



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103495165 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 08

(21) 申请号 201310394514. 5	<i>A61P 3/10</i> (2006. 01)
(22) 申请日 2002. 06. 05	<i>A61P 13/12</i> (2006. 01)
(30) 优先权数据	<i>A61P 31/00</i> (2006. 01)
60/296, 961 2001. 06. 08 US	<i>A61P 37/06</i> (2006. 01)
(62) 分案原申请数据	<i>A61P 35/00</i> (2006. 01)
02815654. 4 2002. 06. 05	<i>A61P 11/00</i> (2006. 01)
(71) 申请人 阿布维生物技术有限公司	<i>A61P 1/00</i> (2006. 01)
地址 百慕大汉密尔顿	<i>A61P 9/00</i> (2006. 01)
(72) 发明人 J • 肯佩尼 R • 维斯	<i>A61P 19/08</i> (2006. 01)
S • A • 菲斯科夫	<i>A61P 1/16</i> (2006. 01)
(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所	<i>A61P 31/14</i> (2006. 01)
11256	<i>A61P 31/20</i> (2006. 01)
代理人 陈文平 徐志明	<i>A61P 7/04</i> (2006. 01)
(51) Int. Cl.	<i>A61P 17/02</i> (2006. 01)
<i>A61K 39/395</i> (2006. 01)	<i>A61P 9/10</i> (2006. 01)
<i>A61P 31/04</i> (2006. 01)	
<i>A61P 37/02</i> (2006. 01)	
<i>A61P 29/00</i> (2006. 01)	
<i>A61P 19/02</i> (2006. 01)	
<i>A61P 19/06</i> (2006. 01)	
<i>A61P 37/08</i> (2006. 01)	

权利要求书5页 说明书30页
序列表6页 附图6页

(54) 发明名称

施用抗 TNF α 抗体的方法

(57) 摘要

本发明公开了治疗其中 TNF α 活性是有害的失调的方法,所述方法是通过每两周皮下施用人抗体,优选重组人抗体而进行的,所述抗体特异性地结合人肿瘤坏死因子 α (hTNF α)。抗体可以与氨甲蝶呤一起施用或不一起施用。这些抗体对 hTNF α 有高的亲和力(例如 $K_d=10^{-8}$ M 或更低),低的解离速率(例如 $K_{off}=10^{-3}$ / 秒或更低)和体外、体内中和 hTNF α 活性。本发明的抗体可以是全长抗体或其抗原结合部分。本发明也包括含有药物组合物的和施用说明的试剂盒,和含有药物组合物的预装的注射器。

1. 一种治疗人类受试者中的失调的方法,其中疾病可用 TNF α 抗体治疗,所述方法包括给人类受试者每两周施用一种组合物来治疗失调,其中所述组合物包含抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分。

2. 如权利要求 1 中的方法,其中施用是通过皮下注射进行的。

3. 如权利要求 1 中的方法,其中所述抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是人抗 TNF α 抗体。

4. 如权利要求 3 中的方法,其中由表面等离子共振测定,人抗体或其抗原结合部分以 K_d 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低, K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离,而且在标准的体外 L929 检测方法中以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

5. 如权利要求 3 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 速率常数为 $5 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离。

6. 如权利要求 3 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离。

7. 如权利要求 3 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 检测方法中,以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

8. 如权利要求 3 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 检测方法中,以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

9. 如权利要求 3 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 检测方法中,以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

10. 如权利要求 3 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分是一种重组抗体或其重组的抗原结合部分。

11. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括每两周施用一种组合物,所述组合物包含人抗 TNF α 抗体,其中人抗体或其抗原结合部分具有下列特征:

a) 由表面等离子共振测定,以 K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离;

b) 具有轻链 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或通过 1、4、5、7 或 8 位进行单一丙氨酸替代,或在 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 位进行 1 至 5 个保守氨基酸替代由 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列;

c) 具有重链 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,或通过 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 位进行单一丙氨酸替代,或在 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 位进行 1 至 5 个保守氨基酸替代由 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列。

12. 如权利要求 11 中的方法,其中施用是通过皮下施用。

13. 如权利要求 11 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 速率常数为 $5 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离。

14. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括每两周皮下施用一种组合物,所述组合物包含人抗 TNF α 抗体,其中人抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR),轻链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或通过 1、4、5、7 或 8 位进行单一丙氨酸替代由 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列;重链可变区具有 CDR3 结构域,该结构

域包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列,或通过在 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 位进行单一丙氨酸替代由 SEQ ID NO :4 修饰的氨基酸序列。

15. 如权利要求 14 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分的 LCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 CDR2 结构域,HCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的 CDR2 结构域。

16. 如权利要求 14 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分的 LCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列的 CDR1 结构域,HCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO :8 的氨基酸序列的 CDR1 结构域。

17. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括每两周皮下施用一种组合物,所述组合物包含人抗 TNF α 抗体,其中所述人抗体或其抗原结合部分具有包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR) 和包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。

18. 如权利要求 17 中的方法,其中人抗体具有 IgG1 重链恒定区。

19. 如权利要求 17 中的方法,其中人抗体具有 IgG4 重链恒定区。

20. 如权利要求 17 中的方法,其中人抗体是 Fab 片段。

21. 如权利要求 17 中的方法,其中人抗体是单链 Fv 片段。

22. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,其中所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括每两周皮下施用一种组合物,所述组合物包含人抗 TNF α 抗体,其中所述人抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区 (LCVR) 或重链可变区 (HCVR),轻链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包含选自 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 的氨基酸序列;重链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包含选自 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 和 SEQ ID NO :34 的氨基酸序列。

23. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括每两周皮下施用一种组合物,所述组合物包含人抗 TNF α 抗体,其中所述人抗体是 D2E7 抗体或其抗原结合部分。

24. 一种试剂盒,它包含一种制剂,所述制剂包含:

a) 一种药物组合物,其包含抗 TNF α 抗体和药学上可接受的载体;

b) 每两周施用一次药物组合物以治疗失调的说明,其中抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分在治疗失调时有效。

25. 如权利要求 24 中所述的试剂盒,其中所述抗体包含权利要求 2-22 任一项中的抗体或其抗原结合部分。

26. 一种包含药物组合物的预装注射器,所述药物组合物中包含抗 TNF α 抗体和药学上可接受的载体。

27. 如权利要求 26 中的注射器,其中人抗体包含权利要求 2-22 任一项中的抗体或其抗原结合部分。

28. 一种治疗失调的方法,其中抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分在治疗失调时有效,所

述方法包括给人受试者皮下施用一种组合物,所述组合物包含抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分以及氨甲蝶呤,用以治疗失调。

29. 如权利要求 28 中的方法,其中氨甲蝶呤与抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分一起施用。

30. 如权利要求 28 中的方法,其中氨甲蝶呤在施用抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分前施用。

31. 如权利要求 28 中的方法,其中氨甲蝶呤在施用抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分后施用。

32. 如权利要求 28 中的方法,其中抗 TNF α 抗体是人抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分。

33. 如权利要求 28 中的方法,其中由表面等离子共振测定,人抗体或其抗原结合部分以 K_d 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低, K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离,而且在标准的体外 L929 检测方法中以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

34. 如权利要求 28 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 速率常数为 $5 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离。

35. 如权利要求 28 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离。

36. 如权利要求 28 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 检测方法中,以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

37. 如权利要求 28 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 检测方法中,以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

38. 如权利要求 28 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分,在标准体外 L929 检测方法中,以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。

39. 如权利要求 28 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分是一种重组抗体或其重组的抗原结合部分。

40. 如权利要求 28 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分能够抑制人 TNF α 诱导的 ELAM-1 在人脐带静脉内皮细胞上的表达。

41. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括给人受试者施用氨甲蝶呤并皮下施用人抗 TNF α 抗体,其中所述人抗体或其抗原结合部分具有下列特性:

a) 由表面等离子共振测定,以 K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离;

b) 具有轻链 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或通过 1、4、5、7 或 8 位进行单一丙氨酸替代,或在 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 位进行 1 至 5 个保守氨基酸替代由 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列;

c) 具有重链 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,或通过 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 位进行单一丙氨酸替代,或在 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 位进行 1 至 5 个保守氨基酸替代由 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列。

42. 如权利要求 41 中的方法,其中所述人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 速率常数为 $5 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更低从人 TNF α 上解离。

43. 如权利要求 41 中的方法,其中所述人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 速率常数为

1×10^{-4} / 秒或更低从人 TNF α 上解离。

44. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括施用氨甲蝶呤并皮下施用人抗 TNF α 抗体,其中人抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区 (LCVR) 和重链可变区 (HCVR),轻链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或通过 1、4、5、7 或 8 位进行单一丙氨酸替代由 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列;重链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,或通过 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 位进行单一丙氨酸替代由 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列。

45. 如权利要求 44 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分的 LCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 CDR2 结构域,HCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的 CDR2 结构域。

46. 如权利要求 44 中的方法,其中人抗体或其抗原结合部分的 LCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列的 CDR1 结构域,HCVR 进一步具有包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的 CDR1 结构域。

47. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括施用氨甲蝶呤并皮下施用人抗 TNF α 抗体,其中所述人抗体或其抗原结合部分具有包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的轻链可变区 (LCVR),和包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链可变区 (HCVR)。

48. 如权利要求 47 中的方法,其中人抗体具有 IgG1 重链恒定区。

49. 如权利要求 47 中的方法,其中人抗体具有 IgG4 重链恒定区。

50. 如权利要求 47 中的方法,其中人抗体是 Fab 片段。

51. 如权利要求 47 中的方法,其中人抗体是单链 Fv 片段。

52. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括施用氨甲蝶呤并皮下施用人抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分,其中所述人抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区 (LCVR) 或重链可变区 (HCVR),轻链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包含选自 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 的氨基酸序列;重链可变区具有 CDR3 结构域,该结构域包含选自 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 和 SEQ ID NO:34 的氨基酸序列。

53. 一种在人受试者中抑制人 TNF α 活性的方法,所述人受试者患有其中 TNF α 活性有害的失调,所述方法包括施用氨甲蝶呤并皮下施用人抗 TNF α 抗体,其中所述人抗体是 D2E7 抗体或其抗原结合部分。

54. 一种试剂盒,它包含一种制剂,所述制剂包含:

a) 一种药物组合物,其包含抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分、氨甲蝶呤和药学上可接受的载体;

b) 皮下施用用于治疗失调的药物组合物的说明,其中所述失调中 TNF α 活性是有害的。

55. 如权利要求 54 中的试剂盒,其中所述抗体包含权利要求 32-51 中任一项中的抗体或其抗原结合部分。

56. 一种包含药物组合物的预装注射器,所述药物组合物中包含抗 TNF α 抗体、氨甲蝶呤和药学上可接受的载体。

57. 如权利要求 56 中的注射器,其中所述抗体包含权利要求 32-52 任一项中的抗体或其抗原结合部分。

58. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中所述失调是败血症。

59. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中所述抗体与细胞因子白介素 -6 (IL-6) 一起给人受试者施用,或以血清或血浆 IL-6 浓度在 500pg / ml 以上给人受试者施用。

60. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中所述疾病是自身免疫性疾病。

61. 如权利要求 60 中的方法,其中自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、骨关节炎和痛风性关节炎。

62. 如权利要求 61 中的方法,其中自身免疫性疾病是类风湿性关节炎。

63. 如权利要求 60 中的方法,其中自身免疫性疾病选自变态反应、多发性硬化病、自免性糖尿病、自免性色素层炎和肾病综合征。

64. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中失调是一种传染病。

65. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中失调是移植排斥或移植抗宿主病。

66. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中失调是恶性肿瘤。

67. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中失调是肺病。

68. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中失调是肠道失调。

69. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中失调是心脏失调。

70. 如权利要求 1 或 28 中的方法,其中失调选自炎性骨病、骨吸收疾病、酒精性肝炎、病毒性肝炎、凝血障碍、烧伤、再输注损伤、瘢痕瘤形成、瘢痕组织形成和发热。

71. 一种试剂盒,其包含:

a) 一种药物组合物,其包含人抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分,和药学上可接受的载体;

b) 一种药物组合物,其包含氨甲蝶呤和药学上可接受的载体;

c) 皮下施用抗 TNF α 抗体药物组合物和在施用抗 TNF α 抗体药物组合物之前、之后或同时施用氨甲蝶呤药物组合物的说明。

72. 如权利要求 71 中的试剂盒,其中抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是 D2E7 或其抗原结合部分。

施用抗 TNF α 抗体的方法

[0001] 本申请是 2002 年 6 月 5 日提交的 02815654.4 号发明专利申请（名称为“施用抗 TNF α 抗体的方法”）的分案申请。

背景技术

[0002] 肿瘤坏死因子 (TNF α) 是一种由多种细胞（包括单核细胞和巨噬细胞）产生的细胞因子，最初是根据其诱导某些鼠肿瘤坏死的能力而鉴定出的（参见 Old, L. (1985) *Science* 230 :630-632）。随后，确定了一种与恶病质相关的，命名为恶液质素 (cachectin) 的细胞因子和 TNF α 是同一分子。TNF α 参与介导休克（参见 Beutler, B. 和 Cerami, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 57 :505-518 ; Beutler, B. 和 Cerami, A. (1998) *Annu. Rev. Immunol.* 7 :625-655）。此外，TNF α 与其它多种人类疾病和失调的病理生理学有关，包括脓血症、感染、自身免疫病、移植排斥和移植抗宿主疾病（参见 Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10 :411-452 ; Tracey, K. J. 和 Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45 :491-503）。

[0003] 鉴于人 TNF α (hTNF α) 在多种人类失调中所扮演的有害角色，治疗策略被设计为抑制或中和 hTNF α 的活性。尤其是，能够结合并中和 hTNF α 的抗体已被作为一种抑制 hTNF α 活性的手段 (means)。某些最早的这类抗体是鼠的单克隆抗体 (mAbs)，由用 hTNF α 免疫的鼠淋巴细胞制备的杂交瘤分泌（参见 Hahn T. 等, (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82 :3814-3818 ; Liang, C-M 等 (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137 :847-854 ; Hirai, M 等 (1987) *J. Immunol. Methods* 96 :57-62 ; Fendly, B. M. 等 (1987) *Hybridoma* 6 :359-370 ; Möller, A. 等 (1990) *Cytokine* 2 :162-169 ; Moeller 等的美国专利 No. 5231024 ; wallach, D. 的欧洲专利出版物 No. 186833B1 ; Old 等的欧洲专利申请 No. 218868A1 ; 由 Moeller A. 等的欧洲专利出版物 No. 260610B1）。这些鼠抗 hTNF α 抗体通常显示较高的与 hTNF α 的亲和力（如： $K_d \leq 10^{-9}M$ ）并能中和 hTNF α 活性，但体内应用这些抗体可能受制于施用这些鼠抗人抗体相关的问题，如：血清半衰期短、不能触发某些人体效应器功能以及人体内诱发不期望的对鼠抗体的免疫应答（“人抗鼠抗体” (HAMA) 的反应）。

[0004] 为了解决人体内使用完全的 (full) 鼠抗体所带来的问题，用基因工程的方法将鼠抗 hTNF α 抗体改造得更为“人化”。比如，已经制备了嵌合抗体，其中抗体链的可变区是鼠源性的，而恒定区则是人源性的 (Knight, D. M. 等 (1993) *Mol. Immunol.* 30 :1443-1453 ; Daddona, P. E. 等的 PCT 出版物 No. W092 / 16553)。此外，也制备了人源化抗体，其中抗体可变区的超变区是鼠源性的，但可变区的其余部分和抗体恒定区是人源性 (Adair, J. R. 等的 PCT 出版物 No. W092 / 11383)。然而，因为这些嵌合和人源化抗体仍保留一些鼠序列，它们仍可能诱发不期望的免疫反应，即人抗嵌合抗体 (HACA) 反应，尤其是长期施用时，如治疗类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis) 等慢性适应症时（参见 Elliott, M. J. 等 (1994) *Lancet* 344 :1125-1127 ; Elliot, M. J. 等 (1994) *Lancet* 344 :1105-1110）。

