的细胞分选器 (FACS)。对于某些应用而言,优选的是一种基于单克隆抗体的双位点的免疫检测,在所述的免疫检测中利用一种单克隆抗体,所述的单克隆抗体能够与存在于一种给定的多肽之上的两个互不干扰的表位发生反应,但是一种竞争性的结合检测同样是可以使用的。除了其他出处之外,这些检测以及其他的检测在 Hampton, R. 等人 (于 1990 年;Serological Methods, a Laboratory Manual 《血清学方法实验室手册》,APS 出版社,St Paul,Minn.) 发表的文章中以及 Maddox, D. E. 等人 (于 1983 年;在 J. Exp. Med. 《实验医学杂志》158:1211-1216 中) 发表的文章中进行了描述。

[0256] 各种不同的标记物以及共轭技术是本领域技术人员已知的并且可以被用在各种不同的核酸检测以及氨基酸检测中。用于制备经过标记的杂交探针或者聚合酶链式反应 (PCR) 探针的方式包括寡核苷酸标记,切口平移,末端标记或者聚合酶链式反应扩增,其中所述的探针用于对与多核苷酸相关的序列进行探测,所述的聚合酶链式反应扩增中使用了一种经过标记的核苷酸。可供选择的,可以将所述的序列或者是所述序列中的任何一部分克隆至一种载体之中,用来进行一种 mRNA 探针的制备。这样的载体是本领域中已知的,是可以通过商业购买获得的,并且可以用来进行 RNA 探针的体外合成,其中所述的体外合成是通过添加一种适宜的 RNA 聚合酶以及经过标记的核苷酸的方式来实现的,所述的 RNA 聚合酶是例如 T7, T3, 或者 SP6。可以使用各种不同的商业购买获得的试剂盒来执行这些操作步骤。可以使用的适合的报道分子或者标记物包括,放射性核,酶,荧光试剂,化学发光试剂,或者发色试剂以及底物,辅因子,抑制剂,磁性粒子,以及类似的物质。

[0257] 由一种重组细胞制备得到的所述多肽在细胞内进行分泌或者被容纳在细胞内,这取决于所使用的所述序列和 / 或所述载体。正如所属领域的技术人员将能够理解的,含有本发明中所述的多核苷酸的表达载体可以被设计成为含有信号序列,其中所述的信号序列经由一种原核细胞膜或者真核细胞膜对上述被编码的多肽的分泌进行指导。

[0258] 在某些实施方式中,本发明中所述的多肽是以一种融合多肽的形式被进行制备的,其中在所述的融合多肽中进一步的包括一种多肽结构域,所述的多肽结构域能够促进

可溶性蛋白质的纯化。这样的促进纯化的结构域包括,但不局限于,金属螯合型肽例如组氨酸-色氨酸模块,所述的肽能够允许在固定化的金属上进行纯化;蛋白 A 结构域,所述的结构域能够允许在固定化的免疫球蛋白上进行纯化;以及那些在所述的 FLAGS 延展/亲和纯化系统(Amgen, 西雅图, 华盛顿州)中利用到的所述结构域。为了促进纯化,在所述的纯化结构域与所述的被编码的多肽之间纳入可切断的连接序列,其中所述的可切断的连接序列是例如那些对 XA 因子或者肠激酶具有特异性的序列(Invitrogen, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)。这样的一种表达载体提供了一种融合蛋白的表达,其中在所述的融合蛋白中含有一种感兴趣的多肽以及一种核酸,所述的核酸能够编码 6 个或者更多个组氨酸残基,所述的组氨酸残基位于一种硫氧还蛋白或者肠激酶切割位点的前方。按照 Porath, J. 等人(于 1992 年在 Prot. Exp. Purif. 《蛋白质的表达以及纯化》3:263-281 中发表的文章中)的描述,所述的组氨酸残基促进了在 IMIAC(固定化金属离子亲和色谱)上进行的纯化,同时所述的肠激酶切割位点提供了一种从所述的融合蛋白中对所期望的多肽进行纯化的方式。在 Kroll, D. J. 等人(于 1993 年在 DNA Cell Biol 《DNA 与细胞生物学》12:441-453 中)发表的文章中提供了对于载体的讨论,其中所述的载体可以被用来进行融合蛋白的制备。

[0259] 在某些实施方式中,将本发明中所述的一种多肽与一种异源的多肽进行融合,其中所述的异源多肽可以是一种信号序列或者是其他的多肽,其在所述的成熟蛋白或者多肽的 N-末端上具有一种特异性的切割位点。所选择的异源性的信号序列优选的是一种由所述的宿主细胞进行识别以及加工(即,由一种信号肽酶进行切割)的信号序列。对于原核性的宿主细胞而言,所述的信号序列可以从例如下面的组中选择出来:碱性磷酸酶,青霉素酶,蛋白磷酸酯酶 1(pp),或者热稳定的 II 型肠毒素的前导序列。对于酵母分泌物而言,所述的信号序列可以从例如下述物质中选择出来:酵母转化酶前导序列, α 因子前导序列(包括啤酒酵母 α 因子前导序列以及克鲁维酵母 α 因子前导序列),或者酸性磷酸酶前导序列,白色念珠菌(*C. albicans*) 葡萄糖淀粉酶前导序列,或者在 W0 90/13646 中所描述的信号序列。在哺乳动物细胞的表达中,哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列,例如所述的单纯疱疹 gD 信号,是可以利用的。

[0260] 当使用重组技术时,所述的多肽或者抗体是在细胞内进行制备的,存在于所述的外周胞质间隙里,或者直接分泌在所述的介质之中。如果所述的多肽或者抗体是在细胞内进行制备的,作为第一种步骤,将所述的微粒碎片,无论是宿主细胞或者是溶解的片段,进行去除,其中所述的去除是例如通过离心或者超滤的手段来实现的。Carter 等人(于 1992 年)在 Bio/Technology 《生物/技术》10:163-167 中发表的文章中描述了一种用于分离抗体的操作步骤,其中所述的抗体在所述的大肠杆菌的外周胞质间隙内进行了分泌。简要的说,在有醋酸钠(pH3.5)、乙二胺四乙酸(EDTA)、以及苯甲基磺酰基氟(PMSF)存在的条件下,使细胞团进行大约 30 分钟的解冻。可以通过离心除去细胞碎片。当所述的多肽或者抗体在所述的介质之中进行分泌时,一般而言,首先使用一种可商业购买获得的蛋白质浓缩过滤器对来自于这样的表达系统中的上清液进行浓缩,其中所述的蛋白质浓缩过滤器是例如,一种 Amicon 或者 Millipore Pellicon 超滤单元。一种蛋白酶抑制剂可以被包括在上述步骤中的任何一种步骤中,用以抑制蛋白质的水解,并且抗生素是可以被包括在内的,用以防止所述的外来污染物的生长,其中所述的蛋白酶抑制剂是例如苯甲基磺酰基氟(PMSF)。

[0261] 可以使用例如下述方法对从所述的细胞中制备得到的所述的多肽组合物或者抗

体组合物进行纯化：羟基磷灰石色谱法，凝胶电泳法，透析法，以及亲和色谱法，其中亲和色谱法是所述的优选的纯化技术。所述的蛋白质 A 作为一种亲和配位体所具有的适宜性取决于存在于所述的多肽或者抗体之中的任何免疫球蛋白的 Fc 结构域的种类以及同型体。蛋白质 A 被用来对抗体或者所述抗体的片段进行纯化，其中所述的抗体或其片段是以人类 $\gamma 1$ 重链、 $\gamma 2$ 重链、或者 $\gamma 4$ 重链为基础的（参见 Lindmark 等人（于 1983 年）在 J. Immunol. Meth.《免疫学方法杂志》62:1-13 中发表的文章）。对于所有的小鼠同型体以及人类 $\gamma 3$ 而言，蛋白质 G 是推荐的（参见 Guss 等人（于 1986 年）在 EMBO J.《欧洲分子生物学学会杂志》5:1567-1575 中发表的文章）。最为常见的与所述的亲和配位体发生连接的所述的基质是琼脂糖，但是其他的基质是可以利用的。与琼脂糖能够取得的效果相比，具有机械稳定性的基质能够允许更快的流动速度以及更短的处理时间，其中所述的具有机械稳定性的基质是例如孔度可控的玻璃或者聚（苯乙烯二乙烯基）苯。当所述的多肽或者抗体中包括一种重链恒定结构域 3 (C_H3) 时，所述的 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, 菲利普斯堡, 新泽西州) 可以被有效的用来进行纯化。用于进行蛋白质的纯化的其他技术同样是可以利用的，这取决于需要进行回收的所述的多肽或者抗体，其中所述的其他技术是例如在离子交换柱上进行的分馏法，乙醇沉淀法，逆相高效液相色谱法 (HPLC)，硅石色谱法，肝磷脂色谱法，在阴离子交换树脂或者阳离子交换树脂上进行的琼脂糖凝胶 (SEPHAROSE™) 色谱法（例如一种聚天冬氨酸柱），层析聚焦技术，十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE)，以及硫酸铵沉淀法。

[0262] 经过任意的初步纯化步骤之后，可以使包括所述的感兴趣的多肽或者抗体以及污染物的所述混合物进行低 pH 下的疏水作用层析处理，在所述的疏水作用层析处理中，使用一种 pH 在大约 2.5-4.5 的范围内的洗脱缓冲液，优选的在低盐浓度的条件下（例如，从大约 0-0.25M 的盐）进行所述的处理。

[0263] 药物组合物

[0264] 本发明中进一步的包括药物制剂，其中在所述的药物制剂中包括以一种期望的纯化程度存在的本发明所述的一种多肽、抗体、或者调节剂，以及一种药物可接受性的载体、赋形剂、或者稳定剂（参见 Remington's Pharmaceutical Sciences《雷明顿氏药物科学》第 16 版, Osol, A.（于 1980 年）编著）。在某些实施方式中，将药物制剂制成例如所述的冻干制剂或者水溶液的形式，用以在存储的过程中增强所述多肽或者抗体所具有的稳定性的。

[0265] 可接受性的载体、赋形剂、或者稳定剂指的是在所使用的剂量以及浓度的条件下对接受者而言是无毒性的，并且包括，例如，缓冲剂例如醋酸盐缓冲液，Tris 缓冲液，磷酸盐缓冲液，柠檬酸盐缓冲液以及其他的有机酸缓冲液；抗氧化剂包括抗坏血酸以及甲硫氨酸；防腐剂（例如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵；六甲胺氯；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚，丁醇或者苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲酯或者对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；以及间甲酚）；低分子量（小于大约 10 个残基）多肽；蛋白质，例如血清白蛋白，凝胶，或者免疫球蛋白；亲水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸例如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，组氨酸，精氨酸，或者赖氨酸；单糖，二糖，以及其他的碳水化合物包括葡萄糖，甘露糖，或者糊精；螯合试剂例如乙二胺四乙酸 (EDTA)；激励剂 (tonicifier) 例如海藻糖以及氯化钠；糖类例如蔗糖，甘露醇，海藻糖或者山梨醇；表面活性剂例如聚山梨醇酯；成盐平衡离子例如钠；金属复合物（例如，锌 - 蛋白质复合物）；和 /

或非离子型表面活性剂例如 TWEEN™ (吐温), PLURONICS™ (聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物) 或者聚乙二醇 (PEG)。在某些实施方式中, 所述的治疗制剂中优选的包括以存在于 5-200 毫克 / 毫升的范围之间的浓度存在的所述多肽或者抗体, 优选的存在于 10-100 毫克 / 毫升的范围之间。

[0266] 在本发明中所述的制剂中同样可以含有一种或者多种另外的治疗试剂, 其中所述的治疗试剂适用于对所述特定的迹象所进行的治疗, 所述的特定的迹象是例如需要接受治疗的感染, 或者防止不期望的副作用的出现。优选的, 所述的另外的治疗试剂具有一种与本发明中所述的多肽或者抗体相互补的活性, 并且两者之间不会彼此产生负面的影响。例如, 除了本发明中所述的多肽或者抗体之外, 向所述的同一种制剂中加入例如一种另外的抗体、抗病毒试剂、抗感染试剂和 / 或保心药可能是期望的。这样的分子适合于以能够有效的达到预期的目的的剂量存在于所述的药物制剂当中。

[0267] 同样可以将所述的活性成分包埋在微胶囊中, 胶状药物递送系统中 (例如, 脂质体, 白蛋白微球体, 微乳液, 纳米粒子以及纳米胶囊)、或者大分子乳液中, 其中, 所述的活性试剂例如是本发明中所述的多肽以及抗体以及其他的治疗试剂, 所述的微胶囊是通过例如凝聚技术或者通过分界面聚合作用来进行制备的, 所述的微胶囊是例如, 分别制成羟甲基纤维素微胶囊或者凝胶-微胶囊以及聚 (甲基丙烯酸) 微胶囊。在 Oslo, A. (于 1980 年) 编著的 Remington's Pharmaceutical Sciences 《雷明顿氏药物科学》第 16 版本中对这样的技术进行了公开。

[0268] 可以制备持续释放的制剂。适宜的持续释放的制剂的例子包括固体疏水性聚合物的半渗透性基质, 其中在所述的固体疏水性聚合物中含有所述的抗体, 所述的基质是以成型的物体的形式存在的, 例如, 膜, 或者微胶囊。持续释放的基质的例子包括聚酯, 水凝胶 (例如, 聚 (2-羟乙基-甲基丙烯酸酯), 或者聚 (乙烯醇)), 聚交酯 (参见美国专利 No. 3773919), L-谷氨酸与 γ -L-谷氨酸乙酯的共聚物, 非可降解型的乙烯-醋酸乙烯, 可降解型的乳酸-羟基乙酸共聚物例如所述的 LUPRON DEPOT™ (可注射型的微球体, 所述的微球体是由乳酸-羟基乙酸共聚物以及醋酸亮丙瑞林组成的), 以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0269] 用于进行体内施用的制剂优选的是无菌的。这可以通过过滤的方式来容易的进行实现, 其中所述的过滤是经由无菌性的过滤膜来实现的。

[0270] 诊断性的用途

[0271] 与普通的对照细胞以及组织相比较而言, 本发明中所述的抗体以及抗体片段能够与被巨细胞病毒 (CMV) 感染了的细胞或者组织发生特异性的结合或者优先的结合。因此, 本发明中所述的抗体可以被用来在一种患者、一种生物学样本、或者细胞种群中对被感染的细胞进行探测, 其中所述的探测使用到各种不同的诊断方法以及预测方法中的任意一种, 包括那些在本发明中所描述的方法。当然, 一种抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体所具有的探测被感染细胞的能力将取决于它所具有的结合特异性, 这可以通过下述方式来容易的进行确定: 对所述的抗体与被感染细胞或者组织进行结合的能力进行测试, 其中所述的被感染细胞或者组织是从不同的患者处获得的, 和 / 或是从感染有不同的巨细胞病毒 (CMV) 菌株的患者处获得的。

[0272] 诊断性的方法一般而言包括: 将从一名患者处获得的一种生物学样本与一种巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体进行接触, 其中所述的生物学样本是例如, 血液, 血清, 唾液, 尿

液,痰液,一种细胞涂抹样本,或者一种组织的生物学切片,并且确定与一种对照样本相比或者与预先确定的临界值相比,所述的抗体是否能够与所述的样本进行优选的结合,从而表明所述的被感染细胞是否存在。在特定的实施方式中,与一种适宜的对照普通细胞或者组织样本相比较而言,有至少两倍的、三倍的、或者五倍的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体与一种被感染的细胞进行了结合。一种预先确定的临界值可以通过例如下述方式来确定,例如:对所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体的数量取平均值,其中所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体是与几种不同的适宜的对照样本进行结合的抗体,所述的结合是在与用来实现所述的诊断性检测相同的条件下所进行的结合,其中所述的诊断性检测是针对接受测试的所述的生物学样本来实施的。

[0273] 可以使用本发明中所描述的操作步骤以及本领域中已知的操作步骤对结合的抗体进行探测。在某些实施方式中,本发明中所述的诊断方法是使用巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体来进行实践的,其中所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体与一种可探测性的标记物进行了共轭,所述的可探测性的标记物是例如一种荧光团,用以促进对结合抗体所进行的探测。然而,同样可以使用所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体的二级探测方法来实践本发明中所述的诊断方法。这些方法包括,例如,放射性免疫检测 (RIA),酶联免疫吸附检测 (ELISA),沉淀反应,凝集反应,补体结合以及荧光免疫检测。

[0274] 在某些操作步骤中,所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体是经过标记的。所述的标记物是可以直接被探测到的,例如是放射性标记物以及荧光染料,或者所述的标记物是半族类物质,例如酶,其中所述的半族类物质必须要发生反应或者经过衍生才能被探测到。同位素标记物的例子是 ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P 以及 ^{35}S 。可以使用的荧光材料包括,例如,荧光素及其衍生物,若丹明及其衍生物,金胺,尸胺,伞形酮, luciferia, 2, 3-dihydrophthalazinediones, 辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶,溶菌酶,以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

