



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102993303 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 27

(21) 申请号 201210344864. 6

(22) 申请日 2002. 01. 29

(30) 优先权数据

60/270, 775 2001. 02. 22 US

10/044, 896 2002. 01. 09 US

(62) 分案原申请数据

02805351. 6 2002. 01. 29

(83) 生物保藏信息

ATCC PTA-2880 2001. 01. 09

ATCC PTA-2881 2001. 01. 09

ATCC PTA-2882 2001. 01. 09

ATCC PTA-2883 2001. 01. 09

ATCC PTA-2917 2001. 01. 18

(71) 申请人 基因技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A. 春塔拉帕伊 J. K. 金

L. G. 普雷斯塔 T. 斯图尔特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

C07K 16/24 (2006. 01)

C12N 15/13 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 1/19 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

C12N 5/20 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

A61P 3/10 (2006. 01)

A61P 5/14 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 46 页

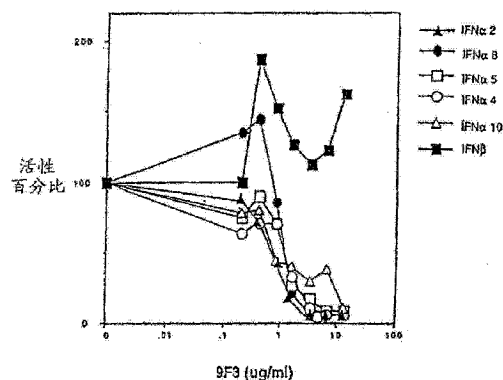
序列表 4 页 附图 6 页

(54) 发明名称

抗-干扰素 α 的抗体

(57) 摘要

本发明涉及抗-干扰素 α 的抗体, 更具体地, 本发明总体上涉及产生和特征鉴定对各种 IFN α 亚型具有广泛反应活性的中和性抗-IFN α 单克隆抗体。本发明还涉及这种抗-IFN- α 抗体在诊断和治疗与 IFN- α 表达增高有关的疾病, 特别是自身免疫性疾病, 如胰岛素依糖性糖尿病 (1DDM) 和全身性红斑狼疮中的应用。

mAb 9F3 对 INF- α 活性的中和作用

1. 一种抗 IFN- α 单克隆抗体, 该抗体与至少 IFN- α 亚型: IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10 和 IFN- α 21 结合并中和其生物活性。
2. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体为鼠抗体。
3. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体为人源化抗体。
4. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体为人抗体。
5. 如权利要求 1 所述的抗体, 其中所述生物活性为抗病毒活性。
6. 如权利要求 5 所述的抗体, 其中所述抗体能中和所述 IFN- α 诸亚型至少 70% 的抗病毒活性。
7. 如权利要求 5 所述的抗体, 其中所述抗体能中和所述 IFN- α 诸亚型至少 80% 的抗病毒活性。
8. 如权利要求 5 所述的抗体, 其中所述抗体能中和所述 IFN- α 诸亚型至少 90% 的抗病毒活性。
9. 如权利要求 5 所述的抗体, 其中所述抗体能中和所述 IFN- α 诸亚型至少 99% 的抗病毒活性。
10. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体能与鼠抗人 IFN- α 单克隆抗体 9F3 或其人源化或嵌合形式结合基本上相同的 IFN- α 表位。
11. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体是鼠抗人 IFN- α 单克隆抗体 9F3 或其人源化或嵌合形式。
12. 如权利要求 11 所述的抗体, 该抗体是人源化的抗人 IFN- α 单克隆抗体 9F3 的版本 13(V13)。
13. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体能与 2001 年 1 月 18 日保藏于 ATCC 的、保藏号为 PTA-2917 的杂交瘤细胞系所产生的抗 IFN- α 抗体结合基本上相同的 IFN- α 表位。
14. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体为 IgG 类。
15. 如权利要求 14. 所述抗体, 该抗体有 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 或 IgG₄ 同种型。
16. 如权利要求 1 所述的抗体, 该抗体为抗体片段。
17. 如权利要求 16 所述的抗体, 该抗体为 Fab 片段。
18. 如权利要求 16 所述的抗体, 该抗体为 F(ab')₂ 片段。
19. 如权利要求 16 所述的抗体, 该抗体为 Fab' 片段。
20. 一种抗 IFN- α 抗体轻链或其片段, 该轻链或其片段含有下列 CDR:
 - (a) 化学式 RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO:7) 的 L1;
 - (b) 化学式 YASNLES (SEQ ID NO:8) 的 L2; 和
 - (c) 化学式 QHSWGIPRTF (SEQ ID NO:9) 的 L3。
21. 如权利要求 20 所述的抗 IFN- α 抗体轻链片段, 该轻链片段为轻链可变结构域。
22. 一种抗 IFN- α 抗体重链或其片段, 该重链或其片段含有下列 CDR:
 - (a) 化学式 GYTFTEYIIH (SEQ ID NO:10) 的 H1;
 - (b) 化学式 SINPDYDITNYNQRFKG (SEQ ID NO:11) 的 H2;
 - (c) 化学式 WISDFFDY (SEQ ID NO:12) 的 H3。
23. 如权利要求 22 所述的抗 IFN- α 抗体重链片段, 该重链片段为重链可变结构域。
24. 一种抗 IFN- α 抗体, 该抗体含有:

(A) 至少一条轻链或其片段,该轻链或其片段含有下列 CDR:

(a) 化学式 RASQSVSTSSYSYMH(SEQ ID NO:7) 的 L1;

(b) 化学式 YASNLES(SEQ ID NO:8) 的 L2;和

(c) 化学式 QHSWGIPRTF(SEQ ID NO:9) 的 L3;和

(B) 至少一条重链或其片段,该重链或其片段含有下列 CDR:

(a) 化学式 GYTFTEYIIH(SEQ ID NO:10) 的 H1;

(b) 化学式 SINPDYDITNYNQRFGK(SEQ ID NO:11) 的 H2;和

(c) 化学式 WISDFFDY(SEQ ID NO:12) 的 H3。

25. 如权利要求 24 所述的抗体,该抗体具有同质四聚体结构,该结构含有两个由二硫键联接的抗体重链-轻链对。

26. 如权利要求 24 所述的抗体,该抗体为线形抗体。

27. 如权利要求 24 所述的抗体,该抗体为鼠抗体。

28. 如权利要求 24 所述的抗体,该抗体为嵌合抗体。

29. 如权利要求 24 所述的抗体,该抗体为人源化抗体。

30. 如权利要求 24 所述的抗体,该抗体为人抗体。

31. 一种分离的核酸分子,该分子编码权利要求 1 所述的抗体。

32. 一种分离的核酸分子,该分子编码权利要求 11 所述的抗体。

33. 一种分离的核酸分子,该分子编码权利要求 12 所述的抗体。

34. 一种分离的核酸分子,该分子编码权利要求 24 所述的抗体。

35. 一种分离的核酸分子,该分子编码权利要求 20 所述的抗体轻链或其轻链片段。

36. 一种分离的核酸分子,该分子编码权利要求 22 所述的抗体重链或其重链片段。

37. 一种分离的核酸分子,该分离的核酸分子含有于 2001 年 1 月 9 日在 ATCC 保存的登录号 PTA-2882 的载体中编码轻链多肽的核酸序列。

38. 一种分离的核酸分子,该分子含有于 2001 年 1 月 9 日在 ATCC 保存的登录号 PTA-2881 的载体中编码重链多肽的核酸序列。

39. 一种载体,该载体含有权利要求 31 至 38 任何一项所述的核酸分子。

40. 一种宿主细胞,该细胞是用权利要求 31 至 38 任何一项所述的核酸分子转化的宿主细胞。

41. 产生如权利要求 1,11,12 和 24 任何一项所述的抗体的方法,该方法包括,在使编码该抗体的核酸序列表达从而产生抗体的条件下,培养含有该核酸序列的宿主细胞。

42. 一种杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞系含有权利要求 31 至 38 任何一项所述的核酸分子。

43. 一种杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞系由 ATCC 于 2001 年 1 月 18 日保存,登录号为 PTA-2917。

44. 一种权利要求 42 所述的杂交瘤细胞系产生的抗体。

45. 一种药物组合物,该药物组合物含有与药学上可接受的载体混合的有效量的权利要求 1 所述的抗体。

46. 一种药物组合物,该药物组合物含有与药学上可接受的运载体混合的有效量的权利要求 11 所述的抗体。

47. 一种药物组合物,该药物组合物含有与药学上可接受的运载体混合的有效量的权利要求 12 所述的抗体。

48. 一种药物组合物,该药物组合物含有与药学上可接受的运载体混合的有效量的权利要求 24 所述的抗体。

49. 一种诊断与细胞内 IFN- α 表达有关的疾病的方法,该方法包括使所述细胞与权利要求 1 所述的抗 IFN- α 抗体接触,并检测 IFN- α 的存在。

50. 一种治疗与患者体内 IFN- α 表达有关的疾病的方法,该方法包括给予所述患者有效量的如权利要求 1 所述的抗 IFN- α 抗体。

51. 如权利要求 50 所述方法,其中所述患者为哺乳动物患者。

52. 如权利要求 51 所述方法,其中所述患者为人。

53. 如权利要求 52 所述方法,其中所述疾病为自身免疫性疾病。

54. 如权利要求 53 所述方法,其中所述疾病选自于胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM);和全身性红斑狼疮 (SLE);和自身免疫性甲状腺炎。

抗-干扰素 α 的抗体

[0001] 本申请是申请日为 2002 年 01 月 29 日、申请号为 02805351.6(国际申请号为 PCT/US02/02709)、发明名称为“抗-干扰素 α 的抗体”的发明申请的分案申请。

[0002] 发明背景

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及中和性抗-IFN- α 单克隆抗体的产生和特性鉴定,这些抗体对各种 IFN- α 亚型具有广谱反应性。本发明还涉及这些抗-IFN- α 抗体在诊断与治疗与 IFN- α 的表达增加相关疾病,特别是自身免疫病如胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 和全身性红斑狼疮 (SLE) 中的应用。

[0004] 相关技术的描述

[0005] 干扰素- α (IFN- α)

[0006] 虽然干扰素最初发现的是它们的抗病毒活性,但随后的研究阐明了与这些强力细胞因子有关的多种调节活性。I 型干扰素形成了一个细胞因子的古老家族,包括: IFN- α , IFN- β , IFN- δ , IFN- ω 以及 IFN- τ (Roberts 等人, J. Interferon Cytokine Res. 18:805-816 [1998])。他们由无内含子的基因编码并且广泛分布于脊椎动物中。其中 IFN- β 在灵长类和啮齿类动物中由单一基因编码,在小鼠和人体中各发现了 10 种和 15 种以上的不同的 IFN- α 亚型。其他 I 型干扰素更有限,比如,猪的 IFN- δ ,牛和羊的 IFN- τ ,牛和人的 IFN- ω 。因此,人 I 型干扰素包括 IFN- α 家族中的多个成员,以及 IFN- β 和 IFN- ω 家族的单个成员。所有 I 型 IFN 看来都只结合一个受体,该受体含有至少两个跨膜蛋白质。另一方面,II 型干扰素由一个成员 IFN- γ 代表,并且结合一个独特的受体。

[0007] 尽管所有的 I 型 IFN,包括 IFN- α ,都显示出抗病毒和抗增殖活性而因此有助于控制病毒感染和肿瘤 (Lefevre 等人, Biochimie 80:779-788 [1998];Horton 等人, Cancer Res. 59:4064-4068 [1999];Alexenko 等人, J. Interferon Cytokine Res. 17:769-779 [1997];Gresser, J. Leukoc. Biol. 61:567-574 [1997]),但也有几种自身免疫疾病与 IFN α 的表达增加有关,最显著的是胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM) 和全身性红斑狼疮 (SLE)。

[0008] I 型糖尿病,也就是自身免疫性糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病 (IDDM),是一种自身免疫疾病,该疾病的特征是自身反应性 T 淋巴细胞所引起的胰腺 β 细胞的选择性破坏 (Bach, Endocr Rev. 15:516-542 [1994];Castano 和 Eisenbarth, Annu. Rev. Immunol. 8:647-679 [1990];Shehadeh 和 Lafferty, Diabetes Rev. 1:141-151 [1993])。IDDM 的病理学非常复杂,涉及遗传易感性宿主中的后生事件 (可能是病毒感染),胰腺 β 细胞和免疫系统之间的相互反应。许多细胞因子,包括 IFN- α 和 IFN- γ ,参与了人体与此病动物模型中的 IDDM 病理过程 (Campbell 等人, J. Clin. Invest. 87:739-742 [1991];Huang 等人, Diabetes 44:658-664 [1995];Rhodes 和 Taylor, Diabetologia 27:601-603 [1984])。例如,已有报告说患 IDDM 病人的 β 细胞内存在胰 Ifn- α mRNA 表达和免疫反应性 IFN- α (Foulis 等人, Lancet 2:1423-1427 [1987];Huang 等人, [1995] 同上;Somoza 等人, J. Immunol. 153:1360-1377 [1994])。IFN- α 表达与人胰岛内主要组织相容性复合

物 (MHC) I_A 类抗原的高表达有关 (Foulis 等人 [1987] 同上; Somoza 等人 [1994] 同上)。在自身免疫性糖尿病的两种啮齿动物模型 (易于患糖尿病的 DPBB 大鼠和链唑霉素处理的小鼠) 中, 胰岛内 Ifn- α mRNA 的表达先于胰岛炎和糖尿病 (Huang 等人, Immunity 1:469-478 [1994])。此外携带杂合性人胰岛素启动子 -Ifn- α 构建物的转基因小鼠发生了伴有胰岛炎的 1 型糖尿病 (Stewart 等人, Science 260:1942-1946 [1993])。

[0009] 看来胰岛细胞在对潜在的致糖尿病性刺激如病毒的反应中局部表达的 IFN- α 可激发胰岛炎过程。与 IFN- α 作为始动因素的作用相一致, 已显示它能诱导人胰岛内皮细胞产生细胞间粘附分子-1 (ICAM-1) 和 HLA I_A 类分子, 这会导致胰岛炎时白细胞的渗入 (Chakrabarti 等人, J. Immunol. 157:522-528 [1996])。此外, 通过诱导胰岛内抗原呈递细胞上的共刺激分子 ICAM-1 和 B7.2, IFN- α 促进了 T 细胞的激活 (Chakrabarti 等人, Diabetes 45:1336-1343 [1996])。这些研究集合在一起表明 β 细胞早期表达 IFN- α 在自身免疫性糖尿病的启动中可能是关键性的。虽然有许多报告提示 IFN- γ 涉及啮齿动物模型中 IDDM 的发生, 但是该细胞因子的表达与人 IDDM 之间相关性很差。只是在所选出的具有明显淋巴细胞渗入胰岛的一组患者的胰岛中, 可能发现表达 IFN- γ 的细胞。而在不按此标准所选的患者组中没有发现 IFN- γ 表达与人 IDDM 之间的明显关系。

[0010] 根据全身性红斑狼疮 (SLE) 病人 IFN- α 表达水平的增加, IFN- α 也涉及 SLE 的病理过程 (Ytterberg 和 Schnitzer, Arthritis Rheum. 25:401-406 [1982]; Shi 等人, Br. J. Dermatol. 117:155-159 [1987])。令人感兴趣的是目前 IFN- α 正用于治疗癌症与病毒感染, 如乙肝或丙肝病毒感染引起的慢性肝炎。与 IFN- α 水平增高激发自身免疫性的观察相一致, 已报道接受 IFN- α 治疗的病人中自身免疫失调 (如 IDDM, SLE 以及自身免疫性甲状腺炎) 的出现明显增加。例如, 研究表明长期使用 IFN- α 作为抗病毒疗法会引起 IDDM (Waguri 等人, Diabetes Res. Clin. Pract. 23:33-36 [1994]; Fabris 等人, J. Hepatol. 28:514-517 [1998]) 或 SLE (Garcia-Porrua 等人, Clin. Exp. Rheumatol. 16:107-108 [1998])。用 IFN- α 疗法治疗柯萨奇病毒 B (CBV) 感染, 也与 IDDM 的引起相关 (Chehadeh 等人, J. Infect. Dis. 181:1929-1939 [2000])。类似地, 在用 IFN- α 治疗的癌症患者中有多个病例报告发现 IDDM 或 SLE (Ronnblom 等人, J. Intern. Med. 227:207-210 [1990])。

[0011] 抗体疗法

[0012] 随着一些单克隆抗体 (mAb) 被批准于人体或者作后期临床试验考核, 使用单克隆抗体作为治疗剂已获得了越来越多的接受。1986 年美国食品和药品署 (FDA) 第一个批准的 mAb 是用于治疗同种异体移植物排斥的抗 -CD3 (OKT3)。此后, mAb 领域的前进步伐大为加速, 尤其是 1994 年起, 导致另外 7 个 mAb 被批准用于人体治疗。这些包括 1994 年用于治疗冠状血管成形术并发症的 **ReoPro[®]**, 1997 年用于预防同种异体移植物排斥反应的 **Zenapax[®]** (抗 -CD25), 1997 年用于治疗 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的 **Rituxan[®]** (抗 -CD20), 1998 年最初用于治疗克罗恩氏病并且随后在 1999 年用于治疗类风湿性关节炎的 **Infliximab[®]** (抗 -TNF- α), 1998 年用于预防同种异体移植物排斥反应的 **Simulect[®]** (抗 -CD25), 1998 年用于治疗呼吸道感染的 **Synagis[®]** (抗呼吸道合胞病毒的 F 蛋白), 以及 1998 年用于治疗 HER2 过度表达性转移性乳腺癌的 **Herceptin[®]** (抗 -HER2/neu) (Glennie

和 Johnson, Immunol. Today 21:403-410 [2000])。

[0013] 抗-IFN- α 抗体

[0014] 经单克隆抗体治疗干预能得以缓解的疾病状态包括所有那些具有病理性靶抗原水平的疾病。例如,能中和 SLE 患者血清中存在的和在 IDDM 中胰岛表达的 IFN- α 的抗体,是治疗性干预这些疾病的潜在候选物。这也可用于 IFN- α 表达潜在性增加和起病因作用的其它自身免疫性疾病的治疗性干涉。在人 IDDM(Foulis 等人, Lancet 2:1423-1427 [1987];Huang 等人, Diabetes44:658-664[1995];Somoza 等人, J. Immunol. 153:1360-1377 [1994]) 和人 SLE(Hooks 等人, Arthritis & Rheumatism 25:396-400 [1982];Kim 等人, Clin. Exp. Immunol. 70:562-569[1987];Lacki 等人, J. Med. 28:99-107[1997];Robak 等人, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 46:375-380[1998];Shiozawa 等人, Arthritis & Rheumatism 35:417-422 [1992];vonWussow 等人, Rheumatology International8:225-230 [1988]) 二者中,看起来疾病都与 IFN- α 有关,但与 IFN- β 或 IFN- γ 无关。因而,抗干扰素 mAb 在 IDDM 或 SLE 中的干预要求对大多数(如果不是所有的)IFN- α 亚型产生特异性中和而不引起 IFN- β 或 IFN- γ 的任何明显性中和。保留后两种干扰素的活性完整也可能有利于保留明显的抗病毒活性。

[0015] 虽然已有描述说一些 mAb 对一定范围的重组人 IFN- α 亚型显示了反应活性,但发现只能中和所分析的重组 IFN- α 亚型的有限亚组或者对激活的外周血白细胞产生的 IFN- α 亚型混合物无中和能力(Tsukui 等人, Microbiol. Immunol. 30:1129-1139 [1986];Berg, J. Interferon Res. 4:481-491[1984];Meager 和 Berg, J. Interferon Res. 6:729-736 [1986];US Patent No. 4,902,618;和 EP publication No. 0,139,676B1)。

[0016] 因此对不仅能结合大多数,优选所有的 IFN- α 亚型而且能中和这些亚型同时不干扰其它干扰素生物功能的抗-IFN- α 抗体有很大需要。

[0017] 发明简述

[0018] 本发明以一种单克隆抗体的开发为基础,该单克隆抗体在实验中发现能中和所有 7 种受测试的不同的重组人 IFN- α 亚型和两种天然人 IFN- α 亚型的独立的合并物。

[0019] 一方面,本发明提供了一种抗人 IFN- α 单克隆抗体,该抗体能结合至少人 IFN- α 亚型:IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10 以及 IFN- α 21 并中和其生物活性。另一方面,本发明提供了一种能结合所有人 IFN- α 亚型并中和其生物活性的抗人 IFN- α 单克隆抗体。本发明的抗体能显著降低或者消除所讨论人 IFN- α 的生物活性。在一个实例中,本发明的抗体能中和目标人 IFN- α 的生物活性的至少 60%或至少 70%,较佳至少 75%,更佳至少 80%,再佳至少 85%,还要佳至少 90%,还要更佳至少 95%,最佳至少 99%。在另一实例中,这种中和人 IFN- α 生物活性的单克隆抗体不中和人 IFN- β 的相应生物活性。

[0020] 目标人 IFN- α 的生物活性可以是 IFNAR2 结合活性。在一具体实施例中,本发明提供的抗人 IFN- α 单克隆抗体能够结合所有的或基本上所有的人 IFN- α 亚型并阻断 IFNAR2 结合活性的至少 60%或至少 70%,较佳至少 75%,更佳至少 80%,再佳至少 85%,还要佳至少 90%,还要更佳至少 95%,最佳至少 99%。在另一实施例中本发明提供一种抗人 IFN- α 单克隆抗体,它能结合每种人 IFN- α 亚型 1、2、4、5、8、10 和 21 并阻断 IFNAR2 结合活性的至少 60%或至少 70%,较佳至少 75%,更佳至少 80%,再佳至少 85%,还要佳至少 90%,还要更佳至少 95%,最佳至少 99%。在另一实施例中,该抗人 IFN- α 单克隆抗体不与人 IFN- β 交叉反应。

[0021] 目标人 IFN- α 的生物活性可以是抗病毒活性。在一个实施例中, 抗人 IFN- α 单克隆抗体能与所有的或基本上所有的人 IFN- α 亚型结合并中和其抗病毒活性。在另一实施例中, 该抗人 IFN- α 单克隆抗体能结合每种人 IFN- α 亚型: 1、2、4、5、8、10 和 21 并中和其抗病毒活性。在一具体实施例中, 本发明提供的抗人 IFN- α 单克隆抗体能够结合所有的或基本上所有的人 IFN- α 亚型并中和其抗病毒活性的至少 60% 或至少 70%, 较佳至少 75%, 更佳至少 80%, 再佳至少 85%, 还要佳至少 90%, 还要更佳至少 95%, 最佳至少 99%。在还有另一实施例中, 本发明提供的抗人 IFN- α 单克隆抗体能结合每种人 IFN- α 亚型 1、2、4、5、8、10 和 21 并中和其抗病毒活性的至少 60% 或至少 70%, 较佳至少 75%, 更佳至少 80%, 再佳至少 85%, 还要佳至少 90%, 还要更佳至少 95%, 最佳至少 99%。在还有另一实施例中, 这种中和人 IFN- α 的抗病毒活性的单克隆抗体不中和人 IFN- β 的抗病毒活性。

[0022] 此抗体可以是小鼠的、人源化的或人的抗体。此抗体可以是小鼠抗人 IFN- α 单克隆抗体 9F3 或它的人源化版本如版本 13(V13) 或其嵌合形式。本发明的范围还包括能与小鼠抗人 IFN- α 单抗 9F3 或其人源化或嵌合形式结合基本上相同的 IFN- α 表位的抗体。例如, 用于这一目的的参考抗体是 2001 年 1 月 18 日存放在 ATCC 的登录号 No. PTA-2917 的小鼠杂交瘤细胞系 9F3.18.5 产生的抗 -IFN- α 抗体。在另一实施例中, 本发明提供了小鼠或鼠/人嵌合性抗人 IFN- α 单克隆抗体, 该抗体含有如图 5A(SEQ ID NO:1) 所示的小鼠轻链可变结构域氨基酸序列和/或图 5B(SEQ ID NO:2) 所示的小鼠重链可变结构域氨基酸序列。在另一实施例中, 本发明提供了人源化抗人 IFN- α 单克隆抗体, 该抗体含有如图 5A(SEQ ID NO:3) 所示的人源化轻链可变结构域氨基酸序列和/或图 5B(SEQ ID NO:5) 所示的人源化重链可变结构域氨基酸序列。

[0023] 还提供了一种抗人 IFN- α 单克隆抗体, 该抗体能与小鼠抗人 IFN- α 单克隆抗体 9F3 或其人源化或嵌合形式结合基本上相同的人 IFN- α 亚型 1, 2, 4, 5, 8, 10 和 21 上的表位。本文还提供了抗人 IFN- α 单克隆抗体, 该抗体能与小鼠抗人 IFN- α 单克隆抗体 9F3 竞争与每种人 IFN- α 亚型 1, 2, 4, 5, 8, 10 和 21 相结合。

