

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480036775.9

[43] 公开日 2007 年 1 月 3 日

[11] 公开号 CN 1889978A

[22] 申请日 2004.12.10

[21] 申请号 200480036775.9

[30] 优先权

[32] 2003.12.10 [33] US [31] 60/528,757

[86] 国际申请 PCT/US2004/041777 2004.12.10

[87] 国际公布 WO2005/059106 英 2005.6.30

[85] 进入国家阶段日期 2006.6.9

[71] 申请人 米德列斯公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 艾利森·威特 丹尼斯·威廉姆斯
约瑟芬·M·卡达雷利 戴维·金
戴维·帕斯莫尔

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 徐雁漪

权利要求书 6 页 说明书 72 页 附图 12 页

[54] 发明名称

干扰素 α 抗体及其用途

[57] 摘要

本发明提供分离的抗干扰素 α 单克隆抗体，特别是人单克隆抗体，其抑制多种干扰素 (IFN) α 亚型的生物活性，但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性或 IFN β 或 IFN ω 的生物活性。也提供了包含本发明抗体的免疫偶联物、双特异性分子和药物组合物。本发明还提供应用本发明的抗体抑制 IFN α 的生物活性的方法，以及通过施用本发明的抗体治疗 IFN α 介导的疾病，如自身免疫病、移植排斥和移植抗宿主疾病的方法。

1. 一种分离的抗-干扰素 α 单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体:

(a) 抑制多种干扰素(IFN) α 亚型的生物活性, 但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性; 且

(b) 基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性。

2. 权利要求 1 的抗体, 其中该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达。

3. 权利要求 1 的抗体, 其中该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10。

4. 权利要求 1 的抗体, 其中该抗体抑制系统性红斑狼疮(SLE) 血浆介导的树突细胞发育。

5. 权利要求 1 的抗体, 其抑制多种人 IFN α 亚型的生物活性, 但是基本不抑制人 IFN α 21 的生物活性。

6. 权利要求 1 的抗体, 其中该抗体: (i)不抑制 IFN α 与表达干扰素 α 受体(IFNAR)的细胞的结合; 和(ii)在 IFN α 存在下与表达 IFNAR 的细胞结合。

7. 权利要求 1 的抗体, 其为人抗体。

8. 权利要求 1 的抗体, 其为 IgG1 或 IgG4 同种型的全长抗体。

9. 权利要求 1 的抗体, 其为抗体片段或单链抗体。

10. 一种分离的抗-干扰素 α 单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体:

(a)包含人 VH 1-18 或 4-61 基因的重链可变区;

(b)包含人 Vk A27 基因的轻链可变区; 且

(c)抑制至少一种干扰素 α 亚型的生物活性。

11. 权利要求 10 的抗体, 其包含人 VH 1-18 基因的重链可变区。

12. 权利要求 10 的抗体, 其包含人 VH 4-61 基因的重链可变区。

13. 一种分离的抗-干扰素 α 单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包

含含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区, 和含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区, 其中:

(a)重链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

(b)轻链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 18 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列;

(c)该抗体抑制多种 IFN α 亚型的生物活性,但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性; 且

(d)该抗体基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性。

14. 权利要求 13 的抗体, 其中该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达。

15. 权利要求 13 的抗体, 其中该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10。

16. 权利要求 13 的抗体, 其中该抗体抑制系统性红斑狼疮(SLE)血浆介导的树突细胞发育。

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

18. 权利要求 17 的抗体, 其中所述重链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:1、2 和 3 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列; 且轻链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:10、11 和 12 的氨基酸序列及其保守修饰的氨基酸序列。

19. 权利要求 13 的抗体, 其为人抗体。

20. 权利要求 13 的抗体, 其为人源化或嵌合抗体。

21. 一种分离的抗-干扰素 α 单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

(a)重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:19、20 和 21 的氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列;

(b)轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:22、23 和 24 的氨基酸序列至少 80%同源的氨基酸序列;

(c)该抗体抑制多种 IFN α 亚型的生物活性,但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性; 且

(d)该抗体基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性。

22. 权利要求 21 的抗体, 其中该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达。

23. 权利要求 21 的抗体, 其中该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10。

24. 权利要求 21 的抗体, 其中该抗体抑制系统性红斑狼疮(SLE)血浆介导的树突细胞发育。

25. 权利要求 21 的抗体, 其为人抗体。

26. 权利要求 21 的抗体, 其为人源化或嵌合抗体。

27. 一种分离的抗-干扰素 α 单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

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

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

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

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

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

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

其中该抗体抑制至少一种干扰素 α 亚型的生物活性。

28. 权利要求 27 的抗体, 其包含:

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

29. 权利要求 27 的抗体, 其包含:

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

30. 权利要求 27 的抗体, 其包含:

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

31. 一种分离的抗-干扰素 α 单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

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

其中该抗体抑制至少一种干扰素 α 亚型的生物活性。

32. 权利要求 31 的抗体, 其包含:

- (a)包含 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列的重链可变区;和

(b)包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的轻链可变区。

33. 权利要求 31 的抗体, 其包含:

(a)包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸序列的重链可变区;和

(b)包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列的轻链可变区。

34. 权利要求 31 的抗体, 其包含:

(a)包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列的重链可变区;和

(b)包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的轻链可变区。

35. 一种分离的抗-干扰素 α 单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

(a)包含选自 SEQ ID NO:34、35、36 和 37 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b)包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的轻链可变区;

其中该抗体抑制至少一种干扰素 α 亚型的生物活性。

36. 一种分离的抗-干扰素 α 人单克隆抗体或其抗原结合部分, 其抑制多种干扰素(IFN) α 亚型的生物活性, 其中该抗体不抑制 IFN α 与表达干扰素 α 受体(IFNAR)的细胞的结合, 并且其中该抗体在 IFN α 存在下与表达 IFNAR 的细胞结合, 但在不存在 IFN α 时不与之结合。

37. 一种分离的人抗体或其抗原结合部分, 其与权利要求 1-36 任一项的抗体竞争结合 IFN α 2a 或 IFN α 2b。

38. 一种组合物, 其含有权利要求 1-36 任一项的抗体或其抗原结合部分, 和药学上可接受的载体。

39. 一种免疫偶联物, 其包含与治疗剂连接的权利要求 1-36 任一项的抗体或其抗原结合部分。

40. 权利要求 39 的免疫偶联物, 其中所述治疗剂是一种细胞毒素。

41. 权利要求 39 的免疫偶联物, 其中所述治疗剂是一种放射性同位素。

42. 一种组合物, 其含有权利要求 39 的免疫偶联物和药学上可

接受的载体。

43. 一种双特异性分子，其包含与第二功能部分连接的权利要求 1-36 任一项的抗体或其抗原结合部分，该第二功能部分具有与该抗体或其抗原结合部分不同的结合特异性。

44. 一种组合物，其含有权利要求 43 的双特异性分子和药学上可接受的载体。

45. 一种分离的核酸分子，其编码权利要求 1-36 任一项的抗体或其抗原结合部分。

46. 一种表达载体，其包含权利要求 45 的核酸分子。

47. 一种宿主细胞，其包含权利要求 46 的表达载体。

48. 一种含有人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转基因小鼠，其中该小鼠表达权利要求 1-36 任一项的抗体。

49. 由权利要求 48 的小鼠制备的杂交瘤，其中该杂交瘤产生所述抗体。

50. 一种抑制干扰素 α 的生物活性的方法，包括使干扰素 α 接触权利要求 1-36 任一项的抗体或其抗原结合部分，使得干扰素 α 的生物活性受到抑制。

51. 一种对需要治疗的受试者治疗干扰素 α 介导的疾病或紊乱的方法，包括向该受试者施用权利要求 1-36 任一项的抗体或其抗原结合部分，使该受试者中干扰素 α 介导的疾病得到治疗。

52. 权利要求 51 的方法，其中所述疾病或紊乱是系统性红斑狼疮。

53. 权利要求 51 的方法，其中所述疾病或紊乱选自：多发性硬化症、炎性肠病、胰岛素依赖型糖尿病、牛皮癣、自身免疫性甲状腺病、类风湿性关节炎和肾小球肾炎。

54. 权利要求 51 的方法，其中所述疾病或紊乱是移植排斥或移植抗宿主疾病。

干扰素 α 抗体及其用途

相关申请

本申请要求 2003 年 12 月 10 日提交的美国临时专利申请系列号 60/528,757 的优先权, 该申请的全部内容在此引用作为参考。

发明背景

I 型干扰素(IFN)(IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- τ)是具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用的结构上相关的细胞因子的一个家族(Hardy 等(2001) Blood 97:473; Cutrone 和 Langer (2001) J. Biol. Chem. 276:17140)。人 IFN α 基因座包括两个亚家族。第一个亚家族由具有至少 75%同源性的至少 14 个非等位基因和 4 个假基因组成。第二个亚家族, α II 或 ω , 含有 5 个假基因和 1 个功能基因, 它们显示与 IFN α 基因有 70%同源性。IFN α 的亚型具有不同的特定活性, 但是它们具有相同的生物学谱(Streuli 等(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2848), 并且具有相同的细胞受体(Agnet M.等(1983) in “Interferon 5” Ed. I. Gresser p. 1-22, Academic Press, London)。

所有人 I 型干扰素都与细胞表面受体(IFN α 受体, IFNAR)结合, IFNAR 由两个跨膜蛋白 IFNAR-1 和 IFNAR-2 组成(Uze 等(1990) Cell 60:225; Novick 等(1994) Cell 77:391; Pestka 等(1987) Annu Rev. Biochem. 56:727; Mogensen 等(1999) J. Interferon Cytokine Res. 19:1069)。IFNAR-1 是 IFNAR 复合物的高亲和力结合和特异性差异的关键(Cutrone (2001), 同上文)。尽管各种 I 型 IFN 亚型的功能差异尚未确定, 但是认为它们都可能显示与 IFNAR 受体成分的不同相互作用, 导致可能多样化的信号传导结果(Cook 等(1996). J. Biol. Chem. 271:13448)。特别是, 使用 IFNAR1 和 IFNAR2 突变形式的研究提示, α 和 β 干扰素通过与相应链不同地相互作用, 通过受体发出不同的信

号(Lewerenz 等(1998) J. Mol. Biol. 282:585)。

早期对于 I 型 IFN 的功能研究集中于抗病毒感染的先天防御(Haller 等(1981) J. Exp. Med. 154:199; Lindenmann 等(1981) Methods Enzymol. 78:181)。但是最近的研究提示 I 型 IFN 为获得性免疫应答中的强免疫调节细胞因子。特别是,已经显示 I 型 IFN 有利于幼稚 T 细胞沿 Th1 途径分化(Brinkmann 等(1993) J. Exp. Med. 178:1655), 增强抗体产生(Finkelman 等(1991) J. Exp. Med. 174:1179), 以及支持记忆 T 细胞的功能活性和存活(Santini,等(2000) J. Exp. Med. 191:1777; Tough 等(1996) Science 272:1947)。

许多研究小组最近的工作提示, IFN- α 可以增强树突细胞(DC)的成熟或活化(Santini,等(2000) J. Exp. Med. 191:1777; Luft 等(1998) J. Immunol. 161:1947; Luft 等(2002) Int. Immunol. 14:367; Radvanyi 等(1999) Scand. J. Immunol. 50:499; Paquette 等(1998) J. Leukoc. Biol. 64:358)。此外,已经描述了在许多自身免疫病中 I 型干扰素表达增加(Foulis 等(1987) Lancet 2:1423; Hooks 等(1982) Arthritis Rheum 25:396; Hertzog 等(1988) Clin. Immunol. Immunopathol. 48:192; Hopkins 和 Meager (1988) Clin. Exp. Immunol. 73:88; Arvin 和 Miller (1984) Arthritis Rheum. 27:582)。对此研究最多的例子是胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)(Foulis (1987), 同上文)、系统性红斑狼疮(SLE)(Hooks (1982), 同上文; Blanco 等(2001) Science 294:1540; Ytterberg 和 Schnitzer (1982) Arthritis Rheum. 25:401; Batteux 等(1999) Eur. Cytokine Netw. :509)和自身免疫性甲状腺病(Prummel 和 Laurberg (2003) Thyroid 13:547; Mazziotti 等(2002) J. Endocrinol. Invest. 26:624; You 等(1999) Chin. Med. J. 112:61; Koh 等(1997) Thyroid 7:891), 它们均与 IFN α 水平升高有关, 以及类风湿性关节炎(RA)(Hertzog (1988), Hopkins 和 Meager (1988), Arvin 和 Miller (1984), 同上文), 在该疾病中 IFN- β 可能起更重要的作用。

此外,曾报道施用干扰素 α 使牛皮癣、自身免疫性甲状腺病和多发性硬化症患者的所患疾病恶化, 并且在以前没有自身免疫病史

的患者中诱发 SLE 样综合征。干扰素 α 也显示在正常小鼠中诱发肾小球肾炎, 并且加速 NZB/W 小鼠的获得性自身免疫病的发病。此外, IFN- α 治疗已经在某些病例中显示导致不希望的副作用, 包括发热和神经紊乱。因此, 存在抑制 IFN- α 活性可能有益于患者的病理情况, 并且需要有效抑制 IFN- α 活性的药剂。

发明概述

本发明提供可结合 IFN- α 并且抑制多种 IFN α 亚型的生物活性, 但是基本不抑制 IFN α 21 亚型或 IFN β 或 IFN ω 的生物活性的分离的单克隆抗体。在优选实施方案中, 本发明的抗体能够抑制 IFN α 诱导的细胞标记物的表面表达, 抑制 IFN α 诱导的 IP-10 表达, 和/或抑制系统性红斑狼疮(SLE)患者血浆介导的树突细胞发育。这些抗体可用于治疗, 包括预防目的, 例如用于干扰素 α 的产生或表达与病理学症状有关的情况。这些抗体也可用于多种疾病的诊断, 或者用于研究这些疾病的进展。

在一个实施方案中, 本发明包括一种抗体或抗体片段, 其结合 IFN α , 优选人 IFN α (例如人 IFN α 2a, 人 IFN α 2b), 并且抑制多种 IFN α 亚型的生物活性, 但是基本不抑制 IFN α 21 亚型或 IFN β 或 IFN ω 的生物活性。另外, 在各种实施方案中, 本发明的抗体能够抑制 IFN α 诱导的细胞标记物的表面表达, 抑制 IFN α 诱导的 IP-10 表达, 和/或抑制系统性红斑狼疮(SLE)患者血浆介导的树突细胞发育。该抗体或抗体片段优选地是人抗体或抗体片段, 或者可以是鼠、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中, 本发明的抗体通过非竞争性作用机制起作用。例如, 在优选实施方案中, 该抗体: (i) 不抑制 IFN α , 如 IFN α 2a, 与表达干扰素 α 受体(IFNAR)的细胞的结合; 和(ii)在 IFN α , 如 IFN α 2a 存在下与表达 IFNAR 的细胞结合。

一方面, 本发明涉及分离的抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体:

(a) 包含人 VH 1-18 或 4-61 基因的重链可变区;

(b) 包含人 A27 基因的轻链可变区; 且

(c)抑制干扰素 α 的生物活性(例如抑制至少一种 IFN α 亚型的生物活性)。

另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区,和含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,其中:

(a)重链可变区 CDR3 序列包含 SEQ ID NO:7、8 或 9 的氨基酸序列或其保守修饰;

(b)轻链可变区 CDR3 序列包含 SEQ ID NO:16、17 或 18 的氨基酸序列或其保守修饰;

(c)该抗体抑制多种 IFN α 亚型的生物活性,但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性; 且

(d)该抗体显示至少一种下列性质:

(i) 该抗体基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性;

(ii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达;

(iii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10;

(iv) 该抗体抑制系统性红斑狼疮(SLE)血浆介导的树突细胞发育。

在这些抗体中,重链可变区 CDR2 序列可包含 SEQ ID NO:4、5 或 6 的氨基酸序列或其保守修饰; 且轻链可变区 CDR2 序列可包含 SEQ ID NO:13、14 或 15 的氨基酸序列或其保守修饰。此外,在这些抗体中,重链可变区 CDR1 序列可包含 SEQ ID NO:1、2 或 3 的氨基酸序列或其保守修饰; 且轻链可变区 CDR1 序列可包含 SEQ ID NO:10、11 或 12 的氨基酸序列或其保守修饰。

另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

(a)重链可变区包含与 SEQ ID NO:19、20 或 21 至少 80%同源的氨基酸序列;

(b)轻链可变区包含与 SEQ ID NO:22、23 或 24 至少 80%同源的

氨基酸序列;

(c)该抗体抑制多种 IFN α 亚型的生物活性,但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性; 且

(d)该抗体显示至少一种下列性质:

(i) 该抗体基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性;

(ii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达;

(iii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10;

(iv) 该抗体抑制系统性红斑狼疮(SLE)血浆介导的树突细胞发育。

另一方面,本发明涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

(a)重链可变区包含含 SEQ ID NO:19、20 或 21 的氨基酸序列的氨基酸序列; 且

(b)轻链可变区包含含 SEQ ID NO:22、23 或 24 的氨基酸序列的氨基酸序列;

其中该抗体抑制干扰素 α 的生物活性(例如抑制至少一种 IFN α 亚型的生物活性)。

另一方面,本发明涉及稳定性提高的 SEQ ID NO:19 的突变变体。优选实施方案包括一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

(a)包含选自 SEQ ID NO:34、35、36 和 37 的氨基酸序列的重链可变区; 和

(b)包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列的轻链可变区;

其中该抗体抑制至少一种 IFN α 亚型的生物活性。

另一方面,本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

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

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

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

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

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

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

其中该抗体抑制干扰素 α 的生物活性(例如抑制至少一种 IFN α 亚型的生物活性)。

另一方面, 本发明涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其与上述任一抗体竞争结合 IFN α 2a 或 IFN α 2b。

另一方面, 本发明涉及一种分离的人抗体或其抗原结合部分, 其抑制多种干扰素(IFN) α 亚型的生物活性, 其中该抗体不抑制 IFN α 与表达干扰素 α 受体(IFNAR)的细胞的结合, 并且其中该抗体在 IFN α 存在下与表达 IFNAR 的细胞结合, 但在不存在 IFN α 时不与之结合。

本发明也包括编码上述任何抗体中的抗体或其抗原结合部分的核酸分子。

本发明的抗体可以是任何同种型。优选的抗体是 IgG1 或 IgG4 同种型。本发明的抗体可以是包含可变区和恒定区的全长抗体, 或者它们可以是其抗原结合片段, 如单链抗体或 Fab 片段。

本发明也包括本发明的抗体的免疫偶联物, 其中该抗体与治疗剂如细胞毒素或放射性同位素连接。本发明也包括含有本发明的抗体的双特异性分子, 其中该抗体与具有与该抗体不同的结合特异性的第二功能部分连接。

还提供了包含抗体或其抗原结合部分, 或其免疫偶联物或双特异

性分子的药物组合物。这些药物组合物包含活性剂和药学上可接受的载体。

另一方面，本发明包括在体内或体外抑制干扰素 α 的生物活性的方法，包括使干扰素 α 接触本发明的抗-IFN α 抗体，使得干扰素 α 的生物活性受到抑制。

另一方面，本发明包括治疗受试者中干扰素 α 介导的疾病的方法，包括向该受试者施用本发明的抗-IFN α 抗体，使该受试者中干扰素 α 介导的疾病得到治疗。可以治疗的疾病的例子包括自身免疫病(例如系统性红斑狼疮、多发性硬化症、胰岛素依赖型糖尿病、炎症肠病、牛皮癣、自身免疫性甲状腺病、类风湿性关节炎和肾小球肾炎)、移植排斥和移植物抗宿主疾病。