[0275] 可以使用当前可以利用的比色技术、分光光度技术、荧光分光光度技术或者气体定量分析技术中的任意一种,对一种酶标记物进行探测。可以被用在这些操作步骤中的许多酶是已知的并且是可以被利用的。例子是过氧化物酶,碱性磷酸酶, β -葡萄糖苷酸酶, β -D-葡萄糖苷酶, β -D-半乳糖苷酶,尿素酶,葡萄糖氧化酶加过氧化物酶,半乳糖氧化酶加过氧化物酶以及酸性磷酸酶。

[0276] 可以通过已知的方法利用这样的标记物对所述的抗体进行标记。例如,可以使用偶联试剂利用上文中描述的荧光标记物、化学发光标记物、以及酶标记物对所述的抗体进行标记,其中所述的偶联试剂是例如乙醛,碳二亚胺,马来酰亚胺,酰亚胺酯,琥珀酰亚胺,双-重氮联苯胺以及类似的试剂。通常情况下,可以使用桥接分子将一种酶与一种抗体分子进行结合,其中所述的桥接分子是例如碳二亚胺,高碘酸盐,二异氰酸盐,戊二醛以及类似的分子。在下述文章中对各种不同的标记技术进行了描述: Morrison (于 1974 年) 在 *Methods in Enzymology* 《酶学方法》32b, 103 中发表的文章, Syvanen 等人 (于 1973 年) 在 *J. Biol. Chem.* 《生物化学杂志》284, 3762 中发表的文章以及 Bolton 与 Hunter (于 1973 年) 在 *Biochem J.* 《生物化学杂志》133, 529 中发表的文章。

[0277] 本发明中所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体能够对患有巨细胞病毒 (CMV) 感染的患者以及未患有巨细胞病毒 (CMV) 感染的患者进行区分,并且能够确定出一名患者是否

患有感染,其中所述的区分以及确定使用的是在本发明中所提供的代表性的检测方法。根据一种方法,一种生物学样本是从一名患者处获得的,所述的患者被怀疑为患有巨细胞病毒 (CMV) 感染,或者已知所述的患者已经患有巨细胞病毒 (CMV) 感染。在优选的实施方式中,所述的生物学样本包括来自于所述患者的细胞。将所述的样本与一种巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体进行接触,例如,在足以允许所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体与存在于所述的样本之中的被感染细胞进行结合的时间以及条件下使其发生接触。对上述发生结合的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体的数量进行确定并且将其与一种对照的数值进行比较,其中所述的对照数值可以是,例如,一种预先确定的数值或者是一种从普通的组织样本中确定的数值。与所述的对照样本相比较而言,与所述的患者样本发生结合的抗体的数量的增加则表明着在所述的患者样本中所述的被感染细胞的存在。

[0278] 在一种相关的方法中,将一种从一名患者处获得的生物学样本与一种巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体进行接触,其中进行接触的时间以及条件足以允许所述的抗体与被感染的细胞发生结合。在此之后对发生结合的抗体进行探测,并且所述的结合抗体的存在则表明着在所述的样本中含有被感染的细胞。当所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体并不能以一种可探测性的水平与普通的细胞进行结合时,这种实施方式是格外有效的。

[0279] 在某些实施方式中,与一种被感染的细胞进行结合的抗体优选的生成一种信号,表明在参与进行所述感染的探测的患者中至少有大约 20% 的患者存在有这种感染,更加优选的为至少大约 30% 的患者。可供选择的,或者除此之外的,所述的抗体将生成一种负性的信号,表明在参与进行所述感染的探测患者中至少有大约 90% 的个体不存在有这种感染。每一种抗体都应当满足上述的标准;然而,本领域普通技术人员应当能够意识到,可以对本发明中所述的抗体进行组合使用,从而提高其敏感性。

[0280] 本发明中同样包括能够有效的实现诊断性的检测以及预测性的检测的试剂盒,其中在所述的检测中使用到本发明中所述的抗体。这些试剂盒中将包括一种适合的容器,在所述的容器内装有本发明中所述的一种或者多种巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体,其中所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体是以经过标记的形式或者未经标记的形式存在的。除此之外,当所述的抗体是以一种适合于进行间接性的结合检测的经过标记的形式来提供时,所述的试剂盒中可以进一步的包括用于实现所述的适宜的间接性检测的试剂。例如,所述的试剂盒中可以包括一种或者多个适当的容器,在所述的容器内装有酶底物或者衍生试剂,这取决于所述的标记物所具有的性质。对照样本和 / 或说明书同样是可以被包括在内的。

[0281] 治疗性的用途

[0282] 与普通的对照的未经感染的细胞以及组织相比较而言,本发明中所述的巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体以及上述抗体的片段能够与被感染的细胞发生特异性的结合或者优先的结合。因此,这巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体可以被用来在一名患者中、在一种生物学样本中、或者在细胞种群中对被感染的细胞或者组织产生特异性的作用。根据这些抗体所具有的与所述的感染进行特异性结合的性质,本发明提供了这样的方法:调节(例如,抑制)所述的被感染细胞的生长的方法,杀灭被感染细胞的方法,以及诱导被感染细胞的细胞凋亡的方法。这些方法中均包括将一种被感染的细胞与本发明中所述的一种巨细胞病毒 (CMV) 特异性抗体进行接触的步骤。可以在试管内、在活体外、或者在活体内对这些方法进行实践。

[0283] 可以向目标患者群体进行本发明中所述的药物组合物的施用,其中所述的目标患者群体包括,但不局限于,非常年老的以及非常年轻的免疫受损的宿主(例如,带有人类免疫缺陷病毒(HIV)的宿主/患有获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的宿主,患有另外一种免疫抑制性疾病的宿主,或者患有一种遗传障碍的宿主,其中所述的遗传障碍能够产生一种不健全的或者受损的免疫系统),移植接受者(包括整体器官,组织,以及,特别的,那些接受了造血干细胞种群或者骨髓的移植或者替换的患者),接受了免疫抑制性治疗的宿主(例如,那些正在服用针对下述病症的药物的宿主,其中所述的病症是例如关节炎,移植排斥反应,以及癌症),以及巨细胞病毒(CMV)阴性的怀孕妇女,其中所述的怀孕妇女具有被暴露于巨细胞病毒(CMV)之下的危险或者具有感染巨细胞病毒(CMV)的危险(巨细胞病毒能够传递给这些宿主的胎儿,能够以全部新生儿的将近1%的水平引发耳聋以及认知缺陷)。

[0284] 在各种不同的实施方式中,所述的抗体本身是具有治疗活性的,和/或所述的抗体可以与一种细胞毒性试剂或者生长抑制剂进行共轭,其中所述的细胞毒性试剂或者生长抑制剂是例如一种放射性同位素或者是一种毒素,被用来对与所述的抗体发生结合的被感染细胞进行治疗。

[0285] 在一种实施方式中,本发明提供了一种为患者治疗或者预防感染的方法,在所述的方法中包括下述的步骤:向一名患者提供本发明中所述的一种巨细胞病毒(CMV)特异性抗体,其中所述的患者被诊断为患有巨细胞病毒(CMV)感染,或者所述的患者存在发展成为巨细胞病毒(CMV)感染的危险,或者所述的患者被怀疑为患有巨细胞病毒(CMV)感染。本发明中所述的方法被用在所述感染的一线治疗之中,继续治疗之中,或者被用在一种复发性感染或者难以控制的感染的治疗之中。利用本发明中所述的抗体所进行的治疗可以是一种独立的治疗,或者,利用本发明中所述的抗体所进行的治疗可以是一种组合治疗方案中的一种组成部分或者一种阶段,其中在所述的组合治疗方案中还使用到一种或者多种另外的治疗试剂对所述的患者进行治疗。

[0286] 为了对人类患者以及非人类患者进行体内的治疗,通常向所述的患者施用或者提供一种药物制剂,在所述的药物制剂中包括本发明中所述的一种巨细胞病毒(CMV)特异性抗体。当被用来进行体内的治疗时,将本发明中所述的抗体以治疗性的有效剂量(即,能够消除或者减轻所述患者的病毒负担的剂量)对所述的患者进行施用。依照已知的方法,向一名人类患者施用所述的抗体,其中所述的已知方法是例如静脉内施用,例如,作为一种大丸剂或者通过在一段时间内连续灌注的方式,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部、或者吸入的途径进行施用。在可能的情况下,可以在所述的目标细胞位点上对所述的抗体进行肠胃外的施用,或者进行静脉内的施用。在某些实施方式中,所述抗体的静脉内施用或者皮下施用是优选的。

[0287] 为了进行肠胃外的施用,将所述的抗体与一种药物可接受性的肠胃外溶媒一同配制成成为一种单位剂量的可注射形式(溶液,悬浮液,乳状液)。这样的溶媒的例子是水,盐水,罗格氏溶液,葡萄糖溶液,以及5%的人血清白蛋白。非水性的溶媒例如不挥发性油以及油酸乙酯同样是可以进行使用的。脂质体可以被用来作为载体。所述的溶媒中可以含有少剂量的添加剂,其中所述的添加剂是例如能够增强等渗性以及化学稳定性的物质,例如,缓冲剂以及防腐剂。所述的抗体在通常情况下是以大约1毫克/毫升至10毫克/毫升的浓度被配制在这样的溶媒之中的。

[0288] 所述的剂量以及给药方案将取决于各种不同的因素,这些因素是内科医生能够容易的进行确定的,例如所述的感染所具有的性质以及与所述的抗体进行共轭的所述特定的细胞毒性试剂或者生长抑制剂(如果使用的话)所具有的特征,例如,它的治疗指数,所述的患者所具有的特征,以及所述患者的病史。一般而言,向一名患者施用治疗性的有效剂量的抗体。在特定的实施方式中,进行施用的所述抗体的剂量将存在于大约 0.1 毫克/千克至大约 50 毫克/千克患者体重的范围之内。依据所述的感染所属于的类型以及严重程度,大约 0.1 毫克/千克至大约 50 毫克/千克患者体重(例如,大约 0.1-15 毫克/千克/剂量)的抗体可以作为一种初始的候选剂量,用于向所述的患者进行施用,无论其中所述的施用是例如通过一种或者多种单独的施用方式还是通过连续灌注的形式来进行的。通过常规的方法以及检测,并且根据内科医师或者本领域的其他技术人员已知的标准,可以容易对这种治疗的进程进行监控。

[0289] 在一种特定的实施方式中,向所述的患者施用一种免疫共轭物,其中在所述的免疫共轭物中包括与一种细胞毒性试剂发生共轭的所述抗体。优选的,所述的免疫共轭物被所述的细胞进行了内在化处理,导致了所述的免疫共轭物在对所述细胞的杀伤方面具有增强了的治疗功效,其中所述的细胞是与所述的免疫共轭物进行结合的细胞。在一种实施方式中,所述的细胞毒性试剂对存在于所述的被感染细胞之中的所述核酸发挥作用,或者对存在于所述的被感染细胞之中的所述核酸进行干扰。这样的细胞毒性试剂的例子是在上文中所描述的那些并且包括,美登素类,卡奇霉素,核糖核酸酶以及 DNA 核酸内切酶。

[0290] 可以将其他的治疗方案与本发明中所述的巨细胞病毒(CMV)抗体的施用进行组合。所述的组合施用包括同时施用,其中使用单独的制剂或者一种单一的药物制剂,以及以任意的顺序进行的连续施用,其中优选的,在一种时间段内,两种(或者全部)活性试剂同时发挥它们的生物学活性。优选的,这样的组合治疗产生了一种协同性的治疗作用。

[0291] 在某些实施方式中,将本发明中所述的一种抗体与另外一种抗体进行的组合施用是令人期望的,其中所述的另外一种抗体直接作用于与所述的感染性试剂有关的另外一种抗原。

[0292] 除了向所述的患者进行所述的抗体蛋白的施用之外,本申请中可以预期到通过基因治疗的方式对所述的抗体进行施用的方法。这种对编码所述抗体的核酸所进行的施用被涵盖在所述的表述“施用治疗性的有效剂量的抗体”的范围之内。参见,例如,PCT 专利申请公开 WO 96/07321,其中涉及到基因治疗的使用,用来生成细胞内的抗体。

[0293] 在本说明书中所涉及到的和/或在所述的 Application Data Sheet(申请记录表)上所列出的上述所有的美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请以及非专利公开出版物中的全部内容在本发明中被引入作为参考。

[0294] 实施例 1

[0295] 抗巨细胞病毒(CMV)抗体的制备

[0296] 按照下文中描述的方法,对人类单克隆抗体进行重组制备,其中所述的人类单克隆抗体对巨细胞病毒(CMV)具有特异性。

[0297] 通过酶联免疫吸附检测(ELISA)对 89 个人类血浆样本进行是否存在所述的巨细胞病毒(CMV)抗体的筛选,在所述的筛选中使用到一种多肽,所述的多肽与所述的巨细胞病毒(CMV)糖蛋白(gp)116 表位抗原决定簇(AD)2 位点相一致,其中所述的位点上具有下

述的氨基酸序列:SHRANETIYNTTLKYGDTTGTNTTK(序列识别号:31)。两个血浆样本被检测呈阳性,这意味着在其中存在所述的抗巨细胞病毒(CMV)糖蛋白(gp)116抗体。

[0298] 从一种供体的血液样本中获得外周血单核细胞(PBMC),并且利用大量的免疫球蛋白G(IgG)对所述的巨细胞病毒(CMV)糖蛋白(gp)116表位抗原决定簇(AD)2进行滴定。对CD19⁺细胞进行富集并且将其与所述的巨细胞病毒(CMV)糖蛋白(gp)116抗原决定簇(AD)2肽进行混合,其中所述的抗原决定簇(AD)2肽是以一种被生物素化的形式来使用的,并且使用经过链霉亲和素包裹的微小珠子对抗原特异性B细胞进行富集。将这些抗原选择性B细胞放置在微滴定板内,所述的放置是以每个孔中超过1个细胞的密度来进行的,并且在有利于进行B细胞的增殖以及激活的条件下对所述的细胞进行培养,从而生成了抗体制备的B细胞,其中所述的有利于进行B细胞的增殖以及激活的条件是例如,在存在有一种B细胞有丝分裂原的条件下,其中所述的有丝分裂原是例如脂多糖(LPS)或者CD40配体。在此之后,对从所述的B细胞中获得的细胞上清液进行测试,测试与所述的巨细胞病毒(CMV)糖蛋白(gp)116表位抗原决定簇(AD)2进行结合的所述抗体是否存在,从而识别出11个含有B细胞的孔,所述的孔内能够制备出抗原特异性的抗体。

[0299] 通过将所述的DNA亚克隆至所述的pcDNA3.1+表达载体之中的方式,对包括所述的抗原特异性抗体的抗原结合区域的重组抗体进行制备,其中所述的DNA能够对所述的抗体链上的可变区域进行编码。在293FT细胞中进行了瞬间转染,从而对这些抗体进行了重新构建以及重组性的制备。之后对所述的重组制备的抗体进行测试,测试它们与巨细胞病毒(CMV)糖蛋白(gp)116表位抗原决定簇(AD)2进行结合的能力,并且识别出7个与这种抗原进行结合的重组免疫球蛋白G(IgG)。根据这些相同的方法,随后又生成了另外两种抗巨细胞病毒(CMV)抗体。对所述的抗体所具有的结合亲和性进行了确定,在表格1中被表示出来。

[0300] 表格1. 通过解离常数(K_D)以及解离速率常数(K_{off})分选出的抗巨细胞病毒(CMV)抗体所具有的结合亲和性

[0301]

通过解离常数 (K_D) 进行的分选

巨细胞病毒抗体	$K_a(M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$K_d(s^{-1})$	$K_D(k_{off}/k_{on})$, 纳摩
单克隆抗体 G-ITC88	7.67(6)	0.00116(3)	1.51(5)
单克隆抗体 A-2F10	5.62(7)	0.001112(7)	1.98(2)
单克隆抗体 E-5P9	2.45(2)	0.00121(3)	4.9(1)
单克隆抗体 F-9C16	5.83(9)	0.00286(8)	4.9(2)
单克隆抗体 B-2M16	27(1)	0.023(1)	8.47(5)
单克隆抗体 D-4P12	1.75(1)	0.00190(3)	10.9(2)
单克隆抗体 C-2N9	26(1)	0.030(2)	11.59(7)

通过解离速率常数 (K_{off}) 进行的分选

巨细胞病毒抗体	$K_a(M^{-1}s^{-1}) \times 10^5$	$K_d(s^{-1})$	$K_D(k_{off}/k_{on})$, 纳摩
单克隆抗体 A-2F10	5.62(7)	0.001112(7)	1.98(2)
单克隆抗体 G-ITC88	7.67(6)	0.00116(3)	1.51(5)
单克隆抗体 E-5P9	2.45(2)	0.00121(3)	4.9(1)
单克隆抗体 D-4P12	1.75(1)	0.00190(3)	10.9(2)
单克隆抗体 F-9C16	5.83(9)	0.00286(8)	4.9(2)
单克隆抗体 B-2M16	27(1)	0.023(1)	8.47(5)
单克隆抗体 C-2N9	26(1)	0.030(2)	11.59(7)

