

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810100025.3

[51] Int. Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 10 月 7 日

[11] 公开号 CN 101550190A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

[22] 申请日 2001.8.7

[21] 申请号 200810100025.3

分案原申请号 01816961.9

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 7 [33] US [31] 60/223358

[32] 2000. 9. 29 [33] US [31] 60/236827

[32] 2001. 8. 1 [33] US [31] 09/920262

[71] 申请人 森托科尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 J·吉勒斯-科马尔

D·M·克奈特 D·佩里特

B·斯卡尔伦 D·希利

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘健付磊

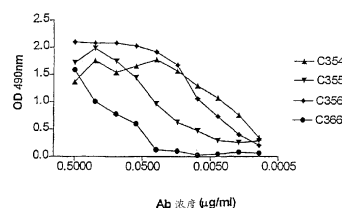
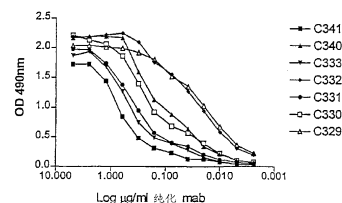
权利要求书 5 页 说明书 69 页 附图 10 页

[54] 发明名称

抗 IL-12 抗体、组合物、方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及至少一种抗 IL-12 抗体, 包括编码至少一种抗 IL-12 抗体的分离核酸、IL-12、载体、宿主细胞、转基因动物或植物、及其制备方法和用途, 包括治疗组合物、方法和设备。



1. 一种分离的抗-IL-12 抗体, 其包含含有 SEQ ID NO: 7 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO: 8 的轻链氨基酸序列的可变区。

2. 根据权利要求 1 的抗-IL-12 抗体, 其中所述抗体与 IL-12 以选自至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-11} M 或至少 10^{-12} M 中的至少一种的亲合性结合。

3. 根据权利要求 1 的抗-IL-12 抗体, 其中所述抗体基本中和至少一种 IL-12 蛋白的至少一种活性。

4. 一种编码至少一种分离的哺乳动物抗 IL-12 抗体的分离核酸分子, 所述抗体包含 SEQ ID NO: 7 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO: 8 的轻链氨基酸序列。

5. 一种包含根据权利要求 4 的分离核酸分子的分离核酸载体。

6. 一种包含根据权利要求 5 的分离载体的分离原核或真核宿主细胞。

7. 根据权利要求 6 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞为至少一种选自下组的细胞: COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髓瘤或淋巴瘤细胞, 或其任意衍生、永生化或转化的细胞。

8. 一种产生抗-IL-12 抗体的方法, 所述方法包括在体外条件下翻译权利要求 4 的核酸分子, 使得 IL-12 抗体以可检测或可回收的量表达。

9. 一种包含分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体和至少一种药学可接受载体或稀释剂的组合物, 所述抗体包含 SEQ ID NO: 7 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO: 8 的轻链氨基酸序列。

10. 根据权利要求 9 的组合物, 其进一步包含至少一种包含有效量的选自下组的至少一种化合物或蛋白的组合物: 至少一种可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、刺激剂、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

11. 一种特异性结合分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体的抗独特型抗体或片段, 所述抗-IL-12 抗体包含 SEQ ID NO: 7 的重链氨基酸序列和 SEQ

ID NO: 8 的轻链氨基酸序列。

12. 分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体在制备用于治疗 and/或预防或诊断 IL-12 相关状况的药物中的应用, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO: 7 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO: 8 的轻链氨基酸序列。

13. 根据权利要求 12 的应用, 其中使用包含 0.001-50 mg/kg 细胞、组织、器官或动物的所述分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体的有效量。

14. 根据权利要求 12 的应用, 其中所述药物能够通过至少一种选自下列的途径接触或给药: 肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内和经皮给药。

15. 根据权利要求 12 的应用, 其中所述药物是与至少一种包含有效量的选自下组的至少一种化合物或蛋白的组合物联合使用的药物: 至少一种可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、刺激剂、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

16. 根据权利要求 12 的应用, 其中所述 IL-12 相关状况是牛皮癣。

17. 根据权利要求 12 的应用, 其中所述 IL-12 相关状况是多发性硬化。

18. 根据权利要求 12 的应用, 其中所述 IL-12 相关状况是局限性回肠炎。

19. 一种医学设备, 其包含分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体, 所述抗体包含 SEQ ID NO: 7 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO: 8 的轻链氨基酸序列, 其中所述设备适于所述抗-IL-12 抗体的接触或给药, 该接触或给药是通过选自下组的至少一种方式进行的: 肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑

室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内和经皮。

20. 一种产生分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体的方法, 所述抗体包含 SEQ ID NO: 7 的重链氨基酸序列和 SEQ ID NO: 8 的轻链氨基酸序列, 该方法包括提供能够表达可回收量的所述抗体的宿主细胞或转基因非人类动物或转基因植物或植物细胞。

21. 根据权利要求 20 的方法产生的抗 IL-12 抗体。

22. 分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体, 其包含 (i) SEQ ID NOS: 1、2 和 3 的所有重链互补决定区 (CDR) 氨基酸序列; 和 (ii) SEQ ID NOS: 4、5 和 6 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

23. 根据权利要求 22 的抗-IL-12 抗体, 其中所述抗体与 IL-12 以选自至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-11} M 或至少 10^{-12} M 中的至少一种的亲和性结合。

24. 根据权利要求 23 的抗-IL-12 抗体, 其中所述抗体基本中和至少一种 IL-12 蛋白的至少一种活性。

25. 一种编码分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体的分离核酸分子, 所述抗体具有 (i) SEQ ID NOS: 1、2 和 3 的所有重链 CDR 氨基酸序列; 和 (ii) SEQ ID NOS: 4、5 和 6 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

26. 一种包含根据权利要求 25 的分离核酸分子的分离核酸载体。

27. 一种包含根据权利要求 26 的分离载体的原核或真核宿主细胞。

28. 根据权利要求 27 的宿主细胞, 其中所述宿主细胞为至少一种选自下组的细胞: COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髓瘤或淋巴瘤细胞, 或其任意衍生、永生化或转化的细胞。

29. 一种产生抗-IL-12 抗体的方法, 所述方法包括在体外条件下翻译权利要求 25 的核酸分子, 使得抗-IL-12 抗体以可检测或可回收的量表达。

30. 一种包含分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体和至少一种药学可接受载体或稀释剂的组合物, 所述抗体具有 (i) SEQ ID NOS: 1、2 和 3 的所有重链 CDR 氨基酸序列; 和 (ii) SEQ ID NOS: 4、5 和 6 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

31. 根据权利要求 30 的组合物, 其进一步包含至少一种包含有效量的选自下组的至少一种化合物或蛋白的组合物: 至少一种可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、刺激剂、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

32. 一种特异性结合分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体的抗独特型抗体或片段, 所述抗 IL-12 抗体具有 (i) SEQ ID NOS: 1、2 和 3 的所有重链 CDR 氨基酸序列; 和 (ii) SEQ ID NOS: 4、5 和 6 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

33. 分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体在制备用于治疗和/或预防或诊断 IL-12 相关状况的药物中的应用, 所述抗体具有 (i) SEQ ID NOS: 1、2 和 3 的所有重链 CDR 氨基酸序列; 和 (ii) SEQ ID NOS: 4、5 和 6 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

34. 根据权利要求 33 的应用, 其中使用包含 0.001-50 mg/kg 细胞、组织、器官或动物的所述分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体的有效量。

35. 根据权利要求 33 的应用, 其中所述药物能够通过至少一种选自下列的途径接触或给药: 肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮给药剂型。

36. 根据权利要求 33 的应用, 其中所述药物是与至少一种包含有效量的选自下组的至少一种化合物或蛋白的组合物联合使用的药物: 至少一种可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药 (NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、刺激剂、

抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

37. 根据权利要求 33 的应用，其中所述抗-IL-12 相关状况是牛皮癣。

38. 根据权利要求 33 的应用，其中所述 IL-12 相关状况是多发性硬化。

39. 根据权利要求 33 的应用，其中所述 IL-12 相关状况是局限性回肠炎。

40. 一种医学设备，其包含分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体，所述抗体具有 (i) SEQ ID NOS: 1、2 和 3 的所有重链 CDR 氨基酸序列；和 (ii) SEQ ID NOS: 4、5 和 6 的所有轻链 CDR 氨基酸序列，其中所述设备适于所述抗-IL-12 抗体的接触或给药，该接触或给药是通过选自下组的至少一种方式进行的：肠胃外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内和经皮。

41. 一种产生分离的哺乳动物抗-IL-12 抗体的方法，所述抗体具有 (i) SEQ ID NOS: 1、2 和 3 的所有重链 CDR 氨基酸序列；和 (ii) SEQ ID NOS: 4、5 和 6 的所有轻链 CDR 氨基酸序列，该方法包括提供能够表达可回收量的所述抗体的宿主细胞或转基因非人类动物或转基因植物或植物细胞。

42. 根据权利要求 41 的方法产生的抗 IL-12 抗体。

抗 IL-12 抗体、组合物、方法和用途

本申请是发明名称为“抗 IL-12 抗体、组合物、方法和用途”，申请号为 01816961.9 的分案申请。

发明背景

发明领域

本申请部分基于并要求 2000 年 8 月 7 日提交的美国临时申请 60/223,358 和 2000 年 9 月 29 日提交的美国临时申请 60/236,827 的优先权，在此引入每一个作为参考。

本发明涉及至少一种白介素-12 (IL-12) 蛋白或其片段的特异性抗体，包括特定的部分或变体，以及编码所述抗 IL-12 抗体的核酸、其互补核酸、载体、宿主细胞及其准备方法和用途，包括治疗制剂、给药和设备。

背景技术

白介素-12 (IL-12) 是一种异二聚体细胞因子，由 35 和 40 kD 的糖基化多肽链组成，这两条链由二硫键连接。该细胞因子由树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、B 细胞、朗格罕氏细胞和角化细胞以及天然杀伤 (NK) 细胞等抗原呈递细胞合成和分泌。IL-12 介导许多生物学过程，被称作 NK 细胞刺激因子 (NKSP)、T 细胞刺激因子、细胞毒性 T 淋巴细胞成熟因子和 EBV 转化的 B 细胞系因子 (Curfs, J. H. A. J., et al., *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 742-780 (1997))。

白介素-12 可以与细胞（如 T 细胞、NK 细胞）膜上表达的 IL-12 受体结合，从而改变（如抑制、预防）生物学过程。例如，IL-12 与 IL-12 受体的结合可以刺激预激活的 T 细胞和 NK 细胞的增殖，增强细胞毒性 T 细胞 (CTL)、NK 细胞和 LAK（淋巴因子激活的杀伤）细胞的细胞溶解活性，诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 γ 干扰素，并且诱导幼稚的 Th0 细胞分化为产生 IFN γ 和 IL-12 的 Th1 细胞 (Trinchieri, G., *Annual Review of Immunology*, 13: 251-276 (1995))。具体地，IL-12 对于产生细胞溶解性细胞（如 NK, CTL）和产生细胞免疫应答（如 Th1 细胞介导的免疫应答）是关键的。因此，IL-12 对于保护性免疫（如根除感染）和病理性免疫应答（如自身免疫）的产生和调节是至关重要的 (Hendrzak, J. A. and Brunda, M. J., *Laboratory*

Investigation, 72: 619-637 (1995)). 因此, 例如可以通过抗体等操作 IL-12 的体内生物学活性, 从而增强、抑制或预防免疫应答 (如保护性的或病理性的)。

非人哺乳动物抗体、嵌合抗体、多克隆抗体 (如抗血清) 和/或单克隆抗体 (Mabs) 和抗体片段 (如其蛋白水解消化产物或融合蛋白产物) 是被研究在某些情况下尝试用于治疗某些疾病的潜在治疗剂。然而, 当给予人类这些抗体或片段时可以引发免疫应答。这种免疫应答可以导致免疫复合物介导的从循环中清除抗体或片段, 使得重复给药不适用于治疗, 从而减少了对患者的治疗益处并且限制了再次给予抗体或片段。例如, 重复给予包含非人部分的抗体或片段可以导致血清病和/或过敏。为了避免这些和其它问题, 采用了许多方法减少这些抗体及其部分的免疫原性, 包括嵌合化和人源化, 这是本领域所公知的。然而, 这些和其它方法仍然可以产生具有一些免疫原性、低亲和力的抗体和片段, 或具有细胞培养、大规模进行、生产和/或低产率的问题。因此, 这些抗体或片段对于生产或用作治疗蛋白仍然不够理想。

因此, 需要提供能够克服这些问题中的一个或多个的抗 TNF 抗体或片段, 以及改进已知的抗体或其片段。

发明概述

本发明提供如这里所描述和实现的分离的人、灵长类、啮齿类、哺乳动物、嵌合、人源化和/或 CDR 嫁接的抗 IL-12 抗体、免疫球蛋白、其裂解产物及特定的部分和变体, 以及抗 IL-12 抗体组合物、其编码或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、制剂、设备、转基因动物、转基因植物及其制备方法和用途, 它们结合了本领域已知的成分。

本发明也提供了至少一种这里所描述的抗 IL-12 抗体。本发明的抗体包括任何包含含有免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的蛋白或肽, 所述部分可以是, 但不限于可以掺入本发明的抗体的至少一种重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区 (CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区、或其任意部分。本发明的抗体可以包括或来源于任何哺乳动物, 例如, 但不限于人、小鼠、兔、大鼠、啮齿类动物、灵长类动物或其任意组合等。

本发明的一方面提供一种分离的核酸分子, 它包含、互补于或杂交于一种编码至少一种 IL-12 抗独特型抗体的多核苷酸, 该抗体包含至少一种其特定序列、结构域、部分或变体。本发明进一步提供了包含所述 IL-12 抗独特

型抗体的编码核酸分子的重组载体,含所述核酸和/或重组载体的宿主细胞,以及这种抗独特型抗体核酸、载体和/或宿主细胞的制备方法和/或用途。

本发明也提供了至少一种在宿主细胞中表达至少一种抗 IL-12 抗体、或 IL-12 抗独特型抗体的方法,包括按照此处的描述在其中至少一种抗 IL-12 抗体以可检测和/或可回收的量表达的条件下培养宿主细胞。

本发明也提供了至少一种组合物,它包含 (a) 如此处描述的分离的抗 IL-12 抗体的编码核酸和/或抗体;和 (b) 合适的载体或稀释剂。载体或稀释剂可以任选是可药用的已知载体或稀释剂。该组合物可以任选进一步包含至少一种其它的化合物、蛋白或组合物。

本发明进一步提供了至少一种抗 IL-12 抗体方法或组合物,用于在本领域已知的和/或这里所描述的相关状况之前、之后或之时以治疗有效量给药,以便调节或治疗细胞、组织、器官、动物或病人中的至少一种 IL-12 相关状况。

本发明也提供了至少一种递送治疗或预防有效量的至少一种本发明的抗 IL-12 抗体的组合物、设备和/或方法。

本发明进一步提供了至少一种抗 IL-12 抗体方法或组合物,用于在本领域已知的和/或这里所描述的相关状况之前、之后或之时诊断细胞、组织、器官、动物或病人中的至少一种 IL-12 相关状况。

本发明也提供了至少一种递送用于诊断至少一种本发明的抗 IL-12 抗体的组合物、设备和/或方法。

附图说明

图 1A 和 1B 表示人抗 IL-12 mAb 与固定化的人 IL-12 的浓度依赖性结合。用 1% BSA/PBS 对抗 IL-12 抗体进行系列稀释,并且在 rhIL-12 包被的板上在 37℃ 下孵育 1 小时。用 0.02% Tween 20 (聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯)、0.15M 盐水洗涤两次,然后用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗人 IgG κ 特异性抗体在室温下探测 1 小时。再次用邻苯二胺(OPD)底物洗涤板,在 490nm 处测定每个孔的光密度(OD)。

图 2: 图 A 和 B 中从左至右的泳道包含人 IL-2, 人 IL12 p40、鼠 IL-12 和预染色的分子量标记。图 2A 表示从总蛋白得到的染色带。每道的主要带是 IL-12 (75 kd), p40 人 IL-12 (40 kd), 和鼠 IL-12 (75 kd)。图 2B 表示从与图 2A 所示相同的凝胶制备的蛋白印迹。在用 HRP 标记的山羊抗人 IgG 标

记之后使印迹与 C340 反应, 并且特异性检测人 IL-12 (单体和多聚体) 和人 IL-12 p40。与 HRP 标记的山羊抗人 IgG 反应的对照印迹 (未示出) 没有显示出任何带。

图 3: 在用有或无抗 IL-2 抗体 C340, 8.6.2, 同种型对照抗体时用 IL-2, IL-12, IL-2+IL-12 处理的人 PBL 中的 IFN γ 基因表达的反转录 PCR 分析。对总 RNA 进行反转录, 使用基因特异性引物进行 PCR 扩增。对每个样品中的 β 肌动蛋白 mRNA 水平进行测定, 将其作为 mRNA 完整性和含量的对照。

图 4 是表示人抗 IL-12 mAb (C340) 抑制用 IL-2 加 IL-12 刺激的单核细胞耗尽的 CD3+外周血单核细胞 (PBMC) 产生 γ 干扰素 (IFN γ) 的柱状图。在对照培养基 (未加细胞因子), 补加 IL-12 (0.1 ng/ml) 加 IL-2 (50 IU/ml) (IL-12/IL-2) 的培养基, 含 mAb C340 (10 μ g/ml) 的对照培养基, 和含 mAb C340 (10 μ g/ml) 的 IL-12/IL-2 培养基中培养 PBMC 5 小时。通过用 CD3-PE 和 IFN γ -FITC 进行的两色免疫染色测量细胞内 IFN γ 。没有显示一个供体的数据。

图 5 表示用两个不同批号的人抗 IL-12 mAb (C340) 抑制由 IL-2 加 IL-12 刺激的外周血淋巴细胞分泌 IFN γ 。在提到的 10 U/ml IL-2, IL-2 加 400 pg/ml IL-12, 或 IL-2 加 IL-12 和 mAb C340 存在下培养人 PBL (8×10^6 /ml) 24 小时。取出培养物上清液, 通过 EIA 测定 IFN γ 。

图 6 是表示人抗 IL-12 mAb (C340) 对 IL-12 加 IL-2 诱导的 LAK 细胞的细胞毒性的剂量依赖性抑制的柱状图。在 IL-12 (400 pg/ml) 加 IL-2 (10 U/ml) 和 mAb C340 (如指出的 5000 ng/ml 或 50 ng/ml) 存在下培养 LAK 效应细胞 (人 PBL, 8×10^6 /ml) 24 小时。洗涤 LAK 效应细胞, 以 80: 1 的效应细胞与靶细胞 (E: T) 比与 ^{51}Cr 标记的 Raji 靶细胞一起培养 4 小时, 测量 Raji 细胞裂解时释放至培养基中的 ^{51}Cr 的量。结果表示为三个正常供体标准误的平均值。IL-12 阳性对照 (IL-12) 是有 IL-12 和无抗体时孵育的效应细胞。本底 (BKGD) 是在无 IL-12 或抗体时孵育的效应细胞。

图 7A 和 7B 是表示人抗 IL-12 mAb (C340) 抑制用 IL-2 加 IL-12 诱导的 CD3+外周血单核细胞上表达 CD95 的柱状图。在 mAb C340 (10 μ g/ml) 存在或不存在下在含 0.1 ng/ml IL-12 和次最佳剂量的 IL-2 (50 IU/ml) 的培养基中培养 PBMC 72 小时。用抗 CD95-FITC 染色的流式细胞术测量 CD95 表达。用两色分析 (CD3 或 CD56-PE 与 CD95-FITC) 和正向与正交光散射进行控制。

图 8 表示重组人抗人 IL-12 抗体 (rC340) 以不能区分于纯化 mAb C340 的

方式与固定的 IL-12 结合。测定了三种产生 rC340 的重组细胞系的上清液中的 rC340 浓度，用 ELISA 评估上清液中的 IL-12 结合。用 2 $\mu\text{g/ml}$ 人 IL-12 包被板，用来自于原始杂交瘤（标准）或重组细胞系上清液的纯化 mAb C340 孵育。用碱性磷酸酶偶联的山羊抗人 IgG（重链 + 轻链）检测 IL-12 结合的抗体。

图 9A-9C 表示由三种独立来源的产生 rC340 的重组细胞亚克隆分泌的抗体的生长动力学和量（图 9A，亚克隆 C379B；图 9B，亚克隆 C381A；图 9C，亚克隆 C389A）。将重组细胞以 2×10^5 的起始密度种植于 T75 烧瓶中的标准培养基中。在各个时间，重悬细胞，测定培养基中的活细胞数目和量（ $\mu\text{g/ml}$ ）。

发明详述

本发明提供分离的、重组的和/或合成的人、灵长类、啮齿类、哺乳动物、嵌合、人源化和/或 CDR 嫁接的抗 IL-12 抗体和 IL-12 抗独特型抗体，以及包含至少一种编码至少一种抗 IL-12 抗体或 IL-12 抗独特型抗体的多核苷酸的组合物和编码核酸分子。本发明进一步包括，但不限于，所述核酸和抗体以及抗独特型抗体的制备方法和用途，包括诊断和治疗组合物、方法和设备。

这里用到的“抗白介素 12 抗体”、“抗 IL-12 抗体”、“抗 IL-12 抗体部分”或“抗 IL-12 抗体片段”和/或“抗 IL-12 抗体变体”等包括任何含有一种分子的肽或多肽，该分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分，例如，但不限于重链或轻链的互补决定区 (CDR) 或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区或其任意部分，或可以掺入到本发明的抗体中的 IL-12 受体或结合蛋白的至少一部分。这种抗体任选进一步影响特异性配体，例如，但不限于，这些抗体调节、减少、增加、拮抗、激动、减轻、缓解、阻断、抑制、消除和/或干扰至少一种 IL-12 活性或结合，或在体外、原位和/或体外具有 IL-12 受体活性或结合。作为非限制性的例子，本发明的适当抗 IL-12 抗体、特定部分或变体可以结合至少一种 IL-12、或其特定部分、变体或结构域。适当的抗 IL-12 抗体、特定部分或变体也可以任选影响至少一种 IL-12 活性或功能，例如，但不限于，RNA、DNA 或蛋白合成，IL-12 释放，IL-12 受体信号传递、膜 IL-12 裂解、IL-12 活性、IL-12 产生和/或合成。术语“抗体”进一步包含抗体、其消化片段、特定部分和变体，包括抗体模拟物或包括模拟

抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分,包括单链抗体及其片段。功能性片段包括与哺乳动物 IL-12 结合的抗原结合片段。例如,本发明也包括能够与 IL-12 或其部分结合的抗体片段,包括但不限于 Fab (例如通过木瓜蛋白酶消化), Fab' (如通过胃蛋白酶消化和部分还原) 和 F(ab')₂ (如通过胃蛋白酶消化), facb (如通过纤溶酶消化), pFc' (如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化), Fd (如通过胃蛋白酶消化、部分还原和再聚集), Fv 或 scFv (如通过分子生物学技术) 片段(见例如, Colligan, Immunology, 同上)。

这些片段可以通过如本领域公知的和/或这里描述的酶促裂解、合成或重组技术而产生。也可以用抗体基因产生各种截短形式的抗体,在这些基因中天然终止位点的上游导入了一个或多个终止密码子。例如可以设计一种编码 F(ab')₂ 重链部分的组合基因,使其包含编码重链 CH₁ 结构域和/或铰链区的 DNA 序列。可以通过常规技术将抗体的各部分以化学方式连接在一起,或用基因工程技术制备作为连续蛋白的抗体的各部分。

这里用到的术语“人抗体”是指这样一种抗体,其中该蛋白的每个部分(如 CDR, 构架区, CL, CH 结构域(如 CH₁, CH₂, CH₃), 铰链区, (VL, VH)) 在人类中基本是非免疫原性的, 仅仅有微小的序列改变或变异。同样, 称作灵长类(猴、狒狒、猩猩等)、啮齿类(小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠等)和其它哺乳动物抗体的抗体是指这种物种、亚属、属、亚家族、家族特异性抗体。此外,嵌合抗体包括上述抗体的任意组合。这种改变或变异相对于未修饰抗体任选并优选保留或减少人类在人或其它物种中的免疫原性。因此,人抗体与嵌合或人源化抗体不同。已经指出,人抗体可以由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(如重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可以包含在天然人抗体中不存在的连接肽。例如, Fv 可以包含连接肽,例如大约 2-8 个甘氨酸或其它氨基酸残基,它们连接重链可变区和轻链可变区。这种连接肽被认为是来源于人的。

也可以使用双特异性、异特异性、异偶联或类似的抗体,它们是对至少两个不同抗原具有结合特异性的抗体。在本申请中,一种结合特异性是针对至少一种 IL-12 蛋白,另一种是针对任意其它抗原。制备特异性抗体的方法是本领域中公知的。一般地,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特

异性(Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤产生 10 中不同抗体分子的可能混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化是繁杂的,产率很低。相似的程序公开于,例如 WO 93/08829, US Patent Nos, 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121: 210 (1986), 在此引入其完整内容作为参考。

用于本发明的方法和组合物中的抗 IL-12 抗体(也称作 IL-12 抗体)的特征可以任选在于与 IL-12 结合的高亲和性,并且任选并优选具有低毒性。具体地,本发明中使用其中各个成分,如可变区、恒定区和构架区的和/或其集合任选和优选具有低免疫原性的本发明的抗体、特定片段或变体。本发明中使用的抗体的特征任选在于它们能够在很长时间内治疗患者,具有可测量的症状缓解和/或可接受的毒性。低或可接受的免疫原性和/或高亲和性,以及其它适当的特性可以用于达到治疗结果。此处定义的“低免疫原性”是指在约 75%以下或优选 50%的受治疗患者中引起显著的 HAHA, HACA 或 HAMA 反应,和/或在受治疗患者中产生低滴度(用双抗原酶免疫测定时小于约 300, 优选小于约 100)(Elliott et al., Lancet 344 : 1125-1127 (1994), 在此引入其完整内容作为参考)。

用途

本发明的分离核酸可以用于产生至少一种抗 IL-12 抗体或其特定变体,所述抗体或其特定变体可以用于在细胞、组织、器官或动物(包括哺乳动物和人)中测量或起作用,用于诊断、监测、调节、治疗、缓解至少一种 IL-12 状况,帮助预防该状况的发生,或减轻其症状,所述状况选自,但不限于,至少一种免疫紊乱或疾病、一种心血管紊乱或疾病、感染性、恶性和/或神经紊乱或疾病或其它已知的或特定的 IL-12 相关状况。

这种方法包括将有效量的含有至少一种抗 IL-12 抗体的组合物或药物组合物给予需要这种调节、治疗、缓解、预防或减轻该症状、作用或机制的细胞、组织、器官、动物或患者。有效量可以包括每单次(如快速

注射(bolus)、多次或连续给药时约 0.001-500 mg/kg, 或每单次(如团快速注射)、多次或连续给药时达到约 0.01-5000 μ g/ml 的血清浓度, 或用此处描述的或相关领域中已知的方法完成和测定的任意有效范围或值。

引用文献

在此引入这里所引用的所有出版物或专利的完整内容作为参考, 它们显示了本发明时的技术状态和/或为本发明提供了说明并使本发明成为可能。出版物是指任何科学或专利公开, 或可以用任何媒体形式, 包括所有录音、电子或印刷形式获得的任何其它信息, 在此全文引入以下对比文献作为参考: Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)。

本发明的抗体

本发明的至少一种抗 IL-12 抗体可以任选通过本领域公知的细胞系、混合细胞系、永生化细胞或永生化细胞的克隆群产生。见, 例如, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 在此全文引入作为参考。

可以通过用适当的免疫原性抗原, 如分离的和/或 IL-12 蛋白或其部分(包括合成分子, 如合成肽)诱导产生人 IL-12 蛋白或其片段的特异性人抗体。可以用相似的方法产生其它特异性或普通哺乳动物抗体。可以用适当的技术制备免疫原性抗原和产生单克隆抗体。

在一种方法中,可以通过融合适当的永生细胞系和抗体产生细胞而产生。所述细胞系如骨髓瘤细胞系,例如,但不限于 Sp2/0, Sp2/0-AG14, NS0, NS1, NS2, AE-1, L. 5, > 243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A 等,或异骨髓瘤,或本领域已知的其它细胞系。见,例如, www.atcc.org, www.lifetech.com 等。所述抗体产生细胞例如,但不限于分离的或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体或其它免疫细胞或 B 细胞,或其它任何表达重链或轻链恒定区或可变区或构架区或 CDR 序列的细胞,这些序列可以是内源性或异源核酸,重组或内源性的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿类、马、山羊、绵羊、灵长类、真核生物的基因组 DNA, cDNA, rDNA, 线粒体 DNA 或 RNA, 叶绿体 DNA 或 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 单链、双链或三链、杂交序列等或其组合。见,例如 Ausubel, 同上, 和 Colligan, Immunology, 同上, 第二章, 在此引入作为参考。

抗体产生细胞也可以从用感兴趣的抗原免疫的人或其它适当动物的外周血或优选脾或淋巴结获得。也可以用任何其它适当的宿主细胞表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源性核酸。可以用选择性培养条件或其它适当的已知方法分离融合细胞(杂交瘤)或重组细胞,并且用有限稀释或细胞分选或其它公知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可以通过适当的测定(如 ELISA)进行选择。

可以使用其它适当的产生或分离具有所需特异性的抗体,包括,但不限于本领域公知和/或此处描述的从能够产生人抗体所有组成成分的肽或蛋白文库(所述文库例如,但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA 等、展示文库;如可以来自于 Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys, 见,例如 EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754;

(Scripps); EP 614989 (MorphoSys); W095/16027 (BioInvent) ; W088/06630; W090/3809 (Dyax); US4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); W089/06283 ; EP371 998 ; EP550 400; (Xoma); EP229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys)) ;或随机产生的肽或蛋白 - US 5723323, 5763192, 5814476, 5 817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, 目前应用的分子演变 (AME), 在此全文引入作为参考);或依赖于转基因动物免疫的肽或蛋白(所述转基因动物如 SCID 小鼠, Nguyen et al., Microbiol. Immunol. 41: 901-907 (1997); Sandhu et al., Crit. Rev. Biotechnol. 16: 95-118 (1996); Eren et al., Immunol. 93: 154-161 (1998), 每个文献或相关专利和申请均在此引入作为参考)选择重组抗体的方法。这些技术包括但不限于, 核糖体展示(Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937-4942 (May 1997); Hanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 14130-14135 (Nov. 1998));单细胞抗体产生技术(如选择的淋巴细胞抗体方法("SLAM") (美国专利 5,627,052, Wen et al., J. Immunol. 17: 887-892 (1987); Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-7848 (1996));凝胶微滴和流式细胞术(Powell et al., Biotechnol. 8: 333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray et al., J. Imm. Meth. 182: 155-163 (1995); Kenny et al., Bio/Technol. 13: 787-790 (1995)); B 细胞选择(Steenbakkers et al., Molec. Biol. Reports 19: 125-134 (1994); Jonak et al., Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands (1988))。

也可以使用本领域公知的工程化或人源化非人或人抗体的得到。一般地, 人源化或工程化的抗体具有一个或多个非人来源的氨基酸, 例如, 但不限于来源于小鼠、大鼠、非人灵长类或其它哺乳动物。这些人类氨基酸残基一般称作“输入”残基。一般来自于已知人序列的“输入”可变区、恒定区或其它结构域。已知的人 IgG 序列公开于, 例如

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/;
www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/TT/TT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.antibodyresource.com/;
mob.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.chime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983),

在此全文引入作为参考。

这些输入序列可以用于减少免疫原性，或用于减少、增强或修饰结合、亲和性、开率 (on-rate)、闭率 (off-rate)、亲和力、特异性、半衰期或任意其它适当的特征，如本领域所公知的。保留非人或人 CDR 序列的大部分或全部，用人氨基酸或其它氨基取代可变区和恒定区。任选对抗体人源化，保留抗体对抗原的高亲和性和其它有利的生物学特性。为了达到这一目的，通过采用母体和人源化序列的三维模型分析母体序列和各种得到的人源化序列的过程任选制备人源化抗体。通常可以得到三维免疫球蛋白模型，并且是本领域技术人员公知的。说明和演示所选的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构计算机程序是可得到的。检查这

些演示结果可以分析候选免疫球蛋白序列功能中残基的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白与其抗原的结合能力的残基。以这种方式,可以选择FR残基,并且与共有序列和输入序列结合,从而得到需要的抗体特征,如对靶抗原的亲合性增加。概言之,CDR残基直接并最大程度参与抗原结合的影响。本发明抗体的人源化或工程化可以采用任意已知的方法进行,例如,但不限于,以下文献中描述的方法, Winter (Jones et al., Nature 321: 522 (1986); Riechmann et al. Nature 332: 323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993), 美国专利 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT/ : US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, 在此全文引入每一篇文献作为参考。

抗 IL-12 抗体也可以任选通过免疫能够产生人类抗体所有组成成分转基因动物(如小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类等)而产生,如此处的描述和/或本领域所公知。产生人类抗 IL-12 抗体的细胞可以通过适当的方法从这些动物中分离并永生代,例如通过这里所描述的方法。

可以产生与人抗原结合的人类抗体所有组成成分的转基因动物是通过公知方法产生的(例如,但不限于授权于 Lonberg 等的美国专利 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 和 5,789,650, Jakobovits 等的 WO 98/50433, Jakobovits 等的 WO 98/24893, Lonberg 等的 WO 98/24884, Lonberg 等的 WO 97/13852, Lonberg 等的 WO 94/25585, Kucherlapate 等的 WO 96/34096, Kucherlapate 等的 EP 0463 151 B1, Kucherlapate 等的 EP 0710 719 A1, Surani 等的美国专利 5,545,807, Bruggemann 等的 WO 90/04036, Bruggemann 等的 EP 0438 474 B1, Lonberg 等的 EP 0814 259 A2, Lonberg 等的 GB 2 272 440 A, Lonberg et al. Nature 368 : 856-859 (1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6 (4) 579-591 (1994), Green et al,

Nature Genetics 7: 13-21 (1994), Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997), Taylor et al., Nucleic Acids Research 20 (23): 6287-6295 (1992), Tuailon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90 (8) 3720-3724 (1993), Lonberg et al., Int Rev Immunol 13 (1) : 65-93 (1995)和 Fishwald et al., Nat Biotechnol 14 (7): 845-851 (1996), 在此全文引入每一篇文献作为参考。一般地, 这些小鼠包含至少一种转基因, 所述转基因包含来自于至少一种人免疫球蛋白基因座的 DNA, 它进行了功能性重排, 或可以进行功能性重排。该小鼠中的内源性免疫球蛋白基因座可以被破坏或去除, 以便去除动物产生由内源性基因编码的抗体的能力。

可以通过肽展示文库方便地完成筛选特异性与相似蛋白或片段结合的抗体。该方法包括筛选大量肽中具有所需功能或结构的各个成员。肽展示文库的抗体筛选是本领域公知的。展示的肽序列长度可以为 3-5000 或更多氨基酸, 通常长度为 5-100 个氨基酸, 一般长度为约 8-25 个氨基酸。除了产生肽文库的直接化学合成方法, 也描述了一些重组 DNA 法。一种类型包括在噬菌体或细胞的表面展示肽序列。每种噬菌体或细胞含有具体展示的肽序列的编码核苷酸序列。这些方法描述于 PCT 专利公开 91/17271, 91/18980, 91/19818 和 93/08278。用于产生肽文库的其它系统同时具有体外化学合成和重组方法。见 PCT 专利公开 92/05258, 92/14843 和 96/19256。也见美国专利 5,658,754 和 5,643,768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可以从 Invitrogen (Carlsbad, CA) 和 Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) 等供应商购得。见, 例如 Enzon 的美国专利 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456; Dyax 的美国专利 5223409, 5403484, 5571698, 5837500; Affymax 的美国专利 5427908, 5580717; Cambridge antibody Technologies 的美国专利 5885793; Genentech 的美国专利 5750373; Xoma 的美国专利 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417; Colligan, 同上; Ausubel, 同上; Sambrook, 同上, 在此全文引入上述每个专利和出版物作为参考。

也可以使用至少一种编码抗 IL-12 抗体的核酸提供转基因动物或哺乳动物, 从而制备本发明的抗体, 所述动物如山羊、牛、马、绵羊等, 它

们在其乳汁中产生这些抗体。这些动物可以通过已知的方法提供, 见, 例如, 但不限于美国专利 5, 827, 690; 5, 849, 992; 4, 873, 316; 5, 849, 992; 5, 994, 616; 5, 565, 362; 5, 304, 489 等, 在此全文引入作为参考。

还可以使用至少一种编码抗 IL-12 抗体的核酸提供在植物部分或由其培养的细胞中产生所述抗体、特定部分或变体的转基因植物并培养植物细胞(例如, 但不限于烟草和玉米), 从而制备本发明的抗体。作为非限制性的实例, 已经成功使用表达重组蛋白的烟叶提供大量重组蛋白, 如, 使用诱导型启动子。见, 例如, Cramer et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240: 95-118 (1999) 及其中引用的文献。同样, 已经采用转基因玉米以商业生产水平表达哺乳动物蛋白, 其生物活性等于在其它重组系统产生或从天然来源纯化的蛋白。见, 例如 Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127-147 (1999) 及其中引用的文献。也已经从转基因植物种子, 包括烟草种子和马铃薯块根中大量产生了抗体, 包括抗体片段, 例如单链抗体(scFv's)。见, 例如 Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38: 101109 (1998) 及其中引用的文献。这样, 也可以根据已知方法采用转基因植物产生本发明的抗体。也见 Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 99-108 (Oct., 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13: 522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109: 341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22: 940-944 (1994); 及其中引用的文献。在此全文引用上述每一篇文献作为参考。

本发明的抗体可以以宽范围的亲和性(K_D)结合人 IL-12。在一种优选实施方案中, 本发明的至少一种人单克隆抗体可以任选以高亲和性结合人 IL-12。例如, 人单克隆抗体可以与人 IL-12 结合, 其 K_D 等于或小于约 $10^{-7}M$, 例如, 但不限于 $0.1-9.9$ (或其中的任意范围或任意值) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} 或其中的任意范围或任意值。

抗体与抗原的亲和性或亲和力可以采用适当的方法进行实验室测定。(见, 例如, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Imszlunolo, gy, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); 及此处描述的方法)。如果在不同的条件(如盐浓度, pH)下测定, 所测定的特定抗体-抗原相互作用的亲和性可以不同。因此, 优选标准抗体和抗原溶液、标准缓冲液, 如此处描述的缓冲液

测量亲和性和其它抗原-抗体结合参数(例如 K_D , K_i , K_d).

核酸分子

采用这里提供的信息,如编码 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 中的至少一种、其特定片段、变体或共有序列的至少 70-100% 的连续氨基酸的核苷酸序列,或包含这些序列中的至少一种的保藏载体,可以根据此处描述或本领域公知的方法获得编码至少一种抗 IL-12 抗体的本发明的核酸分子。

本发明的核酸分子可以是 RNA 形式,例如 mRNA, hnRNA, tRNA 或任意其它形式,或可以是 DNA 形式,包括,但不限于通过克隆或合成产生,或其任意组合而产生的 cDNA 和基因组 DNA。DNA 可以是三链、双链或单链,或其任意组合。DNA 或 RNA 的至少一条链的任意部分可以是编码链,也称作有义链,或可以是非编码链,也称作反义链。

本发明的分离核酸分子可以包括含有开放读码框(ORF),任选具有一种或多种内含子的核酸分子,例如,但不限于至少一种重链(如 SEQ ID NOS: 1-3)或轻链(如 SEQ ID NOS: 4-6)的至少一种 CDR,如 CDR1, CDR2 和/或 CDR3 的至少一个特定部分;包含抗 IL-12 抗体或可变区的编码序列的核酸分子(如 SEQ ID NOS: 7, 8);以及包含基本不同于上述那些的核苷酸序列的核酸分子,但由于遗传密码简并性,它们仍然编码此处描述和/或本领域公知的至少一种抗 IL-12 抗体。当然,遗传密码是本领域公知的。因此,本领域技术人员制备这种编码本发明的特异性抗 IL-12 抗体的简并核酸变体是常规的。见,例如, Ausubel, et al., 同上,这些核酸变体包括在本发明中。本发明的分离核酸分子的非限制性例子包括分别编码 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC 可变区和 LC 可变区的核酸。

如此处指出的,包含编码抗 IL-12 抗体的核酸的本发明的核酸分子可以包括,但不限于自身编码抗体片段的氨基酸序列的核酸;完整抗体或其部分的编码序列;抗体、片段或部分的编码序列,以及其它的序列,例如至少一种信号前导肽或融合肽的编码序列,它具有或不具有前面提到的其它编码序列,如至少一种内含子,同时具有其它的非编码序列,包括,但不限于非编码 5'和 3'序列,如在转录、mRNA 加工,包括剪接和聚腺苷酸化信号中起作用(例如 mRNA 的核糖体结合和稳定性)的转录的、未翻译的序列;编码其它氨基酸,如提供其它功能的氨基酸的其它序列。

因此，编码抗体的序列可以与标记序列融合，例如与促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化的肽的编码序列融合。

选择性与此处描述的多核苷酸杂交的多核苷酸

本发明提供了在选择性杂交条件下与此处公开的多核苷酸杂交的分离核酸。因此，该实施方案中的多核苷酸可以用于分离、检测和/或定量包含所述多核苷酸的核酸。例如，本发明的多核苷酸可以用于在保藏的文库中鉴定、分离或扩增部分或全长克隆。在一些实施方案中，多核苷酸是分离的基因组或 cDNA 序列，或者互补于来自于人或哺乳动物核酸文库的 cDNA。

优选地，cDNA 文库包含全长序列的至少 80%，优选包含全长序列的至少 85%或 90%，更优选包含全长序列的至少 95%。可以对 cDNA 文库进行标准化，以增加稀有序列的代表性。低或中度严格杂交条件一般、但不是专门用于相对于互补序列的序列等同性较低的序列。中度和高度严格性条件任选用具有更高等同性的序列。低严格性杂交条件允许具有约 70%的序列等同性的序列的选择性杂交，并且可以用于鉴定直向同源序列或共生同源序列。

本发明的多核苷酸任选编码由此处描述的多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包括可以用于与编码本发明的抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。见，例如 Ausubel, 同上; Colligan, 同上，在此全文引入作为参考。

核酸的构建

本发明的分离核酸可以利用本领域公知的 (a) 重组方法，(b) 合成技术，(c) 纯化技术或其组合进行制备。

核酸可以方便地包含除本发明的多核苷酸以外的序列。例如，可以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆位点插入核酸，以帮助多核苷酸的分离。也可以插入可翻译的序列以帮助本发明的被翻译的多核苷酸的分离。例如，一种六组氨酸标记序列提供了纯化本发明的蛋白的方便方法。除编码序列外，本发明的核酸任选为用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体、连接物或接头。

在这种克隆和/或表达序列中也可以加入其它序列，用于优化它们在克隆和/或表达中的功能，用于帮助多核苷酸的分离，用于改进多核苷酸向细胞中的导入。克隆载体、表达载体、连接物和接头的用途是本领域

中公知的。(See, 例如, Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

构建核酸的重组方法

本发明的分离核酸组合物, 如 RNA, cDNA, 基因组 DNA 或其任意组合可以用本领域技术人员公知的任何克隆方法从生物来源中获得。在一些实施方案中, 在严格条件下选择性与本发明的多核苷酸杂交的寡核苷酸探针被用于鉴定 cDNA 或基因组 DNA 文库中的所需序列。RNA 的分离和 cDNA 以及基因组文库的构建是本领域普通技术人员所公知的。(见, 例如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

核酸筛选和分离方法

可以采用基于本发明的多核苷酸序列的探针筛选 cDNA 或基因组文库, 如此处所公开。可以用探针与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交, 以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域技术人员将理解, 在测定中可以使用不同严格性程度的杂交, 杂交或洗涤介质中的任意一个都可以是严格的。当杂交条件更严格时, 探针和靶序列之间的互补性必须更高, 这样才能形成双链体。严格性程度可以由温度、离子强度、pH 和甲酰胺等部分变性溶剂的存在中的一个或多个条件进行控制。例如, 杂交的严格性可以通过改变反应物溶液的极性而方便地改变, 反应物溶液的极性可以通过例如在 0% - 50% 的范围内操作甲酰胺的浓度而改变。可检测的结合所要求的互补性程度(序列等同性)将根据杂交介质和/或洗涤介质的严格性而改变。互补性程度最佳为 100% 或 70-100%, 或其中的任意范围或任意值。然而, 应该理解, 探针和引物中的小量序列变异可以通过减少杂交和/或洗涤介质的严格性而补偿。

