

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/10

C12N 5/12 C12N 5/16

C12N 5/18 C12N 15/12

C12N 15/63 C12N 15/64

C07K 14/47 C07K 16/24

A61K 39/395 A61K 39/44



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820778.5

[43] 公开日 2005 年 1 月 26 日

[11] 公开号 CN 1571836A

[22] 申请日 2002.8.23 [21] 申请号 02820778.5

[30] 优先权

[32] 2001. 8.23 [33] US [31] 60/314,731

[86] 国际申请 PCT/US2002/026769 2002.8.23

[87] 国际公布 WO2003/017935 英 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.19

[71] 申请人 根马布股份公司

地址 丹麦哥本哈根

[72] 发明人 J·G·J·范德温克尔

M·A·范迪克 J·舒尔曼

A·F·格里特森

O·巴尔德斯加尔德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 孟凡宏

权利要求书 7 页 说明书 78 页 序列表 3 页

[54] 发明名称 白介素 15(IL-15)特异性人抗体

[57] 摘要

公开了特异性结合 IL-15(例如人 IL-15)的分离的人单克隆抗体及基于相关抗体的组合物和分子。可以在能够通过经历 V-D-J 重组和同种型转换而产生人单克隆抗体的多种同种型的转染瘤或非人类转基因动物例如转基因小鼠中产生所述人抗体。也公开了包含所述人抗体的药用组合物、产生所述人抗体的非人类转基因动物和杂交瘤以及应用所述人抗体的治疗方法和诊断方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种分离的人单克隆抗体, 所述抗体特异性结合人 IL-15 并抑制 IL-15 诱导的促炎作用。

5 2. 权利要求 1 的抗体, 所述抗体抑制 IL-15 诱导的 $\text{TNF}\alpha$ 产生或 T 细胞增殖。

3. 权利要求 2 的抗体, 根据增殖抑制分析测定, 所述抗体抑制 IL-15 诱导的 T 细胞增殖的 IC_{50} 值小于约 100 nM。

10 4. 权利要求 2 的抗体, 根据增殖抑制分析测定, 所述抗体抑制 IL-15 诱导的 T 细胞增殖的 IC_{50} 值小于约 10 nM。

5. 权利要求 1 的抗体, 采用重组人 IL-15 作为被分析物而用所述抗体作为配体, 根据表面胞质团共振 (SPR) 技术测定, 所述抗体结合人 IL-15 的解离平衡常数 (K_D) 小于 10^{-7} M。

15 6. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体特异性结合位于人 IL-15 的 β -链或 γ -链相互作用结构域上的表位。

7. 权利要求 6 的抗体, 其中所述抗体特异性结合位于人 IL-15 的 γ -链相互作用结构域上的表位。

20 8. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体干扰人 IL-15 的 Asp^8 与人 IL-15 受体的 β -单位的结合或者人 IL-15 的 Gln^{108} 与人 IL-15 受体的 γ -单位的结合。

9. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体与受体结合的人 IL-15 特异性结合。

25 10. 一种分离的人单克隆抗体, 所述抗体特异性结合由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码的人 IL-15, 所述核酸在其可变区中分别包含图 2 (SEQ ID NO:1) 和图 3 (SEQ ID NO:3) 所示的核苷酸序列及其保守序列修饰。

11. 一种分离的人单克隆抗体, 所述抗体特异性结合具有 IgG 重链和 κ 轻链可变区的人 IL-15, 所述可变区分别包含图 2 (SEQ ID NO:2)

和图 3 (SEQ ID NO:4)所示的氨基酸序列及其保守序列修饰。

12. 一种分离的人单克隆抗体, 所述抗体特异性结合包含选自以下的 CDR 区的人 IL-15:

5 (a) CDR1 区, 所述 CDR1 区分别包含图 2 (SEQ ID NO:2)和图 3 (SEQ ID NO:4)所示的氨基酸序列 CDR1 及其保守序列修饰,

(b) CDR2 区, 所述 CDR2 区分别包含图 2 (SEQ ID NO:2)和图 3 (SEQ ID NO:4)所示的氨基酸序列 CDR2 及其保守序列修饰, 和

(c) CDR3 区, 所述 CDR3 区分别包含图 2 (SEQ ID NO:2)和图 3 (SEQ ID NO:4)所示的氨基酸序列 CDR3 及其保守序列修饰,

10 其中所述 CDR 区插入到抗体构架区中或者通过合成接头连接。

13. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE 抗体。

14. 权利要求 1 的抗体, 所述抗体包含 IgG1 重链。

15. 权利要求 1 的抗体, 所述抗体是抗体片段或单链抗体。

15 16. 权利要求 1 的抗体, 所述抗体是完全抗体。

17. 权利要求 1 的抗体, 所述抗体由杂交瘤生产, 所述杂交瘤包括得自其基因组中包含人重链转基因和人轻链转基因的转基因非人类动物的、与无限增殖化细胞融合的 B-细胞。

20 18. 一种分离的人单克隆抗体, 所述抗体特异性结合人 IL-15 并抑制 IL-15 在与其受体结合时诱导促炎作用的能力。

19. 一种抑制 IL-15 诱导的但不抑制 IL-2 诱导的 T 细胞或单核细胞中 $TNF\alpha$ 产生的方法, 所述方法包括使 IL-15 与特异性结合人 IL-15 的分离的人单克隆抗体接触。

25 20. 一种抑制 IL-15 诱导的但不抑制 IL-2 诱导的 T 细胞增殖的方法, 所述方法包括在所述 T 细胞存在下, 使 IL-15 与特异性结合人 IL-15 的分离的人单克隆抗体接触。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述 T 细胞是外周血单核细胞 (PBMC)或 CTLL-2 细胞。

22. 一种杂交瘤，所述杂交瘤包含得自其基因组中包含人重链转基因和人轻链转基因的转基因非人类动物的、与无限增殖化细胞融合的 B-细胞，其中所述杂交瘤产生一种特异性结合人 IL-15 的人单克隆抗体。

5 23. 权利要求 22 的杂交瘤，所述杂交瘤产生由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码的人单克隆抗体。

24. 一种杂交瘤，所述杂交瘤产生一种由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码的人单克隆抗体，所述核酸在其可变区中分别包含如图 2 (SEQ ID NO:1)和图 3 (SEQ ID NO:3)所示的核苷酸序列及其保守序列修饰。

25. 一种杂交瘤，所述杂交瘤产生一种具有 IgG 重链和 κ 轻链可变区的人单克隆抗体，所述可变区分别包含如图 2 (SEQ ID NO:2)和图 3 (SEQ ID NO:4)所示的氨基酸序列及其保守序列修饰。

26. 权利要求 1 的分离的人抗体，所述人抗体由包含编码人重链和人轻链的核酸的转染瘤产生。

27. 一种转染瘤，所述转染瘤包含编码人重链和人轻链的核酸，其中所述转染瘤产生可检测量的权利要求 1 的单克隆抗体。

28. 权利要求 27 的转染瘤，所述转染瘤包含编码人重链和人轻链的核酸，所述核酸在其可变区中分别包含如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列或其保守序列修饰。

29. 一种转基因非人类动物，所述转基因非人类动物表达特异性结合人 IL-15 的人单克隆抗体，其中所述转基因非人类动物的基因组包含人重链转基因和人轻链转基因。

30. 一种产生特异性结合人 IL-15 的人单克隆抗体的方法，所述方法包括：

用人 IL-15 或表达人 IL-15 的细胞免疫其基因组中包含人重链转基因和人轻链转基因的转基因非人类动物，使得所述动物的 B-细胞产生抗体；

分离所述动物的 B 细胞;

使所述 B 细胞与骨髓瘤细胞融合, 形成分泌 IL-15 特异性人单克隆抗体的无限增殖杂交瘤细胞; 和

5 从所述杂交瘤的培养上清液中分离出 IL-15 特异性人单克隆抗体。

31. 一种免疫缀合物, 所述免疫缀合物包含权利要求 1 的抗体和一种治疗药物。

32. 权利要求 31 的免疫缀合物, 其中所述治疗药物为免疫抑制剂。

10 33. 权利要求 31 的免疫缀合物, 其中所述治疗药物是选自甾体抗炎药、非甾体抗炎药和 DMARD 的抗炎药。

34. 权利要求 31 的免疫缀合物, 其中所述治疗药物为细胞毒性剂。

15 35. 一种药用组合物, 所述药用组合物包含权利要求 1 的抗体和药学上可接受的载体。

36. 权利要求 35 的组合物, 所述组合物还包含治疗药物。

37. 权利要求 36 的组合物, 其中所述药物为免疫抑制剂。

38. 权利要求 37 的组合物, 其中所述免疫抑制剂为环孢菌素。

20 39. 权利要求 36 的组合物, 其中所述药物是选自甾体抗炎药和非甾体抗炎药的抗炎药。

40. 权利要求 36 的组合物, 其中所述药物是选自甲氨蝶呤、依那西普和英夫利昔单抗的 DMARD。

41. 权利要求 36 的组合物, 其中所述药物是选自多柔比星、顺铂、博来霉素、卡莫司汀、环磷酰胺和苯丁酸氮芥的化疗药。

25 42. 权利要求 36 的组合物, 其中所述药物是用于治疗银屑病的药物。

43. 权利要求 36 的组合物, 其中所述药物是抗体。

44. 权利要求 43 的组合物, 其中所述抗体选自 CD4 特异性抗体

和 IL-2 特异性抗体。

45. 一种治疗或预防由人 IL-15 介导的疾病的方法，所述方法包括将有效量的权利要求 1 的抗体给予患者，以治疗或预防所述疾病。

5 46. 权利要求 45 的方法，其中所述疾病选自银屑病、关节炎、炎性肠病、癌症、移植排斥和感染性疾病。

47. 权利要求 46 的方法，其中所述关节炎是类风湿性关节炎。

48. 权利要求 45 的方法，所述方法还包括与共同给予治疗药物。

49. 权利要求 48 的方法，其中所述药物是免疫抑制剂。环孢菌素。

10 50. 权利要求 49 的方法，其中所述免疫抑制剂是环孢菌素。

51. 权利要求 48 的方法，其中所述药物是选自甾体抗炎药和非甾体抗炎药的抗炎药。

52. 权利要求 48 的方法，其中所述药物是选自甲氨蝶呤、依那西普和英夫利昔单抗的 DMARD。

15 53. 权利要求 48 的方法，其中所述药物是选自多柔比星、顺铂、博来霉素、卡莫司汀、环磷酰胺和苯丁酸氮芥的化疗药。

54. 权利要求 48 的方法，其中所述药物是用于治疗银屑病的药物。

55. 权利要求 48 的方法，其中所述药物是抗体。

20 56. 权利要求 55 的方法，其中所述抗体选自 CD4 特异性抗体和 IL-2 特异性抗体。

57. 一种治疗或预防银屑病的方法，所述方法包括给予患者一种特异性结合人 IL-15 并抑制 IL-15 与其受体结合时诱导促炎作用的能力的分离的人单克隆抗体。

25 58. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体抑制 IL-15 诱导角化不全的能力。

59. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体抑制 IL-15 诱导表皮增厚的能力。

60. 权利要求 57 的方法，其中所述抗体抑制 IL-15 诱导角质化细胞增殖的能力。

61. 一种治疗或预防类风湿性关节炎的方法，所述方法包括给予患者一种特异性结合人 IL-15 并抑制 IL-15 与其受体结合时诱导促炎作用的能力的分离的人单克隆抗体。

62. 权利要求 61 的方法，其中所述抗体抑制 IL-15 诱导活化白细胞趋化性的能力。

63. 一种通过检测样品中存在 IL-15 抗原或表达 IL-15 的细胞而诊断 IL-15 介导的疾病的方法，所述方法包括：

在允许所述抗体或其部分和 IL-15 之间形成复合物的条件下，使所述样品和对照样品与权利要求 1 的人抗体接触；和检测所述复合物的形成，

其中与对照样品相比，所述样品之间复合物形成的差异说明所述样品中存在 IL-15。

64. 一种核酸，所述核酸包含编码抑制 IL-15 的促炎作用的人单克隆抗体可变区的核苷酸序列。

65. 一种核酸，所述核酸包含编码特异性结合人 IL-15 的人单克隆抗体可变区的核苷酸序列，其中所述核苷酸序列选自 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 及其保守序列修饰。

66. 一种表达载体，所述表达载体包含编码结合人 IL-15 的人抗体的轻链、重链或者轻链和重链两者的可变区的核苷酸序列。

67. 权利要求 66 的表达载体，所述表达载体还包含编码结合 IL-15 的人抗体的轻链、重链或者轻链和重链两者的 CDR 区的核苷酸序列。

68. 一种表达载体，所述表达载体包含编码重链和轻链可变区的核苷酸序列，所述可变区分别包含在 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 中所示的氨基酸序列及其保守序列修饰。

69. 一种表达载体，所述表达载体包含编码重链和轻链可变区的

核苷酸序列，所述可变区分别包含在 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 中所示的氨基酸序列及其保守修饰。

70. 一种转染瘤，所述转染瘤包含权利要求 66 的表达载体。

白介素 15 (IL-15)特异性人抗体

5 发明背景

白介素 15 (IL-15)是一种促炎细胞因子即 14-15 kD 糖蛋白。已报道在包括单核细胞和巨噬细胞、成纤维细胞、角质化细胞及树突细胞的多种细胞和组织中组成型表达(Waldmann 和 Tagaya, 1999; Fehniger 和 Caligiuri, 2001)。该表达在炎症状态下受到正调节, 正如用 IFN- γ 和 LPS 刺激的或感染病毒、细菌或原生动物的单核细胞所报道的(Kirman 等, 1998; Waldmann 等, 1998; Waldmann 和 Tagaya, 1999; Fehniger 和 Caligiuri, 2001)。此外, 在慢性炎症性疾病如类风湿性关节炎中, 局部产生的 IL-15 可能通过募集和激活滑膜 T 细胞而加重炎症。已经表明, 这种 IL-15 诱导的效应在疾病发病机理中起关键性的作用(Kirman 等, 1998; McInnes 等, 1996; McInnes 等, 1997; McInnes 和 Liew, 1998; Fehniger 和 Caligiuri, 2001)。

体外研究表明 IL-15 与 IL-2 由于共享多种受体组分而共享数种生物活性。T 细胞上存在的 IL-15 受体由独有的 α -链即 IL-15R α 组成, 但与 IL-2R 共享 β -链和 γ -链。结果, 这两种受体使用相同的 Jak/STAT-信号元件。然而, 已经报道, 基于 IL-2 和 IL-15 及其受体的复杂调节和差异表达, 其体内功能有显著差异(Kirman 等, 1998; Waldmann 和 Tagaya, 1999; Waldmann 等, 2001)。重要的是注意到, IL-15 在天然杀伤(NK)细胞、NK-T 细胞和表皮内淋巴细胞发生、存活、扩充和起作用中的作用并非多余的(Kennedy 等, 2000; Liu 等, 2000)

McInnes 及其同事(McInnes 等, 1997; McInnes 和 Liew, 1998)报道, 在得自类风湿性关节炎患者的 T 细胞中 IL-15 刺激可诱导 TNF- α 的产生。此外, 受 IL-15 激活的外周血 T 细胞显示出通过细胞接触依赖性机制由巨噬细胞诱导显著性 TNF- α 产生。因为 TNF- α 在类风湿性关节炎中的破坏性作用, 所以该细胞因子的抑制可降低疾病活

动性(Bathon 等, 2000; Klippel, 2001; Lovell 等, 2000; Maini 和 Taylor, 2000)。

发明概述

5 本发明基于与人 IL-15 特异性结合并且抑制由 IL-15 诱导的促炎作用的完全人单克隆抗体的首次产生和分离, 以及这种新抗体的表征和它们在治疗各种各样的 IL-15 介导的疾病中的治疗价值的证明。例如, 如本文所述, 已经表明, 人抗体抑制 $\text{TNF}\alpha$ 产生及 T 细胞增殖, 它们两者都与炎性疾病完全相关。因此, 本发明的人抗体提供
10 了一种治疗和预防这些疾病(以及任何其它 IL-15 介导的疾病)的改进方法, 其部分原因是它们的独特特异性(例如表位和种特异性)、亲和性、结构、功能活性以及它们是完全人抗体的事实, 使其在给予人类患者时比先前产生的其它 IL-15 抗体(例如鼠抗体和人源化抗体)的免疫原性显著降低并且在治疗上更有效和更有用。本发明也基于这样
15 的发现: IL-15 抑制抗体(例如本文描述的人抗体)的新治疗应用, 包括治疗炎性疾病, 例如类风湿性关节炎、银屑病、移植排斥和癌症。

 本发明的分离的人抗体包括各种抗体同种型, 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE。通常, 它们
20 包括 IgG1 (例如 IgG1k)、IgG3 和 IgM 同种型。所述抗体可以是全长抗体(例如 IgG1 或 IgG3 抗体)或者可以仅包括抗原结合部分(例如 Fab、 F(ab')_2 、Fv、单链 Fv 片段、分离的互补性决定区(CDR)或两种或两种以上的分离的 CDR 的组合)。

 在一个实施方案中, 所述人抗体是重组抗体。在一个具体的实
25 施方案中, 所述人抗体由人 IgG 重链和人 κ 轻链核酸编码, 所述核酸在其可变区中分别包含如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列及其保守序列修饰。在另一个实施方案中, 所述人抗体包括 IgG 重链可变区和 κ 轻链可变区, 所述可变区分别包含 SEQ ID NO:2 和

SEQ ID NO:4 中所示的氨基酸序列及其保守序列修饰。

5 本发明的人抗体可以在宿主细胞例如含有编码抗体重链和轻链的核酸的转染瘤(例如由无限增殖化 CHO 细胞或淋巴细胞构成的转染瘤)中重组产生, 或者直接得自表达所述抗体的杂交瘤(例如其包括得自其基因组中包含编码所述抗体的人重链转基因和人轻链转基因的转基因非人类动物例如转基因小鼠的、与无限增殖化细胞融合的 B 细胞)。在一个具体的实施方案中, 所述抗体由本文称之为 146B7 的杂交瘤或含有人重链和人轻链核酸的宿主细胞(例如 CHO 细胞)转染瘤产生, 所述核酸包含在其可变区中分别如 SEQ ID NO:1 和 3 所示的核苷酸序列及其保守修饰。在具体的实施方案中, 所述抗体由本文称之为 146B7、146H5、404E4 和 404A8 的杂交瘤产生。在一个优选的实施方案中, 所述抗体与位于 IL-15 的 β -链和/或 γ -链相互作用结构域上的表位特异性结合。

15 在另一个实施方案中, 本发明的人抗体与人 IL-15 特异性结合并抑制 IL-15 诱导促炎作用的能力, 例如抑制 $\text{TNF}\alpha$ 的产生和/或抑制 IL-15 与 IL-15 受体结合时 T 细胞如 PBMC 或 CTLL-2 T 细胞的增殖。通常, 如果在 BIACORE 3000 仪器中, 采用重组人 IL-15 作为被分析物而用所述抗体作为配体, 根据表面胞质团共振(SPR)技术测定, 所述人抗体与 IL-15 结合的解离平衡常数(K_D)小于约 10^{-7} M, 例如小于约 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或者甚至更低。在一个具体的实施方案中, 20 所述抗体与人 IL-15 结合的解离平衡常数(K_D)约为 6.5×10^{-8} M。

25 另一方面, 本发明提供编码本发明抗体或抗原结合部分的核酸分子。因此, 本发明还包括含有本发明抗体编码核酸的重组表达载体以及用这些载体转染的宿主细胞, 也包括通过培养这些宿主细胞制备本发明抗体的方法。

本发明还涉及包含编码重链和轻链可变区的核苷酸序列的表达载体, 所述可变区分别包含 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 中所示的氨基酸序列及其保守修饰。这样的表达载体是本领域众所周知的。

其实例包括采用例如网织红细胞裂解物的体外转录/翻译载体。

再一方面，本发明提供得自转基因非人类动物例如转基因小鼠的分离的 B-细胞，所述 B-细胞能够表达与 IL-15 特异性结合的人单克隆抗体的各种同种型(例如 IgG、IgA 和/或 IgM)。所述分离的 B-细胞优选得自己已经用 IL-15 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 IL-15 的细胞免疫的转基因非人类动物，例如转基因小鼠。所述转基因非人类动物例如转基因小鼠的基因组优选包含人重链转基因和人轻链转基因。然后将所述分离的 B-细胞无限增殖化，以提供抗 IL-15 人单克隆抗体源(例如杂交瘤)。

因此，本发明还提供能够产生特异性结合 IL-15 的人单克隆抗体的杂交瘤。在一个实施方案中，所述杂交瘤包括得自其基因组中包含人重链转基因和人轻链转基因的转基因非人类动物例如转基因小鼠的、与无限增殖化细胞融合的 B-细胞。所述转基因非人类动物可以用 IL-15 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 IL-15 的细胞进行免疫，以产生抗体生产杂交瘤。本发明提供的具体杂交瘤包括 146B7、146H5、404E4 和 404A8。

另一方面，本发明提供表达与 IL-15 特异性结合的人单克隆抗体的转基因非人类动物，例如转基因小鼠。在一个具体的实施方案中，所述转基因非人类动物是其基因组中包含人重链转基因和人轻链转基因的转基因小鼠。所述转基因非人类动物可以用 IL-15 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 IL-15 的细胞进行免疫。所述转基因非人类动物例如转基因小鼠优选能够通过经历 V-D-J 重组和同种型转换，产生抗 IL-15 人单克隆抗体的多种同种型(例如 IgG、IgA 和/或 IgM)。同种型转换可以通过例如经典或非经典同种型转换而产生。

另一方面，本发明提供生产与 IL-15 特异性反应的人单克隆抗体的方法。在一个实施方案中，所述方法包括用 IL-15 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 IL-15 的细胞，免疫其基因组中包含人重链转基因和人轻链转基因的转基因非人类动物如转基因小鼠。然后获取所述

动物的 B 细胞(例如脾 B 细胞), 将其与骨髓瘤细胞融合, 形成分泌抗 IL-15 人单克隆抗体的无限增殖杂交瘤细胞。

5 另一方面, 本发明的特征在于与治疗部分缀合的人抗 IL-15 抗体, 所述治疗部分例如细胞毒性药物、酶活性毒素或其片段、放射性同位素或小分子抗癌药。

另一方面, 本发明提供包含药学上可接受的载体和至少一种与 IL-15 特异性结合的本发明人单克隆抗体的组合物, 例如药用组合物和诊断组合物。所述组合物还可以包含其它治疗药, 例如其它免疫抑制剂或化疗药。

