

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/395

A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410007058.5

[43] 公开日 2005年3月9日

[11] 公开号 CN 1589902A

[22] 申请日 1996.1.26

[21] 申请号 200410007058.5

分案原申请号 96192271.0

[30] 优先权

[32] 1995.1.26 [33] US [31] 08/378, 968

[71] 申请人 拜奥根有限公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 J·L·布朗宁 W·迈耶

C·D·本杰明

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 郭建新

权利要求书2页 说明书55页 附图8页

[54] 发明名称 抗-LT-β-R 抗体在制备药用组合物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及抗-LT-β-R 抗体在制备用于治疗或减弱瘤形成的进展、严重程度或影响的药用组合物中的应用，所述药用组合物含有抗-LT-β-R 抗体和一种可以药用的载体，其中所述组合物是在一种外源性 LT-β-R 激活剂的存在下使用的。

ISSN 1008-4274

1. 抗-LT- β -R 抗体在制备用于治疗或减弱瘤形成的进展、严重程度或影响的药用组合物中的应用, 所述药用组合物含有抗-LT- β -R 抗体和一种可以药用的载体, 其中所述组合物是在一种外源性 LT- β -R 激活剂的存在下使用的。

2. 根据权利要求1的应用, 其中, 所述抗-LT- β -R 抗体具有与一种由细胞系 CB.E11.1 (ATCC 入藏号 No.HB11793) 产生的抗体相同的表位特异性。

3. 根据权利要求1的应用, 其中, 所述抗-LT- β -R 抗体具有与一种由细胞系 BH.A10 (ATCC 入藏号 No.HB11795) 产生的抗体相同的表位特异性。

4. 根据权利要求1的应用, 其中, 所述抗-LT- β -R 抗体含有得自由杂交瘤 CB.E11.1 (ATCC 入藏号 No.HB11793) 产生的抗体 CBE11 的 CDRs。

5. 根据权利要求1的应用, 其中, 所述抗-LT- β -R 抗体选自下组: 由杂交瘤 CB.E11.1 (ATCC 入藏号 No.HB11793) 产生的 CBE11、由杂交瘤 BK.A11.AC10 (ATCC 入藏号 No.HB11799) 产生的 BKA11、由杂交瘤 CD.H10.1 (ATCC 入藏号 No.HB11797) 产生的 CDH10、由杂交瘤 BC.G6.AF5 (ATCC 入藏号 No.HB11794) 产生的 BCG6、由杂交瘤 BH.A10 (ATCC 入藏号 No.HB11795) 产生的 BHA10 以及由杂交瘤 AG.H1.5.1 (ATCC 入藏号 No.HB11796) 产生的 AGH1。

6. 根据权利要求1-5 任一项的应用, 其中, 所述抗-LT- β -R 抗体是 F(ab)₂。

7.根据权利要求 1-5 任一项的应用,其中,所述抗-LT- β -R 抗体是嵌合抗体。

8. 根据权利要求 1-5 任一项的应用,其中,所述抗-LT- β -R 抗体是人源化抗体。

9. 根据权利要求 1-5 任一项的应用,其中,所述 LT- β -R 激活剂选自 IFN- α 、TNF 和抗-LT- β -R 抗体。

10. 根据权利要求 1-5 任一项的应用,进一步包括一种抗肿瘤疗法。

11. 根据权利要求 10 的应用,其中,所述抗肿瘤疗法是辐射或化疗。

抗-LT- β -R抗体在制备药用组合物中的应用

本申请是申请日为1996年1月26日、申请号为96192271.0、发明创造名称为“作为抗肿瘤剂的淋巴毒素- α/β 复合体和抗淋巴毒素- β 受体抗体”的申请的分案申请。

技术领域

本发明涉及用于激活淋巴毒素- β 受体信号的组合物和方法，再由被激活的受体信号引发对肿瘤细胞有效的抗增殖作用。更具体地讲，本发明涉及由淋巴毒素- α 与淋巴毒素- β 的多个亚基之间所形成的淋巴毒素杂聚复合体，在有淋巴毒素- β 受体激活剂的条件下，该复合体能诱发对肿瘤细胞的细胞毒性作用。本发明还涉及抗淋巴毒素- β 受体的抗体，该抗体单独或以与其它淋巴毒素- β 受体激活剂组合的形式，在有或没有淋巴毒素- α/β 复合体的条件下起到淋巴毒素- β 受体激活剂的作用。提供了用于选择这种抗体的筛选方法。本发明还涉及在有其它淋巴毒素- β 受体激活剂的条件下用交联的抗淋巴毒素- β 受体抗体加强肿瘤细胞细胞毒性的组合物和方法。

背景技术

肿瘤坏死因子(TNF)受体家族有几个成员，其信号能诱导肿瘤细胞通过坏死或程序死亡而死亡(编程性细胞死亡)。配体TNF和淋巴毒素- α (LT- α ；以前被称为TNF- β)能与TNF受体(p60和p80；本文称作“TNF-R”)结合并激活该受体。TNF-R信号能启动正常细胞中针对感染或应激的一般免疫反应，但它对具有转化的表型的细胞或肿瘤细胞有细胞毒性。TNF-R信号能选择性地裂解肿瘤细胞和受病毒感染感染的细胞。可以用干扰素- γ (IFN- γ)和各种常规化疗剂加强TNF-R信号对肿瘤细胞的毒性作用。

可将由TNF-R信号在肿瘤细胞中诱发的抗增殖活性或细胞毒性活性用于治疗目的。不过，TNF-R活化对于多种免疫调节反应，包括启动促炎级联系统有多效作用。因此，一直不能做到将TNF-R信号的

细胞毒性作用定向于肿瘤细胞，而又不会同时刺激炎症反应，该反应一般会在人体内产生毒性。

类似地，被称作 Fas 受体(FasR)的另一种 TNF-相关受体的刺激，可以引发细胞毒性，导致多种肿瘤和非肿瘤类细胞的程序死亡。不过，已证实 FasR 的活化作用能导致快速肝坏死，因此排除了其在人体上的治疗用途。

最近，鉴定了 TNF 家族的另一种受体，其被称为 LT- β 受体 (LT- β -R) (Crowe 等, Science,264,PP.707-10(1994)). LT- β -R 能与杂聚淋巴毒素复合体 (LT- α/β) 结合，该复合体包括与另一种被称为淋巴毒素- β (LT- β) 的 TNF-相关多肽结合的 LT- α 亚基。这种 LT- α/β 复合体是膜结合性的，而且，大部分有 LT- $\alpha1/\beta2$ 化学计量 (Browning 等,Cell,72,PP.847-56(1993);Browning 等, J.Immunol.,154, PP.33-46(1995)).

通过对 TNF-R 和其它类 TNF 受体进行类比可以发现，LT- β -R 信号的活化作用发生于当细胞表面的多个受体相互接近时 (Crowe 等,Science,264,PP.707-10(1994)). 这一过程被称为受体群集。TNF 和 LT 配体是多价复合体，其可以同时结合一个以上受体并与这些受体聚集。关于在其它系统中作为受体活化的一种形式的受体群集已积累了大量资料，特别是关于受体酪氨酸激酶的 (Ullrich 和 Schlessinger,Cell,61, PP.203-212(1990);Kolanus 等,Cell,74,PP.171-83(1993)). 因此，服用能诱发靶肿瘤细胞表面的 LT- β -R 分子的群集和下游信号的 LT- $\alpha1/\beta2$ 配体和/或 LT- β -R 激活剂，可以直接刺激在这些细胞里的 LT- β -R 途径。

LT- β -R 信号如 TNF-R 能激活肿瘤细胞中细胞毒性和细胞死亡的途径。重要的是，LT- $\alpha1/\beta2$ 配体不能以任何明显的亲和力与 TNF-R 结合。因此，在肿瘤细胞内的定向 LT- β -R 激活作用将引发这些细胞内的细胞毒性，而不会刺激与 TNF-R 活化相关的炎症途径。因此，用 LT- $\alpha1/\beta1$ 和/或其它 LT- β -R 激活剂处理可用于治疗或减弱致癌细胞 (瘤形成) 进展、严重程度或影响，同时克服了当尝试将 TNF-R 或 FasR 激活作用用于抗肿瘤治疗时所遇到的较大的副作用问题。

发明内容

本发明通过提供能刺激 LT- β -R 信号而不会同时刺激 TNF-R 相关的炎症反应的用于治疗肿瘤细胞的药用组合物和方法解决了上述问题。在一种实施方案中,提供了由 LT- α 与 LT- β 的多个亚基所形成的淋巴毒素复合体(LT- α/β 杂聚复合体),在有 LT- β -R 激活剂条件下,该复合体能诱发对带有 LT- β -R 的细胞的细胞毒性作用。该实验方案的优选组合物和方法包括在有 LT- β -R 激活剂条件下的 LT- $\alpha1/\beta2$ 复合体。更理想的是,LT- $\alpha1/\beta2$ 复合体为可溶形式,而不是膜结合形式,而 LT- β -R 激活剂为 IFN- γ 。

在本发明的另一种实施方案中,将至少一种抗 LT- β -R 抗体(抗-LT- β -R Ab)用作与 LT- α/β 杂聚复合体结合的第二 LT- β -R 激活剂。本实施方案的优选组合物和方法的特征是 LT- $\alpha1/\beta2$ 上有作为第一激活剂的 IFN- γ 和作为第二 LT- β -R 激活剂的至少一种抗 LT- β -R Ab。更理想的是,LT- $\alpha1/\beta2$ 复合体是可溶性的,而所述抗体为单克隆抗体(抗-LT- β -R mAb)。

在本发明的另一种实施方案中,在有或没有第二 LT- β -R 激活剂条件下,在没有外源 LT- α/β 杂聚复合体时使用至少一种抗 LT- β -R Ab。该实施方案的优选组合物和方法包括至少两种抗 LT- β -R 单克隆抗体(抗-LT- β -R mAbs),它能识别与 IFN- γ 组合的 LT- β -R 的非重叠表位。

在另一种实施方案中,本发明提供了用于加强肿瘤细胞的细胞毒性的药用组合物和方法,其特征在于与第二 LT- β -R 激活剂结合的交联的抗-LT- β -R Abs。在一种优选实施方案中,通过交联将单个抗-LT- β -R Abs 固定在一个表面上。在另一种优选实施方案中,在溶液里对抗-LT- β -R Abs 进行交联。更优选的是,抗-LT- β -R Abs 是单克隆抗体,而第二 LT- β -R 激活剂是 IFN- γ 。

本发明还提供了一种用于选择诸如抗-LT- β -R Abs 的 LT- β -R 激活剂的新的筛选方法,该激活剂与 LT- α/β 杂聚复合体组合作用,促进肿瘤细胞死亡。该试验利用了细胞毒性试验中在有 LT- β -R 激活剂条件下人类腺癌细胞对 LT- α/β 杂聚复合体的较高的敏感性。用于检验推定的 LT- β -R 激活剂的方法以抗-LT- β -R 抗体为例进行了说明,该方法包括以下步骤:

1)在有或没有被试验的特定抗-LT- β -R Ab的条件下,在含有IFN- γ 和纯化的LT- α 1/ β 2的培养基中将肿瘤细胞(如HT29人类腺癌细胞)培养几天;

2)用一种能将活细胞染色的染料处理所述细胞;和

3)对被染色的细胞进行定量,以测定在有LT- α 1/ β 2、IFN- γ 和试验抗-LT- β -R Ab的条件下,在每种样品中被杀死的肿瘤细胞的比例。或者,通过若干已知测定细胞活力的试验方法中的任一种测定存活细胞数,如通过测掺入DNA中的 ^3H -胸苷量。

能在该试验中显著提高肿瘤细胞的杀灭百分比的抗-LT- β -R Ab(或Ab组合体)是本发明范围内的LT- β -R激活剂。该溶细胞试验可用于鉴定新的能与LT- α / β 杂聚复合体组合而起作用的LT- β -R激活剂。

附图说明

图1A.通过TNF-R和LT- β -R免疫亲和层析分离的纯化LT- α / β 杂聚复合体形式的大小分析。在一种TSK 3000HPLC树脂上对纯化蛋白进行分析,分析是在磷酸缓冲的盐溶液中进行,图中示出了各种大小标记的位置。

图1B.在一台BioCad仪器(Perceptive Biosystems)上用一个Poros羧甲基柱(4.6mm \times 100mm)对纯化的LT形式进行离子交换分析。将各种样品蛋白27 μg 加注到柱上,并用0-1MNaCl梯度以5ml/分的速度,用20倍的柱体积进行洗脱,梯度液是用一种缓冲液配制而成,该缓冲液含有16.66 μM Hepes,16.66 μM 乙酸钠,和16.66 μM Mes缓冲液(pH6.5)。

图2A,比较在有或没有80U/ml IFN- γ 的条件下抗Fas受体mAb CH-11(- \bullet -)、TNF(- \circ -)、LT- α (- \square -)、LT- α 1/ β 2(- \blacksquare -)、和LT- α 2/ β 1(- \blacklozenge -)对人类腺癌HT29细胞的细胞毒性。

图2B,比较在有80U/ml IFN- γ 的条件下,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的人IgG(- \bullet -)、可溶性p60TNF-R-Fc(- \circ -)和可溶性LT- β -R-Fc受体-免疫球蛋白嵌合体(- \square -)抑制图2A所示的细胞毒性的能力。

图3.抗-LT- α -R mAbs加强LT- α 1/ β 2对人腺癌HT29细胞的

细胞毒性作用。(A)抗-LT- β -R mAb CDH10的存在加强LT- α 1/ β 2对HT29细胞的溶细胞作用。在没有mAb(-●-)和有0.5 μ g/ml对照IgG1(-■-)、0.05 μ g/ml CDH10(-○-)和0.5 μ g/ml(-□-)CDH10的条件下测定LT- α 1/ β 2的作用。(B)抗-LT- β -R mAb BDA8的存在抑制了LT- α 1/ β 2对HT29细胞的溶细胞作用。测定在有2 μ g/ml对照IgG1(-■-)或抗-LT- β -R mAb BDA8(-□-)的条件下LT- α 1/ β 2的作用。在该试测中CDH10和BDA8抗-LT- β -R mAbs的差异是它们针对不同的LT- β -R抗原表位的一种表现。

图4.固定的抗-LT- β -R mAbs对人腺癌HT29细胞具有细胞毒性。(A)当把抗-LT- β -R mAbs固定在一个表面上时,其对HT29细胞有直接的细胞毒性作用。用IgG1(-●-)、抗一种无关的大量细胞表面抗原HT29/26的mAb(-■-)、BDA8(-○-)和CDH10(-□-)涂敷板。(B)可溶性抗-LT- β -R mAbs单独对HT29细胞生长的作用。符号与(A)中相同。当单独服用可溶形式的抗-LT- β -R mAbs时,其对HT29细胞无显著细胞毒性作用。

