



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I453032 B

(45)公告日：中華民國 103 (2014) 年 09 月 21 日

(21)申請案號：098115102

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 05 月 07 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C07K16/24 (2006.01)

A61P29/00 (2006.01)

(30)優先權：2008/05/07 歐洲專利局 08103847.3

(71)申請人：亞格斯治療公司 (美國) ARGOS THERAPEUTICS, INC. (US)  
美國

(72)發明人：史文森 腦斯 安德斯 SVENSSON, LARS ANDERS (SE)；索倫 佩德嘉 (DK)；費德瑞奇森 柏吉特 FRIEDRICHSEN, BIRGITTE (DK)；若許 柏瑞特 歐力森 KROGH, BERIT OLSEN (DK)；佩德森 英格 朗德 PEDERSEN, INGER LUND (DK)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

(56)參考文獻：

CN 1492930A

CN 10115583A

審查人員：李惟宇

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：13 共 0 頁

(54)名稱

抗人類干擾素- $\alpha$  的人體化抗體

HUMANIZED ANTIBODIES AGAINST HUMAN INTERFERON-ALPHA

(57)摘要

本發明提供人類化抗人類 IFN- $\alpha$  單株抗體，其可用於人類之治療應用。較佳的抗體是鼠類抗體 ACO-1 和 ACO-2 的人類化版本，及其變體。

The present invention provides humanized anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies useful for therapeutic applications in humans. Preferred antibodies are humanized versions of murine antibodies ACO-1 and ACO-2, as well as variants thereof.

A

104

1	2	3	4	5	6
12345678901234567890123456789012345678901234567890	12345678901234567890123456789012345678901234567890	Q1VLTQSPTAISLSPGERATLSCAGSS---	Q1VSYLYW1QOKPGQAPRL1Y1TSN1ASGVPA	E1VLTQSPTAISLSPGERATLSCAGSS---	E1VSYLYW1QOKPGQAPRL1Y1TSN1ATGIPA
E1VLTQSPTAISLSPGERATLSCAGSS---	E1VSYLYW1QOKPGQAPRL1Y1TSN1ASGVPA	hzACO-1 VL			

圖1

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於對抗人類干擾素  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )的人類化抗體，及其等在治療或預防人類患者之各種疾病和病症上的用途。

### 【先前技術】

基於各種不同的觀察，干擾素  $\alpha$  (INF- $\alpha$ )是一種細胞介素，咸相信其涉及若干自體免疫疾病。雖然系統性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) 患者通常沒有測得到的 INF- $\alpha$  之血清水平，但其等似乎有明確的 IFN- $\alpha$  基因簽名。此外，可藉著抗 INF- $\alpha$  抗體抑制藉著以 SLE 患者血清處理 DCs 所誘導之樹突細胞 (DC) 成熟。亦已經顯示在具有 SLE 表現型之紐西蘭黑色 (New Zealand Black, NZB) 小鼠中 IFN- $\alpha/\beta$  受體的基因剔除，結果導致幾乎正常的表現型 (Santiago-Raber 等人, J Exp Med. 2003;197(6):777-88)。

因此，已經提議以對抗 INF- $\alpha$  的抗體作為中和該細胞介素之活性的工具，用以單獨或組合治療這類自體免疫疾病。按照在以 WO20060086586 發表之國際專利申請案中的描述產製認得各種不同 INF- $\alpha$  亞型的專一鼠類抗體 (ACO-1 到 ACO-6)，並定性之。然而，鼠類抗體不適合用在人類，因為其等之免疫原性，並因此想要產製人類化抗體，其中將鼠類 CDR 移植到人類鷹架抗體上。然而，與鼠類親本相比較，人類化抗體經常受損於功能缺陷，像是例如低親和

力及/或穩定性及/或不想要的免疫原性。在某些情況下，可藉著製造一或幾個回復點突變來補償在人類化抗體中的這類缺陷。通常不想要進行任何回復點突變，或僅進行極少的回復點突變，因為出現太多次回復突變易於產生不想要的低穩定性及/或不想要程度的免疫原性。因此希望提供安全且穩定，並具有想要之生物特性(例如保留人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體對許多 IFN- $\alpha$  亞型之親和力和效力)的人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體。

因此在技術領域中，需要具有想要特徵之人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體，這類特徵為例如穩定性、專一性、安全性、免疫原性等等。因此，在技術領域中亦需要產生這類抗體的有效方法。

### 【發明內容】

在第一方面，本發明係關於專一地結合人類干擾素- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )的人類化抗體，或其抗原結合性片段，該人類化抗體為鼠類抗體 ACO-1 或 ACO-2 或其組合的人類化版本，且包括比根據 Kabat 之鼠類互補決定區 (complementary determining region, CDR) 少的供者胺基酸殘基。

另一方面，本發明更關於專一地結合 IFN- $\alpha$  的人類化抗體，或其抗原結合性片段，其中該抗體能夠結合 IFN- $\alpha$  亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA，但不與亞型 1 或 D 結合，且其中該抗體包括比根據 Kabat 之非人類 CDR 少的供者胺基酸殘基。

本發明更關於獲得這類抗體的方法，以及這類抗體在治療上之用途和包括這類抗體之組合物。

根據本發明之抗體可適用於治療各種發炎性疾病。

### 【實施方式】

本發明一部分是基於抗 IFN- $\alpha$  抗體，其具有適合治療罹患 IFN- $\alpha$  相關症狀或疾病(像是例如狼瘡疾病或病症，像是例如 SLE；移植對宿主疾病；第 1 型糖尿病、AIDS、自體免疫甲狀腺炎(thyroiditis)、牛皮癬(psoriasis)、幼年型皮肌炎(juvenile dermatomyositis)和薛格連氏徵候群(Sjögren's syndrome))之人類患者的特性。該抗體典型地是基於鼠類 ACO-1 及 / 或 ACO-2 抗體的人類化版本。

已經鑑認 ACO-1 和 ACO-2 能夠阻斷 13 個重組 IFN- $\alpha$  亞型和兩個在病毒感染後產生之 IFN-複合混合物的生物活性(參見 WO2006086586)。藉著微陣列分析，ACO-1 和 ACO-2 亦一致地阻斷得自展現 IFN- $\alpha$  簽名之 SLE 患者之血清的生物活性。ACO-1 和 ACO-2 並未明顯地中和 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 D 和 1 的生物活性，但中和 SLE 血清之 IFN- $\alpha$  生物活性。雖然無意受理論限制，但亞型 D 和 1 因此可能並未顯著地涉及 SLE 的病因學。

如同在實施例中描述的，建立可變區的結構模型，顯示人類化 ACO-1 和 ACO-2 有可能使用比 Kabat CDR 少的供者(鼠類)殘基，因此進一步降低了在人類患者中不利免疫反應的風險。分析亦鑑認出對回復突變有利的位置。更進一

步發現，可能歸因於在 ACO-1 和 ACO-2 可變區之間的高序列類似性(僅在 13 個位置有差異)，可藉著在相對應位置處的 ACO-2 殘基置換在人類化 ACO-1(hzACO-1)序列中的某些胺基酸殘基。在 CDR 區內，可正常地進行突變，不會使抗體序列成為較不似人類的。該人類化程序結果改善了功能特性，如人類化抗體的親和力、穩定性、表現水平和 IFN- $\alpha$ -抑制活性。

在人類化 ACO-1 抗體中，在 hzACO-1 VH(SEQ ID NO:3)中的典型突變包括 V5Q、T28S、M69L、R71V、T73K、S76I、S76N、T77I、V78A、Y79F 和 A93V，及其任何組合(使用 Kabat 編號)。在 hzACO-1 VL(SEQ ID NO:6)中的典型突變包括 E1Q、D29G、L33F、L47W、S50G、I58V 和 F71Y，及其任何組合。在一具體事實中，該 hzACO-1 VH 區包括選自 T28S、N31S 和 A93V 的突變。在另一具體事實中，該 hzACO-1 VH 區包括選自 T28S、N31S 和 A93V，及其任何組合，像是例如 T28S 和 N31S、T28S 和 A93V，以及 N31S 和 A93V 的突變。在另一具體事實中，該 hzACO-1 VH 區包括選自 T28S、N31S 和 A93V，或其組合，像是例如 T28S 和 N31S、T28S 和 A93V 或 N31S 和 A93V 的突變；以及至少一個額外的突變。

### 定義

為更容易了解本發明，如下定義一些術語。

「ACO-1 和 ACO-2 抗體」在 WO20060086586 中定性並描述。以 ATCC 登錄編號 PTA-6557(WO2006086586)存放

ACO-1，並以 ATCC 登錄編號 PTA-7778(WO2008021976)存放 ACO-2。根據本發明之抗體是 ACO-1 和 ACO-2 的人類化變體。然而，根據本發明之 ACO-1 和 ACO-2 的人類化版本不包括全長的鼠類 Kabat 序列。在較佳的具體事實中，至少一個 CDR 序列包括大約 3-10 個胺基酸，較佳的是 3-8 個，更佳的是 4-7 個胺基酸的截短。抗體較佳的是包括在 CDR H2 中的截短，該 CDR H2 較佳的是被截短 3-10 個，較佳的是 3-8 個，更佳的是 4-7 個，而最佳的是 6 個胺基酸。而且推斷可將偶發的點突變導入一或多個 CDR 序列中，以及在人類鷹架抗體內。然而，術語「ACO-1 和 ACO-2 抗體」更可能包含任何能夠與 IFN- $\alpha$  亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 結合，但不與亞型 1 或 D 結合的 IFN- $\alpha$  抗體。然而，要瞭解可能察覺 ACO-1 和 ACO-2 本身是唯一的抗體，因為在其等 CDR 序列中的差異只是幾個胺基酸。因此 ACO-1 和 ACO-2 代表相同抗體之活體內體細胞超突變的兩個階段似乎是合理的。因此，根據本發明之 ACO-1/ACO-2 抗體是人類化抗體，其包括與 ACO-1 和 ACO-2 之 CDR 序列有至少 90%，更佳的是至少 92%，而最佳的是至少 95% 同一性的 CDR 序列。

術語「CDR 截短」、「前進突變」和「CDR 的縮短」在整個文件中是可交替使用。關於本發明，這類術語通常意指可能察覺 CDR-截短是一些連接的前進突變的事實-意指可將經縮短之鼠類 CDR 片段移植到人類架構上。雖然移植較短的 CDR，結果有降低抗體之免疫原性程度的傾向可

能並不令人意外，但可保留人類化抗體之其他有利特徵(如穩定性、專一性等等)實際上卻是令人意外的。「回復突變」總是意指在架構中的突變(即並非在 CDR 中)-且回復突變典型地是在經選擇的位置導入一或多個「鼠類」胺基酸殘基(例如為了使抗體結構穩定)。

當在本文中使用時，術語「干擾素  $\alpha$ 」(IFN- $\alpha$ )意指包括一些先天性免疫之主要效應物的蛋白質家族。有至少 15 個人類 IFN- $\alpha$  的已知亞型。在下文表 1 中列舉 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型的名稱和相對應之編碼基因。

表 1 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型和基因

IFN- $\alpha$ 蛋白質亞型	相對應之 IFN- $\alpha$ 基因
A	2a
2	2b
B2	8
C	10
D ( $\text{Val}^{114}$ )	1
F	21
G	5
H2	14
I	17
J1	7
K	6
4a	4a
4b	4b
WA	16
1 ( $\text{Ala}^{114}$ )	1

參見 Pestka 等人 (1997) 「干擾素標準化和稱呼 (Interferon Standardization and Designations)」 J Interferon Cytokine Res 17: 附錄 1, S9-S14。IFN- $\alpha$ B2 有時亦稱為 IFN- $\alpha$ B，但不可與 IFN- $\beta$  混淆。天然的 IFN- $\alpha$  得自白血球 (白血球 IFN-)，並可從 PBL Biomedical Labs, Piscataway, NJ(interferonsource.com) 獲得重組的人類 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型。天然的 IFN- $\alpha$  是 IFN- $\alpha$  亞型的複雜混合物。偵測和定量這些干擾素的方法，如 ELISA 和 RIA 為在技術領域中已知的。

在本文中術語「抗體」以最廣義使用，且明確地包括全長的單株抗體、多株抗體，除非另行陳述或與前後文相抵觸，還有抗原結合性片段、抗體變體及其多專一性分子，只要其等顯示出想要的生物活性即可。通常，全長抗體是包括至少兩個重 (H) 鏈和兩個輕 (L) 鏈，之間以二硫鍵連接的糖蛋白，或其抗原結合性部分。每個重鏈包括重鏈可變區 (在本文中縮寫為 VH) 和重鏈恆定區。重鏈恆定區包括三個功能部位，CH1、CH2 和 CH3。每個輕鏈包括輕鏈可變區 (在本文中縮寫為 VL) 和輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包括一個功能部位，CL。可再將 VH 和 VL 區細分成高變區，稱為互補決定區 (CDR)，其散布在較經保留、稱為架構區 (FR) 的區域之間。每個 VH 和 VL 分別由三個 CDR 和四個 FRs 構成，以下列順序從胺基-端到羧基-端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重和輕鏈的可變區含有與抗原交互作用的結合性功能部位。

抗體的「抗原結合性片段」是包括全長抗體之能夠以可偵測方式與抗原結合的一部分的分子。抗原結合性片段包括多價分子，其包括抗體的一、二、三或多個抗原結合性部分，以及單-鏈構築體，其中藉著合成的連接子(linker)或藉著重組方法連接 VL 和 VH 區或其經選擇部分，以形成有功能的抗原結合性分子。

術語「抗體衍生物」和「免疫共軛物」在本文中是可交替使用，且代表包括全長抗體或其抗原結合性片段的分子，其中以化學方式修改一或多個胺基酸，例如藉著烷基化、PEG 化、醯化、酯形成或醯胺形成或其類似者，例如將抗體與第二個分子連接。典型的修改包括 PEG 化、半胱胺酸-PEG 化、生物素基化、放射線標示，以及與第二劑共軛，像是可偵測或胞毒性製劑。

「多專一性分子」包括抗體或其抗原結合性片段，其與至少一個有其他功能之分子(例如另一個肽或蛋白質，如另一個抗體或受體之配體)結合或連接，以產生與至少兩個不同結合位置或目標分子結合的分子。典型的多專一性分子包括雙-專一性抗體和與可溶性受體片段或配體連接的抗體。

「人類化」抗體是人類/非人類嵌合型抗體，其含有衍生自非人類免疫球蛋白的最少序列(CDR 區)。因此，人類化抗體是人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中以得自具有想要專一性、親和力和能力的非人類物種(供者抗體)-如小鼠、大鼠、兔子或非人類靈長類之高變區的殘基置換得自接受

者之高變區的殘基。在某些情況下，藉著相對應的非人類殘基置換人類免疫球蛋白的 FR 殘基。而且，人類化抗體可包括不是在接受者抗體中或在供者抗體中找到的殘基。進行這些修改以便進一步精確化抗體性能。通常，人類化抗體會包括實質上所有的至少一個，且典型地兩個可變功能部位，其中所有或實質上所有的高變環(其與非人類免疫球蛋白的那些一致)，以及所有或實質上所有的 FR 殘基(其為人類免疫球蛋白序列的那些)。人類化抗體亦可視需要包括至少一部分的免疫球蛋白恆定區(Fc)，典型地是人類免疫球蛋白的恆定區。

當在本文中使用時，術語「高變區」意指抗體中為抗原結合之原因的胺基酸殘基。高變區通常包括得自「互補決定區」或「CDR」的胺基酸殘基(在輕鏈可變功能部位中之殘基 24-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)，以及在重鏈可變功能部位中之 31-35(H1)、50-65(H2)和 95-102(H3)；Kabat 等人(1991) 免疫學上感興趣的蛋白質序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)，第五版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版物第 91-3242 號)，及/或得自「高變環」的那些殘基(在輕鏈可變功能部位中之殘基 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)，以及在重鏈可變功能部位中之 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3)；Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol 1987 ; 196:901-917)。典型地，藉著在 Kabat 等人，在前中描述的方法，進行在該區域中胺基酸殘基的編號。在本文中，像

是「Kabat 位置」、「Kabat 殘基」和「根據 Kabat」之類的片語，意指重鏈可變功能部位或輕鏈可變功能部位的該編號系統。使用 Kabat 編號系統，肽的實際直線胺基酸序列可能含有較少或額外的胺基酸，與可變功能部位之 FR 或 CDR 的縮短或插入一致。例如，重鏈可變功能部位可在 CDR H2 的殘基 52 之後包含胺基酸插入(殘基 52a、52b 和 52c，根據 Kabat)，並在重鏈 FR 殘基 82 之後包含經插入殘基(例如殘基 82a、82b 和 82c 等等，根據 Kabat)。可藉著使特定抗體在與具有「標準」Kabat 編號序列之抗體序列有同種性的區域排比，判定其殘基的 Kabat 編號。

「架構區」或「FR」殘基是如本文定義之 CDR 以外的那些 VH 或 VL 殘基。

在兩個實質上相同之胺基酸序列中「相對應的」胺基酸位置是藉著任何在本文中提及之蛋白質分析軟體，典型地使用預設參數排比的那些。

「經分離之」分子是在發現其之組合物中，關於其所屬之分子種類為優勢物種的分子(即其構成在該組合物中至少大約 50%的分子類型，並典型地會構成在該組合物中至少大約 70%、至少大約 80%、至少大約 85%、至少大約 90%、至少大約 95%或更多的分子物種，例如肽)。通常，抗體分子之組合物會對於在組合物中在所有現存肽物種之前後文中的抗體分子，或在建議用途之前後文中至少關於實質上有活性之肽物種，顯示出 98%、98%或 99%均一性。

當在本文中使用時，術語「選擇性地中和」意指經分

離和純化之抗體(像是但不限於單株抗體)或其抗原結合性片段，其選擇性地中和至少大約 40%、至少大約 50%或至少大約 60%一或多個 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型的生物活性，但沒有明顯地中和其他 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型的至少一個生物活性，其中該生物活性可以是例如 MxA 啟動基因的活化及/或抗病毒活性。

在本發明的前後文中，「治療」意指預防、減輕、管理、治癒或減少疾病或病症的一或多個徵候或臨床相關症狀，除非與前後文相抵觸。例如，在尚未鑑認疾病或病症之徵候或臨床相關症狀的患者中之「治療」為預防或預防性治療，而在已經鑑認疾病或病症之徵候或臨床相關症狀的患者中之「治療」則通常不包括預防或預防性治療。

當在本文中使用時，片語「IFN- $\alpha$  相關症狀或疾病」意指異常症狀、疾病或前-臨床疾病狀態(其業已與在患者血清中升高的 IFN- $\alpha$  水平發生關連)。這類實例包括，但不限於狼瘡疾病或病症，如 SLE、移植對宿主疾病(graft versus host disease, GVHD)、第 1 型糖尿病、AIDS(由人類免疫不全病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起)、自體免疫甲狀腺炎和牛皮癬。測定 IFN $\alpha$  水平的方法為在技術領域中已知的。

### 人類化抗 IFN- $\alpha$ 抗體

本發明之抗體是抗 IFN- $\alpha$  小鼠抗體 ACO-1 或 ACO-2 的人類化版本、其變體及/或其抗原結合性片段，其特徵在於特殊的功能及/或結構特徵或特性。可在適當的宿主細胞株

中，藉著標準技術產生重組抗體，並如下述藉著各種測定定性，以評估其等之功能活性。事實上，結果與以傳統方式人類化的 IFN- $\alpha$  抗體相比較，可以顯著改善之產量產生根據本發明之 IFN- $\alpha$  抗體。

根據所謂的「最佳配適」方法，針對這類已知人類可變-功能部位序列的庫或人類生殖種系序列的庫篩選齶齒動物抗體之可變功能部位的序列。然後可接受最接近齶齒動物序列的人類序列作為人類化抗體用的人類架構區 (Sims 等人, J. Immunol. 1993; 151:2296 及以下; Chothia 等人, Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 1987; 196:901-917)。其他方法使用衍生自具有輕或重鏈之特殊亞組的所有人類抗體之一致序列的特殊架構區。對於數個不同的人類化抗體，可使用相同的架構。

用在本發明之抗體中的較佳架構序列是在結構上類似由 ACO-1 或 ACO-2 所使用之架構序列的那些。因此，在一具體事實中，本發明提供人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體，其包括衍生自人類 VH1\_46 基因和人類 JH4 基因之 VH 架構殘基，以及衍生自人類 VKIII\_L6 基因和人類 JK2 基因之 VL 架構殘基，且專一地結合人類 IFN- $\alpha$ 。

下文實施例 1 描述典型的人類化 ACO-1 抗體 hzACO-1 的設計，其包括這類架構序列。

#### 功能特性

本發明之人類化抗體專一地結合 IFN- $\alpha$  亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA(表 2)。在一具體

事實中，本發明之人類化抗體 ACO-1 或 ACO-2 抗體以高親和力，例如以大約  $10^{-7}M$  或更低之 KD、大約  $10^{-8}M$  或更低之 KD、大約  $5 \times 10^{-9}M$  或更低之 KD，或大約  $2 \times 10^{-9}M$  或更低之 KD 與 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型，如 IFN- $\alpha$ A 結合。在一具體事實中，該人類化抗體是 hzACO-1 變體，其以可與 hzACO-1 相比擬或更高之親和力，與 IFN- $\alpha$ A、IFN- $\alpha$ F 及 / 或其他 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型結合。

表 2.hzACO-1 對一系列人類 IFN- $\alpha$  亞型的動力學參數

試樣	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
hIFN- $\alpha$ A	2,97E+05	3,94E-04	1,33E-09
hIFN- $\alpha$ 1	沒有結合	-	-
hIFN- $\alpha$ 2	3,58E+05	3,51E-04	9,81E-10
hIFN- $\alpha$ 4b	3,74E+05	6,22E-04	1,67E-09
hIFN- $\alpha$ G	4,63E+05	4,26E-04	9,20E-10
hIFN- $\alpha$ H2	3,78E+05	1,21E-03	3,21E-09
hIFN- $\alpha$ I	7,23E+05	2,03E-03	2,81E-09
hIFN- $\alpha$ J1	6,81E+05	3,27E-03	4,81E-09
hIFN- $\alpha$ WA	7,09E+05	2,91E-03	4,10E-09
hIFN- $\alpha$ 4a	3,33E+04	1,15E-04	3,45E-09
hIFN- $\alpha$ C	7,19E+05	7,53E-04	1,05E-09
hIFN- $\alpha$ K	5,74E+05	8,27E-04	1,44E-09

例如，在 hzACO-1 變體之 KD 和 hzACO-1 對 IFN- $\alpha$ A 蛋白質亞型之 KD 之間的比例，可能是大約 1.0、大約 0.8、大約 0.7 或大約 0.6。在另一具體事實中，該人類化抗體是 hzACO-1 變體，其以可與重組產生之 ACO-1 的親和力可相比擬或比其高的親和力與 IFN- $\alpha$ A、IFN- $\alpha$ F 及 / 或其他的 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型結合。在另一具體事實中，該人類化抗體是 hzACO-1 變體，其以可與融合瘤產生之 ACO-1 之親和力可相比擬或比其高的親和力與 IFN- $\alpha$ A、IFN- $\alpha$ F 及 / 或其他的 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型結合。

而且，本發明之人類化抗體能夠選擇性地中和一或多個 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型的生物活性。例如，與對照組相比較，人類化 ACO-1 或 ACO-2 變體可能能夠選擇性地中和至少大約 40%、至少大約 50% 或至少大約 60% IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 或 WA，或其任何組合的生物活性。在特殊的具體事實中，該人類化抗體並未顯著地中和 IFN- $\alpha$  亞型 D 及 / 或 1 之生物活性。典型的生物活性包括，但不限於 MxA 啟動基因的活化、抗病毒活性或兩者。可使用例如在本文中描述的報告子基因 (RG) 細胞病變抑制 (cytopathic inhibition, CPE) 測定，評估人類化抗體中和這類 IFN- $\alpha$  生物活性的能力。在一具體事實中，該人類化抗體是 hzACO-1 變體，其在 RG 測定中具有可與 hzACO-1 之 IC<sub>50</sub> 相比擬或比其低的 IC<sub>50</sub>。在特定的具體事實中，該 hzACO-1 變體在 RG 測定中具有比 hzACO-1 之 IC<sub>50</sub> 低的 IC<sub>50</sub>。

在一具體事實中，本發明之人類化抗體與 ACO-1 及/或 ACO-2 在 IFN- $\alpha$ 蛋白質亞型上競爭及/或結合相同的抗原決定基。可基於其等在如本文描述之標準 IFN- $\alpha$ 結合測定中與 ACO-1 及/或 ACO-2 交叉競爭的能力，來鑑認這類抗體。受試人類化抗體抑制 ACO-1 或 ACO-2 與一或多個 IFN- $\alpha$ 蛋白質亞型結合的能力，證實該受試抗體可與 ACO-1 或 ACO-2 競爭對 IFN- $\alpha$ 的結合，並因此可與在 IFN- $\alpha$ 蛋白質亞型上與 ACO-1 及/或 ACO-2 相同的抗原決定基結合 (WO02066649 和 WO2005059106)。在特殊的具體事實中，該人類化抗體與與鼠類單株抗體 9F3 和 MMHA-1、-2、-3、-6、-8、-9、-11、-13 和 -17 (PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA) 及/或人類單株抗體 13H5、13H7 和 7H7 不同的人類 IFN- $\alpha$  抗原決定基結合，及/或比起與一或多個所列舉之鼠類和人類單株抗體，更與 ACO-1 或 ACO-2 交叉競爭。

在一具體事實中，由本發明提供之 hzACO-1、hzACO-2、hzACO-1 變體或 hzACO-2 變體，具有可與包括根據 Kabat 之鼠類 CDR(Kabat ACO-1)的人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體相比擬或比其低的免疫原性。可藉著例如一或多個在 Wadwha 等人, Dev Biol (Basel). 2005;122:155-70 中描述的方法，評估人類化抗體的免疫原性，全部以引用方式納入本文中。

在更進一步的觀點中，本發明之人類化抗體在適合投予人類患者之調配物中是穩定的。在一具體事實中，根據本發明之人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體至少像以傳統方式人

類化之 IFN- $\alpha$  抗體(其包括全長鼠類 Kabat 序列)一樣地穩定。可使用在技術領域中已知的方法，包括在實施例 11 中描述的熱螢光(thermoflour)分析，評估抗體的穩定性。

本發明較佳的人類化抗體顯示至少一個，更佳的是二、三、四、五或更多個下列特性：(a)專一地結合 IFN- $\alpha$  亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA；(b)選擇性地中和一或多個 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 或 WA；其任何組合或其全部的生物活性；(c)並未顯著地中和 IFN- $\alpha$ 1 或 D 的生物活性；(d)與 ACO-1 及/或 ACO-2 在 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型上競爭及/或結合相同的抗原決定基；(e)比起與任何 9F3、13H5、13H7 和 7H9 更與 ACO-1 或 ACO-2 競爭；(f)比包括根據 Kabat 之鼠類 CDR 的 hzACO-1 或 hzACO-2 抗體更不可能誘發免疫反應；(g)在藥學調配物中是穩定的；以及(h)以  $10^{-8}M$  或更低之 KD 與至少一個 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 或 WA 結合。

#### 結構特性

本發明之較佳抗體是鼠類單株抗體 ACO-1 和 ACO-2 的人類化版本。可按照在實施例中的描述，產生、分離並定出這類抗體的結構和功能特徵。在表 3 中陳述並在圖 1-3 中描述 ACO-1、hzACO-1 和 ACO-2 的全長、可變區和 Kabat CDR 序列。

表 3 引子、蛋白質和抗體的序列編號

抗體部分	序列組成	序列	SEQ ID NO:
ACO-1 VH	蛋白質		1
VH1_46/JH4	蛋白質		2
hzACO-1 VH	蛋白質		3
ACO-1 VL	蛋白質		4
VKIII_L6/JK2	蛋白質		5
hzACO-1 VL	蛋白質		6
ACO-2 VH	蛋白質		7
J558.33/D_JH3_1	蛋白質		8
ACO-2 VL	蛋白質		9
ae4/ JK4_1	蛋白質		10
PCR 引子 ACO-1 選殖	DNA		11
PCR 引子 ACO-1 選殖	DNA		12
ACO-1 VH	DNA		13
ACO-1 VL	DNA		14
ACO-1 CDR_H1	蛋白質	NYWMH	15
ACO-1 CDR_H2	蛋白質	EINPSHGRTIYNENFKS	16
ACO-1 CDR_H3	蛋白質	GGLGPAWFAY	17
ACO-1 CDR_L1	蛋白質	SAGSSVDSSYLY	18
ACO-1 CDR_L2	蛋白質	STSNLAS	19
ACO-1 CDR_L3	蛋白質	HQWSSYPFT	20
hzACO-1 CDR_H2	蛋白質	EINPSHGRTIYAQKFQG	21
ACO-2 CDR_H1	蛋白質	SYWMH	22
ACO-2 CDR_H2	蛋白質	EINPSHGRTSYNENFKS	23
ACO-2 CDR_L1	蛋白質	SAGSSVGSSYFY	24
ACO-2 CDR_L2	蛋白質	GTSNLAS	25
PCR 引子 ACO-2 選殖	DNA		26
PCR 引子 ACO-2 選殖	DNA		27
ACO-2 VH	DNA		28
ACO-2 VL	DNA		29
hIFN- $\alpha$ 8	蛋白質		30
hzACO-1 Fab HC	蛋白質		31
hzACO-1 LC	蛋白質		32

hzACO-1 CDR H1、H3、L1、L2 和 L3 的序列是與相對應之 ACO-1 序列相同的。ACO-2 CDR H3 和 L3 則是與相對應之 ACO-1 CDR 序列相同的。在 hzACO-1 CDR\_H2 序列中以斜體顯示之胺基酸相當於人類架構序列-在以傳統方式人類化的抗體中，全長 Kabat 序列相當於 ACO-1 CDR\_H2 序列，其中所有的胺基酸均衍生自鼠類抗體。