[0024] 也提供了编码本文所述任一抗体的分离的核酸分子, 含有该分离的核酸分子的载体, 被该核酸分子转化的宿主细胞和产生此抗体的方法, 该方法包括在该核酸分子表达的条件下培养此宿主细胞以产生此抗体并任选地从此宿主细胞回收此抗体。此抗体可以是 IgG 类和亚型如 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4。本发明的范围也包括抗体片段如 Fv, scFv, Fab, F(ab')₂ 和 Fab' 片段。

[0025] 另一方面, 本发明提供了抗人 IFN- α 单克隆抗体轻链或其片段, 它们包含以下 CDR(如 Kabat 等人所定义, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD [1991], 第 1-3 卷): (a) 式 RASQSVSTSYSYM(SYD ID NO:7) 的 L1; (b) 式 YASNLES(SYD ID NO:8) 的 L2; 以及 (c) 式 QHSWGIPRTF(SYD ID NO:9) 的 L3。本发明的范围也包括抗人 IFN- α 单克隆抗体轻链片段的轻链可变结构域。本发明的范围还包括抗人 IFN- α 单克隆抗体轻链多肽, 该多肽含有小鼠/人嵌合性轻链可变结构域氨基酸序列或整个嵌合性轻链多肽氨基酸序列, 其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为 NO. PTA-2880 的 XAIFN-CHLpDR1 载体所编码。本发明的范围还包括抗人 IFN- α 单克隆抗体轻链多肽, 该多肽含有人源化轻链可变结构域氨基酸序列或整个人源化轻链多肽氨基酸序列, 其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为

NO. PTA-2882 的 VLV30-IgG 载体所编码。

[0026] 另一方面,本发明提供了抗人 IFN- α 单克隆抗体重链或其片段,它们含有下述 CDR:(a) 式 GYTFTEYIIH(SEQ ID NO:10) 的 H1;(b) 式 SINPDYDITNYNQRFGK(SEQ ID NO:11) 的 H2;以及 (c) 式 WISDFFDY(SEQ ID NO:12) 的 H3。本发明的范围也包括抗人 IFN- α 单克隆抗体重链片段的重链可变结构域。本发明的范围还包括抗人 IFN- α 单克隆抗体重链多肽,该多肽含有小鼠/人嵌合性重链可变区氨基酸序列或整个嵌合性重链多肽氨基酸序列,其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为 NO. PTA-2883 的 XAIFN-ChHpDR2 载体所编码。本发明的范围还包括抗人 IFN- α 单克隆抗体重链多肽,该多肽含有人源化重链可变区氨基酸序列或整个人源化重链多肽氨基酸序列,其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为 NO. PTA-2881 的 VHV30-IgG2 载体所编码。

[0027] 另一方面,本发明提供了抗人 IFN- α 单克隆抗体,该抗体包含 (A) 至少一条轻链或其片段,它们含有如下 CDR:(a) 式:RASQSVSTSSYSYMH(SEQ ID NO:7) 的 L1;(b) 式 YASNLES(SEQ ID NO:8) 的 L2;以及 (c) 式 QHSWGIPRTF(SEQ ID NO:9) 的 L3;(B) 至少一条重链或其片段,它们含有如下 CDR:(a) 式 GYTFTEYIIH(SEQ ID NO:10) 的 H1;(b) 式 SINPDYDITNYNQRFGK(SEQ ID NO:11) 的 H2;以及 (c) 式 WISDFFDY(SEQ ID NO:12) 的 H3。此抗体可以是由两对由二硫键键合的抗体重链-轻链构成的同型四聚体结构。本发明的范围具体包括:线形抗体,小鼠抗体,嵌合抗体,人源化抗体,或人抗体。还提供了一种嵌合性抗体,该抗体包含:(1) 小鼠/人嵌合性轻链可变区氨基酸序列或整个嵌合性轻链多肽氨基酸序列,其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为 NO. PTA-2880 的 XAIFN-ChLpDR1 载体所编码;和 (2) 小鼠/人嵌合性重链可变区氨基酸序列或整个嵌合性重链多肽氨基酸序列,其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为 NO. PTA-2883 的 XAIFN-ChLpDR2 载体所编码。本文还提供了一种人源化抗体,该抗体包含:(1) 人源化的轻链可变区氨基酸序列或整个人源化轻链多肽氨基酸序列,其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为 NO. PTA-2882 的 VLV30-IgG 载体所编码;和 (2) 人源化的重链可变区氨基酸序列或整个人源化重链多肽氨基酸序列,其由 ATCC 2001 年 1 月 9 日保存的登录号为 NO. PTA-2881 的 VHV30-IgG2 载体所编码。

[0028] 还有一方面,本发明提供了含有有效量的本发明抗体与药学上可接受运载体相混合的药物组合物。

[0029] 还有一方面,本发明提供了诊断与细胞中 IFN- α 表达相关状态的方法,该方法包括使抗-IFN- α 抗体接触细胞并检测 IFN- α 的存在。

[0030] 还有一方面,本发明提供了治疗患者与 IFN- α 表达相关的疾病或状态的方法,该方法包括给予患者有效量的抗-IFN- α 抗体。该患者是哺乳动物患者,优选人类患者。该疾病是自身免疫性疾病,如胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM);全身性红斑狼疮 (SLE);或自身免疫性甲状腺炎。

[0031] 图表简述

[0032] 图 1 表示用于产生抗人 IFN- α 单克隆抗体的策略的简图。

[0033] 图 2 表示小鼠抗人 IFN- α mAb (9F3) 能中和重组 IFN- α 亚型谱系但不能中和重组 IFN- β 。测试了在 mAb 9F3 浓度增加时所示 IFN 对脑心肌炎 (EMC) 病毒在 A549 细胞内生长的抑制。所述数据为在 mAb 9F3 缺乏时用所示 IFN 获得的病毒生长抑制活性的百分比。

[0034] 图 3 (图 3A-3B) 显示了白细胞干扰素 (Sigma) (图 3A) 和类淋巴母细胞干扰素 (NIH 参考品 Ga23-901-532) (图 3B) 的中和作用。在图 3A 中, 将 20000IU/ml (实心柱) 或 5000IU/ml (空白柱) 的白细胞干扰素 (Sigma Product No. I-2396) 与空白对照物 (只有缓冲液) (以“-”表示), 10 :g/ml 小鼠 IgG 对照物 (以“mIgG”表示), 或 10 :g/ml mAb 9F3 (以“9F3”表示) 一起培育。测试诸稀释液并显示残余活性的量。所示结果为一式二份测定的平均值。在图 3B 中, 测定了在所示浓度的 mAb 9F3 存在或不存在下, 类淋巴母细胞干扰素在 10 (实心柱) 或 3 (空白柱) IU/ml 时的作用。较高的细胞病变效应表明干扰素活性下降。所示结果为一式二份测定的平均值。

[0035] 图 4 描述了电泳迁移率变化试验 (EMSA) 的结果, 表明 IFN- α 诱生了 ISGF3/ISRE 复合物以及 9F3mAb 能阻止该复合物的形成。在存在或缺乏 25ng/ml 浓度的人 IFN- α 2 (以“ α 2”表示) 或 IFN- β (以“ β ”表示) 时用 10 :g/ml 浓度的 9F3mAb (以“9F3”表示) 或小鼠 IgG 对照抗体 (以“IgG”表示) 进行了 EMSA。

[0036] 图 5A 显示了小鼠 9F3 (小鼠 SEQ ID NO :1)、人源化 9F3 版本 13 (V13, SEQ ID NO :3) 和共有的人可变区轻链 κ I 亚族 (hu κ I, SEQ ID NO :4) 的轻链可变区的氨基酸序列的排列对比。CDR (L1, SEQ ID NO :7 ; L2, SEQ ID NO :8 ; 以及 L3, SEQ ID NO :9) 以下划线突出显示。残基编号按照 Kabat 等人, (1991) 同上。用星号标明小鼠 9F3 和 V13 序列之间的差异, 以及 9F3 和 HuKI 序列之间的差异。

[0037] 图 5B 显示了小鼠 9F3 (小鼠 SEQ ID NO :2)、人源化 9F3 版本 13 (V13, SEQ ID NO :5) 和共有的人可变区重链 III 亚族 (hu III, SEQ ID NO :6) 的重链可变区的氨基酸序列的排列对比。CDR (H1, SEQ ID NO :10 ; H2, SEQ ID NO :11 ; 以及 H3, SEQ ID NO :12) 以下划线突出显示。残基编号按照 Kabat 等人, (1991) 同上。用星号标明小鼠 9F3 和 V13 序列之间的差异, 以及 9F3 和 hu III 序列之间的差异。

[0038] 图 6 显示初始 mAb 9F3 (左图) 和嵌合蛋白质 CH8-2 (右图) 对受脑心肌炎 (EMC) 病毒攻击的 A549 细胞中重组 IFN- α 亚型抑制病毒生长的中和活性。

[0039] 图 7 描述了人源化 9F3 版本 13 的模型。VL 和 VH 结构域的骨架显示为缎带。CDR 以白色表示并作标记 (L1, L2, L3, H1, H2, H3)。框架侧链从人到小鼠的转换以白色表示并标记了残基编号。

[0040] 优选实施例的详细描述

[0041] A. 定义

[0042] 除非另有说明, 本文所用的技术与科学术语具有本发明所属领域普通技术人员共同理解的相同含义。见, 例如: Singleton 等人, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第二版, J. Wiley & Sons 出版 (New York, NY 1994) ; Sambrook 等人, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)。为了本发明的目的, 下述术语定义如下。

[0043] 如本文所用, 术语“I 型干扰素”定义为包括任何哺乳动物的自然序列的 I 型干扰素的所有亚型, 包括干扰素- α , 干扰素- β , 干扰素- δ , 干扰素- ω 和干扰素- τ 。类似的, 术语“人 I 型干扰素”定义为包括自然序列的 I 型人干扰素的所有亚型, 包括人干扰素- α , 干扰素- β 和干扰素- ω 种类并且它们能结合一共同的细胞受体。

[0044] 除非另外提供解释, 本文所用术语“干扰素- α ”, “IFN- α ”, “人干扰素- α ”, “人

IFN- α ”以及“hIFN- α ”是指自然序列的人 α 干扰素的所有种类,包括自然序列的人干扰素- α 的所有亚型。自然的(自然序列)人干扰素- α 包含23种或更多密切相关的蛋白质,这些蛋白质由具有高度结构同源性的不同基因所编码(Weissmann和Weber, *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 33:251[1986]; *J. Interferon Res.*, 13:443-444[1993]; Roberts等人 *J. Interferon Cytokine Res.* 18:805-816 [1998])。人IFN- α 基因座包含两个亚家族。第一亚家族包括至少14个有功能的非等位基因,包括编码IFN- α A, (IFN- α 2), IFN- α B (IFN- α 8), IFN- α C (IFN- α 10), IFN- α D (IFN- α 1), IFN- α E (IFN- α 22), IFN- α F (IFN- α 21), IFN- α G (IFN- α 5) 和 IFN- α H (IFN- α 14) 的基因,以及至少具有80%同源性的拟基因。第二亚家族, α_{II} 或 T, 至少包含5个拟基因和1个功能性基因(本文以“IFN- α_{II} 1”或“IFN-T”表示),该功能性基因表现出与IFN- α 基因70%的同源性(Weissmann和Weber [1986] 同上)。

[0045] 本文所用术语“第一种人干扰素- α (hIFN- α) 受体”,“IFN- α R”,“hIFNAR1”、“IFNARI”和“Uze 链”是指由 Uze 等人, *Cell*, 60:225-234(1990) 所克隆的557个氨基酸的受体蛋白质,包括409个残基的胞外结构域,21个残基的跨膜结构域,以及100个残基的胞内结构域,如 Uze 等人的229页图5所示。上述术语还包括含有IFNAR1胞外结构域(ECD)(或ECD的片段)的IFNAR1片段。

[0046] 本文所用术语“第二种人干扰素- α (hIFN- α) 受体”,“IFN- α β R”,“hIFNAR2”,“IFNAR2”和“Novick 链”是指由 Domanski 等人, *J. Biol. Chem.*, 37:21606-21611(1995) 所克隆的515个氨基酸的受体蛋白质,包含217个残基的胞外结构域,21个残基的跨膜结构域,和250个残基的胞内结构域,如 Domanski 等人在21608页图1所示。上述术语还包括含有IFNAR2胞外结构域(ECD)(或ECD的片段)的IFNAR2片段,以及IFNAR2的可溶形式,如与免疫球蛋白序列融合的IFNAR2ECD,例如下述的IFNAR2ECD-IgG Fc。

[0047] 与I型干扰素,IFN- α 或任何其它多肽相连的术语“自然序列”,是指与相应的自然衍生的多肽具有相同氨基酸序列的多肽,不论它的制备方式如何。这样的自然序列多肽可从自然中分离得到或通过重组和/或合成方法或其任意组合产生。术语“自然序列”具体包含该全长多肽的自然产生的截短或分泌形式(如,胞外结构域序列),自然产生的变体形式(如可变剪接形式)和自然产生的等位变体。

[0048] “聚合酶链反应”或“PCR”指一种过程或技术,在其中微量的核酸RNA和/或DNA的特定片段,如1987年7月28日公开的美国专利号NO. 4,683,195中所述那样被扩增。通常地,需要获得感兴趣的区域两端或之外的序列信息,这样可设计出寡核苷酸引物;这些引物的序列与待扩增模板的相反链相同或相似。两种引物的5'末端核苷酸可与所扩增材料的两末端重合。PCR可用于扩增特定的RNA序列,整个基因组DNA的特定DNA序列,全细胞RNA转录的cDNA,噬菌体或质粒序列,等等。见 Mullis 等人, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263(1987); Erlich, 编, *PCR Technology* (Stockton Press, NY, 1989)。本文所用的PCR是一种(但不是仅有的)核酸聚合酶反应方法的例子,用于扩增测试的核酸样品,其包括用已知核酸作为引物和核酸聚合酶来扩增或产生核酸的特定片段。

[0049] “抗体”(Ab)和“免疫球蛋白(Ig)”是具有相同结构特征的糖蛋白。抗体表现出对特定抗原的结合特异性,而免疫球蛋白包括抗体和其它缺乏抗原特异性的抗体样分子。例如,后一种多肽由淋巴系统低水平产生,在骨髓瘤中则水平升高。

[0050] “自然抗体和免疫球蛋白”通常是约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白,包含两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链。每条轻链通过一个共价二硫键与一条重链相连,而且不同的免疫球蛋白同种型重链之间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也具有有规律相间隔的链内二硫桥。每条重链一端为可变区(VH),随后是多个恒定区。每条轻链一端为可变区(VL),另一端为一恒定区;轻链的恒定区与重链的第一恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。认为特殊的氨基酸残基形成了轻链和重链可变区之间的界面(Chothia 等人, J. Mol. Biol. 186:651 [1985]; Novotny 和 Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:4592 [1985]; Chothia 等人, Nature 342:877-883 [1989])。

[0051] 术语“可变”指如下情况:抗体中可变区的某些部分在序列上极其不同,用于各个特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀分布于抗体的整个可变区中。它集中存在于轻链和重链可变区内称谓互补决定域(CDR)或高变区的3个区段中。可变区中具有较高保守性的部分称为框架区(FR)。每条天然轻链和重链的可变区都含有4个FR区,大部分采取 β 折叠构型,通过3个CDR相连;3个CDR形成环状连接,有时形成 β 折叠结构的一部分。每条链的CDR通过FR区紧密靠近,并与另一链的CDR一起构成抗体的抗原结合位点(见 Kabat 等人,[1991]同上)。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应器功能,如参与抗体的抗体依赖性细胞毒性。

[0052] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段,各具有一个抗原结合位点)和一残余的“Fc”片段(其名称反映其易于结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生 $F(ab')_2$ 片段,其具有两个抗原结合位点且仍能交联抗原。

[0053] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在双链Fv中,该区域由非共价键紧密联接的轻链和重链可变区的二聚体组成。在单链Fv中,重链和轻链可变区可通过一柔性肽接头共价连接,因而轻链和重链能以类似于双链Fv中的“二聚体”结构相连。正是在这种构型中每个可变区的3个CDR互相作用确定了VH-VL二聚体表面的抗原结合位点。6个CDR共同赋予了抗体的抗原结合特异性。然而,尽管亲和力低于完整的结合位点,一个可变区(或只含有对抗原特异的3个CDR的半个Fv)仍然能识别并结合抗原。

[0054] Fab片段也含有轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab'片段不同于Fab段之处在于其在重链CH1结构域羧基末端添加了几个残基,包括抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH指恒定区的半胱氨酸具有自由巯基的Fab'。F(ab')₂抗体片段最初产生为成对的Fab'片段,此成对Fab'段之间有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0055] 任何脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的轻链可根据它们恒定区的氨基酸序列分入两个明显不同的型之一,称为 κ 和 λ 。

[0056] 根据重链恒定区氨基酸序列,免疫球蛋白可分为不同类。有五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG、IgM,这些类中的几种可进一步分成亚类(同种型),如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。免疫球蛋白不同类的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0057] 术语“抗体”包括完整的免疫球蛋白的所有类和亚类。术语“抗体”也包括抗体片段。术语“抗体”明确包括单克隆抗体,包括抗体片段克隆。

[0058] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,其含有完整抗体的抗原结合区或可变区。抗

体片段的例子包括 Fab, Fab', F(ab') 和 Fv 片段;双抗体(diabodies);单链抗体分子,包括单链 Fv(scFv) 分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0059] 本文所用术语“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群获得的抗体(或抗体片段),即,构成该群体的抗体个体除了可能的自然产生的极少量突变外其他都相同。单克隆抗体具有高度特异性,只针对一个抗原位点。另外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制品相反,每种单克隆抗体只针对抗原上的一个决定簇。除了它们的特异性,单克隆抗体的优点是可通过杂交瘤培养来合成,而且不会污染有其它免疫球蛋白。修饰词“单克隆”表明该抗体的特征是从基本上同质的抗体群获得的,而不应解释为需要通过任何特别方法来生成。例如,可通过 Kohler 等人, *Nature*, 256:495(1975) 最先描述的杂交瘤方法制备或用重组 DNA 方法(见,如美国专利号 NO. 4,816,567) 制备用于本发明的单克隆抗体。“单克隆抗体”还包括含有抗原识别和结合位点的抗体片段的克隆(Fv 克隆),例如采用 Clackson 等人, *Nature*, 352:624-628(1991) 和 Marks 等人 *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) 中所述技术从噬菌体抗体文库中分离获得。

[0060] 本文单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)以及这些抗体的片段,此抗体中重链和/或轻链的一部分与一种特定动物所衍生的或属于某特定类或亚类抗体的抗体中相应序列相同或相似,而该链的其余部分与另一种动物所衍生的或属于另一类或亚类抗体的抗体中相应序列相同或相似,只要他们表现出所需的生物活性(授于 Cabilly 等人的美国专利号 NO. 4,816,567;Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855[1984])。

[0061] 非人(如小鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合性的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合子序列),其中含有从非人免疫球蛋白衍生的最小序列。人源化抗体大部分是人免疫球蛋白(受者抗体);其中部分或全部的受者互补决定区(CDR)的残基,被来自非人动物(供者抗体)(如大鼠、小鼠或家兔)的具有所需特异性、亲和性和活性的残基所取代。有些情况中,人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)残基被相应的非人残基所取代。另外,人源化抗体可含有在受者抗体中或输入的 CDR 或框架序列中都没有的残基。可进行这些修饰以进一步精细化和优化抗体的性能。总之,人源化抗体含有至少 1 个,典型地 2 个基本上整个这样的可变区,其中 CDR 区全部或基本全部对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区,而 FR 区全部或基本全部是人免疫球蛋白序列的 FR 区。较佳地,人源化抗体还至少含有免疫球蛋白恒定区的一部分(Fc),通常为人免疫球蛋白的。更多细节见 Jones 等人, *Nature*, 321:522-525(1986);Reichmann 等人 *Nature*, 332:323-329(1988);Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992);and Clark, *Immunol. Today* 21:397-402(2000)。人源化抗体包括 Primatized™,其中该抗体的抗原结合区域衍生自用感兴趣抗原免疫的猕猴产生的抗体衍生。

[0062] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 区,其中这些区域以单一多肽链存在。通常,scFv 多肽还包含 VH 和 VL 区之间的多肽接头,这使 scFv 形成抗原结合的所需结构。对于 scFv 的综述可见 Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg 和 Moore 编. Springer-Verlag, New York, 269-315 页(1994), Dall'Acqua 和 Carter, *Cur. Opin. Struct. Biol.* 8:443-450(1998) 和 Hudson, *Curr. Opin, Immunol.* 11:548-557(1999)。

[0063] 术语“双抗体”指具有 2 个抗原结合位点的小抗体片段,该片段含有在同一多肽链(VH-VL)中的相连的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)。采用的接头短至不允许同一链上的两个区域之间形成配对,而迫使此二结构域与另一条链的互补结构域配对从而产生两个抗原结合位点。关于双抗体的有更多描述,例如,见 EP 404,097;WO 93/11161;和 Hollinger 等人,Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 90:6444-6448(1993)。

[0064] “分离的”抗体是已经鉴定且与其天然环境成分相分离的和/或回收的抗体。其天然环境的污染成分是可能会干扰该抗体的诊断或治疗应用的物质,可包括酶,激素以及其它蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施例中,可提纯该抗体至(1)纯度用 Lowry 方法测定抗体重量在 95% 以上,最好在重量 99% 以上,(2)提纯至足够获得 N-末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的水平(使用转杯式测序仪),或(3)用考马斯蓝,或优选银染色在还原或非还原条件下,用 SDS-PAGE 测定为均一性。由于没有抗体天然环境的至少一种成分,分离的抗体包括重组细胞中原位产生的抗体。然而一般情况下,分离的抗体将经过至少一步纯化步骤制备。

[0065] “中和性抗体”指一种抗体分子,该抗体分子能消除或显著降低其所结合的靶抗原的效应器功能。因此,“中和性”抗 IFN- α 抗体能消除或显著降低效应器的功能,如 IFN- α 的受体结合功能和/或对细胞反应的诱导。

[0066] 对于本发明的目的,可监测抗-IFN- α 抗体中和 IFN- α 的受体活化活性的能力,例如,在 1995 年 6 月 1 日公开的 W095/14930 中所述的激酶受体活化(KIRA)试验中,测定候选抗体降低 IFNAR1/R2 受体复合物的酪氨酸磷酸化(由于配体结合而致)的能力。

[0067] 对于本发明的目的,优选通过监测对 IFN- α 抗病毒活性的中和作用,测试抗-IFN- α 抗体中和 IFN- α 的细胞应答诱导能力,如 Kawade, J. Interferon Res. 1:61-70(1980),或 Kawade 和 Watanabe, J. Interferon Res. 4:571-584(1984),或 Yousefi 等人, Am. J. Clin. Pathol. 83:735-740(1985) 所述,或通过在电泳迁移率变化试验中,测试抗 IFN- α 抗体中和 IFN- α 激活信号分子,干扰素-刺激因子 3(ISGF3),结合于干扰素刺激反应元件(ISRE)衍生的寡核苷酸的能力的能力,如 Kurabayashi 等人 Mol. Cell Biol. 15:6386(1995) 所述。

[0068] “显著”降低指降低靶抗原(如 IFN- α)的效应器功能(如受体(IFNAR2)结合和/或诱导细胞应答)至少约 60%,或至少约 70%,更佳至少约 75%,更佳至少约 80%,再佳至少约 85%,还要佳至少约 90%,还要更佳至少约 95%,最佳至少约 99%。优选本文所定义的“中和性”抗体能中和 IFN- α 抗病毒活性的至少约 60%,或至少约 70%,更佳至少约 75%,更佳至少约 80%,再佳至少约 85%,还要佳至少约 90%,还要更佳至少约 95%,最佳至少约 99%,如 Kawade(1980),同上或 Yousefi(1985),同上的抗病毒试验所测定的那样。在另一优选实施例中,本文所用“中和性”抗体由于与 IFN- α 结合,能降低 IFNAR1/IFNAR2 受体复合物的酪氨酸磷酸化至少约 60%,或至少约 70%,更佳至少约 75%,更佳至少约 80%,再佳至少约 85%,还要佳至少约 90%,还要更佳至少约 95%,最佳至少约 99%,如上述参考文献 KIRA 试验所测定的那样。在一个特别优选实施例中,本文所用的中和性抗 IFN- α 抗体能中和全部,或基本全部的 IFN- α 亚型而不能中和 IFN- β 。在本文中,术语“基本上全部”指中和性抗 IFN- α 抗体能至少中和 IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10,以及 IFN- α 21。

