



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03809437.1

[43] 公开日 2005 年 8 月 3 日

[11] 公开号 CN 1649624A

[22] 申请日 2003.4.24 [21] 申请号 03809437.1

[30] 优先权

[32] 2002.4.26 [33] US [31] 10/133,715

[86] 国际申请 PCT/US2003/012976 2003.4.24

[87] 国际公布 WO2004/004633 英 2004.1.15

[85] 进入国家阶段日期 2004.10.26

[71] 申请人 艾博特生物技术有限公司

地址 百慕大哈米尔顿

[72] 发明人 斯蒂芬·费施科夫

埃利奥特·查塔斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 42 页 序列表 13 页

[54] 发明名称 TNF $\alpha$  抗体及另外一种药物的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种方法，这种方法是通过每两周一次的，皮下施用人抗体以及另外一种用于治疗疾病的药物来治疗因 TNF 有害活性而导致的疾病，其中所述人抗体优选重组人抗体，这些抗体能特异地结合人肿瘤坏死因子  $\alpha$  (hTNF $\alpha$ )，而另外一种药物是用来治疗这种疾病的。本发明抗体可以是全长抗体，也可以是其抗原结合片段。含有药用组合物和给药说明书的试剂盒也包括在本发明中。

1. 一种治疗人受试者疾病的方法，所述疾病可以用 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合片段治疗，所述方法包括采用每两周给药的剂量方案施用一种组合物和一或多种其他药物给需要的受试者来治疗疾病，所述组5 合物包括抗 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合片段。
2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中含抗 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合片段的组合物的施用是通过皮下注射进行的。
3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中抗 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合片段是人抗 TNF $\alpha$  抗体。
- 10 4. 根据权利要求 3 所述的方法，其中所述人抗体是 D2E7。
5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中施用了 40mg 的 D2E7。
6. 根据权利要求 5 所述的方法，其中所述疾病是自体免疫性疾病。
7. 根据权利要求 6 所述的方法，其中所述自体免疫性疾病是类15 风湿性关节炎。
8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述其他药物指疾病改善抗风湿药物 (DMARD)，非甾体抗炎药物 (NSAID)，类固醇或其任意组合。
9. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述 DMARD 是羟基氯喹，20 来氟米特，氨甲蝶呤，肠胃外给药的金制剂，口服的金制剂，柳氮磺吡啶或其任意组合。
10. 根据权利要求 8 所述的方法，其中所述 NSAID 是泼尼松，叶酸，塞来考昔，罗非考昔，对乙酰氨基酚，萘普生，布洛芬，甲泼尼龙，曲马多，Di-gesic，双氯酚酸，唯寇錠 (vicodin)，曲安西龙，25 利多卡因或其任意组合。
11. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述其他药物是多种维生素，钙，叶酸，流感病毒多价疫苗或其任意组合。
12. 一种药用组合物，其含有 40mgD2E7，一或多种其他药物及药用上可接受的载体。
- 30 13. 根据权利要求 12 所述的药用组合物，其中所述其他药物是疾病改善抗风湿药物 (DMARD)，非甾体抗炎药 (NSAID)，类固醇或其任意组合。

14. 根据权利要求 13 所述的药用组合物, 其中所述 DMARD 是羟基氯喹, 来氟米特, 氨甲蝶呤, 肠胃外给药的金制剂, 口服的金制剂, 柳氮磺吡啶或其任意组合。

15. 根据权利要求 13 所述的药用组合物, 其中所述 NSAID 是泼尼松, 叶酸, 塞来考昔, 罗非考昔, 对乙酰氨基酚, 萘普生, 布洛芬, 甲泼尼龙, 曲马多, Di-gesic, 双氯酚酸, 唯寇錠 (vicodin), 曲安西龙, 利多卡因或其任意组合。

16. 根据权利要求 12 所述的药用组合物, 其中所述其他药物是多种维生素, 钙, 叶酸, 流感病毒多价疫苗或其任意组合。

17. 一种试剂盒, 其包括含下述物质的组成:

a) 一种药用组合物, 含有抗 TNF $\alpha$  抗体和药用上可接受的载体;  
b) 一或多种药用组合物, 每种组合物含有一或多种其他药物和药用上可接受的载体; 和

c) 说明书, 指导每两周施用一次药用组合物来治疗疾病, 抗 TNF $\alpha$  抗体或其抗原结合片段能有效地治疗所述疾病。

18. 根据权利要求 17 所述的试剂盒, 其中所述组合物中含有的抗体是 40mgD2E7, 以及所述说明书涉及治疗类风湿性关节炎。

19. 根据权利要求 18 所述的试剂盒, 其中所述其他组合物包括疾病改善抗风湿药物 (DMARD), 非甾体抗炎药物 (NSAID), 类固醇或其任意组合。

20. 根据权利要求 19 所述的试剂盒, 其中所述 DMARD 是羟基氯喹, 来氟米特, 氨甲蝶呤, 肠胃外给药的金制剂, 口服的金制剂, 柳氮磺吡啶或其任意组合。

21. 根据权利要求 19 所述的试剂盒, 其中所述 NSAID 是泼尼松, 叶酸, 塞来考昔, 罗非考昔, 对乙酰氨基酚, 萘普生, 布洛芬, 甲泼尼龙, 曲马多, Di-gesic, 双氯酚酸, 唯寇錠 (vicodin), 曲安西龙, 利多卡因或其任意组合。

22. 根据权利要求 18 所述的试剂盒, 其中所述其他药物是多种维生素, 钙, 叶酸, 流感病毒多价疫苗或其任意组合。

30

TNF $\alpha$  抗体及另外一种药物的用途

## 发明背景

5 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 是一种细胞因子, 可以由许多类型的细胞产生, 包括单核细胞和巨噬细胞, 最初鉴定这个因子是根据它能诱导某些小鼠肿瘤坏死的能力 (参看 Old, L., 1985, 科学, 230: 630-632)。随后, 一个和恶病质相关的名叫恶液质素的因子被显示是和 TNF $\alpha$  相同的分子。研究暗示 TNF $\alpha$  可能参与介导休克 (参看 Beutler, B 和 Cerami, A. (1988) 生物化学年鉴 (Annu. Rev. Biochem), 57: 505-518; Beutler, B 和 Cerami, A. (1989) Annu. Rev. Immunol. 7: 625-655)。此外, 还暗示 TNF $\alpha$  在别

10 的各种人类疾病和代谢紊乱, 包括败血症, 传染病, 自身免疫病, 移植排异反应以及移植物抗宿主疾病的病理生理学中发挥重要作用 (例如参看 Vasilli, P. (1992) Annu. Rev. Immunol. 10: 411-452; Tracey, K. J. 和 Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45: 491-503)。

因为人 TNF $\alpha$  (hTNF $\alpha$ ) 在各种人类疾病都会产生有害的作用, 因此设计了不同的治疗策略去抑制或阻碍 hTNF $\alpha$  的活性。具体而言, 寻求能结合并中和 hTNF $\alpha$  的各种抗体, 使其成为抑制 hTNF $\alpha$  活性的一种

20 手段。最早的一些这样的抗体是鼠源的单克隆抗体 (mAbs), 它是由小鼠淋巴细胞的杂交瘤分泌的, 这种小鼠用 hTNF $\alpha$  进行了免疫 (参看 Hahn, T 等人 (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 3814-3818; Liang, C-M 等人 (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 137: 847-854; Hirai, M 等人 (1987) J. Immunol. Methods 96: 57-62; Fendly, B. M. 等人 (1987) Hybridoma 6: 359-370; Moller, A 等人 (1990) Cytokine 2: 162-169; Moeller 等人的美国专利 No. 5231024; Wallach, D 的欧洲专利申请 No186833; Old 等人的欧洲专利申请 No218868; Moeller, A 等人的欧洲专利申请 No260610)。尽管这些小鼠抗 hTNF $\alpha$  抗体经常表现出

30 高的 hTNF $\alpha$  亲和力 (例如  $K_d \leq 10^{-9} M$ ), 而且能中和 hTNF $\alpha$  活性, 但是将这些抗体施用给人体时, 伴随出现的诸如短的血清半衰期, 不能诱导人体效应蛋白发挥功能, 以及在人体中诱导出不希望出现的抗小鼠

抗体的免疫反应（“人抗鼠抗体”反应（HAMA））等问题限制了这些抗体在体内的使用。

5 为了克服鼠源抗体在人体使用中出现的問題，通过基因工程将鼠源抗 hTNF $\alpha$  抗体变得更“类人”。例如，制备了一些可变区是鼠源的，而恒定区是人源的嵌合抗体（Knight, D.M 等人（1993）*Mol. Immunol.* 30: 1443-1453; Daddona, P.E. 等人的 PCT 出版物 No. W092/16553）。此外，还制备了人源化抗体，在这种抗体中，可变区的高变区是鼠源的，而可变区的剩余部分以及恒定区则是人源的（Adair, J.R 等人的 PCT 出版物 No. W092/11383）。然而，由于这些嵌合以及人源化的抗体仍然有一些鼠源序列，因此，它们仍然能诱导一些不必要的免疫反应，即人抗嵌合抗体（HACA）反应，尤其是当给药时间延长，如对类风湿性关节炎这样的慢性病给药时便会诱导不必要的免疫反应（参看 Elliott, M.J. 等人（1994）*Lancet* 344: 1125-1127; Elliott, M.J. 等人（1994）*Lancet* 344: 1105-1110）。

15 较鼠源 MAbs 或其衍生物（如嵌合或人源化抗体）优选的 hTNF $\alpha$  抑制剂是完全的人抗 hTNF $\alpha$  抗体，因为即便长期用这种试剂不会诱导 HAMA 反应。利用人杂交瘤技术已经制备出抗 hTNF $\alpha$  的人单克隆自身抗体（Boyle, P., 等人（1993）*Cell. Immunol* 152: 556-568; Boyle, P., 等人（1993）*Cell. Immunol* 152: 569-581; Boyle 等人的欧洲专利申请 No614984）。然而，据报道，这些杂交瘤衍生的单克隆自身抗体对 hTNF $\alpha$  所具有的亲和力水平太低，用常规的方法估算不出来，这种抗体不能结合可溶性的 hTNF $\alpha$ ，而且也不能中和 hTNF $\alpha$  诱导的细胞毒性（参看 Boyle 等人，同上）。而且，人杂交瘤技术的成功取决于人外周血中淋巴细胞的出現，淋巴细胞能产生 hTNF $\alpha$  特异的自身抗体。某些研究在 25 人受试者中发现了抗 hTNF $\alpha$  的血清自身抗体（Fomsgaard, A 等人（1989）*Scand. J. Immunol.* 30: 219-223; Bendtzen, K 等人，（1990）*Prog. Leukocyte Biol.* 10B: 447-452），而别的研究则没发现（Leusch, H-G 等人（1991）*J. Immunol. Methods* 139: 145-147）。

30 可以替代天然的人抗 hTNF $\alpha$  抗体的是重组 hTNF $\alpha$  抗体。能结合 hTNF $\alpha$  的重组人抗体已经做过介绍，它的亲和力相对低（即  $K_d \sim 10^{-7} M$ ），而快速解离率则很快（即  $K_{off} \sim 10^{-2} sec^{-1}$ ）（Griffiths, A.D. 等人（1993）*EMBO J.* 12: 725-734）。然而，由于它们相对比较快的

解离动力学，因此，这些抗体并不适合用于治疗。此外，介绍了一种重组的人抗 hTNF $\alpha$  抗体，它不能中和 hTNF $\alpha$  的活性，但却能增强 hTNF $\alpha$  结合到细胞表面，并增强 hTNF $\alpha$  的内化 (Lidbury, A., 等人 (1994) Biotechnol. Ther. 5: 27-45; Aston 等人的 PCT 出版物 No. W092/5 03145)。

也被介绍的是能结合可溶性 hTNF $\alpha$  的重组人抗体，它具有高的亲和力以及缓慢的解离动力学特征，并能中和 hTNF $\alpha$  的活性，包括 hTNF $\alpha$  诱导的细胞毒性 (体外和体内) 和细胞激活 (参看美国专利 No6090382)。典型的静脉内施用抗体是一周一剂。然而，每周一剂的抗体及/或任何药物既昂贵，又麻烦，而且由于给药次数频繁，导致副作用上升。静脉内给药也有限制，因为这种给药必须由经过医学训练的人来执行。

#### 发明概述

本发明提供了一些方法，这些方法通过施用抗 hTNF $\alpha$  抗体和一或多种药物来治疗 hTNF $\alpha$  相关疾病，如败血症，自身免疫病 (如类风湿性关节炎，过敏症，多发性硬化症，自体免疫性糖尿病，自体免疫性葡萄膜炎和肾病综合征)，传染病，恶性肿瘤，移植排异反应或移植抗宿主病，肺部疾病，骨疾，肠道疾病，中枢神经系统疾病，心脏疾病。优选治疗的自体免疫性疾病是类风湿性关节炎。

抗体可以在其他药物给药前，给药后给药，也可以和其他药物一块给药。本发明的方法包括了抗体和其他药物给药的任何顺序以及给药的手段。治疗 TNF $\alpha$  相关疾病，抗体优选的给药方案是每两周一剂，优选的给药途径是皮下给药。

其他药物优选的是疾病改善抗风湿药物 (DMARD) 或非甾体抗炎药 (NSAID) 或类固醇或其任意组合。优选的 DMARD 是羟基氯喹，来氟米特，氨甲蝶呤，肠胃外给药的金制剂，口服的金制剂以及柳氮磺吡啶。这些方法包括利用联合疗法，这种方法是将人抗体和另外一种治疗剂施用给受试者，这种治疗剂如一或多种能结合别的靶蛋白的抗体 (如能结合别的细胞因子或细胞表面分子的抗体)，一或多种细胞因子，可溶性 TNF $\alpha$  受体 (参看 PCT 出版物 No. W094/06476)，Immunex 公司的依那西普 (ENBREL™)，Centocor 公司的英夫利昔单抗 (REMICADE™)，及/或一或多种能抑制 hTNF $\alpha$  产量或活性的化学试剂

(如在 PCT 出版物 No. W093/19751 中介绍的环己烷-亚基衍生物)。

本发明的另一方面涉及一种药用组合物，它包括抗 TNF $\alpha$  的抗体，以及一或多种用来治疗自体免疫性疾病的药物和药用上可接受的载体。

- 5 本发明的另一方面涉及试剂盒，该试剂盒包括一种包括抗 TNF $\alpha$  抗体和药用上可接受的载体的药用组合物，以及一或多种药用组合物，这些组合物中每种都包含用来治疗自体免疫性疾病的药物和药用上可接受的载体。此外，该试剂盒还包括单一的药用组合物，它包括抗 TNF $\alpha$  抗体，一或多种用来治疗自体免疫性疾病的药物和药用上可接受的载体。这些试剂盒还包括说明书，用来指导服用治疗疾病的药用组合物，施用抗 TNF $\alpha$  抗体对诸如自体免疫性疾病，尤其是类风湿性关节炎这样的疾病是有利的。