本發明一方面提供鼠類 ACO-1 和 ACO-2 抗體的人類化版本，具有比 Kabat CDR 少的供者殘基，即比藉著移植 kabat CDR 產生之人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體少的鼠類殘基。

在一具體事實中，該人類化抗體專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並為鼠類抗體 ACO-1 或 ACO-2 或其組合的人類化版本，其包括比根據 Kabat 之鼠類互補決定區(CDR)少的供者胺基酸殘基。CDR H2 序列可，例如包括比相當於 Kabat 殘基 50-65、50-64、50-63、50-62、50-61 或 50-60 的那些少的供者胺基酸殘基。CDR H2 供者殘基可包括 Kabat 殘基 50-59。額外或可供選擇地，CDR H2 供者胺基酸殘基亦可由 Kabat 殘基 50-59 構成。Kabat 殘基 50-59 相當於 SEQ ID NO:16、21 和 23 的殘基 1-11。在一具體事實中，剩下的 VH CDR 可包括或由 Kabat CDR(參見圖 1-3)構成，即 CDR H1 序列包括相當於 Kabat 殘基 31-35 的供者胺基酸殘基，且 CDR H3 序列包括相當於 Kabat 殘基 95-102 的供者胺基酸殘基。

在一具體事實中，該人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體可包括 CDR L1(其包括相當於 ACO-1 輕鏈(VL)之可變區的 Kabat

殘基 24-34 之供者胺基酸殘基)、CDR L2(其包括相當於 ACO-1 VL 區之 Kabat 殘基 50-56 的供者胺基酸序殘基)，以及 CDR L3(其包括相當於 ACO-1 VL 區(SEQ ID NO:4)或 ACO-2 VL 區(SEQ ID NO:9)之 Kabat 殘基 89-97 的供者胺基酸殘基)。額外或可供選擇地，該抗體亦可包括由 Kabat 殘基 24-34 構成的 CDR L1 供者胺基酸殘基，由 Kabat 殘基 50-56 構成的 CDR L2 供者殘基，以及由 Kabat 殘基 89-97 構成的 CDR L3 供者胺基酸殘基。在表 3 中出示相對應的胺基酸序列。

本發明一方面提供專一的人類化 ACO-1 抗體。該人類化 ACO-1 抗體專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並包括 VH CDR 序列，其實質上與 SEQ ID NO:3 之 Kabat 殘基 31-35、50-65 和 95-102 的序列是相同的，並帶有可選擇的 N31S 突變。該抗體可，例如包括 CDR H1 序列(包括 SEQ ID NO:15)；CDR H2 序列(包括 SEQ ID NO:21)；和 CDR H3 序列(包括 SEQ ID NO:17)。額外或可供選擇地，該抗體亦可包括 CDR H1 序列(由 SEQ ID NO:15 構成)；CDR H2 序列(由 SEQ ID NO:21 構成)；和 CDR H3 序列(由 SEQ ID NO:17 構成)。在一具體事實中，該人類化 ACO-1 包括衍生自人類 VH1\_46 基因及/或人類 JH4 基因，較佳是兩者的 VH 架構殘基。在特定的具體事實中，該人類化抗體包括相當於 SEQ ID NO:3 的 VH 序列。

該人類化 ACO-1 抗體可更進一步包括 VL CDR 序列，其實質上與 SEQ ID NO:6 之 Kabat 殘基 24-34、50-56 和

89-97 的序列是相同的。該抗體可，例如包括 CDR\_L1 序列(包括 SEQ ID NO:18)；CDR\_L2 序列(包括 SEQ ID NO:19)；和 CDR\_L3 序列(包括 SEQ ID NO:20)。額外或可供選擇地，其亦可包括 CDR\_L1 序列(由 SEQ ID NO:18 構成)；CDR\_L2 序列(由 SEQ ID NO:19 構成)；和 CDR\_L3 序列(由 SEQ ID NO:20 構成)。在一具體事實中，該人類化 ACO-1 抗體包括衍生自人類 VKIII\_L6 基因及/或人類 JK2 基因，較佳是兩者的 VL 架構殘基。在特定的具體事實中，該人類化抗體包括相當於 SEQ ID NO:6 的 VL 序列。

本發明一方面提供包括 ACO-2 之 CDR 序列的抗體。該抗體可專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並包括 VH CDR 序列，其實質上與 SEQ ID NO:7 之 Kabat 殘基 31-35、50-59 和 95-102 的序列是相同的。在一具體事實中，該抗體包括 CDR\_H1 序列(包括 SEQ ID NO:22)；CDR\_H2 序列(包括 SEQ ID NO:23)；和 CDR\_H3 序列(包括 SEQ ID NO:17)。在額外或可供選擇的具體事實中，該抗體包括 CDR\_H1 序列(由 SEQ ID NO:22 構成)；CDR\_H2 序列(由 SEQ ID NO:23 構成)；和 CDR\_H3 序列(由 SEQ ID NO:17 構成)。該抗體可更進一步包括 VL CDR 序列，其實質上與 SEQ ID NO:9 之 Kabat 殘基 24-34、50-56 和 89-97 的序列是相同的。在一具體事實中，該抗體包括 CDR\_L1 序列(包括 SEQ ID NO:24)；CDR\_L2 序列(包括 SEQ ID NO:25)；和 CDR\_L3 序列(包括 SEQ ID NO:20)。額外或可供選擇地，該抗體亦包括 CDR\_L1 序列(由 SEQ ID NO:24 構成)；CDR\_L2 序列(由 SEQ ID NO:25 構成)；和 CDR\_L3 序列(由 SEQ ID NO:20 構成)。

成)；和 CDR\_L3 序列(由 SEQ ID NO:20 構成)。該抗體，一方面可以是人類化 ACO-2 抗體。

人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體可更進一步包括至少一部分的人類 Fc-區(除非該抗體是抗原結合性片段，不含任何 Fc-部分)。典型地，選擇 Fc-區的尺寸，以獲得抗體想要的藥物動力學特性；Fc-部分越大，清除就越慢。在一具體事實中，該人類化抗體是全長抗體，較佳的是包括 IgG4 同型物 Fc-區。在特殊的具體事實中，該 IgG4 Fc-區包括 S241P 突變(根據 Kabat 編號)；相當於每個 EU 編號系統的殘基 228(Edelman G.M.等人，Proc. Natl. Acad. USA 63, 78-85 (1969))。

假如 ACO-1 和 ACO-2 兩者均可與 IFN- $\alpha$  結合，並為類似的，則人類化 VH 和 VL 序列可能是「經混合和配對的」，以創造本發明其他的抗 IFN- $\alpha$  結合分子。可使用在本文中描述的結合測定(例如流動式細胞測量術、Biacore、ELISAs)及/或使用一或多個如在本文中描述的功能測定，測試這類「經混合和配對之」抗體的 IFN- $\alpha$  結合。較佳的是，當混合並配對 VH 和 VL 鏈時，以在結構上類似的 VH 序列置換得自特殊 VH/VL 對的 VH 序列。同樣地，較佳的是以在結構上類似的 VL 序列置換得自特殊 VH/VL 對的 VL 序列。

因此，本發明一方面提供人類化單株抗體，或其抗原結合性部分，包括：(a)包括 ACO-1 或 ACO-2 VH CDR 的 VH 區和 (b)包括 ACO-1 或 ACO-2 VL CDR 的 VL 區；其中該抗體專一地結合 IFN- $\alpha$ 。較佳的重和輕鏈組合包括：(a)

包括 SEQ ID NO:15-17 的 VH 區，可視需要省略一些或全部的 SEQ ID NO:16 之 5C-端胺基酸，和 (b) 包括 SEQ ID NO:18-20 的輕鏈可變區；(a) 包括 SEQ ID NO:15-17 的 VH 區，可視需要省略一些或全部的 SEQ ID NO:16 之 5C-端胺基酸，和 (b) 包括 SEQ ID NO:24、25 和 20 的輕鏈可變區；(a) 包括 SEQ ID NO:22、23 和 17 的 VH 區，可視需要省略一些或全部的 SEQ ID NO:23 之 5C-端胺基酸，和 (b) 包括 SEQ ID NO:18-20 的輕鏈可變區；以及 (a) 包括 SEQ ID NO:22、23 和 17 的 VH 區，可視需要省略一些或全部的 SEQ ID NO:23 之 5C-端胺基酸，和 (b) 包括 SEQ ID NO:24、25 和 20 的輕鏈可變區。其他較佳的重和輕鏈組合包括 (a) 包括 SEQ ID NO:3 之序列的 VH 區和 (b) 包括 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列的 VL 區；(a) 包括 SEQ ID NO:15、21 和 17 之 VH 和 (b) 包括 SEQ ID NO:18-20 之 VL；以及 (a) 包括 SEQ ID NO:15、21 和 17 之 VH 和 (b) 包括 SEQ ID NO:24、25 和 20 之 VL。

另一方面，本發明提供包括 ACO-1 或 ACO-2 之重鏈和輕鏈 CDR1s、CDR2s 及 / 或 CDR3s，或其組合的抗體。假定這些抗體的每一個均可與 IFN- $\alpha$  結合，且主要由 CDR1、2 和 3 區提供抗原-結合專一性，則 CDR H1、H2 和 H3 序列和 CDR L1、L2 和 L3 序列便可能是「經混合和配對的」(即可混合並配對來自不同抗體的 CDR，雖然每個抗體可含有 CDR H1、H2 和 H3 以及 CDR L1、L2 和 L3)，以創造本發明其他的抗 IFN- $\alpha$  結合性分子。可使用下文和在實施例中描

述的結合測定(例如流動式細胞測量術、Biacore 或 ELISAs)，測試這類「經混合和配對之」抗體的 IFN- $\alpha$ -結合。較佳的是，當混合並配對 VH CDR 序列時，以在結構上類似的 CDR 序列置換得自特殊 VH 序列之 CDR H1、H2 及/或 H3 序列。同樣地，當混合並配對 VL CDR 序列時，較佳的是以在結構上類似的 CDR 序列置換得自特殊 VL 序列之 CDR L1、L2 及/或 L3 序列。例如，ACO-1 和 ACO-2 的 CDR 共享相當大的結構類似性，並因此可接受混合和配對。

因此，本發明另一方面提供人類化單株抗體或其抗原結合性部分，包括：(a)包括選自由 SEQ ID NO:15 和 22 所組成之群組的胺基酸序列的 CDR H1；(b)包括選自由至少 SEQ ID NO:16 和 23 的殘基 1-12 所組成之群組的胺基酸序列的 CDR H2，(c)包括 SEQ ID NO:17 之 CDR H3；(d)包括選自由 SEQ ID NO:18 和 24 所組成之群組的胺基酸序列的 CDR L1；(e)包括選自由 SEQ ID NO:19 和 25 所組成之群組的胺基酸序列的 CDR L2；以及(f)包括 SEQ ID NO:20 的 CDR L3；其中該抗體專一地結合 IFN- $\alpha$ 。

在較佳的具體事實中，該抗體包括：(a)包括 SEQ ID NO:15 的 CDR H1；(b)至少包括 SEQ ID NO:16 之殘基 1-12 的 CDR H2；(c)包括 SEQ ID NO:17 之 CDR H3；(d)包括 SEQ ID NO:18 的 CDR L1；(e)包括 SEQ ID NO:19 的 CDR L2；和(f)包括 SEQ ID NO:20 的 CDR L3。

在另一較佳的具體事實中，該抗體包括：(a)包括 SEQ ID NO:22 的 CDR H1；(b)至少包括 SEQ ID NO:23 之殘基 1-12

的 CDR H2；(c)包括 SEQ ID NO:17 的 CDR H3；(d)包括 SEQ ID NO:24 的 CDR L1；(e)包括 SEQ ID NO:25 的 CDR L2；和 (f)包括 SEQ ID NO:20 的 CDR L3。

在較佳的具體事實中，該抗體包括：(a)包括 SEQ ID NO:15 的 CDR H1；(b)包括 SEQ ID NO:21 的 CDR H2；(c)包括 SEQ ID NO:17 的 CDR H3；(d)包括 SEQ ID NO:18 的 CDR L1；(e)包括 SEQ ID NO:19 的 CDR L2；和 (f)包括 SEQ ID NO:20 的 CDR L3。

在較佳的具體事實中，該抗體包括：(a)包括 SEQ ID NO:22 的 CDR H1；(b)至少包括 SEQ ID NO:16 之殘基 1-12 的 CDR H2；(c)包括 SEQ ID NO:17 的 CDR H3；(d)包括 SEQ ID NO:18 的 CDR L1；(e)包括 SEQ ID NO:19 的 CDR L2；和 (f)包括 SEQ ID NO:20 的 CDR L3。

在較佳的具體事實中，該抗體包括：(a)包括 SEQ ID NO:15 的 CDR H1；(b)至少包括 SEQ ID NO:16 之殘基 1-12 的 CDR H2；(c)包括 SEQ ID NO:17 的 CDR H3；(d)包括 SEQ ID NO:24 的 CDR L1；(e)包括 SEQ ID NO:19 的 CDR L2；和 (f)包括 SEQ ID NO:20 的 CDR L3。

在較佳的具體事實中，該抗體包括：(a)包括 SEQ ID NO:15 的 CDR H1；(b)至少包括 SEQ ID NO:16 之殘基 1-12 的 CDR H2；(c)包括 SEQ ID NO:17 的 CDR H3；(d)包括 SEQ ID NO:18 的 CDR L1；(e)包括 SEQ ID NO:25 的 CDR L2；和 (f)包括 SEQ ID NO:20 的 CDR L3。

### 人類化抗 IFN- $\alpha$ 抗體變體

雖然抗體變體或衍生物與親本抗體相比較，典型地具有至少一個經改變的特性，但抗體變體或衍生物可保留親本抗 IFN- $\alpha$  抗體的一個、一些、大部分或所有的功能特性，包括但不限於：(a)專一地結合 IFN- $\alpha$  亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA；(b)選擇性地中和 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 或 WA 的一或多個生物活性；其任何組合，或其全部；(c)並未顯著地中和 IFN- $\alpha$ 1 或 D 的生物活性；(d)與 ACO-1 及/或 ACO-2 在 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型上競爭及/或結合相同的抗原決定基；(e)比起與任何 9F3、13H5、13H7 和 7H9 更與 ACO-1 或 ACO-2 競爭；(f)比包括根據 Kabat 之鼠類 CDR 的 hzACO-1 或 hzACO-2 抗體更不可能誘發免疫反應；(g)在藥學調配物中是穩定的；以及(h)以  $10^{-8}M$  或更低之 KD，與至少一個 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 或 WA 結合。可由本發明之抗體顯示出上述之功能特徵的任何組合，及/或如在實施例中描述之功能特徵。

在某些具體事實中，本發明之人類化抗體包括 VH 區(包括 CDR H1-H3 序列)和 VL 區(包括 CDR L1-L3 序列)，其中這些 CDR 序列的一或多個包括基於在本文中描述之較佳抗體所指定的胺基酸序列；ACO-1 和 ACO-2 或其保留性修改，且其中該抗體已經保留或改良了本發明之抗 IFN- $\alpha$  抗體想要的功能特性。因此，本發明提供經分離之單株抗體，或其抗原結合性片段，包括重鏈可變區(包括 CDR H1、CDR H2 和 CDR H3 序列)，以及輕鏈可變區(包括 CDR L1、CDR

L2 和 CDR L3 序列)，其中：(a)CDR H1，包括選自由 SEQ ID NO:15 和 22，及其保留性修改所組成之群組的胺基酸序列；(b)CDR H2，包括選自由 SEQ ID NO:16 和 23 之至少殘基 1-12，及其保留性修改所組成之群組的胺基酸序列；(c)CDR H3，包括 SEQ ID NO:17，及其保留性修改；(d)CDR L1，包括選自由 SEQ ID NO:18 和 24，及其保留性修改所組成之群組的胺基酸序列；(e)CDR L2，包括選自由 SEQ ID NO:19 和 25，及其保留性修改所組成之群組的胺基酸序列；和 (f) CDR L3，包括 SEQ ID NO:20，及其保留性修改；其中該抗體專一地結合 IFN- $\alpha$ 。

因此，可利用得自相同側鏈家族之其他胺基酸殘基置換在本發明抗體之 CDR 或 FR 區內的一或多個胺基酸殘基，並可針對經保留之功能(即在上文(c)、(d)和(e)中陳述之功能)，使用在本文描述的功能測定，測試經改變之抗體。

可使用可在技術領域中取得及/或在本文中描述的標準測定，評估抗體變體的功能特性。例如，可使用標準結合和生物學影響(例如報告子基因)測定，如在實施例中陳述的那些(例如 Biacore 或 ELISAs)，測定抗體與 IFN- $\alpha$  結合的能力。

#### 可變區修改

本發明一方面提供在 CDR 或架構區中帶有突變的人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體。

在實施例 2 和 3 中描述了在人類化 ACO-1 中特定典型的突變及其鑑認(亦參見圖 1 和 3)。這些包括兩種回復突

變；將 ACO-1 殘基導入人類化 ACO-1 內，以及其中將 ACO-2-衍生之殘基導入人類化 ACO-1 內的突變。在 hzACO-1 VH(SEQ ID NO:3)中的典型回復-突變包括 V5Q、M69L、R71V、T73K、S76I 和 V78A，及其任何組合(使用 Kabat 編號)。在 hzACO-1 VL(SEQ ID NO:6)中的典型回復-突變包括 E1Q、L47W、I58V 和 F71Y，及其任何組合。在 hzACO-1 VH(SEQ ID NO:3)中典型的 ACO-2-衍生突變，包括 T28S、N31S、I58S、S76N、T77I 和 A93V，及其任何組合。在 hzACO-1 VL(SEQ ID NO:6)中典型的 ACO-2 衍生突變，包括 D29G、L33F 和 S50G，及其任何組合。

而且，可將各種 hzACO-1 VH 和 VL 變體序列與變體序列或親本序列「混合並配對」，以創造本發明之 hzACO-1 變體庫。可使用在本文中描述的結合測定(例如 Biacore、ELISAs)，及/或使用一或多個如在本文中描述的功能測定，測試這類「經混合並配對之」抗體的 IFN- $\alpha$ -結合。

在一具體事實中，本發明提供人類化抗體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並含有已經併入人類抗體可變功能部位內的可變功能部位、得自與人類 IFN- $\alpha$ 結合之供者非人類抗體的胺基酸，在重鏈可變功能部位中，在選自 5、28、31、58、69、71、73、76、78、79 和 93 的一或多個位置處包括供者抗體胺基酸殘基。

在一具體事實中，本發明提供人類化抗體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並含有已經併入人類抗體可變功能部位內的可變功能部位、得自與人類 IFN- $\alpha$ 結合之供者非人類抗體

的胺基酸，在輕鏈可變功能部位中，在選自 1、29、33、47、50、58 和 71 的一或多個位置處包括供者抗體胺基酸殘基。

在一具體事實中，本發明提供人類化 ACO-1 抗體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並含有已經併入人類抗體可變功能部位內的可變功能部位、得自與人類 IFN- $\alpha$  結合之 ACO-1 的 CDR 序列，且更進一步在重鏈可變功能部位中，在選自 28、31、58、76、77、78、79 和 93 的一或多個位置處包括 ACO-2 胺基酸殘基。在特定的具體事實中，ACO-2 胺基酸殘基是在選自 28、31 和 93 的一或多個位置。

在一具體事實中，本發明提供人類化 ACO-1 抗體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並含有已經併入人類抗體可變功能部位內的可變功能部位、得自與人類 IFN- $\alpha$  結合之 ACO-1 的 CDR 序列，且更進一步在輕鏈可變功能部位中，在選自 29、33 和 50 的一或多個位置處包括 ACO-2 胺基酸殘基。

在一具體事實中，本發明提供 hzACO-1 變體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並包括實質上與 SEQ ID NO:3 之 Kabat 殘基 31-35、50-65 和 95-102 之序列相同的 VH CDR 序列，並帶有 N31S 突變。該抗體可以，例如包括 CDR H1 序列(包括有 N31S 突變的 SEQ ID NO:15)；CDR H2 序列(包括 SEQ ID NO:21)；和 CDR H3 序列(包括 SEQ ID NO:17)。額外或可供選擇地，該抗體亦可包括 CDR H1 序列(由有 N31S 突變的 SEQ ID NO:15 構成)；CDR H2 序列(由 SEQ ID NO:21 構成)；和 CDR H3 序列(由 SEQ ID NO:17 構成)。在一具體事實中，該人類化 ACO-1 包括衍生自人類 VH1\_46 基因及 /

或人類 JH4 基因，較佳是兩者的 VH 架構殘基。在特定的具體事實中，該人類化抗體包括相當於 SEQ ID NO:3 的 VH 序列，在 Kabat 位置 31 處有 N 到 S 的突變。如同在實施例中所示，在 hzACO-1 中的 N31S 突變，增加了對 IFN- $\alpha$ A 的結合親和力，至可與 ACO-1 相比擬的水平，並增加了在 pH3.5 和 4.5 處的穩定性。再者，因為殘基 31 是在「供者」 CDR 殘基中，故該突變不會將更多鼠類殘基導入 hzACO-1 序列內，因此不會在投予人類時增加對該抗體之免疫反應的風險。其他具有相同優點的 CDR 突變，包括在 hzACO-1 VL 中的 D29G 和 S50G。

在一具體事實中，本發明提供 hzACO-1 變體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並包括實質上與 SEQ ID NO:3 之 Kabat 殘基 31-35、50-65 和 95-102 之序列相同的 VH CDR 序列，並帶有 T28S 突變。該抗體可以，例如包括 CDR H1 序列(包括 SEQ ID NO:15)；CDR H2 序列(包括 SEQ ID NO:21)；和 CDR H3 序列(包括 SEQ ID NO:17)。額外或可供選擇地，該抗體亦可包括 CDR H1 序列(由 SEQ ID NO:15 構成)；CDR H2 序列(由 SEQ ID NO:21 構成)；和 CDR H3 序列(由 SEQ ID NO:17 構成)。在一具體事實中，該人類化 ACO-1 包括衍生自人類 VH1\_46 基因的 VH 架構殘基，更進一步包括 T28S 突變。在特定的具體事實中，該人類化抗體包括相當於 SEQ ID NO:3 的 VH 序列，在 Kabat 位置 28 處有 T 到 S 的突變。如同在實施例中所示，在 hzACO-1 中的 T28S 突變，增加了對 IFN- $\alpha$ A 的結合親和力，至可與 ACO-1 相比擬的水平，

並增加了在 pH3.5 和 4.5 處的穩定性。

在一具體事實中，本發明提供 hzACO-1 變體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並包括實質上與 SEQ ID NO:3 之 Kabat 殘基 31-35、50-65 和 95-102 之序列相同的 VH CDR 序列，並帶有 A93V 突變。該抗體可以，例如包括 CDR H1 序列(包括 SEQ ID NO:15)；CDR H2 序列(包括 SEQ ID NO:21)；和 CDR H3 序列(包括 SEQ ID NO:17)。額外或可供選擇地，該抗體亦可包括 CDR H1 序列(由 SEQ ID NO:15 構成)；CDR H2 序列(由 SEQ ID NO:21 構成)；和 CDR H3 序列(由 SEQ ID NO:17 構成)。在一具體事實中，該人類化 ACO-1 包括衍生自人類 VH1\_46 基因和人類 JH4 基因的 VH 架構殘基，更進一步包括 A93V 突變。在特定的具體事實中，該人類化抗體包括相當於 SEQ ID NO:3 的 VH 序列，在 Kabat 位置 93 處有 A 到 V 的突變。如同在實施例中所示，在 hzACO-1 中的 A93V 突變，增加了對 IFN- $\alpha$ A 的結合親和力，至可與 ACO-1 相比擬的水平，增加了在 RG 測定中測量到的抑制 IFN-影響之效力，並增加了在 pH3.5 和 4.5 處的穩定性。

在一具體事實中，本發明提供 hzACO-1 變體，其專一地結合人類 IFN- $\alpha$ ，並包括實質上與 SEQ ID NO:3 之 Kabat 殘基 31-35、50-65 和 95-102 之序列相同的 VH CDR 序列，更進一步包括在 VH CDR 序列之一中的突變，其中該突變不是在 Kabat 殘基 58 中。該抗體可以，例如包括由 SEQ ID NO:3 之 Kabat 殘基 31-35、50-65 和 95-102 構成的 VH CDR，更進一步包括在 VH CDR 序列之一中的突變，其中 Kabat

殘基 58 為 I。在一具體事實中，該人類化 ACO-1 包括衍生自人類 VH1\_46 基因和人類 JH4 基因的 VH 架構殘基。如同在實施例中所示，在 hzACO-1 中的 I58S 實質上降低了對 IFN- $\alpha$ A 的結合親和力，並降低了在 RG 測定中測量到的抑制 IFN-影響之效力。

其他類型的架構修改涉及使在架構區內，或甚至是在一或多個 CDR 區內的一或多個殘基突變，以移除 T 細胞抗原決定基，藉此降低該抗體可能的免疫原性。該方法亦稱為「去免疫化(deimmunization)」，並在 Carr 等人的美國專利公開案第 20030153043 號中更詳細地描述。

#### Fc 修改

除了在架構或 CDR 區內進行修改之外，或作為可供選擇的，可設計本發明之抗體以便在 Fc 區內納入修改，典型地改變該抗體的一或多個功能特性，如血清半衰期、補體固定、Fc 受體結合、蛋白質穩定性及/或抗原-依賴性細胞之胞毒性或缺乏其等。而且，可以化學方式修改本發明之抗體(例如可將一或多個化學部分附接至該抗體)，或加以修改以改變其等之糖基化，再次改變抗體的一或多個功能特性。在下文中更詳細地描述這些具體事實中的每一個。根據 Kabat 將在 Fc 中的殘基編號。

若需要，可藉著已知的技術「轉換」抗體的種類。這類技術包括，例如使用直接重組技術(參見，例如美國專利第 4,816,397 號)，以及細胞-細胞融合技術(參見，例如美國專利第 5,916,771 號)。例如，一開始以 IgM 分子產生的抗

體，可將其種類轉換成 IgG 抗體。亦可使用種類轉換技術將一 IgG 亞類轉變成另一種，例如從 IgG1 到 IgG2。因此，可為了各種治療用途，藉著同型物轉變成例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE 或 IgM 抗體，改變本發明抗體的效應物功能。可經由例如 GenBank 獲得恆定區典型的 cDNA 序列，分別全部以引用方式納入本文中，如下：

人類 IgG1 恒定重鏈區：GenBank 登錄編號：J00228；

人類 IgG2 恒定重鏈區：GenBank 登錄編號：J00230；

人類 IgG3 恒定重鏈區：GenBank 登錄編號：X04646；

人類 IgG4 恒定重鏈區：GenBank 登錄編號：K01316；

和

人類  $\kappa$  輕鏈恒定區：GenBank 登錄編號：J00241。

在一具體事實中，修改 CH1 的鉸鏈區，而得以改變(例如增加或減少)在鉸鏈區中半胱胺酸殘基的數目。在 Bodmer 等人的美國專利第 5,677,425 號中進一步描述了該方法。改變在 CH1 之鉸鏈區中半胱胺酸殘基的數目，例如，有助於輕和重鏈的裝配，或增加或減少抗體的穩定性。

在另一具體事實中，使抗體的 Fc 鉸鏈區突變，以減少該抗體的生物半衰期。更明確地說，將一或多個胺基酸突變導入 Fc-鉸鏈片段之 CH2-CH3 功能部位介面區內，使得該抗體相對於原來的 Fc-鉸鏈功能部位 SpA 結合，有受損的葡萄球菌(Staphylococcal)蛋白質 A(SpA)結合。在 Ward 等人的美國專利第 6,165,745 號中更詳細地描述了該方法。在另一具體事實中，修改抗體以增加其生物半衰期。各種方

法都有可能。例如，可導入一或多個下列的突變：T252L、T254S、T256F，如同在 Ward 之美國專利第 6,277,375 號中描述的。或者，欲增加生物半衰期，可在 CH1 或 CL 區內改變該抗體，使其含有取自 IgG 之 Fc 區的 CH2 功能部位之兩環的補救受體結合性抗原決定基，如同在 Presta 等人之美國專利第 5,869,046 號和 6,121,022 號中描述的。在另一具體事實中，藉著以不同的胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基來改變 Fc 區，以改變該抗體的效應物功能。例如，可利用不同的胺基酸殘基置換選自胺基酸殘基 234、235、236、237、297、318、320 和 322 的一或多個胺基酸，使得該抗體對效應物配體具有經改變之親和力，但仍保留親本抗體的抗原-結合能力。改變對其之親和力的效應物配體可以是，例如 Fc 受體或補體的 C1 組份。在 Winter 等人的美國專利第 5,624,821 號和 5,648,260 號兩者中更詳細地描述了該方法。在另一實施例中，可利用不同的胺基酸殘基置換選自胺基酸殘基 329、331 和 322 的一或多個胺基酸，使得該抗體具有經改變之 C1q 結合及/或經降低或廢除之補體依賴性胞毒性(CDC)。在 Idusogie 等人的美國專利第 6,194,551 號中更詳細地描述了該方法。在另一實施例中，改變在胺基酸位置 231 和 239 內的一或多個胺基酸殘基，藉此改變該抗體固定補體的能力。在 Bodmer 等人的 PCT 公開案 WO94/29351 中更進一步描述了該方法。在另一實施例中，修改 Fc 區以增加該抗體介導抗體依賴性細胞之胞毒性(ADCC)的能力，及/或藉著修改在下列位置的一或多個胺

