

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶
A61K 39/395

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97198565.0

[43]公开日 1999 年 10 月 20 日

[11]公开号 CN 1232402A

[22]申请日 97.10.3 [21]申请号 97198565.0
[30]优先权
[32]96.10.11 [33]US[31]60/028,270
[86]国际申请 PCT/US97/18035 97.10.3
[87]国际公布 WO98/16249 英 98.4.23
[85]进入国家阶段日期 99.4.6
[71]申请人 布里斯托尔-迈尔斯斯奎布公司
地址 美国新泽西州
[72]发明人 A·A·阿鲁弗 N·J·查如普奈
L·P·陈 R·S·米特勒
W·W·舒福特 A·W·斯尔达克

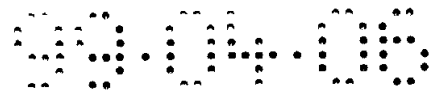
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 杨九昌

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图页数 14 页

[54]发明名称 免疫调节的方法和组合物
[57]摘要

本发明公开了料想不到的结果,即两种抗 4-1BB 单克隆抗体可以抑制体内 对至少 T 细胞依赖性抗原的初次和再次体液应答。这类抗体为体内免疫抑制和 癌症治疗提供了新方法。

ISSN 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 在宿主中抑制对抗原初次和再次体液应答的方法，包括给予所述宿主有效剂量的抗4-1BB抗体。

5 2. 权利要求1的方法，其中所述剂量在暴露于所述抗原之前给予。

3. 权利要求1的方法，其中所述剂量在暴露于所述抗原的同时给予。

10 4. 权利要求1的方法，其中所述剂量在暴露于所述抗原之后给予。

5. 权利要求1的方法，其中所述宿主是人。

6. 权利要求1的方法，其中所述抗原是T细胞依赖性抗原。

7. 权利要求1的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。

15 8. 权利要求1的方法，其中所述4-1BB是得自所述宿主的4-1BB同系物。

9. 权利要求1的方法，其中所述抗体是人的抗体。

10. 在宿主中阻断T细胞依赖性免疫应答的方法，包括给予所述宿主有效剂量的抗4-1BB抗体。

11. 权利要求10的方法，其中所述宿主是人。

20 12. 权利要求10的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。

13. 权利要求10的方法，其中所述抗体是人的抗体。

14. 权利要求10的方法，其中所述4-1BB是得自所述宿主的4-1BB同系物。

15. 包含单克隆抗体1D8的组合物。

25 16. 包含单克隆抗体3E1的组合物。

17. 包含单克隆抗体3H3的组合物。

18. 包含抗4-1BB抗体的组合物，其中所述抗体抑制体内对羊红细胞的抗体应答。

19. 权利要求14的组合物，其中所述抗体抑制配体体外结合到4-1BB。

20. 在宿主中增强淋巴细胞性杀伤肿瘤细胞的方法，包括给予所述宿主有效剂量的抗4-1BB抗体。

5 21. 在宿主中促进细胞毒T细胞发育的方法，包括给予所述宿主有效剂量的抗4-1BB抗体。

22. 治疗患有T细胞自身免疫病的宿主的方法，包括给予所述宿主有效剂量的抗4-1BB抗体。



说明书

关于免疫调节的方法和组合物

发明背景

4-1BB是属于神经生长因子受体超家族的诱导型T细胞受体。这种新抗原表达于激活的脾脏T细胞和胸腺淋巴细胞表面。这种I型跨膜蛋白的胞外域同源神经生长因子超家族成员。其胞质域含有同源T细胞特异性酪氨酸激酶p56^{lck}结合位点的序列。

尽管越来越多的证据表明4-1BB作为信号分子参与T细胞激活,但是其体内作用仍不清楚。例如,在抗CD3刺激的T细胞上4-1BB与单克隆抗体53A2交联导致T细胞增殖增强2-10倍(Pollok等, J. Immunol. 151: 1255(1993))。此外, Zhou等(Immunol. Letters 41: 177-184(1994))已证实, 4-1BB表达于已激活的肠上皮内T淋巴细胞, 并且用抗4-1BB单克隆抗体引发激活的IELS可以提高针对抗分泌抗CD4杂交瘤细胞的IEL细胞毒水平。抗4-1BB抗体的交联也可以增强IELS的增殖。

已经鉴定了至少两种4-1BB候选配体。Chalupny等(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10360-10364(1992))采用可溶性4-1BB免疫球蛋白融合蛋白(4-1BB Rg)来证实4-1BB结合到胞外基质蛋白(EMC)。Goodwin等(Eur. J. Immunol. 23: 2631(1993))报道了分离鼠4-1BB配体(4-1BB-L)的cDNA, 鼠4-1BB配体是具有C-末端氨基酸同源性的emerging配体家族成员, 所述emerging配体家族成员包括TNF、 α -和 β -淋巴毒素(LT)、CD40-L、Cd27-L、CD30-L和Fas-L。

已经克隆了鼠4-1BB的人类似物(hu4-1BB)和鼠4-1-BB-L的人类似物(hu4-1-BB-L)(Alderson等, Eur. J. Immunol. 24: 2219-2227(1994))。抗hu4-1BB的单克隆抗体和用hu4-1BB-L转染的细胞在有丝分裂原共同刺激的初级T细胞中诱导强增殖反应。

因此，存在开发4-1BB拮抗剂的需要。本发明针对这种需要和更多需要。

发明概述

5 本发明的一个方面是抑制宿主对抗原的初次和再次体液免疫应答的方法，该方法包括给予所述宿主有效剂量的抗4-1BB抗体。

本发明的其它方面是包含单克隆抗体1D8、3B8或3E1的组合物。

本发明的又一方面包含抗4-1BB抗体的组合物，其中所述抗体抑制体内对羊红细胞的抗体应答。

10 本发明的另一方面是阻断宿主T细胞依赖性免疫应答的方法，包括给予所述宿主有效剂量抗4-1BB抗体。

本发明的另一方面是增强宿主淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的方法，包括给予所述宿主有效剂量抗4-1BB抗体。

15 本发明的另一方面是增强宿主细胞毒T细胞发育的方法，包括给予所述宿主有效剂量抗4-1BB抗体。

本发明的另一方面是治疗患有T细胞自身免疫病的宿主的方法，包括给予所述宿主有效剂量抗4-1BB抗体。

附图简述

20 图1是描述鼠4-1BB配体结合到固定化4-1BB的曲线图。

图2图释用抗4-1BB单克隆抗体(mAb)阻断4-1BB结合到其配体。

图3是描述刺激后时间与激活T细胞中4-1BB表达的曲线图。圆形代表4-1BB mRNA水平。方形代表激活T细胞系DO.11.10表面的4-1BB受体水平。

25 图4图释亚适剂量(suboptimal dose)的抗CD3单克隆抗体145.2C11和抗4-1BB单克隆抗体共同刺激T细胞激活。

图5图释抗4-1BB单克隆抗体1D8的药代动力学。每种符号代表不同小鼠。

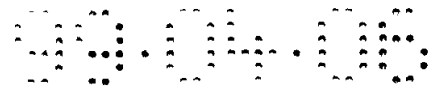


图6图释抗4-1BB抗体抑制初次以及再次抗羊红细胞应答。

图7图释抗4-1BB抗体抑制细胞毒T细胞的产生。

图8图释用抗4-1BB mAb处理后P815肿瘤的退化。

图9图释用抗4-1BB mAb处理后有P815腹水的小鼠长期存活。

5 图10图释CD4和CD8的去除在1D8诱导的排斥P815肿瘤细胞中的效应。

图11图释接受静脉内注射AG104肉瘤细胞的小鼠的治疗。

10 图12(A-C)描述(A)在GvHD期间抑制CTC应答的体内产生；(B)抗4-1BB mAb加速CTC介导的杀伤BDF₁脾细胞作用；(C)在发生GvHD的小鼠中，CD8⁺ T细胞的百分率升高。