本发明的其他特征和优点在下面的详述和实施例中是显而易见的，该详述和实施例不应理解为限制性的。贯穿本申请中引用的所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容均在此处清楚地引入作为参考。

附图简述

图 1A 显示 13H5 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:25)和氨基酸序列(SEQ ID NO:19)。画出了 CDR1(SEQ ID NO:1)、CDR2(SEQ ID NO:4)和 CDR3(SEQ ID NO:7)区，并指出了 V、D 和 J 的种系起源。

图 1B 显示 13H5 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:28)和氨基酸序列(SEQ ID NO:22)。画出了 CDR1(SEQ ID NO:10)、CDR2(SEQ ID NO:13)和 CDR3(SEQ ID NO:16)区，并指出了 V 和 J 的种系起源。

图 2A 显示 13H7 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:26)和氨基酸序列(SEQ ID NO:20)。画出了 CDR1(SEQ ID NO:2)、CDR2(SEQ ID NO:5)和 CDR3(SEQ ID NO:8)区，并指出了 V、D 和 J 的种系起源。

图 2B 显示 13H7 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:29)和氨基酸序列(SEQ ID NO:23)。画出了 CDR1(SEQ ID NO:11)、CDR2(SEQ ID NO:14)和 CDR3(SEQ ID NO:17)区,并指出了 V 和 J 的种系起源。

图 3A 显示 7H9 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:27)和氨基酸序列(SEQ ID NO:21)。画出了 CDR1(SEQ ID NO:3)、CDR2(SEQ ID NO:6)和 CDR3(SEQ ID NO:9)区,并指出了 V、D 和 J 的种系起源。

图 3B 显示 7H9 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:30)和氨基酸序列(SEQ ID NO:24)。画出了 CDR1(SEQ ID NO:12)、CDR2(SEQ ID NO:15)和 CDR3(SEQ ID NO:18)区,并指出了 V 和 J 的种系起源。

图 4 显示 13H5 和 7H9 重链可变区的氨基酸序列与人种系 VH 1-18 氨基酸序列(SEQ ID NO:31)的比对。

图 5 显示 13H7 的重链可变区氨基酸序列与人种系 VH 4-61 氨基酸序列(SEQ ID NO:32)的比对。

图 6 显示 13H5、13H7 和 7H9 的轻链可变区氨基酸序列与人种系 VK A27 氨基酸序列(SEQ ID NO:33)的比对。

图 7 显示未标记的 IFN α 2a (●)对 125 I-IFN α 2a 结合表达 IFNAR 的 Daudi 细胞的竞争,与之相比 mAb 13H5 (▼)引起 125 I-IFN α 2a 结合增强。同种型对照抗体对结合没有影响(◆)。

图 8 显示在 IFN α 2a 存在下 125 I-13H5 与 Daudi 细胞的结合(■),但在不存在 IFN α 2a 时不结合(▲)。13H5 的依赖 IFN α 的特异性结合用圆圈表示(●)。

图 9 显示在 13H5(■)、13H5+IFN α (▲)、同种型对照抗体+IFN α (▼)或阳性对照抗体(●)的存在下,新鲜人单核细胞对 Raji 细胞裂解的 ADCC 测定的结果。只有阳性对照看到裂解。

发明详述

本发明涉及结合 IFN α 并且能够抑制多种 IFN α 亚型的生物活性, 但是不抑制 IFN α 21 亚型或 IFN β 或 IFN ω 的生物活性的分离的单克隆抗体。本发明的抗体能够抑制 IFN α 诱导的细胞标记物的表面表达, 抑制 IFN α 诱导的 IP-10 表达, 和抑制系统性红斑狼疮(SLE)患者血浆介导的树突细胞发育。本发明提供分离的抗体, 制备该抗体的方法, 含有该抗体的免疫偶联物和双特异性分子, 和含有本发明的抗体、免疫偶联物或双特异性分子的药物组合物。本发明还涉及使用这些抗体抑制 IFN α 的活性的方法, 例如用于治疗自身免疫病, 或用于抑制或预防移植排斥或治疗移植物抗宿主疾病。

为了使本发明更容易理解, 首先定义了一些术语。其他的定义在整个发明详述内容中说明。

术语“干扰素 α ”和“IFN α ”可互换使用, 是指由与 IFN α 1(Genbank 号 NP_076918 或 Genbank 号 NM_024013 编码的蛋白质)有 75%或更高序列同一性的干扰素 α 基因座的功能性基因编码的 IFN α 蛋白质。IFN α 亚型的例子包括 IFN α 1、 α 2a、 α 2b、 α 4、 α 5、 α 6、 α 7、 α 8、 α 10、 α 13、 α 14、 α 16、 α 17 和 α 21。术语“干扰素 α ”意在包括各种 IFN α 亚型的重组形式, 以及包含 IFN α 蛋白质的天然存在的制剂, 如白细胞 IFN 和类淋巴母细胞 IFN。术语 IFN α 不是只包括 IFN ω , 尽管术语 IFN α 包括含有 IFN α 和 IFN ω 的组合物。

如此处所用的术语“IFN α 受体”是指分子的 IFN α 受体家族的成员, 它是配体 IFN α 的受体。

术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用, 导致选择性损伤、破坏或从人体中清除侵入的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞, 或在自身免疫或病理性炎症的情况下, 正常人细胞或组织。

“信号转导途径”是指在信号从一个细胞的一部分传送到一个细胞的另一部分中起作用的多种信号转导分子之间的生化关系。如此处所用的, 短语“细胞表面受体”包括, 例如, 能够接收信号和这种

信号跨细胞质膜传播的分子和分子复合物。本发明的“细胞表面受体”的一个例子是 IFN α 受体 1 或 IFN α 受体 2。

这里提到的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。“抗体”是指包含通过二硫键互相连接在一起的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在此缩写为 V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 组成。每条轻链由轻链可变区(在此缩写为 V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。 V_H 和 V_L 区可进一步再分为高变区,称为互补决定区(CDR),散布在被称为构架区(FR)的更加保守的区域中。 V_H 和 V_L 均由三个 CDR 和四个 FR 组成,它们从氨基端向羧基端以如下顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。重链和轻链的可变区含有可与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一成分(C1q)。

如此处所用的,术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保持与抗原(例如 IFN α)特异性结合能力的抗体的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来行使。术语抗体的“抗原结合部分”中所包括的结合片段的例子包括:(i) Fab 片段,即由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,即包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的双价片段;(iii)由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的 Fd 片段;(iv)由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段;(v)由 V_H 结构域组成的 dAb 片段(Ward 等(1989) Nature 341:544-546);和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由单独的基因编码,但是它们可以利用重组方法通过合成接头连接在一起,该接头使它们能够制成一条蛋白质链,其中 V_L 和 V_H 区配对构成单价分子(称为单链 Fv (scFv);参见,例如 Bird 等(1988) Science 242:423-426;和 Huston 等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这种单链抗体也包括在术语抗

体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段用本领域技术人员公知的常规技术获得，并用如完整抗体相同的方法对这些片段进行实用性筛选。

如此处所用的，“分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如，特异性结合 IFN α 的分离的抗体基本不含特异性结合 IFN α 以外抗原的抗体)。但是，特异性结合 IFN α 的分离的抗体与其他抗原如来自其他物种的 IFN α 分子可能具有交叉反应性。而且，分离的抗体可基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

如此处所用的，术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一结合特异性和亲和性。

如此处所用的，术语“人抗体”包括具有可变区的抗体，其中构架区和 CDR 区都源自人种系免疫球蛋白序列。而且，如果该抗体含有恒定区，则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包含不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。但是，如此处所用的，术语“人抗体”不包括如下抗体，其中源自另一哺乳动物种如小鼠的种系的 CDR 序列已移植到人构架序列上。

术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体，其具有可变区，其中构架区和 CDR 区均源自人种系免疫球蛋白序列。在一个实施方案中，人单克隆抗体由杂交瘤产生，该杂交瘤包括与无限增殖细胞融合的 B 细胞，该 B 细胞从具有含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物例如转基因小鼠中获得。

如此处所用的，术语“重组人抗体”包括所有通过重组方法制备、表达、产生或分离的人抗体，例如(a)从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤(下文进一步描述)中分离的抗体，(b)从经转化表达人抗体的宿主细胞如转染瘤中分离的抗体，(c)从重组组合人抗体文库中分离的抗体，和(d)通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪切为其他 DNA 序列的任何其他方法制备、

表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有构架区和 CDR 区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。但是在某些实施方案中，这样的重组人抗体可以进行体外诱变(或者，当使用人 Ig 序列的转基因动物时，进行体内体细胞诱变)，因此重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列尽管源自人种系 V_H 和 V_L 序列并与之相关，但可能不是在体内人抗体种系谱(repertoire)中天然存在。

如此处所用的，术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如 IgM 或 IgG1)。

如此处所用的，术语“抑制 IFN α 亚型的生物活性”是指例如使用功能性测定，如实施例中所述的测定，如 Daudi 细胞增殖测定，与不存在抗体情况下的活性水平相比，至少 10%、更优选至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%或 80%抑制该亚型的活性的抗体。或者，“抑制 IFN α 亚型的生物活性”的抗体可以指以低于 200 nM 或更低、更优选 100 nM 或更低、甚至更优选 50nM 或更低、甚至更优选 10 nM 或更低的 EC_{50} 抑制该亚型活性的抗体。

如此处所用的，术语“基本不抑制”IFN α 亚型或 IFN β 或 IFN ω 的“生物活性”的抗体是指以低于 10%、更优选低于 5%、甚至更优选以基本检测不到的量抑制该亚型的活性的抗体。或者，“不抑制 IFN α 亚型的生物活性”的抗体可以指以 300 nM 或更高的 EC_{50} 抑制该亚型活性的抗体。

如此处所用的，“特异性结合”是指抗体与预定的抗原结合。一般地，抗体以 $10^{-8}M$ 或更低的解离常数(K_D)结合，并且以比与除预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如 BSA、酪蛋白)结合的 K_D 至少低两倍的 K_D 与预定抗原结合。短语“识别抗原的抗体”和“抗原特异性的抗体”在此可以与术语“特异性结合抗原的抗体”互换使用。

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

是由 K_d 与 K_a 的比值获得的(即 K_d/K_a), 并且表示为摩尔浓度(M)。抗体的 K_D 值可能用本领域公知的方法测定。测定抗体 K_D 的一种优选方法是使用表面等离子共振, 优选使用生物传感器系统, 如 Biacore[®] 系统。

如此处所用的, 术语 IgG 抗体的“高亲和力”是指抗体的 K_D 为 10^{-8} M 或更低、更优选 10^{-9} M 或更低、甚至更优选 10^{-10} M 或更低。但是对于其他抗体同种型, “高亲和力”结合可能不同。例如, 对于 IgM 同种型的“高亲和力”结合是指抗体具有 10^{-7} M 或更低、更优选 10^{-8} M 或更低的 K_D 。

如此处所用的, 术语“受试者”包括任何人或非人类动物。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 如非人类灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖类动物、爬行类动物等。

本发明的各个方面在下面的部分中进一步详细描述。

抗-IFN α 抗体

本发明的抗体用抗体的特定功能特征或性质来表征。例如, 在特定实施方案中, 该抗体特异性结合 IFN α 的多种亚型, 如 IFN α 2a 和 IFN α 2b。优选地, 本发明的抗体与 IFN α 2a 和/或 α 2b 高亲和力地结合, 例如 K_D 为 10^{-8} M 或更低, 或 10^{-9} M 或更低, 甚至 10^{-10} M 或更低。在一个优选实施方案中, 该抗体与人 IFN α 2a 和人 IFN α 2b 结合。本发明的抗体的结合亲和力和动力学可以通过例如实施例所述的 Biacore 分析来检测。

此外, 在其他实施方案中, 本发明的抗体显示各种功能性质。例如, 这些抗体能够抑制多种 IFN α 亚型的生物活性, 但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性。这些抗体也可能基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性。本发明的抗体也能够抑制 IFN α 诱导的细胞标记物如 CD38 或 MHC I 类在正常人外周血单核细胞上的表面表达。这些抗体也能够抑制 IFN-诱导的正常人外周血单核细胞表达 IP-10。IFN α

亚型、IFN β 和/或 IFN ω 的生物活性的抑制可以利用功能测定进行评价, 如实施例中所所述的那些, 如 Daudi 细胞增殖测定。

另外, 这些抗体能够抑制系统性红斑狼疮(SLE)患者血浆介导的树突细胞发育。可以如实施例所述通过检测细胞表面标记物如 CD38、MHC I 类和/或 CD123 的表达来评价树突细胞发育。

在某些优选实施方案中, 本发明的抗体通过非竞争性作用机制抑制 IFN α 的生物活性, 即, 该抗体不竞争 IFN α 与 IFNAR 的结合。而是在 IFN α 存在下该抗体变为与细胞表面 IFNAR 结合, 并且抑制通过 IFNAR 的细胞信号传导。在其他优选实施方案中, 具有这些结合性质的抗体不显示明显的 ADCC 活性。用于检测抗体的这些功能性质的试验在本领域中公知, 如实施例 8 和 9 所述的试验。例如, 可以检测抗体抑制放射性标记的 IFN α 与表达 IFNAR 的细胞结合的能力。抗体不能抑制放射性标记的 IFN α 与 IFNAR 结合指示非竞争性作用机制。为了进一步检测这种作用机制, 在存在或不存在 IFN α 的情况下检测放射性标记抗体与表达 IFNAR 的细胞的结合。若在 IFN α 的存在下放射性标记抗体与表达 IFNAR 的细胞结合, 而在不存在 IFN α 的情况下不结合, 则指示这种作用机制,

在一个优选实施方案中, 本发明的抗体以比单独的 IFN α (一种或多种亚型)和/或单独的 IFNAR 更高的亲和力(例如 K_D)与 IFN α -IFNAR 复合物结合。例如, 在某些实施方案中, 本发明的抗体以 $10^{-8}M$ 或更高、 $10^{-9}M$ 或更高或 $10^{-10}M$ 或更高亲和力的 K_D 结合 IFN α -IFNAR 复合物。

在另一优选实施方案中, 本发明的抗体对于 IFN α (一种或多种亚型)和 IFNAR (IFNAR1 和/或 IFNAR2)是双特异性的, 意思是该抗体与 IFN α 和 IFNAR (IFNAR1 和/或 IFNAR2)都结合。因此, 本发明包括这样的双特异性分子, 其含有至少一个对于 IFN α 的第一结合特异性和对于 IFNAR1 的第二结合特异性, 其中, 例如, 对于 IFNAR1 的第二结合特异性可以通过该抗体与 IFN α 结合而形成。本发明也包括这样的双特异性分子, 其含有至少一个对于 IFN α 的第一结合特异

性和对于 IFNAR2 的第二结合特异性, 其中, 例如, 对于 IFNAR2 的第二结合特异性可以通过该抗体与 IFN α 结合而形成。

单克隆抗体 13H5、13H7 和 7H9

本发明优选的抗体是如实施例所述分离并进行结构表征的人单克隆抗体 13H5、13H7 和 7H9。13H5、13H7 和 7H9 的 V_H 氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO:19、20 和 21 中。13H5、13H7 和 7H9 的 V_L 氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO:22、23 和 24 中。假定这些抗体都能够结合 IFN α , 则 V_H 和 V_L 序列可以“混合并匹配”, 以产生本发明的其他的抗-IFN α 结合分子。这些“混合并匹配的”抗体的 IFN α 结合或中和活性可以用上文及实施例中所述的结合试验(例如 ELISA、Biacore 分析、Daudi 细胞增殖测定)检测。优选地, 13H5 和 7H9 的 V_H 序列混合和匹配, 因为这些抗体使用源自相同种系序列 (VH 1-18) 的 V_H 序列, 因此显示结构相似性。另外, 或者, 13H5、13H7 和 7H9 的 V_L 序列可以混合和匹配, 因为这些抗体使用源自相同种系序列 (V_k A27) 的 V_L 序列, 因此显示结构相似性。

因此, 在一个方案中, 本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含:

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

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

其中该抗体抑制干扰素 α 的生物活性。

优选的重链和轻链组合包括:

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

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

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

SEQ ID NO:24 的氨基酸序列的轻链可变区。

在另一方案中，本发明提供包含 13H5、13H7 和 7H9 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 或其组合的抗体。13H5、13H7 和 7H9 的 V_H CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:1、2 和 3 中。13H5、13H7 和 7H9 的 V_H CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:4、5 和 6 中。13H5、13H7 和 7H9 的 V_H CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:7、8 和 9 中。13H5、13H7 和 7H9 的 V_L CDR1 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:10、11 和 12 中。13H5、13H7 和 7H9 的 V_L CDR2 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:13、14 和 15 中。13H5、13H7 和 7H9 的 V_L CDR3 的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:16、17 和 18 中。CDR 区用 Kabat 系统画出(Kabat, E.A.等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242)。

假如根据 IFN 结合活性选择这些抗体中的每一个，并且抗原结合特异性主要由 CDR1、2、3 区提供，则 V_H CDR1、2、3 序列与 V_L CDR1、2、3 序列可以“混合并匹配”(即来自不同抗体的 CDR 可以混合并匹配，但是每个抗体必须含有 V_H CDR1、2、3 和 V_L CDR1、2、3)，产生本发明的其他的抗-IFN α 分子。这些“混合并匹配的”抗体的 IFN α 结合可以用实施例中所所述的结合试验(例如 ELISA 和/或 Biacore)检测。优选地，当 V_H CDR 序列混合并匹配时，来自特定 V_H 序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 序列被置换为结构上相似的 CDR 序列。同样，当 V_L CDR 序列混合并匹配时，来自特定 V_L 序列的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 序列优选地被置换为结构上相似的 CDR 序列。例如，13H5 和 7H9 的 V_H CDR1 具有一定的结构相似性，因此容易混合和匹配。对于本领域技术人员而言显而易见的，将一个或多个 V_H 和/或 V_L CDR 区序列置换为来自单克隆抗体 13H5、13H7 和 7H9 此处公开的 CDR 序列的结构上相似的序列，可以产生新的 V_H 和 V_L 序列。

因此，在另一个方案中，本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含：

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

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

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

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

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

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

其中该抗体抑制干扰素 α 的生物活性。

在一个优选实施方案中, 该抗体包含:

(a)包含 SEQ ID NO:1 的重链可变区 CDR1;

(b)包含 SEQ ID NO:4 的重链可变区 CDR2;

(c)包含 SEQ ID NO:7 的重链可变区 CDR3;

(d)包含 SEQ ID NO:10 的轻链可变区 CDR1;

(e)包含 SEQ ID NO:13 的轻链可变区 CDR2; 和

(f)包含 SEQ ID NO:16 的轻链可变区 CDR3。

在另一个优选实施方案中, 该抗体包含:

(a)包含 SEQ ID NO:2 的重链可变区 CDR1;

(b)包含 SEQ ID NO:5 的重链可变区 CDR2;

(c)包含 SEQ ID NO:8 的重链可变区 CDR3;

