



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101155831 B

(45) 授权公告日 2015.08.19

(21) 申请号 200680011269.3

(22) 申请日 2006.02.09

(30) 优先权数据

60/652,233 2005.02.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007.10.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/004643 2006.02.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/086586 EN 2006.08.17

(73) 专利权人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 J·邦歇罗 K·普里利曼

V·帕斯夸尔 A·K·帕卢卡

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 刘冬 梁谋

(51) Int. Cl.

C07K 16/24(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

(56) 对比文件

WO 200403211 A, 2004.01.08, 全文, 尤其是 SEQ ID NO:13.

WO 200403211 A, 2004.01.08, 全文, 尤其是 SEQ ID NO:13.

MAREE L. O. et al. FUNCTIONAL ANALYSIS OF INTERFERON- α SUBTYPES USING MONOCLONAL ANTIBODIES TO INTERFERON- α 4a-SUBTYPE REACTIVITY, NEUTRALISATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND EPITOPE ANALYSIS. 《Molecular Immunology》. 1992, 参见摘要, 第 391 页右栏第 2 段 - 第 398 页左栏第 3 段, 尤其是表 2、表 3 和图 5.

MAREE L. O. et al. FUNCTIONAL ANALYSIS OF INTERFERON- α SUBTYPES USING MONOCLONAL ANTIBODIES TO INTERFERON- α 4a-SUBTYPE REACTIVITY, NEUTRALISATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES AND EPITOPE ANALYSIS. 《Molecular Immunology》. 1992, 参见摘要, 第 391 页右栏第 2 段 - 第 398 页左栏第 3 段, 尤其是表 2、表 3 和图 5.

审查员 马岚

权利要求书1页 说明书42页

序列表8页 附图12页

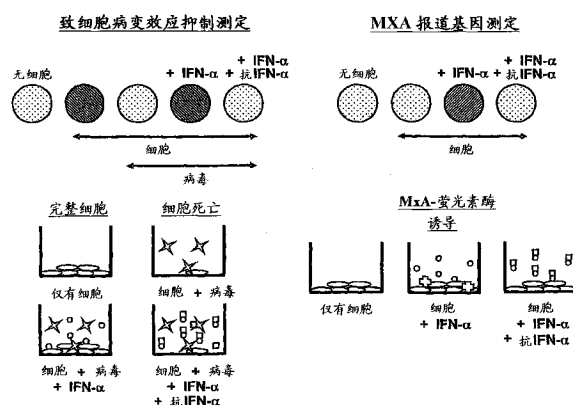
(54) 发明名称

抗干扰素 α 单克隆抗体及其使用方法

(57) 摘要

本发明包括含有抗体的组合物和方法, 所述抗体能选择性中和蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 中的至少两种干扰素 α (“IFN α ”) 蛋白亚型的生物活性, 但不中和 IFN α 蛋白亚型 D 的至少一种生物活性。用于测定的生物活性实例包括 MxA 启动子活化或抗病毒活性和变体、衍生物及其片段。本发明也包括能产生抗体的宿主细胞、杂交瘤和浆细胞瘤。因为本发明的抗体具有独特的选择性和亲和性, 所以它们可用于检测样品或组织中的 IFN α 亚型和 / 或用于治疗性应用, 包括但不限于治疗和 / 或改善 IFN α 相关疾病, 例如系统性红斑狼疮 (SLE)、狼

疮、I 型糖尿病、银屑病、AIDS 和移植物抗宿主病。



1. 一种抗体或其抗原结合片段,其包含 SEQ ID NO: 2 的重链可变区和 SEQ ID NO: 10 的轻链可变区,

其中所述抗体或抗原结合片段特异性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 D 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化或抗病毒活性。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 或 sFv 片段。

3. 一种抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体由 ATCC 保藏号为 PTA-6557 的杂交瘤产生。

4. 一种 ATCC 保藏号为 PTA-6557 的杂交瘤。

5. 一种组合物,所述组合物包含权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

6. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

7. 权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗至少一种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的干扰素 α (“IFN α ”) 蛋白亚型的异常表达相关的疾病或病症的药物中的用途。

8. 权利要求 7 的用途,其中所述疾病或病症选自移植物抗宿主病、1 型糖尿病、AIDS、狼疮、银屑病和自身免疫性甲状腺炎。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述狼疮是系统性红斑狼疮。

10. 一种宿主细胞,其包含编码权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸。

11. 一种分离的核酸,其编码权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

12. 一种药盒,所述药盒包含:

装有权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段的小瓶。

抗干扰素 α 单克隆抗体及其使用方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于诊断和治疗患者的干扰素- α (IFN α) 表达异常水平相关疾病的方法和组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 人干扰素 (IFN) 是功能相关的细胞因子,可以调节先天性及适应性免疫应答。主要根据序列同源性,将它们分为两组:I 型和 II 型。I 型 IFN 包括 6 类 (IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、IFN- κ 、IFN- ϵ 和 IFN- λ)。IFN- α 、 β 、 ω 和 κ 通过相同 IFN 受体 IFNAR 起作用。IFN- λ 与不同受体 IFNLR 结合。IFN- ϵ 的受体目前尚不知道。II 型 IFN 由单独一类 (IFN- γ) 组成,与受体 IFNGR 结合。尽管在病毒感染期间 I 型 IFN 被强烈诱导,但 II 型 IFN 却主要是在响应免疫和炎性刺激时而被诱导,因此 IFN- γ 经常被称为“免疫 IFN”。众多 I 型 IFN 中研究最多的包括 IFN- α 、IFN- β 和 IFN- ω 。其中 IFN- α 最复杂,包括至少 15 种不同蛋白亚型,表现出超过 75% 的序列同源性。Diaz (1995) Semin. Viro. 6:143-149; Weissmann 等 (1986) Prog Nucl Acid Res Mol Biol 33:251; J Interferon Res (1993) 13:443-444; Roberts 等 (1998) J Interferon Cytokine Res 18:805-816。IFN- α 基因及其产物除了具有结构相似性外,也表现出功能相似性。例如,它们由 dsRNA 或病毒诱导,可以与相同受体 (IFN α / β 受体 IFNAR) 相互作用。Mogensen 等 (1999) J Interferons and other Regulatory Cytokine, John Wiley & Sons。IFN α 也抑制细胞凋亡,促进抗原活化 T 辅助细胞的存活和分化,并促进功能有效单核细胞衍生的树突细胞的成熟。

[0004] 当接触病毒和 dsRNA 时,许多细胞类型都可产生 IFN α 。特化的白细胞 (称为干扰素- α 产生细胞 (“IPC”)) 在响应各种刺激 (例如病毒、细菌和原生动物) 时产生 IFN α 。一些体外研究表明,在人外周血单核细胞 (PBMC) 感染后,不同 IFN- α 亚型在不同程度上由各种 IFN- α - 分泌细胞系产生或者以病毒类型特异性方式产生,并且这些方式通常与抗增殖、抗病毒和抗肿瘤活性上的亚型依赖性差异相关。然而,不同亚型及其彼此在体内的协同或拮抗活性的生理意义仍未确定。

[0005] 在几种自身免疫性疾病中观察到 IFN- α 是病理介导体。此外,它在用 IFN- α 治疗癌症和病毒感染的患者中可引起自身免疫性疾病发展。在胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM 或 I 型糖尿病)、银屑病、节段性回肠炎 (Crohn's disease) 和乳糜泻患者的局部患病组织中都观察到 IFN- α 表达增加。在系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE)、IDDM 和 AIDS 患者中观察到 IFN- α 的过量表达。就以富含自身反应型 B 和 T 细胞为特征的 SLE 而言,不仅在组织病灶中而且在受累个体血液循环中都观察到 IFN- α 的表达。此外,IFN- α 血清水平倾向于与临床疾病活性指数相关。人们认为,这是因为当 IFN- α 的产生受到浆细胞样 DC (plasmacytoid DC, pDC) 上调时而触发正常静息单核细胞经循环诱导,生成强效抗原呈递树突细胞 (DC) 所致。的确,本发明人先前已经通过寡核苷酸微阵列分析证明,通过涉及粒细胞生成和 IFN 诱导的未调节基因的“标记 (signature)”而区别 SLE; 当高剂量输注糖皮质激素时,这些标记恢复正常 (美国专利申请 11/228,586, 所述文献通过引用结合到本文中)。

[0006] 系统性红斑狼疮 (SLE) 是全身性自身免疫性风湿性疾病, 尤其会侵袭儿童, 其特征是突发高致病率。自身免疫性疾病例如 SLE 通常表现出复发和缓解的自身延续性循环 (self-perpetuating cycle)。这些循环通常按照给予通用治疗方案以平息 SLE 疾病循环的治疗期来定义。FDA 批准的 SLE 治疗方案包括皮质类固醇、非甾体免疫抑制药、抗疟药和非甾体抗炎药。这些药物破坏了所有免疫效应物反应的完整性, 而不是专门针对 SLE 发病机制起作用。SLE 成为无法满足的医学要求, 因为这些治疗仅部分有效, 且具有中度至严重副作用, 包括骨质疏松 (bone thinning)、体重增加、痤疮、贫血、不育、皮疹、腹泻、脱发和恶心。此外, 在 40 年内没有新型 SLE 治疗药获得批准。

[0007] 目前已将 SLE 与未减弱的 $\text{IFN}\alpha$ 的产生紧密联系起来。Shi 等 (1987) Br. J. Dermatol. 117(2) :155-159。 $\text{IFN}\alpha$ 在 SLE 血清 (Crow 等 (2004) Curr. Opin. Rheumatol. 16(5) :541-547) 和作为 $\text{IFN}\alpha$ 的主要来源的浆细胞样 DC (pDC) 中以升高水平存在, 在 SLE 皮肤中累积。Farkas 等 (2001) Am. J. Pathol. 159(1) :237-243。此外, 已经观察到经 $\text{IFN}\alpha$ 治疗的某些患者狼疮进一步生长 (Okanoue 等 (1996) J. Hepatol. 25(3) :283-291; Tothova 等 (2002) Neoplasma 49(2) :91-94; 和 Raanani 等 (2002) Acta Haematol. 107(3) :133-144), 并且具有 $\text{IFN}\alpha$ 抗体的狼疮患者表现出更温和的疾病形式。Von Wussow 等 (1988) Rheumatol. Int. 8(5) :225-230。 $\text{IFN}\alpha$ 可通过单核细胞向功能性树突细胞 (DC) 分化而起作用, 这样的分化反过来又介导 SLE 发病机理。Pascual V. 等 (2003) Curr. Opin. Rheumatol. 15(5) :548-556。治疗 SLE 的一个建议性方法是中和 $\text{IFN}\alpha$ (参见 Banchereau 等, PCT/US02/00343, 所述文献通过引用结合到本文中)。

[0008] 尽管已制备出可阻断人 $\text{IFN}-\alpha$ 生物活性的单克隆抗体, 但是迄今为止并无它可中和所有 15 种已知亚型的相关报道, 而且也很少能中和天然来源的含 $\text{IFN}-\alpha$ 白细胞 IFN 。PBL Biomedical Laboratories 提供 10 种小鼠单克隆抗体, 它们可结合多种人 $\text{IFN}\alpha$ 基因亚型 (参见万维网 Interferonsource.com/relativespecificity.html)。然而, 每种 PBL 抗体都可结合由人 $\text{IFN}\alpha$ 基因亚型 1 编码的 $\text{IFN}\alpha$ 蛋白亚型 ($\text{IFN}\alpha$ 蛋白亚型 D) 并且可结合 1-12 种其它 $\text{IFN}\alpha$ 亚型。美国专利公布号 2003/0166228A1 公开了来自用白细胞 $\text{IFN}\alpha$ (其包括所有 $\text{IFN}\alpha$ 蛋白亚型) 免疫小鼠的单克隆抗体 (称为 9F3)。9F3 Mab 可结合并中和由 7 种人 $\text{IFN}\alpha$ 基因亚型 1、2、4、5、8、10 和 21 (分别编码 $\text{IFN}\alpha$ 蛋白亚型 D、A、4、G、B2、C 和 F) 所编码的蛋白质的抗病毒活性, 而不中和人 $\text{IFN}\beta$ 的抗病毒活性。该专利公布说明书没有公开 9F3 抗体是否能结合并钝化其它 8 种 $\text{IFN}\alpha$ 基因亚型, 也没有公开它是否与 $\text{IFN}\alpha$ 蛋白亚型 4a 和 4b 中的一种或两种都结合。PCT 公布说明书提出用单克隆抗体治疗 $\text{IFN}\alpha$ 表达增加的相关疾病, 特别是自身免疫病例如胰岛素依赖型糖尿病和 SLE。然而, 尚不知道 9F3 抗体是否足以中和 SLE 血清中存在的 $\text{IFN}\alpha$ 蛋白亚型的生物活性。

[0009] 因为 $\text{IFN}\alpha$ 是免疫应答的多功能介导体, 具有有益的抗病毒活性, 所以对所有 $\text{IFN}\alpha$ 亚型的完全抑制或明显下调并非最佳治疗方法。因此, 需要能够选择性中和病理状况相关的 $\text{IFN}\alpha$ 亚型的药物。本发明即可满足该要求并提供相关优势。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供能中和特定 $\text{IFN}\alpha$ 亚型的单克隆抗体及其衍生物。本发明的抗体可用于改善和治疗 $\text{IFN}\alpha$ 表达增加的相关疾病, 例如 SLE、银屑病、I 型糖尿病、AIDS、移植物抗宿主病和其它自身免疫性疾病。一方面, 本发明包括这样的抗体: 所述抗体能选择性中和至少

两种干扰素 α (“IFN α ”) 蛋白亚型 (例如亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA) 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D 的至少一种生物活性;其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化或抗病毒活性。优选的抗体是单克隆抗体。在一个实施方案中,抗体不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D,也不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 1。在一个实施方案中,单克隆抗体是 ACO-1 或 ACO-2。优选的本发明抗体钝化自系统性红斑狼疮 (SLE) 患者体内分离出的血清刺激单核细胞分化成树突细胞的能力。

[0012] 另一方面,本发明提供一种包含重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中轻链可变区包含下列 CDR、其衍生物或部分:

[0013] V_L1 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:12;

[0014] V_L2 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:14;和

[0015] V_L3 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:16;

[0016] 其中抗体或抗原结合片段能中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 D 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。

[0017] 另一方面,本发明提供一种包含轻链可变区和重链可变区的抗体或其抗原结合片段,其中重链可变区包含下列 CDR、其衍生物或部分:

[0018] V_H1 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:4;

[0019] V_H2 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:6;和

[0020] V_H3 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:8;

[0021] 其中抗体或抗原结合片段特异性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明提供抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含至少一条轻链或其抗原结合片段以及至少一条重链或其抗原结合片段,其中所述轻链或其抗原结合片段包含下列 CDR、其衍生物或部分:

[0023] V_L1 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:12;

[0024] V_L2 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:14;和

[0025] V_L3 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:16;和

[0026] 所述重链或其抗原结合片段包含下列 CDR、其衍生物或部分:

[0027] V_H1 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:4;

[0028] V_H2 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:6;和

[0029] V_H3 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO:8。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明提供抗体,所述抗体能选择性中和 IFN α 蛋白亚型 4a 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 4b 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化和/或抗病毒活性。优选的抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、C、I、K 和 4a 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D、F、G、4b 和 1 的生物活性。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体 ACO-3。

[0031] 本发明也提供抗体,所述抗体能选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2 和 C 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D、4b 和 1 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动

子的活化和 / 或抗病毒活性。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体 ACO-4。

[0032] 另一方面,本发明提供抗体,所述抗体能选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、G、H2、K、WA 和 1 的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 B2 和 D 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化和 / 或抗病毒活性。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体 ACO-5。

[0033] 又一方面,本发明包括单克隆抗体,所述单克隆抗体可选择性中和 IFN α 蛋白亚型 2 和 C 的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 A、B2、C、D、F 和 1 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体 ACO-6。

[0034] 另一方面,本发明提供抗体,所述抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、F、I、4a、4b 和 1 的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 C、H2、K 和 WA 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体 ACO-8。

[0035] 在再一实施方案中,本发明提供抗体,所述抗体能选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、D、F、I、J1、4a、4b 和 1 的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 C、G、H2、K 和 WA 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。

[0036] 本发明的抗体、其衍生物或其片段可以是小鼠、大鼠、人或其它哺乳动物抗体或其片段或其人源化或嵌合形式。本发明的抗体包括小鼠单克隆抗体(例如 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6 和 ACO-8)及其人源化形式、嵌合形式或其片段。本发明还提供抗体,所述抗体所结合的 IFN α 表位与鼠单克隆抗体 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6 和 ACO-8 所结合的 IFN α 表位基本上相同。本发明还提供包含本发明抗体的宿主细胞、杂交瘤、组合物、药用组合物和药盒。

[0037] 本发明的抗体、其衍生物或其片段可用于治疗 IFN α 过量表达相关疾病或病症,包括但不限于 SLE、银屑病、AIDS、I 型糖尿病和自身免疫性甲状腺炎,并且可用于制备治疗所述疾病和病症的药物。本发明的抗体也可用于区别或纯化不同 IFN α 亚型。

[0038] 另一方面,本发明提供包含多核苷酸的分离的核酸,所述多核苷酸编码选自 SEQ ID NO :2 ;SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :16 的多肽或者与其具有至少 80% 序列同一性的多肽。优选的多核苷酸选自 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :13 和 SEQ ID NO :15。

[0039] 另外,本发明提供蛋白质或肽,所述蛋白质或肽选自 SEQ ID NO :2 ;SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :16 或者与其具有至少 80% 序列同一性的蛋白质或肽。另一方面,本发明提供制备杂交瘤细胞系的方法,所述方法包括:用包含重组 IFN α 亚型 A、B2 和 F 的组合物免疫哺乳动物;将来自免疫哺乳动物的脾细胞与骨髓瘤细胞系融合以产生杂交瘤;然后鉴定能产生单克隆抗体的杂交瘤细胞系,所述单克隆抗体能选择性中和一种或多种选自 2、C、G、I、J1、K、4a、4b 和 WA 和 1 的 IFN α 蛋白亚型,但不选择性中和 IFN α 蛋白亚型 D。

[0040] 本发明还包括能产生具有上述特异性的抗体的宿主细胞和杂交瘤细胞系,所述特异性例如特异性结合一种或多种干扰素 α (“IFN α ”) 蛋白亚型(A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA),但不中和例如 IFN α 蛋白亚型 D 的生物活性。抗体和 / 或杂交瘤细胞系可以与载体(例如药学上可接受的载体)结合,用于诊断及治疗方法。抗体可用于检测特定 IFN α 亚型并诊断、预测、治疗和 / 或改善 IFN α 相关疾病的症状。所述疾病的实例包

括但不限于 SLE、银屑病、I 型糖尿病、移植物抗宿主 (GVH) 病、AIDS、自身免疫性甲状腺炎和其它自身免疫病。本发明的抗体也可用于在体外或体内中和和 / 或分离这些 IFN α 亚型。

[0041] 附图简述

[0042] 为了更充分地理解本发明的特征和优势,请参考发明详述和附图,附图中:

[0043] 图 1 表示报道基因 (RG) 测定和致细胞病变效应抑制测定 (CPE) 的示意图。在 CPE 测定图示中,填充圆圈代表活的完整细胞。未填充圆圈代表死细胞,是因病毒感染而死。在 RG 测定图示中,填充圆圈和细胞以及“+”代表萤光素酶表达,而未填充圆圈和细胞代表缺乏萤光素酶表达。

[0044] 图 2 表示 IFN α MAbs 开发方案的流程图。

[0045] 图 3 表示 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4 和 ACO-5 对复杂来源 IFN 的中和作用。(a) 通过 RG 生物测定,评价指定数量的各种 MAbs 对 600pg 白细胞 IFN(Sigma) 的中和作用。根据在白细胞 IFN 存在与否以及任何 MAbs 不存在的条件下所得到的 LCPS 值,计算阻断率。数值代表一式三份测定的平均值。(b) 各 MAbs 对 PBMC- 流感病毒(稀释 640 倍)的中和作用。如前所述计算阻断率。数值代表一式三份的平均值。

[0046] 图 4 表示 ACO-1 对 15 种重组 IFN- α 亚型的中和作用。(a) 通过 RG 生物测定,评价增加浓度的 ACO-1 对指定 IFN- α 亚型的中和作用。各曲线的数值代表中点 (EC_{50}),这是根据在 ACO-1 不存在时(用 Y 轴上的空心圆来表示)所得到的 LCPS 值(每秒的发光计数)和所测定的 MAbs 最高浓度(2000ng/ml)而求出的。N. D. 表示没有 EC_{50} 值。数据点来自三次重复测定。(b) 增加浓度的 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-8 缺乏对 IFN- α 的中和作用。数据点来自三次重复测定。

[0047] 图 5 表示单克隆抗体 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-6 的多元分析(Multiplex analysis) 结果。

[0048] 图 6 表示单克隆抗体 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-6 对 IFN α 亚型的固相结合测定结果。

[0049] 图 7 表示经 CPE 测定而评价的 SLE 患者血清样品 SLE-43(a)、SLE-133(b)、SLE-140(c) 和 SLE-BD(d) 的生物活性的中和作用。所测 MAbs 数量是指定的。对照包括仅有血清、仅有介质(-) 和泛中和(pan-neutralizing) 多克隆抗体(pAb, 兔和抗人 IFN α , PBL)。数值代表一式三份测定的平均值。

[0050] 图 8A-C 表示 ACO-1(A)、ACO-2(B) 和 ACO-3(C) 与 156pg/ 孔猕猴 IFN 的交叉反应性。

[0051] 图 9 表示 ACO-1 重链的 cDNA 和氨基酸序列。编码 V_H1 、 V_H2 和 V_H3 CDR 的 DNA 序列用斜体字表示,而相应氨基酸序列带有下列划线。

[0052] 图 10 表示 ACO-1 轻链的 cDNA 和氨基酸序列。编码 V_L1 、 V_L2 和 V_L3 CDR 的 DNA 序列用斜体字表示,而相应氨基酸序列带有下列划线。

[0053] 发明详述

[0054] 尽管在下文详细讨论了本发明各实施方案的产生和使用,但是应当理解,本发明提供了许多可在各种各样的特定情况下具体实施的应用性发明构思。本文讨论的具体实施方案仅仅是以具体方式进行说明,以便产生和使用本发明,而不得视为对本发明范围的限制。

[0055] 为了便于理解本发明,下文定义了很多术语。本文定义的术语具有本发明相关领域普通技术人员公知的含义。例如,术语前不加数词限定则不仅是指单数实体,而是包括通用类型,其中具体实例可用于说明的目的。本文的术语用于描述本发明的具体实施方案,但是它们的用法并不限制本发明,除非如权利要求书所概括。例如,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。所有的数值,例如 pH、温度、时间、浓度和分子量包括范围,都是近似值,其可以 0.1 的增量变化 (+) 或 (-),即变化幅度为 ± 0.1 。可以理解,尽管并非总有明确说明,但是所有数值前面都带有术语“约”。尽管并非总有明确说明,也可理解,本文所述的试剂仅仅是示例性的,它们的等同试剂是本领域已知的。

[0056] 本文所用的术语“抗体”是指所有类型和亚类的完整免疫球蛋白。术语“抗体”也包括单克隆抗体、抗体片段和抗体片段克隆。“抗体片段”包括含有完整抗体的抗原结合区或可变区的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;单链抗体分子、由抗体片段构成的多特异性抗体;Fd 片段包括 VH 区和 CH 区;Fv 片段包括抗体单臂 VL 区和 VH 区,即 dAb 片段 (Ward 等 (1989) *Nature* 341 :544-546),其包括 VH 区;和分离的互补决定区 (CDR)。“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的 VH 区和 VL 区,其中这些区域以单一多肽链形式存在。通常,scFv 多肽还包含 VH 区与 VL 区之间的多肽接头,其可使 scFv 形成所需结构,用于抗原结合。有关 scFv 的综述参见 Pluckthun (1994) 载于 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第 113 卷, Rosenburg 和 Moore 主编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页, Dall'Acqua 和 Carter (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 :443-450, Hudson (1999) *Curr. Opin. Immunol.* 11 :548-557, Bird 等 (1988) *Science* 242 :423-426 和 Huston 等 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :5879-5883。任何上述抗体片段都可用本领域技术人员已知技术来获取,按照与完整抗体相同的方式筛选片段的结合特异性和中和活性。可从鼠、兔、大鼠、人、绵羊、犬等任何合适的生物来源中分离抗体。“天然存在的”或“天然”抗体是异型四聚体糖蛋白,通常分子量约 150-200kD。异型四聚体包含两条相同的轻 (L) 链和两条相同的重 (H) 链。每条轻链通过二硫键与重链共价连接。

