



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108409862 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201810473570.0

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2016.07.14

A61P 37/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 3/10 (2006.01)

申请公布号 CN 108409862 A

A61P 1/00 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.08.17

A61P 25/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 17/06 (2006.01)

201680002838.1 2016.07.14

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A61P 13/12 (2006.01)

CGMCC No.12542 2016.05.31

A61P 31/18 (2006.01)

CGMCC No.12543 2016.05.31

A61P 37/06 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

(73) 专利权人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(56) 对比文件

US 6713609 B1, 2004.03.30

(72) 发明人 张立国 苏立山 李靖云 马建平

CN 1220699 A, 1999.06.23

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

LISA A. GOLDMAN et

代理人 关畅 张如佳

al..Characterization of Antihuman IFNAR-1 Monoclonal.《JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH》.1999,第9卷(第1期),第15-26页.

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

审查员 徐乐

权利要求书2页 说明书31页

序列表9页 附图7页

(54) 发明名称

I型干扰素受体抗体及其用途

(57) 摘要

本发明公开了I型干扰素受体抗体及其用途。本发明提供了一种IFNAR1的单克隆抗体或其抗原结合部分和分泌所述抗体的杂交瘤细胞株,杂交瘤细胞株的保藏号为CGMCC No.12542或CGMCC No.12543。本发明提供的抗体不仅可以结合I型干扰素受体,并且还能够抑制I型干扰素生物活性。本发明还提供了包含本发明抗体的免疫偶联物、双特异性分子和药物组合物。本发明提供的包含本发明抗体的免疫偶联物、双特异性分子和药物组合物可用于治疗、预防或诊断多种I型干扰素介导的疾病。

1. 一种IFNAR1的单克隆抗体,其特征在于:

所述IFNAR1的单克隆抗体的重链可变区包括重链可变区CDR1、重链可变区CDR2和重链可变区CDR3;

所述IFNAR1的单克隆抗体的轻链可变区包括轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3;

所述重链可变区CDR1的氨基酸序列为序列13所示的氨基酸序列;

所述重链可变区CDR2的氨基酸序列为序列14所示的氨基酸序列;

所述重链可变区CDR3的氨基酸序列为序列15所示的氨基酸序列;

所述轻链可变区CDR1的氨基酸序列为序列18所示的氨基酸序列;

所述轻链可变区CDR2的氨基酸序列为序列19所示的氨基酸序列;

所述轻链可变区CDR3的氨基酸序列为序列20所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的IFNAR1的单克隆抗体,其特征在于:

所述IFNAR1的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为序列12所示的氨基酸序列;

所述IFNAR1的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为序列17所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的IFNAR1的单克隆抗体,其特征在于:

编码所述IFNAR1的单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列如序列11所示;

编码所述IFNAR1的单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列如序列16第1-318位所示。

4. 一株分泌IFNAR1单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其保藏号为 CGMCC No.12543。

5. 权利要求1-3中任一所述IFNAR1的单克隆抗体或权利要求4所述的杂交瘤细胞株在制备具有如下A)或B)功能的产品中的应用:

A) 结合人IFNAR1;

B) 抑制I型干扰素的生物活性。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于:所述结合人IFNAR1为结合人IFNAR1的SD2结构域和SD3结构域;

所述抑制I型干扰素的生物活性为抑制I型干扰素信号报告细胞上I型干扰素的生物活性或抑制在经过刺激剂刺激的人外周血单个核细胞上I型干扰素的生物活性。

7. 一种I型干扰素的拮抗剂,其活性成分为权利要求1-3中任一所述IFNAR1的单克隆抗体。

8. 一种组合物,其含有权利要求1-3中任一所述IFNAR1的单克隆抗体。

9. 一种免疫偶联物,其含有权利要求1-3中任一所述IFNAR1的单克隆抗体。

10. 根据权利要求9所述的免疫偶联物,其特征在于:其含有药学上可接受的载体。

11. 编码权利要求1或2所述IFNAR1的单克隆抗体的核酸分子。

12. 含有权利要求11所述核酸分子的表达盒。

13. 含有权利要求11所述核酸分子的重组载体。

14. 含有权利要求11所述核酸分子的重组微生物。

15. 含有权利要求12所述表达盒的重组载体。

16. 含有权利要求12所述表达盒的重组微生物。

17. 含有权利要求13所述重组载体的重组微生物。

18. 含有权利要求15所述重组载体的重组微生物。

19. 含有权利要求11所述核酸分子的转基因细胞系。
20. 含有权利要求12所述表达盒的转基因细胞系。
21. 含有权利要求13所述重组载体的转基因细胞系。
22. 含有权利要求15所述重组载体的转基因细胞系。
23. 一种抑制I型干扰素对表达IFNAR1的细胞的生物活性的方法,包括如下步骤:使表达IFNAR1的细胞接触权利要求1-3中任一所述IFNAR1的单克隆抗体;所述方法为非疾病诊断和治疗的方法。

## I型干扰素受体抗体及其用途

[0001] 本申请为申请号为201680002838.1、申请日为2016.07.14、发明创造名称为“I型干扰素受体抗体及其用途”的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,具体涉及I型干扰素受体抗体及其用途。

### 背景技术

[0003] I型干扰素(Type I interferon, IFN-I)是具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节作用的结构上相关的细胞因子的一个家族(Hardy等(2001) Blood 97:473; Cutrone和Langer(2001) J. Biol. Chem. 276:17140)。人IFN-I包括5种,它们分别是IFN- $\alpha$  (包括13个亚型)、IFN- $\beta$ 、IFN- $\epsilon$ 、IFN- $\kappa$ 和IFN- $\omega$ 。虽然干扰素是一种强效的抗病毒制剂,但是一些急性病毒病,如上呼吸道感染的特征症状是由人IFN- $\alpha$ 的过量引起的。而且,人IFN- $\alpha$ 与实验动物中的慢性病毒感染以及人慢性病毒病如麻疹病毒感染的病理发生相关。人IFN- $\alpha$ 也是强效的免疫调节分子,刺激B细胞的活化,增强NK细胞的细胞毒性,抑制T细胞功能,以及调节主要相容性复合物(MHC) I类抗原的表达。人IFN- $\alpha$ 的异常产生与许多自身免疫疾病,包括系统性红斑狼疮(SLE)、I型糖尿病、牛皮癣、风湿性关节炎、多发性硬化症、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和严重的混合免疫缺陷疾病等相关。

[0004] 所有的人IFN-I都与细胞表面受体(IFN- $\alpha$ 受体, IFNAR)结合, IFNAR是由两个跨膜蛋白IFNAR1和IFNAR2组成的异源二聚体(Uze等(1990) Cell 60:225; Novick等(1994) Cell 77:391)。人IFNAR1是IFN-I信号途径的重要组分,它属于II型螺旋型细胞因子受体,由各约100个氨基酸的4个III型纤连蛋白结构域的胞外域(ECD),一个跨膜域和100个氨基酸残基的胞内域组成。IFNAR1的4个子域(subdomain, SD)折叠成结构域1(SD1+SD2)和结构域2(SD3+SD4)。IFNAR1和IFNAR2与I型干扰素配体形成三元信号复合物(Cohen B等(1995), Mol Cell Biol 15(8):4208-14)。三元复合物的形成是信号转导途径活化的第一步。因此,针对这个受体以及阻断激酶的活化具有防止与干扰素活化相关疾病的下游生物学效应的潜力。

[0005] 美国专利号US7179465(2007), US7465451(2008)公开了一种针对人IFNAR1的单克隆抗体64G12,该抗体可识别人IFNAR1,并对人I型干扰素的生物活性具有中和能力。该抗体结合人IFNAR1的SD1胞外域。US7465451(2008)还公开了IFNAR的单克隆抗体用于制备治疗或预防与IFN-I过量产生相关的疾病,治疗移植物排斥,自身免疫病,如系统性红斑狼疮、治疗I型糖尿病、牛皮癣、风湿性关节炎、多发性硬化、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)以及严重的免疫缺陷性疾病;治疗急性病毒病如上呼吸道感染,慢性病毒病如麻疹病毒感染疾病的药物中的用途。美国专利号US6713609(2004)公开了抑制多种I型干扰素抗病毒活性的抗IFNAR1单克隆抗体2E1和4A7,其中单克隆抗体2E1结合人IFNAR1的SD1结构域,4A7结合人IFNAR1的SD1和SD2结构域。美国专利号US7662381(2010)和US8460668(2013)公开了结合IFNAR1并且能够抑制I型干扰素活性的单克隆抗体9D4,该抗体结合人IFNAR1的SD3结构域。

## 发明内容

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种IFN A R1的单克隆抗体。

[0007] 本发明提供的IFN A R1的单克隆抗体结合人IFN A R1的SD2结构域全部或部分和/或SD3结构域全部或部分,可抑制人I型干扰素的生物活性。

[0008] 上述单克隆抗体中,所述单克隆抗体或其抗原结合部分表现如下A) -E) 中一种或多种特性:

[0009] A) 结合人IFN A R1;

[0010] B) 结合人IFN A R1的SD2结构域全部或部分和/或SD3结构域全部或部分;

[0011] C) 抑制I型干扰素的生物活性;

[0012] D) 抑制I型干扰素信号报告细胞上I型干扰素的生物活性;

[0013] E) 抑制在经过刺激剂刺激的人外周血单个核细胞上I型干扰素的生物活性。

[0014] 上述单克隆抗体中,

[0015] 所述单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区的编码基因为如下1) 或2) :

[0016] 1) 小鼠IGHV9-3,IGHD2-13和IGHJ1基因的产物或来源于该基因;

[0017] 2) 小鼠IGHV9-3,IGHD1-1和IGHJ3基因的产物或来源于该基因;

[0018] 所述单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区的编码基因为如下3) 或4) :

[0019] 3) 小鼠IGKV6-13和IGKJ5基因的产物或来源于该基因;

[0020] 4) 小鼠IGKV6-15和IGKJ2基因的产物或来源于该基因。

[0021] 上述单克隆抗体中,

[0022] 所述单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区为如下5) 或6) :

[0023] 5) 依次包括小鼠IGHV9-3基因全长或部分编码的蛋白或多肽、小鼠IGHD2-13基因全长或部分编码的蛋白或多肽和小鼠IGHJ1基因全长或部分编码的蛋白或多肽;

[0024] 6) 依次包括小鼠IGHV9-3基因全长或部分编码的蛋白或多肽、小鼠IGHD1-1基因全长或部分编码的蛋白或多肽和小鼠IGHJ3基因全长或部分编码的蛋白或多肽;

[0025] 所述单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区为如下7) 或8) :

[0026] 7) 依次包括小鼠IGKV6-13基因全长或部分编码的蛋白或多肽和小鼠IGKJ5基因全长或部分编码的蛋白或多肽;

[0027] 8) 依次包括小鼠IGKV6-15基因全长或部分编码的蛋白或多肽和小鼠IGKJ2基因全长或部分编码的蛋白或多肽。

[0028] 上述单克隆抗体中,

[0029] 所述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区依次包括所述小鼠IGHV9-3基因编码的蛋白、所述小鼠IGHD2-13基因编码的蛋白和所述小鼠IGHJ1基因编码的蛋白;且其轻链可变区依次包括所述小鼠IGKV6-13基因编码的蛋白和所述小鼠IGKJ5基因编码的蛋白;

[0030] 或所述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区依次包括所述小鼠IGHV9-3基因编码的蛋白、所述小鼠IGHD1-1基因编码的蛋白和所述小鼠IGHJ3基因编码的蛋白,且其轻链可变区依次包括所述小鼠IGKV6-15基因编码的蛋白和所述小鼠IGKJ2基因编码的蛋白。

[0031] 上述单克隆抗体中,

[0032] 所述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区包括重链可变区CDR1、重链可变区CDR2和重链可变区CDR3；

[0033] 所述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包括轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2和轻链可变区CDR3；

[0034] 所述重链可变区CDR1的氨基酸序列为如下(1)或(2)：

[0035] (1) 序列3或序列13所示的氨基酸序列；

[0036] (2) 将序列3或序列13所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；

[0037] 所述重链可变区CDR2的氨基酸序列为如下(3)或(4)：

[0038] (3) 序列4或序列14所示的氨基酸序列；

[0039] (4) 将序列4或序列14所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；

[0040] 所述重链可变区CDR3的氨基酸序列为如下(5)或(6)：

[0041] (5) 序列5或序列15所示的氨基酸序列；

[0042] (6) 或将序列5或序列15所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；

[0043] 所述轻链可变区CDR1的氨基酸序列为如下(7)或(8)：

[0044] (7) 序列8或序列18所示的氨基酸序列；

[0045] (8) 将序列8或序列18所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；

[0046] 所述轻链可变区CDR2的氨基酸序列为如下(9)或(10)：

[0047] (9) 序列9或序列19所示的氨基酸序列；

[0048] (10) 将序列9或序列19所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；

[0049] 所述轻链可变区CDR3的氨基酸序列为如下(11)或(12)：

[0050] (11) 序列10或序列20所示的氨基酸序列；

[0051] (12) 将序列10或序列20所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列。

[0052] 上述单克隆抗体中，

[0053] 所述IFN A R1的单克隆抗体的重链可变区的氨基酸序列为a1)或a2)：

[0054] a1) 序列2或序列12所示的氨基酸序列；

[0055] a2) 将序列2或序列12所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列；

[0056] 所述IFN A R1的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为b1)或b2)：

[0057] b1) 序列7或序列17所示的氨基酸序列；

[0058] b2) 将序列7或序列17所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的具有相同功能的氨基酸序列。

[0059] 上述单克隆抗体中，

[0060] 所述IFN A R1的单克隆抗体重链可变区的核苷酸序列为c1)或c2)或c3)：

- [0061] c1) 序列1或序列11所示的DNA分子；
- [0062] c2) 与c1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性，且编码上述IFN A R1的单克隆抗体重链可变区的cDNA分子或基因组DNA分子；
- [0063] c3) 在严格条件下与c1)或c2)限定的核苷酸序列杂交，且编码上述IFN A R1的单克隆抗体重链可变区的cDNA分子或基因组DNA分子；
- [0064] 所述IFN A R1的单克隆抗体轻链可变区的核苷酸序列为d1)或d2)或d3)：
- [0065] d1) 序列6或序列16所示的DNA分子；
- [0066] d2) 与d1)限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性，且编码上述IFN A R1的单克隆抗体轻链可变区的cDNA分子或基因组DNA分子；
- [0067] d3) 在严格条件下与d1)或d2)限定的核苷酸序列杂交，且编码上述IFN A R1的单克隆抗体轻链可变区的cDNA分子或基因组DNA分子。
- [0068] 本发明的抗体包含的重链和轻链可变区含有与上述抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列，并且其中该抗体保留了本发明的IFN A R1抗体的需要的功能特性。例如，本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：
- [0069] (a) 重链可变区包含与选自序列2和序列12所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列；
- [0070] (b) 轻链可变区包含与选自序列7或序列17所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列；
- [0071] (c) 该抗体特异性结合IFN A R1，并且表现至少一种如下所述的功能特性：
- [0072] L1: 在I型干扰素信号报告细胞中抑制IFN $\alpha$ 2b的活性；
- [0073] L2: 抑制CpGA诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因mx2的表达；
- [0074] L3: 抑制IFN $\alpha$ 2b诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因mx2的表达；
- [0075] L4: 抑制R848诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因mx2的表达；
- [0076] L5: 抑制CpGA诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因isg15的表达；
- [0077] L6: 抑制IFN $\alpha$ 2b诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因isg15的表达；
- [0078] L7: 抑制R848诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因isg15的表达。
- [0079] 本发明的抗体VH或VL氨基酸序列可以与上述氨基酸序列85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源。两个氨基酸序列之间的百分同源性相当于两个序列之间的百分同一性。两个序列之间的百分同一性是考虑了为两个序列之间进行最佳对比所需要引入的空位的数目和每个空位的长度后，这两个序列共有的相同位点的数目的函数(即%同源性=相同位点数/位点总数 $\times$ 100%)。
- [0080] 本发明的抗体用抗体的特定功能特征或特性来表征。例如，该抗体特异性结合IFN A R1，优选人IFN A R1。另外，该抗体可以与来自一种或多种非人类灵长类动物如猕猴和/或恒河猴的IFN A R1交叉反应。
- [0081] 此外，本发明的抗体能够抑制I型干扰素的生物活性。这些抗体抑制至少一种I型干扰素的生物活性，优选抑制多种I型干扰素(即，至少两种，更优选至少三种，或者至少四种，或者至少五种，或者至少六种，或者至少七种，或者至少八种，或者至少九种，或者至少十种，或者至少11种，或者至少12种，或者至少13种，或者至少14种，或者至少15种不同亚型的I型干扰素)的生物活性。在一个优选实施方案中，该抗体抑制以下I型干扰素的生物活

性： $\alpha 1$ 、 $\alpha 2a$ 、 $\alpha 2b$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 、 $\alpha 10$ 、 $\alpha 14$ 、 $\alpha 16$ 、 $\alpha 17$ 、 $\alpha 21$ 、 $\beta$ 和 $\omega$ 。在其他优选实施方案中，该抗体在人PBMC上抑制I型干扰素的活性。

[0082] 抗体抑制I型干扰素的生物活性的能力可以通过一种或多种本领域建立的试验来检测。包括在I型干扰素信号报告细胞上抑制IFN- $\alpha$ 的活性，抑制经刺激剂，如CpG，IFN $\alpha 2b$ 或R848刺激的外周血单核细胞(PBMCs)中干扰素效应基因，如*mx2*和*isg15*的表达。如果与非特异性对照抗体相比，一种抗体将活性抑制了至少20%，更优选至少30%，甚至更优选至少40%，至少50%，至少60%，至少70%，至少80%，或至少90%，则该抗体“抑制I型干扰素的生物活性”。