基酸，增加該抗體對 Fcγ受體的親和力：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439。在 Presta 的 PCT 公開案 WO00/42072 中更進一步描述了該方法。而且，已經將在人類 IgG1 上對 FcγR I 、FcγR II 、FcγR III 和 FcRn 的結合位置作圖，並已經描述具有經改良結合的變體(參見 Shields, R.L. 等人(2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604)。顯示在位置 256、290、298、333、334 和 339 處的專一突變，改善了對 FcR III 的結合。此外，亦顯示下列的組合突變種改善了 FcγR III 結合：T256A/S298A 、 S298A/E333A 、 S298A/K334A 和 S298A/E333A/K334A 。

可進一步修改恆定區，以使抗體穩定，例如降低二價抗體分離成兩個單價 VH-VL 片段的風險。例如，在 IgG4 恒定區中，可使殘基 S241 突變成脯胺酸(P)殘基，以允許在鉸鏈處形成完整的二硫橋(參見例如 Angal 等人, *Mol Immunol.* 1993; 30:105-8)。

### 糖基化修改

在另一具體事實中，修改抗體的糖基化。例如，可製造無糖基化的抗體(即該抗體缺少糖基化)。可改變糖基化，

例如以增加該抗體對抗原的親和力。可藉著例如改變在抗體序列內的一或多個糖基化位置，來完成這類碳水化合物修改。

### 抗原結合性片段

可將本發明之抗 IFN- $\alpha$  抗體製備成全長抗體或其抗原結合性片段。抗原結合性片段的實例包括 Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、F(ab)3、Fv(典型地為抗體單臂的 VL 和 VH 功能部位)、單鏈 Fv(scFv；參見例如 Bird 等人, *Science* 1988; 242:423-426；和 Huston 等人 *PNAS* 1988; 85:5879-5883)、dsFv、Fd(典型地為 VH 和 CH1 功能部位)和 dAb(典型地為 VH 功能部位)片段；VH、VL、VhH 和 V-NAR 功能部位；包括單一 VH 和單一 VL 鏈的單價分子；微型抗體(minibodies)、雙鏈抗體(diabodies)、三鏈抗體(triabodies)、四鏈抗體(tetrabodies)和卡巴抗體(kappa bodies)(參見例如 Ill 等人, *Protein Eng* 1997; 10:949-57)；駱駝 IgG；IgNAR；以及一或多個經分離 CDR 或有功能之抗原互補位(paratope)，其中經分離 CDR 或抗原結合性殘基或多肽可結合或連接在一起，以致於形成有功能的抗體片段。已經在例如 Holliger 和 Hudson, *Nat Biotechnol* 2005; 23:1126-1136；WO2005040219 和已發表的美國專利申請案 20050238646 和 20020161201 中，描述或回顧了各種類型的抗體片段。

可使用傳統的重組或蛋白質設計技術獲得抗體片段，並可針對抗原-結合或其他功能，以與完整抗體相同的方式

篩選該片段。

已經發展出各種技術，來生產抗體片段。在傳統上，經由全長抗體的蛋白水解消化衍生這些片段(參見例如 Morimoto 等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117(1992)；和 Brennan 等人，Science, 229:81(1985))。然而，現在可藉著重組宿主細胞直接產生這些片段。或者，可從大腸桿菌(E.coli)中直接回收 Fab'-SH 片段，並以化學方式偶聯，形成 F(ab')2 片段(Carter 等人，Bio/Technology, 10:163-167(1992))。根據其他方法，可從重組宿主細胞培養物中直接分離 F(ab')2 片段。在另外的具體事實中，選出的抗體為單-鏈 Fv 片段(scFv)。參見 WO 1993/16185；美國專利第 5,571,894 號；以及美國專利第 5,587,458 號。抗體片段亦可以是「線性抗體」，例如，像是在美國專利第 5,641,870 號中的描述。這類線性抗體片段可以是單專一性或雙專一性的。

### 多專一性分子

另一方面，本發明之特徵為多專一性分子，其包括本發明之抗 IFN- $\alpha$  抗體，或其抗原-片段。這類多專一性分子包括雙專一性分子，其包括至少一個對 IFN- $\alpha$  的第一個結合專一性，和對第二個目標抗原決定基的第二個結合專一性。

一種類型的雙專一性分子為雙專一性抗體。雙專一性抗體是具有對至少兩個不同抗原決定基之結合專一性的抗體。製造雙專一性抗體的方法為在技術領域中已知的，且全長雙專一性抗體的傳統生產，經常是基於兩個免疫球蛋白

白重-鏈-輕-鏈對的共同表現，其中兩個鏈具有不同的專一性(Millstein 等人, *Nature*, 305; 537-539(1983))。可將雙專一性抗體製備成全長抗體或抗體片段(例如  $F(ab')_2$  雙專一性抗體)，或在本文中描述之任何其他的抗原結合性片段。

其他多專一性分子包括從 IFN- $\alpha$ -結合性抗體部分與一或多個其他非抗體蛋白質之融合中產生的那些。已經在技術領域中描述了這類多專一性蛋白質，以及如何建構其等。參見，例如 Dreier 等人(*Bioconjug. Chem.* 9(4):482-489 (1998))；美國專利第 6,046,310 號；美國專利公開案第 20030103984 號；歐洲專利申請案 1 413 316；美國專利公開案第 20040038339 號；von Strandmann 等人, *Blood*(2006; 107:1955-1962)和 WO 2004056873。

亦期待具有兩價以上的多專一性分子。例如，可製備三專一性抗體。Tutt 等人, *J. Immunol.*, 147:60(1991)。

可藉著使用在技術領域中已知的方法，使組成的結合專一性共軛，來製備本發明之多專一性分子。例如，可分別產製多專一性分子的每個結合專一性，然後彼此共軛。當結合專一性是蛋白質或肽時，可使用各種偶聯或交-聯劑進行共價結合。交聯劑之實例包括蛋白質 A、碳化二醯亞胺、N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫代雙(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、鄰-苯二順丁烯二醯亞胺(oPDM)、N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPD)和礦基琥珀醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-羧酸酯(礦基-SMCC)(參見例如 Karpovsky 等人(1984) *J. Exp.*

Med. 160:1686；Liu, MA 等人(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括在 Paulus(1985) Behring Ins. Mitt. 78 期, 118-132；Brennan 等人(1985) Science 229: 81-83, 和 Glennie 等人(1987) J. Immunol. 139:2367-2375 中描述的那些。較佳的共軛劑是 SATA 和 磺基-SMCC，兩者均可獲自 Pierce Chemical Co.(Rockford, IL)。

當結合專一性是抗體時，可經由兩個重鏈之 C-端鉸鏈區的硫氫基結合共軛其等。在特佳的具體事實中，在共軛之前先修改鉸鏈區，以使其含有奇數的硫氫基殘基，較佳的是一個。

或者，可在相同載體中編碼兩個結合專一性，並在相同的宿主細胞中表現和組裝。在雙專一性分子為 mAbxmAb、mAbxFab、FabxF(ab')2 或配體 xFab 融合蛋白之處，該方法是特別有用的。本發明之雙專一性分子可以是包括一單鏈抗體和一結合決定位的單鏈分子，或包括兩個結合決定位的單鏈雙專一性分子。雙專一性分子可包括至少兩個單鏈分子。在例如美國專利第 5,260,203 號；美國專利第 5,455,030 號；美國專利第 4,881,175 號；美國專利第 5,132,405 號；美國專利第 5,091,513 號；美國專利第 5,476,786 號；美國專利第 5,013,653 號；美國專利第 5,258,498 號；美國專利第 5,482,858 號；美國專利申請公開案 20030078385；Kontermann 等人，(2005) *Acta Pharmacological Sinica* 26(1):1-9；Kostelny 等人，(1992) *J. Immunol.* 148(5):1547-1553；Hollinger 等人(1993) *PNAS*

(USA) 90:6444-6448；和 Gruber 等人，(1994) J. Immunol. 152:5368 中描述或回顧了製備雙專一性分子的方法。

### 抗體衍生物

在本發明範圍內的抗體衍生物(或免疫共軛物)包含與第二劑共軛或共價結合的抗 IFN- $\alpha$  抗體。

例如，本發明一方面提供包括與胞毒劑共軛或共價結合之抗體的免疫共軛物，其中胞毒劑可選自治療性放射性同位素、毒性蛋白質、毒性小分子，如藥物、毒素、免疫調節劑、激素、激素拮抗劑、酵素、寡核苷酸、酵素抑制劑、治療性放射性核種、血管生成抑制劑、化療藥物、長春花生物鹼、氮芥環黴素、表鬼臼毒素(epidophyllotoxins)、紫杉烷(Taxanes)、抗代謝產物、烷基化劑、抗生素、COX-2抑制劑、SN-38、抗有絲分裂劑(antimitotics)、抗血管生成和細胞凋亡劑，特別是阿黴素(doxorubicin)、胺甲蝶呤(methotrexate)、紫杉醇(taxol)、CPT-11、喜樹鹼(camptothecans)、氮芥(nitrogen mustards)、吉西他濱(gemcitabine)、磺酸烷基酯、亞硝基脲(nitrosoureas)、三氮烯(triazenes)、葉酸類似物、嘧啶類似物、嘌呤類似物、鉑配位複合物、假單胞菌(Pseudomonas)外毒素、蓖麻毒素(ricin)、雞母珠毒蛋白(abrin)、5-氟尿嘧啶、核糖核酸酶(RNA酶)、DNA 酶 I、葡萄球菌腸毒素-A、美洲商陸(pokeweed)抗病毒蛋白、白樹毒素(gelonin)、白喉(diphtherin)毒素、假單胞菌外毒素和假單胞菌內毒素及其他(參見例如雷明頓氏藥理學(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第 19 版

(Mack Publishing Co. 1995)；古德曼和吉爾曼氏治療的藥理學基礎(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)(McGraw Hill, 2001)；Pastan 等人(1986) Cell 47:641 ； Goldenberg(1994) Cancer Journal for Clinicians 44:43；美國專利第 6,077,499 號；將其完整揭示內容以引用方式納入本文中)。會察知毒素可以是動物、植物、真菌或微生物來源的，或可藉著化學合成重新創造。

在另一具體事實中，利用放射性同位素衍生該抗體，如治療性放射性核種或適合檢測目的的放射性核種。可使用任何適當的放射性同位素，包括但不限於 I-131、銦-111、鎘-171、鉈-212、鉈-213、砹-211、銅-62、銅-64、銅-67、鈀-90、碘-125、碘-131、磷-32、磷-33、銑-47、銀-111、鎇-67、鎳-142、鈫-153、鋨-161、鏑-166、欽-166、銣-186、銣-188、銣-189、鉛-212、鐳-223、銅-225、鐵-59、硒-75、砷-77、鈷-89、鉬-99、銠-105、鉑-109、鎳-143、鉄-149、鉺-169、鋨-194、金-198、金-199 和鉛-211。通常，放射性核種較佳的是對於俄歇電子發射(Auger emitter)具有在 20 到 6,000keV 之範圍內，較佳的是在 60 到 200keV 之範圍內的衰變能，對於  $\beta$  發射為 100-2,500keV，而對於  $\alpha$  發射為 4,000-6,000keV。較佳的還有實質上衰變同時產生  $\alpha$ -粒子的放射性核種。

可使用本發明之抗體共軛物，以修改特定的生物反應，其中不應將該藥物部分解釋為受限於典型的化學治療劑。例如，該藥物部分可以是具有想要生物活性的蛋白質

或多肽。這類蛋白質可包括，例如有酵素活性的毒素，或其活性片段，如雞母珠毒蛋白、蓖麻毒素 A、假單胞菌外毒素或白喉毒素；蛋白質，如腫瘤壞死因子或干擾素-y；或生物反應改性劑，像是例如淋巴細胞介素(lymphokines)、介白素-1(「IL-1」)、介白素-2(「IL-2」)、介白素-6(「IL-6」)、粒性細胞巨噬細胞集落刺激性因子(「GM-CSF」)、粒性細胞集落刺激性因子(「G-CSF」)或其他生長因子。

可將第二劑與抗體直接或間接連接，使用任何可利用的許多方法。例如，可經由二硫鍵形成、使用交聯劑(如 N-琥珀醯 3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPD))，或經由在抗體之 Fc 區中的碳水化合物部分，將製劑附接在經還原抗體組份之鉸鏈區(參見例如 Yu 等人(1994) *Int. J. Cancer* 56:244；Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking* (CRC Press 1991)；Upeslasis 等人，「藉著化學方法修改抗體(Modification of Antibodies by Chemical Methods)」，在單株抗體：原理和應用(Monoclonal antibodies: principles and applications), Birch 等人(編輯)，第 187-230 頁(Wiley-Liss, Inc. 1995)中；Price, 「合成肽-衍生之抗體的生產和定性(Production and Characterization of Synthetic Peptide- Derived Antibodies)」，在單株抗體：生產、設計和臨床應用(Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application), Ritter 等人(編輯)，第 60-84 頁 (Cambridge University Press 1995)中；Cattel 等人(1989) *Chemistry today* 7:51-58；Delprino 等人 (1993) *J.*

Pharm. Sci 82:699-704；Arpicco 等人 (1997) Bioconjugate Chernistry 8:3；Reisfeld 等人 (1989) Antibody, Immunicon. Radiopharrn. 2:217；將其完整揭示內容分別以引用方式納入本文中)。亦參見，例如 Arnon 等人，「在癌症治療中適合藥物之免疫靶定的單株抗體 (Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)」，在單株抗體和癌症治療 (Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)，Reisfeld 等人 (編輯)，第 243-56 頁 (Alan R. Liss, Inc. 1985) 中；Hellstrom 等人，「適合藥物遞送的抗體 (Antibodies For Drug Delivery)」，在經控制之藥物遞送 (Controlled Drug Delivery) (第 2 版)，Robinson 等人 (編輯)，第 623-53 頁 (Marcel Dekker, Inc. 1987) 中；Thorpe，「在癌症治療中胞毒劑的抗體載劑：回顧 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)」，在單株抗體 '84 年：生物學和臨床應用 (Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications)，Pinchera 等人 (編輯)，第 475-506 頁 (1985) 中；「在癌症治療中，經放射性標示之抗體的分析、結果和未來期望之治療用途 (Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)」，適合癌症偵測和治療的單株抗體 (Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)，Baldwin 等人 (編輯)，第 303-16 頁 (Academic Press 1985) 中；以及 Thorpe 等人，「抗體-毒素共軛物之製備和胞毒特性 (The Preparation And Cytotoxic

Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)」, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

關於細胞毒素之類型、連接子和使治療劑與抗體共軛之方法的更多討論，亦參見 Saito, G. 等人 (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215 ; Trail, P.A. 等人 (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337 ; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212 ; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763 ; Pastan, I. 和 Kreitman, R.J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091 ; Senter, P.D. 和 Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

在其他的具體事實中，第二劑是可偵測的部分，其可以是任何可定量或定性觀察或測量的分子。可用在本發明之經共軛抗體中的可偵測標記之實例，為放射性同位素、螢光染料，或互補結合對的成員，如下列任一之成員：抗原/抗體(對 IFN- $\alpha$  之抗體以外的)、外源凝集素/碳水化合物；抗生物素蛋白/生物素；受體/配體；或經分子銘印之聚合物/印刷分子系統。

第二劑也可以或可供選擇地是聚合物，企圖例如增加該抗體之循環半衰期。在例如美國專利第 4,766,106 號；4,179,337 號；4,495,285 號；和 4,609,546 號中說明了典型的聚合物，以及將這類聚合物附接至肽的方法。其他舉例說明的聚合物包括經聚氧乙基化之多元醇和聚乙二醇(PEG)部分。當在本文中使用時，術語「聚乙二醇」企圖包括已經用來衍生其他蛋白質之任何形式的 PEG，如單(C1-C10)

烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇，或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。例如，可使全長抗體或抗體片段與一或多個分子量在大約 1,000 到大約 40,000 之間，如在大約 2000 到大約 20,000 之間，例如大約 3,000-12,000 的 PEG 分子共軛。欲 PEG 化抗體或其片段，典型地在其中可使一或多個 PEG 基團變成與抗體或抗體片段附接的條件下，使該抗體或片段與聚乙二醇(PEG)-如 PEG 的反應性酯或醛衍生物反應。較佳的是，經由與反應性 PEG 分子(或類似之反應性水溶性聚合物)的醯化反應或烷基化反應，完成 PEG 化。在某些具體事實中，欲經 PEG 化之抗體是無糖基化的抗體。PEG 化蛋白質的方法為在技術領域中已知的，並可適用於本發明之抗體。參見例如 Nishimura 等人的歐洲專利 0 154 316 和 Ishikawa 等人的歐洲專利 0 401 384。

### 抗體定性

在生產和純化之後，或作為篩選或選擇程序的一部分，可調查本發明之抗 IFN- $\alpha$  抗體的功能特徵。

下列的是抗體定性之典型測定的簡單說明。有些會在其他章節中更進一步描述，及/或在實施例中描述。

### 結合測定

本發明提供與 IFN- $\alpha$  結合的抗體、抗原結合性片段及其免疫共軛物。可使用任何的各種測定來評估抗體對 IFN- $\alpha$  的結合。特別適合使用基於 ELISAs、放射性免疫測定、西方墨點法、BIACORE 和競爭測定的協定，並為在技術領域中已熟知的。

例如，可使用簡單的結合測定，其中在目標蛋白質或抗原決定基(例如選自 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b、WA、1 和 D 的 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型、其一部分或其任何組合)的存在下培養受試抗體，洗掉未結合的抗體，並使用例如 RIA、ELISA 等等評估已結合抗體的存在。這類方法為熟諳此藝者已熟知的。任何超過在對照組、非專一性抗體中看到之量的結合量，表示該抗體專一地結合目標。

在這類測定中，可將受試抗體與人類 IFN- $\alpha$  結合的能力，與(陰性)對照組蛋白質(例如對在結構上無關之抗原升高的抗體)，或非 Ig 肽或蛋白質與相同目標結合的能力相比較。使用任何適當的測定，若抗體或片段相對於對照組蛋白質，與 IFN- $\alpha$  之結合有 25%、50%、100%、200%、1000% 或更高的增加親和力之能力，該抗體或片段就是與目標「專一地結合」或與目標「專一地交互作用」，且對於用在下述之治療方法中是較佳的。亦可評估受試抗體影響(陽性)對照組抗體，例如人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體，與 IFN- $\alpha$  結合的能力。

本發明一方面提供與人類化 ACO-1 或 ACO-2 抗體共享生物特徵及/或實質之 VH 及/或 VL 序列同一性的人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體。一個典型的生物特徵為與 ACO-1 或 ACO-2 抗原決定基，即在某些 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型之細胞外功能部位中與 ACO-1 和 ACO-2 抗體結合的個別區域結合。欲篩選與 ACO-1 或 ACO-2 抗原決定基結合的抗體，可進行例行的交叉阻斷測定，如在抗體，實驗室手冊 (Antibodies, A

Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, 編輯 Harlow 和 David Lane (1988) 中描述的。

在典型的交叉阻斷或競爭測定中，混合(或預先-吸附)ACO-1 或 ACO-2(對照組)抗體和受試抗體，並施用在含有 IFN- $\alpha$  的試樣中。在某些具體事實中，在施用於含有 IFN- $\alpha$  之試樣中之前，會預先混合對照組抗體與變化量的受試抗體(例如 1:10 或 1:100)一段時間。在其他的具體事實中，可在接觸抗原/目標試樣的期間，簡單地混合對照組和變化量的受試抗體。只要可區別已結合和自由抗體(例如藉著使用分離或沖洗技術，以排除未結合的抗體)，以及對照組抗體和受試抗體(例如藉著使用物種-或同型物-專一之二級抗體，藉著以可偵測標記專一地標示對照組抗體，或藉著使用物理方法，如質譜分析，以區別不同的化合物)即可，吾人能夠測定受試抗體是否減少了對照組抗體與抗原之結合，表示受試抗體實質上認得與對照組相同的抗原決定基。在該測定中，(經標示之)對照組抗體在完全無關之抗體存在下的結合，為對照組高值。藉著將經標示之(陽性)對照組抗體與未經標示之對照組抗體一起培養，獲得對照組低值，其中會發生競爭，並減少經標示之抗體的結合。

在測試測定中，在受試抗體存在下，在經標示之抗體反應性上的顯著降低，代表該受試抗體認得相同的抗原決定基，即與經標示之對照組抗體「交叉反應」的抗原決定基。將在大約 1:10 到大約 1:100 之間的對照組：受試抗體或化合物之任何比例下，降低經標示對照組與抗原/目標之

結合至少 50%，或更佳的是 70% 的任何受試抗體或化合物，視為與實質上與對照組相同之抗原決定基或決定位結合的抗體或化合物。較佳的是，這類受試抗體或化合物會降低對照組與抗原/目標的結合至少 90%。然而，在本發明中可使用降低對照組抗體或化合物之結合至任何可測量之程度的任何化合物或抗體。

### 生物活性

單核細胞的分化。經活化 T 和 B 淋巴細胞的產生，需要提交抗原之細胞 (antigen presenting cells, 「APC」) 的招募和成熟。這些 APC 包括 B 細胞、單核細胞/巨噬細胞和樹突細胞。SLE 患者的血清含有 IFN- $\alpha$ ，其可活化 DCs，並可利用根據本發明之人類化抗體製劑阻斷該經活化之活性。在科學和專利文獻中，描述了偵測和定量該活性的方法 (參見，例如專利公開案第 US20040067232A1 的段落 0136 到 0150，將其相關部分以引用方式納入本文中)。

MxA 啟動基因的活化。可使用報告子基因 (RG) 測定，其中將 MxA 啟動基因與報告子基因融合，如氯黴素乙醯轉移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 或螢光素酶 (luc)，較佳的是螢光素酶，測量 IFN- $\alpha$  活化 MxA 啟動基因的能力，以及本發明之抗 IFN- $\alpha$  單株抗體阻斷該活化的能力。CAT 和螢光素酶的測定為熟諳此藝者已知的。較佳的是，在以 MxA 啟動基因/報告子基因融合構築體穩定轉型的 A549 細胞中，測量 MxA 啟動基因的活性。A549 細胞是肺癌細胞株，可經由 ATCC 獲得 (產品編號 CC1-185)。

MxA(亦名 MxI)啟動基因可以是人類、小鼠或大鼠的。在 GenBank 登錄編號 X55639，Chang 等人(1991) Arch Virol. 117:1-15；和 Ronni 等人(1998) J Interferon Cytokine Res. 18:773-781 中揭示了人類 MxA 啟動基因的序列和結構。在 專利公開案 US20040209800 和 Rosmorduc 等人(1999) J of Gen Virol 80:1253-1262 中揭示了人類 MxA 啟動基因/螢光素酶融合構築體和螢光素酶測定。在 Fernandez 等人(2003) J Gen Virol 84:2073-2082 和 Fray 等人(2001) J Immunol Methods 249:235-244 中揭示了人類 MxA 啟動基因/CAT 融合構築體和 CAT 測定。在 GenBank 登錄編號 M21104；Hug 等人(1988) Mol Cell Biol 8:3065-3079；和 Lleonart 等人(1990) Biotechnology 8:1263-1267 中揭示了小鼠 MxA(MxI)啟動基因。在 Canosi 等人(1996) J Immunol Methods 199:69-67 中揭示了小鼠 MxA 啟動基因/螢光素酶融合構築體和螢光素酶測定。

細胞病變效應(Cytopathic effect, CPE)抑制測定。CPE 測定是基於干擾素的抗病毒活性。通常，在干擾素的存在下以病毒感染適當的細胞株，並對病毒繁殖或複製過程定量干擾素的抑制活性。測定的讀值可能是基於病毒產量的降低、病毒細胞病變效應的降低、病毒蛋白質或 RNA 合成的降低、病毒溶菌斑形成的降低。可使用細胞病變測定，以測定抗體對干擾素活性的中和效果。在 Meager, A. 1987 藉著抗病毒測定定量干擾素，及其等之標準化(Quantification of interferons by anti-viral assays and their

standardization.) 在：Clemens, M.J., Morris, A.G., Gearing, A.J.H.(編輯), 淋巴細胞介素和干擾素：實施方法 (Lymphokines and interferons: A Practical Approach.) IRL, Press, Oxford, 第 129 頁中, 以及 Grossberg 和 Sedmak, 1984. 干擾素的測定 (Assays of interferons) 在：Billiau, A.(編輯) 干擾素 (Interferon), 第 1 冊：普通和應用觀點 (General and Applied Aspects.) Elsevier, Amsterdam, 第 189 頁中, 以及在 PCT 公開案 WO2006086586 的實施例 6、段落 157-164 和圖 1 中, 描述了典型的 CPE 測定。

### 藥學調配物

本發明的其他目標是提供藥學調配物，其包括以從 10-500 毫克/毫升之濃度存在的[蛋白質]化合物，像是例如 20-300 毫克/毫升，較佳的是 30-100 毫克/毫升，且最佳的是 50-100 毫克/毫升，且其中該調配物具有從 2.0 到 10.0 之 pH 值。該調配物更可包括緩衝系統、防腐劑、張力劑、螯合劑、穩定劑和表面活性劑。在本發明之一具體事實中，該藥學調配物是水性調配物，即調配物包括水。這類調配物典型地為溶液或懸浮液。在本發明更進一步之具體事實中，該藥學調配物是水溶液。將術語「水性調配物」定義為包括至少 50 重量%水的調配物。同樣地，將術語「水溶液」定義為包括至少 50 重量%水的溶液，並將術語「水性懸浮液」定義為包括至少 50 重量%水的懸浮液。

在另一具體事實中，該藥學調配物是冷凍-乾燥的調配物，在使用之前由醫師或患者將溶劑及/或稀釋劑加至其中。

在另一具體事實中，該藥學調配物是經乾燥的調配物（例如冷凍-乾燥或噴霧-乾燥），隨時可使用，不需任何之前的分解。

### 診斷應用

本發明之 IFN- $\alpha$ -抗體亦具有非治療用途。例如，抗 IFN- $\alpha$  抗體亦可用在 IFN- $\alpha$ 蛋白質的診斷測定中，例如偵測其在特定細胞、組織或血清中的表現。例如，抗 IFN- $\alpha$  抗體可用在替抗 IFN- $\alpha$ 治療挑選患者的測定中。為了這類目的，可使用抗 IFN- $\alpha$ 抗體來分析 IFN- $\alpha$ 在血清或組織樣本中的存在。為了診斷應用，典型地會以可偵測部分來標示該抗體。

### 治療應用

亦由本發明提供使用如在本文中描述之人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體治療患者的方法。在一具體事實中，本發明提供了如在本文中描述之人類化抗體，在製備投予人類患者之醫藥組合物上的用途。典型地，該患者罹患或處在自體免疫或發炎性疾病或病症之風險下，該疾病或病症與至少一個選自由亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 所組成之群組的 IFN- $\alpha$  亞型之異常表現有關。

欲以本發明之抗體治療的典型症狀或病症，包括但不限於狼瘡（例如系統性紅斑性狼瘡（SLE））、風濕性關節炎（rheumatoid arthritis）、幼年型慢性關節炎、骨關節炎（osteoarthritis）、脊柱關節病（spondyloarthropathies）、系統性硬皮病（systemic sclerosis（硬皮病（scleroderma）））、特發性炎性肌病（idiopathic inflammatory myopathies）（皮肌炎

(dermatomyositis)、多肌炎 (polymyositis) )、薛格連氏徵候群、脈管炎 (vasculitis)、系統性脈管炎、類肉瘤病 (sarcoidosis)、自體免疫溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia) (免疫泛血球減少症 (immune pancytopenia)、陣發性睡眠性血紅蛋白尿 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria))、自體免疫性血小板減少症 (autoimmune thrombocytopenia) (特發性血小板減少性紫斑 (idiopathic thrombocytopenic purpura)、免疫-介導之血小板減少症 (immune-mediated thrombocytopenia))、甲狀腺炎 (葛瑞夫茲病 (Grave's disease)、橋本氏甲狀腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、幼年型淋巴細胞性甲狀腺炎 (juvenile lymphocytic thyroiditis)、萎縮性甲狀腺炎 (atrophic thyroiditis))、糖尿病、免疫-介導之腎病 (腎小球性腎炎 (glomerulonephritis)、腎小管間質性腎炎 (tubulointerstitial nephritis))、中樞和周圍神經系統的脫髓鞘疾病，如多發性硬化症 (multiple sclerosis)、特發性脫髓鞘性多發性神經病 (idiopathic demyelinating polyneuropathy) 或格林-巴厘徵候群 (Guillain-Barre syndrome) 和慢性發炎性脫髓鞘性多發性神經病 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)、肝膽疾病，如傳染性肝炎 (A、B、C、D、E 型肝炎及其他非嗜肝病毒)、自體免疫性慢性主動性肝炎 (autoimmune chronic active hepatitis)、原發性膽汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis)、肉芽腫性肝炎 (granulomatous hepatitis) 和硬化性膽管炎 (sclerosing cholangitis)、發炎性腸病 (inflammatory

bowel disease)(潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis)、克隆氏症(Crohn's disease))、乳糜瀉(celiac disease)、麸質過敏性腸病(gluten-sensitive enteropathy)和惠普爾病(Whipple's disease)、自體免疫或免疫-介導之皮膚疾病，包括大皰性皮膚病(bullous skin diseases)、多形紅斑(erythema multiforme)和接觸性皮膚炎(contact dermatitis)、牛皮癬、過敏疾病，如氣喘(asthma)、過敏性鼻炎(allergic rhinitis)、異位性皮膚炎(atopic dermatitis)、食物過敏(food hypersensitivity)和蕁麻疹(urticaria)、肺的免疫學疾病，如嗜曙紅細胞性肺炎(eosinophilic pneumonias)、特發性肺纖維變性(idiopathic pulmonary fibrosis)和過敏性肺炎(hypersensitivity pneumonitis)，以及與移植有關的疾病，包括移植排斥和移植-對-宿主疾病。在特定的具體事實中，該疾病、症狀或病症係選自狼瘡、薛格連氏徵候群、牛皮癬、糖尿病、風濕性關節炎和幼年型皮肌病。在另一特定的具體事實中，該疾病、症狀或病症為SLE。例如，一方面將抗IFN- $\alpha$ 抗體與一或多個其他的消炎藥併用，包括但不限於止痛藥、免疫抑制劑、皮質類固醇和抗TNF $\alpha$ 劑，或其他抗細胞介素或抗細胞介素受體製劑，以及抗血管生成劑。特定的實例包括胺甲蝶呤、TSG-6、美羅華<sup>®</sup>和CTLA4-Fc融合蛋白。在下文中提供組合治療更進一步的實例。