10 再一方面, 本发明提供用一种或多种本发明人抗体抑制 IL-15 的促炎作用例如抑制 IL-15 诱导的 $\text{TNF}\alpha$ 产生和/或 T 细胞增殖、优选不抑制结构相关蛋白/细胞因子(例如 IL-2)的活性(例如 $\text{TNF}\alpha$ 产生和/或 T 细胞增殖)的方法。

15 本发明的人抗体可以用于治疗和/或预防各种各样的 IL-15 介导的疾病, 即通过将所述抗体给予罹患这些疾病的患者。

20 可以用本发明的方法和组合物治疗(例如缓解)或预防的示例性疾病包括但不限于炎性疾病如关节炎(例如银屑病性关节炎和类风湿性关节炎, 包括活动性类风湿性关节炎和青少年类风湿性关节炎)、炎性肠病。例如, 已经证明所述抗体可减轻银屑病中的角化不全、减轻表皮增厚以及减少角质化细胞增殖。也已证明所述抗体可减轻与类风湿性关节炎相关的炎症和/或防止活化白细胞的趋化性。所述抗体还可以用于治疗感染性疾病例如 HIV 感染。此外, 所述抗体可以用于治疗移植排斥。再者, 所述抗体可以用于治疗各种各样的涉及 IL-15 介导的新血管形成的疾病, 例如肿瘤生长和癌症如 T 细胞白血病。

25 本发明的人抗体也可以与一种或多种其它治疗药物联合使用, 所述治疗药物例如抗炎药、DMARD (疾病调修抗风湿药)、免疫抑制剂、化疗药和银屑病药。

在一个实施方案中，患者可以另以一种或多种增强所述抗体抑制促炎作用的药物进行治疗，所述药物例如抗炎药如甾体药或 NSAID (非甾体抗炎药)。优选的药物包括例如阿司匹林和其它水杨酸酯、Cox-2 抑制剂如罗非考昔(Vioxx)和塞来考昔(Celebrex)、NSAID 如布洛芬(Motrin, Advil)、非诺洛芬(Nalfon)、萘普生(Naprosyn)、舒林酸(Clinoril)、双氯芬酸(Voltaren)、吡罗昔康(Feldene)、酮洛芬(Orudis)、二氟尼柳(Dolobid)、萘丁美酮(Relafen)、依托度酸(Lodine)、噁丙嗪(Daypro)和吲哚美辛(Indocin)。

在另一个实施方案中，本发明的人抗体可以与一种或多种 DMARD 联合给予，所述 DMARD 例如甲氨蝶呤(Rheumatrex)、羟氯喹(Plaquenil)、柳氮磺吡啶(Asulfidine)，嘧啶合成抑制剂例如来氟米特(Arava)、IL-1 受体阻断剂例如阿那白滞素(Kineret)以及 TNF- α 阻断剂如依那西普(Enbrel)、英夫利昔单抗(Remicade)和阿达木单抗。

在另一个实施方案中，本发明的人抗体可以与一种或多种免疫抑制剂联合给予，所述免疫抑制剂例如环孢菌素(Sandimmune, Neral)和硫唑嘌呤(Imural)。

在另一个实施方案中，本发明的人抗体可以与一种或多种化疗药联合给予，所述化疗药例如多柔比星(阿霉素)、顺铂(Platinol)、博来霉素(Blenoxane)、卡莫司汀(Gliadel)、环磷酰胺(环磷酰胺制剂, Procytox, Neosar)和苯丁酸氮芥(Leukeran)。依照本发明的人抗体还可以连同放疗一起给予。

在另一个实施方案中，本发明的人抗体可以与一种或多种治疗银屑病的药物联合给予，所述药物例如含有煤焦油、维生素 A、可的松或其它皮质甾体的局部用药物，口服或注射用药物如皮质甾体、甲氨蝶呤、类视色素类例如 acicretin (Neogitason)或环孢菌素(Sandimmune, Neral)。其它治疗可包括接触日光或光线疗法。

在另一个实施方案中，本发明的人抗体可以与其它抗体联合给予，所述抗体例如 CD4 特异性抗体和 IL-2 特异性抗体。本发明人抗

体与 CD4 特异性抗体或 IL-2 特异性抗体的组合被认为对治疗自身免疫病和移植排斥特别有用。

再一方面，本发明提供一种在体外或体内检测样品中存在 IL-15 抗原的方法，例如用于诊断 IL-15 介导的疾病的方法。在一个实施方案中，在抗体和 IL-15 之间能够形成复合物的条件下，使待测样品以及对照样品与本发明人抗体或其抗原结合部分接触，来完成这一步。然后检测这两种样品中的复合物形成(例如采用 ELISA)，并且在所述样品间形成复合物方面的任何统计学显著性差异，说明所述试验样品中存在所述 IL-15 抗原。

根据下文之详细描述和权利要求书，本发明的其它特征和优势将会是显而易见的。

附图简述

图 1 包括显示人 IL-15 特异性抗体 146B7、147H5、404A8 和 404E4 与人 IL-15 (hIL-15)以及与突变型 IL-15 蛋白 Q108S 和 D8SQ108S 结合的曲线图。用 ELISA 检测连续稀释的抗体与 hIL-15 或突变型 IL-15 蛋白 D8SQ108S 和 Q108S 的结合。

图 2 和图 3 分别显示抗体 146B7 之 V_H -区和 V_L -区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 和 4)及核苷酸序列 (SEQ ID NO:1 和 3)。标出了构架区 (FR)和互补性决定区 (CDR)。

图 4A-D 包括显示 IL-15 介导的 TNF- α 释放被抗体 146B7 抑制的曲线图。将人 PBMC 与 hIL-15 (0 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml)以及 146B7 抗体或同种型对照抗体 (0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml)一起孵育 72 小时。通过 ELISA 测量所产生的 TNF- α 量。显示了来自两名健康志愿者的数据。

图 5 是显示抗体 146B7 对 IL-2 或 IL-15 介导的 TNF- α 产生的影响的曲线图。将人 PBMC 与 hIL-15 (0 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml)或 hIL-2 (100 ng/ml) 以及 146B7 (0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml)一起

孵育 72 小时。通过 ELISA 测量所产生的 TNF- α 量。

图 6 是显示抗体 146B7、146H5、404E4 和 404A8 对 hIL-15 诱导的 CTLL-2 增殖的抑制活性的曲线图。将 hIL-2 饥饿的 CTLL-2 细胞与 hIL-15 (60 pg/ml)以及连续稀释的 146B7、146H5、404E4 和 404A8 一起孵育 48 小时。测量 ^3H -胸苷掺入,以表示增殖(cpm)。结果以平均值表示。

图 7-9 包括显示抗体 146B7 (图 7)、404E4 (图 8)和 404A8 (图 9)对 IL-15 诱导的 PBMC 增殖的抑制活性的曲线图。将人 PBMC 与 hIL-15 (0 ng/ml、25 ng/ml、100 ng/ml; 分别为图 7A、图 8A 和图 9A)或 hIL-2 (0 ng/ml、10 ng/ml、100 ng/ml; 分别为图 7B、图 8B 和图 9B)以及 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 的 146B7 (图 7)、404E4 (图 8)或 404A8 (图 9)一起孵育 72 小时。测量 ^3H -胸苷掺入,以表示增殖(cpm)。

图 10 是显示抗体 146B7 与 $\text{INF}\gamma$ -刺激的单核细胞结合的曲线图。人 PBMC 在 $\text{INF}\gamma$ (500 U/ml)存在下培养至多 2 天(37 $^{\circ}\text{C}$)。通过流式细胞术分析且门控单核细胞后,测定每个样品至少 5000 个细胞的荧光强度。数据表示刺激指数($\text{S.I.} = (\text{平均荧光正染色})/(\text{平均荧光背景染色})$)。

图 11 显示人单核细胞与抗体 146B7 (图 B)或同种型对照抗体(图 A)的结合。将所述细胞与 $\text{INF}\gamma$ (500U/ml)一起培养后,分离人 PBMC 并制备细胞抹片(cytospin)。细胞用苏木精复染色。

图 12 显示人银屑病皮肤与 146B7 (图 B)或同种型对照抗体(hIgG1) (图 A)的结合。人银屑病斑得自征得同意后的患者,并于-80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存直至测定。组织用生物素化抗体染色并在辣根过氧化物酶激活后显现。

图 13A 是显示用 146B7 或溶媒处理 SCID 小鼠后类风湿性关节炎组织中的有核细胞百分比的曲线图。组织用苏木青和曙红(H&E)染色并用 6.0 版 Photo Shop 进行分析。数据以 146B7 处理($n=4$)或溶媒处理($n=2$)后小鼠细胞核(全视野百分率)的平均值和 s.e.m 表示。图 13B

显示用 146B7 (图 B)或 PBS (图 A)处理后, SCID 小鼠中异种移植的 RA 组织的代表性 H&E 染色。

图 14 包括显示抗体 146B7 治疗对 SCID/银屑病小鼠的作用的曲线图。活检组织在福尔马林中固定, 供石蜡包埋用, 并以 H&E 和 Ki-67 核抗原染色。图 14A 显示通过测量角质层至表皮突起始处的表皮厚度而评价的银屑病的严重程度。图 14B 显示测量从角质层至表皮最深处的表皮厚度。图 14C 显示角化不全的等级。图 14D 显示上皮中炎性单核细胞的数目。图 14E 显示 Ki-67+循环角质化细胞的数目。

图 15 显示用抗体 146B7 (图 C)、CsA (图 B)或溶媒(图 A)处理后, SCID 小鼠中移植的人银屑病皮肤的 H&E 染色。移植 3 周后, 小鼠接受 PBS (安慰剂), 每隔 2 天接受 10 mg/kg 剂量的 CsA (环孢菌素 A) (Sandoz)达 15 天, 或者在第 1 天接受 20 mg/kg 剂量以及在第 8 天和第 15 天接受 10 mg/kg 剂量的 146B7。最后一次注射后 1 周, 处死小鼠, 并从每种异种移植物中取 4 mm 穿刺活检组织。活检组织在福尔马林中固定, 供石蜡包埋用, 并用 H&E 染色。

图 16 显示用抗体 146B7 (图 C)、CsA (图 B)或溶媒(图 A)处理后, SCID 小鼠中移植的人银屑病皮肤的 Ki-67 染色。移植 3 周后, 小鼠接受 PBS (安慰剂), 每隔 2 天接受 10 mg/kg 剂量的 CsA (环孢菌素 A) (Sandoz)达 15 天, 或在第 1 天接受 20 mg/kg 剂量以及在第 8 天和第 15 天接受 10 mg/kg 剂量的 146B7。最后一次注射后 1 周, 处死小鼠, 并从每种异种移植物中取 4 mm 穿刺活检组织。活检组织在福尔马林中固定, 供石蜡包埋用, 并针对 Ki-67 核抗原染色。

图 17 是显示抗体 146B7 与受体结合的 IL-15 结合的曲线图。各板用 IL-15 α 包被并与 IL-15 一起孵育。10 分钟后, 向各孔中加入生物素化 146B7。用 ELISA 读出仪于 405 nm 评价 146B7 与受体结合的 IL-15 的结合。

图 18 是显示 IL-15 与其在 Raji 细胞上表达的受体结合后, 抗体 146B7 与 IL-15 结合的曲线图。在表达 IL-15R 的 Raji 细胞与 IL-15

一起孵育后,在 10 分钟后向所述细胞中加入生物素化 146B7。通过 FACS 分析,评价 146B7 与受体结合的 IL-15 的结合。

发明详述

5 本发明提供治疗和诊断各种各样的 IL-15 介导的疾病(即由 IL-15 的促炎作用引起的疾病)的基于抗体的新治疗药物。本文所用的术语“IL-15 的促炎作用”包括由 IL-15 诱导的任何体液介导免疫应答或细胞介导免疫应答,例如 $\text{TNF}\alpha$ 和其它炎症介质的产生以及 T 细胞的募集/增殖。本发明的治疗采用与 IL-15 上存在的表位特异性结合的
10 分离人单克隆抗体。

在一个实施方案中,在通过经历 V-D-J 重组和同种型转换而能够产生抗 IL-15 人单克隆抗体的多种同种型(例如 IgG、IgA 和/或 IgE)的非人类转基因动物例如转基因小鼠中产生所述人抗体。因此,本发明的各个方面包括抗体及其药用组合物、以及制备这些单克隆抗
15 体的非人类转基因动物、B-细胞、宿主细胞转染瘤和杂交瘤。本发明也包括应用本发明抗体检测与 IL-15 结合的细胞的方法和/或在体外或体内抑制 IL-15 介导的功能的方法。也包括将与 IL-15 结合的药物靶向细胞的方法。

为了更容易地理解本发明,首先定义某些术语。其它定义在详
20 述中叙述。

术语“IL-15”、“IL-15 抗原”和“白介素 15”在本文可互换使用,并且包括由细胞天然表达的任何变异体或同种型。

本文涉及的术语“抗体”包括完整的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相互
25 连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链或其抗原结合部分的糖蛋白。每条重链由一个重链可变区(本文缩写为 V_H)和一个重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域—CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由一个轻链可变区(本文缩写为 V_L)和一个轻链恒定区组成。轻链恒定区

由一个结构域 CL 组成。V_H 和 V_L 可以进一步再分为称为互补性决定区(CDR)的高变区, 间插称为构架区(FR)的更为保守的区域。每个 V_H 和 V_L 由三个 CDR 和四个 FR 组成, 并按以下顺序从氨基端至羧基端排列: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有一个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包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)以及经典补体系统的第一组分(C1q)在内的宿主组织或因子的结合。

本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留与抗原(例如 IL-15)特异性结合能力的抗体的一个或多个片段。已经表明, 全长抗体的片段可以执行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合部分”内包括的结合片段的实例包括(i) Fab 片段, 由 V_H 结构域、V_L 结构域、CL 结构域和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 包含在铰链区通过一个二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) Fd 片段, 由 V_H 结构域和 CH1 结构域组成; (iv) Fv 片段, 由抗体一条臂的 V_L 结构域和 V_H 结构域组成, (v) dAb 片段(Ward 等, (1998), *Nature* 341:544-546), 该片段由一个 V_H 结构域组成; 和(vi) 分离的互补性决定区(CDR); 或(vii) 两种或两种以上的分离 CDR 的组合, 其可以任选通过合成接头连接在一起。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域—V_L 和 V_H 由不同基因编码, 但可以采用重组方法, 通过合成接头将它们连接在一起, 使其能够成为单链蛋白质, 其中 V_L 区和 V_H 区配对形成单价分子(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)。这样的单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。采用本领域技术人员已知的常规技术, 获得这些抗体片段, 并且可以以与完整抗体相同的方法, 所述片段根据用途进行筛选。

本文所用的术语“单克隆抗体”是指对特定表位表现出一种结合特异性和亲和性的抗体。因此, 术语“人单克隆抗体”是指表现

出一种结合特异性并且具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。在一个实施方案中，人单克隆抗体由这样的杂交瘤产生：所述杂交瘤包括得自其基因组中包含人重链转基因和轻链转基因的转基因非人类动物例如转基因小鼠的、与无限增殖化细胞融合的 B-细胞。

本文所用的术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、构建或分离的所有人抗体，例如(a)从对于人免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或者由此制备的杂交瘤中分离的抗体(进一步描述于下面的第 I 小节)，(b)从转化以表达所述抗体的宿主细胞例如从转染瘤中分离的抗体，(c)从重组体、组合人抗体文库中分离的抗体，以及(d)通过任何其它方法制备、表达、构建或分离的抗体，所述方法包括将人免疫球蛋白基因序列剪接至其它 DNA 序列。这样的重组人抗体具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而，在某些实施方案中，这样的重组人抗体可以经过体外诱变(或者当使用人 Ig 序列的转基因动物时，经过体内体细胞诱变)，因而所述重组抗体的 V_H 区和 V_L 区的氨基酸序列是尽管来源于并且类似于人种系的 V_H 和 V_L 序列但是可能并非天然存在于人体内抗体种系库中的序列。

本文所用的“异源抗体”被定义为涉及转基因非人类生物体产生的所述抗体。该术语是指这样的抗体：所述抗体具有对应于在不是由所述转基因非人类动物构成的生物体中存在的、一般得自非转基因非人类动物的物种的氨基酸序列或编码核酸序列。

本文所用的“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如特异性结合 IL-15 的分离抗体基本上不含特异性结合非 IL-15 抗原的抗体)。然而，特异性结合 IL-15 表位的分离抗体，可能与来源于不同物种的其它相关细胞因子或其它 IL-15 蛋白有交叉反应性。然而，所述抗体最好总是与人 IL-15 结合。此外，分离的抗体通常基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。在本发明

的一个实施方案中，将具有不同 IL-15 特异性的“分离的”单克隆抗体的组合在一种成分充分确定的组合物混合。

5 本文所用的“特异性结合”是指抗体与预定抗原结合。通常，如果在 BIACORE 3000 仪器中，采用重组人 IL-15 作为被分析物而用所述抗体作为配体，根据表面胞质团共振 (SPR) 技术测定，所述抗体结合的亲和力 (k_D) 约小于 10^{-7} M，例如约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或甚至更低，并且与预定抗原结合的亲和力比其与除预定抗原以外的非特异性抗原 (例如 BSA、酪蛋白) 或密切相关抗原结合的亲和力至少高两倍。短语“识别抗原的抗体”和“抗原特异性抗体”在本文
10 可与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

本文所用的术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

本文所用的“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)。

15 本文所用的“同种型转换”是指抗体类别或同种型从一种 Ig 类别变为其它 Ig 类别之一的现象。

本文所用的“非转换同种型”是指重链在不发生同种型转换时产生的同种型类别；编码所述非转换同种型的 CH 基因通常是紧接功能性重排 VDJ 基因下游的第一个 CH 基因。同种型转换分为经典同种型转换或非经典同种型转换。经典同种型转换通过涉及转基因中
20 至少一个转换序列区的重组事件而发生。非经典同种型转换可以通过例如人 σ_μ 和人 Σ_μ 之间的同源重组 (δ -相关缺失) 而发生。替代的非经典转换机制例如其中有可能发生转基因间和/或染色体间重组，而完成同种型转换。

25 本文所用的术语“转换序列”是指那些负责转换重组的 DNA 序列。“转换供体”序列，通常是 μ 转换区，将是在转换重组期间将被缺失的构建体区 5' (即上游)。“转换受体”区在构建体待缺失区和取代恒定区 (例如 γ 、 ϵ 等) 之间。由于没有总是发生重组的特定位点，故

此最终的基因序列一般不能根据构建体来预测。

本文所用的“糖基化模式”定义为与蛋白质共价连接、更准确地讲与免疫球蛋白共价连接的糖单位的模式。当本领域普通技术人员认为，与所述转基因的 CH 基因来源的物种相比，所述异源抗体的糖基化模式与所述非人类转基因动物物种中的所述糖基化模式更为相似时，异源抗体的糖基化模式可以被描述为与在所述非人类转基因动物的物种所产生的抗体上正常发生的糖基化模式基本相似。

本文所用的术语“天然存在的”，当用于物体时，是指物体可以在自然界中被发现的事实。例如，生物体(包括病毒)中存在的、可以从自然界的来源中分离并且未经人类在实验室中有意修饰的多肽或多核苷酸序列就是天然存在的。

本文所用的术语“重排的”是指免疫球蛋白重链或轻链基因座的构型，其中 V 片段在分别编码基本上完整的 V_H 结构域或 V_L 结构域的构象中紧邻 D-J 区段或 J 区段定位。通过与种系 DNA 比较，可以鉴定出经重排的免疫球蛋白基因座；重排的基因座至少有一个重组的七聚体/九聚体同源性元件。

本文所用的术语“未重排的”或“种系构型”，对于 V 区段，是指其中 V 区段未经过重组而紧邻 D 区段或 J 区段的构型。

本文所用的术语“核酸分子”意指包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链 DNA，或者是双链 DNA，但最好是双链 DNA。

本文所用的术语“分离的核酸分子”，对于编码结合 IL-15 的抗体或抗体部分(例如 V_H 、 V_L 、CDR3)的核酸，意指其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码结合非 IL-15 抗原的抗体或抗体部分的其它核苷酸序列的核酸分子，所述其它序列可能天然邻接人类基因组 DNA 中的核酸。SEQ ID NO:1-4 对应于包含本发明人抗 IL-15 抗体 146B7 的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的核苷酸序列和氨基酸序列。具体地说，SEQ ID NO:1 和 2 对应于 146B7 抗体的 V_H ，SEQ ID NO:3 和 4 对应于 146B7 抗体的 V_L 。

本发明也包括 SEQ ID NO: 1-4 中所示序列的“保守序列修饰”，即不显著影响或改变由所述核苷酸序列所编码的或者含有所述氨基酸序列的抗体的结合特性的核苷酸序列修饰和氨基酸序列修饰。这种保守序列修饰包括核苷酸和氨基酸的取代、添加和缺失。通过本领域已知的标准技术，例如定点诱变和 PCR 介导的诱变，可以将修饰引入 SEQ ID NO:1-4 中。保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。本领域已经确定了具有相似侧链的氨基酸残基的类型。这些类型包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(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)、具有非极性侧链的氨基酸(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)、具有 β -支链侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，人抗 IL-15 抗体的预测非必需氨基酸残基最好被来自相同侧链类型的其它氨基酸残基取代。

此外，在另一个实施方案中，例如通过饱和诱变，可以沿整个抗 IL-15 抗体编码序列或其一部分随机引入突变，并且所得的经修饰的抗 IL-15 抗体可以根据结合活性进行筛选。

因此，由本文公开的(重链和轻链可变区)核苷酸序列编码和/或含有本文公开的(重链和轻链可变区)氨基酸序列(即 SEQ ID NO:1-4)的抗体包括由经过保守修饰的相似序列编码或者含有所述序列的基本相似的抗体。下文提供关于如何根据本文作为 SEQ ID NO:1-4 公开的部分(即重链和轻链可变区)序列可以产生这类基本相似的抗体的进一步讨论。

对于核酸，术语“实质同源性”是指当进行最佳比对和比较时，在适当插入或缺失核苷酸的情况下，两种核酸序列或其指定序列在

至少约 80%、通常至少约 90%至 95%，更优选至少有约 98%至 99.5% 的核苷酸中是相同的。或者，当所述区段在选择性杂交条件下与该链的互补序列杂交时，存在实质同源性。