图13图释抗4-1BB-PE40免疫毒素杀伤激活的鼠T细胞。

图14图释抗4-1BB抗体阻断实验性自身免疫性脑脊髓炎发生的能力。

15 具体实施方案的说明

免疫抑制治疗通常用于炎症控制、癌症治疗和器官移植。传统治疗，例如使用肾上腺皮质激素和其诱导剂、促肾上腺皮质激素、化疗药物和放射治疗，可能导致非特异性免疫抑制和免疫缺陷。因此，极其需要诱导免疫抑制的替代方法。本发明的抗体提供了优先导向表达于T细胞表面的特定多肽(即4-1BB)的机会。

20 本文使用的术语“4-1BB”是指鼠细胞表面蛋白4-1BB和存在于其它物种(包括人)的该蛋白的同系物。尽管预计在不同物种的同系物之间存在一定程度的氨基酸同源性，但是同源程度可能低达约50%。因此，4-1BB同系物定义为与鼠4-1BB的氨基酸序列同源性至少为50%、表达于激活T细胞上的跨膜蛋白。此外，4-1BB的定义中包括4-1BB和同系物的等位基因、具有保守氨基酸替代的4-1BB和同系物、以及可溶形式的4-1BB和同系物。

本文使用的术语“体液应答”是指可以随血清转移的免疫反应，

通常由存在的特异性抗体而产生。术语“初次”和“再次”免疫应答是分别指所述宿主首次暴露于抗原和随后的暴露于抗原。在上述体液免疫应答中，通常在初次应答早期(即第一周)主要抗体类型为IgM，而再次应答中的主要抗体类型为IgG。

5 本发明的单克隆抗体可以是任何类别的抗体，但是优选IgG 或 IgM。

对于给予人类例如作为体内治疗组合物的组分的单克隆抗体，本发明的单克隆抗体优选为大致人的，以使免疫原性最小，而且是大致纯形式。“大致人的”是指所述组合物的免疫球蛋白部分一般含有至少大约70%人抗体序列，优选至少大约80%人抗体序列，最优选至少大约90-95%或更高的人抗体序列。当指“抗体”时，当然是指非免疫球蛋白序列可任选地存在于该分子中，只要该分子保留结合4-1BB的能力。

可能最理想的是，采用重组DNA技术，将非人单克隆抗体(例如得自己制备好的抗人4-1BB同系物的鼠单克隆抗体)的抗原结合区(例如F(ab')₂、可变区或高变区(互补性决定区))转移到人抗体恒定区(Fc)或构架区，由此产生大致人的分子。这类方法一般是本领域技术人员已知的，并描述于例如，美国专利第4,816,397号、欧洲公告第173,494号和第239,400号，所述文献通过引用结合到本文中。另一方面，按照一般操作流程通过筛选得自人B细胞的DNA文库，人们可以分离编码特异性结合到4-1BB的人单克隆抗体或其部分的DNA序列，所述操作流程由Huse等(Science 246: 1275-1281(1989))概述并描述于WO 90/14430，上述文献通过引用结合到本文中，然后克隆和扩增编码具有所需要特异性的抗体(或结合片段)的序列。在其它实施方案中，可以制备结合到4-1BB的单链结合多肽。通过克隆和连接结合到4-1BB的单克隆抗体的重链和轻链的可变区，可以产生这些单链多肽。关于产生单链结合多肽的方法详细描述于例如，美国专利第4,946,778号，该专利通过引用结合到本文中。



实施例

I. 免疫接种和筛选流程

构建由鼠4-1BB分子的胞外部分和人免疫球蛋白(Ig)恒定区域组成的融合蛋白(EP 0 595 659, 该专利通过引用全部结合到本发明), 以用于免疫接种和筛选。所述4-1BBIg融合蛋白在所述4-1BB和所述分子的Ig部分之间含有蛋白酶凝血酶切割位点。用凝血酶切割所述融合蛋白, 然后通过一个A蛋白柱以去除未消化蛋白和Ig片段, 以用于免疫接种。由该过程产生的未结合物质用于免疫接种, 通过SDS-PAGE分析, 所述未结合物质含有几条带。

采用免疫脾细胞和鼠骨髓瘤AG8 (Kearney等, *J. Immunol.* 123: 1548-1550(1974))细胞系作融合配偶体, 产生大鼠-小鼠杂交瘤, 并用标准技术进行选择。从两个分离的融合细胞获得抗体。在实验当天和第3天, 于爪垫将RIBI佐剂(RIBI Immunochemical)的20 μ g蛋白注射到Sprague-Dawley大鼠两次之后, 从融合细胞产生mAb 3B8和1D8; 在第10天, 所述大鼠接受第三次爪垫注射PBS中的20 μ g蛋白, 并在第13天取出引流的腭淋巴结(drainage popliteal lymph node), 并进行融合。在4次腹腔内注射RIBI中的20 μ g蛋白之后5个月内, 于第2种脾细胞融合体产生余下的mAb。在融合之前17和3天静脉内注射30 μ g蛋白。

II. 抗4-1BB抗体的特征鉴定

首先通过在标准ELISA中特异性结合到4-1BBIg融合物鉴定抗体。确立所述抗体特异性的其它标准有: (1)结合到表达全长4-1BB分子的COS细胞, 而不能结合到模拟转染的对照细胞; (2)结合到D0-11-10 T细胞杂交瘤系, 该T细胞杂交瘤系被激活以表达4-1BB(用10ng/ml PMA和0.5 μ g/ml离子霉素激活12小时)。在ELISA检测中采用同种型特异性过氧化物酶试剂(Zymed)和所述4-1BBIg蛋白测定, 3B8抗体同种型抗体是大鼠IgM, 而其它抗体均是IgG2a同种型。

III. 纯化抗体

在抗 κ 链 (mAb RG7(ATCC TIB 172)) 柱上亲和纯化 3B8 mAb(IgM)。用免疫纯Ig洗脱缓冲液(Pierce)洗脱该mAb, 然后对磷酸缓冲盐溶液(PBS)透析。RG7纯化的物质确实含有用所述完整抗体共纯化的某些游离轻链。在G蛋白(Gammabind Plus, Pharmacia)上纯化所有其它抗体。免疫纯Ig洗脱缓冲液用来洗脱所述抗体。使用前对PBS透析该洗脱的抗体。

IV. 通过mAb抑制4-1BB配体结合到4-1BB蛋白

由所述4-1BB配体羧基末端的胞外部分和鼠CD8氨基末端的胞外部分组成的可溶性融合蛋白用作替代物, 以研究对配体结合到所述4-1BB分子的抑制。采用含有一个BamHI位点的上游引物(5'-GCGGCGGATCCCCGCACCGAGCCTCGGCCAGCG-3')和含有一个XbaI位点的下游引物(5'-CGCTCTAGAGGATAGTTCTCATTCCCATGG-3'), 通过聚合酶链式反应(PCR)产生编码鼠4-1BB配体胞外域(残基104-309)的DNA。所述鼠4-1BB配体DNA片段在阅读框架中克隆到CDM7(B-)载体中, 该载体含有CD8胞外域并后接一个BamHI位点。该分子在本文称为4-1BB配体(4-1-BBL)。在ELISA和基于细胞的检测系统中评价抗4-1BB mAb阻断配体结合到4-1BB分子的能力。用mAb 53.6 (ATCC TIB 105), 通过用40%丙二醇/60% 50mM Tris(pH 7.0)/1.25 M (NH₄)₂SO₄洗脱, 在抗CD8亲和柱上纯化该4-1-BBL, 并对磷酸缓冲盐液(PBS)透析。所纯化的物质作为主要宽带在还原SDS-PAGE中迁移, 所述宽带估计分子量为55,000。当用HPLC凝胶过滤评价时洗脱产生3个峰。主峰的估计分子量为300,000。

按如下所述进行抑制4-1BBL结合的ELISA检测。所述4-1BBIg蛋白以含0.1 μ g/ml的PBS液于4 $^{\circ}$ C过夜包被到ELISA孔上, 用样品稀释液(Genetic Systems)封闭, 并与所纯化抗体温育1小时。然后加入配体, mAb和配体的混合物再温育1小时。洗涤所述板, 并与生物素化mAb

