

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680046065.3

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 101326197A

[22] 申请日 2006.12.8

[21] 申请号 200680046065.3

[30] 优先权

[32] 2005.12.8 [33] US [31] 60/748,914

[32] 2006.9.5 [33] US [31] 60/824,593

[86] 国际申请 PCT/US2006/061816 2006.12.8

[87] 国际公布 WO2007/067991 英 2007.6.14

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.6

[71] 申请人 米德列斯公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 A·J·科尔曼 M·J·塞尔比

L-S·路 A·威特 黄海春

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 陈文平

权利要求书 5 页 说明书 106 页 附图 25 页

[54] 发明名称

抗 O8E 的人单克隆抗体

[57] 摘要

本发明提供以高亲和力特异性结合 O8E 的分离的单克隆抗体，特别是人单克隆抗体。还提供了编码本发明的抗体的核酸分子、表达载体、宿主细胞和表达本发明的抗体的方法。还提供了包含本发明的抗体的免疫偶联物、双特异性分子和药物组合物。本发明还提供了治疗癌症的方法。

1. 一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述抗体:

(a) 以 1×10^{-7} M 或更低的 K_D 与人 O8E 结合; 且

(b) 与乳腺细胞癌肿瘤细胞系结合。

2. 权利要求1的抗体, 其为 IgG1 或 IgG4 同种型的全长抗体。

3. 权利要求1的抗体, 其为抗体片段或单链抗体。

4. 权利要求1的抗体, 其中所述抗体以 5.5×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人 O8E 结合。

5. 权利要求1的抗体, 其中所述抗体以 3×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人 O8E 结合。

6. 权利要求1的抗体, 其中所述抗体以 2×10^{-9} M 或更低的 K_D 与人 O8E 结合。

7. 权利要求1的抗体, 其中所述抗体被内化。

8. 权利要求1的抗体, 其中所述乳腺细胞癌肿瘤细胞系选自 SKBR3 细胞系。

9. 权利要求1的抗体, 其中所述抗体缺乏岩藻糖残基。

10. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体与参比抗体交叉竞争结合 O8E, 其中所述参比抗体:

(a) 以 1×10^{-7} M 或更低的 K_D 与人 O8E 结合; 且

(b) 与乳腺细胞癌肿瘤细胞系结合。

11. 权利要求10的抗体, 其中所述参比抗体包含:

(a) 包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b) 包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的轻链可变区。

12. 权利要求10的抗体, 其中所述参比抗体包含:

(a) 包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b) 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的轻链可变区。

13. 权利要求10的抗体, 其中所述参比抗体包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链可变区; 和
- (b) 包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的轻链可变区。

14. 权利要求10的抗体, 其中所述参比抗体包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的重链可变区; 和
- (b) 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的轻链可变区。

15. 权利要求10的抗体, 其中所述参比抗体包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的重链可变区; 和
- (b) 包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的轻链可变区。

16. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含产生自或来源于人V_H 4-34基因、人V_H 3-53基因或V_H 3-9基因的重链可变区, 其中该抗体与O8E特异性结合。

17. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含产生自或来源于人V_K A17基因或人V_K L6基因的轻链可变区, 其中该抗体与O8E特异性结合。

18. 权利要求1的抗体, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 11的重链可变区CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO: 16的重链可变区CDR2;
- (c) 包含SEQ ID NO: 21的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO: 26的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO: 31的轻链可变区CDR2; 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 36的轻链可变区CDR3。

19. 权利要求1的抗体, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 12的重链可变区CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO: 17的重链可变区CDR2;
- (c) 包含SEQ ID NO: 22的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO: 27的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO: 32的轻链可变区CDR2; 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 37的轻链可变区CDR3。

20. 权利要求1的抗体, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 13的重链可变区CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO: 18的重链可变区CDR2;
- (c) 包含SEQ ID NO: 23的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO: 28的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO: 33的轻链可变区CDR2; 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 38的轻链可变区CDR3。

21. 权利要求1的抗体, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 14的重链可变区CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO: 19的重链可变区CDR2;
- (c) 包含SEQ ID NO: 24的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO: 29的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO: 34的轻链可变区CDR2; 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 39的轻链可变区CDR3。

22. 权利要求1的抗体, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 15的重链可变区CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO: 20的重链可变区CDR2;
- (c) 包含SEQ ID NO: 25的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO: 30的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO: 35的轻链可变区CDR2; 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 40的轻链可变区CDR3。

23. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链可变区; 和
- (b) 包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的轻链可变区;

其中该抗体与O8E特异性结合。

24. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的重链可变区; 和
- (b) 包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的轻链可变区;

其中该抗体与O8E特异性结合。

25. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链可变区; 和
 - (b) 包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的轻链可变区;
- 其中该抗体与O8E特异性结合。

26. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的重链可变区; 和
 - (b) 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的轻链可变区;
- 其中该抗体与O8E特异性结合。

27. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

- (a) 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的重链可变区; 和
 - (b) 包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的轻链可变区;
- 其中该抗体与O8E特异性结合。

28. 一种组合物, 其含有权利要求1的抗体或其抗原结合部分, 和药物可接受的载体。

29. 一种免疫偶联物, 其包含与治疗剂连接的权利要求1的抗体或其抗原结合部分。

30. 一种组合物, 其含有权利要求29的免疫偶联物和药物可接受的载体。

31. 权利要求30的免疫偶联物, 其中所述治疗剂是细胞毒素。

32. 一种组合物, 其含有权利要求31的免疫偶联物和药物可接受的载体。

33. 权利要求29的免疫偶联物, 其中所述治疗剂是放射性同位素。

34. 一种组合物, 其含有权利要求33的免疫偶联物和药物可接受的载体。

35. 一种分离的核酸分子, 其编码权利要求1的抗体或其抗原结合部分。

36. 一种表达载体, 其包含权利要求35的核酸分子。

37. 一种宿主细胞, 其包含权利要求36的表达载体。

38. 一种制备抗O8E抗体的方法, 包括在权利要求39的宿主细胞中表达该抗体, 并且从该宿主细胞中分离该抗体。

39. 一种治疗或预防以表达O8E的肿瘤细胞生长为特征的疾病的方法，包括给受试者施用有效治疗或预防该疾病的量的权利要求1的抗体或其抗原结合部分。

40. 权利要求39的方法，其中所述疾病是癌症。

41. 权利要求40的方法，其中所述癌症是乳腺细胞癌。

42. 权利要求40的方法，其中所述癌症是卵巢癌。

43. 权利要求40的方法，其中所述癌症是肾癌。

44. 权利要求40的方法，其中所述癌症是头颈癌。

抗 O8E 的人单克隆抗体

相关申请的交叉参考

本申请要求 2005 年 12 月 8 日提交的美国临时申请序号 60/748,914 和 2006 年 9 月 5 日提交的美国临时申请序号 60/824,593 的优先权, 上述申请的全部内容引入本文作为参考。

技术领域

本申请总的涉及免疫学和分子生物学领域。更具体而言, 此处提供了人抗 O8E 单克隆抗体、编码人抗 O8E 单克隆抗体的核酸、制备人抗 O8E 单克隆抗体的方法、和治疗以表达 O8E 的细胞生长为特征的疾病如癌症的方法。

背景技术

乳腺癌和卵巢癌分别是美国女性因癌症死亡的第二位和第四位的原因(American Cancer Society (2005) Cancer facts and figures)。美国癌症协会估计, 2005 年美国将有接近 40,000 名女性死于乳腺癌, 有大约 16,000 名将死于卵巢癌。表面上皮肿瘤占有所有卵巢恶性肿瘤的 80%以上, 包括浆液性肿瘤、粘液性肿瘤、子宫内膜样肿瘤和透明细胞癌(Seidman 等人. "Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract" 791-4 (Kurman, editor, 5th ed. New York, Springer-Verlag, 2002)。卵巢癌通常出现在晚期, 此时转移性疾病已经扩散到区域和远处部位(Pettersson, (1994) *Int. Fed. Of Gyn. and Obstetrics*, Vol. 22; 和 Heintz 等人. (2001) *J. Epidemiol. Biostat.* 6:107-38)。因此, 乳腺癌的存活可能性明显高于卵巢癌, 乳腺癌患者的 5 年存活率实质上好于卵巢癌患者。

B7 样分子属于免疫球蛋白(Ig)超家族。B7 样分子的胞外部分含

有单 IgV 和 IgC 域, 并且共有约 20%-40%的氨基酸同一性。B7 样分子在抗原特异性免疫应答的控制和微调中起关键作用。O8E 也被称为 B7H4、B7x 和 B7S1, 是 B7 家族的一个成员, 被认为在 T 细胞应答的刺激性和抑制性调节中起作用 (Carreno 等人, (2002) *Ann. Rev. Immunol.* 20:29-53 和 Khoury 等人, (2004) *Immunity* 20:529-538)。已经将人 O8E 在染色体 1 上作图, 它由六个外显子和五个内含子组成, 横跨 66 kb, 其中外显子 6 用于选择性剪接, 而产生两个不同的转录物 (Choi 等人, (2003) *J. Immunol.* 171:4650-4654)。

O8E 通过与 T 细胞上的受体结合发挥其生理学功能, 然后诱导细胞周期停滞并且抑制细胞因子分泌、细胞毒性发展和 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞产生细胞因子 (Prasad 等人, (2003) *Immunity* 18:863-873; Sica 等人, (2003) *Immunity* 18:849-861; Wang 等人, (2004) *Microbes Infect.* 6:759-66; 和 Zang 等人, (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:10388-10392)。已经提出 O8E 可能是炎症应答的弱化子, 并且可在抗原特异性免疫和抗肿瘤应答的下调中起作用 (Zang 等人, (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:10388-10392; Prasad 等人 (2003) *Immunity* 18:863-873; Sica 等人, (2003) *Immunity* 18:849-861; Choi 等人 (2003) *J. Immunol.* 171:4650-4654; 和 Carreno 等人, (2003) *Trends Immunol* 24:524-7)。

已经在广泛范围的正常体细胞组织中检测到 O8E mRNA 而不是蛋白质的表达, 这些组织包括肝脏、骨骼肌、肾脏、胰和小肠 (Sica 等人, (2003) *Immunity* 18:849-61 和 Choi 等人, (2003) *J. Immunol.* 171:4650-4)。在刺激 T 细胞、B 细胞、单核细胞和树突细胞后, O8E 是可诱导的; 然而, 免疫组化分析揭示在几种周围组织中的表达极低, 一个例外是在某些卵巢癌和肺癌中为阳性染色 (同上)。另外, O8E 在原发性和转移性乳腺癌中均一致地过量表达, 与肿瘤分级或分期无关, 提示该蛋白质在乳腺癌生物学中具有关键的作用 (Tringler 等人, (2005) *Clinical Cancer Res.* 11:1842-48)。参见美国专利 6,962,980; 6,699,664; 6,468,546; 6,488,931; 6,670,463; 和 6,528,253, 所述专利均

全文均引入本文作为参考。

晚期乳腺癌和卵巢癌的治疗可以使用多种治疗方法,包括放射疗法、使用细胞毒性抗肿瘤剂的传统化学疗法、激素疗法(芳香酶抑制剂、促黄体素释放素类似物)、双磷酸盐类和信号转导抑制剂(Smith (2002) *Lancet*, 260:790-2)。然而遗憾的是,许多患者对上述任一治疗方法的应答较差,或者根本没有应答。因此,需要鉴定针对乳腺癌和卵巢癌的新的分子标记物和治疗剂。因此,O8E代表了一种有价值的癌症治疗靶标,所述癌症包括卵巢癌和乳腺癌以及多种以O8E表达为特征的其他疾病。

发明内容

本发明提供与O8E(a/k/a B7H4、B7S1和B7x)结合并且表现出许多所需特性的分离的单克隆抗体,特别是人序列单克隆抗体。这些特性包括与人O8E高亲和力结合。还提供了应用本发明的抗体和组合物治疗多种O8E介导的疾病的方法。

在一个方面,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体:

- (a) 以 1×10^{-7} M或更低的 K_D 与人O8E结合; 且
- (b) 与O8E转染的人CHO细胞结合。

在某些实施方案中,该抗体与乳腺细胞癌肿瘤细胞系如细胞系SKBR3(ATCC保藏号HTB-30)结合。

该抗体一般为人抗体,但是在替代实施方案中,该抗体也可以是,例如,鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

在一个实施方案中,该抗体以 5×10^{-8} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 2×10^{-8} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 1×10^{-8} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 5×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 4×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 3×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合,或者以 2×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合。

在另一实施方案中,该抗体在与SKBR3乳腺细胞癌肿瘤细胞上表

达的O8E结合后被这些细胞内化。

在另一实施方案中，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中该抗体与参比抗体交叉竞争结合O8E，其中所述参比抗体：

- (a) 以 1×10^{-7} M或更低的 K_D 与人O8E结合；且
- (b) 与O8E转染的人CHO细胞结合。

在各种实施方案中，所述参比抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的轻链可变区。

或者所述参比抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的轻链可变区；

或者所述参比抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的轻链可变区；

或者所述参比抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的轻链可变区；

或者所述参比抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的轻链可变区。

在另一方面，本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_H 4-34基因（其蛋白质产物在此以SEQ ID NO: 51表示）的重链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。本发明也提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_H 3-53基因（其蛋白质产物在此以SEQ ID NO: 52表示）的重链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。本发明也提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_H 3-9/D3-10/JH6b基因（其蛋白质产物在此以SEQ ID NO: 53表示）的

重链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。

本发明进一步提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_K A27基因（其蛋白质产物在此以SEQ ID NO: 54表示）的轻链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。本发明进一步提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_K L6/JK1基因（其蛋白质产物在此以SEQ ID NO: 55表示）的轻链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。

在另一方面，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含：

- (a) 人V_H 4-34、3-53或3-9基因的重链可变区；和
 - (b) 人V_K A27或V_K L6的轻链可变区，
- 其中该抗体与O8E特异性结合。

在一个相关实施方案中，该抗体包含人V_H 4-34基因的重链可变区和人V_K A27基因的轻链可变区。在另一个相关实施方案中，该抗体包含人V_H 3-53基因的重链可变区和人V_K A27基因的轻链可变区。在另一个相关实施方案中，该抗体包含人V_H 3-9基因的重链可变区和人V_K L6基因的轻链可变区。

在另一方面，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包括：

包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区；和包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区，其中：

(a) 重链可变区CDR3序列包含选自SEQ ID NO: 21、22、23、24和25的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列；

(b) 轻链可变区CDR3序列包含选自SEQ ID NO: 36、37、38、39和40的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列；

(c) 该抗体以 1×10^{-7} M或更低的K_D与人O8E结合；

(d) 与被O8E转染的人CHO细胞结合。

典型地，重链可变区CDR2序列包含选自SEQ ID NO: 16、17、18、19和20的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区

CDR2序列包含选自SEQ ID NO: 31、32、33、34和35的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。典型地，重链可变区CDR1序列包含选自SEQ ID NO: 11、12、13、14和15的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区CDR1序列包含选自SEQ ID NO: 26、27、28、29和30的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。

一种具体的组合包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 11的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 16的重链可变区CDR2；
- (c) 包含SEQ ID NO: 21的重链可变区CDR3；
- (d) 包含SEQ ID NO: 26的轻链可变区CDR1；
- (e) 包含SEQ ID NO: 31的轻链可变区CDR2；和
- (f) 包含SEQ ID NO: 36的轻链可变区CDR3。

另一种具体的组合包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 12的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 17的重链可变区CDR2；
- (c) 包含SEQ ID NO: 22的重链可变区CDR3；
- (d) 包含SEQ ID NO: 27的轻链可变区CDR1；
- (e) 包含SEQ ID NO: 32的轻链可变区CDR2；和
- (f) 包含SEQ ID NO: 37的轻链可变区CDR3。

另一种具体的组合包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 13的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 18的重链可变区CDR2；
- (c) 包含SEQ ID NO: 23的重链可变区CDR3；
- (d) 包含SEQ ID NO: 28的轻链可变区CDR1；
- (e) 包含SEQ ID NO: 33的轻链可变区CDR2；和
- (f) 包含SEQ ID NO: 38的轻链可变区CDR3。

另一种具体的组合包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 14的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 19的重链可变区CDR2；

- (c) 包含SEQ ID NO: 24的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO: 29的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO: 34的轻链可变区CDR2; 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 39的轻链可变区CDR3。

另一种具体的组合包括:

- (a) 包含SEQ ID NO: 15的重链可变区CDR1;
- (b) 包含SEQ ID NO: 20的重链可变区CDR2;
- (c) 包含SEQ ID NO: 25的重链可变区CDR3;
- (d) 包含SEQ ID NO: 30的轻链可变区CDR1;
- (e) 包含SEQ ID NO: 35的轻链可变区CDR2; 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 40的轻链可变区CDR3。

本发明其他具体的抗体或其抗原结合部分包括:

- (a) 包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的轻链可变区。

另一种具体的组合包括:

- (a) 包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的轻链可变区。

另一种具体的组合包括:

- (a) 包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的轻链可变区。

另一种具体的组合包括:

- (a) 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的轻链可变区。

另一种具体的组合包括:

- (a) 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的轻链可变区。

在本发明的另一方面, 提供了与上述任意抗体竞争结合O8E的抗体或其抗原结合部分。

本发明的抗体可以是, 例如, 如IgG1、IgG2或IgG4同种型的全长

抗体。或者，这些抗体可以是抗体片段，如Fab、Fab'或Fab'₂片段或单链抗体（例如scFv）。

本发明还提供一种免疫偶联物，其包含与诸如细胞毒素或放射性同位素等治疗剂连接的本发明的抗体或其抗原结合部分。本发明还提供一种双特异性分子，其包含与第二功能部分连接的本发明的抗体或其抗原结合部分，该第二功能部分具有与该抗体或其抗原结合部分不同的结合特异性。

还提供包含本发明的抗体或其抗原结合部分或免疫偶联物或双特异性分子和药物可接受的载体的组合物。

本发明还包括编码本发明的抗体或其抗原结合部分的核酸分子，以及包含这些核酸的表达载体，包含这些表达载体的宿主细胞，和应用这些宿主细胞制备抗O8E抗体的方法。而且，本发明提供一种含有人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转基因小鼠，其中该小鼠表达本发明的抗体，以及由这种小鼠制备的杂交瘤，其中该杂交瘤产生本发明的抗体。

在另一方面，本发明提供一种治疗或预防以表达O8E的肿瘤细胞生长为特征的疾病的方法，包括给受试者施用有效治疗或预防该疾病的量的本发明的抗O8E人抗体。所述疾病可以是癌症，例如乳腺细胞癌。

在另一方面，本发明提供一种治疗自身免疫病的方法，包括给受试者施用有效治疗自身免疫病的量的本发明的抗O8E人抗体。

通过下面的详述和实施例，本发明的其他特征和优点将是显而易见的，该详述和实施例不应理解为限制性的。贯穿本申请中引用的所有参考文献、Genbank项、专利和公布的专利申请的内容均在此处特别引入作为参考。

附图说明

图1A显示1G11人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 41)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO:

11)、CDR2(SEQ ID NO: 16)和CDR3(SEQ ID NO: 21)区,并指出了V和J的种系来源。

图1B显示1G11人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 46)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 26)、CDR2(SEQ ID NO: 31)和CDR3(SEQ ID NO: 36)区,并指出了V和J的种系来源。

图2A显示2A7人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 42)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 12)、CDR2(SEQ ID NO: 17)和CDR3(SEQ ID NO: 22)区,并指出了V、D和J的种系来源。

图2B显示2A7人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 47)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 27)、CDR2(SEQ ID NO: 32)和CDR3(SEQ ID NO: 37)区,并指出了V和J的种系来源。

图3A显示2F9人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 43)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 3)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 13)、CDR2(SEQ ID NO: 18)和CDR3(SEQ ID NO: 23)区,并指出了V、D和J的种系来源。

图3B显示2F9人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 48)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 8)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 28)、CDR2(SEQ ID NO: 33)和CDR3(SEQ ID NO: 38)区,并指出了V和J的种系来源。

图4A显示12E1人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 44)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 4)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 14)、CDR2(SEQ ID NO: 19)和CDR3(SEQ ID NO: 24)区,并指出了V、D和J的种系来源。

图4B显示12E1人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 49)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 9)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 29)、CDR2(SEQ ID NO: 34)和CDR3(SEQ ID NO: 39)区,并指出了V

和J的种系来源。

图5A显示13D12人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 45)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 5)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 15)、CDR2(SEQ ID NO: 20)和CDR3(SEQ ID NO: 25)区,并指出了V、D和J的种系来源。

图5B显示13D12人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 50)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 10)。勾画出了CDR1(SEQ ID NO: 30)、CDR2(SEQ ID NO: 35)和CDR3(SEQ ID NO: 40)区,并指出了V和J的种系来源。

图6显示1G11和13D12的重链可变区氨基酸序列与人种系V_H 4-34氨基酸序列(SEQ ID NO: 51)的比对。

图7显示2A7和2F9的重链可变区氨基酸序列与人种系V_H 3-53氨基酸序列(SEQ ID NO: 52)的比对。

图8显示12E1的重链可变区氨基酸序列与组合人种系V_H 3-9/D3-10/JH6b氨基酸序列(SEQ ID NO: 53)的比对。

图9显示1G11、2A7、2F9和13D12的轻链可变区氨基酸序列与人种系V_K A27氨基酸序列(SEQ ID NO: 54)的比对。

图10显示12E1的轻链可变区氨基酸序列与组合人种系V_K L6/JK1氨基酸序列(SEQ ID NO: 55)的比对。

图11A和11B显示ELISA实验结果,证明抗人O8E的人单克隆抗体与O8E特异性结合。图11A显示用人抗O8E抗体包被ELISA板、然后加入纯化的O8E蛋白、并用兔抗O8E抗血清检测的结果。图11B显示用小鼠Fc抗血清包被ELISA板、然后加入单克隆抗C9(0.6 µg/ml)、然后用所示Penta-O8E蛋白滴定、然后用1 µg/ml人抗O8E抗体检测的结果。

图12显示流式细胞实验结果,证明抗O8E人单克隆抗体2A7与O8E转染的CHO细胞结合。

图13显示流式细胞实验结果,证明O8E在SKBR3乳腺癌细胞以及O8E转染的SKOV3和HEK细胞中表达。

图14显示Hum-Zap内化实验的结果,证明抗人O8E的人单克隆抗体可以内化到O8E⁺ CHO细胞内。

图15显示Hum-Zap内化实验的结果,证明抗人O8E的人单克隆抗体可以内化到O8E⁺ SKBR3细胞内。

图16显示使用多种人抗O8E单克隆抗体(包括1G11、2A7、2F9和13D12)进行表位作图研究的结果。

图17显示抗体依赖的细胞毒性(ADCC)测定结果,证明人单克隆抗O8E抗体以依赖于ADCC的方式杀死人乳腺癌细胞系SKBR3。

图18显示抗体依赖的细胞毒性(ADCC)测定结果,证明人单克隆抗O8E抗体以依赖于ADCC的方式杀死O8E转染的SKOV3细胞。

图19显示抗体依赖的细胞毒性(ADCC)测定结果,证明人单克隆抗O8E抗体以依赖于浓度和ADCC的方式杀死人乳腺癌细胞系SKBR3。

图20显示对SCID小鼠进行的体内研究的结果,表示抗O8E抗体对HEK-B7H4肿瘤的肿瘤生长抑制作用。

发明详述

本发明涉及以高亲和力特异性结合O8E (a/k/a B7H4、B7S1和B7x)的分离的单克隆抗体,特别是人序列单克隆抗体。在某些实施方案中,本发明的抗体来源于特定重链和轻链种系序列,和/或包含特定结构特征,如包含特定氨基酸序列的CDR区。本发明提供分离的抗体、制备该抗体的方法、含有该抗体的免疫偶联物和双特异性分子、和含有本发明的抗体、免疫偶联物或双特异性分子的药物组合物。本发明还涉及利用该抗体(例如)检测O8E以及治疗与O8E表达有关的疾病如癌症的方法。相应地,本发明还提供使用本发明的抗O8E抗体治疗多种癌症,例如治疗乳腺细胞癌、转移性乳腺癌、卵巢细胞癌、转移性卵巢癌和肾细胞癌的方法。

为了使本发明更容易理解,首先定义了一些术语。其他的定义在发明详述内容中说明。

术语“O8E”、“B7H4”、“B7x”和“B7S1”在本文中可以互换使用；包括人O8E的变体、同种型(isoforms)、同源物、直向同源物(ortholog)和旁系同源物(paralog)。例如，O8E特异性抗体在某些情况中可以与来自人类以外物种的O8E交叉反应。在其他实施方案中，人O8E特异性抗体对于人O8E可能是完全特异性的，并且可能不显示物种或其他类型的交叉反应性。术语“人O8E”是指人序列O8E，如Genbank登录号为NP_078902的人O8E的完整氨基酸序列(SEQ ID NO:56)。O8E在本领域中也被称为，例如，BL-CAM、B3、Leu-14和Lyb-8。人O8E序列可能不同于SEQ ID NO:56的人O8E，例如，具有保守突变或在非保守区具有突变，CD22与SEQ ID NO:56的人O8E具有基本上相同的生物学功能。例如，人O8E的生物学功能是在O8E的胞外域中具有可被本发明的抗体特异性结合的表位，或者人O8E的生物学功能包括，例如，抑制T细胞增殖、抑制细胞因子产生、抑制细胞周期产生、或者与T细胞受体结合。

一个具体的人O8E序列通常在氨基酸序列上与SEQ ID NO:56的人O8E至少90%相同，并且含有当与其他物种（例如鼠）的O8E氨基酸序列相比较时能够确定该氨基酸序列为人序列的氨基酸残基。在某些情况中，人O8E在氨基酸序列上与SEQ ID NO:56的O8E可能至少95%、或者至少96%、97%、98%或99%相同。在某些实施方案中，人O8E序列显示与SEQ ID NO:56的O8E有不超过10个氨基酸的差异。在某些实施方案中，人O8E可能显示与SEQ ID NO:56的O8E有不超过5个、或者不超过4、3、2或1个氨基酸的差异。百分同一性可以如本文所述测定。

术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用，该作用导致选择性损伤、破坏或从人体中清除侵入的病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌细胞，或（在自身免疫或病理性炎症的情况下）正常人细胞或组织。

“信号转导途径”是指在信号从一个细胞的一部分向一个细胞的

另一部分传送中起作用的多种信号转导分子之间的生化关系。本文使用的短语“细胞表面受体”包括，例如，能够接收信号和跨过细胞质膜传播这种信号的分子和分子复合物。本发明的“细胞表面受体”的一个例子是O8E受体。

本文提到的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。“抗体”是指包含通过二硫键互相连接在一起的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白，或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在此缩写为 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 组成。每条轻链由轻链可变区(在此缩写为 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。 V_H 和 V_L 区可进一步再分为高变区，称为互补决定区(CDR)，CDR散布在被称为构架区(FR)的更加保守的区域中。每个 V_H 和 V_L 均由三个CDR和四个FR组成，它们从氨基端向羧基端以如下顺序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重链和轻链的可变区含有可与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，该宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q)。

本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或“抗体部分”)是指保留与抗原(例如O8E)特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段。已证明抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来行使。术语抗体的“抗原结合部分”中所包括的结合片段的例子包括：(i) Fab片段，即由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，即包含在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的双价片段；(iii) Fab'片段，其基本上是具有铰链区部分的Fab (见Fundamental Immunology (Paul ed., 3rd ed. 1993))；(iv)由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的Fd片段；(v)由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段；(vi)由 V_H 结构域组成的dAb片段(Ward等 (1989) Nature 341:544-546)；(vii)分离的互补决定区(CDR)；和(viii)纳米抗体(nanobody)，即，含有单可变域和两个恒定域的重链可变区。此外，尽管Fv片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由单独的基因编码，但是它

们可以利用重组方法通过合成连接体连接在一起,该连接体使它们能够制成一条蛋白质链,其中 V_L 和 V_H 区配对构成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见,例如Bird等(1988) *Science* 242:423-426;和Huston等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这种单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段用本领域技术人员公知的常规技术获得,并用与完整抗体相同的方法对这些片段的实用性进行筛选。

本文使用的“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与O8E特异性结合的分离的抗体基本不含与除O8E以外的抗原特异性结合的抗体)。但是,与O8E特异性结合的分离的抗体与诸如来自其他物种的O8E分子等其他抗原可能具有交叉反应性。而且,分离的抗体可基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

本文使用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物表现出对特定表位的单一结合特异性和亲和性。

本文使用的术语“人抗体”或“人序列抗体”包括具有如下可变区的抗体,在该可变区中,构架区和CDR区都源自人种系免疫球蛋白序列。而且,如果该抗体含有恒定区,则该恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。人抗体可以包含后来的修饰,包括天然或合成修饰。本发明的人抗体可包含并非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引入的突变)。但是,本文使用的术语“人抗体”不包括其中源自另一哺乳动物种如小鼠的种系的CDR序列已被移植到人构架序列上的抗体。

术语“人单克隆抗体”(在“人”后可以包括术语“序列”)是指表现单一结合特异性的抗体,其具有其中构架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。在一个实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,该杂交瘤包括与无限增殖化细胞融合的B细胞,该B细胞从具有含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物(例如转基因小鼠)中获得。