[0005] 一种针对鼠单抗或其衍生物（如嵌合或人源化抗体）的优选的 hTNF α 抑制剂应当是完全的人抗 hTNF α 抗体，因为这类药剂即使是长期使用也不会诱发 HAMA 反应。应用人杂交瘤技术已经制备了人抗 hTNF α 的单克隆自身抗体 (Boyle, P 等 (1993) *Cell*。

Immunol. 152 :556-568 ;Boyle, P. 等 (1993) Cell. Immunol. 152 :569-581 ;Boyle 等的欧洲专利申请出版物 No. 614984A2)。然而,据报道这些杂交瘤来源的单克隆自身抗体对 hTNF α 有亲和力,但亲和力太低以至于用常规方法测不出来,也不能够结合可溶性的 hTNF α ,也不能够中和 hTNF α 诱导的细胞毒性(参见 Boyle 等;同上)。而且,人杂交瘤技术的成功依赖于人周血中天然存在的产生特异性抗 hTNF α 自身抗体的淋巴细胞。某些研究检测了人体中的抗 hTNF α 的血清自身抗体 (Fomsgaard, A 等 (1989) Scand. J. Immunol. 30 :219-223 ; Bendtzen, K 等 (1990) Prog. Leukocyte Biol 10B :447-452),而其它的研究没有进行检测 (Leusch, H-G 等 (1991) J. Immunol. Methods 139 :145-147)。

[0006] 除天然存在的人抗 hTNF α 外可选择重组 hTNF α 抗体。与 hTNF α 以相对低的亲和力(如 K_d 约 10^{-7} M)和快的解离速率(如 K_{off} 约 10^{-2} / 秒)结合的重组人抗体已有报道 (Griffiths, A. D. 等 (1993) EMBO J. 12 :725-734)。然而,由于它们的相对快速的解离动力学,这些抗体不适于治疗用。此外,已报道一种重组人抗 hTNF α 不能中和 hTNF α 活性,反而强化 hTNF α 与细胞表面的结合,加速其内吞 (Lidbury, A 等 (1994) Biotechnol. Ther. 5 : 27-45 ;Aston, R 等的 PCT 出版物 No. W092 / 03145)。

[0007] 也有报道描述了重组人抗体,能够以高的亲和力以及慢的解离速率结合可溶的 hTNF α ,这种抗体能够中和 hTNF α 活性,包括 hTNF α 诱导的细胞毒性(体内和体外)和 hTNF α 诱导的细胞活化(参见美国专利 No. 6090382)。施用抗体的典型方案为每周静脉用药。每周施用抗体和 / 或任何药物是昂贵的、繁琐的,而且由于频繁施用而导致副反应次数的增加。另外,静脉施用通常需要受过医学训练的人来操作,这也是一种限制。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供一种治疗 TNF α 相关失调的每两周进行一次的用药方法,优选地通过皮下用药。每两周用药一次与每周用药一次相比有许多优点,包括但不限于,较少的注射总数,较少的注射部位反应(如局部疼痛与肿胀),患者接受程度提高(归因于注射频率降低),对患者和卫生保健机构(health care provider)而言较低的花费。皮下用药本身也有优点,即患者可自己施用治疗剂,如人 TNF α 抗体,这方便了患者和卫生保健机构。

[0010] 本发明提供了治疗其中 TNF α 活性有害的失调的方法。该方法包括给受试者每两周皮下注射抗体一次。优选的抗体是能够特异性结合人 TNF α 的重组人抗体。本发明进一步提供了治疗其中 TNF α 活性有害的失调的方法。这些方法包括利用联合治疗方法,其中人抗体与其它治疗药剂一同给受试者施用,所述其它治疗药剂如一种或多种可与其它靶物质结合的抗体(如结合其它细胞因子或细胞表面分子的抗体),一种或多种细胞因子,可溶性 TNF α 受体(见例如 PCT 出版物 No. W094 / 06476)和 / 或一种或多种能够抑制 TNF α 产生或抑制其活性的化学药剂(诸如 PCT 出版物 No. W093 / 19751 中所述的 cyclohexanemylidene 衍生物),优选药剂是氨甲蝶呤。抗体优选能够特异性结合人 TNF α 的重组人抗体。本发明抗体的特征是以高亲和力和低解离动力学与 hTNF α 结合,而且能够中和 hTNF α 活性,包括 hTNF α 诱导的细胞毒性(体内和体外)和 hTNF α 诱导的细胞活化。这些抗体可以是全长的(如 IgG1 或 IgG4 抗体),也可仅包含抗原结合部分(如 Fab, F(ab')₂, scFv 片段或单结构域)。本发明最优选的重组抗体命名为 D2E7,其轻链 CDR3 结构域包含 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列,重链 CDR3 结构域包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列(在附录 B 中列出)。优选地, D2E7 抗体轻链可变区(LCVR)包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列,

重链可变区 (HCVR) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。这些抗体在美国专利 No. 6090382 中有描述,其全文在此引入作为参考。

[0011] 在一个实施方案中,本发明提供了治疗其中 TNF α 活性有害的失调的方法。这些方法包括每两周皮下施用一次抗 TNF α 抗体,抑制人 TNF α 活性而治疗失调。失调可以是例如脓血症、自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、变态反应、多发性硬化、自身免疫性糖尿病、自身免疫性色素层炎以及肾病综合征)、感染性疾病、恶性肿瘤、移植排斥或移植植物抗宿主疾病、肺失调、骨失调、肠道失调或心脏失调。

[0012] 在另一实施方案中,本发明提供了治疗其中 TNF α 活性有害的失调的方法。这些方法包括通过皮下施用抗 TNF α 抗体和氨甲蝶呤,抑制人 TNF α 活性,从而治疗失调。在一方面中,氨甲蝶呤与抗 TNF α 抗体一同施用。在另一方面中,在施用抗 TNF α 抗体之前施用氨甲蝶呤。在另一方面中,在施用抗 TNF α 抗体之后施用氨甲蝶呤。

[0013] 在一优选实施方案中,用于治疗其中 TNF α 活性有害的失调的抗 TNF α 抗体是人抗 TNF α 抗体。更优选的是,通过每两周皮下施用分离的人抗体或抗体的抗原结合部分来进行治疗。优选地,抗体或其抗原结合部分以 K_d 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} / \text{秒}$ 或更小从人 TNF α 解离,这两者都是由表面等离子共振(surface plasmon resonance)测定;而且按照标准的体外 L929 检测方法以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低中和人 TNF α 细胞毒性。更优选地,分离的人抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 为 $5 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更小,更优选地以 K_{off} 为 $1 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更小,从人 TNF α 解离。更优选地,分离的人抗体或其抗原结合部分,按照标准的体外 L929 检测方法检测,以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低,进一步优选以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低,更进一步优选以 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更低,中和人 TNF α 细胞毒性。

[0014] 再另一实施方案中,本发明提供了通过给受试者每两周皮下施用人抗体或其抗原结合部分来治疗其中 TNF α 活性有害的失调的方法。所述抗体或其抗原结合部分优选具有下列特征:

[0015] a) 由表面等离子共振测定,以 K_{off} 为 $1 \times 10^{-3} / \text{秒}$ 或更小从人 TNF α 解离;

[0016] b) 具有轻链 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或通过 1,4,5,7 或 8 位进行单一丙氨酸替代,或在 1,3,4,6,7,8 和 / 或 9 位进行 1 至 5 个保守氨基酸替代由 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列;

[0017] c) 具有重链 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,或通过 2,3,4,5,6,8,9,10 或 11 位进行单一丙氨酸替代,或在 2,3,4,5,6,8,9,10,11 和 / 或 12 位进行 1 至 5 个保守氨基酸替代由 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列;

[0018] 更优选地,抗体或其抗原结合部分以 K_{off} 值为 $5 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更小从人 TNF α 解离。进一步优选地,抗体或抗体的抗原结合部分以 K_{off} 值为 $1 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更小从人 TNF α 解离。

[0019] 在另一实施方案中,本发明提供了治疗其中 TNF α 活性有害的失调的方法。这些方法包括每两周给受试者皮下施用人抗体或其抗原结合部分。抗体或其抗原结合部分优选包含 LCVR 区和 HCVR 区,所述 LCVR 区具有 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,或通过 1,4,5,7 或 8 位进行单一丙氨酸替代由 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列;所述 HCVR 区具有 CDR3 结构域,其包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列,或通过 2,3,4,5,6,8,9,10 或 11 位进行单一丙氨酸替代由 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列。进一步优选地,LCVR 区

还具有 CD2 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列,而 HCVR 还具有 CD2 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列。再进一步优选地,LCVR 区还具有 CDR1 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,而 HCVR 具有 CDR1 结构域,该结构域包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列。

[0020] 在另一实施方案中,本发明提供了通过每两周给受试者皮下施用分离的人抗体或其抗原结合部分来治疗其中 TNF α 活性有害的失调的方法。所述抗体或抗体的抗原结合部分优选包含 LCVR 区和 HCVR 区,所述 LCVR 区包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列;而所述 HCVR 区包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。在某些实施方案中,抗体具有 IgG1 重链的恒定区或 IgG4 重链的恒定区。在另一实施方案中,抗体是 Fab 片段、F(ab')₂ 片段或单链 Fv 片段。

[0021] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗失调的方法,该方法通过每两周给受试者皮下施用一种或多种抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分而使受试者获益。所述抗体或其抗原结合部分优选包含 LCVR 区或连同 HCVR 区,所述 LCVR 区具有 CDR3 结构域,其包含选自 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 的氨基酸序列;而所述 HCVR 区具有 CDR3 结构域,其包含选自 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 和 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列。

[0022] 本发明的另一个方面涉及包含药物制剂的试剂盒,所述药物制剂包含药物组合物。该试剂盒包含抗 TNF α 抗体和药学上可接受的载体。试剂盒内附有每两周皮下施用治疗失调的药物组合物的说明,其中施用抗 TNF α 可使患者获益。在另一个方面中,本发明涉及包含药物制剂的试剂盒,所述药物制剂包含药物组合物,所述试剂盒进一步包含抗 TNF α 抗体、氨甲蝶呤以及药学上可接受的载体。试剂盒内附有皮下施用治疗失调的药物组合物的说明,其中施用抗 TNF α 抗体可使患者获益。

[0023] 本发明的另一方面提供了一种含有药物组合物的预装的注射器,所述药物组合物包含抗 TNF α 抗体和药学上可接受的载体。在另一方面中,本发明提供了一种含有药物组合物的预装的注射器,所述药物组合物包含抗 TNF α 抗体、氨甲蝶呤和药学上可接受的载体。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1A 和 1B 显示了患类风湿性关节炎 (RA) 患者在每周皮下施用一次 D2E7 抗体,共施用 12 周后的美国风湿病学会 20 (ACR20) 和 ACR50 反应结果 (图 1A),或在隔周皮下施用一次 D2E7 抗体和氨甲蝶呤,共施用 24 周后的美国风湿病学会 20 (ACR20) 和 ACR50 反应结果 (图 1B)。这些资料表明隔周施用与每周施用一样有效。

[0026] 图 2 显示了患类风湿性关节炎患者在隔周皮下施用一次 D2E7 抗体和氨甲蝶呤,施用 24 周后的 ACR20、ACR50 和 ACR70 反应结果。

[0027] 图 3 显示了患类风湿性关节炎患者在隔周皮下施用一次 D2E7 抗体和氨甲蝶呤,施用 24 周后的疼痛关节计数 (3A) 和肿胀关节计数 (3B) 随时间的结果。

[0028] 图 4 显示了患类风湿性关节炎患者在隔周皮下施用一次 D2E7 抗体和氨甲蝶呤,施用 24 周后的体检结果简表 (SF-36)。RP,身体状况 (role physical);PF,身体功能;BP,身

体疼痛 ;GH, 总体健康状态 ;V, 活力 ;SF, 社会功能 ;RE, 情绪状况 ;和 ME, 精神健康。

[0029] 图 5 显示了患类风湿性关节炎患者在静脉注射一次 D2E7 抗体和氨甲蝶呤后 ACR 反应的百分比。

[0030] 发明详述

[0031] 本发明涉及治疗失调的方法, 在所述失调中施用抗 TNF α 抗体对患者有益, 所述方法包括施用分离的人抗体或其抗原结合部分, 所述抗体或其抗原结合部分以高亲和力、低解离速率和高的中和能力与人 TNF α 结合, 从而治疗失调。本发明的各个方面涉及用抗体和抗体片段进行治疗, 以及它们的药物组合物。

[0032] 为了使本发明更易于理解, 首先定义某些术语。

[0033] 本文所用术语“用药 (dosing)”, 是指施用一种物质 (如抗 TNF α 抗体) 以获得治疗目的 (如治疗 TNF α 相关的失调)。

[0034] 本文所用术语“两周一次用药方案”, “两周一次用药”, “两周一次施用”, 是指为获得治疗目的 (如治疗 TNF α 相关的疾病) 而给受试者用药 (如抗 TNF α 抗体) 的时间间隔。两周一次用药方案并不包括每周一次用药方案。优选每 9-19 天用药一次, 进一步优选的是每 11-17 天用药一次, 更优选的是每 13-15 天用药一次, 最优选的是每 14 天用药一次。

[0035] 本文所用术语“联合治疗”是指施用两种或两种以上的治疗物质, 如抗 TNF α 抗体和氨甲蝶呤。氨甲蝶呤可以与抗 TNF α 抗体同时施用, 也可以在施用抗 TNF α 抗体前施用, 或者在施用抗 TNF α 抗体后施用。

[0036] 本文所用术语“人 TNF α ”(缩写为 hTNF α 或 hTNF), 是指一种人的细胞因子, 该因子以分泌形式存在时分子量为 17kD, 以膜相关形式存在时分子量为 26kD, 生物活性形式是由 17kD 的分子以非共价键方式结合的三聚体形式存在。TNF α 的结构在如 Pennica, D 等 (1984) Nature 312 : 724-729 ; Davis, J. M. 等 (1987) Biochemistry 26 : 1322-1326 和 Jones, E. Y. 等 Nature 338 : 225-228 中有进一步的描述。人 TNF α 包括重组人 TNF α (rhTNF α), 该蛋白可以通过标准的重组表达方法制备或购自商品化的产品 (R&D systems, catalog No. 210-TA, Minneapolis, MN)。

[0037] 本文所用术语“抗体”, 是指由四条多肽链组成的免疫球蛋白分子, 其中两条重链 (H) 和两条轻链 (L) 通过二硫键相互链接。每条重链又由重链可变区 (缩写为 HCVR 或 VH) 和重链恒定区组成, 重链恒定区由 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域组成; 每条轻链又由轻链可变区 (缩写为 LCVR 或 VL) 和轻链恒定区组成, 轻链恒定区由 CL 一个结构域组成。VH 和 VL 又进一步的细分为超变区, 命名为互补决定区 (CDR), 分散分布的较保守的区域, 命名为框架区 (FR)。每条 VH 和 VL 又由三个 CDR 区和 4 个 FR 区组成, 从氨基端至羧基端按照下列顺序排列 : FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。

[0038] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”), 是指抗体的一个或多个片段, 该片段保留了特异性与抗原 (如 hTNF α) 结合的能力。抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来实现。抗体的“抗原结合部分”一词所包含的结合片段实例, 包括 (1) Fab 片段, 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (2) F(ab')₂ 片段, 由两个 Fab 片段在铰链区通过一个二硫键结合在一起的双价片段; (3) 由 VH 和 VL 组成的 Fd 片段; (4) 由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段; (5) dAb 片段 (Ward 等, (1989) Nature 341 : 544-546), 由 VH 结构域组成; (6) 分离的互补决定区 (CDR)。虽然 Fv 片段的两个结构域 VL