图5.用成对的可溶性抗-LT- β -R mAbs处理之后,对肿瘤细胞的细胞毒性加强的代表性定量测定。(A)对照IgG1(100ng/ml)、抗-LT- β -R mAb BHA10(100ng/ml)、抗-LT- β -R mAb CBE11(50ng/ml)、BHA10(100ng/ml)+IgG(100ng/ml)、和BHA10(100ng/ml)+CBE11(50ng/ml)对HT29细胞的细胞毒性作用。含有80U/ml的IFN- γ 。(B)对照IgG1(100ng/ml)、抗-LT- β -R mAb CDH10(100ng/ml)、抗LT- β -R mAb CBE11(50ng/ml)、CDH10(100ng/ml)+IgG1(100ng/ml)和CDH10(100ng/ml)+CBE11(50ng/ml)对HT29细胞的细胞毒性作用。含有80U/ml的IFN- γ 。(C)对照IgG1(100ng/ml)、抗-LT- β -R mAb CDH10(33ng/ml)、抗-LT- β -R mAb AGH1(50ng/ml)和CDH10(33ng/ml)+AGH1(50ng/ml)在含有80U/ml IFN- γ 的条件下对HT29细胞的细胞毒性作用。(D)与(C)相同,所不同的是在溶细胞试验中采用WiDr人腺癌细胞(Raitano和Korc, J.Biol.Chem.,265,PP.10466-472(1990))。

图6.用抗-LT- β -R mAb处理过的SCID小鼠的肿瘤大小。(A)

在接种 30 天后人腺癌 WiDr 肿瘤在 SCID 小鼠体内的大小,用一种抗体进行共处理。在第 1 和第 2 天用盐水、单用 IFN- γ 、有或没有 IFN- γ 的抗-LT- β -R mAb (CBE11) 和有 IFN- γ 的对照抗-人 LFA-3mAb(1E6)处理小鼠。每组的平均值用横线表示。5 组的平均值、标准误、和动物数(感觉异常的)(从左至右)为: 0.88+/-0.59(14)、1.21+/-0.7(21)、0.041+/-0.052(16)、0.11+/-0.1(12)和 0.98+/-1.16(12)。(B) 接种后进行为期 15 天的抗体处理,在接种后 14-49 天人腺癌 WiDr 肿瘤在 SCID 小鼠中的大小。在没有任何处理的条件下让肿瘤生长至平均直径为 0.53cm(0.076cc),在第 15 天开始 i.p.注射,并按箭头所示继续注射。示出的是单用 IFN- γ (1×10^6 U/注射) (-□-)、有 50 μ g 1E6 抗-LFA-3mAb 的 IFN- γ (-○-)、有 50 μ g CBE11 抗-LT- β -R mAb 的 IFN- γ (- Δ -) 或单用 50 μ g CBE11 抗-LT- β -R mAb (未示出) 处理一组 12 只动物的平均值和标准误。

具体实施方式

为了能全面地理解本发明,特做以下详细说明。

“抗肿瘤活性”这一说法是指一种物质或组合物阻止与其相互作用的肿瘤细胞增殖或诱导其死亡的能力。

“细胞程序死亡”是指一种编程的细胞死亡过程。

“细胞毒性活性”是指一种物质或组合物诱导与其相互作用的细胞死亡的能力。

“表位”(或抗原决定子)是指与一个抗体分子上的一个抗原结合位点结合的部分。一个表位可由一个单克隆抗体(mAb)识别。多个表位通常能由多克隆抗体(Ab)识别。

抗体的“Fc 结构域”是指该抗体分子的一部分,包括 CH₂、CH₃ 和绞链区,但缺少抗原结合位点。

“干扰素诱导剂”是指能够直接或间接刺激 I 型(IFN- α , IFN- β)或 II 型(IFN- γ)干扰素内源生成的任何试剂。干扰素诱导剂的例子包括双链 RNA 分子,和由各种植物或药物衍生的化合物。

“LT- α 突变蛋白”和“LT- β 突变蛋白”是指与其天然多肽的氨基酸序列相比,具有一个或几个氨基酸变化的 LT- α 或 LT- β 多肽。

“LT- β -R 激活剂”是指能增加配体与 LT- β -R 结合、细胞表面 LT- β -R 群集或 LT- β -R 信号或影响 LT- β -R 信号在

细胞内的翻译的任何试剂。LT- β -R 激活剂的例子包括 IFN- α 、IFN- γ 、TNF、干扰素诱导剂、可溶性抗-LT- β -R Abs、交联的抗-LT- β -R Abs 和多价抗-LT- β -R Abs。

“LT- β -R 信号”是指一切与 LT- β -R 途径相关的分子反应，以及随后的由该反应导致的分子反应。

“抗-LT- β -受体抗体”（“抗-LT- β -R-Ab”）是指能识别并结合 LT- β 受体的至少一个表位的任何抗体。

“抗-LT- β 受体单克隆抗体”（“抗-LT- β -R mAb”）是指能识别并结合 LT- β -R 的一个表位的任何单克隆抗体。

“交联的抗-LT- β -R(m)Abs”是指抗 LT- β -R 的抗体，该抗体或在溶液中用抗-LT- β -R 抗体(Ab)或(mAb)交联剂相互交联形成抗体附聚物，或将其彼此接近地固定在一个表面或基质上。

“抗-LT- β -R Ab（或 mAb）交联剂”是指能在溶液中共价地或非共价地聚集抗-LT- β -R Abs 的任何试剂，聚集后的抗体可以结合并加强靶细胞表面 LT- β 受体群集。所述交联剂包括但不限于化学交联剂、能与抗-LT- β -R Abs 或 mAbs 部分反应的二级抗体、或能与抗-LT- β -R Abs 结合的内源或外源加入的可溶性或表面结合的 Fc 受体。

“LT- α 生物学活剂”、“LT- β 生物学活性”和“LT- α/β 生物学活性”的定义如下：1)与一种抗相应的天然亚基或亚基复合体至少一个表位的抗体的免疫交叉反应性；或 2)LT 亚基或亚基复合体竞争诸 TNF-R 或 LT- β -R 的 LT 专一性受体上的配体结合位点的能力；或 3)具有从性质上讲与天然 LT 亚基或复合体相同的刺激免疫调节反应或细胞毒性活性的能力。

“LT- α/β 杂聚复合体”是指至少一个 LT- α 亚基与一个以上 LT- β 亚基之间的稳定的结合体。所述亚基之间可以通过静电、范德华力或共价相互作用结合在一起。理想的是，LT- α/β 杂聚复合体具有至少 2 个相邻的 LT- β 亚基，但缺乏相邻的 LT- α 亚基。最好是该复合体具有化学计量学 LT- $\alpha/1/\beta/2$ 。

“多价配体”是指一种分子或复合体，它具有一个以上受体结合位

点,并能同时结合和聚拢至少两个受体分子。

“I型前导序列”是指一种真核蛋白的氨基末端部分,它作为引导该蛋白至内质网(ER)膜的信号,而且该蛋白通常要通过整个分泌通道。前导序列通常在ER膜中被一种信号肽酶裂解下来。

“信号序列”是原核宿主中的真核细胞I型前导序列的功能等同物,它能引导蛋白进入或通过细菌的类脂双层膜。

“可溶性LT- α/β 杂聚复合体”是一种含有可溶性LT- β 亚基的LT- α/β 杂聚复合体,其中,能将该多肽定位于所述膜上的氨基酸序列已缺失或失活,从而使LT- β 亚基变得可溶。用遗传工程方法制备的能表达两种亚基的合适宿主细胞能够分泌可溶性LT- α/β 杂聚复合体。

“表面LT- α/β 复合体”是指出现在细胞表面的含有LT- α 和膜结合LT- β 亚基的复合体。

膜结合LT- α/β 复合体的生产

业已在能大量表达LT的CD4⁺T细胞杂交瘤细胞(H-23.D7)中鉴定到细胞表面淋巴毒素复合体(Browning等, J.Immunol.,147, PP.1230-37(1991);Androlewicz等,J.Biol.Chem.,267,PP.2542-47(1992)).成熟的LT- α 缺乏跨膜结构域并通过与至少一个膜结合LT- β 亚基的相互作用定位于细胞表面。膜结合(表面)LT- α/β 杂聚复合体具有突出的LT- $\alpha1/\beta2$ 化学计量。

在合成中,LT- β 作为一种细胞膜蛋白与LT- α 结合,从而将LT- α “导引”至细胞膜。在没有LT- β 的情况下,LT- α 被分泌到胞外介质中。LT亚基通常在蛋白进入细胞膜之前在细胞里组合成复合体。一旦LT- β 亚基插入细胞膜,它就不再与分泌的LT- α 形成稳定的复合体了。因此,如果需要膜结合形式的LT- α/β 杂聚复合体的话,最好在同一细胞中共同表达所需的LT- α 和LT- β 亚基。

通过用LT- α 和LT- β 基因共转染宿主细胞可以重建表面LT- α/β 杂聚复合体。在单独表达每一种LT基因的稳定细胞系中看不到表面LT复合体。不过,如果宿主细胞能正常产生大量LT- α (例如RPMI1788细胞;参见下文),则用编码所需LT- β 多肽的LT- β 基因进行转染应当足以产生含有全长LT- α 亚基的LT- α/β 复合体。

LT - α 和 LT - β 多肽在若干真核表达系统中的共表达会导致其组合并作为活性配体输出 (Crowe 等, *J.Immunol.Methods*,168,79-89(1994)). 可以采用的宿主系统包括但不限于 CHO 细胞, COS 细胞, β 细胞, 包括骨髓瘤, 杆状病毒感染的昆虫细胞和酵母。

本发明的 LT - α/β 杂聚复合体的 LT - α 亚基可选自淋巴毒素 - α 、天然人或动物淋巴毒素 - α 、重组淋巴毒素 - α 、可溶性淋巴毒素 - α 、分泌性淋巴毒素 - α 、具有 LT - α 生物学活性的淋巴毒素 - α 突变蛋白、或具有 LT - α 生物学活性的上述任何淋巴毒素 - α 的片段。

LT - α 多肽可以是包括其活性片段的该分子的任何可溶形式, 该多肽可以在真核表达系统中产生, 其中, 天然 LT - α 前导序列将被切除。另外, 可将成熟 LT - α 序列与异源信号序列的融合形式用于增加 LT - α 在其它宿主系统中的分泌。信号的选择基于打算采用的宿主细胞, 并可以包括细菌、酵母、哺乳动物和病毒序列。天然信号或血管细胞粘着分子 - 1 (VCAM - 1) 信号序列适用于哺乳动物表达系统。

LT - α 多肽还能和诸如免疫球蛋白链或其片段的具有较长的血浆半衰期的多肽融合。可用于提高血浆半衰期的血浆蛋白包括血清白蛋白、免疫球蛋白, 载脂蛋白和运铁蛋白。聚乙二醇 (PEG) 结合可以稳定该多肽并降低其免疫原性。理想的是, LT - α 融合蛋白在受治对象体内不是明显的免疫原, 而且所述血浆蛋白在该对象体内不会因为其正常的生物学活性而导致不理想的副作用。

人 LT - α 在 N 和 O 残基上被糖基化, 这要取决于其来源, 这种糖基化具有显著的糖基微不均匀性。被选择用于形成 LT 复合体的特定 LT - α 寡糖组份会影响体内清除速度 (Fukushima 等, *Arch.Biochem.Biophys.*,304,PP.144-53(1993))。由于糖基化突变体可以通过在不同的宿主细胞中表达而产生, 这是在选择 LT - α 来源时所要考虑的一个因素。

可以从 B 淋巴母细胞系 RPMI1788 中纯化 LT - α , 该细胞系能以组成成份形式分泌 LT - α , 而且通过用佛波酯 PMA 处理, 可以诱导其大量分泌 (Aggarwal 等, *J.Biol.chem.*,259,PP.686-91(1984))。另外, 可以将人类 LT - α 基因用于在不同宿主系统中重组法生产 LT - α 多肽, 所

述系统包括细菌(Schoenfeld 等,J.Biol.Chem.266,PP.3863-69(1991)); 杆状病毒感染的昆虫细胞(Crowe 等,J.Immunol.Methods, 168, PP.70-89(1994)); 和哺乳动物细胞(Browning 和 Ribolini, J.Immunol.143, PP.1859-67(1989); Fukushima 等,Arch.Biochem.Biophys.,304,PP.144-53(1993))。

可以用常规筛选方法测定编码具有 LT - α 生物学活性的多肽片断的 LT - α 基因部分。可用于筛选 LT - α 生物学活性的方法包括用结合于 TNF - R 的天然 LT - α 进行的竞争抑制分析或在已知方法中通过抑制 LT - α 诱导肿瘤细胞的细胞毒性的能力直接或间接地进行测定。理想的是, 将 LT - α 片段与 LT - β 组成杂聚复合体, 或通过结合于 LT - β - R 的 LT - α/β 的竞争抑制测定 LT - α/β 的生物学活性, 或在本文所披露的方法中测定其诱导肿瘤细胞的细胞毒性的能力对复合体进行分析。

淋巴毒素 β , 又被称为 p33 业已在 T 淋巴细胞、T 细胞系、B 细胞系和淋巴因子激活的杀伤细胞的表面得到鉴定。LT - β 是本申请人待批的国际申请 PCT/US91/04588 的主题, 该申请于 1992 年 1 月 9 日公开, 公开号为 WO92/00329; 和 PCT/US93/11669, 公开日为 1994 年 6 月 23 日, 公开号为 WO94/13808, 这些专利被收作本文的背景技术。

LT - β 基因编码一种 240 - 244 个氨基酸的多肽(Browning 等.,Cell,72,PP.847-56(1993))。LT - β 是 II 型膜蛋白, 具有一个短的 N 末端胞质结构域, 其后为一个由 30 个疏水氨基酸组成的膜锚锭结构域。它具有一个单一的 N 连接糖基化位点并且仅有一个半胱氨酸残基, 该残基似乎不参与亚基间二硫键的形成。

组成本发明的 LT - α/β 杂聚复合体的 LT - β 亚基可选自淋巴毒素 - β 、天然人或动物淋巴毒素 - β 、重组淋巴毒素 - β 、可溶性淋巴毒素 - β 、分泌性淋巴毒素 - β 、具有 LT - β 生物学活性的淋巴毒素 - β 突变蛋白或具有 LT - β 生物学活性的上述任何物质的淋巴毒素 β - 片段。

由上文针对 LT - α 多肽所作的说明, 也可以对 LT - β 多肽进行修饰, 以便通过相同方法提高其可溶性或血浆半衰期。同样, 如针对 LT - α 所述的那样, 也可采用常规筛选方法评价编码有 LT - β 生物学活性的

多肽片段的 LT - β 基因部分。

可溶性复合体的生产

可溶性（非膜结合）LT - α/β 杂聚复合体包括已由膜结合形式变成可溶性形式的 LT - β 亚基。这种复合体详细披露于本申请人的待批国际申请（PCT/US93/11669，公开日 1992 年 1 月 9 日，公开号 WO94/13808）中。可溶性 LT - β 肽是由淋巴毒素 - β 的氨基酸序列限定，其中，所述序列在按照 Browning 等(Cell,72,PP847-56(1993))的编号系统编号的跨膜域末端（即：44 位氨基酸左右）和第一 TNF 同源片段（即 88 位氨基酸左右）之间的任意位置处被切断。

