



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102603894 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 30

(21) 申请号 201210053959. 2

A61P 37/02(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 06. 20

A61P 19/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 13/12(2006. 01)

60/581, 747 2004. 06. 21 US

A61P 31/18(2006. 01)

A61P 37/06(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

C12N 15/13(2006. 01)

200580025034. 5 2005. 06. 20

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

(73) 专利权人 梅达雷克斯有限责任公司

地址 美国新泽西州

(56) 对比文件

US 6713609 B1, 2004. 03. 30,

(72) 发明人 约瑟芬·M·卡达雷尔利

艾莉森·威特 莫汉·斯里尼瓦桑

审查员 杨光

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

A61K 51/10(2006. 01)

A61P 19/04(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 3/10(2006. 01)

A61P 1/00(2006. 01)

A61P 17/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书47页

序列表12页 附图14页

(54) 发明名称

干扰素 α 受体 1 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供结合 IFNAR-1 并且能够抑制 I 型干扰素生物活性的分离的人单克隆抗体。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 I 型干扰素介导的疾病的生物活性的方法，包括应用本发明的抗体治疗自身免疫病、移植排斥或移植抗宿主疾病的方法。

抗-IFNAR 3F11 VH

V 区段 : 4-34
D 区段 : 未确定
J 区段 : JH6b

```

1   Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L
   CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG OCT TOT CAG ACC CTG
                                     COR1
50  S L T C A V Y G G S F S C Y P W S W
   TCC CTC ACC TCC OCT CTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GAT TAT TTC TGG AGC TGG
                                     COR2
109 I R Q P P G K G L E W T G E I D H S
   ATC DGC CAG CCC CCA GGG AAG DGG CTG CAG TGG ATT GGG GAA ATC GAT CAG AGT
                                     COR3
163 G K T H Y N F S L S S B V T I S V D
   GCA AAG ACC AAC TGC AAT CCG TTC CTC AAG AGT CCA ACC ACC ATA TCA GTA GAC
217 T S K N Q V S L E L S S V T A A D T
   AGC TCC AAG AAC CAG GTC TCC CTG AAG CTG AGC TGT GTG ACC GGC GGG GAC AGG
                                     COR4
271 A V Y Y C A R E S K Y Y F G L D V W
   GCT GTG TAT TAT TGT GGG AGA GAA AAG AAC TAC TAC TTC GGT TTG GAC GTC TGG
325 G G G T T V T V T S
   GGC GAA GGG ACC ACC GTC ACC GTC ACC TCA

```

1. 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:
 - (a) 由 SEQ ID NO:3 组成的重链可变区 CDR1;
 - (b) 由 SEQ ID NO:7 组成的重链可变区 CDR2;
 - (c) 由 SEQ ID NO:11 组成的重链可变区 CDR3;
 - (d) 由 SEQ ID NO:15 组成的轻链可变区 CDR1;
 - (e) 由 SEQ ID NO:19 组成的轻链可变区 CDR2;和
 - (f) 由 SEQ ID NO:23 组成的轻链可变区 CDR3。
2. 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:
 - (a) 由 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列组成的重链可变区;和
 - (b) 由 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列组成的轻链可变区。
3. 权利要求 1 或 2 的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分是人源化抗体或嵌合抗体。
4. 一种组合物,其含有权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合部分,和药学上可接受的载体。
5. 一种免疫偶联物,其包含与治疗剂连接的权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合部分。
6. 权利要求 5 的免疫偶联物,其进一步含有药学上可接受的载体。
7. 权利要求 5 的免疫偶联物,其中所述治疗剂是细胞毒素。
8. 权利要求 7 的免疫偶联物,其进一步含有药学上可接受的载体。
9. 权利要求 5 的免疫偶联物,其中所述治疗剂是放射性同位素。
10. 权利要求 9 的免疫偶联物,其进一步含有药学上可接受的载体。
11. 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 1-3 中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。
12. 一种组合物,其含有权利要求 11 的双特异性分子和药学上可接受的载体。
13. 一种分离的核酸分子,其编码权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合部分。
14. 一种表达载体,其包含权利要求 13 的核酸分子。
15. 一种宿主细胞,其包含权利要求 14 的表达载体。
16. 一种抑制 I 型干扰素对表达干扰素 α 受体 1 的细胞的生物活性的体外方法,包括使所述细胞接触权利要求 1-3 中任一项的抗体,使得 I 型干扰素的生物活性受到抑制。
17. 权利要求 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合部分在制备用于治疗受试者中的 I 型干扰素介导的疾病或病症的药物中的用途。
18. 权利要求 17 的用途,其中所述 I 型干扰素介导的疾病是干扰素 α 介导的疾病。
19. 权利要求 17 的用途,其中所述疾病或病症是系统性红斑狼疮。
20. 权利要求 17 的用途,其中所述疾病或病症选自:胰岛素依赖型糖尿病、炎症肠病、多发性硬化症、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、类风湿性关节炎和肾小球肾炎。
21. 权利要求 17 的用途,其中所述疾病或病症是 HIV 感染或 AIDS。
22. 权利要求 17 的用途,其中所述疾病或病症是移植排斥或移植物抗宿主疾病。

干扰素 α 受体 1 抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 6 月 20 日,申请号为 200580025034.5,发明名称为“干扰素 α 受体 1 抗体及其用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求 2004 年 6 月 21 日提交的美国临时申请 60/581,747 的优先权,该申请的全部内容在此引入作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 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 80% 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 , 包括 5 个假基因和 1 个功能基因, 它们显示与 IFN α 基因有 70% 的同源性 (Weissmann 和 Weber (1986) Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 33:251-300)。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 (Agnat M. 等, “Interferon 5” Ed. I. Gresser p. 1-22, Academic Press, London, 1983)。

[0005] 干扰素 β (IFN β) 由与 IFN α 基因有大约 50% 同源性的单基因编码。

[0006] γ 干扰素是由活化的淋巴细胞产生的, 与 α/β 干扰素没有任何同源性, 并且不与它们的受体反应。

[0007] 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)。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), 见上)。尽管各种 I 型 IFN 亚型的功能差异尚未确定, 但是认为它们每一种都可能显示不同的与 IFNAR 受体成分的相互作用, 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)。

[0008] 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)。

[0009] 许多研究小组最近的研究提示, 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)。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),见上文) 和系统性红斑狼疮 (SLE) (Hooks(1982),见上),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),见上文),在该疾病中 IFN- β 可能起更重要的作用。

[0010] 而且,曾报道干扰素 α 给药使牛皮癣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。也显示干扰素 α 在正常小鼠中诱发肾小球肾炎,并且加速 NZB/W 小鼠的自发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 I 型 IFN 活性可能对患者有益的病理情况,并且需要有效抑制 I 型 IFN 活性的药物。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供结合 IFNAR-1 并且抑制 I 型干扰素、优选多种 I 型干扰素的生物活性的分离的人单克隆抗体。而且,该抗体不与鼠抗-IFNAR-1 抗体 64G12 结合相同的表位。

[0013] 一方面,本发明涉及一种分离的人抗体或其抗原结合部分,其中该抗体特异性结合 IFNAR-1 并且表现一种或多种以下特性:

[0014] a) 以 1×10^{-7} M 的 K_D 或更高的亲和力结合 IFNAR-1;

[0015] b) 抑制多种 I 型干扰素的生物活性;

[0016] c) 在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN α 2b 的活性;

[0017] d) 在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN ω 的活性;

[0018] e) 抑制 IFN α 2b 诱导的外周血单核细胞分泌 IP-10;

[0019] f) 抑制 IFN ω 诱导的外周血单核细胞分泌 IP-10;

[0020] g) 抑制系统性红斑狼疮血浆介导的树突细胞发育;和

[0021] h) 与鼠单克隆抗体 64G12(ECACC 登记号 92022605) 结合不同的表位。

[0022] 本发明优选的抗体特异性结合人干扰素 α 受体 1,并且以 1×10^{-8} M 的 K_D 或更高的亲和力或 1×10^{-9} M 或 5×10^{-10} M 更高的亲和力或 2×10^{-10} M 或更高的亲和力结合。

[0023] 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,其包含的重链可变区是人 V_H 4-34 或 5-51 基因的产物或来源于该基因,其中该抗体特异性结合人干扰素 α 受体 1。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,其包含的轻链可变区是人 V_K L18 或 A27 基因的产物或来源于该基因,其中该抗体特异性结合人干扰素 α 受体 1。另一方面,本发明涉及一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

[0024] (a) 是人 V_H 4-34 或 5-51 基因的产物或来源于该基因的重链可变区;和

[0025] (b) 是人 V_K L18 或 A27 基因的产物或来源于该基因的轻链可变区;

[0026] 其中该抗体特异性结合人干扰素 α 受体 1。在优选实施方案中,该抗体包含人 V_H 4-34 基因的重链可变区和人 V_K L18 基因的轻链可变区,或者该抗体包含人 V_H 5-51 基因的重链可变区和人 V_K A27 基因的轻链可变区。

[0027] 另一方面,本发明提供一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:

[0028] 含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的人重链可变区;和含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的人轻链可变区,其中:

[0029] (a) 人重链可变区 CDR3 序列包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 和其

保守修饰的氨基酸序列；

[0030] (b) 人轻链可变区 CDR3 序列包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 和其保守修饰的氨基酸序列；

[0031] (c) 该抗体以至少 1×10^{-8} M 的结合亲和力或更高的亲和力特异性结合人干扰素 α 受体 1；和

[0032] (d) 该抗体抑制至少一种 I 型干扰素的生物活性。

[0033] 优选地，人重链可变区 CDR2 序列含有选自氨基酸序列 SEQ ID NO:5、6、7、8 和其保守修饰的氨基酸序列；人轻链可变区 CDR2 序列含有选自氨基酸序列 SEQ ID NO:17、18、19、20 和其保守修饰的氨基酸序列。优选地，人重链可变区 CDR1 序列含有选自氨基酸序列 SEQ ID NO:1、2、3、4 和其保守修饰的氨基酸序列；人轻链可变区 CDR1 序列含有选自氨基酸序列 SEQ ID NO:13、14、15、16 和其保守修饰的氨基酸序列。

[0034] 另一方面，本发明提供一种分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含人重链可变区和人轻链可变区，其中：

[0035] (a) 人重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:25、26、27 和 28 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列；

[0036] (b) 人轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:29、30、31 和 32 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列；

[0037] (c) 该抗体以至少 1×10^{-8} M 的结合亲和力或更高的亲和力特异性结合人干扰素 α 受体 1；和

[0038] (d) 该抗体抑制至少一种 I 型干扰素的生物活性。

[0039] 本发明优选的抗体包括分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含：

[0040] (a) 包含选自 SEQ ID NO:1、2、3 和 4 的氨基酸序列的人重链可变区 CDR1；

[0041] (b) 包含选自 SEQ ID NO:5、6、7 和 8 的氨基酸序列的人重链可变区 CDR2；

[0042] (c) 包含选自 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 的氨基酸序列的人重链可变区 CDR3；

[0043] (d) 包含选自 SEQ ID NO:13、14、15 和 16 的氨基酸序列的人轻链可变区 CDR1；

[0044] (e) 包含选自 SEQ ID NO:17、18、19 和 20 的氨基酸序列的人轻链可变区 CDR2；和

[0045] (f) 包含选自 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 的氨基酸序列的人轻链可变区 CDR3；

[0046] 其中，该抗体以至少 1×10^{-8} M 的结合亲和力或更高的亲和力特异性结合人干扰素 α 受体 1。

[0047] 优选的 CDR 区的组合包括以下：

[0048] (a) 包含 SEQ ID NO:1 的人重链可变区 CDR1；

[0049] (b) 包含 SEQ ID NO:5 的人重链可变区 CDR2；

[0050] (c) 包含 SEQ ID NO:9 的人重链可变区 CDR3；

[0051] (d) 包含 SEQ ID NO:13 的人轻链可变区 CDR1；

[0052] (e) 包含 SEQ ID NO:17 的人轻链可变区 CDR2；和

[0053] (f) 包含 SEQ ID NO:21 的人轻链可变区 CDR3。

[0054] (a) 包含 SEQ ID NO:2 的人重链可变区 CDR1；

[0055] (b) 包含 SEQ ID NO:6 的人重链可变区 CDR2；

[0056] (c) 包含 SEQ ID NO:10 的人重链可变区 CDR3；

- [0057] (d) 包含 SEQ ID NO:14 的人轻链可变区 CDR1 ;
- [0058] (e) 包含 SEQ ID NO:18 的人轻链可变区 CDR2 ;和
- [0059] (f) 包含 SEQ ID NO:22 的人轻链可变区 CDR3。
- [0060] (a) 包含 SEQ ID NO:3 的人重链可变区 CDR1 ;
- [0061] (b) 包含 SEQ ID NO:7 的人重链可变区 CDR2 ;
- [0062] (c) 包含 SEQ ID NO:11 的人重链可变区 CDR3 ;
- [0063] (d) 包含 SEQ ID NO:15 的人轻链可变区 CDR1 ;
- [0064] (e) 包含 SEQ ID NO:19 的人轻链可变区 CDR2 ;和
- [0065] (f) 包含 SEQ ID NO:23 的人轻链可变区 CDR3。
- [0066] (a) 包含 SEQ ID NO:4 的人重链可变区 CDR1 ;
- [0067] (b) 包含 SEQ ID NO:8 的人重链可变区 CDR2 ;
- [0068] (c) 包含 SEQ ID NO:12 的人重链可变区 CDR3 ;
- [0069] (d) 包含 SEQ ID NO:16 的人轻链可变区 CDR1 ;
- [0070] (e) 包含 SEQ ID NO:20 的人轻链可变区 CDR2 ;和
- [0071] (f) 包含 SEQ ID NO:24 的人轻链可变区 CDR3。
- [0072] 本发明其他优选的抗体包括分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含 :
- [0073] (a) 包含选自 SEQ ID NO:25、26、27 和 28 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0074] (b) 包含选自 SEQ ID NO:29、30、31 和 32 的氨基酸序列的人轻链可变区 ;
- [0075] 其中,该抗体以至少 1×10^{-8} M 的结合亲和力或更高的亲和力特异性结合人干扰素 α 受体 1。
- [0076] 优选的重链和轻链的组合包括以下 :
- [0077] (a) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0078] (b) 包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0079] (a) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0080] (b) 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0081] (a) 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0082] (b) 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0083] (a) 包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0084] (b) 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0085] 本发明的另一方面涉及与本发明提供的参比抗体竞争结合 IFNAR-1 的抗体。因此,在另外一个实施方案中,本发明提供 :
- [0086] 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体与参比抗体交叉竞争结合人干扰素 α 受体 1,其中该参比抗体选自 :
- [0087] a) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的抗体 ;
- [0088] b) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的抗体 ;
- [0089] c) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的抗体 ;

[0090] d) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的抗体。

[0091] 在某些实施方案中,本发明提供一种人抗体或其抗原结合部分,其中该抗体不与小鼠单克隆抗体 64G12 (ECACC 登记号 92022605) 结合相同的表位(即,不交叉竞争)。

[0092] 本发明的抗体可以是任何同种型。优选的抗体是 IgG1、IgG3 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 或 Fab' 2 片段。

[0093] 本发明也提供一种免疫偶联物,其含有与治疗剂如细胞毒素或放射性同位素连接的本发明的抗体或其抗原结合部分。本发明也提供一种双特异性分子,其含有与第二功能部分连接的本发明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。

[0094] 还提供了包含本发明的抗体或其抗原结合部分,或其免疫偶联物或双特异性分子和药学上可接受的载体的组合物。

[0095] 本发明也包括编码本发明的抗体或其抗原结合部分的核酸分子,以及包含这些核酸的表达载体和包含这些表达载体的宿主细胞。而且,本发明提供一种含有人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转基因小鼠,其中该小鼠表达本发明的抗体,以及由这种小鼠制备的杂交瘤,其中该杂交瘤产生本发明的抗体。

[0096] 本发明也提供了基于此处提供的抗-IFNAR-1 抗体的序列制备“第二代”抗-IFNAR-1 抗体的方法。例如,本发明提供了一种制备抗-IFNAR-1 抗体的方法,包括:

[0097] (a) 提供:(i) 重链可变区抗体序列,其含有选自 SEQ ID NO :1、2、3 和 4 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO :5、6、7 和 8 的 CDR2 序列,和选自 SEQ ID NO :9、10、11 和 12 的 CDR3 序列;或(ii) 轻链可变区抗体序列,其含有选自 SEQ ID NO :13、14、15 和 16 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO :17、18、19 和 20 的 CDR2 序列,和选自 SEQ ID NO :21、22、23 和 24 的 CDR3 序列;

[0098] (b) 改变至少一个可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基,所述序列选自重链可变区抗体序列和轻链可变区抗体序列,从而产生至少一个改变的抗体序列;和

[0099] (c) 将改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0100] 本发明也提供一种抑制 I 型干扰素对表达干扰素 α 受体 1 的细胞的生物活性的方法,包括使所述细胞接触本发明的抗体,使得 I 型干扰素的生物活性受到抑制。本发明也提供一种治疗需要治疗的受试者中 I 型干扰素介导的疾病或病症的方法,包括向该受试者施用本发明的抗体或其抗原结合部分,使该受试者中 I 型干扰素介导的疾病得到治疗。I 型干扰素介导的疾病可以是,例如干扰素 α 介导的疾病。

[0101] 可以应用本发明的方法治疗的疾病或病症的例子包括系统性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病、炎性肠病、多发性硬化症、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、类风湿性关节炎、肾小球肾炎、HIV 感染、AIDS、移植排斥和移植物抗宿主疾病。

[0102] 更具体地,本发明涉及以下内容:

[0103] 第 1 项,一种特异性结合人干扰素 α 受体 1 (IFNAR-1) 的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体表现一种或多种以下特性:

[0104] a) 以 1×10^{-7} M 的 K_D 或更高的亲和力结合 IFNAR-1;

- [0105] b) 抑制多种 I 型干扰素的生物活性 ;
- [0106] c) 在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN α 2b 的活性 ;
- [0107] d) 在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN ω 的活性 ;
- [0108] e) 抑制 IFN α 2b 诱导的外周血单核细胞分泌 IP-10 ;
- [0109] f) 抑制 IFN ω 诱导的外周血单核细胞分泌 IP-10 ;
- [0110] g) 抑制系统性红斑狼疮血浆介导的树突细胞发育 ;和
- [0111] h) 与鼠单克隆抗体 64G12 (ECACC 登记号 92022605) 结合不同的表位。
- [0112] 第 2 项, 第 1 项的抗体, 其中该抗体以 1×10^{-8} M 的 K_D 或更高的亲和力结合人干扰素 α 受体 1。
- [0113] 第 3 项, 第 1 项的抗体, 其中该抗体以 1×10^{-9} M 的 K_D 或更高的亲和力结合人干扰素 α 受体 1。
- [0114] 第 4 项, 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其中该抗体与参比抗体交叉竞争结合人干扰素 α 受体 1, 其中该参比抗体选自 :
- [0115] a) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO :25 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO :29 的氨基酸序列的抗体 ;
- [0116] b) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO :26 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO :30 的氨基酸序列的抗体 ;
- [0117] c) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO :27 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO :31 的氨基酸序列的抗体 ;和
- [0118] d) 其所含的重链可变区含有 SEQ ID NO :28 的氨基酸序列、所含的轻链可变区含有 SEQ ID NO :32 的氨基酸序列的抗体。
- [0119] 第 5 项, 第 1 项的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含的重链可变区是人 V_H 4-34 或 5-51 基因的产物或来源于该基因。
- [0120] 第 6 项, 第 1 项的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含的轻链可变区是人 V_K L18 或 A27 基因的产物或来源于该基因。
- [0121] 第 7 项, 第 5 项的分离的人单克隆抗体或其抗原结合部分, 其包含的轻链可变区是人 V_K L18 或 A27 基因的产物或来源于该基因。
- [0122] 第 8 项, 第 7 项的抗体, 其包含人 V_H 4-34 基因的重链可变区和人 V_K L18 基因的轻链可变区。
- [0123] 第 9 项, 第 7 项的抗体, 其包含人 V_H 5-51 基因的重链可变区和人 V_K A27 基因的轻链可变区。
- [0124] 第 10 项, 第 2 项的抗体, 其包含 :
- [0125] (a) 包含 SEQ ID NO :1 的人重链可变区 CDR1 ;
- [0126] (b) 包含 SEQ ID NO :5 的人重链可变区 CDR2 ;
- [0127] (c) 包含 SEQ ID NO :9 的人重链可变区 CDR3 ;
- [0128] (d) 包含 SEQ ID NO :13 的人轻链可变区 CDR1 ;
- [0129] (e) 包含 SEQ ID NO :17 的人轻链可变区 CDR2 ;和
- [0130] (f) 包含 SEQ ID NO :21 的人轻链可变区 CDR3。
- [0131] 第 11 项, 第 2 项的抗体, 其包含 :

- [0132] (a) 包含 SEQ ID NO:2 的人重链可变区 CDR1 ;
- [0133] (b) 包含 SEQ ID NO:6 的人重链可变区 CDR2 ;
- [0134] (c) 包含 SEQ ID NO:10 的人重链可变区 CDR3 ;
- [0135] (d) 包含 SEQ ID NO:14 的人轻链可变区 CDR1 ;
- [0136] (e) 包含 SEQ ID NO:18 的人轻链可变区 CDR2 ;和
- [0137] (f) 包含 SEQ ID NO:22 的人轻链可变区 CDR3。
- [0138] 第 12 项,第 2 项的抗体,其包含 :
- [0139] (a) 包含 SEQ ID NO:3 的人重链可变区 CDR1 ;
- [0140] (b) 包含 SEQ ID NO:7 的人重链可变区 CDR2 ;
- [0141] (c) 包含 SEQ ID NO:11 的人重链可变区 CDR3 ;
- [0142] (d) 包含 SEQ ID NO:15 的人轻链可变区 CDR1 ;
- [0143] (e) 包含 SEQ ID NO:19 的人轻链可变区 CDR2 ;和
- [0144] (f) 包含 SEQ ID NO:23 的人轻链可变区 CDR3。
- [0145] 第 13 项,第 2 项的抗体,其包含 :
- [0146] (a) 包含 SEQ ID NO:4 的人重链可变区 CDR1 ;
- [0147] (b) 包含 SEQ ID NO:8 的人重链可变区 CDR2 ;
- [0148] (c) 包含 SEQ ID NO:12 的人重链可变区 CDR3 ;
- [0149] (d) 包含 SEQ ID NO:16 的人轻链可变区 CDR1 ;
- [0150] (e) 包含 SEQ ID NO:20 的人轻链可变区 CDR2 ;和
- [0151] (f) 包含 SEQ ID NO:24 的人轻链可变区 CDR3。
- [0152] 第 14 项,第 2 项的抗体,其包含 :
- [0153] (a) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0154] (b) 包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0155] 第 15 项,第 2 项的抗体,其包含 :
- [0156] (a) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0157] (b) 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0158] 第 16 项,第 2 项的抗体,其包含 :
- [0159] (a) 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0160] (b) 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0161] 第 17 项,第 2 项的抗体,其包含 :
- [0162] (a) 包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的人重链可变区 ;和
- [0163] (b) 包含 SEQ ID NO:32 的氨基酸序列的人轻链可变区。
- [0164] 第 18 项,第 1 项的人抗体,其中该抗体与小鼠单克隆抗体 64G12 (ECACC 登记号 92022605) 不结合相同的表位。
- [0165] 第 19 项,一种组合物,其含有第 1 项的抗体或其抗原结合部分,和药学上可接受的载体。
- [0166] 第 20 项,一种免疫偶联物,其包含与治疗剂连接的第 1 项的抗体或其抗原结合部分。
- [0167] 第 21 项,第 20 项的免疫偶联物,其进一步含有药学上可接受的载体。

- [0168] 第 22 项,第 20 项的免疫偶联物,其中所述治疗剂是一种细胞毒素。
- [0169] 第 23 项,第 22 项的免疫偶联物,其进一步含有药学上可接受的载体。
- [0170] 第 24 项,第 20 项的免疫偶联物,其中所述治疗剂是一种放射性同位素。
- [0171] 第 25 项,第 24 项的免疫偶联物,其进一步含有药学上可接受的载体。
- [0172] 第 26 项,一种双特异性分子,其包含与第二功能部分连接的第 1-18 项中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。
- [0173] 第 27 项,一种组合物,其含有第 26 项的双特异性分子和药学上可接受的载体。
- [0174] 第 28 项,一种分离的核酸分子,其编码第 1-18 项中任一项的抗体或其抗原结合部分。
- [0175] 第 29 项,一种表达载体,其包含第 28 项的核酸分子。
- [0176] 第 30 项,一种宿主细胞,其包含第 29 项的表达载体。
- [0177] 第 31 项,一种含有人免疫球蛋白重链和轻链转基因的转基因小鼠,其中该小鼠表达第 1-18 项中任一项的抗体。
- [0178] 第 32 项,由第 31 项的小鼠制备的杂交瘤,其中该杂交瘤产生所述抗体。
- [0179] 第 33 项,一种制备抗-IFNAR-1 抗体的方法,包括:
- [0180] (a) 提供:(i) 重链可变区抗体序列,其含有选自 SEQ ID NO:1、2、3 和 4 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO:5、6、7 和 8 的 CDR2 序列,和选自 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 的 CDR3 序列;或(ii) 轻链可变区抗体序列,其含有选自 SEQ ID NO:13、14、15 和 16 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO:17、18、19 和 20 的 CDR2 序列,和选自 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 的 CDR3 序列;
- [0181] (b) 改变至少一个可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基,所述序列选自重链可变区抗体序列和轻链可变区抗体序列,从而产生至少一个改变的抗体序列;和
- [0182] (c) 将所述改变的抗体序列表达为蛋白质。
- [0183] 第 34 项,一种抑制 I 型干扰素对表达干扰素 α 受体 1 的细胞的生物活性的方法,包括使所述细胞接触第 1-18 项中任一项的抗体,使得 I 型干扰素的生物活性受到抑制。
- [0184] 第 35 项,一种治疗需要治疗的受试者中 I 型干扰素介导的疾病或病症的方法,包括向该受试者施用第 1-18 项中任一项的抗体或其抗原结合部分,使该受试者中 I 型干扰素介导的疾病得到治疗。
- [0185] 第 36 项,第 35 项的方法,其中所述 I 型干扰素介导的疾病是干扰素 α 介导的疾病。
- [0186] 第 37 项,第 35 项的方法,其中所述疾病或病症是系统性红斑狼疮。
- [0187] 第 38 项,第 35 项的方法,其中所述疾病或病症选自:胰岛素依赖型糖尿病、炎症肠病、多发性硬化症、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、类风湿性关节炎和肾小球肾炎。
- [0188] 第 39 项,第 35 项的方法,其中所述疾病或病症是 HIV 感染或 AIDS。
- [0189] 第 40 项,第 35 项的方法,其中所述疾病或病症是移植排斥或移植物抗宿主疾病。
- [0190] 本发明的其他特征和优点通过下面的详述和实施例将是显而易见的,该详述和实施例不应理解为限制性的。在本申请中引用的所有参考文献、Genbank 条目、专利和公布的专利申请的内容均在此处特别引入作为参考。

[0191] 附图简述

[0192] 图 1A 显示 3F11 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :33) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :25)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :1)、CDR2 (SEQ ID NO :5) 和 CDR3 (SEQ ID NO :9) 区。

[0193] 图 1B 显示 3F11 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :37) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :29)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :13)、CDR2 (SEQ ID NO :17) 和 CDR3 (SEQ ID NO :21) 区。

[0194] 图 2A 显示 4G5 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :34) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :26)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :2)、CDR2 (SEQ ID NO :6) 和 CDR3 (SEQ ID NO :10) 区。

[0195] 图 2B 显示 4G5 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :38) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :30)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :14)、CDR2 (SEQ ID NO :18) 和 CDR3 (SEQ ID NO :22) 区。

[0196] 图 3A 显示 11E2 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :35) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :27)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :3)、CDR2 (SEQ ID NO :7) 和 CDR3 (SEQ ID NO :11) 区。

[0197] 图 3B 显示 11E2 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :39) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :31)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :15)、CDR2 (SEQ ID NO :19) 和 CDR3 (SEQ ID NO :23) 区。

[0198] 图 4A 显示 9D4 人单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :36) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :28)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :4)、CDR2 (SEQ ID NO :8) 和 CDR3 (SEQ ID NO :12) 区。

[0199] 图 4B 显示 9D4 人单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列 (SEQ ID NO :40) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :32)。标出了 CDR1 (SEQ ID NO :16)、CDR2 (SEQ ID NO :20) 和 CDR3 (SEQ ID NO :24) 区。

[0200] 图 5 显示 3F11 的重链可变区的氨基酸序列与人种系 V_H 4-34 氨基酸序列 (SEQ ID NO :41) 的对比。

[0201] 图 6 显示 4G5 的重链可变区氨基酸序列与人种系 V_H 4-34 氨基酸序列 (SEQ ID NO :41) 的对比。

[0202] 图 7 显示 11E2 和 9D4 的重链可变区氨基酸序列与人种系 V_H 5-51 氨基酸序列 (SEQ ID NO :42) 的对比。

[0203] 图 8 显示 3F 11 的轻链可变区氨基酸序列与人种系 V_K L18 氨基酸序列 (SEQ ID NO :43) 的对比。

[0204] 图 9 显示 4G5 的轻链可变区氨基酸序列与人种系 V_K L18 氨基酸序列 (SEQ ID NO :43) 的对比。

[0205] 图 10 显示 11E2 和 9D4 的轻链可变区氨基酸序列与人种系 V_K A27 氨基酸序列 (SEQ ID NO :44) 的对比。

[0206] 图 11 显示实验结果,证明抗人 IFNAR-1 的人单克隆抗体 3F11 不与小鼠单克隆抗体 64G12 竞争结合 IFNAR-1。

[0207] 发明详述

[0208] 本发明涉及结合干扰素 α 受体 1 (IFNAR-1) 并且能够阻断 I 型干扰素作用的分离的单克隆抗体。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 I 型干扰素与表达 IFNAR-1 的细胞上的 IFNAR-1 结合的方法, 例如用于治疗患者的免疫介导的疾病, 包括自身免疫病、移植排斥和移植物抗宿主病 (GVHD)。

[0209] 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。

[0210] 术语“干扰素 α 受体 1”、“IFNAR-1”和“IFNAR-1 抗原”可互换使用, 包括人 IFNAR-1 的变体、同种型、种同源物, 和与 IFNAR-1 具有至少一个共同表位的类似物。因此, 本发明的人抗体在某些情况下可以与来自人类以外的物种的 IFNAR-1 交叉反应, 或者与在结构上与人 IFNAR-1 相关的其他蛋白质 (例如人 IFNAR-1 同源物) 交叉反应。在其他情况下, 抗体可能对人 IFNAR-1 是完全特异性的, 不表现物种或其他类型的交叉反应性。

[0211] 人 IFNAR-1 的完整 cDNA 序列的 Genbank 登记号为 NM_000629。

[0212] 如此处所用的术语“I 型干扰素”是指 I 型干扰素分子家族的成员, 它们是 IFNAR-1 的配体 (即, 能够结合 IFNAR-1 的分子的 I 型干扰素家族的成员)。I 型干扰素配体的例子有 IFN α 1、2a、2b、4、5、6、7、8、10、14、16、17、21、干扰素 β 和干扰素 ω 。

[0213] 术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由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、感染了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。

[0214] “信号转导途径”是指在信号从细胞的一部分传送到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, 能够接收信号和跨细胞质膜传播这种信号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 IFNAR-1 受体。

[0215] 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), 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, 它们从氨基端至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域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子, 包括与免疫系统的各种细胞 (例如效应细胞) 和经典补系统的第一成分 (C1q) 的结合。

[0216] 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”) 是指保留特异性结合抗原 (例如 IFNAR-1) 的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

铰链区处通过二硫键连接的两个 Fab 片段的双价片段 ;(iii) 由 V_H 和 C_H 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 由分别的基因编码,但是它们可以利用重组方法通过合成接头连接在一起,从而能够将它们制成一条蛋白质链,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,并用与完整抗体相同的方法对这些片段进行实用性筛选。

[0217] 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 IFNAR-1 的分离的抗体基本不含特异性结合 IFNAR-1 以外抗原的抗体)。但是,特异性结合 IFNAR-1 的分离的抗体与其他抗原如来自其他物种的 IFNAR-1 分子可能具有交叉反应性。而且,分离的抗体可能基本不含其他细胞材料和 / 或化学物质。

[0218] 如此处所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有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的结合特异性和亲和性。

[0219] 如此处所用的术语“人抗体”包括具有其中构架区和 CDR 区都源自人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。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的抗体。

[0220] 术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其具有其中构架区和 CDR 区均源自人种系免疫球蛋白序列的可变区。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 细胞是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的。

[0221] 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) 从经转化后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接为其他 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,可以对这样的重组人抗体进行体外诱变 (或者,当使用人 Ig 序列转基因动物时,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所有组成成分 (repertoire) 中天然存在的序列。

[0222] 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)。

[0223] 如此处所用的,“特异性结合”是指抗体与预定的抗原结合。典型地,抗体以 $10^{-7}M$ 或更低的解离常数 (K_D) 结合,并且与预定抗原结合的 K_D 比与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。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。

[0224] 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 值可以用本领域公知的方法确定。确定抗体 K_D 的一种优选方法是使用表面等离子共振法, 优选使用生物传感器系统, 如 **Biacore**[®] 系统。

[0225] 如此处所用的术语“高亲和力”对于 IgG 抗体是指抗体的 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,“高亲和力”结合是指抗体的 K_D 为 10^{-7} M 或更低、更优选 10^{-8} M 或更低。

[0226] 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。

[0227] 本发明的各个方面在下面的部分中进一步详细描述。

[0228] 抗-IFNAR-1 抗体

[0229] 本发明的抗体用抗体的特定功能特征或特性来表征。例如,该抗体特异性结合 IFNAR-1, 优选人 IFNAR-1。另外,该抗体可以与来自一种或多种非人类灵长类动物如猕猴和/或恒河猴的 IFNAR-1 交叉反应。优选地,本发明的抗体与 IFNAR-1 高亲和力地结合,例如 K_D 为 10^{-7} M 或更低,更优选 K_D 为 10^{-8} M 或更低,或 10^{-9} M 或更低,或者甚至 5×10^{-10} M 或更低,或 2×10^{-10} M 或更低。

[0230] 此外,本发明的抗体能够抑制 I 型干扰素的生物活性。这些抗体抑制至少一种 I 型干扰素的生物活性,优选抑制多种 I 型干扰素 (即,至少两种,更优选至少三种,或者至少四种,或者至少五种,或者至少六种,或者至少七种,或者至少八种,或者至少九种,或者至少十种,或者至少 11 种,或者至少 12 种,或者至少 13 种,或者至少 14 种,或者至少 15 种不同亚型的 I 型干扰素) 的生物活性。在一个优选实施方案中,该抗体抑制以下 I 型干扰素的生物活性: $\alpha 1$ 、 $\alpha 2a$ 、 $\alpha 2b$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 10$ 、 $\alpha 14$ 、 $\alpha 16$ 、 $\alpha 17$ 、 $\alpha 21$ 、 β 和 ω 。在其他优选实施方案中,该抗体抑制类淋巴母细胞 IFN 和/或白细胞 IFN 的活性。

[0231] 抗体抑制 I 型干扰素的生物活性的能力可以通过一种或多种本领域建立的试验来检测。非限制性例子包括对 I 型 IFN 介导的 Daudi 细胞增殖抑制的抑制, I 型 IFN 诱导的外周血单核细胞 (PBMC) 表达 IP-10 的抑制, 系统性红斑狼疮 (SLE) 血浆介导的树突细胞发育的抑制, 和 I 型 IFN 的抗病毒活性的抑制。如果与非特异性对照抗体相比,一种抗体将活性抑制了至少 20%, 更优选至少 30%, 甚至更优选至少 40%, 至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80%, 或至少 90%, 则该抗体“抑制 I 型干扰素的生物活性”。

[0232] 在优选实施方案中,该抗体在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN $\alpha 2b$ 的活性, 在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN ω 的活性, 抑制 IFN $\alpha 2b$ 或 IFN ω 诱导的 PBMC 分泌 IP-10, 和/或抑制 SLE 血浆介导的树突细胞发育。

[0233] 在另外一个优选实施方案中,该抗体不与鼠抗-IFNAR-1 抗体 64G12 (ECACC 登记号为 92022605) 交叉竞争 (即结合不同的表位)。

[0234] 评价抗-IFNAR-1 抗体的功能活性的试验在实施例更详细地描述。本发明优选

的抗体表现至少一种,更优选两种、三种、四种、五种或更多以下的特性:

- [0235] a) 特异性结合 IFNAR-1 (优选人 IFNAR1);
- [0236] b) 高亲和力地结合 IFNAR1,如 K_D 为 $1 \times 10^{-8}M$ 或更高的亲和力;
- [0237] c) 抑制多种 I 型干扰素的生物活性;
- [0238] d) 在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN α 2b 的活性;
- [0239] e) 在 Daudi 细胞增殖试验中抑制 IFN ω 的活性;
- [0240] f) 抑制 IFN α 2b 诱导的外周血单核细胞分泌 IP-10;
- [0241] g) 抑制 IFN ω 诱导的外周血单核细胞分泌 IP-10;
- [0242] h) 抑制系统性红斑狼疮血浆介导的树突细胞发育;和
- [0243] i) 与鼠单克隆抗体 64G12 (ECACC 登记号 92022605) 结合不同的表位 (即,不交叉竞争)。

[0244] 本发明的抗体可以显示上述功能特征的任意组合,和 / 或如实施例中所所述的功能特征。

[0245] 单克隆抗体 3F11、4G5、11E2 和 9D4

[0246] 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 3F11、4G5、11E2 和 9D4。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_H 氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO:25、26、27 和 28 中。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_L 氨基酸序列分别显示在 SEQ ID NO:29、30、31 和 32 中。

[0247] 假定这些抗体都能够结合 IFNAR-1,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-IFNAR-1 结合分子。这些“混合并匹配的”抗体的 IFNAR-1 结合可以用本文所述的结合试验 (例如 ELISA) 和 / 或用实施例中所所述的 I 型 IFN 功能抑制试验来检测。优选地,当 V_H 和 V_L 链混合并匹配时,来自特定 V_H/V_L 配对的 V_H 序列被替换为结构上相似的 V_H 序列。同样,优选地来自特定 V_H/V_L 配对的 V_L 序列被替换为结构上相似的 V_L 序列。例如,3F11 和 4G5 的 V_H 和 V_L 序列特别适合混合并匹配,因为这些抗体使用源自相同种系序列 (V_H 4-34 和 V_K L18) 的 V_H 和 V_L 序列,因此显示结构相似性。另外,11E2 和 9D4 的 V_H 和 V_L 序列特别适合混合并匹配,因为这些抗体使用源自相同种系序列 (V_H 5-51 和 V_K A27) 的 V_H 和 V_L 序列,因此显示结构相似性。

[0248] 因此,一方面,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:

[0249] (a) 包含选自 SEQ ID NO:25、26、27 和 28 的氨基酸序列的重链可变区;和

[0250] (b) 包含选自 SEQ ID NO:29、30、31 和 32 的氨基酸序列的轻链可变区;

[0251] 其中该抗体特异性结合 IFNAR-1。

[0252] 优选的重链和轻链组合包括:

[0253] (a) 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列的重链可变区;和 (b) 包含 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0254] (a) 包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列的重链可变区;和 (b) 包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0255] (a) 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列的重链可变区;和 (b) 包含 SEQ ID NO:31 的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0256] (a) 包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列的重链可变区;和 (b) 包含 SEQ ID NO:32

的氨基酸序列的轻链可变区。

[0257] 另一方面,本发明提供包含 3F11、4G5、11E2 和 9D4 的重链和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 或其组合的抗体。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_H CDR1 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:1、2、3 和 4 中显示。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_H CDR2 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:5、6、7 和 8 中显示。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_H CDR3 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 中显示。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_K CDR1 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:13、14、15 和 16 中显示。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_K CDR2 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:17、18、19 和 20 中显示。3F11、4G5、11E2 和 9D4 的 V_K CDR3 的氨基酸序列在 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 中显示。CDR 区用 Kabat 系统 (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) 标出。

[0258] 假如这些抗体中的每一个都能够结合 IFNAR-1 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_K 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_K CDR1、2、3),从而产生本发明的其他的抗-IFNAR-1 结合分子。这些“混合并匹配的”抗体的 IFNAR-1 结合可以用以上及实施例中所所述的结合试验(例如 ELISA)来检测。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_K CDR 序列混合并匹配时,来自特定 V_K 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,3F11 和 4G5 的 V_H CDR1 具有一定的结构相似性,因此适合混合和匹配。作为另一个例子,11E2 和 9D4 的 V_H CDR1 具有一定的结构相似性,因此适合混合和匹配。作为另一个例子,3F11 和 4G5 的 V_K CDR1 具有一定的结构相似性,因此适合混合和匹配。作为另一个例子,11E2 和 9D4 的 V_H CDR1 具有一定的结构相似性,因此适合混合和匹配。对于本领域技术人员而言显而易见的是,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 3F11、4G5、11E2 和 9D4 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。

[0259] 因此,另一方面,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:

[0260] (a) 包含选自 SEQ ID NO:1、2、3 和 4 的氨基酸序列的重链可变区 CDR1;

[0261] (b) 包含选自 SEQ ID NO:5、6、7 和 8 的氨基酸序列的重链可变区 CDR2;

[0262] (c) 包含选自 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 的氨基酸序列的重链可变区 CDR3;

[0263] (d) 包含选自 SEQ ID NO:13、14、15 和 16 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR1;

[0264] (e) 包含选自 SEQ ID NO:17、18、19 和 20 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR2;和

[0265] (f) 包含选自 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 的氨基酸序列的轻链可变区 CDR3;

[0266] 其中该抗体特异性结合 IFNAR-1。

[0267] 在一个优选实施方案中,该抗体包含:

[0268] (a) 包含 SEQ ID NO:1 的重链可变区 CDR1;

[0269] (b) 包含 SEQ ID NO:5 的重链可变区 CDR2;

[0270] (c) 包含 SEQ ID NO:9 的重链可变区 CDR3;

[0271] (d) 包含 SEQ ID NO:13 的轻链可变区 CDR1;

[0272] (e) 包含 SEQ ID NO:17 的轻链可变区 CDR2;和

[0273] (f) 包含 SEQ ID NO:21 的轻链可变区 CDR3。

- [0274] 在另一个优选实施方案中,该抗体包含:
- [0275] (a) 包含 SEQ ID NO:2 的重链可变区 CDR1;
- [0276] (b) 包含 SEQ ID NO:6 的重链可变区 CDR2;
- [0277] (c) 包含 SEQ ID NO:10 的重链可变区 CDR3;
- [0278] (d) 包含 SEQ ID NO:14 的轻链可变区 CDR1;
- [0279] (e) 包含 SEQ ID NO:18 的轻链可变区 CDR2;和
- [0280] (f) 包含 SEQ ID NO:22 的轻链可变区 CDR3。
- [0281] 在另一个优选实施方案中,该抗体包含:
- [0282] (a) 包含 SEQ ID NO:3 的重链可变区 CDR1;
- [0283] (b) 包含 SEQ ID NO:7 的重链可变区 CDR2;
- [0284] (c) 包含 SEQ ID NO:11 的重链可变区 CDR3;
- [0285] (d) 包含 SEQ ID NO:15 的轻链可变区 CDR1;
- [0286] (e) 包含 SEQ ID NO:19 的轻链可变区 CDR2;和
- [0287] (f) 包含 SEQ ID NO:23 的轻链可变区 CDR3。
- [0288] 在另一个优选实施方案中,该抗体包含:
- [0289] (a) 包含 SEQ ID NO:4 的重链可变区 CDR1;
- [0290] (b) 包含 SEQ ID NO:8 的重链可变区 CDR2;
- [0291] (c) 包含 SEQ ID NO:12 的重链可变区 CDR3;
- [0292] (d) 包含 SEQ ID NO:16 的轻链可变区 CDR1;
- [0293] (e) 包含 SEQ ID NO:20 的轻链可变区 CDR2;和
- [0294] (f) 包含 SEQ ID NO:24 的轻链可变区 CDR3。
- [0295] 与 3F11、4G5、11E2 和 9D4 结合相同表位的抗体
- [0296] 在另一个实施方案中,本发明提供与单克隆抗体 3F11、4G5、11E2 或 9D4 (具有分别如 SEQ ID NO:25、26、27 和 28 所示的 V_H 序列,和分别如 SEQ ID NO:29、30、31、32 所示的 V_L 序列) 结合相同的人 IFNAR-1 上表位的抗体。这些抗体可以根据它们在标准 IFNAR-1 结合试验中与 3F11、4G5、11E2 或 9D4 交叉竞争的能力来鉴定。一种试验抗体抑制 3F11、4G5、11E2 或 9D4 结合人 IFNAR-1 的能力证明该试验抗体能够与 3F11、4G5、11E2 或 9D4 竞争结合人 IFNAR-1,从而与 3F11、4G5、11E2 或 9D4 结合相同的人 IFNAR-1 上的表位。在一个优选实施方案中,与 3F11、4G5、11E2 或 9D4 结合相同的人 IFNAR-1 上的表位的抗体是一种人单克隆抗体。这种人单克隆抗体可以如实施例所述制备和分离。
- [0297] 在另一个优选实施方案中,该抗体与小鼠单克隆抗体 64G12 (ECACC 登记号 92022605) 结合不同的表位 (即,不交叉竞争)。
- [0298] 具有特定种系序列的抗体
- [0299] 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。
- [0300] 例如,在一个优选实施方案中,本发明提供一种分离的抗 -IFNAR-1 单克隆抗体或其抗原结合部分,其中该抗体:
- [0301] (a) 包含人 V_H 4-34 或 5-51 基因的重链可变区;
- [0302] (b) 包含人 V_k L18 或 A27 基因的轻链可变区;且

[0303] (c) 该抗体特异性结合 IFNAR-1。

[0304] 分别具有 VH 4-34 和 Vk L18 的 V_H 和 V_K 的抗体的例子包括 3F11 和 4G5。分别具有 VH 5-51 和 Vk A27 的 V_H 和 V_K 的抗体的例子包括 11E2 和 9D4

[0305] 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或“源自”它的或是它的“产物”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或“源自”它的或是它的“产物”的人抗体可以如下鉴定: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,并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或“源自”它的或是它的“产物”的人抗体与该种系序列相比可能包含氨基酸差异,例如是由于天然发生的体细胞突变或有意引入定点突变。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为人抗体的氨基酸残基。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%、或者甚至至少 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、或者甚至不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸。

[0306] 同源抗体

[0307] 在另一个实施方案中,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的抗-IFNAR-1 抗体的需要的功能特性。例如,本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0308] (a) 重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:25、26、27 和 28 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;

[0309] (b) 轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:29、30、31 和 32 的氨基酸序列至少 80% 同源的氨基酸序列;

[0310] (c) 该抗体特异性结合 IFNAR-1,并且表现至少一种此处所述的功能特性,优选此处所述的几种功能特性。

[0311] 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。具有分别与上述序列的 V_H 和 V_L 区高度(即 80% 或以上)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:33、34、35、36、37、38、39 或 40 的核酸分子,然后用此处所述的功能试验来检测编码的改变抗体所保留的功能(即以上(c)、(d)和(e)所述的功能)。

[0312] 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对比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点的数目的函数(即%同源性=相同位点数/位点总数 $\times 100\%$)。两个序列之间的序列比较和百分同一性的确定可以用

如下面的非限制性实施例中所述的数学算法来实现。

[0313] 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)) 的算法来确定, 其使用 PAM120 权重残基表, 空位长度罚分为 12, 空位罚分为 4。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)) 的算法来确定, 其使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵, 空位权重为 16、14、12、10、8、6 或 4, 长度权重为 1、2、3、4、5 或 6。

[0314] 另外, 或者, 本发明的蛋白质序列可以进一步作为“查询序列”来对公共数据库进行检索, 例如用来鉴定相关序列。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对比, 可以采用如 Altschul 等 (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402 所述的空位 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>。

[0315] 具有保守修饰的抗体

[0316] 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 3F11、4G5、11E2 和 9D4) 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-IFNAR-1 抗体的需要的功能特性。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:

[0317] (a) 重链可变区 CDR3 序列包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 和其保守修饰的氨基酸序列;

[0318] (b) 轻链可变区 CDR3 序列包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 和其保守修饰的氨基酸序列; 且

[0319] (c) 该抗体特异性结合 IFNAR-1, 并且表现至少一种此处所述的功能特性, 优选此处所述的几种功能特性。

[0320] 在另一个实施方案中, 重链可变区 CDR2 序列包含选自 SEQ ID NO:5、6、7 和 8 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:17、18、19 和 20 的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列。在又一个实施方案中, 重链可变区 CDR1 序列包含选自 SEQ ID NO:1、2、3 和 4 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:13、14、15 和 16 的氨基酸序列和其保守修饰的氨基酸序列。

[0321] 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,本发明抗体的 CDR 区内的一个或多个氨基酸残基可以被替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)、(d)和(e)所述的功能)。

[0322] 工程化的和修饰的抗体

[0323] 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,工程化一种修饰的抗体,该修饰的抗体可能具有与起始抗体相比改变的特性。可以通过修饰一个或两个可变区(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工程化一种抗体。另外,或者,可以通过修饰恒定区内的残基来工程化抗体,例如改变该抗体的效应功能。

[0324] 可以进行的一种类型的可变区工程化是 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,CDR 内的氨基酸序列比 CDR 外的序列在各个抗体之间更加多样化。由于 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此通过构建如下的表达载体可以表达模拟该特定天然存在抗体的特性的重组抗体:该表达载体包含来自特定天然存在抗体的 CDR 序列,该 CDR 序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的构架序列上(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)。

[0325] 因此,本发明的另一个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、3 和 4、SEQ ID NO:5、6、7 和 8、和 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 的氨基酸序列,以及含 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:13、14、15 和 16、SEQ ID NO:17、18、19 和 20、和 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 的氨基酸序列。因此,这些抗体含有单克隆抗体 3F11、4G5、11E2 或 9D4 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。

[0326] 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 (人种系 V_H 序列的全部组成成分揭示了具有不同高变环的大约 50 个 V_H 区段组)” *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 (人种系 V_H 区段目录揭示其应用的强烈偏好)” *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; 其内容均在此特别引入作为参考。

[0327] 用于本发明抗体的优选构架序列在结构上类似于本发明选择的抗体使用的构架序列,例如,类似于 3F11 和 4G5 单克隆抗体使用的 V_H 4-34 和 V_L L18 构架序列,或 11E2 和 9D4 单克隆抗体使用的 V_H 5-51 和 V_L A27 构架序列。可以将 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12 的 V_H CDR1、2、3 序列和 SEQ ID NO:13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 和 24 的 V_L CDR1、2、3 序列移植到与衍生该构架序列的种系免疫球蛋白基因具有相同序列的构架区上,或者可以将 CDR 序列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)。

[0328] 另一种类型的可变区修饰是将 V_H 和 / 或 V_L CDR1、CDR2 和 / 或 CDR3 区内的氨基酸序列突变,从而改善目标抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以进行定点诱变或 PCR 介导的诱变,以引入突变,对抗体结合的影响,或者其他目标功能特性,可以用此处所述以及在实施例中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。突变可以是氨基酸置换、添加或缺失,但是优选置换。而且,一般在 CDR 区内改变不超过 5 个残基。

[0329] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供分离的抗-IFNAR-1 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、3 和 4 的氨基酸序列,或与选自 SEQ ID NO:1、2、3 和 4 的氨基酸序列相比具有 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:5、6、7 和 8 的氨基酸序列,或与选自 SEQ ID NO:5、6、7 和 8 的氨基酸序列相比具有 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:9、10、11 和 12 的氨基酸序列,或与选自 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 的氨基酸序列相比具有 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:13、14、15 和 16 的氨基酸序列,或与选自 SEQ ID NO:13、14、15 和 16 的氨基酸序列相比具有 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:17、18、19 和 20 的氨基酸序列,或与选自 SEQ ID NO:17、18、19 和 20 的氨基酸序列相比具有 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:21、22、23 和 24 的氨基酸序列,或与选自 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸置换、缺失或添加的氨基酸序列。

[0330] 本发明的工程化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衍生该抗体的种系序列不同的构架残基。通过比较抗体构架序列与衍生该抗体的种系序列,可以鉴定这些残基。例如,对于 3F11, V_H 的氨基酸残基 #43(FR2 内)是苏氨酸,而在相应的 V_H 4-43 种系序列中该残基为丙氨酸(见图 5)。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,3F11 的 V_H 的残基 43 可以从苏氨酸“回复突变”为丙氨酸)。作为另一个例子,对于 4G5, V_H 的氨基酸残基 #81(FR3 内)是天冬酰胺,而在相应的 V_H 4-43 种系序列中该残基为赖氨酸(见图 6)。为了使构架区序列恢复为其种系构型,体细胞突变可以从天冬酰胺

“回复突变”为赖氨酸。作为另一个例子,对于 11E2 和 9D4, V_H的氨基酸残基 #28(FR1 内)是异亮氨酸,而在相应的 V_H5-51 种系序列中该残基为丝氨酸(见图 7)。为了使构架区序列恢复为其种系构型,体细胞突变可以从异亮氨酸“回复突变”为丝氨酸。这些“回复突变”的抗体也包括在本发明内。

[0331] 另一种类型的构架修饰涉及对构架区内、或者甚至一个或多个 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。

[0332] 除了在构架区或 CDR 区内进行修饰以外,或者作为它的替代,本发明的抗体可以被工程化为包括 Fc 区内的修饰,一般是为了改变该抗体的一种或多种功能特性,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,也可以化学修饰本发明的抗体(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特性。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。

[0333] 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目改变,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目是为了,例如,有利于轻链和重链的装配,或提高或降低抗体的稳定性。

[0334] 在另一个实施方案中,对抗体的 Fc 铰链区进行突变,以缩短该抗体的生物半衰期。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。

[0335] 在另一个实施方案中,修饰抗体以延长其生物半衰期。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,为了延长生物半衰期,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。

[0336] 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,而保留亲本抗体的抗原结合能力。对其亲和力被改变的效应配体可以是,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。

[0337] 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,使得该抗体的 C1q 结合改变和 / 或补体依赖性细胞毒性(CDC)降低或消除。该方法在 Idusogie 等人的美国专利号 6,194,551 中更详细地描述。

[0338] 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。

[0339] 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,通过修饰在下列位点处的一个或多个氨基酸来修饰 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 的结合位点已经被作图,并且已经描述了结合得到改善的变体(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 Fc γ RIII 的结合。另外,下列组合突变体显示改善了与 Fc γ RIII 的结合:T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 和 S298A/E333A/K334A。

[0340] 在另一个实施方案中,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,可以进行导致一个或多个可变区构架糖基化位点消失的一个或多个氨基酸置换,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。

[0341] 另外,或者,可以制备具有改变类型的糖基化的抗体,如岩藻糖基残基数目减少的低岩藻糖基化抗体,或等分 GlcNac 结构增多的抗体。已经证明这种改变的糖基化模式能提高抗体的 ADCC 能力。这种糖修饰可以通过例如在糖基化机制改变的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制改变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,从而产生糖基化改变的抗体。例如,Hanai 等人的 EP1,176,195 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表现为低岩藻糖基化。Presta 的 PCT 公布 WO 03/035835 记载了一种变异 CHO 细胞系, Lec13 细胞,它的使岩藻糖连接到 Asn(297)-连接的碳水化合物上的能力降低,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)) 的工程化细胞系,因此该工程化细胞系中表达的抗体表现为等分 GlcNac 结构增多,导致抗体的 ADCC 活性提高(参见,Umana 等(1999) Nat. Biotech. 17 :176-180)。

[0342] 本发明涉及的此处所述抗体的另一种修饰是 PEG 化。例如,为了延长抗体的生物(例如血清)半衰期,可以将该抗体 PEG 化。为了 PEG 化一种抗体,在使一个或多个 PEG 基团变为与抗体或抗体片段连接条件下,一般将该抗体或其片段与聚乙二醇(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”包括用于衍生化其他蛋白质的任何形式的 PEG,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,Nishimura 等人的 EP 0154316 和 Ishikawa 等人的 EP 0401384。

[0343] 工程化抗体的方法

[0344] 因此,在本发明的另一方面,利用本发明的抗-IFNAR-1 抗体如 3F11、4G5、11E2 和 9D4 的结构特征产生结构上相关的抗-IFNAR-1 抗体,该结构相关的抗体保留本发明抗体的至少一种功能特性,如结合 IFNAR-1。例如,3F11、4G5、11E2 或 9D4 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工程化的本发明的抗-IFNAR-1 抗体。其他类型的修饰包括以上部分所述的修饰。用于工程化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。为了产生工程化抗体,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。

[0345] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供一种制备抗-IFNAR-1 抗体的方法,包括:

[0346] (a) 提供:(i) 重链可变区抗体序列,其包含选自 SEQ ID NO:1、2、3 和 4 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO:5、6、7 和 8 的 CDR2 序列,和/或选自 SEQ ID NO:9、10、11 和 12 的 CDR3 序列;和(ii) 轻链可变区抗体序列,其包含选自 SEQ ID NO:13、14、15 和 16 的 CDR1 序列,选自 SEQ ID NO:17、18、19 和 20 的 CDR2 序列,和/或选自 SEQ ID NO:21、22、23 和 24 的 CDR3 序列;

[0347] (b) 改变第一抗体序列和/或第二抗体序列内的至少一个氨基酸残基,从而产生至少一个改变的抗体序列;和

[0348] (c) 制备该改变的抗体序列;和

[0349] (d) 将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0350] 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。

[0351] 优选地,由改变的抗体序列编码的抗体保留此处所述的抗-IFNAR-1 抗体的一种、一些或全部功能特性,该功能特性包括但不限于:

[0352] (i) 结合 IFNAR-1;

[0353] (ii) 抑制 I 型干扰素与 IFNAR-1 的结合;

[0354] (iii) 结合表达人 IFNAR-1 的活细胞;

[0355] (iv) 以 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低(例如 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更低)的 K_D 结合人 IFNAR-1;

[0356] (v) 结合 IFNAR-1 上的独特表位(以消除具有互补活性的单克隆抗体在组合使用时竞争结合相同表位的可能性)。

[0357] 改变的抗体的功能特性可以用本领域中可使用的和/或此处所述的标准试验来评价。例如,抗体结合 IFNAR-1 的能力可以用标准结合试验,如实施例所述的那些试验(例如 ELISA)来确定。

[0358] 在工程化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-IFNAR-1 抗体编码序列(例如 3F11、4G5、11E2 或 9D4 编码序列)随机或选择性地引入突变,并可以对结合活性和/或如此处所述的其他功能特性筛选获得的修饰的抗-IFNAR-1 抗体。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、合成连接装配或其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。

[0359] 编码本发明的抗体的核酸分子

[0360] 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,从其他细胞成分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白质中分离纯化时,该核酸是“分离的”或“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。

[0361] 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。

[0362] 本发明优选的核酸分子是编码 3F11、4G5、11E2 和 9D4 单克隆抗体的 V_H 和 V_L 序列的核酸分子。编码 3F11 的 V_H 和 V_L 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO :33 和 37 中。编码 4G5 的 V_H 和 V_L 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO :34 和 38 中。编码 11E2 的 V_H 和 V_L 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO :35 和 39 中。编码 9D4 的 V_H 和 V_L 序列的 DNA 序列分别显示在 SEQ ID NO :36 和 40 中。

[0363] 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 (operatively linked)”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阅读框内。

[0364] 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,但是最优选的是 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。

[0365] 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,但是最优选的是 κ 恒定区。

[0366] 为了产生 scFv 基因,将编码 V_H 和 V_L 的 DNA 片段与编码柔性接头例如编码氨基酸序列 (Gly₄-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)。

[0367] 本发明的单克隆抗体的产生

[0368] 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。

[0369] 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非常完善确立的程序。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。

[0370] 本发明的嵌合或人源化抗体可以基于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工程化为含有非鼠 (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)。

[0371] 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 IFNAR-1 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”。

[0372] 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, 该小鼠表现为小鼠 IgM 或 κ 表达降低, 并且响应于免疫, 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), 见上; 综述见 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 ;Tuailon 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 ;Tuailon 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。

[0373] 在另一个实施方案中, 可以用在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本发明的人抗体。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。

[0374] 再者,在本领域中可以获得替代的表达人免疫球蛋白基因的转基因动物系统,能够用来产生本发明的抗-IFNAR-1 抗体。例如,可以使用一种被称为 Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的替代的转基因系统,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。

[0375] 而且,在本领域中可以获得替代的表达人免疫球蛋白基因的转染色体动物系统,能够用来产生本发明的抗-IFNAR-1 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,其被称为“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-IFNAR-1 抗体。

[0376] 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。

[0377] 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。

[0378] 人 Ig 小鼠的免疫

[0379] 当使用人 Ig 小鼠产生本发明的人抗体时,如 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,用纯化的或富集的 IFNAR-1 抗原制剂和 / 或表达 IFNAR-1 的细胞免疫该小鼠。优选地,第一次输注时小鼠为 6-16 周龄。例如,可以使用纯化的或富集的 IFNAR-1 抗原制剂 (5-50 μ g) 腹膜内免疫人 Ig 小鼠。在使用纯化的或富集的 IFNAR-1 抗原制剂免疫不产生抗体的情况下,也可以用表达 IFNAR-1 的细胞如人 T 细胞系免疫小鼠,促进免疫应答。

[0380] 产生抗 IFNAR-1 完全人单克隆抗体的详细程序在下面的实施例 1 中描述。应用各种抗原的积累的经验证明,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,发现没有佐剂的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。可以通过 ELISA (如下所述) 筛选血浆,使用具有足够抗-IFNAR-1 人免疫球蛋白效价的小鼠进行融合。用抗原对小鼠静脉内加强免疫,3 天后处死小鼠并且取出脾。预期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。通常 HCo7 和 HCo12 系都使用。另外,HCo7 和 HCo12 转基因可以杂交在一起,产生一种具有两种不同人重链转基因的小鼠 (HCo7/HCo12)。

[0381] 产生本发明的人单克隆抗体的杂交瘤的产生

[0382] 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。根据抗原特异性抗体的产生筛选得到的杂交瘤。例如,使用 50% PEG,将来自被免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与六分之一数目的 P3X63-Ag8.653 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1580)融合。细胞以大约 2×10^5 接种于平底微量滴定板,接着在含有 20% 胎克隆血清, 18% “653” 条件基质, 5% Origen (IGEN), 4mM L-谷氨酰胺, 1mM 丙酮酸钠, 5mM HEPES, 0.055mM 2-巯基乙醇, 50 单位/毫升青霉素, 50mg/ml 链霉素, 50mg/ml 庆大霉素和 $1 \times \text{HAT}$ (Sigma; 融合 24 小时后加入 HAT) 的选择性培养基中温育两周。大约两周之后,在用 HT 替换了 HAT 的培养基中培养细胞。然后通过 ELISA 筛选各孔的人单克隆 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。再次接种分泌抗体的杂交瘤,再次筛选,如果对于人 IgG 仍然是阳性,则通过有限稀释将单克隆抗体至少亚克隆两次。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。

[0383] 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。将缓冲溶液换成 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。

[0384] 产生本发明单克隆抗体的转染瘤的产生

[0385] 例如,利用本领域公知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合(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。

[0386] 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,使得该基因与转录和翻译控制序列可操作连接。在本文中,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该抗体基因转录和翻译的预期功能。选择与使用的表达宿主细胞匹配的表达载体和表达控制序列。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,抗体基因片段和载体上的互补限制性位点连接,或者如果不存在限制性位点,则平端连接)。通过将此处描述的抗体的轻链和重链可变区插入到已经编码所需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 区段与载体中的 C_H 区段可操作连接,而 V_L 区段与载体中的 C_L 区段可操作连接,能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由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,使得该信号肽在阅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)。

[0387] 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”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,聚腺苷酸化信号)。这些调节序列例如在 Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)) 中描述。本领域技术人员知道,表达载体的设计,包括调节序列的选择,取决于诸

如要转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调节序列包括引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。此外,也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)。

[0388] 除了抗体链基因和调节序列以外,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已经导入载体的宿主细胞 (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已经导入该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)。

[0389] 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。术语“转染”的各种形式包括常用于将外源 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。虽然理论上在原核或真核宿主细胞中都可能表达本发明的抗体,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,因为这些真核细胞,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生活性抗体 (Boss, M. A. 和 Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6 :12-13)。

[0390] 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,在 Urlaub 和 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216-4220 中描述,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)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。特别地,用于 NS0 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允许抗体在宿主细胞中表达的一段时间,或更优选地,足以使抗体分泌到宿主细胞生长所处培养基中的一段时间,来产生抗体。可应用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

[0391] 抗体与抗原结合的特征

[0392] 例如通过标准 ELISA,可以检测本发明的抗体与 IFNAR-1 的结合。简要地说,用在 PBS 中的 0.25 μ g/ml 纯化 IFNAR-1 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 IFNAR-1 免疫小鼠的血浆的稀释液),在 37°C 下温育 1-2 小时。用 PBS/Tween 洗板,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°C 下温育 1 小时。洗涤后,平板用 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。

[0393] 如上所述的 ELISA 分析也可以用来筛选表现出与 IFNAR-1 免疫原有阳性反应性

的杂交瘤。将与 IFNAR-1 高亲合力结合的杂交瘤亚克隆,并且进一步表征。从每个杂交瘤中选择保留母细胞反应性(通过 ELISA)的一个克隆,制备 5-10 小瓶细胞库,在 -140℃ 下保存,用于抗体纯化。

[0394] 为了纯化抗 -IFNAR-1 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℃ 下保存。

[0395] 为了确定选择的抗 -IFNAR-1 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 IFNAR-1 包被的 ELISA 板应用未标记的单克隆抗体和生物素化单克隆抗体进行竞争研究。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。

[0396] 为了确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,为了确定人单克隆抗体的同种型,在 4℃ 下用 1 μg/ml 抗人免疫球蛋白将微量滴定板的孔包被过夜。用 1% BSA 封闭之后,平板与 1 μg/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。

[0397] 为了证明单克隆抗体与表达 IFNAR-1 的活细胞的结合,可以使用流式细胞术。简要说,表达 IFNAR-1 的细胞系(在标准生长条件下生长)与不同浓度的单克隆抗体在含 0.1% BSA 和 10% 胎牛血清的 PBS 中混合,37℃ 温育 1 小时。洗涤后,细胞与荧光素标记的抗人 IgG 抗体在与第一抗体染色相同的条件下反应。使用光和侧向散射特性用门圈出 (gate) 单细胞,通过 FACSscan 仪器分析样品。(除了或者替代)流式细胞试验,可以使用一种利用荧光显微镜的替代试验。细胞可以完全如上所述染色,并通过荧光显微镜检查。该方法允许显示个别细胞,但是根据抗原密度灵敏度可能降低。

[0398] 可以通过 Western 印迹法进一步检测抗 -IFNAR-1 人 IgG 与 IFNAR-1 抗原的反应性。简要说,从表达 IFNAR-1 的细胞制备细胞提取物,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,并用待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。

[0399] 免疫偶联物

[0400] 另一方面,本发明提供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 -IFNAR-1 抗体或其片段。这些偶联物在此被称为“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细胞有害(例如杀伤)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、二羟基炭疽菌素二酮、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、氨烯咪胺 (decabazine)),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), 氨基霉素类 (例如, 柔红霉素 (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)。

[0401] 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以作为商品购得的 Mylotarg™ (Wyeth-Ayerst)。

[0402] 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。已经用于将细胞毒素与抗体偶联的接头类型的实例包括但不限于脲、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)。

[0403] 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。

[0404] 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, 也被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、钬 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 Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) 和 Bexxar™ (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。

[0405] 本发明的抗体偶联物可用于修饰特定的生物学反应, 且药物部分不应理解为局限于经典的化学治疗剂。例如, 药物部分可以是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。

[0406] 用于将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 (在癌症治疗中用于药物的免疫靶向的单克隆抗体)”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeldt 等 (编), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等, “Antibodies For Drug Delivery (用于给药的抗体)”, 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 (癌症治疗中细胞毒剂的抗体载体: 综述)”, 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 (放射性标记抗体在癌症治疗中的治疗用途的分析、结果和未来前景)”, 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 (抗体-毒素偶联物的制备和细胞毒性)”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

[0407] 双特异性分子

[0408] 另一方面, 本发明提供包含本发明的抗-IFNAR-1 抗体或其片段的双特异性分子。可将本发明的抗体或其抗原结合部分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, 以生成可与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。实际上可以将本发明的抗体衍生化或连接到一种以上的其他功能性分子上, 以生成可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、基因融合、非共价结合等), 从而得到双特异性分子。

[0409] 因此, 本发明包括包含至少一种对 IFNAR-1 的第一结合特异性和对第二个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, 第二个目标表位是 Fc 受体, 如人 Fc γ RI (CD64) 或人 Fc α 受体 (CD89)。因此, 本发明包括既能与表达 Fc γ R、Fc α R 或 Fc ϵ R 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 IFNAR-1 的靶细胞结合的双特异性分子。这些双特异性分子将表达 IFNAR-1 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 IFNAR-1 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。

[0410] 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-IFNAR-1 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, 例如结合参与细胞毒性活性的表面蛋白质并因而增强抗靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以是结合特定分子如抗原或受体, 并因而导致对 Fc 受体或靶细胞抗原的结合决定簇作用增强的抗体、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, 抗增强因子部分可结合细胞毒性 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)。

[0411] 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。该抗体也可以是轻链或重链二聚体, 或其任何最小片段, 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。

[0412] 在一个实施方案中, 对 Fc γ 受体的结合特异性由单克隆抗体提供, 该单克隆抗体的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 -链基因的任何个。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 Fc γ 受体类型: Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16)。在一

个优选实施方案中, $\text{Fc}\gamma$ 受体是人高亲和力 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 。人 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 是 72kDa 的分子, 表现出对单体 IgG 的高亲和力 (10^8 – 10^9M^{-1})。

[0413] 某些优选抗 $\text{Fc}\gamma$ 单克隆抗体的制备和表征在 Fanger 等人的 PCT 公布 WO 88/00052 和美国专利号 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 $\text{Fc}\gamma$ 结合位点不同的位点处与 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ 或 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 的表位结合, 因而, 其结合基本不被生理学水平的 IgG 阻断。可用于本发明的特定抗 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 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 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 受体抗体是单克隆抗体 22 的人源化形式 (H22)。H22 抗体的产生和表征在 Graziano, R. F. 等 (1995) J. Immunol 155(10):4996–5002 和 PCT 公布 WO 94/10332 中描述。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。

[0414] 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 $\text{Fc}\alpha$ 受体 ($\text{Fc}\alpha\text{RI}$ (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”包括位于染色体 19 上的一个 α -基因的基因产物 ($\text{Fc}\alpha\text{RI}$)。已知该基因编码几个 55–110kDa 的可变剪接的跨膜同种型。 $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ (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。 $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ 对 IgA1 和 IgA2 两者均具有中等亲和力 (约 $5\times 10^7\text{M}^{-1}$), 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 $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ -特异性单克隆抗体, 标识为 A3、A59、A62 和 A77, 它们在 IgA 配体结合域之外结合 $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ (Monteiro, R. C. 等 (1992) J. Immunol. 148:1764)。

[0415] $\text{Fc}\alpha\text{RI}$ 和 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ 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。

[0416] 优选人单克隆抗体, 而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。

[0417] 可通过应用本领域中公知的方法偶联组成结合特异性, 如抗 FcR 和抗 IFNAR-1 结合特异性, 来制备本发明的双特异性分子。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-硫代乙酸酯 (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) 丙酸酯 (SPDP) 和磺基琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚氨基甲基) 环己基-1-羧酸酯 (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。

[0418] 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合来偶联。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。

[0419] 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 mAbxmAb, mAbxFab, FabxF(ab')₂ 或配体 xFab 融合蛋白时,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例如在美国专利号 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 中描述。

[0420] 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 Western Blot 测定进行证实。这些试验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) 来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中的任意一种来检测。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。

[0421] 药物组合物

[0422] 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可与靶抗原上不同表位结合或具有互补活性的组合的抗体 (或免疫偶联物或双特异性剂)。

[0423] 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-IFNAR-1 抗体与至少一种其他的免疫抑制剂组合。

[0424] 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,该载体适合于静脉内、肌肉、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,以保护该化合物免于可使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

[0425] 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。酸加成盐包括那些由无毒性无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等衍生的盐,以及由无毒性有机酸如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等衍生的盐。碱加成盐包括那些由碱土金属如钠、钾、镁、钙等衍生的盐,以及由无毒性有机胺如 N, N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等衍生的盐。

[0426] 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。

[0427] 可用于本发明的药物组合物中的适当的水性或非水性载体的例子包括水，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，和可注射的有机酯如油酸乙酯。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，以及通过应用表面活性剂，可维持适当的流动性。

[0428] 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、苯酚山梨酸等来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。

[0429] 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。这些介质和试剂用于药学活性物质的应用是本领域公知的。除了任何常规介质或试剂与活性化合物不相容的情况外，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。

[0430] 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、聚乙二醇和液态聚乙二醇等）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，在分散剂的情况下通过保持所需的颗粒大小，以及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。

[0431] 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其组合，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无菌载体中制备分散剂。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末剂，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。

[0432] 可以与载体材料组合以制备单一剂量形式的活性成分的量根据所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以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 100% 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。

[0433] 调节剂量方案，以提供最佳的需要的反应（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需，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剂量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单位剂量用于所治疗的受试者的物理不连续单位；每个单位含有预定量的活性化合物，经计算该预定量的活性化合物与需要的药物载

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种用于治疗个体敏感性的活性化合物的限制。

[0434] 对于抗体的给药, 剂量范围为约 0.0001 至 100mg/kg, 更通常为 0.01 至 5mg/kg 受者体重。例如, 剂量可以是 0.3mg/kg 体重、1mg/kg 体重、3mg/kg 体重、5mg/kg 体重或 10mg/kg 体重, 或在 1-10mg/kg 范围内。一个治疗方案的实例需要每周给药一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每 3 月一次、或每 3-6 月一次。本发明的抗-IFNAR-1 抗体的优选剂量方案包括经静脉内给予 1mg/kg 体重或 3mg/kg 体重, 该抗体使用如下剂量方案之一给药: (i) 每 4 周一次, 共 6 次, 然后每 3 个月一次; (ii) 每 3 周一次; (iii) 3mg/kg 体重一次, 然后每 3 周 1mg/kg 体重。

[0435] 在一些方法中, 具有不同结合特异性的两种或多种单克隆抗体同时给药, 在该情况中, 每种抗体的给药剂量落在所述范围内。抗体通常在有必要时多次给药。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, 例如通过测定患者中靶抗原的抗体的血液水平来确定。在一些方法中, 调节剂量以达到约 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆抗体浓度, 在一些方法中为约 25-300 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0436] 另外, 抗体可以作为持续释放制剂给药, 在此情况中需要频率较低的给药。剂量和频率根据抗体在患者中的半衰期而不同。通常, 人抗体表现出最长的半衰期, 之后是人源化抗体、嵌合抗体和非人类抗体。给药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给予相对较低的剂量。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给予较高的剂量, 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给药。

[0437] 本发明药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变, 以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应, 而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平将取决于多种药物代谢动力学因素, 包括所用本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性, 给药途径, 给药时间, 所用特定化合物的排泄速率, 治疗的持续时间, 与所用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。

[0438] 本发明的抗-IFNAR-1 抗体的“治疗有效剂量”优选地导致疾病症状的严重性降低, 疾病无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失能。例如, 在系统性红斑狼疮 (SLE) 的情况中, 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、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用于治疗 SLE 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, 如受试者的年龄、受试者症状的严重性和选择的特定组合物或施用途径。

[0439] 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 / 或方式根据需要的结果而不同。用于本

发明抗体的优选施用途包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途，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，通常是通过注射，包括但不局限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0440] 此外，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。

[0441] 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通常为本领域技术人员所公知。参见，例如，Sustained and controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编著, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0442] 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。可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装置；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。本领域技术人员公知许多其他这样的植入物、递送系统和组件。

[0443] 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) 阻止了许多高度亲水性的化合物。为了确保本发明的治疗化合物能够穿过 BBB (如果需要时)，可将它们配制在如脂质体中。至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。脂质体可包含被选择性地转运入特定细胞或器官内的一个或多个部分，从而增强定向药物递送 (参见，例如，V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29 : 685)。定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. Keinänen ; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346 : 123 ; J. J. Killian ; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4 : 273。

[0444] 本发明的使用和方法

[0445] 本发明的抗体 (和免疫偶联物和双特异性分子) 具有体外和体内诊断和治疗应用。例如，这些分子可以施用于例如在体外或离体培养的细胞，或者例如在体内施用于人类受试者，以治疗、预防或诊断多种疾病。如此处使用的术语“受试者”包括人和非人动物。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、两栖类动物和爬行类动物。这些方法特别适合治疗患有与异常或不当 I 型干扰素表达（例如过量表达）相关的疾病的人类患者。

[0446] 当抗 IFNAR-1 抗体与另一种药物一起给药时，这两种药物可以依次或同时给药。例如，本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以与一种或多种以下药物组合使用：抗 -IFN α 抗体、抗 IFN γ 受体抗体、可溶性 IFN γ 受体、抗 -TNF 抗体、抗 -TNF 受体抗体和 / 或可溶性 TNF 受体（参见例如美国专利 5,888,511）。此外，本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以与 Flt3 配体拮抗剂组合使用（参见例如美国申请 2002/0160974）。

[0447] 在一个实施方案中，本发明的抗体（和免疫偶联物和双特异性分子）可以用于检测 IFNAR-1 的水平或表达 IFNAR-1 的细胞的水平。例如，这可以如下实现：使样品（如体外样品）和对照样品在允许该抗体和 IFNAR-1 之间形成复合物的条件下接触抗 -IFNAR-1 抗体。检测在抗体和 IFNAR-1 之间形成的任何复合物，并在样品和对照之间进行比较。例如，可以用本发明的组合物进行本领域公知的标准检测方法，如 ELISA 和流式细胞试验。

[0448] 因此，一方面，本发明进一步提供检测样品中 IFNAR-1（例如人 IFNAR-1 抗原）的存在，或测定 IFNAR-1 的量的方法，包括在允许抗体或其部分与 IFNAR-1 之间形成复合物的条件下使样品和对照样品接触特异性结合 IFNAR-1 的本发明的抗体或其抗原结合部分。然后检测复合物的形成，其中样品与对照样品之间复合物形成的不同表示样品中存在 IFNAR-1 抗原。

[0449] 本发明范围内还包括药盒，其中包括本发明的组合物（例如抗体、人抗体、免疫偶联物和双特异性分子）和使用说明。该药盒可以进一步包括至少一种另外的试剂，或本发明的一种或多种另外的抗体（例如，具有互补活性的抗体，它所结合的靶抗原上的表位与第一抗体不同）。药盒一般包括表明药盒内容物目标用途的标记。术语标记包括药盒提供的或以其他方式附带的任何书面或记录材料。

[0450] IFNAR-1 是 I 型干扰素的细胞受体的一部分，众所周知 I 型干扰素是与 T 细胞分化、抗体产生和记忆 T 细胞活性和存活有关的免疫调节细胞因子。而且，在许多自身免疫病、HIV 感染、移植排斥和移植物抗宿主病 (GVHD) 中已经描述了 I 型干扰素的表达提高。因此，抑制 I 型干扰素功能活性的本发明的抗 -IFNAR-1 抗体（和免疫偶联物和双特异性分子）可以用于与异常或不希望的 I 型干扰素活性有关的多种临床适应症。因此，本发明提供一种抑制 I 型干扰素介导的疾病或病症的方法，其中该方法包括施用本发明的抗体或其抗原结合部分（或本发明的免疫偶联物或双特异性分子），使 I 型干扰素介导的疾病或病症得到治疗。

[0451] 可以应用本发明的抗体治疗的自身免疫病的具体例子包括但不限于：系统性红斑狼疮 (SLE)、胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM)、炎性肠病 (IBD)（包括克罗恩病、溃疡性结肠炎和乳糜泻）、多发性硬化症 (MS)、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、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能够用于抑制或预防移植排斥或用于治疗移植物抗宿主疾病 (GVHD) 或治疗 HIV 感染 / AIDS。

[0452] 在系统性红斑狼疮 (SLE) 患者的血清中观察到高水平的 IFN α （参见，例如，Kim 等 (1987) Clin. Exp. Immunol. 70 :5662-569）。而且，例如在癌症或病毒性感染治疗中的 IFN α 给药已经显示诱发 SLE (Garcia-Porrúa 等 (1998) Clin. Exp. Rheumatol. 16 :107-108)。因此，在另一个实施方案中，本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以通过对需要治疗的受试者施用抗

体用于治疗 SLE。该抗体可以单独使用或者与其他抗 SLE 药物如非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、皮质类固醇 (例如强的松、氢化可的松)、免疫抑制剂 (如环磷酰胺、硫唑嘌呤和氨甲喋呤)、抗疟药 (如羟氯喹) 和抑制产生 dsDNA 抗体的生物药物 (例如 LJP394) 组合使用。

[0453] IFN α 也与 I 型糖尿病的病理学有关。例如,已经报道了在 I 型糖尿病患者的胰岛 β 细胞中存在免疫反应性 IFN α (Foulis 等 (1987) Lancet 2 :1423-1427)。在抗病毒治疗中长期使用 IFN α 也显示诱发 I 型糖尿病 (Waguri 等 (1994) Diabetes Res. Clin. Pract. 23 : 33-36)。因此,在另一个实施方案中,本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗 I 型糖尿病。该抗体可以单独使用或者与其他抗糖尿病药物如胰岛素组合使用。

[0454] IFNAR 的抗体已经证明在炎性肠病动物模型中有效 (参见美国专利申请 60/465,155)。因此,本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗炎性肠病 (IBD),包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。该抗体可以单独使用或者与其他抗 IBD 药物如含有关沙拉秦的药物 (包括柳氮磺吡啶和含有 5-氨基水杨酸 (5-ASA) 的其他药物,如奥沙拉秦和巴柳氮)、非甾体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、皮质类固醇 (例如强的松、氢化可的松)、TNF 抑制剂 (包括 adalimumab (**Humira**®)、依那西普(**Enbrel**®)和英夫利昔单抗(**Remicade**®))、免疫抑制剂 (如 6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤和环孢素 A) 和抗生素组合使用。

[0455] 已经发现用 IFN α 治疗可诱发自身免疫性甲状腺炎 (Monzani 等 (2004) Clin. Exp. Med. 3 :199-210 ;Prummel 和 Laurberg (2003) Thyroid 13 :547-551)。因此,在另一个实施方案中,本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗自身免疫性甲状腺病,包括自身免疫性原发性甲状腺功能减退症、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎和伴有甲状腺功能减退的破坏性甲状腺炎。该抗体可以单独使用或者与其他药物或治疗如抗甲状腺药物、放射性碘和甲状腺次全切除术组合使用。

[0456] 在 RA 患者血清中已经观察到水平升高的 I 型干扰素,特别是 IFN- β (参见例如 Hertzog 等 (1988) Clin. Immunol. Immunopath. 48 :192)。因此,在一个实施方案中,本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗 RA。该抗体可以单独使用或者与一种或多种其他抗 RA 药物如非甾体抗炎药 (NSAID)、COX-2 抑制剂、镇痛药、皮质类固醇 (例如强的松、氢化可的松)、金、免疫抑制剂 (如氨甲喋呤)、B 细胞消耗剂 (例如 RituxanTM)、B 细胞激动剂 (例如 LymphoStat-BTM) 和抗 -TNF- α 剂 (例如 EMBRELTM、**HUMIRA**®和 REMICADETM) 组合使用。

[0457] 曾经报道 IFN α 给药使牛皮癣恶化。因此,在另一个实施方案中,本发明的抗 -IFNAR-1 抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗牛皮癣和牛皮癣性关节炎。该抗体可以单独使用或者与一种或多种其他抗牛皮癣治疗如光疗、局部治疗 (例如局部糖皮质激素) 或全身治疗 (例如氨甲喋呤、合成类维生素 A、环孢素)、抗 -TNF- α 剂 (例如 EMBRELTM、**HUMIRA**®和 REMICADETM) 和 T 细胞抑制剂 (例如 RaptivaTM) 组合使用。

[0458] 在 HIV 感染患者的循环中也曾经观察到高水平的 IFN α , 并且它的存在是 AIDS 进展的预测性标记 (DeStefano 等 (1982) J. Infect. Disease 146 :451 ;Vadhan-Raj 等 (1986) Cancer Res. 46 :417)。因此,在另一个实施方案中,本发明的抗 -IFNAR-1 抗体用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗 HIV 感染或 AIDS。该抗体可以单独使用或者与其他抗

HIV 剂如核苷逆转录酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和融合抑制剂组合使用。

[0459] 已经证明 IFNAR-1 的抗体在抑制同种异体移植排斥和延长同种异体移植存活期中有效（参见，例如，Tovey 等 (1996) *J. Leukoc. Biol.* 59 :512-517 ; Benizri 等 (1998) *J. Interferon Cytokine Res.* 18 :273-284）。因此，本发明的抗-IFNAR-1 抗体也可以用于移植物接受者，以抑制同种异体移植排斥和 / 或延长同种异体移植存活期。本发明提供一种通过对需要治疗的移植接受者施用本发明的抗-IFNAR-1 抗体来抑制移植排斥的方法。可以治疗的组织移植的例子包括但不限于：肝、肺、肾、心脏、小肠和胰岛细胞，以及移植物抗宿主病 (GVHD) 的治疗。该抗体可以单独使用或者与其他抑制移植排斥的药物如免疫抑制剂（例如环孢素、硫唑嘌呤、甲基强的松龙、强的松龙、强的松、麦考酚酸莫酯、西罗莫司、雷帕霉素、他克莫司）、抗感染剂（例如阿昔洛韦、克霉唑、更昔洛韦、制霉菌素、复方新诺明）、利尿剂（例如布美他尼、呋塞米、美托拉宗）和溃疡药物（例如西咪替丁、法莫替丁、兰索拉唑、奥美拉唑、雷尼替丁、硫糖铝）组合使用。

[0460] 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

[0461] 实施例 1 : 抗 IFNAR-1 人单克隆抗体的产生

[0462] 抗原

[0463] 含有 IFNAR-1 胞外域的可溶性 IFNAR-1 通过重组方法产生，并且用作免疫的抗原。

[0464] 转基因 HuMab 小鼠

[0465] 用均表达人抗体基因的 HuMab 转基因小鼠 HCo7、HCo12 和 HCo7×HCo12 系制备抗 IFNAR-1 的完全人单克隆抗体。在这些小鼠系中，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 所述将内源小鼠重链基因纯合地破坏。这些小鼠系均携带人 κ 轻链转基因，KCo5，如 Fishwild 等 (1996) *Nature Biotechnology* 14 :845-851 所述。HCo7 系携带 HCo7 人重链转基因，如美国专利 No. 5, 545, 806、5, 625, 825 和 5, 545, 807 所述。Hco12 系携带 Hco12 人重链转基因，如 PCT 公布 WO 01/09187 的实施例 2 所述。HCo7×HCo12 系携带 HCo7 和 HCo12 转基因，通过使两个系繁殖而产生。

[0466] HuMab 小鼠的免疫：

[0467] 为了产生抗 IFNAR-1 的完全人单克隆抗体，用纯化的重组 IFNAR-1 作为抗原免疫 HuMab 小鼠。用于 HuMab 小鼠的一般性免疫方案在 Lonberg, N. 等 (1994) *Nature* 368 : 856-859 ; Fishwild, D. 等 (1996) *Nature Biotechnology* 14 :845-851 和 PCT 公布 WO 98/24884 中描述。在第一次输注抗原时小鼠为 6-16 周龄。利用纯化的重组可溶性 IFNAR-1 抗原制剂 (5-50 μ g) 经腹膜内、皮下 (Sc) 或通过足垫注射来免疫 HuMab 小鼠。

[0468] 转基因小鼠用完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原经腹膜内 (IP)、皮下 (Sc) 或通过足垫 (FP) 免疫两次，然后用不完全弗氏佐剂或 Ribi 佐剂中的抗原经腹膜内、皮下或通过足垫免疫 3-21 天（最多可达总共 11 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-IFNAR-1 人免疫球蛋白效价的小鼠用于进行融合。用抗原经静脉内对小鼠进行加强免疫，3 天及 2 天后处死小鼠并取出脾脏。每种抗原一般进行 10-35 次融合。每种抗原使用数十只小鼠。

[0469] 产生抗-IFNAR-1 抗体的 HuMab 小鼠的选择

[0470] 为了选择产生可结合 IFNAR-1 的抗体的 HuMab 小鼠，如 Fishwild, D. 等 (1996) 所述通过 ELISA 检测来自被免疫小鼠的血清。简要地说，用来自大肠杆菌的纯化的重组 IFNAR-1，在 PBS 中以 $1-2 \mu\text{g/ml}$ 的浓度， $50 \mu\text{l}$ /孔的量，包被微量滴定板， 4°C 下温育过夜，然后用 PBS/Tween (0.05%) 中的 5% 鸡血清以 $200 \mu\text{l}$ /孔封闭。将来自 IFNAR-1 免疫的小鼠的血浆稀释液加入各孔中，室温下温育 1-2 小时。用 PBS/Tween 洗板，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，平板用 ABTS 底物 (Sigma, A-1888, 0.22mg/ml) 显色，并用分光光度计在 OD 415-495 下分析。显示最高抗-IFNAR-1 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-IFNAR-1 活性。

[0471] 产生抗 IFNAR-1 人单克隆抗体的杂交瘤的产生

[0472] 从 HuMab 小鼠中分离脾细胞，根据标准程序用 PEG 将其与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后根据抗原特异性抗体的产生筛选获得的杂交瘤。使用 50% PEG (Sigma) 将来自被免疫小鼠的脾淋巴细胞单细胞悬液与 1/4 数目的 SP2/0 非分泌型小鼠骨髓瘤细胞 (ATCC, CRL 1581) 融合。将细胞以约 1×10^5 /孔的密度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) 加 5mM HEPES 中的 origen (IGEN)、0.055mM 2-巯基乙醇、50mg/ml 庆大霉素和 $1 \times \text{HAT}$ (Sigma, CRL P-7185)。1-2 周后，将细胞在用 HT 替代了其中的 HAT 的培养基中培养。然后通过 ELISA (如上所述) 对各个孔进行人抗 IFNAR-1 单克隆 IgG 抗体的筛选。一旦发生广泛的杂交瘤生长，则通常在 10-14 天后监测培养基。将分泌抗体的杂交瘤再次接种，再次筛选，并且如果对于人 IgG 仍然是阳性的，则通过有限稀释将抗 IFNAR-1 单克隆抗体亚克隆至少两次。然后在体外培养稳定的亚克隆，以在组织培养基中产生少量的抗体用于进一步表征。

[0473] 选择杂交瘤克隆 3F11、4G5、11E2 和 9D4 用于进一步的分析。

[0474] 实施例 2：人单克隆抗体 3F11、4G5、11E2 和 9D4 的结构表征

[0475] 编码 3F11、4G5、11E2 和 9D4 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 3F11、4G5、11E2 和 9D4 杂交瘤获得，并利用标准 DNA 测序技术进行测序。

[0476] 3F11 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:33 和 25 中。

[0477] 3F11 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:37 和 29 中。

[0478] 3F11 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，3F11 重链应用了来自人种系 VH 4-34 的 V_H 区段，一个未确定的 D 区段，和来自人种系 J_H 6b 的 J_H 区段。3F11 V_H 序列与种系 VH 4-34 序列的对比显示于图 5 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 3F11 V_H 序列的进一步分析标出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区，分别如图 1A 和图 5 和 SEQ ID NO:1、5 和 9 所示。

[0479] 3F11 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,3F11 轻链应用了来自人种系 V_k L18 的 V_L 区段和来自人种系 JK 5 的 JK 区段。3F11 V_L 序列与种系 V_k L18 序列的对比显示于图 8 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 3F11 V_L 序列的进一步分析标出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,分别如图 1B 和图 8 和 SEQ ID NO:13、17 和 21 所示。

[0480] 4G5 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:34 和 26 中。

[0481] 4G5 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:38 和 30 中。

[0482] 4G5 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,4G5 重链应用了来自人种系 V_H 4-34 的 V_H 区段、未确定的 D 区段和来自人种系 JH 4b 的 JH 区段。4G5 V_H 序列与种系 V_H 4-34 序列的对比显示于图 6 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 4G5 V_H 序列的进一步分析标出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,分别如图 2A 和图 6 以及 SEQ ID NO:2、6、10 所示。

[0483] 4G5 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,4G5 轻链应用了来自人种系 V_k L18 的 V_L 区段和来自人种系 JK 2 的 JK 区段。4G5 V_L 序列与种系 V_k L18 序列的对比显示于图 9 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 4G5 V_L 序列的进一步分析标出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,分别如图 2B 和图 9 以及 SEQ ID NO:14、18、22 所示。

[0484] 11E2 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:35 和 27 中。

[0485] 11E2 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:39 和 31 中。

[0486] 11E2 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,11E2 重链来源于或者高度类似于来自人种系 VH 5-51 的 V_H 区段、未确定的 D 区段和来自人种系 JH 4b 的 JH 区段。11E2 V_H 序列与种系 VH 5-51 序列的对比显示于图 7 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 11E2 V_H 序列的进一步分析标出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,分别如图 3A 和图 7 以及 SEQ ID NO:3、7、11 所示。

[0487] 11E2 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,11E2 轻链应用了来自人种系 V_k A27 的 V_L 区段和来自人种系 JK 5 的 JK 区段。11E2 V_L 序列与种系 V_k A27 序列的对比显示于图 10 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 11E2 V_L 序列的进一步分析标出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,分别如图 3B 和图 10 以及 SEQ ID NO:15、19、23 所示。

[0488] 9D4 的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 4A 和 SEQ ID NO:36 和 28 中。

[0489] 9D4 的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别显示于图 4B 和 SEQ ID NO:40 和 32 中。

[0490] 9D4 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,9D4 重链来源于或者高度类似于来自人种系 VH 5-51 的 V_H 区段,未确定的 D 区段,和来自人种系 JH 4b 的 JH 区段。9D4 V_H 序列与种系 VH 5-51 序列的对比显示于图 7 中。利用 Kabat CDR

区测定系统对 9D4 V_H 序列的进一步分析标出了重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,分别如图 4A 和图 7 和 SEQ ID NO :4、8 和 12 所示。

[0491] 9D4 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,9D4 轻链应用了来自人种系 V_k A27 的 V_L 区段和来自人种系 JK 5 的 JK 区段。9D4 V_L 序列与种系 V_k A27 序列的对比显示于图 10 中。利用 Kabat CDR 区测定系统对 9D4 V_L 序列的进一步分析标出了轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 区,分别如图 3B 和图 10 和 SEQ ID NO :16、20 和 24 所示。

[0492] 实施例 3 :抗 -IFNAR-1 人单克隆抗体抑制干扰素 α 2b 的生物活性

[0493] 来源于人 B 淋巴瘤细胞 burkitts 淋巴瘤的 Daudi 细胞系表达高水平的 IFNAR-1,这些细胞的生长被 I 型干扰素抑制。为了测定人抗 -IFNAR-1 抗体的功能阻断能力,进行两个不同的试验,即细胞增殖试验和报道 (reporter) 试验。

[0494] 在第一个试验中, Daudi 细胞与干扰素 α 2b 在存在或不存在抗体的情况下培养,通过 $^3[H]$ -胸苷的摄取测定增殖。Daudi 细胞 (ATCC CCL-213) 在含有 10% FCS 和 2mM β -巯基乙醇的 RPMI (培养基) 中生长。旋转离心细胞,以 1×10^6 细胞 /ml 的浓度重悬浮于添加了 1% 人血清白蛋白的培养基 (培养基 +HS) 中。向 96 孔板的每孔中加入 100 μ l 含有适当浓度抗体的 200U/ml 干扰素 α 2b (Schering Corporation)。向孔中加入 100 μ l 在培养基 +HS 中的 Daudi 细胞,培养板在 37°C 下温育 48 小时。用 1 μ Ci $^3[H]$ -胸苷对该板进行脉冲,再温育 24 小时。收集该板,合并到 96 孔纤维滤板上,用 TopCount 闪烁计数器 (Packard) 计数。将每分钟的计数对抗体浓度作图,使用 Prism 软件 (San Diego, CA),通过非线性回归, S 形剂量应答 (可变斜率) 分析数据。

[0495] 在第二个试验中,用一种构建体转染 U937 细胞,该构建体中干扰素刺激的应答成分与报道基因连接 (ISRE-RG),测定人源化抗 -IFNAR-1 抗体阻断 IFN- 诱导的报道基因表达的能力。细胞在含有 10% FCS 和 2mM β -巯基乙醇的 RPMI (培养基) 中生长。将细胞 (1×10^6 细胞 /ml) 重悬浮于添加了 2% 人血清的培养基中。向 96 孔板中加入 100 μ l 细胞。抗体用含有 200U/ml 干扰素 α 2b (Schering Corporation) 的培养基系列稀释,向每孔中加入 100 μ l。培养板在 37°C 下温育过夜。温育后,通过流式细胞术评价报道基因的表达。将几何平均荧光强度对抗体浓度作图,使用 Prism 软件 (San Diego, CA),通过非线性回归, S 形剂量应答 (可变斜率) 分析数据。

[0496] 使用上述两个试验,比较 3F11 人单克隆抗体与鼠抗 -IFNAR-1 抗体 64G12 (ECACC 登记号 92022605) 和人源化抗 -IFNAR-1 抗体 D1 H3K1 (在美国系列号 60/465, 058 中描述) 的效价。显示 3F11 的效价 5-10 倍高于小鼠抗体, 6-30 倍高于人源化抗体。结果总结在以下的表 1 中。

[0497] 表 1 :人抗 -IFNAR-1 抗体时干扰素 α 2b 的阻断能力

[0498]

	同种型	细胞增殖 (Daudi) EC ₅₀ (nM)	ISRE-RG 报道基因 (U937)EC ₅₀ (nM)
64G12	m IgG1	3.1	6.0
DI H3K1	h IgG1	9.3	8.0
3F11	h IgG1	0.3	1.2

[0499] 实施例 4:抗-IFNAR-1 人单克隆抗体抑制 IFN ω 的生物活性

[0500] 利用如实施例 3 所述的 Daudi 增殖试验,检测了人抗-IFNAR-1 抗体抑制 IFN ω 应答的能力。向 96 孔板的每孔中加入 100 μ l 含有适当浓度抗体的 200U/ml 干扰素 ω (PBL)。人抗体 3F11、4G5、11E2 和 9D4 比小鼠 64G12 抗体强 4-18 倍(根据 EC₅₀确定)。结果总结在以下的表 2 中。

[0501] 表 2:人抗-IFNAR-1 抗体对干扰素 ω 的阻断能力

[0502]		同种型	细胞增殖 (Daudi) EC ₅₀ (nM)
	64G12	m IgG1	5.5
	DI H3K1	h IgG1	30.7
	3F11	h IgG1	0.6
	4G5	h IgG1	1.4
	11E2	h IgG1	0.3
	9D4	h IgG1	0.3

[0503] 实施例 5:抗-IFNAR-1 人单克隆抗体抑制多种 I 型 IFN 的生物活性

[0504] 如实施例 3 所述,干扰素 α 以剂量依赖的方式抑制 Daudi(burkitts 淋巴瘤, ATCC#CCL-213) 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。利用这种细胞增殖试验,通过检测天然类淋巴细胞 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。

[0505] 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 (312nM) 至 381pg/ml (2.4pM) 两倍连续稀释的抗-IFNAR-1 抗体 3F11 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 $\times$ 10⁴Daudi 细胞/100 μ l/孔,并在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂下温育 72 小时。加入 20 μ l/孔的 MTS(Promega) 测定增殖,再温育 3 小时后测量 490nm 下的 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 3F11 抗体进行评分,产生 IFN α 亚型特异性的分布图。结果证明,人抗-干扰素 α 受体-1 抗体 3F11 抑制多种 IFN α 亚型的作用,包括 IFN α 6, 2b, 2a, 1, 16, 10, 8, 5, 14, 17, 7, 4 和 21,以及类淋巴细胞 IFN、白细胞 IFN 和 IFN ω 。3F11

是 IFN β 的低水平抑制剂,但是观察到大于 50% 的抑制。干扰素的 % 阻断和标准差在下面的表 3 中显示。

[0506] 表 3:多种 I 型干扰素的抗体抑制

[0507]

3F11 在 1000 $\times$ Ab 时的 IFN 阻断 (%)		
IFN	平均值	标准差
类淋巴母细胞 IFN	94.9	2.9
IFN α 6	107.1	6.6

[0508]

IFN α 2b	101.9	0.4
IFN α 2a	103.1	3.0
IFN α 1	111.6	1.9
白细胞 IFN	109.4	1.4
IFN α 16	105.7	1.4
IFN α 10	96.7	5.5
IFN α 8	87.5	2.6
IFN α 5	105.1	3.9
IFN α 14	100.3	1.4
IFN α 17	99.8	2.4
IFN α 7	102.8	3.2
IFN α 4	100.5	2.5
IFN α 21	104.4	2.3
IFN- β	53.0	1.7
IFN- ω	107.1	1.3

[0509] 实施例 6:抗-IFNAR-1 抗体对 IFN 诱导的 IP-10 分泌的抑制

[0510] 已经证明向细胞培养基中加入 IFN α 2b 诱导正常外周血单核细胞 (PBMNC) 分泌

IP-10。通过 ELISA 结合试验检测人抗 -IFNAR-1 抗体 3F 11 抑制干扰素诱导的正常 PBMNC 培养物分泌 IP-10 的活性。

[0511] PBMNC 在培养基 (RPMI 1640+10% FBS+1% 人血清) 中与白细胞 IFN、IFN α 2b 或 IFN ω 温育 24-48 小时。收集上清液,用定量夹心 ELISA 试剂盒 (Quantikine®, R&D Systems) 按照厂商推荐以 1 : 30 的稀释度分析 IP-10/CXCL10 浓度。结果证明人单克隆抗体 3F11 抑制白细胞 IFN、重组 IFN α 2b 和重组 IFN ω 诱导的正常 PBMNC 培养物分泌 IP-10。这些结果显示在表 4 中。

[0512] 表 4 :IFN 诱导的正常 PBMNC 的 IP-10 表达的抗体抑制

[0513]

Ab 处理	无 IFN IP-10(pg/ml)	白细胞 IFN IP-10 (pg/ml)	IFN α 2b IP-10 (pg/ml)	IFN ω IP-10 (pg/ml)
无抗体	907	2665	2739	2904
3F11 (5 μ g/ml)	387	854	745	674
对 照 Ig (5 μ g/ml)	838	3512	3117	3960

[0514] *向培养物中加入 100U/ml 各种 IFN 亚型

[0515] 实施例 7 :抗 -IFNAR-1 人单克隆抗体交叉竞争试验

[0516] 为了评价人单克隆抗体是否与小鼠 64G12 单克隆抗体结合相同的表位,利用交叉竞争 ELISA 试验确定抗体是否竞争相同的结合表位。

[0517] 用 1 μ g/ml 浓度的溶于新鲜制备的 DPBS 中的可溶性 CHO 衍生的人 IFNAR-1 以 100 μ l/孔包被 96 孔板 (Mediatech)。向第一列孔中加入 20 μ g/ml 的人单克隆抗体 3F11、4G5、11E2 和 9D4,从第 1 列向第 12 列以 1 : 2 的比例在孔中系列稀释,然后温育 45 分钟。加入 EC75 浓度为 0.3 μ g/ml 的小鼠单克隆抗体 64G12,每孔 50 μ L,培养板温育 30 分钟。培养板用 Elx405 自动洗板机 (BIO-TEK Instruments) 洗涤 3 次。过氧化物酶亲和纯化后的 F(ab')₂ 山羊抗小鼠 IgG (Fc γ 特异性的) 抗体用 PBS 以 1 : 3000 稀释,作为检测偶联物加入 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, cat. 115-036-0710)。温育 1 小时后,培养板用 Elx405 自动洗板机洗涤 3 次。向每孔中加入 27.8mg/ml 的 ABTS 溶液 (800 μ l ABTS 贮存液,8 μ l 30% H₂O₂,和 100mL 柠檬酸磷酸缓冲液),温育 20 分钟。用 490nm 作为参照波长在 415nm 下读培养板。结果显示在图 11 中。结果证明,人抗 -IFNAR-1 单克隆抗体 3F11、4G5、11E2 和 9D4 不与 64G12 竞争结合 IFNAR-1,因此与 64G12 结合不同的 IFNAR-1 上的表位。

[0518] 实施例 8 :SLE 血浆介导的树突细胞发育的抗体抑制

[0519] SLE 血浆诱导由正常人单核细胞向树突细胞发育。在该实施例中,检测了纯化的单克隆人抗 -IFNAR-1 抗体 3F11 对树突细胞发育的抑制,这是根据抗体抑制 SLE 血浆诱导细

胞表面标记物 CD38、MHC I 类和 CD123 的能力来评价的。

[0520] 25ml 棕黄层用 PBS 稀释 4 倍。将样品分配到 4×50ml 锥形管中,在其下面用 15ml 淋巴细胞分离液 (ICN Biomedicals) 分层。以 500 $\times$ g 离心 30 分钟后,吸出含有 PBMC 的棕黄层,用 PBS 洗涤。将细胞以 4×10⁶细胞 /ml 重悬浮于培养基中。将 PBMC (2.0×10⁷细胞 /5ml/25cm²瓶) 在培养基中 37℃ 温育 1.5 小时,然后洗去未附着的细胞两次,以此分离单核细胞。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 10iu/ml)+25% 正常人血浆用作标记物诱导的阳性对照。培养瓶在 37℃, 5% CO₂ 下温育 3-7 天。从每个培养瓶中收集条件培养基,通过用 Sorvall RTH-750 转头以 1000rpm 离心回收悬浮的细胞。将沉淀的细胞保留在冰上,上清液在 -80℃ 下冷冻用于 ELISA。用 PBS 洗液 (2ml) 从培养瓶中回收附着的细胞,然后必要的话在乙二胺四乙酸 (3ml) 中温育 15 分钟。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。每种 PBS 洗液和乙二胺四乙酸都与从条件培养基收集物中回收的细胞混合。合并的细胞悬浮液用 Sorvall RTH-750 转头以 1000rpm 离心,将获得的沉淀物在染色缓冲液 (PBS+0.1M EDTA+2% FBS+1% HS) 中重悬浮至 300 μ l,以 100 μ l/孔分散到 V 形底 96 孔板中。用 Sorvall RTH-750 转头以 2800rpm 离心培养板,沉淀的细胞以 25 μ l/孔重悬浮在荧光染料标记的以下抗体中: (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 染色缓冲液然后脉冲离心,洗涤细胞三次,最后重悬浮在溶于 PBS 的 200 μ l 的 2% 低聚甲醛中。使用 Becton Dickinson FACScalibur™ 通过流式细胞术分析树突细胞的染色。在前向散射对侧向散射图上用门圈选,以从分析中除去污染的细胞。在 3F11 存在下标准化的细胞表面标记物 MHC I 类、CD38 和 CD123 表达证明,抗 -IFNAR-1 人单克隆抗体 3F11 抑制依赖 IFN α 的树突细胞发育过程。结果显示在下面的表 5 中,其中 (A) 和 (B) 总结了 2 个代表性 SLE 供体标本的结果。

[0521] 表 5: 树突细胞成熟的抑制

[0522] (A)

[0523]

	供体血浆 #40* (13.3 iU/ml**)		
培养条件	MHC I 类	CD123	CD38
	MFI	MFI	MFI
0 IFN/mL	148	14	40
10 IFN/mL	200	19	44
100 IFN/mL	229	26	63
0			
3F11	206	22	47
HuIgG1(同种型对照)	115	13	32
	194	22	62

[0524] (B)

[0525]

	供体血浆#59* (75.3 iU/ml**)		
培养条件	MHC I 类	CD123	CD38
0 IFN/mL	229	11	58
10 IFN/mL	271	12	86
100 IFN/mL	294	13	112
0			
3F11	202	15	62
	112	8	22

[0526]

HuIgG1(同种型对照)	266	14	55
---------------	-----	----	----

[0527] 实施例 9 :抗-IFNAR-1 人抗体与 Daudi 细胞或人外周血单核细胞的 Scatchard 结合分析

[0528] 人外周血单核细胞利用 Ficoll 分离通过标准方案从新鲜血液中制备。Daudi 细胞从 ATCC 获得,在含有 10%胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 中生长。细胞用含有 10% FBS 的 RPMI 在 4℃洗涤 2 次,用含有 10%胎牛血清的 RPMI 培养基 (结合缓冲液) 将细胞调节为 4×10^7 细胞 /ml。Millipore 板 (MAFB NOB) 用溶于水中的 1%脱脂奶粉包被,4℃贮存过夜。用结合缓冲液洗板,向 Millipore 96 孔玻璃纤维滤板的对照孔 (非特异性结合 NSB) 中加入 25 μ l 未标记的抗体 (1000 倍过量)。向最大结合对照孔中只加入 25 μ l 缓冲液 (总结合)。加入在结合缓冲液中的 25 μ l 不同浓度的 125 I- 抗-IFNAR-1 抗体和 25 μ l Daudi 细胞或人外周血单核细胞 (4×10^7 细胞 /ml)。培养板在 4℃摇床上以 200RPM 温育 2 小时。在温育结束时用 0.2ml 冷结合缓冲液洗 Millipore 板 2 次。取出滤板,在 γ 计数器中计数。使用 Prism 软件 (San Diego, CA) 用单位点结合参数进行平衡结合的评价。

[0529] 利用上述 Scatchard 结合试验,该抗体对 Daudi 细胞和人外周血单核细胞的 K_D 分别约为 0.2nM 和 0.5nM。

[0530] 序列表概述

[0531]

SEQ ID NO :	序列	SEQ ID NO :	序列
1	VH CDR1a. a. 3F11	21	VK CDR3a. a. 3F11
2	VH CDR1a. a. 4G5	22	VK CDR3a. a. 4G5
3	VH CDR1a. a. 11E2	23	VK CDR3a. a. 11E2
4	VH CDR1a. a. 9D4	24	VK CDR3a. a. 9D4

[0532]

5	VH CDR2a. a. 3F11	25	VH a. a. 3F11
6	VH CDR2a. a. 4G5	26	VH a. a. 4G5
7	VH CDR2a. a. 11E2	27	VH a. a. 11E2
8	VH CDR2a. a. 9D4	28	VH a. a. 9D4
9	VH CDR3a. a. 3F11	29	VK a. a. 3F11
10	VH CDR3a. a. 4G5	30	VK a. a. 4G5
11	VH CDR3a. a. 11E2	31	VK a. a. 11E2
12	VH CDR3a. a. 9D4	32	VK a. a. 9D4
13	VK CDR1a. a. 3F11	33	VH n. t. 3F11
14	VK CDR1a. a. 4G5	34	VH n. t. 4G5
15	VK CDR1a. a. 11E2	35	VH n. t. 11E2
16	VK CDR1a. a. 9D4	36	VH n. t. 9D4
17	VK CDR2a. a. 3F11	37	VK n. t. 3F11
18	VK CDR2a. a. 4G5	38	VK n. t. 4G5
19	VK CDR2a. a. 11E2	39	VK n. t. 11E2
20	VK CDR2a. a. 9D4	40	VK n. t. 9D4
41	VH 4-34 种系 a. a.		
42	VH 5-51 种系 a. a.		
43	VK L18 种系 a. a.		
44	VK A27 种系 a. a.		

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 约瑟芬.M. 卡达雷尔利
艾莉森. 威特
莫汉. 斯里尼瓦桑

<120> 干扰素ALPHA受体1抗体及其用途

<130> 04280/1201494-US1

<140> 11/157,494
<141> 2005-06-20

<150> 60/581,747
<151> 2004-06-21

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 1
Gly Tyr Phe Trp Ser
1 5

<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 2
Asn Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 3
Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 4
Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 5
Glu Ile Asp His Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 6

[0002]

<211> 16
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

Glu Ile Ile Leu Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 7

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Glv

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Glv

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 9

Glu Ser Lys Tyr Tyr Phe Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

<400> 10

Glu Ser Lys Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 11

His Asp Ile Glu Glv Phe Asp Tyr
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT

[0003]

<213> 人

<400> 12

His Asp Ile Glu Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

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

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Arg Ala Thr Gln Asp Ile Ser Ile Ala Leu Val
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Phe Ala
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Phe Ala
1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 17

Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Asp Ala Ser Gly Leu Gly Ser
1 5

<210> 19

<211> 7

[0004]

<212> PRT
<213> 人

<400> 19

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 20

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 21

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Ile Thr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 23

Gln Gln Trp Asp Ser Ser Ala Ile Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 24

Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Ala Ile Thr
1 5

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

<400> 25

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr

[0005]

20	25	30
Phe Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45		
Gly Glu Ile Asp His Ser Gly Lys Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys 50 55 60		
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu 65 70 75 80		
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
Arg Glu Ser Lys Tyr Tyr Phe Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110		
Thr Val Thr Val Thr Ser 115		
<210> 26 <211> 118 <212> PRT <213> 人		
<400> 26		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu 1 5 10 15		
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asn Tyr 20 25 30		
Ile Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45		
Gly Glu Ile Ile Leu Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys 50 55 60		
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu 65 70 75 80		
Asn Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala 85 90 95		
Arg Glu Ser Lys Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110		
Leu Val Thr Val Ser Ser 115		
<210> 27 <211> 117 <212> PRT <213> 人		
<400> 27		
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu 1 5 10 15		

[0006]

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Asp Ile Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 28
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Asp Ile Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 29
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 29
 Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0007]

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Tyr Ser Val	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Lys Leu Leu Ile	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Ile Thr	85	90	95
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	100	105	
<210> 30			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 30			
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Thr Gln Asp Ile Ser Ile Ala	20	25	30
Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Gly Leu Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	100	105	
<210> 31			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 31			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser	20	25	30

[0008]

Phe Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Leu Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ser Ala
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 33
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc ctctgagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gggtatttct ggagctggat ccgccagccc 120
 ccaggaagg ggctggagtg gattggggaa atcgatcaca gtggaagac caactacaat 180
 ccgtccctca agagtcgagt taccatatca gtagacacgt ccaagaacca ggtctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgagag agaaagcaag 300
 tactacttcg gtttgacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtcac ctca 354

<210> 34

[0009]

<211>	354		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	34		
cagggtgcagc	tacagcagtg	gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgcgctg	tctatgggtg	gtccttcagt aattactact ggagctggat ccgccagccc	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	gattggggaa atcattctta gtggaagcac caactacaac	180
ccgtccctca	agagtcgagt	caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aacctgacct	ctgtgaccgc	cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agagtctaaa	300
tgggggttact	actttgactc	ctgggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca	354
<210>	35		
<211>	351		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	35		
gagggtgcagc	tgggtgcagtc	tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	catctttacc aattactgga tcgcctgggt gcgccagatg	120
cccggtaaag	gcctggagtc	gatggggatc atctatcctg gtgactctga tatcagatac	180
agcccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagtctgaa	ggcctcagac accgccatgt attactgtgc gagacatgac	300
atagaggggt	tigactactg	gggccgggga accctggatc ccgtctctc a	351
<210>	36		
<211>	351		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	36		
gagggtgcagc	tgggtgcagtc	tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg	gttctggata	catctttacc aactactgga tcgcctgggt gcgccagatg	120
cccggtaaag	gcctggagtc	gatggggatc atctatcctg gtgactctga tatcagatac	180
agcccgtcct	tccaaggcca	ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcac caccgcctac	240
ctgcagtgga	gcagtctgaa	ggcctcagac accgccatgt attactgtgc gagacatgac	300
atagaggggt	tigactactg	gggccgggga accctggatc ccgtctctc a	351
<210>	37		
<211>	318		
<212>	DNA		
<213>	人		
<400>	37		
gccatccagt	tgaccagtc	tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gggcatttac agtgttttag cctggatatca gcagaaacca	120
gggaaaactc	ctaagctcct	gatctaigat gcctcccgtt tggaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagat ttactctca ccatacagcag cctgcagcct	240
gaagattttg	caacttatta	ctgtcaacag tttaatatgtt acatcacctt cggccaaggg	300
acacgactgg	agattaaa		318

[0010]

<210> 38
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 38
 gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaactca ggacattagc attgcttttag tctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctgagctcct gatctatgat gcctccgggt tgggaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtagac ttttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 39
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 39
 gaaatigtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtggttagc agcagcttct tcgcttggtta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacagggttaa gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata gctcagcgat caccttcggc 300
 caaggacac gactggagat taaa 324

<210> 40
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 40
 gaaatigtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtggttagc agcagcttct tcgcttggtta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacagggttaa gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcac cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatgata gctcagcgat caccttcggc 300
 caaggacac gactggagat taaa 324

<210> 41
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 41

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

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

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

[0011]

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 42
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 42

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 43
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 43

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

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

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

[0012]

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

<210> 44
<211> 95
<212> PRT
<213> 人

<400> 44

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

抗-IFNAR 3F11 VH

V 区段 : 4-34
D 区段 : 未确定
J 区段 : JH6b

```
      Q  V  Q  L  Q  Q  W  G  A  G  L  L  K  P  S  E  T  L
1    CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCT GAG ACC CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
      S  L  T  C  A  V  Y  G  G  S  F  S  G  Y  F  W  S  W
55   TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAT TTC TGG AGC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
      I  R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  I  D  H  S
109  ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC GAT CAC AGT

                                CDR2
                                ~~~~~
      G  K  T  N  Y  N  P  S  L  K  S  R  V  T  I  S  V  D
163  GGA AAG ACC AAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTT ACC ATA TCA GTA GAC

      T  S  K  N  Q  V  S  L  K  L  S  S  V  T  A  A  D  T
217  ACG TCC AAG AAC CAG GTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                CDR3
                                ~~~~~
      A  V  Y  Y  C  A  R  E  S  K  Y  Y  F  G  L  D  V  W
271  GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA AGC AAG TAC TAC TTC GGT TTG GAC GTC TGG

      G  Q  G  T  T  V  T  V  T  S
325  GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC ACC TCA
```

图 1A

抗-IFNAR 3F11 VK

V 区段: L18
J 区段: JK5

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1
~~~~~  
55 V T I T C R A S Q G I Y S V L A W Y  
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT TAC AGT GTT TTA GCC TGG TAT

CDR2  
~~~~~  
109 Q Q K P G K T P K L L I Y D A S R L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA ACT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC CGT TTG

CDR2
~~~~~  
163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T  
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

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

CDR3
~~~~~  
271 F N S Y I T F G Q G T R L E I K  
TTT AAT AGT TAC ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA

图 1B

## 抗-IFNAR 4G5 VH

V 区段 : 4-34  
D 区段 : 未确定  
J 区段 : JH4b

1 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L  
CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

CDR1  
~~~~~  
55 S L T C A V Y G G S F S N Y Y W S W
TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT AAT TAC TAC TGG AGC TGG

CDR2
~~~~~  
109 I R Q P P G K G L E W I G E I I L S  
ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC ATT CTT AGT

CDR2  
~~~~~  
163 G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

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

CDR3
~~~~~  
271 A V Y Y C A R E S K W G Y Y F D S W  
GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG TCT AAA TGG GGT TAC TAC TTT GAC TCC TGG

325 G Q G T L V T V S S  
GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

图 2A

## 抗-IFNAR 4G5 VK

V 区段 : L18  
J 区段 : JK2

```

      A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R
1  GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
 V T I T C R A T Q D I S I A L V W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA ACT CAG GAC ATT AGC ATT GCT TTA GTC TGG TAT

 CDR2
                                ~~~~~
      Q   Q   K   P   G   K   A   P   E   L   L   I   Y   D   A   S   G   L
109 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT GAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC GGT TTG

      CDR2
      ~~~~~
 G S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 GGA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGC ACA GAT TTC ACT

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

      CDR3
      ~~~~~
 F N S Y P Y T F G Q G T K L E I K
271 TTT AAT AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA
```

图 2B

## 抗-IFNAR 11E2 VH

V 区段 : 5-51  
D 区段 : 未确定  
J 区段 : JH4b

```
 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
1 GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

 CDR1
                                ~~~~~
      K I S C K G S G Y I F T N Y W I A W
55   AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ATC TTT ACC AAT TAC TGG ATC GCC TGG

                                CDR2
                                ~~~~~
 V R Q M P G K G L E S M G I I Y P G
109 GTG CGC CAG ATG CCC GGT AAA GGC CTG GAG TCG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

 CDR2
                                ~~~~~
      D S D I R Y S P S F Q G Q V T I S A
163  GAC TCT GAT ATC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

      D K S I T T A Y L Q W S S L K A S D
217  GAC AAG TCC ATC ACC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGT CTG AAG GCC TCA GAC

                                CDR3
                                ~~~~~
 T A M Y Y C A R H D I E G F D Y W G
271 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GAC ATA GAG GGG TTT GAC TAC TGG GGC

 R G T L V T V S S
325 CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

图 3A

## 抗-IFNAR 11E2 VK

V 区段 : A27  
J 区段 : JK5

```
 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
                                ~~~~~
      A  T  L  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  S  S  F  F  A  W
55   GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TTC TTC 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
      ~~~~~
      R  A  T  G  I  P  D  R  L  S  G  S  G  S  G  T  D  F
163  AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTA AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

 CDR3
      ~~~~~
      Q  Y  D  S  S  A  I  T  F  G  Q  G  T  R  L  E  I  K
271  CAG TAT GAT AGC TCA GCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
```

图 3B

## 抗-IFNAR 9D4 VH

V 区段 : 5-51  
D 区段 : 未确定  
J 区段 : JH4b

```
      E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  E  S  L
1    GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

                                CDR1
                                ~~~~~
 K I S C K G S G Y I F T N Y W I A W
55 AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ATC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GCC TGG

 CDR2
                                ~~~~~
      V  R  Q  M  P  G  K  G  L  E  S  M  G  I  I  Y  P  G
109   GTG CGC CAG ATG CCC GGT AAA GGC CTG GAG TCG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

                                CDR2
                                ~~~~~
 D S D I R Y S P S F Q G Q V T I S A
163 GAC TCT GAT ATC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

 D K S I T T A Y L Q W S S L K A S D
217 GAC AAG TCC ATC ACC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC AGT CTG AAG GCC TCA GAC

 CDR3
                                ~~~~~
      T  A  M  Y  Y  C  A  R  H  D  I  E  G  F  D  Y  W  G
271   ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GAC ATA GAG GGG TTT GAC TAC TGG GGC

      R  G  T  L  V  T  V  S  S
325   CGG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

图 4A

## 抗-IFNAR 9D4 VK

V 区段 : A27  
J 区段 : JK5

```
      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
                                ~~~~~~
 A T L S C R A S Q S V S S S F F A W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TTC TTC 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
      ~~~~~~
 R A T G I P D R L S G S G S G T D F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTA AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

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

      CDR3
      ~~~~~~
 Q Y D S S A I T F G Q G T R L E I K
271 CAG TAT GAT AGC TCA GCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA
```

图 4B

## 抗-IFNAR 3F11 VH 区

4-34 种系: CDR1  
Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G  
G S F S G Y Y W S W I R Q P  
3F11 VH: - - - - -  
- - - - - F - - - - -

4-34 种系: CDR2  
P G K G L E W I G E I N H 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  
3F11 VH: - - - - - D - - - K - - - - -  
- - - - - V - - -

4-34 种系: CDR3  
K L S S V T A A D T A V Y Y C A R  
3F11 VH: - - - - - E S K Y Y F G L D  
V W G Q G T T V T V T S

图 5

## 抗-IFNAR 4G5 VH 区

4-34 种系: Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G <sup>CDR1</sup>  
G S F S G Y Y W S W I R Q P  
4G5 VH: - - - - -  
- - - - N - - - - -

4-34 种系: P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R <sup>CDR2</sup>  
V T I S V D T S K N Q F S L  
4G5 VH: - - - - - I L - - - - -  
- - - - -

4-34 种系: K L S S V T A A D T A V Y Y C A R <sup>CDR3</sup>  
4G5 VH: N - T - - - - - E S K W G Y Y F D  
S W G Q G T L V T V S S

图 6

## 抗-IFNAR 11E2 和 9D4 VH 区

|          |      |                                           |             |
|----------|------|-------------------------------------------|-------------|
| 5-51     | 种系 : | E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S | <u>CDR1</u> |
|          |      | Y S F T S Y W I G W V R Q M P             |             |
| 11E2 VH: |      | - - - - -                                 |             |
|          |      | - I - - N - - - A - - - - -               |             |
| 9D4 VH:  |      | - - - - -                                 |             |
|          |      | - I - - N - - - A - - - - -               |             |

|          |      |                                     |             |
|----------|------|-------------------------------------|-------------|
| 5-51     | 种系 : | G K G L E W M G                     | <u>CDR2</u> |
|          |      | I I Y P G D S D T R Y S P S F Q G Q |             |
| 11E2 VH: |      | - - - - - S - - - - -               |             |
|          |      | - - - - - T - - - - -               |             |
| 9D4 VH:  |      | - - - - - S - - - - -               |             |
|          |      | - - - - - T - - - - -               |             |

|          |      |                                 |             |
|----------|------|---------------------------------|-------------|
| 5-51     | 种系 : | W S S L K A S D T A M Y Y C A R | <u>CDR3</u> |
| 11E2 VH: |      | - - - - -                       |             |
|          |      | R G T L V T V S S               |             |
| 9D4 VH:  |      | - - - - -                       |             |
|          |      | - - - - -                       |             |

图 7

## 抗-IFNAR 3F11 VK 区

CDR1  
L18 种系: A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R  
A S Q G I S S A L A W Y  
3F11 VK: - - - - -  
- - - - - Y - V - - - - -

CDR2  
L18 种系: Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S  
R F S G S G S G T D F T  
3F11 VK: - - - - - T - - - - - R - - - - -  
- - - - -

CDR3  
L18 种系: L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q F N S Y P  
3F11 VK: - - - - - I T  
F G Q G T R L E I K

图 8

## 抗-IFNAR 4G5 VK 区

L18 种系: A I Q L T Q S P S S L S A S CDR1  
 Q G I S S A L A W Y Q Q K P  
 4G5 VK: - - - - - T  
 - D - - I - - V - - - - -

L18 种系: G K A P K L L I Y CDR2  
 S G T D F T L T I S S L Q P  
 4G5 VK: - - - - E - - - - G - G - - - - -  
 - - - - -

L18 种系: E D F A T Y Y C CDR3  
 4G5 VK: - - - - - Y T F G Q G T K L E I  
 K

图 9

## 抗-IFNAR 11E2 和 9D4 VK 区

A27 种系: E I V L T Q S P G T L S L CDR1  
 Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P  
 11E2 VK: - - - - -  
 - - - - - F F - - - - -  
 9D4 VK: - - - - -  
 - - - - - F F - - - - -

A27 种系: G Q A P R L L I Y CDR2  
 S G T D F T L T I S R L E P E  
 11E2 VK: - - - - - L - - - -  
 - - - - - T - - - - -  
 9D4 VK: - - - - - L - - - -  
 - - - - - T - - - - -

A27 种系: D F A V Y Y C CDR3  
 11E2 VK: - - - - - D - - A I T F G Q G T R L E I K  
 9D4 VK: - - - - - D - - A - - - - -

图 10

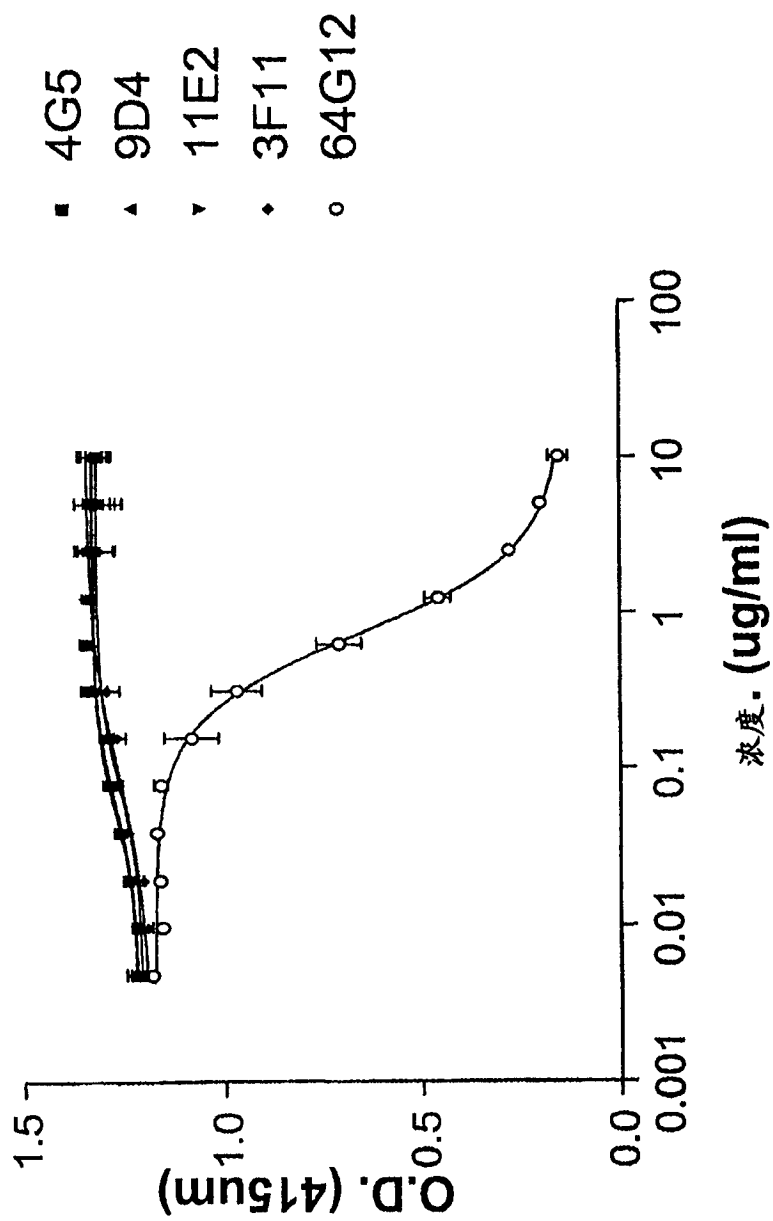


图 11