- 抗体或其抗原结合片段优选重组人抗体，它们能特异地结合人 TNF $\alpha$ 。抗体优选能结合人 TNF $\alpha$  的重组人抗体。本发明的抗体的特征是能结合 hTNF $\alpha$ ，具有高的亲和力和低的解离动力学，并且能中和 hTNF $\alpha$  活性，包括 hTNF $\alpha$  诱导的细胞毒性(体外和体内)和细胞激活。抗体或其抗原结合片段优选的是从人 TNF $\alpha$  中解离出来，TNF $\alpha$  的  $K_d$  是  $1 \times 10^{-8} M$  或更低，而  $K_{off}$  速率常数为  $1 \times 10^{-3} S^{-1}$  或更低，这两个参数都是由表面等离子共振确定的，在一个标准的体外 L929 实验中，能中和人 TNF $\alpha$  细胞毒性， $IC_{50}$  是  $1 \times 10^{-7} M$  或更低。更优选的是，分离的人抗体，或其抗原结合片段是从人 TNF $\alpha$  中解离出来的，TNF $\alpha$  的  $K_{off}$  是  $5 \times 10^{-4} S^{-1}$  或更低，或者甚至更优选的  $K_{off}$  是  $1 \times 10^{-4} S^{-1}$  或更低。更优选的是，分离的人抗体，或其抗原结合片段在一个标准的体外 L929 实验中，能中和人 TNF $\alpha$  细胞毒性， $IC_{50}$  为  $1 \times 10^{-8} M$  或更低， $IC_{50}$  是  $1 \times 10^{-9} M$  或更低甚至更优选，而  $1 \times 10^{-10} M$  或更低的  $IC_{50}$  仍然是优选的。抗体可以是全长的(例如 IgG1 或 IgG4 抗体)或只包括抗原结合片段(例如 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv 片段或单一结构域)。本发明最优选的重组抗体是 D2E7，它的轻链 CDR3 结构域包括 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列，而重链 CDR3 结构域包括 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列。优选的是，D2E7 抗体的轻链可变区(LCVR)包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸序列，而重链可变区(HCVR)包括 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列。这些抗体都在美国专利 No. 6090382 中介绍了，此处完整引用作为参考。

优选的抗体或抗原结合片段具有下列特征:

a) 是从人 TNF $\alpha$  中解离出来, TNF $\alpha$  的  $K_{off}$  是  $1 \times 10^{-3} S^{-1}$  或更低, 它是由表面等离子共振确定的。

b) 它的轻链 CDR3 结构域包括 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列, 或者是 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列的如下修饰形式, 在 1, 4, 5, 7 或 8 位有单一的丙氨酸取代, 或者在位置 1, 3, 4, 6, 7, 8 和/或 9 位有 1-5 个保守的氨基酸取代。

c) 重链 CDR3 结构域包括 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列, 或者是 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列的如下修饰形式, 在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 位有单一的丙氨酸取代, 或者在位置 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 和/或 12 位有 1-5 个保守的氨基酸取代。

更优选的是, 分离的人抗体, 或其抗原结合片段是从人 TNF $\alpha$  中解离出来的, TNF $\alpha$  的  $K_{off}$  是  $5 \times 10^{-4} S^{-1}$  或更低。分离的人抗体, 或其抗原结合片段是从人 TNF $\alpha$  中解离出来的, TNF $\alpha$  的  $K_{off}$  是  $1 \times 10^{-4} S^{-1}$  或更低, 这仍然是更优选的。

优选的抗体, 或其抗原结合片段含有具有 CDR<sub>3</sub> 结构域的 LCVR, 该结构域包括 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列, 或者是 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列的修饰形式, 在 1, 4, 5, 7 或 8 位由单一的丙氨酸取代, 它的 HCVR 含有 CDR<sub>3</sub> 结构域, 该结构域包括 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列, 或者是 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列的修饰形式, 在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 位由单一的丙氨酸取代, 更优选的是, LCVR 进一步还包括 CDR2 结构域, 该结构域包括 SEQ ID NO: 5 氨基酸序列, 而 HCVR 进一步还包括 CDR2 结构域, 该结构域包括 SEQ ID NO: 6 氨基酸序列。LCVR 进一步还包括 CDR1 结构域, 该结构域包括 SEQ ID NO: 7 氨基酸序列, 而 HCVR 进一步还包括 CDR1 结构域, 该结构域包括 SEQ ID NO: 8 氨基酸序列, 这仍然是更优选的。

优选的抗体, 或其抗原结合片段含有的 LCVR 包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸序列, 它的 HCVR 包括 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列。在某些实施方案中, 抗体有 IgG1 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。在另外还有些实施方案中, 抗体是 Fab 片段, F(ab')<sub>2</sub> 片段, 或单链 Fv 片段。

在另外一些实施方案中, 本发明提供了一些治疗疾病的方法, 每两周一次, 通过皮下将一或多种抗 TNF $\alpha$  抗体, 或其抗原结合片段施



用给受试者，这些抗 TNF $\alpha$  抗体对疾病是有利的。优选的抗体，或其抗原结合片段含有的 LCVR 包括 CDR3 结构域，该结构域包括的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, 它的 HCVR 含有 CDR3 结构域，该结构域包括的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35.

在本发明前述最优选的实施方案中，抗体 D2E7 通过皮下注射，每两周一次，每次剂量是 40mg。一或多种药物的剂量和它们的有效剂量一致。

#### 发明详述

在另外一些实施方案中，本发明提供了一些治疗疾病的方法，在这些方法中，将分离的人抗体，或其抗原结合片段和一或多种其他药物组合施用，这种抗体的给药对治疗疾病是有利的，它能结合人 TNF $\alpha$ ，亲和力高，解离速率低，而中和能力高，因此能治疗疾病。

为了更容易地理解本发明，我们首先对某些术语进行定义。

本发明使用的术语“给药”指的是某种物质（例如抗 TNF $\alpha$  抗体）的施用能达到治疗目的（例如 TNF $\alpha$  相关疾病的治疗）。

本发明使用的术语“每两周给药方案”，“每两周给药”以及“每两周施用”指的是为了获得治疗目的（例如 TNF $\alpha$  相关疾病的治疗），将物质（例如抗 TNF $\alpha$  抗体）施用给受试者的时间过程。每两周给药方案并不包括一周一次的给药方案。这种物质优选的是每 9-19 天给药一次，更优选的是 11-17 天，甚至更优选的是 13-15 天，而最优选的是每隔 14 天给药一次。

本发明使用的术语“联合治疗”指的是施用两或多种治疗物质，如抗 TNF $\alpha$  抗体和别的诸如 DMARD 或 NSAID 这样的药物。其他药物可以和抗 TNF $\alpha$  抗体共同给药，也可以在它之前，之后给药。

本发明使用的术语“人 TNF $\alpha$ ”（本发明缩写成 hTNF $\alpha$ ，或简写成 hTNF）指的是一种人细胞因子，它的分泌形式是 17kDa，而膜结合形

式是 26kDa, 它的活性形式是由 17kDa 分子非共价结合形成的三聚体。例如, TNF $\alpha$  的结构在 Pennica, D 等人 (1984) *Nature*312:724-729; Davis, J.M 等人 (1987) *Biochemistry*26:1322-1326 以及 Jones, E.Y 等人 (1989) *Nature*338:225-228 中介绍了。术语人 TNF $\alpha$  5 意思包括重组的人 TNF $\alpha$  (rh TNF $\alpha$ ), 它能够通过标准的重组方法制备, 或者通过商业途径购买 (R&D 系统, 目录号是 No.210-TA, Minneapolis, MN)。

本发明使用的术语“抗体”指的是免疫球蛋白, 它包括四条多肽链, 两条重链 (H) 和两条轻链 (L), 它们通过二硫键相互连接。每 10 条重链包括可变区 (本发明简写成 HCVR 或 VH) 和恒定区。重链恒定区包括三个结构域, CH1, CH2 和 CH3。每条轻链包括可变区 (本发明简写成 LCVR 或 VL) 和恒定区。轻链恒定区包括 CL 1 个结构域。VH 和 VL 能进一步分成许多高变区, 即决定簇互补区 (CDR), 它们散布在更保守的骨架区 (FR) 中。每个 VH 和 VL 包括三个 CDRs 和四个 FRs, 15 它们按下列顺序排列, 从氨基端到碳末端是 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

本发明使用的术语抗体的“抗原结合片段” (或简化成“抗体部分”) 指的是一或多个抗体片段, 它们仍然有特异结合抗原的能力 (如 hTNF $\alpha$ )。全长抗体的片段具有结合抗原的功能。包含在术语抗体的 20 “抗原结合片段”中的结合片段实施例包括 (i) Fab 片段, 单价片段, 含有 VL, VH, CL 和 CH1 结构域; (ii) F(ab')<sub>2</sub> 片段, 双价片段, 含有两个 Fab 片段, 在铰链区通过二硫键相连; (iii) Fd 片段, 含有 VH 和 CH1 结构域; (iv) Fv 片段, 含有抗体单臂的 VL 和 VH 结构域; (v) dAb 片段 (Ward 等人 (1989) *Nature*341:544-546), 它包括 25 VH 结构域; 以及 (vi) 单独的决定簇互补区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由单独的基因编码, 但它们能通过重组技术合成的接头连结成一条蛋白链, 在这条单链蛋白链中, VL 和 VH 区配对形成单价分子 (已知的单链 Fv (scFv), 参看 Bird 等人 (1988) *Science*242:423-426; 以及 Huston 等人 (1988) 30 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*85:5879-5883)。这样的单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。别的形式的单链抗体, 如双价抗体也包括在这个术语之内。双价抗体是二价的, 双特异性的抗体, 在

这个抗体中，VH 和 VL 结构域表达成一条多肽链，但是得使用一个接头，这个接头太小而不能在同一条链的两个结构域中配对，这样迫使结构域和另一条链的互补结构域配对，从而创造出两个抗原结合位点（参看 Holliger, P., 等人 (1993)

5 Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 6444-6448; Poljak, R. J 等人 (1994) Structure2: 1121-1123)。

更进一步，抗体，或其抗原结合片段是更大的免疫粘附分子的一部分，这种免疫粘附分子是由一或多个蛋白或肽共价或非共价将抗体或抗体部分连接在一起形成的。这种免疫粘附分子的实施例包括，利用链霉抗生物素核心区制造一个四聚体的 scFv 分子 (Kipriyanov, S.M 等人 (1995), Human Antibodies and Hbridomas6: 93-101)，以及利用一个半胱氨酸残基，标记肽和 C-末端多聚组氨酸标签制造一个双价的，生物素 scFv 分子 (Kipriyanov, S.M 等人 (1994), Mol. Immunol. 31: 1047-1058)。

10 诸如 Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 这样的抗体片段，可以利用常规技术从整个抗体中制备，如分别利用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化整个抗体。而且可以利用本发明介绍的标准重组 DNA 技术制备抗体，抗体部分以及免疫粘附分子。

本发明使用的术语“人抗体”包括这样的抗体，它的可变区和恒定区衍生自人免疫球蛋白胚系基因。本发明的人抗体还包括不是人免疫球蛋白胚系基因编码的氨基酸序列（如在体外通过随机或定点突变产生的突变，以及在体内通过体细胞突变产生的突变），例如在 CDRs，尤其是 CDR3 中的氨基酸。然而，本发明使用的术语“人抗体”并不包括这样的抗体，它们的 CDR 序列衍生自别的哺乳动物，如小鼠的胚系基因，然后嫁接到人骨架序列上。

25 本发明使用的术语“重组人抗体”意思包括所有通过重组技术制备，表达，创造或分离的人抗体，如重组表达载体在转化宿主细胞中表达的抗体（在下面 II 部分进一步介绍），从重组的，组合的人抗体文库中分离的抗体（在下面 III 部分进一步介绍），从人免疫球蛋白基因的转基因动物（如小鼠）中分离的抗体（如参看 Taylor, L. D 等人 (1992) Nucl. Acids. Res20: 6287-6295) 或通过任何别的技术制备，表达，创造或分离的抗体，这些技术涉及将人免疫球蛋白基因

5 拼接到别的 DNA 序列上。这样的人抗体包括的可变区和恒定区衍生自人免疫球蛋白胚系基因。在某些实施方案中，这种重组人抗体在体外很容易发生诱变（或者当使用一种人 Ig 基因的转基因动物时，在体发生体细胞突变），因此，重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列衍生自人胚系 VH 和 VL 序列，但它在人胚系抗体库中不是天然存在。

10 本发明使用的“分离的抗体”指的是基本上没有别的具不同抗原特异性的抗体的抗体（如一种能特异结合 hTNF $\alpha$  的抗体，它基本上没有能特异结合非 hTNF $\alpha$  抗原的抗体）。然而，能特异结合 hTNF $\alpha$  的分离抗体和别的抗原具有交叉反应活性，如别的物种的 hTNF $\alpha$ （在下面进一步详细地讨论）。而且分离的抗体基本上没有别的细胞物质，和/或化学物质。

15 本发明使用的“中和抗体”（或者叫“能中和 hTNF $\alpha$  活性的抗体”）指的是能结合 hTNF $\alpha$ ，从而抑制 hTNF $\alpha$  生物活性的抗体。hTNF $\alpha$  活性的抑制可以通过检测一或多个 hTNF $\alpha$  生物活性的指标来评估，如 hTNF $\alpha$  诱导的细胞毒性（体外或体内），hTNF $\alpha$  诱导的细胞激活以及 hTNF $\alpha$  和 hTNF $\alpha$  受体的结合。这些 hTNF $\alpha$  生物活性的指标可以用本领域已知的一或多种标准体外或体内试验来评估（参看美国专利 No. 6090382）。优选的是，抗体中和 hTNF $\alpha$  生物活性的能力可以通过 L929 细胞中的 hTNF $\alpha$  诱导的细胞毒性来评估。作为 hTNF $\alpha$  活性另外或替代的参数，抗体抑制 hTNF $\alpha$  诱导的 ELAM-1 在 HUVEC 中的表达能力，20 可以作为 hTNF $\alpha$  诱导的细胞激活的检测工具，也可被评估。

25 本发明使用的“表面等离子共振”指的是一种光学现象，通过检测生理传感器点阵中蛋白浓度的改变来分析实时的生物特异的相互作用，例如利用 BIAcore 系统（Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, NJ）。进一步的介绍，请参考实施例 1 和 Jonsson, U., 等人（1993）Ann. Biol. Clin 51: 19-26; Jonsson, U 等人（1991）Biotechniques 11: 620-627; Johnson, B 等人（1995）J. Mol. Recognit, 8: 125-131; 以及 Johnson, B 等人（1991）Anal. Biochem. 198: 268-277。

