

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97193635.8

[51] Int. Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1300173C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/68 (2006.01)

[22] 申请日 1997.2.10 [21] 申请号 97193635.8

[30] 优先权

[32] 1996. 2. 9 [33] US [31] 08/599,226

[32] 1996.11.25 [33] US [31] 60/031,476

[86] 国际申请 PCT/US1997/002219 1997.2.10

[87] 国际公布 WO1997/029131 英 1997.8.14

[85] 进入国家阶段日期 1998.10.5

[73] 专利权人 艾博特生物技术有限公司

地址 百慕大国汉密尔顿

[72] 发明人 J·G·萨菲尔德 D·J·阿伦

Z·凯马克卡兰 B·拉布科夫斯基

J·A·曼克维 B·T·麦圭内斯

A·J·罗伯茨 P·萨克拉法斯

H·R·J·M·霍根布姆

D·舍恩豪特 T·J·沃汉

M·怀特 A·J·维尔顿

[56] 参考文献

WO9306213A1 1993.4.1

EP 0614984A2 1994.9.14

WO 9306213A1 1993.4.1

WO 9216553 1992.10.1

WO9216553 1992.10.1

EP0614984A2 1994.9.14

审查员 陆 纯

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

权利要求书 5 页 说明书 84 页 附图 11 页

[54] 发明名称

结合人 TNF α 的人抗体

[57] 摘要

公开了特异性与人肿瘤坏死因子 α (hTNF α) 结合的人抗体, 最好为重组人抗体。这些抗体对 hTNF α 具有高亲和性(例如, K_d 不高于 1×10^{-8} M)和低解离速率(例如, K_{off} 不高于 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$)并在体外和体内中和 hTNF α 活性。本发明的抗体可以是全长抗体或是其抗原结合部分。本发明的抗体或抗体部分可以用于检测 hTNF α 并例如在患有其中 hTNF α 活性是有害的紊乱的人类受治疗者中抑制 hTNF α 活性。本发明亦包括表达本发明重组人抗体的核酸、载体和宿主细胞、以及合成所述重组人抗体的方法。

1. 分离的人抗体或其抗原结合部分, 其轻链可变区具有包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列、或通过对 SEQ ID NO: 3 位置 1、4、5、7 或 8 进行单丙氨酸置换修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域, 其重链可变区具有包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列、或通过对 SEQ ID NO: 4 位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 进行单丙氨酸置换修饰得到的氨基酸序列的 CDR3 域。

2. 权利要求 1 的分离的人抗体或其抗原结合部分, 它以不高于 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速率常数与人 TNF α 解离。

3. 权利要求 1 的分离的人抗体或其抗原结合部分, 它以不高于 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速率常数与人 TNF α 解离。

4. 权利要求 1 的分离的人抗体或其抗原结合部分, 它以通过表面等离子体激元共振测定不高于 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速率常数与人 TNF α 解离。

5. 权利要求 1 的分离的人抗体或其抗原结合部分, 其中轻链可变区另外具有包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的 CDR2 域, 并且重链可变区还具有包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 CDR2 域。

6. 权利要求 5 的分离的人抗体或其抗原结合部分, 其中轻链可变区另外具有包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 CDR1 域, 并且重链可变区具有包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 CDR1 域。

7. 权利要求 1 的分离的人抗体或其抗原结合部分, 其中轻链可变区包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列, 重链可变区包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。

8. 权利要求 7 的分离的人抗体, 该抗体具有一 IgG1 重链恒定区。

9. 权利要求 7 的分离的人抗体, 该抗体具有一 IgG4 重链恒定区。

10. 权利要求 7 的分离的人抗体, 该抗体是一 Fab 片段。

11. 权利要求 7 的分离的人抗体, 该抗体是一单链 Fv 片段。

12. 包含权利要求 1-11 任一项的抗体或其抗原结合部分和药学上

可接受的载体的药用组合物。

13. 权利要求 12 的药用组合物, 它还包含至少一种用于治疗 TNF α 活性有害的紊乱的其它治疗剂。

14. 权利要求 13 的药用组合物, 其中其他治疗剂选自非类固醇抗炎药、细胞因子抑制抗炎药、皮质类固醇、生长因子、氨水杨酸、抗生素、细胞因子的拮抗剂、组织因子通道抑制剂、海洋生物脂、植物脂、抗氧化剂、铁螯合物、铁螯合剂。

15. 权利要求 13 的药用组合物, 其中其它治疗剂选自 CDP-571/BAY-10-3356、cA2、75kdTNFR-IgG、55kdTNFR-IgG、IDEC-CE9.1/SB210396、DAB486-IL-2、DAB 389-IL-2、抗 Tac、IL-4、IL-10、IL-4 激动剂、IL-10 激动剂、TNF-bp/s-TNFR、R973401、MK-966、伊洛前列素、氨甲蝶呤、酞胺哌啶酮、来氟米特、凝血酸、T-614、前列腺素 E1、替尼达普、萘普生、美洛昔康、吡罗昔康、双氯芬酸、消炎痛、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、ICE 抑制剂、zap-70 抑制剂、lck 抑制剂、VEGF 抑制剂、VEGF-R 抑制剂、TNF-转化酶抑制剂、抗 IL-12 抗体、白介素-11、白介素-13、白介素-17 抑制剂、青霉胺、氯喹、羟氯喹、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、环孢菌素、抗胸腺细胞球蛋白、抗 CD4 抗体、CD-5 毒素、胶原蛋白、氯苯扎利二钠、细胞因子调节剂 HP228 和 HP466、ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸、强的松、奥古蛋白、葡糖胺聚糖多硫酸盐、二甲胺四环素、抗 IL2R 抗体、金诺芬、保泰松、甲氯芬那酸、氟芬那酸、静注用免疫球蛋白、齐留通、霉酚酸、他克莫司、西罗莫司、氨普立糖、克拉屈滨、阿扎立平、表皮生长因子、氨基水杨酸盐、6-巯基嘌呤、甲硝唑、脂氧合酶抑制剂、奥沙拉秦、巴柳氮、凝血噻烷抑制剂、IL-1 受体拮抗剂、弹性蛋白酶抑制剂、吡啶基咪唑化合物、强的松龙的葡糖苷酸结合前体药物、地塞米松的葡糖苷酸结合前体药物或布地奈德的葡糖苷酸结合前体药物、强的松龙的葡聚糖结合前体药物、地塞米松的葡聚糖结合前体药物或布地奈德的葡聚糖结合前体药物、可溶性补体受体 1、缓释氨水杨酸、血小板激活因子 PAF 拮抗剂、环丙沙星、利多卡因、强的松

龙、甲基强的松龙、4-氨基吡啶、替扎尼定、干扰素- β 1a、干扰素- β 1b、Cop-1、碳青霉烯、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 和/或 IL-8 细胞因子拮抗剂、SK&F 107647、四价咪基脒 CNI-1493、PHP、五乙酸二乙三胺-铁(III)络合物、lisofylline、PGG-葡聚糖、用脂类重构的载脂蛋白 A-1、手性异羟肟酸、抗内毒素抗体、E5531、rBPI₂₁、合成抗内毒素肽。

16. 抑制人 TNF α 活性的方法，该方法包括用权利要求 1-11 任一项的抗体或其抗原结合部分体外接触人 TNF α 使得人 TNF α 活性被抑制。

17. 权利要求 1-11 任一项的抗体或其抗原结合部分用于制造治疗其中 TNF α 活性是有害的紊乱的药物的用途。

18. 权利要求 17 的用途，其中该紊乱是脓毒症。

19. 权利要求 18 的用途，其中所述药物还含有细胞因子白介素-6。

20. 权利要求 17 的用途，其中该紊乱是自身免疫疾病。

21. 权利要求 20 的用途，其中该自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、骨关节炎和痛风性关节炎。

22. 权利要求 20 的用途，其中该自身免疫疾病选自变态反应、多发性硬化症、自身免疫性糖尿病、自身免疫性眼色素层炎和肾病综合症。

23. 权利要求 17 的用途，其中该紊乱是传染病。

24. 权利要求 23 的用途，其中传染病选自脑膜炎、恶病质、免疫缺陷综合症、细菌性脑膜炎。

25. 权利要求 17 的用途，其中该紊乱是移植排斥或移植物抗宿主病。

26. 权利要求 17 的用途，其中该紊乱是恶性肿瘤。

27. 权利要求 17 的用途，其中该紊乱是肺功能紊乱。

28. 权利要求 27 的用途，其中肺功能紊乱选自成人呼吸窘迫综合症、休克肺、慢性肺炎、肺结节病、肺纤维化和硅肺。

29. 权利要求 17 的用途，其中该紊乱是肠功能紊乱。

30. 权利要求 29 的用途, 其中肠功能紊乱选自炎症性肠病、特发性炎症性肠病、局限性回肠炎和溃疡性结肠炎。

31. 权利要求 17 的用途, 其中该紊乱是心脏功能紊乱。

32. 权利要求 31 的用途, 其中心脏功能紊乱是心脏局部缺血和心脏功能不全。

33. 权利要求 17 的用途, 其中该紊乱选自炎症性骨病、骨吸收疾病、酒精性肝炎、病毒性肝炎、爆发性肝炎、凝结紊乱、烧伤、再灌注损伤、瘢痕疙瘩形成、瘢痕组织形成、发热、牙周炎、肥胖、脓毒症性休克、内毒素性休克、革兰氏阳性脓毒症、毒性休克综合症、疟疾、AIDS 相关综合症 ARC 和放射毒性。

34. 权利要求 17 的用途, 其中该紊乱选自移植继发的巨细胞病毒感染、因感染引起的发烧和肌痛、感染继发的恶病质和同种移植排斥。

35. 权利要求 17 的用途, 其中该紊乱选自在恶性肿瘤中刺激肿瘤生长、增强转移潜力和介导细胞毒性, 以及抑制肿瘤生长或转移。

36. 权利要求 17 的用途, 其中所述药物还含有至少一种其它治疗剂。

37. 权利要求 36 的用途, 其中所述其它治疗剂选自非类固醇抗炎药、细胞因子抑制抗炎药、皮质类固醇、生长因子、氨水杨酸、抗生素、细胞因子的拮抗剂、组织因子通道抑制剂、海洋生物脂、植物脂、抗氧化剂、铁螯合物、铁螯合剂。

38. 权利要求 36 的用途, 其中该其它治疗剂选自 CDP-571/BAY-10-3356、cA2、75kdTNFR-IgG、55kdTNFR-IgG、IDEC-CE9.1/SB210396、DAB 486-IL-2、DAB 389-IL-2、抗 Tac、IL-4、IL-10、IL-4 激动剂、IL-10 激动剂、TNF-bp/s-TNFR、R973401、MK-966、伊洛前列素、氨甲蝶呤、酞胺哌啶酮、来氟米特、凝血酸、T-614、前列腺素 E1、替尼达普、萘普生、美洛昔康、吡罗昔康、双氯芬酸、消炎痛、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、ICE 抑制剂、zap-70 抑制剂、lck 抑制剂、VEGF 抑制剂、VEGF-R 抑制剂、TNF-转化酶抑制剂、抗 IL-12

抗体、白介素-11、白介素-13、白介素-17 抑制剂、青霉胺、氯喹、羟氯喹、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、环孢菌素、抗胸腺细胞球蛋白、抗 CD4 抗体、CD-5 毒素、胶原蛋白、氯苯扎利二钠、细胞因子调节剂 HP228 和 HP466、ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸、强的松、奥古蛋白、葡糖胺聚糖多硫酸盐、二甲胺四环素、抗 IL2R 抗体、金诺芬、保泰松、甲氯芬那酸、氟芬那酸、静注用免疫球蛋白、齐留通、霉酚酸、他克莫司、西罗莫司、氨普立糖、克拉屈滨、阿扎立平、表皮生长因子、氨基水杨酸盐、6-巯基嘌呤、甲硝唑、脂氧合酶抑制剂、奥沙拉秦、巴柳氮、凝血噻烷抑制剂、IL-1 受体拮抗剂、弹性蛋白酶抑制剂、吡啶基咪唑化合物、强的松龙的葡糖苷酸结合前体药物、地塞米松的葡糖苷酸结合前体药物或布地奈德的葡糖苷酸结合前体药物、强的松龙的葡聚糖结合前体药物、地塞米松的葡聚糖结合前体药物或布地奈德的葡聚糖结合前体药物、可溶性补体受体 1、缓释氨基水杨酸、血小板激活因子 PAF 拮抗剂、环丙沙星、利多卡因、强的松龙、甲基强的松龙、4-氨基吡啶、替扎尼定、干扰素- β 1a、干扰素- β 1b、Cop-1、碳青霉烯、TNF α 、IL-1 β 、IL-6 和/或 IL-8 细胞因子拮抗剂、SK&F 107647、四价咪基脒 CNI-1493、PHP、五乙酸二乙三胺-铁 (III) 络合物、lisofylline、PGG-葡聚糖、用脂类重构的载脂蛋白 A-1、手性异羟肟酸、抗内毒素抗体、E5531、rBPI₂₁、合成抗内毒素肽。

结合人 TNF α 的人抗体

发明背景

肿瘤坏死因子 α (TNF α)是由许多细胞类型(包括单核细胞和巨噬细胞)产生的细胞因子,其原始鉴定是基于其诱导某些小鼠肿瘤坏死的能力(参见例如 Old, L.(1985) *Science* 230:630-632)。随后,一个与恶病质相关的名称为恶病质素的因子表明是与 TNF α 相同的分子。据信 TNF α 参与介导休克(参见例如 Beutler, B.和 Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:505-518; Beutler, B.和 Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655)。另外,据信 TNF α 参与各种各样的其它人类疾病和紊乱的病理生理学,包括脓毒症、感染、自身免疫疾病、移植物排斥和移植物抗宿主病(参见例如 Moeller, A.等(1990) *Cytokine* 2:162-169; Moeller 等的美国专利 5,231,024 号; Moeller, A. 等的欧洲专利公开 260 610 B1 号, Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452; Tracey, K.J.和 Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503)。

由于人 TNF α (hTNF α)在各种各样的人体紊乱中的有害作用,已设计治疗策略以抑制或抵消 hTNF α 的活性。特别是,已寻找与 hTNF α 结合或中和 hTNF α 的抗体做为抑制 hTNF α 活性的手段。一些最早的这种抗体是由用 hTNF α 免疫的小鼠的淋巴细胞制备的杂交瘤分泌的小鼠单克隆抗体(mAbs)(参见例如 Hahn T;等, (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3814-3818; Liang, C-M.等(1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 847-854; Hirai, M. 等(1987) *J. Immunol. Methods* 96: 57-62; Fendly, B.M.等(1987) *Hybridoma* 6:359-370; Moeller, A.等(1990) *Cytokine* 2:162-169; 授予 Moeller 等的美国专利 5,231,024 号; Wallach, D.的欧洲专利公开 186 833 B1 号; Old 等的欧洲专利申请公开 218 868 A1 号; Moeller, A.等的欧洲专利公开 260 610 B1 号)。虽然这些小鼠抗

hTNF α 抗体经常展示与 hTNF α 的高亲和力(例如 $K_d \leq 10^{-9}M$)并能够中和 hTNF α 活性, 但它们的体内使用受与给与人类小鼠抗体相关的问题所限制, 所述问题例如为血清半衰期短、不能触发某些人体效应物的功能和引出不想要的人体内抗该小鼠抗体的免疫应答(“人抗鼠抗体”(HAMA)反应)。

为试图克服与在人体内使用全鼠抗体相关的问题, 已对鼠抗 hTNF α 抗体进行遗传工程使其更“人类化”。例如, 已制备嵌合抗体, 其中抗体链的可变区为鼠源, 而抗体链的恒定区为人源(Knight, D.M 等(1993) *Mol. Immunol.* 30:1443-1453; Daddona, P.E.等的 PCT 公开 WO 92/16553 号)。另外, 也已制备人化抗体, 其中所述抗体可变区的超变域为鼠源, 但所述可变区的其余部分和所述抗体恒定区为人源(Adair, J.R.等的 PCT 公开 WO 92/11383 号)。然而, 因为这些嵌合抗体和人化抗体仍然保留一些鼠序列, 因此它们仍然可能引出不想要的免疫反应, 即人抗嵌合抗体(HACA)反应, 特别是当长期给药时, 例如用于慢性适应症, 例如类风湿性关节炎(参见例如 Elliott, M.J.等(1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J.等(1994) *Lancet* 344:1105-1110)。

优于鼠 mAbs 或其衍生物(例如嵌合抗体或人化抗体)的 hTNF α 抑制剂可以是完全人类抗 hTNF α 抗体, 因为这种药剂甚至在长期给与时也不会引起该 HAMA 反应。已使用人类杂交瘤技术制备了抗 hTNF α 人单克隆自身抗体(Boyle, P.等(1993) *Cell. Immunol.* 152:556-568; Boyle, P.等(1993) *Cell. Immunol.* 152:569-581; Boyle 等的欧洲专利申请公开 614 984 A2 号)。然而, 据报道这些杂交瘤来源的单克隆自身抗体对 hTNF α 的亲合性太低, 以致于不能用常规方法计算, 不能结合可溶性 hTNF α 并且不能中和 hTNF α 诱导的细胞毒性(参见 Boyle 等; 见上述)。另外, 人杂交瘤技术的成功取决于产生 hTNF α 特异性自身抗体的淋巴细胞在人外周血中的自然存在。某些研究已在人类对象中检测到抗 hTNF α 血清自身抗体(Fomsgaard, A.等(1989) *Scand. J. Immunol.* 30:219-223; Bendtzen, K.等(1990) *Prog. Leukocyte Biol.* 10B:

447-452), 而其它的研究未检测到(Leusch, H-G.等(1991) *J. Immunol. Methods* 139:145-147).

除自然发生的人抗 hTNF α 抗体之外的另一选择是重组 hTNF α 抗体。已描述了以相对低亲和性(即 $K_d \sim 10^{-7}M$)和快解离速率(即 $K_{off} \sim 10^{-2} \text{秒}^{-1}$)结合 hTNF α 的重组人抗体(Griffiths, A.D.等(1993) *EMBO J.* 12: 725-734)。然而, 由于它们的相对快速解离的动力学, 这些抗体可能不适于治疗用途。另外, 已描述了一种重组人抗 hTNF α , 它不中和 hTNF α 活性, 却增强 hTNF α 与细胞表面的结合并增强 hTNF α 内在化(Lidbury, A.等(1994) *Biotechnol. Ther.* 5:27-45; Aston, R.等的 PCT 公开 WO 92/03145 号)。

因此, 仍然需要以高亲和性和慢解离动力学地结合可溶性 hTNF α 并具有中和 hTNF α 活性包括 hTNF α 诱导的细胞毒性(体外和体内)和 hTNF α 诱导的细胞激活的能力的人抗体, 诸如重组人抗体。

发明概要

本发明提供特异性与人 TNF α 结合的人抗体, 最好是重组人抗体。本发明抗体的特征为高亲和性和慢解离动力学地与 hTNF α 结合和中和 hTNF α 的活性, 包括 hTNF α 诱导的细胞毒性(体外和体内)和 hTNF α 诱导的细胞激活。本发明抗体的其它特征为与 hTNF α 而非 hTNF β (淋巴细胞毒素)结合并具有与除人 TNF α 之外的其它灵长类 TNF α 和非灵长类 TNF α 结合的能力。

本发明的抗体可以是全长的(例如 IgG1 或 IgG4 抗体)或可以仅包含抗原结合部分(例如 Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段)。本发明最优选的重组抗体 D2E7 称为 D2E7, 有一包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的轻链 CDR3 域和一包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列的重链 CDR3 域。该 D2E7 抗体最好具有包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)和包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)。

在一个实施方案中, 本发明提供分离的人抗体或其抗原结合部分, 它以不高于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 的 K_d 和不高于 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速率常数 (均由表面等离子体激元共振测定) 与人 $\text{TNF}\alpha$ 解离, 并在标准体外 L929 检测中以不高于 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 的 IC_{50} 中和人 $\text{TNF}\alpha$ 细胞毒性。该分离的人抗体或其抗原结合部分更优选地以不高于 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 、甚至更优选地以不高于 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 与人 $\text{TNF}\alpha$ 解离。更优选的是, 在标准体外 L929 检测中以不高于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 、甚至更优选地以不高于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、甚至再更优选地以不高于 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 的 IC_{50} 中和人 $\text{TNF}\alpha$ 细胞毒性。

在另一实施例中, 本发明提供具有以下特征的人抗体或其抗原结合部分:

a) 以不高于 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} (由表面等离子体激元共振测定) 与人 $\text{TNF}\alpha$ 解离;

b) 具有一轻链 CDR3 域, 该域包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列, 或通过于位置 1、4、5、7 或 8 的单丙氨酸置换或通过于位置 1、3、4、6、7、8 和/或 9 的 1-5 个保守氨基酸置换从 SEQ ID NO: 3 修饰的氨基酸序列;

c) 具有一重链 CDR3 域, 该域包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列, 或通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 的单丙氨酸置换或通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和/或 12 的 1-5 个保守氨基酸置换从 SEQ ID NO: 4 修饰的氨基酸序列。