和 VH 是由独立的基因编码,但通过重组方法,可以用合成的接头链接而成为一个蛋白,其中的 VL 和 VH 配对形成单价分子(称为单链 Fv(scFv);参见 Bird 等(1988)Science242:423-426;以及 Huston 等(1988)Natl. Acad. Sci. USA85:5879-5883)。这类单链抗体也包括在抗体的“抗原结合部分”中。其它形式的单链抗体,如 diabodies 也包括在内。Diabodies 是双价、双特异性的抗体,其中 VH 和 VL 结构域表达在单一的多肽链上,但由于所用的接头太短而不能使同一条链上的两个结构域配对,因而迫使其与另一条链上的互补结构域配对而产生了两个抗原结合位点(参见 Holliger, P. 等(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:6444-6448;Poljak, R. J. 等(1994)Structure2:1121-1123)。

[0039] 进一步来讲,抗体或其抗原结合部分可以是一个大的免疫粘附分子的部分,可以由抗体或抗体部分通过共价或非共价方式与一个或多个其它的蛋白或多肽连接形成。这类免疫粘附分子的实例包括,用链霉抗生物素核心区制得的 scFv 的四聚体(Kipriyanov, S. M. 等(1995)Human antibodies and Hybridomas6:93-101)和用一个半胱氨酸残基,一个标记肽和 C 末端多聚组氨酸标记而制成的双价和生物素化的 scFv 分子(Kipriyanov, S. M. 等(1994)Mol. Immunol. 31:1047-1058)。用常规技术如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶分别消化完整抗体,可以从完整抗体制备抗体部分,如 Fab 和 F(ab')₂ 片段。而且,应用如本文所述的标准重组 DNA 技术,可以制备抗体、抗体部分和免疫粘附分子。

[0040] 本文所用的术语“人抗体”,包括那些具有从人种系(germline)免疫球蛋白序列衍生的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(如体外随机或位点特异性的突变或体内细胞突变),如在 CDR 区,尤其是在 CDR3 区。然而,本文所用的“人抗体”,并不包括那些 CDR 区序列源自其它哺乳动物种类(如鼠)的种系,然后移植至人框架序列的抗体。

[0041] 本文所用的术语“重组人抗体”,包括那些通过重组方法制备、表达、创造或分离的所有人抗体,如用重组表达载体转染宿主细胞表达的抗体(在下面第二部分详述),分离自重组、组合人抗体文库的抗体(在下面第三部分详述),分离自转入人免疫球蛋白基因的转基因动物(如鼠)的抗体(参见 Taylor, L. D 等(1992)Nucl. Acids Res. 20:6287-6295),或者是通过其它涉及人免疫球蛋白基因序列剪切至其它 DNA 序列的方法而制备、表达、创造或分离的抗体。这类重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。在某些实施方案中,对这类重组人抗体进行体外诱变(或,当使用转入人 Ig 序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因而这类重组人抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是这样一些序列,它们来源于人种系 VH 和 VL 序列且与之相关,但不是体内人抗体种系所有组成部分(repertoire)中天然存在的序列。

[0042] 本文所用的“分离抗体”,是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(如特异性结合 hTNF α 的分离抗体,基本上不含与除 hTNF α 外的抗原特异性结合的抗体)。然而,特异性结合 hTNF α 的分离抗体可以与其它抗原(如源于其它物种的 hTNF α)有交叉反应性(下面将进一步讨论)。而且,分离的抗体可以基本上不合其它的细胞物质或化学物质。

[0043] 本文所用的“中和抗体”(或“能够中和 hTNF α 活性的抗体”),是指能够与 hTNF α 结合并导致其生物活性被抑制的一类抗体。hTNF α 生物活性的抑制,可以通过检测 hTNF α 生物活性的一种或多种指标来测定,如检测 hTNF α 诱导的细胞毒性(无论体内还是体外),

hTNF α 诱导的细胞活化以及 hTNF α 与其受体的结合。这些 hTNF α 的生物活性指标可以通过本领域已知的几种体内或体外标准方法中一种或多种测定（见实施例 4）。优选通过 hTNF α 诱导的 L929 细胞的细胞毒性的抑制测定抗体中和 hTNF α 活性的能力。作为一种附加或可选的 hTNF α 活性指标，可测定抗体抑制 hTNF α 诱导 HUVEC 上 ELAM-1 的表达能力，作为 hTNF α 诱导细胞活化的量度。

[0044] 本文所用的术语“表面等离子共振”，是指一种光学现象，可通过检测生物传感器基质 (matrix) 中蛋白浓度的变化实时地分析生物特异性反应，比如用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)。进一步的描述参见实施例 1 和 Jönsson U. 等 (1993) Ann. Biol. Clin. 51 :19-26 ; Jönsson U. 等 (1991) Biotechniques 11 :620-627 ; Johnsson, B 等 (1995) J. Mol. Recognition. 8 :125-131 ; 和 Johnsson, B. 等 (1991) Anal. Biochem. 198 :268-277。

[0045] 本文所用的术语“ K_{off} ”，是指抗体从抗体 / 抗原复合物上解离下来的解离速率常数。

[0046] 本文所用的术语“ K_d ”，是指特定抗体 - 抗原反应的解离常数。

[0047] 本文所用的术语“核酸分子”，包括 DNA 和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，优选双链的。

[0048] 本文在提及编码与 hTNF α 结合的抗体或抗体部分（例如 VH、VL、CD3）的核酸时所用的“分离的核酸分子”，是指一种核酸分子，其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列没有编码可结合非 hTNF α 的抗原的抗体或抗体部分的其它核苷酸序列，所述其它序列可以天然位于人基因组 DNA 序列的两侧。比如，本发明的分离的编码抗 TNF α 抗体 VH 区的核酸序列不包括编码结合非 hTNF α 抗原的其它 VH 区的序列。

[0049] 本文所用的术语“载体”，是指能够转运与其连接的另一种核酸分子的核酸分子。载体类型之一是“质粒”，是一种环状双链 DNA 环，能够连接附加的 DNA 片段。另一类型的载体是病毒载体，其中附加的 DNA 片段连接至病毒基因组。某些载体在引入的宿主细胞中能够自主复制（如具有细菌复制启动子的细菌载体和游离的哺乳动物载体）。其它的载体（如非游离的哺乳动物载体）可以在引入宿主细胞后整合进宿主细胞的基因组，随基因组的复制而复制。而且，某些载体能够表达其连接的基因。这类载体在本文中称为“重组表达载体”（或简称“表达载体”）。总的来说，重组 DNA 技术中所用的表达载体通常是质粒。在本文中，“质粒”和“载体”可以混用，因为质粒是最常用的载体。然而，本发明也包括其它形式的表达载体，如病毒载体（如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒），它们同样具有一样的功能。

[0050] 本文所用的术语“重组宿主细胞”（或简称“宿主细胞”），是指引入重组表达载体的细胞。应理解，这一术语包括的不仅是特指的受试者细胞，而且包括其传代细胞。由于突变或环境影响在随后的传代中会发生某些修饰，这样事实上其传代细胞可能与亲代细胞不一样，但仍属于本文所用的“宿主细胞”范畴。

[0051] 在下面的各个小部分中详细描述本发明的不同方面。

[0052] I. 结合人 TNF α 的人抗体

[0053] 本发明提供了用抗 TNF α 抗体而治疗失调的方法，这些方法包括每两周皮下施用一次分离的人抗体或抗体的抗原结合部分，其中抗体或抗原结合部分可以与人 TNF α 以高

亲和力、低解离常数和高中和能力结合。本发明的人抗体优选重组的、具有中和活性的人抗 TNF α 抗体。本发明最优选的重组中和抗体在本文称为 D2E7 (D2E7VL 区氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示, D2E7 VH 区氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示)。D2E7 抗体的性质在 Salfeld 等的美国专利 No. 6090382 中已经描述过, 在本文中引入作为参考。

[0054] 一方面, 本发明涉及用抗 TNF α 抗体治疗失调, 治疗包括每两周皮下施用一次分离的 D2E7 抗体或抗体部分、D2E7 相关抗体和抗体部分, 或与 D2E7 抗体具有相当的特性的人抗体或抗体部分, 所述特性如可以与人 TNF α 以高的亲和力结合并具有低的解离动力学和高的中和能力。在某一方案中, 本发明提供了用分离的人抗体或抗体的抗原结合部分进行治疗的方法, 抗体以 K_d 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, K_{off} 速率常数为 $1 \times 10^{-3} / \text{秒}$ 或更小从人 TNF α 上解离, 这二者都由表面等离子共振测定, 而且用体外标准 L929 检测方法检测中和人 TNF α 细胞毒性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更小。进一步优选的分离人抗体或其抗原结合部分的 K_{off} 为 $5 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更小, 或进一步优选 K_{off} 为 $1 \times 10^{-4} / \text{秒}$ 或更小。再优选的分离的人抗体或抗原结合部分, 用体外标准的 L929 检测方法检测其中和人 TNF α 细胞毒性的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更小, 再一步优选的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更小, 再优选的 IC_{50} 为 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更小。在某一优选的方案中, 抗体为分离的重组人抗体或其抗原结合部分。

[0055] 本领域中众所周知, 抗体的重链和轻链的 CDR3 结构域在抗体与抗原的结合特异性 / 亲和性中起重要作用。因而本发明的另一方面涉及施用抗 TNF α 抗体治疗失调的方法, 其中施用人抗体方法是皮下施用, 该抗体与 hTNF α 结合的解离动力学常数低, 其重链和轻链 CDR3 结构域在结构上与 D2E7 一致或相关。D2E7VL CDR3 区的第 9 位可以是丙氨酸或苏氨酸, 这基本上不影响其 K_{off} 值。相应地, D2E7VL CDR3 区的共有基元包含 Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T / A) (SEQ ID NO :3) 的氨基酸序列。另外 D2E7VH CDR3 区的第 12 位可以是酪氨酸或天冬酰胺, 这基本上不影响 K_{off} 值。相应地, D2E7VH CDR3 区的共有基元包含 V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y / N) (SEQ ID NO :4) 的氨基酸序列。而且, 如实施例 2 所证实的, D2E7 抗体的轻和重链 CDR3 结构域, 用单个丙氨酸替代 (在 VL 的 CDR3 区位置 1, 4, 5, 7 或 8 或在 VH 的 CDR3 区位置 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 替换), 基本上并不影响 K_{off} 。进而, 本领域的技术人员将意识到: 既然 D2E7 抗体 VH 和 VL CDR3 结构域的氨基酸可以用丙氨酸替代, 那么在保留抗体低解离常数的前提下, CDR3 区内的其它氨基酸的替代也是可能的, 尤其是用保守的氨基酸替代。本文所用的“保守氨基酸替代”, 是指某一氨基酸残基被另一个具有相似侧链的氨基酸残基所替代。本领域的具有相似侧链的氨基酸残基家族已经确定, 包括碱性侧链 (如, 赖氨酸, 精氨酸和组氨酸), 酸性侧链 (如天冬氨酸, 谷氨酸), 不带电荷极性侧链 (如甘氨酸, 天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸), 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、蛋氨酸和色氨酸) 以及芳香族侧链 (如酪氨酸、苯丙氨酸, 色氨酸和组氨酸)。D2E7VL 和 / 或 VH CDR3 区内的保守替代优选不超过 1-5 个; D2E7VL 和 / 或 VH CDR3 结构域内的保守替代进一步优选不超过 1~3 个。另外, 保守氨基酸的替代不应在与 hTNF α 结合的关键位置上, D2E7 抗体 VL 的 CDR3 区的第 2 和 5 位的氨基酸和 VH 的 CDR3 区的第 1 和 7 位的氨基酸似乎对抗体与 hTNF α 的相互作用很重要, 因此优选这些位置的保守氨基酸不被替代 (虽然在 D2E7 抗体 VL CDR3 第 5 位氨基酸用丙氨酸替代也可以接受, 如上所述) (参见美国专利 No. 6090382)。

[0056] 相应地, 在另一实施方案中, 本发明提供了治疗失调的方法, 其通过每两周皮下施

用一次分离的人抗体或其的抗原结合部分而进行。抗体或其抗原结合部分优选包含下列特征：

[0057] a) 与人 TNF α 的解离常数 K_{off} 为 1×10^{-3} / 秒或更小, 由表面等离子共振测定。

[0058] b) 其轻链 CDR3 结构域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列, 或用丙氨酸在 1, 4, 5, 7 或 8 替代 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列后的修饰序列或在 1, 3, 4, 6, 7, 8 和 / 或 9 位置上进行 1 ~ 5 个保守氨基酸替代修饰的序列。

[0059] c) 重链 CDR3 结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列, 或用丙氨酸在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 替代 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列后的修饰序列或在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 或 12 位置上进行 1 ~ 5 个保守氨基酸替代修饰的序列。

[0060] 更优选的抗体或抗体的抗原结合部分与人 TNF α 解离 K_{off} 值为 5×10^{-4} / 秒或更小; 进一步优选抗体或抗体的抗原结合部分与人 TNF α 解离 K_{off} 值为 1×10^{-4} / 秒或更小。

[0061] 在另一个实施方案中, 本发明提供了治疗失调的方法, 通过每两周皮下施用一次分离的人抗体或其的抗原结合部分而进行治疗。抗体或抗原结合部分, 优选其轻链可变区 (LCVR) CDR3 结构域包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列, 或用丙氨酸在 1, 4, 5, 7 或 8 替代 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列后的修饰序列, 优选其重链可变区 (HCVR) CDR3 结构域包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列, 或用丙氨酸在 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 或 11 替代 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列修饰序列。优选 LCVR 进一步包含一个 CDR2 区, 该区包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列 (即 D2E7 抗体的 VL 中的 CDR2 区) 以及 HCVR 进一步包含 CDR2 区, 该区包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 (即 D2E7 抗体的 VH 中的 CDR2 区)。再进一步优选 LCVR 进一步包含一个 CDR1 区, 该区包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列 (即 D2E7 抗体的 VL 中的 CDR1 区) 以及 HCVR 进一步包含一个 CDR1 区, 该区包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列 (即 D2E7 抗体的 VH 中的 CDR1 区)。VL 区的框架区优选来自 V κ 1 人种系家族, 更优选来自 A20 人抗体产生种系家族 V κ 基因, 最优选美国专利 No. 6090382 中图 1A 和 1B 中所示的 D2E7 的 VL 框架区序列。VH 区的框架区优选来自 VH³ 人抗体产生细胞族, 更优选来自人抗体产生细胞 DP31 的 VH 基因, 最优选美国专利 No. 6090382 中图 2A 和 2B 中所示的 D2E7 的 VH 框架区序列。

[0062] 本发明的再一个实施方案中提供了治疗失调的方法, 通过每两周皮下施用一次分离的人抗体或其的抗原结合部分而进行治疗。抗体或抗原结合部分, 优选其轻链可变区 (LCVR) 包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列 (即 D2E7VL), 优选其重链可变区 (HCVR) 包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列 (即 D2E7VH)。在某些实施方案中, 抗体包含重链的恒定区, 如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 或 IgD 的恒定区; 重链恒定区优选 IgG1 或 IgG4 的重链恒定区, 而且抗体包含轻链恒定区, 无论是 κ 链还是 λ 链的恒定区。优选地, 抗体包含 κ 轻链恒定区。另外, 抗体部分可以是例如 Fab 片段或是单链 Fv 片段。

[0063] 在另外的实施方案中, 本发明提供了治疗失调的方法, 通过每两周皮下施用一次分离的人抗体或其的抗原结合部分而进行治疗。抗体或其抗原结合部分优选包含 D2E7 相关的 VL 和 VH 的 CDR3 结构域, 例如下列的抗体或抗原结合部分, 其中轻链可变区 (LCVR) 具有 CDR3 结构域, 其包含的氨基酸序列选自 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 和 SEQ ID NO:26, 或重链可变区 (HCVR) 具有 CDR3 结构域, 其包含的

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 和 SEQ ID NO :35。

[0064] 本发明的抗体或抗体部分可被衍化为或连接至另一个功能分子（如另一个肽或蛋白）。相应地，被发明的抗体或抗体部分包含本文所述的人抗 hTNF α 抗体的衍生物或其它修饰体，包括免疫粘附分子。比如，本发明的抗体或抗体部分可以有效地结合（通过化学偶联、基因融合以及非共价连接等）到一个或多个其它的分子实体上，如另一种抗体（如双特异性抗体或 diabody）、检测试剂、细胞毒性试剂、药物和 / 或蛋白或肽上，其中蛋白或肽能够介导抗体或抗体部分与另一种分子（如链霉抗生物素核心区或多聚组氨酸标记）相连接。

