



(12) 发明专利 (扉页更正)

(10) 授权公告号 CN 1452636 B8

(45) 授权公告日 2011.06.15

(48) 更正文献出版日 2011.10.12

(21) 申请号 01812490.9

A61K 47/48 (2006.01)

(22) 申请日 2001.05.08

G01N 33/569 (2006.01)

(30) 优先权数据

G01N 33/577 (2006.01)

60/203,126 2000.05.08 US

C12N 15/63 (2006.01)

60/230,739 2000.09.07 US

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 39/12 (2006.01)

2003.01.08

A61P 31/00 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

PCT/US2001/015114 2001.05.08

A61P 37/00 2006.01)

(87) PCT申请的公布数据

(56) 对比文件

W001/85798 EN 2001.11.15

KIRSCHNING E. Primary structure of the antigen-binding domain of a human oligodendrocyte-reactive IgM monoclonal antibody derived from a patient with multiple sclerosis. 《journal of neuroimmunology》. 1999, 第99卷(第1期), 125.

(73) 专利权人 赛尔德克斯医疗公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 Y·M·德奥 T·凯勒 J·特拉姆

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

ASAKURA K. Targeting of IgM kappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination. 《journal of neuroscience》. 1998, 第18卷(第19期), 7701-7703.

审查员 吴希哲

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 41 页

序列表 4 页 附图 10 页

(54) 发明名称

抗树突细胞的人单克隆抗体

(57) 摘要

公开了特异性结合树突细胞的分离的人单克隆抗体及其抗原结合部分。还公开了包括所述抗体或抗体部分的双特异性物质、免疫毒素和抗原结合物。所述人抗体可以在能够通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生多种人单克隆抗体同种型的诸如转基因小鼠的非人转基因动物中产生。还公开了含有所述人抗体的药用组合物,产生所述人抗体的非人转基因动物和杂交瘤,以及使用所述人抗体的治疗方法和诊断方法。

1. 一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合人树突细胞上的人巨噬细胞甘露糖受体,其重链可变区和轻链可变区分别由如 SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列组成。

2. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体结合来源于单核细胞或祖干细胞的细胞。

3. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它不结合来源于选自皮肤、扁桃体、肝脏、乳腺、脾脏、肾脏、淋巴结、脑、睾丸、胰腺、心脏、小肠、骨髓和肺的人体组织的非树突细胞。

4. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它调节人树突细胞的至少一种活性。

5. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它活化人树突细胞。

6. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它诱导人树突细胞释放细胞因子。

7. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它抑制病原体对甘露糖受体的任选结合。

8. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它在结合树突细胞之后被内化。

9. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它与抗原结合时增强人树突细胞呈递抗原。

10. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体以至少 $10^7 M^{-1}$ 的结合亲和常数结合树突细胞。

11. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体以至少 $10^8 M^{-1}$ 的结合亲和常数结合树突细胞。

12. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体以 $10^{-3} S^{-1}$ 或更低的速度常数 K_{dis} 从树突细胞解离。

13. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其中抗体重链为 IgG1 或 IgG3 重链。

14. 权利要求 1 的人单克隆抗体或其抗原结合部分,它是抗体片段或单链抗体。

15. 一种包含连接于抗原的前述任意一项权利要求的人单克隆抗体或其抗原结合部分的分子复合物。

16. 权利要求 15 的分子复合物,其中所述抗原包括病原体成分。

17. 权利要求 15 的分子复合物,其中所述抗原包括肿瘤抗原或自身抗原。

18. 权利要求 15-17 的任意一项的分子复合物,其中所述复合物的抗体部分包含抗体片段或单链抗体。

19. 一种抗体结合物,包含连接于治疗剂的权利要求 1-14 任意一项的人抗体或其抗原结合部分。

20. 权利要求 19 的抗体结合物,其中治疗剂是细胞毒素。

21. 权利要求 19 的抗体结合物,其中治疗剂是放射性同位素。

22. 一种包含权利要求 1-14 任意一项的人抗体或其抗原结合部分和对靶细胞上的 Fc 受体或抗原的第二结合特异性的双特异性分子。

23. 权利要求 22 的双特异性分子,其中靶细胞选自肿瘤细胞、微生物病原体、病毒和病

毒感染的细胞。

24. 权利要求 22 的双特异性分子,其中第二结合特异性是人单克隆抗体或其抗原结合部分。

25. 一种包含权利要求 1-14、22-24 的任意一项的抗体、其抗原结合部分、或双特异性分子和可药用载体的组合物。

26. 权利要求 15-18 任意一项的分子复合物在制备用于在受试者体内将抗原导向于树突细胞的药物中的用途。

27. 权利要求 15-18 任意一项的分子复合物在制备用于在受试者体内诱导或增强针对一种抗原的免疫应答的药物中的用途。

28. 权利要求 27 的用途,其中免疫应答包括呈递作为 MHC-I 或 MHC-II 复合物的一个成分的抗原。

29. 权利要求 15-18 任意一项的分子复合物在制备用于免疫受试者的药物中的用途。

30. 权利要求 26-29 任意一项的用途,其中该药物中所含分子复合物的量足以诱导树突细胞释放细胞因子。

31. 权利要求 26-29 任意一项的用途,其中该药物中所含分子复合物的量足以调节树突细胞表面一种或多种免疫调节受体的表达。

32. 权利要求 31 的用途,其中免疫调节受体选自:CD80 (B7. 1)、CD86 (B7. 2)、CD40 和 CD54 (ICAM)。

33. 权利要求 1-14 任意一项的人抗体或其抗原结合部分在制备用于防止病原体结合树突细胞上的人甘露糖受体的药物中的用途。

34. 权利要求 33 的用途,其中所述病原体是病毒或细菌。

35. 权利要求 19 的免疫结合物在制备用于抑制受试者体内肿瘤生长的药物中的用途。

36. 权利要求 19 的免疫结合物在制备用于治疗或预防受试者自身免疫病的药物中的用途。

37. 权利要求 36 的用途,其中所述疾病是移植物抗宿主疾病。

38. 一种表达载体,含有由 SEQ ID NO :3 组成的编码重链可变区的核苷酸序列,以及由 SEQ ID NO :1 组成的编码轻链可变区的核苷酸序列。

39. 一种表达载体,含有编码由氨基酸序列 SEQ ID NO :4 组成的重链可变区以及由氨基酸序列 SEQ ID NO :2 组成的轻链可变区的核苷酸序列。

40. 一种核酸,其由编码 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :4 所示氨基酸序列的核苷酸序列组成。

抗树突细胞的人单克隆抗体

[0001] 发明背景

[0002] 树突细胞是免疫系统的特化细胞,它具有启动初次和再次 T 和 B 淋巴细胞反应的独特能力。树突细胞被确定为专用抗原呈递细胞 (APCs),表达 MHC 和启动初始 T 淋巴细胞所必需的共同刺激分子。树突细胞的这种独特特征又被称为“天然佐剂”,引起了人们的极大兴趣,人们试图了解它在自身免疫病中的可能作用,以及将其用于各种疾病的免疫治疗的潜力。

[0003] 树突细胞培养的最新进展业已大大地增加了我们对这种复杂类型的细胞的了解。有若干种类型的树突细胞,它们的不同表现在谱系,在组织中的位置,表型和功能方面。与 T 淋巴细胞关系最密切的用于启动免疫应答类型的树突细胞,是来源于骨髓的树突细胞。源于骨髓的树突细胞还可以进一步划分成 1) 胸腺树突细胞,这种细胞是淋巴来源的,并且表现出专门参与消除成熟中的 T 淋巴细胞,2) 朗格罕氏细胞,它是骨髓谱系的,并且在皮肤中具有特殊的 APC 功能,和 3) 源于骨髓谱系的树突细胞,特别存在于血液、脾脏和淋巴节中。

[0004] 源于骨髓谱系的树突细胞(包括朗格罕氏细胞)的特征如下:1) 摄取抗原并且加工以便呈递的能力,2) 在组织中选择性迁移的能力,和 3) 直接刺激 T 淋巴细胞(初始的和已激活的)的能力。

[0005] 尽管在鉴定树突细胞方面取得了以上最新进展,但是,对树突细胞特异性受体或分子的了解还非常少。存在多种与其他骨髓和非骨髓细胞共同拥有的与树突细胞相关的分子,不过,可以获得的对树突细胞特异的反应物非常有限。能与树突细胞特异性或优先反应的反应物,特别是抗体具有作为诱导针对肿瘤或传染性疾病的抗原的有效免疫应答的导向剂的巨大潜力。还可以对这种细胞特异性导向剂进行工程改造,以便输送毒素,消除骨髓和器官移植或其他自身免疫病中的有效的 APCs(例如,树突细胞)。

[0006] 因此,树突细胞特异性结合剂具有巨大的治疗和诊断价值。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了特异性结合抗原呈递细胞 (APCs),特别是树突细胞的分离的人单克隆抗体,以及含有所述抗体的组合物,所述抗体是唯一的或者与其他治疗或诊断试剂组合(例如,混合或连接)。因此,本发明的抗体和组合物可用于多种树突细胞定向治疗,例如,影响抗原呈递或治疗 APC 介导的疾病。

[0009] 在某些实施方案中,所述人抗体的特征是具有对树突细胞的高结合亲和力,以及通过导向分子或对树突细胞具有特定功能的细胞(例如,肿瘤细胞、细菌、病毒、效应细胞)影响树突细胞生长和/或功能的能力。因此,本发明的人单克隆抗体能够在体内和体外被用作诊断或治疗剂。

[0010] 在其他实施方案中,所述人抗体的特征是能结合树突细胞上的特殊的新型表位(例如,受体)。在另一些实施方案中,所述人抗体的特征是能结合巨噬细胞甘露糖受体或相关受体。

[0011] 本发明分离的人抗体包括各种抗体同种型,如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE。通常,所述抗体包括 IgG1(例如, IgG1 κ) 和 IgM 同种型。所述

抗体可能具有完整长度（例如，IgG1 或 IgG4 抗体）或者可能只包括抗原结合部分（例如，Fab、F(ab')₂、Fv 或单链 Fv 片段）。在一种实施方案中，所述人抗体是重组人抗体。在另一种实施方案中，所述人抗体是通过杂交瘤产生的，该杂交瘤包含与永生化细胞融合的 B 细胞，该 B 细胞从具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因非人动物，诸如转基因小鼠体内获得。

[0012] 本发明的特定的人抗体包括由在本文中被称为 A3、A5、A23、A24、A33、B9、B11、B33、B47、C8、C10、C20、C28、C29、C30、C35、E1、E8、E10、E18、E20、E21 和 E24 的杂交瘤产生的人抗体。

[0013] 在另一种实施方案中，本发明的人抗体的特征是特异性结合树突细胞以及具有下列特征中的一种或多种：

[0014] a) 结合亲和常数为至少大约 10^7M^{-1} ，优选大约 10^9M^{-1} ，更优选 10^{10}M^{-1} – 10^{11}M^{-1} 或更高。

[0015] c) 缔合常数 (K_{assoc}) 至少为大约 10^3 ，更优选大约 10^4 ，最优选大约 $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ；

[0016] d) 解离常数 (K_{dis}) 为大约 10^{-3}s^{-1} ，优选大约 10^{-4}s^{-1} ，更优选 10^{-5}s^{-1} ，最优选 10^{-6}s^{-1} ；

[0017] e) 调理树突细胞的能力；

[0018] f) 在与树突细胞结合之后内化的能力；

[0019] g) 原位（例如，在人组织中）结合树突细胞的能力；

[0020] h) 活化树突细胞的能力（例如，诱导细胞因子释放，表达免疫调节表面分子）；或

[0021] i) 在浓度大约为 10 微克 / 毫升或更低的人效应细胞存在的条件下，抑制生长和 / 或介导吞噬作用以及杀死树突细胞的能力（例如，在体外）。

[0022] 在一种实施方案中，本发明的分离的人抗体与树突细胞结合的亲和常数为至少大约 10^7M^{-1} ，优选大约 10^8M^{-1} ，更优选大约 10^9M^{-1} ，更优选大约 10^{10} – 10^{11}M^{-1} 或更强。

[0023] 在另一方面，本发明提供了编码本发明抗体或抗原结合部分的核酸分子。因此，本发明还包括含有本发明抗体编码核酸的重组表达载体，和用所述载体转染过的宿主细胞，以及通过培养所述宿主细胞制备本发明的抗体的方法。

[0024] 在另一方面，本发明提供了源于诸如转基因小鼠的转基因非人动物的分离的 B 细胞，它能表达特异性结合树突细胞的人单克隆抗体的各种同种型（例如，IgG、IgA 和 / 或 IgM）。所述分离的 B 细胞优选是从已用纯化的或富集的树突细胞制剂免疫过的转基因非人动物体内获得的，例如转基因小鼠。所述诸如转基因小鼠的转基因非人动物优选具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组。然后将所分离的 B 细胞永生化，以便提供抗树突细胞的人单克隆抗体的来源（例如，杂交瘤）。

[0025] 因此，本发明还提供了能够产生特异性结合树突细胞的人单克隆抗体的杂交瘤。在一种实施方案中，该杂交瘤包含与永生化细胞融合的从在其基因组中包含人重链转基因和人轻链转基因的转基因非人动物，诸如转基因小鼠体内获得的 B 细胞。可以用纯化的或富集的树突细胞制剂对所述转基因非人动物进行免疫，以便制备产生抗体的杂交瘤。本发明的特定杂交瘤包括 A3、A5、A23、A24、A33、B9、B11、B33、B47、C8、C10、C20、C28、C29、C30、C35、E1、E8、E10、E18、E20、E21 和 E24。

[0026] 在另一方面，本发明提供了诸如转基因小鼠的转基因非人动物（在本文中又被称为“HuMab”），它能表达特异性结合树突细胞的人单克隆抗体。在一种特定实施方案中，所述转基因非人动物是具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因小鼠。用纯

化的或富集的树突细胞制剂对所述转基因非人动物进行免疫。诸如转基因小鼠的转基因非人动物优选能够通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生抗树突细胞人单克隆抗体的多种同种型（例如，IgG、IgA 和 / 或 IgM）。例如，同种型转换可以通过经典的或非经典的同种型转换完成。

[0027] 在另一方面，本发明提供了用于产生与树突细胞特异性起反应的人单克隆抗体的方法。在一种实施方案中，该方法包括用纯化的或富集化的树突细胞制剂对诸如转基因小鼠的具有包含人重链转基因和人轻链转基因的基因组的转基因非人动物进行免疫。然后获得所述动物的 B 细胞（例如，脾 B 细胞），并且与骨髓瘤细胞融合，以便产生能分泌抗树突细胞的人单克隆抗体的永生化杂交瘤细胞。

[0028] 可以将本发明的分离的抗树突细胞人单克隆抗体或其抗原结合部分衍生化，或者与另一种功能性分子，例如，另一种肽或蛋白（例如，Fab' 片段）连接。例如，本发明的抗体或抗原结合部分能够功能性地连接于诸如一种或另一种抗体（例如，双特异性或多特异性抗体）的一种或多种其他分子实体上。因此，在一方面，本发明描述了与一种治疗成分结合的人抗树突细胞抗体或其片段，例如，所述治疗成分可以是细胞毒性药物，酶促活性毒素，或其片段，放射性同位素，或小分子，例如，免疫调节（例如，抗炎）化合物或抗癌药物。

[0029] 本发明的人抗树突细胞抗体还可以与一种抗原连接，以便所述抗原导向于内化、加工并呈递抗原的树突细胞。例如，所述抗原可以是肿瘤细胞抗原，微生物抗原，病毒抗原或自身抗原。

[0030] 在另一方面，本发明提供了一种用于在受试者体内诱导或增强对一种抗原（例如，肿瘤细胞抗原，微生物抗原或病毒抗原）的免疫应答的方法，该方法包括给予所述受试者一种分子复合物，该复合物包含与至少一种抗原连接的对树突细胞表面上的一种成分的至少一种结合特异性，其中，所述树突细胞表面上的成分在通过所述结合特异性结合之后，能介导所述分子复合物的内化。在一种实施方案中，所述免疫应答包括与所述抗原结合的抗体。在另一种实施方案中，所述免疫应答包括与作为 MHC-I 或 MHC-II 复合物成分的抗原结合的 T 细胞。

[0031] 在一方面，可以将所述抗树突细胞抗体或其片段用于将整个细胞（例如，肿瘤细胞、效应细胞）或病原体导向于树突细胞，以便诱导免疫应答。在一种实施方案中，可以用本发明的编码人抗树突细胞抗体的核酸分子转染或转导一种细胞，以便在所述细胞表面表达抗树突细胞抗体。在另一种实施方案中，可以将本发明的人抗树突细胞抗体直接以化学方式或其他方式交联、锚定或附加在一种细胞（例如，肿瘤细胞、细菌或病毒）的细胞表面上，以便该细胞能被导向于树突细胞。

[0032] 在另一方面，本发明提供了一种用于对受试者进行免疫的方法，该方法包括给所述受试者服用有效量的分子复合物，该复合物包含与至少一种抗原连接的对树突细胞表面上的成分的结合特异性，其中，所述树突细胞表面上的成分在通过所述结合特异性结合之后，能介导所述分子复合物的内化。

[0033] 在另一方面，本发明描述了一种双特异性或多特异性分子，该分子包含至少一种对树突细胞的第一结合特异性，和对诸如人 Fc γ RI 或人 Fc α 受体的 Fc 受体的第二结合特异性。另一方面，本发明提供了一种双特异性或多特异性分子，该分子包含至少一种对树突细胞的第一结合特异性，和对靶细胞上的一种抗原的第二结合特异性。靶细胞是这样一种

细胞,它的消除会有利于宿主,例如,肿瘤细胞、微生物病原体或病毒或病毒感染的细胞。

[0034] 本发明的多特异性分子还包括三特异性、四特异性和其他多特异性分子。在一种实施方案中,所述多特异性分子包括抗增强因子(EF)部分,例如,与参与细胞毒性活性的表面蛋白结合分子。

[0035] 在一种具体实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包含至少一种抗体或其片段(例如,Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv)。在一种具体实施方案中,所述抗体或其片段是完整的人抗体或其部分,或“嵌合的”或“人源化的”抗体或其部分(例如,具有可变区,或至少一个源于非人抗体(例如,鼠类)的互补决定区(CDR),其余部分是来源于人的)。

[0036] 在一种实施方案中,所述双特异性或多特异性分子中的至少一种抗体或其片段结合于Fc受体上,如人IgG受体,例如,Fc-γ受体(FcγR),如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、和FcγRIII(CD16)。优选的Fcγ受体是高亲和力Fc受体——FcγRI。不过,诸如人IgA受体的其他Fc受体(例如,FcαRI)同样可以导向。Fc受体优选位于效应细胞表面,例如,单核细胞、巨噬细胞或活化的多型核细胞。在一种优选实施方案中,所述双特异性和多特异性分子与Fc受体的结合位点不同于该受体的免疫球蛋白Fc(例如,IgG或IgA)结合位点。因此,所述双特异性和多特异性分子的结合不会受到生理学水平的免疫球蛋白的阻断。

[0037] 在另一方面,本发明提供了定向特异性效应细胞,它包括与本发明的双特异性或多特异性分子连接的能表达Fc受体的诸如巨噬细胞或活化的PMN细胞的效应细胞,所述分子通过效应细胞的Fc受体与其结合,并且还和树突细胞结合,以便将效应细胞导向树突细胞。

[0038] 在另一方面,本发明提供了诸如药用和诊断组合物的组合物,该组合物包含可以药用的载体,以及至少一种能特异性结合树突细胞的本发明的人单克隆抗体,或其抗原结合部分。在一种实施方案中,所述组合物包含所述人抗体或其抗原结合部分的组合,优选各自与不同的表位结合。例如,含有能在效应细胞存在的情况下介导对树突细胞的高效杀伤活性的人单克隆抗体的药用组合物,可以与能抑制树突细胞生长的另一种人单克隆抗体组合。因此,这种组合提供了多种特别制订的治疗方法,以便提供最好的治疗效果。组合物,例如,包含本发明的至少一种人单克隆抗体或其抗原结合部分,以及至少一种本发明的双特异性或多特异性分子或其他治疗剂(例如,细胞毒性剂)的药用组合物也属于本发明的范畴。

[0039] 在另一方面,本发明提供了利用本发明的抗体或其抗原结合部分(或双特异性或多特异性抗体)通过诸如人多型核细胞(PMNs)、单核细胞和巨噬细胞的人效应细胞,通过抑制生长和/或通过诱导吞噬作用和/或杀死树突细胞而抑制树突细胞增殖和/或分化的方法。在一种实施方案中,所述方法包括在体外或体内,在存在人效应细胞的条件下,让树突细胞与本发明的一种人单克隆抗体或人单克隆抗体的组合或其抗原结合部分接触。所述方法可用于诸如体外或来自体内的培养物(例如,包含树突细胞和效应细胞的培养物)。例如,可以在体外培养含有树突细胞和效应细胞的样品,并且与本发明的抗体或其抗原结合部分(或本发明的双特异性或多特异性分子)组合。另外,所述方法还可以在受试者体内实施,例如,作为体内(例如,治疗或预防)方案的一部分。

[0040] 对于体内方法来说,可以给予患有树突细胞介导的疾病的人类受试者所述抗体或其抗原结合部分(或本发明的双特异性或多特异性分子)。例如,所述疾病包括自身免疫病、炎性疾病和移植物抗宿主疾病。可以用本发明的方法和组合物治疗(例如,缓解)或预防的代表性自身免疫病包括,但不限于类风湿性关节炎,多发性硬化、糖尿病、重症肌无力、恶性贫血、Addison 氏病、红斑狼疮、Reiter 综合症和 Graves 病。

[0041] 在一种实施方案中,所述受试者还可以用一种调节,例如,增强或抑制诸如 Fc α 受体或 Fc γ 受体的 Fc 受体表达或活性的制剂进行治疗,例如,通过用一种细胞因子治疗所述受试者。在用双特异性和多特异性分子治疗期间使用的优选细胞因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、干扰素 γ (IFN- γ)、和肿瘤坏死因子(TNF)。

[0042] 本发明的分离的人单克隆抗体组合物还可以与诸如抗炎或免疫抑制治疗或细胞毒素的其他治疗一起组合使用。

[0043] 在另一方面,本发明提供了一种用于体外或体内检测样品中树突细胞存在的方法,例如,用于诊断树突细胞相关疾病。在一种实施方案中,这一目的是通过在所述抗体和树突细胞之间能形成复合物的条件下,让本发明的人单克隆抗体或其抗原结合部分(或双特异性或多特异性分子)与待检测样品和对照样品接触而实现的。然后检测(例如,通过 ELISA 检测)在这两种样品中所形成的复合物,这两种样品之间在复合物形成方面的任何统计学上的显著差异,都表明测试样品中存在树突细胞。

[0044] 通过以下详细说明和权利要求书,可以理解本发明的其他特征和优点。

[0045] 附图简述

[0046] 图 1 表示通过流式细胞仪测定的人单克隆抗体 B11、C20 和 E21 与树突细胞和造血细胞系 U937、CEM、THP-1 和 L540 之间的反应性。结合是通过平均荧光强度测定的。