更优选的是, 该抗体或其抗原结合部分以不高于 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 与人 $\text{TNF}\alpha$ 解离。再更优选的是, 该抗体或其抗原结合部分以不高于 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 与人 $\text{TNF}\alpha$ 解离。

在再一实施方案中, 本发明提供人抗体或其抗原结合部分, 其 LCVR 具有的 CDR3 域包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列、或通过于位置 1、4、5、7 或 8 的单丙氨酸置换从 SEQ ID NO: 3 修饰的氨基酸序列, 其 HCVR 具有的 CDR3 域包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列、

或通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 的单丙氨酸置换从 SEQ ID NO: 4 修饰的氨基酸序列。更优选地, 该 LCVR 另外具有包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的 CDR2 域, 并且该 HCVR 另外具有包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 CDR2 域。再更优选地, 该 LCVR 另外具有包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 CDR1 域, 并且该 HCVR 具有包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 CDR1 域。

在再一实施方案中, 本发明提供具有包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的 LCVR 和包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的 HCVR 的分离人抗体或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 该抗体具有一 IgG1 重链恒定区或一 IgG4 重链恒定区。在其它实施方案中, 该抗体是一 Fab 片段、一 F(ab')₂ 片段或一单链 Fv 片段。

在另一些实施方案中, 本发明提供抗体或其抗原结合部分, 其 LCVR 具有选自以下氨基酸序列的一个 CDR3 域: SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26 或其 HCVR 具有选自以下氨基酸序列的一个 CDR3 域: SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35。

在再一实施方案中, 本发明提供中和人 TNF α 而非人 TNF β (淋巴细胞毒素)活性的分离人抗体或其抗原结合部分。在一最佳实施方案中, 该人抗体或其抗原结合部分中和人 TNF α 、黑猩猩 TNF α 和选自以下的至少一种其它的灵长类 TNF α 的活性: 狒狒 TNF α 、猿 TNF α 、猕猴 TNF α 和恒河猴 TNF α 。最好是, 该抗体亦中和至少一种非灵长类 TNF α 的活性。例如, 在一分实施方案(subembodiment)中, 该分离人抗体或其抗原结合部分亦中和犬 TNF α 的活性。在另一分实施方案

中, 该分离人抗体或其抗原结合部分亦中和猪 $\text{TNF}\alpha$ 的活性。在再一分实施方案中, 该分离人抗体或其抗原结合部分亦中和小鼠 $\text{TNF}\alpha$ 的活性。

本发明的另一方面涉及编码本发明抗体或其抗原结合部分的核酸分子。本发明优选的核酸分子编码 D2E7 LCVR, 具有图 7 和 SEQ ID NO: 36 所示的核苷酸序列。本发明的另一优选核酸分子编码 D2E7 HCVR, 具有图 8 和 SEQ ID NO: 37 所示的核苷酸序列。本发明亦包含携带本发明抗体编码核酸的重组表达载体、导入这种载体的宿主细胞, 也包括通过培养本发明的宿主细胞制备本发明的抗体的方法。

本发明的再一方面涉及使用本发明的抗体或其抗原结合部分抑制人 $\text{TNF}\alpha$ 活性的方法。在一个实施方案中, 该方法包括用本发明的抗体或其抗原结合部分接触人 $\text{TNF}\alpha$, 使得抑制人 $\text{TNF}\alpha$ 活性。在另一实施方案中, 该方法包括将本发明的抗体或其抗原结合部分给与患病(其中 $\text{TNF}\alpha$ 活性是有害的)的人类受治疗者, 使得抑制该人类受治疗者中的人 $\text{TNF}\alpha$ 活性。该疾病可以是例如脓毒症、自身免疫疾病(例如类风湿性关节炎, 变态反应, 多发性硬化, 自身免疫性糖尿病, 自身免疫性眼色素层炎和肾病综合症)、传染性疾病、恶性肿瘤、移植物排斥或移植物抗宿主病、肺功能紊乱、骨疾病、肠功能紊乱或心脏功能紊乱。

附图简述

图 1A 和 1B 展示了下述的氨基酸序列: D2E7 的轻链可变区(D2E7 VL; 亦示于 SEQ ID NO: 1)、D2E7 VL 的丙氨酸扫描突变体(LD2E7*.A1、LD2E7*.A3、LD2E7*.A4、LD2E7*.A5、LD2E7*.A7 和 LD2E7*.A8)、D2E7 相关抗体 2SD4 的轻链可变区(2SD4 VL; 亦示于 SEQ ID NO: 9)和其它 D2E7 相关轻链可变区(EP B12、VL10E4、VL100A9、VL100D2、VL10F4、LOE5、VLLOF9、VLL0F10、VLLOG7、VLLOG9、VLLOH1、VLLOH10、VL1B7、VL1C1、

VL1C7、VL0.1F4、VL0.1H8、LOE7、LOE7.A和LOE7.T)。图1A展示所述FR1、CDR1、FR2和CDR2域。图1B展示所述FR3、CDR3和FR4域。所述轻链CDR1(“CDR L1”)、CDR2(“CDR L2”)和CDR3(“CDR L3”)域位于框内。

图2A和2B展示了下述的氨基酸序列：D2E7的重链可变区(D2E7 VH; 亦示于SEQ ID NO: 2)、D2E7 VH的丙氨酸扫描突变体(HD2E7*.A1、HD2E7*.A2、HD2E7*.A3、HD2E7*.A4、HD2E7*.A5、HD2E7*.A6、HD2E7*.A7、HD2E7*.A8和HD2E7*.A9)、D2E7相关抗体2SD4的重链可变区(2SD4 VH; 亦示于SEQ ID NO: 10)和其它D2E7相关重链可变区(VH1B11、VH1D8、VH1A11、VH1B12、VH1-D2、VH1E4、VH1F6、VH1G1、3C-H2、VH1-D2.N和VH1-D2.Y)。图2A展示所述FR1、CDR1、FR2和CDR2域。图2B展示所述FR3、CDR3和FR4域。所述重链CDR1(“CDR H1”)、CDR2(“CDR H2”)和CDR3(“CDR H3”)域位于框内。

图3是一曲线图，描述与鼠抗hTNF α 抗体MAK 195相比，由人抗hTNF α 抗体D2E7对TNF α 诱导的L929细胞毒性的抑制。

图4是一曲线图，描述与鼠抗hTNF α 抗体MAK 195相比，由人抗hTNF α 抗体D2E7对rh TNF α 与U-937上的hTNF α 受体结合的抑制。

图5是一曲线图，描述与鼠抗hTNF α 抗体MAK 195相比，由人抗hTNF α 抗体D2E7对TNF α 诱导的ELAM-1在HUVEC上表达的抑制。

图6是一柱状图表，描述与鼠抗hTNF α 抗体MAK 195(空心柱)相比，通过给与人抗hTNF α 抗体D2E7(实心柱)保护D-半乳糖胺致敏小鼠免受TNF α 诱导的致死性。

图 7 展示 D2E7 的轻链可变区的核苷酸序列, 在该核苷酸序列下是预期的氨基酸序列。在所述 CDR L1、CDR L2 和 CDR L3 区下划线。

图 8 展示 D2E7 的重链可变区的核苷酸序列, 在该核苷酸序列下是预期的氨基酸序列。在所述 CDR H1、CDR H2 和 CDR H3 区下划线。

图 9 是一曲线图, 描述 D2E7 抗体治疗对做为多关节炎模型的 Tg197 转基因小鼠平均关节尺寸的影响。

发明详述

本发明涉及以高亲和性、低解离速率和高中和能力地与人 TNF α 结合的分离人抗体或其抗原结合部分。本发明的各个方面涉及抗体和抗体片段以及其药用组合物、以及制备这种抗体和片段的核酸、重组表达载体和宿主细胞。本发明亦包括用本发明的抗体检测人 TNF α 或在体外或体内抑制人 TNF α 活性。

为更易理解本发明, 首先定义某些术语。

本文所用的术语“人 TNF α ”(本文缩写为 hTNF α 或简单地写为 hTNF)是指以 17 kD 分泌形式和 26 kD 膜结合形式存在的人细胞因子, 其生物学活性形式由非共价键连接的 17 kD 分子的三聚体组成。hTNF α 的结构另外描述于例如 Pennica, D.等(1984) *Nature* 312:724-729; Davis, J.M.等(1987) *Biochemistry* 26:1322-1326;和 Jones, E.Y.等(1989) *Nature* 338:225-228。术语人 TNF α 包括重组人 TNF α (rhTNF α), 它可以通过标准重组表达方法制备或购买得到(R & D Systems, 目录号 210-TA, Minneapolis, MN)。

本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子, 它们由四条多肽链组成, 即由二硫键相互连接的二条重链(H)和二条轻链(L)。每条重链由重链可变区(本文简写为 HCVR 或 VH)和重链恒定区组成。该重链恒定区由 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域组成。每条轻链由轻链可变区

(本文简写为 LCVR 或 VL)和轻链恒定区组成。该轻链恒定区由一个结构域即 CL 组成。VH 和 VL 区可以进一步划分为超变区,称为互补性决定区(CDR),其间散布着更为保守的称为框架区(FR)的区域。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成,它从氨基末端至羧基末端的排布顺序如下: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

本文所用的抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)指保留与抗原(例如 hTNF α)特异性结合能力的抗体的一个或多个片段。已发现可以由全长抗体的片段行使抗体的抗原结合功能。在抗体的“抗原结合部分”术语中包括的结合片段的例子包括: (i) 一个 Fab 片段,由 VL、VH、CL 和 CH1 域组成的单价片段; (ii) 一个 F(ab')₂ 片段,包含在铰链区由二硫桥连接的二个 Fab 片段的二价片段; (iii) 一个 Fd 片段,由 VH 和 CH1 域组成; (iv) 一个 Fv 片段,由抗体单臂的 VL 和 VH 域组成; (v) 一个 dAb 片段(Ward 等, (1989) *Nature* 341:544-546), 由一个 VH 域组成; 和(vi) 一个分离的互补性决定区(CDR)。另外, 尽管该 Fv 片段的二个结构域 VL 和 VH 由独立的基因编码, 但可以采用重组方法用能使它们成为单蛋白链的合成接头将它们连接, 在该单蛋白链中所述 VL 和 VH 区配对形成单价分子(已知为单链 Fv (scFv); 参见例如 Bird 等(1988) *Science* 242:423-426; 和 Huston 等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。这种单链抗体亦包含于术语抗体的“抗原结合部分”之中。亦包括其它形式的单链抗体, 例如双抗体。双抗体是二价的双特异性抗体, 其中 VH 和 VL 域表达于一个多肽单链上, 但所用的接头太短使得同一链上的这二个结构域不能配对, 因此迫使这些结构域与另一链的互补结构域配对而创造出二个抗原结合位点(参见例如 Holliger, P.等(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R.J.等(1994) *Structure* 2:1121-1123)。

另外, 抗体或其抗原结合部分可以是一个较大的免疫粘附分子的一部分, 该分子由该抗体或抗体部分与一个或多个其它蛋白或肽通过

共价或非共价结合而形成。这种免疫粘附分子的例子包括用抗生蛋白链菌素核心区制备四聚体 scFv 分子(Kipriyanov, S.M.等(1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101)和使用半胱氨酸残基、标记肽和 C 末端多组氨酸标记制备二价生物素化 scFv 分子(Kipriyanov, S.M.等(1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)。可以采用常规技术例如用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶分别消化完整抗体,从完整抗体制备诸如 Fab 和 F(ab')₂ 片段的抗体部分。另外,可以按照本文描述的标准重组 DNA 技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附分子。

本文使用的术语“人抗体”包括具有得自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。本发明的人抗体例如在 CDR 中和在 CDR3 中可以包括未被人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变导入的突变)。然而,本文使用的术语“人抗体”不包括其中 CDR 序列得自其它哺乳动物种(例如小鼠)并已被移植至人框架序列的抗体。

本文使用的术语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、创造或分离的所有人抗体,例如用转染至宿主细胞的重组表达载体表达的抗体(在以下第 II 节进一步描述)、从重组、联合人抗体文库中分离的抗体(在以下第 III 节进一步描述)、从用人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如 Taylor, L.D.等(1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295)或通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接至其它 DNA 序列的任何其它方法制备、表达、创造或分离的抗体。这种重组人抗体具有得自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施方案中,对这种重组人抗体进行体外诱变(或使用人 Ig 序列转基因动物时为体内体细胞诱变),因此所述重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是那些虽然得自人种系 VH 和 VL 序列并与之相关、但在体内的人抗体种系的所有组成部分中都不天然存在+的序列。

本文使用的“分离抗体”是指大致不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如特异性结合 hTNF α 的分离抗体大致不含有与

hTNF α 之外的抗原特异性结合的抗体)。然而, 与 hTNF α 特异性结合的分选抗体具有对其它抗原(例如来自其它种的 hTNF α)的交叉反应性(在以下详细讨论)。另外, 分选抗体可以大致不含其它细胞物质和/或化学物质。

本文使用的“中和抗体”(或“中和 hTNF α 活性的抗体”)是指与 hTNF α 结合导致 hTNF α 的生物学活性被抑制的抗体。这种对 hTNF α 生物学活性的抑制可以通过测定 hTNF α 生物学活性的一个或多个指标进行评价, 所述指标例如 hTNF α 诱导的细胞毒性(或者体外或者体内)、hTNF α 诱导的细胞激活和 hTNF α 与 hTNF α 受体的结合。可以通过本领域已知的一种或多种标准体外或体内检测评价这些 hTNF α 生物学活性指标(参见实施例 4)。最好是, 通过抑制 hTNF α 诱导的 L929 细胞的细胞毒性评价抗体中和 hTNF α 活性的能力。做为另一个或者二者择一的 hTNF α 活性指标, 可以评价抗体抑制 hTNF α 诱导的 ELAM-1 在 HUVEC 上的表达的能力, 做为 hTNF α 诱导的细胞激活的度量。

本文使用的术语“表面等离子体激元共振”是指一光学现象, 它允许通过例如使用 BIAcore 系统(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, NJ)检测在生物传感器基质中蛋白质浓度的改变进行实时生物特异性相互作用分析。有关进一步的描述, 参见实施例 1 和 Jönsson, U.等(1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U.等(1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B.等(1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; 和 Johnsson, B.等(1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277。

本文使用的术语“ K_{off} ”是指抗体从所述抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。

本文使用的术语“ K_d ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离常数。

本文使用的术语“核酸分子”包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链, 但最好是双链 DNA。

本文使用的与编码结合 hTNF α 的抗体或抗体部分(例如 VH、VL、CDR3)的核酸有关的术语“分离核酸分子”是指下述核酸分子,其中编码该抗体或抗体部分的核苷酸序列不含其它编码与 hTNF α 之外的抗原结合的抗体或抗体部分的核苷酸序列,所述其它序列可能在人基因组 DNA 中天然位于该核酸的侧翼。因此,例如编码抗 TNF α 抗体的 VH 区的本发明的分离核酸分子不含任何其它编码与 TNF α 之外的抗原结合的其它 VH 区的序列。

本文使用的术语“载体”是指有能力运送与其连接的另一核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,是指其中可以连接其它 DNA 片段的环状双链 DNA 环。载体的另一类型是病毒载体,其中在病毒基因组中可以连接其它 DNA 片段。某些载体能够在其导入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳动物载体)。其它载体(例如非附加体哺乳动物载体)可以在导入该宿主细胞时被整合入该宿主细胞的基因组,由此可以与该宿主基因组一起复制。另外,某些载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达。这种载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般而言,在重组 DNA 技术中使用的表达载体的常见形式为质粒。在本说明书中,可以将“质粒”和“载体”互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明包括具有相同的功能的其它形式的表达载体,例如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

本文使用的术语“重组宿主细胞”是指导入了重组表达载体的细胞。应理解这种术语不仅指特定的对象细胞,而且指这种细胞的后代。因为在后续世代中由于或者突变或者环境影响可能发生某些修饰,事实上这种后代可以与亲本细胞不同,但却仍然包含于本文使用的术语“宿主细胞”的范围之内。

在下面的小节中更详细地描述本发明的各种方面。

I. 与人 TNF α 结合的人抗体

本发明提供以高亲和性、低解离速率和高中和能力与人 TNF α 结合的分离人抗体或其抗原结合部分。本发明的人抗体优选地是重组的、中和人抗 TNF α 抗体。最优选的本发明重组中和抗体在本文中称为 D2E7 并具有图 1A、1B 和图 2A、2B 分别展示的 VL 和 VH 序列 (D2E7 VL 区的氨基酸序列亦示于 SEQ ID NO: 1; D2E7 VH 区的氨基酸序列亦示于 SEQ ID NO: 2)。以下概述了与表现出高亲和性和低解离动力学的鼠抗 hTNF α MAK 195 mAb 和另一个与 D2E7、2SD4 有关的人抗 hTNF α 抗体相比的 D2E7 的结合特性:

抗体	K_{off} sec^{-1}	K_{on} $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	K_{d} M	化学 计量
D2E7 IgG1	8.81×10^{-5}	1.91×10^5	6.09×10^{-10}	1.2
2SD4 IgG4	8.4×10^{-3}	4.20×10^5	2.00×10^{-8}	0.8
MAK 195 F(ab') ₂	8.70×10^{-5}	1.90×10^5	4.60×10^{-10}	1.4

在用几种体外和体内检测评价时, 该 D2E7 抗体及其相关抗体亦表现出强大的中和 hTNF α 活性的能力(参见实施例 4)。例如, 这些抗体中和 hTNF α 诱导的 L929 细胞的细胞毒性的 IC₅₀ 值的范围为约 10^{-7}M 至约 10^{-10}M 。当 D2E7 以全长 IgG1 抗体表达时, 中和 hTNF α 诱导的 L929 细胞的细胞毒性的 IC₅₀ 值的范围为约 $1.25 \times 10^{-10}\text{M}$ 。另外, 当以 Fab、F(ab')₂ 或 scFv 片段表达该抗体时, 保持 D2E7 的中和能力。D2E7 亦抑制通过 hTNF α 诱导的 ELAM-1 在 HUVEC 上的表达测定的 TNF α 诱导的细胞激活(IC₅₀ = 约 $1.85 \times 10^{-10}\text{M}$)和 hTNF α 与 U-937 细胞上的 hTNF α 受体的结合(IC₅₀ = 约 $1.56 \times 10^{-10}\text{M}$)。关于后者, D2E7 抑制 hTNF α 与 p55 和 p75 hTNF α 受体的结合。另外, 该抗体抑制 hTNF α 在小鼠体内诱导的致死性(ED₅₀ = 1-2.5 μg /小鼠)。

关于 D2E7 的结合特异性, 该抗体与各种形式的人 $\text{TNF}\alpha$ 结合, 包括可溶性 $\text{hTNF}\alpha$ 、跨膜 $\text{hTNF}\alpha$ 和结合至细胞受体的 $\text{hTNF}\alpha$ 。D2E7 不特异性地与其它细胞因子结合, 例如淋巴细胞毒素($\text{TNF}\beta$)、 $\text{IL-1}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-2 、 IL-4 、 IL-6 、 IL-8 、 $\text{IFN}\gamma$ 和 $\text{TGF}\beta$ 。然而, D2E7 确实表现出对来自其它物种的肿瘤坏死因子的交叉反应性。例如, 该抗体以与中和 $\text{hTNF}\alpha$ 大致相同的 IC_{50} 值中和至少五种灵长类(黑猩猩、狒狒、狢、猕猴和恒河猴) $\text{TNF}\alpha$ 的活性(参见实施例 4, E 小节)。D2E7 亦中和小鼠 $\text{TNF}\alpha$ 的活性, 尽管其效果比中和人 $\text{TNF}\alpha$ 低 1000 倍(参见实施例 4, E 小节)。D2E7 亦结合犬和猪 $\text{TNF}\alpha$ 。

在一个方面, 本发明涉及 D2E7 抗体和抗体部分、D2E7 相关抗体和抗体部分和其它具有与 D2E7 相同性质(例如以低解离动力学和高中和能力高亲和性地与 $\text{hTNF}\alpha$ 结合)的其它人抗体和抗体部分。在一个实施方案中, 本发明提供分离人抗体或其抗原结合部分, 它以不高于 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 的 K_d 和不高于 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 速率常数(均由表面等离子体激元共振测定)与人 $\text{TNF}\alpha$ 解离, 并在标准体外 L929 检测中以不高于 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 的 IC_{50} 中和人 $\text{TNF}\alpha$ 细胞毒性。该分离人抗体或其抗原结合部分更优选地以不高于 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 、甚至更优选地以不高于 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 的 K_{off} 与人 $\text{TNF}\alpha$ 解离。该分离人抗体或其抗原结合部分更优选地在标准体外 L929 检测中以不高于 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 、甚至更优选地以不高于 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 、再更优选地以不高于 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 的 IC_{50} 中和人 $\text{TNF}\alpha$ 细胞毒性。在一个最佳实施方案中, 该抗体是分离人重组抗体或其抗原结合部分。在另一最佳实施方案中, 如用标准体外检测进行 $\text{TNF}\alpha$ 诱导的 ELAM-1 在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)上表达所评价的, 该抗体亦中和 $\text{TNF}\alpha$ 诱导的细胞激活。

可以按照实施例 1 所述, 进行测定 K_d 和 K_{off} 的表面等离子体激元共振分析。在实施例 4 的 A 小节中描述了测定 IC_{50} 值的标准体外 L929 检测。在实施例 4 的 C 小节中描述了 $\text{TNF}\alpha$ 诱导的 ELAM-1 在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)上表达的标准体外检测。符合或预期符合上述动

力学和中和标准的重组人抗体的例子包括具有下述[VH/VL]对的抗体, 其序列示于图 1A、1B、2A 和 2B(有关动力学和中和分析亦可参见实施例 2、3 和 4): [D2E7 VH/D2E7 VL]; [HD2E7*.A1/D2E7 VL], [HD2E7*.A2/D2E7 VL], [HD2E7*.A3/D2E7 VL], [HD2E7*.A4/D2E7 VL], [HD2E7*.A5/D2E7 VL], [HD2E7*.A6/D2E7 VL], [HD2E7*.A7/D2E7 VL], [HD2E7*.A8/D2E7 VL], [HD2E7*.A9/D2E7 VL], [D2E7 VH/LD2E7*.A1], [D2E7 VH/LD2E7*.A4], [D2E7 VH/LD2E7*.A5], [D2E7 VH/LD2E7*.A7], [D2E7 VH/LD2E7*.A8], [HD2E7*.A9/LD2E7*.A1], [VH1-D2/LOE7], [VH1-D2.N/LOE7.T], [VH1-D2.Y/LOE7.A], [VH1-D2.N/LOE7.A], [VH1-D2/EP B12]和[3C-H2/LOE7].