圆括号内的数字代表的是最后一次报道的数值中的标准误差。

[0302] 对所述的抗体所具有的序列进行了确定,包括所述的被命名为 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 4P12, 5P9, 9C16 的所述抗体的 γ 重链以及 κ 轻链上的可变区域内的序列。除此之外,对编码所述的抗体序列的所述多核苷酸序列中的每一种所具有的序列进行了确定。在下文中表示出的是所述的 γ 重链以及 κ 轻链中的所述多肽序列以及多核苷酸序列,其中对存在于所述的可变区域中的 N-末端 (或者 5' 末端) 上的所述的信号肽用粗体表示,并且

对存在于所述的可变区域中的 C- 末端（或者 3' 末端）上的所述的恒定区域用粗体表示，这些均是以纯文本的形式来进行表示的。

[0303] 2F10 γ :

[0304] **ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT**
CAGGTACATCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCGTCGTCCAGCCTGGTAGGGCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCAC
TGGATTACATTTAGTAATCACGGCATAACATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGCTGGCAG
TTATTTCAAGCGATGGAGATGATGACCGTTACGCAGACTCCGTGAAGGGTCGATTACAGCGTCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACACCGTGCATCTGCAGATGAATGGCCTGAGACCTGACGACACGGCTATTTATTTCTGTGCGCGAGA
TGGGAGGTGTGGTGAACCTAAGTGCTACTCAGGGTGCCTGATTACTGGGGCCGGGGACCCTGGTCACCGTCTC
G **AGCGCCTCCACCAAGGGCC**
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA（序列识别号:1)

[0305] 2F10 γ 可变区域:

[0306] CAGGTACATCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCGTCGTCCAGCCTGGTAGGGCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCACTGGATTACATTTAGTAATCACGGCATAACATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGCTGGC
AGTTATTTCAAGCGATGGAGATGATGACCGTTACGCAGACTCCGTGAAGGGTCGATTACAGCGTCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACCGTGCATCTGCAGATGAATGGCCTGAGACCTGACGACACGGCTATTTATTTCTGTGCGCGAGATGGG
AGGTGTGGTGAACCTAAGTGCTACTCAGGGTGCCTGATTACTGGGGCCGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (序列
识别号:34)

[0307] 2F10 γ :

[0308] **MEFGLSWVFLVALLRGVQC** QVHLVESGGGVVQPGRALRLSCAATGFTFSNHG IHWVRQAPGKGLE
WLAVISSDGGDDRYADSVKGRFSVSRDNSKNTVHLQMNGLRPDDTA IYFCARDGRCGEPKCYSLPDYWGRGLTVT
S **SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**

**GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK** (序列识别号 :2)

[0309] 2F10 γ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示,

[0310] 由 Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0311] QVHLVESGGGVVQPGRALRLSCAAT **GFTFSN** HGIHWVRQAPGKGLEWLA **VISSDGDDDR** YADSVK
GRFSVSRDNSKNTVHLQMNGLRPDDTAIFYCAR **DGRCGEPKCYSGLPDY** WGRGTLTVS

[0312] (序列识别号 :35)

[0313] 2F10 γ 的重链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0314] CDR 1 :SNHGIH (序列识别号 :36)

[0315] CDR 2 :VISSDGDDDRYADSVKG (序列识别号 :37)

[0316] CDR 3 :DGRCGEPKCYSGLPDY (序列识别号 :38)

[0317] 2F10 γ 的重链 Chothia 互补决定区域 (CDR) :

[0318] CDR 1 :GFTFSN (序列识别号 :39)

[0319] CDR 2 :VISSDGDDDR (序列识别号 :40)

[0320] CDR 3 :DGRCGEPKCYSGLPDY (序列识别号 :38)

[0321] 2F10 κ :

[0322]

**ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGCTACCACCGGA
GAGATTGTTTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCTCC
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGGTACTTAGCCTGGTATCAACAAAAGCCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCCTCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGG
TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGT
CTTCAGCGTAACACGTGGCCTCCGCTCACTTTCTGGGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTAC
G **GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T** (序列识别号 :3)**

[0323] 2F10 κ 的可变区域 :

[0324] GAGATTGTTTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGACAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGGTACTTAGCCTGGTATCAACAAAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCCTCTA
TGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCA
TCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGTCTTCAGCGTAACACGTGGCCTCCGCTCACTTTCTGGG
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACG (序列识别号 :41)

[0325] 2F10 κ :

[0326] **MEAPAQLLFLLLLLWLPATTG** EIVLTQSPATLSLSPGDRATLSCRASQSVGGYLA WYQQ
KPGQAPRLLLYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLT ISSLEPEDFALYYCLQRNTWPPLTFGGG TKVEIKR
T **VAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS**
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (序列识别号 : :4)

[0327] 2F10 κ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示由 Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0328] EIVLTQSPATLSLSPGDRATLSC **RASQSVGGYLA** WYQQKPGQAPRLLLY **DASNRAT** GIPARFSG
SGSGDFTLT ISSLEPEDFALYYC **LQRNTWPPLT** FGGG TKVEIKRT (序列识别号 :42)

[0329] 2F10 κ 轻链的 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0330] CDR 1 :RASQSVGGYLA (序列识别号 :43)

[0331] CDR 2 :DASNRAT (序列识别号 :44)

[0332] CDR 3 :LQRNTWPPLT (序列识别号 :45)

[0333] 2F10 κ 轻链的 Chothia 互补决定区域 (CDR)

[0334] CDR 1 :RASQSVGGYLA (序列识别号 :43)

[0335] CDR 2 :DASNRAT (序列识别号 :44)

[0336] CDR 3 :LQRNTWPPLT (序列识别号 :45)

[0337] 2M16 γ :

[0338] **ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGC**
CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCATGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCAGCCTC
TGGACTCACCTTCAGCAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAG
TTATATCAAGTGATGGAAGTAATGAGCACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAAT
TTCAACAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGCGAGAGA
TGGGAGGTGTCCTGATGTTAACTGCTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTC
G **AGCGCCTCCACCAAGGGCC**

CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAACCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (序列识别号 :5)

[0339] 2M16 γ 可变区域 :

[0340] CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCATGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTTCA
GCCTCTGGACTCACCTTCAGCAATTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTTATATCAAGTGATGGAAGTAATGAGCACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAATT
TCAACAACATGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGCGAGAGATGGG
AGGTGTCCTGATGTAACTGCTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (序列
识别号 :46)

[0341] 2M16 γ :

[0342] **MELGLCWVFLVALLRGVQC** QVQLVDSGGGMVQPGRSLRLSCSASGLTFSNYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISSDGSNEHYADSVKGRFTISRDNFNNMLYLQMNSLRAEDTAVYYSARDGRCPDVNCYSLIDYWGQGLTVT
S **SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (序列识别号 :6)

[0343] 2M16 γ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由
Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0344] QVQLVDSGGGMVQPGRSLRLSCSAS **GLTFSN** YGMHWVRQAPGKGLEWVA **VISSDGSNEH** YADSVK
GRFTISRDNFNNMLYLQMNSLRAEDTAVYYSAR **DGRCPDVNCYSLIDY** WGQGLTVTVS (序列识别号 :47)

[0345] 2M16 γ 重链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0346] CDR 1 :SNYGMH (序列识别号 :48)

[0347] CDR 2:VISSDGSNEHYADSVKG(序列识别号:49)

[0348] CDR 3:DGRCPDVNCYSGGLIDY(序列识别号:50)

[0349] 2M16 γ 重链 Chothia 互补决定区域 (CDR):

[0350] CDR 1:GLTFSN(序列识别号:118)

[0351] CDR 2:VISSDGSNEH(序列识别号:51)

[0352] CDR 3:DGRCPDVNCYSGGLIDY(序列识别号:50)

[0353] 2M16 κ :

[0354]

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA
GAAATTGTCTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAGGTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGG
TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCGACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT
CAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGTCCAAGGTGGAGATCAAACGTAC
G **GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA**
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T(序列识别号:7)

[0355] 2M16 κ 可变区域:

[0356] GAAATTGTCTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGATACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAGGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA
TGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCA
TCGACAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGTCCAAGGTGGAGATCAAACGTACG(序列识别号:94)

[0357] 2M16 κ

[0358] **MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTG** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLAWYQQ
KGGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLTIDSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGSKVEIKR
T **VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS**
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(序列识别号:8)

[0359] 2M16 κ 可变区域:(由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示,由 Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示)

[0360] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC **RASQSVGRYLA** WYQQKGGQAPRLLIY **DASNRAT** GIPARFSG
SGSGDFTLTIDSLEPEDFAVYYC **QQRSNWPPLT** FGGGSKVEIKRT(序列识别号:52)

[0361] 2M16 κ 轻链 Kabat 互补决定区域 (CDR):

[0362] CDR 1:RASQSVGRYLA(序列识别号:53)

[0363] CDR 2:DASNRAT(序列识别号:44)

[0364] CDR 3:QQRSNWPPLT(序列识别号:54)

[0365] 2M16 κ 轻链 Chothia 互补决定区域 (CDR) :

[0366] CDR 1 :RASQSVGRYLA (序列识别号 :53)

[0367] CDR 2 :DASNRAT (序列识别号 :44)

[0368] CDR 3 :QQRSNWPPLT (序列识别号 :54)

[0369] 2N9 γ :

[0370] **ATGGAGTTGGGGCTGCGCTGGGTTTTCTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT**
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC
TGGATTACCTTCAGTAGTAATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGCAG
TTATATCATCTGATGCAAATGATAACAATACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT
TCCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTTGAAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGA
TGGGACGTGCAGTGGTGGTAACTGCTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCGGGAATTCTGGTCACCGTCTC
G **AGCGCCTCCACCAAGGGCC**
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (序列识别号 :9)

[0371] 2N9 γ 可变区域 :

[0372] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTAATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGACTGGGTGGC
AGTTATATCATCTGATGCAAATGATAACAATACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTTGAAGACACGGCTGTCTATTTCTGTGCGAGAGATGGG
ACGTGCAGTGGTGGTAACTGCTACTCAGGGTTGATTGACTATTGGGGCCGGGAATTCTGGTCACCGTCTCG (序列
识别号 :55)

[0373] 2N9 γ

[0374] **MELGLRWVFLVALLRGVQC** QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGLD
WVAVISSDANDKQYADSVKGRFTISRDN SKNMVYLQMNSLRVEDTAVYFCARDGTCSGGNCYSGLIDYWGRGILVTV

S **SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (序列识别号 :10)

[0375] 2N9 γ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由 Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0376] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAAS **GFTFSS** NGIHWVRQAPGKGLDWVA **VISSDANDKQ** YADSV
KGRFTISRDN SKNMVYLQMNSLRVEDTAVYFCAR **DGTCSSGGNCYSGLIDY** WGRGILVT VS (序列识别号 :
56)

[0377] 2N9 γ 重链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0378] CDR 1 :SSNGIH (SEQ ID NO :57)

[0379] CDR 2 :VISSDANDKQYADSVKG (序列识别号 :58)

[0380] CDR 3 :DGTCSSGGNCYSGLIDY (序列识别号 :59)

[0381] 2N9 γ 重链 Chothia 互补决定区域 (CDR) :

[0382] CDR 1 :GFTFSS (序列识别号 :60)

[0383] CDR 2 :VISSDANDKQ (序列识别号 :61)

[0384] CDR 3 :DGTCSSGGNCYSGLIDY (序列识别号 :59)

[0385] 2N9 κ :

[0386]

ATGGACATGAGGGTCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCG
GA GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGTCTTTGTCTCCAGGTGAAAGAGCCACCCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCC
CAGGCTCCTCATCTACGATGCCTCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGG
TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT
CACCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCCGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGTACG
GTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG
AGAGTGT (序列识别号 :11)

[0387] 2N9 κ 可变区域 :

[0388] GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGTCTTTGTCTCCAGGTGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA
CGATGCCTCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCA
TCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTACCCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCCGC
GGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGTACG (序列识别号 :62)

[0389] 2N9 κ :

[0390] **MRVPAQLLFLLLLWLPTTG** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLAWYQQ
KPGQAPRLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSNWPPLTFGGGTKVDIKR
T **VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS**
TYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (序列识别号 :12)

[0391] 2N9 κ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由 Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0392] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC **RASQSVGGYLA** WYQQKPGQAPRLLIYD **ASIRAT** GIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC **HQRSNWPPLT** FGGGTKVDIKRT (序列识别号 :63)

[0393] 2N9 κ 轻链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0394] CDR 1 :RASQSVGGYLA (序列识别号 :43)

[0395] CDR 2 :ASIRAT (序列识别号 :64)

[0396] CDR 3 :HQRSNWPPLT (序列识别号 :65)

[0397] 2N9 κ 轻链 Chothia 互补决定区域 (CDR) :

[0398] CDR 1 :RASQSVGGYLA (序列识别号 :43)

[0399] CDR 2 :ASIRAT (序列识别号 :64)

[0400] CDR 3 :HQRSNWPPLT (序列识别号 :65)

[0401] 4P12 γ :

[0402] **ATGGAGTTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT**
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTTGCCTC
TAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCGG
TTATATCAAAAAGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAAC
TCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGA
GGGCCGGTGTATTGAAGAAAAGTCTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTC
G **AGCGCCTCCACCAAGGGCC**

CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC'TCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC'TCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC'TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (序列识别号 :13)

[0403] 4P12 γ 可变区域 :

[0404] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTT
GCCTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
GGTTATATCAAAAGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAACT
CCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACCTGAAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGC
CGGTGTATTGAAGAAAAC'TGCTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCG (序列
识别号 :66)

[0405] 4P12 γ :

[0406] **MELGLSWVFLVALLRGVQC** QVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVASKFIFSNHGIHWVRQAPGKGLE
WVAVISKDGTNAHYADSVRGRFISIRDNSKDTVFLEMRLRPEDTAVYYCAREGRGRCIEENCYSGQIDYWGQSLVTV
S **SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (序列识别号 :14)

[0407] 4P12 γ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由
Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0408] QVQLVESGGGVIQGRSLRLSCVAS **KFIFSN** HGIHWVRQAPGKGLEWVA **VISKDGTNAH** YADSVR
GRFISIRDNSKDTVFLEMRLRPEDTAVYYCAR **EGRGRCIEENCYSGQIDY** WGQSLVTVS (序列识别号 :67)

[0409] 4P12 γ 重链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0410] CDR 1 : SNHGIH (序列识别号 :36)

[0411] CDR 2:VISKDGTNAHYADSVRG(序列识别号:68)

[0412] CDR 3:EGRCIEENCYSGQIDY(序列识别号:69)

[0413] 4P 12gamma heavy chain Chothia CDRs:

[0414] CDR 1:KFIFSN(序列识别号:70)

[0415] CDR 2:VISKDGTNAH(序列识别号:71)

[0416] CDR 3:EGRCIEENCYSGQIDY(序列识别号:69)

[0417] 4P12 κ:

[0418]

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGA
GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGG
TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTACTGT
CAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAACGTAC
G **GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA**
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T(序列识别号:15)

[0419] 4P12 κ 可变区域:

[0420] GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA
TGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCA
TCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAACGTACG(序列识别号:72)

[0421] 4P12 κ:

[0422] **MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTG** EILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYMAWYQQ
RPGQAPRLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGGTKVEIKR
T **VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS**
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(序列识别号:16)

[0423] 4P12 κ 可变区域:(由 Kabat 方法确定的互补决定区域(CDR)用下划线表示,由 Chothia 方法确定的互补决定区域)用粗体、下划线表示):

[0424] EILLTQSPATLSLSPGERATLSC **RASQSVGRYMA** WYQQRPQGAPRLLIY **DASIRAT** GIPARFSG
SGSGTDFLTITSSLPEDFAIYYC **QQRSSWPPLT** FGGGTKVEIKRT(序列识别号:73)

[0425] 4P12 κ 轻链 Kabat 互补决定区域(CDR):

[0426] CDR 1:RASQSVGRYMA(序列识别号:74)

[0427] CDR 2:DASIRAT(序列识别号:75)

[0428] CDR 3:QQRSSWPPLT(序列识别号:76)

[0429] 4P12 κ 轻链 Chothia 互补决定区域 (CDR) :

[0430] CDR 1 :RASQSVGRYMA (序列识别号 :74)

[0431] CDR 2 :DASIRAT (序列识别号 :75)

[0432] CDR 3 :QQRSSWPPLT (序列识别号 :76)

[0433] 5P9 γ :

[0434] **ATGGAGTTGGGGCTGCGCTGGGTTTTCTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT**
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTTGCCTC
TAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCGG
TTATATCAAAGGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAAC
TCCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACCTGAAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGA
GGGCCGTGTATTGAAGAAAAGTGCTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGGCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTC
G **AGCGCCTCCACCAAGGGCC**
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (序列识别号 :17)

