

1. 一种分离的抗体，其包含选自下组的至少一个高变区（HVR）序列：该组由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 的保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的 HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2 和 LC-HVR3 构成，并且该抗体结合人 α 干扰素受体 2（IFNAR2）。

2. 一种分离的抗体，其包含如下所述的重链可变域和/或轻链可变域序列，且结合人 α 干扰素受体 2（IFNAR2）：所述重链可变域和/或轻链可变域序列是由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 的保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变域和/或轻链可变域序列。

3. 一种免疫球蛋白多肽，其包含选自下组的至少一个高变区（HVR）序列：该组由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 的保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的 HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2 和 LC-HVR3 构成，并且该免疫球蛋白多肽结合人 α 干扰素受体 2（IFNAR2）。

4. 一种免疫球蛋白多肽，其包含如下所述的重链可变域和/或轻链可变域序列，且结合人 α 干扰素受体 2（IFNAR2）：所述重链可变域和/或轻链可变域序列是由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变域和/或轻链可变域序列。

5. 一种分离的抗体，其与以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体结合人 IFNAR2 上相同的表位。

6. 一种分离的抗体，其与以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体竞争对人 IFNAR2 的结合。

7. 前述任一项权利要求的抗体，其中所述抗体抑制人白细胞干扰素的抗病毒活性。

8. 前述任一项权利要求的抗体，其中所述抗体抑制人 α 干扰素的抗病

毒活性。

9. 前述任一项权利要求的抗体，其中至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的所述抗体抑制大约 0.5 U/ml 到大约 1000 U/ml 人白细胞干扰素的至少大约 25% 的抗病毒活性。

10. 权利要求 9 的抗体，其中所述白细胞干扰素是大约 10 U/ml。

11. 前述任一项权利要求的抗体，其中至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的所述抗体抑制大约 1000 U/ml α 干扰素的至少大约 25% 的抗病毒活性。

12. 前述任一项权利要求的抗体，其中至少大约 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的所述抗体抑制大约 25 U/ml β 干扰素的至少大约 25% 的抗病毒活性。

13. 权利要求 12 的抗体，其中抗体浓度为至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 。

14. 前述任一项权利要求的抗体，其中至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的所述抗体抑制大约 25 U/ml β 干扰素的至少大约 25% 的抗病毒活性。

15. 前述任一项权利要求的抗体，其中全长 IgG 形式的所述抗体以 300 pM 或更好的结合亲和力特异性结合人 IFNAR2。

16. 权利要求 15 的抗体，其中所述结合亲和力是 280 pM 或更好。

17. 权利要求 16 的抗体，其中所述结合亲和力是 200 pM 或更好。

18. 权利要求 17 的抗体，其中所述结合亲和力是 100 pM 或更好。

19. 权利要求 18 的抗体，其中所述结合亲和力是 60 pM 或更好。

20. 前述任一项权利要求的抗体，其中所述抗体以基本上相等的抗体效价阻断 α 干扰素和 β 干扰素的抗病毒活性。

21. 前述任一项权利要求的抗体，其中相等量的所述抗体能够阻断第一种 I 型干扰素和第二种 I 型干扰素的至少 75% 的抗病毒活性，其中这些干扰素的每一个以其各自的最优抗病毒量施用于 WISH 细胞生物测定中，且其中所述第二种 I 型干扰素是 β 干扰素。

22. 权利要求 21 的 IFNAR2 抗体，其中所述第一种 I 型干扰素是 α 干扰素。

23. 权利要求 21 的 IFNAR2 抗体，其中所述第一种 I 型干扰素是人白细胞干扰素。

24. 前述权利要求中任一项的分离的抗体，其中所述抗体不是如下所述的抗体：由具有 ATCC 保藏号 HB-12426、12427 和/或 12428 的杂交瘤细

胞系所产生的抗体；或 1993 年出版的 Journal of Biological Chemistry 第 268 卷第 10895 到 10899 页描述的 IFNAR2 抗体；或 PCT 公开号为 WO96/33735、WO96/34096、WO9741229 的 PCT 申请，欧洲专利 588177 B1、927252、676413，和/或美国专利 6458932 和 6136309 中公开的分离的 IFNAR2 抗体。

25. 前述权利要求中任一项的分离的抗体，其中该抗体不与下述抗体竞争对人 IFNAR2 的结合：由具有 ATCC 保藏号 HB-12426、12427 和/或 12428 的杂交瘤细胞系所产生的抗体；或 1993 年出版的 Journal of Biological Chemistry 第 268 卷第 10895 到 10899 页描述的 IFNAR2 抗体；或 PCT 公开号为 WO96/33735、WO96/34096、WO9741229 的 PCT 申请，欧洲专利 588177 B1、927252、676413，和/或美国专利 6458932 和 6136309 中公开的分离的 IFNAR2 抗体。

26. 前述权利要求中任一项的分离的抗体，其中该抗体不与下述抗体结合相同的人 IFNAR2 上的表位：由具有 ATCC 保藏号 HB-12426、12427 和/或 12428 的杂交瘤细胞系所产生的抗体；或 1993 年出版的 Journal of Biological Chemistry 第 268 卷第 10895 到 10899 页描述的 IFNAR2 抗体；或 PCT 公布 WO96/33735、WO96/34096、WO9741229，欧洲专利 588177 B1、927252、676413，和/或美国专利 6458932 和 6136309 中公开的分离的 IFNAR2 抗体。

27. IFNAR2 抗体，其由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系的抗体编码序列所编码。

28. 编码前述任一项权利要求的抗体的核酸分子。

29. 宿主细胞，其包含编码前述任一项权利要求的抗体的核酸序列。

30. 能够产生前述任一项权利要求的 IFNAR2 抗体的细胞系。

31. 一种产生前述任一项权利要求的抗体的方法，包括在产生所述抗体的条件下培养包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞。

32. 一种组合物，包含有效量的前述任一项权利要求的抗体和载体。

33. 一种诊断样品中 IFNAR2 的存在的方法，包括使样品接触前述任一项权利要求的抗体。

34. 一种治疗与 IFN- α 、 β 和/或 IFNAR2 的表达相关的疾病或状况的方法，该方法包括对患者施用有效量的前述任一项权利要求的抗体。

35. 权利要求 24 的方法，其中所述患者是哺乳动物患者。

36. 权利要求 36 的方法，其中患者是人。

37. 权利要求 30 的方法，其中所述疾病是自身免疫疾病。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述疾病选自胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）、系统性红斑狼疮（SLE）、自身免疫性甲状腺炎，斯耶格伦氏综合征、银屑病、炎性肠病（例如溃疡性结肠炎，克罗恩氏病）、类风湿性关节炎和 IgA 肾病。

用于靶向 IFNAR2 的方法和组合物

相关申请

本申请是根据 37 CFR 1.53(b)(1)提交的非临时申请,根据 35 USC 119(e) 要求 2005 年 6 月 22 日提交的临时申请第 60/692,786 号的优先权,本文引证其内容。

发明领域

本发明涉及抗 I 型干扰素受体抗体的领域,更具体的是涉及阻断 I 型干扰素对 I 型干扰素受体复合物第二组分 (IFNAR2) 的结合的抗 I 型干扰素受体抗体。

背景技术

I 型干扰素 (IFNs) 是对多种细胞类型具有多效作用的细胞因子。IFN 最为人所知的是它们的抗病毒活性,但它们也具有抗细菌、抗原生动物、免疫调变、和细胞生长调节功能。I 型干扰素包括 α 干扰素 (IFN- α) 和 β 干扰素 (IFN- β)。人 α 干扰素 (hIFN- α) 是一个具有至少 23 种不同多肽的家族,但 INF- β 多肽只有一种 (J. Interferon Res., 13: 443-444 (1993))。hIFN- α 亚类显示超过 70% 的氨基酸序列同源性,并且与 hIFN- β 具有大约 25% 的氨基酸同一性。hIFN- α 和 hIFN- β 具有共同的受体。

已经鉴定了 hIFN- α 受体复合物的两种组分。第一种 hIFN- α 受体 (hIFNAR1) 的 cDNA 编码一种 63kD 的受体蛋白 (Uze et al., Cell, 60: 225-234 (1990) 中有报道)。这种受体经历大量的糖基化,这导致它在凝胶电泳中作为大得多的 135 kD 蛋白迁移。第二种干扰素受体 hIFNAR2 (hIFN- $\alpha\beta$ R 长) 是一种 115 kD 的蛋白质,它与 hIFNAR1 缔合时介导功能性的信号传导复合物 (Domanski et al., J. Biol. Chem., 270: 21606-21611 (1995) 中报道)。一种 IFNAR2 变体, IFN- α/β 受体 (hIFN- $\alpha\beta$ R 短), 是 55 kD 的蛋白质,能够结合 I 型 hIFN, 但与 hIFNAR1 缔合时不能形成功能性复合物 (Novick et al., Cell, 77: 391-400 (1994) 报道)。这种 IFN- α/β 受体看来是

hIFNAR2 的一种可变剪接变体。

未加工的 hIFNAR1 表达产物由 557 个氨基酸组成, 包括 409 个残基的胞外域 (ECD)、21 个残基的跨膜域、和 100 个残基的胞内域, 如 Uze 等人, 同上, 第 229 页图 5 所示。IFNAR1 的胞外域由两个功能域组成, 即功能域 1 和功能域 2, 这两个功能域被一个三脯氨酸基序分隔开来。功能域 1 和功能域 2 之间有 19% 的序列同一性和 50% 的序列同源性(Uze et al., supra)。每个功能域 (D200) 由大约 200 个残基构成, 并可进一步细分为两个大约 100 个氨基酸的同源子域 (SD100)。未加工的 hIFNAR2 表达产物由 515 个氨基酸组成, 包括一个 217 残基的胞外域 (ECD), 一个 21 残基的跨膜域和一个 250 残基的胞质长尾, 如 Domanski et al., J. Biol. Chem., 37: 21606-21611 (1995) 第 21608 页的图 1 所示。

通过使用 IFNAR1 基因敲除小鼠已经证明, IFNAR1 对于针对所有 I 型 IFN 的响应 (Muller et al., Science, 264: 1918-1921 (1994); Cleary et al., J. Biol. Chem., 269: 18747-18749 (1994)), 以及物种特异性 IFN 信号转导 (Constantinescu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 9602-9606 (1994)) 的介导, 均是至关重要的。但是, 在配体结合中起关键作用的是 IFNAR2, 而不是 IFNAR1 (Cohen et al., Mol. Cell Biol., 15: 4208 (1995))。

Benoit et al., J. Immunol., 150: 707-716 (1993) 报道了一种抗 IFNAR1 单抗: 64G12, 发现它抑制 IFN- α 2 (IFN- α A) 和 IFN- α B 对 Daudi 细胞的结合, 并且抑制 IFN- α 2、IFN- β 和 IFN- ω (IFN- α ₁) 对 Daudi 细胞的抗病毒活性。Benoit 等人也报道, 64G12 识别 IFNAR1 的结构域 1 中存在的一个表位。Eid 和 Tovey, J. Interferon Cytokine Res., 15: 205-211 (1995) 报道, 64G12 不能从 Daudi 细胞中免疫沉淀交联的 IFN- α 2-受体复合物。

Colamonici and Domanski, J. Biol. Chem., 268: 10895-10899 (1993) 报道了一种 IFNAR2 单抗 (称为 “IFNaR β 1 单抗”), 其阻断 IFN- α 2 (IFN- α A) 对 Daudi 细胞和 U-266 细胞的结合, 并阻断不同类型的 I 型干扰素对 Daudi 细胞的抗增殖活性 (使用 MTT 细胞增殖测定)。

还有多种干扰 I 型干扰素-干扰素受体相互作用的其它抗体已被公开。参见例如, US 5516515, 5919453, 5,643,749, 5821078, 5886153, 6458932, 6136309, 6713609, 6787634, WO9320187, WO96/33735, EP0822830, EP495907, WO 95/07716, WO96/34096, EP 0537166 B1, EP588177 A2,

EP588177 B1, WO9741229, EP927252, EP676413 B1, WO2004/093908, WO2004/094473, 和 US Pub. 2003/0018174, US Pub. 2003/0166228。

I 型干扰素途径在多种疾病中的作用已开始得到了解。这些疾病包括多种免疫复合物失调的表现。参见例如 Schmidt & Ouyang, *Lupus* (2004), 13:348-352。显然, 可有效地靶向和调节这种重要途径的组合物和方法将是有益的。本文提供的发明涉及这样的组合物和方法。

本文引证本文所引用的包括专利申请和出版物在内所有参考文献的全部内容。

本发明的公开

本发明提供新的抗体, 它们能够结合 IFNAR2 和/或通过 I 型干扰素受体复合物的第二组分 (IFNAR2) 调节与 I 型干扰素信号传导相关的生物活性。

在一个方面中, 本发明提供一种分离的免疫球蛋白多肽, 其包含选自下述群组的至少 1 个, 2 个, 3 个, 4 个, 5 个或全部高变区(HVR)序列, 并特异性结合人 IFNAR2: 所述群组是由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)的杂交瘤细胞系所产生的抗体的 HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2 和 LC-HVR3 序列构成的。例如, 在一个方面中, 本发明提供了一种分离的抗体, 其包含选自下述群组的至少 1 个, 2 个, 3 个, 4 个, 5 个或全部高变区(HVR)序列, 并特异性结合人 IFNAR2: 所述群组是由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)的杂交瘤细胞系所产生的抗体的 HC-HVR1、HC-HVR2、HC-HVR3、LC-HVR1、LC-HVR2 和 LC-HVR3 序列构成的。在一个实施方案中, 本发明提供一种分离的抗体, 其包括选自由 HC-HVR1、HC-HVR2 和 HC-HVR3 构成的群组的至少 1 个, 2 个或所有 HC-HVR, 以及选自由 LC-HVR1、LC-HVR2 和 LC-HVR3 构成的群组的至少 1 个, 2 个或所有 LC-HVR。在一个实施方案中, 本发明的分离的抗体中的 HVR 序列是以保藏号 PTA-6242 保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的杂交瘤细胞系所产生的抗体的 HVR 序列。在一个实施方案中, 本发明的分离的抗体中的 HVR 序列是以保藏号 PTA-6243 保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的杂交瘤细胞系

所产生的抗体的 HVR 序列。在一个实施方案中，本发明的分离的抗体中的 HVR 序列是以保藏号 PTA-6244 保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的 HVR 序列。

在一个方面中，本发明提供一种分离的免疫球蛋白多肽，其包含如下所述的重链可变域和/或轻链可变域，且其特异性结合人 IFNAR2：所述重链可变域和/或轻链可变域序列是由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变域和/或轻链可变域序列。例如，在一个方面中，本发明提供一种分离的抗体，其包含如下所述的重链可变域和/或轻链可变域序列，且其特异性结合人 IFNAR2：所述重链可变域和/或轻链可变域序列是由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变域和/或轻链可变域序列。在一个实施方案中，所述分离的抗体包含以保藏号为 PTA-6242 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变域和/或轻链可变域序列。在一个实施方案中，所述分离的抗体包含以保藏号为 PTA-6243 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变域和/或轻链可变域序列。在一个实施方案中，所述分离的抗体包含以保藏号为 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体的重链可变域和/或轻链可变域序列。

在一个方面中，本发明提供一种 IFNAR2 抗体，它由以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系的抗体编码序列所编码。

在一个实施方案中，本发明提供一种分离的抗体，它与以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体结合人 IFNAR2 上相同的表位。

在一个方面中，本发明提供一种分离的抗体，它与以保藏号为 PTA-6242、PTA-6243 或 PTA-6244 保藏在美国典型培养物保藏中心（ATCC）的杂交瘤细胞系所产生的抗体竞争对人 IFNAR2 的结合。

在本发明抗体的一个实施方案中，所述抗体抑制人白细胞干扰素的抗病毒活性。

在本发明抗体的一个实施方案中，所述抗体抑制人 α 干扰素的抗病毒活性。

在本发明抗体的一个实施方案中，至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的所述抗体抑制大约 0.5 U/ml 到大约 1000 U/ml 人白细胞干扰素的至少大约 25%，40%，50%，75%，或 90% 的抗病毒活性。在一个实施方案中，白细胞干扰素为大约 10 U/ml。

在本发明抗体的一个实施方案中，至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的所述抗体抑制大约 1000 U/ml α 干扰素的至少大约 25%，40%，50%，75%，或 90% 的抗病毒活性。

在本发明抗体的一个实施方案中，至少大约 0.01，0.04，0.1，0.4，1.1，3.3，10 或 20 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的所述抗体抑制大约 25 U/ml β 干扰素的至少大约 25%，40%，50%，75%，或 90% 的抗病毒活性。在一个实施方案中，抗体浓度为至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 。在一个实施方案中，至少大约 10 $\mu\text{g/ml}$ 的全长 IgG 形式的本发明抗体抑制大约 25 U/ml β 干扰素的至少大约 25% 的抗病毒活性。

在本发明抗体的一个实施方案中，全长 IgG 形式的所述抗体以大约 300pM 或更好的结合亲和力特异性结合人 IFNAR2。在一个实施方案中，结合亲和力为大约 280 pM 或更好。在一个实施方案中，结合亲和力为大约 200 pM 或更好。在一个实施方案中，结合亲和力为大约 100 pM 或更好。在一个实施方案中，结合亲和力为大约 60 pM 或更好。

在一个实施方案中，本发明抗体以基本相等的抗体效价阻断 α 干扰素和 β 干扰素的抗病毒活性。

在一个实施方案中，本发明抗体在体外阻断第一种 I 型干扰素(a first Type I interferon)（例如 α 干扰素）和第二种 I 型干扰素(a second Type I interferon)（例如 β 干扰素）的抗病毒活性的效力基本相等。例如，在一个实施方案中，相等量的本发明抗体能够阻断第一种 I 型干扰素和第二种 I 型干扰素的至少约 50%、75%、85%、90% 或 95% 的抗病毒活性，其中这些干扰素分别以它们各自在 WISH 细胞生物测定（例如，如下文的实施例中所述）中的近似最优抗病毒量施用，且其中所述第二种 I 型干扰素是 β 干扰素。在一个实施方案中，第一种 I 型干扰素是 α 干扰素。在一个实施方案中，第一种 I 型干扰素是白细胞干扰素。

本发明的抗体可以是多种形式。例如，本发明的抗体可以是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一个实施方案中，本发明的抗体不是人抗体，例如，它不是异种移植小鼠(xenomouse)中产生的抗体（例如，如 WO96/33735 中所述的）。本发明的抗体可以是全长的抗体或者是其片段（例如，包含抗原结合部分的片段）。

在一个实施方案中，本发明的抗体不是下列抗体：由具有 ATCC 保藏号 HB-12426、12427 和/或 12428 的杂交瘤细胞系所产生的抗体；或 1993 年出版的 Journal of Biological Chemistry 第 268 卷第 10895 到 10899 页描述的 IFNAR2 抗体；或 PCT 公布 WO96/33735、WO96/34096、WO9741229，欧洲专利 588177 B1、927252、676413，和/或美国专利 6458932 和 6136309 中公开的分离的 IFNAR2 抗体。

在一个实施方案中，本发明的抗体不与下述抗体竞争对人 IFNAR2 的结合：由具有 ATCC 保藏号 HB-12426、12427 和/或 12428 的杂交瘤细胞系所产生的抗体；或 1993 年出版的 Journal of Biological Chemistry 第 268 卷第 10895 到 10899 页描述的 IFNAR2 抗体；或 PCT 公布 WO96/33735、WO96/34096、WO9741229，欧洲专利 588177 B1、927252、676413，和/或美国专利 6458932 和 6136309 中公开的分离的 IFNAR2 抗体。

在一个实施方案中，本发明的抗体不与下述抗体所结合的人 IFNAR2 上的表位结合：由具有 ATCC 保藏号 HB-12426、12427 和/或 12428 的杂交瘤细胞系所产生的抗体；或 1993 年出版的 Journal of Biological Chemistry 第 268 卷第 10895 到 10899 页描述的 IFNAR2 抗体；或 PCT 公布 WO96/33735、WO96/34096、WO9741229，欧洲专利 588177 B1、927252、676413，和/或美国专利 6458932 和 6136309 中公开的分离的 IFNAR2 抗体。

在一个方面中，本发明提供包含一种或多种本发明抗体以及载体的组合物。在一个实施方案中，所述载体是可药用的。

在一个方面中，本发明提供编码本发明的免疫球蛋白多肽（例如抗体）的核酸。

在一个方面中，本发明提供包含本发明核酸的载体。

在一个方面中，本发明提供包含本发明核酸或载体的宿主细胞。载体可以是任何类型，例如重组载体诸如表达载体。可以使用多种宿主细胞中的任何一种。在一个实施方案中，宿主细胞是原核细胞，例如大肠杆菌

(*E.coli*)。在一个实施方案中, 宿主细胞是真核细胞, 例如哺乳动物细胞诸如中华仓鼠卵巢(CHO)细胞。

在一个方面中, 本发明提供制备本发明抗体的方法。例如, 本发明提供一种制备抗 IFNAR2 抗体(如本文定义, 其包括全长抗体及其片段)的方法, 所述方法包括在合适的宿主细胞中表达编码所述抗体(或其片段)的本发明重组载体, 并回收所述抗体。