本领域众所周知抗体重链和轻链 CDR3 域在抗体与抗原结合的特异性/亲和性方面起重要作用。因此, 在另一方面, 本发明涉及具有与 hTNF α 结合的低解离动力学并具有与 D2E7 的 CDR3 域在结构上相同或相关的轻链和重链 CDR3 域的人抗体。正如实施例 3 中证明的, D2E7 VL CDR3 的位置 9 可以被 Ala 或 Thr 占据而基本上不影响 K_{off} 。因此, D2E7 VL CDR3 的共有基序包含以下氨基酸序列: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A)(SEQ ID NO: 3)。另外, D2E7 VH CDR3 的位置 12 可以被 Tyr 或 Asn 占据而基本上不影响 K_{off} 。D2E7 VH CDR3 的共有基序包含以下氨基酸序列: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N)(SEQ ID NO: 4)。另外, 正如在实施例 2 中证明的, D2E7 重链和轻链的 CDR3 域可以经受用一个单丙氨酸残基置换(在该 VL CDR3 内的 1、4、5、7 或 8 位, 或在该 VH CDR3 内的 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 位)而基本上不影响该 K_{off} 。另外, 技术人员会理解, 已知 D2E7 VL 和 VH 的 CDR3 域对丙氨酸置换的经受性, 则在仍然保持该抗体的低解离速率常数时在所述 CDR3 域内的其它氨基酸置换也是可能的, 特别是用保守氨基酸置换。本文使用的“保守氨基酸置换”是指其中一个氨基酸残基被另一个具有类似侧链的氨基酸取代。具有类似侧链的

氨基酸残基的家族已在本领域中定义，它们包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、无电荷极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β 分枝侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。优选在 D2E7 VL 和/或 VH 的 CDR3 域内制造不超过 1 至 5 个保守氨基酸置换。更优选在 D2E7 VL 和/或 VH CDR3 域内制造不超过 1 至 3 个保守氨基酸置换。另外，不应在对与 hTNF α 结合的关键氨基酸位置进行保守氨基酸置换。如实施例 3 所示，看来该 D2E7 VL CDR3 的位置 2 和 5 以及该 D2E7 VH CDR3 的位置 1 和 7 对与 hTNF α 相互作用是关键的，因此最好不在这些位置进行保守氨基酸置换(尽管在该 D2E7 VL CDR3 的位置 5 的丙氨酸置换是可以接受的，如上所述)。

因此，在另一实施方案中，本发明提供具有以下特征的分离人抗体或其抗原结合部分：

a) 以不高于 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 的 K_{off} 速率常数(由表面等离子体激元共振测定)与人 TNF α 解离；

b) 具有的轻链 CDR3 域，该域包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列；或通过于位置 1、4、5、7 或 8 的单丙氨酸置换或通过于位置 1、3、4、6、7、8 和/或 9 的 1 至 5 个保守氨基酸置换从 SEQ ID NO: 3 修饰的氨基酸序列。

c) 具有重链 CDR3 域，该域包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列，或通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 的单丙氨酸置换或通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和/或 12 的 1 至 5 个保守氨基酸置换从 SEQ ID NO: 4 修饰的氨基酸序列。

更优选地是，该抗体或其抗原结合部分以不高于 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的 K_{off} 与人 TNF α 解离。甚至更优选地是，该抗体或其抗原结合部分以不高于 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 的 K_{off} 与人 TNF α 解离。

在再一实施方案中, 本发明提供分离人抗体或其抗原结合部分, 其轻链可变区(LCVR)具有的 CDR3 域包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列、或通过于位置 1、4、5、7 或 8 的单丙氨酸置换从 SEQ ID NO: 3 修饰的氨基酸序列, 其重链可变区(HCVR)具有的 CDR3 域包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列、或通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 的单丙氨酸置换从 SEQ ID NO: 4 修饰的氨基酸序列。优选地是, 该 LCVR 另外具有包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的 CDR2 域(即 D2E7 VL CDR2), 并且该 HCVR 另外具有包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 CDR2 域(即 D2E7 VH CDR2)。甚至更优选地是, 该 LCVR 另外具有包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 CDR1 域(即 D2E7 VL CDR1), 并且该 HCVR 具有包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 CDR1 域(即 D2E7 VH CDR1)。VL 的框架区优选来自 V_KI 人种系家族, 更优选来自 A20 人种系 V_k 基因, 最优选来自示于图 1A 和 1B 的该 D2E7 VL 框架序列。VH 的框架区优选来自 V_H3 人种系家族, 更优选来自 DP-31 人种系 VH 基因, 最优选来自示于图 2A 和 2B 的该 D2E7 VH 框架序列。

在又一实施方案中, 本发明提供具有包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列(即 D2E7 VL)的轻链可变区(LCVR)和包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列(即 D2E7 VH)的重链可变区(HCVR)的分离人抗体或其抗原结合部分。在某些实施方案中, 该抗体包含一重链恒定区, 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区。优选地是, 该重链恒定区是 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。另外, 该抗体可以包含一轻链恒定区, 或者 κ 轻链恒定区或者 λ 轻链恒定区。最好是, 该抗体包含 κ 轻链恒定区。另一方面, 该抗体部分可以是例如一 Fab 片段或一单链 Fv 片段。

在另一些实施方案中, 本发明提供具有 D2E7 相关 VL 和 VH 的 CDR3 域的分离人抗体或其抗原结合部分, 例如, 其轻链可变区(LCVR)具有包含选自以下氨基酸序列的 CDR3 域的抗体或其抗原结合部分:

SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 或其重链可变区(HCVR)具有包含选自以下氨基酸序列的 CDR3 域: SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35。

在另一实施方案中, 本发明提供中和人 $\text{TNF}\alpha$ 而非人 $\text{TNF}\beta$ 活性的重组人抗体或其抗原结合部分。最好是抗体或其抗原结合部分亦中和黑猩猩 $\text{TNF}\alpha$ 和选自以下的至少一种其它灵长类 $\text{TNF}\alpha$ 的活性: 狒狒 $\text{TNF}\alpha$ 、猿 $\text{TNF}\alpha$ 、猕猴 $\text{TNF}\alpha$ 和恒河猴 $\text{TNF}\alpha$ 。该抗体或其抗原结合部分在标准体外 L929 检测中中和人、黑猩猩和/或另一灵长类 $\text{TNF}\alpha$ 时的 IC_{50} 优选为不高于 1×10^{-8} M, 更优选为不高于 1×10^{-9} M, 甚至更优选为不高于 5×10^{-10} M。在一个分实施方案中, 该抗体亦中和犬 $\text{TNF}\alpha$ 的活性, 它在标准体外 L929 检测中的 IC_{50} 优选为不高于 1×10^{-7} M, 更优选为不高于 1×10^{-8} M, 甚至更优选为不高于 5×10^{-9} M。在另一分实施方案中, 该抗体亦中和猪 $\text{TNF}\alpha$ 的活性, 其 IC_{50} 优选为不高于 1×10^{-5} M, 更优选为不高于 1×10^{-6} M, 甚至更优选为不高于 5×10^{-7} M。在再一分实施方案中, 该抗体亦中和小鼠 $\text{TNF}\alpha$ 的活性, 其 IC_{50} 优选为不高于 1×10^{-4} M, 更优选为不高于 1×10^{-5} M, 甚至更优选为不高于 5×10^{-6} M。

可以将本发明的抗体或抗体部分衍生为或连接至另一功能分子(例如另一肽或蛋白)。因此, 本发明的抗体和抗体部分包括本文描述的人抗 h $\text{TNF}\alpha$ 抗体的衍生的和其它修饰的形式, 包括免疫粘附分子。例如, 本发明的抗体或抗体部分可以功能性地连接(通过化学偶联、遗传融合、非共价结合或其它)至一个或多个其它分子实体, 例如另一抗体(例如双特异性抗体或双抗体)、可检测药剂、细胞毒药剂、药用药

剂和/或可以介导该抗体或抗体部分与另一分子结合的蛋白或肽(例如抗生蛋白链菌素核心区或多组氨酸标记)。

一种类型的衍生抗体是通过交联二个或多个抗体(同一类型或不同类型,例如创造双特异性抗体)制备。适当的交联剂包括那些杂双官能的、具有二个由适当隔离物分隔的独特反应基团(例如邻马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯)或同双官能的(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)。可以从 Pierce Chemical Company, Rockford, IL 得到这些接头。

可以用于衍生本发明抗体或抗体部分的可检测剂包括荧光化合物。典型的荧光可检测剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、5-二甲基氨基-1-萘磺酰氯、藻红蛋白等等。亦可以用可检测酶衍生抗体,所述酶为例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等等。当用可检测酶衍生抗体时,通过加入该酶用于产生可检测反应产物的另外的试剂检测该抗体。例如,当有可检测剂辣根过氧化物酶时,加入过氧化氢和二氨基联苯胺产生可检测的有色反应产物。亦可以用生物素衍生抗体,并通过间接测定抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素结合检测。

II. 抗体表达

可以通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链制备本发明的抗体或抗体部分。为重组表达抗体,用携带编码该抗体免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段的一个或多个重组表达载体转染宿主细胞,使所述轻链和重链在该宿主细胞中表达并最好分泌至培养所述宿主细胞的培养基中,可以从该培养基回收所述抗体。使用了诸如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(编辑),分子克隆:实验室手册,第二版,冷泉港,纽约,(1989),Ausubel, F.M.等(编辑)分子生物学现行方法, Greene Publishing Associates, (1989)和 Boss 等的美国专利 4,816,397 号

描述的标准重组 DNA 方法, 以获得抗体重链和轻链基因、将这些基因加入重组表达载体并将所述载体导入宿主细胞。

为表达 D2E7 或 D2E7 相关抗体, 首先获得编码所述轻链和重链可变区的 DNA 片段。可以通过使用聚合酶链式反应(PCR)扩增和修饰种系轻链和重链可变序列制备这些 DNA。本领域已知道人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列(参见例如“Vbase”人种系序列数据库; 亦可参见 Kabat, E.A.等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M.等(1992) “人种系 V_H 序列的所有组成部分揭示约 50 组具有不同超变环的 V_H 区段” *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 和 Cox, J.P.L.等(1994) “人种系 V_K 区段的目录揭示在其使用中的强偏差” *Eur. J. Immunol.* 24:827-836;其内容通过引用结合到本文中)。为获得编码该 D2E7 或 D2E7 相关抗体的重链可变区的 DNA 片段, 通过标准 PCR 扩增人种系 VH 基因的 V_H3 家族的一员。最优选地是, 扩增 DP-31 VH 种系序列。为获得编码 D2E7 或 D2E7 相关抗体的轻链可变区的 DNA 片段, 通过标准 PCR 扩增人种系 VL 基因的 V_KI 家族的一员。最优选地, 扩增 A20 VL 种系序列。可以使用标准方法、根据上述引用参考文献中公开的核苷酸序列, 设计用于扩增 DP-31 种系 VH 和 A20 种系 VL 序列的适当 PCR 引物。

一旦得到所述种系 VH 和 VL 片段后, 可以使这些序列突变以编码本文公开的所述 D2E7 或 D2E7 相关氨基酸序列。首先将由种系 VH 和 VL DNA 序列编码的氨基酸序列与所述 D2E7 或 D2E7 相关 VH 和 VL 氨基酸序列比较, 以鉴别在所述 D2E7 或 D2E7 相关序列中与种系不同的氨基酸残基。然后, 使用遗传密码确定应改变的核苷酸, 将所述种系 DNA 序列的适当核苷酸突变, 使得该突变种系序列编码该 D2E7 或 D2E7 相关氨基酸序列。通过标准方法例如 PCR 介导的诱变(其中将所述突变核苷酸加入所述 PCR 引物, 使得所述 PCR 产物含有所述突变)或定点诱变进行所述种系序列的诱变。

另外, 应注意如果该通过 PCR 扩增得到的“种系”序列在框架区编码的氨基酸与真正的种系构型不同(即例如由于体细胞突变, 与真正的种系序列相比扩增序列中有差异), 可能最好将这些氨基酸差异变回真正的种系序列(即框架残基“回复突变”至该种系构型)。

一旦得到编码 D2E7 或 D2E7 相关 VH 和 VL 片段的 DNA 片段(按上述, 通过扩增和诱变种系 VH 和 VL 基因), 可以通过标准重组 DNA 技术进一步操作这些 DNA 片段, 例如, 将所述可变区基因转变为全长抗体链基因、 Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中, 将 VL 或 VH 编码 DNA 片段可操作地连接至编码另一蛋白(例如抗体恒定区或挠性接头)的另一 DNA 片段。本文使用的术语“可操作地连接”是指连接这二个 DNA 片段使得由这二个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持在框架中。

通过可操作地将该 VH 编码 DNA 连接至另一编码重链恒定区(CH1、CH2 和 CH3)的 DNA 分子, 可以将编码该 VH 区的分离 DNA 转变为全长重链基因。本领域已知道人重链恒定区基因序列(参见例如 Kabat, E.A.等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO. 91-3242), 并且可以通过标准 PCR 扩增获得包含这些区的 DNA 片段。该重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区, 但最好是 IgG1 或 IgG4 恒定区。关于 Fab 片段重链基因, 可以将该 VH 编码 DNA 可操作地连接至仅编码该重链 CH1 恒定区的另一 DNA 分子。

通过可操作地将该 VL 编码 DNA 连接至另一编码该轻链恒定区 CL 的 DNA 分子, 可以将编码该 VL 区的分离 DNA 转变为全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。本领域已知道人轻链恒定区基因序列(参见例如 Kabat, E.A.等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication

NO. 91-3242), 并且可以通过标准 PCR 扩增获得包含这些区的 DNA 片段。该轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区, 但最好是 κ 恒定区。

为制备 scFv 基因, 将所述 VH 和 VL 编码 DNA 片段可操作地连接至编码挠性接头(例如编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃)的另一片段, 使得该 VH 和 VL 序列做为相连单链蛋白表达, 由该挠性接头连接所述 VL 和 VH 区(参见例如 Bird 等(1988) *Science* 242:423-426; Huston 等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty 等, *Nature* (1990) 348: 552-554)。

为表达本发明的抗体或抗体部分, 将上述得到的编码部分或全长轻链和重链的 DNA 插入表达载体, 使得所述基因可操作地连接至转录和转译控制序列。在本文中, 术语“可操作地连接”是指抗体基因连接至载体中, 使得该载体内的转录和转译控制序列发挥它们调节该抗体基因转录和转译的既定功能。选择该表达载体和表达控制序列使之与所用的表达宿主细胞相容。可以将该抗体轻链和该抗体重链插入单独的载体中, 或更常用的是将这两个基因插入同一载体中。通过标准方法(例如连接该抗体基因片段和载体上的互补限制位点、或如果没有限制位点就进行平端连接)将所述抗体基因插入该表达载体。在插入该 D2E7 或 D2E7 相关轻链或重链序列之前, 该表达载体可以已经携带抗体恒定区序列。例如, 将该 D2E7 或 D2E7 相关序列转变为全长抗体基因的一个方法是, 将它们分别插入已经编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体, 使得该 VH 区段可操作地连接至该载体内的 CH 区段并使该 VL 区段可操作地连接至该载体内的 CL 区段。另外或二者择一地, 该重组表达载体可以编码便于该抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将该抗体链基因克隆入该载体, 使得该信号肽在框架内连接至该抗体链基因的氨基末端。该信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

除所述抗体链基因之外, 本发明的重组表达载体还携带控制所述抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”包括启

动子、增强子和控制所述抗体链基因转录或转译的其它表达控制元件(例如多腺苷酸化信号)。这种调节序列例如描述于 Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)。本领域技术人员会理解该表达载体的设计(包括选择调节序列)可以取决于种种因素,例如选择欲转化的宿主细胞、所需蛋白的表达水平等。优选的哺乳动物细胞表达调节序列包括指导在哺乳动物细胞中高水平蛋白表达的病毒元件,例如来自巨细胞病毒(CMV)(例如 CMV 启动子/增强子)、猿猴病毒 40 (SV40)(例如 SV40 启动子/增强子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP)和多形瘤的启动子和/或增强子。有关病毒调节元件及其序列的进一步描述,参见例如 Stinski 的美国专利 5,168,062 号、Bell 等的美国专利 4,510,245 号和 Schaffner 等的美国专利 4,968,615 号。

除所述抗体链基因和调节序列之外,本发明的重组表达载体还可以携带其它序列,例如在宿主细胞中调节该载体复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。该选择标记基因便于选择已导入该载体的宿主细胞(参见例如 Axel 等的美国专利 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017 号)。例如,一般该选择标记基因赋予已导入该载体的宿主细胞对药物(例如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤)的抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于 dhfr 宿主细胞用氨甲蝶呤选择/扩增)和 *neo* 基因(用于 G418 选择)。

为表达所述轻链和重链,将编码所述重链和轻链的表达载体通过标准技术转染入宿主细胞。术语“转染”的各种形式涵盖了众多的各种用于将外源基因导入原核或真核宿主细胞的常用技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE 葡聚糖转染等等。尽管理论上可以在或者原核宿主细胞或者真核宿主细胞中表达本发明的抗体,但最优选在真核细胞中、最优选在哺乳动物细胞中表达抗体,因为这种真核细胞、特别是哺乳动物细胞比原核细胞更有可能装配和分泌正确折叠和具免疫活性的抗体。据报道抗体基因原核表达在活性抗体的高产率生产方面

是低效的(Boss, M.A.和 Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

优选的表达本发明重组抗体的哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠子宫(CHO)细胞(包括 dhfr⁻ CHO 细胞, 描述于 Urlaub 和 Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, 与 DHFR 选择标记一起使用, 例如描述于 R.J. Kaufman 和 P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时, 通过培养所述宿主细胞足够时间以在所述宿主细胞中表达该抗体, 或更优选地将该抗体分泌到所述宿主细胞生长的培养基中生产所述抗体。使用标准蛋白纯化方法可以从该培养基中回收抗体。

亦可以用宿主细胞生产完整抗体的部分, 例如 Fab 片段或 scFv 分子。应理解上述方法的变化亦属于本发明的范围。例如, 可能最好用编码本发明抗体的或者轻链或者重链(但不是两者)的 DNA 转染宿主细胞。亦可以用重组 DNA 技术除去编码对与 hTNF α 结合非必需的或者轻链或者重链或者这二者的一些或全部 DNA。本发明的抗体亦包括从这种截短的 DNA 分子表达的分子。另外, 通过用标准化学交联方法交联本发明的抗体和第二抗体, 可以生产双功能抗体, 其中一条重链和一条轻链是本发明的抗体, 另一条重链和另一条轻链对非 hTNF α 的抗原具特异性。