扩增 RNA 或 DNA 的方法是本领域公知的, 可以根据此处的教导和指导用于本发明, 而不需要过多的实验。

已知的扩增 RNA 或 DNA 的方法包括, 但不限于聚合酶链式反应(PCR)和相关的扩增方法(见, 例如, Mullis 等的美国专利 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188; Tabor 等的 4,795,699 和 4,921,794; Innis 的 5,142,033; Wilson 等的 5,122,464; Innis 的 5,091,310; Gyllensten 等的 5,066,584; Gelfand 等的 4,889,818; Silver 等的 4,994,370; Biswas 的 4,766,067; Ringold 的 4,656,134) 和 RNA 介导的扩增, 该扩增中使用靶序列的反义 RNA 作为模板用于双链 DNA 合成(Malek 等的美国专利 5,130,238, 商品名为 NASBA), 在此全文引入所有

参考文献作为参考。(见,例如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上。)

例如,可以用聚合酶链式反应(PCR)技术从基因组 DNA 或 cDNA 文库直接扩增本发明的多核苷酸序列和相关基因。也可以用 PCR 和其它体外扩增方法克隆需要表达的蛋白的编码核酸序列,制备用于检测样品中是否存在所需 mRNA 的探针,对核酸测序,或其它目的。足够指导技术人员使用体外扩增方法的技术的例子见, Berger, 同上, Sambrook, 同上, 和 Ausubel, 同上,以及 Mullis 等的美国专利 4,683,202 (1987);以及 Innis 等, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)。用于基因组 PCR 扩增的商品化试剂盒是本领域已知的。见,例如, Advantage-GC 基因组 PCR 试剂盒(Clontech)。此外,如 T4 基因 32 蛋白(Boehringer Mannheim)可以用于改进长 PCR 产物的产率。

构建核酸的合成方法

本发明的分离核酸也可以根据已知方法通过直接化学合成而制备(见,例如 Ausubel 等, 同上)。化学合成一般产生单链核苷酸,该单链核苷酸可以通过与互补序列杂交或通过用单链作为模板,采用 DNA 聚合酶进行聚合而转化为双链 DNA。本领域技术人员了解,尽管 DNA 的化学合成可以限制在约 100 或更多碱基的序列,也可以通过较短序列的连接获得较长的序列。

重组表达盒

本发明进一步提供了包含本发明的核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列,例如,编码本发明的抗体的 cDNA 或基因组序列可以用于构建重组表达盒,该表达盒可以被导入至少一种需要的宿主细胞。重组表达盒一般包含本发明的多核苷酸,该多核苷酸可操作性连接于指导多核苷酸在目的宿主中转录的转录起始调节序列。异源性和非源性(即内源性)启动子可以用于指导本发明的核酸分子的表达。

在一些实施方案中,作为启动子、增强子或其它元件的分离核酸可以导入本发明的多核苷酸的非异源形式中的适当位置(位于内含子上游、下游或内部),以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如,可以通过突变、去除和/或取代而体内或体外改变内源性启动子。

载体和宿主细胞

本发明也涉及包含本发明的分离核酸分子的载体,用重组载体基因工

程化的宿主细胞,以及通过本领域公知的重组技术产生至少一种抗 IL-12 抗体。见,例如, Sambrook 等,同上; Ausubel 等,同上,在此全文引入作为参考。

多核苷酸可以任选与含有可选择标记的载体连接,用于在宿主中增殖。一般地,将质粒载体导入一种沉淀物,例如磷酸钙沉淀,或导入具有带电脂质的复合物。如果载体是病毒,可以用适当的包装细胞系将其包装后转导至宿主细胞。

DNA 插入物可以操作性与适当启动子连接。表达构建体进一步包含转录起始位点、转录终止位点和转录区中的位点,以及用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的天然转录物的编码部分将优选包含位于起始处的翻译起始密码子和位于被翻译的 mRNA 末端适当位置的终止密码子(如 UAA, UGA 或 UAG),哺乳动物或真核细胞表达优选采用 UAA 和 UAG。

表达载体优选但任选包含至少一种可选择标记。这些标记包括,例如,但不限于真核细胞培养物的氨甲喋呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR, 美国专利 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶(GS, 美国专利 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739)抗性基因,以及大肠杆菌和其它细菌或原核生物的四环素或氨苄青霉素抗性基因(上述专利在此全文引入作为参考)。上述宿主细胞的适当培养基和培养条件是本领域公知的。适当的载体是本领域技术人员容易理解的。可以通过磷酸钙转染、DEAE-右旋糖苷介导的转染、阴离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它已知方法将载体构建体导入宿主细胞。这些方法在本领域有描述,例如 Sambrook, 同上,1-4 和 16-18 章; Ausubel, 同上,1, 9, 13, 15, 16 章。

本发明的至少一种抗体可以以修饰的形式,例如以融合蛋白的形式表达,并且可以包括分泌信号和其它异源功能区。例如,其它的氨基酸区域,特别是带电氨基酸区域可以添加至抗体的 N 端以改进纯化或随后的加工和储存过程中在宿主中的稳定性和耐受性。也可以将本发明的肽部分添加至本发明的抗体,以促进纯化。这些区域可以在抗体或其至少一个片段的最终制备之前去除。这些方法描述于许多实验室手册,例如 Sambrook, 同上,17.29-17.42 和 18.1-18.74 章; Ausubel, 同上,16, 17 和 18 章。

本领域普通技术人员了解,许多表达系统都可以用于表达编码本发明的蛋白的核酸。

作为选择,本发明的核酸可以通过在包含编码本发明的抗体的内源性DNA的宿主细胞中打开(turning on)(通过操作)而在宿主细胞中表达。这些方法是本领域公知的,如描述于美国专利 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746,和 5,733,761,在此引入每一篇专利作为参考。

用于产生抗体、其特定部分或变体的示例性的细胞培养物为哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统一般是单层细胞的形式,但也可以使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白的适当宿主细胞系,包括COS-1(如ATCC CRL 1650),COS-7(如ATCC CRL1651),HEK293,BHK21(如ATCC CRL-10),CHO(如ATCC CRL 1610)和BSC-1(如ATCC CRL-26)细胞系,Cos-7细胞,CHO细胞,hep G2细胞,P3X63Ag8.653,SP2/0-Ag14,293细胞,HeLa细胞等,它们可以容易从例如美国典型培养物保藏中心Manassas,Va(www.atcc.org)获得。特别优选的宿主细胞是P3X63Ag8.653细胞(ATCC保藏号CRL-1580)和SP2/0-Ag14细胞(ATCC保藏号CRL-1851)。在一种特别优选的实施方案中,重组细胞是P3X63Ab8.653或SP2/0-Ag14细胞。

这些细胞的表达载体可以包含一种或多种以下表达控制序列,例如,但不限于复制起点;启动子(如晚期或早期SV40启动子,CMV启动子(美国专利 5,168,062; 5,385,839)、HSV tk、pgk(磷酸甘油酯激酶)启动子、EF-1 α 启动子(美国专利 5,266,491)、至少一种人类免疫球蛋白启动子);增强子和/或加工信号位点,例如核糖体结合位点,RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点(如SV40大T Ag聚腺苷酸添加位点)和转录终止子序列。见,例如Ausubel等,同上;Sambrook,等,同上。其它用于产生本发明的核酸或蛋白的细胞是已知的和/或可得到的,例如从美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录(www.atcc.org)或商业来源得到。

当使用真核宿主细胞时,一般将聚腺苷酸化或转录终止子序列掺入载体。终止子序列的一个例子是来自于牛生长激素基因的聚腺苷酸化序列。也可以包括用于准确剪接转录物的序列。剪接序列的一个例子是SV40的VP1内含子(Sprague, et al., J. Virol. 45: 773-781 (1983))。此外,用于控制宿主细胞中复制的基因序列可以掺入本领域公知的载体中。

抗体的纯化

可以通过公知的方法从重组细胞培养物中回收并纯化抗 IL-12 抗体, 所述方法包括, 但不限于, 蛋白 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阴离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。也可以采用高效液相层析("HPLC")进行纯化。见, 例如, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, 或 *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 例如 1, 4, 6, 8, 9, 10 章, 在此全文引入作为参考。

本发明的抗体包括天然纯化产物, 化学合成程序产物, 以及通过重组技术从酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞等真核宿主产生的产物。根据在重组产生程序中使用的宿主, 本发明的抗体可以本发明的抗体可以被糖基化或可以未糖基化, 优选被糖基化。这些方法描述于许多实验室手册, 例如 Sambrook, 同上, 17.37-17.42 部分; Ausubel, 同上, 10, 12, 13, 16, 18 和 20 章; Colligan, *Protein Science*, 同上, 12-14 章, 在此全文引入所有这些文献作为参考。

抗 IL-12 抗体

本发明的分离抗体包含由任意适当的多核苷酸编码的此处公开的抗体氨基酸序列, 或任意分离的或制备的抗体。人抗体或抗原结合片段优选结合人 IL-12, 并因此部分或基本上中和该蛋白的至少一种生物活性。部分或基本上中和至少一种 IL-12 蛋白或其片段的生物活性的抗体或其特定部分或变体可以结合该蛋白或片段, 从而抑制由 IL-12 与 IL-12 受体的结合介导的或其它 IL-12 依赖性 IL-12 介导的机制。此处用到的术语“中和抗体”是指根据所采用的测定, 可以抑制约 20-120%, 优选至少约 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 的 IL-12 依赖性活性的抗体。抗 IL-12 抗体抑制 IL-12 依赖性活性的能力优选通过至少一种适当的 IL-12 蛋白或受体测定方法进行评估, 如此处的描述和/或本领域公知。本发明的人抗体可以是任意类型(IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 等)或同种型, 可以包含 κ 或 λ 轻链。在一种实施方案中, 人抗体包含一个 IgG 重链或限定的片段, 例如, 同种型 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 中的至少一种。这种类型的抗体可以通过使用含有至少一种人轻链(如 IgG, IgA 和 IgM (如 γ 1, γ 2, γ 3, γ 4)) 转基因的转基因小鼠或其它转基因非人哺乳动物制备, 如此处的描述和/或本领域所公知。在另一种实施方案中, 抗人 IL-12 人

抗体包含一个 IgG1 重链和一个 IgG1 轻链。

本发明的至少一种抗体结合至少一种特异于 IL-12 蛋白、其亚基、片段、部分或其任意组合的至少一种特定表位。所述至少一种表位包含至少一个抗体结合区，该区包含所述蛋白的至少一部分，该表位优选由所述蛋白的至少一个细胞外、可溶性、亲水性、外部或细胞质部分组成。所述至少一种特定表位可以包含 SEQ ID NO: 9 的至少 1-3 个氨基酸至 SEQ ID NO: 9 的连续氨基酸的完整特定部分的任意组合。

本发明的人抗体或抗原结合片段一般将包含一个抗原结合区，该区包含至少一个重链可变区的至少一个人互补决定区 (CDR1, CDR2 和 CDR3) 或变体和至少一个轻链可变区的至少一个人互补决定区 (CDR1, CDR2 和 CDR3) 或至少变体。作为非限制性的实例，抗体或抗原结合部分或变体可以包含至少一种具有 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的重链 CDR3，和/或具有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。在一种特定的实施方案中，抗体或抗原结合片段可以具有一种抗原结合区，该区包含具有相应 CDR1, CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列 (如 SEQ ID NOS: 1, 2 和/或 3) 的至少一个重链 CDR (即 CDR1, CDR2 和/或 CDR3) 的至少一部分。在另一种特定实施方案中，抗体或抗原结合部分或变体可以具有一种抗原结合区，该区包含具有相应 CDR1, CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列 (如 SEQ ID NOS: 4, 5 和/或 6) 的至少一个轻链 CDR (即 CDR1, CDR2 和/或 CDR3) 的至少一部分。在一种优选实施方案中，抗体或抗原结合片段的三种重链 CDR 和三种轻链 CDR 具有单克隆抗体 TNV148, TNV14, TNV15, TNV196, TNV15, TNV118, TNV32, TNV86 中的至少一种的相应 CRD 的氨基酸序列，如此处的描述。可以使用常规技术通过将抗体的各种部分 (如 CDR、构架区) 化学连接在一起而制备这些抗体，也可以通过常规重组 DNA 技术或任何其它适当方法制备和表达一种 (即一种或多种) 编码抗体的核酸分子而制备这些抗体。

抗 IL-12 抗体可以包含至少一种具有确定氨基酸序列的重链或轻链可变区。例如，在一种优选实施方案中，抗 IL-12 抗体包含至少一种任选具有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列的重链可变区和/或至少一种任选具有 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的轻链可变区。结合于人 IL-12 的抗体和包含确定的重链和轻链可变区的抗体可以用适当方法制备，例如噬菌体展示 (Katsube, Y., et al., Int J Mol. Med, 1 (5) : 863-868 (1998))

或使用转基因动物的方法，如本领域所公知和/或此处所描述。例如，可以用人 IL-12 或其片段免疫转基因小鼠以诱导抗体的产生，该转基因小鼠包含功能性重排的人免疫球蛋白重链转基因和包含来源于能够进行功能性重排的人免疫球蛋白轻链基因座的转基因。如果需要，可以采用此处描述的和/或本领域公知的方法分离抗体产生细胞以及制备杂交瘤或其它永生化的抗体产生细胞。作为选择，可以在适当宿主细胞中用其编码核酸或其部分表达抗体、其特定部分或变体。

本发明也涉及包含与此处描述的氨基酸序列基本相同的序列中的氨基酸的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和 CDR。这些抗体或抗原结合片段和包含所述链或 CDR 的抗体可以以高亲和性（如 K_D 小于或等于约 $10^{-9}M$ ）与人 IL-12 结合。与此处描述的序列基本相同的氨基酸序列包括含有保守氨基酸取代和氨基酸去除和/或插入的序列。保守氨基酸取代是指，用具有与第一种氨基酸相似的化学和/或物理特性（如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性）的第二种氨基酸代替第一种氨基酸。保守氨基酸取代包括用下列各组中的一种氨基酸代替另一种氨基酸：赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)；天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)；天冬酰胺(N)，谷氨酰胺(Q)，丝氨酸(S)，苏氨酸(T)，酪氨酸(Y)，K, R, H, D 和 E；丙氨酸(A)，缬氨酸(V)，亮氨酸(L)，异亮氨酸(I)，脯氨酸(P)，苯丙氨酸(F)，色氨酸(W)，甲硫氨酸(M)，半胱氨酸(C)和甘氨酸(G) F, W 和 Y；C, S 和 T。

氨基酸代码

组成本发明的抗 IL-12 抗体的氨基酸通常以缩写表示，可以通过单字母代码、三字母代码、名称或三核苷酸密码子表示氨基酸，这是本领域公知的（见(see Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994):

单字母代码	三字母代码	名称	三核苷酸密码子
A	Ala	丙氨酸	GCA, GCC, GCG, GCU
C	Cys	半胱氨酸	UGC, UGU
D	Asp	天冬氨酸	GAC, GAU
E	Glu	谷氨酸	GAA, GAG
F	Phe	苯丙氨酸	UUC, UUU

G	Gly	谷氨酸	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	组氨酸	CAC, CAU
I	Ile	异亮氨酸	AUA, AUC, AUU
K	Lys	赖氨酸	AAA, AAG
L	Leu	亮氨酸	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	甲硫氨酸	AUG
N	Asn	天冬酰胺	AAC, AAU
P	Pro	脯氨酸	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	谷氨酰胺	CAA, CAG
R	Arg	精氨酸	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	丝氨酸	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	苏氨酸	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	缬氨酸	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	色氨酸	UGG
Y	Tyr	酪氨酸	UAC, UAU

本发明的 IL-12 抗体可以包括这里所指出的通过天然突变或人工操作导致的一个或多个氨基酸取代、去除或添加。

当然，技术人员所进行的氨基酸取代的数目将取决于许多因素，包括前面提到的那些。一般说来，任何给定的抗 IL-12 抗体、片段或变体的氨基酸取代、插入或去除的数目不超过 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 例如 1-30 或其中的任意范围或任意值，如此处所规定。

可以通过本领域公知的方法鉴定对功能起关键作用的本发明的抗 IL-12 抗体中的氨基酸，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变（如 Ausubel, 同上, 8, 15 章; Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)）。后一种程序在分子中每个残基处导入单个丙氨酸突变。然后检测得到的突变分子的生物活性，例如，但不限于至少一种 IL-12 中和活性。也可以通过结晶、核磁共振或光亲和性标记等结构分析鉴定抗体结合的关键

位点(Smith, et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992) and de Vos, et al., Science 255: 306-312 (1992)).

本发明的抗 IL-12 抗体可以包括,但不限于选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 中至少一个的 5 个至所有连续氨基酸的至少一种部分、序列或组合。

本发明的 IL-12 抗体或其特定部分或变体可以包括,但不限于选自 SEQ ID NO: 1 的至少 3-5 个连续氨基酸, SEQ ID NO: 2 的 5-17 个连续氨基酸, SEQ ID NO: 3 的 5-10 个连续氨基酸, SEQ ID NO: 4 的 5-11 个连续氨基酸, SEQ ID NO: 5 的 5-7 个连续氨基酸, SEQ ID NO: 6 的 5-9 个连续氨基酸; SEQ ID NO: 7 的 Leu21, Lys76, Met83, Ser85 的至少一部分、序列或组合。

本发明的抗 IL-12 抗体可以进一步任选包含 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 或 8 中的至少一个的 5, 17, 10, 11, 7, 9, 119 或 108 个连续氨基酸的 70-100%中的至少一个的多肽。

在一种实施方案中,免疫球蛋白链的氨基酸序列或其部分(如可变区、CDR)与 SEQ ID NOS: 7, 8 中的至少一个的相应链的氨基酸序列具有约 70-100%的等同性(如 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 或其中的任意范围或任意值)。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO: 8 的序列相似,或重链 CDR3 的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO: 3 相似。优选地,用本领域公知的适当计算机算法确定出具有 70-100%的氨基酸等同性(即 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 或其中的任意范围或任意值)。

示例性的重链和轻链可变区序列见 SEQ ID NOS: 7, 8。本发明的抗体或其特定变体可以包含来源于本发明的一种抗体的任意数目的连续氨基酸,其中该数目选自抗 IL-12 抗体中连续残基数目的 10-100%。该连续氨基酸的亚序列长度为至少约 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 或更多,或其中的任意范围或任意值。此外,这些亚序列的数目可以是选自 1-20 的任意整数,例如至少为 2, 3, 4 或 5。

本领域技术人员可以理解,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体具有天然(非合成)、内源性或相关和已知抗体的至少

20%, 30%或 40%的特异活性, 优选至少 50%, 60%或 70%, 最优选具有天然、内源性或相关和已知抗体的至少 80%, 90%或 95% - 1000%的特异活性。测定和定量测定酶活性和底物特异性的方法是本领域技术人员公知的。

另一方面, 本发明涉及此处描述的人抗体和抗原结合片段, 它们可以通过共价连接有机部分而得到修饰。这种修饰可以产生具有改进的药代动力学特性(如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或分支的疏水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在特定实施方案中, 亲水聚合物基团的分子量可以为约 800 - 120000Da, 并且可以是聚链烷醇(如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯基吡咯烷酮, 脂肪酸或脂肪酸酯基团可以包含约 8 - 40 个碳原子。

本发明的修饰抗体和抗原结合片段可以包含与抗体直接或间接共价结合的一种或多种有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段结合的每一种有机部分可以独立是亲水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。这里用到的“脂肪酸”包括单羧酸和二羧酸, 这里用到的“亲水聚合物基团”是指在水中比在辛烷中的溶解度更高的有机聚合物。例如, 聚赖氨酸在水中比在辛烷中的溶解度更高。因此, 本发明包括通过共价连接聚赖氨酸而被修饰的抗体。适于修饰本发明的抗体的亲水聚合物可以是线性的或分支的, 可以包括, 例如聚链烷醇(如 PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG 等), 碳水化合物(如右旋糖苷、纤维素、寡糖、多糖等), 亲水氨基酸的聚合物(如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等), 聚环氧烷(如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)和聚乙烯基吡咯烷酮。修饰本发明的抗体的亲水聚合物作为独立分子实体的分子量优选为约 800 - 150,000Da。例如, PEG_{5,000} 和 PEG_{20,000}, 其中下标是以 Da 为单位表示的可以使用的聚合物的分子量。可以用 1 至约 6 个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代亲水聚合物。可以采用适当的方法制备用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物。例如, 包含胺基的聚合物可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧基偶联, 脂肪酸或脂肪酸酯的上的活化羧基(如用 N,N-羰基二咪唑活化)可以与聚合物上的羟基偶联。

适于修饰本发明的抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可以包含一个或多个不饱和单元。适于修饰本发明的抗体的脂肪酸包括, 例如正十二烷酸(C₁₂, 月桂酸), 正十四烷酸(C₁₄, 肉豆蔻酸), 正十八烷酸(C₁₈,

硬脂酸), 正二十烷酸(C_{20} , 花生酸), 正二十二烷酸(C_{22} , 山嵛酸), 正三十烷酸(C_{30}), 正四十烷酸(C_{40}), 顺式- Δ^9 -十八烷酸(C_{18} , 油酸), 全顺式- $\Delta^5, 8, 11, 14$ -二十碳四烯酸(C_{20} , 花生四烯酸), 辛二酸, 十四烷二酸, 十八烷二酸, 二十二烷二酸等。适当的脂肪酸酯包括含有线性或分支低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基可以包含1个至约12个, 优选1个至约6个碳原子。

