



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102281902 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 13

(21) 申请号 200980154665. 5

(22) 申请日 2009. 11. 16

(30) 优先权数据

61/115, 439 2008. 11. 17 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 07. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/064613 2009. 11. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02010/057109 EN 2010. 05. 20

(73) 专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 B·洛博 S·洛 A·瓦卡恩卡尔

Y·J·王 R·L·黄 P·哥德巴赫

H·C·马勒

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 胡志君 黄革生

(51) Int. Cl.

A61K 47/30(2006. 01)

A61K 39/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20040202658 A1, 2004. 10. 14, 权利要求
1.

US 20060067930 A1, 2006. 03. 30, 权利要求
1-9.

US 20060193918 A1, 2006. 08. 31, 权利要求
1-25.

审查员 刘启明

权利要求书2页 说明书40页

序列表26页 附图3页

(54) 发明名称

用于减少大分子在生理条件下聚集的方法和
制剂

(57) 摘要

本发明提供了用于通过添加 5% 至 20% 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 减少大分子如蛋白质在生理条件下聚集并抑制其絮凝的方法。本发明还提供了在皮下施用大分子期间使注射部位处炎症最小化的方法。在进一步的方面, 本发明提供了用于皮下施用大分子的药物制剂和治疗 CD20 阳性癌症或自身免疫病的方法, 所述方法包括施用在本发明药物制剂中的人源化抗 CD20 抗体。本发明还提供了评价赋形剂减少抗体或其他大分子在生理条件下聚集的能力的体外透析方法。

1. 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的缩写为 PVP 的聚乙烯吡咯烷酮的用途,用于制备皮下施用 2H7 抗体期间使注射部位处炎症最小化的药物制剂,其中所述药物制剂包含所述 2H7 抗体和 5% 至 20%PVP。

2. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体是治疗性抗体。

3. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体是诊断性抗体。

4. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含表 1 中所示的 2H7 抗体变体 A、B、C、D、F、G、H 或 I。

5. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含选自由 SEQ ID NO:1-15 组成的组中的氨基酸序列。

6. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:1 的轻链可变结构域和 SEQ ID NO:2 的重链可变结构域。

7. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:3 的轻链可变结构域和 SEQ ID NO:4 的重链可变结构域。

8. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:3 的轻链可变结构域和 SEQ ID NO:5 的重链可变结构域。

9. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:6 的全长轻链和 SEQ ID NO:7 的全长重链。

10. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:6 的全长轻链和 SEQ ID NO:15 的全长重链。

11. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:9 的全长轻链和 SEQ ID NO:10 的全长重链。

12. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:9 的全长轻链和 SEQ ID NO:11 的全长重链。

13. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:9 的全长轻链和 SEQ ID NO:12 的全长重链。

14. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:9 的全长轻链和 SEQ ID NO:13 的全长重链。

15. 权利要求 1 所述的用途,其中 2H7 抗体包含 SEQ ID NO:9 的全长轻链和 SEQ ID NO:14 的全长重链。

16. 用于皮下施用 2H7 抗体的药物制剂,其包含处于 10mg/ml 至 200mg/ml 浓度范围的 2H7 抗体和 5% 至 20% 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的 PVP。

17. 权利要求 16 所述的制剂,其中 2H7 抗体以 30mg/ml 至 150mg/ml 的浓度范围存在。

18. 权利要求 16 所述的制剂,其中 2H7 抗体以 100mg/ml 至 150mg/ml 的浓度范围存在。

19. 权利要求 16 所述的制剂,其中 PVP 的浓度是 10%。

20. 权利要求 16 所述的制剂,其中 PVP 的分子量范围是从 7000-11000 道尔顿。

21. 权利要求 16 所述的制剂,其包含 100mg/ml 的人源化 2H7 抗体和 10% 具有 7000-11000 道尔顿分子量范围的 PVP。

22. 权利要求 21 所述的制剂,其中人源化 2H7 抗体包含表 1 中所示的抗体变体 A、B、C、D、F、G、H 或 I。

23. 权利要求 21 所述的制剂, 其还包含 30mM 乙酸钠 ;5% 二水合海藻糖 ;和 0.03% 聚山梨酯 20, pH5.3。

24. 权利要求 23 所述的制剂, 其中人源化 2H7 抗体包含表 1 中所示的抗体变体 A、B、C、D、F、G、H 或 I。

25. 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的 PVP 的用途, 用于制备治疗 CD20 阳性 B 细胞癌的药物制剂, 其中所述药物制剂包含治疗有效量的表 1 的人源化 2H7 抗体和 5% 至 20% 所述 PVP。

26. 权利要求 25 所述的用途, 其中 CD20 阳性 B 细胞癌是 B 细胞淋巴瘤或白血病。

27. 权利要求 26 所述的用途, 其中 CD20 阳性 B 细胞癌选自自由缩写为 NHL 的非霍奇金淋巴瘤、复发惰性 NHL 和利妥昔单抗难治的惰性 NHL、缩写为 LPHD 的淋巴细胞主型霍奇金病、缩写为 SLL 的小淋巴细胞淋巴瘤和缩写为 CLL 的慢性淋巴细胞白血病组成的组。

28. 权利要求 26 所述的用途, 其中人源化 2H7 抗体是来自表 1 的变体 A、B、C、D 或 H。

29. 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的 PVP 的用途, 用于制备治疗自身免疫病的药物制剂, 其中所述药物制剂包含治疗有效量的表 1 的人源化 2H7 抗体和 5% 至 20% 所述 PVP。

30. 权利要求 29 所述的用途, 其中自身免疫病选自自由缩写为 RA 的类风湿性关节炎和幼年型类风湿性关节炎, 包括氨甲蝶呤不充分应答者和 TNF α - 拮抗剂不充分应答者 ;缩写为 SLE 的系统性红斑狼疮, 包括狼疮肾炎 ;缩写为 MS 的多发性硬化, 包括缩写为 RRMS 的复发 - 缓解型多发性硬化 ;韦格纳病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、缩写为 ITP 的特发性血小板减少性紫癜、缩写为 TTP 的血栓性血小板减少性紫癜、自身免疫性血小板减少症、多发性硬化、银屑病、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、重症肌无力、ANCA 相关血管炎、糖尿病、Reynaud 综合征、Sjogren 综合征、缩写为 NMO 的视神经脊髓炎和肾小球肾炎组成的组。

31. 权利要求 30 所述的用途, 其中人源化 2H7 抗体是来自表 1 的变体 A、B、C、D 或 H。

32. 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的 PVP 的用途, 用于制备在注射时于患者的注射部位处改善或维持水性皮下制剂中 2H7 抗体的溶解或使该抗体沉淀最小化的药物制剂, 其中所述药物制剂包含水性皮下制剂中的 2H7 抗体和 5% 至 20% 所述 PVP。

33. 权利要求 32 所述的用途, 其中 2H7 抗体是表 1 中所示的人源化抗 CD20 抗体变体 A、B、C、D、F、G、H 或 I。

34. 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的 PVP 的用途, 用于制备增加待皮下施用的 2H7 抗体的生物利用率的药物制剂, 其中所述药物制剂包含水性皮下制剂中的 2H7 抗体和 5% 至 20% 所述 PVP。

35. 权利要求 34 所述的用途, 其中 2H7 抗体是表 1 中所示的人源化抗 CD20 抗体变体 A、B、C、D、F、G、H 或 I。

用于减少大分子在生理条件下聚集的方法和制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及针对皮下施用大分子而言通过减少生理条件下的聚集使注射部位处炎症最小化的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 在过去二十年中,重组 DNA 技术已经导致作为生物分子、尤其蛋白质的药物的数目明显增加。生物分子药物的增加已经导致药物制剂领域的新挑战。高剂量的蛋白质治疗药如抗体可以通过静脉内输注递送至患者,但是这种药物施用途径是不方便的,并且如可能的话,通常优选配制该蛋白质治疗药用于皮下注射。然而,用于皮下注射的药物溶液的体积比静脉内输注体积小得多,从而蛋白质必然以更高的浓度存在。在每毫升数十毫克的高的治疗性蛋白质浓度上,维持治疗性蛋白质稳定溶解持续延长的时间段是重要的。高浓度的蛋白质溶液增加了有利于聚集的蛋白质-蛋白质相互作用的可能性;防止聚集已经变成蛋白质药物配制的重要事项。聚集造成许多问题,包括活性蛋白的生物利用率减少,药物代谢动力学改变和不想要的免疫原性。(Frokjaer, S. 和 Otzen, D. E., Nat. Rev. Drug. Discov. 4 :298-306 (2005); Jiskoot, W. 和 Crommelin, D. J. A., EJHP Practice 12 :20-21 (2006))。

[0004] 防止聚集仍主要是经验性的,因为聚集过程的分子细节总体上未知。常见策略是添加稳定剂至蛋白质溶液。常使用的稳定剂包括糖、盐、游离氨基酸如 L-精氨酸和 L-谷氨酰胺 (Golovanov, A. P. 等人, J. Am. Chem. Soc. 126 :8933-8939 (2004))、多元醇 (Singh, S. 和 Singh, J., AAPS Pharm. Sci. Tech 4 :1-9 (2003); Mishra, R. 等人, J. Biol. Chem. 280 :15553-15560 (2005))、聚乙二醇 (PEG) 和可以减少蛋白质-蛋白质相互作用的其他聚合物,如聚山梨酯 (polysorbates) 或泊洛沙姆 (Frokjaer 和 Otzen, 见上文; Lee, R. C. 等人, Ann. Biomed. Eng. 34 :1190-1200 (2006); (Nema, S. 等人, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 51 :166-171 (1997))。

[0005] PVP 是基本上由线性聚合的 1-乙烯基-2-吡咯烷酮(乙烯基吡咯烷酮)组成的合成聚合物,其聚合度导致具有各种分子量的聚合物。聚乙烯吡咯烷酮的同义词包括 PVP、聚(1-乙烯基-2-吡咯烷酮)、聚维酮和 Kollidon。PVP 是生物学惰性的并且口服和局部用途无毒。分子量低于 25000 道尔顿的 PVP 通过肾小球滤过作用从体循环中移除并且因此预期不在身体中堆积。

[0006] PVP 已经在制药工业中广泛用作片剂包衣助剂并且在眼用和局部用制品中用作增黏剂。PVP 也已经最初作为血浆增容剂用于肠胃外施用并且随后在可注射制剂(例如,抗生素、激素、镇痛药)中用来产生黏度。这些制剂限于通常小于 500 道尔顿的小分子化合物或小蛋白如激素。含有 PVP 的当前可用药品包括 Bicillin C-R™ (Wyeth)、Wycillin™ (Wyeth) 和 Pfizerpen™ (Pfizer), 它们均含有小分子青霉素 G, 以及非常低浓度(≤ 0.6%)的 PVP。Depo-SubQ Provera 104™ (Pharmacia and Upjohn) 含有 5% PVP 连同小分子醋酸甲羟孕酮。Bexxar™ (Glaxo Smith Kline) 含有放射性标记的抗 CD20 抗体连同 4.4-6.6% PVP。在 Bexxar 的例子中, PVP 特异地用作放射防护剂以减少放射性标记的抗体因所附着放射性同

位素而自辐射分解（美国专利号 5,961,955 和美国专利号 6,338,835）。

[0007] PVP 和聚乙二醇也被生物化学家用来沉淀溶解的蛋白质（美国专利号 5,525,519）。

[0008] CD20 抗原（也叫做人 B-淋巴细胞限制的分化抗原, Bp35）是位于前 B(pre-B) 淋巴细胞和成熟 B 淋巴细胞上的分子量大约 35kD 的疏水性跨膜蛋白 (Valentine 等人 J. Biol. Chem. 264(19) :11282-11287(1989) ;和 Einfeld 等人 EMBO J. 7(3) :711-717(1988))。该抗原也在大于 90% 的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 上表达 (Anderson 等人 Blood 63(6) :1424-1433(1984)), 但是不存在于造血干细胞、原 B(pro-B) 细胞、正常浆细胞或其他正常组织上 (Tedder 等人 J. Immunol. 135(2) :973-979(1985))。人们认为 CD20 调节细胞周期启动和分化的活化过程中的早期步骤 (Tedder 等人, 见上文) 并且可能作为钙离子通道发挥作用 (Tedder 等人 J. Cell. Biochem. 14D :195(1990))。

[0009] 鉴于 CD20 在 B 细胞淋巴瘤中表达, 该抗原已经成为治疗此类淋巴瘤的有用治疗靶。例如, 作为针对人 CD20 抗原的基因工程嵌合鼠 / 人单克隆抗体 (可商业地获自 Genentech, Inc., 南旧金山, 加利福尼亚州, 美国和 F. Hoffmann-La Roche AG, 巴塞尔, 瑞士), 利妥昔单抗 (**RITUXAN®**, **MABTHERA®**) 抗体用于治疗患有复发或难治性低等级或滤泡性、CD20 阳性、B 细胞非霍奇金淋巴瘤的患者。利妥昔单抗是在 1998 年 4 月 7 日发表的美国专利号 5,736,137 (Anderson 等人) 中和美国专利号 5,776,456 中称作 “C2B8” 的抗体。指出用于治疗 NHL 的其他抗 CD20 抗体包括与放射性同位素钷 -90 连接的鼠抗体 Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA) 和作为与 I-131 缀合的另一种完整鼠抗体的 Bexxar™ (Corixa, WA)。

[0010] CD20 也是用于治疗自身免疫病的有用靶抗原。利妥昔单抗也已经在多种其中 B 细胞及自身抗体似乎在疾病病理生理学方面发挥作用的非恶性自身免疫病中进行研究, 包括 Edwards 等人, Biochem Soc. Trans. 30 :824-828(2002)。已经报道利妥昔单抗潜在地减轻例如以下疾病的体征和症状: 类风湿性关节炎 (RA) (Leandro 等人, Ann. Rheum. Dis. 61 :883-888(2002) ;Edwards 等人, Arthritis Rheum., 46 (增刊 9) :S46(2002) ;Stahl 等人, Ann. Rheum. Dis., 62 (增刊 1) :OP004(2003) ;Emery 等人, Arthritis Rheum. 48(9) :S439(2003))、狼疮 (Eisenberg, Arthritis. Res. Ther. 5 :157-159(2003) ;Leandro 等人 Arthritis Rheum. 46 :2673-2677(2002) ;Gorman 等人, Lupus, 13 :312-316(2004))、免疫性血小板减少性紫癜 (D' Arena 等人, Leuk. Lymphoma 44 :561-562(2003) ;Stasi 等人, Blood, 98 :952-957(2001) ;Saleh 等人, Semin. Oncol, 27(Supp 12) :99-103(2000) ;Zaia 等人, Haematologica, 87 :189-195(2002) ;Ratanatharathorn 等人, Ann. Int. Med., 133 :275-279(2000))、单纯红细胞再生障碍性贫血 (Auner 等人, Br. J. Haematol, 116 :725-728(2002)) ;自身免疫性贫血 (Zaja 等人, Haematologica 87 :189-195(2002) (印刷错误出现在 Haematologica 87 :336(2002) 中)、冷凝集素病 (Layios 等人, Leukemia, 15 :187-8(2001) ;Berentsen 等人, Blood, 103 :2925-2928(2004) ;Berentsen 等人, Br. J. Haematol, 115 :79-83(2001) ;Bauduer, Br. J. Haematol, 112 :1083-1090(2001) ;Damiani 等人, Br. J. Haematol, 114 :229-234(2001))、严重胰岛素抵抗 B 型综合征 (Cou 等人, N. Engl. J. Med., 350 :310-311(2004))、混合冷球蛋白血症 (DeVita 等人, Arthritis Rheum. 46 增刊 9 :S206/S469(2002))、重症肌无力 (Zaja 等人, Neurology, 55 :

1062-63(2000);Wylam 等人, J. Pediatr., 143 :674-677(2003))、韦格纳肉芽肿病 (Specks 等人, Arthritis&RheumatismAA :2836-2840(2001))、难治性寻常天疱疮 (Dupuy 等人, Arch Dermatol., 140 :91-96(2004))、皮炎 (Levine, Arthritis Rheum., 46(增刊 9) :S 1299(2002))、Sjogren 综合征 (Sommer 等人, Arthritis&Rheumatism, 49 :394-398(2003))、活动性 II 型混合性冷球蛋白血症 (Zaja 等人, Blood, 101 :3827-3834(2003))、寻常性天疱疮 (Dupuy 等人, Arch. Dermatol, 140 :91-95(2004))、自身免疫肾病 (Pestronk 等人, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74 :485-489(2003))、肿瘤预兆性视性眼阵挛 - 肌阵挛综合征 (Pranzatelli 等人 Neurology60(增刊 1)P05. 128 :A395(2003)) 和复发 - 缓解型多发性硬化 (RRMS). Cross 等人 (摘要) 在“美国多发性硬化研究与治疗委员会第八届年会中”的《来自 MS 中利妥昔单抗 II 期试验的初步结果》, 20-21(2003))。

[0011] 本发明提供了用于防止大分子如抗体在生理条件下聚集的方法和制剂。本发明的方法在制备治疗性蛋白质 (如本说明书中所述的抗 CD20 抗体) 的制剂方面提供优势。这些优势包括制备皮下注射用制剂的能力, 所述能力会引起治疗性抗体的生物利用率增加和注射部位处炎症减少, 以及从下文显而易见的额外优势。

[0012] 发明概述

[0013] PVP 和聚乙二醇被生物化学家用来沉淀溶解的蛋白质 (美国专利号 5, 525, 519)。我们的研究结果, 即分子量范围 2000 至 54000 道尔顿的 PVP 确实抑制蛋白质的聚集和絮凝, 因而改善其溶解度, 这是出乎意料的并且因此是 PVP 的新用途。我们还已经开发了新的体外筛选方法, 该方法包括使用具有定义的分子量 (MW) 截止值和定制释放介质 (customized releasemedia) 的透析管, 所述的定义的分子量截止值和定制释放介质均模拟注射部位处的生理条件。

[0014] 本发明提供了用于通过添加 5% 至 20% 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 减少大分子如蛋白质在生理条件下聚集并抑制其絮凝的方法。聚集和絮凝因添加 PVP 而显著减少也与大鼠中皮下注射部位处炎症的显著减少相关。本发明还提供了皮下施用大分子 (如蛋白质) 期间使注射部位处炎症最小化的方法, 所述方法通过添加 5% 至 20% 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 至该皮下制剂。在本发明的多个实施方案中, 大分子是抗体。在本发明的其他实施方案中, 该抗体是治疗性抗体或诊断性抗体。

[0015] 在本发明的多个实施方案中, 大分子是抗 CD20 抗体。在本发明的某些实施方案中, 抗 CD20 抗体是人源化抗体。在本发明的某些实施方案中, 抗 CD20 抗体包含来自表 1 的变体 A、B、C、D、F、G、H 或 I 之一。本发明还提供方法和制剂, 其中抗 CD20 抗体包含选自 SEQ ID NO :1-15 组成的组中的氨基酸序列。在本发明的其他实施方案中, 该抗体包含 SEQ ID NO :1 的轻链可变结构域和 SEQ ID NO :2 的重链可变结构域, 或者 SEQ ID NO :3 的轻链可变结构域和 SEQ ID NO :4 的重链可变结构域, 或者 SEQ ID NO :3 的轻链可变结构域和 SEQ ID NO :5 的重链可变结构域。本发明还提供方法和制剂, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO :6 的全长轻链和 SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8 或 SEQ ID NO :15 的全长重链。本发明还提供方法和制剂, 其中所述抗体包含 SEQ ID NO :9 的全长轻链和 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11、SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :14 的全长重链。