可以通过截短 LT - β 的 N - 末端除去其胞质尾区和跨膜区来生产可溶性 LT - β 多肽(Crowe 等,Science,264,PP.707-710(1994))。另外，可以通过缺失或用亲水氨基酸置换正常的疏水氨基酸残基（包括跨膜结构域）使跨膜结构域失活。在任何情况下均会产生明显的亲水特征，由此降低亲脂性并改善其水溶性。跨膜结构域的缺失优于用亲水性氨基酸残基进行的置换，因为它可以避免导入有效免疫原表位。

缺失的或失活的跨膜结构域可以用 I 型前导序列（如 VCAM - 1 前导序列）所取代或与该序列结合，以便该蛋白由 Val 40-Pro88 之间的序列的任一处开始分泌。可溶性 LT - β 多肽可以包括位于 N - 末端的任何数目的前导序列。这种序列使得所述肽能被表达并被导向真核系统的分泌途径。例如，参见 Ernst 等，美国专利 US5,082,783(1992)。

可以通过用编码 LT - α 和可溶性 LT - β 的 DNA 共转染合适的宿主细胞来生产可溶性 LT - α/β 杂聚复合体(Crowe 等,J.Immunol.Methods, 168,PP.79-89(1994))。在缺乏 LT - α 的条件下分泌的可溶性 LT - β 是高度寡聚化的。然而，当与 LT - α 共表达时，形成一种 70kDa 的含有两种蛋白的类三体结构。还可以通过用编码一种可溶性 LT - β 多肽的基因转染仅能正常表达 LT - α 的细胞系（如上文所披露的 RPMI1788 细胞）来生产可溶性 LT - $\alpha1/\beta2$ 杂聚复合体。

LT - α 和 LT - β 多肽可以分别合成，用温和的洗涤剂变性，混合在一起，并通过除去洗涤剂复性，以形成能被分离的混合 LT 杂聚复合体（见下文）。

LT - α 1/ β 2 复合体的纯化

用 TNF 和 LT - β 受体作为亲和纯化剂通过亲和层析从含有不同亚基化学计量的共表达复合体中分离可溶性 LT - α 1/ β 2 杂聚复合体。TNF 受体仅结合于 LT 复合体的 α/α 裂隙内。LT - β 受体以很高的亲和力与 β/β 裂隙结合, 以较低的亲和力与杂聚 LT - α/β 复合体 α/β 裂隙结合。因此, LT - α 3 和 LT - α 2/ β 1 能和 TNF - R 结合。LT - β - R 也能和 LT - α 2/ β 1 三体 (在 α/β 裂隙内) 结合, 但不能结合 LT - α 3。另外, LT - β - R (而不是 TNF - R) 能结合 LT - α 1/ β 2 和 LT - β _n (这种制剂的确切组成尚不清楚, 但它是大的聚集体)。

受体亲和剂可以可溶性胞外结构域形式制备 (例如, 参见 Loetscher 等, *J.Biol.Chem.*, 266, PP.18324-29(1991)), 或以胞外配体结合域与免疫球蛋白 Fc 结构域连接的嵌合蛋白形式制备 (Loetscher 等, *J.Biol.Chem.*, 266, PP.18324-29(1991); Crowe 等, *Science*, 264, PP.707-710(1994))。用常规方法通过化学交联将受体同亲和基质连接。

有两种用受体和免疫亲和层析纯化 LT - α 1/ β 2 配体的方法。在第一种方法中, 让来自能共表达 LT - α 和截短的 LT - β 形式的合适表达系统的上清液通过 TNF - R 柱。TNF - R 能结合 LT - α 3 和 LT - α 2/ β 1 三体。通过 TNF - R 柱的流通液含有 LT - β (n) 和 LT - α 1/ β 2。

在第二种方法中, 所有含 LT - β 的形式 (LT - β (n)、LT - α 1/ β 2 和 LT - α 2/ β 1) 与 LT - β - R 柱结合并用诸如离液剂或 pH 变化的经典方法从 LT - β - R 柱上洗脱。(LT - α 3 从该柱中流过)。中和洗出液或除去离液剂, 然后让洗出液通过一个 TNF - R 柱, 其仅结合于 LT - α 2/ β 1 三体。该柱的流通部分将含有 LT - β (n) 和 LT - α 1/ β 2 三体。

在两种情况下, 通过随后的本领域已知的凝胶过滤和/或离子交换层析方法将纯的 LT - α 1/ β 2 三体同 LT - β 分离。

另外, 可以通过各种常规层析方法分离并纯化不同形式的 LT - α/β 杂聚复合体。同样理想的是, 可以将一系列常规纯化方法与上述免疫亲和纯化步骤之一进行组合。

抗 - LT - β - R 抗体的来源

用常规技术制备抗人 LT - β 受体的多克隆抗体血清，作法为：用含于弗氏完全佐剂中的人 LT - β 受体 - Fc 融合蛋白（例 2）对诸如羊、兔或小鼠的动物进行皮下注射，然后通过腹膜内或皮下注射弗氏完全佐剂加强免疫。用常规方法筛选含有抗 LT - β 受体的理想抗体的多克隆抗血清。

抗人 LT - β 受体 - Fc 融合蛋白的小鼠单克隆抗体(mAbs)是这样制备的：在没有佐剂的条件下用与蛋白 A Sepharose 珠结合的 CHO 细胞衍生的重组 LT - β 受体 - Fc 融合蛋白 (LT - β - R - Fc) 反复对 RBF 小鼠进行腹膜内免疫。最后用可溶性 LT - β - R - Fc 进行加强 (i.p. 和 i.v.)，用常规方法融合脾细胞，并通过 ELISA 筛选杂交瘤(Ling 等, *J. Interferon and Cytokine Res.*, 15, PP.53-59(1995))。在细胞淘选试验中进一步筛选杂交瘤阻止被激活的能表达表面 LT - α 1/ β 2 的 II - 23 杂交瘤细胞与 LT - β - R - Fc 涂敷的板结合的能力。通过 IgG 的蛋白 A Sepharose 纯化从杂交瘤培养上清液中制备纯的 mAbs。

还可以用标准重组 DNA 技术制备各种形式的抗 - LT - β - R 抗体 (Winter 和 Milstein, *Nature*, 349, PP.293-99(1991))。例如，可以构建“嵌合”抗体，其中，来自动物抗体的抗原结合域与人的稳定结构域连接（例如，Cabilly 等, *US4, 816, 567*; Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, PP.6851-55(1984))。当把嵌合抗体用于人类临床治疗时可以观察到由动物抗体引起的免疫原性反应减少了。

另外，可以合成能识别 LT - β - R 的重组“人源化抗体”。人源化抗体是含有大部分人类 IgG 序列的嵌合体，决定特异抗原结合的片段已插入该嵌合体中（例如，WO94/04679）。用需要的抗原免疫动物，分离相应的抗体，并除去决定特异抗原结合的可变区序列部分。然后将动物产生的抗原结合域克隆到人抗体基因的合适位置，所述基因中抗原结合域已缺失。人源化抗体能减少杂合（种间）序列的应用，而且不大可能在受治对象体内引发免疫反应。

不同类型重组抗 - LT - β - R 抗体的构建也可以这样实现：制备含有抗 LT - β - R 可变结构域和自不同类型免疫球蛋白中分离的人稳定域 (CH1、CH2、CH3) 的嵌合的或人源化抗体。例如，可以按如下

方法制备具有较高抗原结合位点化合价的抗-LT- β -R IgM 抗体：通过将抗原结合位点克隆到带有人 μ 链稳定域的载体中进行重组生产 (Arulanandam 等, J.Exp.Med., 177, PP.1439-50(1993); Lane 等, Eur.J.Immunol.22,PP.2573-78(1993); Traunecker 等, Nature, 339, PP. 68-70(1989)).

另外, 可以用标准重组 DNA 技术, 通过改变抗原结合位点附近的氨基酸残基而改变重组抗体与其抗原的结合亲和力。可以通过基于分子模拟的诱变提高人源化抗体的抗原结合亲和力(Queen 等, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A,86,PP,10029-33(1989);WO94/04679)。

可能希望提高或降低基于靶组织类型或所设计的具体治疗方案的抗-LT- β -R Abs 对 LT- β -R 的亲和力。例如, 用稳定水平的抗-LT- β -R Abs 治疗患者可能是有利的, 该抗体具有减弱了的通过 LT- β 途径发信号的能力, 用于半预防治疗。类似地, 将具有较高的对 LT- β -R 的亲合力的抗-LT- β -R Abs 用于短期的肿瘤定向治疗是有利的。

筛选用作 LT- β -R 激活剂的抗-LT- β -R 抗体

在有诸如 IFN- γ 之类的 LT- β -R 激活剂条件下, 本发明的抗-LT- β -R 抗体能加强 LT- α/β 杂聚复合物(优选为 LT- $\alpha1/\beta2$) 的抗肿瘤活性。在本文中, 抗-LT- β -R 抗体也被称作 LT- β -R 激活剂。被用作 LT- β -R 激活剂的抗体的选择如下:

1)在有或没有受试抗-LT- β -R Ab 的系列稀释液条件下, 在含有诸如 IFN- γ 的 LT- β -R 激活剂和纯化的 LT- α/β 杂聚复合物-优选为 LT- $\alpha1/\beta2$ -的培养基中, 将一系列含有诸如 HT29 细胞的肿瘤细胞的组织培养物孔培养 3-4 天;

2)将测定线粒体功能用的诸如 MTT 的活体染料加入细胞混合物中, 并反应几小时;

3)在 550nm 波长的光线下对各孔中混合物的光密度进行定量 (OD550)。OD550 与各孔中在有 LT- α/β 杂聚复合物、LT- β -R 激活剂和试验抗-LT- β -R Ab 的条件下被杀死的肿瘤细胞数成反比。

在有 LT- α 1/ β 2 和 IFN- γ 的条件下可以单独作为 LT- β -R 激活剂的本发明优选抗体包括: BKA11、CDH10、BHA10 和 BCG6 抗-LT- β -R mAbs (表 2, 见下文)。

交联抗-LT- β -R 抗体

在有诸如 IFN- γ 的第二种 LT- β -R 激活剂的条件下, 无需外源 LT- α / β 杂聚复合体, 本发明的交联抗-LT- β -R 抗体即可单独作为 LT- β -R 激活剂。交联的抗-LT- β -R 抗体能明显结合于细胞表面 LT- β 受体, 并诱导其群集, 从而激活 LT- β 受体介导的靶细胞死亡。

在一种实施方案中, 通过固定于水不溶性基质或表面上对一种或几种类型的抗 LT- β -R 抗体进行交联。与一种双官能剂的衍生化作用可用于将所述抗体与水不溶性支持基质或表面交联。常被用于实施抗体与水不溶性支持基质或表面的交联的试剂包括 1, 1 双(-重氮乙酰基)-2-苯乙烷、戊醛、N-羧琥珀酰胺酯, 包括与 4-重氮水杨酸的酯, 同型双官能亚氨酸酯, 包括二琥珀酰亚胺酯, 和双功能马来酰亚胺, 如双-N-马来亚氨-1, 8-辛烷。诸如甲基-3-[(P-重氮苯基)二硫]丙亚氨酸酯能形成光敏化中间体, 当用光线刺激时, 这些中间体可以选择性地进行交联。还可将溴化氰激活的糖类和披露于以下美国专利中的底物用作蛋白固定化和交联的活性水不溶性基质: US3,959,080; 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4, 247, 642; 4,229,537;4,055,635; 和 4,330,440。

抗体结合的表面可以是非蛋白类聚合物, 通常为天然的或合成的亲水性聚合物。可以采用诸如聚乙烯醇(PVA)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的亲水性聚乙烯聚合物。还可以采用聚亚烷基醚, 如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化乙烯酯或甲氧基聚乙二醇、聚氧化烯, 如聚氧化乙烯和聚氧化丙烯, 和聚氧化乙烯和聚氧化丙烯的嵌段共聚物(Pluronic); 聚异丁烯酸酯; 聚羧乙烯制剂; 分支的或不分支的多糖, 其包括糖单体 D-甘露糖、D-和 L-半乳糖、岩藻糖、果糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡萄糖醛酸、唾液酸、D-半乳糖醛酸、D-甘露糖醛酸(例如, 聚甘露糖醛酸或藻酸)、D-葡糖胺、D-半乳糖胺、D-葡萄糖

和神经氨酸，包括同多糖和杂多糖，如乳糖、支链淀粉、淀粉、羟乙基淀粉、直链淀粉、葡聚糖硫酸酯、葡聚糖、糊精、糖原、或酸性粘多糖的多糖亚基，如透明质酸；糖醇聚合物，如聚山梨醇和聚甘露醇；和肝素或类肝素。

交联之前的聚合物优选为水溶性的并且最好是仅含有一个单一的活性化学基团，以避免与抗体的多次交联反应。在任何情况下均应优化反应条件，以便减少交联并直接地或通过一个后续的凝胶过滤或层析步骤回收具有大致均匀的分子量范围的产物。通过常规实验法确定交联抗体基质的最佳分子量，采用本文所披露的细胞毒性和受体结合试验。

交联后的最终缀合物优选可溶于诸如血液的生理液体。缀合形式的聚合物的免疫原性不应当很高，而且应当具有适于静脉内输液或注射的粘度，如打算以所述方式服用的话。

该聚合物也可以是水不溶性的。可以采用的材料包括亲水凝胶，或具有抗体可固定在它上面的表面的成型物品，如外科导管、插管、或引流管。优选采用固体支持材料，该材料是生物学相容的，而且在生理环境中基本上是惰性的。如果一种材料被放入受治对象体内后基本上不会刺激免疫反应（包括发炎）或吸附纤维变性细胞，则该材料为生物学上相容的。

抗-LT- β -R Abs 还可以固定在被共价地或非共价地涂有次级抗体的表面上，次级抗体能结合一级抗体（例如，羊抗小鼠 IgG 抗体；参见例 7）。单独检验每一种抗-LT- β -R mAb，当固定在具有次级抗体的表面上时，在有 IFN- γ 的条件下起着 LT- β -R 激活剂的作用（图 4 和 7）。

在另一种实施方案中，溶液中的交联的抗-LT- β -R Abs 起着 LT- β -R 激活剂的作用。可以用抗-LT- β -R Ab（或 mAb）交联剂对抗-LT- β -R Abs 进行交联。本发明的抗-LT- β -R Ab（或 mAb）交联剂是任何能够在溶液中共价交联或非共价地聚集抗-LT- β -R Abs（或 mAbs）的试剂，交联的抗 LT- β -R Abs（或 mAbs）能结合于并加强靶细胞表面 LT- β -R 群集。所述抗-LT- β -R Ab（或 mAb）交联剂包括，但不限于能以上述受控制的方式与

抗体反应的化学交联剂。另外，次级抗体、Sepharose A、Fc受体或其它能结合并聚集多个初级抗-LT- β -R Abs但又不会阻止其活性的试剂可用于在溶液中形成抗-LT- β -R Abs聚集体。