30 本发明使用的术语“ $K_{off}$ ”指的是抗体从抗体/抗原复合物中解离的速率常数。

本发明使用的术语“ $K_d$ ”指的是特定抗体抗原相互作用的解离常

数。

本发明使用的术语“核酸分子”包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链分子，也可以是双链分子，但优选的是双链 DNA 分子。

5 本发明使用的术语“分离的核酸分子”涉及的是编码能结合 hTNF $\alpha$  的抗体或抗体部分（例如 VH, VL, CDR3）的核酸，它指的是核酸分子，在这种核酸分子中，编码抗体和抗体部分的核苷酸序列中没有别的能结合非 hTNF $\alpha$  抗原的抗体或抗体部分的核苷酸序列。在这些核苷酸序列中，别的序列天然位于人基因组 DNA 的两侧。因此，本发明编码抗 hTNF $\alpha$  抗体 VH 区的分离核酸不含别的结合非 hTNF $\alpha$  抗原的抗体 VH 区  
10 序列。

本发明使用的术语“载体”指的是一种核酸分子，它能将其连接的另一核酸分子进行转移。一种类型的载体是“质粒”，它指的是一种环形的双链 DNA 环，另外的 DNA 片段可以连接到这个 DNA 环中。另外一种载体是病毒载体，在这种载体中，可以将另外的 DNA 片段连接到病毒基因组中。某些载体在其导入的宿主细胞中能自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和哺乳动物附加体载体）。别的载体（如哺乳动物非附加体载体）在导入宿主细胞后，能整合到宿主细胞基因组中，因此，它能和宿主基因组一起复制。而且，某些载体能指导与其可操作地连接的基因的表达。这种载体在本发明被称作“重组表达  
15 载体”（或简称为“表达载体”）。总之，在重组 DNA 技术中使用的表达载体通常以质粒的形式存在。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以交互使用，因为质粒是载体最常用的形式。然而，本发明的意图是还包括别的形式表达载体，如病毒载体（如复制缺陷型逆转录病毒，腺病毒和腺病毒相关病毒），它们的功能相同。

25 本发明使用的术语“重组宿主细胞”（或简称为“宿主细胞”）指的是重组表达载体导入的细胞。应该理解这些术语不仅指特定的供试细胞，而且指这些细胞的子代。由于突变或环境的影响，某些修饰可能在连续数代中出现，因此，事实上，这些细胞的子代不可能和母细胞完全一样，但仍然包括在本发明术语“宿主细胞”的范围之内。

30 下面将进一步详细说明本发明的不同方面。

本发明提供了一些治疗疾病的方法，在这些方法中，这种抗体的给药对治疗疾病是有利的。这些方法包括将分离的人抗体或其抗原结

合片段以及一或多种其他药物每两周，皮下给药，其中所述人抗体或其抗原部分能结合人 TNF $\alpha$ ，亲和力高，解离速率低，而中和能力高，其他药物用于治疗自体免疫性疾病，尤其是类风湿性关节炎。本发明优选的人抗体是重组的，中和性人抗 TNF $\alpha$  抗体。本发明最优选的重组中和抗体在本发明被称作 D2E7 (D2E7 VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，而 D2E7 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示)，其给药的剂量是 40mg。D2E7 的性质在 Salfeld 等人的美国专利 No. 6090382 中介绍了，这个专利被引入本发明作为参考。

一个方面，本发明涉及治疗疾病，用来治疗自体免疫性疾病的抗 TNF $\alpha$  抗体以及一或多种其他药物的施用对治疗疾病是有利的。这些治疗包括每两周，皮下施用 D2E7 及其抗体部分，D2E7 相关抗体及其抗体部分，和别的抗体及其抗体部分，它们和 D2E7 的性质一样，比方说高的亲和力，能结合 hTNF $\alpha$ ，解离动力学低，并且具高的中和能力。在一个实施方案中，本发明提供了分离的人抗体或其抗原结合片段用于治疗，该人抗体或其抗原结合片段是从人 TNF $\alpha$  中解离的，K<sub>d</sub> 是  $1 \times 10^{-4}$ M 或更低，而 K<sub>off</sub> 速率常数是  $1 \times 10^{-3}$ s<sup>-1</sup> 或更低，这两个参数都是由表面等离子共振确定的，并且在一个标准的体外 L929 实验中，能中和人 TNF $\alpha$  细胞毒性，IC<sub>50</sub> 是  $1 \times 10^{-7}$ M 或更低。更优选的是，分离的人抗体，或其抗原结合片段是从人 TNF $\alpha$  中解离出来的，TNF $\alpha$  的 K<sub>off</sub> 是  $5 \times 10^{-4}$ s<sup>-1</sup> 或更低，或者甚至更优选的 K<sub>off</sub> 是  $1 \times 10^{-4}$ s<sup>-1</sup> 或更低。更优选的是，分离的人抗体，或其抗原结合片段在一个标准的体外 L929 实验中中和的人 TNF $\alpha$  细胞毒性 IC<sub>50</sub> 是  $1 \times 10^{-8}$ M 或更低， $1 \times 10^{-9}$ M 或更低的 IC<sub>50</sub> 甚至更优选，而  $1 \times 10^{-10}$ M 或更低的 IC<sub>50</sub> 仍然是优选的。在一个优选的实施方案中，抗体是分离的人重组抗体，或其抗原结合片段。

本领域众所周知，抗体重链和轻链 CDR3 区在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中发挥重要作用。因此，在另一方面，本发明涉及治疗疾病的方法，通过皮下施用的人抗体对疾病治疗是有利的，人抗体和 hTNF $\alpha$  结合的解离动力学慢，并且含有重链和轻链 CDR3 区，它们在结构上和 D2E7 的 CDR3 区完全一样，或者和它们相关。D2E7 VL CDR3 的位置 9 可以由 Ala 或 Thr 占据，而基本上不会影响 K<sub>off</sub>。因此，D2E7 VL CDR3 的保守基元包括如下氨基酸序列：Q-R-Y-N-R-A-P-Y-

(T/A) (SEQ ID NO: 3)。此外，D2E7 VH CDR3 的位置 12 可以由 Tyr 或 Asn 占据，而基本上不会影响  $K_{off}$ 。因此，D2E7 VH CDR3 的保守基元包括如下氨基酸序列：V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO: 4)。而且，如实施例 2 所述，D2E7 的重链和轻链的 CDR3 结构域易于用单个丙氨酸残基取代（在 VL CDR3 的位置 1, 4, 5, 7 或 8，或者在 VH CDR3 的位置 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11），而基本不会影响  $K_{off}$ 。再进一步说，有经验的技术人员将会意识到，假设 D2E7 VL 和 VH CDR3 结构域易于被丙氨酸取代，那么 CDR3 结构域中别的氨基酸可能被取代，具体而言，被保守的氨基酸取代，但是抗体的解离速率常数仍然低。本发明使用的“保守的氨基酸取代”指的是用另一个具相似侧链的氨基酸取代一个氨基酸。具相似侧链的氨基酸家族本领域已有定义，包括碱性侧链（如赖氨酸，精氨酸，组氨酸），酸性侧链（如天冬氨酸，谷氨酸），不带电荷的极性侧链（如甘氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺，丝氨酸，苏氨酸，酪氨酸，半胱氨酸），非极性侧链（如丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，异亮氨酸，脯氨酸，苯丙氨酸，蛋氨酸，色氨酸）， $\beta$ -支链侧链（如苏氨酸，缬氨酸，异亮氨酸），以及芳香侧链（如酪氨酸，苯丙氨酸，色氨酸，组氨酸）。优选的，在 D2E7 VL 和/或 VH CDR3 结构域中的保守氨基酸取代不超过 1-5 个。更优选的，在 D2E7 VL 和/或 VH CDR3 结构域中的保守氨基酸取代不超过 1-3 个。此外，对结合  $TNF\alpha$  关键的氨基酸位置不应该发生保守氨基酸取代。D2E7 VL CDR3 的位置 2 和 5 以及 D2E7 VH CDR3 的位置 1 和 7 在和  $TNF\alpha$  相互作用中是关键性的，因此，在这些位置不发生氨基酸取代是优选的（尽管如上述那样，在 D2E7 VL CDR3 的位置 5 用丙氨酸取代也是可接受的）（参看美国专利 No. 6090382）。

因此，在本发明的另一个实施方案中，提供了治疗疾病的方法，在这些方法中，每两周，皮下施用抗  $TNF\alpha$  抗体或其抗原结合片段和一或多种其他药物对治疗疾病是有利的，所述其他药物用于治疗自体免疫疾病。优选的抗体或抗原结合片段具有下列特征：

a) 是从人  $TNF\alpha$  中解离出来， $TNF\alpha$  的  $K_{off}$  是  $1 \times 10^{-3} S^{-1}$  或更低，它是由表面等离子共振确定的。

b) 它的轻链 CDR3 结构域包括 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列，或者是 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列的修饰形式，在 1, 4, 5, 7 或 8 位有单一

的丙氨酸取代，或者在位置 1, 3, 4, 6, 7, 8 和/或 9 位有 1-5 个保守的氨基酸取代。

5 c) 重链 CDR3 结构域包括 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列，或者是 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列的修饰形式，在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 位有单一的丙氨酸取代，或者在位置 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 和/或 12 位有 1-5 个保守的氨基酸取代。

更优选的是，抗体，或其抗原结合片段是从人 TNF $\alpha$  中解离出来的，TNF $\alpha$  的  $K_{off}$  是  $5 \times 10^{-4} S^{-1}$  或更低。抗体，或其抗原结合片段从人 TNF $\alpha$  中解离出来的，TNF $\alpha$  的  $K_{off}$  是  $1 \times 10^{-4} S^{-1}$  或更低，这甚至更优选。

10 在另外一个实施方案中，抗体，或其抗原结合片段含有的轻链可变区 (LCVR) 含有 CDR3 结构域，该结构域包括 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列，或者是 SEQ ID NO: 3 氨基酸序列的修饰形式，在 1, 4, 5, 7 或 8 位有单一的丙氨酸取代，它的重链可变区 (HCVR) 含有 CDR3 结构域，该结构域包括 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列，或者是 SEQ ID NO: 4  
15 氨基酸序列的修饰形式，在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 位有单一的丙氨酸取代。优选的是，LCVR 进一步还包括 CDR2 结构域，该结构域包括 SEQ ID NO: 5 氨基酸序列 (即 D2E7 VL CDR2)，而 HCVR 进一步还包括 CDR2 结构域，该结构域包括 SEQ ID NO: 6 氨基酸序列 (即 D2E7 VH CDR2)。LCVR 进一步还包括 CDR1 结构域，该结构域包括 SEQ  
20 ID NO: 7 氨基酸序列 (即 D2E7 VL CDR1)，而 HCVR 进一步还包括 CDR1 结构域，该结构域包括 SEQ ID NO: 8 氨基酸序列 (即 D2E7 VH CDR1)，这甚至更优选。VH 骨架区优选的是来自人 VH3 胚系基因家族，更优选的是来自人 DP-31 胚系 VH 基因，而最优选的是来自 D2E7 VL 骨架序列，这段序列如美国专利 No. 6090382 图 2A 和 2B 所示。

25 仍然在另外一个实施方案中，优选的抗体，或其抗原结合片段含有的轻链可变区 (LCVR) 包括 SEQ ID NO: 1 氨基酸序列 (即 D2E7 VL)，它的重链可变区 (HCVR) 包括 SEQ ID NO: 2 氨基酸序列 (即 D2E7 VH)。在某些实施方案中，抗体包括重链恒定区，如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 或 IgD 恒定区。重链恒定区优选的是 IgG1 重  
30 链恒定区或 IgG4 重链恒定区。此外，抗体包括轻链恒定区，可以是  $\kappa$  轻链恒定区或  $\lambda$  轻链恒定区。抗体轻链恒定区优选的是  $\kappa$  轻链恒定区。此外，抗体部分可以是诸如 Fab 片段或 Fc 片段这样的片段。



仍然在另外一个实施方案中，优选的抗体，或其抗原结合片段含有 D2E7 相关的 VL 和 VH CDR3 结构域，例如，含有轻链可变区 (LCVR) CDR3 结构域的抗体，或其抗原结合片段，该结构域包括的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, 它的重链可变区 (HCVR) 含有 CDR3 结构域，该结构域包括的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35.

本发明的抗体，或其抗原结合片段可以衍生化，或连接到别的功能分子上（如别的肽或蛋白）。因此，本发明的抗体，或其抗原结合片段包括本发明介绍的人抗 TNF $\alpha$  抗体的衍生化以及别的修饰形式，包括免疫粘附分子。例如，本发明的抗体或抗体部分可以功能性地连接到（化学耦合，基因融合，非共价结合或其他）一或多个其他分子，如别的抗体（如双特异性抗体或双价抗体），检测试剂，细胞毒性药物，药用试剂，及/或蛋白或肽上，它们能介导抗体或抗体部分和其他分子（如链霉抗生物素核心区或多聚组氨酸标签）偶联。

一种类型的衍生化抗体是将两或多个抗体交联而成（同一类型或不同类型，从而获得双特异的抗体）。合适的交联接头包括那些具异种双活性的接头，这些接头有两个不同的反应基团，基团被合适的间隔序列（如马来酰亚胺苯甲酰-N-羧基琥珀酰亚胺脂）隔开，或者是具同种双活性（如二琥珀酰辛二酸）的接头。这样的接头可以从 Pierce Chemical Company, Rockfort, IL. .