5 考虑到进行两个序列最佳比对所需要引入的空位(gap)数和每个空位的长度，两个序列之间的同一性百分率随所述序列所共享的相同位置数而变(即%同源性=相同位置数/总位置数 × 100)。运用数学算法，可以完成对序列的比较和两个序列间同一性百分率的测定，如下文非限制性实例中所描述的。

运用 GCG 软件包中的 GAP 程序(可以得自 <http://www.gcg.com>)，
10 使用 NWSgapdna.CMP 矩阵，以及空位加权(gap weight)为 40、50、60、70 或 80，而长度加权(length weight)为 1、2、3、4、5 或 6，可以测定两个核苷酸序列之间的同一性百分率。运用加入了 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyes 和 W. Miller 的算法(CABIOS, 4:11-17 (1989))，使用 PAM120 加权残基表，空位长度罚分(gap length penalty)为 12，而空
15 位罚分(gap penalty)为 4，也可以测定两个核苷酸序列或氨基酸序列之间的同一性百分率。另外，运用加入了 GCG 软件包中的 GAP 程序(可以得自 <http://www.gcg.com>)的 Needleman 和 Wunsch 的算法(*J. Mol. Biol.* (48):444-453(1970))，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵，并且空位加权为 16、14、12、10、8、6 或 4，而长度加权为 1、
20 2、3、4、5 或 6，可以测定两个氨基酸序列之间的同一性百分率。

本发明的核酸序列和蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”，以对公共数据库进行搜索，例如以鉴定相关的序列。可以运用 Altschul 等((1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10)的 NBLAST 和 XBLAST 程序(2.0 版)，进行这样的搜索。可以运用 NBLAST 程序，分值(score)=100、
25 字长(wordlength)=12，进行 BLAST 核苷酸搜索，以获得与本发明核酸分子同源的核苷酸序列。可以运用 XBLAST 程序，分值=50、字长=3，进行 BLAST 蛋白质搜索，以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的、包括空位的序列比对，可以

使用 Gapped BLAST, 如 Alschul 等(1997) *Nucleic Acid Res.* 15(17): 3389-3402 中所描述的。当运用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时, 可以使用相应程序(例如 XBLAST 和 NBLAST)的缺省参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

- 5 所述核酸可以存在于全细胞、细胞裂解液中, 或者以部分纯化或基本纯的形式存在。当通过标准技术, 包括碱/SDS 处理、CsCl 分带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其它技术, 当从其它细胞组分或其它污染物例如其它细胞核酸或蛋白质中纯化出来时, 核酸是“分离的”或“成为基本纯的”。参见 F. Ausubel 等主编, Current Protocol in Molecular Biolory, Greene Publishing and Wiley Interscience, 纽约 (1987)。

15 本发明的核酸组成, 尽管通常为来自 cDNA、染色体或其混合物的天然序列(经修饰的限制位点等除外), 也可以根据提供基因序列的标准技术进行突变。对于编码序列, 这些突变可以按照需要影响氨基酸序列。特别是, 考虑了本文描述的天然 V 序列、D 序列、J 序列、恒定区序列、转换区序列或其它这类序列基本同源的或者来源于所述序列的 DNA 序列(其中“来源于”是指一种序列与另一种序列相同, 或者由另一种序列经修饰而来)。

20 核酸当将其置于与另一核酸序列的功能关系时则是“有效连接的”。例如, 如果启动子或增强子如果其影响序列的转录则与编码序列是有效连接的。就转录调节序列而论, 有效连接是指所连接的 DNA 序列是相邻的, 并且必要时使两个蛋白质编码区相邻并符合读框地连接。对于转换序列, 有效连接是指所述序列能够影响转换重组。

25 本文所用的术语“载体”意指能够转运与之连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”, 质粒是指可以将额外的 DNA 区段连接到其中的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体, 其中额外的 DNA 区段可以被连接到病毒基因组中。某些载

体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如非附加型哺乳动物载体)可以在被导入宿主细胞后可整合到宿主细胞的基因组中,从而随宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其有效连接的基因的表
5 达。这样的载体在本文称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般而言,重组DNA技术中所用的表达载体通常为质粒形式。在本说明书中,由于质粒是最常用的载体形式,因此“质粒”和“载体”可互换使用。然而,本发明包括用于等同功能的这样的其它形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。
10

本文所用的术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意指其中导入了重组表达载体的细胞。不用说这样的术语不仅指特定的题述细胞,而且指这类细胞的后代。因为在后续世代中可能由于突变或环境影响而发生某些修饰,所以这样的后代可能实际上与亲代
15 细胞不完全相同,但仍包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范畴之内。

本文所用的术语“患者”包括任何人或非人类动物。例如,本发明的方法和组合物可以用于治疗炎性疾病例如关节炎(例如类风湿性关节炎)患者。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳
20 动物和非哺乳动物,例如非人类灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

下面的各小节更详细地描述本发明的各个方面。

I. 抗 IL-15 人抗体的产生

25 可以采用各种各样的已知技术,例如 Koler 和 Milstein, Nature 256:495 (1975)描述的标准体细胞杂交技术,产生本发明的人单克隆抗体。尽管优选体细胞杂交法,但是原则上,也可以采用用于产生单克隆抗体的其它技术,例如,B淋巴细胞的病毒或癌基因转化,采

用人抗体基因文库的噬菌体展示技术。

用于产生生产本发明人单克隆抗体的杂交瘤的优选动物系统是鼠类系统。小鼠中的杂交瘤生产是本领域众所周知的，包括用于分离和融合免疫脾细胞的免疫方案和技术。

- 5 在一个实施方案中，采用携带部分人免疫系统而非小鼠免疫系统的转基因或转染色体小鼠，产生针对 IL-15 的人单克隆抗体。在一个实施方案中，本发明使用含有编码未经重排的人重链(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(miniloci)以及使内源 μ 和 κ 链基因座失活的中靶突变的转基因小鼠，在本文称为“HuMAb
- 10 小鼠”(Lonberg, N.等(1994), *Nature* 368(6774): 856-859)。因此，所述小鼠表现出小鼠 IgM 或 κ 表达减少，并且在免疫反应中，所导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变，产生高亲和力的人 IgG κ 单克隆抗体(Lonberg, N.等(1994), 参见上文; 综述于 Lonberg, N. (1994), *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:48-101;
- 15 Lonberg, N.和 Huszer, D. (1995), *Intern. Rev. Immunol.* 第 13 卷: 65-93, 以及 Harding, F.和 Lonberg, N. (1995), *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546)。HuMAb 小鼠的产生在下面的第 II 小节有详细描述，并且详述于 Taylor, L.等(1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J.等(1993) *International Immunology* 5:647-656; Tuailon 等(1993)
- 20 *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; Lonberg 等(1994) *Nature* 368 (6474):856-859; Lonberg, N. (1994), *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L.等(1994) *International Immunology* 6:579-591; Lonberg,
- 25 N.和 Huszar, D. (1995), *Intern. Rev. Immunol.* 第 13 卷: 65-93; Harding, F.和 Lonberg, N. (1995), *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546; Fishwild, D. 等(1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851。另见美国专利号 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; 全都属于 Lonberg 和

Kay 以及 GenPharm Internatinal; Surani 等的美国专利第 5,545,807 号; 于 1998 年 6 月 11 日公布的国际公布号 WO 98/24884; 于 1994 年 11 月 10 日公布的 WO 94/25585; 于 1993 年 6 月 24 日公布的 WO 93/1227; 于 1992 年 12 月 23 日公布的 WO 92/22645; 于 1992 年 3 月 19 日公布的 WO 92/03918。实施例 2 具体描述了 HCO12 转基因 HuMAb 小鼠的产生。

免疫

为了产生抗 IL-15 的完全人单克隆抗体, 可以用 IL-15 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 IL-15 的细胞, 免疫含有人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠(例如 HCo12、HCo7 或 KM 小鼠), 例如 Lonberg 等(1994) *Nature* 368(6474):856-859; Fishwild 等(1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851 和 WO 98/24884 描述的。或者, 可以用编码人 IL-15 的 DNA 免疫小鼠。首次输注时, 所述小鼠最好为 6-16 周龄。例如, 可以用 IL-15 抗原的纯化或富集制剂(5-50 μ g)腹膜内免疫 HuMAb 小鼠。在用 IL-15 抗原的纯化或富集制剂进行免疫不产生抗体的情况下, 也可以用表达 IL-15 的细胞例如细胞系免疫小鼠, 以促进免疫应答。

使用各种抗原的累积的经验已经表明, HuMAb 转基因小鼠当最初用完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内(IP)或皮下(SC)免疫、随后每隔一周用不完全弗氏佐剂中的抗原 IP/SC 免疫(直至总共 10 次)时, 反应最佳。在所述免疫方案的过程中, 可以通过眶后放血获得的血浆样品, 监测免疫应答。可以通过 ELISA (如下所述)对所述血浆进行筛选, 而具有足够效价的抗 IL-15 人免疫球蛋白的小鼠可以进行融合。小鼠可以在处死和取出脾脏前 3 天用抗原静脉内加强免疫。

生产抗 IL-15 人单克隆抗体的杂交瘤的产生

为了制备产生抗 IL-15 人单克隆抗体的杂交瘤, 可以从免疫小鼠分离脾细胞和淋巴结细胞, 并将其与合适的无限增殖化细胞系如小

鼠骨髓瘤细胞系融合。然后,所产生的杂交瘤可以根据抗原特异性抗体的产生进行筛选。例如,可能将来自免疫小鼠脾淋巴细胞的单细胞悬液与含有 50% PEG (w/v)的 SP2/0-Ag8.653 非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1580)融合。可以将细胞以约 1×10^5 接种到平底微量滴定板中,随后在还含有 10% fetal Clone Serum (胎克隆血清)、5-10% origen 杂交瘤克隆因子(IGEN)和 1X HAT (Sigma)的选择培养液中孵育两周。约两周后,细胞可以在 HAT 被 HT 取代的培养液中进行培养。然后通过 ELISA,根据抗 IL-15 人单克隆抗体 IgM 和单克隆抗体 IgG 对各孔进行筛选。一旦发生广泛的杂交瘤生长时,则通常可以在 10-14 天后观察培养液。可以将分泌所述抗体的杂交瘤重新接种,再次进行筛选,并且如果人 IgG 仍呈阳性,则可以通过有限稀释,将抗 IL-15 单克隆抗体亚克隆至少两次。然后稳定的亚克隆可以在体外进行培养,以便在组织培养液中产生抗体,供特征鉴定用。

产生抗 IL-15 人单克隆抗体的转染瘤的制备

例如,采用本领域熟知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合(Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202),也可以在宿主细胞转染瘤中产生本发明的人抗体。

例如,在一个实施方案中,可以将目标基因例如人抗体基因连接到表达载体例如真核表达质粒中,例如采用 WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP 338 841 中公开的 GS 基因表达系统或本领域熟知的其它表达系统。可以将携带克隆抗体基因的纯化质粒导入真核宿主细胞如 CHO-细胞或 NSO-细胞或其它真核细胞如植物源性细胞、真菌细胞或酵母细胞中。用于导入这些基因的方法可以是本领域描述的方法,例如电穿孔、脂质转染、脂质转染胺等等。在将这些抗体基因导入宿主细胞后,可以对表达所述抗体的细胞进行鉴定和选择。这些细胞代表此后可以根据其表达水平进行扩增并且高标度产生抗

体的转染瘤。可以从这些培养上清液和/或细胞中分离和纯化重组抗体。

另一方面，可以在其它表达系统如大肠杆菌(*E. coli*)或完整的生物体中表达这些克隆抗体基因，或者可以合成表达所述抗体基因。

5

应用部分抗体序列表达完整的抗体

抗体主要通过位于 6 个重链和轻链互补性决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。为此，在各个抗体之间，CDR 内的氨基酸序列比 CDR 之外的序列更多样化。因为 CDR 序列负责大多数的抗体-抗原相互作用，所以有可能通过构建包括来自特定天然存在的抗体的 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的表达载体，来表达模拟特定天然存在的抗体特性的重组抗体(参见例如 Riechmann, L.等, 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P.等, 1986, *Nature* 321:522-525;和 Queen, C.等, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033)。这样的构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库中获得。这些种系序列与成熟抗体基因序列不同，因为它们将不包括在 B 细胞成熟期间通过 V(D)J 连接而形成的完整装配型可变基因。种系基因序列也将与高亲和性次要组分抗体在所述可变区中并非均匀分布的序列有所不同。例如，体细胞突变在构架区的氨基端部分相对罕见。例如，体细胞突变在构架区 1 的氨基端部分以及构架区 4 的羧基端部分相对罕见。此外，许多体细胞突变并不显著改变抗体的结合特性。为此，获得特定抗体的完整 DNA 序列以再构建具有类似于原始抗体结合活性的完整重组抗体并不是必需的(参见于 1999 年 3 月 12 日申请的 PCT/US99/05535)。跨越所述 CDR 区的部分重链和轻链序列通常对于该目的是足够的。用所述部分序列来确定哪些种系可变区基因区段和连接基因区段对所述重组的抗体可变基因有贡献。然后用所述种系序列补上所述可变区的缺失部分。在蛋白质成熟期间，重链和轻链前导序列被切除，并不影

10

15

20

25

响最终抗体的特性。为添加缺失的序列，可以通过连接或 PCR 扩增，将克隆化 cDNA 序列与合成寡核苷酸结合。或者，完整的可变区可以作为一组短的重叠寡核苷酸来合成，然后通过 PCR 扩增将其连接，以构建完整的合成可变区克隆。该方法有一些优点，例如消除或包含或具体限定位点，或者最优化特定密码子。

来自一个杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列可以用来设计一组重叠的合成寡核苷酸，以构建具有与天然序列相同的氨基酸编码能力的合成 V 序列。所述合成的重链和 κ 链序列可以在三个方面不同于天然序列：间隔有重复核苷酸碱基序列段，以利于寡核苷酸合成和 PCR 扩增；根据 Kozak 法则(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)，加入最适翻译起始位点；以及在所述翻译起始位点上游加入 HindIII 位点。

对于重链和轻链可变区，优化的编码链序列和相应的非编码链序列大约在相应的非编码寡核苷酸的中点处被断裂成 30-50 个核苷酸。因此，对于每条链，可以将所述寡核苷酸装配成跨越 150-400 个核苷酸区段的重叠双链组。然后用所述库作为模板，产生 150-400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。通常，一个可变区寡核苷酸组被分成两个库，分别扩增所述库，产生两种重叠 PCR 产物。然后通过 PCR 扩增连接这些重叠产物，形成完整的可变区。也可能需要在 PCR 扩增中包括重链或轻链恒定区的重叠片段(包括 κ 轻链的 BbsI 位点或 γ 重链的 AgeI 位点)，以产生可以被克隆到所述表达载体构建体中的片段。

重建的重链和轻链可变区然后与克隆启动子序列、前导序列、翻译起始序列、前导序列、恒定区序列、3'非翻译序列、聚腺苷酸化序列和翻译终止序列结合，构成表达载体构建体。可以将所述重链和轻链表达构建体结合到一种载体中、共转染、连续转染或分别转染到宿主细胞中，然后融合形成表达这两种链的宿主细胞。

下面描述用于构建人 IgG κ 表达载体的质粒(实施例 1)。构建所述

质粒,使得 PCR 扩增的 V 重链和 V κ 轻链 cDNA 序列可以用来重建完整的重链和轻链小基因。这些质粒可以用来表达完整的人 IgG1 κ 或 IgG4 κ 抗体。本发明的完全人抗体及嵌合抗体也包括 IgG2、IgG3、IgE、IgA、IgM 和 IgD 抗体。可以构建相似的质粒,用于表达其它重链同种型,或者用于表达包含 λ 轻链的抗体。

因此,本发明的另一方面,本发明的人抗 IL-15 抗体 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的结构特征用于构建结构上相关的、保留本发明抗体的至少一种功能特性(例如与 IL-15 结合)的人抗 IL-15 抗体。更准确地讲,146B7、147H5、404A8 和 404E4 的一个或多个 CDR 区可以与已知的人构架区和 CDR 重组结合,以构建本发明的其它重组工程的人抗 IL-15 抗体。

因此,在另一个实施方案中,本发明提供一种用于制备抗 IL-15 抗体的方法,所述方法包括:

制备包含以下组分的抗体: (1)人重链构架区和人重链 CDR,其中至少一个人重链 CDR 包含一种选自图 2 所示 CDR 的氨基酸序列(或 SEQ ID NO:2 中的相应氨基酸残基)的氨基酸序列; 和(2)人轻链构架区和人轻链 CDR,其中至少一个人轻链 CDR 包含一种选自图 3 所示 CDR 的氨基酸序列(或 SEQ ID NO:4 中的相应氨基酸残基)的氨基酸序列;

其中所述抗体保留与 IL-15 结合的能力。

可以采用标准结合测定,例如实施例中叙述的那些方法(例如 ELISA),来测定所述抗体与 IL-15 结合的能力。

由于本领域熟知抗体重链和轻链 CDR3 结构域在抗体对抗原的结合特异性/亲和性方面具有特别重要的作用,因此如上所述制备的本发明重组抗体优选包含 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的重链和轻链 CDR3。所述抗体还可以包含 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的 CDR2。所述抗体还可以包含 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的 CDR1。所述抗体还可以包含 CDR 的任何组合。

因此,在另一个实施方案中,本发明还提供抗 IL-15 抗体,所述抗体包含: (1)人重链构架区—人重链 CDR1 区、人重链 CDR2 区和人重链 CDR3 区,其中所述人重链 CDR3 区选自 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的 CDR3,例如图 2 所示 146B7 的人重链 CDR 区(或 SEQ ID NO:2 中的相应氨基酸残基); 和(2)人轻链构架区—人轻链 CDR1 区、人轻链 CDR2 区和人轻链 CDR3 区,其中所述人轻链 CDR3 区选自 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的 CDR3,例如图 3 所示 146B7 的人轻链 CDR 区(或 SEQ ID NO:4 中的相应氨基酸残基); 其中所述抗体与 IL-15 结合。所述抗体还可以包含 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的重链 CDR2 和/或轻链 CDR2。所述抗体还可以包含 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的重链 CDR1 和/或轻链 CDR1。

上述工程抗体的 CDR1 区、CDR2 区和/或 CDR3 区可以包含本文中公开的 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的准确氨基酸序列。然而,普通技术人员将会认识到,某些偏离 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的准确 CDR 序列的序列也是可行的,只要仍然保留所述抗体有效结合 IL-15 的能力(例如保守序列修饰)。因此,在另一个实施方案中,所述工程抗体可以由例如与 146B7、147H5、404A8 和 404E4 的一个或多个 CDR 有 90%、95%、98%或 99.5%相同的一个或多个 CDR 组成。

除仅仅结合 IL-15 外,工程抗体例如上述的那些工程抗体可以根据其保留本发明抗体的其它功能特性进行选择,所述功能特性例如:

- (1) 结合人 IL-15 并抑制 IL-15 诱导的促炎作用;
- (2) 抑制 IL-15 诱导的 $\text{TNF}\alpha$ 产生或 T 细胞增殖;
- (3) 如果在 BIACORE 3000 仪器中,采用重组人 IL-15 作为被分析物而用所述抗体作为配体,根据表面胞质团共振(SPR)技术测定,与人 IL-15 结合的解离平衡常数(K_D)小于约 10^{-7} M;
- (4) 结合位于人 IL-15 的 β -链和/或 γ -链相互作用结构域上的表位;

(5) 干扰人 IL-15 的 Asp⁸ 与人 IL-15 受体β-单位和/或人 IL-15 的 Gln¹⁰⁸ 与人 IL-15 受体 γ-单位的结合;

(6) 结合受体结合的人 IL-15;

(7) 结合人 IL-15 并抑制人 IL-15 诱导角化不全的能力;

5 (8) 结合人 IL-15 并抑制人 IL-15 诱导表皮增厚的能力;

(9) 结合人 IL-15 并抑制人 IL-15 诱导角质化细胞增殖的能力;
和/或

(10) 结合人 IL-15 并抑制人 IL-15 诱导活化白细胞趋化性的能力。

10

抗 IL-15 人单克隆抗体的表征

可以采用各种已知技术,对本发明人单克隆抗体结合 IL-15 的特征进行鉴定。一般而言,所述抗体首先通过 ELISA 鉴定。简而言之,微量滴定板可以先用 PBS 中的纯化 IL-15 包被,然后用无关蛋白如 PBS 稀释的牛血清白蛋白(BSA)封闭。向各孔中加入 IL-15 免疫小鼠血浆的稀释液并于 37℃ 孵育 1-2 小时。所述板用 PBS/吐温 20 洗涤,然后与碱性磷酸酶缀合的山羊抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂一起于 37℃ 孵育 1 小时。洗涤后,所述板用 ABTS 底物显色,并于 OD 为 405 时进行分析。最好将产生最高效价的小鼠用于融合。

20 上述 ELISA 测定可以用来筛选抗体,因而可以筛选出产生对 IL-15 免疫原呈阳性反应的抗体的杂交瘤。则可以将结合 IL-15,最好是以高亲和力与 IL-15 结合的杂交瘤进行亚克隆并进一步表征。然后可以从每个保留其亲代细胞反应性(通过 ELISA)的杂交瘤中选择一个克隆,用于制备细胞库以及用于抗体纯化。

25 为了纯化人抗 IL-15 抗体,可以让所选的杂交瘤在滚瓶、两升旋转瓶或其它培养系统中生长。可以过滤并浓缩上清液,然后用 A 蛋白琼脂糖(Pharmacia, Piscataway, NJ)亲和层析,以纯化所述蛋白。在将缓冲液更换为 PBS 之后,可以用消光系数 1.43 通过 OD₂₈₀ 或最好

通过浊度分析来测定浓度。可以通过凝胶电泳和抗原特异性方法检查 IgG。

5 为了确定所选抗 IL-15 人单克隆抗体是否与独特表位结合，可以用市售的试剂(Pierce, Rockford, IL)将每种抗体生物素化。可以用链霉抗生物素蛋白标记的探针检测生物素化 MAb 的结合。为了确定纯化抗体的同种型，可以采用本领域公知的技术进行同种型 ELISA。例如，微量滴定板的各孔可以用 10 $\mu\text{g/ml}$ 的抗人 Ig 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。用 5% BSA 封闭后，让所述板与 10 $\mu\text{g/ml}$ 单克隆抗体或纯化同种型对照在环境温度下反应 2 小时。然后可以让各孔与人 IgG1 或其它人同种型特异性缀合的探针反应。如上所述，使板显色并进行分析。

