

[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 200580014802.7

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月18日

[11] 公开号 CN 1950107A

[22] 申请日 2005.3.29

[21] 申请号 200580014802.7

[30] 优先权

[32] 2004.3.29 [33] US [31] 60/557,741

[86] 国际申请 PCT/US2005/010265 2005.3.29

[87] 国际公布 WO2005/097185 英 2005.10.20

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.9

[71] 申请人 米德列斯公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 罗伯特·格拉齐亚诺

约瑟芬·M·卡达雷尔利

托马斯·肯普 贝思·卡特

莫汉·斯里尼瓦桑

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 孟凡宏

权利要求书 8 页 说明书 71 页 序列表 21 页
附图 16 页

[54] 发明名称

IRTA-5 抗体及其用途

[57] 摘要

本发明提供分离的单克隆抗体，特别是人单克隆抗体，它与 IRTA-5 高亲和力地结合。也提供了编码本发明抗体的核酸分子，用于表达本发明抗体的表达载体、宿主细胞和方法。还提供了包含本发明抗体的免疫偶联物、双特异性分子和药物组合物。本发明还提供检测 IRTA-5 的方法，以及治疗各种 B 细胞恶性肿瘤，包括非何杰金氏淋巴瘤的方法。

1. 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 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合；
 - (b) 基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合；且
 - (c) 与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合，但是基本不与 CD3+ 外周血 T 细胞、CD1A+ 外周血树突细胞、CD14+ 外周血单核细胞、或 CD56+ 外周血自然杀伤细胞结合。
2. 权利要求 1 的抗体，其为人抗体。
3. 权利要求 1 的抗体，其为嵌合或人源化抗体。
4. 权利要求 2 的抗体，其为 IgG1 或 IgG4 同种型的全长抗体。
5. 权利要求 2 的抗体，其为抗体片段或单链抗体。
6. 权利要求 2 的抗体，其中所述抗体以 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合。
7. 权利要求 2 的抗体，其中所述抗体以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合。
8. 权利要求 2 的抗体，其中所述抗体以 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合。
9. 权利要求 2 的抗体，其中所述抗体以 $0.05 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合。
10. 权利要求 2 的抗体，其中所述抗体以介于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 之间的 K_D 与人 IRTA-5 结合。
11. 权利要求 2 的抗体，其中人 IRTA-5 包含具有如 SEQ ID NO: 37[Genbank 登录号 AAL60250]所示氨基酸序列的多肽。
12. 权利要求 2 的抗体，其中人 IRTA-1 包含具有如 SEQ ID NO: 38[Genbank 登录号 NP_112572]所示氨基酸序列的多肽。
13. 权利要求 2 的抗体，其中人 IRTA-2 包含具有如 SEQ ID NO: 39[Genbank 登录号 NP_112571]所示氨基酸序列的多肽。
14. 权利要求 2 的抗体，其中人 IRTA-3 包含具有如 SEQ ID NO:

40[Genbank 登录号 AAL59390]所示氨基酸序列的多肽。

15. 权利要求 2 的抗体, 其中人 IRTA-4 包含具有如 SEQ ID NO: 41[Genbank 登录号 AAL60249]所示氨基酸序列的多肽。

16. 权利要求 2 的抗体, 其中 B 细胞肿瘤系选自 Daudi、Ramos 和 SU-DHL-4 细胞系。

17. 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 IRTA-5, 所述参比抗体包括:

(a) 包含选自 SEQ ID NO: 19、20 和 21 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b) 包含选自 SEQ ID NO: 22、23 和 24 的氨基酸序列的轻链可变区。

18. 权利要求 17 的抗体, 其中所述参比抗体包括:

(a) 包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的轻链可变区。

19. 权利要求 17 的抗体, 其中所述参比抗体包括:

(a) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b) 包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列的轻链可变区。

20. 权利要求 17 的抗体, 其中所述参比抗体包括:

(a) 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的轻链可变区。

21. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 包含产自或源自人 V_H 3-33 基因的重链可变区, 其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

22. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 包含产自或源自人 V_H DP44 基因、人 V_H 3-23 基因、或人 V_H 3-7 基因的重链可变区, 其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

23. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 包含产自或源自人 V_K L6 基因的轻链可变区, 其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

24. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 包括:

(a) 人 V_H 3-33、 V_H DP44、 V_H 3-23、或 V_H 3-7 基因的重链可变

区;和

(b) 人 $V_K L6$ 基因的轻链可变区;

其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

25. 权利要求 24 的抗体, 其包含人 $V_H 3-33$ 基因的重链可变区和人 $V_K L6$ 基因的轻链可变区。

26. 权利要求 24 的抗体, 其包含人 $V_H DP44$ 基因的重链可变区和人 $V_K L6$ 基因的轻链可变区。

27. 权利要求 24 的抗体, 其包含人 $V_H 3-23$ 基因的重链可变区和人 $V_K L6$ 基因的轻链可变区。

28. 权利要求 24 的抗体, 其包含人 $V_H 3-7$ 基因的重链可变区和人 $V_K L6$ 基因的轻链可变区。

29. 权利要求 24 的抗体, 其中该抗体不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 特异性结合。

30. 权利要求 24 的抗体, 其中 IRTA-5 包含具有如 SEQ ID NO: 37[Genbank 登录号 AAL60250]所示氨基酸序列的人 IRTA-5 多肽。

31. 权利要求 29 的抗体, 其中人 IRTA-1 包含具有如 SEQ ID NO: 38[Genbank 登录号 NP_112572]所示氨基酸序列的多肽。

32. 权利要求 29 的抗体, 其中人 IRTA-2 包含具有如 SEQ ID NO: 39[Genbank 登录号 NP_112571]所示氨基酸序列的多肽。

33. 权利要求 29 的抗体, 其中人 IRTA-3 包含具有如 SEQ ID NO: 40[Genbank 登录号 AAL59390]所示氨基酸序列的多肽。

34. 权利要求 29 的抗体, 其中人 IRTA-4 包含具有如 SEQ ID NO: 41[Genbank 登录号 AAL60249]所示氨基酸序列的多肽。

35. 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: 7、8 和 9 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: 16、17 和 18

的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列，

(c) 该抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合；

(d) 该抗体基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合；且

(e) 该抗体与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合，但是基本不与 CD3+外周血 T 细胞、CD1A+外周血树突细胞、CD14+外周血单核细胞、或 CD56+外周血自然杀伤细胞结合。

36. 权利要求 35 的抗体，其中重链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 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: 13、14 和 15 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。

37. 权利要求 36 的抗体，其中重链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO: 1、2 和 3 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: 10、11 和 12 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。

38. 权利要求 35 的抗体，其为人抗体。

39. 权利要求 35 的抗体，其为人源化或嵌合抗体。

40. 权利要求 35 的抗体，其中 B 细胞肿瘤系选自 Daudi、Ramos 和 SU-DHL-4 细胞系。

41. 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: 19、20 和 21 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: 22、23 和 24 的氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列；

(c) 该抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合；

(d) 该抗体基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合；且

(e) 该抗体与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合，但是基本不与

CD3+外周血 T 细胞、CD1A+外周血树突细胞、CD14+外周血单核细胞、或 CD56+外周血自然杀伤细胞结合。

42. 权利要求 41 的抗体，其为人抗体。

43. 权利要求 41 的抗体，其为人源化或嵌合抗体。

44. 权利要求 41 的抗体，其中 B 细胞肿瘤系选自 Daudi、Ramos 和 SU-DHL-4 细胞系。

45. 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 和 3 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1；

(b) 包含选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2；

(c) 包含选自 SEQ ID NO: 7、8 和 9 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3；

(d) 包含选自 SEQ ID NO: 10、11 和 12 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1；

(e) 包含选自 SEQ ID NO: 13、14 和 15 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2；和

(f) 包含选自 SEQ ID NO: 16、17 和 18 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3；

其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

46. 权利要求 45 的抗体，其包括：

(a) 包含 SEQ ID NO: 1 的重链可变区 CDR1；

(b) 包含 SEQ ID NO: 4 的重链可变区 CDR2；

(c) 包含 SEQ ID NO: 7 的重链可变区 CDR3；

(d) 包含 SEQ ID NO: 10 的轻链可变区 CDR1；

(e) 包含 SEQ ID NO: 13 的轻链可变区 CDR2；和

(f) 包含 SEQ ID NO: 16 的轻链可变区 CDR3。

47. 权利要求 45 的抗体，其包括：

(a) 包含 SEQ ID NO: 2 的重链可变区 CDR1；

- (b) 包含 SEQ ID NO: 5 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 8 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 11 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 14 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 17 的轻链可变区 CDR3。

48. 权利要求 45 的抗体, 其包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 3 的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含 SEQ ID NO: 6 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 9 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 12 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 18 的轻链可变区 CDR3。

49. 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: 19、20、21 和 36 的氨基酸序列的重链可变区; 和
- (b) 包含选自 SEQ ID NO: 22、23 和 24 的氨基酸序列的轻链可变区;

其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

50. 权利要求 49 的抗体, 其包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的轻链可变区。

51. 权利要求 49 的抗体, 其包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列的轻链可变区。

52. 权利要求 49 的抗体, 其包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 21 或 36 的氨基酸序列的重链可变区;和
- (b) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的轻链可变区。

53. 一种组合物, 其含有权利要求 1-52 中任一项的抗体或其抗原结合部分, 和药物可接受的载体。

54. 一种免疫偶联物，其包含与治疗剂连接的权利要求 1-52 中任一项的抗体或其抗原结合部分。

55. 一种组合物，其含有权利要求 54 的免疫偶联物和药物可接受的载体。

56. 权利要求 54 的免疫偶联物，其中所述治疗剂是细胞毒素。

57. 一种组合物，其含有权利要求 56 的免疫偶联物和药物可接受的载体。

58. 权利要求 54 的免疫偶联物，其中所述治疗剂是放射性同位素。

59. 一种组合物，其含有权利要求 58 的免疫偶联物和药物可接受的载体。

60. 一种双特异性分子，其包含与第二功能部分连接的权利要求 1-52 中任一项的抗体或其抗原结合部分，该第二功能部分具有与所述抗体或其抗原结合部分不同的结合特异性。

61. 一种组合物，其含有权利要求 60 的双特异性分子和药物可接受的载体。

62. 一种分离的核酸分子，其编码权利要求 1-52 中任一项的抗体或其抗原结合部分。

63. 一种表达载体，包含权利要求 62 的核酸分子。

64. 一种宿主细胞，包含权利要求 63 的表达载体。

65. 一种含有人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转基因小鼠，其中该小鼠表达权利要求 1-52 中任一项的抗体。

66. 由权利要求 65 的小鼠制备的杂交瘤，其中该杂交瘤产生所述抗体。

67. 一种制备抗-IRTA-5 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: 1、2 和 3 的 CDR1 序列、选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 的 CDR2 序列、和选自 SEQ ID NO: 7、8 和 9 的 CDR3 序列；或(ii)轻链可变区抗体序列，其包含选自 SEQ ID NO: 10、11 和 12 的 CDR1 序列、选自

SEQ ID NO: 13、14 和 15 的 CDR2 序列、和选自 SEQ ID NO: 16、17 和 18 的 CDR3 序列;

(b) 改变至少一个可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基, 该序列选自重链可变区抗体序列和轻链可变区抗体序列, 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。

68. 一种抑制表达 IRTA5 的肿瘤细胞生长的方法, 包括使该细胞接触抑制肿瘤细胞生长有效量的权利要求 1-52 中任一项的抗体或其抗原结合部分。

IRTA-5 抗体及其用途

相关申请的交叉参考

本申请要求 2004 年 3 月 29 日提交的美国临时专利申请系列号 60/557,741 的优先权，其内容在此全部引用作为参考。

发明背景

免疫受体易位相关 (IRTA) 基因/蛋白，也称作 Fc 受体同源物 (FcRH) 基因，由 5 个成员的免疫球蛋白样细胞表面受体家族组成 (Miller 等, (2002) Blood. 99:2662; Davis 等, (2002) Immunological Reviews 190:123)。IRTA 最早是通过分析含有 1q21 染色体重排的多发性骨髓瘤细胞系的断裂点而发现的 (Hatzivassiliou 等, (2001) Immunity. 14:277)。每个 IRTA 糖蛋白含有 3-9 个胞外 Ig 样域 (Miller, 2002, 见上文)。IRTA 的特征还在于具有在特定基序内含有 3-5 个酪氨酸残基的胞质域，提示免疫酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和免疫酪氨酸激活样 (ITAM 样) 基序的存在 (Miller, 2002, 见上文; Hatzivassiliou, 2001, 见上文)。

IRTA 在外周淋巴样组织中表达，包括淋巴结、扁桃体、静息外周 B 细胞和正常生发中心 B 细胞 (Davis 等, (2001) PNAS. 98:9772)。IRTA 2、3、4、5 均在脾脏中高水平表达，而与之相比，在脾脏中检测到低水平的 IRTA1。已经分析了人扁桃体组织 B 细胞区内的 IRTA 表达。IRTA1 在淋巴滤泡外部以边缘区模式表达，并且在上皮内淋巴细胞中表达。IRTA2 和 3 在生发中心内表达，在富含中央细胞的明区中表达水平最高。IRTA4 和 5 在外套层内表达水平最高，表明在幼稚 B 细胞中表达 (Miller, 2002, 见上文)。

IRTA5 在 IRTA 中是独特的，因为它在跨膜区内含有带电荷的谷氨酸残基，提示它可能与邻近位置的含带正电荷氨基酸的蛋白质异

源二聚化 (Miller, 2002, 见上文)。

已经证明 IRTA 基因在 B 细胞非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、滤泡性淋巴瘤、B 系弥漫性大细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤中高度表达 (Davis, 2001, 见上文)。

发明概述

本发明提供与 IRTA-5 结合并且表现出许多所需特性的分离的单克隆抗体，特别是人单克隆抗体。这些特性包括：与人 IRTA-5 高亲和力结合，但是缺乏与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3、或 IRTA-4 的实质交叉反应性。而且，该抗体与 B 细胞特异性结合。而且，本发明的抗体显示与 B 细胞肿瘤细胞系结合，但是不与 T 细胞、树突细胞、单核细胞或自然杀伤细胞结合。

在本发明优选的实施方案中，人 IRTA-5 包含具有如 SEQ ID NO: 37 [Genbank 登录号 AAL60250] 所示氨基酸序列的多肽；人 IRTA-1 包含具有如 SEQ ID NO: 38 [Genbank 登录号 NP_112572] 所示氨基酸序列的多肽；人 IRTA-2 包含具有如 SEQ ID NO: 39 [Genbank 登录号 NP_112571] 所示氨基酸序列的多肽；人 IRTA-3 包含具有如 SEQ ID NO: 40 [Genbank 登录号 AAL59390] 所示氨基酸序列的多肽；和/或人 IRTA-4 包含具有如 SEQ ID NO: 41 [Genbank 登录号 AAL60249] 所示氨基酸序列的多肽。

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 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合；
- (b) 基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合；且
- (c) 与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合，但是基本不与 CD3+ 外周血 T 细胞、CD1A+ 外周血树突细胞、CD14+ 外周血单核细胞、或 CD56+ 外周血自然杀伤细胞结合。

优选地，该抗体为人抗体，但是在替代实施方案中，该抗体可以是鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

在更优选的实施方案中，该抗体以 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合，以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合，以 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合，以 $0.05 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合，以介于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 之间的 K_D 与人 IRTA-5 结合。

在另一优选实施方案中，B 细胞肿瘤系选自 Daudi、Ramos 和 SU-DHL-4 细胞系。

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 IRTA-5，包括：

- (a) 包含选自 SEQ ID NO: 19、20 和 21 的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含选自 SEQ ID NO: 22、23 和 24 的氨基酸序列的轻链可变区。

在不同实施方案中，参比抗体包括：

- (a) 包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的轻链可变区；

或者参比抗体包括：

- (a) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列的轻链可变区；

或者参比抗体包括：

- (a) 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列的重链可变区；和
- (b) 包含 SEQ ID NO: 24 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，包含产自或源自人 V_H 3-33 基因的重链可变区，其中该抗体特异性结合 IRTA-5。本发明也提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，包含产自或源自人 V_H DP44 基因、人 V_H 3-23 基因、或人 V_H 3-7 基因的重链可变区，其中该抗体特异性结合 IRTA-5。本发明还提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，包含产自或源自人 V_K L6 基因的轻链可变区，其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

在一个优选实施方案中,本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,包含:

(a) 人 V_H 3-33、 V_H DP44、 V_H 3-23、或 V_H 3-7 基因的重链可变区;和

(b) 人 V_K L6 基因的轻链可变区;

其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

在一个优选实施方案中,所述抗体包含人 V_H 3-33 基因的重链可变区和人 V_K L6 基因的轻链可变区。在另一个优选实施方案中,所述抗体包含人 V_H DP44 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: 7、8 和 9 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: 16、17 和 18 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列,

(c) 该抗体以 $5 \times 10^{-8} M$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合;