本文使用的术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的所有人抗体，例如：(a)从对于人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物（例如小鼠）或由其制备的杂交瘤（下文进一步描述）中分离的抗体，(b)从经转化表达人抗体的宿主细胞如转染瘤中分离的抗体，(c)从重组组合人抗体文库中分离的抗体，和(d)通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪接为其他DNA序列的任何其他方法制备、表达、产生或分离的抗体。这些重组人抗体具有其中构架区和CDR区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。但是在某些实施方案中，这些重组人抗体可以经历体外诱变（或者，当使用人Ig序列的转基因动物时，经历体内体细胞诱变），因此重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列尽管是源自人种系V_H和V_L序列并与之相关的序列，但可能不是在体内天然存在于人抗体种系的所有组成成分（repertoire）中。

本文使用的术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别（例如IgM或IgG1）。

短语“识别抗原的抗体”和“抗原特异性抗体”在此与术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换使用。

术语“人抗体衍生物”是指人抗体的任何修饰形式，例如抗体和其它试剂或抗体的偶联物。

术语“人源化抗体”是指其中来源于另外一种哺乳动物种如小鼠的种系的CDR序列已经被移植到人构架序列上的抗体。在人构架序列内也可以进行其它的构架区修饰。

术语“嵌合抗体”是指其中可变区序列来源于一个物种而恒定区序列来源于另一个物种的抗体，例如其中可变区序列来源于小鼠抗体而恒定区序列来源于人抗体的抗体。

本文使用的术语“与人O8E特异性结合”的抗体是指以 1×10^{-7} M或更低、更优选 5×10^{-8} M或更低、更优选 3×10^{-8} M或更低、更优选 1×10^{-9} M或更低、甚至更优选 5×10^{-9} M或更低的K_D与人O8E结合的抗体。

本文使用的术语“基本不结合”蛋白质或细胞意思是不与该蛋白质或细胞结合或者不以高亲和力与该蛋白质或细胞结合，即，以

$1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或更高、更优选 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 或更高、更优选 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 或更高、更优选 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 或更高、甚至更优选 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ 或更高的 K_D 与该蛋白质或细胞结合。

本文使用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率，而本文使用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。本文使用的术语“ K_D ”是指解离常数，它是由 K_d 与 K_a 的比值获得的(即 K_d/K_a)，并且表示为摩尔浓度(M)。抗体的 K_D 值可以用本领域建立的方法测定。测定抗体 K_D 的一种优选方法是使用表面等离子共振法，优选使用生物传感器系统，如Biacore[®]系统。

本文使用的术语IgG抗体的“高亲和力”是指抗体对于靶抗原的 K_D 为 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、更优选 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、更优选 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低、甚至更优选 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低。但是对于其他抗体同种型来说，“高亲和力”结合可能不同。例如，对于IgM同种型来说，“高亲和力”结合是指抗体具有 10^{-6}M 或更低、更优选 10^{-7}M 或更低、甚至更优选 10^{-8}M 或更低的 K_D 。

本文使用的术语“受试者”包括任何人或非人类动物。术语“非人类动物”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、猫、马、牛、鸡、两栖类动物、鱼、爬行类动物等。

本文使用的术语“O8E”与术语“B7H4”、“B7S1”、“B7x”具有相同含意，这些术语不同地出现在科技文献中。公众可以获得O8E(B7H4)的氨基酸序列，参考GenBank登录号AAZ17406、AAS13400、AAP37283、CAI12739和CAI12737，以及参考Prasad等人(2003) Immunity 18:863-873; Sica等人. (2003) Immunity 18:849-861; 和美国专利No. 6,891,030，均全文引入作为参考。

本申请的各个方面在下面的章节中进一步详细描述。

抗O8E抗体

本发明的抗体的特征在于抗体的特定功能特征或特性。例如，这

些抗体与人O8E特异性结合。典型地,本发明的抗体以高亲和力与O8E结合,例如 K_D 为 1×10^{-7} M或更低。本发明的抗O8E抗体典型地显示以下一个或多个特征:

(a) 以 1×10^{-7} M或更低的 K_D 与人O8E结合;

(b) 与O8E转染的人CHO细胞结合。

典型地,该抗体以 5×10^{-8} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 2×10^{-8} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 5×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 4×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 3×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合,以 2×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合,或者以 1×10^{-9} M或更低的 K_D 与人O8E结合。

评价抗体对O8E的结合能力的标准试验在本领域中是公知的,包括,例如ELISA、Western印迹分析、RIA和流式细胞分析。合适的试验在实施例中详细描述。抗体的结合动力学(例如结合亲和力)也可以通过本领域公知的标准试验(如ELISA、Scatchard和Biacore®系统分析)来评价。作为另外一个例子,本发明的抗体可以与乳腺癌肿瘤细胞系例如SKBR3细胞系结合。

单克隆抗体1G11、2A7、2F9、12E1和13D12

本发明示例性的抗体包括如实施例1和2所述分离并进行结构表征的人单克隆抗体1G11、2A7、2F9、12E1和13D12。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的 V_H 氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO: 1、2、3、4和5中。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的 V_L 氨基酸序列分别显示在SEQ ID NO: 6、7、8、9和10中。

因为这些抗体中的每一个都能够与O8E结合,这些 V_H 和 V_L 序列可以“混合并匹配”,从而产生本发明的其他的抗O8E结合分子。O8E与这些“混合并匹配的”抗体的结合可以用上文及实施例中所述的结合试验(例如FACS或ELISA)来检测。优选地,当 V_H 和 V_L 链混合并匹配时,来自特定 V_H/V_L 配对的 V_H 序列被替换为结构上相似的 V_H 序列。同样,优选地,来自特定 V_H/V_L 配对的 V_L 序列被替换为结构上相似的

V_L序列。

因此，在一个方面，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包括：

(a) 包含选自SEQ ID NO: 1、2、3、4和5的氨基酸序列的重链可变区；和

(b) 包含选自SEQ ID NO: 6、7、8、9和10的氨基酸序列的轻链可变区；其中该抗体与O8E、优选人O8E特异性结合。

优选的重链和轻链组合包括：

(a) 包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含SEQ ID NO: 6的氨基酸序列的轻链可变区；或

(a) 包含SEQ ID NO: 2的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含SEQ ID NO: 7的氨基酸序列的轻链可变区；或

(a) 包含SEQ ID NO: 3的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含SEQ ID NO: 8的氨基酸序列的轻链可变区；或

(a) 包含SEQ ID NO: 4的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含SEQ ID NO: 9的氨基酸序列的轻链可变区；或

(a) 包含SEQ ID NO: 5的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含SEQ ID NO: 10的氨基酸序列的轻链可变区。

在另一方面，本发明提供包含1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3或其组合的抗体。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_H CDR1的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO: 11、12、13、14和15中。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_H CDR2的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO: 16、17、18、19和20中。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_H CDR3的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO: 21、22、23、24和25中。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_K CDR1的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO: 26、27、28、29和30中。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_K CDR2的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO: 31、32、33、34和35中。1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_K CDR3的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO: 36、37、38、39和40中。CDR区用Kabat

系统 (Kabat, E.A.等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号91-3242) 勾画出。

以上提到的在此被命名为1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的人抗体的氨基酸和核苷酸序列均在以下表1和序列表中列出。

表1. 人抗体1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的重链和轻链可变区和恒定区和相应的CDR的序列

序列号	说明	序列
SEQ ID NO: 1	1G11人单克隆抗体重链可变区的氨基酸序列	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWTWIRQP PGKGLEWIGEINHSGTTNYPNPSLKSRVTISADTSKNQFSR LSSVTAADTAVYYCARLSSWSNWAFFEYWGQGTTLTVTVSS
SEQ ID NO: 2	2A7人单克隆抗体重链可变区的氨基酸序列	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMNWVRQA PGKGLEWVSVIYGSGRYYADSVKGRVTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDTYAMDVWGQGTTLTVTVSS
SEQ ID NO: 3	2F9人单克隆抗体重链可变区的氨基酸序列	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFIVSRNYMNWVRQA PGKGLEWVSVIYGSGRYDCADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDG DYGM DVWGQGTTLTVTVSS
SEQ ID NO: 4	12E1人单克隆抗体重链可变区的氨基酸序列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCV ASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTALYYCTKALYGS GSSDFYYYGM DVWGQGT TVAVSS
SEQ ID NO: 5	13D12人单克隆抗体重链可变区的氨基酸序列	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQP PGKGLEWIGKINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLNSVTAADTAVYYCARELRYFENYYYGM DVWGQGTTLTV SS
SEQ ID NO: 6	1G11人单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列	EIVLTQFPGTSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQN PGQAPRVLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYQGSSPLTFGGG TKVEIK
SEQ ID NO: 7	2A7人单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列	EIVLTQSPGTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYQGSSPMYTFGQGT KLEIK
SEQ ID NO: 8	2F9人单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列	EIVLTQSPGTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYQGSSPLYTFGQGT KLEIK
SEQ ID NO: 9	12E1人单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELP EDFAVYYCQQRRTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 10	13D12人单克隆抗体轻链可变区的氨基酸序列	EIVLTQSPGTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYQGSSPRTFGQGT KVEIK
SEQ ID NO: 11	1G11人单克隆抗体重链可变区CDR1的氨基酸序列	DYFWT
SEQ ID NO: 12	2A7人单克隆抗体重链可变区CDR1的氨基酸序列	SNYMNW
SEQ ID NO: 13	2F9人单克隆抗体重链可变区CDR1的氨基酸序列	RNYMN
SEQ ID NO: 14	12E1人单克隆抗体重链可变区CDR1的氨基酸序列	DYAMH

SEQ ID NO:15	13D12人单克隆抗体重链可变区CDR1的氨基酸序列	GYYSWS
SEQ ID NO: 16	1G11人单克隆抗体重链可变区CDR2的氨基酸序列	EINHSGETTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 17	2A7人单克隆抗体重链可变区CDR2的氨基酸序列	VIYGSGRITYYADSVKG
SEQ ID NO: 18	2F9人单克隆抗体重链可变区CDR2的氨基酸序列	VIYGSGRITDCADSVKG
SEQ ID NO: 19	12E1人单克隆抗体重链可变区CDR2的氨基酸序列	GISWNSGSIQYADSVKG
SEQ ID NO: 20	13D12人单克隆抗体重链可变区CDR2的氨基酸序列	KINHSGSTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 21	1G11人单克隆抗体重链可变区CDR3的氨基酸序列	LSSWSNWAFFEY
SEQ ID NO:22	2A7人单克隆抗体重链可变区CDR3的氨基酸序列	DTYAMDV
SEQ ID NO:23	2F9人单克隆抗体重链可变区CDR3的氨基酸序列	DGDYGM DV
SEQ ID NO:24	12E1人单克隆抗体重链可变区CDR3的氨基酸序列	LYGSGSSDFYYYGM DV
SEQ ID NO:25	13D12人单克隆抗体重链可变区CDR3的氨基酸序列	ELRYFENYYYGM DV
SEQ ID NO: 26	1G11人单克隆抗体轻链可变区CDR1的氨基酸序列	RASQSVSSSTYLA
SEQ ID NO:27	2A7人单克隆抗体轻链可变区CDR1的氨基酸序列	RASQSVSSSYLA
SEQ ID NO: 28	2F9人单克隆抗体轻链可变区CDR1的氨基酸序列	RASQSVSSSYLA
SEQ ID NO: 29	12E1人单克隆抗体轻链可变区CDR1的氨基酸序列	RASQSVSSSYLA
SEQ ID NO:30	13D12人单克隆抗体轻链可变区CDR1的氨基酸序列	RASQSVSSSYLA
SEQ ID NO: 31	1G11人单克隆抗体轻链可变区CDR2的氨基酸序列	GASRRAT
SEQ ID NO:32	2A7人单克隆抗体轻链可变区CDR2的氨基酸序列	GASSRAT
SEQ ID NO:33	2F9人单克隆抗体轻链可变区CDR2的氨基酸序列	GASSRAT
SEQ ID NO:34	12E1人单克隆抗体轻链可变区CDR2的氨基酸序列	DASNRAT
SEQ ID NO:35	13D12人单克隆抗体轻链可变区CDR2的氨基酸序列	GASSRAT
SEQ ID NO: 36	1G11人单克隆抗体轻链可变区CDR3的氨基酸序列	QQYGSSPLT
SEQ ID NO:37	2A7人单克隆抗体轻链可变区CDR3的氨基酸序列	QQYGSSPMYT
SEQ ID NO: 38	2F9人单克隆抗体轻链可变区CDR3的氨基酸序列	QQYGSSPLYT
SEQ ID NO: 39	12E1人单克隆抗体轻链可变区CDR3的氨基酸序列	QQRRT

SEQIDNO: 40	13D12人单克隆抗体轻链可变区CDR3的氨基酸序列	QQYGGSSPRT
SEQ ID NO:41	1G11人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGC CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGG GTCCTTCAGTGATTACTTCTGGACCTGGATCCGCCAGCCC CCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGAAATCAATCATA GTGGAACCACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGT CACCATTTCAGCAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG AGGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATT ACTGTGCGAGACTCAGCAGCTGGTCGAAGTGGGCCTTTGA GTAAGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTTA
SEQ ID NO: 42	2A7人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTT CACCGTCAGTAGCAACTACATGAAGTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATGGCA GTGGTAGAACATATTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAGT CACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAACGCTGTATCTT CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATT ACTGTGCGAGAGATACCTACGCTATGGACGTCTGGGGCC AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCT
SEQ ID NO:43	2F9人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列	GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGATCCAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGGTT CATCGTCAGTAGAACTACATGAAGTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTTATTTATGGCA GTGGTAGGACAGACTGCGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCGAAGAACGCTGTATCTT CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATT ACTGTGCGAGAGATGGGGACTACGGTATGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO:44	12E1人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATCCAGC CTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATT CACCTTTGATGATTATGCCATGCAGTGGGTCCGGCAAGCT CCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGA ATAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTAT CTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGT ATTACTGTACAAAAGCCCTCTATGGTTCCGGGAGTTCTGA CTTCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACC ACGGTCGCGCTCTCTCA
SEQ ID NO: 45	13D12人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGC CTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTATGGTGG GTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCC CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAAATCAATCATA GCGGAAGTACCAACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGT CACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG AACTAAACTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATT ACTGTGCGAGAGAATTACGATATTTGAAAAGTACTACTA CGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA
SEQ ID NO: 46	1G11人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTTTCCAGGCACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTAGCAGCACCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCAGGGTCTCATCTATGGTGCATCCA GAAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTA GCTCACCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT CAAA

SEQ ID NO: 47	2A7人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA GCTCACCCTGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
SEQ ID NO: 48	2F9人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA GCTCACCTCTGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA GATCAAA
SEQ ID NO: 49	12E1人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGGACGT TCGGCCAAGGGATCAAGGTGGAAATCAAA
SEQ ID NO: 50	13D12人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA GCTCACCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAAT CAAA
SEQ ID NO: 51	人种系 V _H 4-34的氨基酸序列	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQP PGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTVISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCAR
SEQ ID NO: 52	人种系 V _H 3-53的氨基酸序列	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQA PGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAR
SEQ ID NO: 53	人种系 V _H 3-9/D3-10/JH6b的氨基酸序列	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTALYYCAKDYGSGSYYYGYMDVWVGQGT TVSS
SEQ ID NO: 54	人种系 V _K A27的氨基酸序列	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQYQSSP
SEQ ID NO: 55	人种系 V _K L6/JK1的氨基酸序列	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEP EDFAVYYCQQRNWTFGQGTKVEIK

因为这些抗体均能与O8E结合，并且抗原结合特异性主要是由CDR1、2和3区提供的，V_H CDR1、CDR 2和CDR 3序列与V_K CDR1、CDR 2和CDR 3序列可以“混合并匹配”（即来自不同抗体的CDR可以混合并匹配，但是每个抗体必须含有V_H CDR1、CDR 2和CDR 3和V_K CDR1、CDR 2和CDR 3），从而产生本发明的其他的抗O8E结合分子。

O8E与这些“混合并匹配的”抗体的结合可以用上文及实施例中所述的结合试验（例如FACS、ELISA、Biacore[®]系统分析）检测。优选地，当V_H CDR序列混合并匹配时，来自特定V_H序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列被替换为结构上相似的CDR序列。同样，当V_K CDR序列混合并匹配时，来自特定V_K序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列优选地被替换为结构上相似的CDR序列。对于本领域技术人员而言显而易见的是，通过将一个或多个V_H和/或V_L CDR区序列替换为来自此处公开的单克隆抗体1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的CDR序列的结构上相似的序列，可以产生新的V_H和V_L序列。

因此，在另一个方面，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包括：

(a) 包含选自SEQ ID NO: 11、12、13、14和15的氨基酸序列的重链可变区CDR1；

(b) 包含选自SEQ ID NO: 16、17、18、19和20的氨基酸序列的重链可变区CDR2；

(c) 包含选自SEQ ID NO: 21、22、23、24和25的氨基酸序列的重链可变区CDR3；

(d) 包含选自SEQ ID NO: 26、27、28、29和30的氨基酸序列的轻链可变区CDR1；

(e) 包含选自SEQ ID NO: 31、32、33、34和35的氨基酸序列的轻链可变区CDR2；和

(f) 包含选自SEQ ID NO: 36、37、38、39和40的氨基酸序列的轻链可变区CDR3；其中该抗体与O8E、优选与人O8E特异性结合。

在一个优选实施方案中，该抗体包括：

(a) 包含SEQ ID NO: 11的重链可变区CDR1；

(b) 包含SEQ ID NO: 16的重链可变区CDR2；

(c) 包含SEQ ID NO: 21的重链可变区CDR3；

(d) 包含SEQ ID NO: 26的轻链可变区CDR1；

(e) 包含SEQ ID NO: 31的轻链可变区CDR2；和

(f) 包含SEQ ID NO: 36的轻链可变区CDR3。

在另一优选实施方案中，该抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 12的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 17的重链可变区CDR2；
- (c) 包含SEQ ID NO: 22的重链可变区CDR3；
- (d) 包含SEQ ID NO: 27的轻链可变区CDR1；
- (e) 包含SEQ ID NO: 32的轻链可变区CDR2； 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 37的轻链可变区CDR3。

在另一优选实施方案中，该抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 13的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 18的重链可变区CDR2；
- (c) 包含SEQ ID NO: 23的重链可变区CDR3；
- (d) 包含SEQ ID NO: 28的轻链可变区CDR1；
- (e) 包含SEQ ID NO: 33的轻链可变区CDR2； 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 38的轻链可变区CDR3。

在另一优选实施方案中，该抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 14的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 19的重链可变区CDR2；
- (c) 包含SEQ ID NO: 24的重链可变区CDR3；
- (d) 包含SEQ ID NO: 29的轻链可变区CDR1；
- (e) 包含SEQ ID NO: 34的轻链可变区CDR2； 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 39的轻链可变区CDR3。

在另一优选实施方案中，该抗体包括：

- (a) 包含SEQ ID NO: 15的重链可变区CDR1；
- (b) 包含SEQ ID NO: 20的重链可变区CDR2；
- (c) 包含SEQ ID NO: 25的重链可变区CDR3；
- (d) 包含SEQ ID NO: 30的轻链可变区CDR1；
- (e) 包含SEQ ID NO: 35的轻链可变区CDR2； 和
- (f) 包含SEQ ID NO: 40的轻链可变区CDR3。

本领域公知，不依赖于CDR1和/或CDR2域，单独的CDR3域即可以决定抗体对于同源抗原的结合特异性，并且基于共同的CDR3序列可以预测性地产生具有相同结合特异性的多种抗体。参见，例如，Klimka等，*British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (描述了仅使用鼠抗-CD30抗体Ki-4的重链可变域CDR3产生人源化抗-CD30抗体)；Beiboer等，*J. Mol Biol.* 296:833-849 (2000) (描述了仅使用亲本鼠MOC-31抗-EGP-2抗体的重链CDR3序列产生重组上皮糖蛋白-2 (EGP-2)抗体)；Rader等，*Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (描述了使用鼠抗整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 抗体LM609的重链和轻链可变CDR3域的一组人源化抗整联蛋白 $\alpha_v\beta_3$ 抗体，其中每个成员抗体在CDR3域之外含有不同的序列，并且能够与亲本鼠抗体结合相同的表位，其亲和力与亲本鼠抗体一样高或更高)；Barbas等，*J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (公开了CDR3域对抗原结合提供了最重要的贡献)；Barbas等，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (描述了三种抗人胎盘DNA的Fab (SI-1, SI-40和SI-32)的重链CDR3序列向抗破伤风类毒素Fab的重链上的移植，由此替换了存在的重链CDR3，并且证明单独的CDR3提供结合特异性)；和Ditzel等，*J. Immunol.* 157:739-749 (1996) (描述了移植研究，其中仅向单特异性IgG破伤风类毒素结合Fab p313抗体转移亲本多特异性Fab LNA3的重链CDR3足以保留亲本Fab的结合特异性)。上述每一参考文献都全文引入作为参考。

因此，在某些方面，本发明提供包含一个或多个来自非人抗体如小鼠或大鼠抗体的重链和/或轻链CDR3域的单克隆抗体，其中该单克隆抗体能够与O8E特异性结合。在某些实施方案中，这些本发明的包含一个或多个来自非人抗体的重链和/或轻链CDR3域的抗体与相应的亲本非人抗体(a)能够竞争结合；(b)保留功能特性；(c)结合相同的表位；和/或(d)具有类似的结合亲和力。

在其他方面，本发明提供包含一个或多个来自第一人抗体（如从非人动物获得的人抗体）的重链和/或轻链CDR3域的单克隆抗体，其

中该第一人抗体能够与O8E特异性结合，并且其中来自该第一人抗体的CDR3域代替了缺乏对O8E的结合特异性的人抗体中的CDR3域，从而产生能够与O8E特异性结合的第二人抗体。在某些实施方案中，本发明的包含一个或多个来自第一人抗体的重链和/或轻链CDR3域的抗体与相应的亲本第一人抗体(a)能够竞争结合；(b)保留功能特性；(c)结合相同的表位；和/或(d)具有类似的结合亲和力。

具有特定种系序列的抗体

在某些实施方案中，本发明的抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

例如，在一个优选实施方案中，本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_H 4-34基因的重链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。在另一优选实施方案中，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_H 3-53基因的重链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。在另一优选实施方案中，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分或片段，其包含产生自或来源于人V_H 3-9/D3-10/JH6b基因的重链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。

在另一优选实施方案中，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含产生自或来源于人V_K A27基因的轻链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。在另一优选实施方案中，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分或片段，其包含产生自或来源于人V_K L6/JK1基因的轻链可变区，其中该抗体与O8E特异性结合。

在另一优选实施方案中，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其中该抗体：

(a) 包含产生自或来源于人V_H 4-34基因、人V_H 3-53基因或组合人V_H 3-9/D3-10/JH6b（所述基因分别编码SEQ ID NO： 51、52和53所示的氨基酸序列）的重链可变区；

(b) 包含产生自或来源于人V_K A27基因或组合人V_K L6/JK1基因（所述基因分别编码SEQ ID NO: 54和55所示的氨基酸序列）的轻链可变区；且

(c) 该抗体与O8E、优选人O8E特异性结合。

分别具有V_H 4-34和V_K A27的V_H和V_K的抗体的例子是1G11和13D12。分别具有V_H 3-53和V_K A27的V_H和V_K的抗体的例子是2A7和2F9。分别具有V_H 3-9/D3-10/JH6b和V_K L6/JK1的V_H和V_K的抗体的例子是13D12。

在本文中，如果一种人抗体的可变区是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得的，则该人抗体包含“产生自”或“来源于”特定种系序列的重链或轻链可变区。这样的系统包括用目标抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠，或者用目标抗原筛查展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。“产生自”或“来源于”人种系免疫球蛋白序列的人抗体可以这样鉴定：将该人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较，选择在序列上最接近于该人抗体序列（即有最高%同一性）的人种系免疫球蛋白序列。“产生自”或“来源于”特定人种系免疫球蛋白序列的人抗体与该种系序列相比可能包含氨基酸差异，例如由于天然发生的体细胞突变或定点突变的有意引入而导致的氨基酸差异。但是，选择的人抗体在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列通常至少90%相同，并且含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列（例如鼠种系序列）相比较时确认该人抗体属于人类抗体的氨基酸残基。在某些情况下，人抗体在氨基酸序列上与该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列可以至少95%、或者甚至至少96%、97%、98%或99%相同。典型地，来源于特定人种系序列的人抗体表现与该人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列有不超过10个氨基酸的差异。在某些情况中，该人抗体可能表现与该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列有不超过5个、或者甚至不超过4、3、2或1个氨基酸的差异。

同源抗体

在另一实施方案中，本发明的抗体包含的重链和轻链可变区含有与此处所述优选抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列，并且其中该抗体保留了本发明抗O8E抗体的所需功能特性。

例如，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(a) 重链可变区包含与选自SEQ ID NO: 1、2、3、4和5的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列；

(b) 轻链可变区包含与选自SEQ ID NO: 6、7、8、9和10的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列；

(c) 以 1×10^{-7} M或更低的 K_D 与人O8E结合；和

(d) 与O8E转染的人CHO细胞结合。

在另外一些实施方案中， V_H 和/或 V_L 氨基酸序列可以与上述序列85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源。具有与上述序列的 V_H 和 V_L 区高度（即80%或更高）同源的 V_H 和 V_L 区的抗体可以如下获得：诱变（例如定点诱变或PCR介导的诱变）编码SEQ ID NO: 41、42、43、44、45、46、47、48、49和50的核酸分子，然后用此处所述的功能试验检测编码的被改变抗体所保留的功能（即以上(c)和(d)所述的功能）。

如本文使用的，两个氨基酸序列之间的百分同源性等同于两个序列之间的百分同一性。考虑为了两个序列之间进行最佳比对所需要引入的空位的数目和每个空位的长度后，两个序列之间的百分同一性是这两个序列共有的相同位点的数目的函数（即%同源性=相同位点的数目/位点的总数 $\times 100$ ）。两个序列之间的序列比较和百分同一性的确定可以如下面的非限制性实施例中所述用数学算法实现。

两个氨基酸序列之间的百分同一性可以用已经整合入ALIGN程序(2.0版本)中的E. Meyers和W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))的算法来确定，其使用PAM120权重残基表，12的空位长度罚分，4的空位罚分。另外，两个氨基酸序列之间的百分同一性也可以

用已经整合入GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)的GAP程序中的Needleman和Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))的算法来确定, 其使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵, 16、14、12、10、8、6或4的空位权重, 和1、2、3、4、5或6的长度权重。

另外或者可替代地, 本发明的蛋白质序列可以进一步作为“查询序列”用于进行公共数据库的检索, 例如鉴定相关序列。这种检索可以用Altschul等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10的XBLAST程序(2.0版本)进行。BLAST蛋白质检索可以用XBLAST程序进行, 得分=50, 字长=3, 以获得与本发明的抗体分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对, 可以采用如Altschul等(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402所述的空位BLAST。当采用BLAST和空位BLAST程序时, 可以使用各自程序(例如XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

具有保守修饰的抗体

在某些实施方案中, 本发明的抗体包括含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区, 其中这些CDR序列中的一个或多个包含基于本文所述优选抗体(例如1G11、2A7、2F9、12E1或13D12)的特定氨基酸序列或其保守修饰, 并且其中该抗体保留本发明抗O8E抗体的所需功能特性。因此, 本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包括含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区, 其中:

(a) 重链可变区CDR3序列包含选自SEQ ID NO: 21、22、23、24和25的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列,

(b) 轻链可变区CDR3序列包含选自SEQ ID NO: 36、37、38、39和40的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列,

(c) 以 1×10^{-7} M或更低的 K_D 与人O8E结合; 和

(d) 与O8E转染的人CHO细胞结合。

在一个优选实施方案中，重链可变区CDR2序列包含选自SEQ ID NO: 16、17、18、19和20的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区CDR2序列包含选自SEQ ID NO: 31、32、33、34和35的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列。在另一优选实施方案中，重链可变区CDR1序列包含选自SEQ ID NO: 11、12、13、14和15的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区CDR1序列包含选自SEQ ID NO: 26、27、28、29和30的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列。

在各种实施方案中，抗体可以是，例如，人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

本文使用的术语“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变含该氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。可以通过本领域公知的标准技术，如定点诱变和PCR介导的诱变，向本发明抗体中引入修饰。保守氨基酸置换是将氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域中已经定义。这些家族包括：具有碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、 β -分支侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳族侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。因此，本发明抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以被置换为来自相同侧链家族的其他氨基酸残基，并且可以检测改变的抗体所保留的功能。

与本发明的抗O8E抗体结合相同表位的抗体

在另一实施方案中，本发明提供与本发明的任意O8E单克隆抗体结合人O8E上的相同表位的抗体（即能够与本发明的任意单克隆抗体交叉竞争结合O8E的抗体）。在优选实施方案中，用于交叉竞争研究