10 为了测试单克隆抗体与表达 IL-15 的活细胞的结合，可以使用流式细胞术。简而言之，将表达膜结合的 IL-15 的细胞系和/或人 PBMC (在标准生长条件下生长)与不同浓度的含有 0.1% BSA 和 0.01% NaN₃ 的 PBS 中的单克隆抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 混合 1 小时。洗涤后，让细胞与荧光素标记的抗人 IgG 抗体在与第一抗体染色的相同条件下反应。可以运用 FACSscan 仪器，利用光散射和侧向散射特性对单细胞进行门控来分析样品，并测定标记抗体的结合。(除了或者替代)流式细胞术测定，可以使用利用荧光显微镜检术的替代测定。可以完全如上所述将细胞染色，然后用荧光显微镜检查。这一方法允许显现出各个细胞，但基于抗原的密度，可能降低了灵敏度。

20 通过蛋白质印迹法，可以进一步测试抗 IL-15 人 IgG 与 IL-15 抗原的反应性。简而言之，可以制备来自表达 IL-15 的细胞的细胞提取物并进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后，将分离的抗原转移至硝化纤维素膜上，用 20%小鼠血清封闭，并用待测单克隆抗体探测。人 IgG 结合可以采用抗人 IgG 碱性磷酸酶进行检测，并且用 BCIP/NBT 底物片(tablets) (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO)来显色。

II. 产生抗 IL-15 人单克隆抗体的转基因和转染色体非人类动物的产生

另一方面, 本发明提供能够表达特异性结合 IL-15 的人单克隆抗体的转基因和转染色体非人类动物, 例如转基因或转染色体小鼠。

5 在一个具体的实施方案中, 本发明提供其基因组中包含人重链转基因的转基因或转染色体小鼠, 致使所述小鼠当用 IL-15 抗原和/或表达 IL-15 的细胞免疫时产生人抗 IL-15 抗体。可以将所述人重链转基因整合到所述小鼠的染色体 DNA 中, 转基因小鼠例如本文详细描述和举例说明的 HuMAb 小鼠的情况正是如此。或者, 人重链转基因可以在染色体外保持, 如 WO 02/43478 (2002 年 6 月 6 日公布) 中描述的转染色体(例如 KM)小鼠的情况正是如此。这样的转基因和转染色体小鼠能够通过经历 V-D-J 重组和同种型转换而产生抗 IL-15 人单克隆抗体的多种同种型(例如 IgG、IgA 和/或 IgE)。同种型转换可以通过例如经典或非经典同种型转换而发生。

15 设计对外源抗原刺激应答、具有异源抗体库的转基因或转染色体非人类动物, 需要在所述转基因动物中所含有的异源免疫球蛋白转基因准确地通过 B-细胞发育途径起作用。这包括例如异源重链转基因的同种型转换。因此, 构建转基因以便产生同种型转换以及抗体下述功能的一种或多种: (1)高水平 and 细胞类型特异性表达, (2)功能性基因重排, (3)对等位基因排斥的激活和应答, (4)表达足够的初级库, (5)信号转导, (6)体细胞超变, 以及(7)在免疫应答期间转基因抗体基因座的显性化。

25 并非所有上述标准都需要符合。例如, 在其中所述转基因动物的内源免疫球蛋白基因座被功能性破坏的那些实施方案中, 所述转基因无需激活等位基因排斥。此外, 在其中所述转基因包含功能性重排的重链和/或轻链免疫球蛋白基因的那些实施方案中, 功能性基因重排的第二条标准是不必要的, 至少对于已经重排的转基因是不必要的。有关分子免疫学的背景, 参见 Fundamental Immunology, 第

二版(1989), Paul William E.主编, Raven Press, 纽约。

在某些实施方案中, 用来产生本发明人单克隆抗体的转基因或转染色体非人类动物在所述转基因动物的种系中含有经重排的、未经重排的或者经重排或未经重排组合的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因。各重链转基因包含至少一个 C_H 基因。另外, 所述重链转基因可以含有功能性同种型转换序列, 所述转换序列在所述转基因动物的 B 细胞中能够支持编码多种 C_H 基因的异源转基因的同种型转换。这样的转换序列可以是在来自用作转基因 C_H 基因源的物种的种系免疫球蛋白基因座中天然存在的那些序列, 或者这样的转换序列可以来源于接受所述转基因构建体的物种(所述转基因动物)中存在的那些序列。例如, 用于产生转基因小鼠的人转基因构建体可以产生更高频率的同种型转换事件, 如果其掺入了与小鼠重链基因座中天然存在的转换序列相似的转换序列, 由于推测所述小鼠转换序列最适合与小鼠转换重组酶的酶系统一起发挥作用, 而人转换序列则不是这样的。可以分离转换序列并通过常规克隆方法克隆, 或者可以由根据与免疫球蛋白转换区序列相关的公开序列资料设计的重叠合成寡核苷酸从头合成所述转换序列(Mills 等, *Nucl. Acids Res.* 15:7305-7316 (1991); Sideras 等, *Intl. Immunol.* 1:631-642 (1989))。对于每种上述转基因动物, 功能性重排的异源重链和轻链免疫球蛋白转基因存在于相当大比例的所述转基因动物的 B 细胞中(至少 10%)。

用于产生本发明转基因动物的转基因包括含有编码以下的 DNA 的重链转基因: 至少一个可变区基因区段、一个多样性基因区段、一个连接基因区段和至少一个恒定区基因区段。所述免疫球蛋白轻链转基因包含编码以下的 DNA: 至少一个可变区基因区段、一个连接基因区段和至少一个恒定区基因区段。编码所述轻链和重链基因区段的基因区段对于所述转基因非人类动物是异源的, 因为它们来源于或对应于编码来自不包括所述转基因非人类动物的物种的免疫球蛋白重链和轻链基因区段的 DNA。在本发明的一个方面, 构建所

述转基因，致使各基因区段是未经重排的，即没有重排，以便编码功能性免疫球蛋白轻链或重链。这样的未重排转基因支持所述 V、D 和 J 基因区段的重组(功能性重排)，并且最好支持将整个 D 区基因区段或其一部分掺入到接触 IL-15 抗原的转基因非人类动物体内所产生的重排免疫球蛋白重链中。

在一个替代的实施方案中，所述转基因包括未经重排的“小基因座(mini-locus)”。这样的转基因通常包含 C、D 和 J 区段的相当大部分以及 V 基因区段的亚组。在这样的转基因构建体中，各种调节序列例如启动子、增强子、类别转换区、用于 RNA 加工的剪接供体序列和剪接受体序列、重组信号等，包含来源于所述异源 DNA 的相应序列。可以将这样的调节序列掺入到来自本发明所用的非人类动物的相同或相关物种的转基因中。例如，可以将人免疫球蛋白基因区段与用于转基因小鼠的啮齿动物免疫球蛋白增强子序列在转基因中结合。或者，可以将合成的调节序列掺入到所述转基因中，其中这样的合成调节序列与已知在哺乳动物基因组中天然存在的功能性 DNA 序列并不同源。依照共有序列原则(consensus rules)，例如那些限定剪接-受体位点或启动子/增强子基序的允许序列(permissible sequence)的共有序列原则，设计合成调节序列。例如，与天然存在的种系 Ig 基因座相比，小基因座包含所述基因组免疫球蛋白基因座的一部分，所述部分具有非必需 DNA 部分(例如间插序列；内含子或其部分)的至少一个内部(即不在该部分的末端)缺失。

在本发明的一个优选实施方案中，用于产生抗 IL-15 人抗体的转基因或转染色体动物含有 WO 98/24884 的实施例 12 中描述的转基因(例如 pHC1 或 pHC2)的至少 1 个，通常 2-10 个且有时 25-50 个或更多个拷贝，让所述动物与含有 WO 98/24884 的实施例 5、6、8 或 14 中描述的单拷贝轻链转基因的动物配种，而让其后代与 WO 98/24884 的实施例 10 中描述的 J_H 缺失动物配种。让动物繁育至这三个性状中每个性状达到纯合性。这样的动物具有下述基因型：单拷贝(每单套

染色体)的人重链未重排小基因座(WO 98/24884 的实施例 12 中描述的)、单拷贝(每单套染色体)的重排人 K 轻链构建体(WO 98/24884 的实施例 14 中描述的)以及在去除全部功能性 J_H 区段的每个内源小鼠重链基因座上的一个缺失(WO 98/24884 的实施例 10 中描述的)。让这样的动物与对于 J_H 区段缺失为纯合的小鼠(WO 98/24884 的实施例 10 中描述的)配种,产生对于所述 J_H 缺失为纯合的而对于所述人重链和轻链构建体为半合的后代。给所产生的动物注射抗原并用来产生针对这些抗原的人单克隆抗体。

从这样的动物中分离的 B 细胞对于人重链和轻链是单特异性的,因为它们仅含单拷贝的每个基因。此外,它们对于人或小鼠重链将是单特异性的,因为两个内源小鼠重链基因拷贝由于跨越所引入的 J_H 区的缺失而均无功能,如 WO 98/24884 的实施例 9 和 12 中所描述的。此外,相当大比例的 B 细胞对于人或小鼠轻链将是单特异性的,因为在相当大比例的 B 细胞中,单拷贝的所述重排人 κ 轻链基因的表达将等位基因和同种型地排斥内源小鼠 κ 链和 λ 链基因的重排。

本发明所用的转基因和转染色体小鼠表现出产生大部分种系库免疫球蛋白,理想条件下基本类似于天然小鼠。因此,例如在其中已使内源 Ig 基因失活的实施方案中,血清的总免疫球蛋白水平范围为约 0.1-10 mg/ml,最好为 0.5-5 mg/ml,理想条件下至少约 1.0 mg/ml。当已经将能够实现从 IgM 转换成 IgG 的转基因导入转基因小鼠中时,成年小鼠血清 IgG 与 IgM 之比最好是约 10:1。所述 IgG 与 IgM 之比远小于未成年小鼠。一般而言,大于约 10%、优选 40-80%的脾和淋巴结 B 细胞只表达人 IgG 蛋白。

所述库最好近似于天然小鼠,通常高至少约 10%,优选 25-50%或更高。一般而言,将产生至少约 1000 个不同的免疫球蛋白(最好是 IgG),优选 10^4 至 10^6 或更多,主要取决于小鼠基因组中所引入的不同 V、J 和 D 区的数目。这些免疫球蛋白将通常识别约二分之一或更高的高抗原性蛋白,例如葡萄球菌 A 蛋白。通常,所述免疫球蛋白

对预选抗原表现出的亲和力(K_D)小于 $10^{-7}M$, 例如小于 $10^{-8}M$, $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 或甚至更低。

在某些实施方案中, 可能最好产生具有预定库的小鼠, 以限制对预定抗原类型应答的抗体中代表的 V 基因的选择。具有预定库的重链转基因可以包含例如对预定人抗原类型应答的抗体中优先使用的人 V_H 基因。另一方面, 由于各种原因, 某些 V_H 基因可能被排除在已知库之外(例如与编码针对预定抗原的高亲和性 V 区的可能性低; 经历体细胞突变和亲和力增强的倾向性低; 或对某些人有免疫原性)。因此, 在含有各种重链和轻链基因区段的转基因重排之前, 这样的基因区段可以容易地例如通过杂交或 DNA 测序从非转基因动物的生物体种中鉴定出来。

可以用例如 IL-15 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 IL-15 的细胞免疫上述转基因和转染色体小鼠。或者, 可以用编码人 IL-15 的 DNA 免疫所述转基因小鼠。然后所述小鼠将产生通过转基因内转换重组(顺式转换)经历类别转换并表达与 IL-15 反应的免疫球蛋白的 B 细胞。所述免疫球蛋白可以是人抗体(也称为“人序列抗体”), 其中重链和轻链多肽由人转基因序列编码, 所述序列可以包括由体细胞突变产生的序列和 V 区重组连接序列以及种系编码序列; 这些人抗体可以被称为与由人 V_L 或 V_H 基因区段以及人 J_L 或 D_H 和 J_H 区段编码的多肽序列基本相同的, 即使由于体细胞突变和不同 V-J 和 V-D-J 重组连接而可能存在其它非种系序列。每种抗体链的可变区通常至少 80% 由人种系 V 基因区段、J 基因区段编码以及当其为重链时由 D 基因区段编码; 经常至少 85% 的可变区由转基因中存在的人种系序列编码; 常常 90% 或 95% 或更高的可变区序列由转基因中存在的人种系序列编码。然而, 由于体细胞突变以及 VJ 与 VDJ 连接而引入了非种系序列, 因此人序列抗体通常具有一些不是由人 V、D 或 J 基因区段编码的可变区序列(并且罕见恒定区序列), 正如在所述小鼠的种系中的人转基因中所发现的。通常, 这样的非种系序列(或单个核苷酸位

置)在 CDR 中或附近成簇,或者在已知细胞突变集中的区成簇。

与预定抗原结合的人抗体可以由同种型转换产生,致使产生包含人序列 γ 链(如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2B$ 或 $\gamma 3$)和人序列轻链(例如 κ)的人抗体。

5 由于亲和性成熟和 B 细胞经抗原选择、尤其是随后第二次(或后续)抗原攻击,这样的同种型转换人抗体通常在可变区且经常在 CDR 约 10 个残基中或以内常常含有一个或多个体细胞突变。这些高亲和性人抗体的结合亲和力(K_D)可小于 10^{-7} M、例如小于 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或甚至更低。

10 本发明的另一方面包括来源于本文所述转基因或转染色体小鼠的 B 细胞。所述 B 细胞可以用于产生表达以高亲和力(例如小于 10^{-7} M)与人 IL-15 结合的人单克隆抗体的杂交瘤。因此,在另一个实施方案中,如果在 BIACORE 3000 仪器中,采用重组人 IL-15 作为被分析物而用所述抗体作为用于结合人 IL-15 的配体,根据表面胞质团共振 (SPR)技术测定,本发明提供一种产生人抗体的亲和力(K_D)小于约 10^{-7} M、例如小于约 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或甚至更低的杂交瘤,其中所述抗体包含:

20 一条人序列轻链,所述人序列轻链包含(1)一个轻链可变区,具有与由人 V_L 基因区段和人 J_L 区段编码的多肽序列基本相同的多肽序列,和(2)一个轻链恒定区,具有与由人 C_L 基因区段编码的多肽序列基本相同的多肽序列;和

一条人序列重链,所述人序列重链包含(1)一个重链可变区,具有与由人 V_H 基因区段、任选 D 区和人 J_H 区段编码的多肽序列基本相同的多肽序列,和(2)一个重链恒定区,具有与由人 C_H 基因区段编码的多肽序列基本相同的多肽序列。

25 可以通过在其基因组中包含整合的人免疫球蛋白转基因的转基因小鼠中,扩充人可变区基因区段库的方法,促进产生抗 IL-15 的高亲和性人单克隆抗体,所述方法包括将包含在所述整合的人免疫球蛋白转基因中不存在的 V 区基因区段的 V 基因转基因引入所述基因

组中。通常，所述 V 区转基因是包含一部分人 V_H 或 V_L (V_K) 基因区段阵列的酵母人工染色体，其可能在人基因组中天然存在或者通过重组方法分别将其剪接到一起，其可能包括无序或缺失的 V 基因区段。所述 YAC 中通常含有至少五个或更多个功能性 V 基因区段。在这种变异中，产生通过 V 库扩充方法产生的转基因小鼠是可行的，其中所述小鼠表达包含由 V 区转基因上存在的 V 区基因区段编码的可变区序列和根据人 Ig 转基因编码的 C 区的免疫球蛋白链。通过 V 库扩充方法，可以产生具有至少 5 种不同 V 基因的转基因小鼠；小鼠同样可以含有至少约 24 种 V 基因或更多。某些 V 基因区段可能是非功能性的(例如假基因(pseudogene)等)；这些区段可以被保留，或者必要时，通过技术人员可以掌握的重组方法选择性缺失。

一旦所述小鼠种系已进行工程改造以含有具有经扩充的 V 区段库、在含有所述 J 和 C 基因区段的人 Ig 转基因中基本不存在的功能性 YAC，则所述性状可以遗传或培育到其它遗传背景中，所述背景包括其中将具有扩充 V 区段库的功能性 YAC 培育到具有不同人 Ig 转基因的小鼠种系中的背景。具扩充 V 区段库的多种功能性 YAC 可以培育到与人 Ig 转基因(或多种人 Ig 转基因)一起起作用的种系中。尽管本文称之为 YAC 转基因，但是这样的转基因当整合到基因组中时可能已基本上不含酵母序列，例如在酵母中自主复制所需的序列；当不再需要在酵母中复制后(例如在导入小鼠 ES 细胞或小鼠原合子(prozygote)之前)，这样的序列可以任选通过基因工程除去(例如限制性消化以及脉冲场凝胶电泳或其它合适的方法)。人序列免疫球蛋白表达的性状的遗传方法，包括培育具有人 Ig 转基因且也任选具有含扩充 V 区段库的功能性 YAC 的转基因小鼠。 V_H 和 V_L 基因区段均可以存在于 YAC 中。所述转基因小鼠可以培育到专业人员希望的任何背景中，包括带有其它人转基因的背景，包括人 Ig 转基因和/或编码其它人淋巴细胞蛋白的转基因。本发明也提供一种由具有扩充 V 区库 YAC 转基因的转基因小鼠产生的高亲和性人序列免疫球蛋白。尽

管上文描述了本发明转基因动物的优选实施方案，但是考虑了分为以下的四个类别的其它实施方案：

I. 含有未重排重链和重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

5 II. 含有未重排重链和未重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

III. 含有重排重链和未重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

IV. 含有重排重链和重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。

10 在这些类别的转基因小鼠中，优选的优先顺序如下：当内源轻链基因(或至少 K 基因)通过同源重组(或其它方法)而被剔除时为 $II > I > III > IV$ ，而当内源轻链基因未被剔除并且必须通过等位基因排斥而显性化时为 $I > II > III > IV$ 。

15 III. 抗体缀合物/免疫毒素

另一方面，本发明的特征在于一种与治疗部分例如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性同位素缀合的抗 IL-15 人单克隆抗体。当与细胞毒素缀合时，这些抗体缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害(例如杀伤)的任何药剂。实例
20 包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素二酮、米托蒽醌、普卡霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗药包括但不限于
25 于抗代谢药(例如甲氧蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、降卡巴嗪(decarbazine))、烷化剂(例如氮芥、thioepa 苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐星、丝裂霉素 C 和顺式二胺二氯铂(II) (DDP)

顺铂)、蒽环类抗生素(例如柔红霉素(旧称道诺霉素)和多柔比星)、抗生素类(例如放线菌素 D (旧称放线菌素)、博来霉素、普卡霉素和安曲霉素(AMC))以及抗有丝分裂药(例如长春新碱和长春花碱)。本发明的抗体可以与放射性同位素例如放射性碘缀合,产生用于治疗 IL-15 相关疾病如癌症的细胞毒性放射性药物。

本发明的抗体缀合物可以用来调节给定的生物反应。所述治疗部分不应解释为限于经典的化疗药。例如,所述药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可包括例如酶活性毒素或其活性片段,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 ;或生物反应调节剂,如淋巴因子、白介素-1 (“IL-1”)、白介素-2 (“IL-2”)、白介素-6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其它细胞因子或生长因子。

用于将这样的治疗部分与抗体缀合的技术是众所周知的,参见例如 Arnon 等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drug In Cancer Therapy (癌症治疗中用于药物免疫靶向的单克隆抗体)”,载于 Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 等(主编),第 243-56 页(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等,“Antibodies For Drug Delivery (用于药物传递的抗体)”,载于 Controll Drug Delivery (第 2 版),Robison 等(主编),第 623-53 页(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review(综述:癌症治疗中细胞毒性药物的抗体载体)”,载于 Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Application, Pinchera 等(主编),第 475-506 页(1985); “Analysis , Results, And Future Prospective Of The Use Of Therapeutic Radiolabled Antibody In Cancer Therapy (癌症治疗中放射性标记抗体治疗应用的分析、结果和前景)”,载于 Monoclonal Antibodies For Cancer Detecion And Therapy, Baldwin 等(主编),第 303-16 页(Academic Press 1985),以及 Thorpe 等,“The Preparation And

Cytotoxic Properties Of Antibodies-Toxin Conjugate (抗体-毒素缀合物的制备和细胞毒特性)”，Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

IV. 药用组合物

5 另一方面，本发明提供一种组合物例如药用组合物，所述组合物含有与药学上可接受的载体一起配制的一种或一种组合的本发明的人单克隆抗体或其抗原结合部分。在一个优选的实施方案中，所述组合物包括多种(例如两种或更多种)分离的本发明人抗体的组合。所述组合物中每种抗体最好与 IL-15 的不同预选表位结合。

10 本发明的药用组合物也可以在联合疗法中给予，即与其它药物联合给予。例如，所述联合疗法可以包括本发明组合物与至少一种或多种其它治疗药，如抗炎药、DMARD (疾病调修抗风湿药)、免疫抑制剂、化疗药和银屑病药。本发明的药用组合物也可以结合放射疗法给予。本发明也包括与其它抗体例如 CD4 特异性抗体和 IL-2 特异性抗体共同给予。这种与 CD4 特异性抗体或 IL-2 特异性抗体的组合被认为对于治疗自身免疫病和移植排斥特别有用。

15 本文所用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有生理上相容的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂 and 抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。所述载体最好适合于静脉内、肌肉、皮下、胃肠外、
20 脊髓或表皮给药(例如通过注射或输注)。根据给药途径，所述活性化合物即抗体、双特异性或多特异性分子，可以用保护所述化合物免遭酸和可以使所述化合物失活的其它天然条件的作用的材料来包衣。

25 “药学上可接受的盐”是指保留母体化合物的所需生物活性并且不引起任何不想要的毒理学效应的盐(参见例如 Berge, S.M.等(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括由无毒无机酸以及无毒有机酸衍生的盐，无毒无机酸例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等，无毒

5 有机酸例如脂族一和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等。碱加成盐包括由碱土金属以及无毒有机胺衍生的盐，碱土金属例如钠、钾、镁、钙等，无毒有机胺例如 N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等。