(d)包含 SEQ ID NO:11 的轻链可变区 CDR1;

(e)包含 SEQ ID NO:14 的轻链可变区 CDR2; 和

(f)包含 SEQ ID NO:17 的轻链可变区 CDR3。

在另一个优选实施方案中, 该抗体包含:

(a)包含 SEQ ID NO:3 的重链可变区 CDR1;

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

具有特定种系序列的抗体

在某些实施方案中,本发明的抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

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

- (a)包含人 VH 1-18 或 4-61 基因的重链可变区;
- (b)包含人 Vk A27 基因的轻链可变区; 且
- (c)该抗体抑制干扰素 α 的生物活性。

在一个实施方案中,该抗体包含人 VH 1-18 基因的重链可变区。分别具有 VH 1-18 和 Vk A27 的 VH 和 Vk 基因序列的抗体的例子包括 13H5 和 7H9。在另一实施方案中,该抗体包含人 VH 4-61 基因的重链可变区。分别具有 VH 4-61 和 Vk A27 的 VH 和 Vk 基因序列的抗体的一个例子是 13H7。

如此处所用的,如果一种人抗体的可变区是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得的,则该抗体包含特定种系序列的(即它的“产物”)或“源自”它的重链或轻链可变区。这样的系统包括用目标抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠,或者用目标抗原筛选展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。人种系免疫球蛋白序列的(即它的产物)或“源自”它的人抗体可以这样鉴定:将该人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较,选择在序列上最接近于该人抗体序列(即有最高%同一性)的人种系免疫球蛋白序列。特定人种系免疫球蛋白序列的(即它的产物)或“源自”它的人抗体与

该种系序列相比可能包含氨基酸差异，例如由于天然发生的体细胞突变或定点突变的有意引入。但是，选择的人抗体在氨基酸序列上与人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列一般至少 90% 相同，并且含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如鼠种系序列)相比时，决定该人抗体属于人类的氨基酸残基。在某些情况下，人抗体在氨基酸序列上与该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列可以至少 95%、甚至至少 96%、97%、98% 或 99% 相同。一般来说，源自特定人种系序列的人抗体将显示与该人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相差不超过 10 个氨基酸。在某些情况下，该人抗体可显示与该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相差不超过 5 个、甚至不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸。

同源抗体

在另一实施方案中，本发明的抗体包含的重链和轻链可变区含有与此处所述优选抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列，并且其中该抗体保留了本发明抗-IFN α 抗体的需要的功能性质。

例如，本发明提供分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

(a) 重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:19、20 和 21 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列；

(b) 轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:22、23 和 24 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列；

(c) 该抗体抑制多种 IFN α 亚型的生物活性，但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性；

(d) 该抗体显示至少一种下列性质：

(i) 该抗体基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性；

(ii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达；

(iii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10；

(iv) 该抗体抑制系统性红斑狼疮(SLE)血浆介导的树突细胞发育。

在另外的实施方案中, V_H 和/或 V_L 氨基酸序列可以与上述序列 85%、90%、95%、96%、97%、98%或 99%同源。具有分别与 SEQ ID NO: 19、20、21 和 22、23、24 的 V_H 和 V_L 区高度(即 80%或更高)同源的 V_H 和 V_L 区的抗体可以如下获得: 诱变(例如定点或 PCR 介导的诱变)编码 SEQ ID NO: 19、20 和 21 和/或 22、23 和 24 的核酸分子, 然后用此处所述的功能试验检测编码的改变抗体保留的功能(即以上 (c)和(d)所述的功能)。

如此处所用的, 两个氨基酸序列之间的百分同源性相当于两个序列之间的百分同一性。两个序列之间的百分同一性是考虑了为两个序列之间进行最佳比对所需要引入的空位的数目和每个空位的长度后, 这两个序列共有的相同位置的数目的函数(即%同源性=相同位置数/位置总数 $\times$ 100%)。两个序列之间的序列比较和百分同一性的确定可以用如下面非限制性实施例中所述的数学算法实现。

两个氨基酸序列之间的百分同一性可以用已经整合入 ALIGN 程序(2.0 版本)中的 E. Meyers 和 W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))的算法进行确定, 其使用 PAM120 权重残基表, 12 的空位长度罚分, 4 的空位罚分。另外, 两个氨基酸序列之间的百分同一性也可以用已经整合入 GCG 软件包(可从 <http://www.gcg.com> 获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))的算法进行确定, 其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵, 16、14、12、10、8、6 或 4 的空位权重, 和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重。

另外, 或者, 本发明的蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”来对公共数据库进行检索, 例如鉴定相关序列。这种检索可以用 Altschul 等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 的 XBLAST 程序(2.0 版本)进行。BLAST 蛋白质检索可以用 XBLAST 程序进行, 得分=50, 字长=3, 以获得与本发明的抗体分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对, 可以如 Altschul 等(1997) Nucleic Acids Res.

25(17):3389-3402 所述采用空位 BLAST。当采用 BLAST 和空位 BLAST 程序时, 可以使用各自程序(例如 XBLAST 和 NBLAST)的缺省参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

具有保守修饰的抗体

在某些实施方案中, 本发明的抗体包含含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区, 其中这些 CDR 序列中的一个或多个包含基于此处所述优选抗体(例如 13H5、13H7 或 7H9)的特定氨基酸序列或其保守修饰, 并且其中该抗体保留本发明抗-IFN α 抗体的需要的功能性质。例如, 本发明优选的抗体包括这样的抗体, 其中重链可变区 CDR3 序列包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或其保守修饰, 而轻链可变区 CDR3 序列包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或其保守修饰。因此, 本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区, 其中:

(a)重链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 和其保守修饰的氨基酸序列;

(b)轻链可变区 CDR3 序列包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 18 和其保守修饰的氨基酸序列;

(c)该抗体抑制多种 IFN α 亚型的生物活性, 但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性;

(d)该抗体显示至少一种下列性质:

(i) 该抗体基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性;

(ii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达;

(iii) 该抗体抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10;

(iv) 该抗体抑制系统性红斑狼疮(SLE)血浆介导的树突细胞发育。

在另一个实施方案中，重链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO:13、14 和 15 的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列。在又另一实施方案中，重链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:1、2 和 3 的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:10、11 和 12 的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列。

如此处所用的，术语“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变含该氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸置换、添加和缺失。可以通过本领域公知的标准技术，如定点诱变和 PCR 介导的诱变，向本发明的抗体中引入修饰。保守氨基酸置换是指将氨基酸残基替换为一个具有相似侧链的氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已经定义。这些家族包括：具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此，本发明的抗体 CDR 区内的一个或多个氨基酸残基可以被置换为来自相同侧链家族的其他氨基酸残基，并且可以用此处所述的功能试验检测改变的抗体保留的功能(即以上(c)和(d)所述的功能)。

与本发明的抗-IFN α 抗体结合相同表位的抗体

在另一实施方案中，本发明提供与此处所述本发明的各种人 IFN α 抗体结合相同表位的抗体，例如与此处所述的 13H5、13H7 和 7H9 抗体结合相同表位的其他人抗体。这些抗体可以在标准 IFN α 结合试验中根据它们与本发明其他抗体如 13H5、13H7 或 7H9 交叉竞争(例如以统计学显著性方式竞争性抑制它们的结合)的能力来鉴定。

例如,如实施例通过 Biacore 分析所证明的,13H5 与 IFN α 2a 和 IFN α 2b 高亲和力地结合。因此,在一个实施方案中,本发明提供与本发明另一种抗体(例如 13H5、13H7 或 7H9)竞争结合 IFN α 2a 或 IFN α 2b 的抗体,优选人抗体。测试抗体抑制例如 13H5、13H7 或 7H9 与 IFN α 2a 或 IFN α 2b 结合的能力证明,该测试抗体能够与该抗体竞争结合 IFN α 2a 或 IFN α 2b;根据非限制性的理论,这种抗体可以与它所竞争的抗体结合 IFN α 2a 或 IFN α 2b 上相同或相关(例如结构上相似或空间上接近)的表位。在一个优选实施方案中,与例如 13H5、13H7 或 7H9 结合 IFN α 2a 或 IFN α 2b 上相同表位的抗体是一种人单克隆抗体。这些人单克隆抗体可以如实施例所述制备和分离。

改造的(engineered)和修饰的抗体

本发明的抗体还可以如下制备:用具有此处所公开的一种或多种 V_H 和/或 V_L 序列的抗体作为起始材料,改造一种修饰的抗体。可以通过修饰一个或多个可变区(即 V_H 和/或 V_L)例如一个或多个 CDR 区内和/或一个或多个构架区内的一个或多个残基来改造抗体。另外,或者,可以通过修饰恒定区内的残基来改造抗体,例如改变该抗体的效应功能。

可以实施的一种类型的可变区改造是 CDR 移植。抗体主要是通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,在各个抗体之间,CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列更加多样化。由于 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用,通过构建一种表达载体,其包含来自特定天然存在抗体的 CDR 序列,该 CDR 序列移植到来自具有不同性质的不同抗体的构架序列上,可以表达模拟该特定天然存在抗体的性质的重组抗体(参见,例如, Riechmann, L.等(1998) Nature 332:323-327; Jones, P.等(1986) Nature 321:522-525; Queen, C.等(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Winter 的美国专利 5,225,539 号,和 Queen 等人的美国专利 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370 号)。

因此,本发明的另一实施方案涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区,该 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别包含选自 SEQ ID NO:1、2 和 3、SEQ ID NO:4、5 和 6 和 SEQ ID NO:7、8 和 9 的氨基酸序列,并且包含含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,该 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列分别包含选自 SEQ ID NO:10、11 和 12、SEQ ID NO:13、14 和 15 和 SEQ ID NO:16、17 和 18 的氨基酸序列。因此,这些抗体含有单克隆抗体 13H5、13H7 或 7H9 的 V_H 和 V_L CDR 序列,但是可能含有与这些抗体不同的构架序列。

这些构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或发表的参考文献中获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在以下资源中发现:“VBase”人种系序列数据库(可从因特网上 www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase 获得),以及 Kabat, E. A. 等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242; Tomlinson, I. M. 等(1992) “The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops” *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 和 Cox, J. P. L. 等(1994) “A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; 其内容均在此引用作为参考。

用于本发明抗体的优选构架序列在结构上类似于选择的本发明抗体使用的构架序列,例如,类似于本发明优选的单克隆抗体使用的 V_H 1-18 或 4-61 和 VK A27 构架序列。 V_H CDR1、2、3 序列和 V_L CDR1、2、3 序列可以移植到与该构架序列的来源种系免疫球蛋白基因具有相同序列的构架区上,或者 CDR 序列可以移植到与该种系序列相比含有一个或多个突变的构架区上。例如,已经发现,在某些情况中,将构架区的残基进行突变对于保持或增强抗体的抗原结合能力是有利的(参见,例如,Queen 等人的美国专利 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 和 6,180,370)。

另一种类型的可变区修饰是突变 V_H 和/或 V_L CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸序列，从而改善目标抗体的一种或多种结合性质(例如亲和力)。可以进行定点诱变或 PCR 介导的诱变，引入突变，对抗体结合的影响，或者其他目标功能性质，可以用此处所述并且在实施例提供的体外或体内试验来评价。优选引入(如上文所述的)保守修饰。这些突变可以是氨基酸置换、添加或缺失，但是优选置换。而且，一般改变 CDR 区内的不超过 1、2、3、4 或 5 个残基。

因此，在另一实施方案中，本发明提供分离的抗-IFN α 单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含的重链可变区含有：(a) V_H CDR1 区，其包含选自 SEQ ID NO:1、2 和 3 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 1、2 或 3 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列；(b) V_H CDR2 区，其包含选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 4、5 或 6 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列；(c) V_H CDR3 区，其包含选自 SEQ ID NO: 7、8 和 9 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO:7、8 或 9 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列；(d) V_L CDR1 区，其包含选自 SEQ ID NO:10、11 和 12 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 10、11 或 12 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列；(e) V_L CDR2 区，其包含选自 SEQ ID NO:13、14 和 15 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 13、14 或 15 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列；和(f) V_L CDR3 区，其包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 18 的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 16、17 或 18 相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列。

本发明的改造的抗体包括例如为了改善抗体性质而对其 V_H 和/或 V_L 内的构架残基进行了修饰的抗体。进行这样的构架修饰一般是为了降低抗体的免疫原性。例如，一种方法是将一个或多个构架残基“回复突变”为相应的种系序列。更特别地，经历体细胞突变的抗

体可含有与该抗体的来源种系序列不同的构架残基。通过比较抗体构架序列与该抗体的来源种系序列,可以鉴定这些残基。例如,对于13H5, V_H的氨基酸残基#81(FR3内)是亮氨酸,而在相应的VH 1-18种系序列中该残基为甲硫氨酸(见图4)。为了使构架区序列恢复为其种系构型,通过例如定点诱变或PCR介导的诱变,体细胞突变可以“回复突变”为种系序列(例如,13H5的V_H的残基81可以从亮氨酸“回复突变”为甲硫氨酸)。这些“回复突变”的抗体也包括在本发明内。

另一种类型的构架修饰涉及对构架区内、甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基进行突变,以除去T细胞表位,从而降低该抗体的潜在的免疫原性。该方法也被称为“脱免疫”,在Carr等人的美国专利公布号20030153043中详细记载。

除了在构架区或CDR区内进行修饰以外,或者作为它的替代,本发明的抗体可以改造为包括Fc区内的修饰,一般是为了改变该抗体的一种或多种功能性质,如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体也可以化学修饰(例如一个或多个化学部分可以连接到该抗体上),或者修饰改变其糖基化,以改变该抗体的一种或多种功能性质。这些实施方案均在下文详细描述。Fc区中残基的编号是Kabat的EU指数的编号。

在一个实施方案中,修饰CH1的铰链区,使该铰链区中半胱氨酸残基的数量改变,例如增加或减少。该方法在Bodmer等人的美国专利5,677,425中详细记载。改变CH1铰链区中半胱氨酸的数量是为了,例如,促进轻链和重链的装配,或提高或降低抗体的稳定性。

在另一实施方案中,对抗体的Fc铰链区进行突变,以降低该抗体的生物学半衰期。更具体地,向Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区引入一个或多个氨基酸突变,使得相对于天然Fc-铰链结构域的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合,该抗体的SpA结合减弱。该方法在Ward等人的美国专利6,165,745号中详细记载。

在另一实施方案中,修饰抗体以提高其生物学半衰期。可以使用各种方法。例如,可以引入一个或多个如下突变:T252L、T254S、

T256F, 如 Ward 的美国专利 6,277,375 所述。或者, 为了提高生物学半衰期, 该抗体可以在 CH1 或 CL 区内进行改变, 使之含有来自 IgG Fc 区 CH2 结构域的两个环的补救受体结合表位, 如 Presta 等人的 5,869,046 和 6,121,022 号所述。

在其他实施方案中, 通过将至少一个氨基酸残基置换为不同的氨基酸残基来改变 Fc 区, 以改变抗体的效应功能。例如, 可以将选自氨基酸残基 234、235、236、237、297、318、320、322 的一个或多个氨基酸置换为不同的氨基酸残基, 使得该抗体具有改变的对效应配体的亲和力, 但是保留亲本抗体的抗原结合能力。改变对其亲和力的效应配体可以是, 例如, Fc 受体或补体的 C1 成分。该方法在 Winter 等人的美国专利号 5,624,821 和 5,648,260 中更详细地描述。

在另外一个实施例中, 可以将选自氨基酸残基 329、331 和 322 的一个或多个氨基酸置换为不同的氨基酸残基, 使得该抗体具有改变的 C1q 结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。该方法在 Idusogie 等人的美国专利号 6,194,551 中更详细地描述。

在另外一个实施例中, 改变氨基酸位点 231 和 239 中的一个或多个氨基酸残基, 从而改变该抗体固定补体的能力。该方法在 Bodmer 等人的 PCT 公布 WO 94/29351 中进一步描述。

在另外一个实施例中, 为了提高抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或提高抗体对 Fc γ 受体的亲和力, 通过在下列位点处修饰一个或多个氨基酸修饰 Fc 区: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 或 439。该方法在 Presta 的 PCT 公布 WO 00/42072 中进一步描述。而且, 人 IgG1 上对于 Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII 和 FcRn 的结合位点已经作图, 并且已经描述了具有改善的结合的变体(参见, Shields, R.L.等(2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。位点 256、290、298、333、334 和 339 处的特

定突变显示改善了与 FcγRIII 的结合。另外，下列组合突变体显示改善了 FcγRIII 结合：T256A/S298A，S298A/E333A，S298A/K224A 和 S298A/E333A/K334A。

在另一实施方案中，修饰抗体的糖基化。例如，可以制备无糖基化的抗体(即该抗体缺乏糖基化)。例如，为了提高抗体对抗原的亲和力，可以改变糖基化。这样的糖基化修饰可以通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。例如，可以进行一个或多个氨基酸置换，导致一个或多个可变区构架糖基化位点消失，从而消除了该位点处的糖基化。这种糖基化可以提高抗体对抗原的亲和力。这种方法在 Co 等人的美国专利号 5,714,350 和 6,350,861 中进一步详细描述。

另外，或者，可以制备具有改变类型的糖基化的抗体，如具有数量减少的岩藻糖基残基的低岩藻糖基化抗体，或具有增多的等分 GlcNac 结构的抗体。这种改变的糖基化模式已经证明提高抗体的 ADCC 能力。这种糖修饰可以通过例如在具有改变的糖基化机制的宿主细胞中表达抗体来实现。具有改变的糖基化机制的细胞在本领域中已有描述，能够用作宿主细胞在其中表达本发明的重组抗体，从而产生具有改变的糖基化的抗体。例如，Hanai 等人的 EP 1,176,195 描述了一种细胞系，其具有功能破坏的 RUT8 基因，该基因编码一种岩藻糖基转移酶，因此这种细胞系中表达的抗体显示低岩藻糖基化。Presta 的 PCT 公布 WO 03/035835 记载了一种变异 CHO 细胞系，Lec13 细胞，其具有降低的使岩藻糖连接到 Asn(297)-连接的碳水化合物上的能力，也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(参见，Shields, R.L.等(2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana 等人的 PCT 公布 WO 99/54342 记载了经改造表达糖蛋白修饰的糖基转移酶(例如β(1,4)-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III(GnTIII))的细胞系，因此该工程细胞系中表达的抗体显示增加的等分 GlcNac 结构，导致抗体的 ADCC 活性提高(参见，Umana 等(1999) Nat. Biotech. 17:176-180)。

本发明包括的此处所述抗体的另一种修饰是 PEG 化。例如，为了提高抗体的生物学(例如血清)半衰期，可以将该抗体 PEG 化。为了 PEG

化一种抗体，在一个或多个 PEG 基团变为与该抗体或抗体片段连接的条件，将该抗体或其片段一般与聚乙二醇(PEG)如 PEG 的反应性酯或醛衍生物反应。优选地，通过与反应性 PEG 分子(或类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应进行 PEG 化。如此处所用的，术语“聚乙二醇”意在包括用于衍生化其他蛋白质的任何 PEG 形式，如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中，要 PEG 化的抗体是一种无糖基化的抗体。将蛋白质 PEG 化的方法在本领域中公知，并且可以用于本发明的抗体。参见，例如，Nisbimura 等人的 EP 0 154 316 和 Ishikawa 等人的 EP 0 401 384。