在一重组表达本发明抗体或其抗原结合部分的推荐系统中, 通过磷酸钙介导的转染将既编码该抗体重链又编码该抗体轻链的重组表达载体导入 dhfr⁻ CHO 细胞。在该重组表达载体中, 所述抗体重链和轻链基因都可操作地连接至增强子/启动子调节元件(例如来自 SV40、CMV、腺病毒等等的, 例如 CMV 增强子/AdMLP 启动子调节元件或 SV40 增强子/AdMLP 启动子调节元件)以驱动所述基因的高水平转录。该重组表达载体亦携带 DHFR 基因, 它使得可以用氨甲蝶呤选择/扩增选择已用该载体转染的 CHO 细胞。培养该选出的转化体宿主细胞

以表达所述抗体重链和轻链，并从该培养基中回收完整抗体。使用标准分子生物学方法制备该重组表达载体、转染所述宿主细胞、选择转化体、培养所述宿主细胞并从该培养基中回收该抗体。

鉴于前述，本发明的另一方面涉及可以用于重组表达本发明抗体和抗体部分的核酸、载体和宿主细胞组合。编码该 D2E7 轻链可变区的核苷酸序列示于图 7 和 SEQ ID NO: 36。该 LCVR 的 CDR1 域包括核苷酸 70-102，该 CDR2 域包括核苷酸 148-168，而该 CDR3 域包括核苷酸 265-291。编码该 D2E7 重链可变区的核苷酸序列示于图 8 和 SEQ ID NO: 37。该 HCVR 的 CDR1 域包括核苷酸 91-105，该 CDR2 域包括核苷酸 148-198，而该 CDR3 域包括核苷酸 295-330。技术人员会理解，使用遗传密码和标准分子生物学技术可以从编码该 D2E7 LCVR 和 HCVR 的核苷酸序列衍生编码 D2E7 相关抗体或其部分(例如诸如 CDR3 域的 CDR 域)的核苷酸序列。

在一个实施方案中，本发明提供编码轻链 CDR3 域的分离核酸，该 CDR3 域包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列(即 D2E7 VL CDR3)、或包含通过于位置 1、4、5、7 或 8 的单丙氨酸置换或通过于位置 1、3、4、6、7、8 和/或 9 的一至五个保守氨基酸置换从 SEQ ID NO: 3 修饰的氨基酸序列。该核酸可以仅编码该 CDR3 区，或更优选编码整个抗体轻链可变区(LCVR)。例如，该核酸可以编码一个具有包含 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的 CDR2 域(即 D2E7 VL CDR2)和包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的 CDR1 域(即 D2E7 VL CDR1)的 LCVR。

在另一实施方案中，本发明提供编码重链 CDR3 域的分离核酸，该 CDR3 域包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列(即 D2E7 VH CDR3)、或包含通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 的单丙氨酸置换或通过于位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和/或 12 的一至五个保守氨基酸置换从 SEQ ID NO: 4 修饰的氨基酸序列。该核酸可以仅编码该 CDR3 区，或更优选编码整个抗体重链可变区

(HCVR)。例如，该核酸可以编码一个具有包含 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的 CDR2 域(即 D2E7 VH CDR2)和包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 CDR1 域(即 D2E7 VH CDR1)的 HCVR。

在再一实施方案中，本发明提供编码 D2E7 相关 CDR3 域的分离合核酸，该 CDR3 域例如包含选自以下的氨基酸序列：SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34 和 SEQ ID NO: 35。

在又一实施方案中，本发明提供编码包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的抗体轻链可变区(即 D2E7 LCVR)的分离合核酸。该核酸最好包含 SEQ ID NO: 36 的核苷酸序列，尽管技术人员会理解由于遗传密码的简并性，其它核苷酸序列可以编码 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。该核酸可以仅编码该 LCVR 或亦可以编码可操作地连接至该 LCVR 的抗体轻链恒定区。在一个实施方案中，该核酸存在于一个重组表达载体中。

在又一实施方案中，本发明提供编码包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的抗体重链可变区(即 D2E7 HCVR)的分离合核酸。该核酸最好包含 SEQ ID NO: 37 的核苷酸序列，尽管技术人员会理解由于遗传密码的简并性，其它核苷酸序列可以编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列。该核酸可以仅编码该 HCVR 或亦编码可操作地连接至该 HCVR 的重链恒定区。例如，该核酸可以包含 IgG1 或 IgG4 恒定区。在一个实施方案中，该核酸存在于一个重组表达载体中。

本发明亦提供既编码抗体重链又编码抗体轻链的重组表达载体。例如，在一个实施方案中，本发明提供编码以下的重组表达载体：

(a) 具有包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列的可变区的抗体轻链(即 D2E7 LCVR); 和

(b) 具有包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的可变区的抗体重链(即 D2E7 HCVR)。

本发明亦提供已导入一个或多个本发明重组表达载体的宿主细胞。该宿主细胞优选是哺乳动物宿主细胞, 该宿主细胞更优选是 CHO 细胞、 NS0 细胞或 COS 细胞。

另外本发明提供合成本发明重组人抗体的方法, 即通过在适当培养基中培养本发明的宿主细胞直至合成本发明的重组人抗体。该方法还包括从该培养基中分离该重组人抗体。

III. 选择重组人抗体

可以通过筛选重组联合抗体文库、最好是从得自人淋巴细胞的 mRNA 制备的人 VL 和 VH cDNA 制备的 scFv 噬菌体呈现文库分离除本文公开的该 D2E7 或 D2E7 相关抗体之外的本发明重组人抗体。本领域已知道制备和筛选这种文库的方法学。除市售制备噬菌体呈现文库的药盒(例如 Pharmacia 的重组噬菌体抗体系统, 目录号 27-9400-01; 和 Stratagene SurfZAP™噬菌体呈现药盒, 目录号 240612)之外, 可以在以下文献中找到特别适用于制备和筛选抗体呈现文库的方法和试剂: 例如 Ladner 等的美国专利 5,223,409 号; Kang 等的 PCT 说明书 WO 92/18619 号; Dower 等的 PCT 说明书 WO 91/17271 号; Winter 等的 PCT 说明书 WO 92/20791 号; Markland 等的 PCT 说明书 WO 92/15679 号; Breitling 等的 PCT 说明书 WO 93/01288 号; McCafferty 等的 PCT 说明书 WO 92/01047 号; Garrard 等的 PCT 说明书 WO 92/09690 号; Fuchs 等(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay 等(1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse 等(1989) *Science* 246:1275-1281; McCafferty 等, *Nature* (1990) 348:552-554; Griffiths 等(1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins 等(1992) *J Mol Biol* 226:889-896; Clackson 等(1991) *Nature*

352:624-628; Gram 等(1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrad 等(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom 等(1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137;和 Barbas 等(1991) *PNAS* 88:7978-7982.

在一个最佳实施方案中,为分离对 hTNF α 具有高亲和性和低解离速率常数的人抗体,首先用对 hTNF α 具有高亲和性和低解离速率常数的鼠抗 hTNF α 抗体(例如 MAK 195, 保藏号为 ECACC 87 050801 的杂交瘤)、采用描述于 Hoogenboom 等的 PCT 说明书 WO 93/06213 号的表位印记或导向选择方法,选择具有对 hTNF α 类似的结合活性的人重链和轻链序列。在该方法中使用的抗体文库最好是按照 McCafferty 等的 PCT 说明书 WO 92/01047 号, McCafferty 等, *Nature* (1990) 348: 552-554;和 Griffiths 等, (1993) *EMBO J* 12:725-734 所述制备和筛选的 scFv 文库。最好用重组人 TNF α 做为抗原筛选所述 scFv 抗体文库。

一旦选择出最初的人 VL 和 VH 区段,就进行“混合和配对”实验,在该实验中对最初选择的 VL 和 VH 区段的不同配对进行 hTNF α 结合筛选,以选择优选的 VL/VH 对组合。另外,为进一步提高对 hTNF α 结合的亲和性和/或降低 hTNF α 结合的解离速率常数,可以对优选的 VL/VH 对的 VL 和 VH 区段进行随机突变,该突变最好在 VH 和/或 VL 的 CDR3 区进行,突变过程与造成在自然免疫应答中抗体亲和性成熟的体内体细胞突变过程相似。可以使用与 VH CDR3 或 VL CDR3 分别互补的 PCR 引物,通过扩增 VH 和 VL 区完成这种体外亲和性成熟,所述引物已用四种核苷酸碱基的随机混合物于某些位置“钉入”,使得该得到的 PCR 产物编码已在 VH 和/或 VL CDR3 区中导入随机突变的 VH 和 VL 区段。可以再次筛选这些随机突变 VH 和 VL 区段的 hTNF α 结合性,可以选择出展示对 hTNF α 结合有高亲和性和低解离速率的序列。

可以将选择的抗体重链和轻链的氨基酸序列与种系重链和轻链氨基酸序列比较。在该选择的 VL 和/或 VH 链的某些框架残基不同于种系构型时(例如由于用于制备该噬菌体文库的免疫球蛋白基因的体

细胞突变的结果), 可能需要将所述选定抗体的改变的框架残基“回复突变”为该种系构型(即改变该选定抗体的框架氨基酸序列, 使它们与所述种系框架氨基酸序列相同)。框架残基的这种“回复突变”(或“种系化”)可以通过用于导入特异性突变的标准分子生物学方法(例如定点诱变; PCR 介导的诱变等等)完成。

在从重组免疫球蛋白呈现文库筛选和分离本发明的抗 hTNF α 抗体之后, 可以从该呈现包装物(例如从该噬菌体基因组)回收编码该选择抗体的核酸并通过标准重组 DNA 技术将其亚克隆入其它表达载体。如果需要, 可以进一步操作该核酸以创造本发明的其它抗体形式(例如连接至编码另外免疫球蛋白结构域的核酸, 例如其它恒定区)。为表达通过联合文库筛选分离的重组人抗体, 如上述 II 节详述, 将编码该抗体的 DNA 克隆入重组表达载体并导入哺乳动物宿主细胞。

IV. 药用组合物和给药

可以将本发明的抗体和抗体部分加入适于给与受治疗者的药用组合物中。通常, 该药用组合物包含本发明的抗体或抗体部分和药学上可接受的载体。本文使用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有的生理适用的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等等。药学上可接受载体的例子包括一种或多种的水、盐水、磷酸缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等等及其组合物。在许多情况下, 在该组合物中最好包括等渗剂, 例如, 糖、诸如甘露醇、山梨醇的多元醇、或氯化钠。药学上可接受载体还可以包含少量的辅助物质, 例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲液, 它们增强了该抗体或抗体部分的有效期或效力。

本发明的组合物可以有各种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂量形式, 例如液体溶液(例如注射液和输注液)、分散液或悬液、片剂、丸剂、粉剂、脂质体和栓剂。推荐的形式取决于给药方式和治疗用途。典型的推荐组合物是注射液或输注液的形式, 例如与

用其它抗体对人进行被动免疫所用的组合物类似的组合物。推荐的给药方式是非肠道的(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在一个最佳实施方案中,通过静脉内输液或注射给与该抗体。在另一最佳实施方案中,通过肌肉注射或皮下注射给与该抗体。

治疗组合物一般必须无菌且在生产储存条件下稳定。可以将该组合物配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适于高药物浓度的有序结构。通过将所需量的该活性化合物(即抗体或抗体部分)与所需上述成分的一种或组合一起加入适当的溶剂中并接着进行除菌过滤制备无菌注射液。一般而言,通过将该活性化合物加入含有基本分散介质和所需的上述其它成分的无菌溶媒中制备分散液。在用于制备无菌注射液的无菌粉剂的情况下,推荐的制备方法是真空干燥和冷冻干燥产生该活性成分与任何其它来自先前除菌过滤溶液的所需成分的粉剂。例如通过诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下通过保持所需颗粒大小和通过使用表面活性剂,可以保持溶液的适当流动性。通过在该组合物中包括延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸盐和明胶)可以达到注射组合物的延长吸收。

本发明的抗体和抗体部分可以用本领域已知的各种方法给药,尽管在许多治疗用途中推荐的给药途径/给药方式是静脉内注射或输液。技术人员会理解给药途径和/或给药方式随所需的结果而变化。在某些实施方案中,该活性化合物可以与保护该化合物免于快速释放的载体一同制备,例如控释制剂,包括移植物、透皮贴和微囊传递系统。可以使用生物可降解的、生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙酯、聚酐、聚羟基乙酸、胶原蛋白、聚正酯和聚乳酸。制备这种制剂的许多方法均已申请专利或一般为本领域技术人员所知。参见例如 *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson 编辑, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1978。

在某些实施方案中,本发明的抗体或抗体部分可以与例如惰性稀释剂或可同化的食用载体一同口服。该化合物(和其它成分,如果需要)

亦可以包于硬或软壳明胶胶囊、压制成片剂或直接加入受治疗者的膳食中。关于口服治疗给药, 可以将所述化合物与赋形剂一起加入并以可食片剂、颊含片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬液、糖浆、糯米纸囊剂等等形式使用。为了以非肠道给药之外给与本发明的化合物, 可能需要用防止其失活的材料对该化合物包衣或与该化合物一同给与。

亦可以将补充的活性化合物加入该组合物中。在某些实施方案中, 将本发明的抗体或抗体部分与一种或多种可以用于治疗 hTNF α 活性为有害的疾病的其它治疗药物共配制和/或共给与。例如, 本发明的抗体或抗体部分可以与一种或多种结合其它靶的抗体(例如结合其它细胞因子的抗体或结合细胞表面分子的抗体)、一种或多种细胞因子、可溶性 TNF α 受体(参见例如 PCT 说明书 WO 94/06476 号)和/或一种或多种抑制 hTNF α 产生或活性的化学药剂(例如 PCT 说明书 WO 93/19751 号中描述的亚环己烷基衍生物)共配制和/或共给与。另外, 可以将一种或多种本发明的抗体与二种或多种前述治疗药物联用。这种联合治疗可以优越地利用较低剂量的该给与的治疗药物, 因此避免可能的毒性或与各种单一疗法相关的并发症。

可以与本发明的抗体或抗体部分联用的类风湿性关节炎治疗药物的非限制性例子包括以下: 非类固醇抗炎药(NSAID); 细胞因子抑制抗炎药(CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (人化抗 TNF α 抗体; Celltech/Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG(5 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (无缺失灵长类化抗 CD4 抗体; IDEC/SmithKline; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1995) Vol. 38, S185); DAB 486-IL-2 和/或 DAB 389-IL-2 (IL-2 融合蛋白; Seragen; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223); 抗 Tac(人化抗 IL-2R α ; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (抗炎细胞因子;

DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; 重组 IL-10, 抗炎细胞因子; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 和/或 IL-4 激动剂(例如激动剂抗体); IL-1RA (IL-1 受体拮抗剂; Synergen/Amgen); TNF-bp/s-TNFR (可溶性 TNF 结合蛋白; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S284; *Amer. J. Physiol. -Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, 第 37-42 页); R973401 (磷酸二酯酶 IV 型抑制剂; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S282); MK-966 (COX-2 抑制剂; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S81); 伊洛前列素(参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S82); 氨甲蝶呤; 酞胺哌啶酮(参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S282)和酞胺哌啶酮相关药物 (例如 Celgen); 来氟米特 (抗炎和细胞因子抑制剂; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, 第 103-107 页); 凝血酸(血纤维蛋白溶酶原激活抑制剂; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S284); T-614 (细胞因子抑制剂; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S282); 前列腺素 E1(参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S282); 替尼达普(非类固醇抗炎药; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S280); 萘普生(非类固醇抗炎药; 参见例如 *Neuro Report* (1996) Vol. 7, 第 1209-1213 页); 美洛昔康 (非类固醇抗炎药); 布洛芬(非类固醇抗炎药); 吡罗昔康(非类固醇抗炎药); 双氯芬酸 (非类固醇抗炎药); 消炎痛(非类固醇抗炎药); 柳氮磺胺吡啶(参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S281); 硫唑嘌呤 (参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S281); ICE 抑制剂(白介素-1 β 转化酶抑制剂); zap-70 和/或 lck 抑制剂(酪氨酸激酶 zap-70 或 lck 抑制剂); VEGF 抑制剂和/或 VEGF-R 抑制剂(血管内皮细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子受体抑制剂; 血

管发生抑制剂); 皮质类固醇抗炎药(例如 SB203580); TNF-转化酶抑制剂; 抗IL-12 抗体; 白介素-11 (参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S296); 白介素-13 (参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S308); 白介素-17 抑制剂(参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, 第 9 期(增刊), S120); 金; 青霉胺; 氯喹; 羟氯喹; 苯丁酸氮芥; 环磷酰胺; 环孢菌素; 全淋巴照射; 抗胸腺细胞球蛋白; 抗 CD4 抗体; CD-5 毒素; 口服肽和胶原蛋白; 氯苯扎利二钠; 细胞因子调节剂 (CRA) HP228 和 HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸(ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 可溶性补体受体 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); 强的松; 肝蛋白; 葡糖胺聚糖多硫酸盐; 二甲胺四环素; 抗 IL2R 抗体; 海洋和植物脂质(鱼类和植物种子脂肪酸; 参见例如 DeLuca 等(1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21: 759-777); 金诺芬; 保泰松; 甲氯芬那酸; 氟芬那酸; 静注免疫球蛋白; 齐留通; 霉酚酸(RS-61443); 他克莫司 (FK-506); 西罗莫司(雷帕霉素); 氨普立糖 (therafectin); 克拉屈滨(2-氯脱氧腺苷); 和阿扎立平。

可以与本发明的抗体或抗体部分联用的炎症性肠病治疗药物的非限制性例子包括以下: budenoside; 表皮生长因子; 皮质类固醇; 环孢菌素; 柳氮磺胺吡啶; 氨基水杨酸盐; 6-巯基嘌呤; 硫唑嘌呤; 甲硝唑; 脂氧合酶抑制剂; 氨水杨酸; 奥沙拉秦; 巴柳氮; 抗氧化剂; 凝血噁烷抑制剂; IL-1 受体拮抗剂; 抗 IL-1 β 单克隆抗体; 抗 IL-6 单克隆抗体; 生长因子; 弹性蛋白酶抑制剂; 吡啶基-咪唑化合物; CDP-571/BAY-10-3356 (人化抗 TNF α 抗体; Celltech/Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (55kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); 白介素-10 (SCH 52000; Schering Plough); IL-4; IL-10 和/或 IL-4 激动剂(例如激动

剂抗体); 白介素-11; 强的松龙、地塞米松或布地奈德的葡糖苷酸或葡聚糖结合前体药物; ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡聚脱氧核苷酸 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 可溶性补体受体1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); 缓释氨水杨酸; 氨甲蝶呤; 血小板激活因子(PAF)拮抗剂; 环丙沙星; 和利多卡因。

可以与本发明的抗体或抗体部分联用的多发性硬化治疗药物的非限制性例子包括以下: 皮质类固醇; 强的松龙; 甲基强的松龙; 硫唑嘌呤; 环磷酰胺; 环孢菌素; 氨甲蝶呤; 4-氨基吡啶; 替扎尼定; 干扰素- β 1a (AvonexTM; Biogen); 干扰素- β 1b (BetaseronTM; Chiron/Berlex); Copolymer 1(Cop-1; CopaxoneTM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 高压氧; 静注免疫球蛋白; clabribine; CDP-571/BAY-10-3356 (人化抗 TNF α 抗体; Celltech/Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); IL-10; IL-4; 和 IL-10 和/或 IL-4 激动剂(例如激动剂抗体)。

可以与本发明的抗体或抗体部分联用的脓毒症治疗药物的非限制性例子包括以下: 高渗盐溶液; 抗生素; 静注 γ 球蛋白; 连续性滤血; 碳青霉烯(例如 meropenem); 诸如 TNF α 、IL-1 β 、IL-6 和/或 IL-8 的细胞因子的拮抗剂; CDP-571/BAY-10-3356 (人化抗 TNF α 抗体; Celltech/Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); 细胞因子调节剂(CRA) HP228 和 HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); SK&F 107647 (低分子肽; SmithKline Beechem); 四价脒基脲 CNI-1493 (Picower Institute); 组织因子通道抑

制剂(TFPI; Chiron); PHP (化学修饰血红蛋白; APEX Bioscience); 铁螯合剂和螯合物, 包括五乙酸二乙三胺-铁(III)络合物(DPTA铁(III); Molichem Medicines); lisofylline (合成小分子甲基黄嘌呤; Cell Therapeutics, Inc.); PGG-葡聚糖(水溶性 β 1,3 葡聚糖; Alpha-Beta Technology); 用脂类重建的载脂蛋白 A-1; 手性异羟肟酸(抑制脂 A 生物合成的合成抗菌剂); 抗内毒素抗体; E5531(合成脂 A 拮抗剂; Eisai America, Inc.); rBPI₂₁(人杀菌剂/透过性增强蛋白的重组 N 末端片段); 和合成抗内毒素肽(SAEP; Biosynth Research Laboratories);

可以与本发明的抗体或抗体部分联用的成人呼吸窘迫综合症 (ARDS)治疗药物的非限制性例子包括以下: 抗 IL-8 抗体; 表面活性剂置换疗法; CDP-571/BAY-10-3356 (人化抗 TNF α 抗体; Celltech/Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见例如 *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A); 和 55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche).