可以通过适当的方法, 例如通过与一种或多种修饰剂反应而制备修饰的人抗体和抗原结合片段。此处用到的“修饰剂”是指包括活化基团的适当有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是指在适当条件下, 可以与第二种化学基团反应, 从而形成修饰剂与第二种化学基团之间的共价键的化学部分或官能团。例如, 胺反应性活化基团包括亲电子基团, 如甲苯磺酸酯、甲磺酰酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)等。可以与硫醇反应的活化基团包括, 例如, 马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基、二硫吡啶、5-硫羟-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB 硫醇)等。可以将醛官能团与含有酰胺或酰肼的分子偶联, 可以使叠氮基与三价磷酸基反应形成氨基磷酸酯或亚氨代磷酸酯键。用于将活化基团导入分子的适当方法是本领域公知的(见例如, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: San Diego, CA (1996))。活化基团可以直接与有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)结合, 或通过接头部分与其结合, 所述接头部分例如为二价 C_1 - C_{12} 基团, 其中一个或多个碳原子可以被氧、氮或硫等杂原子取代。适当的接头部分包括, 例如, 四甘醇、 $-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ 和 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 。例如, 可以在1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)存在下使单-Boc-烷基二亚胺(如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸反应, 在游离胺和脂肪酸羧基之间形成酰胺键, 以便产生包含接头部分的修饰剂。用四氟乙酸(TFA)处理产物, 从而使伯胺暴露, 可以从产物去除 Boc 保护基, 该伯胺可以与上述另一羧基偶联, 或可以与马来酸酐反应, 将得到的产物环化可以产生被活化的脂肪酸的马来酰亚胺衍生物。(见, 例如, Thompson, et al., WO 92/16221, 在此引入其完整教导作为参考。)

本发明的修饰抗体可以通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应而产生。例如, 通过采用胺反应性修饰剂, 例如, PEG 的 NHS 酯, 有机部

分可以与抗体以非位点特异性方式结合。也可以通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键（如链内二硫键）而制备修饰的人抗体或抗原结合片段。然后可以使被还原的抗体或抗原结合片段与硫醇反应性修饰剂反应，以便产生本发明的修饰抗体。可以采用反向蛋白水解等适当方法制备包含与本发明抗体的特异位点结合的有机部分的修饰人抗体和抗原结合片段（Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6 (10): 2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24 (1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (4): 456-463 (1997)），也可以采用描述于 Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996) 中的方法。

抗 IL-12 IG 来源的蛋白组分的抗独特型抗体

除单克隆抗体或嵌合抗 IL-12 抗体外，本发明还涉及特异于本发明的这些抗体的抗独特型（抗 Id）抗体。抗 Id 抗体是识别独特决定簇的抗体，所述决定簇一般与另一种抗体的抗原结合区相关。可以用抗体或其含 CDR 的区域免疫与作为 Id 抗体来源的动物相同物种和基因型（如小鼠株）的动物，从而制备抗 Id。被免疫的动物将识别免疫抗体的独特型决定簇并对其产生应答，并且产生抗 Id 抗体。抗 Id 抗体也可以用作“免疫原”以诱导另一动物的免疫应答，产生所谓的抗-抗独特型抗体。

抗 IL-12IG 来源的蛋白的组合物

本发明也提供至少一种以天然存在的组合物、混合物或形式提供的抗 IL-12 抗体组合物，其中包含此处描述的和/或本领域公知的至少一种、至少两种、至少四种、至少五种、至少六种或更多抗 IL-12 抗体。这些组合物包括天然存在的组分，包括抗 IL-12 抗体氨基酸序列的至少一种或两种全长的序列、C 和/或 N 端去除的变体、结构域、片段、或特定变体，该抗 IL-12 抗体氨基酸序列选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体。优选的抗 IL-12 抗体组合物包括抗 IL-12 抗体氨基酸序列的至少一种含 CDR 或 LBR 的部分的至少一种或两种全长的序列、片段结构域或变体，该抗 IL-12 抗体氨基酸序列选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体。更优选的组合物包含选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变

体中的至少一种的 40-99%。组分百分比是液体或干溶液、混合物、悬浮液、乳状液或胶体的重量、体积、浓度、体积克分子浓度或重量克分子浓度百分比，如本领域所公知或此处的描述。

本发明的抗 IL-12 抗体可以进一步包含任意适当的有有效量的组分或药物组分中的至少一种，所述组分包括需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或病人的至少一种抗 IL-12 抗体，该组合物任选进一步包含至少一种选自以下物质的组分：至少一种 TNF 拮抗剂（例如，但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂）、抗风湿药物（如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶）、肌肉松弛剂、麻醉药（narcotic）、非甾体类抗炎药（NSAID）、镇痛药、麻醉剂（anesthetic）、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂（如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、flurorquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂）、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素（如 epoetin α ）、非尔司啉（如 G-CSF, Neupogen）、沙拉斯（GM-CSF, 白细胞素）、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂（如 basiliximab、环孢霉素、daclizumab）、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 α 链道酶（Pulmozyme）、细胞因子或细胞因子拮抗剂。细胞因子的非限制性实例包括，但不限于 IL-1 至 IL-23 中的任意一种。适当的剂量是本领域公知的。见，例如，Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000)，在此全文引入作为参考。

这些抗癌或抗感染试剂也可以包括与本发明的至少一种抗体缔合、结

合、共同制剂化或共同给药的毒素分子。毒素可以任选选择性杀灭病变细胞或组织。病变细胞可以癌或其它细胞。这些毒素可以是，但不限于，纯化或重组毒素或毒素片段，它包含如选自蓖麻毒素、白喉毒素、蛇毒毒素或细菌毒素中的至少一种的毒素的至少一种功能性细胞毒性结构域。毒素也包括由任意天然存在的、突变或重组细菌或病毒的内毒素和外毒素，它们可以导致人类或其它哺乳动物中的任意病理学状况，包括致死的毒素休克。这些毒素可以包括，但不限于，产肠毒素的大肠杆菌的热不稳定性肠毒素(LT)、热稳定性肠毒素(ST)、志贺氏菌细胞毒素、Aeromonas 肠毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌肠毒素A(SEA)、B(SEB)或C(SEC)、链球菌肠毒素等。所述细菌包括，但不限于，产肠毒素的大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(如血清型 0157:H7 的菌株)、葡萄球菌物种(如金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌)、志贺氏菌物种(如痢疾志贺氏菌、弗氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌和索氏志贺氏菌)、沙门氏菌物种(如伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌)、梭菌物种(如产气荚膜梭菌、艰难梭菌、肉毒梭菌)、弯曲杆菌物种(如空肠弯曲杆菌、胚胎弯曲杆菌)、螺杆菌物种(如幽门螺杆菌)、气单胞菌物种(如温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌)、类志贺邻单胞菌、小肠结肠盐耶尔森氏菌、Vibrios 物种(如霍乱弧菌、副溶血弧菌)、克雷白氏菌物种、铜绿假单胞菌和链球菌。见，例如，Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N. J., 1992; Wood et al, FEMS Microbiology Immunology, 76: 121-134 (1991); Marrack et al, Science, 248: 705-711 (1990), 在此全文引入这些参考文献的完整内容作为参考。

本发明的抗 IL-12 抗体化合物、组合物或其组合可以进一步包含任意适当辅助物质，例如，但不限于稀释液、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂溶剂、防腐剂、佐剂等中的至少一种。优选药学可接受的辅助物质。这些无菌溶液的非限制性的例子和制备方法是本领域公知的，例如，但

不限于 Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。可以常规选择药学可接受的载体, 这些载体适于抗 IL-12 抗体、片段或变体组合物的给药方式、溶解度和/或稳定性, 如本领域公知或此处的描述。

用于本发明的组合物的药物赋形剂和添加剂包括, 但不限于蛋白、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(如糖, 包括单糖、双糖、三糖、四糖和寡糖; 衍生糖, 如醛醇、醛酸、酯化糖等; 以及多糖或糖聚合物), 可以单个或组合存在, 单独或组合占重量或体积 1-99.99%。示例性的蛋白赋形剂包括血清白蛋白, 如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。可以起缓冲作用的代表性氨基酸/抗体成分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括, 例如单糖, 如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等; 双糖, 如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等; 多糖, 如棉籽糖、松三糖、麦芽糖糊精、右旋糖苷、淀粉等; 以及醛醇, 如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇(葡萄糖醇)、肌醇等。用于本发明的优选的碳水化合物赋形剂是甘露醇、海藻糖和棉籽糖。

抗 IL-12 抗体组合物也可以包含缓冲剂或 pH 调节剂; 一般地, 缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐, 例如柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐; Tris, 盐酸 tromethamine、或磷酸缓冲液。用于本发明的组合物中的优选缓冲剂是有机酸盐如柠檬酸盐。

此外, 本发明的抗 IL-12 抗体组合物可以包含聚合物赋形剂/添加剂, 如聚乙烯基吡咯烷酮、ficolls(一种聚合的糖)、dextrans(如环糊精, 例如 2-羟基丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、矫味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(如聚山梨醇酯, 例如 "TWEEN 20" 和 "TWEEN 80")、脂质(如磷脂、脂肪酸)、类固醇(如胆固醇)和螯合剂(如 EDTA)。

适用于抗 IL-12 抗体、部分或变体组合物的这些和其它已知药物赋形剂和/或添加剂是本领域公知的, 例如, 列于 "Remington: The Science &

Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), 和 "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), 在此引入其完整公开内容作为参考。优选的载体或赋形剂物质是碳水化合物(如糖和醛醇)和缓冲剂(如柠檬酸盐)或聚合剂。

制剂

如前面所指出的, 本发明提供了稳定的制剂, 优选为含有盐或选择的盐的磷酸缓冲液, 以及含有防腐剂的储存溶液和制剂, 适于药用或兽医用途的多用途储存制剂, 它包含置于药学可接受制剂中的至少一种抗 IL-12 抗体。储存制剂包含至少一种已知的防腐剂或任选自至少一种苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁(如六水合物)、对羟基苯甲酸烷基酯(甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠, 或其在水性稀释液中的混合物。可以使用本领域公知的任何适当浓度或混合物, 例如 0.001-5%, 或其中的任意范围或任意值, 例如, 但不限于, 0.001, 0.003, 0.005, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 或其中的任意范围或任意值。非限制性实例包括, 无防腐剂, 0.1-2%间甲酚(如 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.1-3%苯甲醇(如 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 0.001-0.5%乙基汞硫代水杨酸钠(如 0.005, 0.01), 0.001-2.0%苯酚(如 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005-1.0%对羟基苯甲酸烷基酯(如 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%)等。

如前面所指出的, 本发明提供了一种制品, 包括包装材料和至少一个管形瓶, 其中包含至少一种抗 IL-12 抗体的溶液和规定的缓冲剂和/或防腐剂, 任选溶于一种水性稀释液, 其中所述包装材料包括一种标签, 它指出所述溶剂可以保留 1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72 小时或更长的时间。本发明进一步包括一种制

品, 包括包装材料和含有至少一种冷冷冻干燥的抗 IL-12 抗体的第一个管形瓶, 和含有规定的缓冲剂或防腐剂的水性稀释液的第二个管形瓶, 其中包装材料包括一种标签, 它指导患者在水性稀释液中重构至少一种抗 IL-12 抗体, 以便形成可以保留 24 小时或更长时间的溶液。

根据本发明而使用的至少一种抗 IL-12 抗体可以通过重组方法产生, 包括从哺乳动物细胞或转基因制剂重组产生, 或者从其它生物来源纯化, 如此处所描述或本领域公知。

在本发明的产品中的至少一种抗 IL-12 抗体的范围包括在湿/干体系中重构时, 产生约 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 至约 1000 mg/ml 的量, 但更低和更高的浓度也是可行的, 并且依赖于准备使用的递送载体, 例如, 溶液制剂将不同于经皮贴剂、肺、经粘膜或渗透或微泵方法。

优选地, 水性稀释液任选进一步包含药学可接受的防腐剂, 优选的防腐剂包括选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯(甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠, 或其混合物的那些。用于制剂中的防腐剂的浓度为足以产生抗微生物作用的浓度。这些浓度取决于选择的防腐剂, 并且本领域技术人员很容易确定。

可以任选和优选将其它赋形剂, 如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐增强剂加入稀释液中。甘油等等渗剂通常以公知的浓度使用。优选加入生理耐受的缓冲剂以改进 pH 控制。制剂可以有宽范围的 pH 值, 例如 pH 约 4-10, 优选 pH 约 5-9, 最优选约 6.0-8.0。本发明的制剂的 pH 优选为约 6.8-7.8。优选的缓冲剂包括磷酸缓冲液, 最优选为磷酸盐, 特别是磷酸缓冲盐水(PBS)。

也可以任选向制剂或组合物中加入其它添加剂, 如药学可接受的增溶剂, 如 Tween 20 (聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单月桂酸酯)、Tween 40 (聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单棕榈酸酯)、Tween 80 (聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单油酸酯)、Pluronic F68 (聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)和 PEG (聚乙二醇)或非离子型表面活性剂, 例如聚山梨糖醇酯 20 或 80、或 poloxamer 184 或 188、Pluronic®多元醇其它共聚物, 以及螯合剂如 EDTA 和 EGTA, 以减少聚集。如果用泵或塑料容器给予制剂, 则这些添加剂特别有用。药学可接受的表面活性剂的存在减少了蛋白聚集的倾向。

可以通过以下方法制备本发明的制剂, 包括将至少一种抗 IL-12 抗体

和选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯（甲基、乙基、丙基、丁基等）、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠，或其混合物在一种水性稀释液中混合。采用常规的溶解和混合步骤在一种水性稀释液中混合所述至少一种抗 IL-12 抗体和防腐剂。为了制备适当的制剂，例如，可以将测得量的溶于缓冲液中的至少一种抗 IL-12 抗体在其量足以提供需要浓度的蛋白和防腐剂的缓冲液中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如，加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

可以将本发明的制剂以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者，双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗 IL-12 抗体的管形瓶，将其用含有水、防腐剂和/或赋形剂，优选磷酸缓冲剂和/或盐水和溶于水性稀释液中的选择的盐的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次，并且可以满足病人治疗的单个或多个周期，因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

本发明的制品可用于在 24 小时左右或更长的时间内给药。因此，本发明的制备为患者提供了显著的优势。本发明的制剂任选可以储存在约 2 - 40℃ 的温度下储存，并且在长时间保持蛋白的生物活性，因此，包装标签指出，该溶液可以在超过 6、12、18、24、36、48、72 或 96 小时的时间内保留和/或使用。如果使用了储存稀释液，该标签指出，该溶液可以在 1-12 个月，半年，一年半和/或两年的时间用不完。

本发明中的至少一种抗 IL-12 抗体溶液可以通过包括在水性稀释液中混合至少一种抗体的方法而制备。采用常规的溶解和混合步骤进行混合。为了制备适当的稀释液，例如，可以将测得量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白和任选的防腐剂或缓冲液量混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如，加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

本发明的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者，双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗 IL-12 抗体的管形瓶，将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次，并且可以满足病人治疗的单个或多

个周期，因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

本发明的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给药店、诊所、或其它机构和设施，从而直接提供给患者，其中双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗 IL-12 抗体的管形瓶，将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。此情况下的澄清溶液最多可达 1 升或甚至更多，提供于大的储存容器，从中可以一次或多次取出至少一种抗体溶液的更小部分，将其转移至更小的管形瓶中，由药店或诊所提供给客户和/或病人。

公认的包括这些单个管形瓶体系的设备包括用于递送溶液的笔式注射器，例如 BD Pens, BD Autojector[®], Humaject[®], NovoPen[®], B-DPen[®], AutoPen[®], 以及 OptiPen[®], GenotropinPen[®], Genotronorm Pen[®], HumatroPen[®], Reco-Peno[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®], 如由以下公司生产: Becton Dickenson (Franklin, Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com)。公认的包括双管形瓶的设备包括用于在药筒中递送重构的冷冷冻干燥药物的笔式注射器系统，例如 HumatroPen[®]。

当前要求保护的产品包括包装材料。除了管理部门要求的信息，包装材料提供了可以使用该产品的条件。本发明的包装材料为病人提供了用两个管形瓶中的湿/干产品在水性稀释液中重构至少一种抗 IL-12 抗体，以形成溶液，并且在 2-24 小时或更长的时间内使用该溶液的说明。对于单一管形瓶中的溶液产品，该标签说明该溶液可以在 2-24 小时或更长的时间内使用。当前要求保护的产品可以用于人类药用产品用途。

本发明的制剂可以通过以下方法制备，包括混合至少一种抗 IL-12 抗体和选定的缓冲液，优选含有盐水或选定的盐的磷酸缓冲液。用常规溶解和混合步骤在水性缓冲液中混合至少一种抗体和缓冲剂。为了制备适当的制剂，例如，可以将测得量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白和缓冲剂的量与所需缓冲剂在水中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如，加入各成分的顺序、是否使

用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

要求保护的稳定或储存的制剂可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者，双管形瓶包含一个装有至少一种冷冷冻干燥的抗 IL-12 抗体的管形瓶，将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次，并且可以满足病人治疗的单个或多个周期，因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

可以根据本发明通过各种递送方法给予患者此处描述的至少一种抗 IL-12 抗体的稳定或储存制剂或溶液；所述方法包括皮下或肌肉注射；经皮、肺部、经粘膜、植入、渗透泵、药筒、微泵，或其它本领域公知的本领域技术人员了解的方法。

治疗用途

本发明也提供了使用本发明的至少一种 IL-12 抗体调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种本领域公知或此处描述的 IL-12 相关疾病的方法。

本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 IL-12 相关疾病的方法，所述疾病包括，但不限于，肥胖、免疫相关疾病、心血管疾病、感染性疾病、恶性疾病或神经疾病中的至少一种。

本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法，所述疾病包括，但不限于，以下疾病中的至少一种：类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、全身发病的幼年类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强制性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维化、系统性血管炎/ wegener's 肉芽肿、肉样瘤病、睾丸炎/输精管切除逆转程序、过敏性/特应性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、过敏性接触性皮炎、过敏性结膜炎、过敏性肺炎、移植、器官移植排斥、移植物抗宿主疾病、全身炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性菌脓毒症、革兰氏阴性菌脓毒症、培养阴性菌脓毒症、真菌脓毒症、中性粒细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、创伤/出血、烧伤、离子辐射暴露、急性胰

腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎性病变、肉样瘤病、克隆氏病、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、过敏反应、过敏性鼻炎、枯草热、终年性肺炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、风疹、全身过敏、皮炎、恶性贫血、溶血性疾病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰腺移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体排斥、抗受体过敏反应、格雷夫斯病、雷诺氏病、B型胰岛素抵抗糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III型过敏反应、系统性红斑狼疮、POEMS综合征(多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆 γ 球蛋白病和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆 γ 球蛋白病和皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮病、混合性结缔组织病、特发性阿狄森氏病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、白癜风、血管炎、MI心脏切开后综合征、IV型过敏、接触性皮炎、过敏性肺炎、同种异体排斥、细胞内生物引起的肉芽肿、药物过敏、代谢性/特发性威尔逊氏病、血色素沉着病、 α -1-抗胰岛素缺陷、糖尿病肾病、桥本氏甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬化、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶液质、囊性纤维化、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、家族性血巨噬细胞淋巴细胞组织细胞增多症、皮肤病学状况、牛皮癣、斑秃、肾病综合征、肾炎、肾小球肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、中毒、惊厥前状态、okt3治疗、抗cd3治疗、细胞因子治疗、化疗、放疗(如包括,但不限于 toasthenia、贫血、恶液质等)、慢性水杨酸盐中毒等。见,例如 the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 在此引入作为参考。

本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种心血管疾病的方法,所述疾病包括,但不限于,

进一步包括在之前、同时和/或之后,给予至少一种选自下组的药物:至少一种 TNF 拮抗剂(例如,但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂)、抗风湿药物(如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂(如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、fluroquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂)、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素(如 epoetin α)、非尔司啉(如 G-CSF, Neupogen)、沙拉斯(GM-CSF, 白细胞素)、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如 basiliximab、环孢霉素、daclizumab)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 α 链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。细胞因子的非限制性实例包括,但不限于 IL-1 至 IL-23 中的任意一种。适当的剂量是本领域公知的。见,例如, Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), 在此全文引入作为参考。

适用于本发明的组合物、联合治疗、共同给药、设备和/或方法的 TNF 拮抗剂(进一步包括本发明的至少一种抗体、其特定片段和变体)包括,但不限于,抗 TNF 抗体、其抗原结合片段、以及与 TNF 特异性结合的受体分子;防止和/或抑制 TNF 合成、TNF 释放或 TNF 作用于靶细胞的化合物,如酰胺吡啶酮、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂(如己酮可可碱、环戊苯吡酮)、A2b 腺苷受体激动剂和 A2b 腺苷受体增强剂;防止和/或抑制

TNF 受体信号传递的化合物, 如有丝分裂原激活的蛋白 (MAP) 激酶抑制剂; 阻断和/或抑制膜 TNF 裂解的化合物, 如金属蛋白酶抑制剂; 阻断和/或抑制 TNF 活性的化合物, 如血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂 (如卡托普利); 和阻断和/或抑制 TNF 活性产生和/或合成的化合物, 如 MAP 激酶抑制剂。

这里用到的“肿瘤坏死因子抗体”、“TNF 抗体”、“TNF α 抗体”或片段等在体外、原位和/或优选体内减少、阻断、抑制、消除或干扰 TNF α 活性。例如, 本发明的适当 TNF 人抗体可以结合 TNF α 并且包括特异性与 TNF α 结合的抗 TNF 抗体、其抗原结合片段、及其特定突变体或结构域。适当的 TNF 抗体或片段也可以减少、阻断、抑制、消除、干扰、防止和/或抑制 TNF RNA、DNA 或蛋白合成、TNF 释放、TNF 受体信号传递、膜 TNF 裂解、TNF 活性、TNF 产生和/或合成。

嵌合抗体 cA2 由称作 A2 的高亲和性中和性小鼠抗人 TNF α IgG1 抗体的抗原结合可变区和人 IgG1 κ 免疫球蛋白的恒定区组成。人 IgG1 Fc 区改进同种异体基因抗体效应功能, 增加血清循环半衰期和减少抗体的免疫原性。嵌合抗体 cA2 的亲合力和表位特异性来源于鼠抗体 A2 的可变区。在特定实施方案中, 编码鼠抗体 A2 可变区的核酸的优选来源是 A2 杂交瘤细胞系。