本发明的抗体，或其抗原结合片段可以和包括荧光化合物在内的有用检测试剂一起衍生化。荧光检测试剂包括荧光素，异硫氰酸荧光素，罗丹明，5-二甲胺-1-萘磺酰氯，藻红蛋白等。抗体也可用可检测的酶，如碱性磷酸酶，辣根过氧化酶，葡萄糖氧化酶等衍生化。当抗体用可检测的酶衍生化时，可以通过添加别的试剂来检测，可检测的酶利用这些试剂来产生可检测的反应产物。例如，当可检测的酶是辣根过氧化酶时，添加过氧化氢和二氨基联苯胺能产生有色的反应产

物，它可以检测到。抗体也可以用生物素衍生化，并通过抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合进行间接检测。

本发明的抗体，或抗体部分可以通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链来制备。为了表达重组的抗体，用一或多个含有抗体轻链和重链编码 DNA 片段的重组表达载体转化宿主细胞，致使抗体轻链和重链在宿主细胞中表达，优选的是分泌到宿主细胞的培养基中，然后从宿主细胞培养基中回收抗体。用标准的重组 DNA 方法来获得抗体重链和轻链基因，将这些基因整合到重组表达载体中，并导入宿主细胞，这在 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis (编辑)，分子克隆：实验室手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)，第二版，冷泉港实验室，N. Y (1989)，Ausubel, F. M 等人 (编辑)，分子生物学最新方法 (Current Protocols in Molecular Biology)，Greene 出版公司 (1989) 以及 Boss 等人的美国专利 No4816397 中介绍了。

为了表达 D2E7 或 D2E7 相关抗体，首先获得编码轻链和重链可变区的 DNA 片段。这些 DNA 片段可以通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增和修饰胚系轻链和重链可变区序列获得。人重链和轻链可变区基因的胚系 DNA 序列是本领域众所周知的 (参看 “Vbase” 人胚系序列数据库；也可参看 Kabat, E. A 等人 (1991) 免疫目的蛋白序列 (Sequence of Protein of Immunological Interest, 第五版，美国健康与人类服务部，NIH 出版号 No. 91-3242; Tomlinson, L. M 等人 (1992) “The Repertoire of Human Germline VH Sequence Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops” J. Mol. Biol. 227: 776-798; 以及 Cox, J. P. L 等人 (1994) “A Directory of Human Germ-line V78 Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” Eur. J. Immunol. 24: 827-836; 这些文献表示的内容整体被引作参考)。为了获得编码 D2E7 或 D2E7 相关抗体重链可变区的 DNA 片段，用标准 PCR 扩增人胚系 VH 基因的 VH3 家族成员。扩增 DP-31 VH 胚系序列是最优选的。适合扩增 DP-31 胚系 VH 和 A20 胚系 VL 序列的 PCR 引物可以根据上面引用的参考文献中公开的核苷酸序列进行设计，采用的是标准方法。

一旦获得胚系 VH 和 VL 片段，这些序列可以突变成本发明公开的 D2E7 或 D2E7 相关氨基酸序列。首先将胚系 VH 和 VL DNA 序列编码的

氨基酸序列和 D2E7 或 D2E7 相关 VH 和 VL 氨基酸序列比较,确定 D2E7 或 D2E7 相关序列与胚系序列不同的氨基酸残基。然后利用遗传密码确定哪个核苷酸应该改变,突变胚系 DNA 序列中合适的核苷酸,使得突变胚系 DNA 序列能编码 D2E7 或 D2E7 相关氨基酸序列。用标准的方法,如 PCR 介导的突变(在这种突变方法中,突变的核苷酸包含在 PCR 引物中,因此 PCR 产物中含有突变)和定点突变对胚系序列进行突变。

一旦获得 D2E7 或 D2E7 相关 VH 和 VL 片段的编码 DNA 序列(通过对胚系 VH 和 VL 基因进行扩增和突变,如上所述),便可以用标准的 DNA 重组技术对这些 DNA 进行进一步的操作,例如,将可变区基因转化成全长抗体链基因, Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中, VL 或 VH 编码 DNA 可操作地连接到另外一个编码别的蛋白的 DNA 上,如抗体恒定区或可弯曲的接头。上下文使用的术语“可操作地连接”指的是两段 DNA 连接在一起,以便这两段 DNA 编码的氨基酸序列在一个阅读框内。

将 VH 编码 DNA 可操作地连接到编码重链恒定区(CH1, CH2, CH3)的 DNA 分子上,从而将编码 VH 区的分离 DNA 转变成全长重链基因。人重链恒定区基因序列是本领域众所周知的(参看 Kabat, E. A 等人(1991), 免疫目的蛋白序列(Sequence of Protein of Immunological Interest, 第五版, 美国健康与人类服务部, NIH 出版号 No. 91-3242), 而包括这些区域的 DNA 序列可以通过标准的 PCR 扩增获得。重链恒定区可以是 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 或 IgD 恒定区, 但最优选的是 IgG1 和 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因, VH 编码 DNA 可操作地连接到只编码重链恒定区 CH1 的 DNA 分子上。

将 VL 编码 DNA 可操作地连接到编码轻链恒定区 CL 的 DNA 分子上,从而将编码 VL 区的分离 DNA 转变成全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因序列是本领域众所周知的(参看 Kabat, E. A 等人(1991), 免疫目的蛋白序列(Sequence of Protein of Immunological Interest, 第五版, 美国健康与人类服务部, NIH 出版号 No. 91-3242), 而包括这些区域的 DNA 序列可以通过标准的 PCR 扩增获得。轻链恒定区可以是  $\kappa$  或  $\lambda$  恒定区, 但最优选的是  $\kappa$  恒定区。

为了创造 scFv 基因, 将 VH 和 VL 编码 DNA 可操作地连接到编码

可弯曲接头，如氨基酸序列 (Gly4-Ser) 3 的编码 DNA 上，使得 VH 和 VL 序列能被表达成一个连续的单链蛋白，而 VL 和 VH 区通过可弯曲的接头连接在一起（参看 Bird 等人 (1988) Science242:423-426; Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883; McCafferty 等人, Nature(1990) 348:552-554）。

为了表达本发明的抗体，或抗体片段，用上述的方法获得编码部分或全长轻链和重链的 DNA，然后插入表达载体，使得这些基因可操作地连接到转录和翻译控制序列上。此处“可操作地连接”指的是抗体基因连接到载体中，使得载体中的转录和翻译控制序列能发挥调节抗体基因转录和翻译的功能。选择和使用的宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。抗体轻链和重链基因可以插入单独的载体中，或者更典型的是插入同一个载体中。通过标准的方法将抗体基因插入表达载体中（如连接抗体基因和载体上互补的限制性酶切位点，如果没有酶切位点，则进行钝末端连接）。在将 D2E7 或 D2E7 相关轻链或重链基因插入载体之前，表达载体已经携带有抗体恒定区序列。例如，一种将 D2E7 或 D2E7 相关 VH 或 VL 序列转变成全长抗体基因的方法就是将它们插入分别携带有重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中，使得 VH 片段可操作地连接到载体的 CH 片段上，而 VL 片段可操作地连接到载体的 CL 片段上。此外，或者说另一种选择，重组表达载体编码一段信号肽，它有助于抗体链从宿主细胞中分泌出来。抗体链基因可以克隆到载体中，使得信号肽按阅读框连接到抗体基因的氨基端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽，也可以是异源信号肽（即非免疫球蛋白的信号肽）。

除了抗体链基因，本发明重组表达载体携带的调节序列能调控抗体链基因在宿主细胞中的表达。术语“调控序列”包括启动子，增强子以及别的表达控制元件（如多聚腺苷酸信号），它们能控制抗体链基因的转录或翻译。这些调控序列在诸如 Goeddel 的“基因表达技术：酶学方法” 185, Academic 出版社, San Diego, CA (1990) 这样的文献中介绍了。本领域的技术人员应该意识到表达载体的设计，包括调控序列的选择依赖于所选择转化的宿主细胞，所需蛋白的表达水平等。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括病毒元件，它能指导蛋白在哺乳动物中高水平的表达，如衍生自巨细胞病毒 (CMV)（如

CMV 启动子/增强子), 猿病毒 40 (SV40) (如 SV40 启动子/增强子), 腺病毒(如腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP)) 以及多瘤病毒的启动子和/或增强子。对于病毒调控元件及其序列的进一步介绍参看 Stinski 的美国专利 No5168062, Bell 等人的美国专利 No4510245 以及 5 Schaffnet 等人的美国专利 No. 4968615。

除了抗体链基因和调控序列, 本发明的重组表达载体可以携带别的序列, 如调控载体在宿主细胞中复制的序列(如复制起点)以及选择标记基因。选择标记基因有助于载体导入的宿主细胞的选择(参看美国专利 No4399216, 4634665 和 5179017, 所有的专利都是 Axel 等 10 人的)。例如, 典型的选择标记基因使得载体导入的宿主对药物如 G418, 潮霉素或氨基蝶呤有抗性。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因(用氨基蝶呤在 dhfr<sup>-</sup>宿主细胞中选择/扩增)和 neo 基因(用 G418 选择)。

为了表达轻链和重链, 用标准技术将编码重链和轻链的表达载体 15 转入宿主细胞。不同形式的术语“转化”包括范围广的通用技术, 这些技术将外源 DNA 导入原核或真核宿主细胞, 如电穿孔, 磷酸钙沉淀, DEAB 葡聚糖转染等。尽管从理论上说, 本发明的抗体可以在原核或真核宿主细胞中表达, 但在真核细胞, 尤其是哺乳动物宿主细胞中表达抗体是最优选, 因为真核细胞, 尤其是哺乳动物细胞比原核细胞更可能 20 装配和分泌正确折叠并具有免疫活性的抗体。据报道抗体基因在原核细胞中不能有效地表达高产量有活性的抗体 (Boss, M. A 和 Wood, C. R (1985), Immunology Today 6: 12-13)。

表达本发明重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) (包括在 Urlaub 和 Chasin (1980) Proc. Natl. 25 Acad. Sci. USA 77: 4216-4220 中介绍的 dhfr<sup>-</sup>细胞, 它和 DHFR 选择标记一块使用, 这和 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621 中介绍的一样), NS0 骨髓细胞, COS 细胞和 SP2 细胞。当编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞时, 培养宿主细胞一段时间, 使得抗体在宿主细胞中 30 表达, 从而产生抗体, 或者更优选的是将抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中。通过标准的方法从培养基中回收抗体。

宿主细胞也能被用来产生完整抗体的部分, 如 Fab 片段或 scFv

分子。应该可以理解上述方法的修改也在本发明的范围之内。例如，用编码本发明抗体轻链或重链（但不是一起）的 DNA 转染宿主细胞是所需的。也可利用重组 DNA 技术来去掉轻链或重链或两者编码 DNA 中对结合 hTNF $\alpha$  没必要的部分或所有 DNA。这些截短 DNA 表达的分子也

5 包括在本发明的抗体范围之内。此外，利用标准的化学交联方法将本发明的抗体和第二个抗体交联，就能形成双价的抗体，在这种抗体中，一条重链和一条轻链是本发明的抗体，而另外一条重链和轻链对非 hTNF $\alpha$  抗原特异。

在一个抗体或其抗原结合片段重组表达的优选系统中，通过磷酸钙介导转染将编码抗体重链和轻链的重组表达载体导入 dhfr-CHO 细胞中。在这个重组表达载体中，抗体重链和轻链每一条都可操作地连接到 CMV 增强子/AdMLP 启动子调控元件上，驱动基因转录产物高水平表达。重组表达载体也携带有 DHFR 基因，使得能利用氨基蝶呤来选择/扩增转染了载体的 CHO 细胞。培养选择的转化细胞，使得抗体重

10 链和轻链表达，而后从培养基中回收完整抗体。用标准的分子生物学技术来制备重组表达载体，转染宿主细胞，选择转化子，培养宿主细胞并从培养基中回收抗体。

除了本发明公开的 D2E7 或其抗原结合片段或 D2E7 相关抗体，本发明的重组人抗体可以通过筛选重组组合抗体文库进行分离，优选的是 scFv 噬菌体展示文库，利用人 VL 和 VH cDNAs 制备，人 VL 和 VH cDNAs 是从人淋巴细胞 mRNA 中制备来的。制备和筛选这样的文库的方法是本领域众所周知的。除了商业上购买的产生噬菌体展示文库的试剂盒（例如 Pharmacia 的重组噬菌体抗体文库，目录号 No27-9400-01；以及 Stratagene 的 SurfZAP<sup>TM</sup> 噬菌体展示试剂盒，目录号

20 No240612），特别容易用来产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂可以在诸如 Ladner 等人的美国专利 No. 5223409；Kang 等人的 PCT 出版物 No. W092/18619；Dower 等人的 PCT 出版物 No91/17271；Winter 等人的 PCT 出版物 No92/20791；Markland 等人的 PCT 出版物 No. W092/15679；Breitling 等人的 PCT 出版物

25 No. W093/01288；McCafferty 等人的 PCT 出版物 No. W092/01047；Garrard 等人的 PCT 出版物 No. W092/09690；Fuch 等人（1991）Bio/Technology9: 1370-1372；Hay 等人（1992）Hum

Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse 等人 (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty 等人, Nature (1990) 348:552-554; Griffiths 等人 (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins 等人 (1992) J. Mol. Biol 226:889-896; Clackson 等人 (1991) Nature 352:624-628; Gram 等人 (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard 等人 (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom 等人 (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137 以及 Barbas 等人 (1991) PNAS 88:7978-7982 这些文献中找到。

在一个优选的实施方案中, 为了分离对 hTNF $\alpha$  具高亲和力和低解离常数的人抗体, 首先通过表位印记法, 利用对 hTNF $\alpha$  具高亲和力和低解离常数的鼠源抗 hTNF $\alpha$  抗体 (如 MAK195, 杂交瘤, 它的存贮号是 ECACC87050801) 来筛选具相似 hTNF $\alpha$  结合活性的人重链和轻链序列, 该方法在 Hoogenboom 等人的 PCT 出版物 No. W093/06213 中介绍了。这个方法中使用的抗体文库优选的是 scFv 文库, 它制备和筛选的方法和 McCafferty 等人的 PCT 出版物 No. W092/01047, McCafferty 等人 Nature (1990) 348:552-554 以及 Griffiths 等人, (1993) EMBO J 12:725-734 等文献中介绍的一样。scFv 抗体文库优选的是用重组人 TNF $\alpha$  做抗原进行筛选。

一旦最初的人 VL 和 VH 片段被筛选出来, 利用“混合与匹配”试验来选择优选的 VL/VH 配对组合物, 在这个试验中, 通过和 TNF $\alpha$  结合, 选择出不同对初筛的 VL 和 VH 片段。此外, 为了进一步改善 TNF $\alpha$  结合的亲和力以及/或降低解离速率常数, 优选的 VL/VH 对中的 VL 和 VH 片段被随机突变, 优选的是在 VH 和/或 VL 的 CDR3 区发生突变, 突变过程和体内体细胞突变过程类似, 体细胞突变是在天然免疫反应中, 负责抗体亲和力成熟的。利用和 VH CDR3 或 VL CDR3 分别互补的 PCR 引物, 扩增 VH 和 VL 区, 在体外完成亲和力成熟, 在 PCR 引物的某些位置引入四种核苷酸的随机混合物, 使得产生的 PCR 产物能编码 VH 和 VL 片段, 在这些片段的 CDR3 区, 已经导入了随机的突变。这些随机突变的 VH 和 VL 片段能通过和 hTNF $\alpha$  结合重新筛选, 而那些对 hTNF $\alpha$  结合表示出高的亲和力和低的解离速率的序列能被选择出来。

从重组的免疫球蛋白展示文库筛选和分离本发明的抗 hTNF $\alpha$  抗体后, 编码选择的抗体的核苷酸能从展示包装 (如噬菌体基因组) 中回

收，并通过标准的重组 DNA 技术亚克隆到别的表达载体中。如果有需要，可以对这些核酸作进一步操作，创造本发明别的抗体形式（如连接到编码别的免疫球蛋白结构域的核酸上，如别的恒定区）。为了表达通过筛选组合文库获得的重组的人抗体，编码抗体的 DNA 被克隆到重组的表达载体，并导入哺乳动物宿主细胞，进一步详细地介绍如上面的 II 部分。