[0016] 在其他方面, 本发明提供了用于皮下施用大分子 (如蛋白质) 的药物制剂, 其包含

5%至20%具有2000至54000道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。在一些实施方案中,本发明提供了用于皮下施用抗体的药物制剂,其包含处于10mg/ml至200mg/ml浓度范围的抗体和5%至20%具有2000至54000道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。在某些实施方案中,该抗体浓度范围是从30-150mg/ml。在其他实施方案中,该抗体浓度范围是从100-150mg/ml。在某些实施方案中,PVP的浓度是10%。在某些实施方案中,PVP的分子量范围是从7000-11000道尔顿。在一个具体的实施方案中,本发明提供了用于皮下施用抗体的药物组合物,其包含100mg/ml的人源化2H7抗体和10%具有7000-11000道尔顿分子量范围的PVP。在其他实施方案中,该药物组合物还包含30mM乙酸钠;5%二水合海藻糖;和0.03%聚山梨酯20,pH 5.3。

[0017] 本发明还提供任意的以上制剂,其包含由表1中所列的任意抗体组成的人源化抗CD20抗体。本发明还提供制剂,其中抗CD20抗体包含选自SEQ ID NO:1-15组成的组中的氨基酸序列。在本发明的其他实施方案中,该抗体包含SEQ ID NO:1的轻链可变结构域和SEQ ID NO:2的重链可变结构域,或者SEQ ID NO:3的轻链可变结构域和SEQ ID NO:4的重链可变结构域。本发明还提供方法和制剂,其中所述抗体包含SEQ ID NO:6的全长轻链和SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:15的全长重链。本发明还提供方法和制剂,其中所述抗体包含SEQ ID NO:9的全长轻链和SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:14的全长重链。

[0018] 本发明还提供了治疗表达CD20的B细胞癌的方法,其包括施用在药物制剂中表1人源化抗CD20抗体的任一种,其中所述的药物制剂包含5%至20%具有2000至54000道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。CD20阳性B细胞癌优选地是B细胞淋巴瘤或白血病。在具体实施方案中,使用包含结合人CD20(hCD20)的人源化2H7抗体和其功能性片段的制剂来治疗非霍奇金淋巴瘤(NHL)、惰性NHL(包括复发惰性NHL和利妥昔单抗不应性的惰性NHL)、淋巴细胞主型霍奇金病(LPHD)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。在具体实施方案中,使用包含人源化CD20结合抗体、尤其来自表1的变体A、B、C、D或H、或其功能性片段的制剂来治疗上文所列的CD20阳性B细胞癌。

[0019] 本发明也提供了治疗自身免疫病的方法,包括施用在药物制剂中治疗有效量的表1的人源化2H7抗体至患有所述自身免疫病的患者,所述的药物制剂包含5%至20%具有2000至54000道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。在具体的实施方案中,自身免疫病选自类风湿性关节炎(RA)和幼年型类风湿性关节炎组成的组,并且RA患者是氨甲蝶呤(Mtx)不充分应答者和TNF α -拮抗物不充分应答者、利妥昔单抗不应性患者或复发患者。在一个实施方案中,RA患者是相对于另一种抗CD20治疗性抗体而言难治或复发的。在其他实施方案中,自身免疫病选自系统性红斑狼疮(SLE),包括狼疮肾炎;多发性硬化(MS),其包括复发-缓解型多发性硬化(RRMS);韦格纳病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、自身免疫性血小板减少症、多发性硬化、银屑病、IgA肾病、IgM多发性神经病、重症肌无力、ANCA相关血管炎、糖尿病、Reynaud综合征、Sjogren综合征、视神经脊髓炎(NMO)和肾小球肾炎组成的组。在具体的实施方案中,使用包含人源化CD20结合抗体、尤其来自表1的变体A、B、C、D或H、或其功能性片段的制剂来治疗上文所列的自身免疫病。

[0020] 在治疗前述疾病的方法的某些实施方案中,患有所述疾病的受试者或患者是灵长

类动物,优选地是人。

[0021] 本发明还提供了在注射时于患者的注射部位处改善或维持水性皮下制剂中抗体的增溶作用或使该抗体沉淀最小化的方法,包括添加 5%至 20%具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 至水性皮下制剂。

[0022] 本发明还提供了增加待皮下施用的抗体的生物利用率的方法,包括添加 5%至 20%具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 至包含该抗体的水性皮下制剂。

[0023] 本发明还提供了评价赋形剂减少抗体或其他大分子在生理条件下聚集的能力的体外透析方法,包括:将含有和不含有试验赋形剂的该大分子的制剂针对模仿生理条件的试验介质在 37°C 伴随恒定搅拌的情况下透析;对改变的介质溶液采样;并且测量外观,如样品的浊度和释放介质中存在的蛋白质的量由诸多方法如 UV 光谱扫描法测量,其中在含有试验赋形剂的测定法中与缺少赋形剂的对照相比,释放介质中增加的蛋白质浓度和减少的浊度指示该试验赋形剂减少大分子聚集的能力。在具体实施方案中,该介质涉及改良的 PBS 溶液,如其含有 167mM 钠,140mM 氯化物,17mM 磷酸盐,4mM 钾。在该方法的具体实施方案中,透析管具有 1 百万道尔顿分子量截止值。在该方法的其他具体的实施方案中,使用 UV 光谱测定法测量试样中的蛋白质浓度和浊度。在该方法的其他实施方案中,该方法包括对改变的释放介质和透析管内部的溶液检查沉淀,其中与缺少赋形剂的对照相比,在含有试验赋形剂的透析管中的沉淀减少指示试验赋形剂减少大分子聚集的能力。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1 显示 2H7 在生理条件下的聚集。在 37°C 将 150mg/ml 的 2H7 透析入 PBS 持续 2 日。

[0026] 图 2 显示用来评价赋形剂对生理条件下 2H7 聚集的影响的体外透析模型。在 37°C 用 220ml 的改良 PBS 溶液 (167mM 钠,140mM 氯化物,17mM 磷酸盐,4mM 钾) 填充 250ml 玻璃罐。将 6cm 长度的 12mm 透析管在一端夹住,充以大约 1ml 试样,排出过多的空气,并且将该管的另一端夹至封盖上。这个罐置于 37°C,伴以恒定搅拌。

[0027] 图 3 显示对照在体外透析模型中的行为特征。2H7 和 rhuMab CD11a 均在图 2 中所示的模型中测试。在 2.5、6、12、24、33 和 48 小时时间点测量释放入 PBS 溶液的蛋白质的累积百分数。

[0028] 图 4 显示低分子量 PVP (重均 MW 9K 道尔顿) 和高分子量 PVP (重均 MW 1.2 百万道尔顿) 对 2H7 在体外模型中释放的影响。

[0029] 图 5 显示 5% -20% 低分子量 PVP (重均 MW 9K 道尔顿) 对 2H7 在体外模型中释放的影响。

[0030] 图 5 显示具有从 2K 至 1.5M 的分子量范围的 PVP 对 2H7 在体外模型中释放的有效性。

[0031] 实施方案详述

[0032] 动词“聚集”的多种形式指各个蛋白质分子或复合物缔合以形成聚集物的过程。“聚集物”是包含蛋白质的分子或复合物的高分子装配物。聚集可以进行至形成可见沉淀物的程度。这种可见沉淀物的形成在本文中也称作“絮凝作用”。

[0033] 可以测定大分子沉淀物的相对量,例如,通过与目视对照比较。验证沉淀的额外方

法是本领域已知的并且在下文描述,例如,实施例 2 中详述的体外透析方法或实施例 3 中描述的体内模型。

[0034] 术语“生物利用率”指药物或其他物质在施用后于生理活性部位处被吸收或变得可用的程度或速率。大分子的生物利用率可以通过本领域已知的体内药物代谢动力学方法分析。

[0035] 术语“大分子”指具有至少 10000 道尔顿分子量的分子,并且可以包括蛋白质,如抗体。

[0036] 术语“赋形剂”或“药用赋形剂”指可以减少大分子聚集的化合物。赋形剂可以包括糖、盐、游离氨基酸如 L-精氨酸和 L-谷氨酰胺、多元醇、聚乙二醇 (PEGs) 和其他聚合物,如聚山梨酯、泊洛沙姆或 PVP。

[0037] 术语“PVP”指实质上由线性聚合的 1-乙烯基-2-吡咯烷酮(乙烯基吡咯烷酮)组成的聚合物,其聚合度导致具有各种分子量的聚合物。聚乙烯吡咯烷酮的同义词包括 PVP、聚(1-乙烯基-2-吡咯烷酮)、聚维酮和 Kollidon。

[0038] 术语“治疗性抗体”指在治疗疾病中使用的抗体。治疗性抗体可以具有多种作用机制。治疗性抗体可以结合并中和靶的正常功能。例如,阻断癌细胞存活所需要的蛋白质的活性的单克隆抗体引起该癌细胞的死亡。另一种治疗性单克隆抗体可以结合并激活靶的正常功能。例如,单克隆抗体可以与细胞上的蛋白质结合并触发凋亡信号。最终,如果单克隆抗体与仅在患病组织上表达的靶结合,则毒性有效载荷(有效药物)如化疗药物或放射药物与该单克隆抗体的缀合可以产生用于特异性递送该毒性有效载荷至患病组织的药物,从而减少对健康组织的伤害。

[0039] 术语“诊断性抗体”指作为疾病的诊断试剂使用的抗体。诊断性抗体可以结合至与特定疾病特异性相关或显示在该疾病中表达增加的靶结合。诊断性抗体可以例如用来检测来自患者的生物学样品中的靶或用于对患者中的疾病部位(如肿瘤)诊断性成像。

[0040] “CD20”抗原是分子量大约 35kD 的非糖基化的跨膜磷蛋白,其存在于来自外周血或淋巴样器官的大于 90% B 细胞的表面上。CD20 在早期前 B 细胞发育期间表达并且维持直至浆细胞分化;它不存在于人干细胞、淋巴样先祖细胞或正常浆细胞上。CD20 存在于正常 B 细胞以及恶性 B 细胞二者上。文献中 CD20 的其他名称包括“B-淋巴细胞限制的分化抗原”和“Bp35”。CD20 抗原在例如,Clark 和 Ledbetter, *Adv. Can. Res.* 52 :81-149(1989) 和 Valentine 等人 *J. Biol. Chem.* 264(19) :11282-11287(1989) 中描述。

[0041] 术语“抗体”在最广泛的意义上使用并且具体地涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们展示出想要的生物学的活性或功能。

[0042] 本发明的人源化 CD20 结合抗体的生物学活性将至少包括该抗体与人 CD20 结合,更优选地与人和其他灵长类动物(包括食蟹猴、猕猴、黑猩猩)的 CD20 结合。所述抗体以不高于 1×10^{-8} 的 Kd 值、优选不高于 1×10^{-9} 的 Kd 值结合 CD20,并且与不用这种抗体治疗的适宜阴性对照相比时,能够在体内杀死或耗尽 B 细胞,优选地至少 20%。B 细胞耗尽可以是 ADCC、CDC、凋亡或其他机制中一种或多种机制的结果。在本文疾病治疗的一些实施方案中,优于其他效应子功能或机制的特定的效应子功能或机制可能是想要的,并且优选人源化 2H7 的某些变体以实现那些生物学功能,如 ADCC。

[0043] “抗体片段”包含全长抗体的一部分，通常是其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段；双体 (diabodies)；线性抗体；单链抗体分子；和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0044] “Fv”是含有完整抗原识别及结合部位的最小抗体片段。该片段由紧密、非共价缔合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。贡献用于抗原结合的氨基酸残基并向该抗体赋予抗原结合特异性的 6 个高变环（分别来自 H 和 L 链的 3 个环）源自这两个结构域的折叠。然而，甚至单个可变结构域（或仅包含 3 个抗原特异性 CDR 的半个 Fv）具有识别并结合抗原的能力，虽然以比完整结合部位更低的亲和力进行。

[0045] 如本文中所述的术语“单克隆抗体”指从基本上均一的抗体群体获得的抗体，即，该群体包含的各个抗体是相同的和 / 或结合相同的表位，除在该单克隆抗体产生期间可以出现的可能变体之外，此类变体通常以微小的量存在。这种单克隆抗体一般包括了包含结合某靶的多肽序列的抗体，其中通过以下方法获得靶结合的多肽序列，所述方法包括从多个多肽序列中选择单个靶结合的多肽序列。例如，该选择方法可以从多个克隆（如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组 DNA 克隆的汇集物）选择独特克隆。应当理解可以进一步改变所选择的靶结合序列，例如旨在改善对该靶的亲和力、旨在人源化靶结合序列、旨在改善其在细胞培养中的产生、旨在降低其体内免疫原性、旨在产生多特异性抗体等，并且应当理解包含所述改变的靶结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与一般包括针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物相反，单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外，单克隆抗体制备物也是有利的，在于它们一般不混杂其他免疫球蛋白。修饰语“单克隆”指示该抗体的特征为从基本上均一的抗体群体获得，并且不得解释为通过任何具体方法产生该抗体。例如，根据本发明待使用的单克隆抗体可以由多项技术（包括，例如，杂交瘤方法（例如，Kohler 等人，*Nature*, 256 :495 (1975) ;Harlow 等人，*Antibodies :A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第 2 版 .1988) ;Hammerling 等人，在《单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤》第 563-681 页 (Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681), (Elsevier, N. Y., 1981)、重组 DNA 方法（见，例如，美国专利号 4,816,567）、噬菌体展示技术（见，例如，Clackson 等人，*Nature*, 352 :624-628 (1991) ;Marks 等人，*J. Mol Biol*, 222 :581-597 (1991) ;Sidhu 等人，*J. Mol Biol*. 338 (2) :299-310 (2004) ;Lee 等人，*J. Mol. Biol* 340 (5) :1073-1093 (2004) ;Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101 (34) :12467-12472 (2004) ;和 Lee 等人 *J. Immunol. Methods* 284 (1-2) :119-132 (2004)) 和用于在具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中产生人或人样抗体的技术（见，例如，WO 1998/24893 ;WO 1996/34096 ;WO1996/33735 ;WO 1991/10741 ;Jakobovits 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :2551 (1993) ;Jakobovits 等人，*Nature*, 362 :255-258 (1993) ;Bruggemann 等人，*Year in Immuno.*, 7 :33 (1993) ;美国专利号 5,545,806 ;5,569,825 ;5,591,669 (均属于 GenPharm) ;5,545,807 ;WO1997/17852 ;美国专利号 5,545,807 ;5,545,806 ;5,569,825 ;5,625,126 ;5,633,425 ;和 5,661,016 ;Marks 等人，*Bio/Technology*, 10 :779-783 (1992) ;Lonberg 等人，*Nature*, 368 :856-859 (1994) ;Morrison, *Nature*, 368 :812-813 (1994) ;Fishwild 等人，*Nature Biotechnology*, 14 :845-851 (1996) ;Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14 :826 (1996) ;和 Lonberg 和 Huszar,

Intern. Rev. Immunol, 13 :65-93 (1995) 产生。

[0046] 本发明的 CD20 结合抗体的“功能性片段”是这些片段,它们保持与 CD20 以与衍生这些片段的完整全长分子基本上相同的亲和力结合,并且显示生物学活性,包括如体外或体内测定法(如本文中所述的那些测定法)耗尽 B 细胞。

[0047] 术语“可变的”指抗体之间可变结构域的某些节段在序列方面很大不同的事实。V 结构域介导抗原结合并定义特定抗体针对其特定抗原的特异性。然而,变异性在涵盖可变结构域的 110 个氨基酸范围内并非均匀地分布。相反,V 区由 15-30 个氨基酸的叫做构架区 (FR) 的相对不变动的区段组成,所述的区段被具有极端变动性的叫做“高变区”的各自长 9-12 个氨基酸的较短区域隔开。天然重链和轻链的可变结构域各自包含大体上采取 β -折叠构型的由 3 个高变区连接的 4 个 FR,所述 FR 形成连接环并且在一些情况下形成该 β -折叠结构的部分。每条链中的高变区被 FR 密切接近地固定在一起,并且在高变区来自其他链的情况下,有助于抗体的抗原结合部位的形成(见 Kabat 等人,免疫学感兴趣的蛋白质的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest),第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原结合,但是展示出多种效应子功能,如使抗体参与抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC)。

[0048] 在本文中使用时,术语“高变区”指抗体的负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如, V_L 中的约第 24-34 位 (L1)、第 50-56 位 (L2) 和第 89-97 位 (L3) 残基和 V_H 中的约第 31-35B 位 (H1)、第 50-65 位 (H2) 和第 95-102 位 (H3) 残基 (Kabat 等人,免疫学感兴趣的蛋白质的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest),第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 和 / 或来自“高变环”的那些残基(例如 V_L 中的第 26-32 (L1) 位、第 50-52 (L2) 位和第 91-96 (L3) 位残基和 V_H 中的第 26-32 (H1) 位、第 52A-55 (H2) 位和第 96-101 (H3) 位残基 (Chothia 和 Lesk J. Mol. Biol. 196 :901-917 (1987))。

[0049] 如本文中所提及,“共有序列”或共有性 V 结构域序列是从已知人免疫球蛋白可变区序列的氨基酸序列的比较中衍生的人工序列。基于这些比较,制备了编码 V 结构域氨基酸和人 H 链亚组 III V 结构域的重组核酸序列,其中所述的 V 结构域氨基酸是从人 κ 衍生的序列的共有区。该共有 V 序列没有任何已知的抗体结合特异性或亲和力。

[0050] “嵌合”抗体(免疫球蛋白)具有重链和 / 或轻链部分,所述的部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,同时所述链的其余部分与衍生自另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体以及这种抗体的片段中的相应序列相同或同源,只要它们展示想要的生物学活性(美国专利号 4,816,567;和 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855 (1984))。如本文中所用的人源化抗体是嵌合抗体的亚类。

[0051] 非人(例如,鼠)抗体的“人源化”形式是含有衍生自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。就大部分而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受者或受体抗体),其中受者的高变区残基被来自非人物种(供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的具有所希望特异性、亲和力和能力的高变区残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的 Fv 构架区 (FR) 残基被相应的非人残基替换。另外,人源化抗体可以包含在受体抗体中或在供体抗体中不

存在的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能如结合亲和力。通常地,人源化抗体会基本上包含至少1个、并且一般2个可变结构域的全部,在所述的可变结构域中全部或基本上全部的高变环与非人免疫球蛋白的那些高变环对应并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白序列的那些FR区,虽然所述FR区可以包括一个或多个改善结合亲和力的氨基酸置换。FR中这些氨基酸置换的数目一般在H链中不多于6,并且在L链中不多于3。人源化抗体任选地也会包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),一般是人免疫球蛋白的部分恒定区。对于进一步细节,见Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Reichmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0052] “补体依赖性细胞毒作用”或“CDC”指在补体存在下裂解靶细胞。经典补体途径的活化因补体系统第一组分(C1q)与(适宜亚类的)结合至其对应抗原的抗体结合而启动。为评估补体活化,可以进行CDC测定法,例如,如Gazzano-Santoro等人,J. Immunol. Methods 202:163(1996)中描述。