的参比抗体可以是单克隆抗体1G11（具有分别如SEQ ID NO: 1和6所示的V_H和V_L序列），或单克隆抗体2A7（具有分别如SEQ ID NO: 2和7所示的V_H和V_L序列），或单克隆抗体2F9（具有分别如SEQ ID NO: 3和8所示的V_H和V_L序列），或单克隆抗体12E1（具有分别如SEQ ID NO: 4和9所示的V_H和V_L序列），或单克隆抗体13D12（具有分别如SEQ ID NO: 5和10所示的V_H和V_L序列）。这些交叉竞争抗体可以根据它们在标准O8E结合测定中与1G11、2A7、2F9、12E1或13D12交叉竞争的能力来鉴定。例如，可以利用BIAcore[®]系统分析、ELISA测定或流式细胞分析来证明与本发明抗体的交叉竞争。被测试抗体抑制（例如）1G11、2A7、2F9、12E1或13D12与人O8E结合的能力证明，该测试抗体可以与1G11、2A7、2F9、12E1或13D12竞争结合人O8E，因此与1G11、2A7、2F9、12E1或13D12相同地结合人O8E上的相同表位。在一个优选实施方案中，与1G11、2A7、2F9、12E1或13D12相同地结合人O8E上的相同表位的抗体是人单克隆抗体。这些人单克隆抗体可以如实施例所述制备和分离。

工程化抗体和修饰的抗体

本发明的抗体进一步可以利用具有此处所公开的一种或多种V_H和/或V_L序列的抗体作为起始材料来制备，以构建一种修饰的抗体，该修饰的抗体相对于与起始抗体相比可以具有改变的特性。可以通过修饰一个或两个可变区（即V_H和/或V_L）例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个构架区内的一个或多个残基来构建抗体。另外，或者，可以通过修饰恒定区内的残基来构建抗体，例如改变该抗体的效应功能。

可以进行的一种类型的可变区工程化是CDR移植。抗体主要是通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因，CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列在各个抗体之间更加多样化。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用，因此通过构建如下的表达载体能够表达模拟特定天然存在抗体的特

性的重组抗体：该表达载体包含来自特定天然存在抗体的CDR序列，该CDR序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的构架序列上(参见，例如，Riechmann, L.等(1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P.等(1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C.等(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winter的美国专利5,225,539，和Queen等的美国专利5,530,101; 5,585,089; 5,693,762和6,180,370)。

因此，本发明的另一个实施方案涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包括含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区，该CDR1、CDR2和CDR3序列分别包含选自SEQ ID NO: 11、12、13、14和15，SEQ ID NO: 16、17、18、19和20，和SEQ ID NO: 21、22、23、24和25的氨基酸序列，并且包括含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区，该CDR1、CDR2和CDR3序列分别包含选自SEQ ID NO: 26、27、28、29和30，SEQ ID NO: 31、32、33、34和35，和SEQ ID NO: 36、37、38、39和40的氨基酸序列。因此，这些抗体含有单克隆抗体1G11、2A7、2F9、12E1或13D12的V_H和V_L CDR序列，但是可能含有与这些抗体不同的构架序列。

这些构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或发表的参考文献中获得。例如，人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在以下资源中发现：“VBase”人种系序列数据库（可从因特网上www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得），以及Kabat, E. A.等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号94-61242; Tomlinson, I. M.等(1992) “The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops” *J. Mol. Biol.* 227:776-798;和Cox, J. P. L.等(1994) “A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; 其内容均引入本文作为参考。作为另一个例子，人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在Genbank数据库中发现。例如，在HCo7 HuMAb小鼠中发现的下列

重链种系序列可以根据如下Genbank登录号获得：1-69 (NG_001010109, NT_024637 和 BC070333)、3-53 (NG_001010109 和 NT_024637) 和 3-7 (NG_001010109 和 NT_024637)。作为另一个例子，在VK HCo12 HuMAb 小鼠中发现的以下重链种系序列可以根据如下Genbank登录号获得：1-69 (NG_001010109、NT_024637和BC070333)、5-51 (NG_001010109和NT_024637)、4-34 (NG_001010109和NT_024637)、4-34 (CAJ556644)和3-23 (AJ406678)。

使用一种被称为缺口BLAST的序列相似性检索方法将抗体蛋白质序列与编译的蛋白质序列数据库进行比较(Altschul等人, (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402)，该方法是本领域技术人员公知的。BLAST是一种启发式算法，其中抗体序列和数据库序列之间统计学显著的比对可能含有排比字的高评分的区段对(HSP)。延伸或修剪无法提高其评分的区段对被称为命中(hit)。简要地说，翻译VBASE来源的核苷酸序列(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)，保留介于FR1和FR3构架区之间并且包含FR1和FR3的区域。数据库序列的平均长度为98个残基。除去在蛋白质全长上完全匹配的重复序列。使用除了关闭的低复杂性过滤器以外采用缺省标准参数的blastp程序，以及BLOSUM62的取代矩阵，对蛋白质进行BLAST检索，过滤前5个产生序列匹配的命中。在全部6个框架中翻译核苷酸序列，在数据库序列的匹配区段中不含终止密码子的框架被认为是潜在的命中。随后用BLAST程序tblastx进行验证，该程序翻译全部6个框架中的抗体序列，并且将这些翻译与在全部6个框架中动态翻译的VBASE核苷酸序列进行比较。

同一性是抗体序列与蛋白质数据库之间在序列全长上完全氨基酸匹配。阳性(同一性 + 取代匹配)不是相同，而是由BLOSUM62取代矩阵引导的氨基酸置换。如果抗体序列以相同的同一性与两个数据库序列匹配，则阳性最强的命中被确定为匹配序列命中。

用于本发明抗体的优选构架序列在结构上类似于由所选择的本发明抗体使用的构架序列，例如，类似于本发明优选的单克隆抗体使

用的V_H 4-34构架序列(SEQ ID NO: 51)和/或V_H 3-53构架序列(SEQ ID NO: 52)和/或V_H 3-9/D3-10/JH6b构架序列(SEQ ID NO: 53)和/或V_K A27构架序列(SEQ ID NO: 54)和/或组合V_K L6/JK1构架序列(SEQ ID NO: 55)。V_H CDR1、CDR 2和CDR 3序列和V_K CDR1、CDR 2和CDR 3序列可以被移植到与该构架序列的来源种系免疫球蛋白基因具有相同序列的构架区上,或者CDR序列可以被移植到与该种系序列相比含有一个或多个突变的构架区上。例如,已经发现,在某些情况中,将构架区内的残基进行突变对于保持或增强抗体的抗原结合能力是有利的(参见,例如,Queen等的美国专利5,530,101; 5,585,089; 5,693,762和6,180,370)。

另一种类型的可变区修饰是突变V_H和/或V_K CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基,从而改善目标抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变,以引入突变,对抗体结合的影响,或者其他目标功能特性,可以用此处所述和实施例中提供的体外或体内试验来评价。优选引入(如上文所述的)保守修饰。这些突变可以是氨基酸置换、添加或缺失,但是优选置换。而且,一般改变CDR区内的不超过1、2、3、4或5个残基。

因此,在另一个实施方案中,本发明提供分离的抗O8E单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含的重链可变区含有:(a) V_H CDR1区,其包含选自SEQ ID NO: 11、12、13、14和15的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 11、12、13、14和15相比具有1、2、3、4或5个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列;(b) V_H CDR2区,其包含选自SEQ ID NO: 16、17、18、19和20的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 16、17、18、19和20相比具有1、2、3、4或5个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列;(c) V_H CDR3区,其包含选自SEQ ID NO: 21、22、23、24和25的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 21、22、23、24和25相比具有1、2、3、4或5个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列;(d) V_K CDR1区,其包含选自SEQ ID NO: 26、27、28、29和30的氨基酸序列,或与SEQ ID NO: 26、27、28、29和30相比具有1、2、3、4或5个氨基酸置换、

缺失或添加的氨基酸序列；(e) V_K CDR2区，其包含选自SEQ ID NO: 31、32、33、34和35的氨基酸序列，或与SEQ ID NO: 31、32、33、34和35相比具有1、2、3、4或5个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列；和(f) V_K CDR3区，其包含选自SEQ ID NO: 36、37、38、39和40的氨基酸序列，或与SEQ ID NO: 36、37、38、39和40相比具有1、2、3、4或5个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列。

本发明的工程化抗体包括例如为了改善抗体特性而对其 V_H 和/或 V_K 内的构架残基进行了修饰的抗体。进行这样的构架修饰一般是为了降低抗体的免疫原性。例如，一种方法是将一个或多个构架残基“回复突变”为相应的种系序列。更特别地，经历体细胞突变的抗体可含有与衍生该抗体的种系序列不同的构架残基。通过比较抗体构架序列与衍生该抗体的种系序列，可以鉴定这些残基。

例如，对于1G11， V_H 的氨基酸残基#71（FR3内）是丙氨酸，而在相应的 V_H 4-34种系序列中该残基为缬氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，可以通过（例如）定点诱变或PCR介导的诱变，将该体细胞突变“回复突变”为种系序列（例如，1G11的 V_H 的FR3的残基#71可以从丙氨酸“回复突变”为缬氨酸）。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一个例子是，对于1G11， V_H 的氨基酸残基#81（FR3内）是精氨酸，而在相应的 V_H 4-34种系序列中该残基为赖氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将1G11的 V_H 的FR3的残基#81从精氨酸“回复突变”为赖氨酸。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一个例子是，对于13D12， V_H 的氨基酸残基#83（FR3内）是天冬酰胺，而在相应的 V_H 4-34种系序列中该残基为丝氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将13D12的 V_H 的FR3的残基#83从天冬酰胺“回复突变”为丝氨酸。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一个例子是，对于2A7， V_H 的氨基酸残基#67（FR3内）是缬氨酸。

酸，而在相应的V_H 3-53种系序列中该残基为苯丙氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将2A7的V_H的FR3的残基#67从缬氨酸“回复突变”为苯丙氨酸。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一个例子是，对于2F9，V_H的氨基酸残基#28（FR1内）是异亮氨酸，而在相应的V_H 3-53种系序列中该残基为苏氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将2F9的V_H的FR1的残基#28从异亮氨酸“回复突变”为苏氨酸。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一个例子是，对于12E1，V_H的氨基酸残基#23（FR1内）是缬氨酸，而在相应的V_H 3-9种系序列中该残基为丙氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将12E1的V_H的FR1的残基#23从缬氨酸“回复突变”为丙氨酸。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一个例子是，对于1G11，V_k的氨基酸残基#7（FR1内）是苯丙氨酸，而在相应的V_k A27种系序列中该残基为丝氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将1G11的V_k的FR1的残基#7从苯丙氨酸“回复突变”为丝氨酸。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一个例子是，对于1G11，V_k的氨基酸残基#47（FR2内）是缬氨酸，而在相应的V_k A27种系序列中该残基为亮氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将1G11的V_k的FR2的残基#47从缬氨酸“回复突变”为亮氨酸。这样“回复突变”的抗体也包括在本发明中。

另一种类型的构架修饰涉及对构架区内、乃至一个或多个CDR区内的一个或多个残基进行突变，以除去T细胞表位，从而降低该抗体的潜在的免疫原性。该方法也被称为“脱免疫”，在Carr等的公布号为20030153043的美国专利中详细记载。

本发明的工程化抗体也包括其中已经通过改变抗体上T细胞表位

相互作用的氨基酸修饰对氨基酸残基进行修饰从而提高或降低免疫原性应答的那些抗体(参见, 例如美国专利No. 6,835,550; 6,897,049和6,936,249)。

除了在构架区或CDR区内进行的修饰以外, 或者作为它的替代方案, 也可以将本发明的抗体改造为在Fc区内包括修饰, 一般是为了改变该抗体的一种或多种功能特性, 如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外, 也可以将本发明的抗体化学修饰(例如一个或多个化学部分可以连接到该抗体上), 或者修饰改变其糖基化, 以改变该抗体的一种或多种功能特性。这些实施方案均在下文详细描述。Fc区中残基的编号是Kabat的EU指数的编号。

在一个实施方案中, 修饰CH1的铰链区, 使该铰链区中半胱氨酸残基的数目改变, 例如增加或减少。该方法在Bodmer等的美国专利No. 5,677,425号中详细记载。改变CH1铰链区中半胱氨酸的数目是为了(例如)促进轻链和重链的装配, 或提高或降低抗体的稳定性。

在另一实施方案中, 对抗体的Fc铰链区进行突变, 以降低该抗体的生物半衰期。更具体地, 向Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区引入一个或多个氨基酸突变, 使得该抗体与葡萄球菌蛋白A(SpA)的结合比天然Fc-铰链结构域与SpA的结合减弱。该方法在Ward等的美国专利No. 6,165,745号中详细记载。

在另一实施方案中, 修饰抗体以提高其生物半衰期。可以使用各种方法。例如, 如Ward的美国专利No. 6,277,375所述, 可以引入一个或多个如下突变: T252L、T254S、T256F。或者, 如Presta等的美国专利No. 5,869,046和6,121,022所述, 为了提高生物半衰期, 该抗体可以在CH1或CL区内进行改变, 使之含有来自IgG Fc区CH2结构域的两个环的补救受体结合表位。

在其他一些实施方案中, 通过将至少一个氨基酸残基置换为不同的氨基酸残基来改变Fc区, 以改变抗体的效应功能。例如, 可以将选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320、322的一个或多个氨基酸置换为不同的氨基酸残基, 使得该抗体对效应配体的亲和力

改变，但是保留亲本抗体的抗原结合能力。其亲和力被改变的效应配体可以是，例如，Fc受体或补体的C1成分。该方法在Winter等的美国专利No. 5,624,821和5,648,260中更详细地描述。

在另外一个实施例中，可以将选自氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸置换为不同的氨基酸残基，使得该抗体的C1q结合改变和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)降低或消除。该方法在Idusogie等的美国专利No. 6,194,551中更详细地描述。

在另外一个实施例中，改变氨基酸位点231和239中的一个或多个氨基酸残基，从而改变该抗体固定补体的能力。该方法在Bodmer等的PCT公布WO 94/29351中进一步描述。

在另外一个实施例中，为了提高抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或提高抗体对Fcγ受体的亲和力，通过在下列位点处修饰一个或多个氨基酸来修饰Fc区：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439。该方法在Presta的PCT公布WO 00/42072中进一步描述。而且，人IgG1上对于FcγRI、FcγRII、FcγRIII和FcRn的结合位点已经作图，并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见，Shields, R.L.等(2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。位点256、290、298、333、334和339处的特定突变显示改善了与FcγRIII的结合。另外，下列组合突变体显示改善了与FcγRIII的结合：T256A/S298A，S298A/E333A，S298A/K224A和S298A/E333A/K334A。

在另一实施方案中，改变抗体的糖基化。例如，可以制备无糖基化的抗体(即该抗体缺乏糖基化)。例如，为了提高抗体对抗原的亲和力，可以改变糖基化。这样的碳水化合物修饰可以通过(例如)改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如，可以进行一个

或多个氨基酸置换,使一个或多个可变区构架糖基化位点消失,从而消除该位点处的糖基化。这种无糖基化可以提高抗体对抗原的亲合力。这种方法在Co等的美国专利No. 5,714,350和6,350,861中更详细地描述。

另外或者可替代地,可以制备糖基化类型改变的抗体,如岩藻糖基残基数目减少的低岩藻糖基化抗体,或等分GlcNac结构增多的抗体。已经证明这种改变的糖基化模式提高了抗体的ADCC能力。这种碳水化合物修饰可以通过(例如)在糖基化机制改变的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制改变的细胞在本领域中已有描述,能够用作宿主细胞,在其中表达本发明的重组抗体,从而产生糖基化改变的抗体。例如,细胞系Ms704、Ms705和Ms709缺乏岩藻糖基转移酶基因,FUT8 ($\alpha(1,6)$ 岩藻糖基转移酶基因),因此在Ms704、Ms705和Ms709细胞系中表达的抗体在它们的碳水化合物中缺乏岩藻糖。通过使用两种替代载体定向破坏CHO/DG44细胞中的FUT8基因,产生Ms704、Ms705和Ms709 FUT8^{-/-}细胞系(参见Yamane等的美国专利申请No. 20040110704 和 Yamane-Ohnuki 等, (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22)。另一个例子是, Hanai等的EP 1,176,195描述了具有功能破坏的FUT8基因的细胞系,该基因编码岩藻糖转移酶,由于减少或消除了 $\alpha(1,6)$ 键相关的酶,在这种细胞系中表达的抗体表现为低岩藻糖基化。Hanai等也描述了用于向结合抗体Fc区的N-乙酰葡萄糖胺上添加岩藻糖的酶活性低或不具有酶活性的细胞系,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0 (ATCC CRL 1662)。Presta的PCT公布WO 03/035835记载了一种变异CHO细胞系, Lec13细胞,其将岩藻糖连接到Asn(297)-连接的碳水化合物上的能力降低,也导致在该宿主细胞中表达的抗体为低岩藻糖基化(参见, Shields, R.L.等(2001) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740)。Umana等的PCT公布WO 99/54342记载了表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶III (GnTIII))的工程化细胞系,因此该工程化细胞系中表达的抗体表现为等分GlcNac结构增加,导致抗体的ADCC活性提高(参见, Umana 等(1999)

Nat. Biotech. 17:176-180)。此外，抗体的岩藻糖残基可以用岩藻糖苷酶切下。例如，岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶从抗体上除去岩藻糖残基(Tarentino, A.L.等. (1975) Biochem. 14:5516-23)。

本发明涉及的对此处所述抗体的另一种修饰是PEG化。例如，为了提高抗体的生物(例如血清)半衰期，可以将该抗体PEG化。为了PEG化一种抗体，一般在一个或多个PEG基团与抗体或抗体片段连接的条件下，将该抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)如PEG的反应性酯或醛衍生物反应。优选地，通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行PEG化。本文使用的术语“聚乙二醇”包括用来衍生化其他蛋白质的任何PEG形式，如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中，将要PEG化的抗体是一种无糖基化的抗体。将蛋白质PEG化的方法在本领域中公知，并且可以用于本发明的抗体。参见，例如，Nishimura等的EP 0 154 316和Ishikawa等的EP 0 401 384。

抗体工程化方法

如上所述，能够利用具有此处公开的V_H和V_K序列的抗O8E抗体，通过修饰V_H和/或V_K序列或与之连接的恒定区，产生新的抗O8E抗体。因此，在本发明的另一方面，利用本发明的抗O8E抗体(例如1G11、2A7、2F9、12E1或13D12)的结构特征，产生结构上相关的抗O8E抗体，该结构上相关的抗体保留本发明抗体的至少一种功能特性，如与人O8E结合。如上所述，例如，1G11、2A7、2F9、12E1或13D12的一个或多个CDR区或其突变可以与已知的构架区和/或其他CDR重组组合，从而产生另外的重组工程化的本发明的抗O8E抗体。其他类型的修饰包括以上部分所述的修饰。用于工程化方法的起始材料是此处提供的一种或多种V_H和/或V_K序列，或其一个或多个CDR区。为了产生工程化抗体，不一定必须实际制备(即表达为蛋白质)具有此处提供的一种或多种V_H和/或V_K序列，或其一个或多个CDR区的抗体。而是用该序列中所含的信息作为起始材料，产生由原始序列衍生的“第二

代”序列，然后制备该“第二代”序列，并将其表达为蛋白质。

因此，在另一实施方案中，本发明提供一种制备抗O8E抗体的方法，包括：

(a) 提供：(i)重链可变区抗体序列，其包含选自SEQ ID NO: 11、12、13、14和15的CDR1序列、选自SEQ ID NO: 16、17、18、19和20的CDR2序列、和/或选自SEQ ID NO: 21、22、23、24和25的CDR3序列；和/或(ii)轻链可变区抗体序列，其包含选自SEQ ID NO: 26、27、28、29和30的CDR1序列、选自SEQ ID NO: 31、32、33、34和35的CDR2序列、和/或选自SEQ ID NO: 36、37、38、39和40的CDR3序列；

(b) 改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基，从而产生至少一个改变的抗体序列；和

(c) 将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

可以利用标准分子生物学技术制备和表达所述改变的抗体序列。

典型地，由改变的抗体序列编码的抗体保留此处所述抗O8E抗体的一种、一些或全部功能特性，该功能特性包括但不限于：

(i) 以 1×10^{-7} M或更低的 K_D 与人O8E结合；

(ii) 与O8E转染的人CHO细胞结合。

改变的抗体的功能特性可以用本领域中使用的和/或此处所述的（如实施例中所所述的）标准试验（例如流式细胞术、结合测定）来评价。

在本发明抗体的工程化方法的某些实施方案中，可以沿全部或部分抗O8E抗体编码序列随机或选择性引入突变，并可以针对结合活性和/或如此处所述的其他功能特性，筛选获得的修饰的抗O8E抗体。突变方法在本领域中已经描述。例如，Short的PCT公布WO 02/092780记载了利用饱和诱变、合成连接装配或它们的组合产生和筛选抗体突变的方法。另外，Lazar等的PCT公布WO 03/074679也记载了利用计算筛选方法优化抗体的生理化学性质的方法。

编码本发明的抗体的核酸分子

本发明的另一方面涉及编码本发明的抗体的核酸分子。该核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中，或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过包括碱/SDS处理、CsCl显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳在内的标准技术和本领域公知的其他方法与其他细胞成分或其他污染物（例如其他细胞核酸或蛋白质）分离纯化时，核酸是“分离的”或“基本上纯的”。参见，F. Ausubel等ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本发明的核酸可以是例如DNA或RNA，并且可以含有或者可以不含内含子序列。在一个优选实施方案中，该核酸是cDNA分子。

本发明的核酸可以利用标准分子生物学技术获得。对于杂交瘤（例如，由如下文进一步描述的携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤）表达的抗体，编码由杂交瘤制备的抗体轻链和重链的cDNA可以用标准PCR扩增或cDNA克隆技术获得。对于从免疫球蛋白基因文库中获得的抗体（例如使用噬菌体展示技术），可以从文库中回收编码该抗体的一种或多种核酸。

本发明优选的核酸分子是编码1G11、2A7、2F9、12E1或13D12单克隆抗体的V_H和V_L序列的核酸分子。编码1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_H序列的DNA序列分别在SEQ ID NO: 41、42、43、44和45中示出。编码1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的V_L序列的DNA序列分别在SEQ ID NO: 46、47、48、49和50中示出。

一旦获得编码V_H和V_L片段的DNA片段，即可通过标准重组DNA技术进一步操作这些DNA片段，例如将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中，编码V_L或V_H的DNA片段与编码另外一种蛋白质如抗体恒定区或柔性连接体的另一个DNA片段有效连接。如本文使用的术语“有效连接”意思是两个DNA片段连接在一起，使得这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持符合阅读框。

通过将编码V_H的DNA与编码重链恒定区（CH1、CH2和CH3）的

另外一种DNA分子有效连接, 可以将分离的编码 V_H 区的DNA转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在本领域中公知(参见, 例如, Kabat, E. A.等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版号94-61242), 包括这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区, 但是最优选的是IgG1或IgG4恒定区。对于Fab片段重链基因, 编码 V_H 的DNA可以与只编码重链CH1恒定区的另外一种DNA分子有效连接。

通过将编码 V_L 的DNA与编码轻链恒定区CL的另外一种DNA分子有效连接, 可以将分离的编码 V_L 区的DNA转化为全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域中公知(参见, 例如, Kabat, E. A.等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH出版号94-61242), 包括这些区域的DNA片段可以通过标准PCR扩增获得。在优选的实施方案中, 轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区, 但最优选地是 κ 恒定区。

为了产生scFv基因, 将编码 V_H 和 V_L 的DNA片段与编码柔性连接体例如编码氨基酸序列 $(Gly_4-Ser)_3$ 的另外一个片段有效连接, 使得 V_H 和 V_L 序列可以表达为连续的单链蛋白质, 其 V_L 和 V_H 区通过该柔性连接体连接(参见, 例如Bird等(1988) Science 242:423-426; Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty等(1990) Nature 348:552-554)。

本发明的单克隆抗体的产生

本发明的单克隆抗体(mAb)能够通过多种技术制备, 包括常规的单克隆抗体方法, 例如, Kohler和Milstein (1975) Nature 256: 495所述的标准体细胞杂交技术。虽然优选体细胞杂交技术, 但是原则上, 能使用制备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。

用于制备杂交瘤的优选的动物系统是鼠系统。用小鼠产生杂交瘤是一种完善建立的程序。免疫程序和分离用于融合的被免疫脾细胞的技术是本领域公知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是公知的。

本发明的嵌合或人源化抗体可以基于如上所述获得的鼠单克隆抗体的序列来制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从目标非人杂交瘤中获得,并且使用标准分子生物学技术将其改造为含有人免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以利用本领域公知的方法将鼠可变区连接到人恒定区上(参见,例如,Cabilly等的美国专利No. 4,816,567)。为了产生人源化抗体,可以利用本领域公知的方法将鼠CDR区插入人构架内(参见,例如,Winter的美国专利No. 5,225,539,和Queen等的美国专利No. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762和6,180,370)。

在一个优选实施方案中,本发明的抗体是人单克隆抗体。这种抗O8E人单克隆抗体能用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生。这些转基因和转染色体小鼠包括在此分别被称作HuMab小鼠[®]和KM小鼠[®]的小鼠,并且在此通称为“人Ig小鼠”。

HuMab小鼠[®](Medarex, Inc.)包含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小基因座,和使内源 μ 和 κ 链基因座失活的定向突变(参见,例如,Lonberg等(1994) Nature 368(6474): 856-859)。因此,该小鼠表现为小鼠IgM或 κ 表达降低,并且响应于免疫,导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变,从而产生高亲和力人IgG κ 单克隆抗体(Lonberg, N.等(1994),同上; 综述Lonberg, N. (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)。HuMab小鼠的制备和使用,以及该小鼠携带的基因组修饰,在下面的文献中详细描述: Taylor, L.等(1992) Nucleic Acids

Research 20: 6287-6295; Chen, J.等(1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon等(1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 3720-3724; Choi等(1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J.等(1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon等(1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, L.等(1994) International Immunology 6: 579-591; 和Fishwild, D.等(1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, 这些文献的内容全文引入本文作为参考。进一步参见, Lonberg和Kay的美国专利No. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 和5,770,429; 和Surani等的美国专利No. 5,545,807; Lonberg和Kay的PCT公布号WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884和WO 99/45962; 和Korman等的PCT公布号WO 01/14424。

在另一实施方案中, 可以用转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠, 例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠, 产生本发明的人抗体。这种小鼠在此被称为“KM小鼠[®]”, 在Ishida等的PCT公布WO 02/43478中详细描述。

再者, 表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统在本领域中可以获得, 能够用来产生本发明的抗O8E抗体。例如, 可以使用一种被称作Xenomouse (Abgenix, Inc.)的替代转基因系统, 这种小鼠在例如Kucherlapati等的美国专利No. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584和6,162,963中描述。

而且, 表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统在本领域中可以获得, 能够用来产生本发明的抗O8E抗体。例如, 可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠, 其被称作“TC小鼠”; 这种小鼠在Tomizuka等 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中描述。作为另外一个例子, 本领域中已经描述了携带人重链和轻链染色体的牛(Kuroiwa等(2002) Nature Biotechnology 20:889-894), 其能够用来产生本发明的抗O8E抗体。

本发明的人单克隆抗体也可以使用用于筛查人免疫球蛋白基因

文库的噬菌体展示方法制备。这种用于分离人抗体的噬菌体展示方法在本领域中已经建立。参见,例如, Ladner等的美国专利No. 5,223,409; 5,403,484; 和 5,571,698; Dower等的美国专利No. 5,427,908 和 5,580,717; McCafferty等的美国专利No. 5,969,108和6,172,197; 和 Griffiths等的美国专利No. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,9130, 31, 32, 33, 34, 35和36,593,081。

本发明的人单克隆抗体也可以用SCID小鼠制备, 该SCID小鼠中重构了人免疫细胞, 因此在免疫时能够产生人抗体应答。这种小鼠在例如Wilson等的美国专利No. 5,476,996和5,698,767中描述。

人Ig小鼠的免疫

当使用人Ig小鼠产生本发明的人抗体时, 根据Lonberg, N.等(1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, D.等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851; 和PCT公布WO 98/24884和WO 01/14424所述, 用表达O8E的细胞系、纯化的或富集的O8E抗原和/或重组O8E或O8E融合蛋白的制品免疫该小鼠。优选地, 第一次免疫时小鼠为6-16周龄。例如, 可以使用纯化的或重组的O8E抗原的制剂(5-50 μ g)腹膜内免疫人Ig小鼠。

产生抗O8E完全人单克隆抗体的详细程序在下面的实施例1中描述。应用各种抗原积累的经验证明, 当最初使用弗氏完全佐剂中的抗原腹膜内(IP)免疫, 接着隔周用弗氏不完全佐剂中的抗原腹膜内免疫(最多共六次)时, 转基因小鼠产生应答。但是, 发现弗氏佐剂之外的佐剂也是有效的。另外, 发现在没有佐剂时, 全细胞具有高度免疫原性。在免疫方案进程中用例如眼眶后取血获得的血浆样品监测免疫应答。通过ELISA筛选血浆, 用具有足够抗O8E人免疫球蛋白效价的小鼠进行融合(如实施例1所述)。用抗原对小鼠进行静脉内加强免疫, 3天后处死并且取出脾脏。预期每次免疫可能需要2-3次融合。每一种抗原一般免疫6-24只小鼠。通常HCo7和HCo12系都使用。HCo7和HCo12小鼠系的产生分别在美国专利No. 5,770,429和PCT公开WO 01/09187的实施例2中描述。另外, HCo7和HCo12转基因可以杂交,