(d) 该抗体基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合;且

(e) 该抗体与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合,但是基本不与 CD3+外周血 T 细胞、CD1A+外周血树突细胞、CD14+外周血单核细胞、或 CD56+外周血自然杀伤细胞结合。

优选地,重链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 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: 13、14 和 15 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。优选地,重链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO: 1、2 和 3 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: 10、11 和 12 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。

在一个优选实施方案中，B 细胞肿瘤系选自 Daudi、Ramos 和 SU-DHL-4 细胞系。

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: 19、20 和 21 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: 22、23 和 24 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列；

(c) 该抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合；

(d) 该抗体基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合；且

(e) 该抗体与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合，但是基本不与 CD3+ 外周血 T 细胞、CD1A+ 外周血树突细胞、CD14+ 外周血单核细胞、或 CD56+ 外周血自然杀伤细胞结合。

在优选实施方案中，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包括：

(a) 包含选自 SEQ ID NO: 1、2 和 3 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1；

(b) 包含选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2；

(c) 包含选自 SEQ ID NO: 7、8 和 9 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3；

(d) 包含选自 SEQ ID NO: 10、11 和 12 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1；

(e) 包含选自 SEQ ID NO: 13、14 和 15 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2；和

(f) 包含选自 SEQ ID NO: 16、17 和 18 的氨基酸序列的轻链可

变区 CDR3;

其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

一种优选的组合包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含 SEQ ID NO: 4 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 7 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 10 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 13 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 16 的轻链可变区 CDR3。

另一优选组合包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 2 的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含 SEQ ID NO: 5 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 8 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 11 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 14 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 17 的轻链可变区 CDR3。

再一优选组合包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 3 的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含 SEQ ID NO: 6 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 9 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 12 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 18 的轻链可变区 CDR3。

在另一个优选实施方案中, B 细胞肿瘤系选自 Daudi、Ramos 和 SU-DHL-4 细胞系。

本发明的其他优选抗体或其抗原结合部分含有:

- (a) 包含选自 SEQ ID NO: 19、20、21 和 36 的氨基酸序列的重链可变区; 和
- (b) 包含选自 SEQ ID NO: 22、23 和 24 的氨基酸序列的轻链可

变区；

其中该抗体特异性结合 IRTA-5。

一种优选的组合包括：

(a) 包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的重链可变区；和

(b) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的轻链可变区。

另一优选组合包括：

(a) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的重链可变区；和

(b) 包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列的轻链可变区。

再一优选组合包括：

(a) 包含 SEQ ID NO: 21 或 36 的氨基酸序列的重链可变区；和

(b) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的轻链可变区。

在本发明的另一方面，提供了与任何上述抗体竞争结合 IRTA-5 的抗体或其抗原结合部分。

本发明的抗体可以是，例如，如 IgG1 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 或 Fab'2 片段，或单链抗体。

本发明也提供一种免疫偶联物，其包含与治疗剂如细胞毒素或放射性同位素连接的本发明的抗体或其抗原结合部分。本发明也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。

本发明也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，和包含这些表达载体的宿主细胞。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。

另一方面，本发明提供一种为需要治疗的受试者治疗 B 细胞恶

性肿瘤的方法，包括向该受试者施用本发明的抗体或其抗原结合部分，从而使该受试者的 B 细胞恶性肿瘤得到治疗。这样的疾病可以是，例如，非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、滤泡性淋巴瘤、B 系弥散性大细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

本发明还提供根据此处提供的抗-IRTA-5 抗体序列制备“第二代”抗-IRTA-5 抗体的方法。例如，本发明提供一种制备抗-IRTA-5 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: 1、2 和 3 的 CDR1 序列、选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 的 CDR2 序列、和/或选自 SEQ ID NO: 7、8 和 9 的 CDR3 序列；和/或(ii)轻链可变区抗体序列，其包含选自 SEQ ID NO: 10、11 和 12 的 CDR1 序列、选自 SEQ ID NO: 13、14 和 15 的 CDR2 序列、和/或选自 SEQ ID NO: 16、17 和 18 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。

本发明的其他特征和优点通过下面的详述和实施例将是显而易见的，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 2G5 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 25)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 19)。划出了 CDR1(SEQ ID NO: 1)、CDR2(SEQ ID NO: 4)和 CDR3(SEQ ID NO: 7)区，并指出了 V、D 和 J 的种系来源。

图 1B 显示 2G5 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 28)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 22)。划出了 CDR1(SEQ ID NO: 10)、CDR2(SEQ ID NO: 13)和 CDR3(SEQ ID NO: 16)区，并指出了

V 和 J 的种系来源。

图 2A 显示 5A2 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 26)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 20)。划出了 CDR1(SEQ ID NO: 2)、CDR2(SEQ ID NO: 5)和 CDR3(SEQ ID NO: 8)区, 并指出了 V 和 J 的种系来源。

图 2B 显示 5A2 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 29)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 23)。划出了 CDR1(SEQ ID NO: 11)、CDR2(SEQ ID NO: 14)和 CDR3(SEQ ID NO: 17)区, 并指出了 V 和 J 的种系来源。

图 3A 显示 7G8 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 27)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 21)。划出了 CDR1(SEQ ID NO: 3)、CDR2(SEQ ID NO: 6)和 CDR3(SEQ ID NO: 9)区, 并指出了 V 和 J 的种系来源。

图 3B 显示 7G8 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO: 30)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 24)。划出了 CDR1(SEQ ID NO: 12)、CDR2(SEQ ID NO: 15)和 CDR3(SEQ ID NO: 18)区, 并指出了 V 和 J 的种系来源。

图 4 显示 2G5 和 5A2 的重链可变区氨基酸序列与人种系 V_H3-33 氨基酸序列(SEQ ID NO: 31)的比对。

图 5 显示 7G8 的重链可变区氨基酸序列与人种系 V_HDP44 氨基酸序列(SEQ ID NO: 32)的比对。

图 6 显示 2G5、5A2 和 7G8 的轻链可变区氨基酸序列与人种系 V_KL6 氨基酸序列(SEQ ID NO: 33)的比对。

图 7 显示 7G8 的重链可变区(SEQ ID NO: 21)和被称为 7G8(mut) 的 7G8 重链可变区突变形式的氨基酸序列与人种系 V_HDP44、V_H3-33 和 V_H3-7 氨基酸序列(分别为 SEQ ID NO: 32、34 和 35)的比对。

图 8 显示基于 BIAcore 分析的抗-IRTA-5 抗体的表位分组。

图 9 显示证明抗人 IRTA-5 的人单克隆抗体 4B7、2G1、7F5、7G8、5A2、1E5 和 2G5 特异性结合人 IRTA-5 的实验结果。

图 10A 显示流式细胞实验结果,证明抗人 IRTA-5 的人单克隆抗体 2G5 和 7G8 与 CD19+ B 细胞结合。

图 10B 显示流式细胞实验结果,证明抗人 IRTA-5 的人单克隆抗体 2G5 和 7G8 不与 CD3+外周血 T 细胞、CD1A+外周血树突细胞、CD14+外周血单核细胞、或 CD56+外周血 NK 细胞结合。

图 11 显示直方图,证明抗人 IRTA-5 的人单克隆抗体 2G2 特异性结合 B 细胞来源的肿瘤细胞系的细胞表面。

图 12 显示流式细胞实验结果,证明抗人 IRTA-5 的人单克隆抗体 2G5 与 B 细胞肿瘤系 Karpas 1106P、SU-DHL-4、Granta 519 和 L-540 结合。

发明详述

本发明涉及特异性结合 IRTA-5 并且抑制 IRTA-5 的功能特性的分离的单克隆抗体,特别是人单克隆抗体。在某些实施方案中,本发明的抗体源自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。本发明还涉及使用该抗体的方法,例如用于检测 IRTA-5,以及治疗与 IRTA-5 表达有关的疾病,如表达 IRTA-5 的 B 细胞恶性肿瘤。因此,本发明也提供使用本发明的抗-IRTA-5 抗体治疗 B 细胞恶性肿瘤的方法,例如治疗非何杰金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、滤泡性淋巴瘤、B 系弥漫性大细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

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“免疫球蛋白超家族受体易位相关基因 5”和“IRTA-5”可互换使用,包括人 IRTA-5 的变体、同种型和物种同源物。因此,本发明的人抗体在某些情况下可与来自人类以外物种的 IRTA-5 交叉反应。在其他情况下,该抗体对于人 IRTA-5 可能是完全特异性的,并且可

能不表现出物种或其他类型的交叉反应性。人 IRTA-5 的完整氨基酸序列的 Genbank 登录号为 AAL60250 (SEQ ID NO: 37)。

术语“IRTA-1”、“IRTA-2”、“IRTA-3”和“IRTA-4”分别包括人“IRTA-1”、“IRTA-2”、“IRTA-3”和“IRTA-4”的变体、同种型和物种同源物。人 IRTA-1 的完整氨基酸序列的 Genbank 登录号为 NP_112572 (SEQ ID NO: 38)。人 IRTA-2 的完整氨基酸序列的 Genbank 登录号为 NP_112572 (SEQ ID NO: 39)。人 IRTA-3 的完整氨基酸序列的 Genbank 登录号为 AAL59390 (SEQ ID NO: 40)。人 IRTA-4 的完整氨基酸序列的 Genbank 登录号为 AAL60249 (SEQ ID NO: 41)。

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,导致选择性损伤、破坏或从人体中清除侵入的病原体、感染有病原体的细胞或组织、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递中起作用的多种信号转导分子之间的生化关系。如此处所用的,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 IRTA-5 受体。

这里提到的术语“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。 V_H 和 V_L 均由三个 CDR 和四个 FR 组成,它们从氨基端至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,包括与免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)的结合。

如此处所用的,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留特异性结合抗原(例如 IRTA-5)的能力的抗体的一个或多个片段。已显示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)由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的 Fd 片段;(iv)由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段;(v)由 V_H 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等(1989) *Nature* 341:544-546);和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由分别的基因编码,但是它们可以利用重组方法通过合成接头连接在一起,从而能够将它们制备成一条蛋白质链,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。

如此处所用的“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,特异性结合 IRTA-5 的分离的抗体基本不含特异性结合除 IRTA-5 以外的抗原的抗体)。但是,分离的特异性结合 IRTA-5 的抗体与其他抗原如来自其他物种的 IRTA-5 分子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。

如此处所用的术语“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。单克隆抗体组合物对特定表位表现

出单一结合特异性和亲和性。

如此处所用的术语“人抗体”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，则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包含不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，如此处所用的术语“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”是指显示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。

如此处所用的术语“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切为其他 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受体外诱变（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源自人种系 V_H 和 V_L 序列并与之相关，但可能不是在体内人抗体种系所有组成成分（repertoire）中天然存在的。

如此处所用的，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“特异性

结合抗原的抗体”可互换使用。

如此处所用的，术语“特异性结合人 IRTA-5”的抗体是指以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、更优选 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、甚至更优选 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合的抗体。

如此处所用的术语“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率，而如此处所用的术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如此处所用的术语“ 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 值可能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。

如此处所用的，术语 IgG 抗体的“高亲和力”是指抗体对于靶抗原的 K_D 为 10^{-8}M 或更低、更优选 10^{-9}M 或更低、甚至更优选 10^{-10}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^{-7}M 或更低、更优选 10^{-8}M 或更低的 K_D 。

如此处所用的，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，如非人类灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖类动物、爬行类动物等。

本发明的各个方面在下面的部分中进一步详细描述。

抗-IRTA-5 抗体

本发明的抗体，包括具有特定种系序列的抗体、同源抗体、具有保守修饰的抗体，工程化的和修饰的抗体，用抗体的特定功能特征或特性来表征。例如，这些抗体特异性结合人 IRTA-5。优选地，本发明的抗体以高亲和力与 IRTA-5 结合，例如 K_D 为 10^{-8}M 或更低、或 10^{-9}M 或更低、或甚至 10^{-10}M 或更低。本发明的抗-IRTA-5 抗体优选地表现出以下一种或多种特性：

- (a) 以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合；

(b) 基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合；和/或

(c) 与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合，但是基本不与 CD3+ 外周血 T 细胞、CD1A+ 外周血树突细胞、CD14+ 外周血单核细胞、或 CD56+ 外周血自然杀伤细胞结合。

更优选地，该抗体以 $3 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D ，或以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D ，或以 $0.1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D ，或以 $0.05 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D ，或以介于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 至 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 之间的 K_D 与人 IRTA-5 结合。

在一个特定实施方案中，抗-IRTA-5 抗体具有举例说明的抗体 2G5、5A2、7G8、1E5、7F5、4B7 或 2G1 的特征，如实施例所述。在另一实施方案中，抗-IRTA-5 抗体与 2G5、5A2、7G8、1E5、7F5、4B7 或 2G1 中的一种或多种竞争结合 IRTA-5。

评价抗体对 IRTA-5 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 印迹分析和 RIA。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 Biacore 分析来评价。

本发明的抗体当对 IRTA-5 比对其他 IRTA 之一具有高于约 10:1，优选高于约 100:1 的选择性时，其“基本”不与 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3、或 IRTA-4 结合。

单克隆抗体 2G5、5A2 和 7G8

本发明优选的抗体是如实施例 1 和 2 所述分离并进行结构表征的人单克隆抗体 2G5、5A2 和 7G8。2G5、5A2 和 7G8 的 V_H 氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 19、20 和 21 中。2G5、5A2 和 7G8 的 V_L 氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 22、23 和 24 中。

假定这些抗体中的每一个都能够与 IRTA-5 结合，则 V_H 和 V_L 序列可以“混合并匹配”，以产生本发明的其他的抗-IRTA-5 结合分子。IRTA-5 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 ELISA）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。例如，2G5 和 5A2 的 V_H 和 V_L 序列特别适合混合并匹配，因为这些抗体使用源自相同种系序列（ V_H 3-33 和 V_L 6）的 V_H 和 V_L 序列，因此它们显示结构相似性。

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: 19、20 和 21 的氨基酸序列的重链可变区；和

(b) 包含选自 SEQ ID NO: 22、23 和 24 的氨基酸序列的轻链可变区；

其中该抗体特异性结合 IRTA-5，优选人 IRTA-5。

优选的重链和轻链组合包括：

(a) 包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列的轻链可变区；或

(a) 包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含 SEQ ID NO: 23 的氨基酸序列的轻链可变区；或

(a) 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列的重链可变区；和(b) 包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的轻链可变区。

在另一方面，本发明提供包含 2G5、5A2 和 7G8 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 或其组合的抗体。2G5、5A2 和 7G8 的 V_H CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 1、2 和 3 中。2G5、5A2 和 7G8 的 V_H CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 4、5 和 6 中。2G5、5A2 和 7G8 的 V_H CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 7、8 和 9 中。2G5、5A2 和 7G8 的 V_L CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 10、11 和 12 中。2G5、5A2 和 7G8 的 V_L CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 13、14 和 15 中。2G5、5A2 和 7G8 的 V_L CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 16、17 和 18 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) 划出。

假如这些抗体均能与 IRTA-5 结合, 并且抗原结合特异性主要是由 CDR1、2 和 3 区提供的, 则 V_H CDR1、CDR 2 和 CDR 3 序列与 V_L 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-IRTA-5 结合分子。IRTA-5 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所述的结合试验(例如 ELISA, Biacore 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。例如, 2G5、5A2 和 7G8 的 V_H CDR1 具有一定的结构相似性, 因此适于混合并匹配。对于本领域技术人员而言显而易见的, 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 2G5、5A2 和 7G8 的 CDR 序列的结构相似的序列, 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: 1、2 和 3 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含选自 SEQ ID NO: 7、8 和 9 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含选自 SEQ ID NO: 10、11 和 12 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含选自 SEQ ID NO: 13、14 和 15 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2; 和

(f) 包含选自 SEQ ID NO: 16、17 和 18 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3;

其中该抗体特异性结合 IRTA-5, 优选人 IRTA-5。

在一个优选实施方案中, 该抗体包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 1 的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含 SEQ ID NO: 4 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 7 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 10 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 13 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 16 的轻链可变区 CDR3。

在另一个优选实施方案中, 该抗体包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 2 的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含 SEQ ID NO: 5 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 8 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 11 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 14 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 17 的轻链可变区 CDR3。

在另一个优选实施方案中, 该抗体包括:

- (a) 包含 SEQ ID NO: 3 的重链可变区 CDR1;
- (b) 包含 SEQ ID NO: 6 的重链可变区 CDR2;
- (c) 包含 SEQ ID NO: 9 的重链可变区 CDR3;
- (d) 包含 SEQ ID NO: 12 的轻链可变区 CDR1;
- (e) 包含 SEQ ID NO: 15 的轻链可变区 CDR2; 和
- (f) 包含 SEQ ID NO: 18 的轻链可变区 CDR3。

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, 本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含产自或源自人 V_H 3-33 基因的重链可变区, 其中该抗体特异性结合 IRTA-5。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, 其包含产自或源自人 V_H DP44 基因、人 V_H 3-23 基因、或人 V_H 3-7 基因的重链可变区, 其中该抗体特异性结合 IRTA-5。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, 其包含产自或源自人 V_K L6 基因的轻链可变区, 其中该抗体特异性结合 IRTA-5。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) 包含产自或源自人 V_H 3-33、 V_H DP44、 V_H 3-23、或 V_H 3-7 基因 (分别编码 SEQ ID NO: 31、32、34 和 36 所示的氨基酸序列) 的重链可变区;