[0083] 在优选实施方案中，该抗体在I型干扰素信号报告细胞系HEK293T中抑制IFN $\alpha 2b$ 的活性，抑制CpG $\alpha$ ，IFN $\alpha 2b$ 或R848诱导的PBMC中干扰素效应基因，如*mx2*和*isg15*的表达。一方面，本发明优选的抗体是如实施例所述分离并进行结构表征的单克隆抗体10C2和10C9。10C2和10C9的VH氨基酸序列分别显示在序列2和序列12中；10C2和10C9的VL氨基酸序列分别显示在序列7和序列17中。

[0084] 假定这些抗体都能够结合IFNAR1，则VH和VL序列可以“混合并匹配”，以产生本发明的其他的抗IFNAR1结合分子。这些“混合并匹配”抗体的IFNAR1结合可以用本发明实施例中所述的稳定表达IFNAR1的HEK293报告细胞系来检测。优选地，当VH和VL链混合并匹配时，来自特定VH/VL配对的VH序列被替代为结构上相似的VH序列。同样，优选地来自特定VH/VL配对的VL序列被替代为结构上相似的VL序列。例如，10C2和10C9的VH和VL序列特别适合混合并匹配，因为这些抗体使用源自相同种系序列(IGHV9-3和IGKV6-13)的VH和VL序列，因此显示结构相似性。

[0085] 另一方面，本发明提供包含10C2和10C9的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3或其组合的抗体。10C2和10C9的VH CDR1的氨基酸序列分别为序列3和序列13。10C2和10C9的VH CDR2的氨基酸序列分别为序列4和序列14。10C2和10C9的VH CDR3的氨基酸序列分别为序列5和序列15。CDR区用VECTOR NTI标出。

[0086] 假如这些抗体中的每一个都能够结合IFNAR1并且抗原结合特异性主要由CDR1、CDR2、CDR3区提供，则VH CDR1、CDR2、CDR3序列与VL CDR1、CDR2、CDR3序列可以“混合并匹配”(即来自不同抗体的CDR可以混合并匹配，但是每个抗体必须含有VH CDR1、CDR2、CDR3和VL CDR1、CDR2、CDR3)，从而产生本发明的其他的抗IFNAR1结合分子。这些“混合并匹配的”抗体的IFNAR1结合可以用实施例中所述的稳定表达IFNAR1的报告细胞HEK293T检测。优选地，当VH CDR序列混合并匹配时，来自特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列被替代为结构上相似的CDR序列。同样，当VL CDR序列混合并匹配时，来自特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列优选地被替代为结构上相似的CDR序列。例如，10C2和10C9的VH CDR1具有一定的结构相似性，因此适合混合和匹配。将一个或多个VH和/或VL CDR区序列替代为来自单克隆抗体10C2和10C9此处公开的CDR序列的结构上相似的序列，可以产生新的VH和/或VL序列。

[0087] 在某些实施方案中，本发明的抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

[0088] 例如，在一个优选实施方案中，本发明提供一种分离的抗IFNAR1单克隆抗体或其抗原结合部分，其中该抗体：



[0089] (a) 包含小鼠IGHV9-3,IGHD2-13和IGHJ1基因;或IGHV9-3,IGHD1-1和IGHJ3基因的重链可变区;

[0090] (b) 包含小鼠IGKV6-13和IGKJ5基因;或IGKV6-15和IGKJ2基因的轻链可变区;

[0091] (c) 特异性结合人IFNAR1。

[0092] 具有IGHV9-3,IGHD2-13和IGHJ1基因的重链可变区和IGKV6-13和IGKJ5基因的轻链可变区的例子是10C2。具有IGHV9-3,IGHD1-1和IGHJ3基因的重链可变区和IGKV6-15和IGKJ2基因的轻链可变区的例子是10C9。

[0093] 如果一种小鼠抗体的可变区是从使用小鼠种系免疫球蛋白基因的系统获得的,则该抗体包含特定种系序列的或“源自”它的或是它的“产物”的重链或轻链可变区。小鼠种系免疫球蛋白序列的或“源自”它的或是它的“产物”的小鼠抗体可以如下鉴定:将该小鼠抗体的氨基酸序列与小鼠种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较,并选择在序列上最接近于该小鼠抗体序列(即有最高%同一性)的小鼠种系免疫球蛋白序列。特定小鼠种系免疫球蛋白序列的或“源自”它的或是它的“产物”的小鼠抗体与该种系序列相比可能包含氨基酸差异,例如是由于天然存在的体细胞突变或有意引入定点突变。但是,选择的小鼠抗体在氨基酸序列上与小鼠种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列一般至少90%相同,并且含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如鼠种系序列)相比时决定该小鼠抗体为小鼠抗体的氨基酸残基。

[0094] 在某些情况下,小鼠抗体在氨基酸序列上与该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列可以至少95%、或者甚至至少96%、97%、98%或99%相同。一般来说,源自特定小鼠种系序列的小鼠抗体将显示与该小鼠种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相差不超过10个氨基酸。在某些情况下,该小鼠抗体可显示与该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相差不超过5个、或者甚至不超过4、3、2或1个氨基酸。

[0095] 本发明的第二个目的是提供一株分泌上述IFN A R1的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0096] 本发明提供的分泌上述IFN A R1的单克隆抗体的杂交瘤细胞株的保藏号为CGMCC No.12542或CGMCC No.12543。

[0097] 将本发明提供的分泌上述IFN A R1的单克隆抗体的杂交瘤细胞株分别命名为杂交瘤细胞株10C2和杂交瘤细胞株10C9。

[0098] 上述杂交瘤细胞株10C2的分类命名为小鼠杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞株已于2016年5月31日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.12542。

[0099] 上述杂交瘤细胞株10C9的分类命名为小鼠杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞株已于2016年5月31日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.12543。

[0100] 本发明的第三个目的是提供上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分或上述杂交瘤细胞株的新用途。

[0101] 本发明提供了上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分或杂交瘤细胞株在如

下A) -G) 中至少一种中的应用:

[0102] A) 结合人IFN A R1;

[0103] B) 抑制I型干扰素的生物活性;

[0104] C) 抑制IFN $\alpha$ 2b的活性;

[0105] D) 结合人IFN A R1的SD2结构域和/或SD3结构域;

[0106] E) 抑制I型干扰素信号报告细胞上I型干扰素的生物活性;

[0107] F) 抑制在经过刺激剂刺激的人外周血单个核细胞上I型干扰素的生物活性;

[0108] G) 治疗和/或预防I型干扰素介导和/或I型干扰素异常引起的疾病。

[0109] 上述应用中,所述抑制在经过刺激剂刺激的人外周血单个核细胞上I型干扰素的生物活性体现在如下(1) - (6):

[0110] (1) 抑制CpGA诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因mx2的表达水平;

[0111] (2) 抑制IFN $\alpha$ 2b诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因mx2的表达水平;

[0112] (3) 抑制R848诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因mx2的表达水平;

[0113] (4) 抑制CpGA诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因isg15的表达水平;

[0114] (5) 抑制IFN $\alpha$ 2b诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因isg15的表达水平;

[0115] (6) 抑制R848诱导的外周血单核细胞中干扰素效应基因isg15的表达水平。

[0116] 上述应用中,所述I型干扰素为干扰素 $\alpha$ 。

[0117] 本发明的第四个目的是提供一种I型干扰素的拮抗剂。

[0118] 本发明提供的I型干扰素的拮抗剂的活性成分为上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0119] 本发明的第五个目的是提供一种组合物。

[0120] 本发明提供的组合物含有上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0121] 本发明提供的组合物,例如药物组合物,其含有与药学上可接受的载体配制在一起的一种或组合的本发明的单克隆抗体或者其抗原结合部分。这样的组合物可以包含一种或组合的(例如两种或多种不同的)本发明的抗体或免疫偶联物或双特异性分子。例如,本发明的药物组合物可以含有可与靶抗原上不同表位结合或具有互补活性的组合的抗体(或免疫偶联物或双特异性剂)。

[0122] 本发明的药物组合物也可在联合治疗中施用,即与其他药剂联用。例如,联合治疗可包括本发明的抗IFN A R1抗体与至少一种其他的免疫抑制剂组合。文中所用的,“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,该载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。根据施用途径,可将活性化合物即抗体、免疫偶联物或双特异性分子包被于一种材料中,以保护该化合物免于可使该化合物失活的酸和其他天然条件的作用。

[0123] 本发明的药物组合物可包含一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保持了亲代化合物的所需生物活性且不引起任何不想要的毒理学作用的盐(参见如 Berge, S.M. 等(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19)。这样的盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些由无毒性无机酸如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等衍生的盐,以及由无毒性有机酸如脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂族和芳族磺酸等衍生的盐。碱加成盐包括那些由碱土金属如钠、钾、镁、钙等衍生的

盐,以及由无毒性有机胺如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等衍生的盐。

[0124] 本发明的药物组合物也可含有药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠,亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如棕榈酸抗坏血酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(DHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0125] 可用于本发明的药物组合物中的适当的水性或非水性载体的例子包括水,乙醇,多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其适当的混合物,植物油如橄榄油,和可注射的有机酯如油酸乙酯。例如通过应用包衣材料如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需的颗粒大小,以及通过应用表面活性剂,可维持适当的流动性。

[0126] 这些组合物也可含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以通过上述的灭菌程序或通过包含各种抗细菌和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚山梨酸等来确保防止存在微生物。也可能需要在组合物中包含等渗剂,例如,糖和氯化钠等。另外,通过包含延迟吸收剂,例如单硬脂酸铝和明胶,可实现注射型药物延长的吸收。

[0127] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌注射液或分散液的粉末剂。这些介质和试剂用于药学活性物质的应用是本领域公知的。还可以向组合物中掺入补充的活性化合物。

[0128] 治疗组合物一般必须是无菌的并且在制备和贮存条件下稳定。可以将组合物配制成溶液、微乳状液、脂质体或其他适合高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,丙三醇、聚乙二醇和液态聚乙二醇等)和它们的合适的混合物的溶剂或分散剂。例如,通过使用包衣,例如卵磷脂,在分散剂的情况下通过保持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。在很多情况下,组合物中优选包含等渗剂,例如,糖、多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇或氧化钠。通过在组合物中加入延迟吸收剂,例如单硬脂酸盐和明胶,可实现注射型药物延长的吸收。

[0129] 通过将活性化合物以需要的量混入合适的溶剂中,并且根据需要加入以上列举的成分的一种或其组合,接着无菌微过滤,可制备无菌注射液。通常,通过将活性化合物掺入到含有基本分散介质和来自上面所列举的其他所需成分的无菌载体中制备分散剂。对于用于制备无菌注射液的无菌粉末剂,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),由其前述无菌过滤的溶液得到活性成分加任何额外所需成分的粉末。

[0130] 可以与载体材料组合以制备单一剂量形式的活性成分的量根据所治疗的受试者和特定的给药方式而不同。可以与载体材料组合以制备单一剂量形式的活性成分的量一般是产生治疗效果的组合物的量。通常,以100%计,这个量的范围是大约0.01%至大约99%的活性成分,优选大约0.1%至大约70%,最优选大约1%至大约30%的活性成分,与药学上可接受的载体相组合。

[0131] 本发明的组合物可以利用本领域公知的一种或多种方法通过一种或多种施用途径施用。本领域技术人员应当明白,施用途径和/或方式根据需要的结果而不同。用于本发明抗体的优选施用途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如注射或输注。

[0132] 文中所用的短语“肠胃外施用”是指不同于肠和局部施用的施用模式,通常是通过注射,包括但不局限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0133] 此外,本发明的抗体也可以通过非肠胃外途径施用,如局部、表皮或粘膜途径施用,例如,鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

[0134] 本发明的抗体(和免疫偶联物和双特异性分子)具有体外和体内诊断和治疗应用。例如,这些分子可以施用于例如在体外或离体培养的细胞,或者例如在体内施用于人类受试者,以治疗、预防或诊断多种疾病。

[0135] 文中使用的术语“受试者”包括人和非人动物。非人动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、牛、马、鸡、两栖类动物和爬行类动物。这些方法特别适合治疗患有与异常或不当I型干扰素表达(例如过量表达)相关的疾病的人类患者。

[0136] 当抗IFN $\alpha$  R1抗体与另一种药物一起给药时,这两种药物可以依次或同时给药。例如,本发明的抗IFN $\alpha$  R1抗体可以与一种或多种以下药物组合使用:抗IFN $\alpha$ 抗体、抗IFN- $\gamma$ 受体抗体、可溶性IFN- $\gamma$ 受体、抗TNF抗体、抗TNF受体抗体和/或可溶性TNF受体。此外,本发明的抗IFN $\alpha$  R1抗体可以与Flt3配体拮抗剂组合使用。

[0137] 本发明的第六个目的是提供一种免疫偶联物。

[0138] 本发明提供的免疫偶联物含有上述IFN $\alpha$  R1的单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0139] 上述免疫偶联物中,所述免疫偶联物含有药学上可接受的载体。

[0140] 本发明提供的抗IFN $\alpha$  R1抗体或其片段可以与治疗性剂如细胞毒素、药物(例如免疫抑制剂)或放射性毒素偶联,得到偶联物。这些偶联物称为“免疫偶联物”。包括一个或多个细胞毒素的免疫偶联物称作“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害(例如杀伤)的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙啶、吐根碱、丝裂霉素、表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷、表鬼臼毒噻吩糖苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素和它们的类似物或同系物。治疗剂还包括,例如,抗代谢物(例如,氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺(decarbazine),烧化剂(例如,氮芥、thioepa苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露糖醇、链唑霉素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂),氨基霉素类(例如,柔红菌素(以前称为道诺霉素)和阿霉素),抗生素(例如,放线菌素D、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC)),和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。能与本发明抗体偶联的治疗性细胞毒素的其他优选例子包括倍癌霉素、刺孢霉素、美坦生、auristatin,和它们的衍生物。

[0141] 可以利用本领域可用的接头技术将细胞毒素与本发明的抗体偶联。已经用于将细胞毒素与抗体偶联的接头类型的实例包括但不限于脰、硫醚、酯、二硫化物和含肽的接头。可以选择,例如,在溶酶体室内易被低pH切割或易被蛋白酶切割的接头,该蛋白酶例如是在肿瘤组织中优先表达的蛋白酶,如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B、C、D)。

[0142] 关于细胞毒素的类型、用于偶联治疗剂与抗体的接头和方法的进一步讨论,参见Saito,G.等(2003)Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P. A.等(2003)

Cancer. Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. 和 Kreitman, R.J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. 和 Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

[0143] 本发明的抗体也可与放射性同位素偶联,产生细胞毒性放射性药物,也被称为放射性免疫偶联物。能够与诊断或治疗性使用的抗体偶联的放射性同位素的例子包括但不限于碘<sup>131</sup>、铟<sup>111</sup>、钷<sup>90</sup>和镱<sup>177</sup>。制备放射性免疫偶联物的方法在本领域中已经建立。放射性免疫偶联物的例子可以作为商品获得,包括 Zevalin<sup>TM</sup> (IDEC Pharmaceuticals) 和 Bexxar<sup>TM</sup> (Corixa Pharmaceuticals), 能够利用类似的方法使用本发明的抗体制备放射性免疫偶联物。

[0144] 本发明的抗体偶联物可用于修饰特定的生物学反应,且药物部分不应理解为局限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有需要的生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可包括,例如,具有酶活性的毒素或其活性片段,如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子或干扰素- $\gamma$ ;或生物学反应调节物,如淋巴因子、白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 或其他生长因子。

[0145] 用于将这种治疗剂与抗体偶联的技术是众所周知的,参见,例如,Arnon等,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy (在癌症治疗中用于药物的免疫靶向的单克隆抗体)”, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldt等(编), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom等,“Antibodies For Drug Delivery (用于给药的抗体)”, Controlled Drug Delivery (第二版), Robinson等(编), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review (癌症治疗中细胞毒剂的抗体载体:综述)”, Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera等(编), pp. 475-506 (1985) “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy (放射性标记抗体在癌症治疗中的治疗用途的分析、结果和未来前景)”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin等(编), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 和 Thorpe等, “The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates (抗体-毒素偶联物的制备和细胞毒性)”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

[0146] 本发明的第七个目的是提供一种抗体基因工程改造的抗体。

[0147] 本发明提供的抗体基因工程改造的抗体是将上述 IFN  $\alpha$  R1 的单克隆抗体或其抗原结合部分进行修饰和改造后得到的抗体。

[0148] 在某些实施方案中,本发明的抗体包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,其中这些 CDR 序列中的一个或多个包含基于本发明的抗体(例如 10C2 和 10C9)的特定氨基酸序列或其保守修饰,并且其中该抗体保留本发明抗 IFN  $\alpha$  R1 抗体的需要的功能特性。因此,本发明提供一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的重链可变区和含 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的轻链可变区,

其中：重链可变区CDR3序列包含选自序列5和序列15所示的氨基酸序列或其保守修饰的氨基酸序列，且轻链可变区CDR3序列包含选自序列10和序列20所示的氨基酸序列或其保守修饰的氨基酸序列；且该抗体特异性结合IFN A R1，并且表现至少一种上述功能特性。

[0149] 在另一个实施方案中，重链可变区CDR2序列包含选自序列4和序列14所示的氨基酸序列或其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区CDR2序列包含选自序列9和序列19所示的氨基酸序列或其保守修饰的氨基酸序列。在又一个实施方案中，重链可变区CDR1序列包含选自序列3和序列13所示的氨基酸序列或其保守修饰的氨基酸序列；且轻链可变区CDR1序列包含选自序列8和序列18所示的氨基酸序列或其保守修饰的氨基酸序列。