[0047] 图 2 表示通过流式细胞仪测定的人单克隆抗体 B11、C20 和 E21 与树突细胞的剂量决定性结合。结合是通过平均荧光强度测定的。

[0048] 图 3 表示通过流式细胞仪测定的人单克隆抗体 B11 与 CD34+ 干细胞衍生的树突细胞的剂量决定性反应性。结合是通过平均荧光强度测定的。

[0049] 图 4 表示通过流式细胞仪测定的人单克隆抗体 B11 与树突细胞和巨噬细胞的结合。

[0050] 图 5 表示通过流式细胞仪测定的人单克隆抗体 B11 与被诱导分化成树突细胞表型的 THP-1 的结合。

[0051] 图 6 表示通过流式细胞仪测定的人单克隆抗体 B11 与猕猴树突细胞的结合。结合是通过平均荧光强度测定的。

[0052] 图 7 表示在 37°C 下,树突细胞随着时间推移将人单克隆抗体 B11 内化的百分比。

[0053] 图 8 表示与单独使用抗原相比,通过抗体 B11 增强的抗原呈递,是通过破伤风类毒素特异性 T 细胞刺激测定的。

[0054] 图 9 表示 B11ScFv 构建体,该构建体是通过连接人单克隆抗体 B11 的 V_L(SEQ ID NO :1 和 2) 和 V_H(SEQ ID NO :3 和 4) 结构域而产生的。

[0055] 图 10 表示完整人单克隆抗体 B11 和 B11 的 F(ab')₂ 片段与树突细胞结合的比较,是通过 FACS 分析测定的。

[0056] 图 11 表示树突细胞将 FITC 葡聚糖内化的百分比。

[0057] 图 12 表示抗原与 B11 的结合增强抗原呈递, 因为使用低 10-100 倍量的抗体 B11 结合的破伤风类毒素, 就能获得与单独使用破伤风类毒素相同水平的 T 细胞刺激。

[0058] 图 13 表示抗体 B11 的可变轻链 (VL) 和可变重链 (VH) 的核苷酸序列和相应的氨基酸序列。

[0059] 发明详述

[0060] 本发明提供了用于调节对抗原的免疫应答, 并且用于治疗 and 诊断由树突细胞介导的疾病的新的基于抗体的治疗方法。

[0061] 本发明的治疗方法采用分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分, 它结合存在于抗原呈递细胞 (APC) 上的表位, 特别是树突细胞和与其相关的细胞。在一种实施方案中, 所述人抗体是在诸如转基因小鼠的非人转基因动物体内产生的, 通过进行 V-D-J 重组和同种型转换可以产生抗树突细胞的人单克隆抗体的多种同种型 (例如, IgG、IgA 和 / 或 IgE)。因此, 本发明的各个方面包括人抗体、抗体片段和抗体模拟物, 其药用组合物, 以及非人转基因动物, 和用于制备所述单克隆抗体的 B- 细胞和杂交瘤。使用本发明的抗体在体外和体内检测树突细胞或能表达树突细胞抗原的相关类型的细胞, 或抑制树突细胞生长、分化和 / 或活性的方法也属于本发明的范畴。

[0062] 为了能更好地理解本发明, 首先对某些术语进行定义。其他定义在详细说明中提出。

[0063] 本文所使用的术语“树突细胞”包括未成熟的和成熟的树突细胞和能够分化成树突细胞的相关的骨髓祖细胞, 或能表达与树突细胞相同的抗原的相关的抗原呈递细胞 (例如, 单核细胞和巨噬细胞)。在本文中, 术语“相关的”包括源于共同的祖细胞或细胞谱系的细胞。在一种优选实施方案中, 本发明抗体与树突细胞的结合, 抑制树突细胞的生长。在另一种优选实施方案中, 本发明抗体与树突细胞的结合, 通过将具有特定功能的分子或细胞 (例如, 肿瘤细胞、效应细胞、微生物病原体) 导向树突细胞, 介导对树突细胞生长和 / 或功能的影响。在另一种实施方案中, 本发明抗体与树突细胞的结合导致所述树突细胞对所述抗体的内化。

[0064] 在本文中, 术语“抗体”表示包括通过二硫键相互连接的至少两个重 (H) 链和两个轻 (L) 链的糖蛋白。每一个重链由一个重链可变区 (在本文中缩写为 HCVR 或 VH) 和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域组成: CH1、CH2 和 CH3。每一个轻链由轻链可变区 (在本文中缩写为 LCVR 或 VL) 和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。所述 VL 和 VH 区可以进一步划分成被称为互补决定区 (CDR) 的高变区, 和散布在其中的被称为构架区 (FR) 的更保守的部分。每一个 VH 和 VL 由三个 CDRs 和四个 FRs 组成, 从氨基末端到羧基末端的排列顺序如下: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。所述重链和轻链的可变区包括与抗原相互作用的结合结构域。所述抗体的恒定区能介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合, 包括免疫系统的各种细胞 (例如, 效应细胞) 和经典补体系统的第一种成分 (C1q)。

[0065] 本文所使用的术语抗体的“抗原结合部分” (或者简称为抗体部分) 表示保留了与一种抗原 (例如, 树突细胞上的抗原) 特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。业已证实, 抗体的抗原结合功能可以通过完整长度抗体的片段实现。术语抗体的“抗原结合

部分”所包括的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段、由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的一价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，它是在铰链区通过二硫键连接的包括两个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体的一个臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；(v) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546)；和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。另外，尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是由分离的基因编码的，但可以利用重组方法通过合成的连接子将这两个基因结合在一起，以使它能够产生单一的蛋白链，其中，VL 和 VH 区配对形成一价分子（被称为单链 Fv (scFv)；例如，参见 Bird et al., 1988, Science 242:423-426；和 Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这种单链抗体同样被认为包括在术语抗体的“抗原结合部分”的含义范围内。所述抗体片段是利用本领域技术人员所公知的常规技术获得的，并且以筛选完整抗体的相同方法筛选所述片段的用途。

[0066] 术语“双特异性分子”意在包括诸如蛋白、肽、或蛋白或肽复合物的具有两种不同的结合特异性的任何制剂，例如，所述制剂能结合 (a) 树突细胞和 (b) 位于效应细胞表面上的 Fc 受体，或与之相互作用。在另一种实施方案中，本发明的双特异性分子具有两种不同的结合特异性，它能结合 (a) 树突细胞和 (b) 靶细胞（例如，肿瘤细胞）上的抗原，或与之相互作用。术语“多特异性分子”或“异特异性分子”意在包括诸如蛋白、肽、或蛋白或肽复合物的具有两种以上不同的结合特异性的任何制剂，例如，所述制剂能结合 (a) 树突细胞，(b) 效应细胞表面上的 Fc 受体，和 (c) 至少一种其他成分，或与之相互作用。因此，本发明包括，但不限于针对细胞表面抗原，如树突细胞抗原和针对效应细胞上的 Fc 受体或靶细胞（例如，肿瘤细胞）上的抗原的双特异性、三特异性、四特异性和其他多特异性分子。术语“双特异性抗体”进一步包括双抗体 (diabodies)。双抗体是二价双特异性抗体，其中，VH 和 VL 结构域是在单一的多肽链上表达的，但是所使用的连接子太短，以至于不能使这两个结构域在同一个链上配对，从而迫使这两个结构域与另一个链上的互补结构域配对，并产生两个抗原结合部位（例如，参见 Holliger, P., et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poljak, R. J. et al., 1994, Structure 2:1121-1123）。

[0067] 在本文中，术语“异源抗体”是指两种或两种以上抗体、抗体结合片段（例如，Fab）、其衍生物或连接在一起的抗原结合区，至少其中的两个具有不同的特异性。所述不同的特异性包括对树突细胞的结合特异性，和对效应细胞上的 Fc 受体或诸如肿瘤细胞的靶细胞上的抗原或表位的结合特异性。

[0068] 在本文中，术语“人抗体”意在包括具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变导入的突变）。不过，本文所使用的术语“人抗体”并不包括这样的抗体：其中，源于诸如小鼠的另一种哺乳动物的 CDR 序列业已嫁接到人构架序列上。

[0069] 本文所使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”表示具有单一分子组合物的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物表现出对一种特定表位的单一的结合特异性和亲和力。因此，术语“人单克隆抗体”表示具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的表现出单一结合特异性的抗体。在一种实施方案中，所述人单克隆抗体是通过杂交瘤产生的，所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的 B 细胞，该 B 细胞从具有包含人重链转基因和人

轻链转基因的基因组的转基因非人动物,诸如转基因小鼠获得。

[0070] 本文所述使用的术语“重组人抗体”意在包括通过重组方法制备、表达、创建或分离的所有人抗体,如从人免疫球蛋白基因的转基因动物(例如,小鼠)体内分离的抗体(在下面的 I 节中进一步说明);由转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体;从重组的组合人抗体文库中分离的抗体;或通过涉及到将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他 DNA 序列上的任何其他方法制备、表达、创建或分离的抗体。所述重组人抗体具有源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。不过,在某些实施方案中,要对所述重组人抗体进行体外诱变(或在使用人 I g 序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因此,所述重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列:尽管所述序列源于和关于人种系 VH 和 VL 序列,但是,它并非天然存在于体内的人抗体种系成分中。

[0071] 在本文中,“异源抗体”是相对产生这种抗体的转基因非人生物定义的。该术语表示这样一种抗体:该抗体的氨基酸序列或编码核酸序列相应于存在于不含所述转基因非人动物的生物中的序列,并且通常来自除了所述转基因非人动物之外的物种。

[0072] 在本文中,“异源杂合抗体”表示具有来自不同生物的轻链和重链的抗体。例如,具有与鼠类轻链结合的人重链的抗体就是异源杂合抗体。这种异源杂合抗体的例子包括嵌合抗体和人源化抗体,如上所述。

[0073] 本文所说的“分离的抗体”意在表示基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,能特异性结合树突细胞和相关的骨髓衍生的抗原呈递细胞(例如,单核细胞和巨噬细胞),并且基本上不含能特异性结合除了树突细胞以外类型的细胞的抗体)。不过,能特异性结合树突细胞的分离的抗体可能具有对其他细胞的交叉反应性,例如,能表达与树突细胞上的关联抗原相关的抗原的细胞类型。另外,分离的抗体可能基本上不含其他细胞材料和/或化合物。在本发明的一种实施方案中,在一种特定的组合物中将具有不同特异性的“分离的”单克隆抗体组合在一起。

[0074] 在本文中,术语“特异性结合”和“特异性结合于”表示抗体与预定抗原或细胞类型结合的特异性。“特异性结合于”一种特定抗原或细胞类型或对特定抗原或细胞类型“特异”的抗体,选择性地结合所述抗原或细胞类型,超过了对其他抗原和细胞类型的选择性。尽管本发明的每一种抗体特异性地结合特定的靶表位(例如,存在于树突细胞的表面上),在某些实施方案,本发明的特定抗体可能具有与其他 APCs 的某些交叉反应性。在其他实施方案中,所述特定抗体只与树突细胞起反应。通常,所述抗体的结合亲和力至少为大约 $1 \times 10^7 M^{-1}$,并且与所述预定抗原的结合亲和力比与除了所述预定抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原(例如,BSA,酪蛋白)的结合亲和力高至少 2 倍。在本文中,短语“识别一种抗原的抗体”和“对一种抗原特异的抗体”可以与术语“特异性结合一种抗原的抗体”交替使用。

[0075] 在本文中,IgG 抗体的“高亲和力”表示结合亲和力至少为大约 $10^7 M^{-1}$,优选至少大约 $10^9 M^{-1}$,更优选至少大约 $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ 或更高,例如,高达 $10^{13} M^{-1}$ 或更高。不过,对于其他抗体同种型来说,“高亲和力”结合可以变化。例如,IgM 同种型的“高亲和力”结合表示结合亲和力至少为大约 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 。

[0076] 本文所使用的术语“ K_{assoc} ”意在表示特定抗体-抗原相互作用的缔合常数。

[0077] 本文所使用的术语“ K_{dis} ”意在表示特定抗体-抗原相互作用的解离常数。

[0078] 在本文中,“同种型”表示由重链恒定区基因编码的抗体类型(例如,IgM 或 IgG1)。

[0079] 在本文中,“同种型转换”表示一种抗体的类型或同种型从一种 Ig 类型转变成另一种 Ig 类型的现象。

[0080] 在本文中,“非转换同种型”表示在没有发生同种型转换时所产生的重链的同种型类型;编码非转换同种型的 CH 基因通常是紧挨着功能性重排 VDJ 基因下游的第一个 CH 基因。业已将同种型转换划分成经典的或非经典的同种型转换。经典的同种型转换是通过重组事件发生的,它包括位于所述转基因上的至少一个转换序列区。非经典同种型转换可以通过诸如人 σ_{μ} 和 Σ_{μ} (δ -相关的缺失)之间的同源重组完成。其他的非经典转换机制,如转基因之间和/或染色体之间的重组也可能发生,并实现同种型转换。

[0081] 在本文中,术语“转换序列”表示负责转换重组的 DNA 序列。“转换供体”序列通常是一个 μ 转换区,它是在转换重组期间将要缺失的构建体区的 5' 末端(即上游)。“转换受体”区位于将要缺失的构建体区和置换的恒定区(例如, γ 、 ϵ 等)之间。由于不存在经常发生重组的特定位置,通常无法根据所述构建体预测最终的基因序列。

[0082] 在本文中,“糖基化形式”被定义为与蛋白,更特异的是与免疫球蛋白共价结合的碳水化合物单位的形式。当本领域普通技术人员认为异源抗体的糖基化形式与来自获得所述转基因的 CH 基因的物种相比更类似于所述非人转基因动物物种的糖基化形式时,它可以被鉴定为大体上类似于由所述非人转基因动物物种所产生的抗体上天然发生的糖基化形式。

[0083] 在本文中,用在一种物体上的术语“天然存在的”表示一种物体可以在自然界中找到的事实。例如,可以从天然来源分离,并且没有在实验室中做过人为有意修饰的、存在于一种生物(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0084] 本文所使用的术语“重排的”表示重链或轻链免疫球蛋白基因座的一种构象,其中,在编码基本完整的 VH 或 VL 结构域的构象中,V 片段的位置分别紧挨着 D-J 或 J 片段。可以通过与种系 DNA 比较确定重排的免疫球蛋白基因座。重排的基因座具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源因子。

[0085] 在本文中,提到 V 片段时使用的术语“未重排的”或“种系构象”表示这样一种构象,其中,V 片段不是重组的,以便它紧挨着 D 或 J 片段。

[0086] 在本文中所使用的术语“核酸分子”意在包括 DNA 和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的,不过优选双链 DNA。

[0087] 在本文中,在提到编码与树突细胞结合的抗体或抗体部分(例如,VH、VL、CDR3)的核酸时所使用的术语“分离的核酸分子”意在表示这样一种核酸分子,其中,编码所述抗体或抗体部分的核苷酸序列,不含编码能结合除了树突细胞以外的其他细胞的抗体或抗体部分的其他核苷酸序列,所述其他序列可能天然存在于人基因组 DNA 上的核酸旁侧。

[0088] 对于核酸来说,术语“基本同源性”表示在对两种核酸或其设计的序列进行优化排列和比较时,在具有适当的核苷酸插入和缺失情况下,其核苷酸的相同性至少为大约 80%,通常至少为大约 90-95%,更优选至少为大约 98-99.5%。另外,当所述片段能在选择性杂交条件下与所述链的互补体杂交时,就存在基本同源性。

[0089] 两种序列之间的相同性百分比是这两种序列所分享的相同位点的数量的函数(即%同源性=相同位点的数量/位点的总数量 \times 100),考虑到了为了对这两种序列进行

优化比对而需要引入的空位数量和每一个空位的长度。两种序列之间的序列比较和相同性百分比的确定,可以利用在下面的非限定实施例中所公开的数学计算方法完成。

[0090] 两种核苷酸序列之间的相同性百分比可以利用 GCG 软件包中的 GAP 程序(可以从 <http://www.gcg.com> 获得)确定,使用 NWSgapdna, CMP 矩阵和空位权数为 40、50、60、70 或 80,长度权数为 1、2、3、4、5 或 6。两种核苷酸或氨基酸序列之间的相同性百分比还可以用 E. Meyers 和 W. Miller 的计算方法确定 (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988),该方法业已整合到 ALIGN 程序(2.0 版)中,使用 PAM120 加权残基表,空位长度罚分为 12,而空位罚分为 4。另外,两种氨基酸序列之间的相同性百分比可以用 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970) 计算方法确定,该方法业已整合到 GCG 软件包中的 GAP 程序中(可以从 <http://www.gcg.com> 获得),使用 Blossum62 矩阵或 PAM250 矩阵,空位权数为 16、14、12、10、8、6 或 4,而长度权数为 1、2、3、4、5 或 6。

[0091] 还可以将本发明的核酸和蛋白序列用作“查询序列”对公共数据库进行检索,以便,例如,鉴定相关的序列。所述检索可以用 Altschul 等的 NBLAST 和 XBLAST 程序(2.0 版)完成(1990. J. Mol. Biol. 215:403-10)。BLAST 核苷酸检索可以通过 NBLAST 程序完成,得分等于 100,字长等于 12,以便获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白检索可以通过 XBLAST 程序完成,得分 = 50,字长 = 3,以便获得与本发明蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有空位的排列,可以使用 Altschul 所公开的空位 BLAST(1997, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402)。在采用 BLAST 和空位 BLAST 程序时,可以使用相应程序(例如, XBLAST 和 NBLAST)的预设参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0092] 所述核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中,或者以部分纯化或基本上纯化的形式存在。当通过标准技术使核酸从诸如其他细胞核酸或蛋白的其他细胞成分或其他污染物中纯化出来时,它就是“分离的”或“成为基本上纯的”,所述标准技术包括碱/SDS 处理,氯化铯显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其他技术。参见 F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987。

[0093] 尽管本发明的核酸组成通常是来自 cDNA 基因组或混合物的天然序列(修饰过的限制位点等除外),可以用标准技术对其进行诱变,以便提供基因序列。对于编码序列来说,所述诱变可以按照需要影响氨基酸序列。具体地讲,包括大体上同源于或源于本文所公开的天然 V、D、J、恒定、转换和其他诸如此类的序列的 DNA 序列(其中,“源于”表示一种序列与另一种序列相同或者是由另一种序列修饰而成)。

[0094] 术语“操作性连接”或“可操作地连接”意在表示有关分子功能性地彼此偶联在一起,即一种分子的活性或状态的改变受其他分子的活性或状态的影响。当一种核酸分子与另一种核酸序列呈功能性关系时,它们就是“可操作地连接”的。例如,如果启动子或增强子能影响编码序列的转录的话,它们就是与编码序列可操作地连接的。就转录调控序列而言,可操作地连接意味着所连接的 DNA 序列是相邻的,并且有必要连接两个蛋白编码区,相邻并且存在于读框内。对于转换序列来说,可操作地连接表示有关序列能够进行转换重组。通常,可操作地连接的两种多肽是通过肽键共价连接的。

[0095] 在本文中,所使用的术语“载体”意在表示能够转运业已连接在它上面的另一种核

酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”，它表示在它上面可以连接其他 DNA 片段的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中，可以将其他 DNA 片段连接在病毒基因组上。某些载体能够在导入了这种载体的宿主细胞中自主复制（例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体（例如，非附加型哺乳动物载体）在导入宿主细胞时能够整合到宿主细胞的基因组中，并因此与宿主基因组一起复制。另外，某些载体能够指导与它可操作地连接的基因的表达。在本文中，所述载体被称为“重组表达载体”（或简单地称之为“表达载体”）。一般，应用于重组 DNA 技术中的表达载体通常是质粒形式的。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以交替使用，因为质粒是最常使用载体的形式。不过，本发明还包括所述其他形式的表达载体，如病毒载体（例如，复制缺陷型逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒），这些病毒具有等同的功能。

[0096] 本文所使用的术语“重组宿主细胞”（或简单地称之为宿主细胞）意在表示业已导入了重组表达载体的细胞。应当理解的是，所述术语不仅仅表示特定的受试者细胞，而且还包括所述细胞的后代。由于在延续的世代中因为突变或环境影响可能发生某些修饰，事实上，所述后代可能与亲代细胞不相同，但这种细胞仍然属于本文所使用的术语“宿主细胞”的范围。

[0097] 在下面的各小节中将对本发明的各个方面作更详细的说明。

[0098] I. 产生抗树突细胞的人抗体

[0099] 尽管在本文中详细公开了产生本发明的人单克隆抗体 (mAbs) 的特别优选的方法，不过也可以使用多种其他技术，包括传统的单克隆抗体方法，例如，Kohler 和 Milstein 的标准体细胞杂交技术 (Nature 256 :495, 1975)。尽管体细胞杂交方法是优选的，但也可以采用产生单克隆抗体的其他技术，例如，B 淋巴细胞的病毒或致癌转化。

[0100] 用于制备杂交瘤的优选动物体系是鼠类体系。在鼠类体系中进行杂交瘤产生是一种业已完善的方法。免疫方案和分离用于融合的免疫过的脾细胞的技术为本领域所公知。融合配偶体（例如，鼠骨髓瘤细胞）和融合方法同样是众所周知的。

[0101] 在一种优选实施方案中，抗树突细胞的人单克隆抗体是用具有所述人免疫系统一部分而不是小鼠系统的转基因小鼠产生的。在本文中被称为“HuMAb”小鼠的所述转基因小鼠含有编码未重排的人重链 (μ 和 γ) 和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座，同时还具有使内源 μ 和 κ 链基因座失活的定向突变 (Lonberg, N. et al., 1994, Nature 368 (6474) :856-859)。因此，所述小鼠表现出小鼠 IgM 或 κ 的表达减弱，并且在免疫应答时，所导入的人重链和轻链转基因发生类型转换和体细胞突变，产生高亲和力 LgG κ 单克隆 (Lonberg, N. et al., 1994, 同上 ; 综述见于 Lonberg, N. et al., 1994, Handbook of Experimental Pharmacology 113 :49-101 ; Lonberg, N. 和 Huszar, D. 1995, Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 :65-93, 和 Harding, F. 和 Lonberg, N., 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci 764 :536-546)。在下面的第 II 节和以下文献中详细公开了 HuMAb 小鼠的制备 : Taylor, L. et al., 1992, Nucleic Acids Research 20 :6287-6295 ; Chen, J. et al., 1993, International Immunology 5 :647-656 ; Tuailon et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :3720-3724 ; Choi. et al., 1993, Nature Genetics 4 :117-123 ; Chen, J. et al., 1993, EMBO J. 12 :821-830 ; Tuailon et al., 1994, J. Immunol. 152 :2912-2920 ; Lonberg et al., 1994, Nature 368 (6474) :856-859 ; Lonberg, N., 1994, Handbook of Experimental Pharmacology