[0053] 除非另外说明,本说明书和权利要求书中免疫球蛋白重链的恒定结构域中残基的编号按照如Kabat等人,免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)中的EU index进行,所述文献通过引用的方式明确并入本文中。“如Kabat中那样的EUindex”指人IgG1EU抗体的残基编号法。V区的残基根据Kabat编号法编号,除非专门指出顺序编号系统或其他编号系统。

[0054] CD20抗体包括:“C2B8”,现在叫做“利妥昔单抗”(“**RITUXAN®**”) (美国专利号5,736,137);从IDEC Pharmaceuticals, Inc. 可商业获得的命名为“Y2B8”或“替伊莫单抗”(“**ZEVALIN®**”)的钇-⁹⁰标记2B8鼠抗体(美国专利号5,736,137;2B8于1993年7月22日以保藏号HB11388保藏于ATCC);鼠IgG2a“B1”,也叫做“托西莫单抗”,任选地用¹³¹I标记以产生“¹³¹I-B1”或“碘I131托西莫单抗”抗体(BEXXAR™, GlaxoSmithKline, 也见美国专利号5,595,721);鼠单克隆抗体“1F5”(Press等人Blood 69(2):584-591(1987)和其变体,包括“构架贴补的”或人源化1F5(WO 2003/002607, Leung, S.;ATCC保藏物HB-96450);鼠2H7抗体和嵌合2H7抗体(美国专利号5,677,180);人源化2H7(WO 2004/056312(Lowman等人)和如下所述);HuMAX-CD20™完全人抗体(Genmab, Denmark;见,例如,Glennie和van de Winkel, Drug Discovery Today 8:503-510(2003)和Cragg等人,Blood 101:1045-1052(2003));WO 2004/035607(Teeling等人)中所描述的人单克隆抗体;US 2004/0093621(Shitara等人)中所描述的具有与Fc区结合的复杂N-糖苷连接的糖链的抗体;CD20结合分子如AME系列抗体,例如,WO 2004/103404(Watkins等人,应用分子进化论(Applied Molecular Evolution))中所描述的AME-133™抗体;A20抗体或其变体如嵌合或人源化A20抗体(分别为cA20、IMMU-106a. k. a hA20(US 2003/0219433、US2005/0025764; Immunomedics);和从国际白细胞分型会议(International Leukocyte Typing Workshop)可获得的单克隆抗体L27, G28-2, 93-1B3, B-C1或NU-B2(Valentine等人,引自《白细胞分型III》(Leukocyte Typing III)(McMichael编著,第440页,牛津大学出版社(1987))。本文中的优选CD20抗体是人源化、嵌合或人CD20抗体,更优选地是人源化2H7抗体、利妥昔单抗、嵌合或人源化A20抗体(Immunomedics)和HuMAX-CD20™人CD20抗体(Genmab)。

[0055] “分离的”抗体是已经被鉴定并且从其自然环境的组分中分离的和 / 或回收的一种抗体。其自然环境的杂质组分是可能干扰该抗体的诊断性或治疗性用途的物质,并且可以包括酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性溶质。在优选的实施方案中,将该抗体纯化(1)至以重量计大于 95% 的抗体,如 Lowry 法所测定,并且最优选地以重量计大于 99%,纯化(2)至通过转杯测序仪 (spinning cup sequenator) 获得至少 15 个 N 端残基或内部氨基酸序列的程度或纯化(3)至通过还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选使用银染的 SDS-PAGE 所确定的均一性。分离的抗体包括重组细胞内部在原位的抗体,因为该抗体的自然环境的至少一种组分将不存在。然而,一般将通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0056] 本发明的组合物和方法

[0057] 本发明提供了用于皮下施用大分子(如蛋白质)的药物组合物,其包含 5% 至 20% 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。在一些实施方案中,本发明提供了用于皮下施用抗体的药物制剂,其包含处于 30mg/ml 至 200mg/ml 浓度范围的抗体和 5% 至 20% 具有 2000 至 54000 道尔顿分子量范围的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。在某些实施方案中,该抗体浓度范围是从 10-150mg/ml。在其他实施方案中,该抗体浓度范围是从 100-150mg/ml。在某些实施方案中,PVP 的浓度是 10%。在某些实施方案中,PVP 的分子量范围是从 7000-11000 道尔顿。在一个具体的实施方案中,本发明提供了用于皮下施用抗体的药物组合物,其包含 100mg/ml 的人源化 2H7 抗体和 10% 具有 7000-11000 道尔顿分子量范围的 PVP。在其他实施方案中,该药物组合物还包含 30mM 乙酸钠;5% 二水合海藻糖;和 0.03% 聚山梨酯 20, pH 5.3。

[0058] 在多个实施方案中,本发明提供了包含人源化 2H7 抗体(在本文中称作 hu2H7)的药物组合物。在具体实施方案中,人源化 2H7 抗体是表 1 中所列的抗体。

[0059] 表 1- 人源化抗 CD20 抗体及其变体

2H7 变体	V _L SEQ ID NO.	V _H SEQ ID NO.	全长L链 SEQ ID NO.	全长H链 SEQ ID NO.
A	1	2	6	7
B	1	2	6	8
C	3	4	9	10
D	3	4	9	11
F	3	4	9	12
G	3	4	9	13
H	3	5	9	14
I	1	2	6	15

[0061] 表 1 的抗体变体 A、B 和 I 各自包含轻链可变序列 (VL) :

[0062] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG

[0063] VPSR

[0064] FSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKR

[0065] (SEQ ID NO :1) ;和

[0066] 重链可变序列 (V_H) :

[0067] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP

[0068] GNGDTSY

- [0069] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSSNSYWFYFDVWG
- [0070] QGTLVTV
- [0071] SS(SEQ ID NO :2).
- [0072] 表 1 的抗体变体 C、D、F 和 G 各自包含轻链可变序列 (V_L) :
- [0073] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYLHWYQQKPKAPKPLIYAPSNLASG
- [0074] VPSR
- [0075] FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR
- [0076] (SEQ ID NO :3), 和
- [0077] 重链可变序列 (V_H) :
- [0078] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
- [0079] GNGATSY
- [0080] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSSASYWFYFDVWG
- [0081] QGTLVTV
- [0082] SS(SEQ ID NO :4).
- [0083] 表 1 的抗体变体 H 包含 SEQ ID NO :3 的轻链可变序列 (V_L) (上文) 和重链可变序列 (V_H) :
- [0084] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
- [0085] GNGATSY
- [0086] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSSYRYWFYFDVWG
- [0087] QGTLVTV
- [0088] SS(SEQ ID NO. 5).
- [0089] 表 1 的抗体变体 A、B 和 I 各自包含全长轻链序列 :
- [0090] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHYQQKPKAPKPLIYAPSNLASG
- [0091] VPSR
- [0092] FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
- [0093] PPS
- [0094] DEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSYL
- [0095] SSTLTL
- [0096] SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- [0097] (SEQ ID NO :6)。
- [0098] 表 1 的变体 A 包含全长重链序列 :
- [0099] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
- [0100] GNGDTSY
- [0101] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSSNSYWFYFDVWG
- [0102] QGTLVTV
- [0103] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPP
- [0104] AVLQ
- [0105] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
- [0106] PELL

- [0107] GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
[0108] KPREEQ
[0109] YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
[0110] TLPPSR
[0111] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKL
[0112] TVDKS
[0113] RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[0114] (SEQ ID NO :7)。
[0115] 表 1 的变体 B 包含全长重链序列：
[0116] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
[0117] GNGDTSY
[0118] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWG
[0119] QGTLVTV
[0120] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
[0121] AVLQ
[0122] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
[0123] PELL
[0124] GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
[0125] KPREEQ
[0126] YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
[0127] TLPPSR
[0128] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKL
[0129] TVDKS
[0130] RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
[0131] (SEQ ID NO :8)。
[0132] 表 1 的变体 I 包含全长重链序列：
[0133] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
[0134] GNGDTSY
[0135] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWG
[0136] QGTLVTV
[0137] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
[0138] AVLQ
[0139] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
[0140] PELL
[0141] GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
[0142] KPREEQ
[0143] YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
[0144] TLPPSR
[0145] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKL

- [0146] TVDKS
- [0147] RWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0148] (SEQ ID NO :15)。
- [0149] 表 1 的抗体变体 C、D、F、G 和 H 各自包含全长轻链序列：
- [0150] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG
- [0151] VPSR
- [0152] FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
- [0153] PPS
- [0154] DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL
- [0155] SSTLTL
- [0156] SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :9)。
- [0157] 表 1 的变体 C 包含全长重链序列：
- [0158] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
- [0159] GNGATSY
- [0160] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSASYWYFDVWG
- [0161] QGTLVTV
- [0162] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
- [0163] AVLQ
- [0164] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
- [0165] PELL
- [0166] GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
- [0167] KPREEQ
- [0168] YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
- [0169] TLPPSR
- [0170] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
- [0171] TVDKS
- [0172] RWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0173] (SEQ ID NO :10)。
- [0174] 表 1 的变体 D 包含全长重链序列：
- [0175] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
- [0176] GNGATSY
- [0177] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSASYWYFDVWG
- [0178] QGTLVTV
- [0179] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
- [0180] AVLQ
- [0181] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
- [0182] PELL
- [0183] GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
- [0184] KPREEQ

- [0185] YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEATISKAKGQPREPQVY
- [0186] TLPPSR
- [0187] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
- [0188] TVDKS
- [0189] RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0190] (SEQ ID NO :11)。
- [0191] 表 1 的变体 F 包含全长重链序列：
- [0192] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
- [0193] GNGATSY
- [0194] NQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSASYWYFDVWG
- [0195] QGTLVTV
- [0196] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
- [0197] AVLQ
- [0198] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
- [0199] PELL
- [0200] GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
- [0201] KPREEQ
- [0202] YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
- [0203] TLPPSR
- [0204] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
- [0205] TVDKS
- [0206] RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0207] (SEQ ID NO :12)。
- [0208] 表 1 的变体 G 包含全长重链序列：
- [0209] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP
- [0210] GNGATSY
- [0211] NQKFGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYSASYWYFDVWG
- [0212] QGTLVTV
- [0213] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
- [0214] AVLQ
- [0215] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
- [0216] PELL
- [0217] GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
- [0218] KPREEQ
- [0219] YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAALPAPIAATISKAKGQPREPQVY
- [0220] TLPPSR
- [0221] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
- [0222] TVDKS
- [0223] RWQQGNVFSCSVMHEALHWHTQKSLSLSPGK

[0224] (SEQ ID NO :13)。

[0225] 表 1 的变体 H 包含全长重链序列：

[0226] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGA IYP

[0227] GNGATSY

[0228] NQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVVYYSRYWYFDVWG

[0229] QGTLVTV

[0230] SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAI TSGVHTFP

[0231] AVLQ

[0232] SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA

[0233] PELL

[0234] GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

[0235] KPREEQ

[0236] YNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAPIAATISKAKGQPREPQVY

[0237] TLPPSR

[0238] EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL

[0239] TVDKS

[0240] RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0241] (SEQ ID NO 14)。

[0242] 在某些实施方案中,本发明的人源化 2H7 抗体还包含在 IgG Fc 中的氨基酸改变并且展示出对人 FcRn 的增加的结合亲和力,胜过具有野生型 IgG Fc 的抗体至少 60 倍、至少 70 倍、至少 80 倍、更优选地至少 100 倍、优选地至少 125 倍、甚至更优选地至少 150 倍至约 170 倍。

[0243] IgG 中的 N-糖基化位点是在 CH2 结构域中的 Asn297 处。本发明的人源化 2H7 抗体组合物包括具有 Fc 区的前述人源化 2H7 抗体任意者的组合物,其中该组合物中的约 80-100% (并且优选地约 90-99%) 抗体包含与该糖蛋白 Fc 区附着的缺少果糖的成熟核心糖结构。本文中显示了此类组合物以展示与 Fc γ RIIIA (F158) 的结合作用方面令人惊讶的改善,其中所述的 Fc γ RIIIA (F158) 在与人 IgG 相互作用方面不如 Fc γ RIIIA (V 158) 那样有效。Fc γ RIIIA (F 158) 在正常、健康的非洲裔美国人和高加索人中比 Fc γ RIIIA (V 158) 更常见。见 Lehrnbecher 等人 Blood 94 :4220 (1999)。历史上,中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) (最广泛使用的工业用宿主之一) 中产生的抗体含有该群体中的约 2 至 6% 非果糖化种类。然而, YB2/0 和 Lec 13 可以产生具有 78 至 98% 非果糖化种类的抗体。Shinkawa 等人 J Bio. Chem. 278 (5), 3466-347 (2003) 报道在具有较小 FUT8 活性的 YB2/0 和 Lec 13 细胞中产生的抗体显示明显增加的体外 ADCC 活性。例如在 Li 等人 (GlycoFi) 2006 年 1 月 2 日《自然·生物学》在线发表中的“在糖工程化的巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中优化人源化 IgG (Optimization of humanized IgGs in glyco engineered *Pichia pastoris*) ; Niwa R. 等人 Cancer Res. 64 (6) :2127-2133 (2004) ; US 2003/0157108 (Presta) ; US 6, 602, 684 和 US2003/0175884 (Glycart Biotechnology) ; US 2004/0093621、US2004/0110704、US 2004/0132140 (均属于 Kyowa Hakko Kogyo) 中也描述了产生果糖含量降低的抗体。

[0244] 本文中的制剂也可以根据正在治疗的具体特定适应症需要而含有多于一种活性

化合物,优选地是具有没有相互不利影响的互补活性的那些活性化合物。例如,可以想要还提供细胞毒性剂、化疗药、细胞因子或免疫抑制剂(例如作用于T细胞的一种药物如环孢菌素或结合T细胞的抗体,例如结合LFA-I的一种抗体)。此类的其他药物的有效量取决于该制剂中存在的抗体的量、疾病或病症的类型或疗法和上文讨论的其他因素。这些药物通常以相同的剂量使用并且以如本文中所述施用途径或以约1至99%前述所用的剂量使用。

[0245] 待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这通过借助无菌滤器过滤轻易地实现。抗体生产

[0246] 单克隆抗体

[0247] 单克隆抗体可以使用首先由Kohler等人, *Nature*, 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤方法产生,或可以通过重组DNA方法产生(美国专利号4,816,567)。

[0248] 在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其他适宜的宿主动物如仓鼠以激发产生或能够产生抗体的淋巴细胞,其中所述的抗体会与用于免疫的蛋白质特异性结合。备选地,淋巴细胞可以体外免疫。免疫后,将淋巴细胞分离并随后使用合适的融合剂如聚乙二醇与骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding, 单克隆抗体:原理与实践 (Monoclonal Antibodies :Principles and Practice), 第59-103页 (Academic Press, 1986))。

[0249] 如此制备的杂交瘤细胞铺种并在合适的培养基中培育,其中所述的培养基优选地含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞(也称作融合伴侣)生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),杂交瘤的选择性培养基一般会包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),所述物质防止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0250] 优选的融合伴侣骨髓瘤细胞是高效融合、支持由所选择抗体产生细胞稳定高水平产生抗体并且对选择性培养基敏感的那些细胞,其中所述的选择性培养基针对未融合的亲本细胞选择。优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,如可从美国加利福尼亚州旧金山Salk Institute Cell Distribution Center获得的从MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤衍生的那些鼠骨髓瘤系和衍生物,例如可从美国马里兰州罗克韦尔美国典型培养物保藏中心获得的X63-Ag8-653细胞。也已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系(Kozbor, *J. Immunol.*, 133 :3001 (1984); 和 Brodeur 等人, 单克隆抗体生产技术及应用 (Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications), 第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0251] 对其中杂交瘤细胞生长的培养基分析针对抗原的单克隆抗体的产生。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)确定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0252] 单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Munson等人, *Anal. Biochem.*, 107 :220 (1980) 中所述的Scatchard分析法测定。

[0253] 一旦鉴定了产生具有所希望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞,所述克隆可以由有限稀释法亚克隆并且由标准方法生长(Goding, 单克隆抗体:原理与实践 (Monoclonal Antibodies :Principles and Practice), 第59-103页 (Academic Press, 1986))。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为腹水肿瘤在动物中体内生长,例如,通过腹膜内注射所述细胞到小鼠中。

[0254] 通过常规抗体纯化方法例如亲和层析法（例如，使用蛋白 A 或蛋白 G-Sepharose）或离子交换层析法、羟基磷灰石层析法、凝胶电泳法、透析法等将所述亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水液或血清恰当地分开。

[0255] 使用常规方法（例如，通过使用能够与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针），轻易地分离并测序编码所述单克隆抗体的 DNA。所述杂交瘤细胞充当此 DNA 的优选来源。一旦分离，该 DNA 可以被置入表达载体中，所述的表达载体随后转染入否则的话不产生抗体蛋白的宿主细胞如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞中，以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。关于细菌中重组表达编码抗体的 DNA 的综述包括 Skerra 等人, *Curr. Opin. in Immunol*, 5 :256-262 (1993) 和 **Plückthun**, *Immunol. Revs.*, 130 :151-188 (1992)。

[0256] 在又一个实施方案中，单克隆抗体或抗体片段可以从使用在 McCafferty 等人, *Nature*, 348 :552-554 (1990) 中描述的技术所产生的抗体噬菌体文库分离。Clackson 等人, *Nature*, 352 :624-628 (1991) 和 Marks 等人, *J. Mol Biol*, 222 :581-597 (1991) 描述了使用噬菌体文库分别分离出鼠抗体和人抗体。后续出版物描述了通过链改组法产生高亲和力和 (nM 级) 人抗体 (Marks 等人, *Bio/Technology*, 10 :779-783 (1992))，以及组合型感染和体内重组作为构建非常大噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等人, *Nuc. Acids. Res.*, 21 :2265-2266 (1993))。因而，这些技术是分离单克隆抗体的常规单克隆抗体杂交瘤技术的可行备选。

[0257] 可以修饰编码抗体的 DNA 以产生嵌合或融合抗体多肽，例如，通过人重链和轻链恒定结构域 (C_H 和 C_L) 序列置换同源鼠序列（美国专利号 4, 816, 567；和 Morrison 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81 :6851 (1984)) 或通过免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽（异源多肽）的编码序列的全部或部分融合。非免疫球蛋白多肽序列可以置换抗体的恒定结构域，或它们被一种抗体的一个抗原结合部位的可变结构域替换以产生嵌合双价抗体，其包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合部和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合部位。

[0258] 人源化抗体

[0259] 本领域中已经描述了用于人源化非人抗体的方法。优选地，人源化抗体具有来自非人类来源的一个或多个氨基酸残基导入其中。这些非人类氨基酸残基经常称作“输入”残基，它们一般取自“输入”可变结构域。人源化可以基本上按照 Winter 和合作者 (Jones 等人, *Nature*, 321 :522-525 (1986) ;Reichmann 等人, *Nature*, 332 :323-327 (1988) ;Verhoeyen 等人, *Science*, 239 :1534-1536 (1988)) 的方法。通过用高变区序列置换人抗体的相应序列进行。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体（美国专利号 4, 816, 567），其中明显小于完整人可变结构域的区域已经被来自非人物种的相应序列置换。在实践中，人源化抗体一般是其中一些高变区残基并且可能地一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基置换的人抗体。

[0260] 当抗体意在人治疗性使用时，为降低抗原性和 HAMA 应答（人抗小鼠抗体），选择在产生人源化抗体中待使用的人可变结构域（重链和轻链两者）是极重要的。根据所谓“最佳配合 (best-fit)”方法，针对已知的人可变结构域序列的完整文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。鉴定到与啮齿动物 V 结构域序列最接近的人 V 结构域序列并且