[0069] 对于本发明的目的,抗 IFN- α 抗体阻断 IFN- α 与受体结合的能力,定义为在竞

争结合试验中某浓度的抗体降低或消除 IFN- α 与 IFNAR2 结合的特性或能力,与此试验中同等浓度的无关对照抗体对 IFN- α 结合 IFNAR2 的效果相比较。优选,与无关对照抗体相比,阻断性抗 IFN- α 抗体降低 IFN- α 与 IFNAR2 的结合至少约 50%,或至少约 55%,或至少约 60%,或至少约 65%,或至少约 70%,或至少约 75%,或至少约 80%,或至少约 85%,或至少约 90%,或至少约 95%,或至少约 99%。

[0070] 对于本发明的目的,可用常规竞争试验测定抗 IFN- α 抗体阻断 IFN- α 结合 IFNAR2 的能力,如 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane (1988) 所述。例如,可改进下述例 2 所述 IFN- α 结合 ELISA 试验以采用在抗 IFN- α 抗体和可溶性 IFNAR2 之间的竞争结合。这一试验按以下步骤进行:在微量滴定板上包被 IFN- α , 将该包被板与混合了所选浓度的标记的 IFNAR2ECD- 人 IgG Fc 融合蛋白质的未标记抗 IFN- α 抗体或未标记对照抗体的连续的稀释液一起培育,检测并测量各培育混合液中的信号,然后比较各抗体稀释液显示的信号测量结果。

[0071] 在一特别优选实施例中,本文所用的阻断性抗 IFN- α 抗体能阻断全部或基本全部 IFN- α 亚型的 IFNAR2- 结合而不与 IFN- β 交叉反应。在本文中,术语“基本全部”指阻断性抗 IFN- α 抗体将至少阻断 IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 8, IFN- α 10, 以及 IFN- α 21 的 IFNAR2 结合。在一特别优选实施例中,本发明的阻断性抗 IFN- α 抗体将阻断所有已知的 IFN- α 亚型与 IFNAR2 的结合。

[0072] 术语“表位”用于指蛋白质抗原上的(单克隆或多克隆)抗体结合位点。

[0073] 可通过“表位作图”鉴定与特定表位结合的抗体。本领域有许多已知方法可用于作图和特征鉴定蛋白质上表位的位置,包括分辨抗体-抗原复合物的晶体结构,竞争试验,基因片段表达试验,和合成肽为基础的试验,例如,见 Harlow 和 Lane 的第 11 章, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999 所述。竞争试验本文上下文都有讨论。根据基因片段表达试验,将编码该蛋白质的开放可读框随机地或通过特定的遗传构建而片段化,并测定该蛋白质的表达片段与所测抗体的反应活性。例如,可用 PCR 产生基因片段然后在体外转录并在放射性氨基酸存在下翻译为蛋白质。再用免疫沉淀和凝胶电泳测定该抗体与放射性标记的蛋白质片段的结合。采用展示在噬菌体颗粒表面的随机肽序列文库(噬菌体文库)也可鉴定某些表位。或者,可在简单结合试验中测试结合于测试抗体的重叠肽片段的确定文库。后一种方法适合于确定大约 5 到 15 个氨基酸的线形表位。

[0074] 若一种抗体与参比抗体识别相同或空间重叠的表位,则这两种抗体结合“基本上相同的表位”。测定两抗体是否结合相同或空间重叠的表位的应用最广泛和快速的方法,是竞争试验,该试验可有各种不同形式的布局,使用标记抗原或标记抗体。通常,将抗原固定在 96 孔平板上,用放射性或酶标记测量未标记抗体阻断标记抗体结合的能力。

[0075] 本文所用术语氨基酸或氨基酸残基,指天然存在的 L 氨基酸或指下文在变体方面所述的 D 氨基酸。本文使用通常所用的表示氨基酸的 1 字母和 3 字母缩写 (Bruce Alberts 等人, Molecular Biology of The Cell, Garland Publishing, Inc., New York (第三版 1994))。

[0076] 本文所用关于多肽序列的“百分比 (%) 氨基酸序列同一性”,定义为在排列序列和导入缺口(如需要),以获得最大百分比的序列同一性而不将任何保守性替代看作部分序

列同一性后候选序列中的氨基酸残基与某序列中的氨基酸残基相同的百分比。可以本领域技术之内的各种方法获得排列对比以测定氨基酸序列同一性的百分比,例如,可采用公众可获得的计算机软件如 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域那些技术人员可确定测量排列对比的适当参数,包括需要获得被比较序列全长的最大排列对比的任何算法。为此目的,如下文所述使用序列对比计算机程序 ALIGN-2, 可获得氨基酸序列同一性的百分比。ALIGN-2 序列对比计算机程序由 Genentech 公司制作,其原代码与使用者文件已在美国版权办公室,华盛顿特区,20559 登记备案,它在美国版权登记处登记号为 NO. TXU510087。ALIGN-2 程序可通过 Genentech 公司(旧金山南部,加利福尼亚)公开获得,而 ALIGN-2 程序的原代码和其使用指南在国际专利申请出版物 2000 年 7 月 6 日的 WO2000/39297 中公布。ALIGN-2 程序应编制为在 UNIX 操作系统上使用,较佳地是数字 UNIX V4.0D。所有的序列对比参数由 ALIGN-2 程序设置且不变。

[0077] 用于本文目的,某给定氨基酸序列 A 对某给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性百分比(或者描述为某给定氨基酸序列 A 具有或含有与某给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性百分比)计算如下:

[0078] 100 乘以分数 X/Y

[0079] 其中 X 是在 A 和 b 的程序性对比中,经序列排列对比程序 ALIGN-2 评价为同一性匹配的氨基酸残基数目,而 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。可以理解氨基酸序列 A 的长度不等同于氨基酸序列 B 的长度时, A 对 B 的氨基酸序列同一性百分比并不等于 B 对 A 的氨基酸序列同一性百分比。除非另有特别说明,本文所用的所有氨基酸序列同一性百分比数值均如上所述采用 ALIGN-2 序列对比的计算机程序获得。然而,氨基酸序列同一性百分比也可采用序列对比程序 NCBI-BLAST2 测定 (Altschul 等人, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997))。NCBI-BLAST2 序列对比程序可从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 下载。NCBI-BLAST2 使用一些检索参数,其中所有的这些检索参数设置为缺省值,包括,例如,无屏蔽 (unmask)=是,链 (strand)=全部,期望的事物出现 (expected occurrences)=10,最低复杂性长度 (minimum low complexity length)=15/5,多遍 e 值 (multi-pass e-value)=0.01,多遍常数 (constant for multi-pass)=25,最终空格排列对比落选 (dropoff for final gapped alignment)=25 以及评分矩阵 (scoring matrix)=BLOSUM62。

[0080] 在采用 NCBI-BLAST2 作氨基酸序列对比的情况下,某给定氨基酸序列 A 对某给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性百分比(或者描述为给定氨基酸序列 A 具有或含有与给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性百分比)计算如下:

[0081] 100 乘以分数 X/Y

[0082] 其中 X 是在 A 和 B 的程序性对比中,经序列排列对比程序 NCBI-BLAST2 评价为同一性匹配的氨基酸残基数目,而 Y 是 B 中的氨基酸残基总数。可以理解氨基酸序列 A 的长度不等同于氨基酸序列 B 的长度时, A 对 B 的氨基酸序列同一性百分比并不等于 B 对 A 的氨基酸序列同一性百分比。

[0083] 当核酸被放置在与另一核酸序列功能性相关的位置上时,是“操作性相连接”的。例如,如果前序列或分泌前导序列的 DNA 表达为参与某多肽分泌的前蛋白,则其与该多肽的 DNA 操作性相连接;如果启动子或增强子影响某序列的转录,则其与该编码序列操作性相连接;或者如果核糖体结合位点的定位易于翻译,则其与该编码序列操作性相连接。通常

“操作性连接”指所连接的 DNA 序列是毗邻的,如果是分泌性前导序列,应是毗邻且在读码框内。然而,增强子不需要毗邻。可在方便的限制性位点上通过连接反应即实现此种连接。如果没有这样的位点,可按常规方法采用合成的寡核苷酸衔接头或接头。

[0084] 术语“疾病状态”指细胞或整个哺乳动物的一种生理状态,该状态中发生了细胞或身体功能,系统或器官功能的中断,停止或失调。

[0085] 术语“有效量”指有效治疗(包括预防)哺乳动物的疾病,失调或有害生理状态的药物量。在本发明中,“有效量”的抗 IFN- α 抗体可以降低、减缓或延迟自身免疫失调症如 IDDM 或 SLE;降低,防止或抑制(即,某种程度的减缓优选停止)自身免疫失调症如 IDDM 或 SLE 的发生;和/或某种程度上减轻一种或多种与自身免疫失调症如 IDDM 或 SLE 有关的症状。

[0086] 在本发明方法中,术语“控制”和其语法异体词,是指对有害状态(即生理状态,如自反应性 T 细胞的产生和自身免疫性的发生)的防止,部分或完全抑制,降低,延迟或减缓。

[0087] “治疗”指治疗性处理和预防或防止措施。需要治疗者包括那些已患有疾病和那些易患疾病或那些必须预防疾病者。对于本发明的目的,有益的或所需的临床结果包括,但不限于,缓解症状,减轻疾病程度,稳定(即不恶化)疾病状态,延迟或减缓疾病的发展,好转或减轻疾病状态,减轻(无论部分或全部),无论是可检测或不可检测。“治疗”还指与不接受治疗的预期存活相比的延长存活。需要治疗者包括那些已患疾病或失调症和那些易患疾病或那些必须预防疾病者。

[0088] “药物学上可接受的”运载体、赋形剂或稳定剂是在所用的剂量和浓度下对接触其的细胞或哺乳动物无毒的那些。生理上可接受的运载体常常是水性的 pH 缓冲溶液。生理上可接受的运载体的实例包括缓冲液,如磷酸盐,柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;小分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸,或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖,或糊精;螯合剂,如 EDTA;糖醇,如甘露糖醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;和/或非离子表面活性剂,如 TweenTM,聚乙二醇(PEG),和 PluronicTM。

[0089] 治疗对象“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物,包括人,家养动物和家畜,和动物园,竞赛或宠物动物,如狗,马,猫,牛等。优选的哺乳动物是人。

[0090] B. 进行本发明的方法

[0091] 1 抗体的产生

[0092] (i) 多克隆抗体

[0093] 制备多克隆抗体的方法是本领域已知的。可在哺乳动物体内产生多克隆抗体,例如,一次或多次注射某免疫制剂和(如果需要)佐剂。通常,可通过多处皮下或腹膜内注射将该免疫制剂和/或佐剂注射入哺乳动物体内。可能有用的是将该免疫制剂与已知在被免疫接种的动物体内具有免疫原性的蛋白质偶联,诸如血清清蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。可采用的佐剂例子包括弗氏完全佐剂和 MPL-TDM。

[0094] 在另一优选实施例中,可用各种,优选所有的 IFN- α 亚型的混合物免疫接种动物,以产生对 IFN- α 诸亚型具有广泛反应活性的抗 IFN- α 抗体。在另一优选实施例中,用人 IFN- α 诸亚型的混合物免疫接种动物,这些亚型存在于仙台病毒所诱导的伯基特淋巴

瘤细胞 (Namalva 细胞) 分泌的人类淋巴母细胞干扰素中, 如下文例 1 所述那样。该人类淋巴母细胞干扰素的合适制品可从 Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo) 购得 (产品号 No. I-9887)。

[0095] (ii) 单克隆抗体

[0096] 单克隆抗体可用杂交瘤方法 (最初由 Kohler 等人, Nature 256 :495 (1975) 所述) 制备, 或用重组 DNA 法 (美国专利号 NO 4, 816, 567) 制备。

[0097] 在杂交瘤方法中, 将小鼠或其他合适的宿主动物, 如仓鼠或猕猴, 按如上所述进行免疫接种以诱导产生或能产生抗体的淋巴细胞, 该抗体能与免疫接种所用的蛋白质特异性结合。或者, 体外进行淋巴细胞免疫接种。然后以合适的融合剂 (如聚乙二醇) 将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 页 [Academic Press, 1996])。

[0098] 将如此制得的杂交瘤细胞接种在合适的培养基中培育, 培养基优选含有 1 种或多种能抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如, 如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT), 该杂交瘤细胞的培养基通常将包括次黄嘌呤, 氨基蝶呤, 和胸苷 (HAT 培养基), 其中的物质能阻止 HGPRT 缺陷性细胞的生长。

[0099] 优选的骨髓瘤细胞是那些能有效融合, 能支持选出的抗体生成细胞稳定性高水平产生抗体, 且对培养基如 HAT 培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中, 优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系, 如由 MOP-21 和 MC-11 小鼠肿瘤衍生的骨髓瘤细胞 (可从美国加利福尼亚圣地亚哥 Salk Institute Cell Distribution 中心购得) 和 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞 (可从 the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA 购得)。也报道了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系来产生人单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol. 133:3001. (1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 页, Marcel Dekker, Inc., New York, [1987])。

[0100] 测定有杂交瘤细胞生长的培育液是否产生了针对该抗原的单克隆抗体。优选免疫沉淀法或体外结合试验 (如放射免疫试验 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA)) 测定杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0101] 例如单克隆抗体的结合亲和力可用 Scatchard 分析法 (Munson 等人 Anal Biochem. 107 :220 (1980)) 测定。

[0102] 鉴定到产生具有所需特异性, 亲和力, 和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 可将该细胞用有限稀释法亚克隆并用标准方法培养 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103 页 Academic Press, 1996)。为此目的合适培育基包括, 如 DMEM 或 RPMI-1640 培养基。此外, 杂交瘤细胞也可在动物体内作为腹水瘤生长。

[0103] 通过常规的免疫球蛋白纯化方法, 如 A 蛋白琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析法, 凝胶电泳, 透析或亲和层析法, 可将亚克隆分泌的单克隆抗体适当地从培育基中, 腹水中, 或血清中分离出来。

[0104] 用常规方法 (如, 采用能与单克隆抗体重链和轻链的编码基因特异性结合的寡核苷酸探针), 不难将编码单克隆抗体的 DNA 分离出来并测序。杂交瘤细胞可作为此种 DNA 的优选来源。一旦分离出来, 可将该 DNA 置入表达载体中, 然后转染入宿主细胞如大肠杆菌细

胞,猴 COS 细胞,中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞,或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以获得在重组宿主细胞中的单克隆抗体的合成。也可修饰此 DNA,例如,用人重链和轻链恒定区的编码序列取代同源小鼠序列 (Morrison 等人, Proc. Nat. Acad, Sci. 81:6851[1984]) 或者将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价连接。按此方式制备具有本文抗 IFN- α 单克隆抗体的结合特异性的“嵌合性”或“杂合”抗体。

[0105] 通常用这种非免疫球蛋白多肽取代本发明抗体的恒定区或取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变区,以产生一种嵌合性二价抗体,该抗体含有一个对 IFN- α 特异性的抗原结合位点和对一个不同抗原具有特异性的另一抗原结合位点。

[0106] 也可采用已知的合成蛋白质化学方法(包括那些涉及交联剂的方法)体外制备嵌合性或杂合抗体。例如,采用二硫化物交换反应或形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的的适合试剂包括亚胺硫醇盐和 4 巯基丁酰亚氨酸甲酯 (methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

[0107] 抗体的重组制备将在下文更详细描述。

[0108] (iii) 人源化抗体

[0109] 人源化抗体通常具有从非人类来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常称作“输入”残基,该残基通常取自“输入”的可变区。人源化可用 Winter 及其同事的方法通过用啮齿动物的 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列来进行 (Jones 等人, Nature 321:522-525[1986]; Riechmann 等人, Nature 332:323-327[1988]; Verhoeyen 等人, Science 239:1534-1536[1988]; 综述 Clark, Immunol. Today 21:397-402[2000])。

[0110] 因此,这样的“人源化”抗体是嵌合性抗体 (Cabilly, 同上), 其中基本上不到一个完整的人可变区被非人动物的相应序列所取代。实践中,人源化抗体通常是人抗体中的一些 CDR 残基和可能一些 FR 残基被啮齿动物抗体的类似位点的残基所取代。

[0111] 重要的是待人源化的抗体保留了对抗原的高度亲和力以及其它有利的生物特性。为了达到这一目标,根据优选的方法,利用亲本与人源化序列的三维模型通过分析亲本序列和不同概念人源化产物的过程,制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常可购得且为本领域技术人员所熟悉。阐述并演示所选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构型结构的计算机程序市场有售。视查这些演示得以分析候选免疫球蛋白序列的残基在功能中的可能作用,如,分析能影响候选免疫球蛋白与其抗原结合能力的残基。这样,可从共有序列和输入序列中选出 FR 残基并组合从而获得所需的抗体特性,如对靶抗原的亲和力增加。总之,CDR 残基直接并最根本地参与了对抗原结合的影响。进一步详述见美国专利 No. 5821337。

[0112] (iv) 人抗体

[0113] 由于缺乏合适的人骨髓瘤细胞系,使用相同技术产生人 mAb 的尝试受到阻碍。用异源骨髓瘤 (小鼠 * 人杂交骨髓瘤) 作为融合伴侣 (Kozbor, J. Immuno. 133:3001(1984); Brodeur 等人, Monoclonal Production Techniques and Applications, 51-63 页, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987) 获得了最好结果。或者,可用 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 感染使人抗体分泌细胞永生化。然而,EBV 感染细胞难于克隆而且通常只产生相对低得率的免疫球蛋白 (James 和 Bell, J. Immunol. Methods 100:5-40[1987])。将来,通过导入转化基因的确定组合,有可能获得人 B 细胞的永生化。最近证明端粒酶催化亚基与 SV40 大 T 癌蛋白和 H-ras 致癌等位基因一起表达导致正常人上皮细胞和成纤维细胞的致癌性转变突出了这种

可能性 (Hahn 等人, Nature 400:464-468[1999])

[0114] 现在,已能够产生转基因动物(如小鼠),这些动物(经免疫接种)产生没有内源免疫球蛋白产物的人类抗体全集(Jakobovits 等人, NATURE 362:255-258[1993]; Lonberg 和 Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93[1995]; Fishwild 等人, Nat. Biotechnol. 14:845-851[1996]; Mendez 等 Nat. Genet, 15:146-156[1997]; Green, J Immunol Methods 231:11-23[1999]; Tomizuka 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727[2000]; 综述见 Little 等人, Immunol. Today 21:364-370[2000])。例如,已有描述说在嵌合性和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合性缺失导致完全抑制内源抗体的产生(Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555[1993])。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这类种系突变小鼠中导致了抗原攻击后人抗体的产生(Jakobovits 等 Nature, 362:255-258[1993])。

[0115] Mendez 等人 (Nature Genetics 15:146-156[1997]) 已制备了一种转基因小鼠,命名为“**XenoMouse[®] II**”,当受到抗原攻击时,它会产生高亲和力的完全人的抗体。这可通过将兆碱基的人重链和轻链基因座种系整合引入上述缺失内源 J_H 区段的小鼠体内而获得。**XenoMouse[®] II** 含有 1,020Kb 的人重链基因座(约含有 66 个 V_H 基因,完整的 D_H 和 J_H 区以及 3 个不同的恒定区 μ , δ , γ),还含有 800Kb 的人 K 基因座(含有 32 个 V_K 基因, J_K 区段,和 C_K 基因)。这些小鼠产生的抗体与人抗体在所有方面看都极为相似,包括基因重排,组装,以及全集。由于缺失内源 J_H 区段阻止了小鼠基因座的基因重排,人抗体优先于内源抗体而表达。

[0116] Tomizuka 等人 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727[2000]) 最近描述了通过在一种内源性 IgH 和 IgK 基因座被灭活的小鼠品种中导入两个独立的人染色体片段(hCFs):一个含有整个 Ig 重链基因座(IgH, 约 1.5Mb)而另一个含有整个 K 轻链基因座(IgK, 约 2Mb),产生了一种双转移染色体(Tc)小鼠。这些小鼠产生了抗原特异性的人抗体应答反应而无小鼠抗体。此 Tc 技术使得能够在小鼠或其他动物中进行兆碱基的复杂的基因座或基因簇(如编码 T 细胞受体,主要组织相容性复合体, P450 簇等)的人源化。该方法的另一优点是不需要克隆大的基因座。这是重大进步,因为即使使用酵母人工染色体仍然难以进行含有整个 Ig 基因座的兆碱基大小的 DNA 片段的克隆(Peterson 等人, Trends Genet. 13:61-66[1997]; Jakobovits, Cvr Biol. 4:761-763[1994])。此外,已知人 IgH 基因座的恒定区含有难于克隆的序列(Kang 和 Cox, Genomics 35:189-195[1996])。

[0117] 另外,可采用噬菌体展示技术从未免疫接种供体的免疫球蛋白可变(V)区基因全集体外产生人抗体和抗体片段(McCafferty 等人, Nature 348:552-553[1990]; 综述见 Kipriyanov 和 Little, Mol. Biotechnol. 12:173-201[1999]; Hoogenboom 和 Chames, Immunol. Today 21:371-378[2000])。根据这一技术,可将抗体 V 区基因框内克隆入丝状噬菌体如 M13 或 fd 的主要或次要包膜蛋白质基因中,并在噬菌体颗粒表面展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,基于抗体功能特性的选择也导致了显示这些特性的抗体的编码基因的选择。因而,噬菌体模拟了 B 细胞的有些特性。噬菌体展示可以多种形式进行(综述见 Johnson 和 Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:564-571[1993]; Winter 等人, Annu. Rev. Immunol. 12:433-455[1994]; Dall'Acqua 和 Carter, Curr. Opin. Struct.