在一个方面中, 本发明提供一种制品, 其包括容器和该容器中容纳的组合物, 其中所述组合物包含一种或多种本发明抗体。在一个实施方案中, 所述组合物包含本发明的核酸。在一个实施方案中, 包含本发明的免疫球蛋白多肽(例如抗体)的组合物还包含载体, 所述载体在一些实施方案中是可药用的。在一个实施方案中, 本发明的制品还包含用于对受试者施用所述组合物(例如抗体)的说明书。

在一个方面中, 本发明提供一种试剂盒, 包括: 包含组合物的第一容器, 所述组合物包含一种或多种本发明抗体; 及包含缓冲剂的第二容器。在一个实施方案中, 所述缓冲剂是可药用的。在一个实施方案中, 包含抗体的组合物还包含载体, 所述载体在一些实施方案中是可药用的。在一个实施方案中, 试剂盒还包含用于对受试者施用所述组合物(例如抗体)的说明书。

在一个方面中, 本发明提供本发明的抗体在制备用于疾病的治疗性和/或预防性处理的药物中的用途, 所述疾病诸如细胞增殖性病症或免疫(例如自身免疫)病症。

在一个方面中, 本发明提供本发明的核酸在制备用于疾病的治疗性和/或预防性处理的药物中的用途, 所述疾病诸如细胞增殖性病症或免疫(例如自身免疫)病症。

在一个方面中, 本发明提供本发明的表达载体在制备用于疾病的治疗性和/或预防性处理的药物中的用途, 所述疾病诸如细胞增殖性病症或免疫(例如自身免疫)病症。

在一个方面中, 本发明提供本发明的宿主细胞在制备用于疾病的治疗性和/或预防性处理的药物中的用途, 所述疾病诸如细胞增殖性病症或免疫(例如自身免疫)病症。

在一个方面中, 本发明提供本发明的制品在制备用于疾病的治疗性和/

或预防性处理的药物中的用途，所述疾病诸如细胞增殖性病症或免疫（例如自身免疫）病症。

在一个方面中，本发明提供本发明的试剂盒在制备用于疾病的治疗性和/或预防性处理的药物中的用途，所述疾病诸如细胞增殖性病症或免疫（例如自身免疫）病症。

本发明提供可用于调节与 I 型干扰素/IFNAR2 信号轴（axis）失调相关的疾病状态的方法和组合物。该信号途径参与了多种生物学和生理学功能。本发明的抗体能够调节该途径，从而可用于调节与一种或多种上述生物学和生理学功能异常相关的状况。因此，在一个方面中，本发明提供一种方法，它包括对受试者施用本发明抗体，从而治疗病理状况。

在一个方面中，本发明提供一种治疗与 α 干扰素、 β 干扰素和/或 IFNAR2 的过表达和/或异常高水平活性相关的疾病或状况的方法，所述方法包括对受试者施用有效量的本发明抗体，从而治疗所述疾病/状况。在一个实施方案中，所述受试者是哺乳动物。在一个实施方案中，所述受试者是人。

可以使用本发明的方法和组合物治疗与 α 干扰素、 β 干扰素和/或 IFNAR2 的过表达和/或异常高水平活性相关的多种疾病。例如，在一个实施方案中，用本发明的方法或组合物进行治疗的疾病是自身免疫疾病，例如胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）；系统性红斑狼疮（SLE）（其可包括例如狼疮性肾炎）；自身免疫性甲状腺炎；斯耶格伦氏综合征（Sjogen's syndrome）；银屑病；炎性肠病（例如溃疡性结肠炎，克罗恩氏病（Crohn's disease））；类风湿性关节炎和 IgA 肾病。

在一个方面中，本发明提供一种抑制细胞或组织中 I 型干扰素/IFNAR2 信号传导的方法，所述方法包括使细胞或组织接触有效量的本发明抗体，从而抑制所述细胞或组织中的 I 型干扰素/IFNAR2 信号传导。

在一个方面中，本发明提供一种治疗受试者中与 I 型干扰素/IFNAR2 信号传导失调相关的病理状况的方法，所述方法包括使细胞或组织接触有效量的本发明抗体，从而治疗所述状况。在一个实施方案中，所述病理状况与 I 型干扰素/IFNAR2 表达上调相关。

可以使用本发明的方法来影响任何合适的病理状态，例如，与 I 型干扰素/IFNAR2 信号途径失调相关的细胞和/或组织。在一个实施方案中，本发明的方法所靶定的细胞是免疫细胞。在一个实施方案中，所述免疫细胞是 T

细胞、B 细胞或单核细胞。

在一个实施方案中，本发明抗体对 I 型干扰素/IFNAR2 信号传导的抑制与通过 Tyk2、Jak1、Stat1 和/或 Stat2 的信号传导的抑制相关。在一个实施方案中，本发明抗体对 I 型干扰素/IFNAR2 细胞信号传导的抑制与 ISRE 复合物形成的抑制相关。在一个实施方案中，本发明抗体对 I 型干扰素/IFNAR2 细胞信号传导的抑制与受干扰素调控的基因（例如 Mx-1、MHC I、CD69、Fas）的表达的抑制相关。

本发明的方法可进一步包含额外的治疗步骤/药剂。例如，在一个实施方案中，还可以对患者施用类固醇（例如对自身免疫疾病而言）。

在一个方面中，本发明的抗体与毒素诸如细胞毒剂连接。这些分子可以与添加剂/增强剂诸如类固醇相组合来配制或施用。

在一个方面中，本发明提供一种检测样品中 IFNAR2 之存在的方法，包括使所述样品接触本发明的抗体。

在一个方面中，本发明提供一种诊断疾病的方法，包括测定组织细胞的测试样品中 IFNAR2 的水平，所述测定是通过使该样品与本发明抗体接触，这样该抗体所结合的 IFNAR2 可指示该样品中 IFNAR2 的存在和/或量。在一个方面中，本发明提供一种诊断疾病的方法，包括测定组织细胞的测试样品中 I 型干扰素/IFNAR2 生物学活性的水平，其中所述测定是通过使该样品与本发明抗体接触，这样，该样品中所述生物学活性相比于对照样品的减少可指示测试样品中 I 型干扰素/IFNAR2 的存在和/或生物学活性水平的增加。

在另一个方面中，本发明提供一种确定个体是否有风险患上疾病的方法，包括测定组织细胞的测试样品中 I 型干扰素/IFNAR2 的水平，所述测定是通过使测试样品与本发明的抗体接触，从而确定样品中存在的 IFNAR2 的量，其中，相比于包含与测试样品细胞来源相同的正常组织的对照样品，测试样品中 IFNAR2 的水平升高指示所述个体具有患上所述疾病的风险。

在本发明的方法的一个实施方案中，根据测试样品中被抗体结合的 IFNAR2 的量所指示的 IFNAR2 多肽的量来确定 IFNAR2 的水平。任选地，可将该方法中采用的抗体可检测性地标记，附着于固体支持物，等等。在本发明的方法的一个实施方案中，I 型干扰素/IFNAR2 生物学活性抑制的量是基于与经由 I 型干扰素/IFNAR2 途径的信号传导相关的生物学活性的量

来确定的, 例如通过抑制经由 Tyk2, Jak1, Stat1 和/或 Stat2 的信号传导; 通过抑制 ISRE 复合物的形成, 和/或通过抑制受 IFN 调控的基因的表达。

在一个方面中, 本发明提供一种使本发明的抗体与体液例如血液中存在的 IFNAR2 结合的方法。

在另一个方面中, 本发明涉及一种使本发明的抗体结合表达 IFNAR2 多肽的细胞的方法, 其中所述方法包括使所述细胞与所述抗体在适于所述抗体结合 IFNAR2 的条件下接触并容许它们之间结合。在一个实施方案中, 所述抗体对细胞上 IFNAR2 的结合抑制 IFNAR2 的生物学功能。在一个实施方案中, 所述抗体不抑制 IFNAR2 与其配体的相互作用。在一个实施方案中, 所述抗体与细胞上 IFNAR2 分子结合并抑制另一分子与所述 IFNAR2 分子结合。

在一个方面中, 本发明提供一种使治疗剂靶向宿主中 IFNAR2 相关组织的方法, 该方法包括对宿主施用所述治疗剂, 其中该治疗剂是与本发明抗体连接的形式, 从而使该治疗剂靶向宿主中的 IFNAR2 相关组织。在一个实施方案中, 结合 IFNAR2 的抗体能够特异性结合位于细胞上的 IFNAR2 (在体外或体内), 例如当 IFNAR2 存在于细胞表面时。

附图简述

图 1 是显示 WISH 干扰素生物测定数据的图表, 该生物测定评估抗体 1922 和 1923 在多种 α 干扰素浓度条件下的中和作用。

图 2 是显示 WISH 干扰素生物测定数据的图表, 该生物测定评估抗体 1922 在多种人白细胞干扰素浓度或多种抗体浓度条件下的中和作用。

图 3 是显示 WISH 干扰素生物测定数据的图表, 该生物测定评估抗体 1923 在多种人白细胞干扰素浓度或多种抗体浓度条件下的中和作用。

图 4 是显示 WISH 干扰素生物测定数据的图表, 该生物测定评估抗体 1922 和 1923 针对干扰素 α 或干扰素 β 的中和作用。

图 5 是显示 WISH 干扰素生物测定数据的图表, 该生物测定评估抗体 1922 针对不同浓度干扰素 β 的中和作用。

图 6 是显示 WISH 干扰素生物测定数据的图表, 该生物测定评估抗体 1922 在多种抗体浓度条件下的中和作用。

图 7 是显示 WISH 干扰素生物测定数据的图表, 该生物测定评估抗体

1923 在多种抗体浓度条件下的中和作用。

本发明的实施方式

通用技术

除非另有说明，本发明的实施将使用分子生物学（包括重组技术）、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术，它们都在本领域技术的范围之内。文献对这些技术作出了充分的说明，例如“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”，second edition (Sambrook et al., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994); “A Practical Guide to Molecular Cloning” (Perbal Bernard V., 1988); “Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas et al., 2001)。

定义

如本文使用的，术语“Ⅰ型干扰素(type I interferon)”和“人Ⅰ型干扰素”定义为：属于人源和合成 α 干扰素(IFN- α)、 ω 干扰素(IFN- ω)和 β 干扰素(IFN- β)类型，并且结合共同的细胞受体的所有种类的天然和合成干扰素。天然人 α 干扰素包括23种密切相关的蛋白质，它们由不同的基因所编码，并具有高度结构同源性(Weissmann and Weber, Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 33: 251 (1986); J. Interferon Res., 13: 443-444 (1993))。人IFN- α 座位包括两个亚家族。第一个亚家族由至少14种功能性非等位基因组成，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)、IFN- α 16、IFN- α 17、IFN- α 4、IFN- α 6、IFN- α 7和IFN- α H (IFN- α 14)的基因，以及具有至少80%同源性的假基因。第二个亚家族， α_{II} 或 ω ，包括至少5种假基因和1种功能性基因(命名为“IFN- α_{II} 1”或“IFN- ω)”，与IFN- α 基因有70%同源性(Weissmann 和 Weber (1986))。一般认为人IFN- β 是由单拷贝基因编码的。

如本文所用的，术语“第一人 α 干扰素(hIFN- α)受体(First human

interferon- α (hIFN- α) receptor)”、“IFN- α R”、“hIFNAR1”、“IFNAR1”和“Uze 链”定义为 Uze et al., Cell, 60: 225-234 (1990)克隆的 557 个氨基酸的受体蛋白质, 其包括 409 个残基的胞外域, 21 个残基的跨膜域, 和 100 个残基的胞内域, 如 Uze et al.第 229 页上图 5 所显示的。在一个实施方案中, 上述术语包括含有 IFNAR1 的胞外域 (ECD) (或 ECD 的片段) 的 IFNAR1 片段。

如本文所用的, 术语“第二 α 干扰素(hIFN- α)受体”、“IFN- $\alpha\beta$ R”、“hIFNAR2”、“IFNAR2”和“Novick 链”定义为 Domanski et al., J. Biol. Chem., 37: 21606-21611 (1995)所克隆的 515 个氨基酸的受体蛋白质, 其包括 217 个残基的胞外域, 21 个残基的跨膜域, 和 250 个残基的胞内域, 如 Domanski et al.第 21608 页上图 1 所显示的。在一个实施方案中, 上述术语包括含有 IFNAR2 的胞外域 (ECD) (或 ECD 的片段) 的 IFNAR2 片段, 以及 IFNAR2 的可溶形式, 诸如与免疫球蛋白序列的至少一部分融合的 IFNAR2 ECD。

“分离的”抗体指已经鉴定且与其天然环境成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质, 可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在一个实施方案中, 将抗体纯化至 (1) 根据 Lowry 法的测定, 抗体重量超过 95%, 最优选重量超过 99%, (2) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度, 或 (3) 根据使用考马斯蓝或优选银染色的还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE, 达到同质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体, 因为抗体天然环境的至少一种成分不会存在。然而, 分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

本文所用的术语“抗 IFNAR2 抗体”是指能够结合 IFNAR2 的抗体。

如本文所用的, 具有“阻断 I 型干扰素对 IFNAR2 的结合”的性质或能力的本发明抗体定义为这样的抗 IFNAR2 抗体, 它能够结合 IFNAR2, 使得 IFNAR2 结合一种或多种 I 型干扰素的能力减弱或消除。

如本文所用的, 短语“基本类似”、“基本相同”、“等同”或“基本等同”是指两个数值 (例如一种分子与某一分子相关, 另一种分子与某一参照/比较分子相关) 之间足够高的相似程度, 使得本领域技术人员认为在这两个数值所量度的生物学特征 (例如, Kd 值, 抗病毒作用等) 的背景

下,这两个数值间的差异几乎没有生物学和/或统计学上的显著性。作为参照/比较分子的值的函数,所述两个值之间的差异优选小于约 50%,优选小于约 40%,优选小于约 30%,优选小于约 20%,优选小于约 10%。

如本文所用的,短语“显著减少(或降低)”或“显著不同”,是指两个数值(通常一个与某一分子相关,另一个与某一参照/比较分子相关)之间足够高的差异程度,使得本领域技术人员认为在这两个数值所量度的生物学特征(例如,Kd 值,HAMA 应答,抗病毒作用等)的背景下,这两个数值间的差异具有统计学上的显著性。作为参照/比较分子的值的函数,所述两个值之间的差异优选大于约 10%,优选大于约 20%,优选大于约 30%,优选大于约 40%,优选大于约 50%。

“结合亲和力”通常指分子(例如抗体)的单一结合位点与其结合配偶(例如抗原)之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,在用于本文时,“结合亲和力”指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶 Y 的亲和力通常可用解离常数(Kd)来表述。亲和力可通过本领域知道的常用方法来测量,包括本文中所描述的。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原且趋于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原且趋于保持更长时间的结合。本领域知道测量结合亲和力的多种方法,其中任一种都可用于本发明的目的。下文描述了具体的示例性实施方案。

在一个实施方案中,依照本发明的“Kd”或“Kd 值”是通过如下述测定法所述使用目的抗体的 Fab 型式及其抗原进行的放射性标记抗原结合测定法(RIA)来测量的:通过在存在未标记抗原的滴定系列的条件下,用最小浓度的(^{125}I)标记抗原平衡 Fab,然后用抗 Fab 抗体包被板捕捉结合的抗原来测量 Fab 对抗原的溶液结合亲和力(Chen, et al., J Mol Biol 293: 865-881 (1999))。为了确定测定法的条件,将微量滴定板(Dynex)用 50mM 碳酸钠(pH 9.6)中的 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕捉用抗 Fab 抗体(Cappel Labs)包被过夜,随后用 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清清蛋白于室温(约 23 $^{\circ}\text{C}$)封闭 2-5 小时。在非吸附板(Nunc #269620)中,将 100pM 或 26pM (^{125}I)-抗原与连续稀释的目的 Fab(例如与 Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)中抗 VEGF 抗体, Fab-12 的评估一致)混合。然后将目的 Fab 温育过夜;然而,温育可持续更长时间(例如 65 个小时)以保证达到平衡。此后,将混合物转移至捕捉板,于室温温育(例如 1

小时)。然后除去溶液,并用含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗板 8 次。平板干燥后,加入 150 μ l/孔闪烁液(MicroScint-20; Packard),然后在 Topcount 伽马计数器(Packard)上对平板计数 10 分钟。选择各 Fab 给出小于或等于最大结合之 20%的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方案,Kd 或 Kd 值是通过表面等离子共振测定法使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)于 25℃使用固定化抗原 CM5 芯片在约 10 个响应单位(RU)测量的。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。将抗原用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M),然后以 5 μ l/分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后,注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量,于 25℃以约 25 μ l/分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST)中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software version 3.2)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(Kd)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293: 865-881 (1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$,那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定,即根据分光计诸如配备了停流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量,存在浓度渐增的抗原的条件下,测量 PBS pH 7.2 中 20nM 抗抗原抗体(Fab 形式)于 25℃的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm, 16nm 带通(band-pass))的升高或降低。

依照本发明的“结合速率”(on-rate, rate of association, association rate)或“ k_{on} ”也可通过上文所述相同的表面等离子共振技术来测定,其中使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ),于 25℃使用固定化抗原 CM5 芯片及大约 10 个响应单位(RU)的条件进行测定。简而言之,依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。将抗原用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M),然后以 5 μ l/分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位(RU)的偶联

蛋白质。然后注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量，于 25℃ 以约 25 μ l/分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_d)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293: 865-881 (1999)。然而，如果根据上文表面等离子共振测定法，结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$ ，那么结合速率优选使用荧光淬灭技术来测定，即在根据分光计诸如配备了停流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯的测量，存在浓度渐增的抗原的条件下，测量 PBS pH 7.2 中 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 于 25℃ 的荧光发射强度 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。在一个实施方案中，使用 Fab 形式的抗体和抗原进行放射标记抗原结合测定“RIA”来测量根据本发明的“ K_d ”或“ K_d 值”，如下述的测定法所描述的：该测定法在未标记抗原的滴定系列存在的条件下使用最小浓度的(^{125}I)标记抗原平衡 Fab，然后用抗 Fab 抗体包被的平板捕获结合的抗原(Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881)。为了确立该测定法的条件，将微量滴定板 (Dynex) 用含 5 μ g/ml 抗 Fab 捕捉抗体(Cappel Labs)的 50 mM 碳酸钠 (pH 9.6) 包被过夜，然后用含 2% (w/v) 牛血清白蛋白的 PBS 于室温 (大约 23℃) 封闭 2 到 5 个小时。在非吸附性平板(Nunc #269620)中将 100 pM 或 26 pM 的 [^{125}I]-抗原与目标 Fab 的系列稀释物混合 (与 Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599 中对一种抗 VEGF 抗体 Fab-12 的评估一致)。然后将目标 Fab 温育过夜；但是，可以继续温育更长时间 (例如 65 个小时) 以保证达到平衡。然后将所述混合物转移到捕捉平板中，于室温温育 1 小时。然后移去溶液，用含 0.1% Tween-20 的 PBS 将平板洗涤 8 次。待平板干燥后，加入 150 μ l/孔的闪烁剂(MicroScint-20; Packard)，将平板在 Topcount 伽马计数器 (Packard) 上计数 10 分钟。选择每种 Fab 的产生少于或等于 20% 最大结合的浓度用于竞争性结合测定。根据另一个实施方案，利用表面等离子共振技术，使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 于 25℃ 使用固定化抗原 CM5 芯片以约 10 个响应单位(RU)进行测定。简而言之，依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺

(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。将抗原用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M), 然后以 5 μ l/分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后, 注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 于 25 $^{\circ}$ C 以约 25 μ l/分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software version 3.2)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_d)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., (1999) J Mol Biol 293: 865-881。然而, 如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即在根据分光计诸如配备了停流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量, 存在浓度渐增的抗原的条件下, 测量 PBS pH 7.2 中 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 于 25 $^{\circ}$ C 的荧光发射强度 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。

在一个实施方案中, 利用与上述同样的表面等离子共振技术, 使用 BIAcoreTM-2000 或 BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 于 25 $^{\circ}$ C 使用固定化抗原 CM5 芯片以约 10 个响应单位(RU)来测定依照本发明的“结合速率”或“ k_{on} ”。简而言之, 依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, BIAcore Inc.)。将抗原用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M), 然后以 5 μ l/分钟的流速注入以获得约 10 个响应单位(RU)的偶联蛋白质。然后注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 于 25 $^{\circ}$ C 以约 25 μ l/分钟的流速注入在含 0.05% Tween-20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIAcore Evaluation Software version 3.2)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。平衡解离常数(K_d)以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., (1999) J Mol Biol 293: 865-881。然而, 如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即在根据分光计诸如配备了停流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或 8000 系列 SLM-Aminco 分光

光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯的测量,存在浓度渐增的抗原的条件下,测量 PBS pH 7.2 中 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 于 25℃ 的荧光发射强度 (激发=295nm; 发射=340nm, 16nm 带通) 的升高或降低。