[0150] 文中所用的术语“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变含该氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸替代、添加和缺失。可以通过本领域公知的技术，如定点诱变和PCR介导的诱变，向本发明的抗体中引入修饰。保守氨基酸替代是指将氨基酸残基替代为一个具有相似侧链的氨基酸残基。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已经定义。这些家族包括：具有碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、 $\beta$ -分支侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳族侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。因此，本发明抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以被替代为来自相同侧链家族的其他氨基酸残基，并且可以用本文所述的功能试验检测改变的抗体保留的上述功能。

[0151] 本发明的抗体还可以如下制备：用具有此处所公开的一种或多种VH和/或VL序列的抗体作为起始材料，工程化一种修饰的抗体，该修饰的抗体可能具有与起始抗体相比改变的特性。可以通过修饰一个或两个可变区（即VH和/或VL）例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个骨架区内的一个或多个残基来工程化一种抗体。另外，可以通过修饰恒定区内的残基来工程化抗体，例如改变该抗体的效应功能。

[0152] 可以进行的一种类型的可变区工程化是CDR移植。抗体主要是通过位于六个重链和轻链互补决定区（CDR）中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因，CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列在各个抗体之间更加多样化。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用，因此通过构建如下的表达载体可以表达模拟该特定天然存在抗体的特性的重组抗体：该表达载体包含来自特定天然存在抗体的CDR序列，该CDR序列被移植到来自具有不同特性的不同抗体的骨架序列上（参见，例如，Riechmann, L. 等（1998）*Nature* 332:323-327 Jones, P. 等（1986）*Nature* 321:522-525；Queen, C. 等（1989）*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033）。

[0153] 因此，本发明的另一个实施方案涉及一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含：含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区，该CDR1、CDR2和CDR3序列分别包含选自序列3和序列13、序列4和序列14；以及序列5和序列15所示的氨基酸序列，以及含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区，该CDR1、CDR2和CDR3序列分别包含选自序列8和序列18、序列9和序列19，以及序列10和序列20所示的氨基酸序列。因此，这些抗体含有单克隆抗体10C2和10C9的VH和VL CDR序列，但是可能含有与这些抗体不同的骨架序列。这些骨架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或发表的参考文献中获得。例如，人重链和轻链可变区

基因的种系DNA序列可以在以下资源中获得：“VBase”人种系序列数据库(可从因特网上www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得),以及Kabat,E.A.等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242;Tomlinson,I.M.等(1992)“The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops(人种系Vh序列的全部组成成分揭示了具有不同高变环的大约50个VH区段组)”J.Mol.Biol.227:776-798;Cox,J.P.L.等(1994)“ADirectory of Human Germline Vh Segments Reveals a Strong Bias in their Usage(人种系Vh区段目录揭示其应用的强烈偏好)”Eur.J.Immunol.24:827-836。

[0154] 另一种类型的可变区修饰是将VH和VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸序列突变,从而改善目标抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变,以引入突变,对抗体结合的影响,或者其他目标功能特性,可以用文中所述以及在实施例中提供的试验来评价。优选引入(如上文所述的)保守序列修饰。突变可以是氨基酸替代、添加或缺失,但是优选替代。而且,一般在CDR区内改变不超过5个残基。

[0155] 因此,在另一个实施方案中,本发明提供分离的抗IFN A R1单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含的重链可变区含有:

[0156] (a) VH CDR1区,其包含选自序列3和序列13所示的氨基酸序列,或与选自序列3和序列13所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4或5个氨基酸替代、缺失或添加的氨基酸序列;

[0157] (b) VH CDR2区,其包含选自序列4和序列14所示的氨基酸序列,或与选自序列4和序列14所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4或5个氨基酸替代、缺失或添加的氨基酸序列;

[0158] (c) VH CDR3区,其包含选自序列5和序列15所示的的氨基酸序列,或与选自序列5和序列15所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4或5个氨基酸替代、缺失或添加的氨基酸序列;

[0159] (d) VL CDR1区,其包含选自序列8和序列18的氨基酸序列,或与选自序列8和序列18所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4或5个氨基酸替代、缺失或添加的氨基酸序列;

[0160] (e) VL CDR2区,其包含选自序列9和序列19所示的的氨基酸序列,或与选自序列9和序列19所示的的氨基酸序列相比具有1、2、3、4或5个氨基酸替代、缺失或添加的氨基酸序列;

[0161] (f) VL CDR3区,其包含选自序列10和序列20所示的氨基酸序列,或与选自序列10和序列20所示的氨基酸序列相比具有1、2、3、4或5个氨基酸替代、缺失或添加的氨基酸序列。

[0162] 本发明的工程化抗体包括例如为了改善抗体性质而对其VH和/或VL内的骨架残基进行了修饰的抗体。进行这样的骨架修饰一般是为了降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是将一个或多个骨架残基“回复突变”为相应的种系序列。更特别地,经历体细胞突变的抗体可含有与衍生该抗体的种系序列不同的骨架残基。通过比较抗体骨架序列与衍生该抗体的种系序列,可以鉴定这些残基。

[0163] 另一种类型的骨架修饰涉及对骨架区内、或者甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基进行突变,以除去T细胞表位,从而降低该抗体的潜在的免疫原性。

[0164] 除了在骨架区或CDR区内进行修饰以外,或者作为它的替代,本发明的抗体可以被

工程化为包括Fc区内的修饰,一般是为了改变该抗体的一种或多种功能特性,如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,也可以化学修饰本发明的抗体(例如一个或多个化学部分可以连接到该抗体上),或者修饰改变其糖基化,以改变该抗体的一种或多种功能特性。

[0165] 利用本发明的抗IFN A R1抗体,如10C2和10C9的结构特征产生结构上相关的抗IFN A R1抗体,该结构相关的抗体保留本发明抗体的至少一种功能特性,如结合IFN A R1。例如,10C2或10C9的一个或多个CDR区,可以与已知的骨架区和/或其他CDR重组组合,产生另外的重组工程化的本发明的抗IFN A R1抗体。其他类型的修饰包括以上部分所述的修饰。用于工程化方法的起始材料是此处提供的一种或多种VH和/或VL序列,或其一个或多个CDR区。为了产生工程化抗体,不一定实际制备(即表达为蛋白质)具有此处提供的一种或多种VH和/或VL序列或其一个或多个CDR区的抗体。而是用该序列中所含的信息作为起始材料,产生源自原始序列的“第二代”序列,然后制备该“第二代”序列,并将其表达为蛋白质。

[0166] 上述制备工程化IFN A R1抗体的方法,包括如下步骤:

[0167] (a) 提供如下序列: (i) 重链可变区抗体序列,其包含选自序列3和序列13的CDR1序列、序列4和序列14的CDR2序列,和选自序列5和序列15的CDR3序列;和(ii) 轻链可变区抗体序列,其包含选自序列8和序列18的CDR1序列、序列9和序列19的CDR2序列,和选自序列10和序列20的CDR3序列;

[0168] (b) 改变第一抗体序列和/或第二抗体序列内的至少一个氨基酸残基,从而产生至少一个改变的抗体序列;和

[0169] (c) 制备该改变的抗体序列;和

[0170] (d) 将该改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0171] 可以利用常规分子生物学技术制备和表达改变的抗体序列。优选地,由改变的抗体序列编码的抗体保留如下所述的抗IFN A R1抗体的一种、一些或全部功能特性:结合IFN A R1;抑制I型干扰素与IFN A R1的结合;结合表达人IFN A R1的细胞;在表达IFNAR1细胞上抑制I型干扰素的生物活性;在经过刺激剂刺激的PBMC上抑制I干扰素的生物活性。

[0172] 改变的抗体的功能特性可以用本领域中可使用的和/或本发明所述的试验来评价。

[0173] 在工程化本发明抗体的方法的某些实施方案中,可以沿全部或部分抗IFN A R1抗体编码序列(例如10C2或10C9编码序列)随机或选择性地引入突变,并可以对结合活性和/或如本发明所述的其他功能特性筛选获得修饰的抗IFN A R1抗体。突变方法在本领域中已经描述。例如,Short的PCT公布W002/092780记载了利用饱和诱变、合成连接装配或其组合产生和筛选抗体突变的方法。

[0174] 本发明的第八个目的是提供一种人源化抗体。

[0175] 本发明提供的人源化抗体是将上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分进行人源化后得到的抗体。

[0176] 可用本领域公知的重组DNA技术将本发明的单克隆抗体人源化,或制备成嵌合抗体。为了产生嵌合抗体,可以利用本领域公知的方法将鼠可变区连接到人恒定区上。制备嵌合抗体的方法,例如,参见Morrison等,Proc.Natl.Acad.ScL U.S.A.81:6851,1985;Takeda等,Nature 314:452,1985,Cabilly等,U.S.Patent No.4,816,567;Boss等U.S.Patent



No.4,816,397;Tanaguchi等,European Patent Publication EP171496;European Patent Publication 0173494,United Kingdom Patent GB 2177096B,在此全部引入作为参考。抗体的人源化涉及将非人抗体结合位点移植到人抗体上。可将非人类抗体的CDR移植到人抗体的骨架区和人抗体的恒定区,或者通过将某些暴露的氨基酸残基替代成人抗体表面而将整个非人类抗体的可变区隐藏。制备人源化抗体的细节在U.S.Pat.No.5,472,693中描述。

[0177] 也可用表达人重链和轻链基因,但是能表达内源性小鼠免疫球蛋白的重链和轻链基因的转基因小鼠制备人源化抗体。Winter描述了可用于制备人源化抗体的CDR-移植方法(U.S.Patent No.5,225,539)。可以用至少部分非人CDR替代特定人抗体的所有CDRs,或者仅用非人CDRs替代一些人CDRs。仅需要将人源化抗体与特定抗原需要的CDRs替代。

[0178] 可以用来源于人Fv可变区的等同序列替代没有直接涉及抗原结合的Fv区的序列制备人源化抗体或其片段。Morrison(1985) *Science* 229:1202-1207; Oi等(1986) *BioTechniques* 4:214; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; 和US 6,407,213提供了产生人源化抗体或其片段的实例。这些方法包括从编码至少一个重链或轻链的所有或部分免疫球蛋白Fv可变区分离、操作和表达核酸序列。这些核酸可从产生针对如上所述特定靶的杂交瘤或其他来源获得。可以将编码人源化抗体分子的重组DNA克隆至合适的表达载体中。

[0179] 在一些实施方案中,可以引入保守替代、共有序列替代、胚系替代和/或回复突变将人源化抗体进行优化。这些改变的免疫球蛋白分子可以通过本领域公知的技术获得(例如,Teng等, *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.*, 80:7308-7312,1983; Kozbor等, *Immunology Today*, 4:7279,1983; Olsson等, *Meth.Enzymol*, 92:3-16,1982)。一般地,进行保守替代,可以使用人胚系抗体序列中常用的氨基酸。Tomlinson等(1992) *J.MoI Biol.* 227:776-798; Cook, G.P等(1995) *Immunol.Today Vol.16* (5):237-242; Chothia, D等(1992) *J.MoI Biol.* 227:799-817; Tomlinson等(1995) *EMBO J.* 14:4628-4638中公开了人胚系序列中常用的氨基酸。这些序列可以作为人序列如骨架区和CDR的来源。

[0180] 可以使用本领域公知的方法,如噬菌体展示技术产生人抗体。噬菌体展示技术通过克隆抗体基因文库,并选择结合需要的靶,如IFNAR1的SD2,SD3中的表位模拟哺乳动物免疫系统。噬菌体展示技术中使用的文库可以从多种来源制备。例如,通过接种或疾病而暴露于目的抗原产生的免疫文库,即使相对较小,也具有针对抗原的高水平的循环抗体。从非免疫的个体中分离的mRNA制备的naive文库,可被重复用于分离针对多种抗原的抗体。另外,体外克隆和组合排列的胚系抗体基因片段组成的编码完全VH和VL链的重组基因的合成文库,具有产生针对自身抗原的抗体的优势。通过在CDR环中筛选一个或多个抗体骨架和随机序列,可制备半合成文库。

[0181] 在噬菌体展示技术中,一旦产生文库,就与噬菌体表面蛋白发生融合。通过淘筛,展示针对目的抗原特异的抗体的噬菌体被选择性的吸附到固相抗原上而被富集。随后,结合的噬菌体可从表面洗脱下并通过感染大肠杆菌细胞进行扩大培养。

[0182] 产生人源化抗体的噬菌体展示技术的其他改进也是本领域已知的。例如,在微生物细胞例如大肠杆菌和酿酒酵母,而不是在噬菌体表面展示抗体。在这种情况下,可以与缓冲液中荧光标记的配体孵育进行筛选。展示结合配体的抗体的细胞被荧光标记,可通过荧光激活的细胞分选将细胞分离出来。另一种修饰,核糖体展示,依赖于在核糖体、mRNA和多

肽之间形成三元复合物。

[0183] 本领域已知的另一产生人抗体的方法是使用转基因小鼠。这些小鼠中的免疫球蛋白库被鼠染色体中人V基因替代。可以用需要的抗原注射这些小鼠,通过在免疫文库,或者通过常规的杂交瘤技术中克隆和筛选获得产生的抗体。这些小鼠产生大量的仅在糖基化图式中不同的完全的人抗体。

[0184] 本发明的第九个目的是提供一种双特异性分子。

[0185] 本发明提供的双特异性分子含有上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分的特异性结合位点。

[0186] 本发明提供的含有上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分的特异性结合位点的双特异性分子可将本发明的抗体或其抗原结合部分衍生化或连接到另一功能性分子上,如另一种肽或蛋白质(例如另一种抗体或受体的配体)上,以生成可与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。可以将本发明的抗体衍生化或连接到一种以上的其他功能性分子上,以生成可与两个以上不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;这样的多特异性分子也包括在此处所用的术语“双特异性分子”内。为了产生本发明的双特异性分子,本发明的抗体可与一种或多种其他结合分子如其他抗体、抗体片段、肽或结合模拟物功能性连接(如通过化学偶联、基因融合、非共价结合等),从而得到双特异性分子。

[0187] 本发明的第十个目的是提供与上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分相关的生物材料。

[0188] 本发明提供的与上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分相关的生物材料为下述A1)至A12)中的任一种:

[0189] A1) 编码上述IFN A R1的单克隆抗体或其抗原结合部分的核酸分子;

[0190] A2) 含有A1)所述核酸分子的表达盒;

[0191] A3) 含有A1)所述核酸分子的重组载体;

[0192] A4) 含有A2)所述表达盒的重组载体;

[0193] A5) 含有A1)所述核酸分子的重组微生物;

[0194] A6) 含有A2)所述表达盒的重组微生物;

[0195] A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物;

[0196] A8) 含有A4)所述重组载体的重组微生物;

[0197] A9) 含有A1)所述核酸分子的转基因细胞系;

[0198] A10) 含有A2)所述表达盒的转基因细胞系;

[0199] A11) 含有A3)所述重组载体的转基因细胞系;

[0200] A12) 含有A4)所述重组载体的转基因细胞系。

[0201] 上述核酸分子可以存在于完整细胞、细胞裂解物中,或以部分纯化或基本纯化的形式存在。当通过常规技术,包括碱/SDS处理、CsCl显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域公知的其他方法,从其他细胞成分或其他污染物例如其他细胞核酸或蛋白质中分离纯化时,该核酸是“分离的”或“基本上纯的”。参见,F.Ausubel等编著(1987)Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing and Wiley Interscience,New York。本发明的核酸可以是例如DNA或RNA,并且可以含有或者可以不含内含子序列。在一个优选实施方案中,该核酸是cDNA分子。

[0202] 本发明的核酸分子可以利用常规分子生物学技术获得。对于杂交瘤表达的抗体，编码通过杂交瘤制备的抗体轻链和重链的cDNA可以用PCR扩增或cDNA克隆技术获得。对于从免疫球蛋白基因文库中获得的抗体（例如使用噬菌体展示技术），编码抗体的核酸可以从文库中获得。

[0203] 本发明优选的核酸分子是编码10C2和10C9单克隆抗体的VH和/或VL序列的核酸分子。编码10C2的VH和VL序列的DNA序列分别显示在序列1和序列6中。编码10C9的VH和VL序列的DNA序列分别显示在序列11和序列16中。

[0204] 一旦获得编码VH和/或VL的DNA片段，即可通过重组DNA技术进一步操作这些DNA片段，例如将可变区基因转化为全长抗体链基因，转化为Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中，将编码VH和/或VL的DNA片段与编码另外一种蛋白质如抗体恒定区或柔性接头的另一种DNA片段可操作连接。如在本文中使用的术语“可操作连接 (operatively linked)”意思是两个DNA片段连接在一起，使得这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在阅读框内。

[0205] 通过将编码VH的DNA与编码重链恒定区 (CH1、CH2和CH3) 的另外一种DNA分子可操作连接，可以将编码VH区的分离的DNA转化为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在本领域中公知（参见，例如，Kabat, B.A. 等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242），包括这些区域的DNA片段可以通过PCR扩增获得。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区，但是最优选的是IgG1或IgG2a恒定区。对于Fab片段重链基因，编码VH的DNA可以与只编码重链CH1恒定区的另外一种DNA分子可操作连接。

[0206] 通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的另外一种DNA分子可操作连接，可以将编码区的分离的DNA转化为全长轻链基因（以及Fab轻链基因）。人轻链恒定区基因的序列在本领域中公知（参见，例如，Kabat, B.A. 等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 出版号 91-3242），包括这些区域的DNA片段可以通过PCR扩增获得。轻链恒定区可以是 $\kappa$ 或 $\lambda$ 恒定区，但是最优选的是 $\kappa$ 恒定区。