Biol. 8:443-450[1998];Hoogenboom 和 Chames, Immunol. Today 21:371-378[2000])。V 基因区段的一些来源可用于噬菌体展示。Clackson 等 (Nature 352:624-628, 1991) 从免疫小鼠脾脏获得的 V 基因小随机组合文库中分离得到抗唑酮抗体的多样性阵列。按照 Marks 等人, J. Mol. Biol. 222:581-597[1991] 或 Griffiths 等人, EMBO J. 12:725-734(1993) 所述技术可构建未经免疫的人供体的 V 基因全集和分离得到针对抗原 (包括自身抗原) 的多样性阵列的抗体。在天然免疫应答中, 抗体基因高速积聚突变 (体细胞超突变)。导入的某些变化将赋予更高的亲和力, 在随后的抗原攻击期间展示高亲和力表面免疫球蛋白的 B 细胞优先复制和分化。采用称为“链改组”的技术可以模拟这一自然过程 (Marks 等人, Bio/Technol. 10:779-783[1992])。在该方法中, 噬菌体展示获得的“原代”人抗体的亲和力可通过随后用未经免疫供体的 V 区基因的天然存在的变体 (文库) 置换重链和轻链 V 区基因而改进。这一技术得以产生具有 nM 范围亲和力的抗体和抗体片段。制备极大噬菌体抗体全集的方法 (也称为“母体全文库”) 已由 Waterhouse 等人 Nucl. Acids Res. 21:2265-2266(1993) 所描述, 而且已报道了从此种大噬菌体文库中直接分离得到高亲和力的人抗体, 见 Griffiths 等人, EMBO J. 13:3245-3260(1994)。基因改组也可用于从啮齿动物抗体中衍生出人抗体, 其中该人抗体具有与起始啮齿动物抗体类似的亲和力和特异性。根据这一方法, 也称为“表位印记法”, 用人 V 区基因全集取代通过噬菌体展示技术获得的啮齿动物抗体的重链或轻链 V 区基团, 产生了啮齿动物-人嵌合体。经抗原选择导致分离得到能恢复功能性抗原结合位点的人可变区, 即, 表位控制 (印记) 伴侣选择。重复这一过程以取代其余的啮齿动物 V 区, 获得了人抗体 (见 PCT 专利申请 WO 93/06213, 公布于 1993 年 4 月 1 日)。与通过 CDR 移植进行的啮齿动物抗体传统人源化不同的是, 该技术提供了完全人的抗体, 该抗体没有啮齿动物来源的框架或 CDR 残基。

[0118] (V) 双特异性抗体

[0119] 双特异性抗体是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体 (优选人或人源化抗体)。在本例中, 结合特异性的其中一种是对 IFN- α 的而提供了中和抗体, 而另一种是对其它任何抗原。

[0120] 本领域已知制备双特异性抗体的方法。传统上, 双特异性抗体的重组产生基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达, 其中两条重链具有不同的特异性 (Millstein 和 Cuello, Nature 305:537-539[1983])。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分类, 这些杂交瘤 (四源杂交瘤 (quadroma)) 产生了 10 种不同抗体分子的潜在混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。此种正确分子的纯化 (通常以亲和层析法进行) 相当麻烦且产量低。类似方法公开于 PCT 申请出版物 NO. WO 93/08829 中 (1993 年 5 月 13 日出版), 和 Traunecker 等人, EMBO J. 10:3655-3659(1991)。

[0121] 根据一种不同而且更优选的方法, 将具有所需结合特异性 (抗体-抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。优选与至少含有部分铰链区, CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选在至少一个融合物中存在含有轻链结合必需位点的重链第一恒定区 (CH1)。可将编码免疫球蛋白重链融合物的 DNA 和如果需要的话编码免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体中, 共转染入合适的宿主生物中。在所用三条多肽链以不相等比率用于构建时提供最大产量的实施例, 该方法为调节此三条多肽片段的互相比例提供了很大灵活性。然而, 当至少两条多肽链以相同比例表达以产生高得率或此比例

没有特别意义时,可以将两条或所有三条多肽链的编码序列插入一个表达载体中。在该方法的一个优选实施例中,构成该双特异性抗体的两臂中,一臂上为具有第一种结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,而另一臂上为杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二种结合特异性)。已发现,由于免疫球蛋白轻链只存在于该双特异性分子的一半中,这提供了容易的分离方法,这种不对称结构有利于从不需要的免疫球蛋白链混合物中分离所需的双特异性组合物。

[0122] 产生双特异性抗体的更多细节见,例如 Suresh 等人,Methods in Enzymology 121, 210(1986)。

[0123] (VI) 异质偶联抗体

[0124] 异质偶联抗体也在本发明范围之内。异质偶联抗体含有两个共价连接的抗体。例如,已提出这样的抗体可将免疫系统细胞靶向不良细胞(美国专利号 NO. 4, 676, 980),和治疗 HIV 感染(PCT 申请出版物 WO 91/00360 和 WO 92/200373 ;EP 03089)。可用方便的交联方法制备异质偶联抗体。适合的交联剂是本领域所熟知并与一些交联技术一起公开于美国专利号 NO. 4, 676, 980 中。

[0125] (VII) 抗体片段

[0126] 在某些实施例中,中和性抗 IFN- α 抗体(包括小鼠,人和人源化抗体,以及抗体变体)是一种抗体片段。已发展了各种技术来制备抗体片段。传统上通过完整抗体的蛋白水解消化衍生这些片段(见, Morimoto 等人 J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117[1992] 和 Brennan 等人, Science 229:81[1985])。然而,这些片段现在可用重组宿主细胞直接生产(综述见 Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11:548-557[1999]; Little 等人 Immunol. Today 21:364-370[2000])。例如,可从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段并化学偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等人., Bio/Technology 10:163-167[1992])。在另一实施例中,使用亮氨酸拉链 GCN4 促进 F(ab')₂ 分子的装配来形成 F(ab')₂。根据另一方法, Fv, Fab 或 F(ab')₂ 片段可从重组宿主细胞培育物中直接分离得到。熟练从业者知道制备抗体片段的其它技术。

[0127] (VIII) 抗体的氨基酸序列变体

[0128] 考虑了本文所述抗 IFN- α 抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。通过在编码抗 IFN- α 抗体链的核酸中导入合适的核苷酸变化或通过肽合成,制备抗 IFN- α 抗体的氨基酸序列变体。这样的修饰包括,例如,缺失,和/或插入和/或取代抗 IFN- α 抗体的氨基酸序列内的一些残基。制作缺失、插入,和取代的任何组合以获得最终结构,只要该最终结构具有所需特性。氨基酸变化也可能改变抗 IFN- α 抗体的翻译后加工,如改变糖基化位点的数目或位置。

[0129] 中和性抗 IFN- α 抗体作为优选诱变位置的某些残基或区域的常用鉴定方法称为“丙氨酸扫描诱变法”,如 Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085(1989) 所述。鉴定残基或靶残基组(如带电荷的残基,精氨酸,天冬氨酸,组氨酸,赖氨酸,和谷氨酸)并用中性或带负电荷的氨基酸替代(最优选是丙氨酸或聚丙氨酸)以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后那些对于取代表现出功能敏感性的氨基酸位置通过在取代位点进一步导入其它突变而细化。这样,虽然预先确定了导入氨基酸序列突变的位点,但不需要预先确定突变本身的性质。例如为了分析某给定位点的突变性能,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随

机诱变并筛选具有所需活性的表达的抗 IFN- α 抗体变体。

[0130] 氨基酸序列的插入包括氨基和 / 或羧基末端的融合（长度范围从一个残基到包含 100 个或更多残基的多肽）以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 末端甲硫氨酰残基的抗 IFN- α 中和性抗体, 或与一表位标签融合的抗体。抗 IFN- α 抗体分子的其他插入性变体包括在抗体的 N 或 C 末端融合能增加抗体的血清半衰期的多肽或酶。

[0131] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体在中和性抗 IFN- α 抗体分子中至少有一个氨基酸残基被去除并在其位置插入了一个不同的残基。取代诱变的最关注位置包括高变区, 但也考虑 FR 的改变。保守性取代见表 1 题头为“优选的取代”。如果这些取代导致生物活性改变, 那么可, 见表 1 中称为“示范性取代”, 或如下文所述参见氨基酸分类导入更多的实质性变化并筛选产物。

[0132] 表一：

[0133]

原残基	示范性取代	优选的取代
丙氨酸(A)	缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸	缬氨酸
精氨酸(R)	赖氨酸, 谷氨酰胺; 天冬酰胺	赖氨酸
天冬酰胺(N)	谷氨酰胺; 组氨酸; 天冬氨酸; 赖氨酸; 精氨酸	谷氨酰胺
天冬氨酸(D)	谷氨酸; 天冬酰胺	谷氨酸
半胱氨酸(C)	丝氨酸; 丙氨酸	丝氨酸
谷氨酰胺(Q)	天冬酰胺; 谷氨酸	天冬酰胺
谷氨酸(E)	天冬氨酸; 谷氨酰胺	天冬氨酸
甘氨酸(G)	丙氨酸	丙氨酸
组氨酸(H)	天冬酰胺; 谷氨酰胺; 赖氨酸; 精氨酸	精氨酸
异亮氨酸(I)	亮氨酸; 缬氨酸; 蛋氨酸; 丙氨酸; 苯丙氨酸; 正亮氨酸	亮氨酸
亮氨酸(L)	正亮氨酸; 异亮氨酸; 缬氨酸; 蛋氨酸; 丙氨酸; 苯丙氨酸	异亮氨酸
赖氨酸(K)	精氨酸; 谷氨酰胺; 天冬酰胺	精氨酸
蛋氨酸(M)	亮氨酸; 苯丙氨酸; 异亮氨酸	亮氨酸
苯丙氨酸(F)	亮氨酸; 缬氨酸; 异亮氨酸; 丙氨酸; 酪氨酸	酪氨酸
脯氨酸(P)	丙氨酸	丙氨酸
丝氨酸(S)	苏氨酸	苏氨酸
苏氨酸(T)	丝氨酸	丝氨酸
色氨酸(W)	酪氨酸; 苯丙氨酸	酪氨酸
酪氨酸(Y)	色氨酸; 苯丙氨酸; 苏氨酸; 丝氨酸	苯丙氨酸
缬氨酸(V)	异亮氨酸; 亮氨酸; 蛋氨酸; 苯丙氨酸; 丙氨酸; 正亮氨酸	亮氨酸

[0134] 选择在维持 (a) 取代区多肽主链的结构, 例如片层或螺旋构型, (b) 靶位点上分子的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链的大小方面的作用明显不同的取代, 进行抗体生物特性的实质性修饰。根据共同的侧链性质, 将天然存在的残基分成以下几组:

[0135] (1) 疏水的: 正亮氨酸, 蛋氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸;

[0136] (2) 中性、疏水的: 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸;

[0137] (3) 酸性的: 天冬氨酸, 谷氨酸;

[0138] (4) 碱性的: 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, ;

[0139] (5) 影响链取向的残基 : 甘氨酸, 脯氨酸 ; 和

[0140] (6) 芳香族的 : 色氨酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸。

[0141] 非保守性取代需要将这些类别之一的一个成员换成另一类别的成员

[0142] 不参与维持中和性抗 IFN- α 抗体正确构型的任何半胱氨酸残基也可被取代 (通常用丝氨酸) 以改善该分子的氧化稳定性并防止异常交联。相反, 可向抗体加入半胱氨酸键以改善其稳定性 (尤其当抗体是如 FV 片段的抗体片段时)。

[0143] 特别优选的取代变体类型包括取代亲本抗体 (如人源化或人抗体) 的一个或多个高变区残基。通常, 为进一步发展选择的所得变体将具有改进的生物活性 (相对于产生它们的亲本抗体而言)。产生这样的取代变体的方便方法是通过噬菌体展示的亲和力成熟。简单而言, 可进行几个高变区位点 (如 6-7 位点) 的突变以在各个位点产生所有可能的氨基酸取代。如此产生的抗体变体作为与包裹在每个颗粒中的 M13 基因 III 产物的融合物, 以单价形式从丝状噬菌体颗粒中展示。然后如本文所述筛选噬菌体展示的变体的生物活性 (如, 拮抗剂活性)。为了鉴定进行修饰的候选高变区位点, 可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合有明显贡献的高变区残基。或者, 或另外, 分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和 IFN- α 之间的接触点可能是有利的。根据本文所述技术, 这种接触残基和相邻残基是取代的候选者。一旦产生这样的变体, 如本文所述筛选变体组并在一个或多个相关试验中选出具有优良特性的抗体来进一步开发。

[0144] (IX) 糖基化变体

[0145] 抗体在它们的恒定区保守位置上糖基化 (Jefferis 和 Lund, Chem. Immunol. 65:111-128[1997]; Wright 和 Morrison, Trends Biotechnol. 15:26-32[1997])。免疫球蛋白的寡糖侧链影响蛋白质的功能 (Boyd 等人, Mol. Immunol. 32:1311-1318[1996]; Wittwe 和 Howard, Biochem. 29:4175-4180[1990]), 和能影响糖蛋白构型和所呈现三维表面的糖蛋白部分之间分子内相互作用 (Jefferis 和 Lund, 同上; Wyss 和 Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416[1996])。寡糖也能基于特异性识别结构将给定的糖蛋白靶向某些分子。例如, 已有报导说在未半乳糖基化的 IgG 中, 其寡糖部分翻转出 CH2 之间间隔, 使末端 N-乙酰葡萄糖胺残基可结合甘露糖结合蛋白质 (Malhotra 等人, Nature Med. 1:237-243[1995])。用糖肽酶从中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生的 CAMPATH-1H (识别人淋巴细胞的 CDw52 抗原的重组人源化鼠单克隆 IgG1 抗体) 中去除寡糖, 导致补体介导的裂解 (CMCL) 完全减低 (Boyd 等人 Mol. Immunol. 32:1311-1318[1996]), 而使用神经氨酸酶选择性去除唾液酸残基不会引起 DMCL 的损失。也已报道抗体的糖基化会影响依赖于抗体的细胞的细胞毒性 (ADCC)。特别地, 根据报道, 具有四环素调节的 β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III (GnTIII) (一种催化等分 GlcNAc 形成的糖基转移酶) 表达的 CHO 细胞, 具有改进的 ADCC 活性 (Umana 等 Meture Biotech, 17:176-180, 1999)。

[0146] 通常抗体的糖基化是 N 连接或 O 连接。N 连接指糖部分结合于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸 (其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸) 是糖部分与天冬酰胺侧链的酶促结合的识别序列。这样, 在多肽中存在这些三肽序列之一产生了潜在的糖基化位点。O 连接糖基化是指糖 N-乙酰半乳糖胺, 半乳糖, 或木糖之一结合于羟基氨基酸, 最常见的是丝氨酸或苏氨酸, 虽然也可用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖

氨酸。

[0147] 抗体的糖基化变体是抗体的糖基化模式被改变的变体。改变意味着抗体中缺失一个或多个原有的糖部分,在抗体中加入一个或多个糖部分,改变糖基化组成(糖基化模式)和糖基化程度,等等。

[0148] 通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述的三肽序列可方便地实现将糖基化位点加入抗体中(对于N连接糖基化位点)。也可在原抗体序列中加入或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基进行这种改变(对于O连接糖基化位点)。类似地,改变抗体的天然糖基化位点内的氨基酸也可实现糖基化的消除。

[0149] 通过改变核酸序列通常可改变氨基酸序列。用本领域已知的各种方法制备抗-IFN α 抗体的氨基酸序列变体的编码核酸分子。这些方法包括但不限于,从天然来源中分离(就天然存在的氨基酸序列变体而言),或通过对抗-IFN抗体的先前制备的变体或非变体的寡核苷酸介导(或定点)的诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

[0150] 也可不改变氨基酸序列或核苷酸序列而改变抗体的糖基化(包括糖基化模式)。糖基化主要取决于用于表达抗体的宿主细胞。由于用于表达作为潜在治疗剂的重组糖蛋白(如抗体)的细胞类型极少为天然细胞,可以预见抗体糖基化模式的明显变异(见Hse等人J Biol. Chem, 272:9062-9070. 1997)。除了选择宿主细胞外,在抗体重组产生过程中影响糖基化作用的因素包括生长方式,培养基配方,培养密度,氧合作用,pH值,纯化方案等。业已提出各种方法在具体宿主生物体中获得糖基化模式的改变,包括导入或过度表达参与寡糖产生的某些酶(美国专利No. 5,047,335;5,510,261;和5,278,229)。糖基化,或某些类型的糖基化,可从糖蛋白中经过酶促反应而消除,例如使用内切糖苷酶H(EndoH)。此外,可以基因改造重组宿主细胞,如,制造某些类型多糖加工的缺陷。这些以及类似技术是本领域熟知的。

[0151] 可采用常规的糖类分析技术(包括凝集素层析,NMR,质谱,HPLC,GPC,单糖组分分析,顺序酶消化,以及使用高pH阴离子交换层析根据电荷分离寡糖的HPAEC-PAD)不难分析抗体的糖基化结构。为了分析目的而释放寡糖的方法也是已知的,包括但不限于酶处理(通常用肽-N-糖苷酶F/内切- β -半乳糖苷酶进行),用强碱性环境消除以主要释放O连接结构,以及用无水肼释放N连接和O连接寡糖的化学方法。

[0152] (X) 抗体的其它修饰

[0153] 本文所公开的中和性抗IFN- α 抗体也可配制成免疫脂质体。含此抗体的脂质体可用本领域已知的方法制备,如Epstein等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:3688[1985];Hwang等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980);以及美国专利No.4,485,045和4,544,545.所述。具有增加的血循环期的脂质体公开于美国专利NO 5,013,556中。

[0154] 用含有磷脂酰胆碱,胆固醇和磷脂酰乙醇胺聚乙二醇衍生物(PEG-PE)的脂质组合物进行反相蒸发方法可产生特别有用的脂质体。将脂质体挤压通过确定孔径的滤器以产生具有所需直径的脂质体。如Martin等人.,J.Biol.Chem.257:286-288(1982)所述通过链间二硫键反应,可将本发明抗体的Fab'片段与脂质体偶联。可任选地在该脂质体中含有化疗剂(如多柔比星)。见Gabizon等人J.National Cancer Inst.81(19);1484(1989)。

[0155] 通过将抗体与一种前药活化酶偶联,此酶能将前药(如肽基化疗剂,见W081/01145)转变成活性药物,也可在ADEPT中应用本发明的抗体。见,例如,W088/07378

和美国专利 NO 4, 975, 278。

[0156] 可用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括能作用于前药的任何酶, 此酶能将前药转变成显示所需生物特性的更活跃形式。

[0157] 本发明方法中使用的酶包括但不限于, 用于将含磷酸盐的前药转变成游离药物的碱性磷酸酶; 用于将含硫酸盐前药转变为游离药物的芳基硫酸酶; 用于将无毒 5- 氟胞嘧啶转变成抗癌药物 (5- 氟尿嘧啶) 的胞嘧啶脱氨酶; 用于将含肽的前药转变为游离药物的蛋白酶, 例如沙雷氏菌蛋白酶, 嗜热菌蛋白酶, 枯草蛋白酶, 羧肽酶和组织蛋白酶 (如组织蛋白酶 B 和 L); 用于转变含 D- 氨基酸取代前药的 D- 丙氨酰羧肽酶; 用于将糖基化的前药转变为游离药物的糖类裂解酶, 如 β - 半乳糖苷酶和神经氨酸酶; 用于转变 β - 内酰胺衍生药物为游离药物的 β 内酰胺酶; 青霉素酰胺酶, 如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶, 用于将在其氨基氮分别用苯氧乙酰或苯乙酰基团衍生的药物转变为游离药物。另外, 具有酶活性的抗体, 在本领域称为“抗体酶”, 可用于将本发明的前药转变为游离药物 (见 Massey, Nature 328:457-458 (1987))。抗体- 酶偶联物可按本文所述方法制备, 将抗体酶输送给所需的细胞群。

[0158] 可用本领域熟知的技术将酶与中和性抗 IFN- α 抗体共价结合, 如使用上述的异质双功能交联剂。另外, 用本领域熟知的重组 DNA 技术可构建融合蛋白质, 该蛋白质至少含有与本发明酶的功能活性部分相连的本发明抗体的抗原结合区 (见 Neuberger 等人, Nature 312:604-608 [1984])。

[0159] 在本发明的某些实施例中, 可能需要采用抗体片段而不是完整的抗体。在此情况下, 可能需要修饰抗体片段以增加其血清半衰期。例如这可通过在抗体片段中掺入一补救性受体结合表位 (如, 通过在抗体片段内合适区域的突变, 或在肽标签中掺入该表位, 然后与抗体片段末端之一或中间融合, 如, 通过 DNA 或肽合成) 而实现。见 1996 年 10 月 17 日公布的 WO 96/32478。

[0160] 通常, 补救性受体结合表位构成一个区域, 其中 Fc 区的一个或二个环上的任一个或多个氨基酸残基被转移到该抗体片段的类似位置。甚至更优选 Fc 区的一个或二个环上的 3 个或多个残基被转移。更优选此表位取自 Fc 区 (如 IgG) 的 CH2 结构域并且转移到此抗体的 CH1, CH3 或 VH 区或 1 个以上的这些区域中。或者, 此表位取自 Fc 区的 CH2 结构域并且转移到该抗体片段的 CL 区或 VL 区或这二个区。

[0161] 中和性抗 IFN- α 抗体的共价修饰也包括在本发明范围之内。如果需要, 可通过化学合成或抗体的酶促裂解或化学裂解制备。用能够与所选侧链或 N 端或 C 端残基反应的有机衍生试剂与此抗体的靶氨基酸残基反应, 将其它类型的抗体共价修饰引入此分子中。典型的多肽共价修饰在美国专利 5, 534, 615 中有描述, 参考文献中。抗体共价修饰的优选类型包括以美国专利 4, 640, 835; 4, 496, 689; 4, 301, 144; 4, 670, 417; 4, 791, 192 或 4, 179, 337 中所述方式将抗体与各种非蛋白性聚合物之一相连, 如聚乙二醇, 聚丙二醇, 或聚氧化烯。

[0162] 2、筛选具有所需特性的抗体

[0163] 产生抗体的技术上文已有描述。具有所需的广泛的中和特性的抗 IFN- α 抗体可用本领域已知方法来鉴定。

[0164] (i) 结合试验

[0165] 例如,将候选抗体与一种或多种 IFN- α 亚型,或各种 IFN- α 亚型的阵列或混合物一起培育,并监测结合和 IFN- α 生物活性的中和,可在 IFN- α 结合试验中鉴定本发明的中和性抗 IFN- α 抗体。可采用纯化的 IFN- α 多肽进行此结合试验。在一实施例中,该结合试验是竞争性结合试验,其中评价在 IFN- α 结合方面候选抗体与一个已知抗 IFN- α 抗体竞争的能力。此试验可以不同方式进行,包括 ELISA 形式,也在下列实施例中阐述。如下所述,也可用 BIAcoreTM 生物传感器试验监测候选抗体的 IFN- α 结合。

[0166] 可采用本领域已知的任何合适的竞争结合试验来特征鉴定候选抗 IFN- α 单克隆抗体与小鼠抗人 IFN- α 单克隆抗体 9F3 竞争结合某具体 IFN- α 种类的能力。常规竞争试验在 Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane (1988) 中有所描述。在另一实施例中,可改进如下例 2 所述的 IFN- α 结合性 ELISA 试验以利用候选抗体与 9F3 抗体之间的 IFN- α 结合竞争。该试验按如下方法进行:在微量滴定板上包被 IFN- α ,用与所选浓度的标记 9F3 抗体相混合的未标记抗 IFN- α 抗体或未标记对照抗体的系列稀释液温育已包被的滴定板,检测并测量 9F3 抗体标记物的信号,然后比较抗体的不同稀释液所显示的信号测量结果。

[0167] (ii) 抗病毒试验

[0168] 例如,如 Kawade, J. Interferon Res. 1:61-70 (1980) 或 Kawade 和 Watanabe, J. Interferon Res. 4:571-584 (1984) 所述,通过监测 IFN- α 的抗病毒活性的中和,可测定候选抗体中和 IFN- α 生物活性的能力。简而言之,将与候选抗体的不同稀释液预先混合的固定浓度的 IFN- α 加入到人羊膜衍生 FL 细胞中,并用适当的病毒(如新培斯病毒)测定候选抗体中和 IFN- α 的抗病毒活性的能力。用国际参考品人 IFN- α (NIH Ga23-901-527) 测定,以国际单位 (IU) 表示滴定度。

[0169] 如果某一浓度的抗体比在同等浓度对照抗体存在下所测定的抗病毒活性抑制基线水平抑制了更多的抗病毒活性,那么认为该候选抗 IFN- α 抗体能够抑制所选 IFN- α 亚型的抗病毒活性。任选地,在抗病毒活性试验中与在同等浓度对照抗体存在下所测的基线活性相比,某一浓度候选抗 IFN- α 抗体将抑制所选 IFN- α 亚型的抗病毒活性的至少约 60%,或至少约 70%,较佳至少约 75%,或更佳至少约 80%,或再佳至少约 85%,或还要佳至少约 90%,或还要更佳至少约 95%,或最佳至少约 99%。如果候选抗体的任何浓度不显示比在同等浓度对照抗体存在下所测抗病毒活性抑制基线水平更多的抗病毒活性抑制度,那么认为该候选抗 IFN- α 抗体不能抑制所选 IFN- α 亚型的抗病毒活性。

[0170] 在一个优选实施例中,滴定在病毒感染性试验中所用的每种干扰素至一浓度,该浓度提供与 IFN- α 标准品预选单位数所诱导的相同水平的病毒生长抑制。该浓度的作用是提供受测试干扰素的标准化单位。为了评价抗 IFN- α 抗体抑制不同 IFN- α 亚型的抗病毒活性的能力,对每种待测试 IFN- α 亚型测定了抗 IFN- α 抗体抑制具体 IFN- α 亚型抗病毒活性(滴定至提供标准化活性单位的浓度)50%的有效浓度 (EC₅₀)。

[0171] 在一个实施例中,如下例 1 所述进行抗病毒活性中和试验。简而言之,在 96 孔微量滴定板上培养 A549 细胞至密度 5×10^5 个 A549 细胞/孔。在 37°C 以 100:1 的总体积将 0.2 单位/:1 的所选 IFN- α 亚型(标准化至 0.2 单位/:1 的 NIH 参考标准品重组人 IFN- α 2) 与候选抗 IFN- α 抗体的系列稀释液培育 1 小时。然后将各 100:1 体积的抗体/干扰素培育混合物加入到微量滴定板的各孔的 5×10^5 A549 细胞和 100:1 的培育基中,各孔

中获得最终 100 单位 /ml 的 IFN- α 浓度。37° C 培育该细胞培养混合物 24 小时。然后将细胞用 2×10^5 pfu 的脑心肌炎 (EMC) 病毒攻击并 37° c 再培育 24 小时。培育后,用可见光显微镜检或结晶紫染色测定细胞活力。对每个待检测的 IFN- α 亚型测定候选抗 IFN- α 抗体在试验中抑制具体 IFN- α 亚型抗病毒活性 50% 的有效浓度 (EC50)。

[0172] 在本发明的一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 高达约 20 :g/ml,或高达约 10 :g/ml,或高达约 5 :g/ml,或高达约 4 :g/ml,或高达约 3 :g/ml,或高达约 2 :g/ml,或高达约 1 :g/ml。