术语“载体”在用于本文时意指能够运输与其连接的其它核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”,指其中可连接另外的 DNA 区段的环状双链 DNA 环。另一类载体是噬菌体载体。另一类载体是病毒载体,其中可将另外的 DNA 区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所导入的宿主细胞中自主复制 (例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体 (例如非附加型哺乳动物载体) 可在导入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,由此随着宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其可操作连接的基因表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体” (或简称为“重组载体”)。通常,在重组 DNA 技术中有用的表达载体常常是质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是载体的最常用形式。

“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,指任何长度的核苷酸聚合物,包括 DNA 和 RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经过修饰的核苷酸或碱基、和/或其类似物,或者是可通过 DNA 或 RNA 聚合酶或者通过合成反应掺入聚合物的任何底物。多核苷酸可包含经过修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸及其类似物。

“抗体” (Abs) 和“免疫球蛋白” (Igs) 是具有相同结构特征的糖蛋白。抗体展现对特定抗原的结合特异性,而免疫球蛋白包括抗体和其它通常缺少抗原特异性的类抗体分子。后一种类的多肽,例如,在淋巴系统中以低水平产生,而在骨髓瘤中产生的水平升高。

术语“抗体”和“免疫球蛋白”可互换地以最广义使用,包括单克隆抗体 (例如全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、单价、多价抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体,只要它们展现期望的生物学活性),还可以包括特定的抗体片段 (如本文进一步详述的)。抗体可以是嵌合的、人的、人源化的和/或亲和力成熟的。

根据其重链恒定域氨基酸序列,抗体(免疫球蛋白)可归入不同的“类”。免疫球蛋白有五种主要的类: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其中有些可进一步分为“亚类” (同种型), 例如 IgG-1、IgG-2、IgA-1, IgA-2, 等等。

将与抗体的不同类对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的，一般性描述于例如 Abbas et al., Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (2000)。抗体可以是抗体与一种或多种其它蛋白质或肽共价或非共价缔合而形成的更大融合分子的一部分。

术语“全长抗体”、“完整抗体”和“整个抗体”在本文中可互换使用，指基本上完整形式的抗体而非如下文所定义的抗体片段。该术语具体指重链包含 Fc 区的抗体。

“抗体片段”只包含完整抗体的一部分，其中所述部分保留该部分存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项功能，优选保留大多数或所有功能。在一个实施方案中，抗体片段包含完整抗体的抗原结合位点，从而保留结合抗原的能力。在另一个实施方案中，抗体片段，例如包含 Fc 区的抗体片段，保留通常与 Fc 区存在于完整抗体中时通常与之有关的至少一项生物学功能，诸如 FcRn 结合、抗体半衰期调节、ADCC 功能、和/或补体结合。在一个实施方案中，抗体片段是具有与完整抗体基本上相似的体内半衰期的单价抗体。例如，这样的抗体片段可包含抗原结合臂，其与可赋予该片段以体内稳定性的 Fc 序列相连。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体，即构成群体的各个抗体相同，除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的，针对单一抗原。此外，与典型的包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的常规（多克隆）抗体制备物不同，每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。

单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体，以及此类抗体的片段，其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源，只要它们展现出期望生物学活性（美国专利第 4,816,567 号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)）。

非人（例如鼠源）抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在一个实施方案中，人源化抗体指人免疫球蛋白（受体抗体）中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和/或能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基

替换的免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变区，其中整个或基本上整个高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环，且整个或基本上整个 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc)，通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988)和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。还参见下列综述文章和其中引用的参考文献: Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)。Biotech. 5:428-433 (1994)。

术语“高变区”、“HVR”或“HV”在用于本文时指抗体可变域中序列上高度可变和/或形成结构上定义的环的区域。术语“HVR”或“HV”前的字母“HC”和“LC”分别指重链和轻链的 HVR 或 HV。通常，抗体包含六个高变区：三个在 VH 中 (H1、H2、H3)，三个在 VL 中 (L1、L2、L3)。本文中使用且涵盖许多高变区的叙述。Kabat 互补决定区(CDR)是以序列变异性为基础的，而且是最常用的(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia 改为指结构环的位置(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。AbM 高变区代表 Kabat CDR 和 Chothia 结构环之间的折衷，而且得到 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件的使用。“接触”高变区是以对可获得的复合物晶体结构的分析为基础的。下文记录了这些高变区中每一个的残基。

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96

H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号)				

H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 编号)				

H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
----	---------	---------	---------	---------

H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
----	----------	----------	----------	----------

“框架”或“FR”残基是指除本文定义的高变区残基之外的那些可变域残基。

抗体的“可变区”或“可变域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端域。这些域通常是抗体最具可变性的部分，并含有抗原结合位点。

“人源抗体”或“人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成人源抗体的任何技术生成的抗体。人源抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

“亲和力成熟的”抗体指在其一个或多个 HVR 中具有导致抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的一处或多处改变的抗体。在一个实施方案中，亲和力成熟的抗体具有纳摩尔或甚至皮摩尔水平的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知流程生成。Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)记载了通过 VH 和 VL 结构域改组的亲和力成熟。下列文献记载了 CDR 和/或框架残基的随机诱变：Barbas *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier *et al.*, *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton *et al.*, *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7): 3310-9 (1995); Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226: 889-896 (1992)。

“阻断性”抗体或“拮抗性”抗体是抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。优选的阻断性抗体或拮抗剂抗体显著地或完全地抑制抗原的生物学活性。

“激动性”抗体用于本文时是指模仿目标多肽的至少一种功能活性的抗体。

“病症”是指任何可得益于本发明抗体治疗的状况。这包括慢性和急性病症，包括使哺乳动物易患所讨论病症的那些病理状况。本文要治疗的

病症的非限制性例子包括炎症性病症、免疫性病症和其它与干扰素有关的病症。

“自身免疫病”在本文中指源于且针对个体自身组织的非恶性疾病或病症。自身免疫病在本文中明确排除恶性或癌性疾病或状况，尤其排除 B 细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(Hairy cell leukemia)和慢性成髓细胞白血病(chronic myeloblastic leukemia)。自身免疫性疾病或病症的例子包括但不限于炎性应答，诸如炎性皮肤病，包括银屑病和皮炎（例如特应性皮炎）；系统性硬皮病和硬化；与炎性肠病有关的应答（诸如克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎）；呼吸窘迫综合征（包括成人呼吸窘迫综合症；ARDS）；皮炎；脑膜炎；脑炎；葡萄膜炎；结肠炎；肾小球肾炎；过敏状况，诸如湿疹和哮喘及涉及 T 细胞浸润和慢性炎性应答的其它状况；动脉粥样硬化；白细胞粘着缺陷；类风湿性关节炎；系统性红斑狼疮(SLE)（包括但不限于狼疮肾炎，皮肤狼疮）；糖尿病（例如 I 型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病）；多发性硬化；雷诺氏(Reynaud)综合征；自身免疫性甲状腺炎；桥本氏甲状腺炎；变应性脑脊髓炎；斯耶格伦氏(Sjogren)综合征；幼发型糖尿病(juvenile onset diabetes)；通常在肺结核病、结节病、多肌炎、肉芽肿病和脉管炎中发现的与细胞因子和 T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏反应有关的免疫应答；恶性贫血（阿狄森氏(Addison)病）；涉及白细胞渗出的疾病；中枢神经系统(CNS)炎性病症；多器官损伤综合征；溶血性贫血（包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯氏(Coombs)阳性贫血）；重症肌无力；抗原-抗体复合物介导的疾病；抗肾小球基底膜病；抗磷脂综合症；过敏性神经炎；格雷夫斯氏(Graves)病；朗-伊二氏(Lambert-Eaton)肌无力综合症；大疱性类天疱疮；天疱疮；自身免疫性多种内分泌腺病；莱特氏(Reiter)病；僵人(stiff-man)综合症；贝切特氏(Behcet)病；巨细胞动脉炎；免疫复合物肾炎；IgA 肾病；IgM 多神经病；免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症等。

术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”是指与某种程度的异常细胞增殖相关的病症。

在用于本文时，“治疗”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预，可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包

括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、预防或减少炎症和/或组织/器官损伤、减缓疾病进展的速率、改善或减轻疾病状态、及减轻或改善预后。在有些实施方案中，本发明的抗体用于延迟疾病或病症的发展。

“有效量”是指在必须的剂量和时程条件下可有效地达到期望地治疗或预防结果地量。

本发明物质/分子的“治疗有效量”可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重及该物质/分子在个体中引发期望应答的能力等因素而变化。治疗有效量还指该物质/分子的治疗有益效果胜过任何有毒或有害后果的量。

“预防有效量”指在必需的剂量和时间上有效实现期望的预防效果的量。通常而非必然，由于预防剂量是在疾病发作之前或在疾病的早期用于受试者的，因此预防有效量将低于治疗有效量。

如本文中所用的，术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞的功能和/或造成细胞破坏的物质。

B. 通用方法

一般地，本发明提供可用于治疗期望部分或全部阻断 I 型干扰素活性的免疫介导病症的抗 IFNAR2 抗体。在一个实施方案中，本发明的抗 IFNAR2 抗体用于治疗自身免疫病症，诸如上面提到的那些。在另一个实施方案中，本文提供的抗 IFNAR2 抗体用于治疗移植物排斥或移植物抗宿主病。本发明的抗 IFNAR2 抗体的独特性质使得它们特别有用于在患者中实现目标水平的免疫抑制。对于需要紧急介入的患者，可使用本文提供的导致广谱 I 型干扰素活性消除(ablation)的抗 IFNAR2 抗体来尽可能多地减损不希望的免疫应答。对于需要维持免疫抑制的患者，可以使用本文提供的阻断一种或多种（但不一定是所有）I 型干扰素，或使用以不同的程度阻断不同种类的 I 型干扰素的抗 IFNAR2 抗体，来部分减弱该患者的免疫系统，从而降低不希望的免疫应答的风险，同时使该患者 I 型干扰素介导的免疫的某些组分保持完整，以避免不希望的副作用，诸如感染。

在另一个方面中，本发明的抗 IFNAR2 抗体可用作 IFNAR2 的检测及分离用试剂，例如用于检测多种细胞类型和组织中的 IFNAR2 表达，包括细胞群体中 IFNAR2 受体的密度和分布的确定以及基于 IFNAR2 受体表达的

细胞分选。在另一个方面中,抗 IFNAR2 抗体可用于开发具有与本发明抗体相类似的 I 型干扰素阻断活性模式的 IFNAR2 拮抗剂。例如,可以使用本发明的抗 IFNAR2 抗体来确定和鉴定具有相同 IFNAR2 结合特征和/或抗病毒阻断能力的其它抗体。另一个例子是,可以使用本发明的抗 IFNAR2 抗体来鉴定与本文列举的抗体结合基本相同的 IFNAR2 表位,包括线性表位和构象表位的其它抗 IFNAR2 抗体。可以在 IFNAR2 信号转导测定中使用本发明的抗 IFNAR2 抗体来筛选在阻断 I 型干扰素与 IFNAR2 的结合方面将展现相似的药理作用的小分子 IFNAR2 拮抗剂。

候选抗体的生成可以使用本领域常规技术来实现,包括本文中描述的那些技术,诸如杂交瘤技术和结合物分子噬菌体展示库的筛选。这些方法是本领域普遍认可的。

简单地说,可以使用组合文库来筛选具有期望的一种或多种活性的合成抗体克隆,以制备本发明的抗 IFNAR2 抗体。理论上,通过筛选噬菌体库来选择合成抗体克隆,其中噬菌体库含有展示多种与噬菌体外壳蛋白融合的抗体可变区(Fv)片段的噬菌体。使用亲和色谱,针对期望的抗原对这样的噬菌体库进行淘选。表达能够结合期望抗原的 Fv 片段的克隆被吸附于所述抗原,从而与库中的非结合性克隆分离。然后将结合的克隆从抗原上洗脱下来,并可使用更多的抗原吸附/洗脱循环将其进一步富集。任何本发明的抗 IFNAR2 抗体可以这样获得:设计合适的抗原筛选流程来选择感兴趣的噬菌体克隆,然后使用来自感兴趣的噬菌体克隆的 Fv 序列和合适的恒定区(Fc)序列构建全长抗 IFNAR2 抗体克隆,所述恒定区序列描述于 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3。另参见 PCT Pub. WO03/102157 及其中引用的参考文献。

在一个实施方案中,本发明的抗 IFNAR2 抗体是单克隆的。本发明范围中还涵盖本文所提供的抗 IFNAR2 抗体的抗体片段,诸如 Fab, Fab', Fab'-SH 和 F(ab')₂ 片段,及其变化形式。这些抗体片段可以通过常规方式诸如酶消化来形成,或者可通过重组技术来产生。此类抗体片段可以是嵌合的、人源的或人源化的。这些片段可用于本文提出的诊断和治疗目的。

单克隆抗体可以获自一群基本上同质的抗体,即构成群体的抗体个体是相同的,除了在生产单克隆抗体的过程中可能产生的变体外,这种变体

可以很少量存在。由此，修饰语“单克隆”表示抗体的特征，即不是不同抗体的混合物。

本发明的抗 IFNAR2 单克隆抗体可以使用多种本领域已知的方法来制备，包括 Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法，或者它们可以通过重组 DNA 方法来制备（例如美国专利 4,816,567）。

载体、宿主细胞和重组方法

为了重组生产本发明的抗体，分离编码它的核酸，并将其插入可复制载体，用于进一步克隆（DNA 扩增）或表达。可使用常规流程容易地分离编码抗体的 DNA 并测序（如使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针）。可利用许多载体。载体的选择部分取决于将要使用的宿主细胞。通常，优选的宿主细胞是原核或真核（通常是哺乳动物）起源的。

使用原核宿主细胞生成抗体

载体构建

可使用标准重组技术来获得编码本发明抗体多肽构件的多核苷酸序列。可从抗体生成细胞诸如杂交瘤细胞分离期望的多核苷酸序列并测序。或者，可使用核苷酸合成仪或 PCR 技术合成多核苷酸。一旦得到，将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制并表达异源多核苷酸的重组载体。为了本发明的目的，可使用本领域可获得的且知道的许多载体。适宜载体的选择将主要取决于将要插入载体的核酸的大小和将要用载体转化的具体宿主细胞。根据其功能（扩增或表达异源多核苷酸，或二者兼有）及其与它在其中驻留的具体宿主细胞的相容性，每种载体含有多种构件。载体构件通常包括但不限于复制起点、选择标志基因、启动子、核糖体结合位点（RBS）、信号序列、异源核酸插入片段、和转录终止序列。

一般而言，与宿主细胞一起使用的质粒载体包含衍生自与这些宿主相容物种的复制子和控制序列。载体通常携带复制位点，以及能够在转化细胞中提供表型选择的标志序列。例如，通常用衍生自大肠杆菌物种的质粒 pBR322 转化大肠杆菌。pBR322 包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因，由此提供轻松鉴定转化细胞的手段。pBR322、其衍生物、或

其它微生物质粒或噬菌体还可包含或经修饰而包含可被微生物生物体用于表达内源蛋白质的启动子。Carter 等人, 美国专利 5,648,237 中详细记载了用于表达特定抗体的 pBR322 衍生生物的实例。

另外, 可将包含与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体用作这些宿主的噬菌体载体。例如, 可使用噬菌体诸如 λ GEM.TM.-11 来构建可用于转化易感宿主细胞诸如大肠杆菌 LE392 的重组载体。

本发明的表达载体可包含两种或多种启动子-顺反子对, 它们编码每一种多肽构件。启动子是位于顺反子上游(5')的非翻译调控序列, 它调控顺反子的表达。原核启动子通常分成两类, 诱导型的和组成性的。诱导型启动子指响应培养条件的变化(如营养物的存在与否或温度变化)而启动受其控制的顺反子的升高水平转录的启动子。

众所周知受到多种潜在宿主细胞识别的大量启动子。通过限制酶消化切下源 DNA 中的启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体, 由此可将选择的启动子与编码轻链或重链的顺反子 DNA 可操作连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于指导靶基因的直接扩增和/或表达。在有些实施方案中, 使用异源启动子, 因为与天然靶多肽启动子相比, 它们通常容许所表达靶基因的更高转录和更高产量。

适用于原核宿主的启动子包括 PhoA 启动子、 β -半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、和杂合启动子诸如 *tac* 或 *trc* 启动子。然而, 在细菌中有功能的其它启动子(诸如其它已知的细菌或噬菌体启动子)也是合适的。它们的核苷酸序列已经发表, 由此熟练工作人员能够使用提供任何所需限制位点的接头或衔接头将它们与编码靶轻链和重链的顺反子可操作连接(Siebenlist et al., Cell 20: 269 (1980))。

在本发明的一个方面, 重组载体内的每个顺反子都包含指导所表达多肽穿膜转运的分泌信号序列构件。一般而言, 信号序列可以是载体的构件, 或者它可以是插入载体的靶多肽 DNA 的一部分。为了本发明而选择的信号序列应当是受到宿主细胞识别并加工(即被信号肽酶切除)的信号序列。对于不识别并加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞, 将信号序列用选自例如下组的原核信号序列替代: 碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp、或热稳定的肠毒素 II (STII) 前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA 和 MBP。在本发明的一个实施方案中, 表达系统的两个顺反子中都使用的信号序列是

STII 信号序列或其变体。

在另一方面，依照本发明的免疫球蛋白的生成可在宿主细胞的细胞质中发生，因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在那点上，免疫球蛋白轻链和重链在细胞质内表达、折叠和装配而形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株（如大肠杆菌 *trxB* 菌株）提供有利于二硫键形成的细胞质条件，从而容许所表达蛋白质亚基的正确折叠和装配。Proba and Pluckthun, *Gene* 159: 203 (1995)。

本发明的抗体还可以通过使用这样的表达系统来生成，其中可以调控所表达多肽构件的数量比率，从而使分泌且正确装配的本发明抗体的产量最大化。这种调控是至少部分通过同时调控多肽构件的翻译强度而实现的。

Simmons 等人，美国专利 5,840,523 中公开了用于调控翻译强度的一种技术。它在顺反子内利用翻译起始区(TIR)的变体。对于指定 TIR，可创建具有一定范围翻译强度的一系列氨基酸或核苷酸序列变体，由此提供针对特定链的期望表达水平调节此因素的方便手段。可通过常规诱变技术导致能改变氨基酸序列的密码子变化（尽管优选核苷酸序列中的沉默变化）从而生成 TIR 变体。TIR 中的改变可包括例如 Shine-Dalgarno 序列的数目或间距的改变，及信号序列中的改变。用于生成突变型信号序列的一种方法是在编码序列的开端生成不改变信号序列氨基酸序列的“密码子库”（即变化是沉默的）。这可通过改变每个密码子的第三个核苷酸位置来实现；另外，有些氨基酸，诸如亮氨酸、丝氨酸、和精氨酸，具有多种第一个和第二个位置，这可在建库中增加复杂性。Yansura et al., *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4: 151-158 (1992)中详细记载了这种诱变方法。

优选的是，对于载体中的每个顺反子，生成具有一定范围 TIR 强度的一组载体。这个有限集合提供了每条链的表达水平以及期望抗体产物的产量在各种 TIR 强度组合下的比较。可通过量化报道基因的表达水平来测定 TIR 强度，Simmons 等人，美国专利 5,840,523 中有详细描述。根据翻译强度的比较，选择期望的各个 TIR 在本发明的表达载体构建物中进行组合。

适于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌（Archaeobacteria）和真细菌（Eubacteria），诸如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体。有用细菌的实例包括埃希氏菌属（*Escherichia*）（如大肠埃希氏菌（大肠杆菌（*E. Coli*））、

芽孢杆菌属 (*Bacillus*) (如枯草芽孢杆菌(*B. Subtilis*))、肠杆菌属 (*Enterobacteria*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (如铜绿假单胞菌(*P. Aeruginosa*))、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形菌属 (*Proteus*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、透明颤菌属 (*Vitreoscilla*)、或副球菌属 (*Paracoccus*)。在一个实施方案中,使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中,使用大肠杆菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌菌株的实例包括菌株 W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷, Washington, D.C., 美国微生物学学会, 1987, 第1190-1219页; ATCC 保藏号 27,325) 及其衍生物, 包括具有基因型 W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) *ptr3 lac Iq lacL8* $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)$ *degP41 kan^R* 的菌株 33D3(美国专利号 5,639,635)。其它菌株及其衍生物, 诸如大肠杆菌 294 (ATCC 31,446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 λ 1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌 RV308 (ATCC 31,608) 也是合适的。这些实例只是例示而非限制。本领域知道用于构建具有指定基因型的任何上述细菌衍生物的方法, 参见例如 Bass et al., Proteins 8: 309-314 (1990)。通常必需考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择适宜的细菌。例如, 在使用众所周知的质粒诸如 pBR322、pBR325、pACYC177 或 pKN410 来提供复制子时, 大肠杆菌、沙雷氏菌属、或沙门氏菌属各个种可能适于用作宿主。通常, 宿主细胞应当分泌最小量的蛋白水解酶, 而且可能希望在细胞培养物中掺入额外的蛋白酶抑制剂。