在 IV 小节中进一步讨论将本发明的抗体或抗体部分与其它治疗药物联用的用途。

本发明的药用组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体或抗体部分。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间下有效达到所需治疗效果的量。抗体或抗体部分的治疗有效量可以根据诸如个体的病况、年龄、性别和体重以及该抗体和抗体部分在该个体引起所需反应的能力等因素而变化。治疗有效量亦指该抗体或抗体部分的有益治疗效果超过其任何毒性或有害效果的量。“预防有效量”是指在必要剂量和时间下有效达到所需预防效果的量。因为预防剂量用于患病前或疾病早期的受治疗者, 预防有效量通常小于治疗有效量。

可以调整剂量制度以提供最佳所需反映(例如治疗或预防应答)。例如, 可以单次大团给药, 可以在一段时间内给与几个均分量或根据治疗情况的迫切性按比例降低或增加剂量。配制易于给药和剂量统一的剂量单位形式的非肠道组合物尤其有利。本文使用的剂量单位形式指适于欲治疗的哺乳动物受治疗者的单元剂量的物理分离单位; 每个单位含有预定量的计算用于与所需药用载体一同产生所需治疗效果的活性化合物。本发明的剂量单位形式的规格由以下确定并直接取决于以下(a)该活性化合物的独特特征和欲达到的特定治疗或预防效果, 和(b)在混合这种用于治疗个体敏感性活性化合物的技术中的内在限制。

本发明的抗体或抗体部分的治疗或预防有效量的典型的非限制性范围是 0.1-20 mg/kg, 更优选为 1-10 mg/kg。应注意剂量值将根据欲减轻的疾病类型和严重性变化。另外应理解对于任何特定受治疗者, 应随着时间根据个体需要和给与或监督给与所述组合物的人的专业判断调整特定剂量制度, 并且本文设定的剂量范围仅为例证性的, 并不会限制要求保护的组合物的范围或实践。

IV. 本发明抗体的用途

已知本发明的抗 hTNF α 抗体或其部分结合 hTNF α 的能力, 可以将其用于在诸如酶联免疫吸附检测(ELISA)、放射免疫检测(RIA)或组织免疫组织化学的常规免疫检测中检测 hTNF α (例如在诸如血清或血浆的生物样品中)。本发明提供在生物样品中检测 hTNF α 的方法, 该方法包括用本发明的抗体或抗体部分接触生物样品并检测或者结合至 hTNF α 的抗体(或抗体部分)或者未结合抗体(或抗体部分), 由此检测该生物样品中的 hTNF α 。用便于检测结合或未结合抗体, 用可检测物质直接或间接标记该抗体。合适的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射性物质。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 合适的辅基复合体例子

包括抗生蛋白链菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光物质的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的例子包括鲁米诺;而合适的放射性物质的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

与标记该抗体二者择一地,利用用可检测物质标记的 rhTNF α 标准和未标记抗 hTNF α 抗体,通过竞争免疫检测可以在生物流体中检测 hTNF α 。在该检测中,将该生物样品、该标记 rhTNF α 标准和该抗 hTNF α 抗体混合并测定与该未标记抗体结合的标记 rhTNF α 标准的量。该生物样品中的 hTNF α 量与结合至该抗 hTNF α 抗体的标记 rhTNF α 标准的量成反比。

亦可以用本发明的 D2E7 抗体检测来自除人类之外的其它物种的 TNF α ,特别是来自灵长类(例如黑猩猩、狒狒、猿、猕猴和恒河猴)、猪和小鼠的 TNF α ,因为 D2E7 可以与这些 TNF α 的每一种结合(在实施方案 4 的 E 小节中进一步讨论)。

本发明的抗体和抗体部分能够在体外和体内中和 hTNF α 活性(参见实施方案 4)。另外,至少一些本发明抗体(例如 D2E7)可以中和来自其它物种的 TNF α 。因此,本发明的抗体和抗体部分可以用于例如在含有 hTNF α 的细胞培养物、在人类受治疗者或在其它具有本发明的抗体可以交叉反应的 TNF α 的哺乳动物受治疗者(例如黑猩猩、狒狒、猿、猕猴和恒河猴、猪或小鼠)中抑制 TNF α 活性。在一个实施方案中,本发明提供抑制 TNF α 活性的方法,该方法包括用本发明的抗体或抗体部分接触 TNF α 使得 TNF α 活性被抑制。该 TNF α 最好是人 TNF α 。例如,可以在含有或怀疑含有 hTNF α 的细胞培养物的培养基中加入本发明的抗体或抗体部分,以抑制该培养物中的 hTNF α 活性。

在另一实施方案中,本发明提供在患病的受治疗者中抑制 TNF α 的方法,在该病中 TNF α 活性是有害的。已提出 TNF α 参与许多的各种紊乱的病理生理学(参见例如 Moeller, A. 等(1990) *Cytokine* 2:162-169; 授予 Moeller 等的美国专利 5,231,024; Moeller, A. 等的欧洲专利公开

260 610 B1 号)。本发明提供在患这种紊乱的受治疗者中有关 TNF α 活性的方法, 该方法包括给与该受治疗者本发明的抗体或抗体部分, 使得该受治疗者中的 TNF α 活性被抑制。最好是, 该 TNF α 是人 TNF α 并且该受治疗者是人。二者择一地, 该受治疗者可以是表达本发明抗体交叉反应的 TNF α 的哺乳动物。另外的该受治疗者可以是已经导入 hTNF α 的哺乳动物(例如通过给与 hTNF α 或通过表达 hTNF α 转基因)。可以将本发明的抗体以治疗目的给与人受治疗者(以下进一步讨论)。另外, 可以将本发明的抗体给与表达该抗体交叉反应的 TNF α 的非人类哺乳动物(例如灵长类、猪或小鼠), 以达到兽医目的或做为人类疾病的动物模型。有关后者, 这种动物模型可以用于评价本发明抗体的治疗效力(例如测试给药的剂量和时间过程)。

本文使用的术语“其中 TNF α 活性是有害的紊乱”包括疾病和其它紊乱, 其中在患该紊乱的受治疗者中 TNF α 的存在已显示出或被怀疑或者对该病的病理生理学负责或是造成该病加重的因子。因此, 其中 TNF α 是有害的紊乱是这样一种紊乱, 其中 TNF α 活性的抑制预期将减轻该紊乱的症状和/或进程。这种紊乱可以通过例如患该病的受治疗者的生物流体中 TNF α 浓度的增加(例如在该受治疗者的血清、血浆、滑液等中 TNF α 浓度增加)而证实, 这可以用上述抗 TNF α 抗体检测。有许多其中 TNF α 是有害的紊乱的例子。以下进一步讨论本发明的抗体和抗体部分在治疗具体紊乱中的用途:

A. 脓毒症

肿瘤坏死因子在脓毒症病理生理学中已有确定地位, 其生物学效应包括低血压、心肌抑制、血管漏出综合症、器官坏死、刺激释放毒性次级介质和激活凝血级联(参见例如 Moeller, A. 等(1990) *Cytokine* 2:162-169; 授予 Moeller 等的美国专利 5,231,024 号; Moeller, A. 等的欧洲专利公告 260 610 B1 号; Tracery, K.J. 和 Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503; Russell, D 和 Thompson, R.C. (1993) *Curr. Opin.*

Biotech. 4:714-721)。因此，本发明的人抗体和抗体部分可以用于治疗任何临床背景中的脓毒症，包括脓毒症性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒症和毒性休克综合症。

另外，为治疗脓毒症，可以将本发明的抗hTNF α 抗体或抗体部分与一种或多种可以另外减轻脓毒症的其它治疗药物共给药，所述其他治疗药物为例如白介素-1抑制剂(诸如在PCT说明书WO 92/16221和WO 92/17583号中描述的)、细胞因子白介素-6 (参见例如PCT说明书WO 93/11793号)或血小板激活因子的拮抗剂(参见例如欧洲专利申请公告EP 374 510号)。在小节III中进一步讨论治疗脓毒症的其它组合法。

另外，在一个最佳实施方案中，将本发明的抗hTNF α 抗体或抗体部分给与一脓毒症病人小组的人受治疗者，这些病人的治疗时的血清或血浆IL-6浓度超过500 pg/ml，更优选地超过1000 pg/ml (参见Daum L.等的PCT说明书WO 95/20978号)。

B. 自身免疫疾病

已发现肿瘤坏死因子在各种自身免疫疾病的病理生理学中起作用。例如，已发现TNF α 参与激活组织炎症并引起类风湿性关节炎中的关节破坏(参见例如Moeller, A.等(1990) *Cytokine* 2:162-169; 授予Moeller等的美国专利5,231,024号; Moeller, A. 等的欧洲专利公开260 610 B1号; Tracery, K.J.和Cerami, 见上述; Arend, W.P.和Dayer, J-M. (1995) *Arth. Rheum.* 38:151-160; Fava, R.A.等(1993) *Clin. Exp. Immunol.* 94: 261-266)。亦发现TNF α 在糖尿病中参与促进胰岛细胞死亡和介导胰岛素抗性(参见例如Tracery, K.J.和Cerami, 见上述; PCT说明书WO 94/08609号)。亦发现TNF α 在多发性硬化中参与介导对少突神经胶质细胞的细胞毒和诱导炎症斑(参见例如Tracey和Cerami, 见上述)。已经进行了嵌合和人化鼠抗hTNF α 抗体治疗类风湿性关节炎的临床试验(参见例如Elliott, M.J.等(1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J.等(1994)

Lancet 344:1105-1110; Rankin, E.C.等(1995) *Br. J. Rheumatol.* 34:334-342).

本发明的人抗体和抗体部分可以用于治疗自身免疫疾病,特别是那些与炎症有关的自身免疫疾病,包括类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、骨关节炎和痛风性关节炎、变态反应、多发性硬化症、自身免疫性糖尿病、自身免疫性眼色素层炎和肾病综合症。典型地,系统性给与该抗体或抗体部分,尽管对某些紊乱而言在炎症位点局部给与该抗体或抗体部分是有益的(例如单独或与PCT说明书WO 93/19751号描述的环己烷-ylidene衍生物联用,在类风湿性关节炎的关节处局部给与或在糖尿病性溃疡表面涂药)。本发明的抗体或抗体部分亦可以与在III小节中进一步讨论的用于治疗自身免疫疾病的一或多种治疗药物一同给与。

C. 传染病

已发现肿瘤坏死因子参与介导在各种传染病中观察到的生物学效应。例如,已发现TNF α 介导疟疾中的大脑炎症和毛细血管血栓形成和梗塞。亦发现TNF α 参与介导大脑炎症,诱导脑膜炎中的血脑屏障崩溃、触发脓毒症性休克综合症和激活静脉梗塞。亦发现TNF α 在获得性免疫缺陷综合症(AIDS)中参与诱导恶病质、刺激病毒增殖和介导中枢神经系统损伤。因此,可以用本发明的抗体和抗体部分治疗传染病,包括细菌性脑膜炎(参见例如欧洲专利申请公告EP 585 705号)、脑型疟、AIDS和AIDS相关综合症(ARC)(参见例如欧洲专利申请公告EP 230 574号)、以及移植继发的巨细胞病毒感染(参见例如Fietze, E.等(1994) *Transplantation* 58:675-680)。本发明的抗体和抗体部分亦可以用于减轻与传染病有关的症状,包括因感染(例如流感)引起的发烧和肌痛和感染继发的恶病质(例如AIDS或ARC继发的)。

D. 移植

已发现肿瘤坏死因子可能是同种移植排斥和移植物抗宿主病(GVHD)的关键介质并参与介导在用导向T细胞受体CD3复合物的大鼠抗体OKT3抑制肾移植排斥时观察到的负反应(参见例如Eason, J.D.等(1995) *Transplantation* 59:300-305; Suthanthiran, M.和Strom, T.B. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:365-375)。因此, 可以用本发明的抗体和抗体部分抑制移植排斥, 包括同种移植和异种移植排斥和抑制GVHD。尽管可以单独使用该抗体或抗体部分, 但更优选地将其与一种或多种抑制抗同种移植的免疫应答或抑制GVHD的其它药剂联用。例如, 在一个实施方案中, 将本发明的抗体或抗体部分与OKT3联用, 以抑制OKT3诱导的反应。在另一实施方案中, 将本发明的抗体或抗体部分与一或多种导向参与调节免疫应答的其它靶的抗体联用, 这些靶例如为细胞表面分子CD25 (白介素-2受体- α)、CD11a (LFA-1)、CD54 (ICAM-1)、CD4、CD45、CD28/CTLA4、CD80 (B7-1)和/或CD86 (B7-2)。在再一实施方案中, 将本发明的抗体或抗体部分与诸如环孢菌素A或FK506的一或多种一般性免疫抑制剂联用。

E. 恶性肿瘤

已发现肿瘤坏死因子在恶性肿瘤中参与诱导恶病质、刺激肿瘤生长、增强转移潜力和介导细胞毒性。因此, 可以使用本发明的抗体和抗体部分治疗恶性肿瘤, 抑制肿瘤生长或转移和/或减轻恶性肿瘤继发的恶病质。可以将该抗体或抗体部分系统性给药或局部给与该肿瘤部位。

F. 肺功能紊乱

已知肿瘤坏死因子参与成人呼吸窘迫综合症(ARDS)的病理生理学, 包括刺激白细胞-内皮细胞激活、细胞毒性导向肺细胞和诱导血管漏出综合症。因此, 可以用本发明的抗体和抗体部分治疗肺功能紊乱,

包括成人呼吸窘迫综合症(参见例如PCT说明书WO 91/04054号)、休克肺、慢性肺炎、肺结节病、肺纤维化和硅肺。可以将该抗体或抗体部分系统性给药或局部地给与肺表面,例如做为气溶胶。亦可以将本发明的抗体或抗体部分与一种或多种用于治疗肺功能紊乱的其它治疗药物(在III小节中进一步讨论)一同给与。

G. 肠功能紊乱

已发现肿瘤坏死因子参与炎症性肠功能紊乱的病理生理学(参见例如Tracy, K.J.等(1986) *Science* 234:470-474; Sun, X-M.等(1988) *J. Clin. Invest.* 81:1328-1331; MacDonald, T.T.等(1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81:301-305)。已进行嵌合鼠抗hTNF α 抗体治疗局限性回肠炎的临床试验(van Dullemen, H.M.等(1995) *Gastroenterology* 109:129-135)。亦可以使用本发明的人抗体和抗体部分治疗肠功能紊乱,例如特发性炎症性肠病,该病包括二种综合症,即局限性回肠炎和溃疡性结肠炎。亦可以将本发明的抗体或抗体部分与一或多种用于治疗肠功能紊乱的治疗药物(在III小节中进一步讨论)一同使用。

H. 心脏功能紊乱

亦可以用本发明的抗体和抗体部分治疗各种心脏功能紊乱,包括心脏局部缺血(参见例如欧洲专利申请公告EP 453 898号)和心脏功能不全(心肌虚弱)(参见例如 PCT说明书WO 94/20139号)。

I. 其它

亦可以用本发明的抗体和抗体部分治疗各种其中TNF α 活性是有害的其它紊乱。已发现TNF α 活性参与其病理生理学并因此可以用本发明抗体或抗体部分治疗的其它疾病和紊乱的例子包括炎症性骨病和骨吸收(参见例如Bertolini, D.R.等(1986) *Nature* 319:516-518; Konig, A.等(1988) *J. Bone Miner. Res.* 3:621-627; Lerner, U.H.和Ohlin, A. (1993) *J.*

Bone Miner. Res. 8:147-155; 和Shankar, G.和Stern, P.H. (1993) *Bone* 14: 871-876)、肝炎, 包括酒精性肝炎(参见例如McClain, C.J.和Cohen, D.A. (1989) *Hepatology* 9:349-351; Felver, M.E.等(1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14:255-259; 和Hansen, J.等(1994) *Hepatology* 20:461-474)、病毒性肝炎(Sheron, N.等(1991) *J. Hepatol.* 12:241-245; 和Hussain, M.J.等(1994) *J. Clin. Pathol.* 47:1112-1115)和爆发性肝炎; 凝结紊乱(参见例如 van der Poll, T.等(1990) *N. Engl. J. Med.* 322:1622-1627; 和van der Poll, T.等(1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367:55-60), 烧伤(参见例如Giror, B.P.等(1994) *Am. J. Physiol.* 267:H118-124;和Liu, X.S.等(1994) *Burns* 20:40-44), 再灌注损伤(参见例如Scales, W.E.等(1994) *Am. J. Physiol.* 267: G1122-1127; Serrick, C.等(1994) *Transplantation* 58:1158-1162; 和Yao, Y.M., 等(1995) *Resuscitation* 29:157-168), 瘢痕疙瘩形成(参见例如 McCauley, R.L.等(1992) *J. Clin. Immunol.* 12:300-308), 瘢痕组织形成; 发热; 牙周病; 肥胖和放射毒性。

通过以下实施例进一步描述本发明, 这些实施例并不限制本发明。本申请引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请通过引用结合到本文中。

实施例1: 人抗体与hTNF α 结合的动力学分析

使用BIAcore系统(Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)通过表面等离子体激元共振 (SPR) 检测配体(生物素化的重组人TNF α (rhTNF α), 固定于生物传感器基质上)与分析物(溶液中的抗体)之间的实时结合反应。该系统利用SPR的光学特性检测葡聚糖生物传感器基质中蛋白浓度的改变。以已知浓度将蛋白共价结合至该葡聚糖基质。将抗体注射通过该葡聚糖基质, 注射抗体和固定化配体之间的特异性结合导致基质蛋白浓度增加并导致SPR信号变化。SPR信号的变化以共振单位(RU)记录并沿着传感图的y轴随时间显示。

为便于将生物素化rhTNF α 固定于生物传感器基质上,通过首先用100 mM N-羟基柠檬酰亚胺(NHS)和400 mM盐酸N-乙基-N'-(3-二乙基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)激活基质上的羧基,将抗生蛋白链菌素通过游离氨基共价连接至该葡聚糖基质。下一步,将抗生蛋白链菌素通过该活化基质注射。将稀释于乙酸钠pH 4.5的35微升抗生蛋白链菌素(25 μ g/ml)注射通过该活化的生物传感器,该蛋白上的游离胺直接结合至该活化的羧基。通过注射1M的乙醇胺失活未反应的基质EDC-酯。抗生蛋白链菌素偶联的生物传感器芯片亦有市售(Pharmacia BR-1000-16, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)。

通过首先溶解5.0 mg生物素(D-生物素- ϵ -氨基己酸N-羟基柠檬酰亚胺酯; Boehringer Mannheim目录号1008 960)于500 μ l二甲基亚砷以制备10 mg/ml溶液,制备生物素化rhTNF α 。每毫升rhTNF α (2.65 mg/ml)加入10微升生物素以使生物素与rhTNF α 摩尔比为2:1。温和搅拌反应物并于黑暗处于室温保温2小时。用25 ml冷PBS平衡装有Sephadex G-25M (Pharmacia目录号17-0851-01)的PD-10柱,并以每根柱2 ml rhTNF α -生物素上柱。用10 $\times$ 1 ml冷PBS洗脱该柱。收集分部收集液并于OD280读数(1.0 OD = 1.25 mg/ml)。合并适当的分部并储存于-80°C直至使用。生物素化rhTNF α 亦有市售(R & D Systems目录号FTA00, Minneapolis, MN)。

将欲通过抗生蛋白链菌素固定化于该基质上的生物素化rhTNF α 稀释于PBS流动缓冲液(Gibco目录号14190-144, Gibco BRL, Grand Island, NY),该缓冲液添加了0.05% (BIAcore)表面活性剂P20 (Pharmacia BR-1000-54, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ)。为测定rhTNF α 特异性抗体结合固定化rhTNF α 的能力,按下述进行结合检测。以5 μ l/min的流速将数等份的生物素化rhTNF α (25 nM; 10 μ l等份)注射通过该偶联了抗生蛋白链菌素的葡聚糖基质。在注射该蛋白之前和刚注射完时,仅使PBS缓冲液流过每个流动池。基线和生物素化rhTNF α 注射完成后约30秒钟的信号净差值做为结合值(约500 RU)。测定了

rhTNF α 特异性抗体与固定化生物素化rhTNF α 的直接结合。在PBS流动缓冲液中稀释抗体(20 $\mu\text{g/ml}$), 并将25 μl 的等份以5 $\mu\text{l/min}$ 的流速注射通过所述固定化蛋白基质。在注射抗体之前和刚注射完时, 仅使PBS缓冲液流过每个流动池。基线信号和抗体注射完成后的信号的净差值做为该特定样品的结合值。在注射下一个样品之前用100 mM HCl再生生物传感器基质。为确定解离速率(K_{off})、结合速率(K_{on})、结合速率(K_a)和解离速率(K_d)常数, 使用了BIAcore动力学评价软件(2.1版)。

D2E7 (IgG4全长抗体)与生物素化rhTNF α 结合的代表性结果以及与之比较的鼠mAb MAK 195 (F(ab') $_2$ 片段), 均示于以下表1中。