产生具有两种不同人重链转基因（HCo7/HCo12）的一种小鼠。可替代地或者另外，如PCT公开WO 02/43478所述，可以使用KM小鼠[®]系。

产生本发明的人单克隆抗体的杂交瘤的制备

为了制备产生本发明的人单克隆抗体的杂交瘤，从被免疫的小鼠中分离脾细胞和/或淋巴结细胞，并且与合适的无限增殖化细胞系（例如小鼠骨髓瘤细胞系）融合。根据抗原特异性抗体的产生筛选得到的杂交瘤。例如，可以使用50% PEG，将来自被免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与三分之一数量的Sp2/0非分泌小鼠骨髓瘤细胞（ATCC, CRL 1581）融合。或者，可以应用基于电场的电融合法，应用Cyto Pulse大腔室细胞融合电穿孔仪（Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD），将被免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬浮液与等量的Sp2/0小鼠骨髓瘤细胞融合。将细胞以大约 1×10^5 的密度接种于平底微量滴定板中，接着在选择性培养基中孵育两周，该选择性培养基在加有5mM HEPES、0.055 mM β -巯基乙醇、50 mg/ml庆大霉素和 $1 \times$ HAT（Sigma; CRL P-7185）的DMEM（Mediatech, CRL 10013，含有高浓度葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠）中含有10%胎牛血清（Hyclone, Logan, UT）、10% P388DI（ATCC, CRL TIB-63）条件基质、3-5% origen（IGEN）。大约1-2周之后，在用HT替换了HAT的培养基中培养细胞。然后通过ELISA或FACS根据人单克隆IgM和IgG抗体筛选各孔。然后通过ELISA使用O8E重组蛋白筛选阳性克隆的O8E阳性抗体，或者，例如，通过FACS使用表达O8E的细胞例如CHO-O8E转染的细胞筛选阳性克隆的O8E阳性抗体。一旦发生广泛的杂交瘤生长，通常在10-14天之后可以观察培养基。将分泌抗体的杂交瘤再次平板接种，再次筛选，如果对于人IgG仍然是阳性，则可以通过有限稀释将单克隆抗体至少亚克隆两次。然后在体外培养稳定的亚克隆，以在组织培养基中产生少量抗体用于表征。

为了纯化人单克隆抗体，选择的杂交瘤可以在用于单克隆抗体纯化的两升旋转摇瓶中生长。过滤上清液，浓缩，之后用蛋白A-sepharose

(Pharmacia, Piscataway, N.J.)进行亲和层析。洗脱下来的IgG通过凝胶电泳和高效液相色谱法检查以确保纯度。将缓冲溶液换成PBS,用1.43的消光系数根据OD280确定浓度。可将单克隆抗体分成等份并且在-80℃下保存。

产生本发明的单克隆抗体的转染瘤的制备

利用(例如)本领域公知的重组DNA技术和基因转染方法的组合(例如, Morrison, S. (1985) science 229:1202),也能在宿主细胞转染瘤中产生本发明的抗体。

例如,为了表达抗体或其抗体片段,可通过标准分子生物学技术(例如,使用表达目标抗体的杂交瘤进行PCR扩增或cDNA克隆),获得编码部分或全长轻链和重链的DNA,并将该DNA插入到表达载体中,使得基因与转录和翻译控制序列有效连接。在上下文中,术语“有效连接”意思是抗体基因连接到载体中,使得载体中的转录和翻译控制序列发挥它们调节该抗体基因的转录和翻译的预期功能。选择与所用的表达宿主细胞相匹配的表达载体和表达控制序列。抗体轻链基因和抗体重链基因可被插入到分开的载体中,或者,更通常地,将两个基因插入到同一表达载体中。通过标准方法将抗体基因插入到表达载体中(例如,抗体基因片段上的互补限制性位点与载体连接,或者如果不存在限制性位点的活,则平端连接)。通过插入到已经编码期望的同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,使得V_H区段与载体中的C_H区段有效连接,而V_K区段与载体中的C_L区段有效连接,可以利用本文描述的抗体的轻链和重链可变区产生任意抗体同种型的全长抗体基因。另外,或者可替代地,重组表达载体能编码有利于宿主细胞分泌抗体链的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中,使得信号肽与该抗体链基因的氨基末端符合阅读框地连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的蛋白质的信号肽)。

除了抗体链基因以外,本发明的重组表达载体还带有控制该抗体

链基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”包括启动子、增强子和控制抗体链基因转录或翻译的其他表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。这样的调节序列例如在Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))中描述。本领域技术人员应当理解,表达载体的设计,包括调节序列的选择,取决于诸如要转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括指导蛋白质在哺乳动物细胞中高水平表达的病毒元件,例如来源于巨细胞病毒(CMV)、猿病毒40 (SV40)、腺病毒(例如,腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。可替代地可以使用非病毒调节序列,例如泛蛋白启动子或 β -珠蛋白启动子。另外,调节元件也可由来自诸如SR α 启动子系统等不同来源的序列组成,SR α 启动子系统含有来自SV40早期启动子的序列和人1型T细胞白血病病毒的长末端重复序列(Takebe, Y.等 (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

除了抗体链基因和调节序列以外,本发明的重组表达载体还可以携带另外的序列,例如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择性标记基因。选择性标记基因有利于筛选载体已经导入其中的宿主细胞(参见,例如, Axel等的美国专利No. 4,399,216, 4,634,665和5,179,017)。例如,选择性标记基因一般给已经导入载体的宿主细胞带来抗药性,例如G418、潮霉素或氨基嘌呤抗性。优选的选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(在dhfr-宿主细胞中用于氨基嘌呤选择/扩增)和neo基因(用于G418选择)。

为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语“转染”的各种形式包括常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞中的各种技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等等。虽然在理论上可以在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体,但是优选在真核细胞中,最优选在哺乳动物宿主细胞中表达该抗体,因为这样的真核细胞,特别是哺乳动物细胞,比

原核细胞更可能组装和分泌正确折叠并且具有免疫活性的抗体。据报道，原核表达抗体基因无法高产率地产生活性抗体(Boss, M.A.和Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13)。

用于表达本发明的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220中描述的dhfr-CHO细胞，和DHFR选择性标记一起使用，例如，如R. J. Kaufman和P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621所述)、NSO骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。特别地，用于NSO骨髓瘤细胞的另一种优选表达系统是WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841公开的GS基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞中时，通过将宿主细胞培养足以使抗体在宿主细胞中表达的时间，或更优选地，培养足以使抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中的时间，而产生抗体。可应用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

抗体与抗原结合的表征

通过(例如)流式细胞术，可以检测本发明的抗体与O8E的结合。简要地说，从组织培养瓶中新鲜收获表达O8E的细胞，制备单细胞悬浮液。表达O8E的细胞悬浮液直接用第一抗体染色或者在用1%低聚甲醛的PBS溶液固定后用第一抗体染色。约1百万个细胞重悬浮在含0.5% BSA和50-200 $\mu\text{g/ml}$ 第一抗体的PBS中，在冰上孵育30分钟。细胞用含有0.1% BSA、0.01% NaN_3 的PBS洗涤两次，重悬浮在100 μl 1:100稀释的FITC-偶联的山羊抗人IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)中，在冰上再孵育30分钟。细胞再次洗涤两次，重悬浮在0.5 ml洗涤缓冲液中，在FACSCalibur细胞计数器(Becton-Dickinson, San Jose, CA)上分析荧光染色。

或者，可以通过标准ELISA检测本发明抗体与O8E的结合。简要地说，用0.25 $\mu\text{g/ml}$ 的纯化O8E在PBS中的溶液包被微量滴定板，然后用PBS中的5%牛血清白蛋白封闭。向各个孔中加入抗体的稀释液(例

如,来自O8E免疫小鼠的血浆的稀释液),并且在37℃下孵育1-2小时。用PBS/Tween洗涤培养板,之后和与碱性磷酸酶偶联的第二试剂(例如,对于人抗体,为山羊抗人IgG Fc特异性多克隆试剂)一起在37℃下孵育1小时。洗涤后,培养板用pNPP底物(1mg/ml)显色,并且在OD 405-650下分析。优选地,用表现出最高效价的小鼠进行融合。

如上所述的ELISA分析也可以用来筛选表现出与O8E免疫原有阳性反应性的杂交瘤。将与O8E高亲合力结合的杂交瘤进行亚克隆,并且进一步表征。从每个杂交瘤中选择保留母细胞反应性的一个克隆(通过ELISA或FACS),制备5-10小瓶细胞库,保存在-140℃下,用于抗体纯化。

为了纯化抗O8E抗体,选择的杂交瘤在用于单克隆抗体纯化的两升旋转摇瓶中生长。过滤上清液并且浓缩,然后用蛋白A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ)进行亲和层析。通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的IgG以确保纯度。将缓冲溶液换成PBS,并且使用1.43的消光系数根据OD₂₈₀确定浓度。将单克隆抗体分成等份并且在-80℃下保存。

为了确定选择的抗O8E单克隆抗体是否与独特表位结合,可以使用商售试剂(Pierce, Rockford, IL)将每种抗体生物素化。可以使用如上所述的O8E包被的ELISA板,应用未标记的单克隆抗体和生物素化单克隆抗体进行竞争研究。可以使用链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶探针检测生物素化mAb的结合。或者,如下面的实施例进一步所述,可以使用放射性标记的抗体进行竞争性研究,并且可以用Scatchard分析检测未标记的竞争抗体。

为了确定被纯化的抗体的同种型,可以用对特定同种型抗体具有特异性的试剂进行同种型ELISA。例如,为了确定人单克隆抗体的同种型,在4℃下用1μg/ml抗人免疫球蛋白包被微量滴定板的孔过夜。用1% BSA封闭之后,平板与1μg/ml或更少的测试单克隆抗体或纯化的同种型对照物在室温下反应1-2小时。这些孔然后与人IgG1或人IgM特异性碱性磷酸酶偶联的探针反应。如上所述使平板显色并且分析。

可以通过Western印迹法进一步检测抗O8E人IgG与O8E抗原的反应性。简要地说,制备O8E并进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用10%胎牛血清封闭,并用待检测的单克隆抗体探查。人IgG的结合可以用抗人IgG碱性磷酸酶检测,并用BCIP/NBT底物片(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)显色。

抗体的物理性质

本发明的抗体可以进一步通过抗O8E抗体的各种物理性质进行表征。可以利用各种试验基于这些物理性质检测和/或区分不同类别的抗体。

在某些实施方案中,本发明的抗体可以在轻链或重链可变区中含有一个或多个糖基化位点。可变区中一个或多个糖基化位点的存在可能由于抗原结合改变而导致抗体的免疫原性提高或者抗体的pK改变(Marshall等(1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA和Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick等 (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh等 (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura等(2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。已知糖基化在含有N-X-S/T序列的基序处发生。可变区的糖基化可以用Glycoblott试验进行检测,该试验切割抗体,产生Fab,然后利用测定高碘酸盐氧化和席夫碱形成的试验检测糖基化。或者,可变区的糖基化也可以用Dionex光层析法(Dionex-LC)检测,该方法从Fab上切下糖成为单糖,并且分析各种糖的含量。在某些情况中,优选不含可变区糖基化的抗O8E抗体。这可以通过选择在可变区中不含糖基化基序的抗体或者利用本领域公知的标准技术突变糖基化基序内的残基来实现。

在一个优选实施方案中,本发明的抗体不含天冬酰胺异构化位点。脱酰胺或异天冬氨酸作用可以分别在N-G或D-G序列上发生。脱酰胺或异天冬氨酸作用导致产生异天冬氨酸,异天冬氨酸通过在侧链

羧基末端而不是在主链上产生扭结的结构而降低了抗体的稳定性。异天冬氨酸的产生可以用iso-quant试验来测定,该试验利用反相HPLC检测异天冬氨酸。

每种抗体具有独特的等电点(pI),但是通常抗体落入6至9.5的pH范围内。IgG1抗体的pI一般落入7-9.5的pH范围内,IgG4抗体的pI一般落入6-8的pH范围内。抗体也可以具有该范围之外的pI。尽管这种作用通常未知,但是推测pI落于正常范围之外的抗体在体内条件下可能具有一定的解折叠和不稳定性。等电点可以用毛细管等电聚焦试验来测定,该试验产生pH梯度,并且可以利用激光聚焦来提高精确性(Janini等(2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma等(2001) Chromatographia 53:S75-89; Hunt等(1998) J Chromatogr A 800:355-67)。在某些情况中,优选pI值落入正常范围内的抗O8E抗体。这可以通过选择pI位于正常范围内的抗体或者通过利用本领域公知的标准技术突变带电荷的表面残基来实现。

每种抗体的溶解温度指示热稳定性(Krishnamurthy R和Manning MC(2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。较高的热稳定性表示在体内有较高的总体抗体稳定性。抗体的熔点可以用诸如差示扫描量热法(Chen等(2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando等(1999) Immunol Lett 68:47-52)等技术来测量。 T_{M1} 表示抗体开始解折叠的温度。 T_{M2} 表示抗体完全解折叠的温度。通常,优选地本发明的抗体的 T_{M1} 大于60°C,优选大于65°C,甚至更优选大于70°C。此外,抗体的热稳定性也可以利用圆二色性来测量(Murray等(2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9)。

在一个优选实施方案中,选择不快速降解的抗体。抗O8E抗体的破裂可以用本领域公知的毛细管电泳法(CE)和MALDI-MS来测定(Alexander AJ和Hughes DE(1995) Anal Chem 67:3626-32)。

在另一个优选实施方案中,选择具有最小的聚集作用的抗体。聚集可以触发不希望的免疫应答和/或改变的或不利的药代动力学性质。通常,抗体具有25%或更少的聚集是可以接受的,优选20%或更少,

甚至更优选15%或更少，甚至更优选10%或更少，甚至更优选5%或更少。聚集可以用本领域公知的几种技术来测定，包括大小排阻柱（SEC）、高效液相层析（HPLC）和光散射法，用来鉴定单体、二聚体、三聚体或多聚体。

免疫偶联物

另一方面，本发明涉及与诸如细胞毒素、药物（例如免疫抑制剂）或放射性毒素等治疗性部分偶联的抗O8E抗体或其片段。这些偶联物在此被称为“免疫偶联物”。包括一个或多个细胞毒素的免疫偶联物被称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害（例如杀伤细胞）的任何试剂。实例包括：紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、吐根碱、丝裂霉素、表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷、表鬼臼毒噻吩糖苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、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和它们的类似物或同系物。治疗剂还包括，例如：抗代谢物（例如，氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪(decarbazine)），烷化剂（例如，氮芥、苯丁酸氮芥（thioepa chlorambucil）、苯丙氨酸氮芥、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺合铂(II) (DDP)顺铂），氨基糖苷类（例如，柔红菌素（以前称为道诺霉素）和阿霉素），抗生素（例如，放线菌素D（以前称为放线菌素）、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC)），和抗有丝分裂剂（例如，长春新碱和长春碱）。

能与本发明抗体偶联的治疗性细胞毒素的其他优选例子包括倍癌霉素、刺孢霉素、美坦生、auristatin、和它们的衍生物。刺孢霉素抗体偶联物的一个例子是可作为商品购得的（MylotargTM；Wyeth-Ayerst）。

可以利用本领域使用的连接体技术将细胞毒素与本发明的抗体偶联。已经用于将细胞毒素与抗体偶联的连接体类型的实例包括但不

限于脙、硫醚、酯、二硫化物和含肽的连接体。可以选择,例如,在溶酶体区室内易被低pH切割或易被蛋白酶切割的连接体,该蛋白酶例如是在肿瘤组织中优先表达的蛋白酶,如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B、C、D)。

关于细胞毒素的类型、用于偶联治疗剂与抗体的连接体和方法的进一步讨论,参见Saito, G.等(2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A.等(2003) *Cancer. Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I.和Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D.和Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

本发明的抗体也可以与放射性同位素偶联,产生细胞毒性放射性药物,也被称作放射性免疫偶联物。能够与诊断或治疗性使用的抗体偶联的放射性同位素的例子包括但不限于碘¹³¹、碘¹²⁵、铟¹¹¹、钇⁹⁰和镱¹⁷⁷。制备放射性免疫偶联物的方法在本领域中已经建立。放射性免疫偶联物的例子可以作为商品获得,包括ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals)和BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals),并且能够利用类似的方法使用本发明的抗体制备放射性免疫偶联物。

本发明的抗体偶联物可用于修饰特定的生物学反应,且药物部分不应理解为局限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有需要的生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质包括,例如:具有酶活性的毒素或其活性片段,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物学反应调节物,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。

将这种治疗性部分与抗体偶联的技术是众所周知的,参见,例如,Arnon等, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*,

Reisfeld等(ed.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom等, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson 等(ed.), 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等(ed.), 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等(ed.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和Thorpe等, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

双特异性分子

另一方面, 本发明涉及包含本发明的抗O8E抗体或其片段的双特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合部分可以被衍生化或连接到另一个功能性分子上, 如另一个肽或蛋白质(例如另一个抗体或受体的配体)上, 从而生成可与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。本发明的抗体实际上可以被衍生化或连接到一个以上的其他功能性分子上, 从而生成可与两个以上不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子; 这样的多特异性分子也包括在本文使用的术语“双特异性分子”内。为了产生本发明的双特异性分子, 本发明的抗体可与一个或多个其他结合分子如其他抗体、抗体片段、肽或结合模拟物功能性连接(如通过化学偶联、基因融合、非共价结合等), 从而得到双特异性分子。

因此, 本发明包括双特异性分子, 其具有至少一种对于O8E的第一结合特异性和对于第二种目标表位的第二结合特异性。在本发明一个特定实施方案中, 第二种目标表位是Fc受体, 如人FcγRI (CD64)或人Fcα受体(CD89)。因此, 本发明包括既能与表达FcγR或FcαR的效应细胞(如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN))结合, 又能与表达

O8E的靶细胞结合的双特异性分子。这些双特异性分子将表达O8E的细胞导向于效应细胞，并且触发Fc受体介导的效应细胞活性，如表达O8E的细胞的吞噬作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、细胞因子释放、或超氧阴离子的产生。

在其中双特异性分子是多特异性分子的本发明的一个实施方案中，除抗-Fc结合特异性和抗O8E结合特异性之外，该分子还可包括第三结合特异性。在一个实施方案中，该第三结合特异性是抗增强因子(EF)部分，例如与参与细胞毒性活性的表面蛋白质结合因而增强针对靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是与诸如抗原或受体等特定分子结合，从而导致结合决定簇对Fc受体或靶细胞抗原的作用增强的抗体、功能性抗体片段或配体。“抗增强因子部分”可与Fc受体或靶细胞抗原结合。可替代地，抗增强因子部分可以与一种实体结合，该实体不同于第一和第二结合特异性所结合的实体。例如，抗增强因子部分可与细胞毒性T细胞结合(如经由CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或其他免疫细胞，该细胞导致针对靶细胞的免疫应答增强)。

在一个实施方案中，本发明的双特异性分子包含至少一个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、Fd、dAb或单链Fv。该抗体也可以是轻链或重链二聚体，或任何其最小片段，如Fv或单链构建体，如Ladner等的美国专利No. 4,946,778所述，该专利的内容引入本文作为参考。

在一个实施方案中，对于Fc γ 受体的结合特异性由单克隆抗体提供，该单克隆抗体的结合不被人免疫球蛋白G(IgG)阻断。本文使用的术语“IgG受体”是指位于染色体1上的8个 γ -链基因的任意一个。这些基因编码总共12个跨膜或可溶性受体同种型，这些同种型分组为3个Fc γ 受体类别：Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)。在一个优选实施方案中，Fc γ 受体是人高亲和力Fc γ RI。人Fc γ RI是72 kDa的分子，对单体IgG表现出高亲和力(10^8 - 10^9 M⁻¹)。

某些优选抗-Fc γ 单克隆抗体的制备和表征由Fanger等在PCT申请

WO 88/00052和美国专利号4,954,617中描述, 在此处将其内容整体引入作为参考。这些抗体在与受体的Fc γ 结合位点不同的位点处与Fc γ RI、Fc γ RII或Fc γ RIII的表位结合, 因而, 其结合基本不被生理学水平的IgG阻断。可用于本发明中的特定抗-Fc γ RI抗体为mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62和mAb 197。产生mAb 32的杂交瘤可从美国典型培养物保藏中心获得, ATCC保藏号为HB9469。在另外一些实施方案中, 抗-Fc γ 受体抗体是单克隆抗体22的人源化形式(H22)。H22抗体的产生和表征在Graziano, R.F.等(1995) *J. Immunol* 155(10):4996-5002和Tempest等的PCT公布WO 94/10332中描述。产生H22抗体的细胞系以HA022CL1的名称保藏在美国典型培养物保藏中心, 保藏号为CRL 11177。

在另外一些优选实施方案中, 对Fc受体的结合特异性由可与人IgA受体如Fc α 受体(Fc α RI(CD89))结合的抗体提供, 该抗体的结合优选地不被人免疫球蛋白A (IgA)阻断。术语“IgA受体”包括位于染色体19上的一个 α -基因的基因产物(Fc α RI)。已知该基因编码几个55-110 kDa的可变剪接跨膜同种型。Fc α RI (CD89)在单核细胞/巨噬细胞、嗜酸性和嗜中性粒细胞上组成型表达, 但不在非效应细胞群体上组成型表达。Fc α RI对IgA1和IgA2两者均具有中等亲和力(约 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), 在暴露于诸如G-CSF或GM-CSF的细胞因子后该亲和力增加(Morton, H.C.等(1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440)。已描述了4种Fc α RI-特异性单克隆抗体, 它们被确定为A3、A59、A62和A77, 它们在IgA配体结合域之外与Fc α RI结合(Monteiro, R.C.等(1992) *J. Immunol.* 148:1764)。

Fc α RI和Fc γ RI是用于本发明的双特异性分子的优选触发受体, 因为它们(1)主要表达于诸如单核细胞、PMN、巨噬细胞和树突细胞的免疫效应细胞上; (2)高水平表达(如每个细胞表达5,000-100,000个); (3)是细胞毒性(如ADCC、吞噬作用)的介质; (4)介导导向于它们的抗原(包括自身抗原)的增强的抗原呈递。

优选人单克隆抗体, 但是可以在本发明的双特异性分子中使用的

其他抗体包括,例如,鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

可通过应用本领域中公知的方法偶联组成的结合特异性,如抗-FcR和抗O8E结合特异性,制备本发明的双特异性分子。例如,双特异性分子的每一种结合特异性可单独生成,然后彼此偶联。当结合特异性是蛋白质或肽时,可以使用多种偶联剂或交联剂进行共价偶联。交联剂的例子包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰-硫代乙酸盐(SATA)、5,5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基双马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸盐(SPDP)和磺基琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己基-1-羧酸盐(sulfo-SMCC)(参见,例如,Karpovsky等(1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA等(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan等(1985) Science 229:81-83和Glennie等(1987) J. Immunol. 139:2367-2375所描述的方法。优选的偶联剂为SATA和sulfo-SMCC,两者均可从Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)获得。

当结合特异性是抗体时,它们可通过两个重链的C-末端铰链区的巯基键合而偶联。在一个特别优选的实施方案中,对铰链区进行修饰以使其在偶联前含有奇数个,优选1个巯基残基。

可替代地,两种结合特异性可在同一载体中编码,并在相同的宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是mAb × mAb、mAb × Fab、Fab × F(ab')₂或配体 × Fab融合蛋白时,该方法是特别有用的。本发明的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可以包含至少两个单链分子。制备双特异性分子的方法例如在美国专利5,260,203、美国专利5,455,030、美国专利4,881,175、美国专利5,132,405、美国专利5,091,513、美国专利5,476,786、美国专利5,013,653、美国专利5,258,498和美国专利5,482,858中描述。

双特异性分子与其特异性靶标的结合可通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(如生长抑

制)或Western印迹分析来证实。这些试验中的每一个通常通过应用对目标复合物具有特异性的标记试剂(如抗体)来检测特定目标蛋白质-抗体复合物的存在。例如,可以利用识别和特异性结合抗体-FcR复合物的酶联抗体或抗体片段来检测FcR-抗体复合物。或者,这些复合物可利用多种其他免疫分析中的任一种来检测。例如,可对抗体进行放射性标记并且在放射免疫测定(RIA)中使用(参见,例如,Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986年3月,引入本文作为参考)。可以通过诸如使用 γ 计数器或闪烁计数器的手段或者通过放射自显影方法检测放射性同位素。

药物组合物

另一方面,本发明提供一种组合物,例如药物组合物,其含有与药物可接受的载体配制在一起的一种或组合的本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分。这样的组合物可以包含一种或组合的(例如两种或多种不同的)本发明的抗体或免疫偶联物或双特异性分子。例如,本发明的药物组合物可以含有结合靶抗原上的不同表位或具有互补活性的抗体组合(或免疫偶联物或双特异性分子)。

本发明的药物组合物也可以在联合治疗中施用,即与其他药剂联用。例如,联合治疗可包括本发明的抗O8E抗体联合至少一种其他的抗炎剂或免疫抑制剂。可在联合治疗中使用的治疗剂的例子在下面本发明抗体的应用一节中更详细地描述。

本文使用的“药物可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,该载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。根据施用途径,可将活性化合物即抗体、免疫偶联物或双特异性分子包裹于一种材料中,以保护该化合物免受可使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

本发明的药物组合物可包含一种或多种药物可接受的盐。“药物

可接受的盐”是指保持了亲代化合物的所需生物活性而不引起任何不期望的毒理学作用的盐(参见如Berge, S.M.等(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这样的盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些由诸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等无毒性无机酸衍生的盐,以及由诸如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等无毒性有机酸衍生的盐。碱加成盐包括那些由诸如钠、钾、镁、钙等碱土金属衍生的盐,以及由诸如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等无毒性有机胺衍生的盐。

本发明的药物组合物也可含有药物可接受的抗氧化剂。药物可接受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、焦亚硫酸钠,亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 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、磷酸等。

可用于本发明药物组合物中的适当的水性或非水性载体的例子包括水,乙醇,多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其适当的混合物,植物油如橄榄油,和注射用有机酯如油酸乙酯。例如通过应用包被材料如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需的颗粒大小,以及通过应用表面活性剂,能够维持适当的流动性。

这些组合物还可含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过上述的灭菌程序或通过包含诸如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚山梨酸等各种抗细菌剂和抗真菌剂确保防止存在微生物。也可能需要在组合物中包含等渗剂,例如,糖、氯化钠等。另外,通过包含延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可实现注射型药物延长的吸收。

药物可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射液或分散液的粉末剂。这些用于药学活性物质的介质和试剂的使用是本领域公知的。除了任何与活性化合物不相容的常规介质或试

剂范围外，包括其在本发明的药物组合物中的应用。还可以向组合物中掺入补充的活性化合物。

治疗性组合物一般必须是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定的。可以将组合物配制成溶液、微乳状液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)及其合适的混合物的溶剂或分散剂。例如，通过使用包衣，例如卵磷脂，在分散液的情况下通过保持所需的颗粒大小，以及通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。在很多情况下，组合物中优选包含等渗剂，例如，糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇或氧化钠。通过在组合物中加入延迟吸收剂，例如单硬脂酸盐和明胶，可实现注射型药物延长的吸收。

通过将活性化合物以需要的量混入合适的溶剂中，并且根据需要加入以上列举的成分中的一种或其组合，接着无菌微过滤，可制备无菌注射液。通常，通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和上面所列其他所需成分的无菌载体中制备分散剂。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末剂，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，由其预先无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量根据所治疗的受试者和特定给药方式而不同。可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。通常，以100%计，这个量的范围是大约0.01%至大约99%的活性成分，优选大约0.1%至大约70%，最优选大约1%至大约30%的活性成分，与药物可接受的载体相组合。

调节剂量方案，以提供最佳的期望的反应(例如，治疗反应)。例如，可以施用单一大丸剂，可以随时间施用几次分开的剂量，或者根据治疗状况的紧急情况所需，可以按比例减小或增加剂量。特别有利的是将肠胃外组合物配制成容易给药并且剂量均匀的剂量单位形式。此处使用的剂量单位形式是指适合作为单位剂量用于所治疗的受试者的物理不连续单位；每个单位含有预定量的活性化合物，经计算该

预定量的活性化合物与需要的药物载体组合产生所需的治疗效果。对本发明剂量单位形式的具体说明限定于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果,和(b)本领域中固有的对于配制这种用于治疗个体敏感性的活性化合物的限制。

对于抗体的给药而言,剂量范围为约0.0001至100 mg/kg,更通常为0.01至25 mg/kg受者体重。例如,剂量可以是0.3 mg/kg体重、1 mg/kg体重、3 mg/kg体重、5 mg/kg体重或10 mg/kg体重,或在1-10 mg/kg范围内。需要时可以使用较高的剂量,例如15 mg/kg体重、20 mg/kg体重或25 mg/kg体重。一个治疗方案的例子需要每周给药一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每3月一次、或每3-6月一次。本发明的抗O8E抗体的优选剂量方案包括经静脉内给予1 mg/kg体重或3 mg/kg体重,该抗体使用如下剂量方案之一给药:(i)每4周一次,共6次,然后每3个月一次;(ii)每3周一次;(iii) 3 mg/kg体重一次,然后每3周1 mg/kg体重。