[0207] 为了产生scFv基因，将编码VH和VL的DNA片段与编码柔性接头例如编码氨基酸序列 (Gly4-Ser) 3的另外一种片段可操作连接，使得VH和VL序列可以表达为连续的单链蛋白质，其VH和VL区通过柔性接头连接（参见，例如Bird等 (1988) Science 242:423-426; Huston等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty等 (1990) Nature 348:552-554）。

[0208] 本发明的第十一个目的是提供一种制备抗IFN A R1抗体的方法。

[0209] 本发明提供的制备抗IFN A R1抗体的方法，包括：

[0210] 1) 提供：

[0211] (i) 重链可变区抗体序列，其含有选自序列3或序列13的CDR1序列，选自序列4或序列14的CDR2序列，和选自序列5或序列15的CDR3序列；

[0212] 或 (ii) 轻链可变区抗体序列，其含有选自序列8或序列18的CDR1序列，选自序列9或序列19的CDR2序列，和选自序列10或序列20的CDR3序列；

[0213] 2) 改变至少一个可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基，所述序列选自所述重链可变区抗体序列和所述轻链可变区抗体序列，从而产生至少一个改变的抗体序列；

[0214] 3) 将所述改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0215] 本发明的单克隆抗体通过权威的单克隆抗体制备方法(例如, Paterson, H.M.V.a.Y. (Jone Wiley and Sons, Inc. New York, 1995). Production of Antibodies. Current Protocols in Immunology) 制备得到。制备杂交瘤优选的动物是小鼠。用小鼠产生杂交瘤是非常完善确立的程序。免疫程序和用于融合的免疫脾细胞的分离技术是本领域公知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合方法也是公知的。

[0216] 在制备本发明的单克隆抗体的小鼠免疫步骤中, 可以用纯化的或富集的IFN A R1 抗原制剂和/或表达IFN A R1的细胞免疫小鼠。优选地, 用表达IFNAR1的小鼠细胞免疫小鼠。第一次输注时小鼠为6-8周龄。例如, 可以使用纯化的或富集的IFN A R1 抗原制剂(5-50 $\mu$ g) 腹膜内免疫小鼠, 或使用表达IFN A R1的小鼠细胞腹膜内免疫小鼠, 优选使用表达IFN A R1的小鼠细胞与免疫佐剂, 例如, CpG-B混合腹膜内免疫小鼠, 促进免疫应答, 可以多次免疫小鼠, 例如3次, 4次或5次免疫小鼠, 时间间隔3周或4周, 最后一次免疫后3天, 4天或5天后取小鼠脾细胞或淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞进行融合。

[0217] 在制备产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞的步骤中, 从接受免疫的小鼠中分离脾细胞和/或淋巴结细胞, 并且与合适的无限增殖细胞系例如小鼠骨髓瘤细胞系融合。根据抗原特异性抗体的产生筛选得到杂交瘤。例如, 使用50%聚乙二醇(PEG), 将来自被免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与三分之一数目的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0融合。细胞以大约 $2 \times 10^5$ 接种于平底微量滴定板, 接着在含有10%胎牛血清, 4mM L-谷氨酰胺, 1mM丙酮酸钠, 5mM HEPES, 50单位/mL青霉素, 50mg/mL链霉素, 和1X HAT (Sigma; 融合24小时后加入HAT) 的选择性培养基中温育10天。大约10天之后, 筛选分泌IFNAR1抗体的杂交瘤细胞。

[0218] 在制备产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞筛选的步骤中, 通过构建表达人IFNAR1胞外区的真核表达载体转染HEK293T细胞系得到用于筛选杂交瘤分泌的IFNAR1抗体的报告细胞系, 该细胞系稳定表达GFP。如果杂交瘤细胞分泌IFNAR1抗体, 抗体与细胞表达的IFNAR1胞外区结合, 再加入荧光素PE标记的抗鼠IgG抗体, 则该细胞可发出绿色荧光和黄色荧光。使用流式细胞仪分析细胞的GFP与PE信号, 可筛选到分泌IFNAR1抗体的杂交瘤。通过构建的稳定表达IFNAR1胞外区的报告细胞系筛选各孔的单克隆IgG抗体。一旦发生广泛的杂交瘤生长, 则通常在10-14天之后对杂交瘤细胞进行筛选。对分泌IFNAR1抗体的杂交瘤细胞利用有限稀释法进行亚克隆, 再次筛选。如果对于人IFNAR1仍然是阳性, 则通过有限稀释将单克隆抗体至少亚克隆两次。然后体外培养稳定的亚克隆, 在组织培养基中产生少量抗体用于表征。

[0219] 为了纯化单克隆抗体, 选择的杂交瘤可以在用于单克隆抗体纯化的两升旋转摇瓶中生长。过滤上清液, 浓缩, 之后用NAb Protein G Spin Column (GE) 进行亲和层析。洗脱下来的IgG通过凝胶电泳和高效液相色谱法检查以确保纯度。通过BCA蛋白定量法(Pierce) 测定浓度。将单克隆抗体分成等份并且在-80 $^{\circ}$ C下保存。

[0220] 为了测定筛选到的结合IFNAR1表达细胞的单克隆抗体是否阻止I型干扰素的结合并阻断其下游信号转导的能力, 将杂交瘤培养上清液与本发明构建的I型干扰素信号报告细胞37 $^{\circ}$ C孵育30分钟至2小时, 优选30分钟, 1小时, 2小时, 更优选1小时, 然后加入适量, 如1ng/ml至1 $\mu$ g/ml, 优选1ng/ml至500ng/ml, 进一步优选1ng/ml至100ng/ml, 具体为1ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 30ng/ml, 40ng/ml, 50ng/ml, 更优选10ng/ml的I型干扰素。继续培养一定

时间,如18-36小时,优选20-28小时,更优选24小时后,通过流式细胞仪分析报告细胞中GFP的表达。使细胞中GFP表达低的样品为阻断人I型干扰素受体的抗体,通过如上所述的方法,获得了既结合人IFNAR1,又可以阻断I型干扰素信号的抗体10C2和10C9。

[0221] 本发明的单克隆抗体是通过权威的单克隆抗体制备方法制备得到的,除了通过在体内或体外扩增杂交瘤细胞获得鼠抗人IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9,还可以将本发明的抗体的编码基因利用传统的分子克隆方法克隆到真核表达载体,通过真核表达纯化的方法获得抗体。具体步骤如下:

[0222] 真核表达载体构建的方法包括如下步骤:

[0223] 将序列1所示的DNA分子利用分子克隆的方法插入含有CMV启动子和筛选基因puromycin的真核表达载体(例如pCMV或pcDNA3.1),得到表达单克隆抗体10C2重链的质粒;

[0224] 将序列6所示的DNA分子利用分子克隆的方法插入含有CMV启动子和筛选基因puromycin的真核表达载体(例如pCMV或pcDNA3.1),得到表达单克隆抗体10C2轻链的质粒;

[0225] 或,

[0226] 将序列11所示的DNA分子利用分子克隆的方法插入含有CMV启动子和筛选基因puromycin的真核表达载体(例如pCMV或pcDNA3.1),得到表达单克隆抗体10C2轻链的质粒;

[0227] 将序列16所示的DNA分子利用分子克隆的方法插入含有CMV启动子和筛选基因puromycin的真核表达载体(例如pCMV或pcDNA3.1),得到表达单克隆抗体10C2轻链的质粒;

[0228] 重组细胞的构建方法包括如下步骤:将表达单克隆抗体10C2重链的质粒和表达单克隆抗体10C2轻链的质粒按照摩尔比为1:1的比例,使用Lipofectamine2000 (Invitrogen)转染入哺乳动物细胞(例如CHO细胞或HEK293T细胞),并通过抗性基因筛选获得稳定表达单克隆抗体10C2的细胞株;

[0229] 或,

[0230] 将表达单克隆抗体10C9重链的质粒和表达单克隆抗体10C9轻链的质粒按照摩尔比为1:1的比例,使用Lipofectamine2000 (Invitrogen)转染入哺乳动物细胞(例如CHO细胞或HEK293T细胞),并通过抗性基因筛选获得稳定表达单克隆抗体10C9的细胞株;

[0231] 单克隆抗体的体外表达与纯化的方法包括如下步骤:分别扩大培养表达IFNAR1单克隆抗体10C2的细胞株和表达IFNAR1单克隆抗体10C9的细胞株,并收集培养上清;过滤上清,浓缩之后用NAb Protein G Spin Column (GE)进行亲和层析,得到纯化后的单克隆抗体。洗脱下来的IgG通过凝胶电泳和高效液相色谱法检查以确保纯度,并通过BCA蛋白定量法(Pierce)测定浓度,将单克隆抗体分成等份并且在-80℃下保存。

[0232] 本发明的第十二个目的是提供一种抑制I型干扰素对表达IFNAR1的细胞的生物活性的方法。

[0233] 本发明提供一种抑制I型干扰素对表达IFNAR的细胞的生物活性的方法,包括使所述细胞接触本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分,使得I型干扰素的生物活性受到抑制。

[0234] 本发明的第十三个目的是提供一种治疗I型干扰素介导的疾病的方法。

[0235] 本发明提供的治疗I型干扰素介导的疾病的方法包括向患有I型干扰素介导的疾病的受试者施用上述IFNAR1的单克隆抗体或其抗原结合部分,使该受试者中I型干扰素介导的疾病得到治疗。

[0236] 上述方法中,所述I型干扰素介导的疾病是干扰素 $\alpha$ 介导的疾病,所述疾病或病症

为如下任一种：系统性红斑狼疮、胰岛素依赖型糖尿病、炎性肠病、多发性硬化症、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、类风湿性关节炎和肾小球肾炎、HIV感染或AIDS和植排斥或移植物抗宿主疾病。

[0237] 本发明的抗体(和免疫偶联物和双特异性分子)可以用于检测IFN A R1的水平或表达IFN A R1的细胞的水平。例如,这可以如下实现:使样品(如体外样品)和对照样品在允许该抗体和IFN A R1之间形成复合物的条件下接触抗IFN A R1抗体。检测在抗体和IFN A R1之间形成的任何复合物,并在样品和对照之间进行比较。例如,可以用本发明的组合物进行本领域公知的检测方法,如ELISA和流式细胞试验。

[0238] 本发明进一步提供检测样品中IFN A R1(例如人IFN A R1抗原)的存在,或测定IFN A R1的量的方法,包括在允许抗体或其部分与IFN A R1之间形成复合物的条件下使样品和对照样品接触特异性结合IFN A R1的本发明的抗体或其抗原结合部分。然后检测复合物的形成,其中样品与对照样品之间复合物形成的不同表示样品中存在IFN A R1抗原。

[0239] IFN A R1是I型干扰素的细胞受体的一部分,众所周知I型干扰素是与T细胞分化、抗体产生和记忆T细胞活性和存活有关的免疫调节细胞因子。而且,在许多自身免疫病、HIV感染、移植排斥和移植物抗宿主病(GVHD)中已经描述了I型干扰素的表达提高。因此,抑制I型干扰素功能活性的本发明的抗IFN A R1抗体(和免疫偶联物和双特异性分子)可以用于与异常或不希望的I型干扰素活性有关的多种临床适应症。因此,本发明提供一种抑制I型干扰素介导的疾病或病症的方法,其中该方法包括施用本发明的抗体或其抗原结合部分(或本发明的免疫偶联物或双特异性分子),使I型干扰素介导的疾病或病症得到治疗。

[0240] 可以应用本发明的抗体治疗的自身免疫病的具体例子包括但不限于:系统性红斑狼疮(SLE)、胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、炎性肠病(IBD)(包括克罗恩病、溃疡性结肠炎和乳糜泻)、多发性硬化症(MS)、牛皮癣、自身免疫性甲状腺炎、类风湿性关节炎(RA)和肾小球肾炎。此外,本发明的抗体组合物能够用于抑制或预防移植排斥或用于治疗移植物抗宿主疾病(GVHD)或治疗HIV感染/AIDS。在系统性红斑狼疮(SLE)患者的血清中观察到高水平的IFN $\alpha$ (参见,例如, Kim等(1987) Clin. Exp. Immunol. 70:5662-569)。而且,例如在癌症或病毒性感染治疗中的IFN $\alpha$ 给药已经显不诱发SLE(Garcia-Porrúa等(1998) Clin. Exp. Rheumatol. 16:107-108)。因此,在另一个实施方案中,本发明的抗IFN A R1抗体可以通过对需要治疗的受试者施用抗体用于治疗SLE。该抗体可以单独使用或者与其他抗SLE药物如非甾体抗炎药(NSAID)、镇痛药、皮质类固醇(例如强的松、氢化可的松)、免疫抑制剂(如环磷酰胺、硫唑嘌呤和氨甲喋呤)、抗疟药(如羟氯喹)和抑制产生dsDNA抗体的生物药物(例如LJP394)组合使用。

[0241] IFN $\alpha$ 也与I型糖尿病的病理学有关。例如,已经报道了在I型糖尿病患者的胰岛 $\beta$ 细胞中存在免疫反应性IFN $\alpha$ (Foulis等(1987) Lancet 2:1423-1427)。在抗病毒治疗中长期使用IFN $\alpha$ 也显不诱发I型糖尿病(Waguri等(1994) Diabetes Res. Clin. Pract. 23:33-36)。因此,在另一个实施方案中,本发明的抗-IFN A R1抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗I型糖尿病。该抗体可以单独使用或者与其他抗糖尿病药物如胰岛素组合使用。

[0242] IFN A R的抗体已经证明在炎性肠病动物模型中有效(参见美国专利申请60/465, 155)。因此,本发明的抗IFN A R1抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗炎

性肠病 (IBD), 包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。该抗体可以单独使用或者与其他抗IBD药物如含有美沙拉秦的药物 (包括柳氮磺吡啶和含有5-氨基水杨酸 (5-ASA) 的其他药物, 如奥沙拉秦和巴柳氮)、非留体抗炎药 (NSAID)、镇痛药、皮质类固醇 (例如强的松、氢化可的松)、TNF 抑制剂 (包括 adalimumab (Humira®)、依那西普 (Enbrel®) 和英夫利昔单抗 (Remicade))、免疫抑制剂 (如6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤和环孢素A) 和抗生素组合使用。

[0243] 已经发现用IFN $\alpha$ 治疗可诱发自身免疫性甲状腺炎 (Monzani等 (2004) Clin. Exp. Med. 3:199-210; Prummel和Laurberg (2003) Thyroid 13:547-551)。因此, 在另一个实施方案中, 本发明的抗IFN A R1抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗自身免疫性甲状腺病, 包括自身免疫性原发性甲状腺功能减退症、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎和伴有甲状腺功能减退的破坏性甲状腺炎。该抗体可以单独使用或者与其他药物或治疗如抗甲状腺药物、放射性碘和甲状腺次全切除术组合使用。

[0244] 在RA患者血清中已经观察到水平升高的I型干扰素, 特别是IFN- $\beta$  (参见例如 Hertzog等 (1988) Clin. Immunol. Immunopath. 48:192)。因此, 在一个实施方案中, 本发明的抗IFN A R1抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗RA。该抗体可以单独使用或者与一种或多种其他抗RA药物如非留体抗炎药 (NSAID)、COX-2抑制剂、镇痛药、皮质类固醇 (例如强的松、氢化可的松)、免疫抑制剂 (如氨甲喋呤)、B细胞消耗剂 (例如Rituxan™)、B细胞激动剂 (例如LymphoStat-B™) 和抗TNF- $\alpha$ 剂 (例如EMBREL™、HUMIRA® 和 REMICADE™) 组合使用。

[0245] 曾经报道IFN $\alpha$ 给药使牛皮癣恶化。因此, 在另一个实施方案中, 本发明的抗IFN A R1抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗牛皮癣和牛皮癣性关节炎。该抗体可以单独使用或者与一种或多种其他抗牛皮癣治疗如光疗、局部治疗 (例如局部糖皮质激素) 或全身治疗 (例如氨甲喋呤、合成类维生素A、环孢素)、抗TNF- $\alpha$ 剂 (例如EMBREL™、HUMIRA® 和 REMICADE™) 和T细胞抑制剂 (例如Raptiva™) 组合使用。在HIV感染患者的循环中也曾经观察到高水平的IFN $\alpha$ , 并且它的存在是AIDS进展的预测性标记 (DeStefano等 (1982) J. Infect. Diseases 146:451; Vadhan\_Raj等 (1986) Cancer Res. 46:417)。因此, 在另一个实施方案中, 本发明的抗-IFN A R1抗体用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗HIV感染或AIDS。该抗体可以单独使用或者与其他抗HIV剂如核苷逆转录酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和融合抑制剂组合使用。

[0246] 已经证明IFN A R1的抗体在抑制同种异体移植排斥和延长同种异体移植存活期中有效 (参见, 例如, Tovey等 (1996) J. Leukoc. Biol. 59:512-517; Benizri等 (1998) J. Interferon Cytokine Res. 18:273-284)。因此, 本发明的抗IFN A R1抗体也可以用于移植接受者, 以抑制同种异体移植排斥和/或延长同种异体移植存活期。本发明提供一种通过对需要治疗的移植接受者施用本发明的抗IFN A R1抗体来抑制移植排斥的方法。可以治疗的组织移植的例子包括但不限于: 肝、肺、肾、心脏、小肠和胰岛细胞, 以及移植抗宿主病 (GVHD) 的治疗。该抗体可以单独使用或者与其他抑制移植排斥的药物如免疫抑制剂 (例如环孢素、硫唑嘌呤、甲基强的松龙、强的松龙、强的松、麦考酚酸莫酯、西罗莫司、雷帕霉素、他克莫司)、抗感染剂 (例如阿昔洛韦、克霉唑、更昔洛韦、制霉菌素、复方新诺明)、利尿剂 (例如布美他尼、呋塞米、美托拉宗) 和溃疡药物 (例如西咪替丁、法莫替丁、兰索拉唑、奥美拉唑、雷尼替丁、硫糖铝) 组合使用。