113:49-101; Taylor, L. et al., 1994, International Immunology 6:579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. 1995, Intern. Rev. Immunol. Vol. 13:65-93; Harding, F. 和 Lonberg, N., 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D. et al., 1996, Nature Biotechnology 14:845-851, 所有文献的内容都以全文形式收作本文参考; 还可以参见美国专利 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; 和 5770429; 以上所有专利均属于 Lonberg 和 Kay 以及 GenPharm International; 属于 Surani 等的美国专利 5545807; 于 1988 年 6 月 11 日公开的国际公开号 W098/24884; 于 1994 年 11 月 10 日公开的 W094/25585; 于 1993 年 6 月 24 日公开的 W093/1227; 于 1992 年 12 月 23 日公开的 W092/22645; 于 1992 年 3 月 19 日公开的 W092/03918; 以上所有专利的内容均以全文形式收作本文参考。

[0102] HuMab 免疫

[0103] 为了制备抗树突细胞的完整的人单克隆抗体, 可以通过以下文献所公开的方法用纯化的或富集的树突细胞制剂对 HuMab 小鼠进行免疫: Lonberg, N. et al., 1994 Nature 368(6474):856-859; Fishwild, D. et al., 1996, Nature Biotechnology 14:845-851 和 W094/24884。在第一次免疫接种时, 所述小鼠优选 6-16 周龄。例如, 可以通过腹膜内注射方式用纯化的或富集的树突细胞制剂 (1-10 百万细胞) 对 HuMab 小鼠进行免疫接种。在用纯化的或富集的树突细胞制剂进行免疫不能产生抗体时, 还可以用树突细胞的裂解物对小鼠进行免疫, 以便促进免疫应答。

[0104] 用各种抗原积累的经验业已表明, 用存在于完全弗氏佐剂中的抗原通过腹膜内注射 (IP) 进行初次免疫, 然后每隔一周用存在于非完全弗氏佐剂中的抗原进行 IP 免疫接种 (一共多达 6 次) 时, 所述 HuMab 转基因小鼠的免疫应答最强。在免疫接种过程中, 可以通过眼眶后取血获得的血浆样品监测免疫应答。可以通过诸如 ELISA 或流式细胞仪的方法对所述血浆进行筛选 (如下文公开的), 并且可以将具有足够的抗树突细胞人免疫球蛋白滴度的小鼠用于融合。在宰杀并取出脾脏之前 3 天, 通过静脉内注射, 用抗原对所述小鼠进行加强免疫。预计需要对每一种抗原进行 2-3 次融合。用每一种抗原对若干小鼠进行免疫。例如, 可以对 HC07 和 HC012 品系的一共 12 只 HuMab 小鼠进行免疫。

[0105] 制备产生抗树突细胞的人单克隆抗体的杂交瘤

[0106] 可以根据标准方案, 分离小鼠脾细胞, 并且通过 PEG 与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后对所得到的杂交瘤产生抗原特异性抗体的能力进行筛选。例如, 通过 50% 的 PEG 使来自免疫过的小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮液与 1/6 数量的 P3X63-Ag8.653 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL1580) 融合。以大约 2×10^5 的密度将细胞铺在平底微量滴定板上, 然后在选择培养基中孵育 2 周, 该培养基含有 20% 胎克隆血清, 18% “653” 条件培养基, 5% origen (IGEN), 4mM L-谷胺酰胺, 1mM L-谷胺酰胺, 1mM 丙酮酸钠, 5mM HEPES, 0.055mM 2-巯基乙醇, 50 单位 / 毫升青霉素, 50 毫克 / 毫升链霉素, 50 毫克 / 毫升庆大霉素和 $1 \times \text{HAT}$ (Sigma; HAT 是在融合之后 24 小时添加的)。2 周之后在 HAT 被 HT 取代的培养基中培养细胞。然后通过 ELISA 筛选每一个孔中的人抗树突细胞单克隆 IgM 和 IgG 抗体。一旦发生了广泛的杂交瘤的生长, 通常在 10-14 天之后对培养基进行观察。将抗体分泌杂交瘤重新铺平板, 再次筛选, 并且如果人 IgG 抗树突细胞单克隆抗体仍然呈阳性的话, 就可以通过限制稀释亚克隆至少 2 次。然后在体外培养稳定的亚克隆, 以便在组织培养基中制

备少量的抗体用于鉴定。

[0107] 人单克隆抗体与树突细胞结合的鉴定

[0108] 为了鉴定本发明的人单克隆树突细胞抗体的结合,可以筛选杂交瘤,例如,通过流式细胞仪筛选与树突细胞的阳性反应。

[0109] 简单地讲,收获并洗涤树突细胞,然后添加到 96 孔平板上,并且在 4°C 下与杂交瘤上清液的稀释液(或存在于含有 0.1% Tween80 和 20% 小鼠血清的 PBS 中的单克隆抗体)一起孵育 1 小时。然后洗涤所述平板,并在 4°C 下用第二抗体(例如, FITC 或 PE- 标记过的抗人 IgG)再孵育 1 小时。在洗涤之后,用 1% 的低聚甲醛固定细胞,并进行分析。可以通过 FACSscan 仪器利用单细胞上的光散射和侧面散射特性分析所述样品。可以使用荧光显微镜的其他测定方法,作为流式细胞仪测定的补充或替代。可以按上述方法对细胞进行染色,并且通过荧光显微镜检查。该方法可以观察单细胞,但取决于抗原密度,灵敏度可能降低。

[0110] 对能以高亲和力与树突细胞结合的杂交瘤进行亚克隆,并作进一步的鉴定。可以选择每一种杂交瘤的保留了亲本细胞反应性的一个克隆(通过流式细胞仪选择)以便制备 5-10 小瓶细胞库,在 -140°C 下保存,并用于抗体纯化。

[0111] 为了纯化人抗树突细胞抗体,选择的杂交瘤可以在 2 升旋转烧瓶中生长,用于单克隆抗体纯化。在用蛋白 A- 琼脂糖 (Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行亲和层析之前,可以对上清液进行过滤并浓缩。可以通过凝胶电泳和高效液相层析检查洗脱的 IgG, 以确保其纯度。可以将所述缓冲液换成 PBS, 并且可以通过 OD₂₈₀ 使用 1.43 的消光系数测定其浓度。可以将所述抗体分装,并且在 -80°C 下保存。

[0112] 为了确定所选择的人抗树突细胞单克隆抗体是否与单一的表位结合,可以用通过商业渠道获得的试剂 (Pierce, Rockford, IL) 对每一种抗体进行生物素化。可以通过使用上文所公开的流式细胞仪,用未标记过的单克隆抗体和生物素化的单克隆抗体进行竞争研究。可以用链亲和素碱性磷酸酶探针检测生物素化的单克隆抗体结合。

[0113] 为了确定纯化抗体的同种型,可以进行同种型 ELISAs。可以在 4°C 下用 10 微克 / 毫升的抗人 Ig 将微量滴定板的孔包被过夜。在用 5% BSA 封闭之后,在环境温度下让所述平板与 10 微克 / 毫升单克隆抗体或纯化的同种型对照反应 2 小时。然后用人 IgG1 或人 IgM 特异性碱性磷酸酶结合的探针与所述孔反应。在洗涤之后,用 pNPP 底物 (1 毫克 / 毫升) 使所述平板显影,并在 405-6500D 下分析。

[0114] 可以通过 Western 印迹进一步检验抗树突细胞人 IgGs 与树突细胞的反应性。简单地讲,可以制备来自树突细胞的细胞提取物,并且进行十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳之后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用 20% 的小鼠血清封闭,并且用待试验的单克隆抗体作探针检测。可以用抗人 IgG 碱性磷酸酶检测人 IgG 结合,并且用 BCIP/NBP 底物片剂 (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) 显影。

[0115] 人单克隆抗体对树突细胞的吞噬和细胞杀伤活性

[0116] 除了能特异性结合树突细胞之外,还可以检测人单克隆抗树突细胞抗体介导对树突细胞的吞噬作用和杀伤作用的能力。在体外对单克隆抗体活性的检测,可以在体内模型试验之前提供初步的筛选。简单地讲,可以通过 Ficoll Hypaque 密度离心,然后裂解污染红细胞纯化来自健康供体的多型核细胞 (PMN) 或其他效应细胞。可以将洗涤过的 PMNs 悬浮在添加了 10% 加热灭活的胎牛血清的 RPMI 中,并且以各种效应细胞与树突细胞的比例

(效应细胞:树突细胞)与⁵¹Cr标记过的树突细胞混合。然后可以按各种浓度添加纯化的人抗树突细胞IgGs。可以用无关的人IgG作阴性对照。测定可以在37°C下进行0-120分钟。可以通过测定释放到培养上清液中的⁵¹Cr分析样品的细胞裂解作用。还可以通过相互组合的方式测定抗树突细胞单克隆抗体,以便确定多种单克隆抗体是否能增强细胞裂解。

[0117] 另外,也可以在活体模型(例如,小鼠)上检验与树突细胞结合的人单克隆抗体,以便确定其介导对树突细胞的吞噬作用和杀伤作用的效力。例如,所述抗体可以根据以下标准进行选择,这些标准并不是排他性的:

[0118] 1) 与活的树突细胞结合;

[0119] 2) 对树突细胞的高亲和力;

[0120] 3) 与树突细胞上的独特表位结合(以便消除当具有互补活性的单克隆抗体在组合使用时竞争结合相同表位的可能性)

[0121] 4) 调理树突细胞;

[0122] 5) 在有人效应细胞的情况下,介导对树突细胞的生长抑制、吞噬作用和/或杀伤作用;

[0123] 6) 在与树突细胞结合之后内化;

[0124] 7) 与树突细胞原位(例如,在人组织中)结合;

[0125] 8) 活化树突细胞(例如,诱导细胞因子释放,表达免疫调节表面分子(例如,CD80(B7.1), CD86(B7.2), CD40和CD54(ICAM)));

[0126] 9) 与树突细胞上的人甘露糖受体结合;和

[0127] 10) 与在灵长类中保守的树突细胞抗原结合。

[0128] 本发明优选的人单克隆抗体满足上述标准中的一条或更多条,优选全部。在一种具体实施方案中,所述人单克隆抗体组合使用,例如,作为含有两种或两种以上抗树突细胞单克隆抗体或其片段的药用组合物。例如,可以将具有不同,但是互补活性的人抗树突细胞单克隆抗体组合在单一的治疗方法中,以便获得理想的治疗或诊断效果。说明上述组合的例子是含有一种被树突细胞迅速内化的抗树突细胞人单克隆抗体与另一种诱导树突细胞的抗原呈递细胞活性,例如,释放免疫刺激细胞因子的人抗树突细胞人单克隆抗体组合的一种组合物。

[0129] II. 产生能制备人单克隆抗树突细胞抗体的转基因非人动物

[0130] 在另一方面,本发明提供了诸如转基因小鼠的转基因非人动物,它可以表达能特异性结合树突细胞,优选以高亲和力结合树突细胞的人单克隆抗体。在一种优选实施方案中,所述诸如转基因小鼠(HuMab小鼠)的转基因非人动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。在一种实施方案中,所述诸如转基因小鼠的转基因非人动物业已用纯化的或富集的树突细胞和/或树突细胞裂解物制剂免疫过。所述诸如转基因小鼠的非人动物优选能够通过进行V-D-J重组和同种型转换产生抗树突细胞的人单克隆抗体的多种同种型(例如IgG、IgA和/或IgE)。例如,同种型转换可以通过经典的或非经典的同种型转换进行。

[0131] 能对外源抗原刺激作出应答的具有异源抗体所有组成成分的转基因非人动物的设计,需要所述转基因动物体内所包含的异源免疫球蛋白转基因在B细胞发育全程中正确发挥作用。在一种优选实施方案中,异源重链转基因的正确功能包括同种型转换。因此,构

建本发明的转基因,以便能产生同种型转换和下列现象中的一种或多种:(1)高水平的和细胞类型特异性表达,(2)功能性基因重排,(3)活化等位排斥并对等位排斥作出反应,(4)表达足够的一级成分,(5)信号转导,(6)体细胞高变,和(7)在免疫应答中所述转基因抗体基因座的支配作用。

[0132] 并非必须满足上述所有标准。例如,在转基因动物的内源免疫球蛋白基因座被功能性破坏的实施方案中,所述转基因不必活化等位排斥。另外,在所述转基因包括功能性重排的重链和/或轻链免疫球蛋白基因的实施方案中,第二个标准即功能性基因重排是不需要的,至少对于业已重排的转基因来说是如此。有关分子免疫学的背景知识可以参见 *Fundamental Immunology*, 2nd edition (1989), Paul, William E., ed. Raven Press, N. Y., 以上文献被收作本文参考。

[0133] 在某些实施方案中,本发明用于制备人单克隆抗体的转基因非人动物在转基因动物物种系中含有重排的、未重排的或重排的和未重排的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因的组合。每一个重链转基因包含至少一个 C_H 基因。另外,所述重链转基因可以包含有功能的同种型转换序列,该序列能支持编码多个 C_H 基因的异源转基因在所述转基因动物的 B 细胞中的同种型转换。所述转换序列可以天然存在于被用作转基因 C_H 基因来源的物种的种系免疫球蛋白基因座上,或者所述转换序列可以来源于存在于接受所述转基因构建体的物种(转基因动物)中的序列。例如,用于产生转基因小鼠的人转基因构建体如果结合类似于天然存在于小鼠重链基因座上的转换序列的话,就能产生高频率的同种型转换事件,因为可能小鼠转换序列进行了优化,能和小鼠转换重组酶系统一起发挥作用,而所述人转换序列则不能。可以分离转换序列并通过传统克隆方法克隆,或者通过根据公开的与免疫球蛋白转换区序列相关的序列信号设计重叠的合成寡核苷酸从头合成 (Mills et al., *Nucl. Acids Rev.* 15:7305-7316, 1991; Sideras et al., *Intl. Immunol.* 1:631-642, 1989, 以上文献被收作本文参考)。对上述每一种转基因动物来说,在显著比例(至少 10%)的所述转基因动物 B 细胞中发现了功能性重排的异源重链和轻链免疫球蛋白转基因。

[0134] 用于产生本发明转基因动物的转基因包含一个重链转基因,该转基因包含编码至少一个可变基因片段,一个多样性基因片段,一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的 DNA。所述免疫球蛋白轻链转基因包含编码至少一个可变基因片段,一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的 DNA。编码所述轻链和重链基因片段的基因片段相对于转基因非人动物而言是异源的,因为它们来源于或者相应于来自不包含所述转基因非人动物的物种中编码免疫球蛋白重链和轻链基因片段的 DNA。在本发明的一个方面,构建所述转基因,以便单个的基因片段是未重排的,即没有进行重排,以便编码有功能的免疫球蛋白轻链或重链。所述未重排的转基因支持 V、D 和 J 基因片段的重组(功能性重排),并优选支持在接触树突细胞时,在所述转基因非人动物体内将 D 区基因片段的全部或一部分掺入到所得到的重排免疫球蛋白重链上。

[0135] 在另一种实施方案中,所述转基因包含一个未重排的“微型基因座”。所述转基因通常包含 C、D 和 J 片段的主要部分,以及 V 基因片段的亚型。在所述转基因构建体中,诸如启动子、增强子、类型转换区、RNA 加工的剪接供体和剪接受体序列和重组信号之类的各种调控序列,包含来自所述异源 DNA 的相应序列。所述调控序列可以整合到来自用于本发明的非人转基因动物的相同或相关物种的转基因上。例如,可以将人免疫球蛋白基因片段与

啮齿类动物免疫球蛋白增强子序列组合在一个转基因上以便用于转基因小鼠。另外,可以将合成的调控序列整合到所述转基因上,其中,所述合成的调控序列与已知天然存在于哺乳动物基因组中的功能性 DNA 序列不同源。合成的调控序列是按照公认的规则设计的,例如,规定剪接-受体位点或启动子/增强子基序的容许序列的规则。例如,与天然存在的种系 Ig 基因座相比,微型基因座包含具有至少一个非必需 DNA 部分(例如,间插序列;内含子或其部分)内部(即不在该部分的末端)缺失的基因组免疫球蛋白基因座的一部分。

[0136] 在本发明的一种优选实施方案中,用于制备抗树突细胞的人抗体的转基因动物包含至少一个,通常 2-10 个,有时候 25-50 或更多个拷贝的在 W098/24884 的实施例 12 中所公开的转基因(例如, pHCl 或 pHC2),这种动物与含有公开于 W098/24884 的实施例 5、6、8 或 14 中的单一拷贝的轻链转基因的动物杂交的,后代与公开于 W098/24884 的实施例 10 中的 J_H 缺失动物杂交,以上文献的内容被专门收作本文参考。将动物培育成对于上述三种性状中的每一种来说是纯合型。所述动物具有以下基因型:单拷贝(每套单倍体染色体组)的人重链未重排的微型基因座(公开于 W098/24884 的实施例 12 中),单拷贝(每套单倍体染色体组)的重排的 κ 轻链构建体(公开于 W098/24884 的实施例 14 中),以及在每一个内源小鼠重链基因座上的去掉了所有功能性 J_H 片段的缺失(公开于 W098/24884 的实施例 10 中)。让所述动物与在 J_H 片段缺失上纯合的小鼠杂交(W098/24884 的实施例 10),以便产生在 J_H 缺失上纯合,而在人重链和轻链构建体上为半合子的后代。用抗原注射所得到的动物,并用于产生抗所述抗原的人单克隆抗体。

[0137] 相对所述人重链和轻链而言,从所述动物体内分离的 B 细胞是单特异性的,因为它们只含有每一种基因的单一拷贝。另外,所述动物相对人或小鼠重链而言也是单一性的,因为通过引入跨越 J_H 区的缺失使两个内源小鼠重链拷贝都失去功能,正如在 W098/24884 的实施例 9 和 12 中所公开的。另外,就人或小鼠轻链而言,B 细胞的大部分是单特异性的,因为所述单一拷贝的重排人 κ 轻链基因的表达会等位性地和同种型性地排斥内源小鼠 κ 和 λ 链基因在相当一大部分 B 细胞中的重排。

[0138] 所述优选实施方案的转基因小鼠可以具有免疫球蛋白产物的大部分成分,理想的是基本上类似于天然小鼠的免疫球蛋白组成成分。因此,例如,在内源 Ig 基因业已失活的实施方案中,总免疫球蛋白含量在大约 0.1-10 毫克/毫升血清范围内,优选 0.5-5 毫克/毫升,理想的是至少大约 1.0 毫克/毫升。在业已将能够实施从 IgM 到 IgG 转换的转基因导入所述转基因小鼠之后,成年小鼠血清的 IgG 与 IgM 的比例优选为大约 10:1,在未成熟的小鼠中,IgG 与 IgM 的比例要低的多。一般,超过大约 10%,优选 40-80%的脾和淋巴节 B 细胞只能表达人 IgG 蛋白。

[0139] 理想的是所述组成成分接近在非转基因小鼠体内所出现的成分,通常至少占它的大约 10%,优选 25-50%或更多。一般,会产生至少大约 1000 个不同的免疫球蛋白(优选 IgG),优选 10^4 - 10^6 或更多,这主要取决于导入小鼠基因组中的 V、J 和 D 区的数量。所述免疫球蛋白通常能识别大约 1/2 或更多的高抗原性蛋白,例如,树突细胞蛋白。通常,所述免疫球蛋白对预先确定抗原的亲合力为至少大约 $10^7 M^{-1}$,优选至少大约 $10^9 M^{-1}$,更优选至少大约 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ 或更高,例如,高达 $10^{13} M^{-1}$ 或更高。

[0140] 在某些优选实施方案中,优选制备具有预定组成成分的小鼠,以便限制存在于对预定抗原类型的抗体反应中的 V 基因的选择。例如,具有预定组成成分的重链转基因可以

包含被优选用于对人体内的预定抗原类型起抗体反应的人 V_H 基因。另外,可以出于各种原因从特定的组成成分中排除某些 V_H 基因(例如,具有编码对预定抗原的高亲和力 V 区的较低的可能性;具有发生体细胞突变和亲和力增强的较低的倾向;或对某些人有免疫原性)。因此,在对含有重链或轻链片段的各种转基因进行重排之前,所述基因片段已经通过杂交或 DNA 测序的方法将所述基因片段鉴定为来自除了所述转基因动物以外的生物物种。

[0141] 可以按上文所公开的方法,用纯化的或富集的树突细胞和/或树突细胞裂解物的制剂对本发明的转基因小鼠进行免疫。所述小鼠能产生通过转基因内转换重组(顺式转换)发生类型转换的 B 细胞,并且表达与树突细胞起反应的免疫球蛋白。所述免疫球蛋白可以是人序列抗体,其中,所述重链和轻链多肽是由人转基因序列编码的,它可以包含通过体细胞突变和 V 区重组连接所产生的序列,以及种系编码的序列;所述人序列免疫球蛋白可以被称为与由人 V_L 或 V_H 基因片段和人 J_L 或 J_H 片段编码的多肽序列基本上相同,即使有可能因为体细胞突变和不同的 V-J 和 V-D-J 重组连接而出现了其他非种系序列也是如此。就所述人序列抗体而言,每一条链的可变区通常至少 80% 是由人种系 V、J 编码的,并且对于重链来说,是由 D 基因片段编码的;通常,所述可变区的至少 85% 是由存在于所述转基因上的人种系序列编码的。通常,90% 或 95% 或更多的可变区序列是由存在于所述转基因上的人种系序列编码的。不过,由于通过体细胞突变和 VJ 和 VDJ 连接导入了非种系序列,人序列抗体通常具有某些可变区序列(较少见的是恒定区序列),这些序列不是由存在于所述小鼠种系的人转基因上的人 V、D 或 J 基因片段编码的。通常,所述非种系序列(或单个核苷酸位置)聚集在 CDRs 中或靠近 CDRs,或者聚集在已知的体细胞突变集中区。

[0142] 可以通过同种型转换产生能结合预定抗原的人序列抗体,以便产生包含人序列 γ 链(如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2B$ 或 $\gamma 3$) 和人序列轻链(如 κ) 的人抗体。所述同种型转换的人序列抗体通常包含一个或多个体细胞突变,突变通常存在于可变区中,并且通常在 CDR 中或大约 10 个残基内,这是通过亲和力成熟,和通过抗原,特别是在进行再次(或随后)抗原刺激之后进行 B 细胞筛选而产生的。所述高亲和力人序列抗体的结合亲和力至少为 $1 \times 10^9 M^{-1}$, 通常至少为 $5 \times 10^9 M^{-1}$, 通常高于 $1 \times 10^{10} M^{-1}$, 并且有时候为 $5 \times 10^{10} M^{-1} - 1 \times 10^{11} M^{-1}$ 或更高。

[0143] 本发明的另一方面涉及源于所述小鼠的 B 细胞,所述细胞可用于制备表达以高亲和力(例如高于 $2 \times 10^9 M^{-1}$) 结合树突细胞的人单克隆抗体的杂交瘤。因此,在本发明的另一种实施方案中,用所述杂交瘤制备含有与树突细胞结合的亲和力常数 (K_a) 至少为 $2 \times 10^9 M^{-1}$ 的免疫球蛋白的组合物,其中,所述免疫球蛋白包含:

[0144] 人序列轻链,它包含 (1) 具有与人 V_L 基因片段和人 J_L 片段编码的多肽序列基本上相同的多肽序列的轻链可变区,和 (2) 具有与人 C_L 基因片段编码的多肽序列基本上相同的多肽序列的轻链恒定区;和

[0145] 人序列重链,它包含 (1) 具有与人 V_H 基因片段,选择性地为 D 区和人 J_H 片段编码的多肽序列基本上相同的多肽序列的重链可变区,和 (2) 具有与人 C_H 基因片段编码的多肽序列基本上相同的多肽序列的恒定区。

[0146] 抗树突细胞的高亲和力人单克隆抗体的开发,得到了在具有包含整合的人免疫球蛋白转基因的基因组的转基因小鼠中扩增人可变区基因片段组成成分方法的促进,该方法包括将含有不存在于所述整合的人免疫球蛋白转基因上的 V 区基因片段的 V 基因转基因导入所述基因组中。通常,所述 V 区转基因是包含一部分人 V_H 或 V_L (V_R) 基因片段排列的酵母

人工染色体,该基因片段排列可以天然存在于人基因组中,或者可以通过重组方法分别剪接在一起,它可以包含失调的(out oforder)或省略的V基因片段。通常在YAC上包含至少5个或更多个有功能的V基因片段。在这种变化形式中,可能通过V组成成分扩增方法制备一种转基因小鼠,其中,该小鼠表达的免疫球蛋白链包含由存在于V区转基因上的V区基因片段编码的可变区序列和由人Ig转基因上编码的C区。通过V组成成分扩增方法,可以产生具有至少5个不同V基因的转基因小鼠。因为小鼠可以包含至少大约24个V基因或更多。某些V基因片段可能是无功能的(例如,假基因等);所述片段可以保留,或者如果需要的话,可以通过技术人员所公知的重组方法使这些片段有选择性地缺失。

[0147] 一旦将所述小鼠种系工程改造成包含具有基本上不存在于含有J和C基因片段的人Ig转基因上的扩增的V片段组成成分的有功能的YAC,就可以将该性状繁殖并转育到其他遗传背景中,包括具有扩增的V片段组成成分的有功能的YAC被转育到具有不同的人Ig转基因的小鼠种系中的背景。可以将具有扩增的V片段组成成分的多个有功能的YACs转育到一个种系中,以便与人Ig转基因(或多个人Ig转基因)一起起作用。尽管在本文中被称为YAC转基因,这种转基因在整合到所述基因组中之后可能基本上缺乏酵母序列,如缺乏在酵母中自主复制所需要的序列;在酵母中复制之后一旦不再需要(即在导入小鼠ES细胞或小鼠原合子中之前),可以通过遗传工程(例如,限制性消化和脉冲场凝胶电泳或其他合适方法)选择性地除去所述序列。繁殖人序列免疫球蛋白表达性状的方法,包括培育具有人Ig转基因,并且还选择性地具有包含扩增的V片段组成成分的有功能的YAC的转基因小鼠。 V_H 和 V_L 基因片段都可以存在于YAC上。操作者可以将所述转基因小鼠转育到任何背景,包含具有其他人转基因的背景,包含人Ig转基因和/或编码其他人淋巴细胞蛋白的转基因。本发明还提供了一种由具有扩增的V区成分YAC转基因的转基因小鼠产生的高亲和力人序列免疫球蛋白。尽管上面公开了本发明转基因动物的优选实施方案,其他实施方案也是可行的,可以将这些实施方案划分成四种类型:

[0148] I. 含有未重排的重链和重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物;

[0149] II. 含有未重排的重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物;

[0150] III. 含有重排的重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物;和

[0151] IV. 含有重排的重链和重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。

[0152] 在这四种类型的转基因动物中,其优选的顺序如下:II > I > III > IV,其中,业已通过同源重组(或其他方法)剔除了内源轻链基因(或至少是K基因);I > II > III > IV,其中,并未剔除内源轻链基因,并且必须经过等位排斥成为显性。

[0153] III. 能结合树突细胞的双特异性/多特异性分子

[0154] 在本发明的另一种实施方案中,可以将抗树突细胞的人单克隆抗体或其抗原结合部分衍生化,或者与诸如另一种肽或蛋白(例如,Fab'片段)的另一种有功能的分子偶联,以便制备能结合多个结合位点或靶表位的双特异性或多特异性分子。例如,本发明的抗体或其抗原结合部分能功能性地连接于(例如,通过化学连接,遗传学融合,非共价结合或其他方式)诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物的一种或多种其他结合分子上。

[0155] 因此,本发明包括含有至少一种对树突细胞的第一结合特异性和对第二种靶表位的第二结合特异性的双特异性和多特异性分子。在本发明的一种优选实施方案中,所述第二靶表位是靶细胞上的抗原,例如,肿瘤细胞抗原,微生物抗原,病毒抗原或自身抗原。所述

双特异性和多特异性分子可以将树突细胞引导至靶细胞,以便所述树突细胞能够调节针对所述靶细胞或靶细胞抗原的免疫应答。

[0156] 在本发明的另一种实施方案中,所述第二靶表位是 Fc 受体,例如人 Fc γ RI (CD64) 或人 Fc 受体 (CD89)。因此,本发明包括能够同时结合表达 Fc γ R, Fc α R 或 Fc ϵ R 的效应细胞(例如,单核细胞,巨噬细胞或多型核细胞(PMNs))和树突细胞的双特异性和多特异性分子。这些双特异性和多特异性分子将树突细胞引导至效应细胞,并且象本发明的人单克隆抗体一样,可以诱导 Fc 受体介导的效应细胞的活性,如吞噬树突细胞、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、细胞因子释放、或产生超氧化物阴离子。

[0157] 本发明的双特异性和多特异性分子除了抗 Fc 结合特异性或抗靶细胞抗原和抗树突细胞结合特异性之外,还可以包括第三种结合特异性。在一种实施方案中,所述第三种结合特异性是抗增强因子(EF)部分,例如,能结合于参与细胞毒性活性的表面蛋白上的分子,并因此增强对所述靶细胞的免疫应答。“抗增强因子部分”可以是一种抗体,有功能的抗体片段或能结合诸如抗原或受体的特定分子的配体,并因此导致 Fc 受体、靶细胞抗原或树突细胞的结合决定因子效果的增强。“抗增强因子部分”可以结合 Fc 受体、靶细胞抗原或树突细胞。另外,所述抗增强因子部分可以结合在与所述第一和第二结合特异性结合的实体不同的实体上。例如,抗增强因子部分可以结合一种细胞毒性 T 细胞(例如,通过 CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1)或其他免疫细胞,导致针对所述靶细胞的免疫应答增强。

[0158] 在一种实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包括至少一种抗体,或其抗体片段作为结合特异性,包括,例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、或单链 Fv。所述抗体也可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,如 Fv 或公开于 1990 年 8 月 7 日授予 Ladner 等的美国专利 4946778 中的单链构建体,该专利的内容被专门收作本文参考。

[0159] 在一种实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包含对诸如肿瘤细胞抗原、微生物抗原、病毒抗原或自身抗原的靶细胞上的抗原的结合特异性,以及对树突细胞的第二结合特异性。

[0160] 在另一种实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子包含对存在于效应细胞表面上的 Fc γ R 或人 Fc α R 的结合特异性,以及对树突细胞的第二结合特异性。

[0161] 在一种实施方案中,对 Fc 受体的结合特异性是由人单克隆抗体提供的,其结合不受人免疫球蛋白 G(IgG) 阻断。在本文中,术语“IgG 受体”表示位于 1 号染色体上的 8 个 γ 链基因中的任一个。这些基因一共编码 12 种跨膜或可溶性受体同种型,这些同种型被划分成三种类型的 Fc γ 受体:Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、Fc γ RIII (CD16)。在一种优选实施方案中,Fc γ 受体是人高亲和力 Fc γ RI。人 Fc γ RI 是一种 72kDa 分子,它对单聚体 IgG 表现出高的亲和力 (10^8 - 10^9 M⁻¹)。

[0162] Fanger 等在 PCT 申请 W088/00052 和美国专利 4954617 中公开了上述优选单克隆抗体的产生和特征分析,以上专利的内容被完整地收作本文参考。所述抗体与 Fc γ RI、Fc γ RII 或 Fc γ RIII 的表位结合的位点,与所述 Fc γ 的受体结合位点不同,因此,其结合不会受到生理水平的 IgG 的明显抑制。本发明有用的特异性抗 Fc γ RI 抗体是 mAb22、mAb 32、mAb44、mAb62 和 mAb197。产生 mAb32 的杂交瘤可以从美国典型培养物保藏中心获得,ATCC 保藏号为 HB9469。抗 -Fc γ RI mAb22、mAb22 的 F(ab')₂ 片段可以从 Medarex, Inc. 获得 (Annandale, N. J)。在其他实施方案中,所述抗 Fc γ 受体抗体是源化形成的

单克隆抗体 22 (H22)。H22 抗体的产生和特征分析公开在 Graziano R. F. et al. (1995) *J. Immunol* 155 (10) :4996-5002 和 PCT/US93/10384。H22 抗体产生细胞系以 HA022CL1 的名称,于 1992 年 11 月 4 日保存在美国典型培养物保藏中心,保藏号为 CRL11177。

[0163] 在另一种优选实施方案中,对 Fc 受体的结合特异性是由结合诸如 Fc- α 受体 (Fc α RI (CD89)) 的人 IgA 受体的抗体提供的,所述抗体的结合优选不会受到人免疫球蛋白 A (IgA) 的阻断。术语“IgA 受体”意在包含位于 19 号染色体上的一个 α 基因 (Fc α RI) 的基因产物。已知该基因编码 55-110kDa 的若干种不同剪接的跨膜同种型。Fc α RI (CD89) 是在单核细胞 / 巨噬细胞、嗜伊红性和嗜中性粒细胞上组成型表达的,但不能在非效应性细胞群体上表达。Fc α RI 对 IgA1 和 IgA2 具有中等亲和力 ($\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$),该亲和力在接触诸如 G-CSF 或 GM-CSF 的细胞因子之后会提高 (Morton, H. C. et al., 1996, *Critical Reviews in Immunology* 16 :423-440)。业已公开了能在 IgA 配体结合结构域之外结合 Fc α RI 的四种 Fc α RI 特异性单克隆抗体,这些抗体被确定为 A3、A59、A62 和 A77 (Monteiro, R. C. et al., 1992, *J. Immunol.* 148 :1764)。

[0164] Fc α RI 和 Fc γ RI 是用于本发明的优选的触发受体,因为它们是 (1) 主要在诸如单核细胞、PMNs、巨噬细胞和树突细胞的免疫效应细胞上表达的 ;(2) 以高水平表达 (例如,每个细胞 5000-100000) ;(3) 细胞毒性活性的介体 (例如,ADCC,吞噬作用) ;(4) 介导导向它们的包括自身抗原在内的抗原的增强了的抗原呈递。

[0165] 在其他实施方案中,本发明的双特异性和多特异性分子还包括识别,例如,结合诸如树突细胞上的抗原的树突细胞的结合特异性。在一种优选实施方案中,所述结合特异性是由本发明的人单克隆抗体提供的。

[0166] 本文所说的“效应细胞特异性抗体”表示结合效应细胞的 Fc 受体的抗体或功能性抗体片段。用于本发明的优选抗体与效应细胞 Fc 受体结合的位点,不与内源免疫球蛋白结合。

[0167] 在本文中,术语“效应细胞”表示参与免疫应答的效应期的免疫细胞,所述效应期与免疫应答的识别期和激活期相反。典型的免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如,淋巴细胞 (例如, B 细胞和 T 细胞,包括溶细胞 T 细胞 (CTLs))、杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜伊红性粒细胞、嗜中性粒细胞、多型核细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。某些效应细胞表达特异性 Fc 受体,并且完成特定的免疫功能。在优选实施方案中,效应细胞能够诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC),例如,嗜中性粒细胞能够诱导 ADCC。例如,表达 FcR 的单核细胞、巨噬细胞参与靶细胞的特异性杀伤和将抗原呈递给免疫系统的其他成分或者结合到呈递抗原的细胞上。在其他实施方案中,效应细胞可以吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。可以通过诸如细胞因子的体液因子调控特定 FcR 在效应细胞上的表达。例如,业已发现干扰素 γ (IFN- γ) 上调 Fc γ RI 的表达。这种增强了的表达提高了具有 Fc γ RI 的细胞对目的物的细胞毒性。效应细胞可以吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

[0168] “靶细胞”表示受试者 (例如,人或动物) 体内的能够由本发明的组合物 (例如,人单克隆抗体,双特异性或多特异性分子) 定向的任何不需要的细胞。在一种实施方案中,所述靶细胞是树突细胞。在其他实施方案中,靶细胞包括肿瘤细胞、微生物病原体、病毒或病毒感染细胞。

[0169] 尽管人单克隆抗体是优选的,可以用于本发明的双特异性或多特异性分子中的其

他抗体包括鼠类、嵌合型和人源化的单克隆抗体。

[0170] 嵌合型鼠-人单克隆抗体(即嵌合抗体)可以通过本领域公知的重组 DNA 技术产生。例如,用限制酶消化编码鼠(或其他物种)单克隆抗体分子 Fc 恒定区的基因,以便去掉编码鼠 Fc 的区域,并且用编码人 Fc 恒定区的基因的等同部分取代它。参见:Robinson 等,国际专利公开号 PCT/US86/02269;Akira 等,欧洲专利申请号 184187;Taniguchi, M., 欧洲专利申请号 171496;Morrison 等,欧洲专利申请号 173494;Neuberger 等,国际申请号 W086/01533;Cabilly 等,美国专利 4816567;Cabilly 等,欧洲专利申请号 125023;Better 等(1988Science 240:1041-1043);Liu et al.,1987 PNAS 84:3439-3443;Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526;Sun et al.,1987,PNAS84:214-218;Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005;Wood et al.,1985, Nature314:446-449;和 Shaw et al., 1998, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559)。

[0171] 还可以通过来自人 Fv 可变区的同等序列置换不直接参与抗原结合的 Fv 可变区的序列将所述嵌合抗体进一步人源化。在以下文献中提供了人源化嵌合抗体的一般性综述:Morrison, S. L. 1985, Science229:1202-1207 和 Oi et al.,1986, BioTechniques4: 214。所述方法包括分离、操作和表达编码来自重链或轻链中的至少一种的免疫球蛋白 Fv 可变区的全部或部分的核酸序列,所述核酸的来源对本领域技术人员来说是公知的,并且,例如,可以从 7E3,一种产生抗 GPII_bIII_a 抗体的杂交瘤获得。然后,可将编码所述嵌合抗体或其片段的重组 DNA 克隆到合适的表达载体上。合适的人源化抗体还可以通过 CDR 置换产生:US5225539;Jones et al.,1986, Nature321:552-525;Verhoeyan et al.,1988, Science239:1534;和 Beidler et al.,1988, J. Immunol. 141:4053-4060。

[0172] 特定人抗体的所有 CDRs 都可以用至少一部分非人 CDR 取代,或者只有某些 CDRs 可以用非人 CDRs 取代。只需要取代将人源化抗体结合在 Fc 受体上所需 CDRs 的数量。

[0173] 可以用任何方法将一种抗体人源化,该方法能够用来自非人抗体的 CDR 取代人抗体 CDR 的至少一部分。Winter 公开了可用于制备本发明的人源化抗体的方法(英国专利申请号 GB2188638A,申请日为 1987 年 3 月 26 日),该专利的内容被专门收作参考。可以通过在国际专利申请号 W094/10332(发明名称为抗人单核吞噬细胞上的免疫球蛋白 G 的 Fc 受体的人源化抗体)中公开的寡核苷酸定点诱变,用非人 CDRs 取代人 CDRs。

[0174] 业已取代、缺失或添加了特定氨基酸的嵌合和人源化抗体同样属于本发明的范围。具体地讲,优选的人源化抗体具有在构架区内的氨基酸取代,以便改善与所述抗原的结合。例如,在具有小鼠 CDRs 的人源化抗体中,位于人构架区内的氨基酸,可以用位于小鼠抗体相应位置上的氨基酸取代。已知在某些场合下,这种取代能改善人源化抗体对所述抗原的结合。业已添加、缺失或取代了氨基酸的抗体,在本文中被称作修饰过的抗体或改变了的抗体。

[0175] 术语修饰过的抗体意在还包括业已通过诸如缺失、添加或取代抗体一部分的方法进行过修饰的抗体,如单克隆抗体、嵌合抗体和人源化抗体。例如,可以通过缺失其恒定区,并代之以能增加所述抗体的半衰期,例如,血清半衰期,稳定性或亲和力的恒定区而对一种抗体进行修饰。任何修饰都属于本发明的范围,只要所述双特异性和多特异性分子具有至少一个对 Fc γ R 特异的抗原结合区,并且能引起至少一种效应功能。

[0176] 可以通过化学技术(例如,参见 D. M. Kranz et al.,1981, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 78:5807)、“polydoma”技术(参见授予 Reading 的 US4474893)或重组 DNA 技术制备本发明的双特异性和多特异性分子。

[0177] 具体地讲,可以利用本领域公知的、并且在本文所提供的实施例中所公开的方法,通过结合组成结合特异性例如抗 FcR 和抗树突细胞结合特异性,制备本发明的双特异性和多特异性分子。例如,可以分别制备所述双特异性和多特异性分子的每一种结合特异性,然后再彼此结合在一起。当所述结合特异性是蛋白或肽时,可以将多种偶联剂或交联剂用于共价结合。交联剂的例子包括蛋白 A、碳化二亚胺、N-琥珀酰亚胺酰-S-乙酰-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻-亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺酰-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺酰-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(磺基-SMCC)(例如,参见 Karpovskiy et al., 1984, J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括由 Paulus (Behring Ins. Mitt., 1985, No. 78:118-132); Brennan 等 (Science, 1985, 229:81-83) 和 Glennie 等 (J. Immunol., 1987, 139:2367-2375) 所公开的方法。优选的结合制剂是 SATA 和磺基-SMCC,这两种制剂都可以从 Pierce 化学公司 (Rockford, IL) 购买。

[0178] 当所述结合特异性是抗体(例如,两种人源化抗体)时,可以通过巯基联结两个重链的 C-末端铰链区进行结合。在一种特别优选的实施方案中,在结合之前对所述铰链区进行修饰,以使其包含奇数数量的巯基残基,优选一个残基。

[0179] 另外,两种结合特异性可以编码在同一个载体中,并且在同一个宿主细胞中表达和组装。当所述双特异性和多特异性分子是 mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂ 或配体×Fab 融合蛋白时,该方法特别适用。本发明的双特异性和多特异性分子,例如,双特异性分子可以是单链分子,如单链双特异性抗体,包括一个单链抗体和一个结合决定子的单链双特异性分子,或包括两个结合决定子的单链双特异性分子。双特异性和多特异性分子还可以是单链分子或者可以包括至少两个单链分子。例如,制备双特异性和多特异性分子的方法公开于以下文献中:US5260203;US5455035;US4881175;US5132405;US5091513;US5476786;US5013653;US5258498;和 US5482858。

[0180] 可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS 分析、生物测定(例如,生长抑制)或 Western 印迹测定证实所述双特异性和多特异性分子对其特定目的物的结合。上述每一种测定通常通过采用对感兴趣的复合物特异的标记过的试剂(例如,抗体),来检测特定感兴趣的蛋白-抗体复合物的存在。例如,可以用能识别、并特异性结合抗体-FcR 复合物的诸如酶联抗体或抗体片段检测 FcR 抗体复合物。另外,还可以用多种其他免疫测定方法中的任一种检测复合物。例如,可以对所述抗体进行放射性标记,并用于放射免疫测定(RIA)(例如,参见 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 该文献被收作本文参考。可以利用诸如 γ 计数器或闪烁计数器或通过放射性自显影检测所述放射性同位素。

[0181] IV. 抗体结合物/免疫毒素

[0182] 在另一方面,本发明描述了与诸如细胞毒素、药物或放射性同位素的治疗成分结合的人抗树突细胞单克隆抗体或其片段。在与细胞毒素结合时,这种抗体结合物被称为免疫毒素。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的(例如,杀伤性)的任何试剂。其例子包

括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、足叶乙甙、tenoposide、长春新碱、长春花碱、秋水仙素、阿霉素、道诺红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗剂包括,但不限于抗代谢物(例如,氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂(例如,氮芥、thioepa 苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消胺、二溴甘露糖醇、链脲菌素、丝裂霉素 C 和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)。蒽环类(例如,道诺红霉素(以前称之为道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如,放线菌素(以前称之为 actinomycin)、博来霉素、普卡霉素、和氨基霉素(AMC))、以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春花碱)。可以将本发明的抗体与诸如放射性碘的放射性同位素结合,以便制备细胞毒性放射性药物,用于治疗与树突细胞相关的疾病,如自身免疫病或炎症性疾病,或移植物抗宿主疾病。

[0183] 本发明的抗体结合物可用于修饰特定的生物学反应,并且所述药物成分并不被视为局限于传统的化学治疗剂。例如,所述药物成分可以是具有所需生物学活性的蛋白或多肽。例如,所述蛋白可以包括具有酶促活性的毒素或其活性片段,如相思豆毒素蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素、或白喉毒素;诸如肿瘤坏死因子或干扰素 γ 的蛋白;或生物学反应修饰剂,如淋巴因子、白介素-1(“IL-1”)、白介素-2(“IL-2”)、白介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其他生长因子。

[0184] 用于将所述治疗成分结合在抗体上的技术是众所周知的,例如,参见 Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery”, in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., “The Preparation And Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。

[0185] 在另一方面,可以将对树突细胞特异的人抗体用于直接将诸如肿瘤细胞、效应细胞或微生物病原体的完整细胞导向树突细胞。可以在细胞表面上直接表达抗树突细胞抗体或其抗原结合片段,例如,通过用含有编码本发明的人树突细胞特异性抗体或其抗原结合片段的核酸序列的载体转染或转导细胞,例如这一目的可以通过以下方式实现:用编码包括跨膜结构域和人抗树突细胞抗体或其抗原结合片段的融合蛋白的核酸转染所述靶细胞。例如,用于制备所述核酸、融合蛋白和表达所述融合蛋白的细胞的方法公开于以全文形式收作本文参考的美国专利申请流水号 09/203958 中。另外,可以利用化学连接子、脂类标记或其他相关方法将抗树突细胞抗体或其抗原结合片段结合在细胞或病原体上 (deKruif, J. et al., 2000, *Nat. Med.* 6:223-227; Nizard, P. et al., 1998, *FEBS Lett.* 433:83-88)。可

以将具有表面锚定的抗树突细胞抗体或其抗原结合片段的细胞用于诱导针对诸如肿瘤细胞或微生物病原体的细胞的特异性免疫应答。

[0186] V. 药用组合物

[0187] 在另一方面,本发明提供了含有与可以药用的载体一起配制的本发明的一种或组合的人单克隆抗体或其抗原结合部分的诸如药用组合物的治疗组合物。所述组合物还可以含有诸如其他抗体、细胞毒素或药物(例如,免疫抑制剂)的其他治疗剂,并且可以单独使用或者与诸如放射治疗的其他治疗组合使用。