抗体生成

用上述表达载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

转化即将 DNA 导入原核宿主, 使得 DNA 能够进行复制, 或是作为染色体外元件或是作为染色体整合成分。根据所用宿主细胞, 使用适于这些细胞的标准技术进行转化。采用氯化钙的钙处理通常用于具有实质性细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。使用的还有一种技术是电穿孔。

在本领域知道的且适于培养选定宿主细胞的培养基中培养用于生成本发明多肽的原核细胞。合适培养基的实例包括添加了必需营养补充物的 LB

培养基(Luria broth)。在有些实施方案中,培养基还含有根据表达载体的构建而选择的选择剂,以选择性容许包含表达载体的原核细胞生长。例如,向用于培养表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的培养基中添加氨苄青霉素。

除了碳、氮、和无机磷酸盐来源以外,还可含有适当浓度的任何必需补充物,或是单独加入或是作为与另一种补充物或培养基的混合物,诸如复合氮源。任选的是,培养基可含有一种或多种选自下组的还原剂:谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐/酯、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

在合适的温度培养原核宿主细胞。例如,对于培养大肠杆菌,优选的温度范围是约 20℃至约 39℃,优选约 25℃至约 37℃,优选约 30℃。主要取决于宿主生物体,培养基的 pH 可以是范围为约 5 至约 9 的任何 pH。对于大肠杆菌, pH 可以是约 6.8 至约 7.4,或大约 7.0。

如果本发明的表达载体中使用诱导型启动子,那么在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面,使用 PhoA 启动子来控制多肽的转录。因此,为了诱导,在磷酸盐限制培养基中培养经过转化的宿主细胞。优选的是,磷酸盐限制培养基是 C.R.A.P 培养基(参见例如 Simmons et al., J. Immunol. Methods 263: 133-147 (2002))。根据所采用的载体构建物,可采用多种其它诱导物,正如本领域所知道的。

在一个实施方案中,所表达的本发明多肽分泌到宿主细胞的周质中并从中回收。蛋白质回收通常涉及破坏微生物,通常通过诸如渗透压震扰(osmotic shock)、超声处理或裂解等手段。一旦细胞遭到破坏,可通过离心或过滤清除细胞碎片或整个细胞。可以通过例如亲和树脂层析进一步纯化蛋白质。或者,蛋白质可能转运到培养液中并从中分离。可从培养液清除细胞,并将培养物上清液过滤和浓缩,用于进一步纯化所生成蛋白质。可使用普遍知道的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和 Western 印迹分析进一步分离和鉴定所表达蛋白质。

在本发明的一个方面,通过发酵过程大量进行抗体生产。多种大规模补料-分批发酵流程可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少 1000 升的容量,优选约 1,000 至 100,000 升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧和养分,尤其是葡萄糖(优选的碳源/能源)。小规模发酵通常指在体积容量不超过约 100 升的发酵罐中进行的发酵,范围可以是约 1 升至约 100 升。

在发酵过程中，通常在将细胞在合适条件下培养至期望密度（如 OD₅₅₀ 约 180-220，在此阶段细胞处于早期稳定期）后启动蛋白质表达的诱导。根据所采用的载体构建物，可使用多种诱导物，正如本领域知道的和上文描述的。可在诱导前将细胞培养更短的时间。通常将细胞诱导约 12-50 小时，但是可使用更长或更短的诱导时间。

为了提高本发明多肽的产量和质量，可修改多种发酵条件。例如，为了改善所分泌抗体多肽的正确装配和折叠，可使用过度表达伴侣蛋白诸如 Dsb 蛋白（DsbA、DsbB、DsbC、DsbD 和/或 DsbG）或 FkpA（具有伴侣活性的一种肽基脯氨酰-顺式,反式-异构酶）的额外载体来共转化宿主原核细胞。已经证明伴侣蛋白促进在细菌宿主细胞中生成的异源蛋白质的正确折叠和溶解度。Chen et al., J. Biol. Chem. 274: 19601-19605 (1999); Georgiou 等人，美国专利 6,083,715; Georgiou 等人，美国专利 6,027,888; Bothmann and Pluckthun, J. Biol. Chem. 275: 17100-17105 (2000); Ramm and Pluckthun, J. Biol. Chem. 275: 17106-17113 (2000); Arie et al., Mol. Microbiol. 39: 199-210 (2001)。

为了将所表达异源蛋白质（尤其是对蛋白水解敏感的异源蛋白质）的蛋白水解降至最低，可将蛋白水解酶缺陷的某些宿主菌株用于本发明。例如，可修饰宿主细胞菌株，在编码已知细菌蛋白酶的基因中进行遗传突变，诸如蛋白酶 III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶 I、蛋白酶 Mi、蛋白酶 V、蛋白酶 VI 及其组合。可以获得有些大肠杆菌蛋白酶缺陷菌株，参见例如 Joly et al., (1998) 见上文; Georgiou 等人，美国专利 5,264,365; Georgiou 等人，美国专利 5,508,192; Hara et al., Microbial Drug Resistance 2: 63-72 (1996)。

在一个实施方案中，在本发明的表达系统中使用蛋白水解酶缺陷且经过过度表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

抗体纯化

在一个实施方案中，进一步纯化本文中生成的抗体蛋白质以获得基本上同质的制品，用于进一步的测定和使用。可采用本领域知道的标准蛋白质纯化方法。下面的流程是合适纯化流程的例示：免疫亲和或离子交换柱上的分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土或阳离子交换树脂诸如 DEAE 上的

层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、和使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤。

在一个方面，将固定在固相上的蛋白 A 用于本发明抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白 A 是来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的 41kD 细胞壁蛋白质，它以高亲和力结合抗体 Fc 区。Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)。蛋白 A 固定其上的固相可以是具有玻璃或石英表面的柱子，或者是可控孔径的玻璃柱或硅胶柱。在有些应用中，柱子以诸如甘油等试剂包被，以防止可能的污染物的非特异粘附。

作为纯化的第一步，可以将衍生自如上所述细胞培养物的制备物施加到蛋白 A 固定化固相上，使得目的抗体特异结合蛋白 A。然后清洗固相以清除与固相非特异结合的污染物。最后通过洗脱从固相回收目的抗体。

使用真核宿主细胞生成抗体：

载体构件通常包括但不限于如下一种或多种：信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

(i) 信号序列构件

在真核宿主细胞中使用的载体还可在目的成熟蛋白质或多肽的 N 端包含信号序列或具有特异切割位点的其它多肽。所选的异源信号序列通常是被宿主细胞识别并加工（即被信号肽酶切除）的。在哺乳动物细胞表达中，可利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列，例如单纯疱疹病毒 gD 信号。

将这些前体区的 DNA 共阅读框地与编码抗体的 DNA 连接。

(ii) 复制起点

通常，哺乳动物表达载体不需要复制起点构件。例如，SV40 起点通常可能只因包含早期启动子才使用。

(iii) 选择基因构件

表达和克隆载体可包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a) 赋予对抗生素或其它毒素的抗性，如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素；(b) 补足相应的营养缺陷；或(c) 提供不能从复合培养基获得的关键营养物。

选择方案的一个实例利用药物来阻滞宿主细胞的生长。经异源基因成

功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质，因而可经历选择方案而存活。此类显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个实例是能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志，诸如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 I 和 II（例如灵长类金属硫蛋白基因）、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如，可以首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤（Mtx，DHFR 的一种竞争性拮抗剂）的培养基中进行培养来鉴定经 DHFR 选择基因转化的细胞。在采用野生型 DHFR 时，适宜的宿主细胞包括，例如，DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系（如 ATCC CRL-9096）。

或者，可通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素如卡那霉素、新霉素或 G418 的培养基中培养细胞来选择被编码抗体、野生型 DHFR 蛋白、和另一种选择标志诸如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶(APH)的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞（特别是包含内源 DHFR 的野生型宿主）。参见美国专利 4,965,199。

(iv) 启动子构件

表达和克隆载体通常包含为宿主生物体所识别，且与编码目标多肽（例如抗体）的核酸可操作连接的启动子。真核细胞的启动子序列是已知的。几乎所有真核基因都具有一个富含 AT 的区域，它位于起始转录的位点上游约 25 至 30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70 至 80 个碱基处发现的另一种序列是 CNCAAT 区，其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3'端是 AATAAA 序列，它可能是向编码序列的 3'端添加聚腺苷酸(polyA)尾的信号。所有这些序列适宜地插入真核表达载体中。

例如，在哺乳动物宿主细胞中，抗体多肽从载体转录的过程可以由来自病毒基因组、来自异源哺乳动物启动子、或来自热休克启动子的启动子所控制，倘若这些启动子与宿主细胞系统相容的话。其中所述病毒的例子有多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒（诸如 2 型腺病毒）、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、和猿猴病毒 40 (SV40)，异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子。

适宜地，以 SV40 限制性片段的形式获得 SV40 病毒的早期和晚期启动子，该片段还包含 SV40 病毒复制起点。适宜地，以 HindIII E 限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利 4,419,446 中公开了

使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统。美国专利 4,601,978 中记载了该系统的一种修改。关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人 β -干扰素 cDNA 还可参见 Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982)。或者,可使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

(v) 增强子元件构件

常常可以通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗体多肽的 DNA 的转录。现在知道来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括 SV40 复制起点晚期侧的增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期侧的增强子、和腺病毒增强子。关于激活真核启动子的增强元件还可参见 Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982)。增强子可剪接到载体中抗体多肽编码序列的 5'或 3'侧的位置,但是通常位于启动子的 5'一侧。

(vi) 转录终止构件

在真核宿主细胞中使用的表达载体通常还包含终止转录和稳定 mRNA 所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5'非翻译区,偶尔也可从其 3'非翻译区获得。这些区域包含在编码抗体的 mRNA 的非翻译区中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见 WO94/11026 及其中公开的表达载体。

(vii) 宿主细胞的选择和转化

适于克隆或表达本文载体中的 DNA 的宿主细胞包括本文描述的高等真核细胞,包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的繁殖已经成为常规流程。有用哺乳动物宿主细胞系的实例有经 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7, ATCC CRL 1651)、人胚肾系(293 细胞或为悬浮培养而亚克隆的 293 细胞, Graham et al., 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 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980))、小鼠塞托利(Sertoli)细胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980))、猴肾细胞(CV1, ATCC CCL 70)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL 1587)、人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2)、犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34)、牛鼠

(buffalo rat)肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442)、人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75)、人肝细胞 (Hep G2, HB 8065)、小鼠乳瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51)、TRI 细胞 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982))、MRC 5 细胞、FS4 细胞和人肝细胞瘤 (hepatoma) 系 (Hep G2)。

为了生成抗体, 用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规培养培养基中进行培养。

(viii) 宿主细胞的培养

可在多种培养基中培养用于生成本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如 Ham 氏 F10 (Sigma)、极限必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、和 Dulbecco 氏修改 Eagle 氏培养基 (DMEM, Sigma) 适于培养宿主细胞。另外, 可使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基: Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979); Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980); 美国专利 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国再版专利 30,985。任何这些培养基可根据需要补充激素和/或其它生长因子 (诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂 (诸如 HEPES)、核苷酸 (诸如腺苷和胸苷)、抗生素 (诸如 GENTAMYCIN™ 药物)、痕量元素 (定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物)、和葡萄糖或等效能源。还可以适宜浓度含有本领域技术人员知道的任何其它必需补充物。培养条件诸如温度、pH 等即为表达而选择的宿主细胞先前所用的, 这对于普通技术人员是显然的。

(ix) 抗体的纯化

在使用重组技术时, 可在细胞内生成抗体, 或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体, 那么首先一般通过例如离心或超滤清除微粒碎片 (或是宿主细胞或是裂解片段)。如果抗体分泌到培养基中, 那么通常首先使用商品化蛋白质浓缩滤器 (例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元) 浓缩来自这些表达系统的上清液。可在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂诸如 PMSF 以抑制蛋白水解, 而且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

可使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析 (优选的纯化技术是亲和层析) 来纯化从细胞制备的抗体组合物, 其中亲和色谱是普遍

接受的纯化技术。亲和试剂例如蛋白 A 作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 域的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。蛋白 G 推荐用于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。亲和配体所连接的基质最常用的是琼脂糖,但是可使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯 (poly(styrenedivinyl)benzene) 能获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含 C_H3 域,则可使用 Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、二氧化硅上的层析、肝素 SEPHAROSE™ 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂 (诸如聚天冬氨酸柱) 上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

在任何初步纯化步骤之后,可视需要对含有目的抗体和污染物的混合物进行更多的纯化步骤,例如低 pH 疏水相互作用层析,使用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液,通常在低盐浓度 (如约 0-0.25M 盐) 进行。

应当指出,一般而言,制备用于研究、测试和临床应用的抗体的技术和方法学是本领域普遍认可的,与上述一致的,和/或本领域技术人员认为对感兴趣的具体抗体适宜的。

活性测定法

可通过本领域知道的多种测定法对本发明的抗体鉴定它们的物理/化学特性和生物学功能。

可通过一系列测定法进一步鉴定纯化的抗体,包括但不限于 N 端测序、氨基酸分析、非变性大小排阻高压液相层析 (HPLC)、质谱、离子交换层析和木瓜蛋白酶消化。

必要的时候,分析抗体的生物学活性。在有些实施方案中,对本发明的抗体测试它们的抗原结合活性。本领域知道的且可用于本文的抗原结合测定法包括但不限于使用诸如 Western 印迹、放射免疫测定法、ELISA (酶联免疫吸附测定法)、“三明治”免疫测定法、免疫沉淀测定法、荧光免疫测定法和蛋白 A 免疫测定法等技术的任何直接或竞争性结合测定法。

在一个实施方案中,本发明设想了这样的改良抗体:它具有一些但不

是所有的效应器功能，从而使它在许多抗体体内半衰期是重要的，但某些效应器功能（诸如补体和 ADCC）是不必要的或有害的应用中成为理想的候选物。在某些实施方案中，测量所生成抗体的 Fc 活性以确保只保留了期望的特性。可进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认 CDC 和/或 ADCC 活性的降低/消减。例如，可进行 Fc 受体(FcR)结合测定法以确认抗体缺乏 FcγR 结合(因此有可能缺乏 ADCC 活性)但保留 FcRn 结合能力。介导 ADCC 的主要细胞，NK 细胞，只表达 FcγRIII，而单核细胞表达 FcγRI、FcγRII 和 FcγRIII。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。美国专利 5,500,362 或 5,821,337 中记载了用于评估目的分子的 ADCC 活性的体外测定法的实例。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外，可在体内评估目的分子的 ADCC 活性，如在动物模型中，诸如 Clynes et al., *PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998)中所公开的。还可进行 C1q 结合测定法以确认抗体不能结合 C1q 且因此缺乏 CDC 活性。为了评估补体激活，可进行 CDC 测定法，例如如 Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)中所述。还可使用本领域知道的方法进行 FcRn 结合和体内清除/半衰期测定。

人源化抗体

本发明涵盖人源化抗体。本领域知道用于人源化非人抗体的多种方法。例如，人源化抗体可具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称为“输入”残基，它们通常取自“输入”可变区。基本上可遵循 Winter 及其同事的方法进行人源化（Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., (1988) *Science* 239: 1534-1536），即用高变区序列替代人抗体的对应序列。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体（美国专利 4,816,567），其中显著少于完整的人可变区用非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体通常是如下人抗体，其中有些高变区残基和可能的有些 FR 残基用啮齿类抗体类似位点的残基替代。

用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变区的选择对于降低抗原性可能是重要的。依照所谓的“最适(best-fit)”方法，用啮齿类抗体的可变区序

列对已知人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架 (Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 (1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚类(subgroup)的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。相同框架可用于几种不同的人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993))。

通常理想的是, 抗体在人源化后保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了达到此目的, 依照一种方法, 通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。通常可获得免疫球蛋白三维模型, 这是本领域技术人员所熟悉的。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些显示图像能分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用, 即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样, 可以从受体序列和输入序列中选出 FR 残基并组合, 从而得到期望的抗体特征, 诸如对靶抗原的亲和力升高。一般而言, 高变区残基直接且最实质的参与对抗原结合的影响。

抗体变体

一方面, 本发明提供了在构成 Fc 区的 Fc 多肽界面中包含修饰的抗体, 其中该修饰推动和/促进异多聚化。这些修饰包括将突起导入第一 Fc 多肽和将腔导入第二 Fc 多肽, 其中突起可位于腔中, 从而促进第一和第二 Fc 多肽的复合。本领域知道生成具有这些修饰的抗体的方法, 例如美国专利 5,731,168 中所述。

在有些实施方案中, 设想了本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如, 可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。抗体的氨基酸序列变体是通过将适宜的核苷酸变化引入抗体核酸或通过肽合成制备的。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。可以进行任何删除、插入和替代组合以获得最终的构建物, 只要最终的构建物具有期望的特征。可在制备序列时将氨基酸改变引入本发明抗体氨基酸序列。

可用于鉴定抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的方法有“丙氨酸扫描诱变”, 如 Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)

中所述。这里，鉴定一个残基或一组靶残基（如带电荷的残基，诸如精氨酸、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（例如丙氨酸或多聚丙氨酸）替代，以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体，推敲对替代展示功能敏感性的氨基酸位置。由此，尽管用于引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的，然而突变本身的本质不必预先决定。例如，为了分析指定位点处突变的结果，在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变，并根据期望的活性对所表达免疫球蛋白进行筛选。

氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端的融合，长度范围由一个残基至包含上百或更多残基的多肽，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 端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括将抗体的 N 或 C 端与酶（如用于 ADEPT）或延长抗体血清半衰期的多肽融合。

另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替代。最有趣进行替代诱变的位点包括高变区，但是也设想了 FR 改变。表 A 中“优选替代”栏显示了保守替代。如果此类替代导致生物学活性变化，那么可导入表 A 中称为“例示替代”的更实质变化，或如下文参照氨基酸分类进一步所述，并筛选产物。

表 A

原始残基	例示替代	优选替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg

Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

对抗体生物学特性的实质性修饰可通过选择对维持以下方面的效果差异显著的替代来实现：(a) 替代区域中多肽主链的结构，例如（折叠）片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性，氨基酸可如下分组（A. L. Lehninger, 《Biochemistry》，第2版，第73-75页，Worth Publishers, New York, 1975）：

(1) 非极性的：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 不带电荷、极性的：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性的：Asp (D)、Glu (E)

(4) 碱性的：Lys (K)、Arg (R)、His (H)

或者，根据共同的侧链特性，天然发生残基可如下分组：

(1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性的：Asp、Glu；

(4) 碱性的：His、Lys、Arg；

(5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

(6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

非保守替代需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。还可将此

类替代残基引入保守替代位点，或者更优选的是引入剩余（非保守）位点。

一类替代变体涉及替代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改变的（例如改进的）生物学特性。用于生成此类替代变体的一种便利方法涉及使用噬菌体展示的亲和力成熟。简而言之，将数个高变区位点（例如 6-7 个位点）突变，在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此生成的抗体展示在丝状噬菌体颗粒上，作为与各个颗粒内包装的噬菌体包被蛋白（例如 M13 基因 III 产物）的融合物。然后如本文所公开的根据其生物学活性（例如结合亲和力）对噬菌体展示的变体进行筛选。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行扫描诱变（例如丙氨酸扫描）以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外，分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本领域已知的技术，例如本文详述的那些技术进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体，使用本领域知道的技术，包括本文所述的那些技术，对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域知道的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然发生氨基酸序列变体的情况中），或者通过对较早制备的变体或非变异型式的抗体进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

可能希望在本发明抗体的 Fc 区中引入一处或多处氨基酸修饰，由此生成 Fc 区变体。Fc 区变体可包括在一个或多个氨基酸位置（包括铰链半胱氨酸）包含氨基酸修饰（例如替代）的人 Fc 区序列（例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 区）。

依照此描述和本领域的教导，设想了在有些实施方案中，本发明的抗体与野生型对应抗体相比可在例如 Fc 区中包含一处或多处改变。与它们的野生型对应物抗体相比，这些抗体仍将基本上保留治疗功效所需要的相同特性。例如，认为可在 Fc 区中进行将会导致 C1q 结合和/或补体依赖性细胞毒性（CDC）改变（即或是增强或是削弱）的某些改变，例如 WO99/51642 中所述。还可参见关注 Fc 区变体其它实例的 Duncan and Winter, Nature 322: 738-40 (1988); 美国专利 5,648,260; 美国专利 5,624,821; 及 WO94/29351。

免疫偶联物

在另一个方面中，本发明提供包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物或抗体-药物偶联物(ADC)，所述细胞毒剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段）或放射性同位素（即放射偶联物）。