[0173] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.1 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.1 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.1 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.1 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.1 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.1 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.1 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0174] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.2 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.2 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.2 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.2 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.2 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.2 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.2 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0175] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.3 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.3 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.3 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.3 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.3 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.3 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.3 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0176] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.4 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.4 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.4 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.4 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.4 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.4 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.4 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0177] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.5 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.5 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.5 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.5 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.5 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.5 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.5 :g/ml 至约 1 :g/ml 的。

[0178] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.6 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.6 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.6 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.6 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.6 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.6 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.6 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0179] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试

IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.7 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.7 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.7 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.7 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.7 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.7 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.7 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0180] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.8 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.8 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.8 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.8 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.8 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.8 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.8 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0181] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 0.9 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 0.9 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 0.9 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 0.9 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 0.9 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 0.9 :g/ml 至约 2 :g/ml,从约 0.9 :g/ml 至约 1 :g/ml。

[0182] 在本发明的另一个方面中,在上述 A549 细胞 EMC 病毒抑制试验中,对受测试 IFN- α 亚型表现出抗病毒活性中和作用的抗 IFN- α 抗体,将显示对各受测试 IFN- α 亚型的 EC50 从约 1 :g/ml 至约 20 :g/ml,从约 1 :g/ml 至约 10 :g/ml,从约 1 :g/ml 至约 5 :g/ml,从约 1 :g/ml 至约 4 :g/ml,从约 1 :g/ml 至约 3 :g/ml,从约 1 :g/ml 至约 2 :g/ml。

[0183] (iii) 交叉阻断试验

[0184] 为了筛选能与感兴趣抗体所结合的 IFN- α 表位相结合的抗体,可进行如“Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 所述的常规交叉阻断试验。或者,或此外,可用本领域已知的方法进行表位作图。例如,可用 Fendly 等人., Cancer Research 50:1550-1558 (1990) 所述的竞争结合分析测定受本发明单克隆抗体结合的 IFN- α 表位。在另一个例子中,在微量滴定板上用直接荧光进行交叉阻断研究。此方法中,使用已建立的方法 (Wofsy 等人. Select Methods in Cellular Immunology, 287 页, Mishel 和 Schiigi 编 San Francisco: W. J. Freeman Co. (1980)), 将感兴趣的单克隆抗体与异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联。微量滴定板的孔用所选 IFN- α 包被,将包被孔与 (1) FITC 标记的感兴趣单克隆抗体和 (2) 未标记的受试单克隆抗体的混合物一起培育,并且定量测定各孔的荧光以确定此抗体所显示的交叉阻断水平。如果与无关单克隆抗体对照相比各单克隆抗体彼此阻断了 50% 或更多的结合,那么认为这些单克隆抗体针对一共同表位。

[0185] 在细胞为基础的生物试验中所获结果然后可在动物中测试,如小鼠模型,和人临床实验。若需要,可将已鉴定具有所需特性的鼠单克隆抗体转变成嵌合抗体,或用本领域所熟知的技术人源化,包括“基因转变诱变”方法,如美国专利 NO. 5, 821, 337 中所述,本文参考引用该完整专利。本文的特定抗 IFN- α 抗体的人源化也在下列实例中描述。

[0186] (iv) 噬菌体展示方法

[0187] 可利用组合文库鉴定本发明抗 IFN- α 抗体,以筛选具有所需活性的合成性抗体克隆。原则上,筛选含有展示与噬菌体包膜蛋白融合的抗体可变区 (Fv) 的各种片段 (如, Fab, F(ab')₂ 等) 的噬菌体的噬菌体文库,选出合成性抗体克隆。用所需抗原的亲亲和层析

淘选这样的噬菌体文库。表达能与所需抗原结合的 Fv 片段的克隆被抗原吸附并因而与文库中的非结合性克隆相分离。然后从抗原上洗脱结合性克隆,可另加几轮抗原吸附/洗脱循环进一步富集。通过设计合适的抗原筛选方法以选出感兴趣的噬菌体克隆,然后采用此感兴趣噬菌体克隆的 Fv 序列和如 Kabat 等人 (1991), 同上所述的合适恒定区 (Fc) 序列构建全长的抗 IFN- α 抗体克隆,可获得本发明任何 IFN- α 抗体。

[0188] 噬菌体展示文库的构建

[0189] 抗体的抗原结合结构域由轻 (VL) 链和重 (VH) 链的两个各含有约 110 个氨基酸的可变 (V) 结区构成,二者都有三个高变环或互补决定区 (CDR)。如 Winter 等人., Ann. Rev. Immunol, 12:433-455 (1994) 所述,可变区可在噬菌体上功能性展示;或者作为单链 Fv (scFv) 片段,其中 VH 和 VL 通过一条短而柔性的肽共价相连,或者作为 D(ab')₂ 片段,其中二片段分别与恒定区融合并且非共价互相作用。如本文所用, scFv 编码噬菌体克隆和 Fab 或 F(ab')₂ 编码噬菌体克隆都称为“Fv 噬菌体克隆”或“Fv 克隆”。

[0190] 动物的原初文库 (抗原攻击前的文库) 提供了能与基本上任何非自身分子以中等亲和力 (K_d^{-1} 约为 10^6 - $10^7 M^{-1}$) 结合的抗体。抗体结合位点的序列多样性在种系中不直接编码但以组合方式由 V 基因区段组装。在人重链中,从不到 50 个 VH 基因区段中取得前两个高变环 (H1 和 H2), 与 D 区段和 JH 区段联合产生第三个高变环 (H3)。在人轻链中,从不到约 30 个 V8 和不到约 30 个 V6 区段中取得前两个高变环 (L1 和 L2) 和第三个 (L3) 的大部分以完成第三个高变环 (L3)。

[0191] 干细胞中 V 基因区段的每种组合性重排产生了表达单个 VH-VL 组合的 B 细胞。免疫接种引发了制造结合免疫原的组分的 B 细胞增值 (克隆扩增) 并分泌相应抗体。然后通过诱变和选择 (称为亲和力成熟) 过程这些天然抗体成熟至高度亲和力 (K_d^{-1} 为 10^9 - $10 M^{-1}$)。此后,通常取出这些细胞以制备杂交瘤并产生高亲和力的单克隆抗体。

[0192] 如 Winter 等人 Ann. Rev. Immunol, 12:433-455 (1994) 所述,在此法三步中, VH 和 VL 基因文库可通过聚合酶链反应 (PCR) 分别克隆并在噬菌体文库中随机重组,然后搜寻抗原结合克隆。免疫接种来源的文库提供了对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。另外,如 Griffiths 等人 EMBOJ. 12:725-734 (1993) 所述,可将该原初文库克隆以在无需免疫接种的前提下提供对广泛范围的非自身和自身抗原的人抗体的一种来源。最后,如 Hoogenboom 和 Winter. J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992) 所述,通过克隆自干细胞的未经重排的 V 或 VIII 基因区段,并采用含有随机序列的 PCR 引物以在体外编码 CDR3 高变区并完成重排,也可合成制得原初文库。

[0193] 噬菌体展示模仿了 B 细胞。通过与次要包膜蛋白 p III 融合使用丝状噬菌体来展示抗体片段。如 Marks 等人 J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 所述,抗体片段可作为单链 Fv 片段展示,其中 VH 和 VL 区通过一柔性的多肽接头连接在同一多肽链上,或如 Hoogenboom 等人, Nucl. Acids Res., 19:4133-4137 (1991) 所述,作为 Fab (包括 F(ab')₂) 片段展示,其中一条链与 P III 融合而另一条分泌入细菌宿主细胞周质中,在那儿组装成 Fab-包膜蛋白质结构,通过取代一些野生型包膜蛋白在噬菌体表面展示。当抗体片段与 p III 的 N 端融合时,此噬菌体有传染性。然而,如果切下 p III 的 N 末端结构域并与第二结构域形成融合,此噬菌体无传染性,而野生型 p III 必须通过辅助噬菌体提供。

[0194] 可将噬菌体的 p III 融合物和其它蛋白质全部编码在同一噬菌体复制子中或不同

复制子上。使用两个复制子时,在噬菌粒(含有噬菌体复制起点的质粒)上编码 p III 融合物。如, Vieira 和 Messing, Meth. Enzymol, 153:3-11(1987) 所述,用提供所有噬菌体蛋白质(包括 p III)但由于缺乏起点在与噬菌粒竞争中自身难以被包装的辅助噬菌体(如 M13K07)通过“挽救”,将噬菌体包入噬菌体颗粒中。在一优选方法中,如 Bass 等人 Proteins, 8:309-314(1990) 和 W092/09690(PCT/US91/09133 公布于 1992 年 6 月 11 日)所述,设计噬菌体展示系统,使得重组噬菌体可在允许不多于微量的噬菌体颗粒在颗粒表面展示一个以上拷贝的 F_v 一包膜蛋白融合物的条件下在宿主细胞中培养。

[0195] 一般,从人或动物收获的免疫细胞中获得编码抗体基因片段的核酸。如果需要偏性选择抗 IFN- α 克隆的文库,可用 IFN- α 免疫接种该对象以产生抗体应答,并回收脾细胞和/或循环性 B 细胞外周血淋巴细胞(PBL)用于文库构建。在一优选实施例中,在具有功能性人免疫球蛋白基因阵列(且缺乏功能性内源抗体产生系统)的转基因小鼠中产生抗人 IFN- α 抗体应答而获得偏性选择抗人 IFN- α 克隆的人抗体基因片段文库,因而 IFN- α 免疫接种产生的 B 细胞可产生抗 IFN- α 的人序列抗体。

[0196] 在另一优选实施例中,为了产生(包括生成对 IFN- α 诸亚型具有广泛反应活性的抗 IFN- α 抗体的 B 细胞)抗体应答用不同的优选所有的 IFN- α 亚型的混合物免疫接种动物。在另一优选实施例中,如下例 1 所述,用存在于人类淋巴瘤母细胞干扰素(由仙台病毒诱生的伯基特淋巴瘤细胞(Namalva 细胞)分泌)中的人 IFN- α 诸亚型混合物免疫接种动物。此种人类淋巴瘤母细胞干扰素的适用制品可从 Sigma Chemical Compay, St. Louis, MO 购得。

[0197] 用适当的筛选方法分离表达 IFN- α 特异性膜结合抗体的 B 细胞,如用 IFN- α 亲和层析分离细胞或使细胞吸附于荧光色素标记的 IFN- α ,然后用荧光激活细胞分选法(FACS),可获得抗 IFN- α 反应活性细胞群的进一步富集。

[0198] 或者,使用未免疫供体的脾细胞和/或 B 细胞或其它 PBL,提供可能的抗体文库的更好提呈,并且也得以使用 IFN- α 无抗原性的动物(人或非人)构建抗体文库。为了体外掺入抗体基因构建物的文库,收获该对象的干细胞以提供编码未重排抗体基因区段的核酸。感兴趣的免疫细胞可从各种动物获得,如人、小鼠、大鼠、兔、luprine、犬、猫、猪、牛、马、鸟类等。

[0199] 可从感兴趣的细胞回收编码抗体可变基因区段(包括 VH 和 VL 区段)的核酸并扩增。如 Orlandi 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837(1989) 所述,在重排 VH 和 VL 基因文库的情况中,分离淋巴细胞的基因组 DNA 或 mRNA 然后用匹配于重排 VH 和 VL 基因的 5' 和 3' 端的引物进行聚合酶链反应(PCR),可获得所需的 DNA,然后制得用于表达的多样性 V 基因文库。如 Orlandi 等人, (1989) 和 Ward 等人, Nature, 341:544-546(1989) 所述,用编码成熟 V 结构域的外显子 5' 端上的后引物和基于 J 区段内的前引物,可从 cDNA 和基因组 DNA 中扩增此 V 基因。然而,如 Jones 等人, Biotechnol, 9:88-89(1991) 所述,对于 cDNA 扩增,后引物也可基于前导外显子,而如 Sastry 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732(1989) 所述,前引物也可基于恒定区。如 Orlandi 等人, (1989) 或者 Sastry 等人(1989) 所述,为了将互补性最大化,可在引物中掺入简并性。优选地,如 Marks 等人, J. Mol. Biol, 222:581-597(1991) 中方法所述或如 Orum 等人, Nucleic Acids Res., 21:4491-4498(1993) 方法所述,采用针对各 V 基因家族的 PCR 引物以扩增存在于免疫细胞核酸样品中所有可得的 VH 和 VL 排列,使该文库多样性最大化。如 Orlandi 等人(1989)

所述,为了将扩增的 DNA 克隆入表达载体,可将稀有的限制性位点引入 PCR 引物一端中作为标记,或如 Clackson 等人 Nature, 352:624-628(1991) 所述,用标记的引物进行进一步 PCR 扩增。

[0200] 合成性重排的 V 基因文库可在体外由 V 基因区段衍生。大部分的人 VH 基因区段已被克隆与测序 (Tomlinson 等人, J. Mol. Biol., 227:776-798(1992) 所报导), 以及作图 (Matsuda 等人, Nature Genet., 3:88-94(1993) 所报导); 这些克隆的区段 (包括 H1 和 H2 环的所有主要构象) 用编码不同序列和长度的 H3 环的 PCR 引物可产生多样性 VH 基因文库 (如 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388(1992) 所述)。用位于单个长度的长 H3 环中的所有序列多样性也可制备 VH 文库 (Barbas 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461(1992) 所述)。人 V6 和 V8 区段已被克隆和测序 (Williams 和 Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461(1993) 报导) 并可用于制取合成性轻链文库。以一系列 VH 和 VL 折叠和 L3 以及 H3 长度为基础的合成性 V 基因文库, 将编码大量的结构多样性的抗体。V 基因编码 DNA 经扩增之后, 种系 V 基因区段可按照 Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol. 227:381-388(1992) 所述方法体外重排。

[0201] 以几种方法将 VH 和 VL 基因文库联合在一起, 可构建抗体片段的文库。每一种文库可构建在不同载体中, 在体外重组这些载体, 如 Hogrefe 等人, Gene, 128:119-126(1993) 所述, 或体内组合感染, 例如 Waterhouse 等人, Nucl. Acids Res., 21:2265-2266(1993) 所述的 loxP 系统。体内重组法利用 Fab 片段的二链性质来克服大肠杆菌转化效率所带来的文库大小限制。分别克隆原初 VH 和 VL 文库, 一个克隆入噬菌粒而另一个克隆入噬菌体载体。然后用噬菌体感染含噬菌粒的细菌, 将两文库联合, 使得每个细胞都含有不同的组合而且文库大小只受所存在细胞数目的限制 (约 10^{12} 克隆)。两载体都含有体内重组的信号, 使得 VH 和 VL 基因被重组于一个复制子上而且共同包装入噬菌体毒粒中。这些巨大文库提供了大量有良好亲和力 (K_d^{-1} 为约 10^{-8} M) 的多样性抗体。

[0202] 另外, 可将这些文库依次克隆至同一载体中, 如 Barbas 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982(1991) 所述, 或用 PCR 组装起来, 然后克隆, 如 Clackson 等人, Nature 352:624-628(1991) 所述。PCR 组装也可用于将 VH 和 VL DNA 与编码一柔性肽间隔物的 DNA 相连接以形成一个单链 Fv(scFv) 文库。在另一技术中, “细胞内 PCR 组装” 用于在淋巴细胞中通过 PCR 组合 VH 和 VL 基因, 然后克隆所连接的基因文库 (如 Embleton 等人, Nucl. Acids Res., 20:3831-3837(1992) 所述)。

[0203] 原初文库 (或者天然或者合成的) 所产生的抗体可能具有中度亲和力 (K_d^{-1} 为约 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ M⁻¹), 但通过构建和重选择次级文库也可在体外模仿亲和力成熟 (如 Winter 等人 (1994), 同上所述)。例如使用易错聚合酶 (Leung 等人, Technique, 1:11-15(1989) 报导) 以 Hawkins 等人, J. Mol. Biol., 226:889-896(1992) 的方法或以 Gram 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580(1992) 的方法可在体外随机引入突变。此外, 通过所选个体的 Fv 克隆中随机突变一个或多个 CDR, 如采用带有跨越感兴趣 CDR 的随机序列的引物作 PCR, 并筛选更高亲和力的克隆可进行亲和成熟过程。WO 9607754 (公开于 1996 年 3 月 14 日) 描述了在免疫球蛋白轻链的互补决定区中诱导突变产生轻链基因文库的方法。另一有效方法是重组通过噬菌体展示对得自非免疫供体的天然存在 V 区变体文库选出的 VH 或 VL 结构域, 并通过几轮链改组筛选更高的亲和力 (如 Marks 等

人, Biotechnol 10:779-786(1992) 所述)。这一技术产生了具有 10^{-9} M 范围亲和力的抗体和抗体片段。

[0204] 淘选噬菌体展示文库的抗 IFN- α 克隆

[0205] a. IFN- α 的合成

[0206] 利用已公布的干扰素的氨基酸和核酸序列(如见 J. Interferon Res., 13:443-444(1993)、含有各种 I 型干扰素基因组和 cDNA 序列的汇编参考文献和该文引用的参考文献)可设计本文所用的 IFN- α 亚型的编码核酸序列。对于 IFN- α A (IFN- α 2)、IFN- α B (IFN- α 8)、IFN- α C (IFN- α 10)、IFN- α D (IFN- α 1)、IFN- α E (IFN- α 22)、IFN- α F (IFN- α 21)、IFN- α G (IFN- α 5)、IFN- α H (IFN- α 14) 氨基酸序列或 cDNA 序列, 见 Goeddel 等人, Nature, 290:20-26(1981) 23-24 页的图 3 和图 4。对于编码 IFN- α 7 (IFN- α J) 的氨基酸序列的 cDNA, 见 Cohen 等人, Dev. Biol. Standard, 60:111-112(1985)。用本领域已知的各种方法可制备编码感兴趣的干扰素的 DNA。这些方法包括但不限于 Engels 等人 Agnew. Chem. Int. Ed. Eghl., 28:716-734(1989) 中所述任何一种化学合成方法, 如三酯, 亚磷酸酯, 亚磷酰胺和 H 磷酸酯方法。在一个实施例中, 在干扰素编码 DNA 的设计中采用表达宿主细胞优选的密码子。另外, 编码干扰素的 DNA 也可从基因组或 cDNA 文库中分离得到。

[0207] 构建了编码感兴趣干扰素的 DNA 分子之后, 将该 DNA 分子操作性连接于表达载体如质粒中的表达调控序列, 其中调控序列可为用此载体转化的宿主细胞所识别。总之, 质粒载体包含有复制和调控序列, 这些序列衍生于与宿主细胞相容的物种。此载体通常带有一个复制位点以及编码蛋白质(能够提供在转化细胞中的表型选择)的序列。

[0208] 对于原核宿主的表达, 合适的载体包括 pBR322 (ATCC No. 37017)、pGH107 (ATCC No. 40011)、PB0475、pS0132、pRIT5、PRIT20 或 pRIT30 系列中的任何载体 (Nilsson 和 Abrahmsen, Meth. Enzymol., 185:144-161(1990))、pRIT2T、pKK233-2、pDR540 和 pPL-lambda。本文所适用的含有表达载体的原核宿主细胞包括大肠杆菌 K12 株 294 (ATCC NO. 31446), 大肠杆菌株 JM101 (Messing 等人, Nucl. Acid Res., 9:309(1981)), 大肠杆菌株 B, 大肠杆菌株 II1776 (ATCC No. 31537), 大肠杆菌株 c600 (Appleyard, Genetics, 39:440(1954)), 大肠杆菌株 W3110 (F⁻, γ ⁻, 原养型, ATCC 编号 27325), 大肠杆菌株 27C7 (W3110, tonA, phoA E15, (argF-lac) 169, ptr3, degP41, ompT, kan^r) (美国专利 No. 5288931, ATCC No. 55244), 枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、粘质沙雷氏菌和假单胞菌属。

[0209] 除原核生物之外, 真核生物如酵母菌, 或多细胞生物衍生的细胞可用作宿主细胞。对于酵母宿主细胞的表达, 如普通的面包酵母或酿酒酵母, 合适的载体包括基于 2 微米的质粒, 整合载体和酵母人工染色体 (YAC) 载体的附加型复制性载体。对于昆虫宿主细胞的表达, 如 Sf9 细胞, 合适的载体包括杆状病毒载体。对于植物宿主细胞的表达, 特别是双子叶植物宿主如烟草, 合适的表达载体包括衍生自根瘤农杆菌 Ti 质粒的载体。

[0210] 然而, 最关注脊椎动物宿主细胞。有用的哺乳动物宿主细胞包括受 SV40 转化的猴肾 CV1 系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚胎肾系 (293 或为生长于悬浮培养中而亚克隆 293 细胞, Graham 等人, J. Gen. Virol., 36:59(1977)); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 和 Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 77:4216(1980)); 小鼠塞托利细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980)); 猴肾细胞 (CV1ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人子宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL2); 犬肾细胞 (MDCK, QTCC CCL 34); 牛鼠 (buffalo rat) 肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138 ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳房肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞 (Mather 等人, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68(1982)); MRC5 细胞; FS4 细胞; 以及人肝癌细胞系 (Hep G2)。对于哺乳动物宿主细胞表达, 有用的载体包括 SV40 衍生的载体, 巨细胞病毒衍生的载体如 pRK 载体, 包括 pRK5 和 pRK7 (Suva 等人, Science, 237:893-896(1987), EP 307, 247(3/15/89), EP 278776(8/17/88)), 痘苗病毒或其它痘病毒衍生的载体, 以及逆转录病毒载体如莫落尼鼠白血病病毒 (MoMLV) 衍生的载体。

[0211] 任选地, 将编码感兴趣干扰素的 DNA 操作性连接于一分泌性前导序列, 导致宿主细胞将表达产物分泌到培养基中。分泌前导序列的例子包括 stII, ecotin, lamB, 疱疹 GD, lpp, 碱性磷酸酶, 转化酶, 以及 α 因子。也适用于本文的是蛋白质 A 的 36 氨基酸前导序列 (Abrahmsen 等人, EMBO J., 4:3901(1985))。

[0212] 转染宿主细胞并优选本发明上述表达或克隆载体转化, 并在已改进适合于诱导启动子, 选择转化体, 或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中培育。

[0213] 转染指宿主细胞摄入表达载体, 不论编码序列实际上是否表达。许多转染方法是本领域普通技术人员所已知的, 例如磷酸钙沉淀和电穿孔。当表明该载体操纵已在宿主细胞中发生时, 一般认为转染成功。

[0214] 转化指将 DNA 引入生物体使得 DNA 可复制 (作为染色体外元件或通过染色体整合)。取决于所用的宿主细胞, 采用适合该细胞的标准方法进行转化。使用氯化钙作钙处理 (如 Sambrook 等人, Molecular Cloning(第二版), Cold Spring Harbor Laboratory, NY(1989) 1.82 节所述) 通常用于含有大量细胞壁屏蔽的原核生物或其他细胞。根瘤农杆菌感染用于某些植物细胞的转化, 如 Shaw 等人, Gene, 23:315(1983) 和 1989 年 6 月 29 号公开的 W089/05859 所述。对于没有细胞壁的哺乳细胞, 优选如 Sambrook 等人 (同上第 16.30-16.37 节) 所述的磷酸钙沉淀方法。哺乳动物细胞宿主系统转化的总体方面内容在 Axel 的 1983 年 8 月 16 日公布的美国专利 4,399,216 中有所描述。通常根据 Van Solingen 等人, J. Bact., 130:946(1977) 和 Hsiao 等人, Proc. Natl. Acad. Scia(USA), 76:3829(1979) 的方法进行酵母转化。然而, 也可采用将 DNA 引入细胞的其它方法, 如核注射, 电穿孔, 或原生质体融合。

[0215] 如 Sambrook 等人 (同上) 所述, 可培养用于产生感兴趣干扰素的原核宿主细胞。

[0216] 可用各种培养基培养用于产生感兴趣干扰素的哺乳动物宿主细胞。可购得的培养基如 Ham's F10(Sigma), Minimal Essential Medium((MEM), Sigma), RPMI-1640(Sigma), 和 Dulbecco's Modified Eagle's Medium((DMEM), Sigma) 适用于培育宿主细胞。另外, 如 Ham 和 Wallace, Meth. Enz., 58:44(1979), Barnes 和 Sato, Anal. Biochem., 102:255(1980), U. S. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 或 4,560,655; W090/03430; W087/00195; U. S. Pat. Re 30,985; 或 U. S. 5,122,469 所述的任何培养基 (所有这些公开内容纳入本文参考文献中), 可用作宿主细胞的培养基。如需要, 这些培养基可补加激素和/或其它生长因子 (如胰岛素, 运铁蛋白, 或表皮生长因子), 盐类 (如氯化钠, 钙,