接受其内部的人构架区 (FR) 用于人源化抗体 (Sims 等人, *J. Immunol*, 151 :2296(1993) ; Chothia 等人, *J. Mol Biol*, 196 :901(1987))。另一种方法使用从具有轻链或重链特定亚组的全部人类抗体的共有序列衍生的特定构架区。相同的构架可以用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89 :4285(1992) ;Presta 等人, *J. Immunol*, 151 : 2623(1993))。

[0261] 进一步重要的是抗体应当人源化,同时保留针对抗原的高结合亲和力和其他有利生物学特性。为实现这个目标,根据优选的方法,通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的并且是本领域技术人员熟悉的。说明并展示所选择候选免疫球蛋白序列的可能三维构象性结构的计算机程序是可获得的。对这些显示结果的检验允许分析残基在候选免疫球蛋白序列中的可能功能,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体序列和输入序列选出并且组合 FR 残基,从而实现想要的抗体特征,如对靶抗原增加的亲和力。通常,高变区残基直接并且绝大部分参与影响抗原结合作用。

[0262] 人源化抗体可以是抗体片段,如 Fab,其任选地用一种或多种细胞毒性剂缀合以产生免疫缀合物。备选地,人源化抗体可以是全长抗体,如全长 IgG1 抗体。

[0263] 人抗体和噬菌体展示方法学

[0264] 作为人源化的备选,可以产生人抗体。例如,现在可能产生当免疫时能够在不存在内源免疫球蛋白生产的情况下产生人抗体完整库的转基因动物(例如,小鼠)。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链铰链区(J_H)基因的纯合缺失导致内源抗体产生的完全抑制。转移人种系免疫球蛋白基因阵列到这种种系突变小鼠会导致抗原攻击时人抗体的产生。见,例如, Jakobovits 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :2551(1993) ; Jakobovits 等人, *Nature*, 362 :255-258(1993) ;Bruggemann 等人, *Year in Immuno.*, 7 : 33(1993) ;美国专利号 5,545,806、5,569,825、5,591,669(均属于 GenPharm) ;5,545,807 ;和 WO 97/17852。

[0265] 备选地,噬菌体展示技术 (McCafferty 等人, *Nature* 348 :552-553[1990]) 可以用来在体外从源自非免疫供体的免疫球蛋白可变 (V) 结构域基因库产生人抗体和抗体片段。根据这项技术,将抗体 V 结构域基因符合读码框地克隆到丝状噬菌体(如 M13 或 fd) 的主要或次要衣壳蛋白基因中并且作为有功能的抗体片段展示在噬菌体粒子的表面上。因为丝状粒子含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,故基于抗体功能性特性的选择也导致选择编码展示那些特性的抗体的基因。因而,噬菌体模拟了 B 细胞的一些特征。噬菌体展示可以按多种模式进行,综述见例如, Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3 :564-571(1993)。可以将几个来源的 V 基因片段用于噬菌体展示。Clackson 等人, *Nature*, 352 :624-628(1991) 从衍生自免疫小鼠的脾中的 V 基因小型随机组合文库中分离了多样化抗 **噁唑酮** 抗体组。可以从非免疫的人供体构建 V 基因库,并且可以基本上按照 Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222 :581-597(1991) 或 Griffith 等人, *EMBO J.* 12 : 725-734(1993) 描述的技术分离针对多样化抗原组(包括自身抗原)的抗体。也参见美国专利号 5,565,332 和 5,573,905。

[0266] 如上文讨论,也可以通过体外活化的 B 细胞产生人抗体(见美国专利 5,567,610

和 5, 229, 275)。

[0267] 抗体片段

[0268] 在某些情况下,存在使用抗体片段而非完整抗体的优势。所述片段的更小尺寸允许迅速清除,并且可以导致改善的到达实体肿瘤。

[0269] 已经开发了用于产生抗体片段的多种技术。常规地,这些片段借助蛋白酶解消化完整抗体衍生(见,例如,Morimoto 等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992);和 Brennan 等人, *Science*, 229:81(1985))。然而,这些片段现在可以由重组宿主细胞直接产生。Fab、Fv 和 ScFv 抗体片段均可以在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达和从中分泌出来,因而允许轻易产生大量的这些片段。抗体片段可以从上文讨论的抗体噬菌体文库分离。备选地, Fab' -SH 片段可以从大肠杆菌直接回收并且化学地偶联以形成 $F(ab')_2$ 片段 (Carter 等人, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。根据另一种方法, $F(ab')_2$ 片段可以从重组宿主细胞培养物直接分离。美国专利号 5, 869, 046 中描述了包含补救受体结合表位残基的体内半寿期增加的 Fab 和 $F(ab')_2$ 片段。用于产生抗体片段的其他技术对于技术人员将是显而易见的。在其他实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。见 WO 93/16185;美国专利号 5, 571, 894;和美国专利号 5, 587, 458。Fv 和 sFv 是具有恒定区缺乏的完好结合部位的仅有种类;因而,它们适合于体内使用期间减少的非特异性结合。可以构建 sFv 融合蛋白以产生效应子蛋白在 sFv 氨基端或羧基端处融合。见上文《抗体工程》(Antibody Engineering), Borrebaeck 编著。抗体片段也可以是“线型抗体”,例如,如美国专利 5, 641, 870 中描述。此类线型抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0270] 其他氨基酸序列修饰

[0271] 构思了本文中所述 CD20 结合抗体的氨基酸序列修饰。例如,可以想要的是改善该抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。通过导入适宜的核苷酸变化到抗 CD20 抗体的核酸中或通过肽合成法制备抗 CD20 抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如,从抗 CD20 抗体的氨基酸序列内部缺失残基和/或将残基插入该氨基酸序列中和/或置换该氨基酸序列中的残基。产生缺失、插入和置换的任意组合以实现最终构建体,条件是所述最终构建体拥有想要的特征。氨基酸变化也可以改变抗 CD20 抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数目或位置。

[0272] 一种用于鉴定抗 CD20 抗体中作为诱变优选位置的某些残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变法”,如 Cunningham 和 Wells 在 *Science*, 244:1081-1085(1989) 中描述。这里,残基或目标残基组被确定(例如,带电荷残基如 arg、asp、his、lys 和 glu) 并且被中性或带负电荷氨基酸(最优选地,丙氨酸或聚丙氨酸)替换以影响所述氨基酸与 CD20 抗原的相互作用。随后通过在置换的部位或对置换的部位导入另外或其他变体来改进那些对置换显示功能敏感性的氨基酸。因而,尽管用于导入氨基酸序列变异的部位是预定的,但是突变本身的性质不需要是预定的。例如,为分析突变在给定部位的性能,在靶密码子或靶区域实施丙氨酸扫描或随机诱变,并且对表达的抗 CD20 抗体变体筛选想要的活性。

[0273] 氨基酸序列插入包括长度从 1 个残基至含有成百个或更多残基的多肽间变动的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有 N 端甲硫氨酰残基的抗 CD20 抗体或与细胞毒性多肽融合的该抗体。抗 CD20 抗体分

子的其他插入性变体包括抗 CD20 抗体的 N 端或 C 端与酶（例如针对 ADEPT 的酶）或增加该抗体血清半寿期的多肽融合。

[0274] 变体的另一种类型是氨基酸置换变体。这些变体使得抗 CD20 抗体分子中的至少一个氨基酸残基被不同的残基替代。对于置换性诱变而言兴趣最大的位点包括高变区，但是也构思了 FR 变异。保守性置换在下表中标题“优选的置换”下显示。如果此类置换导致生物学活性的改变，则可以导入在该表中命名为“示例性置换”或如下文参考氨基酸类别进一步所描述的更明显改变，并且筛选产物。

[0275] 表 2- 氨基酸置换

[0276]

原始残基	示例性置换	优选的置换
Ala(A)	val ;leu ;ile	Val
Arg(R)	lys ;gln ;asn	Lys
Asn(N)	gln ;his ;asp, lys ;arg	Gln
Asp(D)	glu ;asn	Glu
Cys(C)	ser ;ala	Ser
Gln(Q)	asn ;glu	Asn
Glu(E)	asp ;gln	Asp
Gly(G)	ala	Ala
His(H)	asn ;gln ;lys ;arg	Arg
Ile(I)	leu ;val ;met ;ala ;phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ile ;val ;met ;ala ;phe	Ile
Lys(K)	arg ;gln ;asn	Arg
Met(M)	leu ;phe ;ile	Leu
Phe(F)	leu ;val ;ile ;ala ;tyr	Tyr
Pro(P)	ala	Ala
Ser(S)	thr	Thr
Thr(T)	ser	Ser

Trp(W)	tyr ;phe	Tyr
Tyr(Y)	trp ;phe ;thr ;ser	Phe
Val(V)	ile ;leu ;met ;phe ;ala ;正亮氨酸	Leu

[0277] 通过选择在维持 (a) 多肽主链在置换区域内的结构例如折叠或螺旋构象、(b) 该分子在靶位点处的电荷或疏水性或 (c) 侧链体积方面作用明显不同的置换实现所抗体生物学特性的明显修饰。天然存在的残基基于共有的侧链特性划分成组。

[0278] (1) 疏水性 :正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile ;

[0279] (2) 中性亲水性 :cys、ser、thr ;

[0280] (3) 酸性 :asp、glu ;

[0281] (4) 碱性 :asn、gln、his、lys、arg ;

[0282] (5) 影响链方向的残基 :gly、pro ;和

[0283] (6) 芳香性 :trp、tyr、phe。

[0284] 非保守性置换将使得这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。

[0285] 不参与维持抗 CD20 抗体正确构象的任意半胱氨酸残基也可以被置换,通常用丝氨酸置换,以改善该分子的氧化稳定性并且防止异常交联。相反,可以添加半胱氨酸键至该抗体以改善其稳定性(尤其在抗体是抗体片段如 Fv 片段的情况下)。

[0286] 置换性变体的特别优选类型涉及置换亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,为进一步开发所选择的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改善的生物学特性。用于产生此类置换性变体的便利方式涉及使用噬菌体展示的亲合力成熟法。简而言之,将几个高变区位点(例如 6-7 个位点)突变以在每个位点处产生全部可能的氨基酸置换。将如此产生的抗体变体以单价形式从丝状噬菌体粒子中展示为与每个粒子内部包装的 M 13 的基因 III 产物的融合物。随后如本文中所公开那样,对噬菌体展示的变体筛选它们的生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可以进行丙氨酸扫描诱变以鉴定明显有助于抗原结合作用的高变区残基。备选地或额外地,可以有益的是分析抗原抗体复合物的晶体结构以鉴定该抗体与人 CD20 之间的接触点。此类接触残基和邻近残基是根据本文中所详述的技术进行置换的候选者。一旦产生此类变体,将这组变体进行如本文所述的筛选,并且可以选择在一种或多种相关测定法中具有优异特性的抗体用于进一步开发。

[0287] 该抗体的氨基酸变体的另一种形式变更该抗体的初始糖基化模式。变更意指删除一个或多个存在于该抗体中的糖部分和 / 或添加一个或多个不存在于该抗体中的糖基化位点。

[0288] 抗体的糖基化一般是 N 连接的或 O 连接的。N 连接的指糖部分与天冬酰胺残基侧链的接合。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸,其中 X 是除脯氨酸之外的任意氨基酸,是糖部分与天冬酰胺侧链酶促接合的识别序列。因而,多肽中这些三肽序列二者之一的存在产生了潜在糖基化位点。O 连接的糖基化指以下糖 :N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟氨基酸、最常见与丝氨酸或苏氨酸的接合,虽然也可以使用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸。

[0289] 通过变更氨基酸序列方便地实现添加糖基化位点至抗体,从而该抗体含有一个或多个上述的三肽序列(对于N连接的糖基化位点而言)。通过对初始抗体的序列添加或置换入一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基也可以产生这种变异(对于O连接的糖基化位点而言)。

[0290] 编码抗CD20抗体的氨基酸序列变体的核酸分子由本领域已知的多种方法制备。这些方法包括,但不限于,从天然来源分离(在天然存在的氨基酸序列变体的情况下)或通过寡核苷酸介导(或位点定向)诱变、PCR诱变和盒诱变较早制备的抗CD20抗体变体或非变体形式制备。

[0291] 可以想要的是就效应子功能方面修饰本发明的抗体,从而例如增强该抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可以通过在抗体的Fc区中导入一个或多个氨基酸置换实现。备选地或额外地,可以在Fc区中导入半胱氨酸残基,因而允许在该区域中的链间二硫键形成。如此产生的同二聚体抗体可以具有改善的内化能力和/或提高的补体介导细胞杀伤作用和抗体依赖性细胞毒性作用(ADCC)。见Caron等人,J. Exp. Med. 176:1191-1195(1992)和Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922(1992)。也可以使用如Wolff等人Cancer Research 53:2560-2565(1993)中所述的异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体。备选地,可以工程化具有双Fc区并且因而可以具有增强的补体介导裂解能力和ADCC能力的抗体。见Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)。

[0292] 治疗性用途

[0293] 使用所公开的方法和包含本发明人源化2H7CD20结合抗体的组合物来治疗众多恶性和非恶性疾病,包括CD20阳性B细胞癌(如B细胞淋巴瘤和白血病)和自身免疫病。骨髓中的干细胞(B细胞先祖)缺少CD20抗原,从而允许健康的B细胞在治疗后再生并在几个月内恢复至正常水平。

[0294] CD20阳性B细胞癌是包括在细胞表面上表达CD20的B细胞异常增殖的那些B细胞癌。CD20阳性B细胞肿瘤包括CD20阳性霍奇金病,包括淋巴细胞主型霍奇金病(LPHD);非霍奇金淋巴瘤(NHL);滤泡中心细胞(FCC)淋巴瘤;急性淋巴细胞白血病(ALL);慢性淋巴细胞白血病(CLL);毛细胞白血病。

[0295] 如本文中所示,术语“非霍奇金淋巴瘤”或“NHL”指不是霍奇金淋巴瘤的淋巴系统癌症。霍奇金淋巴瘤通常可以因霍奇金淋巴瘤中存在Reed-Sternberg细胞并且在非霍奇金淋巴瘤中不存在所述细胞而区别于非霍奇金淋巴瘤。被如本文中使用的此术语包括的非霍奇金淋巴瘤实例包括可以由本领域技术人员(例如,肿瘤学家或病理学家),根据本领域已知的分类方案如Color Atlas of Clinical Hematology(第3版),A. Victor Hoffbrand和John E. Pettit(编著)(Harcourt Publishers Ltd.,2000)中所述的欧洲美国淋巴瘤(REAL)修订方案鉴定的任意非霍奇金淋巴瘤。尤其见图11.57、11.58和11.59中的名单。更具体的实例包括,但不限于复发性或难治性NHL、一线(front line)低度恶性NHL、III/IV期NHL、化疗抵抗性NHL、前体B原始淋巴细胞白血病和/或淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病和/或幼淋巴细胞白血病和/或小淋巴细胞淋巴瘤、B细胞幼淋巴细胞淋巴瘤、免疫细胞瘤和/或淋巴浆细胞性淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、结外边缘区-MALT淋巴瘤、淋巴结边缘区淋巴瘤、毛细胞白

血病、浆细胞瘤和 / 或浆细胞骨髓瘤、低度恶性 / 滤泡淋巴瘤、中度恶性 / 滤泡 NHL、套细胞淋巴瘤、滤泡中心细胞淋巴瘤 (滤泡)、中度恶性弥漫 NHL、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、侵袭性 NHL (包括侵袭性一线 NHL 和侵袭性复发性 NHL)、自体干细胞移植后复发或难治的 NHL、原发性纵隔大 B 细胞淋巴瘤、原发渗出性淋巴瘤、高度恶性免疫母细胞性 NHL、高度恶性原始淋巴瘤 NHL、高度恶性小无裂细胞 NHL、巨大肿块型 NHL (bulky disease NHL)、伯基特淋巴瘤、前体 (外周) 大颗粒淋巴细胞白血病、蕈样肉芽肿病和 / 或 Sezary 综合征、皮肤 (皮肤型) 淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤。

[0296] 在具体实施方案中,使用包含人源化 CD20 结合抗体和其功能性片段的药物组合来治疗非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、淋巴细胞主型霍奇金病 (LPHD)、小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL) 和慢性淋巴细胞白血病 (CLL),包括这些疾病的复发。

[0297] 惰性淋巴瘤是缓慢生长的不可治愈性疾病,其中普通患者 (average patient) 在多次缓解和复发周期后存活 6 年和 10 年之间。在一个实施方案中,使用人源化 CD20 结合抗体或其功能性片段来治疗惰性 NHL,包括复发的惰性 NHL 和利妥昔单抗难治的惰性 NHL。复发的惰性 NHL 患者可以是已经事先接受 1 个疗程的利妥昔单抗并且已经应答大于 6 个月的利妥昔单抗应答者。

[0298] 本发明的人源化 2H7 抗体或其功能性片段作为单剂治疗 (单一疗法) 用于例如复发或难治性低等级或滤泡性、CD20 阳性 B 细胞 NHL 中,或可以在多重药物方案中与其他药物组合施用至患者。

[0299] 本发明的人源化 2H7 抗体或功能性片段可以作为一线疗法使用。本发明也构思了这些抗体用于治疗患有 CD20 阳性 B 细胞肿瘤的患者用途,其中所述的患者对使用以下任一种药物治疗后无应答或具有不充分的应答:利妥昔单抗 (Genentech); 替伊莫单抗 (ibritumomabtiuxetan) (Zevalin™, Biogen Idee); 托西莫单抗 (Bexxar™, GlaxoSmithKline); HuMAX-CD20™ (GenMab); IMMU-106 (它是人源化抗 CD20a. k. a. hA20 或 90Y-hLL2, Immunomedics); AME-133 (AppliedMolecular Evolution/Eli Lilly); 吉妥单抗奥佐米星 (Mylotarg™, 人源化抗 CD33 抗体, Wyeth/PDL); 阿仑珠单抗 (Campath™, 抗 CD52 抗体, ScheringPlough/Genzyme); 依帕珠单抗 (IMMU-103™, 人源化抗 CD22 抗体, Immunomedics) 或在使用这些药物治疗后已经复发。

[0300] 本发明还提供了使用本发明人源化 2H7 抗体治疗 CLL 患者的方法,所述患者包括氟达拉滨疗法已经失败的那些患者。

[0301] 本文中的“自身免疫病”是产生自并且针对个体自身组织或共分离物的疾病或病症或疾病或病症的表现或从其所致的病状。自身免疫病或病症的实例包括,但是不限于关节炎 (类风湿性关节炎如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、慢性炎性关节炎、变性关节炎、感染性关节炎、莱姆关节炎、增生性关节炎、银屑病关节炎、椎骨关节炎,和幼年发作型类风湿性关节炎、骨关节炎、慢性进行性关节炎、变形性关节炎、慢性原发多发性关节炎、反应性关节炎和强直性脊柱炎)、炎性过度增生性皮肤病、银屑病如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和趾甲银屑病、特应性,包括特应性疾病如枯草热和 Job 综合征、皮炎,所述皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、过敏性皮炎、过敏性接触性皮炎、疱疹样皮炎,和特异性皮炎、X 连锁的 IgM 过多综合征、荨麻疹如慢性过敏性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹,包括慢性自身免疫性荨麻疹、多发性肌炎 / 皮肌炎、幼年