[0065] 通过交连两种或两种以上的抗体（相同或不同类型，如产生双特异性抗体）可获得一种衍生抗体。适于交连的物质包括那些具有异质双官能，具有两个不同的反应基团并被合适的间隔物分开的物质（如 m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester）或同质双官能基团（如 disuccinimidyl suberate）。这些连接物可从 Pierce Chemical Company, Rockford, IL 公司获得 (p14-36)。

[0066] 能够与本发明抗体或抗体部分连接的可检测试剂包括荧光化合物。代表性的荧光检测试剂包括荧光素、异硫氰荧光素，若丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯，藻红蛋白等。抗体也可以与检测性的酶生成衍生物，如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶等。当抗体与可检测性的酶生成衍生物时，可以通过添加另外一种酶能够利用而产生可检测反应产物的试剂而进行检测。比如，当存在辣根过氧化物酶检测试剂时，加入过氧化氢和联苯胺就可产生可检测的颜色反应。抗体也可以和生物素生成衍生物，然后通过间接地检测亲和素或链亲和素来检测。

[0067] II. 抗体表达

[0068] 本发明的抗体或抗体部分能够通过通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白的轻链和重链而制备。为了表达重组抗体，用一个或多个携带编码免疫球蛋白抗体轻链和重链的 DNA 片段的表达载体转染宿主细胞，这样在宿主细胞中就可以表达轻链和重链，优选的宿主细胞能够分泌表达物至培养细胞的培养基，从而可以回收培养基而制备抗体。正如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编著的分子克隆：实验室操作手册，第二版，冷泉港，纽约（1989）；Ausubel F.M. 等编著的分子生物学操作程序，Greene 出版社（1989）以及 Boss 等的美国专利 No. 4816397 中所描述的，标准的重组 DNA 技术可用于获得抗体的轻链和重链基因，然后将这些基因克隆入重组表达载体，介导这些载体进入宿主细胞。

[0069] 为了表达 D2E7 或 D2E7 相关的抗体，首先需要获得编码轻链和重链的可变区 DNA 片段。这些 DNA 片段可以通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增和修饰抗体生产细胞的轻链和重链可变区而获得。本领域中，扩增人轻链和重链可变区基因的种系 DNA 序列是众所周知的（参见“Vbase”人 germline 序列数据库；参见 Kabat EA 等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest 第五版，US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242；Tomlinson I.M. 等 (1992) “the Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops” J. Mol. Biol. 227 :776-798；以及 Cox. J.P.L. 等 (1994) “A Directory of Human Germline V78 Segments Reveals a Strong Bias in their

Usage” Eur. J. Immunol. 24 :827-836 ;这些文献内容在本文中引入作为参考)。为了获得编码 D2E7 或 D2E7 相关抗体重链的 DNA 片段,可用标准 PCR 方法从人种系 VH 基因中 VH3 家族中的一员扩增。最优选扩增 DP-31VH 种系序列。为获得编码 D2E7 或 D2E7 相关抗体轻链的 DNA 片段,可用标准 PCR 方法从人种系细胞 VL 基因中 V κ I 家族中的一员扩增。最优选扩增 A20VL 种系基因。基于上述文献所揭示的核酸序列,用标准的方法设计扩增 DP-31VH 和 A20VL 序列的 PCR 引物。

[0070] 一旦获得了种系 VH 和 VL 片段,可以突变成本文所述的编码 D2E7 或 D2E7 相关的氨基酸序列。首先比较种系 VH 或 VL DNA 编码的氨基酸序列和 D2E7 或 D2E7 相关 VH 和 VL 的氨基酸序列,找出与 D2E7 或 D2E7 相关抗体序列不同的氨基酸,然后根据基因密码子确定需突变的核酸,适当的突变获得的 DNA 序列而获得突变的种系序列,该序列编码 D2E7 或 D2E7 相关抗体的氨基酸。种系序列突变由标准的方法完成,如 PCR 介导的突变(其中突变的核酸置于 PCR 引物中,这样 PCR 产物就包含了突变)或定点突变。

[0071] 一旦获得了编码 D2E7 或 D2E7 相关抗体的 DNA 片段(如上所述,通过抗体生产细胞的 VH 和 VL 扩增和修饰获得),可以进一步通过标准重组 DNA 技术操作这些 DNA 片段,比如将可变区基因转化为全长抗体链基因、Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中,编码 VL 和 VH 的 DNA 片段可操作性连接至编码另一种蛋白的 DNA 片段上,如抗体的恒定区或一个柔性接头上。在此意义上,“可操作性连接,,一词,是指两个 DNA 片段连接使得两段 DNA 编码的氨基酸序列保持在框架中。

[0072] 分离的编码 VH 区的 DNA 可以转化成全长的重链基因,方法是可操作性地连接编码 VH 的 DNA 至另一个编码重链恒定区(CH1, CH2 和 CH3)的 DNA 分子。人重链恒定区的序列在本领域是已知的(参见 Kabat EA 等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest 第五版,US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91.3242),而且包含这些区域的 DNA 片段可以通过标准的 PCR 扩增方法获得。重链恒定区可以是 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 或 IgD 的恒定区,但最优选的是 IgG1 或 IgG4 的恒定区。对 Fab 片段的重链基因,编码 VH 的 DNA 可操作性的连接至另一仅编码重链 CH1 恒定区的 DNA 分子上。

[0073] 分离的编码 VL 区的 DNA 可以转化成全长的轻链基因(和 Fab 轻链基因),方法是可操作性的连接编码 VL DNA 至另一个编码轻链恒定区 CL DNA 分子。人轻链恒定区序列在本领域是已知的(参见 Kabat EA 等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest 第五版,US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242),而且包含这些区域的 DNA 片段可以通过标准的 PCR 扩增方法获得。轻链恒定区可以是 κ 链或 λ 链恒定区,但最优选的是 κ 链的恒定区。

[0074] 为构建 scFv 基因,可将编码 VH 和 VL 的 DNA 片段可操作性连接至编码一柔性接头的片段上,如编码氨基酸序列 (Gly₄-Ser)₃,这样 VH 和 VL 就可以表达成一条连续的单链蛋白,其中 VL 和 VH 区被柔性接头连接在一起(参见 Bird 等(1988)Science242 : 423-426 ;Huston 等(1988)Proc Natl Acad Sci USA85 :5879-5883 ;McCafferty 等 Nature(1990)348 :552-554)。

[0075] 为表达本发明的抗体或抗体部分,如上述获得的编码部分或全部轻链和重链的 DNA,可以插入表达载体,这样基因就被可操作性的连接至转录和翻译调控基因。在本文中,

“可操作性连接”表达的意思是：抗体基因连接至载体后，载体中转录和翻译调控基因就能够如同设计的功能一样调节抗体基因的转录和翻译，选择的载体和表达调控序列需与宿主细胞相容。抗体的轻链基因和重链基因可插入独立的载体，或更为普遍的是将两段基因插入同一表达载体。抗体基因可用标准方法插入表达载体（如连接抗体基因片段和载体上互补的酶切位点，或如果没有限制性酶切位点时用钝端连接）。在 D2E7 或 D2E7 相关的轻链和重链序列插入之前，表达载体可已经携带有抗体的恒定区基因序列。比如，一种转化 D2E7 或 D2E7 相关 VH 和 VL 序列为全长抗体基因的方法是将它们分别插入至含编码轻链和重链恒定区的表达载体中，这样 VH 片段就可操作性的连接至载体内 CH 片段上，而 VL 片段就可操作性的连接至载体内 CL 片段上。另外的或可选择性的做法是：重组表达载体可编码信号肽，这样利于宿主细胞分泌抗体链。抗体链基因可被克隆入载体，就使信号肽与抗体链基因连接并保持了氨基酸读码框架不变。信号肽可以使免疫球蛋白的信号肽或异源的信号肽（即源于非免疫球蛋白的蛋白信号肽）。

[0076] 除抗体链基因外，本发明重组表达载体携带调控序列，能够调节抗体链在宿主细胞中的表达。“调控序列”包括启动子、增强子和其它表达控制元件（如多聚腺苷酸信号），这些序列控制抗体基因的转录或翻译。这些调控序列在许多文献中有详述，比如在 Goeddel 所著的 *Gene Expression Technology: Methods In Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)。本领域的技术人员可以理解：表达载体的设计，包括调控序列的选择，取决于如要转化的宿主细胞、欲表达的蛋白表达状况等。优选的调控哺乳动物细胞表达的序列包括：能够指导蛋白在哺乳动物细胞中高水平表达的病毒元件，如源于巨细胞病毒（如 CMV 的启动子 / 增强子），猴病毒 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)）和多瘤病毒的启动子和 / 或增强子。关于病毒调控元件的详尽描述以及序列，参见 Stinski 的美国专利 No. 5168062, Bell 的美国专利 No. 4510245 以及 Schaffner 等的美国专利 No. 4968615。

[0077] 除抗体链基因和调控序列外，本发明的重组病毒载体可携带其它的序列，如调控载体在宿主细胞中复制的序列（如复制起点）和选择性标记基因。选择性标记基因利于将转入载体的宿主细胞筛选出来（参见 Axel 等的美国专利 No. 4399216、4634665 和 5179017）。比如，通常的选择性标记基因赋予转入载体的细胞以药物抗性，如抗 G418、潮霉素和氨甲蝶呤抗性。优选的选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因（将氨甲蝶呤用于筛选和扩增培养 dhfr⁻ 的宿主细胞）以及 neo 基因（用于 G418 筛选）。

[0078] 为了表达轻链和重链，用标准技术可将编码轻链和重链的表达载体转染一种宿主细胞。术语“转染”的不同形式包括通常用于将外源 DNA 引入原核或真核宿主细胞的广泛技术，如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖苷转染等。虽然理论上无论原核还是真核细胞都可能表达本发明的抗体，但最优选的是真核细胞表达抗体，尤其优选哺乳动物细胞表达，因为这类真核细胞尤其是哺乳动物细胞比原核细胞更倾向于组装和分泌出正确折叠的、有免疫学活性的抗体。有研究报告称：抗体基因的原核病毒不能有效制备高产的活性抗体 (Boss MA 和 Wood CR (1995) *Immunology Today* 6:12-13)。

[0079] 优选的表达本发明重组抗体的哺乳动物宿主细胞，包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)（包括 dhfr-CHO 细胞，在 Urlaub 和 Chasin (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216-4220 中有说明，用 DHFR 筛选标志，如 R. J. Kaufman 和 P. A. Sharp (1982) *Mol Biol* 159:601-621)，

NS0 骨髓瘤细胞, COS 细胞和 SP2 细胞。当编码抗体基因的重组表达载体转入哺乳动物宿主细胞后, 将其培养一段时间使抗体在宿主细胞中表达而获得抗体, 最优选的是细胞将抗体分泌至培养细胞的培养基中。然后用标准的蛋白纯化方法从培养基中回收。

[0080] 宿主细胞可用于生产完整抗体的部分, 如 Fab 片段或 scFv 分子。可以理解上述方法的任何变通都包括在本发明的范围之内。比如, 可能需要用编码本发明轻链或重链的 DNA (但不是两个) 转染一宿主细胞。重组 DNA 技术也可用于去除部分或全部的编码轻链和重链中对结合 TNF α 不是必需的 DNA。从这样剪切后的 DNA 分子表达的分子也包括在本发明抗体范畴。另外, 通过标准的化学交连方法将本发明的抗体与第二种抗体交连而生产出双功能抗体, 其中一条轻链和一条重链是本发明的抗体, 另一条轻链和另一条重链是特异性结合另一种抗原而非 hTNF α 的抗体。

[0081] 在优选的表达本发明抗体或抗原结合部分的重组表达系统中, 编码抗体轻、重链的重组表达载体用磷酸钙介导的转染方法转入 dhfr-CHO 细胞中, 重组表达载体中抗体轻链和重链基因可操作性的连接至 CMV 增强子 / AdMLP 启动子等调控元件, 以使基因的转录水平提高。重组表达载体同时也携带 DHFR 基因, 可以用氨甲蝶呤筛选 / 扩增转染了载体的宿主细胞。然后培养筛选出的宿主细胞, 让其表达抗体的轻链和重链并从培养基中回收完整的抗体。标准的分子生物学技术用于制备重组表达载体, 转染宿主细胞, 筛选转染细胞, 培养宿主细胞以及从培养基中回收抗体。

[0082] III. 重组人抗体的选择

[0083] 除 D2E7 或其抗原结合部分或本文所述的 D2E7 相关抗体外的重组人抗体, 可以通过筛选重组联合抗体文库而分离, 优选 scFv 噬菌体展示文库, 该文库是用源于人淋巴细胞 mRNA 制备的 VL 和 VHcDNA 构建的。本领域内, 制备和筛选这类文库的方法是已知的 (如: the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; 以及 the Stratagene SurfZAPTM phage display kit, catalog no. 240612)。从下列文献中可以找出确实可行的制备和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例, 如 Ladner 等的美国专利 No. 5223409; Kang 等的 PCT 出版物 W092 / 18619; Dower 等的 PCT 出版物 W091 / 17271; Winter 等的 PCT 出版物 W092 / 20791; Markland 等的 PCT 出版物 W092 / 15679; Breitling 等的 PCT 出版物 W093 / 01288; McCafferty 等的 PCT 出版物 W092 / 01047; Garrard 等的 PCT 出版物 W092 / 09690; Fuchs 等 (1991) Bio / Technology 9:1370-1372; Hay 等 (1992) Hum Antibod Hydridoma 3:81-85; Huse 等 (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty 等 Nature (1990) 348:552-554; Griffiths 等 (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins 等 (1992) J. Mol Biol 226:889-896; Clackson 等 (1991) Nature 352:624-628; Gram 等 (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard 等 (1991) Bio / Technology 9:1373-1377; Hoogenboom 等 (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; 以及 Barbas 等 (1991) PNAS 88:7978-7982。

[0084] 在一优选实施方案中, 为了分离具有高亲和力以及低解离常数的与 hTNF α 结合的人抗体, 首先施用具有高亲和力以及低解离常数的、与 hTNF α 结合的鼠抗 hTNF α 抗体 (如 MAK195 杂交瘤, 其保藏号为 ECACC87050801) 筛选具有相似结合 hTNF α 活性的人轻链和重链序列, 所用方法为 Hoogenboom 等的 PCT 出版物 W093 / 06213 中所述的表位印迹方法, 该方法中所用文库优选 scFv 文库, 文库的制备与筛选参见 McCafferty 等的 PCT 出版物 W092 / 01047, McCafferty 等 Nature 348:552-554; 以及 Griffiths 等 (1993) EMBO J 12:

725-734。优选用重组人 TNF α 作为抗原筛选 scFv 抗体文库。

[0085] 一旦筛选出人 VH 和 VL 片段,可以进行“混合和匹配”实验,即将选出的不同对的 VL 和 VH 片段用于筛选其与 hTNF α 的结合,筛选出优化的 VL / VH 对。此外,为进一步提高亲和力和 / 或降低从 hTNF α 的解离常数,可对优选出的 VL / VH 对的 VL 和 VH 片段进行随机突变,优选在 VH 和 / 或 VL 区的 CDR3 区突变,其过程类似于体内体细胞突变过程,该过程对应于天然免疫反应中抗体亲和力的突变。体外亲和力突变可以用分别与 VH CDR3 和 / 或 VL CDR3 互补的 PCR 引物来扩增 VH 和 VL 区而实现,其中在引物的某位置嵌入随机的四核苷酸,这样获得的编码 VH 和 VL 的 CDR3 区的 PCR 产物中就引入了随机突变。这些随机突变的 VH 和 VL 片段再用于 hTNF α 结合的筛选,选出具有高亲和力以及低解离常数的与 hTNF α 结合的序列。