[0435] 5P9 γ 可变区域 :

[0436] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTT
GCCTCTAAATTCATCTTCAGTAACCATGGCATACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
GGTTATATCAAAGGATGGGACTAATGCACACTACGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTTAGCATCTCCAGAGACAAC
CCAAGGACACTGTCTTTCTGGAAATGCGCAGCCTGCGACCTGAAGACACGGCTGTCTATTACTGTGCGAGAGAGGGC
CGGTGTATTGAAGAAAAGTGCTACTCCGGACAGATTGACTATTGGGGGCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCG (序列
识别号 :77)

[0437] 5P9 γ :

[0438] **MELGLRWVFLVALLRGVQC** QVQLVESGGGVITPGRSLRLSCVASKFIFSNHGIHWVRQAPGKGLE
WVAVISKDGTNAHYADSVRGRFISRDNSKDTVFLEMRSLRPEDTAVYYCAREGRGRCIEEKCYSGQIDYWGQSLTV

S **SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (序列识别号 :18)

[0439] 5P9 γ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由 Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示)

[0440] QVQLVESGGGVIPGRSLRLSCVAS **KFIFSN**HGIHWVRQAPGKGLEWVA **VISKDGTNAH**YADSVR
GRFSISRDNKDTVFLEMRSLRPEDTAVYYCAR **EGRCIEEKCYSGQIDY**WGQGS LTVS (序列识别号 :78)

[0441] 5P9 γ 重链 Kabat 互补决定区域 (CDR)

[0442] CDR 1 :SNHGIH (序列识别号 :36)

[0443] CDR 2 :VISKDGTNAHYADSVRGR (序列识别号 :79)

[0444] CDR 3 :EGRCIEEKCYSGQIDY (序列识别号 :80)

[0445] 5P9 γ 重链 Chothia 互补决定区域 (CDR)

[0446] CDR 1 :KFIFSN (序列识别号 :70)

[0447] CDR 2 :VISKDGTNAH (序列识别号 :71)

[0448] CDR 3 :EGRCIEEKCYSGQIDY (序列识别号 :80)

[0449] 5P9 κ :

[0450]

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGA
GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGG
TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTACAGACTGAAGATTTTGCAATTTATTACTGT
CAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAACGTAC
G **GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA**
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (序列识别号 :19)

[0451] 5P9 κ 可变区域 :

[0452] GAAATTCTATTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTTGGCAGGTACATGGCCTGGTATCAACAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA
TGATGCATCCATCAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTACCA
TCAGCAGCCTACAGACTGAAGATTTTGCAATTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAGCTGGCCCCCGCTCACTTTTCGGC
GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAACGTACG (SEQ ID NO :81)

[0453] 5P9 κ

[0454] **MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTG** EILLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYMAWYQQ
RPGQAPRLLIYDASIRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQTEDFAIYYCQQRSSWPPLTFGGGTKVEIKR
T **VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS**
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (序列识别号 :20)

[0455] 5P9 κ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由 Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0456] EILLTQSPATLSLSPGERATLSC **RASQSVGRYMA** WYQQRPGQAPRLLIY **DASIRAT** GIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLQTEDFAIYYC **QQRSSWPPLT** FGGGTKVEIKRT (序列识别号 :82)

[0457] 5P9 κ 轻链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0458] CDR 1 :RASQSVGRYMA (序列识别号 :74)

[0459] CDR 2 :DASIRAT (序列识别号 :75)

[0460] CDR 3 :QQRSSWPPLT (序列识别号 :76)

[0461] 5P9 κ 轻链 Chothia 互补决定区域 (CDR) :

[0462] CDR 1 :RASQSVGRYMA (序列识别号 :74)

[0463] CDR 2 :DASIRAT (序列识别号 :75)

[0464] CDR 3 :QQRSSWPPLT (序列识别号 :76)

[0465] 9C16 γ :

[0466] **ATGGAGTTGGGGCTGTGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT**
CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC
TGGACTCACCTTCAGTGATTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAG
TCATCTCAAAGGATGGAACATAACACACACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC
TCCAAGAACATTTTCTATCTGCAAATGAACGGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGGGAGAGA
TGGAAGTGTCTGATCTTAAGTGCTACTCAGGGTTGATTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTC
G **AGCGCCTCCACCAAGGGCC**
CATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA
CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC

CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCC
TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA
GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCAT
CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC
TGTCTCCGGGTAAA (序列识别号 :21)

[0467] 9C16 γ 可变区域 :

[0468] CAGGTGCAGCTGGTGGACTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGACTCACCTTCAGTGATTATGGTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC
AGTCATCTCAAAGGATGGAACAAACACACTATGCAGACTCCGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACT
CCAAGAACATTTTCTATCTGCAAATGAACGGCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTCTATTACAGTGGGAGAGATGGG
AAGTGTCTGATCTTAAGTGCTACTCAGGGTTGATTGACTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACCGTCTCG (序列
识别号 :83)

[0469] 9C16 γ :

[0470] **MELGLCWVFLVALLRGVQC** QVQLVDSGGGVVQPGRSLRLSCAASGLTFSDYGMHWVRQAPGKGLE
WVAVISKDGTNTHYADSVRGRFTISRDN SKNIFYLQMNGLR AEDTAVYYSGR DGKCPDLKCYSGLIDYWGQGLTVTV
S **SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS**
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (序列识别号 :22)

[0471] 9C16 γ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由
Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0472] QVQLVDSGGGVVQPGRSLRLSCAAS **GLTFSD** YGMHWVRQAPGKGLEWVA **VISKDGTNTH** YADSVR
GRFTISRDN SKNIFYLQMNGLR AEDTAVYYSGR **DGKCPDLKCYSGLIDY** WGQGLTVTVS (序列识别号 :84)

[0473] 9C16 γ 重链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0474] CDR 1 :SDYGMH (序列识别号 :85)

[0475] CDR 2 :VISKDGTNTHYADSVRG (序列识别号 :86)

[0476] CDR 3 :DGKCPDLKCYSGLIDY (序列识别号 :87)

[0477] 9C16 γ 重链 Chothia 互补决定区域 (CDR) :

[0478] CDR 1 :GLTFSD (序列识别号 :88)

[0479] CDR 2 :VISKDGTNTH (序列识别号 :89)

[0480] CDR 3 :DGKCPDLKCYSGLIDY (序列识别号 :87)

[0481] 9C16 κ :

[0482]

ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAACCACCGGA
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCGGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCC
TGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGCCAGGCTCCC
AGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGG
TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTACTGT
CACCAGCGTAGCAGCTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGTAC
G **GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA**
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT
GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
T (序列识别号 :23)

[0483] 9C16 κ 可变区域 :

[0484] GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCGGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGC
AGGGCCAGTCAGAGTGTGGCGGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA
TGATGCATCCAAAAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGC

[0485] WO 2009/114560

PCT/US2009/036706

[0486] AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAATTTATTAC
TGTCACCAGCGTAGCAGCTGGCCTCCGCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGATATCAAACGTACG (序列识
别号 :90)

[0487] 9C16 κ :

[0488] **MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTG** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGGYLA WYQQ
KPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSDFTLTISTLEPEDFAIYYCHQRSSWPPLTFGGGTKVDIKR
T **VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS**
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (序列识别号 :24)

[0489] 9C16 κ 可变区域 : (由 Kabat 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用下划线表示, 由
Chothia 方法确定的互补决定区域 (CDR) 用粗体、下划线表示) :

[0490] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC **RASQSVGGYLA** WYQQKPGQAPRLLIY **DASKRAT** GIPARFSG
SGSGDFTLTISTLEPEDFAIYYC **HQRSSWPPLT** FGGGTKVDIKRT (序列识别号 :91)

[0491] 9C16 κ 轻链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0492] CDR 1 :RASQSVGGYLA (序列识别号 :43)

[0493] CDR 2 :DASKRAT (序列识别号 :92)

[0494] CDR 3 :HQRSSWPPLT (序列识别号 :93)

[0495] 9C16 κ 轻链 Kabat 互补决定区域 (CDR) :

[0496] CDR 1 :RASQSVGGYLA (序列识别号 :43)

[0497] CDR 2 :DASKRAT (序列识别号 :92)

[0498] CDR 3 :HQRSSWPPLT (序列识别号 :93)

[0499] 表格 2 :来自于抗巨细胞病毒 (CMV) 抗体以及共有序列中的互补决定区域 (CDR) 序列 (所述的重链是通过使用所述的 Kabat 方法以及 Chothia 方法来进行确定的,其中所述的互补决定区域 (CDR) 与所述轻链中的互补决定区域 (CDR) 相同)

[0500]

	互补决定区域重链 1 (Kabat)	序列 识别 号	互补决定区域重链 2 (Kabat)	序列 识别 号	互补决定区域重链 3 (Kabat)	序列 识别 号
2F10	SNHGIH	36	VISSDGDDDRYAD SVKG	37	DGRCGEPKCYSGLPDY	38
2M16	SNYGMH	48	VISSDGSNEHYADS VKG	49	DGRCPDVNCYSGGLIDY	50
2N9	SSNGIH	57	VISSDANDKQYAD SVKG	58	DGTCSGGNCYSGGLIDY	59
4P12	SNHGIH	36	VISKDGTNAHYAD SVRG	68	EGRCIEENCYSGQIDY	69
5N9	SNHGIH	36	VISKDGTNAHYAD SVRGR	79	EGRCIEEKCYSGQIDY	80
9C16	SDYGMH	85	VISKDGTNTHYAD SVRG	86	DGKCPDLKCYSGGLIDY	87
共有序列 A	SXXGXH	95	VISXDXXXXXYAD SVRG	96	XCXCXXXCYSGXXDY	97
共有序列 B	SXXGIH	98	VISXDGXNXHYAD SVXG	99	DGXCSXXXCYSGLXD Y	100
共有序列 C	SXYGMH	101			EGRCIEEXCYSGQIDY	102
共有序列 D					DGXCPDXXCYSGGLIDY	103
	互补决定区域重链 1 (Chothia)		互补决定区域重链 2 (Chothia)		互补决定区域重链 3 (Chothia)	
2F10	GFTFSN	39	VISSDGDDDR	40	DGRCGEPKCYSGLPDY	38
2M16	GLTFSN	118	VISSDGSNEH	51	DGRCPDVNCYSGGLIDY	50
2N9	GFTFSS	60	VISSDANDKQ	61	DGTCSGGNCYSGGLIDY	59
4P12	KFIFSN	70	VISKDGTNAH	71	EGRCIEENCYSGQIDY	69
5P9	KFIFSN	70	VISKDGTNAH	71	EGRCIEEKCYSGQIDY	80
9C16	GLTFSD	88	VISKDGTNTH	89	DGKCPDLKCYSGGLIDY	87
共有序列 A	XXXFSX	104	VISXDXXXXX	105	XGXCXXXCYSGXXD Y	106
共有序列 B	GXTFSX	107	VISKDGTNXH	108	DGXCSXXXCYSGLXD Y	109
共有序列 C					EGRCIEEXCYSGQIDY	110
	互补决定区域轻链 1		互补决定区域轻链 2		互补决定区域轻链 3	
2F10	RASQSVGGYLA	43	DASNRAT	44	LQRNTWPPLT	45

[0501]

2M16	RASQSVGRYLA	53	DASNRAT	44	QQRSNWPPLT	54
2N9	RASQSVGGYLA	43	ASIRAT	64	HQRSNWPPLT	65
4P12	RASQSVGRYMA	74	DASIRAT	75	QQRSSWPPLT	76
5P9	RASQSVGRYMA	74	DASIRAT	75	QQRSSWPPLT	76
9C16	RASQSVGGYLA	43	DASKRAT	92	HQRSSWPPLT	93
共有序列 A	RASQSVGXYXA	111	XASXRAT	112	XQRXXWPPLT	113
共有序列 B	RASQSVGXYLA	114	DASXRAT	115	HQRSXWPPLT	116
共有序列 C					QQRSXWPPLT	117

[0502] 实施例 2

[0503] 对保守的抗体可变区域进行的识别

[0504] 正如在附图 1A 以及 1B 中所表示出的, 将按照实施例 1 中所描述的方法制备得到的所述七种抗体所具有的 κ 轻链可变区域以及 γ 重链可变区域中的氨基酸序列进行比对, 从而对保守的区域以及残基进行识别。

[0505] 上述生成的所述抗巨细胞病毒 (CMV) 的抗体所具有的可变区域是高度保守的。例如, 上述被命名为 3C21 以及 4P12 的抗体在所述的重链可变区域内是相同的并且仅仅在所述的 κ 轻链上存在一种氨基酸上的差异, 这看上去像是一种聚合酶链式反应 (PCR) 的人造产物, 因为所述的 4P12 序列与生殖系是相匹配的。所述的 5P9 抗体的 γ 链与所述的 3G7 抗体的 γ 链相同并且仅仅在 CD3 之内与所述的 3C21 以及 4P12 抗体的 γ 链上存在一种氨基酸的差异。所述的 5P9 抗体的 κ 链与所述的 5A11、3C21、以及 4P12 (后面的两条链彼此相同, 不同之处仅在于存在一种 D/E 的转变) 抗体的 κ 链是紧密匹配的 (存在 1 个氨基酸的差异)。所述的 9C16 抗体的 γ 链与所述的 2M16 抗体的 γ 链最为相似, 而所述的 9C16 抗体的 κ 链与所述的 2N9 抗体的 κ 链最为相似 (仅仅存在两个氨基酸的差异)。所述的 3G7 抗体的 κ 链与其他抗体之间存在相当的差异, 包括 5P9 抗体在内, 这表明所观察到的所述的结合归因于所述的重链。

[0506] 这些数据证明了能够与巨细胞病毒 (CMV) gp 116 表位抗原决定簇 (AD) 2 进行特异性的结合的所述抗体具有高度保守的性质, 并且识别出了对于这种特异性而言十分重要的抗体的区域。

[0507] 实施例 3

[0508] 重组抗体与巨细胞病毒 (CMV) 之间所进行的结合

[0509] 通过在 293PEAK 细胞中进行的较大规模的瞬间转染, 制备得到了毫克质量水平的所述重组抗体 2F10, 2M16, 2N9, 3C21, 3G7, 4P12, 以及 5J12, 并且通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对所述的重组抗体所具有的与巨细胞病毒 (CMV) 病毒进行结合的能力进行了测试, 其中所述的巨细胞病毒 (CMV) 是经过紫外光 (UV) 灭活的, 并且被涂覆在一种培养板之上。在存在以及不存在竞争性巨细胞病毒 (CMV) gp 116 表位抗原决定簇 (AD) 2 肽的情况下, 对所述的抗体所具有的结合能力进行了测试, 并且同样将其与一种对照抗体所具有的结合能力进行了比较, 其中所述的对照抗体是 ITC88, 所述的抗体同样能够与巨细胞病毒 (CMV) gp 116 表位抗原决定簇 (AD) 2 进行结合 (参见 Ohlin 等人于 1993 年在 J Virol 《病毒学杂志》67:703-710 中发表的文章)。

[0510] 使用一种二级抗人类抗体作为所述的探测试剂,其中所述的二级抗人类抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 进行了共轭。

[0511] 正如附图 2-8 中所表示出的,所述的 2F10、2M16、2N9、3C21、以及 4P12 抗体均与巨细胞病毒 (CMV) 进行了结合,并且与巨细胞病毒 (CMV) gp 116 表位抗原决定簇 (AD) 2 肽进行了竞争。这些数据证实了依靠巨细胞病毒 (CMV) gp 116 表位而生成的人类重组抗体同样能够与所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒进行特异性的结合。

[0512] 实施例 4

[0513] 重组抗体对巨细胞病毒 (CMV) 产生的抑制作用

[0514] 对所述的重组抗体 2F10、2M16、2N9、3C21、3G7、4P12 所具有的抑制人类巨细胞病毒 (hCMV) 的能力进行测试,其中所述的测试是通过下述方式来进行的:将人类巨细胞病毒 (hCMV) 与上述抗体中的每一种进行混合,并且在此之后使用所述的混合物对细胞进行感染。之后对所述的被感染细胞与全部细胞之间的比例作为抗体的浓度的函数进行绘图。通过利用 YOYO-1 进行染色的方式对全体的细胞核进行计数,并且通过下述方式对发生人类巨细胞病毒 (hCMV) 感染的核进行确定:对所述的细胞进行穿透并且利用所述的被命名为 1-K-10 的单克隆抗体 (小鼠免疫球蛋白 G2a;Meridian Life Science, 辛辛那提, 俄亥俄州) 对所述的巨细胞病毒 (CMV) 即刻早期抗原的结合进行确定,继而利用 alexafluor (AF) 647 抗小鼠免疫球蛋白 G (H & L) (Invitrogen; Carlsbad, CA) 进行探测。所述的对照抗体 ITC88 同样被用在每一项试验中。