具有提高的稳定性的修饰抗体

在另一方面，本发明提供与野生型 13H5 相比显示稳定性提高的 13H5 抗体的修饰形式。如实施例 10 进一步详细描述，13H5 抗体在 V_H 链的 CDR2 内 Asn-55 处含有一个脱酰胺位点。该位点处的氨基酸序列，从位点 55 到 58，是 NGNT(SEQ ID NO:19 的氨基酸残基 55-58)。因此，在某些实施方案中，13H5 V_H 链的氨基酸序列在位点 55 处由天冬酰胺突变为不同的氨基酸。另外，或者，可以突变影响脱酰胺作用的 Asn-55 周围的氨基酸位点。在位点 55 处的优选氨基酸置换包括天冬氨酸和谷氨酰胺，更优选谷氨酰胺。具有 N55D 置换的 13H5 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:34 中。具有 N55Q 置换的 13H5 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:35 中。在另一实施方案中，除 Asn-55 的突变之外，也突变 13H5 V_H 链的 Asn-57。在位点 57 处一个优选的氨基酸置换是谷氨酰胺。具有 N55Q 和 N57Q 置换的 13H5 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:36 中。在强制脱酰胺条件下，与野生型 13H5 相比，这三种突变抗体显示提高的稳定性，如实施例 11 进一步描述。

在另一实施方案中，氨基酸位点 56 处的甘氨酸突变为丙氨酸(G56A)，因为从模型肽已经确定，相比使用与丙氨酸相邻的甘氨酸，使用与天冬酰胺相邻的丙氨酸脱酰胺速率大约低 20 倍(参见，例如 Ahern, T. 和 Manning, M.C., 编. Stability of Protein Pharmaceuticals,

Pharmaceutical Biotechnology, 第2卷, 第1章, 第1-30页)。因此, G56A突变代表了与野生型序列相比反应性降低与最小结构改变之间的平衡, 从而提高了稳定性而仍保持活性。具有 G56A 置换的 13H5 的氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:37 中。

因此, 在各种实施方案中, 本发明提供在 13H5 V_H 链 CDR2 的 Asn-55、Gly-56 和/或 Asn-57 处具有氨基酸置换的本发明的 IFN α 抗体, 其野生型序列显示在 SEQ ID NO:19 中。优选的突变抗体包含选自 SEQ ID NO:34、35、36 和 37 的氨基酸序列的重链可变区。优选地, 如 SEQ ID NO:22 所示, 抗体 VH 链与 13H5 的 VK 链配对。

改造抗体的方法

如上所述, 通过修饰 VH 和/或 VL 序列或与之连接的恒定区, 具有此处公开的 V_H 和 V_L 序列的抗-IFN α 抗体能够用于产生新的抗-IFN α 抗体。因此, 在本发明的另一方面, 本发明的抗-IFN α 抗体, 例如 13H5、13H7 或 7H9 的结构特征, 用来产生结构上相关的抗-IFN α 抗体, 该结构相关的抗体保留本发明抗体的至少一种功能性质, 如与 IFN α 结合。例如, 13H5、13H7 或 7H9 的一个或多个 CDR 区或其突变, 可以与已知的构架区和/或其他 CDR 重组组合, 如上所述产生另外的重组改造的本发明的抗-IFN α 抗体。其他类型的修饰包括以上部分所述的修饰。用于改造方法的起始材料是此处提供的一种或多种 V_H 和/或 V_L 序列, 或其一个或多个 CDR 区。为了产生改造的抗体, 不一定实际制备(即表达为蛋白质)具有此处提供的一种或多种 V_H 和/或 V_L 序列, 或其一个或多个 CDR 区的抗体。而是用该序列中所含的信息作为起始材料, 产生源自原始序列的“第二代”序列, 然后制备该“第二代”序列, 并将其表达为蛋白质。

因此, 在另一实施方案中, 本发明提供一种制备抗-IFN α 抗体的方法, 包括:

(a)提供: (i)重链可变区抗体序列, 其包含选自 SEQ ID NO:1、2 和 3 的 CDR1 氨基酸序列; 和/或选自 SEQ ID NO:4、5 和 6 的 CDR2

氨基酸序列；和/或选自 SEQ ID NO:7、8 和 9 的 CDR3 氨基酸序列；和/或(ii)轻链可变区抗体序列，其包含选自 SEQ ID NO:10、11 和 12 的 CDR1 氨基酸序列；和/或选自 SEQ ID NO:13、14 和 15 的 CDR2 氨基酸序列；和/或选自 SEQ ID NO:13、14 和 15 的 CDR3 氨基酸序列；

(b)改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基，产生至少一个改变的抗体序列；和

(c)使该改变的抗体序列表达为蛋白质。

可以利用标准分子生物学技术制备和表达改变的抗体序列。

优选地，由改变的抗体序列编码的抗体保留此处所述抗-IFN α 抗体的一种、一些或全部功能性质，该功能性质包括但不限于：

(i)抑制干扰素 α 的生物活性；

(ii)抑制多种 IFN α 亚型的生物活性，但是基本不抑制 IFN α 21 的生物活性；

(iii)基本不抑制 IFN β 或 IFN ω 的生物活性；

(iv)抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞上 CD38 或 MHC I 类的表面表达；

(v)抑制 IFN-诱导的外周血单核细胞表达 IP-10；

(vi)抑制系统性红斑狼疮(SLE)血浆介导的树突细胞发育；

(vii)与人干扰素 α 2a 高亲和力地结合；

(viii)与人干扰素 α 2b 高亲和力地结合。

改变的抗体的功能性质可以用本领域中使用的和/或此处所述的标准试验来评价。例如，抗体与 IFN α 结合的能力可以用标准结合试验，如实施例中所述的那些(例如 ELISA 和/或 Biacore)来确定。抗体抑制干扰素 α 各种功能活性的能力可以用如实施例中所述的试验(例如 Daudi 细胞增殖、IFN 诱导的细胞标记物表达、IFN 诱导的 IP-10 表达等)来确定。

在改造本发明抗体的方法的某些实施方案中，可以沿全部或部分抗-IFN α 抗体编码序列(例如 13H5 编码序列)随机或选择性引入突变，并

可以对获得的修饰的抗-IFN α 抗体筛选其结合活性和/或如此处所述的其他功能性质。突变方法在本领域中已经描述。例如, Short 的 PCT 公布 WO 02/092780 记载了利用饱和诱变、合成连接装配或它们的组合产生和筛选抗体突变的方法。另外, Lazar 等人的 PCT 公布 WO 03/074679 也记载了利用计算筛选方法优化抗体的生理化学性质的方法。

编码本发明的抗体的核酸分子

本发明的另一方面涉及编码本发明的抗体的核酸分子。该核酸可以存在于完整细胞、细胞裂解物中,或以部分纯化或基本纯化的形式存在。当通过标准技术,包括碱/SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其他方法,与其他细胞成分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白质分离纯化时,核酸是“分离的”或“使得基本上纯的”。参见, F. Ausubel 等编著(1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本发明的核酸可以是例如 DNA 或 RNA,并且可以含有或者可以不含内含子序列。在一个优选实施方案中,该核酸是 cDNA 分子。

本发明的核酸可以利用标准分子生物学技术获得。对于杂交瘤(例如由如下文进一步描述的携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤)表达的抗体,编码通过杂交瘤制备的抗体轻链和重链的 cDNA 可以用标准 PCR 扩增或 cDNA 克隆技术获得。对于从免疫球蛋白基因文库中获得的抗体(例如使用噬菌体展示技术),编码抗体的核酸可以从文库中获得。

本发明优选的核酸分子是编码 13H5、13H7 或 7H9 单克隆抗体的 V_H 和 V_L 序列的核酸分子。编码 13H5、13H7 和 7H9 的 V_H 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO:25、26 和 27 中。编码 13H5、13H7 和 7H9 的 V_L 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO:28、29 和 30 中。

一旦获得编码 V_H 和 V_L 段的 DNA 片段,即可通过标准重组 DNA 技术进一步操作这些 DNA 片段,例如将可变区基因转化为全长抗体链基因,转化为 Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中,将编码

V_L 或 V_H 的 DNA 片段与编码另外一种蛋白质如抗体恒定区或柔性接头的另一种 DNA 片段可操作连接。如在本文中使用的, 术语“可操作连接”意思是两个 DNA 片段连接在一起, 使得这两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保持在读框内。

通过将编码 V_H 的 DNA 与编码重链恒定区(CH1、CH2 和 CH3)的另外一种 DNA 分子可操作连接, 可以将编码 V_H 区的分离的 DNA 转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在本领域中公知(参见, 例如, Kabat, B. A.等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242), 包括这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区, 但是最优选地是 IgG1 或 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因, 编码 V_H 的 DNA 可以与只编码重链 CH1 恒定区的另外一种 DNA 分子可操作连接。

通过将编码 V_L 的 DNA 与编码轻链恒定区 CK 的另外一种 DNA 分子可操作连接, 可以将编码 V_L 区的分离的 DNA 转化为全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域中公知(参见, 例如, Kabat, B. A.等(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242), 包括这些区域的 DNA 片段可以通过标准 PCR 扩增获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区, 但是最优选地是 κ 恒定区。

为了产生 scFv 基因, 编码 V_H 和 V_L 的 DNA 片段可以与编码柔性接头例如编码氨基酸序列 $(Gly_4-Ser)_3$ 的另外一种片段可操作连接, 使得 V_H 和 V_L 序列可以表达为连续的单链蛋白质, 其 V_L 和 V_H 区通过柔性接头连接(参见, 例如 Bird 等(1988) *Science* 242:423-426; Huston 等(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty 等(1990) *Nature* 348:552-554)。

本发明的单克隆抗体的产生

通过多种技术能制备本发明的单克隆抗体(mAb), 包括常规的单克

隆抗体方法,例如,Kohler和Milstein(1975) Nature 256: 495 的标准体细胞杂交技术。虽然优选体细胞杂交技术,但是原则上,能使用制备单克隆抗体的其他技术,例如B淋巴细胞的病毒或致癌基因转化。

制备杂交瘤的优选的动物系统是鼠系统。用小鼠产生杂交瘤是一种完善确立的程序。免疫程序和用于融合的免疫脾细胞的分离技术是本领域公知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是公知的。

本发明的嵌合或人源化抗体可以根据如上所述制备的鼠单克隆抗体的序列制备。编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA可以从目标鼠杂交瘤中获得,并且使用标准分子生物学技术改造为含有非鼠(例如人类)免疫球蛋白序列。例如,为了产生嵌合抗体,可以利用本领域公知的方法将鼠可变区连接到人恒定区上(参见,例如,Cabilly等人的美国专利4,816,567号)。为了产生人源化抗体,可以利用本领域公知的方法将鼠CDR区插入人构架内(参见,例如,Winter的美国专利5,225,539号,和Queen等人的美国专利5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370号)。

在一个优选实施方案中,本发明的抗体是人单克隆抗体。这种抗-IFN α 的人单克隆抗体能用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生。这些转基因和转染色体小鼠包括在此分别称作HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并且在此通称作“人Ig小鼠”。

HuMAb小鼠®(Medarex, Inc.)包含编码未重排的人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因小基因座,和灭活内源 μ 和 κ 链基因座的靶向突变(参见,例如,Lonberg等(1994) Nature 368(6474): 856-859)。因此,该小鼠表现出小鼠IgM或 κ 表达降低,并且对免疫有响应,导入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变,产生高亲和性人IgG κ 单克隆(Lonberg, N.等(1994),同上;综述Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N.和Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, 和Harding, F.和Lonberg, N. (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci 764: 536-546)。HuMAb小鼠的制备和使用,以及该小鼠携带的基因组修饰,详细描述于下面的文献中: Taylor, L.等(1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, J.

等(1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon 等(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 3720-3724; Choi 等(1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J.等(1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon 等(1994) *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Taylor, L.等(1994) *International Immunology* 6: 579-591; 和 Fishwild, D.等(1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, 这些文献的内容全文在此引入作为参考。进一步参见, 美国专利 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 和 5,770,429; 都属于 Lonberg 和 Kay; 和 Surani 等人的美国专利 5,545,807; PCT 公布号 WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 和 WO 99/45962, 都属于 Lonberg 和 Kay; 和 Korman 等人的 PCT 公布号 WO 01/14424。

在另一实施方案中, 本发明的人抗体可以用转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠, 例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠产生。这种小鼠在此称为“KM 小鼠”, 在 Ishida 等人的 PCT 公布 WO 02/43478 中详细记载。

再者, 另外的表达人免疫球蛋白基因的转基因动物系统在本领域中可以获得, 能够用来产生本发明的抗-IFN α 抗体。例如, 可以使用一种被称为 Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的另外的转基因系统, 这种小鼠在例如 Kucherlapati 等人的美国专利 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 和 6,162,963 中记载。

而且, 另外的表达人免疫球蛋白基因的转染色体动物系统在本领域中可以获得, 能够用来产生本发明的抗-IFN α 抗体。例如, 可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠, 其称为“TC 小鼠”; 这种小鼠在 Tomizuka 等 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 中记载。另外, 携带人重链和轻链转染色体的牛在本领域中已经记载 (Kuroiwa 等(2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894), 并且能够用来产生本发明的抗-IFN α 抗体。

本发明的人单克隆抗体也可以使用用于筛查人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法制备。用于分离人抗体的这些噬菌体展示方法在本

领域中已经建立。参见, 例如, Ladner 等人的美国专利 5,223,409; 5,403,484; 和 5,571,698; Dower 等人的美国专利 5,427,908 和 5,580,717; McCafferty 等人的美国专利 5,969,108 和 6,172,197; 和 Griffiths 等人的美国专利 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 和 6,593,081。

本发明的人单克隆抗体也可以用 SCID 小鼠制备, SCID 小鼠中重构了人类免疫细胞, 因此在免疫时能够产生人类抗体应答。这种小鼠在例如 Wilson 等人的美国专利 5,476,996 和 5,698,767 中记载。

人 Ig 小鼠的免疫

当使用人 Ig 小鼠产生本发明的人抗体时, 根据 Lonberg, N.等(1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, D.等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851; 和 PCT 公布 WO 98/24884 和 WO 01/14424 所述, 用纯化的或重组的 IFN α 抗原制剂免疫该小鼠。优选地, 第一次输注时小鼠为 6-16 周龄。例如, 可以使用纯化的类淋巴母细胞 IFN 制剂(25-100 μ g)腹膜内免疫人 Ig 鼠, 该制剂是通过用病毒处理类淋巴母细胞细胞系而使该细胞系产生含有多重 IFN α 亚型(但是不含 IFN ω)的 IFN α 制剂而制备的。

产生抗 IFN α 完全人单克隆抗体的详细程序在下面的实施例 1 中描述。用各种抗原积累的经验证明, 当最初使用弗氏完全佐剂中的抗原腹膜内(IP)免疫, 接着隔周用弗氏不完全佐剂中的抗原腹膜内免疫(最多共六次)时, 转基因小鼠产生应答。但是, 发现弗氏佐剂之外的佐剂也是有效的。另外, 发现在没有佐剂时, 全细胞具有高度免疫原性。免疫方案进程中用眶后取血获得的血浆样品监测免疫应答。通过 ELISA(如下所述)筛选血浆, 使用具有足够抗-IFN α 人免疫球蛋白效价的小鼠进行融合。在处死之前 3 天用抗原对小鼠静脉内加强免疫并且取出脾。预期对于每次免疫可能需要融合 2-3 次。每一种抗原一般免疫 6-24 只小鼠。对于 HuMab 小鼠通常使用 HCo7 和 HCo12 株。另外, HCo7 和 HCo12 转基因可以杂交在一起, 产生具有两种不同人重链转基因的一种小鼠

(HCo7/HCo12)。或者，另外，可以使用 KM 小鼠，如实施例 2 所述。

产生本发明的人单克隆抗体的杂交瘤的产生

为了制备产生本发明的人单克隆抗体的杂交瘤，从接受免疫的小鼠中分离脾细胞和/或淋巴结细胞，并且与合适的无限增殖细胞系例如小鼠骨髓瘤细胞系融合。对得到的杂交瘤筛选抗原特异性抗体的产生。例如，使用 50 % PEG，来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液能与六分之一数量的 P3X63-Ag8.653 非分泌小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1580)融合。细胞以大约 2×10^5 在平底微量滴定板中平板培养，接着在含有 20% 胎克隆血清，18% “653”条件基质，5 % Origen (IGEN)，4 mM L-谷氨酰胺，1 mM 丙酮酸钠，5mM HEPES，0.055 mM 2-巯基乙醇，50 单位/毫升青霉素，50 mg/ml 链霉素，50mg/ml 庆大霉素和 $1 \times$ HAT 的选择性培养基(Sigma; 融合 24 小时后加入 HAT)中温育两周。大约两周之后，在其中用 HT 替换了 HAT 的培养基中培养细胞。然后通过 ELISA 对各孔筛选人单克隆 IgM 和 IgG 抗体。一旦发生广泛的杂交瘤生长，则通常在 10-14 天之后观察培养基。分泌抗体的杂交瘤再次平板培养，再次筛选，如果对于人 IgG，单克隆抗体仍然是阳性，则能通过限制性稀释至少亚克隆两次。然后体外培养稳定的亚克隆，在组织培养基中产生少量抗体用于表征。

为了纯化人单克隆抗体，选择的杂交瘤可以在用于单克隆抗体纯化的两升旋转摇瓶中生长。过滤上清液，浓缩，之后用蛋白 A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.)进行亲和层析。洗脱下来的 IgG 通过凝胶电泳和高效液相色谱法检查以确保纯度。缓冲溶液换成 PBS，用 1.43 的消光系数根据 OD280 测定浓度。将单克隆抗体分成等份并且在 -80°C 下保存。

产生本发明单克隆抗体的转染瘤的产生

利用，例如，本领域公知的重组 DNA 技术结合基因转染方法(例如，Morrison, S. (1985) Science 229:1202)，在宿主细胞转染瘤中也能产生本

发明的抗体。

例如，为了表达抗体或其抗体片段，可通过标准分子生物学技术(例如，使用表达目标抗体的杂交瘤的 PCR 扩增或 cDNA 克隆)，获得编码部分或全长轻链和重链的 DNA，并将其插入到表达载体中，使得基因与转录和翻译控制序列可操作连接。在上下文中，术语“可操作连接”意思是抗体基因连接到载体中，使得载体中的转录和翻译控制序列发挥它们调节抗体基因转录和翻译的预期功能。选择表达载体和表达控制序列与使用的表达宿主细胞匹配。抗体轻链基因和抗体重链基因可被插入到分开的载体中，或者，更通常地，两个基因插入到同一表达载体中。抗体基因通过标准方法插入到表达载体中(例如，抗体基因片段上的互补限制性位点与载体连接，或者如果不存在限制性位点，则平端连接)。通过插入到已经编码期望的同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中，使得 V_H 段与载体中的 C_H 段可操作连接，而 V_L 段与载体中的 C_L 段可操作连接，此处描述的抗体的轻链和重链可变区能被用来产生任何抗体同种型的全长抗体基因。另外，或者，重组表达载体能编码促进宿主细胞分泌抗体链的信号肽。抗体链基因能被克隆到载体中，使得该信号肽在读框内与该抗体链基因的氨基末端连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即，来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