型皮炎、中毒性表皮坏死松解症、硬皮病（包括全身性硬皮病）、硬化如系统性硬化病、多发性硬化（MS）如脊髓-视神经 MS、原发性进行性 MS（PPMS），和复发缓解性 MS（RRMS）、进行性系统性硬化病、动脉粥样硬化、动脉硬化、散播性硬化和共济失调性硬化、炎症肠病（IBD）（例如，节段性回肠炎、自身免疫介导的胃肠病、结肠炎如溃疡性结肠炎（ulcerative）、溃疡性结肠炎（colitis ulcerosa）、显微镜性结肠炎、胶原性结肠炎、息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎、以及自身免疫炎症性肠病）、坏疽性脓皮病、结节性红斑、原发性硬化性胆管炎、表层巩膜炎）、呼吸窘迫综合症、包括成人或急性呼吸窘迫综合症（ARDS）、脑膜炎、全部或部分葡萄膜的炎症、虹膜炎、脉络膜炎、自身免疫血液病、类风湿性脊椎炎、突发性听力丧失、IgE 介导的疾病如过敏反应和过敏性与特应性鼻炎、脑炎如 Rasmussen 脑炎和边缘性和 / 或脑干脑炎、葡萄膜炎、如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎、伴有和不伴有肾病综合症的肾小球肾炎（GN），如慢性或急性肾小球肾炎如原发性 GN、免疫介导的 GN、膜性 GN（膜性肾病）、特发性膜性 GN 或特发性膜性肾病、膜性（membrano）或膜性增生性 GN（MPGN），包括 I 型和 II 型，和快速进行性 GN、过敏疾病和过敏反应、变态反应、湿疹，包括变应性或特发性湿疹、哮喘，如支气管哮喘、支气管哮喘和自身免疫性哮喘、涉及 T 细胞浸润和慢性炎症反应的病状、针对外来抗原如妊娠期间的胎儿 A-B-O 血型的免疫反应、慢性肺部炎症性疾病、自身免疫性心肌炎、白细胞黏附性缺陷、系统性红斑狼疮（SLE）或系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematoses）如皮肤 SLE、亚急性皮肤型红斑狼疮、新生儿期狼疮综合征（NLE）、播散性红斑狼疮、狼疮（包括肾炎、脑炎、儿童的、非肾、肾外、盘状、秃顶性狼疮）、幼年发作型（I 型）糖尿病，包括儿科胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）、成人发作型糖尿病（II 型糖尿病）、自身免疫性糖尿病、特发性尿崩症、与细胞因子及 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫反应、结核病、结节病、肉芽肿，包括淋巴瘤样肉芽肿、韦格纳肉芽肿病、粒细胞缺乏症、血管炎类，包括血管炎（包括大血管血管炎（包括风湿性多肌痛和巨细胞（Takayasu's）动脉炎）、中等血管血管炎（包括 Kawasaki 病和结节性多动脉炎 / 结节性外周动脉炎）、显微镜性多动脉炎、CNS 血管炎、坏死性、皮肤型或超敏性血管炎、系统性坏死性血管炎，和 ANCA 相关的血管炎，如 Churg-Strauss 血管炎或综合征（CSS）、颞动脉炎、再生障碍性贫血、自身免疫性再生障碍性贫血、Coombs 阳性贫血、先天性再生障碍性贫血、溶血性贫血或免疫性溶血性贫血，包括自身免疫性溶血性贫血（AIHA）、恶性贫血（anemia perniciosa）、Addison 病、纯红细胞贫血或发育不良（PRCA）、因子 VIII 缺乏症、血友病 A、自身免疫性嗜中性白血球减少症、泛白细胞减少症、白细胞减少症、涉及白细胞渗出的疾病、CNS 炎症病症、多器官损伤综合征，如继发于败血症、创伤或出血的那些多器官损伤综合征、抗原抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜病、抗磷脂抗体综合征、变应性神经炎、Behcet 或 Behcet 病、Castleman 综合征、Goodpasture 综合征、Reynaud 综合征、Sjogren 综合征、Stevens-Johnson 综合征、类天疱疮，如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮、天疱疮（包括寻常性天疱疮、落叶状天疱疮、天疱疮粘膜类天疱疮（pemphigus mucosum-membrane pemphigoid）和红斑性天疱疮）、自身免疫性多内分泌腺病、Reiter 病或综合征、免疫复合物肾炎、抗体介导的肾炎、视神经脊髓炎、多发性神经病、慢性神经病如 IgM 多发性神经病或 IgM 介导的神经病、血小板减少症（如由心肌梗死患者发展），包括血栓性血小板减少性紫癜（TTP）、输血后紫癜（PTP）、肝素诱导的血小板减少症，

和自身免疫性或免疫介导的血小板减少症,如特发性血小板减少性紫癜 (ITP) (包括慢性或急性 ITP)、睾丸和卵巢的自身免疫病,包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎、原发性甲状腺功能减退症、甲状旁腺功能减退症、自身免疫性内分泌疾病 (包括甲状腺炎如自身免疫性甲状腺炎、桥本病、慢性甲状腺炎 (桥本甲状腺炎) 或亚急性甲状腺炎、自身免疫性甲状腺疾病、特发性甲状腺功能减退症、Grave 病、多内分泌腺综合征,如自身免疫性多内分泌腺综合征 (或多内分泌腺内分泌病综合征)、副肿瘤性综合征,包括神经系统副肿瘤综合征如 Lambert-Eaton 肌无力综合征或 Eaton-Lambert 综合征、僵人或僵者综合征 (stiff-man or stiff-person syndrome)、脑脊髓炎,如变应性脑脊髓炎或过敏性脑脊髓炎和实验性变应性脑脊髓炎 (EAE)、重症肌无力如胸腺肿瘤相关重症肌无力、小脑变性、神经性肌强直、视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征 (OMS),和感觉神经病、多灶性运动神经病、Sheehan 综合征、自身免疫性肝炎、慢性肝炎、类狼疮肝炎、巨细胞肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎、淋巴细胞间质性肺炎 (LIP)、闭塞性细支气管炎 (非移植物) 抗 NSIP、Guillain-Barre 综合征、Berger 病 (IgA 神经病)、特发性 IgA 神经病、线状 IgA 皮肤病 (linear IgA dermatosis)、原发性胆汁性肝硬化、肺硬变、自身免疫性肠病综合征、腹腔疾病、腹腔疾病、乳糜泻 (谷蛋白肠病)、难治性口炎性腹泻、特发性口炎性腹泻、冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化 (ALS; Lou Gehrig 病)、冠状动脉病、自身免疫性耳病如自身免疫性内耳病 (AIED)、自身免疫性听力丧失、视性眼阵挛肌阵挛综合征 (OMS)、多软骨炎如难治性或复发性多软骨炎、肺泡蛋白沉着症、淀粉样变性病、巩膜炎、非癌性淋巴细胞增多、原发性淋巴细胞增多,其包括单克隆 B 细胞淋巴细胞增多 (例如,良性单克隆免疫球蛋白病和意义不确定性单克隆免疫球蛋白病, MGUS)、外周神经病、副肿瘤性综合征、离子通道病,如癫痫、偏头痛、心律失常、肌肉病 (muscular disorder)、耳聋、失明、周期性麻痹,和 CNS 的离子通道病、自闭症、炎性肌病、局灶节段性肾小球硬化 (FSGS)、内分泌眼病、葡萄膜视网膜炎、脉络膜视网膜炎、自身免疫性肝病 (autoimmune hepatological disorder)、纤维肌痛、多发性内分泌衰竭 (multiple endocrine failure)、Schmidt 综合征、肾上腺炎、胃萎缩、早老性痴呆、脱髓鞘病,如自身免疫性脱髓鞘病和慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、糖尿病性神经病、Dressler 综合征、斑秃、CREST 综合征 (钙化、雷诺现象、食管运动功能失常、指端硬化和毛细血管扩张症)、男性和女性自身免疫性不育、混合型结缔组织病、Chaga 病、风湿热、反复流产、霉菌肺 (farmer' s lung)、多形红斑、心脏切开术后综合征、库欣综合征、养鸟人肺 (bird-fancier' s lung)、变应性肉芽肿性血管炎、良性淋巴细胞血管炎、Alport 综合征、肺泡炎,如过敏性肺泡炎和纤维化肺泡炎、间质性肺病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、kypanosomiasis、血吸虫病、蛔虫病、曲霉病、Sampter 综合征、Caplan 综合征、登革热、心内膜炎、心肌内膜纤维化、弥漫性间质性肺纤维化、间质性肺纤维化、肺纤维化、特发性肺纤维化、囊性纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑 (erythema elevatum et diutinum)、胎儿幼红细胞增多症、嗜酸性细胞增多性肌膜炎、Shulman 综合征、Felty 综合征、丝虫病 (fiariasis)、睫状体炎,如慢性睫状体炎、异色性睫状体炎 (heterochronic cyclitis)、虹膜睫状体炎 (急性或慢性) 或 Fuch 睫状体炎、Henoch-Schonlein 紫癜、人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染、艾柯病毒感染、心肌病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、先天性风疹感染、Epstein-Barr 病毒感染、腮腺炎、Evan 综合征、自身免疫性性腺衰竭、Sydenham 舞蹈病、链球菌感染后肾炎、闭塞性血栓性血管炎 (thromboangitis

ubiterans)、甲状腺毒症、脊髓痨 (tabes dorsalis)、脉络膜炎、巨细胞多肌痛、内分泌眼病、慢性超敏性肺炎、干燥性角膜结膜炎、流行性角膜结膜炎、特发性肾病综合征、微小病变性肾病、良性家族性和缺血 - 再灌注损伤、视网膜自体免疫 (retinal autoimmunity)、关节炎、支气管炎、慢性阻塞性气道疾病、矽肺病、口疮、口疮性口炎、动脉硬化性疾病、aspermogenesis、自身免疫性溶血、Boeck 病、冷球蛋白血症、Dupuytren 挛缩、晶状体蛋白过敏性眼内炎 (endophthalmitis phacoanaphylactica)、过敏性肠炎、麻风结节性红斑、特发性面瘫、慢性疲劳综合征、风湿热 (febris rheumatica)、Hamman-Rich 病、感觉神经性听力丧失、阵发性血红蛋白尿 (haemoglobinuria paroxysmica)、性腺功能减退症、局限性回肠炎、白细胞减少症、传染性单核细胞增多症、横贯性脊髓炎、原发性特发性粘液性水肿、肾变病、交感性眼炎 (ophthalmia sympathica)、肉芽肿性睾丸炎、胰腺炎、急性多发性神经根炎、坏疽性脓皮病、奎汶氏甲状腺炎、获得性脾萎缩 (acquired splenic atrophy)、因抗精子抗体所致的不育、非恶性胸腺肿瘤、白癜风、SCID 和 Epstein-Barr 病毒相关性疾病、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、寄生虫病如利什曼原虫、中毒性休克综合征、食物中毒、涉及 T 细胞浸润的病状、白细胞黏附性缺陷、与细胞因子和 T 淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏反应相关的免疫应答、涉及白细胞渗出的疾病、多器官损伤综合征、抗原抗体复合物介导的疾病、抗肾小球基底膜病、变应性神经炎、自身免疫性多内分泌腺病、卵巢炎、原发性粘液性水肿、自身免疫性萎缩性胃炎、交感性眼炎、风湿性疾病、混合型结缔组织病、肾病综合征、胰岛炎、多内分泌腺衰竭、外周神经病、自身免疫性多内分泌腺综合征 I 型、成年发作型特发性甲状旁腺功能减退症 (AOIH)、全秃、扩张型心肌病、获得性大疱性表皮松解症 (EBA)、血色素沉着症、心肌炎、肾病综合征、原发性硬化胆管炎、化脓性或非化脓性鼻窦炎、急性或慢性鼻窦炎、筛窦炎、额窦炎、上颌窦炎或蝶窦炎、嗜酸细胞相关病症如嗜酸粒细胞增多症、嗜酸粒细胞增多性肺浸润、嗜酸粒细胞增多 - 肌痛综合征、Löffler 综合征、慢性嗜酸粒细胞性肺炎、热带肺嗜酸粒细胞增多症、支气管肺曲霉病、曲霉肿, 或含有嗜酸性细胞的曲霉肿、过敏反应、血清阴性脊椎关节炎、多内分泌腺自身免疫病、硬化胆管炎、巩膜念珠菌病、巩膜外层念珠菌病、慢性粘膜皮肤念珠菌病、Bruton 综合征、婴儿期暂时性低 γ 球蛋白血症、Wiskott-Aldrich 综合征、共济失调毛细血管扩张症、与胶原病相关的自身免疫功能紊乱、风湿病、神经学疾病、淋巴结炎、缺血性再灌注病、血压下降反应、血管功能障碍、脉管扩张 (angiectasis)、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、脑缺血, 和伴血管化疾病、变应性超敏病 (allergic hypersensitivity disorder)、肾小球肾炎 (glomerulonephritides)、再灌注损伤、心肌或其他组织的再灌注损伤、具有急性炎症组分的皮肤病、急性紫癜性脑膜炎或其他中枢神经系统炎性病症、眼和眼眶炎性病症、粒细胞输血相关综合征、细胞因子诱导的中毒、急性严重炎症、慢性顽固性炎症、肾盂炎、肺硬变、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性大动脉病、动脉内增生、消化性溃疡、心瓣炎和子宫内膜异位。

[0302] 在具体实施方案中, 使用包含人源化 2H7 抗体和其功能性片段的药物组合物来治疗类风湿性关节炎和幼年型类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮 (SLE), 包括狼疮肾炎、韦格纳病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、自身免疫性血小板减少症、多发性硬化包括复发缓解型 MS、银屑病、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、重症肌无力、ANCA 相关血管炎、糖尿病、Reynaud 综合征、Sjogren 综合征、视神经脊髓炎 (NMO) 和肾小球肾炎。

[0303] “治疗 (treating)”或“治疗 (treatment)”或“减轻”指治疗性处理,其中若目的不是治愈,则目的是减缓(减轻)所指向的病理状况或病症或防止该状况复发。如果根据本发明的方法接受治疗量的本发明人源化 CD20 结合抗体后,受试者显示自身免疫病或 CD20 阳性 B 细胞恶性肿瘤的一种或多种体征和症状可观察到和 / 或可测量地减少或不存在,则针对这种具体疾病成功地“治疗”该受试者。例如,对于癌症而言,癌细胞数目明显减少或癌细胞不存在;肿瘤尺寸减少;抑制(即,减缓至某种程度并且优选地终止)肿瘤转移;抑制肿瘤生长至某种程度;增加缓解的时间长度、减缓该疾病进展和 / 或减轻一种或多种与特定癌症相关的症状至某种程度;减少发病率和死亡率;和改善生活事务的质量。也可以由患者感觉到某疾病的体征或症状减少。治疗可以实现完全应答,其定义为癌症的全部体征消失,或部分应答,其中肿瘤的尺寸减少,优选地减少超过百分之 50,更优选地 75%。如果患者体验到稳定的疾病,则也认为该患者受到治疗。在一个标准下,本发明的 h2H7 抗体实现大于 95% 的外周血 B 细胞耗尽,并且 B 细胞恢复至基线的 25%。在优选的实施方案中,采用本发明抗体治疗有效地导致癌症患者在治疗后 4 个月、优选地治疗后 6 个月,更优选地 1 年,甚至更优选地 2 年或更多年无癌症进展。用于评估成功治疗和改善所述疾病的这些参数是通过本领域内具有适宜技术的内科医生熟悉的常规方法轻易可测量的。

[0304] “治疗有效量”指有效“治疗”受试者中疾病或病症的抗体或药物的量。在癌症的例子中,药物的治疗有效量可以减少癌细胞的数目;减少肿瘤尺寸;抑制(即,减缓至某种程度并且优选地终止)癌细胞浸润入外周器官;抑制(即,减缓至某种程度并且优选地终止)肿瘤转移;抑制肿瘤生长至某种程度和 / 或减轻一种或多种与该癌症相关的症状至某种程度。见“治疗”的先前定义。在自身免疫病的例子中,抗体或其他药物的治疗有效量有效减少该疾病的体征和症状。

[0305] 用于评估肿瘤治疗的效力或成功的参数会是在相应疾病方面熟练的内科医生已知的。通常,熟练医师会寻找具体疾病体征和症状的减少。参数可以包括直至疾病进展的中位数时间、缓解时间、稳定的疾病。

[0306] 以下参考文献描述了淋巴瘤和 CLL、它们的诊断、治疗和用于测量治疗效力的标准医疗程序。Canellos GP, Lister, TA, Sklar JL:《淋巴瘤》. W. B. Saunders 公司, Philadelphia, 1998; van Besien K 和 Cabanillas, F: 非霍奇金淋巴瘤的临床表现、分期和治疗 (Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma), 第 70 章第 1293-1338 页, 引自:《血液学, 基本原理与实践》(Hematology, Basic Principles and Practice), 第 3 版. Hoffman 等人(编者). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000; 以及 Rai, K 和 Patel, D:《慢性淋巴细胞白血病》(Chronic Lymphocytic Leukemia), 第 72 章第 1350-1362 页, 引自:《血液学, 基本原理与实践》(Hematology, Basic Principles and Practice), 第 3 版. Hoffman 等人(编者). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000。

[0307] 用于评估自身免疫或自身免疫相关疾病的治疗效力或成功的参数会是在适宜疾病方面熟练的内科医师已知的。通常, 熟练内科医师会寻找具体疾病体征和症状的减少。下文是举例。

[0308] 在一个实施方案中, 使用包含人源化 2H7 抗体的药物组合物来治疗类风湿性关节炎。

[0309] RA 是侵袭超过 2 百万美国人并且妨碍患者日常活动的致虚弱性自身免疫病。RA 在身体自身免疫系统不适宜地攻击关节组织并且引起慢性炎症时发生,其中所述的慢性炎症摧毁健康组织且在关节内部造成损伤。症状包括关节炎症、肿胀、僵硬和疼痛。另外,由于 RA 是全身性疾病,故它可以在其他组织如肺、眼和骨髓中造成影响。已知无法治愈。治疗包括多种甾体和非甾体抗炎药物、免疫抑制剂、缓解疾病的抗风湿药物 (DMARD) 和生物剂 (biologics)。然而,许多患者继续针对治疗具有不充分的应答。

[0310] 抗体可以在患有早期 RA (即,未用过氨甲蝶呤 (MTX)) 的患者中作为一线疗法或作为单一疗法或与例如 MTX 或环磷酰胺联合或在它们之后使用。或者,所述抗体可以在治疗中作为二线疗法针对 DMARD 和 / 或 MTX 难治的患者使用并且作为单一疗法或与例如 MTX 组合使用。使用人源化 CD20 结合抗体来防止并控制关节损伤、延缓结构性损伤、减少与 RA 中炎症相关的疼痛,并且通常减少轻度至重度 RA 中的体征和症状。RA 患者可以用人源化 CD20 抗体在用于治疗 RA 的其他药物之前、之后或与之一起治疗 (见下文的联合疗法)。在一个实施方案中,用本发明的人源化 CD20 结合抗体治疗先前已经使缓解疾病的抗风湿药物失效和 / 或对仅氨甲蝶呤具有不充分应答的患者。在这种疗法的一个实施方案中,患者在一个 17 日治疗方案中仅接受人源化 CD20 结合抗体 (在第 1 和第 15 日 1g 静脉内输注);CD20 结合抗体加环磷酰胺 (在第 3 和第 17 日 750mg 静脉内输注);或 CD20 结合抗体加氨甲蝶呤。

