

## 抗人 I 型干扰素受体亚基 1 人源化单克隆抗体的制备和鉴定

裘霁宛\*, 孔永, 陈卫, 徐蕾, 曹纯洁, 陈涛, 吴亦亮

(江苏荃信生物医药股份有限公司, 泰州 225300)

**摘要** I 型干扰素在系统性红斑狼疮 (SLE) 等自身免疫性疾病的发病机制中发挥重要作用, 采用抗体阻断其信号转导通路具有潜在的治疗作用。本研究以人 I 型干扰素受体亚基 1 (IFNAR1) 重组蛋白为抗原免疫新西兰白兔, 采用 B 细胞克隆技术筛选兔抗人 IFNAR1 单克隆抗体, 经过人源化改造获得 QX006N。体外研究结果显示, QX006N 能特异性地结合人 IFNAR1, 亲和力约 108 pmol/L, 可阻断 I 型干扰素信号通路及其介导的生物学效应。本研究为开发靶向干预 I 型干扰素信号途径用于治疗 SLE 的抗体药物提供了坚实的基础。

**关键词** B 细胞克隆; 人源化; 兔单克隆抗体; IFNAR1; I 型干扰素; 系统性红斑狼疮

中图分类号 R593.2; R967 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)03-0404-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024031401

引用本文 裘霁宛, 孔永, 陈卫, 等. 抗人 I 型干扰素受体亚基 1 人源化单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(3): 404–411.

Cite this article as: QIU Jiwan, KONG Yong, CHEN Wei, et al. Generation and characterization of humanized monoclonal antibody against human IFNAR1[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(3): 404–411.

## Generation and characterization of humanized monoclonal antibody against human IFNAR1

QIU Jiwan\*, KONG Yong, CHEN Wei, XU Lei, CAO Chunjie, CHEN Tao, WU Yiliang

*Qyuns Therapeutics Co., Ltd., Taizhou 225300, China*

**Abstract** Type I interferons play an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE). Monoclonal antibody shows therapeutic potential by blocking the signaling pathway. This study used recombinant human subunit 1 of the type I interferon receptor (IFNAR1) protein to immunize New Zealand white rabbits, and applied B cell cloning technology to screen and obtain rabbit parental antibodies. After humanization modification, QX006N was obtained. *In vitro* biological studies showed that QX006N could specifically bind to human IFNAR1 with an affinity of 108 pmol/L, and neutralize the type I interferon signaling pathway and this pathway mediated biological effects. This study provides a solid foundation for the development of antibody drugs targeting the type I interferon signaling pathway for the treatment of SLE.

**Key words** B cell cloning; humanization; rabbit monoclonal antibody; IFNAR1; type I interferon; systemic lupus erythematosus

干扰素 (interferon, IFN) 是在免疫调节中具有多效性作用的细胞因子, 根据序列同源性可分为 3 个家族 (I 型、II 型和 III 型)。在人体中, I 型干扰素 (IFN-I) 是最大的 IFN 家族, 包括 IFN- $\alpha$  (13 个亚型)、IFN- $\beta$ 、IFN- $\epsilon$ 、IFN- $\kappa$  和 IFN- $\omega$ <sup>[1-2]</sup>。

IFN-I 通过与其异二聚体型受体结合而启动信号, 该受体被称为 IFN- $\alpha/\beta$  受体 (IFNAR)。IFNAR

是由两个跨膜蛋白 IFNAR1 和 IFNAR2 组成的异源二聚体, 几乎在所有细胞类型上都有表达。人 IFNAR1 属于 II 型螺旋型细胞因子受体, 包含 4 个 III 型纤连蛋白结构域的胞外域, 1 个跨膜域和 100 个氨基酸残基的胞内域<sup>[3]</sup>。当 IFN-I 与 IFNAR 胞外域结合时, IFNAR1 以及 IFNAR2 被活化, 胞内区级联激活下游信号蛋白: 活化的 IFNAR1 与酪氨酸激

酶 2 (tyrosine kinase 2, Tyk2) 结合, 活化的 IFNAR2 与 Janus 激酶 1 (JAK1) 结合, 激活信号转导和转录激活因子 (STATs)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 信号通路以产生相应生物学效应<sup>[4]</sup>。

人 IFN- $\alpha$  的异常表达与许多自身免疫性疾病相关, 包括系统性红斑狼疮 (SLE)、1 型糖尿病、银屑病、风湿性关节炎、多发性硬化症、获得性免疫缺陷综合征和严重的混合免疫缺陷疾病等。大量数据显示, IFN-I 是系统性红斑狼疮发病机制的重要参与者。据报道, 60%~80% 的系统性红斑狼疮患者存在 IFN-I 高表达特征, 系统性红斑狼疮患者外周血细胞中 IFN-I 调控基因的过表达与系统性红斑狼疮疾病活动度正相关<sup>[5-6]</sup>。IFN-I 与免疫激活的标志物 (如补体) 和自身抗体的产生 (如抗 ds-DNA 抗体) 相关, 并且参与维持 SLE 疾病活动, 提示 IFN-I (特别是 IFN- $\alpha$ ) 在 SLE 发病机制中的重要作用<sup>[7]</sup>。因此, 阻断 IFN-I 信号通路对 SLE 具有潜在的治疗作用。