[0515] 正如附图 9-14 中所表示出的,所述的 2F10、2M16、2N9、3C21、3G7、4P12 抗体均能够对人类巨细胞病毒 (hCMV) 进行抑制,使其达到与所述的对照 ITV88 抗体相当的水平。这些数据证实了依靠巨细胞病毒 (CMV) gp 116 抗原决定簇 (AD) 2 表位而生成的人类重组抗体能够与所述的巨细胞病毒 (CMV) 病毒进行抑制。

[0516] 实施例 5

[0517] 人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体所具有的抑制功效以及光谱:试验设计以及一般性的方法

[0518] 巨细胞病毒 (CMV) 能够进入很大范围的人类细胞类型中。近来已经报道了巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白宿主受体间的相互作用在不同的细胞类型之间存在变化。然而,关于所述的巨细胞病毒 (CMV) 所具有的进入所有的细胞类型之中的能力的中心议题是所述的糖蛋白 gB 复合体 (是由蛋白质糖蛋白 58 以及糖蛋白 116 组成的) 与宿主细胞受体之间的相互作用。

[0519] 经由一种操作步骤生成一系列的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体,其中在所述的操作步骤中包括:从几个健康的人类志愿者处进行血液的收集,随后进行 B 细胞的收集以及刺激,正如在实施例 1 中所描述到的。对所分泌出的免疫球蛋白 G (IgG) 所具有的与所述的抗原决定簇 (AD) 2 的反应能力进行测试,其中所述的抗原决定簇 (AD) 2 存在于所述的糖蛋白 B (gB) 的氨基末端之内。从所述的 B 细胞表达的抗原决定簇 (AD) 2 结合的免疫球蛋白 G (IgG) 中向外进行所述重链以及轻链的克隆。对每一种抗体所具有的结合亲和性进行确定。

[0520] 不论所感染的病毒菌株的类型或者所述的细胞类型是怎样,所有参与测试的抗体都能够有效的抑制巨细胞病毒 (CMV) 的进入。这与豚鼠巨细胞病毒 (CMV) 的感染形成对

比,在所述的豚鼠巨细胞病毒 (CMV) 感染中,正如所预料到的,所述的抑制性抗体中没有一种发挥了作用。与豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 糖蛋白 B 相对而言,所述的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体对人类巨细胞病毒 (HCMV) 糖蛋白 B 所具有的特异性归因于存在于这些蛋白质之中的发散序列,其能够对所述的抗体结合功效产生影响 (表格 3)。下文中所描述的所述数据为进一步的测试当前的一组巨细胞病毒 (CMV) 抑制性抗体以及研究其他的巨细胞病毒 (CMV) 糖蛋白复合体提供了支持。

[0521] 材料以及方法

[0522] 抗体

[0523] 使用在上文中描述的所述方法获得抗体 2N9、5P9、2F10、4P12、2M16,以及 ITC88。抗体糖蛋白 H(gH) (1) 是一种参考的抑制性抗糖蛋白 H 抗体。Cytotect™ 是一种可商业购买获得的巨细胞病毒 (CMV) 治疗剂,所述的治疗剂是由 Chong Lap (香港) 有限公司制造的。

[0524] 病毒

[0525] 从一位怀孕妇女的子宫颈分泌物中获得人类巨细胞病毒 (HCMV) 菌株 VR1814。所述的三种临床人类巨细胞病毒 (HCMV) 分离物 8818、8819、以及 8824 是分别从被感染的患者的唾液、支气管肺泡灌洗液、以及肺部组织中分离得到的,并且在所述的内皮细胞系 ARPE-19 中进行繁殖。所述的豚鼠巨细胞病毒 (CMV) 菌株 V545/82 是从 Mark Schleiss 处获得的并且含有一种绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因 (参见 McGregor A. 以及 Schleiss M. R. (于 2001 年) 在 Molecular Genetics and Metabolism《分子遗传学以及代谢》72(1): 15-26 中发表的文章)。

[0526] 细胞系

[0527] 用来进行这些检测的所述细胞系是来自于人类的上皮细胞系 ARPE-19 (视网膜色素上皮细胞, ATCC 分类号 #CRL-2302), 来自于人类的纤维原细胞系 NN-NHDF (新生的正常人类真皮纤维原细胞, Lonza 分类号 #CC-2509), 来自于人类的内皮细胞系 HUVEC (人类脐静脉内皮细胞, Lonza 分类号 #CC-2517), 以及来自于豚鼠的纤维原细胞系 JH4 (豚鼠肺纤维原细胞, ATCC 分类号 #CCL-158)。

[0528] 对进入情况所进行的检测

[0529] 将视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19)、新生的正常人类真皮纤维原细胞 (NN-NHDF)、人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、以及豚鼠肺纤维原细胞 (JH4) 接种至 96 孔培养板内,所述的细胞是以每孔 8×10^3 个细胞的浓度进行接种的,接种于体积为 100 微升的生长培养基之中。视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 在 DMEM/F-12 完全培养基中进行生长,新生的正常人类真皮纤维原细胞 (NN-NHDF) 在完全的 DMEM 中进行生长,人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 在 EGM-2 培养基中进行生长,并且豚鼠肺纤维原细胞 (JH4) 在 F-12K 培养基中进行生长。在 37°C 以及 5% 的二氧化碳的条件下对细胞进行过夜的培养。第二天,首先通过除去所述的生长培养基并且对每个孔进行三次洗涤的方式对细胞进行感染,其中所述的洗涤是在每个孔中使用 100 微升不含血清的培养基来进行洗涤的。利用 SF-DMEM/F-12 对视网膜色素上皮细胞 (ARPE-12) 进行洗涤,利用 SF-DMEM 对新生的正常人类真皮纤维原细胞 (NN-NHDF) 进行洗涤,利用 EBM-2 对人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 进行洗涤,并且利用 SF-F-12K 培养基对豚鼠肺纤维原细胞 (JH4) 进行洗涤。使用针对各自相应细胞系的不含血清的培养基 (参见上文) 对抗体进行连续的稀释,并且使所述的抗体在 96 孔培养板内与足够的病毒进行混

合从而对 50% 的细胞进行感染,并且在 37℃ 下以及 5% 的二氧化碳条件下进行 1 小时的培养。通过在每个孔中一式三份的添加 50 微升体积的所述病毒 / 抗体混合液的方式对所述的孔进行感染。将视网膜色素上皮细胞 (ARPE) 以及人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的培养板在 37℃ 下以及 5% 的二氧化碳的条件下进行 3 小时的培养,并且将新生的正常人类真皮纤维原细胞 (NN-NHDF) 以及豚鼠肺纤维原细胞 (JH4) 的培养板在 37℃ 下以及 5% 的二氧化碳的条件下进行 1 小时的培养。除去所述的含有病毒 / 抗体的培养基并且在每个孔中利用 100 微升体积的适宜的完全培养基 (参见上文) 对所述的孔进行三次洗涤。不必除去所述的最终洗涤液。将所述的培养板在 37℃ 下以及 5% 的二氧化碳的条件下进行过夜的培养。

[0530] VR1814 以及临床人类巨细胞病毒 (HCMV) 分离物的免疫电泳 (IE) 染色

[0531] 除去所述的培养基并且在室温下 (RT) 利用 4% 的多聚甲醛以 100 微升 / 孔的水平对所述的细胞进行 20 分钟的固定。在此之后除去所述的多聚甲醛并且利用 100 微升 / 孔的磷酸盐缓冲液 (PBS) 对所述的细胞进行三次的洗涤。每个孔中接收 50 微升的小鼠抗巨细胞病毒 (CMV) 免疫电泳 (IE) 抗体并且将其在室温 (RT) 下进行 1 小时的培养,其中所述的抗体是以 1 : 2000 的稀释度存在于磷酸盐缓冲液 -GC (PBS-GC) 之中的,在所述的磷酸盐缓冲液 -GC (PBS-GC) 中含有 0.1% 的 Triton X-100。

[0532] 除去所述的免疫电泳 (IE) 抗体并且利用 100 微升 / 孔的磷酸盐缓冲液 (PBS) 对所述的孔进行三次洗涤。通过将 Alexa Fluor 594 山羊抗小鼠抗体与 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 进行混合的方式,在同一种步骤中向每个孔中加入了 50 微升的二级抗体以及 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI),其中所述的山羊抗小鼠抗体是以 1 : 2000 的稀释度存在于磷酸盐缓冲液 -GC (PBS-GC) 之中的,所述的 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 是以 1 : 5000 的稀释度存在于磷酸盐缓冲液 -GC (PBS-GC) 之中的。在室温 (RT) 下将所述的培养板在黑暗中进行 1 小时的培养。除去所述的二级抗体并且利用 100 微升 / 孔的磷酸盐缓冲液 (PBS) 对所述的孔进行三次洗涤。不必除去所述的第三次的洗涤液。在 Cellomics Array **Scan®** VTI 高内涵成像平台上对所述的培养板进行读取。

[0533] 豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 的染色

[0534] 除去所述的培养基并且在室温下 (RT) 利用 4% 的多聚甲醛以 100 微升 / 孔的水平对所述的细胞进行 20 分钟的固定。在此之后除去所述的多聚甲醛并且利用 100 微升 / 孔的磷酸盐缓冲液 (PBS) 对所述的细胞进行三次的洗涤。每个孔中接收 50 微升的 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI),其中所述的 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 是以 1 : 5000 的稀释度存在于磷酸盐缓冲液 -GC (PBS-GC) 之中的。在室温 (RT) 下将所述的培养板在黑暗中进行 10 分钟的培养。除去所述的 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 并且利用 100 微升 / 孔的磷酸盐缓冲液 (PBS) 对所述的孔进行三次洗涤。不必除去所述的第三次的洗涤液。在 Cellomics Array **Scan®** VTI 高内涵成像平台上对所述的培养板进行读取。

[0535] 分析

[0536] 使用所述的 Cellomics Array **Scan®** VTI 高内涵成像平台对来自于所述的抑制性检测中的数据进行收集。利用透明的粘性培养板密封条对培养板进行密封并且利用机械臂对其进行装载。使用所述的目标激活方案 (Target Activation protocol) NB-TA-2CH (每个孔中计算 1000 个目标) 对利用 VR1814 以及人类巨细胞病毒 (HCMV) 临床分离物进行感染的那些培养板进行分析。使用所述的分子迁移方案 (Molecular

Translocation protocol)NB-MT- 豚鼠巨细胞病毒 (CMV) (每个孔中计算 1000 个目标) 对利用豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 进行感染的那些培养板进行分析。通过下述方式对所述的传染性%进行计算:将每个孔中所述的巨细胞病毒 (CMV) 阳性细胞的数量 (是由免疫电泳 (IE) 或者绿色荧光蛋白 (GFP) 进行探测的,这取决于所述的病毒)除以每个孔中的所述的细胞数量并且乘以 100。对于每一种稀释度而言,所述的相对传染性%是通过下述方式进行计算的:计算出不含有抗体 (仅含有病毒) 的所述孔所具有的传染性%并且将上述传染性%除以每一种抗体在每一种稀释度上所具有的传染性%并且将上述结果乘以 100。依照所述的抗体所具有的浓度对相对传染性%绘制曲线图,其中所述的抗体的浓度是以微克/毫升为单位的,并且根据所述的抗体所具有的浓度确定所述的半数最大抑制浓度 (IC50),其中所述的抗体所具有的浓度指的是在仅为对照的病毒中观察到占所述感染性病毒的 50% 的病毒被抑制的情况下 (50% 的相对感染性) 所述抗体的浓度。

[0537] 概述

[0538] 在这里所呈递出的所述数据表示出:所述的六种抗体能够抑制人类巨细胞病毒 (HCMV) 进入到来自于人类的纤维原细胞细胞系、上皮细胞细胞系、以及内皮细胞系中去,其中所述的六种抗体能够作用于人类巨细胞病毒 (HCMV) 糖蛋白 B 的 DLD 上的抗原决定簇 (AD) 2 区域。在全部的三种细胞系中,所述的每一种抗体所具有的 IC50 值是一直的,其中所述的三种细胞系被 VR1814 进行了感染,这证明了他们所具有的抑制进入的能力与所述的细胞类型无关。这些抗体同样能够抑制三种低通量的人类巨细胞病毒 (HCMV) 临床分离物向新生的正常人类真皮纤维原细胞 (NN-NHDF) 中的进入,在每一种抗体之间没有观察到抑制性作用方面所存在的差异。这种作用同样可以在人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 以及视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 上看到,其中所述的人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 以及视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 被所述的人类巨细胞病毒 (HCMV) 8819 临床分离物进行了感染。上述经过测试的所述抗体中没有一种能够抑制豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 进入所述的豚鼠纤维原细胞系 JH4 中去。然而,这并不是预料不到的,因为在豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 的糖蛋白 B (gB) 与人类巨细胞病毒 (HCMV) 的糖蛋白 B (gB) 的抗原决定簇 (AD) 2 区域中存在着大量的序列可变性。在受试的全部三种来源于人类的细胞系中,所有的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 的糖蛋白 B (gB) 抗体一致性的对所有的人类巨细胞病毒 (HCMV) 病毒菌株产生抑制作用,在它们的有效性方面没有体现出显著的差异。

[0539] 实施例 6

[0540] 在人类上皮细胞 (ARPE-19)、内皮细胞 (HUVEC)、以及纤维原细胞 (NHDF) 中,人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体能够有效的抑制 VR1814 的感染

[0541] 所述的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体是在从 30 至 0.003 微克/毫升的稀释度范围内进行测试的并且所述的抗体能够对全部的三种细胞类型所产生的人类巨细胞病毒 (HCMV) VR1814 的感染进行抑制 (附图 15)。所记录的 IC50 值在 0.35 至 1.73 微克/毫升的范围之内并且与所述的阳性对照糖蛋白 H (gH) (1) 相当。在上述每一种抗体所具有的抑制性作用之间仅存在微小的差异。在所有的细胞系中,全部的六种抗体均表现出一致的 VR1814 抑制作用,在所述的 IC50 方面不存在显著的变化。

[0542] 实施例 7

[0543] 人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体能够有效的抑制纤维原细胞中由人类巨细胞病毒

(HCMV) 临床分离物 8818、8819、以及 8824 所产生的感染

[0544] 所述的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体是在从 30 至 0.003 微克 / 毫升的稀释度范围内进行测试的并且所述的抗体能够对纤维原细胞中由人类巨细胞病毒 (HCMV) 临床分离物 8818、8819、以及 8824 所产生的感染进行抑制 (附图 16)。所记录的 IC₅₀ 值在 0.19 至 0.83 微克 / 毫升的范围之内并且与所述的阳性对照糖蛋白 H(gH) (1) 相当,除了所述的临床分离物 8824 之外,所述的临床分离物 8824 在糖蛋白 H(1) 上表现出了一种转变了的 (更高的) IC₅₀。在上述的每一种抗体之间仅存在微小的差异。在所有的三种临床分离物对纤维原细胞所进行的感染中,全部的六种抗体均表现出了一致的抑制作用,在所述的 IC₅₀ 方面不存在显著的变化。

[0545] 实施例 8

[0546] 在内皮细胞 (HUVEC) 以及上皮细胞 (ARPE-19) 中,人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体能够有效的抑制由人类巨细胞病毒 (HCMV) 临床分离物 8819 所产生的感染

[0547] 临床分离物 8818 以及 8824 不能够完全的适应于进行内皮细胞的感染以及上皮细胞的感染,并且,因此,在当前并不能够以足够高的滴定水平来测量存在于人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 感染以及视网膜色素上皮细胞 (ARPE-19) 感染之间的统计学显著性差异。因此,仅仅在这些细胞类型上进行了 8819 的感染。所述的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体是在从 30 至 0.003 微克 / 毫升的稀释度范围内进行测试的并且所述的抗体能够对上皮细胞 (ARPE-19) 以及内皮细胞 (HUVEC) 的感染进行有效的抑制,其中所述的感染是由人类巨细胞病毒 (HCMV) 临床分离物 8819 所产生的 (附图 17)。所记录的 IC₅₀ 值在 0.19 至 0.83 微克 / 毫升的范围之内并且与所述的阳性对照糖蛋白 H(gH) (1) 相当。在上述每一种抗体之间仅存在微小的差异。在两种细胞系中,全部的六种抗体一致性的对所述的 8819 临床分离物产生抑制作用,在所述的 IC₅₀ 方面不存在显著的变化。在人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的某些样本中观察到的高的标准偏差归因于低剂量的感染性病毒。尽管 8819 能够对人类脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 进行感染,但所述的感染性 % 比较低,这使得所述的相对感染性 % 更为多变。

[0548] 实施例 9

[0549] 人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体不能够抑制豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 向豚鼠肺纤维原细胞 (JH4) 中的进入