[0086] 从重组的免疫球蛋白展示文库中筛选、分离出本发明的抗 hTNF α 抗体后,从噬菌体包装体(如,从噬菌体基因组)中回收编码选出的抗体核酸序列,然后亚克隆入其它的表达载体,方法为标准重组 DNA 技术。如果愿意,可对该核酸可以进一步操作,以转成本发明的其它的抗体形式(如与编码免疫球蛋白的其它结构域的核酸连接,比如恒定区)。为了表达从联合文库中筛选的重组人抗体,可将编码抗体的基因克隆入重组表达载体,然后转入哺乳动物宿主细胞,这在上面第二部分中已详细论述过了。

[0087] IV. 药物组合物和药物施用

[0088] 本发明的抗体和抗体部分可以配伍至给受试者施用的药物组合物中,适合的方法为本文所述,如每两周皮下定量施用。通常,药物组合物包含本发明的抗体(或抗体部分)和 / 或氨甲蝶呤以及药学上接受的载体。本文所用的“药学上可接受的载体”包括任意和全部的溶剂、分散介质、包衣、抗生素与抗真菌药物、等渗和吸收缓释药物等,这些物质是生理学上相容的、适用于本文所述的给受试者的用药方法。药学上可接受的载体实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲液、葡萄糖、甘油、乙醇等的一种或多种,以及这些物质联用。多数情况下,组合物中优选施用的物质包括等渗试剂,如糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇或氯化钠。药学上可接受的载体实例可能进一步包含少量的附加物质,如增湿或乳化试剂、保护剂或缓冲液,这些物质可以提高抗体或抗体部分的保存限期或有效性。

[0089] 本发明的组合物可以多种形式出现,包括比如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(注射和输注溶液),分散剂或悬液,片剂,丸剂,粉剂,脂质体以及栓剂。优选的形式因施用组合物的预想模式而定。优选的组合物是注射和输注溶液形式,如类似于用其他抗体被动免疫人时所用的组合物。用药的优选方式是胃肠外方式(如静脉注射,皮下注射、腹膜注射、肌肉注射)。优选实施方案中,通过静脉注射和输注方式施用抗体。在另一优选实施方案中,通过肌肉注射方式施用抗体。在特别优选实施方案中,通过皮下注射方式施用抗体(如每两周皮下注射方式用药一次)。

[0090] 治疗组合物在制造和存储时,通常必须是无菌而且稳定的。这些组合物可以配制溶液、微乳化剂、分散剂、脂质体或其它适于高浓度施用的预定结构。无菌注射溶液可通过将活性化合物(抗体或抗体部分)以所需的浓度在合适的溶剂中溶解后,与需要的其它联用组分的一种或多种配伍,然后过滤除菌。通常,分散药剂是通过将活性组分与无菌的载体配伍后制备,载体包含基本的分散基质和其它所需的乳化组分。制备无菌注射溶液用的无菌粉末时,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,以获得含有活性的组分以及前述的

过滤的添加组分。溶液适当的流动性可以通过使用,如卵磷脂等的包衣,或使用分散剂维持所需的颗粒大小或通过使用表面活性剂等维持。延缓注射组分的吸收可以通过在组分中添加延缓吸收的制剂,比如单硬脂酸盐和凝胶。

[0091] 尽管对于多数治疗应用而言,优选的途径/模式是皮下注射,但本发明抗体和抗体部分的许多施用方法在本领域内都是已知的。如本领域内技术人员理解的一样,用药途径和/或模式取决于想要的结果。在某些实施方案中,活性组分与载体制备在一起,载体将阻止化合物的快速释放,包括比如植入、皮肤贴剂以及微胶囊用药等可控释放制剂。生物降解性的、生物兼容性的多聚体,如乙烯乙酸乙烯酯,聚乙二醇(PEG),聚酐,聚羧乙酸,胶原, polyorthoesters 和聚乳酸等都可使用。许多制备这些制剂的方法已经申请专利或对本领域的技术人员而言是已知的。参见 Sustained and controlled release drug delivery systems, J. R. Robinson 编著, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0092] 在某些实施方案中,本发明抗体或抗体部分可以口服,如与无活性的稀释液或可同化、消化的载体一起。化合物(和其它需要的组分)也可以包在硬或软的胶囊壳中,压缩在片剂中或配伍至受试者饮食中。为了口服治疗,化合物可以掺入赋形剂,而且以可消化的片剂、咀嚼片、片剂、胶囊、药液、悬浮液、糖浆、薄膜等方式施用。为了在消化道应用,可以用其它物质包裹本发明的化合物或共用施用,以免其失活。

[0093] 附加的活性化合物也可以配制进该组合物中。在某些实施方案中,本发明的抗体或抗体部分与一种或多种附加治疗药物配伍或共同施用。比如,本发明的抗体或抗体部分可以与氨甲蝶呤配伍或共同施用,可以与一种或多种结合其它抗原的抗体(如,与细胞因子或细胞表面分子结合的抗体),一种或多种细胞因子,可溶性 TNF α 受体(参见 PCT 出版物 W093 / 06476)和/或一种或多种抑制 hTNF α 产生或其活性的化学物质(如 PCT 出版物 W093 / 197501 cyclohexaneylidene 的衍生物)。再者,本发明的一种或多种抗体可以与前述的两种或两种以上的治疗剂施用。这类联合治疗便于施用小剂量的治疗剂,因而避免了可能的毒性或与不同的单治疗剂施用带来的相关问题。本发明抗体或抗体部分与其它治疗药物的联用将在第 IV 部分中进一步详细讨论。

[0094] 可以与本发明抗体或抗体部分联用的、治疗类风湿性关节炎的药物非限制性实例包括:非类固醇抗炎性药物(NSAIDs);细胞因子抑制性抗炎性药物(CSAIDs); CDP-571 / BAY-10-3356(人源化的抗 TNF α 抗体;Celltech / Bayer);cA2(嵌合抗 TNF α 抗体;Centocor);75kdTNFR-IgG(75kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白;Immunex;参见 Arthritis & Rheumatism(1994)Vol. 37, S295;J. Invest. Med. (1996) vol. 44, 235A);55kdTNFR-IgG(55kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白;Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1 / SB210396(非消耗性灵长化抗 CD4 抗体;IDEC / SmithKline;参见 Arthritis&Rheumatism(1995)Vol. 38, S185);DAB486-IL-2 和/或 DAB389-IL-2(IL2 融合蛋白;Seragen;参见 Arthritis&Rheumatism(1993)Vol. 36, 1223);Anti-tac(人源化抗 IL-2R α ;Protein Design Labs/Roche);IL-4(抗炎性因子;DNAX / Schering);IL-10(SCH52000;重组 IL10, 抗炎性因子;DNAX / Schering);IL-4;IL-10 和/或 IL-4 激动剂(如激动抗体);IL-1RA(IL-1 受体拮抗剂;Synergen / Amgen);TNF-bp / s-TNFR(可溶性 TNF 结合蛋白;参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S284;Amer. J. Physiol. -Heart and Circulatory Physiology(1995)vol. 268, pp37-42);

R974301(IV 型磷酸二酯酶抑制剂;参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S282);MK-966(COX-2 抑制剂;参见 Arthritis & Rheumatism(1996)vol39, No. 9(supplement), S81);Iloprost(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol39, No. 9(supplement), S82);氨甲蝶呤;酰胺哌啶酮(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S282)和酰胺哌啶酮相关药物(例如 Celgen);leflunomide(抗炎性和细胞因子抑制剂;参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S131;Inflammation Research(1996)vol. 45, pp. 103-107);氨甲环酸(纤溶酶原激活抑制剂,参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), s284);T-614(细胞因子抑制剂;参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S282);前列腺素 E1(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S282);Tenidap(非类固醇类抗炎药,参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S280);Naproxen(非类固醇类抗炎药;参见 Neuro Report(1996)vol. 7, pp. 1209-1213);美洛昔康(非类固醇类抗炎药);布洛芬(非类固醇类抗炎药);吡罗昔康(非类固醇类抗炎药);二氯芬酸(非类固醇类抗炎药);indomethacin(非类固醇类抗炎药);水杨酸偶氮磺胺吡啶(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S281);硫唑嘌呤(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S281);ICE 抑制剂(白介素 1 β 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抑制剂或血管内皮细胞生长因子受体;血管生成抑制剂);类皮质酮抗炎性药物(例如 SB203580);TNF 蛋白转化酶抑制剂;抗白介素 2 抗体;白介素 11(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S296);白介素 13(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S308);白介素 17(参见 Arthritis&Rheumatism(1996)vol. 39, No. 9(supplement), S120);gold;青霉胺;氯奎;羟氯喹;苯丁酸氮芥;环磷酰胺;环孢霉素;全身淋巴放射治疗药物;抗胸腺细胞球蛋白;抗 CD4 抗体;CD5- 毒素;口服肽和胶原蛋白;氯苯扎利二钠;细胞因子调控药物(CRAs)HP228 和 HP466(Houghten Pharmaceuticals 公司);ICAM-1 二硫代磷酸酯的反义寡聚脱氧核酸(ISIS2302;Isis 医药公司);可溶性补体受体 1(TP10;T 细胞科学公司);泼尼松;奥古蛋白;硫酸葡糖胺聚糖;美满霉素;抗白介素 2 受体抗体;海产品和植物脂类(鱼和植物种子脂肪酸;参见 Deluca 等(1995)Rheum. Dis. Clin. North Am. 21:759-777);金诺芬;保泰松;甲氯芬那酸;氟奋那酸;静脉用免疫球蛋白;齐留通;麦考酚酸(RS-61443);tacrolimus(FK-56);西罗莫司(雷帕霉素);氨普立糖(therafectin);克拉屈滨(2- 氯脱氧腺苷)和阿扎立平。

[0095] 可以与本发明抗体或抗体部分联用的、治疗炎性肠道疾病的药物的非限制性实例包括:budenoside;表皮生长因子;类皮质酮;环孢菌素,水杨酸偶氮磺胺吡啶;氨基水杨酸盐;巯基嘌呤;硫唑嘌呤;metronidazole;脂加氧酶抑制剂;氨基水杨酸;奥沙拉秦;巴柳氮;抗氧化剂;血栓素抑制剂;白介素 1 受体拮抗剂;抗白介素 1 β 单抗;抗白介素 6 单抗;生长因子;弹性蛋白酶抑制剂;吡啶-咪唑化合物;CDP-571 / BAY-10-3356(人源化的抗 TNF α 抗体;Celltech / Bayer);cA2(嵌合抗 TNF α 抗体;Centocor);75kdTNFR-IgG(75kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白;Immunex;参见 Arthritis&Rheumatism(1994)Vol. 37, S295;J. Invest. Med. (1996)vol. 44235A);55kdTNFR-IgG(55kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白;

Hoffmann-LaRoche); IL-10 (SCH52000; Schering Plough); IL-4; IL-10 和 / 或 IL-4 激动剂 (如激动抗体); 白介素 11; 葡糖苷酸或葡聚糖连接的泼尼松龙, 地塞米松或布德松前药; ICAM-1 二硫代磷酸酯的反义寡聚脱氧核酸 (ISIS2302; Isis 医药公司); 可溶性补体受体 1 (TP10; T 细胞科学公司); 缓释氨基水杨酸; 氨甲蝶呤; 血小板活化因子 (PAF) 拮抗剂; 环丙沙星和利诺卡因。

[0096] 可以与本发明抗体或抗体部分联用的、治疗多发性硬化病的药物的非限制性实例包括: 类皮质酮; 脱氢皮质醇; 甲基脱氢皮质醇; 咪唑硫嘌呤; 环磷酰胺; 环孢菌素; 氨甲蝶呤, 4-氨基吡啶; 替托尼定; 干扰素- β 1a (AvonexTM; Biogen); 干扰素 β 1b (BetaseronTM; Chiron / Berlex); 共聚物 1 (Cop-1; CopaxoneTM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); 高压氧法; 静脉用免疫球蛋白; clabribine; CDP-571 / BAY-10-3356 (人源化的抗 TNF α 抗体; Celltech / Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75kdTNFR-IgG (75kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见 Arthritis&Rheumatism (1994) Vol. 37, s295; J. Invest. Med. (1996) vol44235A); 55kdTNFR-IgG (55kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); IL-10; IL-4; IL-10 和 / 或 IL-4 激动剂 (如激动抗体)。

[0097] 可以与本发明抗体或抗体部分联用的、治疗败血病的药物的非限制性实例包括: 高渗盐溶液; 抗生素; 静脉用 γ 免疫球蛋白; 连续血液滤过; κ 青霉烯 (如米诺配能); 如 TNF α 、IL-1 β 、IL6 和 / 或 IL8 细胞因子的拮抗剂; CDP-571 / BAY-10-3356 (人源化的抗 TNF α 抗体; Celltech / Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75kdTNFR-IgG (75kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见 Arthritis&Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) vol. 44, 235A); 55kdTNFR-IgG (55kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche); 细胞因子调控药物 (CRAs) HP228 和 HP466 (Houghten Pharmaceuticals 公司); SK&F107647 (小分子肽; SmithKline Beecham); 四价丙咪唑 CNI-1493 (Picower Institute); 组织因子途径抑制剂 (TFPI; Chiron); PHP (化学修饰的血色素; APEX Bioscience); 铁螯合剂和螯合物, 包括二乙撑三胺五乙酸-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 Therapeutics 公司); PGG- 葡聚糖 (水溶性的 β 1,3 葡聚糖; Alpha-Beta 技术公司); 载脂的载脂蛋白 A-1; 手性异羟肟酸 (合成的能够抑制脂质 A 生物合成的抗菌素); 抗内毒素抗体; E5531 (合成的脂质 A 拮抗剂; Eisai America 公司); rBPI₂₁ (重组的人杀菌 / 渗透性增强蛋白的 N 末端片段); 以及合成的抗内毒素肽 (SAEP; Biosynth 研究实验室)。

[0098] 可以与本发明抗体或抗体部分联用的、治疗成人呼吸窘迫综合征的药物的非限制性实例包括: 抗 IL-8 抗体; 表面活性剂替代疗法; CDP-571 / BAY-10-3356 (人源化的抗 TNF α 抗体; Celltech / Bayer); cA2 (嵌合抗 TNF α 抗体; Centocor); 75kdTNFR-IgG (75kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白; Immunex; 参见 Arthritis&Rheumatism (1994) Vol. 37, S295; J. Invest. Med. (1996) vol. 44235A); 55kdTNFR-IgG (55kd 的 TNF 受体-IgG 融合蛋白; Hoffmann-LaRoche)。

[0099] 本发明药物组合物包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体或抗体部分。“治疗有效量”是指在一定剂量和必需的一段时间下, 有效地达到预期的治疗效果的量。抗体或抗体部分的治疗有效总量可根据如疾病状态、年龄、性别或个体体重以及抗体或抗体部分在每个个体内诱导预期反应的能力等因素而不同。治疗有效量同时也是一种抗体或抗

体部分治疗效果要大于其带来的任何毒性或有害性的剂量。“预防有效量”是指在一定剂量和必需的一段时间下,有效地达到预期的预防效果的量。通常,由于预防用药是预先或在发病的早期给受试者用药,所以预防有效量低于治疗有效量。

[0100] 用药方案可以调整以达到最佳效果(如治疗或预防效果)。比如,一次大剂量用药、一段时间内分几次用药或根据治疗情形的紧迫程度按比例减少或增加剂量。以剂量单位形式配制的胃肠外组合物施用方便、剂量统一,这是其最大的优点。本文所用的剂量单位形式是指:不连续剂量,且该剂量是适于给哺乳动物受试者治疗用的单个剂量单位;每个单位含有预定量的活性化合物,与所需的药学载体一起,预计可以产生预期的治疗效果。本发明的剂量单位方式直接由下列因素确定和决定:(a) 活性化合物的特性,要达到的确切的治疗或预防效果;(b) 化合物领域的内在限制,如一种活性化合物对每个个体治疗的敏感性。