针对 IFN- $\alpha$  开发的单克隆抗体有阿斯利康的西法木单抗 (sifalimumab) 和罗氏的隆利组单抗 (rontalizumab)。隆利组单抗的 II 期临床试验未达到主要终点 BILAG 指数的改善, 已停止开发<sup>[8]</sup>。虽然西法木单抗的 II 期临床达到主要终点, 但是阿尼鲁单抗 (anifrolumab) 具有强劲的药效学反应, 加上比西法木单抗更好的获益风险比, 使阿尼鲁单抗成为系统性红斑狼疮 III 期开发的候选药物<sup>[9-10]</sup>。阿尼鲁单抗通过直接作用于 IFNAR1, 能够阻断与 SLE 发病机制有关的几种 IFN-I (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  和 IFN- $\omega$ ) 与其受体的结合, 抑制 IFN-I 的信号转导及生物活性。与安慰剂相比, 更多接受阿尼鲁单抗治疗的患者, 整个器官系统 (包括皮肤和关节) 的总体疾病活动度降低, 并且口服皮质类固醇的使用持续减少。2021 年 7 月, 阿尼鲁单抗被美国 FDA 批准, 用于治疗正在接受标准治疗的中度至重度系统性红斑狼疮成人患者<sup>[11-12]</sup>。

目前临床上治疗性单克隆抗体多为鼠源, 相比之下, 基于 B 细胞克隆技术的兔单克隆抗体平台更易获得多样性佳、亲和力高、功能性优、特异性强的单克隆抗体, 逐渐被应用和重视。本研究采用人 IFNAR1 蛋白免疫新西兰白兔, 利用 B 细胞克隆技术制备兔单抗; 筛选出 IFN-I 信号中和活性最好的亲本抗体, 通过互补决定区 (CDR) 移植进行人源化

改造获得 QX006N; 经过体外生物学活性评价, 显示出优良的生物学特性。该研究为靶向 IFNAR1 抗体药物及其临床试验开展奠定了基础。

## 1 材料

### 1.1 试剂

人 IFNAR1、人 IFNAR2、人 IFNGR1、人 IFN- $\alpha$ 2b 和人 IFN- $\gamma$  (苏州近岸蛋白质科技股份有限公司); 人 IFN- $\beta$  和人 IFN- $\omega$ 1 (北京义翘神州科技股份有限公司); 人 IFNGR2 (美国 Novus Biologicals 公司); 人 IFN- $\epsilon$  (美国 R&D 公司)。根据专利 WO2009 100309A2 提供的 9D4 序列, 构建表达质粒, 瞬转 ExpiCHO-S 细胞自制获得阿尼鲁单抗。

### 1.2 仪器

Varioskan LUX 多功能酶标仪, NanoDrop One 超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Biacore T200 生物分子相互作用分析仪 (美国 GE 公司)。

### 1.3 细胞株

ExpiCHO-S 细胞 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HEK Blue<sup>TM</sup> IFN- $\alpha$ / $\beta$  细胞 (美国 InvivoGen 公司); Daudi 细胞和 THP-1 细胞 (上海盖宁生物科技有限公司)。根据《赫尔辛基宣言》, 于健康献血者手臂抽取外周血 (肝素钠抗凝)。

## 2 方法

### 2.1 兔抗人 IFNAR1 单克隆抗体的制备

采用人 IFNAR1 重组蛋白免疫新西兰白兔; 提取经免疫动物外周血单个核细胞, 通过 B 细胞克隆技术分离培养抗原特异性 B 细胞; 利用 ELISA 及 HEK Blue<sup>TM</sup> IFN- $\alpha$ / $\beta$  报告基因细胞法分析 B 细胞克隆上清液的结合和中和活性。提取有中和活性的 B 细胞克隆的 mRNA, 通过 RT-PCR 获取抗体的基因序列。将抗体重链和轻链可变区分别与载体 pRBT 进行构建, 瞬转 ExpiCHO-S 细胞进行抗体的表达, 用 ProteinA 亲和色谱法纯化抗体, 经 HEK Blue<sup>TM</sup> IFN- $\alpha$ / $\beta$  报告基因细胞法筛选出中和活性最佳的亲本兔抗用于人源化改造。

### 2.2 抗人 IFNAR1 兔单克隆抗体的人源化改造

经筛选, 362#兔抗和 1203#兔抗的中和活性最好, 序列高度相似。利用 NCBI IgBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/>) 进行人 IgG 胚系序列 (germline) 同源性比对, 选择同源性最高的

IGHV3-66\*01 作为重链 CDR 移植模板, 将兔抗重链的 CDR 区移植入 IGHV3-66\*01 的骨架区; 选择同源性最高的 IGKV1-6\*01 作为轻链 CDR 移植模板, 将兔抗轻链的 CDR 区移植入 IGKV1-6\*01 的骨架区; 对骨架区特定位点进行回复突变, 获得人源化抗体的可变区。为了减少 ADCC 效应带来的潜在的不良反应, 人源化抗体重链恒定区选择人 IgG4 亚型。重组人源化抗体序列重链和轻链分别与载体 pHZD 进行构建, 并表达抗体, 方法同“2.1”项。利用分子排阻色谱高效液相 (SEC-HPLC) 检测抗体纯度, 并用 HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  报告基因细胞法对抗体分子的中和能力进行比较, 筛选中和能力强的抗体分子作为候选抗体进行进一步评价。

