



(10) 申请公布号 CN 120152990 A

(43) 申请公布日 2025.06.13

(21) 申请号 202380077589.2

(22) 申请日 2023.11.07

(30) 优先权数据

63/423,767 2022.11.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.05.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/078951 2023.11.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/102734 EN 2024.05.16

(71) 申请人 基因泰克公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

(72) 发明人 P·B·勒翰 T·A·大町 J·程

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

权利要求书6页 说明书53页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

治疗儿童期发作的特发性肾病综合征的组合物和方法

(57) 摘要

本公开提供了用于治疗大于或等于2岁且小于或等于25岁的个体的儿童期发作的特发性肾病综合征(INS)或者降低所述个体的儿童期发作的INS的复发的风险和/或频率的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用有效量的奥妥珠单抗。

1. 一种用于治疗个体的儿童期发作的特发性肾病综合征 (INS) 的方法, 所述方法包括向所述个体施用对 II 型抗 CD20 抗体的第一抗体暴露和对所述 II 型抗 CD20 抗体的第二抗体暴露;

其中直到所述第一抗体暴露之后约 18 周至约 26 周才提供所述第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括一个或两个剂量的所述 II 型抗 CD20 抗体, 所述第一抗体暴露包括:

(a) 介于约 1800mg 与约 2200mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 或

(b) 介于约 36mg/kg 与约 44mg/kg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 如果所述个体的体重小于 45kg 的话;

其中所述第二抗体暴露包括一个或两个剂量的所述 II 型抗 CD20 抗体, 所述第二抗体暴露包括:

(c) 介于约 1800mg 与约 2200mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 或

(d) 介于约 36mg/kg 与约 44mg/kg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 如果所述个体的体重小于 45kg 的话;

其中所述 II 型抗 CD20 抗体为奥妥珠单抗; 并且

其中所述个体为大于或等于 2 岁且小于或等于 25 岁的人。

2. 一种用于降低患有儿童期发作的特发性肾病综合征 (INS) 的个体的复发的风险和/或频率的方法, 所述方法包括向所述个体施用对 II 型抗 CD20 抗体的第一抗体暴露和对所述 II 型抗 CD20 抗体的第二抗体暴露;

其中直到所述第一抗体暴露之后约 18 周至约 26 周才提供所述第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括一个或两个剂量的所述 II 型抗 CD20 抗体, 所述第一抗体暴露包括:

(a) 介于约 1800mg 与约 2200mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 或

(b) 介于约 36mg/kg 与约 44mg/kg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 如果所述个体的体重小于 45kg 的话;

其中所述第二抗体暴露包括一个或两个剂量的所述 II 型抗 CD20 抗体, 所述第二抗体暴露包括:

(c) 介于约 1800mg 与约 2200mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 或

(d) 介于约 36mg/kg 与约 44mg/kg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露, 如果所述个体的体重小于 45kg 的话;

其中所述 II 型抗 CD20 抗体为奥妥珠单抗; 并且

其中所述个体为大于或等于 2 岁且小于或等于 25 岁的人。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法, 其中所述第一抗体暴露包括介于约 1800mg 与约 2200mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露; 其中所述第二抗体暴露包括介于约 1800mg 与约 2200mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体的总暴露; 并且其中所述个体的体重大于或等于 45kg。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法, 其中所述第一抗体暴露包括: 第一剂量的介于约 900mg 与约 1100mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体, 以及第二剂量的介于约 900mg 与约 1100mg 之间的所述 II 型抗 CD20 抗体。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述第一抗体暴露包括:第一剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体,并且其中所述个体的体重小于45kg。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一抗体暴露包括第一剂量的所述II型抗CD20抗体和第二剂量的所述II型抗CD20抗体,并且其中直到所述第一抗体暴露的所述第一剂量之后约1.5周至约2.5周才提供所述第一抗体暴露的所述第二剂量。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述第一抗体暴露包括第一剂量的所述II型抗CD20抗体和第二剂量的所述II型抗CD20抗体,并且其中直到所述第一抗体暴露的所述第一剂量之后约2周才提供所述第一抗体暴露的所述第二剂量。

8. 根据权利要求1至4、6和7中任一项所述的方法,其中所述第一抗体暴露的所述第一剂量为约1000mg的所述II型抗CD20抗体。

9. 根据权利要求1至4和6至8中任一项所述的方法,其中所述第一抗体暴露的所述第二剂量为约1000mg的所述II型抗CD20抗体。

10. 根据权利要求1至3和5至7中任一项所述的方法,其中所述第一抗体暴露的所述第一剂量为约20mg/kg的所述II型抗CD20抗体,并且其中所述个体的体重小于45kg。