表1: D2E7 IgG4或MAK 195与生物素化rhTNF α 的结合

抗体	[Ab], nM	结合的 rhTNF α , RUs	结合的 Ab, RUs	rhTNF α /Ab	K_{off} , sec $^{-1}$, (Avg)
D2E7	267	373	1215	1.14	8.45×10^{-5}
	133	420	1569	1.30	5.42×10^{-5}
	67	434	1633	1.31	4.75×10^{-5}
	33	450	1532	1.19	4.46×10^{-5}
	17	460	1296	0.98	3.47×10^{-5}
	8	486	936	0.67	2.63×10^{-5}
	4	489	536	0.38	2.17×10^{-5}
	2	470	244	0.18	3.68×10^{-5}
					(4.38×10^{-5})
MAK 195	400	375	881	1.20	5.38×10^{-5}
	200	400	1080	1.38	4.54×10^{-5}
	100	419	1141	1.39	3.54×10^{-5}
	50	427	1106	1.32	3.67×10^{-5}
	25	446	957	1.09	4.41×10^{-5}
	13	464	708	0.78	3.66×10^{-5}
	6	474	433	0.47	7.37×10^{-5}
	3	451	231	0.26	6.95×10^{-5}
					(4.94×10^{-5})

在第二系列试验中, 按照上述用BIAcore技术定量分析了D2E7的IgG1全长形式与生物素化rhTNF之间的分子动力学相互作用, 并得出了动力学速率常数, 概括于以下表2、3和4中。

表2: D2E7和生物素化rhTNF相互作用的表观解离速率常数

实验	$K_d (s^{-1})$
1	9.58×10^{-5}
2	9.26×10^{-5}
3	7.60×10^{-5}
平均	$8.81 \pm 1.06 \times 10^{-5}$

表3: D2E7和生物素化rhTNF之间相互作用的表观结合速率常数

实验	$K_a (M^{-1}, s^{-1})$
1	1.33×10^5
2	1.05×10^5
3	3.36×10^5
平均	$1.91 \pm 1.26 \times 10^5$

表4: D2E7和生物素化rhTNF的表观动力学速率常数和亲和性常数

实验	$K_a (M^{-1}, s^{-1})$	$K_d (s^{-1})$	$K_d (M)$
1	1.33×10^5	9.58×10^{-5}	7.20×10^{-10}
2	1.05×10^5	9.26×10^{-5}	8.82×10^{-10}
3	3.36×10^5	7.60×10^{-5}	2.26×10^{-10}
平均	$1.91 \pm 1.26 \times 10^5$	$8.81 \pm 1.06 \times 10^{-5}$	$6.09 \pm 3.42 \times 10^{-10}$

用BIA分析软件通过分析该传感图的解离区和结合区计算解离和结合速率常数。以常规化学反应动力学假设D2E7与生物素化rhTNF分子之间的相互作用：零阶解离和一阶结合动力学。为了分析的原因，在选择分析该动力学数据的分子模型时仅考虑该二价D2E7抗体的一个臂与该三聚体生物素化rhTNF的一个单位之间的相互作用。进行了三次独立的实验并分别分析其结果。D2E7与生物素化rhTNF之间相互作用的平均表观解离速率常数(K_d)是 $8.81 \pm 1.06 \times 10^{-5} s^{-1}$ ，平均表观结

合速率常数 K_a 是 $1.91 \pm 1.26 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。然后用公式 $K_d=K_d/K_a$ 计算表观内在解离常数(K_d)。因此,得自动力学参数的D2E7抗体对rhTNF的平均 K_d 是 $6.09 \pm 3.42 \times 10^{-10} \text{ M}$ 。未将D2E7的IgG1形式的动力学值(示于表2、3和4中)和D2E7的IgG4形式的动力学值(示于表1和实施例2和3中)的较小的差别认为是由或者IgG1恒定区或IgG4恒定区的存在产生的真正差别,而认为是由于将更精确的抗体浓度测定用于IgG1动力学分析而造成。因此,认为本文提出的D2E7的IgG1形式的动力学值是该D2E7抗体最精确的动力学参数。

实施例2: D2E7 CDR3域的丙氨酸扫描诱变

通过标准方法沿着D2E7 VL区和D2E7 VH区的CDR3域导入一系列单丙氨酸突变。所述轻链突变示于图1B (LD2E7*.A1、LD2E7*.A3, LD2E7*.A4、LD2E7*.A5、LD2E7*.A7和LD2E7*.A8, 分别于该D2E7 VL CDR3的位置1、3、4、5、7或8具有一个丙氨酸突变)。所述重链突变示于图2B (HD2E7*.A1、HD2E7*.A2、HD2E7*.A3、HD2E7*.A4、HD2E7*.A5、HD2E7*.A6、HD2E7*.A7、HD2E7*.A8和HD2E7*.A9, 分别于该D2E7 VH CDR3域的位置2、3、4、5、6、8、9、10或11具有一个丙氨酸突变)。将rhTNF α 与由野生型D2E7 VL和D2E7 VH组成的抗体相互作用的动力学与下述组成的抗体的动力学比较: 1)野生型D2E7 VL与丙氨酸置换的D2E7 VH配对; 2)野生型D2E7 VH与丙氨酸置换的D2E7 VL配对; 或3)丙氨酸置换的D2E7 VL与丙氨酸置换的D2E7 VH配对。所有的抗体都做为全长IgG4分子进行试验。

按照实施例1所述通过表面等离子体激元共振测定抗体与rhTNF α 相互作用的动力学。不同VH/VL配对的 K_{off} 速率概括于以下表5中:

表5: D2E7丙氨酸扫描突变体与生物素化rhTNF α 的结合

VH	VL	K _{off} (sec ⁻¹)
D2E7 VH	D2E7 VL	9.65 x 10 ⁻⁵
HD2E7*.A1	D2E7 VL	1.4 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A2	D2E7 VL	4.6 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A3	D2E7 VL	8.15 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A4	D2E7 VL	1.8 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A5	D2E7 VL	2.35 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A6	D2E7 VL	2.9 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A7	D2E7 VL	1.0 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A8	D2E7 VL	3.1 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A9	D2E7 VL	8.1 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A1	6.6 x 10 ⁻⁵
D2E7 VH	LD2E7*.A3	NOT DETECTABLE
D2E7 VH	LD2E7*.A4	1.75 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A5	1.8 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A7	1.4 x 10 ⁻⁴
D2E7 VH	LD2E7*.A8	3.65 x 10 ⁻⁴
HD2E7*.A9	LD2E7*.A1	1.05 x 10 ⁻⁴

这些结果证明该D2E7 VL区和VH区的CDR3域的大多数位置可以经受用单丙氨酸残基置换。与野生型亲本D2E7抗体相比, 于该D2E7 VL CDR3域的1、4、5或7位或于该D2E7 VH CDR3域的2、5、6、8、9或10位的单丙氨酸置换未显著影响hTNF α 结合的解离速率。于该D2E7 VL CDR3的位置8或于该D2E7 VH CDR3的位置3的丙氨酸置换给出了快四倍的K_{off}, 于D2E7 VH CDR3的4或11位的丙氨酸置换给出了快八倍的K_{off}, 表明这些位点对与hTNF α 结合更为关键。然而, 于该D2E7 VL CDR3域的1、4、5、7或8位或于该D2E7 VH CDR3域的2、3、4、5、6、8、9、10或11位的单丙氨酸置换仍然产生一个具有不高于1 × 10⁻³的K_{off}的抗hTNF α 抗体。

实施例3: D2E7相关抗体的结合分析

按照实施例1所述通过表面等离子体激元共振, 分析与D2E7相比的其序列与D2E7相关的一系列抗体。测试的VL区的氨基酸序列示于图1A和1B中。测试的VH区的氨基酸序列示于图2A和2B中。各种VH/VL配对(在所示的形式中, 或者做为全长IgG1或IgG4抗体或做为scFv)的 K_{off} 速率概括于以下表6中:

表6: D2E7相关抗体与生物素化rhTNF α 的结合

VH	VL	形式	$K_{off}(\text{sec}^{-1})$
D2E7 VH	D2E7 VL	IgG1/IgG4	9.65×10^{-5}
VH1-D2	LOE7	IgG1/IgG4	7.7×10^{-5}
VH1-D2	LOE7	scFv	4.6×10^{-4}
VH1-D2.N	LOE7.T	IgG4	2.1×10^{-5}
VH1-D2.Y	LOE7.A	IgG4	2.7×10^{-5}
VH1-D2.N	LOE7.A	IgG4	3.2×10^{-5}
VH1-D2	EP B12	scFv	8.0×10^{-4}
VH1-D2	2SD4 VL	scFv	1.94×10^{-3}
3C-H2	LOE7	scFv	1.5×10^{-3}
2SD4 VH	LOE7	scFv	6.07×10^{-3}
2SD4 VH	2SD4 VL	scFv	1.37×10^{-2}
VH1A11	2SD4 VL	scFv	1.34×10^{-2}
VH1B12	2SD4 VL	scFv	1.01×10^{-2}
VH1B11	2SD4 VL	scFv	9.8×10^{-3}
VH1E4	2SD4 VL	scFv	1.59×10^{-2}
VH1F6	2SD4 VL	scFv	2.29×10^{-2}
VH1D8	2SD4 VL	scFv	9.5×10^{-3}
VH1G1	2SD4 VL	scFv	2.14×10^{-2}
2SD4 VH	EP B12	scFv	6.7×10^{-3}
2SD4 VH	VL10E4	scFv	9.6×10^{-3}
2SD4 VH	VL100A9	scFv	1.33×10^{-2}
2SD4 VH	VL100D2	scFv	1.41×10^{-2}
2SD4 VH	VL10F4	scFv	1.11×10^{-2}
2SD4 VH	VLLOE5	scFv	1.16×10^{-2}
2SD4 VH	VLL0F9	scFv	6.09×10^{-3}
2SD4 VH	VLL0F10	scFv	1.34×10^{-2}
2SD4 VH	VLLOG7	scFv	1.56×10^{-2}
2SD4 VH	VLLOG9	scFv	1.46×10^{-2}
2SD4 VH	VLLOH1	scFv	1.17×10^{-2}

2SD4 VH	VLLOH10	scFv	1.12×10^{-2}
2SD4 VH	VL1B7	scFv	1.3×10^{-2}
2SD4 VH	VL1C1	scFv	1.36×10^{-2}
2SD4 VH	VL1C7	scFv	2.0×10^{-2}
2SD4 VH	VL0.1F4	scFv	1.76×10^{-2}
2SD4 VH	VL0.1H8	scFv	1.14×10^{-2}

具有选自D2E7、LOE7、LOE7.T和LOE7.A的VL (它们在位置9或者有一个苏氨酸或有丙氨酸)的全长抗体(即IgG形式)的慢解离速率(即 $K_{\text{off}} \leq 1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$), 表明该D2E7 VL CDR3的位置9可以由这二种残基之一占据而大致不影响 K_{off} 。因此, 该D2E7 VL CDR3的共有基序包含氨基酸序列: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A)(SEQ ID NO: 3)。另外, 具有选自D2E7、VH1-D2.N和VH1-D2.Y的VH (它们在位置12或者有酪氨酸或有天冬酰胺)的抗体的慢解离速率(即 $K_{\text{off}} \leq 1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$), 表明该D2E7 VH CDR3的位置12可以由这二种残基之一占据而大致不影响 K_{off} 。因此, 该D2E7 VH CDR3的共有基序包含氨基酸序列: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D (Y/N)(SEQ ID NO: 4)。

示于表6中的结果证明, 在scFv形式下, 与含有该D2E7 VL或VH CDR3区的抗体相比, 含有2SD4 VL或VH CDR3区的抗体表现出更快的 K_{off} (即 $K_{\text{off}} \geq 1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$)。在该VL CDR3内, 2SD4在2、5和9位与D2E7不同。然而, 如上述讨论, 9位可以由Ala (如在2SD4中)或Thr (如在D2E7中)占据而基本不影响 K_{off} 。因此, 通过比较2SD4和D2E7, 可以鉴定出该D2E7 VL CDR3的2和5位(都是精氨酸)对该抗体与hTNF α 结合是关键。这些残基可以做为该抗体结合位点的接触残基直接参与或可以对保持在该区抗体分子的支架结构起关键作用。关于位置2的重要性, 用Lys (在EP B12中)取代Arg (在LOE7中, 它与D2E7具有相同的VL CDR3)以2倍系数加速解离速率。关于位置5的重要性, 如实施例2所述, 用Ala (在LD2E7*.A5)取代Arg (在D2E7中)亦加速解离速率2倍。另外, 在2和5位均无Arg时(在2SD4中), 解离速率快5倍。然而,

应注意尽管位置5对增强与hTNF α 结合是重要的,但此位置的变化可以由其它位置的变化抵消,如在VLLOE4、VLLOH1或VL0.1H8中观察到的。

在该VH CDR3中,2SD4在1、7和12位与D2E7不同。然而,如上述讨论,12位可以由Asn(如在2SD4中)或Tyr(如在D2E7中)占据而基本不影响K_{off}。因此,通过比较2SD4和D2E7,可以鉴定出该D2E7 VH CDR3的1和7位对与hTNF α 结合是关键的。如上述讨论,这些残基可以做为该抗体结合位点的接触残基直接参与或可以对保持在该区抗体分子的支架结构起关键作用。这二个位置对与hTNF α 结合都是重要的,因为使用3C-H2 VH CDR3(它相对于D2E7 VH CDR3而言,在位置1有一个缬氨酸变为丙氨酸的变化)时,该scFv的解离速率比用D2E7 VH CDR3时快3倍,但该解离速率仍然比使用2SD4 VH CDR3时慢4倍(它相对于D2E7 VH CDR3而言在位置1和7都有变化)。

实施例4: D2E7的功能活性

为检查D2E7的功能活性,将该抗体用于几个或者体外或者体内测定该抗体抑制hTNF α 活性的能力的检测之中。

A. 在L929细胞中中和TNF α 诱导的细胞毒性

在培育18-24小时后,人重组TNF α (rhTNF α)引起对鼠L929细胞的细胞毒性。如下述通过共温育抗体与rhTNF α 和所述细胞,在L929检测中评价人抗hTNF α 抗体。将含有100 μ l抗hTNF α Abs的96孔微滴定板用含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI培养基沿着该板双份进行1/3连续稀释。加入50 μ l rhTNF α 使每个样品孔的最终浓度为500 pg/ml。然后将所述板于室温温育30分钟。接着,加入含有1 μ g/ml放线菌素D的50 μ l TNF α 敏感型L929小鼠成纤维细胞,使最终浓度为每孔 5×10^4 细胞。对照包括培养基加细胞和rhTNF α 加细胞。这些对照和范围为2 ng/ml至8.2

pg/ml的一个TNF α 标准曲线用于测定该检测的质量并提供一个中和窗口。然后将这些板于37°C在5% CO₂中培育过夜(18-24小时)。

从每个孔中取出100 μ l培养基, 并加入50 μ l PBS中的5 mg/ml 溴化3,(4,4-二甲基噻唑-2-基)2,5-二苯基-四唑鎓(MTT;可从Sigma Chemical Co., St. Louis, MO购得)。然后将这些板于37°C培育4小时。然后加入50 μ l的20%十二烷基硫酸钠(SDS)至每个孔中, 并将这些板于37°C培育过夜。测定570/630 nm的光密度, 为每个样品绘制曲线并通过标准方法确定IC₅₀。

与鼠MAK 195 mAb的相比, 具有各种VL和VH配对的人抗体的代表性的结果示于图3和下表7中。

表7: 中和TNF α 诱导的L929细胞毒性

VH	VL	结构	IC ₅₀ , M
D2E7	D2E7	scFv	1.1 x 10 ⁻¹⁰
D2E7	D2E7	IgG4	4.7 x 10 ⁻¹¹
2SD4	2SD4	scFv/IgG1/IgG4	3.0 x 10 ⁻⁷
2SD4	LOE7	scFv	4.3 x 10 ⁻⁸
VH1-D2	2SD4	scFv	1.0 x 10 ⁻⁸
VH1-D2	LOE7	scFv/IgG1/IgG4	3.4 x 10 ⁻¹⁰
VH1-D2.Y	LOE7.T	IgG4	8.1 x 10 ⁻¹¹
VH1-D2.N	LOE7.T	IgG4	1.3 x 10 ⁻¹⁰
VH1-D2.Y	LOE7.A	IgG4	2.8 x 10 ⁻¹¹
VH1-D2.N	LOE7.A	IgG4	6.2 x 10 ⁻¹¹
MAK 195	MAK 195	scFv	1.9 x 10 ⁻⁸
MAK 195	MAK195	F(ab') ₂	6.2 x 10 ⁻¹¹

图3和表7中的结果证明, 该D2E7人抗hTNF α 抗体和各种D2E7相关抗体以与鼠抗hTNF α mAb MAK 195基本相等的能力中和TNF α 诱导的L929细胞毒性。

在另一系列实验中，按照上述检查了D2E7的IgG1形式中和TNF α 诱导的L929细胞毒性的能力。在以下表8中概括了三个独立实验的结果及其平均值：

表8: D2E7 IgG1中和TNF α 诱导的L929细胞毒性

实验	IC ₅₀ [M]
1	1.26 $\times 10^{-10}$
2	1.33 $\times 10^{-10}$
3	1.15 $\times 10^{-10}$
平均	1.25 $\pm$ 0.01 $\times 10^{-10}$

该系列实验证明，全长IgG1形式的D2E7以平均IC₅₀ [M]为 1.25 $\pm$ 0.01 $\times 10^{-10}$ 中和TNF α 诱导的L929细胞毒性。

B. 抑制TNF α 与U-937细胞上的TNF α 受体结合

使用表达hTNF α 受体的人组织细胞系U-937细胞系(ATCC No. CRL 1593)检测人抗hTNF α 抗体抑制hTNF α 与细胞表面hTNF α 受体结合的能力。将U-937生长于RPMI 1640培养基中，该培养基添加了10%胎牛血清(Hyclone A-1111, Hyclone Laboratories, Logan, UT)、L-谷氨酰胺(4 nM)、HEPES缓冲液(10 mM)、青霉素(100 μ g/ml)和链霉素(100 μ l/ml)。为检测全长IgG抗体的活性，用添加了1 mg/ml人IgG (Sigma I-4506, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)的PBS在冰上预培养U-937细胞45分钟，然后用结合缓冲液清洗细胞三次。为进行受体结合检测，将U-937细胞(5×10^6 细胞/孔)在96孔微滴定板(Costar 3799, Costar Corp., Cambridge, MA)中的结合缓冲液(PBS, 添加了0.2%牛血清白蛋白)与¹²⁵I标记的rhTNF α (3×10^{-10} M; 25 μ Ci/ml; 得自NEN Research Products, Wilmington, DE)、加或不加抗hTNF α 抗体、总体积为0.2 ml中温育。将该板在冰上培养1.5小时。然后，将各75 μ l的样品转移至含有邻苯二甲酸二丁酯(Sigma D-2270, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)和邻苯二甲酸二癸酯(ICN 210733, ICN, Irvine, CA)的1.0 ml试管(Sarstedt 72.700,

Sarstedt Corp., Princeton, NJ). 所述试管分别含有体积比为2:1的邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二癸酯的300 μl混合物。通过微量离心5分钟除去游离的(即未结合的)¹²⁵I标记的rhTNFα。然后, 借助微试管剪刀(Bel-Art 210180001, Bel-Art Products, Pequannock, NJ)剪下每个含有细胞沉淀的试管末端。该细胞沉淀含有与p60或p80 TNFα受体结合的¹²⁵I标记的rhTNFα, 而油混合物上的水相则含有多余的游离¹²⁵I标记的rhTNFα。将所有的细胞沉淀收集于计数管(Falcon 2052, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ)并于闪烁计数器中计数。

代表性的结果示于图4。在这些实验中, D2E7对hTNFα与U-937细胞上的hTNFα受体结合的抑制的IC₅₀值为约3 × 10⁻¹⁰ M。这些结果证明该D2E7人抗hTNFα抗体以与鼠抗hTNFα mAb MAK 195基本相同的浓度抑制rhTNFα与U-937细胞上的hTNFα受体结合。

在另一系列实验中, 按照上述检测了D2E7的IgG1形式抑制rhTNFα与U-937 细胞上的hTNFα受体结合的能力。在以下表9中概括了三个独立实验的结果及其平均值:

表9: D2E7 IgG1抑制U-937细胞上TNF受体结合

实验	IC ₅₀ [M]
1	1.70 × 10 ⁻¹⁰
2	1.49 × 10 ⁻¹⁰
3	1.50 × 10 ⁻¹⁰
平均	1.56 ± 0.12 × 10 ⁻¹⁰