镁,以及磷酸盐),缓冲液(如 HEPES),核苷(如腺苷和胸苷),抗生素(如庆大霉素药物),微量元素(限于通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物),以及葡萄糖或等同的能源。也可包括本领域技术人员所知的适当浓度的任何其他所需补充物。培养条件,如温度,pH 值等等,是那些先前与所选表达宿主细胞一起使用的,并且对于本领域普通技术人员是清楚的。

[0217] 本文所提宿主细胞包括体外培养的细胞以及宿主动物体内的细胞。

[0218] 在胞内表达系统或周质间隙分泌系统中,可通过破坏宿主细胞膜/细胞壁(如渗透休克或用洗涤剂溶解宿主细胞膜)从培养细胞中回收重组表达的干扰素蛋白质。另外,在胞外分泌系统中,可由培养基中回收重组蛋白质。第一步,离心培养基或裂解液以除去任何颗粒性细胞碎片。然后分离膜与可溶性蛋白组分。通常从可溶性组分中纯化得到干扰素。如果 IFN- α 表达为膜结合种类,可用洗涤剂溶解从膜组分中回收膜结合肽。然后用合适的方法(如免疫亲和或离子交换柱上的分级;乙醇沉淀;反相 HPLC;硅土或阳离子交换树脂(如 DEAE)层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;如使用 SephadexG-75 的凝胶过滤;疏水亲和树脂和使用固定在基质上的干扰素受体的配体亲和法)进一步纯化该粗肽提取物。

[0219] 本文所用的许多人 IFN- α 可从商业来源获得,如从 Sigma(St. Louis, MO), Calbiochem-Novabiochem Corporation(San Diego, CA) 或 ACCURATE Chemical & Scientific Corporation(Westbury, NY) 获得。

[0220] 标准的克隆方法如 Maniatis 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY(1989) 所述用于构建质粒,该质粒能指导各种 hIFN- α 转位进入大肠杆菌周质空隙中。利用加入到引物中的 NsiI 和 StyI 限制性位点在 hIFN- α 的不同亚型的 cDNA 克隆上进行 PCR 反应(Goeddel 等, *Nature* 290:20-26(1981))。然后将这些 PCR 产物亚克隆入表达载体 pB0720 的相应位点(如 Cunningham 等人, *Science* 243:1330-1336(1989) 所述)。所得的质粒将 h-IFN- α 亚型的产生置于大肠杆菌 phoA 启动子和热稳定肠毒素 II 信号肽的调控下(如 Chang 等人, *Gene* 55:189-196(1987) 所述)。用美国生物化学测序酶试剂盒 2.0 版本证实每个基因的正确 DNA 序列。将各质粒转化入大肠杆菌株 27C7(ATCC#55244) 中并在 10 升发酵罐中培养(如 Carter 等人, *Bio/Technology* 10:163-167(1992) 所述)。用亲和层析法从含有各个 IFN- α 的大肠杆菌糊浆中纯化得到人 hIFN。裂解细菌,并以 10,000xg 离心裂解液除去碎片。将上清液加到含有小鼠抗 hIFN- α B 抗体(LI-1)(如 Staehelin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:1848-1852(1981) 所述获得)的免疫亲和柱上。用 Roy 等人, *Journal of Chromatography*, 303:225-228(1984) 的改进方法将 LI-1 固定在可控孔玻璃上。用含 20%(W/V) 甘油 pH 为 3.0 的 0.1M 柠檬酸盐从该柱中洗脱结合的干扰素。纯化的 IFN 用 SDS-PAGE 和免疫印迹法分析,和用本文所述的 hIFN 诱导的抗病毒试验测试生物活性。

[0221] 如 Rehberg 等人, *J. Biol. Chem.*, 257:11497-11502(1992) 或 Horisberger 和 Marco, *Pharmac. Ther.*, 66:507-534(1995) 所述,获得了人 IFN- α 2/1 杂合分子(IFN- α 2₁₋₆₂/ α 64-166)。

[0222] b. IFN- α 的固定

[0223] 为了用于噬菌体展示克隆的亲和层析分离,可将纯化的 IFN- α 吸附于合适的基质,如琼脂糖珠,丙烯酰胺珠,玻璃珠,纤维素,多种丙烯酸共聚物,羟基甲基丙烯酸酯凝

胶,聚丙烯酸和聚甲基丙烯酸共聚物,尼龙,中性和离子型运载体,等等。用如 Methods in Enzymology, vol. 44(1976) 所述方法可实现 IFN- α 蛋白质与基质的附着。将蛋白质配体附着在多糖基质(如琼脂糖、葡聚糖或纤维素)的常用技术包括用卤化氰活化运载体并随后将肽配体的主要脂肪胺或芳香胺与该活化基质偶联。

[0224] 另外, IFN- α 可用于包被吸附板孔,表达在固定于吸附板的宿主细胞上或用于细胞分选,或偶联生物素而用于用链霉亲和素包被的玻璃珠来捕获,或用于任何其他已知的淘选噬菌体展示文库的方法中。

[0225] c、淘选方法

[0226] 在适合于用吸附剂结合至少一部分噬菌体颗粒的条件下使噬菌体文库样品,与固定的 IFN- α 接触。通常,选择此条件包括 pH 值,离子强度,温度等来模拟生理条件。洗涤结合于固相的噬菌体并用酸(如 Barbas 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982(1991) 所述),或用碱(如 Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597(1991) 所述),或用 IFN- α 抗原(如类似于 Clackson 等人, Nature, 352:624-628(1991) 的抗原竞争法的方法)洗脱。在一轮选择中,可富集噬菌体 20-1000 倍。另外,可将富集的噬菌体培养在细菌培养物中并进行更多轮选择。

[0227] 在一个优选实施例中,用各种固定的 IFN- α 亚型连续地温育噬菌体以鉴定和进一步特征分析对大部分(优选全部) IFN- α 亚型表现出明显结合的噬菌体克隆。此方法中,噬菌体先与一特定 IFN- α 亚型一起温育。洗脱结合于此亚型的噬菌体并用另一 IFN- α 亚型选择。对所有 IFN- α 亚型重复此结合与洗脱过程。最后,该方法获得了对所有 IFN- α 亚型具有广谱反应活性的噬菌体展示抗体群。除 IFN- α 外用其它种类 IFN 检测这些噬菌体,以选择那些对其他种类 IFN 不显示明显结合的克隆。最后,可检测所选出的噬菌体克隆中和各种 IFN- α 亚型的生物活性(如抗病毒活性)的能力,最后选出展现对大部分(优选全部) IFN- α 亚型有广泛中和活性的抗体的克隆。

[0228] 选择效率依赖许多因素,包括洗涤时的解离动力学,和单个噬菌体上的各个抗体片段能否同时与抗原结合。具有快速解离动力学(和弱结合亲和力)的抗体可用短时洗涤,多价噬菌体展示和固相中抗原高密度包被来保留。高密度通过多价相互作用不仅能稳定噬菌体,还有利于已解离的噬菌体重结合。用长时间洗涤和单价噬菌体展示(如 Bass 等人, Proteins, 8:309-314(1990) 和 W092/09690 所述),以及抗原低密度包被(如 Marks 等人, Biotechnol., 10:779-783(1992) 所述)可促进具有慢解离动力学(和良好结合亲和力)的抗体的选择。

[0229] 可在对 IFN- α 具有不同亲和力(甚至微弱差别的亲和力)的噬菌体抗体之间进行选择。然而,所选抗体的随机突变(如按照上述亲和力成熟技术的某些技术进行)可能产生许多突变体,大部分能结合抗原,且少数具有高亲和力。通过限制 IFN- α ,可竞争出罕见的高亲和力噬菌体。为了保留所有较高亲和力的突变体,可与过量的生物素化 IFN- α (但用低于 IFN- α 靶摩尔亲和力常数的摩尔浓度的生物素化 IFN- α)一起温育噬菌体。用链霉亲和素包被的顺磁珠可捕获高亲和力结合性噬菌体。此种“平衡捕捉”使得抗体根据它们的结合亲和力而被选出,其灵敏度能够从大大过量的低亲和力噬菌体中分离出亲和力只高 2 倍的突变克隆。也可操纵用于洗涤结合于固相的噬菌体的条件来根据解离动力学进行区分。

[0230] 在一个实施例中,将噬菌体与固定在固体支撑物(如上述层析聚合物基质)上的不同 IFN- α 亚型一起连续温育。此方法中,噬菌体先与一特定 IFN- α 亚型一起温育。用合适的洗脱液(如能将结合的噬菌体释放到溶液中的盐或酸性缓冲液)从固相中洗脱结合于该亚型的噬菌体。然后,将洗脱的噬菌体克隆用另一 IFN- α 亚型选择。为了富集与可溶性 IFNAR2 竞争结合 IFN- α 的克隆群,从一系列 IFN- α 亚型层析分离物中回收噬菌体克隆,将其与预先吸附于 IFN- α 的固定 IFNAR2 的复合物一起温育,然后从温育反应混合物中回收未吸附的噬菌体克隆。

[0231] 选择方法可设计为使用任何合适的批次层析技术。在一个实施例中,使噬菌体克隆吸附在悬浮的 IFN- α 衍生聚合物基质珠上。离心回收吸附的珠,以合适的洗脱缓冲液重悬回收的珠并温育,合适的洗脱液冲洗是能使结合的噬菌体释放到溶液中的盐或酸性缓冲液,离心洗脱混合物,从上清液中回收洗脱的噬菌体克隆,然后对于每种其它 IFN- α 亚型都重复此吸附/洗脱程序。为了富集能与可溶性 IFNAR2 竞争性结合 IFN- α 的克隆群,将从 IFN- α 亚型层析分离物回收的噬菌体克隆与预吸附至 IFN- α 的 IFNAR2 衍生聚合物基质珠悬浮液一起温育,离心温育混合物,然后从上清液中回收未吸附的噬菌体克隆。

[0232] 在另一实施例中,设计选择方法来富集在每次亲和层析分离中能抑制 IFN- α 与 IFNAR2 结合的噬菌体群落。此方法中,使噬菌体与各种固定在固体支撑物上的特定 IFN- α 亚型一起连续温育,然后用含有过量可溶性 IFNAR2(如 IFNAR2ECD-IgG Fc)的洗脱液,在可溶性 IFNAR2 能够置换与 IFNAR2 竞争结合固定化 IFN- α 的噬菌体克隆的条件下从固相中洗脱。对每种特定 IFN- α 亚型重复此结合与洗脱过程。

[0233] 在另一实施例中,使噬菌体克隆吸附于悬浮的 IFN- α 衍生聚合物基质珠上,离心回收吸附的珠,以含有过量可溶性 IFNAR2(如 IFNAR2ECD-IgGFc)的合适的洗脱缓冲液重悬回收的珠,在可溶性 IFNAR2 能够置换与 IFNAR2 竞争性结合固定化 IFN- α 的条件下培育,使结合的噬菌体释放到溶液中,离心洗脱混合物,从上清液中回收洗脱的噬菌体克隆,然后对于每种其它 IFN- α 亚型都重复此吸附/洗脱程序。

[0234] 最后,此法获得对广泛 IFN- α 亚型具有 IFNAR2 结合抑制活性的噬菌体展示抗体群。然后可测试这些噬菌体对其它 IFN 种类(除了 IFN- α 种类)如 IFN- β 的作用,以选出那些对其他种类 IFN 不显示明显结合的克隆。最后,可测试所选噬菌体克隆中和各种 IFN- α 亚型生物活性,如抗病毒活性的能力,最终选出展现对大多数(优选全部)IFN- α 亚型有广泛中和活性的抗体的克隆。

[0235] 抗 IFN- α 克隆的活性选择

[0236] 在一个实施例中,本发明提供了抗 IFN- α 抗体,该抗体能结合并中和大多数(优选全部)IFN- α 亚型的活性,但并不明显结合或中和其他种类干扰素的活性。例如用前述用于抗体的基本上相同方法,可测试不同噬菌体克隆中和不同 IFN- α 亚型抗病毒活性的能力。

[0237] 4、可溶性 IFNAR2-IgG 的制备

[0238] 采用与 Haak-Frendscho 等人,Immunology 79:594-599(1993)所述用于构建鼠 IFN 受体免疫黏附素的相似方法,可产生基于 hIFNAR2 胞外域的人免疫球蛋白融合蛋白(免疫黏附素)的编码 cDNA(pRKS hIFNAR2-IgG 克隆)。简而言之,如 W089/02922(PCT/US 88/03414,公布于 1989 年 4 月 6 日)实施例 4 所述构建质粒 pRKCD4₂F_{C1}。从公开的序列

(Novick 等人, Cell, 77:391-400[1994]) 中获得成熟 hIFNAR2ECD 的前 216 个残基的 cDNA 编码序列。用 hIFNAR2ECD 编码 cDNA 代替 pRKCD₄F_{Cl} 的 CD4 编码序列以形成 pRK5hIFNAR2-IgG 克隆。使用磷酸钙沉淀技术通过瞬时转染在人胚胎肾 293 细胞中表达 hIFNAR2-IgG。通过蛋白质 A-sepharose 凝胶柱亲和层析 (如 Haak-Frendscho 等人, (1993), 同上所述) 从血清细胞培养上清液中一步纯化此免疫黏附素。用含 20%(W/V) 甘油, pH 为 3.0 的 0.1M 柠檬酸盐缓冲液洗脱结合的 hIFNAR2-IgG。根据 SDS-PAGE, hIFNAR2-IgG 纯化至 95% 纯以上。

[0239] 5、抗 IFN- α 抗体的诊断应用

[0240] 本发明的抗 IFN- α 抗体是 IFN- α 表达诊断试验中的独特研究试剂。如前所述, 在某些自身免疫疾病如 IDDM, SLE 以及自身免疫性甲状腺炎中 IFN- α 表达增加。使用对大部分 IFN- α 亚型有广泛反应活性的本发明抗 IFN- α 抗体可检测并定量测量这些疾病中各种 IFN- α 亚型的增加表达。抗 IFN- α 抗体也用于从重组细胞培养物或天然来源中亲和纯化各种 IFN- α 亚型。

[0241] 在许多众所周知的诊断试验方法之任一中可采用抗 IFN- α 抗体以检测 IFN- α 。例如, 从所需来源中获得样品, 将该样品与抗 IFN- α 抗体混合使得该抗体与存在于混合物中的任何 IFN- α 亚型形成抗体 / IFN- α 复合物, 并且检测存在于混合物中的任何抗体 / IFN- α 复合物, 可测定生物样品的 IFN- α 。以本领域已知的适合特定样品的方法可制备试验用的生物样品。根据所用试验的类型选择将样品与抗体混合的方法以及检测抗体 / IFN- α 复合物的方法。这种试验包括竞争和夹心试验, 以及空间抑制试验。竞争和夹心方法采用相分离步骤作为该方法的完整部分而空间抑制试验在单个反应混合物中进行。

[0242] IFN- α 的分析方法都采用 1 种或多种下列试剂: 标记 IFN- α 的类似物, 固定化 IFN- α 的类似物, 标记的抗 IFN- α 抗体, 固定化抗 IFN- α 抗体和立体偶联物。标记试剂也称为“示踪剂”。

[0243] 所用标记是任何不干扰 IFN- α 和抗 IFN- α 抗体结合的可检测的官能度。用于免疫试验的许多标记是已知的, 例子包括那些可直接检测的分子, 如荧光色素, 化学发光剂, 和放射性标记以及必须经反应或衍生才能检测到的分子, 如酶。这些标记的例子包括放射性同位素 ³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H 和 ¹³¹I, 荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物, 罗丹明及其衍生物, 丹酰, 伞形酮, 萤光素酶, 如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶 (美国专利 NO 4, 737, 456), 萤光素, 2,3-二氢酞嗪二酮, 辣根过氧化物酶 (HRP), 碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶, 葡糖淀粉酶, 溶菌酶, 糖氧化酶, 如葡萄糖氧化酶, 半乳糖氧化酶, 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶, 与使用过氧化氢氧化染料前体的酶如 HRP, 乳过氧化物酶, 或微过氧化物酶偶联, 生物素 / 亲和素, 自旋标记, 噬菌体标记, 稳定的自由基, 等等。

[0244] 可用常规方法将这些标记共价结合于蛋白质或多肽。例如, 可用偶联剂如二醛, 碳化二亚胺, 马来酰肼, 双亚氨酸酯, 双重氮化联苯胺等以上述荧光、化学发光和酶标记对抗体进行标记。如见美国专利 NO. 3, 940, 475 (荧光测定) 和 3, 645, 090 (酶); Hunter 等人, Nature, 144:945(1962); David 等人, Biochemistry, 13:1014-1021(1974); Pain 等人, J. Immunol. Methods, 40:219-230(1981); 和 Nygren, J. Histochem. And Cytochem., 30:407-412(1982)。本文优选的标记是酶, 如辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

[0245] 这些标记 (包括酶) 与抗体的偶联是免疫试验技术普通技术人员的标准操作方

法。如参见 O' Sullivan 等人, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," 收编在 *Methods in Enzymology*, J. J. Langone 和 H. Van Vunakis 编, 第 73 卷 (Academic Press, New York, New York, 1981), 147-166 页。

[0246] 对某些试验方法需要固定试剂。固定需要将抗 IFN- α 抗体与溶液中保持游离的 IFN- α 相分离。常规上, 在试验步骤之前不溶解抗 IFN- α 抗体或 IFN- α 类似物而实现这一分离, 如通过吸附于水不溶性基质或表面 (Bennich 等人, 美国专利 3, 720, 460), 通过共价偶联 (例如, 用戊二醛交联), 或者后来不溶解抗 IFN- α 抗体或 IFN- α 类似物, 如免疫沉淀法。

[0247] 其它的试验方法, 已知为竞争或夹心试验, 已经完善建立并广泛用于商品化诊断产业。

[0248] 竞争性试验依赖示踪剂 IFN- α 类似物与测试样品 IFN- α 竞争有限数量的抗 IFN- α 抗体抗原结合位点的能力。通常在竞争之前或 / 之后不溶解抗 IFN- α 抗体然后将结合于抗 IFN- α 抗体的示踪剂和 IFN- α 与未结合的示踪剂和 IFN- α 相分离。通过倾析 (其中结合伴侣为预先不溶解的) 或离心 (其中结合伴侣在竞争反应之后被沉淀) 进行此分离。试验样品 IFN- α 的量与结合的示踪剂的量 (通过标记物质的量测定) 成反比。用已知数量的 IFN- α 制作剂量反应曲线并与试验结果作比较, 以定量测定试验样品中的 IFN- α 量。当用酶作为可检测标记时, 这些试验称为 ELISA 系统。

[0249] 另一种竞争试验称为“均相”试验, 不需要相分离。在此, 制备并使用 IFN- α 与酶的偶联物, 这样当抗 IFN- α 抗体结合于 IFN- α 时, 所含抗 IFN- α 抗体调节了酶活性。此例中, IFN- α 或其免疫活性片段以双功能有机桥与酶 (如过氧化物酶) 偶联。用抗 IFN- α 抗体选择所用的偶联物, 使得抗 IFN- α 抗体的结合抑制或加强了标记酶的活性。此方法本身以 EMIT 命名而广泛使用。

[0250] 立体偶联物用于均相试验的空间位阻方法中。将低分子量的半抗原与小 IFN- α 片段共价连接合成这些偶联物使得抗半抗原的抗体基本上不能与抗 IFN- α 抗体同一时间结合此偶联物。在此试验方法下, 试验样品中所含 IFN- α 将结合抗 IFN- α 抗体, 从而使抗 - 半抗原抗体与此偶联物结合, 导致偶联物半抗原的特性改变, 如, 当半抗原是荧光团时发生荧光改变。

[0251] 夹心试验尤其适用于 IFN- α 或抗 IFN- α 抗体的测定。顺序夹心试验中, 使用固定的抗 IFN- α 抗体吸附试验样品的 IFN- α , 通过洗涤除去试验样品, 用结合的 IFN- α 吸附第二个标记的抗 IFN- α 抗体, 然后将残余的示踪剂与结合物质相分离。结合的示踪剂量与试验样品的 IFN- α 量成正比。在“同时”夹心试验中, 试验样品在加入标记的抗 IFN- α 之前不分离。用抗 IFN- α 单克隆抗体作为一种抗体, 多克隆抗 IFN- α 抗体作为另一种抗体的顺序夹心试验可用于测试样品的 IFN- α 。

[0252] 前文只是 IFN- α 的示范性诊断试验。现在或以后开发的采用抗 IFN- α 抗体测定 IFN- α 的其他方法, 也包括在本文范围之内, 包括上述的生物试验法。

[0253] 6、治疗组合物与抗 IFN- α 抗体的给药

[0254] 将具有所需纯度的抗体与任选的生理上可接受的运载体, 赋形剂或稳定剂 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 19 版, Alfoson, R. 编, Mack

Publishing Co. (Easton, PA:1995)) 混合制备本发明的抗 IFN- α 抗体治疗制剂以冻干饼或水溶液形式贮存。可接受的运载体,赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对受者无毒性,且包括缓冲液,如磷酸盐,柠檬酸盐,以及其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(少于约 10 个残基)多肽,蛋白质,如血清清蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖以及其它糖类包括葡萄糖,甘露糖,或糊精;螯合剂如 EDTA;糖醇如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子如钠;和/或非离子表面活性剂如 Tween, Pluronic 或聚乙二醇(PEG)。

[0255] 用于体内给药的抗 IFN- α 抗体必须是无菌的。在冻干和重建之前或之后,通过无菌过滤膜过滤不难实现这一要求。通常抗 IFN- α 抗体以冻干形式或溶液贮存。

[0256] 通常将治疗性抗 IFN- α 抗体组合物置于带无菌入口的容器中,例如带有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉输液袋或小管中。

[0257] 根据已知方法进行抗 IFN- α 抗体的给药,如静脉内、腹膜内、脑内、皮下、肌肉内、眼内、动脉内、脑脊髓内或病灶内途径注射或灌注,或如下所述的缓释系统。抗体优选是全身给药的。

[0258] 缓释制品的合适例子包括以有形物品形式如薄膜,或微胶囊的半渗透性聚合物基质。缓释基质包括聚酯,水凝胶,聚交酯(美国专利 3,773,919, EP 58,481), L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物(Sidman 等人, Biopolymers, 22:547-556(1983), 聚(甲基丙烯酸 2-羟基乙酯(Langer 等人, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981) 和 Langer. Chem Tech. 12:98-105, 1982), 乙烯-乙酸乙烯(Langer 等人, 同上)或聚-D-(-)-3 羟丁酸(EP 133,988)。缓释抗 IFNAR2 抗体组合物也包括脂质体包裹的抗体。按已知方法(DE3218121; Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692, 1985; Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034, 1980; EP 52,322; EP36,676; EP88,046; EP143,949; EP142,641; 日本专利申请 83-118008; 美国 4,485,045 和 4,544,545, 以及 EP102,324) 制备含抗体的脂质体。通常脂质体是小的(约 200-800 埃)单层类型,其中脂类含量大于约 30mol% 的胆固醇,为获得最适抗体疗法调整所选比例。

[0259] 抗 IFN- α 抗体也可通过吸入给药。用于液体制剂的商品化雾化器(包括喷射雾化器和超声雾化器)可用于给药。液体制剂可直接雾化,而冻干粉末可在重建后雾化。另外,抗 IFN- α 抗体用氟碳配方和计量剂量吸入器气溶胶化,或作为冻干和碾磨粉吸入。

[0260] 治疗上所用的抗 IFN- α 抗体的“有效量”将取决于例如治疗对象、给药途径、所用抗 IFN- α 抗体的类型,以及患者状况。因此,治疗学家必需滴定剂量并按需修改给药途径以获得最佳治疗效果。通常,临床医生将给予抗 IFN- α 抗体直到获得所需效果的剂量。用常规试验不难监控该治疗过程。

[0261] 用本发明抗 IFN- α 抗体治疗的患者包括临床前患者或那些最近发作免疫介导疾病,尤其是自身免疫性疾病的患者。患者是本发明治疗对象,直到没有健康组织需要受保护避免免疫介导的破坏。例如,患胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的患者可从用本发明抗 IFN- α 抗体的治疗中得益,直到患者的胰岛细胞不再有活力。在免疫介导的或自身免疫性疾病的发展过程中,需要尽可能早的给予抗 IFN- α 抗体,并且要持续治疗只要必须保护健康组织不受患者免疫系统的破坏。例如,治疗 IDDM 患者直到胰岛素监测显示有充分的胰岛应答和胰岛坏死减少的其它迹象(如抗-胰岛-抗体滴度降低),之后患者可撤销抗 IFN- α 抗体