[0188] 在一种实施方案中,将具有互补活性的人抗树突细胞单克隆抗体组合使用,例如,作为包括两种或两种以上人抗树突细胞单克隆抗体的药用组合物。例如,可以在有效应细胞的情况下介导对树突细胞的高效杀伤作用的人单克隆抗体与抑制树突细胞生长的另一种人单克隆抗体组合。在另一种实施方案中,可以将被树突细胞迅速内化的人单克隆抗体与诱导树突细胞的抗原呈递细胞活性,例如,释放免疫刺激细胞因子的另一种人单克隆抗体组合。

[0189] 在另一种实施方案中,所述组合物包含一种或组合的本发明的双特异性或多特异性分子(例如,该组合物包含对Fc受体的至少一种结合特异性和对树突细胞的至少一种结合特异性)。

[0190] 在另一种实施方案中,所述组合物包含对树突细胞的至少一种结合特异性,与诸如细胞毒素、或抗原,例如,靶细胞上的抗原的另一种分子实体功能性连接。

[0191] 在本文中,“可以药用的载体”包括在生理学上可混溶兼容的任一种和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸附延迟剂等。所述载体优选适合通过静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮途径使用(例如,通过注射或输液)。根据给药途径,可以用一种材料对活性化合物,即抗体、双特异性或多特异性分子进行包衣,以便保护该化合物免受有可能使该化合物失活的酸和其他自然条件的作用。

[0192] “可以药用的盐”表示能保留亲本化合物的理想生物学活性,并且不会产生任何不需要的毒理学作用的盐(例如,参见 Berge, S. M. et al., 1977, J. Pharm. Sci. 66 :1-19)。所述盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括源于诸如氢氯酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸之类的无毒无机酸的盐,以及源于诸如脂族一和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳香族磺酸之类的无毒有机酸的盐。碱加成盐包括源于诸如钠、钾、镁、钙之类的碱土金属盐,以及源于诸如N, N' -二苯基乙二胺、N-甲基谷胺酰胺、盐酸普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺和普鲁卡因之类的无毒有机胺的盐。

[0193] 本发明的组合物可以通过本领域已知的多种方法给药。正如技术人员可以理解的,给药途径和/或方式可以根据需要的结果改变。所述活性化合物可以和能够防止该化合物迅速释放的载体一起制备,如控释制剂,包括移植物、经皮贴膏,和微型胶囊化输送系统。可以使用能生物降解的、生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备所述制剂的很多方法已经具有专利或者为本领域技术人员所普遍公知。例如,参见 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0194] 为了通过某些给药途径使用本发明的化合物,可能有必要用一种材料对该化合物进行包衣,或者与该化合物同时使用,以便防止其失活。例如,所述化合物可以在诸如脂质

体或稀释剂的合适载体中给予受试者。可药用的稀释剂包括盐水和含水的缓冲液。脂质体包括水包油包水 CGF 乳液,以及传统的脂质体 (Strejan et al., 1984, J. Neuroimmunol. 7: 27)。

[0195] 可以药用的载体包括无菌水溶液或分散剂,以及用于临时制备无菌注射溶液或分散剂的无菌粉末。所述介质和制剂作为药用活性物质的用途在本领域中是公知的。任何传统介质或试剂都可将其用于本发明的药用组合中,除非与所述活性化合物不兼容。还可将补充性活性化合物掺入所述组合中。

[0196] 治疗组合通常必须是无菌的,并且在产生和储存条件下是稳定的。可以将所述组合制备成溶液、微乳液、脂质体、或其他适合高药物浓度的有序结构。所述载体可以是含有诸如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物的溶剂或分散介质。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的包衣剂,对于分散剂来说通过保持需要的粒度,以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。在很多场合下,在所述组合中优选包括等渗剂,例如,糖、聚醇,如甘露糖醇、山梨醇或氯化钠。通过在所述组合中添加诸如单硬脂酸盐和明胶的能延长吸收的制剂,实现所述可注射组合物的延长吸收。

[0197] 无菌注射溶液可以通过以下方法制备:将所需量的活性化合物掺入合适的溶剂中,该溶剂根据需要含有上面所列举的一种成分或几种成分的组合,然后进行消毒微量过滤。通常,分散剂是通过将所述活性化合物添加到含有基本分散介质和来自上文所列举的其他必需成分的无菌媒介物中而制备的。对于用来制备无菌注射溶液的无菌粉末来说,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冷冻干燥),它能由此获得所述活性成分的粉末,和来自它的事先无菌过滤的溶液的任何其他必需成分。

[0198] 对剂量方案进行调整,以便提供最佳的所需反应(例如,治疗反应)。例如,可以给予单一的药团,可以隔一定时间给予若干分开的剂量,或者根据表现出来的治疗状况紧急程度的需要,相应地减少或增加剂量。将肠胃外组合制成剂量单位形式是特别有利的,它可以方便服用,并保持剂量的一致性。本文所说的剂量单位形式表示适合作为接受治疗的受试者的单一剂量的在物理形式上独立的单位;每个单位含有计算出来的、产生所需治疗效果的预定数量的活性化合物,和需要的药用载体。本发明剂量单位形式的确定直接取决于和依赖于(a)所述活性化合物的独特特征和要获得的具体治疗效果,和(b)为了个体的治疗灵敏度制备这样一种活性化合物的领域中所固有的限制。

[0199] 可以药用的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠和亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、镓酸丙酯、和 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸,和磷酸等。

[0200] 对于治疗组合来说,本发明的制剂包括适合口服、鼻腔、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃给药用制剂。所述制剂能以单位剂量形式方便地提供,并且可以通过药理学领域的任何已知方法制备。用于产生单一剂量形式的可以与载体材料组合的活性成分的量,根据被治疗的受试者和具体的给药方式而改变。用于产生单一剂量形式的可以与载体材料组合的活性成分的量,通常是能产生治疗效果的组合物的量。一般,以百分比衡量,活性成分的用量在大约0.01%到大约99%之间,优选大约0.1%到大约70%,最优选大约1%到大约30%。

[0201] 适合阴道使用的本发明的制剂还包括含有本领域已知合适的载体的子宫托,止血棉塞、乳剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。用于本发明组合物的局部或经皮给药的剂量形式包括粉末、喷雾剂、软膏、糊剂、乳剂、洗液、凝胶、溶液、膏贴和吸入剂。可以在无菌条件下将活性化合物与可以药用的载体和可能需要的任何防腐剂、缓冲剂和推进剂混合。

[0202] 本文所使用的短语“肠胃外给药”和“经肠胃外给药”表示除了肠道和局部给药以外的用药方式,通常是通过注射给药,并且包括,但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输液。

[0203] 可用于本发明的药用组合物中的合适的含水载体和无水载体的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和聚乙二醇等)及其合适的混合物,植物油,如橄榄油,可注射的有机酯,如油酸乙酯。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣材料,对于分散剂来说通过保持需要的粒度,以及通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。

[0204] 所述组合物还可以含有佐剂,如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过上述消毒方法,并通过添加各种抗细菌剂和抗真菌剂确保防止出现微生物,例如,添加 parabens、氯丁醇、和酚山梨酸等。可能还需要向所述组合物中添加等渗剂,如糖类、氯化钠等。另外,通过添加能延长吸收时间的诸如单硬脂酸铝和明胶的制剂,实现可注射药用制剂的延长吸收。

[0205] 当本发明的化合物在作为药物给人和动物使用时,可以单独使用,或者作为药用组合物使用,例如,该组合物含有与可以药用的载体组合的 0.01-99.5% (更优选 0.1-90%) 的活性成分。

[0206] 无论选择什么样的给药途径,可以合适的水化形式应用的本发明的化合物和/或本发明的药用组合物,能通过本领域技术人员所公知的传统方法制备成可以药用的剂量形式。

[0207] 本发明药用组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变,以便获得能实现预期的对特定患者、组合物、和给药模式的治疗反应,而又对患者没有毒性的所述活性成分的用量。选择的剂量水平取决于多种药物动力学因素,包括所使用的本发明的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,所采用的特定化合物的排出速度,治疗时间,与所采用的特定组合物组合使用的其他药物,化合物和/或材料,接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、一般健康情况以及以前的医疗史,以及医学领域众所周知的类似因素。

[0208] 具有本领域普通技能的医生或兽医能方便地确定并开出有效量的所需药用组合物。例如,医生或兽医开始使用的所述药用组合物中采用的本发明的化合物的量,低于获得理想治疗效果所需要的量,并逐渐增加剂量,直到获得理想的效果。一般,本发明组合物的合适的每日剂量是有效产生治疗效果所需要的所述化合物的最低剂量。所述有效剂量通常取决于上述因素。优选通过静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下途径使用,优选在靠近靶部位处使用。如果需要,治疗组合物的每日有效剂量可以按 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个或更多个小剂量,在 1 天内以适当的时间间隔分别使用,选择性地以单位剂量形式使用。本发明的化合物尽管可以单独给药,但优选以药用制剂(组合物)形式使用该化合物。

[0209] 治疗组合物可以用本领域公知的医疗器械给药。例如,在一种优选实施方案中,本发明的治疗组合物可以借助无针头的皮下注射装置给药,如使用公开于以下美国专利中的装置:US5399163;5383851;5312335;5064413;4941880;4790824 或 4596556。可用于本发

明中的众所周知的移植物和组件的例子包括：US4487603，它公开了一种用于以受控制的流量分配药物的可植入的微型输液泵；US4486194，它公开了一种用于通过皮肤给药的治疗装置；US4447233；它公开了一种用于以精确的输液流量输送药物的药物输液泵；US4447224，它公开了一种用于连续药物输送的流量可变的可植入的输液装置；US4439196，它公开了一种具有多个腔室的渗透性药物输送系统；和 US4475196，它公开了一种渗透性药物输送系统。这些专利被收作本文参考文献。很多其他这样的植入物、输送系统、和组件是本领域技术人员所公知的。

[0210] 在本发明的某些实施方案中，可以对本发明的人单克隆抗体进行配制，以便确保在体内正确地分配。例如，血脑屏障 (BBB) 排斥了很多高度亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物能通过 BBB (如果需要的话)，可以对所述化合物进行制备，例如，包在脂质体中。例如，有关产生脂质体的方法参见：US4522811；5374548；和 5399331。脂质体可以包括一种或多种成分，这些成分被选择性地输送到特定的细胞或器官，从而增强定向药物输送 (例如，参见 V. V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29 :685)。典型的导向成分包括叶酸或生物素 (例如，参见授予 Low 等的 US5416016)；甘露糖苷 (Umezawa et al., 1988, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 :1038)；抗体 (P. G. Bloeman et al., 1995, FEBS Lett. 357 :140；M. Owais et al., 1995, Antimicrob. Agents Chemother 39 :180)；表面活性剂蛋白 A 受体 (Briscoe et al., 1995, Am. J. Physiol. 1233 :134)，其中的不同种类可以包括本发明的制剂，以及本发明分子的成分；p120 (Schreier et al., 1994, J. Biol. Chem. 269 :9090)；还可参见 K. Keinanen；M. L. Laukkanen, 1994, FEBS Lett. 346 :123；J. J. Killion；I. J. Fidler, 1994, Immunomethods 4 :273。在本发明的一种实施方案中，本发明的治疗化合物是在脂质体中制备的；在一种更优选的实施方案中，所述脂质体包括一种导向成分。在一种最优选的实施方案中，所述脂质体中的治疗化合物是通过药团注射的方式输送到靠近肿瘤或感染部位的。所述组合物的流动性必须达到容易注射的程度。在产生和储存条件下，它必须是稳定的，并且必须能防止诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。

[0211] 相对未治疗的受试者而言，“治疗有效剂量”优选调节树突细胞生长和 / 或活性的至少大约 20%，更优选至少大约 40%，甚至更优选至少大约 60%，更优选至少大约 80%。可以在用于预测抗原呈递和 / 或免疫调节效力的动物模型系统中评估一种化合物调节树突细胞生长和 / 或活性的能力。另外，可以通过检验一种化合物调节树突细胞对免疫细胞的刺激作用的能力，评估该化合物的这种特性，如在体外通过本文所公开的并且为技术人员所公知的测定方法进行评估。在一种实施方案中，治疗化合物的治疗有效量能够在受试者体内抑制树突细胞生长和 / 或活性，或者减轻症状，例如自身免疫症状。在另一种实施方案中，治疗化合物的治疗有效量可以增强树突细胞的抗原加工和呈递，并因此增强对免疫原或靶抗原的免疫应答。本领域普通技术人员可以根据诸如受试者大小、受试者症状严重程度、受试者体内的免疫活性、和所选择的特定组合物或服用途径之类的因素确定所述有效。

[0212] 所述组合物必须是无菌的，并且其流动性必须达到使该组合物能够通过注射器输送的程度。除了水之外，所述载体可以是等渗缓冲的盐溶液、乙醇、多元醇 (例如，甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇等) 及其合适的混合物。例如，合适的流动性可以通过使用诸如卵磷脂的包衣剂，对于分散剂来说通过保持需要的粒度，以及通过使用表面活性剂来保持。在很多场合下，优选在所述组合物中添加等渗剂，例如，糖类，诸如甘露糖醇或山梨醇的聚醇，和

氯化钠。可注射组合物的长期吸收,可以通过在该组合物中添加诸如单硬脂酸铝或明胶的能延长吸收的制剂而实现。

[0213] 当所述活性化合物以上文所述方式受到合适保护时,该化合物就可以口服使用,例如,用一种惰性稀释剂或可同化的食用载体进行保护。

[0214] VI. 本发明的用途和方法

[0215] 本发明的组合物(例如,抗树突细胞的人单克隆抗体及其衍生物/结合物)可用于体外和体内诊断和治疗目的。

[0216] 例如,可以将所述分子用于培养中的,例如体外或来自体内的细胞,或用于受试者,例如,体内,以便治疗、预防或诊断多种疾病。在本文中,术语“受试者”意在包括人和非人动物。本发明的术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,如非人灵长类动物,绵羊,狗,牛,鸡,两栖类动物,爬行动物等。

[0217] 在一种具体实施方案中,所述人抗体及其衍生物被用于体内治疗、预防或诊断多种由树突细胞介导的或与树突细胞相关的疾病。

[0218] 在一种实施方案中,优选的人类动物包括具有由树突细胞介导的或与树突细胞相关疾病的人类患者。例如,可以将本发明的方法和组合物用于治疗患有自身免疫病、免疫系统疾病、或炎性疾病的受试者,例如,与树突细胞的免疫调节相关的异常的或不希望的免疫活性为特征的疾病。可以从用本发明的人抗树突细胞治疗中受益的自身免疫病、免疫系统疾病和炎性疾病,包括类风湿关节炎、多发性硬化、糖尿病、重症肌无力、恶性贫血、Addison 氏病、红斑狼疮、Reiter 综合症和 Graves 病。例如,患有自身免疫疾病的受试者能够从抑制由树突细胞介导的自身抗原呈递中受益。

[0219] 可以用本发明的人抗树突细胞抗体治疗的疾病的其他例子包括移植物排斥和移植物抗宿主疾病。

[0220] 移植物排斥

[0221] 近年来,在移植诸如皮肤、肾脏、肝脏、心脏、肺、胰腺和骨髓的组织 and 器官的手术技术效率方面业已取得了明显改善。也许主要的突出问题是缺乏令人满意的用于诱导受体产生对移植的同种异体移植物或器官的免疫耐受性的制剂。在将同种异体细胞或器官移植到宿主体内时(即供体和受体是来自相同物种的不同个体),宿主免疫系统有可能发动针对移植物中的外源抗原的免疫应答(宿主抗移植物病),导致移植组织破坏。CD8⁺ 细胞、CD4⁺ 细胞以及单核细胞都参与对移植组织的排斥作用。本发明的治疗剂可用于抑制由树突细胞介导的发生在受体体内的,由同种异体抗原诱导的免疫应答,从而抑制所述细胞参与破坏移植的组织或器官。

[0222] 移植物抗宿主疾病

[0223] 本发明治疗剂的一种相关用途是用于调节与移植物抗宿主疾病(GVHD)相关的免疫应答。GVHD 是一种在将免疫活性细胞移植到同种异体受体中时发生的潜在的致命性疾病。在这种场合下,供体的免疫活性细胞会攻击受体的组织。皮肤、肠上皮和肝脏组织通常是攻击的目标,并且有可能在 GVHD 过程中受到损伤。在移植免疫组织时,如在进行骨髓移植时,这种疾病存在尤其严重的问题;不过,也报导过在其他场合下不太严重的 GVHD,包括心脏和肝脏移植。本发明的治疗剂可用于抑制诸如树突细胞的宿主抗原呈递细胞的活性。

[0224] 在另一种实施方案中,本发明的方法和组合物可用于在受试者体内调节对一种抗

原的免疫应答。可以将本发明的人抗树突细胞抗体用于将一种抗原导向树突细胞,并因此调节抗原呈递和加工,以便诱导针对所述抗原的免疫应答。所述抗原可以是肿瘤抗原,或者是来自病原体的抗原,例如微生物病原体。所述病原体可以是病毒(例如 HIV)、细菌真菌、或寄生虫。所述抗原还可以是在诸如早老性痴呆患者体内的淀粉样沉积物的成分,并且,所述抗原是 A β 肽。

[0225] 例如,可以给予受试者含有至少一种对存在于树突细胞表面上的成分的结合特异性的与一种抗原结合的分子复合物,以便诱导或增强对所述抗原的免疫应答,其中,所述复合物与树突细胞的结合能介导该分子复合物的内化。所产生的针对所述抗原的免疫应答包括与所述抗原结合的抗体和与作为 MHC-I 或 MHC-II 复合物的成分的所述抗原结合的 T 细胞。因此,还可以将本发明的人抗树突细胞抗体用于介导受试者的树突细胞定向免疫。例如,可以用含有至少一种对存在于树突细胞表面上的成分的结合特异性的与一种抗原结合的分子复合物,对一种受试者进行免疫,其中,所述复合物与树突细胞的结合,能介导该分子复合物的内化,并且,例如,增强所述抗原的加工和呈递。

[0226] 在另一方面,还可将对树突细胞特异的人抗体用于直接将诸如肿瘤细胞、效应细胞或微生物病原体的完整细胞导向树突细胞。抗树突细胞抗体或其抗原结合片段,可以直接在细胞表面表达,例如,通过用含有编码本发明的人抗树突细胞特异性抗体的核酸序列的载体转染或转导细胞。另外,抗树突细胞抗体或其抗原结合片段可以通过化学连接子、或脂类标记或其他相关方法结合在细胞或病原体上。可以用具有表面锚定的抗树突细胞抗体或其抗原结合片段的细胞,诱导诸如针对肿瘤细胞或微生物病原体的细胞的特异性免疫应答。

[0227] 因此,可将本发明的抗体用于刺激针对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。特别适合这种治疗方法的病原体的例子,包括目前还没有有效疫苗的病原体,或常规疫苗不能完全发挥作用的病原体,其中包括,但不限于 HIV、肝炎(甲型、乙型和丙型)、流感、疱疹、贾第亚鞭毛虫、疟疾、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌。

[0228] 可以首先在体外试验本发明组合物(例如,人抗体,多特异性和双特异性抗体)与治疗或诊断用途相关的结合活性。例如,可以通过在下面的实施例中所公开的流式细胞仪和内化测定检测本发明的组合物。另外,可以测定所述分子在引起包括树突细胞的细胞裂解在内的,至少一种由效应细胞介导的效应细胞活性方的活性。用于测定效应细胞介导的吞噬作用和细胞裂解作用的方法,在本领域是公知的。

[0229] 本发明的组合物(例如,人抗体,多特异性和双特异性分子)还可用于治疗 and 诊断由树突细胞介导的或与树突细胞相关的疾病。例如,可以将所述人单克隆抗体、多特异性或双特异性分子用于在体内或体外诱导以下生物学活性中的一种或多种:调理树突细胞;在存在效应细胞的条件下,介导对树突细胞的吞噬作用或细胞裂解;抑制树突细胞生长;被树突细胞内化;或将一种抗原导向树突细胞。

[0230] 本发明组合物(例如,人抗体,多特异性和双特异性分子)的给药方法在本领域中是公知的。所使用的所述分子的合适剂量,取决于受试者的年龄和体重以及所使用的具体药物。所述分子可以与诸如 ¹³¹I、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh 之类的放射性核素偶联,正如在以下文献中所公开的:Goldenberg, D. M. et al., 1981, Cancer Res. 41:4354-4360, 和 EP0365997。本发明的组合物(例如,人抗体,多特异性和双特异性分子)还可以与免疫调节剂偶联。

[0231] 还可以将诸如与本发明组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子）连接的效应细胞的靶特异性效应细胞用作治疗剂。用于导向的效应细胞可以是人白细胞，如巨噬细胞、嗜中性粒细胞或单核细胞。其他细胞包括嗜伊红性粒细胞、天然杀伤细胞和具有 IgG 或 IgA 受体的其他细胞。如果需要，可以从接受治疗的受试者体内获得效应细胞。所述靶特异性效应细胞能以悬浮在生理学上可接受的溶液中的细胞悬浮液形式使用。所使用的细胞的数量在 10^8 - 10^9 的数量级上，不过，可以根据治疗目的而改变。在一种实施方案中，这一数量足以实现在诸如树突细胞上的定位，并且足以通过诸如吞噬作用实现细胞杀伤。在另一种实施方案中，可以将诸如与本发明组合物结合的树突细胞的靶特异性树突细胞用作治疗剂，用于定位在诸如肿瘤细胞、微生物病原体、病毒或病毒感染的细胞的靶细胞，或者用于对一种抗原进行导向，并且通过诸如抗原加工和呈递，实现对所述靶细胞或靶抗原的免疫应答。给药途径也可以改变。

[0232] 用靶特异性效应细胞或靶特异性树突细胞进行的治疗，还可以结合清除靶细胞的其他技术实施。例如，用本发明组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子）和 / 或用这种组合物装备的效应细胞进行的抗树突细胞治疗，可以与诸如抗炎或免疫抑制治疗的化疗或免疫调节治疗组合进行。另外，还可以通过组合免疫治疗将两种不同的细胞毒性效应群体导向到例如树突细胞。例如，可以将与抗 Fc γ RI 或抗 CD3 连接的抗树突细胞抗体，与 IgG 或 IgA 受体特异性结合制剂组合使用。

[0233] 在另一种实施方案中，可以将由诸如本发明的人抗体、多特异性和双特异性分子导向的树突细胞，与诸如免疫刺激的免疫调节治疗组合使用，以便增强针对靶细胞或靶抗原的免疫应答。树突细胞定向治疗可以与诸如细胞因子治疗（例如，干扰素、TNF α 、GM-CSF、G-CSF、IL-2）的其他免疫治疗形式组合。

[0234] 还可以将本发明的双特异性和多特异性分子用于调节树突细胞活性，例如，抗原加工和呈递，也可用于调节树突细胞上的关联抗原的水平，例如，通过封闭并消除所述细胞表面上的受体。

[0235] 在存在补体的情况下，还可以使用具有补体结合位点的本发明组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子），例如，来自 IgG-1、2 或 3 或 IgM 的能结合补体的部分。在一种实施方案中，用本发明的结合制剂和合适的效应细胞对包括靶细胞的细胞群体进行的来自体内的治疗，可以通过添加补体或含有补体的血清进行补充。通过结合补体蛋白，可以改善对由本发明的结合制剂包被的靶细胞的吞噬作用。在另一种实施方案中，由本发明组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子）包被的靶细胞还可以被补体裂解。

[0236] 本发明的组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子）还可以与补体一起使用。因此，包括人抗体、多特异性或双特异性分子和血清或补体的组合物属于本发明的范畴。这种组合物的优点是，所述补体紧邻所述人抗体、多特异性或双特异性分子。另外，可以分别使用本发明的人抗体、多特异性或双特异性分子以及补体或血清。

[0237] 在其他实施方案中，还可以用调节，例如，增强或抑制免疫细胞活性和 / 或 Fc γ 或 Fc α 受体的表达或活性的制剂治疗所述受试者，通过例如，用细胞因子治疗所述受试者。在用所述多特异性分子治疗期间使用的优选细胞因子，包括粒细胞集落刺激因子（G-CSF）、粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）、干扰素 γ （IFN- γ ）和肿瘤坏死因子（TNF α ）。

[0238] 还可将本发明组合物（例如，人抗体，多特异性和双特异性分子）用于定向于诸如

树突细胞的细胞,例如,用于标记所述细胞。对这种用途来说,所述结合制剂可以与可检测分子连接。因此,本发明提供了用于定位来自体内的或体外树突细胞的方法。例如,所述可检测的标记可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅助因子。

[0239] 在一种实施方案中,本发明提供了用于检测树突细胞或树突细胞抗原在一种样品中的存在,或测定树突细胞或树突细胞抗原的数量的方法,该方法包括让所述样品和一种对照样品,与能特异性结合树突细胞或树突细胞抗原的人单克隆抗体或其抗原结合部分接触,接触是在能在所述抗体或其部分与树突细胞或树突细胞抗原之间形成复合物的条件下进行的。然后检测复合物的形成,其中,所述样品与所述对照样品之间复合物形成的差异,表明在所述样品中存在树突细胞或树突细胞抗原。

[0240] 在另一种实施方案中,本发明提供了用于在体内或体外检测树突细胞的存在或对树突细胞进行定量的方法。该方法包括(i)给予受试者与一种可检测标记结合的本发明的组合物(例如,多特异性或双特异性分子)或其片段;(ii)让所述受试者接触用于检测所述可检测标记的装置,以便确定含有树突细胞的部位。

[0241] 包括本发明组合物(例如,人抗体,多特异性或双特异性分子)的试剂盒以及使用说明书也属于本发明的范畴。该试剂盒还可以包括至少一种其他制剂,如细胞因子或补体,或一种或多种其他本发明的人抗体(例如,不同于人第一抗体的具有互补活性的能结合树突细胞上的表位的人抗体)。

[0242] 通过以下实施例对本发明作进一步说明,不应当将这些实施例理解成是进一步的限定。在本申请中所引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容被专门收作本文参考。

[0243] 1. G. Kobler and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 :495-497.