[0101] 例如,本发明抗体或抗体部分的治疗或预防有效量的非限制性范围是 10 ~ 100 毫克,较优选的是 20 ~ 80 毫克,最优选的约 40 毫克。应当注意剂量值可随要缓解的病情类型以及严重程度变化而变化。对于确切的个体,在一段时间内按照个体需要以及施用药物的人或监督用药人的专业判断,用药方案应当调整,这都是应当能够理解的,本文提供的剂量范围仅是实例性的,并不是对所保护组合物的范围或应用的限制。

[0102] V. 本发明抗体的应用

[0103] 本发明抗 hTNF α 抗体或其部分,具有结合 hTNF α 的活性,因此用常规的免疫学检测方法可检测 hTNF α (如血清或血浆等生物样本中的),所述免疫学检测方法如酶联免疫吸附检测法(ELISA)、放免检测(RIA)或免疫组织化学检测。本发明提供了检测生物样本中 hTNF α 的方法,这些方法包括检测与抗体或抗体部分作用的生物样本和检测与 hTNF α 结合的或不结合的抗体或抗体部分,进而检测生物样品中的 hTNF α 。抗体可以用可检测的底物直接或间接标记,利于检测结合或未结合的抗体。可用的可检测底物包括各种酶、互补基团、荧光物质、发光物质和放射性物质。适用的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适用的互补基团实例包括链亲和素/生物素和亲和素/生物素;适用的荧光物质实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪氨荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的一个实例包括鲁米诺;适用的放射性物质包括 ^{125}I 、 ^{136}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0104] 除标记抗体外,生物体液中的 hTNF α 可以用竞争性免疫检测法检测,该方法使用标记了可检测物质的重组人 TNF α 作为标准和未标记的抗 TNF α 抗体。在该检测中,生物样品、标记的 rhTNF α 标准品和抗 TNF α 抗体结合联用,测定结合至未标记抗体的、标记的 rhTNF α 的量,生物样品中的 hTNF α 的量与结合在抗 TNF α 抗体上的标记的 TNF α 的量呈反比。

[0105] 本发明的 D2E7 抗体也可以用于检测来源于非人的其它种的 TNF α ,尤其是来源于灵长类(如黑猩猩,狒狒,绒,猕猴和恒河猴)以及猪和鼠的 TNF α ,因为 D2E7 能够与这些 TNF α 结合。

[0106] 本发明的抗体和抗体部分能够在体内外中和 hTNF α 的活性(参见美国专利 No. 6090382)。而且至少本发明的某些抗体,如 D2E7 抗体,能够中和其它物种的 hTNF α 。因此,本发明的抗体或抗体部分可用于抑制 hTNF α 活性,如在含 hTNF α 的细胞培养物、以及

具有与本发明抗体交叉反应的 TNF α 的人或其它哺乳动物（如黑猩猩，狒狒，绒，猕猴和恒河猴以及猪和鼠）中。在一个实施方案中，本发明提供了抑制 TNF α 活性的方法，该方法包含施用本发明的抗体或抗体部分与 TNF α 作用，从而抑制 TNF α 活性。优选的 TNF α 是人 TNF α 。例如，在含有或怀疑含有 TNF α 的细胞培养物中，可将本发明的抗体或抗体部分加入培养液中以抑制其中 hTNF α 活性。

[0107] 在优选的实施方案中，本发明提供了治疗失调的方法，其中施用抗 TNF α 抗体是有益的，所述方法包括每两周给受试者皮下施用一次本发明的抗体或抗体部分，来治疗疾病。在特别优选的实施方案中，抗体的施用是按每两周皮下施用一次抗体。在另一个特别优选的实施方案中，施用氨甲蝶呤前，施用过程中和施用后，皮下施用抗体。优选的受试者是人。此外，受试者可以是表达与本发明的抗体交叉反应的 TNF α 的哺乳动物。受试者也可以是引入 hTNF α 的哺乳动物（如施用 hTNF α 或表达 hTNF α 转基因的动物）。本发明的抗体为治疗目的而给人受试者施用（下面进一步讨论）。本发明的抗体也可为医治动物目的而给表达 TNF α 的非人哺乳动物（如灵长类、猪或鼠）施用，该动物表达的 TNF α 与所用抗体有交叉反应，或作为人类疾病的一种动物模型而施用。对于后者，这种动物模型对于评价本发明抗体的疗效是有用的（如测试施用剂量和时间）。

[0108] 本文所用的术语“一种失调，其中施用抗 TNF α 抗体是有益的”包括下列疾病或其它失调，即该病患者体内的 TNF α 的存在是或怀疑是该病病理学的发病原因或对该病恶化起作用，或者已有证据表明另一种抗 TNF α 抗体或其抗体部分成功用于治疗该疾病。因此，由于 TNF α 活性有害致病的一种疾病，是一种可通过抑制 TNF α 活性预期能够缓解该病症状和 / 或进程的疾病。这类疾病可被证明，如，患这种疾病的患者个体的生物体液中的 TNF α 浓度增高（如患者的血清、血浆、滑液等的 TNF α 浓度升高），这一特点可以用如上所述的抗 TNF α 抗体检测。不少疾病中 TNF α 活性有害。下面将进一步讨论治疗特定疾病中的抗体或抗体部分的施用：

[0109] A. 败血症

[0110] 肿瘤坏死因子在败血症的病理学中的作用和生物学效应已经确定，这些生物学效应包含血压过低，心肌抑制，血管泄漏综合症，器官坏死，刺激有害的第二介质的释放和激活凝血过程（参见 Tracey 和 Cerami 等 (1994) *Annu Rev Med* 45 :491-503 ;Russell, D. 和 Thompson R. C. 等 (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4 :714-721)。因此，本发明人抗体或抗体部分可用于治疗任何临床发病的败血症，包括感染性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒症和中毒性休克综合征。

[0111] 此外，为了治疗败血症，本发明的抗 TNF α 抗体或抗体部分可以与一种或多种其它可进一步缓解败血症的治疗药物联用，这些药物如白介素 1 抑制剂（如 PCT 出版物 W092 / 16221 和 W092 / 17583），细胞因子白介素 6（参见 PCT 出版物 W093 / 11793）或血小板活化因子的拮抗剂（参见欧洲专利申请出版物 EP374510）。

[0112] 另外，在优选的实施方案中，给患败血症的个体施用本发明的抗 TNF α 抗体或抗体部分时，其血清或血浆 IL6 浓度达到 500pg / ml 以上，较优选的为 1000pg / ml。

[0113] B. 自身免疫性疾病

[0114] 肿瘤坏死因子在各种自身免疫性疾病的病理学中起一定的作用。比如，TNF α 参与了组织炎症的激活和类风湿性关节炎中关节的破坏（参见 Tracey 和 Cerami, 见上；

Arend W.P. 和 Dayer J-M(1995)Arth Rheum. 38 :151-160 ;Fava R. A. 等 (1993)Clin Exp Immunol, 94 :261-266)。TNF α 也参与了糖尿病患者体内胰岛细胞死亡的启动以及调控胰岛素抗性 (参见上述 Tracey 和 Cerami ;PCT 出版物 W094 / 08609)。TNF α 也参与了多发性硬化症患者体内,对少突胶质细胞细胞毒性的介导和诱导炎症斑块 (参见上述 Tracey 和 Cerami)。嵌合抗体和人源化鼠抗 hTNF α 抗体已经通过了临床上治疗类风湿性关节炎的实验 (参见 Elliott M. J. 等 (1994)Lancet344 :1125-1127 ;Elliott M. J. 等 (1994)Lancet344 :1105-1110 ;Rankin E. C. 等 (1995)Br. J. Rheumatol. 34 :334-342)。

[0115] 本发明的人抗体或抗体部分可用于治疗自身免疫性疾病,尤其是那些与炎症有关的疾病,包括类风湿性关节炎,类类风湿性脊椎炎,骨关节炎,痛风性关节炎,多发性硬化症,自免性糖尿病,自免性色素层炎和肾病综合征。虽然对某种疾病,在炎症部位局部施用抗体或抗体部分 (在类风湿性关节炎患者关节部位局部用药或给糖尿病性溃疡局部涂药,单独或与环己烷亚基衍生物联用,如 PCT 出版物 W093 / 19751 所述) 是有效的,但通常为系统用药。

[0116] C. 传染病

[0117] 在多种传染病观察到:肿瘤坏死因子参与了介导的生物学效应。比如,TNF α 与疟疾中脑部炎症和毛细血管血栓以及梗塞有关 (参见上述 Tracey 和 Cerami);TNF α 也与脑膜炎中脑部炎症有关,包括血脑屏障障碍,触发感染性休克以及激活静脉栓塞 (参见上述 Tracey 和 Cerami);TNF α 也与获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 中的恶疾、激活病毒复制以及介导中枢神经系统损伤有关 (参见上述 Tracey 和 Cerami);因此,本发明的抗体或抗体部分可用于治疗的传染病,包括细菌性脑膜炎 (参见欧洲专利申请出版物 EP585705),脑型疟,艾滋病和艾滋病相关复征 (ARC) (参见欧洲专利申请出版物 EP230574),以及移植后的巨细胞病毒感染 (参见 Fietze E 等 (1994)Transplantation58 :675-80)。本发明的抗体或抗体部分也可用于缓解与传染病相关的症状,包括感染 (如流感) 所致的发热和肌痛以及感染后的恶疾 (AIDS 或 ARC 后继发的)

[0118] D. 移植

[0119] 肿瘤坏死因子是同种移植排斥和移植物抗宿主疾病 (GVHD) 的关键因素,并且介导一种有害反应,这种反应在施用直接与 T 细胞受体 CD3 结合的大鼠抗体 OKT3 可抑制肾移植排斥反应中观察到 (参见上述 Tracey 和 Cerami ;Eason, J. D. 等 (1995)Transplantation59 :300-305 ;Suthanthiran M. 和 Strom T. B. (1994)New Engl. J. Med. 331 :365-75)。因此,本发明的抗体或抗体部分可用于抑制移植排斥,包括同种异体移植排斥和异种移植排斥以及抑制 GVHD。虽然本发明的抗体或抗体部分可以单独施用,但优选与一种或多种能够抑制同种异体移植排斥或抑制 GVHD 的药物联用。比如,在某一实施方案中,本发明的抗体或抗体部分可以与 OKT3 联用,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与一种或多种抗体联用,其中联用的抗体直接与其它调节免疫反应的靶标结合,比如细胞表面分子 CD25 (白介素 2 受体 - α), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28 / CTLA4, CD80 (B7-1) 和 / 或 CD86 (B7-2)。在另一个实施方案中,本发明的抗体或抗体部分与一种或多种通用的免疫抑制剂如环磷酰胺 A 或 FK506 联用。

[0120] E. 恶性肿瘤

[0121] 肿瘤坏死因子与恶性肿瘤所致的恶疾、刺激肿瘤生长、增强肿瘤转移可能性以及

介导的恶性肿瘤细胞毒性有关（参见上述 Tracey 和 Cerami）。因此，本发明的抗体或抗体部分可用于恶性肿瘤治疗，抑制肿瘤生长或转移和 / 或缓解肿瘤后的恶疾。本发明的抗体或抗体部分可以系统施用或在肿瘤部位局部用药。

[0122] F. 肺病

[0123] 肿瘤坏死因子与成人呼吸窘迫综合征的病理学有关，包括白细胞 - 内皮细胞活化，导致对肺细胞的细胞毒性以及诱导血管泄漏综合症（参见上述 Tracey 和 Cerami）。因而，本发明的抗体或抗体部分可用于治疗不同的肺病，包括成人呼吸窘迫综合征（参见 PCT 出版物 W091 / 04054），肺休克，慢性肺炎，肺部肉状瘤病，肺纤维化和硅肺病。抗体或抗体部分可以系统施用和在肺部表面局部施用，如作为气溶剂施用。

[0124] G. 肠道疾病

[0125] 肿瘤坏死因子与炎性肠道疾病的病理学有关（参见 Tracy, K. J. 等 (1986) science234 :470-474 ;Sun X-M 等 (1998) J. Clin. Invest. 81 :1328-1331 ;MacDonald T. T. 等 (1990) Clin. Exp. Immunol. 81 :301-305）。嵌合的鼠抗 TNF α 抗体已经通过治疗局限性肠炎临床实验（van Dullemen H. M. 等 (1995) Gastroenterology109 :129-135）。本发明的人抗 TNF α 抗体或抗体部分也可用于治疗肠道疾病，如特发性肠道炎症，包括局限性肠炎和溃疡性结肠炎。

[0126] H. 心脏疾病

[0127] 本发明的抗体或抗体部分也可以用于治疗各种心脏病，包括心脏缺血（参见欧洲专利申请出版物 EP453898）和心衰（心肌衰弱）（参见 PCT 出版物 W094 / 20139）。

[0128] I. 其它疾病

[0129] 本发明的抗体或抗体部分也可用于治疗其它的疾病，这些疾病中 TNF α 的活性有害。这些疾病和失调的与 TNF α 参与了疾病的病理学有关，因此可以应用本发明的抗体或抗体部分治疗，其实例包括炎性骨失调和骨吸收障碍（参见 Bertolini D. R. 等 (1986) Nature319 :516-518 ;Konig A. 等 (1998) J. Bone Miner. Res. 3 :621-627 ;Lerner, U. H. 和 Ohlin A (1993) J. Bone Miner. Res. 8 :147-155 ; 和 Shanker G. 和 Stern, P. H. (1993) Bone14 :871-876），肝炎，包括酒精性肝炎（参见 McClain C. J. 和 Cohen D. A. (1989) Hepatology9 :349-351 ;Felver M. E. 等 (1990) Alcohol. Clin. Exp. Res. 14 :255-259 ; 和 Hansen J. 等, Hepatology20 :461-474）和病毒性肝炎（参见 sheron, N. 等 (1991) J. Hepatol. 12 :241-245 ; 和 Hussain M. J. 等 (1994) J. Clin. Pathol. 47 :1112-1115），凝血障碍（参见 van der Poll, T. 等 (1990) N. Engl. J. Med. 322 :1622-1627 ; 和 van der Poll, T. 等 (1991) Prog. Clin. Biol. Res. 367 :55-60），烧伤（参见 Giroir, B. P. 等 (1994) Am. J. Physiol. 267 :H118-124 ; 和 Liu X. s. 等 (1994) Burns20 :40-44），再输注损伤（参见 Scales, W. E. 等 (1994) Am. J. Physiol. 267 :G1122-1127 ;Serrick, C. 等 (1994) Transplantation58 :1158-1162 ; 和 Yao Y. M. 等 (1995) Resuscitation29 :157-168），瘢痕瘤形成（参见 McCauley R. L. 等 (1992) J Clin Immunol12 :300-308），瘢痕组织形成和发热。

[0130] 本发明将通过下面的实施例进一步阐明，但这些实施例不应当解释为一种限制。本发明中所引用的参考文献、专利以及公开的专利申请的内容，在本文中引入作为参考。

[0131] 实施例 1 用抗 TNF α 抗体治疗

[0132] 皮下施用 D2E7 后的效力

[0133] 本研究中,24 例患活动类风湿性关节炎每周施用一次施用 D2E7 抗体 (n=18) 或安慰剂 (n=6),剂量为 0.5 毫克 / 公斤,途径为皮下注射,时间达 3 个月。参与本研究的患者平均患病 10.1 年,在治疗前疾病活动分值 (DAS) 为 4.87 和平均 3.4DMARDs(disease modifying anti-rheumatic drugs);这又相当大的程度上反映了疾病的活动度。用 D2E7 抗体治疗有反应的患者,继续公开标记 (open-label) 的治疗;而对 0.5 毫克 / 公斤剂量没有反应或失去了 DAS 反应患者,在本研究进行 12 周后提高至 1 毫克 / 公斤,途径仍是皮下注射。