多抗-LT- β -R Abs在溶液中起LT- β -R激活剂的作用

本发明提供了在溶液中含有起LT- β -R激活剂作用的多抗-LT- β -R Abs的组合物，所述Abs通过加强表面LT- β -R群集而起激活剂作用。可以采用针对LT- β -R的不同表位的多克隆抗-LT- β -R Abs。

理想的是，抗-LT- β -R Abs是针对LT- β -R的不同的和非重叠的表位的单克隆Abs。

用于LT- β -受体激活作用的组合的抗-LT- β -R mAb法需要组合两种非重叠表位。而且，仅有某些表位能产生受体聚集。我们已证实了4种特殊LT- β -R免疫活性表位的存在。可以用如下方法鉴定其它表位（如由新的mAbs所形成）：继续融合免疫过的小鼠脾细胞、通过免疫不同种类的动物、以及采用不同的免疫方法。

还可以用BIAcore层析技术通过测定不同mAbs相互竞争结合LT- β -R的能力对表位进行直接作图(Pharmacia BIAtechnology Handbook, "Epitope Mapping", Section 6.3.2, (May 1994); 同样参见Johne等, J.Immunol.Methods, 160, PP, 191-8(1993))。

根据其在细胞毒性试验中（例8；表1）与其它LT- β -R mAbs配合杀死肿瘤细胞的能力，可将单个LT- β -R mAs分成至少4种类型。例如，I型的BDA8 mAb不能与I型的AGH1 mAb组合作用，以促进肿瘤细胞毒性。类似地，在肿瘤细胞毒性试验中，III型的BKA11和CDH10 mAbs也不能配合作用。

图5A - C表示在细胞毒性试验中，在有IFN- γ 作为LT- β -R激活剂的情况下，单独和以成对的组合形式服用代表性抗-LT- β -R mAbs对肿瘤细胞的作用。单独使用的IV型抗-LT- β -R mAb CBE11具有轻微的细胞毒性作用，通过与II型mAb BHA10组合可以加强这种毒性作用（图5A）。CBE11能产生与III型mAb CDH10类似的作用（图5B）。

通过服用存在于溶液中的组合形式的抗-LT- β -R mAbs 所产生的细胞毒性，并不是专门针对 HT29 肿瘤细胞系的。图 5C 表明，I 型 AGH1 mAb 和 III 组 CDH10 mAb 在杀灭源于人腺癌肿瘤的两种不同肿瘤细胞系（HT29 细胞和 WiDr 细胞）时的协同作用。

对抗-LT- β -R mAbs 特征的总结

在有第二种 LT- β -R 激活剂，如 IFN- γ 的条件下，本发明的所有抗-LT- β -R mAbs 在通过固定交联时起着 LT- β -R 激活剂的作用。在溶液中有或没有 LT- α 1/ β 2 的条件下，抗-LT- β -R mAbs 作为 LT- β -R 激活剂的能力通常因测试时细胞的状态而异。下面的表 2 总结了本发明所鉴定的抗-LT- β -R mAbs 的特性。

在含有 LT- α 1/ β 2 的溶液中，I 型 mAbs BDA8 和 AGH1 不能作为 LT- β -R 激活剂。BDA8 mAb 确实能阻止 LT- α 1/ β 2 的抗肿瘤作用（图 3B 和表 2）。相反，当与 LT- α 1/ β 2 一起服用时，II 型抗-LT- β -R mAbs BCG6 和 BHA10 具有混合的刺激和拮抗作用。III 型抗-LT- β -R mAbs BKA11 和 CDH10 作为 LT- β -R 激活剂具有独特的能力，在有 LT- α 1/ β 2 和诸如 IFN- γ 的第二种 LT- β -R 激活剂的条件下能加强抗肿瘤作用，而不会出现 II 型 mAbs BCG6 和 BHA10 所常见的拮抗作用。

重要的是要记住根据其在肿瘤细胞溶细胞试验中的配合能力而对抗-LT- β -R mAbs 进行的分类反映出它们与 LT- β -R 的不同表位相互作用。不过，组成同一类型的 mAbs 对其同源表位不一定有相同的结合亲和力。因此，当比较属于相同或不同类型的 mAbs 的作用时所观察到的可变结果可能体现了结合亲和力的差异。因此，可以分离具有对 LT- β -R 较高结合亲和力的 I 型或 IV 型 mAb，这种抗体在有 LT- α 1/ β 2 的条件下能像 III 型 mAbs 一样起着 LT- β -R 激活剂的作用。

已按照布达佩斯条约规定，于 1995 年 1 月 12 日将能产生上述抗-LT- β -R mAbs 的杂交瘤细胞系或其亚克隆交由美国模式培养物保存所（ATCC）(Rockville,MD)保藏，所确定的 ATCC 入藏号如下：

细胞系	mAb 名称	ATCC 入藏编号
-----	-----------	--------------

a)	AG.H1.5.1	AGH1	HB11796
b)	BD.A8.AB9	BDA8	HB11798
c)	BC.G6.AF5	BCG6	HB11794
d)	BH.A10	BHA10	HB11795
e)	BK.A11.AC10	BKA11	HB11799
f)	CB.E11.1	CBE11	HB11793
g)	CD.H10.1	CDH10	HB11797

在该申请被批准为专利后,对公众获得上述 ATCC 保藏物的所有限制将自动取消。

抗 - LT - β - R IgM 单克隆抗体作为 LT - β - R 激活剂

含有多于常见的两个 IgG 抗原结合位点的抗 - LT - β - R mAbs 在溶液中也作为细胞表面 LT - β - R 交联剂,因此,也落入本发明的 LT - β - R 激活剂的定义内。可以用标准重组 DNA 和杂交瘤技术将抗 - LT - β - R mAb 的抗原结合位点构建成含有 10 个抗原结合位点的 IgM 分子(例 12)。

另外,在用抗原进行一次免疫之后可以通过杂交瘤融合技术收集并富集所分离的全小鼠(或其它动物) IgM 分子。富集 IgM 分子的方法之一是对 CD40 信号缺损小鼠进行免疫(Kawabe 等,Immunity,1,PP.167-78(1994);Xu 等,Immunity,1,PP.423-31(1994))。这类小鼠不能有效产生 IgGs,因此,其对抗原刺激的反应是富集 IgM 的同种型。

抗 - LT - β - R IgM 抗体由于其较高的化合价能在膜平面内有效聚集 LT - β - R 分子,从而加强与其具有 2 个抗原结合位点的 IgG 对应物相比的 LT - β - R 信号。在受体群集中多价抗体的较高效率的一个典型例子,发现于 Fas 受体的抗体,其中 IgM 形式是十分有效的,而普通的二价 IgGs 在溶液中不十分有效(Yonihara 和 Yonihara, J.Exp.Med., 169,PP.1747-56(1989);Alderson 等., Int.Immunol., 6, PP.1799-1806(1994))。

类似的,抗 Fas 受体的 apo-1mAb 是一种 IgG3 mAb。这种 mAb 是一种有效的细胞毒性剂,这种毒性取决于 IgG3 亚型独有的 Fc 相互作用,这种相互作用能聚集成多价形式。除去 Fc 片段能产生一种 F(ab)₂

形式，这种形式不能结合成较大的聚集体，而且没有活性(Dhein等,J.Immunol.,149,PP.3166-73(1992))。因此，通过类比可以预计，抗-LT- β -R mAbs的IgM形式将是有效的抗肿瘤剂。

抗-LT- β -R mAbs抑制小鼠体内的肿瘤生长

诸如抗-LT- β -R mAb的LT- β -R激活剂在体外抑制人肿瘤细胞生长的能力(例6-8和13)可能暗示其体内抗致癌活性。用免疫缺损(SCID)小鼠进行的实验表明，抗-LT- β -R mAb(CBE11)能有效阻止人腺癌WiDr细胞的肿瘤生成(例14;图6)。用WiDr细胞以皮下方式(S.C.)接种的小鼠在两周内产生可测出的肿瘤。当S.C.接种WiDr细胞的同时用CBE11 mAb i.p.处理小鼠时，能够明显抑制肿瘤的过分生长(图6A)。加入IFN- γ 能够加强CBE11抗-LT- β -R mAb的抗肿瘤作用；不过当没有外源IFN- γ 时，CBE11也是有效的。在CBE11 + IFN- γ 组中，16只动物中的7只完全没有肿瘤，而其余动物有小瘤，在2个月时这种小瘤还没有发展。单独用CBE11处理的小鼠在30天时类似于CBE11 + IFN- γ 组。不过，单独用CBE11处理的小鼠最终缓慢地生长出肿瘤。从统计学上讲，在CBE11(+/-IFN- γ)组与对照组(盐水，仅用1FN- γ 和对照抗-人LFA-3 mAb(1E6)+IFN- γ)之间存在显著差异，但对照组之间无显著差异。1E6和CBE11 mAbs均为IgG1抗体。1E6 mAb能有效包围肿瘤细胞，但不能阻止肿瘤生长。因此，由补体或天然的杀伤细胞介导的作用不是CBE11抗LT- β -R mAb的抗肿瘤活性的唯一基础。

在没有外源1FN- γ 的条件下CBE11 mAb在体内抑制肿瘤生长的效力是出乎意料的，因为在体外可测出的基于LT- β -R的细胞毒性作用取决于IFN- γ 。在体内，有某些小鼠1FN- γ 会交换到人IFN- γ 受体上，或涉及其他机制。

CBE11抗-LT- β -R mAb能够在小鼠体内抑制已形成的肿瘤的生长(图6B)。在第一天给小鼠s.c.接种WiDr人腺癌细胞，并让肿瘤生长15天(例14)。在为期7周的实验中，单用IFN- γ ，或用对照抗-人LFA-3 mAb(1E6)+IFN- γ i.p.处理的动物体内的肿瘤的大小继续增加。相反，用CBE11抗-LT- β -R mAb(+IFN- γ 或单独)处理

的肿瘤停止生长，然后，在为期3周的时间内3次注射CBE11抗体，在接种后49天，当实验结束时能抑制肿瘤生长（图6B）。

上述实验表明，在体内致瘤的初期阶段，能激活LT- β -R信号的抗-LT- β -R mAb可有效抑制肿瘤生成，并能在晚期阻止肿瘤细胞的持续生长。该实验还表明，服用单一的LT- β -R激活剂可以有效治疗或减轻感染动物的瘤形成的发展、严重程度或影响。

例14中所披露的方法可用于鉴定本发明的LT- β -R激活剂，该激活剂在体内单独或以组合形式抑制肿瘤细胞生长。预计，其它LT- β -R激活剂（包括但不限于用体外肿瘤细胞毒性分析法确定的激活剂）单独或以组合形式给动物或人服用时能在体内产生类似的抗肿瘤作用。

IFN- γ 及其它LT- β -R激活剂的应用

LT- β -R激活剂，特别是IFN- γ 的存在，可以提高LT- α/β 杂聚复合体及交联的或多抗-LT- β -R Abs对肿瘤细胞的细胞毒性作用。以前业已证实源于肠道的人腺癌细胞（HT29细胞）对FasR信号是敏感的(Yonehara和Yonehara, *J.Exp.Med.*, 169, PP.1747-56(1989)); 而且在有IFN- γ 的条件下对TNF和LT- α 敏感(Browning等, *J.Immunol.*, 143, PP.1859-67(1989))。

提高本发明LT- α/β 杂聚复合体、抗-LT- β -R Abs或其它LT- β -R激活剂的抗肿瘤活性所需的LT- β -R激活剂量取决于被处理的细胞或组织的类型，以及处理方式，并可以用常规方法凭经验确定该用量。以一定浓度提供LT- β -R激活剂或以一定速度输送该激活剂，该激活性能与所服用的其它LT- β -R激活剂一起起作用，在确定其用量时，将上述因素考虑在内。

另外，可以依赖诸如IFN- γ 的干扰素的内源LT- β -R激活剂，该激活剂可由靶肿瘤细胞周围的细胞或组织产生。内源IFN- γ 通常是在受到病毒感染时产生，而且同样出现在肿瘤附近(Dinge等, *Immunity*, 1, PP.447-56(1994))。

能够诱导干扰素，特别是IFN- γ 的任何制剂，以及能加强LT- α/β 杂聚复合体和抗-LT- β -R mAb对肿瘤细胞的细胞毒性作用的制剂属于本发明的LT- β -R激活剂类型。尽管病毒感染通常会诱导

IFN - γ 产生, 用其它制剂也可提高内源 IFN - γ 的含量(例 10)。例如, 临床实验已证实双链 RNA(dsRNA)处理能诱导干扰素产生。因此, 聚核糖鸟苷酸/聚核糖胞苷酸(Poly-rG/rC)及 dsRNA 的其它形式能有效作为干扰素诱导物(Juraskova 等, Eur.J.Pharmacol.,221,PP.107-11(1992))。

也可将源于光果甘草(Glycyrrhiza glabra)的干扰素刺激剂(Acharya 等, Indian J.Med.Res.,98,PP.69-74(1993)),以及药用制剂(其中很多可以口服)用于促进内源干扰素的水平。这种干扰素诱导物包括: imiquimod(Bernstein 等, Antiviral Res.,20, PP.45-55(1994)); saporin(Paramenova 等, Vopr.Virusol., 39, PP.131-34(1994)); 芳基嘧啶酮, 如溴匹立明(Onishi 和 Mochida, Hinyokika Kyo, 40, PP.195-200(1994)); Ridostin(Cheknev 等, Vopr.Virusol.,39,PP.125-28(1994))。

上述干扰素诱导剂中的几种已被鉴定为 I 型干扰素, 如 IFN - α 的诱导剂。I 型干扰素也可以作为 LT - β - R 激活剂, 但不如 IFN - γ 有效。

用 LT - α / β 复合体和 LT - β - R 激活剂治疗

以有效剂量服用本发明的组合物, 以治疗所针对的具体的临床症状。对于具体应用来说, 优选药用组合物的确定以及治疗有效剂量方案的确定属于本领域的公知技术, 例如, 要考虑的因素有患者的状态及体重, 理想的治疗程度和患者对治疗的承受能力。

一般, 在表现出严重的毒性之前, 人能耐受高达 100 - 200 μ g/m² 的 TNF(Schiller 等, Cancer Res.,51,PP.1651-58(1991))。在小鼠中, 以 5×10^4 单位重组人 IFN - γ 给出的 1 - 5 μ g/小鼠/天的剂量范围能导致人初级肿瘤的抑制(Balkwill 等, CIBA Foundation Symposium (1987); Havell 等, J.Exp.Med.,167,PP.1067-85(1988))。根据在 HT29 溶细胞试验中 TNF 和 LT - α 1/ β 2 的相对效果, 大约 5 - 25 μ g/小鼠/天的 LT - α 1/ β 2 能产生治疗剂量范围。外推至人, 与 LT - β - R 激活剂, 如 IFN - γ 组合所需的 LT - α 1/ β 2 剂量至少为 1mg/m²。

从历史上看, IFN - γ 治疗一直是以 100 - 250 μ g/m² 范围内的最大耐受剂量或以 10 - 25 μ g/m² 范围内的“免疫调制”水平进行(例