[0311] 因为身体在 RA 期间产生肿瘤坏死因子 α (TNF α), 故 TNF α 抑制剂已经用于该疾病的治疗。然而, TNF α 抑制剂如 Etanercept (**ENBREL®**)、英利昔单抗 (**REMICADE®**) 和阿达木单抗 (HUMIRA™) 可以产生不利的副作用如感染、心衰和脱髓鞘作用。

[0312] 因此,在一个实施方案中,使用人源化 CD20 结合抗体或其生物学功能性片段例如作为一线疗法来治疗 RA 患者以降低用 TNF α 抑制剂药物体验到的这些不利副作用的风险或治疗被认为易于经历毒性 (例如心脏毒性) 的患者。人源化 CD20 结合抗体或其生物学功能性片段也用于治疗患有 RA 的受试者的方法中,其中所述的受试者已经用 TNF α - 抑制剂治疗过,但不应答;对 TNF α - 抑制剂具有不充分的应答 (TNF-IR 患者) 或在应答一些时间后出现疾病复发;或被确定为未必可能对采用 TNF α - 抑制剂治疗产生应答的一位受试者。在一个实施方案,在用 TNF α 抑制剂治疗之前, TNF-IR 用低剂量如低于 100mg 治疗。

[0313] 在 RA 评价治疗效力的一种方法基于美国风湿病学学会 (ACR) 标准,该方法测量触痛和肿胀关节的改善百分数,连同其他指标。RA 患者可以与无抗体治疗 (例如,治疗前的基线) 或用安慰剂治疗相比在例如 ACR20 (20% 改善) 时评分。评价抗体疗法效力的其他方式包括 X 射线评分法,如用来评定结构性损伤如骨侵蚀和关节间隙狭窄的锐化 X 射线 (SharpX-ray) 评分法。患者也可以在治疗期间或治疗后的时间段上,基于健康评估调查表 [HAQ] 评分法、AIMS 评分法、SF-36 针对残疾的预防或改善进行评价。ACR20 标准可以包括触痛 (疼痛) 关节计数和肿胀关节计数二者的 20% 改善外加 5 个额外量度中至少 3 个量度的 20% 改善。

[0314] 1. 借助视觉模拟量表 (visual analog scale ;VAS) 的患者疼痛评估,

[0315] 2. 患者对疾病活动性的总体评估 (VAS),

[0316] 3. 内科医师对疾病活动性的总体评估 (VAS),

[0317] 4. 患者自我评估的残疾,由健康评估调查表测量,和

[0318] 5. 急性期反应物、CRP 或 ESR。

[0319] 类似地定义 ACR 50 和 70。优选地,向患者施用有效实现至少 ACR 20 评分、优选至少 ACR 30、更优选至少 ACR50、甚至更优选至少 ACR70、最优选至少 ACR 75 和更高评分的本发明 CD20 结合抗体的量。

[0320] 银屑病关节炎 (Psoriatic arthritis) 具有独特和突出的放射照相特征。对于银屑病关节炎,也可以通过锐化评定法 (Sharp score) 评价关节侵蚀和关节间隙狭窄 (joint space narrowing)。本发明的人源化 CD20 结合抗体可以用来防止关节损伤以及减少该病症的疾病体征和症状。

[0321] 本发明的又一个方面是通过施用药物组合物至患有 SLE 或狼疮肾炎的受试者治疗该病症的方法,其中所述的药物组合物包含治疗有效量的本发明的人源化 CD20 结合抗体。SLEDAI 评定法提供了疾病活动性的数字定量。SLEDAI 是 24 种已知与疾病活动性相关的临床参数和实验室参数的加权指数,数字范围是 0-103。见 Current Opinion in Rheumatology 2002,14 :515-521 中的 Bryan Gescuk 和 John Davis,“系统性红斑狼疮的新治疗药 (Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus)”。其他评定方法包括 BILAG 评定法。针对双链 DNA 的抗体据信引起肾炎和狼疮的其他表现。可以在肾炎时监督正在接受抗体治疗的患者,所述的肾炎定义为血清肌酐、尿蛋白或尿中血液的明显、反复增加。备选地或额外地,可以监测患者的抗核抗体水平和针对双链 DNA 的抗体的水平。针对 SLE 的疗法包括高剂量皮质类固醇和 / 或环磷酰胺 (HDCC)。在本文中,对狼疮的成功治疗会减少炎症,即,降低严重性和 / 或缩短下次炎症的时间。

[0322] 脊柱关节病是关节的一组病症,包括强直性脊柱炎、银屑病关节炎和节段性回肠炎。可以通过验证过的患者和内科医师总体评估测量工具来确定治疗成功。

[0323] 就血管炎而言,大约 75% 患有系统性血管炎的患者具有抗嗜中性粒细胞胞质抗体并且聚类为影响小尺度 / 中尺度血管的 3 种病状之一:韦格氏肉芽肿 (WG)、显微镜下多血管炎 (MPA) 和 Churg Strauss 综合征 (CSS),统称为 ANCA 相关血管炎 (AAV)。

[0324] 与基线状况相比,对银屑病的治疗效力通过监测本病临床体征和症状的变化 (包括内科医师总体评估 (PGA) 变化和银屑病面积与严重性指数 (PASI) 评定法、银屑病症状评估 (PSA)) 进行评估。用本发明人源化 CD20 结合抗体 (如 hu2H7. v511) 治疗的银屑病患者可以在整个治疗期间依据视觉模拟量表定期测量,其中所述的视觉模拟量表用来指示在特定时间点上体验到的瘙痒的程度。

[0325] 患者可以在首次输注治疗性抗体时体验到输注反应或输注相关症状。这些症状在严重性方面各异并且通常是用医疗介入而可逆转的。这些症状包括,但不限于流感样发热、寒战 / 僵直、恶心、荨麻疹、头疼、支气管痉挛、血管性水肿。对于本发明疾病治疗方法而言,使输注反应最小化是希望的。为减轻或最小化此类不良事件,患者可以接受初始条件化或耐受化剂量的抗体,随后接受治疗有效剂量。条件化剂量将低于治疗有效剂量以训练患者来耐受更高的剂量。

[0326] 给药

[0327] 取决于待治疗的适应症和本领域熟练医师熟悉的给药相关因素,本发明的抗体将以有效治疗该适应症同时使毒性和副作用最小化的剂量施用。想要的剂量可能取决于疾病

和疾病严重性、疾病的阶段、想要的 B 细胞调节的水平和本领域熟练医师熟悉的其他因素。

[0328] 本发明的抗体可以按多种给药频率施用,例如,每周、每二周、每月等。在一个实例中,给药频率是每 6 个月一个剂量,或每 6 个月间隔 2 周 2 个剂量。待注射的抗体溶液的体积可以从约 0.1 至约 3ml/ 每次注射,更优选地从约 0.5 至约 1.5ml/ 每次注射。在 1 次注射中施用的人源化 2H7 抗体的总量可以直至约 150mg/ 每次注射。可以使用多次注射,旨在取得想要的剂量。

[0329] 为治疗自身免疫病,取决于个体患者中的疾病和 / 或疾病严重性,可能想要的是通过调节人源化 2H7 抗体的剂量来调整 B 细胞耗尽的程度。B 细胞耗尽可以是完全的,但无需是完全的。或者,可以在初始治疗中希望 B 细胞彻底耗尽,但是在后续治疗中,可以调节该剂量以实现仅部分耗尽。在一个实施方案中,B 细胞耗尽是至少 20%,即与治疗前的基线水平相比,80%或更少的 CD20 阳性 B 细胞留下。在另一个实施方案中,B 细胞耗尽是 25%、30%、40%、50%、60%、70%或更大。优选地,B 细胞耗尽足以使该疾病的进展停止,更优选地足以减轻处于治疗下的特定疾病的体征和症状,甚至更优选地足以治愈该疾病。

[0330] 可以使用本发明的任意给药方案治疗患有自身免疫病或 B 细胞恶性肿瘤的患者,所述患者是一种或多种现有疗法对其无效、不良耐受或禁忌的患者。例如,本发明构思了用于 RA 患者的本发明治疗方法,其中所述的 RA 患者已经针对肿瘤坏死因子 (TNF) 抑制剂疗法或针对缓解疾病的抗风湿药物 (DMARD) 疗法具有不充分应答。

[0331] “慢性”施用指以与急性模式相反连续模式施用所述药物,从而维持初始治疗性作用 (活性) 持续延长的时间段。“间歇”施用不是不中断地连续地进行,而是本质上为循环性的疗法。

[0332] 联合疗法

[0333] 在治疗上文描述的 B 细胞肿瘤中,患者可以用与一种或多种治疗药 (如多重药物方案中的化疗药) 组合的本发明人源化 2H7 抗体治疗。人源化 2H7 抗体可以与该化疗药同时、依次或交替施用或在采用其他疗法无应答性后施用。用于淋巴瘤治疗的标准化疗可以包括环磷酰胺、阿糖胞苷、美法仑、和米托蒽醌加美法仑。CHOP 是用于治疗非霍奇金淋巴瘤的最常见化疗方案之一。以下是 CHOP 方案中所用的药物:环磷酰胺 (商标名 Cytoxan、neosar);阿霉素 (多柔比星 / 羟多柔比星);长春新碱 (Oncovin) 和泼尼松龙 (有时叫做 Deltasone 或 Orasone)。在具体的实施方案,将 CD20 结合抗体与以下一种或多种化疗药:多柔比星、环磷酰胺、长春新碱和泼尼松龙组合施用至有需要的患者。在一个具体的实施方案中,患有淋巴瘤 (如非霍奇金淋巴瘤) 的患者用与 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松) 疗法组合的本发明人源化 2H7 抗体治疗。在另一个实施方案中,癌症患者可以用与 CVP (环磷酰胺、长春新碱和泼尼松) 化疗法组合的本发明人源化 2H7CD20 结合抗体治疗。在一个具体的实施方案中,对患有 CD20 阳性 NHL 的患者施用与 CVP 组合的人源化 2H7. v511 或 v114,例如,每 3 周施用 1 次,持续 8 个循环。在 CLL 疗法的一个具体实施方案中,hu2H7. v511 抗体与带有氟达拉滨和环磷酰胺中的一种或两种药物的化疗法组合地施用。

[0334] “化疗药”是用于治疗癌症中的化学化合物。化疗药实例包括烷基化剂如塞替派和环磷酰胺 **CYTOXAN®** 环磷酰胺;烷基磺酸酯如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌、美妥替哌 (meturedopa) 和乌瑞替派 (uredopa);氮丙啶类和甲基蜜胺类包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺

(triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺; TLK 286 (TELCYTA™); 乙酸原类 (尤其布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); Δ -9-四氢大麻酚 (屈大麻酚、**MARINOL®**); β -拉帕酮; 拉帕醇; 秋水仙碱; 桦木酸; 喜树碱 (包括合成性类似物拓扑替康(**HYCAMTIN®**))、CPT-11 (伊立替康, **CAMPTOSAR®**)、乙酰喜树碱、东莨菪素 (scopollectin) 和 9-氨基喜树碱); 苔藓抑素; 海绵多烯酮类化合物 (callystatin); CC-1065 (包括它的阿多来新、卡折来新和比折来新合成性类似物); 鬼臼毒素; 鬼臼酸; 替尼泊苷; 隐藻素 (尤其隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀; 多达霉素 (duocarmycin) (包括合成性类似物 KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴素; 水鬼蕉碱; 匍枝珊瑚醇 A (sarcodictyin); 海绵素; 氮芥类如苯丁酸氮芥、萘氮芥、cholophosphamide、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲类如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、罗莫司汀、尼莫司汀、和雷莫司汀; 二膦酸盐类如氯膦酸盐; 抗生素如烯二炔类抗生素 (例如, 刺孢霉素, 尤其刺孢霉素 γ II 和刺孢霉素 ω II (见, 例如, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)) 和蒽环类抗生素如蒽环霉素、AD 32、阿柔比星 (alcarubicin)、柔红霉素、右雷佐生、DX-52-1、表柔比星、GPX-100、伊达比星、KRN5500、美诺立尔、烯二炔蒽环类抗生素, 包括烯二炔蒽环类抗生素 A、埃斯波霉素、新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素 (authramycin)、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、卡柔比星 (carabycin)、去甲柔红霉素、嗜癌霉素、色霉素 (chromomycinis)、放线菌素 D、地托比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素®多柔比星 (包括吗啉基-多柔比星、氰基吗啉-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星、脂质体多柔比星和去氧多柔比星)、依索比星、马塞罗霉素、丝裂霉素类如丝裂霉素 C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀和佐柔比星; 叶酸类似物如二甲叶酸、蝶罗呤和曲美沙特; 嘌呤类似物如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨和氟尿苷; 雄激素类如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷和睾内酯; 抗肾上腺药如氨鲁米特、米托坦和曲洛司坦; 叶酸补充剂如亚叶酸 (甲酰四氢叶酸); 醋葡醛内酯; 抗叶酸酯抗肿瘤药如**ALIMTA®**、LY231514 培美曲塞、二氢叶酸还原酶抑制剂如氨甲蝶呤、抗代谢物如 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 及其原药如 UFT、S-I 和卡培他滨和胸苷酸合酶抑制剂和甘氨酸核糖核苷酸转甲酰基酶抑制剂如雷替曲塞 (拓优得™, TDX); 二氢嘧啶脱氢酶抑制剂如恩尿嘧啶; 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 安吡啶; bestrabucil; 比生群; 依达曲沙; 地磷酰胺; 秋水仙胺; 地吡醌; 依氟鸟氨酸; 依利醋铵; 埃坡霉素; 依托格鲁; 硝酸镓; 羟脲; 香菇多糖; 氯尼达明; 美坦生类化合物如美坦生和安斯菌素; 米托胍胺; 米托蒽醌; 莫哌达醇; 尼曲吡啶 (nitraerine); 喷司他丁; 蛋氨酸 (phenamet); 吡柔比星; 洛索蒽醌; 2-乙基肼; 丙卡巴肼; **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 丙亚胺; 利索新; 西佐喃; 锗螺胺; 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯族化合物 (尤其 T-2 毒素、疣孢菌素 A (verracurin A)、杆孢菌素 A 和蛇形菌素); 乌拉坦; 长春地辛 (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**); 达卡巴嗪; 甘露莫司汀; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; gacytosine; 阿糖胞苷 (“Ara-C”); 环磷酰胺; 塞替派; 紫杉烷类化合物和紫杉烷类、例如, **TAXOL®** 紫杉醇 (Bristol-Myers

Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、ABRAXANE™ 紫杉醇的无 Cremophor、白蛋白工程化纳米粒子制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和泰索帝® 紫杉醇 (doxorubicin) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, 法国); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨 (**GEMZAR®**); 6- 硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 铂; 铂类似物或基于铂的类似物如顺铂、奥沙利铂和卡铂; 长春碱 (**VELBAN®**); 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱 (**ONCOVIN®**); 长春花生物碱; 长春瑞滨 (**NAVELBINE®**); 诺安托; 依达曲沙; 道诺霉素; 氨基蝶呤; 希罗达; 伊班膦酸盐; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 维甲类如维甲酸; 以上任意药物的可药用盐、酸或衍生物; 以及以上药物中两者或多者的组合如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和 FOLFOX (与 5-FU 和甲酰四氢叶酸组合的奥沙利铂 (ELOXATIN™) 治疗方案的缩写)。

[0335] 该定义中还包括起到调节或抑制针对肿瘤的激素作用的抗激素药, 如抗雌激素药和选择性雌激素受体调节物 (SERMs), 其包括例如他莫昔芬 (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4- 羟他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮和 **FARESTON®** 托瑞米芬; 抑制芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素产生, 例如 4(5)-咪唑类、氨鲁米特、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮、**AROMASIN®** 依西美坦、福美坦、法偈唑、**RIVISOR®** 伏氯唑、**FEMARA®** 来曲唑和 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑; 和抗雄激素药如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙立德和戈舍瑞林; 以及曲他沙滨 (1, 3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 尤其那些抑制了参与异常细胞增殖的信号传导途径中的基因 (例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R)) 表达的反义寡核苷酸; 疫苗, 如基因治疗疫苗, 例如, **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗; **PROLEUKIN®** rIL-2; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 1 抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; 和任一上述药物的可药用盐、酸或衍生物。

[0336] 另外, hu2H7 抗体和其功能性片段可以与抗肿瘤血管生成剂如血管内皮生长因子 (VEGF) 拮抗剂组合地用来治疗表达 CD20 的 B 细胞肿瘤 (例如, NHL)。“抗血管生成剂”或“血管生成抑制剂”指直接或间接地抑制血管生成、血管新生或不良血管通透性的小分子量物质、多核苷酸、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白、抗体或其缀合物或融合蛋白。例如, 抗血管生成剂是针对如上所定义生血管药的抗体或其他拮抗剂, 例如, 针对 VEGF 的抗体、针对 VEGF 受体的抗体、阻断 VEGF 受体信号传导的小分子 (例如, PTK787/ZK2284, SU6668)。“VEGF 拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、消除、减少或干扰 VEGF 活性 (包括其与一个或多个 VEGF 受体的结合) 的分子。在一个实施方案中, 患有这种 B 细胞肿瘤的患者用与 **Avastin®** (贝伐单抗; Genentech) 联合的 2H7. v511 或 2H7. v114 治疗。抗 VEGF 抗体“贝伐单抗 (BV)”, 也称作“rhuMAb VEGF”或“**Avastin®**”, 是根据 Presta 等人 Cancer Res. 57:4593-4599 (1997) 产生的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体。

[0337] hu2H7 抗体和其功能性片段与细胞因子 TNF 家族的成员如 Apo-2 配体 (Apo2L) (也称作 TRAIL) 联合地用于治疗表达 CD20 的 B 细胞肿瘤的方法中。全长天然序列人 Apo-2 配体的是一种长 281 个氨基酸的细胞因子肿瘤坏死因子家族 II 型跨膜蛋白。已经发现可溶性形式的 Apo-2 配体 (如包含胞外结构域 (ECD) 或其部分的那些 Apo-2 配体) 具有多种活

性,包括在哺乳动物癌细胞中凋亡活性。Apo2L/TRAIL(在 WO 97/01633 和 WO97/25428 中描述)是可溶性人蛋白质,该蛋白质是 ECD 的片段,包含全长 Apo-2L 蛋白的第 114-281 位氨基酸。

[0338] 在治疗上文描述的自身免疫病或自身免疫相关病状中,患者可以用一种或多种与第二治疗药如免疫抑制剂(如在多重药物方案中)联合的 hu2H7 抗体治疗。所述 2H7 抗体可以与该免疫抑制剂同时、依次或交替施用或当采用其他疗法无应答性时施用。该免疫抑制剂可以按照与本领域中所述相同或较之更少的剂量施用。优选的辅佐免疫抑制剂将取决于多种因子,包括正在治疗的疾病的类型以及患者病史。