(b) 包含产自或源自人 V_K L6 基因 (编码 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列) 的轻链可变区; 且

(c) 特异性结合 IRTA-5, 优选人 IRTA-5。

分别具有 V_H 3-33 和 V_K L6 的 V_H 和 V_K 的抗体的例子包括 2G5 和 5A2。分别具有 V_H DP44 和 V_K L6 的 V_H 和 V_K 的抗体的一个例子是 7G8。如实施例 3 所述, 假如 V_H DP44 与 V_H 3-33 和 V_H 3-7 在结构上具有相关性, 则预期能够选择本发明的其他 IRTA-5 抗体, 它们利用源自这些其他种系序列中任一种的 V_H 区。

如此处所用的, 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, 则该抗体包含“产自”或“源自”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。“产自”或“源自”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 (即有最高%同一性) 的人种系免疫球蛋白序列。“产自”或“源自”特定人种

系免疫球蛋白序列的人抗体可能包含与该种系序列不同的氨基酸差异，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。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一般至少 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。一般来说，源自特定人种系序列的人抗体显示与该人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相差不超过 10 个氨基酸。在某些情况下，该人抗体可能显示与该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相差不超过 5 个、或者甚至不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸。

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-IRTA-5 抗体的需要的功能特性。

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: 19、20 和 21 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: 22、23 和 24 的氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列；

(c) 该抗体以 5×10^{-8} M 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合；

(d) 该抗体基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合；且

(e) 该抗体与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合，但是基本不与 CD3+外周血 T 细胞、CD1A+外周血树突细胞、CD14+外周血单核细胞、或 CD56+外周血自然杀伤细胞结合。

在各种实施方案中，该抗体可以是，例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

在另外的实施方案中， 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: 25、26、27、28、29或30的核酸分子，然后用此处所述的功能试验检测编码的改变抗体保留的功能（即以上(c)和(d)所述的功能）。

如此处所用的，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，本发明的蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”来对公共数据库进行检索，例如用来鉴定相关序列。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 2G5、5A2 或 7G8)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-IRTA-5 抗体的需要的功能特性。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: 7、8 和 9 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: 16、17 和 18 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列,

(c) 该抗体以 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合;

(d) 该抗体基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合; 且

(e) 该抗体与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合, 但是基本不与 CD3+外周血 T 细胞、CD1A+外周血树突细胞、CD14+外周血单核细胞、或 CD56+外周血自然杀伤细胞结合。

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: 4、5 和 6 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: 13、14 和 15 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: 1、2 和 3 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: 10、11 和 12 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，该抗体可以是，例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

如此处所用的，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征的氨基酸修饰。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，并且可以用此处所述的功能试验检测改变的抗体保留的功能（即以上(c)至(j)所述的功能）。

与本发明的抗-IRTA-5 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何 IRTA-5 单克隆抗体结合相同表位的抗体（即能够与本发明的任何单克隆抗体交叉竞争结合 IRTA-5 的抗体）。7 种抗-IRTA-5 抗体（2G5、5A2、7G8、4B7、7F5、4B7 和 2G1）的表位作图已经通过 Biacore 分析确定（见实施例 4），已经证明这些抗体落入 3 个表位组，这些表位组在图 8 中示意说明。本发明包括落入这些表位组中任一个的抗-IRTA-5 抗体，这些抗体能够使用以上确定的抗体通过交叉竞争研究来确定。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 2G5（具有如 SEQ ID NO: 19 和 22 所示的 V_H 和 V_L 序列），单克隆抗体 5A2（具有如 SEQ ID NO: 20 和 23 所示的 V_H 和 V_L 序列），

或单克隆抗体 7G8 (具有如 SEQ ID NO: 21 和 24 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 IRTA-5 结合测定中与 2G5、5A2 或 7G8 交叉竞争的能力来鉴定。例如,可以利用 BIAcore 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。测试抗体抑制例如 2G5、5A2 或 7G8 与人 IRTA-5 结合的能力证明,该测试抗体可以与 2G5、5A2 或 7G8 竞争结合人 IRTA-5,因此与 2G5、5A2 或 7G8 相同地结合人 IRTA-5 上相同的表位。在一个优选实施方案中,与 2G5、5A2 或 7G8 相同地结合人 IRTA-5 上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(engineered)和修饰的抗体

本发明的抗体还可以如下制备: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,工程化一种修饰的抗体,该修饰的抗体可能具有与起始抗体相比改变的特性。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工程化抗体。另外,或者,可以通过修饰恒定区内的残基来工程化抗体,例如改变该抗体的效应功能。

可以实施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 等人的美国专利 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: 1、2 和 3、SEQ ID NO: 4、5 和 6 和 SEQ ID NO: 7、8 和 9 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: 10、11 和 12、SEQ ID NO: 13、14 和 15 和 SEQ ID NO: 16、17 和 18 的氨基酸序列。因此,这些抗体含有单克隆抗体 2G5、5A2 或 7G8 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 91-3242; 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 (人种系 V_H 序列的全部组成成分揭示了具有不同高变环的大约 50 个 V_H 区段组)” *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 (人种系 V_H 区段目录揭示其应用的强烈偏好)” *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; 其内容均在此引用作为参考。

用于本发明抗体的优选构架序列在结构上类似于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 3-33 序列(SEQ ID NO: 31)和/或 V_H DP44 序列(SEQ ID NO: 32)和/或 V_H 3-23 序列(SEQ ID NO: 34)和/或 V_H 3-7 序列(SEQ ID NO: 35)和/或 V_K L6 构架序列(SEQ ID NO: 33)。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，从而引入突变，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。优选地引入（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-IRTA-5 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: 1、2 和 3 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 1、2 和 3 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: 4、5 和 6 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 4、5 和 6 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: 7、8 和 9 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 7、8 和 9 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: 10、11 和 12 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 10、11 和 12 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: 13、14 和 15 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 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；和(f) V_K CDR3 区，其包含选自 SEQ ID NO: 16、17 和 18 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16、17 和 18 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该抗体的来源种系序列不同的构架残基。通过比较抗体构架序列与该抗体的来源种系序列，可以鉴定这些残基。例如，对于 2G5， V_H 的氨基酸残基#4 (FR1 内) 是缬氨酸，而在相应的 V_H 3-33 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，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，5A2 的 V_H 的 FR1 的残基 4 可以从缬氨酸“回复突变”为亮氨酸）。

另一个例子是，对于 7G8， V_H 的氨基酸残基#1 (FR1 内) 是天冬氨酸，而在相应的 V_H DP44 种系序列中该残基为谷氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将 7G8 的 V_H 的残基#1 从天冬氨酸“回复突变”为谷氨酸。这种“回复突变”的抗体也包括在本发明内。

另一个例子是，对于 7G8， V_H 的氨基酸残基#3 (FR1 内) 是组氨酸，而在相应的 V_H DP44 种系序列中该残基为谷氨酰胺。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将 7G8 的 V_H 的残基#3 从组氨酸“回复突变”为谷氨酰胺。这种“回复突变”的抗体也包括在本发明内。

另一个例子是，对于 7G8， V_H 的氨基酸残基#37 (FR2 内) 是异亮氨酸，而在相应的 V_H DP44 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，例如，可以将 7G8 的 V_H 的残基#37 (FR2 的残基#2) 从异亮氨酸“回复突变”为缬氨酸。这种“回复突变”的抗体也包括在本发明内。

另一个例子是，对于 7G8， V_H 的氨基酸残基#44 (FR2 内) 是天冬氨酸，而在相应的 V_H DP44 种系序列中该残基为甘氨酸。为了使构架区序列恢复为其种系构型，例如，可以将 7G8 的 V_H 的残基#44

(FR2 的残基#9)从天冬氨酸“回复突变”为甘氨酸。这种“回复突变”的抗体也包括在本发明内。

另一个例子是,对于 2G5, V_K 的氨基酸残基#85 (FR3 内)是亮氨酸,而在相应的 V_K L6 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,例如,可以将 2G5 的 V_K 的残基#85 (FR3 的残基#29)从亮氨酸“回复突变”为缬氨酸。这种“回复突变”的抗体也包括在本发明内。

在一个优选实施方案中,7G8 的 V_H 内的某些残基被突变为与其他人种系序列中的残基相同或相似的残基(实施例 3 中进一步讨论)。例如,本发明也提供了 7G8(mut)的重链可变区,其中位点 13 的组氨酸被突变为赖氨酸或谷氨酰胺,位点 87 的甲硫氨酸被突变为苏氨酸。7G8(mut)的 V_H 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36 所示。因此,在另一实施方案中,本发明提供一种抗体,其包括含 SEQ ID NO: 36 的氨基酸序列的重链可变区,和含 SEQ ID NO: 22、23 或 24、优选 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列的轻链可变区。

另一种类型的构架修饰涉及对构架区内、或者甚至一个或多个 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 等人的公布号为 20030153043 的美国专利中详细记载。

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,也可以将本发明的抗体工程化为在 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,本发明的抗体也可以化学修饰(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 等人的美国

专利 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 等人的美国专利 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，可以引入一个或多个如下突变：T252L、T254S、T256F，如 Ward 的美国专利 6,277,375 所述。或者，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，如 Presta 等人的美国专利 5,869,046 和 6,121,022 所述。

在其他实施方案中，通过将至少一个氨基酸残基替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替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。对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 等人的美国专利号 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替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 等人的美国专利号 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 等人的 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, 并且已经描述了结合得到改善的变体(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, 修饰抗体的糖基化。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。这样的糖基化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, 导致一个或多个可变区构架糖基化位点消失, 从而消除了该位点处的糖基化。这种糖基化可以提高抗体对抗原的亲和力。这种方法在 Co 等人的美国专利号 5,714,350 和 6,350,861 中更详细地描述。

另外, 或者, 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。这种糖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, 能够用作在其中表达本发明的重组抗体的宿主细胞, 从而产生糖基化改变的抗体。例如, 细胞系 Ms704、Ms705 和 Ms709 缺乏岩藻糖转移酶基因 FUT8 ($\alpha(1,6)$ 岩藻糖转移酶), 因此在 Ms704、Ms705 和 Ms709 细胞系中表达的抗体在其碳水化合物上缺乏岩藻糖。Ms704、Ms705 和 Ms709 FUT8^{-/-}细胞系是通过用两种替换载体定向破坏 CHO/DG44 细胞中的 FUT8 基因而产生的(参见, Yamane

等的美国专利公开号 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 FUT8 基因功能被破坏的细胞系, 该基因编码岩藻糖转移酶, 因此由于减少或清除了 α 1,6 键相关的酶, 这种细胞系中表达的抗体表现为低岩藻糖基化。Hanai 等还描述了具有低酶活性或者没有酶活性的细胞系, 例如大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0 (ATCC CRL 1662), 该酶活性用于向可与抗体 Fc 区结合的 N-乙酰葡萄糖胺上添加岩藻糖。Presta 的 PCT 公布 WO 03/035835 记载了一种变异 CHO 细胞系, Lec13 细胞, 其使岩藻糖连接到 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的低岩藻糖基化(参见, Shields, R.L.等(2001) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740)。Umana 等人的 PCT 公布 WO 99/54342 记载了表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如 β (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)。或者, 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 基团将与抗体或抗体片段连接的条件, 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。如此处所用的, 术语“聚乙二醇”意在包括用于将其他蛋白质衍生化的任何 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, 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 等人的 EP 0 154 316 和 Ishikawa 等人的 EP 0 401 384。

将抗体进行工程化的方法

如上所述,通过修饰 V_H 和/或 V_K 序列或与之连接的恒定区,能够利用具有此处公开的 V_H 和 V_K 序列的抗-IRTA-5 抗体产生新的抗-IRTA-5 抗体。因此,在本发明的另一方面,本发明的抗-IRTA-5 抗体,例如 2G5、5A2 或 7G8 的结构特征,用来产生结构上相关的抗-IRTA-5 抗体,该结构相关的抗体保留本发明抗体的至少一种功能特性,如与人 IRTA-5 结合。如上所述,例如,2G5、5A2 或 7G8 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-IRTA-5 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,不必实际制备(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-IRTA-5 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: 1、2 和 3 的 CDR1 序列、选自 SEQ ID NO: 4、5 和 6 的 CDR2 序列、和/或选自 SEQ ID NO: 7、8 和 9 的 CDR3 序列; 和/或(ii)轻链可变区抗体序列,其包含选自 SEQ ID NO: 10、11 和 12 的 CDR1 序列、选自 SEQ ID NO: 13、14 和 15 的 CDR2 序列、和/或选自 SEQ ID NO: 16、17 和 18 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改变的抗体序列。

优选地,由改变的抗体序列编码的抗体保留此处所述抗-IRTA-5 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 5×10^{-8} M 或更低的 K_D 与人 IRTA-5 结合;
- (ii) 基本不与人 IRTA-1、IRTA-2、IRTA-3 和 IRTA-4 结合; 并且/或者
- (iii) 与人 B 淋巴细胞和 B 细胞肿瘤系结合, 但是基本不与 CD3+ 外周血 T 细胞、CD1A+ 外周血树突细胞、CD14+ 外周血单核细胞、或 CD56+ 外周血自然杀伤细胞结合。

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-IRTA-5 抗体编码序列随机或选择性引入突变, 并可以根据结合活性和/或如此处所述的其他功能特性, 筛选获得的修饰的抗-IRTA-5 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 等人的 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。当通过标准技术, 包括碱/SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其他方法, 从其他细胞成分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白质中分离纯化时, 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），编码该抗体的核酸可以从文库中获得。

本发明优选的核酸分子是编码 2G5、5A2 或 7G8 单克隆抗体的 VH 和 VL 序列的核酸分子。编码 2G5、5A2 和 7G8 的 VH 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO: 25、26、27 中。编码 2G5、5A2 和 7G8 的 VL 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO: 28、29、30 中。

一旦获得编码 VH 和 VL 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，转化为 Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中，将编码 VL 或 VH 的 DNA 片段与编码另外一种蛋白质如抗体恒定区或柔性接头的另一个 DNA 片段可操作地连接。如在本文中使用的，术语“可操作地连接”意思是将两个 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在阅读框内。

通过将编码 VH 的 DNA 与编码重链恒定区（CH1、CH2 和 CH3）的另外一种 DNA 分子可操作地连接，可以将分离的编码 VH 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 91-3242），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 VH 的 DNA 可以与只编码重链 CH1 恒定区的另外一种 DNA 分子可操作地连接。

通过将编码 VL 的 DNA 与编码轻链恒定区 CL 的另外一种 DNA 分子可操作地连接，可以将分离的编码 VL 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 91-3242), 包括这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区, 但是最优选的是 κ 恒定区。

为了产生 scFv 基因, 将编码 VH 和 VL 的 DNA 片段与编码柔性接头例如编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃的另外一个片段可操作地连接, 使得 VH 和 VL 序列可以表达为连续的单链蛋白质, 其 VL 和 VH 区通过该柔性接头连接(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

通过多种技术能制备本发明的单克隆抗体(mAb), 包括常规的单克隆抗体方法, 例如, Kohler 和 Milstein (1975) Nature 256: 495 所述的标准化细胞杂交技术。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。

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。免疫程序和用于融合的被免疫脾细胞的分离技术是本领域公知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是公知的。

本发明的嵌合或人源化抗体可以根据如上所述制备的鼠单克隆抗体的序列制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的 DNA 可以从目标鼠杂交瘤中获得, 并且使用标准分子生物学技术将其工程化为含有非鼠(例如人类)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 等人的美国专利 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 5,225,539, 和 Queen 等人的美国专利 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 IRTA-5 的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称作 HuMab 小鼠[®]和 KM 小鼠[®]的小鼠, 并且在此通称作“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,从而产生高亲和性人 IgG κ 单克隆抗体(Lonberg, N.等(1994), 见上文; 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,详细描述于下面的文献中: Taylor, L.等(1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J.等(1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon 等(1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 3720-3724; Choi 等(1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, J.等(1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon 等(1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; 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在此引入作为参考。进一步参见, 美国专利 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; 都属于 Lonberg 和 Kay; 和 Surani 等人的美国专利 5,545,807; PCT 公布号 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 和 WO 99/45962, 都属于 Lonberg 和 Kay; 和 Korman 等人的 PCT 公布号 WO 01/14424。

在另一实施方案中,本发明的人抗体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。这种小鼠在此称为“KM 小鼠TM”,在 Ishida 等人的 PCT 公布 WO 02/43478 中详细描述。