如, 参见 Kopp 等, *J.Immunother.*, 13, PP.181-90(1993)). 用两种干扰素进行组合治疗时, 使用 4×10^6 单位/ m^2 的 IFN - α 和约 $250 \mu g/m^2$ 的 IFN - γ (Niederle 等, *Leuk.Lymphoma*, 9, PP.111-19(1993)). 约 $25 - 100 \mu g/m^2$ 中等剂量的 IFN - γ 与本文所披露的 LT - α/β 杂聚复合体或纯化抗 - LT - β - R - Abs 组合预计是优化治疗剂量的合适起点。

可以用任何常规的可以接受的服用具有抗肿瘤活性的制剂的方法服用本发明的 LT - α/β 杂聚复合体和交联的抗 - LT - β - R Abs, 包括所述抗体或复合体的分离和纯化形式、其盐或其药理上可以接受的衍生物。

用于此类治疗的药用组合物也可以为各种形式。例如, 其中包括固体、半固体和液体剂型, 如片剂、丸剂、粉剂、液体溶液或悬浮液、栓剂、和可注射的和可灌輸的溶液。其优选形式取决于预计的服用方式和治疗用途。服用方式可以包括口服、肠胃外、皮下、静脉内、损伤内部或表皮服用。

例如, 可将 LT - α/β 杂聚复合体、IFN - γ 和抗 - LT - β - R Abs 放入有或没有能促进吸收或稳定性的辅助因子的无菌、等渗的组合物中。所述组合物优选为液体, 或为冰冻干燥的粉状物。例如, 可以用一种组合物缓冲液稀释 LT 复合物和/或抗 - LT - β - R Abs 和 IFN - γ , 该缓冲液含有 5.0mg/ml 柠檬酸一水合物、2.7mg/ml 柠檬酸三钠、41mg/ml 甘露醇、1mg/ml 甘氨酸和 1mg/ml 聚山梨酸盐 20。可将该溶液冻干、冷冻保存, 并在服用之前用无菌 Water-For-Injection(USP)进行重建。

所述组合物还可以含有本领域已知的常见的、可以药用的载体(例如, 参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th 版, 1980, MacPublishing Company)。这种可以药用的载体可以包括其它医用制剂、载体、遗传载体、佐剂、赋形剂等, 如人血清白蛋白或血浆制剂。所述组合物优选为单位剂型, 而且, 一般每天服用一次或几次。

本发明的药用组合物也可以微球体、脂质体、其它微颗粒输送系统或缓释组合物形式服用, 使其进入接近相关的组织或血液, 或以其它方式与相关组织或血液相联系。缓释载体的合适例子包括有型制品形式的

半渗透性聚合物基质，如栓剂或微胶囊。可植入的或微胶囊化缓释基质包括聚交酯(US3,773,319;EP58,481)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸酯共聚物(Sidman等, *Bibpolymers*, 22, PP.547-56(1985));聚(乙-羟乙基-异丁烯酸酯)或乙烯乙酸乙烯酯(Langer等, *J.Biomed.Mater.Res.*, 15, PP.167-277(1981); Langer, *Chem.Tech.*, 12, PP.98-105(1982))。

可以用已知方法制备含有LT- α/β 杂聚复合体和/或抗-LT- β -R Abs和IFN- γ 的脂质体(例如, 参见DE3,218,121;Epstein等, *Proc.Natl.Acad.Sci,U.S.A.*, 82, PP,3688-92(1985);Hwang等, *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, 77, PP.4030-34(1980);U.S.4,485,045和4,544,545)。通常, 脂质体为小的(约200Å)单层形式, 其中, 类脂含量高于约30mol%胆固醇。对胆固醇的比例进行选择, 以控制LT复合体和/或抗LT- β -R Abs和IFN- γ 的释放速度。

本发明的LT- α/β 杂聚复合体和抗LT- β -R Abs还可以与脂质体结合, 脂质体中含有其它LT- β -R激活剂、化疗剂或IFN- γ , 以补充通常存在于肿瘤部位的IFN- γ 。LT复合体和抗-LT- β -R Abs与脂质体的结合可以用任何已知的交联剂实现, 如已被广泛用于将毒素或化疗剂与抗体连接用于定向输送的异基双官能交联剂。也可以用糖定向的交联剂4-(4-马来酰亚胺苯基)丁酸酰肼(MPBH)实现与脂质体的缀合(Duzgunes等, *J. Cell. Biochem. Abst. Suppl.* 16E77(1992))。

基于抗-LT- β -R激活作用的治疗组合物的优点

以LT- β -R激活为基础的抗肿瘤治疗有几个优点。与LT- α/β 杂聚复合体结合的LT- β -R在 β/β 裂隙中具有较高的亲合力, 而在相邻LT- α 与LT- β 亚基之间界面处所形成的 α/β 裂隙中具有较低的亲合力。相反, TNF受体仅能在 α/α 裂隙中以高的亲合力与LT- α/β 杂聚复合体结合。因此, 纯化的LT- $\alpha1/\beta2$ 复合体以高的亲合力与相邻LT- β 亚基之间的LT- β -R结合, 但缺乏 α/α 裂隙, 因此, 不能通过TNF受体交叉激活信号。因此, 本发明的LT- α/β 杂聚复合体不会刺激与TNF-相关的炎症反应。

LT- $\alpha1/\beta2$ 的使用, 即使是以较大的量使用时也不会激活与炎症反

应相关的内皮细胞的变化。因此,使用激活 LT- β -R 的药用组合物 and 治疗方法不会出现在用 TNF 激活炎性级联反应时所发生的副作用问题。

LT- α 1/ β 2 与小鼠 LT- β -R 的结合大体上与和人 LT- β -R 的结合一样好。每只小鼠注射 100- μ g 人 LT- α 1/ β 2 不会致死(例 11), 这表明 LT- β -R 对整只动物的刺激不会出现在用 FasR 或 p60 TNF-R 激活作用进行类似的试验时所出现的明显毒性。

与用 LT- α / β 杂聚复合体进行治疗相比,用特异抗-LT- β -R 单克隆抗体或抗体组合在人体内触发这种途径具有若干优点。用抗受体抗体进行治疗比用配体进行治疗更具选择性。而且,抗-LT- β -R mAbs 的重组形式比可溶性 LT- α / β 杂聚复合体更易于制备,并能以更大规模生产。

预计,能以与常规抗肿瘤疗法(即辐射和化疗)结合的方式给肿瘤患者服用 mAbs 或 LT- α / β 杂聚复合体。LT- β -R 激活作用与常规疗法的组合治疗可以产生额外的杀伤肿瘤的活性,这种方法能比单独采用抗肿瘤疗法更有效地清除患者体内的致癌细胞。

另外,该方法还具有较少的副作用,因此能以半预防的性质治疗可能没有转移的癌,或用于治疗具有患某种类型癌的遗传倾向的家族的患者。

下面的实施例说明了本发明的 LT- α / β 杂聚复合体和抗-LT- β -R mAbs 及其鉴定方法。这些实施例不应当被视为是限定性的: 所列举的实施例是用于说明目的, 本发明的范围仅由权利要求书来限定。

例 1

制备含 LT- α / β 形式的杆状病毒感染的昆虫细胞的上清液

按所述方法制备编码全长 LT- α 或分泌形式的 LT- β 的重组杆状病毒(Crowe 等,Science,264,PP707-710(1994)). 以 2×10^5 细胞/ml 的密度将 High five 昆虫细胞(Invitrogen,San Diego,CA)接种到 7.2 升无血清 SF900-II(Gibco)培养基中。48 小时后培养物达到 1.8×10^6 细胞/ml, 用 150ml (3×10^8 PFU/ml) LT- β 和 300ml LT- α 杆状病毒母液感染。2 天以后收集培养物, 并通过离心除去细胞残屑。加入 EDTA 和 PMSF(1mM EDTA 和 150 μ M PMSF 的终浓度), 用一个 SIYM10

(Amicon)螺旋柱通过超滤将澄清的上清液浓缩 10 倍。将浓缩液分成 6 份, 每份 120ml, 并在纯化之前将等分样品放在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存待用。

例 2

制备可溶性 LT - β 受体作为免疫球蛋白 Fc 嵌合体

通过 PCR 由 cDNA 克隆扩增 LT - β - R 的胞外结构域直至跨膜区, 采用分别在其 5' 末端和 3' 末端结合了 NotI 和 SalI 限制性酶位点的引物(Browning 等, J.Immunol., 154, PP.33-46(1995))。用 NotI 和 SalI 裂解扩增产物, 纯化, 并与编码人 IgG1 的 Fc 片段的 SalI-NotI 片段一起连接到由 NotI 线性化的载体 pMD901 上。所得到的载体含有由不同启动子驱动的二氢叶酸还原酶基因和 LT - β - R - Fc 嵌合体。通过电击使所述载体进入 CHO dhfr⁻细胞, 并用标准方法分离抗氨甲蝶呤克隆。LT - β - R - Fc 被分泌到培养基中, 并通过 ELISA 试验选择能产生大量嵌合蛋白的细胞系。让高产细胞系生长至较大数量, 并收集条件培养基。通过 Protein A Sepharose 速流亲和层析分离纯蛋白。

例 3

用 TNF - R 和 LT - β - R 进行 LT - α 1/ β 2 的亲亲和层析

为了制备用于 LT 形式的受体亲和纯化的受体, 基本上按生产商的说明以 5mg/ml 树脂的比例将 LT - β - R - Fc (如本文例 2 所述) 和 TNF - R p60 - Fc(Crowe 等, Science, 264, pp.707-10(1994)) 的纯化制剂固定在 CNBr - Sepharose(Pharmacia)上。在使用之前, 对该树脂进行一轮洗脱。让一部分(120ml)SIY10 浓缩液从两个连续的结合 LT - α 和 LT - α 2/ β 1 的 p60 TNF - R - Fc 柱中通过。让含有 LT - α 1/ β 2 和 LT - β 的流通材料通过一个 LT - β - R - Fc 柱。分别用 5 倍柱体积的 PBS、含有 0.5M NaCl 的 PBS 和 PBS 洗柱, 然后用 25mM 磷酸钠、100mM NaCl, pH3.5 洗脱 LT - α 和 LT - α 2/ β 1 复合体。洗脱级分马上用 1/20 体积的 0.5M 磷酸钠, pH8.6 洗脱, 并保存在冰上。通过在 280nm 波长下测光吸收鉴定含有蛋白的级分, 合并峰值级分并通过考马斯亮蓝染色的 SDS - PAGE 分析来自该柱的洗脱收集液。上述洗脱能产生纯度在 95 % 以上的 LT - α 1/ β 2。

例 4

鉴定纯化的 LT - α 1/ β 配体

通过凝胶排阻层析对例 3 的级分进行大小分离, 以确定是否形成了三体以及是否存在聚集体。用 TSK G3000 swx2 柱以 0.5ml/分钟的流速对 BioRad 凝胶过滤蛋白标准, 和 3 种不同 LT 三体: LT - α 3、LT - α 2/ β 1 和 LT α 1/ β 2 进行大小分离。图 1A 表明, 很少(如果有的话) LT - α 1/ β 2 三体以高分子量附聚体形式存在。与大小标准进行比较表明, 三种形式均为三体, 即约 50 - 60kDa。假若为三体, 可以用如下方法测定纯化的 LT - α 1/ β 2 和 LT - α 2/ β 1 级分中所含的 LT - α 至 LT - β 的化学计量: 或通过对考马斯染色的凝胶进行光密度测定或在 C4 反向 HPLC 上分离之后对两个峰进行峰高分析。两种测定方法都证实了如上所述的从亲和柱上洗脱的级分。

通过离子交换层析进一步测定该制剂的纯度, 在几种不同的缓冲系统中, 用 BioCAD 分析仪在弱阳离子交换树脂上作 LT - α 1/ β 2 和 LT - α 2/ β 1 的 pH 图。该方法具有明确地保留并分离 3 种与 POROS CM (羧甲基) 柱结合的三体的最大能力, 用 16.66mM MES、16.66mM HEPES、16.66mM 乙酸钠, pH6.5 缓冲液以 5ml/分的速度洗柱, 并用 1M NaCl 梯度以 20 倍柱体积洗脱。LT - α 1/ β 2 和 LT - α 2/ β 1 复合体的 BioCAD 层析图如图 1B 所示。各种三体即 LT - α 3、LT - α 2/ β 1 和 LT - α 1/ β 2 在不同盐浓度下被洗脱, 而且在各种制剂中无高于 1 - 2% 的交叉污染迹象。

例 5

用可溶性 LT - α 1/ β 2 复合体杀死 HT29 人腺癌细胞

上文已披露了 HT29 溶细胞试验 (Browning 和 Ribolini, J. Immunol., 143, PP. 1859-67 (1989))。在一个典型的试验中, 在 96 孔板上制备体积为 0.05ml 的 LT - α 1/ β 2 (及其它可采用的细胞因子) 的系列稀释液, 并将 5000 个胰蛋白酶消化的 HT29 - 14 细胞加入含有 0 或 80U/ml (抗病毒单位) 的人 IFN - γ 的 0.05ml 培养基中。HT29 - 14 细胞为源于原始 ATCC 衍生的 HT29 系的亚克隆, 所述细胞系更为均匀。在该试验中采用 HT29 - 14 细胞; 用原始 ATCC - 衍生的 HT29 系也能观察到所有上述结果。3 - 4 天后, 按以下方法测定 MTT 染料的线

粒体还原: 加入 10 升 MTT, 并于 3 小时后用含有 10mM HCl 的 0.09ml 异丙醇溶解还原的染料, 并在 550nm 下测 O.D.值。在加入细胞之前按本文所披露的方法制备的可溶性受体形式或加入纯的人 IgG, 使其终浓度为 5 μ g/ml。

图 2A 表示用抗 - Fas 受体 mAbCH-11 (它能刺激 FasR 信号) 处理; 以及用与 IFN - γ 结合的 INF、LT - α 3、LT - α 1/ β 2 和 LT - α 2/ β 1 配体处理对 HT29 细胞的杀伤情况。对用 LT - α 1/ β 2 处理的细胞进行目测检查发现, 该试剂能杀死细胞, 而不只是抑制其增殖。在无 IFN - γ 的条件下, 看不到其作用, 这反映出 IFN - γ 影响细胞对来自受体的 TNF 家族的信号的翻译的异乎寻常的能力。根据抗病毒活性单位的定量分析发现, 干扰素 α 和 β 的效果比 IFN - γ 低 100 倍。

图 2B 表示 LT - β - R - Fc 能抑制 LT - α 1/ β 2 的杀伤作用, 但 p60 - TNF - R - Fc 不能, 表明细胞毒性对 LT- α 1/ β 2 有特异性。p60 - TNF - R - Fc 缺乏抑制作用这一事实表明, 混杂的 LT - α (已知其低于 1%) 不能影响 LT - α 1/ β 2 的细胞毒性活性。