[0244] 2. G. L. Boulianne, Hozum N., and Shulman M. J. (1984) Production of functional chimeric mouse/human antibody. *Nature* 312 :643-646.

[0245] 3. P. T. Jones, Dear P. H., Foote J., Neuberger M. S., and Winter G. (1989) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those of a mouse. *Nature* 321 :522-525.

[0246] 4. J. D. Marks et al. (1991) Bypassing Immunization: Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* 222 :581-597.

[0247] 5. N. Lonberg, et al. 1994. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368 (6474) :856-859.

[0248] 6. G. Gafie, Howe S. C., Butcher M. C. C. W., and Howard H. C. (1997) Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266 :550-552.

实施例

[0249] 实施例 1. 抗树突细胞的人单克隆抗体的产生

[0250] 人抗树突细胞单克隆抗体是通过用树突细胞制剂对 HuMAb 小鼠的 HC07 品系进行免疫而制备的。HC07 HuMAb 小鼠是按照公开于 US5770429 和 5545806 中的方法产生的,以

上专利的完整内容被收作本文参考。

[0251] 具体地讲,通过腹膜内注射,用弗氏佐剂乳化的人树突细胞对 HC07 小鼠进行 4 次免疫接种。简单地讲,按以下方法制备树突细胞。通过对全血或 Leukopak 血小板去除制备物进行密度梯度离心,获得人外周血单核细胞 (PBMCs)。通过在组织培养烧瓶上贴壁 2 小时分离单核细胞,然后通过在不含巨噬细胞血清的培养基 (Gibco) 中,用 2 纳克 / 毫升 GM-CSF 和 10 纳克 / 毫升 IL-4 孵育 5-9 天,使其分化成树突细胞。用于免疫接种的细胞是新鲜使用或者在 -80°C 下冷冻保存。每 2-3 周对小鼠进行免疫接种。最后,在实施脾切除术之前,静脉注射悬浮在磷酸缓冲的盐溶液 (PBS) 中的树突细胞。收获来自相应小鼠的脾脏,并且分散成单细胞。

[0252] 为了制备产生抗树突细胞抗体的杂交瘤,将来自具有含抗树突细胞抗体血浆的小鼠的脾细胞与 P3X63-Ag8.653 骨髓瘤细胞 (以 ATCC CRL1580 非分泌小鼠骨髓瘤细胞的名称保存在 ATCC) 和 PEG 融合。通过在含有 HAT 的培养基中生长筛选杂交瘤。在生长出杂交瘤之后 (大约 10-14 天),通过抗人 IgG ELISA 筛选含有杂交瘤的每一个孔中人 IgG 的产生。

[0253] 根据以下特性筛选并选择阳性杂交瘤:(1) 产生人 IgG 抗体,和 (2) 与树突细胞结合。

[0254] 通过流式细胞仪检验分泌人 IgG 的杂交瘤与各种类型血液细胞的反应性。通过在添加了 GM-CSF 和 IL-4 的培养基中培养 5-7 天,由贴壁单核细胞制备树突细胞。从肝素化的全血中获得粒细胞 (PMN)、单核细胞和淋巴细胞。在 4°C 下将所述细胞与来自 IgG 阳性克隆的杂交瘤上清液一起孵育。通过 FITC 标记过的山羊抗人 IgG (Fc) 探针检测结合。通过用 FACScalibur 仪器分析,确定与细胞结合的荧光素。

[0255] 如下面的表 1 所示,筛选的若干种杂交瘤产生人 IgG1 κ 抗体,通过流式细胞仪测定证实该抗体与树突细胞有反应性 (例如, A3、A5、A23、A24、A33、B9、B11、B33、B47、C8、C10、C20、C28、C29、C30、C35、E1、E8、E10、E18、E20、E21 和 E24)。与其他类型的血液细胞相比,上述某些人抗体表现出与树突细胞有非常高的和优先的反应性。

[0256] 表 1 对树突细胞有反应性的人单克隆抗体

[0257]

人 MAbs	淋巴细胞	单核细胞	PMNs	树突细胞
A3	-	+/-	+/-	+
A5	-	+/-	-	+/-
A23	-	+	-	+/-
A24	-	++	+	++
A33	-	+/-	-	+/-
B9	+/-	+++	+	+++
B11	-	+/-	-	+++

B33	-	+/-	-	+/-
B47	-	+/-	+/-	+/-
C8	-	+/-	-	+/-
C10	-	+/-	+/-	+
C20	-	+/-	+/-	++
C28	-	+/-	-	+/-
C29	-	+/-	+/-	++
C30	-	-	-	+/-
C35	-	-	-	++
E1	-	-	-	+
E8	-	+	+	++
E10	-	+	+	+++
E18	-	+	+	++
E20	+	+/-	+/-	+++
E21	+/-	+/-	+/-	+++
E24	-	-	-	+/-

[0258] 图解 :- 没有检测到结合

[0259] +/- 弱的 / 不确定的结合

[0260] + 低度 / 显著结合

[0261] ++ 高度结合

[0262] +++ 极高度的结合

[0263] 实施例 2. 抗树突细胞的人单克隆抗体的特征分析

[0264] I. 纯化的人抗树突细胞抗体对树突细胞的结合特异性

[0265] 对分泌对树突细胞有特异性的人 IgG 抗体的若干种杂交瘤进行亚克隆, 并且扩增用于纯化。从在含有 5% 二氧化碳的潮湿培养箱中的旋转烧瓶中生长的杂交瘤培养物的上清液中分离单克隆抗体。通过在蛋白 A- 琼脂糖柱上按照产生商 (Pierce, Rockford IL) 的说明进行层析纯化抗体。

[0266] 然后, 通过流式细胞仪检测所述纯化的人抗体与树突细胞和代表各种其他造血细胞类型的细胞系的反应性。简单地讲, 按上述方法, 通过在添加了 GM-CSF 和 IL-4 的培养

基中培养 5-7 天,由贴壁单核细胞制备树突细胞。在补充了 10%胎牛血清的培养基中培养 U937、CEM、THP-1 和 L540 细胞系。收获、洗涤所述细胞,并且在 4℃下与饱和浓度的人单克隆抗体 B11、C20、E21 或同种型对照(人 IgG1)一起摇晃孵育 1 小时。通过在 4℃下与 FITC 标记过的山羊抗人 IgG(Fc) 探针一起再孵育 1 小时,检测抗体结合。洗涤所述细胞,用 1% 低聚甲醛固定,并且采用 FACScalibur(Beckton Dickinson) 仪器和 CellQuest 软件分析细胞结合的荧光素。

[0267] 如图 1 所示,人单克隆抗体 B11 只能结合树突细胞。单克隆抗体 C20 特异性结合树突细胞,并且还表现出与单核细胞样细胞系 U-937 和 THP-1 以及霍奇金淋巴瘤细胞系 L540 具有低水平的反应性。类似地,人单克隆抗体 E21 能优先结合树突细胞,但也能在低水平上与 L540 细胞和 THP-1 细胞起反应。以上结果表明,人单克隆抗体 B11、C20 和 E21 识别不同的抗原,并且,与造血谱系的其他细胞相比,它们优先结合树突细胞。

[0268] II. 纯化的人抗树突细胞抗体对树突细胞的剂量决定性结合

[0269] 通过流式细胞仪验证纯化的人抗树突细胞单克隆抗体 B11、C20 和 E21 与树突细胞的剂量决定性反应性。

[0270] 树突细胞是按上文所述方法由贴壁单核细胞制备的。收获所述细胞,并且在 4℃下与各种浓度的单克隆抗体 B11、C20、E21 或同种型对照一起培养。用 FITC- 标记的山羊抗人 IgG(Fc) 探针检测抗体结合,并利用 FACScalibur 仪器和 CellQuest 软件测定细胞结合的荧光素。

[0271] 如图 2 所示,与同种型匹配的对照 IgG 抗体相比,每一种单克隆抗体都表现出与树突细胞的剂量决定性结合。以上数据表明,纯化的人单克隆抗体 B11、C20 或 E21 以浓度决定性方式结合树突细胞。抗树突细胞抗体之间不同的结合强度表明,它们识别所述树突细胞上的独特分子或表位。

[0272] III. 人抗体 B11 与 CD34+ 干细胞衍生的树突细胞的结合

[0273] 由于其有效性,由循环血液单核细胞分化而成的树突细胞,是研究和临床应用最常用的树突细胞类型。不过,也可以使用由祖干细胞衍生的树突细胞,并且能更精确地代表人组织中的树突细胞。因此,在以下研究中,通过流式细胞仪评估 CD34+ 祖细胞分化的树突细胞对人单克隆抗体 B11 的反应性。

[0274] 用 0.3M 碳酸钠缓冲液(pH9.5)对纯化的单克隆抗体 B11 进行充分透析,以使用异硫氰酸荧光素(FITC)标记。通过将 1 毫克固体 FITC 溶解在 1 毫升 DMSO 中制备 FITC 母液。以每毫克抗体蛋白提供 50 微克 FITC 的用量,逐滴添加 FITC 母液,并持续混合。在添加 FITC 之后,在室温下遮光孵育该溶液 1-3 小时。通过在用 PBS 平衡的 Sephadex G-10 柱上凝胶过滤分离 FITC 标记的抗体。

[0275] CD34+ 祖细胞和树突细胞分化培养基是从 Poetic Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD) 获得的。按照产生商的说明使所述细胞分化。收获树突细胞,并且在 4℃下与各种浓度的 B11-FITC 或同种型对照抗体(人 IgG-FITC)一起孵育。通过用 FACScalibur 仪器和 CellQuest 软件分析,确定与所述细胞结合的荧光素。

[0276] 结果如图 3 所示,并且表明人单克隆抗体 B11 以剂量决定性形式结合由 CD34+ 干细胞分化的树突细胞。因此,B11 靶抗原在由单核细胞和祖干细胞衍生的树突细胞上表达。

[0277] IV. 人抗体 B11 与巨噬细胞和树突细胞的结合

[0278] 通过流式细胞仪测定与树突细胞相比的人抗树突细胞单克隆抗体 B11 结合巨噬细胞的能力。

[0279] 按上文所述方法由贴壁单核细胞制备树突细胞。通过与 M-CSF 一起培养 5-7 天，由贴壁单核细胞制备巨噬细胞。收获所述细胞，并且在 4℃ 下与 10 微克 / 毫升的单克隆抗体 B11 或同种型对照抗体一起孵育。用 FITC 标记的山羊抗人 IgG (Fc) 探针检测人抗体结合。通过用 FACScalibur 仪器和 CellQuest 软件分析，测定与所述细胞结合的荧光素。

[0280] 结果如图 4 所示，并且表明人抗体 B11 结合巨噬细胞的程度低于结合树突细胞的程度。因此，B11 靶抗原同样在巨噬细胞上表达，不过表达水平低于在树突细胞上观察到的表达水平。单克隆抗体 B11 与巨噬细胞的反应性并不令人吃惊，因为在树突细胞和巨噬细胞之间存在相似性。由于这两种类型的细胞分享结构和功能特征，包括刺激 T 和 B 淋巴细胞反应的能力，抗体 B11 与巨噬细胞的交叉反应性可能有利于导向抗原呈递细胞。

[0281] V. 在 THP-1 细胞上诱导人抗体 B11 靶抗原

[0282] 在诱导 THP-1 细胞分化成树突细胞表现型之前和之后，通过流式细胞仪检测人单克隆抗体 B11 与 THP-1 细胞的结合，它是源于人单核细胞白血病的单核细胞样细胞系。

[0283] 简单地讲，在标准培养基中或在补充了 GM-CSF 和 IL-1 的培养基中生长 THP-1 细胞。在 4℃ 下将所述细胞与 10 微克 / 毫升单克隆抗体 B11-FITC 或同种型对照抗体（人 IgG-FITC）一起孵育。通过用 FACScalibur 仪器和 CellQuest 软件分析，测定细胞结合的荧光素。结果如图 5 所示。

[0284] 以上数据表明，在正常生长条件下，THP-1 细胞不表达 B11 靶抗原。不过，当通过在含有 GM-CSF 和 IL-4 的培养基中培养使 THP-1 细胞趋向树突细胞表型时，就同时诱导了 B11 靶抗原的表达。因此，以上结果进一步证实了 B11 人抗体对与树突细胞特异性相关的靶抗原 (B11) 的特异性。

[0285] VI. 人抗体 B11 与猕猴树突细胞的结合

[0286] 猕猴 (cynomolgous macaques) 动物模型 (猴) 可以提供有关抗体的临床应用的相关信息，只要所述靶抗原在灵长类动物中是保守的。因此，通过流式细胞仪，评估了人单克隆抗体 B11 与来自猕猴的树突细胞的交叉反应性。

[0287] 新鲜的猕猴血液是从 Sierra Biomedicals 获得的，而树突细胞是通过用 GM-CSF 和 IL-4 培养由贴壁单核细胞制备的。在 4℃ 用 10 微克 / 毫升的单克隆抗体 B11-FITC 或同种型对照抗体（人 IgG-FITC）孵育树突细胞。通过用 FACScalibur 仪器分析，测定与细胞结合的荧光素。

[0288] 如图 6 所示，人单克隆抗体 B11 结合源于猕猴的树突细胞，这表明 B11 靶抗原在灵长类动物中是保守的。

[0289] VII. 人抗体 B11 与人组织中的树突细胞的结合

[0290] 通过免疫组织化学评估人单克隆抗体 B11 与来自人组织的树突细胞的反应性。还设计这些实验，以便评估抗体 B11 与人组织的其他细胞或抗原的任何可能的交叉反应性。

[0291] 通过尸体解剖或外科活组织检查获得人组织的冷冻切片，并且包埋在 Tissue-Tek O. C. T. 介质中，在低于 -70℃ 的温度下冷冻保存。以 5 毫米的厚度进行组织切片，用丙酮固定 10 分钟，并且干燥过夜。在染色之前，将载玻片放在 10% 中性缓冲的福尔马林中固定 10 秒。采用间接免疫过氧化物酶技术。首先用在含有热聚合的 IgG 的 PBS 中稀释的 B11-FITC

或同种型匹配的 FITC 抗体对切片进行染色,以便阻断 Fc 依赖性结合。依次用兔抗 FITC 抗体和过氧化物酶标记过的抗兔试剂检测一抗。由权威病理学家对每一张切片进行阅读,并且按照以下标准对结合进行分级:±(不确定),1+(弱),2+(中等),3+(强),4+(非常强),Neg.(阴性)。在下面的表 2 中示出的结果证实,能使所有检验组织中的树突细胞和某些巨噬细胞明显染色。用所述同种型对照抗体没有观察到特异性染色。

[0292] 以上结果表明,人单克隆抗体 B11 结合人组织中的树突细胞,还结合人组织中的巨噬细胞,不过结合程度较低。B11 与脾脏中的单核细胞和骨髓中的祖细胞的最低结合,可以代表与未成熟树突细胞的结合。人抗体 B11 不与检测样品中的其他细胞类型或组织交叉反应,这进一步证实了这种抗体对树突细胞的特异性,以及在较低程度上对巨噬细胞的特异性。

[0293] 表 2 人单克隆抗体 B11 结合人组织的免疫组织化学

[0294]

抗体	组织和反应性
B11-FITC (2 微克 / 毫升)	皮肤 :真皮树突细胞 3+,所有其他部分为阴性。
※	扁桃腺 :间质和 / 或上皮下树突细胞 2+,所有其他部分为阴性。
※	肝脏 :间质树突细胞 2+,枯氏细胞 2+,所有其他部分为阴性。
※	乳腺 :真皮 / 皮下 / 间质树突细胞 3-4+,所有其他部分为阴性。
※	脾脏 :间质树突细胞 3-4+,Billiroth 网状内皮细胞衬里条索 2+,在边缘区中的单核细胞偶然为 2+,在 PALS / 滤泡中的单核细胞很少 - 偶然为 2+,其他部分为阴性。
※	肾脏 :间质树突细胞 3-4+,所有其他部分为阴性。
※	淋巴结 :包膜树突细胞 3-4+,包膜下树突细胞 / 巨噬细胞 3+,滤泡树突细胞 2-3+,皮质旁树突细胞 2-3+,髓窦树突细胞 / 巨噬细胞 1-2+,其他部分为阴性。
※	脑 :脑膜 / 周皮树突细胞 3-4+,所有其他部分为阴性。
※	睾丸 :间质树突细胞 3-4+,所有其他部分为阴性。
※	胰腺 :间质树突细胞 3-4+,所有其他部分为阴性。
※	心脏 :间质树突细胞 3-4+,所有其他部分为阴性。

※	小肠:间质树突细胞 3-4+, 固定层树突细胞 / 巨噬细胞 2-3+, 集合淋巴结树突细胞 / 巨噬细胞 2-3+, 其他部分为阴性。
※	骨髓:间质树突细胞 3-4+, 造血祖细胞 2+, 其他部分为阴性。
※	肺:间质树突细胞 3-4+, 肺泡巨噬细胞 3-4+, 其他部分为阴性。
IgG1-FITC (2 微克 / 毫升)	所有受检的组织:所有部分为阴性。

[0295] 组织交叉反应性研究是在 Pathology Associates International, Frederick, MD study#IM598 进行的。

[0296] VIII. 人抗体 B11 的单链 Fv (ScFv) 片段与人树突细胞的结合

[0297] 通过流式细胞仪评估人单克隆抗体 B11 的单链 Fv 片段与来自人组织的树突细胞的反应性。

[0298] 如图 9 所示, B11 ScFv 是通过连接人单克隆抗体 B11 的 V_L (SEQ ID NO:1 和 2) 和 V_H (SEQ ID NO:3 和 4) 结构域而构建的。为了用抗 EFG 抗体检测 ScFv 与树突细胞的结合, 整合了 EGF 序列。在 4°C 下将树突细胞与 B11-ScFv 一起孵育 1 小时, 洗涤之后再与抗 EFG-FITC 探针一起在 4°C 下孵育 1 小时。通过 FACS 分析分析所述样品。

[0299] FACS 分析的结果证实, 人单克隆抗体 B11 的 B11 ScFv 片段与人树突细胞结合。因此, 可以分别通过将 ScFv 与选定的抗原或毒素结合将 ScFv 用作疫苗或用作免疫毒素。

[0300] IX. 人抗体 B11 的 $F(ab')_2$ 片段与人树突细胞的结合

[0301] 通过流式细胞仪测定评估人单克隆抗体 B11 的 $F(ab')_2$ 片段与来自人组织的树突细胞的反应性。还对所述实验进行了设计, 以便评估人抗体 B11Fc 部分是否明显参与了 B11 与树突细胞的结合。

[0302] $F(ab')_2$ 片段是通过在标准条件下用胃蛋白酶消化纯化的 B11 mAb 而制备的。通过蛋白 L 层析纯化 $F(ab')_2$ 片段。将通过在 GM-CSF 和 IL-4 中培养由人单核细胞制备的新鲜的树突细胞, 与完整的抗体或 $F(ab')_2$ 抗体片段一起在 4°C 下孵育 1 小时。洗涤所述细胞, 然后与抗人 IgG- $F(ab')_2$ -PE 探针一起在 4°C 下孵育 1 小时。在用 FACScalibur 仪器和 Cellquest 软件分析之前, 再次洗涤所述细胞。

[0303] 如图 10 所示, FACS 分析的结果表明, 完整的人单克隆抗体 B11 和 B11 的 $F(ab')_2$ 片段以相似的动力学结合树突细胞, 这表明完整单克隆抗体的 Fc 部分对 B11 与树突细胞的结合没有明显的作用。

[0304] 实施例 3. B11 靶抗原的特征分析

[0305] I. 从树突细胞中免疫沉淀人单克隆抗体 B11 靶抗原

[0306] 将人单克隆抗体 B11 用于从树突细胞中免疫沉淀其关联的靶抗原。

[0307] 简单地讲, 用树突细胞制备细胞裂解物, 并且在 4°C 下与单克隆抗体 B11 或同种型对照 IgG 抗体一起孵育。用抗人 IgG 琼脂糖捕捉抗体-抗原复合物, 并且通过 SDS 聚丙烯