10 本发明的组合物可以通过本领域已知的多种方法来给予。正如本领域技术人员将会认识到的，给药途径和/或方式将视所需结果而变。所述活性化合物可以与保护所述化合物抵抗快速释放的载体一起配制，例如控释制剂，包括植入剂、透皮贴剂和微囊化递药系统。可以使用生物可降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞类、聚乙二醇酸、胶原、多聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这类制剂的许多方法是专利方法或者是本领域技术人员普遍已知的。参见例如 *Sustained and Controlled Release Drug Delivery System* (缓释和控递药物递药系统), J.R. Robinson 主编, Marcel Dekker, Inc. 纽约, 15 1978。

20 为了通过某些给药途径给予本发明的化合物，所述化合物可能必需用防止其失活的材料来包衣，或者将所述化合物与所述材料共同给予。例如，所述化合物可以在合适的载体例如脂质体或稀释剂中给予受治疗者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲液。脂质体包括水包油包水型 CGF 乳剂以及常规的脂质体(Strejan 等(1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27)。

25 药学上可接受的载体包括无菌水性溶液或分散体以及用于临时配制无菌注射液或分散剂的无菌粉末。将这样的介质和试剂用于药用活性物质是本领域已知的。除非任何常规介质或试剂与所述活性化合物不相容，考虑了其在本发明药用组合物中的应用。也可将补充的活性化合物掺入到所述组合物中。

治疗组合物通常必须是无菌的，并且在生产和贮藏条件下稳定。所述组合物可以配制成溶液剂、微乳剂、脂质体或适合于高药物浓

度的其它有序结构。所述载体可以是溶剂或分散介质，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。例如通过应用包衣剂如卵磷脂，在分散体的情况下通过维持所需的粒径，以及通过利用表面活性剂，可以维持适当的流动性。在许多情况下，所述组合物中最好包括等渗剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。通过在所述组合物中包括延长吸收的药剂例如单硬脂酸盐和明胶，可以引起注射用组合物的延长吸收。

通过将所需量的所述活性化合物与根据需要的一种或一种组合的上述组分掺入到合适的溶剂中，然后微量过滤除菌，可以制备无菌注射液。一般而言，通过将所述活性化合物掺入到含有基本分散介质和上述的所需其它组分的无菌载体中，制备分散剂。就供制备无菌注射液的无菌粉针剂而言，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干)，得到由预先过滤除菌的其溶液的有效成分的粉末加上任何其它的所需成分。

调整给药方案，以提供最佳的所需反应(例如治疗反应)。例如，可以给予一次大剂量，可以在规定时间内给予几个分次剂量，或者根据治疗情况的需要所指示的，所述剂量可以按比例减少或增加。例如，本发明的人抗体可以通过皮下注射每周给予一次或两次，或者通过皮下注射每月给予一次或两次。尤其有利的是配制单位剂型的胃肠外组合物，以便于给药和剂量的均一性。本文所用的单位剂型是指对于待治疗患者适合作为单位剂量的物理上分离的单位；每个单位含有计算用以与所需药用载体结合产生所需疗效的预定量的活性化合物。对于本发明的单位剂型的规定由以下因素决定或者直接取决于以下因素：(a)所述活性化合物的独特特性和待达到的特定疗效，和(b)用于治疗个体的敏感性的这样一种活性化合物的配制领域中固有的限制。

药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(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)

脂溶性抗氧化剂，如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(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)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

- 5 对于所述治疗组合物，本发明的制剂包括适合于经口、经鼻、局部(包括口腔含化和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外给药的制剂。所述制剂通常可以以单位剂型存在，并且可以通过药学领域已知的任何方法来制备。可以与载体材料联合产生一种剂型的有效成分的量将随待治疗患者以及特定给药方式而变。可以与载体材料联合产生
- 10 一种剂型的有效成分的量一般是所述组合物产生疗效的量。一般而言，按百分比计，该量的范围将为约 0.001%至约 90%的有效成分，优选约 0.005%至约 70%，最优选约 0.01%至约 30%。

- 适合于阴道给药的本发明制剂也包括含有本领域已知的合适的这类载体的子宫托、阴道塞、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫制剂或
- 15 喷雾制剂。用于本发明组合物的局部给药或透皮给药的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。所述活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载体以及可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或抛射剂混合。

- 本文所用的短语“胃肠外给药”和“在胃肠外给药”是指肠道
- 20 给药和局部给药之外的给药方式，通常为注射，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

- 可以用于本发明药用组合物中的合适水性和非水性载体的实例
- 25 包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和它们的合适混合物、植物油如橄榄油以及注射用有机酯如油酸乙酯。例如通过应用包衣材料如卵磷脂，在分散体的情况下通过维持所需的粒径，以及利用表面活性剂，可以维持适当的流动性。

这些组合物也可以含有辅料，例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过上述灭菌方法，以及通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚山梨酸等，可以确保防止微生物的存在。也可能需要在所述组合物中包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。另外，通过包含延长吸收的药剂，例如单硬脂酸铝和明胶，可以引起注射用药物形式的延长吸收。

当本发明的化合物作为药物给予人和动物时，它们可以单独给予，或者作为含有例如 0.001-90% (更优选 0.005-70%，例如 0.01-30%) 的有效成分以及药学上可接受的载体的药用组合物给予。

无论选择何种给药途径，可以将以合适的水合形式应用的本发明化合物和/或本发明的药用组合物，通过本领域技术人员已知的常规方法，配制成药学上可接受的剂型。

本发明药用组合物中的所述有效成分的实际剂量水平可以变化，以便对于特定患者、组合物和给药方式而言获得有效达到所需治疗反应且对所述患者无毒的所述有效成分的量。所选的剂量水平将取决于各种各样的药代动力学因素，包括所用的本发明的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、所用特定化合物的排泄速率、疗程、与所述特定组合物联合使用的其它药物、化合物和/或材料、待治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康状况和此前的用药史和药物领域熟知的类似因素。具有本领域普通技术的医师或兽医可以容易地确定所需的药用组合物的有效量并开出处方。例如，所述医师或兽医可以开始给予水平低于达到所需疗效的所需水平的所述药用组合物中所用的本发明化合物，然后逐渐增加剂量，直至达到所需的疗效。一般而言，本发明的组合物的合适日剂量将是所述化合物有效产生疗效的最低剂量的量。这样的有效剂量一般取决于上述因素。优选静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下给药，优选接近靶部位给药。如有需要，治疗组合物的有效日剂量可以以 2 个、3 个、4 个、5 个、6 个或更多分剂量，在一天内以合

适的间隔分别给予，任选以单位剂型给予。当有可能单独给予本发明的化合物时，优选所述化合物作为药用制剂(组合物)给予。

5 治疗组合物可以用本领域已知的药物装置给予。例如，在一个优选的实施方案中，本发明的治疗组合物可以用无针皮下注射装置给予，所述装置例如公开于美国专利号 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824 或 4,596,556 中。可用于本发
10 明的众所周知的植入物和组件的实例包括：美国专利第 4,487,603 号，它公开了一种用于以控制速率分配药物的可植入微型输注泵；美国专利第 4,486,194 号，它公开了一种用于透过皮肤给予药物的治疗装置；美国专利第 4,447,233 号，它公开了一种用于以精确的输注速度递药的
15 药物输注泵；美国专利第 4,447,224 号，它公开了一种用于连续递药的可变流速的可植入输注装置；美国专利第 4,439,196 号，它公开了一种具有多室区室的渗透性递药系统；以及美国专利第 4,475,196 号，它公开了一种渗透性递药系统。许多其它这样的植入物、递药系统和组件是本领域技术人员已知的。

在某些实施方案中，本发明的人单克隆抗体可以配制成确保在体内的适当分布。例如，血脑屏障(BBB)排除了许多高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过 BBB (如有需要)，可以将它们配制在例如脂质体中。有关生产脂质体的方法，参见例如美国专利
20 4,522,811、5,374,548 和 5,399,331。所述脂质体可以包含被选择性地转运到特定细胞或器官、从而增强靶药物传递的一个或多个部分(参见例如 V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如 Low 等的美国专利 5,416,016)、甘露糖苷(Umezawa 等(1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038);
25 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 A 蛋白受体(Briscoe 等(1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134)，其不同种类的可包含本发明制剂以及本发明分子的组分；p120 (Schreier 等(1994) *J. Biol. Chem.*

269:9090); 另见 K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273。在本发明的一个实施方案中, 在脂质体中配制本发明的治疗化合物; 在一个更优选的实施方案中, 所述脂质体包括一个靶向部分。在一个最优选的实施方案中, 所述脂质体中的治疗化合物通过大剂量注射传递到
5 紧靠肿瘤或感染的部位。所述组合物必须是流动的, 使得存在易于注射性。它必须在生产和贮藏条件下稳定, 并且必须防腐以抵抗微生物如细菌和真菌的污染作用。

对于类风湿性关节炎的“治疗有效剂量”优选在患者中产生改善率的 ACR20 预先定义 (ACR20 Preliminary Definition of Improvement), 更优选产生改善率的 ACR50 预先定义 (ACR50 Preliminary Definition of Improvement), 并且甚至更优选产生改善率的 ACR70 预先定义 (ACR70 Preliminary Definition of Improvement)。
10

改善率的 ACR20 预先定义的定义是: 在触痛关节计数(TCJ)和肿胀关节计数(SWJ)中, 改善率 $\geq 20\%$; 并且在下列五项评价中有 3 项的改善率 $\geq 20\%$: 患者疼痛评价(VAS)、患者综合评价(VAS)、医生综合评价(VAS)、患者残疾自我评价(HAQ)、急性期反应物(CRP 或 ESR)。
15

ACR50 和 ACR70 以同样方式定义, 而改善率分别为 $\geq 50\%$ 和 $\geq 70\%$ 。有关进一步细节参见 Felson 等, 载于 American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis (美国风湿病学会关于类风湿性关节炎改善率的预先定义); Arthritis Rheumatism (1995) 38: 727-735。
20

化合物抑制肿瘤的能力可以用预测在人类肿瘤中的功效的动物模型系统中来评价。或者, 组合物的这种特性可以通过检查所述化合物的抑制能力来评价, 这类抑制用技术人员已知的测定在体外来检查。治疗化合物的治疗有效量可以缩小肿瘤大小, 或者缓解患者的症状。本领域普通技术人员可以根据如患者的体重、患者症状的
25

严重程度以及所选的特定组合物或给药途径等因素来确定这样的量。

所述抗体治疗或预防银屑病的能力也可以按照本领域熟知的方法来评价。

5 所述组合物必须是无菌的，且是流动的，使得所述组合物可通过注射器给予。除水之外，所述载体可以是等渗缓冲盐溶液、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)和它们的合适混合物。例如通过应用包衣剂例如卵磷脂、在分散体的情况下通过维持所需的粒径，以及通过应用表面活性剂，可以维持适当的流动性。在许
10 多情况下，优选在所述组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇例如甘露醇或山梨醇以及氯化钠。通过在所述组合物中包括延长吸收的药剂，例如单硬脂酸铝或明胶，可以引起所述注射用组合物的长期吸收。

15 当所述活性化合物如上所述被适当保护时，所述化合物可以例如与惰性稀释剂或可吸收的食用载体一起口服给予。

V. 本发明的应用和方法

20 本发明的抗 IL-15 的人抗 IL-15 抗体(包括所述抗体的衍生物和缀合物)以及含有所述抗体的组合物可以用于多种体外和体内诊断和治疗应用。

25 在一个实施方案中，本发明的人抗体用来抑制 IL-15 诱导的 T 细胞和/或单核细胞/巨噬细胞的 $\text{TNF}\alpha$ 产生，优选不抑制由其它细胞因子如 IL-2 诱导的 $\text{TNF}\alpha$ 产生。通过使所述抗体与 IL-15 接触(例如通过将所述抗体给予患者)，IL-15 通过 IL-15 受体传导信号的能力被抑制，因而也抑制了 T 细胞和/或单核细胞/巨噬细胞产生 $\text{TNF}\alpha$ 。优选的抗体与 IL-15 特异性表位(例如特定亚基如 γ 亚基)结合，因而有利地抑制了 IL-15 诱导的 $\text{TNF}\alpha$ 产生，但不干扰结构上相关的细胞因子如 IL-2 诱导的 $\text{TNF}\alpha$ 产生。

在另一个实施方案中，本发明的人抗体用来抑制 IL-15 诱导的 T 细胞募集和/或增殖，优选不抑制其它结构上相关的细胞因子如 IL-2 诱导的 T 细胞增殖。如同 TNF α 产生一样，通过使所述抗体与 IL-15 接触(例如通过将所述抗体给予患者)，IL-15 通过 IL-15 受体传导信号的能力被抑制，因而也抑制了 IL-15 对 T 细胞的刺激作用。

因此，在又一个实施方案中，本发明提供一种用于治疗或预防由 IL-15 介导的疾病(例如自身免疫病如银屑病、类风湿性关节炎或炎性肠病，或感染性疾病如 HIV)的方法，即将有效量的本发明人抗体给予患者，以治疗或预防所述疾病。所述抗体可以单独给予，或者与其它治疗药一起给予，所述治疗药例如抗炎药如甾体或非甾体抗炎药，或者与抗体联合或协同作用的细胞毒素一起给予，以治疗或预防所述 IL-15 介导的疾病。

在一个具体的实施方案中，本发明的人抗体用来治疗或预防类风湿性关节炎(RA)。所述抗体限制了 IL-15 在疾病相关性炎症如 RA 的进程中所起的作用。T 细胞、尤其是 CD4⁺ T-辅助细胞参与 RA 炎症过程的触发和维持。另一种细胞因子 TNF- α 也参与最终导致 RA 患者关节损伤和功能丧失的炎症途径。局部合成的 IL-15 在激活和募集 T 细胞以及诱导 TNF- α 和其它炎性细胞因子中起关键性的作用。IL-15 在 RA 进程中的作用涉及由巨噬细胞合成的 IL-15 诱导 T 细胞募集的过程。然后，所述活化 T 细胞：(1)维持巨噬细胞激活；并且(2)诱导 TNF- α 产生。受刺激的巨噬细胞促进合成更多的 IL-15 以及 T 细胞激活，因而持续进行所述循环。除了其对 TNF- α 和巨噬细胞的作用外，IL-15 还激活嗜中性粒细胞，并影响局部 B 细胞的免疫球蛋白分泌，尤其是类风湿因子的合成。

因此，本发明的抗 IL-15 抗体可以用于预防或阻断引起 RA 的 IL-15 的上述作用，因而可以用于预防或治疗该疾病。例如，本发明的抗 IL-15 抗体可以用于抑制与 RA 相关的炎症和/或预防活化白细胞的趋化性。

本发明的人抗体可以用于抑制对甲氨蝶呤有不适当反应的类风湿性关节炎患者的结构性损伤的发展，或用于减少一般至严重的活动性类风湿性关节炎患者的体征和症状以及延缓结构性损伤，包括并没有经历过 DMARD 治疗无效的患者。

5 本发明的人抗体还可以用于阻断或抑制 IL-15 的其它作用。IL-15 在各种细胞和组织中表达，包括单核细胞和巨噬细胞、成纤维细胞、树突细胞以及角质化细胞。角质化细胞是表皮和粘膜组织上皮层的主要组分。角质化细胞生长的控制由细胞因子和生长因子的复杂网络介导，其中部分因子由角质化细胞自身产生。来自角质化细胞的
10 IL-15 促使 T 细胞聚集、增殖及在银屑病斑中存活。已知多种其中角质化细胞数目增加所导致的表皮增生的疾病，所述表皮增生引起至少某些相关的疾病症状。这些疾病包括慢性疾病如银屑病和特应性皮炎，以及慢性病症如慢性手部湿疹、接触性皮炎、病毒疣(HPV 有关的)、皮肤 T 细胞淋巴瘤、伤口愈合困难如糖尿病引起的伤口愈合
15 困难。因此，本发明提供治疗或预防这类疾病的方法，即通过将有效量的本发明人抗 IL-15 抗体给予患者，以治疗或预防所述疾病。例如，本发明的抗 IL-15 抗体可以用于阻断或抑制银屑病中的角化不全，减少银屑病中的表皮厚度，以及减少银屑病中的角质化细胞增殖。

20 IL-15 也调节肠上皮细胞的功能(Reinecker 等, (1996) Gastroenterology 111:1706-13)。准确地讲，IL-15 可以导致对粘膜上皮细胞和肠上皮细胞系的调整，因此与炎性肠病如腹腔疾病的发病机理有关。IL-15 在这些疾病中的作用表现在未治疗的腹腔疾病患者的小肠中的 IL-15+细胞的选择性过度出现(WO 00/02582)。因此，已经表明，
25 IL-15 直接参与腹腔疾病的触发和维持。因此，在另一个实施方案中，本发明的抗 IL-15 人抗体(即抑制 IL-15 促炎作用的抗体)可以用于治疗和/或预防腹腔疾病，即将有效量的所述抗体给予患者，以治疗或预防所述疾病。

此外, 本发明人已经发现 IL-15 还促进新血管的形成, 一种被称为新血管形成或血管生成的过程。因此, 本发明抗体的又一用途包括预防或治疗包括新血管形成在内的疾病。除炎症性疾病之外, 这些疾病还包括各种依赖于或其特征在于新血管形成的癌症。

5 本发明的人抗体还可以用于阻断或抑制与感染性疾病如 HIV 相关的 IL-15 的作用。因此, 本发明抗体的另一用途包括预防或治疗感染性疾病如 HIV-1。

10 例如, 所述抗体可以用于在体外或体内诊断由 IL-15 介导的各种疾病。准确地讲, 所述抗体可以用于检测 IL-15 的水平或在其膜表面含有 IL-15 或与其受体(受体结合的人 IL-15)相关的细胞水平。然后可找出这种 IL-15 水平检测与某些疾病症状之间的联系。或者, 所述抗体可以用于抑制或阻断 IL-15 的功能, 进而可以预防或缓解由 IL-15 作用引起的疾病症状。

15 如上文所述, 本发明的人抗 IL-15 抗体可以与一种或多种治疗药如免疫抑制剂或抗炎药共同给予, 以提高整体抗炎效应。所述抗体可以连接于所述药物(作为免疫复合物), 或者可与所述药物分开给予。在后一种情况下(分开给药), 可以在给予所述药物之前、之后或同时, 给予所述抗体。合适的治疗药其中包括抗炎药、DMARD (疾病调修抗风湿药)、免疫抑制剂、化疗药和银屑病药。根据本发明的人抗体也可以结合放疗给予。

20 在另一个实施方案中, 本发明的人抗体可以与其它抗体例如 CD4 特异性抗体和 IL-2 特异性抗体联合给予。本发明的人抗体与 CD4 特异性抗体或 IL-2 特异性抗体的组合被认为对治疗自身免疫病和移植排斥特别有用。

25 包含本发明的人抗 IL-15 抗体的试剂盒以及任选使用说明也在本发明的范围内。所述试剂盒还可以含有一种或多种其它试剂如免疫抑制剂或一种或多种本发明的其它人抗体(例如不同于第一种人抗体、具有补体活性、结合 IL-15 抗原的表位的人抗体)。

因此,用本发明抗体治疗的患者可以另外给予(在给予本发明的人抗体之前、同时或之后)另一治疗药,例如增强或提高所述人抗体疗效的抗炎药。

在另一个实施方案中,通过使这样的化合物与所述抗体结合,本发明的人抗体可以用于将化合物(例如治疗药、标记、细胞毒素、免疫抑制剂等)靶向含有与其表面(例如结合 IL-15 受体或与其结合的膜)结合的 IL-15 的细胞。因此,本发明也提供用于使离体、体内或体外表达 IL-15 和 IL-15 受体的细胞定位的方法(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)。

在下面的实施例中描述了本发明的其它实施方案。

通过以下实施例进一步说明本发明,不应解释为以下实施例进一步限制本发明。序列表、附图和在本申请中所引用的所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容通过引用结合到本文中。

实施例

实施例 1 C μ 中靶小鼠的产生

CMD 打靶载体的构建

质粒 pICE μ 含有一个跨越 μ 基因的鼠 Ig 重链基因座的 EcoRI/XhoI 片段,得自 Balb/C 基因组 λ 噬菌体文库(Marcu 等, Cell 22:187, 1980)。将该基因组片段亚克隆到质粒 pICEMI9H (Marsh 等; Gene 32, 481-485, 1984)的 XhoI/EcoRI 位点中。pICE μ 中包括的重链序列从恰好位于 μ 内含子增强子 3'的 EcoRI 位点下游延伸至位于 μ 基因最后一个跨膜外显子下游约 1 kb 的 XhoI 位点;然而, μ 转换重复区中的大部分已经由于在大肠杆菌(*E. coli*)中传代而缺失。

如下构建所述打靶载体。从 pICE μ 中切下一个 1.3 kb HindIII/SmaI 片段,并将其亚克隆到 HindIII/SmaI 消化的 pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA)中。该 pICE μ 片段从位于 C μ 1 5'约 1 kb 的 HindIII 位点延伸至位于 C μ 1 内的 SmaI 位点。所得的质粒用 SmaI/SpeI 消化,插入来

自 pICE μ 、从 C μ 1 3'中的 Sma I 位点延伸至恰好位于最后一个 C μ 外显子下游的 XbaI 位点的约 4 kb SmaI/XbaI 片段。所得质粒 pTAR1 在 SmaI 位点线性化, 并插入一个 neo 表达盒。该盒由处于小鼠磷酸甘油酸激酶(pgk)启动子(XbaI/TaqI 片段; Adra 等(1987), Gene 60:65-74)的转录控制下并且含有 pgk 聚腺苷酸化位点(PvuII/HindIII 片段; Boer 等(1990) Biochemical Genetics 28:299-308)的 neo 基因组成。该盒得自质粒 pKJ1 (如 Tybulewicz 等(1991) Cell 65:1153-1163 所述), 从所述质粒中切取 neo 盒作为 EcoRI/HindIII 片段, 并将其亚克隆到 EcoRI/HindIII 消化的 pGEM-7Zf (+)中, 产生 pGEM-7 (KJ1)。通过 EcoRI/SalI 消化, 从 pGEM-7 (KJ1)中切取该 neo 盒, 将其平端化, 并以与基因组 C μ 序列相反的方向亚克隆到质粒 pTAR1 中的 SmaI 位点。所得的质粒用 Not I 线性化, 并插入单纯疱疹病毒胸苷激酶(tk)盒, 以便富集带有同源重组体的 ES 克隆, 如 Mansour 等(1988) Nature 336:348-352 所述。该盒由以小鼠 pgk 启动子和聚腺苷酸化位点作支架的 tk 基因的编码序列组成, 如 Tybulewicz 等(1991) Cell 65: 1153-1163 所述。所得的 CMD 打靶载体与所述重链基因座有总共大约 5.3 kb 同源性, 设计用以产生其中 neo 表达盒插入第一个 C μ 外显子的唯一 SmaI 位点中的突变型 μ 基因。所述打靶载体在通过电穿孔进入 ES 细胞中之前, 用在质粒序列内切割的 PvuI 线性化。