该系列实验证明, 全长IgG1形式的D2E7以平均IC₅₀ [M]为 1.56 ± 0.12 × 10⁻¹⁰抑制U-937细胞上TNF受体结合。

为研究D2E7对¹²⁵I-rhTNF与单个p55和p75受体结合抑制的能力, 进行固相放射免疫检测。为测定D2E7对独立TNF受体的IC₅₀值, 将各种浓度的该抗体与3 × 10⁻¹⁰浓度的¹²⁵I-hTNF一同培育。然后以剂量依

赖性方式在含有或者p55 TNF受体或者p75 TNF受体的独立平板上检测该混合物。结果概括于下表10:

表10: D2E7 IgG1对TNF受体与p55和p75 TNFR结合的抑制

试剂	IC ₅₀ [M]	
	p55 TNFR	p 75TNFR
D2E7	1.47 × 10 ⁻⁹	1.26 × 10 ⁻⁹
rhTNF	2.31 × 10 ⁻⁹	2.70 × 10 ⁻⁹

由D2E7对¹²⁵I-rhTNF与U937细胞上的p55和p75 TNF受体的结合抑制遵循简单的S形曲线，表明每个受体的IC₅₀值相似。在用重组TNF受体的固相放射免疫检测(RIA)实验中，D2E7对¹²⁵I-rhTNF与所述p55和p75受体结合抑制的IC₅₀值分别计算为1.47 × 10⁻⁹和1.26 × 10⁻⁹M。在固相中IC₅₀值的降低可能是因为在该RIA形式中受体密度较高，而未标记rhTNFα亦以类似IC₅₀值进行抑制。未标记rhTNF对¹²⁵I-rhTNF与p55和p75受体结合抑制的IC₅₀值分别为2.31 × 10⁻⁹和2.70 × 10⁻⁹。

C. 抑制ELAM-1在HUVEC上表达

通过用rhTNFα处理，可以诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)在其表面表达内皮细胞白细胞粘附分子(ELAM-1)，通过用鼠抗人ELAM-1抗体与rhTNFα处理的HUVEC反应可以检测到该分子。如下述检测人抗hTNFα抗体抑制该TNFα诱导的ELAM-1在HUVEC上表达的能力: 将HUVEC (ATCC No. CRL 1730)平板接种于96孔平板(5 × 10⁴细胞/孔)并于37°C培养过夜。第二天，以20-100 μg/ml抗体为起点，在微滴定板中进行人抗hTNFα抗体的连续稀释(1:10)。制备4.5 ng/ml的rhTNFα贮液，将等份的rhTNFα加入每个含有抗体的孔中，并彻底混合内容物。对照包括培养基自身、培养基加抗hTNFα抗体和培养基加rhTNFα。将HUVEC平板从其37°C过夜培养中移出，并温和地从每个孔中吸出培养基。向所述HUVEC平板的每个孔中转移200 μl的该抗体-rhTNFα混合

物。然后将所述HUVEC平板在37°C再培育4小时。接着,将鼠抗ELAM-1抗体贮液在RPMI中稀释1:1000。从该HUVEC平板的每个孔中温和地吸出培养基,加入50 μ l/孔的该抗ELAM-1抗体溶液并于室温将所述HUVEC平板培育60分钟。在RPMI中制备¹²⁵I标记的抗鼠Ig抗体溶液(约50,000 cpm/50 μ l)。将所述HUVEC平板的每个孔中的培养基温和地吸出,用RPMI清洗这些孔二次,然后向每个孔中加入50 μ l的¹²⁵I标记的抗鼠Ig溶液。将所述平板于室温培育1小时,然后用RPMI清洗每个孔三次。向每个孔中加入180 μ l的5% SDS以裂解所述细胞。将每个孔中的溶胞物转移至试管中并于闪烁计数器中计数。

代表性结果示于图5中。在这些实验中,D2E7对hTNF α 诱导的ELAM-1在HUVEC上表达的抑制的IC₅₀值为约 6×10^{-11} M。这些结果证明该D2E7人抗hTNF α 抗体以与鼠抗hTNF α mAb MAK 195基本相同的浓度抑制hTNF α 诱导的ELAM-1在HUVEC上的表达。

在另一系列实验中,按照上述检测了D2E7的IgG1形式抑制hTNF α 诱导的ELAM-1在HUVEC上的表达的能力。在以下表11中概括了三个独立实验的结果及其平均值:

表11: D2E7 IgG1受体抑制TNF α 诱导的ELAM-1表达

实验	IC ₅₀ [M]
1	1.95×10^{-10}
2	1.69×10^{-10}
3	1.90×10^{-10}
平均	$1.85 \pm 0.14 \times 10^{-10}$

该系列实验证明,全长IgG1形式的D2E7以平均IC₅₀ [M]为 $1.85 \pm 0.14 \times 10^{-10}$ 抑制TNF α 诱导的ELAM-1在HUVEC上的表达。

亦检测了D2E7 IgG1对rhTNF诱导的其它二种粘附分子ICAM-1和VCAM-1的表达的中和能力。因为于16小时的ICAM-1表达的rhTNF效

价曲线与ELAM-1表达的曲线非常相似, 因此在该抗体中和实验中使用了同样浓度的rhTNF。在各种浓度的D2E7存在下, 将HUVEC与rhTNF于37°C CO₂培养箱中培养16小时, 通过鼠抗ICAM-1抗体后加¹²⁵I标记的羊抗鼠抗体测定ICAM-1的表达。进行二次独立的实验并计算IC₅₀值。一种不相关人IgG1抗体没有抑制该ICAM-1表达。

测试VCAM-1表达抑制的实验程序与用于ELAM-1表达的程序相同, 但是使用了抗VCAM-1 MAb代替抗ELAM-1 MAb。进行了三次独立的实验并计算IC₅₀值。一种不相关人IgG1抗体没有抑制该VCAM-1表达。

结果概括于下表12中:

表12: D2E7 IgG1抑制ICAM-1和VCAM-1表达

ICAM-1抑制		IC ₅₀ [M]	
实验	IC ₅₀ [M]	实验	IC ₅₀ [M]
1	1.84 × 10 ⁻¹⁰	1	1.03 × 10 ⁻¹⁰
2	2.49 × 10 ⁻¹⁰	2	9.26 × 10 ⁻¹⁰
		3	1.06 × 10 ⁻¹⁰
平均	2.17 ± 0.46 × 10 ⁻¹⁰	平均	1.01 ± 0.01 × 10 ⁻¹⁰

这些实验证明用rhTNF处理原代人脐静脉内皮细胞导致粘附分子的最佳表达: ELAM-1H和VCAM-1在第4小时, ICAM-1的最大向上调节表达在第16小时。D2E7能够以剂量依赖性方式抑制这三种粘附分子的表达。抑制ELAM-1、ICAM-1和VCAM-1的IC₅₀值分别是1.85×10⁻¹⁰、2.17 × 10⁻¹⁰和1.01 × 10⁻¹⁰M。这些值非常相似, 表明诱导ELAM-1、ICAM-1和VCAM-1表达对rhTNF激活信号剂量的要求相似。有意义的是, D2E7在该ICAM-1表达的较长久的抑制检测中有相似效力。该ICAM-1抑制检测需要将rhTNF和D2E7与HUVEC共培育16小时, 与之相反, ELAM-1和VCAM-1抑制检测需要4小时。因为D2E7对rhTNF有

慢解离速率，可以相信在该16小时共培育期间在HUVEC上的TNF受体没有显著竞争。

D. 体内中和hTNF α

使用了三种不同的体内系统以证明D2E7有效地在体内抑制hTNF α 活性。

I. 在D-半乳糖胺致敏的小鼠中抑制TNF诱导的致死性

给D-半乳糖胺致敏的小鼠注射重组人TNF α (rhTNF α)导致在24小时内的致死性。已表明TNF α 中和剂可以在此模型中防止致死性。为检测人抗hTNF α 抗体在此模型中体内中和hTNF α 的能力，用PBS中的各种浓度的D2E7-IgG1或对照蛋白腹膜内注射C57B1/6小鼠。30分钟后，用PBS中的1 μ g rhTNF α 和20 mg D-半乳糖胺腹膜内注射攻击小鼠，并于24小时后观察。已预先确定这些量的rhTNF α 和D-半乳糖胺在这些小鼠中达到80-90%的致死性。

代表性结果以存活百分比对抗体浓度做成柱状图表示于图6中。实心柱代表D2E7，而空心柱代表MAK 195。每只小鼠注射2.5-25 μ g D2E7抗体保护这些动物不受TNF α 诱导的致死性影响。ED₅₀值约为1-2.5 μ g/小鼠。阳性对照抗体MAK 195在保护能力方面相似。在没有rhTNF α 的情况下注射D2E7对小鼠没有任何有害影响。注射非特异性人IgG1抗体没有提供任何免于TNF α 诱导的致死性的保护。

在第二个实验中，将49只小鼠分成7个相等的组。每组在接受LD₈₀剂量的rhTNF/D-半乳糖胺混合物(1.0 μ g rhTNF和20 mg D-半乳糖胺/小鼠)的30分钟之前接受了各种剂量的D2E7。对照组7接受了25 μ g/小鼠剂量的正常人IgG1 κ 抗体。24小时后检查小鼠。各组的存活率概括于下表13中。

表13: 用D2E7处理24小时后的存活率

组	存活率(生存/总数)	存活率(%)
1 (无抗体)	0/7	0
2 (1 μg)	1/7	14
3 (2.6 μg)	5/7	71
4 (5.2 μg)	6/7	86
5 (26 μg)	6/7	86
6 (26 μg ; 无rhTNF)	7/7	100
7 (25 μg Hu IgG1)	1/7	14

II. 抑制TNF诱导的兔发热

检测了D2E7抑制rhTNF诱导的兔发热反应的效力。用D2E7、rhTNF和D2E7与rhTNF的免疫复合物静脉注射三只一组重约2.5 kg的每一只NZW雌兔。用Kaye热记录仪的热敏电阻探头测定每分钟的直肠温度约4小时。在注射后约45分钟，盐水中的以5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 注射的重组人TNF导致温度上升超过0.4°C。直至注射后140分钟，溶于盐水并以138 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量单独的抗体制剂没有导致兔子温度上升。在所有的进一步实验中，将D2E7或对照试剂(人IgG1或盐水载体)静脉注射给兔子。并于15分钟后静脉注射盐水中5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的rhTNF。几个实验的代表性结果概括于下表14:

表14: 用D2E7在兔子中抑制rh-TNF诱导的发热

D2E7剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	温度上升*, $^{\circ}\text{C}$		抑制%**	摩尔比	峰值温度
	rhTNF	rhTNF + D2E7		D2E7: rhTNF	rhTNF后 分钟
14	0.53	0.25	53	1	60
24	0.43	0.13	70	1.6	40
48	0.53	0.03	94	3.3	50
137	0.53	0.00	100	9.5	60
792	0.80	0.00	100	55	60

* = 峰值温度

** = 抑制百分比 = $(1 - \{\text{使用rhTNF和D2E7时的温度上升} / \text{仅使用rhTNF时的温度上升}\}) \times 100$

与仅用盐水预治疗的兔子相比, 用14 $\mu\text{g/kg}$ 的剂量的D2E7静脉预治疗部分地抑制该热原反应。以137 $\mu\text{g/kg}$ 给与的D2E7在同一实验中完全抑制了rhTNF的热原反应。在第二个实验中, 与仅用盐水预治疗的兔子相比, 以24 $\mu\text{g/kg}$ 给与的D2E7亦部分地抑制该热原反应。在这个实验中, D2E7与rhTNF的摩尔比是1/6:1。在第三个实验中, 与盐水中的30 $\mu\text{g/kg}$ 的对照人IgG1预治疗的兔子相比, 以48 $\mu\text{g/kg}$ (摩尔比D2E7:rhTNF = 3.3:1)静脉注射的D2E7完全抑制了该热原反应。在最后一个实验中, 用很高D2E7:rhTNF (55:1)摩尔比的D2E7 (792 $\mu\text{g/kg}$)预治疗的兔子在直至观察的4个小时内的任何时刻体温都升高。用将D2E7和rhTNF的混合物(摩尔比55:1)于37 $^{\circ}\text{C}$ 培育1小时制备的免疫复合物治疗兔子亦未引起在同一实验中的任何温度上升。

III. 在Tg197转基因小鼠中预防多关节炎

在转基因鼠关节炎模型中研究D2E7对疾病发展的影响。已制备表达人野生型TNF (在所述编码序列的3'区内修饰)的转基因小鼠(Tg197), 并且这些小鼠在4-7周龄时100%发生慢性多关节炎(参见

EMBO J. (1991) 10:4025-4031有关多关节炎Tg197模型的进一步描述)。

通过PCR在年龄为三天时识别转基因动物。将一窝转基因小鼠分成六组。在年龄为15天时通过槽印迹杂交分析确认转基因小鼠。按下述程序治疗这六个组: 1组=未治疗; 2组=盐水(载体); 3组=1.5 $\mu\text{g/g}$ 的D2E7; 4组=15 $\mu\text{g/g}$ 的D2E7; 5组=30 $\mu\text{g/g}$ 的D2E7; 和6组=30 $\mu\text{g/g}$ 的IgG1同种型对照。将一窝非转基因小鼠亦包括于本研究中做为对照(7组-非转基因; 未治疗)。每组每周接受指明的治疗的三次腹膜内注射。注射持续10周。每周, 记录每个动物的关节形态的宏观变化。第10周时, 处死所有的小鼠并将小鼠组织收集于福尔马林中。对该组织进行显微镜检查。

在每周开始时记录每只小鼠的动物重量克数。同时记录测定的关节尺寸(mm)以做为疾病严重性的尺度。用测微仪三次测定后右踝的平均值做为关节尺寸。每周按照下述记录关节分数: 0 = 无关节炎, (正常外观和弯曲); += 轻微关节炎(关节变形); ++ = 中等关节炎(肿胀, 关节变形)和+++ = 严重关节炎(在屈曲检测到关节强硬和严重运动受损)。根据关节切片的苏木精/曙红染色的组织病理学计分按下述进行: 0 = 未检测到疾病; 1 = 滑膜增生; 2 = 严重滑液加厚; 3 = 软骨破坏和骨侵蚀。

D2E7治疗对该Tg197转基因关节炎小鼠的平均关节尺寸的影响示于图9的曲线图中。11周龄时该Tg197转基因小鼠的组织病理学和关节炎计分概括于下表15中:

表15: D2E7对Tg197小鼠组织病理学和关节炎计分的影响

组别	治疗	组织病理学计分	关节炎计分
1	无	3 (7/70)	+++ (7/7)
2	盐水	3 (8/8)	+++ (8/8)
6	IgG1对照	3 (9/9)	+++ (7/9)
3	1.5 µg/g的D2E7	0 (6/8)	0 (8/8)
4	15 µg/g的D2E7	0 (7/8)	0 (8/8)
5	30 µg/g的D2E7	0 (8/8)	0 (8/8)

该实验证明D2E7抗体对表达野生型人TNF的转基因小鼠(Tg197)具有明确有益效果, 在本研究时期后没有可证实的关节炎。

E. D2E7中和来自其它物种的TNF α

利用L929细胞毒性检测(如上述实施例4A小节所述), 通过检测D2E7中和来自各种灵长类物种和来自小鼠的肿瘤坏死因子检测其结合特异性。结果概括于下表16中:

表16: D2E7在L929检测中中和来自不同物种TNF的能力

TNF α *	来源	D2E7中和的IC ₅₀ (M)**
人	重组	7.8×10^{-11}
黑猩猩	LPS刺激的PBMC	5.5×10^{-11}
狒狒	重组	6.0×10^{-11}
狨	LPS刺激的PBMC	4.0×10^{-10}
猕猴	LPS刺激的PBMC	8.0×10^{-11}
恒河猴	LPS刺激的PBMC	3.0×10^{-11}
犬	LPS刺激的WBC	2.2×10^{-10}
猪	重组	1.0×10^{-7}
鼠	重组	$> 1.0 \times 10^{-7}$

表16中的结果证明, D2E7可以以约等于人TNF α 的情况中和五种灵长类TNF α 的活性, 而且可以中和犬TNF α (约比人TNF α 差10倍)、猪和鼠TNF α (约比人TNF α 差~1000倍)。另外, D2E7与溶液相rhTNF α 的结合未受其它细胞因子(例如淋巴细胞毒素(TNF β)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IFN γ 和TGF β)抑制, 表明D2E7对其配体TNF α 具有非常的特异性。

F. 用D2E7培育的人全血缺乏细胞因子释放

在该实施例中, 检测了D2E7本身诱导正常人血液细胞分泌细胞因子或排出细胞表面分子的能力。将D2E7与来自三个不同正常献血者的稀释全血于不同浓度培育24小时。同时进行LPS阳性对照, 其浓度已预先确定可以刺激免疫活性血细胞分泌细胞因子。收集上清液并在有10种可溶性细胞因子、受体和粘附分子(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1受体拮抗剂、IL-6、IL-8、TNF α 、可溶性TNF α 受体I、可溶性TNF α 受体II、可溶性ICAM-1和可溶性E-selectin)的ELISA 药盒嵌板中检测。直至浓度为343 μ g/ml, 由于D2E7抗体共培育的结果, 没有检测到显著数量的

细胞因子或排出细胞表面分子。未加入该抗体的对照培养物亦未产生可检测量的细胞因子，而LPS共培养对照产生了pg至ng范围的较高的值。这些结果表明D2E7没有诱导全血细胞离体培养中分泌高出正常水平的细胞因子或排出细胞表面蛋白。

所附的顺序表构成了本说明书的一部分，该表的内容概括于下表中：

SEQ ID NO:	抗体链	区	序列类型
1	D2E7	VL	氨基酸
2	D2E7	VH	氨基酸
3	D2E7	VL CDR3	氨基酸
4	D2E7	VH CDR3	氨基酸
5	D2E7	VL CDR2	氨基酸
6	D2E7	VH CDR2	氨基酸
7	D2E7	VL CDR1	氨基酸
8	D2E7	VH CDR1	氨基酸
9	2SD4	VL	氨基酸
10	2SD4	VH	氨基酸
11	2SD4	VL CDR3	氨基酸
12	EP B12	VL CDR3	氨基酸
13	VL10E4	VL CDR3	氨基酸
14	VL100A9	VL CDR3	氨基酸
15	VLL100D2	VL CDR3	氨基酸
16	VLL0F4	VL CDR3	氨基酸
17	LOE5	VL CDR3	氨基酸
18	VLLOG7	VL CDR3	氨基酸
19	VLLOG9	VL CDR3	氨基酸
20	VLLOH1	VL CDR3	氨基酸
21	VLLOH10	VL CDR3	氨基酸
22	VL1B7	VL CDR3	氨基酸

23	VL1C1	VL CDR3	氨基酸
24	VL0.1F4	VL CDR3	氨基酸
25	VL0.1H8	VL CDR3	氨基酸
26	LOE7.A	VL CDR3	氨基酸
27	2SD4	VH CDR3	氨基酸
28	VH1B11	VH CDR3	氨基酸
29	VH1D8	VH CDR3	氨基酸
30	VH1A11	VH CDR3	氨基酸
31	VH1B12	VH CDR3	氨基酸
32	VH1E4	VH CDR3	氨基酸
33	VH1F6	VH CDR3	氨基酸
34	3C-H2	VH CDR3	氨基酸
35	VH1-D2.N	VH CDR3	氨基酸
36	D2E7	VL	核酸
37	D2E7	VH	核酸

等价物

仅仅使用常规实验，本领域技术人员将会识别或能够确定许多与本文描述的本发明的具体实施方案的等价物。这种等价物包括于下列权利要求之内。

序列表

(1) 一般资料

(i) 申请人:

- (A) 收信人: BASF Aktiengesellschaft
- (B) 街道: Carl-Bosch Str. 38
- (C) 城市: 67056 Ludwigshafen
- (D) 州: Rheinland-Pfalz
- (E) 国家: 德意志联邦共和国

(ii) 发明名称: 结合人 $\text{TNF}\alpha$ 的人抗体

(iii) 序列数: 37

(iv) 通信地址:

- (A) 收信人: LAHIVE & COCKFIELD
- (B) 街道: 60 State Street, suite 510
- (C) 城市: 波士顿
- (D) 州: 麻省
- (E) 国家: 美国
- (F) 邮政编码: 02109-1875

(v) 计算机可读形式

- (A) 媒体类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC 兼容机
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本#1.25

(vi) 当前申请数据

- (A) 申请号:
- (B) 提交日期:
- (C) 分类:

(vii) 在先申请数据

- (A) 申请号: US 08/599,226

(B) 提交日期: 1996 年 2 月 9 日

(vii) 在先申请数据

(A) 申请号: US 60/031,476

(B) 提交日期: 1996 年 11 月 25 日

(viii) 代理律师/代理人资料

(A) 姓名: DeConti, Giulio A., Jr.