本发明的抗体和抗体部分以及用来治疗自体免疫疾病的药物可以分别混合，或混合成适合在本发明介绍的方法中施用给受试者的药用组合物。典型的药用组合物包括本发明的抗体（或抗体部分）和/或一或多种药物，这些药物用来治疗自体免疫性疾病，还包括药用上可接受的载体。如本发明使用的那样，“药用上可接受的载体”包括任何以及所有溶剂，分散介质，涂层，抗细菌和抗真菌的试剂，等渗试剂以及吸收延迟试剂等，它们在生理上相容，并适合在本发明介绍的方法中施用给受试者。药用上可接受的载体包括一或多种水，盐，磷酸缓冲盐，葡萄糖，甘油，乙醇等，以及它们的组合。在许多情况下，优选的组合物中包括等渗试剂，例如，蔗糖，诸如甘露醇和山梨糖醇这样的多元醇，或氯化钠。药用上可接受的载体可以进一步包括微量的辅助试剂，如润湿剂或乳化剂，防腐剂或缓冲液，它们能增强抗体或抗体部分的货架期或有效性。

本发明的组合物可以有多种形式。这些形式包括液体，半固体，和固体剂型，如液体溶液（如注射和灌注液），或分散性粉剂或悬浮液，药片，药丸，粉末，脂质体和栓剂。优选的形式取决于给药的方式和治疗应用。典型的优选组合物形式是注射液或灌注液，如那些与别的抗体对人进行被动免疫的组合物一样。优选的给药方式是肠胃外给药方式（如静脉内给药，皮下给药，腹膜内给药，肌内给药）。在一个优选的实施方案中，含有抗体的组合物通过注射给药。在另一个实施方案中，抗体通过肌内注射给药。在一个特别优选的实施方案中，抗体通过皮下注射给药。

药用组合物典型的是应该灭菌，并且在制造和贮存条件下保持稳定。组合物可以配制成溶液，微乳液，分散相，脂质体，或别的适合高药浓度的规则结构。灭菌的注射液通过如下方式制备：将溶解在合适溶剂中的活性化合物（抗体或抗体部分）按所需量和上面列举的



一种成份，或成分的组合物混合，然后进行过滤灭菌。总之，分散相的制备是将活性化合物混合到灭菌的载体中，该载体含有基本的分散介质，以及上面列举的别的必需成份。为了制备用于配置灭菌注射液的灭菌粉末，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，这样能从以前  
5 过滤灭菌的溶液中获得活性成份粉末以及任何别的必须成份。可以通过一些方法来保持溶液的流动性，如利用注入卵磷脂这样的涂层，保持分散相中必须粒子的大小，以及利用表面活性剂。在注射组合物中添加能延长吸收的试剂，可以延长注射组合物的吸收，这样的试剂如单硬脂酸盐和明胶。

10 本发明的抗体和抗体部分能通过各种本领域已知的方法施用，尽管有很多的治疗用处，但优选的给药途径/方式是皮下注射。熟练的技术人员将会意识到，给药路线/方式是根据所需目的而变化的。在某些实施方案中，活性化合物和载体一块制备，这样就能防止化合物被快速降解，这样制备如可释剂型，包括植入物，穿透皮肤药贴以及  
15 微胶囊传输系统。可以使用生物降解的，生物适合的多聚体，如乙烯-醋酸乙烯共聚物，聚乙二醇（PEG），聚酸酐，聚羟基乙酸，胶原蛋白，聚原酸酯和聚乳酸。许多制备这种制剂的方法都是专利，或一般是本领域的技术人员所已知的。参看“缓释和控释药物传输系统”，J. R. Robinson 编辑，Marcel Dekker 公司，纽约，1978。

20 在某些实施方案中，本发明的抗体或抗体部分可以口服，例如，和惰性稀释液，可同化的食用载体一起口服。也可将化合物（如果有必要的话，和别的成份）装入一个硬或软的贝壳明胶胶囊中，压缩成药片，或直接掺入受试者的食物中。对于口服治疗，化合物可以和赋形剂混合在一起，使用的形式有可消化药片，口含片剂，片剂，胶囊，  
25 酏剂，混悬剂，糖浆剂，糯米纸囊剂等。如果用非肠胃外方法施用本发明化合物，有必要用抑制化合物失活的物质包被化合物或和化合物一块施用。

也可在组合物中加入补充的活性化合物。在某些实施方案中，本发明的抗体或抗体部分和一或多种别的治疗试剂共同配制和/或共同  
30 施用。例如，本发明抗 hTNF $\alpha$  抗体或抗体部分可以和一或多种 DMARD，或一或多种 NSAID，或一或多种别的能结合其它靶蛋白的抗体（如能结合其他细胞因子和细胞表面分子的抗体），一或多种细胞因子，可

溶性 TNF $\alpha$  受体 (参看 PCT 出版物 No. W094/06476), 和/或一或多种能抑制 hTNF $\alpha$  产量或活性(如在 PCT 出版物 No. W093/19751 中介绍的环己胺-ylidene 衍生物)的化学物质或它们的任何组合物共同配制和/或共同施用。此外, 本发明一或多种抗体可以和两或多种前述的治疗试剂组合使用。这种组合治疗可以有利地施用更低剂量的治疗试剂, 这样就能避免在患者中伴随单一制剂治疗出现的可能的副作用, 并发症或低水平反应。

本发明的药用组合物还包括“治疗效应数量”或“预防效应数量”的本发明抗体或抗体部分和/或其他药物。“治疗效应数量”指的是在必要的剂量和时期中, 数量能有效地达到所需的治疗效果。治疗效应数量可以根据诸如疾病状态, 年龄, 性别和个体重量以及抗体或抗体部分或别的用来治疗自体免疫疾病的药物在个体中诱导所需反应的能力等因素而变化。治疗效应数量也是这么一种数量, 在这种数量上, 抗体或抗体部分或其他药物的副作用被有利的作用超过。“预防效应数量”指的是在必要的剂量和时期中, 数量能有效地达到所需的预防效果。典型地, 因为预防剂量是在疾病的更早期或之前施用给受试者, 因此, 预防效应数量要小于治疗效应数量。

调整剂量方案, 提供最优的所需反应(例如治疗或预防反应)。例如, 可以一次施用大剂量, 可以在一段时间内施用若干次剂量, 也可以根据治疗状态的情况按比例减少或增加剂量。把肠胃外组合物配制成剂量单位形式是特别有利的, 给药简单, 剂量一致。本发明使用的剂量单位形式指的是生理上不连续的单位, 它适合作为要治疗的受试者的单一剂量, 每个单位含有预定数量的活性化合物, 计算它能和必需的药用载体产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格是根据和直接依赖于(a)活性化合物的唯一特征和将要达到的特定治疗或预防效果而规定的, (b)混合这种活性化合物领域的内在限制, 这种化合物能治疗个体的敏感性。

本发明抗体或抗体部分的示范性, 没有限制的治疗或预防效应数量范围是 10-100mg, 更优选的是 20-80mg, 最优选的是 40mg。应该注意到剂量值是随着状态减轻的类型和严重性而变化的。应该进一步理解, 对于任何特定的目的, 一段时间内根据个体的需要和控制或监督组合物的施用的人的职业判断, 可以调整特定的剂量方案, 而且本发

明提出的剂量范围只是示范性的，并不打算限制本发明声称权力要求的组合物的范围和实践。

本发明的抗体，或抗体部分可以结合的治疗类风湿性关节炎的试剂包括如下：非类固醇类抗炎药（NSAIDs），细胞因子抑制抗炎药  
5 （CSAIDs）；CDP-571/BAY-10-3356（人源抗 TNF $\alpha$  抗体，Celltech/Bayer）；cA2（嵌合的抗 TNF $\alpha$  抗体，Centocor）；75kdTNFR-IgG（75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白；Immunex；参看 Arthritis & Rheumatism（1994）Vol137, S295；J Invest. Med（1996）Vol 44, 235A）；55kd TNFR-IgG（75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白；  
10 Hoffmann-LaRoche）；IDEC-CE9.1/SB210396（非损耗性灵长源抗 CD4 抗体；IDEC/SmithKline；参看 Arthritis & Rheumatism（1995）Vol138, S185）；DAB486-IL-2 和/或 DAB389-IL-2（IL-2 融合蛋白；Seragen；参看 Arthritis&Rheumatism（1993）Vol136, 1223）；Anti-Tac（人源抗-IL-2R $\alpha$ ；Protein Design Labs/Roche）；IL-4（抗炎性细胞  
15 因子；DNAX/Schering）；IL-10（SCH52000，重组 IL-10，抗炎性细胞因子，DNAX/Schering）；IL-4；IL-10 和/或 IL-4 激动剂（激动剂抗体）；IL-1RA（IL-1 受体激动剂；Synergen/Amgen）；TNF-bp/s-TNFR（可溶性的 TNF 结合蛋白；参看 Arthritis & Rheumatism（1996）Vol139, No9（增刊），S284；Amer. J. Physiol-Heart and Circulatory  
20 Physiology（1995）Vol126837-42 页）；R973401（磷酸二酯酶 IV 型抑制剂，参看 Arthritis&Rheumatism（1996）Vol139, No9（增刊），S282）；氨甲蝶呤；沙利度胺（参看 Arthritis&Rheumatism（1996）Vol139, No9（增刊），S282）以及沙利度胺相关药物（如 Celgen）；来氟米特（抗炎症和细胞因子抑制剂，参看 Arthritis & Rheumatism（1996）Vol 39,  
25 No9（增刊），S131；Inflammation Research（1996）45 卷，103-107 页）；氨甲环酸（纤溶酶原激活抑制剂，参看 Arthritis & Rheumatism（1996）Vol 39, No9（增刊），S284）；T-614（细胞因子抑制剂，参看 Arthritis&Rheumatism（1996）Vol139, No9（增刊），S282）；前列腺素 E1（参看  
30 Arthritis&Rheumatism（1996）Vol139, No9（增刊），S282）；替尼达普（非类固醇类抗炎药，参看 Arthritis & Rheumatism（1996）Vol139, No9（增刊），S280）；萘普生（非类固醇类抗炎药，参看 Neuro

Report(1996)第7卷,1209-1213页);美洛昔康(非类固醇类抗炎药);布洛芬(非类固醇类抗炎药);吡洛昔康(非类固醇类抗炎药);双氯芬酸(非类固醇类抗炎药);吲哚美辛(非类固醇类抗炎药);柳氮磺吡啶(参看 Arthritis&Rheumatism(1996)Vol39,No9(增刊), S281); 5 硫唑嘌呤参看 Arthritis&Rheumatism(1996)Vol39,No9(增刊), S281); ICE 抑制剂(白介素 1 $\beta$  转化酶抑制剂); zap-70 和/或 lck 抑制剂(酪氨酸激酶 zap-70 或 lck 抑制剂); VEGF 抑制剂和/或 VEGF-R 抑制剂(血管内皮细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子受体抑制剂;血管生成抑制剂);皮质类固醇抗炎药(如 SB203580); 10 TNF 转换酶抑制剂;抗 IL-12 抗体;白介-11(参看 Arthritis & Rheumatism(1996)Vol39,No9(增刊), S296);白介-13(参看 Arthritis & Rheumatism(1996)Vol39,No9(增刊), S308);白介-17 抑制剂(参看 Arthritis & Rheumatism(1996)Vol39,No9(增刊), S120);金,青霉胺,氟喹,羟化氟喹,苯丁酸氮芥,环磷酰胺,环孢霉素,全淋巴照射,抗胸腺细胞球蛋白,抗 CD4 抗体,CD5 毒素,口服肽和胶原蛋白,氟苯扎利钠,细胞因子调节试剂(CRAs)HP228 和 HP466(Houghten Pharmaceuticals 公司);ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡核苷酸(ISIS 2302;Isis Pharmaceuticals 公司);可溶性补体受体 1(TP10;T Cell Science 公司);强的松;奥古蛋白,氨基葡聚糖聚硫酸,二甲胺四环素,抗 IL2R 抗体,鱼油和植物油(鱼和植物种子脂肪酸,参看 Deluca 等人(1995)Rheum. Dis. Clin. North Am21: 759-777);金诺,苯基丁氮酮,甲氧灭酸,氟灭酸,静脉注射免疫球蛋白,齐留通,霉酚酸(RS-61443);他克莫司(FK-506);西罗莫司(雷帕霉素);安普立糖(therafectin);克拉屈滨(2-氟脱氧腺苷)以及阿扎立平。 25

本发明的抗体,或抗体部分可以结合的治疗炎症性肠病的试剂包括如下:布地奈德,表皮生长因子,皮质类固醇;环孢素;柳氮磺吡啶,对氨基水杨酸,6-巯基嘌呤,硫唑嘌呤,甲硝唑,脂氧合酶抑制剂,美沙拉嗪,奥沙拉秦,巴柳氮,抗氧化剂,血栓烷抑制剂,IL-1 30 受体拮抗物,抗-IL-1 $\beta$  单克隆抗体;抗-IL-6 单克隆抗体,生长因子;弹性蛋白酶抑制剂,吡啶基咪唑化合物,CDP-571/BAY-10-3356(人源化的抗 TNF $\alpha$  抗体, Celltech/Bayer); cA2(嵌合的抗 TNF $\alpha$  抗体,

Centocor); 75kdTNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参看 Arthritis & Rheumatism (1994) Vol37, S295; J Invest. Med (1996) Vol44, 235A); 55kd TNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); 白介素-10 (SCH52000; Schering Plough); 5 IL-4; IL-10 和/或 IL-4 激动剂(激动剂抗体); 白介素-11; 葡萄糖醛酸或右旋糖苷交联的泼尼松龙前药, 地塞米松或布地奈德, ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡核苷酸 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals 公司); 可溶性补体受体 1 (TP10; T Cell Science 公司); 缓慢释放的美沙拉嗪, 血小板激活因子 (PAF) 拮抗物, 环丙沙星和利诺卡因。

10 本发明的抗体, 或抗体部分可以结合的治疗多发性硬化症的试剂包括如下: 皮质类固醇, 泼尼松龙, 甲泼尼龙, 硫唑嘌呤, 环磷酰胺, 环孢(菌)素, 氨甲蝶呤, 4-氨基吡啶, 替扎尼定, 干扰素- $\beta$ 1a (Avonex<sup>TM</sup>, Biogen); 干扰素- $\beta$ 1b (Betaseron<sup>TM</sup>, Chiron/Berlex); 共聚物 1 (Cop-1; Copaxone<sup>TM</sup>, Teva Pharmaceutical Industries 公司); 15 高压氧, 注射免疫球蛋白, 克拉屈滨, CDP-571/BAY-10-3356 (人源化的抗 TNF $\alpha$  抗体, Celltech/Bayer); cA2 (嵌合的抗 TNF $\alpha$  抗体, Centocor); 75kdTNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参看 Arthritis&Rheumatism(1994)Vol37, S295; J Invest. Med (1996) Vol44, 235A); 55kd TNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); IL-10; IL-4; IL-10 和/或 IL-4 激动剂(激动剂抗体)。