[0134] 第一位参加的患者接受 60 次注射,并持续 60 周的研究。皮下注射剂量效率与静脉注射相似。在治疗的第一周内,高达 78% 的患者达到 DAS 和 ACR20 反应。以 0.5 毫克 / 毫升剂量皮下施用 D2E7 12 周,与基线相比,有 54% 的关节肿胀 (SWJ) 减轻,关节压痛 (CRP) 61% 减轻,CRP 减轻 39%,而所有的指标与安慰剂组相比都升高。完成本研究的安慰剂对照期后,患者持续用维持效力的抗体治疗长达 14 个月。因此这些结果表明:皮下施用 D2E7,剂量为 0.5 毫克 / 公斤 / 周,可以安全地自己施用,而且局部耐受性不错。

[0135] 施用 D2E7 和氨甲蝶呤

[0136] 本研究中,患者除施用正在施用的 (氨甲蝶呤) MTX 外,接受皮下或静脉注射安慰剂或 D2E7,剂量为 1 毫克 / 公斤。54 位患者参加本研究,18 位接受 D2E7 和安慰剂静脉注射,18 位接受静脉注射安慰剂和皮下注射 D2E7,18 位患者接受静脉或皮下注射安慰剂。患者仅在他们无可见反应状态时,接受第二剂量药物,但第一剂量后不得早于 4 周。此后,所有患者都接受公开标记的每两周一次皮下注射 D2E7 抗体。

[0137] 本研究的研究总体统计学特征包括:平均患类风湿性关节炎 11.1 年,用药前平均 3.6DMARDs(不是氨甲蝶呤)和本研究开始时 DAS 平均为 4.81。到 29 天时,72% 静脉注射 D2E7 治疗患者和 44% 皮下注射 D2E7 治疗患者获得了 DAS 标准反应,相比较而言,安慰剂治疗的患者只有 28% 患者达到标准 (见图 5)、本研究有反应的患者中,至 29 天时 28% 安慰剂治疗患者维持 ACR20 反应,而对应的有 72% 静脉注射 D2E7 治疗患者和 67% 皮下注射 D2E7 治疗患者,他们的 ACR20 反应持续一至三个月。

[0138] 实施例 2 皮下施用抗 TNF α 抗体的全身剂量

[0139] 每周皮下施用一次 D2E7

[0140] 本研究有 284 名类风湿性关节炎患者参加,设计目的为确定皮下施用 D2E7 的、优化全身剂量。患者每周随机接受 20,40 或 80 毫克的 D2E7 或安慰剂,施用 12 周。安慰剂治疗后的患者转用 D2E7,剂量为 40 毫克 / 周。

[0141] 接近 49% 的患者在施用 20 毫克时达到 ACR20,55% 的患者在施用 40 毫克时达到 ACR20,54% 的患者在施用 80 毫克时达到 ACR20 (见图 1A)。接近 23% 的患者在施用 20 毫克时达到 ACR50,27% 的患者在施用 40 毫克时达到 ACR50,20% 的患者在施用 80 毫克时达到 ACR50,而接受安慰剂的患者仅有 2% 达到 ACR50。这些资料表明说明,皮下施用 D2E7,尤其在剂量为 40 毫克 / 周时,获得良好的反应。

[0142] 实施例 3:每两周皮下施用一次抗 TNF α 抗体

[0143] 每两周皮下施用一次 D2E7

[0144] 以不同的剂量在隔周皮下 (s. c.) 施用安慰剂或 D2E7 并持续与 MTX 联用 24 周后,研究对氨甲蝶呤部分反应的类风湿性关节炎患者的临床效果、安全性、免疫原性和耐受性。

[0145] 研究设计

[0146] 对氨甲蝶呤效果不明显或对其耐受的类风湿性关节炎患者,进行有安慰剂对照、双盲、随机、多中心的研究。在试验期间,患者持续施用恒定剂量的氨甲蝶呤,以及按照下面所述的特定的内在标准的剂量范围。

[0147] 本研究由两部分组成:1) 在施用第一剂量的药物前四周为一段“药力消散期”,在此期间 DNARDs(氨甲蝶呤除外)消退;(二)“安慰剂控制期”,在此期间 67 位患者随机分配成四组接受安慰剂,20 毫克、40 毫克、80 毫克的 D2E7(作为全身总剂量)的治疗,隔周皮下给药,用药长达 24 周。每个剂量的研究药物分两次皮下注射,注射剂量位 1.6ml / 次。患者第一次用药由医务人员给药,并作为培训患者的一个环节。随后在医务人员的直接观察下由患者自己用药四周。此后,在研究地点外由患者自己、或由患者指定的受训人员或医务人员用药。每次临床评估后分发给患者 4 或 5 周的药量。患者连续在第一、二、三、四、六、八、十二、十六、二十和二十四周进行关节检查,检查由不知情的、与治疗医生无关的辅助人员进行。

[0148] 本研究有 271 名类风湿性关节炎患者参加。本研究的总体适度的代表了北美严重类风湿性关节炎患者的情况:70%女性,大部分年龄超过 40 岁。该总体有本领域中技术人员根据标准选择出来,如患者必须接受类风湿性关节炎的诊断,按照 1987 年修订的美国风湿学会 (ACR) 标准定义来诊断(参见附录 A)

[0149] 结果

[0150] 图 1B 和 2-4 表明每两周皮下施用一次 D2E7,且与氨甲蝶呤联用,在 24 周内减轻类风湿性关节炎征兆和症状方面明显好于安慰剂。统计分析表明,所有 D2E7 三种剂量与每周施用安慰剂相比明显有效,而且 40 和 80 毫克剂量的 D2E7 比 20 毫克剂量效率更高。

[0151] 等价方案

[0152] 本领域内的那些技术人员,将认识到或仅通过常规的试验就能够确定有许多和本发明所述特定方法等价的方案。这类等价方案包括在下面的权利要求中。

[0153] 附录 A

[0154] 类风湿性关节炎的 ACR 定义

[0155] 类风湿性关节炎 (RA) 的 1987 年分类标准和功能

[0156]

标准	定义
1. 3 个或 3 个以上 关节区域关节炎	医生观察到至少有 3 个关节区域有软组织肿胀或流体（不是单纯的骨过度生长）。14 个可能的关节区域是左或右 PIP, MDP, 腕、肘、踝和 MTP 关节。
2. 手关节炎 腕关节炎 掌指关节炎 掌指或腕关节炎 掌指或腕关节炎	医生观察到特定区域有软组织肿胀或流体（不是单纯的骨过度生长）。其中 2 个区域是特定的、同时发病。
3. 对称性肿胀（关节炎）	左右相同关节同时发病（如定义 1 中的 PIPs、MCPs 或 MTPs, 在身体两侧（双边）并非对称性的发病是可以接受的）
4. 血清类风湿因子	用任何方法检测出血清类风湿因子总量不正常，其中所用方法的结果在正常对照人群中具有小于 5% 的人是阳性的。
5. 类风湿关节炎的 X 光片的变化	典型的类风湿关节炎的 X 光片的变化是在 posteroanterior 手和腕部 X 光片的变化，其中包括侵蚀或明确的骨脱钙作用，定位于或多数标记的发病的关节附近（骨关节炎变化未作定义）

[0157] 如果他或她包含表 7 中 5 个亚类中类风湿性关节炎的一个以及由其医生临床诊断为类风湿性关节炎的患者认为是类风湿性关节炎。标准 1、2 和 3 必须是至少 6 周出现的症状。

[0158] Arthritis and Rheumatism, vol131No. 3 (March1988)

[0159] 附录 B

[0160]

SEQ ID NO: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

```

SEQ ID NO: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

```

SEQ ID NO:3:

```

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1           5

```

[0161]

SEQ ID NO: 4:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

SEQ ID NO: 5:

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

SEQ ID NO: 6:

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15
Gly

SEQ ID NO: 7:

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

SEQ ID NO: 8:

Asp Tyr Ala Met His
1 5

SEQ ID NO: 10:

[0162]

```

Gln 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 Asp 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 Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95
Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

SEQ ID NO:11:

```

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
1           5

```

SEQ ID NO:12:

```

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1           5

```

SEQ ID NO:13:

```

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1           5

```

SEQ ID NO:14:

```

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1           5

```

SEQ ID NO:15:

```

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1           5

```

SEQ ID NO:16:

```

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

```

[0163]

SEQ ID NO:17:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

SEQ ID NO:18:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

SEQ ID NO:19:

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:20:

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

SEQ ID NO:21:

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

SEQ ID NO:22:

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

SEQ ID NO:23:

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:24:

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:25:

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

SEQ ID NO:26:

[0164]

SEQ ID NO:27:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

SEQ ID NO:28:

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

SEQ ID NO:29:

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

SEQ ID NO:30:

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

SEQ ID NO:31:

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

SEQ ID NO:32:

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

SEQ ID NO:33:

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

SEQ ID NO:34:

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

SEQ ID NO:35:

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

[0165]

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGGGA CAGAGTCACC	60
ATCACTTGTC GGGCAAGTCA GGGCATCAGA AATTACTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA	120
GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAATCAGG GGTCCCATCT	180
CGGTTCAAGT GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTACAGCCT	240
GAAGATGTTG CAACTTATTA CTGTCAAAGG TATAACCGTG CACCGTATAC TTTTGGCCAG	300
GGGACCAAGG TGGAAATCAA A	321

SEQ ID NO:37:

GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CCGGCAGGTC CCTGAGACTC	60
TCCTGTGCGG CCTCTGGATT CACCTTTGAT GATTATGCCA TGCACTGGGT CCFJCAAGCT	120
CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GGTCTCAGCT ATCACTTGGA ATAGTGGTCA CATAGACTAT	180
GCGGACTCTG TGGAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCCCTGTAT	240
CTGCAAATGA ACAGTCTGAG AGCTGAGGAT ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGTCTCG	300
TACCTTAGCA CCGCGTCCTC CCTTGACTAT TGGGGCCAAG GTACCCTGGT CACCGTCTCG	360
AGT	363

[0001]

序列表

<110> 阿布维生物技术有限公司

<120> 施用抗-TNF α 抗体的方法

<130> BBI-168PC

<140> PCT/US02/17790

<141> 2002-06-05

<150> 60/296961

<151> 2001-06-08

<160> 37

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<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> PRT

<213> 人

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链CDR3

<220>

<221> VARIANT

[0002]

<222> (9)
<223> Xaa = Thr 或 Ala

<400> 3
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可变重链 CDR3

<220>
<221> VARIANT
<222> (12)
<223> Xaa = Tyr 或 Asn

<400> 4
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人

<400> 5
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 人

<400> 6
Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15
Gly

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 7
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 8
Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 10
<211> 121
<212> PRT

[0003]

<213> 人

<400> 10

Gln 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 Asp 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 Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 12

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 13

Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 15

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

[0004]

<400> 16
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 17
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 18
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 19
Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 20
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 21
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

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

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

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

<210> 24

[0005]

<211> 9
<212> PRT
<213> 人

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

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 25
Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 26
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 27
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 28
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 29
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 30
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 31
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr

[0006]

1	5	10
---	---	----

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 32
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 33
Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 34
Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

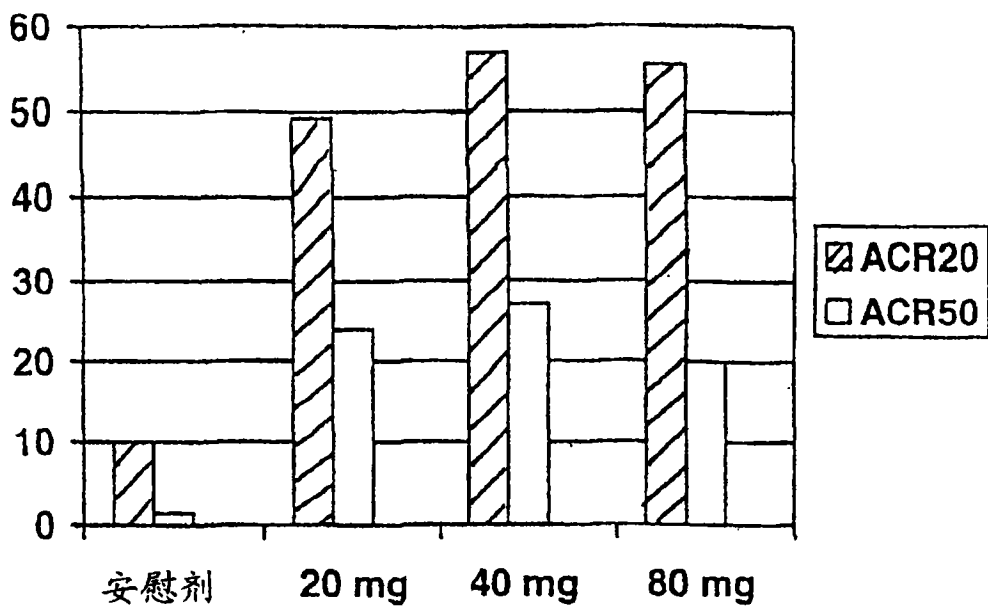
<400> 35
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 36
<211> 321
<212> DNA
<213> 人

<400> 36
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtc gggcatcaga aattacttag cctggatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctacagcct 240
gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa a 321

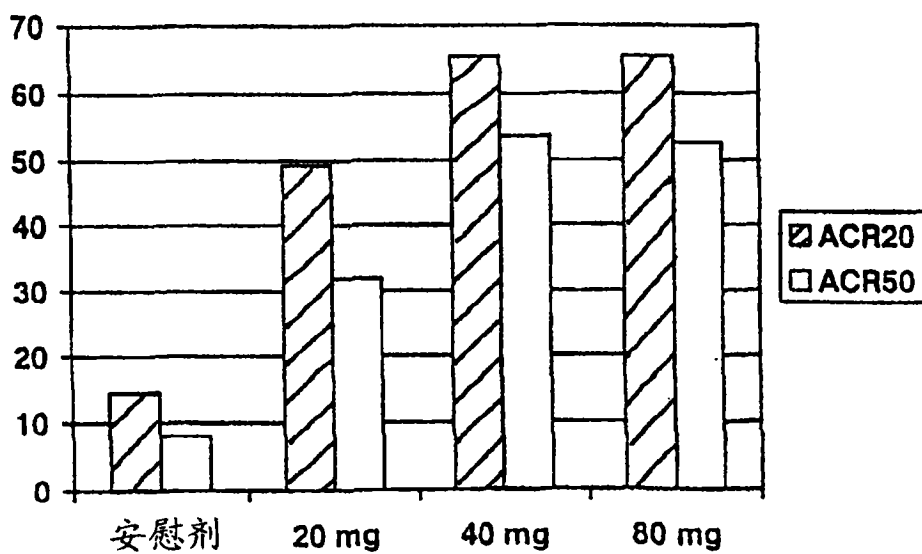
<210> 37
<211> 363
<212> DNA
<213> 人

<400> 37
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc cgggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcgg cctctggatt cacccttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgga atagtgtgca catagactat 180
gcggactctg tggagggccg atcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgctcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggc caccgtctcg 360
agt 363



DE007每周剂量研究

图 1A



DE009隔周剂量研究

图 1B

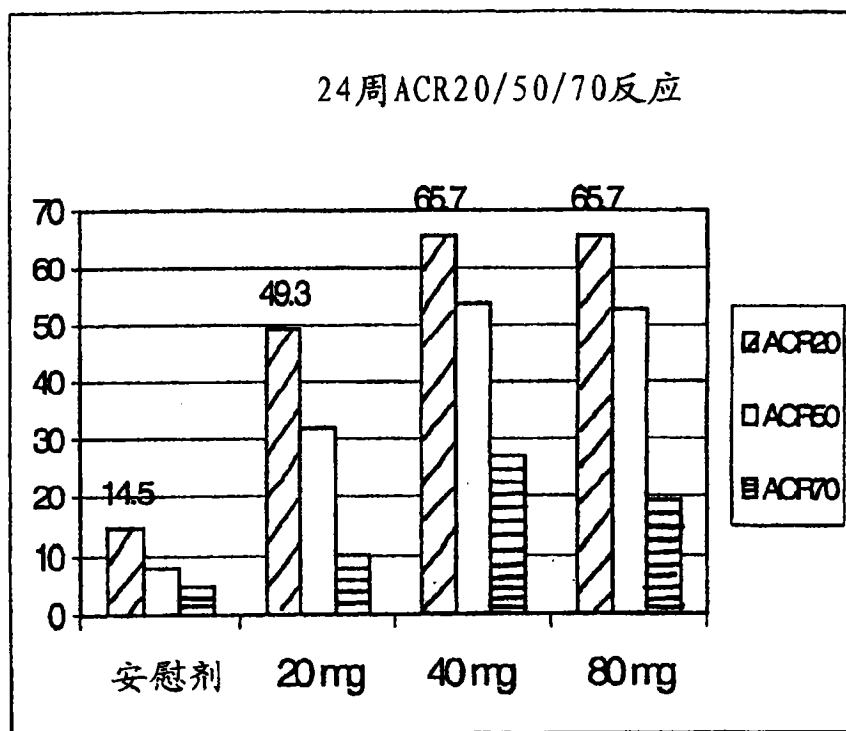
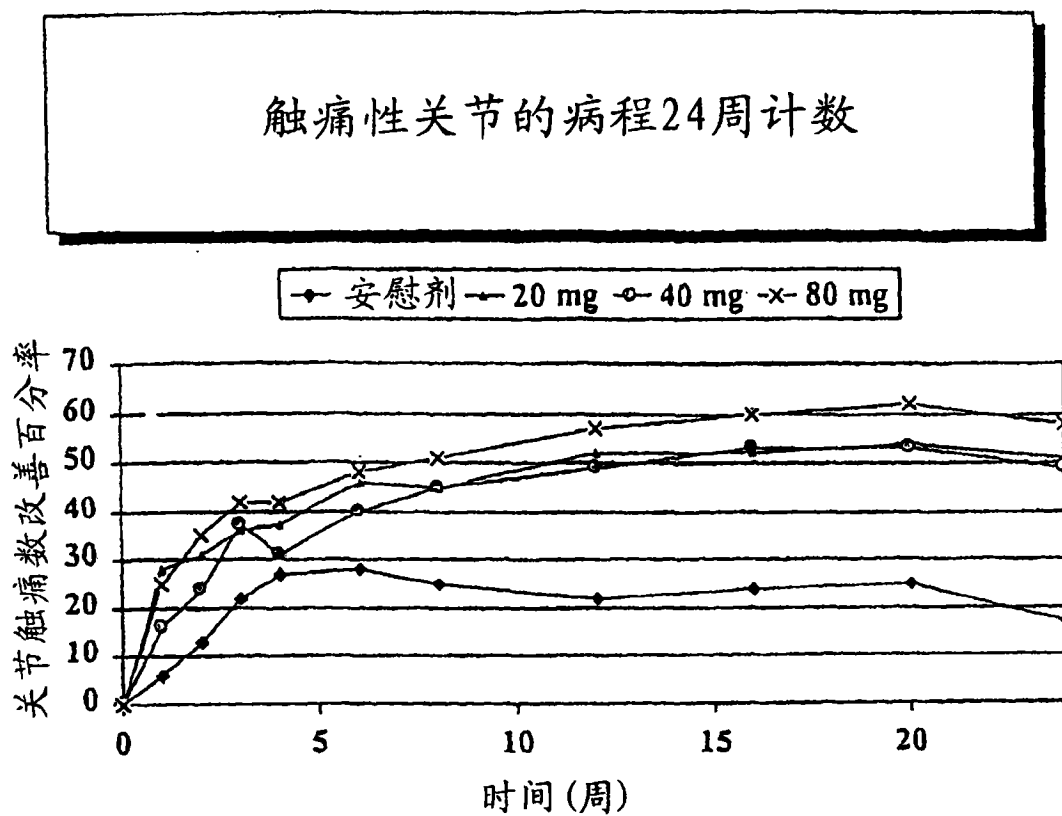


图 2

A



B

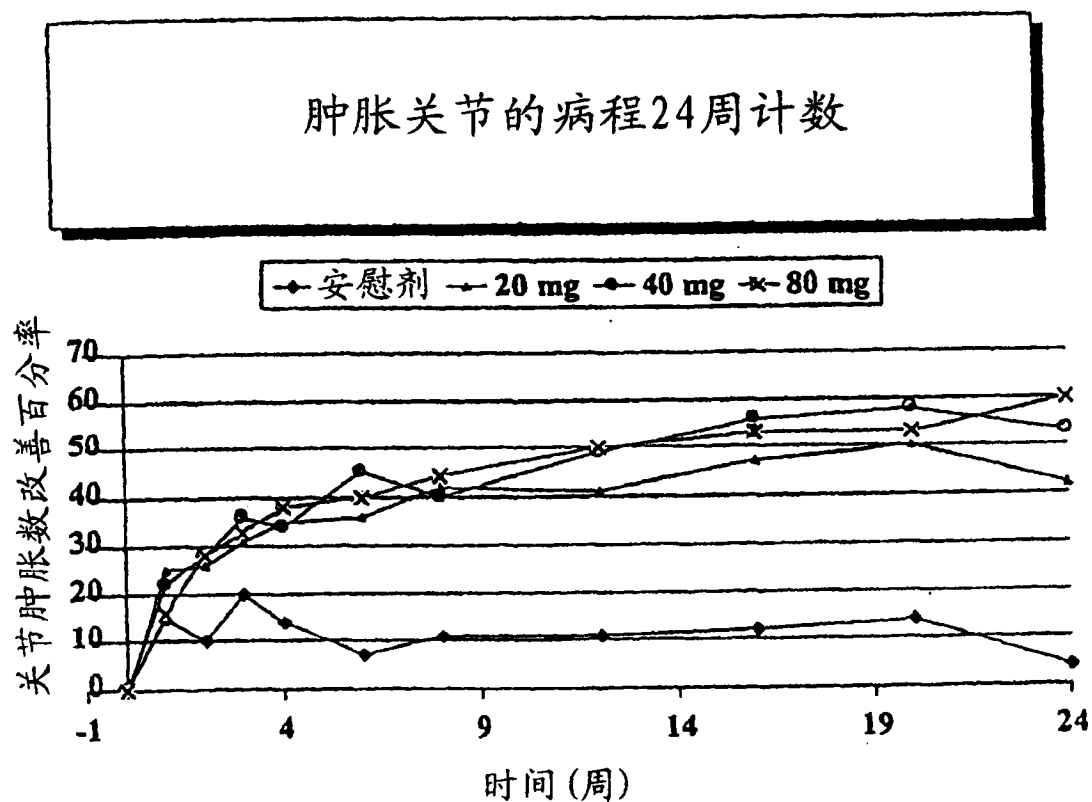


图 3

SF-36 数值范围

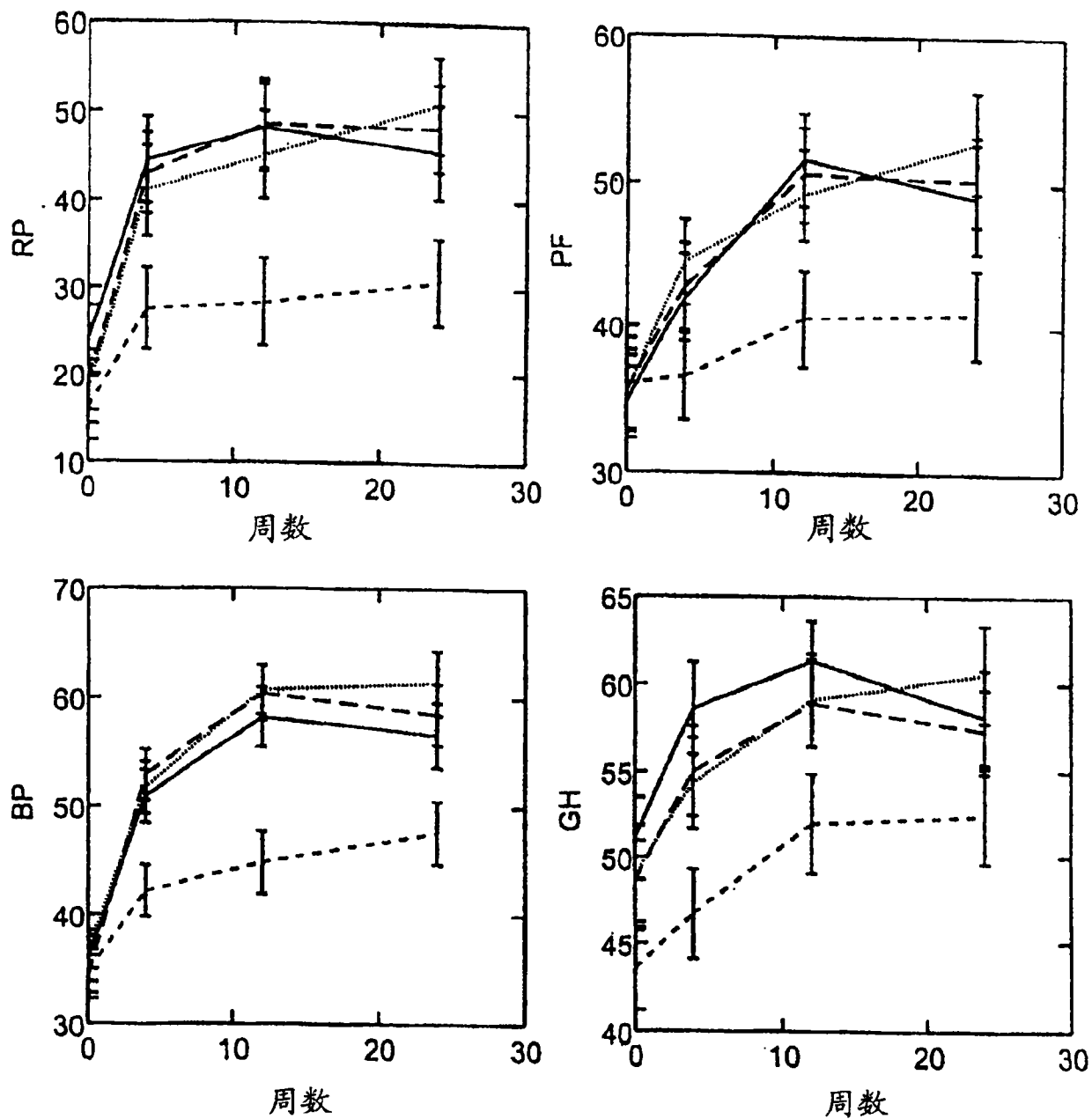


图 4

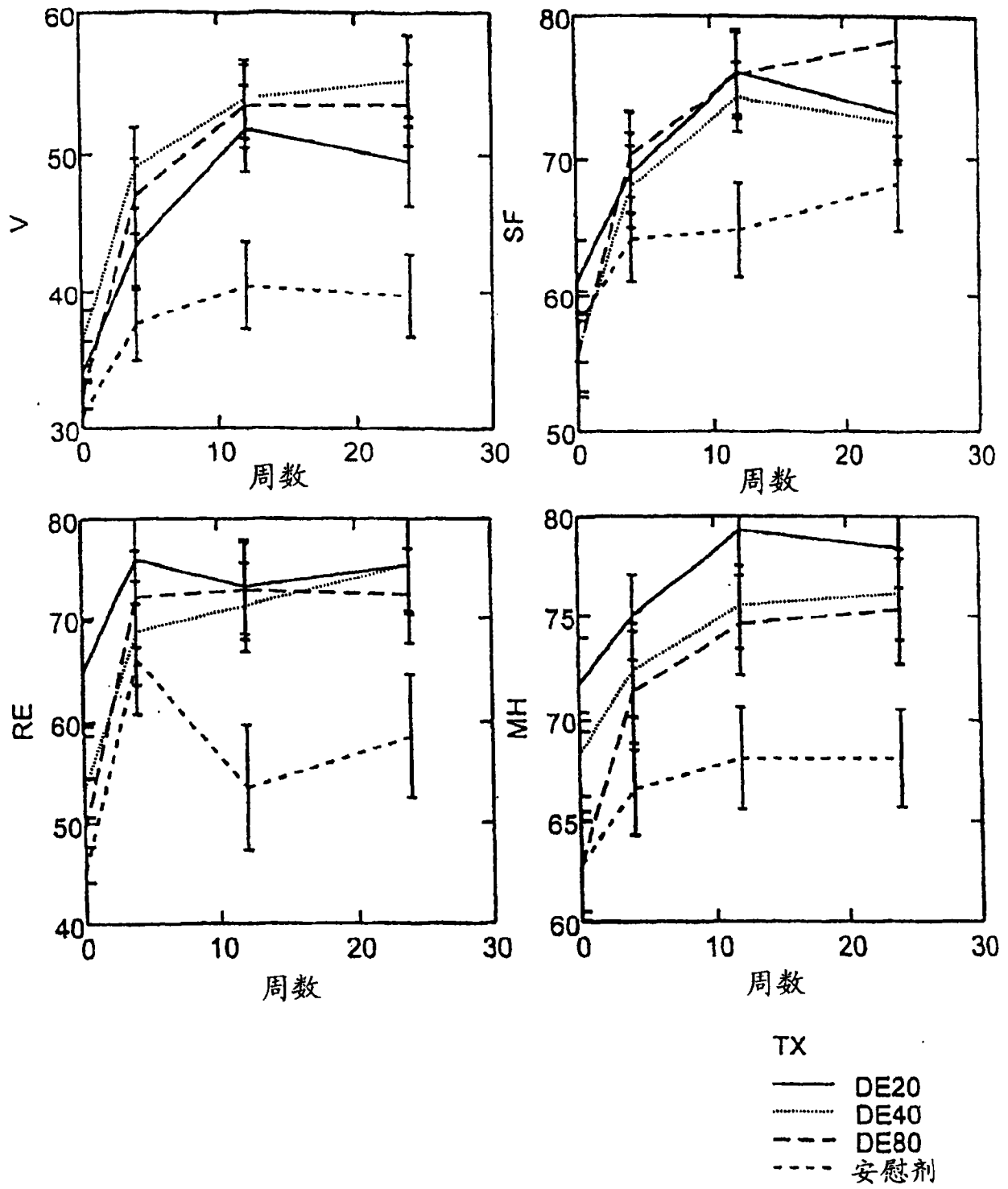


图 4

一次静脉注射D2E7和/或安慰剂(DE010)后ACR20反应的百分比

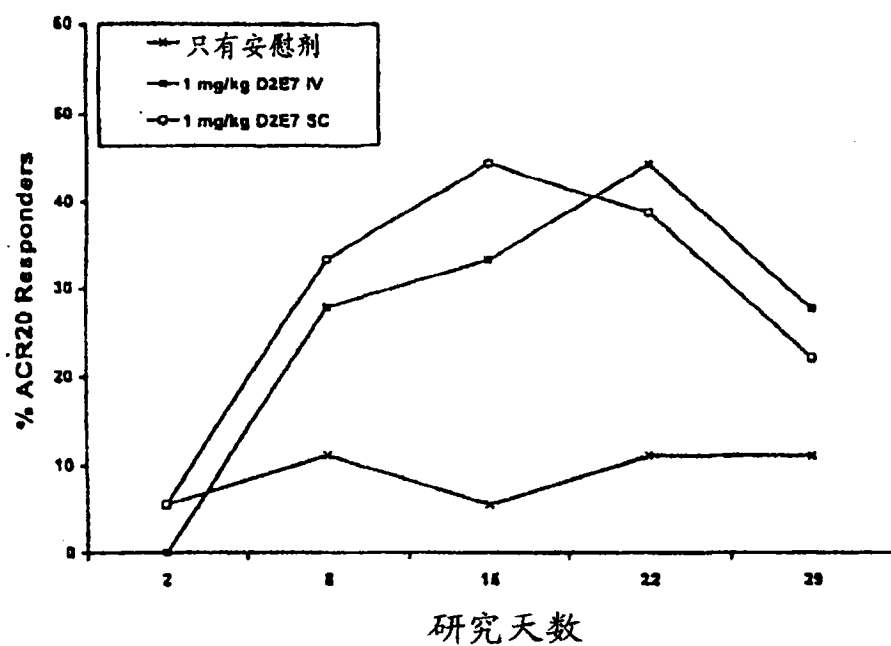


图 5