在一些方法中,同时施用具有不同结合特异性的两种或多种本发明的抗O8E单克隆抗体,在该情况中,每种抗体的给药剂量落在所述范围内。抗体通常在有必要时多次给药。单次给药之间的间隔可以是,例如,每周、每月、每三个月或每年。间隔也可以是不定期的,例如通过测定患者中抗靶抗原的抗体的血液水平来确定。在一些方法中,调节剂量以达到约1-1000 μ g/ml的血浆抗体浓度,在一些方法中为约25-300 μ g/ml。

在其他方法中,一种或多种本发明的抗O8E单克隆抗体与具有不同结合特异性的抗体例如抗CTLA-4和/或抗PD-1同时给药,在这种情况下,每种抗体的给药剂量落在所述范围内。

可替代地,抗体也可以作为持续释放制剂来给药,在此情况中需要频率较低的给药。剂量和频率根据抗体在患者中的半衰期而不同。通常,人抗体表现出最长的半衰期,之后是人源化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。给药剂量和频率根据处理是预防性的还是治疗性的而不同。在预防性应用中,在长时间内以较不频繁的时间间隔给予相对较低的

剂量。有些患者在余生中持续接受处理。在治疗性应用中，有时需要以较短的间隔给予较高的剂量，直到疾病的进展减轻或停止，优选直到患者表现为疾病症状部分或完全改善。之后，可以以预防性方案给患者给药。

本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可能改变，以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应，而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括应用的本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性，给药途径，给药时间，应用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料，接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史，以及医学领域中公知的类似因素。

本发明的抗O8E抗体的“治疗有效剂量”优选地导致疾病症状的严重性降低，疾病无症状期的频率和持续时间增加，或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。例如，对于O8E+肿瘤的治疗，相对于未接受治疗的受试者，“治疗有效剂量”优选地将细胞生长或肿瘤生长抑制至少约20%，更优选至少约40%，更优选至少约60%，更优选至少约80%。化合物抑制肿瘤生长的能力可以在预测对人类肿瘤的疗效的动物模型系统中评价。或者，也可以通过检查化合物抑制细胞生长的能力来评价该组合物的这种性能，这种抑制可以通过本领域技术人员公知的试验在体外测定。治疗有效量的治疗性化合物能够减小肿瘤大小，或者以其他方式缓解受试者的症状。本领域技术人员可以根据如下因素确定这种量，如受试者的尺寸、受试者症状的严重性和选择的特定组合物或给药途径。

本发明的组合物可以利用本领域公知的一种或多种方法通过一种或多种给药途径给药。本领域技术人员应当理解，给药途径和/或方式根据期望的结果而不同。本发明抗体的优选给药途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外给药途径，例如注射或输注。本文使用的短语“肠胃外给药”是指除肠和局部给药以外的

给药模式，通常是注射，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

可替代地，本发明的抗体也可以通过非肠胃外途径给药，如局部、表皮或粘膜途径给药，例如，鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

活性化合物可以与保护化合物不被快速释放的载体一起制备，例如控释制剂，包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这样的制剂的很多方法受专利保护或者通常为本领域技术人员所公知。参见，例如，Sustained and controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

治疗性组合物可应用本领域公知的医疗装置给药。例如，在一个优选实施方案中，本发明的治疗组合物可用无针皮下注射装置给药，如在美国专利No. 5,399,163；5,383,851；5,312,335；5,064,413；4,941,880；4,790,824；或4,596,556中公开的装置。可用于本发明的公知的植入物和模块的例子包括：美国专利No. 4,487,603，该专利公开了用于以受控速率分散药物的可植入微量输注泵；美国专利No. 4,486,194，该专利公开了用于通过皮肤给药的治疗装置；美国专利No. 4,447,233，该专利公开了用于以精确的输注速率递送药物的医用输注泵；美国专利No. 4,447,224，该专利公开了用于连续递送药物的变流可植入输注装置；美国专利No. 4,439,196，该专利公开了具有多腔区室的渗透药物递送系统；和美国专利No. 4,475,196，该专利公开了一种渗透药物递送系统。这些专利引入本文作为参考。本领域技术人员公知许多其他这样的植入物、递送系统和模块。

在某些实施方案中，本发明的人单克隆抗体可配制为确保在体内的正确分布。例如，血-脑屏障(BBB)阻止了许多高度亲水性的化合物。为了确保本发明的治疗性化合物能够跨过BBB(如果需要时)，可将它们配制在如脂质体中。至于制备脂质体的方法，参见，例如，美国专

利4,522,811; 5,374,548; 和5,399,331。脂质体包含可被选择性地转运入特定细胞或器官内的一个或多个部分,从而增强定向药物递送(参见,例如,V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。定向部分的例子包括叶酸或生物素(参见,例如,Low等的美国专利5,416,016); 甘露糖苷(Umezawa等(1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 抗体(P.G. Bloeman等(1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais等(1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等(1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier等(1994) J. Biol. Chem. 269:9090); 也参见K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273。

本发明的应用和方法

本发明的抗体(特别是人抗体)、抗体组合物和方法,具有与(例如)检测O8E、通过阻断O8E治疗癌症或增强免疫应答有关的许多体外和体内诊断和治疗应用。在一个优选实施方案中,本发明的抗体是人抗体。例如,这些分子可以施用于在体外或离体培养的细胞,或者(例如)在体内施用于人类受试者,从而治疗、预防以及诊断多种疾病或在多种情况下增强免疫。

本文使用的术语“受试者”包括人和非人动物。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,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类动物和爬行类动物。优选的受试者包括患有与O8E表达有关的疾病或需要增强免疫应答的人类患者。这些方法特别适合治疗患有与异常O8E表达有关的疾病的人类患者。这些方法也特别适合治疗患有可通过增强T细胞介导的免疫应答而治疗的疾病的人类患者。为了实现抗原特异性免疫增强,抗O8E抗体可以与目标抗原一起施用。当抗O8E抗体与另外一种药物一起给药时,这两种药物可以相继或同时给药。

鉴于本发明的抗体与O8E特异性结合,本发明的抗体可以用来特

异性检测细胞表面上O8E的表达,而且可以用来通过免疫亲和纯化方法纯化O8E。

癌症

O8E在多种人类癌症中表达,所述癌症包括乳腺细胞癌、转移性乳腺癌、卵巢细胞癌、转移性卵巢癌和肾细胞癌(Tringler等人.(2005) *Clinical Cancer Res.* 11:1842-48; Salceda等人 (2005) *Exp Cell Res.* 306:128-41; Tringler等人.(2006) *Gynecol Oncol.* 100:44-52; Krambeck等人.(2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10391-6; Chen等人.(2006) *Kidney Int.* 待出版; Sun等人 (2006) *Lung Cancer* 53:143-51; Bignotti等人.(2006) *Gynecol Oncol.* 103:405-16; Kryczek等人 (2006) *J Exp Med* 203:871-81; Simon等人.(2006) *Cancer Res.* 66:1570-5)。抗O8E抗体可以单独使用,用来抑制癌性肿瘤的生长。或者,如下文所述,抗O8E抗体也可以与其他免疫原性剂、标准癌症治疗或其他抗体一起使用。

发现B和T淋巴细胞弱化子(BTLA)是O8E的受体,并且对免疫应答具有抑制作用,类似于细胞毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA-4)和程序性死亡-1 (PD-1) (Carreno和Collins (2003) *Trends Immunol* 24:524-7)。O8E通过抑制T细胞增殖、细胞因子产生和细胞周期产生来负调节T细胞免疫而起作用(Choi等人 (2003) *J Immunol.* 171:4650-4)。O8E-Ig融合蛋白抑制T细胞活化,而抗体对O8E的阻断可以增强患者中的免疫应答(Sica等人.(2003) *Immunity* 18:849-61)。

在一个方面,本申请涉及使用抗O8E抗体在体内治疗受试者,使癌性肿瘤的生长受到抑制。抗O8E抗体可以单独使用,用来抑制癌性肿瘤的生长。或者,如下文所述,抗O8E抗体可以与其他免疫原性剂、标准癌症治疗或其他抗体一起使用。

因此,在一个实施方案中,本发明提供一种抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法,包括给受试者施用治疗有效量的抗O8E抗体或其抗原结合部分。优选地,该抗体是人抗O8E抗体(如本文所述的任何人抗人O8E抗体)。另外或者可替代地,该抗体可以是嵌合或人源化抗O8E

抗体。

其生长可以用本发明的抗体抑制的优选癌症包括一般对免疫治疗有应答的癌症。可治疗的优选癌症的非限制性例子包括乳腺癌（例如乳腺细胞癌）、卵巢癌（例如卵巢细胞癌）和肾细胞癌（RCC）。可以用本发明的方法治疗的其他癌症的例子包括黑素瘤（例如转移性恶性黑素瘤）、前列腺癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、脑瘤、慢性或急性白血病（包括急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病）、淋巴瘤（例如何杰金氏淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤、淋巴细胞淋巴瘤、原发性CNS淋巴瘤、T细胞淋巴瘤）、鼻咽癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、阴户癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、环境诱发的癌症（包括石棉诱发的癌症，例如间皮瘤），和所述癌症的组合。

任选地，抗O8E抗体可以与免疫原性剂如癌细胞、纯化的肿瘤抗原（包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子）、细胞和用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞联合使用(He等人, *J. Immunol.* 173:4919-28 (2004))。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性例子包括黑素瘤抗原的肽，例如gp100的肽、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶或转染后表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。

在人类中，某些肿瘤表现为免疫原性，例如黑素瘤。预期通过O8E阻断提高T细胞活化的阈值，可以相应地在宿主中活化肿瘤。

当与接种方案组合时，O8E阻断可能最有效。已经提出了许多针对肿瘤进行接种的实验策略(参见, Rosenberg, "Development of Cancer Vaccines" ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, ASCO

Educational Book Spring:414-428 (2000); Foon, ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000); 参见Restifo和Sznol, Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita等人. (ed.) Cancer: Principles and Practice of Oncology, 第五版(1997)). 在其中一个策略中, 使用自体或异体肿瘤细胞制备疫苗。优选地, 当转导肿瘤细胞使其表达GM-CSF时, 这些细胞疫苗最有效。已经证明对于肿瘤接种, GM-CSF是抗原呈递的一种强激活剂(Dranoff等人. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43 (1993))。

在各种肿瘤中的基因表达和大规模基因表达模式研究导致定义了所谓的肿瘤特异性抗原(Rosenberg, *Immunity* 10:281-7 (1999))。在许多情况下, 这些肿瘤特异性抗原是在肿瘤中以及在产生该肿瘤的细胞中表达的分化抗原, 例如黑色素细胞抗原gp100、MAGE抗原和Trp-2。更重要的是, 许多这样的抗原可能是宿主中发现的肿瘤特异性T细胞的靶标。为了产生对这些蛋白质的免疫应答, O8E阻断可以与收集肿瘤中表达的重组蛋白质和/或肽一起使用。这些蛋白质通常被免疫系统视为自身抗原, 因此对其耐受。肿瘤抗原也可包括蛋白质端粒酶, 它是染色体端粒合成所需要的, 在85%以上的人类癌症中表达, 而仅在数量有限的身体组织中表达(Kim等人, *Science* 266:2011-2013 (1994))。(可以利用多种手段保护这些身体组织免遭免疫攻击)。肿瘤抗原也可以是由于改变蛋白质序列或产生两种无关序列之间的融合蛋白(如费城染色体中的bcr-abl)的体细胞突变而在癌细胞中表达的“新抗原”或来自B细胞肿瘤的独特型。

其他肿瘤疫苗可包括来自与人类癌症有关的病毒的蛋白质, 所述病毒例如是人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV和HCV)和卡波西肉瘤病毒(KHSV)。可以与O8E阻断一起使用的肿瘤特异性抗原的另外一种形式是从肿瘤组织本身中分离的纯化的热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段, 并且这些HSP在向抗原呈递细胞递送以引发肿瘤免疫方面非常有效(Suot和Srivastava *Science* 269:1585-1588 (1995)); Tamura等人. *Science* 278:117-120

(1997))。

树突细胞(DC)是有效的抗原呈递细胞,可以用来引发抗原特异性应答。DC可以离体产生,并且载有各种蛋白质和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle, F.等人. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332)。也可以通过遗传手段转导DC,使其表达这些肿瘤抗原。为了免疫目的,也曾将DC与肿瘤细胞直接融合(Kugler, A.等人. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336)。作为一种接种方法,DC免疫可以与PD-1阻断有效结合,来激活更强的抗肿瘤应答。

O8E阻断也可以与标准癌症治疗联合使用。O8E阻断可以与化学治疗方案有效联合。在这些情况中,可以降低化疗剂的给药剂量(Mokyr, M.等人. (1998) *Cancer Research* .58: 5301-5304)。这种联合的一个例子是抗O8E抗体联合达卡巴嗪(decarbazine)用于治疗多种癌症。这种联合的另一个例子是抗O8E抗体联合白介素-2 (IL-2)用于治疗多种癌症。O8E阻断与化学治疗联合应用的科学原理是,大多数化疗化合物的细胞毒性作用引起的细胞死亡会导致抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平升高。可能通过细胞死亡与O8E阻断协同的其他联合治疗有放射治疗、手术和激素剥夺。这些方案均在宿主中产生肿瘤抗原来源。血管生成抑制剂也可以与O8E阻断联合使用。血管生成的抑制导致肿瘤细胞死亡,肿瘤细胞死亡可以将肿瘤抗原补充到宿主抗原呈递途径内。

O8E阻断抗体也可以与使表达Fc α 或Fc γ 受体的效应细胞导向至肿瘤的双特异性抗体联合使用(参见,例如,美国专利Nos. 5,922,845和5,837,243)。双特异性抗体可以用来导向两种不同的抗原。例如,抗Fc受体/抗肿瘤抗原(例如Her-2/neu)双特异性抗体已经用来将巨噬细胞导向至肿瘤部位。这种导向可以更有效地激活肿瘤特异性应答。利用O8E阻断可以加强这些应答的T细胞部分。此外,可以利用结合肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标记物的双特异性抗体将抗原直接递送给DC。

肿瘤通过多种机制逃避宿主的免疫监视。通过灭活肿瘤表达的免

免疫抑制性蛋白质可以克服许多这样的机制。尤其包括TGF- β (Kehrl, J. 等人. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050)、IL-10 (Howard, M.和 O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200)和Fas配体(Hahne, M.等人. (1996) *Science* 274: 1363-1365)。针对这些物质的抗体可以与抗PD-1联合使用,以抵消免疫抑制剂的作用,并且有利于宿主的肿瘤免疫应答。

其他可以用来激活宿主免疫反应性的抗体可以与抗O8E联合使用。包括激活DC功能和抗原呈递的树突细胞表面上的分子。抗CD40抗体能够有效代替T细胞辅助活性(Ridge, J.等人. (1998) *Nature* 393: 474-478),并且能够与O8E抗体一起使用。激活的针对T细胞共刺激分子如CTLA-4 (例如美国专利5,811,097)、OX-40 (Weinberg, A.等人. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169)、4-1BB (Melero, I.等人. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997)、PD-1 (del Rio等人. (2005) *Eur J Immunol.* 35:3545-60)和ICOS (Hutloff, A.等人. (1999) *Nature* 397: 262-266)的抗体也可以提供提高的T细胞活化水平。

骨髓移植当前用来治疗多种造血来源的肿瘤。移植物抗宿主疾病是这种治疗的后果,但是可以从移植物对肿瘤的应答中获得治疗益处。O8E阻断可以用来提高供体移植的肿瘤特异性T细胞的有效性。

也有几种实验治疗方案包括离体活化和扩增抗原特异性T细胞,并将这些细胞过继转移到受者中,以产生针对肿瘤的抗原特异性T细胞(Greenberg, R.和Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51)。也可以利用这些方法激活针对传染原如CMV的T细胞应答。在抗O8E抗体存在下的离体激活预期可提高过继转移的T细胞的频率和活性。

鉴于O8E在多种肿瘤细胞上表达,本发明的人抗体、抗体组合物和方法能够用来治疗患有致肿瘤疾病的受试者,所述疾病例如是以存在表达O8E的肿瘤细胞为特征的疾病,包括,例如,乳腺癌(例如乳腺细胞癌)、卵巢癌(例如卵巢细胞癌)和肾癌。其他可以用本发明的方法治疗的癌症的例子包括黑素瘤(例如转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌、结肠癌和肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼

内恶性黑素瘤、子宫癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、阴户癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤（NHL）、急性淋巴细胞白血病（ALL）、慢性淋巴细胞白血病（CLL）、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤（ALCL）、多发性骨髓瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、结节性小卵裂细胞淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、伦纳特淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、T细胞白血病/淋巴瘤（ATLL）、成人T细胞白血病（T-ALL）、中心母细胞/中心细胞性（cb/cc）滤泡性淋巴瘤、B系弥漫性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性淋巴结病（AILD）-样T细胞淋巴瘤、HIV相关体腔淋巴瘤、胚胎性癌、未分化鼻咽癌（例如施明克瘤）、卡斯尔曼病、卡波西肉瘤、多发性骨髓瘤、沃尔登斯特伦巨球蛋白血症和其他B细胞淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病（包括急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病）、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统（CNS）肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、胶质母细胞瘤、脑瘤、鼻咽癌、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症（包括石棉诱发的癌症），和所述癌症的组合。本发明也可用于治疗转移癌。

因此，在一个实施方案中，本发明提供一种抑制受试者中肿瘤细胞生长的方法，包括给受试者施用治疗有效量的抗O8E抗体或其抗原结合部分。典型地，该抗体是人抗O8E抗体（如本文所述的任何人抗O8E抗体）。另外或者可替代地，该抗体可以是嵌合或人源化抗O8E抗体。

传染病

本发明的其他方法用来治疗曾经暴露于特定毒素或病原体的患者。因此，本发明的另一方面提供了一种治疗患者的传染病的方法，

包括给患者施用抗O8E抗体或其抗原结合部分，以治疗该患者的传染病。优选地，该抗体是人抗人O8E抗体（如本文所述的任何人抗O8E抗体）。另外或者可替代地，该抗体可以是嵌合或人源化抗体。

类似于如上所述的对于肿瘤的应用，抗体介导的O8E阻断可以单独使用或者作为辅助手段与疫苗联合使用，来刺激对病原体、毒素和自身抗原的免疫应答。该治疗方法特别有效的病原体的例子包括目前没有有效疫苗的病原体或者常规疫苗不能完全有效的病原体。包括但不限于HIV、肝炎(甲、乙和丙型)病毒、流感病毒、疱疹病毒、贾第虫(*Giardia*)、疟疾菌、利什曼原虫、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas Aeruginosa*)。PD-1阻断特别可用于对抗如HIV的病原体建立的感染，它们与感染过程相比呈现改变的抗原。在抗人O8E给药时，这些新表位被认为是外来物，从而产生不被通过O8E的阴性信号减弱的强T细胞应答。

引起可用本发明方法治疗的感染的病原性病毒的一些例子包括HIV、肝炎(甲、乙和丙型))病毒、疱疹病毒(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II和CMV、EB病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒和虫媒病毒脑炎病毒。

引起可用本发明方法治疗的感染的病原性细菌的一些例子包括衣原体、立克次体菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、脑膜炎球菌和淋球菌(*conococci*)、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉杆菌、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱菌、破伤风菌、肉毒杆菌、炭疽杆菌、鼠疫杆菌、钩端螺旋体(*leptospirosis*)和莱姆病细菌。

引起可用本发明方法治疗的感染的病原性真菌的一些例子包括假丝酵母(白假丝酵母、克鲁斯假丝酵母、*glabrata*、热带假丝酵母等)、新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)、曲霉(烟曲霉、黑曲霉等)、

毛霉属(毛霉、犁头霉、根霉)、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、粗球孢子菌 (*Coccidioides immitis*) 和荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)。

引起可用本发明方法治疗的感染的病原性寄生虫的一些例子包括溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、结肠肠袋虫 (*Balantidium coli*)、福氏耐格里原虫 (*Naegleria fowleri*)、棘阿米巴属的种 (*Acanthamoeba* sp.)、蓝氏贾第虫 (*Giardia lamblia*)、隐孢子虫属的种 (*Cryptosporidium* sp.)、卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、田鼠巴贝虫 (*Babesia microti*)、布鲁斯锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克鲁斯锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原虫 (*Leishmania donovani*)、弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、巴西钩虫 (*Nippostrongylus brasiliensis*)。

在所有上述方法中，O8E阻断可以与其他形式的免疫治疗如细胞因子治疗(例如干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2)或双特异性抗体治疗联合使用，提供增强的肿瘤抗原呈递(参见，例如，Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123)。

自身免疫反应

抗O8E抗体可以引起以及扩大自身免疫应答。实际上，使用肿瘤细胞和肽疫苗诱导抗肿瘤应答揭示了许多抗肿瘤应答涉及抗自身反应性(在同上的van Elsas等人中，在抗CTLA-4 + GM-CSF-修饰的B16黑素瘤中观察到色素脱失；在Trp-2接种的小鼠中有色素脱失 (Overwijk, W. 等人. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 2982-2987); TRAMP肿瘤细胞疫苗引起自身免疫前列腺炎(Hurwitz, A. (2000) 同上)、在人临床试验中观察到的黑素瘤肽抗原接种和白癜风 (Rosenberg, SA和White, DE (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19 (1): 81-4)。

因此，为了设计接种方案，以有效产生针对自身蛋白质的免疫应答，用于疾病治疗，可以考虑使用抗O8E阻断联合各种自身蛋白质。例如，阿尔茨海默病涉及在脑中淀粉样蛋白沉积物中A β 肽的不当积累；针对淀粉样蛋白的抗体应答能够清除这些淀粉样蛋白沉积物(Schenk等人, (1999) *Nature* 400: 173-177)。

其他自身蛋白质也可以用作靶标，如用于治疗变态反应和哮喘的IgE，和用于类风湿性关节炎的TNF α 。最后，可以利用抗O8E抗体抗体诱导对多种激素的抗体应答。中和抗体对生殖激素的应答可以用于避孕。中和抗体对特定肿瘤生长所需的激素和其他溶性因子的应答也可以被认为是可能的免疫靶标。

如上所述用于抗O8E抗体的类似方法可以用于诱导治疗性自身免疫应答，来治疗其他自身抗原如淀粉样蛋白沉积物（包括阿尔茨海默病中的A β ）细胞因子如TNF α 和IgE不当积累的患者。

疫苗

通过抗O8E抗体与目标抗原（例如疫苗）共给药，可以利用抗O8E抗体刺激抗原特异性免疫应答。因此，在另一方面，本发明提供了一种增强受试者中对抗原的免疫应答的方法，包括给该受试者施用：(i) 抗原；和(ii) 抗O8E抗体或其抗原结合部分，使受试者中对抗原的免疫应答增强。优选地，抗体是人抗人O8E抗体（例如本文所述的任何人抗O8E抗体）。另外或者可替代地，抗体可以是嵌合或人源化抗体。抗原可以是，例如，肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。这些抗原的非限制性例子包括在以上章节中提到的那些，如上述肿瘤抗原（或肿瘤疫苗）或来自病毒、细菌或上述其他病原体的抗原。

在体内和体外施用本发明的抗体组合物（例如人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子和免疫偶联物）的适宜途径在本领域中公知，并且可以由本领域技术人员选择。例如，抗体组合物可以通过注射（例如静脉内或皮下）给药。使用的分子的适宜剂量将取决于受试者的年

龄和体重以及抗体组合物的浓度和/或制剂。

如前所述，本发明的人抗O8E抗体可以与一种或多种其他治疗剂例如细胞毒剂、放射性毒剂或免疫抑制剂共同给药。抗体可以与治疗剂连接（作为免疫复合物），或者可以与治疗剂分开给药。对于后者（分开给药），抗体可以在治疗剂之前、之后或同时给药，也可以与其他已知治疗如抗癌治疗例如放射治疗共同应用。这些治疗剂尤其包括，抗肿瘤剂，如多柔比星（阿霉素）、顺铂、硫酸博来霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、达卡巴嗪和环磷酰胺、羟基脲，它们本身仅在对患者具有毒性或亚毒性的水平时有效。顺铂以100mg/剂的剂量静脉内给药，每4周1次，阿霉素以60-75mg/ml的剂量静脉内给药，每21天1次。本发明的人抗O8E抗体或其抗原结合片段与化疗剂的共同给药提供了两种抗癌剂，它们通过不同的对人肿瘤细胞产生细胞毒性作用的机制起作用。这种共同给药能够解决由于发展耐药性或肿瘤细胞抗原性改变（这将使它们对抗体没有反应性）引起的问题。

本发明的范围内还包括药盒，该药盒包括本发明的抗体组合物（例如人抗体、多特异性或双特异性分子，或免疫偶联物）和使用说明。该药盒可以进一步包括至少一种另外的试剂或一种或多种另外的本发明的人抗体（例如，具有补充活性的人抗体，它所结合的O8E抗原上的表位与第一人抗体不同）。药盒一般包括说明试剂盒内容物目标用途的标签。术语“标签”包括附加在试剂盒上或试剂盒提供的或以其他方式随试剂盒提供的任何书面的或记录的材料。

联合治疗

在一个实施方案中，本发明提供了一种治疗过度增生性疾病的方法，包括给患者施用O8E抗体和CTLA-4和/或PD-1抗体。在进一步的实施方案中，抗O8E抗体以亚治疗剂量给药，抗CTLA-4和/或PD-1抗体以亚治疗剂量给药，或者均以亚治疗剂量给药。在另外一个实施方案中，本发明提供一种改变与使用免疫刺激剂治疗过度增生性疾病有关的不良事件的方法，包括给患者施用抗O8E抗体和亚治疗剂量的抗

CTLA-4和/或抗PD-1抗体。在某些实施方案中，患者是人。在某些实施方案中，抗CTLA-4抗体是人序列单克隆抗体10D1，抗PD-1抗体是人序列单克隆抗体，如17D8、2D3、4H1、5C4和4A11。人序列单克隆抗体10D1已经分离并且进行了结构表征，如美国专利No. 6,984,720所述。人序列单克隆抗体17D8、2D3、4H1、5C4和4A11已经分离并且进行了结构表征，如美国临时专利No. 60/679,466所述。

本发明的抗O8E抗体、抗CTLA-4抗体和抗PD-1单克隆抗体(mAbs)和人序列抗体可以通过多种技术产生，包括常规单克隆抗体方法，例如，Kohler和Milstein (1975) *Nature* 256: 495所述的标准体细胞杂交技术。可以使用任何制备单克隆抗体的技术，例如B淋巴细胞的病毒或致癌转化。一种用于制备杂交瘤的优选的动物系统是鼠系统。用小鼠产生杂交瘤是一种完善建立的程序。免疫程序和分离用于融合的被免疫脾细胞的技术是本领域公知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是公知的(参见，例如，Hariow和Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York)。

通过 O8E和PD-1和/或CTLA-4的阻断，抗体组合可用于增强针对过度增生性疾病的免疫应答。在一个优选实施方案中，本发明的抗体是人抗体，例如，这些分子可以在体外或者离体施用于培养中的细胞，或者例如在体内施用于人类受试者，以在多种情况下增强免疫。因此，在一个方面，本发明提供一种改变受试者的免疫应答的方法，包括给受试者施用本发明的抗体组合或其抗原结合部分的组合，使受试者的免疫应答得到改变。优选地，应答增强、刺激或上调。在另外一个实施方案中，本发明提供一种改变与使用免疫刺激性治疗剂治疗过度增生性疾病有关的不良事件的方法，包括给受试者施用抗O8E抗体和亚治疗剂量的抗CTLA-4或抗PD-1抗体。

抗体对O8E、PD-1和CTLA-4的阻断可以增强患者中对癌细胞的免疫应答。其生长可以利用本发明抗体抑制的癌症包括一般对免疫治疗有应答的癌症。可用本发明的联合疗法治疗的癌症的代表性实例包

括黑素瘤（例如转移性恶性黑素瘤）、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌和肺癌。其他可以用本发明的方法治疗的癌症的例子包括骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、阴户癌、何杰金氏病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病（包括急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病）、儿童实体瘤、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症（包括石棉诱发的癌症），所述癌症的组合。本发明也可用于治疗转移癌。

在某些实施方案中，此处所述治疗性抗体的组合可以作为在药物可接受的载体中的单一组合物同时给药，或者作为分开的组合物同时给药，每种抗体在一种药物可接受的载体中。在另一实施方案中，治疗性抗体的组合可以相继给药。例如，抗O8E抗体和抗PD-1抗体可以相继给药，例如抗O8E首先给药，然后抗PD-1给药，或者抗PD-1首先给药，然后抗O8E给药。此外，如果相继给予一次以上的联合治疗，则在每次给药时，相继给药的顺序可以颠倒，或者保持相同顺序，相继给药可以与同时给药组合，或其任意组合。例如，抗O8E抗体和抗PD-1抗体组合的第一次给药可以是同时的，而第二次给药可以是相继进行的，首先抗O8E，然后抗PD-1，第三次给药可以是相继进行的，首先抗PD-1，然后抗O8E，以此类推。另外一种代表性的给药方案可以包括第一次是相继给药，即首先抗PD-1，然后抗O8E，而后来的给药可以同时进行。

任选地，抗O8E和抗CTLA-4和/或抗PD-1抗体可以进一步与免疫原性剂如癌细胞、纯化的肿瘤抗原（包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子）、细胞和由编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞联合使