治疗一段试验时间,监测此期间内胰岛素反应和抗胰岛抗体的水平有无复发。

[0262] 在用抗 IFN- α 抗体治疗与预防免疫介导的或自身免疫性疾病中,以复合优良药物规范的方式制备此抗体组合物,确定剂量并给药。上文所考虑因素包括待治疗的具体疾病、待治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、患病原因、抗体输送的部位、抗体的具体类型、给药方法、给药时间表,以及医生已知的其他因素。待给予的抗体的“治疗有效量”将视这些因素而定,而且是预防,缓解或治疗此病(包括治疗慢性自身免疫性疾病和移植物受者中维持免疫抑制)所必需的最小量。此量宜低于对宿主有毒或使宿主对感染显著易感的量。

[0263] 作为一般建议,肠胃道外给予该抗体的初步药理学有效量范围是每天病人体重每公斤约 0.1-50mg,典型的初步抗体剂量范围是 0.3-20mg/kg/天,更佳是 0.3-15mg/kg/天。所需的剂量可通过抗体的单次推注给药,多次推注给药或连续输注给药来递送,取决于医师希望达到的药物动力学衰减模式。

[0264] 如上所指,这些抗体的建议量应经过大量的治疗性斟酌。如上所示,选择适当剂量与时间表的关键因素是所获结果。

[0265] 此抗体不需要,但任选地可与当前用于预防或治疗所示免疫介导的或自身免疫性疾病的一种或多种制剂一起配制。例如,对于类风湿性关节炎,此抗体可与糖皮质激素联合给予。这些其他制剂的有效量取决于配方所含抗 IFN- α 抗体的量,疾病或治疗类型,以及上述的其它因素。这些制剂通常以相同剂量和前述给药途径或以上所用剂量的 1-99% 使用。

[0266] 以下实例中可发现本发明的更多细节,进一步明确了本发明的范围。此说明书所引用的所有参考文献及其中所引用的参考文献都在这里完整引入以作参考。

[0267] 实施例

[0268] 提供以下实例来阐明而不限制。提供实例的目的是为了向本领域的普通技术人员提供如何制备和应用本发明的化合物,组合物,及方法,而无意限制发明者所认为的发明范围。已作出努力确保所用数字的准确度(如,数量,温度,等),但是应该说明有一些实验性误差和偏差。除另有注明,分是重量等分,温度是摄氏温度,而压力为大气压或接近大气压。在说明书中所有引用的公开内容纳入本文作为参考文献引用。

[0269] 实施例 1 广泛反应活性的小鼠抗 IFN- α 单克隆抗体的产生和特性鉴定材料与方法

[0270] 对 IFN- α 诸亚型具有广泛反应性的鼠单克隆抗体

[0271] 用人 IFN- α 诸亚型的混合物顺次免疫接种小鼠产生大量候选 mAbs,然后筛选其结合能力和活性,从而开发了泛-IFN- α 中和性抗体。特别地,用重悬在 MPL-TDM(Ribi Immunochemical Research, Inc., Hamilton, MT) 中的 2.5 :g 类淋巴瘤细胞 hIFN- α (Product No. I-9887 of Sigma, St. Louis, MO) 免疫接种 Balb/c 小鼠各后腿足垫 9 次(间隔两周)。最后一次加强注射后第三天,用 35% 聚乙二醇将脾窝淋巴结细胞与鼠类骨髓瘤细胞 P3X63Ag 8. U. 1(ATCC CRL1597) 融合。在 HAT 培养基中选择杂交瘤。融合后第十天,在 ELISA 中先筛选杂交瘤培养上清液与不同种类 hIFN- α 结合的 mAbs。如下所述,测试了所选杂交瘤培养上清液抑制 IFN 对人肺癌细胞系 A549 细胞的抗病毒细胞病变效应的能力。如图 1 所示,从 1794 个融合孔中获得的 3 个 mAbs 能中和一组多种 IFN- α 亚型。亚克

隆并重分析这三个 mAbs。

[0272] 中和 IFN- α 的抗病毒活性

[0273] 如 Yousefi, S., 等人, Am. J. Clin. Pathol., 83:735-740(1985) 所述测试了候选抗体中和 IFN- α 的抗病毒活性的能力。简而言之,用受脑心肌炎 (EMC) 病毒攻击的人肺癌 A549 细胞进行了该试验。以 100:1 的总体积将 mAb 的系列稀释液与各种单位的 I 型干扰素一起温育 37°C 1 小时。然后以 100:1 的细胞培养基将这些混合物与 5×10^5 个 A549 细胞一起温育 24 小时。然后用 2×10^5 pfu 的 EMC 病毒攻击细胞 24 小时。在温育后,用可见光显微镜检查或结晶紫染色测定细胞活力。中和性抗体滴定度 (EC50) 定义为能中和 100 单位 /ml 的 I 型 IFN 50% 的抗病毒细胞病变作用的抗体浓度。用 NIH 参考品重组人 IFN- α 2 为标准品测定本研究中所用 I 型 IFN 的单位。所测的各种 I 型 IFN 的比活性如下: IFN- α 2/ α 1 (IFN- α 2 残基 1-62/- α 1 残基 64-166 (2×10^7 IU/mg), IFN- α 1 (3×10^7 IU/mg), IFN- α 2 (2×10^7 IU/mg), IFN- α 5 (8×10^7 IU/mg), IFN- α 8 (19×10^7 IU/mg), 以及 IFN- α 10 (1.5×10^5 IU/mg)。所测的白细胞 IFN 是 Sigma 产品 No. I-2396。所测的类淋巴母细胞 IFN 是 NIH 参考标准品 Ga23-901-532。在申请人请求下,在 Access Biomedical (San Diego, CA) 进行的实验中使用上述试验方式获得图 3B 所示数据。

[0274] 电泳迁移变动实验

[0275] IFN 的大多数立即作用与潜伏性胞质信号转导剂和转录激活 (STAT) 蛋白的激活相联系,产生多蛋白复合体,干扰素刺激的基因因子 3 (ISGF-3),其诱发靶启动子干扰素刺激应答元件 (ISRE) 的转录。ISGF3 包含 3 个蛋白质亚基: STAT1, STAT2 和 p48/ISGF3 γ 。p48 蛋白质属于干扰素调节因子 (IRF) 家族,且是直接和 ISRE 互相作用的 DNA 结合蛋白质。这样,监测 IFN 治疗反应中的 ISRE 特异性细胞 DNA 结合复合体提供了评价 IFN 对靶细胞作用的简单,快捷而方便的方法。进行这种分析的方便形式之一是电泳迁移变动试验 (EMSA),其中 IFN 治疗所诱发的 ISRE 结合活性,导致了相应于 ISRE 的共同序列的放射标记的双链寡核苷酸探针的电泳迁移率变动。

[0276] 基本上如 Kurabayashi 等人, Mol. Cell Biol., 15:6386(1995) 所述进行了该试验。简而言之,将 5ng 的特定 IFN- α 亚型加上不同浓度 (5-100 μ g/ml 的抗 IFN- α mAb 在 37°C 下与 5×10^5 个 HeLa 细胞在 200 μ L 的 DMEM 中温育 30 分钟。加入 hIFN- α 前将细胞与抗体 4°C 预温育 15 分钟。在 PBS 中洗涤细胞并悬于 125 μ L 缓冲液 A 中 (10mM HEPES pH7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM 苯甲基磺酰氟, 10 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽, 10 μ g/ml 抑蛋白酶肽)。在冰上培育 15 分钟后,加入 0.025%NP40 裂解细胞。通过离心获得核沉淀,悬于 50 微升缓冲液 B (20mM HEPES, pH7.9, 400mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM 苯甲基磺酰氟, 10 微克 / 毫升亮抑蛋白酶肽、10 微克 / 毫升抑蛋白酶肽) 中,并保持在冰上 30 分钟。离心澄清核组分并在 70°C 下保存上清液直至使用。利用 DNA 聚合酶 I Klenow 填充反应应用 32 P-dATP (3000Ci/mM, Amersham) 由单链寡核苷酸 (ISG 15 顶部: 5'-GATCGGGAAAG GGAAACCGAAACTGAAGCC-3' [SEQ ID NO. 13], ISG15 底部, 5'-GATCGGCTTCAGTTTCGGTTTCCCTT TCCC-3' [SEQ ID NO. 14]) 制得双链探针。使用 BIO-Spin 30 柱 (Bio-Rad) 从未掺入放射性核苷酸中提纯标记的寡核苷酸。室温下培养结合反应液 (在 15 μ L 结合缓冲液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM 苯甲基磺酰氟和 15% 甘油) 中含有 5 μ L 核提取物, 25000cpm 标记探针和 2 μ g 非特异性竞争物聚 (dI-dC)-聚 (dI-dC)) 30 分

钟。将 DNA-蛋白质复合体在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中解析并用作放射自显影图分析。在单独反应混合物中加入 350ng 的未标记 ISG15 探针测定试验的特异性。用抗 STAT1 抗体以超变动试验证实 ISGF3 特异复合体的形成。

[0277] 克隆编码 9F3 抗 IFN- α 单克隆抗体的基因

[0278] 产生、克隆并测序鼠抗人 IFN- α mAb 9F3。用于大肠杆菌中的 F(ab)s 表达与诱变的质粒 pEMXI 先前已有描述 (Werther 等人, J. Immunol. 157:4986-4995[1996])。简单而言,此质粒含有编码共有的人 K 亚组 1 轻链 (VLK1-CL) 和共有的人亚组 III 重链 (VHIII-CH1) 的 DNA 片段和碱性磷酸酶启动子。采用 VL 和 VH 的共有序列先前已有描述 (Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289[1992])。

[0279] 结果

[0280] 我们前已经表明 IDDM 患者的胰岛表达了广谱的 IFN- α 亚型 (Huang 等人, Diabetes 44:658-664[1995])。我们也阐述了在 IDDM 和 IFN- β 或 IFN- γ 的表达之间没有明显关系 (Huang 等人, [1995] 同上)。虽然特定 IFN- α 亚型的表达作为 SLE 病理学的一部分还没有被确定,对于 IDDM,是与 IFN- α 相关,而不与 IFN- β 或 IFN- γ 相关 (Hooks, 等人, Arthritis & Rheumatism 25:396-400[1982]; Kim 等人, Clin. Exp. Immunol. 70:562-569[1987]; Lacki 等, J. Med. 28:99-107[1997]; Robak 等人, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 46:375-380[1998]; Shiozawa 等, Arthritis & Rheumatism 35:417-422[1992]; von Wussow 等人, Rheumatology International 8:225-230[1988])。这些观察使得我们提出对于 IDDM 或 SLE 的治疗干预需要候选抗体能中和大多数的 IFN- α 亚型而同时保留其它干扰素 (β , γ 和 ω) 和白细胞介素的完整活性,该活性是宿主防御所需要的。

[0281] 它们之一 (9F3) 能够中和广谱重组干扰素- α 亚型并进一步作了特征鉴定。如图 2 所示,9F3 能中和 7 种重组干扰素 (IFN- α -2,4,5,8 和 10 (图 2) 和 IFN- α 1 以及 21 (表 2 和图 6) 的抗病毒活性。这些 IFN- α 亚型包括如 I 型干扰素序列系统树图阐明的全谱序列。更重要的是,能中和 IFN- α 诸亚型的 9F3mAb 不能中和 IFN- β (图 2,表 2) 或 IFN- γ 。如图 2 所示 IFN- β 活性的略微增加在其他试验中不可再现,看起来这是试验误差的结果。

[0282] 已经开发了其它中和 IFN- α 的 mAb (Tsukui et al., Microbiol. Immunol. 30:1129-1139[1986]; Berg, J. Interferon Res. 4:481-491[1984]; Meager and Berg, J. Interferon Res. 6:729-736[1986]; 美国专利 No. 4,902,618; 及 EP 公开 No. 0,139,676B1)。然而,这些抗体只中和有限数目的重组 IFN- α 亚型,不能中和广谱 IFN- α 亚型,如那些由活化白细胞产生的 IFN- α 亚型。相反,9F3mAb 能中和活化白细胞产生的 IFN- α 亚型异质性混合物的至少 95% 抗病毒活性 (图 3A)。类似地,9F3mAb 也能阻断另一类淋巴母细胞 IFN 制品 (NIH 参考标准) 的抗病毒活性,如在另一试验中所测得的那样 (图 3B)。

[0283] 采用另一种生物试验法也可测定 9F3mAb 中和 IFN- α 的能力。该试验根据在 DNA 结合试验即电泳迁移率变动试验中 IFN- α 激活信号分子,干扰素刺激基因因子 3 (ISGF3) 与衍生自干扰素刺激应答元件 (ISRE) 的寡核苷酸结合的能力 (Horvath et al., Genes Dev. 9:984-994[1995])。I 型干扰素信号向细胞核的转导依靠蛋白复合体 ISGF3 的激活,包括两个信号转导物及转录活化物 (STAT) 蛋白, STAT1 和 STAT2,以及干扰素调节因子 (IRF) 蛋白, p48/ISGF3 γ (Wathelet et al., Mol. Cell 1:507-518[1998])。后者是 ISGF3

的DNA序列识别亚基且直接与ISRE相互作用(McKendry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11455-11459[1991]; John et al., Mol. Cell. Biol. 11:4189-4195[1991])。用IFN- α 或IFN- β 处理COS细胞,导致相应于ISGF3与ISRE衍生探针结合的复合体的出现。9F3mAb阻断了IFN- α 诱导的而不是IFN- β 诱导的复合体的出现(图4)。另外,9F3mAb能中和该试验中所测试的6种重组IFN- α 亚型的活性(表2)。

[0284] 表2

[0285] mAb 9F3对I型IFN诱导ISGF3形成的抑制作用

[0286]

mAb	IFN- α 2/1	IFN- α 1	IFN- α 2	IFN- α 5	IFN- α 8	IFN- α 21	IFN- β
9F3. 18. 5	+++	+++	+++	+	+++	+++	-
IgG1	-	-	-	-	-	-	-

[0287] 9F3对IFN诱导的复合体的抑制作用程度如表中所示:-表示诱导条带没有改变;+表示诱导条带部分丢失而+++表示诱导条带被大部分消除。所用mAb为10 μ g/ml,所用IFN- α 为25ng/ml。

[0288] 已建立了9F3能中和广泛种类的重组IFN- α 亚型及活化白细胞产生的IFN- α 亚型的混和物,我们克隆并测序了编码9F3mAb重和轻链的cDNA。提纯重和轻链而所衍生的N末端氨基酸用于设计对应于N末端的简并5'引物,而对应于小鼠K轻链和IgG2重链的恒定结构域设计3'引物。用常规PCR技术克隆对应cDNA并测定嵌入的核苷酸序列。图5显示了鼠类9F3单克隆抗体VL(5A)和VH(5B),人源化版本(V13)以及人重链III亚组和人K轻链III亚组的共有序列的序列比对。为确保所克隆的cDNA编码了反映9F3mb特异性与特性的正确Mab,使用如图5所示的小鼠cDNA序列和人CH1结构域生成了重组嵌合蛋白。所得嵌合体(CH8-2)能完全中和多种重组IFN- α 亚型(图6)。然后用重和轻链的氨基酸序列生成人源化抗体。

[0289] 实施例29F3泛-IFN- α 中和性单克隆抗体的人源化

[0290] 材料与方法

[0291] 人源化F(ab)s的构建

[0292] 为了构建人源化9F3的第一个F(ab)变体,在pEMX1的含脱氧尿苷的模板上进行定点诱变(Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492[1985])。将6个CDR改为鼠9F3序列(图5),每个CDR中所包含的残基来自于基于序列的CDR定义(Kabat等人(1991)见上文)。因此F-1由具有6个完整鼠CDR序列的完整人框架(VL_K亚组1和VH亚组III)组成。从F-1的质粒模板构建了所有其它F(ab)变体的质粒。用商品化试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)将质粒转化入大肠杆菌株XL-1Blue中(Stratagene, San Diego, CA),用于制备双链和单链DNA。用双脱氧核苷酸链终止法(Sequenase, U. S. Biochemical Corp., Cleveland, OH)对每个变体编码轻链和重链的DNA完全测序。将质粒转化入大肠杆菌株16C9(MM294的衍生物)中,接种在含有50 μ g/ml羧苄青霉素的Luria肉汤平板上,并选择单个菌落以表达蛋白质。37℃下,单菌落培养在5ml Luria肉汤—100 μ g/ml羧苄青霉素中5-8小时。将这5ml培养物加入到500ml含有50 μ g/ml羧苄青霉

素的 AP5 培养基中并在 4L 带挡板摇瓶中 37℃ 培养 20 小时。AP5 培养基含有 1.5g 葡萄糖, 11.0g Hycase SF, 0.6g 酵母提取物 (检定的), 0.19 克 MgSO_4 (无水的), 1.07g NH_4Cl , 3.73g KCl , 1.2g NaCl , 120ml 1M 三乙醇胺, pH7.4 加到 1L 水中, 然后用 0.1 μM Sealkeen 过滤器过滤除菌。在 1L 离心瓶中以 3000 $\times g$ 离心收获细胞并除去上清液。冻结 1 小时之后, 将沉淀重悬于 25ml 冷的 10mM Tris-1mM EDTA-20% 蔗糖, pH7.5 中, 加入 250 μL 的 0.1M 苯甲酰胺 (Sigma, St. Louis, MO) 抑制蛋白水解。冰上缓慢搅拌 3 小时后, 以 40000 $\times g$ 离心样品 15 分钟。然后将上清液加到已用 10mM Tris-1mM EDTA, pH7.5 平衡的蛋白 G — Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 柱中 (柱床体积 0.5ml)。用 10ml 10mM Tris-1mM EDTA, pH7.5 洗涤此柱并用 3ml 0.3M 甘氨酸, pH3.0 洗脱到 1.25ml 1M Tris, pH8.0 中。然后用 Centricon-30 (Amicon, Beverly, MA) 将 F(ab) 的缓冲液更换为 PBS 并浓缩到 0.5ml 的最终体积。所有 F(ab)s 跑 SDS-PAGE 电泳以确定纯度, 并用电喷射质谱法验证各变体的分子量。用定量氨基酸分析测定 F(ab) 浓度。

[0293] 嵌合性与人源化 IgG 的构建

[0294] 为了产生嵌合性和人源化 9F3 的人 IgG2 版本, 将合适的鼠或人源化的 VL 和 VH(F-13, 表 3) 结构域亚克隆入分开的前述 pRK 载体中 (Eaton et al., Biochemistry 25:8343-8347[1986]), 该载体含有编码人 IgG2CH1-Fc 或人轻链 CL 结构域的 DNA。用双脱氧核苷酸测序法验证编码各变体的完整轻链和完整重链的 DNA。嵌合性 IgG 含有与人 CH1 结构域氨基酸 SerH113 融合的完整鼠 9F3VH 结构域, 和与人 CL 结构域氨基酸 LysL107 融合的完整鼠 9F3VL 结构域。

[0295] 采用高效方法 (Gorman et al., DNA Prot. Eng. Tech. 2:3-10[1990]) 将重链和轻链质粒共转染入腺病毒转化的人胚肾细胞系 293 中 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-74[1977])。将培养液改为无血清培养液, 每日收获至 5 天。用蛋白 A — Sepharose CL-4B (Pharmacia) 从合并的上清液中提纯抗体。用 Centricon-30 (Amicon) 将洗脱抗体的缓冲液换为 PBS, 浓缩至 0.5ml, 用 Millex-GV (Millipore, Bedford, MA) 除菌过滤并在 4℃ 下保存。用定量氨基酸分析测定 IgG2 浓度。

[0296] IFN- α 结合试验

[0297] 在 ELISA 中, 在各孔中加入 50 μL PBS 配的 0.1 $\mu\text{g/ml}$ IFN- α 包被 96 孔微量滴定板 (Nunc) 4℃ 培养过夜。然后用洗涤缓冲液 (PBS 加 0.05% Tween20) 洗板三次。用 200 μL SuperBlock (Pierce) 封闭微量滴定板诸孔室温温育 1 小时。用洗涤缓冲液再洗板三次。洗涤后, 在所选孔中加入 100 μL 起始于 10 $\mu\text{g/ml}$ 人源化 mAb 的系列稀释液。在振摇器上室温温育滴定板 1 小时, 并用洗涤缓冲液洗三次。接着, 将 100 μL 与山羊抗人 Fab 特异性抗体 (Cappel) 偶联的辣根过氧化物酶以试验缓冲液 (溶于 PBS 中的 0.5% 牛血清白蛋白, 0.05% Tween20) 作 1:1000 稀释, 加入到各孔中。室温振摇器上温育滴定板, 然后用洗涤缓冲液洗三次, 然后在各孔中加入 100 μL 底物 (TMB, 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺; Kirkegaard & Perry) 室温温育 10 分钟。各孔中加入 100 μL 终止液 (购自 Kirkegaard & Perry) 终止反应, 在自动微量滴定板读数器中读取 450nm 处吸光值。

[0298] BIA core™ 生物传感器试验

[0299] 用 BIA core™ 生物传感器 (Karlsson et al., Methods: A companion to Methods in Enzymology 6:97-108[1994]) 测定了 IFN- α 与人源化 F(ab)s, 嵌合性和人源化 IgG2

抗体的结合。将 IFN- α 以 pH6.3, 50mM MES 缓冲液配的 IFN- α 60 μ g/ml 固定在传感芯片上。使抗体以磷酸盐缓冲盐水 /1%Tween-20 配的抗体 75 μ g/ml (500nM) 接触芯片。测定抗体的结合速率 (on-rate) (k_{on})。

[0300] 鼠和人源化 F(ab)s 的计算机图解模型

[0301] 用 VL 和 VH 结构域 (图 5A 和 B) 序列构建了鼠 9F3VL-VH 结构域的计算机图解模型 (图 7)。用此模型确定哪个框架残基应该掺入到人源化抗体中。还构建了人源化 F(ab) 模型以验证鼠框架残基的正确选择。如前所述 (Carter et al., [1992] 见上文; Werther et al., [1996] 见上文) 构建了这些模型。

[0302] 结果

[0303] 将人重链亚型 III 和轻链亚型 I 的共有序列用作图 5 所示的人源化框架 (Kabat et al., (1991) 见上文)。此框架已成功用于其它鼠抗体的人源化 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 [1992]; Presta et al., J. Immunol. 151: 2623-2632 [1993]; Eigenbrot et al., Proteins 18:49-62 [1994]; Werther et al., J. Immunol. 157:4986-4995 [1996])。先制备所有人源化变体并筛选在大肠杆菌中表达的 F(ab)s 的结合。500ml 摇瓶中通常得率为 0.1-0.4mg F(ab)。

[0304] 已根据序列高变性 (Kabat et al., (1991) 见上文) 或 F(ab)-抗原复合体的晶体结构 (Chothia et al., Nature 342:877-883 [1989]) 明确了互补决定区 (CDR) 残基。虽然以序列为基础的 CDR 大于以结构为基础的 CDR, 这两种限定 (范围) 除了 CDR-H1 外通常是一致的。根据以序列为基础的限定范围, CDR-H1 包括残基 H31-H35, 而以结构为基础的限定范围是 CDR-H1 的残基为 H26-H32 (轻链残基以 L 为前缀, 重链残基以 H 为前缀)。对于本研究, CDR-H1 的限定范围是此二者的结合, 即, 包括残基 H26-H35。用以序列为基础的限定范围来确定其它 CDR (Kabat et al., (1991) 见上文)。

[0305] 在最初的变体 F-1 中, 从小鼠抗体的 CDR 残基转移到人框架。另外, 生成含有带 F-1 轻链 (Ch-1) 的嵌合重链和带嵌合轻链 (Ch-2) 的 F-1 重链组成的 F(ab)s 并试验结合能力。F-1 与 IFN- α 结合极差 (表 3)。对 Ch-1 和 Ch-2 结合亲和力的比较 (表 3) 表明需要改变 F-1VH 结构域中的框架残基以增强结合。

[0306] 表 3

[0307]

人源化的抗 IFN- α 版本					
版本	模板	改变物 ^a	10ug/ml 时的 OD _{450nm}		
			均值	标准偏差	重复数
Ch-1	F-1 VL/鼠 VH		1.45	0.11	3
Ch-2	鼠 VL/F-2 VH		0.24	0.04	3
F-1	人 FR/CDR 交换		0.06	0.00	3
F-2	F-1	ArgH71Leu; AsnH73Lys	0.08	0.01	3

[0308]