### 製造物件

在本發明另一具體事實中，提供包含可用來治療上述病症之材料的製造物件。例如，該製造物件可包括含有如

在本文中描述之人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體，連同指示使用者以有效量之抗體來治療人類病症(如自體免疫或發炎性疾病或病症)之說明書的容器。製造物件典型地包括容器和在容器上或與其結合之標籤或包裝插入物。適當的容器包括，例如瓶子、小瓶、注射筒等等。可由各種材料形成容器，如玻璃或塑料。該容器裝有有效治療症狀的組合物，並具有無菌進入孔(例如該容器可以是靜脈內溶液袋，或具有可由皮下注射針頭刺穿之塞子的小瓶)。在該組合物中，至少一個活性劑是本文之人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體或抗原結合性片段，或包括這類抗體的抗體衍生物(例如免疫共軛物)。標籤或包裝插入物指示使用該組合物來治療所選擇的症狀，像是例如 SLE。

此外，製造物件可包括(a)其中含有組合物的第一個容器，其中該組合物包括本文之人類或人類化抗體，和(b)其中含有組合物的第二個容器，其中該組合物包括人類或人類化抗體以外的治療劑。在本發明之具體事實中的製造物件，可進一步包括包裝插入物，指示可併用第一和第二個組合物，以治療自體免疫或發炎性疾病或病症。這類治療劑可以是任何在先前段落中描述的輔助治療。可供選擇或額外地，製造物件可進一步包括第二個(或第三個)容器，其包括在藥學上可接受的緩衝溶液，如制菌的注射用水(BWFI)、磷酸緩衝之生理鹽水、林格氏液和右旋糖溶液。其可進一步含有在商業和使用者觀點上想要的其他材料，包括其他的緩衝溶液、稀釋劑、濾器、針頭和注射筒。

因此在第一項觀點中，本發明係關於人類化抗體，或其抗原結合性片段，其專一地結合人類干擾素- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )，該人類化抗體是鼠類抗體 ACO-1 或 ACO-2，或其組合的人類化版本，包括比根據 Kabat 之鼠類互補決定區 (CDR) 少的供者胺基酸殘基。

因此在第二項觀點中，本發明係關於專一地結合 IFN- $\alpha$  的人類化抗體，或其抗原結合性片段，其中該抗體能夠結合 IFN- $\alpha$  亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA，但不與亞型 1 或 D 結合，且其中該抗體包括比根據 Kabat 之非人類 CDR 少的供者胺基酸殘基。

根據一具體事實，該 CDR H2 供者殘基包括 Kabat 殘基 50-59。在另一具體事實中，該抗體與 ACO-1 及/或 ACO-2 抗體在 IFN- $\alpha$  亞型上競爭及/或結合相同的抗原決定基。

根據較佳的具體事實，該抗體為 IgG4 亞型。在較佳的具體事實中，該抗體包括根據 SEQ ID NO:21 的 CDR H2 序列。

在第三項觀點中，本發明係關於產生根據本發明之抗體的方法，其中該方法包括在適當的條件下培養編碼該抗體之宿主細胞，且隨後分離該抗體。而且，本發明係關於藉著這類方法獲得或可藉此獲得的抗體。

在第四項觀點中，本發明係關於包括根據本發明之抗體的組合物。而且，本發明係關於製備根據本發明之組合物的製程，其中該方法包括將抗體或其片段與賦形劑混合。而且，本發明係關於藉著這類方法獲得或可藉此獲得

的組合物。

在第五項觀點中，本發明係關於預防、管理、治療或改善與 IFN- $\alpha$  有關之發炎性疾病或病症的方法，該方法包括對需要其之個體投予預防或治療有效量的根據本發明之抗體。

最後，本發明係關於根據本發明之抗體在製備適合用來治療發炎性疾病之醫藥品上的用途。

### 實施例

藉著下列非限制性之實施例，解釋本發明的細節。

#### 實施例 1-鼠類 ACO-1 和 ACO-2 抗體的定序

本實施例說明在 WO20060086586 中描述之鼠類抗體 ACO-1 和 ACO-2 的定序和重組表現，以及對 ACO-2 VH 和 VL 序列的 BLAST 搜尋。

#### 抗體選殖和定序

使用得自 Qiagen 的 RNeasy (#634914)，從融合瘤 (ACO-1.5.2 和 ACO-2.2.1) 中萃取總 RNA。使用得自 Clonetech 的 SMART-RACE cDNA 擴大套組，從 1 微克總 RNA 來合成 cDNA。該反應在 42°C 下執行 1.5 小時，並以 75 微升曲辛 (tricine)-EDTA 稀釋試樣。在 50 微升反應中進行目標的 PCR 擴大，使用 5 微升 cDNA 作為模板。在 SMART RACE 套組中含有重和輕鏈兩者的前進引子，其為萬能引子混合物 (universal primer mix, UPM)。如下設計 ACO-1 重鏈 (HC) 的逆向引子序列：5'-CTGGGCCAGGTGCTGGAGG (SEQ ID NO:11)，和 ACO-1 輕鏈 (LC) 的逆向引子序列：5'-CTAAC

ACTCATTCTGTTGAAGCTC(SEQ ID NO:12)。如下設計  
ACO-2 重鏈(HC)的逆向引子序列：5'-CTAGCTAGCTCATT  
TACCCGGAGACCGGGAGATGG(SEQ ID NO:26)，和 ACO-2  
輕鏈(LC)的逆向引子序列：5'-GCTCTAACACTCATTCTG  
TTGAAGCTCTG(SEQ ID NO:27)。

使用得自 Clonetech 的 Advantage HF PCR 套組進行  
PCR 反應，並以在 94°C/2 分鐘下的單一變性步驟，接著是  
94°C/30 秒；55°C/30 秒；72°C/1.5 分鐘的 24 次循環，執行  
PCR 程式。最後的延伸步驟為 72°C/10 分鐘。在含有溴化乙  
銨的 1% 琼脂糖凝膠上鑑認 PCR 產物。使用得自 GE  
Healthcare 的 GFX 純化套組，從凝膠中純化 PCR 產物，接  
著選殖到 Zero Blunt TOPO PCR 選殖套組 (#K2875-40) 內，  
並轉型到得自 Invitrogen 之 TOP10 大腸桿菌細胞內。

使用得自 Qiagen 的 miniprep 套組 (#27106)，從大腸桿  
菌菌落中萃取 DNA。在 MWG Biotech, Martinsried,  
Germany，使用定序引子 M13 rev(-29) 和 M13 uni(-21) 定序  
質體。藉著使用 VectorNTI 證實 HC 和 LC 得自經鑑認之序  
列。所有基於套組的程序均根據製造者的指示進行。

從 ACO-1.5.2 融合瘤細胞中，選殖單一  $\kappa$  LC 和單一  
IgG2a HC，具有下列的核酸和胺基酸序列。

ACO-1 VH 序列 (SEQ ID NO:13(包含信號肽))：

```
atgggatggagctatatcatgcttttggtagcaacagctacagatgtccact
cccaggtccaaactgcagcagcctggggctgaactggtagaaggcctggggcttcagtg
aagctgtcctgttaaggcttctggctacacccctcaccactactggatgcactgggtga
```

agcagaggcctggacaaggcctgagtggtggagagattaatccatgccacggtc  
 gtactatctacaatgaaaacttcaagagcaaggccacactgactgttagacaatcctc  
 catcacagccttcatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctgcggctatttct  
 gtgcaagagggggactgggaccgcctggttgcttactggggccaaggactctg  
 gtcactgtctctgca

ACO-1 VL 序列 (SEQ ID NO:14(包含信號肽)) :

atggatttcaagtgcagatttcagcttcctgctaattcagtgctcagtcataat  
 gtccagaggacaaattgttctacccagtcagccatgtctgtctccctgggg  
 agaagggtcaccttgcacccatgtccggctcaagtgttagattccagctattgtactg  
 gtaccagcagaagccaggatccctcccaaactctggatttatagcacatccaacctg  
 gcttctggagtccctgctcgcttcagtgccagtggtctggacacttactctcac  
 aatcagcagcatggaggctgaagatgctgccttatttctgccatcagtgagtagtt  
 acccattcacgttcggctcgggacaaaattggaaataaaacgg

ACO-1 VH (SEQ ID NO:1(排除信號肽)) :

QVQLQQPGAEVLVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHW  
 VKQRPGQGLEWIGEINPSHGRITIYNENFKSKATLTVDKSSI  
 TAFMQLSSLTSEDSA VYFCARGGLGPAWFAYWGQGTLVT  
 VSA

ACO-1 VL (SEQ ID NO:4(排除信號肽)) :

QIVLTQSPA I M S A S P G E K V T L T C S A G S S V D S S Y L Y W Y Q  
 Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L I S S M E  
 A E D A A S Y F C H Q W S S Y P F T F G S G T K L E I K R

從 ACO-2.2.1 融合瘤細胞中，選殖單一  $\kappa$  型 ACO-2 輕鏈和單一 IgG2b ACO-2 重鏈，具有下列的核酸和胺基酸序

列。

ACO-2 VH 序列 (SEQ ID NO:28(包含信號肽)) :

atggatggagctatatcatcctctttggtagcagcagctacagatgtccact  
 cccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggtaagcctggggcttcagtg  
 aagctgtcctgcaaggcctctggctacagcttaccagctactggatgcactgggtga  
 agcagaggcctggacaaggccttgagtggattggagagattaatccatggccacggc  
 gtactagctacaatgagaactcaagagcaaggccacactgactgttagacaaatcct  
 ccaacatagtctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctgcggcttatta  
 ctgtgttaagaggggactgggacccgcctggcttactggggccaaggactct  
 ggtcactgtctgtta

ACO-2 VL 序列 (SEQ ID NO:29(包含信號肽)) :

atggatttcaagtgcagatttcagttcctgctaatcagtgtctcagtcataat  
 gtccagaggacaaattgttctcaccaggctccagcaatcatgtctgcatttcctgg  
 gagaaggcaccttgcacctgcagtgccggctcaagtgttaggttccagctactttact  
 ggtaccagcagaagccaggatccctcccaaactctggatttatggcacatccaacc  
 tggcttctggagtcctgcctcgctttagtggcagtggtctgggacacttactctc  
 acaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccttatttgcctcagtgagtag  
 gttatccattcacgttgcggctggggacaaaattggaaataaaacgg

ACO-2 VH 序列 (SEQ ID NO:7(排除信號肽)) :

QVQLQQPGAEVLVKPGASVKLSCKASGY SFTSYWMHW  
 VKQRPGQGLEWIGEINPSHGRTSY NENFKSKATLTVDKSSN  
 IVYMQLSSLTSEDSAVYYCVRGGLGPAWFAYWGQGTLVT  
 VSV

ACO-2 VL 序列 (SEQ ID NO:9(排除信號肽)) :

QIVLTQSPAAMSASPGEKVTLTCSAGSSVGSSYFYWYQ  
 QKPGSSPKLWIYGTTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSME  
 AEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLEIKR

發現根據 Kabat 定義之 ACO-2 CDR 序列為如下。

CDR-H1:SYWMH	(SEQ ID NO:22)
CDR-H2:EINPSHGRTSYNENFKS	(SEQ ID NO:23)
CDR-H3:GGLGPAWFAY	(SEQ ID NO:17)
CDR-L1:SAGSSVGSSYFY	(SEQ ID NO:24)
CDR-L2:GTSNLAS	(SEQ ID NO:25)
CDR-L3:HQWSSYPFT	(SEQ ID NO:20)

實施例 2-設計人類化 ACO-1 並鑑認可能的回復-突變殘基  
 小鼠 ACO-1 CDR 的鑑認和定性

發現根據 Kabat 定義之 ACO-1 CDR 序列為如下。

CDR-H1:NYWMH	(SEQ ID NO:15)
CDR-H2:EINPSHGRTIYNENFKS	(SEQ ID NO:16)
CDR-H3:GGLGPAWFAY	(SEQ ID NO:17)
CDR-L1:SAGSSVDSSYLY	(SEQ ID NO:18)
CDR-L2:STSNLAS	(SEQ ID NO:19)
CDR-L3:HQWSSYPFT	(SEQ ID NO:20)

人類生殖種系的鑑認

使用 MOE(藥物研發環境 (Molecular Operating Environment); 可在 [www.chemcomp.com](http://www.chemcomp.com) 獲得)，利用得自蛋白質資料庫銀行 (Protein Database Bank, PDB) 的結構模板：1Z3G，建立 3D 蛋白質結構模型。在 Berman 等人 (Nucl

Acids Res 2000; 28:235-242) 中描述了 PDB，並可在 [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb) 獲得。基於在 PDB 資料庫中之抗體-抗原複合物的分析，發現在抗原互補位中最有可能的殘基是 ACO-1 VH 的殘基 23-35、49-58、93-102，和 ACO-1 VL 的 24-34、49-56、89-97。使用 MOE，鑑認出與抗原互補位交互作用(忌水性、氫鍵、電荷交互作用)的殘基，並以在圖 1 中出示，所謂的 ACO-1 遮罩，獲得混合的殘基組(抗原互補位+交互作用性殘基)。

以 ACO-1 VH 和 ACO-1 VL 搜尋生殖種系 V 資料庫，歸還下列可能的架構模板(在小括弧中提供 E-值)：

VH : VH1\_46(3e-038) 、 VH1\_f(6e-037) 、 VH1\_02(6e-037) 、 VH1\_03(1e-036) 、 VH1\_24(2e-034) ，  
 VL : VK III \_L6(9e-035) 、 VK III \_A11(4e-034) 、 VK III \_A27(8e-034) 、 VK III \_L25(1e-033) 、 VK I \_L8(1e-033) 。

以遮罩搜尋生殖種系資料庫，歸還下列可能的架構模板(在小括弧中提供 E-值)：

VH : VH1\_46(3e-011) 、 VH1\_02(6e-011) 、 VH1\_f(1e-010) 、 VH5\_a(4e-010) 、 VH1\_03(4e-010) ，  
 VL : VK III \_A11(5e-009) 、 VK III \_L6(7e-009) 、 VK III \_A27(9e-009) 、 VK III \_L25(3e-008) 、 VK I \_L9(6e-008) 。

在排比的手工檢查和命中之後，選出 VH1\_46 和 VK III \_L6 作為人類鷹架。可選擇其他的模板，以改變或最適化(例如)人類化抗體的物-化特性。選出 JH4 和 JK2 作為生殖種系 J-斷片(分別為 SEQ ID NO:2 和 5)。

設計最適切的人類化 ACO-1

利用以下的規則進行人類化：

-取得遮罩外側的殘基，當作人類的。

-取得遮罩內側和 Kabat CDR 內側的殘基，當作鼠類的。

-取得遮罩內側和具有小鼠/生殖種系一致之 Kabat CDR 外側的殘基，當作一致序列。

-取得遮罩內側和具有小鼠/生殖種系之 Kabat CDR 外側的殘基，當作生殖種系序列，但使鼠類差異接受可能的回復-突變。

所獲得之最適切 hzACO-1 抗體的 CDR 為(根據 Kabat 定義)：

CDR\_H1:NYWMH (SEQ ID NO:15)

CDR\_H2:EINPSHGRTIYA**Q**KF**Q**G (SEQ ID NO:21)

CDR\_H3:GGLGPAWFAY (SEQ ID NO:17)

CDR\_L1:SAGSSVDSSYLY (SEQ ID NO:18)

CDR\_L2:STSNLAS (SEQ ID NO:19)

CDR\_L3:HQWSSYPFT (SEQ ID NO:20)

使用以上的人類化方法，設計基於 hzACO-1 和 IFN- $\alpha$ A 之 3D 模型，預測構成抗原互補位之殘基的遮罩，與單純的 CDR 移植相反，獲得具有較少鼠類殘基的 hzACO-1 抗體，因為包括經最適化 hzACO-1 CDR H2 序列之 5C-端胺基酸的肽(在上文中以粗體強調)，與相對應之人類架構序列是相同的，同時在根據 Kabat 定義之 ACO-1 CDR H2 序列中的相對應肽是鼠類來源的。另外，在本分析中鑑認的人類化

ACO-1 抗體之 CDR H1 序列，比在 WO2006/086586 中描述的序列短。因此，經最適化的 hzACO-1 抗體，或包括至少一部分 hzACO-1 VH 序列的抗體或抗原結合性片段，在人類患者中可能對於人類抗小鼠抗體(HAMA)-反應有降低的風險。此外，在重鏈之位置 60-62 中，序列 AQK 代替 NEN 的置換，有避免兩個天冬醯胺殘基的優點，其可能有脫醯胺的傾向。

#### 鑑認可能的回復突變

在圖 1 中解釋了 ACO-1 VH 和 VL 序列的分析。在圖 1 中，顯示所得之人類化 ACO-1(hzACO-1)VH(SEQ ID NO:3) 和 VL(SEQ ID NO:6) 序列，有像人類一樣可能的回復突變殘基，即沒有任何的回復突變。為了獲得一或多個經最適化 hzACO-1 抗體，鑑認出在架構區中下列的回復-突變變體，通常需要其等以便保留原始小鼠抗體的親和力：

-hzACO-1 VH：野外型(即沒有回復-突變)、V5Q、M69L、R71V、T73K、S76I、V78A，及其任何組合；

-hzACO-1 VL：野外型、E1Q、L47W、I58V、F71Y，及其任何組合；

-以各種重-輕鏈組合。

#### 實施例 3-為了 hzACO-1 的親和力成熟，設計 hzACO-1 之基於 ACO-2 的變體

如同在圖 2 中所示，ACO-1 和 ACO-2 VH 和 VL 序列的胺基酸序列排比，顯示在個別輕和重鏈之間的高序列同一性。無意受理論限制，該抗體可能衍生自相同的前驅物細

胞，因為其等具有相同的 V-D-J 重排，且與生殖種系序列比較，含有 3 個相同的突變。此外，該抗體在 13 個胺基酸殘基處有差異，可能歸因於後續的體細胞超突變。

在 ACO-1 和 ACO-2 VH 和 VL 功能部位之 13 個不相同的胺基酸殘基中，選擇 9 個殘基進行突變分析，以便改善人類化 ACO-1 抗體的親和力(圖 3)。單獨加入 ACO-2 衍生之超突變，可能鑑認出有害和有利的胺基酸殘基，並藉著允許僅導入有利的胺基酸，而改善親和力超越原始的小鼠 ACO-1 和 ACO-2 抗體。基於其等在輕或重鏈 CDR 之一內的位置(根據 Kabat 定義)，或基於其等在基於抗原-抗體 3D 模型，描繪為可能的抗原-交互作用區之區域內的所在地，選出所靶定之殘基。

為了獲得一或多個經最適化 hzACO-1 抗體，鑑認下列的變體：

-hzACO-1 VH：野外型、T28S、N31S、I58S、S76N、T77I 和 A93V，以及至少兩個選自 T28S、N31S、I58S、S76N、T77I 和 A93V 之突變的任何組合；

-hzACO-1 VL：野外型、D29G、L33F、S50G，以及至少兩個選自 D29G、L33F 和 S50G 之突變的任何組合；

-以各種重-輕鏈組合。

分別使殘基從在 hzACO-1 輕和重鏈構築體內的 ACO-1 序列突變成 ACO-2 序列，以便評估每個殘基對抗原結合的個別貢獻。亦產生一連串的組合突變種。

**實施例 4-選殖 ACO-1、ACO-2、hzACO-1 和特定位突變**

### ACO-1、ACO-2 和 hzACO-1

將 VH 和 VL 序列轉移至基於 CMV 啟動基因的表現載體 (pTT 載體)，其適合在由 Durocher 等人 (Nucleic Acids Res. 2002; 30(2):E9) 描述的 HEK293-EBNA (HEK293-6E) 表現系統中暫時表現。除了 CMV-啟動基因之外，該載體含有 pMB1 起點、EBV 起點和 AmpR 基因。將 ACO-1 和 ACO-2 的 VH 選殖到分別含有小鼠 IgG2a 和 IgG2b 之恆定區的基於 CMV 之載體內。關於 ACO-1 和 ACO-2 兩者，將全長 LC 轉移至空的基於 CMV 之載體。從 Geneart, Regensburg, Germany 訂購 hzACO-1 之可變區的 DNA 序列。將遞送 hzACO-1 VH 的序列轉移至含有人類 IgG4 之恆定區 (S241P) (在鉸鏈區中含有 S241P 突變) 的表現載體。將遞送 hzACO-1 VL 的序列轉移至含有人類  $\kappa$  輕鏈之恆定區的載體。

### 產製 hzACO-1 之回復-突變變體

將在實施例 2 中鑑認之 10 個可能的回復-突變，分別導入 hzACO-1 HC 和 LC 構築體，以便判斷每個殘基對抗原結合的個別貢獻。納入少數一樣好的組合。亦藉著特定位突變，產生帶有經延伸 CDR H2 的 hzACO-1 變體 (hzACO-1-Kabat CDRH2)，該經延伸 CDR H2 相當於 Kabat 定義的鼠類 CDR H2 (SEQ ID NO:16)。

在 hzACO-1 LC 和 HC 表現載體上進行特定位突變。欲產生單一突變種，根據製造者協定，使用得自 Stratagene 的 QuickChange<sup>®</sup>特定位突變套組 (目錄 #200518)。藉著對每個突變種定序質體 DNA 製劑 (MWG Biotech, Martinsried,

Germany)，證實想要突變的導入。

為了表現，將經突變之 LC 構築體與 hzACO-1 HC 混合，並為了抗體表現，將經突變之 HC 構築體與 hzACO-1 LC 混合。

帶有回復-突變的輕鏈變體：

hzACO-1-E1Q

hzACO-1-L47W

hzACO-1-I58V

hzACO-1-F71Y

hzACO-1-L47W、I58V

帶有回復-突變的重鏈變體：

hzACO-1-V5Q

hzACO-1-M69L

hzACO-1-R71V

hzACO-1-T73K

hzACO-1-S76I

hzACO-1-V78A

hzACO-1-R71V、T73K

hzACO-1-M69L、R71V、T73K、S76I、V78A

hzACO-1-Kabat CDRH2

產製 hzACO-1 之基於 ACO-2 的變體

為了改善親和力，按照在實施例 3 中的描述，對 hzACO-1 LC 和 HC 表現載體進行將 ACO-2 專一殘基導入 hzACO-1 抗體內的特定位突變。欲產製單一突變種，根據

製造者協定，使用得自 Stratagene 的 QuickChange®特定位突變套組（目錄 #200518）。根據製造者協定，使用 QuickChange®特定位突變和 QuickChange®多重特定位突變套組（目錄 #200513）兩者，產生組合突變種。

藉著對每個突變種定序質體 DNA 製劑 (MWG Biotech, Matinsried, Germany)，證實想要突變的導入。

為了表現，將經突變之輕鏈構築體與 hzACO-1 重鏈混合，並為了抗體表現，將經突變之重鏈構築體與 hzACO-1 輕鏈構築體混合。

帶有 ACO-2-衍生之突變的輕鏈變體：

hzACO-1-D29G

hzACO-1-L33F

hzACO-1-S50G

hzACO-1-D29G、L33F、S50G

帶有 ACO-2-衍生之突變的重鏈變體：

hzACO-1-T28S

hzACO-1-N31S

hzACO-1-I58S

hzACO-1-S76N

hzACO-1-T77I

hzACO-1-A93V

hzACO-1-N31S、I58S

hzACO-1-T28S、N31S、I58S、A93V

hzACO-1-S76N、T77I

hzACO-1-T28S、N31S、I58S、S76N、T77I、A93V  
 hzACO-1-T28S、A93V  
 hzACO-1-N31S、A93V  
 hzACO-1-T28S、N31S、A93V  
 hzACO-1-T28S、N31S。

### 實施例 5-重組 ACO 衍生之抗體的表現

依據一般的抗體表現協定，在經暫時轉染的 HEK293 細胞中表現 ACO-1、ACO-2、hzACO-1 和 hzACO-1 變體。以下描述適應懸浮之 HEK293 細胞的轉染協定。

細胞維持：使適應懸浮之 HEK293 細胞生長在補充有 25 微克 / 毫升選擇試劑 (Geneticin)<sup>®</sup> (Invitrogen 目錄 #：10131-019)、0.1 體積 % 普魯尼克 (Pluronic)<sup>®</sup> F-68 (Invitrogen 目錄 #：12347-019) 表面活性劑和 1 體積 % 青黴素-鏈黴素 (任意的) (Invitrogen 目錄 #：15140-122) 的 GIBCO<sup>®</sup> FreeStyle<sup>™</sup> 293 表現培養基 (Invitrogen 目錄 #：12338-026) 中。在 37°C、8%CO<sub>2</sub> 和 125rpm 下的恆溫震盪器中，以在 0.2-2×10<sup>6</sup> 個細胞 / 毫升之間的細胞密度，將細胞維持在錐形震盪燒瓶中。

DNA 轉染：用於轉染之培養物的細胞密度是 0.8-1.5 × 10<sup>6</sup> 個細胞 / 毫升。每毫升細胞培養物使用 0.5 微克輕鏈載體 DNA + 0.5 微克重鏈載體 DNA。以每微克經轉染 DNA 1 微升試劑的濃度，使用 293fectin<sup>™</sup> (Invitrogen 目錄 #：12347-019) 作為轉染試劑。以 30 倍體積之 Opti-MEM<sup>®</sup> (Invitrogen 目錄 #：51985-034) 稀釋 293fectin<sup>™</sup>，混合並留置於室溫下 (23-25°C) 持續 5 分鐘。以每微克總 DNA 30 微升

Opti-MEM® 稀釋 DNA，混合並留置於室溫下(23-25°C)持續 5 分鐘。1:1 混合 DNA 和轉染試劑稀釋物，並留置於室溫下(23-25°C)持續 25 分鐘。直接將 DNA-293fectin™ 混合物加至細胞培養物中。將轉染細胞培養物轉移至在 37°C、8%CO<sub>2</sub> 和 125rpm 下的恆溫震盪器。在 4-7 天之後，藉著離心收穫細胞培養上清液，接著通過 0.22 微米 PES 濾紙(Corning 目錄 #: 431098)過濾。以上清液分析抗體，或使用標準蛋白質 A 純化技術純化。

#### 比較 hzACO-1 和 hzACO-1-Kabat CDRH2 的表現水平

比較 hzACO-1 和 hzACO-1-Kabat CDRH2 在 HEK293-6E 細胞中的暫時表現水平，以測定末端 CDR H2 殘基是否對細胞表現兩種抗體變體任一者的能力有任何影響。

按照上述以 hzACO-1 輕鏈和 hzACO-1 或 hzACO-1-Kabat CDRH2 重鏈的基於 pTT 之表現載體轉染 HEK293-6E 細胞。以一式三份進行該轉染。對於每個抗體變體，使用 DNA-293Fectin 主要混合物轉染三個培養物(25 毫升)，以便將來自吸移錯誤的影響減至最少。按照上述，在震盪恆溫箱中培養經轉染之培養物 4 天。在第 4 天，從培養物中萃取試樣，進行細胞存活力和細胞密度測量，並藉著離心收穫剩餘的細胞培養上清液。藉著 Biolayer 干涉術(Interferometry)，使用 ForteBio Octet 系統和蛋白質 A 生物感測器，直接對經澄清之細胞培養上清液進行抗體生產的定量分析。使用 Cedex HiRes 自動細胞培養分析儀，測量細胞培養物密度和存活力。在下文表 4 中出示結果。

表 4. 表現分析

	表現產量 (毫克/公升)	標準偏差 (表現產量)	存活細胞密度 ( $\times 10^5$ 個細胞/毫升)	標準偏差 (存活細胞密度)	細胞存活力 (%)	標準偏差 (細胞存活力)
hzACO-1	41	0.9	19	0.2	65	2.1
hzACO-1-Kabat CDRH2	22	0.7	18	0.5	65	3.2

在表 4 中的結果，意外地顯示與 hzACO-1-Kabat CDRH2(使用傳統程序人類化的人類化 IFN- $\alpha$  抗體，並因此有全長 Kabat 序列)相比較，hzACO-1(根據本發明之人類化 IFN- $\alpha$  抗體)在暫時表現水平上有顯著差異。對於以兩種 hzACO-1 變體任一種轉染的細胞培養物，在細胞存活力或密度上都沒有觀察到任何差異。hzACO-1 的表現水平比 hzACO-1-Kabat CDRH2 抗體變體的表現水平高大約 2-倍。

藉著移植比 Kabat 定義之 CDRH2 短的 CDR H2 版本，意外地顯著增加了抗體的表現水平。

無意與理論結合，可假設在 hzACO-1 中人類生殖種系衍生之殘基，當與 hzACO-1-Kabat CDRH2 抗體變體相比較時，攜帶經延伸之 CDR H2(SEQ ID NO:16)，影響了 HC 摺疊，可能還有 LC-HC 交互作用，結果改善了蛋白質穩定性並因此改善了表現產量。

在暫時表現水平中觀察到這類起因於改善蛋白質穩定性的經改善之蛋白質表現水平，會反映在穩定的基於 CHO 之生產細胞株中。因此，藉著移植短版本的 CDRH2(SEQ ID

NO:21)，有可能產生高-生產性的穩定生產細胞株。

比較 hzACO-1 之 IgG4、1 和 2 變體的表現水平

比較 hzACO-1 之前導 IgG4(S241P)變體和 hzACO-1 (IgG1)和 hzACO-1(IgG2)在 HEK293-6E 細胞中的暫時表現水平，測定重鏈亞類轉換是否對抗體表現水平有任何影響。