[0550] 所述的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体中没有一种能够对所述的豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) V545/82 菌株在豚鼠肺纤维原细胞 (JH4) 中的感染进行抑制 (附图 18)。所述的抗人类巨细胞病毒 (HCMV) 抗体在高达 300 微克 / 毫升的条件下对豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 的进入仍然不会产生可以观察到的影响,这已经达到了测试的最高浓度。肝磷脂是唯一一种能够抑制豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 进入豚鼠肺纤维原细胞 (JH4) 的化合物。这些抗体在阻滞豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 的进入方面的失效归因于所述的大程度的序列可变性,其中所述的序列可变性是存在于豚鼠巨细胞病毒 (GPCMV) 糖蛋白 B(gB) 与存在于受试的另外一种人类巨细胞病毒 (HCMV) 分离物上的所述的糖蛋白 B(gB) 序列之间的 (表格 3)。

[0551] 表格 3 :抗原决定簇 -2 的比对

[0552]

	65	70	80	90	100	110	
VR1814 gB	63	VSHRANETIYNTTLKYGDVVGWNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPMKPI	序列识别号:25				
8818 gB	63	VSHRANETIYNTTLKYGDVVGWNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPMKPI	序列识别号:26				
8819 gB	63	VSHGVNETIYNTTLKYGDVVGWNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPMKPI	序列识别号:27				
8824 gB	61	VSHRANETIYNTTLKYGDVVGWNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPMKPI	序列识别号:28				
GPCMV gB	58	S--RNNTVIRNLTASVLFSSQ---RRLYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPMKPI	序列识别号:29				
共有序列	65	VSHRANETIYNTTLKYGDVVGWNTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTPMKPI	序列识别号:30				

[0553] 抗原决定簇-2 区域用黑色高亮表示

[0554] 通过前述的内容应当被理解的是, 尽管为了达到说明的目的, 已经对本发明中的具体实施方式进行了描述, 可以进行各种不同的修饰, 这不会背离本发明所述的精神以及范围。因此, 本发明并不会受到限制, 本发明是通过后附的权利要求来进行限定的。

2F10 gamma	QVHLVE	SGGGV	VQGR	ALRL	SCA	ATG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WLA	V	SSD	GDD	DRY	ADS	VKGRF
2M16 gamma	QVQLVD	SGGGM	VQGR	SLRL	SCS	ASG	LTF	SNYGM	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GSNE	HYA	DS	VKGRF
2N9 gamma	QVQLVE	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	AND	KQY	ADS	VKGRF
3C21 gamma	QVQLVE	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GTNA	HYA	DS	VKGRF
4P12 gamma	QVQLVE	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GTNA	HYA	DS	VKGRF
5P9 gamma	QVQLVE	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GTNA	HYA	DS	VKGRF
3G7 gamma	QVQLVE	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GTNA	HYA	DS	VKGRF
9C16 gamma	QVQLVD	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	LTF	SNYGM	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GTNT	HYA	DS	VKGRF
5J12 gamma	QVQLVE	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GTNA	HYA	DS	VKGRF
共有序列	QVQLVE	SGGGV	VQGR	SLRL	SCA	ASG	FTF	SNHG	I	HWVR	QA	PG	KGLE	WVA	V	SSD	GTNT	HYA	DS	VKGRF
2F10 gamma	SVSRDN	SKNTV	HLQMN	GLRP	DDTA	I	YFC	ARD	GR	CE	PKCY	SG	L	PDY	WGR	GT	LV	TVS		
2M16 gamma	TISRDN	FNMLY	LQMN	SLRA	EDT	AVY	SAR	DGR	CP	DVNCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
2N9 gamma	TISRDN	SKNMV	YLQMN	SLRV	EDT	AVY	SAR	DGR	CP	DVNCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
3C21 gamma	SISRDN	SKD	TVFLEM	RSLRP	EDT	AVY	SAR	DGR	CE	PKCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
4P12 gamma	SISRDN	SKD	TVFLEM	RSLRP	EDT	AVY	SAR	DGR	CE	PKCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
5P9 gamma	SISRDN	SKD	TVFLEM	RSLRP	EDT	AVY	SAR	DGR	CE	PKCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
3G7 gamma	SISRDN	SKD	TVFLEM	RSLRP	EDT	AVY	SAR	DGR	CE	PKCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
9C16 gamma	TISRDN	SKNTV	FLQMN	GLRA	EDT	AVY	SAR	DGR	CP	DVNCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
5J12 gamma	SISRDN	SKD	TVFLEM	RSLRP	EDT	AVY	SAR	DGR	CE	PKCY	SG	L	IDY	WGR	GT	LV	TVS			
共有序列	siSRDN	skd	tvf	leMr	isLR	pEDT	AVY	Yca	ReGr	Ci	enCY	SG	q	iDY	WGR	Gq	S	LV	TVS	

图 1A

[illegible]