### 2.3 ELISA 检测 QX006N 与抗原结合的活性及特异性

分别将 IFNAR1 以及相关蛋白 (人 IFNAR2、人 IFNGR1、人 IFNGR2、人 IFN- $\alpha$ 2b、人 IFN- $\beta$ 、人 IFN- $\gamma$ 、人 IFN- $\omega$ 1、人 IFN- $\epsilon$ ) 以 1  $\mu$ g/mL (每孔 50  $\mu$ L) 包被酶标板, 2 ~ 8  $^{\circ}$ C 过夜后, 弃去包被液, 洗板, 加 0.5% BSA-PBS 封闭 2 h。加入 10  $\mu$ g/mL 起始 1:5 梯度稀释的 QX006N, 每孔 50  $\mu$ L, 置于室温孵育 2 h。洗板后每孔加入 100 ng/mL HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体 50  $\mu$ L 置于室温孵育 1 h, 洗板后加入 TMB 进行显色反应, 用酶标仪在 450、630 nm 处读取吸收度, 并采用 SoftMax 软件进行四参数拟合, 分析评价 QX006N 的抗原结合活性和特异性。

### 2.4 表面等离子共振技术 (SPR) 检测 QX006N 的亲合力

用 Biacore T200 检测 QX006N 与人 IFNAR1 的亲合力, 所有过程于 25  $^{\circ}$ C 进行。采用商品化 Protein A 芯片, 通过捕获法固定适量的 QX006N, 捕获流速是 10  $\mu$ L/min。将抗原进行梯度稀释, 仪器流速切换成 30  $\mu$ L/min, 按照浓度 (20 nmol/L, 1:2 梯度稀释) 从低到高的顺序依次流过参比通道和固定抗体的通道, 流过缓冲液作为阴性对照。每个结合、解离完成后用 pH 1.5 甘氨酸再生芯片。用仪器自带分析软件选择 Kinetics 选项中 1:1 结合模型进行拟合, 计算抗体的结合速率常数  $k_a$ , 解离速率常数  $k_d$  以及解离平衡常数  $K_D$  ( $k_d/k_a$ )。

### 2.5 细胞水平检测 QX006N 的中和活性

报告基因细胞是检测信号通路激活与抑制常用的细胞模型。IFN-I 可诱导 HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  报告细胞 STAT1/2 磷酸化, 抗体中和 IFN-I 能

力越强, 报告细胞 STAT1/2 磷酸化信号则越弱。此外, 由于 IFN-I 可与多种细胞增殖或下游因子释放有关, 本研究将分别以 Daudi 细胞、THP-1 细胞和人全血细胞 3 种不同的细胞为模型检测抗体的中和能力。相关检测方法如表 1 所示。采用 SoftMax 拟合四参数曲线, 计算样品 IC<sub>50</sub>, 分析评价 QX006N 的中和活性。

**Table 1** Different neutralization assays to evaluate the potency of QX006N

Assay	Stimulating factor	c/(ng/mL)	Detection method
HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$ cell	IFN- $\alpha$ 2b	0.05	STAT1/2 phosphorylation
	IFN- $\beta$	0.005	
	IFN- $\omega$ 1	1	
Daudi cell	IFN- $\alpha$ 2b	0.2	Cell proliferation
THP-1 cell	IFN- $\alpha$ 2b	10	Release of IP-10 and BLYS
Human whole blood cell	IFN- $\alpha$ 2b*	1	Release of IP-10

\* with 5 ng/mL of TNF $\alpha$

IP-10: Interferon gamma-induced protein 10; BLYS: B lymphocyte stimulator protein

### 2.6 ELISA 分析 QX006N 的抗原结合表位区域

人 IFNAR1 的胞外区 (hIFNAR1-ECD) 包含 4 个结构域 Domain1 (D1, K28~A126)、Domain2 (D2, Q127~N227)、Domain3 (D3, E228~Q329) 和 Domain4 (D4, A330~K436), 分别对应图 1 中蓝色、绿色、黄色和灰色背景的氨基酸序列。根据 hIFNAR1-ECD 的序列特征, 设计并制备截短的 hIFNAR1-ECD 突变体, 包括 hIFNAR1 (D1+D2)、hIFNAR1 (D3+D4) 和 hIFNAR1 (D1+D2+D3), 通过 ELISA 检测突变体与 QX006N 的结合情况, 分析 QX006N 与 IFNAR1-ECD 的结合区域位置。