嵌合 A2 (cA2) 以剂量依赖性方式中和天然和重组人 IL-12 的细胞毒作用。从嵌合抗体 cA2 和重组人 IL-12 的结合测定可以计算出, 嵌合抗体 cA2 的亲合常数为 $1.04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。通过竞争性抑制测定单克隆抗体特异性和亲和性的优选方法可以参见, Harlow, et al., antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor et al., Immunology Today, 4 : 72-79 (1983); Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York (1987-2000); 和 Muller, Meth. Enzymol., 92 : 589-601 (1983), 在此全文引入每一篇作为参考。

在特定实施方案中, 鼠单克隆抗体由称作 c 134A 的细胞系产生。嵌合抗体 cA2 由称作 c 168A 的细胞系产生。

其它可以用于本发明的单克隆抗 IL-12 抗体的例子在本领域中有描述 (见, 例如, 美国专利 No. 5,231,024; Moller, A. et al., Cytokine 2 (3): 162-169 (1990); 美国申请 No. 07/943,852 (1992 年 9 月 11 日提交); Rathjen et al., 国际公开 No. WO 91/02078 (1991 年 2 月 11 日公开); Rubin et al., 欧洲专利申请 No. 0 218 868 (1987 年 4 月 22 日公开); Yone et al., 欧洲专利申请 No. 0 288 088 (1988 年 10 月 26 日); Liang, et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 137: 847-854 (1986); Meager, et al., Hybridoma 6: 305-311 (1987); Fendly et al., Hybridoma 6: 359-369 (1987); Bringman, et al., Hybridoma 6: 489-507 (1987); 和 Hirai, et al., J. Immunol. Meth. 96: 57-62 (1987), 在此全文引入作为参考。

TNF 受体分子

用于本发明的优选 TNF 受体分子是以高亲和性与 TNF α 结合 (见, 例如 Feldmann et al., 国际公开 No. WO 92/07076 (1992 年 4 月 30 日公开); Schall et al., Cell 61: 361-370 (1990); 和 Loetscher et al., Cell 61: 351-359 (1990), 在此全文引入作为参考) 并且任选具有低免疫原性的受体。具体地, 55 kDa (p55 TNF-R) 和 75 kDa (p75 TNF-R) TNF 细胞表面受体可以用于本发明。这些受体的截短形式, 包括受体的细胞外结构域 (ECD) 或其功能部分 (见, 例如 Corcoran et al., Emir. J. Biochem. 223: 831-840 (1994)) 也可以用于本发明。已经在尿和血清中检测到了作为 30 kDa 和 40 kDa 的 TNF α 抑制性结合蛋白的截短形式的 TNF 受体, 其中包含 ECD (Engelmann, H. et al., J. Biol. Chem. 265: 1531-1536 (1990))。TNF 受体多聚分子和 TNF 免疫受体融合分子, 及其衍生物和片段或部分是本发明的方法和组合物中可以使用的 TNF 受体分子的其它例子。可以用于本发明的 TNF 受体分子的特征在于可以在延长的时间中治疗患者, 具有良好至极佳的症状缓解作用, 以及低毒性。低免疫原性和/或高亲和性, 以及其它未确定的特性, 都可以对达到治疗结果起作用。

用于本发明的 TNF 受体多聚分子包含两种或多种 TNF 受体的 ECD 的所有或功能性部分, 它们通过一种或多种多肽接头或其它非肽接头, 例如聚乙二醇 (PEG) 连接。多聚分子可以进一步包含指导多聚分子表达的被分泌蛋白的信号肽。这些多聚分子和产生它们的方法描述于美国申请 No. 08/437, 533 (1995 年 5 月 9 日提交), 在此引入其完整内容作用参考。

用于本发明的方法和组合物中的TNF免疫受体融合分子包含一种或多种免疫球蛋白分子的至少一部分和一种或多种TNF受体的全部或功能性部分。这些免疫受体融合分子可以组装为单体、或异或同多聚体。免疫受体融合分子也可以是单价或多价的。这种TNF免疫受体融合分子的一个例子是TNF受体/IgG融合蛋白。TNF免疫受体融合分子和产生它们的方法在本领域中已有描述(Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 21: 2883-2886 (1991); Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Peppel et al., J. Exp. Med. 174: 1483-1489 (1991); Kolis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215-219 (1994); Butler et al., Cytokine 6 (6): 616-623 (1994); Baker et al., Eur. J. Immunol. 24: 2040-2048 (1994); Beutler et al., 美国专利 No. 5,447,851; 和美国申请 No. 08/442,133 (1995年5月16日提交), 在此全文引入每一篇作为参考)。产生免疫受体融合分子的方法也参见 Capon et al., 美国专利 No. 5,116,964; Capon et al., 美国专利 No. 5,225,538; 和 Capon et al., Nature 337: 525-531 (1989), 在此全文引入作为参考。

TNF受体的功能等价物、衍生物、片段或区域是指TNF受体分子的部分, 或编码TNF受体分子的TNF受体分子序列的部分, 它们的大小和序列足以在功能上类似于可以用于本发明的TNF受体分子(如, 以高亲和性结合TNF并且具有低免疫原性)。TNF受体分子的功能等价物也包括修饰的TNF受体分子——该分子在功能上类似于可以用于本发明的TNF受体分子(如, 以高亲和性结合TNF并且具有低免疫原性)。例如, TNF受体分子的功能等价物可以包含“沉默”密码子或一种或多种氨基酸取代、去除或添加(如用一种氨基酸取代另一种氨基酸; 或用编码相同或不同疏水性氨基酸的密码子取代另一种编码疏水性氨基酸的密码子)。参见, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York (1987-2000)。

细胞因子包括任何已知的细胞因子。见, 例如 CopewithCytokines.com。细胞因子拮抗剂包括, 但不限于, 任何抗体、其片段或模拟物、任何可溶性受体、其片段或模拟物、任何小分子拮抗剂或任何其组合。

治疗处理。本发明的任何方法可以包括治疗IL-12介导的疾病, 包括

给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种 IL-12 抗体的组合物或药物组合物。所述方法可以任选进一步包括用于治疗这些免疫疾病的共同给药或联合治疗，其中给予所述至少一种抗 IL-12 抗体、其特定部分或变体，进一步包括在之前、同时和/或之后，给予至少一种选自下组的药物：至少一种 TNF 拮抗剂（例如，但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂）、抗风湿药物（如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶）、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药（NSAID）、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂（如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、flurorquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂）、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素（如 epoetin α ）、非尔司啉（如 G-CSF, Neupogen）、沙拉斯（GM-CSF, 白细胞素）、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂（如 basiliximab、环孢霉素、daclizumab）、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 α 链道酶（Pulmozyme）、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

一般地，病理学状况的治疗是通过给予有效量或剂量的至少一种抗 IL-12 抗体组合物而实现的，该组合物中平均总共含有至少约 0.01 - 500mg 至少一种抗 IL-12 抗体/千克患者体重/剂，优选每单次或多次给药约 0.01 - 100mg 抗体/千克患者体重，这取决于组合物中含有的比活性。作为选择，有效血清浓度可以包括每单次或多次给药 0.1 - 5000 $\mu\text{g/ml}$ 的血清浓度。适当的剂量是医学从业者已知的，当然，取决于特定的疾病状态、给予的组合物比活性、以及患者正在进行的具体治疗。在一些情况下，为获得需要的治疗量，必须提供重复给药，即重复特定监测或计量剂量的各次给药，其中重复各次给药，直到达到需要的每日剂量或

效果。

优选的剂量可以任选包括 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 和/或 100-500 mg/kg/给药，或其中的任意范围、任意值或任意分数，或每单次或多次给药达到 0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、和/或 5000 $\mu\text{g/ml}$ 血清浓度，或其中的任意范围、任意值或任意分数。

此外，给药剂量可以根据已知因素而改变，例如具体试剂的药代动力学特征，以及其给药模式和途径；接受者的年龄、健康和体重；症状的性质和范围；同时进行治疗的类型、频率，以及需要的效果。活性成分的剂量通常为约 0.1-100mg/kg 体重。通常为 0.1-50，优选 0.1-10mg/kg/给药，或以有效获得需要的结果的持续释放形式。

作为非限制性实例，人或动物的治疗可以通过一次或周期剂量的至少一种本发明的抗体而提供，其剂量为 0.1-100 mg/kg，例如 0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90 或 100 mg/kg/日，在第 1、2、3、4、5、6、7、

8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、或40天中的至少一天给药，或作为选择或额外地在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、或52周的至少一周给药，或作为选择或额外地在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20年中的至少一年中给药，或其任意组合，采用单次输注或重复给药。

适于内部给药的剂型（组合物）一般包含约0.1mg - 约500mg活性成分/单位或容器。在这些药物组合物中，活性成分的量一般为组合物总重量的约0.5-99.999 wt%。

对于肠胃外给药，可以将抗体配制为与药学可接受的肠胃外载体结合或分别提供的溶液、悬浮液、乳状液或冷冻干燥的粉末。这些载体的例子为水、盐水、林格氏液、右旋糖溶液、和1-10%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体如固定的油。载体或冷冻干燥的粉末可以含有维持等渗性（如氯化钠、甘露醇）和化学稳定性（如缓冲剂和防腐剂）。该制剂可以通过已知或适当技术灭菌。

适当的药物载体描述于本领域的标准参考文献 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol 的最新版本。

作为选择的给药

可以根据本发明采用许多公知的和开发的方式给予药学有效量的本发明的至少一种抗 IL-12 抗体，尽管在以下说明书中使用了肺部给药，根据本发明可以使用其它给药方式，得到适当的结果。

本发明的 IL-12 抗体在载体中递送，作为溶液、乳状液、胶体或悬浮液、或作为干粉末递送，采用适于通过此处描述的或本领域公知的吸入或其它方式进行给药的任何设备和方法。

肠胃外制剂和给药

肠胃外给药的制剂可以包含作为常规赋形剂的无菌水或盐水、聚链烷醇如聚乙二醇、植物油、氢化萘等。可以通过适当的乳化剂或润湿剂和悬浮剂根据已知方法制备用于注射的水性或油性悬浮液。用于注射的试剂可以是无毒的、非口服给药的稀释剂，如水溶液或无菌可注射溶液

或溶剂中的悬浮液。作为可使用的载体或溶剂，可以使用水、林格氏液、等渗盐水等；作为普通溶剂或悬浮溶剂，可以使用无菌的不挥发油。对于这些目的，可以使用任意类型的不挥发油和脂肪酸，包括天然或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸；天然或合成的或半合成的甘油单酯或二酯或三酯。肠胃外给药是本领域公知的，包括，但不限于，常规注射工具、描述于美国专利 No. 5,851,198 的气加压的无针头注射设备，和描述于美国专利 No. 5,839,446 的激光穿孔器设备，在此全文引入上述专利作为参考。

作为选择的递送

本发明进一步涉及通过肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮设备而给予至少一种抗 IL-12 抗体。可以制备至少一种抗 IL-12 抗体的组合物，用于肠胃外（皮下、肌内或静脉内）或任意其它给药，特别是以液体溶液或悬浮液给药；用于阴道或直肠给药，特别是以半固体形式给药，例如，但不限于以霜和栓剂形式给药；用于颊部或舌下给药，例如，但不限于以片剂或胶囊形式给药；或用于鼻内给药，例如，但不限于以粉末、鼻滴液或气溶胶或某些制剂形式给药；或用于经皮给药，例如，但不限于以凝胶、油膏、洗液、悬浮液或贴剂递送系统给药，同时用化学增强剂如二甲基亚砷修饰皮肤结构或增加经皮贴剂的药物浓度 (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994,) 在此全文引入作为参考)，或使用氧化剂以便将含有蛋白和肽的制剂应用于皮肤上 (WO 98/53847)，或施加电场以便产生电穿孔等瞬时转运途径，或增加带电药物通过皮肤的迁移率，如离子电渗疗法，或应用超声，如超声电渗疗法 (美国专利 Nos. 4,309,989 和 4,767,402) (上述文献和专利在此全文引入作为参考)。

肺部/鼻部给药

对于肺部给药，至少一种抗 IL-12 抗体组合物优选以优选到达肺的下气道或鼻窦的颗粒大小进行递送。根据本发明，至少一种抗 IL-12 抗体

可以通过本领域公知的各种吸入或鼻设备递送,用于通过吸入进行治疗剂的给药。这些设备可以将气溶胶化的制剂沉积在患者的鼻窦腔或肺泡中,所述设备包括计量吸入器、喷洒器、干粉产生器、喷雾器等。其它适于指导抗体的肺或鼻给药的设备是本领域公知的。所有这些设备可以使用适于以气溶胶形式给予分散抗体的制剂。这些气溶胶可以由溶液(水性和非水性)或固体颗粒组成。Ventolin[®]等计量吸入器一般使用推进气体并且在吸入时要求激活(见,例如 WO 94/16970, WO 98/35888)。由 Inhale Therapeutics 出售的 Turbuhaler[™] (Astra)、Rotahaler[®] (Glaxo)、Diskus[®] (Glaxo)、Spiros[™] 吸入器 (Dura) 等干粉吸入器以及 Spinhaler[®] 粉末吸入器使用呼吸激活的混合粉末 (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, 在此全文引入作为参考)。AERx[™] Aradigm、Ultravent[®] 喷洒器 (Mallinckrodt) 和 Acorn II[®] 喷洒器 (Marquest Medical Products) ((US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), 上述参考文献在此全文引入作为参考) 从溶液产生气溶胶, 而计量吸入器、干粉吸入器等产生小颗粒气溶胶。这些商购吸入设备的具体例子是用于代表适于本发明的实施的具体设备, 不准备限制本发明的范围。包含至少一种抗 IL-12 抗体的组合物优选通过干粉吸入器或喷雾器递送。用于本发明的至少一种抗体的给药的吸入设备具有一些需要的特征。例如, 通过吸入设备递送是有利的, 它可靠、可重复并且准确。吸入设备可以任选递送小的干颗粒, 例如小于约 10 μm , 优选约 1-5 μm , 以便能够较好地呼吸。

作为喷雾给予 IL-12 抗体组合物

可以迫使至少一种抗 IL-12 抗体的悬浮液和溶液在压力下通过喷嘴, 从而产生包括 IL-12 抗体组合物的喷雾。可以选择喷嘴大小和构型、施加的压力和填入液体的速度而达到需要的输出量和颗粒大小。可以通过连接于毛细管或喷嘴的电场产生电喷雾。有利的是, 由喷雾递送的至少一种抗 IL-12 抗体组合物蛋白的颗粒大小小于约 10 μm , 优选约 1-5 μm , 最优选约 2-3 μm 。

适用于喷雾器的至少一种抗 IL-12 抗体组合物蛋白的制剂一般包含溶于水溶液中的抗体组合物蛋白, 其浓度为约每毫升溶液约 0.1-约 100 mg 至少一种抗 IL-12 抗体组合物蛋白或 mg/gm, 或其中的任意范围或任意值, 例如, 但不限于 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、

3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90 或 100 mg/ml 或 mg/gm。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定组合物蛋白的试剂，例如缓冲剂、还原剂、大分子蛋白或碳水化合物。用于配制抗体组合物蛋白的大分子蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制抗体组合物蛋白的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合物蛋白制剂也可以包含表面活性剂，它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的抗体组合物蛋白的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂，例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇，以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约 0.001 - 14%。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨糖醇酯 80、聚山梨糖醇酯 20 等。用于 IL-12 抗体或其特定部分或变体的蛋白制剂的其它试剂是本领域公知的，也可以包含在制剂中。

通过喷洒器给予 IL-12 抗体组合物

可以通过喷洒器给予抗体组合物，例如喷射喷洒器或超声喷洒器。一般地，在喷射喷洒器中，用压缩气体源通过一个孔而产生高速气体喷射。当其它膨胀超过喷嘴时，产生低压区，该区将抗体组合物蛋白溶液拉拽通过与液体储存器连接的毛细管。通过毛细管的液体流出管时被剪切成不稳定的细丝和微滴，产生气溶胶。可以使用各种构型、流速和挡板类型一般从给定的喷射喷洒去达到需要的性能特征。在超声喷洒器中，采用高频电能产生振动、机械能，一般采用压电式换能器。该能量被直接或通过耦合流体转移至抗体组合物制剂，产生包含抗体组合物蛋白的气溶胶。有利地，由喷洒器递送的抗体组合物蛋白的颗粒大小小于约 10 μm ，优选约 1 - 5 μm ，最优选约 2 - 3 μm 。

喷射喷洒器或超声喷洒器中适用的至少一种抗 IL-12 抗体制剂的浓度一般为每毫升溶液约 0.1 - 100mg 至少一种抗 IL-12 抗体蛋白。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定至少一种抗 IL-12 抗体组合物蛋白的试剂，例如缓冲剂、还原剂、大分子蛋白或碳水化合物。用于配制至少一种抗 IL-12 抗体的大分子蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于

配制至少一种抗 IL-12 抗体的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗 IL-12 抗体制剂也可以包含表面活性剂，它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的至少一种抗 IL-12 抗体的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂，例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇，以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约 0.001 - 4%。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨糖醇酯 80、聚山梨糖醇酯 20 等。用于抗体蛋白等蛋白制剂的其它试剂是本领域公知的，也可以包含在制剂中。

通过计量吸入器给予 IL-12 抗体组合物

在计量吸入器 (MDI) 中，在一个小罐中装有作为包含液化的压缩气体的混合物的推进剂、至少一种抗 IL-12 抗体和任意赋形剂或其它添加剂。计量阀的激活释放作为气溶胶的混合物，优选含有大小小于约 $10\mu\text{m}$ ，优选约 $1-5\mu\text{m}$ ，最优选约 $2-3\mu\text{m}$ 的。需要的气溶胶颗粒大小可以通过使用由本领域技术人员公知的各种方法，包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点浓缩等方法产生的抗体组合物蛋白制剂而获得。优选的计量吸入器包括由 3M 或 Glaxo 制造并且使用氢氟碳推进剂的那些。

计量吸入器设备中使用的至少一种抗 IL-12 抗体一般包含精细分割的粉末，其中含有作为非水介质中的悬浮物的至少一种抗 IL-12 抗体，例如，在表面活性剂的帮助下悬浮于一种推进剂中。用于此目的的推进剂可以是任何常规材料，如氟氟碳、氢氟氟碳、氢氟碳或烃，包括三氟甲烷、二氟二氟甲烷、二氟四氟乙醇和 1,1,1,2-四氟乙烷、HFA-134a (氢氟链烷-134a)、HFA-227 (氢氟链烷-227) 等。推进剂优选是氢氟碳。可以选择表面活性剂以稳定作为推进剂中的悬浮物的至少一种抗 IL-12 抗体，从而保护活性试剂免受化学降解等。适当的表面活性剂包括山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等。在一些情况下，溶液气溶胶优选使用乙醇等溶剂。本领域已知的用于蛋白制剂的其它试剂，如蛋白，也可以包含在制剂中。

本领域的普通技术人员将认识到，本发明的方法可以通过此处没有描述的设备对至少一种抗 IL-12 抗体组合物进行肺部给药而达到。

口服制剂和给药

口服制剂依赖于佐剂 (如间苯二酚和非离子型表面活性剂如聚氧乙烯油酯和正十六烷基聚乙醚) 的共同给药而人工增加肠壁的通透性，并

且依赖于酶抑制剂（如胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟代硫酸酯(DFP)和抑肽酶）的共同给药而抑制酶促降解。用于口服给药的固态剂型的活性组成化合物可以与至少一种添加剂混合，所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露醇、海藻糖、棉籽糖、麦芽糖醇、右旋糖苷、淀粉、琼脂、arginates、几丁质、脱乙酰壳聚糖、果胶、黄芪树胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物和甘油酯。这些剂型也可以包含其它类型的添加剂，如非活性稀释剂、润滑剂如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂如山梨酸、抗坏血酸、 α 生育酚、抗氧化剂如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、增甜剂、矫味剂、芳香剂等。

片剂和丸剂可以进一步加工成肠衣制剂。用于口服给药的液体制剂包括允许医学应用的乳状液、糖浆、酏剂、悬浮液和溶液制剂。这些制剂可以含有所述领域常用的非活性稀释剂，如水。也已经描述将脂质体用作胰岛素和肝素的药物递送系统（美国专利 No. 4,239,754）。最近，已经使用混合氨基酸（类蛋白）的人工聚合物微球体来递送药物（美国专利 No. 4,925,673）。此外，美国专利 No. 5,879,681 和美国专利 No. 5,587,753 中描述的载体化合物也已经用于口服递送生物活性试剂，这是本领域公知的。

粘膜制剂和给药

对于通过粘膜表面吸收，给予至少一种抗 IL-12 抗体的组合物和方法包括含有多种亚微米颗粒、粘膜吸附性大分子、生物活性肽和水性连续相的乳状液，它通过达到乳状液颗粒的粘膜吸附而促进通过粘膜表面的吸收（美国专利 Nos. 5,514,670）。适于施加本发明的乳状液的粘膜表面可以包括角膜、结膜、颊、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠给药途径。用于阴道或直肠给药的制剂，如栓剂，可以包含赋形剂，例如聚链烷醇、凡士林、可可油等。用于鼻内给药的制剂可以是固体，包含赋形剂，例如乳糖，或可以是水性或油性的鼻滴液。对于颊部给药，赋形剂包括糖、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等（美国专利 Nos. 5,849,695）。经皮制剂和给药

对于经皮给药，将至少一种抗 IL-12 抗体包被于递送载体，如脂质体或聚合纳米颗粒、微颗粒、微胶囊或微球体中（除非特别指出，统一称作微颗粒）。已知有许多适当的设备，包括由以下成分组成的微颗粒：合

成聚合物如多羟基酸，如聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物、聚原酸酯、聚酐和聚磷腈，以及天然聚合物如胶原、聚氨基酸、铝和其它蛋白、藻酸盐和其它多糖、及其组合（美国专利 Nos. 5,814,599）。

延长的给药和制剂

有时可能需要在延长的时间内向受试者递送本发明的化合物，例如，单次给药在一周至一年的时间。可以使用各种缓释、储存或植入剂型。例如，该剂型可以包含化合物的药学可接受的无毒盐，该化合物在体液中具有低溶解度，例如，(a)多价酸的酸加成盐，所述酸例如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、pamoic 酸、藻酸、聚谷氨酸、萘单或二磺酸、聚半乳糖醛酸等；多价金属阳离子的盐，所述阳离子如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等，或与有机阳离子如 N, N'-二苄基-乙二胺或乙二胺形成的盐；或 (c)，(a) 和 (b) 的组合物，如鞣酸锌。此外，本发明的化合物或优选相对不溶的盐，如前面描述的化合物和盐，可以与芝麻油等适于注射的物质一起配制于单硬脂酸铝凝胶等凝胶中。特别优选的盐是锌盐、鞣酸锌盐、pamoate 盐等。用于注射的缓释储存制剂的另一种类型包含用于包被于胶囊中的分散的化合物或盐，所述化合物或盐位于缓慢降解、无毒、非抗原性的聚合物中，如描述于美国专利 No. 3,773,919 的聚乳酸/聚乙醇酸聚合物。该化合物或优选相对不溶的盐，如前面描述的化合物和盐，也可以配制于胆固醇基质硅橡胶丸，特别是用于动物。其它缓释、储存或植入制剂，如气体或液体脂质体是本领域公知的（美国专利 Nos. 5,770,222 和 "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1978）。

前面已经一般性地描述了本发明，参考以下实施例可以更容易理解本发明，实施例是用于举例说明，而不是限制性的。

用载体 pC4 表达 IL-12 抗体表达。质粒 pC4 是质粒 pSV2-dhfr（ATCC 保藏号 No. 37146）的衍生物。该质粒含有 SV40 早期启动子控制下的小鼠 DHFR 基因。可以通过在选择性培养基（如 α -MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD）中培养细胞而选择用这些质粒转染的中国仓鼠卵巢细胞或其它缺乏二氢叶酸活性的细胞，该培养基中补加了化疗剂氨甲喋呤。抗氨甲喋呤 (MTX) 的细胞中的 DHFR 基因的扩增已经有记载（见，例如 F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253: 1357-1370 (1978); J. L.

Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097: 107-143 (1990); 和 M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9: 64-68 (1991)). 在不断增加的 MTX 浓度下培养的细胞通过靶酶 DHFR 的过量产生发生了对药物的抗性, 这是因为 DHFR 基因的扩增。如果将第二种基因连接于 DHFR 基因, 它通常被共扩增并且过度表达。本领域公知该方法可以用于开发携带多于 1000 拷贝的被扩增基因的细胞系。因此, 当撤去氨甲喋呤时, 获得了含有整合到宿主细胞的一个或多个染色体的被扩增基因。

质粒 pC4 含有用于表达目的基因的劳斯肉瘤病毒长末端重复(LTR)的强启动子(Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985)) 和从人巨细胞病毒(CMV)的立即早期基因的增强子分离的片段(Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985)). 启动子下游是允许基因整合的 BamHI, XbaI, 和 Asp718 限制酶裂解位点。该质粒在这些克隆位点之后含有 3' 内含子和大鼠前胰岛素原基因的聚腺苷酸化位点。其它高效启动子也可以用于表达, 例如人 β 肌动蛋白启动子、SV40 早期或晚期启动子或来自于其它逆转录病毒, 如 HIV 和 HTLV I 的长末端重复。Clontech 的 Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统和相似的系统可以用于在哺乳动物细胞中以经调节的途径表达 IL-12 (M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). 对于 mRNA 的聚腺苷酸化, 也可以使用例如人生长激素或球蛋白基因的其它信号。携带整合到染色体中的目的基因的稳定细胞系也可以通过用可选择标记如 gpt, G418 或潮霉素共转染而进行选择。在开始时使用 G418 加氨甲喋呤等一种以上的可选择标记是有利的。

用限制酶消化 pC4 质粒, 然后通过本领域公知的程序用小牛肠磷酸酶去磷酸化。然后从 1% 琼脂糖凝胶分离载体。

根据已知的方法步骤, 使用了编码完整 IL-12 抗体的 DNA 序列, 如相应于本发明的 IL-12 抗体 HC 和 LC 可变区的 SEQ ID NOS: 1 和 2 所示序列。此构建体中也使用了编码适当人恒定区 (即 HC 和 LC 区) 的分离核酸 (如提供于载体 p1351)。

然后用 T4 DNA 连接酶连接分离的可变区和恒定区编码 DNA 和去磷酸化的载体。然后转化大肠杆菌 HB 101 或 XL-1 Blue 细胞, 并且例如用限制酶分析鉴定含插入 pC4 质粒的片段的细菌。

用缺乏 DHFR 基因的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞进行转染。用 $0.5 \mu\text{g}$

pSV2-neo 质粒采用脂质转染共转染 5 μ g 表达质粒 pC4。pSV2-neo 质粒含有显性可选择标记,即来自于 Tn5 的 neo 基因,它编码一种酶,该酶赋予对包括 G418 的一组抗生素的抗性。将这些细胞种植在补加 1 μ g/ml G418 的 α MEM 中。两天后,用胰蛋白酶消化细胞并且种植在杂交瘤克隆板上(Greiner, Germany),置于补加 10、25 或 50 ng/ml 氨甲喋呤+1 μ g/ml G418 的 α MEM 中。大约 10-14 天后,用胰蛋白酶消化单个克隆,然后种植在 6 孔培养皿或 10ml 烧瓶中,使用不同浓度的氨甲喋呤(50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM)。然后将在最高浓度氨甲喋呤下生长的细胞转染到新的 6 孔板中,该板含有更高浓度的氨甲喋呤(1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM)。重复同样的程序,直到获得在 100-200 mM 的浓度下生长的克隆。例如,通过 SDS-PAGE 和蛋白印迹或反相 HPLC 分析所需基因产物的表达。

实施例 2: 用转基因小鼠产生与人 IL-12 反应的高亲和性人 IgG 单克隆抗体

概要

使用含有人类重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠,产生高亲和性的完全的人单克隆抗体,该抗体可以治疗性使用以抑制 IL-12 的作用,从而治疗一种或多种 IL-12 介导的疾病。用人重组 IL-12 免疫含有人重链和轻链可变区和恒定区抗体转基因的 (CBA/J x C57/BL6/J) F₂ 杂交小鼠 (Taylor et al., Intl. Immunol. 6: 579-591 (1993); Lonberg, et al., Nature 368: 856-859 (1994); Neuberger, M., Nature Biotech. 14: 826 (1996); Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996))。一些融合产生了一组或多组完全的人 IL-12 反应性 IgG 单克隆抗体。进一步鉴定完全的人抗 IL-12 抗体。它们都是 IgG1 μ 。发现这些抗体的亲和常数为约 $1 \times 10^9 - 9 \times 10^{12}$ 。这些完全的人单克隆抗体的预料不到的高亲和性使它们成为 IL-12 相关疾病、病理或紊乱的治疗应用的适宜候选物。

缩写

BSA - 牛血清白蛋白

CO₂ - 二氧化碳

DMSO - 二甲基亚砷

EIA - 酶免疫测定

FBS - 胎牛血清

H₂O₂ - 过氧化氢

HRP - 辣根过氧化物酶\

ID - 皮内

Ig - 免疫球蛋白

IL-12 - 组织坏死因子 α

IP - 腹膜内

IV - 静脉内

Mab - 单克隆抗体

OD - 光密度

OPD - 邻苯二胺二氢氯化物

PEG - 聚乙二醇

PSA - 青霉素, 链霉素, 两性霉素

RT - 室温

SQ - 皮下

v/v - 体积/体积

w/v - 重量/体积

材料和方法

动物

可以表达人抗体的转基因小鼠是本领域公知的并且可以购得(例如, 购自 GenPharm International, San Jose, CA; Abgenix, Fremont, CA 及其它公司), 它们表达人免疫球蛋白, 而不是小鼠 IgM 或 Ig μ 。例如, 这些转基因小鼠含有人序列转基因, 这些基因进行了 V(D)J 连接、重链类转换、和体细胞突变, 以产生人序列免疫球蛋白所有组成成分(Lonberg, et al., Nature 368: 856-859 (1994))。轻链转基因可以部分来自包含近一半种系人 V μ 区的酵母人工染色体克隆。此外, 重链转基因可以编码人 μ 和人 $\gamma 1$ (Fishwild, et al., Nature Biotechnology 14: 845-851 (1996)) 和/或 $\gamma 3$ 恒定区。来源于适当基因系的小鼠可以用于免疫和融合过程, 以产生完全的人 IL-12 单克隆抗体。

免疫

可以用一种或多种免疫方案产生抗 IL-12 人杂交瘤。在以下示例性的免疫程序后可以进行最初的几次融合, 但也可以使用其它相似的公知程

序。用 1-1000 μg 重组人 IL-12 对一些 14-20 周龄的雌性和/或手术去势的转基因雄性小鼠进行 IP 或 ID 免疫, 这些重组人 IL-12 采用等体积的 TITERMAX 或弗氏完全佐剂进行乳化, 其最终体积为 100-400 μL (如 200)。每只小鼠也可以任选在 2 个 SQ 位点之一接受溶于 100 μL 生理盐水的 1-10 μg 。然后可以在 1-7, 5-12, 10-18, 17-25 和/或 21-34 天后用等体积 TITERMAX 或弗氏不完全佐剂乳化的 IL-12 进行 IP (1-400 μg) 和 SQ (1400 $\mu\text{g} \times 2$) 免疫。12-25 和 25-40 天之后可以通过不抗凝条件下的眶后穿刺而从小鼠取血。然后使血液在 RT 下凝固 1 小时, 收集血清, 根据已知的方法采用 IL-12 EIA 测定滴度。当重复注射不导致滴度增加时进行融合。此时, 可以用稀释于 100 μL 生理盐水的 1-400 μg IL-12 给予小鼠最后一次 IV 加强注射。3 天后, 通过断颈椎处死小鼠, 在无菌条件下去除脾, 浸入含有 100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、和 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素 B (PSA) 的 10 mL 冰冷盐酸缓冲盐水 (PBS)。通过用 PSA-PBS 无菌灌注脾而收获脾细胞, 用台盼蓝染色排除法计数, 并且重悬于含 25 mM Hepes 的 RPMI 1640 培养基。

细胞融合

可以根据已知的方法, 如本领域公知的方法进行融合, 鼠骨髓瘤细胞与存活脾细胞的比例为 1: 1 至 1: 10。作为非限制性的实例, 将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下, 在 1 mL 50% (w/v) PEG/PBS 溶液 (PEG 分子量 1450, Sigma) 中重悬沉淀 30 秒以上。然后通过缓慢加入 10.5 mL 含有 25 mM Hepes (37 $^{\circ}\text{C}$) 的 RPMI 1640 培养基 1 分钟以上, 以便终止融合。以 500-1500 rpm 将融合细胞离心 5 分钟。然后将细胞重悬于 HAT 培养基 (RPMI 1640 培养基, 含有 25 mM Hepes, 10% Fetal Clone I 血清 (Hyclone), 1 mM 丙酮酸钠, 4 mM L-谷氨酰胺, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素, 2.5% Origen 培养补充物 (Fisher), 10% 653 调节的 RPMI 1640/ Hepes 培养基, 50 μM 2-巯基乙醇, 100 μM 次黄嘌呤, 0.4 μM 氨基嘌呤和 16 μM 胸苷), 并且以 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 平铺于 15 个 96 孔平底组织培养板。然后将板置于含有 5% CO_2 和 95% 空气的潮湿的 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育器中 7-10 天。

检测小鼠血清中的人 IgG 抗 IL-12 抗体

可以用固相 EIA 从小鼠血清中筛选人 IL-12 的特异性人 IgG 抗体。简言之, 用 PBS 中的 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IL-12 包被平板过夜。在含有 0.02% (v/v) Tween 20 的 0.15M 盐水中洗涤后, 用 PBS 中的 1% (w/v) BSA, 以 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 在

RT 下封闭各个孔 1 小时。立即使用平板或在 -20°C 下冷冻,以便将来使用。在 IL-12 包被的板上以 $50\text{ }\mu\text{L/孔}$ 在 RT 下孵育小鼠血清稀释液 1 小时。洗涤平板,然后用在 1% BSA-PBS 中 1:30000 特异性稀释的 $50\text{ }\mu\text{L/孔}$ HRP 标记的山羊抗人 IgG Fc 在 RT 下探测 1 小时。再次洗涤平板,在 RT 下加入 $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ 柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液 (0.1M 柠檬酸和 0.2M 硫酸钠, 0.01% H_2O_2 和 1 mg/mL OPD) 15 分钟。然后加入 $25\text{ }\mu\text{L/孔}$ 终止溶液 (4N 硫酸), 在 490 nm 下通过自动平板分光光度计读出 OD 值。

在杂交瘤上清液中检测完全的人免疫球蛋白

可以使用适当的 EIA 检测分泌完全人免疫球蛋白的生长阳性杂交瘤。简言之,可以用溶于碳酸钠缓冲液的 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 山羊抗人 IgG Fc 在 4°C 下包被 96 孔板 (VWR, 610744) 过夜。洗涤板,用 1% BSA-PBS 在 37°C 下封闭 1 小时,立即使用或冷冻于 -20°C 。 37°C 下在板上孵育未稀释杂交瘤的上清液。洗涤平板,然后用在 1% BSA-PBS 中 1:10000 稀释的 HRP 标记的山羊抗人 IgG κ 在 37°C 下探测 1 小时。然后按上述方法用底物溶液孵育板。测定完全的人抗 IL-12 活性

可以用适当的 RIA 或其它测定方法同时测定上述杂交瘤的活性。例如,按上述方法在山羊抗人 IgG Fc 板上孵育上清液,洗涤,然后用放射性标记的 IL-12 在室温下探测 1 小时,每孔具有适当的计数。用 PBS 洗涤孔两次,用适当的计数器对结合的放射性标记的 IL-12 进行定量。

可以在细胞培养物中扩增人 IgG1 κ 抗 IL-12 分泌性杂交瘤,通过有限稀释进行系列亚克隆。可以扩增得到的克隆细胞群,并且在冷冻培养基 (95% FBS, 5% DMSO) 中冷冻保存并储存于液氮中。

同种型分析

使用 EIA,采用类似于在小鼠免疫血清中筛选特异性滴度的形式完成抗体的同种型测定。可以按上述方法将 IL-12 包被在 96 孔板上,并且可以在室温下于平板上孵育 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的纯化抗体 1 小时。洗涤平板,然后用 HRP 标记的山羊抗人 IgG₁ 或在 1% BSA-PBS 中 1:4000 稀释的 HRP 标记的山羊抗人 IgG₃ 在室温下探测 1 小时。然后按上述方法再次洗涤板,并且用底物溶液孵育板。

人类抗人 IL-12 抗体与人 IL-12 的结合动力学

例如,用 IL-12 捕获 EIA 和 BIAcore 技术对抗体的结合特征进行适当测定。可以在按上述方法进行的测定中评估纯化的人 IL-12 抗体的分级

浓度与 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ IL-12 包被的 EIA 板的结合。然后可以将 OD 表示为半对数图, 该图表示相对结合效率。

可以通过例如如下描述或任意其它已知的适当方法获得定量结合常数。将 BIAcore CM-5 (羧甲基) 芯片置于 BIAcore 2000 单位中。HBS 缓冲液 (0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v P20 表面活性剂, pH 7.4) 以 $5\text{ }\mu\text{L/分钟}$ 流过芯片的流动室, 直到获得稳定的基线。将 $200\text{ }\mu\text{L}$ 水中的 15 mg EDC (N-乙基-N'-(3-二甲基-氨基丙基)-盐酸碳二亚胺) 的溶液 ($100\text{ }\mu\text{L}$) 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 水中的 2.3 mg NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 的 $100\text{ }\mu\text{L}$ 溶液。将 $40\text{ }\mu\text{L}$ 得到的溶液注射到芯片上。将 $6\text{ }\mu\text{L}$ 人 IL-12 溶液 ($15\text{ }\mu\text{L/mL}$, 溶于 10 mM 醋酸钠, pH 4.8) 注射到芯片上, 导致约 500 RU 的增加。将缓冲液改变为 TBS/Ca/Mg/BSA 流动缓冲液 (20 mM Tris, 0.15 M 氯化钠, 2 mM 氯化钙, 2 mM 醋酸镁, 0.5% Triton X-100, $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ BSA, pH 7.4), 流过芯片过夜使其平衡, 并且水解未反应的琥珀酰亚胺酯或对其封端。

将抗体以 33.33 、 16.67 、 8.33 和 4.17 nM 的浓度溶解于流动缓冲液。将流速调节为 $30\text{ }\mu\text{L/分}$, 仪器温度调节为 25°C 。将两个流动细胞用于动力学研究, 在其中一个细胞上固定 IL-12 (样品), 在第二个细胞为未衍生化流动细胞 (空白)。将 $120\text{ }\mu\text{L}$ 的每一种浓度抗体的注射在 $30\text{ }\mu\text{L/分}$ 的流动细胞上 (缔合相), 然后连续流过缓冲液 360 秒 (解离相)。通过两次连续注射各 $30\text{ }\mu\text{L}$ 2 M 异硫氰酸胍而重建芯片的表面 (解离肿瘤坏死因子 α /抗体复合物)。

用本领域公知的 BIA evaluation 3.0 或 CLAMP 2.0 分析数据。对于每一种抗体, 从样品的感应图 (sensogram) 中减去空白的感应图, 得到每种抗体的浓度。对解离 ($k_d\text{ sec}^{-1}$) 和缔合 ($k_a\text{ mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$) 以及计算得到的 (k_d/k_a) 解离常数 ($K_D\text{ mol}$) 进行总体拟合。当抗体亲和性足够高, 使得捕获的抗体的 $\text{RUs} > 100$ 时, 进行抗体的额外稀释。

结果和讨论

抗人 IL-12 单克隆抗体的产生

进行一些融合, 将每种融合物种植于 15 个平板 (1440 孔/融合物), 产生数十种人 IL-12 的特异性抗体。其中的一些由人和小鼠 Ig 链的组合组成。剩下的杂交瘤分泌完全由人重链和轻链组成的抗 IL-12 抗体。所有的人杂交瘤预计都是 IgG1 κ 。

人类抗人 IL-12 抗体与人 IL-12 的结合动力学

ELISA 分析证明来源于大多数或所有这些杂交瘤的纯化抗体以浓度依赖性方式结合 IL-12。图 1-2 表示这些抗体的相对结合效力的结果。在此情况下, 测量每种抗体与其相关抗原(表位)的亲和力。应该注意, IL-12 与 EIA 板的直接结合可以导致蛋白的变性, 表观结合亲和性不能反应与未变性蛋白的结合。在一定范围的浓度中得到 50% 结合。

通过人抗体 BIAcore 分析获得定量结合常数, 发现一些人单克隆抗体的亲和性非常高, K_D 为 1×10^{-9} 至 7×10^{-12} 。

结论

使用来自于杂交小鼠的脾细胞进行一些融合, 该杂交小鼠含有人可变区和恒定区转基因, 并且用人 IL-12 免疫。产生了一组完全的人 IL-12 IgG 单克隆抗体, 这些抗体为 IgG1 κ 同种型。进一步鉴定完全的人 IL-12 抗体。产生的一些抗体的亲和常数为 1×10^9 至 9×10^{12} 。这些完全的人单克隆抗体的预料不到的高亲和性使它们适用于 IL-12 依赖性疾病、病理或相关状况的治疗应用。

实施例 3: C340 是一种中和性人多克隆抗体

发现 CD340 在各种 IL-12 依赖性活性测定中中和 IL-12 的生物活性。由于 IL-12 增加由 NK 细胞和 T 淋巴细胞产生的 IFN γ , 检验了 C340 抗体对 IFN γ mRNA 的上调和 C340 抗体对 IFN γ 产量的影响 (Trinchieri, G., Current Opinion in Immunology, 9: 17-23 (1997), Morris, S. C., et al., Journal of Immunology, 152: 1047-1056 (1994))。在这些研究中也测定了 C340 中和 IL-12 驱动的淋巴细胞激活的杀伤 (LAK) 细胞活性的诱导的能力 (Kutza, J. and Murasko, D. M., Mechanisms of Ageing and Development, 90: 209-222 (1996), Stem, A. S., et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A., 87: 6808-6812 (1990))。最后, 检验了 CD340 对 T 和 NK 细胞上的 IL-12 介导的 CD95 细胞表面表达的上调的作用 (Medvedev, A. E., et al., Cytokine, 9: 394-404 (1997))。

抑制 IFN γ mRNA 转录

为了测定 C340 是否在人 PBL 中抑制 IL-12 诱导的 IFN γ 基因转录, 进行了反转录 PCR 测定。用 β 肌动蛋白 (mRNA 完整性和含量的对照) 和 IFN γ 的特异性引物扩增从被刺激的人 PBL 获得的 cDNA。图 3 表示 C340 在 IL-12/IL-2 (2 小时) 激活的 PBMC 中下调 IFN γ mRNA。

流式细胞术测量的细胞内 IFN γ 的抑制

反应于各种信号和作为激活的测量, T 细胞和 NK 细胞可以被诱导而分泌细胞因子。更具体地, 用 IL-2 和 IL-12 处理的 PBL 在刺激后 4-8 小时内起始 IFN γ 的大量合成。可以通过流式细胞术检测 Brefeldin-A 处理的 PBL 细胞质中的该产量。图 4 证明了当 C340 IL-12 与 IL-12 联合加入 5 小时时, 该培养物中 IFN γ 产量减少 60%。

IL-12 诱导的 IFN γ 分泌的抑制

图 5 明确表示两个不同批号的 C340 以剂量依赖性方式抑制外周血淋巴细胞分泌 IFN γ 。将 400pg IL-12 与各种量的 C340 预混合, 然后加入 IL-2 刺激的 PBL 培养物。18-24 小时后通过 EIA 测量 IFN γ 时, 检测到用少至 1 μ g/mL C340 抗体显著减少了 IFN γ 的量。

IL-12 诱导的 LAK 细胞的细胞毒性的抑制

Raji 细胞, 即一种 IL-12 敏感性 Burkitt 淋巴瘤来源的细胞系, 是抗 NK 细胞的 LAK 细胞敏感性细胞系。将三份 Raji 细胞与存在或不存在人单克隆抗体 C340 (5000 ng/mL 或 50 ng/mL) 条件下用 400 pg/mL IL-12 和 10 U/mL IL-2 激活的 LAK 细胞一起培养 4 小时。图 6 表示从三个正常健康供体得到的结果。效应细胞的 IL-12 + IL-2 激活导致相对于用 IL-2 单独激活的细胞的细胞毒活性增加。C340 抗体抑制该 IL-12 依赖性作用。抑制的强度与抗体浓度相关, 所检验的最高浓度将细胞毒性减少至本底水平。