11. 根据权利要求1至3、5至7和10中任一项所述的方法,其中所述第一抗体暴露的所述第二剂量为约20mg/kg的所述II型抗CD20抗体,并且其中所述个体的体重小于45kg。

12. 根据权利要求1至4和6至9中任一项所述的方法,其中所述第二抗体暴露包括:第一剂量的介于约900mg与约1100mg之间的所述II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约900mg与约1100mg之间的所述II型抗CD20抗体。

13. 根据权利要求1至3、5至7、10和11中任一项所述的方法,其中所述第二抗体暴露包括:第一剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体,并且其中所述个体的体重小于45kg。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述第二抗体暴露包括第一剂量的所述II型抗CD20抗体和第二剂量的所述II型抗CD20抗体,并且其中直到所述第二抗体暴露的所述第一剂量之后约1.5周至约2.5周才提供所述第二抗体暴露的所述第二剂量。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中直到所述第二抗体暴露的所述第一剂量之后约2周才提供所述第二抗体暴露的所述第二剂量。

16. 根据权利要求1至4、6至9、12、14和15中任一项所述的方法,其中所述第二抗体暴露的所述第一剂量为约1000mg的所述II型抗CD20抗体。

17. 根据权利要求1至4、6至9、12和14至16中任一项所述的方法,其中所述第二抗体暴露的所述第二剂量为约1000mg的所述II型抗CD20抗体。

18. 根据权利要求1至3、5至7、10、11和13至15中任一项所述的方法,其中所述第二抗体暴露的所述第一剂量为约20mg/kg的所述II型抗CD20抗体,并且其中所述个体的体重小于45kg。

19. 根据权利要求1至3、5至7、10、11、13至15和18中任一项所述的方法,其中所述第二抗体暴露的所述第二剂量为约20mg/kg的所述II型抗CD20抗体,并且其中所述个体的体重小于45kg。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述个体患有或已经被诊断患有儿童期发作的INS。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述儿童期发作的INS为频繁复发性肾病综合征(FRNS)。

22. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述儿童期发作的INS为类固醇依赖性肾病综合征(SDNS)。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述个体在所述施用之前处于完全缓解。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的方法,其进一步包括向所述个体施用有效量的糖皮质激素或皮质类固醇。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述糖皮质激素或皮质类固醇包括甲泼尼龙。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中甲泼尼龙以80mg的剂量静脉内施用于所述个体。

27. 根据权利要求25所述的方法,其中甲泼尼龙以1.5mg/kg的剂量静脉内施用于所述个体;并且其中所述个体的体重小于45kg。

28. 根据权利要求24所述的方法,其中所述糖皮质激素或皮质类固醇包括泼尼松。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法,其进一步包括向所述个体施用有效量的抗组胺药。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述抗组胺药包括苯海拉明。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中盐酸苯海拉明以0.5-1mg/kg的剂量经口或静脉内施用于所述个体。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的方法,其进一步包括向所述个体施用有效量的对乙酰氨基酚。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述对乙酰氨基酚以15mg/kg的剂量经口施用,最大剂量为1000mg。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法,其中所述方法引起所述个体在1年时的持续完全缓解。

35. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的1000mg所述II型抗CD20抗体;并且其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的1000mg所述II型抗CD20抗体。

36. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的20mg/kg所述II型抗CD20抗体;其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的20mg/kg所述II型抗CD20抗体;并且其中所述个体的体重小于45kg。

37. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量的1000mg所述II型抗CD20抗体;并且其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的1000mg所述II型抗CD20抗体。

38. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量的20mg/kg所述II型抗CD20抗体;其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的20mg/kg所述II型抗CD20抗体,并且其中所述个体的体重

小于45kg。

39. 一种用于治疗个体的儿童期发作的INS或者降低所述个体的所述儿童期发作的INS的复发的风险和/或频率的方法,所述方法包括向所述个体静脉内施用对奥妥珠单抗的第一抗体暴露和第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量的1000mg奥妥珠单抗;

其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的1000mg奥妥珠单抗;

其中所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且

其中所述个体的体重大于或等于45kg。

40. 一种用于治疗个体的儿童期发作的INS或者降低所述个体的所述儿童期发作的INS的复发的风险和/或频率的方法,所述方法包括向所述个体静脉内施用对奥妥珠单抗的第一抗体暴露和第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量的20mg/kg奥妥珠单抗;