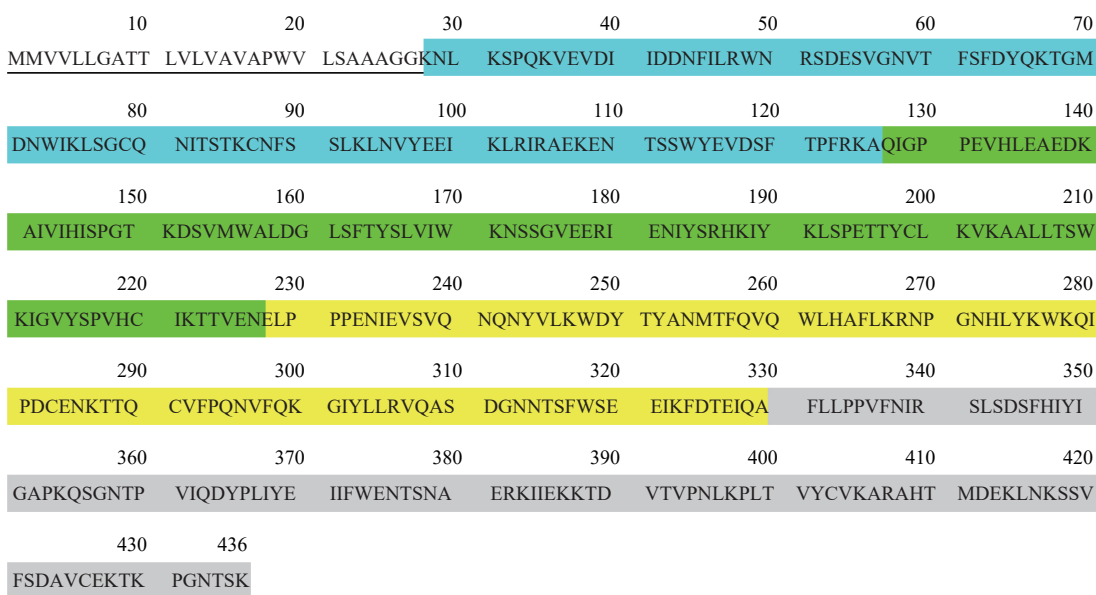
## 3 结果

### 3.1 兔抗人 IFNAR1 单克隆抗体的制备和筛选

本研究共进行 4 轮 B 细胞克隆和筛选, 获得 114 个具有中和活性的 B 细胞克隆; 优选 13 个克隆进行重组表达后进行中和活性验证, 最终挑选 2 个中和活性最佳的兔单克隆抗体 362# 和 1203# (图 2)。兔抗 362# 和 1203# 的氨基酸序列高度相似, 分别在重链 CDR2 区和轻链 CDR2 区相差 1 个氨基酸 (图 3)。HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  报告基因细胞活性检测结果 (表 2) 显示, 兔抗 1203# 的中和活性更优。

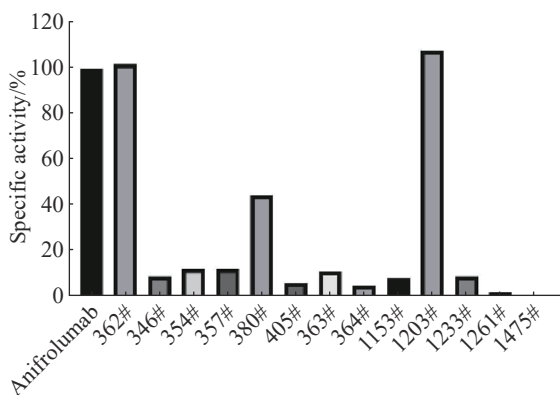
### 3.2 抗人 IFNAR1 兔单克隆抗体的人源化

通过 CDR 移植结合骨架区关键氨基酸回复



**Figure 1** Human IFNAR1-ECD amino acid sequence

Underlined sequence is the signal peptide sequence, and the amino acid sequences with blue, green, yellow and gray backgrounds constitute Domain1 to Domain4 of IFNAR1-ECD, respectively



**Figure 2** Neutralizing activity of 13 recombinant rabbit monoclonal antibodies compared to anifrolumab

突变, 对 362#兔抗进行人源化改造(图 4)。结果(表 3)显示, 与对照阿尼鲁单抗相比, 人源化改造导致中和活性下降, HZD362-5 的相对中和活性只有 72.3%。由于 1203#兔抗的细胞活性相比 362#略

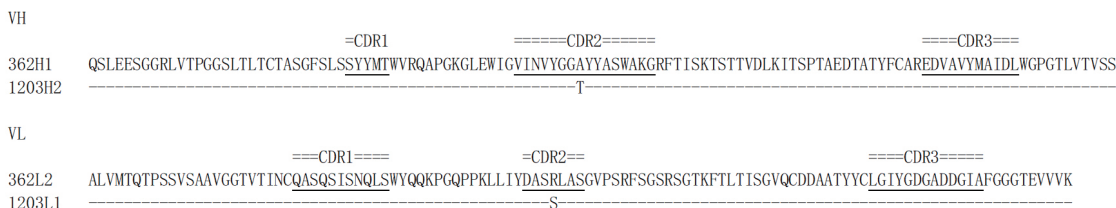
好, 且 1203#兔抗的 CDR 区比 362#兔抗多了 2 个与人 germline 相似的氨基酸, 因此继续对 1203#兔抗进行人源化改造(图 4)。与对照阿尼鲁单抗相比, HZD1203-45 的细胞比活达 92.0%, 选为最终的人源化分子 QX006N。

3.3 QX006N 的抗原结合活性和特异性

本研究运用 ELISA 的方法, 检测 IFNAR1 以及相关蛋白(人 IFNAR2、人 IFNGR1、人 IFNGR2、人 IFN- $\alpha$ 2b、人 IFN- $\beta$ 、人 IFN- $\gamma$ 、人 IFN- $\omega$ 1、人 IFN- $\epsilon$ )的结合情况。检测结果显示, QX006N 与人