除了抗体链基因，本发明的重组表达载体还带有控制该抗体链基因在宿主细胞中表达的调节序列。术语“调节序列”意在包括启动子、增强子和控制抗体链基因转录或翻译的其他表达控制元件(例如，多腺苷酸化信号)。这样的调节序列例如描述于 Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))。本领域技术人员认识到，表达载体的设计，包括调节序列的选择，可取决于诸如要转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括指导哺乳动物细胞中高水平蛋白质表达的病毒元件，例如来自巨细胞病毒(CMV)、猿病毒 40 (SV40)、腺病毒(例如，腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者，可以使用非病毒调节序列，例如泛蛋

白启动子或 β -珠蛋白启动子。另外,调节元件也可由来自不同来源的序列组成,例如 SR α 启动子系统,其含有来自 SV40 早期启动子的序列和人 1 型 T 细胞白血病病毒的长末端重复序列(Takebe, Y.等 (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

除了抗体链基因和调节序列,本发明的重组表达载体还可以携带另外的序列,例如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如,复制起点)和选择性标记基因。选择性标记基因有利于筛选载体已经导入其中的宿主细胞(参见,例如,美国专利 4,399,216, 4,634,665 和 5,179,017,都属于 Axel 等人)。例如,选择性标记基因一般给其中导入载体的宿主细胞带来抗药性,例如 G418、潮霉素或氨甲喋呤抗性。优选的选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(在 dhfr-宿主细胞中,用于氨甲喋呤选择/扩增)和 neo 基因(用于 G418 选择)。

对于轻链和重链的表达,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。各种形式的术语“转染”意在包括常用于将外源 DNA 导入原核或真核宿主细胞中的各种技术,例如,电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等等。虽然理论上有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体,但是优选在真核细胞中表达抗体,最优选在哺乳动物宿主细胞中表达,因为这样的真核细胞,特别是哺乳动物细胞,比原核细胞更可能组装和分泌正确折叠并且具有免疫活性的抗体。据报道,抗体基因的原核表达无法高产率地产生活性抗体(Boss, M.A.和 Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6:12-13)。

用于表达本发明的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO 细胞)(包括 dhfr- CHO 细胞,描述于 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, 和 DHFR 选择性标记一起使用,例如,如 R. J. Kaufman 和 P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621 所述)、NSO 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。特别地,用于 NSO 骨髓瘤细胞时,另一种优选表达系统是 WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP 338,841 公开的 GS 基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养足以使抗体在宿主

细胞中表达的时间,或更优选地,足以使抗体分泌到培养宿主细胞的培养基中的时间,产生抗体。可应用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

抗体与抗原结合的特征

通过例如标准 ELISA 或者通过 Biacore, 可以检测本发明的抗体与 IFN α 的结合。简要地说,对于 ELISA,以 PBS 中 0.25 μ g/ml 的 IFN α (例如重组形式的不同 IFN α 亚型或白细胞或类淋巴母细胞 IFN)包被微量滴定板,然后用 PBS 中的 5% 牛血清白蛋白封闭。向各个孔中加入抗体的稀释液(例如,来自 IFN α 免疫小鼠的血浆的稀释液),并且在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1-2 小时。培养板用 PBS/Tween 洗涤,之后和与碱性磷酸酶偶联的第二试剂(例如,对于人抗体,为山羊抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂)一起在 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时。洗涤后,培养板用 pNPP 底物(1mg/ml)显色,并且在 OD 405-650 下分析。优选地,显示最高效价的小鼠用于融合。

如上所述的 ELISA 分析也可以用来筛选表现出与 IFN α 免疫原有阳性反应性的杂交瘤。亚克隆与 IFN α 高亲合力结合的杂交瘤,并且进一步表征。从每个杂交瘤中选择保留母细胞反应性的一个克隆(通过 ELISA),制备 5-10 小瓶细胞库,在 -140 $^{\circ}$ C 下保存,用于抗体纯化。

为了纯化抗-IFN α 抗体,在用于单克隆抗体纯化的两升旋转摇瓶中培养选择的杂交瘤。过滤上清液并且浓缩,然后用蛋白质 A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ)进行亲和层析。通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的 IgG 以确保纯度。将缓冲溶液换成 PBS,并且使用 1.43 的消光系数根据 OD₂₈₀ 测定浓度。将单克隆抗体分成等份并且在 -80 $^{\circ}$ C 下保存。

为了测定选择的抗-IFN α 单克隆抗体是否与独特表位结合,使用商售试剂(Pierce, Rockford, IL)将各种抗体生物素化。如上所述,使用 IFN α 包被的 ELISA 板进行应用未标记单克隆抗体和生物素化单克隆抗体进行的竞争研究。使用链抗生物素蛋白-碱性磷酸酶探针检测生物素化 mAb 的结合。

为了测定纯化抗体的同种型,可以用对于特定同种型抗体特异性的试剂进行同种型 ELISA。例如,为了测定人单克隆抗体的同种型,在 4℃ 下用 1 μ g/ml 抗人免疫球蛋白包被微量滴定板的孔过夜。用 1% BSA 封闭之后,平板与 1 μ g/ml 或更少的测试单克隆抗体或纯化的同种型对照物在室温下反应 1-2 小时。这些孔然后与人 IgG1 或人 IgM 特异性碱性磷酸酶偶联的探针反应。如上所述使平板显色并且分析。

可以通过 Western 印迹法进一步检测抗-IFN α 人 IgG 与 IFN α 抗原的反应性。简要地说,从表达 IFN α 的细胞中制备细胞提取物,并进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用 10%胎牛血清封闭,并用所检测的单克隆抗体探查。人 IgG 的结合可以用抗人 IgG 碱性磷酸酶检测,并用 BCIP/NBT 底物片 (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)显色。

免疫偶联物

另一方面,本发明的特征在于与治疗性部分如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素偶联的抗-IFN α 抗体或其片段。这些偶联物在此称为“免疫偶联物”。包括一个或多个细胞毒素的免疫偶联物称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对(例如杀伤)细胞有害的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素 B、短杆菌肽 D、溴化乙啶、吐根碱、丝裂霉素、表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷、表鬼臼毒噻吩糖苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素 D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素和它们的类似物或同系物。治疗剂还包括,例如,抗代谢物(例如,氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺(decarbazine)),烷化剂(例如,氮芥、thioepa 苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素 C 和顺-二氯二胺铂(II) (DDP)顺铂),氮苄霉素类(例如,柔红菌素(以前称为道诺霉素)和阿霉素),抗生素(例如,放线菌素 D (以前称为放线菌素)、

博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC)), 和抗有丝分裂剂(例如, 长春新碱和长春碱)。

能与本发明抗体偶联的治疗性细胞毒素的其他优选例子包括倍癌霉素、刺孢霉素、美坦生、auristatin, 和它们的衍生物。刺孢霉素抗体偶联物的一个例子是可商品购得的(MyloTargTM; Wyeth-Ayerst)。

可以利用本领域可用的接头技术将细胞毒素与本发明的抗体偶联。接头类型的实例已经用于将细胞毒素与抗体偶联, 包括但不限于脰、硫醚、酯、二硫化物和含肽的接头。可以选择, 例如, 在溶酶体室内易被低 pH 切割或易被蛋白酶切割的接头, 该蛋白酶例如是在肿瘤组织中优先表达的蛋白酶, 如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶 B、C、D)。

关于细胞毒素的类型, 用于偶联治疗剂与抗体的接头和方法的进一步讨论, 参见 Saito, G.等(2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A.等(2003) *Cancer. Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I.和 Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D.和 Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264。

本发明的抗体也可与放射性同位素偶联, 产生细胞毒性放射性药物, 也称为放射性免疫偶联物。能够与诊断或治疗性使用的抗体偶联的放射性同位素的例子包括但不限于碘¹³¹、铟¹¹¹、钇⁹⁰和镱¹⁷⁷。制备放射性免疫偶联物的方法在本领域中已经建立。放射性免疫偶联物的例子可以作为商品获得, 包括 ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals)和 BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), 能够利用类似的方法使用本发明的抗体制备放射性免疫偶联物。

本发明的抗体偶联物可用于修饰给定的生物学反应, 且药物部分不应理解为局限于经典的化学治疗剂。例如, 药物部分可为具有需要的生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可包括, 例如, 具有酶活性的毒素或其活性片段, 如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌外毒素或白喉毒素; 蛋白质, 如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ; 或生物学反应调节物, 如淋巴因子、白细胞介素-1 (“IL-1”)、白细胞介素-2 (“IL-2”)、白细胞介

素-6 (“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其他生长因子。

使这种治疗部分与抗体偶联的技术是众所周知的, 参见, 例如, Arnon 等, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeldt 等(编), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等, “Antibodies For Drug Delivery”, in *Controlled Drug Delivery* (第二版), Robinson 等(编), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera 等(编), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin 等(编), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和 Thorpe 等, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。

双特异性分子

另一方面, 本发明的特征在于包含本发明的抗-IFN α 抗体或其片段的双特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合部分可进行衍生化或连接到另一功能性分子上, 如另一种肽或蛋白质(例如另一种抗体或受体的配体)上, 以生成与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。本发明的抗体实际上可以进行衍生化或连接到一种以上的其他功能性分子上, 以生成与两个以上不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子; 这样的多特异性分子也包括在此处所用的术语“双特异性分子”内。为了产生本发明的双特异性分子, 本发明的抗体可与一种或多种其他结合分子如其他抗体、抗体片段、肽或结合模拟物功能性连接(如通过化学偶联、遗传融合、单价结合等), 从而得到双特异性分子。

因此, 本发明包括包含至少一种对 IFN α 的第一结合特异性和对第

二种目标表位的第二结合特异性的双特异性分子。在本发明一个特定实施方案中，第二种目标表位是Fc受体，如人FcγRI (CD64)或人Fcα受体(CD89)。因此，本发明包括既能与表达FcγR、FcαR或FcεR的效应细胞(如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞(PMN))结合，又能与表达IFNα的靶细胞结合的双特异性分子。这些双特异性分子将表达IFNα的细胞导向于效应细胞，并且触发Fc受体介导的效应细胞活性，如表达IFNα的细胞的吞噬作用、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、细胞因子释放或超氧阴离子的生成。

在其中双特异性分子是多特异性分子的本发明的一个实施方案中，除抗-Fc结合特异性和抗-IFNα结合特异性之外，该分子可进一步包括第三结合特异性。在一个实施方案中，该第三结合特异性是抗增强因子(EF)部分，例如与参与细胞毒性活性的表面蛋白质结合并因而增强抗靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是与给定分子如抗原或受体结合，并因而导致结合决定簇对Fc受体或靶细胞抗原的作用增强的抗体、功能性抗体片段或配体。“抗增强因子部分”可与Fc受体或靶细胞抗原结合。或者，抗增强因子部分可以与一种实体结合，该实体不同于第一和第二结合特异性所结合的实体。例如，抗增强因子部分可细胞毒性T细胞(如通过导致抗靶细胞免疫应答增强的CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或其他免疫细胞)。

在一个实施方案中，本发明的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段作为结合特异性，包括如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv。抗体也可以是轻链或重链二聚体，或任何其最小片段，如Fv或单链构建体，如Ladnor等人的美国专利号4,946,778所述，该专利的内容引入作为参考。

在一个实施方案中，对Fcγ受体的结合特异性由单克隆抗体提供，其结合不被人免疫球蛋白G(IgG)阻断。如此处所用的，术语“IgG受体”是指位于染色体1上的8个γ-链基因的任何一個。这些基因编码总共12个跨膜或可溶性受体同种型，这些同种型分为3个Fcγ受体类型：FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和FcγRIII (CD16)。在一个优选实施方案中，Fcγ

受体是人类高亲和力 FcγRI。人 FcγRI 是 72 kDa 的分子，显示对单体 IgG 的高亲和力(10^8 - 10^9 M⁻¹)。

某些优选抗-Fcγ 单克隆抗体的制备和表征由 Fanger 等人在 PCT 公布 WO 88/00052 和在美国专利号 4,954,617 中描述，在此处将其教导整体引入作为参考。这些抗体在与受体的 Fcγ 结合位点不同的位点处与 FcγRI、FcγRII 或 FcγRIII 的表位结合，因而，其结合基本不被生理学水平的 IgG 阻断。用于本发明中的特定抗-FcγRI 抗体为 mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62 和 mAb 197。产生 mAb 32 的杂交瘤可从美国典型培养物保藏中心获得，ATCC 保藏号为 HB9469。在另外的实施方案中，抗-FcγRI 受体抗体是单克隆抗体 22 的人源化形式(H22)。H22 抗体的产生和表征描述于 Graziano, R.F.等(1995) J. Immunol 155(10):4996-5002 和 PCT 公布 WO 94/10332 中。产生 H22 抗体的细胞系以 HA022CL1 的名称保藏在美国典型培养物保藏中心，保藏号为 CRL 11177。

在另外一些优选实施方案中，对 Fc 受体的结合特异性由与人 IgA 受体如 Fc-α受体(FcαRI(CD89))结合的抗体提供，其结合优选地不被人免疫球蛋白 A (IgA)阻断。术语“IgA 受体”意在包括位于染色体 19 上的一个α-基因的基因产物(FcαRI)。已知该基因编码几个 55-110 kDa 的可变剪接的跨膜同种型。FcαRI (CD89)在单核细胞/巨噬细胞、嗜酸性和嗜中性粒细胞上组成型表达，但不在非效应细胞群体上组成型表达。FcαRI 对 IgA1 和 IgA2 两者均具有中等亲和力(约 5×10^7 M⁻¹)，在暴露于细胞因子如 G-CSF 或 GM-CSF 后该亲和力增加(Morton, H.C.等(1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。已描述了 4 种 FcαRI-特异性单克隆抗体，确定为 A3、A59、A62 和 A77，它们在 IgA 配体结合结构域之外结合 FcαRI (Monteiro, R.C.等(1992) J. Immunol. 148:1764)。

FcαRI 和 FcγRI 是用于本发明的双特异性分子的优选触发受体，因为它们(1)主要表达于免疫效应细胞上，如单核细胞、PMN、巨噬细胞和树突细胞；(2)以高水平表达(如每个细胞 5,000-100,000 个)；(3)是细胞毒性活性(如 ADCC、吞噬作用)的介质；(4)介导导向于它们的抗原(包括自身抗原)的增强的抗原呈递。

优选人单克隆抗体，在本发明双特异性分子中使用的其他抗体是鼠、嵌合和人源化单克隆抗体。

本发明的双特异性分子可通过应用本领域中公知的方法偶联组分结合特异性，如抗-FcR 和抗-IFN α 结合特异性而制备。例如，双特异性分子的每一种结合特异性可单独生成，然后彼此偶联。当结合特异性是蛋白质或肽时，多种偶联剂或交联剂可用于共价偶联。交联剂的例子包括蛋白 A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰-硫代乙酸盐(SATA)、5,5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基双马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶二硫代)丙酸盐(SPDP)和磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己基-1-羧酸盐(sulfo-SMCC)(参见，例如，Karpovsky 等(1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA 等(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括 Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan 等(1985) Science 229:81-83 和 Glennie 等(1987) J. Immunol. 139:2367-2375 所描述的方法。优选的偶联剂为 SATA 和 sulfo-SMCC，两者均可从 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) 获得。

当结合特异性是抗体时，它们可通过两个重链 C-末端铰链区的巯基键偶联。在一个特别优选的实施方案中，对铰链区进行修饰以使其在偶联前含有奇数个巯基残基，优选 1 个。

或者，两种结合特异性可在同一载体中编码，并在相同的宿主细胞中表达和装配。当双特异性分子是 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 或配体 x Fab 融合蛋白质时，该方法是特别有用的。本发明的双特异性分子可以是包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链分子或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可以包含至少两个单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于如美国专利号 5,260,203、美国专利号 5,455,030、美国专利号 4,881,175、美国专利号 5,132,405、美国专利号 5,091,513、美国专利号 5,476,786、美国专利号 5,013,653、美国专利号 5,258,498 和美国专利号 5,482,858 中。

双特异性分子与其特异性靶标的结合可通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS 分析、生物测定(如生长抑制)

或蛋白质印迹测定进行证实。这些测定的每一个通常通过应用对感兴趣的复合物特异性的标记试剂(如抗体)检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。例如,利用如识别和特异性结合抗体-FcR复合物的酶联抗体或抗体片段可检测 FcR-抗体复合物。或者,这些复合物可利用多种其他免疫分析来检测。例如,可对抗体进行放射性标记并且在放射免疫测定(RIA)中使用(参见,例如, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986 年 3 月, 在此引入作为参考)。通过如使用 γ 计数器或闪烁计数器的方法或者通过放射自显影方法,能检测放射性同位素。

药物组合物

另一方面,本发明提供一种组合物,例如药物组合物,其含有与药学上可接受的载体配制在一起的一种或组合的本发明的单克隆抗体或者其抗原结合部分。这样的组合物可以包含一种或组合的(例如两种或多种不同的)本发明的抗体或免疫偶联物或双特异性分子。例如,本发明的药物组合物可以含有组合的可与靶抗原上不同表位结合或具有互补活性的抗体(或免疫偶联物或双特异性剂)。

本发明的药物组合物也可在联合治疗中施用,即与其他药剂联用。例如,联合治疗可包括本发明的抗-IFN α 抗体联合至少一种其他的抗 IFN α 剂(例如免疫抑制剂)。

如此处所用的,“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。根据施用途径,可将活性化合物即抗体、免疫偶联物或双特异性分子包被于一种材料中,以保护该化合物免受可使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

本发明的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保持了亲代化合物的所需生物活性且不引起

任何不想要的毒理学作用的盐(参见如 Berge, S.M.等(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这样的盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些源自非毒性无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的盐,以及源自非毒性有机酸如脂族单和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等的盐。碱加成盐包括那些源自碱土金属如钠、钾、镁、钙等的盐,以及源自非毒性有机胺如 N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等的盐。

本发明的药物组合物也可含有药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠,亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(DHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

可用于本发明的药物组合物中的适当的含水或不含水载体的例子包括水,乙醇,多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其适当的混合物,植物油如橄榄油,和注射用有机酯如油酸乙酯。例如通过应用包被材料如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需的颗粒大小,和通过应用表面活性剂,可维持适当的流动性。

这些组合物也可含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过上述的灭菌程序或通过包含各种抗细菌和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚山梨酸等而确保防止存在微生物。也可能需要在组合物中包含等渗剂,例如,糖、氯化钠等。另外,通过包含延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可实现注射型药物延长的吸收。

药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射液或分散液的粉末剂。使用这样的用于药学活性物质的介质和试剂是本领域公知的。除了任何常规介质或与活性化合物不相容的试剂范围外,包括其在本发明的药物组合物中的应用。还可以

向组合物中掺入补充的活性化合物。

治疗组合物一般必须是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定。可以将组合物配制成溶液、微乳状液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、聚乙二醇和液体聚乙二醇等)和它们的合适的混合物的溶剂或分散剂。例如,通过使用包衣,例如卵磷脂,在分散液的情况下通过保持所需的颗粒大小,和通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在很多情况下,组合物中优选包含等渗剂,例如,糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇或氧化钠。通过在组合物中加入延迟吸收剂,例如单硬脂酸盐和明胶,可实现注射型药物延长的吸收。