抑制 CD95 上调

报道描述了高度纯化的 CD56+ PBL 表面的 IL-12 诱导的 CD95 上调。如图 7A 和 7B 所示, 分布性流式细胞术分析发现, 用 IL-12 加 IL-2 处理 72 小时后, CD3+ T 细胞和 CD56+ NK 细胞上的 CD95 表达显著上调。伴随的抗 IL-12 处理抑制了 CD3+ 和 CD56+ 细胞群的 CD95 表达。CD3+ 细胞被抑制了 50% (图 7A)。CD56+ 细胞被抑制了 80% (图 7B), 这是由 MFI 指数 (比未刺激的对照高出的百分比) 减少所证明的。

实施例 4: 基因克隆和鉴定

克隆和纯化了含 C340 重链基因或 C340 轻链的基因组 DNA 片段。用 Sau3A 限制酶部分消化从 C340 杂交瘤细胞系的基因组 DNA, 通过 10-40% 蔗糖梯度的离心分离进行大小选择。将大小范围为 15-23 kb 的 DNA 片段克隆至噬菌体载体 EMBL3 中, 并且包装至噬菌体颗粒中。一些包装反应产生了 1 百万噬菌体克隆的文库。使用含人 IgG1 重链恒定区序列或人 κ 轻链恒定区序列的

32P 标记的基因组 DNA 片段作为探针,通过噬斑杂交从文库中筛选约 600,000 个克隆。检测了 13 个重链和 9 个轻链克隆。其中,通过两轮或多轮筛选纯化 3 个重链克隆和 4 个轻链克隆。通过噬菌体 DNA 的 PCR 分析证明一个重链克隆和两个轻链克隆含有编码序列的 5' 和 3' 端。重链(HC)克隆 H4 的 DNA 插入片段大小为 16 kb,并且包含 3.6 kb 的 5' 侧翼序列和至少 2 kb 的 3' 侧翼序列。轻链(LC)克隆 LC1 的 DNA 插入片段大小为 15 kb,并且包含 4.4 kb 的 5' 侧翼序列和 6.0 kb 的 3' 侧翼序列。从噬菌体载体去除作为 SalI 片段的完整插入片段,并且克隆至质粒表达载体 p1351 的 XhoI 和 SalI 位点之间,所述载体提供了 gpt 可选择标记基因。由于在重链可变区编码序列中有一个内部 SalI 位点,必须将两个 SalI 片段从噬菌体 H4 转移至 p1351 表达载体。得到的重链和轻链表达质粒分别称作 p1560 和 p1558。分别用限制酶分析和 PCR 测定重链和轻链基因在这两个质粒中相对于 p1351 载体序列中的定向。在两种情况下,其定向使得 Ab 基因的 5' 末端片段临近于 gpt 的 3' 末端。对克隆基因的编码区的两条链进行测序。质粒 p1560 和 p1558 的序列分别见图 11A-11K 和图 13A-13J。

实施例 5: 制备重组细胞系

通过 PvuI 限制酶消化将重链质粒 p1560 显性化,用 SalI 限制酶将轻链质粒 p1558 线性化。按照描述的方法,通过电穿孔用预混合的线性化质粒分别转染 p3X63Ag8. 653 (653) 和 SP2/0-Ag14 (SP2/0) 细胞,培养细胞,用霉酚酸选择被转染细胞(Knight, et al., Molecular Immunology 30: 1443 (1993))。约两周后,测定来自于抗霉酚酸集落的细胞上清液中的人 IgG (即重组 C340 (rC340))。为此,在用特异于人 IgG 的 Fc 部分的山羊抗体包被的 96 孔 ELISA 板上孵育细胞上清液。按照描述的方法用碱性磷酸酶偶联的山羊抗人 IgG (重链 + 轻链) 抗体和碱性磷酸酶底物检测与包被的板结合的人 IgG(Knight, et al., Molecular Immunology 30: 1443 (1993))。将克隆产量高的细胞转移至 24 孔培养皿的标准培养基中并铺展(IMDM, 5% FBS, 2 mM 谷氨酰胺, 霉酚酸选择培养物)。用纯化的 C340 mAb 作为标准,通过 ELISA 仔细对产生的抗体量(即分泌至消耗的培养物的培养基中)进行定量。然后将选择的克隆扩展至 T75 烧瓶中,通过 ELISA 对这些克隆产生的 IgG 进行定量。根据这些值,对 6 个独立的 653 转染物和 3 个独立的 SP2/0 转染物进行亚克隆(通过在 96 孔板中平均种植 1 个细胞/孔),通过测定(ELISA)各个亚克隆集落的上清液而确定由亚克隆产生的抗体量。选择 3 个亚克隆,653 转

染物 19-20 (C379B) 和 SP2/0 转染物 84-81 (C381A) 和 22-56 (C389A) 进行进一步分析。

测定 rC340 抗原结合

按上述方法对所选择的细胞系进行亚克隆前, 用三种亲代细胞系 (653 转染物克隆 2 和克隆 18 和 SP2/0 转染物克隆 1) 的上清液检验 rC340 的抗原结合特征。首先通过 ELISA 测定三种细胞上清液样品中的 rC340 浓度。然后在 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 人 IL-12 包被的 96 孔板中孵育滴定量的上清液样品或纯化的 C340 阳性对照。然后用碱性磷酸酶偶联的山羊抗人 IgG (重链 + 轻链) 抗体和适当的碱性磷酸酶底物检测结合的 mAb。如图 8 所示, rC340 以不同于原始的 C340 mAb 的方式特异性结合于人 IL-12。

鉴定所选择的细胞系

通过以 2×10^5 细胞/ml 的起始细胞密度种植 T75 烧瓶中的标准培养基或无血清的 SFM-5 培养基进行生长曲线分析, 然后每日监测细胞数目和 rC340 浓度, 直到培养物消耗。标准培养基中的培养结果见图 9A-9C。C379B, C381A 和 C389A 的最大 C340 mAb 产生水平分别为 $135\text{ }\mu\text{g/ml}$, $150\text{ }\mu\text{g/ml}$, 和 $110\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。尝试使 C379B 细胞适应 SFM-5 培养基没有成功。C381A 细胞在 SFM-5 培养基中与在标准培养基中产生相同量的 rC340, 而 C389A 在 SFM-5 培养基中产生的 rC340 只有在标准培养基中的产量的一半。

在不同时间段中, 在具有标准培养基或无霉酚酸选择的标准培养基的 24 孔培养皿中培养细胞, 以便评估三个克隆的 rC340 mAb 产量随时间的稳定性。观察到 C379B 和 C381A 在存在或不存在选择的条件下分别在 30 天 (检测的最大时间) 和 75 天的时间段稳定产生 rC340。C389A 细胞系不稳定, 培养 43 天后产生的抗体仅仅是研究开始时产量的 20%。

应该明确的是, 本发明的实施可以不限于前面说明书和实施例的具体描述。

根据前面的教导, 可以对本发明进行各种修饰和变化, 它们都属于所附权利要求的范围。

序列表

<110> D. 希利; D. 克奈特; B. 斯卡尔伦; J. 吉勒斯-科马尔; D. 佩里特

<120> IL-12 抗体、组合物、方法和用途

<130> CEN248

<160> 15

<170> PatentIn Ver 2.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

Thr Tyr Trp Leu Gly

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3

Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr

20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 9

<211> 503

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 9

Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu

1 5 10 15

His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys

20 25 30

Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp

35 40 45

His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu

50 55 60

Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr

65 70 75 80

Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe

85 90 95

Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr

100 105 110

Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys

115 120 125

Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu

130 135 140

Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser

145	150	155	160
Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu			
	165	170	175
Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser			
	180	185	190
Tyr Leu Asn Ala Ser Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val			
	195	200	205
Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr			
	210	215	220
Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser			
225	230	235	240
Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu			
	245	250	255
Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu			
	260	265	270
Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser			
	275	280	285
Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu			
	290	295	300
Arg Cys Glu Ala Lys Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu			
305	310	315	320

Thr Thr Ile Ser Thr Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly
325 330 335

Ser Ser Asp Pro Gln Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala
340 345 350

Glu Arg Val Arg Gly Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys
355 360 365

Gln Glu Asp Ser Ala Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu
370 375 380

Val Met Val Asp Ala Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser
385 390 395 400

Ser Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu
405 410 415

Gln Leu Lys Pro Leu Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu
420 425 430

Tyr Pro Asp Thr Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe
435 440 445

Cys Val Gln Val Gln Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val
450 455 460

Phe Thr Asp Lys Thr Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser
465 470 475 480

Ile Ser Val Arg Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu
485 490 495