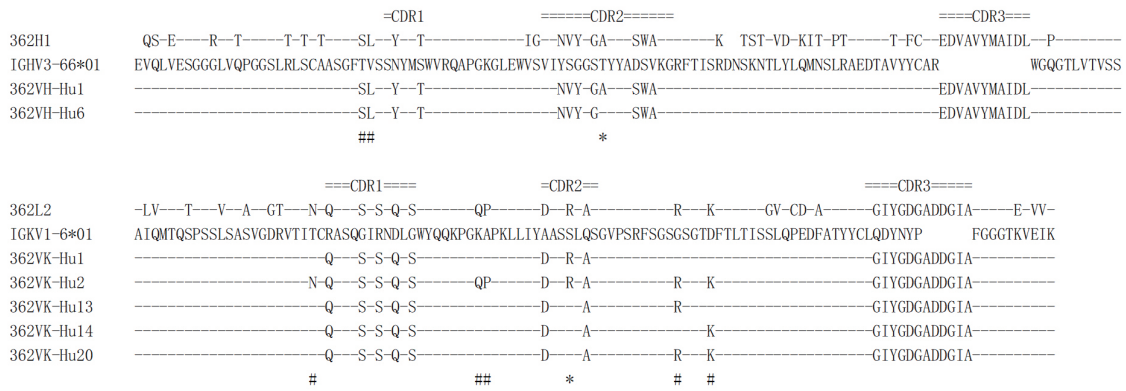
**Table 2** Neutralization activity of rabbit mAb 362# and 1203# based on HEK-Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  reporter cells

Sample	IC <sub>50</sub> (ng/mL)		
	IFN- $\alpha$ 2b	IFN- $\beta$	IFN- $\omega$ 1
Anifrolumab	5.5	28.3	23.3
362#	5.8	27.2	29.1
1203#	4.7	23.4	17.5



**Figure 3** Amino acid sequence alignment between the variable region of rabbit mAb 362# and 1203#

CDR region of the antibody is marked with an underscore according to the Kabat numbering scheme; "-" means the amino acid of 1203# is identical to 362#; VH: Heavy-chain variable region; VL: Light-chain variable region



**Figure 4** Amino acid sequence alignment between the variable regions of humanized anti-IFNAR1 rabbit monoclonal antibodies

“-” denotes residues that are identical to human germline at the corresponding positions; “#” denotes the residues in human framework regions were back-mutated; “\*” denotes the different residues between rabbit antibodies 362# and 1203#

**Table 3** Summary of humanized anti-IFNAR1 rabbit monoclonal antibodies

Antibody	VH		VL		SEC-HPLC/%			Activity ratio*
	Name	Humanization	Name	Humanization	HMW	Monomer	LMW	
HZD362-1	362VH-Hu1	97.7%	362VK-Hu1	100%	2.7	97.2	0.1	21.2%
HZD362-5	362VH-Hu1	97.7%	362VK-Hu2	93.8%	1.2	98.8	ND	72.3%
HZD1203-38	362VH-Hu6	97.7%	362VK-Hu13	98.8%	0.8	99.2	ND	35.0%
HZD1203-39	362VH-Hu6	97.7%	362VK-Hu14	98.8%	0.8	99.2	ND	34.0%
HZD1203-45	362VH-Hu6	97.7%	362VK-Hu20	97.5%	1.3	98.7	ND	92.0%

ND: Not detected; HMW: High molecular weight; LMW: Low molecular weight

\* Neutralization activity of humanized antibodies compared to anifrolumab was measured using HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  reporter cell

IFNAR1 特异性结合, 与相关蛋白均无结合(图 5)。

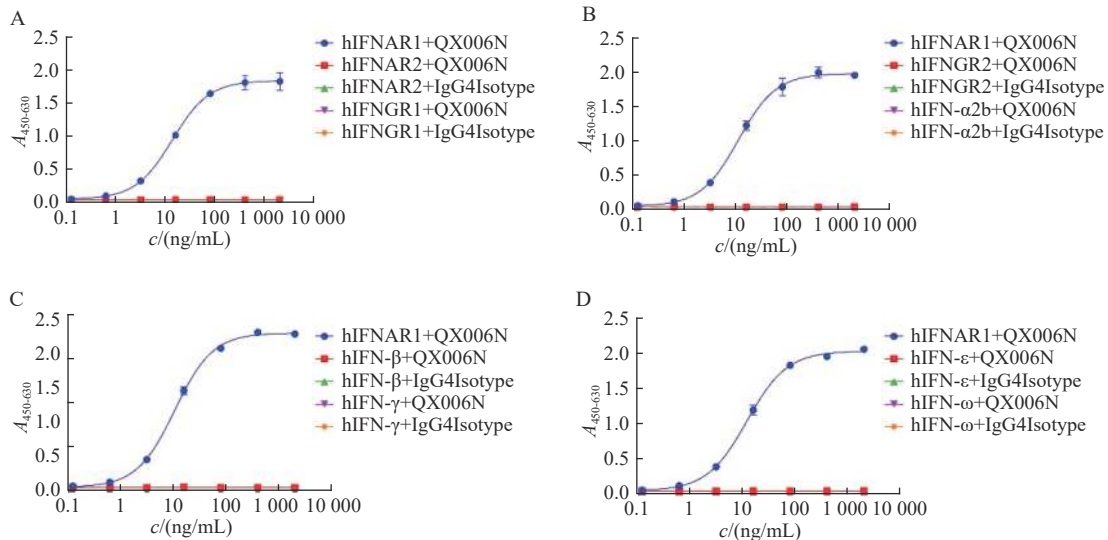
### 3.4 QX006N 的抗原亲和力

采用 Biacore T200 检测 QX006N、阿尼鲁单抗与人 IFNAR1 的亲和力, 结果显示 QX006N 与人 IFNAR1 的亲和力常数  $K_D$  与阿尼鲁单抗相当