抗体-药物偶联物在癌症治疗中用于局部递送细胞毒剂或抑制细胞试剂（即用于杀死或抑制肿瘤细胞的药物）的用途（Syrigos and Epenetos, *Anticancer Research* 19: 605-614 (1999); Niculescu-Duvaz and Springer, *Adv. Drg. Del. Rev.* 26: 151-172 (1997); 美国专利 4,975,278）能将药物部分靶向递送至肿瘤，并在那里进行细胞内积累，而系统施用这些未经偶联的药物试剂可能在试图消除的肿瘤细胞以外导致不可接受的对正常细胞的毒性水平（Baldwin et al., *Lancet* 603-05 (1986 年 5 月 15 日); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”，在《*Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*》中，A. Pinchera 等人编，第 475-506 页，1985）。由此试图获得最大功效及最小毒性。多克隆抗体和单克隆抗体皆有报道可用于这些策略（Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 21: 183-87 (1986)）。这些方法中所使用的药物包括道诺霉素(d Daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)和长春地辛(vindesine)（Rowland et al., 1986, 见上文）。抗体-毒素偶联物中所使用的毒素包括细菌毒素诸如白喉毒素、植物毒素诸如蓖麻毒蛋白、小分子毒素诸如格尔德霉素(geldanamycin)（Mandler et al., *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581 (2000); Mandler et al., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10: 1025-1028 (2000); Mandler et al., *Bioconjugate Chem.* 13: 786-791 (2002)）、美登木素生物碱类（EP 1391213; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996)）、和加利车霉素（Lode et al., *Cancer Res.* 58: 2928 (1998); Hinman et al., *Cancer Res.* 53: 3336-3342 (1993)）。毒素可通过包括微管蛋白结合、DNA 结合或拓扑异构酶抑制在内的机制发挥其毒害细胞和抑制细胞的效果。有些细胞毒药物在与大的抗体或蛋白质受体配体偶联时趋于失活或活性降低。

ZEVALIN®（ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idex）是由针对在正常和恶性 B 淋巴细胞表面上发现的 CD20 抗原的鼠 IgG1 κ 单克隆抗体与通过硫脲

接头-螯合剂所结合的 ^{111}In 或 ^{90}Y 放射性同位素构成的抗体-放射性同位素偶联物 (Wiseman et al., Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7): 766-77 (2000); Wiseman et al., Blood 99(12): 4336-42 (2002); Witzig et al., J. Clin. Oncol. 20(10): 2453-63 (2002); Witzig et al., J. Clin. Oncol. 20(15): 3262-69 (2002))。尽管 ZEVALIN 具有针对 B 细胞非何杰金氏(Hodgkin)淋巴瘤(NHL)的活性, 然而施药在大多数患者中导致严重且长时间的血细胞减少。MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), 即由人 CD33 抗体与加利车霉素连接而构成的抗体-药物偶联物, 在 2000 年批准用于经注射治疗急性髓性白血病 (Drugs of the Future 25(7): 686 (2000); 美国专利 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001)。Cantuzumab mertansine (Immunogen Inc.), 即由 huC242 抗体经二硫化物接头 SPP 与美登木素生物碱药物部分 DM1 连接而构成的抗体-药物偶联物, 正在进行用于治疗表达 CanAg 的癌症诸如结肠癌、胰腺癌、胃癌和其它癌的测试。MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), 即由抗前列腺特异膜抗原(PSMA)单克隆抗体与美登木素生物碱药物部分 DM1 连接而构成的抗体-药物偶联物, 正在进行用于前列腺肿瘤潜在治疗的测试。将多拉司他汀(dolastatin)的合成类似物 auristatin 肽、auristatin E (AE)和单甲基 auristatin (MMAE)与嵌合单克隆抗体 cBR96 (对癌上的 Lewis Y 特异)和 cAC10 (对恶性血液肿瘤上的 CD30 特异)偶联 (Doronina et al., Nature Biotechnology 21(7): 778-784 (2003)), 且正在进行治疗性开发。

本文(上文中)描述了可用于生成免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白(ricin) A 链、相思豆毒蛋白(abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白(modeccin) A 链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)毒蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(croton)、肥皂草(*saponaaria officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见, 例如, 1993 年 10 月 28 日公布的 WO93/21232。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。实例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y

和 ^{186}Re 。抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备, 诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如, 可如 Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。

本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素诸如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱类(maytansinoids)、dolostatins, aurostatins, 单端孢霉素(trichothecene)和 CC1065 及这些毒素具有毒素活性的衍生物的偶联物。

美登素和美登木素生物碱类

在某些实施方案中, 免疫偶联物包括与一个或多个美登木素生物碱分子偶联的本发明的抗体。

美登木素生物碱类是通过抑制微管蛋白多聚化来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初从东非灌木齿叶美登木(*Maytenus serrata*)分离得到(美国专利 3,896,111)。随后发现某些微生物也生成美登木素生物碱类, 诸如美登醇和 C-3 美登醇酯(美国专利 4,151,042)。例如下列美国专利公开了合成美登醇及其衍生物和类似物: 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 及 4,371,533。

美登木素生物碱药物部分在抗体药物偶联物中是令人感兴趣的药物部分, 因为它们: (i)相对易于通过发酵或发酵产物的化学修饰、衍生而制得; (ii)可以用适于通过非二硫化物接头与抗体偶联的功能团来衍生化; (iii) 在血浆中稳定, 和(iv)对多种肿瘤细胞系有效。

美登木素生物碱药物部分的示例性实施方案包括: DM1; DM3; 和 DM4。

下列专利公开了包含美登木素生物碱类的免疫偶联物，其制备方法，及其治疗用途，例如美国专利 5,208,020; 5,416,064; 及欧洲专利 EP 0 425 235 B1，明确将其公开内容收入本文作为参考。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996)记载了包含与针对人结肠直肠癌的单克隆抗体 C242 连接的称为 DM1 的美登木素生物碱的免疫偶联物。发现该偶联物具有针对培养的结肠癌细胞的高度细胞毒性，而且在体内肿瘤生长测定法中显示抗肿瘤活性。Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)记载了其中美登木素生物碱经二硫化物接头与结合人结肠癌细胞系上抗原的鼠抗体 A7 或结合 HER-2/*neu* 癌基因的另一鼠单克隆抗体 TA.1 偶联的免疫偶联物。在体外在人乳癌细胞系 SK-BR-3 上测试了 TA.1-美登木素生物碱偶联物的细胞毒性，该细胞系每个细胞表达 3×10^5 个 HER-2 表面抗原。药物偶联物达到了与游离美登木素生物碱药物相似程度的细胞毒性，这可通过增加每个抗体分子偶联的美登木素生物碱分子数目来提高。A7-美登木素生物碱偶联物在小鼠中显示低系统性细胞毒性。

抗体-美登木素生物碱偶联物可通过将抗体与美登木素生物碱分子化学连接且不显著削弱抗体或美登木素生物碱分子的生物学活性来制备。参见，例如，美国专利 5,208,020（本文明确引证其公开内容）。每个抗体分子偶联平均 3-4 个美登木素生物碱分子在增强针对靶细胞的细胞毒性中显示功效，且对抗体的功能或溶解度没有负面影响，尽管预计甚至一个分子的毒素/抗体也将较之裸抗体的使用增强细胞毒性。美登木素生物碱类在本领域是众所周知的，而且可通过已知技术合成或从天然来源分离。例如美国专利 5,208,020 和上文提及的其它专利及非专利发表物中公开了合适的美登木素生物碱类。优选的美登木素生物碱类是美登醇和美登醇分子的芳香环或其它位置经过修饰的美登醇类似物，诸如各种美登醇酯。

本领域知道许多连接基团可用于制备抗体-美登木素生物碱偶联物，包括例如美国专利 5,208,020 或欧洲专利 0 425 235 B1 及 Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)，和 2004 年 10 月 8 日提交的美国专利申请 10/960,602 中所公开的，本文明确引证上述文件的公开内容。包含接头构件 SMCC 的抗体-美登木素生物碱偶联物可以如 2004 年 10 月 8 日提交的美国专利申请 10/960,602 中公开的那样加以制备。连接基团包括二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳

定基团，正如上文所述专利中所公开的，优选二硫化物和硫醚基团。本文描述并例举了其它连接基团。

可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和美登木素生物碱的偶联物，诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异氰酸酯（诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯）、和双活性氟化合物（诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）的双功能衍生物。特别优选的偶联剂包括 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)（Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 (1978)）和 N-琥珀酰亚氨基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(SPP)，由此提供二硫键连接。

根据连接的类型，可将接头附着于美登木素生物碱分子的多个位置。例如，可使用常规偶联技术通过与羟基的反应来形成酯键。反应可发生在具有羟基的 C-3 位置、经羟甲基修饰的 C-14 位置、经羟基修饰的 C-15 位置、和具有羟基的 C-20 位置。在一个优选的实施方案中，在美登醇或美登醇类似物的 C-3 位置形成键连接。

Auristatins 和 dolostatins

在一些实施方案中，免疫偶联物包括与多拉司他汀（dolastatin）或 dolostatin 肽模拟物和衍生物—auristatins（美国专利 5635483; 5780588）偶联的本发明抗体。已经证明多拉司他汀和 auristatins 干扰微管动力学，GTP 水解，以及核和细胞分裂（Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584），并具有抗癌（US 5663149）和抗真菌（Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965）活性。多拉司他汀或 auristatins 药物部分可以通过肽药物部分的 N（氨基）末端或 C（羧基）末端与抗体连接(WO 02/088172)。

示例性的 auristatin 实施方案包括 N 末端连接的 monomethylauristatin 药物部分 DE 和 DF，其公开于《Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands》，美国流水号 10/983,340，提交于 2004 年 11 月 5 日，

本文明确引证该文件的全部公开内容。

示例性的 auristatin 实施方案有 MMAE 和 MMAF。其它示例性实施方案包括 MMAE 或 MMAF 以及多种接头构件（本文进一步有说明）Ab-MC-vc-PAB-MMAF, Ab-MC-vc-PAB-MMAE, Ab-MC-MMAE 和 Ab-MC-MMAF。

典型地，基于肽的药物部分可以通过在两个或多个氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备。这样的肽键可以，例如，通过肽化学领域公知的液相合成方法（参见 E. Schröder and K. Lübke, “The Peptides”, volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press）来制备。auristatin/多拉司他汀药物部分可以根据下列文件的方法来制备：US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; 及 Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863。还参见 Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784; 《Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands》，美国流水号 10/983,340，提交于 2004 年 11 月 5 日，本文引证其全部内容（其公开了例如用于制备单甲基缬氨酸化合物，诸如偶联有接头的 MMAE 和 MMAF 的接头和方法）。

加利车霉素

在其它实施方案中，免疫偶联物包含与一个或多个加利车霉素分子偶联的本发明抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度生成双链 DNA 断裂。关于加利车霉素家族偶联物的制备参见美国专利 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; 5,877,296（都授予美国 Cyanamid 公司）。可用的加利车霉素结构类似物包括但不限于 γ_1^1 、 α_2^1 、 α_3^1 、N-乙酰基- γ_1^1 、PSAG 和 θ_1^1 （Hinman et al., Cancer Research 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998); 及上述授予美国 Cyanamid 公司的美国专利）。可与抗体缀合的另一种抗肿瘤药物是 QFA，它是一种抗叶酸药物。加利车霉素和 QFA 都具有胞内作用位点，且不易穿过质膜。因此，这些试剂经由抗体介导的内在化的细胞摄取大大增强了它们的细胞毒效果。

其它细胞毒剂

可与本发明抗体偶联的其它抗肿瘤剂包括 BCNU、链佐星(streptozotocin)、长春新碱(vincristine)、5-氟尿嘧啶、美国专利 5,053,394、5,770,710 中记载的统称为 LL-E33288 复合物的试剂家族、及埃斯波霉素类(esperamicins) (美国专利 5,877,296)。

可用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒蛋白(ricin) A 链、相思豆毒蛋白(abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白(modeccin) A 链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)毒蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公布的 WO 93/21232。

本发明还设想了抗体和具有核酸降解活性的化合物(如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶, 诸如脱氧核糖核酸酶; DNA 酶)之间形成的免疫偶联物。

为了选择性破坏肿瘤, 抗体可包含高度放射性的原子。有多种放射性同位素可用于生成放射偶联抗体。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和 Lu 的放射性同位素。在将偶联物用于检测时, 可包含放射性原子用于闪烁照相研究, 例如 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} , 或是包含自旋标记物用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像, mri), 诸如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

可以已知方式将放射性或其它标记物掺入偶联物。例如, 可生物合成肽, 或是通过化学氨基酸合成法合成肽, 其中使用涉及例如氟-19 代替氢的合适氨基酸前体。可经肽中的半胱氨酸残基来附着标记物, 诸如 $\text{Tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 和 In^{111} 。可以经赖氨酸残基来附着钐-90。IODOGEN 法(Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 (1978))可用于掺入碘-123。

《Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy》(Chatal, CRC Press, 1989)详细记载了其它方法。

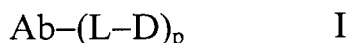
可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的偶联物, 诸

如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异硫氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如 Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992); 美国专利 5,208,020)。

本发明的化合物明确设想但不限于用下列交联剂制备的 ADC: 商品化(如购自 Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, U.S.A.)的 BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC 和 sulfo-SMPB、和 SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)。见 2003-2004 年度应用手册和产品目录(Applications Handbook and Catalog)第 467-498 页。

抗体-药物偶联物的制备

在本发明的抗体-药物偶联物(ADC)中,将抗体(Ab)经接头(L)与一个或多个药物部分(D)偶联,例如每个抗体偶联约 1 个至约 20 个药物部分。可采用本领域技术人员知道的有机化学反应、条件和试剂通过数种路径来制备通式 I 的 ADC,包括:(1)抗体的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应,形成 Ab-L,随后与药物部分 D 反应;和(2)药物部分的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应,形成 D-L,随后与抗体的亲核基团反应。本文描述了用于制备 ADC 的其它方法。

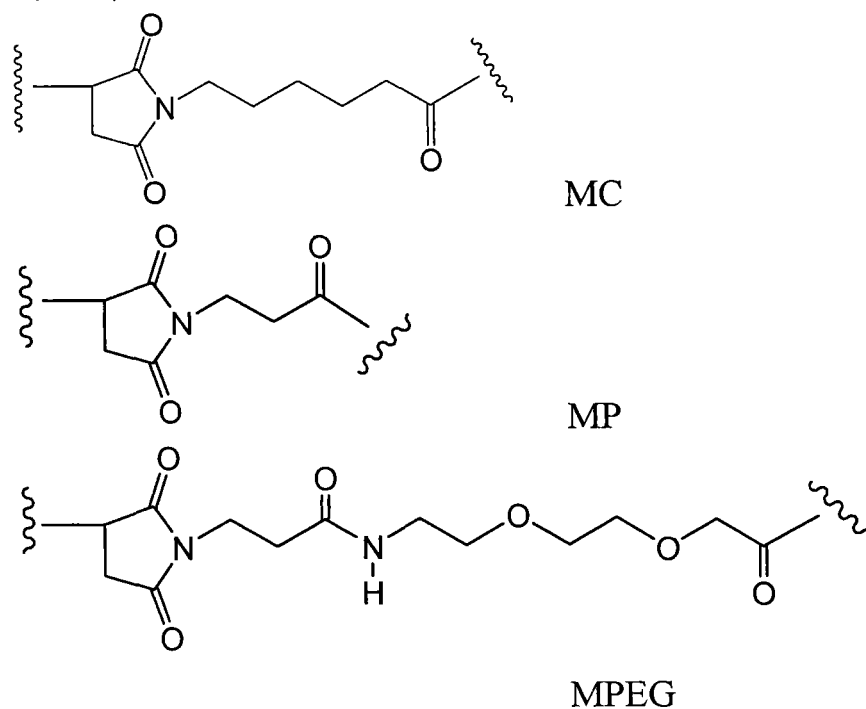


接头可由一种或多种接头构件组成。示例性的接头构件包括 6-马来酰

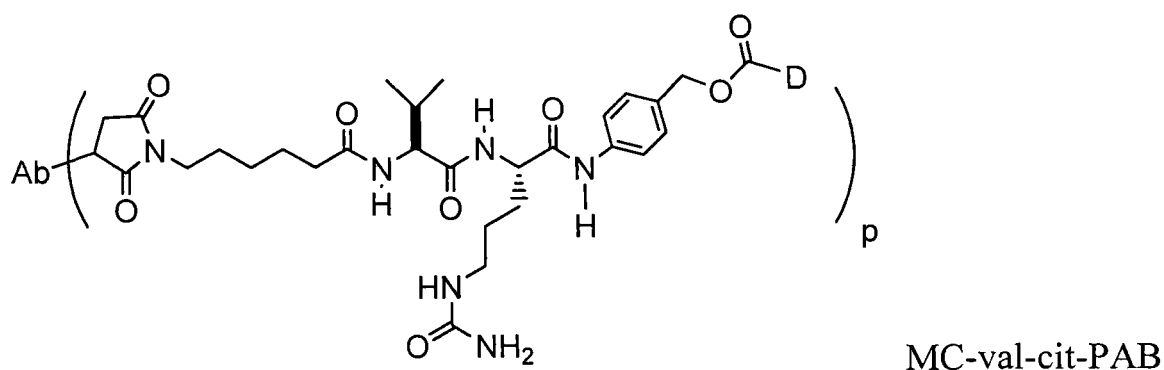
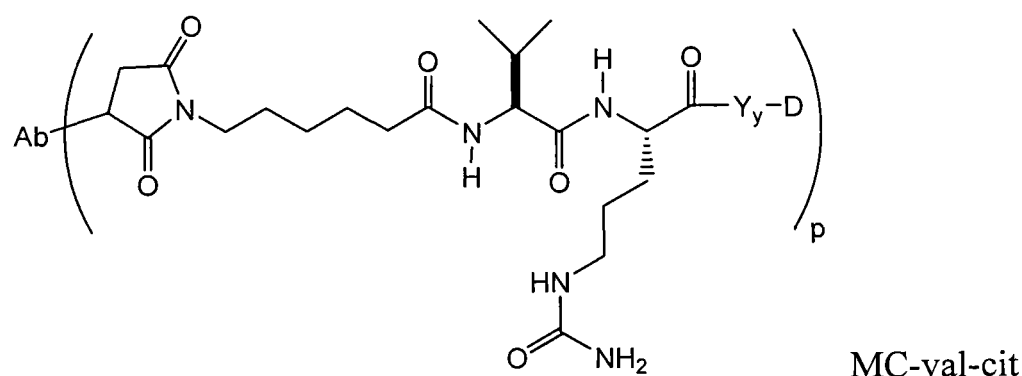
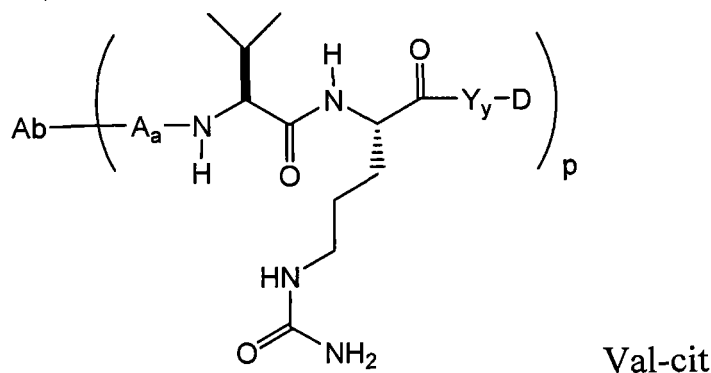
亚胺己酰基(“MC”)、马来酰亚胺丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄基氧羰基(“PAB”), N-琥珀酰亚氨基 4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”), N-琥珀酰亚氨基 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(“SMCC”), 和 N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。其它的接头构件是本领域已知的, 其中一些在本文中有描述。另见《Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands》, 流水号为 10/983,340 的美国申请, 提交于 2004 年 11 月 5 日, 本文引证其全部内容。

在一些实施方案中, 接头可包含氨基酸残基。示例性的氨基酸接头构件包括二肽、三肽或五肽。示例性的二肽包括: 缬氨酸-瓜氨酸(vc 或 val-cit), 丙氨酸-苯丙氨酸(af 或 ala-phe)。示例性的三肽包括: 甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。构成氨基酸接头构件的氨基酸残基包括天然存在的那些, 以及稀有(minor)氨基酸以及非天然存在的氨基酸类似物, 诸如瓜氨酸。可以设计并优化氨基酸接头构件对于特定酶(例如肿瘤相关蛋白酶、组织蛋白酶 B、C 和 D 或纤溶酶蛋白酶)的酶促切割的选择性。

示例性的接头构件结构如下图所示(其中波浪线表示与 ADC 其它构件共价连接的位点):



其它示例性接头构件和缩写包括（其中画出了抗体(Ab)和接头，p 为 1 到约 8）：



抗体的亲核基团包括但不限于：(i) N 末端氨基；(ii) 侧链氨基，如赖氨酸；(iii) 侧链巯基，如半胱氨酸；和(iv) 糖基化抗体中糖的羟基或氨基。氨基、巯基、和羟基是亲核的，能够与接头部分上的亲电子基团反应而形成共价键，而接头试剂包括：(i) 活性酯类，诸如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物；(ii) 烃基和苯甲基卤化物，诸如卤代乙酰胺；(iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫键，即半胱氨酸桥。可通过还原剂诸如 DTT（二硫苏糖醇）处理使抗体具有与