用(He等人, *J. Immunol.* 173:4919-28 (2004))。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性例子包括黑素瘤抗原的肽, 例如gp100的肽、MAGE抗原、Trp-2、MARTI和/或酪氨酸酶或转染后表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步描述)。

组合的O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断可进一步与接种方案组合。已经设计了许多针对肿瘤进行接种的实验策略(参见, Rosenberg, S. (2000) *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. (2000) ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. (2000) ASCO Educational Book Spring: 730-738; 参见Restifo和 Sznol, *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita等人 (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 第五版)。在一个这样的策略中, 使用自体或同种异体肿瘤细胞制备疫苗。在转导肿瘤细胞使其表达GM-CSF时这些细胞疫苗显示最有效。已经证明对于肿瘤接种, GM-CSF是抗原呈递的强激活剂(Dranoff等人 (1993) *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.* 90: 3539-43)。

在各种肿瘤中的基因表达和大规模基因表达模式研究导致定义了所谓的肿瘤特异性抗原(Rosenberg, *Immunity* 10:281-7 (1999))。在许多情况下, 这些肿瘤特异性抗原是在肿瘤中以及在产生该肿瘤的细胞中表达的分化抗原, 例如黑色素细胞抗原gp100、MAGE抗原和Trp-2。更重要的是, 许多这样的抗原可能是宿主中发现的肿瘤特异性T细胞的靶标。在某些实施方案中, 使用本文所述的抗体组合物进行组合的O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断可以与收集肿瘤中表达的重组蛋白质和/或肽一起使用, 以产生对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质通常被免疫系统视为自身抗原, 因此对其耐受。肿瘤抗原也可包括蛋白质端粒酶, 它是染色体端粒合成所需要的, 在85%以上的人类癌症中表达, 而仅在数量有限的身体组织中表达(Kim等人, *Science* 266:2011-2013 (1994))。(可以利用多种手段保护这些身体组织免遭免疫攻击)。肿瘤抗原也可以是由于改变蛋白质序列或产生两种无关序

列之间的融合蛋白（如费城染色体中的bcr-abl）的体细胞突变而在癌细胞中表达的“新抗原”或来自B细胞肿瘤的独特型。

其他肿瘤疫苗可包括来自与人类癌症有关的病毒的蛋白质，所述病毒例如是人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV和HCV)和卡波西肉瘤病毒(KHSV)。可以与O8E阻断一起使用的肿瘤特异性抗原的另外一种形式是从肿瘤组织本身中分离的纯化的热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段，并且这些HSP在向抗原呈递细胞递送以引发肿瘤免疫方面非常有效(Suot和Srivastava *Science* 269:1585-1588 (1995)); Tamura 等人. (1997) *Science* 278:117-120)。

树突细胞(DC)是有效的抗原呈递细胞，可以用来引发抗原特异性应答。DC可以离体产生，并且载有各种蛋白质和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle, F.等人. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332)。也可以通过遗传手段转导DC，使其表达这些肿瘤抗原。为了免疫目的，也曾将DC与肿瘤细胞直接融合(Kugler, A.等人. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336)。作为一种接种方法，DC免疫可以与组合的O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断有效结合，来激活更强的抗肿瘤应答。

组合的O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断也可以进一步与标准癌症治疗联合使用。例如，组合的O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断可以与化学治疗方案有效联合。在这些情况中，如同使用抗O8E和抗CTLA-4和/或抗PD-1抗体的组合观察到的，可以降低与本发明的组合一起给药的其他化疗剂的剂量(Mokyr, M.等人. (1998) *Cancer Research* .58: 5301-5304)。O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断与化学治疗联合应用的科学原理是，大多数化疗化合物的细胞毒性作用引起的细胞死亡会导致抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平升高。可通过细胞死亡与O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断协同的其他联合治疗包括放射治疗、手术或激素剥夺。这些方案均在宿主中产生肿瘤抗原来源。血管生成抑制剂也可以与组合的O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断联合使用。血管生成的抑制导致肿瘤细胞死亡，肿瘤细胞死亡可以将肿瘤抗原补充到宿主抗原呈递

途径内。

O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断抗体的组合也可以与将表达Fc α 或Fc γ 受体的效应细胞导向至肿瘤的双特异性抗体联合使用（参见，例如，美国专利Nos. 5,922,845和5,837,243）。双特异性抗体可以用来导向两种不同的抗原。例如，抗Fc受体/抗肿瘤抗原（例如Her-2/neu）双特异性抗体已经用来将巨噬细胞导向至肿瘤部位。这种导向可以更有效地激活肿瘤特异性应答。利用组合O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断可以加强这些应答的T细胞部分。此外，可以利用结合肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标记物的双特异性抗体将抗原直接递送给DC。

在另一实例中，抗PD-1和抗CTLA-4抗体的组合可以与抗肿瘤抗体一起使用，所述抗肿瘤抗体如Rituxan[®]（利妥昔单抗）、赫赛汀（Herceptin[®]）（曲妥珠单抗）、Bexxar[®]（托西莫单抗）、Zevalin[®]（ibritumomab）、Campath[®]（阿仑珠单抗）、Lymphocide[®]（依帕珠单抗）、Avastin[®]（贝伐珠单抗）和Tarceva[®]（埃罗替尼）等。例如，不希望被理论所束缚，应用抗癌抗体或与毒素偶联的抗癌抗体的治疗可以导致癌细胞（例如肿瘤细胞）死亡，这将增强由O8E、CTLA-4或PD-1介导的免疫应答。在一个示例性的实施方案中，治疗过度增生性疾病（例如癌性肿瘤）可以包括抗癌抗体与抗O8E和抗PD-1和/或抗CTLA-4抗体同时或相继联合使用，或者其任意组合，这可增强宿主的抗肿瘤免疫应答。

肿瘤通过多种机制逃避宿主的免疫监视。通过灭活肿瘤表达的免疫抑制性蛋白质可以克服许多这样的机制。尤其包括TGF- β （Kehrl, J. 等人. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050)、IL-10（Howard, M.和O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200)和Fas配体（Hahne, M.等人. (1996) *Science* 274: 1363-1365）。在另外一个实例中，针对这些物质的抗体可以进一步与抗O8E和抗PD-1和/或抗CTLA-4联合使用，以抵消免疫抑制剂的作用，并且有利于宿主的肿瘤免疫应答。

其他可以用来激活宿主免疫反应性的抗体可以与抗O8E和抗

PD-1和/或抗CTLA-4的组合联合使用。包括激活DC功能和抗原呈递的树突细胞表面上的分子。抗CD40抗体能够有效代替T细胞辅助活性(Ridge, J.等人. (1998) *Nature* 393: 474-478), 并且显示与抗CTLA-4一起使用有效(Ito, N.等人. (2000) *Immunobiology* 201 (5) 527-40)。激活的针对T细胞共刺激分子如OX-40 (Weinberg, A.等人. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169)、4-1BB (Melero, I.等人. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997)、PD-1 (del Rio等人. (2005) *Eur J Immunol.* 35:3545-60)和ICOS (Hutloff, A.等人. (1999) *Nature* 397: 262-266)的抗体也可以提供提高的T细胞活化水平。

骨髓移植当前用来治疗多种造血来源的肿瘤。移植物抗宿主疾病是这种治疗的后果, 但是可以从移植物对肿瘤的应答中获得治疗益处。组合O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断可以用来提高供体移植的肿瘤特异性T细胞的有效性。

也有几种实验治疗方案包括离体活化和扩增抗原特异性T细胞, 并将这些细胞过继转移到受者中, 以产生针对肿瘤的抗原特异性T细胞(Greenberg, R.和Riddell, S. (1999) *Science* 285: 546-51)。也可以利用这些方法激活针对传染原如CMV的T细胞应答。在抗O8E和抗PD-1和/或抗CTLA-4抗体存在下的离体激活预期可提高过继转移的T细胞的频率和活性。

如本文所述, 器官在免疫刺激性治疗抗体治疗后可能表现出免疫相关的不良事件, 例如抗CTLA-4治疗后的胃肠道(腹泻和结肠炎)和皮肤(疹和痒)事件。例如, 在抗CTLA-4抗体治疗后, 在食道(十二指肠炎)和回肠(回肠炎)中也观察到非结肠的胃肠道免疫相关不良事件。

在某些实施方案中, 本发明提供一种改变与使用免疫刺激剂治疗过度增生性疾病有关的不良事件的方法, 包括给患者施用抗O8E抗体和亚治疗剂量的抗CTLA-4抗体。例如, 本发明的方法提供一种通过给患者施用非吸收性类固醇降低免疫刺激性治疗抗体诱发的结肠炎或腹泻的发病率的方法。因为接受免疫刺激性治疗抗体的任何患者都

具有发生这种抗体诱发的结肠炎和腹泻的危险，整个患者群体适合根据本发明的方法治疗。尽管已经施用类固醇来治疗炎症性肠病(IBD)和防止IBD加重，但是其还没有用于防止（降低发病率）未诊断为IBD的患者中的IBD。与类固醇、甚至非吸收性类固醇相关的重要副作用阻碍了其预防应用。

在进一步的实施方案中，O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断（即免疫刺激性治疗抗体抗O8E和抗PD-1和/或抗CTLA-4）的组合可以进一步与使用任何非吸收性类固醇组合。本文使用的“非吸收性类固醇”是一种糖皮质激素，它表现广泛的首过代谢，因此在肝脏中代谢后，该类固醇的生物利用率较低，即低于大约20%。在本发明的一个实施方案中，非吸收性类固醇是布地奈德。布地奈德是一种局部作用的糖皮质激素，它在口服后被广泛代谢，主要被肝脏代谢。ENTOCORT EC[®] (Astra-Zeneca)是一种为优化向回肠和整个结肠给药而开发的依赖于pH和时间的口服布地奈德制剂。ENTOCORT EC[®]在美国被批准用于治疗累及回肠和/或升结肠的轻度到中度克罗恩氏病。ENTOCORT EC[®]治疗克罗恩氏病的常用口服剂量是6-9 mg/天。ENTOCORT EC[®]在肠中释放后被肠粘膜吸收并保持。一旦它通过肠粘膜到达靶组织，ENTOCORT EC[®]就被肝脏中的细胞色素P450系统广泛代谢为具有可忽略的糖皮质激素活性的代谢物。因此，生物利用度较低（大约10%）。布地奈德的低生物利用度导致其治疗比高于其他首过代谢程度较低的糖皮质激素。布地奈德产生较少的副作用，包括比全身作用的糖皮质激素更低的下丘脑-垂体抑制。然而，ENTOCORT EC[®]长期给药可导致全身糖皮质激素效应，如肾上腺功能亢进和肾上腺抑制。参见PDR 58th ed. 2004; 608-610。

在进一步的实施方案中，组合O8E和PD-1和/或CTLA-4阻断（即免疫刺激性治疗抗体抗O8E和抗PD-1和/或抗CTLA-4）与非吸收性类固醇的组合可以进一步与水杨酸盐组合。水杨酸盐包括5-ASA剂，例如：柳氮磺吡啶(AZULFIDINE[®], Pharmacia & UpJohn); 奥沙拉秦(DIPENTUM[®], Pharmacia & UpJohn); 巴柳氮(COLAZAL[®], Salix

Pharmaceuticals, Inc.); 和美沙拉秦(ASACOL[®], Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA[®], Shire US; CANASA[®], Axcan Scandipharma, Inc.; ROWASA[®], Solvay)。

根据本发明的方法,水杨酸盐与抗O8E和抗PD-1和/或抗-CTLA-4抗体和非吸收性类固醇联合给药可以包括水杨酸盐和非吸收性类固醇的任何重叠的或相继的给药,目的是降低免疫刺激性抗体诱导的结肠炎的发病率。因此,例如,根据本发明降低免疫刺激性抗体诱导的结肠炎的发病率的方法包括同时或相继施用水杨酸盐和非吸收性类固醇(例如,在非吸收性类固醇给药6个小时后施用水杨酸盐)或其任意组合。进一步地,根据本发明,水杨酸盐和非吸收性类固醇可以通过相同途径给药(例如,均为口服)或者通过不同途径给药(例如水杨酸盐口服而非吸收性类固醇经直肠给药),该途径可以不同于抗O8E和抗PD-1和抗-CTLA-4抗体的给药途径。

具有补体结合位点(如来自IgG1、-2或-3或IgM的补体结合部分)的本发明的组合物(例如人抗体、多特异性和双特异性分子和免疫偶联物),也可以在补体的存在下使用。在一个实施方案中,用本发明的结合剂和适宜的效应细胞离体处理含有靶细胞的细胞群体能够通过加入补体或含有补体的血清来实现。补体蛋白的结合能够改善用本发明的结合剂包被的靶细胞的吞噬作用。在另一实施方案中,用本发明的组合物(例如人抗体、多特异性和双特异性分子)包被的靶细胞也能够被补体裂解。在另一实施方案中,本发明的组合物不激活补体。

本发明的组合物(例如人抗体、多特异性和双特异性分子和免疫偶联物)也可以与补体一起施用。因此,含有人抗体、多特异性或双特异性分子和血清或补体的组合物也在本发明的范围内。这些组合物是有利的,因为补体与人抗体、多特异性或双特异性分子紧密接近。可替代地,本发明的人抗体、多特异性或双特异性分子和补体或血清也可以分开施用。

因此,可以给用本发明的抗体组合物治疗的患者(在本发明的人抗体给药之前、同时或之后)另外施用另一种治疗剂,如细胞毒剂或

放射性毒剂，该治疗剂可以增强或增加人抗体的治疗效果。

在另外一些实施方案中，可以另外用调节（例如增强或抑制）Fc γ 或Fc γ 受体的表达或活性的药物治疗受试者，例如用细胞因子治疗受试者。在用多特异性分子治疗过程中施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）。

本发明的组合物（例如人抗体、多特异性和双特异性分子）也可以用来导向表达Fc γ R或O8E的细胞，例如标记这些细胞。对于这种应用，可以将结合剂与能够被检测到的分子连接。因此，本发明提供离体或在体外定位表达Fc受体如Fc γ R或O8E的细胞的方法。可检测标记物可以是，例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。

在一个特定实施方案中，本发明提供检测样品中O8E抗原的存在或测定O8E抗原量的方法，包括在允许抗体或其部分与O8E之间形成复合物的条件下使样品和对照样品接触可与O8E特异性结合的人单克隆抗体或其抗原结合部分。然后检测复合物的形成，其中样品与对照样品相比复合物形成的差异指示样品中O8E抗原的存在。

在其他实施方案中，本发明提供治疗受试者中O8E介导的疾病的方法。

在另一实施方案中，通过将化合物与抗体连接，可以利用本发明的免疫偶联物将该化合物（例如治疗剂、标记物、细胞毒素、放射毒素、免疫抑制剂等）靶向至具有O8E细胞表面受体的细胞。例如，抗O8E抗体可以与如美国专利申请10/160,972, 10/161,233, 10/161,234, 11/134,826, 11/134,685和美国临时专利申请No. 60/720,499所述的UPT和/或美国专利No. 6,81,354和6,548,530、美国专利公开Nos. 20030050331、20030064984、20030073852和20040087497所述或WO 03/022806公开的任一种毒素化合物偶联。因此，本发明也提供用于离体或在体内定位表达O8E的细胞（例如应用可检测标记物，如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子）的方法。可替代地，免疫偶联物通过将细胞毒素或放射毒素靶向至O8E，也可以杀伤具有O8E细胞

表面受体的细胞。

本发明进一步通过下面的实施例进行阐述，不应将这些实施例理解为进一步的限制。全部附图和在本申请中引用的全部参考文献、专利和公开专利申请的内容均引入本文作为参考。

实施例

实施例1

抗O8E人单克隆抗体的产生

本实施例公开了与人O8E (a/k/a B7H4、B7S1和B7x) 特异性结合的人单克隆抗体的产生。

抗原

利用标准重组转染方法，用O8E转染CHO和HEK-293细胞，用作免疫抗原。另外，单独的重组人O8E也用作免疫抗原。

转基因HuMAb小鼠[®]和KM小鼠[®]

用表达人抗体基因的转基因HuMAb小鼠[®]HCo7和HCo12系和转基因转染色体小鼠KM系制备抗O8E的完全人类单克隆抗体。在这些小鼠系的每一个中，已经如Chen等(1993) EMBO J. 12:811-820所述将内源小鼠 κ 轻链基因纯合地破坏，并且已经如PCT公布WO 01/09187的实施例1所述将内源小鼠重链基因纯合地破坏。这些小鼠系均携带如Fishwild等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851所述的人 κ 轻链转基因KCo5。HCo7系带有如美国专利Nos. 5,545,806; 5,625,825; 和5,545,807所述的HCo7人重链转基因。HCo12系带有如PCT公布WO 01/09187实施例2中所述的HCo12人重链转基因。KM小鼠[®]系含有如PCT公布WO 02/43478所述的SC20转染色体。

HuMAb和KM的免疫:

为了产生抗O8E的完全人类单克隆抗体，用CHO-O8E转染的细

胞、HEK-293-O8E转染的细胞和/或纯化的重组O8E蛋白免疫HuMAb小鼠[®]和KM小鼠[®]。用于HuMAb小鼠[®]的一般性免疫方案在Lonberg, N.等(1994) Nature 368 (6474):856-859; Fishwild, D.等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851和PCT公开WO 98/24884中描述。在第一次输注抗原时小鼠为6-16周龄。利用纯化的重组O8E蛋白制品(5-50 µg)免疫HuMAb小鼠TM和KM小鼠TM。

转基因小鼠用在完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内(IP)或皮下(Sc)免疫两次,然后用在不完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内或皮下免疫3-21天(最多可达总共11次免疫)。通过眼眶后采血监测免疫应答。通过ELISA对血浆进行筛选(如下文所述),用具有足够的抗O8E人免疫球蛋白效价的小鼠进行融合。用抗原经静脉内对小鼠进行加强免疫,3天和2天后处死小鼠,并取出脾脏。每种抗原一般进行10-35次融合。每种抗原免疫几十只小鼠。

产生抗O8E抗体的HuMAb小鼠[®]或KM小鼠[®]的选择

为了选择产生可与O8E结合的抗体的HuMAb小鼠TM或KM小鼠TM,通过如Fishwild, D.等(1996)(同上)所述的流式细胞分析来检测来自被免疫小鼠的血清。简要地说,用在PBS中浓度为1-2µg/ml的纯化重组O8E融合蛋白以100µl/孔的量包被微量滴定板,4℃下孵育过夜,然后用PBS/Tween (0.05%)中的5%鸡血清以200µl/孔封闭。将来自O8E免疫的小鼠的血浆稀释液加入各孔中,在室温下孵育1-2小时。用PBS/Tween洗板,然后与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗人IgGFc多克隆抗体在室温下孵育1小时。洗涤后,培养板用ABTS底物(Sigma, A-1888, 0.22 mg/ml)显色,并用分光光度计在OD 415-495处分析。用显示最高抗O8E抗体效价的小鼠进行融合。如下文所述进行融合,并通过ELISA和FACS检测杂交瘤上清液的抗O8E活性。

产生抗O8E人单克隆抗体的杂交瘤的产生

根据标准程序使用PEG将从HuMAb小鼠TM和/或KM小鼠TM中分

离的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后根据抗原特异性抗体的产生筛选获得的杂交瘤。使用50% PEG (Sigma)将来自被免疫小鼠的脾细胞单细胞悬液与1/4数量的SP2/0非分泌型小鼠骨髓瘤细胞(ATCC CRL 1581)融合。将细胞以约 1×10^5 /孔的密度接种于平底微量滴定板上,然后在选择性培养基中孵育大约两周,该选择性培养基在加有5mM HEPES、0.055 mM β -巯基乙醇、50 mg/ml庆大霉素和 $1 \times$ HAT (Sigma; CRL P-7185)的DMEM (Mediatech, CRL 10013, 含有高浓度葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠)中含有10%胎牛血清(Hyclone, Logan, UT)、10% P388DI(ATCC, CRL TIB-63)条件基质、3-5% origen (IGEN)。一至两周之后,在用HT替换了HAT的培养基中培养细胞。然后通过ELISA和FACS(如上所述)针对人抗O8E单克隆IgG抗体筛选各个孔。然后通过ELISA使用O8E重组蛋白或者通过FACS使用表达O8E的细胞例如CHO-O8E转染的细胞针对O8E阳性抗体筛选阳性克隆。简要地说,从组织培养瓶中收获表达O8E的细胞,并制备单细胞悬液。表达O8E的细胞悬液用第一抗体直接染色,或者在用1%多聚甲醛的PBS溶液固定后染色。将大约一百万个细胞重悬浮在含有0.5% BSA和50-500 μ g/ml第一抗体的PBS中,并在冰上孵育30分钟。用含有0.1% BSA、0.01% NaN_3 的PBS洗涤细胞两次,将其重悬浮在100 μ l 1:100稀释的FITC偶联的山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)中,并且在冰上再孵育30分钟。再洗涤细胞两次,重悬浮在0.5 ml洗涤缓冲液中,用FACSScalibur血细胞计数器(Becton-Dickinson, San Jose, CA)分析荧光染色。

一旦发生广泛的杂交瘤生长,则通常在10-14天后监测培养基。将分泌抗体的杂交瘤再次平板接种,再次筛选,并且如果对于人IgG仍然是阳性,则通过有限稀释将抗O8E单克隆抗体亚克隆至少两次。然后在体外培养稳定的亚克隆,以在组织培养基中产生少量的抗体用于进一步表征。

选择杂交瘤克隆1G11、2A7、2F9、12E1和13D12进一步分析。

实施例2

人单克隆抗体1G11、2A7、2F9、12E1和13D12的结构表征

本实施例公开了五种特异性结合O8E的人单克隆抗体的序列分析。

利用标准PCR技术分别从1G11、2A7、2F9、12E1和13D12杂交瘤中获得编码1G11、2A7、2F9、12E1和13D12单克隆抗体的重链和轻链可变区的cDNA序列，并利用标准DNA测序技术进行测序。

1G11的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图1A和SEQ ID NO: 41和1中。

1G11的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图1B和SEQ ID NO: 46和6中。

1G11重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明，1G11重链应用了来自人种系VH 4-34的VH区段。1G11 VH序列与种系VH 4-34序列的比对显示在图6中。利用Kabat CDR区测定系统对1G11 VH序列的进一步分析勾画出了重链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图1A和6以及SEQ ID NO: 11、16和21所示。

1G11轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明，1G11轻链应用了来自人种系VK A27的VL区段。1G11 VL序列与种系VK A27序列的比对显示于图9中。利用Kabat CDR区测定系统对1G11 VL序列的进一步分析勾画出了轻链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图1B和9以及SEQ ID NO: 26、31和36所示。

2A7的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图2A和SEQ ID NO: 42和2中。

2A7的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图2B和SEQ ID NO: 47和7中。

2A7重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明，2A7重链应用了来自人种系VH 3-53的VH区段和来自人种系JH 6b的JH区段。2A7 VH序列与种系VH 3-53序列的比对显示于图7中。利用Kabat CDR区测定系统对2A7 VH序列的进一步分析勾画出了

重链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图2A和7以及SEQ ID NO: 12、17和22所示。

2A7轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明，2A7轻链应用了来自人种系VK A27的VL区段。2A7 VL序列与种系VK L18序列的比对显示于图9中。利用Kabat CDR区测定系统对2A7 VL序列的进一步分析勾画出了轻链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图2B和9以及SEQ ID NO: 27、32和37所示。

2F9的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图3A和SEQ ID NO: 43和3中。

2F9的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图3B和SEQ ID NO: 48和8中。

2F9重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明，2F9重链应用了来自人种系VH 3-53的VH区段和来自人种系JH 6b的JH区段。2F9 VH序列与种系VH 3-53序列的比对显示于图7中。利用Kabat CDR区测定系统对2F9 VH序列的进一步分析勾画出了重链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图3A和7以及SEQ ID NO: 13、18和23所示。

2F9轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明，2F9轻链应用了来自人种系VK A27的VL区段。2F9 VL序列与种系VK A27序列的比对显示于图9中。利用Kabat CDR区测定系统对2F9 VL序列的进一步分析勾画出了轻链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图3B和9以及SEQ ID NO: 28、33和38所示。

12E1的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图4A和SEQ ID NO: 44和4中。

12E1的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图4B和SEQ ID NO: 49和9中。

12E1重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明，12E1重链应用了来自人种系VH 3-9的VH区段、来自人种系3-10的D区段和来自人种系JH 6b的JH区段。12E1 VH序列与种系VH

3-9序列的比对显示于图8中。利用Kabat CDR区测定系统对12E1 VH序列的进一步分析勾画出了重链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图3A和8以及SEQ ID NO: 14、19和24所示。

12E1轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明，12E1轻链应用了来自人种系VK L6的VL区段和来自人种系JK 1的JK区段。12E1 VL序列与种系VK L6序列的比对显示于图10中。利用Kabat CDR区测定系统对12E1 VL序列的进一步分析勾画出了轻链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图3B和10以及SEQ ID NO: 29、34和39所示。

13D12的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图5A和SEQ ID NO: 45和5中。

13D12的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图5B和SEQ ID NO: 50和10中。

13D12重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明，13D12重链应用了来自人种系VH 4-34的VH区段。13D12 VH序列与种系VH 4-34序列的比对显示于图6中。利用Kabat CDR区测定系统对13D12 VH序列的进一步分析勾画出了重链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图5A和6以及SEQ ID NO: 15、20和25所示。

13D12轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明，13D12轻链应用了来自人种系VK A27的VL区段。13D12 VL序列与种系VK A27序列的比对显示于图9中。利用Kabat CDR区测定系统对13D12 VL序列的进一步分析勾画出了轻链CDR1、CDR2和CDR3区，分别如图5B和9以及SEQ ID NO: 30、35和40所示。

实施例3

抗O8E人单克隆抗体的结合特异性的表征

本实施例公开了通过标准ELISA比较抗O8E抗体与免疫纯化的O8E的结合，用来检测对于O8E的结合特异性。

用重组His-标记的和重组myc-标记的O8E包被平板过夜，然后检

测与抗O8E人单克隆抗体2A7、12E1和13D12的结合。进行标准ELISA程序。以1 µg/ml的浓度加入抗O8E人单克隆抗体,并且以1:2的连续稀释度向下滴定。使用与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗人IgG (Fc或κ链特异性)多克隆抗体作为第二抗体。

通过蛋白A层析法从用B7H4-Ig构建体转染的293T细胞的上清液中纯化重组B7H4-Ig。用人抗体包被ELISA板,然后加入纯化的蛋白质,然后用兔抗B7H4抗血清检测。参见图11A。使用2A7亲和柱通过层析法从用Penta-B7H4-C9构建体转染的293T细胞的上清液中纯化具有C-9标签的重组Penta-B7H4。用抗小鼠Fc包被ELISA板,然后加入单克隆抗-C9 (0.6 µg/ml),然后用所示Penta-B7H4滴定,然后是1 µg/ml的人抗体。包被抗小鼠Fc,然后是M-抗-C9 (0.6 µg/ml),然后用所示Penta-O8E滴定,然后是1 µg/ml的人抗体。见图11B。

抗O8E人单克隆抗体2A7、12E1和13D12与O8E高特异性结合。

实施例4

抗O8E抗体与乳腺癌细胞系表面上表达的O8E结合的特征

本实施例公开了通过流式细胞术检测抗O8E抗体与CHO-O8E (a/k/a B7H4、B7S1和B7x)转染子和在其细胞表面上表达O8E的乳腺癌细胞的结合。

检测用O8E转染的CHO细胞系和乳腺癌细胞癌细胞系SKBR3(ATCC保藏号HTB-30)的抗体结合。HuMAb 2A7抗O8E人单克隆抗体的结合如下评价:将 1×10^5 个细胞与浓度为1 µg/ml的2A7一起孵育。洗涤细胞,用FITC标记的抗人IgG Ab检测其结合。使用FACScan流式细胞仪(Becton Dickinson, San Jose, CA)进行流式细胞分析。结果显示在图12和13中。

这些数据证明抗O8E HuMAb与表达O8E的CHO细胞结合,并且与示例的乳腺癌细胞癌细胞系结合。

实施例5

抗O8E单克隆抗体的结合亲和力的Scatchard分析

本实施例公开了采用Scatchard分析检测人单克隆抗体1G11、2F9、2A7、12E1和13D12对O8E转染的HEK细胞系的结合亲和力。

使用标准技术用全长O8E转染HEK细胞，并且使其在含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI培养基中生长。（图12显示利用2A7人抗O8E单克隆抗体对这些HEK-O8E细胞的FACS分析）用胰蛋白酶消化该细胞，用基于Tris的结合缓冲液(24mM Tris pH 7.2、137mM NaCl、2.7mM KCl、2mM葡萄糖、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1% BSA)洗一次，用结合缓冲液将细胞调节至 2×10^6 细胞/ml。Millipore板(MAFB NOB)用1%脱脂奶粉水溶液包被，并在4℃下贮存过夜。用0.2 ml结合缓冲液洗板三次。向最大结合孔中加入单独50微升缓冲液（总结合）。向对照孔中加入单独25微升缓冲液（非特异性结合）。向所有孔中加入体积为25 μl的不同浓度的¹²⁵I-抗-O8E抗体。（在有些情况下，用FITC标记的抗体进行滴定，因为非标记材料无法获得，在这些情况下结合可能受到影响。）向对照孔中加入体积为25 μl的100倍过量的不同浓度的未标记的抗体，并向所有孔中加入25 μl在结合缓冲液中的O8E转染的CHO细胞(2×10^6 细胞/ml)。将板在4℃摇床上以200 RPM孵育2小时。在孵育结束时，用0.2 ml冷洗涤缓冲液(24mM Tris pH 7.2、500mM NaCl、2.7mM KCl、2mM葡萄糖、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1% BSA)洗Millipore板三次。取出滤膜，用γ计数器计数。使用Prism软件(San Diego, CA)用单位点结合参数进行平衡结合的评价。