[0057] 本文所用的术语“抗体衍生物”是指包括能结合表位的分子,其为本发明天然单克隆抗体的修饰物或衍生物。衍生物包括但不限于例如双特异性、多特异性、异种特异性、三特异性、四特异性、多特异性的抗体、嵌合体、重组体和人源化抗体。

[0058] 本文所用的术语“抗体变异体”是指在并非小鼠的物种中产生的抗体或选自 ACO-1 至 ACO-6 和 ACO-8 的抗体的抗体同种型。术语“抗体变异体”也包括含有翻译后修饰为抗体或片段的线状多肽序列的抗体。它还包括完整的人抗体。

[0059] 本文所用的术语“单克隆抗体”是指得自基本同质的抗体群体的抗体 (包括抗体片段),即群体中的各个抗体是相同的,除了少量可能的天然存在的突变之外,这些抗体也是本发明的组成部分,只要它们表现出所需生物活性。单克隆抗体是高度特异性的,只针对单一表位。单克隆抗体可通过在生物反应器 (象腹水一样) 中由杂交瘤培养物合成或者通过重组方法制备,例如在细菌、酵母、植物、昆虫和 / 或动物细胞中进行体外翻译。因此,修饰词“单克隆” (modifier “monoclonal”) 是指得自基本同质的抗体群体的抗体特征,并不受到任何特定方法产生的抗体的限制。例如,本发明所用的单克隆抗体可以通过 Kohler 等 (1975) *Nature*, 256 :495 首次描述的杂交瘤方法来制备,或者通过重组 DNA 方法制备 (参见例如 U. S. 4, 816, 567)。“单克隆抗体”包括但不限于人单克隆抗体、人源化单克隆抗体、

重组人抗体、分离自噬菌体抗体文库及其衍生物的含有抗原识别和结合位点的抗体片段克隆 (Fv 克隆)。(参见 Clackson 等 (1991) *Nature*, 352 :624-628 ;和 Marks 等 (1991) *J Mol Biol* 222 :581-597)。单克隆抗体也包括“嵌合”抗体 (免疫球蛋白),其中,例如部分重链和 / 或轻链与来自特定物种的抗体的相应序列相同或同源,或者隶属于特定抗体类型或亚类,尽管链或其部分的其余部分与来自另一物种的抗体的相应序列相同或同源,或者隶属于另一抗体类型或亚类,以及所述抗体的片段,只要它们表现出所需生物活性 (U. S. 4, 816, 567 ; Morrison 等, (1984) *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 :6851-6855)。

[0060] 本文所用的术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性的抗体,其具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。

[0061] 本文所用的术语“人抗体”是指具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体包含的氨基酸残基不由人种系免疫球蛋白序列编码 (例如经随机或定点体外诱变而引入突变或通过体内体细胞突变)。然而,本文所用的术语“人抗体”并不包括这样的抗体:其中来自另一哺乳动物物种 (例如小鼠) 种系的 CDR 序列移植到人构架序列上。因此,本文所用的术语“人抗体”是指这样的抗体:其中蛋白质的几乎每一部分 (例如 CDR、构架、CL、CH 区 (例如 CH₁、CH₂、CH₃)、铰链、(VL、VH)) 基本上对人体是非免疫原性的,只有少量序列变化或改变。同样,灵长类 (猴、狒狒、黑猩猩等)、啮齿类 (小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠等) 和其它哺乳动物的抗体是这些物种、亚属、属、亚科、科的特定抗体。如上所述,嵌合抗体也可包括上述抗体的任意组合。与非修饰抗体相比,这样的变化或改变任选并优选保留或降低对人或其它物种的免疫原性。因此,人抗体不同于嵌合抗体或人源化抗体。人抗体可由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白 (例如重链和 / 或轻链) 基因的非人类动物或原核细胞或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它也包含天然人抗体所没有的接头肽。例如, Fv 片段也可包含接头肽,例如 2 个至约 8 个甘氨酸或其它氨基酸残基,其连接重链可变区和轻链可变区。这样的接头肽被认为是来自人体。

[0062] 人抗体“来自”特定种系序列,如果抗体得自使用人免疫球蛋白序列的系统的話,例如通过免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或者通过筛选人免疫球蛋白基因文库。可以通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列,鉴定“来自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体。所选人抗体的氨基酸序列通常具有与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少 90% 同一性,并含有经鉴定为人抗体的氨基酸残基,当与其它物种 (例如小鼠或大鼠种系序列) 的种系免疫球蛋白氨基酸序列进行比较时。在某些情况下,人抗体的氨基酸序列与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少 95%、或者甚至至少 96%、97%、98%、或 99% 同一性。通常,与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比,来自特定人种系序列的人抗体都会显示出不超过 10 个氨基酸的差异。在某些情况下,与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比,来自特定人种系序列的人抗体都会显示出不超过 5、甚至不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸的差异。

[0063] 本文所用的术语“人源化”是指使用部分非人类 (例如小鼠或大鼠) 抗体,其用于人免疫球蛋白主链上,以制备嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合亚序列),其具有来自非人类免疫球蛋白的序列。通常,人源化抗体是人免疫球蛋白 (受体抗体),其中来自受体抗体一个或多个互补决定区 (CDR) 的部分或全部的残基被来自非人类物种 (供体抗体) 的一个或多个 CDR 的残基取代,

所述非人类物种例如小鼠、大鼠或兔,具有所需特异性、亲和性和能力。例如,人免疫球蛋白 Fv 构架区 (FR) 残基被相应非人类残基取代,或反之亦然,也就是说,人免疫球蛋白部分可以移植到决定抗原特异性的非人类免疫球蛋白区上。此外,人源化抗体可包含既不存在于受体抗体、也不存在于输入 CDR 或构架序列的残基。并非供体或受体抗体部分的修饰是常见的,经常被制备用于进一步改进和优化抗体性能。一般而言,人源化抗体将会包括至少一个和通常两个可变区(轻链和重链)的几乎全部,其中所有或几乎所有的 CDR 区都对应于非人类免疫球蛋白的 CDR 区,而所有或几乎所有 FR 区都是人免疫球蛋白序列的 FR 区。人源化抗体也可包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。

[0064] 本文所用的术语“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,例如从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)中分离的抗体,或由从中制备的杂交瘤中分离的抗体,从经转化以表达抗体的宿主细胞中分离的抗体,例如从经转染以表达抗体的细胞(通常是浆细胞瘤)中分离的抗体,从重组、组合人抗体文库中分离的抗体,以及通过任何其它方法制备、表达、产生或分离的抗体(所述方法包括将人免疫球蛋白基因序列与其它 DNA 序列剪接)。这样的重组人抗体具有来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,这样的重组人抗体可经过体外诱变(或者当使用人 Ig 序列的转基因动物时,则经体内体细胞诱变),因此重组抗体 VH 区和 VL 区的氨基酸序列是来自人种系 VH 和 VL 序列或与其相关的序列,而不是在体内人抗体种系库中天然存在的。

[0065] 本文所用的术语“抗原结合位点”或“结合部分”是指参与抗原结合的免疫球蛋白分子部分。抗原结合位点是由 N 端 3 个重(“H”)链可变(“V”)区和 3 个轻(“L”)链可变区的氨基酸残基构成的。重链和轻链的 V 区内 3 个高度趋异的序列段称为“超变区”或“CDR”,其中 3 个插入在称为“构架区”(FR)的 4 个保守侧翼序列段之间。构架区是指在免疫球蛋白超变区间发现的并与其相邻的氨基酸序列。在抗体分子中,轻链的 3 个超变区 (V_L1 、 V_L2 和 V_L3) 和重链的 3 个超变区 (V_H1 、 V_H2 和 V_H3) 倾向于在三维空间中彼此相关,构成抗原结合表面。抗原结合表面与结合抗原的三维表面互补,而每个重链和轻链的 3 个超变区称为“互补决定区”或“CDR”。

[0066] 本文所用的术语“生物活性”是指一种或多种 IFN α 亚型(或 IFN β)激活 MxA 启动子(和干扰素诱导型启动子)或发挥抗病毒效应的能力。抗体对 IFN α 生物活性的 EC₅₀ 和中和百分率的变化取决于测定条件和所测 IFN α 生物活性的类型。为了一致起见,采用特定种类的生物活性(即 MxA 启动子的活化和抗病毒活性)和测定条件(即“RG 测定”和“CPE 测定”)。采用本文所述条件进行 RG 测定。按照实施例所述,测定 MxA 启动子活化的中和百分率(参见实施例 3),采用 RG_{max} IFN 用量和 2 微克 /ml 抗体。可以按照实施例所述方法进行抗病毒(CPE)测定。

[0067] 本文所用的术语“双特异性分子”是指具有两种不同结合特异性的任何物质,例如蛋白质、肽或蛋白质或肽复合物。术语“多特异性分子”或“异种特异性分子”包括具有两种以上不同结合特异性的任何物质,例如蛋白质、肽或蛋白质或肽复合物。

[0068] 本文所用的术语“组合物”是指活性剂和载体的组合,所述载体例如惰性(例如可检测试剂或标记)或活性的化合物或组合物,例如佐剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐类、亲脂溶剂、防腐剂、辅料等。载体也包括药物赋形剂和添加剂、蛋白质、肽、氨基酸、脂

质和碳水化合物（例如糖，包括单糖、双糖、三糖、四糖和寡糖；衍生糖，例如糖醇、醛糖糖酸、酯化糖等；和多糖或糖聚合物），其可单独或组合存在，包括单独或按 1-99.99%（重量或体积）的比例组合。示例性的蛋白赋形剂包括血清白蛋白，例如人血清白蛋白（HSA）、重组人白蛋白（rHA）、明胶蛋白、酪蛋白等。代表性的氨基酸/抗体组分（其在缓冲范围内可起作用）包括例如丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿司巴甜等。碳水化合物赋形剂也包括在本发明的范围内，其实例包括但不限于单糖，例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；双糖，例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等；和糖醇，例如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇（葡萄糖醇）和肌醇。术语载体还包括缓冲剂或 pH 调节剂；通常，缓冲剂是有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸的盐，例如柠檬酸盐、抗坏血酸盐、葡糖酸盐、碳酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐、或邻苯二甲酸盐；Tris 盐、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐或磷酸缓冲剂。额外的载体包括聚合赋形剂/添加剂，例如聚乙烯吡咯烷酮、菲可（ficolls）（一种聚合糖）、葡萄糖结合剂（dextrans）（例如环糊精，例如 2-羟基丙基-转象（quadrature）-环糊精）、聚乙二醇、矫味剂、抗微生物剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂（例如聚山梨酯，例如“吐温 20（TWEEN 20）”和“吐温 80”）、脂质（例如磷脂、脂肪酸）、甾体（例如胆固醇）和螯合剂（例如 EDTA）。

[0069] 本文所用的术语“对照”是指在研究中用于比较目的的替代受试者或样品。对照可以是“阳性”或“阴性”。

[0070] 本文所用的术语“有效量”是指足以达到有益或所需结果的用量。可在一次或多次给药、应用或剂量中给予有效量。

[0071] 本文所用的术语“表位”或“抗原决定簇”是指在抗原或抗原片段上被抗体或抗原受体所识别的位点。T 细胞表位是来自蛋白质抗原的短肽，以合适的主要组织相容性（MHC）蛋白为代表。B 细胞表位通常是被 B 细胞识别的抗原决定簇，是由抗体识别的三维表面的通用部分，其可包括顺序决定簇或构象决定簇，正如本领域技术人员所知道的那样。

[0072] IgG 抗体可经木瓜蛋白酶消化而切割成 3 段。这些片段中的两个是通常相同的抗原结合片段，称为“Fab”片段，各自具有单个抗原结合位点，而剩余的是“Fc”片段。Fab 片段含有轻链和重链氨基端的一半，经链间二硫键连接在一起。Fc 片段由两个重链羧基端的一半彼此通过残余铰链区经二硫键连接在一起而组成的。IgG 抗体经胃蛋白酶消化的切割位置，是在木瓜蛋白酶切割抗体的同一通用区上，但却是在二硫键的羧基端一侧，结果产生 F(ab')₂ 片段，其具有两个抗原结合位点并且仍具有交联抗原的能力。Fab' 片段与 Fab 片段的区别之处在于：在重链 CH1 区羧基端上加入几个残基，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是恒定区的半胱氨酸残基带有游离巯基的 Fab'。

[0073] 本文所用的术语“Fv”是指最小抗体片段，其包含完整的抗原-识别和结合位点。在两链 Fv 中，该区包含以非共价缔合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体。在单链 Fv 中，一个重链可变区和一个轻链可变区可由柔性肽接头共价连接，使得轻链和重链缔合成“二聚体”结构，类似于两链 Fv。

[0074] 本文所用的术语“异种抗体”是指两种以上连接在一起的抗体、抗体结合片段（例如 Fab）、其衍生物或抗原结合区，具有至少两种不同抗原特异性。

[0075] 本文所用的术语“干扰素 α ”(“IFN α ”)是指一个蛋白质家族,包括一些先天免疫的主要效应物。人 IFN α 至少有 15 种已知同种型。IFN α 蛋白亚型和相应的编码基因的名称如下。

[0076]	IFN α 蛋白亚型	相应 IFN α 基因
[0077]	A	2a
[0078]	2	2b
[0079]	B2	8
[0080]	C	10
[0081]	D(Val ¹¹⁴)	1
[0082]	F	21
[0083]	G	5
[0084]	H2	14
[0085]	I	17
[0086]	J1	7
[0087]	K	6
[0088]	4a	4a
[0089]	4b	4b
[0090]	WA	16
[0091]	1(Ala ¹¹⁴)	1

[0092] 参见 Pestka 等 (1997) “Interferon Standardization and Designations” J Interferon Cytokine Res 17:增刊 1, S9-S14。IFN α B2 有时也称为 IFN α B,但不要与 IFN β 相混淆。来自白细胞的天然 IFN α (白细胞 IFN) 以及这些重组人 IFN α 蛋白亚型可得自 PBL Biomedical Labs, Piscataway, NJ (Interferon source.com)。天然 IFN α 是 IFN α 亚型的复杂混合物。IFN β 在本文所用的天然 IFN α 制备物中未检出。检测和定量检测这些干扰素的方法,例如 ELISA 和 RIA,都是本领域已知的。参见 Staehelin 等 (1981) Methods in Enzymology 79 (S. Pestka 主编) Academic Press, NY 589-595; Kelder 等 (1986) Methods in Enzymology 119 (S. Pestka 主编) Academic Press, NY 582-587; Stewart (2003), 出处同上; Bennett 等 (2003) J. Exp. Med. 197 (6):711-723; Baechler 等 (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (5):2610-2615。

[0093] 本文所用的术语“IFN α - 产生细胞”是指负责产生 IFN α 的特化白细胞,其广泛地受到双链 RNA ((ds) RNA)、病毒、细菌、原生动物、某些细胞系和未甲基化 CpG-DNA 的诱导。Ronnblom 和 Alm (2004) J. Exp. Med. 194 (12):F59-F63。

[0094] 本文所用的术语“IFN α 相关病症或疾病”是指与患者血清 IFN α 水平升高相关的异常和有害的疾病或临床前疾病状态。其实例包括但不限于 SLE、移植物抗宿主病 (GVHD)、1 型糖尿病、AIDS (人免疫缺陷病毒 (HIV) 所致)、自身免疫性甲状腺炎、银屑病和狼疮。IFN α 水平的检测方法是本领域已知的并在本文中有记载。

[0095] 本文所用的术语“免疫应答”是指淋巴细胞对外源物质的抗原特异性应答。可引发免疫应答的任何物质都被认为是“免疫原性的”,称为“免疫原”。所有免疫原都是抗原,然而,并非所有抗原都是免疫原性的。免疫应答可以是体液的 (通过抗体活性) 或细胞介

导的（通过 T 细胞活化）。

[0096] 本文所用的术语“免疫结合”和“免疫结合特性”是指免疫球蛋白分子与免疫球蛋白特异性抗原间发生的非共价相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和性可以表示为相互作用的解离常数 (K_d)，其中 K_d 越小则表示亲和性越大。采用本领域众所周知的方法可定量测定所选多肽的免疫结合特性。这样一种方法需要测定抗原结合位点 / 抗原复合物形成和解离速率，其中所述速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和性和在两个方向上等影响速率的几何参数。因此，“缔合速率常数” (K_{on}) 和“解离速率常数” (K_{off}) 都可通过计算浓度而求出，实际的缔合和解离速率是本领域众所周知的。 K_{off}/K_{on} 之比能够去掉所有与亲和性无关的参数，因此等于解离常数 K_d 。参见例如 Coligan 等，CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley, NY(1999)。

[0097] 本文所用的术语“分离的”是指已经从其天然环境组分中鉴别和分离和 / 或回收的抗体。其天然环境的杂质组分是可能干扰抗体的诊断性或治疗性用途的材料，包括酶、激素和其它蛋白质类或非蛋白质类溶质。在优选实施方案中，抗体经纯化 (1) 得到大于 95% (重量) 的抗体，最优选超过 99% (重量) (经 Lowry 方法测定)，(2) 其程度足以获得 N 端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基 (通过使用转杯式测序仪 (spinning cup sequenator))，或 (3) 达到同质性 (经 SDS-PAGE，在还原性或非还原性条件下，采用考马斯蓝或者优选银染)。分离的抗体包括在重组细胞原位的抗体，因为抗体天然环境的至少一种组分不存在。然而，通常，分离的抗体可通过至少一个纯化步骤而制备。认为单克隆抗体及其变异体和衍生物是分离的抗体。

[0098] 本文所用的术语“同种型”是指根据其重链恒定区氨基酸序列而划分的抗体类型。免疫球蛋白有 5 种主要同种型：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，它们中的一些还可进一步分为亚类，例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0099] “狼疮”是指若干疾病或障碍。“系统性红斑狼疮” (SLE) 是可累及身体许多部位的疾病类型。SLE 的症状可以是轻微的或严重的，本文有综述。“盘状红斑狼疮”是在脸、头皮或其它部位出现红色丘疹的慢性皮肤病。丘疹区域可增厚、有鳞屑，并导致瘢痕。皮疹可持续数日或数年并可复发。盘状狼疮患者中一小部分以后还会患有或进一步发展 SLE。“亚急性皮肤红斑狼疮”是指暴露在阳光下的身体部位出现的皮损。“药物所致狼疮”是某些药物引起的狼疮形式。症状类似于 SLE (关节炎、皮疹、发热和胸痛)，而且它们通常在停药后完全消失。很少累及肾脏和脑。“新生儿狼疮”是在患有 SLE、Sjögren 综合征或完全无病的妇女所生新生儿中发生的罕见疾病，可能由母亲血液中称为抗 Ro (SSA) 和抗 La (SSB) 的自身抗体所致。出生时，婴儿通常带有皮疹、肝脏问题和血细胞计数偏低。

[0100] 本文所用的术语“药学上可接受的载体”是指任何标准药物载体，例如磷酸缓冲盐溶液、水和乳剂，例如油 / 水或水 / 油乳剂和各类润湿剂。组合物也可含稳定剂和防腐剂以及任何上述载体，前提条件是它们是体内使用可接受的。有关载体、稳定剂和辅料的实例参见 Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 第 18 版, Mack Publ. Co., Easton, PA (1995) 和载于“PHYSICIAN'S DESK REFERENCE”, 第 58 版, Medical Economics, Montvale, N. J. (2004)。

[0101] 本文所用的术语“选择性中和”是指分离纯化的抗体 (例如但不限于单克隆抗体) 选择性中和一种或多种“IFN α ”蛋白亚型的至少 40% 的生物活性，但不明显地中和另一 IFN α 蛋白亚型的至少一种生物活性，其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化或抗病毒活

性。因为各 IFN α 亚型在功能上不同,其优势是:选择性中和特定形式的 IFN α ,以控制特定功能。本发明的一种或多种抗体对 IFN α 具有特异性,但对一种或多种亚型(而非其它的)也是具有“选择性”的。为了选择性中和一种或多种 IFN α 蛋白亚型(例如 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b),如本文所公开的,对 IFN α 上的一个或多个抗原性表位进行鉴定、分离、表征和纯化,所述表位与例如 D 亚型上的抗原性表位没有明显交叉反应。

[0102] 本文所用的术语“不明显地中和”是指抗体中和特定 IFN α 亚型(或 IFN β)的小于 40%的生物活性,其中所述生物活性是通过 MxA 报道基因测定(RG 测定)或致细胞病变效应测定(CPE 测定),按照本文所述的条件来测定的。在某些实施方案中,本发明的抗体不明显地中和特定 IFN α 亚型的超过 35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2%或者甚至不大于 1%的生物活性。

[0103] 本文所用的术语“患者”是指脊椎动物,优选哺乳动物,更优选人。哺乳动物包括但不限于啮齿类、猿、人、农场动物、马、狗和猫。

[0104] 目前 SLE 治疗是对症治疗,会诱导全身免疫抑制;这些包括糖皮质激素、环磷酸胺、硫唑嘌呤和麦考酚酸吗乙酯。其功效仅是部分的,具有不想要的副作用,例如常见的是对感染的易感性增加。因此,特异性中和 SLE 患者体内的 IFN- α 是用于控制疾病病理的一个颇有吸引力的构思。因为 pDC 大量不受调节地产生 IFN- α ,在维持疾病循环中起到重要作用,用特定 MAbs 阻断来中和 IFN- α 生物活性,提供了靶向治疗药,因此不会破坏患者针对病原体而发起有效的免疫应答的能力。一种针对 IFN- α 的理想 MAb 候选物需要指定特征,包括(i)与大多数或所有参与 SLE 病因学的人 IFN- α 亚型能够起反应的能力;(ii)阻断这类 IFN- α 亚型生物活性的能力,(iii)不能阻断 IFN- β 即 IFNAR;和/或(iv)高亲和性。中和 IFN- α 而不是 IFNAR,也可提供更安全更特异性治疗,因为该方法将不影响 IFN- β 信号转导途径的抗病毒效应,后者与 IFN- α 使用相同的受体。最终,本发明也提供一系列能够中和人 IFN- α 的单克隆抗体(MAb)。例如,两个这样的抗 IFN- α MAb 能阻断 13 种重组 IFN- α 亚型以及病毒感染后产生的两种 IFN 复杂混合物的生物活性。一方面,本发明提供可变地中和人 IFN- α 的 7 种 MAbs,其中的 3 种明显中和至多 13 种重组 IFN- α 亚型和复杂 IFN- α 混合物(市售白细胞 IFN 和用流感病毒感染 PBMC 后产生的上清液)。两种 MAb 即 ACO-1 和 ACO-2 也持续阻断来自 SLE 患者血清的生物活性,所述患者经微阵列分析表现出 IFN- α 的鉴别标记。因为 ACO-1 和 ACO-2 不明显中和 IFN α 蛋白亚型 D 和 1 的生物活性,但中和 SLE 血清的 IFN α 生物活性,所以这些亚型不大可能明显地参与 SLE 病因学。因此,最好是用抗体治疗 SLE,所述抗体例如 ACO-1 和 ACO-2 的人源化或非抗原性(例如去免疫化(deimmunized))变异体,其可阻断 SLE 相关 IFN α 亚型的生物活性,但不阻断 IFN α 蛋白亚型(D 和 1)的生物活性,后两种亚型与 SLE 并无明显相关性。

[0105] 本发明也提供抗体,所述抗体选择性中和至少两种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的干扰素 α (“IFN α ”)蛋白亚型的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D 的至少一种生物活性;其中所述生物活性是例如 MxA 启动子的活化和/或抗病毒活性。另一方面,本发明提供治疗患者的至少一种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的干扰素 α (“IFN α ”)蛋白亚型异常表达相关疾病或病症的方法,所述方法不中和 IFN α 蛋白亚型 D 抗病毒活性;所述方法包括给予患者有效量的一种或多种本文所述的抗体。这类抗体的实例包括但不限于 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6

等抗体,以及与任何上述抗体相比能识别基本相同的 IFN α 表位的抗体。优选的抗体是单克隆抗体。能产生这些单克隆抗体的杂交瘤细胞系的 ATCC 保藏号见下文。因此,本发明还提供杂交瘤细胞系,所述细胞系表达 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6 和 ACO-8 抗体。

[0106] 一方面,本发明提供抗体,所述抗体所结合的 IFN α 表位与选自 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-6 的抗体所结合的 IFN α 表位基本上相同。本发明还提供能表达这些抗体的细胞系,例如杂交瘤。

[0107] 在另一个实施方案中,本发明提供抗体,所述抗体能中和至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的 IFN α 蛋白亚型的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 D 的至少一种生物活性;其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化或抗病毒活性。本发明还提供表达这些抗体的杂交瘤细胞系。

[0108] 提供单克隆抗体,所述抗体不中和 IFN α 蛋白亚型 1 的至少一种生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化和 / 或抗病毒活性。

[0109] 另一方面,本发明提供单克隆抗体,所述抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、K、4a、4b 和 WA 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D 和 1 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化和 / 或抗病毒活性。其它实施方案包括 ACO-1 和 ACO-2。

[0110] 再一方面,本发明提供单克隆抗体,所述抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、C、I、K 和 4a 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D、F、G、4b 和 1 的生物活性;其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化和 / 或抗病毒活性。一个这样的实施方案是由 ACO-3 细胞及其衍生物制备的 ACO-3 抗体及其衍生物。

[0111] 另一方面,本发明提供抗体,所述抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2 和 C 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 D、4b 和 1 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化和 / 或抗病毒活性。一个这样的实施方案是由 ACO-4 细胞及其衍生物制备的 ACO-4 抗体及其衍生物。

[0112] 另一方面,本发明的抗体选择性中和 IFN α 4a 的生物活性,但不选择性中和 IFN α 4b,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。这些抗体的实例是称为 ACO-3 和 ACO-4 的抗体及其衍生物,其分别由例如 ACO-3 和 ACO-4 细胞及其衍生物制备。

[0113] 又一方面,本发明提供单克隆抗体,所述抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、G、I、K、WA 和 1 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 B2 和 D 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化和 / 或抗病毒活性。一个这样的实施方案是 ACO-5 抗体及其衍生物,其由例如 ACO-5 细胞及其衍生物制备。

[0114] 在一个额外的实施方案中,本发明提供单克隆抗体,所述抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 2 和 C 的生物活性,但不中和 IFN α 蛋白亚型 A、B2、C、D、F 和 1 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。一个实例是 ACO-6 抗体及其衍生物,其由 ACO-6 细胞及其衍生物制备。

[0115] 再一方面,本发明提供单克隆抗体,所述抗体选择性中和 IFN α 蛋白亚型 A、2、B2、D、F、I、4a、4b 和 1 的生物活性,但不明显地中和 IFN α 蛋白亚型 C、H2、K 和 WA 的生物活性,其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化。一个实例是 ACO-8 抗体及其衍生物,其由 ACO-8

细胞及其衍生物制备。

[0116] 本发明的单克隆抗体也包括人源化抗体、人抗体、嵌合抗体、抗体片段,例如 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fab' 片段或技术人员已知的任何其它片段。在一个实例中,抗体是人源化嵌合抗体。

[0117] 在再一实施方案中,本发明提供杂交瘤细胞系的制备方法,例如,用包含重组 IFN α 亚型 A、B2 和 F 的组合物免疫哺乳动物;将来自所述哺乳动物的脾细胞与骨髓瘤细胞系融合,产生杂交瘤;然后鉴定能产生单克隆抗体的杂交瘤细胞系,所述抗体能选择性中和一种或多种选自 2、C、G、I、J1、K、4a、4b 和 WA 和 1 的 IFN α 蛋白亚型,但不选择性中和 IFN α 蛋白亚型 D。

[0118] 本文所用的术语“中和”是指当用本文定义的 RG、CPE 或单核细胞分化测定进行检测时,抗体抑制 IFN α 蛋白亚型一种或多种生物活性达至少 40% 的能力。例如,抗体中和 IFN α 蛋白亚型的至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 的生物活性。IFN α 生物活性包括 MxA 启动子的转录活化(参见例如“RG”测定,参见下文)、抗病毒活性(例如致细胞病变效应测定(“CPE”)) 和 SLE 血清使单核细胞分化成树突细胞的能力。用 RG 测定和 CPE 测定以求出%中和率的方法如本文所述。

[0119] 本文所用的术语“不中和”或“不明显地中和”是指抗体中和 IFN α 蛋白亚型的小于 40% 的生物活性,其中所加入抗体的中和效应是通过 RG、CPE 或单核细胞分化测定来检测。例如,抗体中和小于 35%、或小于 35%、或小于 30%、或小于 25%、或小于 20%、或小于 15%、或小于 10%、或小于 8%、或小于 5%、或小于 3%、或者甚至小于 1% 的生物活性。

[0120] 本发明的抗体可以是抗体变体、衍生物或片段。一方面,抗体是分离的。另一方面,抗体与合适载体结合。抗体可从小鼠、大鼠、猿猴等任何物种中分离,或者重组产生。小鼠单克隆抗体的实例是称为 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6 和 ACO-8 的抗体。本发明还提供能产生这些单克隆抗体的杂交瘤细胞系,所述抗体与载体结合或在培养物中。

[0121] 本发明还提供包括抗体、变体、衍生物或其片段在内的多肽,所述多肽包括但不限于免疫球蛋白链和 CDR。如上所述,多肽优选结合、抑制和/或中和 IFN α ,其具有相同或相似亲和力和/或能力。

[0122] 本发明还提供可与 ACO-1 至 ACO-6 或 ACO-8 的任何抗体反应的抗独特型抗体。抗独特型抗体是针对单个抗体的独特决定簇而产生的抗体。抗独特型抗体在免疫测定和其它应用中可用于检测结合抗体。本发明的抗独特型抗体可包括或来自任何哺乳动物,例如但不限于人、小鼠、兔、大鼠、啮齿类动物、灵长类动物等。

[0123] 一种或多种上述抗体还可以与载体、药学上可接受的载体或医学装置结合,其适合于在诊断或治疗方法中使用抗体或相关组合物。载体可以是液相载体或固相载体,例如珠、凝胶或载体分子,例如脂质体。组合物还可任选包含至少一种其它化合物、蛋白质或组合物。“载体”的额外实例包括治疗活性药物,例如另一种肽或蛋白质(例如 Fab' 片段、J-链、另一抗体、毒素等)。例如,本发明的抗 IFN α 抗体、其变体、衍生物或其片段可以功能性连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合等方法连接)一种或多种其它分子实体,例如另一抗体(例如以产生双特异性或多特异性抗体)、细胞毒素、细胞配体或抗原。因此,本发明包括各种各样的抗体缀合物、双特异性和多特异性分子和融合蛋白,无论它们所靶向的表位是否与本发明抗体所靶向的相同。

[0124] 载体的额外实例是有机分子（也称为修饰剂）或活化剂，它们可以与本发明的抗体直接或间接地共价连接。分子的连接可改善药代动力学特性（例如增加体内血清半衰期）。有机分子的实例包括但不限于亲水聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。本文所用的术语“脂肪酸”是指例如一羧酸和二羧酸。本文所用的术语“亲水性聚合基团”是指例如比辛烷更易溶于水的有机聚合物。

[0125] 适于修饰本发明抗体的亲水聚合物可以是直链或支链的，包括例如聚链烷二醇（polyalkane glycol）（例如聚乙二醇（PEG）、一甲氧基-聚乙二醇（mPEG）、聚丙二醇（PPG）等）、碳水化合物（例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等）、亲水氨基酸聚合物（例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等）、聚环氧烷（例如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等）和聚乙烯吡咯烷酮。用于本发明抗体的合适亲水聚合物的分子量例如约 800 道尔顿至约 150,000 道尔顿（单独的分子实体）。亲水聚合基团可被 1 个至约 6 个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。用合适方法可制备被脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物。例如，含氨基聚合物在脂肪酸上可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧基和活化羧基（例如用 N,N-羰基二咪唑活化）偶联，或者脂肪酸酯可以在聚合物上与羟基偶联。

[0126] 适于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可含有一个或多个不饱和单元。其实例包括但不限于正十二烷酸酯、正十四烷酸酯、正十八烷酸酯、正二十烷酸酯、正二十二烷酸酯、正三十烷酸酯、正四十烷酸酯、顺- δ -9-十八烷酸酯、全顺- δ -5,8,11,14-二十烷四烯酸酯、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括含有直链或支链低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基包含 1 至约 12、优选 1 至约 6 个碳原子。

[0127] 再一方面，本发明提供表达完整人单克隆抗体的转基因非人类动物，例如转基因小鼠（本文也称为“人 MAbs 小鼠”），所述人单克隆抗体与上述本发明抗体一样，能中和至少一种 IFN α 蛋白亚型。在一个具体的实施方案中，转基因非人类动物是转基因小鼠，其基因组包含编码所有或部分本发明抗 α V 抗体的人重链转基因和人轻链转基因。为了产生人抗体，转基因非人类动物可以用 IFN α 蛋白亚型 A、B 和 F 的纯化或浓缩制剂进行免疫。转基因非人类动物的实例可以是例如转基因小鼠，它通过经历 V-D-J 重组和同种型转换而产生针对 IFN α 的人单克隆抗体的多种同种型（例如 IgG、IgA 和 / 或 IgM）。同种型转换可通过例如经典或非经典同种型转换而发生。

[0128] 因此，在另一个实施方案中，本发明提供来自或分离自如上所述的转基因非人类动物（例如转基因小鼠）的分离的细胞，所述细胞表达人抗体。分离的 B 细胞可以通过与无限增殖化细胞融合而无限增殖，以提供人抗体的来源（例如杂交瘤）。这些杂交瘤也包括在本发明的范围之内。

[0129] 本发明还提供至少一种抗体方法或组合物，用于在细胞、组织、器官、动物或患者中和 / 或在相关疾病之前、之后或期间诊断至少一种 IFN α 相关病症，正如本领域已知的那样和 / 或如本文所述。它们也可用于预测或监测疾病的发展。

[0130] 还提供包含至少一种本发明抗 IFN α 抗体、变体、衍生物或其片段的组合物，其适于以有效量给予，以便在细胞、组织、器官、动物或患者中和 / 或在相关疾病之前、之后或期间调节或改善 IFN α 相关症状或治疗至少一种 IFN α 相关病症，正如本领域已知的那样和 / 或如本文所述。组合物包括例如药用和诊断用组合物 / 药盒，其包含药学上可接受的

载体和至少一种本发明的抗 IFN α 抗体、变异体、衍生物或其片段。如上所述,组合物还可包含额外的抗体或治疗药一起联用,以提供特制的多种治疗,从而达到最大治疗益处。

[0131] 或者,本发明的组合物可以与其它治疗剂和细胞毒剂联用,无论是否将它们连接在一起或同时给予。它们可以与这样的试剂同时给予(例如同在一个组合物中或单独给予)或者可以在给予这样的试剂之前或之后给予。这些试剂可包括皮质类固醇、非甾体免疫抑制药、抗疟药和非甾体抗炎药。组合物可以与替代疗法联用,例如给予皮质类固醇、非甾体免疫抑制药、抗疟药和非甾体抗炎药。

[0132] 另一方面,本发明提供方法,所述方法用于选择性中和至少两种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的干扰素 α (“IFN α ”)蛋白亚型的生物活性,但不选择性中和 IFN α 蛋白亚型 D 的至少一种生物活性;其中所述生物活性是 MxA 启动子的活化或抗病毒活性。该方法需要将怀疑含有某亚型的样品与能选择性中和该亚型的单克隆抗体接触。这类抗体的实例包括但不限于称为 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-6 的抗体。

[0133] 本发明提供各种疗法。例如,本说明书公开了改善患者的至少一种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、K、4a、4b 和 WA 的干扰素 α (“IFN α ”)蛋白亚型的异常表达相关症状、但却不结合 IFN α 蛋白亚型 D 和 1 的方法,所述方法通过给予患者有效量的能选择性中和所述亚型的抗体。其实例如上提供。

[0134] 本发明提供用于治疗患者的疾病或病症的方法,所述疾病或病症导致至少一种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、K、4a、4b 和 WA 的干扰素 α (“IFN α ”)蛋白亚型的异常表达、但却不结合 IFN α 蛋白亚型 D 和 1,所述方法通过给予患者有效量的能选择性中和所述亚型的抗体。其实例如上提供。还提供了免疫方法,即通过给予哺乳动物包含重组 IFN α 亚型 A、B2 和 F 的组合物。在另一个实施方案中,免疫方法包括给予哺乳动物基本上由 IFN α 亚型 A、B2 和 F 以及药学上可接受的载体组成的组合物,任选一种或多种佐剂。在一个替代方面,免疫可产生能中和 IFN α 蛋白亚型 A、B2 和 F、但不中和 IFN α 蛋白亚型 D 和 1 的抗体。另一方面,所述方法和组合物中和 IFN α 4a,而不中和 IFN α 4b(例如 ACO-3)。

[0135] 对于体内使用,按治疗有效量将本发明抗体和组合物给予或递送给患者(例如病人),以中和所选 IFN α 亚型。另外,采用任何合适基于抗体的临床产品的给药途径给予或递送有效量的本发明抗体或组合物,可用于治疗或改善患者的 IFN α 相关病症的症状,所述病症例如 SLE、糖尿病、银屑病或 AIDS。许多途径是本领域已知的,例如注射或输注。

[0136] 剂型。本发明抗体的使用剂量单位可以是单一化合物或与其它化合物的混合物。化合物可以混合在一起,形成离子键或者甚至共价键。一种或多种本发明抗体可以口服、静脉内(推注或输注)、腹膜内、皮下或肌肉内形式给予,全都采用药学领域普通技术人员众所周知的剂型。根据特定部位或给药方法,可以采用不同剂型,例如片剂、胶囊剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂和乳剂,以将本发明的抗体提供给需要治疗的患者,所述治疗包括按本文所述中和某些 IFN α 亚型。抗体通常是疏水性的,但它们可以任何一种已知的盐形式给予。

[0137] 抗体通常与合适的药用盐、缓冲剂、稀释剂、填充剂、赋形剂和/或载体(本文统称为药学上可接受的载体或载体材料)混合给予,它们是根据预定给药形式并按照常规药理学实践的要求而选择的。根据给药最佳部位来配制抗体,以提供例如最大和/或持续给予

特定形式,用于口服、直肠、局部、静脉内注射或胃肠外给药。虽然抗体、例如人源化形式的 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6 和 ACO-8 可以单独给予或与药学上可接受的载体一起给予。载体可以是固体或液体,取决于所选给药类型和 / 或部位。

[0138] 制备本发明的常用剂型的技术和组合物可参见以下一个或多个参考文献: Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 第 2 版 (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 17 版 (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences 第 7 卷 (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995); Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Series 36 (James McGinity, Ed., 1989); Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 第 61 卷 (Alain Rolland, Ed., 1993); Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J. G. Hardy, S. S. Davis, Clive G. Wilson, Eds.); Modern Pharmaceuticals Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 第 40 卷 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds.), 等等, 相关部分通过引用结合到本文中。

[0139] 本发明的抗体可以脂质体递送系统的形式给予, 例如小单层泡囊 (small unilamellar vesicle)、大单层泡囊 (large unilamellar vesicle) 和多层泡囊 (multilamellar vesicle), 无论是否带电荷。脂质体可包含一种或多种下列成分: 磷脂 (例如胆固醇)、硬脂胺和 / 或磷脂酰胆碱、其混合物等。

[0140] 抗体也可与作为药物载体或作为前体药物的一种或多种可溶的生物可降解、生物相容性聚合物偶联。这样的聚合物可包括: 聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟丙基甲基丙烯酸酯-苯酚、聚羟乙基天冬酰胺苯酚 (polyhydroxyethyl aspartate-midphenol) 或被棕榈酰基取代的聚环氧乙烷-聚赖氨酸、其混合物等。此外, 抗体可与一种或多种生物可降解聚合物偶联, 以达到抗体的控制释放, 本发明所用的生物可降解聚合物包括: 聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸和聚乙醇酸的共聚物、聚 ϵ -己内酰胺、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯 (polycyanoacrylate) 和水凝胶的交联或两亲嵌段共聚物、其混合物等。

[0141] 对于直接给予鼻腔、鼻窦、口、喉、食道、trachea、肺和肺泡而言, 抗体也可通过使用合适的鼻内溶媒、以鼻内形式给予。对于皮肤和经皮给药而言, 抗体可以用本领域普通技术人员众所周知的洗剂、乳膏剂、油剂、酊剂、血清、经皮贴剂等形式给予。胃肠外和静脉内形式也可包含药学上可接受的盐和 / 或矿物质和其它材料, 使它们与所选的注射类型或递送系统相适应, 例如缓冲等渗溶液。给予抗体的有用药物剂型的实例可包括下述形式。

[0142] 注射液。适于注射给药的胃肠外组合物制备如下: 将 1.5% (重量) 的活性成分在去离子水中搅拌, 然后与例如最多 10% (体积) 的丙二醇和水混合。用氯化钠制备等渗溶液并用例如超滤而除菌。无菌注射液制备如下: 将所需量的活性化合物加入到合适溶剂中, 并视需要加入上述各种其它成分, 然后过滤除菌。通常, 分散剂制备如下: 将各种无菌的活性成分加入到具有基本分散介质的无菌溶媒中。在用于制备无菌注射液的无菌粉针剂的情况下, 制备干粉剂的有用方法包括: 真空干燥、喷雾冷冻、加热真空干燥和冷冻干燥技术,

自先前过滤除菌的溶液剂而得到活性成分以及任何额外所需成分的粉剂。本发明的抗体可以微粒或纳米粒的注射用形式或通过肺部或其它部位给药。

[0143] 混悬剂。在一个实施方案中,可制备给药用含水混悬剂,使每 5ml 含有例如 0.001-1,000mg 微细活性成分、200mg 羧甲基纤维素钠、5mg 苯甲酸钠、1.0g 山梨醇溶液并加入盐水至 0.01ml、0.1ml、1ml、5ml 或 10ml。

[0144] 抗体的有效量可包括重配后得到的量,如果是在湿 / 干系统中,浓度为约 1.0 μ g/ml 至约 1000mg/ml,尽管更低和更高浓度也可操作,但取决于预定给药溶媒,例如溶液制剂不同于经皮贴剂、肺部、经粘膜或渗透性或微泵方法。

[0145] 本文提供包含本发明抗体的制剂。本发明的制剂可按以下方法制备:所述方法包括将本发明的至少一种抗体与防腐剂混合,所述防腐剂选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或其混合物 / 含水稀释剂。用常规溶解和混合方法,将抗体和防腐剂在含水稀释剂中混合。例如,将测定量的至少一种抗体 / 缓冲液与所需防腐剂 / 缓冲液混合,其数量足以使抗体和防腐剂达到所需浓度。本领域普通技术人员将知道对该方法的改动,例如各组分的添加顺序,是否使用额外添加剂,制备制剂时的温度和 pH,这些对于所用浓度和给药方法来说都是可以优化的因子。

[0146] 制剂中可包含一种或多种防腐剂或稳定剂,例如苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、福尔马林、氯丁醇、氯化镁(例如六水合物)、对羟基苯甲酸烷基酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或其混合物 / 含水稀释剂。如本领域所知,任何合适的浓度或混合物都可使用,例如 0.001-5%、或其中的任何范围或数值,例如但不限于 0.001、0.003、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9 或其中的任何范围或数值。非限制性实例包括无防腐剂,或包括防腐剂,例如 0.1-2% 间甲酚(例如 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.1-3% 苯甲醇(例如 0.5%、0.9%、1.1%、1.5%、1.9%、2.0%、2.5%)、0.001-0.5% 硫柳汞(例如 0.005%、0.01%)、0.001-2.0% 苯酚(例如 0.05%、0.25%、0.28%、0.5%、0.9%、1.0%)、0.0005-1.0% 对羟基苯甲酸烷基酯(例如 0.00075%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.005%、0.0075%、0.009%、0.01%、0.02%、0.05%、0.075%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、0.75%、0.9% 和 1.0%)。

[0147] 给予患者的组合物和制剂可以是澄清溶液剂或两个小瓶(vial),其中一个小瓶内装的是冻干抗体,可用装有含水稀释剂的第二个小瓶来重配。无论是一个溶液瓶还是重配所需的两个小瓶都可反复使用多次,以满足单次或多轮患者治疗,并因此提供比目前所用的更方便的治疗方案。公认的装置包括这些单个小瓶系统,包括用于给予溶液剂的笔式注射器装置,例如 BD Pens, BD Autojectore, Humaject™ NovoPen™, B-DTMPen, AutoPen™ 和 OptiPen™, GenotropinPen™, Genotronorm Pen™, Humatro Pen™, Reco-Pen™, Roferon Pen™, Biojector™, Iject™, J-tip Needle-Free Injector™, Intraject™, Medi-Ject, 例如由以下公司制备或开发:Becton Dickenson(Franklin Lakes, N.J. 在 bectondickenson.com 网站可获得), Disetronic(Burgdorf, Switzerland, 在 disetronic.com 网站可获得);

Bioject, Portland, Oregon (在 bioject.com 网站可获得); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, 在 weston-medical.com 网站可获得), Medi-Ject Corp (Minneapolis, Minn., 在 mediject.com 网站可获得)。

[0148] 本发明提供制品, 包括包装材料和至少一个装有本发明的至少一种抗体以及规定缓冲剂和 / 或防腐剂 (任选在含水稀释剂中) 的小瓶, 其中包装材料包括标签, 注明该溶液剂可存放 1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72 小时或更长时间。本发明还包括制品, 包括包装材料、第一小瓶和第二小瓶, 其中第一小瓶内装有本发明的至少一种冻干抗体, 第二小瓶内装有规定缓冲剂或防腐剂的稀释剂水溶液, 其中包装材料包括标签, 标签内容告诉患者抗体可用含水稀释剂重配, 以制成溶液剂, 并且该溶液剂可存放 24 小时或更长时间。

[0149] 药盒。本发明也包括用于例如治疗疾病的药盒, 药盒可包括一个或多个容器, 容器内装有药物组合物, 药物组合物可稀释或重新悬浮成治疗有效量的抗体。如有必要, 这样的药盒还可包含常规药盒组分中的一种或多种组分, 例如, 装有一种或多种药学上可接受的载体的容器、液体、额外容器等, 这些对于本领域技术人员是显而易见的。药盒中也可包括印刷的使用说明书 (可以是说明书或标签), 注明所给予成分的用量、给药指南和 / 或成分的混合指南。可以理解, 尽管给出的材料和条件对本发明实践来说很重要, 但是未给出的材料和条件也未排除在外, 只要它们不妨碍实现本发明的益处即可。

[0150] 抗体。本发明的抗体包括单克隆抗体。它们也可以是 IFN α - 中和功能性片段、抗体衍生物或抗体变异体。它们可以是嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。抗体的功能性片段包括但不限于 Fab、Fab'、Fab2、Fab'₂ 和单链可变区。抗体可在细胞培养物中或各种动物体内产生, 所述细胞培养物例如细菌、酵母、植物或植物细胞、昆虫或昆虫细胞、真核细胞, 所述动物包括但不限于牛、兔、山羊、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、绵羊、狗、猫、猴、黑猩猩、猿等。只要片段或衍生物保留本发明抗体的结合特异性或中和能力就可采用。可通过在给定的系列条件下, 比较抗体与合适抗原以及与无关抗原或抗原混合物的结合, 可测定抗体的结合特异性。如果抗体与合适抗原的结合, 比与无关抗原或抗原混合物的结合至少大 2 倍、5 倍、7 倍, 甚至 10 倍, 则被认为是特异性的。用于测定特异性的具体测定 (例如 ELISA) 参见下文。

[0151] 抗体的特性是其中和 IFN α 蛋白亚型的一种或多种生物活性的能力, 例如但不限于由 IFN α 诱导的 MxA 启动子或其它启动子的转录活化、抗病毒活性、SLE 血清使单核细胞分化成树突细胞的能力。

[0152] 用本领域已知的和文献中已充分描述的常规杂交瘤技术, 可产生本发明的单克隆抗体。例如, 可将合适的无限增殖化细胞系与产生抗体的细胞融合在一起, 产生杂交瘤; 所述无限增殖化细胞系例如骨髓瘤细胞系 (例如但不限于 Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L. 5、> 243、P3X63Ag8. 653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U397、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A、CHO、PerC. 6、YB2/0) 等或异质骨髓瘤 (heteromyeloma)、其融合产物、或其来源的任何细胞或融合细胞、或本领域已知的任何其它合适的细胞系 (参见例如 www.atcc.org, www.lifetech.com. 等); 所述产生抗体的细胞例如但不限于分离或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体细胞、或其它免疫细胞或含有 B 细胞的细胞、或表达重链或轻链恒定

区或可变区或构架或 CDR 序列的任何其它细胞（无论是作为内源还是异源核酸，无论是重组还是内源的，病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿动物、马、羊（ovine）、山羊、绵羊（sheep）、灵长动物、真核生物的基因组 DNA、cDNA、rDNA、线粒体 DNA 或 RNA、叶绿体 DNA 或 RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链、杂合等或其任意组合）。产生抗体的细胞也可得自经目标抗原免疫的人或其它合适动物的外周血，或者优选脾脏或淋巴结。任何其它合适的宿主细胞也可用于表达编码本发明抗体、特定片段或其变异体的异源或内源核酸。可使用选择性培养条件或其它合适的已知方法，分离融合细胞（杂交瘤）或重组细胞，然后通过有限稀释或细胞分选或其它已知方法进行克隆。

[0153] 可以使用产生或分离具有所需特异性抗体的其它合适方法，包括但不限于用本领域已知方法，从肽或蛋白质文库（例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA 等，展示文库；例如得自各销售商，例如 Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK), MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Scotland, UK), BioInvent (Lund, Sweden) 和 Antitope (Cambridge, UK) 中选择重组抗体的方法。参见 U. S. 4,704,692、5,723,323、5,763,192、5,814,476、5,817,483、5,824,514、5,976,862。替代方法依赖于转基因动物的免疫（例如 SCID 小鼠，Nguyen 等 (1977) MicroBiol. Immunol. 41 :901-907 (1997) ; Sandhu 等 (1996) Crit. Rev. Biotechnol. 16 :95-118 ; Eren 等 (1998) Immunol. 93 :154-161），正如本领域已知和 / 或本文所述，这样的免疫能产生人抗体库。这类技术包括但不限于核糖体展示 (Hanes 等 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 :4937-4942 ; Hanes 等, (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 :14130-14135) ; 单细胞抗体产生技术（例如选择淋巴细胞抗体方法（“SLAM”）(U. S. 5,627,052, Wen 等 (1987) J. Immunol. 17 :887-892 ; Babcook 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93 :7843-7848) ; 凝胶微滴和流式细胞术 (Powell 等 (1990) Biotechnol. 8 :333-337 ; One Cell Systems, (Cambridge, Mass) ; Gray 等 (1995) J. Imm. Meth. 182 :155-163 ; Kenny 等 (1995) Bio/Technol. 13 :787-790) ; B 细胞选择 (Steenbakkers 等 (1994) Molec. Biol. Reports 19 :125-134 (1994)。

[0154] 将编码本发明抗体的多核苷酸给予合适宿主，例如以提供转基因动物或哺乳动物（例如山羊、牛、马、绵羊等，所述哺乳动物可在其乳汁中产生所述抗体），可制备本发明的抗体变异体。这些方法是本领域已知的，参见例如 U. S. 5,827,690、5,849,992、4,873,316、5,849,992、5,994,616、5,565,362 和 5,304,489。

[0155] 本文所用的术语“抗体变异体”是指抗体或片段的线状多肽序列的翻译后修饰。例如，U. S. 6,602,684 B1 描述了一种方法，所述方法用于产生修饰的乙二醇形式的抗体，包括完整抗体分子、抗体片段或融合蛋白，其包含等同于免疫球蛋白 Fc 区的区域，具有由此产生的增加的 Fc 介导的细胞毒性和糖蛋白。

[0156] 抗体变异体也可制备如下：即给予本发明的多核苷酸，以提供转基因植物和培养的植物细胞（例如但不限于烟草、玉米和浮萍），其可在植物部分或其培养细胞中产生所述抗体、特定部分或变异体。例如，Cramer 等 (1999) Curr. Top. MicroBiol. Immunol. 240 :95-118 及其中引用的参考文献，描述了制备能表达大量重组蛋白的转基因烟草叶片，例如采用诱导型启动子。转基因玉米已用于以商品生产水平表达哺乳动物蛋白，其生物活性等同于在其它重组系统中产生的或从天然来源纯化的蛋白质。参见例如 Hood 等, Adv. Exp.

Med. Biol. (1999) 464 :127-147 及其引用的参考文献。也已从包含抗体片段、例如单链抗体 (scFv) 的转基因植物种子 (包括烟草种子和土豆块茎) 中大量产生抗体变异体。参见例如 Conrad 等 (1998) Plant Mol. Biol. 38 :101-109 及其引用的参考文献。因此,按照已知方法,采用转基因植物,也可产生本发明的抗体。

[0157] 可通过例如加入外源序列,以改变免疫原性或降低、增加或改变结合性、亲和性、缔合速率、解离速率、亲合性、特异性、半衰期或任何其它合适特性,以产生抗体衍生物。通常保留部分或全部非人类或人 CDR 序列,而可变区和恒定区的非人类系列被人或其它氨基酸取代。一般而言,CDR 残基直接和最显著地参与了对抗原结合的影响。

[0158] 小鼠 (或其它非人类动物) 所产生的单克隆抗体在治疗中具有这样的风险:人可产生针对动物 MAb 的抗体。这样人抗体就会降低动物 Mab 的有效性,也会导致变态反应。通过构建不被识别为外源物质的抗体,即可避免该问题。这类抗体的构建方法是本领域已知的,通常是将动物 MAb 的 CDR 区移植到目标宿主的免疫球蛋白主链上。最常用的方法就是人源化,可通过将动物抗体的 CDR 移植到人免疫球蛋白构架上,而达到人源化。在某些情况下,保留来自动物抗体构架的少数氨基酸残基,以保持抗原结合位点的完整性。

[0159] 本发明抗体的人源化或改造可用任何已知方法来进行,所述方法例如但不限于以下文献中描述的方法:U. S. 5, 723, 323、5, 976, 862、5, 824, 514、5, 817, 483、5, 814, 476、5, 763, 192、5, 723, 323、5, 766, 886、5, 714, 352、6, 204, 023、6, 180, 370、5, 693, 762、5, 530, 101、5, 585, 089、5, 225, 539 和 4, 816, 567。根据计算机建模和可变区的抗体人源化方法是本领域技术人员已知的。参见例如 Tsurushita 等 (2005) Humanized Antibodies and their Applications 36(1) :69-83 ;所述文献的内容通过引用结合到本文中。

[0160] 在一种人源化方法中,并非将整个动物 CDR 移植到人构架上,而是仅将决定特异性的残基 (SDR) (用于抗体-配体结合的 CDR 的最关键残基) 移植到人构架上 (Kashmiri 等 (2005) Humanized Antibodies and their Applications 36(1) :25-34 ;所述文献的内容通过引用结合到本文中)。在一个人源化的替代方法中,根据人 CDR 与有待人源化的动物 CDR 的结构相似性,选择来自一系列人种系基因的人构架序列 (Hwang 等 (2005) Humanized Antibodies and their Applications 36(1) :35-42 ;所述文献的内容通过引用结合到本文中)。

[0161] 构架改组是人源化的另一方法,它允许鉴定人构架组合,其可支持小鼠或其它动物 CDR 的功能性特征,而不需要合理设计或结构信息。在该方法中,可通过动物 MAb 的 CDR 与相应人构架库的符合读框的融合,产生组合 Fab 文库,所述人构架库包括所有已知重链和轻链人种系基因。然后可筛选 Fab 文库的抗原结合。亲本 Mab 的轻链和重链在进一步选择步骤中可被连续人源化。参见 Dall'Acqua 等 (2005) Humanized Antibodies and their Applications 36(1) :43-60 ;所述文献的内容通过引用结合到本文中。

[0162] 在一个已成功用于制备至少一种 FDA 批准的人用抗体的替代方法中,指导的选择可用于进行一系列从啮齿类形式到啮齿类抗体的人形式的转换,即通过使用与起始的啮齿类抗体和噬菌体或核糖体展示具有类似特性的一组人抗体。参见 Osbourn 等 (2005) Humanized Antibodies and their Applications 36(1) :61-68 ;所述文献的内容通过引用结合到本文中。在该方法中,根据对目标抗原的结合作用,对这一组人抗体或 V 区进行筛选。所得抗体完全是人源的。

[0163] 制备部分至完全人抗体的技术是本领域已知的,任何这类技术都可使用。按照一个实施方案,在经改造以表达人重链和轻链抗体基因的转基因小鼠中可产生完全人抗体系列。已经制备了这类转基因小鼠的多个品系,其可产生不同类别的抗体。可以使来自能产生所需抗体的转基因小鼠的 B 细胞融合,以产生杂交瘤细胞系,用于持续产生所需抗体。(参见例如 Russel 等 (2000) *Infection and Immunity* April 2000 :1820-1826 ;Gallo 等 (2000) *European J. of Immun.* 30 :534-540 ;Green (1999) *J. of Immun. Methods* 231 :11-23 ;Yang 等 (1999) *J. of Leukocyte Biology* 66 :401-410 ;Yang (1999) *Cancer Research* 59 (6) :1236-1243 ;Jakobovits (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 31 :33-42 ;Green, L. 和 Jakobovits (1998) *J. Exp. Med.* 188 (3) :483-495 ;Jakobovits (1998) *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7 (4) :607-614 ;Tsuda 等 (1997) *Genomics* 42 :413-421 ;Sherman-Gold (1997) *Genetic Engineering News* 17 (14) ;Mendez 等 (1997) *Nature Genetics* 15 :146-156 ;Jakobovits (1996) *WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, THE INTEGRATED IMMUNE* 第 IV 卷,194.1-194.7 ;Jakobovits (1995) *Current Opinion in Biotechnology* 6 :561-566 ;Mendez 等 (1995) *Genomics* 26 :294-307 ;Jakobovits (1994) *Current Biology* 4 (8) :761-763 ;Arbones 等 (1994) *Immunity* 1 (4) :247-260 ;Jakobovits (1993) *Nature* 362 (6417) :255-258 ;Jakobovits 等 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (6) :2551-2555 ;美国专利 6,075,181)。

[0164] 也可通过杂交瘤产生人单克隆抗体,所述杂交瘤包含得自转基因非人类动物(例如转基因小鼠)的 B 细胞及与其融合的无限增殖化细胞,其中该 B 细胞的基因组中含有人重链转基因和轻链转基因。本发明的抗体也可经修饰,产生嵌合抗体。嵌合抗体是抗体重链和轻链的各个区是由来源于不止一个物种的 DNA 所编码。参见例如 U. S. 4,816,567。

[0165] 可以使用本发明的任何重组抗体或其抗体片段,只要它可与至少两种选自蛋白亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 的干扰素 α (“IFN α ”) 蛋白亚型特异性反应,但不中和 IFN α 蛋白亚型 D 的至少一种生物活性。经已知生物测定方法检测,抗体也可中和 IFN α ,例如所述生物活性是 MxA 启动子的活化或抗病毒活性。一个这样的抗体是能与一种或多种 IFN α 亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 发生特异性反应、但却不与亚型 D 反应的抗体,并且包含 CDR、衍生物或其选自以下的部分、以下部分的衍生物和它们的组合:

[0166] V_H1 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :4 ;

[0167] V_H2 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :6 ;

[0168] V_H3 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :8。

[0169] V_L1 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :12 ;

[0170] V_L2 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :14 ;

[0171] V_L3 ,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :16。

[0172] 抗体也可包括抗体和 / 或抗体片段,其中这些氨基酸序列中有一个或多个氨基酸缺失、添加、取代和 / 或插入,并且能与 IFN α 亚型 A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、K、4a、4b 和 WA 发生特异性反应的抗体和 / 或抗体片段也包括在本发明的范围之内。

[0173] 在本发明中,氨基酸序列中有一个或多个氨基酸缺失、取代、插入或添加,是指免疫球蛋白主链上的一个或多个位点上的一个或多个氨基酸发生缺失、取代、插入和 / 或添

加的修饰和 / 或突变。在同一氨基酸序列中可同时引入一个或多个缺失、取代、插入和 / 或添加。而且,取代、插入或添加的氨基酸残基可以是天然或非天然的。天然氨基酸残基的实例包括 L- 丙氨酸、L- 天冬酰胺、L- 天冬氨酸、L- 谷氨酰胺 (L-glutamine)、L- 谷氨酸、甘氨酸、L- 组氨酸、L- 异亮氨酸、L- 亮氨酸、L- 赖氨酸、L- 甲硫氨酸、L- 苯丙氨酸、L- 脯氨酸、L- 丝氨酸、L- 苏氨酸、L- 色氨酸、L- 酪氨酸、L- 缬氨酸、L- 半胱氨酸等。

[0174] 可以被取代的氨基酸残基的实例可以在一个或多个以下分组内找到,例如:

[0175] A 组:亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2- 氨基丁酸、甲硫氨酸、O- 甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸;

[0176] B 组:天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2- 氨基己二酸、2- 氨基辛二酸;

[0177] C 组:天冬酰胺、谷氨酰胺;

[0178] D 组:赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4- 二氨基丁酸、2,3- 二氨基丙酸;

[0179] E 组:脯氨酸、3- 羟脯氨酸、4- 羟脯氨酸;

[0180] F 组:丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸;和

[0181] G 组:苯丙氨酸、酪氨酸。

[0182] 术语“抗体衍生物”还包括“线状抗体”。线状抗体的制备方法是本领域已知的,参见 Zapata 等 (1995)Protein Eng. 8(10):1057-1062。简而言之,线状抗体包括一对串联 Fd 区段 ($V_H-C_H1-V_H-C_H1$),其来自一对抗原结合区。线状抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0183] 可以通过已知方法,从重组细胞培养物中回收和纯化本发明的抗体,所述方法包括但不限于蛋白 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱 (“HPLC”) 也可用于纯化。

[0184] 本发明的抗体包括天然纯化产物,化学合成方法的产物和通过重组技术从真核宿主或如上所述的原核细胞中产生的产物,所述真核宿主包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。

[0185] 在本发明的某些方面,检测性或治疗性地标记抗体是有用的。将抗体与这些试剂缀合的方法是本领域已知的。仅为说明的目的,抗体可以用放射性原子、生色团、荧光团等可检测部分来标记。这样的标记抗体可用于诊断技术,可用于体内,或用于分离的试样。抗体也可以是缀合的,例如与化疗药或毒素等药物缀合。它们可以与细胞因子、配体、另一抗体结合。与抗体偶联以达到抗肿瘤效果的合适试剂包括细胞因子,例如白介素 2 (IL-2) 和肿瘤坏死因子 (TNF);光敏剂,用于光动力疗法,包括四磺酸酞菁铝 (III)、血卟啉和酞菁;放射性核素,例如碘-131 (^{131}I)、钇-90 (^{90}Y)、铋-212 (^{212}Bi)、铋-213 (^{213}Bi)、锝-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、铼-186 (^{186}Re) 和铼-188 (^{188}Re);抗生素,例如多柔比星、阿霉素、柔红霉素、甲氨蝶呤、道诺霉素、新制癌菌素和卡铂;细菌、植物和其它毒素,例如白喉毒素、假单胞菌外毒素 A、葡萄球菌肠毒素 A、相思豆毒蛋白-A 毒素、蓖麻毒蛋白 A (脱糖基化蓖麻毒蛋白 A 和天然蓖麻毒蛋白 A)、TGF- α 毒素、来自中国眼镜蛇 (*naja naja atra*) 的细胞毒素和多花白树毒蛋白 (gelonin) (一种植物毒素);来自植物、细菌和真菌的核糖体失活蛋白,例如局限曲菌素 (一种由局限曲霉 (*Aspergillus restrictus*) 产生的核糖体失活蛋白)、皂草毒蛋白 (一种由肥皂草 (*Saponaria officinalis*) 产生的核糖体失活蛋白) 和 RNA 酶;酪氨酸激酶抑制剂;ly207702 (一种二氟化嘌呤核苷);含有脂质体的抗 cystic 剂 (anti cystic agents)

(例如反义寡核苷酸、编码毒素的质粒、甲氨蝶呤等);和其它抗体或抗体片段,例如F(ab)。

[0186] 对于含有与有机分子共价结合的抗体的制剂而言,它们可以用合适方法来制备,例如通过与一种或多种修饰剂反应。其实例包括修饰和活化基团。本文所用的术语“修饰剂”是指包含活化基团的合适有机基团(例如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。其具体实例在上文已经提供。“活化基团”是化学部分或官能团,它们可在合适条件下与第二化学基团反应,由此在修饰剂与第二化学基团之间形成共价键。其实例是亲电子基团,例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺基酯(NHS)等。可与硫醇类反应的活化基团包括例如马来酰亚胺、碘乙酰基、丙烯酰基(acryloyl)、吡啶基二硫化物、5-巯基-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB-硫醇)等。醛官能团可以与含胺或酰肼的分子偶联,而叠氮基可以与三价磷基团反应,形成氨基磷酸酯键或亚氨基磷酸酯键(phosphorimidelinkage)。将活性基团引入分子内的合适方法是本领域已知的(参见例如Hermanson(1996)BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press:San Diego, Calif.)。活性基团可以直接连接有机基团(例如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)或通过接头部分连接有机基团,接头部分例如二价 C_1-C_{12} 基团,其中一个或多个碳原子可被氧、氮或硫等杂原子置换。合适的接头部分包括例如四乙二醇。可产生包含接头部分的修饰剂,例如在1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)存在下,通过使一-Boc-烷基二胺(例如一-Boc-1,2-乙二胺、一-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸反应,在游离胺与脂肪酸羧酸酯之间形成酰胺键。Boc保护基可以从产物上脱去,即通过用三氟乙酸(TFA)处理,暴露伯胺,如上所述其可与另一羧酸酯偶联,或者可以与马来酸酐反应,所得产物经环化产生活化的脂肪酸马来酰亚胺衍生物。

[0187] 通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应,可产生本发明的修饰抗体。例如,有机部分可以与抗体以非位点特异性方式连接,即通过使用胺-反应性修饰剂,例如PEG的NHS酯。也可通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(例如链内二硫键),制备修饰的人抗体或抗原结合片段。然后,还原的抗体或抗原结合片段可与硫醇反应性(thiol-reactive)修饰剂反应,产生本发明的修饰抗体。用合适方法(例如反向蛋白水解),可制备包含有机部分的修饰的人抗体和抗原结合片段,所述有机部分与本发明抗体的特定位点键合。一般性参见Hermanson(1996)BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press:San Diego, Calif. (1996)。

[0188] 蛋白质和多肽的制备和分离。多肽和蛋白质是各种本发明方法的必要组分。例如可以用市售自动化肽合成仪,通过化学合成,得到重组抗体、变异体、衍生物及其片段,所述合成仪例如以下公司生产的合成仪:Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., 430A型或431A型, Foster City, CA, USA。合成的蛋白质或多肽可以沉淀下来,再进一步纯化,例如通过高效液相色谱(HPLC)。或者,可通过本文所述的已知重组方法,使用以上所述的宿主细胞和载体系统,获取蛋白质和多肽。它们也可通过天然存在的蛋白质的酶促水解或切割而制备。

[0189] 可通过标准方法,分离或纯化蛋白质和肽,所述方法包括色谱(例如离子交换、亲和色谱和大小柱色谱法)、离心、不同溶解度或通过蛋白质纯化的任何其它标准技术。或者,亲和标记(例如hexa-His(Invitrogen)、麦芽糖结合域(New England Biolabs)、流感病毒包膜序列(Kolodziej等, (1991)Methods Enzymol. 194:508-509)和谷胱甘肽-S-转移酶)可连接到本发明的肽上,以便通过合适的亲和柱进行纯化。分离的肽也可采用蛋白水解、核

磁共振和 X 射线晶体学等技术进行物理表征。

[0190] 众所周知,可对任何肽进行修饰,使其特性改变。可以修饰本发明所用的肽,使其包含非天然氨基酸。因此,肽可包含 D-氨基酸、D-氨基酸和 L-氨基酸的组合以及各种“设计者”氨基酸(例如 β -甲基氨基酸、C- β -甲基氨基酸和 N- α -甲基氨基酸等),以赋予肽特定性能。

[0191] 在又一个实施方案中,选择赋予有用化学和结构特性的肽亚基。例如,含有 D-氨基酸的肽在体内可抵抗 L-氨基酸特异性蛋白酶。可以合成用 D-氨基酸修饰的化合物,其中氨基酸以相反方向排列,以产生本发明肽的逆-倒位肽(retro-inverso peptide)。另外,本发明包括制备具有更好的确定结构特性的肽,并包括使用肽模拟物和肽模拟键,例如酯键,以制备具有新特性的肽。在另一个实施方案中,可以产生掺入还原肽键的肽,即 $R1-CH_2NH-R2$,其中 R1 和 R2 是氨基酸残基或序列。还原肽键可以二肽亚单位形式引入。这样的分子能抵抗肽键水解,例如蛋白酶活性。这样的分子将会使肽具有独特功能和活性,例如体内半衰期延长,这是因为抵抗代谢分解或蛋白酶活性所致。此外,众所周知,在某些系统中,受限制的肽(constrained peptide)表现出功能活性增加(Hruby(1982)Life Sciences31:189-199 和 Hruby 等(1990)Biochem J. 268:249-262);本发明提供产生受限制的肽的方法,所述肽在所有其它位置上都掺入随机序列。

[0192] IFN α 生物活性测定。单核细胞分化。活化 T 和 B 淋巴细胞的产生需要抗原呈递细胞(“APC”)的募集和成熟。这些 APC 包括 B 细胞、单核细胞/巨噬细胞和树突细胞。SLE 患者血清含有 IFN α ,可激活 DC,而活化的活性可阻断多克隆或单克隆抗体制剂。该活性的检测和定量检测方法在科技文献和专利文献中均有描述(例如参见专利公布号 U. S. 2004/0067232A1 第 0136-0150 段),相关部分通过引用结合到本文中。

[0193] MxA 启动子的活化。可以采用 MxA 启动子与报道基因融合的报道基因测定,检测 IFN α 激活 MxA 启动子的能力和本发明抗 IFN α 单克隆抗体阻断该活化的能力,所述报道基因例如氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因或萤光素酶(luc)基因,优选萤光素酶基因。CAT 和萤光素酶的测定方法是本领域技术人员已知的。优选 MxA 启动子的活性是在用 MxA 启动子/报道基因融合构建体稳定转化的 A549 细胞中进行测定的。A549 细胞是肺癌细胞系,可得自 ATCC(产品号 CC1-185)。MxA(a. k. a. Mx1)启动子可以是人、小鼠或大鼠的启动子。人 MxA 启动子的序列和结构公开于 Genbank 检索号 X55639,Chang 等(1991)Arch Virol. 117:1-15;和 Ronni 等(1998)J Interferon Cytokine Res. 18:773-781。人 MxA 启动子/萤光素酶融合构建体和萤光素酶测定公开于美国专利申请 20040209800 和 Rosmorduc 等(1999)J of Gen Virol 80:1253-1262。人 MxA 启动子/CAT 融合构建体和 CAT 测定公开于 Fernandez 等(2003)J Gen Virol 84:2073-2082 和 Fray 等(2001)J Immunol Methods 249:235-244。小鼠 MxA(Mx1)启动子公开于 Genbank 检索号 M21104;Hug 等(1988)Mol Cell Biol 8:3065-3079;和 Lleonart 等(1990)Biotechnology 8:1263-1267。小鼠 MxA 启动子/萤光素酶融合构建体和萤光素酶测定公开于 Canosi 等(1996)J Immunol Methods 199:69-67。

[0194] 实施例

[0195] 材料与方法

[0196] 人 IFN- α 的来源。重组 IFN- α 亚型蛋白得自 PBL Biomedical Laboratories(PBL)。由制造商测定的亚型和比活包括:IFN- α A(3.8×10^8 U/

mg) ;IFN- α 2 (2.77×10^8 U/mg) ;IFN- α B2 (4.63×10^8 U/mg) ;IFN- α C (2.31×10^8 U/mg) ;IFN- α D (7.5×10^7 U/mg) ;IFN- α F (3.6×10^8 U/mg) ;IFN- α G (2.33×10^8 U/mg) ;IFN- α H2 (1.05×10^8 U/mg) ;IFN- α I (1.4×10^8 U/mg) ;IFN- α J1 (2.6×10^8 U/mg) ;IFN- α K (1.48×10^8 U/mg) ;IFN- α 1 (1.4×10^8 U/mg) ;IFN- α 4a (2.12×10^8 U/mg) ;IFN- α 4b (1.8×10^8 U/mg) ;IFN- α WA (2.4×10^8 U/mg) ;和 IFN- β (8.23×10^7 U/mg)。白细胞 IFN 购自 Sigma 公司 (I-2396,批号 111K1603)。

[0197] 自制含有人 IFN α 亚型复杂混合物的 PBMC- 流感病毒上清液 (PBMC-flu),即通过用流感病毒 A/PR/8/34(H1N1) (Charles River Laboratories,批号 4XPR011022) 以 1 HAU/pDC 病毒滴度感染来自白细胞层的人 PBMC。具体地讲,在 Ficoll 上离心,从人白细胞层收获 PBMC (外周血单核细胞) 并收集含 PBMC 的界面。进行 FACS 染色 / 分析,证实浆细胞样 DC 的存在并测定它们占 PBMC 的百分率,然后用对以下物质具有特异性荧光 - 缀合的抗体染色:Lin、CD3、CD14、CD16、CD19、CD56、CD123、HLA-DR 和 CD11c (BD Pharmingen)。pDC 的特性是 CD14 阴性、CD11c 阴性和 CD123 阳性。流感病毒贮液 (无特定病原体的禽类供应商 (Specific Pathogen-Free Avian Supply);流感病毒 A/PR/8/34(H1N1) (目录号 490710;批号 4XPR011022),最终 HA 滴度 (每 0.05ml) :1 :16,777,216;Charles River Laboratories, Connecticut, USA) 稀释至 1000 HAU/ μ l (血凝素单位 / 微升) 的 RPMI 培养基 (RPMI+10% FCS+L- 谷氨酰胺)。所需的稀释病毒体积是根据 pDC 在纯化 PBMC 中的比例,使得有至少 1 HAU/pDC (即每孔应含 1×10^6 PBMC,如果你有 0.3% pDC,每孔应含 3000 pDC)。在这样的情况下,将 4-5 μ l 病毒 (1000 HAU/ μ l) 加入到每孔中)。

[0198] 从白细胞层制备的 PBMC 在 900rpm 下离心 10min,重悬于 5,000 细胞 / μ l (这可提供 1×10^6 细胞 / 孔,体积 200 μ l) 的 RPMI+10% FCS+L- 谷氨酰胺)。将细胞加上流感病毒接种在 96 板 U 型底板中,在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中孵育 24h。孵育 24h 后,细胞在各孔底部形成沉淀并形成簇。用吸管小心地从各孔收集上清液,不要吸到孔底的细胞沉淀。合并的上清液在 50ml 圆锥管中以 900rpm 离心 10min,沉淀任何残余细胞和其它培养物碎片。将含有复杂 IFN α 混合物的 PBMC- 流感病毒上清液合并,混合,然后按 0.5ml 等分试样贮存在 -80 $^{\circ}$ C 备用。

[0199] 致细胞病变效应 (CPE) 抑制测定。CPE 材料:“完全”Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM) :含酚红的 DMEM+10% FCS+2mM L- 谷氨酰胺 + 青霉素 + 链霉素 + β -2- 巯基乙醇 (β -me),96 孔平底组织培养板,A549 细胞 (ATCC CCL-185);将这些细胞培养在 Ham's F12K 培养基 +10% FCS+2 mM L- 谷氨酰胺 + 青霉素 + 链霉素 +500-800 μ g G418、1 $\times$ PBS、1 $\times$ 胰蛋白酶、“Intron A” (IFN α -2b, Schering-Plough) 对照、试样 (SLE 血清、重组 IFN α 亚型),含 / 不含杂交瘤上清液或购买的多克隆 / 单克隆抗体制剂,EMC 病毒贮液 (从 Vero 细胞单层上适于组织培养的鼠脑心肌炎病毒 (EMCV) 中制备;该病毒贮液的 ATCC 产品编号为 VR-129B,而 Vero 细胞的产品编号为 CCL-81)。

[0200] 结晶紫贮液:1.25mg NaCl+3.75 mg 结晶紫+775ml 福尔马林 / 乙醇溶液 (用 75ml 福尔马林、750ml 95%乙醇和 1500ml 蒸馏水制备) 搅拌 20min,然后通过 0.45 微米滤器过滤,贮存不超过 3 个月。用福尔马林 / 乙醇溶液按 1 : 10 稀释贮液,制备结晶紫工作液。结晶紫溶液贮存在室温下。

[0201] CPE 方法。致细胞病变效应抑制测定 (CPE) 的示意图见图 1。在 96 孔平底板

的孔中进行 CPE 测定,一式三份。对于每种测定类型,都应结合使用含不同浓度 intron A (Schering-Plough) 样品的阳性对照孔和仅含细胞 + 培养基的阴性对照孔。除去培养基,从培养瓶中收获贴壁 A549 细胞,用 PBS 洗涤一次后进行胰酶消化。向培养瓶中加入“完全”DMEM,终止胰酶消化过程。从瓶内收集胰酶消化的细胞,离心,重悬浮并计数。将浓度调节至 600,000 细胞 /ml 完全 DMEM。用于测定的孔体积为 150 μ L (加入病毒前) 和 200 μ L (加入病毒后)。50 μ L 体积是细胞,其中每孔加入 15,000 个细胞 (50 μ L, 300,000/ml 细胞悬液)。

[0202] 为了测定重组 IFN α 对病毒的抑制作用。将 100 μ L 不同浓度的 IFN α 液 (溶于完全 DMEM 中) 加入孔中,一式三份。加入 50 μ L 细胞,在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中孵育 5 小时。随后加入 50 μ L EMC 病毒 (将贮液稀释 50 倍) 并在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中继续孵育 48h。

[0203] 为了测定 SLE 血清对病毒的抑制作用。将 50 μ L (例如未稀释) 或 25 μ L (例如 2x 稀释) 的 SLE 血清加入到各孔中,一式三份。通过加入不含 FCS 的 DMEM,将体积调节至 100 μ L (注意:用该测定,在任何时间将任何类型的血清样品加入到孔中,均采用不含 FCS 的 DMEM),再加入 50 μ L 细胞,在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中孵育 4h。随后加入 50 μ L EMC 病毒 (将贮液稀释 50 倍,测定该浓度,用于我们的制备,因为最小量的贮液都可在 48 小时内杀死所有细胞),并在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中继续孵育 48h。

[0204] 为了测定 PBMC- 流感病毒上清液对病毒的抑制作用。将 50 μ L (例如未稀释) 或系列稀释的 PBMC- 流感病毒上清液加入到各孔中,一式三份。通过加入含 FCS 的 DMEM,将各孔体积调节至 100 μ L,再加入 50 μ L 细胞,在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中孵育 4h。随后加入 50 μ L EMC 病毒 (将贮液稀释 50 倍) 并在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中继续孵育 48h。

[0205] 为了测定重组 IFN α 、SLE 血清或 PBMC- 流感病毒上清液对病毒抑制的抗体介导的阻断作用,使用市售 Ab、小鼠血清或融合上清液,各 50 μ L:(i) 不含 FCS、含有市售多克隆或单克隆 Ab 制剂的 DMEM;(ii) 50 μ L 小鼠血清;或 (iii) 50 μ L 杂交瘤上清液加入各孔,使各孔此时的总体积达 100 μ L。将各板在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中孵育 1.5-2h。将 50 μ L 细胞加入到各孔并在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中孵育 5h。随后加入 50 μ L EMC 病毒 (将贮液稀释 50 倍) 并在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂ 中继续孵育 48h。

[0206] 在以上 CPE 测定中,在 48 小时孵育后用多道吸管将所有培养基从各孔中小心吸出。加入 50 μ L 结晶紫,让其染色 4-6min。小心除去结晶紫,加入 200 μ L 蒸馏水并立即除去。让各板干燥至少 30min,然后在 ELISA 读板器上、在 OD 570nm 处读数。

[0207] 为了得到阻断率 (根据所包含对照抗体或杂交瘤上清液中所含有的抗体对 IFN α 介导的针对细胞死亡的保护作用的抑制能力),在 100% 活力 (0% 细胞死亡) 的“阴性对照”(IFN α 重组、SLE 血清或 PBMC- 流感病毒上清液 + 细胞 + 病毒) 和 0% 活力 (100% 细胞死亡) 的“阳性对照”(仅有细胞 + 病毒) 的情况下将数据归一化,使用 Macintosh Prism 4.0,4.0A 版软件 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 和归一化算法,按照对照的百分率而调整所有数值。

[0208] 报道基因 (RG) 测定。RG 材料。Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM),无酚红或添加物;“完全”Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM):DMEM+ 酚红 +10% FCS+2 mM L- 谷氨酰胺 + 青霉素 + 链霉素 +2-me (β -me);Dulbecco 氏改良 Eagle 氏培养基 (DMEM),其含有除 FCS 之外的所有上述材料;ViewPlate-96,白色,组织培养-处理 (PerkinElmer Life

Sciences);93D7 细胞(转染的 A549,能在 I 型 IFN- 诱导型 MxA 启动子驱动下表达萤光素酶);这些细胞培养在 Ham's F12K 培养基 +10% FCS+2mM L- 谷氨酰胺 + 青霉素 + 链霉素 +500-800 μ g G418;1 $\times$ PBS;1 $\times$ 胰蛋白酶;"intron A"(IFN α 2b,Schering-Plough)对照;试样(SLE 血清、重组 IFN α 亚型)含/不含杂交瘤上清液或购买的多克隆/单克隆抗体制剂;BriteliteTM发光报道基因测定试剂盒(PerkinElmer Life Sciences)。

[0209] RG 方法。采用基于萤光素酶的报道基因测定,评价抗 IFN α MAbs 中和重组 IFN α 亚型、白细胞 IFN 和 PBMC- 流感病毒的生物活性的能力。RG 测定示意图见图 1。来自 IFN- 诱导型构建体(MxA 启动子/萤光素酶融合)稳定转染的 A549 细胞系(CLL-185,ATCC)的 93D7 细胞系,是由 Dr. Guenther Adolf(Boehringer-Ingelheim GmbH,Austria)惠赠。MxA 启动子/luc 融合载体包含 1.6 Kb BamHI 片段,其含有从 pSP64-Mxp(PstI-PvuII)-r β glo 上切下的鼠 MxA 启动子和 IFN 反应元件(Lleonart 等(1990)Biotechnology 8:1263-1267)以及萤光素酶编码序列的插入上游。

[0210] RG 测定在不透明 96 孔平底板(ViewPlatesTM,白壁,透明底;PerkinElmer)的各孔中进行,一式三份。对于每种测定类型,最好结合采用含不同浓度 intron A(Schering-Plough)样品的阳性对照孔和仅有细胞+培养基的阴性对照孔。

[0211] 具体地讲,除去培养基,从培养瓶中收获贴壁 93D7 细胞,用 PBS 洗涤一次后进行胰酶消化。向培养瓶中加入"完全"DMEM,终止胰酶消化过程。从瓶内收集细胞,离心,重悬浮并计数。将其浓度调节至 600,000 细胞/ml 完全 DMEM。

[0212] 来自免疫小鼠的血清、杂交瘤上清液或纯化的抗 IFN α MAbs 与重组 IFN 亚型、白细胞 IFN 或 PBMC- 流感病毒(以 100 μ L/孔的体积)在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂中预孵育 1.5 小时,然后每孔加入 93D7 细胞(50 μ L,600,000/ml 细胞悬液=30,000 个细胞),并继续再孵育 5 小时。测定孔的终体积为 150 μ L。然后用 BriteliteTM发光报道基因系统(Perkin Elmer)对测定进行显色,在加入底物 15 分钟内在 WallacMicrobeta TriluxTM闪烁和发光计数器上读数。

[0213] 为了测定重组 IFN α 对 MxA 的诱导。将 IFN α 的溶液浓度(在完全 DMEM 中)调节至各孔中放入的数量为 100 μ L。将 100 μ L IFN α 加入各孔中,一式三份,然后加入 50 μ L 细胞并在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂中孵育 5 小时。

[0214] 为了测定 SLE 血清对 MxA 的诱导作用。将 50 μ L(例如未稀释)或 25 μ L(例如 2x 稀释)的 SLE 血清加入到各孔中,一式三份。通过加入不含 FCS 的 DMEM,将每孔体积调节至 100 μ L(注意:用该测定,在任何时间将任何类型的血清样品加入到孔中,均采用不含 FCS 的 DMEM),再加入 50 μ L 细胞,在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂中孵育 5h。

[0215] 为了测定 PBMC- 流感病毒上清液对 MxA 诱导的阻断作用。将 50 μ L(例如未稀释)或系列稀释的 PBMC- 流感病毒上清液加入到各孔中,一式三份。通过加入含 FCS 的 DMEM,将各孔体积调节至 100 μ L,再加入 50 μ L 细胞,在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂中孵育 5h。

[0216] 为了测定重组 IFN α 、SLE 血清或 PBMC- 流感病毒上清液对 MxA 诱导的阻断作用,使用市售 Abs、小鼠血清或融合上清液。每孔加入 50 μ L 或所需稀释度的重组 IFN α 、SLE 血清或 PBMC- 流感病毒。各 50 μ L:(i) 不含 FCS、含有市售多克隆或单克隆抗体制剂的 DMEM;(ii) 50 μ L 小鼠血清;或(iii) 50 μ L 杂交瘤上清液加入各孔,使各孔的总体积达 100 μ L。将各板在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂孵育 1.5h。然后加入 50 μ L 细胞并在 37 $^{\circ}$ C +5% CO₂中孵育 5h。

[0217] 在测定显影之前,将 Britelite™试剂盒试剂/显影试剂(底物管、底物缓冲剂、未染色 DMEM)在室温下放置 40min。在 30min 预显影中,将测定板放置在室温下。在 10min 预显影中,用缓冲液重配冻干底物(10ml/管)。

[0218] 5 小时孵育后,用多道吸管将所有培养基从各孔中小心吸出。然后将粘稠白色阻断剂固定在 ViewPlate™的底部。每孔加入 90 μ L DMEM(无酚红)。每孔加入 90 μ L 重配 Britelite™试剂,确保吸打两次(但不要让孔中内容物溅到孔的边沿,也不要产生气泡)以充分混合试剂和培养基。该步应尽量既快速又精确地进行。板子用透明胶带密封。旋转超过 1min 但不超过 15min,然后用 Wallac MicrobetaTrilux™对各板的发光强度读数。

[0219] 为了得到阻断率(根据所包含对照抗体或杂交瘤上清液中所含有的抗体否定 MxA- 萤光素酶诱导的能力),在 100% IFN α 活性的“阳性对照”(IFN α 重组、SLE 血清或 PBMC- 流感病毒上清液+细胞)和 0% IFN α 活性的“阴性对照”(仅有细胞/培养基)的情况下将数据归一化,用软件 Prism(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) 和归一化算法,按照对照的百分率而调整所有数值。

[0220] 实施例 1:单克隆抗体细胞系的免疫和选择。IFN α MAbs 开发流程图见图 2。按照下表 1,以 2-3 周的间隔,用 5-10 μ g 各种天然白细胞 IFN α (I-2396,批号 111K1603, Sigma) 和/或混合重组蛋白(3 种重组 IFN α 亚型 A、B2 和 F(得自 PBL Biomedical Laboratories “PBL”),每种 5-10 μ g) 的 MPL[®]+TDM 乳剂(Sigma#M6536)免疫每组 5 只 6-8 周龄 Balb/c 雌性小鼠(Harlan)。MPL[®]+TDM 乳剂是 Ribi 佐剂系统,由单磷酸基-脂质 A(MPL:来自明尼苏达沙门氏菌(S. minnesota)的脱毒内毒素)和海藻糖 dicorynomycolate(TDM)/2%油(角鲨烯)-吐温 80-水乳剂组成。抗原通过腹膜内(i. p.)或皮下(s. c.)途径给予。以 3 种滴度(1:200、1:2000 和 1:20,000),预融合筛选从小鼠中收集的血清,采用报道基因(RG)测定,根据 MxA- 萤光素酶融合蛋白,通过 I 型 IFN 受体的活化,以测定对 IFN α 生物活性的阻断。在第三次加强免疫后 7 天,通过眼眶后放血,从小鼠收集血清,用上述报道基因(RG)测定,筛选 PBMC- 流感病毒的生物活性。让至少 1:2000 滴度 $\geq$ 50%中和的小鼠休息 4 周,然后给予最后一次加强免疫(可经 i. v. 或 i. p.)即 2.5 μ g 白细胞 IFN,3 天后将脾细胞与鼠骨髓瘤 Sp2/0-Ag14(CRL-8287, ATCC)融合。在 50% PEG 1500(Roche)中进行融合,使用 1 $\times$ HAT 添加物(Sigma)/DMEM+15% FCS 进行杂交瘤选择。10-14 天后筛选培养上清液对 PBMC-flu 的中和作用。根据上述 MxA/luc 报道基因(RG)生物测定,在免疫小鼠中,有 17 只能中和 PBMC- 流感病毒上清液达至少 50%(在 1:200 滴度时),其中的 14 只能中和 $\geq$ 50%(稀释度为 1:2000),有 3 只中和滴度达 1:20000。

[0221] 表 1. 单克隆抗体细胞系的免疫和选择

[0222]

	方案 1 Balb/c 小鼠	方案 2 Balb/c 小鼠	方案 3 Balb/c 小鼠	方案 4 B6 小鼠	方案 5 B6 小鼠

初次 免疫	第 0 天 10 μ g 天然 IFN α 5 只小鼠 i. p. 5 只小鼠 s. c.	第 0 天 10 μ g IFN α A、B2 和 F 5 只小鼠 i. p. 5 只小鼠 s. c.	第 0 天 5 μ g 天然 IFN α , 分为 i. p. 和 s. c. 每组 4 只共 3 组小鼠 (接受 adeno-mIFN α 在第 -2、+2 天 或第 1 次加强 免疫)	第 0 天 2.5 μ g IFN α F 5 只小鼠 i. p. 2.5 μ g IFN α F 和 B2 5 只小鼠 i. p.	第 0 天 4 μ g IFN α B2 5 只小鼠 i. p.
第 1 次 加强 免疫	第 2 周 5 μ g 天然 IFN α 5 只小鼠 i. p. 5 只小鼠 s. c.	第 2 周 5 μ g IFN α A、B2 和 F 5 只小鼠 i. p. 5 只小鼠 s. c.	第 2 周 2.5 μ g 天然 IFN α , 分为 i. p. 和 s. c.	第 2 周 2 μ g IFN α F 5 只小鼠 i. p. 2 μ g IFN α F 和 B2 5 只小鼠 i. p.	第 1.5 周 2 μ g IFN α A 5 只小鼠 i. p.

[0223]

	方案 1 Balb/c 小鼠	方案 2 Balb/c 小鼠	方案 3 Balb/c 小鼠	方案 4 B6 小鼠	方案 5 B6 小鼠
第 2 次 加强 免疫	第 5 周 5 μ g 天然 IFN α 5 只小鼠 i. p. 5 只小鼠 s. c.	第 5 周 5 μ g IFN α A、B2 和 F 5 只小鼠 i. p. 5 只小鼠 s. c.	第 5 周 1.5 μ g 天然 IFN α , 分为 i. p. 和 s. c.	第 5 周 4 μ g IFN α F 5 只小鼠 i. p. 4 μ g IFN α F 和 B2 5 只小鼠 i. p.	第 4 周 2 μ g IFN α F 5 只小鼠 i. p.
第 3 次 加强 免疫	第 10.5 周 2.5 μ g 天然 IFN α 所有小鼠 i. p.	第 9 周 2 μ g IFN α A、B2 和 F 所有小鼠 i. p.	第 8.5 周 2 μ g 天然 IFN α , i. p.	第 7 周 2 μ g IFN α F 5 只小鼠 i. p. 2 μ g IFN α F 和 B2 5 只小鼠 i. p.	N/A

第 4 次 加强 免疫	第 16.5 周 2.5 μ g 天然 IFN α 所有小鼠 i. p.	第 13.5 周 2.5 μ g 天然 IFN α 所有小鼠 i. p.	N/A	第 9 周 2.5 μ g IFN α A 所有小鼠 i. p.	N/A
-----------------------	---	---	-----	--	-----

[0224] 注意：方案 1、2 和 3 的小鼠用于制备融合物 1-6。在方案中用来自 2-3 只小鼠的合并细胞进行融合。2 只小鼠（在方案 6 中，开始用 IFN α F 免疫）合并制备融合物 8。在方案 5 中，2 只小鼠合并制备融合物 7，3 只合并制备 9。

[0225] 单克隆抗体的制备和纯化。如上所述，根据小鼠血清中和 PBMC- 流感病毒中存在的 IFN α 亚型复杂混合物的能力，鉴定作为候选者的小鼠。用从具有可接受血清滴度的小鼠中收获的脾细胞进行一系列的 8 次融合。脾细胞与 Sp2/0-Ag14 鼠骨髓瘤细胞系（ATCC 号 CRL-1581，因为其不能表达内源 Ig 链而选择）融合，接种到 96 孔平底组织培养板上，孵育 12-15 天，然后筛选上清液，以便通过上述 RG 测定方案检测多克隆抗体反应。具体地讲，将来自免疫小鼠的血清样品与来自流感病毒感染的 PBMC 的上清液在 37℃ 预孵育 1 小时，然后加入 93D7 细胞，再过 5 小时。在第 5 小时进行测定，在发光计数器上读数。前 8 次融合的概述见下表 2。从 3911 个最初孔筛选来自 8 次融合的上清液，在本文所述的 RG 生物测定中根据其稳定表明对 PBMC- 流感病毒（稀释 640 倍）介导的 MxA/luc 产生的活化有任何可见的下降的能力，鉴定出 8 个候选者（ACO-1 ~ ACO-8，都是从融合 4 分离出的）。杂交瘤细胞系通过有限稀释进行亚克隆。产生抗 IFN- α MAb 的杂交瘤适合生长在 Gibco PFHM-II (Invitrogen) 中，并在 IntegraCELLine 瓶 (Becton Dickinson) 中培养。每 5-7 天从细胞中收集上清液，并在 -80℃ 贮存。然后通过 FPLC，在蛋白 A 柱上，从 50ml 分批上清液中纯化 MAb，再针对 PBS 透析。将纯化的 MAb 分成等分试样，在 -80℃ 贮存。通过 ELISA 测定，ACO-1、2、3、4、5 和 8 与 IgG2a (ACO-1)、IgG2b (ACO-2) 和 IgG1 (ACO-3、4、5、6 和 8) 是同种型。所有这些候选者都来自脾细胞融合，所述脾细胞来自开始用白细胞 IFN 或 IFN- α A、B2 和 F 重组蛋白混合物免疫、再用白细胞 IFN 预融合 (pre-fusion) 加强免疫的小鼠；仅给予重组 IFN- α 亚型的小鼠进行的融合，没有得到任何能中和 PBMC- 流感病毒的候选者。

[0226] 表 2. 融合总结

[0227]

融合	1	2	3	4	5	6	7	8	总计
筛选	435	1644	560	396	136	217	191	332	3911
选择	12	66	2	25	0	29	5	15	154
亚克隆	3	13	0	8	0	2	0	0	26
候选者	0	0	0	6	0	2	0	0	8

[0228] 实施例 2. ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4 和 ACO-5 对市售白细胞 IFN α 或 PBMC- 流感病毒上清液生物活性的中和作用。选择能显示强烈结合并中和至少一种 IFN- α 亚型的抗

IFN- α MAbs, 检查它们对天然来源 IFN 制剂的中和能力, 已知天然来源 IFN 制剂含有各种各样的 IFN- α 亚型。为了进行这些研究, 在针对市售白细胞 IFN 和如上所述制备的 PBMC- 流感病毒上清液的 RG 生物测定中, 测定 ACO-1 至 ACO-5。在所有 3 种 MAbs 测试量 (200ng、20ng 和 2ng) 中, ACO-1、ACO-2 和 ACO-3 阻断白细胞 IFN 生物活性达至少 50% (图 3a); ACO-4 得到略大于 50% 的中和作用, 仅当测试 200 ng 时。相比之下, ACO-5 对白细胞 IFN 的表现差, 最大阻断都小于 10% 的测定信号。

[0229] 用上述 RG 测定, 将确定浓度的单克隆抗体对不同稀释度的 PBMC- 流感病毒上清液进行相对抑制。Flu/PBMC 上清液中 IFN α 的绝对浓度是未知的, 所以在该研究中仅评价相对中和能力。然而, 当 5 种 MAbs (2000ng、200ng、20ng 和 2ng) 针对 PBMC- 流感病毒而滴定时, 在所有抗体测试量下、但除最低量之外, ACO-5 都能中和至少 50% 的生物活性 (图 3b)。当对 PBMC- 流感病毒进行测试时, ACO-1 表现出最大效力, 在所有 4 个测定的 MAbs 用量下都可阻断至少 50%。ACO-5 对白细胞 IFN 和 PBMC- 流感病毒的中和作用的差异可能归因于不同 IFN- α 亚型和 / 或它们在我们测定中所用的两种不同 IFN 来源中存在的相对浓度。

[0230] 实施例 3. ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6 和 ACO-8 对重组 IFN α 亚型生物活性的抑制作用。通过 RG 测定以及传统的致细胞病变效应 (CPE) 抑制测定, 测定对 15 种重组 IFN α 亚型以及 IFN β 的中和作用, 筛选出能中和 IFN α 的候选者 ACO-1 至 6 和 ACO-8。重组 IFN- α 亚型蛋白得自 PBL Biomedical Laboratories (Piscataway, NJ); info@Interferonsource.com, 以下称为“PBL”)。制造商测定的比活见表 3。

[0231] 表 3. 抗体表征中使用的重组人 IFN- α 亚型

[0232]

IFN α 蛋白亚型 (基因)	比活 (U/mg)	产品号 (PBL)	批号 (PBL)	RG _{max} 单位	RG 平台 (IFN 的 pg)	RG 中间 (IFN 的 pg)	CPE 平台 (IFN 的 pg)	CPE 中间 (IFN 的 pg)
A (2a)	3.8×10^8	11100-1	2167	47.5	125	62.5	50	25
2 (2b)	2.77×10^8	11105-1	2122	8.31	30	15	25	12.5
B2 (8)	4.63×10^8	11115-1	2168	3.7	8	5	5	2.5
C (10)	2.31×10^8	11120-1	2118	3.47	15	4	5	2.5
D [Val ¹¹⁴] (1)	7.5×10^7	11125-1	2403	150	2000	750	750	375
F (21)	3.6×10^8	11130-9	2169	72	200	62.5	25	12.5
G (5)	2.33×10^8	11135-1	2104	116.5	500	62.5	50	25
H2 (14)	1.05×10^8	11145-1	2528	131.25	1250	200	25	12.5

I (17)	1.4×10^8	11150-1	1770	8.75	62.5	15	10	5
J1 (7)	2.6×10^8	11160-1	2105	260	1000	200	20	10
K (6)	1.48×10^8	11165-1	1359	92.5	62.5	155	25	12.5
1 [A1a ¹¹⁴] (D)	1.4×10^8	11175-1	2106	17.5	125	15	200	100
4a (4a)	2.12×10^8	11177-1	2180	10	10	2	25	12.5
4b (4b)	1.8×10^8	11180-1	1424	45	250	31	100	50
WA	2.4×10^8	11190-1	2107	30	125	15	25	12.5
IFN- β	8.23×10^7		2558	6.56				

[0233] 通过测定给定亚型中和 50% (鉴定为 1U/ml) 的致细胞病变效应的能力 (由疱疹性口腔炎病毒在牛 MDBK 细胞上产生), 得到制造商提供的中和单位 (U)。因为在生物测定中 IFN- α 效力受到许多变量 (包括测定类型、制备的各批次和不同实验室间小的技术差异) 的影响, 而且对每种亚型没有国际公认标准, 所以在这些研究中一直使用一个批号。测定了在 RG 生物测定中能得到最大反应 (RG_{max}) 的制造商定义的每种重组子的 U。在这些 IFN- α 亚型数量存在下, 在 RG 生物测定中, 滴定纯化 ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5、ACO-6 和 ACO-8。IFN- β (比活 = 8.23×10^7 U/mg) 得自 PBL。

[0234] 对于 ACO-1 针对 15 种 IFN- α 亚型的 RG_{max} 值的滴定的代表性的 RG 生物测定数据见图 4a。如图所示, 根据每次测定的 EC_{50} 值, 数值赋予每次 ACO-1 针对指定亚型的滴定。ACO-1 不能中和 IFN- α D 或 IFN- α 1, 而其它 13 种亚型在不同抗体浓度时都可被中和。对于所有 ACO-1、2、3、4、5 和 8 (中和 IFN- α 的 MAbs) 的 EC_{50} 结果 (以 ng/ml 计) 见表 4。中和率见表 5。因此, 在抗体浓度小于 300ng/ml 时, ACO-1 和 2 中和 12 种亚型 (IFN- α A、2、B2、C、F、G、H2、I、J1、4a、4b 和 WA) 的能力类似; ACO-1 也按该范围中和 IFN- α K, 虽然 ACO-2 不能。ACO-3 和 4 分别中和 9 种亚型 (IFN- α A、2、B2、C、I、J1、K、4a 和 WA) 和 6 种亚型 (IFN- α A、2、B2、C、I、J1 和 4a), 其浓度小于 300ng/ml。在给定抗体浓度限制时, ACO-8 中和 4 种亚型 (IFN- α 2、1、4a 和 4b), 而 ACO-5 仅强烈中和 3 种 (IFN- α A、2 和 WA)。MAbs 全都不能中和 IFN- β (图 4b)。

[0235] 表 4. ACO-1、2、3、4、5 和 8 对重组 IFN- α 亚型的中和作用 (EC_{50} ng/ml)

[0236]

IFN- α 亚型	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-8
A	23.15	64.17	4.82	23.57	3.61	335.5
2	16.52	38.57	0.31	19.21	0.23	180.4
B2	8.09	6.09	1.01	172.3	-----	308.2

C	0.56	2.19	3.22	152	539.3	-----
D	-----	-----	-----	-----	-----	373
F	145.8	54.05	-----	-----	704.7	349.8
G	27.07	43.29	-----	-----	465.8	-----
H2	153.3	123.7	637.1	-----	604.7	-----
I	13.5	8.4	6.32	147.1	528.1	342.6
J1	168.3	212.6	206.6	-----	646.5	488
K	235.2	352.9	239.5	475.3	444.8	-----
1	-----	-----	-----	-----	576.7	211.2
4a	2.11	5.6	0.04	55.59	597.6	134.4
4b	5.43	7.27	-----	-----	669.9	271.8
WA	84.85	106.8	250.4	-----	140.5	-----

IFN- α 亚型	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-8
A	93.6	89.4	86.7	59.5	92.7	73.1
2	90.3	88	88.8	85.3	95.8	77.6
B2	87	87.5	87	75.2	29.2	77
C	91.4	92.9	85.8	70.9	28.4	30.5
D	12.5	20.8	0	8.2	30.4	42
F	83.7	88	0	1	24.9	55.2
G	92.7	95	0	0	59.6	37.3
H2	77.5	87	22.6	6.5	16.5	25.4
I	87.1	93.3	79.6	46.7	58.9	68.5
J1	83.9	81.9	45.2	2.9	20.5	31.8
K	77.9	71.2	60	12.9	53	25.2
1	0	13.5	1	5.1	46.7	75.7
4a	67.8	67.4	64	58.3	31.6	71.3
4b	93.7	92.4	9	4.8	24.2	63.2
WA	86.9	84	55.5	5.4	85.2	14.3
IFN- β	9	0	6.5	1	0	0

[0237] 类似于 RG 测定, 设置 CPE 测定, 用未转染 A549 细胞 (ATCC 号 CCL-185, 人肺癌细胞系): 在标准 96 孔平底组织培养板中进行测定。抗体与 IFN α 亚型预孵育 (37°C 1 小时) 之后加入细胞, 5 小时后加入小鼠脑心肌炎病毒 (EMCV), 将细胞孵育 48 小时, 然后用结晶紫染色, 评价残留活细胞。对于 RG 和 CPE 测定, 通过事先滴定重组 IFN α 蛋白, 测定所用的每种 IFN α 亚型的用量, 以便在测定中得到最大 MxA- 萤光素酶诱导作用 (RG) 或保护细胞以免死亡的保护作用 (CPE)。表 6 所示数据代表生物活性阻断率, 所述阻断率是在 CPE 测定中由每种 ACO 单克隆抗体针对各 IFN α 亚型 (编码各亚型的相应基因在括号中标明) 而显示的。对于 CPE 测定, 通过事先滴定重组 IFN α 蛋白, 测定各 IFN α 亚型的用量, 以便得到以免细胞死亡的最大保护 (CPE)。N/D = 未测。如图所示, 在测定条件下, ACO-1 和 ACO-2 所能阻断的最大量 IFN α 亚型在 $\geq 90\%$ 的水平, 而 ACO-6 是最受限的。在大多数情况下, RG 和 CPE 测定结果彼此相关。

[0238] 表 6. 在 CPE 测定中 Mab 对 IFN α 亚型活性的中和率

[0239]

IFN- α	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-6
A(2a)	95.7	81.4	93.9	94.6	90.0	0.0
2(2b)	80.1	75.8	96.6	92.4	93.9	0.0
B2(8)	98.8	98.6	96.4	49.6	13.0	0.0
C(10)	99.4	98.2	92.1	65.1	21.9	0.0
D(1)	33.0	38.5	0.0	11.3	0.0	0.0
F(21)	96.6	95.4	0.0	23.5	34.5	0.0
G(5)	99.0	97.4	0.0	0.0	80.8	0.0
H2(14)	95.9	98.3	92.6	90.7	78.9	0.0
I(17)	98.0	99.8	95.0	85.1	56.2	0.0
J1(7)	98.1	97.3	92.8	47.1	61.1	0.0
K(6)	98.3	99.5	90.1	82.1	85.3	0.0
4a(4a)	82.9	83.6	81.3	N/D	0.0	0.0
4b(4b)	98.7	96.7	0.0	0.0	53.7	0.0
WA(16)	88.7	94.6	91.0	N/D	100	0.0
1(1)	16.7	22.9	15.9	11.9	64.3	0.0
IFN- α	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D

[0240] 实施例 4. ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-6 的多元分析 (multiplex analysis)。进行多元分析以评价是否包括空间结构不同的结合域。通过在 Luminex™ 100 系统上进行多元分析,对 ACO 抗体同时结合 IFN α -A 的能力进行组合分析。按照指定浓度,将与未标记 ACO 抗体(捕获)偶联的珠子与重组 IFN α -A 一起孵育,然后暴露给 PE- 标记的 ACO 抗体(报告)。该项检查表明,ACO-5 可以与任何 ACO-1、ACO-2、ACO-3 和 ACO-4 复合 (multiplex)(参见图 5 中的淡阴影)。另外,当 ACO-4 用作捕获抗体且 ACO-3 用作报告抗体时,也会发生复合作用 (Multiplexing)。因此,ACO-5 能结合 IFN α -A 结构域,该结构域在空间结构上区别于 ACO-1、2、-3 和 -4 所结合的结构域。同样,ACO-3 和 ACO-4 能结合 IFN α -A 的空间结构不同的结构域。在所有情况下,ACO-6 的结果都为阴性。

[0241] 实施例 5. ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-6 的亲合力测定。用 Biacore 2000 和 3000 光学生物传感器 (装有 CM5 传感器芯片并用 10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% P20、0.1mg/ml BSA (pH 7.4) 在 25℃ 平衡), 进行 ACO 抗体针对 IFN α -A 的动力学分析。对于 ACO 1 至 6 中的每一种, 用快脱盐柱对抗体先进行第一次缓冲液交换, 从 Tris- 甘氨酸缓冲液换成 10mM 乙酸钠缓冲液 (pH 5.0), 再用标准胺-偶联化学方法固定在 3 个流动池表面上, 同时第 4 个不修饰, 用作参考。最终 MAb 固定化密度范围为 500-1100RU (反应单位)。监控结合反应, 因为 IFN α -A 以滴定量 (0nM、0.31nM、0.93nM、2.78nM、8.33nM、25.0nM 和 75.0nM) 流过抗体和参考流动池, 流速 50 μ l/min。监测 Ab/Ag 复合物的缔合达 4 分钟, 监测解离达 12 分钟。每次结合周期结束后, 表面都用 1/1000 H₃PO₄ 再生 (除了 ACO-5 需用 1/200 H₃PO₄ 之外)。进行测定, 一式三份。结果见表 7。5 种抗 IFN- α MAb 的 K_d 值覆盖范围与 IFN- α 亚型 (所述 IFN- α 亚型被每种 MAb 中和) 的宽度以及它们在阻断白细胞 IFN 和 PBMC- 流感病毒生物活性中的效力成反比。ACO-1 表现除最低亲和力 (5.61 $\times 10^{-9}$ M), 而 ACO-5 表现出高 14 倍的亲和性 (4.00 $\times 10^{-10}$ M)。ACO-6 不结合 IFN α -A, 因此也就没有速率。

[0242] 表 7. ACO-1 至 ACO-6 与 IFN- α A 的 Biacore 动力学分析

[0243]

抗体	K _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	K _D (M)
ACO-1	7.86 $\times 10^4$	4.41 $\times 10^{-4}$	5.61 $\times 10^{-9}$
ACO-2	9.87 $\times 10^4$	1.90 $\times 10^{-4}$	1.92 $\times 10^{-9}$
ACO-3	5.12 $\times 10^5$	2.36 $\times 10^{-4}$	4.61 $\times 10^{-10}$
ACO-4	5.82 $\times 10^5$	2.74 $\times 10^{-4}$	4.71 $\times 10^{-10}$
ACO-5	5.25 $\times 10^5$	2.10 $\times 10^{-4}$	4.00 $\times 10^{-10}$
ACO-6	N/A	N/A	N/A

[0244] 实施例 6. ACO-1、ACO-2、ACO-3、ACO-4、ACO-5 和 ACO-6 与 IFN α 亚型的固相结合。通过 ELISA 测定, 评价所有 15 种 IFN α 亚型的固相结合, 用于筛选 MAb 特异性。简而言之, 将 50 μ l/ 孔的 1 μ g/ml 重组 IFN α 蛋白亚型在 4℃ 中、在 ELISA 板 (NUNCM MaxiSorp™) 上包被过夜。将包被板用 PBS+1% BSA 封闭, 与 50 μ l 25ng ACO 候选者 MAb/PBS 在 37℃ 中一起孵育 1 小时。通过与 50 μ l/ 孔 HRP 缀合的山羊抗小鼠 -IgG (Jackson ImmunoResearch) 在室温下一起孵育 30 分钟, 再与 100 μ l 孔 TMB 底物溶液 (Zymed) 一起孵育 15 分钟, 进行测定。用 100 μ l 孔 1N HCl 终止反应, 在 OD₄₅₀ 处、在 ELISA 读板器上读数。通过将背景信号值与测定的最大信号值 (在 IFN α -4a 中观察到) 归一化, 求出结合率。结果见表 8 和图 6。在 RG 生物测定中, ACO-1 和 2 都结合相同的 12 种 IFN- α 亚型, 其中它们都能有效中和, 其信号比同种型-匹配的对照而言至少大 2 倍; IFN- α 亚型 B2、K、4a 和 4b 的结合表明信号比对照大 20 倍。然而在 ACO-3、4、5 和 8 中, 观察到结合与中和能力间的差异。就 ACO-3 而言, 亚型 B2、K 和 4a 的 ELISA 信号是最高的, 尽管有以下事实: IFN- α K 中和的 EC₅₀ 值比 IFN- α B2 的 EC₅₀ 高 200 倍, 比 IFN- α 4a 高 4 倍; 亚型 J1 能明显结合, 而它在生物测定中被

中和却是不可检测的。ACO-4 和 5 的结合和中和特性彼此成反比关系。尽管 ACO-4 和 5 各自强烈结合一种亚型（分别是 IFN- α 4a 和 2），但 ACO-4 能结合的亚型比它能中和的更多，而 ACO-5 能中和（虽然在高 EC_{50} 值）的亚型比它能结合的更多。可能的解释是这两种 MAb 在水相 (RG) 与固相 (ELISA) 测定中所识别的特定表位的易接近性的差异。ACO-8 不能强烈结合任一所测 IFN- α 亚型；它表现出与 IFN- α D、1 和 4a 的结合小 20 倍。ACO-6 不结合任何亚型。

[0245] 表 8. ACO-1、2、3、4、5 和 8 与重组 IFN- α 亚型的结合

[0246]

IFN- α 亚型	ACO-1	ACO-2	ACO-3	ACO-4	ACO-5	ACO-8
A	<u>6.4</u>	<u>9.8</u>	<u>8.4</u>	<u>7.2</u>	1.7	1.0
2	<u>8.7</u>	<u>7.0</u>	<u>9.8</u>	<u>9.0</u>	<u>3.4</u>	1.1
B2	24.3	32.7	39.2	<u>13.2</u>	1.3	1.1
C	<u>5.2</u>	<u>5.4</u>	<u>3.2</u>	<u>2.2</u>	1.5	1.0
D	1.2	1.4	1.0	<u>2.5</u>	1.7	<u>3.7</u>
F	<u>5.3</u>	<u>10.8</u>	1.0	<u>2.8</u>	1.4	1.4
G	<u>7.4</u>	<u>8.5</u>	0.9	<u>2.4</u>	1.3	1.1
H2	<u>7.5</u>	<u>10.9</u>	<u>9.0</u>	<u>4.5</u>	1.1	1.3
I	<u>7.8</u>	<u>12.5</u>	<u>8.9</u>	<u>3.9</u>	1.3	1.1
J1	<u>2.1</u>	<u>3.0</u>	1.8	<u>2.6</u>	1.4	1.1
K	23.2	22.3	27.7	<u>15.1</u>	1.4	1.1
1	1.3	1.1	1.0	<u>2.7</u>	1.6	<u>2.8</u>
4a	54.9	51.6	59.0	38.3	1.4	<u>3.3</u>
4b	22.2	26.1	1.0	<u>2.6</u>	1.4	1.4
WA	<u>3.2</u>	<u>3.3</u>	<u>6.2</u>	<u>3.2</u>	1.6	1.1

[0247] 下划线表示信号比匹配的对照大 2 倍。粗体表示信号比匹配的对照大 20 倍。比匹配的对照小 2 倍的信号表示不明显结合。

[0248] 实施例 7. ACO-1、ACO-2 和 ACO-3 单克隆抗体对 SLE 患者血清生物活性的阻断。用抗病毒测定评价抗 IFN- α MAb 中和 SLE 患者血清保护活性的能力，所述患者患有活动性疾病，一旦脑心肌炎病毒 (RMCV) 感染，A540 细胞 (CCL-185, ATCC) 就会死亡。测定了表现出

最广泛 IFN- α 亚型、白细胞 IFN 和 PBMC- 流感病毒中和特性的抗体 (ACO-1、2 和 3)。SLE 血清得自 4 名活动性 SLE 患者 (称为 SLE-43、133、140 和 BC), 是根据 IFN 和粒细胞生成基因表达标记 (特征来自其血单核细胞) 来选择的。在 CPE 生物测定中, 筛选 SLE 血清对病毒感染的保护作用, 然后进行 MAbs 中和测定。在这些分析中不用 RG 测定, 是因为与 CPE 测定 (48 小时) 相比, RG 生物测定在相对较短孵育周期 (5 小时) 内血清因子抑制细胞与 ViewPlates™ 结合。Vero 细胞 (CCL-81, ATCC) 用 EMCV (VR-129B, ATCC) 感染, 从上清液中制备工作病毒贮液。在组织培养 - 处理的平底 96 孔板中进行测定, 一式三份, 在 37°C +CO₂ 中与 A549 细胞 (15,000 细胞 / 孔, 各 50 μ l) 一起孵育过夜。将抗 IFN- α MAbs 和 SLE 患者血清加入到各板 (100 μ l / 孔) 并预孵育 4 小时, 然后加入 EMCV (稀释到最小浓度, 50 μ l, 在 48 小时内能杀死 100% 未保护细胞)。继续孵育 48 小时, 再用结晶紫染色, 在 OD₅₇₀ 处、在 ELISA 读板器上读数。对照是仅有血清、仅有培养基 (-) 和泛中和多克隆抗体 (pAb, 兔抗人 IFN- α , PBL)。结果见图 7a-d, 表示三次重复实验的平均值。尽管它们具有较低亲和性, 但是 ACO-1 和 2 在某种程度上能中和所有 4 种血清。ACO-3 不能阻断 SLE-43、140 或 BC。在某些情况下, 相关同种型对照抗体阻断血清的能力 (IgG2b 对于 SLE-43, 所有 3 种同种型对于 SLE-BC) 可能由从一个患者到另一个患者的其它血清组分的天然变异所致, 其对于测定所用细胞具有细胞毒性。

[0249] 实施例 8. ACO-1 和 ACO-2 与灵长类 IFN- α 的交叉反应性。为了在人体临床试验开始之前进行临床前安全性 / 毒性研究, 鉴定动物模型是有用的, 其中内源性 IFN- α 与人源化抗 IFN- α 单克隆抗体反应。测定 2 个候选者 (即鼠抗人 IFN- α Ab ACO-1 和 ACO-2) 中和灵长类 IFN- α 的能力。具体地讲, 当用纯化猕猴 IFN- α 4b (156pg / 孔) 刺激时, 在 A549 细胞中测定抗体阻断 MxA- 萤光素酶报道基因诱导的能力。如图 8 所示, 抗体 ACO-1 和 ACO-2 强烈阻断报道基因的诱导 (分别是 A 和 B), 而 ACO-3 在高浓度是甚至都不能阻断 (C)。人与猕猴的 IFN- α 间的同源性是高度保守的。此外, 市售抗人 IFN- α 抗体已经表现出与恒河猴和 cynomologous 猴同源物 (homolog) 的交叉反应。这些数据表明灵长类是合适的安全性筛选模型。

[0250] 实施例 9. ACO-1 重链和轻链的序列。用简并引物库进行 RT/PCR, 从表达 ACO-1 的杂交瘤中扩增 mRNA。用一组 6 个简并引物库 (HA-HG) 扩增重链可变区 mRNA, 并用一组 8 个简并引物库 (LA-LI) 扩增轻链可变区 mRNA。用以下引物库得到扩增产物: HA、HB、HE、HF、LB、LC 和 LG。用库 LI 没有扩增 PCR 产物, 因此轻链来自 κ 簇。各产物经克隆, 每种产物都有几个克隆进行了测序。

[0251] 鉴定了 2 种不同的重链序列。库 HA 和 HF 扩增一个序列, 其编码终止密码子在构架区 3 末端的截短重链。因此不一定是该重链可形成能结合抗原的抗体。

[0252] 库 HB 和 HE 扩增一个序列, 其不同于 HA 和 HF, 编码全长小鼠 V_H 区, 如图 9 所示。全长重链 DNA 序列是 SEQ ID NO:1, 而全长氨基酸序列是 SEQ ID NO:2。编码 CDR V_H1 (TACACCTTACCAACTACTGGATGCAC; SEQ ID NO:3)、V_H2 (GAGATTAATCTAGCCACGGTCGTA CTATCTACAATGAAAACTTCAAGAGC; SEQ ID NO:5) 和 V_H3 (GGGGGACTGGGACCCGCCTGGTTTGCTT AC; SEQ ID NO:7) 的 DNA 序列用斜体表示, 而氨基酸序列 V_H1 (YTFTNYWMH; SEQ ID NO:4)、V_H2 (EINPSHGRITYNENFKS; SEQ ID NO:6) 和 V_H3 (GGLGPAWFAY; SEQ ID NO:8) 用下划线表示。

[0253] 鉴定了 2 种轻链序列。库 LB 和 LC 扩增一个序列, 其排列已经有文件详细记载, 是

在某些杂交瘤中发现的异常截短 κ 轻链。库 LG 扩增一个序列,是全长序列,不同于库 LB 和 LC 所扩增的序列。轻链序列见图 10。全长轻链 DNA 序列是 SEQ ID NO :9,而全长氨基酸序列是 SEQ ID NO :10。编码 CDR V_L1 (AGTGCCGGCTCAAGTGTAGATTCCAGCTATTTGTAC ;SEQ IDNO :11)、 V_L2 (AGCACATCCAACCTGGCTTCT ;SEQ ID NO :13) 和 V_L3 (CATCAGTGGAGTAGTTACCCATTACAG ;SEQ ID NO :15) 的 DNA 序列用斜体表示,而氨基酸序列 V_L1 (SAGSSVDSSYLY ;SEQ IDNO :12)、 V_L2 (STSNLAS ;SEQ ID NO :14) 和 V_L3 (HQWSSYPFT ;SEQID NO :16) 用下划线表示。

[0254] 对得自杂交瘤 ACO-1 的序列进行分析,概述于表 9。可变区与它们最近的人种系序列表现出高度同源性 (67% -65%), 构架序列与人种系数据库具有相近的同源性。

[0255] 表 9 :克隆 ACO-1

[0256]

	H 链	L 链
CDR ^a 1 长度	V_H1 :9aa	V_L1 :12aa
CDR2 长度	V_H2 :17aa	V_L2 :7aa
CDR3 长度	V_H3 :10aa	V_L3 :9aa

[0257]

小鼠种系	J558.33	Vk ae4
最接近的人种系 ^b	VH1-46 (67%)	L6 (65%)
最接近的人 FW1 ^b	VH1-46/18/8/3/2 (80%)	L20/A11/L6 (69%) L4/18a/018/012/L19/L18
最接近的人 FW2 ^b	VH1-46/69/18/2 (78%)	L12/L11/08/02/L9/L8/L5 (80%)
最接近的人 FW3 ^b	VH1-69 (65%)	A26/A10/A14 (75%)
最接近的人 J ^b	J4 (92%)	J2 (92%)

[0258] ^aCDR 定义和序列编号按照 Kabat

[0259] ^b所标明的种系 ID 后面是 % 同源性

[0260] 实施例 10. 单克隆抗体的人源化及其表征。用本领域已知方法,将鼠互补决定区移植到人抗体构架上 (CDR 移植), 制备人源化抗体 (参见 Jones 等, (1986) Nature, 321 : 522-525 ;Reichmann 等, (1988) Nature, 332 :323-329 ;Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2 :593-596 ;和 Clark (2000) Immunol. Today 21 :397-402)。人源化抗体与上述鼠单克隆抗体具有同样的结合和功能参数。

[0261] 实施例 11. 用人源化单克隆抗体治疗 SLE。按照本领域已知的并描述于以下文献的方法,用微阵列分析监测 IFN α 标记 :Bennett 等 (2003), 出处同上和 Baechler 等 (2003), 出处同上。这一新工具用于分类 (stratify) (即阳性 IFN α 标记包含标准), 以及监测患者。该分析也可用于测定哪些患者适于用本发明的组合物和方法进行治疗。一方面, 给予本发明抗体会使该标记消失。一方面, 本领域技术人员可确定何时达到本发明方法的

目的以及给予抗体的有效量,当定义为在有效时间内(例如约4周)IFN α 标记需要量抑制 $\geq 50\%$ 时。

[0262] 可以输注有效量,例如约1mg/kg,第2次2.5mg/kg,第3次5mg/kg抗体,必要时,第4次10mg/kg。每个患者的“计算最佳剂量”定义为在约4周内,可安全给予并达到至少50% IFN α 标记被抑制的量。

[0263] 每周监测患者的IFN α 标记。IFN α 标记的重现时间决定给药间隔。例如,如果1mg/kg剂量在仅2周内就减少 $\geq 50\%$ 标记,则患者将接受第2次给予2.5mg/kg。如果每周监测表明仅3周就有 $\geq 50\%$ 标记抑制,则患者将接受第3次给予5mg/kg。测定10mg/kg的最大剂量,目标是鉴定在至少4周达到 $\geq 50\%$ IFN α 标记抑制的剂量。

[0264] 用任何可接受的方法测定功效。可接受的方法包括但不限于PBMC的微阵列分析(一旦干扰素标记消失即可确定功效)、PBMC的流式细胞术(T/B淋巴细胞计数增加可确定功效)、浆细胞增多现象下降和不成熟嗜中性粒细胞存在的减少或血清细胞因子多元分析(通过使用luminex分析)。

[0265] 生物保藏。ACO-1至ACO-6杂交瘤细胞系保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,10801University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA(ATCC))并给予下表10所列出的保藏号。

[0266] 表10

[0267]

杂交瘤细胞系	ATCC 保藏号	保藏日期
ACO-1	PTA-6557	02/08/2005
ACO-2	PTA-6558	02/08/2005
ACO-3	PTA-6559	02/08/2005
ACO-4	PTA-6560	02/08/2005
ACO-5	PTA-6561	02/08/2005
ACO-6	PTA-6562	02/08/2005

[0268] 这些保藏是依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约的规定而作出的。这保证活的保藏培养物自保藏日起能维持30年。依据布达佩斯条约的条款,保藏材料在ATCC保藏并受Baylor Research Institute与ATCC之间的协议约束。根据该协议,一旦发布相关美国专利或向公众公开任何美国或外国专利申请(无论哪个在先),就应保证永久而无限限制地向公众提供保藏培养物的后代。该协议还保证,按照35 U. S. C. § 122及其委员会的法律追溯力(包括37 C. F. R. § 1.14,尤其参考866 OG 638),经专利委员会确定的任何方式都可以获得保藏培养物的后代。

[0269] 本申请的受让人已同意,如果在合适条件下培养时保藏材料的培养物死亡或被遗失或破坏,则这些材料将在得到通知后快速地用另一相同材料替代。获得保藏材料的一方不得通过任何违反任何政府有关部门依照专利法授予所准许的专利权的行为实施本发明。

[0270] 可以理解,本发明所述具体实施方案是以说明性的方式出现,不得视为对本发明的限制。在不偏离本发明范围的情况下,本发明的主要特征适用于各种实施方案。本领域技术人员知道或能确定使用不超过常规实验,本文所述的具体方法有大量的等同方法。这

样的等同方法被认为落入本发明范围之内并由权利要求书所涵盖。

[0271] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请都属于本发明所属领域技术人员的水平。所有出版物和专利申请、特别是其相关部分都通过引用结合到本文中,其程度如同每个单独出版物或专利申请具体而单独指明通过引用结合到本文中一样。

[0272] 在权利要求书中,例如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、“含有”、“涉及”等表达方式都被认为是开放式的,意即包括但不限于。只有表达方式“由……组成”和“基本上由……组成”才分别是封闭式或半封闭式表达方式。

[0273] 按照本发明所公开内容,无需过多实验就可以制备和实施本文公开和要求保护的所有组合物和/或方法。尽管本发明的组合物和方法已经通过优选实施方案进行了描述,但是本领域技术人员显而易见的是,在不偏离本发明的构思、精神和范围的情况下,可以对本文所述的组合物和/或方法以及本文所述方法的步骤或步骤顺序进行改变。更准确地讲,用某些化学和生理上相关的试剂替代本文所述试剂而得到相同或相似的结果,是显而易见的。所有这些对本领域技术人员来说是显而易见的相似替代和修改都被视为落入所附权利要求书限定的本发明精神、范围和构思之内。

[0001]

CPCH0762947P

序 列 表

<110> 贝勒研究院(Baylor Research Institute)

Banchereau, Jacques

Prilliman, Kiley

Pascual, Virginia

Palucka, Anna Karolina

<120> 抗干扰素 α 单克隆抗体及其使用方法

<130> ARG032W0

<140> 尚未确定

<141> 2006-02-09

<150> US 60/652,233

<151> 2005-02-10

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 1

cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gaa ctg gtg aag cct ggg gct
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1

5

10

15

48

[0002]

tca gtg aag ctg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttc acc aac tac	96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr	
20 25 30	
tgg atg cac tgg gtg aag cag agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att	144
Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga gag att aat cct agc cac ggt cgt act atc tac aat gaa aac ttc	192
Gly Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe	
50 55 60	
aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc atc aca gcc ttc	240
Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ile Thr Ala Phe	
65 70 75 80	
atg caa ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gca aga ggg gga ctg gga ccc gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg	336
Ala Arg Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	
100 105 110	
act ctg gtc act gtc tct gca	357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
115	
<210> 2	
<211> 119	
<212> PRT	
<213> 小家鼠(Mus musculus)	
<400> 2	
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	

[0003]

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 3

tacaccttca ccaactactg gatgcac

27

[0004]

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 4

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His

1 5

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 5

gagattaatc ctageccacgg tcgtactatc tacaatgaaa acttcaagag c

51

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 6

Glu Ile Asn Pro Ser His Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Glu Asn Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 7

<211> 30

[0005]

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 7

gggggaactgg gaccgcctg gtttgcttac

30

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 8

Gly Gly Leu Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 9

<211> 327

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 9

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca atc atg tct got tct cct ggg

48

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

1

5

10

15

gag aag gtc acc ttg acc tgc agt gcc ggc tca agt gta gat tcc agc

96

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Gly Ser Ser Val Asp Ser Ser

20

25

30

tat ttg tac tgg tac cag cag aag cca gga tcc tcc ccc aaa ctc tgg

144

[0006]

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

att tat agc aca tcc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt 192
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

gct gaa gat gct gcc tct tat ttc tgc cat cag tgg agt agt tac cca 288
Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
85 90 95

ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aaa ttg gaa ata aaa cgg 327
Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 10

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

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

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

[0007]

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

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

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

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

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 11

agtgcggct caagtgtaga ttccagctat ttgtac

36

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 12

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

<210> 13

[0008]

<211> 21

<212> DNA

<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 13

agcacatcca acctggcttc t

21

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 14

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1

5

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 15

catcagtgga gtagttaccc attcacg

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠(*Mus musculus*)

<400> 16

His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Phe Thr

1

5

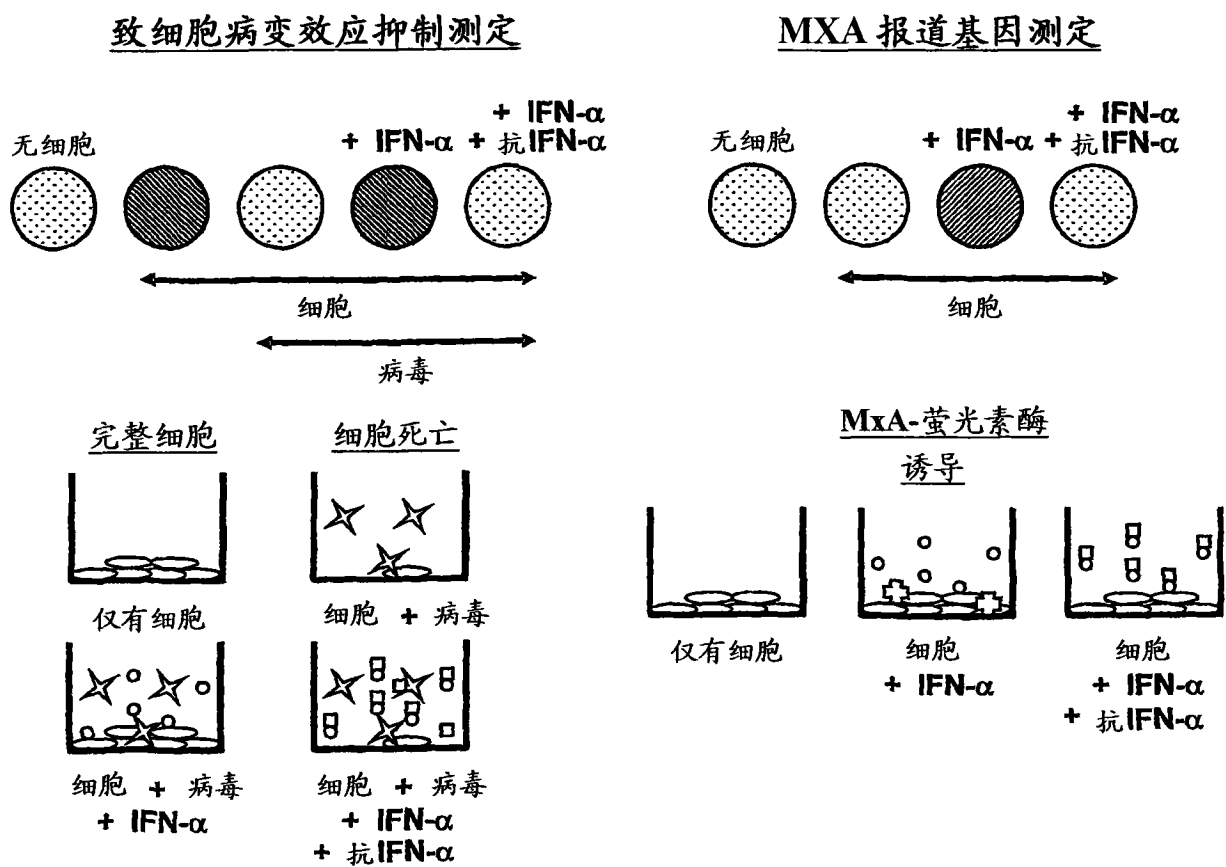


图 1

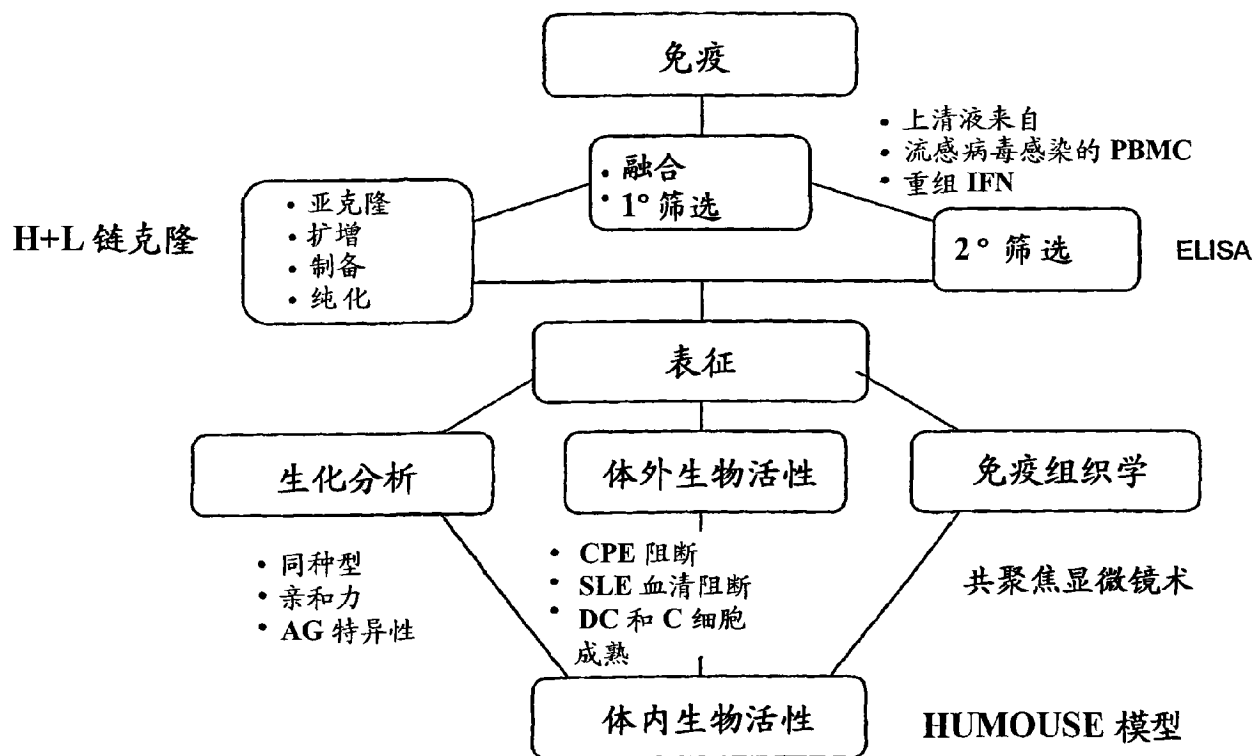


图 2

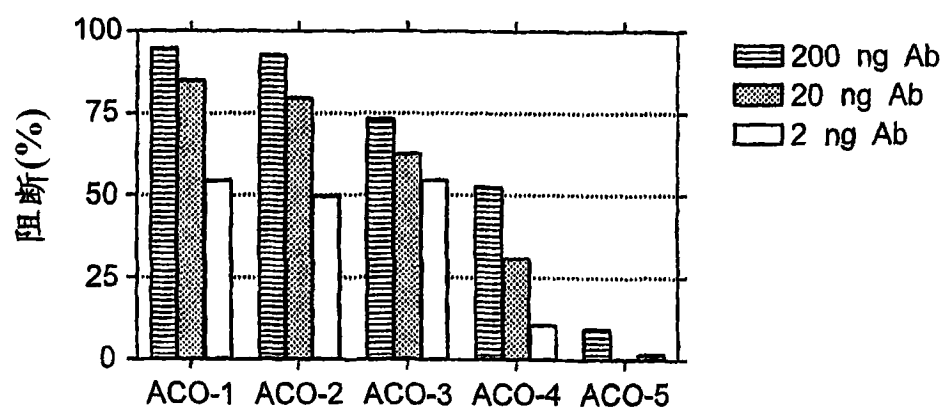


图 3A

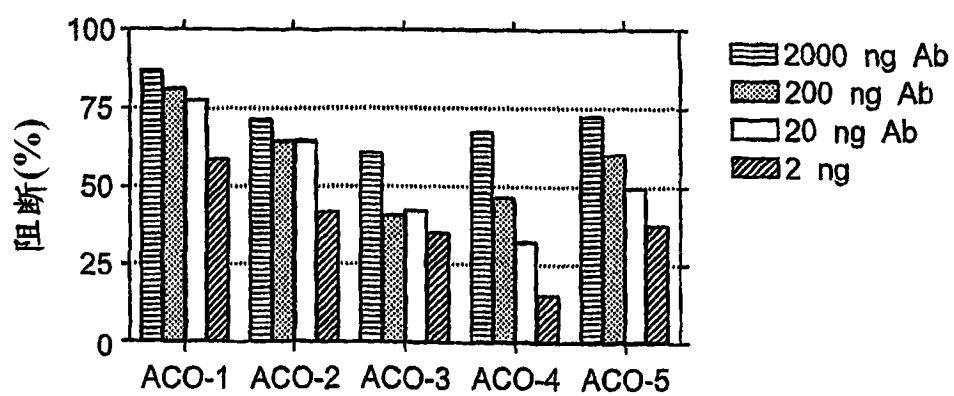


图 3B

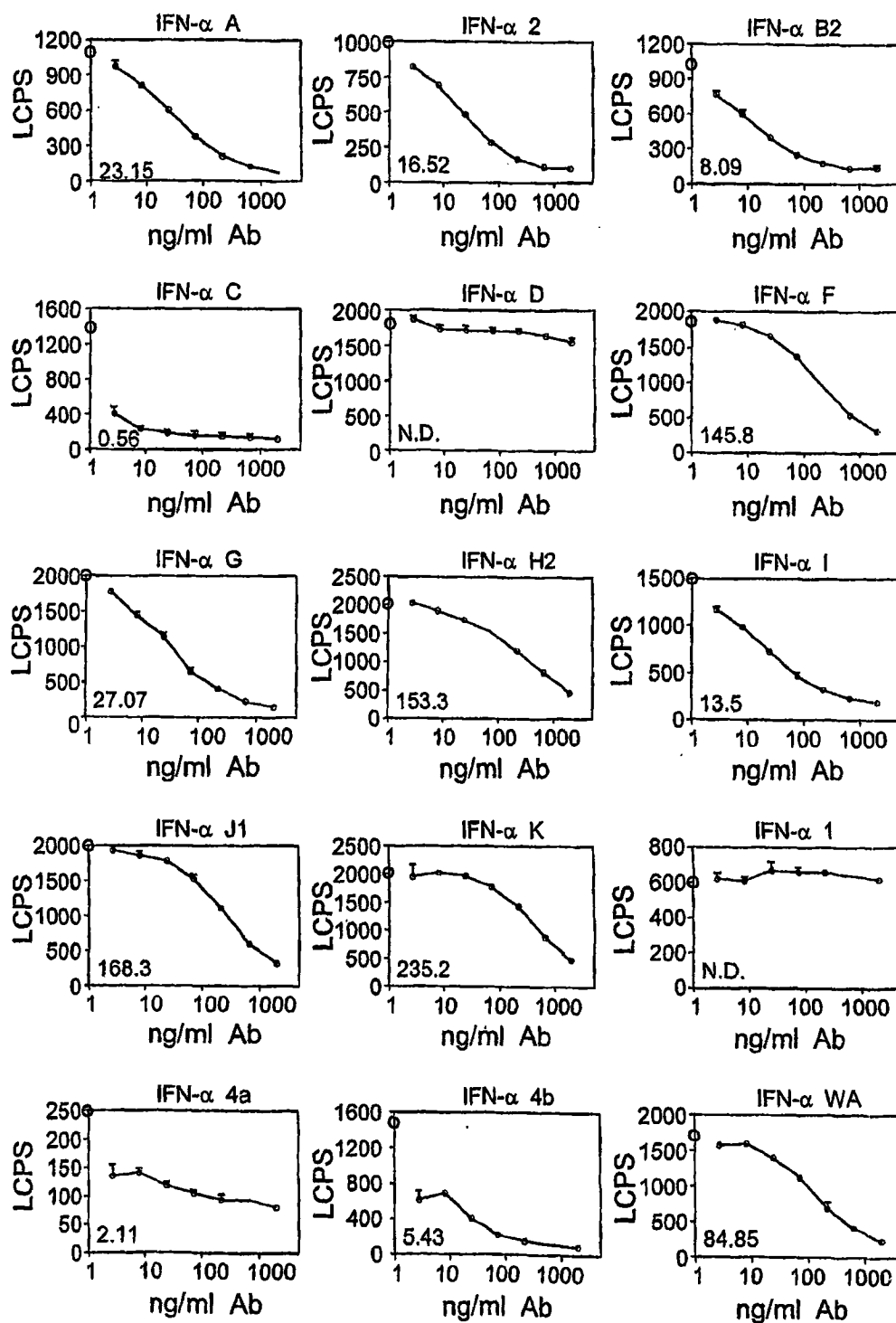


图 4A

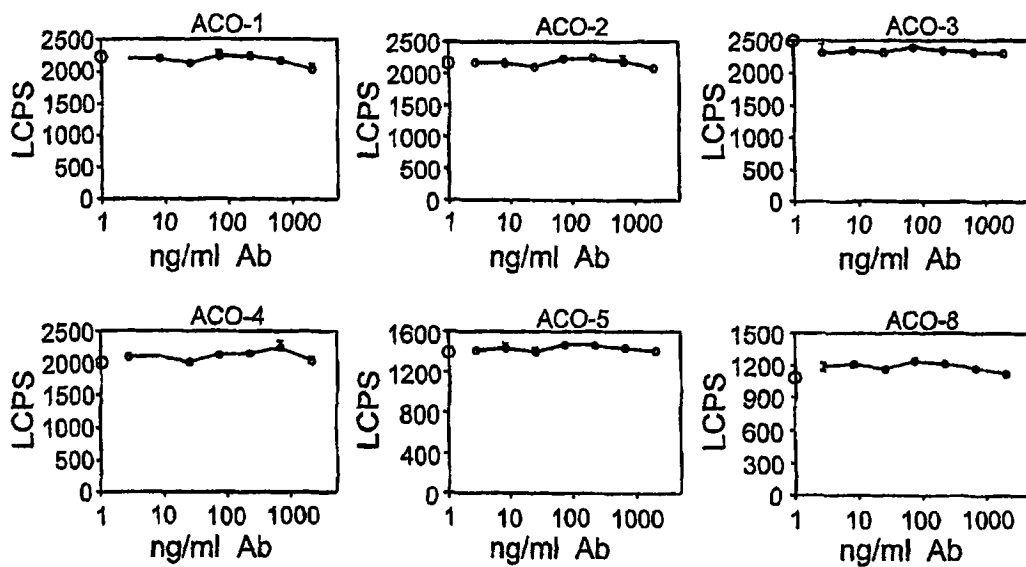


图 4B

	捕获	报告		捕获	报告		捕获	报告
pg/mL	ACO-1	ACO-	ACO-2	ACO-	ACO-3	ACO-	ACO-4	ACO-
0	7	2	5	1	5	1	7	1
1000	8	3	5	3	8	2	10	1
0	5	4	8	4	5	2	6	2
1000	8	5	6	5	8	3	9	2
0	9	6	26	6	15	4	9	3
1000	8	6	21	6	14	5	586	3
0	32	6	36	6	10	5	8	5
1000	256	6	160	6	642	6	636	5
0	11	6	11	6	7	6	7	6
1000	9	6	9	6	5	6	11	6

	捕获	报告		捕获	报告		捕获	报告
pg/mL	ACO-4	ACO-	ACO-5	ACO-	ACO-6	ACO-	ACO-6	ACO-
0	7	1	46	1	37	1	37	1
1000	10	2	520	2	34	2	34	2
0	6	3	10	3	17	3	17	3
1000	9	3	558	3	10	4	10	4
0	9	4	3	4	7	5	7	5
1000	586	4	618	5	8	5	8	5
0	8	5	11	5	14	5	14	5
1000	636	5	484	5	15	5	15	5
0	7	6	4	6	13	6	13	6
1000	11	6	3	6	14	6	14	6

图 5

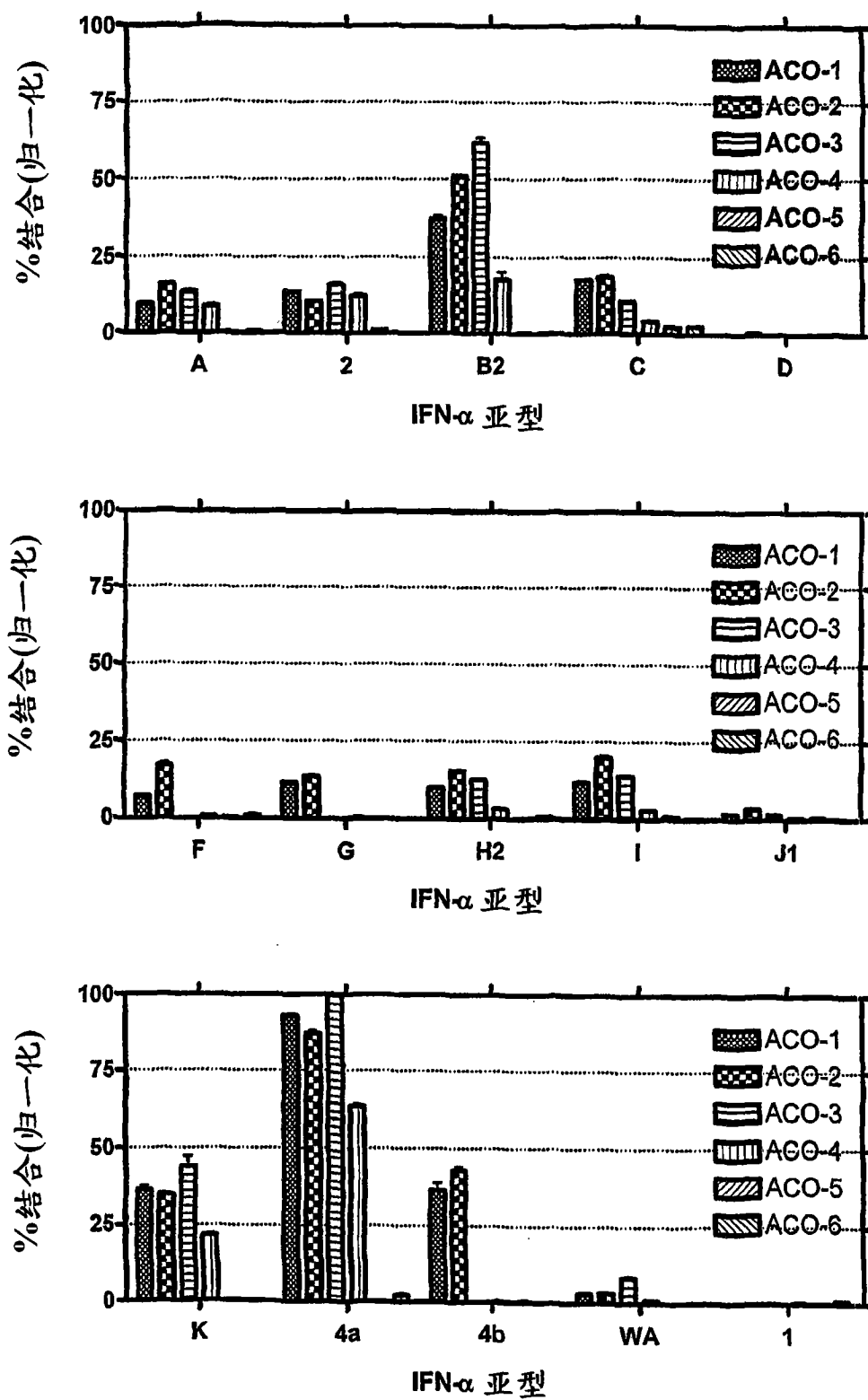


图 6

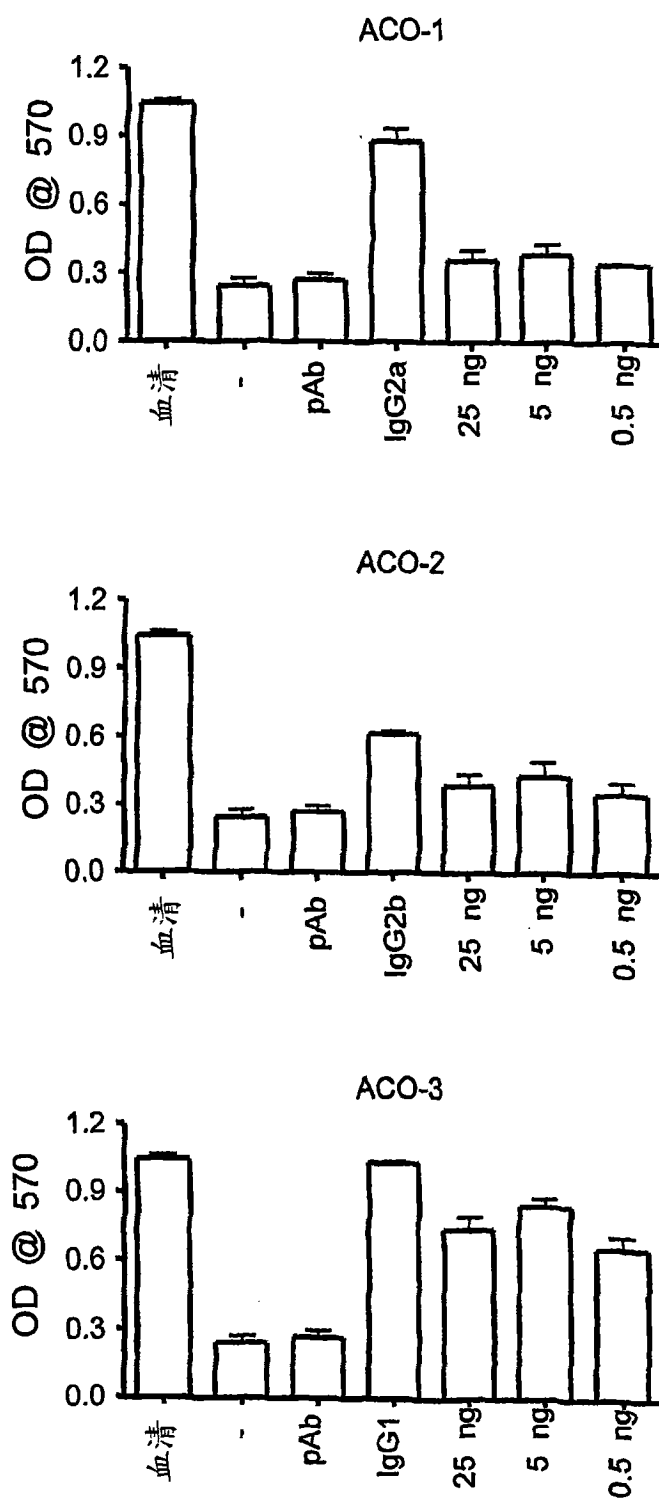


图 7A

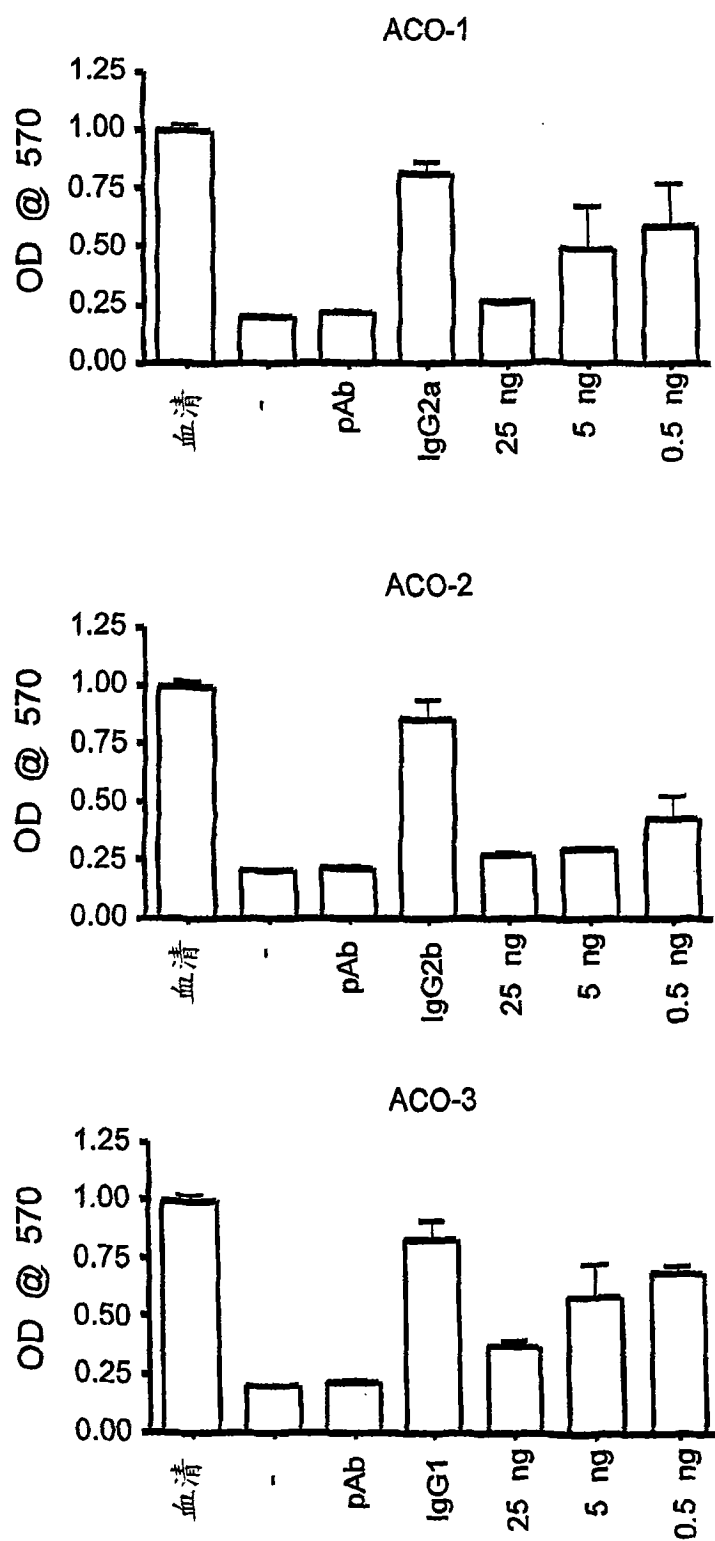


图 7B

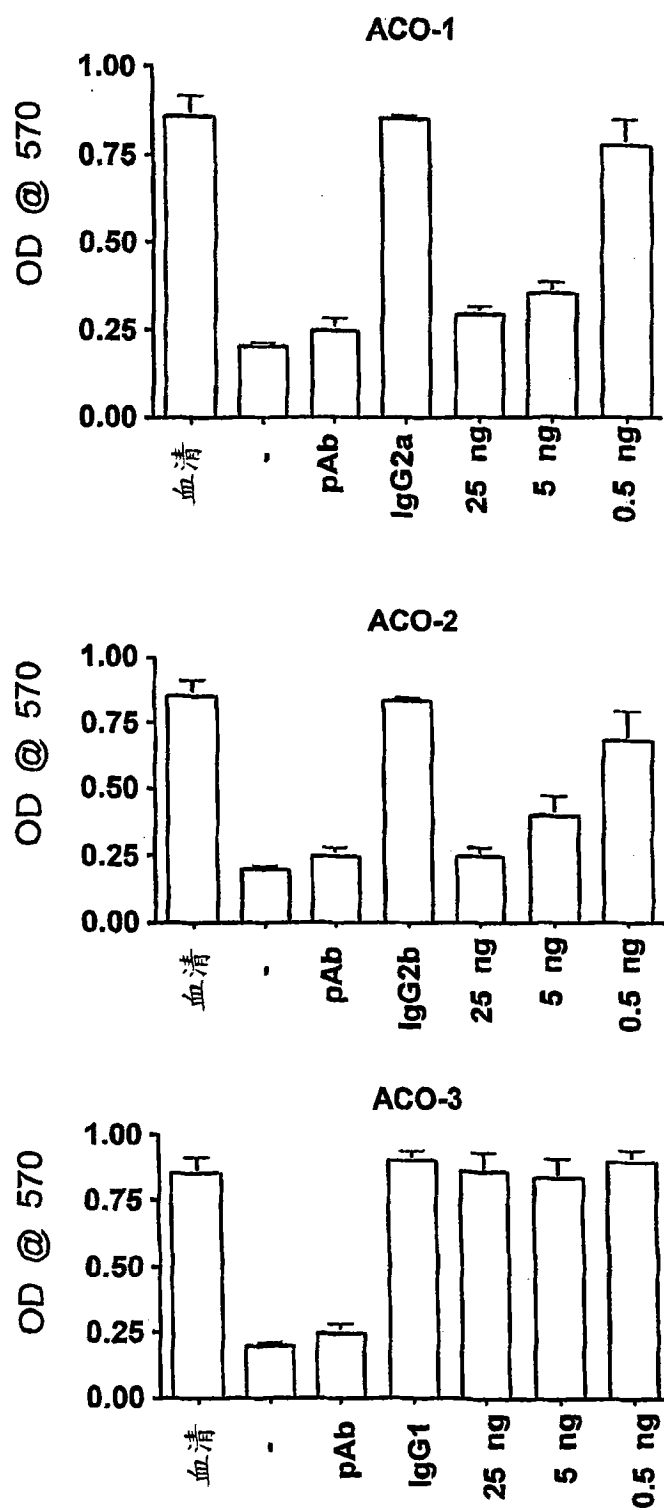


图 7C

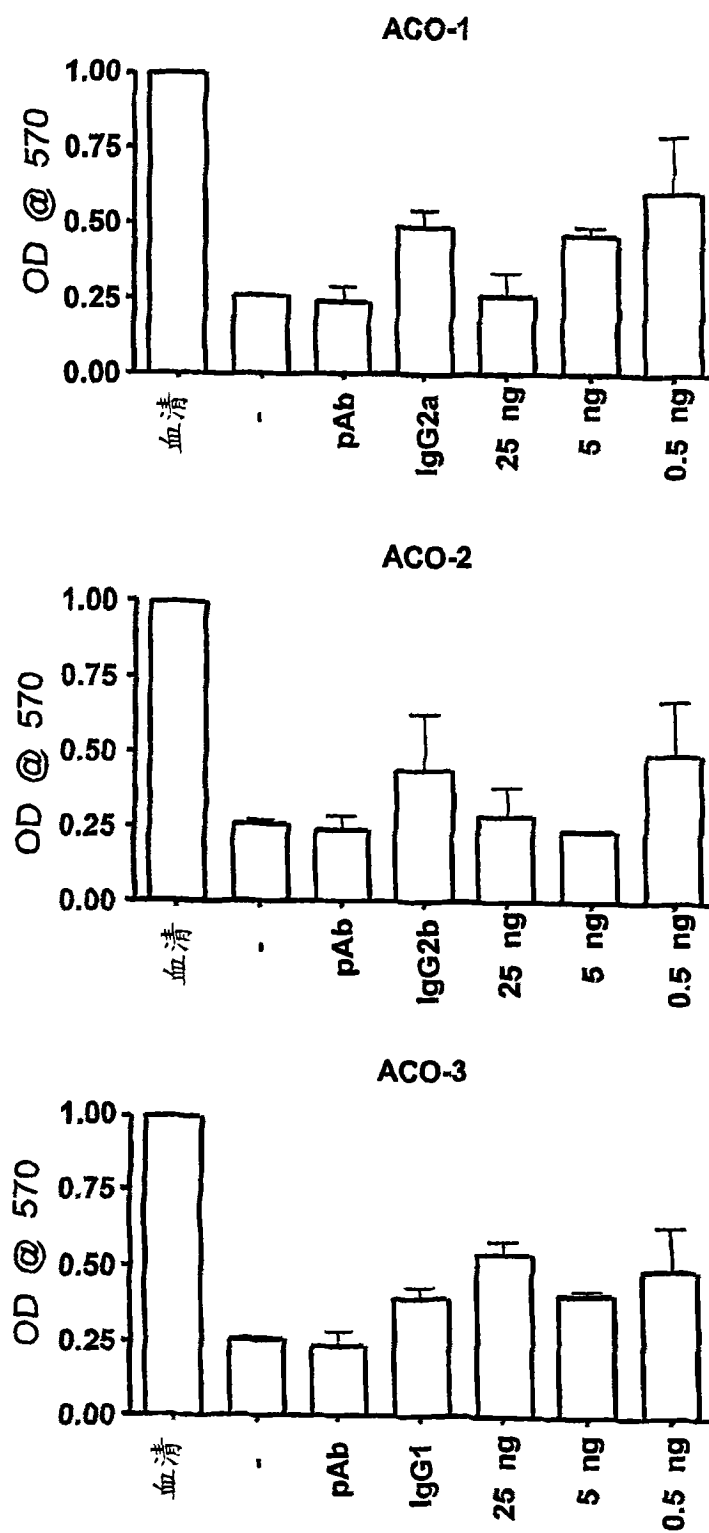


图 7D

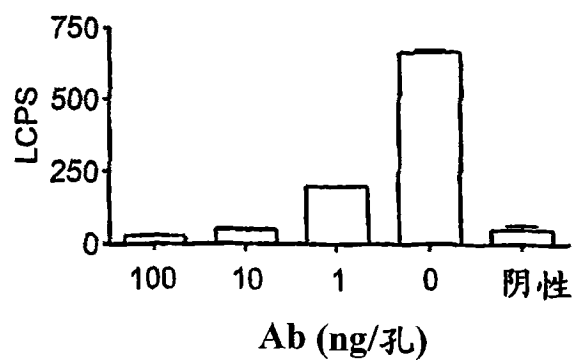


图 8A

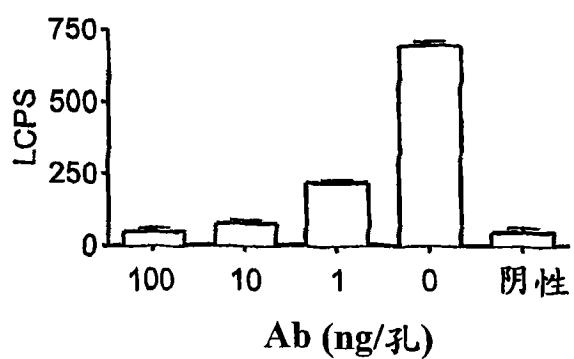


图 8B

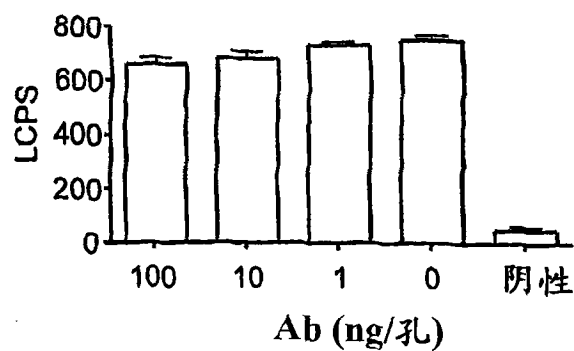


图 8C

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTG
 Q V Q L Q Q P G A E L V K P G A S V K L
 TCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGG
 S C K A S G Y T F T N Y W M H W V K Q R
 V_H1
 CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCCACGGTCGTACTATCTAC
 P G Q G L E W I G E I N P S H G R T I Y
 V_H2
 AATGAAAACCTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCATCACAGCCTTC
N E N F K S K A T L T V D K S S I T A F
 ATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGA
 M Q L S S L T S E D S A V Y F C A R G G
 CTGGGACCCGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
L G P A W F A Y W G Q G T L V T V S A
 V_H3
 SEQ ID NO:1
 SEQ ID NO:2

图 9

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCTTCTCCTGGGGAGAAGGTCACC
 Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T
 TTGACCTGCAGTGCCGGCTCAAGTGTAGATTCCAGCTATTTGTACTGGTACCAGCAGAAG
 L T C S A G S S V D S S Y L Y W Y Q Q K
 L1
 CCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT
 P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P
 L2
 GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAG
 A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E
 GCTGAAGATGCTGCCTCTTATTTCTGCCATCAGTGGAGTAGTTACCCATTACGTTTCGGC
 A E D A A S Y F C H Q W S S Y P F T F G
 L3
 TCGGGGACAAAATTGGAAATAAAACGG SEQ ID NO:9
 S G T K L E I K R SEQ ID NO:10

图 10