接头试剂缀合的反应活性。每个半胱氨酸桥理论上将形成两个反应性硫醇亲核体。可经由赖氨酸与 2-亚氨基硫烷 (Traut 氏试剂) 的反应, 导致胺转变为硫醇, 从而将额外亲核基团引入抗体。可以通过引入一个, 两个, 三个, 四个或者更多半胱氨酸残基 (例如制备包含一个或多个半胱氨酸氨基酸残基的突变体多肽) 来将反应性硫醇基团引入抗体 (或其片段)。

还可通过修饰抗体来生成本发明的抗体-药物偶联物, 即引入可与接头试剂或药物上的亲核取代基反应的亲电子部分。可用例如高碘酸盐氧化剂氧化糖基化抗体的糖, 从而形成可与接头试剂或药物部分的胺基团反应的醛或酮基团。所得亚胺 Schiff 碱基可形成稳定的键, 或者可用例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中, 糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可在蛋白质中生成羰 (醛和酮) 基团, 它可与药物上的适宜基团反应 (Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中, 包含 N 末端丝氨酸或苏氨酸残基的蛋白质可与偏高碘酸钠反应, 导致在第一个氨基酸处生成醛 (Geoghegan & Stroh, Bioconjugate Chem. 3: 138-146 (1992); US 5362852)。此类醛可与药物部分或接头亲核体反应。

同样, 药物部分上的亲核基团包括但不限于: 胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯、和芳基酰肼基团, 它们能够与接头部分上的亲电子基团反应而形成共价键, 而接头试剂包括: (i) 活性酯类, 诸如 NHS 酯、HOBt 酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物; (ii) 烷基和苯甲基卤化物, 诸如卤代乙酰胺; (iii) 醛类、酮类、羧基、和马来酰亚胺基团。

或者, 可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。DNA 的长度可包含各自编码偶联物两个部分的区域, 或是彼此毗邻或是由编码接头肽的区域分开, 该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

在又一个实施方案中, 可将抗体与“受体” (诸如链霉亲和素) 偶联从而用于肿瘤预先靶向, 其中对患者施用抗体-受体偶联物, 接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物, 然后施用与细胞毒剂 (如放射性核苷酸) 偶联的“配体” (如亲合素)。

抗体 (Ab)-MC-MMAE 可以如下所述将本文提供的任何抗体与 MC-MMAE 偶联来制备。将溶于 500mM 硼酸钠和 500 mM 氯化钠, pH 8.0 的抗体用过量的 100 mM 二硫苏糖醇 (DTT) 处理。37°C 温育大约 30 分钟

后, 通过在 Sephadex G25 树脂上洗脱交换缓冲液, 并用含 1 mM DTPA 的 PBS 洗脱。通过下述方法检查硫醇基/Ab 值: 由溶液的 280 nm 吸光度确定还原抗体的浓度, 通过与 DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) 反应并测定 412 nm 吸光度来确定硫醇基浓度。将溶于 PBS 的还原抗体在冰上冷却。将溶于 DMSO 中的药物接头试剂—马来酰亚胺基己酰基- monomethylauristatin E (MMAE), 即 MC-MMAE, 在乙腈和水中稀释到已知浓度, 并加入到含还原抗体 2H9 的冷却 PBS 中。大约 1 小时后, 加入过量的马来酰亚胺终止反应并封闭任何未反应的抗体硫醇基团。通过离心超滤浓缩反应混合物, 将 2H9-MC-MMAE 通过 G25 树脂在 PBS 中洗脱纯化并脱盐, 无菌条件下过 0.2 μm 滤器过滤, 并冷冻保存。

可以按照为 Ab-MC-MMAE 提供的规程将本文所述的任何抗体与 MC-MMAF 偶联, 来制备抗体-MC-MMAF。

可以按照为 Ab-MC-MMAE 提供的规程将本文所述的任何抗体与 MC-val-cit-PAB-MMAE 偶联, 来制备抗体-MC-val-cit-PAB-MMAE。

可以按照为 Ab-MC-MMAE 提供的规程将本文所述的任何抗体与 MC-val-cit-PAB-MMAF 偶联, 来制备抗体-MC-val-cit-PAB-MMAF。

如下所述将本文提供的任何抗体与 SMCC-DM1 偶联制备抗体-SMCC-DM1。将纯化的抗体用(琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC, Pierce Biotechnology, Inc)衍生化以引入 SMCC 接头。具体地说, 用 7.5 个摩尔当量的 SMCC (20 mM 于 DMSO 中, 6.7 mg/mL) 处理 50 mM 磷酸钾/50 mM 氯化钠/2 mM EDTA, pH 6.5 中 20 mg/mL 的抗体。在环境温度氩气氛下搅拌 2 小时后, 将反应混合物用 50 mM 磷酸钾/50 mM 氯化钠/2 mM EDTA, pH 6.5 平衡的 Sephadex G25 柱过滤。合并含有抗体的级分并进行测定。

将这样制备的抗体-SMCC 用 50 mM 磷酸钾/50 mM 氯化钠/2 mM EDTA, pH 6.5 稀释到最终浓度为大约 10 mg/ml, 并与 DM1 在二甲基乙酰胺中的 10 mM 溶液反应。在环境温度氩气氛下搅拌反应物 16.5 小时。用 1 x PBS, pH 6.5 将偶联反应混合物通过 Sephadex G25 凝胶过滤柱(1.5 x 4.9 cm) 过滤。DM1 药物对抗体的比率 (p) 可以是约 2 到 5, 由 252 nm 及 280 nm 的吸光度测量。

如下所述将本文提供的任何抗体与 SPP-DM1 偶联制备抗体-SPP-DM1。

将经过纯化的抗体用 N-琥珀酰亚胺基-4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯衍生化以引入二硫代吡啶基团。用 SPP (5.3 个摩尔当量, 于 2.3 mL 乙醇中) 处理含 NaCl (50 mM) 和 EDTA (1 mM) 的 44.7 mL 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5) 中的抗体 (376.0 mg, 8 mg/mL)。在环境温度氩气氛下搅拌 90 分钟后, 将反应混合物用 35 mM 柠檬酸钠, 154 mM NaCl, 2 mM EDTA 平衡的 Sephadex G25 柱凝胶过滤。合并含有抗体的级分并加以测定。如上所述测定抗体的修饰程度。

将抗体-SPP-Py (大约 10 微摩尔可释放的 2-硫代吡啶基团) 用上述 35 mM 柠檬酸钠缓冲液, pH 6.5 稀释到大约 2.5 mg/mL 的终浓度。然后将含 DM1 (1.7 个当量, 17 微摩尔) 的 3.0 mM 二甲基乙酰胺 (DMA, 最终反应混合物中 3.3% v/v) 加入抗体溶液中。反应在环境温度氩气氛下进行大约 20 个小时。将反应物加载到用 35 mM 柠檬酸钠, 154 mM NaCl, pH 6.5 平衡的 Sephacryl S300 凝胶过滤柱 (5.0 cm x 90.0 cm, 1.77 L) 上。流速可为大约 5.0 mL/min, 收集了 65 个级分 (每个 20.0 mL)。每个抗体分子连接的 DM1 药物分子的数目 (p') 通过测量 252 nm 和 280 nm 的吸光度来确定, 并且可以是每个 2H9 抗体大约 2 个到 4 个 DM1 药物部分 (moiety)。

如下所述将本文提供的任何抗体与 BMPEO-DM1 偶联制备抗体-BMPEO-DM1。用双马来酰亚胺基试剂 BM(PEO)4 (Pierce Chemical) 修饰抗体, 在抗体表面上留下未反应的马来酰亚胺基团。这可以通过下面的步骤实现: 将 BM(PEO)4 在 50% 乙醇/水混合物中溶解至 10 mM 的浓度, 并以 10 倍摩尔过量加入抗体溶液中, 其中抗体溶液为含有大约 1.6 mg/ml (10 微摩尔) 抗体的磷酸盐缓冲盐水; 使其反应 1 小时, 形成抗体-接头中间体 2H9-BMPEO。通过在含 150 mM NaCl 的 30 mM 柠檬酸盐 pH 6 缓冲液中凝胶过滤 (HiTrap 柱, Pharmacia) 去除过量的 BM(PEO)4。将大约 10 倍摩尔过量的 DM1 溶于二甲基乙酰胺 (DMA) 中并加入该 2H9-BMPEO 中间体中。也可以使用二甲基甲酰胺 (DMF) 来溶解药物部分试剂。让反应混合物反应过夜, 然后凝胶过滤或透析到 PBS 中以去除未反应的 DM1。用 S200 柱在 PBS 中进行凝胶过滤去除高分子量聚集体, 并提供纯化的 2H9-BMPEO-DM1。

可进一步修饰本发明的抗体以包含本领域知道的且易于获得的额外非蛋白质性质部分。在一个实施方案中,适于抗体衍生化的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、右旋糖苷、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)、和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量,而且可以是分支的或不分支的。附着到抗体上的聚合物数目可以变化,而且如果附着了一个以上的聚合物,那么这些聚合物可以是相同或不同的分子。一般而言,可根据下列考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于待改进抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于指定条件下的治疗等。

药用配制剂

可通过将具有期望纯度的抗体与任选的生理可接受的载体、赋形剂或稳定剂(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol,A.编,1980)混合,以水溶液、冻干或其它干燥制剂的形式,制备包含本发明抗体的治疗用配制剂供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐,组氨酸和其它有机酸的缓冲剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、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,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

本文中的配制剂还可含有一种以上的所治疗具体适应症所必需的活性

化合物，优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。合适的是，此类分子以对于预定目的有效的量组合。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊）、在胶状药物递送系统中（例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液(macroemulsions)中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》，第16版，Osol,A.编，1980。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易地通过使用无菌滤膜过滤来实现。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有本发明免疫球蛋白的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质是定型产品的形式，例如薄膜或微囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙醇醇)）、聚交酯（美国专利第3,773,919号）、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子达100天以上，但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当包囊的免疫球蛋白在体内长时间维持时，它们可能由于暴露于37℃的潮湿环境而变性或聚集，导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可以根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如，如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换的分子间S-S键形成，那么可通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定聚合物基质组合物来实现稳定。

用途

本发明的抗体可用于例如体外、回体(ex vivo)和体内治疗方法。本发明的抗体可用作拮抗剂，在体外、离体和/或体内部分或完全阻断特异抗原活性。此外，至少有些本发明抗体可中和来自其它物种的抗原活性。因此，本发明的抗体可用于抑制特异抗原活性，例如在含有抗原的细胞培养物中、在人受试者中或在具有本发明抗体与之交叉反应的抗原的其它哺乳动物受试者（如黑猩猩(chimpanzee)、狒狒(baboon)、狨猴(marmoset)、獼猴(cynomolgus)

和恒河猴、猪或小鼠)中。在一个实施方案中,本发明的抗体可用于抑制抗原活性,即使抗体接触抗原,使得抗原活性受到抑制。在一个实施方案中,抗原是人蛋白质分子。

在一个实施方案中,本发明的抗体可用于在患有某种病症的受试者中抑制抗原的方法,在所述病症中抗原活性是有害的,包括对受试者施用本发明的抗体,使得受试者中的抗原活性受到抑制。在一个实施方案中,抗原是人蛋白质分子且受试者是人受试者。或者,受试者可以是表达本发明抗体所结合的抗原的哺乳动物。又或者,受试者可以是其中导入了抗原(如通过施用抗原或通过表达抗原转基因)的哺乳动物。可出于治疗目的将本发明的抗体施用于人受试者。此外,可出于兽医目的将本发明的抗体施用于表达抗体与之交叉反应的抗原的非人哺乳动物(如灵长类、猪或小鼠),或是人疾病的动物模型。关于后者,此类动物模型可用于评估本发明抗体的治疗功效(如测试施药的剂量和时程)。本发明的抗体可用于治疗、抑制、延迟其发展、预防/延迟其复发、改善、或预防与 I 型干扰素/IFNAR2 的异常表达和/或活性有关的疾病、病症或状况,包括但不限于炎症性、自身免疫性和其它免疫性病症。

一方面,本发明的阻断性抗体对 IFNAR2 特异,且通过阻断或干扰涉及 IFNAR2 的配体-受体相互作用来抑制 IFNAR2 活性,由此抑制相应的信号途经和其它相关的分子或细胞事件。本发明的特色还有受体特异抗体,它们不是必须阻止(或仅部分阻止)配体结合,但显著地干扰受体活化,由此抑制通常由配体结合启动的任何应答。

在某些实施方案中,将包含与细胞毒剂偶联的抗体的免疫偶联物施用于患者。在有些实施方案中,免疫偶联物和/或它所结合的抗原由细胞内在化,导致免疫偶联物杀伤它所结合的靶细胞的治疗功效提高。在一个实施方案中,细胞毒剂靶向或干扰靶细胞中的核酸。此类细胞毒剂的实例包括本文所述任何化疗剂(诸如美登木素生物碱或加利车霉素)、放射性同位素、或核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶。

在治疗中,本发明的抗体可单独使用,或是与其它组合物联合使用。例如,本发明的抗体可与另一种抗体,和/或佐剂/治疗剂(例如类固醇)联合施用。例如,在治疗方案中,例如在包括炎症性、自身免疫性和其它免疫病症在内的任何本文所述疾病的治疗中,本发明的抗体可以与抗炎剂和/

或抗菌防腐药联合。上文所述此类联合疗法包括联合施药（当相同或分开配制剂中包含两种或多种药剂时）和分开施药，在后一种情况中，本发明抗体的施用可发生在伴随疗法的施用之前和/或之后。

可通过任何合适手段来施用本发明的抗体（和伴随治疗剂），包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内，以及损伤部位内（如果希望局部治疗的话）施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。另外，脉冲输注抗体也是合适的，特别是抗体剂量递减时。可通过任何合适路径服药，例如通过注射，诸如静脉内或皮下注射，这部分取决于施药是短期的还是长期的。

可以与优良医学实践一致的方式配制、剂量给药和施用本发明的抗体组合物。在此内容中考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、患者个体的临床状况、病症的起因、递送药剂的部位、施药的方法、施药的日程安排、和医学从业人员知道的其它因素。不是必需而是任选将抗体与目前用于预防或治疗所讨论病症的一种或多种药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的本发明抗体的量、病症或治疗的类型、和上文讨论的其它因素。这些通常是以与本文所述的不同剂量和施用路径使用，或是本文所述剂量的大约 1-99%，或者施用按经验/临床上确定为合适的任何剂量或路径。

对于疾病的预防或治疗，本发明抗体的适宜剂量（在单独使用或联合其它药剂诸如化疗剂时）将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体是出于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体的响应、及主治医师的判断。合适的是，一次性或通过一系列治疗将抗体施用于患者。根据疾病的类型和严重程度，施用于患者的初始候选剂量可以是约 $1\mu\text{g/kg}$ 至 15mg/kg （例如 0.1mg/kg - 10mg/kg ）抗体，例如或是通过一次或多次分开施药或是通过连续输注。根据上文所述因素，典型日剂量的范围可以是约 $1\mu\text{g/kg}$ 至 100mg/kg 或更多。对于持续数天或更长的重复施药，根据状况，一般持续治疗直至疾病症状发生期望的抑制。抗体的例示剂量的范围可以是约 0.05mg/kg 至约 10mg/kg 。由此，可对患者施用约 0.5mg/kg 、 2.0mg/kg 、 4.0mg/kg 或 10mg/kg （或其任意组合）的一剂或多剂。这些剂量可间歇施用，例如每周或每三周（例如使得患者接受约 2 剂至约 20 剂，或例如约 6 剂抗体）。可施用一剂较高的初始加载

剂量，后续一剂或多剂较低剂量。例示性剂量给药方案包括施用一剂约4mg/kg 抗体的初始加载剂量，后续每周一剂约2mg/kg 的维持剂量。然而，其它剂量方案也是有用的。这种疗法的进程易于通过常规技术和测定法来监测。

制品

在本发明的另一个方面，提供了包含可用于治疗、预防和/或诊断上文所述病症的物质的制品。制品包括容器和贴在所述容器上或与其相连的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。容器可用各种材料制成，诸如玻璃或塑料。容器中装有其自身或在联合其它组合物时有效治疗、预防和/或诊断疾患的组合物，而且可具有无菌存取口（例如容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管）。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示该组合物用于治疗选择的疾患。此外，制品可包括(a)其中装有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本发明的抗体；和(b)其中装有组合物的第二容器，其中所述组合物包含额外的细胞毒剂或其它治疗剂。本发明此实施方案中的制品还可包括指示所述组合物可用于治疗特定疾患的包装插页。或者/另外，制品还可包括第二（或第三）容器，其中装有药用缓冲剂，诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和右旋糖溶液。它还可包括商业和用户立场上所需的其它物质，包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

下面是本发明方法和组合物的实施例。应当理解，根据上文提供的一般描述，可实行多种其它实施方案。

实施例

材料和方法

针对 IFNAR2 的抗体的产生

基本上如2003年1月23日公开的US Pub. 2003-0018174所述产生针对IFNAR2的抗体。

单克隆抗体(mAb)亲和力的测定

在 Biacore 3000 仪上使用 Biosensor CM5 芯片(Biacore cat# BR-1000-14; Neuchatel, Switzerland)进行结合亲和力测定。使用 10 mM 乙酸钠 pH 4.8 的缓冲液, 将 CHO 细胞中产生的人干扰素抗体受体 2 (IFNAR2) ECD 蛋白与 IgG1 的融合物 (IFNAR2.ECD.IgG1) 固定到所述芯片上。使用针对受体 β 链的抗体作为测定中的分析物。将每种抗体在加有 0.05% Tween20™的 PBS 中制成 500 nM 到 0.69 nM 的一系列 1/3 连续稀释物。结合在 37℃ 完成, 其中最高的两个测试物浓度的解离速率是 60 分钟。在各次分析物注入之间, 通过注入 20mM 盐酸两次再生芯片。使用 1:1 (Langmuir)结合模型同时拟合动力学 k_a/k_d 来测量 KD。

抗病毒测定

进行遵照下述规程的实验来测量干扰素介导的抗病毒活性和多种抗体中和该活性的能力。对 ECMV 敏感的细胞系 (例如 WISH 细胞系) 在组织培养物中被这种病毒杀死。如果与 ECMV 温育的过程中存在干扰素 (IFN), 则细胞被保护免遭病毒杀死。可以将抗 IFN 受体抗体与干扰素一起添加到组织培养物中来评估这些抗体的中和活性。可以基于抗体阻断干扰素保护活性的能力来确定该抗体的中和活性。

材料: (下文所有的体积计算均相应于总终体积为 1L 的制备物)

WISH 成纤维细胞(人)成纤维细胞培养基

培养基: Eagle's MEM (ATCC#30-2003)	900 ml
(已含有非必需氨基酸, 2 mM L-glu, 1 mM 丙酮酸钠和 1500 mg/L 碳酸氢钠)	
10%胎牛血清(FCS) (热灭活)	100 ml
10 mM HEPES	10 ml (1M)
1X 青霉素/链霉素	10 ml

培养基 D DMEM (高 glu)	900 ml
10% FCS (热灭活)	100 ml
0.4%碳酸氢钠	53 ml (7.5%)
4 mM HEPES	4 ml (1M)
40 mM L-谷氨酰胺	20 ml (200 mM)

青霉素/链霉素(1X)	10 ml (10X)
生物测定培养基 DMEM (高 glu)	900 ml
2% FCS (热灭活)	100 ml
0.4%碳酸氢钠	53 ml (7.5%)
4 mM HEPES	4 ml (1M)
40 mM L-谷氨酰胺	20 ml (200 mM)
青霉素/链霉素(1X)	10 ml (10X)

EMC 病毒(小鼠脑心肌炎, ATCC VR-129B), 保存于-80℃; 以 1 ml 等分保存(效价大约 3.25×10^8 PFU/ml).