使用S形剂量应答(PRIZM™)通过非线性回归分析数据，由此计算EC₅₀，用EC₅₀对抗体进行排序，如表2所示。在这些实验中计算的EC₅₀值是抗体亲和力的定性值，不代表对于O8E的绝对亲和力。

表2

抗体	EC ₅₀	95% CI
2F9.E6-FITC	407pM	250 -663 pM
13D12.G10	746 pM	569 -979 pM
2A7.C11	750 pM	519 pM - 1 nM

1G11.H11-FITC	1.69 nM	1.4 -2.0 nM
12E1.G9*	19.8 pM	14 -27.6 nM

* 低值和高值作为常数调整，以补偿不完整的曲线。

实施例6

抗O8E单克隆抗体的内化

本实施例证明使用Hum-Zap内化试验检测抗O8E HuMAb向表达O8E的CHO和乳腺癌细胞中内化的能力。Hum-Zap试验通过第二抗体的结合检测第一人抗体的内化，该第二抗体具有对偶联到毒素肥皂草毒蛋白（saporin）上的人IgG的亲合性。

将表达O8E的乳腺癌细胞系SKBR3以 1.25×10^4 细胞/孔的密度接种到100 μ l孔中过夜。向孔中加入浓度为10 pM的抗O8E HuMAb抗体1G11、2F9、2A7、12E1或13D12。使用对O8E非特异性的同种型对照抗体作为阴性对照。以11 nM的浓度加入Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25)，将板孵育72小时。然后用1.0 Ci 3 H-胸苷对板进行脉冲24小时，收获，用Top Count闪烁计数器(Packard Instruments, Meriden, CT)读数。结果显示在以下的表3和图14-15中。抗O8E抗体 1G11、2F9、2A7、12E1或13D12显示，在表达O8E的SKBR3乳腺癌细胞中 3 H-胸苷掺入依赖于抗体浓度降低。

这些数据证明抗O8E抗体1G11、2F9、2A7、12E1和13D12内化到乳腺癌细胞系中。

表3

	1号试验		2号试验		3号试验	
	%内化		%内化		%内化	
抗O8E	平均值	sd	平均值	sd	平均值	sd
2A7/C11	29	12	17.5	3.5	40.7	2.7
2F9.E6	37	17	NT	NT	NT	NT
1G11.H1	18	8	NT	NT	NT	NT
13D12.G10	NT	NT	12.1	2.5	12.2	2.8
12E1.G9	NT	NT	10.4	18.5	4.3	2.7

将在SKBR3的三个实验和CHO-O8E的两个实验中的内化效率的

秩进行平均。内化秩，以及与CHO-O8E结合的EC50，在表4和表5中显示。结果表明内化效率与结合亲和力不直接相关，提示内化依赖于表位。

表4 根据在SKBR3乳腺癌细胞系中的内化分选的内化效率

	内化		
抗O8E	SKBR3	CHO-O8E	EC50 CHO-O8E结合
2F9.E6	1	3	407 pM
2A7.C11	2	1	750 pM
1G11.H1	3	4	1.69 nM
13D12.G10	4	2	746 pM
12E1.G9	5	5	19.8 pM

表5 根据在CHO-O8E细胞系中的内化分选的内化效率

	内化		
抗O8E	SKBR3	CHO-O8E	EC50 CHO-O8E结合
2A7.C11	2	1	750 pM
13D12.G10	4	2	746 pM
2F9.E6	1	3	407 pM
1G11.H1	3	4	1.69 nM
12E1.G9	5	5	19.8 pM

使用人单克隆抗体2A7、2F9和1G11，在大约500 pM至1 pM的范围上用剂量应答测定肥皂草毒蛋白偶联物在CHO-O8E中的内化活性。如图14所示，内化非常有效，EC50在低pM范围内。CHO亲代细胞系和Hu IgG-SAP用作阴性对照，显示没有显著背景毒性或非特异性内化。抗O8E与SAP的直接偶联物与SKBR3细胞一起使用。图15显示作为Ig-SAP剂量函数的内化百分比（相对于对照）。

实施例7

毒素偶联的抗O8E抗体对乳腺细胞癌细胞系的细胞杀伤的评价

该实施例公开了利用细胞增殖试验检测与毒素偶联的抗O8E单克隆抗体杀伤O8E⁺乳腺细胞癌细胞系的能力。

抗O8E HuMAb抗体1G11、2F9、2A7、12E1或13D12可以与毒素

通过诸如肽、胺或二硫化物连接体等连接体偶联。将表达O8E的乳腺癌细胞系如SKBR3以大约 $1-3 \times 10^4$ 细胞/孔的密度接种在100 μl 孔中3小时。向孔中加入初始浓度为30 nM的抗O8E抗体-毒素偶联物，并以1:3连续稀释度向下滴定。用对于O8E非特异性的同种型对照抗体作为阴性对照。使板孵育69小时。然后用1.0 Ci ^3H -胸苷对板进行脉冲24小时，收获，并用Top Count闪烁计数器(Packard Instruments, Meriden, CT)读数。预期在表达O8E的乳腺癌细胞中，抗O8E抗体显示抗体-毒素浓度依赖性的 ^3H -胸苷掺入减少。该数据证明抗O8E抗体1G11、2F9、2A7、12E1和13D12当与毒素偶联时对于乳腺癌细胞系具有潜在的细胞毒性。

实施例8

抗O8E抗体的ADCC活性的评价

该实施例公开了利用荧光细胞毒性试验检测抗O8E单克隆抗体在效应细胞存在下通过抗体依赖的细胞毒性(ADCC)杀伤O8E⁺细胞系的能力。

如下用全血制备人效应细胞。通过标准Ficoll-paque分离法从肝素化的全血中纯化人外周血单核细胞。将该细胞重悬浮在含有10% FBS和200 U/ml人IL-2的RPMI1640培养基中，并在37°C下孵育过夜。次日，收集细胞，用培养基洗四次，并以 2×10^7 细胞/ml的浓度重悬浮。O8E⁺靶细胞与BATDA试剂(Perkin Elmer, Wellesley, MA)以每 1×10^6 个靶细胞/mL使用2.5 μl BATDA的比例在37°C下孵育20分钟。将靶细胞洗四次，离心，并使终浓度为 1×10^5 细胞/ml。

如下所述使用Delfia荧光发射分析法检测O8E⁺细胞系SKBR3以及O8E转染的SKOV3细胞系对人抗O8E单克隆抗体的抗体特异性ADCC。每种靶细胞系(100 μl 标记的靶细胞)与50 μl 效应细胞和50 μl 抗体一起孵育。在整个实验过程中使用1:50的靶:效比。在所有研究中，用人IgG1同种型对照作为阴性对照。在以2000 rpm脉冲离心和37°C孵育一小时后，收集上清液，再次快速离心，并将20 μl 上清液转

移到平底板中，向其中加入180 μ l Eu溶液(Perkin Elmer, Wellesley, MA)，用RubyStar读板器(BMG Labtech)读数。裂解%如下计算：(样品释放 - 自发释放 $\times$ 100)/(最大释放 - 自发释放)，其中自发释放是来自只含靶细胞的孔的荧光，最大释放是来自含有靶细胞并且用2% Triton-X处理的孔的荧光。抗O8E抗体1G11、2F9和2A7对SKBR3细胞的细胞毒性%裂解显示在图17中；抗O8E抗体1G11、2F9和2A7对SKOV3-O8E转染的细胞系的细胞毒性%裂解显示在图18中；抗O8E抗体2F9和2A7对SKBR3细胞的浓度依赖性细胞毒性%裂解显示在图19中。对于HuMAb抗O8E抗体1G11、2F9和2A7，表达O8E⁺的细胞系SKBR3和SKOV3-O8E均显示抗体介导的细胞毒性。该数据证明HuMAb抗O8E抗体显示对O8E⁺表达细胞的特异性细胞毒性。

实施例9

使用裸抗O8E抗体和细胞毒素偶联的抗O8E抗体治疗体内肿瘤异种移植模型

本实施例公开了用毒素偶联的抗O8E抗体在体内治疗植有乳腺细胞癌肿瘤的小鼠，以检测该抗体对肿瘤生长的体内效果。

用标准实验程序在体外扩增SKBR3或其他合适的乳腺细胞癌细胞。使用6-8周龄的雄性Ncr无胸腺裸鼠(Taconic, Hudson, NY)，每只小鼠在右肋皮下植入在0.2 ml PBS/Matrigel (1:1)中的 7.5×10^6 ACHN或A-498细胞。在植入后对小鼠称重，使用电子卡尺在三个维度上测量肿瘤，每周两次。肿瘤体积计算为高度 $\times$ 宽度 $\times$ 长度。将荷有平均270 mm³的ACHN肿瘤或平均110 mm³的A498肿瘤的小鼠随机分入治疗组。在第0天，给小鼠腹膜内施用PBS载体、毒素偶联的同种型对照抗体或毒素偶联的抗O8E HuMAb。可以与本发明的抗体偶联的毒素化合物的例子在编号为MEDX-0034US4的未决的美国专利申请中描述。用三种不同的毒素化合物检测接受抗O8E HuMAb的小鼠。在给药后的60天里，监测小鼠的肿瘤生长。当肿瘤达到肿瘤终点(2000 mm³)时，对小鼠行安乐死。与毒素偶联的适当抗O8E抗体延长了达到肿瘤终点

体积(2000 mm^3)的平均时间, 并且延缓了肿瘤生长的进展。因此, 用这种抗O8E抗体-毒素偶联物治疗对肿瘤生长具有直接的体内抑制效果。

实施例10

使用抗O8E HuMAb 2A7的免疫组化研究

本实施例公开了使用正常小鼠组织阵列 (IMGENEX Histo-Array, Imgenex Corp., San Diego, CA) 通过免疫组化方法检测抗O8E HuMAb 2A7对O8E的识别。

对于免疫组化, 使用 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的组织块。干燥30分钟后, 用丙酮固定切片(在室温下10分钟)并且风干5分钟。用PBS漂洗玻片, 然后与PBS中的10%正常山羊血清预孵育20分钟, 随后与在含10%正常山羊血清的PBS中的 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ fitc化的2A7在室温下孵育30分钟。然后, 用PBS洗涤玻片三次, 与小鼠抗FITC ($10\mu\text{g/ml}$, DAKO)在室温下孵育30分钟。再用PBS洗涤玻片, 与山羊抗小鼠HRP偶联物(DAKO)在室温下孵育30分钟。用PBS洗涤玻片三次。用二氨基联苯胺(Sigma)作为底物, 产生棕色染色。用蒸馏水洗涤后, 将玻片用苏木精复染1分钟。然后在流动的蒸馏水中洗涤玻片10秒种, 在甘油凝胶 (glycergel) (DAKO) 中固定。这些试验的结果显示在表6中。

表6 O8E在正常小鼠组织阵列中的免疫反应性

组织类型	2A7.C11-FITC		Hu-IgG1-FITC
	$2\text{ }\mu\text{g/ml}$	$5\text{ }\mu\text{g/ml}$	$5\text{ }\mu\text{g/ml}$
皮肤, 耳垂			
表皮	—	±	—
皮脂腺	—	±	—
其他部分	—	—	—
结肠			
表面上皮	±, 1+	1+	±
其他部分	—	—	—
小肠			
隐窝上皮	±, 1+	1+, 2+	±

其他部分	—	—	—
胃			
表面和腺	1+, 2+, ocas	1+, 2+, freq	1+, 2+, ocas
上皮细胞			
神经丛	—	±, 1+	—
其他部分	—	—	—
胰			
腺泡上皮	1+	2+	±, 1+
胰岛	—	±	—
其他部分	—	—	—
唾液腺			
腺泡上皮	±	1+	—
其他部分	—	—	—
肝			
肝细胞	—	±, —	—
其他部分	—	—	—
大脑			
神经元	±	2+, 1+, freq	±, —
神经毡/纤维	—, ±	2+, 2+, ocas	—
脑桥			
神经元	±	±	±
神经毡/纤维	±	2+, 1+, freq	—
小脑			
浦肯野细胞	±, 1+	1+	±, —
白质	—	1+, 2+	—
其他部分	—	—	—
脾			
红髓中的大淋巴细胞	—	1+, 2+, rare	—
其他部分	—	—, ±	—
胸腺	—	—	—
骨骼肌	—	—	—
舌	—	—	—
心脏	—	—, ±	—
肺	—	—	—
肾皮质	—	—, ±	—
肾髓质	—	—	—
膀胱			

移行上皮 其他部分	- -	±, 1+ -	- -
精囊 上皮 腔液 其他部分	±, - 1+ -	± 3+ -	- ± -
睾丸 初级精母细胞 其他部分	- -	±, 1+ -	- -
附睾	-	-	-
子宫 子宫内膜/腺上皮 其他部分	-, ± -	± -	- -
卵巢	-	±	-
免疫反应性强度: ± (可疑); + (弱); 2+ (中); 3+ (强); 4+ (剧烈); - (阴性). Freq: 频繁; Ocas: 偶然			

这些数据和为抗O8E抗体1G11和2F9收集的相应数据证明, 在结肠和小肠中的肠内分泌样细胞中以及在精囊的腔液中存在强到剧烈的O8E免疫反应性(3+, 4+); 在大脑神经元、大脑和脑桥的神经毡和纤维中、在小脑白质中、在小肠的隐窝上皮细胞中、在脾的少量大淋巴细胞中, 显示弱到中度的O8E免疫反应性(1+, 2+); 在结肠表面上皮、小脑浦肯野细胞、唾液腺和胰的腺泡上皮中证明有弱O8E免疫反应性(1+); 在膀胱的移行上皮、睾丸的初级精母细胞(primary spermatocyte)、胃神经丛中显示可疑到弱的O8E免疫反应性; 所有其他器官显示阴性到可疑的染色, 包括皮肤、肝脏、心脏、肺、胸腺、肾、子宫、卵巢、附睾、舌和骨骼肌。

实施例11

脱岩藻糖基化HuMAb的产生

本实施例说明了缺少岩藻糖基残基的抗O8E HuMAb的产生。

已经证明岩藻糖基残基数目减少的抗体提高抗体的ADCC能力。

用表达抗O8E HuMAb重链和轻链的载体对缺乏岩藻糖基转移酶基因

FUT 8的CHO细胞系Ms704-PF (Biowa, Inc., Princeton, NJ)进行电穿孔。通过在含有6 mM L-谷氨酰胺和500 µg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA)的Ex-Cell 325-PF CHO培养基(JRH Biosciences, Lenexa, KS)中生长筛选耐药性克隆。通过标准ELISA测定根据IgG表达来筛选克隆。产生了两个单独的克隆, B8A6和B8C11, 其产率范围为每天每细胞1.0到3.8皮克。

实施例12

脱岩藻糖基化抗O8E抗体的ADCC活性的评价

该实施例公开了利用荧光细胞毒性试验检测脱岩藻糖基化的和非脱岩藻糖基化的抗O8E单克隆抗体在效应细胞存在下通过抗体依赖的细胞毒性(ADCC)杀伤O8E⁺细胞的能力。

如上所述将人抗O8E单克隆抗体脱岩藻糖基化。如下所述用全血制备人效应细胞。通过标准Ficoll-paque分离法从肝素化的全血中纯化人外周血单核细胞。将该细胞重悬浮在含有10% FBS和200 U/ml人IL-2的RPMI1640培养基(培养基)中, 并在37°C下孵育过夜。次日, 收集细胞, 用培养基洗一次, 并以 2×10^7 细胞/ml的浓度重悬浮。O8E⁺靶细胞与BATDA试剂(Perkin Elmer, Wellesley, MA)以每 1×10^6 靶细胞/mL培养基(添加有2.5 mM丙磺舒)(测定培养基)使用2.5 µl BATDA的比例在37°C下孵育20分钟。将靶细胞用含有20mM HEPES和2.5mM丙磺舒的PBS洗四次, 离心, 并使测定基质中的终浓度为 1×10^5 细胞/ml。

如下所述使用Delfia荧光发射分析法检测O8E⁺细胞系ARH-77(人B淋巴母细胞白血病; ATCC保藏号CRL-1621)对于脱岩藻糖基化和非脱岩藻糖基化的人抗O8E单克隆抗体的抗体特异性ADCC。靶细胞系ARH-77(100 µl标记的靶细胞)与50 µl效应细胞和50 µl 1G11或脱岩藻糖基化的1G11抗体一起孵育。在整个实验过程中使用1:50的靶: 效比。用人IgG1同种型对照作为阴性对照。在以2100 rpm脉冲离心和37°C孵育一小时后, 收集上清液, 再次快速离心, 并将20 µl上清液转

移到平底板中，向其中加入180 μ l Eu溶液(Perkin Elmer, Wellesley, MA)，用Fusion Alpha TRF读板器(Perkin Elmer)读数。裂解%如下计算： $(\text{样品释放} - \text{自发释放} \times 100) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})$ ，其中自发释放是来自只含靶细胞的孔的荧光，最大释放是来自含有靶细胞并且用3% Lysol处理的孔的荧光。表达O8E+的细胞系ARH-77显示对于HuMAb抗O8E抗体1G11的抗体介导的细胞毒性，并且显示与抗O8E抗体1G11的脱岩藻糖基化形式有关的增加的特异性裂解百分比。因此，脱岩藻糖基化的HuMAb抗O8E抗体增强了对O8E+表达细胞的特异性细胞毒性。

实施例13

通过免疫荧光染色分析评价HuMAb抗O8E抗体的内化

靶细胞系O8E⁺ SKBR3 (人乳腺癌，ATCC# HTB-30)和ZR-75 (人乳腺癌，ATCC# CRL-1500)用于利用免疫荧光染色检测HuMAb抗O8E抗体2A7C11、1G11H1和2F9E6在与细胞结合后的内化。

SKBR3和ZR-75细胞(96孔板中每孔每100 μ l 10^4)通过用0.25%胰蛋白酶/EDTA处理从组织培养瓶中收获，与5 μ g/ml在FACS缓冲液(PBS + 5% FBS, 介质)中的每种HuMAb抗O8E抗体一起在冰上孵育30分钟。人IgG1同种型对照用作阴性对照。用介质洗涤2次后，将细胞重悬浮在介质中(每孔100 μ l)，然后与1:00稀释的偶联到PE (Jackson ImmunoResearch Lab)的山羊抗人第二抗体一起在冰上孵育30分钟。用介质洗涤后，在0分钟时，或者在37 $^{\circ}$ C下孵育不同的时间后，将细胞立即在荧光显微镜(Nikon)下成像。在下图所示的不同时间点采集细胞形态学的图像和染色细胞的免疫荧光强度。只在用HuMAb抗O8E抗体染色的细胞中观察到荧光。使用IgG1对照抗体没有检测到荧光。在试验中使用FITC-直接偶联的HuMAb抗O8E抗体也获得类似的结果

成像数据显示，使用全部三种HuMAb抗O8E抗体，在0分钟时在细胞膜上均出现荧光。在30分钟孵育中，膜荧光强度显著降低，而细胞内染色增强。在120分钟点时，膜上的荧光消失，而出现在细胞内

区室中。该数据证明, HuMab抗O8E抗体在与表达O8E的内源肿瘤细胞结合后可以被特异性内化。

实施例14

抗O8E抗体对SCID小鼠中HEK-B7H4肿瘤的效果

在该实施例中, 用裸抗O8E抗体在体内处理植入了HEK-B7H4肿瘤的SCID小鼠, 检测抗体对肿瘤生长的体内效果。

使用缺乏功能性B和T淋巴细胞的重度联合免疫缺陷(SCID)小鼠研究肿瘤生长。将来自用B7H4转染的HEK肿瘤细胞系的细胞在matrigel (50% v/v)中以5百万个细胞/鼠的密度皮下植入。每只小鼠在第0天接受0.2 ml细胞的接种。从第0天开始检查小鼠的肿瘤生长, 并且每周监测两次肿瘤生长, 持续大约6周。当肿瘤达到大约130 mm³时, 根据肿瘤体积将小鼠随机分入3个组。用10 mg/kg裸抗O8E抗体2A7处理小鼠, 用同种型对照抗体或配制缓冲液作为阴性对照。通过每5天腹膜内注射给予动物, 共注射5次。使用电子卡尺在三个维度上测量肿瘤(高 × 宽 × 长)并且计算肿瘤体积。

当肿瘤达到1500 mm³的体积或者体重减轻大于15%时对小鼠行安乐死。结果显示在图20中。抗O8E抗体2A7处理抑制了肿瘤生长。用2A7处理的组的肿瘤生长抑制中值在第34天为63%。在停止给药后肿瘤重新生长。这些结果证明抗O8E抗体在体内治疗表达O8E的肿瘤方面有效。

实施例15

使用抗O8E抗体的免疫组化研究

使用来自卵巢癌、肺癌、乳腺癌和头颈癌的临床活检组织, 通过免疫组化法检测抗B7H4 HuMAb 2A7识别B7H4的能力。

对于免疫组织化学, 使用5 μm冷冻的切片(Ardais Inc, USA)。干燥30分钟后, 将切片用丙酮固定(在室温下10分钟)并且风干5分钟。用PBS漂洗玻片, 然后与PBS中的10%正常山羊血清预孵育20分钟, 随

后与10 µg/ml在含10%正常山羊血清的PBS中的fitc化抗体在室温下孵育30分钟。然后，用PBS洗涤玻片三次，与小鼠抗FITC (10µg/ml, DAKO)在室温下孵育30分钟。再用PBS洗涤玻片，与山羊抗小鼠HRP偶联物(DAKO)在室温下孵育30分钟。用PBS洗涤玻片三次。用二氨基联苯胺(Sigma)作为底物，产生棕色染色。用蒸馏水洗涤后，将玻片用苏木精复染1分钟。然后在流动的蒸馏水中洗涤玻片10秒种，在甘油凝胶(DAKO)中固定。临床活检免疫组化染色显示肺癌、乳腺癌、卵巢癌和头颈癌样品中为阳性染色。

实施例16

正常和癌组织的定量RT-PCR

利用定量反转录酶PCR (RT-PCR)根据O8E mRNA的表达筛选各种正常和癌组织样品。mRNA的表达指示O8E蛋白质表达。

对于定量 RT-PCR，使用下列 O8E 引物： B7-H4.3: AGGATGGAATCCTGAGCTGCACTT; B7-H4.4: TCCGACAGCTCATCTTTGCCTTCT, 由Operon (Huntsville, AL)提供。使用标准反应条件(5 µl 1 ng/µl的cDNA模板, 0.1 ul 40 µM的上游引物, 0.1 µl 40µM的下游引物, 6µl 2× SYBR Green PCR混合物(Applied Biosystems # 4367659), 和0.8µl水)。在ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA)中利用标准PCR条件扩增cDNA共40循环。定量RT-PCR结果显示在下面的表7中。未确定计数的样品代表低于荧光阈值的值。乳腺、卵巢和头颈肿瘤显示表达O8E，在一些卵巢癌和头颈癌样品中看到最高水平的表达。这证明乳腺癌、卵巢癌和头颈肿瘤样品中的O8E表达比正常组织增加。

表7 在正常和癌组织中的定量RT-PCR表达

组织	计数	量
正常脂肪细胞(#301)	28.953062	25.57793
正常动脉(#303)	31.856901	3.0423617

正常膀胱(#257)	30.620392	7.5326214
正常骨髓(#342)	未确定	0
正常脑 (#258)	34.33955	0.49280354
正常乳腺 (#259)	25.63064	292.28528
正常结肠(#261)	未确定	0
正常食道(#262)	32.27514	2.2388945
正常心脏 (#125)	未确定	0
正常肾 (#264)	33.599422	0.8479082
正常肝 (#266)	未确定	0
正常肺 (#268)	32.44523	1.9763907
正常淋巴结 (#315)	未确定	0
正常卵巢 (#270)	35.045704	0.29364112
正常胰 (#271)	28.446985	37.06916
正常外周血白细胞(#302)	34.652363	0.39180183
正常前列腺 (#272)	32.635994	1.7184163
正常视网膜(#256)	34.70426	0.37717298
正常骨骼肌 (#119)	未确定	0
正常骨骼肌(#126)	未确定	0
正常皮肤 (#273)	未确定	0
正常脊髓(#129)	39.383526	0.01220525
正常脾 (#274)	未确定	0
正常胃 (#275)	未确定	0
正常舌(#324)	30.956758	5.886249
正常扁桃体(#325)	未确定	0
正常气管(#314)	29.771343	14.03797
乳腺肿瘤 (#176)	33.798374	0.7328206
乳腺肿瘤(#177)	25.759022	266.02777
乳腺肿瘤(#178)	28.572468	33.81085

乳腺肿瘤(#179)	25.31508	368.374
乳腺肿瘤(#180)	29.323488	19.494516
头/颈肿瘤(喉, #402)	28.116425	47.23582
头/颈肿瘤(咽, #403)	25.776083	262.72076
头/颈肿瘤(舌, #403)	26.950275	111.07142
头/颈肿瘤(扁桃体, #404)	23.03704	1957.3722
肾肿瘤(#167)	27.029814	104.77927
卵巢肿瘤(#187)	25.321087	366.75525
卵巢肿瘤(#188)	22.846964	2250.0833
卵巢肿瘤(#189)	25.079527	437.81958
卵巢肿瘤(#190)	27.964441	52.80399
卵巢肿瘤(#191)	22.686525	2530.9656

本发明的范围不受本文所述的具体实施方案所限制。实际上, 根据以上描述和附图, 除了本文所述的以外, 对本公开内容的各种修改对本领域技术人员也是显而易见的。这些修饰落在所附权利要求书的范围之内。

在本申请中引用了专利、专利申请、出版物、产品说明和方案, 其公开文件都为了所有目的而完整引入本文作为参考。

抗-O8E 1G11VH

V- 区段 : 4-34
 D- 区段 : D6-13
 J- 区段 : JH4b

```

1   Q   V   Q   L   Q   Q   W   G   A   G   L   L   K   P   S   E   T   L
   CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55  S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   F   S   D   Y   F   W   T   W
   TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GAT TAC TTC TGG ACC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109 I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   E   I   N   H   S
   ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

                                CDR2
                                ~~~~~
163 G   T   T   N   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S   A   D
   GGA ACC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATT TCA GCA GAC

217 T   S   K   N   Q   F   S   L   R   L   S   S   V   T   A   A   D   T
   ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AGG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                ~~~~~
271 A   V   Y   Y   C   A   R   L   S   S   W   S   N   W   A   F   E   Y
   GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CTC AGC AGC TGG TCG AAC TGG GCC TTT GAG TAC
                                D6-13/DN1
                                ~~~~~
325 W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
   TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
                                JH4b
  
```

图 1A

抗-O8E 1G11VK

V- 区段 : A27
J- 区段 : JK4

```

      E I V L T Q F P G T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TTT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      A T L S C R A S Q S V S S T Y L A W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      Y Q Q K P G Q A P R V L I Y G A S R
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG GTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGA

      CDR2
      ~~~~~
      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163  AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
                                ~~~~~
      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217  ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      ~~~~~
      Q Y G S S P L T F G G G T K V E I K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

      L
      ↓ JK4

```

图 1B

抗-O8E 2A7VH

V- 区段 : 3-53
D- 区段 : 未发现
J- 区段 : JH6b

```

      E  V  Q  L  V  E  S  G  G  G  L  I  Q  P  G  G  S  L
1    GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     ~~~~~~
      R  L  S  C  A  A  S  G  F  T  V  S  S  N  Y  M  N  W
55   AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGG TTC ACC GTC AGT AGC AAC TAC ATG AAC TGG

                                     CDR2
                                     ~~~~~~
      V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  V  S  V  I  Y  G  S
109  GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT TAT GGC AGT

      CDR2
      ~~~~~~
      G  R  T  Y  Y  A  D  S  V  K  G  R  V  T  I  S  R  D
163  GGT AGA ACA TAT TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA GTC ACC ATC TCC AGA GAC

      N  S  K  N  T  L  Y  L  Q  M  N  S  L  R  A  E  D  T
217  AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG

      CDR3
      ~~~~~~
      A  V  Y  Y  C  A  R  D  T  Y  A  M  D  V  W  G  Q  G
271  GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACC TAC GCT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
      |
      | JH6b

      T  T  V  T  V  S  S
325  ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCT

```

图 2A

抗-O8E 2A7VK

V- 区段 : A27

J- 区段 : JK2

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      ~~~~~
      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163  AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
                                ~~~~~
      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217  ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      ~~~~~
      Q Y G S S P M Y T F G Q G T K L E I
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCC ATG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

                                JK2
                                ~~~~~
      K
325  AAA

```

图 2B

抗-O8E 2F9VH

V- 区段 : VH3-53

D- 区段 : D5-24

J- 区段 : JH6b

```

      E V Q L V E S G G G L I Q P G G S L
1   GAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR 1
                                ~~~~~
      R L S C A A S G F I V S R N Y M N W
55  AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGG TTC ATC GTC AGT AGA AAC TAC ATG AAC TGG