本发明的抗体, 或抗体部分可以结合的治疗败血症的试剂包括如下: 高渗盐溶液, 抗生素, 静脉注射  $\gamma$ -免疫球蛋白, 持续血液过滤, 卡巴培南类药物(美罗培南), 诸如 TNF $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-6 和/或 IL-8 25 这样的细胞因子的拮抗物, CDP-571/BAY-10-3356 (人源化的抗 TNF $\alpha$  抗体, Celltech/Bayer); cA2 (嵌合的抗 TNF $\alpha$  抗体, Centocor); 75kdTNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参看 Arthritis&Rheumatism(1994)Vol37, S295; J Invest. Med (1996) Vol44, 235A); 55kd TNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); 细胞因子调节试剂 (CRAs) HP228 和 HP466 (Houghten Pharmaceuticals 公司); SK&F107647 (低分子量肽, SmithKline Beecham); 四价脒基脲 CNI-1493 (Picower 研究 30

所), 组织因子通路阻抑因子 (TFPI, Chiron); PHP (化学修饰的血色素; APEX Bioscience); 铁结合剂和螯合物, 包括二乙烯三胺五乙酸铁 (III) 复合物 (DTPA 铁 (III); Molichem Medicines); 利索茶碱 (合成的小分子甲基黄嘌呤; Cell Therapeutic 公司); PGG 葡聚糖 (水溶性的  $\beta$ 1, 3 葡聚糖,  $\alpha$ - $\beta$  技术); 脂质重构的载脂蛋白 A-1, 抗内毒素抗体, E5531 (合成的脂质 A 拮抗物, Eisai America 公司); rBPI21 (人杀菌/通透性增加蛋白重组的 N 末端片段); 以及合成的抗内毒素肽 (SAEP; Biosynth Research 实验室)。

本发明的抗体, 或抗体部分可以结合的治疗成人呼吸窘迫综合征的试剂包括如下: 抗 IL-8 抗体, 表面活性剂补充疗法, CDP-571/BAY-10-3356 (人源化的抗 TNF $\alpha$  抗体, Celltech/Bayer); cA2 (嵌合的抗 TNF $\alpha$  抗体, Centocor); 75kdTNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参看 Arthritis & Rheumatism (1994) Vol137, S295; J Invest. Med (1996) Vol144, 235A); 55kd TNFR-IgG (75kDa TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche)。

抗 TNF $\alpha$  抗体和一或多种其他药物组合物的施用取决于疾病是否被 TNF $\alpha$  抑制所影响。本发明使用的术语“抗 TNF $\alpha$  抗体的施用对其有利的疾病”包括疾病和别的代谢紊乱, 在这些疾病和代谢紊乱中, 有证据显示或猜测代谢紊乱的供使者中的 TNF $\alpha$  对疾病的病理生理学发挥作用或是使疾病恶化的因素, 另外一种抗 TNF $\alpha$  抗体或其聚生物活性部分成功地用来治疗这种疾病。因此, 在 TNF $\alpha$  活性被损害的疾病中, 抑制 TNF $\alpha$  活性能减缓疾病的症状或进展, 或两种情况都能减缓。这样的疾病很明显, 例如, 在患疾病的受试者生物流体中, TNF $\alpha$  的浓度上升 (例如, 受试者血清, 血浆, 关节液等中的 TNF $\alpha$  的浓度上升), 这可以检测到, 例如, 如上面所述利用抗 TNF $\alpha$  抗体。这种疾病的例子很多, 在这些疾病中, TNF $\alpha$  的活性被削弱了。

#### A. 败血症

肿瘤坏死因子在败血症病理生理学中的作用已经得到公认, 它的生理学效果包括血压过低, 心肌抑制, 血管渗出症, 器官坏死, 刺激有毒刺激介质的释放和凝血瀑布反应的激活 (参看, Tracey, K. J. 和 Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45: 491-503; Russell, D 和 Thompson, R. C (1993) Curr. Opin. Biotech 4: 714-721)。因此, 本发

明的人抗体及抗体部分可以用来治疗任何临床环境下的败血症，包括败血症休克，内毒素性休克，革兰氏阴性败血症，中毒性休克综合征。优选的是抗体和抗体部分与用在治疗败血症中的其他药物一起使用。更优选的是其中的抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药，每两周一次，每次剂量为 40mg，和别的用于治疗败血症的药物一起使用。

此外，为了治疗败血症，本发明的抗 TNF $\alpha$  的抗体或抗体部分可以和一或多种别的治疗试剂一起给药，可以进一步减缓败血症，别的治疗试剂如白介素-1 抑制剂（如那些在 PCT 出版物 No. W092/16221 和 W092/17583 中介绍的），细胞因子白介素-6（参看 PCT 出版物 No. W093/11793）或血小板激活因子拮抗物（参看欧洲专利申请出版物 No. EP374510）。

此外，在一个优选的实施方案中，本发明的抗 TNF $\alpha$  的抗体或抗体部分施用给败血症患者亚群中的受试者，这些患者在治疗时 IL-6 的血清或血浆浓度高于 500pg/ml，而更优选的是 1000pg/ml（参看 Daum, L 等人的 PCT 出版物 No. W095/20978）。

#### B. 自体免疫性疾病

已经暗示肿瘤坏死因子在不同的自体免疫性疾病的病理生理中发挥了作用。例如，已经暗示 TNF $\alpha$  在类风湿性关节炎中能引起组织炎症坏死和关节破坏（参看 Tracy 和 Cerami, 同上, Arend, W. P. 和 Dayer, J-M (1995) *Arth. Rheum.* 38: 151-160; Fava, R. A 等人 (1993) *Clin. Exp. Immunol* 94: 261-266）。此外，也暗示 TNF $\alpha$  能促进胰岛细胞死亡和介导糖尿病中胰岛素的抗性（参看 Tracy 和 Cerami, 同上, PCT 出版物 No. W094/08609）。此外，还暗示 TNF $\alpha$  能介导对少突胶质细胞的细胞毒性，并且在多发性硬发症中的诱导炎症病斑（参看 Tracy 和 Cerami, 同上）。对嵌合和人源化的鼠源抗 hTNF $\alpha$  抗体是否能治疗类风湿性关节炎已经进行了临床试验（参看, Elliott, M. J 等人 (1994) *Lancet* 344: 1125-1127; Elliot, M. J 等人 (1994) *Lancet* 344: 1105-1110; Rankin, E. C 等人 (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34: 334-342）。

本发明的抗体，或抗体部分能被用来治疗自体免疫性疾病。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗自体免疫性疾病的药物一起使用，这是优选的。更优选的是抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药，每两

周一次，每次剂量为 40mg，和别的用于治疗自体免疫性疾病的药物一起使用，这甚至是更优选的。尤其是那些伴随有炎症的自体免疫性疾病，包括类风湿性关节炎，类风湿性脊椎炎，骨性关节炎和痛风性关节炎，过敏症，多发性硬发症，自体免疫性糖尿病，自体免疫性葡萄膜炎和肾病综合征。典型的，抗体或抗体部分是系统性给药，尽管对于某些疾病，在炎症位点局部施用抗体或抗体部分是有利的（如在类风湿性关节炎中局部施用到关节上，或局部施用给糖尿病溃疡，单独施用或和环己胺-ylidene 衍生物组合施用，它在 PCT 出版物 No. W093/19751 中介绍了）。

#### 10 C. 传染病

暗示肿瘤坏死因子参与介导不同传染病中的各种生物学效应。例如，暗示 TNF $\alpha$  能介导大脑炎症，以及微血管血栓和疟疾中梗塞形成（参看 Tracy 和 Cerami，同上）。也暗示 TNF $\alpha$  能介导大脑炎症，血脑屏障的崩溃，引发败血症休克症状以及激活脑膜炎的静脉梗塞（参看 Tracy 和 Cerami，同上）。也暗示 TNF $\alpha$  能诱导恶病质，刺激病毒扩增以及介导获得性免疫缺损综合征(AIDS)中中枢神经系统损伤（参看 Tracy 和 Cerami，同上）。因此，本发明的抗体，抗体部分能用来治疗传染病。抗体或抗体部分优选的是能和别的用在传染病治疗上的药物组合施用。更优选的是其中的抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药，每两周一次，每次剂量为 40mg，和别的用于治疗传染病的药物一起使用。具体而言，细菌性脑膜炎（参看欧洲专利申请出版物 No. EP585705），脑型疟疾，AIDS 和 AIDS 相关复合物（ARC）（参看欧洲专利申请出版物 No. EP230574），以及移植后出现的巨细胞病毒感染（参看 Fietze, E 等人（1994）Transplantation 58: 675-680）。本發明抗体，和抗体部分也能用来减缓伴随传染病的症状，包括有感染而引发的发烧和肌肉疼痛（如流行性感胃）和感染后出现的恶病质（如 AIDS 或 ARC 后）。

#### D. 移植

暗示肿瘤坏死因子是同种异体移植排斥和移植物抗宿主疾病（GVHD）的关键介质，还介导当大鼠抗体 OKT3 被用来抑制肾移植的排斥反应时出现的不利反应，OKT3 抗 T 细胞受体 CD3 复合物（参看，Tracey 和 Cerami 同上，Eason, J. D 等人（1995）Transplantation



59: 300-305; Suthanthiram, M 和 Strom, T. B (1994) *New Engl. J. Med.* 331: 365-375)。因此, 本发明的抗体或抗体部分能用来抑制移植排斥反应, 包括同种异体移植排斥和异种移植排斥以及抑制移植抗宿主疾病。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗移植排斥的药物一起使用, 这是优选的。更优选的是抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药, 每两周一次, 每次剂量为 40mg, 和别的用于治疗移植排斥的药物一起使用, 这甚至是更优选的。例如, 在一个实施方案中, 本发明的抗体或抗体部分与 OKT3 组合施用去抑制 OKT3 诱导的反应。在另一个实施方案中, 本发明的抗体或抗体部分和一或多种抗体组合施用, 这些抗体定向别的靶蛋白, 参与调节免疫反应, 如细胞表面分子 CD25 (白介素 2 $\alpha$  受体), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B-7) 和/或 CD86 (B7-2)。还是在另外一个实施方案中, 本发明的抗体或抗体部分和一或多种一般的免疫抑制剂, 如环孢素 A 或 FK506 组合施用。

#### 15 E. 恶性肿瘤

暗示肿瘤坏死因子能诱导恶病质, 刺激肿瘤生长, 增强转移的潜力以及介导恶性肿瘤的细胞毒性 (参看 Tracy 和 Cerami, 同上)。因此, 本发明的抗体或抗体部分被用来治疗恶性肿瘤, 抑制肿瘤生长或转移, 或减缓恶性肿瘤引发的恶病质, 或两者都能达到。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗恶性肿瘤, 抑制肿瘤生长或转移, 或减缓恶性肿瘤引发的恶病质, 或两者都能达到的药物一起使用, 这是优选的。更优选的是抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药, 每两周一次, 每次剂量为 40mg, 和别的用于治疗恶性肿瘤, 抑制肿瘤生长或转移, 或减缓恶性肿瘤引发的恶病质, 或两者都能达到的药物一起使用, 这甚至是更优选的。抗体或抗体部分可以系统性地或局部地施用到肿瘤位点。

#### F. 肺部疾病

暗示肿瘤坏死因子在成人呼吸窘迫综合征发挥作用, 包括刺激白细胞内皮细胞激活, 产生对肺泡细胞的细胞毒性, 以及诱导血管渗出综合征 (参看 Tracy 和 Cerami, 同上)。因此, 本发明的抗体或抗体部分被用来治疗不同的肺部疾病。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗肺部疾病的药物一起使用, 这是优选的。更优选的是抗体是

D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药，每两周一次，每次剂量为 40mg，和别的用于治疗肺部疾病的药物一起使用，这甚至是更优选的。具体而言，成人呼吸窘迫综合征（参看 PCT 出版物 No. W091/04054），休克肺，慢性肺部炎症疾病，肺类肉瘤病，肺纤维化和硅肺病。抗体或抗体部分可以系统性地或局部地施用到肺表面，例如可以以气雾剂的形式施用。

#### G. 消化肠道的病症

暗示肿瘤坏死因子在炎症性肠病病理生理学中发挥作用（参看 Tracy, K. J 等人（1986），Science234:470-474; Sun, X-M 等人（1988）J. Clin. Invest81:1328-1331; MacDonald, T. T., 等人（1990）Clin. Exp. Immunol81:301-305）。对嵌合鼠源抗 hTNF $\alpha$  抗体是否能治疗克隆氏症已经进行了临床试验（van Dullemen, H. M 等人（1995）Gastroenterology109:129-135）。本发明的抗体或抗体部分被用来治疗消化肠道的病症。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗消化肠道的病症的药物一起使用，这是优选的。更优选的是抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药，每两周一次，每次剂量为 40mg，和别的用于治疗消化肠道的病症的药物一起使用，这甚至是更优选的。具体而言，原发性发炎性肠道疾病，这种病包括两种综合症：克隆氏症和溃疡性结肠炎。

#### H. 心脏疾病

本发明的抗体或抗体部分被用来治疗不同的心脏疾病，包括心脏缺血（参看欧洲专利申请出版物 No. EP453898）以及心脏功能不全（心肌削弱）（参看 PCT 出版物 No. W094/20139）。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗心脏疾病的药物一起使用，这是优选的。更优选的是抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药，每两周一次，每次剂量为 40mg，和别的用于治疗心脏疾病的药物一起使用，这甚至是更优选的。

#### I. 神经疾病

本发明的抗体或抗体部分被用来治疗神经疾病。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗神经疾病的药物一起使用，这是优选的。更优选的是抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药，每两周一次，每次剂量为 40mg，和别的用于治疗神经疾病的药物一起使用，这甚至是更优选

的。

实验证据表明神经元组织的受损会释放过多的 TNF。因此，使用 TNF 拮抗物将会导致这些神经状态的改善。由髓鞘脱失性疾病（如多发性硬发症），免疫疾病，炎症，损伤或压迫症而引发的神经疾病发生的临床形式不一样，这取决于解剖部位，病因以及生理问题发生的自然史。所有这些疾病共同的特征是他们能引起持久的神经损伤，这种损伤发生的很快，并且不可逆，而且目前对这些疾病的治疗并不理想，通常需要手术或使用药物，或两种都需要，而这经常并不是完全成功的。这些神经疾病包括急性脊髓外伤，脊髓压迫，脊髓血肿，脊髓挫伤（这些病例通常是外伤造成的，如车祸或运动伤害造成的），神经压迫，最普遍的是椎间盘突出引起的坐股神经压迫，神经病和疼痛；也包括颈椎间盘突出，它能引起颈部神经压迫，腕管综合症（无 RA 的）；由癌症引发的急性或慢性脊髓压迫（通常是因为转移到了脊柱，例如从前列腺癌，乳癌或肺癌）；神经系统自体免疫性疾病，以及髓鞘脱失性疾病，最常见的情况是多发性硬发症。