其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的20mg/kg奥妥珠单抗;

其中所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且

其中所述个体的体重小于45kg。

41. 一种用于治疗个体的儿童期发作的INS或者降低所述个体的所述儿童期发作的INS的复发的风险和/或频率的方法,所述方法包括向所述个体静脉内施用对奥妥珠单抗的第一抗体暴露和第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的1000mg奥妥珠单抗;

其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的1000mg奥妥珠单抗;

其中所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且

其中所述个体的体重大于或等于45kg。

42. 一种用于治疗个体的儿童期发作的INS或者降低所述个体的所述儿童期发作的INS的复发的风险和/或频率的方法,所述方法包括向所述个体静脉内施用对奥妥珠单抗的第一抗体暴露和第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的20mg/kg奥妥珠单抗;

其中所述第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的20mg/kg奥妥珠单抗;

其中所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且

其中所述个体的体重小于45kg。

43. 根据权利要求39或权利要求40所述的方法,其进一步包括在治疗的第0周、第2周、第24周和第26周,在施用奥妥珠单抗之前,通过静脉内(IV)输注向所述个体施用甲泼尼龙。

44. 根据权利要求41或权利要求42所述的方法,其进一步包括在治疗的第1天、第15天、

第168天和第182天,在施用奥妥珠单抗之前,通过静脉内(IV)输注向所述个体施用甲泼尼龙。

45. 根据权利要求43或权利要求44所述的方法,其中:

- (a) 如果所述个体的体重大于或等于45kg,则向所述个体施用80mg甲泼尼龙;或者
- (b) 如果所述个体的体重小于45kg,则向所述个体施用1.5mg/kg甲泼尼龙。

46. 一种用于治疗个体的儿童期发作的INS的药盒,所述药盒包括:

(a) 包含II型抗CD20抗体的容器,其中所述II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗;

(b) 具有关于治疗个体的儿童期发作的INS的说明的包装插页,其中所述说明指示所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且其中所述说明进一步指示向所述个体施用对所述II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对所述II型抗CD20抗体的第二抗体暴露,直到所述第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供所述第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第一抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露;

其中所述第二抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第二抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露。

47. 一种用于治疗个体的儿童期发作的INS的药盒,所述药盒包括:

(a) 包含II型抗CD20抗体的容器,其中所述II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗;

(b) 具有关于治疗个体的儿童期发作的INS的说明的包装插页,其中所述说明指示所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人并且体重小于45kg;并且其中所述说明进一步指示向所述个体施用对所述II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对所述II型抗CD20抗体的第二抗体暴露,直到所述第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供所述第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第一抗体暴露包括介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露;

其中所述第二抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第二抗体暴露包括介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露。

48. 一种II型抗CD20抗体,其用于治疗有此需要的个体的儿童期发作的INS的方法中,其中所述方法包括向所述个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对所述II型抗CD20抗体的第二抗体暴露;

其中直到所述第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供所述第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第一抗体暴露包括:

(a) 介于约1800mg与约2200mg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,或

(b) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,如果所述个体的体重小于45kg的话;

其中所述第二抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第二抗体暴露包括:

(c) 介于约1800mg与约2200mg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,或

(d) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,如果所述个体的体重小于45kg的话;

其中所述II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗;并且

其中所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。

49. 一种II型抗CD20抗体,其用于降低有此需要的患有儿童期发作的INS的个体的复发的风险和/或频率的方法中,其中所述方法包括向所述个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对所述II型抗CD20抗体的第二抗体暴露;

其中直到所述第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供所述第二抗体暴露;

其中所述第一抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第一抗体暴露包括:

(a) 介于约1800mg与约2200mg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,或

(b) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,如果所述个体的体重小于45kg的话;

其中所述第二抗体暴露包括一个或两个剂量的所述II型抗CD20抗体,所述第二抗体暴露包括:

(c) 介于约1800mg与约2200mg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,或

(d) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的所述II型抗CD20抗体的总暴露,如果所述个体的体重小于45kg的话;

其中所述II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗;并且

其中所述个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。

50. 一种II型抗CD20抗体,其用于根据权利要求1至45中任一项所述的方法中。

## 治疗儿童期发作的特发性肾病综合征的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年11月8日提交的美国临时专利申请序列号63/423,767的优先权权益,将其通过引用以其整体并入本文。