结晶紫溶液(0.5%)

96 孔平底平板

12 孔多孔洗板机/真空滤器系统

流程:

在成纤维细胞培养基中培养成纤维细胞。

第 1 天:

1. 将成纤维细胞以 2×10^5 个细胞/ml (100 μ l/孔)接种于 96 孔平板上培养基 D 中, 并在 37℃、5%CO₂ 条件下温育 18-24h。

第 2 天:

1. 在有或没有中和抗体存在的条件下, 将 IFN(例如 IFN- α (Genentech, Inc.自制或购自 PBL (Piscataway, New Jersey)) 和白细胞干扰素 (Sigma®; St. Louis, MO)) 在培养基 D 中进行稀释。将 100 μ l 的每种稀释物加入每个孔中 (200 μ l 终体积)。然后将平板在 37℃、5%CO₂ 条件下温育 18-24h。

第 3 天:

1. 对所有的孔进行抽吸以去除培养基 D (+/- IFNAR2 抗体(Ab)稀释物, 如数据组/图中示明的)。向每个孔中加入生物测定培养基 (100 μ l/孔)。
2. 用 EMC 病毒对除了对照孔之外的所有孔进行攻击 (100 μ l EMC/孔 $\rightarrow$ 200 μ l 终体积, 于生物测定培养基中)。

WISH 细胞:

1 ml 中 5 μ l = 1 MOI

每个需要病毒的平板 (100 μ l/孔 = 7 ml)

35 μ l (未稀释病毒) 于 6965 μ l 生物测定培养基中

3. 将细胞再次在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下温育 18-24 个小时 (在专用于病毒操作的培养箱中)。

第 4 天:

1. 抽吸掉培养基, 并用 0.5% 结晶紫 (每个孔 290 μ l) 染色 10-30 min, 然后用蒸馏水 (2X) 清洗。
2. 干燥后在 540 nm 读板。

结果

IFNAR2 抗体在抗病毒测定中对干扰素的中和

测试了针对 IFNAR2 生成的抗体中和 1000 U/ml 的 IFN- α 对病毒攻击的 WISH 成纤维细胞的抗病毒作用的能力。抗体 1922 和 1923 的数据显示在表 A 并图示在图 1 中。对照实验的组成为: (i) 在有 IFN- α 存在的条件下培养的细胞; (ii) 在有 IFN- α 以及已知的阻断性抗-IFN- α 抗体存在的条件下培养的细胞; (iii) 未刺激细胞 (即未加入 I 型干扰素) 的生长; (iv) 在没有病毒存在的条件下细胞的生长。测试了第三种抗体—抗体 1924 中和 α 干扰素的能力。抗体 1924 能够中和 α 干扰素, 尽管以相同抗体浓度测试时其活性不如抗体 1922 和 1923 强 (数据未显示)。Chuntharapai et al., J. Immunol. (1999), 163:766-773 中也对抗体 1924 作了一般性的表征 (表 1 中 “3B2” 所代表的抗体)。表达抗体 1924 的杂交瘤细胞系已经保藏于 ATCC, 如下文所述。

表 A

	$\mu\text{g/ml}$	重复 1	重复 2	重复 3	平均
抗体 1922 (1000 U/ml IFN- α)	40	0.276	0.203	0.265	0.248
	20	0.146	0.11	0.079	0.111666667
	10	0.502	0.243	0.342	0.362333333
	50	0.578	0.254	0.106	0.312666667
	2.5	0.745	0.75	0.707	0.734
	1.25	1.084	1.396	1.107	1.195666667
	0.63	1.495	1.265	1.243	1.334333333
	0.31	1.738	1.815	1.8662	1.8064
抗体 1923 (1000 U/ml IFN- α)	40	0.802	0.366	0.367	0.511666667
	20	0.134	0.179	0.563	0.292
	10	0.486	0.679	0.759	0.641333333
	50		0.951	1.253	1.102
	2.5	1.541	0.943	1.435	1.306333333
	1.25	1.086	1.546	1.631	1.421
	0.63	1.336	1.684	1.572	1.530666667
	0.31	2.017	2.39	1.72	2.042333333
对照	IFN- α	1.936	2.083	2.177	2.065333333
	IFN- α +抗 IFN- α 抗体	0.206	0.628		0.417
	无刺激	0.088	0.143	0.139	0.123333333
	无病毒	1.983	1.845	2.107	1.978333333

还测试了针对 IFNAR2 生成的抗体中和不同浓度的人白细胞干扰素对病毒攻毒的 WISH 成纤维细胞的抗病毒作用的能力。抗体 1922 的数据显示在表 B 并图示在图 2 中。抗体 1923 的数据显示在表 C 并图示在图 3 中。对照实验的组成为 (i)在有 $\alpha 2$ 干扰素(1000U/ml; Sigma)存在的条件下培养的细胞; (ii)在有 $\alpha 2$ 干扰素(1000 U/ml; Sigma)及抗体(Ab) 1922 或抗体(Ab) 1923 (10 $\mu\text{g/ml}$)存在的条件下培养的细胞; (iii)在有 IFN- γ (10 U/ml; PBL)存在的条件下培养的细胞; (iv)在有 IFN- γ (10 U/ml; PBL)及抗体 1922 或 1923 (10 $\mu\text{g/ml}$)存在的条件下培养的细胞; (v)未刺激细胞 (即没有添加 I 型干扰素)的生长; (vi)在没有病毒存在的条件下细胞的生长。

表 B

			重复 1	重复 2	平均
人白细胞 IFN	仅 IFN	1000 U/ml	1.219	1.145	1.182
		500 U/ml	1.515	1.358	1.4365
		100 U/ml	1.803	2.083	1.943
		10 U/ml	1.918	2.118	2.018
		5 U/ml	1.303	1.356	1.3295
		1 U/ml	0.563	0.531	0.547
		0.5 U/ml	0.314	0.238	0.276
		0.1 U/ml	0.127	0.122	0.1245
	IFN + 抗体				
	(Ab) 1922 (10 µg/ml)	1000 U/ml	0.768	0.804	0.786
		500 U/ml	0.575	0.352	0.4635
		100 U/ml	0.137	0.152	0.1445
		10 U/ml	0.103	0.107	0.105
		5 U/ml	0.096	0.121	0.1085
		1 U/ml	0.098	0.115	0.1065
		0.5 U/ml	0.095	0.113	0.104
		0.1 U/ml	0.112	0.14	0.126
抗体 1922	人白细胞 IFN(hu leuko IFN) (10 U/ml)				
		10 µg/ml	0.105	0.136	0.1205
		3.3 µg/ml	0.097	0.167	0.132
		1.1 µg/ml	0.119	0.137	0.128
		0.4 µg/ml	0.279	0.372	0.3255
		0.1 µg/ml	0.982	0.879	0.9305
		0.04 µg/ml	1.083	1.507	1.295
		0.01 µg/ml	1.47	1.895	1.6825
		0.005 µg/ml	2.074	2.284	2.179
对照	IFN-α2 (1000U/ml)		0.731	2.07	1.4005
	IFN-α2 (1000U/ml)+ 抗体 1922		0.106	0.1	0.103
	IFN-γ(10 U/ml)		1.361	1.612	1.4865
	IFN-γ (10 U/ml)+ 抗体 1922		1.673	1.946	1.8095
	无刺激		0.109	0.096	0.1025
	无病毒		2.787	2.457	2.622

表 C

			重复 1	重复 2	平均
人白细胞 IFN (Sigma)	仅 IFN	1000 U/ml	1.122	1.342	1.232
		500 U/ml	1.321	1.693	1.507
		100 U/ml	1.714	2.016	1.865
		10 U/ml	2.291	2.257	2.274
		5 U/ml	1.44	1.94	1.69
		1 U/ml	0.589	0.593	0.591
		0.5 U/ml	0.221	0.578	0.3995
		0.1 U/ml	0.165	0.137	0.151
	IFN+抗体 1923 (10 µg/ml)	1000 U/ml	1.225	1.122	1.1735
		500 U/ml	1.205	0.708	0.9565
		100 U/ml	0.209	0.215	0.212
		10 U/ml	0.11	0.101	0.1055
		5 U/ml	0.097	0.128	0.1125
		1 U/ml	0.115	0.1	0.1075
		0.5 U/ml	0.165	0.092	0.1285
		0.1 U/ml	0.121	0.154	0.1375
抗体 1923	人白细胞 IFN (hu leuko IFN) (10 U/ml)	10 µg/ml	0.105	0.109	0.107
		3.3 µg/ml	0.129	0.11	0.1195
		1.1 µg/ml	0.123	0.171	0.147
		0.4 µg/ml	0.479	0.424	0.4515
		0.1 µg/ml	0.591	1.009	0.8
		0.04 µg/ml	1.296	1.074	1.185
		0.01 µg/ml	1.557	1.582	1.5695
		0.005 µg/ml	1.139	1.729	1.434
对照		IFN-α2 (1000U/ml)	2.116	2.081	2.0985
		IFN-α2 (1000U/ml)+ 抗体 1923	0.127	0.131	0.129
		IFN-γ(10 U/ml)	1.473	1.494	1.4835
		IFN-γ (10 U/ml)+ 抗体 1923	1.945	1.586	1.7655
		无刺激	0.104	0.12	0.112
		无病毒	2.459	2.688	2.5735

还测试了抗体中和 IFN-β 的抗病毒保护作用的能力。10 μg/ml 浓度的抗体 1922 和 1923 针对 IFN-α (1000 U/ml)或 IFN-β (25 U/ml)的测试数据如下文表 D 和图 4 所示。对照实验的组成亦为：(i) 在仅有 IFN-α 存在的条件下细胞的活力(viability)；(ii)在仅有 IFN-β 存在的条件下细胞的生长；(iii)未刺激细胞的活力；(iv)在没有病毒存在的条件下细胞的活力。

表 D

		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均
IFN-α [1000u/ml]	抗体(Ab)1922	0.186	0.258			0.222
	抗体(Ab)1923	0.177	0.297	0.383		0.285666667
IFN-β [25u/ml]	抗体(Ab)1922	0.337	0.163	0.317		0.272333333
	抗体(Ab)1923	0.974	0.99	1		0.988
对照	IFN-α [1000U/ml]	2.505	2.313	2.587	2.593	2.4995
	IFN-β [25U/ml]	1.566	1.611	1.691	1.746	1.6535
	无刺激	0.73	0.591	0.379	0.563	0.56575
	无病毒	2.768	2.201	2.392	2.911	2.568

还测试了抗体 1922 在多种干扰素浓度下中和 IFN-β (PBL, 批号 1400-2) 的抗病毒保护作用的能力。数据如下面的表 E 和图 5 所示。对照实验的组成亦为：(i) 在仅有 IFN-α (1000 U/ml)存在的条件下的细胞活力；(ii)在有 IFN-α (1000 U/ml)和抗体 1922 (10 μg/ml)存在的条件下的细胞活力；(iii)未刺激细胞的活力；(iv)在没有病毒存在的条件下细胞的活力。

表 E

条件		重复 1	重复 2	重复 3	平均
抗体 1922 (10 μg/ml) + IFN-β (PBL)	500 U/ml	0.333	0.123	0.184	0.213333333
	250 U/ml	0.192	0.388	0.251	0.277
	100 U/ml	0.268	0.125	0.155	0.182666667
	50 U/ml	0.234	0.329	0.122	0.228333333
	10 U/ml	0.177	0.196	0.103	0.158666667
	1 U/ml	0.084	0.103	0.116	0.101
对照	IFN-α (1000 U/ml)	2.127	1.98	1.79	1.965666667
	IFN-α+抗体 1922	0.12	0.126	0.207	0.151
	无刺激	0.185	0.281	0.172	0.212666667
	无病毒	2.47	2.617	2.738	2.608333333

还测试了抗体 1922 和 1923 在多个抗体浓度下中和 IFN-β (PBL, 批号 11400-2) 抗病毒保护作用的能力。抗体 1922 的数据在下文表 F 和图 6 中显示。抗体 1923 的数据在下文表 G 和图 7 中显示。对照实验的组成亦为: (i) 在有 α 干扰素(IFN-α) (1000 U/ml) 存在的条件下的细胞生长; (ii) 在有 α 干扰素和抗体 1922 (表 F) 或 β 干扰素(IFN-β) 和抗体 1922 (表 G) 存在的条件下的细胞活力; (iii) 未刺激细胞的细胞活力; (iv) 在没有病毒存在的条件下细胞的活力。

表 F

			重复 1	重复 2	重复 3	平均
人 IFN-β (25 U/ml)	抗体 1922	10 μg/ml	0.105	0.079	0.082	0.088666667
		3.3 μg/ml	0.086	0.087	0.122	0.098333333
		1.1 μg/ml	0.123	0.158	0.348	0.209666667
		0.4 μg/ml	0.568	1.329	0.855	0.917333333
		0.1 μg/ml	2.369	1.711	2.093	2.057666667
		0.04 μg/ml	2.187	2.087	2.162	2.145333333
		0.01 μg/ml	2.304	1.93	1.89	2.041333333
		0.005 μg/ml	2.21	2.389	2.227	2.275333333
对照	IFN-α (1000 U/ml)		2.334	2.127	2.223	2.228
	IFN-α+抗体 1922		0.084	0.106	0.194	0.128
	无刺激		0.098	0.103	0.198	0.133
	无病毒		2.804	3.118	2.886	2.936

表 G

		$\mu\text{g/ml}$	重复 1	重复 2	重复 3	平均
人 IFN- β (25 U/ml)	抗体					
	1923	20	0.11	0.117	0.168	0.131666667
		10	0.131	0.2	0.149	0.16
		3.3	0.307	0.389	0.301	0.332333333
		1.1	0.72	0.685	0.646	0.683666667
		0.4	1.678	1.137	1.741	1.518666667
		0.1	2.578	2.211	2.82	2.536333333
		0.04	2.729	2.56	2.969	2.752666667
		0.01	1.506	2.743	1.649	1.966
对照	IFN- β (25 U/ml)		2.97	2.982		2.976
	IFN- β +抗体					
	1922		0.137	0.11	0.097	0.114666667
	无刺激		0.176	0.096	0.193	0.155
	无病毒		3.597	3.269	3.463	3.443

通过 Biacore 测定评估的抗体对 IFNAR2 的结合亲和力

通过 Biacore 测定了抗体 1922 和 1923 对人 IFNAR2.ECD.IgG1 的结合亲和力。没有观察到对鼠 IgG1 和 IgG2a 的结合，而抗体 1922 和 1923 显示了对 IFNAR2 的高结合亲和力。

表 H

抗体	结合亲和力
对照抗体 1	无结合
对照抗体 2	无结合
抗体 1922	58 pM
抗体 1923	280 pM
对照抗体 3	无结合

下列杂交瘤已经保藏于美国典型培养物保藏中心 (the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC)) :

细胞系

ATCC 保藏号为

保藏日

抗体 1922 (1C7.8.8)

PTA-6242

2004 年 10 月 5 日

抗体 1923 (2B4.10.6)	PTA-6243	2004 年 10 月 5 日
抗体 1924 (3B2.5.7)	PTA-6244	2004 年 10 月 5 日

这些保藏是根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约》及其实施细则（《布达佩斯条约》）的规定作出的。这将保证自保藏日起保藏物维持存活 30 年。这些细胞株将由 ATCC 根据《布达佩斯条约》的规定予以提供，并且受 Genentech, Inc.和 ATCC 之间达成的协议的制约；该协议保证，一旦相关的美国专利得到授权，或者一旦任何美国专利申请或任何外国专利申请对公众公开，以其先发生者为准，公众即对这些细胞系享有永久且不受限制的获取权，该协议还保证，由美国专利商标局局长根据 35 USC §122 及据此作出的局长令（包括 37 CFR §1.14, 特别是 886 OG 638）的规定认定为有权获取这些细胞系的，即能够获取这些细胞系。

本申请的受让人已经同意，如果被保藏的细胞系在合适的条件下培养的过程中发生丢失或破坏，在得到通知后，将迅速用相同细胞系的样品予以替换。对保藏细胞系的获取权不应被解释为对于侵犯任何政府根据其专利法授予的权利而实施本发明之行为的许可。