                                CDR 2
                                ~~~~~
      V R Q A P G K G L E W V S V I Y G S
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT TAT GGC AGT

                                CDR 2
                                ~~~~~
      G R T D C A D S V K G R F T I S R D
163 GGT AGG ACA GAC TGC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

      N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T
217 AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG

                                CDR 3
                                ~~~~~
      A V Y Y C A R D G D Y G M D V W G Q
271 GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGG GAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA
      D5-24
      G T T V T V S S
325 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
      JH6b

```

图 3A

抗 O8E 2F9VK

V- 区段 : A27

J- 区段 : JK2

```

1      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
      GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR 1
                                -----
55     A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
      GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR 2
                                -----
109    Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
      TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR 2
      -----
163    R A T G I P D R F S G S G S G T D F
      AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR 3
                                -----
217    T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
      ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR 3
      -----
271    Q Y G S S P L Y T F G Q G T K L E I
      CAG TAT GGT AGC TCA CCT CTG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

                                JK2
                                -----
325    K
      AAA

```

图 3B

抗-O8E 12E1 VH

V 区段 : 3-9
D 区段 : 3-10
J 区段 : JH6b

```

1      E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L
      GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55     R L S C V A S G F T F D D Y A M H W
      AGA CTC TCC TGT GTA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109    V R Q A P G K G L E W V S G I S W N
      GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT TGG AAT

      ~~~~~
      CDR2
      ~~~~~
163    S G S I G Y A D S V K G R F T I S R
      AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217    D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D
      GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
271    T A L Y Y C T K A L Y G S G S S D F
      ACG GCC TTG TAT TAC TGT ACA AAA GCC CTC TAT GGT TCG GGG AGT TCT GAC TTC

                                CDR3
                                ~~~~~
325    Y Y Y G M D V W G Q G T T V A V S S
      TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC GCC GTC TCC TCA

```

JH6b

图 4A

抗-08E 12E1 VK

V 区段 : L6
J 区段 : JK1

```
      E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55  GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                CDR2
                                ~~~~~
      Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~
      A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163  GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
      L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
      R R T F G Q G T K V E I K
271  CGT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
      ↓
```

图 4B

抗-08E 13D12 VH

V 区段 : 4-34
D 区段 : 3-9
J 区段 : JH6b

```

1   Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L
    CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55  S  L  T  C  A  V  Y  G  G  S  F  S  G  Y  Y  W  S  W
    TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109 I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  K  I  N  H  S
    ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AAA ATC AAT CAT AGC

                                CDR2
                                ~~~~~
163 G  S  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D
    GGA AGT ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

217 T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  N  S  V  T  A  A  D  T
    ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAA CTA AAC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                ~~~~~
271 A  V  Y  Y  C  A  R  E  L  R  Y  F  E  N  Y  Y  Y  G
    GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA TTA CGA TAT TTT GAA AAC TAC TAC TAC GGT
                                JH6b

                                CDR3
                                ~~~~~
325 M  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
    ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

```

图 5A

抗-08E 13D12 VK

V 区段 : A27
J 区段 : JK1

```

      E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
      A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      ~~~~~
      R A T G I P D R F S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                CDR3
                                ~~~~~
      T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

      CDR3
      ~~~~~
      Q Y G S S P R T F G Q G T K V E I K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
      L→

```

图 5B

抗-08E 1G11 和 13D12 VH 区

4-34 种系 1G11 VH 13D12 VH	Q	V	Q	L	Q	Q	W	G	A	G	L	L	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	A	V	Y	G	G	S	F	S	G	Y	Y	W	S	W	I	R
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-34 种系 1G11 VH 13D12 VH	Q	P	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E	I	N	H	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-34 种系 1G11 VH 13D12 VH	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	C	A	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1G11 VH 13D12 VH:	V	T	V	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注意: * = 缺口, 在该位点没有氨基酸

图 6

抗-08E 12E1 VH 区

3-9 种系: EVQLVESGGGLVQPGGSRSLRSLSCAASGFFTFDDYAMH
12E1 VH: -
CDRL

3-9 种系: 12E1 VH: WVRRQAPGKGLEWVS GISWNSGSI GYADSVKGRFTI CDR2

	CDR3
3-9 种系:	
D 3-10 种系:	
12E1 VH:	
	S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K D
	Y G S G S
	T - A L - - - - -

JH6b 种系
12E1 VH: Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T V T V S S (JH6b)
S D F - - - - - A - - -

8
[X]

抗-O8E 12E1 VK 区

L6 种系:	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A	CDR1
12E1 VK:	- - - - -	- - - - -
L6 种系:	W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G	CDR2
12E1 VK:	- - - - -	- - - - -
L6 种系:	T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W	CDR3
JK1 种系:	- - - - -	- T F G Q G T K V
12E1 VK:	- - - - -	- R - - - - -
JK1 种系:	E I K	- - - - -
12E1 VK:	- - - - -	- - - - -

图 10

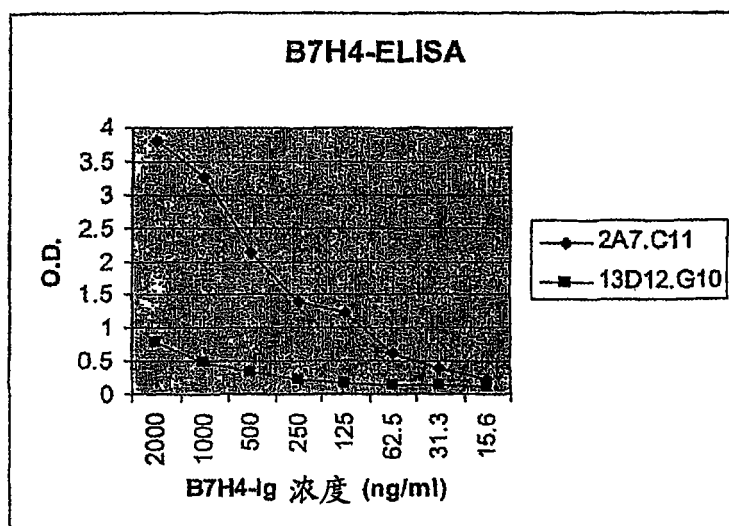


图 11A

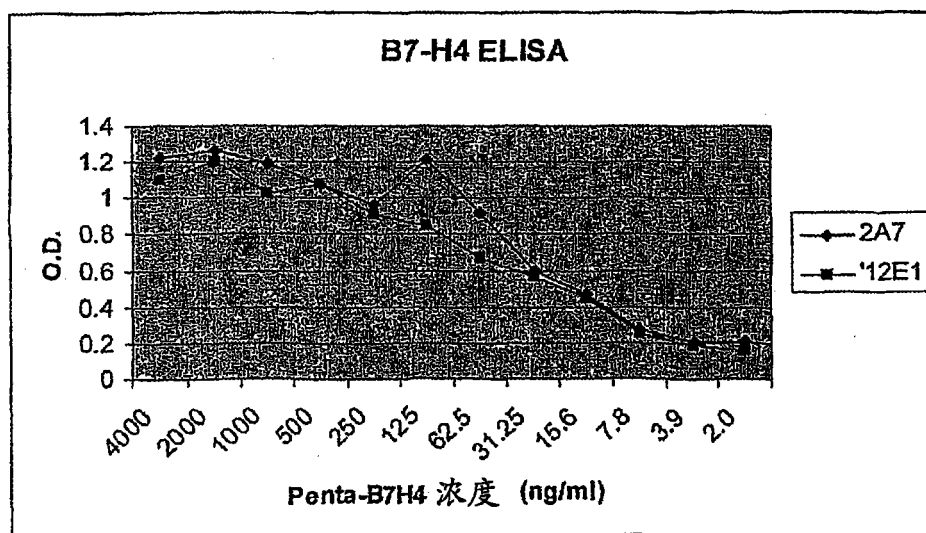


图 11B

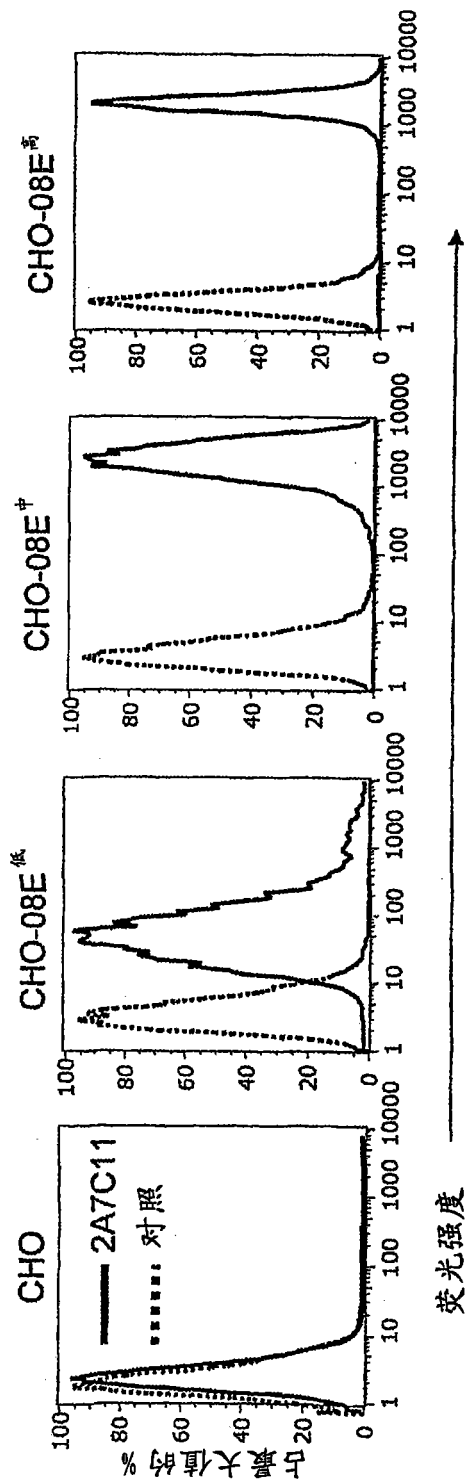


图 12

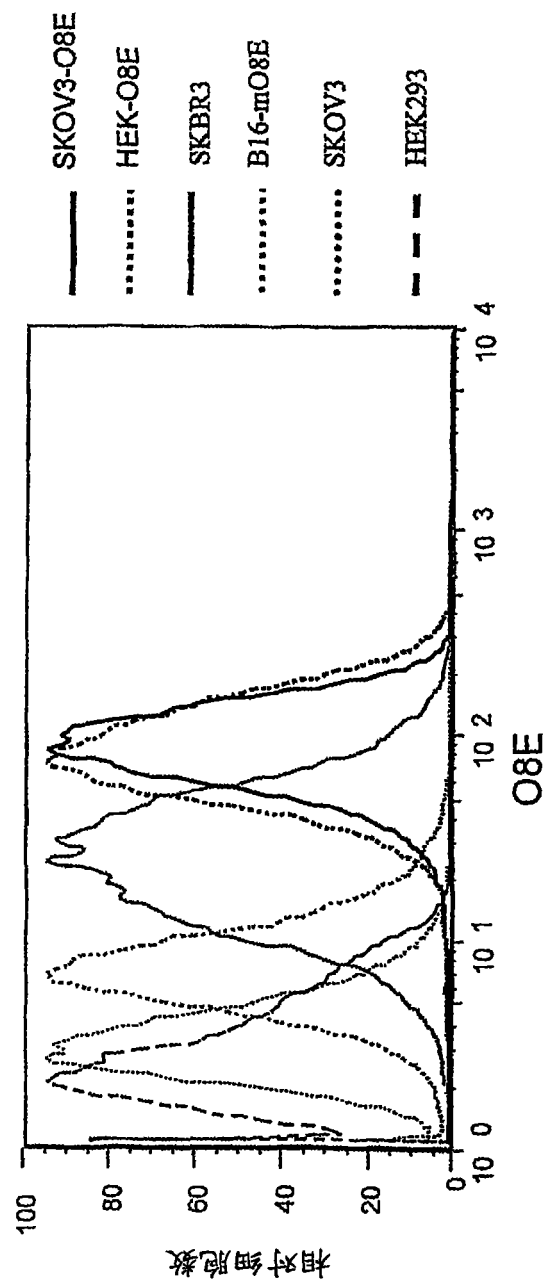


图 13

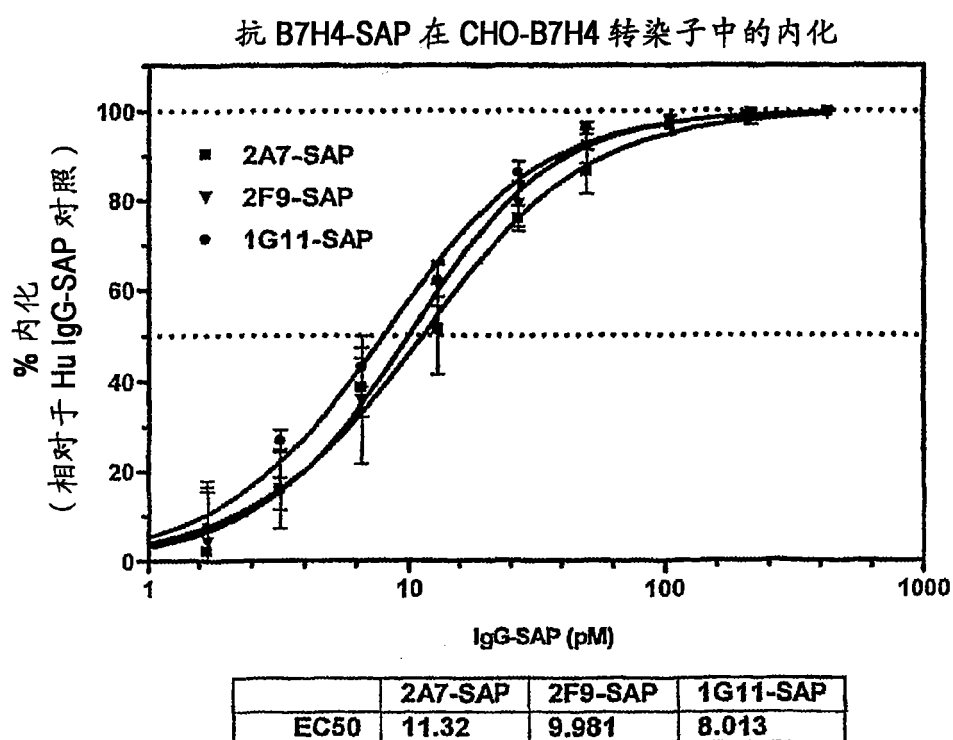


图 14

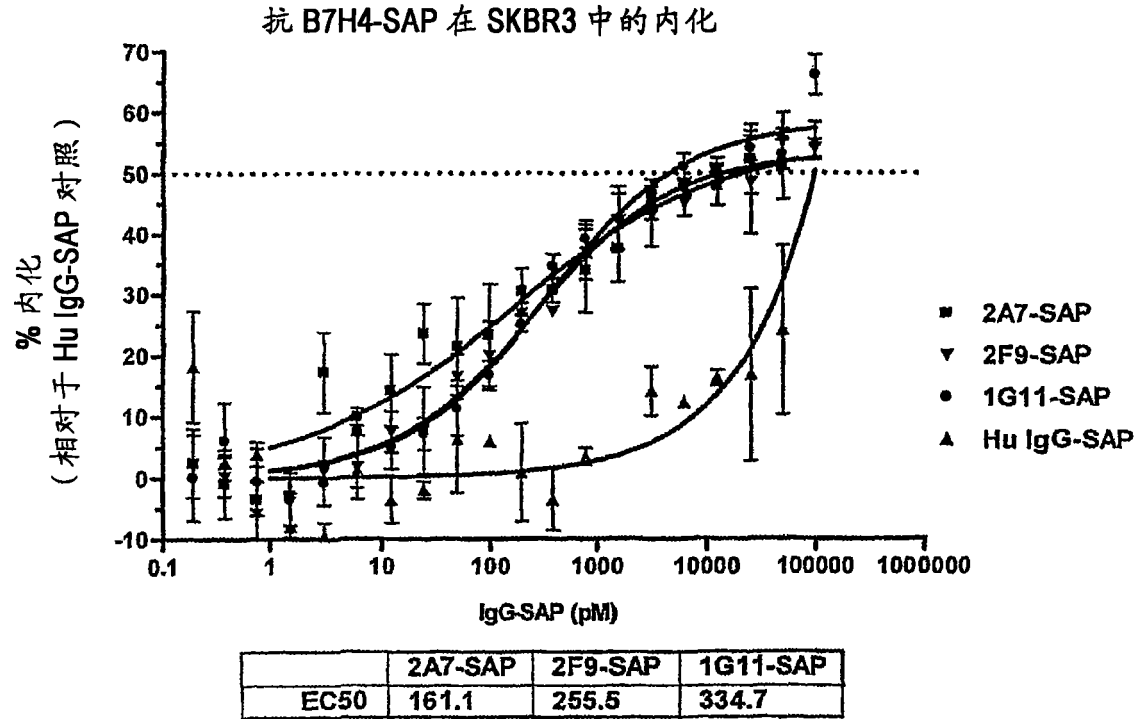


图 15

利用 HuMab 对 O8E 表位作图

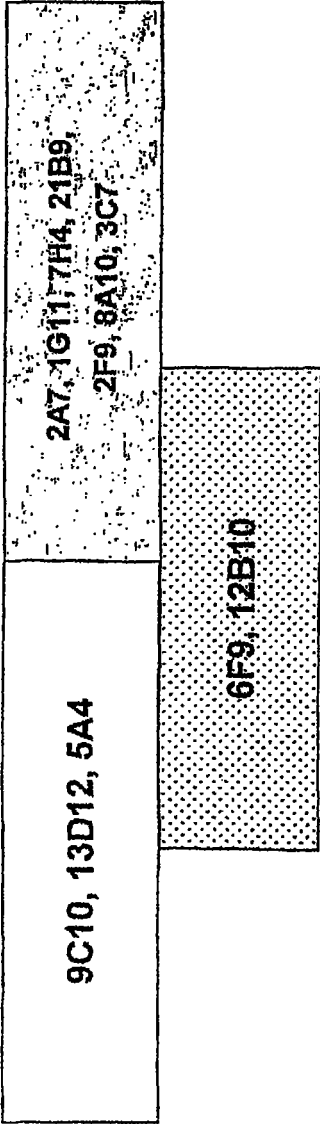
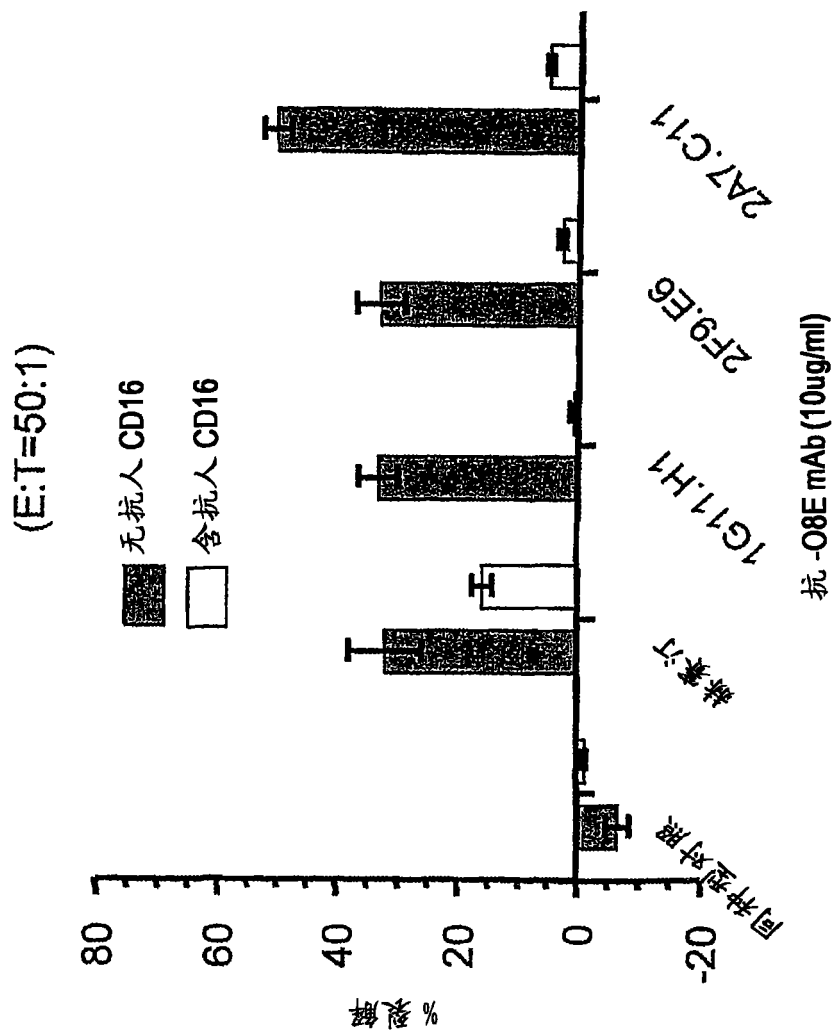


图 16



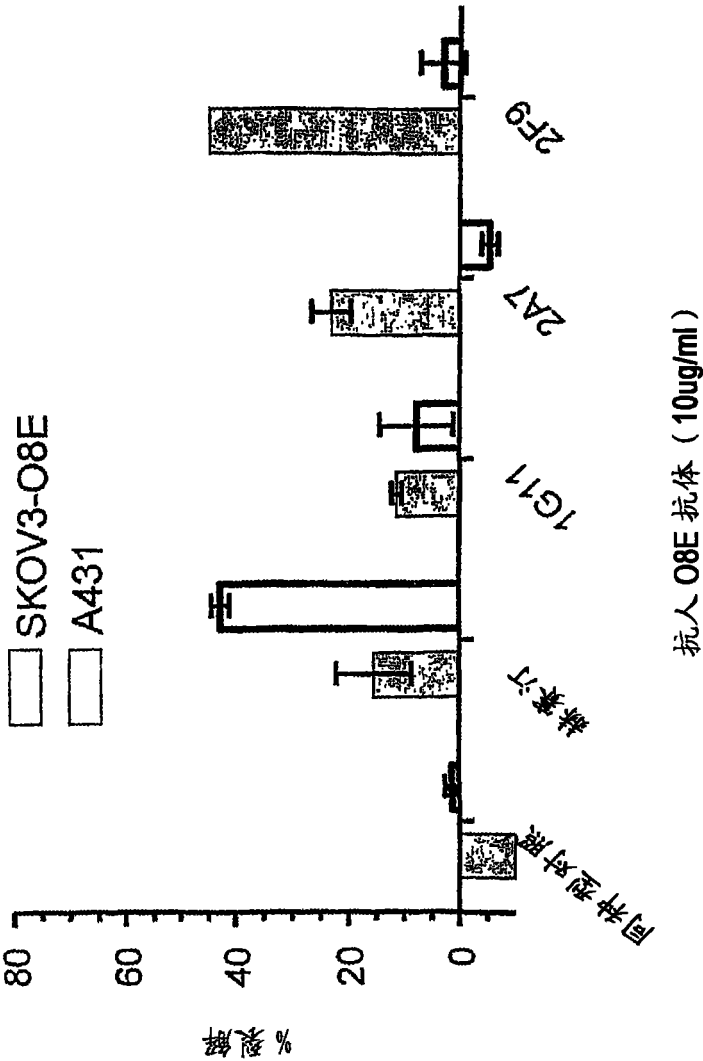


图 18

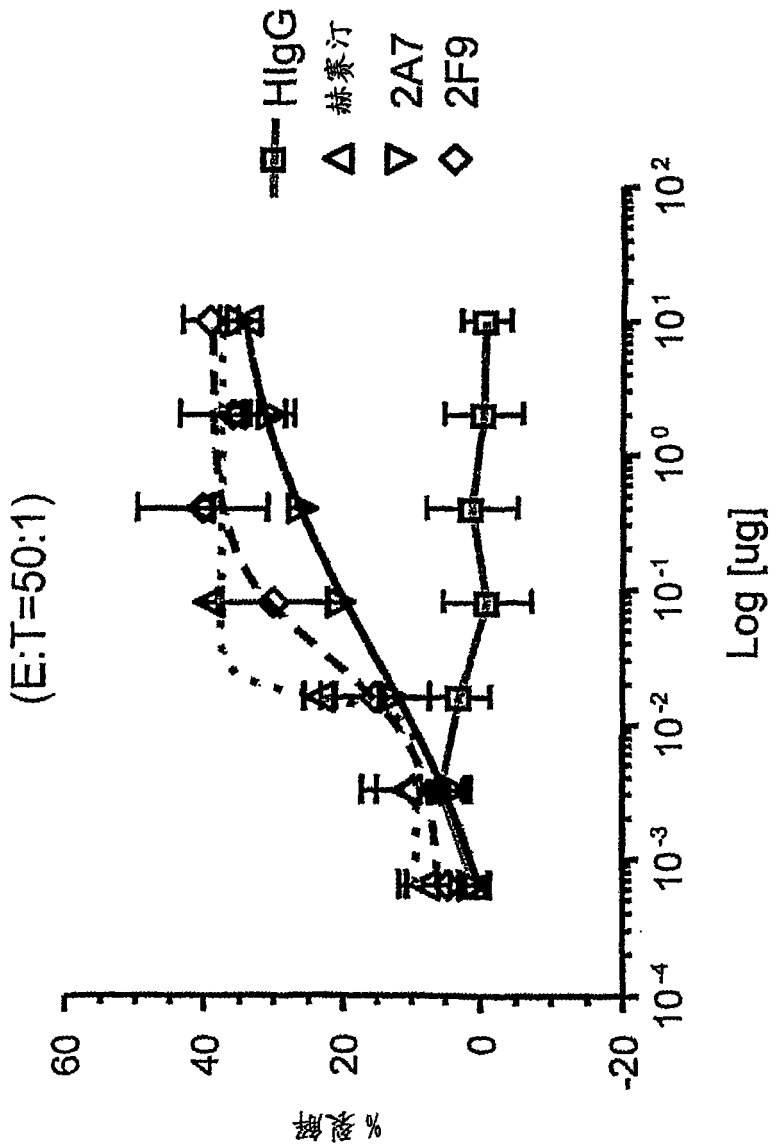


图 19

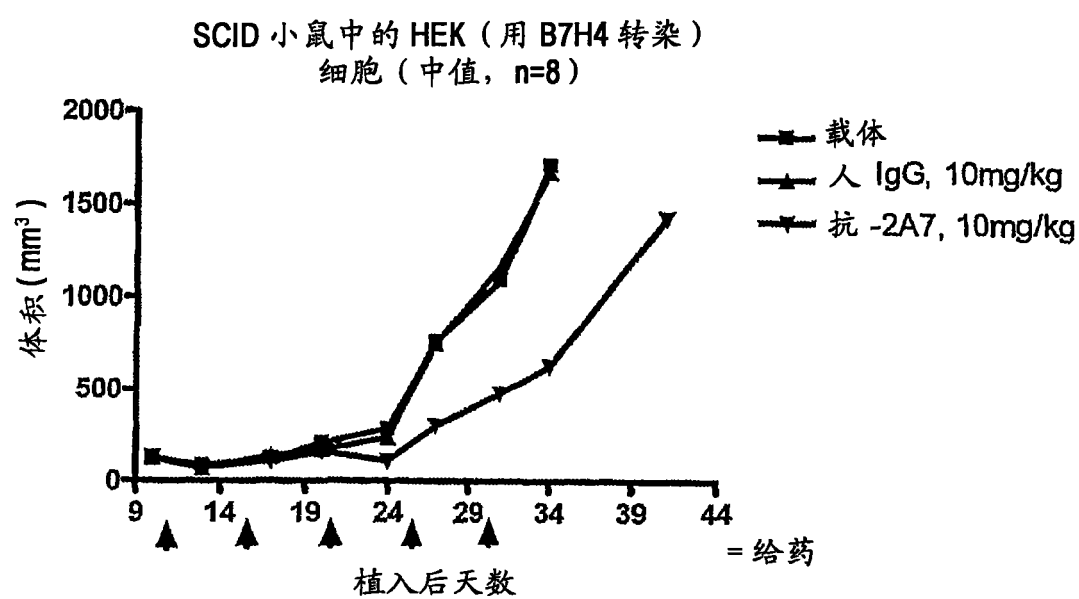


图 20

专利名称(译)	抗O8E的人单克隆抗体		
公开(公告)号	CN101326197A	公开(公告)日	2008-12-17
申请号	CN200680046065.3	申请日	2006-12-08
[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		
[标]发明人	AJ科尔曼 MJ塞尔比 L S路 A威特 黄海春		
发明人	A·J·科尔曼 M·J·塞尔比 L - S·路 A·威特 黄海春		
IPC分类号	C07K16/28 A61P35/00 G01N33/53		
代理人(译)	陈文平		
优先权	60/824593 2006-09-05 US 60/748914 2005-12-08 US		
其他公开文献	CN101326197B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供以高亲和力特异性结合O8E的分离的单克隆抗体，特别是人单克隆抗体。还提供了编码本发明的抗体的核酸分子、表达载体、宿主细胞和表达本发明的抗体的方法。还提供了包含本发明的抗体的免疫偶联物、双特异性分子和药物组合物。本发明还提供了治疗癌症的方法。