F-3	F-2	PheH67Ala; IleH69Leu; LeuH78Ala	0.14	0.02	3
F-4	F-3	ArgH94Ser	0.495	0.02	3
F-5	F-4	AlaH24Thr	0.545	0.03	3
F-6	F-5	ValH48Ile; AlaH49Gly	0.527	0.02	2
<i>F-7</i>	<i>F-5</i>	AlaH78Leu	0.259	0.02	2
<i>F-8</i>	<i>F-5</i>	LeuH69Ile	0.523	0.05	3
<i>F-9</i>	<i>F-5</i>	AlaH67Phe	0.675	0.09	3
<i>F-10</i>	<i>F-9</i>	LeuH69Ile	0.690	0.03	3
F-11	F-10	LysH75Ser	0.642	0.06	3
F-12	F-10	AsnH76Arg	0.912	0.05	3
F-13	F-12	LeuL46Val TyrL49Ser	1.050	0.16	3
<i>F-14</i>	<i>F-13</i>	LeuH71Arg	0.472	0.06	3
<i>F-15</i>	<i>F-13</i>	LysH73Asn	0.868	0.32	3

[0309] ^a 鼠残基为粗体字；残基编号方式根据 Kabat 等人 (1991)。标准字体标明了由人框架残基到小鼠的变化。斜体字标明了由小鼠框架残基到人的变化。用 ELISA 测试 Fab 与 IFN- α 的结合,结果以 10 μ g/ml OD450nm 提供。SD,标准偏差;n,实验重复次数。

[0310] 先前的人源化过程 (Xiang et al., J. Mol. Biol. 253:385-390 [1995]; Werther et al., [1996] 见上文) 与 F(ab)- 抗原晶体结构的研究 (Chothia et al., [1989] 见上文; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175-182 [1990]) 已显示了残基 H71 和 H73 能对结合产生深度影响 (可能通过影响 CDR-H1 和 CDR-H2 的构型)。将 H71 和 H73 位置的人残基改变成其小鼠对应物仅仅微弱改善结合 (版本 F-2, 表 3)。在位置 H67, H69 和 H78 (版本 F-3) 的更多的同时改变以及随后 ArgH94Ser (版本 F-4) 和 AlaH24Thr (版本 F-5) 的改变显著改善了结合 (表 3)。由于位置 H67, H69 和 H78 已经同时改变,每个各自变回人共有序列框架残基;版本 F-7, F-8, F-9 和 F-10 显示位置 H67 人残基是优选的,位置 H69 并未显示对鼠或人残基有任何偏爱,而位置 H78 优选鼠残基。

[0311] 在之前的人源化过程中,我们已发现紧邻 CDR-H1 和 CDR-H2 的框架环, FR3 (Kabat et al., (1991) 见上文) 内的残基能影响结合 (Eigenbrot et al., (1994) 见上文)。因此,将此环中的两个残基改变为它们的鼠对应物:赖氨酸 H75 变为小鼠的丝氨酸 (版本 F-11) 和天冬酰胺 H76 变为鼠精氨酸 (版本 F-12)。只有天冬酰胺 H76 变成精氨酸提高了结合 (表 3)。

[0312] 检验鼠和人源化 F(ab)s 的模型,表明了掩蔽在 VL-VH 界面并与 CDR-H3 互相作用

的残基 L46 也可能对 CDR-H3 构象的决定和 / 或 VL 与 VH 结构域间的互相作用的影响起作用。类似地,紧邻于 CDR-L2 的 L49 位置在人共有序列 (酪氨酸) 和 9F3 (丝氨酸) 序列之间不同。因此,同时取代亮氨酸 L46 缬氨酸和酪氨酸 L49 丝氨酸残基,产生了具有更进一步改善的结合 (表 3) 的变体 (F-13)。根据所有产生的变体中的最佳结合,选择 F-13 作为最终人源化版本。

[0313] 将衍生于 F-13 的 VH 和 VL 结构域分别与人 IgG2CH1-Fc 和人 CL 结构域融合,产生了人源化重组抗 IFN- α 单克隆抗体 (V13IgG2)。然后将 V13IgG2 的 K_{on} 速率和 K_D 值与嵌合性 IgG2 或鼠 9F3 相比较。V13IgG2 和嵌合性 IgG2 结合于固定化 IFN- α 的 BIAcore™ 测定显示它们的 K_{on} 速率相似 (表 4)。采用 Kinexa™ 技术的亲和力测量表明,与亲本鼠 9F3 抗体相比,V13IgG2 对 IFN α 的亲和力降低了 2 倍 (表 4)。

[0314] 表 4

[0315]

抗 IFN α 抗体的 BIAcore™和 Kinexa™数据			
抗体 ^a	$K_{on}(\mu M/sec)$	$K_d(nM)^b$	方法
		0.14	BIAcore™
ChIgG2	3.9		BIAcore™
V13IgG2	3.3		BIAcore™
V13Fb		4.1	BIAcore™
抗体 ^a	$K_D(pM)$		
鼠 9F3	1.5		Kinexa™
V13Fab	3.4		Kinexa™

[0316] a. V13IgG2 是与人 IgG2CH1-Fc 相连的 F-13VH 结构域和与人 CL 结构域相连的 F-13VL 结构域;ChIgG2 是与人 IgG2CH1-Fc 相连的鼠 9F3VH 结构域和与人 CL 结构域相连的鼠 9F3VL 结构域。^b K_{off}/K_{on} 。

[0317] 材料的保藏

[0318] 以下材料已存放在美国典型培养物保藏所 (10801University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC)):

材料	ATCC 保藏号	保藏日期
1、分泌 9F3 鼠抗-IFN- α 单克隆抗体的杂交瘤细胞系 (Id.Ref.:9F3.18.5)	PTA-2917	2001 年 1 月 18 日
2、表达嵌合性 CH8-2 全长 IgG 的重链的 pRK 基础载体 (Id.Ref.:XAIFN-ChHpDR2)	PTA-2883	2001 年 1 月 9 日
[0319]	PTA-2880	2001 年 1 月 9 日
3、表达嵌合性 CH8-2 全长 IgG 的轻链的 pRK 基础载体 (Id.Ref.:XAIFN-ChLpDR1)		
4、表达人源化 V13 全长 IgG ₂ 重链的 pRK 基础载体 (Id.Ref.:VHV30-IgG2)	PTA-2881	2001 年 1 月 9 日
5、表达人源化 V13 全长 IgG ₂ 轻链的 pRK 基础载体 (Id.Ref.:VLV30-IgG)	PTA-2882	2001 年 1 月 9 日

[0320] 根据关于国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约及其实施细则的条款进行此保藏。自保藏之日起,保证所保藏的活培养物维持 30 年。保藏物在布达佩斯条约条款下由 ATCC 可获得并遵循 Genentech 公司和 ATCC 之间的协定,其保证相关美国专利授权或者任何美国或外国专利申请公开(无论哪个先来)后,该保藏物培养产生的后代公众可永久和不受限制的得到,并保证对美国专利商标委员会根据 35U. S. C § 122 和该委员会规则包括 37C. F. R § 1. 14 具体参考 8860G 638 所确定的人可得到该保藏物后代。

[0321] 本申请受托人同意如果保藏的材料培养物在合适的条件下培养时死亡或损失或遭受破坏,将立即用另一相同材料替换此材料。可获得该保藏材料并不构成许可实施本发明,那样做就违反了政府当局根据其专利法所授予的权利。

[0322] 认为先前所写的说明书足以使本领域技术人员实施本发明。因为本文的保存实施例的目的是阐述本发明的某些方面,任何功能上相同的构建物都在本发明的范围之内,所以本发明并不限于该保藏的构建物所限定的范围。本文材料的保藏并不构成承认本文中的描述不足以使本发明任何方面得以实施,包括其最佳形式,也不构成将权利要求的范围限制在本说明书所描述的范围内。本领域技术人员会懂得除了本文所显示和描述的内容外,可根据以上描述对本发明作各种修改,这些都落在附属权利要求书的范围内。

[0001]

序列表

<110> 基因技术股份有限公司 (GENENTECH, INC.)

Chuntharapai, Anan

Kim, Jin K.

Stewart, Timothy

Presta, Leonard G.

<120> 抗-干扰素 α 的抗体

<130> GENENT. 074A

<150> 60/270775

<151> 2001-02-22

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 2

```

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

```

[0002]

<210> 3
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此序列表示包含人和非人序列的人源化的嵌合抗体。

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Ser Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
 85 90 95
 Gly Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val

<210> 4
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser 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
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

<210> 5
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此序列表示包含人和非人序列的人源化的嵌合抗体。

<400> 5
 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 Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Ile Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Lys Ser Lys Arg Thr Ala Tyr

[0003]

```

65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Ser Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100     105     110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      115

```

```

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 6
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
Ala Val Ile Ser Gly Asp 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 Gly Arg Val Gly Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100     105     110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
      115

```

```

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 7
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Tyr Met His
 1      5      10      15

```

```

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 8
Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1      5

```

```

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

```

```

<400> 9
Gln His Ser Trp Gly Ile Pro Arg Thr Phe
 1      5      10

```

```

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> 人

```

[0004]

<400> 10
Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His
1 5 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 11
Ser Ile Asn Pro Asp Tyr Asp Ile Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 12
Trp Ile Ser Asp Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> 人

<400> 13
gatcgggaaa gggaaaccga aactgaagcc 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> 人

<400> 14
gatcggttc agtttcggtt tccctttccc 30

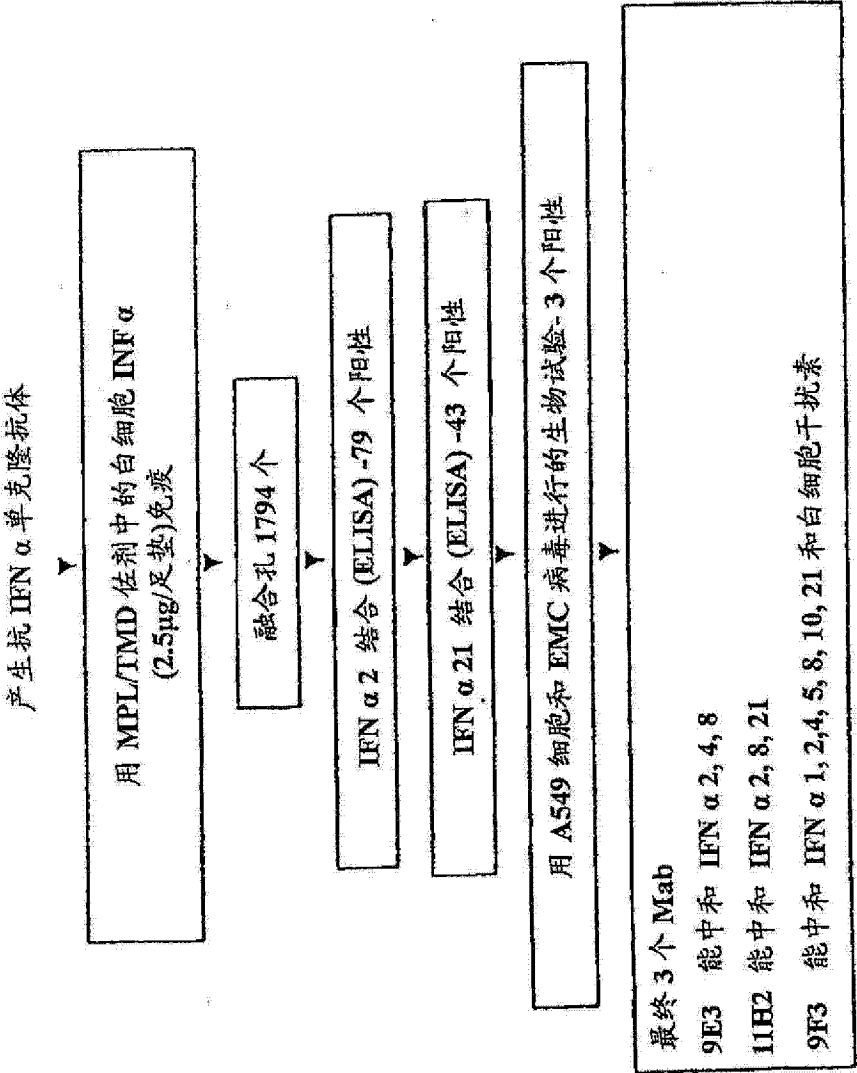


图 1

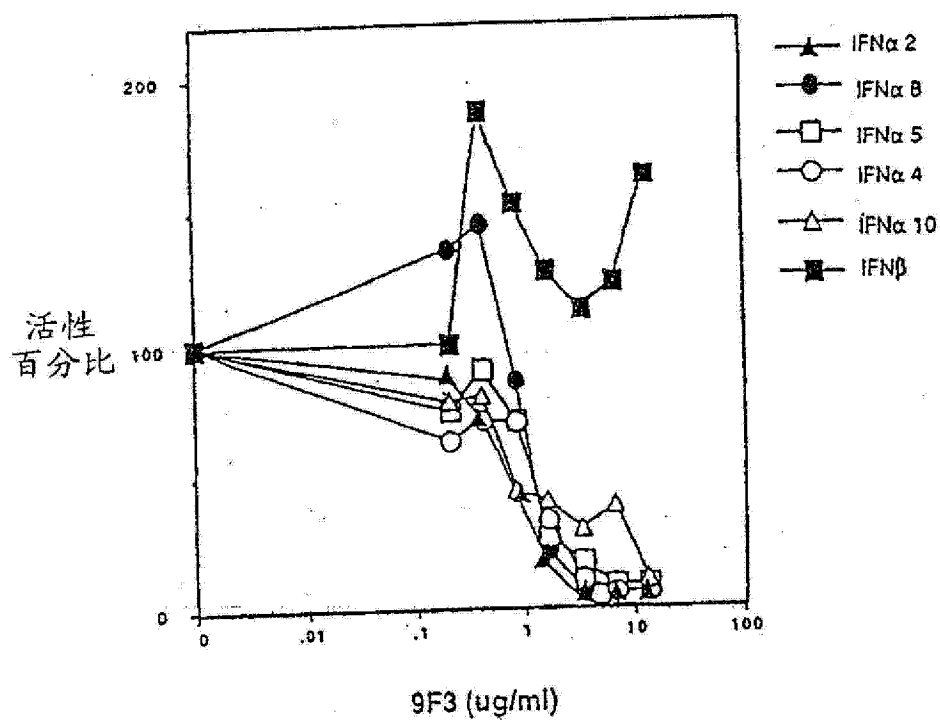
mAb 9F3 对 INF- α 活性的中和作用

图 2

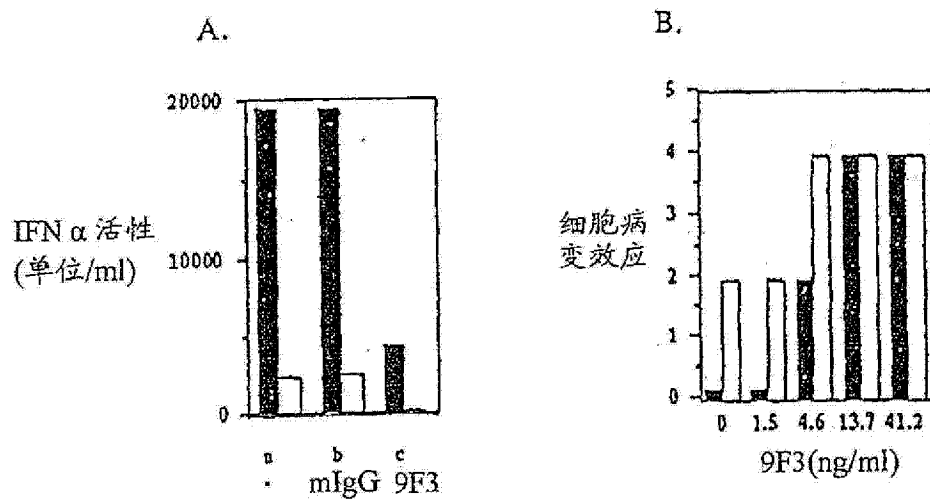


图 3

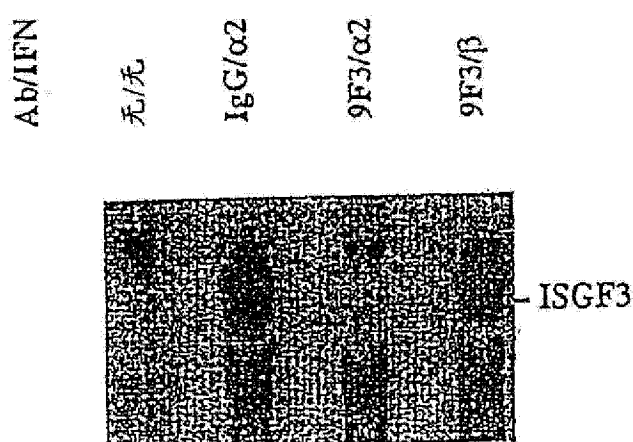


图 4

轻链可变区

```

1      10      20      30 abcd      40
murine DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKVLIS
      **      *      * * * * *      *      **
V13    DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGKAPKVLIS
      * * * * *      * * * * *      * *
hukI   DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SN---YLA WYQQKPGKAPKLLIY
      -----

50      60      70      80      90
murine YASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEGDTATYFCQHSWGIPRTF
      *      * * * * *      *
V13    YASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHSWGIPRTF
      * *      * * * * *
hukI   AASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQYNSLPWTF
      -----

100
murine GAGTKLELRRRAV
      *      * * * *
V13    GQGTVKVEIKRTV
hukI   GQGTVKVEIKRTV

```

图 5A

重链可变区

	1	10	20	30	40		
murine	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYIIHWVKQGHGRSLEWIG						
	** ** * * * * *						
V13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGYTFTEYIIHWVRQAPGKGLEWVA						
	* * * * *						
huIII	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVA						

	50	a	60	70	80	abc	90
murine	SINPDYDITNYNQRFK GKATLTLDKSSRTAYLELRSLTSEDSAVYYCAS						
	* * * * *						
V13	SINPDYDITNYNQRFKGRFTISLDKSKRTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAS						
	* * * * * * * * *						
huIII	VISGDGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR						

	100						
murine	WISDFFDYWGQGTTLMVSAAS						
	* * * *						
V13	WISDFFDYWGQGT LVT VSSAS						

huIII	GRVGYDYWGQGT LVT VSSAS						

图 5B

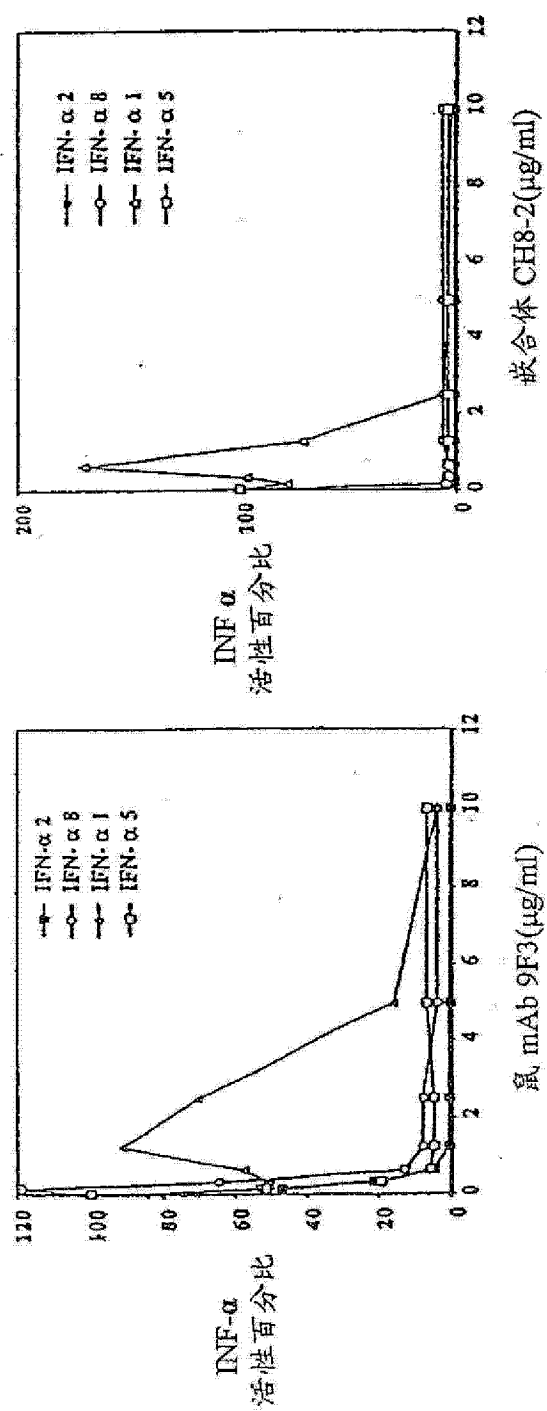


图 6

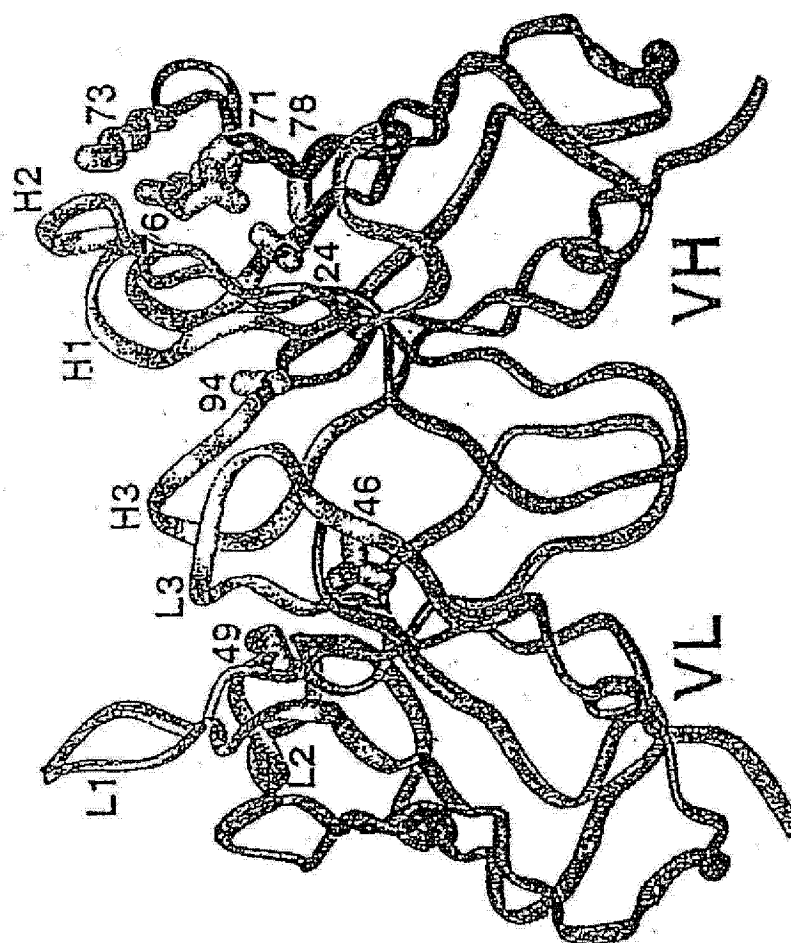


图 7

专利名称(译)	抗-干扰素α的抗体		
公开(公告)号	CN102993303A	公开(公告)日	2013-03-27
申请号	CN201210344864.6	申请日	2002-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	基因技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	基因技术股份有限公司		
[标]发明人	A 春塔拉帕伊 J K 金 L G 普雷斯塔 T 斯图尔特		
发明人	A.春塔拉帕伊 J.K.金 L.G.普雷斯塔 T.斯图尔特		
IPC分类号	C07K16/24 C12N15/13 C12N15/63 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/08 C12N5/20 A61K39/395 A61P37/02 A61P3/10 A61P5/14 G01N33/577 G01N33/53 A61P5/50 A61P17/00 A61P37/06 C07K19/00 C12N1/15 C12N5/16 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/02 G01N33/564 G01N33/68		
CPC分类号	G01N2800/042 C07K2319/00 C07K2317/565 C07K2317/92 G01N33/6866 C07K2317/55 C07K2316/96 C07K2317/567 G01N33/564 C07K16/249 G01N2333/56 A61K2039/505 G01N2800/24 C07K2317/24 A61P17/00 A61P19/04 C07K2317/76		
优先权	60/270775 2001-02-22 US 10/044896 2002-01-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗-干扰素α的抗体，更具体地，本发明总体上涉及产生和特征鉴定对各种IFNα亚型具有广泛反应活性的中和性抗-IFNα单克隆抗体。本发明还涉及这种抗-IFN-α抗体在诊断和治疗与IFN-α表达增高有关的疾病，特别是自身免疫性疾病，如胰岛素依糖性糖尿病(1DDM)和全身性红斑狼疮中的应用。

mAb 9F3 对 INF-α 活性的中和作用