20

中靶 ES 细胞的产生及分析

基本上按照已描述的方法(Robertson, E. J. (1978)载于 Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson 主编) 牛津: IRL Press, 第 71-112 页), 让 AB-1 ES 细胞(McMahon, A.P.和 Bradley, A. (1990) Cell 62:1073-1085)在无有丝分裂活性的 SNL76/7 细胞饲养层(出处同前)上生长。采用 Hasty 等所述的方法(Hasty, P. R.等(1991) Nature 350: 243-246), 通过电穿孔, 将线性化 CMD 打靶载体导入 AB-1 细胞中。将电穿孔细胞以 $1-2 \times 10^6$ 细胞/皿的密度接种到 100 mm 培养皿中。24 小时后, 向培养基中加入 G418

25

(200 微克/毫升有效成分)和 FIAU (5×10^{-7} M), 让抗药物克隆在 8-9 天内产生。挑出克隆, 用胰酶消化, 将其分为两份, 进一步扩大培养。将得自每个克隆的一半细胞冷冻, 而另一半细胞用于分析载体和靶序列之间的同源重组。

5 通过 DNA 印迹杂交, 进行 DNA 分析。如 Laird 等所述(Laird, P.W. 等, (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4293), 从克隆中分离 DNA。分离的基因组 DNA 用 SpeI 消化, 用 915 bp SacI 片段即探针 A (参见图 1) 探测, 探针 A 与 μ 内含子增强子和 μ 转换区序列之间的序列杂交。探针 A 从野生型基因座中检测到一个 9.9 kb SpeI 片段, 而从 μ 基因座中检测到一个已经与 CMD 打靶载体(neo 表达盒含有一个 SpeI 位点)同源重组的 7.6 kb 鉴别性条带。在通过 DNA 印迹分析筛选出的 1132 个 G418 和 FIAU 抗性克隆中, 3 个克隆显示出在 μ 基因座同源重组的所述 7.6 kb SpeI 条带。这 3 个克隆进一步用酶 BglII、BstXI 和 EcoRI 消化, 以证实所述载体同源整合到所述 μ 基因中。当与探针 A 杂交时,

10 经 BglII、BstXI 或 EcoRI 消化的野生型 DNA 的 DNA 印迹分别产生 15.7 kb 片段、7.3 kb 片段和 12.5 kb 片段, 而 7.7 kb 片段、6.6 kb 片段和 14.3kb 片段分别指示存在中靶 μ 等位基因。所有 3 个通过 SpeI 消化所检测的阳性克隆显示出预期的鉴别所述 neo 盒插入 $C\mu 1$ 外显子中的 BglII、BstXI 和 EcoRI 限制性片段。

15

20

带有突变型 μ 基因的小鼠的产生

将指定编号为 264、272 和 408 的所述 3 个中靶 ES 克隆解冻复苏, 如 Bradley 所述(Bradley, A. (1987) 载于 Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson 主编) 牛津: IRL Press, 第 113-151 页), 注射到 C57BL/6J 胚胎中。将经注射的胚胎转移到假孕雌性小鼠的子宫中, 产生代表来源于植入 ES 细胞和宿主胚胎的细胞混合物的嵌合小鼠。根据刺豚鼠毛色中 C57BL/6J 黑色背景上来源于所述 ES 细胞系的量, 可以肉眼估计 ES 细胞对所述嵌

25

5 合体的贡献程度。克隆 272 和 408 仅产生低百分比的嵌合体(即刺豚鼠着色的百分比低), 而克隆 264 则产生高百分比的雄性嵌合体。让这些嵌合体与 C57BL/6J 雌鼠配种, 产生 ES 细胞基因组种系遗传的刺豚鼠后代。通过对经 BglII 消化的尾部活检样品的 DNA 的 DNA 印迹分析(如上文关于 ES 细胞 DNA 分析的所述方法), 筛选所述被打中的 μ 基因。大约 50%的所述刺豚鼠后代除显示出 15.7 kb 的野生型条带之外, 还显示出一个 7.7 kb 的 BglII 的杂交条带, 证明中靶 μ 基因的种系遗传。

10 对转基因小鼠 μ 基因的功能性失活的分析

15 为了确定 neo 盒插入到 C μ 1 中是否使所述 Ig 重链基因失活, 让克隆 264 嵌合体与 JHD 突变纯合型小鼠配种, JHD 突变由于 JH 基因区段的缺失而使重链表达失活(Chen 等, (1993) Immunol. 5: 647-656)。产生了 4 个刺豚鼠后代。从 1 月龄这些动物中获得血清, 通过 ELISA 分析鼠 IgM 的存在。所述 4 个后代中的 2 个完全缺乏 IgM (参见表 1)。尾部活检样品 DNA 通过 BglII 消化并使其与探针 A (参见图 1)杂交、以及通过 StuI 消化并与 475 bp EcoRI/StuI 片段(出处同前)杂交进行 DNA 印迹分析, 分析所述 4 只动物的基因型, 证明不能表达血清 IgM 的动物是其中所述重链基因座中的一个等位基因带有所述 JHD 突变、而另一个等位基因带有所述 C μ 1 突变的动物。JHD 突变杂合型小鼠显示出血清 Ig 的野生型水平。这些数据证明, 所述 C μ 1 突变使 μ 基因的表达失活。

表 1

小鼠	血清 IgM (微克/ml)	Ig H 链基因型
42	< 0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD

44	< 0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 × BL6 F1	153	+/+
JHD	< 0.002	JHD/JHD

表 1 显示了通过 ELISA 检测的携带 CMD 突变和 JHD 突变的小鼠(CMD/JHD)、JHD 突变杂合型小鼠(+/JHD)、野生型小鼠(129Sv × C57BL/6J) F1 小鼠(+/+)以及 B 细胞缺陷型 JHD 突变纯合型小鼠(JHD/JHD)的血清 IgM 水平。

实施例 2 HCO12 转基因小鼠的产生

HCO12 人重链转基因

通过将 pHC2 (Taylor 等, 1994, Int. Immunol., 6: 579-591)的 80 kb 插入片段和 pVx6 的 25 kb 插入片段共同注射, 产生 HCO12 转基因。质粒 pVx6 如下所述构建。

将包含人种系 V_H 1-18 (DP-14)基因与约 2.5 kb 5'侧翼基因组序列和 5 kb 3'侧翼基因组序列的 8.5 kb HindIII/SalI DNA 片段, 亚克隆到质粒载体 pSP72 (Promega, Madison, WI)中, 产生质粒 p343.7.16。将包含人种系 V_H 5-51 (DP-73)基因与约 5 kb 5'侧翼基因组序列和 1 kb 3'侧翼基因组序列的 7 kb BamHI/HindIII DNA 片段, 克隆到基于 pBR322 的质粒克隆载体 pGP1f (Taylor 等 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295)中, 产生质粒 p251f。由 pGP1f 衍生的一种新克隆载体 pGP1k (SEQ ID NO:13)用 EcoRV/BamHI 消化, 与包含人种系 V_H 3-23 (DP47)基因以及约 4 kb 5'侧翼基因组序列和 5 kb 3'侧翼基因组序列的 10 kb EcoRV/BamHI DNA 片段连接。所得的质粒 p112.2RR.7 用 BamHI/SalI 消化, 与 p251f 的 7 kb 纯化 BamHI/SalI 插入片段连接。所得的质粒 pVx4 用 XhoI 消化, 与 p343.7.16 的 8.5 kb XhoI/SalI 插入片段连接。

获得一个具有与另外两个 V 基因方向相同的 V_H 1-18 基因的克隆。命名为 pVx6 的该克隆然后用 NotI 消化, 如 Hogan 等所述(B. Hogan

等, Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, 第二版, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview NY), 将经纯化的 26 kb 插入片段与纯化的 pHC2 的 80 kb NotI 插入片段以 1:1 的摩尔比共同注射到半日龄(C57BL/6J × DBA/2J)F2 胚胎的原核中。从由
5 经注射胚胎发育而成的小鼠, 建立了三个独立的包含得自 Vx6 以及 HC2 的序列的转基因小鼠系。这些系命名为(HCO12)14881、(HCO12)15083 和(HCO12)15087。然后, 这三个系中的每个系与包含
10 实施例 1 中所述的 CMD 突变、JKD 突变(Chen 等 1993, EMBO J. 12: 811-820)和(KCo5)9272 转基因(Fishwild 等 1996, Nature Biotechnology 14: 845-851)的小鼠配种。所产生的小鼠在内源小鼠重链和κ轻链基因座被破坏纯合型的背景中表达人重链和κ轻链转基因。

实施例 3 抗 IL-15 人单克隆抗体的产生

如上所述产生的以及由 Medex (San José, CA, 美国)提供的
15 HCo12 和 HCo17 转基因小鼠, 用补充完全弗氏佐剂(CFA, 批号 121024LA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, 美国)或不完全弗氏佐剂(ICFA, 批号 121195LA, Difco)的人重组 IL-15 (hIL-15, Immunex corp., Seattle, 美国)皮下(SC)、腹膜内(IP)或静脉内(IV)注射免疫。在
20 几种情况下, 用与 KLH 偶联的 hIL-15 进行免疫。在用补充完全或不完全弗氏佐剂的 hIL-15 加强免疫数次后, 测试小鼠血清针对 IL-15 的人抗体的存在情况。

产生最终克隆 146B7、146H5、404E4 和 404A8 的转基因小鼠的免疫方案

25

小鼠编号 146 (HCo12)、ID 995-146, 雌性

170699 SC 12 µg hIL-15 + CFA (Difco, 批号 121024LA)

010799 SC 12 µg hIL-15 + CFA (Difco, 批号 121195LA)

150799	SC	12 µg hIL-15 + ICFA
020899	SC	12 µg hIL-15-KLH + ICFA
070999	SC	12 µg hIL-15-KLH + ICFA
280999	SC	12 µg hIL-15-KLH + CFA
111099	IV	30 µg hIL-15 + PBS
121099	IV	30 µg hIL-15 + PBS
151099		该小鼠的淋巴结细胞和脾细胞与 SP2/0 的融合体

小鼠编号 404 (HCo7)、ID 997-404, 雌性

201099	IP	25 µg hIL-15-KLH + CFA (Difco, 批号 121024LA)
031199	IP	12.5 µg hIL-15、12.5 µg hIL-15-KLH、25 µg + ICFA (Difco, 批号 121195LA)
101199	IV	12.5 µg hIL、12.5 µg hIL-15-KLH
121199	IV	12.5 µg hIL、12.5 µg hIL-15-KLH
191199		该小鼠的淋巴结细胞和脾细胞与 SP2/0 的融合体

培养基

5 融合配偶体培养基(FPM)

Iscoves 改良 Dulbecco 氏培养基补充 100 IU/ml 青霉素、100 µg/ml 链霉素、1 mM 丙酮酸钠、0.5 mM β-巯基乙醇(Life Technologies, Paisley, 苏格兰)和 10%热灭活胎牛血清(HyClone, Utah, 美国)。

10 融合选择培养基(FSM):

FPM 补充 30 ml Origen Hybridoma Cloning Factor (杂交瘤克隆因子) (IGEN, Gaithersburg, MD, 美国)、HAT (1 支管形瓶, 生产商推荐的浓度, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, 美国)和 0.5 mg/ml 卡那霉素(Life Technologies, Paisley, 苏格兰)。

15

融合克隆培养基(FCM):

FPM 补充 20 ml Origen Hybridoma Cloning Factor (杂交瘤克隆因子) (IGEN, Gaithersburg, MD, 美国)、HT (1 支管形瓶, 生产商推荐的浓度, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, 美国)和 0.5 mg/ml 卡那霉素(Life Technologies, Paisley, 苏格兰)。

5

杂交瘤制备: 脾细胞和淋巴结细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞的融合

为了获得杂交瘤, 取出所述小鼠的脾脏、腹股沟淋巴结和副主动脉淋巴结。将脾细胞和淋巴结细胞的单细胞悬液与 SP2/0 骨髓瘤细胞以 1:2 的细胞比率混合。离心沉淀细胞, 并将沉淀于 37℃小心地重悬于 1 ml 聚乙二醇(50% w/v 的 PBS 溶液中, Sigma-Aldrich, Irvin, 英国)中。涡旋细胞 60 秒后, 加入 25 ml FPM-2, 然后将细胞于 37℃孵育 30-60 分钟。孵育后, 将细胞以 0.75×10^5 细胞/孔(100 μ l)的细胞浓度在装有 FSM 的 96 孔板中进行培养。3 天后, 向各孔中加入 100 μ l FSM。

15 用 hIL-15 免疫的 HCo7 和 HCo12 小鼠的脾细胞和淋巴结细胞的融合, 导致产生几种产生抗 IL-15 抗体的杂交瘤。分离出以下 4 个产生完全人抗 IL-15 抗体的稳定克隆: (1) 146LyD7F7B7, 重命名为 146B7; (2) 146DE2E12A3H5, 重命名为 146H5; (3) 404CG11B7E4, 重命名为 404E4; 和(4) 404FB12E7A8, 重命名为 404A8。这些克隆
20 全都是人 IgG1/k 亚类。

杂交瘤的筛选

融合后第 7 天和第 11 天之间, 采用以下 ELISA, 筛选各孔中人抗体的存在:

25 用 ELISA 筛选培养上清液中存在的人 IgG

为了进行 ELISA 以检测人 IgG 抗体的存在, 将磷酸缓冲盐溶液(PBS)中的 0.9 μ g/ml 兔- α - κ -轻链抗体(DAKO, Glostrup, 丹麦)以 100 μ l/孔加入到 Nunc Maxisorp ELISA 板中(室温下孵育过夜)。所述板用补充鸡血清(2%; Life Technologies, Paisley, 苏格兰)和吐温-20 (0.05%;

PBSTC)的 PBS 封闭后,加入培养上清液。孵育 1.5 小时后,洗涤所述板,然后加入在 PBSTC 中稀释的 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的与辣根过氧化物酶缀合的兔- α -人 IgG (Fab-2 片段) (DAKO, Glostrup, 丹麦)。孵育 1 小时后,洗涤各孔,按照生产商的方案,加入底物 ABTS (2,2'-连氮双-3-乙基苯并噻唑啉-磺酸, Roche Diagnostics, Mannheim, 德国), 然后用 EL808 ELISA-读出仪(Bio-tek Instruments, Winooski, VT, 美国)在 405 nm 下评价抗体结合。

用 ELISA 筛选存在的 IL-15 特异性抗体

含有人 IgG/k 抗体的各孔进一步用 IL-15-特异性 ELISA 测试人抗 IL-15 抗体的存在。为了进行所述 ELISA, 将 1 $\mu\text{g/ml}$ IL-15 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)以 100 μl /孔加入到 Nunc Maxisorp ELISA 板中(室温下孵育过夜)。所述板用补充鸡血清(2%; Life Technologies, Paisley, 苏格兰)和吐温-20 (0.05%; PBSTC)的 PBS 封闭后,加入培养上清液。孵育 1.5 小时后,洗涤所述板,然后加入在 PBSTC 中以 1/5000 稀释的与辣根过氧化物酶缀合的 α -人 IgG Fc (Jackson Immuno research, West Grove, Pennsylvania, 美国)。孵育 1 小时后,洗涤各孔,然后按照生产商的方案,加入底物 ABTS (2,2'-连氮双-3-乙基苯并噻唑啉-磺酸, Roche Diagnostics, Mannheim, 德国), 然后用 EL808 ELISA-读出仪(Bio-tek Instruments, Winooski, VT, 美国)在 405 nm 下评价抗体结合。

杂交瘤的亚克隆

为了获得稳定的抗 IL-15 细胞系,通过有限稀释 96 孔板中的细胞(至 0.5 个细胞/孔),亚克隆所述杂交瘤。

约 10 天后,用上述 IL-15 ELISA 测试所述亚克隆。在几个亚克隆程序期间,将 FSM 分阶段通过 FCM 替换成 FPM。用下述 ELISA 确定所述亚克隆的同种型。

通过 ELISA 同种型测定抗 IL-15 抗体

5 为了进行同种型 ELISA, 将 1 $\mu\text{g/ml}$ 抗人 Fc (Jackson Immuno research)的磷酸缓冲盐溶液(PBS)以 100 μl /孔加入到 Nunc Maxisorp ELISA 板中(室温下孵育过夜)。所述板用补充鸡血清(2%; Life Technologies, Paisley, 苏格兰)和吐温-20 (0.05%; PBSTC)的 PBS 封闭后, 加入培养上清液。孵育 1.5 小时后, 洗涤各板, 然后加入与碱性磷酸酶缀合的小鼠- α -HuIgG1 (Zymed, plants, land)或与辣根过氧化物酶缀合的小鼠- α -HuIgG3 (Zymed)。孵育 1 小时后, 洗涤各孔, 然后按照生产商的方案, 加入底物 ABTS (2,2'-连氮双-3-乙基苯并噻唑啉-10 磺酸, Roche Diagnostics, Mannheim, 德国), 然后用 EL808 ELISA-读出仪(Bio-tek Instruments, Winooski, VT, 美国)在 405 nm 下评价抗体结合。

实施例 4 完全人抗 IL-15 抗体的表位特异性

15 为了发挥治疗作用并抑制 IL-15 诱导的促炎作用, IL-15 特异性抗体需要识别参与 IL-15 受体的 IL-2R β -链和/或 γ -链相互作用的 IL-15 表位。

用突变蛋白(Pettit 等所述)评价完全人抗 IL-15 抗体—146B7、146H5、404A8 和 404E4 的表位特异性。所用的 IL-15 突变体包括 IL-15 20 突变体 Q108S (残基 108 上的 Gln 被 Ser 取代; γ -链相互作用位点中的突变)和突变体 D8SQ108S (残基 108 上的 Gln 被 Ser 取代, 而 8 位上的 Asp 被 Ser 取代, IL-15 的 β -链和 γ -链相互作用位点中的突变)。

25 用 ELISA 测定 hIL-15 特异性抗体—146B7、146H5、404A8 和 404E4 与 hIL-15 和突变型 IL-15 蛋白的结合

为了进行所述 ELISA, 将 100 μl 的 1 $\mu\text{g/ml}$ IL-15 或 hIL-15 突变蛋白的磷酸缓冲盐溶液(PBS)加入到 Nunc Maxisorp ELISA 板中, 供包被用。所述板用补充鸡血清(2%; Life Technologies, Paisley, 苏格兰)和吐温-20 (0.05%; PBSTC)的 PBS 封闭后, 孵育 hIL-15 特异性抗体

的连续稀释液。洗涤后，加入在 PBSTC 中以 1/5000 稀释的与过氧化物酶缀合的 α -人 IgG Fc (Jackson Immuno research, West Grove, Pennsylvania, 美国)。洗涤后，按照生产商的方案，加入底物 ABTS (2,2'-连氮双-3-乙基苯并噻唑啉-磺酸, Roche Diagnostics, Mannheim, 德国), 然后用 EL808 ELISA-读出仪(Bio-tek Instruments, Winooski, VT, 美国)在 405 nm 下评价抗体结合。

完全人 IL-15 特异性抗体—146B7、146H5、404A8 和 404E4 与 hIL-15 和 IL-15 突变蛋白 Q108S 和 D8SQ108S 的结合示于图 1 中。146B7 和 146H5 均不能与这些突变型 IL-15 蛋白结合。由于这两种突变体都带有 Q108S 突变, 因此 146B7 和 146H5 所识别的表位位于 IL-15 与 IL-15 受体 γ -链相互作用的关键性结构域内。404A8 和 404E4 都能结合所述突变蛋白, 因此, 这些抗体识别 IL-15 的 β -链和 γ -链相互作用结构域以外的表位。146B7 和 146H5 都在与 IL-15 受体 γ -链相互作用的区结合 IL-15。这与采用本发明完全人抗 IL-15 抗体根据增殖测定所得的数据一致。如下文详述, 404A8 和 404E4 都不能抑制 IL-15 诱导的 CTLL-2 细胞和人 PBMC 的增殖。146B7 和 146H5 都能够抑制 IL-15 诱导的增殖。此外, 通过阻断 IL-15 与 IL-15 受体 γ 亚基的相互作用能够实现对增殖的抑制。

20 实施例 5 146B7 的 V_H 区序列和 V_L 区序列

采用下列步骤, 测定 146B7 的重排 V_H 区和 V_L 区的核苷酸序列和导出的氨基酸序列。这些序列给出了关于所用 V_H 和 V_L 种系家族的信息; 这些种系序列中的点突变是由于在所述动物的免疫期间 B 细胞的亲和力成熟所致。

25

RNA 制备

按照生产商的方案, 用 RNazol (Biogenesis, Poole, 英国), 从 5×10^6 146B7 杂交瘤细胞制备总 RNA。

cDNA 制备

按照生产商的方案，用 AMV 反转录酶加上缓冲液(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国)、寡聚 d(T)₁₅ (Promega, Madison, WI, 美国)、dNTP (Boehringer Mannheim Corp., 美国)和 RNAsin (Promega), 从 3 μg RNA 制备 146B7 RNA 的 cDNA。

用于扩增克隆用 V_H 区和 V_L 区的 PCR 引物

所用的引物对:

V_H:

FR1 5'引物

- | | | |
|-----|------|----------------------------|
| (1) | AB62 | CAG gTK CAG CTg gTg CAG TC |
| (2) | AB63 | SAG gTg CAG CTg KTg gAg TC |
| (3) | AB65 | gAg gTg CAG CTg gTg CAG TC |

V_H 前导 5'引物

- | | | |
|-----|------|-----------------------------|
| (4) | AB85 | ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC |
| (5) | AB86 | ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg |
| (6) | AB87 | ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg |
| (7) | AB88 | ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC |
| (8) | AB89 | ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT |

V_H 3'引物

- | | | |
|-----|------|-----------------------------|
| (9) | AB90 | TgC CAG ggg gAA gAC CgA Tgg |
|-----|------|-----------------------------|