[0247] 本发明涉及结合IFN A R1并且能够阻断I型干扰素作用的分离的小鼠单克隆抗体,以及含有本发明的抗体的免疫偶联物和双特异性分子、含有本发明的抗体、免疫偶联物或双特异性分子的药物组合物。本发明还涉及使用这些抗体与表达IFN A R1的细胞上的IFN A R1结合,抑制I型干扰素的信号,用于治疗患者的免疫介导的疾病,包括自身免疫病、移植排斥和移植物抗宿主病(GVHD)的方法。

[0248] 为了使本发明更容易理解,首先定义了一些术语。术语“干扰素 $\alpha$ 受体1”、“IFN A R1”和“IFN A R1抗原”可互换使用,包括人IFN A R1的变体、同种型、种同源物,和与IFN A R1具有至少一个共同表位的类似物。因此,本发明的抗体在某些情况下可以与来自人类以外的物种的IFN A R1交叉反应,或者与在结构上与人IFN A R1相关的其他蛋白质(例如人IFN A R1同源物)交叉反应。在其他情况下,抗体可能对小鼠IFN A R1是完全特异性的,不表现物种或其他类型的交叉反应性。

[0249] 人IFN A R1的完整cDNA序列的Genebank登记号为NM\_000629。

[0250] 文中所用的术语“I型干扰素”是指I型干扰素分子家族的成员,它们是IFN A R1的配体(即,能够结合IFN A R1的分子的I型干扰素家族的成员)。I型干扰素配体的例子有IFN $\alpha$  1、2a、2b、4、5、6、7、8、10、14、16、17、21、干扰素 $\beta$ 和干扰素 $\omega$ 。

[0251] 术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和由上述细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用,导致选择性损伤、破坏或从人体中清除侵入的病原体感染了病原体的细胞或组织、癌细胞,或在自身免疫或病理性炎症的情况下,正常人细胞或组织。

[0252] “信号转导途径”是指在信号从细胞的一部分传送到细胞的另一部分中起作用的多种信号转导分子之间的生化关系。文中所用的,短语“细胞表面受体”包括,例如,能够接收信号和跨细胞质膜传播这种信号的分子和分子复合物。本发明的“细胞表面受体”的一个例子是IFN A R1受体。

[0253] 这里提到的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。“抗体”是指包含通过二硫键互相连接在一起的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在此缩写为VH)和重链恒定区区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(在此缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。VH和VL区可进一步再分为高变区,称为互补决定区(CDR),CDR散布在被称为骨架区(FR)的更加保守的区域中。VH和VL均由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基端至羧基端以如下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。重链和轻链的可变区含有可与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括与免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补系统的第一成分(C1q)的结合。

[0254] 文中所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)是指保留特异性结合抗原(例如IFN A R1)的能力的抗体的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来行使。术语抗体的“抗原结合部分”中所包括的结合片段的例子包括:(i) Fab片段,即由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,即包含在铰链区处通过二硫键连接的两个Fab片段的双价片段;(iii) 由VH和CH结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等



(1989) Nature 341:544-546); 和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分别的基因编码, 但是它们可以利用重组方法通过合成接头连接在一起, 从而能够将它们制成一条蛋白质链, 其中 VL 和 VH 区配对构成单价分子 (称为单链 Fv (scFv)); 参见, 例如 Bird 等 (1988) Science 242:423-426; 和 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。这种单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些抗体片段用本领域技术人员公知的常规技术获得, 并用与完整抗体相同的方法对这些片段进行实用性筛选。

[0255] 文中所用的, “分离的抗体”是指基本不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体 (例如, 特异性结合 IFN $\alpha$  R1 的分离的抗体基本不含特异性结合 IFN $\alpha$  R1 以外抗原的抗体)。但是, 特异性结合 IFN $\alpha$  R1 的分离的抗体与其他抗原如来自其他物种的 IFN $\alpha$  R1 分子可能具有交叉反应性。而且, 分离的抗体可能基本不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0256] 文中所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有单一分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一的结合特异性和亲和性。

[0257] 文中所用的术语“受试者”包括任何人或非人类动物。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 如非人类灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖类动物、爬行类动物等。

[0258] 本发明的抗体 (和免疫偶联物和双特异性分子) 一方面, 可以用于检测 IFN $\alpha$  R1 的水平或表达 IFN $\alpha$  R1 的细胞的水平, 或检测样品中 IFN $\alpha$  R1 的存在, 或测定 IFN $\alpha$  R1 的量; 另一方面, 本发明的抗体 (和免疫偶联物和双特异性分子) 还具有体外和体内诊断和治疗应用, 包括施用本发明的抗 IFN $\alpha$  R1 抗体或其抗原结合部分 (或本发明的免疫偶联物或双特异性分子), 或与其他药物组合使用, 以治疗、预防或诊断多种 I 型干扰素介导的疾病, 例如, 本发明的抗体可以用于通过对需要治疗的受试者施用抗体来治疗炎性肠病 (包括溃疡性结肠炎和克罗恩病)、自身免疫性甲状腺病 (包括自身免疫性原发性甲状腺功能减退症、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎和伴有甲状腺功能减退的破坏性甲状腺炎)、RA、牛皮癣和牛皮癣性关节炎、HIV 感染或 AIDS 等 I 型干扰素介导的疾病, 本发明的抗体也可以用于移植物接受者, 以抑制同种异体移植排斥和/或延长同种异体移植存活期。

[0259] 本发明进一步通过下面的实施例进行阐述, 不应将该实施例理解为进一步的限制。全部附图和在本申请中引用的全部参考文献、专利和公开专利申请的内容均引用作为参考。

## 附图说明

[0260] 图1显示人 I 型干扰素报告细胞。图1A显示构建的 I 型干扰素报告质粒; 图1B显示稳定转染 I 型干扰素报告质粒的细胞系在经 I 型干扰素刺激后, 表达 GFP 蛋白。

[0261] 图2显示人 I 型干扰素受体 IFNAR1 的结合和阻断抗体的筛选。

[0262] 图3显示 IFN $\alpha$  R1 单克隆抗体 10C2 重链可变区的核苷酸序列 (序列1) 和氨基酸序列 (序列2)。图中黑色阴影区域标出了 CDR1 (序列3)、CDR2 (序列4) 和 CDR3 (序列5) 区。

[0263] 图4显示 IFN $\alpha$  R1 单克隆抗体 10C2 轻链可变区的核苷酸序列 (序列6) 和氨基酸序列 (序列7)。图中黑色阴影区域标出了 CDR1 (序列8)、CDR2 (序列9) 和 CDR3 (序列10) 区。

[0264] 图5显示 IFN $\alpha$  R1 单克隆抗体 10C2 的重链可变区的氨基酸序列 (序列2) 与小鼠 V 区

氨基酸序列(序列21)的对比。IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区组成:V基因为IGHV9-3,D基因为IGHD2-13,J基因为IGHJ1。图中所示为IFN A R1单克隆抗体10C2重链氨基酸序列与其原始VDJ基因氨基酸序列比对结果。

[0265] 图6显示IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区的氨基酸序列与小鼠V区氨基酸序列(序列22)的对比。IFN A R1单克隆抗体10C2轻链组成:V基因为IGKV6-13,J基因为IGKJ5。图中所示为IFN A R1单克隆抗体10C2轻链氨基酸序列与其原始VJ基因氨基酸序列比对结果。

[0266] 图7显示IFN A R1单克隆抗体10C9重链可变区的核苷酸序列(序列11)和氨基酸序列(序列12)。图中黑色阴影区域标出了CDR1(序列13)、CDR2(序列14)和CDR3(序列15)区。

[0267] 图8显示IFN A R1单克隆抗体10C9轻链可变区的核苷酸序列(序列16)和氨基酸序列(序列17)。图中黑色阴影区域标出了CDR1(序列18)、CDR2(序列19)和CDR3(序列20)区。

[0268] 图9显示IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区的氨基酸序列(序列12)与小鼠V区氨基酸序列(序列23)的对比。IFN A R1单克隆抗体10C9重链组成:V基因为IGHV9-3,D基因为IGHD1-1,J基因为IGHJ3。图中所示为IFN A R1单克隆抗体10C9重链氨基酸序列与其原始VDJ基因氨基酸序列比对结果。

[0269] 图10显示IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区的氨基酸序列(序列17)与小鼠V区氨基酸序列(序列24)的对比。IFN A R1单克隆抗体10C9重链组成:V基因为IGKV6-15,J基因为IGKJ2。图中所示为IFN A R1单克隆抗体10C9轻链氨基酸序列与其原始VJ基因氨基酸序列比对结果。

[0270] 图11显示IFN A R1单克隆抗体10C2和10C9结合IFNAR1。

[0271] 图12显示IFN A R1单克隆抗体10C2和10C9结合IFNAR1的SD2和/或SD3结构域。

[0272] 图13显示IFN A R1单克隆抗体10C2和10C9在干扰素信号报告细胞上抑制IFN $\alpha$ 2b的生物活性。

[0273] 图14显示IFN A R1单克隆抗体10C2和10C9在经过刺激剂刺激的人外周血单个核细胞上抑制I型干扰素的生物活性。

## 具体实施方式

[0274] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0275] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0276] 下述实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0277] 实施例1、抗人IFN A R1单克隆抗体的制备

[0278] 一、I型干扰素报告细胞系的制备

[0279] 1、引物的设计

[0280] 参照文献“Bürigi等人(Journal of Immunological Methods 381(2012)70-74)”中的方法获取小鼠干扰素效应基因Mx2的基因组序列(NCBI genebank:AB086958),并根据其使用的酶切位点(Nse I和Nhe I)确定了Mx2的启动子有效序列。根据Mx2的启动子序列,设计如下引物:

[0281] F:CTAGCTAGCAAGTCTAAGGGCTCTGAGGACAGAC;

[0282] R:CCCAAGCTTCAAATGCCCTGCTGTACTTACCAGT。

[0283] 2、PCR扩增

[0284] 以小鼠血液基因组DNA为模板,采用步骤1中设计的含Kpn I和Nhe I酶切位点的引物进行PCR扩增,得到PCR扩增产物,即为小鼠Mx2启动子片段;

[0285] PCR反应条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火60℃,30秒;延伸,72℃,1分钟;共进行30循环,最后增加10分钟变性时间。

[0286] 3、pGL4.2 mouseMx2promoter-EGFP的获得

[0287] 用限制性内切酶Kpn I和Nhe I分别酶切步骤2获得的PCR扩增产物和pGL4.2-EGFP载体(pGL4.2-EGFP载体是将eGFP基因替换pGL4(luc2)载体中luc2基因,并保持pGL4(luc2)载体的其它序列不变得到的载体),连接,得到人I型干扰素报告质粒pGL4.2mouseMx2promoter-EGFP(pGL4.2 mouseMx2promoter-EGFP质粒的结构如图1A所示)。

[0288] 4、I型干扰素报告细胞系的获得

[0289] 使用Lipofectamine2000 (Invitrogen)将pGL4.2 mouseMx2promoter-EGFP质粒转染进入HEK293T细胞系(ATCC,货号:ATCC®CRL-3216™)中,并使用puromycin筛选获得稳定转染细胞系(I型干扰素报告细胞系)。

[0290] 5、I型干扰素报告细胞系的功能验证

[0291] 使用100μl的浓度为5ng/ml的人IFNα2b(Cedarlane公司,货号:CL106-04E-100UG)刺激步骤4获得的稳定转染细胞系24小时,收取细胞使用流式细胞仪检测GFP表达情况。

[0292] 结果如图1B所示:I型干扰素报告细胞系在未经I型干扰素刺激时不会表达GFP,但通过I型干扰素刺激后,可以表达GFP蛋白,并可被流式细胞仪检测,证实上述步骤4制备得到的细胞系可以作为I型干扰素报告细胞系,该细胞系可以用作IFNAR1阻断抗体的筛选。

[0293] 二、人I型干扰素受体IFNAR1抗体的制备

[0294] 1、人IFNAR1抗原的制备

[0295] (1)根据人IFNAR1序列,设计如下引物:IFNAR1-F:CTAGCTAGCTCTAGAGCCACCATGATGGTCGTCCTCCTGGGC;IFNAR1-R:GGGTCCGGAACCTCCTCCTCCACAGCATAAATGACAAACGGGAGA。

[0296] (2)以离体人PBMCs的cDNA为模板,采用步骤(1)设计的引物进行PCR扩增,得到PCR扩增产物,即为人I型干扰素受体IFNAR1的胞外区和跨膜区的片段。

[0297] 上述PCR反应条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火,60℃,30秒;延伸,72℃,2分钟;共进行30循环,最后增加延伸10分钟。

[0298] (3)用限制性内切酶Nhe I和Bspe I酶切步骤(2)获得的PCR扩增产物和pEGFP载体,连接,得到pEGFP-humanIFNAR1EC质粒。在pEGFP-humanIFNAR1EC质粒中,IFNAR1胞外和跨膜区序列下游融合有GFP基因,当IFNAR1表达时,可以观察到GFP信号。

[0299] (4)将pEGFP-humanIFNAR1EC质粒使用Lipofectamine2000 (Invitrogen)转染进入小鼠L细胞(ATCC,货号:ATCC®CRL-2648™)中,转染48小时后,得到转染人IFNAR1胞外区的小鼠L细胞。通过分析转染人IFNAR1胞外区的小鼠L细胞中GFP的表达确定转染效率并用于下述小鼠免疫实验。

[0300] 2、Ba1B/C小鼠的免疫

[0301] 将步骤1获得的转染人IFNAR1胞外区的小鼠L细胞作为人IFNAR1的免疫原。将5000,000个转染人IFNAR1的小鼠L细胞与20μg CpG1826(TAKARA合成)混合,形成0.5ml的悬

液,通过腹腔注射的方式免疫6周龄Ba1B/C小鼠。每个月免疫一次,共免疫3次。最后,使用同样方法进行加强免疫,并在4天后进行杂交瘤融合。

#### [0302] 3、稳定表达人IFNAR1胞外区细胞系的构建

[0303] 将pEGFP-humanIFNAR1EC质粒使用Lipofectamine2000 (Invitrogen) 转染进入HEK293T细胞系,并通过puromycin筛选获得稳定转染该质粒的细胞,从而使其稳定表达人IFNAR1胞外与跨膜区(IFNAR1与GFP融合表达)。该细胞系将用于下述抗体筛选实验。

#### [0304] 4、杂交瘤的融合

[0305] 将免疫后待融合的小鼠处死,并取出脾脏细胞。通过细胞计数,将小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0 (ATCC,CRL1581) 按1:3的比例进行混合,并使用50%PEG (Sigma) 融合细胞。将融合后的细胞加入到60ml含1X HAT的RPMI培养基 (Cellgro, 货号:15-041-CV) 中(含10%胎牛血清),按每孔1-2滴的量加入到96孔细胞培养板中。随后,将杂交瘤细胞在37℃,5%CO<sub>2</sub>的条件下进行培养,3-4天进行半量换液。约10天后进行抗体筛选。

#### [0306] 5、人I型干扰素受体IFNAR1抗体的筛选

[0307] 筛选前一天,将96孔细胞培养板中的上清吸出约100μl至96孔U形底的培养板中,并在原孔补入100μl新鲜的含1X HAT的RPMI培养基,继续培养细胞。收取已经培养好的稳定表达人IFNAR1的HEK293T细胞系,将其加至96孔U形底培养板中,10000个细胞/200μl/孔。2200rpm/3分钟离心后,甩出上清,并加入100μl杂交瘤培养上清,重悬后4℃孵育30分钟。孵育完毕,进行离心并甩出上清,每孔加入200μl FACS buffer (含2%FBS和2mM EDTA的PBS),重悬细胞并进行离心,之后甩出上清以达到清洗的目的。每孔加入1:400稀释于FACS buffer的PE标记的羊抗鼠IgG抗体 (Biolegend),将细胞重悬后在4℃避光孵育30分钟。孵育后,将培养板进行离心并除去上清,按前述方法清洗细胞一次后加入200μl FACS buffer重悬细胞。最后,使用流式细胞仪Guava (Millipore) 分析细胞GFP与PE信号。GFP与PE双阳性孔为IFNAR1结合抗体的阳性孔(图2A)。

[0308] 将阳性孔的培养上清用于下一步的阻断功能实验。具体步骤为:首先,在实验前一天将人I型干扰素报告细胞系加至96孔细胞培养板,30000个细胞/孔。实验当天,将细胞培养上清吸出,加入100μl杂交瘤培养上清,37℃孵育1小时。随后,加入100μl含10ng/ml IFNα 2b的DMEM (含10%胎牛血清FBS) 培养基 (Hyclone, 货号:SH30022.01) 培养24小时。培养后通过分析细胞GFP表达情况,确定抗体阻断I型干扰素信号的活性,GFP表达低的样品为阻断人I型干扰素受体的抗体(图2B)。根据上述步骤,最终选择了10C2和10C9既结合人IFNAR1,又可以阻断其信号的两个稳定分泌IFNAR1单克隆抗体的单克隆杂交瘤细胞株,分别将其命名为杂交瘤细胞株10C2和杂交瘤细胞株10C9。杂交瘤细胞株10C2分泌的抗体命名为鼠抗人IFNAR1单克隆抗体10C2;杂交瘤细胞株10C9分泌的抗体命名为鼠抗人IFNAR1单克隆抗体10C9。

[0309] 杂交瘤细胞株10C2的分类命名为小鼠杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞株已于2016年5月31日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.12542。

[0310] 杂交瘤细胞株10C9的分类命名为小鼠杂交瘤细胞系,该杂交瘤细胞株已于2016年5月31日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市

朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏号为CGMCC No.12543。

[0311] 三、鼠抗人IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9的序列

[0312] 1、RNA的提取

[0313] 利用Trizol (Invitrogen) 裂解杂交瘤细胞株10C2和杂交瘤细胞株10C9后,提取了杂交瘤细胞株10C2和杂交瘤细胞株10C9的RNA。RNA的提取的具体操作步骤:

[0314] 每1毫升Trizol加入200微升三氯甲烷,充分震荡后静置10分钟;13000rpm/4℃/15分钟离心;吸取400微升上清加至400微升预冷异丙醇中,混匀后-20℃静置过夜;13000rpm/4℃/15分钟离心;去除上清,加入70%乙醇;13000rpm/4℃/10分钟离心;去除上清,加入70%乙醇;去除上清,加入40微升水溶解,得到RNA溶液;

[0315] 2、cDNA的获得

[0316] 吸取16微升步骤1制备的RNA溶液,加入1微升100nM的Oligo dT (Invitrogen);70℃反应5分钟;立即放置冰上;分别加入1微升RNA酶抑制剂(Takara),1微升10mM的dNTP (Takara),1微升MLV反转录酶和5微升5X缓冲液 (Promega);42度反应60分钟;80℃处理10分钟;

[0317] 3、PCR扩增及测序

[0318] 以步骤2获得的cDNA模板,分别采用重链引物F和重链引物R、轻链引物F和轻链引物R进行PCR扩增,分别获得编码重链和轻链的片段并对其进行测序。引物序列如下:

[0319] 重链引物F:CTAGCTAGCTCTAGAGCCACC ATGATGGTCGTCTCCTGCGG;重链引物R:CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA;

[0320] 轻链引物F:GAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA;

[0321] 轻链引物R:GGATACAGTTGGTGCAGCATC。

[0322] 上述PCR反应条件:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火,54℃;延伸72℃,1分钟;共35循环,最后增加延伸10分钟。

[0323] 测序结果表明:

[0324] IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示于图3中,IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区核苷酸序列为序列1,IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区的氨基酸序列为序列2;将IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区氨基酸序列的第26位-第33位所示的氨基酸序列(序列3)命名为10C2重链CDR1,将IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区氨基酸序列的第51位-第58位所示的氨基酸序列(序列4)命名为10C2重链CDR2,将IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区氨基酸序列的第97位-第112位所示的氨基酸序列(序列5)命名为10C2重链CDR3。

[0325] IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示于图4中,IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区核苷酸序列为序列6,IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区的氨基酸序列为序列7;将IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区氨基酸序列的第27位-第32位所示的氨基酸序列(序列8)命名为10C2轻链CDR1,将IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区氨基酸序列的第50位-第52位所示的氨基酸序列(序列9)命名为10C2轻链CDR2,将IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区氨基酸序列的第89位-第94位所示的氨基酸序列(序列10)命名为10C2轻链CDR3。

[0326] IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示于图7中,IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区核苷酸序列为序列11,IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区的氨基酸序列为序列12;将IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区氨基酸序列的第26位-第33位所示的氨基酸序列(序列13)命名为10C9重链CDR1,将IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区氨基酸序列的第51位-第58位所示的氨基酸序列(序列14)命名为10C9重链CDR2,将IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区氨基酸序列的第97位-第112位所示的氨基酸序列(序列15)命名为10C9重链CDR3。

[0327] IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列显示于图8中,IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区核苷酸序列为序列16;IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区的氨基酸序列为序列17。将IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区氨基酸序列的第27位-第32位所示的氨基酸序列(序列18)命名为10C9轻链CDR1,将IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区氨基酸序列的第50位-第52位所示的氨基酸序列(序列19)命名为10C9轻链CDR2,将IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区氨基酸序列的第89位-第96位所示的氨基酸序列(序列20)命名为10C9轻链CDR3。

[0328] 4、抗体序列分析

[0329] 将IFN A R1单克隆抗体10C2和IFN A R1单克隆抗体10C9的核酸片段在抗体序列分析工具igBlast tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 中进行分析发现:

[0330] IFN A R1单克隆抗体10C2重链编码基因的V基因,D基因和J基因分别对应于小鼠IGHV9-3基因,IGHD2-13基因和IGHJ1基因,IFN A R1单克隆抗体10C2的重链可变区的氨基酸序列(序列2)与小鼠V区氨基酸序列(序列21)的对比结果如图5所示;IFN A R1单克隆抗体10C2轻链编码基因的V基因和J基因分别对应于小鼠IGKV6-13基因和IGKJ5基因,IFN A R1单克隆抗体10C2的轻链可变区的氨基酸序列与小鼠V区氨基酸序列(序列22)的对比结果如图6所示;

[0331] IFN A R1单克隆抗体10C9重链编码基因的V基因,D基因和J基因分别对应于小鼠IGHV9-3基因,IGHD1-1基因和IGHJ3基因,IFN A R1单克隆抗体10C9的重链可变区的氨基酸序列(序列12)与小鼠V区氨基酸序列(序列23)的对比结果如图9所示;IFN A R1单克隆抗体10C9轻链编码基因的V基因和J基因分别对应于小鼠IGKV6-15和IGKJ2,IFN A R1单克隆抗体10C9的轻链可变区的氨基酸序列(序列17)与小鼠V区氨基酸序列(序列24)的对比结果如图10所示。

[0332] 实施例2、IFNAR1单克隆抗体可以结合人I型干扰素受体IFNAR1

[0333] 1、将实施例1步骤二的3中获得的稳定表达人I型干扰素受体IFNAR1的HEK293T细胞使用含2mM EDTA的PBS溶液(每1L PBS含 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42g、NaCl 8g、KCl 0.2g、调节pH至7.2-7.4,用水定容至1L)进行处理,使之成为单细胞悬液。

[0334] 2、将稳定表达人I型干扰素受体IFNAR1的单细胞悬液加至96孔U形底培养板中,10000个细胞/200 $\mu\text{l}$ /孔。通过2200rpm/3分钟离心后,弃上清,收集沉淀。

[0335] 3、向步骤2获得的沉淀中分别加入含有5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的实施例1制备的鼠抗人IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9的FACS buffer(含2%FBS和2mM EDTA的PBS),重新悬浮后4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30分钟。

[0336] 4、孵育完毕,进行离心,弃上清,收集沉淀,每孔加入200 $\mu\text{l}$  FACS buffer,重悬细

胞并进行离心,弃上清,收集沉淀并进行清洗。

[0337] 5、每孔加入1:400稀释于FACS buffer的PE标记的羊抗小鼠IgG抗体(Biolegend),将细胞重新悬浮后在4℃避光孵育30分钟。孵育后,将培养板进行离心并除去上清,按前述方法清洗细胞一次后加入200μl FACS buffer重悬细胞。最后,使用流式细胞仪Guava (Millipore)分析细胞GFP与PE信号。

[0338] 结果如图11所示。由于IFNAR1与GFP融合表达,GFP表达量高的细胞其IFNAR1表达量也较高。因此,GFP表达高的细胞结合抗人IFNAR1抗体也较多,会结合更多的PE标记的羊抗小鼠IgG抗体,也就具有更高的PE信号。从图中可以看出:鼠抗人IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9均可以结合人IFNAR1受体。

[0339] 实施例3、IFNAR1单克隆抗体可以结合人I型干扰素受体IFNAR1的SD2和SD3结构域

[0340] 一、敲除人IFNAR1胞外SD1(aa32-126),SD2(aa127-227)和SD3(aa231-329)的截短体表达质粒的构建

[0341] 1、引物的设计

[0342] 根据人IFNAR1和其质粒的序列,设计引物:

[0343] F:ATTGACGCAAATGGGCGGTA(位于IFNAR1表达质粒的CMV启动子内);

[0344] 1F:CAGGTGGAAAAATCTAAAACAGATTGGTCCTCCAGAAGTACATT;

[0345] 1R:ACTTCTGGAGGACCAATCTGTTTTAGATTTTTTCCACCTGCGGC;

[0346] 2F:TTACACCATTTGCAAAGCTGAACTACCTCCACCAGAAAATATA;

[0347] 2R:TTTTCTGGTGGAGGTAGTTCAGCTTTGCGAAATGGTGTAATGAG;

[0348] 3F:CAGTTGAAAATGAACTACCTTCTACTTCCCTCCAGTCTTTAACA;

[0349] 3R:ACTGGAGGAAGTAGGAAAGCAGGTAGTTCATTTTCAACTGTGGTC;

[0350] R:GGGTCCGGAACCTCCTCCACAGC ATAAATGACAAACGGGAGA

[0351] 2、敲除人IFNAR1胞外SD1,SD2和SD3的截短体表达质粒的构建

[0352] (1)敲除人IFNAR1胞外SD1的截短体表达质粒的构建

[0353] A)以实施例1中的pEGFP-humanIFNAR1EC质粒为模板,使用F和1R,1F和R进行第一轮PCR,得到第一轮PCR产物;

[0354] PCR条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火58℃,30秒;延伸,72℃,2分钟;共进行30循环,最后增加10分钟变性时间;

[0355] B)回收第一轮PCR产物,并将其作为第二轮PCR模板,使用引物F和R进行第二轮PCR,得到第二轮PCR产物;

[0356] PCR条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火60℃,30秒;延伸,72℃,2分钟;共进行30循环,最后增加10分钟变性时间;

[0357] C)回收第二轮PCR产物,使用EcoR I和Bspe I酶切第二轮PCR产物和pEGFP-humanIFNAR1EC质粒,进行回收连接,获得SD1截短的IFNAR1表达质粒。

[0358] SD1截短的IFNAR1表达质粒为将人IFNAR1胞外SD1结构域的编码基因(即IFNAR1氨基酸序列的第32-126位氨基酸的编码基因)替换pEGFP-humanIFNAR1EC质粒EcoR I和Bspe I酶切位点间的片段,且保持pEGFP-humanIFNAR1EC质粒的其他序列不变得到的载体。

[0359] (2)敲除人IFNAR1胞外SD2的截短体表达质粒

[0360] A)以实施例1中的pEGFP-humanIFNAR1EC质粒为模板,使用F和2R,2F和R进行第一

轮PCR,得到第一轮PCR产物;

[0361] PCR条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火58℃,30秒;延伸,72℃,2分钟;共进行30循环,最后增加10分钟变性时间;

[0362] B)回收第一轮PCR产物,并将其作为第二轮PCR模板,使用引物F和R进行第二轮PCR,得到第二轮PCR产物;

[0363] PCR条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火60℃,30秒;延伸,72℃,2分钟;共进行30循环,最后增加10分钟变性时间;

[0364] C)回收得到第二轮PCR产物,使用EcoR I和Bspe I酶切第二轮PCR产物和pEGFP-humanIFNAR1EC质粒,进行回收连接,获得SD2截短的IFNAR1表达质粒。

[0365] SD2截短的IFNAR1表达质粒为将序列将人IFNAR1胞外SD2结构域的编码基因(即IFNAR1氨基酸序列的第127-227位氨基酸的编码基因)替换pEGFP-humanIFNAR1EC质粒EcoR I和Bspe I酶切位点间的片段,且保持pEGFP-humanIFNAR1EC质粒的其他序列不变得到的载体。

[0366] (3)敲除人IFNAR1胞外SD3的截短体表达质粒

[0367] A)以实施例1中的pEGFP-humanIFNAR1EC质粒为模板,使用F和3R,3F和R进行第一轮PCR,得到第一轮PCR产物;

[0368] PCR条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火58℃,30秒;延伸,72℃,2分钟;共进行30循环,最后增加10分钟变性时间,此次反应模板为前述IFNAR1表达质粒;

[0369] B)回收第一轮PCR产物,并将其作为第二轮PCR模板,使用引物F和R进行第二轮PCR,得到第二轮PCR产物;

[0370] PCR条件为:预变性,98℃,2分钟;变性,98℃,30秒;退火60℃,30秒;延伸,72℃,2分钟;共进行30循环,最后增加10分钟变性时间;

[0371] C)回收得到第二轮PCR产物,使用EcoR I和Bspe I酶切第二轮PCR产物和pEGFP-humanIFNAR1EC质粒,进行回收连接,获得SD3截短的IFNAR1表达质粒。

[0372] SD3截短的IFNAR1表达质粒为将人IFNAR1胞外SD3结构域的编码基因(即IFNAR1氨基酸序列的第231-329位氨基酸的编码基因)替换pEGFP-humanIFNAR1EC质粒EcoR I和Bspe I酶切位点间的片段,且保持pEGFP-humanIFNAR1EC质粒的其他序列不变得到的载体。

[0373] 3、表达人IFNAR1胞外SD1,SD2和SD3的截短体的HEK293T细胞的获得

[0374] 将野生型IFNAR1(pEGFP-humanIFNAR1EC)与敲除人IFNAR1胞外SD1,SD2和SD3的截短体表达质粒分别通过Lipofectamine2000(Invitrogen)转染进入HEK293T细胞系,转染24小时后使用含2mM EDTA的PBS处理并收取单细胞悬液,分别得到表达人I型干扰素受体IFNAR1的HEK293T细胞(R1-WT)、表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1- $\Delta$ 1)、表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1- $\Delta$ 2)和表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1- $\Delta$ 3)。

[0375] 二、IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9与各截短体的结合情况

[0376] 按实施例2中的方法,分别检测IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9与表达人I型干扰素受体IFNAR1的HEK293T细胞(R1-WT)、表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1- $\Delta$ 1)、表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1- $\Delta$ 2)和表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1- $\Delta$ 3)的结合情况。



[0377] 结果如图12所示:IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9均结合表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1-△1),但均不与表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1-△2)和表达人I型干扰素受体IFNAR1-SD1截短体的HEK293T细胞(R1-△3)结合。说明IFNAR1单克隆抗体可以特异结合人I型干扰素受体IFNAR1的SD2和/或SD3结构域。

[0378] 实施例4、抗人IFNAR1单克隆抗体在抑制IFNα2b的生物活性中的应用

[0379] 将实施例1步骤一中的I型干扰素报告细胞系作为工具,检测分析IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9阻断I型干扰素的效率。具体步骤如下:

[0380] 1、将人I型干扰素报告细胞加至96孔细胞培养板,30000个细胞/200μl/孔。24小时后。

[0381] 2、将梯度稀释的抗体(浓度分别为20μg/ml、10μg/ml、5μg/ml、2.5μg/ml、1.25μg/ml、0.625μg/ml、0.313μg/ml、0.156μg/ml、0.078μg/ml和0μg/ml)分别加至DMEM培养基(含10%FBS)。

[0382] 3、将细胞上清吸出,分别加入不同梯度稀释抗体的DMEM培养基100μl,37℃孵育1小时。

[0383] 4、将100μl含10ng/ml人IFNα2b(Cedarlane公司,货号:CL106-04E-100UG)的DMEM培养基加至孔中,刺激培养24小时(37℃,5%CO<sub>2</sub>)。

[0384] 5、利用流式细胞仪检测GFP表达情况,以此分析抗体阻断I型干扰素信号的生物活性。

[0385] 结果如图13所示,其中,Iso ctrl代表抗体的同型对照组(mIgG2a,Biolegend),Neg ctrl代表未用IFNα2b刺激对照组,Pos ctrl代表仅用IFNα2b刺激对照组,从图中可以看出,加入不同浓度的IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9后,GFP表达水平均有所降低,且随着浓度的增加,表达水平逐渐降低,说明IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9均可以有效阻断IFNα2b的信号,进而说明抗人IFNAR1单克隆抗体可以抑制IFNα2b的生物活性。

[0386] 实施例5、IFNAR1单克隆抗体在阻断I型干扰素对人外周血单核细胞刺激作用中的应用

[0387] 1、分别将不同浓度(1μg/ml和10μg/ml)的IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9加入到RPMI 1640培养基(Cellgro公司,货号:15-041-CV)中,再加入人外周血单核细胞(PBMC)(通过常规方案利用Ficoll分离从新鲜血液中制备),孵育(37℃,1小时),得到培养后的PBMC。

[0388] 2、按照刺激剂的不同,分为如下三组对培养后的PBMC进行刺激,分别得到刺激后的细胞:

[0389] (1)用CpGA(1μM)(Invivogen公司,货号:t1r1-2216)对培养后的PBMC进行刺激,使其中的浆细胞样树突状细胞(pDC,体内主要的I型干扰素产生细胞)产生I型干扰素。

[0390] (2)用R848(1μg/ml)(Invivogen公司,货号:t1r1-r848)对培养后的PBMC进行刺激,使其中的浆细胞样树突状细胞(pDC,体内主要的I型干扰素产生细胞)产生I型干扰素。

[0391] (3)用IFNα2b(Cedarlane公司,货号:CL106-04E-100UG)(500pg/ml)直接对培养后的PBMC进行刺激。

[0392] 3、刺激14小时后分别收集刺激后的细胞,提取RNA并逆转录合成cDNA。

[0393] 4、利用荧光定量PCR检测各个刺激后的细胞中I型干扰素效应基因Mx2和ISG15的

RNA水平,其中GAPDH为内参基因。

[0394] Mx2的引物序列为:

[0395] Mx2-F:CAGAGGCAGCGGAATCGTAA;

[0396] Mx2-R:TGAAGCTCTAGCTCGGTGTTC;

[0397] ISG15的引物序列为:

[0398] ISG15-F:CCCACAGCCCACAGCCAT;

[0399] ISG15-R:TTCTGGGTGATCTGCGCCTT;

[0400] GAPDH的引物序列为:

[0401] GAPDH-F:AGCCACATCGCTCAGACAC;