以類似上述表現測定之方式進行實驗，但有下列改變：以一式兩份在 5 毫升培養物中進行實驗。在 37°C、8%CO<sub>2</sub> 和 125rpm 下的震盪恆溫箱中，在經濾紙加帽之 50 毫升離心管(falcon tube)中培養該培養物。

不可預測地，hzACO-1(IgG1)和 hzACO-1(IgG2)的平均表現水平約為 hzACO-1(IgG4)之表現水平的 65%。基於在蛋白質表現上觀察到的降低(約 35%)，吾人推論 hzACO-1 可變功能部位與 IgG4 恒定功能部位的組合優於與其他鏈亞類的組合，且該分子的發展大大地助長了高-生產性穩定生產細胞株的產製。

實施例 6-在帶有 hzACO-1-Fab 之複合物中 IFN- $\alpha$ 8 的結晶結構

測定在帶有 hzACO-1 之 Fab 片段的複合物中 IFN- $\alpha$ 8 的結晶結構，並使用 X 射線結晶學精確化至 3.3 Å 解析度(圖 8)。

#### 材料和方法

以 IFN- $\alpha$ 8 稍微過量，將 IFN- $\alpha$ 8(SEQ ID NO:30 的胺基酸 1-166)與 hzACO-1 Fab(帶有 SEQ ID NO:32 之輕鏈序列和 SEQ ID NO:31 之殘基 1-221 的重鏈序列)混合，並在凝膠-

過濾管柱上純化該複合物。將蛋白質複合物 hzACO-1-Fab /IFN- $\alpha$ 8 放在 25mM HEPES 緩衝溶液，pH7.5 +25mM NaCl 的緩衝溶液中，並濃縮至 5 毫克/毫升。使該複合物在沉澱溶液(100mM HEPES 緩衝溶液，pH7.5、15%PEG 10,000 和 15%乙二醇)中形成結晶。在收集繞射數據之前，在液態 N<sub>2</sub> 中急速冷凍該結晶。首先將結晶移至低溫溶液中，其為 25 體積%之 99%甘油和 75%沉澱溶液的混合物。在光束線 BLI911-3、MAX-Lab, Lund, Sweden 下收集繞射數據。將繞射數據編入索引中，並使用 XDS 套裝程式(Kabsch, J. Appl. Crystallogr. 1993; 26:795-800)積分。

使用分子置換(Molecular Replacement, MR)法，使用 CCP4 套裝軟體(Baily, 1994, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 50, 760-763)的 PHASER 程式(Read, 2001, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 57, 1373-1382)測定三維結構。未經複合之 hzACO-1 Fab 的結晶結構為線性的，已經測定至 1.50 $\text{\AA}$  解析度(R-和 R-自由分別為 0.18 和 0.21)，數據未顯示。隨後將那些 3D 座標使用在 hzACO-1/IFN- $\alpha$ 8 複合物的 MR 計算中。將搜尋模型分成三個部分：1)hzACO-1 Fab 的可變功能部位，2)hzACO-1 Fab 的恆定功能部位，和 3)PDB 存放之 IFNtau 模型，蛋白質數據銀行(Protein Data Bank)(Berman 等人，2000,. Nucleic Acids Res. 28, 235-242)登錄碼 1B5L(RADHAKRISHNAN 等人，1999, J. MOL. BIOL. 第 286 冊，第 151 頁)，藉著 COOT 程式突變，以獲得 IFN- $\alpha$ 8 的序列，SEQ ID NO:30。藉著

PHASER 程式進行最後的間隔基測定。間隔基  $P4_1$  得到最高的分數，其具有分別為  $10.7$ 、 $4.4$  和  $2.6\sigma$  之旋轉函數峰值  $RZ's$ ，分別為  $24.1$ 、 $26.4$  和  $8.0\sigma$  之平移峰值  $TZ's$ ，分別為  $383$ 、 $918$  和  $1134$  之對數概率(log-likelihood)增益  $LLG's$ ，且沒有與有對稱關係的分子部分重疊。

在對 COOT 分子圖學程式中的模型進行一些調整之後進行分子置換，隨後施加兩次高達  $2000K$  的扭轉模擬控溫，但沒有個別溫度因子的精確化。原始的  $R$ -和  $R$ -自由值分別為  $0.416$  和  $0.439$ ，而在模擬控溫之後的最終值分別為  $0.314$  和  $0.427$ 。然後使該模型接受在 COOT 程式中的手工介入，接著是使用 REFMAC5 程式(Murshudov 等人, 1997, Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr. 53, 240-255)的精確化，結果分別產生  $0.216$  和  $0.348$  之  $R$ -和  $R$ -自由值。該模型包括殘基 1-21，同時將殘基 22-23 精確化為 Ala 殘基，IFN- $\alpha 8$  的 28-101 和 114-164、hzACO-1 輕鏈的 1-215 和 hzACO-1 重鏈的 1-219。

在精確化中看到在  $R$ -和  $R$ -自由之間有相對較大的差異，係歸因於受限的數據解析度， $3.3\text{\AA}$ ，並有 IFN- $\alpha 8$  X 射線模型的實際拉伸，這在電子密度圖的解釋中完全找不到。電子密度圖清楚定義了在 IFN- $\alpha 8$  對 hzACO-1-Fab 之經穩定化介面中的殘基，同時仍未完全定義遠離抗體位置之 IFN- $\alpha 8$  X 射線結構模型的細節，並因此較不能精確測定。

### 結果

藉著 CCP4 套件的 CONTACT 電腦程式，使用在 Fab 和

IFN- $\alpha$ 8 分子之間 4.0  $\text{\AA}$  的截止距離，鑑認接觸。發現所得的人類 hzACO-1 之抗原決定基包括 IFN- $\alpha$ 8 的下列殘基 (SEQ ID NO:30)：Ser 55、His 58、Glu 59、Gln 62、Gln 63、Asn 66、Glu 97、Leu 118、Arg 121、Lys 122、Phe 124、Gln 125、Arg 126、Thr 128、Leu 129、Thr 132。涉及與 IFN- $\alpha$ 8 交互作用之 HzACO-1 的殘基，抗原互補位，包括 hzACO-1 輕 (L) 鏈的 Ser 32、Tyr 33、Tyr 35、Tyr 50、Ser 51、Trp 92、Ser 93、Tyr 95 和 Phe 97(根據 SEQ ID NO:32 編號，而非 Kabat)，以及重 (H) 鏈的 Thr 30、Asn 31、Tyr 32、Trp 33、His 35、Glu 50、Asn 52、Ser 54、His 55、Arg 57、Leu 101、Gly 102、Trp 105，表 9(根據 SEQ ID NO:31 編號，而非 Kabat)。

SEQ ID NO: 30

>IFN\_a8

```
CDLPQTHSLGNRRALILLAQMRRISPFSCLKDRHDFEFHQEEFDDKQFQKAQAI SVLHEM
IQQTFNLFSTKDSSAALDETLLDEFYIELDQQQLNDLESCVMQEVGVI EPLMYEDSILAV
RKYFQRITLYLTEKKYSSCAWEVVRAEIMRSFSL SINLQKRLKSKE
```

SEQ ID NO: 32

hzACO-1 LC

```
1 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSAGSSVD SSYLYWYQQK PGQAPRLLIY
51 STSNLASGIP ARFSGSGSGT DFTLTISSE PEDFAVYYCH QWSSYPFTFG
101 QGTKLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ
201 GLSSPVTKSF NRGEC
```

SEQ ID NO: 31

hzACO-1 Fab HC

```
1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYWMHWVRQA PGQGLEWMGE
51 INPSHGRTIY AQKFQGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARGG
101 LGPAWFAYWG QGTLTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGKTY
201 TCNVDHKPSN TKVDKRVESK
```

如同在圖 9 中所見，在 IFN- $\alpha$ 8 上的 hzACO-1 交互作用抗原決定基，與 IFNAR1 結合性抗原決定基部分重疊，而 IFNAR2 結合性抗原決定基則遠離 hzACO-1 結合性抗原決定基。這暗示 IFN- $\alpha$  被 hzACO-1 中和，是經由 IFN- $\alpha$  與 IFNAR1，不是與 IFNAR2 結合的中和作用而發生。因此，可想像 hzACO-1 與 IFN- $\alpha$ /IFNAR2 複合物結合，但抑制為細胞內發送信號之原因的三元受體複合物 IFN- $\alpha$ /IFNAR1/IFNAR2 的形成。

表 5.用於結構測定之 IFN- $\alpha$ 8：hzACO-1-Fab 複合物結晶的參數

間隔基：	P4 <sub>1</sub>		
	A	B	C
細胞參數[ $\text{\AA}$ ]：	112.74	112.74	60.55
分子複合物/不對稱元件：	1		

表 6.得自 XDS 套裝軟體之程式 XSCALE 的 X 射線數據統計學

解析度 [ $\text{\AA}$ ]	反射的數目			完成	R-因子		比較	I/Sigma	R-meas	R <sub>rgd-F</sub>	S_norm/ S_ano
	觀察到的	特有的	可能的		觀察到的	預期的					
10.00	984	353	453	77.9	4.4%	4.9%	984	18.84	5.4%	4.1%	-1%
6.00	4237	1461	1562	93.5	6.8%	7.2%	4237	12.45	8.2%	7.8%	1%
5.00	3922	1343	1411	95.2	9.7%	10.1%	3922	9.83	11.7%	11.1%	3%
4.00	8747	3063	3182	96.3	11.6%	11.9%	8747	8.59	14.0%	13.7%	8%
3.50	8588	3106	3212	96.7	24.8%	24.9%	8588	4.43	30.3%	31.3%	9%
3.45	1102	397	410	96.8	36.9%	37.8%	1102	3.17	45.0%	44.4%	7%
3.40	1198	448	464	96.6	41.8%	41.3%	1198	2.82	52.3%	48.7%	-12%
3.35	1271	468	495	94.5	56.0%	51.5%	1271	2.33	69.9%	66.9%	1%
3.30	1317	486	502	96.8	59.6%	51.2%	1317	2.14	74.9%	67.4%	-8%
total	31366	11125	11691	95.2	14.1%	14.2%	31366	7.44	17.2%	20.2%	6%

表 7. 得自 REFMAC 程式之 IFN- $\alpha$ 8:ACO-1-Fab 的最後精確化循環的統計學

在精確化中使用的數據	
解析度範圍 高(Å)	3.30
解析度範圍 低(Å)	20.23
數據截止(SIGMA(F))	無
範圍的完成(%)	95.66
反射的數目	10571
吻合在精確化中使用的數據	
交叉驗證法	從頭到尾
自由R值測試組選擇	隨機的
R值(工作+測試組)	0.22272
R值(工作組)	0.21646
自由R值	0.34845
自由R值測試組尺寸(%)	5.0
自由R值測試組計數	552
在最高解析度 BIN 中的吻合	
所使用之 BINs 的總數	20
BIN 解析度範圍 高	3.300
BIN 解析度範圍 低	3.384
在 BIN 中的反射(工作組)	761
BIN 完成(工作+測試)(%)	96.06
BIN R 值(工作組)	0.290
BIN 自由 R 值組計數	44
BIN 自由 R 值	0.446

B 值			
得自 WILSON 作圖( $A^{**2}$ )	零		
平均 B 值(全體的, $A^{**2}$ )	52.314		
全體的異向性 B 值			
$B_{11}(A^{**2})$	-0.96		
$B_{22}(A^{**2})$	-0.96		
$B_{33}(A^{**2})$	1.92		
$B_{12}(A^{**2})$	0.00		
$B_{13}(A^{**2})$	0.00		
$B_{23}(A^{**2})$	0.00		
經估計之整體座標錯誤			
基於 R 值的 ESU(A)	零		
基於自由 R 值的 ESU(A)	0.776		
基於最大概率的 ESU(A)	0.574		
基於最大概率之 B 值的 ESU( $A^{**2}$ )	33.433		
相關係數			
相關係數 FO-FC	0.901		
相關係數 FO-FC 自由	0.727		
得自理想值的 RMS 偏差	計數	RMS	重量
鍵結長度經精確化的原子(A)	4628	0.014	0.022
鍵結角經精確化的原子(度)	6285	1.738	1.953
扭轉角, 第1期(度)	577	8.885	5.000
扭轉角, 第2期(度)	195	40.409	24.205
扭轉角, 第3期(度)	770	23.636	15.000
扭轉角, 第4期(度)	22	18.930	15.000
手性中心束縛( $A^{**3}$ )	704	0.110	0.200
任意平面經精確化的原子(A)	3478	0.007	0.021

表 8. IFN- $\alpha$ 8-hzACO-1 Fab L 鏈交互作用

使用 4.0 Å 之截止值。藉著 CCP4 套件的 CONTACT 電腦程式鑑認接觸。在最後一欄中「\*\*\*」代表藉著 CONTACT 計算，在該接觸點有氫鍵的強可能性(距離 < 3.3 Å)，「\*」代表弱可能性(距離 > 3.3 Å)。空白代表程式認為這裡不可能有氫鍵。

IFN- $\alpha$ 8 原子	hzACO-1 Fab L 原子	距離(Å)
Leu 118I CB	Tyr 95L CE2	3.78
Leu 118I CG	Tyr 95L CE2	3.68
	Tyr 95L CD2	3.90
Leu 118I CD1	Tyr 95L CG	3.95
	Tyr 95L CE2	3.53
	Tyr 95L CD2	3.21
	Ser 93L O	3.70
	Tyr 95L N	3.96
	Phe 97L CE1	3.62
Leu 118I CD2	Trp 92L O	3.84
Arg 121I NH2	Tyr 95L OH	3.93 *
Lys 122I CA	Tyr 33L OH	3.38
Lys 122I CB	Tyr 33L OH	3.12
Lys 122I CG	Tyr 33L CE1	3.75
	Tyr 33L CZ	3.37
	Tyr 33L OH	2.93
Lys 122I CD	Tyr 33L CZ	3.74
	Tyr 33L OH	3.40
Lys 122I CE	Tyr 33L OH	3.33
Lys 122I C	Tyr 33L OH	3.70
Lys 122I O	Tyr 33L OH	3.41 *

IFN- $\alpha$ 8 原子	hzACO-1 Fab L 原子	距離(Å)
Gln 125I CG	Trp 92L CH2	3.18
	Tyr 33L CE1	3.80
	Trp 92L CZ2	3.63
Gln 125I CD	Trp 92L CH2	3.70
	Tyr 35L OH	3.81
	Trp 92L CZ2	3.58
Gln 125I OE1	Tyr 35L OH	3.50 *
Gln 125I NE2	Ser 32L O	3.24 ***
	Ser 51L OG	3.37 *
	Tyr 33L CE1	3.94
	Tyr 35L OH	3.59 *
	Trp 92L CZ2	3.67
	Tyr 33L OH	3.94
Leu 129I CD1	Ser 51L CB	3.80
	Ser 51L OG	3.77
	Ser 32L OG	3.40
Leu 129I CD2	Ser 51L OG	3.90
Thr 132I OG1	Tyr 50L OH	3.90 *

表 9. IFN- $\alpha$ 8-hzACO-1 Fab H 鍵交互作用

使用 4.0 Å 之截止值。藉著 CCP4 套件的 CONTACT 電腦程式鑑認接觸。在最後一欄中「\*\*\*」代表藉著 CONTACT 計算，在該接觸點有氫鍵的強可能性(距離  $< 3.3\text{ \AA}$ )，「\*」代表弱可能性(距離  $> 3.3\text{ \AA}$ )。空白代表程式認為這裡不可能有氫鍵。

IFN- $\alpha$ 8 原子		hzACO-1 Fab H 原子	距離(Å)
Ser	55I CB	Arg 57H NH2	3.58
Ser	55I OG	Arg 57H NE	3.18 ***
		Arg 57H CZ	3.30
		Arg 57H NH2	2.80 ***
His	58I CG	His 55H CD2	3.73
His	58I CE1	Asn 52H ND2	3.94
		Ser 54H CB	3.90
		Ser 54H OG	3.79
His	58I NE2	His 55H CD2	3.53
		Ser 54H CB	3.60
		Ser 54H OG	3.20 ***
His	58I CD2	His 55H CD2	3.19
Glu	59I CD	Trp 33H NE1	3.90
Glu	59I OE2	Trp 33H CD1	3.74
		Trp 33H NE1	3.01 ***
Gln	62I CD	Asn 52H OD1	3.44
		Thr 30H O	3.71
Gln	62I OE1	Asn 52H CG	3.91
		Asn 52H OD1	3.02 ***
		Ser 54H CB	3.67
		Thr 30H C	3.69
		Thr 30H O	2.55 ***
		Asn 31H CA	3.87
Gln	62I NE2	Asn 52H CG	3.77
		Asn 52H OD1	3.13 ***
		Asn 52H ND2	3.95 *
Gln	63I CD	Leu 101H CD1	3.83
Gln	63I OE1	Leu 101H CG	3.87
		Leu 101H CD1	2.96
Gln	63I NE2	Leu 101H CD2	3.79
Asn	66I CG	Asn 31H O	3.94
Asn	66I OD1	Tyr 32H CE1	3.54
		Asn 31H CB	3.89
		Asn 31H C	3.86
		Asn 31H O	2.80 ***
		Tyr 32H CZ	3.82
Asn	66I ND2	Asn 31H OD1	3.79 *
Glu	97I CG	Ser 54H OG	3.85
Glu	97I CD	Ser 54H O	3.97
		Ser 54H OG	3.24
Glu	97I OE1	Ser 54H O	3.54 *
Glu	97I OE2	Ser 54H CB	3.88
		Ser 54H OG	2.56 ***

Arg	121I CZ	Glu	50H CD	3.73
		Glu	50H OE1	3.31
		Glu	50H OE2	3.30
Arg	121I NH1	His	35H CE1	3.89
		Glu	50H CD	3.78
		Glu	50H OE1	3.06 ***
		Glu	50H OE2	3.66 *
		Trp	105H CZ3	3.82
Arg	121I NH2	Glu	50H CD	3.08
		Glu	50H OE1	2.80 ***
		Glu	50H OE2	2.73 ***
		Trp	33H CG	3.66
		Trp	33H CE2	3.33
		Trp	33H CD2	3.51
		Trp	33H CZ2	3.88
		Trp	33H CD1	3.54
		Trp	33H NE1	3.35 *
Phe	124I CB	Leu	101H CD1	3.79
Gln	125I CD	Gly	102H N	3.69
Gln	125I OE1	Leu	101H CA	3.76
		Leu	101H CB	3.38
		Leu	101H C	3.57
		Gly	102H N	2.55 ***
		Gly	102H CA	3.24
Thr	128I OG1	Leu	101H CB	3.84

#### 實施例 7：基於 hzACO-1 之親和力成熟的突變來設計結構

若不知道抗體/抗原複合物的抗原決定基和抗原互補位，許多可能的胺基酸殘基可能有突變的傾向，以便改善抗體的親和力，況且可能使其等轉變為 20 個剩餘胺基酸殘基中的任一個，以鑑認在特殊位置的最佳殘基。CDR 區容納大約 54 個殘基，可用以進行突變。因此，為了改善交互作用的親和力，可僅在 CDR 內產生  $54 \times 20 = 1080$  個類似物。此外，亦可進行 CDR 外側的突變，以便改善親和力。

然而，在已知抗體/抗原的結構時，可基於結構預測，預測並分析較有限數目的改善親和力之合格突變。因此，基於在帶有 hzACO-1 之 Fab 片段的複合物中 IFN- $\alpha$ 8 的結晶結構，如同在實施例 6 中描述的，鑑認出三個突變種，其

改善了對所有 IFN- $\alpha$  亞型的 hzACO-1 結合。這三個突變種為 hzCAO-1 HC T30R、hzACO-1 LC Y32E 和混合的 hzACO-1 Y32E、T30R(根據 Kabat 的殘基編號)。在下文中描述突變種的身分。

LC Y32E：可看到 IFN- $\alpha$ 8 之殘基 Lys 122 的電子密度，其為與 hzACO-1 結合之抗原決定基的一部分，代表稍微高的移動性。此外，hzACO-1 輕鏈之殘基 Tyr 32(Kabat 標記)的原子  $O\gamma$  指向 Lys 122 側鏈的  $C\beta$  和  $C\gamma$  原子。該交互作用不是任何最佳的殘基-殘基交互作用。使輕鏈 Tyr 32 突變成帶負電的殘基，像 Glu 或 Asp，便有可能在抗體輕鏈 Tyr 32 殘基與 IFN- $\alpha$ 8 之帶正電 Lys 122 殘基之間形成強離子鍵。由於這個緣故，將 Y 換成 E，以便改善 hzACO-1 抗體的親和力。

HC T30R：對於在 X 射線結構中每個接近 IFN- $\alpha$ 8 的 hzACO-1 殘基，計算下列的特性：核心側鏈原子的數目(核心)、周圍側鏈原子的數目(周圍)、帶電交互作用的數目(電荷)、氫鍵的數目(氫鍵)和忌水性交互作用的數目(忌水)，並在下文表 10 中提供。

表 10. hzACO-1 mAb 之胺基酸的特性

輕鏈						
Kabat	殘基	核心	周圍	電荷	氫鍵	忌水
29	D	1	2	1		
31	S	2			1	
32	Y	5	3			6
34	Y	3				2
49	Y	3	1		1	2
50	S	2				8
53	N	1	3			1
91	W	5	2			9
92	S		1			
93	S					4
94	Y	6	2			
96	F	2	2			
重鏈						
28	T		3			
30	T		3			
31	N	4				1
32	Y	6	2			1
33	W	10				3
35	H	2	2			
50	E	4	1	1	1	
52	N	3	1		1	
52A	P		1			
53	S	2			2	
54	H	4	2			6
56	R	5	2	1	1	
58	I	2	2			2
64	Q		1			
71	R		1	1		
97	L	4				3
98	G				1	
99	P		2			
100A	W	2	3			1

藉著將 X 射線結構覆蓋在  $101 \times 101 \times 101$  節點網格上，並對每個網格點計算離節點  $< 2.5 \text{ \AA}$  之原子 ( $N_{\text{外}}$ ) 和  $< 3.5 \text{ \AA}$  之原子 ( $N_{\text{內}}$ ) 的數目，計算核心和周圍原子的數目。具有  $N_{\text{外}} > 0$  之核心節點涵蓋得自 hzACO-1 和 IFN-8 兩者的原子。具有  $N_{\text{外}} = 0$  且  $N_{\text{內}} > 0$  之周圍節點涵蓋得自 hzACO-1 和 IFN- $\alpha$ 8 兩者的原子。核心側鏈原子現在是離任何節點  $< 2.5 \text{ \AA}$  的原子。周圍側鏈原子現在是離任何節點  $\geq 2.5 \text{ \AA} \& < 3.5 \text{ \AA}$  的原子。

最後將周圍殘基定義為僅有周圍原子且沒有交互作用的殘基，故可修改其等以創造結合。已經鑑認出 LC S92、HC T28、HC T30、HC P52、HC Q64 和 HC P99。集中在重鏈非脯胺酸上，藉著目視檢查看到突變 HC T28R 會有可能與 D90 產生交互作用，HC T30R 會有可能與 D90 和 E97 兩者產生交互作用，且 Q64R 會有可能與 E114 產生交互作用，但亦可應用於其他類似的突變。因為跨越所有干擾素  $\alpha$  僅有 E97 受到保留，故預期 HC T30R 以類似 hzACO-1 之輪廓提供最佳的結合。

設計專一突變 HC T30R，以建立在結合位置周圍的電荷-電荷交互作用，改善 hzACO-1 的親和力。

此外，亦產製並分析含有 LC Y32E 和 HC T30R 突變兩者的雙突變種(稱為 hzACO-1 Y32E、T30R)，以測定兩個突變是否會有加成影響。

**實施例 8-測定在 hzACO-1、hzACO-1 變體和重組人類 IFN- $\alpha$  亞型之間交互作用的動力學參數**

可使用表面電漿子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 分析，即時監視蛋白質交互作用。在本研究中，在 Biacore 3000 和 Biacore T100 儀器上進行 SPR 分析，以便就其等對重組人類干擾素  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 之各種亞型的親和力，定性抗 IFN- $\alpha$  單株抗體 hzACO-1 及其變體。

使用直接結合程序進行親和力研究，利用各自的單株抗體，其經由自由胺基團與在感測器晶片表面上的經羧甲基化之葡聚糖膜 (CM5) 共價偶聯。以各種濃度注射重組的 IFN- $\alpha$  亞型 (PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA)，接著是解離期，使恆定緩衝溶液流到感測器晶片表面上。使用該實驗設計，可將 IFN- $\alpha$  對經固定之單株抗體的結合視為 1:1 結合，即一個 IFN- $\alpha$  分子與一個抗體結合位置結合。可使用 1:1 交互作用朗繆 (langmuir) 擬合模型，計算該交互作用的動力學參數。

將經純化之單株抗體固定在在 CM5 型感測器晶片上的個別流動格子中。使用標準胺偶聯程序進行固定，目標是 1000 共振單位 (Resonance Units, RU) 的固定水平。

使用 HBS-EP pH7.4 (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA 和 0.005% 聚山梨醇 P20) 作為執行緩衝溶液，以及重組 IFN- $\alpha$ 's 的稀釋劑。結合 (注射) 為 4 分鐘，接著是 12 至 30 分鐘的解離期。流速為 50 微升/分鐘。在 25°C 下進行實驗。在所有流動格子中同時偵測。流動格子 #1 不含經固定之抗體，並用來扣除背景和散積。

藉著數據對特定抗體-抗原組合的全面擬合，使用 1:1

朗繆結合模型，計算動力學參數。在計算動力學參數之前，先檢查數據的質量-運載限制。

在 Biacore 3000 和 T100 儀器上進行實驗。使用 Biaeval 4.1 和 Biacore T100 評估軟體評估數據。

所得之動力學參數僅在使用緩衝溶液，和利用重組形式之抗原時是有效的。

### 結果

為了產製具有經保留親和力的人類化 ACO-1 抗體，按照在實施例 2、3 和 7 中的描述，使用不同策略產製一些人類化變體。藉著 SPR 分析獲得在重組人類 IFN- $\alpha$  亞型與 hzACO-1 變體之間交互作用的動力學參數。如同在表 11 中所見，即使是根據實施例 2 產生的 hzACO-1(其含有經截短之 CDR H2 且沒有回復突變)，當與鼠類 ACO-1 比較時，已經保留了 hzACO-1 的親和力，如同藉著 hzACO-1 之 KD 是在小鼠抗體兩倍的範圍內所示。因此，沒有更多在架構區中從人類到鼠類 ACO-1 的回復突變需要進行人類化，如同在實施例 2 中鑑認和描述的。此外，已經保留 hzACO-1 抗體的 IFN- $\alpha$  亞型輪廓，如同在表 2 中所示。

表 11. 重組 IFN- $\alpha$ A 與 ACO-1 和 hzACO-1 變體之交互作用的動力學參數

KD 為平衡解離常數， $k_a$  為締合率常數，且  $k_d$  為解離率常數。

抗 IFN- $\alpha$ mAb	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD mAb/KD hzACO-1
ACO-1	3.09E-09	1.24E+05	3.75E-04	0.60
hzACO-1	4.46E-09	1.24E+05	5.56E-04	1
hzACO-1-L33F	4.86E-09	1.89E+05	9.18E-04	1.17
hzACO-1-S50G	4.94E-09	1.98E+05	9.78E-04	1.19
hzACO-1-T28S	2.97E-09	1.58E+05	4.68E-04	0.63
hzACO-1-N31S	2.20E-09	1.16E+05	2.55E-04	0.61
hzACO-1-I58S	1.93E-08	1.93E+05	3.74E-03	4.09
hzACO-1-S76N	5.07E-09	1.16E+05	5.88E-04	1.09
hzACO-1-T77I	6.79E-09	9.80E+04	6.65E-04	1.46
hzACO-1-A93V	2.16E-09	1.08E+05	2.34E-04	0.60
hzACO-1-T28S,N31S	2.22E-09	1.56E+05	3.45E-04	0.77
hzACO-1-N31S,A93V	1.51E-09	1.59E+05	2.40E-04	0.52
hzACO-1-T28S,A93V	1.66E-09	1.61E+05	2.68E-04	0.69
hzACO-1-T28S,N31S,A93V	1.57E-09	1.85E+05	2.91E-04	0.65

在表 12 中列舉，與藉著傳統 CDR 移植產生，並因此含有較大之鼠類 CDR H2 的人類化 ACO-1 分子（稱為 hzACO-1-kabat CDRH2) 相比較，hzACO-1 與重組人類 IFN- $\alpha$ A 之交互作用的動力學參數。如同所示，hzACO-1 分子（根據在實施例 2 中之描述人類化，並含有比 hzACO-1-kabat CDRH2 分子短的 CDR H2) 之親和力是相等的，顯示在實施例 2 中描述之人類化製程所產製的人類化變體像藉著簡單 CDR 移植所產生的一樣好，同時具有較多的人類序列。

表 12. 重組 IFN- $\alpha$ A 與 hzACO-1 和 hzACO-1-kabat CDRH2 之交互作用的動力學參數。

KD 為平衡解離常數，ka 為締合率常數，且 kd 為解離

率常數。

mAb	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD mAb/KD hzACO-1
hzACO-1	1.9E+09	2.22E+05	4.15E-04	1
hzACO-1-kabat CDRH2	1.7E+09	2.05E+05	3.41E-04	0,9

而且，為了調查 hzACO-1 和 hzACO-1-kabat CDRH2 是否對於與人類 IFN- $\alpha$  之各種亞型結合，具有可相比擬的動力學參數，對所選擇之人類 IFN- $\alpha$  亞型進行解離比較實驗(表 13)。這顯示與 hzACO-1-kabat CDRH2 對所有受試亞型相比較，hzACO-1 的親和力似乎受到保留，不管其具有較短的小鼠 CDR H2 序列。