别的用于治疗神经疾病的药物有类固醇类药物，如可的松，它用来治疗前述的神经问题和状态。进一步的用来治疗神经疾病，创伤，损伤以及压迫的药用化学物质，化合物以及试剂，具有不同的有机结构和代谢功能，它们在诸如美国专利 No5756482 和 5574022 这样的文献中公开了，它们整体被引作本发明的参考，它们公开了一些方法，这些方法通过共同使用固醇类激素或诸如孕烯醇酮和硫酸孕烯醇酮这样的类固醇前体物质与诸如吲哚美辛这样的非固醇类抗炎药物来削弱对损伤对神经系统和脊髓的生理伤害。

#### J. 别的疾病

本发明的抗体或抗体部分被用来治疗别的不同的疾病，在这些疾病中，TNF $\alpha$  的活性是有害的。别的由 TNF $\alpha$  参与了病理生理学，因此用本发明的抗体或抗体部分进行治疗的疾病和代谢紊乱包括发炎性骨病和骨骼溶蚀疾病（参看 Bertoline, D.R 等人（1986）Nature 319: 516-518; Konig, A 等人（1988）J. Bone. Miner. Res. 3: 621-627; Lerner, U. H 和 Ohlin, A (1993) J. Bone. Miner. Res. 8: 147-155; 和 Shankar, G 和 Stern, P. H (1993) Bone 14: 871-876），肝炎，包括酒精性肝炎（参看 McClain, C. J 和 Cohen, D. A (1989)

Hepatology9: 349-351; Felver, M. E 等人 (1990) Alcohol. Clin. Exp. Res14: 255-259 和 Hansen, J 等人 (1994) Hepatology20: 461-474) 和病毒性肝炎 (Sheron, N. 等人 (1991) J. Hepatol. 12: 241-245; 和 Hussain, M. J 等人 (1994) J. Clin. Pathol47: 1112-1115), 凝血  
5 素乱(参看 vander Poll, T 等人(1990) N. Engl. J. Med322: 1622-1627; 和 van der Poll, T 等人 (1991) Prog. Clin. Biol. Res367: 55-60), 烧伤 (参看 Giroir, B. P 等人 (1994) Am. J. Physiol. 267: H118-124; 和 Liu, X. S 等人 (1994) Burns20: 40-44), 再灌注损伤 (参看 Scales, W. E 等人(1994) Am. J. Physiol. 267: G1122-1127, Serrick, C  
10 等人 (1994) Transplantation58: 1158-1162; 和 Yao. Y. M 等人 (1995) Resuscitation29: 157-168), 形成疤痕(参看 McCauley, R. L 等人 (1992) J. Clin. Immunol12: 300-308), 疤痕组织形成和发热。这些抗体或抗体部分和别的用来治疗各种紊乱和疾病的药物一起使用, 这是优选的。更优选的是抗体是 D2E7。其中 D2E7 通过皮下给药,  
15 每两周一次, 每次剂量为 40mg, 和别的用于治疗各种紊乱和疾病的药物一起使用, 这甚至是更优选的。

本发明可以通过下列实施例进一步例证, 这些实施例不是一种限制。本申请通篇都引用的参考文献, 专利和出版的专利申请整体被引  
20 作本发明的参考。前述和下列公开内容都能应用, 并且是可能的, 在这种情况下, 这种组合在本发明的范围之内, 即便这种组合没有被陈述。

### 实施例

设计并实施研究来调查 D2E7 的安全性和效力, 每隔一周给 RA 患者施用一次 D2E7, 这些患者的疾病用目前的抗风湿治疗药 (包括已经  
25 接受的 DMARDs, NSAIDs 或类固醇类药物) 不足以治疗, 而且这个研究是多中心的, 随机的, 双盲的, 有安慰剂控制的研究, 在这个研究中, D2E7 每隔一周施用给患类风湿性关节炎的患者, 每次剂量 40mg, 持续多达 24 周, 这些患者的疾病用目前的抗风湿治疗药不足以治疗。研究中允许使用的抗风湿治疗药包括已经接受的疾病改善抗风湿病  
30 药物 (DMARDs), 非类固醇类的消炎药 (NSAIDs), 或类固醇。尽管使用了抗风湿治疗药, 但患者在筛选和基础访视时, 都必须记录到活动性疾病。DMARDs 以及并行施用的泼尼松 (每天 $\leq$ 10mg) 和 NSAIDs

在筛选前至少 28 天内必须是稳定施用的。此外，使用硫唑嘌呤或环孢素，或两种药都使用的患者应该终止这些疗法，并在筛选前经过 28 天的未用药期。在基线访视时，患者随机施用 D2E7 或安慰剂，这意味着开始了 24 天的安慰剂控制的时期。在研究的第 2, 4, 8, 12, 16, 5 20 和 24 周检查患者。不能满足或保持美国风湿病学会 20%改善标准 (ACR20) 反应的患者允许在 DMARD 或类固醇治疗药或者两种药物的剂量上有一次增长，在参与研究后 3 个月用另外一种 DMARD 进行治疗，或在咨询 Knoll 医疗监护后作进一步的调整。

750 位患者参与登记，随机选择 636 位患者，578 位患者完成研究，分析 636 位患者的结果。10

相反，所有随机挑取的患者均包括在人口统计学和安全分析中。

患者已经确切诊断患 RA 至少 3 个月 (根据 1987 年修订的 ACR 标准进行定义) 处于 ACR 功能 I 类, II 类或 III 类。这些患者的疾病用目前的抗风湿治疗药不足以治疗，且患者具有活动性 RA，肿胀关节数 15  $\geq 6$ ，触痛关节数  $\geq 9$ 。此外，如果剂量与每天  $\leq 10\text{mg}$  泼尼松相当，并且至少 28 天保持不变，那么使用糖皮质激素的患者也被考虑进行本研究。

D2E7 用 2ml 的玻璃瓶提供 (每个玻璃瓶中 D2E7 的浓度是 25mg/mL (即 40mg/1.6mL))，每个玻璃瓶中含有 1.6mL 用于注射的溶液，其中含有 40mg D2E7。D2E7 是由在奥地利的 Unterach 的 Ebewe 20 Arzneimittel GmbH 制造和提供。美国 MD, Rockville HBOC Bioscience 的 McKesson 负责 D2E7 的包装，贴标签，贮存并把 D2E7 分发给每个地方参与这项研究的研究者。D2E7 可以由受试者自己施用，每隔一周通过皮下一次注射 40mg，持续 24 周。研究药物的浓度是 25mg/mL。25 安慰剂/1.6mL (不含 D2E7 的枸橼酸盐-磷酸盐缓冲液) 由受试者自己施用，每隔一周皮下注射一次，持续 24 周。

患者持续接受研究前的抗风湿治疗药物剂量。研究中允许使用的抗风湿治疗药包括 DMARDs (羟基氯喹，来氟米特，氨甲蝶呤，肠胃外用的金，口服的金以及柳氮磺吡啶或者这些药物的组合以及与其他 30 DMARDs 的组合)，NSAIDs 及类固醇。DMARDs 以及并行施用的泼尼松 (每天  $\leq 10\text{mg}$ ) 和 NSAIDs 在筛选前至少 28 天内必须是稳定的。

尽所有的努力让患者能完成 24 周安慰剂控制期间的研究。因为

这个方案是设计来反映目前临床的实践，因此，下列附加的治疗和剂量调整是允许的：

在研究的最初 3 个月，可以允许最多 3 次关节内注射类固醇类药物，在每次注射后 28 天的关节检查期内，不对注射的关节进行评估。

- 5 因为耐受性，因此在研究中背景 DMARDs 和/或类固醇或 NSAID 治疗药可以调整一次，进一步的剂量调整只有在咨询 Knoll 医疗监护后才能开始。

如果记录到了效力缺乏（即和基础访视比较后，不能达到 ACR20 反应），可进行下列步骤：

- 10 背景 DMARD 和/或类固醇治疗药（假设泼尼松的剂量保持 $\leq 10\text{mg/天}$ ）的剂量会有一次增加。

在 3 个月时，或 3 个月后，开始上列别的 DMARD 治疗。

背景抗风湿药物进一步的剂量调整只有在咨询 Knoll 医疗监护后才能开始。

- 15 使用硫唑嘌呤或环孢（菌）素，或两种药都使用的患者应该终止这些治疗药，并在筛选前进行 28 天的不用药期。在研究中不能使用这些治疗药。

- 20 并行施用的治疗药的定义是那些在研究之前使用，并在研究中持续施用的治疗药，或在研究中开始施用的治疗药。对所有随机的患者在优选的时期，由治疗小组提出并行施用的治疗药。

根据 CRF 研究者的说明提示，并行施用的治疗药被分成“RA 特异的”和“非 RA 特异的”。在研究中，所有的患者都并行施用了某种形式的 RA 特异药物（DMARD 或非 DMARD）。

RA 特异的并行 DMARD 治疗药：

- 25 对所有的随机患者以优选的方式及治疗小组描述并行 DMARD 治疗，结果示于表 1 中。

表 1 随机治疗小组中最频繁报道<sup>a</sup>的 RA 特异的 DMARD 并行治疗的患者数目 (%)

并行治疗 <sup>b</sup>	D2E7 (N=318)	安慰剂 (N=318)
至少一种相关 RA 特异的并行 DMARD 治疗	261 (82.1)	270 (84.9)
氨甲蝶呤	178 (56.0)	199 (62.6)
抗疟药	75 (23.6)	82 (25.8)
来氟米特	42 (13.2)	48 (14.8)
柳氮磺吡啶	29 (9.1)	33 (10.4)
金制剂	19 (6.0)	18 (5.7)

<sup>a</sup> 在全部的≥5%的患者中出现  
<sup>b</sup> 患者可出现于一个以上组别

在研究中，大多数随机挑取的患者（636 个人中有 531 个 [83.5%]）使用了一或多种并行 DMARD 治疗药物（318 个 D2E7 治疗的患者中有 261 个 [82.1%]，318 个安慰剂治疗的患者中有 270 个 [84.9%]）。总数为 105 的患者没有使用 DMARDs（318 个 D2E7 治疗的患者中有 57 个 [17.9%]，318 个安慰剂治疗的患者中有 48 个 [15.1%]），356（636 的 56.0%）个患者施用一种 DMARD（318 个 D2E7 治疗的患者中有 184 个 [57.9%]，318 个安慰剂治疗的患者中有 172 个 [54.1%]），而 175 个患者（636 的 27.5%）使用了 2-4 种不同的 DMARDs（318 个 D2E7 治疗的患者中有 77 个 [24.2%]，318 个安慰剂治疗的患者中有 98 个 [30.8%]）。

在研究中，D2E7 治疗组使用了平均 1.10 种的 DMARDs，而安慰剂治疗组使用了平均 1.21 种不同的 DMARDs。

最频繁报道的并行 DMARD 治疗药是氨甲蝶呤，636 个患者中的 377 个使用（59.3%）（318 个 D2E7 治疗的患者中有 178 个 [56.0%]，318 个安慰剂治疗的患者中有 199 个 [62.6%]）了这种药物。另外三个最常用的并行 DMARD 治疗药是抗疟药（即氯喹，羟基氯喹）（59.3%）（636 个患者中的 24.7%：318 个 D2E7 治疗的患者中的 23.6%，318 个安慰剂治疗的患者中的 25.8%），来氟米特（636 个患者中的 13.8%：318 个 D2E7 治疗的患者中的 13.2%，318 个安慰剂治疗的患者中的 14.5%），以及柳氮磺吡啶（636 个患者中的 9.7%：318 个 D2E7 治疗的患者中的 9.1%，318 个安慰剂治疗的患者中的 10.4%）。在使用 RA 特异的并行 DMARD 治疗药的频率方面，D2E7 治疗和安慰剂治疗的患者没有相应的差异。

RA 特异的非 DMARD 并行治疗药：

对所有的随机患者以优选的方式及治疗小组描述 RA 特异的非 DMARD 并行治疗，结果示于表 2 中。

表 2 随机治疗小组中最频繁报道<sup>a</sup>的 RA 特异的非 DMARD 并行治疗的患者数目 (%)

并行治疗 <sup>b</sup>	D2E7 (N=318)	安慰剂 (N=318)
至少一种相关 RA 特异的并行非 DMARD 治疗	315 (99.1)	304 (95.6)
泼尼松	141 (44.3)	146 (45.9)
叶酸	88 (27.7)	68 (27.0)
塞来考昔	77 (24.2)	63 (28.1)
罗非考昔	46 (14.2)	39 (12.3)
对乙酰氨基酚	99 (12.3)	49 (15.4)
萘普生	33 (10.4)	40 (12.6)
布洛芬	28 (8.8)	23 (7.2)
甲泼尼龙	21 (6.6)	27 (8.5)
曲马多	17 (5.3)	14 (4.4)
Di-gesic	17 (5.3)	11 (3.5)
双氯酚酸	15 (4.7)	18 (5.7)
唯寇顿	14 (4.4)	21 (6.6)
曲安西龙	13 (4.1)	37 (11.6)
利多卡因	10 (3.1)	22 (6.9)

<sup>a</sup> 在全部的≥5%的患者中出现

<sup>b</sup> 患者可出现于一个以上组别

5 在研究中，636 个随机患者中总数为 619 的患者 (97.3%) 使用了一或多种并行非 DMARD 治疗药物 (318 个 D2E7 治疗的患者中有 315 个 [99.1%]，318 个安慰剂治疗的患者中有 304 个 [95.6%])。

10 最频繁报道的并行非 DMARD 治疗药是泼尼松，636 个患者中的 287 个使用 (45.1%) (318 个 D2E7 治疗的患者中有 141 个 [44.3%]，318 个安慰剂治疗的患者中有 146 个 [45.9%]) 这种药物。另外一个最常用的并行非 DMARD 治疗药是叶酸 (636 个患者中的 27.4%: 318 个 D2E7 治疗的患者中的 27.7%，318 个安慰剂治疗的患者中的 27.0%)。(叶酸被归类为 RA 特异的非 DMARD 并行治疗药或非 RA 特异的非 DMARD 并行治疗药，取决于它在 CRF 记录的含义，对于所有不是 RA 的用药而言，叶酸被归类为非 RA 特异的非 DMARD 并行治疗药)