图 1B

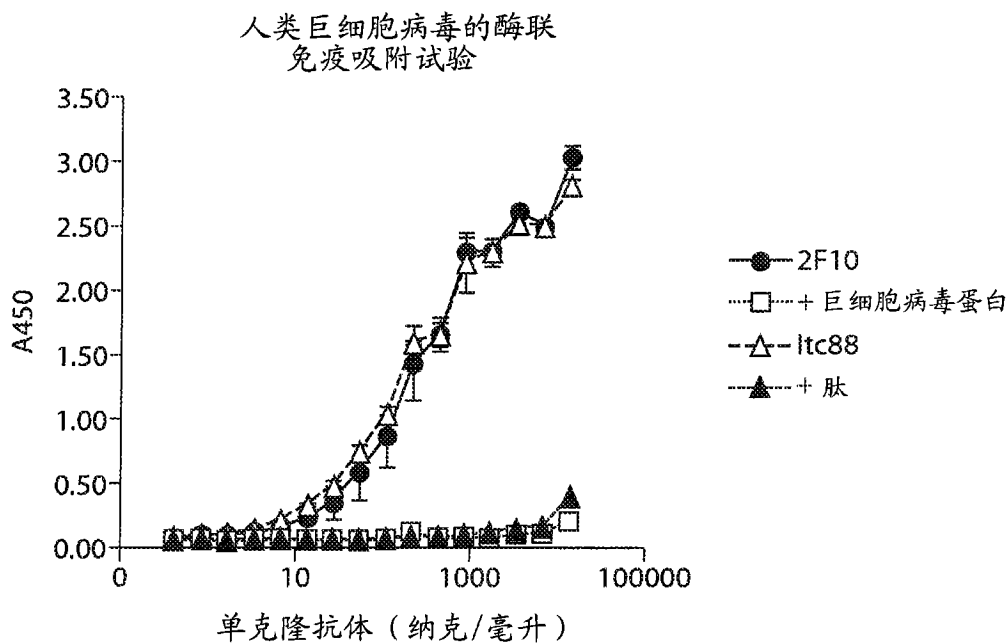


图 2

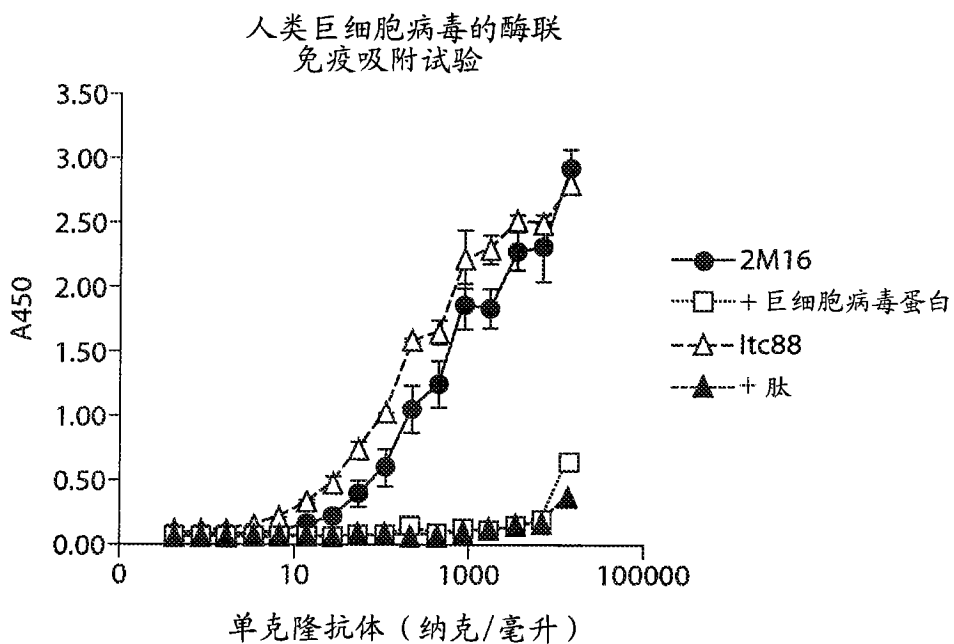


图 3

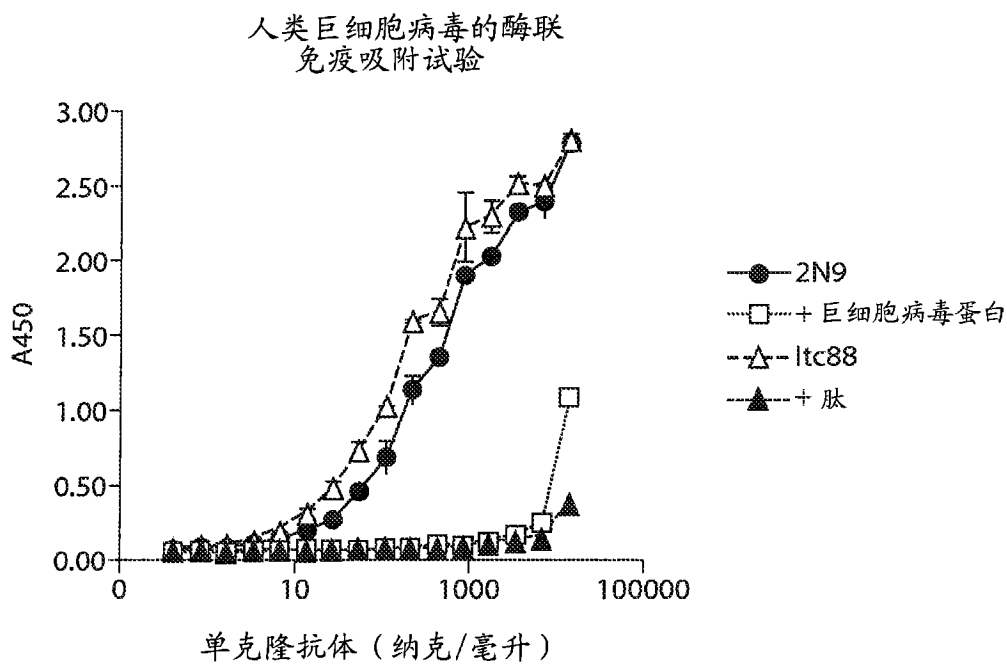


图 4

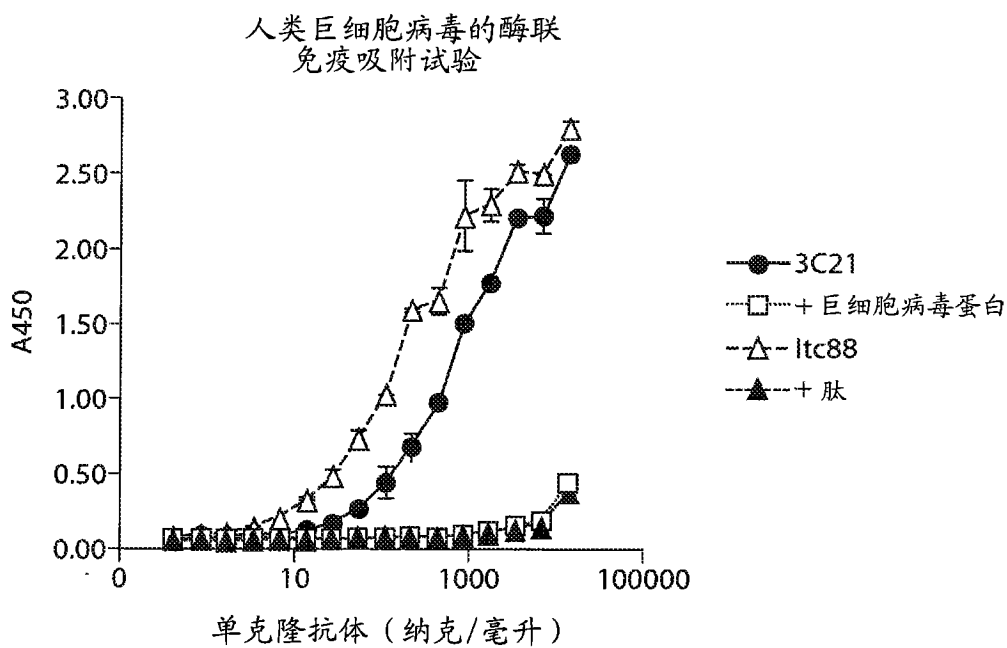


图 5

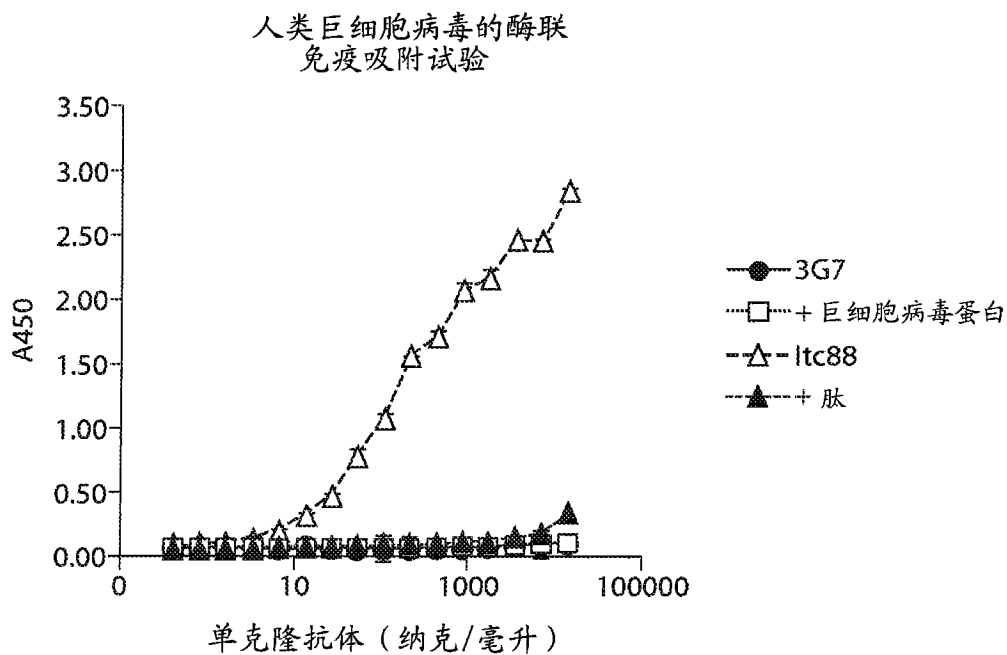


图 6

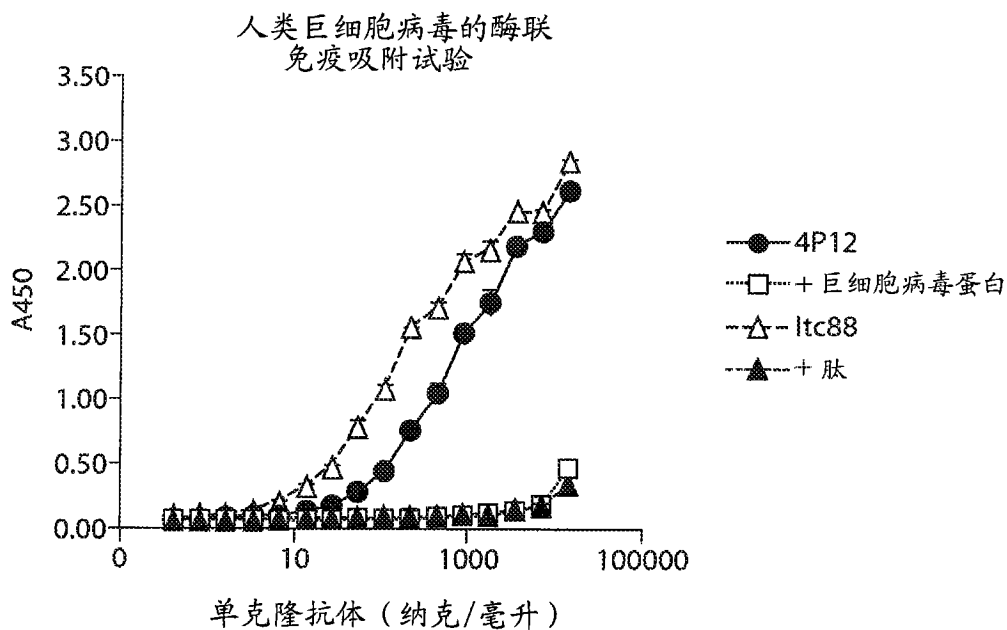


图 7

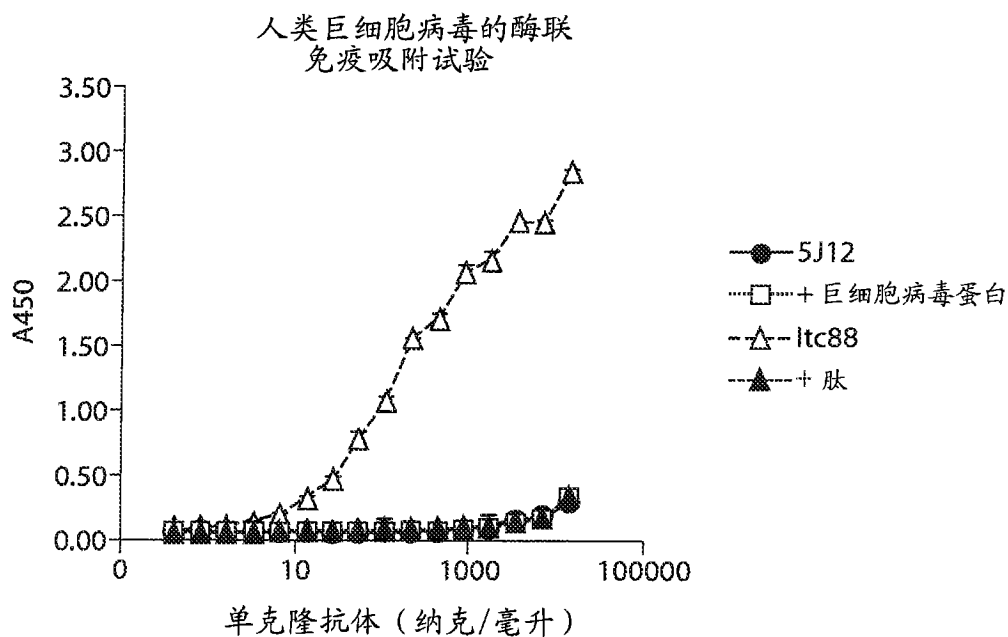


图 8

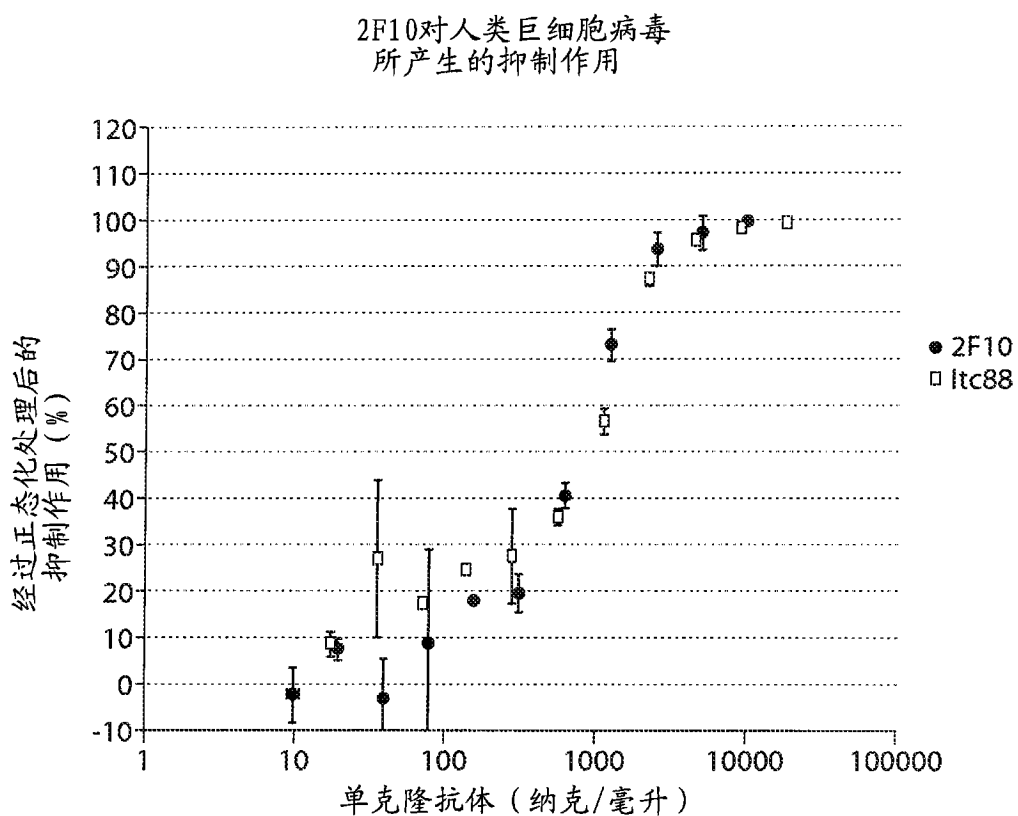


图 9

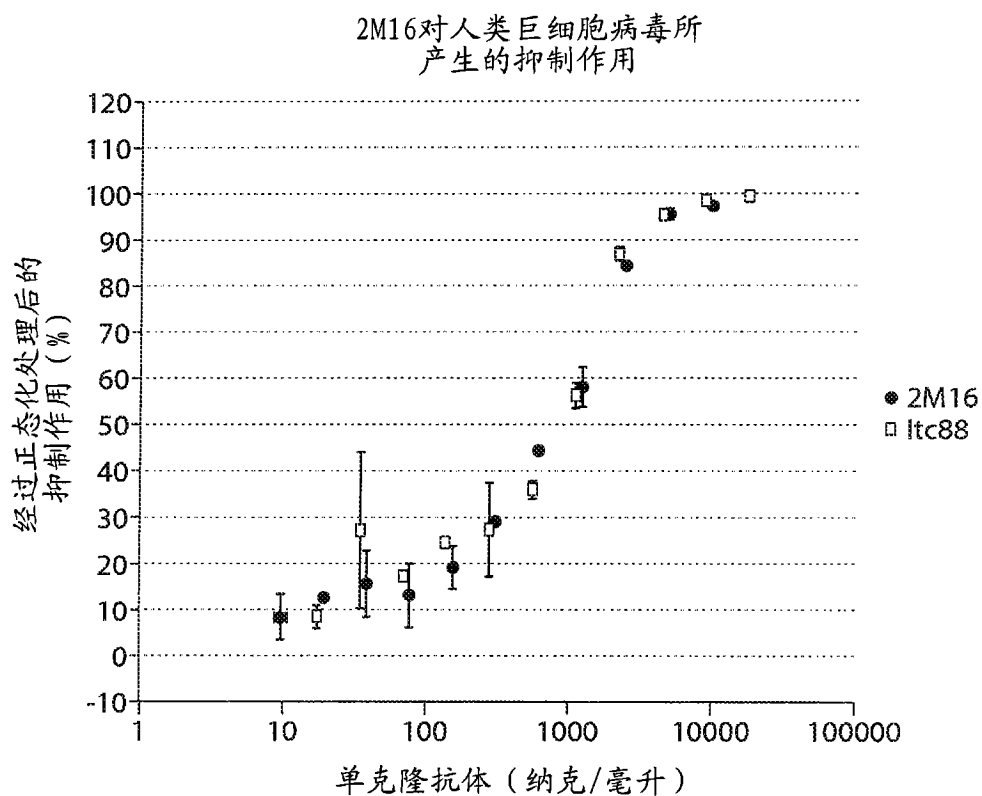