表 13. 分別比較在重組人類 IFN- $\alpha$ A 的各種亞型與 hzACO-1 和 hzACO-1-kabat CDRH2 之間交互作用的解離率常數 (kd)

亞型	hzACO-1	hzACO-1-kabat CDRH2	hzACO-1/hzACO-1-kabat CDRH2
	kd (1/s)	kd (1/s)	Ratio
IFN- H2	4.13E-04	3.28E-04	1,26
IFN- K	2.89E-04	3.41E-04	0,85
IFN- 4b	2.17E-04	1.55E-04	1,40
IFN- WA	2.91E-04	3.66E-04	0,80

為了嘗試改善 hzACO-1 的親和力超過小鼠 ACO-1 抗體的，測量在 IFN- $\alpha$ A 和不同 hzACO-1 變體(含有基於 ACO-2 序列之突變)之間參數的動力學(表 11)。為了使在進行不同實驗時獲得的參數發生關連，將每個個別抗體之 KD 值對在相同實驗中 hzACO-1 的值標準化，並在欄位「KD mAb 對

KD hzACO-1」中出示個別 mAb 之 KD 值對在相同實驗中 hzACO-1 之 KD 值的關係。

親和力測定進一步證實所有 ACO2 衍生之 hzACO-1 抗體變體(除了 hzACO-1-I58S)的 KD 值均在較低的 nM 範圍內。在 KD 值中的最少改變主要與在 kd 中的差異有關。在 hzACO-1 中導入單一胺基酸取代 N31S、A93V 或 T28S 及其組合，稍微增加了親和力，至類似的 ACO-1 的水平。hzACO-1-I58S 突變對 kd 值有深遠的負面影響，證實該特定胺基酸對於 hzACO-1/IFN- $\alpha$ A 複合物之穩定性的重要。

基於 hzACO-1 Fab/IFN- $\alpha$ 8 結晶結構，將一些胺基酸取代導入 hzACO-1 中，以便更進一步增加親和力(參見實施例 7)。在這些之中，兩個單一取代-輕鏈的 Y32E 和重鏈的 T30R，對親和力有顯著正面的影響(表 14)，分別增加了對 IFN- $\alpha$ A 的親和力大約 2 和 6 倍。顯然，藉著混合兩種突變，觀察到含有 Y32E 和 T30R 的 hzACO-1 構築體對 IFN- $\alpha$ A 之親和力增加了大約 10 倍(表 15)。

表 14. 重組 IFN- $\alpha$ A 分別與 hzACO-1 和 hzACO-1 變體之交互作用的動力學參數

KD 為平衡解離常數，ka 為締合率常數，且 kd 為解離率常數。

mAb	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD mAb/KD hzACO-1
hzACO-1	3.20E-09	1.39E+05	4.43E-04	1
hzACO-1 LC Y32E	1.54E-09	2.47E+05	3.81E-04	0.5
hzACO-1 HC T30R	5.40E-10	1.31E+05	7.08E-05	0.16

表 15. 重組 IFN- $\alpha$ A 分別與 hzACO-1 和 hzACO-1 Y32E、T30R 之交互作用的動力學參數

KD 為平衡解離常數， $k_a$  為締合率常數，且  $k_d$  為解離率常數。

mAb	KD (M)	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD mAb/KD hzACO-1
hzACO-1	2.72E-09	1.78E+05	4.85E-04	1
hzACO-1 Y32E,T30R	2.97E-10	1.49E+05	4.43E-05	0.1

在表 16 中的動力學數據說明了基於合理之設計方法產製的 hzACO-1 Y32E、T30R 構築體，已經保留其 IFN- $\alpha$  亞型輪廓，因為它不與 IFN- $\alpha$ 1 結合，但與其餘受試的亞型結合。為了確認由 Y32E、T30R 突變引起之對動力學參數的影響，反映在與人類 IFN- $\alpha$  之各種亞型的結合上，對所選擇之人類 IFN- $\alpha$  亞型進行解離比較實驗(表 16)。雖然所提出之雙突變種 hzACO-1 構築體的突變是基於 IFN- $\alpha$ 8 的結構，但對於所有受試之人類 IFN- $\alpha$  亞型觀察到不可預測經改良的解離率，在 6-64 倍之間變化。

表 16. 分別比較在重組人類 IFN- $\alpha$  之各種亞型與 hzACO-1 和 hzACO-1 Y32E、T30R 之間交互作用的解離率常數( $k_d$ )

mAb 亞型	hzACO-1	hzACO-1 Y32E,T30R	hzACO-1/hzACO-1 Y32E,T30R
	$k_d$ (1/s)	$k_d$ (1/s)	Ratio
IFN- $\alpha$ A	6.24E-04	6.85E-05	9,1
IFN- $\alpha$ 1	沒有結合	沒有結合	-
IFN- $\alpha$ 4b	1.12E-03	1.74E-05	64,4
IFN- $\alpha$ I	1.55E-03	3.15E-05	49,2
IFN- $\alpha$ J1	4.54E-03	1.95E-04	23,3
IFN- $\alpha$ WA	2.47E-03	4.05E-04	6,1

## 實施例 9-在 CPE-測定中分析 hzACO-1 構築體

本實施例顯示 hzACO-1 能夠抑制所有受試之 IFN- $\alpha$  亞型的保護效果，除了 IFN- $\alpha$ 1 和 IFN- $\alpha$ D 的那些，其等不受 hzACO-1 影響。

### 材料和方法

基於 EMC 病毒對 A549 細胞的溶解影響，使用該抗 IFN- $\alpha$  中和測定。所有的 IFN- $\alpha$  亞型均可抑制 EMC 病毒在 A549 細胞中複製，結果導致細胞存活，其可利用細胞 DNA 染色來測量。可藉著減少細胞的 DNA 染色(相當於增加細胞溶解)，測量抗 IFN- $\alpha$  抗體對不同 IFN- $\alpha$  亞型的中和效果。

在具有 96 孔的培養盤(Nunc, 目錄第 167008 號)上進行測定，其中每孔含有 200 微升之終體積。所有 IFN- $\alpha$  製劑均得自 PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA。

以各 50 微升之體積，在每孔中加入 4 種溶液(IFN- $\alpha$ 、hzACO-1、細胞和病毒)。所有溶液均在帶有 10%FCS 的 F12Kaighn's 培養基(Gibco, 目錄第 21127 號)中製備。每個 IFN- $\alpha$  亞型的比濃度(在下文表 17 中列舉)均衍生自先前的研究。基於獲自使用例如鼠類抗體 ACO-1.5.2 和 ACO-2.2 的現存數據，選擇在本測定中使用的抗體濃度。

在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 下，將每個 IFN- $\alpha$  亞型與 hzACO-1 預先培養 2 小時。按照在下文表 17 中所示，稀釋抗干擾素抗體。在抗體與 IFN- $\alpha$  的預先培養之後，加入 50 微升細胞-溶液(300000 個細胞/毫升)，以獲得 15000 個細胞/孔。在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 下培養 4.5 小時之後，以 10<sup>3.5</sup> TCID<sub>50</sub> 之濃度

加入 50 微升 EMC 病毒，接著在 37°C，5%CO<sub>2</sub> 下培養 48 小時。

隨後小心地移出上清液，並加入 50 微升結晶紫溶液 (0.5%結晶紫，25%甲醇)。在室溫下培養 15 分鐘之後，以水沖洗各孔並脫水隔夜。

然後在經脫水的培養盤中加入 200 微升/孔的純甲醇 15 分鐘，以便從細胞中萃取結晶紫。在萃取之後，將 100 微升上清液小心地移至新的 96-孔培養盤 (Nunc, 目錄第 256510 號) 中，並在各孔中加入 100 微升 Milli-Q 水。然後在 590 奈米下在 ELISA 判讀器中測量該盤。

在分析之前，對甲醇和培養盤背景校正從 ELISA 判讀器取回的未加工數據。

表 17. CPE 測定參數

IFN $\alpha$ 亞型	[IFN $\alpha$ ] (微微克/微升)*	[hzACO-1] (豪微克/毫升)
IFN- $\alpha$ A	1,25x 10-1	2.500->0
IFN- $\alpha$ 2	3,125x 10-2	2.500->0
IFN- $\alpha$ F	6,25x 10-2	2.500->0
IFN- $\alpha$ K	6,25x 10-2	2.500->0
IFN- $\alpha$ WA	6,25x 10-2	2.500->0
IFN- $\alpha$ B2	2,5x 10-2	2.500->0
IFN- $\alpha$ H2	1,25x 10-1	2.500->0
IFN- $\alpha$ I	5,0x 10-2	2.500->0
IFN- $\alpha$ J1	1,0x 10-1	2.500->0
IFN- $\alpha$ 4a	2,5x 10-1	250->0
IFN- $\alpha$ C	2,5x 10-2	250->0
IFN- $\alpha$ G	2,5x 10-1	250->0
IFN- $\alpha$ 4b	1,25x 10-1	250->0
IFN- $\alpha$ D	3,75	50.000->0
IFN- $\alpha$ 1	1,0	50.000->0

## 結果和討論

在本研究中，對所有培養盤使用六個不同的對照組(細胞、細胞+抗體、細胞+IFN- $\alpha$ 、細胞+抗體+IFN- $\alpha$ 、細胞+病原體和細胞+IFN- $\alpha$ +病原體)，以確保在本測定中觀察到的細胞病變效應不是由於抗體及/或 IFN- $\alpha$  之胞毒性引起，也不是因為細胞對病原體缺少任何 IFN- $\alpha$ -保護所引起的細胞病變效應。在本測定中沒有觀察到任何顯著的胞毒影響，且在對照組中沒有任何干擾素的水平有細胞病變效應的徵兆。

如同在圖 4 中所示，該 CPE-測定顯示幾乎所有干擾素亞型的保護效果均會受到 hzACO-1 抑制。然而，IFN- $\alpha$ D 和 IFN- $\alpha$ 1 的保護效果卻不受 hzACO-1 抑制，即使在 50000 毫微克/毫升的抗體濃度下。因此，在 hzACO-1 構築體中保留了小鼠 ACO-1 的專一性。

### 實施例 10-在報告子基因(RG)生物測定中分析 ACO-衍生之抗體

利用基於螢光素酶之報告子基因測定，評估 hzACO-1 抗體變體中和重組 IFN- $\alpha$  亞型之生物活性的能力。

#### 材料

杜貝可氏經過修改的鷹式培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)「完全的」：DMEM 包含酚紅+10%FCS+2mM L-穀胺醯胺+青黴素+鏈黴素+2-me.，Nunc 96-孔光學底培養盤，黑色組織培養處理，含有 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  和 1mM  $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS，Steady-Glo 螢光素酶測定系統(Promega)。

藉著以 IFN-可誘導之構築體(其帶有駕馭螢光素酶報

告子基因之 Mx 啟動基因)穩定轉染 A549 細胞株 (CLL-185, ATCC)，衍生 93D7 細胞株。Mx 啟動基因由含有鼠類 MxA 啟動基因之 1.6kb BamHI 片段和刪除 pSP64-Mxp (PstI-PvuII) -r $\beta$ glo 的 IFN 反應元件 (Leonart 等人 (1990) Biotechnology 8:1263-1267) 構成。

在圖 5 中列舉所使用之 IFN- $\alpha$  亞型 (均得自 PBL Biomedical Laboratories, NJ, USA)。

### 方法

以一式四孔在不透明 Nunc 96-孔光學底培養盤中進行 RG 測定。對每個測定，納入陽性對照組 IFN $\alpha$ ，以及含有未-經刺激細胞和在缺乏 IFN $\alpha$  刺激下以抗體處理之細胞的陰性對照組孔。

明確地說，藉著移除培養基，以 PBS 沖洗一次，並以胰蛋白酶消化，從燒瓶中收穫附著的 93D7 細胞。使用 DMEM 完全的，停止胰蛋白酶消化。計算細胞數目，並以完全的 DMEM 調整成 600,000 個/毫升。

在 37°C +5% CO<sub>2</sub> 下，在總體積 100 微升 DMEM 完全的中，將經純化之抗 IFN- $\alpha$  mAbs 與重組 IFN 亞型預先培養 1 小時。在抗體-IFN 培養之後，加入 50 微升 93D7 細胞，並在 37°C +5% CO<sub>2</sub> 下培養 5 小時。

欲測定由重組 IFN 亞物種誘導之 MxA-駕馭的螢光素酶，調整 IFN 之濃度，以便使放在每孔中所含的量為 100 微升。以一式四孔放置 100 微升 IFN，在 37°C +5% CO<sub>2</sub> 下培養 1 小時。隨後加入 50 微升細胞，並繼續培養另外 5 小時。

欲測定使用經純化之 mAbs，抑制由重組 IFN 亞物種誘導之 MxA-駕馭的螢光素酶，每孔中加入 50 微升想要稀釋度的重組 IFN。然後在各孔中加入以 DMEM 完全的稀釋之 50 微升抗體，並在  $37^{\circ}\text{C} + 5\% \text{CO}_2$  下培養 1 小時。在該培養之後，加入細胞，並繼續培養另外 5 小時。

在 5 小時的培養之後，使用多通道吸移管，從細胞中小心地移除培養基。接下來，將有黏性黑色阻斷劑固定在 96 孔培養盤的底部。在各孔中加入帶有  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  離子之 100 微升 PBS。在各孔中加入 100 微升經重建的 Steady-Glo 試劑，確定徹底混合在每孔中的內容物。以明淨的有黏性長條密封該培養盤。在室溫下在暗處培養 5 分鐘之後，在 Topcount 發光計數器 (Perkin Elmer) 中讀取發光。

為了計算由抗體對 IFN 誘導 (MxA 駕馭之) 螢光素酶活性施加的抑制程度，在比較計數時，使各種 IFN- $\alpha$  亞型的 Ab 抑制對在缺少抗體下之活性水平 (並將該值設定為 100%) 標準化。為了比較抗體之變體形式，以未加工之螢光素酶計數，來表示單一 IFN- $\alpha$ s 數據的抑制。一開始在缺少抗體下滴定 IFNs，以測定 EC50，以及在本測定中達到高原時的 IFN 濃度。在測試抗體抑制時，通常以最大刺激水平的 80% 使用 IFN，以確保螢光素酶的可靠誘導，且在本測定中在低於飽和的水平下操作。使用 Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego) 軟體進行計算和數據展示。

### 結果和討論

針對其等在報告子基因測定中，抑制各種人類 IFN- $\alpha$

亞型的能力，評估人類化 ACO-1 構築體。圖 5 顯示藉著 hzACO-1 抗體抑制 12 種 IFN- $\alpha$  亞型的標準化數據。將在缺少抗體下之 IFN- $\alpha$  刺激設定為 100%，同時將經模仿處理之細胞(僅接受培養基)設定為 0%。顯示帶有標準誤差的數據點。根據最佳配適 S 形反應曲線，使用 Prism 軟體計算曲線。hzACO-1 能夠抑制 IFN- $\alpha$ s 所有受試的亞物種，除了 IFN- $\alpha$ D，並因此在 hzACO-1 抗體的人類化期間，保留了親本小鼠 ACO-1 抗體的專一性。在高抗體濃度下，抑制也是完全的，使 IFN- $\alpha$  活性降低至背景水平。在本研究中，各種 IFN- $\alpha$  亞型之抑制的 IC<sub>50</sub>，範圍是從 28 毫微克/毫升到 314 毫微克/毫升。即使在較高的 hzACO-1 濃度下，也不能抑制 IFN- $\alpha$ D。

圖 10 顯示在 RG 測定中，小鼠 ACO-1 Ab 與人類化 ACO-1(hzACO-1)及其兩個變體的比較。一個變體為帶有完整 CDRH2 的人類化 ACO-1(稱為 hzACO-1-kabat CDRH2)，但另一個則按照在實施例 2 中之描述，以較短 CDRH2 建構的 hzACO-1。此外，該圖顯示另一個經突變的 hzACO-1，其已經經由合理的設計，對與 IFN- $\alpha$ s 之交互作用最適化(稱為 hzACO-1 Y32E、T30R)，如同在實施例 7 中的描述。在 RG 測定中，針對五個不同的代表性 IFN- $\alpha$  亞型之抑制，比較這四個重組的 mAb 變體。

hzACO-1 對所有五個 IFN 亞型均展現出幾乎可與小鼠 ACO-1 相比擬的 IC<sub>50</sub> 值，根據在實施例 8 中報告所觀察到的 KDs，在定量上 IC<sub>50</sub>s 小於兩倍(關於相對 IC<sub>50</sub> 值，參見

表 18)。因此，以低於親本 ACO-1 抗體對功能抑制之兩倍的親和力，完成人類化。總之，ACO-1 的 mAb 人類化已經產生了保留 IFN- $\alpha$ s 之親和力的抗體。因此，均認為與原始的小鼠 ACO-1 相比較，在 hzACO-1 抗體中保留了親和力和效力兩者，且不需要更多的回復突變。

如同在實施例 2 中所述，ACO-1 的人類化方法，與藉著簡單 CDR 移植的普通人類化相比較，結果產生了在 CDR H2 中具有相對上較多人類胺基酸的抗體。然而，這可預期在人類化 ACO-1 中導致降低了中和 IFN- $\alpha$  亞型的效力，如同在圖 10 和表 18 中所示，驚訝地是事情的真相並非如此，因為 hzACO-1 和 hzACO-1-kabat CDRH2 對所有受試的 IFN- $\alpha$  亞型都是同樣有效的。這與對兩個 ACO-1 變體報告的親和力一致，如同在實施例 8 中描述的。

表 18. 藉著 hzACO-1 變體抑制 IFN- $\alpha$  亞型的 IC50 值

標準化數據。將每個 IFN- $\alpha$  物種的 IC50 值對 hzACO-1 的標準化。因此，小於 1 的值代表比 hzACO-1 更有效抑制 IFN- $\alpha$  活性的抗體，相反地高於 1 的值則代表以較低之效力抑制。

mAb 變體	相對於 hzACO-1 之 IC50 值				
	IFN- $\alpha$ A	IFN- $\alpha$ B2	IFN- $\alpha$ F	IFN- $\alpha$ G	IFN- $\alpha$ J1
hzACO-1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ACO-1	0,60	0,47	0,82	0,56	0,58
hzACO-1 Y32E, T30R	0,03	0,02	0,05	0,06	0,02
hzACO-1-kabat CDRH2	0,95	0,88	0,95	0,78	1,15

為測定 ACO-2 衍生之 hzACO-1 變體的效力，如同在實施例 3 中描述的，使用 RG 測定比較這些與 hzACO-1。使用兩個 IFN- $\alpha$  亞物種(IFN- $\alpha$ F 和 IFN- $\alpha$ A)進行比較。測試四個不同的單一胺基酸取代：T28S(即在位置 28 處(根據 Kabat)，以絲胺酸取代蘇胺酸)、I58S、N31S 和 A93V。

然而，I58S 變體以降低之效力，並可能亦以降低之效率(IFN- $\alpha$ A)抑制 IFN-作用，T28S 和 N31S 變體兩者皆展現出類似 hzACO-1 的效力。然而，A93V 經取代變體在 RG 測定中測量到對 IFN-影響之抑制顯示出增加的效力(圖 6)。雖然可在不同的 IFN- $\alpha$  亞型之間偵測到在取代影響上的差異，但在所有四種情況下對兩種形式都有相同的傾向。

經由合理的設計，使用在實施例 6 中的結晶結構，建構具有兩個胺基酸改變，hzACO-1 之 HC T30R、LC Y32E 的突變種(稱為 ACO-1 Y32E、T30R)，如同在實施例 7 中描述的，以改良對 IFN- $\alpha$  的結合。即使該突變是基於 IFN- $\alpha$ 8 之結構，如同從圖 10(A-E)中所見，該突變種意外地增加了抑制所有受試之 IFN- $\alpha$ s 的效力。而且，表 18 顯示效力的增加視特定的亞型而定，其為 16 倍的等級，且最高到 50 倍的效力改良。

當然可使用在實施例 6 中獲自結晶結構的抗原決定基資訊，來設計對該抗原決定基具有經改良之結合親和力的其他抗體變體。當然根據本發明的這類人類化抗體變體，亦包含在本發明之範圍內。

#### 實施例 11-人類化 ACO-衍生之抗體的蛋白質定性

本實施例係關於 hzACO-1 和不同變體的熱穩定性

## 材料

### 抗體

以人類 IgG1、IgG2 和 IgG4 同型物表現的 hzACO-1

hzACO-1-T28S

hzACO-1-N31S

hzACO-1-A93V

hzACO-1-T28S-N31S

下列的是在研究中所使用之緩衝溶液(100mM)及其等 pH 值的列表：檸檬酸/檸檬酸鈉，pH3.0、3.5；醋酸鈉，pH4.0、4.5 和 5.0；組胺酸，pH6.0、6.5；咪唑，pH7.0；甘胺酸-甘胺酸 pH8.0、9.0、10.0。

下列的是在研究中所使用之添加物及其等濃度的列表：NaCl, 100mM；蔗糖 0.25M、0.50M；酚，0.5%；吐溫 80，0.01%；甘油 10%。

### 熱螢光穩定性測量

將 10 微升在 DMSO 中之 400X SYPRO 橘色蛋白質凝膠染色 5000X 濃縮物的溶液(Invitrogen Molecular Probes)、25 微升緩衝溶液和 10 微升蛋白質(10uM)，加至 96-孔 PCR 培養盤(Biorad)的孔中。以 Microseal B 有黏性之密封材料 MSB-1001(Biorad)密封該盤，並在 MyiQ 單-色即時 PCR 偵測系統(Biorad)中，以 0.5°C 之增量，從 25°C 加熱至 95°C。同時以電荷耦合元件(charge-coupled device, CCD)攝影機，監視在培養盤孔中的螢光改變。激發和發射波長分別

為 490 和 575 奈米。測定蛋白質無折疊轉變的中點溫度，是螢光強度的第一個微分最大值，為溫度之函數。

hzACO-1 和變體的熱螢光圖，顯示對 IgG 蛋白質的兩個預期溫度轉變，反映兩個主要的功能部位，Fc 和 Fab。蛋白質在較低 pH 下顯示出較低的  $T_m$ 。在 pH5.5 以上轉變中點反而是恆定的。

添加物對不同抗體的影響是相同的。通常，0.5M 的蔗糖有最大穩定化的影響，而 NaCl、酚和吐溫 80 的添加，似乎有去穩定化的影響。

在較低的 pH 值(pH3.5)下，在 hzACO-1 與不同變體之間觀察到穩定性的差異(圖 7A)。在此 pH 值下，雙突變種 hzACO-1-T28S-N31S 和單一突變種 hzACO-1-A93V 顯示出最高的穩定性。這在治療性抗體產物的純化製程中可能是很重要的，因為經常在 pH3.5-4.0 下進行病毒失活步驟。在較高的 pH 值下(pH4.5、5.5；分別為圖 7B 和 7C)，減少了在穩定性上的此項差異。

#### 溶液穩定性研究

在 40°C 下培養在 15mM 組胺酸 pH6.5、蔗糖 20 毫克/毫升和吐溫 80 0.01% 中之 hzACO-1-IgG4、hzACO-1-IgG1 和 hzACO-1-IgG2 的溶液，並在一開始和 5 週之後，收回試樣進行分析。使用尺寸排阻層析法 (size exclusion chromatography, SEC-HPLC) 測定完整蛋白質、可溶性聚集體及/或 hzACO-1 之片段的分布。使用高效率液體層析 (HPLC) 系統 1100 型或 1200 型的液體層析系統 (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA)，利用 BIOSEP SEC 3000 (Phenomenex)管柱，以 0.8 毫升/分鐘之流速，使用 pH7.2 之磷酸緩衝生理鹽水(PBS)作為移動相。藉著監視在 215 奈米處的 OD 值，偵測蛋白質。計算在總蛋白質區中每個高峰的百分比。

在圖 11 中出示形成 hzACO-1-同型物之高分子量形式的量，並清楚顯示 IgG4 構築體在培養期間顯示沒有任何聚集體形成，而 IgG1 和 IgG2 同型物兩者則形成高分子量變體。

此外，hzACO-1-IgG1 變體在培養後顯示出低分子量片段。該片段的量為 1.3%。

因此，從穩定性的觀點來看，hzACO-1 IgG4 是比相對應之 IgG2 和 IgG1 抗體更具吸引力的治療性分子。

#### 實施例 12-ADCC 分析

如同在實施例 6 中描述的，ACO-1 mAb 及其人類化版本可藉著抑制 IFN- $\alpha$  與第 I 型干擾素  $\alpha$  受體次單元 1 (IFNAR1)結合，來阻斷 IFN- $\alpha$  的活性。因此，人類化治療性 ACO-1 mAb 可與細胞表面結合，做出由抗體、IFN- $\alpha$  和 IFNAR2 構成的複合物。這提高了 ACO-1 誘導抗體依賴性細胞之胞毒性(ADCC)的風險。

為了這個目的，進行 ADCC 實驗，以評估 hzACO-1 抗體在 IFN- $\alpha$ 2A 存在下以 IgG4 亞型表現的能力。

#### 材料和方法

使用 Raji 細胞(人類 B 細胞株(ATCC#CCL-86))作為目

標細胞。將 Raji 細胞培養在補充有 10% 胎牛血清、10mM HEPES、1mM 丙酮酸鈉、1mM 穀胺醯胺、2.5 克/公升葡萄糖和 1% 青黴素/鏈黴素的 RPMI1640 中。本測定使用經高度純化的干擾素- $\alpha$ 2A。在使用之前，在報告子基因測定中測試蛋白質的生物活性。使用美羅華<sup>®</sup>(Nomeco A/S, Denmark)作為 ADCC 的陽性對照組，此時使用 Raji 細胞，其為表現 B 細胞表面抗原 CD-20 的 B 細胞株。

收穫目標細胞，並以血球計計數。將  $1.5 \times 10^6$  個細胞移至 15 毫升試管中並離心之。完全移除上清液，並將細胞小球每  $10^6$  個細胞再懸浮於 100 微居里  $^{51}\text{Cr}$ (鉻-51)中(根據蛻變表調整體積)。在  $37^\circ\text{C}$  下與 IFN- $\alpha$  培養 1 小時的期間內，每 15 分鐘放流至小瓶。隨後以培養基(RPMI1640, 10%FCS)沖洗細胞兩次，並再懸浮於 2 毫升測定培養基中。以 50 微升之體積，將 5000 個經  $^{51}\text{Cr}$  標示之細胞平鋪在 96 孔培養盤(平底)中。以一式三份分析所有的試樣，在沒有效應物細胞的孔中測定最大-和最小釋放。最大釋放：5000 個目標細胞/孔 + 1% 曲拉通 X-100。最小釋放：5000 個目標細胞/孔。使用標準技術，藉著 Ficoll 密度離心，從‘膚色血球層(buffy coat)’中純化效應物細胞。在各孔中加入按數目分級之新近分離的人類 PBMC。使用以下的效應物對目標(E:T)細胞比例：10、20、40 和 80。在所有的實驗中，以 10 微克/毫升(66nM)之飽和濃度測試 hzACO-1。以 0.5、2.5、5 和 10nM 測試 IFN- $\alpha$ 2A。終測定體積為 200 微升。在  $37^\circ\text{C}$  下培養 4 小時之後，將 30 微升上清液移至 LumaPlate<sup>TM</sup>，並讓它風

乾隔夜。在 TopCount NXT(PerkinElmer, USA)中測定放射性。將數據登入 GraphPrism® 程式中，並計算一式三份的每分鐘平均計數和相對應之標準偏差。

## 結果

如同在圖 12 中所見，對於在有或無 IFN- $\alpha$  之下，以 IgG4 表現的 hzACO-1 分子沒有觀察到任何超過背景(細胞或細胞與 IFN- $\alpha$ )的 ADCC。相反的，用來作為陽性對照組的美羅華，在不同比例的效應物和目標細胞比例(E:T)下，誘導細胞溶解。

## 實施例 13-補體結合 ELISA 測定

如同在實施例 6 中的描述，ACO-1 mAb 及其人類化版本可藉著抑制 IFN- $\alpha$  與第 I 型干擾素  $\alpha$  受體次單元 1 (IFNAR1)的結合，來阻斷 IFN- $\alpha$  的活性。因此，人類化治療性 ACO-1 mAb 可與細胞表面結合，做出由抗體、IFN- $\alpha$  和 IFNAR2 構成的複合物。這提高了活化補體系統並誘導補體依賴性胞毒性(CDC)的風險。

本補體結合研究的目的是測試當以人類 IgG4 同型物表現 hzACO-1，與在 hIFN- $\alpha$  上相對應之抗原決定基結合並形成複合物時，是否活化典型的補體路徑。這可藉著使用測量抗體對 C4 之結合的 ELISA 來完成。C4 的結合表示改變了 C1s 並業已開始補體級聯。一旦 C4 已經結合，便會轉而活化來自血漿的其他補體組份，其結合並以酵素方式切開級聯的下一個組份。