[0402] GAPDH-R:GCCCAATACGACCAAATCC。

[0403] 结果如图14所示,其中,mock代表RPMI培养基对照组,Isotype代表抗体的同型对照组(mIgG2a,Biolegend),从图中可以看出,加入IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9后,各个刺激后的细胞中I型干扰素效应基因Mx2和ISG15的RNA表达水平明显降低,说明IFNAR1单克隆抗体10C2和10C9均可以有效阻断经刺激产生的内源I型干扰素和外源I型干扰素的刺激信号。



[0039] Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys  
 [0040] 85 90 95  
 [0041] Ala Arg Glu Gly Ala Ile Tyr Tyr Gly Asp Tyr Val Tyr Phe Gly Val  
 [0042] 100 105 110  
 [0043] Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0044] 115 120  
 [0045] <210> 3  
 [0046] <211> 8  
 [0047] <212> PRT  
 [0048] <213> Artificial sequence  
 [0049] <220>  
 [0050] <223>  
 [0051] <400> 3  
 [0052] Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly  
 [0053] 1 5  
 [0054] <210> 4  
 [0055] <211> 8  
 [0056] <212> PRT  
 [0057] <213> Artificial sequence  
 [0058] <220>  
 [0059] <223>  
 [0060] <400> 4  
 [0061] Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro  
 [0062] 1 5  
 [0063] <210> 5  
 [0064] <211> 16  
 [0065] <212> PRT  
 [0066] <213> Artificial sequence  
 [0067] <220>  
 [0068] <223>  
 [0069] <400> 5  
 [0070] Ala Arg Glu Gly Ala Ile Tyr Tyr Gly Asp Tyr Val Tyr Phe Gly Val  
 [0071] 1 5 10 15  
 [0072] <210> 6  
 [0073] <211> 324bp  
 [0074] <212> DNA  
 [0075] <213> Artificial sequence  
 [0076] <220>  
 [0077] <223>

[0078] <400> 6  
 [0079] gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60  
 [0080] atcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actgctgtag cctggatatca agagaaacca 120  
 [0081] ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatccaatc gatacactgg agtccctgat 180  
 [0082] cgcttcacag gcagtggatc tgggacagct ttcactctca ccatcagcaa tatgcagtct 240  
 [0083] gaagacctgg cagattatct ctgccagcaa tattacaatt atcctctcac gttcgggtgct 300  
 [0084] gggaccaagc tggaggtgaa acgg 324  
 [0085] <210> 7  
 [0086] <211> 108  
 [0087] <212> PRT  
 [0088] <213> Artificial sequence  
 [0089] <220>  
 [0090] <223>  
 [0091] <400> 7  
 [0092] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 [0093] 1 5 10 15  
 [0094] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 [0095] 20 25 30  
 [0096] Val Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0097] 35 40 45  
 [0098] Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 [0099] 50 55 60  
 [0100] Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser  
 [0101] 65 70 75 80  
 [0102] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Leu  
 [0103] 85 90 95  
 [0104] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg  
 [0105] 100 105  
 [0106] <210> 8  
 [0107] <211> 6  
 [0108] <212> PRT  
 [0109] <213> Artificial sequence  
 [0110] <220>  
 [0111] <223>  
 [0112] <400> 8  
 [0113] Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 [0114] 1 5  
 [0115]  
 [0116] <210> 9

[0117] <211> 6  
 [0118] <212> PRT  
 [0119] <213> Artificial sequence  
 [0120] <220>  
 [0121] <223>  
 [0122] <400> 9  
 [0123] Ser Ala Ser Asn Arg Tyr  
 [0124] 1 5  
 [0125] <210> 10  
 [0126] <211> 6  
 [0127] <212> PRT  
 [0128] <213> Artificial sequence  
 [0129] <220>  
 [0130] <223>  
 [0131] <400> 10  
 [0132] Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr  
 [0133] 1 5  
 [0134] <210> 11  
 [0135] <211> 369bp  
 [0136] <212> DNA  
 [0137] <213> Artificial sequence  
 [0138] <220>  
 [0139] <223>  
 [0140] <400> 11  
 [0141] cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60  
 [0142] tcctgcaagg cttctggata taccttcaca aactatggag tgaactggat gaagcaggct 120  
 [0143] ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacct acactggaga gccaacatat 180  
 [0144] gctgatgact tcaagggacg ctttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240  
 [0145] ttacagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagagagggg 300  
 [0146] gtttattact acggtgattg ggcttgctt gcttactggg gccaaggac cctggctact 360  
 [0147] gtctctgca 369  
 [0148] <210> 12  
 [0149] <211> 123  
 [0150] <212> PRT  
 [0151] <213> Artificial sequence  
 [0152] <220>  
 [0153] <223>  
 [0154] <400> 12  
 [0155] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

[0156] 1 5 10 15  
 [0157] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 [0158] 20 25 30  
 [0159] Gly Val Asn Trp Met Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 [0160] 35 40 45  
 [0161] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 [0162] 50 55 60  
 [0163] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [0164] 65 70 75 80  
 [0165] Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 [0166] 85 90 95  
 [0167] Ala Arg Glu Gly Val Tyr Tyr Tyr Gly Asp Trp Ala Trp Leu Ala Tyr  
 [0168] 100 105 110  
 [0169] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 [0170] 115 120  
 [0171] <210> 13  
 [0172] <211> 8  
 [0173] <212> PRT  
 [0174] <213> Artificial sequence  
 [0175] <220>  
 [0176] <223>  
 [0177] <400> 13  
 [0178] Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly  
 [0179] 1 5  
 [0180] <210> 14  
 [0181] <211> 8  
 [0182] <212> PRT  
 [0183] <213> Artificial sequence  
 [0184] <220>  
 [0185] <223>  
 [0186] <400> 14  
 [0187] Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro  
 [0188] 1 5  
 [0189] <210> 15  
 [0190] <211> 16  
 [0191] <212> PRT  
 [0192] <213> Artificial sequence  
 [0193] <220>  
 [0194] <223>

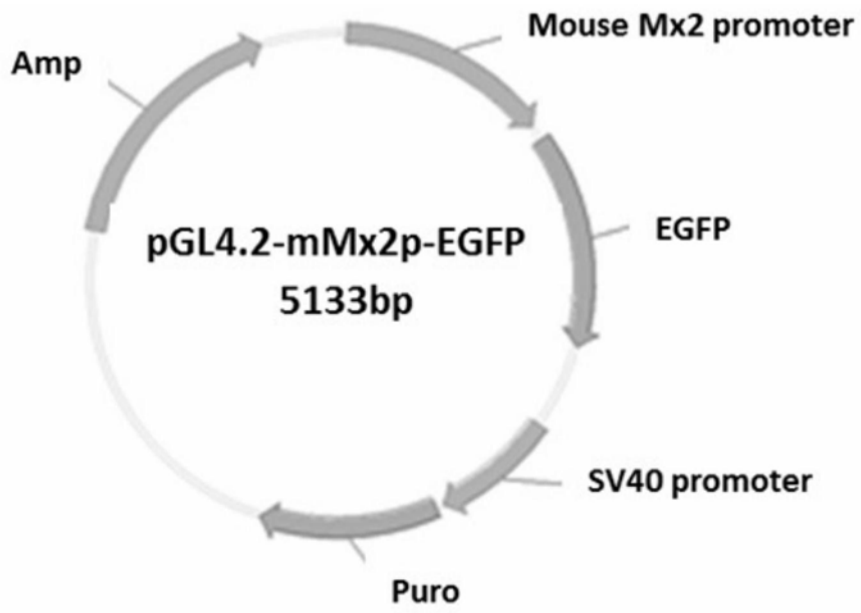
[0195] <400> 15  
 [0196] Ala Arg Glu Gly Val Tyr Tyr Tyr Gly Asp Trp Ala Trp Leu Ala Tyr  
 [0197] 1 5 10 15  
 [0198] <210> 16  
 [0199] <211> 321bp  
 [0200] <212> DNA  
 [0201] <213> Artificial sequence  
 [0202] <220>  
 [0203] <223>  
 [0204] <400> 16  
 [0205] gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atttccacat cagtaggaga cagggtcagc 60  
 [0206] gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag cctggtatca acagaaacca 120  
 [0207] ggtcaatctc ctaaaacact gatttactcg acatcctacc ggtacaatgg agtcctgat 180  
 [0208] cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240  
 [0209] gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcaa tataacagct attacacgtt cggagggggg 300  
 [0210] accaagctgg aaataaaacg g 321  
 [0211] <210> 17  
 [0212] <211> 106  
 [0213] <212> PRT  
 [0214] <213> Artificial sequence  
 [0215] <220>  
 [0216] <223>  
 [0217] <400> 17  
 [0218] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly  
 [0219] 1 5 10 15  
 [0220] Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 [0221] 20 25 30  
 [0222] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile  
 [0223] 35 40 45  
 [0224] Tyr Ser Thr Ser Tyr Arg Tyr Asn Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 [0225] 50 55 60  
 [0226] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
 [0227] 65 70 75 80  
 [0228] Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Tyr Thr  
 [0229] 85 90 95  
 [0230] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 [0231] 100 105  
 [0232] <210> 18  
 [0233] <211> 6



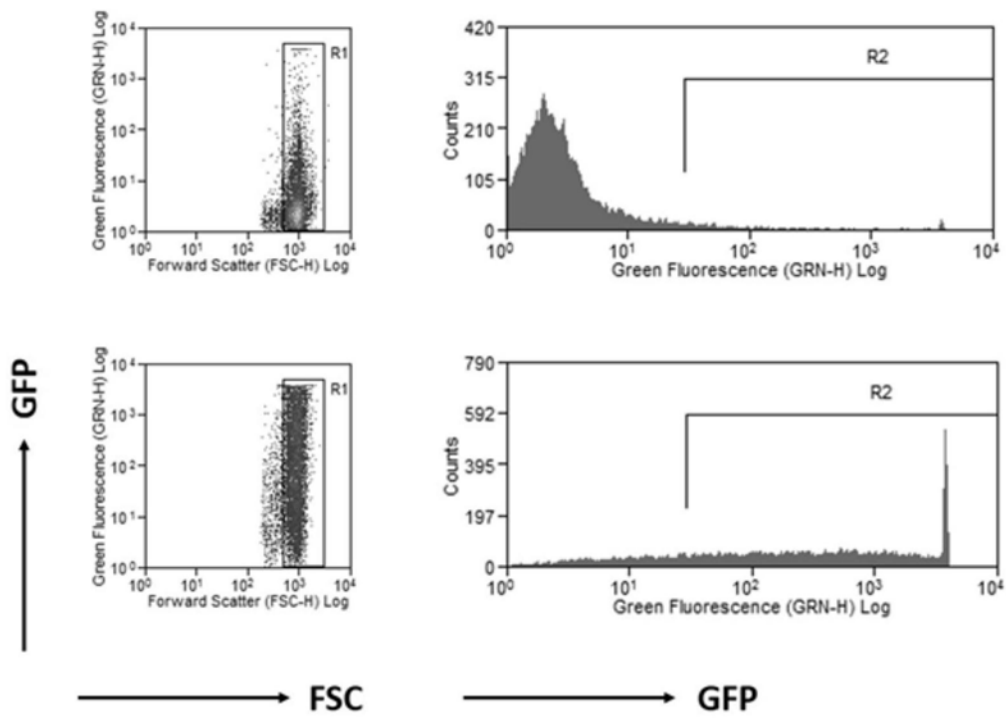
[0234] <212> PRT  
 [0235] <213> Artificial sequence  
 [0236] <220>  
 [0237] <223>  
 [0238] <400> 18  
 [0239] Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 [0240] 1 5  
 [0241]  
 [0242] <210> 19  
 [0243] <211> 6  
 [0244] <212> PRT  
 [0245] <213> Artificial sequence  
 [0246] <220>  
 [0247] <223>  
 [0248] <400> 19  
 [0249] Ser Ala Ser Asn Arg Tyr  
 [0250] 1 5  
 [0251] <210> 20  
 [0252] <211> 8  
 [0253] <212> PRT  
 [0254] <213> Artificial sequence  
 [0255] <220>  
 [0256] <223>  
 [0257] <400> 20  
 [0258] Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Tyr Thr  
 [0259] 1 5  
 [0260] <210> 21  
 [0261] <211> 123  
 [0262] <212> PRT  
 [0263] <213> Artificial sequence  
 [0264] <220>  
 [0265] <223>  
 [0266] <400> 21  
 [0267] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 [0268] 1 5 10 15  
 [0269] Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 [0270] 20 25 30  
 [0271] Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 [0272] 35 40 45

[0273] Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 [0274] 50 55 60  
 [0275] Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 [0276] 65 70 75 80  
 [0277] Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 [0278] 85 90 95  
 [0279] Ala Arg Glu Gly Ala Ile Tyr Tyr Gly Asp Tyr Val Tyr Phe Gly Val  
 [0280] 100 105 110  
 [0281] Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0282] 115 120  
 [0283] <210> 22  
 [0284] <211> 107  
 [0285] <212> PRT  
 [0286] <213> Artificial sequence  
 [0287] <220>  
 [0288] <223>  
 [0289] <400> 22  
 [0290] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 [0291] 1 5 10 15  
 [0292] Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala  
 [0293] 20 25 30  
 [0294] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0295] 35 40 45  
 [0296] Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 [0297] 50 55 60  
 [0298] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser  
 [0299] 65 70 75 80  
 [0300] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu  
 [0301] 85 90 95  
 [0302] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys  
 [0303] 100 105  
 [0304] <210> 23  
 [0305] <211> 123  
 [0306] <212> PRT  
 [0307] <213> Artificial sequence  
 [0308] <220>  
 [0309] <223>  
 [0310] <400> 23  
 [0311] Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

[0312]	1	5	10	15
[0313]	Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr			
[0314]	20	25	30	
[0315]	Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met			
[0316]	35	40	45	
[0317]	Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe			
[0318]	50	55	60	
[0319]	Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
[0320]	65	70	75	80
[0321]	Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys			
[0322]	85	90	95	
[0323]	Ala Arg Glu Gly Val Tyr Tyr Tyr Gly Asp Trp Ala Trp Leu Ala Tyr			
[0324]	100	105	110	
[0325]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
[0326]	115	120		
[0327]	<210> 24			
[0328]	<211> 106			
[0329]	<212> PRT			
[0330]	<213> Artificial sequence			
[0331]	<220>			
[0332]	<223>			
[0333]	<400> 24			
[0334]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly			
[0335]	1	5	10	15
[0336]	Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn			
[0337]	20	25	30	
[0338]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile			
[0339]	35	40	45	
[0340]	Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
[0341]	50	55	60	
[0342]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser			
[0343]	65	70	75	80
[0344]	Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Tyr Thr			
[0345]	85	90	95	
[0346]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0347]	100	105		