[0003] 电子序列表的引用

[0004] 将电子序列表的内容(146392064240seqlist.xml;大小:41,773个字节;以及创建日期:2023年11月2日)通过引用以其整体并入本文。

### 技术领域

[0005] 本文提供了用于通过施用II型抗CD20抗体来治疗个体(例如,大于或等于2岁且小于或等于25岁的个体)的儿童期发作的特发性肾病综合征(INS),或者降低患有儿童期发作的INS的个体的复发的风险和/或频率的方法。

### 背景技术

[0006] 儿童期发作的特发性肾病综合征(INS)也称为原发性肾病综合征(不包括继发性原因),并且涵盖微小病变性疾病(MCD)和局灶节段性肾小球硬化症(FSGS)。尽管这种疾病是罕见的,但是儿童期发作的INS的发病率因种族和地区而异并且在某些种族群体(特别是南亚人和非裔美国人)中发病率较高,其中遗传因素的影响会带来更高的风险,特别是对于FSGS(Chanchlani和Parekh(2016)Front Pediatr 4:39)。这种疾病通常在介于2与5岁之间被首次诊断出(在患有MCD的患者的70%中),通常影响男孩多于女孩(2:1),并且被定义为存在肾病范围的蛋白尿、水肿、高脂血症和低蛋白血症(Noone等人(2018)Lancet 392:61-74)。

[0007] 将患有儿童期发作的INS的患者最初用全身性口服皮质类固醇治疗。复发的频率和对皮质类固醇治疗的反应允许将疾病分为反映疾病严重程度的亚型。这些亚型包括“类固醇抵抗性肾病综合征(潜在遗传原因)”、“非/罕见复发性类固醇敏感性肾病综合征”、“FRNS”和“SDNS”(Noone等人(2018)Lancet 392:61-74)。在后两种亚型中,患者在发作期间接受多个疗程的类固醇,并且经常继续接受类固醇维持疗法以防止进一步复发。治疗的最佳目标是根据患者的临床反应和药物相关的不良反应,最大程度地类固醇节制同时限制复发率。

[0008] 儿童期发作的INS在多于75%的患者中复发,并且接近50%的患者会出现频繁复发或类固醇依赖性(Abdel-Hafez等人(2017)J.Nephrol 16:180-186)。在无法用类固醇很好地控制疾病的儿童中,多种类固醇节制免疫抑制剂(例如,环磷酰胺、左旋咪唑、环孢菌素A、他克莫司、MMF和利妥昔单抗)已经被证明降低复发的风险。然而,比较这些药剂的高质量头对头数据是有限的(Mason等人(2020)Clin.J.Am.Soc.Nephrol.15:983-994)。

[0009] 抗CD20单克隆抗体利妥昔单抗在2004年首次被描述用于治疗儿童期发作的INS(Benz等人(2004)Pediatr Nephrol 19(7):794-797),并且此后已经成为患有FRNS或SDNS的儿童和成人两者的一种有希望的未经批准的治疗选择。文献中描述了许多由研究者发起

的其使用的试验和病例报告,其临床反应率各不相同(12个月时肾脏缓解的患者为50%-85%[无复发]),并且利妥昔单抗已经被证明可以降低患有FRNS和SDNS的患者的年复发率。然而,12个月时未实现完全缓解的患者通常会在利妥昔单抗治疗后介于8个月与9个月之间复发,并且这些复发大多发生在B细胞恢复/重建的背景下(Iijima等人(2014)Lancet 384:1273-1281;Colucci等人(2016)J. Am Soc Nephrol 27:1811-1822)。

[0010] 尽管逐渐减少或停止同时进行的免疫抑制,但是记忆B细胞库的延迟重建仍与延长的缓解相关(Colucci等人(2019)Front Immunol 10:1653)。奥妥珠单抗(GAZYVA®, GAZYVARO®)是一种人源化、经糖工程化的II型抗CD20抗体,相对于I型抗体(诸如利妥昔单抗和奥法木单抗),其对外周血和组织中B细胞具有增强的耗尽。它以IV输注施用。与其更强的B细胞耗尽一致,当与标准化学疗法组合施用时,奥妥珠单抗用于治疗成人的慢性淋巴细胞白血病(CLL)和滤泡性淋巴瘤(FL)时优于利妥昔单抗,并且当前已经在全球范围内批准奥妥珠单抗用于这些适应症中。奥妥珠单抗还被指示用于治疗对用利妥昔单抗或含利妥昔单抗的方案治疗无反应,或者在用利妥昔单抗或含利妥昔单抗的方案治疗期间或之后进展的患有FL的患者。此外,奥妥珠单抗当前正处于针对成人和儿童自身免疫性疾病(狼疮性肾炎[LN]、膜性肾病和系统性红斑狼疮[SLE])的临床开发中。