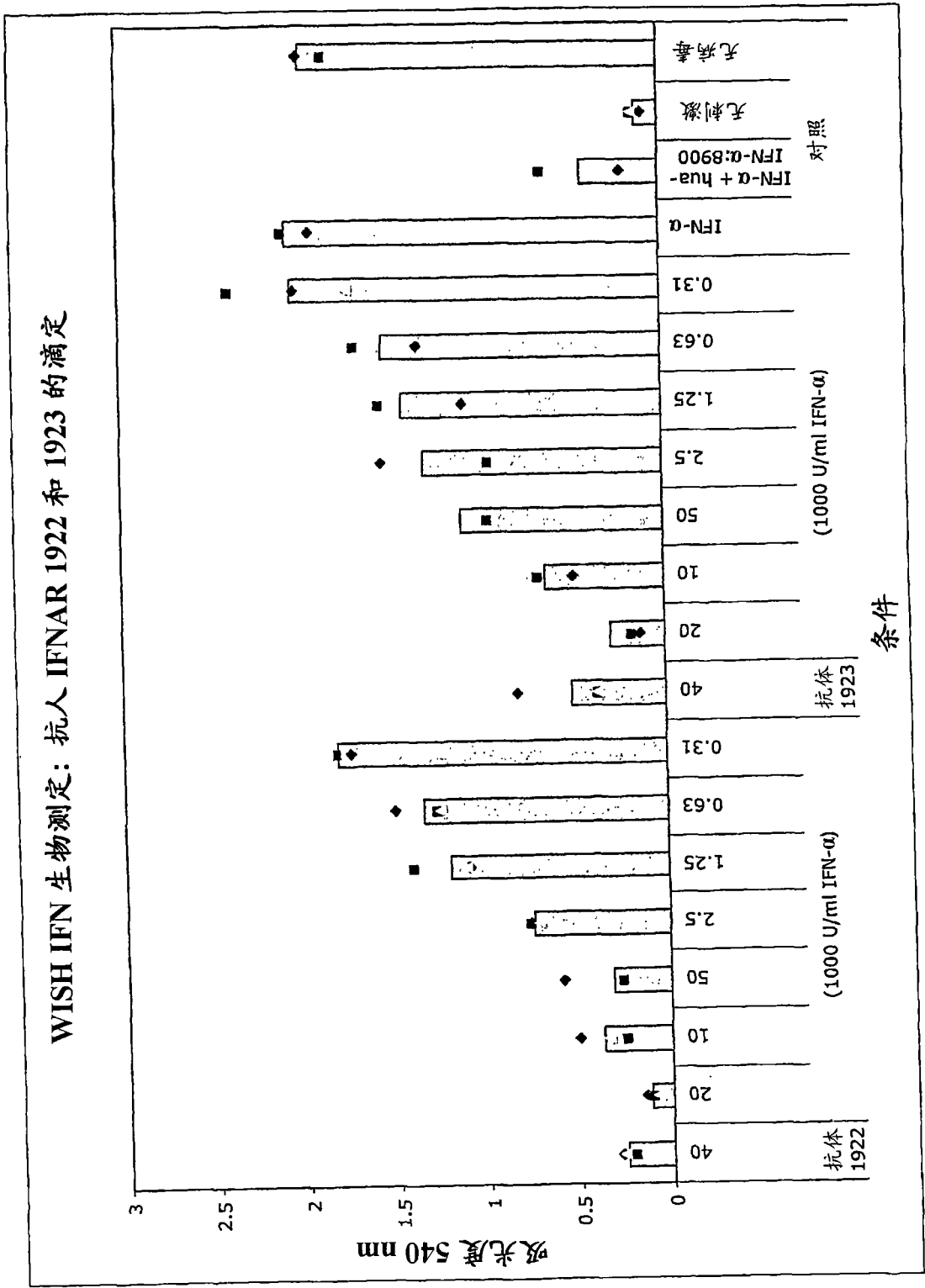


图 1

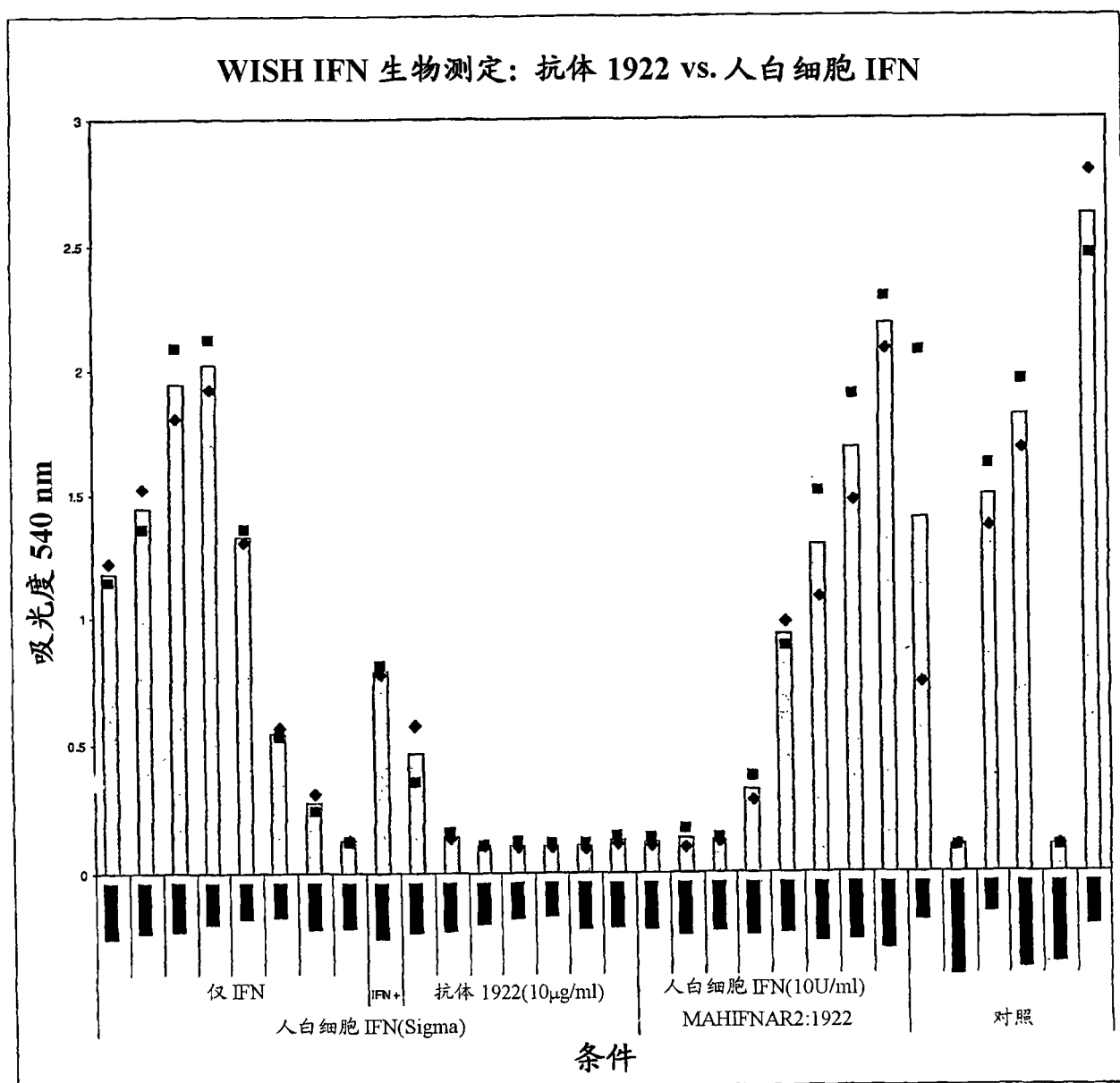


图 2

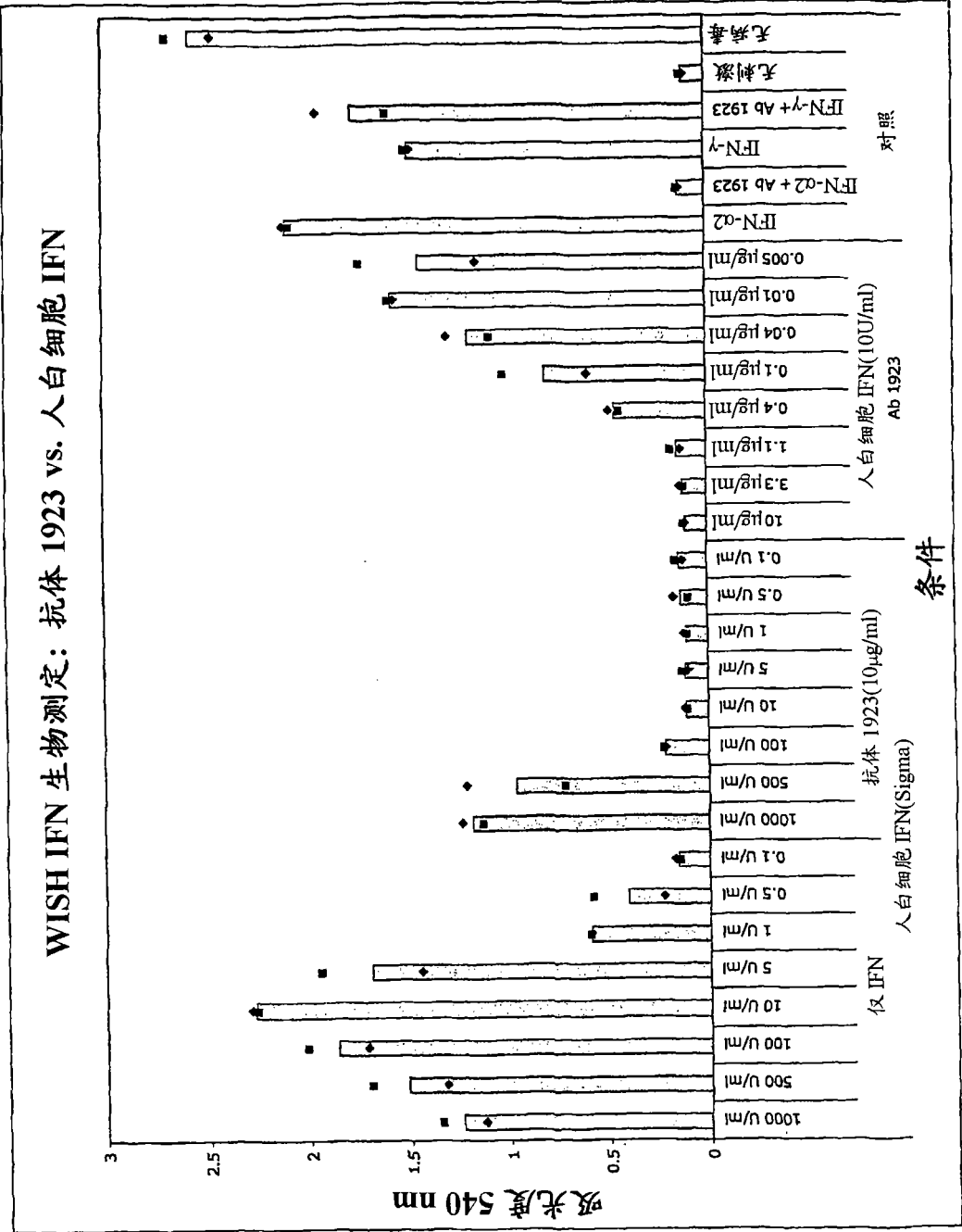


图 3

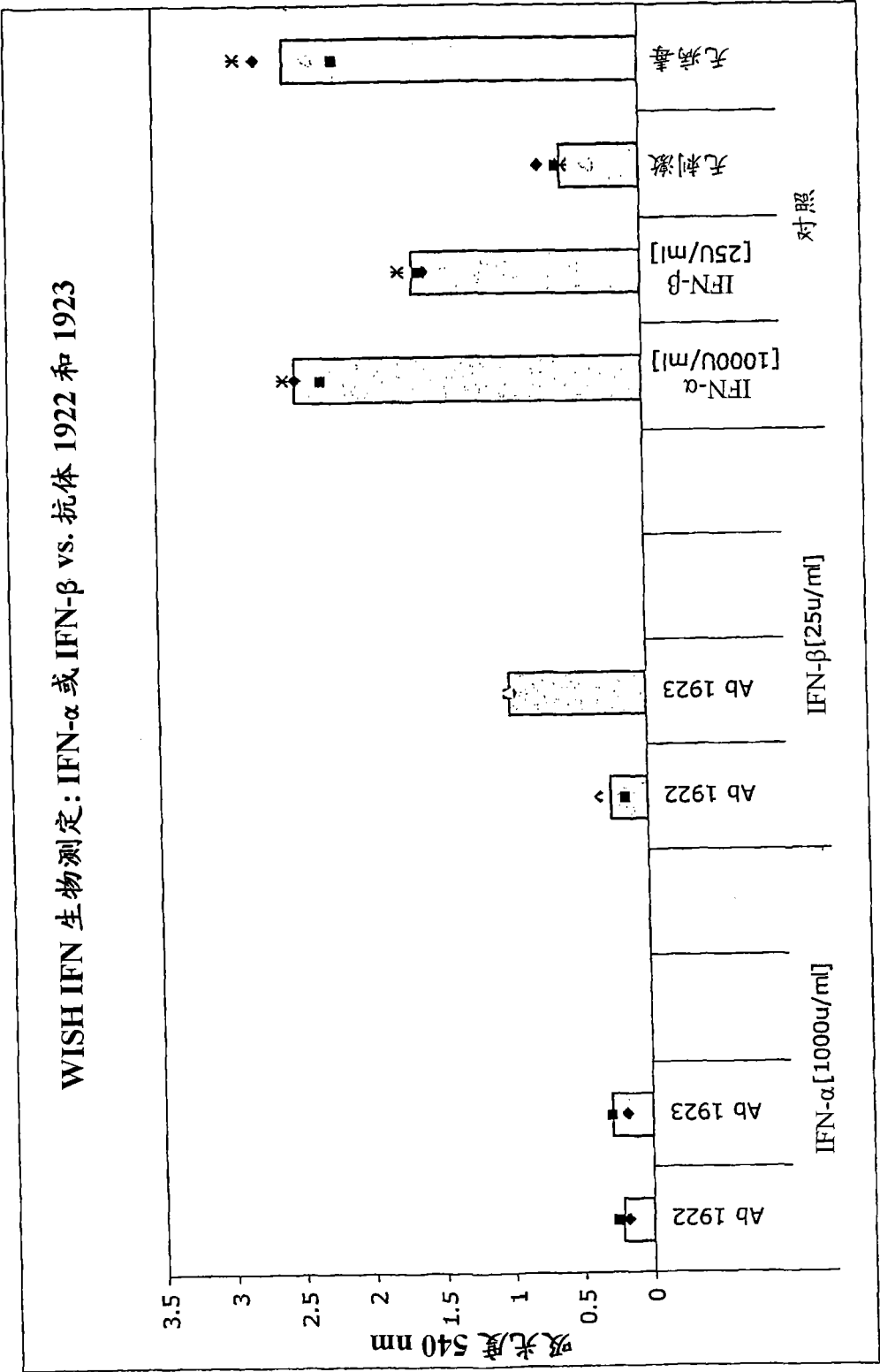


图 4

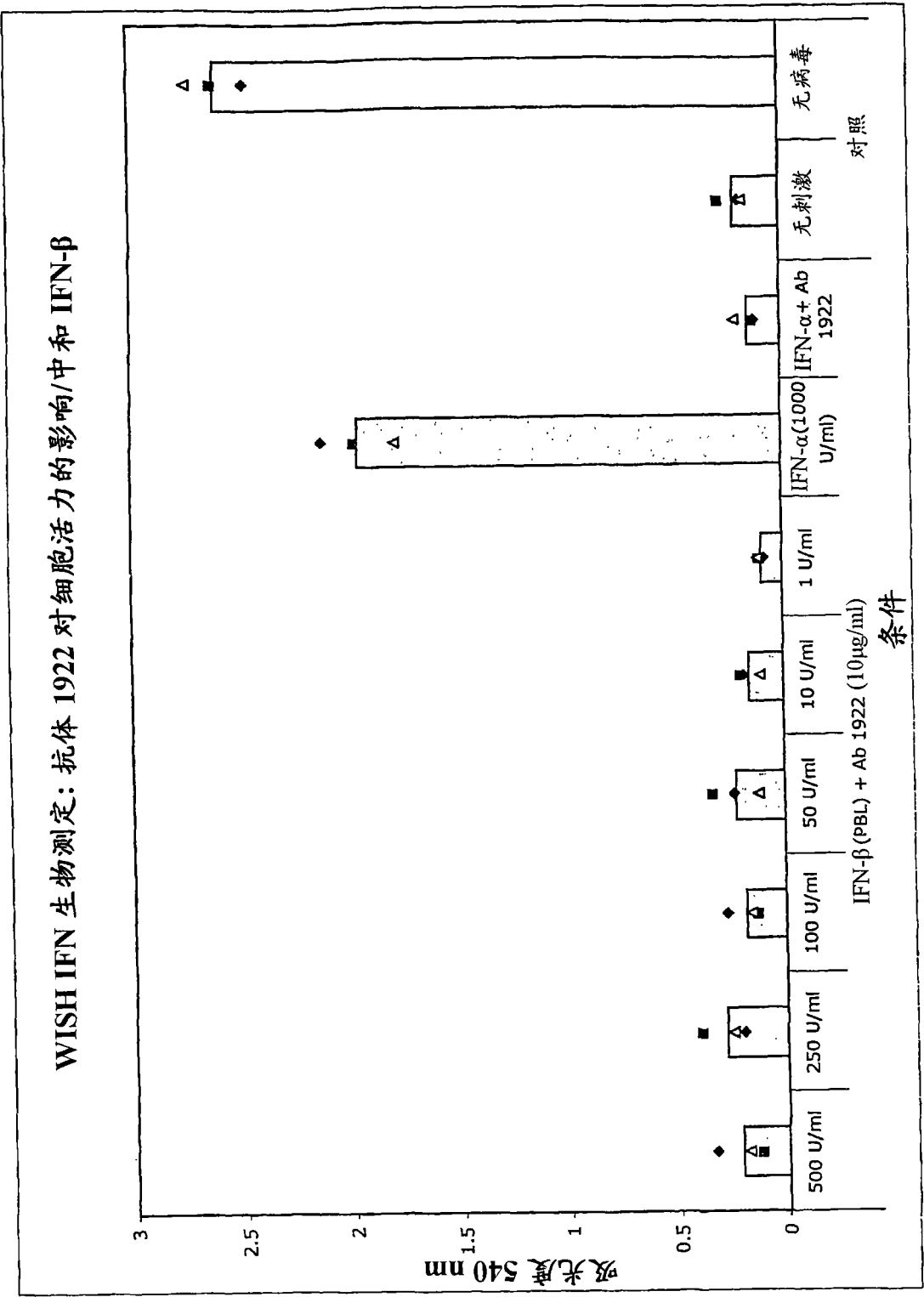


图 5

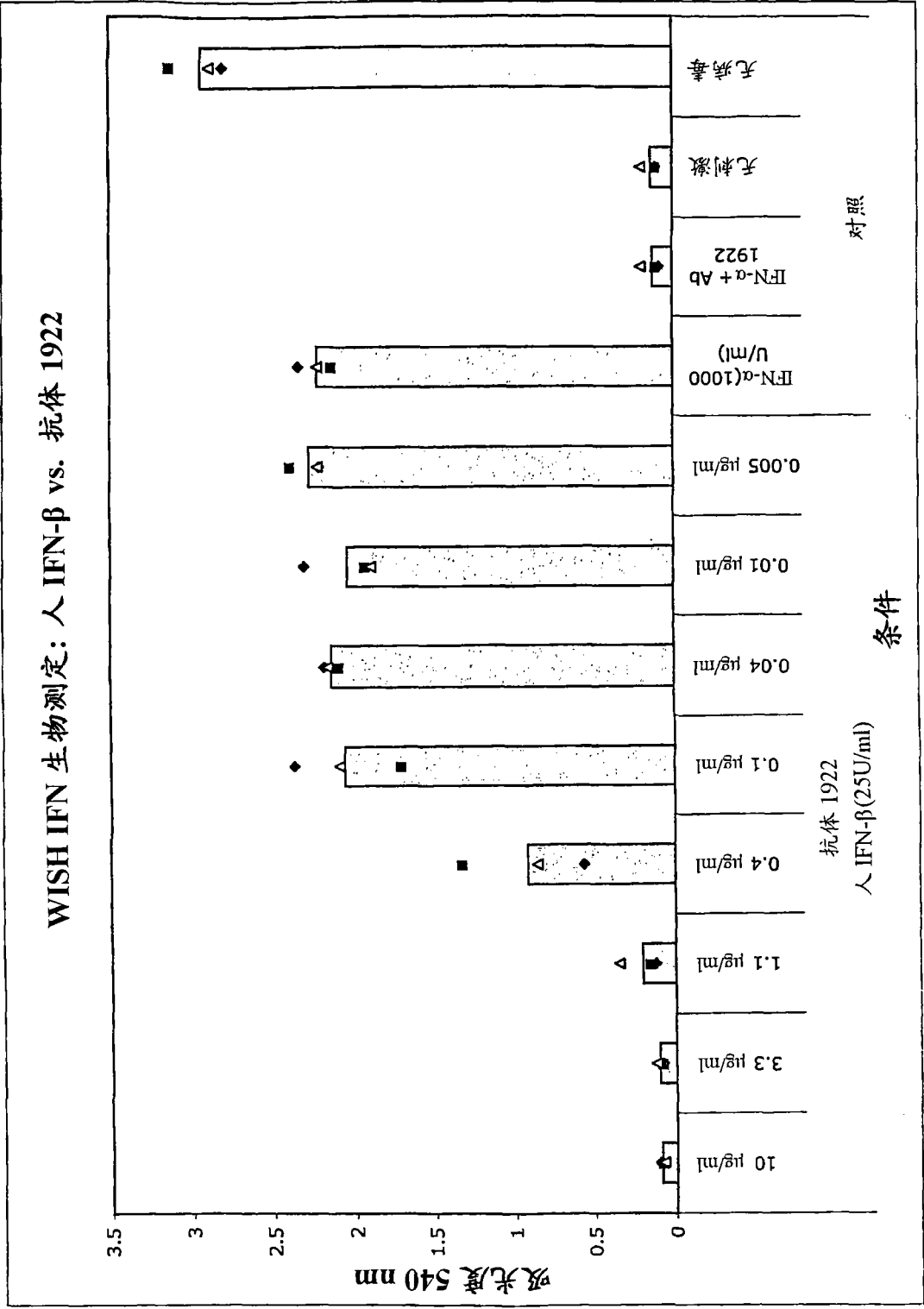


图 6

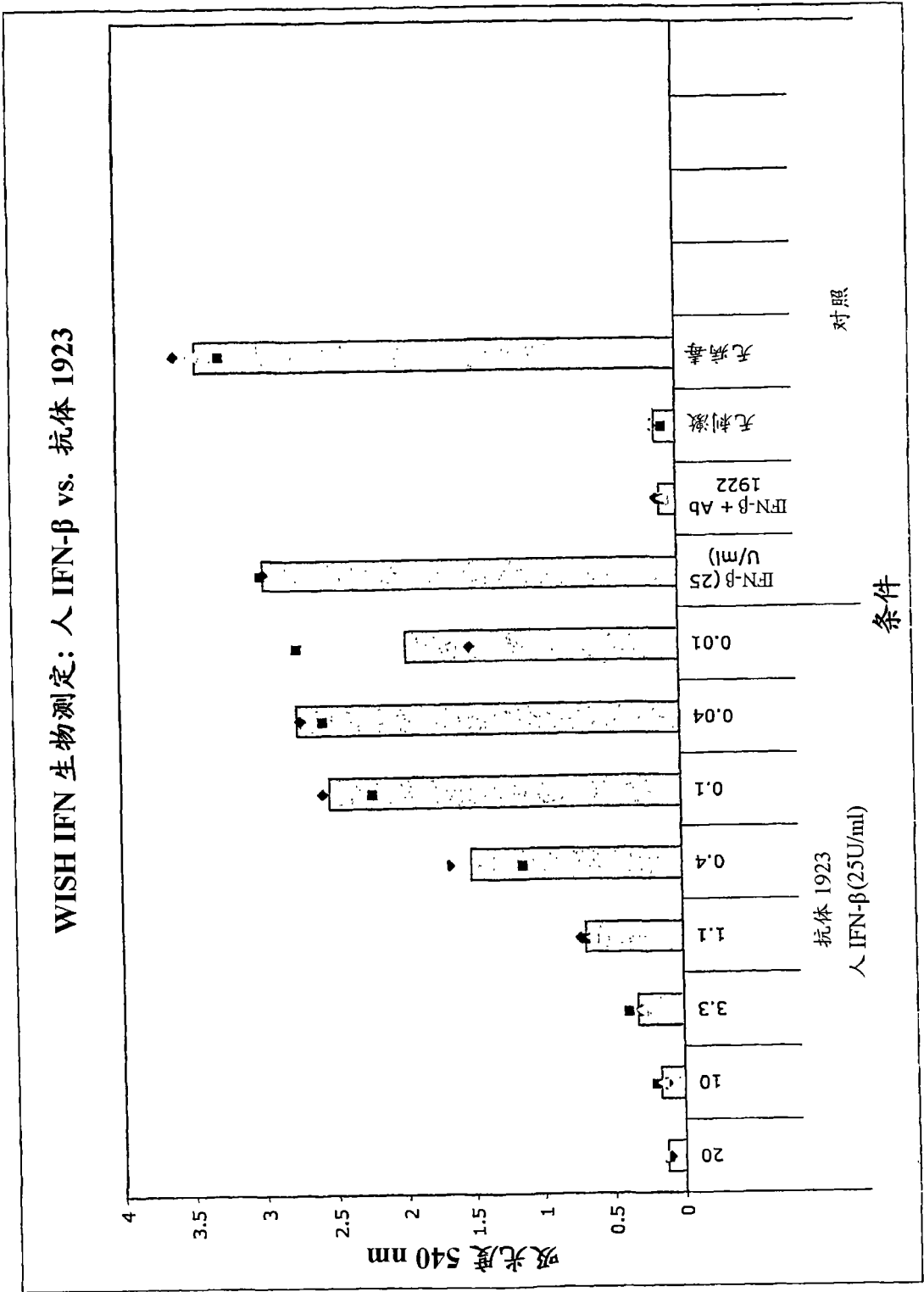


图 7

专利名称(译)	用于靶向IFNAR2的方法和组合物		
公开(公告)号	CN101243105A	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	CN200680030466.X	申请日	2006-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
发明人	阿南·丘恩萨拉佩 克斯廷·施密特		
IPC分类号	C07K16/00 C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06 G01N33/53 C12N15/63		
CPC分类号	C07K16/2866 A61K2039/505 C07K2316/96 A61P1/04 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 C07K2317/76		
代理人(译)	张红春		
优先权	60/692786 2005-06-22 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了抗IFNAR2单克隆抗体和使用这些抗体的方法。