酰胺凝胶电泳分离。

[0308] 在来自两种不同的树突细胞裂解物制剂的抗体 B11 免疫沉淀中,相当于分子量大约为 180kDa 的带很明显,但对照样品中却没。因此,通过 SDS-PAGE 分析进行的上述免疫沉淀研究证实,人单克隆抗体 B11 识别树突细胞上的分子量大约 180kDa 的靶抗原。

[0309] II. 来自树突细胞的人单克隆抗体 B11 靶抗原的 N- 末端测序

[0310] 在上述免疫沉淀之后,对 B11 靶抗原进行 N- 末端氨基酸测序,以便确定与已知蛋白的同源性。

[0311] 用树突细胞制备细胞裂解液,并且在 4°C 下与单克隆抗体 B11 一起孵育。用抗人 IgG- 琼脂糖捕捉抗体-抗原复合物,并且通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。将来自凝胶的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,并且洗脱相当于单克隆抗体 B11 靶抗原的带,用于 N- 末端氨基酸测序。N- 末端测序和数据库检索,在 Midwest Analytical, Inc. (St., Louis, MO) 进行。

[0312] 对单克隆抗体 B11 靶抗原 N- 末端 15 个氨基酸残基的测序,发现了与人巨噬细胞甘露糖受体的蛋白序列同源性,其序列如下:

[0313] DDXXQFLIXXEDXKR (SEQ ID NO :5) B11 抗原

[0314] LDTRQFLIYNEDHKR (SEQ ID NO :6) 巨噬细胞甘露糖受体

[0315] 对所述人蛋白数据库进行计算机检索,没有发现任何其他蛋白与 B11 抗原具有显著同源性。

[0316] 在进一步的研究中,通过与抗小鼠 IgG 加载的琼脂糖一起孵育过夜,清除树突细胞裂解物中的非特异性结合蛋白。通过离心除去琼脂糖,回收消除过的上清液,并且与事先用抗体 B11 加载过的抗人 IgG 琼脂糖一起孵育过夜。用 PBS 洗涤所述琼脂糖,并且与还原性加样缓冲液一起煮沸。最后,通过离心除去琼脂糖,并将上清液加样到凝胶上。抗体 B11 免疫沉淀一种分子量大约为 150-180kDa 的蛋白。将该蛋白吸印到 PVDF 膜上,并且送到 Midwest Analytical, Inc. 进行微量测序。

[0317] 对单克隆抗体 B11 靶抗原进行的 N- 末端微量测序结果发现了以下蛋白序列: LLDTR QFLIY LEDTK RCVDA (SEQ ID NO :7)。该序列再次与人巨噬细胞甘露糖受体的序列 (GenBank 保藏号 NP_002429) 吻合,用国家生物技术信息中心网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLAST 算法确定,在 20 个氨基酸上的相同性为 100%。以上数据表明,树突细胞上的由人单克隆抗体 B11 识别的靶分子是巨噬细胞甘露糖受体。

[0318] III. B11 抑制树突细胞对 FITC- 葡聚糖的摄取

[0319] 设计以下实验,验证抗体 B11 是否阻断甘露糖受体,并因此可用于,例如,防止或抑制病原体与甘露糖受体的相互作用(例如,细胞感染)。

[0320] 在图 11 中所标明的温度下,将树突细胞与 FITC- 葡聚糖 (500 微克/毫升) 和同种型对照人 IgG 或 B11HuMAb (25 微克/毫升) 一起孵育 30 分钟。已知树突细胞能通过甘露糖受体将葡聚糖分子特异性地内化 (F. Sallusto et al., J. Exp. Med. 1995, 185 :389-400)。通过 FACS 分析测定对标记过的 FITC- 葡聚糖的摄取(即,用 FACS calibur 仪器测定树突细胞样品的荧光强度)。将 37°C 下的 FITC- 葡聚糖摄取设定为 100%,而将在 4°C 下的摄取设定为 0%。

[0321] 如图 11 所示,在上述条件下,抗体 B11 能抑制 FITC- 葡聚糖摄取的 61.5%。以上

结果表明,人单克隆抗体 B11 可用于阻断病原体与甘露糖受体之间的相互作用。

[0322] 实施例 4. 人抗树突细胞抗体的活性

[0323] I. 树突细胞对人单克隆抗体 B11 的内化

[0324] 通过流式细胞仪测定评估在与树突细胞结合之后,人抗体 B11 被内化的程度。

[0325] 按上述方法由贴壁单核细胞制备树突细胞。在 4°C 下将所述细胞与饱和浓度的单克隆抗体 B11-FITC 一起孵育 1 小时,以便实现抗体的最大表面结合,用冷的 PBS 洗涤,以便除去多余的抗体,然后在 37°C 下孵育不同的时间,以便完成抗体内化。然后用冷的 PBS 洗涤所述样品,以便终止所述反应,进一步用 0.1% PBA, pH2.5 洗涤,以便除去所述细胞表面上结合的抗体。剩余的荧光素是业已内化的抗体 B11-FITC。马上用 0.1% PBA, pH2.5 洗涤对照细胞,并且保持在 4°C 下,以便代表最低内化,或者只用 PBA, pH7 洗涤,以便代表抗体 B11-FITC 的最大加载量。通过以下公式计算抗体内化的百分比:

[0326] 内化百分率 = (样品的平均荧光强度 - 在 4°C 下酸洗对照的平均荧光强度) / (在 4°C 下 PBS 洗涤的对照的平均荧光强度 - 在 4°C 下酸洗对照的平均荧光强度)

[0327] 图 7 中所示的结果表明,人单克隆抗体 B11 在与树突细胞结合之后被有效内化。人抗树突细胞单克隆抗体 B11 的这种出人意料特征表明,可将这种抗体用于将诸如抗原和毒素的制剂输送到树突细胞内部。

[0328] II. 树突细胞对 B11-FITC 的内化

[0329] 在与树突细胞结合之后,同样通过显微镜观察证实抗体 B11 被内化。通过在非贴壁条件下将单核细胞与 GM-CSF (10 纳克 / 毫升) 和 IL-13 (50 纳克 / 毫升) 一起孵育 7 天制备树突细胞。在有人 IgG (600 微克) 和抗 CD32mAb IV.3 (10 微克) 的条件下,将树突细胞与 mAb B11-FITC (1 微克) 一起混合,以便抑制非特异性摄取,并且在 37°C 下孵育。在整个过程中,在冰上孵育对照细胞。在 37°C 下孵育 15 和 60 分钟之后,将树突细胞放置在冰上,并且用抗 CD11c-PE (1 微克) 染色。使用 BioRadMRC1024 激光扫描聚焦显微镜,通过聚焦观察检验 mAb B11 的内化。用来自 15mW Kr/Ar 激光的 488nm 的光线和两个光学检测仪扫描细胞的荧光 (将 522/35nm 两色性用于 FITC 荧光,而 605/32nm 两色性用于 PE 荧光)。将 63×Plan-AP01.4NA 物镜 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) 与 2.1 的可变光阑 (iris) 设置组合使用,以便检测厚度大约为 1.0 微米的荧光图象的光学切片。在对整个细胞进行切片之后,从通过细胞中央的切片中挑选代表性的图象。

[0330] 结果证实了 B11mAb 在与甘露糖受体结合之后能被树突细胞迅速内化,这再次表明,这种抗体能将抗原或毒素有效输送到抗原呈递细胞内。与 FACS 数据吻合,所述内化是在 15 分钟内显著,并且在 1 小时内就接近完成。

[0331] III. 在通过人单克隆抗体 B11 进行定向抗原输送之后,增强了树突细胞的抗原呈递

[0332] 为了确定是否能将人单克隆抗体 B11 用于增强树突细胞对抗原的加工和呈递,通过化学交联剂 SMCC 将所述抗体结合在破伤风类毒素 (TT) 抗原上。

[0333] 按上述方法由贴壁单核细胞制备树突细胞,所不同的是,细胞是在 Teflon 容器中培养的。收集树突细胞,并且以每孔 5000 个细胞的密度重新铺平板在 96 孔微量滴定板上,存在于含有 10% 胎牛血清的无巨噬细胞血清培养基中。以各种浓度将与破伤风类毒素结合的单克隆抗体 B11 或破伤风类毒素本身添加到树突细胞中。将通过先后与破伤风类毒素和

IL-2 一起孵育的单核细胞产生的自身破伤风类毒素 - 特异性 T 细胞,以每孔 50000 个细胞的密度添加到含树突细胞的孔中。在 37°C 下将所述细胞共同培养 7 天,并且按照产生商的说明 (Promega, Madison, WI),通过基于 MTT 的测定方法测定活细胞的数量。在让细胞接触破伤风类毒素或抗体 B11-破伤风类毒素之后,比较诱导树突细胞特异性刺激破伤风类毒素特异性 T 淋巴细胞的能力。结果 (图 8) 表明,根据抗原特异性 T 细胞增殖来衡量,将破伤风类毒素作为模型抗原与 B11 结合能导致明显更有效的抗原呈递。

[0334] 在另一项实验中,在用与破伤风类毒素 (TT) 结合的 B11 或与 B11 抗体混合的破伤风类毒素 (未结合的对照) 对树突细胞进行加载之后,用 ^3H -Thymidine 作为 T 细胞增殖的显示结果。作为其他的对照,将 FcII (CD32)、mAb IV-3 的封闭抗体添加到含有 B11-TT 结合物的某些孔中,以便确定这种 Fc 受体是否对由 B11-TT 增强的抗原加工和呈递有作用。第二天,将细胞与刚解冻的以前建立的破伤风类毒素特异性 T 细胞混合 4 天。在最后一天,将细胞与 ^3H -Thymidine 一起在 37°C 下共同孵育。测定掺入 T 细胞中的 ^3H 的量。

[0335] 与前面的实验类似,结果 (图 12) 表明,通过抗原特异性 T 细胞增殖来衡量将破伤风类毒素作为模型抗原与 B11 结合能导致明显更有效的抗原呈递。添加过量的 mAb IV. 3 不能显著改变由 B11-TT 结合物引起的抗原呈递的增强。这表明, B11-TT 与 Fc II 的相互作用对这种活性来说不是必要的。

[0336] 总体来讲,在图 8 和 12 中所示的上述研究的结果表明,与仅使用破伤风类毒素所获得的 T 细胞刺激水平相比,达到该水平所需要的抗体 B11-结合的破伤风类毒素的量要低 10-100 倍。另外,当通过抗体 B11 将破伤风类毒素导向树突细胞时,图 8 中所示的 T 细胞刺激的绝对量要高出 2 倍。因此,数据表明,可以将抗原结合在人单克隆抗体 B11 上,并且由抗体导向的抗原能够比未导向的抗原更有效地加工和呈递,导致增强了的抗原特异性 T 细胞反应。

[0337] 实施例 5. 抗树突细胞的人单克隆抗体 E21 的特征分析

[0338] I. 人抗体 E21 抗原的分子量分析

[0339] 由培养的人树突细胞制备树突细胞裂解物。简单地讲,洗涤树突细胞,并且重新悬浮在温度为 4°C 的 Triton X-100 的裂解缓冲液中。将未分离的裂解物加样到 4-15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。将该印迹与 10 微克 / 毫升 E21 一起孵育,然后与抗人 IgG-碱性磷酸酶探针一起孵育,并通过辣根过氧化物酶显色观察。

[0340] 该实验的结果表明,人单克隆抗体 E21 抗原的近似分子量为 36-40kDa。

[0341] II. 人抗体 E21 与人真皮和上皮人树突细胞的结合

[0342] 如图 1 所示,人单克隆抗体 AbE21 能优先结合树突细胞。设计本实验是为了测定人抗体 E21 与真皮和上皮树突细胞的反应性,这是通过用 E21 对冷冻的皮肤进行免疫组织化学分析进行的。

[0343] 用 FITC-E21 或 FITC-huIgG 对照,对冷冻的人皮肤切片进行染色,并且用兔抗 FITC 探针检测。

[0344] 以上免疫组织化学分析的结果表明,人抗体 E21 能与人皮肤切片中的真皮树突细胞 / 巨噬细胞和上皮树突细胞 (朗格罕氏细胞) 起反应。

[0345] III. 人抗体 E21 与猕猴树突细胞的结合

[0346] 猕猴动物 (猴) 模型能提供有关抗体临床应用的相关信息,只要靶抗原在灵长类

动物中是保守的。因此,通过流式细胞仪评估了人单克隆抗体 E21 与猕猴树突细胞的交叉反应性。

[0347] 通过 GM-CSF 和 IL-4 处理将猕猴单核细胞分化成树突细胞,并且通过流式细胞仪检测 E21 结合。在 4°C 将所述树突细胞与 E21 一起孵育 1 小时,洗涤,然后再与抗人 IgG-FITC 探针一起在 4°C 下孵育 1 小时。用 FACScalibur 仪器分析所述样品。

[0348] 结论

[0349] 以上实施例证实了能以高亲和性与树突细胞特异性起反应的人单克隆抗体的产生。

[0350] 具体地讲,人单克隆抗体 B11 特异性识别树突细胞上的人巨噬细胞甘露糖受体。另外,人单克隆抗体 B11 能被树突细胞有效内化,并且增强树突细胞对抗原的加工和呈递。

[0351] 人单克隆抗体 E21 能结合人树突细胞上与 B11 不同的抗原。E21 抗体还能与来自猕猴(猴)的树突细胞交叉反应,这表明 E21 抗原在灵长类动物中是保守的,并因此提供了用于进一步开发所述抗体的相关动物模型。

[0352] 以上结果支持这样的结论:即本发明的完整的人单克隆抗体,包括其片段、结合物和双特异性分子,可用于诊断和治疗与树突细胞相关的疾病。

[0353] 等同方案

[0354] 本领域技术人员不用过多的常规实验就可以理解或者能够确定本文所公开的本发明的具体实施方案的很多等同方案。这些等同方案被认为包括在以下权利要求书中。

[0001]

序列表

<110> 米德列斯公司

<120> 抗树突细胞的人单克隆抗体

<130> MXI-166PC

<150> USSN 60/203, 126

<151> 2000-05-08

<150> USSN 60/230, 739

<151> 2000-09-07

<160> 7

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 321

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (321)