[0011] 尽管当前针对儿童期发作的INS进行治疗,但是患者仍然面临着生长受损和类固醇相关毒性的其他显著副作用的显著风险。鉴于儿童期发作的INS中使用免疫抑制疗法后频繁的临床复发率以及终末期肾病的相关潜在风险,对于具有改善的疗效和更好的长期结局的批准的类固醇节制疗法仍然存在未满足的需求。

[0012] 本文引用的所有参考文献(包括专利申请及公布)全部以其全文引用的方式并入。

## 发明内容

[0013] 在某些方面,本文提供了一种用于治疗个体的儿童期发作的INS的方法,该方法包括向该个体施用至少对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露;其中直到该第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供该第二抗体暴露;其中该第一抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体,该第一抗体暴露包括:(a)介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露,或(b)介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露,如果该个体的体重小于45kg的话;其中该第二抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体,该第二抗体暴露包括:(c)介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露,或(d)介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露,如果该个体的体重小于45kg的话;其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列;并且其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。本文还提供了一种用于预防患有儿童期发作的特发性肾病综合征(INS)的个体的复发,降低该个体的复发的风险,和/或降低该个体的复发的频率的方法,该方法包括向该个体使用至少对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露;其中直到该第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供该第二抗体暴露;其中该第一抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体,该第一抗体暴露包括:(a)介于约1800mg与约2200mg之间

的该II型抗CD20抗体的总暴露,或(b)介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露,如果该个体的体重小于45kg的话;其中该第二抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体,该第二抗体暴露包括:(c)介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露,或(d)介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露,如果该个体的体重小于45kg的话;其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列;并且其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。

[0014] 在一些实施例中,该个体的体重大于或等于45kg。在一些实施例中,该第一抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露;该第二抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露;并且其中该个体的体重大于或等于45kg。

[0015] 在一些实施例中,该第一抗体暴露包括第一剂量的介于约900mg与约1100mg之间的该II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约900mg与约1100mg之间的该II型抗CD20抗体。在一些实施例中,该第一抗体暴露包括第一剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的该II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的该II型抗CD20抗体,并且其中该个体的体重小于45kg。在一些实施例中,该第一抗体暴露包括第一剂量的该II型抗CD20抗体和第二剂量的该II型抗CD20抗体,并且其中直到该第一剂量的该第一抗体暴露之后约1.5周至约2.5周才提供该第二剂量的该第一抗体暴露。在一些实施例中,该第一抗体暴露包括第一剂量的该II型抗CD20抗体和第二剂量的该II型抗CD20抗体,并且其中直到该第一剂量的该第一抗体暴露之后约2周才提供该第二剂量的该第一抗体暴露。在一些实施例中,该第一剂量的该第一抗体暴露为约1000mg该II型抗CD20抗体。在一些实施例中,该第二剂量的该第一抗体暴露为约1000mg该II型抗CD20抗体。在一些实施例中,该第一剂量的该第一抗体暴露为约20mg/kg该II型抗CD20抗体,并且其中该个体的体重小于45kg。在一些实施例中,第二剂量的该第一抗体暴露为约20mg/kg该II型抗CD20抗体,并且其中该个体的体重小于45kg。在一些实施例(例如,其中该第一抗体暴露的一个或多个剂量为固定剂量)中,该个体的体重大于或等于45kg。

[0016] 在一些实施例中,该第二抗体暴露包括第一剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的该II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的该II型抗CD20抗体,并且其中该个体的体重小于45kg。在一些实施例中,第二抗体暴露包括第一剂量的该II型抗CD20抗体和第二剂量的该II型抗CD20抗体,并且其中直到该第一剂量的该第二抗体暴露之后约1.5周至约2.5周才提供该第二剂量的该第二抗体暴露。在一些实施例中,直到该第一剂量的该第二抗体暴露之后约2周才提供该第二剂量的该第二抗体暴露。在一些实施例中,该第一剂量的该第二抗体暴露为约1000mg该II型抗CD20抗体。在一些实施例中,该第二剂量的该第二抗体暴露为约1000mg该II型抗CD20抗体。在一些实施例中,该第一剂量的该第二抗体暴露为约20mg/kg该II型抗CD20抗体,并且其中该个体的体重小于45kg。在一些实施例中,该第二剂量的该第二抗体暴露为约20mg/kg该II型抗CD20抗体,并且其中该个体的体重小于45kg。在一些实施例(例如,其中该第二抗体暴露的一个或多个剂量为固定剂量)中,该个体的体重大于或等于45kg。