V_K:

FR1 5' 引物

- | | | |
|-----|------|----------------------------|
| (1) | AB8 | RAC ATC CAG ATg AYC CAG TC |
| (2) | AB9 | gYC ATC YRg ATg ACC CAG TC |
| (3) | AB10 | gAT ATT gTg ATg ACC CAG AC |
| (4) | AB11 | gAA ATT gTg TTg ACR CAG TC |

- | | | |
|-----|------|----------------------------|
| (5) | AB12 | gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC |
| (6) | AB13 | gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC |
| (7) | AB14 | gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC |

V_K 前导 5' 引物

- | | | |
|------|-------|-------------------------------------|
| (8) | AB123 | CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg |
| (9) | AB124 | CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC |
| (10) | AB125 | CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC |
| (11) | AB126 | ATg gAA CCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC |

V_K 3' 引物

- | | | |
|------|------|----------------------------|
| (12) | AB16 | Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg |
|------|------|----------------------------|

用于扩增克隆用 V_H 区和 V_L 区的 PCR 条件

在 GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, 美国) 上, 用 AmpliTaq 聚合酶 (Perkin Elmer) 进行 PCR 反应。

5

PCR 循环方案:

- | | |
|--------|-------------------|
| | 94° 2' |
| 11 个循环 | 94° 30" |
| | 65° 30", 每个循环减 1° |
| | 72° 30" |
| 30 个循环 | 94° 30" |
| | 55° 30" |
| | 72° 30" |
| | 72° 10' |
| | 冷却至 4° |

在 pGEMT-载体系统 I 中克隆 V_H 和 V_L

在琼脂糖凝胶上分析 PCR 产物之后, 用 S-400 或 S300 microspin 柱(Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, 美国)或 QIAEX II Gel Extraction Kit (凝胶提取试剂盒) (Qiagen GmbH, Hilden, 德国)纯化所述产物。对于每个实验, 按照生产商的方案, 在 pGEMT 载体系统 I (Promega)中克隆用每个 V_H 区和 V_L 区的 FR1 或前导引物的两个独立的 PCR 扩增产物。

转化到大肠杆菌 DH5 α 后, 各克隆用 T7 和 SP6 引物、通过 55℃ 下 30 个循环的菌落 PCR 进行筛选。来自各单菌落的质粒 DNA 用 Qiaprep Spin 微量制备试剂盒(Qiagen)纯化。为了进一步分析 *Nco*1/*Not*1 (NE Biolabs, United Kingdom and Roche Diagnostics), 进行消化并在琼脂糖凝胶上进行分析。

测序

克隆后, 在 pGEMT-载体系统 I 中对 V 区进行测序。按照方案, 联合使用 T7 和 Sp6 引物(Eurogentec, Luik, Belgium)和测序试剂盒: ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Warrington, 英国)。该反应在 ABI PRISM 377 测序仪(PE Applied Biosystems)中进行, 并用程序 DNASTar, SeqmanII 分析序列。然后将所述序列与 VBASE 中的种系 V-基因序列(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm)进行序列比对。

146B7 V_H 区和 V_L 区的克隆和测序

通过 PCR 扩增杂交瘤 146B7 的 V_H 区和 V_L 区, 并将其克隆到 pGEMT-载体系统 I 中, 以测定 cDNA 序列。所述核苷酸序列和相应的氨基酸序列分别示于图 2 (SEQ ID NO:1 和 2)和图 3 (SEQ ID NO:3 和 4)中。也标出了构架区(FR)和互补性决定区(CDR)。依照序列比对, 146B7 V_H 区的种系家族在 Vbase 中为: V_H 5-51 (V_H 5-亚组)、D2-15/D2 (D_H -区段)、JH4b (J_H -区段)。依照序列比对, 146B7 V_L 区的种系家族

在 Vbase 中为: A27 (V_K III-亚组)和 J_K2 (J_K -区段)。有关 V_H 区和 V_L 区的更多资料示于 Kabat 数据库 <http://immuno.bme.nwu.edu/> 或 <http://www.Vbase.com>。

5 实施例 6 146B7 的亲合性结合特征

按照下列程序, 用 BIACORE 3000 仪器, 通过表面胞质团共振 (SPR) 技术, 分析 146B7 的亲合性, 以测定生物分子蛋白质的相互作用。检测出生物分子结合所致的表层 SPR 信号的变化, 并且表示表层质量浓度的变化。亲和力用下列定义表示: k_a = 缔合速率常数 ($M^{-1} sec^{-1}$); k_d = 解离速率常数 (sec^{-1}); K_A = 缔合平衡常数 = $k_a/k_d (M^{-1})$; 而 K_D = 解离平衡常数 = $k_d/k_a (M)$ 。

进行不同的程序, 以获得 146B7 对人 IL-15 (hIL-15) 的亲和力。将来自两个不同供应商 (Immunex, corp., Seattle, 美国和 Peprtech, Rocky Hill, NJ, 美国) 的重组人 IL-15 与 CM5 传感器芯片偶联。将与传感器芯片偶联的化合物定义为配体。在其它实验中, 用 146B7 作为配体。

在各种动力学分析中, 将所用的被分析物 146B7 或 hIL-15 与所述传感器芯片所偶联的配体的结合, 跟与参比对照 CM5 传感器芯片的结合进行比较。测试连续稀释的被分析物 ($0 \mu g/ml$ 、 $3.125 \mu g/ml$ 、 $6.25 \mu g/ml$ 、 $12.5 \mu g/ml$ 、 $25 \mu g/ml$ 、 $50 \mu g/ml$)。在模型 Langmuir 1:1 中, 拟合缔合曲线和解离曲线的单体相互作用, 以测定 k_a 和 k_d 并计算 K_A 和 K_D 。所有数据全都运用 BIA-Evaluation Version 3.1 进行分析。对于二价相互作用, 使用模型“二价被分析物”。所有分析均根据漂移基线进行校正。

为了测定 146B7 的抗体亲和力, 在 BIACORE 3000 上测量抗体 146B7 对得自两个不同供应商 Immunex 和 Peprtech 的重组人 IL-15 的亲和力。用 146B7 作为配体, 而用 hIL-15 作为被分析物, 测定单价相互作用 (曲线拟合 Langmuir 1:1)。

146B7 对 IL-15 (Immunex Corp.)的亲合力如下测量:

缔合速率常数 k_a :	$1.07 (\pm 0.17) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$
解离速率常数 k_d :	$6.56 (\pm 0.09) \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$
缔合平衡常数 K_A :	$1.55 (\pm 0.21) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
解离平衡常数 K_D :	$6.56 (\pm 0.88) \times 10^{-8} \text{ M}$

5 为了测定 146B7 的亲合力, 用 IL-15 (Immunex Corp.)作为配体, 而用 146B7 作为被分析物。如果所得数据运用 Langmuir (1:1)曲线拟合进行分析, 则表示所述抗体的二价相互作用, 从而测定出所述抗体的亲合力。

146B7 对 IL-15 (Immunex Corp.)的亲合力如下测量:

缔合速率常数 k_a :	$7.30 (\pm 0.81) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$
解离速率常数 k_d :	$1.45 (\pm 2.05) \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$
缔合平衡常数 K_A :	$5.03 (\pm 3.40) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
解离平衡常数 K_D :	$1.55 (\pm 1.24) \times 10^{-9} \text{ M}$

10

也测定了 146B7 对得自 Peprotech 的 IL-15 的亲合力和亲合力。未见对两种不同来源的 IL-15 的亲合力或亲合力方面的显著差异。

15 正如以下实施例关于完全人抗 IL-15 抗体对人白介素-15 (hIL-15)诱导的 CTLL-2 细胞和 PBMC 增殖的抑制的描述, 根据^[3H]-胸苷掺入测定, 146B7 以剂量依赖性方式抑制 IL-15 诱导的增殖。计算 50%抑制时的 IC50 浓度为: $3.1 \pm 0.91 \text{ nM}$, 这是一种根据这些增殖抑制实验测定亲和力的更加有效的方法。该 IC50 与用 146B7 作为配体而用重组人 IL-15 作为被分析物通过 BIACORE 3000 测得的亲合力(K_D 1.5 nM)一致, 因而证实了本文所得的亲合力和亲合力测量结果。

20

实施例 7 抗 IL-15 完全人抗体抑制 hIL-15 诱导的 TNF- α 产生

采用下列程序,用来自健康志愿者的外周血单核细胞(PBMC),研究抗 IL-15 完全人抗体—146B7、146H5、404E4 和 404A8 对 IL-15 诱导的 TNF- α 产生的影响。为了评价对 IL-15 的特异性,也检查了这些抗体对 IL-2 介导的 TNF- α 产生的影响。

5

细胞培养

将细胞保持在含有 2 mM L-谷氨酰胺、100 IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素(均得自 Life Technologies, Paisley, 苏格兰)和 10%热灭活胎牛血清(HyClone, Utah, 美国)的 RPMI-1640 中。

10

外周血单核细胞(PBMC)的纯化

征得同意后,从健康志愿者采集新鲜人血,加肝素抗凝。采用 Ficoll (Pharmacia, Uppsala, 瑞典),通过密度梯度离心,进行 PBMC 的纯化。

15

试验化合物

hIL-15, 批号: 6870-011, Immunex corp., Seattle, Washington, 美国。

hIL-2, Chiron Benelux BV, Amsterdam, 荷兰。

所用的完全人抗体: 146B7 (批号: 070101)和 146B7RDJW07, 404A8 (批号: 030101)和 404E4 (批号: 080101)及作为同种型对照的抗体 T1 (97-2B11-2B12, 批号: 190900)。

20

抗 IL-15 抗体抑制对 PBMC 的人 IL-15 (hIL-15)或 hIL-2 诱导的 TNF- α 产生

25

在存在或不存在 hIL-2 或 hIL-15 以及含有或不含抗 IL-15 抗体的情况下, PBMC 按三个复份或四个复份以 1.5×10^5 细胞/孔在 96 孔平底板中进行培养。包括作为阴性对照的同种型对照抗体(T1)。加入伴刀豆球蛋白 A (2.5 μ g/ml, Calbiochem)作为用于增殖的阳性对照。细胞在 37°C 和 5% CO₂ 下孵育 72 小时。收获上清液,以通过 ELISA

(U-CyTech, Utrecht, 荷兰)定量测定人 TNF- α 的含量。

测试 146B7 和同种型对照抗体对 PMBC 的 IL-15 介导的 TNF- α 产生的影响。146B7 以剂量依赖性方式抑制 hIL-15 介导的 TNF- α 产生，而同种型对照抗体不抑制 hIL-15 诱导的 TNF- α 产生(图 6)。显示了两名健康志愿者的数据。404E4 和 404A8 不能抑制 hIL-15 诱导的 TNF- α 产生。

为了确证抗 IL-15 抗体的特异性，评价它们对 hIL-2 介导的 TNF- α 产生的影响。146B7 不诱导对 IL-2 介导的 TNF- α 产生的抑制(图 7)。未见 404E4 或 404A8 之一对 hIL-2 介导的 TNF- α 产生的剂量依赖性抑制。

对 hIL-15 介导的 TNF- α 产生的剂量依赖性抑制仅见于 146B7 而非 404E4 和 404A8。所述抑制作用对 hIL-15 是特异性的；IL-2 介导的 TNF- α 产生未被抑制。

15 实施例 8 抗 IL-15 完全人抗体对人白介素 15 (hIL-15)诱导的 CTLL-2 细胞增殖和 PBMC 增殖的抑制

采用下列程序，使用 CTLL-2 细胞(Gillis 等, 1978)和外周血单核细胞(PBMC)，测试抗体 146B7、146H5、404E4 和 404A8 抑制 T 细胞增殖的能力。

20

细胞培养

将培养物保持在含有 2 mM L-谷氨酰胺、100 IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素(得自 Life Technologies, Paisley, 苏格兰)和 10%热灭活胎牛血清(HyClone, Utah, 美国)的 RPMI-1640 中。将 CTLL-2 细胞(Gillis 等, 1978)保持在补充 36 单位 hIL-2/ml (Chiron Benelux BV, Amsterdam, 荷兰)的上述培养基中并饥饿 hIL-2 达 3-4 天，然后开始进行所述实验。临用前将 CTLL-2 细胞洗涤 3 次。

25

外周血单核细胞(PBMC)的纯化

征得同意后,从健康志愿者采集新鲜人血,加肝素抗凝。采用 Ficoll (Pharmacia, Uppsala, 瑞典), 通过密度梯度离心, 进行 PBMC 的纯化。

试验化合物

5 hIL-15, 批号: 6870-011, Immunex corp., Seattle, Washington, 美国。

hIL-2, Chiron Benelux BV, Amsterdam, 荷兰。

本报告中示于图 8、供 CTLL-2 分析用的抗 IL-15 抗体: 146B7、146H5、404A8、404E4。

10 进行 PMBC 分析所用的抗 IL-15 抗体: 146B7 (批号: 070101), 404A8 (批号: 030101)和 404E4 (批号: 080101)。

抗 IL-15 抗体对人 IL-15 (hIL-15)或 hIL-2 诱导的 CTLL-2 增殖的抑制

15 在每个试验中, 细胞按 3 个复份以 5×10^3 细胞/孔接种于含或不
含 hIL-2 或 hIL-15 的 96 孔板中。为了评价对增殖的作用, 分别加入
这四种抗 IL-15 抗体。细胞在 37℃和 5% CO₂ 下孵育 16 小时。收获
(Harvester 96 Mach II M, Tomtec, Orange, CT, 美国)前 4 小时, 加入 [³H]
胸苷(1 μCi/孔, Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire,
英国)。

20 如图 8 所示, 根据 [³H]胸苷掺入减少表明, 146B7 和 146H5 以剂
量依赖性方式降低 IL-15 诱导的 CTLL-2 细胞增殖。404E4 和 404A8
均不能阻断 IL-15 诱导的 CTLL-2 细胞增殖。

抗 IL-15 抗体对 hIL-15 (hIL-15)或 hIL-2 诱导 PBMC 增殖的抑制

25 在存在或不存在 hIL-2 或 hIL-15 及抗 IL-15 抗体的情况下, 将
PBMC 按 3 个复份以 5×10^4 细胞/孔在 96 孔 U 底板(Nunc, Nalge Nunc
International, 丹麦)中进行培养。加入伴刀豆球蛋白 A (2.5μg/ml,
Calbiochem)作为用于增殖的阳性对照。将细胞在 37℃和 5% CO₂ 下
孵育 72 小时。在收获(Harvester 96, Tomtec, Orange, CT, 美国)前 16

小时, 加入 $[^3\text{H}]$ 胸苷($1\ \mu\text{Ci}/\text{孔}$, Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, 英国)。

146B7 能够以剂量依赖性方式抑制 IL-15 诱导的 $[^3\text{H}]$ 胸苷掺入, 因此抑制增殖($\text{IC}_{50} = 3.1 \pm 0.91\ \text{nM}$)。404E4 和 404A8 均不能阻断 hIL-15 诱导的 PBMC 增殖。根据先前进行的实验所获得的数据, 没有对 146H5 进行测试。为了确证 146B7、404E4 和 404A8 对 IL-15 的特异性, 还评价了这些抗体对 IL-2 介导的增殖的影响。所测试的抗 IL-15 抗体中没有一个表现出对 IL-2 诱导的增殖的影响(图 9)。

实施例 9 抗 IL-15 人抗体 146B7 与人 PBMC 上存在的人 IL-15 结合

试验化合物

人 PBMC 得自征得同意后的健康志愿者。

抗体 146B7 (批号 MDX015), Medarex Inc., Milpitas, CA, 美国。

146B7 和人 IgG 的生物素化

N-羧基琥珀酰亚胺基-生物素(Sigma)首先在 DMSO 中稀释(终稀释度: $100\ \text{mg}/\text{ml}$), 然后在 $0.1\ \text{M}\ \text{NaHCO}_3$ 中稀释(终稀释度: $1\ \text{mg}/\text{ml}$, Sigma)。每 $1\ \text{mg}$ 抗体(在 $1\ \text{ml}$ 中稀释)中加入 $600\ \mu\text{l}$ 生物素溶液(避光, 2 小时, 室温)。将抗体-生物素溶液在 slide-a-lyzerTM 透析盒($10,000\ \text{MWCO}$, Pierce, Perbio Science, 荷兰)中透析(4°C 过夜), 以除去未标记的生物素。次日, 通过分光光度法(Ultrospec 2100pro)在 $\text{OD}\ 280\ \text{nm}$ 下测定生物素化抗体的浓度。

外周血的刺激

为了诱导 IL-15, 通过静脉穿刺获得健康志愿者的血液。将 PBMC 在补充青霉素($5\ \text{U}/\text{ml}$)、链霉素($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$)、L-谷氨酰胺($2\ \text{mM}$) (Biowhittaker Europe)和 10% 胎牛血清(Optimum C241, Multicell, Wisent Inc.)的 RPMI 1640 (Biowhittaker Europe)中最多培养 2 天(37

℃), 并且用 500 U/ml IFN γ (Boehringer Ingelheim)刺激。

流式细胞术

5 将细胞与 10%人 AB 血清(CLB, Amsterdam, 荷兰)一起在补充青霉素(5 U/ml)、链霉素(50 μ g/ml)、L-谷氨酰胺(2 mM) (Biowhittaker Europe)和 10%胎牛血清(Optimum C241, Multicell, Wisent Inc.)的 RPMI 1640 (Biowhittaker Europe)中进行预培养。透化处理(20 min, 4℃, Cytofix/CytopermTM Kit, Becton Dickinson, San Diego, CA)并用 Perm/WashTM 缓冲液(Cytofix/CytopermTM Kit)洗涤后, 通过流式细胞
10 术, 对 PBMC 进行对 IL-15 的染色。在整个染色程序中, 使用 Perm/WashTM 缓冲液(Cytofix/CytopermTM Kit), 实现连续渗透力。将细胞与生物素化 146B7 或生物素化 hIgG1 (20 μ g/ml, 30 min, 4℃)一起孵育并用 Perm/WashTM 缓冲液洗涤后, 随后将细胞与链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白(DAKO)一起孵育 30 分钟(4℃)。通过流式细胞术(FACS
15 Calibur, Becton Dickison)分析并门控单核细胞后, 运用 CellQuest Pro 软件, 测定每个样品至少 5000 个细胞的荧光强度。数据表示刺激指数(S.I.), 如下计算: $S.I. = (\text{平均荧光正染色})/(\text{平均荧光背景染色})$ 。

免疫细胞化学

20 为了检测人单核细胞中存在的 IL-15, 制备全血样品的细胞抹片(cytospin)制备物。当 5×10^4 个细胞(200 μ l)沉降在 Superfrost[®]-Plus 显微镜载玻片(Menzel)后, 风干载玻片(< 60 min), 在 20%低聚甲醛/PBS 中固定(8 min, 4℃), 用 PBS 洗涤后再次风干。染色前, 细胞抹片制备物在 PBS (+ 0.1%皂苷; PBSS)中透化处理, 随后用于整个染色程
25 序。为了阻断内源过氧化物酶的活性, 将细胞抹片制备物与在柠檬酸/磷酸缓冲液中稀释的 0.05% (v/v)过氧化氢(H₂O₂)一起孵育(pH 8.5, 20 min, 室温)。用 PBSS 洗涤后, 按照生产商的说明(Biotin Blocking Kit, Vector Lab., DAKO), 阻断内源生物素的活性。用 PBSS 洗涤后, 细胞抹片制备物在 PBSS 中与 10% (v/v)合并的人 AB-血清(CLB,

Amsterdam, 荷兰)一起孵育(30 min), 阻断非特异性结合位点。此后, 将细胞抹片制备物与生物素化第一抗体一起孵育(60 min, 室温), 用 PBSS 洗涤后, 跟与生物素化辣根过氧化物酶复合的链霉抗生物素蛋白(streptABComplex/HRP, DAKO)一起孵育(1:100 的含 2%人 AB-血清的 PBSS, 30 分钟, 室温)。用 PBSS 洗涤后, 将细胞抹片制备物在醋酸钠缓冲液(50 mM, pH 4.9)中与 3-氨基-9-乙基咔唑(0.5 mg/ml)和 H_2O_2 (0.01%)一起孵育 10 分钟(室温), 以检测 HRP 活性。细胞抹片用水龙头流水洗涤 5 分钟, 用苏木精(DAKO)复染色 1 分钟, 再用水龙头流水洗涤 5 分钟, 在 faramount 或 glycergel (DAKO)中包埋。

10

流式细胞术

146B7 与 $IFN\gamma$ -刺激的人单核细胞的结合示于图 12。生物素化 146B7 与未刺激的单核细胞结合, 表明在未刺激的细胞中存在 IL-15。用 $IFN\gamma$ 刺激单核细胞, 导致 146B7 与所述细胞的结合增加, 在培养的第一天达到最高值。对照抗体 hIgG1 显示几乎不结合未刺激的单核细胞。用 $IFN\gamma$ 刺激通过增加单核细胞上 $Fc\gamma$ 受体的表达而增加 hIgG1 的结合。

15

免疫细胞化学

图 13 显示 146B7 或对照抗体 hIgG1 对人单核细胞的染色。所述细胞与 146B7 一起孵育后, 观察到细胞质被清楚地染成红色, 而对照抗体则不会。因此, 146B7 结合单核细胞中的 hIL-15, 而这种结合在用 $IFN\gamma$ 刺激后受到正调节。图 13 也显示 IL-15 染色主要在细胞内。

20

25 实施例 10 抗 IL-15 人抗体 146B7 通过免疫组织化学结合组织中的 IL-15

试验化合物

人银屑病皮肤一组织样品在征得同意后取得。Louise Villadsen, Department of Dermatology, Gentofte University Hospital, Copenhagen,

丹麦。

抗体 146B7 (批号 MDX015), Medarex, Milpitas, CA, 美国。

146B7 和人 IgG 的生物素化

- 5 N-羟基琥珀酰亚胺基-生物素(Sigma)首先在 DMSO 中稀释(终稀
释度: 100 mg/ml), 然后在 0.1 M NaHCO₃ 中稀释(终稀释度: 1 mg/ml,
Sigma)。每 1 mg 抗体(在 1 ml 中稀释)中加入 600 μ l 生物素溶液(避光,
2 hrs, 室温)。将抗体-生物素溶液在 slide-a-lyzer™ 透析盒(10,000
MWCO, Pierce, Perbio Science, 荷兰)中透析(ON, 4℃), 以除去未标记
10 的生物素。次日, 通过分光光度法(Ultrospec 2100pro)在 OD 280 nm
下测定生物素化抗体的浓度。