再者,表达人免疫球蛋白基因的备选转基因动物系统在本领域中可以获得,并且能够用来产生本发明的抗-IRTA-5 抗体。例如,可以使用

一种称作 Xenomouse (Abgenix, Inc.)的备选转基因系统, 这种小鼠在例如 Kucherlapati 等人的美国专利 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备选转染色体动物系统在本领域中可以获得, 并且能够用来产生本发明的抗-IRTA-5 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。另外, 携带人重链和轻链转折染色体的牛在本领域中已经描述 (Kuroiwa 等(2002) Nature Biotechnology 20:889-894), 并且能够用来产生本发明的抗-IRTA-5 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 等人的美国专利 5,223,409; 5,403,484;和 5,571,698; Dower 等人的美国专利 5,427,908 和 5,580,717; McCafferty 等人的美国专利 5,969,108 和 6,172,197; 和 Griffiths 等人的美国专利 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 和 6,593,081。

本发明的人单克隆抗体也可以用 SCID 小鼠制备, 在该 SCID 小鼠中重构了人类免疫细胞, 因此在免疫时能够产生人类抗体应答。这种小鼠在例如 Wilson 等人的美国专利 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, 用纯化的或富集的 IRTA-5 抗原和/或重组 IRTA-5 或 IRTA-5 融合蛋白的制剂免疫该小鼠。优选地, 第一次输注时小鼠为 6-16 周龄。例如, 可以使用纯化的或重组的 IRTA-5 抗原的制剂(5-50 μ g)腹膜内免疫人 Ig 小鼠。

产生抗 IRTA-5 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眶后取血获得的血浆样品监测免疫应答。通过 ELISA (如下所述)筛选血浆，具有足够抗-IRTA-5 人免疫球蛋白效价的小鼠用于进行融合。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。预期每次免疫可能需要融合 2-3 次。每一种抗原一般免疫 6-24 只小鼠。通常 HCo7 和 HCo12 系都使用。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的一种小鼠 (HCo7/HCo12)。或者，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，从接受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，使用 50% PEG，将来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与六分之一数量的 P3X63-Ag8.653 非分泌小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1580)融合。细胞以大约 2×10^5 的密度接种于平底微量滴定板中，接着在含有 20% 胎克隆血清，18% “653” 条件基质，5% Origen (IGEN)，4 mM L-谷氨酰胺，1 mM 丙酮酸钠，5mM HEPES，0.055 mM 2-巯基乙醇，50 单位/毫升青霉素，50 mg/ml 链霉素，50mg/ml 庆大霉素和 $1 \times$ HAT (Sigma; 融合 24 小时后加入 HAT) 的选择性培养基中温育两周。大约两周之后，在用 HT 替换了 HAT 的培养基中培养细胞。然后通过 ELISA 针对人单克隆 IgM 和 IgG 抗体筛选各孔。一旦发生广泛的杂交瘤生长，则通常在 10-14 天之后观察培养基。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亚克隆至少两次。然后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 测定浓度。可将单克隆抗体分成等份并且在 -80°C 下保存。

产生本发明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 技术与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的 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可操作地连接。在上下文中, 术语“可操作地连接”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别的载体中, 或者, 更通常地, 将两个基因插入到同一表达载体中。抗体基因通过标准方法插入到表达载体中(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, 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 区段可操作地连接, 而 V_K 区段与载体中的 C_L 区段可操作地连接, 此处描述的抗体的轻链和重链可变区能用来产生任何抗体同种型的全长抗体基因。另外, 或者, 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在阅读框内连接。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,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”意在包括启动子、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描述于 Goedel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))中。本领域技术人员应当认识到,表达载体的设计,包括调节序列的选择,可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哺乳动物细胞中高水平蛋白质表达的病毒元件,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。此外也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不同来源的序列组成,例如 SR α 启动子系统,其含有来自 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,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,美国专利 4,399,216, 4,634,665 和 5,179,017,都属于 Axel 等人)。例如,选择性标记基因一般给其中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)。

对于轻链和重链的表达,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”的各种形式意在包括常用于将外源 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。虽然理论上有可能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表达抗体,最优选在哺乳动物宿主细胞中表达,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。已经报道抗体基因的原核表达无法高产量地产生生活性抗体(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 dhfr- CHO 细胞, 于 Urlaub 和 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220 中描述, 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允许在宿主细胞中表达抗体的一段时间, 或更优选地, 足以使抗体分泌到培养宿主细胞的培养基中的一段时间, 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。

抗体与抗原结合的特征

通过例如标准 ELISA, 可以检测本发明的抗体与 IRTA-5 的结合。简要地说, 用 0.25 μ g/ml 的纯化 IRTA-5 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 IRTA-5 免疫小鼠的血浆的稀释液), 并且在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1-2 小时。培养板用 PBS/Tween 洗涤, 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 $^{\circ}$ C 下温育 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, 显示最高效价的小鼠用于融合。

如上所述的 ELISA 分析也可以用来筛选表现出与 IRTA-5 免疫原有阳性反应性的杂交瘤。将与 IRTA-5 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), 制备 5-10 小瓶细胞库, 在 -140 $^{\circ}$ C 下保存, 用于抗体纯化。

为了纯化抗-IRTA-5 抗体, 在用于单克隆抗体纯化的两升旋转摇瓶

中培养选择的杂交瘤。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 测定浓度。将单克隆抗体分成等份并且在 -80°C 下保存。

为了确定选择的抗-IRTA-5 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)将各种抗体生物素化。可以使用如上所述的 IRTA-5 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。

为了确定所纯化的抗体的同种型，可以用对特定同种型抗体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°C 下用 1 μ g/ml 抗人免疫球蛋白将微量滴定板的孔包被过夜。用 1% BSA 封闭之后，培养板与 1 μ g/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。如上所述使培养板显色并且分析。

可以通过 Western 印迹法进一步检测抗-IRTA-5 人 IgG 与 IRTA-5 抗原的反应性。简要地说，制备 IRTA-5 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，并用所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。

免疫偶联物

另一方面，本发明表述了与治疗性部分如细胞毒素、药物（例如免疫抑制剂）或放射性毒素偶联的抗-IRTA-5 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、表鬼白毒吡喃葡萄糖苷、表鬼白毒噻吩糖苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、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、氨烯咪胺(decarbazine))，烷化剂(例如，氮芥、thioepa 苯丁酸氮芥、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-二氯二胺铂(II) (DDP)顺铂)，氨基霉素类(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)。

可以利用本领域使用的接头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接头类型的实例包括但不限于脘、硫醚、酯、二硫化物和含肽的接头。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接头，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接头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，从而产生细胞毒性放射性药物，也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、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 Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) 和 Bexxar™ (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。这样的蛋白质可包括，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、白细胞介素-1 (“IL-1”)、白细胞介素-2 (“IL-2”)、白细胞介素-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。

用于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 (在癌症治疗中用于药物的免疫靶向的单克隆抗体)”，in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld 等(ed.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等，“Antibodies For Drug Delivery (用于给药的抗体)”，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 (癌症治疗中细胞毒剂的抗体载体：综述)”，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 (放射性标记抗体在癌症治疗中的治疗用途的分析、结果和未来前景)”，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 (抗体-毒素偶联物的制备和细胞毒性)”，*Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。

双特异性分子

另一方面，本发明表述了包含本发明的抗-IRTA-5 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功能性分子上，如另一种肽或蛋白质(例如另一种抗体或受体的配体)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种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此处所用的术语“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种或多种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，本发明包括包含至少一种对 IRTA-5 的第一结合特异性和对第二种目标表位的第二结合特异性的双特异性分子。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、FcαR 或 FcεR 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 IRTA-5 的靶细胞结合的双特异性分子。这些双特异性分子将表达 IRTA-5 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 IRTA-5 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-IRTA-5 结合特异性之外，该分子可进一步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并因而增强对靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是与特定分子如抗原或受体结合，并因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。或者，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(如通过导致抗靶细胞免疫应答增强的 CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1 或其他免疫细胞)。

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,包括如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或单链 Fv。抗体也可以是轻链或重链二聚体,或任何其最小片段,如 Fv 或单链构建体,如 Ladner 等人的美国专利号 4,946,778 所述,该专利的内容引入作为参考。

在一个实施方案中,对 Fc γ 受体的结合特异性由单克隆抗体提供,其结合不被人免疫球蛋白 G (IgG)阻断。如此处所用的,术语“IgG 受体”是指位于染色体 1 上的 8 个 γ -链基因的任何个。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 受体类型: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 等人在 PCT 申请 WO 88/00052 和美国专利号 4,954,617 中描述,在此处将其教导整体引入作为参考。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。在另外的实施方案中,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 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,其结合优选地不被人免疫球蛋白 A (IgA)阻断。术语“IgA 受体”意在包括位于染色体 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 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$),在暴露于细胞因子如G-CSF或GM-CSF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,标识为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)主要表达于免疫效应细胞,如单核细胞、PMN、巨噬细胞和树突细胞上;(2)以高水平表达(如每个细胞5,000-100,000个);(3)是细胞毒性活性(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,而可在本发明的双特异性分子中使用的其他抗体是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

本发明的双特异性分子可通过应用本领域中公知的方法偶联组分结合特异性,如抗-FcR和抗-IRTA-5结合特异性而制备。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,多种偶联剂或交联剂可用于共价偶联。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C-末端铰链区的巯基键合来偶联。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巯基残基，优选1个。

或者，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 x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 或配体 x Fab 融合蛋白质时，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。用于制备双特异性分子的方法在例如美国专利号 5,260,203、美国专利号 5,455,030、美国专利号 4,881,175、美国专利号 5,132,405、美国专利号 5,091,513、美国专利号 5,476,786、美国专利号 5,013,653、美国专利号 5,258,498 和美国专利号 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，可以利用如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，在此引入作为参考)。通过如使用 γ 计数器或闪烁计数器的方法或者通过放射自显影方法，能够检测放射性同位素。

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可与靶抗原上不同表位结合或具有互

补活性的组合的抗体(或免疫偶联物或双特异性剂)。

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-IRTA-5 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。

如此处所用的,“药物可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包被物、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,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被于一种材料中,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且不引起任何不想要的毒理学作用的盐(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无毒性无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等衍生的盐,以及由无毒性有机酸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、脂族和芳族磺酸等衍生的盐。碱加成盐包括那些由碱土金属如钠、钾、镁、钙等衍生的盐,以及由无毒性有机胺如 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，和可注射的有机酯如油酸乙酯。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。

这些组合物也可含有佐剂，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各种抗细菌和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚山梨酸等来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。

治疗组合物一般必须是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定。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、山梨糖醇或氯化钠。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)，由其前述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以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以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，剂量可以按比例减小或增加。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。

对于抗体给药，剂量范围为约 0.0001 至 100 mg/kg，更通常为 0.01 至 5 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。一个治疗方案的实例需要每周给药一次、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-IRTA-5 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，具有不同结合特异性的两种或多种单克隆抗体同时给药，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 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆抗体浓度，在一些方法中为约 25-300 $\mu\text{g/ml}$ 。

另外，抗体可以作为持续释放制剂给药，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，有时需要以较短的时间间隔给予较高的剂量，直到疾病的进展减轻或停止，优选直到患者显示疾病症状部分或完全改善。之后，患者可以以预防性方案给药。

本发明药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变，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。选择的剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素，包括所用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，所用特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与所用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-IRTA-5 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 IRTA-5+肿瘤的治疗，相对于未治疗的受试者，“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。另外，也可以通过本领域技术人员公知的试验检查该化合物的体外抑制能力，来评价组合物的这

种性能。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。本领域技术人员能够根据如下因素确定这种量，如受试者的大小、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。用于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。如此处所用的短语“肠胃外给药”是指不同于肠和局部给药的给药模式，通常是通过注射，包括但不局限于静脉内、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。

此外，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。

活性化合物可以使用保护化合物不被快速释放的载体制备，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是专利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，如在美国专利号 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。用于本发明的公知的植入物和组件的例子包括：美国专利号 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；美国专利号 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

号 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; 美国专利号 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; 美国专利号 4,439,196, 该专利公开了具有多腔区室的渗透药物递送系统; 和美国专利号 4,475,196, 该专利公开了一种渗透药物递送系统。这些专利在此引入作为参考。许多其他这样的植入物、递送系统和组件是本领域技术人员公知的。

在某些实施方案中, 可配制本发明的人单克隆抗体以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。脂质体可包含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 等人的美国专利 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. Killion; 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, 具有与诊断和治疗 IRTA-5 介导的疾病有关的许多体外和体内诊断和治疗应用。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, 以治疗、预防或诊断多种疾病。如此处使用的术语“受试者”包括人和非人动物。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 IRTA-5 活性介导的疾病的人类患者。这些方法特别适合治疗患有异常 IRTA-5 表达相关疾病的人类患者。当抗 IRTA-5 抗体与另一种药剂一起给药时，这两种药剂可以依次或同时给药。

假如与 IRTA-1、2、3、4 相比本发明的抗体特异性结合 IRTA-5，则本发明的抗体可以用来特异性检测细胞表面上的 IRTA-5 表达，而且能够用来通过免疫亲和纯化方法纯化 IRTA-5。

此外，假如 IRTA-5 在各种肿瘤细胞上表达，则本发明的人抗体、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，例如特征在于存在表达 IRTA-5 的肿瘤细胞的疾病，包括，例如，伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤（ALCL）、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瘤（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、卡波西肉瘤和其他 B 细胞淋巴瘤。

在一个实施方案中，本发明的抗体（例如人单克隆抗体、多特异性和双特异性分子和组合物）可以用于检测 IRTA-5 的水平或在其膜表面上含有 IRTA-5 的细胞的水平，然后可将该水平与特定疾病症状相关联。此外，这些抗体也可以用来抑制或阻断 IRTA-5 功能，然后可以将其与特定疾病症状的预防或缓解相关联，因此涉及 IRTA-5 作为疾病的介质。这可以如下实现，例如，在允许抗体与 IRTA-5 之间形成复合物的条件下，使样品和对照样品接触抗-IRTA-5 抗体。检测并比较样品和对照中抗体与 IRTA-5 之间形成的任何复合物。

在另一实施方案中，可以在开始时检测本发明的抗体（例如人抗体、多特异性和双特异性分子和组合物）与体外治疗或诊断应用相关的结合活性。例如，能够用以下实施例所述的流式细胞分析来

检测本发明的组合物。

本发明的抗体（例如人抗体、多特异性和双特异性分子、免疫偶联物和组合物）在 IRTA-5 相关疾病的治疗和诊断中具有另外的应用。例如，人单克隆抗体、多特异性或双特异性分子和免疫偶联物可以用来在体内或体外引发一种或多种下列生物活性：抑制表达 IRTA-5 的细胞的生长和/或将其杀死；介导表达 IRTA-5 的细胞在人效应细胞存在下的吞噬作用，或者阻断 IRTA-5 配体与 IRTA-5 的结合。

在一个特定实施方案中，本发明的抗体（例如人抗体、多特异性和双特异性分子和组合物）在体内用于治疗、预防或诊断多种 IRTA-5 相关疾病。IRTA-5 相关疾病的例子包括癌症、非何杰金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤（ALCL）、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、免疫母细胞性淋巴结瘤、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、卡波西肉瘤和其他 B 细胞淋巴瘤。

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-IRTA-5 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，或者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、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-IRTA-5 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。

靶特异性效应细胞，例如与本发明的组合物（例如人抗体、多特异性和双特异性分子）有关的效应细胞也可以用作治疗剂。用于靶向的效应细胞可以是人白细胞，如巨噬细胞、嗜中性粒细胞或单核细胞。其他细胞包括嗜酸性细胞、自然杀伤细胞和其他带有 IgG 或 IgA 受体的细胞。需要时，效应细胞可以从所治疗的受试者中获得。靶特异性效应细胞可以作为生理可接受溶液中的细胞悬浮液给药。施用的细胞数可以是 10^8 - 10^9 个，但是根据治疗目的而不同。通常，该量足以获得在靶细胞处如表达 IRTA-5 的肿瘤细胞处的集中，以及通过例如吞噬作用实现对细胞的杀伤。给药途径也可以不同。

应用靶特异性效应细胞的治疗可以与其他清除靶细胞的技术一起进行。例如，使用本发明的组合物（例如人抗体、多特异性和双特异性分子）和/或具有这些组合物的效应细胞的抗肿瘤治疗可以与化学治疗一起使用。另外，可以用联合免疫治疗将两种不同的细胞毒性效应群体导向肿瘤细胞排斥。例如，与抗-Fc- γ RI 或抗-CD3 连接的抗-IRTA-5 抗体可以与 IgG 或 IgA 受体特异性结合剂一起使用。

本发明的双特异性和多特异性分子也可以用来调节效应细胞上的 Fc γ R 或 Fc γ R 水平，例如通过对细胞表面上的受体加帽或将其清除。抗-Fc 受体的混合物也可以用于该目的。

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)，也能够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对含有靶细胞的细胞群体的离体处理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，本发明的组合物不活化补体。

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）也能够与补体一起施用。因此，在本发明的范围内包括含有人抗体、多特异性或双特异性分子和血清或补体的组合物。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接近。另外，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。

本发明范围内还包括药盒，其中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，如免疫抑制剂、细胞毒剂或放射性毒剂，或本发明的一种或多种另外的人抗体（例如，具有补充活性的人抗体，它所结合的 IRTA-5 抗原中的表位与第一人抗体不同）。