通过将活性化合物以需要的量混入合适的溶剂中,并且根据需要加入以上列举的成分的一种或组合,接着无菌微过滤,可制备无菌注射液。通常,通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和来自上面所列举的其他所需成分的灭菌载体中制备分散剂。在用于制备无菌注射液的灭菌粉末剂的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),由其前述无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量随着要治疗的受试者和特定的给药方式而不同。可以与载体材料组合制备单一剂量形式的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。通常,以在100%中计,这个量的范围是大约0.01%至大约99%的活性成分,优选大约0.1%至大约70%,最优选大约1%至大约30%的活性成分,与药学上可接受的载体相组合。

调节剂量方案,以提供最佳的期望的反应(例如,治疗反应)。例如,可以施用单一大丸剂,可以随时间施用几次分开的剂量,或者根据治疗状况的紧急情况所指示的,剂量可以按比例减小或增加。特别有利的是将肠胃外组合物配制成容易施用并且配药均匀的剂量单位形式。此处使用的剂量单位形式是指适合作为要治疗的受试者的单一剂量的物理不连续单位;每一个单位含有预定量的活性化合

物，该活性化合物的量经计算与必需的药物载体组合产生所需的治疗效果。对本发明剂量单位形式的具体说明限定于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特性和要达到的特定治疗效果，和(b)本领域中固有的对于配制这样的用于治疗个体敏感性的活性化合物的限制。

对于抗体的施用，剂量范围为约 0.0001 至 100 mg/kg，更通常为 0.01 至 5 mg/kg 受者体重。例如，剂量可以是 0.3 mg/kg 体重、1 mg/kg 体重、3 mg/kg 体重、5 mg/kg 体重或 10 mg/kg 体重，或在 1-10 mg/kg 范围内。示例性的治疗方案需要每周施用一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 月一次、每 3-6 月一次。本发明的抗-IFN α 抗体的优选剂量方案包括经静脉内施用 1 mg/kg 体重或 3 mg/kg 体重，该抗体使用如下给药程序之一给药：(i)每 4 周 6 次，然后每 3 周；(ii)每 3 周；(iii) 3 mg/kg 体重一次，然后每 3 周 1 mg/kg 体重。

在一些方法中，同时施用具有不同结合特异性的两种或多种单克隆抗体，在该情况中，每种抗体的给药剂量落在所述剂量内。抗体通常在有必要时多次施用。单次给药之间的间隔可以是，例如，每周、每月、每三个月或每年。间隔也可以是不定期的，例如根据患者中抗靶抗原的抗体的血液水平指示进行。在一些方法中，调节剂量以达到约 1-1000 μ g/ml 的血浆抗体浓度，在一些方法中为约 25-300 μ g/ml。

或者，抗体可以作为持续释放制剂施用，在此情况中需要频率较低的施用。剂量和频率根据抗体在患者中的半衰期而不同。通常，人抗体显示最长的半衰期，之后是人源化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。施用的剂量和频率根据处理是预防性的还是治疗性的而不同。在预防性应用中，在长时间内以较不频繁的间隔施用相对较低的剂量。有些患者在余生中持续接受处理。在治疗性应用中，有时需要以较短的间隔施用较高的剂量，直到疾病的进展减轻或停止，优选直到患者显示疾病症状部分或完全改善。之后，患者可以以预防性方案施用。

本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可进行改变,以获得对特定患者、组合物和施用方式有效实现所需治疗反应,而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平将依赖于多种药物代谢动力学因素,包括本发明应用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,应用的特定化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料,接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史,以及医学领域中公知的类似因素。

本发明的抗-IFN α 抗体的“治疗有效剂量”优选地导致疾病症状的严重性降低,无疾病症状期的频率和持续时间增加,或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或残疾。例如,在系统性红斑狼疮(SLE)的情况下,治疗有效剂量优选地防止 SLE 相关物理症状如疼痛或乏力进一步恶化。治疗有效剂量优选地也防止或延缓 SLE 的发病,例如在出现疾病早期或初步征兆时这可能是希望的。同样,也包括延缓 SLE 相关的慢性进展。SLE 诊断中使用的实验室检测包括化学(包括 IFN α 水平的测定)、血液学、血清学和放射学方法。因此,监测以上所述指标的任何临床或生化测定都可以用来确定特定治疗是否是用于治疗 IFN α 的治疗有效剂量。本领域技术人员能够根据如下因素确定这种量,如受试者体重、受试者症状的严重性和选择的特定组合物或施用途径。

本发明的组合物可以利用本领域公知的一种或多种方法通过一种或多种施用途径施用。本领域技术人员应当明白,施用途径和/或方式根据期望的结果而不同。用于本发明抗体的优选施用途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如注射或输注。如此处所用的短语“肠胃外施用”是指不同于肠和局部施用的施用模式,通常通过注射,包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

或者,本发明的抗体也可以通过非肠胃外途径施用,如局部、表皮或粘膜途径施用,例如,鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

活性化合物可以使用保护化合物不被快速释放的载体制备,例如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微胶囊递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这样的制剂的很多方法是专利或者一般为本领域技术人员公知。参见,例如, Sustained and controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson 编著, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

治疗组合物可应用本领域公知的医疗装置施用。例如,在一个优选实施方案中,本发明的治疗组合物可用无针的皮下注射装置施用,如在美国专利号 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 或 4,596,556 中公开的装置。用于本发明的公知的植入物和组件的例子包括: 美国专利号 4,487,603, 该专利公开了用于以受控速率分散药物的可植入微量输注泵; 美国专利号 4,486,194, 该专利公开了用于通过皮肤施用药物的治疗装置; 美国专利号 4,447,233, 该专利公开了用于以精确的输注速率递送药物的医用输注泵; 美国专利号 4,447,224, 该专利公开了用于连续递送药物的变流可植入输注设备; 美国专利号 4,439,196, 该专利公开了具有多腔区室的渗透药物递送系统; 和美国专利号 4,475,196, 该专利公开了一种渗透药物递送系统。这些专利在此引入作为参考。许多其他这样的植入物、递送系统和组件是本领域技术人员公知的。

在某些实施方案中,可配制本发明的人单克隆抗体以确保在体内的正确分布。例如,血-脑屏障(BBB)排除了许多高亲水性的化合物。为了确保本发明的治疗化合物跨过 BBB(如果需要),可将它们配制在如脂质体中。对于制备脂质体的方法,参见,例如,美国专利 4,522,811; 5,374,548 和 5,399,331。脂质体可包含一种或多种选择性地转运入特定细胞或器官内的部分,从而增强靶向的药物递送(参见,例如, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。靶向部分的

例子包括叶酸或生物素(参见,例如,Low等人的美国专利 5,416,016); 甘露糖苷(Umezawa 等(1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); 抗体(P.G. Bloeman 等(1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais 等(1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); 表面活性剂蛋白 A 受体(Briscoe 等(1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier 等(1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); 也参见 K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273。

本发明的使用和方法

本发明的单克隆抗-IFN α 抗体和相关衍生物/偶联物和组合物具有许多体外和体内诊断和治疗应用。例如, 利用标准抗体/抗原结合试验(例如 ELISA, RIA), 该抗体可以用来在体外或体内检测 IFN α 蛋白质。此外, 这些分子也可以对受试者例如体内施用, 以治疗、预防或诊断 IFN α 起作用的多种疾病。如此处使用的, 术语“受试者”意在包括人和非人动物。优选的受试者包括显示自身免疫病的人类患者。本发明的术语“非人动物”包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类动物、爬行类动物等。

本发明的抗体组合物可用于治疗自身免疫病, 如系统性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化症(MS)、炎性肠病(IBM; 包括克罗恩病、溃疡性结肠炎和乳糜泻病)、胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、牛皮癣、自身免疫性甲状腺病、类风湿性关节炎(RA)和肾小球肾炎。此外, 本发明的抗体组合物还可以用于抑制或预防移植排斥或治疗移植物抗宿主疾病(GVHD)。

开始时可以对本发明的抗体检测与体外治疗用途有关的结合活性。例如, 可以用下面实施例中描述的 Biacore、ELISA 和流式细胞分析试验检测本发明的组合物。而且, 例如可以如下面实施例所述, 在暴露于 IFN α 后通过细胞增殖试验测定这些分子的活性。用于施用

本发明的抗体和组合物的合适方法在本领域中公知，已在上文描述。合适的剂量也可以在本领域技术内确定，取决于受试者的年龄和体重和使用的特定药物。示例性的剂量在上文已经描述。

本发明的抗-IFN α 抗体也可以与如上所述的其他治疗剂共同施用。

如上所述，为了治疗目的，以治疗有效量对患者施用人抗体组合物和药学上可接受的载体。如果抗体组合物和药学上可接受载体的组合的施用量是具有生理学意义的，则称该组合为以“治疗有效量”施用。如果一种药剂的存在导致接受患者的生理学发生可检测的变化，则该药剂是“具有生理学意义的”。如果与系统施用相当的非靶向药剂后在靶标处自然产生的结果相比，一种靶向的治疗剂向预期靶标递送较高比例的施用剂量，则该治疗剂是“治疗有效的”。

本发明范围内还包括试剂盒，其中包括本发明的组合物(例如人抗体、免疫偶联物和双特异性分子)和使用说明。该试剂盒可以进一步包括至少一种另外的试剂，如本发明的一种或多种另外的人抗体(例如，具有抑制 IFN α 活性的互补活性但是与第一人抗体不同的人抗体)。

本发明进一步通过下面的实施例进行阐述，不应将该实施例理解为进一步的限制。全部附图和在本申请中引用的全部参考文献、专利和公开专利申请的内容均引用作为参考。

实施例

实施例 1: 抗 IFN α 人单克隆抗体的产生

抗原

从病毒刺激的人类淋巴母细胞细胞系纯化的含有多亚型的天然人 IFN α 用作抗原，其导致多种 IFN α 亚型的产生，但是不产生 IFN ω 。

转基因转染色体 KM 小鼠TM

用表达人抗体基因的转基因转染色体小鼠的 KM 株制备抗 IFN α 的完全人单克隆抗体。在该小鼠株中,已经如 Chen 等(1993) EMBO J. 12:811-820 所述将内源小鼠 κ 轻链基因纯合地破坏,并且已经如 PCT 公布 WO 01/09187 的实施例 1 中关于 HuMab 小鼠所述将内源小鼠重链基因纯合地破坏。该小鼠携带如 Fishwild 等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851 所述的人 κ 轻链转基因 KCo5。该小鼠也携带如 PCT 公布 WO 02/43478 所述的人重链转染色体 SC20。

KM 小鼠TM的免疫:

为了生成抗 IFN α 的完全人单克隆抗体,用从病毒刺激的人类淋巴瘤细胞系纯化的含有多种亚型的天然人 IFN α 免疫 KM 小鼠TM。一般性免疫方案由 Lonberg, N.等(1994) Nature 368:856-859; Fishwild, D.等(1996) Nature Biotechnology 14:845-851 和 PCT 公布 WO 98/24884 描述。在第一次输注抗原时小鼠为 6-16 周龄。利用纯化的 IFN α 抗原天然制剂(25-100 μ g)(即从病毒刺激的类淋巴瘤细胞中纯化的)腹膜内(IP)或皮下(Sc)免疫 KM 小鼠TM。

转基因转染色体小鼠用完全弗氏佐剂中的抗原腹膜内(IP)或皮下(Sc)免疫两次,接着用不完全弗氏佐剂中的抗原 IP 免疫 2-4 周(最多可达总共 8 次免疫)。通过眶后采血监测免疫应答。通过 ELISA 对血浆进行筛选(如下文所述),具有足够的抗-IFN α 人免疫球蛋白效价的小鼠用于进行融合。在处死和取出脾之前 3 天和 2 天时,用抗原通过静脉内对小鼠进行加强免疫。

产生抗-IFN α 抗体的 KM 小鼠TM的选择

为了选择产生与 IFN α 结合的抗体的 KM 小鼠TM,如 Fishwild, D.等(1996)所述通过 ELISA 检测来自接受免疫的小鼠的血清。简要地说,用纯化的来自类淋巴瘤细胞的天然 IFN α ,在 PBS 中以 1-2 μ g/ml 的浓度,50 μ l/孔的量,包被微量滴定板,4 $^{\circ}$ C 下温育过夜,然后用 200 μ l/孔的 PBS/Tween (0.05%)中的 5%鸡血清封闭。将来自 IFN α 免

疫的小鼠的血浆的稀释液加入各孔中,室温下温育 1-2 小时。培养板用 PBS/Tween 洗涤,然后与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗人 IgG Fc 多克隆抗体在室温下温育 1 小时。洗涤后,培养板用 ABTS 底物(Sigma, A-1888, 0.22 mg/ml)显色,并用设置为波长 415nm、背景修正为 495nm 的分光光度计测量各孔的光密度。显示最高抗-IFN α 抗体效价的小鼠用于进行融合。融合如下文所述进行,通过 ELISA 检测杂交瘤上清液的抗-IFN α 活性。

产生抗 IFN α 人单克隆抗体的杂交瘤的产生

从 KM 小鼠TM 中分离脾细胞,并根据标准规程用 PEG 将其与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后对获得的杂交瘤筛选其抗原特异性抗体的产生。

使用 50% PEG (Sigma)将来自接受免疫的小鼠的脾淋巴细胞单细胞悬液与 1/4 数量的 P3X63-Ag8.653 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1580)融合。将细胞以约 1×10^5 /孔的密度平板接种于平底微量滴定板上,然后在选择性培养基中温育约两周,该培养基含有 10% 胎牛血清、10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63)条件介质、3-5% 于 DMEM (Mediatech, CRL 10013, 含高浓度葡萄糖、L-谷氨酰胺和丙酮酸钠)中的 origen (IGEN)、5 mM HEPES、0.055 mM 2-巯基乙醇、50mg/ml 庆大霉素和 $1 \times$ HAT (Sigma, CRL P-7185)。1-2 周后,将细胞培养于用 HT 替代了其中的 HAT 的培养基中。然后通过 ELISA(如上所述)对单个孔进行人抗 IFN α IgG 抗体的筛选。

利用 Daudi 增殖试验(如下文所述)对经 ELISA 鉴定为分泌抗体的杂交瘤的条件培养基检测其阻断 IFN α 的抗增殖作用的能力。在 Daudi 试验筛选中具有最高中和活性的杂交瘤通过有限稀释亚克隆至少 2 次。然后在体外培养获得的稳定的亚克隆,在组织培养基中产生少量单克隆抗体。重复进行 Daudi 增殖试验筛选,以证实该亚克隆的活性。将在 Daudi 试验中具有最高活性的亚克隆进行放大,产生足以纯化用于进一步表征的单克隆抗-IFN α 的条件培养基(一般

为 1 升)。

用于中和抗-IFN α 抗体的杂交瘤的筛选：Daudi 增殖试验

干扰素 α 以剂量依赖的方式抑制 Daudi (Burkitts 淋巴瘤, ATCC # CCL-213) 细胞的增殖。阻断干扰素与其受体结合的中和抗体可以使增殖得到恢复。确定了天然类淋巴母细胞 IFN α 对 Daudi 的抗增殖作用的剂量应答曲线, 计算足以 50% 地抑制 Daudi 生长的浓度(EC50)。

杂交瘤条件培养基与培养基(RPMI 1640, 补充 10% FCS, 1 $\times$ 2-ME, L-谷氨酰胺和青霉素链霉素)中的 Daudi 细胞在 96 孔平底细胞培养板中混合, 其中加入及不加入 IFN α 。试剂的终混合物如下: 1 $\times$ 10⁴ Daudi 细胞+10%杂交瘤上清液+/- EC50 下的 IFN α , 100 μ l/孔。细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下温育 72 小时。加入 20 μ l/孔 MTS(Promega) 测定增殖, 再温育 3 小时后在 490nm 下读取 OD。活细胞数与 OD 读数成比例。计算杂交瘤上清液+IFN α 相对于单独杂交瘤上清液的 Daudi 抑制百分比, 并与含及不含 IFN α 的对照培养基进行比较。根据 IFN α 阻断的能力对杂交瘤进行排序, 选择最有活性的中和杂交瘤用于亚克隆。

选择杂交瘤克隆 13H5、13H7 和 7H9 用于进一步的分析。

实施例 2: 人单克隆抗体 13H5、13H7 和 7H9 的结构表征

编码 13H5、13H7 和 7H9 单克隆抗体的重链和轻链可变区的 cDNA 序列利用标准 PCR 技术分别从 13H5、13H7 和 7H9 杂交瘤获得, 并利用标准 DNA 测序技术进行测序。

13H5 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 1A 和 SEQ ID NO:25 和 19 中。

13H5 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 1B 和 SEQ ID NO:28 和 22 中。

13H5 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明, 13H5 重链应用了来自人种系 VH 1-18 的 V_H 段, 一个未

确定的 D 段, 和来自人种系 J_H 4b 的 J_H 段。13H5 V_H 序列与种系 VH 1-18 序列的比对显示于图 4 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 13H5 V_H 序列的进一步分析画出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 1A 和 4 和 SEQ ID NO:1、4 和 7 所示。

13H5 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明, 13H5 轻链应用了来自人种系 Vk A27 的 V_L 段和来自人种系 JK 1 的 JK 段。13H5 V_L 序列与种系 Vk A27 序列的比对显示于图 6 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 13H5 V_L 序列的进一步分析画出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 1B 和 6 和 SEQ ID NO:10、13 和 16 所示。

13H7 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 2A 和 SEQ ID NO:26 和 20 中。

13H7 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 2B 和 SEQ ID NO:29 和 23 中。

13H7 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明, 13H7 重链应用了来自人种系 VH 4-61 的 V_H 段, 一个来自人种系 3-10 的 D 段, 和来自人种系 J_H 4b 的 J_H 段。13H7 V_H 序列与种系 VH 4-61 序列的比对显示于图 5 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 13H7 V_H 序列的进一步分析画出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 2A 和 5 和 SEQ ID NO:2、5 和 8 所示。

13H7 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明, 13H7 轻链应用了来自人种系 Vk A27 的 V_L 段和来自人种系 JK 2 的 JK 段。13H7 V_L 序列与种系 Vk A27 序列的比对显示于图 6 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 13H7 V_L 序列的进一步分析画出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 2B 和 6 和 SEQ ID NO:11、14 和 17 所示。

7H9 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 3A 和 SEQ ID NO:27 和 21 中。

7H9 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 3B 和

SEQ ID NO:30 和 24 中。

7H9 重链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白重链序列的比较证明, 7H9 重链应用了来自人种系 VH 1-18 的 V_H 段, 来自人种系 6-6 的 D 段, 和来自人种系 J_H 4b 的 J_H 段。7H9 V_H 序列与种系 VH 1-18 序列的比对显示于图 4 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 7H9 V_H 序列的进一步分析画出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 3A 和 4 和 SEQ ID NO:3、6 和 9 所示。

7H9 轻链免疫球蛋白序列与已知人种系免疫球蛋白轻链序列的比较证明, 7H9 轻链应用了来自人种系 Vk A27 的 V_L 段和来自人种系 JK 1 的 JK 段。7H9 V_L 序列与种系 Vk A27 序列的比对显示于图 6 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 7H9 V_L 序列的进一步分析画出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区, 分别如图 3B 和 6 和 SEQ ID NO:12、15 和 18 所示。