(表 4)。

### 3.5 QX006N 的中和活性

3.5.1 HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  细胞法 采用 HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  报告基因细胞法分析 QX006N 对 IFN-I(IFN- $\alpha$ 2b、IFN- $\beta$  和 IFN- $\omega$ 1) 诱导 HEK Blue™



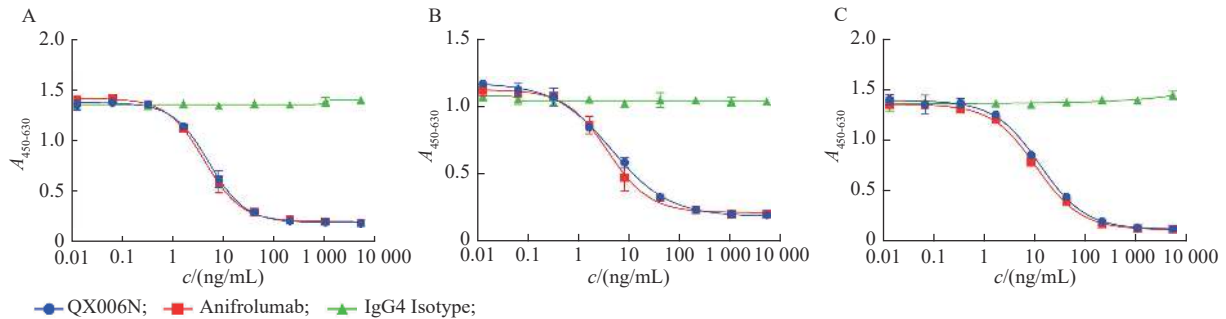
**Figure 5** Binding map of QX006N to related proteins

A: hIFNAR2 and hIFNAR1; B: hIFNGR2 and hIFN- $\alpha$ 2b; C: hIFN- $\beta$  and hIFN- $\gamma$ ; D: hIFN- $\epsilon$  and hIFN- $\omega$ 1

**Table 4** Affinity of QX006N and anifrolumab binding to human IFNAR1 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Sample	$k_a/(\times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	$k_d/(\times 10^{-5}/\text{s})$	$K_D/(\times 10^{-10} \text{ mol/L})$
QX006N	3.47	3.76	1.08
Anifrolumab	18.67	12.40	0.67

IFN- $\alpha/\beta$  细胞 STAT1/2 磷酸化活性的中和作用。结果显示(图 6、表 5): QX006N 中和 IFN- $\alpha$ 2b、IFN- $\beta$ 、IFN- $\omega$ 1 诱导的报告基因细胞 STAT1/2 磷酸化活性的  $IC_{50}$  分别为(4.6  $\pm$  0.4)、(17.4  $\pm$  1.2)和(12.1  $\pm$  1.0)ng/mL, 与阿尼鲁单抗相当。



**Figure 6** QX006N inhibits different IFN-I induced STAT1/2 phosphorylation in HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: IFN- $\alpha$ 2b; B: IFN- $\beta$ ; C: IFN- $\omega$ 1

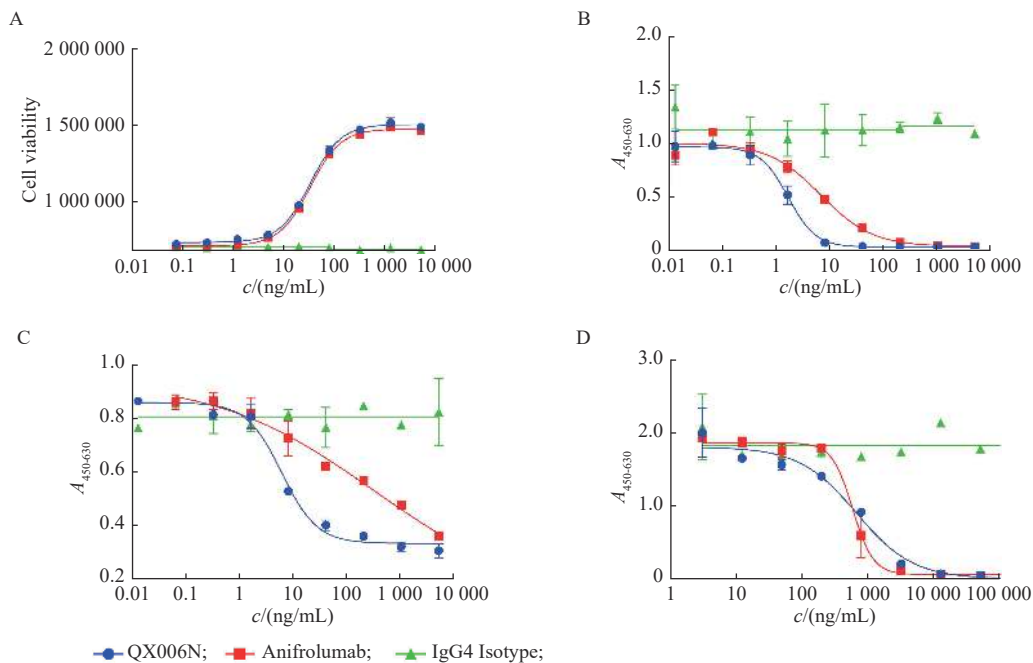
**Table 5** Neutralization activity of QX006N based on HEK Blue™ IFN- $\alpha/\beta$  cell ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Sample	$IC_{50}/(\text{ng/mL})$		
	IFN- $\alpha$ 2b	IFN- $\beta$	IFN- $\omega$ 1
QX006N	4.6 $\pm$ 0.4	17.4 $\pm$ 1.2	12.1 $\pm$ 1.0
Anifrolumab	4.0 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 1.3	10.6 $\pm$ 0.7
IgG4 Isotype	No neutralizing activity		