因此，可以对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）另外给予另一种治疗剂，如细胞毒剂或放射性毒剂，它们能够增强或增加人抗体的治疗效果。

在其他实施方案中，受试者可以另外用调节（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，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）也能够用来靶向表达 Fc γ R 或 IRTA-5 的细胞，例如用于标记这些细胞。

对于这种用途，可以将结合剂与能够被检测的分子连接。因此，本发明提供离体或在体外定位表达Fc受体如FcγR或IRTA-5的细胞的方法。可检测标记可以是，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IRTA-5抗原的存在，或测定IRTA-5抗原量的方法，包括在允许抗体或其部分与IRTA-5之间形成复合物的条件下使样品和对照样品接触特异性结合IRTA-5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之间复合物形成的不同表示样品中存在IRTA-5抗原。

在其他实施方案中，本发明提供通过对受试者施用上述人抗体治疗受试者的IRTA-5介导的疾病的方法，该疾病例如是癌症、非何杰金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤（ALCL）、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、免疫母细胞性淋巴结瘤、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、卡波西肉瘤和其他B细胞淋巴瘤。这些抗体及其衍生物用来抑制IRTA-5诱导的与某些疾病有关的活性，如增殖和分化。通过将抗体与IRTA-5接触（例如通过对受试者施用抗体），IRTA-5诱导这些活性的能力得到抑制，因此相关疾病得到治疗。抗体组合物可以单独给药或者与另一种治疗剂如细胞毒剂或放射性毒剂一起给药，该另一种治疗剂与抗体组合物联合或协同作用，以治疗或预防IRTA-5介导的疾病。

在另一实施方案中，通过将化合物与抗体连接，本发明的免疫偶联物可以用来将化合物（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IRTA-5细胞表面受体的细胞。因此，

本发明也提供用于离体或在体内定位表达 IRTA-5 的细胞(例如用可检测标记,如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)的方法。此外,免疫偶联物通过将细胞毒素或放射毒素靶向至 IRTA-5,也可以用来杀伤具有 IRTA-5 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在此引用作为参考。

实施例

实施例 1: 抗 IRTA-5 人单克隆抗体的产生

抗原

用标准重组方法制备由连接到异源多肽上的 IRTA-5 胞外域组成的融合蛋白,作为用于免疫的抗原。

转基因 HuMab 小鼠[®]

用转基因 HuMab 小鼠[®]的 HCo7 系小鼠制备抗 IRTA-5 的完全人单克隆抗体。在该小鼠系中,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。而且,该小鼠系携带如 Fishwild 等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851 所述的人 κ 轻链转基因 KCo5,和如美国专利 No. 5,545,806、5,625,825 和 5,545,807 所述的人重链转基因 Kco7。

HuMab 的免疫:

为了产生抗 IRTA-5 的完全人单克隆抗体,用纯化的重组 IRTA-5 融合蛋白免疫 HuMab 小鼠[®]系的小鼠,该融合蛋白是由用含有编码该融合蛋白的基因的表达载体转染的哺乳动物细胞产生的。用于 HuMab 小鼠[®]的一般性免疫方案由 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 描述。在第一次输注抗原时小鼠为 6-16 周龄。用纯化的重组 IRTA-5 抗原制剂(5-50 μg , 从表达 IRTA-5 融合蛋白的转染的哺乳动物细胞中纯化)腹膜内 (IP) 免疫 HuMab 小鼠TM。

转基因小鼠用完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原腹膜内免疫两次, 然后用不完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原腹膜内免疫 3-21 天 (最多可达总共 11 次免疫)。通过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), 具有足够的抗-IRTA-5 人免疫球蛋白效价的小鼠用于进行融合。用抗原经静脉内对小鼠进行加强免疫, 3 天后处死并取出脾脏。

产生抗-IRTA-5 抗体的 HuMab 小鼠TM 的选择

为了选择产生可与 IRTA-5 结合的抗体的 HuMab 小鼠TM, 开始时如 Fishwild, D.等(1996)所述通过改良 ELISA 检测来自被免疫的小鼠的血清。简要地说, 用纯化的重组 IRTA-5 融合蛋白, 在 PBS 中以 1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度, 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 的量, 包被微量滴定板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下温育过夜, 然后用 PBS 中的 5% BSA 以 200 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 封闭。将来自 IRTA-5 免疫的小鼠的血浆稀释液加入各孔中, 室温下温育 1-2 小时。培养板用 PBS/Tween 洗涤, 然后与碱性磷酸酶偶联的山羊抗人 κ 轻链多克隆抗体在室温下温育 1 小时。洗涤后, 培养板用 pNPP 底物显色, 并用分光光度计在 OD 415-650 处分析。显示最高抗-IRTA-5 抗体效价的小鼠用于进行融合。融合如下文所述进行, 通过 ELISA 检测杂交瘤上清液的抗-IRTA-5 活性。

产生抗 IRTA-5 人单克隆抗体的杂交瘤的产生

根据标准程序, 用 PEG 将从 HuMab 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) 将来自被免疫的小鼠的脾淋巴细胞单细胞悬液与 1/4 数量的 P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) 非

分泌型小鼠骨髓瘤细胞融合。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温育约两周，该培养基含有 10% 胎牛血清、补充 RPMI 中的 origen (IGEN)、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、HEPES、青霉素、链霉素、庆大霉素、 $1 \times$ HAT 和 β -巯基乙醇。1-2 周后，将细胞在用 HT 替代了其中的 HAT 的培养基中培养。然后通过 ELISA (如上所述) 针对人抗 IRTA-5 单克隆 IgG 抗体对各个孔进行筛选。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 IRTA-5 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小量的抗体用于进一步表征。

选择杂交瘤克隆 2G2、2G5、5A2、7G8、1E5、4B7 和 7F5 用于进一步的分析。

实施例 2: 人单克隆抗体 5A2、2G5 和 7G8 的结构表征

利用标准 PCR 技术分别从 2G5、5A2 和 7G8 杂交瘤中获得编码 2G5、5A2 和 7G8 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。

2G5 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: 25 和 19 中。

2G5 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: 28 和 22 中。

2G5 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，2G5 重链应用了来自人种系 V_H 3-33 的 V_H 区段、来自人种系 7-27 的 D 区段和来自人种系 JH 3b 的 JH 区段。2G5 V_H 序列与种系 V_H 3-33 序列的比对显示于图 4 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 2G5 V_H 序列的进一步分析划出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区，分别如图 1A 和 4 以及 SEQ ID NO: 1、4、7 所示。

2G5 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, 2G5 轻链应用了来自人种系 $V_K L6$ 的 VL 区段和来自人种系 JK 2 的 JK 区段。2G5 VL 序列与种系 $V_K L6$ 序列的比对显示于图 6 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 2G5 VL 序列的进一步分析划出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 1B 和 6 以及 SEQ ID NO: 10、13、16 所示。

5A2 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: 26 和 20 中。

5A2 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: 29 和 23 中。

5A2 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, 5A2 重链应用了来自人种系 $V_H 3-33$ 的 V_H 区段、未确定的 D 区段和来自人种系 JH 4b 的 JH 区段。5A2 V_H 序列与种系 $V_H 3-33$ 序列的比对显示于图 4 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 5A2 V_H 序列的进一步分析划出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 2A 和 4 以及 SEQ ID NO: 2、5、8 所示。

5A2 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, 5A2 轻链应用了来自人种系 $V_K L6$ 的 VL 区段和来自人种系 JK 1 的 JK 区段。5A2 VL 序列与种系 $V_K L6$ 序列的比对显示于图 6 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 5A2 VL 序列的进一步分析划出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 2B 和 6 以及 SEQ ID NO: 11、14、17 所示。

7G8 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: 27 和 21 中。

7G8 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: 30 和 24 中。

7G8 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, 7G8 重链应用了来自人种系 $V_H DP44$ 的 V_H 区段、未确定的 D 区段和来自人种系 JH 2 的 JH 区段。7G8 V_H 序列与种系 $V_H DP44$ 序列的比对显示于图 5 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 7G8

VH 序列的进一步分析划出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区，分别如图 3A 和 5 以及 SEQ ID NO: 3、6、9 所示。

7G8 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，7G8 轻链应用了来自人种系 $V_K L6$ 的 VL 区段和来自人种系 JK 1 的 JK 区段。7G8 VL 序列与种系 $V_K A27$ 序列的比对显示于图 6 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 7G8 VL 序列的进一步分析划出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区，分别如图 3B 和 6 以及 SEQ ID NO: 12、15、18 所示。

实施例 3：单克隆抗体 7G8 的突变和备选种系应用

如以上实施例 2 所述，单克隆抗体 7G8 应用了源自 HuMab 小鼠[®]系的 HCo7 转基因中存在的人 DP-44 种系序列的重链可变区。由于 DP-44 不是在幼稚人免疫球蛋白全部组成成分中应用的种系序列，将 7G8 的 VH 序列突变以降低潜在免疫原性可能是有利的。优选地，将 7G8 VH 序列的一个或多个构架残基突变为在幼稚人免疫球蛋白全部组成成分中应用的结构相关 VH 种系序列的构架中存在的残基。例如，图 7 显示了 7G8 VH 序列与 DP-44 种系序列以及与两个结构相关的人种系序列 VH 3-23 和 VH 3-7 的比对。假如这些序列具有相关性，则可以预测，人们可以选择特异性结合人 IRTA5 并且应用了来自 VH 3-23 或 VH 3-7 的 VH 区的人抗体。而且，人们可以将 7G8 VH 序列内与 VH 3-23 或 VH 3-7 序列中相应位点处的残基不同的一个或多个残基突变为存在于 VH 3-23 或 VH 3-7 中的残基，或者其保守氨基酸置换。例如，此处提供的 7G8 的一种优选突变形式被称为 7G8(mut)，具有图 7 和 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。在 7G8(mut) 中，氨基酸位点 13 处的组氨酸已经被突变为赖氨酸或谷氨酰胺，并且位点 87 处的甲硫氨酸已经被突变为苏氨酸。

实施例 4：抗-IRTA-5 人单克隆抗体的结合特异性和结合动力学的表征

在该实施例中，通过 Biacore 分析检测抗-IRTA-5 抗体的结合亲和力、结合动力学、结合特异性和交叉竞争。也通过流式细胞分析检测了结合特异性。

结合亲和力和动力学

通过 Biacore 分析 (Biacore AB, Uppsala, 瑞典) 表征抗-IRTA-5 抗体的亲和力和结合动力学。使用 Biacore 提供的标准酰胺偶联化学方法和试剂盒，将纯化的重组人 IRTA-5 融合蛋白与 CM5 芯片 (羧甲基葡聚糖包被的芯片) 通过伯胺共价连接。使 HBS EP 缓冲液 (Biacore AB 提供) 中浓度为 267nM 的抗体以 50 μ l/min 的流速流过，来检测结合。抗原-抗体结合动力学检测 5 分钟，解离动力学检测 8 分钟。用 BIAevaluation 软件 (Biacore AB) 将结合和解离曲线与 1:1 Langmuir 结合模型进行拟合。为了使结合常数测定中亲合力的影响最小化，拟合仅使用对应于结合和解离阶段的最初的数据。测定的 K_D 、 k_{on} 和 k_{off} 值显示在表 1 中。

表 1: IRTA-5 HuMAb 的 Biacore 结合数据

样品序号	样品标识号	亲和力 $K_D \times 10^{-9}$ (M)	结合速率 $k_{on} \times 10^5$ (1/Ms)	解离速率 $k_{off} \times 10^{-4}$ (1/s)
1	2G5	0.028	1.52	0.043
2	5A2	0.035	2.52	0.087
3	7G8	16.8	0.72	12.1
4	1E5	17.1	0.23	3.93
5	7F5	19.3	0.72	13.9
6	4B7	25.4	0.46	11.8
7	2G1	42.3	0.31	13.3

抗-IRTA-5 抗体的表位作图

利用 Biacore 确定抗-IRTA-5 HuMAb 的表位分组。用抗-IRTA-5 抗体 (2G5、5A2、7G8、4B7、7F5、4B7、2G1) 将它们在 IRTA5 上的表位作图。抗体 2G5、5A2 和 7G8 各以 8000 RU 包被在同一芯片的 3 个不同表面上。从 10 μ g/ml 开始制备上述 7 种 mAb 之每一个的稀释液, 与 IRTA5-Fc (50nM) 温育 1 小时。将温育的复合物同时注射到所有 3 个表面 (和空白表面) 上, 流速为 20 μ L/min, 注射时间为 1.5 分钟。1.5 分钟结束时, 减去适当空白后的每个表面的信号对复合物中 mAb 的浓度作图。数据分析后, 7 种抗-IRTA-5 抗体被归类为 3 个表位组——A 组, 包括 2G5、5A2 和 7G8; B1 组, 包括 7G8 和 1E5; B2 组, 包括 7F5、4B7 和 2G1。这 3 个表位组的组间关系在图 8 中示意说明。

经流式细胞术测定的结合特异性

开发了在细胞表面表达 5 种 IRTA 蛋白之一的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系, 并用来通过流式细胞术确定 IRTA5 HuMAb 的特异性。用含有编码跨膜形式 IRTA1、IRTA2、IRTA3、IRTA4 或 IRTA5 的全长 cDNA 的表达质粒转染 CHO 细胞。另外, 转染蛋白质在 N 末端含有表位标记, 用于通过该表位的特异性抗体进行检测。通过将转染的细胞与浓度为 10 μ g/ml 的每种 IRTA5 MAbs 温育, 评价 7 种抗 IRTA5 HuMAb 的结合。洗涤细胞, 用 FITC 标记的抗人 IgG Ab 检测其结合。用鼠抗表位标记抗体, 然后用标记的抗鼠 IgG, 作为阳性对照。非特异性人和鼠抗体作为阴性对照。结果显示在图 9 中。根据染色的平均荧光强度 (MFI) 测定, IRTA5 HuMAb 与 IRTA5 转染的 CHO 细胞系结合, 但是不与表达 IRTA1、2 或 4 的 CHO 系结合。随后, 表明 HuMAb 与表达 IRTA3 的 CHO 系没有特异性结合 (数据未显示)。这些数据证明了 HuMAb 对 IRTA5 的特异性。

实施例 5: IRTA-5 抗体与正常 B 细胞和 B 细胞来源的肿瘤系的结合

利用双色免疫荧光和流式细胞术证明 IRTA5 HuMAb 与外周血 B

细胞的结合。CD19 是能够用来区别外周血 B 淋巴细胞的细胞表面标记。人外周血单个核细胞与生物素化的 2G5、生物素化的 7G8 或同种型对照生物素化的人抗体一起温育。洗涤细胞，与 FITC 标记的链霉抗生物素蛋白以及藻红蛋白标记的抗 CD19 抗体一起温育。洗涤细胞，通过流式细胞术分析。结果显示在图 10A 中。淋巴细胞被门控 (gated) 为黑“点”，单核细胞被门控为灰“点”。选择波长，以筛查 FITC (FL1) 和藻红蛋白 (FL2) 信号。CD19+ B 细胞显示与藻红蛋白标记的抗-CD19 抗体 (横座标) 高水平结合。2G5+或 7G8+ 细胞 (纵座标) 也主要是 CD19+，定位于双阳性、右上四分之一区。这些数据证明，根据 HuMAb 2G5 和 7G8 的结合评价，IRTA5 蛋白由大多数 (如果不是全部的话) 正常外周血 B 淋巴细胞表达。

也利用双色免疫荧光和流式细胞术检测 IRTA5 HuMAb 与外周血 T 细胞、树突细胞、单核细胞或自然杀伤 (NK) 细胞的结合。CD3、CD1A、CD14 和 CD56 是能够用来分别区别外周血 T 淋巴细胞、外周血树突细胞、外周血单核细胞和外周血 NK 细胞的细胞表面标记。如上所述，在流式细胞分析中使用生物素化的 2G5、7G8 或同种型对照抗体和藻红蛋白标记的标记抗体 (CD3、CD1A、CD14 和 CD56)。结果显示在图 10B 中。淋巴细胞被门控为黑“点”，单核细胞被门控为灰“点”。选择波长，以筛查 FITC (FL1) 和藻红蛋白 (FL2) 信号。IRTA5 HuMAb 2G5 和 7G8 不与 CD3+外周血 T 细胞、CD1A+外周血树突细胞、CD14+外周血单核细胞或 CD56+外周血 NK 细胞结合，证实了 IRTA5 的 B 细胞特异性表达。

IRTA5 HuMAb 与 B 细胞肿瘤系 Daudi (ATCC CCL-213)、Ramos (ATCC CRL-1596)、Karpas 1106P (DSMZ ACC 545)、SU-DHL-4 (DSMZ ACC 495)、Granta 519 (DSMZ ACC 342) 和 L-540 (DSMZ ACC 72) 的结合通过流式细胞术评价。这些细胞系与每种 IRTA5 HuMAb 或对照人抗体温育，洗涤，并用藻红蛋白标记的抗人第二抗体检测。图 11 为直方图，显示与对照人抗体相比，IRTA5 HuMAb 2G2 与 Daudi 和 Ramos 细胞的结合。其余 6 种 IRTA5 HuMAb 显示类似