<400> 1

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1             5             10             15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agg tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp
          20          25          30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35          40          45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50          55          60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc ggc ctg cag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
          65          70          75          80

```

[0002]

tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tgg atg 144
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc ata tac agc ccg tcc ttc 192
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tgg gac acc gcc atg tat tac tgt 288
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

acg aga ggg gac cgg ggc gtt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc 336
 Thr Arg Gly Asp Arg Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

acc gtc tcc tca 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213>人 (Homo sapiens)

<400> 4

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

[0004]

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213>人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> 变体
 <222> (1)... (15)
 <223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 5
 Asp Asp Xaa Xaa Gln Phe Leu Ile Xaa Xaa Glu Asp Xaa Lys Arg
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213>人 (Homo sapiens)

<400> 6
 Leu Asp Thr Arg Gln Phe Leu Ile Tyr Asn Glu Asp His Lys Arg
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213>人 (Homo sapiens)

<400> 7
 Leu Leu Asp Thr Arg Gln Phe Leu Ile Tyr Leu Glu Asp Thr Lys Arg
 1 5 10 15
 Cys Val Asp Ala
 20

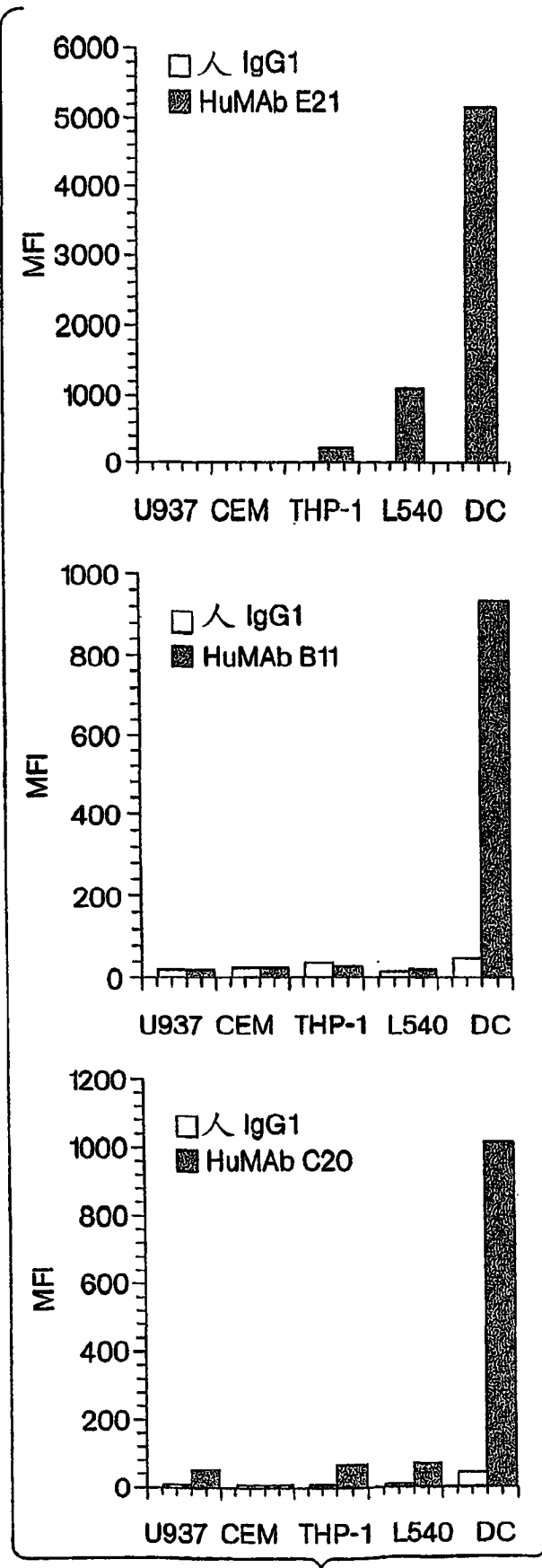


图 1

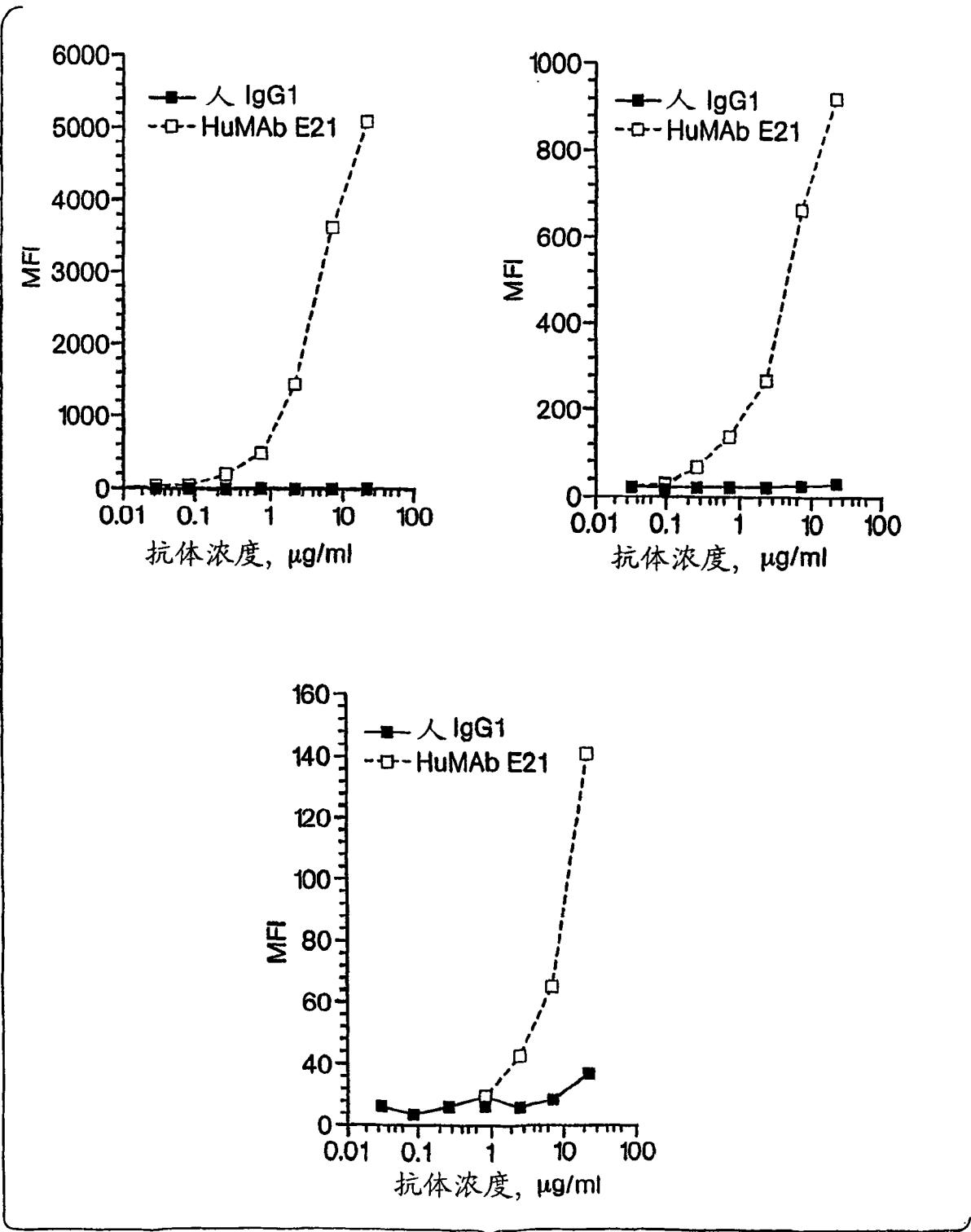


图 2

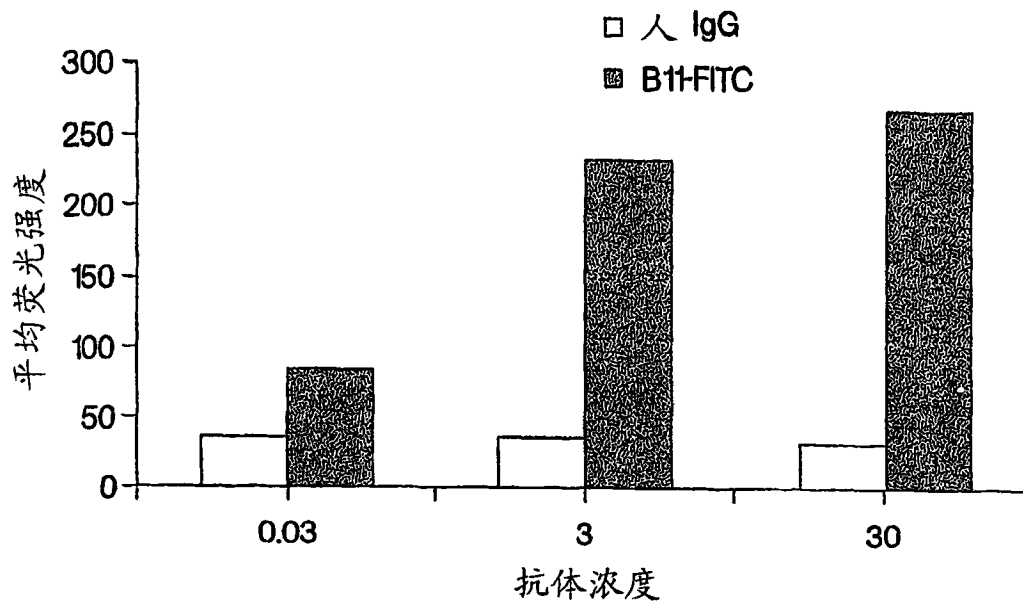


图 3

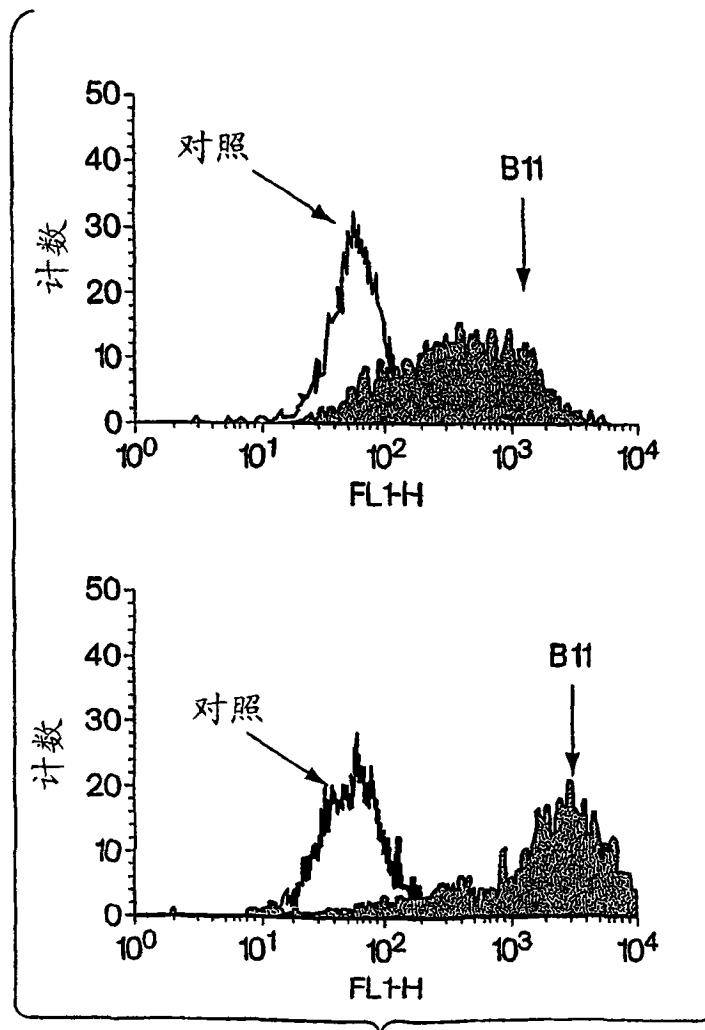


图 4

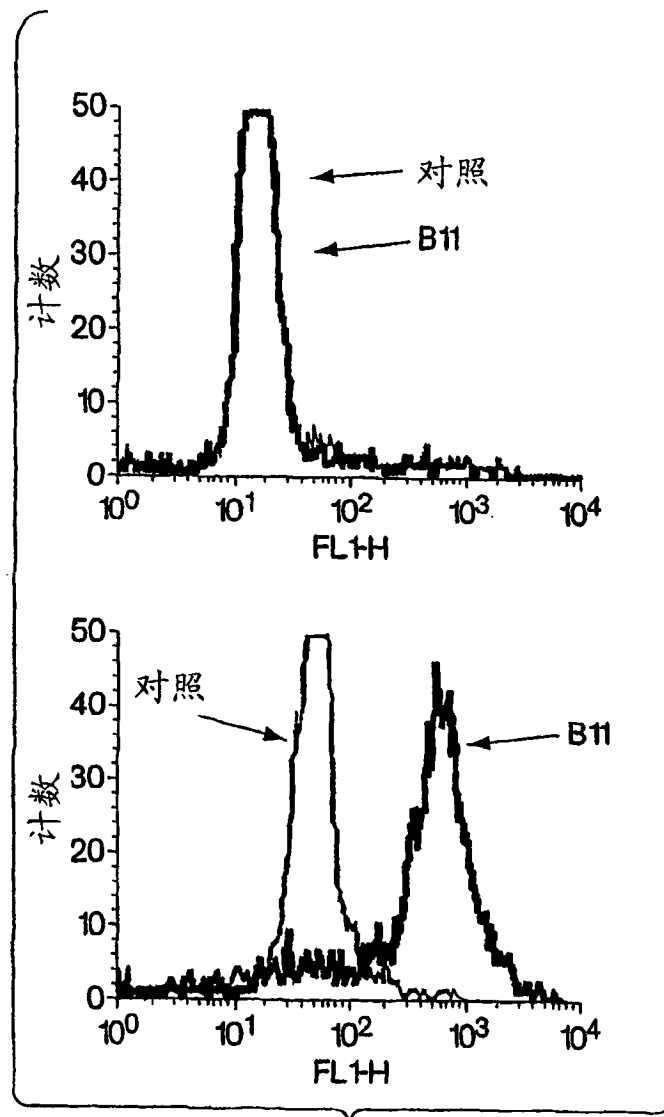


图 5

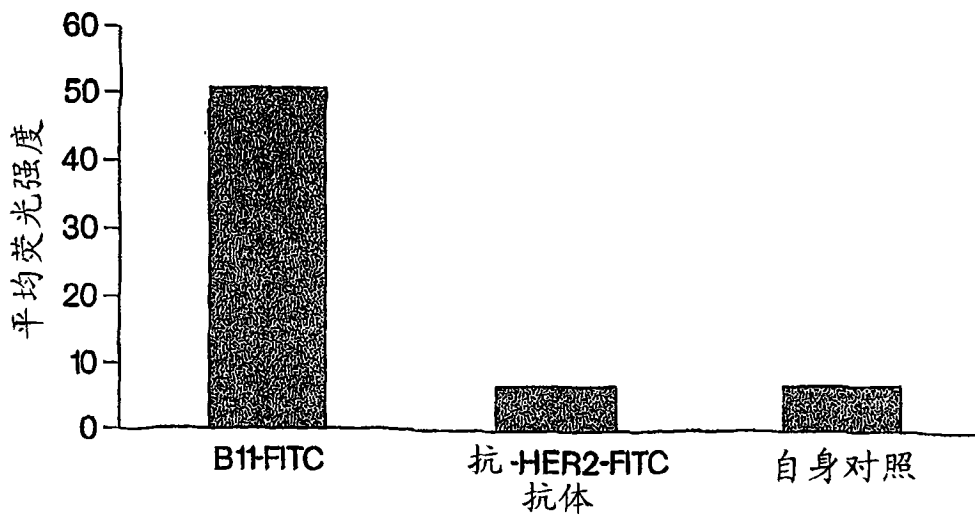


图 6

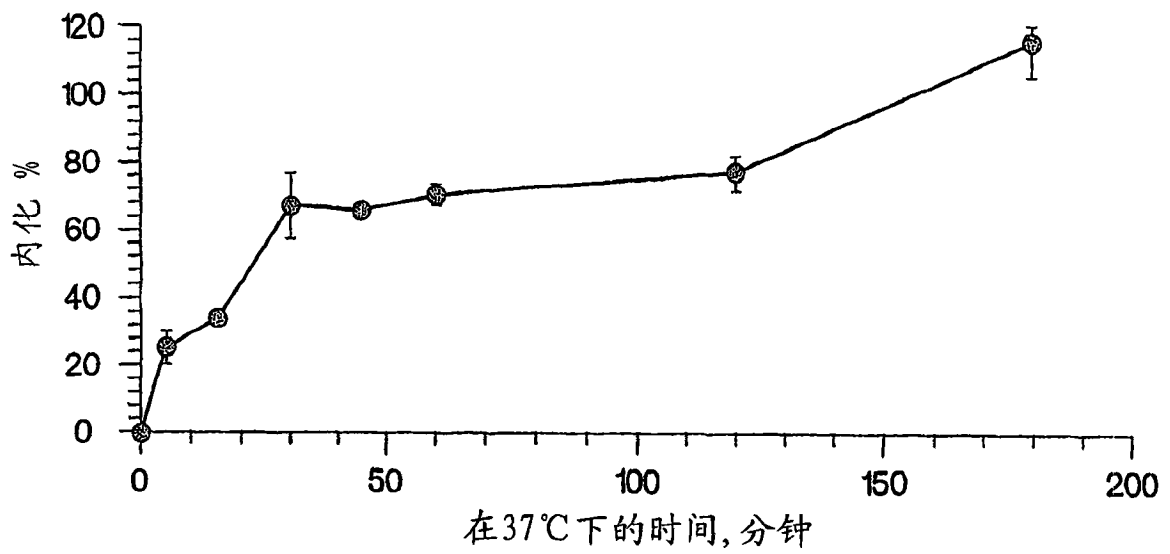


图 7

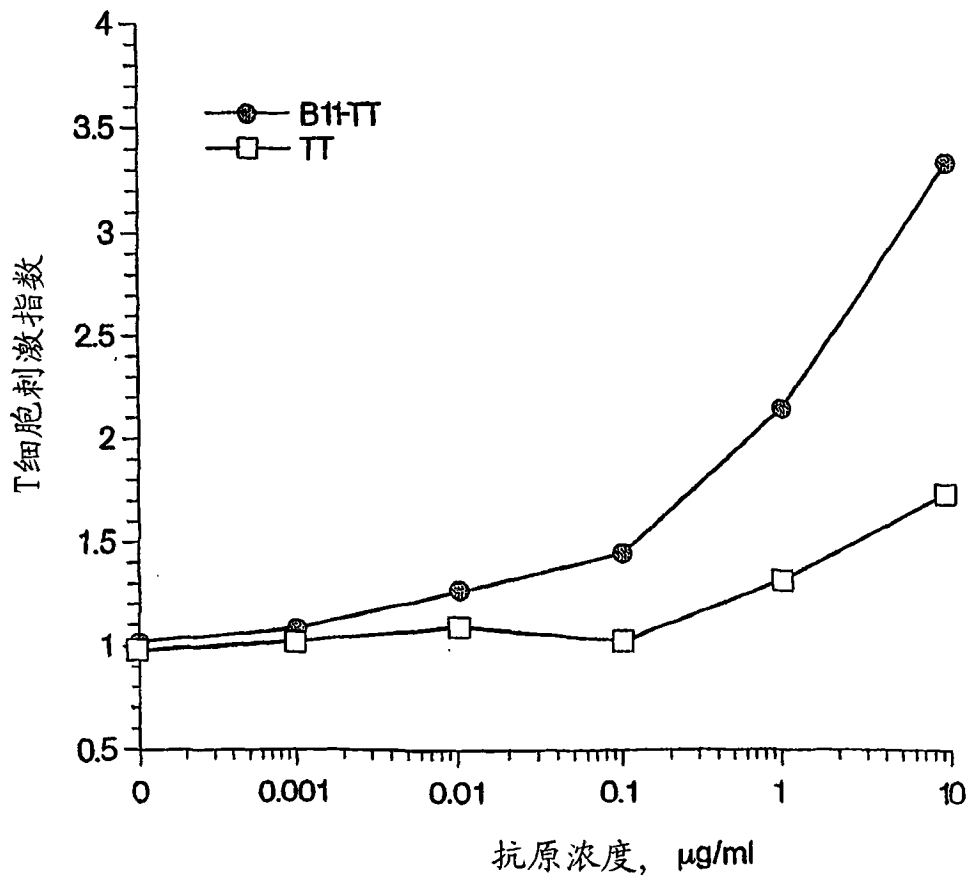


图 8

B11-ScFv 构建体图:

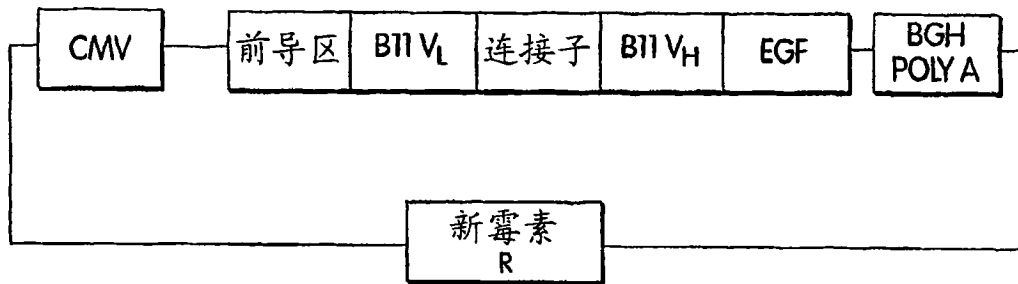


图 9

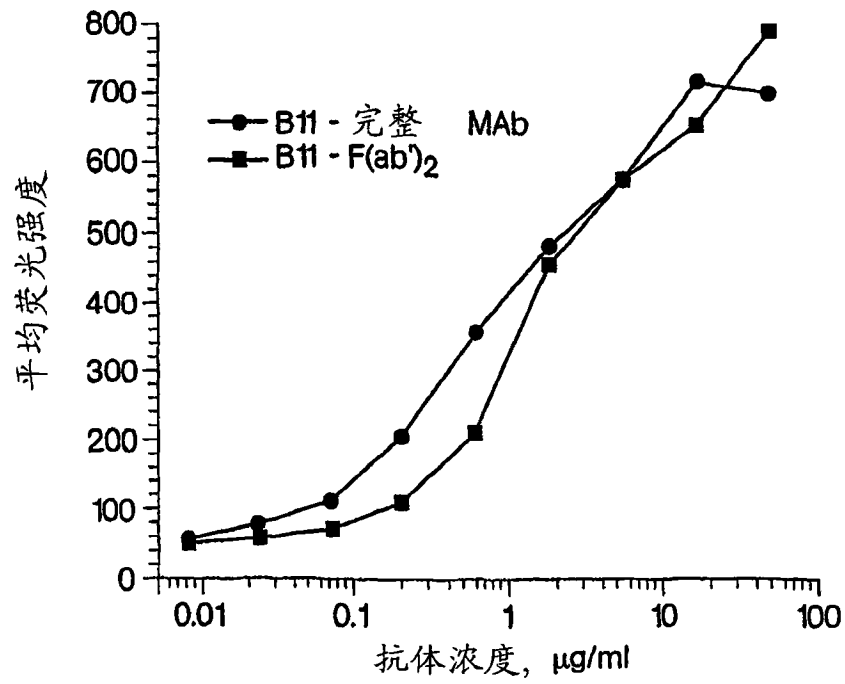


图 10

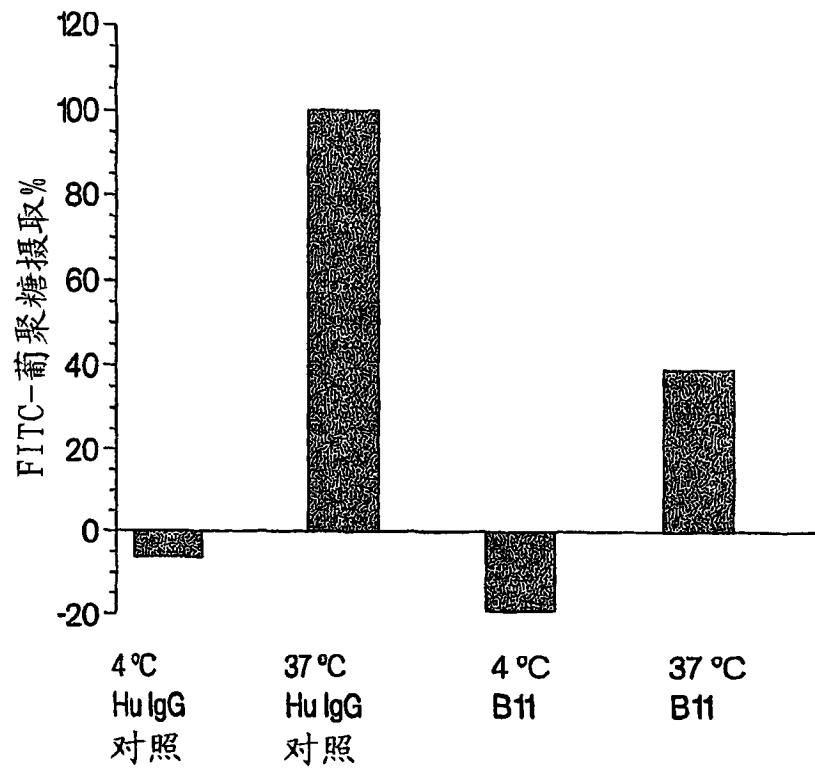


图 11

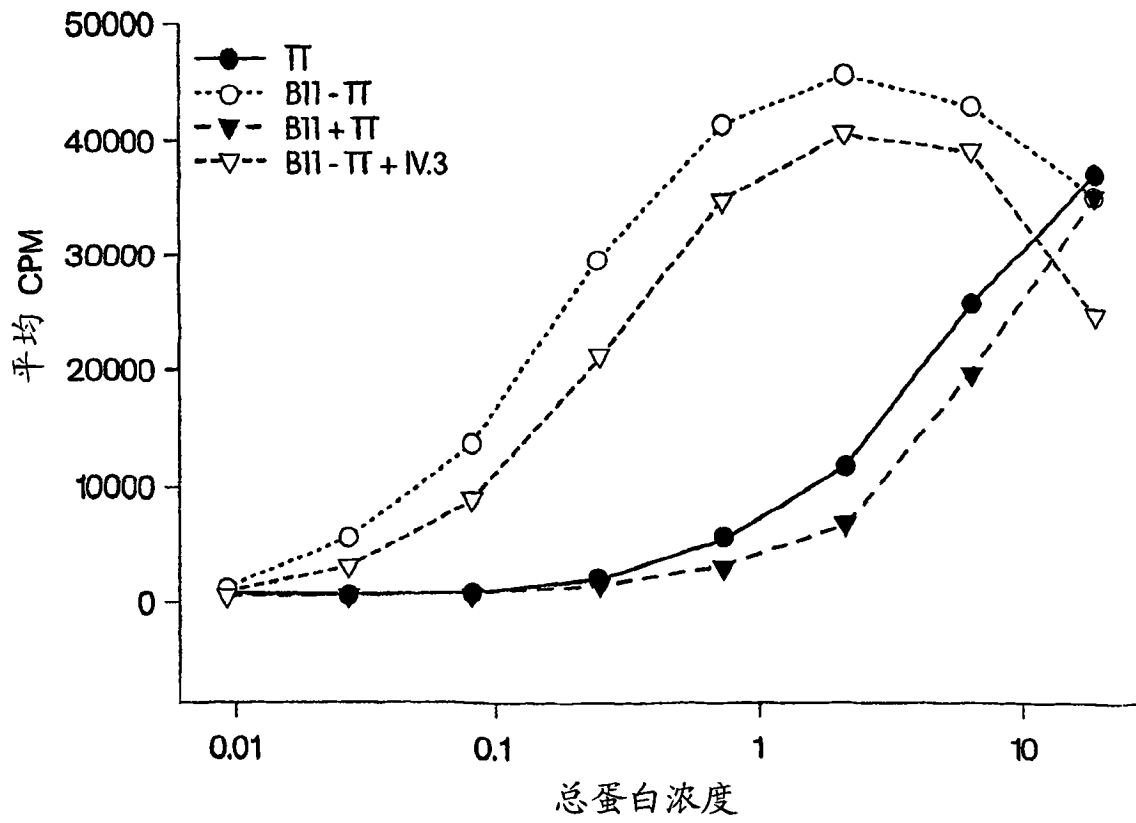


图 12

B11 HuMAb 序列资料:**B11 VL DNA:**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACA
 GAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCA
 GGGTATTAGCAGGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCT
 AAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTT
 TGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTTCAAGGTT
 CACTCTCACCATCAGCGGCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCGGACGTT
 CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
 A

B11 VL 蛋白:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ
 SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQP
 EDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK

B11 VH DNA:

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAGCCCGGGGAGTCT
 CTGAGGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGAGA
 CAGT'TTACCACCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAGATGCCCGGGAAAGGC
 CTGGAGTGGATGGGATCATCTATCCTG
 GTGACTCTGATACCATATACAGCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACCATCTCA
 GCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTACGA
 GAGGGGACCGGGCGTTGACTACTGGGG
 CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

B11 VH 蛋白:

EVQLVQSGAEVKKPAGESLRISCKGSGDSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPG
 DSDTIYSPSFQGVVTSADKSISTAY
 LQWSSLKASDTAMYYCTRGDRGVDYWGQGLVTVSS

图 13

专利名称(译)	抗树突细胞的人单克隆抗体		
公开(公告)号	CN1452636B	公开(公告)日	2011-06-15
申请号	CN01812490.9	申请日	2001-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	米德列斯公司		
申请(专利权)人(译)	米德列斯公司		
当前申请(专利权)人(译)	塞尔德克斯医疗公司		
[标]发明人	YM德奥 T凯勒		
发明人	Y·M·德奥 T·凯勒 J·特拉姆		
IPC分类号	C07K16/28 C12N5/20 A01K67/027 C07K16/46 A61K39/395 A61K47/48 G01N33/569 G01N33/577 C12N15/63 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P31/12 A61P37 /02 A61P37/06 C07K14/705 C07K19/00 C12N5/06 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/564		
CPC分类号	C07K2317/77 A61K39/0011 C07K2317/54 C07K16/46 C07K16/28 C07K2319/00 C07K2317/34 G01N33 /564 C07K2317/21 A61K2039/505 C07K2317/622 A61K2039/515 C07K14/705 A61K47/48561 A61K2039/6056 A61K47/6849 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61K39/395		
代理人(译)	陈文平		
审查员(译)	吴希哲		
优先权	60/203126 2000-05-08 US 60/230739 2000-09-07 US		
其他公开文献	CN1452636A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了特异性结合树突细胞的分离的人单克隆抗体及其抗原结合部分。还公开了包括所述抗体或抗体部分的双特异性物质、免疫毒素和抗原结合物。所述人抗体可以在能够通过进行V-D-J重组和同种型转换产生多种人单克隆抗体同种型的诸如转基因小鼠的非人转基因动物中产生。还公开了含有所述人抗体的药用组合物，产生所述人抗体的非人转基因动物和杂交瘤，以及使用所述人抗体的治疗方法和诊断方法。

《Journal of Immunology》. 1999, 第99卷(第1期), 125-129.
 ASAKURA K. Targeting of IgM Kappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination.. 《Journal of Neurosciences》. 1998, 第18卷(第19期), 7701-7703.

审查员 吴希哲

权利要求书 2 页 说明书 41 页
 序列表 4 页 附图 10 页