53.6(抗CD80)温育,之后与链霉抗生物素-辣根过氧化物酶(HRPO)缀合物温育。ELISA信号降低表明结合被抑制。配体结合到4-1BBIg的效价测定结果显示在图1。鼠gp39-CD8融合蛋白对照不结合4-1BB,而所述4-1BB配体以剂量依赖性方式特异性结合到4-1BB。在类似形式的ELISA中所述mAb阻断配体结合到4-1BBIg的能力显示在图2。

V. 激活DO-11-10细胞以表达4-1BB蛋白

通过用PMA(10ng/ml)和离子霉素(0.5μg/ml)处理不同时间,激活上述T细胞杂交瘤D0-11-10,以表达所述4-1BB分子,之后分别用Northern分析或FACS分析检测4-1BB mRNA或4-1BB的细胞表面表达(图3)。未处理细胞不能结合4-BBL蛋白。激活细胞结合所述4-1BBL蛋白,但是不结合gp39和Lyta2a的类似融合蛋白构建物(Hollenbaugh等, EMBO J. 11(12):4313-4321(1992))。只有当所述细胞系激活时,抗4-1BB抗体1D8和3B8才结合到D0-11-10细胞。那些mAb与DO-11-10细胞预温育,可以阻断随后的4-1BBL的结合。采用抗CD8 mAb(53.6)缀合的抗血清(Biosource)确定4-1BBL结合到细胞。

在其它实验中,研究了抗4-1BB抗体共同刺激T细胞激活的能力。用亚适剂量的抗CD3 mAb 145.2C11和10μg/ml抗4-1BB mAb刺激静息T细胞,使细胞增殖较单独的145.2C11刺激增强2.5-8倍(图4)。结合亲和力或阻断配体结合的能力和所述mAb共刺激T细胞的能力之间几乎没有关系。

VI. 抗4-1BB单克隆抗体1D8和3B8抑制抗SRBC抗体应答的发生

每只小鼠静脉注射250mg抗4-1BB mAb 1D8之后,评估其药代动力学。从第8天开始到第42天结束,收集血清样品并分析其中的抗4-1BB mAb。显示在图5的结果证明,1D8的半衰期为7天。这些结果也证明,在这些动物中不产生抗大鼠IgG(抗1D8)抗体。3B8为大鼠IgM抗体,其半衰期为6.5hr(数据未显示)。

每5只小鼠为一组，用T细胞依赖性抗原羊红细胞(SRBC)和或250mg 1D8或3B8进行静脉注射。每两天再注射一次抗体，持续6天。定期从每只小鼠收集血清样品直到第7周，并检测抗SRBC效价。在第7周所述小鼠接受第二次SRBC免疫，但是不再给予抗4-1BB mAb。在2周内收集血清样品，并检测抗SRBC抗体。1D8和3B8均阻断对SRBC的初次和再次攻击(图6)。这些实验尤其是3B8的结果表明，该处理导致长期不应答性。

VII. 抑制细胞毒T细胞的产生

为了确定4-1BB表达是否对其它T细胞效应子功能重要的，检测在急性抑制物抗宿主病(GvHD)期间1D8和几种得自第二种融合物的mAb影响CTL产生的能力。在静脉注射 10^7 C57BL/6(H-2^b)脾T细胞后10天，从BDF₁(H-2^{db})小鼠分离脾T细胞。在组织培养中用重组小鼠IL-2(R&D Systems)扩增5天后，检测活T细胞对或Ia^d(P815)或Ia^b(EL4)⁵¹Cr标记靶的细胞毒毒性。图7中的结果表明，用对照mAb或PBS处理的脾T细胞以低至3:1的比率有效杀伤含有合适II类MHC单倍型(Ia^d)的靶。相反，得自注射1D8小鼠的脾T细胞，在E: T比率达到50: 1时才能杀伤靶，甚至其杀伤作用降低75%。用mAb 22B6获得类似结果。mAb 3E1完全抑制CTL的产生/存活，而mAb 21E5的抑制作用较小。在EL-4(Ia^b)靶上未观察到杀伤效应(数据未显示)。这些观测结果不是因为在培养物中存在抗4-1BB mAb，因为这类抗体加入到CTL检测中不能阻断CTL杀伤作用。在加入所述抗体到靶之前，所培养的T细胞的显微镜检查显示，完全缺乏激活的细胞，存在在对照培养物没有的许多小静息活细胞和大量的凋亡细胞或死细胞。

VIII. 在体内GvHD期间增加CTL的产生

根据上述研究，用抗4-1BB mAb处理的GvHD小鼠不能证实在有IL-2或无IL-2体外培养5天后对合适靶的CTL活性(数据未显示)，然而

对照小鼠在存在IL-2的情况下发生显著的CTL反应。该观察结果是令人惊奇的,因为显著的1D8诱导的CTL杀伤肿瘤细胞恒定地发现于独立的体内转移和非转移肿瘤疾病模型中(图8、9、10和11)。此外,正常大小脾脏相比,从抗4-1BB处理的GvHD小鼠取出的脾脏比正常脾脏大小增大了2-3倍,Ab对照小鼠也一样。为了阐明该矛盾的观察结果,如前重复该GvHD实验,但是这次在外科手术取出脾脏后立即评价CTL活性,消除IL-2体外扩增CTL作用。该实验的结果显著不同于上述报告的结果。在图12A可以看到,已知结合到4-1BB分子不同区的两种抗4-1BB mAb,即1D8和22B6,与在对照GvHD动物中观察到的结果相比,CTL活性增强几乎4倍。相反,mAb 21E5对CTL产生无明显影响,而配体结合最强阻断剂之一的mAb 3E1完全抑制CTL发育。图12B显示从用这两种抗体处理的小鼠回收的总的活脾细胞数显著下降,进一步证实了1D8和22B6 mAb对CTL发育增强活性的强力作用。此外,脾细胞表型分析揭示,在用1D8 mAb处理的小鼠中,CD8⁺ T细胞的百分率增加到总细胞数的30%(图12C),而用6E9注射处理的GvHD小鼠,即同型匹配的非结合对照或未接受抗体的小鼠,其CD8⁺ T细胞百分率为5%-8%。采用其中进行了域交换的4-1BB融合蛋白进行抗4-1BB mAb的表位作图研究,证明1D8 mAb是独特的,因为1D8 mAb结合到该4-1BB分子胞外域的近膜端区,而不涉及4-1BBL的结合(数据未显示)。

IX. 增强细胞毒T细胞的发育

在这些实验中,抗4-1BB单克隆抗体用来增强细胞毒T细胞的发育,然后细胞毒T细胞杀伤高转移性弱免疫原性和非免疫原性肿瘤。

图8图示实验结果,在该实验中于实验当天用10⁵ P815肥大细胞瘤细胞皮下注射Balb/C小鼠,5只Balb/C小鼠组成一组。对照小鼠接受抗人CD5 mAb 10.2。然而,注射或1D8或3E1(抗4-1BB) mAb的小鼠迅速排斥其肿瘤。在第3天和6天,每只小鼠腹膜内注射抗体400mg。

图9图示给予P815肿瘤和用1D8 mAb处理的小鼠的长期存活情

况。

图10所示的数据证明，从给予P815肿瘤和1D8 mAb的小鼠去除CD4或CD8阳性T细胞后，不能排斥所述肿瘤。我们没有受限于任何一种理论，但这些结果提示CD4和CD8细胞均是mAb 1D8发挥效用所需要的。

图11所示的数据证明，通过1D9 mAb刺激诱导的CTL，可以杀伤非免疫原性的肉瘤AG104。在该实验中，将 10^5 AG104肿瘤细胞皮下注射到Balb/C小鼠，每10只Balb/C小鼠组成一组。如上所述，在第3 和6天皮下注射单克隆抗体。在第60天时，70%所述小鼠存活。因为该肿瘤模型极具攻击性，所以该结果非常有意义。

X. 杀伤激活的鼠T细胞

在本实验中，通过克隆1D8 mAb的可变区产生抗4-1-BB-PE40免疫毒素，由此构建单链Fv。然后将该SF_v用来产生SF_v-PE40(Siegall等, Drug Dev. Res., 34: 210-219(1995))免疫毒素。FACS分析表明,这种免疫毒素只结合到4-1BB⁺激活的细胞。图13的结果证明，该免疫毒素以剂量依赖性方式特异性杀伤激活的4-1BB⁺ T细胞，而对照免疫毒素无此作用。