的结合模式（数据未显示）。这些数据表明 IRTA5 蛋白在 B 细胞来源的 Daudi 和 Ramos 肿瘤细胞系的表面上表达。图 12 显示与同种型对照抗体相比，IRTA5 HuMAb 2G5 与 Karpas 1106P、SU-DHL-4、Granta 519 和 L-540 细胞的结合。该数据显示，根据染色的平均荧光强度（MFI）测定，IRTA5 抗体与 SU-DHL-4 B 细胞肿瘤系的结合增强。总之，这些数据证明了某些 B 细胞肿瘤系在细胞表面上表达 IRTA5 蛋白。

IRTA-5 (SEQ ID NO: 37)

1 mlprilllic aplcepaelf liaspshpte gspvltckm pflqssdaqf qfcffrdtra
61 lpggwssspk lqiaamwked tgsywceaq maskvlrsrr sqinvhrvpv advsletqpp
121 ggqvmegdrf vlicsvamgt gditflwykg avglnlqskt qrsitaeyei psvresdaeq
181 yycvaengyg pspsglvsit vripvsrpil mlrapraqaa vedvlelhce alrgspily
241 wfyheditlg srsapsggga sfnlstech sgnysceann glgaqrseav tlnftvptga
301 rsnhltsuvi egllstlqpa tvallfcygl krkigrsar dplrsplspl pqeftylp
361 tpgqlqpiye nvnvsgdev yslayynqpe qesvaaetlg thmedkvsld iysrlrkani
421 tdvdyedam

IRTA-1 (SEQ ID NO: 38)

1 mlwasllaf apvcgqsaaa hkpvsvhpp wttffkgerv tltcngfqfy atekttwyhr
61 hywgekltl pgntlevres glyrcqargs prsnprllf ssdslilqap ysvfegdtlv
121 lrchrkkec ltavkytwng nilsisnksw dllipqasn nngnyreigy gdendvfrsn
181 fkiikiqelf phpelkatds qptegnsnl scetqlpper sdtpihfnff rdgevilsdw
241 stypelqpt vwrensngsyw cgaetvrgni hkhspslqih vqripvsgvl letqpsggqa
301 vegemlvvc svaegtgdtt fswhredmqe slgrktqrsi raelelpair qshaggyyct
361 adnsygpvqs mvlntvret pgnrdglvaa gatggllsal llavallfnc wrrrksgvgf
421 lgdetrilppa ppggesshsi cpaqvelqsl yvdvhpkkgd lvyseiqtq lgeeeants
481 rtiledkdvs vvysevktqh pdnsagkiss kdes

IRTA-2 (SEQ ID NO: 39)

1 mllwvillvl apvsgqfart prpiiflqpp wttvfqgerv tltckgrfy spqtkwyhr
61 ylgkeilret pdnilevqes geircqaqgs plsspvhldf ssaslilqap lsvfegdsyv
121 lrakraevt lnntiykndn vlaflnkrtd fhphaelkd ngayrctgyk escpvsnt
181 vkiqvqepft rpvlrassfq psgnprvlt cetqlslers dvplrfrrr ddqtlglgws
241 lspnfqitam wskdsgfywc kaatmphsvi sdsprswiqv qipashpvt lspekalnfe
301 gtkvllhct qedsrltyr fyhegvplr ksvrcergas isfsltens gnyyctadng
361 lgakpskavs lsvtvpvshp vnlsspedl ifegakvllh ceaqrgslpi lyqfhhedaa
421 lerrsansag gvaisfslta ehsgnyycta dngfgpqrsk avslsitvpv shpvtlssa
481 ealtfegatv tlhcevqrgs pqilyqfyhe dmplwssstp svgrvsfsfs lteghsgnyy
541 ctadngfgpq rsevsifvt vpvsrpilt rvpraqavvg dllelhceap rgspilywf

601 yhedvtlgss sapsggeasf nlshtaehsg nysceanngl vaqhsdtisl svivpvsrpi
 661 ltrfapraqa vvgdllelhc calrgsspil ywfyhedvtl gkisapsggg asfnlslte
 721 hsgiysead ngpeaqrsem vtlkvavpvs rpvtlrapg thaavgdille lhcealrgsp
 781 lilyrffhed vtlnrssps ggaslnlsit aehsgnysce adnglgaqrs etvtlyitgl
 841 tanrsgpfat gvaggllsia glaagally cwlsrkagrk pasdparsp ddsdqptyh
 901 nvpaweelqp vytnanprge nvvysevrii qekkkhavas dprhlrnkgs piysevkv
 961 stpvsgslfl assaphr

IRTA-3 (SEQ ID NO: 40)

1 mllwlllil tpgreqsgva pkavllnpp wstafkgekv alicssishs laqgdtywyh
 61 deklkikhhd kiqitepgny cqktrgssls davhvefspd wlilqalhpv fegdnvilrc
 121 qgkdnknhq kvyykdgkql pnsynlekit vnsvsrdnsk yhetayrkfy ildievtskp
 181 lniqvqelfl hpvlrassst piegspmtlt cetqlspqrp dvqlqfslfr dsqtlglgws
 241 rsprlqipam wtedsgsywc evetvthsik krslrqirv qrvpvsnvnl eirptggqli
 301 egenmvlics vaqsggtvtf swkhegrvrs lgrktqrsil aelhvtvke sdagryycaa
 361 dnvhspilst wirvtvripv shpvtlfrap rahtvvgdli elhceslrgs ppilyrfyhe
 421 dvtlgnssap sgggasfnls ltaehsgnys cdadnglgaq hshgvsrvt vpvsvpvtl
 481 rapgaqavvg dllelhcesl rgsfpilywf yheddtlgni sahsgggasf nlslttehsg
 541 nysceadngl gaqhskvvtl nvtgtsrnt gltaagitgl vlsilvaaa aallhyarar
 601 rkpqglsatg tsshspsecq epssrsrri dpqepthskp lapmelepmy snvnpqdsnp
 661 iysqiwsiqh tkensancpm mhqehelvt lyselkthp ddsageassr graheeddee
 721 nyenvprvll asdh

IRTA-4 (SEQ ID NO: 41)

1 mllwslivif davteqadsl tivapssvfe gdsivlkcqg eqnwkiaqkma yhkdnkelsv
 61 fkkfsdfliq savlsdsgny fcstkgqlfl wdktsnivki kvqelfqrpv ltassfapie
 121 ggpvslkcet rlsprldvq lqfcffrenq vlgsgwsssp elqisavwse dtgsywckae
 181 tvthrirks lqsqihvqri pnsnvleir apggqvteqg klilicsvag gtgnvtfswy
 241 reatgtsmgk ktqrsisael eipavkesda gkyycradng hvpiqskvvn ipvripvsrp
 301 vltlrspgaq aavgdilleh cealrgspipi lyqfyhedvt lgnssapsgg gasfnlsita
 361 ehsgnyscea nnglgaqcse avpvsisgpd gyrrdlmtag vhwglfgvlg figvalllya
 421 lfhkisgess atneprgasr pnpqeftyss ptpdmeelqp vyvvnvgsdv dvvysqvwsn
 481 qqpeasanir tlenkdsqv iyssvkks

序列表概述

SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列
1	VH CDR1 氨基酸 2G5	22	VK 氨基酸 2G5
2	VH CDR1 氨基酸 5A2	23	VK 氨基酸 5A2
3	VH CDR1 氨基酸 7G8	24	VK 氨基酸 7G8
4	VH CDR2 氨基酸 2G5	25	VH 核苷酸 2G5
5	VH CDR2 氨基酸 5A2	26	VH 核苷酸 5A2
6	VH CDR2 氨基酸 7G8	27	VH 核苷酸 7G8
7	VH CDR3 氨基酸 2G5	28	VK 核苷酸 2G5
8	VH CDR3 氨基酸 5A2	29	VK 核苷酸 5A2
9	VH CDR3 氨基酸 7G8	30	VK 核苷酸 7G8
10	VK CDR1 氨基酸 2G5	31	VH 3-33 种系氨基酸
11	VK CDR1 氨基酸 5A2	32	VH DP44 种系氨基酸
12	VK CDR1 氨基酸 7G8	33	VK L6 种系氨基酸
13	VK CDR2 氨基酸 2G5	34	VH 3-23 种系氨基酸
14	VK CDR2 氨基酸 5A2	35	VH 3-7 种系氨基酸
15	VK CDR2 氨基酸 7G8	36	VH 7G8(mut)氨基酸
16	VK CDR3 氨基酸 2G5	37	IRTA-5 氨基酸
17	VK CDR3 氨基酸 5A2	38	IRTA-1 氨基酸
18	VK CDR3 氨基酸 7G8	39	IRTA-2 氨基酸
		40	IRTA-3 氨基酸
19	VH 氨基酸 2G5	41	IRTA-4 氨基酸
20	VH 氨基酸 5A2		
21	VH 氨基酸 7G8		

<110> 米德列斯公司
 罗伯特·格拉齐亚诺
 约瑟芬·M·卡达雷利
 托马斯·肯普
 贝思·卡特
 莫汉·斯里尼瓦桑

<120> IRTA-5抗体及其用途

<130> 04280/2201101-W00

<150> 60/557,741

<151> 2004-03-29

<160> 41

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Asp Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Asn Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Thr Tyr Thr Met His
 1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

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

Gly

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

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

Gly

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 7

Asp Trp Gly Arg Ala Phe Asp Ile
 1 5

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

Glu Ser Pro Asn Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 9

Glu Val Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 1 5

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12

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

<210> 13

<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 14

<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 15

<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 16

<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

Gln Gln Leu Asn Asn Trp Pro Pro Tyr Thr
1 5 10

<210> 17

<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 18

<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr
1 5

<210> 19

<211> 117
<212> PRT
<213> 人

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Trp Gly Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20

<211> 116

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Gln Val Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Gly Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 21

<211> 116

<212> PRT

<213> 人

<400> 21

Asp Val His Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Val Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 23

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 348

<212> DNA

<213> 人

<400> 25

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgctcggatt caccctcagt gactatggca tgcaactgggt cogccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg gaaataataa atactatgca 180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240

caaatgaaca gtctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag ggactgggga 300
 cgggcttttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca 348

 <210> 26
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 26
 caggtgcagg tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cgctgggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaggt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaaagc 300
 cccaactttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcttca 348

 <210> 27
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 27
 gatgttcatc tgggtgcagtc tgggggaggc ttggtacatc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag gctctggatt caccttcagt acctatacaa tgcactggat tcgccaggct 120
 ccagaaaaag atctggagtg ggtatcagct attggtactg gtggtggcac agactatgca 180
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc cttgtatctt 240
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacatg gctgtgtatt actgtgcaag agaggcttac 300
 tggactttcg atctctgggg ccgtggcacc ctggtcactg tctcttca 348

 <210> 28
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 28
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cactttatta ctgtcagcag cttacaact ggcctccgta cacttttggc 300
 caggggacca agctggagat caaa 324

 <210> 29
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 29
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaacaact ggcctccgtg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaat caaa 324

<210> 30
<211> 321
<212> DNA
<213> 人

<400> 30
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
gaagatttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 31
<211> 98
<212> PRT
<213> 人

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 32
<211> 97
<212> PRT
<213> 人

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg

<210> 33
<211> 94
<212> PRT
<213> 人

<400> 33

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
85 90

<210> 34
<211> 97
<212> PRT
<213> 人

<400> 34

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
35 40 45

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys

<210> 35
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 35

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
 20 25 30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 35 40 45

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 36
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa为Lys或Gln

<400> 36

Asp Val His Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Xaa Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Val Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 429
<212> PRT
<213> 人

<400> 37

Met Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu Ile Cys Ala Pro Leu Cys Glu Pro
1 5 10 15

Ala Glu Leu Phe Leu Ile Ala Ser Pro Ser His Pro Thr Glu Gly Ser
20 25 30

Pro Val Thr Leu Thr Cys Lys Met Pro Phe Leu Gln Ser Ser Asp Ala
35 40 45

Gln Phe Gln Phe Cys Phe Phe Arg Asp Thr Arg Ala Leu Gly Pro Gly
50 55 60

Trp Ser Ser Ser Pro Lys Leu Gln Ile Ala Ala Met Trp Lys Glu Asp
65 70 75 80

Thr Gly Ser Tyr Trp Cys Glu Ala Gln Thr Met Ala Ser Lys Val Leu
85 90 95

Arg Ser Arg Arg Ser Gln Ile Asn Val His Arg Val Pro Val Ala Asp
100 105 110

Val Ser Leu Glu Thr Gln Pro Pro Gly Gly Gln Val Met Glu Gly Asp
115 120 125

Arg Leu Val Leu Ile Cys Ser Val Ala Met Gly Thr Gly Asp Ile Thr
130 135 140

Phe Leu Trp Tyr Lys Gly Ala Val Gly Leu Asn Leu Gln Ser Lys Thr
145 150 155 160

Gln Arg Ser Leu Thr Ala Glu Tyr Glu Ile Pro Ser Val Arg Glu Ser
165 170 175

Asp Ala Glu Gln Tyr Tyr Cys Val Ala Glu Asn Gly Tyr Gly Pro Ser
180 185 190

Pro Ser Gly Leu Val Ser Ile Thr Val Arg Ile Pro Val Ser Arg Pro
195 200 205

Ile Leu Met Leu Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Ala Val Glu Asp Val
210 215 220

Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr
225 230 235 240

Trp Phe Tyr His Glu Asp Ile Thr Leu Gly Ser Arg Ser Ala Pro Ser
245 250 255

Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Glu Glu His Ser Gly
260 265 270

Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu
275 280 285

Ala Val Thr Leu Asn Phe Thr Val Pro Thr Gly Ala Arg Ser Asn His
290 295 300

Leu Thr Ser Gly Val Ile Glu Gly Leu Leu Ser Thr Leu Gly Pro Ala
305 310 315 320

Thr Val Ala Leu Leu Phe Cys Tyr Gly Leu Lys Arg Lys Ile Gly Arg
325 330 335

Arg Ser Ala Arg Asp Pro Leu Arg Ser Leu Pro Ser Pro Leu Pro Gln
340 345 350

Glu Phe Thr Tyr Leu Asn Ser Pro Thr Pro Gly Gln Leu Gln Pro Ile
355 360 365

Tyr Glu Asn Val Asn Val Val Ser Gly Asp Glu Val Tyr Ser Leu Ala
370 375 380

Tyr Tyr Asn Gln Pro Glu Gln Glu Ser Val Ala Ala Glu Thr Leu Gly
385 390 395 400

Thr His Met Glu Asp Lys Val Ser Leu Asp Ile Tyr Ser Arg Leu Arg
405 410 415

Lys Ala Asn Ile Thr Asp Val Asp Tyr Glu Asp Ala Met
420 425

<210> 38
<211> 515
<212> PRT
<213> 人

<400> 38

Met Leu Leu Trp Ala Ser Leu Leu Ala Phe Ala Pro Val Cys Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala His Lys Pro Val Ile Ser Val His Pro Pro Trp Thr
20 25 30

Thr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Phe Gln
35 40 45

Phe Tyr Ala Thr Glu Lys Thr Thr Trp Tyr His Arg His Tyr Trp Gly
50 55 60

Glu Lys Leu Thr Leu Thr Pro Gly Asn Thr Leu Glu Val Arg Glu Ser
65 70 75 80

Gly Leu Tyr Arg Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Arg Ser Asn Pro Val
85 90 95

Arg Leu Leu Phe Ser Ser Asp Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Tyr Ser
100 105 110

Val Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Leu Arg Cys His Arg Arg Arg Lys
115 120 125

Glu Lys Leu Thr Ala Val Lys Tyr Thr Trp Asn Gly Asn Ile Leu Ser
130 135 140

Ile Ser Asn Lys Ser Trp Asp Leu Leu Ile Pro Gln Ala Ser Ser Asn
145 150 155 160

Asn Asn Gly Asn Tyr Arg Cys Ile Gly Tyr Gly Asp Glu Asn Asp Val
165 170 175

Phe Arg Ser Asn Phe Lys Ile Ile Lys Ile Gln Glu Leu Phe Pro His
180 185 190

Pro Glu Leu Lys Ala Thr Asp Ser Gln Pro Thr Glu Gly Asn Ser Val
195 200 205

Asn Leu Ser Cys Glu Thr Gln Leu Pro Pro Glu Arg Ser Asp Thr Pro
210 215 220

Leu His Phe Asn Phe Phe Arg Asp Gly Glu Val Ile Leu Ser Asp Trp
225 230 235 240

Ser Thr Tyr Pro Glu Leu Gln Leu Pro Thr Val Trp Arg Glu Asn Ser
245 250 255

Gly Ser Tyr Trp Cys Gly Ala Glu Thr Val Arg Gly Asn Ile His Lys
260 265 270

His Ser Pro Ser Leu Gln Ile His Val Gln Arg Ile Pro Val Ser Gly
275 280 285

Val Leu Leu Glu Thr Gln Pro Ser Gly Gly Gln Ala Val Glu Gly Glu
290 295 300

Met Leu Val Leu Val Cys Ser Val Ala Glu Gly Thr Gly Asp Thr Thr
305 310 315 320

Phe Ser Trp His Arg Glu Asp Met Gln Glu Ser Leu Gly Arg Lys Thr
325 330 335

Gln Arg Ser Leu Arg Ala Glu Leu Glu Leu Pro Ala Ile Arg Gln Ser
340 345 350

His Ala Gly Gly Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Ser Tyr Gly Pro Val
355 360 365