## 材料和方法

使用經鏈黴菌抗生物素蛋白-塗佈的微量滴定盤 (236001, NUNC) 作為 ELISA 盤。使用經生物素基化之 hIFN- $\alpha$ 2A 作為抗原來源，並以 100 微升/孔 0.25 微克/毫升以沖洗緩衝溶液 (10mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>+145mM NaCl+0.05% 吐溫 20) 稀釋之蛋白質塗佈該盤。顯示該 hIFN- $\alpha$  濃度為在 ELISA 中最佳的塗佈濃度。在室溫下培養該盤 60 分鐘，並溫和地搖動，然後以沖洗緩衝溶液沖洗五次，將最後一次沖洗的緩衝溶液留在盤中 30 分鐘，以阻斷在盤中可能的殘餘結合位置。拋棄盤中的緩衝溶液，並以 1 微克/毫升在盤中加入 100 微升以沖洗緩衝溶液稀釋的 hzACO-1 mAb。在室溫下培養該盤 60 分鐘，並溫和地搖動。以沖洗緩衝溶液沖洗該盤五次。藉著 hzACO-1 IgG4 mAb 的交聯，使用多株抗 IgG4 pAb 作為陽性對照組。以沖洗緩衝溶液稀釋抗 IgG4 pAb mAb，並以從 32 微克/毫升到 32 毫微克/毫升的連續稀釋，以 100 微升/孔加至該盤。使用兩種不同純化的抗 IgG4 pAb，一個經親和力純化的抗體和一個經蛋白質 A 純化的抗體。在室溫下培養該盤 60 分鐘，並溫和地搖動。以沖洗緩衝溶液沖洗該盤五次。以 100 微升/孔加入以血漿緩衝溶液 (PBS 帶有 0.3mM Ca<sup>2+</sup>、1mM Mg<sup>2+</sup>) 稀釋 1:200 的人類血漿。在 37°C 下培養該盤 60 分鐘，並溫和地搖動。沖洗該盤五次，並以 100 微升/孔，在該盤中加入以沖洗緩衝溶液分別稀釋 1:2000 之小鼠抗人類 C4 (HYB162-02+HYB162-04, SSI)。在室溫下培養該盤 60 分鐘，並溫和地搖動。以沖洗緩衝溶液沖洗該盤五次，然後加入 100 微升/孔，以沖洗緩衝溶液

稀釋 1:1000 的 HRP 兔子抗小鼠 IgG(DAKO P0260)。沖洗該盤五次，並在所有的孔中加入 100 微升 TMB 受質。在培養大約 6 分鐘之後，在所有的孔中加入 100 微升 4M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>，以中止酵素反應。藉著 Victor 培養盤判讀器 (Wallac)，以分光光度法測量顏色。

### 結果

藉著 ELISA，使用以 IFN- $\alpha$  塗佈之培養盤，針對其與補體組份結合的能力，測試以人類 IgG4 同型物表現的 hzACO-1。藉著偵測與 C4(其為在典型補體級聯中的組份之一)的結合而使其可見。如同在圖 13 中所示，hzACO-1 IgG4 不能固定補體。使用多株抗 IgG4 pAb 作為陽性對照組，以誘導藉著 hzACO-1 IgG4 抗體之交-聯的結合。若 hzACO-1 與抗 IgG4 pAb 交叉結合，則偵測到 C4 與抗 IgG4 的明確劑量依賴性結合。

### 實施例 14-抗體同型物的選擇

當表現人類化單株抗體時，需要就全長人類抗體的表現來選擇人類抗體同型物。為了發展中和性抗 IFN- $\alpha$  抗體，必須沒有任何 Fc-介導之效應物功能。

而且，雖然 ACO-1 衍生之抗體能夠中和 IFN- $\alpha$  活性(實施例 9 和 實施例 10)，但如同在 實施例 6 中 描述的，ACO-1 抗體變體的結合性抗原決定基可與 IFNAR2 受體次單元和 IFN- $\alpha$  的同時結合相容。因此，雖然治療性 hzACO-1 mAb 與可溶性 IFN- $\alpha$  細胞介素結合，但事實上 mAb 能夠經由 IFN- $\alpha$ /IFNAR2 複合物手與細胞表面結合，藉著招募 Fc 介導

之效應物功能而引起胞毒性。除此之外，關於對抗第 I 型 IFNs(IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ )的抗體，選擇抗體同型物是特別重要的，因為已經描述了抗 IFN mAbs 的 Fc 部分實際上會引起不想要的生物學影響，結果在如下述的某些細胞類型中，產生增效作用，代替 IFN 的中和作用 (Moll HP 等人 J Immunol 180, 1594-604, 2008)。

在第 I 型 IFNs 存在下，正常在其他細胞類型中中和 IFN 活性之對抗人類 IFN- $\alpha$  或 IFN- $\beta$  的抗體，在人類內皮細胞和 PMBCs 中，在 IFN- $\alpha$  或 IFN- $\beta$  的存在下，改而誘導 IFN 活性。在這些研究中使用的抗體是屬於小鼠 IgG1 同型物，已知其與人類 Fc 受體交叉結合。僅對完整抗體看到 IFN 活性的誘導，對相同抗體的 Fab 或 Fab2 片段則否，且似乎藉著以抗體同型物對照組 mAb 阻斷 Fc 受體而抑制。因此，雖然該現象之分子機制是未知的，但顯然需要這些 mAbs 經由 Fc 部分與細胞表面受體結合。此外，該現象似乎是第 I 型 IFNs 特有的，如對抗第 II 型 IFN，IFN- $\gamma$  的抗體，但對於對抗第 I 型 IFN 受體，IFNAR 之抗體並沒有觀察到類似的現象。(Moll HP. 等人 J Immunol 180, 1594-604, 2008)。

總之，對於治療性抗 IFN mAb 的發展而言，不需要中和 IFN- $\alpha$  Fc 介導之效應物功能，且事實上可能藉著在以抗 IFN $\alpha$  mAb 治療之患者的某些細胞類型中引起胞毒性或增效性 IFN 活性，而引起不想要的生物學影響。因此，人類化 mAb 的產製不能引起效應物功能可能是關係重大的。

現存有四種不同的人類抗體同型物，即 IgG1、IgG2、

IgG3 和 IgG4。其中 IgG1 和 IgG3 在與 Fc 受體和補體結合上是最有效的，因此引起 Fc 介導之效應物功能的活化，如 - 依賴性細胞之胞毒性 (ADCC) 和補體依賴性胞毒性 (CDC) (Salfeld JG. Biotechnol 25, 1369-1372, 2007)。已經在文獻中描述了廢除各種 Fc 受體和 C1q 結合的突變 (Hezareh M. 等人 J Virol 75, 12161-12168, 2001; Idusogie EE. 等人 J Immunol 164, 4178-4184, 2000; Lund J. 等人 J Immunol.; 147:2657-6, 1991; 以及 Chappel 等人 1991, Canfield MS 等人 J Exp Med. 173:1483-91, 1991)。然而，選擇例如 IgG1 同型物，並包含數個突變，結果可能會產生免疫原性，並在人體中引起對抗 Fc 部分的免疫反應，因為這類經修改之 Fc 區並不是天然出現在人類中的。

為了那個理由，以 IgG2 和 IgG4 同型物表現 hzACO-1 抗 IFN- $\alpha$  mAb，在一些治療性抗體中使用這兩者 (Salfeld JG. Biotechnol 25, 1369-1372, 2007)。意外地，IgG4 構築體的表現水平明顯比 IgG2 hzACO-1 變體高 (實施例 5)，這會大大地改善生產量。此外，IgG2 hzACO-1 分子而不是 IgG4 變體有聚集的傾向 (實施例 11)。認為這在藥物發展中是嚴重的問題，因為聚集可能在生產期間降低產量、限制儲存壽命，且結果因為增加免疫原性而在患者中導致降低的效力。

因此，選擇 hzACO-1 IgG4 構築體，在 IFN- $\alpha$  存在下的 ADCC 測定中，以及在補體固定 ELISA 測定中進一步定性，如同分別在實施例 12 和 13 中描述的。這些數據證實

hzACO-1 IgG4 分子確實不能引起不想要的胞毒性。在 PBMC 和 EC 中亦可證實如預期地缺少 IFN- $\alpha$  活性之增效作用，如同在 Moll 等人 2008 中描述的。

總之，hzACO-1 IgG4 分子似乎是特別適合的治療性分子，因為它能夠中和 IFN- $\alpha$ ，但不會誘導由 Fc-介導之效應物功能引起的不想要副作用，包括胞毒性和 IFN 活性的增效作用，且因為它是穩定且完美表現的分子，使其適用於製造及投予患者。

#### 實施例 15-T 細胞抗原決定基的分析

基於免疫原性預測的標準技術 (De Groot, A.S. 和 Moise, L. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 10, 332-340, 2007)，使用由 ProPred(Singh, H. & Raghava, G.P. ProPred. BioIFINormatics. 17, 1236-1237, 2001) 擴大的袋狀輪廓法 (pocket profile method)(Sturniolo, T. 等人 Nat. Biotechnol. 17, 555-561, 1999)，預測在 51 個 HLA-DRB 對偶基因中之線性 T-細胞抗原決定基。該方法計算可與在接受評估之蛋白質內之特定 9 個殘基長的肽結合之對偶基因的數目。若與許多對偶基因結合的特定肽是非人類來源的，便可用來作為免疫原性的間接測量。若該肽為人類來源的，則預期沒有任何的免疫反應，因為相對應 T-細胞的早期否定選擇。

本實施例之目的是比較全長 hzACO-1-kabat CDRH2 所使用之人類化程序與施用於 hzACO-1 之現行人類化程序的經預測免疫原性。

當對 ProPred 演算法輸入序列時，使用全長的 ACO-1

CDR\_H2，帶有加在 hzACO-1-kabat CDRH2 周圍的 10+10 個殘基：

APGQGLEWMG/EINPSHGRTIYNENFKS/RVTMTRDTS  
T(CDR\_H2\_全)，

連同在相同區域之相當的 hzACO-1 序列

APGQGLEWMG/EINPSHGRTIYAQKFQG/RVTMTRDTS  
T(CDR\_H2\_人類)。

通過 T-細胞抗原決定基預測器跑 CDR\_H2\_全，得到下列 3 個抗原決定基：WMGEINPSH(與 4% HLA-DRB 對偶基因結合)、INPSHGRTI(6%) 和 FKS RVTMTR(24%)。至於 CDR\_H2\_人類，前兩個次要抗原決定基是相同的，但最後一個主要抗原決定基則換成 FQGRV TMTR(27%)。即使它仍是 T-細胞抗原決定基，它現在卻完全是人類序列，且從藉著在胸腺中之否定選擇刪除自我反應性 T-細胞的假定，已經藉著 CDR\_H2\_人類序列移除在 CDR\_H2\_全中這個可能的主要抗原決定基。

因此預期 hzACO-1 具有比經傳統 CDR 移植之人類化 ACO-1 低的免疫原性。

#### 實施例 16-CDR 截短

如同在實施例 2 中的描述，藉著非傳統方法將小鼠 ACO-1 抗體人類化。這制定了殘基遮罩的設計，基於 hzACO-1 和 IFN- $\alpha$  的 3D 模型而預測其包括抗原互補位。該人類化方法的應用，結果產生 hzACO-1 抗體，其具有比藉著單純 CDR 移植人類化之抗體少的鼠類殘基，因為包括經

## 序列表

<110> 諾佛 儂迪克股份有限公司

<120> 抗人類干擾素- $\alpha$ 的人類化抗體

<130> 7815

<160> 32

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠(mus musculus)

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe  
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Phe  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115

<210> 2

<211> 113

<212> PRT

<213> 現代人(Homo Sapiens)

<400> 2

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

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

Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

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

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

Ser

<210> 3  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人造的

<220>  
 <223> 人類化鼠類序列

&lt;400&gt; 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe  
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Phe  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 4  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

&lt;400&gt; 4

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 5  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 現代人

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 人造的

<220>  
 <223> 人類化序列

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser			
20	25	30	
Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro			
85	90	95	
Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
100	105		
<210> 7			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 小鼠			
<400> 7			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Glu Asn Phe			
50	55	60	
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Ile Val Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Val Arg Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Val			
115			
<210> 8			
<211> 113			
<212> PRT			
<213> 現代人			

&lt;400&gt; 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe  
 50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser

<210> 9  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

&lt;400&gt; 9

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Phe Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 10  
 <211> 109

<212> PRT  
<213> 現代人

<400> 10

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

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser  
20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp  
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 11  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人造的

<220>  
<223> 引子

<400> 11  
ctgggccagg tgctggagg 19

<210> 12  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人造的

<220>  
<223> 引子

<400> 12  
ctaacactca ttccctgttga agctc 25

<210> 13  
<211> 414  
<212> DNA  
<213> 小鼠

<400> 13  
atgggatgga gctatatcat gcttttttgg tagcaacag ctacagatgt ccactcccaag 60  
gtccaaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120  
tgtaaggctt ctggctacac cttcaccaac tactggatgc actgggtgaa gcagaggcct 180  
ggacaaggcc ttgagtgat tggagagatt aatccttagcc acggcgtac tatctacaat 240

gaaaacttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccatcac agccttcatg 300  
 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggcttatt tctgtcaag agggggactg 360  
 ggaccggcct ggttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 414

<210> 14  
 <211> 393  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠

<400> 14  
 atggatttgc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatacgtgtctcataatgtcc 60  
 agaggacaaa ttgttctcac ccagtcctca gcaatcatgt ctgcttctcc tggggagaag 120  
 gtcacccctga cctgcagtgc cggctcaagt gtagattcca gctatttgcatacttaccag 180  
 cagaagccag gatcctcccc caaactctgg atttatacgacatccaaaccttggatcc 240  
 gtccctgctc gcttcagttgg cagtgggtctt gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300  
 atggaggctg aagatgcgtc ctcttatttc tgccatcagt ggagtagtta cccattcacg 360  
 ttcggctcgg ggacaaaattt ggaaataaaaaa cgg 393

<210> 15  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 15

Asn Tyr Trp Met His  
1 5

<210> 16  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 16

Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe Lys  
1 5 10 15

Ser

<210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 17

Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 18  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 18

Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser Tyr Leu Tyr  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 19

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 20

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人造的

<220>  
 <223> 人類化鼠類序列

<400> 21

Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 22  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 22

Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠

<400> 23

Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Glu Asn Phe Lys  
 1 5 10 15

Ser

<210> 24  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 24

Ser Ala Gly Ser Ser Val Gly Ser Ser Tyr Phe Tyr  
 1 5 10

<210> 25  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 小鼠  
 <400> 25

Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 26  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人造的

<220>  
 <223> 引子

<400> 26  
 ctagctagct catttacccg gagaccggga gatgg

35

<210> 27  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人造的

<220>  
 <223> 引子

<400> 27  
 gctctaacac tcattcctgt tgaagctctt g

31

<210> 28  
 <211> 414  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠

<400> 28  
 atgggatgga gctatatcat cctcttttg gtagcagcag ctacagatgt ccactccag 60  
 gtccaaactgc agcagcctgg ggctgaactg gtgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120  
 tgcaaggcct ctggctacag cttcaccagc tactggatgc actgggtgaa gcagaggcct 180  
 ggacaaggcc ttgagtgat tggagagatt aatcctagcc acggtcgtac tagctacaat 240  
 gagaacttca agagcaaggc cacactgact gtagacaaat cctccaacat agtctacatg 300  
 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gcggcttatt actgtgtaaag agggggactg 360  
 ggacccgcct gtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgta 414

<210> 29  
 <211> 393  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠

<400> 29  
 atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaatca gtgtctcagt cataatgtcc 60  
 agaggacaaa ttgttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcacatctcc tggggagaag  
 gtcacccctga cctgcagtgc cggctcaagt gtagggttcca gctacttttta ctggtaccag  
 cagaagccag gatcctccccc caaactctgg atttatggca catccaacct ggcttctgga  
 gtccctgctc gcttcagtgg cagtggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc  
 atggaggctg aagatgctgc ctcttatttc tgccatcaagt ggagtagtta tccattcacg  
 ttcggctcgg ggacaaaatt ggaaataaaa cg 393

<210> 30  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> 現代人

<400> 30

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu Ile  
 1 5 10 15

Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys Asp  
 20 25 30

Arg His Asp Phe Glu Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Asp Lys Gln Phe  
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Thr  
 50 55 60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Leu Asp Glu Thr  
 65 70 75 80

Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Ile Glu Leu Asp Gln Gln Leu Asn Asp Leu  
 85 90 95

Glu Ser Cys Val Met Gln Glu Val Gly Val Ile Glu Ser Pro Leu Met  
 100 105 110

Tyr Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr  
 115 120 125

Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Ser Cys Ala Trp Glu Val Val  
 130 135 140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Ile Asn Leu Gln Lys  
 145 150 155 160

Arg Leu Lys Ser Lys Glu  
 165

<210> 31  
 <211> 220  
 <212> PRT

• <213> 人造的

<220>

• <223> 人類化序列

<400> 31

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys  
210 215 220

<210> 32

<211> 215

<212> PRT

<213> 人造的

<220>

<223> 人類化序列

&lt;400&gt; 32

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser  
20 25 30Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
35 40 45Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser  
50 55 60Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu  
65 70 75 80Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
85 90 95Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
100 105 110Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser  
115 120 125Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu  
130 135 140Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser  
145 150 155 160Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu  
165 170 175Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val  
180 185 190Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys  
195 200 205Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98115102

A61K 39/395 (2006.01)

※申請日：98.5.7

C07K 16/24 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 29/00 (2006.01)

抗人類干擾素- $\alpha$ 的人類化抗體

Humanized antibodies against human interferon-alpha

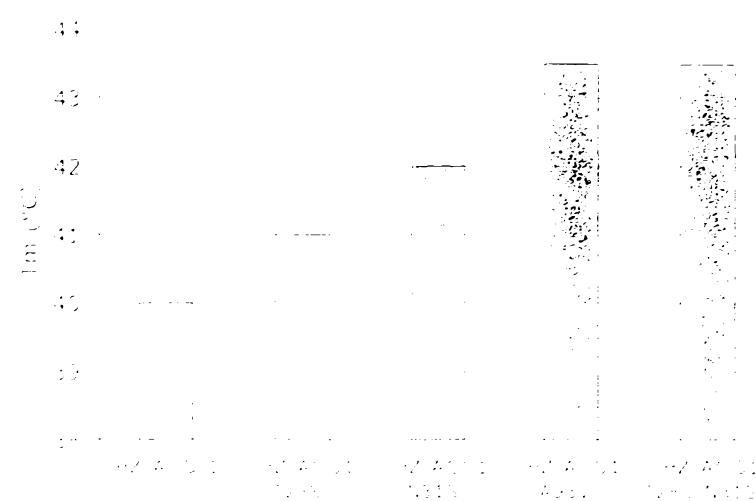
## 二、中文發明摘要：

本發明提供人類化抗人類 IFN- $\alpha$  單株抗體，其可用於人類之治療應用。較佳的抗體是鼠類抗體 ACO-1 和 ACO-2 的人類化版本，及其變體。

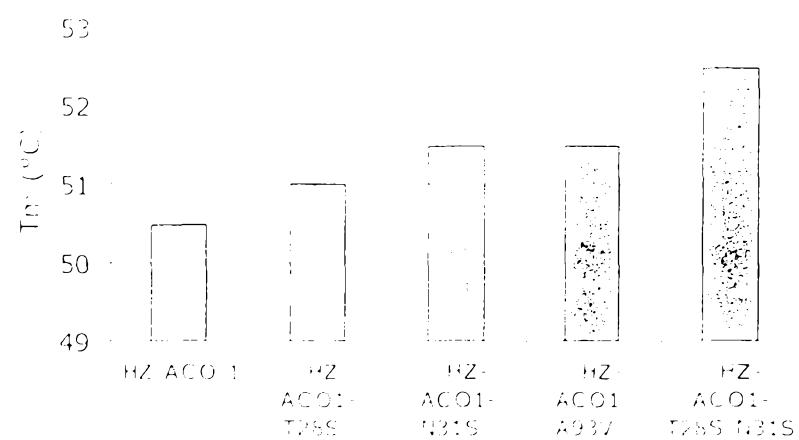
## 三、英文發明摘要：

The present invention provides humanized anti-human IFN- $\alpha$  monoclonal antibodies useful for therapeutic applications in humans. Preferred antibodies are humanized versions of murine antibodies ACO-1 and ACO-2, as well as variants thereof.

A



B



C

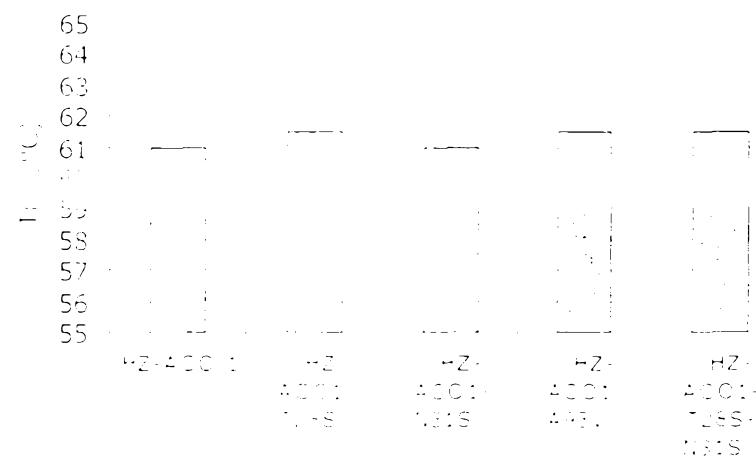


圖 7

I453032

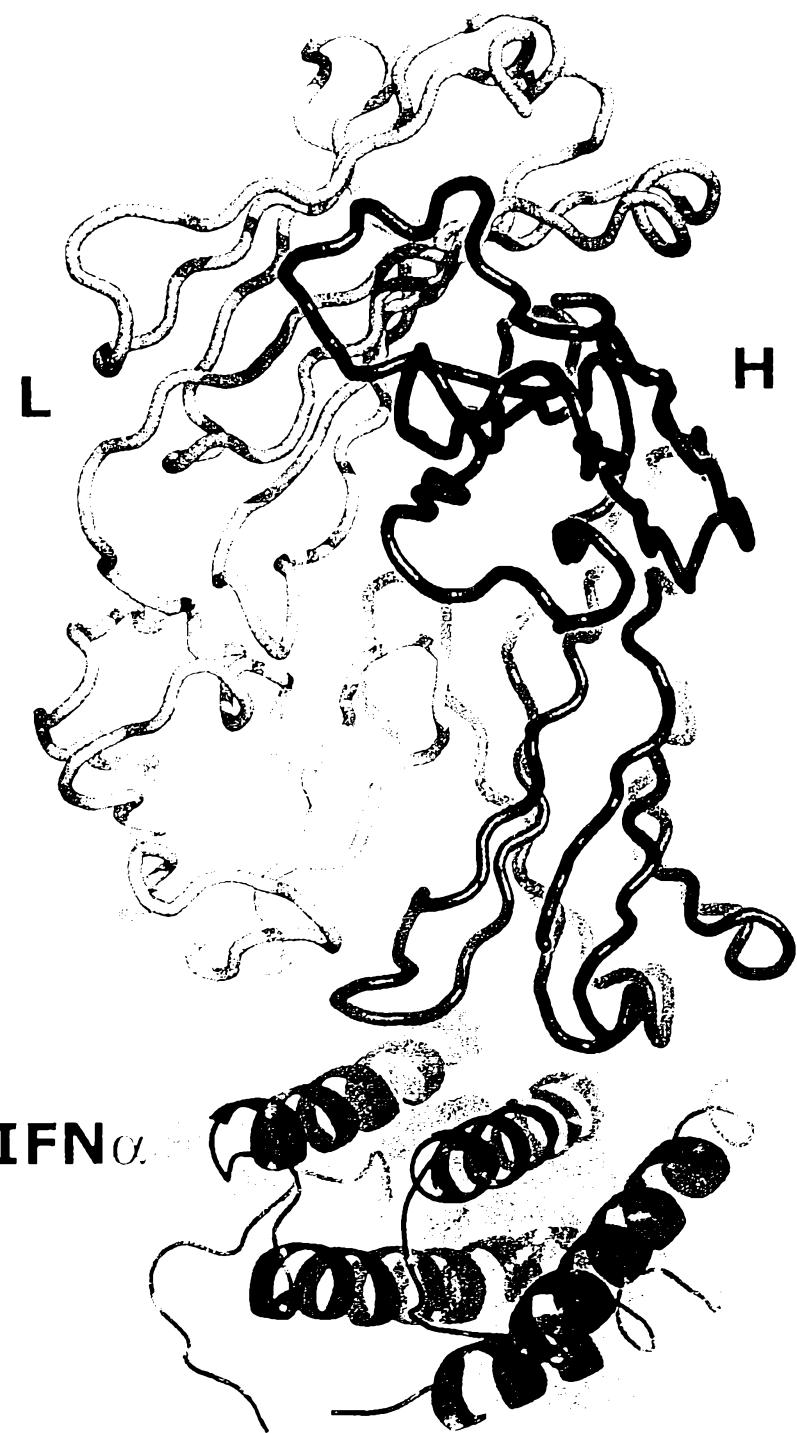


圖8

I453032

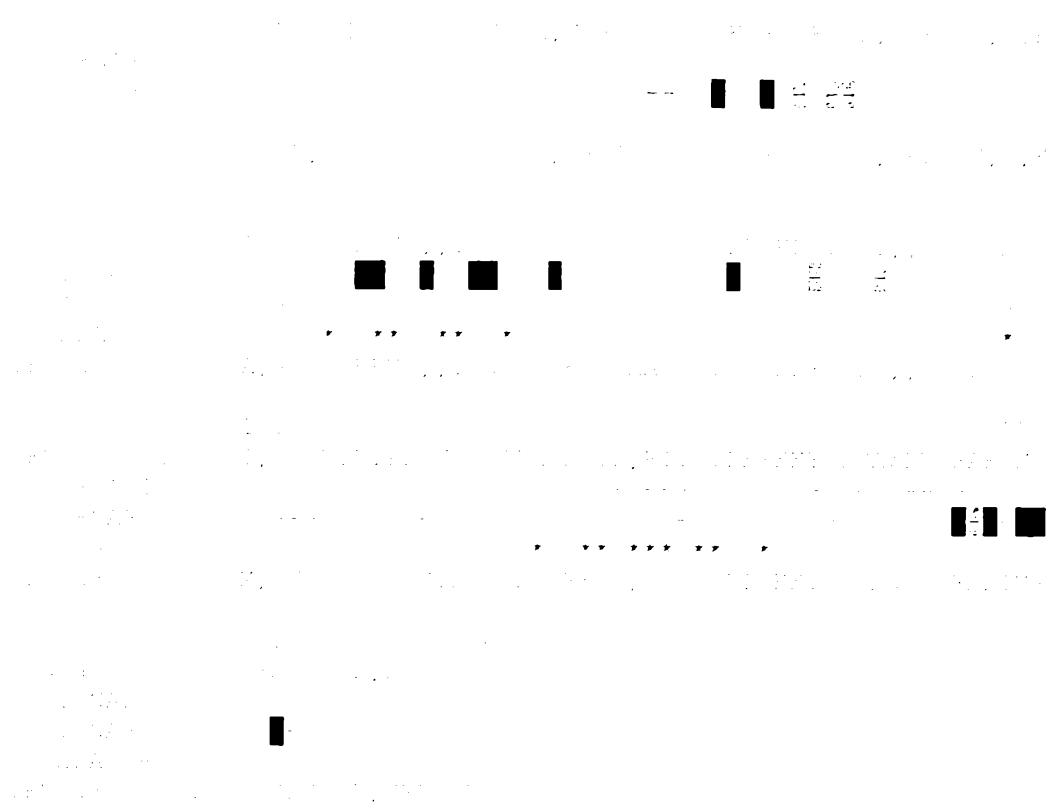


圖9

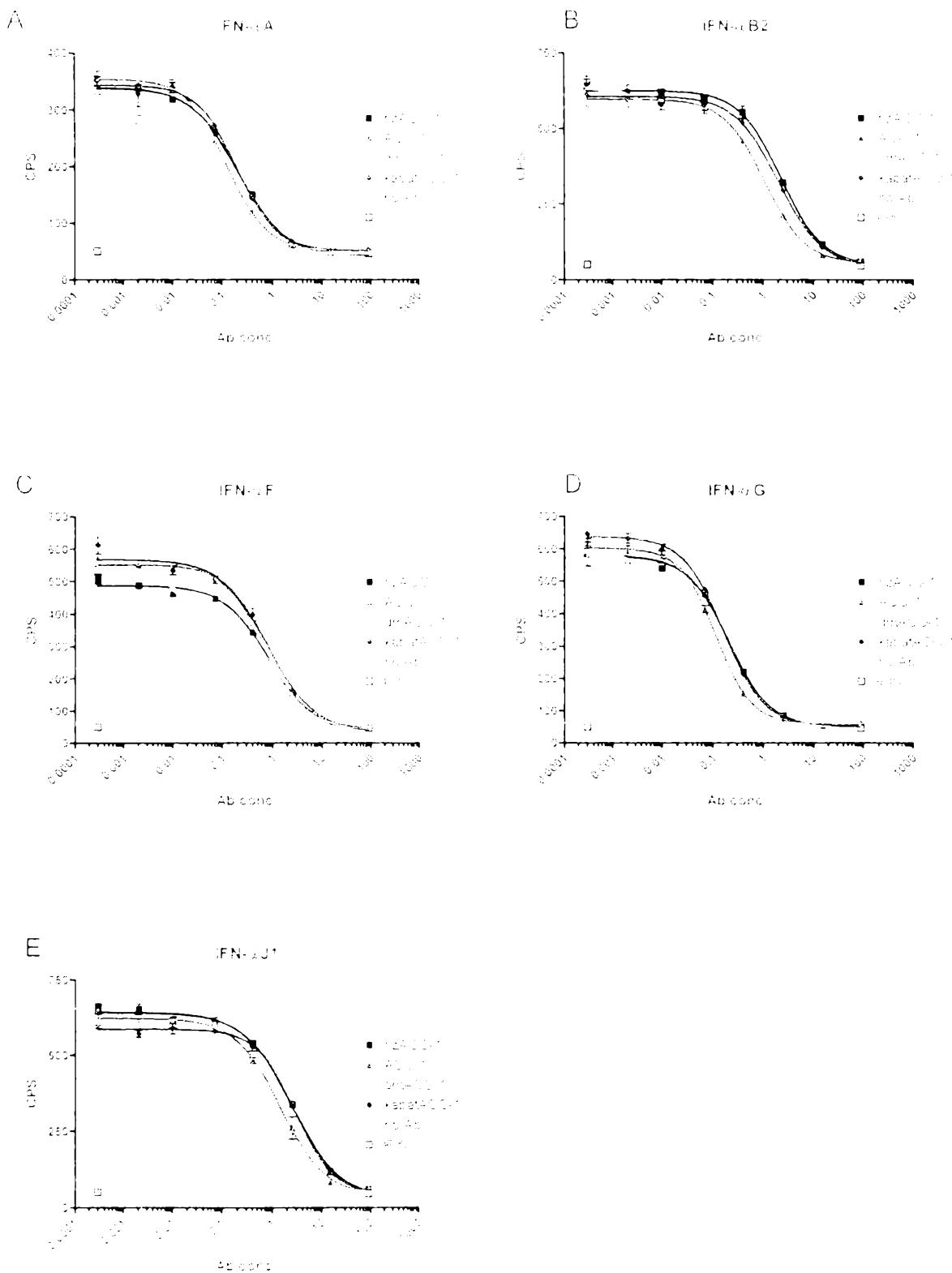


圖 10



四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（1）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無