例 6

由抗 - LT - β - R mAb 能加强 LT - α 1/ β 2 复合体对 HT29 细胞的杀伤作用

按例 5 所述方法进行溶细胞试验, 所不同的是, 以 2x 终浓度加入 IFN - γ 和抗 - LT - β - R mAbs(0.01-1000ng/ml 系列), 然后将 50 μ l 细胞溶液加入含有稀释的 LT - α 1/ β 2 的孔中。按例 5 所述方法测定细胞生长。图 3 表示两种不同抗 - LT - β - R mAbs 在加强 LT - α 1/ β 2 细胞毒性方面的不同作用。图 3A 表示抗 - LT - β - R mAb CDH10 能以取决于剂量的形式加强 LT - α 1/ β 2 细胞毒性活性。图 3B 表示另一种抗 - LT - β - R mAb, BDA8 在相同试验中的作用。BDA8 mAb 能抑制 LT - α 1/ β 2 的细胞毒性活性, 而不是加强肿瘤细胞的死亡。

例 7

固定化抗 - LT - β - R mAbs 能杀伤 HT29 肿瘤细胞

为了将抗 - LT - β - R mAbs 固定在塑料表面, 用 50 μ l 10 μ g/ml 羊抗 - 小鼠 Fc 多克隆抗体(Jackson ImmunoResearch)涂敷 96 孔组织培

养板，用由 PBS 配制的 5% FCS 洗涤并封闭，然后固定所示的抗 LT- β -R mAb，并进行另一次洗涤。将 HT29 细胞放入用所述 mAb 涂过的孔中，并按例 5 所示方法进行溶细胞试验。图 4A 表示固定化 BDA8 和 CDH10 抗-LT- β -R mAbs 对 HT29 细胞的细胞毒性作用。当固定于一个表面上时，各 mAb 能分别诱导对肿瘤细胞的细胞毒性作用。图 4B 表示相同的 BDA8 和 CDH10 抗-LT- β -R mAbs 分别在溶液中试验时无细胞毒性，由此表明在体外单个抗-LT- β -R mAb 的溶细胞活性归功于其固定化。

例 8

抗不同表位的抗-LT- β -R mAbs 在溶液中的组合能杀伤 HT29 细胞

按例 5 所述方法测定 HT29 细胞的生长，所不同的是，生长培养基中含有一种或两种抗-LT- β -R mAbs。表 1 表示当溶液中（即未固定在塑料上）含有各种抗 LT- β -R mAbs 时所观察到的对 HT29 细胞的作用。可根据抗-LT- β -R mAbs 在 HT29 溶细胞试验中相互组合作用的相对能力将其分成 I-IV 型。在溶细胞试验中所得到的抗-LT- β -R mAbs 结果类似于受体结合数据，表明各不同类型的 mAbs 能识别不同的 LT- β -R 表位。

表 1. 可溶性抗-LT- β -R mAbs 的组合对人腺癌 HT29 细胞有细胞毒性。根据抗-LT- β -R mAbs 在 HT29 细胞溶细胞试验中相互组合的作用，可将其分成 I、II、III 和 IV 型。“+”号表示在有 80U/ml IFN- γ 的条件下 mAb 组合对 HT29 细胞的溶细胞作用的相对水平。nr=不相关；nd=未测定。

第二 mAb

型	第一	I 型		II 型		III 型		IV 型
	mAb	BDA8	AGH1	BCG6	BHA10	BKA11	CDH10	CBE11
I	BDA8	nr	-	+	++	+	nd	nd
	AGH1	-	nr	++	+++	++	nd	nd
II	BCG6	++	++	nr	-	+++	nd	nd
	BHA10	++	+++	-	nr	+	+++	++++

III	BKA11	+	++	+++	nd	nr	-	nd
	CDH10	++	++	++	+++	-	nr	+++
IV	CBE11	nd	+	+	++++	nd	++++	nr

图 5A - D 表示对在 HT29 溶细胞试验中抗不同 LT - β - R 表位的配合抗 - LT - β - R mAbs 的代表性成对组合的定量分析结果。图 5A 表示 BHA10 和 CBE11 的细胞毒性作用, 图 5B 表示 CDH10 和 CBE11 的细胞毒性作用, 图 5C 表示 CDH10 和 AGH1 细胞毒性作用, 所述为单独效果和组合效果。图 5D 表示 CDH10 与 AGH1 mAb 组合对被称为 WiDr 的另一种肿瘤细胞系的细胞毒性作用。

表 2. 对本发明代表性抗 - LT - β - R mAbs 的特征的总结。

表 2

小鼠抗 - 人 LT - β - R mAbs HT29 细胞毒性的总结

mAb 类型	mAb 名称	细胞染色 ^a	阻止受体结合 ^b	固定在 Plastic ^c 上的 mAb	仅用可溶性 mAb	含有 LT α 1 β 1 的可溶性 mAb
I	BDA8	+++	+++	+	+/- ^d	抑制
I	AGH1	+++	+++		+/-	抑制
II	BCG6	+++	++	+	+/-	混合
II	BHA10	+++	+++	+	+/-	混合
III	BKA11	+++	+/-	+	-	加强
III	CDH10	+++	+/-	+	+/-	加强
IV	CBE11	+++	+++	+	+/-	无作用
对照	MOPC21	-	-	-	-	无作用
	HT29/26	-	nd	-	-	无作用
	TS2/9 ^e	nd	nd	-	-	无作用

^a 用 LT - β - R 转染的 CHO 细胞的 FACS 染色

^b 测定抗体是否能阻止可溶性受体与被激活的 T - 细胞杂交瘤 II - 23 结合的试验。nd=未做

^c在有 IFN - γ 的条件下,在本发明方法中所限定的抗 - LT - β - R 涂敷的板上生长 HT - 29 细胞。

^d在某些试验中为可变的部分抑制,在其它试验中无作用。

^e抗 - 人 LFA - 3, 一种小鼠 IgG1。

例 9

依赖内源 IFN - γ 治疗肿瘤细胞

本发明的优选 LT - β - R 激活剂 IFN - γ , 是一种细胞因子,它具有抗肿瘤活性,而且人体能够承受。存在于肿瘤周围环境中的内源 IFN - γ 的浓度可能足够高,能不加外源 IFN - γ 的条件下起着本发明 LT - β - R 激活剂的作用。可以用标准免疫化学技术对肿瘤附近的 IFN - γ 浓度进行分析,分析用的组织样品取自肿瘤部位。如果 IFN - γ 的内源浓度高到足以与本发明的 LT - α/β 杂聚复合体或抗 - LT - β - R mAbs 一起起到抗肿瘤活性(用本文所披露的溶细胞试验测定),则无需将 IFN - γ 作为本发明组合物或方法中的第二种 LT - β - R 激活剂使用。

例 10

诱导内源 IFN - γ 作为一种 LT - β - R 激活剂用于治疗肿瘤细胞能诱导诸如 IFN - γ 之类的干扰素的内源产生的化合物属于本发明的 LT - β - R 激活剂类型。例如,通过用诸如聚核糖鸟苷酸/聚核糖胞苷酸(Poly-G/C)的双链 RNA 分子处理,可以诱导干扰素。

用 18mg(600mg/kg)D - 半乳糖胺注射雌性 C57/b16 (6 - 8 周龄),使小鼠对 INF 和其它抗肿瘤剂的作用敏感。将溶于中性盐溶液中的一系列浓度的 poly-G/C(Juraskova 等,Eur.J.Pharmacol.,221,PP.107-11)加入纯化 LT - $\alpha1/\beta2$ (10 - 100 μ g)中,并将该溶液作为腹腔内(i.p.)注射液给小鼠使用。poly-rG/rC 双链 RNA 的存在可以提高 LT - $\alpha1/\beta2$ 的抗肿瘤活性。

类似地,源于植物光果甘草的干扰素刺激剂(Acharya 等,Indian J.Med.Res.,98,PP.69-74(1993))可以 40 - 100ml/天的剂量通过静脉内方式给人使用。可以凭经验确定在有 LT - α/β 杂聚复合体或抗 - LT - β - R Abs 的条件下用于 LT - β - R 激活的最佳剂量,该剂量取决于诸

如输送方式和输送方案的因素。

也可将 Imiquimod R - 837(Bernstein 等, *Antiviral Res.*,20,PP.45-55(1994));Saparal(Paramonova 等, *Vopr.Virusol.*,39,PP.131-34(1994)); 溴匹立明(Onishi 和 Machida, *Hinyokika Kyo*,40,PP.195-200(1994));或 Ridostin(Cheknev 等, *Vopr.Virusol.*,39,PP.125-28(1994))作为 LT - β - R 激活剂与 LT - α/β 杂聚复合体、抗 - LT - β - R Abs、或其组合一组使用。在每种情况下,均可凭经验确定优选输送方式和最佳剂量,以公开的报道作为优化的起点,通过常规临床方法进行优化。

例 11

小鼠能耐受注射人 LT - $\alpha 1/\beta 2$

给经过几天驯化的雌性 C57/b16 (6 - 8 周龄) i.p. 注射 18mg(600mg/kg)D - 半乳糖胺,以使得小鼠对 TNF 及其它抗肿瘤剂的作用敏感。然后 i.p. 注射人 TNF、LT - α 或 LT - $\alpha 1/\beta 2$ 。

表 3. 汇集了注射 24 小时后经处理小鼠的存活率。

表 3

试剂	试量($\mu\text{g}/\text{动物}$)	存活率
盐水	-	4/4
人-TNF	0.2	0/6
人 - TNF	1.0	0/2
人 - TNF	10	0/4
人 - LT - α	0.2	2/2
人 - LT - α	1.0	2/2
人 - LT - $\alpha 1/\beta 2$	10	2/2
人 - LT - $\alpha 1/\beta 2$	100	2/2

例 12

构建重组抗 - LT - β - R IgM 单克隆抗体

采用上述抗肿瘤细胞毒性试验,结合在免疫缺陷小鼠中的标准肿瘤生长模式,可以筛选具有合适特性的抗 - LT - β - R IgG。可将能够和所选择的抗 - LT - β - R IgG 的 IgG 重链和轻链的各可变结构域杂交的通用引物用于制备可变结构域 DNA,制备时是采用标准逆转录酶/PCR

方法,用自分泌性杂交瘤细胞系中分离的 RNA 进行的。这些方法业已披露(Arulanandam 等, J.Exp.Med., 177, PP.1439-50(1993); Lane 等, Eur.J.Immunol,22,PP.2573-78(1993); Traunecker 等, Nature, 339, PP.68-70(1989))。

然后将扩增产物组装成含有人 CH1、CH2 和 CH3 μ 链结构域的载体。两个链在单一宿主中的共表达使得重链和轻链组装成五聚 IgM 分子。该分子是一个由与人恒定区连接的小鼠可变区组成的嵌合体。

另外,可以采用一种通过 PCR 扩增仅编码可变区的实际结合区的 DNA 的方法。然后将扩增的 DNA 插入含有全部人 IgG 序列的载体,该载体不含参与抗原结合的实际氨基酸。这种结构被称为“人源化”抗体,而其详细生产方法是众所周知的(例如 WO94/04679)。

例 13

抗 - LT - β - R IgM 单克隆抗体作为 LT - β - R 激活剂

可以例 12 所述的重组形式制备抗 - LT - β - R IgM 抗体。另外,可以把通过杂交瘤融合技术用初次免疫的正常小鼠或深入免疫的 CD40 信号缺陷小鼠分离到的全小鼠 IgMs(Kawabe 等,Immunity,1,PP.167-78(1994);Xu 等,Immunity,1,PP.423-31(1994))用作抗 - LT - β - R IgM mAbs 源。

在 HT29 溶细胞试验中,在有 IFN - γ 的条件下通过剂量反应比较测知,作为 LT - β - R 激活剂,抗 - LT - β - R IgM mAbs 的效果明显优于其正常二价 IgG 对应体。抗 - LT - β - R IgM mAbs 在固定化或以存在于溶液中的形式服用时均能起到 LT - β - R 激活剂的作用。另外,我们期望它能够加强 LT - α/β 杂聚复合体的抗肿瘤活性。

例 14

抗 - LT - β - R 单克隆抗体抑制人肿瘤细胞在 SCID 小鼠体内的生长

以皮下(s.c.)方式将含于 0.2ml PBS 中的 1×10^6 胰蛋白酶消化并洗涤过的人腺癌 WiDr 细胞注射到 Balb/c SCID 小鼠(Jackson Labs,Bar Harbor,ME)的背部。被注射的 WiDr 细胞在小鼠体内形成肿瘤,监测抗 - LT - β - R mAb 抑制肿瘤生长的能力。在一组实验中,在 s.c.接种

WiDr 细胞的同时, 在有或没有人 IFN - γ (10^6 抗病毒单位/小鼠) 的条件下, 用或不用 CBE11 抗 - LT - β - R mAb 处理小鼠 (图 6A)。通过 i.p. 注射 0.2ml 溶液, 单独使用抗体和 IFN - γ 或同时使用二者。给对照小鼠单独注射盐水、单独注射 IFN - γ 、或对照抗 - 人 LFA - 3mAb(1E6)与 IFN - γ 。在接种后 30 天对所得到的各肿瘤的大小进行分级。通过二维测径所测得的半径计算肿瘤体积 (以 cc 计)。用 CBE11 或 1E6 mAbs 处理过的动物接受 $10 \mu\text{g}$ /小鼠或 $50 \mu\text{g}$ /小鼠的抗体 (图 6A; 分别为加点的圆圈和空白圆圈)。

在另一组实验中, 通过 s.c. 给小鼠接种 WiDr 细胞, 在用 CBE11 抗 - LT - β - R mAb 处理之前, 让肿瘤生长 15 天 (图 6B)。在第 15 天 (在用抗体处理之前), 肿瘤的平均体积为 0.076cc, 平均直径为 0.53cm。然后在有或没有人 IFN - γ (10^6 抗病毒单位/小鼠) 的条件下, 以 i.p. 注射方式给一组 12 只动物服用 0.2ml CBE11 抗 - LT - β - R mAb($50 \mu\text{g}$)。在为期 3 周的时间里再重复注射 3 次。给对照组 (12 只小鼠/组) 单独注射 IFN - γ (10^6 抗病毒单位/小鼠) 或注射 $50 \mu\text{g}$ 对照抗 - 人 LFA - 3mAb(1E6)+IFN - γ (10^6 抗病毒单位/小鼠)。在接种肿瘤细胞后的 15 - 49 天, 在第 15 天出现肿瘤时对其生长分级。图 6B 所示结果是在盲试方法中测得的。用含或不含 IFN - γ 的 CBE11 处理的肿瘤停止生长。在为期 3 周的时间里 3 次注射 CBE11 mAb 之后, 至少在接种后 7 周时间里 (7 周后实验结束) 肿瘤生长停止。