A



B

图1

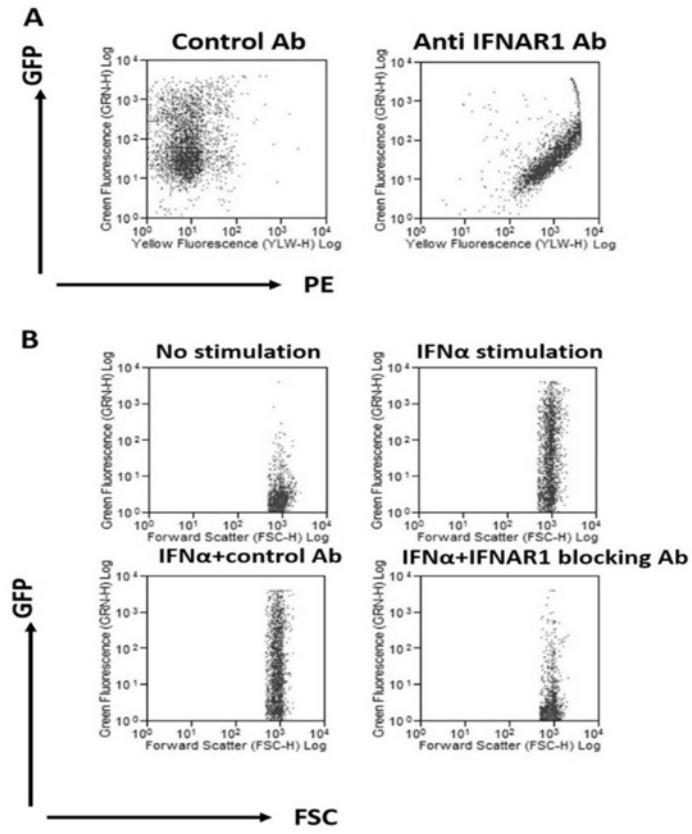


图2

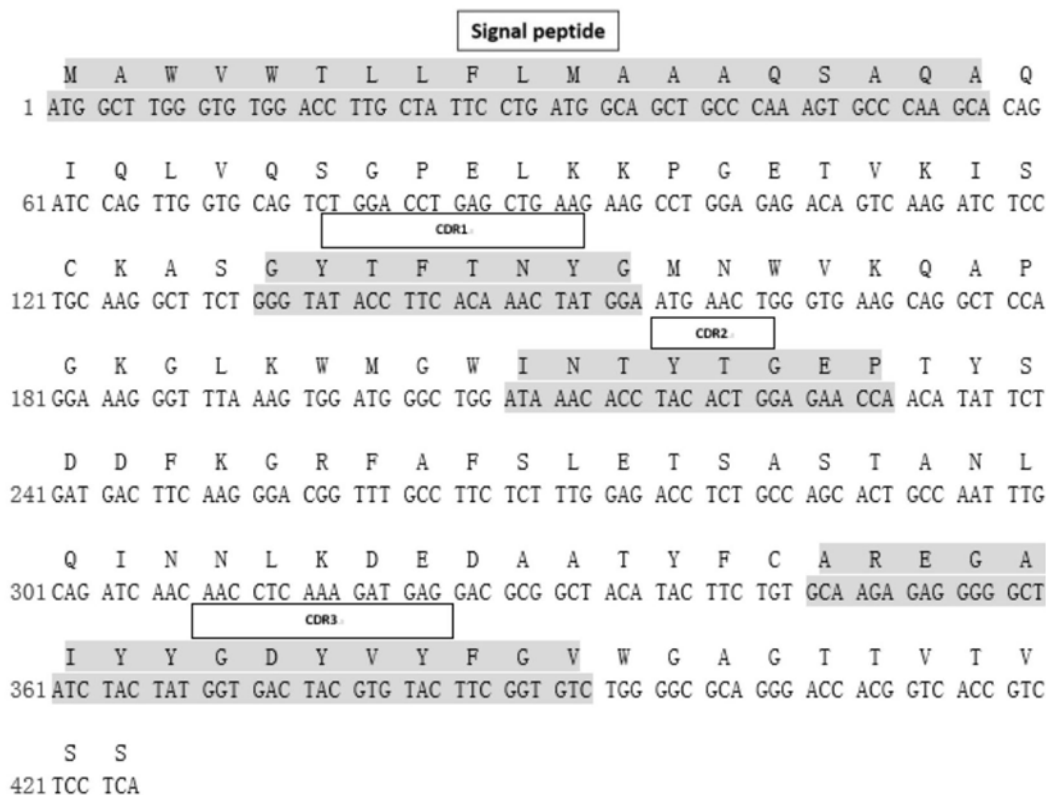


图3

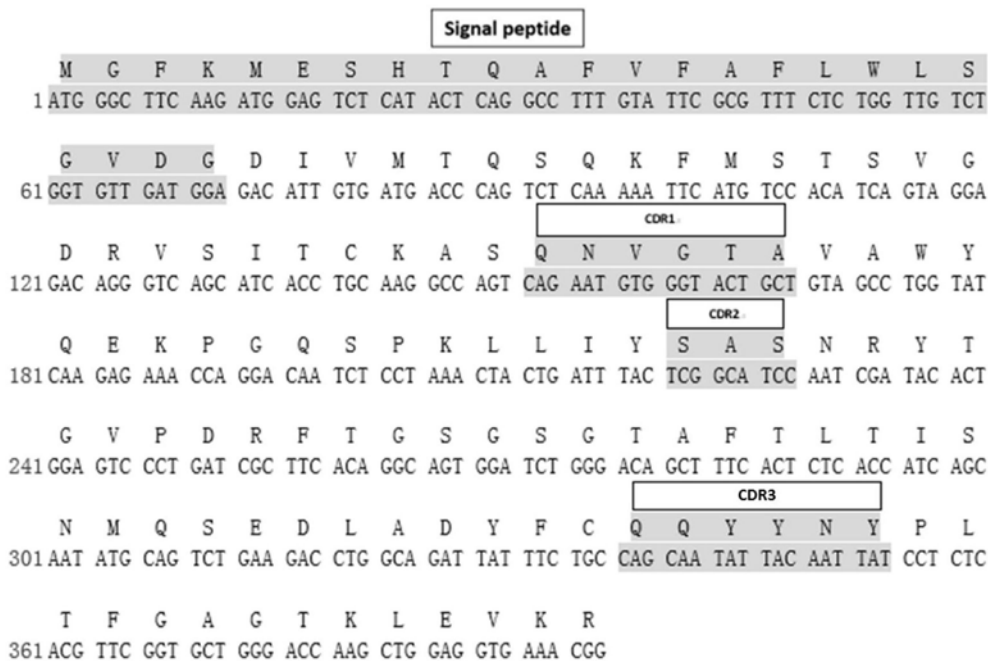


图4

		Section 1								
		(1)	10	20	30	40	50	60	70	80
10C2 heavy chain VDJ	(1)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY	S	DDFKGRF	AFSLETS	A	S	A	T	A
IGHV9-3 IGHJ1	(1)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY	A	DDFKGRF	AFSLETS	A	S	A	T	A
Consensus	(1)	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTY	A	DDFKGRF	AFSLETS	A	S	A	T	A

		Section 2					
		(81)	81	90	100	110	123
10C2 heavy chain VDJ	(81)	LQINNPKDEDAATYFCAREGAIYYGDYVYFGVWGAGTTVTVSS					
IGHV9-3 IGHJ1	(81)	LQINNPKNEDTATYFCAREGAIYYGDYVYFGVWGAGTTVTVSS					
Consensus	(81)	LQINNPK ED ATYFCAREGAIYYGDYVYFGVWGAGTTVTVSS					

图5

		Section 1								
		(1)	10	20	30	40	50	60	70	84
10C2 light chain VJ	(1)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGT	A	F	T	L	T	I	S	N
IGKV6-13 IGKJ5	(1)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGT	D	F	T	L	T	I	S	N
Consensus	(1)	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQ KPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGT	F	T	L	T	I	S	N	Q

		Section 2			
		(85)	85	90	107
10C2 light chain VJ	(85)	DYFCQQYYNYPLTFGAGTKLEVK			
IGKV6-13 IGKJ5	(85)	DYFCQQYSSYPLTFGAGTKLEVK			
Consensus	(85)	DYFCQQY YPLTFGAGTKLEVK			

图6

		Signal peptide																			
		M	A	W	V	W	T	L	L	F	L	M	A	A	A	Q	S	A	Q	A	Q
1	ATG	GCT	TGG	GTG	TGG	ACC	TTG	CTA	TTC	CTG	ATG	GCA	GCT	GCC	CAA	AGT	GCC	CAA	GCA	CAG	
		I	Q	L	V	Q	S	G	P	E	L	K	K	P	G	E	T	V	K	I	S
61	ATC	CAG	TTG	GTG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAG	CTG	AAG	AAG	CCT	GGA	GAG	ACA	GTC	AAG	ATC	TCC	
		C	K	A	S	CDR1					V	N	W	M	K	Q	A	P			
121	TGC	AAG	GCT	TCT	GGA	TAT	ACC	TTC	ACA	AAC	TAT	GGA	GTG	AAC	TGG	ATG	AAG	CAG	GCT	CCA	
		G	K	G	L	K	W	M	G	W	CDR2					P	T	Y	A		
181	GGA	AAG	GGT	TTA	AAG	TGG	ATG	GCC	TGG	ATA	AAC	ACC	TAC	ACT	GGA	GAG	CCA	ACA	TAT	GCT	
		D	D	F	K	G	R	F	A	F	S	L	E	T	S	A	S	T	A	Y	L
241	GAT	GAC	TTC	AAG	GGA	CGC	TIT	GCC	TTC	TCT	TTG	GAA	ACC	TCT	GCC	AGC	ACT	GCC	TAT	TTA	
		Q	I	N	N	L	K	N	E	D	T	A	T	Y	F	C	CDR3				
301	CAG	ATC	AAC	AAC	CTC	AAA	AAT	GAG	GAC	ACG	GCT	ACA	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	GAG	GGG	GTT	
		Y	Y	Y	G	D	W	A	W	L	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V
361	TAT	IAC	TAC	GGT	GAT	TGG	GCC	TGG	CTT	GCT	TAC	TGG	GCC	CAA	GGG	ACC	CTG	GTC	ACT	GTC	
		S	A																		
421	TCT	GCA																			

图7

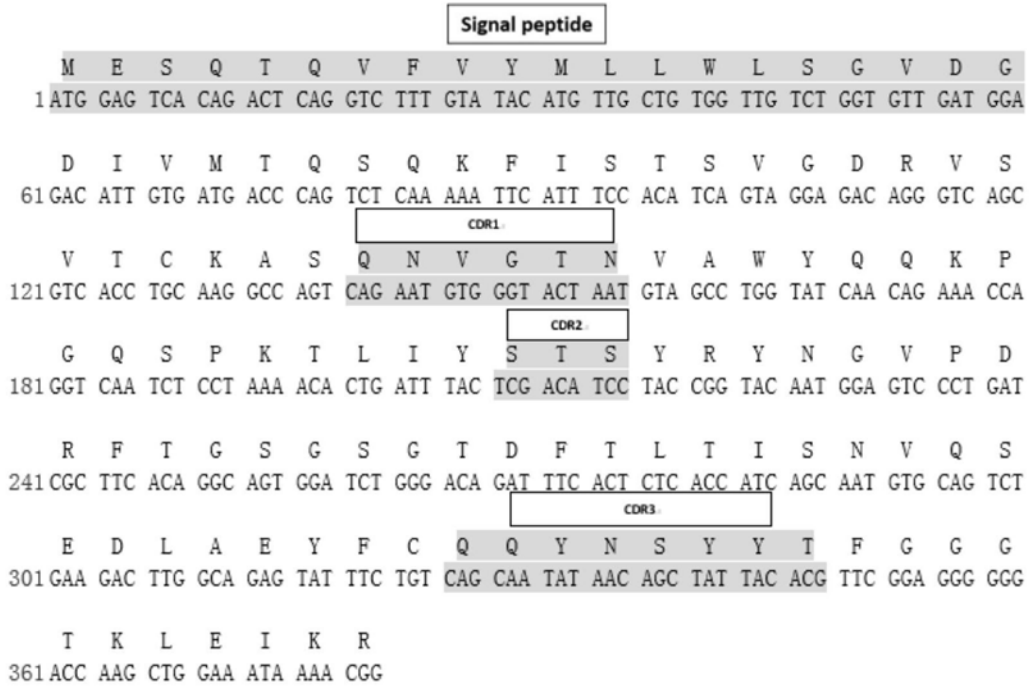


图8

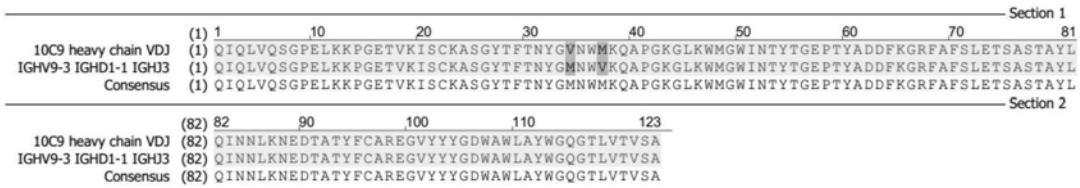


图9

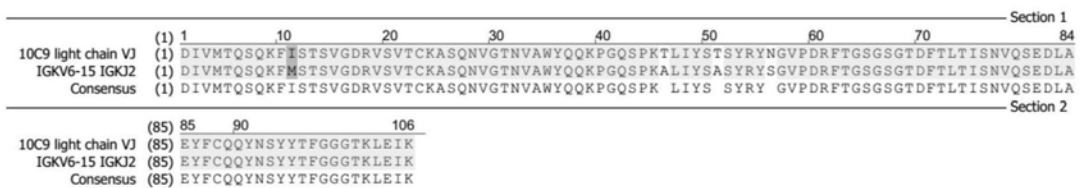


图10



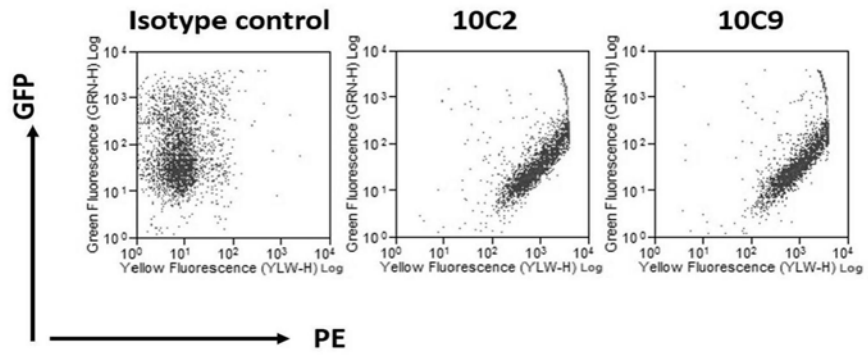


图11

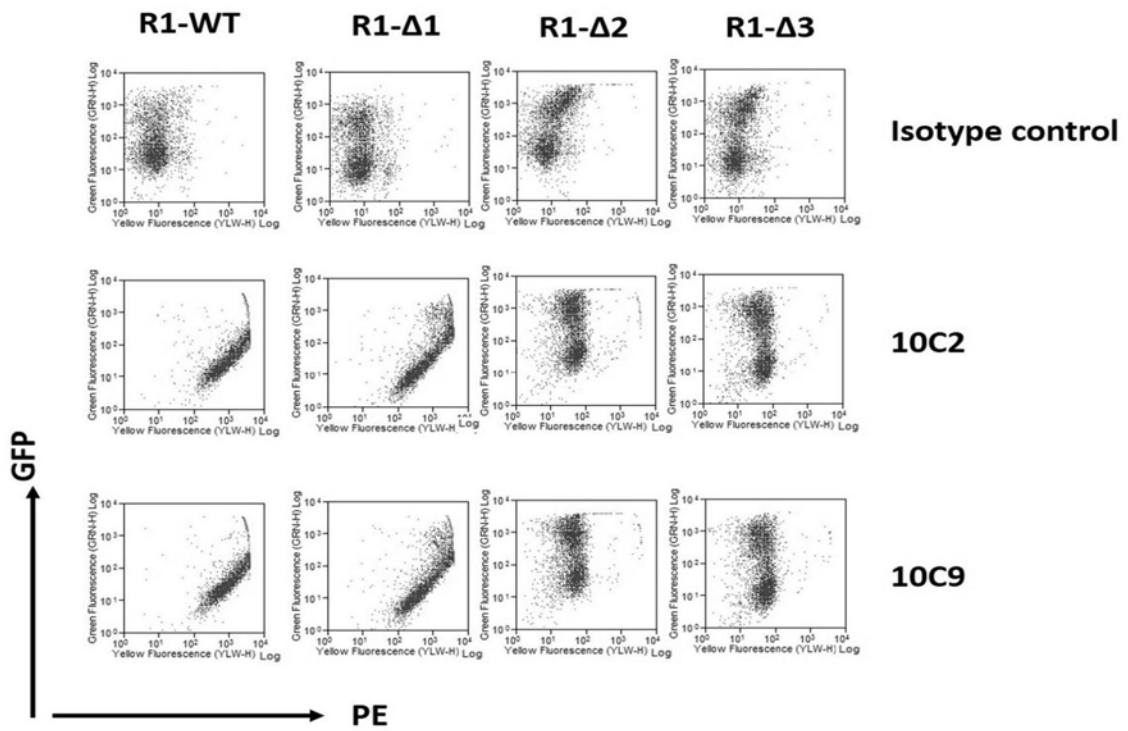


图12

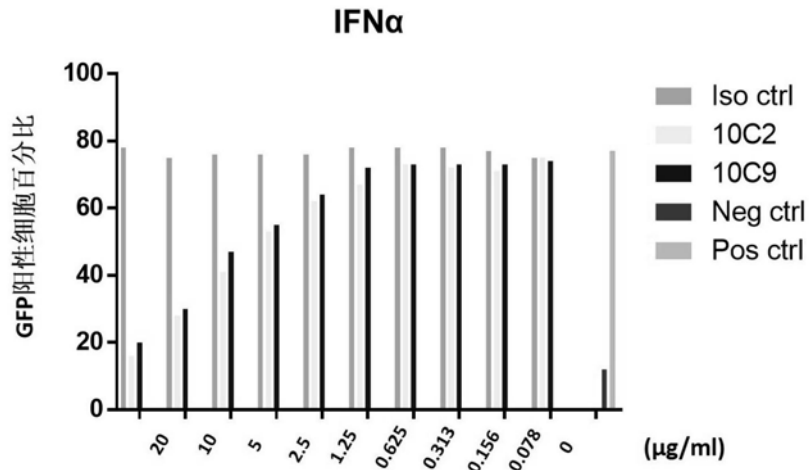


图13

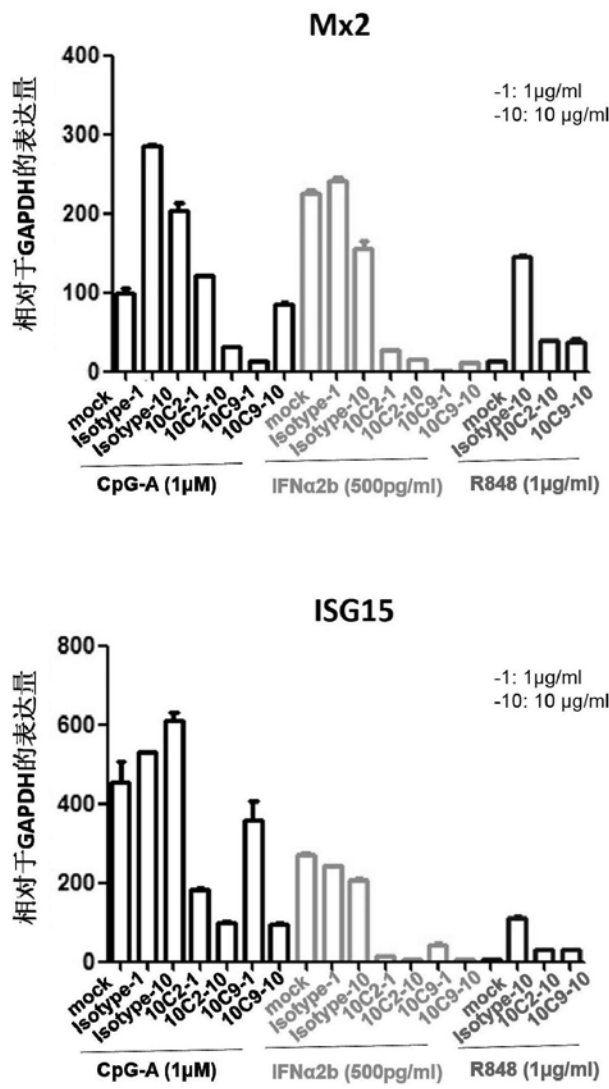


图14