QX006N 中和 IFN- $\alpha$ 2b 抑制 Daudi 细胞增殖的活性。结果显示(图 7、表 6): QX006N 能够中和 IFN- $\alpha$ 2b 诱导的 Daudi 细胞增殖, 其  $IC_{50}$  为(31.4  $\pm$  1.6) ng/mL, 与阿尼鲁单抗活性相当。

3.5.3 THP-1 细胞法 采用 THP-1 细胞法分析 QX006N 中和 IFN- $\alpha$ 2b 诱导 THP-1 细胞释放 IP-10 和 BLYS 的活性。结果显示(图 7、表 6): QX006N 能够中和 IFN- $\alpha$ 2b 诱导 THP-1 细胞释放 IP-10 和

3.5.2 Daudi 细胞法 采用 Daudi 细胞法分析



**Figure 7** QX006N inhibits IFN- $\alpha$ 2b induced cell proliferation and cytokine release ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Daudi cell proliferation; B: IP-10 release in THP-1 cell; C: BLYS release in THP-1 cell; D: IP-10 release in human whole blood cell

**Table 6** Neutralization activity of QX006N based on Daudi, THP-1 and human whole blood cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Sample	IC <sub>50</sub> /(ng/mL)			
	Daudi cells proliferation	THP-1 cells IP-10 release	THP-1 cells BLYS release	Blood cells IP-10 release
QX006N	31.4 ± 1.6	2.0 ± 0.5	5.9 ± 1.4	1 003 ± 311
anifrolumab	31.3 ± 1.7	7.1 ± 0.8	101.3 ± 28.2	904 ± 314
IgG4 Isotype	No neutralizing activity			

BLYS, 其 IC<sub>50</sub> 分别为 (2.0 ± 0.5) ng/mL 和 (5.9 ± 1.4) ng/mL, 活性优于阿尼鲁单抗。

**3.5.4 人全血法** 采用人全血法分析 QX006N 中和 IFN-α2b 诱导人全血释放 IP-10 的活性。结果显示(图 7、表 6): QX006N 能够中和 IFN-α2b 诱导人全血释放 IP-10, 其 IC<sub>50</sub> 为 (1 003 ± 311) ng/mL, 与阿尼鲁单抗活性相当。

### 3.6 QX006N 的抗原结合表位区域

QX006N 是靶向 IFNAR1 胞外区的人源化单克隆抗体。人 IFNAR1 (NP\_000620.2) 是含有 557 个氨基酸的膜受体蛋白, 其中 1~27 位氨基酸序列是 IFNAR1 的信号肽, 28~436 位氨基酸序列是 IFNAR1 的胞外区 (IFNAR1-ECD), 胞外区共包含 4 个区域(图 1)。ELISA 检测 QX006N 与截短的 hIFNAR1 突变体 EC<sub>50</sub> 显示(表 7), hIFNAR1 (D3+D4) 和 hIFNAR1 (D1+D2+D3) 与 QX006N 的 EC<sub>50</sub> 与天然 hIFNAR1-ECD 基本一致, 而 hIFNAR1 (D1+D2) 不与 QX006N 结合, 因此推测 QX006N 与 hIFNAR1-ECD 的结合在 Domain3。

**Table 7** QX006N binds to truncated hIFNAR1-ECD mutants

Sample	QX006N	
	EC <sub>50</sub> /(ng/mL)	Ratio
hIFNAR1-ECD	8.26	1.0
hIFNAR1(D1+D2)	NA	NA
hIFNAR1(D3+D4)	4.29	0.5
hIFNAR1(D1+D2+D3)	8.53	1.0

NA: No binding

## 4 讨论

IFN-I 结合 IFNAR1 和 IFNAR2 形成三元复合物, 激活下游 JAK-STAT 信号通路。为了阻断 IFN-I 信号通路, 抗体可以结合 IFNAR1, 也可以结合 IFNAR2。据报道, 所有 IFN 均以微摩尔亲和力结合 IFNAR1, 并以纳摩尔亲和力结合 IFNAR2<sup>[13]</sup>。抗体结合 IFNAR1 并阻断下游信号通路, 比结合 IFNAR2 更容易, 因此选择 IFNAR1 作为靶点开发