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line S <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, CB.E11.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11793
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EPO	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., 'Accession Number of Deposit')	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line S <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BC.G6.AF5	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11794
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EPO	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BH.A10	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11795
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EPO	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., 'Accession Number of Deposit')	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution <p style="text-align: center;">American Type Culture Collection</p>	
Address of depositary institution (including postal code and country) <p style="text-align: center;">12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America</p>	
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, AG.H1.5.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11796
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EPO	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	For International Bureau use only <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line S <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, CD.H10.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11797
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EPO	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BD.A8.AB9	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11798
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EPO	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line S <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: <u>Hybridoma, BK.All.AC10</u>	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11799
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC)	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EPO	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., 'Accession Number of Deposit')	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line S <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, CB.E11.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11793
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of Finland, until the application has been laid open to public inspection by the Finnish Patent Office, or has been finally decided upon by the Finnish Patent Office without having been laid open to public inspection, samples of the deposited microorganisms will be made available only to an expert in the art.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Finland	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., 'Accession Number of Deposit')	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> . line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BC.G6.AF5	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11794
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of Finland, until the application has been laid open to public inspection by the Finnish Patent Office, or has been finally decided upon by the Finnish Patent Office without having been laid open to public inspection, samples of the deposited microorganisms will be made available only to an expert in the art.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Finland	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., 'Accession Number of Deposit')	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>							
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>							
Name of depositary institution American Type Culture Collection							
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BH.A10							
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11795						
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>							
In respect of the designation of Finland, until the application has been laid open to public inspection by the Finnish Patent Office, or has been finally decided upon by the Finnish Patent Office without having been laid open to public inspection, samples of the deposited microorganisms will be made available only to an expert in the art.							
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)							
Finland							
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)							
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")							
<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">For receiving Office use only</td> <td style="text-align: center;">For International Bureau use only</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</td> <td><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</td> </tr> <tr> <td>Authorized officer</td> <td>Authorized officer</td> </tr> </table>		For receiving Office use only	For International Bureau use only	<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	Authorized officer	Authorized officer
For receiving Office use only	For International Bureau use only						
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:						
Authorized officer	Authorized officer						

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.	1
--	--------------	-------------------------------	---

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made herein relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> lines <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, AG.H1.5.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11796
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of Finland, until the application has been laid open to public inspection by the Finnish Patent Office, or has been finally decided upon by the Finnish Patent Office without having been laid open to public inspection, samples of the deposited microorganisms will be made available only to an expert in the art.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Finland	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.	
--	--------------	-------------------------------	--

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made herein relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, CD.H10.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11797
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of Finland, until the application has been laid open to public inspection by the Finnish Patent Office, or has been finally decided upon by the Finnish Patent Office without having been laid open to public inspection, samples of the deposited microorganisms will be made available only to an expert in the art.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Finland	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>							
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>							
Name of depositary institution American Type Culture Collection							
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BD.A8.AB9							
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11798						
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>							
In respect of the designation of Finland, until the application has been laid open to public inspection by the Finnish Patent Office, or has been finally decided upon by the Finnish Patent Office without having been laid open to public inspection, samples of the deposited microorganisms will be made available only to an expert in the art.							
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)							
Finland							
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)							
The indications listed below will be submitted to the International Bureau in list (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")							
<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">For receiving Office use only</td> <td style="text-align: center;">For International Bureau use only</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</td> <td><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</td> </tr> <tr> <td>Authorized officer</td> <td>Authorized officer</td> </tr> </table>		For receiving Office use only	For International Bureau use only	<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	Authorized officer	Authorized officer
For receiving Office use only	For International Bureau use only						
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:						
Authorized officer	Authorized officer						

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line S <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: <u>Hybridoma, BK.All.AC10</u>	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11799
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
In respect of the designation of Finland, until the application has been laid open to public inspection by the Finnish Patent Office, or has been finally decided upon by the Finnish Patent Office without having been laid open to public inspection, samples of the deposited microorganisms will be made available only to an expert in the art.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Finland	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, CB.E11.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11793
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Singapore	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

<p>A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u></p>	
<p>B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/></p>	
<p>Name of depositary institution American Type Culture Collection</p>	
<p>Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BC.G6.AF5</p>	
<p>Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)</p>	<p>Accession Number HB 11794</p>
<p>C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.</p>	
<p>D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)</p> <p>Singapore</p>	
<p>E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)</p> <p>The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")</p>	
<p align="center">For receiving Office use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</p> <p>Authorized officer</p>	<p align="center">For International Bureau use only</p> <p><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</p> <p>Authorized officer</p>

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BH.A10	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11795
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Singapore	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, AG.H1.5.1	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11796
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Singapore	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> lines <u>18-26</u>							
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>							
Name of depositary institution American Type Culture Collection							
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America							
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, CD.H10.1							
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11797						
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>							
Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.							
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)							
Singapore							
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)							
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., 'Accession Number of Deposit')							
<table border="1"> <tr> <td style="text-align: center;">For receiving Office use only</td> <td style="text-align: center;">For International Bureau use only</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</td> <td><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</td> </tr> <tr> <td>Authorized officer</td> <td>Authorized officer</td> </tr> </table>		For receiving Office use only	For International Bureau use only	<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	Authorized officer	Authorized officer
For receiving Office use only	For International Bureau use only						
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:						
Authorized officer	Authorized officer						

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BD.A8.AB9	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11798
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input checked="" type="checkbox"/>	
Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Singapore	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
<p>For receiving Office use only</p> <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<p>For International Bureau use only</p> <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	B185 CIP PCT	International application No.
--	--------------	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>28</u> line s <u>18-26</u>	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852 United States of America	
Identification Reference by Depositor: Hybridoma, BK.All.AC10	
Date of deposit 12 January 1995 (12.01.95)	Accession Number HB 11799
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Applicant(s) hereby give notice of my/our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
Singapore	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