实施例 3: 抗-IFN α 人单克隆抗体抑制多种干扰素 α 亚型的生物活性

如实施例 1 所述, 干扰素 α 以剂量依赖的方式抑制 Daudi (burkitts 淋巴瘤, ATCC # CCL-213) 细胞的增殖。阻断干扰素与其受体结合的中和抗体将使增殖得到恢复。利用该细胞增殖试验, 通过检测天然类淋巴母细胞 IFN α 、天然白细胞干扰素、13 种重组 IFN α 亚型、IFN β 和 IFN ω 的阻断, 检测了纯化的人抗-IFN α 抗体的特异性。

Daudi 细胞在 96 孔平底细胞培养板中在添加及不加 IFN α 的培养基(RPMI 1640, 补充 10% FCS, 1 $\times$ 2-ME, L-谷氨酰胺和青霉素链霉素)中生长。检测的各种 I 型干扰素在 EC₅₀ 下测定, 并与一般从 50 μ g/ml(312 nM)至 381 pg/ml(2.4 pM)两倍连续稀释的各种抗体混合。将抗体/IFN 混合物加至 96 孔平底培养板的 Daudi 细胞中, 至终密度为 1 $\times$ 10⁴ Daudi 细胞/100 μ l/孔, 并在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下温育 72 小时。加入 20 μ l/孔 MTS(Promega)测定增殖, 再温育 3 小时后在 490nm 下读取 OD。活细胞数与 OD 读数成比例。相对于不含 IFN(=100%阻

断)和只存在 IFN(=0%阻断)时的 Daudi 增殖, 计算干扰素阻断百分比。根据阻断程度对抗体进行评分, 产生所检测的各种抗体的 IFN α 亚型特异性分布图。用 PRISMTM 软件利用非线性回归; S 型剂量应答; 可变斜率曲线拟合, 得出 EC₅₀。结果证明, 人抗-IFN α 抗体 13H5 抑制多种 IFN α 亚型, 特别是 IFN α 6, 2b, 2a, 1, 16, 10, 8, 5 和 14 的作用, 但是不抑制 IFN α 21, IFN β 或 IFN ω 的作用。13H5 是 IFN α 亚型 17、7 和 4 的低水平抑制剂。干扰素的 EC₅₀ 值和 % 阻断显示在下面的表 1 中。

表 1: 多种 IFN α 亚型的抗体抑制

13H5 IFN 阻断		
IFN	EC ₅₀	1000×
类淋巴母细胞 IFN	127 pM	82%
IFN α 6	208 pM	95%
IFN α 2b	432 pM	80%
IFN α 2a	448 pM	95%
IFN α 1	4.6 nM	68%
白细胞 IFN	5.5 nM	70%
IFN α 16	6.8 nM	80%
IFN α 10	19.6nM	40%
IFN α 8	26 nM	37%
IFN α 5	56nM	47%
IFN α 14	70 nM	34%
IFN α 17	110nM	13%
IFN α 7	>300 nM	15%

IFN α 4	>300 nM	7%
IFN α 21	>300 nM	NS
IFN- β	>300nM	NS
IFN- ω	>300 nM	NS

NS=无显著性

实施例 4: 抗-IFN α 抗体对细胞表面标记物的 IFN α 诱导的抑制
已知向细胞培养基中加入 IFN α 2b 诱导细胞表面标记物 CD38 和 MHC I 类在正常外周血单核细胞(PBMNC)上的表达。检测人抗-IFN α 抗体 13H5 抑制干扰素诱导的初级人细胞培养物细胞表面标记物表达的活性, 并通过 FACS 分析进行测定。

将抗-IFN α 单克隆抗体 13H5 和同种型对照用 PBMNC 培养基(RPMI 1640+ 10% FBS+1%人血清)稀释为 20 μ g/ml。抗体以 1.5ml/孔分配到 T25 通气加帽培养瓶中, 并与等体积的在培养基中稀释的 400IU/ml 白细胞 IFN、IFN α 2b 或 IFN ω 混合, 或只与培养基混合。应用肝素包被的 Vacutainer® CPT™管, 按照厂商推荐(Becton Dickinson & Co)从正常人血液中分离 PBMNC。将细胞重悬浮于培养基(RPMI 1640 + 10% FBS + 1%人血清)中至 2×10^6 细胞/ml, 并且等体积加入 Ab/IFN 混合物中, 使得终试验中每 6 ml 培养基含有 6×10^6 PBMNC + 5 μ g/ml Ab +/- 100 iu/ml IFN。培养瓶在 37℃, 5% CO₂ 下温育 24 或 48 小时。

从每个培养瓶中收获条件培养基, 用 Sorvall RTH-750 转头以 100 rpm 离心回收悬浮细胞。沉淀细胞保存于冰上, 上清液冻存于 -80℃ 下用于 ELISA。使用 PBS 洗液(2ml), 接着在乙二胺四乙酸(3ml)中温育 15 分钟, 从培养瓶上回收贴壁细胞。在乙二胺四乙酸温育结束时刮培养瓶, 最后用 PBS 洗液(2ml)漂洗培养瓶。PBS 洗液和乙二胺四乙酸均与从条件培养基收获物中回收的细胞混合。用 Sorvall RTH-750 转头以 1000rpm 离心收集的细胞悬液, 得到的沉淀在染色缓冲液(PBS

+ 0.1M EDTA + 2% FBS + 1% HS)中重悬浮为 300 μ l, 并以 100 μ l/孔分配到 V 底 96 孔板上。

用 Sorvall RTH-750 转头以 2800 rpm 脉冲离心培养板, 并将沉淀的细胞以 25 μ l/孔重悬浮于荧光染料标记的如下抗体中: (1)小鼠抗-MHC I-FITC+小鼠抗-CD38-PE, 和(2)同种型对照, 小鼠 IgG-FITC+小鼠 IgG-PE。培养板在冰上温育 45 分钟, 避光。加入 200 μ l 染色缓冲液洗涤细胞 3 次, 接着脉冲离心, 最后重悬浮于 200 μ l 2%低聚甲醛的 PBS 溶液中。使用 Becton Dickinson FACScalibur™ 通过流式细胞术分析单核细胞的染色, 在正向分散对侧向分散图上画门(gate), 以从分析中除去污染的细胞。结果证明, 人单克隆抗体 13H5 抑制白细胞 IFN 和重组 IFN α 2b 诱导的正常 PBMNC 上 CD38 和 MHC I 类表达的改变。人单克隆抗体 13H5 不阻断 IFN ω 介导的 CD38 和 MHC I 类细胞表面标记物表达的改变。这些结果显示在下面的表 2 和表 3 中。

表 2: IFN 诱导的正常 PBMNC 上 MHC I 类表达的改变百分比

Ab 处理	白细胞 IFN (100u/ml)	IFN α 2b (100u/ml)	IFN ω (100u/ml)
无抗体	31	21	28
13H5 (5 μ g/ml)	-1	-1	29
对照 Ig (5 μ g/ml)	16	25	26

表 3: IFN 诱导的正常 PBMNC 上 CD38 表达的改变百分比

Ab 处理	白细胞 IFN (100u/ml)	IFN α 2b (100u/ml)	IFN ω (100u/ml)
无抗体	774	426	782
13H5 (5 μ g/ml)	195	16	760
对照 Ig (5 μ g/ml)	614	392	829

实施例 5: 抗-IFN α 抗体抑制 IFN 诱导的 IP-10 的表达

已知向细胞培养基中加入 IFN α 2b 诱导正常外周血单核细胞 (PBMNC) 中的 IP-10 表达。通过 ELISA 结合试验检测人抗-IFN α 抗体 13H5 抑制干扰素诱导的正常 PBMNC 培养物中 IP-10 表达的活性。

PBMNC 培养物如实施例 4 所述制备, 用白细胞 IFN、IFN α 2b 或 IFN ω 作为条件。用定量夹心 ELISA 试剂盒(Quantikine®, R&D Systems), 按照厂商推荐, 以 1:30 稀释度分析条件培养基的 IP-10/CXCL10 表达。结果证明人单克隆抗体 13H5 抑制白细胞 IFN 和重组 IFN α 2b 诱导的正常 PBMNC 培养物中 IP-10 的表达, 但不阻断 IFN ω 诱导的 IP-10 表达。这些结果显示在表 4 中。

表 4: IFN 诱导的正常 PBMNC 中 IP-10 表达的抗体抑制

Ab 处理	无 IFN	白细胞 IFN (100u/ml)	IFN α 2b (100u/ml)	IFN ω (100u/ml)
无抗体	907	2665	2739	2904
13H5 (5 μ g/ml)	946	1765	1262	3862
对照 Ig (5 μ g/ml)	838	3512	3117	3960

实施例 6: 抗-IFN α 人单克隆抗体的亲和力表征

在该实施例中, 利用 Biacore 分析对单克隆抗体 13H5 检测了重组 IFN α 2a 和 IFN α 2b 的结合亲和力。

10 μ g/ml 的纯化抗体在 Prot-G 包被的 CM5 芯片上捕获。在 HBS-EP 运行缓冲液中浓度为 80 nM 至 10 nM 的抗原以 25 μ l/min 的流速通过该芯片。允许的结合时间为 5 分钟, 接着是 10 分钟的解离期。通过检测表面与捕获的同种型对照人 IgG (Sigma) 和缓冲液的结合, 消除背景和抗原与芯片和抗体的非特异性结合。使用 20 mM

NaOH + 400mM NaCl 以 100 μ l/min 的流速通过 0.4 分钟实现芯片的再生。使用 BIAevaluation 软件(Biacore AB)将结合和解离曲线与 Langmuir 结合模型拟合。结果显示在下面的表 5 中。

表 5: 单克隆抗体 13H5 的结合特征

IFN α 亚型	K _D	K _{on}	K _{off}
IFN α 2a	1.0 $\times$ 10 ⁻¹⁰ M	3.3 $\times$ 10 ⁻⁵ l/Ms	3.5 $\times$ 10 ⁻⁵ l/Ms
IFN α 2b	1.0 $\times$ 10 ⁻¹⁰ M	5.1 $\times$ 10 ⁻⁵ l/Ms	5.3 $\times$ 10 ⁻⁵ l/Ms

实施例 7: SLE 血浆介导的树突细胞发育的抗体抑制

SLE 血浆诱导正常人单核细胞的树突细胞发育。在该实施例中, 检测了纯化的单克隆人抗-IFN α 抗体对树突细胞发育的抑制, 如根据抗体抑制 SLE 血浆诱导细胞表面标记物 CD38、MHC I 类和 CD123 的能力来评价。

25 ml 棕黄层用 PBS 稀释 4 倍。将样品分配到 4 $\times$ 50ml 锥形管中, 下面用 15ml 淋巴细胞分离液(ICN Biomedicals)分层。以 500 x g 离心 30 分钟后, 取出含有 PBMC 的棕黄层, 用 PBS 洗涤。将细胞以 4 $\times$ 10⁶ 细胞/ml 重悬浮于培养基中。通过将 PBMC (2.0 $\times$ 10⁷ 细胞/5ml/25cm² 瓶)在培养基中 37 $^{\circ}$ C 温育 1.5 小时, 然后洗去未附着的细胞两次, 分离单核细胞。第二次洗涤后, 将细胞在含有 1%热灭活的人血清的培养基中培养。向培养瓶中加入 25% SLE 患者血浆+/-中和抗体和同种型对照 (30 μ g/ml); IFN α 2b (100 和 10 iu/ml)+ 25%正常人血浆用作标记物诱导的阳性对照。培养瓶在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下温育 3-7 天。然后从条件培养基中回收树突细胞, 必要时用 PBS 和乙二胺四乙酸处理, 之后如 PBMNC 培养中标记物诱导阻断所述染色(如上文实施例 4 所述)。使用 Becton Dickinson FACScaliburTM 通过流式细胞术分析树突细胞的染色。在正向分散对侧向分散图上画门, 以从分析中除去污染的细胞。在 13H5 存在下细胞表面标记物 MHC I 类、CD38 和 CD123 的标准化的表达证明, 抗-IFN α 人单克隆抗体 13H5 抑制依赖 IFN α 的树突

细胞发育过程。结果显示在下面的表 6 中，其中(A)、(B)、(C)、(D)总结了 4 个代表性 SLE 供体标本的结果。

表 6: 树突细胞成熟的抑制

(A)

	供体血浆 40 (13 iu/ml IFN)		
培养条件	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	148.34	14.22	39.78
10 iu/ml IFN α 2b	199.84	18.92	44.18
100 iu/ml IFN α 2b	229.05	26.27	63.36
0 Ab	206.02	22	46.78
13H5	144.92	13.67	35.11
对照 IgG	193.52	21.5	62.04

(B)

	供体血浆 39 (19 iu/ml IFN)		
培养条件	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	248.83	18.63	32.69
10 iu/ml IFN α 2b	331.82	21.42	63.23
100 iu/ml IFN α 2b	430.87	30.56	60.61
0 Ab	443.21	17.53	44.87
13H5	330.59	14.18	20.56
对照 IgG	432.43	17.88	39.33

(C)

	供体血浆 36		
培养条件	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	358.88	15.25	45.75
10 iu/ml IFN α 2b	457.133	17.41	58.48
100 iu/ml IFN α 2b	496.32	20.63	64.55
0 Ab	488.58	28.92	88.31
13H5	429.31	15.44	73.88
对照 IgG	485.7	19.75	115.18

(D)

	供体血浆 59 (75 iu/ml IFN)		
培养条件	MHC I	CD123	CD38
0 IFN	228.96	10.5	58
10 iu/ml IFN α 2b	271.19	11.95	86.49
100 iu/ml IFN α 2b	293.99	12.73	112.49
0 Ab	202.04	14.74	61.61
13H5	127.22	9.17	30.79
对照 IgG	266	14.4	55.46

实施例 8: 单克隆抗体 13H5 的作用机制

在该实施例中, 为了确定 13H5 的作用机制, 使用放射性标记的细胞因子和抗体对表达 IFNAR 的细胞进行了几个结合实验。

在第一组实验中, 重组 IFN α 2a 以比活性 29.3 Ci/mmol (Pierce IODO-GEN®管)放射性碘化, 经测定以大约 1 nM 的 K_D 与 Daudi 细胞特异性结合。为了检测该配体与细胞的竞争结合, 用 200 μ l/孔牛奶缓冲液 4 $^{\circ}$ C 封闭玻璃纤维板过夜。Daudi 细胞以 2×10^6 细胞/孔分散在 RPMI 1640 培养基中, 与 125 I-IFN α (2 nM) + 3 倍连续稀释的竞争剂, 13H5、同种型对照抗体或未标记的 IFN α (30 nM 至 14 pM)混合。培养板在摇床上 4 $^{\circ}$ C 温育 2 小时, 之后用 RPMI 洗涤, 风干。将滤纸转移到玻璃管上, 分析放射性。

几个实验的代表性结果显示在图 7 中。未标记的配体用作阳性对照, 观察到以大约 0.5 nM 的 IC_{50} 特异性阻断 125 I-IFN α 结合。但是 13H5 抗体不阻断碘化配体的结合, 而是观察到增强与处理细胞有关的放射性信号, 与同种型对照抗体的行为不同, 同种型对照抗体对 125 I-IFN α 与细胞的结合没有影响。该结果表示 13H5 具有非竞争性作用机制, 是通过阻断信号传导而不是通过阻断配体结合来中和生物活性。

上述结果也提示, 在 IFN α 的存在下, 13H5 可以与细胞表面结合。由于每个 13H5 分子均具有结合两个 IFN α 分子的能力, 这些事件将导致第二个配体连接到细胞膜上。这个假说得到以下发现的支持: 在与 1:1

的 IFN α : 13H5 结合位点一致的抗体和配体体浓度下, 细胞结合的放射性提高约 2 倍。

为了进一步研究 13H5 的作用机制, 在存在或不存在 IFN α 2a 的情况下, 用放射性标记的抗体测定了该抗体与 Daudi 细胞的结合。该细胞因子以根据以前的结合研究计算为饱和 IFNAR 结合的浓度(10 nM)使用。13H5 抗体以比活性 414 Ci/mmol (Pierce IODO-GEN®管)放射性碘化。为了检测抗体与细胞的结合, 用 200 μ l/孔牛奶缓冲液 4 $^{\circ}$ C 封闭玻璃纤维板过夜。Daudi 细胞以 2×10^6 细胞/孔分散在 RPMI 1640 培养基中, 与 2 倍连续稀释的 125 -13H5(20 nM 至 20 pM)+/- IFN α 2a (10 nM)混合。培养板在摇床上 4 $^{\circ}$ C 温育 2 小时, 之后用 RPMI 洗涤, 风干。将滤纸转移到玻璃管上, 分析放射性。为了确定依赖 IFN α 2a 的结合, 从在 IFN α 2a 存在下测量的结果中减去对于单独 125 -13H5 结合测量的 CPM 值。来自几个实验的代表性结果显示在图 8 中。该结果显示在 IFN α 2a 存在下 125 -13H5 与 Daudi 细胞剂量依赖性地可饱和结合, 但是与单独的 125 -13H5 的结合可忽略。13H5 的 IFN α 依赖性的特异性结合在图 8 中用圆圈表示, 其计算是从在 IFN α 存在下 13H5 结合的总 CPM 中减去单独抗体的 CPM(代表非特异性结合)。

因此, 总结起来, 13H5 的作用机制是非竞争性的, 其中与 13H5 结合的 IFN α 的复合物能够与细胞表面上的 IFNAR 结合, 通过阻断通过 IFNAR 的信号传导中和 IFN α 的生物活性。

实施例 9: 使用 13H5 的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性试验

由于在 IFN α 的存在下 13H5 能够与细胞表面结合, 使用 51 Cr 释放试验研究了抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。Raji 细胞用作新鲜人单核细胞裂解的靶标。通过 Ficoll Hypaque 密度梯度离心从肝素化全血中纯化单核细胞。靶细胞用每 10^6 个细胞 100 μ Ci 51 Cr 标记 1 小时, 之后分散到 U 形底微量滴定板中, 每孔 10^4 个细胞, 并与效应细胞混合(效靶比=50:1)+抗体滴定。37 $^{\circ}$ C 温育 4 小时后, 收集上清液条件培养基, 分析放射性。没有抗体情况下放射性的释放作为背景对照, 去污剂处理

靶细胞用来确定 100%裂解。细胞毒性用下面的公式计算： $\%裂解 = (\text{实验 cpm} - \text{靶泄露 cpm}) / (\text{去污剂裂解 cpm} - \text{靶泄露 cpm})$ 。比裂解 = 含 13H5 时的%裂解 - 不含 13H5 时的%裂解。试验一式三份进行。

ADCC 试验的结果总结于图 9 中，证明 13H5 无论单独时还是在 IFN α 存在下，对 Raji 细胞都没有显著的 ADCC 活性。同样，同种型匹配的 IgG 也不显示活性，而阳性对照(利妥昔单抗)显示强剂量依赖性细胞毒性。这些结果表明，IFN α 介导的 13H5 与表达 IFNAR 的细胞表面的结合不足以介导 ADCC。

实施例 10: 13H5 稳定性的检测

13H5 抗体在重链 CDR2 区的 Asn-55 处含有潜在的脱酰胺位点。天冬酰胺残基的脱酰胺是利用重组 DNA 技术获得的多肽和蛋白质中的常见修饰，可导致生物活性和/或稳定性降低，尽管脱酰胺不总是与生物活性的丧失有关。天冬酰胺脱酰胺形成天冬氨酸(和异天冬氨酸)导致净电荷改变，这可以通过基于电荷的分析方法检测到。为了在加速条件(碱性 pH)下检测 13H5 的脱酰胺，使用通过 IEX-HPLC 和毛细管等电聚焦(cEIF)检测 Fab 片段的脱酰胺变体的方法。