[0339] 如本文中所述的辅佐疗法的“免疫抑制剂”指起到抑制或掩蔽患者免疫系统的作用的物质。此类药剂包括抑制细胞因子产生、下调或抑制自身抗原表达或掩蔽 MHC 抗原的物质。此类药剂的实例包括类固醇类如糖皮质激素类,例如泼尼松、甲泼尼龙和地塞米松;2-氨基-6-芳基-5 取代的嘧啶(见美国专利号 4,665,077)、硫唑嘌呤(或环磷酰胺,如果存在针对硫唑嘌呤的副反应);溴隐亭(bromocryptine);戊二醛(其掩蔽 MHC 抗原,如美国专利号 4,120,649 中描述);针对 MHC 抗原和 MHC 片段的抗独特型抗体;环孢菌素 A;细胞因子或细胞因子受体拮抗剂,包括抗干扰素抗体;抗肿瘤坏死因子抗体;抗肿瘤坏死因子抗体;抗白细胞介素-2 抗体和抗 IL-2 受体抗体;抗 L3T4 抗体;异源抗淋巴细胞球蛋白;泛 T 抗体,优选抗 CD3 或抗 CD4/CD4a 抗体;含有 LFA-3 结合结构域的可溶性肽(1990 年 7 月 26 日公布的 WO 90/08187);链激酶;TGF- β ;链道酶;来自宿主的 RNA 或 DNA;FK506;RS-61443;脱氧精胍菌素;雷帕霉素;T 细胞受体(美国专利号 5,114,721);T 细胞受体片段(Offner 等人,Science 251:430-432(1991);WO 90/11294;和 WO 91/01133);和 T 细胞受体抗体(EP 340,109)如 T10B9。

[0340] 为治疗类风湿性关节炎,患者可以用与任一种或多种以下药物联合的本发明 CD20 结合抗体治疗:DMARDs(缓解疾病的抗风湿药物(例如,氨甲蝶呤)、NSAI 或 NSAID(非甾体抗炎药物)、免疫抑制剂(例如,硫唑嘌呤;麦考酚酸酯(**CellCept®**;Roche))、镇痛药、糖皮质激素类、环磷酰胺、HUMIRA™(阿达木单抗;Abbott Laboratories)、**ARAVA®**(来福米特)、**REMICADE®**(英利昔单抗;Centocor Inc.,Malvern,Pa)、**ENBREL®**(依那西普;Immunex,WA)、**ACTEMRA®**(托珠单抗;Roche,Switzerland)、COX-2 抑制剂。通常在 RA 中使用的 DMARD 是羟氯喹、柳氮磺吡啶、氨甲蝶呤、来福米特、依那西普、英利昔单抗、硫唑嘌呤、D-青霉胺、Gold(口服)、Gold(肌肉)、米诺环素、环孢菌素、葡萄球菌蛋白 A 免疫吸附。

[0341] 阿达木单抗是与 TNF 结合的人单克隆抗体。英利昔单抗是与 TNF 结合的嵌合小鼠-人单克隆抗体。它是开出来治疗 RA 和节段性回肠炎的免疫抑制药物。英利昔单抗已经与致命反应如心衰和感染(包括结核病)以及导致 MS 的脱髓鞘作用关联。Actemra(托珠单抗)是人源化抗人白细胞介素-6(IL-6)受体。

[0342] 依那西普是由与人 IgG1Fc 部分连接的人 75kD(p75)肿瘤坏死因子受体(TNFR)胞外配体结合部分组成的“免疫黏附素”融合蛋白。依那西普(**ENBREL®**)是在美国批准用于治疗活动性 RA 的可注射药物。依那西普与 TNF α 结合并且起到从关节和血液移走大部分 TNF α 的作用,因而防止 TNF α 促进类风湿性关节炎的炎症和其他症状。该药物已经与不利的副作用(包括严重感染和脓毒症、神经系统病症如多发性硬化(MS))相关。见,例

如, www.remicade-infliximab.com/pages/enbreL_embrel.html。

[0343] 对于 RA 的常规治疗, 见, 例如, “类风湿性关节炎防治指南 (Guidelines for the management of rheumatoid arthritis)” *Arthritis & Rheumatism* 46(2):328-346 (2002 年 2 月)。在一个具体的实施方案中, RA 患者用与氨甲蝶呤 (MTX) 联合的本发明 hu2H7CD20 抗体治疗。MTX 的示例性剂量是约 7.5-25mg/kg/周。MTX 可以口服或皮下施用。

[0344] 在一个实例中, 患者也接受同时的 MTX (10-25mg/每周口服 (p. o.) 或肠胃外), 连同皮质类固醇方案, 所述的皮质类固醇方案由甲泼尼龙 100mg 静脉内 30 分钟, 之后输注 CD20 抗体, 并且在第 2-7 日口服泼尼松 60mg, 在第 8-14 日口服 30mg, 在第 16 日恢复至基线剂量组成。患者也可以接受作为单个剂量或作为每日划分剂量给予的叶酸酯 (5mg/周)。患者任选地继续在整个治疗期间接受任何背景皮质类固醇 (10mg/日泼尼松或等同物)。

[0345] 为治疗强直性脊柱炎、银屑病关节炎和节段性回肠炎, 患者可以用与例如 **Remicade®** (英利昔单抗; 来自马尔文 Centocor Inc., Pa.)、ENBREL (依那西普; Immunex, WA) 联合的本发明 CD20 结合抗体治疗。

[0346] 针对 SLE 的疗法包括 CD20 抗体与高剂量皮质类固醇和 / 或环磷酰胺 (HDCC) 的组合。患有 SLE、AAV 和 NMO 的患者可以用与任一以下药物组合的本发明 2H7 抗体治疗: 皮质类固醇类、NSAID、镇痛药、COX-2 抑制剂、糖皮质激素、常规 DMARDs (例如氨甲蝶呤、柳氮磺吡啶、羟氯喹、来福米特)、生物 DMARD 如抗 B1ys (例如, 贝利木单抗)、抗 IL6R 例如, 托珠单抗; CTLA4-Ig (阿巴西普)、(抗 CD22, 例如, 依帕珠单抗)、免疫抑制剂 (例如, 硫唑嘌呤; 麦考酚酸酯 (**CellCept®**; Roche)) 和细胞毒性剂 (例如, 环磷酰胺)。

[0347] 为治疗银屑病, 可以对患者施用与局部疗法如局部用类固醇类、蒽林、卡泊三烯、氯倍他索和他扎罗汀或与氨甲蝶呤、维甲类、环孢菌素、PUVA 和 UVB 疗法联合的人源化 2H7 抗体。在一个实施方案中, 银屑病患者用人源化 2H7 抗体连同环孢菌素依次或同时治疗。

[0348] 为使毒性最小化, 常规的全身性疗法可以按轮换、依次、组合或间歇治疗方案或较低剂量联合方案伴以本发明剂量的 hu2H7CD20 结合抗体组合物施用。

[0349] 制造品和试剂盒

[0350] 本发明的另一个实施方案是制造品, 其包含用于治疗自身免疫病和相关病状和 CD20 阳性癌症如非霍奇金淋巴瘤的本发明制剂。该制造品包括容器和标签或在该容器上或与之结合的包装插页。合适的容器例如包括瓶、小药瓶、注射器等。容器可以从多种材料如玻璃或塑料形成。所述制剂或组合物中至少一种活性物质是本发明的 hu2H7 抗体, 此抗体以给药情况下递送上文所述剂量的量存在于容器如注射器中。hu2H7 的浓度会在 10mg/ml 至 200mg/ml 的范围内, 可以是 30-150mg/ml 或 100-150mg/ml。标签或包装插页说明该组合物用于治疗特定的病状。该标签或包装插页会进一步包含用于施用该抗体组合物至患者的说明书。

[0351] 包装插页指治疗产品的商业包装中惯常包括的说明书, 其含有关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症和 / 或涉及使用此类治疗产品之警告的信息。在一个实施方案中, 该包装插页说明该组合物用于治疗非霍奇金淋巴瘤。

[0352] 另外, 该制造品可以还包含第二容器, 其包含可药用缓冲液, 如注射用水 (WFI)、注射用抑菌水 (BWF1)、磷酸盐缓冲盐水、林格液、氯化钠 (0.9%) 和葡萄糖溶液。它可以还包括从商业和用户观点看受欢迎的其他材料, 包括其他缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0353] 实验实施例

[0354] 实施例 1

[0355] rhuMab 2H7 的原始皮下制剂

[0356] 开发了 rhuMab 2H7 的高浓度皮下制剂 (150mg/mL)。这种制剂包含 150mg/ml 2H7, 30mM 乙酸钠 ;7%二水合海藻糖 ;0.03%聚山梨酯 20, pH 5.3。该制剂在最终小瓶贮藏中在推荐的条件下长期稳定。这种材料在食蟹猴 (cynomolugus monkey) 中通过皮下注射的施用导致注射部位处的严重炎症和低的生物利用率 (约 30%)。在这些动物中观察到皮下层中轻度至中度的巨噬细胞浸润。刺激作用的原因归咎于异物材料 (即, 2H7 试验材料)。在模仿该产物在注射部位所暴露的条件下对该制剂的检验证实该蛋白质在生理条件下明显聚集 (图 1), 从而证实在食蟹猴中观察到的炎症结果。观察到的沉淀可以与继发于 pH 改变的盐析效应一致。

[0357] 实施例 2

[0358] 用于在皮下注射的生理条件下测试大分子聚集的体外透析方法

[0359] 研发了一种体外透析方法来测试不同赋形剂在皮下注射期间所遇到的生理条件下减少 2H7 聚集的能力。为该模型开发了改良 PBS 溶液以模仿间质液。这种体外系统用来评价糖、聚合物、表面活性剂和氨基酸在迟滞 2H7 聚集中的作用。显示产物体外释放改善的候选制剂随后在体内 (大鼠皮下模型 ;见实施例 3) 测试以确定这种改善是否对应于减少的体内炎症。

[0360] 该体外透析模型的布局在图 2 中显示。250ml 玻璃罐在 37°C 充以 220ml 改良的 PBS 溶液 (167mM 钠, 140mM 氯化物, 17mM 磷酸盐, 4mM 钾)。长度 6cm 的透析管 (Spectra Por 1 百万分子量截止值 (MWCO) PVDF 透析管, 直径 12mm) 在纯化水中浸透。夹住该透析管的一个末端, 并且该管充以大约 1ml 的试样 (具试验赋形剂的 2H7)。移出多余空气, 并且将该管的另一端夹至该罐的密封盖上。将充满的透析袋添加至含有改良 PBS 溶液的 250mL 玻璃罐, 并且将该罐置于 37°C 伴以恒定搅拌。在 2.5、6、12、24、33 和 48 小时后取出改良 PBS 释放介质的 500 μ l 样品。样品的浊度和释放介质中存在的蛋白质的量由 UV 光谱扫描测量。此外, 对释放介质和透析管内部的溶液目视检验沉淀。

[0361] 认为某试验赋形剂在体外聚集研究中是可接受, 如果 :

[0362] • 具试验赋形剂的 2H7 的累积释放大于阴性对照 (原始 2H7 制剂 -150mg/ml 2H7, 30mM 乙酸钠 ;7%二水合海藻糖 ;0.03%聚山梨酯 20, pH 5.3), 从而显示改善的 2H7 特征。

[0363] • 阳性对照 (Raptiva™ ;rhuMab 抗 CD11a, 一种皮下施用的抗体) 显示无沉淀和比阴性对照更大的释放。

[0364] • 2H7 的沉淀减少或消除。

[0365] • 释放介质的浊度降低。

[0366] 随后在体内大鼠模型中测试满足接受标准的候选物以确定体外迟滞聚集是否与减少的体内炎症相关。

[0367] 体外结果 :

[0368] 图 3 中显示研究对照在所述体外透析方法中的典型释放曲线。选择这个模型的对照以同等考虑不轻易聚集的蛋白质 (rhuMab CD11a) 的释放和在生理条件下通常聚集的蛋白质的 (原始 2H7) 的释放。这两条释放曲线之间的面积度量了试验赋形剂相对于对照而

迟滞聚集的相对能力。

[0369] 原始 2H7 制剂的累积释放是缓慢的 (< 30%)。当 2H7 从透析袋释放入改良 PBS 溶液时,观察到释放介质的浊度增加,表明该物质在这种环境中聚集。透析袋内侧的广泛絮凝作用在 24 小时范围内观察到并且与 2H7 浓度从研究启动时的 150mg/mL 明显降低至 48 小时研究结束时的 4 至 5mg/mL 相对应。全部的这些观察表示 2H7 在生理条件下轻易聚集。当 2H7 原始制剂在 37°C 在玻璃小药瓶贮存时,没有见到这种行为模式。

[0370] 相反,rhuMAb CD11a 迅速地从透析袋释放到改良 PBS 溶液中。释放介质在整个研究保持清亮并且在透析袋内部没有观察到絮凝作用,这表明 rhuMAb CD11a 在生理条件下没有聚集并且作为这个模型的对照是适宜的。表 3 汇总了释放蛋白质的百分数、释放介质浊度和絮凝作用的存在。

[0371] 表 3

[0372]

对照	时间 (小时)	累积释放的 蛋白质%	释放介质的 浊度 <i>OD 350 nm</i>	透析袋 内的絮凝
rhuMAb CD11a	0	0	0.001	无
	48	83	0.03	无
原始 2H7	0	0	0.02	无
	48	28	0.37	有

[0373] 实施例 3 用于测试大分子聚集的体内大鼠皮下模型

[0374] 大鼠皮下模型是基于皮下炎症特征上相似性的适宜模型。接受原始 2H7 制剂的大鼠的炎症反应与食蟹猴中观察到的炎症反应(见实施例 1)一致。在用 2H7 注射的大鼠皮肤切片中针对人免疫球蛋白的免疫组织化学染色是阳性的,表明抗体在炎症区域内存在或持续,这支持了检品(test article)沉淀引起注射部位处炎症的理论。

[0375] 体内大鼠筛选测定法如下实施:

[0376] 皮下施用每种试验制剂或对照制剂(0.25ml)。动物在给药后 72 小时尸检。注射部位处的皮肤部分被横切并在福尔马林中固定,并且通过组织学确定试验赋形剂对减少炎症的影响。炎症评分如下赋予组织学切片:

[0377] +/- :最少 / 轻微炎症

[0378] 1 :轻度炎症

[0379] 2 :中度

[0380] 3 :重度

[0381] 肉芽肿的存在由病理学确定。来自注射部位的组织被切片、染色并且在光学显微镜下检查肉芽肿的存在或不存在。

[0382] 体内大鼠模型的接受标准是:(1)与 rhuMAb CD11a(阴性对照)可比较的炎症,和(2)肉芽肿在注射部位处不存在。

[0383] 实施例 4 表面活性剂减少 2H7 聚集的能力

[0384] 表面活性剂通常用来迟滞大分子的聚集。表面活性剂减少 2H7 聚集和絮凝的能力使用实施例 2 中所述的体外模型予以评价。受测试的表面活性剂涵盖一系列亲水-亲脂平

衡值 (HLB)。聚山梨酯 20、泊洛沙姆和司盘 20 (Span 20) 和司盘 80 (Span 80) 表面活性剂的添加没有相对于原始 2H7 制剂明显改善 2H7 释放。用聚山梨酯 80 观察到最轻微的体外 2H7 释放改善,但是用任意的其他受检表面活性剂没有观察到明显的 2H7 释放改善 (见表 4)。然而,在全部情况下观察到透析袋内部的絮凝作用 (表 4)。因而,虽然表面活性剂常规上用来减少蛋白质聚集,但是它们在该体外模型中在迟滞 2H7 聚集方面不是有效的。

[0385] 表 4

[0386]

表面活性剂+ 2H7	%释放的蛋白质(T=48 小时)	HLB	透析袋内的絮凝
原始的2H7(对照)	31	N/A	有
10% 泊洛沙姆	15	>28	有
0.2% 聚山梨酯 80	59	15	有
0.05% 司盘20	24	8.6	有
0.02% 司盘20	24	8.6	有
0.05% 司盘80	33	4.3	有
0.02% 司盘80	33	4.3	有
rhuMAb CD11a (对照)	100	N/A	无

[0387] 实施例 5PVP 对 2H7 聚集的影响

[0388] 测试了 PVP 对所述体外模型中 2H7 聚集的影响。所用的材料是：

[0389] • BASF Kollidon 30 (重均分子量 44K-54K 道尔顿)

[0390] • BASF Kollidon 17PF (重均分子量 7K-11K 道尔顿)

[0391] • BASF Kollidon 12PF (重均分子量 2K-3K 道尔顿)

[0392] • BASF Kollidon 90F (重均分子量 1M-1.5M 道尔顿)

[0393] • 光谱聚乙烯吡咯烷酮 K-15 (与 BASF Kollidon 17PF 可比)。

[0394] 低分子量 PVP (重均 MW 9K 道尔顿) 的添加明显改善 2H7 在体外模型中的释放 (图 4)。透析袋中的大部分 2H7 被释放并且其量与 rhuMAb CD11a 对照可比。透析袋中没有观察到絮凝作用并且释放介质在整个研究保持清亮。全部这些结果表明低分子量 PVP 抑制 2H7 在生理条件下的聚集。所用 PVP 的分子量是重要的。高分子量 PVP (重均 MW 1.2 百万道尔顿) 的添加导致 2H7 释放到改良 PBS 溶液中减少和可观的透析袋内部絮凝作用 (图 4)。

[0395] 基于这些有前景的结果,在所述体外透析模型中评价了浓度范围 1% 至 20% 的低分子量 PVP (重均 MW 9K 道尔顿)。添加 5% 至 20% 低分子量 PVP (重均 MW 9K 道尔顿) 有效抑制 2H7 聚集。具 5% 至 20% PVP 所释放的 2H7 的百分数是与 rhuMAb CD11a 对照的百分数可比较的 (图 5)。释放介质在整个研究保持清亮并且蛋白质的絮凝也消除。低于 3% 的低分子量 PVP 浓度产生相似的 2H7 释放速率,但是改良的 PBS 释放溶液变得逐步浑浊,表明这些 PVP 浓度太低以至于不能抑制 2H7 聚集。表 5 中显示了蛋白质释放百分数、释放介质浊度和絮凝作用存在的总结。

[0396] 表 5

[0397]

对照	时间 (小时)	累积释放的 蛋白质%	释放介质的 浊度 <i>OD 350 nm</i>	透析袋内 的絮凝
rhuMAb CD11a	0	0	0.001	无
	48	83	0.03	无
原始2H7	0	0	0.02	无
	48	28	0.37	有
2H7 + 5% 低 MW PVP	0	0	0.007	无
	48	76	0.14	无
2H7 + 10% 低MW PVP	0	0	0.009	无
	48	73	0.14	无
2H7 + 20% 低MW PVP	0	0	0.01	无
	48	75	0.15	无
2H7 + 10% 高MW PVP	0	0	0.005	无
	48	20	0.07	有

[0398] 在所述体外系统中也评价了PVP的其它分子量范围(图6)。添加分子量2K直至54K的10%PVP有效减少2H7聚集,这一点通过释放入该介质中的2H7的百分数与对照相比增加而证实。大分子量PVP(1至1.5百万道尔顿)导致增加的2H7聚集,类似于原始2H7制剂对照。

[0399] 实施例6PVP对体内大鼠皮下模型中炎症的影响

[0400] 随后在体内大鼠皮下模型中测试了在体外研究中显示明显改善的含有低分子量PVP(平均MW 9K道尔顿)的抗体制剂。这项工作的目的是确定在体外生理条件下消除2H7聚集是否能转换成注射部位处炎症的减少。该动物模型的成功标准是:(1)相对于rhuMAb CD11a研究对照而言试验制剂中可比较的低炎症,和(2)注射部位处无肉芽肿。