Gln Ser Met Val Leu Asn Val Thr Val Arg Glu Thr Pro Gly Asn Arg
370 375 380

Asp Gly Leu Val Ala Ala Gly Ala Thr Gly Gly Leu Leu Ser Ala Leu
385 390 395 400

Leu Leu Ala Val Ala Leu Leu Phe His Cys Trp Arg Arg Arg Lys Ser

Asn Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Ser Cys Cys Pro Val
165 170 175

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Pro Phe Thr Arg Pro
180 185 190

Val Leu Arg Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Asn Pro Val Thr
195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
210 215 220

Arg Phe Arg Phe Phe Arg Asp Asp Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser
225 230 235 240

Leu Ser Pro Asn Phe Gln Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly
245 250 255

Phe Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Pro His Ser Val Ile Ser Asp
260 265 270

Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile Pro Ala Ser His Pro Val
275 280 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val
290 295 300

Thr Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Arg
305 310 315 320

Phe Tyr His Glu Gly Val Pro Leu Arg His Lys Ser Val Arg Cys Glu
325 330 335

Arg Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu Asn Ser Gly Asn
340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Lys Pro Ser Lys Ala
355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Asn Leu
370 375 380

Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Phe Glu Gly Ala Lys Val Thr Leu His
385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Leu Tyr Gln Phe His His
405 410 415

Glu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Arg Ser Ala Asn Ser Ala Gly Gly Val
420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
435 440 445

Thr Ala Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Lys Ala Val Ser Leu
450 455 460

Ser Ile Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
 465 470 475 480
 Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val
 485 490 495
 Gln Arg Gly Ser Pro Gln Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Met
 500 505 510
 Pro Leu Trp Ser Ser Ser Thr Pro Ser Val Gly Arg Val Ser Phe Ser
 515 520 525
 Phe Ser Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
 530 535 540
 Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Val Val Ser Leu Phe Val Thr
 545 550 555 560
 Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
 565 570 575
 Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Pro Arg Gly
 580 585 590
 Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
 595 600 605
 Ser Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
 610 615 620
 Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu
 625 630 635 640
 Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val
 645 650 655
 Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val
 660 665 670
 Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro
 675 680 685
 Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser
 690 695 700
 Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu
 705 710 715 720
 His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Pro Glu Ala Gln
 725 730 735
 Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro
 740 745 750
 Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val Gly Asp Leu
 755 760 765
 Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr

770 775 780
 Arg Phe Phe His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Arg Ser Ser Pro Ser
 785 790 795 800
 Gly Gly Ala Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
 805 810 815
 Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr
 820 825 830
 Val Thr Leu Tyr Ile Thr Gly Leu Thr Ala Asn Arg Ser Gly Pro Phe
 835 840 845
 Ala Thr Gly Val Ala Gly Gly Leu Leu Ser Ile Ala Gly Leu Ala Ala
 850 855 860
 Gly Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Lys
 865 870 875 880
 Pro Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ser Pro Pro Asp Ser Asp Ser Gln Glu
 885 890 895
 Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
 900 905 910
 Thr Asn Ala Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
 915 920 925
 Ile Ile Gln Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asp Pro Arg His
 930 935 940
 Leu Arg Asn Lys Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
 945 950 955 960
 Ser Thr Pro Val Ser Gly Ser Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
 965 970 975

 Arg

 <210> 40
 <211> 734
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 40
 Met Leu Leu Trp Leu Leu Leu Leu Ile Leu Thr Pro Gly Arg Glu Gln
 1 5 10 15
 Ser Gly Val Ala Pro Lys Ala Val Leu Leu Leu Asn Pro Pro Trp Ser
 20 25 30
 Thr Ala Phe Lys Gly Glu Lys Val Ala Leu Ile Cys Ser Ser Ile Ser
 35 40 45
 His Ser Leu Ala Gln Gly Asp Thr Tyr Trp Tyr His Asp Glu Lys Leu
 50 55 60

Leu Lys Ile Lys His Asp Lys Ile Gln Ile Thr Glu Pro Gly Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Cys Lys Thr Arg Gly Ser Ser Leu Ser Asp Ala Val His Val Glu
85 90 95

Phe Ser Pro Asp Trp Leu Ile Leu Gln Ala Leu His Pro Val Phe Glu
100 105 110

Gly Asp Asn Val Ile Leu Arg Cys Gln Gly Lys Asp Asn Lys Asn Thr
115 120 125

His Gln Lys Val Tyr Tyr Lys Asp Gly Lys Gln Leu Pro Asn Ser Tyr
130 135 140

Asn Leu Glu Lys Ile Thr Val Asn Ser Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys
145 150 155 160

Tyr His Cys Thr Ala Tyr Arg Lys Phe Tyr Ile Leu Asp Ile Glu Val
165 170 175

Thr Ser Lys Pro Leu Asn Ile Gln Val Gln Glu Leu Phe Leu His Pro
180 185 190

Val Leu Arg Ala Ser Ser Ser Thr Pro Ile Glu Gly Ser Pro Met Thr
195 200 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Pro Gln Arg Pro Asp Val Gln Leu
210 215 220

Gln Phe Ser Leu Phe Arg Asp Ser Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser
225 230 235 240

Arg Ser Pro Arg Leu Gln Ile Pro Ala Met Trp Thr Glu Asp Ser Gly
245 250 255

Ser Tyr Trp Cys Glu Val Glu Thr Val Thr His Ser Ile Lys Lys Arg
260 265 270

Ser Leu Arg Ser Gln Ile Arg Val Gln Arg Val Pro Val Ser Asn Val
275 280 285

Asn Leu Glu Ile Arg Pro Thr Gly Gly Gln Leu Ile Glu Gly Glu Asn
290 295 300

Met Val Leu Ile Cys Ser Val Ala Gln Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe
305 310 315 320

Ser Trp His Lys Glu Gly Arg Val Arg Ser Leu Gly Arg Lys Thr Gln
325 330 335

Arg Ser Leu Leu Ala Glu Leu His Val Leu Thr Val Lys Glu Ser Asp
340 345 350

Ala Gly Arg Tyr Tyr Cys Ala Ala Asp Asn Val His Ser Pro Ile Leu
355 360 365

Ser Thr Trp Ile Arg Val Thr Val Arg Ile Pro Val Ser His Pro Val
 370 375 380

Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala His Thr Val Val Gly Asp Leu Leu
 385 390 395 400

Glu Leu His Cys Glu Ser Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Arg
 405 410 415

Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser Ala Pro Ser Gly
 420 425 430

Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
 435 440 445

Tyr Ser Cys Asp Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln His Ser His Gly
 450 455 460

Val Ser Leu Arg Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu
 465 470 475 480

Arg Ala Pro Gly Ala Gln Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His
 485 490 495

Cys Glu Ser Leu Arg Gly Ser Phe Pro Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His
 500 505 510

Glu Asp Asp Thr Leu Gly Asn Ile Ser Ala His Ser Gly Gly Gly Ala
 515 520 525

Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 530 535 540

Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln His Ser Lys Val Val Thr Leu
 545 550 555 560

Asn Val Thr Gly Thr Ser Arg Asn Arg Thr Gly Leu Thr Ala Ala Gly
 565 570 575

Ile Thr Gly Leu Val Leu Ser Ile Leu Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala
 580 585 590

Leu Leu His Tyr Ala Arg Ala Arg Arg Lys Pro Gly Gly Leu Ser Ala
 595 600 605

Thr Gly Thr Ser Ser His Ser Pro Ser Glu Cys Gln Glu Pro Ser Ser
 610 615 620

Ser Arg Pro Ser Arg Ile Asp Pro Gln Glu Pro Thr His Ser Lys Pro
 625 630 635 640

Leu Ala Pro Met Glu Leu Glu Pro Met Tyr Ser Asn Val Asn Pro Gly
 645 650 655

Asp Ser Asn Pro Ile Tyr Ser Gln Ile Trp Ser Ile Gln His Thr Lys
 660 665 670

Glu Asn Ser Ala Asn Cys Pro Met Met His Gln Glu His Glu Glu Leu

675 680 685
 Thr Val Leu Tyr Ser Glu Leu Lys Lys Thr His Pro Asp Asp Ser Ala
 690 695 700
 Gly Glu Ala Ser Ser Arg Gly Arg Ala His Glu Glu Asp Asp Glu Glu
 705 710 715 720
 Asn Tyr Glu Asn Val Pro Arg Val Leu Leu Ala Ser Asp His
 725 730
 <210> 41
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 41
 Met Leu Leu Trp Ser Leu Leu Val Ile Phe Asp Ala Val Thr Glu Gln
 1 5 10 15
 Ala Asp Ser Leu Thr Leu Val Ala Pro Ser Ser Val Phe Glu Gly Asp
 20 25 30
 Ser Ile Val Leu Lys Cys Gln Gly Glu Gln Asn Trp Lys Ile Gln Lys
 35 40 45
 Met Ala Tyr His Lys Asp Asn Lys Glu Leu Ser Val Phe Lys Lys Phe
 50 55 60
 Ser Asp Phe Leu Ile Gln Ser Ala Val Leu Ser Asp Ser Gly Asn Tyr
 65 70 75 80
 Phe Cys Ser Thr Lys Gly Gln Leu Phe Leu Trp Asp Lys Thr Ser Asn
 85 90 95
 Ile Val Lys Ile Lys Val Gln Glu Leu Phe Gln Arg Pro Val Leu Thr
 100 105 110
 Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Glu Gly Gly Pro Val Ser Leu Lys Cys
 115 120 125
 Glu Thr Arg Leu Ser Pro Gln Arg Leu Asp Val Gln Leu Gln Phe Cys
 130 135 140
 Phe Phe Arg Glu Asn Gln Val Leu Gly Ser Gly Trp Ser Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Glu Leu Gln Ile Ser Ala Val Trp Ser Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Trp
 165 170 175
 Cys Lys Ala Glu Thr Val Thr His Arg Ile Arg Lys Gln Ser Leu Gln
 180 185 190
 Ser Gln Ile His Val Gln Arg Ile Pro Ile Ser Asn Val Ser Leu Glu
 195 200 205
 Ile Arg Ala Pro Gly Gly Gln Val Thr Glu Gly Gln Lys Leu Ile Leu
 210 215 220

Leu Cys Ser Val Ala Gly Gly Thr Gly Asn Val Thr Phe Ser Trp Tyr
 225 230 235 240
 Arg Glu Ala Thr Gly Thr Ser Met Gly Lys Lys Thr Gln Arg Ser Leu
 245 250 255
 Ser Ala Glu Leu Glu Ile Pro Ala Val Lys Glu Ser Asp Ala Gly Lys
 260 265 270
 Tyr Tyr Cys Arg Ala Asp Asn Gly His Val Pro Ile Gln Ser Lys Val
 275 280 285
 Val Asn Ile Pro Val Arg Ile Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu
 290 295 300
 Arg Ser Pro Gly Ala Gln Ala Ala Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His
 305 310 315 320
 Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His
 325 330 335
 Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala
 340 345 350
 Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 355 360 365
 Glu Ala Asn Asn Gly Leu Gly Ala Gln Cys Ser Glu Ala Val Pro Val
 370 375 380
 Ser Ile Ser Gly Pro Asp Gly Tyr Arg Arg Asp Leu Met Thr Ala Gly
 385 390 395 400
 Val Leu Trp Gly Leu Phe Gly Val Leu Gly Phe Thr Gly Val Ala Leu
 405 410 415
 Leu Leu Tyr Ala Leu Phe His Lys Ile Ser Gly Glu Ser Ser Ala Thr
 420 425 430
 Asn Glu Pro Arg Gly Ala Ser Arg Pro Asn Pro Gln Glu Phe Thr Tyr
 435 440 445
 Ser Ser Pro Thr Pro Asp Met Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr Val Asn
 450 455 460
 Val Gly Ser Val Asp Val Asp Val Val Tyr Ser Gln Val Trp Ser Met
 465 470 475 480
 Gln Gln Pro Glu Ser Ser Ala Asn Ile Arg Thr Leu Leu Glu Asn Lys
 485 490 495
 Asp Ser Gln Val Ile Tyr Ser Ser Val Lys Lys Ser
 500 505

抗-IRTA5 2G5 VH

V 区段: 3-33
 D 区段: 7-27
 J 区段: JH3b

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
    R L S C A A S G F T F S D Y G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
    V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                ~~~~~
    G N N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AAT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

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

                                CDR3
                                ~~~~~
    T A V Y Y C A R D W G R A F D I W G
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GAC TGG GGA CGG GCT TTT GAT ATC TGG GGC
    |
    |-----> JH3b

    Q G T M V T V S S
325 CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA
    
```

图 1A

抗-IRTA5 2G5 VK

V 区段: L6
J 区段: JK2

```

      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 L Y Y C Q Q
217  CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA CTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~
      L N N W P P Y T F G Q G T K L E I K
271  CTT AAC AAC TGG CCT CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
      ↓
      JK2
  
```

图 1B

抗-IRTA5 5A2 VH

V 区段: 3-33
 D 区段: 未确定
 J 区段: JH4b

```

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

                                CDR1
                                ~~~~~
    R L S C A A S G F T F S N Y G M H W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
    V R Q A P G K G L E W V A G I W Y D
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GGT ATA TGG TAT GAT

                                CDR2
                                ~~~~~
    G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
163 GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

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

                                CDR3
                                ~~~~~
    T A V Y Y C A R E S P N F D Y W G Q
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA AGC CCC AAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG

                                JH4b
                                ~~~~~
    G T L V T V S S
325 GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
  
```

图 2A

抗-IRTA5 5A2 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 N N W P P W T F G Q G T K V E I K
271 CGT AAC AAC TGG CCT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
      |
      └─ JK1

```

图 2B

抗-IRTA5 7G8 VH

V 区段: DP44
 D 区段: 未确定
 J 区段: JH2

```

1   D V H L V Q S G G G L V H P G G S L
   GAT GTT CAT CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAT CCT GGG GGG TCC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
55  R L S C A G S G F T F S T Y T M H W
   AGA CTC TCC TGT GCA GGC TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT ACA ATG CAC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
109 I R Q A P G K D L E W V S A I G T G
   ATT CGC CAG GCT CCA GGA AAA GAT CTG GAG TGG GTA TCA GCT ATT GGT ACT GGT

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

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

                                CDR3
                                ~~~~~
271 A V Y Y C A R E V Y W Y F D L W G R
   GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG GTC TAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT

325 G T L V T V S S
   GGC ACC CTG GTC ACT GTC TCC TCA

```

图 3A

抗-IRTA5 7G8 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 S N W P P T F G Q G T K V E I K
271  CGT AGC AAC TGG CCT CCG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

图 3B

3-33 种系:	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q	CDR1
2G5 VH:	- - - - -	- - - - -
5A2 VH:	- - - V - - - - -	- - - - -
3-33 种系:	A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T	CDR2
2G5 VH:	- - - - -	- - - - -
5A2 VH:	- - - - -	- - - - -
3-33 种系:	L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	CDR3
2G5 VH:	- - - - -	- - - D W G R A F D I W G Q G T M V T V S S (JH3b)
5A2 VH:	- - - - -	- - - E S P N F D Y - - - L - - - (JH4b)

图 4

DP44 种系:	E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L R L S C A G S G F T F S S Y A M H	CDR1
7G8 VH:	D - H - - - - -	T - - - - -
DP44 种系:	W V R Q A P G K G L E W V S A I G T G G G T Y Y A D S V K G R F T I S	CDR2
7G8 VH:	- I - - - - - D - - - - -	- - - - -
DP44 种系:	R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D M A V Y Y C A R	CDR3
7G8 VH:	- - - - -	- E V Y W Y F D L
7G8 VH:	W G R G T L V T V S S	

图 5

CDR1
 DP44 种系: E V Q L V Q S G G L V H P G G S L R L S C A G S G F T F S S Y A M H
 3-7 种系: - - - E - - - Q - - - A - - - A - - - W - S
 3-23 种系: - - - L E - - - Q - - - A - - - A - - - S
 7G8 VH: D - H - - - - - X - - - - - T - T - -
 7G8 (mut) VH: D - H - - - - - X - - - - - T - T - -

CDR2
 DP44 种系: W V R Q A P G K G L E W V S A I G T G G G T Y Y A D S V K G R F T I
 3-7 种系: - - - - - - - - - A N - K Q D - S E K - - - - -
 3-23 种系: - - - - - - - - - S G S - - - - -
 7G8 VH: - I - - - - - D - - - - - D - - - - -
 7G8 (mut) VH: - I - - - - - D - - - - - D - - - - -