为了加速 13H5 的脱酰胺，将该抗体暴露于碱性 pH 的缓冲液。对于起始材料，向 498 μ l PBS 和 6 μ l 100X 叠氮钠贮存液(2%溶液)中加入 102 μ l 等份的 13H5(5.9mg/ml，总共 600 μ g)。对于时间点为 0 时的 PBS 样品，130 μ l 起始材料与 30 μ l PBS 混合，将样品置于-20 $^{\circ}$ C 下直到进一步分析。对于在脱酰胺缓冲液中的时间点为 0 时的样品，130 μ l 起始材料与 15 μ l 10X 脱酰胺缓冲液(10%碳酸氢铵，pH 8.5)混合，并置于-20 $^{\circ}$ C 下直到进一步分析。对于在 PBS 中的第 2 天的样品，130 μ l 起始材料与 30 μ l PBS 混合，在 40 $^{\circ}$ C 下温育 48 小时，然后将样品置于-20 $^{\circ}$ C 下直到进一步分析。对于脱酰胺条件下的第 2 天的样品，130 μ l 起始材料与 15 μ l 10X 脱酰胺缓冲液混合，在 40 $^{\circ}$ C 下温育 48 小时。48 小时后，加入 15 μ l 的 pH 调节缓冲液，将样品置于-20 $^{\circ}$ C 下直到进一步分析。

为了制备用于分析的上述样品，进行木瓜蛋白酶消化。使用的反应

条件为：160 μ l 样品(130 μ g 13H5)，3.2 μ l 50 mM 半胱氨酸，和 6.5 μ l 在溶液中的 1.0mg/ml 木瓜蛋白酶。将样品置于 40℃下 4 小时，加入 4.8 μ l 1M 碘乙酰胺终止反应。木瓜蛋白酶消化后，进行非还原性 SDS-PAGE，以证实 Fab 和 Fc 片段的存在。

为了对样品进行 IEX-HPLC，所有样品都首先用水透析 3 小时。然后，将各 50 μ l 样品加到 HPLC 上，使用如下层析条件：

柱= Dionex WCX-10 弱阳离子交换柱

“A”缓冲液= 10 mM MES, pH 5.5

“B”缓冲液= 10mM MES, pH 5.5; 1.0 M NaCl

洗脱= 4-25 % “B”，0.8 ml/min, 30 分钟

检测= 280 nM 处的 UV 吸光度

IEX-HPLC 分析的结果总结在下面的表 7 中，显示在脱酰胺条件下时间 0 时和第 2 天样品的脱酰胺 Fab 的峰面积：

表 7

样品	峰面积 脱酰胺的 Fab	(%峰面积) 脱酰胺的 Fab	峰面积 Fab	(%峰面积) Fab	总峰面积
时间 0	89,244	6.13	1,366,233	93.87	1,455,477
第 2 天	459,759	43.95	586,428	56.01	1,046,187

为了进行 cIEF 分析，样品首先用水透析 3 小时，然后加至 cIEF 用标准方法进行分析。cIEF 分析的结果总结在下面的表 8 中，显示在脱酰胺条件下时间 0 时和第 2 天样品的脱酰胺 Fab 的峰面积：

表 8

样品	峰面积 脱酰胺的 Fab	(%峰面积) 脱酰胺的 Fab	峰面积 Fab	(%峰面积) Fab	总峰面积
时间 0	75,902	13.96	467,987	86.04	543,889
第 2 天	251,317	58.81	176,040	41.19	427,357

为了检测强制脱酰胺的 pH 依赖性，将 PBS (pH 7.0) 中第 2 天样品的

IEX-HPLC 数据与脱酰胺条件下的第 2 天样品进行比较。结果总结在下面的表 9 中，显示在脱酰胺条件下第 2 天 PBS 和第 2 天的脱酰胺 Fab 的峰面积：

表 9

样品	峰面积 脱酰胺的 Fab	(%峰面积) 脱酰胺的 Fab	峰面积 Fab	(%峰面积) Fab	总峰面积
PBS	106,344	7.0	1,413,233	93.0	1,519,577
脱酰胺的	459,759	43.95	586,428	56.01	1,046,187

该数据支持现有的蛋白质降解理论，该理论预测多肽通过 β -天冬氨酰移位机制的脱酰胺作用在碱性 pH 下比在中性 pH 下以更快的速度发生。

实施例 11：具有提高的稳定性的 13H5 突变体的制备和表征

在该实施例中，制备了在 Asn-55 处具有氨基酸置换的 13H5 突变体，并在第 2 天在强制脱酰胺条件下，通过如实施例 10 所述的 cIEF 分析检查了这些突变体的稳定性。这些突变体通过标准重组 DNA 诱变技术制备。这些突变体在 V_H 的氨基酸位点 55-58 处的序列与野生型 13H5 相比如下：

13H5 野生型： N G N T

突变体#1： D G N T

突变体#2： Q G N T

突变体#3： Q G Q T

突变体#1、#2 和 #3 的全长 V_H 氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO:34、35 和 36 中。

cIEF 分析的结果显示在下面的表 10 中，显示在第 2 天脱酰胺条件下野生型和突变体的脱酰胺 Fab 的峰面积：

表 10

样品	峰面积 脱酰胺的 Fab	(%峰面积) 脱酰胺的 Fab	峰面积 Fab	(%峰面积) Fab	总峰面积
13H5 野生型	24,065	54.2	20,304	45.8	44,369
突变体 1	10,382	9.7	96,584	90.3	106,966
突变体 2	4,592	8.0	52,460	92.0	57,052
突变体 3	7,733	8.9	79,077	91.1	86,810

这些结果证明，在强制脱酰胺条件下，三种 Asn-55 突变体均显示比野生型 13H5 抗体更高的稳定性。

序列表概述

SEQ ID NO:	序列	SEQ ID NO:	序列
1	VH CDR1 a.a. 13H5	19	VH a.a. 13H5
2	VH CDR1 a.a. 13H7	20	VH a.a. 13H7
3	VH CDR1 a.a. 7H9	21	VH a.a. 7H9
4	VH CDR2 a.a. 13H5	22	VK a.a. 13H5
5	VH CDR2 a.a. 13H7	23	VK a.a. 13H7
6	VH CDR2 a.a. 7H9	24	VK a.a. 7H9
7	VH CDR3 a.a. 13H5	25	VH n.t. 13H5
8	VH CDR3 a.a. 13H7	26	VH n.t. 13H7
9	VH CDR3 a.a. 7H9	27	VH n.t. 7H9
10	VK CDR1 a.a. 13H5	28	VK n.t. 13H5
11	VK CDR1 a.a. 13H7	29	VK n.t. 13H7

12	VK CDR1 a.a. 7H9	30	VK n.t. 7H9
13	VK CDR2 a.a. 13H5	31	VH 1-18 种系 a.a.
14	VK CDR2 a.a. 13H7	32	VH 4-61 种系 a.a.
15	VK CDR2 a.a. 7H9		
		33	VK A27 种系 a.a.
16	VK CDR3 a.a. 13H5		
17	VK CDR3 a.a. 13H7	34	VH a.a. 13H5 N55D 突变
18	VK CDR3 a.a. 7H9	35	VH a.a. 13H5 N55Q 突变
		36	VH a.a. 13H5 N55Q 突变 N57Q 突变
		37	VH a.a. 13H5 G56A 突变

抗-IFN α 13H5 VH

V段: 1-18
D段: 未确定
J段: JH4b

```

      Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S
V
1  CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA
   GTG

                                     CDR1 (SEQ ID NO:1)
                                     ~~~~~~
      K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  S  I  S
W
55  AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC AGC TAT AGT ATC AGC
   TGG

                                     CDR2
                                     ~~~~~~
      V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  S  V
Y
109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AGC GTT
   TAC

                                     CDR2 (SEQ ID NO:4)
                                     ~~~~~~
      N  G  N  T  N  Y  A  Q  K  F  Q  G  R  V  T  M  T
T
163 AAT GGT AAC ACA AAC TAT GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC
   ACA

      D  T  S  T  S  T  A  Y  L  E  L  R  S  L  R  S  D
D
217 GAC ACA TCC ACG AGC ACA GCC TAC CTG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC
   GAC

                                     CDR3 (SEQ ID NO:7)
                                     ~~~~~~
      T  A  V  Y  Y  C  A  R  D  P  I  A  A  G  Y  W  G
Q
271 ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CCC ATA GCA GCA GGC TAC TGG GGC
   CAG

      G  T  L  V  T  V  S  S
325 GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
                                     (SEQ ID NO:19)
                                     (SEQ ID NO:25)
```

图 1A

抗-IFN α 13H5 VK

V段: A27
J段: JK1

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
      R
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
      AGA

                                CDR1 (SEQ ID NO:10)
                                ~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   T   Y   L   A
      W
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC
      TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S
      S
109  TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC
      AGC

      CDR2 (SEQ ID NO:13)
      ~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D
      F
163  AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC
      TTC

      ~~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C
      Q
217  ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
      CAG

      CDR3 (SEQ ID NO:16)
      ~~~~~
                                (SEQ ID NO:22)
      Q   Y   G   S   S   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I
      K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC
      AAA

                                (SEQ ID NO:28)
```

图 1B

抗-IFN α 13H7 VH

V段: 4-61
D段: 3-10
J段: JH4b

```

      Q  V  Q  L  Q  E  S  G  P  G  L  M  K  P  S  E  T
1  L
  CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG ATG AAG CCT TCG GAG ACC
  CTG

                                CDR1 (SEQ ID
NO:2)

-----
  S  L  T  C  T  V  S  G  G  S  V  S  S  G  S  Y  Y
55 W
  TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT AGT TAC TAC
  TGG

-----
  S  W  I  R  Q  P  P  G  M  G  L  E  W  I  G  Y  I
109 Y
  AGC TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG ATG GGA CTG GAG TGG ATT GGT TAT ATC
  TAT

                                CDR2 (SEQ ID NO:5)
-----
  S  G  G  G  A  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I
163 S
  TCC GGG GGA GGC GCC AAC TAC AAC CCT TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA
  TCA

  V  D  T  S  K  N  Q  F  S  L  K  L  N  S  V  T  A
217 A
  GTG GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG ACC GCT
  GCG

                                CDR3 (SEQ ID NO:8)
-----
  D  T  A  V  Y  F  C  A  R  G  I  P  M  V  R  G  I
271 L
  GAC ACG GCC GTG TAT TTC TGT GCG AGA GGA ATT CCT ATG GTT CGG GGA ATT
  CTT

-----
  H  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S
325
  CAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA (SEQ ID NO:20)
                                (SEQ ID NO:26)
```

图 2A

抗-干扰素 α 7H9 VH

V段: 1-18
D段: 6-6
J段: JH4b

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S

V

1 CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC TCA GTG

CDR1 (SEQ ID NO:3)

K V S C K A S G Y T F S S Y G I S

W

55 AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAT ACC TTT TCC AGC TAT GGT ATC AGC TGG

CDR2

V R Q A P G Q G L E W M G W I S A

Y

109 GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGA CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AGC GCT TAC

CDR2 (SEQ ID NO:6)

N G N T N Y L Q K L Q G R V T L T

T

163 AAT GGT AAC ACA AAC TAT CTA CAG AAG CTC CAG GGC AGA GTC ACC CTG ACC ACA

D T S T N T A Y M E L R S L R S D

D

217 GAC ACA TCC ACG AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGG AGC CTG AGA TCT GAC GAC

CDR3 (SEQ ID NO:9)

T A V Y Y C T R D P I A A G Y W G

Q

271 ACG GCC GTG TAT TAC TGT ACG AGA GAT CCC ATA GCA GCA GGT TAC TGG GGC CAG

G T L V T V S S

(SEQ ID NO:21)

325 GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

(SEQ ID NO:27)

图 3A

抗-干扰素 α 7H9 VK

V段: A27

J段: JK1

```

      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
      R
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA
      AGA

                                CDR1 (SEQ ID NO:12)
                                ~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   T   Y   L   A
      W
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC
      TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S
      S
109  TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC
      AGC

      CDR2 (SEQ ID NO:15)
      ~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D
      F
163  AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC
      TTC

      CDR3
      ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C
      Q
217  ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT
      CAG

                                CDR3 (SEQ ID NO:18)
                                ~~~~~
                                (SEQ ID NO:24)
      Q   Y   G   S   S   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I
      K
271  CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC
      AAA

                                (SEQ ID NO:30)

```

图 3B

抗-IFN α V_H区

1-18 种系:	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	G	I	S	W	V	R	Q
13H5 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7H9 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1-18 种系:	A	P	G	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	S	A	Y	N	G	N	T	N	Y	A	Q	K	L	Q	G	R	V	T	M	T	T	D	T	S	T	S	T
13H5 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7H9 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

1-18 种系:	A	Y	M	E	L	R	S	L	R	S	D	D	T	A	V	Y	C	A	R																			
13H5 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7H9 V _H :	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

																																					</		

图 4

抗-IFNα V_H区

4-61 种系:
13H7 VH:

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R Q P
- - - - - M - - - - - CDR1 - - - - -

4-61 种系:
13H7 VH:

P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L
- - M - - - - - S G - G A - - - - - CDR2 - - - - -

4-61 种系:
13H7 VH:

S S V T A A D T A V Y C A R
N - - - - - F - - - - - G I P M V R G I L H Y W G Q G T L V T V S S (JH4b)
(SEQ ID NO:32) CDR3 - - - - -

图 5

抗-IFNα V_K 区

A27 种系:	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	Y	L	A
13H5 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7H9 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	
13H7 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	

A27 种系:	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	T
13H5 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7H9 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13H7 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A27 种系:	D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S	P								
13H5 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)	
7H9 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK1)	
13H7 VK:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(JK2)	

图 6

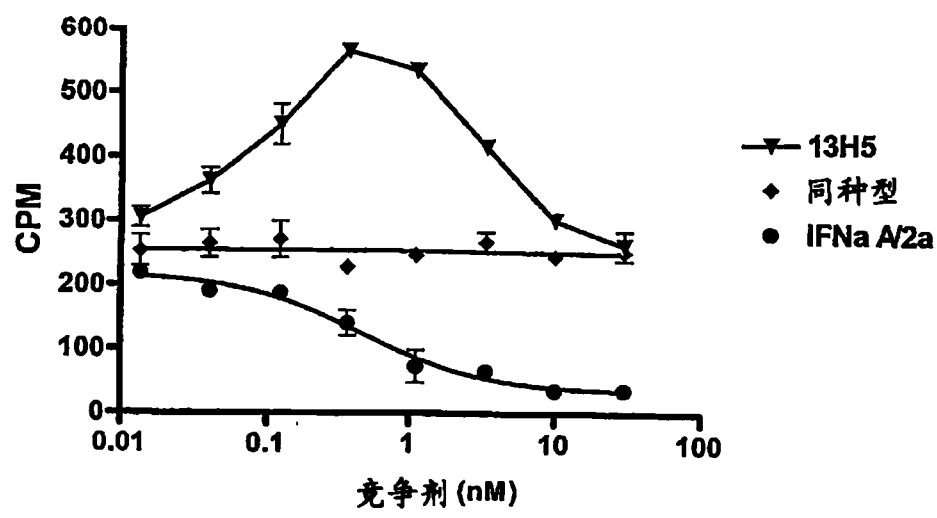


图 7

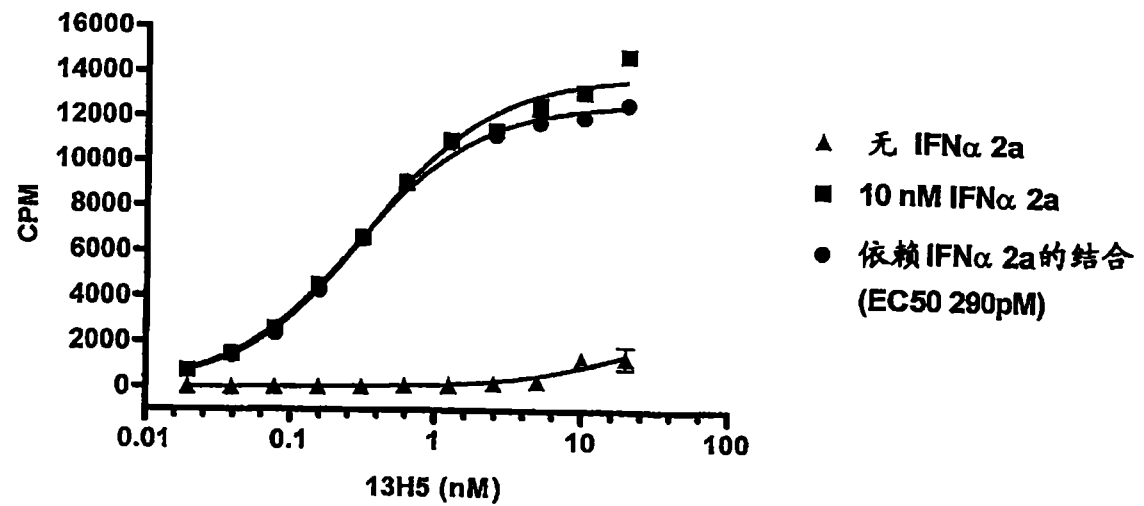


图 8

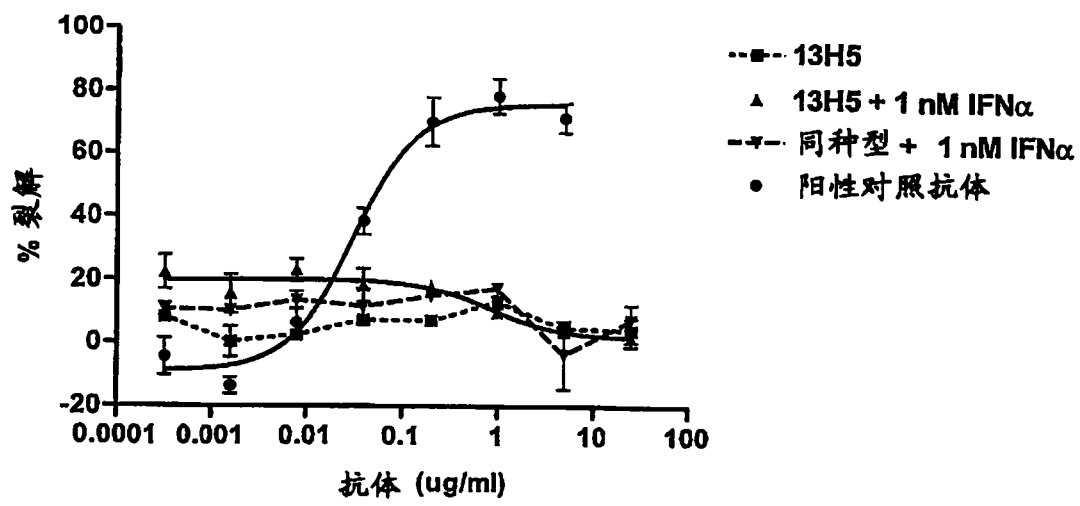


图 9