图 10

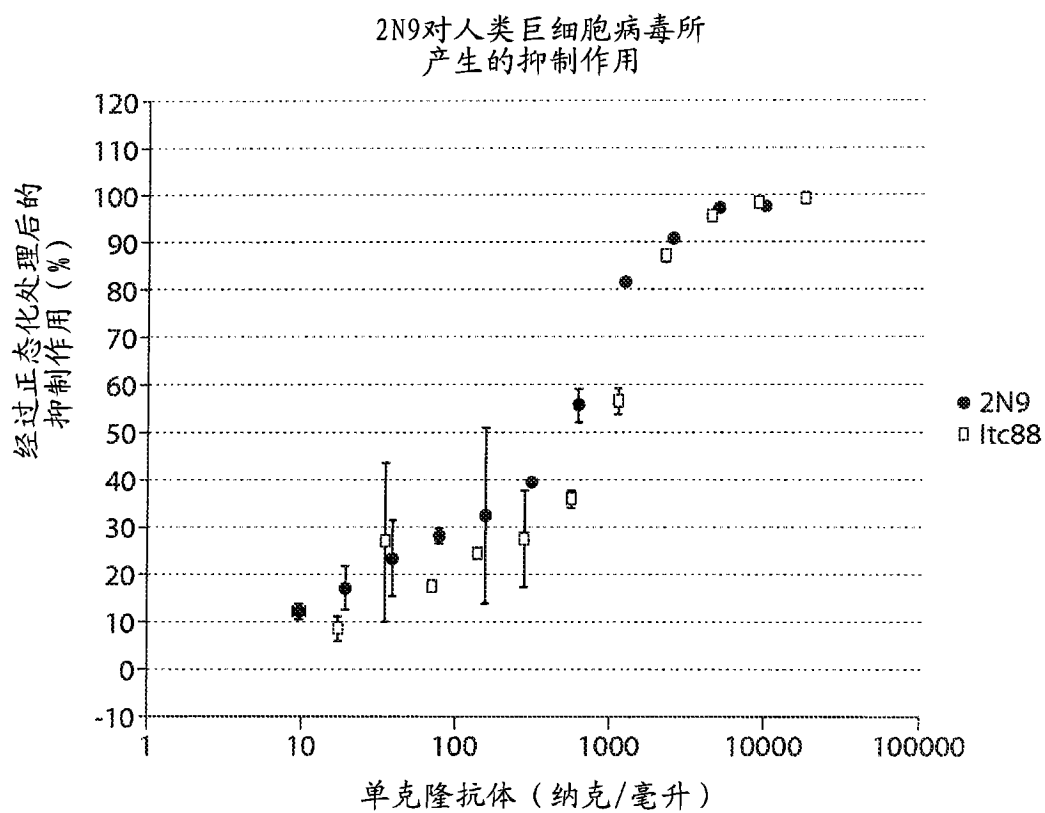


图 11

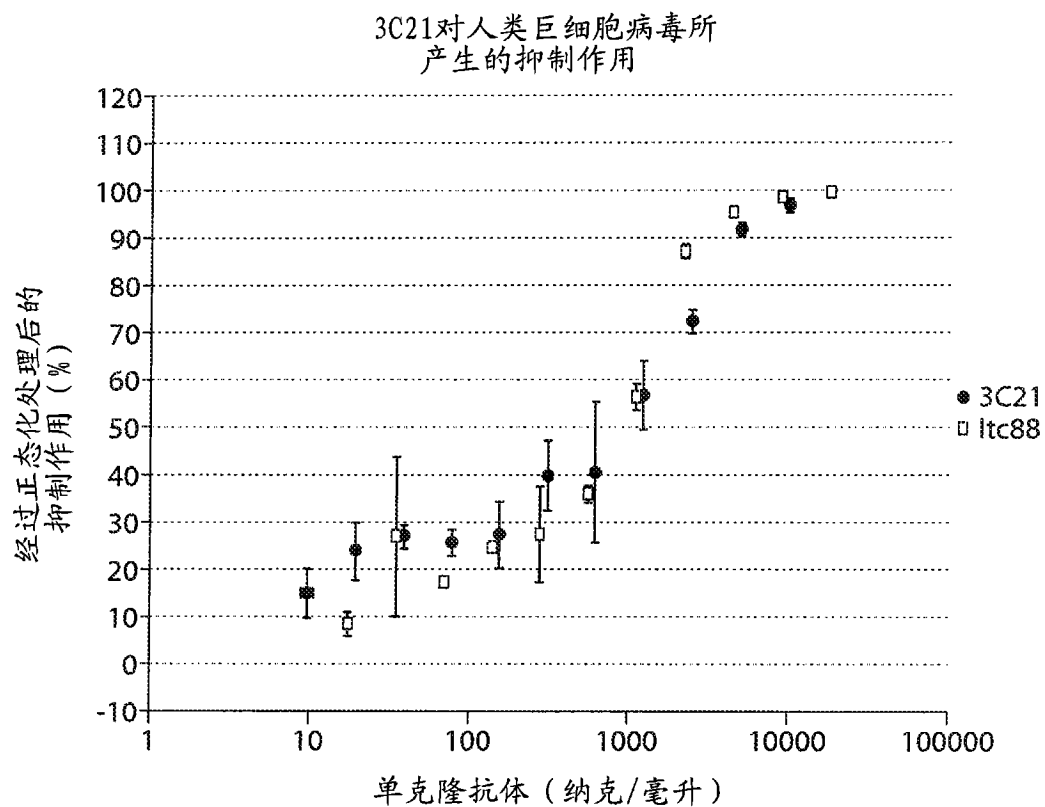


图 12

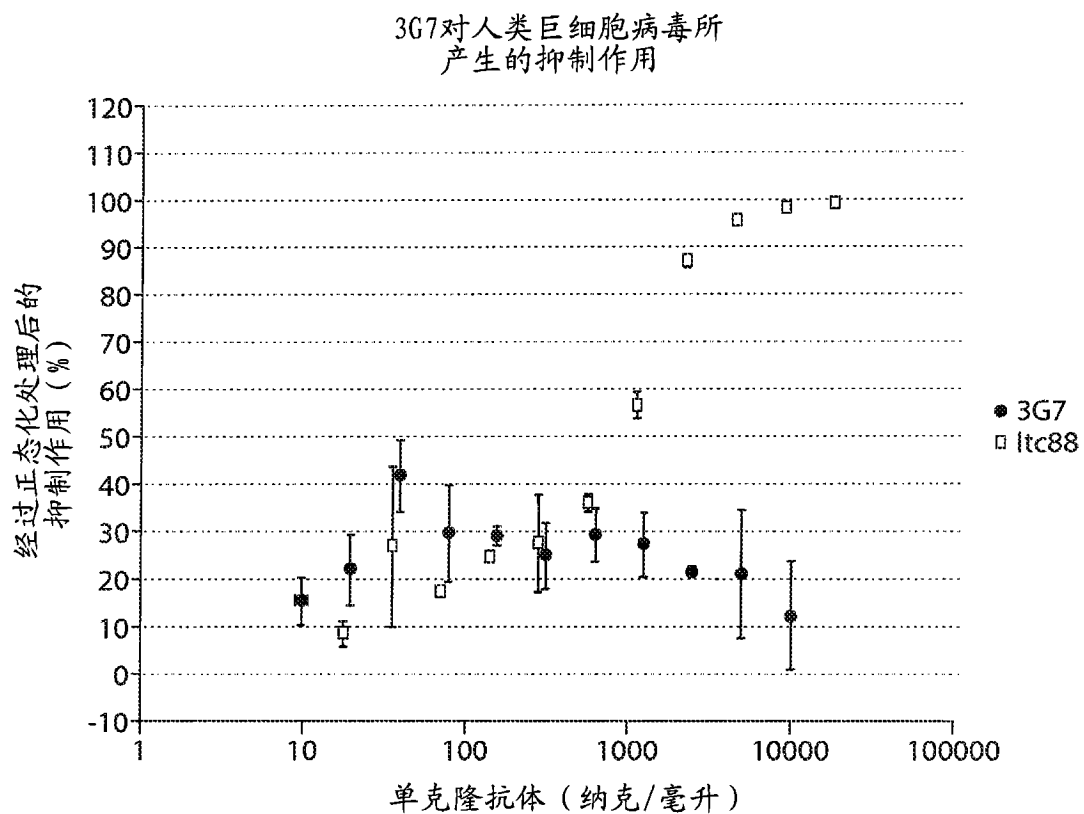


图 13

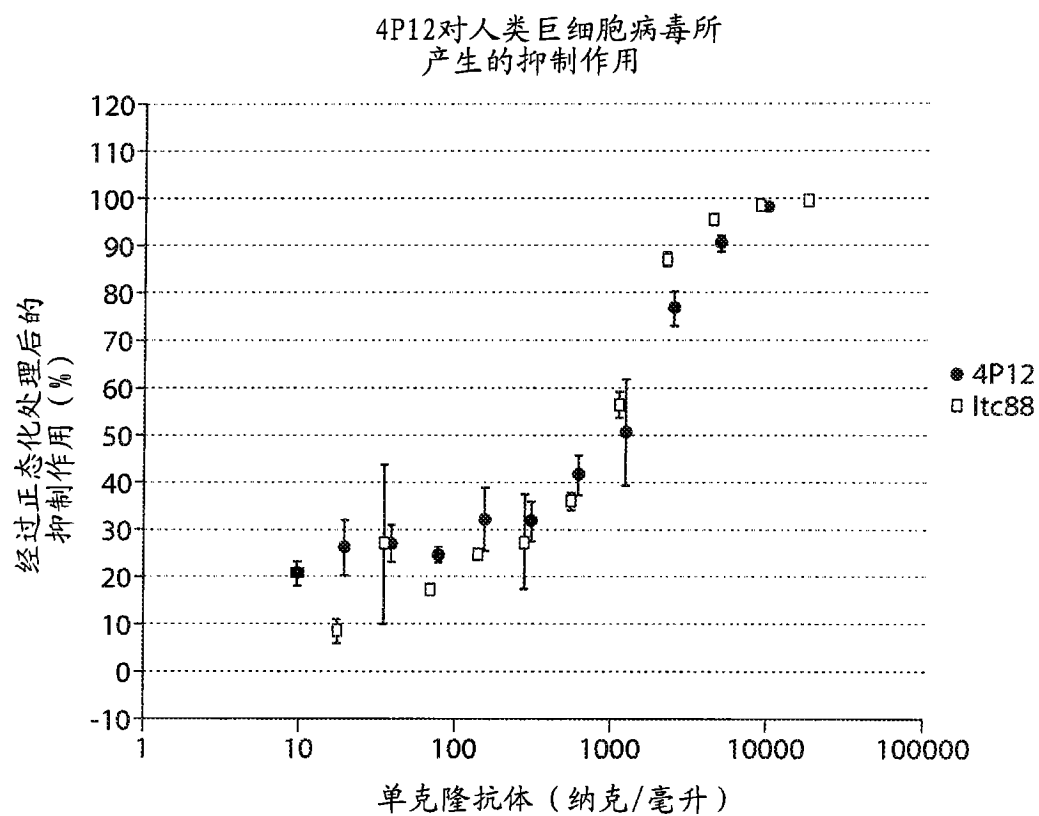


图 14

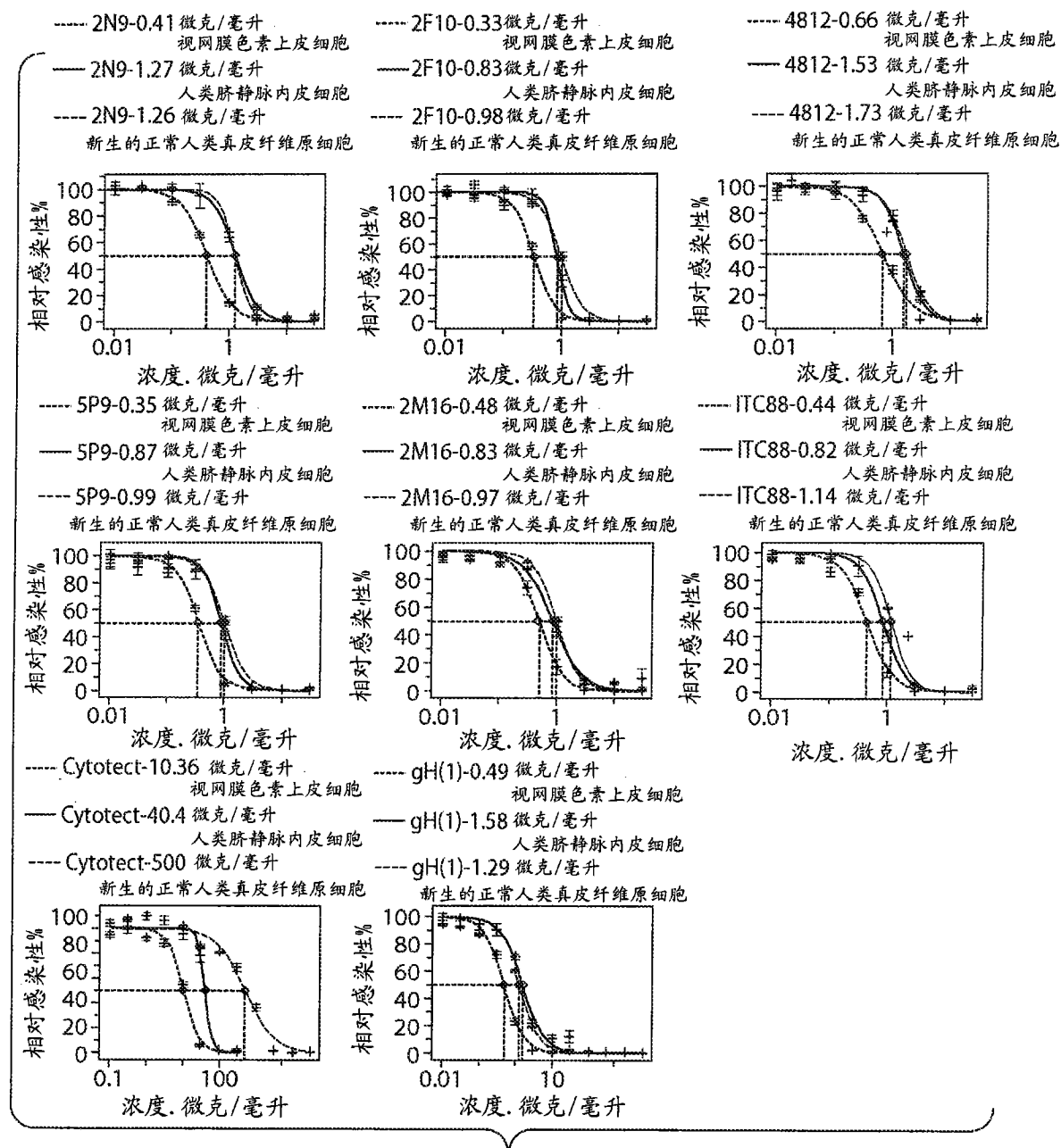


图 15

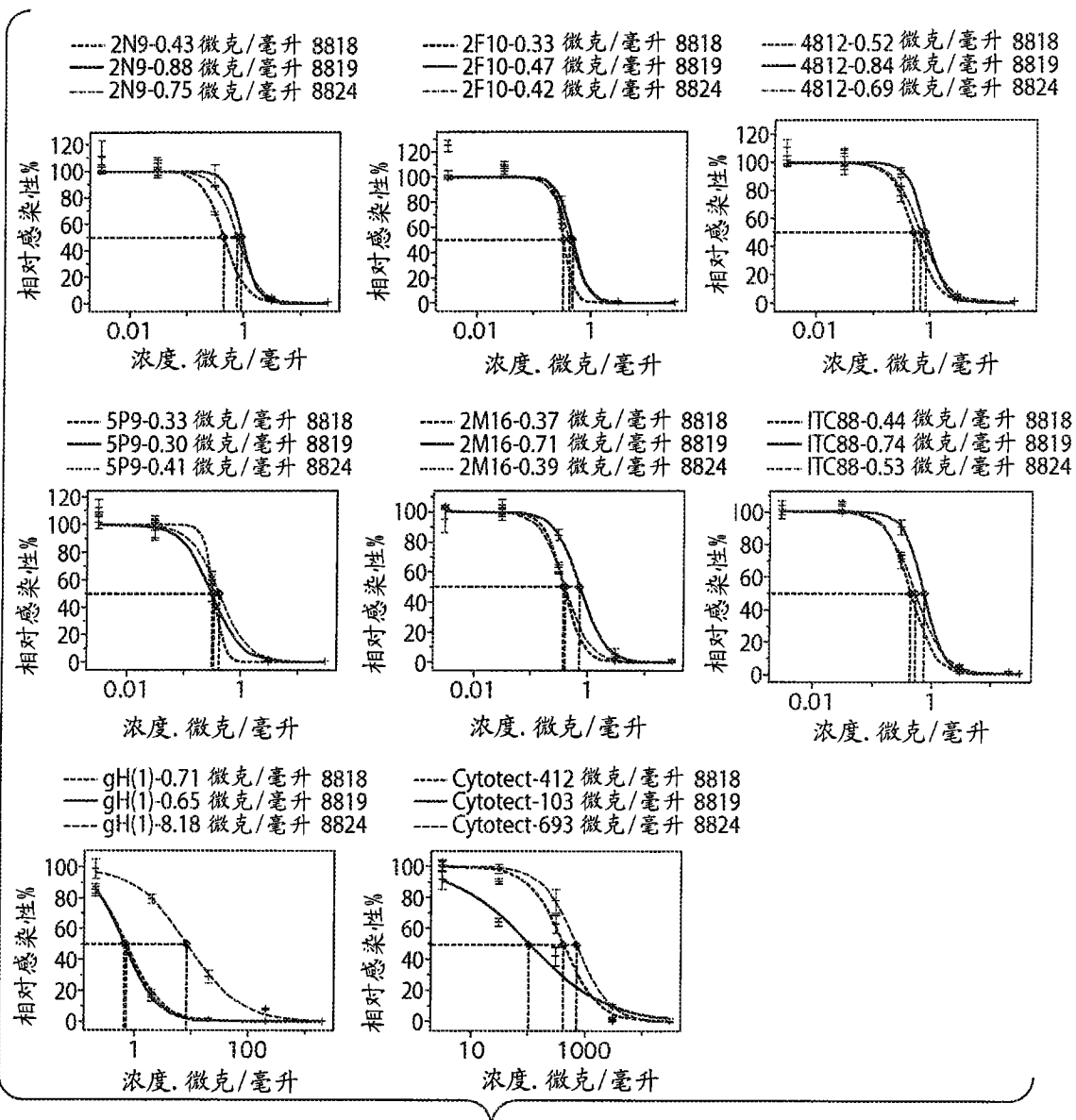


图 16

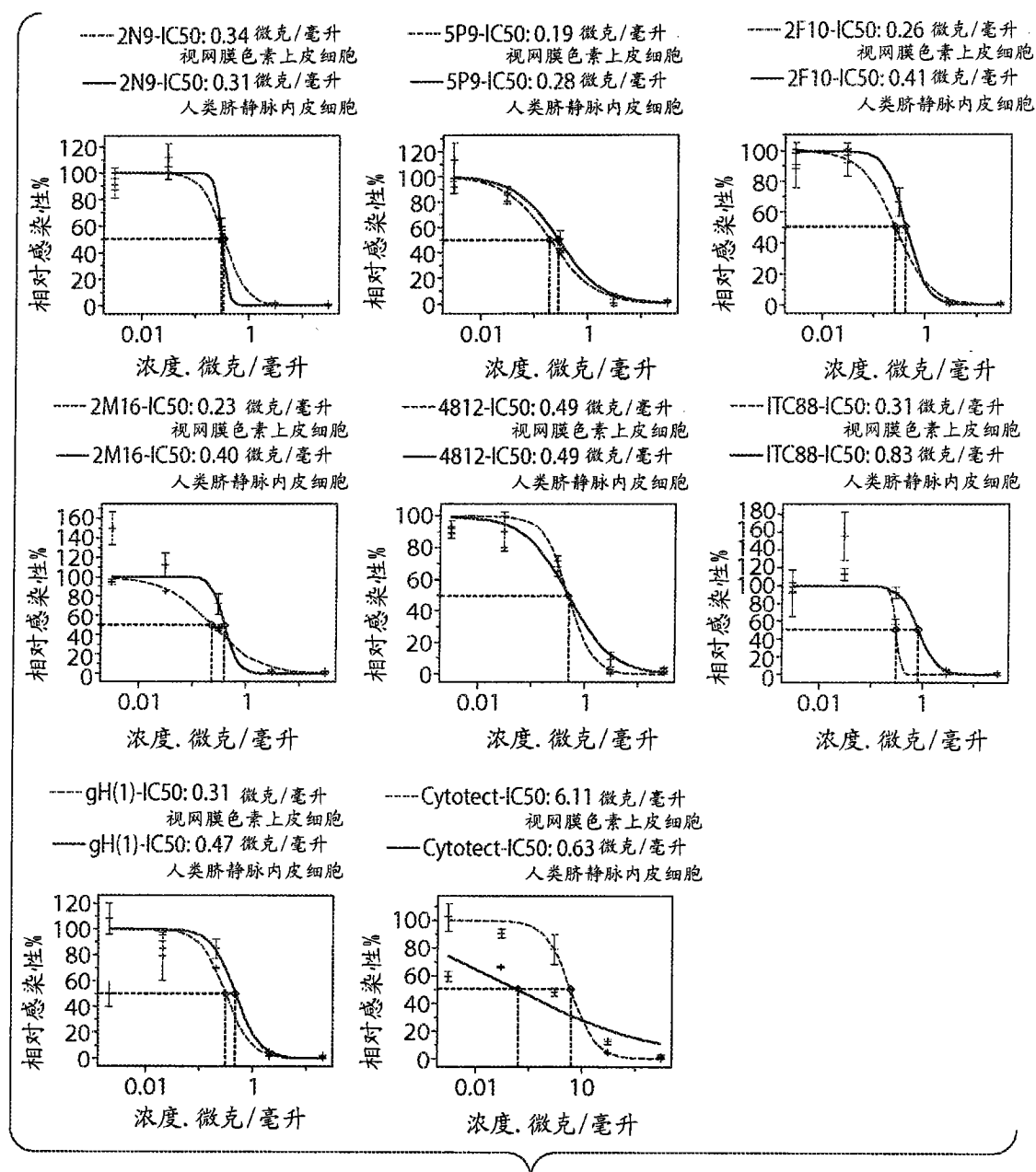


图 17

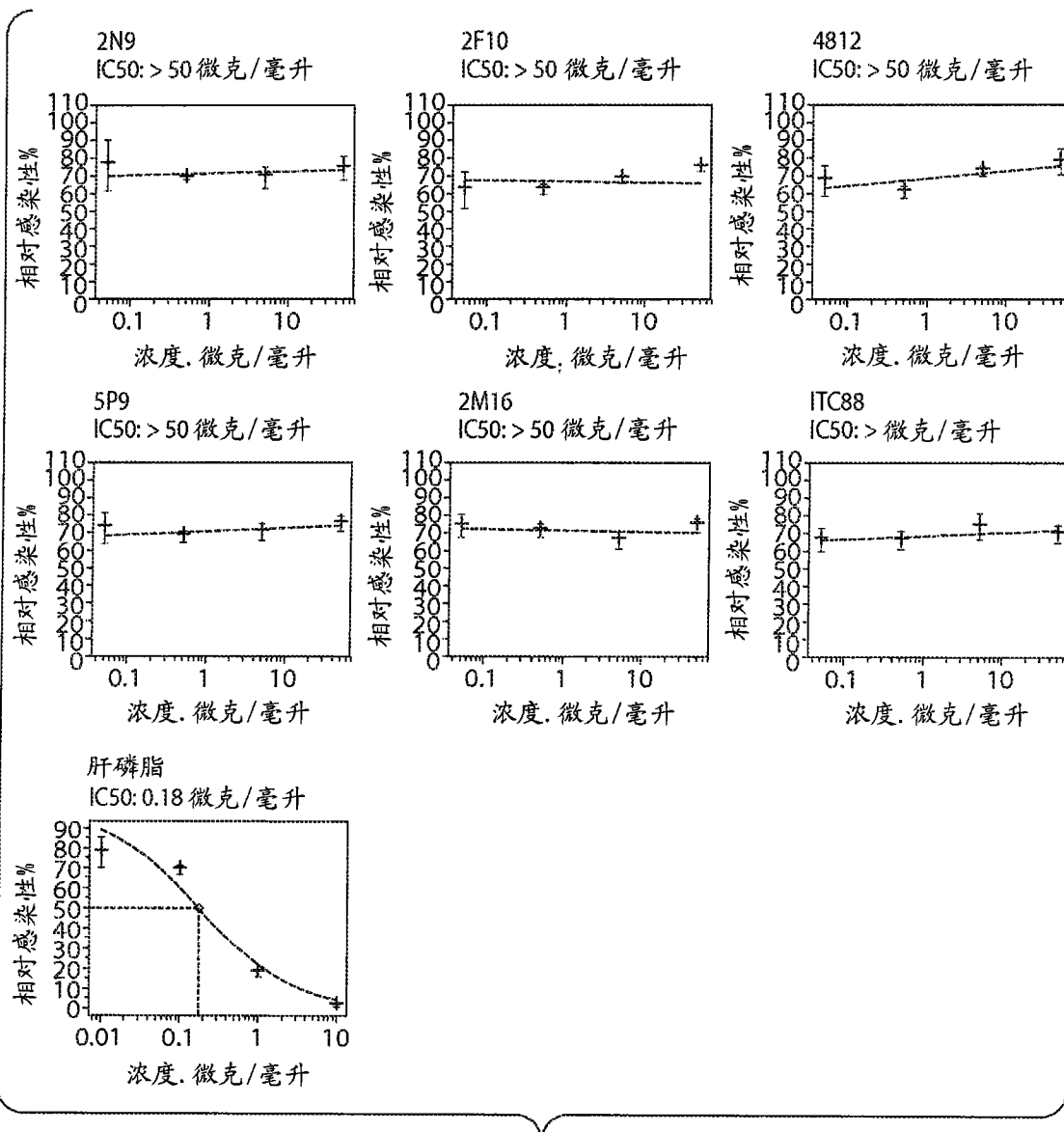


图 18