CDR3
 DP44 种系: S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D M A V Y C A R
 3-7 种系: - - - - - T - - - - -
 3-23 种系: - - - S - - - T - - - T - - - K
 7G8 VH: - - - - - - - - - E V Y W Y F D
 7G8 (mut) VH: - - - - - T - - - - - E V Y W Y F D

7G8 VH: L W G R G T L V T V S S
 7G8 (mut) VH: L W G R G T L V T V S S

其中 X = K 或 Q

图 7

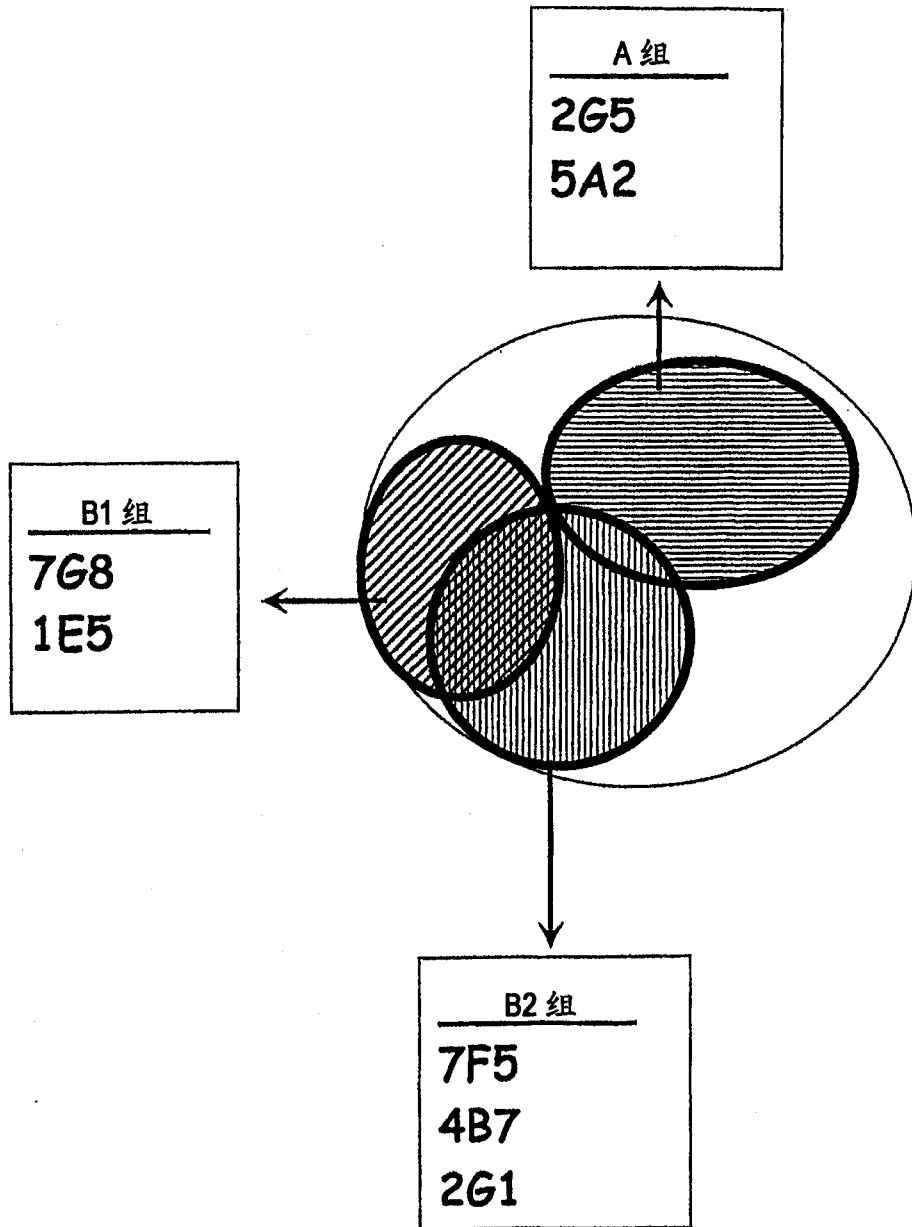


图 8

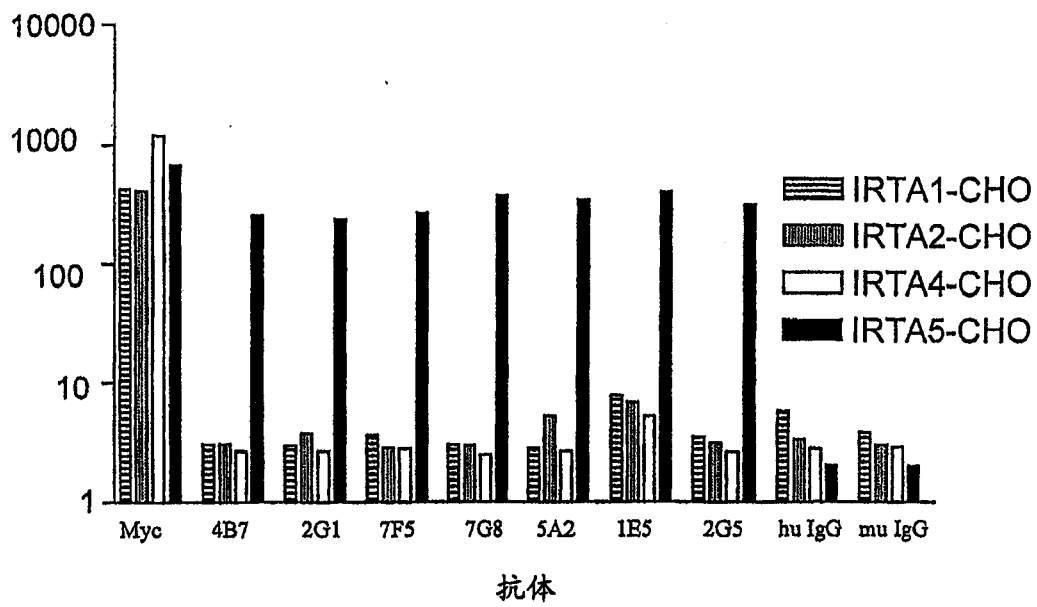


图 9

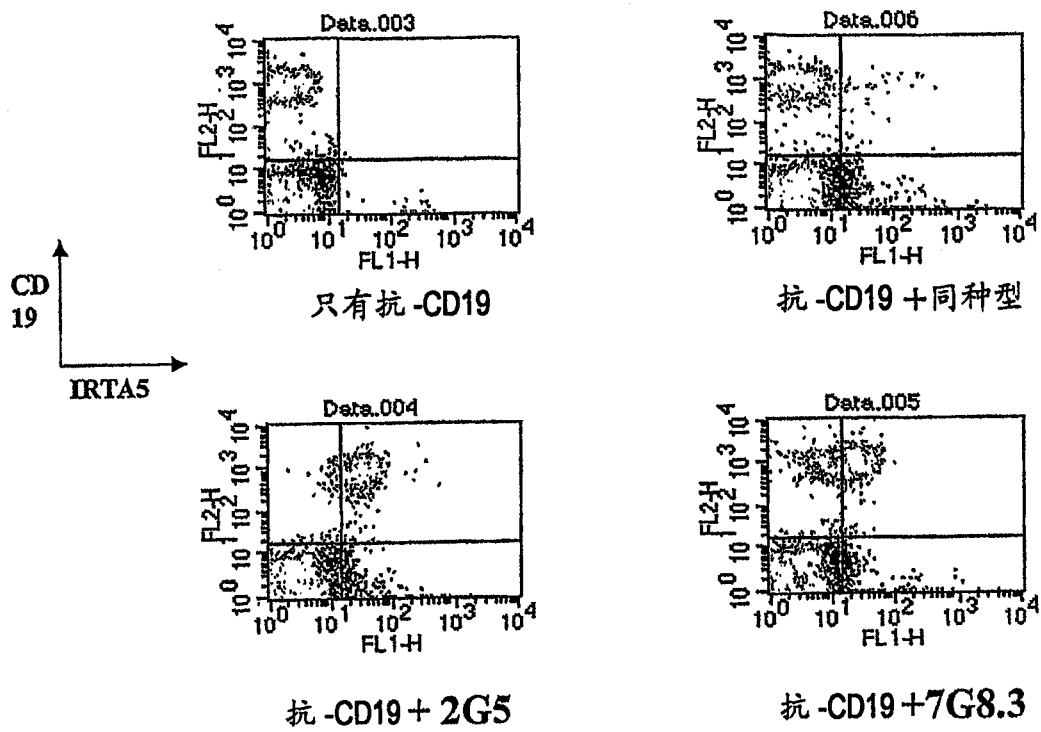


图 10A

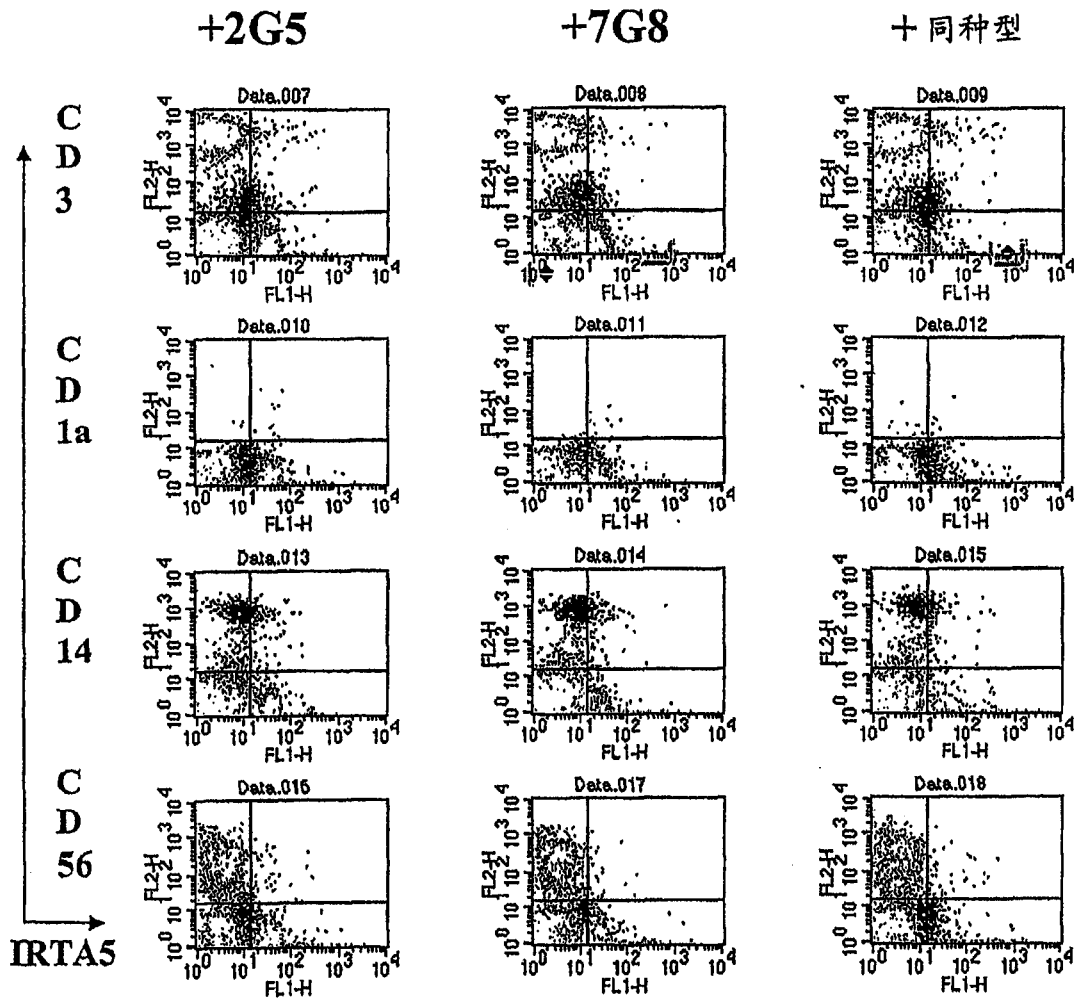


图 10B

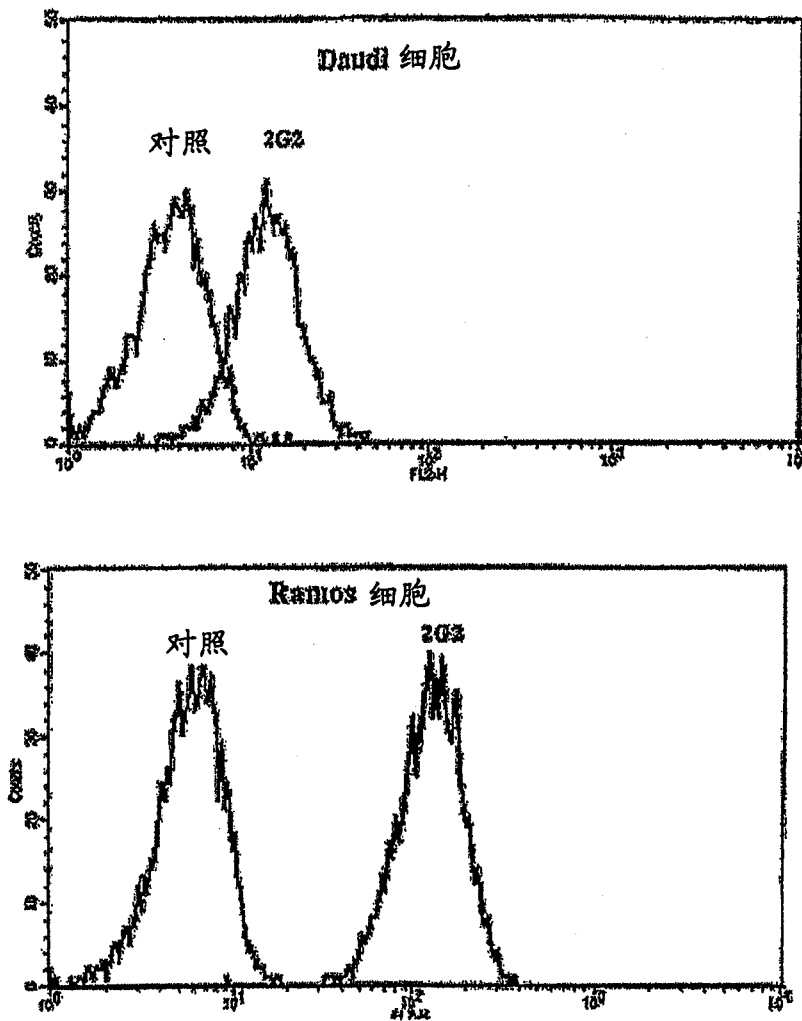


图 11

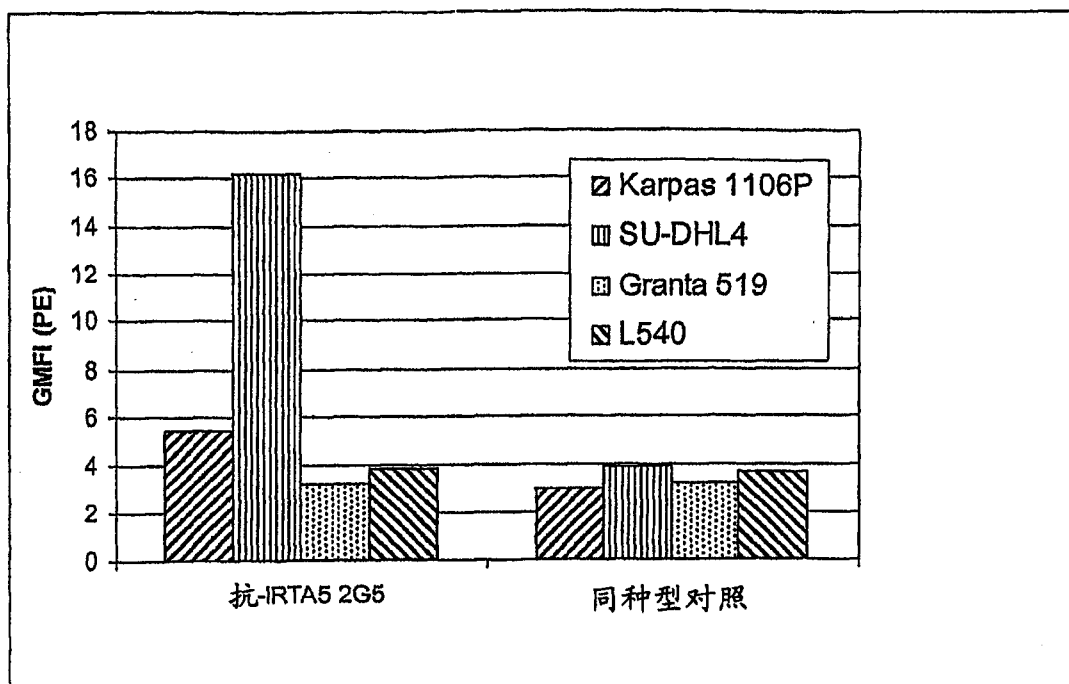


图 12