[0401] 表6中提供了每种试验制剂的组织病理学结果汇总。阴性对照rhuMAb CD11a和不合蛋白质的20%PVP赋形剂诱导最少的皮下炎症。原始150mg/mL 2H7制剂的注射用作阳性对照并且在注射部位产生中度至重度(2-3+)炎症。添加大于5%PVP(平均MW 9K道尔顿)至2H7减少了炎症。最适浓度的10%PVP伴随100mg/mL 2H7减少注射部位处的炎症至阴性对照水平(+/-),这是一个成功标准。炎症的增加与增加的2H7蛋白质浓度相关。添加20%PVP至更高浓度的2H7(150mg/mL)明显减少炎症至轻度(1+)。在任一测试动物中均没有观察到肉芽肿。

[0402] 表6

制剂	动物	组织学评分	评论
150 mg/mL rhuMAb CD11a	1	+/-	滤泡炎 (follicular folitis)
	2	+/-	
	3	+/-	
100 mg/mL 2H7 + 5% PVP	1	2-3+	局灶性广泛炎症, 伴有坏死
	2	2-3+	
	3	2-3+	
100 mg/mL 2H7 + 10% PVP	1	+/-	无评论
	2	+/-	
	3	+/-	
100 mg/mL 2H7 + 20% PVP	1	1+	局灶性广泛炎症
	2	1+	
	3	1+	
150 mg/mL 2H7 + 10% PVP	1	1+	局灶性广泛炎症 (2/3大鼠)
	2	1+	
	3	+/-	
150 mg/mL 2H7 + 20% PVP	1	1+	局灶性广泛炎症
	2	1+	
	3	1+	
150 mg/mL 2H7 原始 制剂	1	2-3+	局灶性广泛炎症, 伴有坏死
	2	2-3+	
	3	2-3+	
20% PVP 赋形剂	1	+/-	无评论
	2	+/-	
	3	+/-	

[0404] 炎症等级评分 : +/- = 最少 / 轻微 ; 1+ = 轻度 ; 2+ = 中度 ; 3+ = 重度

[0405] 结论 :

[0406] 总而言之, 5%至 20% 聚乙烯吡咯烷酮 (重均分子量从 2K 至 54K 道尔顿) 的添加在生理条件下明显减少 2H7 聚集和消除 2H7 絮凝方面是有效的。基于 PVP 的历史用途, 用 PVP 和 2H7 取得的结果是出乎意料的, 并且因此说明本方法的新颖性和创造性。常规上用来减少蛋白质聚集的表面活性剂也在我们的体外模型中进行评价, 但是在迟滞 2H7 聚集方面无一有效。

[0407] 在这种环境下减少 2H7 聚集最终导致明显减少用 2H7 注射的动物的注射部位处的炎症。对于含 10% 低分子量 PVP 的 2H7 制剂, 炎症从重度 (原始 2H7) 减少至最少至轻微。减少蛋白质在这些情形下聚集的能力能转换成增加的生物利用率。最后, 我们已经成功地开发和展示了应用所述体外透析模型测量赋形剂减少蛋白质聚集的能力。

[0408] 参考文献

[0409] 本申请中引用的参考文献, 包括专利、公布的申请和其他出版物, 在此处通过引用的方式并入作为参考。

[0410] 本发明的实施将使用处于本领域技术人员能力范围内的分子生物学等常规技术, 除非另外说明。例如见 Molecular Cloning : A Laboratory Manual (J. Sambrook 等人, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Sprmg Harbor, N. Y., 1989) ; Current Protocols in Molecular Biology (F. Ausubel 等人编著, 1987 更新) ; Essential Molecular Biology (T.

Brown 编 著, IRL Press 1991) ;Gene Expression Technology (Goeddel 编 著, Academic Press 1991) ;Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (A. Bothwell 等人编著, Bartlett Publ. 1990) ;Gene Transfer and Expression (M. Kriegler, Stockton Press 1990) ;Recombinant DNA Methodology II (R. Wu 等人编著, Academic Press 1995) ;PCR :A Practical Approach (M. McPherson 等 人, IRL Press at Oxford University Press 1991) ;Oligonucleotide Synthesis (M. Gait 编 著, 1984) ;Cell Culture for Biochemists (R. Adams 编 著, Elsevier Science Publishers 1990) ;Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. Miller 和 M. Calos 编 著, 1987) ;Mammalian Cell Biotechnology (M. Butler 编著, 1991) ;Animal Cell Culture (J. Pollard 等人编著, Humana Press 1990) ;Culture of Animal Cells, 2nd Ed. (R. Freshney 等人编著, Alan R. Liss 1987) ;Flow Cytometry and Sorting (M. Melamed 等人编著, Wiley-Liss 1990) ;系列丛书 Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) ;Wirth M. 和 Hauser H. (1993) ;Immunochemistry in Practice, 第 3 版, A. Johnstone 和 R. Thorpe, Blackwell Science, Cambridge, MA, 1996 ;Techniques in Immunocytochemistry (G. Bullock 和 P. Petrusz 编著, Academic Press 1982, 1983, 1985, 1989) ;Handbook of Experimental Immunology (D. Weir 和 C. Blackwell, 编著) ;Current Protocols in Immunology (J. Coligan 等人编著 1991) ;Immunoassay (E. P. Diamandis 和 T. K. Christopoulos 编著, Academic Press, Inc., 1996) ;Goding (1986) Monoclonal Antibodies :Principles and Practice (第 2 版) Academic Press, New York ;Harlow 和 David Lane 编著, Antibodies A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988 ;Antibody Engineering, 第 2 版 (C. Borrebaeck 编著, Oxford University Press, 1995) ;和系列丛书 Annual Review of Immunology ;系列丛书 Advances in Immunology。

[0001]

序列表

<110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

<120> 用于减少大分子在生理条件下聚集的方法和制剂

<130> P2390R1 WO

<141> 2009-11-16

<150> US 61/115, 439

<151> 2008-11-17

<160> 15

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 1

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

[0002]

Lys Arg

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20						25				30

Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35						40				45

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr
				50						55				60

Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser
				65						70				75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80						85				90

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser
				95						100				105

Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				110						115				120

Ser Ser

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 3

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

Lys Arg

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 4

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30

[0004]

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120

Ser Ser

<210> 5
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

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

[0005]

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Tyr	Arg
				95					100					105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				110					115					120

Ser Ser

<210> 6

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 6

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

[0006]

110	115	120
Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu		
125	130	135
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
140	145	150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln		
155	160	165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu		
170	175	180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val		
185	190	195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg		
200	205	210

Gly Glu Cys

<210> 7

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr			
20	25	30	
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
35	40	45	
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr			
50	55	60	

[0007]

Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	65	70	75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	95	100	105
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	110	115	120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	125	130	135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	140	145	150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	155	160	165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	170	175	180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	185	190	195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	200	205	210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	215	220	225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	230	235	240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	245	250	255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	260	265	270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285

[0008]

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	320	325	330
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	440	445	450

Gly Lys

<210> 8
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 序列是合成的

[0009]

<400> 8
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210

[0010]

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	320	325	330
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys	335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	425	430	435

[0011]

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 9

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90

Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 110 115 120

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 125 130 135

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp

[0012]

	140	145	150
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln			
	155	160	165
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu			
	170	175	180
Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val			
	185	190	195
Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg			
	200	205	210

Gly Glu Cys

<210> 10

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 10

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

[0013]

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser	95	100	105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	110	115	120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro	125	130	135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	140	145	150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	155	160	165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	170	175	180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	185	190	195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	200	205	210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315

[0014]

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 11

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

[0015]

	20	25	30
Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
	35	40	45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr			
	50	55	60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser			
	65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser			
	95	100	105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val			
	110	115	120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro			
	125	130	135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
	140	145	150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
	155	160	165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	170	175	180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
	185	190	195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	200	205	210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys			
	215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
	230	235	240

[0016]

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn	320	325	330
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys	335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	440	445	450

Gly Lys

[0017]

<210> 12

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

[0018]

	170	175	180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	185	190	195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	200	205	210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys	335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	380	385	390

[0019]

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
440 445 450

Gly Lys

<210> 13

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Ala Ser
95 100 105

[0020]

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	110	115	120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro	125	130	135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	140	145	150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	155	160	165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	170	175	180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	185	190	195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	200	205	210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			

[0021]

	320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
	335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg			
	350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys			
	365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			
	380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser			
	395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
	410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	425	430	435
Ala Leu His Trp His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	440	445	450

Gly Lys

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr			
20	25	30	

[0022]

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	35	40	45
Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Ala Thr Ser Tyr	50	55	60
Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser	65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg	95	100	105
Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	110	115	120
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro	125	130	135
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu	140	145	150
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	155	160	165
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	170	175	180
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	185	190	195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	200	205	210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255

[0023]

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys	335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	440	445	450

Gly Lys

<210> 15

[0024]

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
95 100 105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

[0025]

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser	185	190	195
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	200	205	210
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys	215	220	225
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu	230	235	240
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp	260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His	305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	320	325	330
Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys	335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys	365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly	380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	395	400	405

[0026]

Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				410					415					420
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				425					430					435
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
				440					445					450
Gly	Lys													

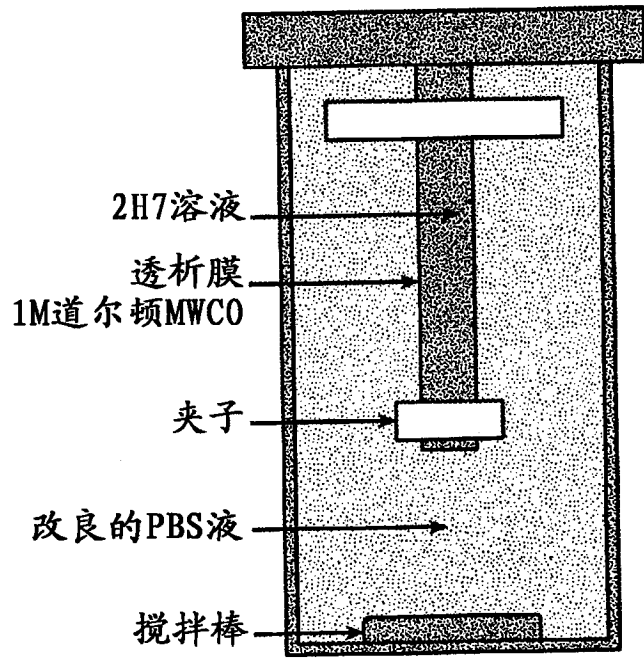
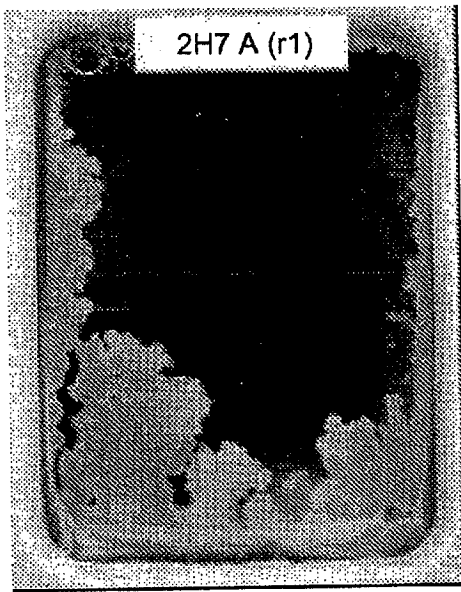


图 1

图 2

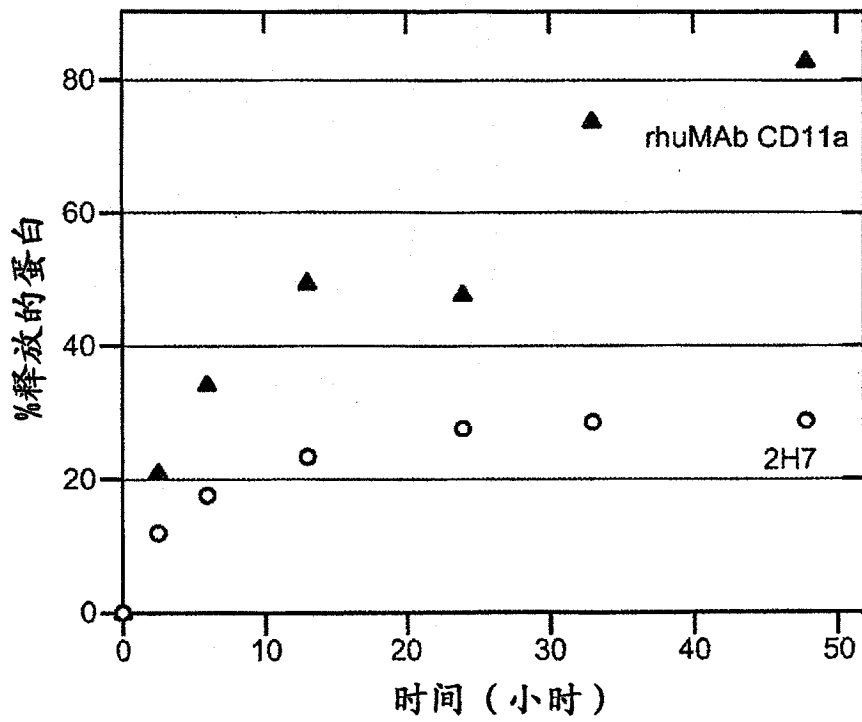


图 3

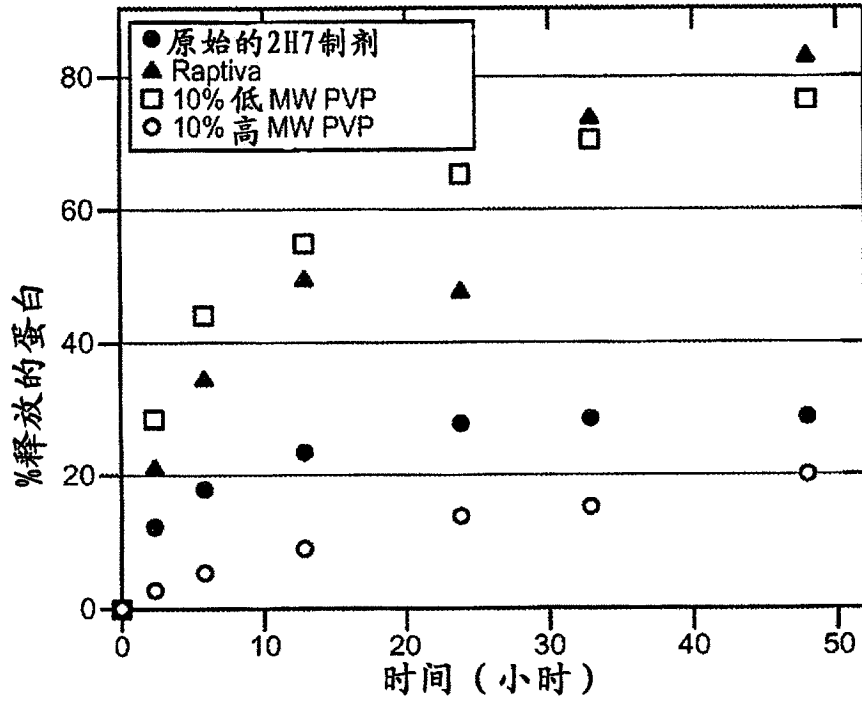


图 4

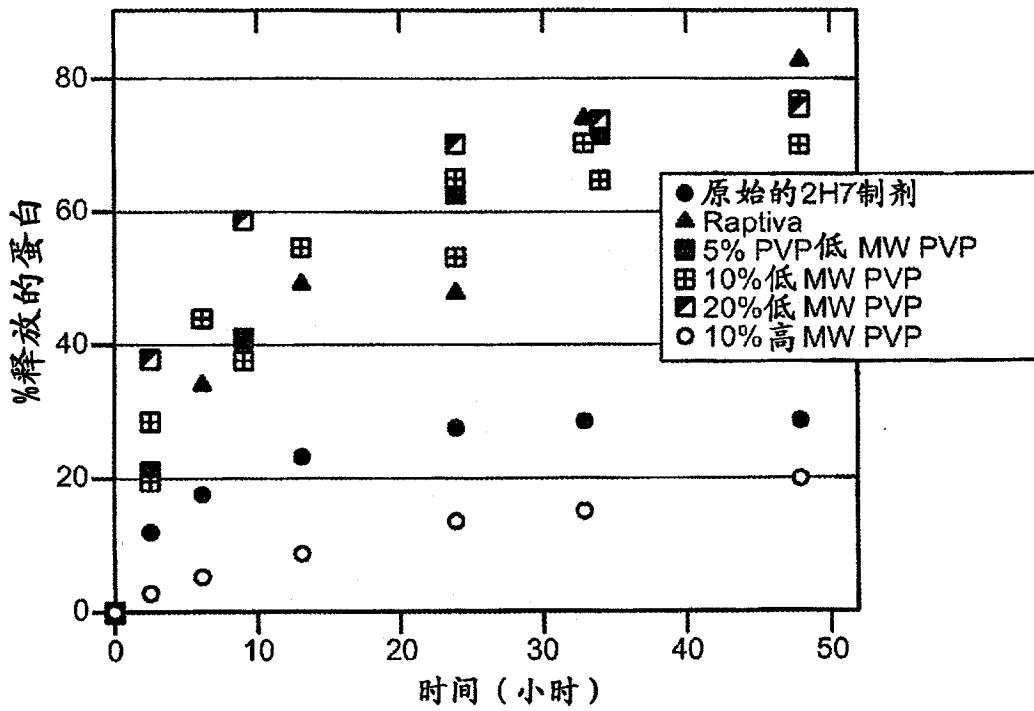


图 5

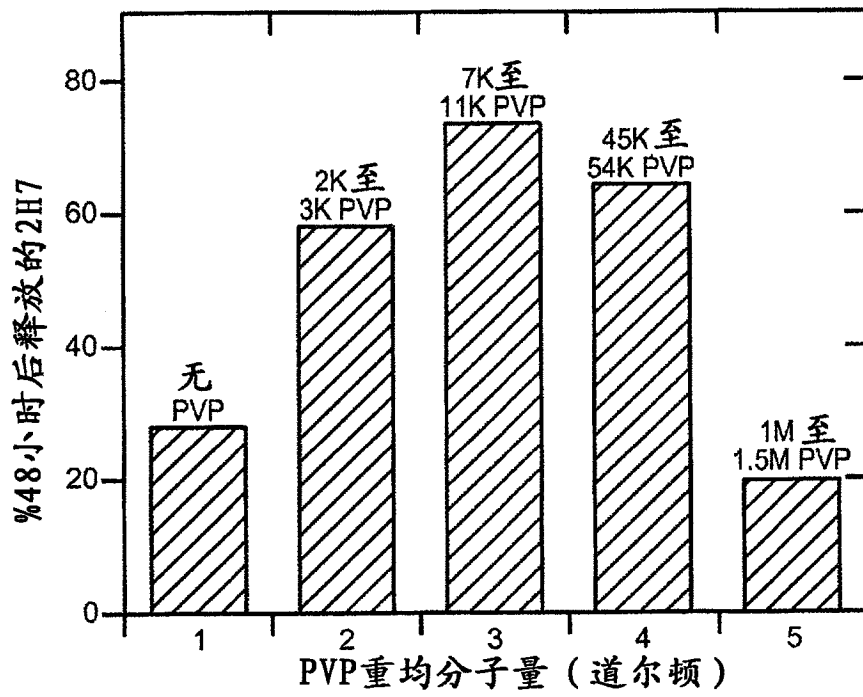


图 6