(B) 注册号: 31,503

(C) 参考/档案号: BBI-043CPPC

(ix) 电讯资料

(A) 电话: (617)227-7400

(B) 传真: (617)227-5941

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 107 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 1:

```

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

```

```

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

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

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

```

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 121 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 2:

```

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
        100              105              110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115              120

```

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (v) 片段类型: 内部
- (ix) 特征:
 - (A) 名称/关键词: 修饰位点
 - (B) 位置: 9
 - (D) 其它信息: /注释= “Xaa 为 Thr 或 Ala”
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 3:

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1 5

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 12 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (v) 片段类型: 内部
- (ix) 特征:
 - (A) 名称/关键词: 修饰位点
 - (B) 位置: 12
 - (D) 其它信息: /注释= “ Xaa 为 Tyr 或 Asn ”

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 4:

```
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 7 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 5:

```
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 17 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 6:

```
Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1           5           10           15
```

Gly

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 11 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (v) 片段类型: 内部
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 7:

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 8 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 5 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (v) 片段类型: 内部
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 8:

Asp Tyr Ala Met His
1 5

(2) SEQ ID NO: 9 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 107 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 9:

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95

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

(2) SEQ ID NO: 10 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 121 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 10:

```

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

```

(2) SEQ ID NO: 11 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 11:

```

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
1           5

```

(2) SEQ ID NO: 12 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 12:

```
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1          5
```

(2) SEQ ID NO: 13 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 13:

```
Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1          5
```

(2) SEQ ID NO: 14 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 14:

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) SEQ ID NO: 15 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 15:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) SEQ ID NO: 16 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 16:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) SEQ ID NO: 17 的信息:

(i) 顺序特征:

- (A) 长度: 9 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 17:

```
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 18 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 18:

```
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 19 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

(2) SEQ ID NO: 20 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

(2) SEQ ID NO: 21 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

(2) SEQ ID NO: 22 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (v) 片段类型: 内部
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

(2) SEQ ID NO: 23 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性
- (ii) 分子类型: 肽
- (v) 片段类型: 内部
- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

(2) SEQ ID NO: 24 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 9 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 24:

```
Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 25 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 25:

```
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 26 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 9 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 26:

```
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1           5
```

(2) SEQ ID NO: 27 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 12 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性

- (ii) 分子类型: 肽

- (v) 片段类型: 内部

- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 27:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO: 28 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 12 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸
 - (D) 拓扑学: 线性

- (ii) 分子类型: 肽

- (v) 片段类型: 内部

- (xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 28:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO: 29 的信息:

- (i) 顺序特征:
 - (A) 长度: 12 个氨基酸
 - (B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 29:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO: 30 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 30:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO: 31 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 31:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 32 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 32:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 33 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 33:

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

(2) SEQ ID NO: 34 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 34:

```
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO: 35 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 12 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: 肽

(v) 片段类型: 内部

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 35:

```
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1           5           10
```

(2) SEQ ID NO: 36 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 321 个核苷酸

(B) 类型: 核酸

(C) 类型: 双链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 31:

```

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC    60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA    120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT    180
CGGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT    240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG    300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A                                             321

```

(2) SEQ ID NO: 37 的信息:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 363 个核苷酸

(B) 类型: 核酸

(C) 类型: 双链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子类型: cDNA

(xi) 顺序描述: SEQ ID NO: 31:

```

GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC    60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCGGCAAGCT    120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT    180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT    240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG    300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG    360
AGT                                                                    363

```

	CDR L1			CDR L2
2SD4 VL	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITC			AASTLQS
EP B12				
VL10E4				
VL100A9				
VL100D2				
VL10F4				
LOE5				
VLL0F9				
VLL0F10				
VLL0G7				
VLL0G9				
VLL0H1				
VLL0H10				
VL1B7				
VL1C1				
VL1C7				
VL0.1F4				
VL0.1H8				
LOE7				
LOE7.A				
LOE7.T				
D2E7 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC			AASTLQS
LD2E7*.A1				
LD2E7*.A3				
LD2E7*.A4				
LD2E7*.A5				
LD2E7*.A7				
LD2E7*.A8				

图1A

	CDR H1		CDR H2
2SD4 VH	QVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFD		AITWNSGHIDYADSV
VH1B11		WVRQAPGKGLDWVS	
VH1D8			
VH1A11			
VH1B12			
VH1-D2			
VH1E4			
VH1F6			
VH1G1			
3C-H2			
VH1-D2.N			
VH1-D2.Y			
D2E7 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSRLRLSCAASGFTFD	WVRQAPGKGLEWVS	AITWNSGHIDYADSV
HD2E7*.A1			
HD2E7*.A2			
HD2E7*.A3			
HD2E7*.A4			
HD2E7*.A5			
HD2E7*.A6			
HD2E7*.A7			
HD2E7*.A8			
HD2E7*.A9			

图2A

		CDR H3													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
2SD4 VH	RFAVSRDN	A	S	Y	L	S	T	S	S	S	L	D	N	W	G
VH1B11		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q
VH1D8		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
VH1A11		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
VH1B12		.	.	.	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	L
VH1-D2		.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	V
VH1E4		.	.	.	.	.	.	.	.	.	H	Y	.	.	T
VH1F6		.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	Y	.	.	V
VH1G1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S
3C-H2		.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	S
VH1-D2.N		.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	N	.	.	S
VH1-D2.Y		.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	S
D2E7 VH	RFTISRDN	V	S	Y	L	S	T	A	S	S	L	D	Y	W	G
HD2E7*.A1		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Q
HD2E7*.A2		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
HD2E7*.A3		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L
HD2E7*.A4		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V
HD2E7*.A5		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S
HD2E7*.A6		.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	S
HD2E7*.A7		.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	S
HD2E7*.A8		.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	S
HD2E7*.A9		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	S

图2B

图3

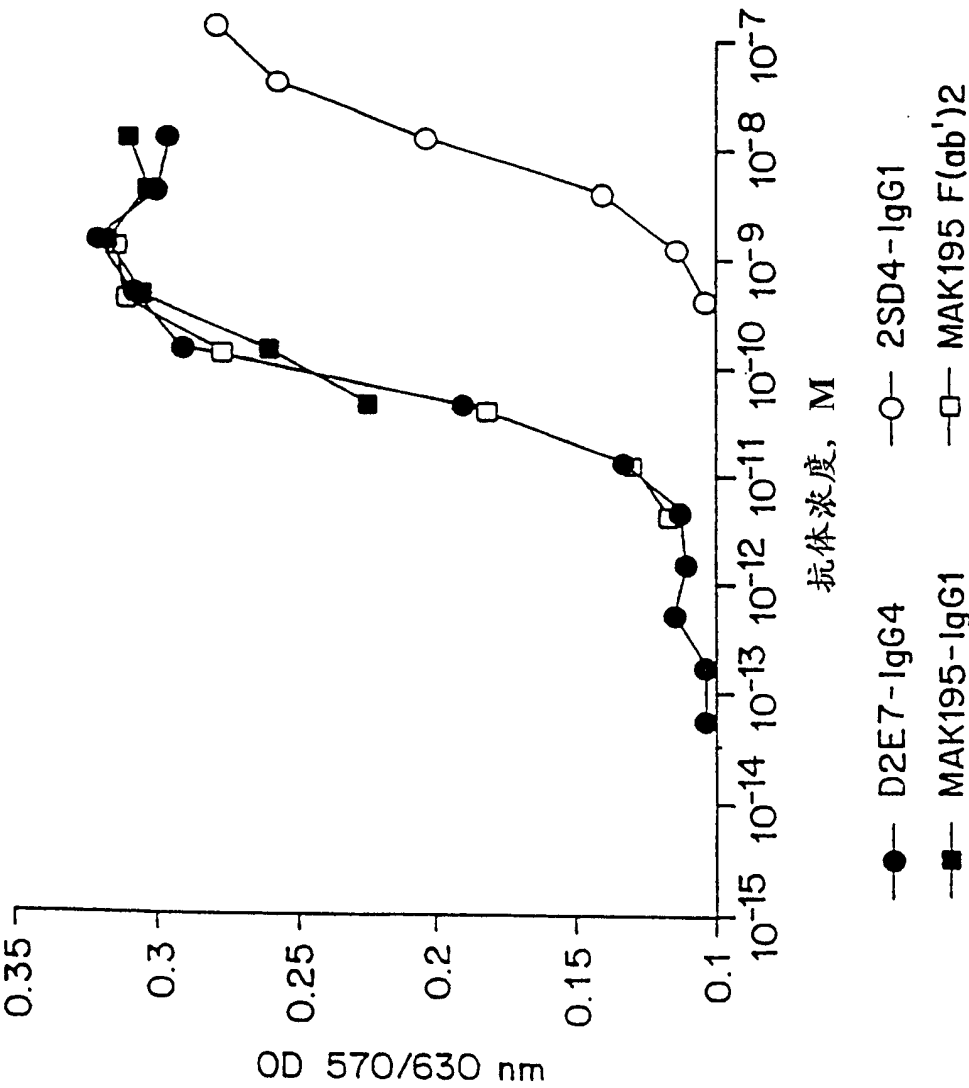


图4

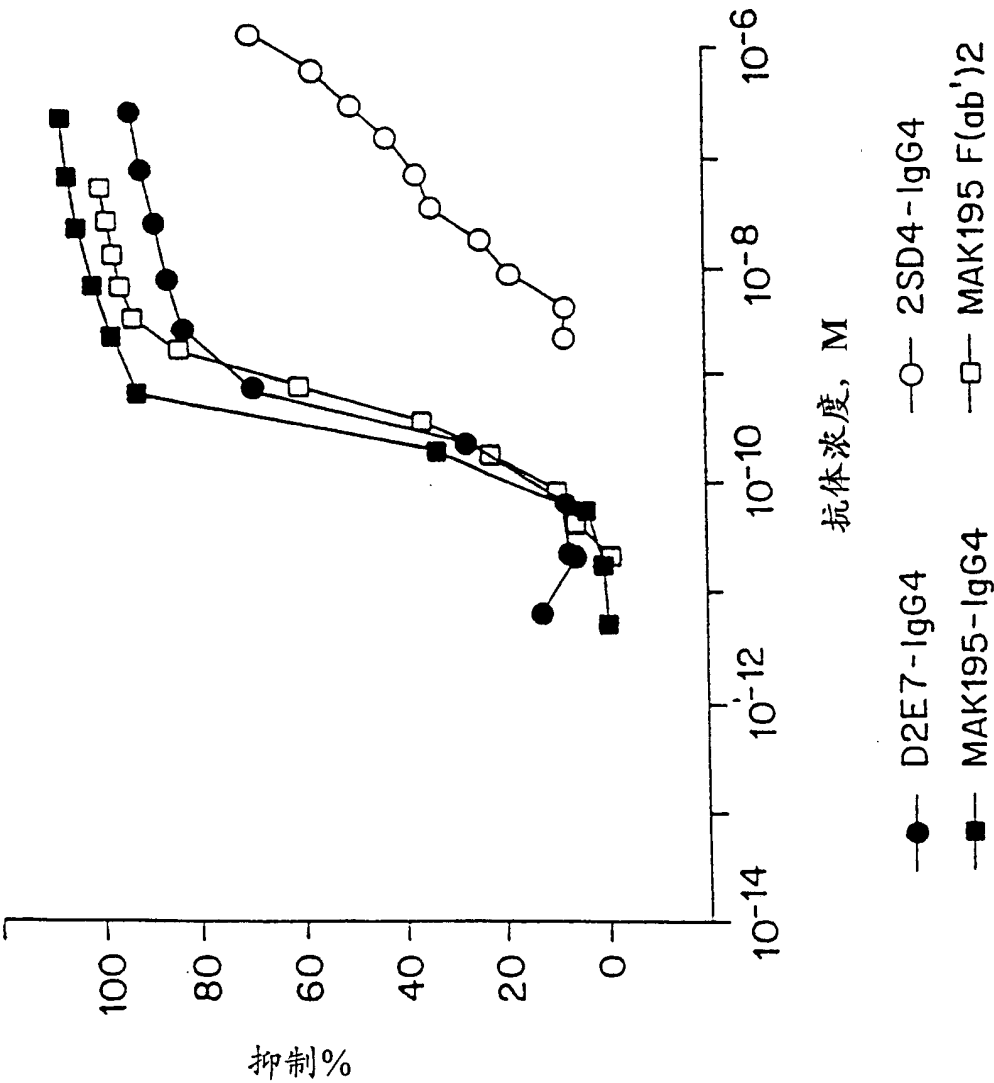


图5

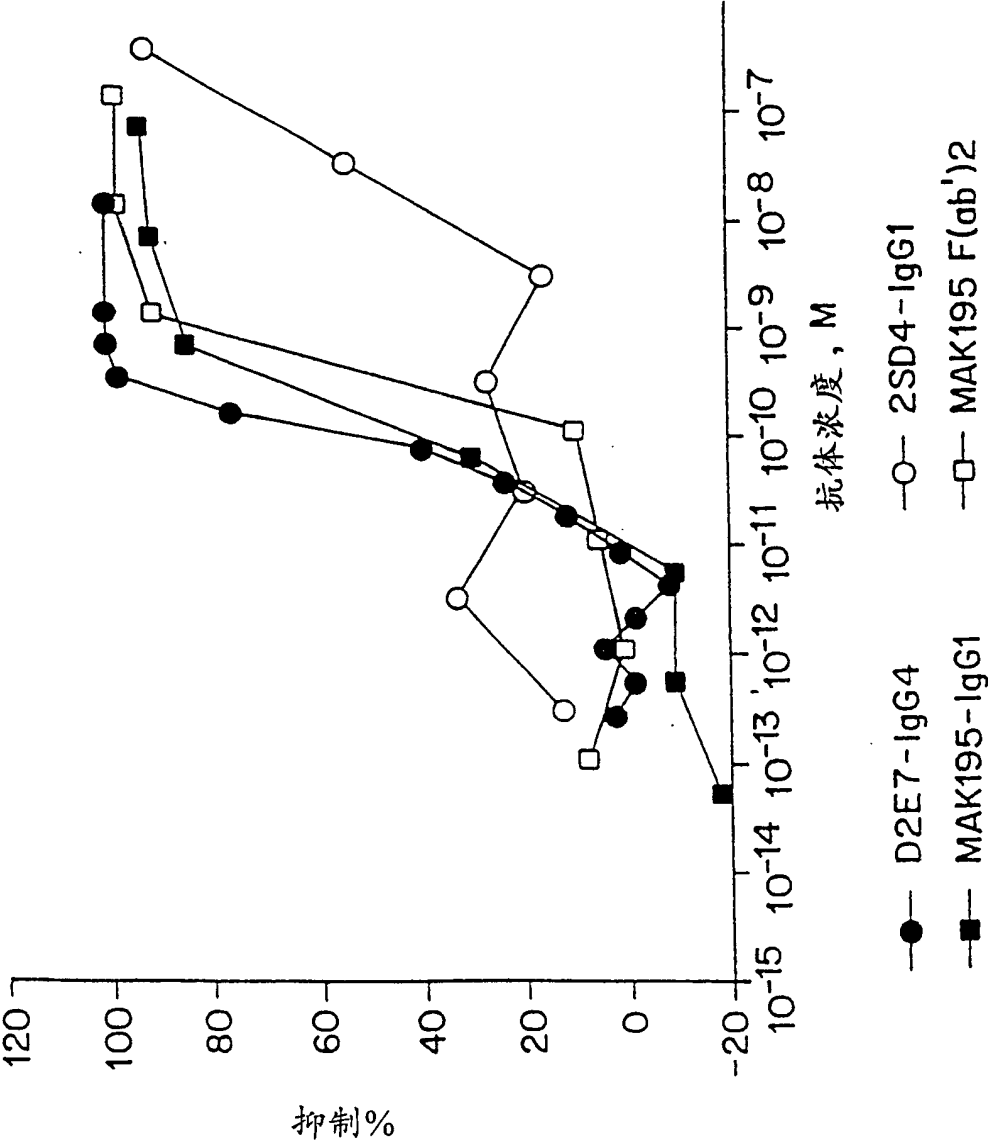
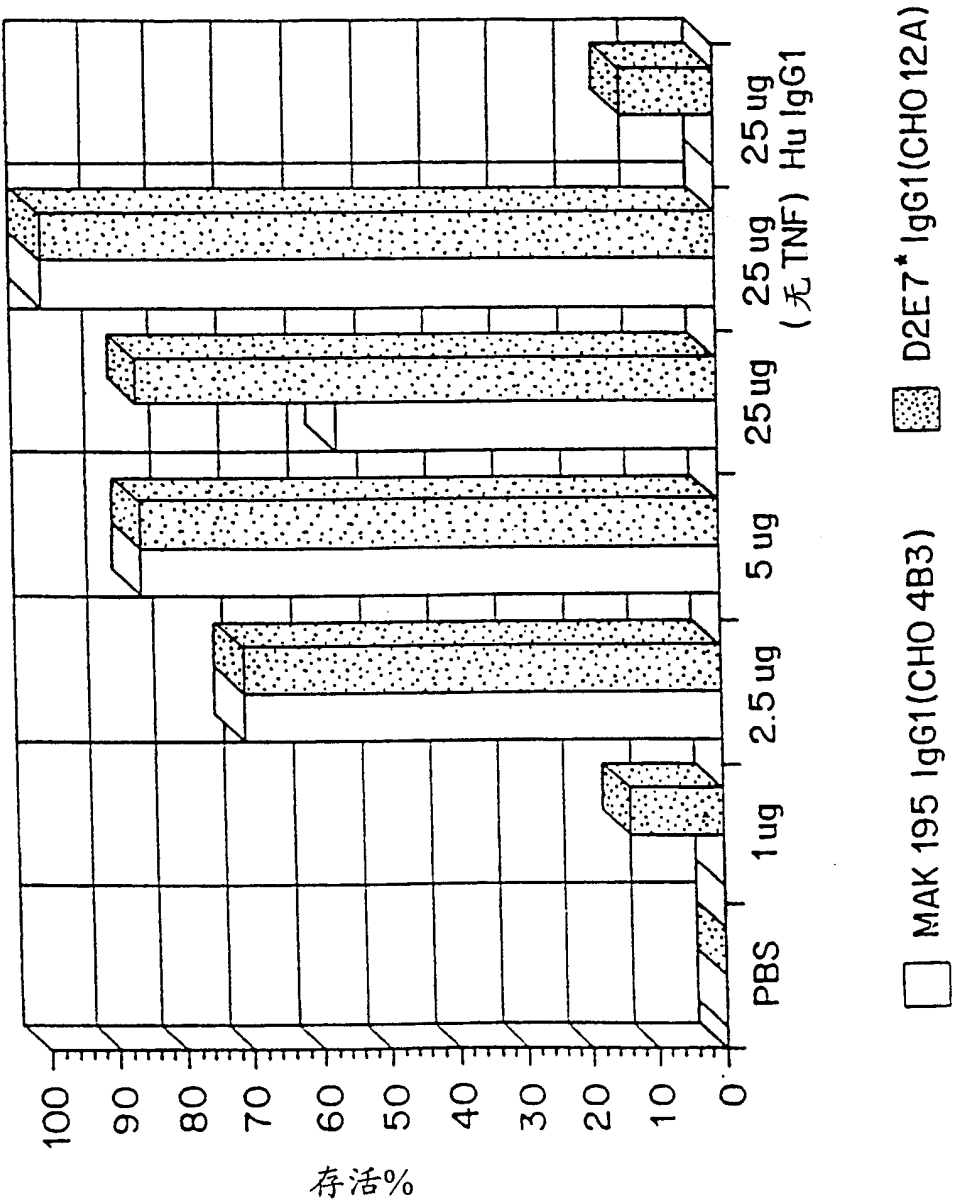


图6



D2E7 VL

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA
 D I Q M T Q S P S S L S A S V

CDR L1

GGG GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCA AGT CAG GGC ATC AGA
 G D R V T I T C R A S Q G I R

AAT TAC TTA GCC TGG TAT CAG CAA AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG
N Y L A W Y Q Q K P G K A P K

CDR L2

CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTG CAA TCA GGG GTC CCA TCT
 L L I Y A A S T L Q S G V P S

CGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
 R F S G S G S G T D F T L T I

AGC AGC CTA CAG CCT GAA GAT GTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA AGG
 S S L Q P E D V A T Y Y C Q R

CDR L3

TAT AAC CGT GCA CCG TAT ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG GTG GAA
Y N R A P Y T F G Q G T K V E

ATC AAA
 I K

图7

D2E7 VH

GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCC GGC
 E V Q L V E S G G G L V Q P G

AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCG GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT
 R S L R L S C A A S G F T F D

CDR H1

GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG
D Y A M H W V R Q A P G K G L

CDR H2

GAA TGG GTC TCA GCT ATC ACT TGG AAT AGT GGT CAC ATA GAC TAT
 E W V S A I T W N S G H I D Y

GCG GAC TCT GTG GAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC
A D S V E G R F T I S R D N A

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

CDR H3

ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA GTC TCG TAC CTT AGC ACC GCG
 T A V Y Y C A K V S Y L S T A

TCC TCC CTT GAC TAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTC TCG
S S L D Y W G Q G T L V T V S

AGT
 S

图8

图9