XI. 阻止EAE发育

下列实验采用具有T细胞自身免疫性的小鼠模型，T细胞自身免疫性即发生实验性自身免疫(或变应性的)脑脊髓炎(EAE)(参见例如, Alvord, G.C. Jr.编辑, Experimental Allergic Encephalomyelitis: A Useful Model for Multiple Sclerosis, Liss, NY(1984))。

实验当天用100μl完全弗氏佐剂中的1mg/ml兔脑髓鞘碱性蛋白皮内注射PL X SJL/F₁雌性小鼠。静脉注射200μl的1μg/ml百日咳外毒素溶液(PBS)。

在第0、2和4天，将200μg的1mg/ml PBS溶液注射8只为一组的小

鼠, 所述PBS液含有一种下列单克隆抗体(所有均得自大鼠, 并是IgG_{2A}同种型): (a)对照mAb 6E9(一种大鼠抗人gp39 mAb); (b)抗4-1BB mAb 3E1; (c)抗4-1BB mAb 3H3。通过观察从尾麻痹到后肢麻痹(在此时由于人道的原因处死动物)分析小鼠的EAE的发生。

5 图14所示的数据证实抗4-1BB抗体阻断EAE发生的能力。

尽管为了清楚理解, 通过图解和举例在一定详细程度上描述了上述发明, 但是可以在所附权利要求书范围内实施的一定变化和改进是显而易见的。