15 塞来考昔 (636 个患者中的 25.2%: 318 个 D2E7 治疗的患者中的 24.2%，318 个安慰剂治疗的患者中的 26.1%)，和罗非考昔 (636 个患者中的 13.2%: 318 个 D2E7 治疗的患者中的 14.2%，318 个安慰剂治疗的患者中的 12.3%) 是另外两种最常用的 RA 特异的并行非 DMARD 治疗药。在使用 RA 特异的并行非 DMARD 治疗药的频率方面，D2E7 治疗和安慰剂治疗的患者没有相应的差异。

20

非 RA 特异的并行治疗药:



对所有的随机患者以优选的方式和治疗小组描述非 RA 特异的并行治疗药。

636 个随机患者中总数为 614 个的患者 (96.5%) 使用了一或多种非 RA 特异的并行治疗药 (318 个 D2E7 治疗的患者中有 306 个 [96.2%], 318 个安慰剂治疗的患者中有 308 个 [96.9%])。

最频繁报道的非 RA 特异的并行治疗药是多种维生素, 636 个患者中的 166 个使用 (26.1%) (318 个 D2E7 治疗的患者中有 78 个 [24.5%], 318 个安慰剂治疗的患者中有 88 个 [27.7%]) 了这种药物。另外三个最常用的非 RA 特异的并行治疗药是钙 (636 个患者中的 24.4%: 318 个 D2E7 治疗的患者中的 23.6%, 318 个安慰剂治疗的患者中的 25.2%), 叶酸 (636 个患者中的 22.2%: 318 个 D2E7 治疗的患者中的 21.4%, 318 个安慰剂治疗的患者中的 23.0%), 和流感病毒多价疫苗 (636 个患者中的 14.2%: 318 个 D2E7 治疗的患者中的 14.2%, 318 个安慰剂治疗的患者中的 14.2%)。叶酸被归类为 RA 特异的非 DMARD 并行治疗药或非 RA 特异的并行治疗药, 取决于在 CRF 记录的用药指示, 对于所有不是 RA 的用药指示, 叶酸被归类为非 RA 特异的并行治疗药)。在使用非 RA 特异的并行治疗药的频率方面, D2E7 治疗和安慰剂治疗的患者没有相应的差异。

疗效指标包括: 在第 24 周的 ACR20 反应; 在第 24 周的 ACR50 和 ACR70 反应; 从研究开始时到第 24 周的 ACR20, ACR50, ACR70 的 AUG (曲线下的面积); 首次出现 ACR20, ACR50, ACR70 的时间; ACR 数 (ACR-N); 从研究开始时到第 24 周, ACR 反应标准内容的变化 (触痛关节计数 [TJC], 肿胀关节计数 [SJC], 患者疼痛评估, 患者和医师对疾病活动力的整体评估, HAQ 和 C-反应蛋白 [CRP]); 用 SF-36, 健康利用指数 (HUI), 慢性病治疗 (FACIT) 疲劳评分检测到的从研究开始时到第 24 周生理功能的变化; Euro-QoL 问卷, 多重疲劳评分 (MAF), 受试者调查结果概况; 背景 DMARD 和/或类固醇治疗药物剂量增长的方式和时间; 对没有临床反应的开始新的 DMARD 治疗药; 类风湿因子 (RF); 和晨僵现象。

根据每 1,000 人一年所发生的频率, 百分比以及比率概括不良反应。利用 Pearson 卡方检验对 D2E7 和安慰剂组进行统计比较。体格检查, 实验室参数和胸部 X 光的变化根据统计特性以及异常值的频率

进行描述。还提供了转换表。根据统计特征描述生命体征。在第 24 周的 ACR20 (从研究开始时变化) 被定义为初级效应变量。利用卡方检验和  $\alpha=0.05$  的双尾显著性比较 D2E7 和安慰剂组的 ACR20 反应速率。对所有别的效应变量分别说明 (统计特性, 频率, 百分比, 可信区间), 并通过探查的 (exploratory) 双尾统计测试进行分析。对于离散数据, 使用 Pearson's 卡方检查, 而对于连续数据使用协方差分析模型 (ANCOVA), 在这个模型中, 治疗组作为因子, 而各自的研究开始时数值作为共变量。比较了 D2E7 和安慰剂组的人口统计特征和基本特征, 利用 Wilcoxon 等级和检验连续变量, 卡方检验离散变量。

#### 疗效结果:

比较目前现有的抗风湿治法中加入 D2E7 的患者与加入安慰剂的患者, 发现其主要的疗效指标 (ACR20) 统计上明显改善 (D2E7 为 53.0% 对安慰剂的 34.9%)。

ACR	D2E7 (N=315) N (%)	安慰剂 (N=315) N (%)
ACR20	167 (53.0)	110 (34.9)
ACR50	92 (29.2)	35 (11.1)
ACR70	47 (14.9)	10 (3.2)

在次要的疗效指标 ACR50, ACR70, ACR-N, 触痛关节数, 肿胀关节数, 患者和医师对疾病活动度的整体评估, 患者的疼痛评估, HAQ 的残疾指数, C-反应蛋白, 晨僵现象, 晨僵现象的持续时间, FACIT 疲劳评分, SF-36 10 个范畴中的 9 个, 以及 HUI16 个范畴中的 7 个中, 以 D2E7 治疗均在统计上具有显著改善。

就 ACR20, ACR50 和 ACR70 反应时间终点, ACR20, ACR50, ACR70 和 ACR-N 的 AUC, Euro-QoL, RF 和 MAF 评分而言, 也证明 D2E7 较安慰剂在治疗反应上有改善。

亚组分析证明和安慰剂组相比, 用 D2E7 治疗, 同时并行施用氨甲蝶呤, 抗疟治疗药, 柳氮磺吡啶, 别的 DMARDs 或并行 DMARDs 的数目 (即 0, 1, 2 或  $\geq 3$ ) 治疗的患者, ACR20, ACR50, ACR70, ACR-N 参数以及 ACR20, ACR50, ACR70 和 ACR-N 值的 AUC 有显著改善。而对所有测试的参数, 并行施用来氟米特和用安慰剂治疗的组相似。

表 3 在第 24 周对亚组进行 ACR20 分析

并行施用药物	ACR20			
	D2E7		安慰剂	
	全部N	% 应答	全部N	% 应答
氨甲蝶呤	178	58.7	199	36.2
抗疟药	76	50.7	82	32.9
来氟米特	42	33.3	48	37.0
柳氮磺吡啶	29	58.8	33	24.2
别的 DMARD	25	52.0	25	44.0
没有 DMARD	54	50.0	45	33.3
一种 DMARD	184	55.4	172	37.8
两种 DMARD	86	50.0	84	29.8
三或多种 DMARD	11	45.5	14	35.7

抗疟药 (如 HCG, 氯喹)

表4 ACR50, ACR70 和 ACR-N 反应速率: 随机挑取的治疗组中患者在第24周的反应

时间点	D2E7 (N=315)	安慰剂 (N=315)
	N (%)	N (%)
ACR50		
24周	92 (29.2) <sup>a</sup>	35 (11.1)
LOCF 24周	95 (30.2)	36 (11.1)
ACR70		
24周	47 (14.9) <sup>a</sup>	10 (3.2)
LOCF 24周	48 (15.2)	10 (3.2)
	平均±SD	平均±SD
ACR-N		
24周	20.3±55.2	0.8±47.0
LOCF 24周	21.2±55.9	1.0±47.0

<sup>a</sup>与安慰剂相比, 在统计意义上有显著差异 (p<0.001)。

表5 在第24周对亚组进行 ACR50, ACR70 和 ACR-N 分析

并行施用 药物	ACR50				ACR70				ACR-N			
	D2E7 (N=315)		安慰剂 (N=315)		D2E7 (N=315)		安慰剂 (N=315)		D2E7 (N=315)		安慰剂 (N=315)	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	平均±SD	N	平均±SD
氟甲蝶呤	178	30.9	199	12.1	178	15.2	199	2.0	178	26.5±42.3	199	3.2±43.0
抗疟药	75	29.3	82	13.4	75	12.0	82	2.4	75	20.0±45.5	82	3.4±43.4
来氟米特	42	14.3	48	10.9	42	0.0	46	8.7	42	-0.5±77.5	46	-4.5±57.3
柳氮磺吡啶	29	34.6	33	12.1	29	17.2	33	8.1	29	21.4±53.9	33	-1.7±41.5
别的												
DMARDs	26	24.0	25	8.0	25	18.0	25	4.0	25	25.3±33.9	25	6.7±49.1
没有 DMARD	54	27.8	45	8.7	54	18.5	45	0.0	54	12.9±68.2	45	-7.5±54.6
一种 DMARD	184	31.0	172	12.2	184	18.3	172	5.2	184	22.9±58.0	172	4.2±45.6
两种												
DMARDs	66	27.3	84	10.7	66	9.1	84	0.0	66	19.5±42.3	84	-4.3±46.9
三或多种												
DMARDs	11	18.2	14	14.3	11	8.1	14	7.1	11	20.1±37.2	14	18.5±30.5
抗疟药 (如 HCG, 氯喹)												

表6 ACR20, ACR50, ACR70 的反应时间: 随机治疗小组产生第一次反应的患者数 (%) (全样本分析, 排除#7 位点)

应答时间	ACR20		ACR50		ACR70	
	D2E7 (N=315)	安慰剂 (N=315)	D2E7 (N=315)	安慰剂 (N=315)	D2E7 (N=315)	安慰剂 (N=315)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
2周	106 (33.7)	27 (8.6)	31 (9.8)	3 (1.0)	9 (2.8)	0 (0.0)
4周	51 (16.2)	43 (13.7)	31 (9.8)	7 (2.2)	12 (3.8)	1 (0.3)
8周	52 (16.5)	40 (12.7)	34 (10.6)	12 (3.8)	12 (3.8)	2 (0.6)
12周	17 (5.4)	32 (10.2)	20 (6.3)	13 (4.1)	18 (5.7)	5 (1.6)
16周	13 (4.1)	20 (6.3)	20 (6.3)	15 (4.8)	18 (5.7)	7 (2.2)
20周	12 (3.8)	15 (4.8)	9 (2.8)	13 (4.1)	7 (2.2)	5 (1.6)
24周	3 (1.0)	10 (3.2)	10 (3.2)	11 (3.5)	8 (2.5)	3 (1.0)
无应答者	91 (28.4)	128 (40.8)	160 (50.8)	241 (76.8)	231 (73.3)	291 (92.4)

结论: 当 D2E7 加入患者正在用的 DMARD 治疗药 (如氟甲蝶呤, 抗疟药 [氯喹/羟基氯喹], 来氟米特和柳氮磺吡啶) 中时, 它的耐受性一般好。D2E7 的添加和任何不良反应的发生或方式不相关。此外, 这些不良反应数据不会因患者施用的并行 DMARDs (即 0, 1, 2, 或≥3)

的总数而受影响。

总之，一剂 40mg 的 D2E7 单独使用或和别的 DMARDs 组合使用时是安全的。

- 5 D2E7 治疗和患者中 RA 的显著改善相关，这些患者的疾病用目前的 DMARD 治疗药不能完全治愈。当和氨甲蝶呤，抗疟治疗药，柳氮磺吡啶，别的 DMARDs，或并行 DMARDs 的数目（即 0，1，2 或  $\geq 3$ ）组合使用时，和安慰剂相比，D2E7 的反应更大。最后，反应速率的改善不依赖使用的 DMARDs 的数目或种类。

#### 等同方案

- 10 本领域的技术人员通过使用常规实验方法，应该能获得本发明介绍的特定实施方案的等同实施方案。这样的等同方案也包括在下面的权利要求书中。

<110> Fischkoff, Steven  
Chartash, Elliot

<120> TNF- $\alpha$  抗体及另一药物的用途

<130> BBI-186

<140> 10/133, 715

<141> 2002-04-26

<160> 37

<170> FastSEQ 视窗第 4.0 版

<210> 1

<211> 107

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> D2E7 轻链可变区

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 121

<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>

<223> D2E7 重链可变区

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
          20           25           30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 3

<211> 9

<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>

<223> D2E7 轻链可变区 CDR3

<221> 变异体

<222> 9

<223> Xaa = 任何氨基酸

<400> 3

```

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
 1           5

```

<210> 4

<211> 12





<211> 11

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> D2E7 轻链可变区 CDR1

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala  
1                    5                    10

<210> 8

<211> 5

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> D2E7 重链可变区 CDR1

<400> 8

Asp Tyr Ala Met His  
1                    5

<210> 9

<211> 107

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 2SD4 轻链可变区

<400> 9

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



<210> 12

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> EP B12 轻链可变区 CDR3

<400> 12

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VL10E4 轻链可变区 CDR3

<400> 13

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VL100A9 轻链可变区 CDR3

<400> 14

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VLL100D2 轻链可变区 CDR3

<400> 15

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr

1

5

<210> 16

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VLL0F4 轻链可变区 CDR3

<400> 16

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

1

5

<210> 17

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> LOE5 轻链可变区 CDR3

<400> 17

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VLLOG7 轻链可变区 CDR3

---

<400> 18

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn  
1 5

<210> 19

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VLLOG9 轻链可变区 CDR3

<400> 19

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VLLOH1 轻链可变区 CDR3

<400> 20

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VLLOH10 轻链可变区 CDR3

<400> 21

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser  
1 5

<210> 22  
<211> 9  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL1B7 轻链可变区 CDR3

<400> 22  
Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr  
1 5

<210> 23  
<211> 9  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL1C1 轻链可变区 CDR3

<400> 23  
Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

<220>  
<223> VL0.1F4 轻链可变区 CDR3

<400> 24  
Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 25  
<211> 9  
<212> 蛋白质  
<213> 人工序列

---

<220>

<223> VL0.1H8 轻链可变区 CDR3

<400> 25

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> LOE7.A 轻链可变区 CDR3

<400> 26

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala

1 5

<210> 27

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 2SD4 重链可变区 CDR3

<400> 27

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn

1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VH1B11 重链可变区 CDR3

<400> 28

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys





<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VH1E4 重链可变区 CDR3

<400> 32

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr  
1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VH1F6 重链可变区 CDR3

<400> 33

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr  
1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> 3C-H2 重链可变区 CDR3

<400> 34

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr  
1 5 10

<210> 35

<211> 12

<212> 蛋白质

<213> 人工序列

<220>

<223> VH1-D2.N 重链可变区 CDR3

&lt;400&gt; 35

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn

1 5 10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D2E7 轻链可变区

&lt;400&gt; 36

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtc gggcatcaga aattacttag cctgggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattcactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

```

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D2B7 重链可变区

&lt;400&gt; 37

```

gaggatgcagc tggatggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgagg cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcaactggg cggcaagct 120
ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttggc atagtgggtca catagactat 180
gaggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgcgcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360
agt 363

```