Trp Ala Ser Val Pro Cys Ser

500

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 10

agatatacta tgcac

15

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 11

gttatatcat ttgatggaag caataaatac tacgtagact ccgtgaaggg c 51

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 12

gaggcccgagg gatcgtatgc ttttgatatc 30

<210> 13

<211> 33

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 13

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cc

33

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 14

gatgcatcca acagggcc

18

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 15

cagcagcgta gcaactggcc t

21

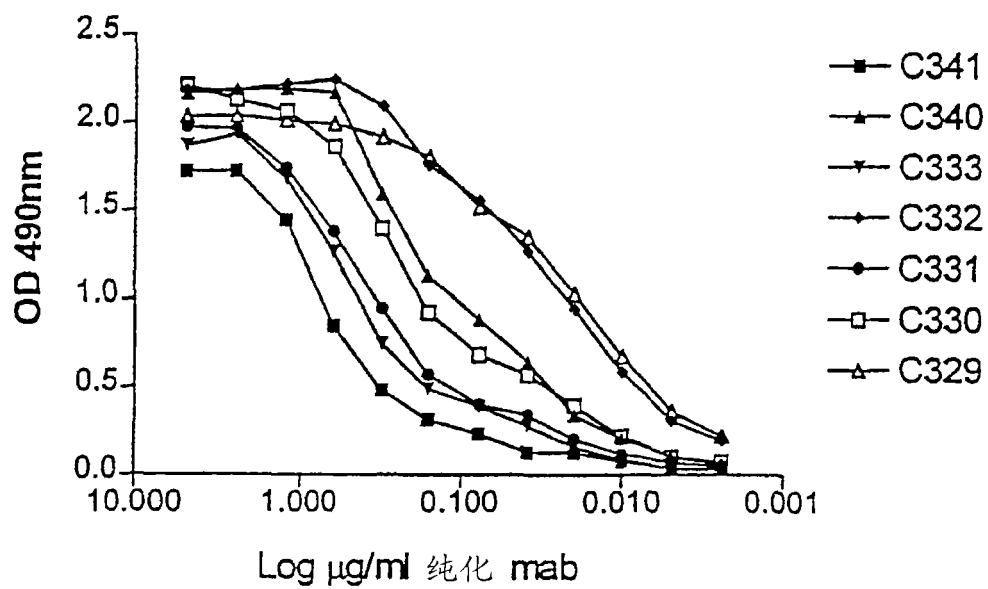


图 1A

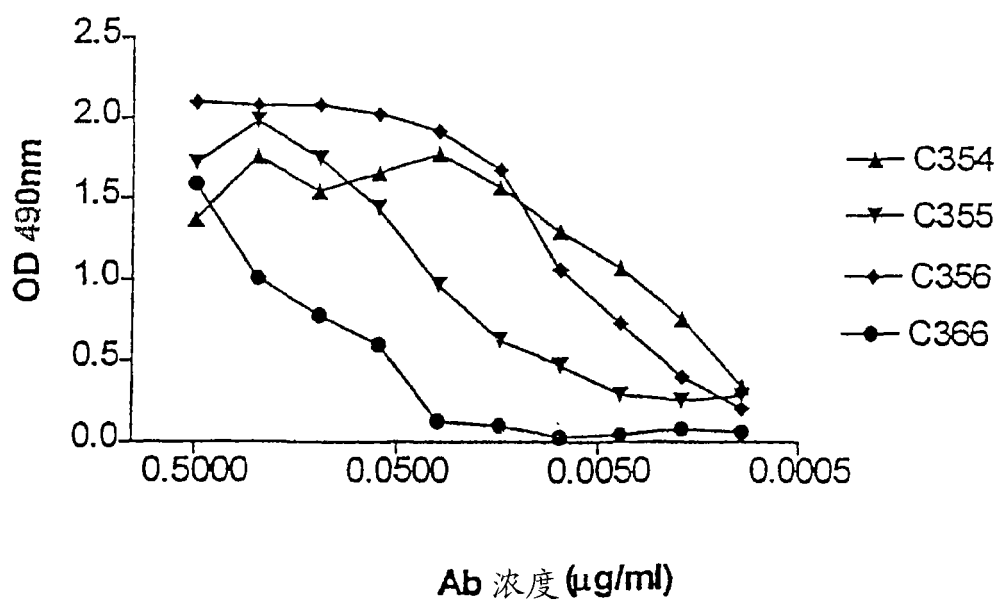


图 1B

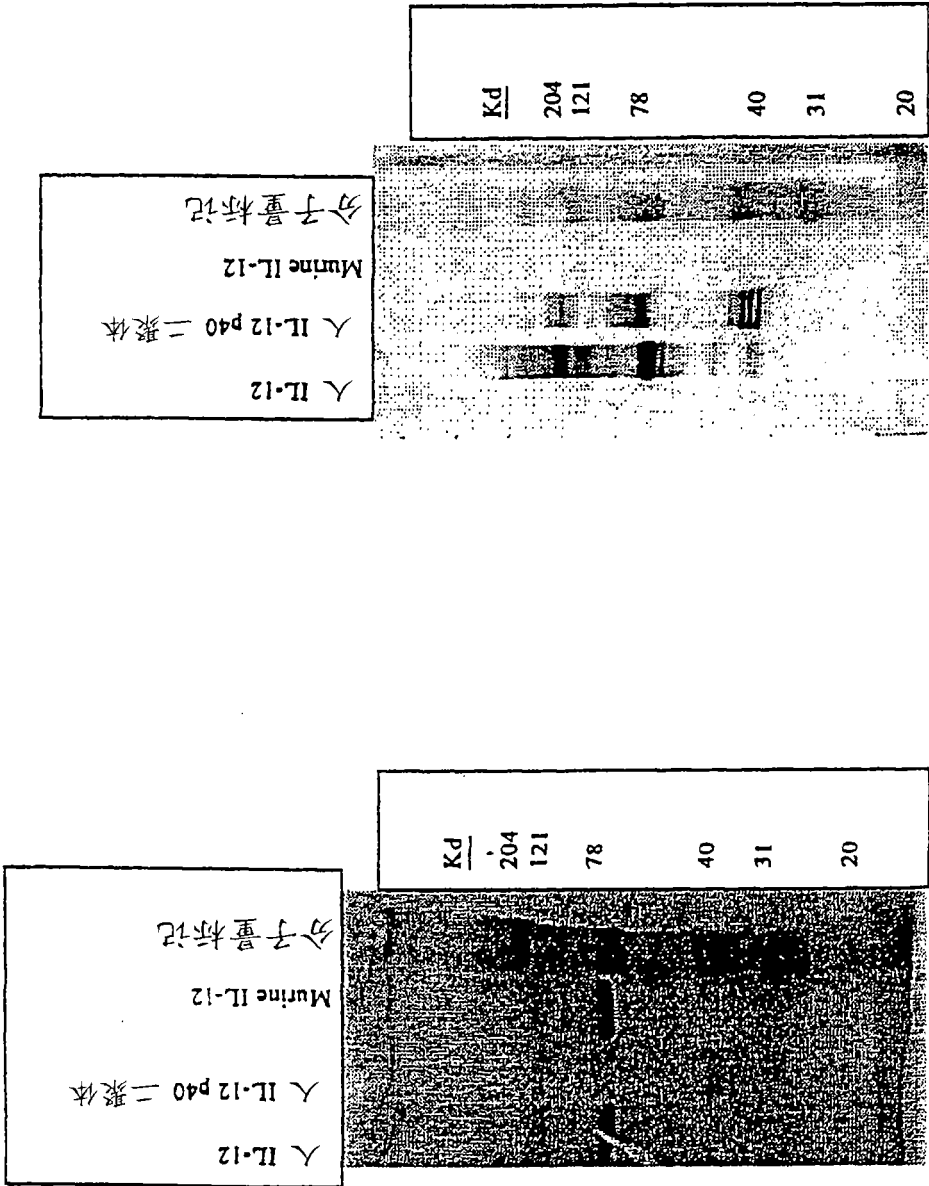


图 2A

图 2B

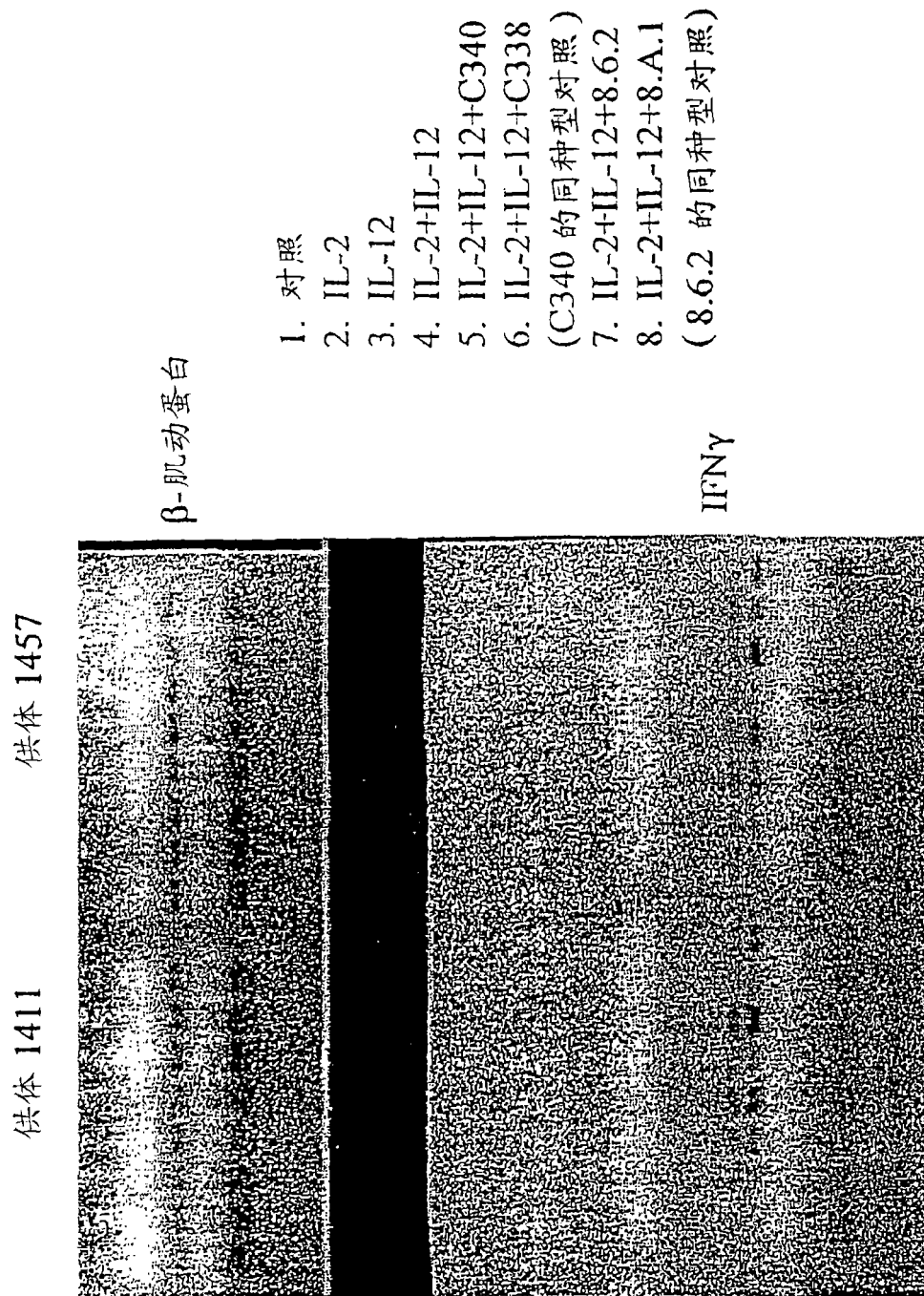


图 3

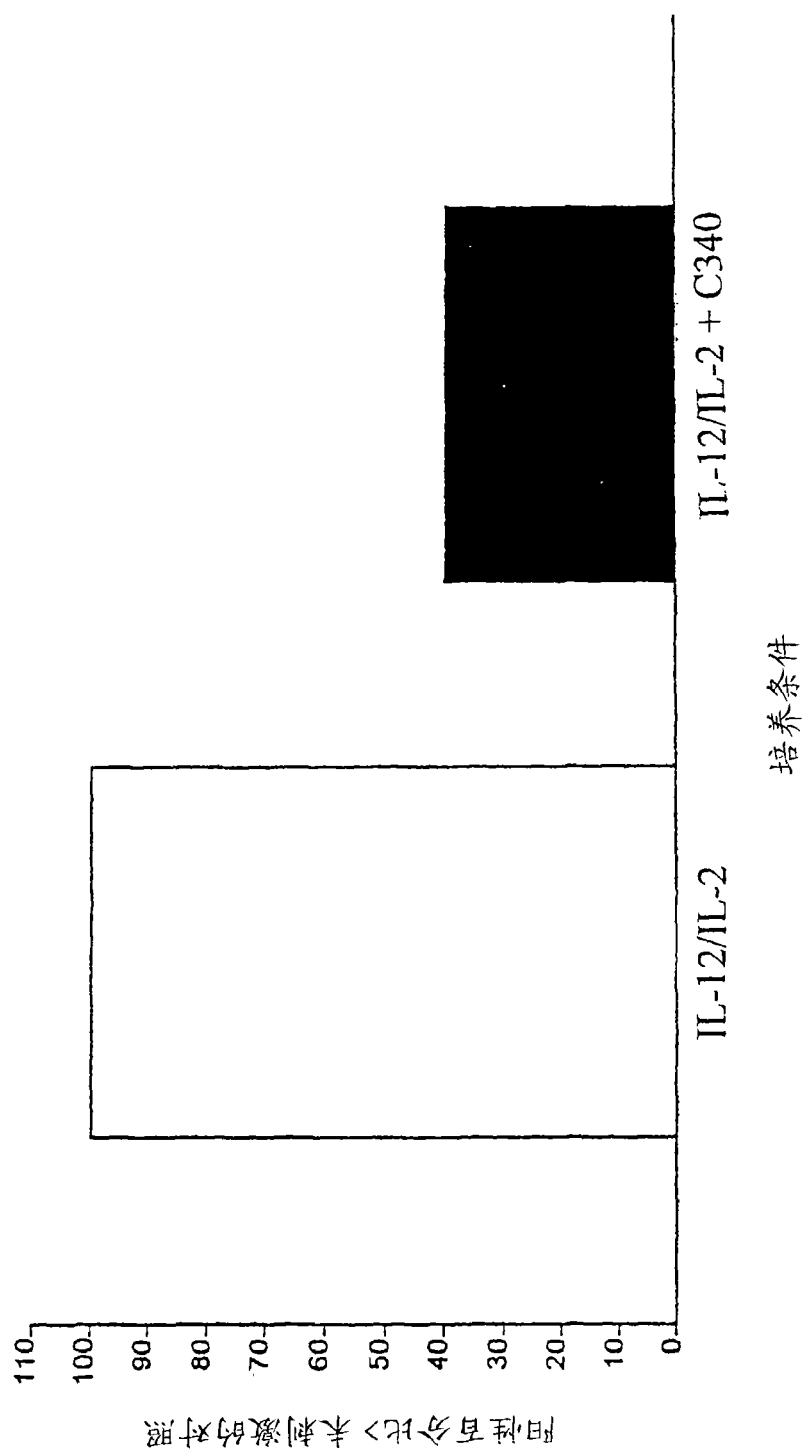


图 4

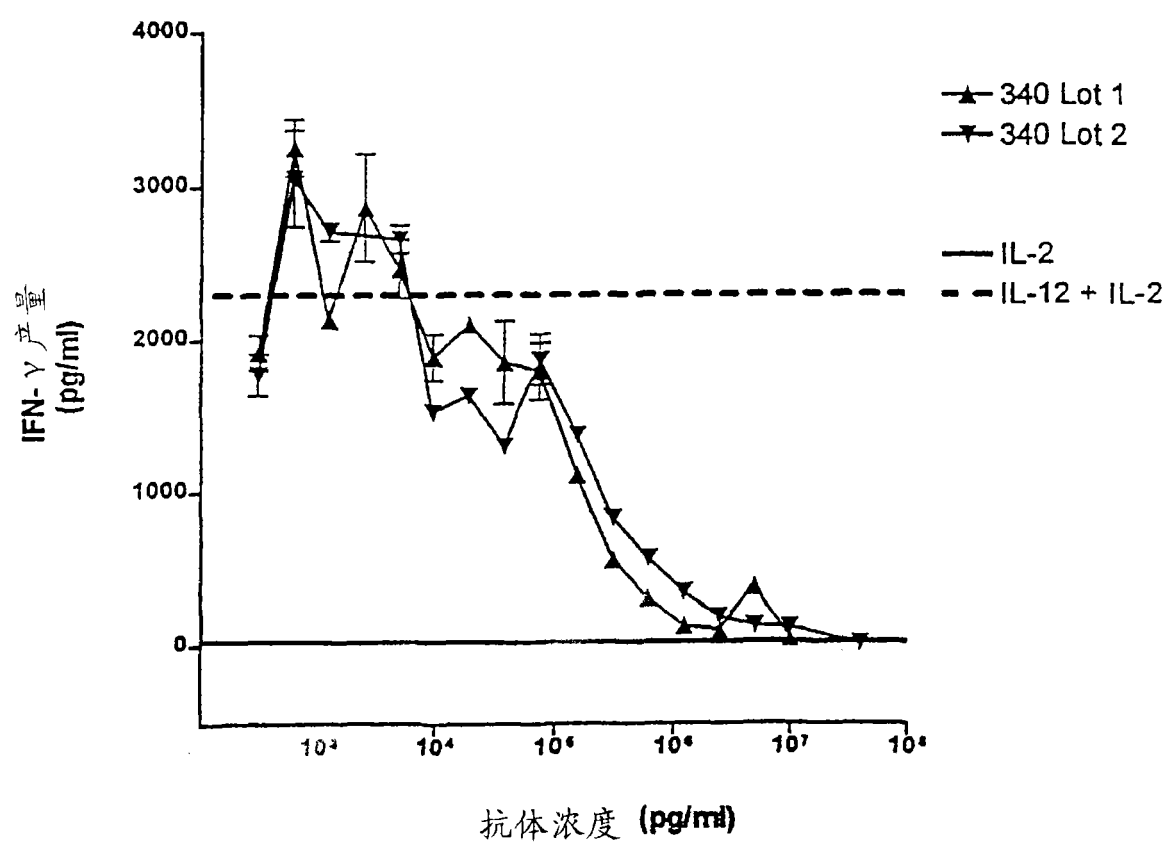


图 5

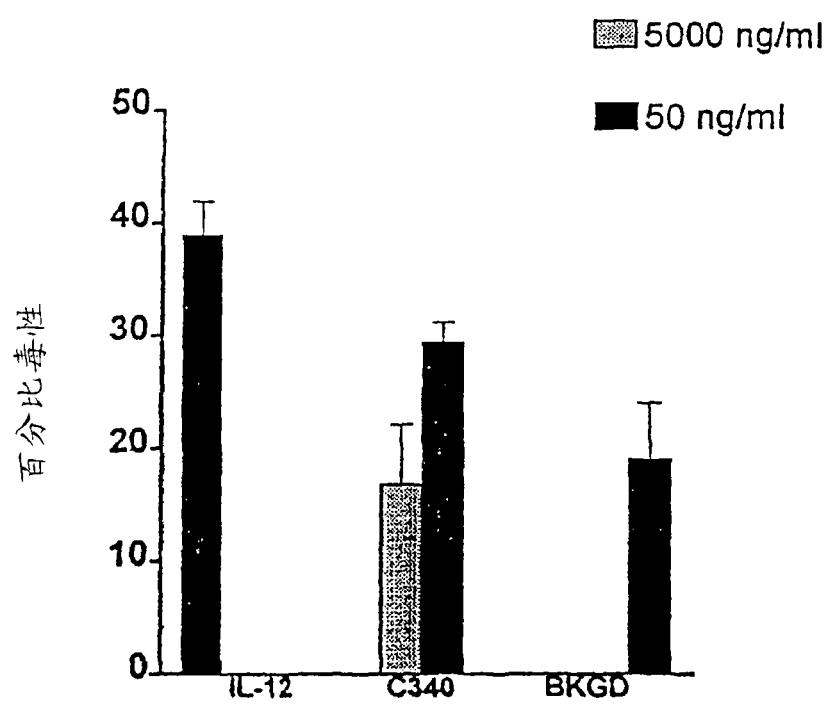


图 6

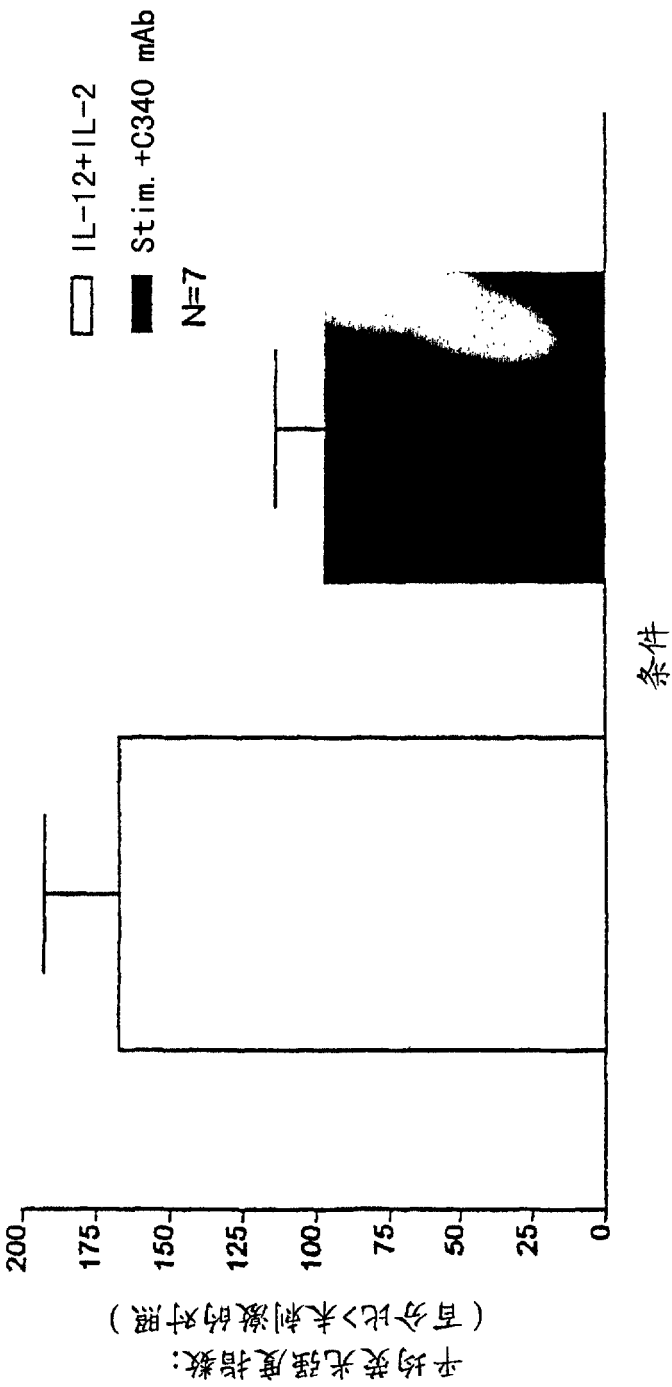


图 7A

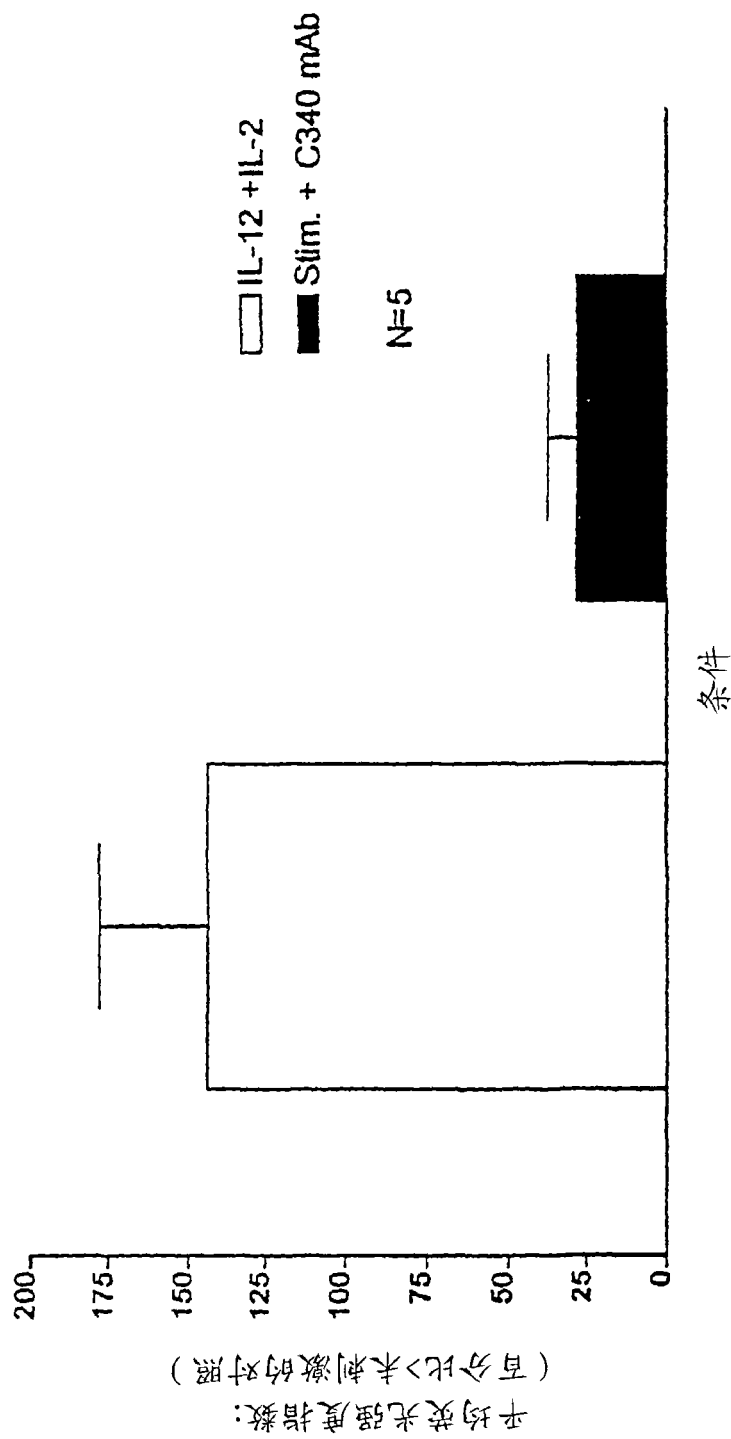


图 7B

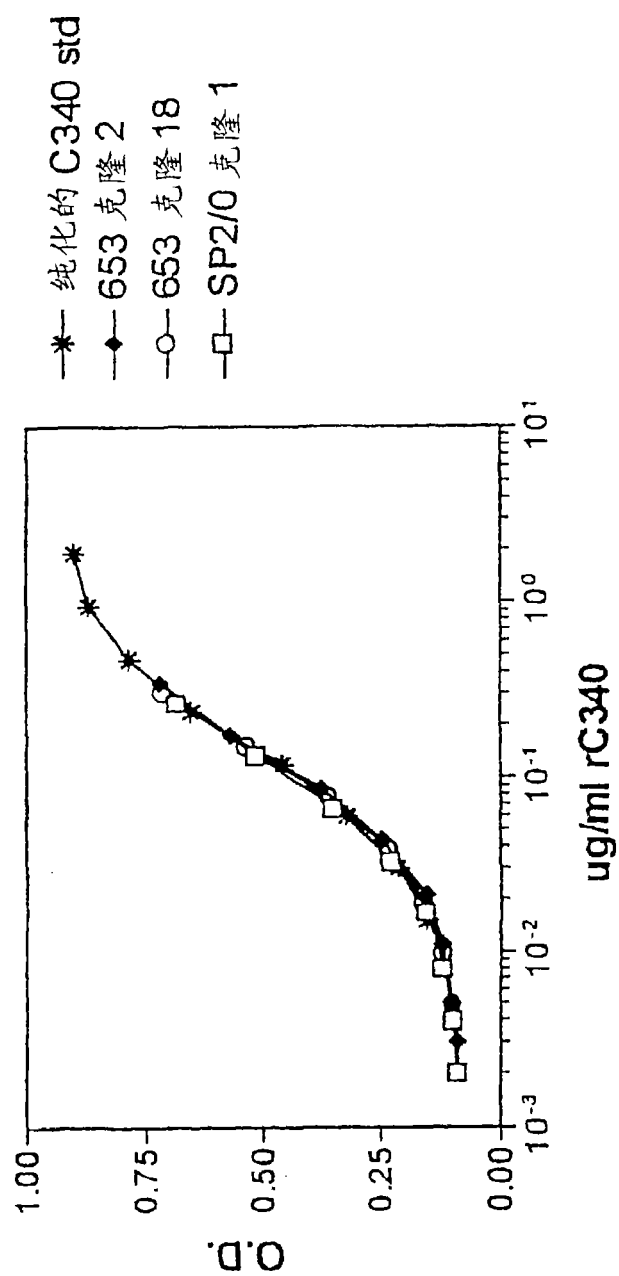


图 8

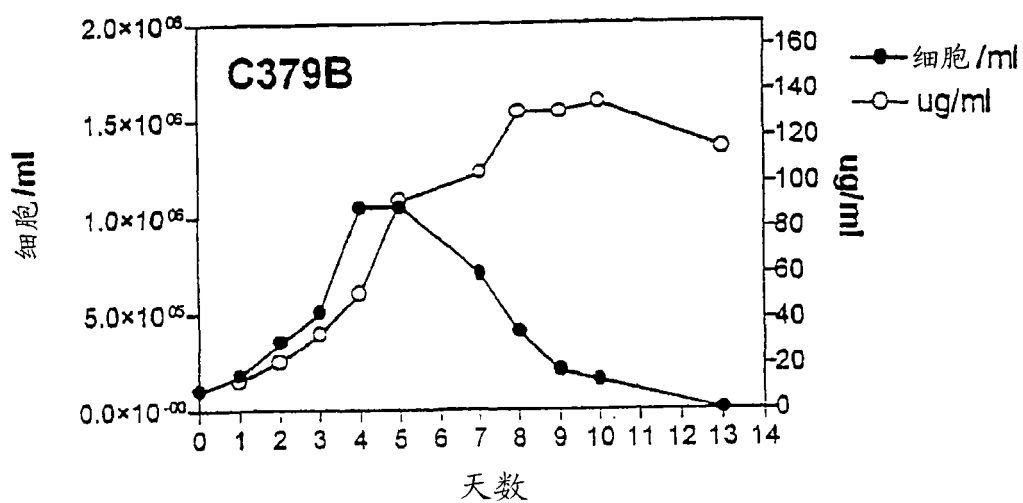


图 9A

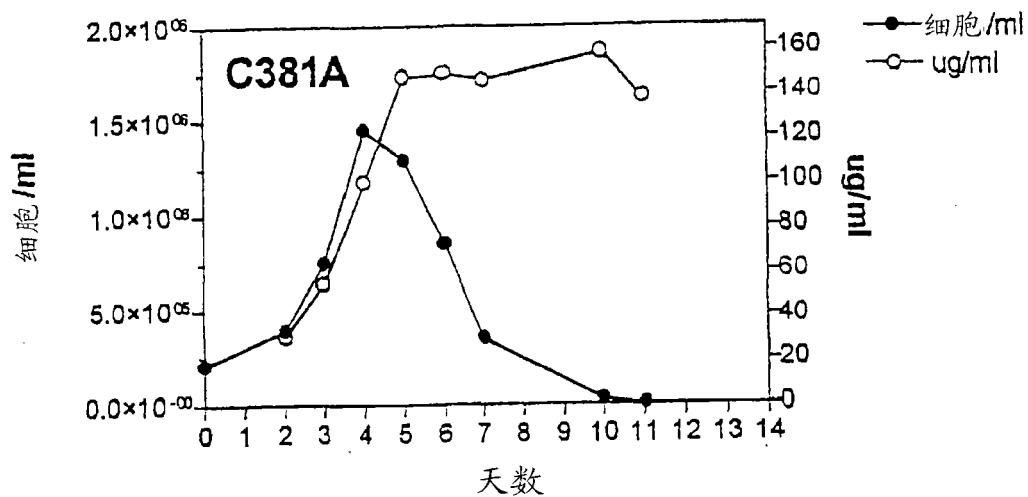


图 9B

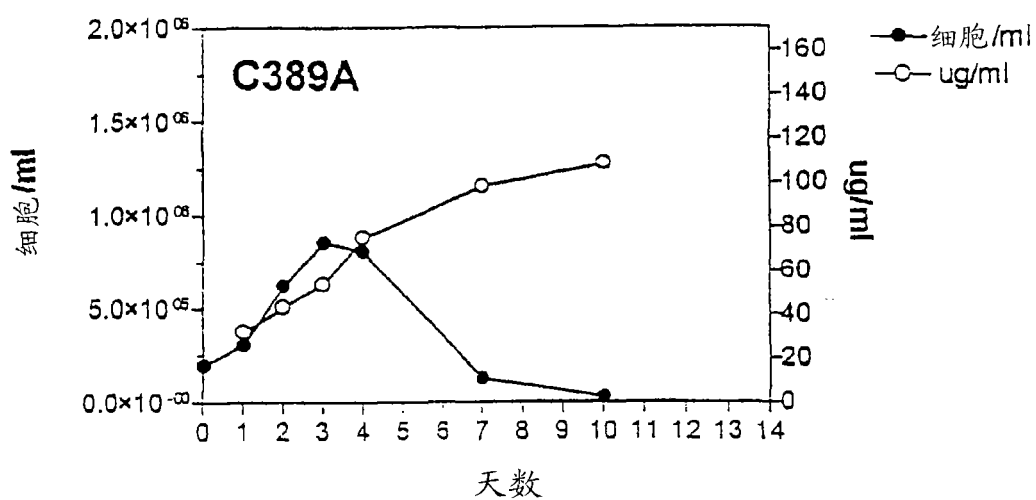


图 9C

专利名称(译)	抗IL - 12抗体、组合物、方法和用途		
公开(公告)号	CN101550190A	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200810100025.3	申请日	2001-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	森托科尔公司		
申请(专利权)人(译)	森托科尔公司		
当前申请(专利权)人(译)	森托科尔公司		
[标]发明人	J吉勒斯 科马尔 DM克奈特 D佩里特 B斯卡尔伦 D希利		
发明人	J·吉勒斯-科马尔 D·M·克奈特 D·佩里特 B·斯卡尔伦 D·希利		
IPC分类号	C07K16/12 C12N15/13 C12N15/63 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K39/395 A61P17/06 A61P37/00 A61P1/00 G01N33/53 C07K16/42 C12P21/00 A01H1/00 A01K67/027 A61K A61K38/00 A61K45/00 A61P A61P25/00 A61P43/00 C07K C07K16/24 C12N C12N15/09 C12P21/08 G01N		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P9/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/02 A61P23/00 A61P23/02 A61P25/00 A61P25/20 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/244 C07K2317/21 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K45/06 C07K2317/565		
代理人(译)	刘健 付磊		
优先权	60/223358 2000-08-07 US 60/236827 2000-09-29 US 09/920262 2001-08-01 US		
其他公开文献	CN101550190B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及至少一种抗IL - 12抗体，包括编码至少一种抗IL - 12抗体的分离核酸、IL - 12、载体、宿主细胞、转基因动物或植物、及其制备方法和用途，包括治疗组合物、方法和设备。