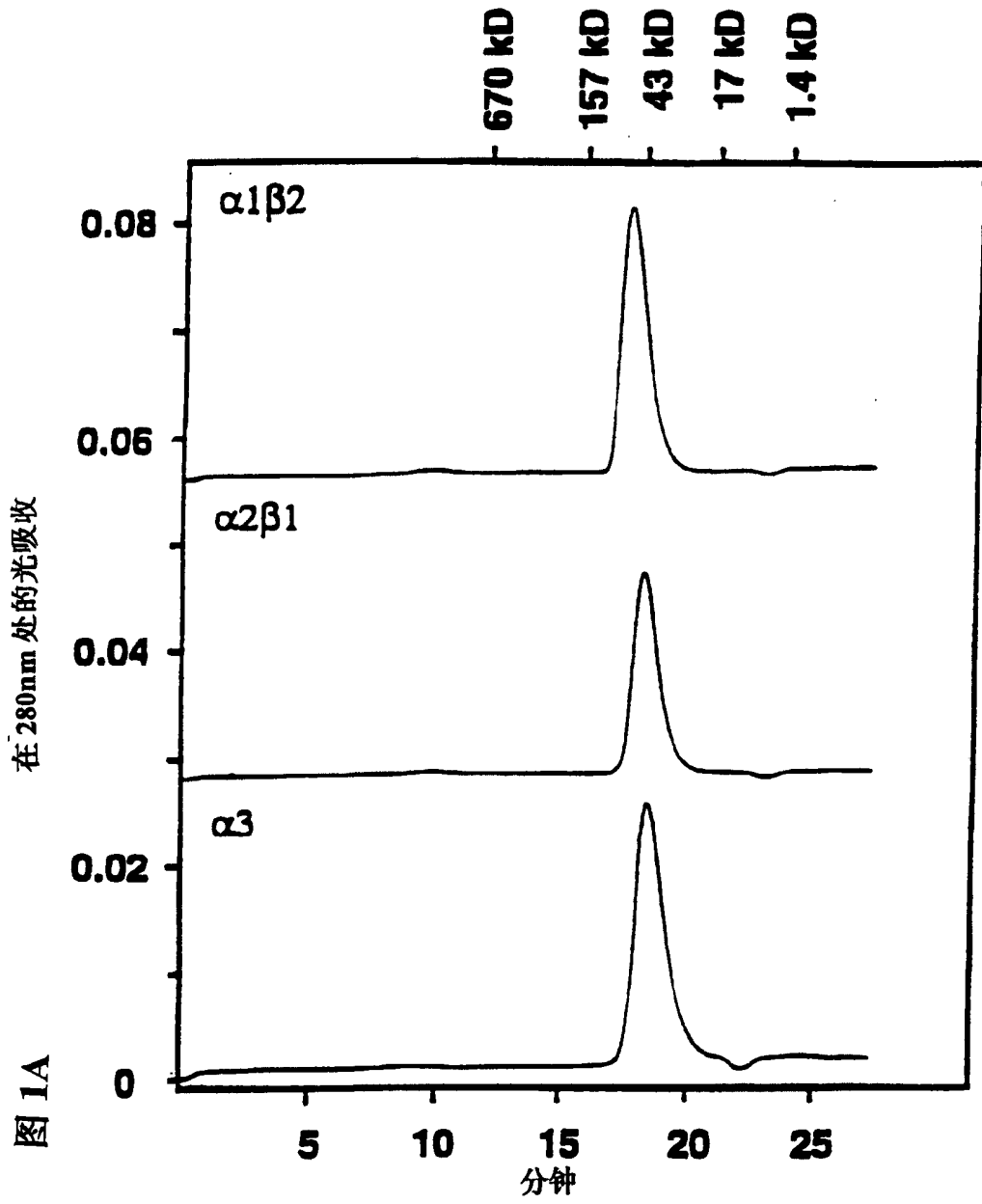


图 1A

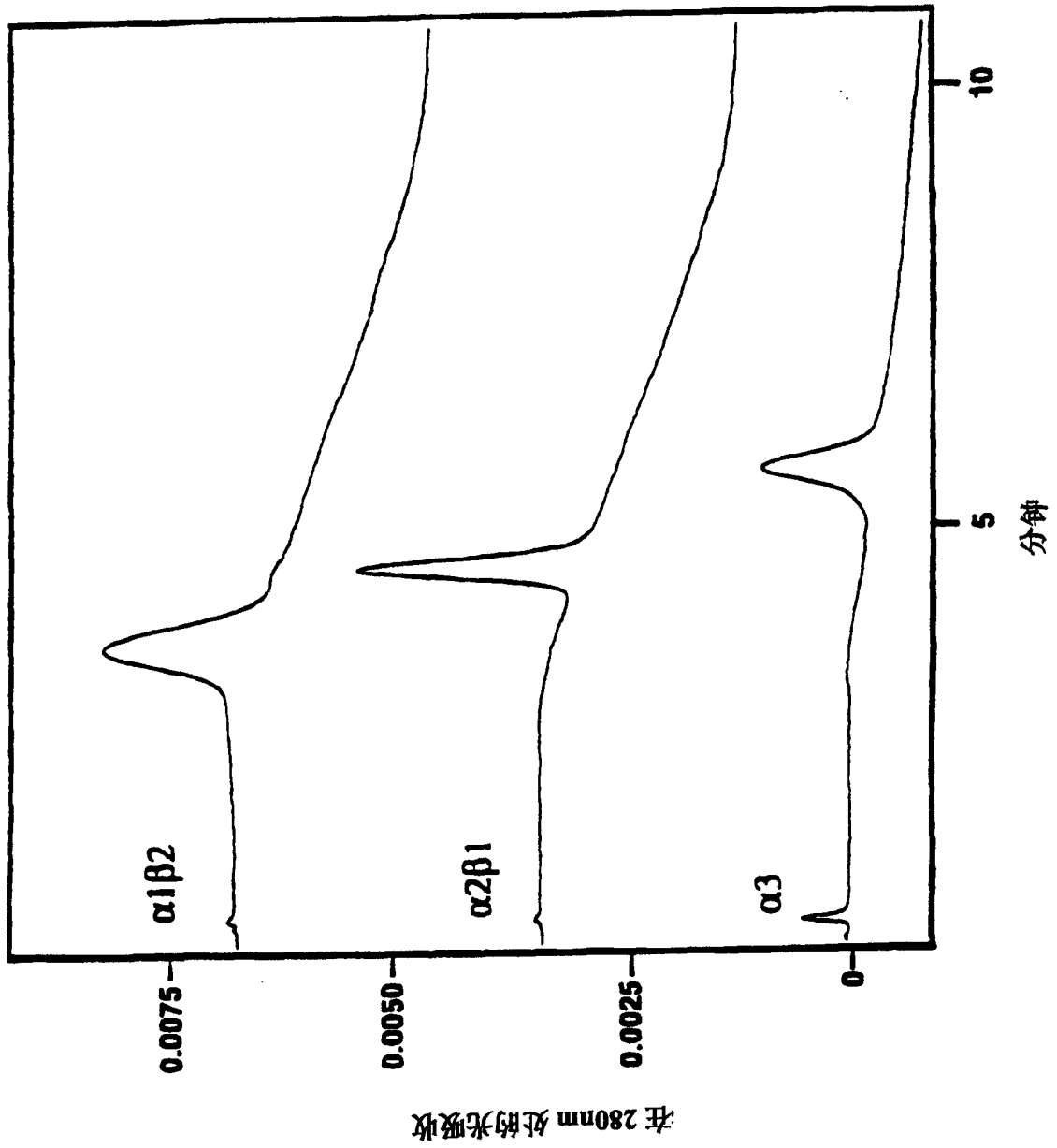


图 1B

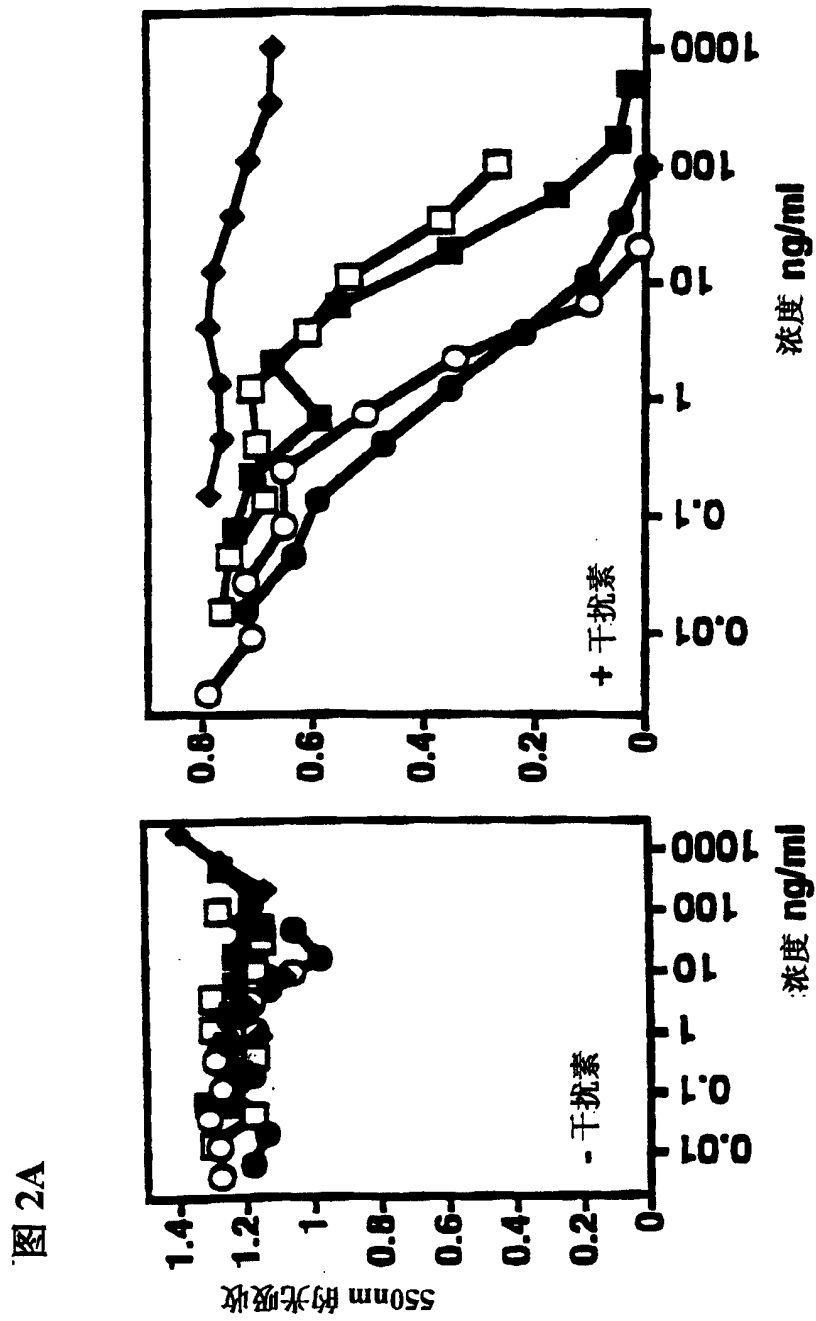


图 2B

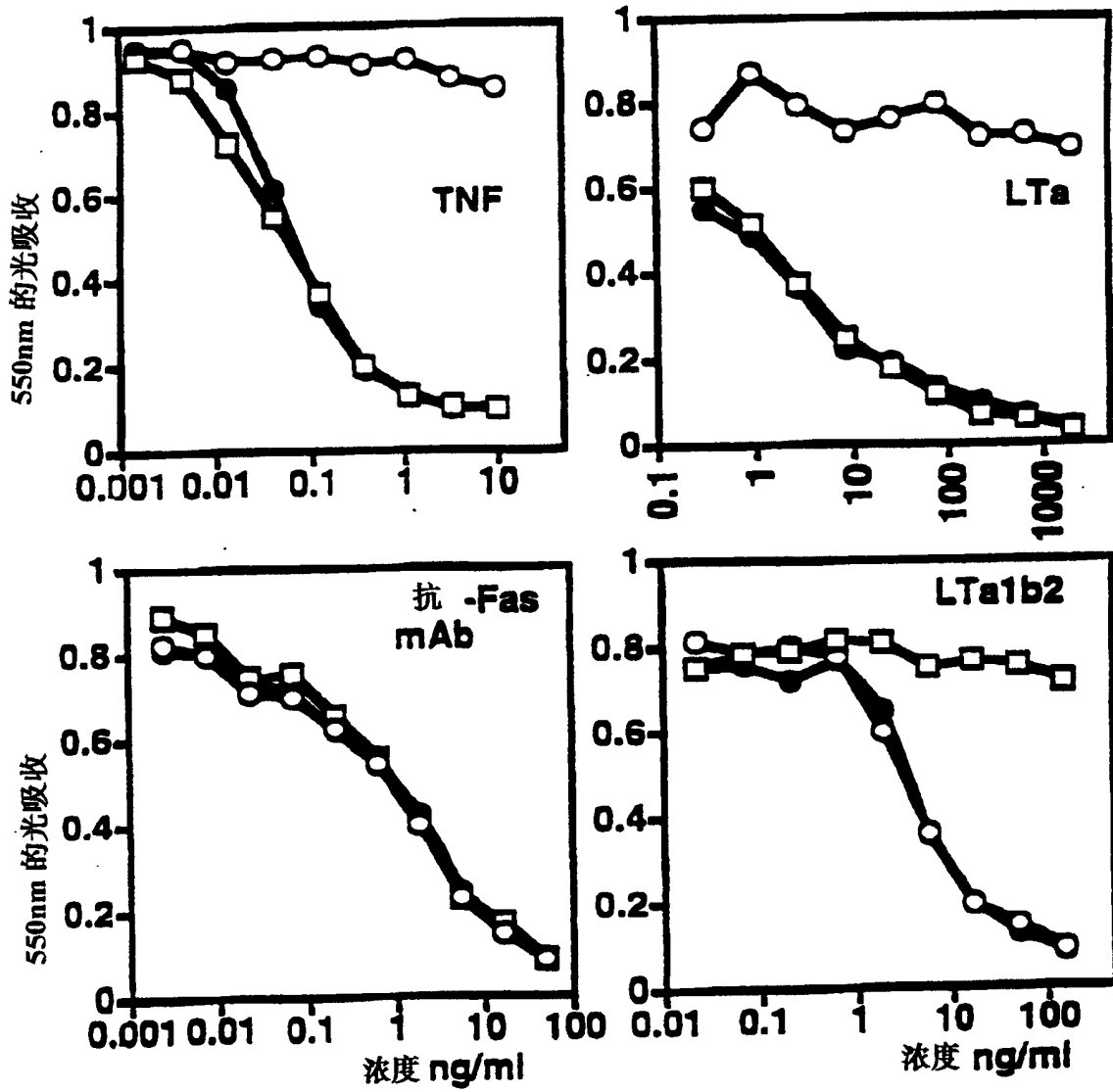


图 3

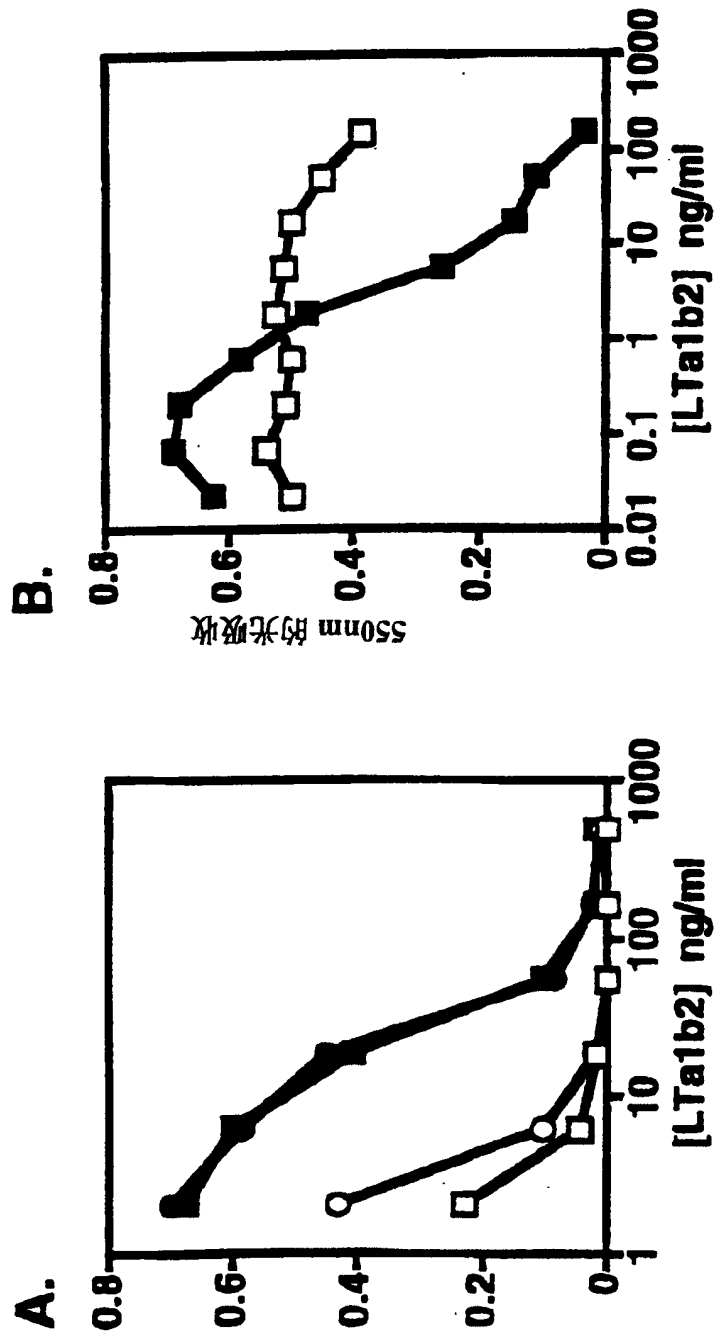


图 4

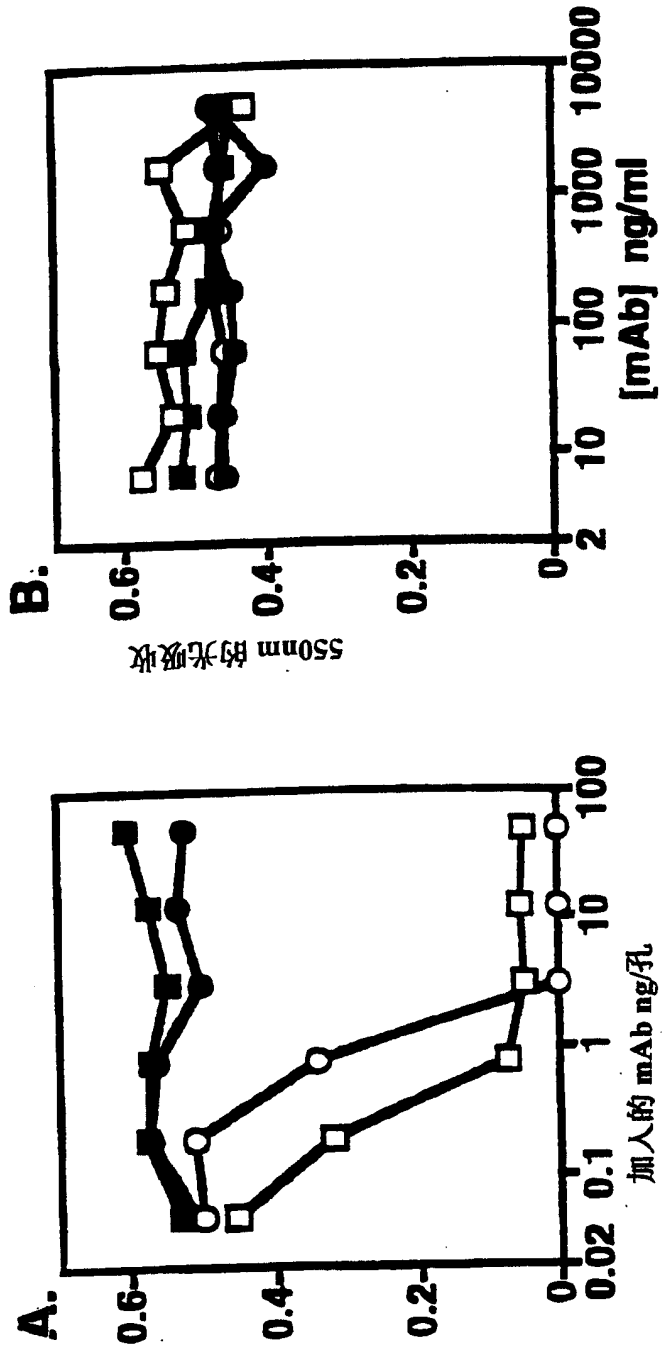


图 5

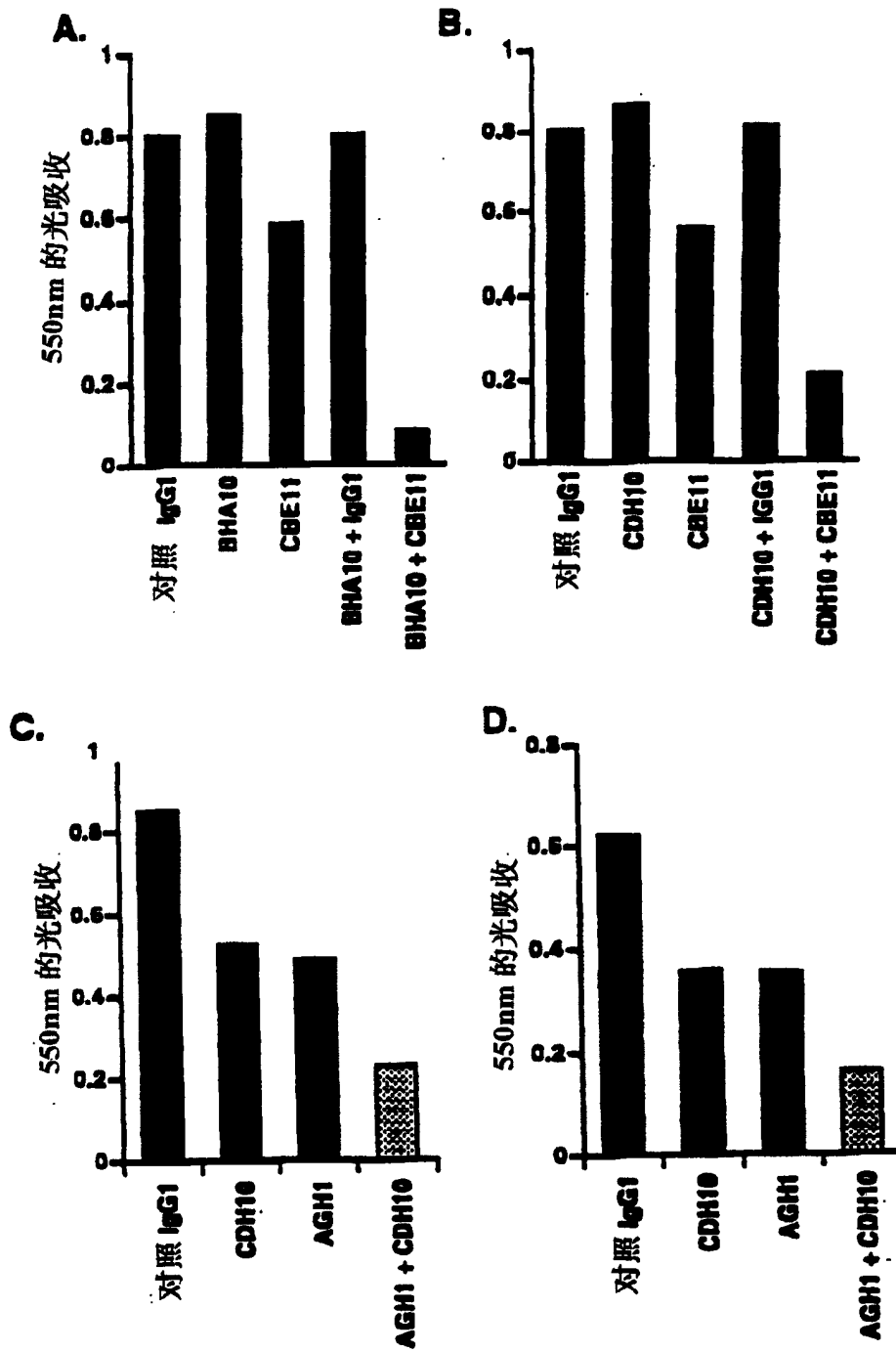


图 6