103年2月24日修正替換頁

最適化 hzACO-1 CDRH2 序列之 5C-端胺基酸的肽，與相對應之人類架構序列是相同的。相反的，在經傳統 CDR 移植之人類化抗體(hzACO-1-kabat CDRH2)中的相對應肽序列則是鼠類來源的。因此，該人類化程序結果產生具有較多人類序列的人類化抗體，較不可能在患者中引起免疫原性。CDR H2 序列的分析，顯示藉著在 hzACO-1 中減少小鼠胺基酸殘基，移除在小鼠胺基酸中所含有之 MHC 第 II 類 T 細胞抗原決定基，並完全以人類的置換，預期患者會較能容忍它。因此，這證實預期 hzACO-1 會有比經傳統 CDR 移植之人類化 ACO-1 抗體少的免疫原性。

如同在實施例 8 中所示，保留 hzACO-1 抗體的親和力在小鼠 ACO-1 抗體的兩倍以內。因此，不需要更多的小鼠回復突變。此外，亦已經保留抗體的 IFN- $\alpha$  亞型輪廓、結合並中和 IFN- $\alpha$ 1/D 以外所有的 IFN- $\alpha$  亞型，如同在實施例 8、9 和 10 中所述。儘管在 CDR H2 含有較少的小鼠胺基酸，但 hzACO-1 的親和力與 hzACO-1-Kabat CDRH2 抗體(其含有得自小鼠 ACO-1 抗體的全長小鼠 CDR H2)之親和力和效力是相同的(分別在實施例 8 和 9)。

再者，在重鏈之位置 60-62 中，藉著使用所描述之人類化方法，以序列 AQK 置換取代 NEN，具有避免兩個天冬醯胺的優點，其可能有脫醯胺的傾向。脫醯胺改變了蛋白質的淨電荷，其可能影響穩定性及/或專一性。藉著保持序列 AQK，會更完美地保護 hzACO-1 的均一性。比較 hzACO-1 和經傳統 CDR 移植之 hzACO-1-Kabat CDRH2 版本，顯示

103年2月21日修正  
頁(本)對線

103年2月21日修正替換頁

hzACO-1 是極為穩定的蛋白質，而 hzACO-1-Kabat CDRH2 意外地有聚集的傾向(實施例 11)。認為聚集在藥物發展中是嚴重的問題，因為聚集可能在生產期間導致降低的產量、限制儲存壽命，並因為增加免疫原性而在患者中導致降低的效力。此外，hzACO-1 構築體的表現水平意外地是 hzACO-1-Kabat CDRH2 變體的兩倍(實施例 5)。

總之，藉著新穎方法人類化的 hzACO-1 IgG4 抗體，結果產生了治療性抗體，其具有較少的小鼠胺基酸，較不可能在患者中引起免疫原性。儘管含有較少的得自原始小鼠 mAb 之胺基酸，該人類化抗體仍具有可與小鼠抗體和藉著傳統 CDR 移植產生之人類化版本相比擬的親和力、效力和 IFN- $\alpha$  亞型輪廓。而且，hzACO-1 抗體較沒有脫醯胺的傾向，且具有較高的表現水平。因此，hzACO-1 抗體是穩定且完美表現的分子，適用於製造及投予患者。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 顯示用於人類化之鼠類 ACO-1 VH (重鏈) (A) 和 VL (輕鏈) (B) 序列的分析 (hz=人類化)，其中以陰影顯示遮罩，以粗體顯示 Kabat CDR，以下標線顯示在小鼠序列和人類生殖種系序列之間的差異，以粗體下標線顯示可能經體細胞超突變(hypermutated)之殘基，並以陰影下標線顯示可能的回復突變殘基。ACO-1 VH=SEQ ID NO:1；人類生殖種系 VH1\_46/JH4=SEQ ID NO:2；hzACO-1 VH=SEQ ID NO:3；ACO-1 VL=SEQ ID NO:4；人類生殖種系 VK III



\_L6/JK2 =SEQ ID NO:5；hzACO-1 VL=SEQ ID NO:6。

圖 2 顯示在 ACO-1 和 ACO-2 VH(重鏈)(A)和 VL(輕鏈)(B)序列，以及相對應之小鼠生殖種系序列之間的排比。ACO-2 VH=SEQ ID NO:7；小鼠生殖種系 J558.33/D/JH3\_1=SEQ ID NO:8；ACO-2 VL=SEQ ID NO:9；小鼠生殖種系 ae4/JK4\_1=SEQ ID NO:10。

圖 3 顯示為了導入 hzACO-1 內而選擇的在重鏈(A)與輕鏈(B)中 ACO-2 殘基的位置。

圖 4 顯示在 CPE 測定中，除了 IFN- $\alpha$ D 和 IFN- $\alpha$ 1 之外所有受試干擾素亞型之保護效果的 hzACO-1 抑制。

圖 5 藉由報告子基因(reporter gene, RG)測定顯示 12 個 IFN- $\alpha$  物種的 hzACO-1 抑制。將每個抗體濃度的數值標準化，並計算四個重複的平均值。以平均值 +/- 標準偏差顯示數據。使用 Prism 軟體計算最佳配適 S 形反應曲線。對所有的數據組而言，R<sup>2</sup> 值均大於 0.98(除了 IFN- $\alpha$ D，沒有對其進行曲線擬合)。

圖 6 顯示使用 IFN- $\alpha$ A(A)或 IFN- $\alpha$ F(B)，hzACO-1 與具有單一 ACO-2-衍生之突變 A93V 的 hzACO-1 變體的 RG 測定比較。按照在圖 5 中所描述者進行數據計算。IC<sub>50</sub> 值是針對 hzACO-1 之值標準化；對於 IFN- $\alpha$ A，ACO-1 之 IC<sub>50</sub> 相對值為 0.473 而 hzACO-1 A93V 之 IC<sub>50</sub> 相對值為 0.332。對於 IFN- $\alpha$ F，ACO-1 之 IC<sub>50</sub> 相對值為 0.277 且 hzACO-1 A93V 之 IC<sub>50</sub> 相對值為 0.156。

圖 7 顯示 hzACO-1 和變體在 pH3.5(A)、4.5(B)和 5.5(C)

103年2月21日修正  
頁(本)對錄

103年2月21日修正替換頁

的轉變溫度，沒有添加物。

圖 8 顯示與 IFN- $\alpha$ 8 結合之 hzACO-1 Fab 片段鏈(H、L)的結構，其係藉由 X 射線結晶學測定。

圖 9 顯示對 IFNAR1 和 IFNAR2 的 IFN- $\alpha$ 8 結合性抗原決定基 (Quadt-Akabayov S.R. 等人 Protein Sci. 15, 2656-2668, 2006 和 Roisman L.C 等人 J. Mol. Biol. 353, 271-281, 2005)，以在 IFN- $\alpha$ 8 序列下面的有色方塊表示。藉著灰色方塊表示的殘基，在所有 IFN- $\alpha$  亞型中部分保留，而以黑色方塊表示的殘基則是完全保留。以在 IFN- $\alpha$ 8 之胺基酸序列上方的「★」表示在 IFN- $\alpha$ 8 上的 hzACO-1 結合性抗原決定基（使用 4 $\text{\AA}$  間隔截止）。

圖 10 顯示在 RG 測定中，小鼠 ACO-1 mAb 對 hzACO-1 及其兩個變體的比較。一變體為帶有完整 CDRH2 的人類化 ACO-1(稱為 hzACO-1-kabat CDRH2)，而 hzACO-1 是按照在實施例 2 中的描述，以較短的 CDRH2 建構。此外，該圖顯示另一個經突變的 hzACO-1，其已經由合理的設計針對與 IFN- $\alpha$ s 的交互作用將最適化(hzACO-1 Y32E、T30R)。如指示，針對對五種不同的代表性 IFN- $\alpha$  亞型的抑制，比較這四個重組的 mAb 變體。

圖 11 顯示以人類 IgG1、IgG2 和 IgG4 同型物表現之 hzACO-1 的蛋白質穩定性研究。在組胺酸緩衝溶液中培養 5 週之後，藉著 HPLC 測定聚集作用。

圖 12 顯示藉著 hzACO-1 IgG4、IFN- $\alpha$  及其不同組合，在不同的效應物：目標細胞比例(E:T)下，說明缺少 ADCC

的  $^{51}\text{Cr}$  釋放測定。細胞 + 單獨 PBMC 但沒有 IFN- $\alpha$  或 hzACO-1 決定背景溶解，而曲拉通 (Triton)-X 100 說明最大溶解。納入美羅華 (Rituxan) 作為陽性對照組，並在所有的 E:T 比例下誘導可偵測的細胞溶解。

圖 13 顯示藉由 ELISA 的補體結合研究。表現成 IgG4 的 hzACO-1 當與 IFN- $\alpha$  結合時不能固定補體。作為陽性對照組，hzACO-1 與抗 IgG4 pAb 交叉結合，並偵測到 C4 對抗 IgG4 之明確的劑量依賴性結合。

#### 【主要元件符號說明】

無

## 七、申請專利範圍：

1. 一種人類化抗 IFN- $\alpha$  抗體或其抗原結合性片段，其包括以下 VH CDR 序列：

- (a) 包括 SEQ ID NO: 15 ( NYWMH ) 的 CDR H1 序列；
- (b) 包括 SEQ ID NO: 21 的 CDR H2 序列；與
- (c) 包括 SEQ ID NO: 17 的 CDR H3 序列；

且進一步包括以下 VL CDR 序列：

- (d) 包括 SEQ ID NO: 18 ( SAGSSVDSSYLY ) 的 CDR L1 序列；
- (e) 包括 SEQ ID NO: 19 ( STSNLAS ) 的 CDR L2 序列；與
- (f) 包括 SEQ ID NO: 20 的 CDR L3 序列。

2. 如申請專利範圍第 1 項之抗體或其抗原結合性片段，其中該抗體或其抗原結合性片段包括包含 SEQ ID NO:3 的 VH 區與包含 SEQ ID NO:6 的 VL 區。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之抗體或其抗原結合性片段，其為 IgG4 亞型。

4. 如申請專利範圍第 1 項之抗體或其抗原結合性片段，其中該抗體或其抗原結合性片段包括包含含有 SEQ ID NO:3 之 T30R 突變的序列的 VH 區。

5. 一種產生如申請專利範圍第 1-4 項中任一項之抗體或其抗原結合性片段的方法，其中該方法包括在適當的條件下培養編碼該抗體或其抗原結合性片段之宿主細胞，並隨後分離該抗體或其抗原結合性片段。

6. 一種抗體或其抗原結合性片段，其係藉著如申請專利範圍第 5 項之方法獲得。

7. 一種組合物，其包括如申請專利範圍第 1-4 和 6 項中任一項之抗體或其抗原結合性片段。

8. 一種製備如申請專利範圍第 7 項之組合物的方法，其中該方法包括將抗體或其抗原結合性片段與賦形劑混合。

9. 一種組合物，其可藉著如申請專利範圍第 8 項之方法獲得。

10. 一種如申請專利範圍第 1-4 和 6 項中任一項之抗體或其抗原結合性片段的用途，其係用於製造供預防、管理、治療、或改善與 IFN- $\alpha$  有關之發炎性疾病或病症之用的醫藥品。

11. 如申請專利範圍第 10 項的用途，其中該醫藥品係適合用來治療發炎性疾病或病症。

12. 一種專一地結合人類干擾素- $\alpha$  的人類化抗體或其抗原結合性片段，其中該抗體或其抗原結合性片段包括以下 VH CDR 序列：

- (a) 包含 SEQ ID NO: 15 ( NYWMH ) 的 CDR H1 序列；
- (b) 包含 SEQ ID NO: 21 的 CDR H2 序列；與
- (c) 包含 SEQ ID NO: 17 的 CDR H3 序列；

且更包括以下 VL CDR 序列：

- (d) 包含胺基酸序列 SAGSSVDSSELY 的 CDR L1 序列；
- (e) 包含 SEQ ID NO: 19 ( STSNLAS ) 的 CDR L2 序列；與

(f) 包含 SEQ ID NO: 20 的 CDR L3 序列。

13. 如申請專利範圍第 12 項之抗體或其抗原結合性片段，其中該重鏈進一步具有鄰接於該 CDR H1 的胺基酸殘基 R，以使得該重鏈之胺基酸序列進一步包括胺基酸序列 RNYWMH。

14. 如申請專利範圍第 12 或 13 項之抗體或其抗原結合性片段，其中該重鏈進一步具有在位置 93 的胺基酸殘基 V。

15. 如申請專利範圍第 12 項之抗體或其抗原結合性片段，其為 IgG4 亞型抗體。

16. 如申請專利範圍第 12 項之抗體或其抗原結合性片段，其為抗體片段，其中該抗體片段專一性地中和 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 與 WA 之生物活性，但不顯著地中和 IFN- $\alpha$  蛋白質亞型 D 之該生物活性，其中該生物活性為 MxA 啟動基因之活化或抗病毒活性。

17. 一種如申請專利範圍第 12-16 項中任一項之抗體或其抗原結合性片段之用途，其係用於製造供預防、管理、治療、或改善與 IFN- $\alpha$  有關之發炎性疾病或病症之用的醫藥品。

18. 如申請專利範圍第 10、11、或 17 項之用途，其中該疾病或病症係選自由系統性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) 、第一型糖尿病、牛皮癬、及 AIDS 所組成的群組。

八、圖式：

(如次頁)

I453032

24

A

12345AB

012ABC34567890

12345

567890ABCDEFGHIJK12

B

4567ABCDEF8901234

0123456

9012345AB67

圖1

I453032

A

22340AB

01234567890

15

22

12345

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 A B C D E F G H I J K L

1

**STAY**

Y A

B

40072000000000000000

卷之三

15

5

2

19

9012345AB67

黑色

圖2

I453032

A

12345AB

012ABC034567890

12345

0367890ABCDEFGHIJK12

B

4567ABCDE8901234

0123456

9012345AB67

圖3

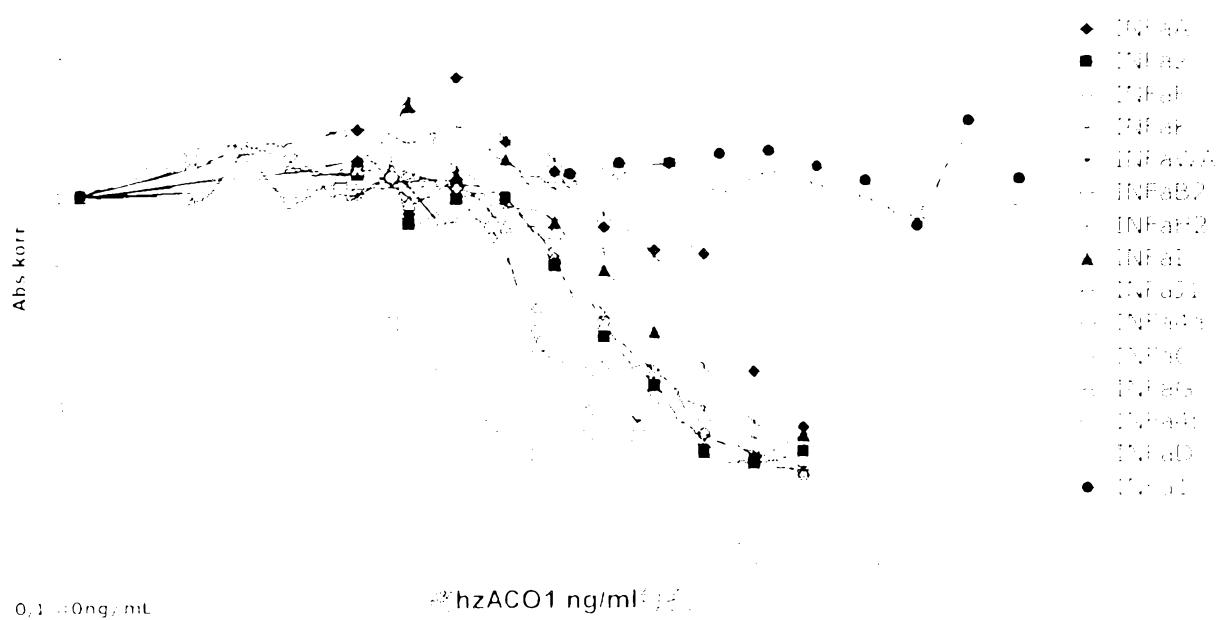
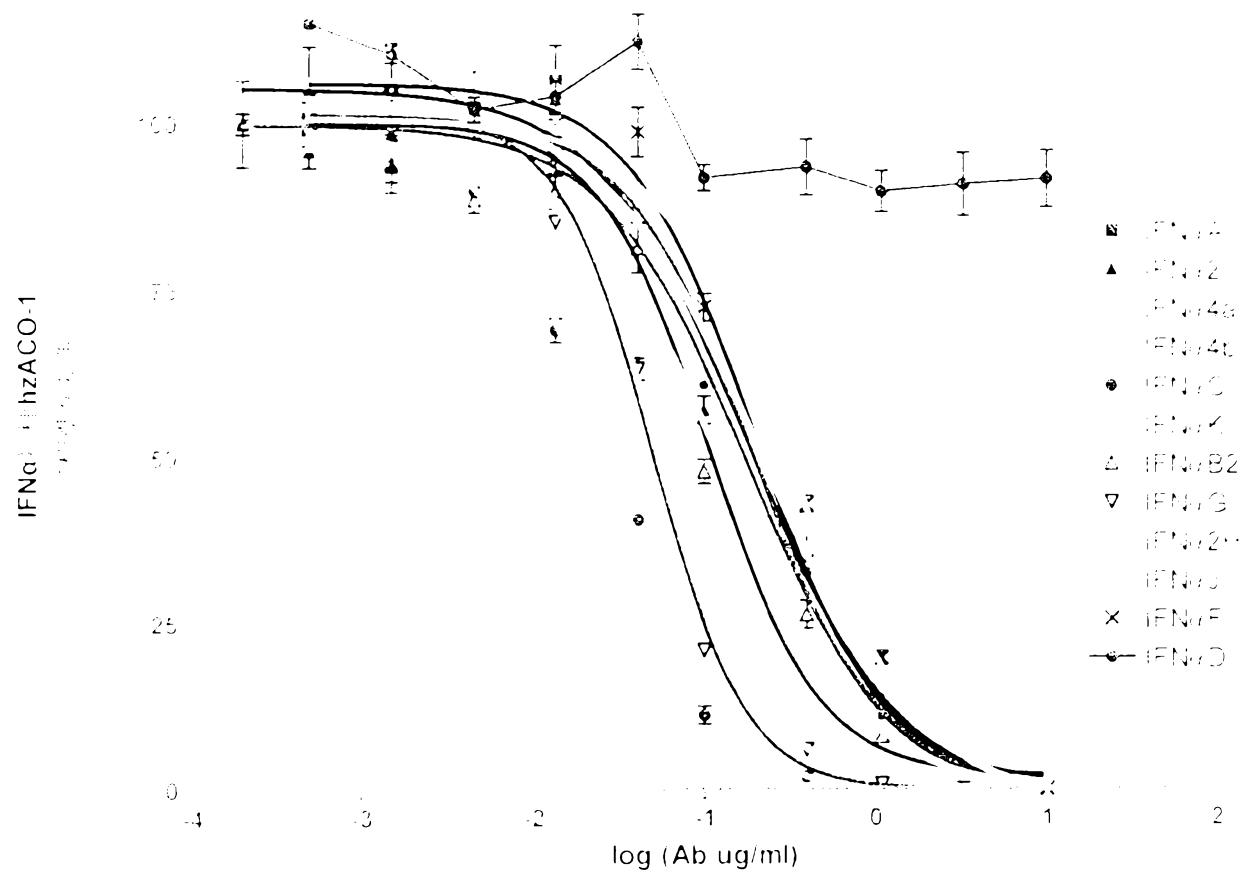
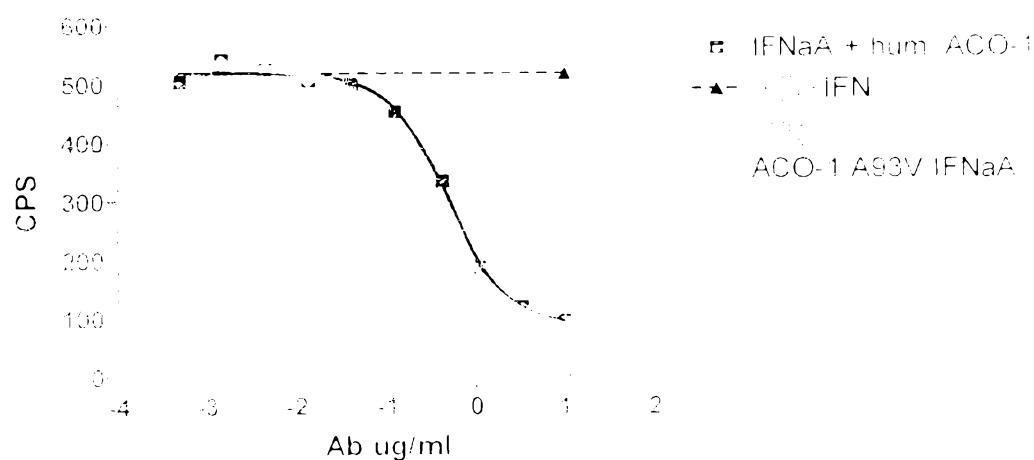


圖 4

125



A



B

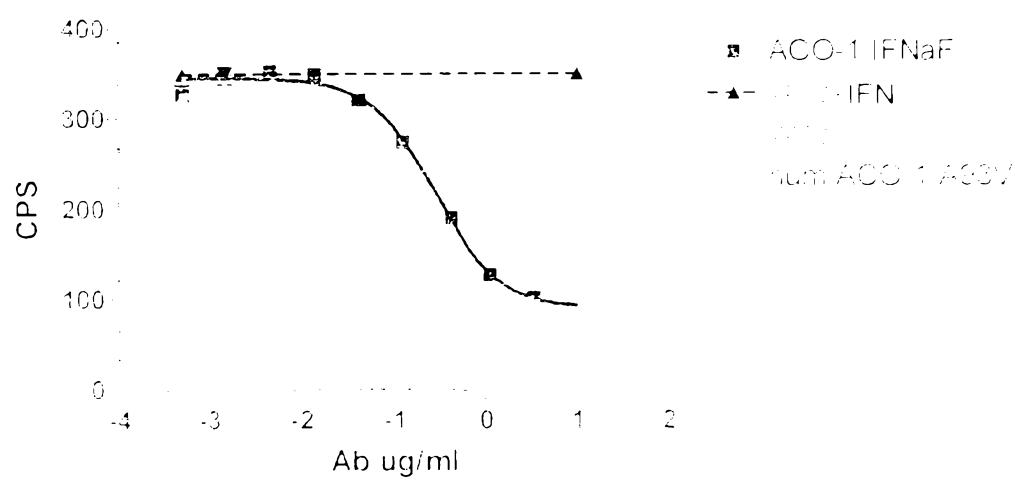
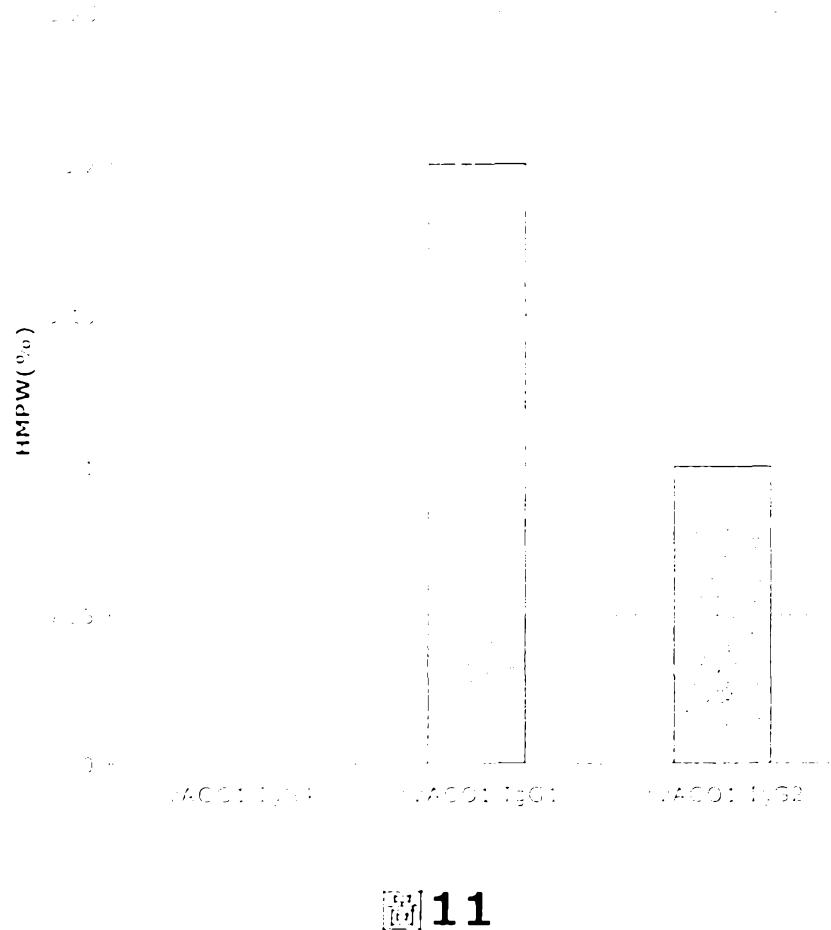


圖6



[<sup>63</sup>Fe] **11**

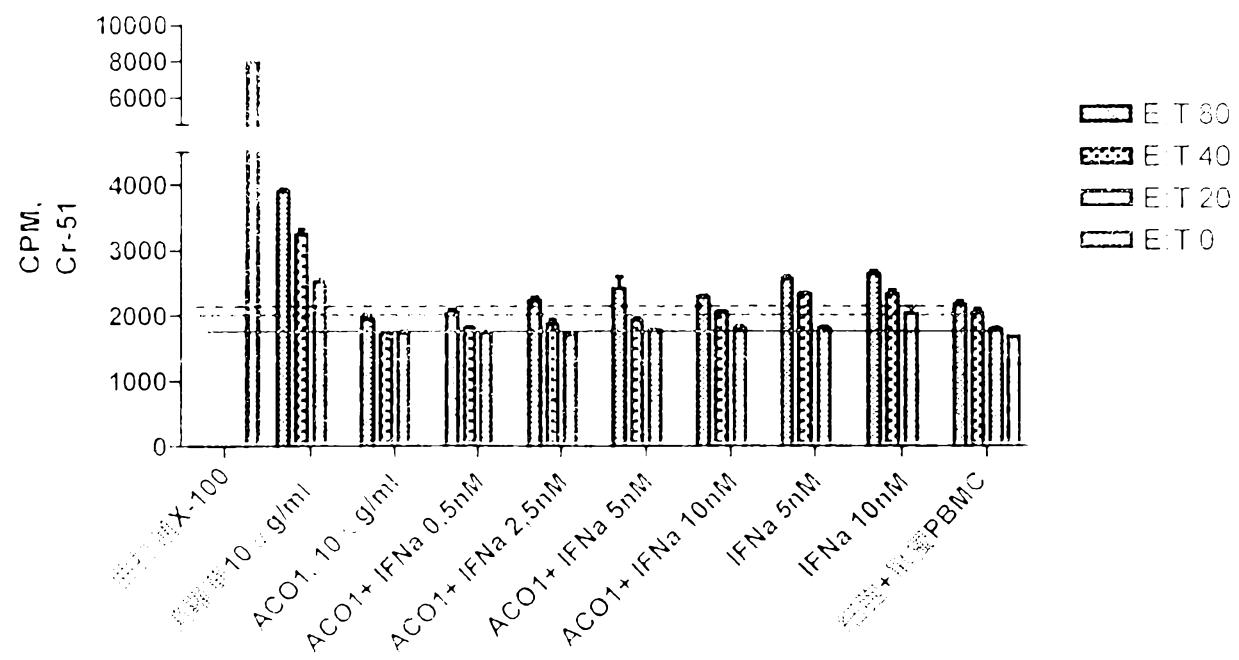
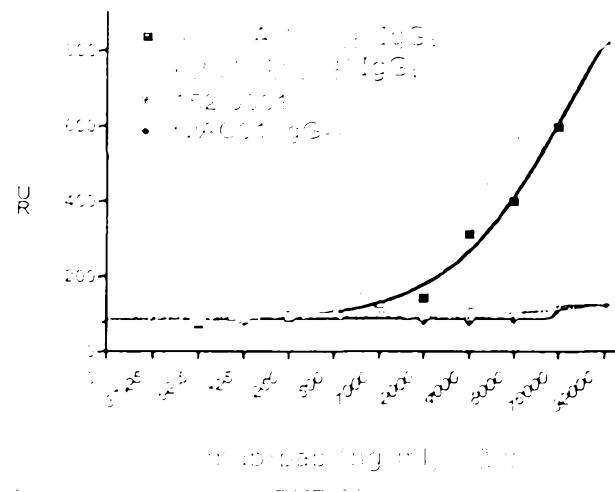


圖 12



[Fig] 13