治疗药物。

兔比小鼠具有更大的体型, 有助于收集更多的免疫 B 细胞, 产生更多样化的兔单抗<sup>[14]</sup>。兔的 B 细胞除发生体细胞超变, 还存在基因转换的现象。基因转换正是兔免疫发育过程中不同于小鼠的关键特征, 将会极大提升初级和次级 B 细胞库重链和轻链可变区的多样性和亲和力, 为抗体的筛选提供更广泛的选择。诺华公司的布洛赛珠单抗 (brolucizumab) 和灵北公司的艾普奈珠单抗 (eptinezumab) 先后被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市<sup>[15-16]</sup>, 充分证明了人源化兔单抗的成药性。因此, 通过免疫兔筛选获得的兔单抗, 具备多样性好、亲和力高以及成药效佳等潜在优势。

有研究表明人源化改造有可能导致抗体的活性下降。本研究发现对筛选获得的兔抗进行人源化改造后, 抗体活性下降。其中 HZD362-5 的细胞比活只有 72.3%, 且 HZD362-5 轻链骨架区有 5 个位点进行了回复突变, 导致轻链骨架区的人源化程度只有 93.8%。由于 1203#兔抗的细胞活性略好, 且 CDR 区比 362#兔抗的人源化程度更高, 因此选择对 1203#兔抗继续进行人源化改造。最终获得了人源化抗体 QX006N (HZD1203-45), 细胞活性约 92%, 与对照阿尼鲁单抗相当, 且轻链骨架区的人源化程度提升到 97.5%。

初步体外评价结果显示 QX006N 特异性结合人 IFNAR1 Domain3 区域, 能够有效中和 IFN-I (IFN-α2b、IFN-β 和 IFN-ω1) 诱导 HEK Blue™ IFN-α/β 细胞 STAT1/2 磷酸化作用, 表明 QX006N 能有效中和 IFN-I 信号通路, 可作为 I 型 IFN 信号通路的有效拮抗剂。而且, QX006N 能够分别有效中和 IFN-α2b 诱导的 Daudi 细胞增殖, THP-1 细胞释放 IP-10 和 BLYS, 以及人全血释放 IP-10。以上结果表明 QX006N 能够有效中和 IFN-I 介导的细胞下游生物学效应, 为其在 SLE 治疗中的临床应用提供了坚实的基础。目前, QX006N 正在进行进一步的临床试验, 旨在验证其安全性、有效性以及在 SLE 治疗中的潜在优势。该研究不仅为 IFN-I 信号在

SLE 等自身免疫疾病中的角色提供了更深入的理解, 也展示了基于兔抗体平台开发的单克隆抗体在治疗这类疾病中的巨大潜力。

## References

- [1] Ramaswamy M, Tummala R, Streicher K, *et al.* The pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic potential of the interferon pathway in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(20): 11286.
- [2] Moll HP, Maier T, Zommer A, *et al.* The differential activity of interferon- $\alpha$  subtypes is consistent among distinct target genes and cell types[J]. *Cytokine*, 2011, **53**(1): 52-59.
- [3] Peng L, Oganessian V, Wu H, *et al.* Molecular basis for antagonistic activity of anifrolumab, an anti-interferon- $\alpha$  receptor 1 antibody[J]. *MAbs*, 2015, **7**(2): 428-439.
- [4] González-Navajas JM, Lee J, David M, *et al.* Immunomodulatory functions of type I interferons[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, **12**(2): 125-135.
- [5] Jiang J, Zhao M, Chang C, *et al.* Type I interferons in the pathogenesis and treatment of autoimmune diseases[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020, **59**(2): 248-272.
- [6] Rönnblom L, Leonard D. Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease[J]. *Lupus Sci Med*, 2019, **6**(1): e000270.
- [7] Crow MK, Olfertiev M, Kirou KA. Type I interferons in autoimmune disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, **14**: 369-393.
- [8] Kalunian KC, Merrill JT, Maciuga R, *et al.* A Phase II study of the efficacy and safety of rontalizumab (rhuMab interferon- $\alpha$ ) in patients with systemic lupus erythematosus (ROSE)[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, **75**(1): 196-202.
- [9] Anderson E, Furie R. Anifrolumab in systemic lupus erythematosus: current knowledge and future considerations[J]. *Immunotherapy*, 2020, **12**(5): 275-286.
- [10] Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, *et al.* Sifalimumab, an anti-interferon- $\alpha$  monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, **75**(11): 1909-1916.
- [11] Kaplon H, Chenoweth A, Crescioli S, *et al.* Antibodies to watch in 2022[J]. *MAbs*, 2022, **14**(1): 2014296.
- [12] Deeks ED. Anifrolumab: first approval[J]. *Drugs*, 2021, **81**(15): 1795-1802.
- [13] Piehler J, Thomas C, Garcia KC, *et al.* Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation[J]. *Immunol Rev*, 2012, **250**(1): 317-334.
- [14] Weber J, Peng HY, Rader C. From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies[J]. *Exp Mol Med*, 2017, **49**(3): e305.
- [15] Markham A. Brolucizumab: first approval[J]. *Drugs*, 2019, **79**(18): 1997-2000.
- [16] Dhillon S. Eptinezumab: first approval[J]. *Drugs*, 2020, **80**(7): 733-739.