免疫组织化学

- 将组织贮存于-80℃ 直至分析。解冻后, 将组织切片在丙酮中固
15 定(10 min, 室温)并风干。为了阻断内源过氧化物酶的活性, 将切片
与在柠檬酸/磷酸缓冲液中稀释的 0.05% (v/v)过氧化氢(H₂O₂)一起孵
育(pH 5.8, 20 分钟, 室温)。用 PBS-吐温 20 (PBST, 0.05%, v/v)洗涤后,
按照生产商的说明(Biotn Blocking Kit, Vector Lab., DAKO), 阻断内
源生物素活性。用 PBST 洗涤后, 将组织切片与 10% (v/v)合并的人
20 AB-血清(CLB, Amsterdam, 荷兰)在 PBST 中孵育(30 分钟), 以阻断
非特异性结合位点。吸印血清后, 随后将切片与在含 2%人 AB 血清
的 PBS 中稀释的生物素化第一抗体(146B7 或 hIgG1)一起孵育 60 分
钟(室温)。用 PBST 洗涤切片。用 PBST 洗涤后, 将所有组织切片均
与在含 2%人 AB 血清的 PBS 中稀释的 streptABComplex/HRP 一起孵
25 育(DAKO , 1:100 稀释于含 2%人 AB-血清的 PBS 中, 30 分钟, 室温)。
用 PBST 洗涤后, 将切片与 3-氨基-9-乙基吡啶(0.5 mg/ml)和 H₂O₂
(0.01%)一起在醋酸钠缓冲液(50 mM, pH 4.9)中孵育 10 分钟(室温),
用于检测 HRP 活性。切片用水龙头流水洗涤 5 分钟, 用苏木精(DAKO)
复染色 1 分钟, 再用水龙头流水洗涤 5 分钟, 最后在 faramount 或

glycergel (DAKO)中包埋。

结果

5 组织切片用 146B7 染色后,观察到银屑病皮肤中的角质化细胞的细胞质被清楚地染色,而对照抗体则不会(图 14; 146B7 染色得自银屑病斑的 IL-15 阳性角质化细胞)。

实施例 11 抗 IL-15 人抗体 146B7 阻断 SCID 小鼠-人组织嵌合体中的 IL-15: 显著抑制关节炎组织和银屑病组织中的炎症

10

试验化合物

滑膜组织—得自征得同意后的青少年类风湿性关节炎患者; Alexei Grom, division of pediatric rheumatology, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, 美国。

15 角化瘤活检组织—组织样品在征得同意后取得。Louise Villadsen, Department of Dermatology, Gentofte University Hospital, Copenhagen, 丹麦。

抗体 146B7 (批号 MDX015), Medarex Inc., Milpitas, CA, 美国, 供银屑病实验用。

20 抗体 146B7 (批号 15-00RDJW07), Medarex Inc., Milpitas, CA, 美国, 供类风湿性关节炎实验用。

阻断 SCID 小鼠-人滑膜组织嵌合体中的 IL-15

25 新鲜滑膜组织样品取自关节置换手术后的青少年类风湿性关节炎患者。样品无菌条件下收集。将来自整个滑膜组织的切碎组织块充分混合,以保证各制备物的均一性。将切碎组织皮下植入 SCID/NOD 小鼠(Jackson Laboratories)的背部(每只小鼠 2-4 移植点,每点 100 mg)。各小鼠在移植物植入当天以及植入后第 7 天、第 14 天和第 21 天接受 146B7 (500 µg, i.p.)或 PBS。植入后第 28 天处死小鼠。切取滑

膜移植植物并置入福尔马林中, 供 H&E 染色用。

SCID 小鼠-人滑膜组织嵌合体组织 H&E 染色的定量测定(根据 Lehr 等, J. Histochem. Cytochem. 1997, 45, 1559 改进的)

- 5 采用×10 物镜(Zeiss 显微镜; Axiovision 软件)获得从 SCID 小鼠-人滑膜组织嵌合体获得的切片的数字图象(2600×2060, jpg)后, 运用 6.0 版 Photoshop (Adobe Systems, Mountain view, CA)并减少至 1300 × 1300 像素, 对数据作计算机分析。在每个切片中选 6 个×10 视野, 以便最佳反映完整载玻片上的组织染色全貌。选择全部染色核后(幻棒对深色核的误差为 10), 产生所选区的光密度图, 并记录平均染色强度(选择相似/图象帧命令之后)。随后, 选择背景并对染色进行定量(幻棒对背景的误差为 10)。以核染色和背景染色之差计算染色强度。此以任意单位下的细胞化学指数表示。数据以平均值和 s.e.m 表示。通过 Student 氏 t-检验, 对数据进行分析。

15

阻断 SCID 小鼠-人银屑病组织嵌合体中的 IL-15

- 20 角质刀活检组织取自两名患者的银屑病斑, 分开后移植到 C.B-17 SCID 小鼠(Jackson Laboratories)。移植 3 周后, 小鼠接受 PBS (安慰剂)、每隔 2 天接受 10 mg/kg 剂量的 CsA (环孢菌素 A) (Sandoz)达 15 天, 或者在第 1 天接受 20 mg/kg 而在第 8 天和第 15 天接受 10 mg/kg 剂量的 146B7。最后一次注射后 1 周, 处死小鼠, 并从每种异种移植植物中取出 4 mm 穿刺活检组织。将活检组织在福尔马林中固定, 供石蜡包埋用, 并用 H&E 和 Ki-67 核抗原染色。

- 25 SCID 小鼠-人银屑病组织嵌合体组织的免疫组织化学染色的定量测定

评价 H&E 染色切片的表皮厚度(μm)、角化不全等级(0-3 级)以及上皮中炎性单核细胞的数目。评价 Ki-67 染色切片的每平方毫米切片循环角质化细胞的数目。计算各处理组中 4 只小鼠的平均值, 而将来自每个患者的数据总结为平均值和 s.e.m。

SCID/RA 模型

对切片的显微镜观察表明，染色最深的核属于浸润细胞。因此，核数目(根据相对表面积测定)被认为是对浸润的度量。与溶媒处理相比，注射 146B7 减少了进入发炎滑膜组织中浸润细胞的数目(图 15a, $p<0.05$)。图 15b 说明 146B7 对异种移植的滑膜组织中细胞浸润的影响，并且显示与溶媒处理比较，着色核的细胞数目减少。

SCID/银屑病模型

图 16 显示用 146B7 或对照处理的 SCID/银屑病小鼠。与溶媒 PBS 相比，注射 146B7 减轻了银屑病根据角质层至表皮突起起始点测量的表皮厚度评价的严重程度(图 16A): PBS ($177.8\pm42.2\ \mu\text{m}$)、CsA ($91.0\pm15.2\ \mu\text{m}$)、146B7 ($62.5\pm9.1\ \mu\text{m}$)。从角质层至表皮突最深处测量时也观察到厚度减小(图 16B): PBS ($433.8\pm32.1\ \mu\text{m}$)、CsA ($303.8\pm62.9\ \mu\text{m}$) 和 146B7 ($208.0\pm33.8\ \mu\text{m}$)。另外，146B7 处理降低了角化不全的等级(图 16C): PBS (1.6 ± 0.4)、CsA (1.3 ± 0.3)、146B7 (0.5 ± 0.3)。此外，146B7 减少了上皮中炎症单核细胞的数目(图 16D): PBS (33.3 ± 1.9 个单核细胞)、CsA (19.4 ± 8.5)、146B7 (16.4 ± 0.1)。人 Ki-67 蛋白的表达与细胞增殖紧密相关。在分裂间期间期，仅在细胞核内检测到所述抗原，而在有丝分裂中，所述蛋白的大多数重新定位于染色体表面。Ki-67 蛋白在细胞周期的所有活动期(G(1), S, D(2)及有丝分裂)期间存在，但在静息细胞(G(0))中不存在的事实，使之成为用于测定特定细胞群体的所谓生长部分的极好标志。146B7 减少 Ki-67+循环角质化细胞的数目(图 16E): PBS (247.9 ± 77.0)、CsA (116.0 ± 24.1)、146B7 (73.8 ± 9.9)。

在类风湿性关节炎的人 SCID 模型中，用 146B7 处理抑制了炎症细胞浸润到发炎组织。此外，在移植人银屑病斑的 SCID 小鼠中，与用 CsA 处理相比，用 146B7 处理减轻了银屑病的严重程度。事实上，在人/SCID 小鼠中，用 146B7 处理导致银屑病的炎症、表皮厚度、

分裂中的角质化细胞数目和角化不全的严重程度显著减轻。

实施例 12 抗 IL-15 人抗体 146B7 识别受体结合的 IL-15

试验化合物

5 hIgG1 - 对照人抗体(Sigma)。

抗体 146B7 – Medarex Inc., MDX015。

组成型表达 IL-15R α 的 Raji 细胞(Martin Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, 英国)

10 146B7 和人 IgG 的生物素化

N-羧基琥珀酰亚胺基-生物素(Sigma)首先在 DMSO 中稀释(终稀释度: 100 mg/ml), 然后在 0.1 M NaHCO₃ 中稀释(终稀释度: 1 mg/ml, Sigma)。每 1 mg 抗体(在 1 ml 中稀释)中加入 600 μ l 生物素溶液(避光, 2 小时, 室温)。将抗体-生物素溶液在 slide-a-lyzerTM 透析盒(10,000 MWCO, Pierce, Perbio Science, 荷兰)中透析(4 $^{\circ}$ C 过夜), 以除去未标记的生物素。次日, 通过分光光度法(Ultrospec 2100pro)在 OD 280 nm 下测定生物素化抗体的浓度。

通过 ELISA 检测 146B7 与 IL-15-IL-15R α 复合物的结合

20 在用 IL-15R α (R&D systems, Minneapolis, MN, 美国)包被(室温下过夜)平底微量滴定板(Greiner)后, 将各板与 PBS 和鸡血清一起孵育(2%, RT, 60 min)。用 PBS (+ 0.02%吐温 20: PBST)洗涤后, 随后, 所述板与几种稀释度的未标记 IL-15 (50 μ l, RT, Immunex, Seattle, 美国)一起孵育。10 分钟后, 向各孔中加入不同浓度的生物素化抗体(50 μ l)

25 (室温下 90 分钟)。用 PBST 洗涤后, 各板与在 PBST-C (PBST 加 2% 鸡血清)中以 1:10,000 稀释的链霉抗生物素蛋白-多聚辣根过氧化物酶 (CLB, Amsterdam, 荷兰)一起孵育(室温下 60 分钟)。最后, 洗涤板后随即按照生产商的方案, 与 ABTS (连氮双-3-乙基苯并噻唑啉-磺酸, Roche Diagnostics, Mannheim, 德国)的 ABTS 缓冲液一起孵育。用 2%

草酸(50 μ l)终止显色反应。用 EL808 ELISA-读出仪(Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, 美国)在 405 nm 下评价结合。

146B7 与 Raji 细胞上的 IL-15-IL-15R 复合物的结合

- 5 将 Raji 细胞与 10%合并的人 AB 血清(CLB, Amsterdam, 荷兰)在 FACS 缓冲液(PBS, 0.05% BSA, 0.02% NaNO_3)中预孵育。将 Raji 细胞 ($1-2 \times 10^5$ 细胞/孔)接种于各孔中, 然后加入几种浓度的 50 μ l 未标记的 IL-15 (在含 10%人 AB 血清的 FACS 中稀释)。将细胞孵育 30 分钟(4°C)并用 FACS 缓冲液洗涤两次后, 向各孔中加入 50 μ l 生物素化抗体
- 10 (146B7 或 hIgG1) (4°C 下 30 分钟)。用 FACS 缓冲液洗涤两次后, 向各孔中加入 50 μ l 链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白(4°C 下 30 分钟)。用 FACS 缓冲液洗涤两次后, 吸取细胞于 200 μ l FACS 缓冲液中, 通过流式细胞术(FACS Calibur, Becton Dickison), 运用 CellQuest 软件分析后, 测定每样品至少 5000 个细胞的荧光强度。数据以如下计算的刺激指数(S.I.)表示:
- 15
$$\text{S.I.} = (\text{平均荧光正染色})/(\text{平均荧光背景染色})。$$

ELISA

- 通过 ELSIA, 146B7 与 IL-15/IL-15R 复合物的结合示于图 19。
- 20 146B7 的结合随与其受体结合的 IL-15 浓度的增加而增加。没有观察到对照抗体与 IL-15 或 IL-15R 的结合作用。

与表达 IL-15R 的 Raji 细胞的结合

- 146B7 与 Raji 细胞上的 IL-15/IL-15R 复合物的结合示于图 20。
- 25 146B7 以剂量依赖性方式与 IL-15/IL-15R 复合物结合。没有观察到 hIgG1 与 Raji 细胞上的 IL-15/IL-15R 复合物的结合(图 20)。
- 146B7 能够在该细胞因子与其受体结合后结合 IL-15。146B7 结合不参与结合所述受体的 IL-15 上的表位。

参考文献

- 5 Bathon J. M., Martin R. W., Fleischmann R. M., Tesser J. R., Schiff M. H., Keystone E. C., Genovese M. C., Wasko M. C., Moreland L. W., Weaver A. L., Markenson J.和 Finck B.K. (2000) A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis (依那西普和甲氨蝶呤在早期类风湿性关节炎患者中的比较). *N Engl J Med* 343, 1586-93.
- 10 Fehniger T. A.和 Caligiuri M. A. (2001) Interleukin 15: biology and relevance to human disease (白介素 15: 生物学及与人类疾病的关系). *Blood* 97:14-28.
- 15 Fishwild D. M., O'Donnell S. L., Bengoechea T., Hudson D. V., Harding F., Bernhard S. L., Jones D., Kay R. M., Higgins K. M., Schramm S. R. 和 Lonberg N. (1996) High-avidity human IgGk monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice (来自小基因座转基因小鼠的一个新品系的高亲合力人 IgGk 单克隆抗体). *Nature biotechn.* 14: 845-51.
- 20 Gillis S., Ferm M. M., Ou W.和 Smith K. A. (1978) T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity (T 细胞生长因子: 对活性的产生和定量微量测定的参数). *J. Immunol* 120, 2027-32.
- Kennedy M.K.等(2000) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in IL-15 deficient mice (IL-15 缺陷型小鼠中天然杀伤 T 细胞和记忆 CD8 T 细胞谱系的可逆性缺陷). *J Exp. Med.* 191: 771-80
- 25 Kirman I., Vainer B.和 Nielsen O. H. (1998) Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases (白介素-15 及其在慢性炎症性疾病中的作用). *Inflamm Res* 47, 285-9.
- Klippel J. H. (2000) Biologic therapy for rheumatoid arthritis (类风湿性关节炎的生物疗法). *N Engl J Med* 343, 1640-1.

Köhler G.和 Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity (分泌预定特异性抗体的融合细胞的连续培养物). *Nature* 256: 495-7.

5 Liu C. C., Perussia B.和 Young J. D. (2000) The emerging role of IL-15 in NK-cell development (IL-15 在 NK 细胞发育中的应急作用). *Immunol Today* 21, 113-6.

10 Lovell D. J., Giannini E. H., Reiff A., Cawkwell G.D., Silverman E. D., Nocton J. J., Stein L. D., Gedalia A., Ilowite N.T., Wallace C. A., Whitmore J. 和 Finck B. K. (2000) Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group (多关节性青少年类风湿性关节炎儿童中的依那西普。儿科风湿病学合作研究小组). *N Engl J Med* 342, 763-9.

15 Maini R. N. 和 Taylor P.C. (2000) Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis (针对类风湿性关节炎的抗细胞因子疗法). *Annu Rev Med* 51. 207-29.

20 McInnes I. B., al-Mughales J., Field M., Leung B. P., Huang F. P., Dixon R., Sturrock R. D., Wilkinson P. C.和 Liew F. Y. (1996) The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis (白介素-15在类风湿性关节炎T细胞迁移和激活中的作用). *Nat Med* 2, 175-82.

25 McInnes I. B., Leung B. P., Sturrock R.D., Field M.和 Liew F. Y. (1997) Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- alpha production in rheumatoid arthritis (白介素-15介导类风湿性关节炎中肿瘤坏死因子- α 产生的 T 细胞依赖性调节). *Nat Med* 3, 189-95.

McInnes I. B.和 Liew F. Y. (1998) Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis (类风湿性关节炎性滑膜炎的促炎作用). *Immunol Today* 19, 75-9.

30 Oppenheimer-Marks 等(1997) *J. Clin. Investig.* 101: 1261-72.
Pettit D. K., Bonnert T. P., Eisenman J., Srinivasan S., Paxton R.,

Beers C., Lynch D., Miller B., Yost J., Grabstein K. H.和 Gombotz W. R. (1997) Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis, polyethylene glycol conjugation, and homology modeling (用定点诱变、聚乙二醇缀合和同源性建模对白介素 15 的结构功能研究). J Biol Chem 272, 2312-8.

Ruchatz 等(1998) J. Immunol. 160: 5654-60.

Waldmann T., Tagaya Y.和 Bamford R. (1998) Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors (白介素-2、白介素-15 及其受体). Int Rev Immunol 16, 205-26.

Waldmann T. A., Dubois S.和 Tagaya Y. (2001) Contrasting Roles of IL-2 and IL-15 in the Life and Death of Lymphocytes . Implications for Immunotherapy (IL-2 和 IL-15 在淋巴细胞的存活和死亡中的相反作用。免疫疗法的意义). Immunity 14, 105-110.

Waldmann T. A.和 Tagaya Y. (1999) The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens (白介素-15 表达的多方面调节及该细胞因子在 NK 细胞分化和宿主对胞内病原体反应中的作用). Annu Rev Immunol 17, 19-49.

20 等同实施方案

本领域技术人员会认识到或者能够仅用常规实验就确定本文所述的本发明具体实施方案的许多等同方案。这类等同方案将包括在以下权利要求书中。在独立权利要求书中公开的实施方案的任何组合考虑在本发明的范围内。

25

文献引用

本文所引用的所有出版物、专利和待审的专利申请都通过引用全部结合到本文中。

	<110> GenMab, Inc. et al.	
5	<120> 白介素 15(IL-15)特异性人抗体	
	<130> GMI-024PC	
	<150> US 60/314,731	
10	<151> 2001-08-23	
	<160> 4	
	<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
15	<210> 1	
	<211> 390	
	<212> DNA	
	<213> 人(Homo sapiens)	
20	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)...(390)	
25	<400> 1	
	gag gtg cag ctg gtg cag tct gga gca gag gtg aaa aag ccc ggg gag 48	
	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu	
	1 5 10 15	
30	tct ctg aag atc tcc tgt aag gtt tct gga tac ttc ttt acc acc tac 96	
	Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Phe Phe Thr Thr Tyr	
	20 25 30	
	tgg atc ggc tgg gtg cgc cag atg ccc ggg aaa ggc ctg gag tat atg 144	
35	Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met	
	35 40 45	
	ggg atc atc tat cct ggt gac tct gat acc aga tac agc ccg tcc ttc 192	
40	Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe	
	50 55 60	
	caa ggc cag gtc acc atc tca gcc gac aag tcc atc agc acc gcc tac 240	
	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	
45	65 70 75 80	
	ctg cag tgg agc agc ctg aag gcc tcg gac acc gcc atg tat tac tgt 288	
	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
50	gcg aga ggg ggt aac tgg aac tgc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc 336	
	Ala Arg Gly Gly Asn Trp Asn Cys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
	100 105 110	
	ctg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc 384	
55	Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	
	115 120 125	

```

ctg gca
Leu Ala
130

5
<210> 2
<211> 130
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

10
<400> 2
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Phe Phe Thr Thr Tyr
15 20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60
20 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
25 Ala Arg Gly Gly Asn Trp Asn Cys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala
130

30
<210> 3
<211> 357
<212> DNA
<213> 人(Homo sapiens)

40
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(357)

45
<400> 3
gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

50
gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

55
tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

60
atc tat ggt gca tcc cgc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

65
ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

```


	65	70	75	80	
5	cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cgg tat ggt agc tca cac	288			
	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser His				
	85	90	95		
10	act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc agc cga act gtg gct gca	336			
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ser Arg Thr Val Ala Ala				
	100	105	110		
15	cca tct gtc ttc atc ttc ccg	357			
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro				
	115				
20	<210> 4				
	<211> 119				
	<212> PRT				
	<213> 人(Homo sapiens)				
25	<400> 4				
	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly 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 Ser				
	20 25 30				
	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu				
	35 40 45				
	Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser				
	50 55 60				
30	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu				
	65 70 75 80				
	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Gly Ser Ser His				
	85 90 95				
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ser Arg Thr Val Ala Ala				
35	100 105 110				
	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro				
	115				

专利名称(译)	白介素15(IL - 15)特异性人抗体		
公开(公告)号	CN1571836A	公开(公告)日	2005-01-26
申请号	CN02820778.5	申请日	2002-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	根马布股份公司		
申请(专利权)人(译)	根马布股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	根马布股份公司		
[标]发明人	JGJ范德温克尔 MA范迪克 J舒尔曼 AF格里特森 O巴尔德斯加尔德		
发明人	J·G·J·范德温克尔 M·A·范迪克 J·舒尔曼 A·F·格里特森 O·巴尔德斯加尔德		
IPC分类号	A01K67/027 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/18 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/543 C12N5/12 C12N5/16 C12N15/63 C12N15/64 C07K14/47 A61K39/44		
CPC分类号	C07K16/24 C07K2317/565 A01K2217/05 C07K2317/92 C07K2317/21 C07K16/244 C07K2317/32 A61K2039/505 C07K2317/73 C07K2317/56 C07K2316/96 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 C07K2317/76		
优先权	60/314731 2001-08-23 US		
其他公开文献	CN100557018C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了特异性结合IL - 15(例如人IL - 15)的分离的人单克隆抗体及基于相关抗体的组合物和分子。可以在能够通过经历V - D - J重组和同种型转换而产生人单克隆抗体的多种同种型的转染瘤或非人类转基因动物例如转基因小鼠中产生所述人抗体。也公开了包含所述人抗体的药用组合物、产生所述人抗体的非人类转基因动物和杂交瘤以及应用所述人抗体的治疗方法和诊断方法。

小鼠	血清IgM (微克/ml)	Ig H链基因型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD