

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 7 月 21 日 (21.07.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/112497 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/24 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/070625

(22) 国际申请日: 2015 年 1 月 13 日 (13.01.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 (INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY, ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCE, PLA.) [CN/CN]; 中国北京市丰台区东大街 20 号, Beijing 100071 (CN)。

(72) 发明人: 孙志伟 (SUN, Zhiwei); 中国北京市丰台区东大街 20 号, Beijing 100071 (CN)。王双 (WANG, Shuang); 中国北京市丰台区东大街 20 号, Beijing 100071 (CN)。杜鹏 (DU, Peng); 中国北京市丰台区东大街 20 号, Beijing 100071 (CN)。仇炜祎 (QIU, Weiyi); 中国北京市丰台区东大街 20 号, Beijing 100071 (CN)。

(74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司 (CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY AGENT

LIMITED); 中国北京市海淀区丹棱街 3 号中国电子大厦 B 座 18 层, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: HUMAN ANTI-HUMAN INTERFERON ALPHA ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 人源抗人 α 干扰素抗体及其应用

(57) Abstract: Provided are a human anti-human interferon alpha (IFN α) antibody and coding gene and application thereof. By combining a gene engineering method with a bacteriophage surface display technology, a plurality of subtype anti-human IFN α gene engineering signal chain antibodies is screened from a fully synthetic single chain human antibody library, and a gene sequence of a variable region of the antibodies is obtained; holistic monoclonal Fab and IgG antibody recombinant carriers are constructed on the above basis, and a high-purity antibody molecule is obtained via expression and purification of mammalian cells. The affinity of combination of the obtained antibody Fab and human IFN α -2 is not greater than 2 nM, and the affinity of combination of the obtained antibody Fab and IFN α -1 is not greater than 100 nM. The antibody of the present invention effectively inhibits the biological activity of a plurality of subtype IFN α such as IFN α -2 at a cellular level, and the present invention provides a specific antibody medicine for treatment of interferon-related diseases, such as systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases.

(57) 摘要: 本发明提供了一种人源抗人 α 干扰素抗体及其编码基因与应用。通过基因工程手段和噬菌体表面展示技术结合运用, 从全合成单链人抗体库中筛选出抗人 IFN α 多个亚型的基因工程单链抗体, 并获得其抗体的可变区基因序列, 在此基础上构建全人单克隆 Fab 及 IgG 抗体重组载体, 经哺乳动物细胞表达、纯化获得高纯度抗体分子。本发明获得抗体的 Fab 与人 IFN α -2 结合的亲和力不大于 2nM, 与 IFN α -1 的亲和力不大于 100nM。本发明抗体能够在细胞水平有效阻断 IFN α -2 等多个亚型 IFN α 的生物学活性, 本发明为治疗干扰素相关疾病, 如系统性红斑狼疮等自身免疫病提供了一种特异性抗体药物。

WO 2016/112497 A1

人源抗人 α 干扰素抗体及其应用

技术领域

本发明涉及治疗用人源基因工程抗体的制备及应用，主要是特异性针对多种亚型人 α 干扰素 (interferon alpha, IFN α)，通过阻断 IFN α 与 IFN α 受体的结合，抑制 IFN α 的生物学功能，从而达到治疗系统性红斑狼疮等与 IFN α 相关的自身免疫性疾病的治疗用基因工程抗体。

背景技术

干扰素 (interferon, IFN) 是由病毒或其他种类的干扰素诱导剂，刺激网状内皮系统、巨噬细胞、淋巴细胞以及体细胞所产生的一种糖蛋白。干扰素是一种广谱抗病毒剂，并不直接杀伤或抑制病毒，而主要是通过细胞表面受体作用使细胞产生抗病毒蛋白，从而抑制病毒的复制；同时还可增强自然杀伤细胞 (NK 细胞)、巨噬细胞和 T 淋巴细胞的活力，从而起到免疫调节作用，并增强抗病毒能力。它们在多种细胞上具有广谱的抗病毒、抗增殖、免疫调节和诱导分化作用。干扰素的作用有以下几个特点：①间接性；②广谱性；③种属特异性：一般在同种属细胞中活性高，对异种细胞无活性；④发挥作用迅速：干扰素既能中断受染细胞的病毒感染又能限制病毒扩散；在感染的起始阶段，体液免疫和细胞免疫发生作用之前，干扰素发挥重要作用 (陆再英，钟南山等，内科学，第 7 版)。干扰素作为一种重要的细胞因子药物，在多种恶性肿瘤的治疗以及病毒性疾病的防治方面发挥了巨大作用。

干扰素分为 I 型、II 型和 III 型。I 型干扰素有 7 种：IFN- α 、IFN- β 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、IFN- ω 、IFN- δ 和 IFN- τ ，人类没有 IFN- δ 和 IFN- τ ；II 型仅有 IFN- γ (且仅有一个亚型)，III 型干扰素有 IFN- λ (目前发现的至少有三个亚型)。据报道，I 型干扰素中的 IFN- α 约有十三个亚型，部分亚型又可根据等位基因的差异再进行细分。不同种类的 I 型干扰素及其分型具有差异的特异活性，但其生物学功能是一致的。全部的 I 型干扰素具有共同的受体 IFNAR。IFNAR 含有 IFNAR1 和 IFNAR2 两条链，且都是糖蛋白。其中，IFNAR2 有三种不同的剪接形式：长型跨膜受体 (IFNAR2c)、短型跨膜受体 (IFNAR2b) 和可溶性受体 (IFNAR2a)。I 型干扰素通过结合单独的 IFNAR2c 或者 IFNAR1 与 IFNAR2c 复合膜受体，激活下游 JAK-STAT 途径产生一系列生物学反应。

传统研究一般都关注干扰素在抗病毒、抗肿瘤方面的效果和作用，随着近些年研究的深入，干扰素在免疫调节和诱导分化方面的功效越来越受重视。例如，I 型干扰素可促进幼稚 T 细胞向 Th1 分化；可维持记忆性 T 细胞的存活以及功能活力；可促进浆母细胞分化成浆细胞，增强抗体的产生；可诱导/激活树状细胞的形成等。此外，大量

研究显示,多种自身免疫性疾病可能与 I 型干扰素的高表达存在相关性。特别地,高水平的 IFN α 与包括胰岛素依赖的糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)、系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 和自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis) 等多种疾病的活动密切相关。由此, IFN α 活性的阻断策略可能对多种自身免疫病患者有益。目前,国外有两株针对 IFN α 的抗体, MedImmune 公司的 Sifalimumab 和 Genetech 公司的 Rontalizumab, 已相继进入 SLE 治疗的 II 期临床试验阶段, 用于银屑病、皮炎、多肌炎等多种自身免疫病治疗的临床研究也正在进行。

人抗体是治疗性抗体发展的最终方向, 临床上应用人抗体, 尤其是在自身免疫性疾病的治疗中, 可最大限度减少抗体的免疫原性、延长药物在体内的半衰期并可借助免疫球蛋白 Fc 段介导免疫调理、ADCC 及 CDC 等效应, 进而增强抗体的生物学效应。人抗体的主要研制手段包括抗体库技术和转基因小鼠技术。其中, 抗体库技术因其具有简单、便捷和灵活等特点, 广受抗体开发者的青睐, 目前, 该技术已经非常成熟, 被认为是目前最成功的开发治疗性抗体的技术手段之一。

发明内容

本发明的第一个目的在于提供人源抗 IFN α 抗体及其活性片段的氨基酸序列。

本发明的第二个目的在于提供编码上述抗体或其活性片段的编码基因。

本发明的第三个目的在于提供上述抗体及其活性片段在制备治疗 IFN α 相关的自身免疫性疾病药物中的应用。

本发明提供的抗体可变区氨基酸序列模式为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。在此, FR1~4 代表 4 个框架区域, CDR1~3 代表 3 个高变区。FR1~4 可以从恒定区序列分离而来 (比如人免疫球蛋白轻重链类、亚类或亚家族最常用的氨基酸), 也可以是从个人抗体框架区分离而来或从不同的框架区基因组合而来。例如 Kabat 等库中收录的众多人抗体框架区序列。其中, 重链为人免疫球蛋白亚群人重链 VH III 家族, 轻链为 Lambda I 家族。关于轻重链的 CDR 区, 通过丙氨酸扫描及其他同类氨基酸突变, 获得大量突变体, 对轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的突变体评价结果表明: CDR1L 序列为: SGSSSNX1GSNX2VX3 (SEQ ID NO 1), 其中, X1 可以是 Ile、Val 或 Met, 优选为 Ile; X2 可以是 Tyr、Lys、Arg 或 Leu, 优选为 Tyr; X3 可以是 Ser、Gly 或 Ala, 优选为 Ser。CDR2L 序列为: DXNQRPS (SEQ ID NO 2), 在此, X 可以是 Asn 或 Thr, 优选为 Asn。CDR3L 序列为: QSX1DX2X3LVX4 (SEQ ID NO 3), 其中, X1 可以是 Asn、Ser 或 Ala, 优选为 Asn; X2 可以是 Ala、Met 或 Leu, 优选为 Ala; X3 可以是 Ser、Gly 或 Ala, 优选为 Ser; X4 可以是 Glu、Met、Lys、Asp、Thr、Ala 或 Gly, 优选为 Glu。对重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的突变体评价结果表明: CDR1H 序列为: SX1X2MS

(SEQ ID NO 4)，其中，X1 可以是 Tyr、Gly、Leu、Val、Met 或 Ala，优选为 Tyr；X2 可以是 Ala、Ser 或 Gly，优选为 Ala。CDR2H 序列为：AISGSGGSTXYADSVKG(SEQ ID NO 5)，在此，X 可以是 Tyr、Asn、Leu、Ile、Met 或 Val，优选为 Tyr。CDR3H 序列为：YX1SX2X3X4SFDY (SEQ ID NO 6)，其中，X1 可以是 Tyr、Trp、Ser、Pro 或 Ala，优选为 Tyr；X2 可以是 Phe、Leu 和 Met，优选为 Phe；X3 可以是 Tyr、Val、Pro、Phe 或 Ala，优选为 Tyr；X4 可以是 Thr、Ala、Gly、或 Asn。对该抗体的轻重链 CDR 区进行丙氨酸扫描，结果表明，轻链 CDR1、CDR2 及重链 CDR3 对抗体与 IFN α -2 的结合至关重要；除重链 CDR2 外的其他 CDR 区对抗体结合 IFN α -1 的影响都十分明显，仅单个氨基酸的变化可引起亲和力几倍至几十倍的改变，具体见实施例 3。

因此，本发明提供了一种人源抗人 IFN α 抗体，其轻链包含以下 CDR 氨基酸序列，CDRL1 序列如 SEQ ID NO.1 所示，CDRL2 序列如 SEQ ID NO.2 所示，CDRL3 序列如 SEQ ID NO.3 所示。

进一步地，本发明提供的人源抗人 IFN α 抗体其重链 CDR3 含有如 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列。

更进一步地，其重链可变区包含以下 CDR 氨基酸序列，CDRH1 序列如 SEQ ID NO.4 所示，CDRH2 序列如 SEQ ID NO.5 所示，CDRH3 序列如 SEQ ID NO.6 所示。

本发明提供的人源抗人 IFN α 抗体，其轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。

本发明提供的人源抗人 IFN α 抗体，其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。

优选地，本发明提供的人源抗人 IFN α 抗体轻链可变区和重链可变区氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8 所示。

本发明提供的抗体可以为单链抗体、Fab、微型抗体、嵌合抗体或全抗体免疫球蛋白 IgG1、IgG2、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 中的一种。

本发明提供的抗体为全抗体或各种其他形式的基因工程抗体。如，抗 IFN α 抗体可以是全抗体或抗体片段。抗体分子本身可用于治疗和诊断。抗体可以被标记、交联或偶联及与其他蛋白或多肽分子融合表达形成复合物（如细胞毒性物质、放射性核素和\或化学分子等）用于诊断和治疗。

本发明更进一步提供：编码抗体的独立基因，表达载体，载体转染宿主细胞相关控制技术以及宿主细胞，抗体表达流程及在细胞培养上清中回收抗体的方法。

编码上述抗体轻链可变区的基因为如下 1)、2) 或 3) 所示：

- 1) 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示；
- 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码所述轻链的 DNA 分子；
- 3) 与 1) 限定的 DNA 序列具有 70% 以上的同源性且编码所述轻链可变区的 DNA 分子。

编码上述抗体重链可变区的基因为如下 1)、2) 或 3) 所示:

- 1) 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示;
- 2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码所述轻链的 DNA 分子;
- 3) 与 1) 限定的 DNA 序列具有 70% 以上的同源性且编码所述重链可变区的 DNA 分子。

在本发明中,“严格条件”是指:(1)在较低的离子强度和较高温度下的杂交和洗脱,如 0.2×SSC,0.1%SDS,60℃;或(2)杂交时加有变性剂,如 50%(V/V)甲酰胺,0.1%小牛血清/0.1Ficoll,42℃等;或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 70%以上,较佳地至少 80%以上,更佳地 90%以上,更好是 95%以上时才发生杂交。

本发明提供了含有上述基因的表达载体以及含有所述表达载体的宿主菌、宿主细胞或表达盒。

本发明提供了制备人源抗人 IFN- α 抗体的方法,利用噬菌体展示抗体库技术筛选抗 IFN α 特异性单链抗体,获得抗体轻重链可变区基因,并将其克隆入全抗体表达载体,通过哺乳动物表达系统对其进行全抗体表达,获得其全抗体蛋白。

上述方法中,所述的抗体轻重链可变区基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 和 SEQ ID NO.10 所示。

此处所公开和要求保护的 SEQ ID NO.1~8 所示序列包括“保守序列修饰”,即不明显影响和改变所述抗体或含有所述氨基酸序列抗体的结合特征的核苷酸和氨基酸序列修饰。所述保守序列修饰包括核苷酸或氨基酸替换、添加或缺失。可以通过本领域的标准技术,如定点诱变和 PCR 介导的诱变等将修饰导入 SEQ ID NO.1~8 中,如本发明实施例 3 中通过对抗体 CDR 区进行丙氨酸扫描和对部分位点进行氨基酸突变,即为保守序列修饰的范例。保守氨基酸替换包括氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基或其他氨基酸残基代替。本领域中,已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸),具有不带电的极性侧链的氨基酸(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),具有非极性侧链的氨基酸(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),具有 β 分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,优选用于来自于同一侧链家族的另一种氨基酸残基代替人抗 IFN α 多个亚型的抗体中的非必须氨基酸残基。

因此,此处公开的核苷酸序列编码的抗体或/和含有此处公开的氨基酸序列的抗体包括基本上由经保守序列修饰的相似序列编码的,或含有经保守序列修饰的相似序列的抗体,均应视为本发明的范畴。

此外,考虑到密码子的简并性,编码本发明 SEQ ID NO.1~8 所述抗体的基因可以但不局限于 SEQ ID NO.9 和 10,例如可在其编码区,在不改变氨基酸序列的条件下,对编码上述抗体的基因序列进行修改,获得编码相同抗体的基因。本领域技术人员可以根据表达抗体宿主的密码子偏好性,人工合成改造基因,以提高抗体的表达效率。

本发明还提供一种抗体靶向药物分子,包含连接于化学分子、放射性同位素、多肽分子、毒素或生物大分子的上述人源抗人 IFN α 抗体。连接方式为抗体被标记、体外交联或分子偶联。

本发明还提供一种双特异性或多特异性分子,包含上述人源抗人 IFN α 抗体或抗体的抗原结合部位。

一种抗体与其他蛋白或/和多肽的融合蛋白,包含上述人源抗人 IFN α 抗体和功能性蛋白或多肽分子的复合物。

上述融合蛋白是将抗体基因与融合蛋白基因连接构建重组表达载体,通过哺乳动物细胞或其他表达系统获得重组融合蛋白分子。

本发明还提供了含有上述人源抗人 IFN α 抗体的药物、制剂或检测试剂。

本发明同样提供含有抗体的组分和药理学上可接受的递送分子或溶液。本治疗用组分为无菌,可低温冻干。

本发明提供了人源抗人 IFN α 抗体在制备以 IFN α 为靶标的疾病治疗药物中的应用。所述的疾病为系统性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病、自身免疫性甲状腺炎、银屑病、多肌炎、皮炎、硬化病、类风湿性关节炎等。

本发明提供一种抗人 IFN α 多个亚型的抗体,该抗体可以抑制 IFN α 所表现的一种或多种生物学活性。本抗体通过阻碍 IFN α 与其受体结合发挥作用,也可以通过降低体内 IFN α 水平发挥作用。IFN α 拮抗剂所具有的所有干扰功能均应平等地视为本发明的目的。

在本发明的实施例中,申请人利用自构建的库容量达到 1.35×10^{10} 的大容量全合成噬菌体单链人抗体资源库(ZL.200910091261.8),以 IFN α _1b 和 IFN α _2b 为靶标,通过交替筛选获得了一株针对多种亚型人 IFN α 的功能抗体 AIA22,其轻链可变区和重链可变区氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8 所示,AIA22 抗体的氨基酸序列和 DNA 序列分别如 SEQ ID NO.15 和 SEQ ID NO.16 所示。

本发明运用噬菌体表面展示技术,从大容量全合成人源单链抗体库中,通过多轮的生物淘洗(bio-panning),筛选获得特异性抗人 IFN α 的单链基因工程抗体(single chain variable fragment, scFv)。在本发明实施例中,将上述抗体轻重链可变区基因分别克隆入全抗体哺乳动物细胞瞬时表达载体 pABL 和 pABG1 中,通过共转染 HEK293-T 细胞进行瞬时分泌表达,亲和纯化获得全抗体 AIA22。

本发明描述的抗体 AIA22 具有良好的治疗应用前景,主要表现为通过与重组人

IFN α -1、IFN α -2、IFN α -4、IFN α -5、IFN α -6、IFN α -8、IFN α -14、IFN α -17、IFN α -21 等多个亚型的特异性结合活性，能够有效阻断其对 Daudi 细胞增殖的抑制作用。

采用 BIAcore 3000 系统对 AIA22 与 IFN α -1b 和 IFN α -2b 的结合能力进行检测，结果表明，该抗体 Fab 与 IFN α -2b 的亲和力 K_D 为 0.213 nM，与 HSA-IFN α -1b 融合蛋白的亲和力 K_D 为 3.24 nM。

本发明通过大容量全合成抗体库技术筛选获得 1 株抗人 IFN α 多个亚型的全人源抗体和一系列亲和力保持不变或提高的突变体抗体，并证实所发明抗体均特异性与 IFN α 结合，并抑制其生物学功能。利用上述获得的全人源抗 IFN α 基因工程抗体可变区基因以及抗体序列特征下的全抗体基因，可以在原核细胞、酵母细胞、真核细胞及任何重组系统中表达和生产此抗体，或以此为基础的改建后的含有此抗体基因的任何其它基因，获得具有抑制 IFN α 生物学活性的抗体产物，或利用体外标记或交联的方法获得的复合物，制成临床上用于治疗与 IFN α 相关的自身免疫性疾病的特异性抗体药物。

附图说明

图 1 所示为载体图谱，其中图 1A 为 pABL 载体图谱，图 1B 为 pABK 载体图谱，图 1C 为 pABG1 载体图谱。

图 2 所示为采用 FreeStyle™ HEK293-T 瞬时表达系统表达并通过 ProteinA 柱亲和纯化获得的 AIA22、Sifalimumab 全抗体 SDS-PAGE 非变性电泳图；1: Pr Marker, 2: AIA22, 3: Sifalimuamb。

图 3 所示为 AIA22 全抗体以浓度梯度结合多种类型抗原的 ELISA 特异性鉴定结果；图例所示为抗原类型及其包被浓度。

图 4 所示为利用 BIAcore 3000 系统测定 AIA22 与 IFN α -2b 和 HSA-IFN α -1b 的亲和力曲线。其中，图 4A：为测定 AIA22 与 IFN α -2b 亲和力结果，从上至下曲线代表的 IFN α -2b 浓度依次为 20nM、10nM、5nM、2.5nM、1.25nM 和 0.625nM；图 4B：为测定 AIA22 与 HSA-IFN α -1b 亲和力结果，从上至下曲线代表的 HSA-IFN α -1b 浓度依次为 400nM、200nM、100nM、50nM、25nM 和 12.5nM。

图 5 所示为 AIA22 和 Sifalimuab 阻断 IFN α -2b 抑制 Daudi 细胞增殖活性的结果；使用的 IFN α -2b 抑制 Daudi 的增殖浓度为 25pM。

图 6 所示为 AIA22 对不同 IFN α 亚型的中和活性图。纵坐标表示 AIA22 对不同亚型的 EC50 值与各亚型 IFN α 使用浓度的比值，比值越小，表明 AIA22 对该亚型的中和活性越强。

图 7 所示为 AIA22 部分突变体阻断 IFN α 不同亚型的抑增殖活性结果；图 7A：为阻断 IFN α -2b 活性，IFN α -2b 的使用浓度为 25pM；图 7B：为阻断 IFN α -1a 活性，IFN α -1a

的使用浓度为 36pM。

具体实施方式

以下实施例进一步说明本发明的内容，但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换，均属于本发明的范围。

若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

实施例 1 特异性人源抗人 α 干扰素抗体的筛选与鉴定

一、材料与方法：

1. 材料：大容量全合成噬菌体单链抗体库由中国人民解放军军事医学科学院构建（ZL200910091261.8），库容量 1.35×10^{10} 。筛选抗体库的抗原为在大肠杆菌中重组表达的人 IFN α _2b（以色列 ProSpec-Tany 公司）以及与人血清白蛋白（HSA）融合表达的 HSA-IFN α _1b 和 HSA-IFN α _2b（抗体在线公司）。菌株为 XL1-Blue（美国 Stratagene）；所用噬菌体为 M13KO7（美国 Invitrogen 公司）。真核表达载体 pABG1、pABK 和 pABL 为本室保存，载体结构图谱如图 1 所示，哺乳动物细胞 FreeStyle™HEK293-T 购自 Invitrogen 公司。MedImmune 公司 Sifalimumab 的可变区核酸序列合成服务由北京天一辉远生物科技有限公司提供。

2. 方法

2.1 噬菌体抗体库的呈现，参照 Pharmacia 公司的 Recombinant phage selection module 用户手册（Cat.NO.XY-040-00-05）进行，但稍作修改，具体如下：

取冻存的抗体库，在 200ml 2×YT-CTG（氯霉素 C 终浓度为 100ug/mL，四环素 T 终浓度为 10ug/mL，Glucose 终浓度为 0.5%）培养基中 37℃，220rpm 培养至 OD₆₀₀=0.5，按 MOI=20：1 的比例加入辅助噬菌体 M13KO7，室温静置 20min。37℃，150rpm 缓慢摇床培养 1h，加入卡那霉素至终浓度为 50μg/ml，并加 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L，于 30℃，220rpm 摇床培养 10~12h。次日，离心收取培养上清加入 1/5 体积的 PEG8000 buffer（20%PEG8000+2.5mol/L NaCl），混匀后于冰上放置 45min，沉淀噬菌体。4℃，10000g 离心 20min，弃上清，沉淀重悬于 5ml 含 2%BSA 和 15%甘油的 PBS 缓冲液中，-70℃冻存备用。

2.2 噬菌体滴度的测定

挑取宿主菌（XL1-Blue）单克隆接种于 LB 培养基，37℃，摇床培养至对数生长期（OD₆₀₀=0.5）。取 50μl 制备好的噬菌体悬液，用 LB 培养基进行系列 10 倍梯度稀释。向稀释到一定倍数的悬液中加入对数生长期的宿主菌，37℃，150~180rpm 摇床培养 1h。取培养后的菌液 100 或 200μl 涂布在 LB 平板上，37℃培养过夜，次日，计数菌落数，

并计算滴度。

2.3 抗 IFN α 多个亚型特异性抗体的淘选, 参照 Pharmacia 公司的 Recombinant phage selection module 用户手册(Cat.NO.XY-040-00-05)稍作改动, 用 IFN α _2b 和 HSA-IFN α _1b 交替进行淘选, 具体如下:

以 IFN α _2b 和 IFN α 1b 为抗原交替筛选: 将重组蛋白抗原 IFN α _2b 用包被液稀释为 20 μ g/ml (第二、三轮包被浓度分别为 5 μ g/mL 和 1 μ g/mL) 包被免疫管, 1ml/管, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。次日, 免疫管用 PBS 洗涤 2 遍, 2min/遍, 然后用 2%BSA 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h (以后各轮交替使用 0.2%酪蛋白和 2%BSA,)。制备好的噬菌体抗体库用封闭液 (同免疫管封闭液, 0.1%Tween 20, 包被抗原为 HSA 融合蛋白时, 相应加入终浓度 40 μ g/mL 的 HSA 封闭) 37 $^{\circ}$ C 封闭 30min。将预封闭后的噬菌体抗体库加入封闭后的免疫管中, 4 $^{\circ}$ C 作用过夜。弃免疫管中溶液, PBST 进行洗涤后, 0.2mol/L 的 Glycine-HCl (pH2.2) 洗脱, 1mol/L Tris 中和至 pH7.4。洗脱液感染对数生长期的 大肠杆菌 XL1-Blue, 涂 2 $\times$ YT-CTG 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。过夜菌进行噬菌体呈现。以用于下一轮筛选。

2.4 噬菌体 ELISA 鉴定阳性克隆

挑取经筛选后的克隆于 96 孔深孔板中, 每孔 250 μ l 2 $\times$ YTCTG 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD600=0.5, 加入 1 $\times$ 10⁸pfu/mL 的辅助噬菌体, 室温静置 15min, 37 $^{\circ}$ C, 150rpm 摇床培养 1h, 加入等体积 2 $\times$ YT-CTKI (卡那霉素 K 终浓度为 50 μ g/ml, IPTG 终浓度为 0.2mmol/L), 30 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。次日, 离心收取上清, 加入 BSA 至终浓度 2%, 加入 Tween-20 至终浓度 0.1%, 37 $^{\circ}$ C 静置 15min, 备用。抗原(HSA-IFN α _1b 和 HSA-IFN α _2b) 分别用包被液稀释至 2 μ g/ml, 加入 96 孔酶联板, 50 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。次日, 弃包被液, 酶联板用 PBST 洗 2 次, PBS 洗一次, 每次 3min, 用 2%BSA+0.1%Tween-20 封闭, 200 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 2h。弃去封闭液, 加入经封闭后的单克隆噬菌体抗体, 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C, 静置 1h。弃去液体, 用 PBST 洗 2 次, PBS 洗一次, 200 μ l/孔, 每次 5min。将 HRP 标记的鼠抗 M13 抗体用 PBST 稀释, 稀释比例为 1 : 5000, 同时加入终浓度 2%的 BSA, 37 $^{\circ}$ C 预封闭 15min。将预封闭后的鼠抗 M13 抗体加入酶联板, 50 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 静置 30min。弃去液体, 酶联板用 PBST 洗 2 次, PBS 洗一次, 200 μ l/孔, 每次 5min。弃去洗涤液, 加入 OPD 底物显色液, 50 μ l/孔, 室温静置显色。用 2M H₂SO₄ 终止显色。酶标仪测定光吸收值 OD492/630。

包被缓冲液(pH 9.6): Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g, 双蒸水加至 1L;

封闭液: 1 $\times$ PBS + 2%BSA (或 0.2%酪蛋白) + 0.1%Tween20;

洗涤液 PBST: 1 $\times$ PBS + 0.1%Tween20;

OPD 底物液稀释液: 0.2M Na₂HPO₄ (28.4g/L) 25.7ml, 0.1M 柠檬酸(19.2g/L)24.3ml,

蒸馏水，50ml。

2.5 噬菌体单链抗体转换为全抗体

载体pABG1和pABL分别用于克隆V_H和V_L可变区基因，分别采用引物H3F (SEQ ID NO11)和HR(SEQ ID NO 12)扩增V_{H3}可变区基因；L1F(SEQ ID NO 13)和LR(SEQ ID NO 14)扩增V_{L1}可变区基因。V_{L1}可变区基因利用酶切位点BsrG I和Hind III克隆入载体PABL，V_{H3}可变区基因利用酶切位点Afl II和NheI克隆入载体pABG1。重组质粒转化大肠杆菌Top10，通过对重组质粒进行菌液PCR及测序鉴定，获得构建正确的全抗体轻、重链表达载体。大提质粒后将抗体轻重链以摩尔比1: 1转染FreeStyle™HEK293-T细胞，进行全抗体的瞬时表达，经ProteinA亲和层析柱对表达上清进行纯化，并对纯化后的全抗体进行电泳分析、亲和力和特异性测定等。

2.6 Sifalimumab 的全抗体改造、表达和纯化

Sifalimumab 的序列信息参见专利 US7741449B2。Sifalimumab 轻重链氨基酸序列如 SEQ ID NO. 19 和 SEQ ID NO. 20。设计其可变区核苷酸序列如 SEQ ID NO. 17 和 SEQ ID NO. 18，在轻链两端引入酶切位点 Xba I 和 Kas I，在重链两端引入酶切位点 Afl II 和 Nhe I，分别利用酶切连接操作克隆入载体 pABK 和 pABG1。重组质粒转化大肠杆菌Top10，通过对重组质粒进行菌液 PCR 及测序鉴定，获得构建正确的全抗体轻、重链表达载体。大提质粒后将抗体轻重链以摩尔比 1: 1 转染 HEK293-T 细胞，进行全抗体的瞬时表达，经 ProteinA 亲和层析柱对表达上清进行纯化，以其为对照抗体开展后续研究。

二、结果

1. 全抗体的表达纯化

对第三轮 IFN α _2b 筛选获得的单克隆进行鉴定，获得特异性噬菌体抗体命名为 AIA22，其噬菌体单链抗体可特异性结合 IFN α _2b 和 IFN α _1b，该单链抗体的氨基酸和核苷酸序列如 SEQ ID NO. 15 和 SEQ ID NO. 16 所示，其轻链可变区和重链可变区氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8 所示。

将噬菌体抗体 AIA22 的轻、重链可变区基因以及 Sifalimumab 的轻、重链基因分别克隆入全抗体瞬时表达载体 pABL 和 pABG1 中，构建其全抗体轻、重链重组表达载体，并通过 HEK293-T 细胞瞬时表达系统实现了哺乳动物细胞瞬时分泌表达。经 Protein A 柱纯化后获得全抗体蛋白纯品，其 SDS-PAGE 电泳结果如图 2 所示，抗体纯度较高，电泳条带位置符合预期，可以用于后续实验。

3. AIA22 的特异性鉴定

在全抗体水平上对 AIA22 的特异性进行分析，以 HSA-IFN α _1b 和 HSA-IFN α _2b 为阳性抗原，IFN ω 、HSA、His-IL6R (带 His 标签的 IL6R)、VEGF、TNF、AHC-A β -T

(AHC、A β 片段以及肉毒毒素融合蛋白) 以及 HEK293 碎细胞上清为对照抗原, 4℃ 过夜包被酶联板, 加入纯化后梯度稀释的 AIA22 全抗体, 以 HRP 标记抗人 IgG 抗体为二抗进行 ELISA, 检测 AIA22 全抗体的特异结合活性。结果如图 3 所示, 可以看出, AIA22 与目标抗原 HSA-IFN α _1b 和 HSA-IFN α _2b 的结合是特异的。

实施例2 AIA22亲和力和体外中和活性分析

一、材料与方法:

1. 材料: CM5芯片购自GE Healthcare Life Sciences公司。IFN α _1、IFN α _2、IFN α _4、IFN α _5、IFN α _6、IFN α _8、IFN α _10、IFN α _14、IFN α _16、IFN α _17、IFN α _21等亚型均购自PBL公司(货号11002-1)。Daudi细胞(人Burkitt's淋巴瘤细胞)购买自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。CCK-8购自日本同仁化学株式会社。新生牛血清NCS购自PAA公司。RPMI 1640细胞培养基购自Gibco公司。其它涉及材料同实施例1。

2. 方法

2.1 BIAcore 3000系统测定抗体亲和力

本例采用 BIAcore 3000 系统检测 AIA22 对 IFN α _2b 和 HSA-IFN α _1b 的亲和力, 具体操作步骤如下:

将纯化后抗体 AIA22 用 HBS-EP 缓冲液稀释至 1 μ g/mL, 并偶联至预先包被有 Prot-G 的 CM5 芯片上, 偶联条件: 温度 25℃, 流速 5 μ L/min, 偶联目标值为 200RU。抗原 IFN α _2b 作为流动相, 用 HBS-EP 作两倍浓度梯度稀释, 其浓度范围为 20nM~625pM。测试条件: 温度 25℃, 流速 30 μ L/min; 结合时间为 3min, 解离时间为 15min。完成一个反应后, 对芯片进行再生, 再生条件: 3M MgCl₂, 30 μ L/min $\times$ 30s, 再生后继续偶联同样目标值的 AIA22, 进行下一轮反应。实验完毕, 扣除空白对照和无关抗体对照响应值, 用 BIAevaluation 软件进行结果分析。

以 HSA-IFN α _1b 作为抗原, 重复上述过程, 其浓度范围为 400nM~12.5nM, 结合时间为 4min, 解离时间为 20min, 其它条件不变。

2.2 AIA22 体外中和活性分析

IFN α 功能(包括在系统性红斑狼疮 SLE 病理中的作用)的发挥是通过与细胞表面的 I 型干扰素受体 IFNAR 结合, 激活下游 JAK-STAT 通路得以实现的。IFN α 抑制 Daudi 细胞的增殖也是如此。人 IFN α 抑制体外培养的 Daudi 细胞增殖效果明显, 并存在确定的量效关系。通过评价 AIA22 在体外阻断人 IFN α 与 IFNAR 的结合, 促进 Daudi 细胞增殖的情况, 可以间接反映出其在疾病治疗当中的实际作用。

通过抑制实验探究不同亚型人 IFN α 抑制 Daudi 增殖的细胞毒性曲线, 从而确定其有效抑制浓度; 在此基础上通过抗体阻断实验验证抗人 IFN α 抗体 AIA22 的体外中和活性。具体操作如下:

2.2.1 IFN α 抑制 Daudi 细胞增殖的细胞毒性曲线

1) 细胞悬液计数, 并用含 10% NCS 的 RPMI 1640 培养基将细胞悬液稀释至 2×10^5 个/mL 的最终密度, 按 50 μ L/孔接种细胞至 96 孔板;

2) 以 2 μ g/mL (或 300 IU/mL) 为起始浓度 (HSA 融合的 IFN α 起始浓度采用 20 μ g/mL, 作 2 倍系列稀释), 用完全培养基对待测 IFN α 亚型进行 1.5 倍系列稀释, 作 14 个稀释度, 混匀后按 50 μ L/孔加入相应孔中。同时设置“细胞 + 空白培养基”、“无细胞 + 空白培养基”以及“无细胞 + 含最高剂量 IFN α 空白培养基”的对照。

3) 480rpm $\times$ 3min 振摇培养板, 然后置于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 细胞孵箱孵育 72h;

4) 按 10 μ L/孔加入 CCK-8, 240rpm $\times$ 3min 振摇培养板, 使充分混合, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 孵育 3 h 后, 用酶标仪检测吸光值 OD $_{450\text{nm}}$ / OD $_{630\text{nm}}$;

5) 记“细胞 + 空白培养基”孔的显色值为 A $_0$, 含 IFN α 实验孔显色值为 A $_s$, “无细胞 + 含高剂量 IFN α 空白培养基”的对照孔显色值为 A $_b$; 则细胞的存活率 (%) = $[(A_s - A_b) / (A_0 - A_b)] \times 100\%$, 作细胞毒性曲线。

2.2.2 抗IFN α 抗体AIA22体外中和活性评价

1) 细胞悬液计数, 并用含 10% NCS 的 1640 培养基将细胞悬液稀释至 2×10^5 个/mL 的最终密度, 按 50 μ L/孔转接细胞至 96 孔板 (每种干扰素亚型占 2 列, 对应每种抗体的 14 个浓度梯度, 同时, 抗体的每个浓度对应一孔不含干扰素的对照, 即每一对 mAb/IFN 需要 8 $\times$ 4 孔, 同时设 2 个复孔, 总共需要接种的细胞孔数按此计算);

2) 分别用含有 IFN α 的完全培养基 (使用浓度根据毒性曲线确定, 取恰好完全抑制细胞增殖的浓度) 和不含干扰素的完全培养基对抗 IFN α 抗体 AIA22 进行 2.5 倍系列稀释, 抗体起始浓度为 100 μ g/mL, 作 14 个稀释度, 混匀后按 50 μ L/孔加入相应孔的细胞中。此时, 每孔细胞最终密度为 1×10^4 个/100 μ L/孔; 抗体浓度为 50 μ g/mL (312 nM) 到 134 pg/mL (0.84 pM); 同时设置不含抗体 (仅含 IFN α) 和空白培养基对照孔。

3) 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 细胞孵箱孵育 72h;

4) 按 10 μ L/孔加入 CCK-8, 240rpm $\times$ 3min 振摇培养板, 使充分混合, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 孵育 3 h 后, 用酶标仪检测吸光值 OD $_{450\text{nm}}$ /630nm;

5) 数据处理: 以不含抗体孔作为 0% 阻断效率, 以各抗体浓度下不含干扰素的孔作为 100% 阻断效率, 计算各浓度抗体/干扰素对应的阻断效率, 通过 CurveExpert 拟合抗体浓度-阻断效率曲线, 计算 EC $_{50}$ 值。

二、结果

1. BIAcore 3000 系统测定抗体亲和力:

CM5 芯片偶联抗体 AIA22, 以浓度梯度的 HSA-IFN α _1b 和 IFN α _2b 为流动相, 采

用 BIAcore 3000 系统测定抗体与 HSA-IFN α _1b、IFN α _2b 的亲和力, 依托 BIAevaluation 软件, 分析曲线特征, 选取适当拟合区间, 拟合曲线并计算抗体亲和力(图 4A 和图 4B), 结果如下表所列。

表 1 AIA22 结合特征

IFN α 亚型	Ka (1/ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
IFN α -2b	2.27×10^6	4.84×10^{-4}	0.213
HSA- IFN α -1b	7.41×10^4	2.41×10^{-4}	3.24

2. AIA22 体外中和活性分析

Daudi 细胞细胞表面表达有 IFNAR 受体, IFN α 通过与 INFAR 受体结合对该细胞的增殖具有抑制作用。利用抗体与 IFN α 的结合, 可阻断 IFN α 与受体间信号的传导, 从而阻断 IFN α 对细胞增殖的抑制作用, 使细胞的增殖活性得以恢复。阻断效率由细胞活性体现。本发明采用 Daudi 增殖实验检测了 AIA22 对人 IFN α 多种亚型的中和活性, 拟合计算其 EC₅₀ 值, 结果如图 5、图 6 及表 2 所示。其中, AIA22 与 Sifalimumab 对 IFN α _2b 的体外活性评价的结果比较如图 5 所示。前述结果显示, AIA22 对 IFN α _2b 的亲和力在略低于 Sifalimumab (0.1 nM) 的情况下, 显示了较优的中和活性。图 6 显示了 AIA22 对不同亚型的 EC₅₀ 值与各亚型 IFN α 使用浓度(完全抑制 Daudi 增殖的 IFN α 浓度临界值)的比值, 比值越小, 表明 AIA22 对该亚型的中和活性越强; 表 2 详细给出了 AIA22 中和不同亚型 IFN α 活性的 EC₅₀ 值以及 1000 倍 EC₅₀ 浓度下的 IFN α 活性抑制率; 可以看出, AIA22 对多种亚型均有中和活性, 尤以对 IFN α -2 活性最强。

表 2 AIA22 中和 IFN α 不同亚型抑制 Daudi 细胞增殖的活性

IFN α 亚型	AIA22 中和活性	
	EC ₅₀ (nM)	1000×
IFN α -1b	335.90	32.6%
IFN α -2a	0.47	100%
IFN α -2b	0.63	100%
IFN α -4b	94.65	28.5%
IFN α -5	82.3	34.3%
IFN α -6	1.34	100%
IFN α -7	>400	NS
IFN α -8	24.6	41.5%
IFN α -10	>400	NS

IFN α -14	28.4	44.3%
IFN α -16	21.07	92.5%
IFN α -17	116.5	27.4%
IFN α -21	79.93	26.5%

NS=not significant

“1000 ×” 栏表示抗体浓度为 IFN α 浓度 1000 倍时的中和活性。

实施例 3 AIA22 轻、重链 CDR 区丙氨酸扫描及突变体评价

一、材料与方法：

1. 材料： Fortebio Octet系统以及Anti-Human IgG Fc Capture购自艾瑞生物技术（上海）有限公司。其它涉及材料同实施例1、实施例2。

2. 方法

2.1 丙氨酸扫描

分别设计定点突变引物对AIA22抗体6个CDR区进行丙氨酸扫描，如果其在该位置是丙氨酸，则将其分别突变为Gly和Ser。方法采用质粒定点突变的方法进行，具体实施方法可参照文献[王荣浩，陈瑞川，刘润忠。快速点突变的优化方法。厦门大学学报（自然科学版），2008, Vol 47, sup 2, 282-285]。

2.2. ELISA检测相对亲和力

抗原（HSA-IFN α _1b和HSA-IFN α _2b）分别用包被液稀释至3 μ g/ml，加入96孔酶联板，50 μ l/孔，4℃包被过夜。次日，弃包被液，酶联板用含2%脱脂奶粉的PBS封闭，50 μ l/孔，37℃，30min。弃去封闭液，加入经PBST牛奶（2%脱脂奶粉、0.1% Tween20）梯度稀释的亲本抗体和突变体抗体（初始浓度1 μ g/mL），50 μ l/孔，37℃，静置1h。弃去液体，用PBST洗3次，200 μ l/孔，每次5min。将HRP标记的鼠抗人IgG Fc抗体用PBST牛奶1：2000稀释，37℃预封闭15min；然后加入酶联板，50 μ l/孔，37℃静置30min。弃去液体，酶联板用PBST洗3次，PBS洗一次，200 μ l/孔，每次5min。弃去洗涤液，加入OPD底物显色液，50 μ l/孔，室温静置显色。用2M H₂SO₄终止显色。酶标仪测定光吸收值OD_{492nm} / 630nm。

2.3. ForteBio Octet 对突变体亲和力的高通量比较

将待检测抗体用 HEPES-EP 缓冲液稀释至 100nM，包被于 Anti-Human IgG Fc Capture，包被时间 20min；包被完成后用 HEPES-EP 缓冲液洗涤 2min，基线校准 1min 后，将 Anti-Human IgG Fc Capture 移入用 HEPES-EP 缓冲液稀释至 20nM 的 IFN α 样品中，结合 10min，待结合曲线达到平衡后将 Anti-Human IgG Fc Capture 移入新的 HEPES-EP 缓冲体系进行抗原抗体复合物的解离，解离时间为 15min。检测完成后，采

用配套 Data Analysis 分析软件对亲和力进行分析。

2.4. 突变体与亲本抗体细胞学活性比较

具体实施方法同实施例2中2.2.2抗IFN α 抗体AIA22体外中和活性评价；抗体剂量使用的基本原则是参考前期实验数据，在其对应浓度两侧取合适的浓度梯度样点。

二、结果

在AIA22氨基酸序列基础上，采用定向突变的方法，对轻重链6个CDR区的全部氨基酸位点进行丙氨酸扫描。用ELISA检测相对亲和力，对部分突变体同时也采用ForteBio Octet系统精确检测其亲和力的变化，结果如表2所列（序列采用Kabat编秩规则）。

丙氨酸扫描结果提示，除重链CDR2以外，其余各CDR区均存在对结合活性影响较大的位点，特别是对IFN α _1b的结合影响较为明显。其可能原因是这些位点的氨基酸直接参与相互作用，或者是这些位点的氨基酸对于维持抗体的正确的整体空间构象至关重要。特别地，轻链的G25、S27、S31a、Y32、N51、E96等位点以及重链的A33、Y96、S97、F98、Y99等位点对于抗体的结合活性影响较大。通过对部分位点的随机突变，并对突变体进行ELISA相对亲和力检测和ForteBio Octet系统亲和力比较的评价（结果未详细列出），多个位点的突变均能在保证抗体对IFN α -2b亲和力无显著改变的前提下显著提高对IFN α _1b的亲和力；同时，在阻断IFN α _1b的抑增殖活性方面也有一定程度的改善，细胞学活性结果如图7A、图7B所示。

表3 AIA22轻重链CDR区丙氨酸扫描及定点突变结果列表

轻链（VL chain）			重链（VH chain）		
位点	相对 AIA22 亲和力		位点	相对 AIA22 亲和力	
	IFN α -2b	IFN α -1b		IFN α -2b	IFN α -1b
S24A	0.9	1.1	S31A	0.8	0.2
G25A	13.4	15.6	Y32A	1.0	0.2
S26A	1.0	4.2	Y32V	0.9	0.9
S27A	3.6	11.2	Y32G	1.1	0.8
S28A	1.0	0.6	A33S	1.0	0.4
N29A	1.1	16.1	A33G	0.8	0.5
G31A	1.0	5.7	M34A	1.0	1.0
S31aA	1.0	15.4	A50S	1.2	1.0
N31bA	1.0	22.5	I51A	1.0	1.0
Y32A	32.5	26.4	G52aA	1.0	1.0
V33A	1.0	5.4	S53A	1.0	1.0

S34A	1.0	0.8	Y58A	0.2	10
D50A	2.5	12.4	Y58L	0.7	5.0
N51A	12.4	20.5	Y58M	0.6	1.5
N52A	1.0	3.5	A60S	1.1	1.0
Q53A	1.0	15.0	A60G	1.0	2.5
R54A	1.0	4.2	D61A	1.3	1.0
P55A	1.4	1.0	S62A	1.0	1.0
S56A	1.5	1.0	V63A	0.9	1.2
S90A	1.0	0.5	K64A	0.9	1.0
N91A	0.8	0.5	G65A	1.0	1.0
N91S	0.8	0.8	Y95A	23.5	34.6
D92A	1.0	12.0	Y96A	1.0	0.2
A93M	0.8	0.2	Y96W	0.8	0.2
A93L	1.0	0.7	S97A	1.0	27.3
S94A	1.0	0.45	F98A	1.0	8.5
S94G	1.0	0.64	F98L	0.9	3.0
V95aL	1.0	0.8	Y99A	1.0	0.6
E96A	23.5	31.8	Y99V	0.9	0.8
E96M	31.2	33.4	Y96S	1.0	0.5
E96G	22.5	37.6	Y96C	0.6	1.0
E96L	12.5	54.2	T100A	1.0	0.5
E96D	14.3	23.4	T100G	0.9	2.3
E96T	26.5	32.5	T100N	1.0	0.8

说明:表中相对 AIA22 亲和力对应数值为计算得到的突变体抗体的解离常数 K_d 与亲本抗体的 K_d 之比, 比值越小, 代表亲和力提高约显著; 相反, 数值越大, 表示亲和力降低明显。

表中未列出的 CDR 区点均是由于表达异常未能获得样品导致未能对其进行检测。

工业实用性

本发明的抗人 $IFN\alpha$ 多个亚型的全人源抗体和一系列亲和力保持不变或提高的突变体抗体均特异性与 $IFN\alpha$ 结合, 并抑制其生物学功能。利用本发明获得的全人源抗 $IFN\alpha$ 基因工程抗体可变区基因以及抗体序列特征下的全抗体基因, 可以在原核细胞、酵母细胞、真核细胞及任何重组系统中表达和生产此抗体, 或以此为基础的改建后的含

有此抗体基因的任何其它基因，获得具有抑制 IFN α 生物学活性的抗体产物，或利用体外标记或交联的方法获得的复合物，制成临床上用于治疗与 IFN α 相关的自身免疫性疾病的特异性抗体药物。

序列表

<110> 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所
 <120> 人源抗人 α 干扰素抗体及其应用
 <130> KHP153110076
 <160> 20
 <170> Patent In version 3.3

<210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> CDRL1
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (7).. (7)
 <223> Xaa=Ile或Val或Met
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (11).. (11)
 <223> Xaa=Tyr或Lys或Arg或Leu
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (13).. (13)
 <223> Xaa=Ser或Gly或Ala
 <400> 1
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Xaa Gly Ser Asn Xaa Val Xaa
 1 5 10

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> CDRL2
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa=Asn或Thr
 <400> 2
 Asp Xaa Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> CDRL3
 <220>
 <221> VARIANT

<222> (3).. (3)
 <223> Xaa=Asn或Ser或Ala
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa=Ala或Met或Leu
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa=Ser或Gly或Ala
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (9).. (9)
 <223> Xaa=Glu或Met或Lys或Asp或Thr或Ala或Gly
 <400> 3
 Gln Ser Xaa Asp Xaa Xaa Leu Val Xaa
 1 5

<210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> CDRH1
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa=Tyr或Gly或Leu或Val或Met或Ala
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (3).. (3)
 <223> Xaa=Ala或Ser或Gly
 <400> 4
 Ser Xaa Xaa Met Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> CDRH2
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (10).. (10)
 <223> Xaa=Tyr或Asn或Leu或Ile或Met或Val
 <400> 5
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> CDRH3
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2).. (2)
 <223> Xaa=Tyr或Trp或Ser或Pro或Ala
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (4).. (4)
 <223> Xaa=Phe或Leu或Met
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa=Tyr或Val或Pro或Phe或Ala
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (6).. (6)
 <223> Xaa=Thr或Ala或Gly或Asn

<400> 6
 Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Ser Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 轻链可变区
 <400> 7
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Asp Ala Ser Leu
 85 90 95
 Val Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

100

105

110

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> 重链可变区

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Tyr Thr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 336

<212> DNA

<213> 轻链可变区

<400> 9

cagagcgttc tgactcaacc tccgtctgtt tctggtgcac cgggtcaacg tgttactatt 60

agctgctctg gcagctctag caatattggg agtaactatg ttagctggta tcagcaactg 120

ccgggtactg caccgaaact gctgatttat gataataacc agcgccectc aggtgttccg 180

gatcgtttta gtggcagcaa aagcgggtacc agcgcctagtc tggcaattac tgggtctgcaa 240

agcgaggatg aggcgggacta ttactgccag tcgaatgatg ccagcctggg tgaggtgttt 300

ggcgggtggca ccaagcttac cgtctaggt cagecc 336

<210> 10

<211> 357

<212> DNA

<213> 重链可变区

<400> 10

gaagtgcaat tgggtggaaag cgggtggcggg ctggtgcagc cgggtggcag cctgcgtctg 60

agctgcgcag cgagcggctt cacccttagc agctacgca tgagctgggt gcgccagga 120

ccgggtaaag gtctggaatg ggtgagcgcg attagcggta gcggcggcag cacctactat 180
 gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatc tcgcgtgata actcgaaaaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg tgcggaagat accgcggtgt attattgcgc acgttattat 300
 agtttttata cgtcgttcga ttactggggc cagggcactc tggtgaccgt gtcgagc 357

<210> 11
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 11
 gcgccccctta agggcgtgca gtgcgaagtg caattgggtg aaagc 45

<210> 12
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 12
 cgggtgctagc gctcgacacg gtcaccagag t 31

<210> 13
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 13
 cgcgtgtaca ggaagctggg ccgatatcgt tctgactcaa cctc 44

<210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<400> 14
 cggtaagctt ggtgccaccg ccaaacac 28

<210> 15
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> AIA22单链抗体氨基酸序列

<400> 15
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30
 Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Asn Asp Ala Ser Leu
 85 90 95
 Val Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Ser Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser
 115 120 125
 Ser Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 145 150 155 160
 Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 165 170 175
 Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 180 185 190
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 195 200 205
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Ser Phe Tyr Thr Ser Phe Asp Tyr Trp
 225 230 235 240
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 245 250

<210> 16

<211> 750

<212> DNA

<213> AIA22 单链抗体核苷酸序列

<400> 16

cagagcgttc tgactcaacc tccgtctgtt tctggtgcac cgggtcaacg tgttactatt 60
 agctgctctg gcagctctag caatattggt agtaactatg ttagctggta tcagcaactg 120
 ccgggtactg caccgaaact gctgatttat gataataacc agcgccttc aggtgttcgc 180
 gatcgtttta gtggcagcaa aagecgtacc agcgetagtc tggcaattac tggctctgcaa 240
 agcgaggatg aggcggacta ttactgccag tcgaatgatg ccagcctggt tgaggtgttt 300
 ggcggtggca ccaaactgac cgtgctgggc agcggcggct cgaccataac ttcgtataat 360
 gtatactata cgaagttatc gagctcgggc agcgaagtgc aattggtgga aagecgtggc 420
 ggtctggtgc agccgggtgg cagcctgcgt ctgagctgcg cagcgagcgg cttcaccttt 480
 agcagctacg cgatgagctg ggtgcgccag gcaccgggta aaggtctgga atgggtgagc 540
 gcgattagcg gtagcggcgg cagcacctac tatgcggata gcgtgaaagg ccgtttttacc 600

atctcgcgtg ataactcgaa aaacaccctg tacctgcaga tgaacagcct gcgtgcggaa 660
gataccgcgg tgtattattg cgcacgttat tatagttttt atacgtcgtt cgattactgg 720
ggtcagggca ctctggtgac cgtgtcgagc 750

<210> 17

<211> 360

<212> DNA

<213> 合成的Sifalimumab轻链可变区

<400> 17

cgcgtctaga ggcgaaattg tgttgacgca gtctccaggc accctgtctt tgtctccagg 60
ggaaagagcc accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagcacct acttagcctg 120
gtaccagcag aaacctggcc aggtctccag gctcctcatc tatggtgcat ccagcagggc 180
cactggcate ccagacaggt tcagtggcag tgggtctggg acagacttca ctctcaccat 240
cagcagactg gagcctgaag attttgcagt gtattactgt cagcagtatg gtagctcacc 300
tcggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgc accgtggcgg cgccagcgcc 360

<210> 18

<211> 360

<212> DNA

<213> 合成的Sifalimumab重链可变区

<400> 18

cgcgtctaga ggcgaaattg tgttgacgca gtctccaggc accctgtctt tgtctccagg 60
ggaaagagcc accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagcacct acttagcctg 120
gtaccagcag aaacctggcc aggtctccag gctcctcatc tatggtgcat ccagcagggc 180
cactggcate ccagacaggt tcagtggcag tgggtctggg acagacttca ctctcaccat 240
cagcagactg gagcctgaag attttgcagt gtattactgt cagcagtatg gtagctcacc 300
tcggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgc accgtggcgg cgccagcgcc 360

<210> 19

<211> 215

<212> PRT

<213> 合成的Sifalimumab轻链

<400> 19

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 Thr
20 25 30
Tyr Leu 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 Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 20

<211> 446

<212> PRT

<213> 合成的Sifalimumab重链

<400> 20

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

权 利 要 求 书

1、一种人源抗人 IFN- α 抗体，其特征在于，其轻链包含以下 CDR 氨基酸序列，CDRL1 序列如 SEQ ID NO.1 所示，CDRL2 序列如 SEQ ID NO.2 所示，CDRL3 序列如 SEQ ID NO.3 所示。

2、如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，其重链 CDR3 含有如 SEQ ID NO.6 所示的氨基酸序列。

3、如权利要求 1 所述的抗体，其特征在于，其重链可变区包含以下 CDR 氨基酸序列，CDRH1 序列如 SEQ ID NO.4 所示，CDRH2 序列如 SEQ ID NO.5 所示，CDRH3 序列如 SEQ ID NO.6 所示。

4、如权利要求 1~3 任一所述的抗体，其特征在于，其轻链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。

5、如权利要求 1~3 任一所述的抗体，其特征在于，其重链可变区氨基酸序列如 SEQ ID NO.8 所示。

6、如权利要求 1~3 任一所述的抗体，其特征在于，其轻链可变区和重链可变区氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.7 和 SEQ ID NO.8 所示。

7、如权利要求 1~6 任一所述的抗体，其特征在于，其为单链抗体、Fab、微型抗体、嵌合抗体或全抗体免疫球蛋白 IgG1、IgG2、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD。

8、编码权利要求 1~7 任一项所述抗体的基因。

9、如权利要求 8 所述的基因，其特征在于，编码轻链可变区的基因为如下 1)、2) 或 3) 所示：

1) 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示；

2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码所述轻链的 DNA 分子；

3) 与 1) 限定的 DNA 序列具有 70% 以上的同源性且编码所述轻链可变区的 DNA 分子。

10、如权利要求 8 所述的基因，其特征在于，编码重链可变区的基因为如下 1)、2) 或 3) 所示：

1) 其核苷酸序列如 SEQ ID NO.10 所示；

2) 在严格条件下与 1) 限定的 DNA 序列杂交且编码所述重链的 DNA 分子；

3) 与 1) 限定的 DNA 序列具有 70% 以上的同源性且编码所述重链可变区的 DNA 分子。

11、含有权利要求 8~10 任一所述基因的表达载体。

12、含有权利要求 11 所述表达载体的宿主菌、宿主细胞或表达盒。

13、制备权利要求 1~7 任一项所述抗体的方法，其特征在于，利用噬菌体展示抗体

库技术筛选抗 IFN- α 特异性单链抗体，获得抗体轻重链可变区基因，并将其克隆入全抗体表达载体，通过哺乳动物表达系统对其进行全抗体表达，获得其全抗体蛋白。

14、如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述的抗体轻、重链可变区基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 和 SEQ ID NO.10 所示。

15、一种抗体靶向药物分子，其特征在于，包含连接于化学分子、放射性同位素、多肽分子、毒素或生物大分子的权利要求 1~7 任一所述的抗体。

16、如权利要求 15 所述的抗体靶向分子，其特征在于，连接方式为抗体被标记、体外交联或分子偶联。

17、一种双特异性或多特异性分子，其特征在于，包含权利要求 1~7 任一项抗体或抗体的抗原结合部位。

18、一种抗体与其他蛋白或/和多肽的融合蛋白，其特征在于，包含权利要求 1~7 之任一项抗体和功能性蛋白或多肽分子的复合物。

19、如权利要求 18 所述的融合蛋白，其特征在于，将抗体基因与免疫毒素或细胞因子基因连接构建重组表达载体，通过哺乳动物细胞或其他表达系统获得重组融合蛋白分子。

20、含有权利要求 1~7 任一项所述抗体的药物、制剂或检测试剂。

21、权利要求 1~7 任一项所述抗体在制备以 IFN α 为靶标的疾病治疗药物中的应用。

22、如权利要求 21 所述的应用，其特征在于，所述的疾病为系统性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病、自身免疫性甲状腺炎、银屑病、多肌炎、皮肌炎、硬化病、类风湿性关节炎等。

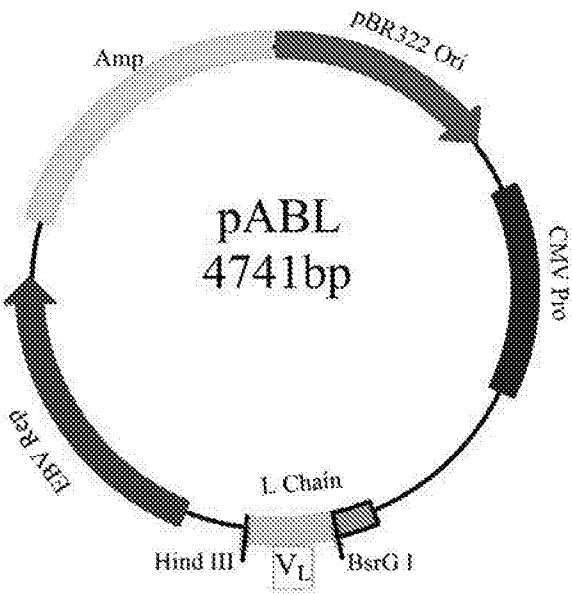


图 1A

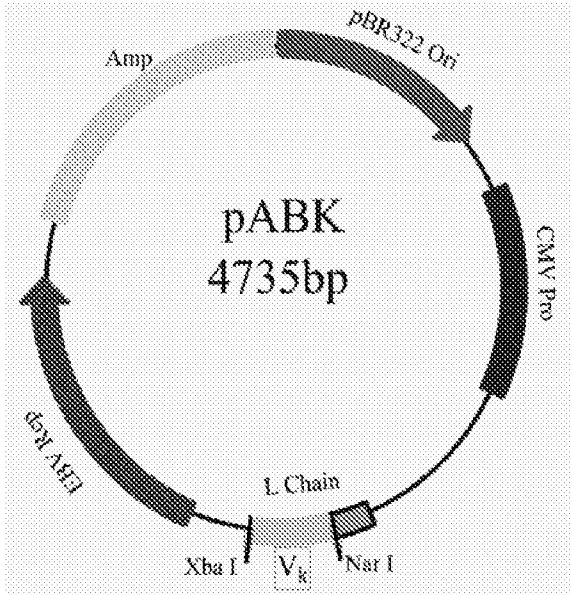


图 1B

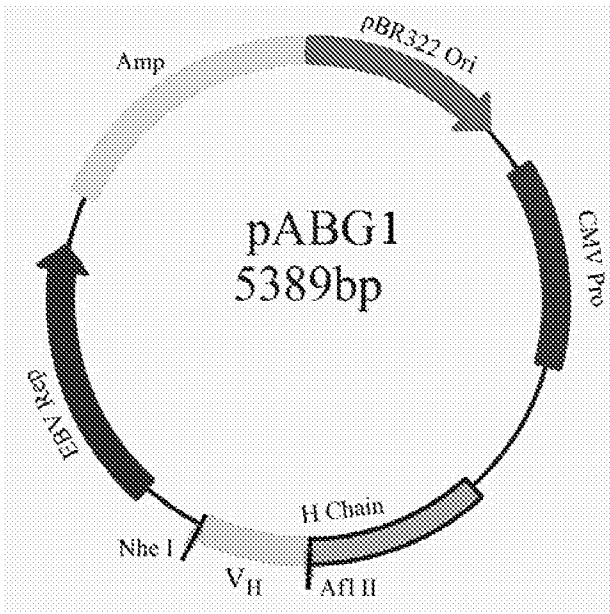


图 1C

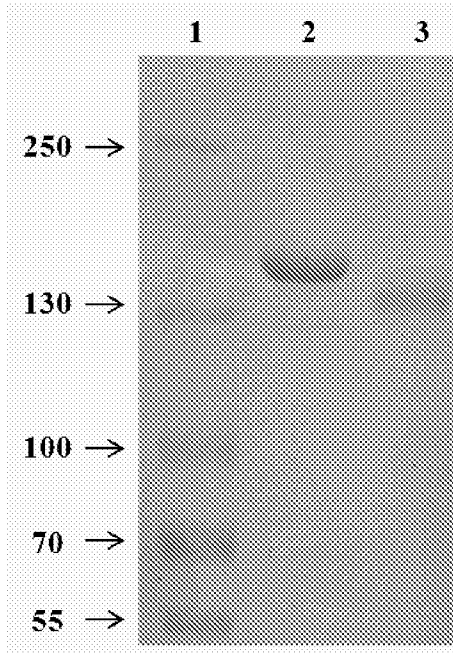


图 2

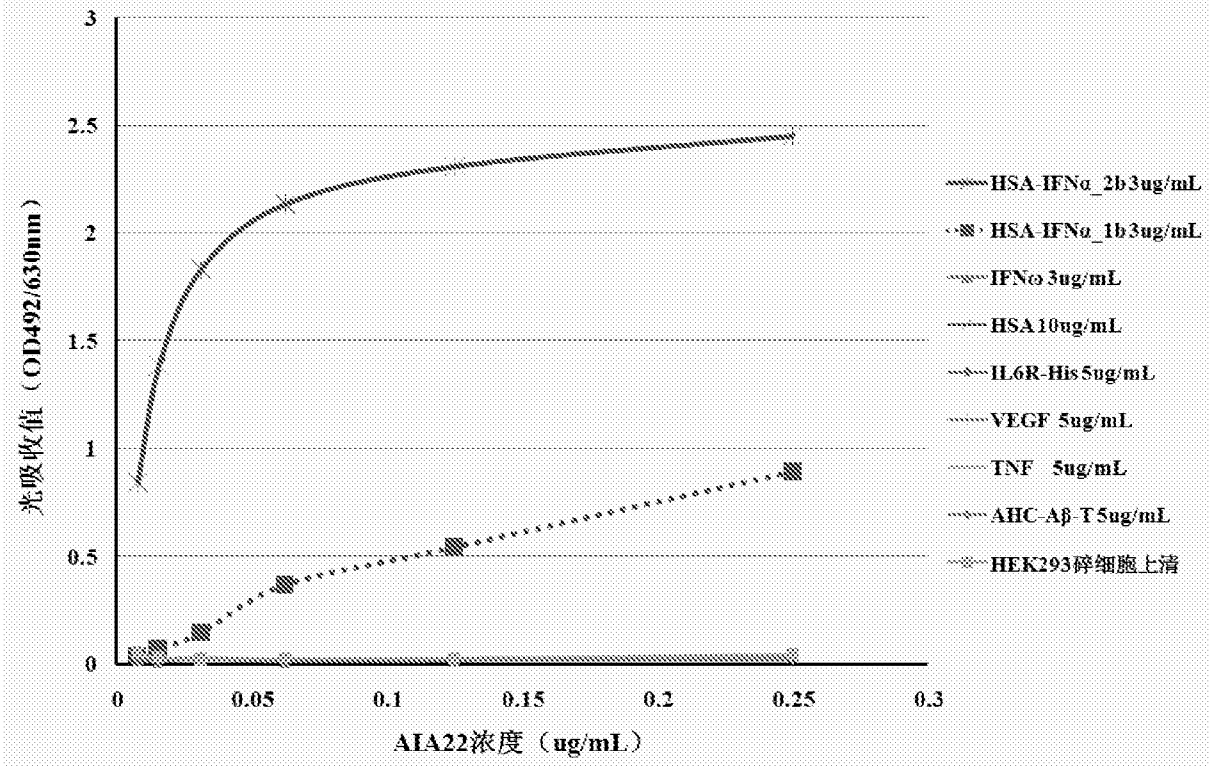


图 3

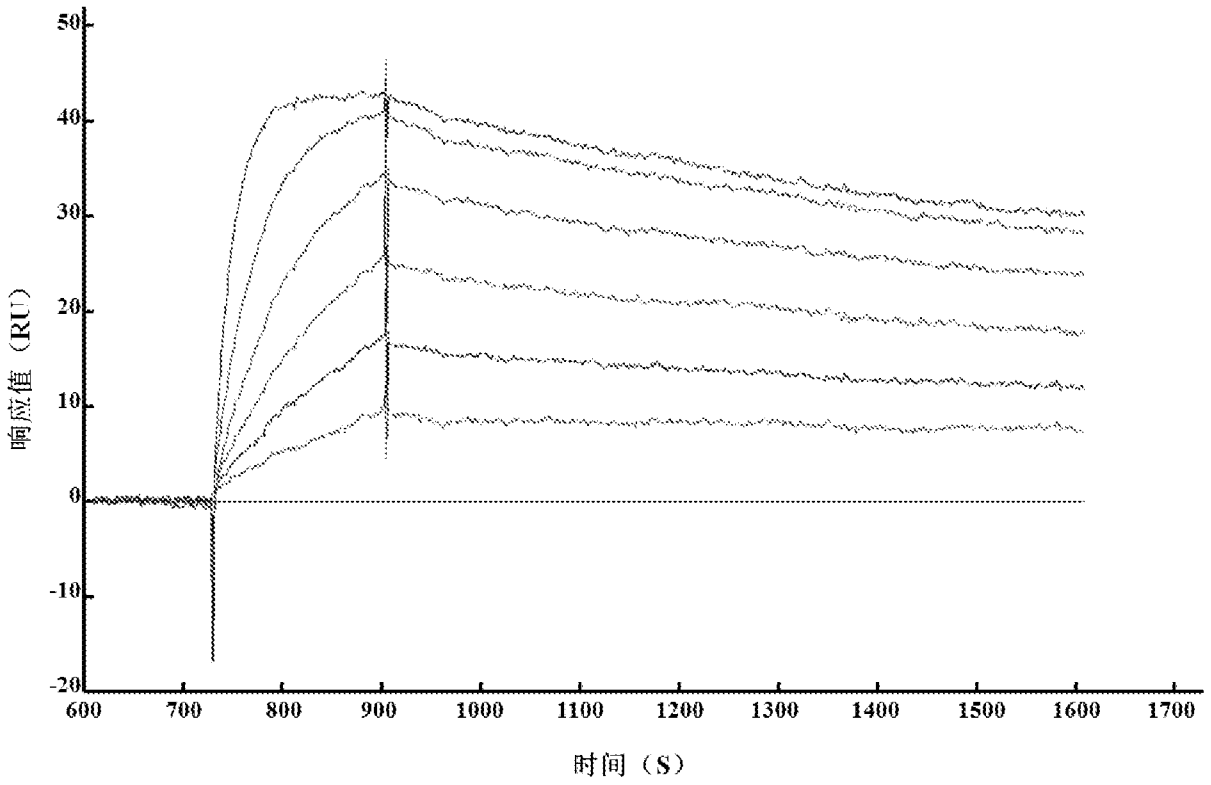


图 4A

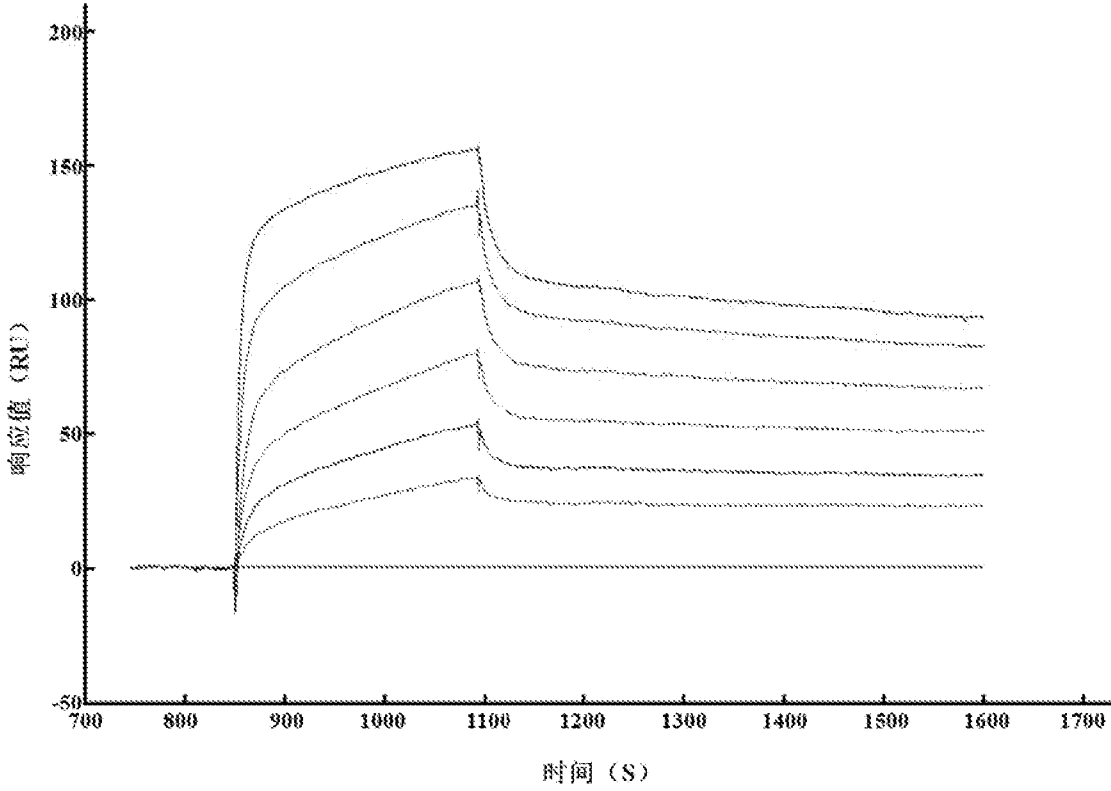


图 4B

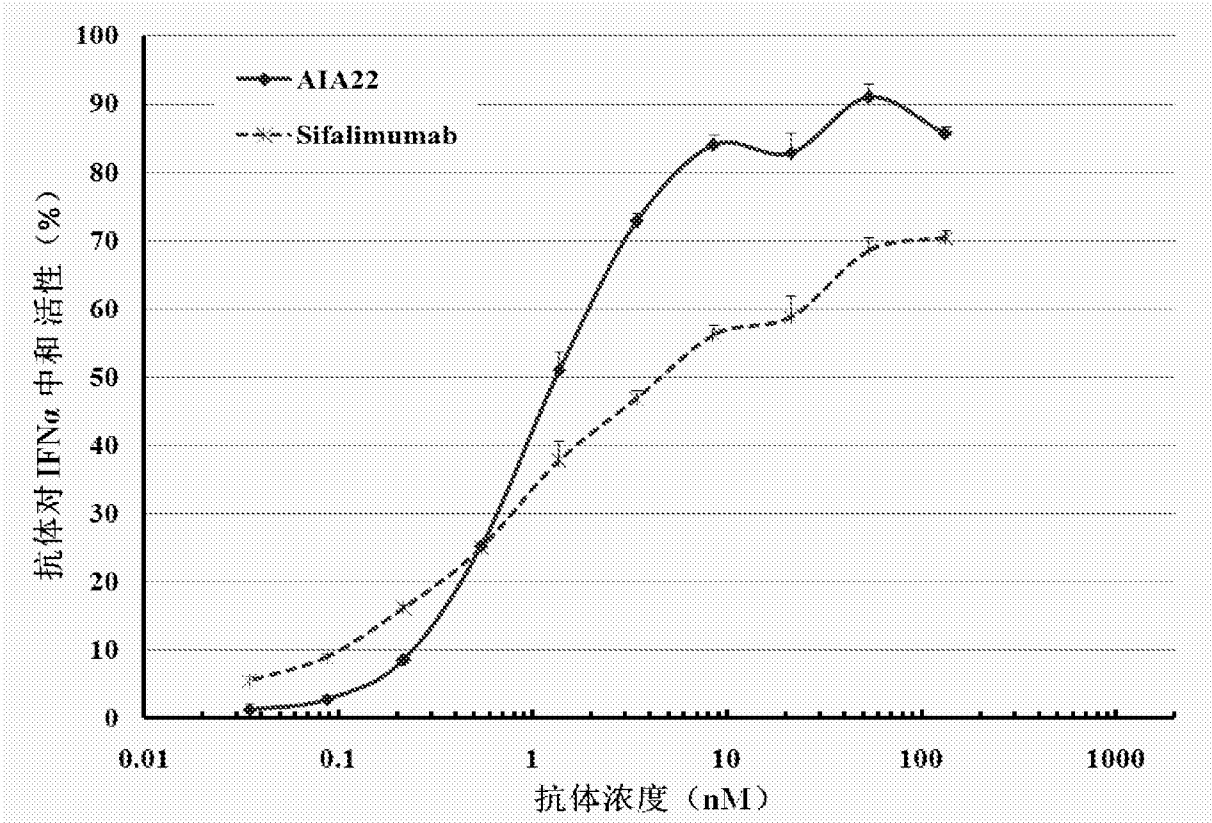


图 5

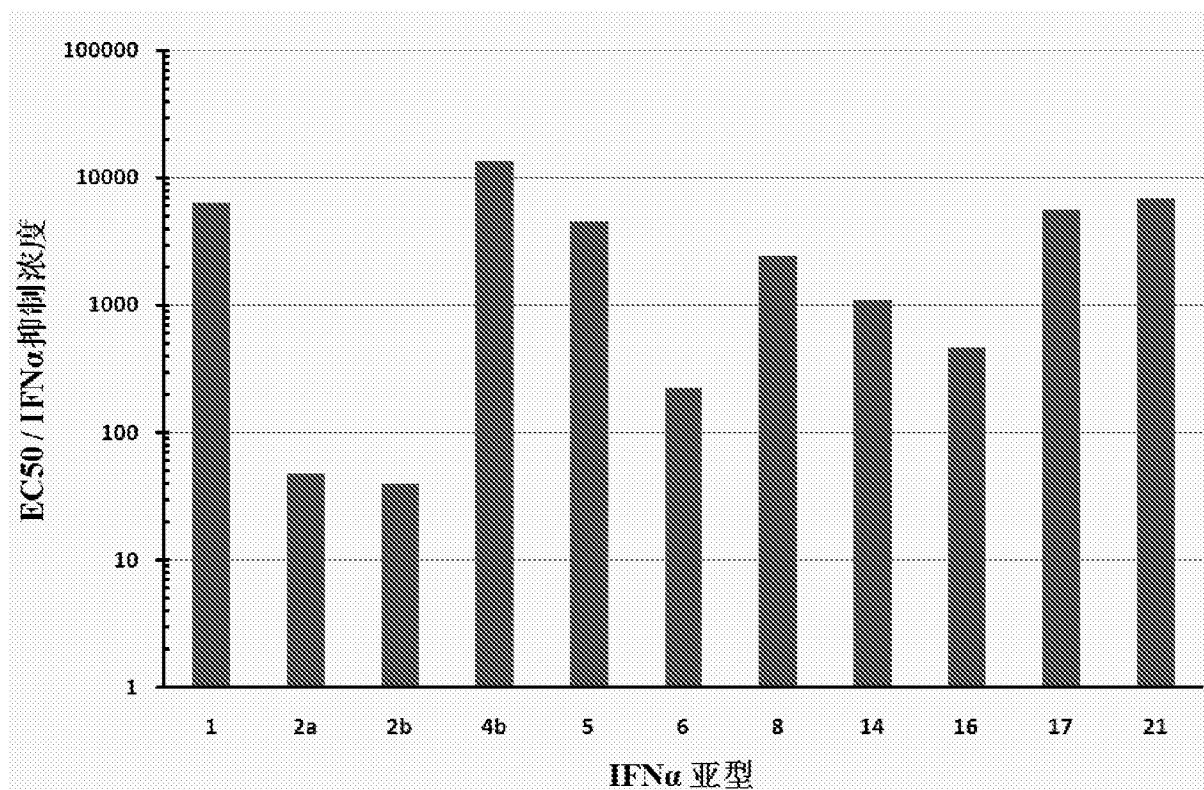


图 6

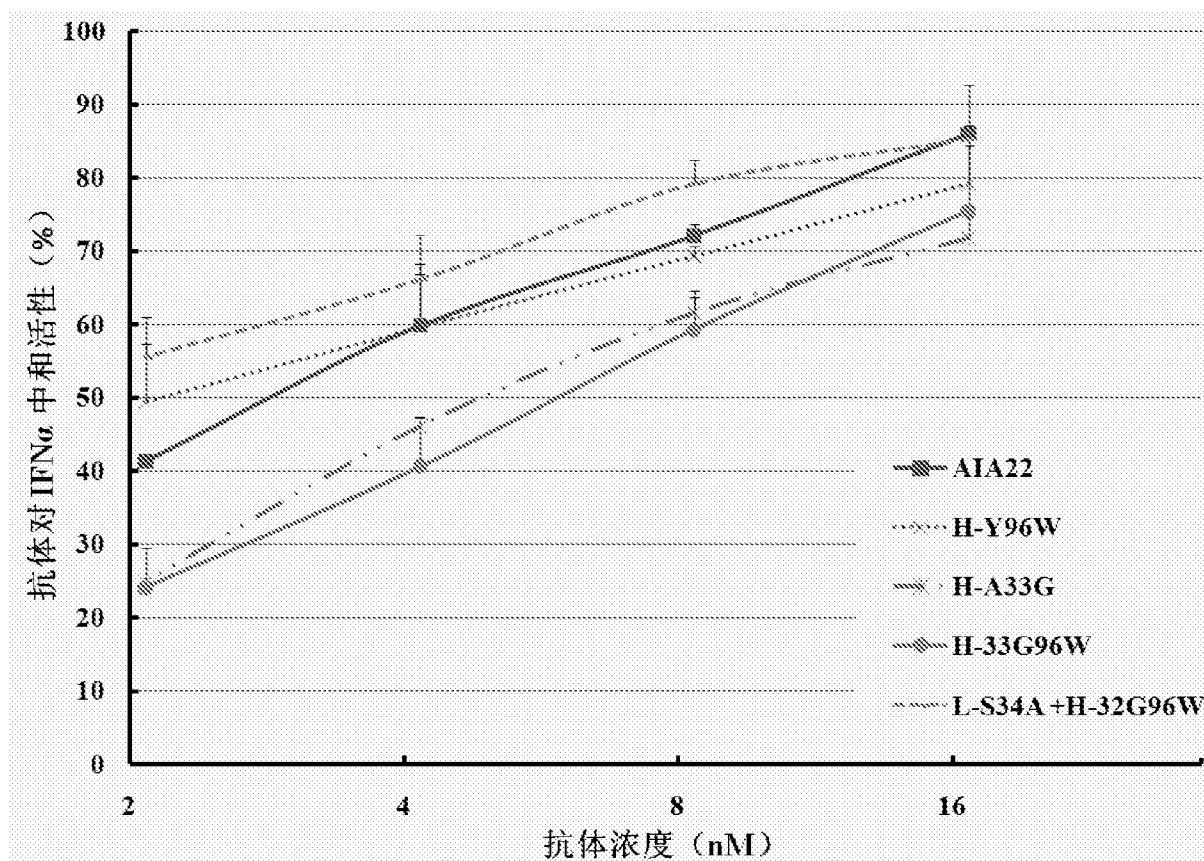


图 7A

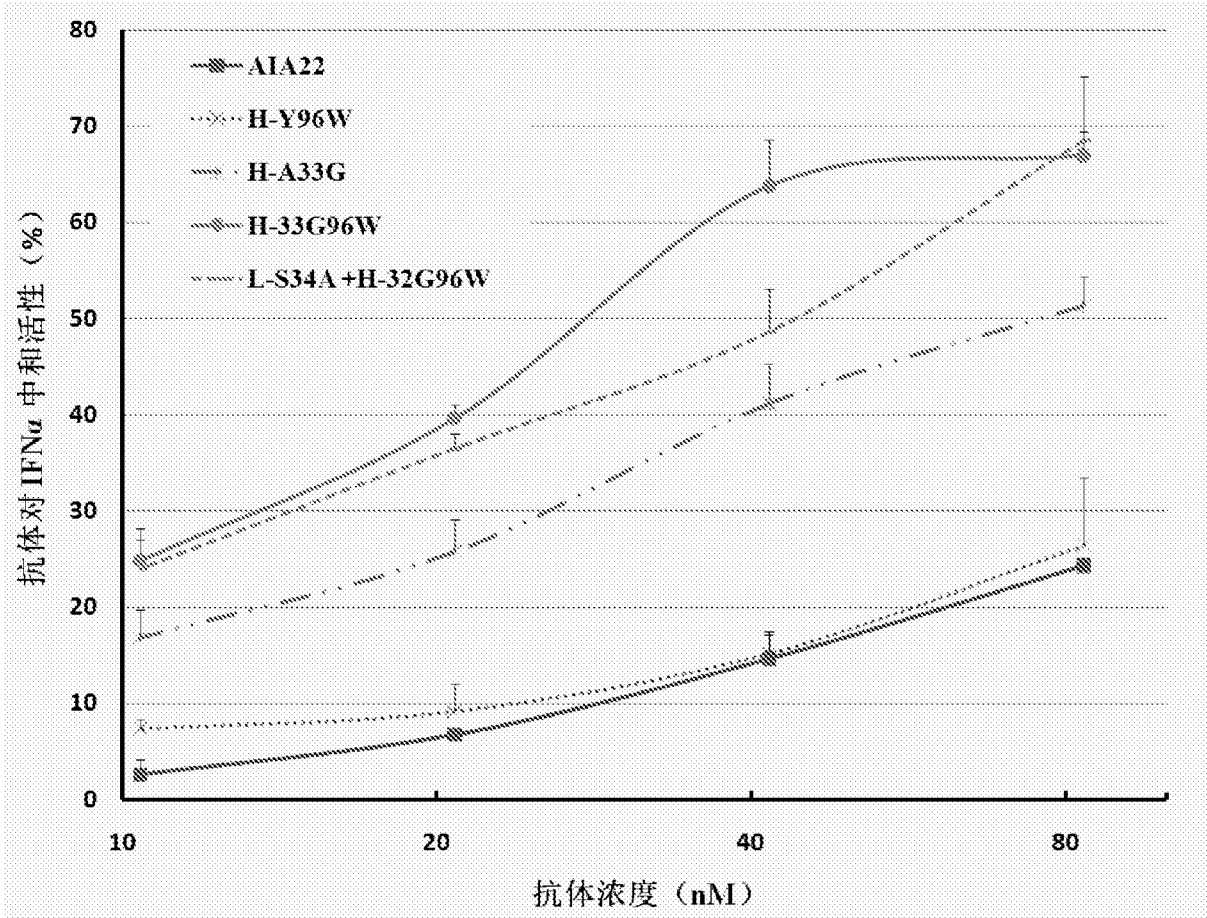


图 7B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/070625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/24 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/85 (2006.01) i; C07K 19/00 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 37/02 (2006.01) i; A61P 19/02 (2006.01) i; A61P 17/00 (2006.01) i; A61P 21/00 (2006.01) i; A61P 3/10 (2006.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNPAT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, CA, ELSEVIER, EMBASE and searched terms: IFN, IFN- α , IFN α , interferon, alpha, antibod+ et al. ;

GENBANK;EMBL; Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched sequence: sequence ID NOs: 1-10

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102344491 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 08 February 2012 (08.02.2012) claims 1-54, description, paragraphs [0009]-[0058]	1, 2, 4, 7-13, 15-22
A	CN 102344491 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.) 08 February 2012 (08.02.2012) claims 1-54, description, paragraphs [0009]-[0058]	3, 5, 6, 14
X	CN 1492930 A (GENENTECH INC.) 28 April 2004 (28.04.2004) claims 1-54	1, 2, 4, 7-13, 15-22
A	CN 1492930 A (GENENTECH INC.) 28 April 2004 (28.04.2004) claims 1-54	3, 5, 6, 14
X	WU, Meiyong et al., Preparation and application of monoclonal antibodies to recombinant human IFN- α , Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 30 September 2002(30.09.2002), no.3, vol. 16, the abstract	1, 2, 4, 7-13, 15-22
A	WU, Meiyong et al., Preparation and application of monoclonal antibodies to recombinant human IFN- α , Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 30 September 2002(30.09.2002), no.3, vol. 16, the abstract	3, 5, 6, 14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 12 October 2015	Date of mailing of the international search report 19 October 2015
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YUE, Lixi Telephone No. (86-10) 62411096

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/070625

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/070625

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102344491 A	08 February 2012	JP 2007513633 A	31 May 2007
		US 8025882 B2	27 September 2011
		JP 2011097943 A	19 May 2011
		KR 101151477 B1	22 June 2012
		EP 1711207 B1	28 November 2012
		US 7741449 B2	22 June 2010
		PT 1711207 E	13 February 2013
		KR 20110140137 A	30 December 2011
		SI 1711207 T1	31 July 2013
		IL 175586 D0	05 September 2006
		DK 1711207 T3	11 March 2013
		US 8475797 B2	02 July 2013
		CA 2546054 C	13 May 2014
		AU 2004299833 B2	07 May 2009
		CA 2546054 A1	30 June 2005
		HK 1095765 A1	23 August 2013
		EP 1711207 A4	07 May 2008
		US 2007014724 A1	18 January 2007
		US 2013254912 A1	26 September 2013
		US 2014199328 A1	17 July 2014
		CN 102344491 B	11 March 2015
		CN 1889978 A	03 January 2007
		IL 175586 A	28 November 2013
		AU 2009206187 B2	12 July 2012
		ES 2399050 T3	25 March 2013
		EP 1711207 A2	18 October 2006
		WO 2005059106 A2	30 June 2005
		AU 2004299833 A1	30 June 2005
		KR 20070011243 A	24 January 2007
		WO 2005059106 A3	09 February 2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/070625

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1492930 A	28 April 2004	US 8722870 B2	13 May 2014
		US 2009324605 A1	31 December 2009
		US 2011300145 A1	08 December 2011
		EP 2418220 A2	15 February 2012
		JP 5047626 B2	10 October 2012
		NZ 547157 A	31 July 2009
		EP 2418220 A3	19 December 2012
		AU 2009206187 A1	27 August 2009
		KR 101225299 B1	24 January 2013
		AU 2002306432 C1	04 September 2002
		DK 2065467 T3	25 November 2013
		US 2011268727 A1	03 November 2011
		WO 02066649 A8	06 November 2003
		EP 2065467 B1	23 October 2013
		KR 100940968 B1	08 February 2010
		SI 2065467 T1	31 January 2014
		JP 2009131257 A	18 June 2009
		EP 2292301 B1	12 March 2014
		CN 102993303 A	27 March 2013
		IL 157170 D0	08 February 2004
		KR 20100095641 A	31 August 2010
		EP 1362105 A2	19 November 2003
		HK 1149567 A1	12 July 2013
		ES 2436787 T3	07 January 2014
		DK 2065467 T5	30 June 2014
		JP 5349018 B2	20 November 2013
		KR 20030081461 A	17 October 2003
		US 8557967 B2	15 October 2013
		US 2007059309 A1	15 March 2007
		MXPA 03007529 A	11 December 2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/070625

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		AU 2002306432 C9	04 September 2002
		AU 2006252117 A1	11 January 2007
		US 2013084295 A1	04 April 2013
		DK 1362105 T3	12 March 2012
		KR 101413907 B1	30 June 2014
		KR 20090107095 A	12 October 2009
		ES 2378062 T3	04 April 2012
		SI 1362105 T1	30 March 2012
		IL 157170 A	30 November 2010
		JP 2012245008 A	13 December 2012
		EP 2301629 A2	30 March 2011
		AU 2011200707 A1	10 March 2011
		AU 2002306432 B2	14 September 2006
		RU 2003128365 A	20 January 2005
		WO 02066649 A2	29 August 2002
		US 2007048311 A1	01 March 2007
		EP 2065467 A2	03 June 2009
		EP 2301629 A3	02 May 2012
		EP 2292301 A3	07 March 2012
		US 2003166228 A1	04 September 2003
		WO 02066649 A3	03 April 2003
		RU 2314317 C2	10 January 2008
		ES 2461148 T3	16 May 2014
		KR 20110066232 A	16 June 2011
		EP 2292301 A2	09 March 2011
		EP 2065467 A3	02 September 2009
		US 2012244148 A1	27 September 2012
		CN 101857636 B	10 October 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/070625

A. 主题的分类

C07K 16/24(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i;
A61K 39/395(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 19/02(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61P
21/00(2006.01)i; A61P 3/10(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI; CNPAT和检索词: IFN, IFN- α , IFN α , interferon, 抗体等; DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT;
CA; ELSEVIER; EMBASE和检索词: IFN, IFN- α , IFN α , interferon, alpha, antibod+等; GENBANK; EMBL; 中国专
利生物序列检索系统和检索的序列: 序列1-10

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102344491 A (米德列斯公司) 2012年 2月 8日 (2012 - 02 - 08) 权利要求1-54、说明书第9-58段	1-2, 4, 7-13, 15-22
A	CN 102344491 A (米德列斯公司) 2012年 2月 8日 (2012 - 02 - 08) 全文	3, 5-6, 14
X	CN 1492930 A (基因技术股份有限公司) 2004年 4月 28日 (2004 - 04 - 28) 权利要求1-54	1-2, 4, 7-13, 15-22
A	CN 1492930 A (基因技术股份有限公司) 2004年 4月 28日 (2004 - 04 - 28) 全文	3, 5-6, 14
X	吴美英等. "重组人 α 干扰素单克隆抗体的研制及其应用" 中华实验和临床病毒学杂志, 第16卷, 第3期, 2002年 9月 30日 (2002 - 09 - 30), 摘要	1-2, 4, 7-13, 15-22
A	吴美英等. "重组人 α 干扰素单克隆抗体的研制及其应用" 中华实验和临床病毒学杂志, 第16卷, 第3期, 2002年 9月 30日 (2002 - 09 - 30), 摘要	3, 5-6, 14

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 10月 12日

国际检索报告邮寄日期

2015年 10月 19日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

岳礼溪

电话号码 (86-10)62411096

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. (提交时间)

☒ 含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/070625

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102344491	A	2012年 2月 8日	JP	2007513633	A	2007年 5月 31日
				US	8025882	B2	2011年 9月 27日
				JP	2011097943	A	2011年 5月 19日
				KR	101151477	B1	2012年 6月 22日
				EP	1711207	B1	2012年 11月 28日
				US	7741449	B2	2010年 6月 22日
				PT	1711207	E	2013年 2月 13日
				KR	20110140137	A	2011年 12月 30日
				SI	1711207	T1	2013年 7月 31日
				IL	175586	D0	2006年 9月 5日
				DK	1711207	T3	2013年 3月 11日
				US	8475797	B2	2013年 7月 2日
				CA	2546054	C	2014年 5月 13日
				AU	2004299833	B2	2009年 5月 7日
				CA	2546054	A1	2005年 6月 30日
				HK	1095765	A1	2013年 8月 23日
				EP	1711207	A4	2008年 5月 7日
				US	2007014724	A1	2007年 1月 18日
				US	2013254912	A1	2013年 9月 26日
				US	2014199328	A1	2014年 7月 17日
				CN	102344491	B	2015年 3月 11日
				CN	1889978	A	2007年 1月 3日
				IL	175586	A	2013年 11月 28日
				AU	2009206187	B2	2012年 7月 12日
				ES	2399050	T3	2013年 3月 25日
				EP	1711207	A2	2006年 10月 18日
				WO	2005059106	A2	2005年 6月 30日
				AU	2004299833	A1	2005年 6月 30日
				KR	20070011243	A	2007年 1月 24日
				WO	2005059106	A3	2006年 2月 9日
				US	8722870	B2	2014年 5月 13日
				US	2009324605	A1	2009年 12月 31日
				US	2011300145	A1	2011年 12月 8日
				EP	2418220	A2	2012年 2月 15日
				JP	5047626	B2	2012年 10月 10日
				NZ	547157	A	2009年 7月 31日
				EP	2418220	A3	2012年 12月 19日
				AU	2009206187	A1	2009年 8月 27日
				KR	101225299	B1	2013年 1月 24日
CN	1492930	A	2004年 4月 28日	AU	2002306432	C1	2002年 9月 4日
				DK	2065467	T3	2013年 11月 25日
				US	2011268727	A1	2011年 11月 3日
				WO	02066649	A8	2003年 11月 6日
				EP	2065467	B1	2013年 10月 23日
				KR	100940968	B1	2010年 2月 8日
				SI	2065467	T1	2014年 1月 31日
				JP	2009131257	A	2009年 6月 18日
				EP	2292301	B1	2014年 3月 12日
				CN	102993303	A	2013年 3月 27日
				IL	157170	D0	2004年 2月 8日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/070625

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		KR 20100095641 A	2010年 8月 31日
		EP 1362105 A2	2003年 11月 19日
		HK 1149567 A1	2013年 7月 12日
		ES 2436787 T3	2014年 1月 7日
		DK 2065467 T5	2014年 6月 30日
		JP 5349018 B2	2013年 11月 20日
		KR 20030081461 A	2003年 10月 17日
		US 8557967 B2	2013年 10月 15日
		US 2007059309 A1	2007年 3月 15日
		MX PA03007529 A	2003年 12月 11日
		AU 2002306432 C9	2002年 9月 4日
		AU 2006252117 A1	2007年 1月 11日
		US 2013084295 A1	2013年 4月 4日
		DK 1362105 T3	2012年 3月 12日
		KR 101413907 B1	2014年 6月 30日
		KR 20090107095 A	2009年 10月 12日
		ES 2378062 T3	2012年 4月 4日
		SI 1362105 T1	2012年 3月 30日
		IL 157170 A	2010年 11月 30日
		JP 2012245008 A	2012年 12月 13日
		EP 2301629 A2	2011年 3月 30日
		AU 2011200707 A1	2011年 3月 10日
		AU 2002306432 B2	2006年 9月 14日
		RU 2003128365 A	2005年 1月 20日
		WO 02066649 A2	2002年 8月 29日
		US 2007048311 A1	2007年 3月 1日
		EP 2065467 A2	2009年 6月 3日
		EP 2301629 A3	2012年 5月 2日
		EP 2292301 A3	2012年 3月 7日
		US 2003166228 A1	2003年 9月 4日
		WO 02066649 A3	2003年 4月 3日
		RU 2314317 C2	2008年 1月 10日
		ES 2461148 T3	2014年 5月 16日
		KR 20110066232 A	2011年 6月 16日
		EP 2292301 A2	2011年 3月 9日
		EP 2065467 A3	2009年 9月 2日
		US 2012244148 A1	2012年 9月 27日
		CN 101857636 B	2012年 10月 10日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)