10 为了各种目的, 本文所引用的所有文献通过引用整个结合到本发明中。

说明书附图

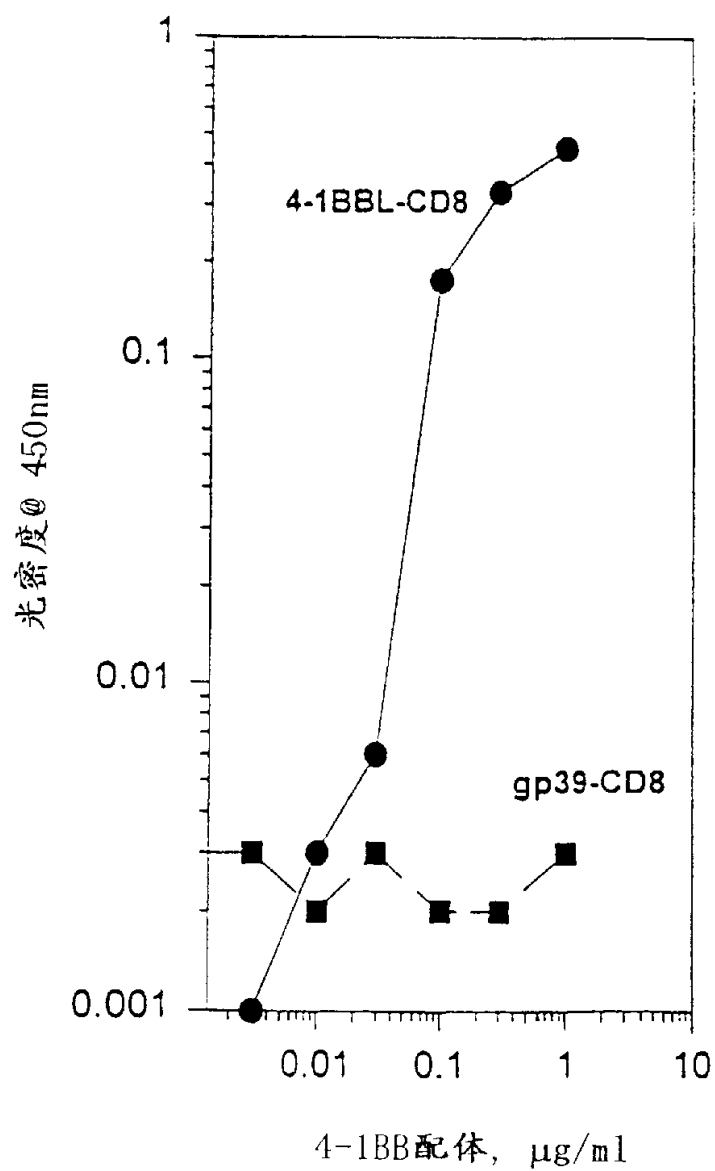


图1

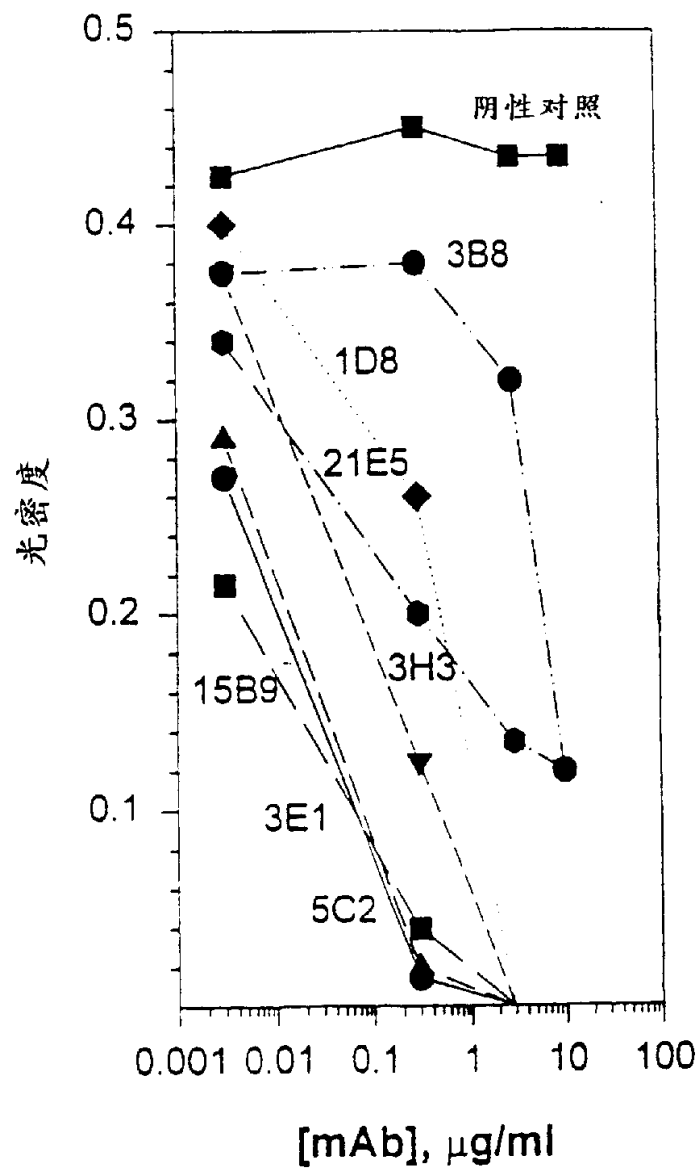


图 2

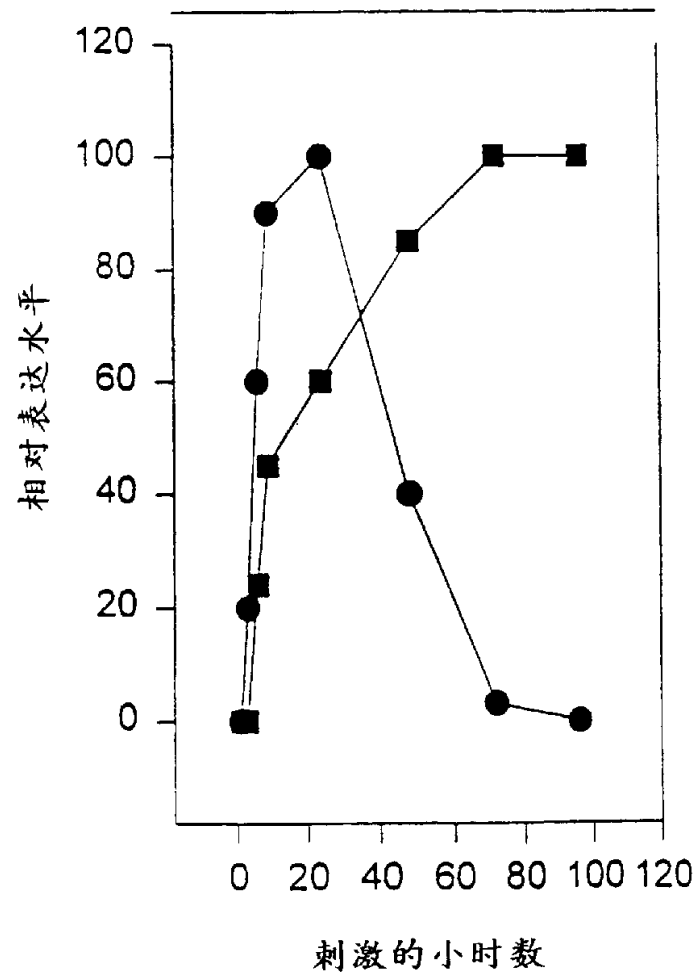


图3

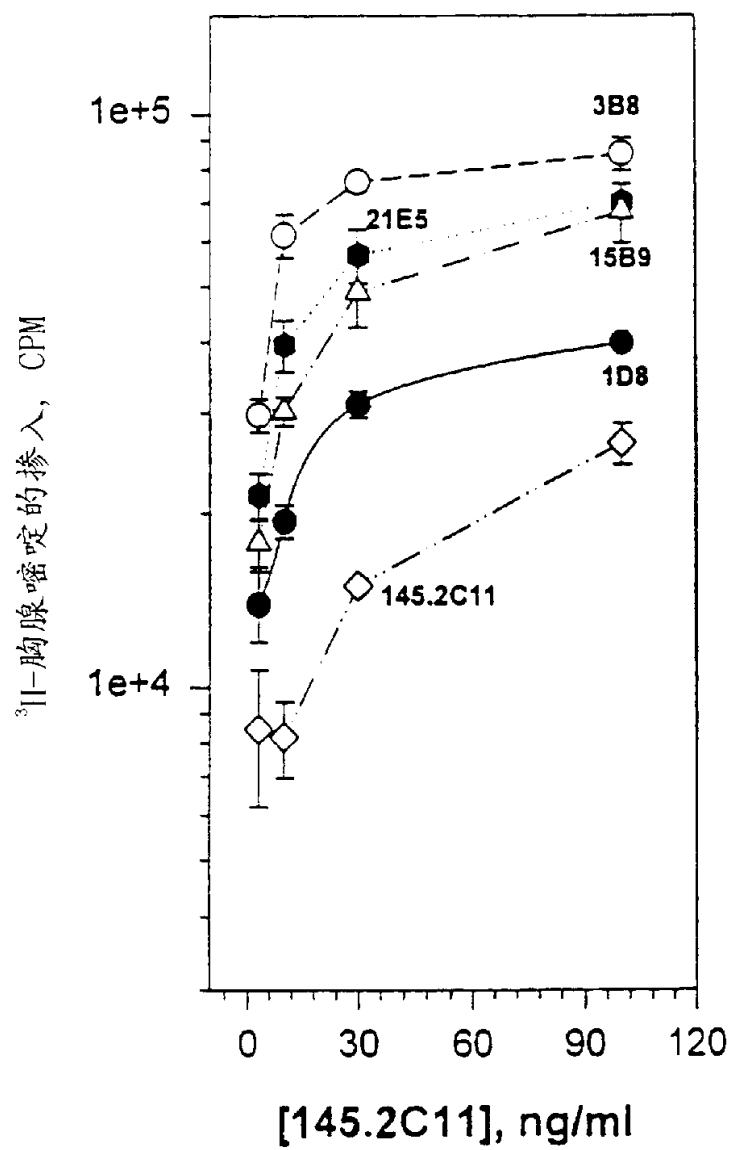


图4

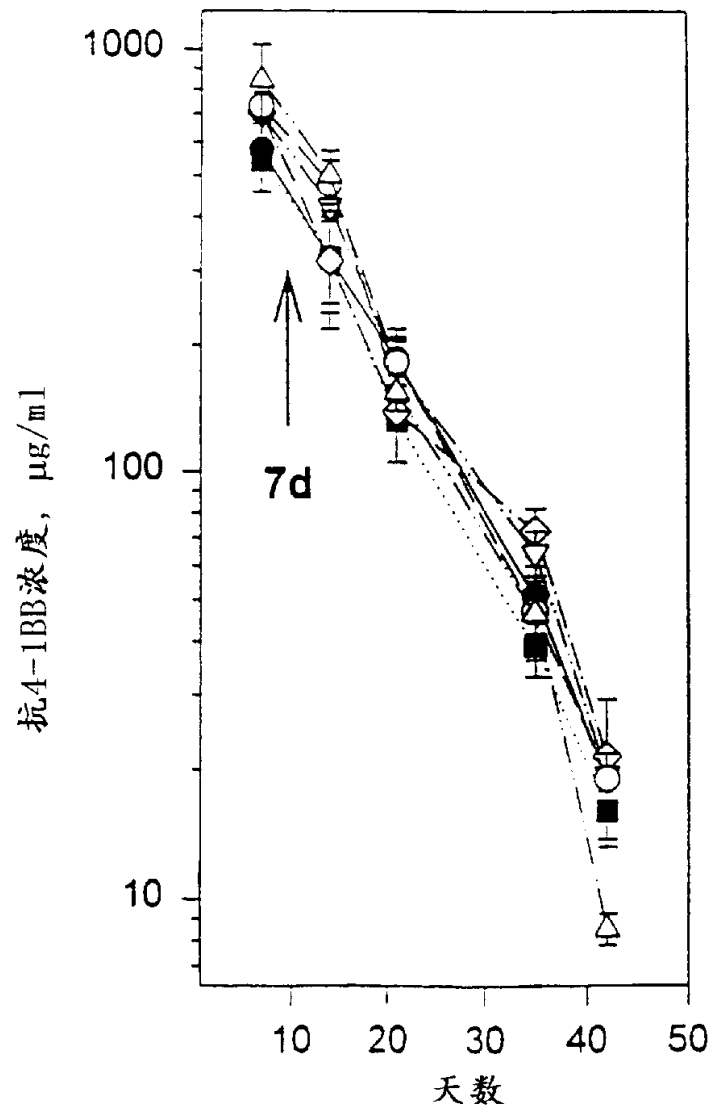


图5

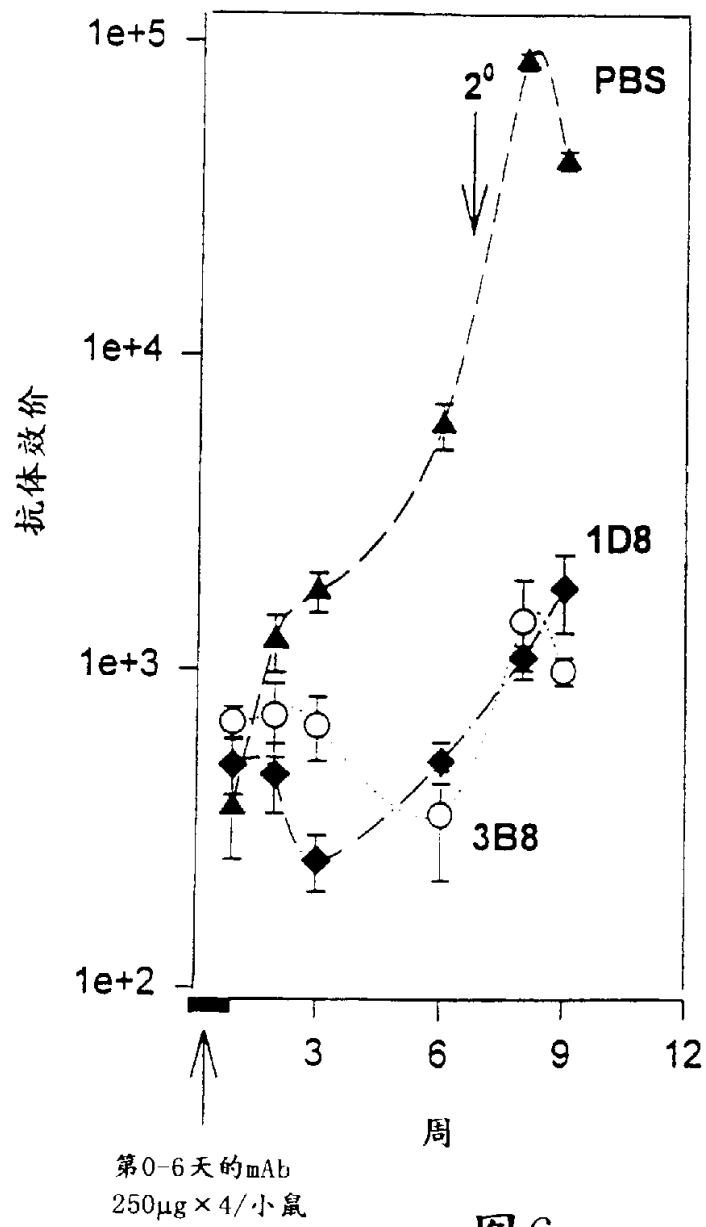


图6

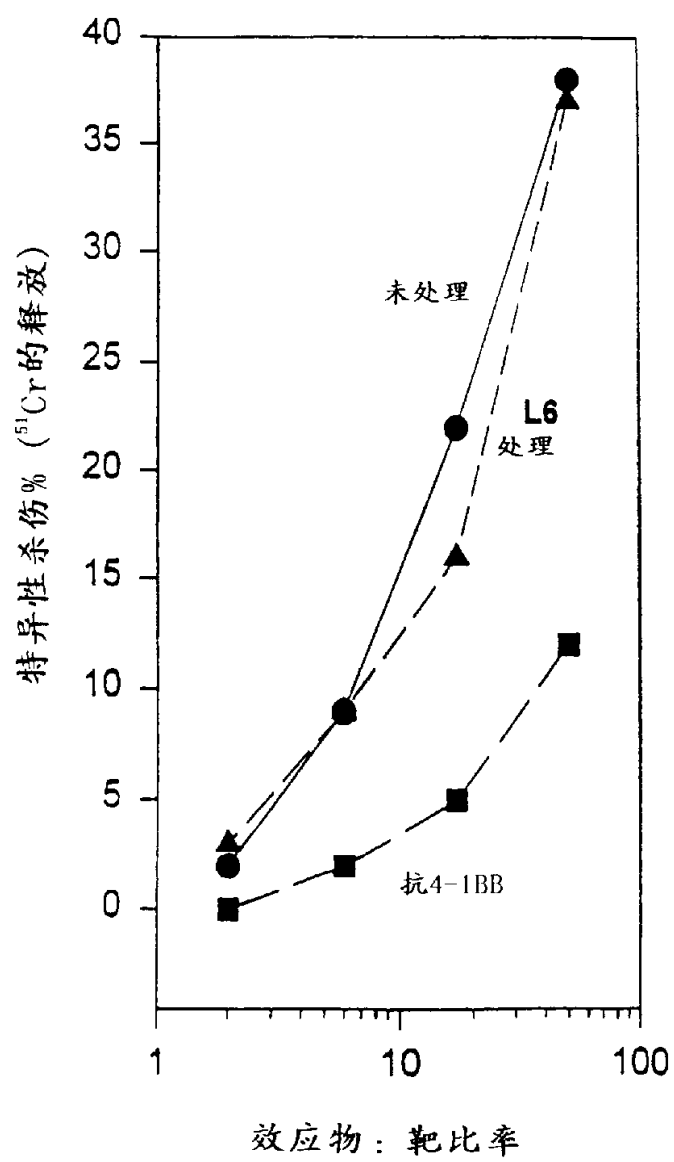


图 7

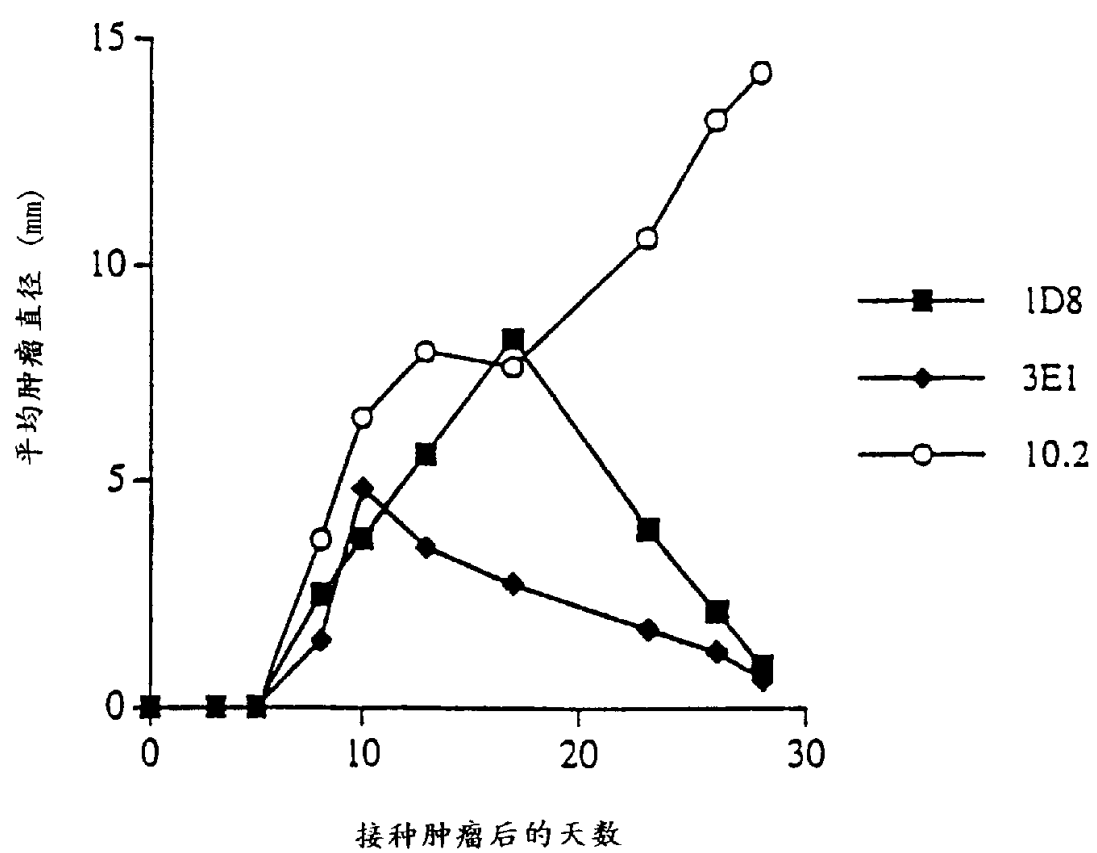


图8

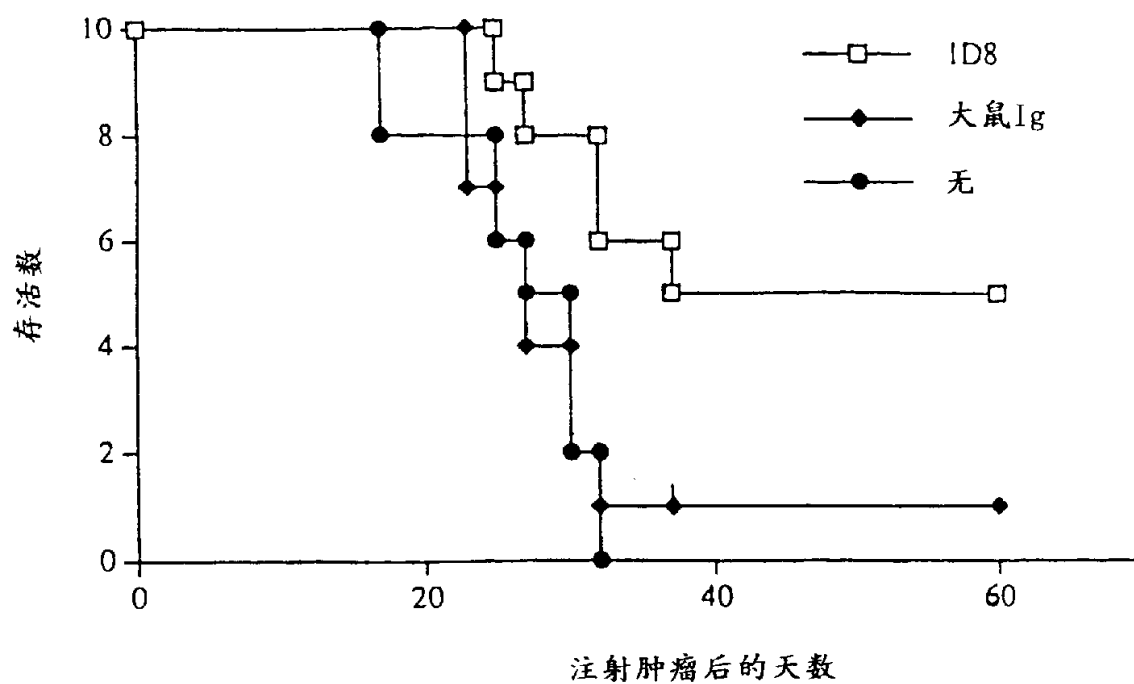


图9

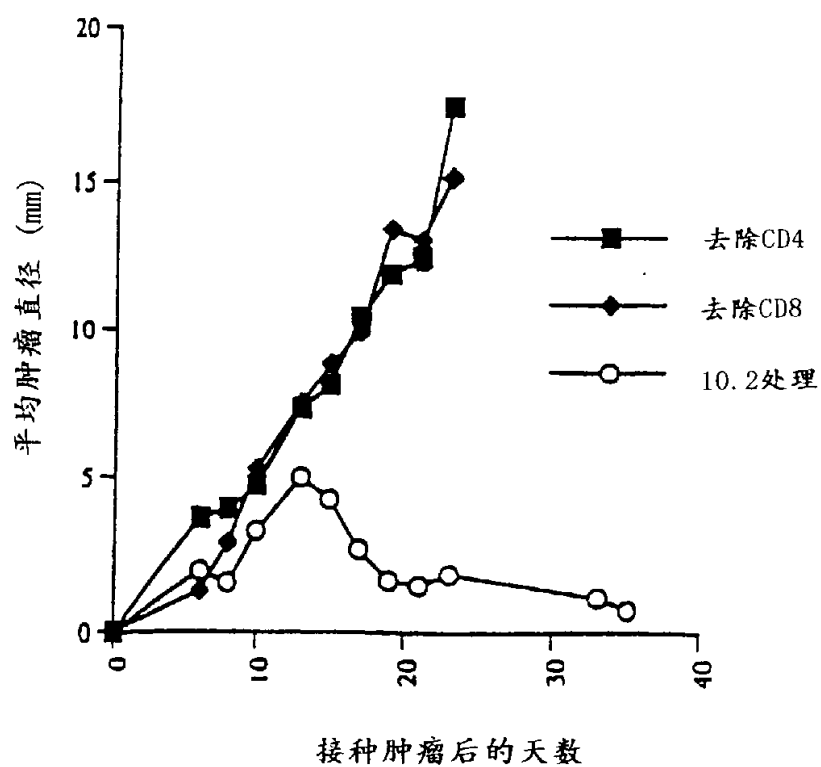
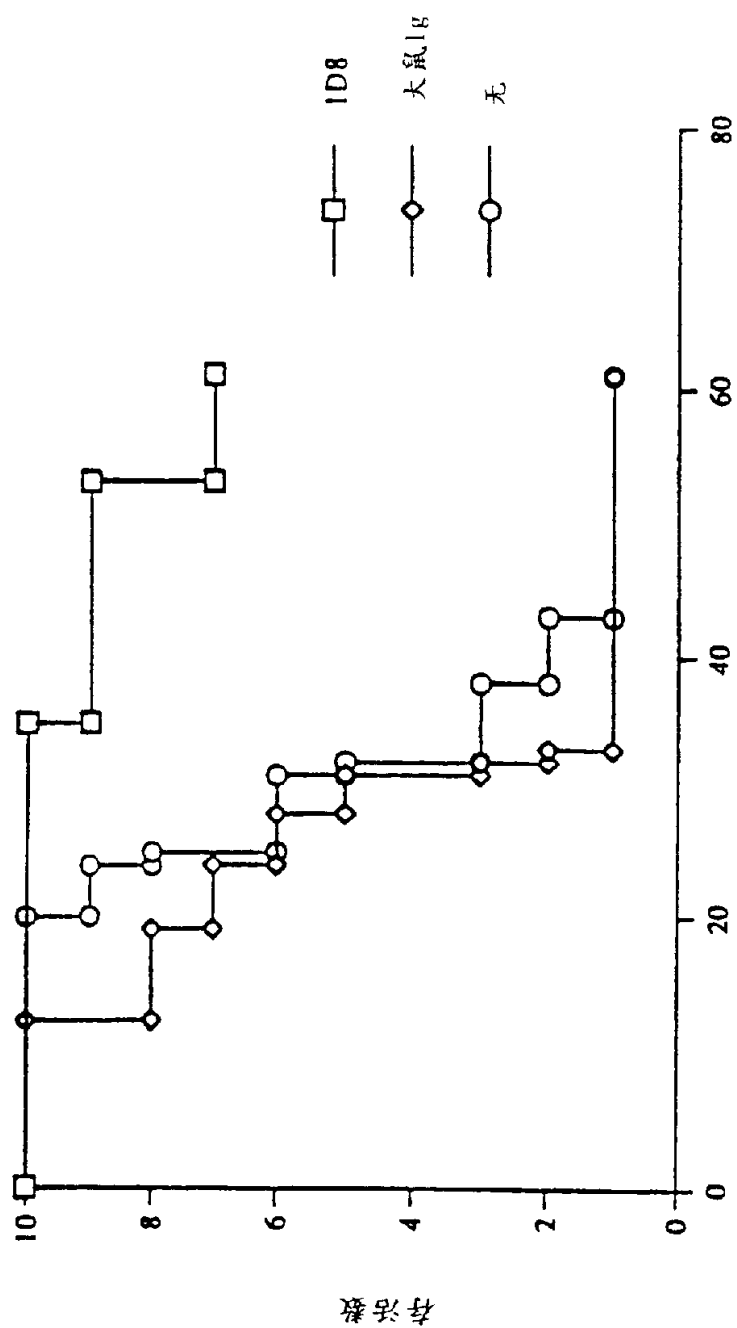


图10



注射肿瘤后的天数

图11

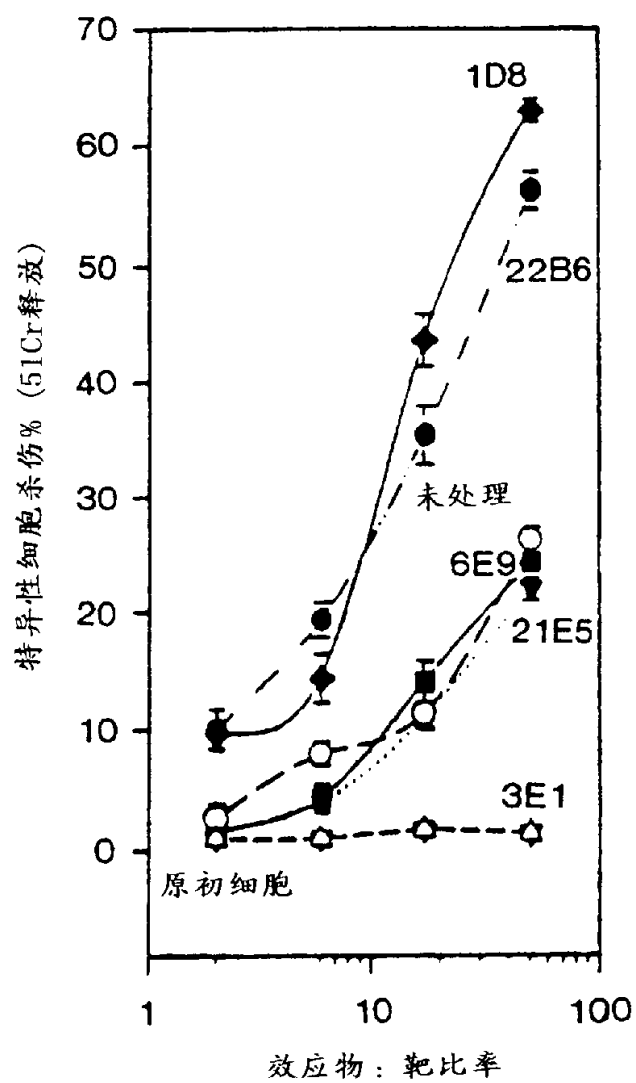


图12A

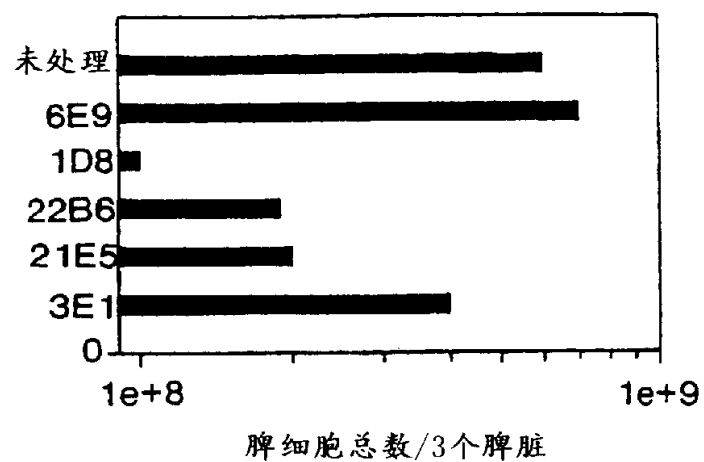


图12B

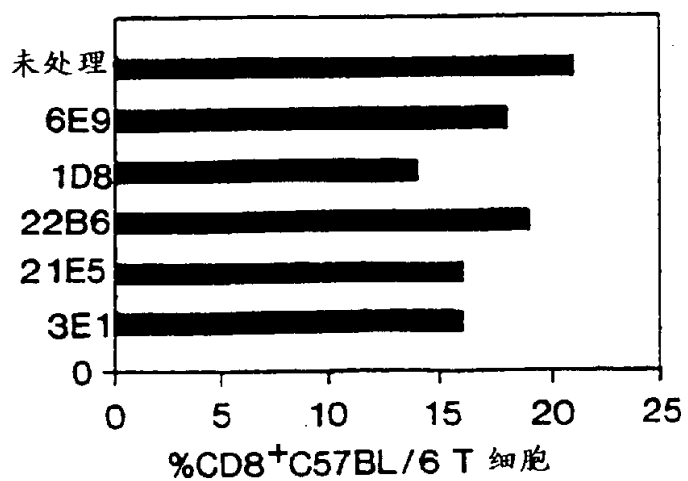


图12C

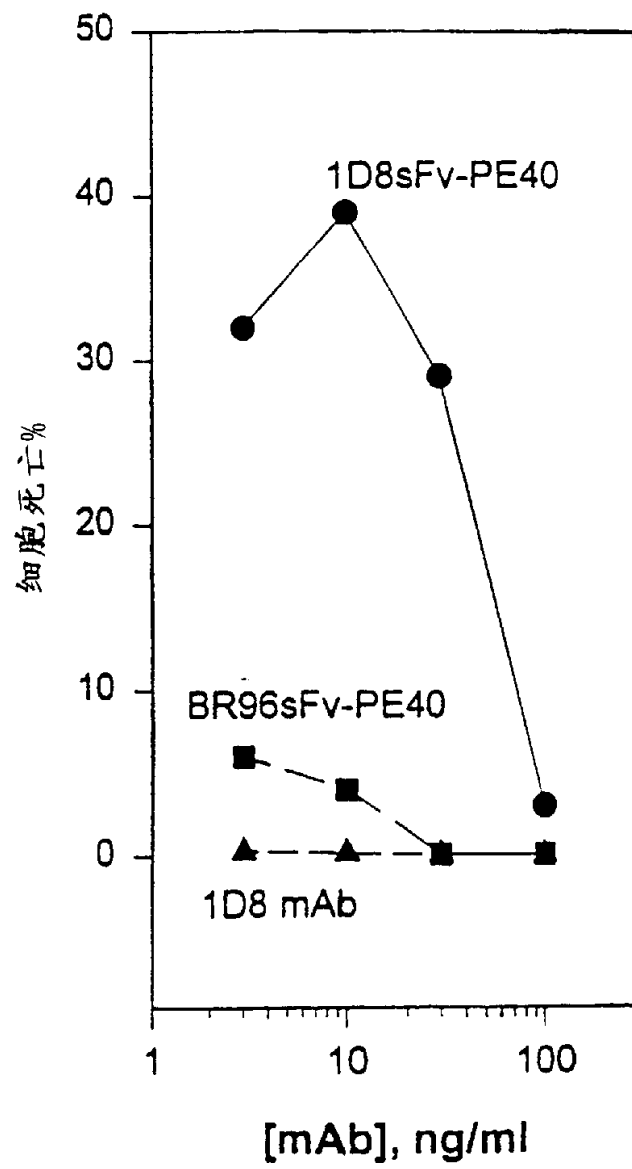


图 13

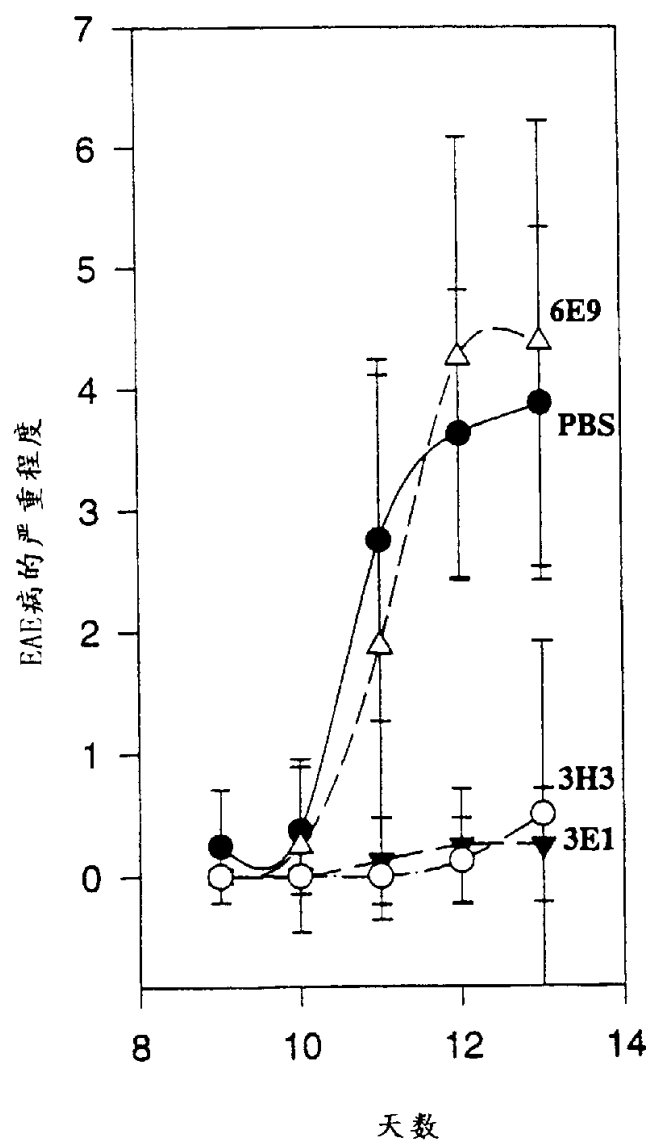


图14