[0017] 在一些实施例中,将该第一抗体暴露和该第二抗体暴露静脉内施用。

[0018] 在一些实施例中,该个体患有或已经被诊断患有儿童期发作的INS。在一些实施例中,该个体患有频繁复发性肾病综合征(FRNS)。在一些实施例中,该儿童期发作的INS为类固醇依赖性肾病综合征(SDNS)。在一些实施例(例如,在施用该第一抗体暴露之前)中,该个体处于完全缓解。

[0019] 在一些实施例中,该方法进一步包括向该个体施用有效量的糖皮质激素或皮质类固醇。在一些实施例中,该糖皮质激素或皮质类固醇包括甲泼尼龙。在一些实施例中,该甲泼尼龙以80mg的剂量静脉内施用于该个体。在一些实施例(例如,如果该个体的体重小于45kg)中,甲泼尼龙以1.5mg/kg的剂量静脉内施用于该个体。在一些实施例中,该糖皮质激素或皮质类固醇包括泼尼松。在一些实施例中,该方法进一步包括向该个体施用有效量的抗组胺药。在一些实施例中,该抗组胺药包括苯海拉明。在一些实施例中,该苯海拉明以0.5至1mg/kg的剂量(任选地最大剂量为50mg)经口施用。在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用有效量的对乙酰氨基酚。在一些实施例中,该对乙酰氨基酚以15mg/kg的剂量(任选地最大剂量为1000mg)经口施用。

[0020] 在一些实施例中,该方法引起该个体在1年时的持续完全缓解。在一些实施例中,该方法引起该个体的循环外周B细胞耗尽。在一些实施例中,这些循环外周B细胞为CD19+B细胞。在一些实施例中,这些B细胞为初始B细胞(例如,CD19+CD27-B细胞)、记忆B细胞(例如,CD19+CD27+B细胞)或浆母细胞(例如,CD19+CD27+CD38++B细胞)。在一些实施例中,这些B细胞为CD19+CD3-CD14-CD33-CD56-细胞。在一些实施例中,在施用该II型抗CD20抗体后,B细胞被耗尽至使得循环外周B细胞以约5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少存在于来自个体的外周血中的水平。在一些实施例中,B细胞被耗尽至使得循环外周B细胞以约1个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少存在于来自个体的外周血中的水平。在一些实施例中,B细胞被耗尽至使得循环外周B细胞以约0.5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少存在于来自个体的外周血中的水平。在一些实施例中,B细胞被耗尽至使得循环外周B细胞以在第一抗体暴露之后达到的水平存在于来自个体的外周血中的水平。在一些实施例中,B细胞被耗尽至低于使用HSFC的检测极限的水平。在一些实施例中,HSFC对B细胞的定量下限(LLoQ)为约1.0个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.8个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.6个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、或0.441个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少。在一些实施例中,在该第一剂量的该第一抗体暴露之后,B细胞耗尽持续至少52周。在一些实施例中,在施用该II型抗CD20抗体后,个体的循环外周B细胞与施用该II型抗CD20抗体前对同一个体的对应测量相比、或与对未接受过该II型抗CD20抗体治疗的个体的对应测量相比,被耗尽至少约90%。

[0021] 在一些实施例中,该第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;该第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;并且该II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗。在一些实施例中,该第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的20mg/kg该II型抗CD20抗体;该第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的20mg/kg该II型抗CD20抗体;该II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗;并且该个体的体重小于45kg。在一些实施例中,该第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;该第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;并且该II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗。在一些实施例中,该第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量

的20mg/kg该II型抗CD20抗体;该第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的20mg/kg该II型抗CD20抗体;该II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗;并且该个体的体重小于45kg。在一些实施例(例如,其中抗体暴露的剂量为固定剂量)中,该个体的体重大于或等于45kg。

[0022] 在某些方面,本文提供了一种用于治疗个体的儿童期发作的INS,或者降低该个体的该儿童期发作的INS复发的风险和/或频率的方法,该方法包括向该个体静脉内施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和第二抗体暴露;其中该第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;其中该第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列;其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且其中该个体的体重大于或等于45kg。在某些方面,本文提供了一种用于治疗个体的儿童期发作的INS,或者降低该个体的该儿童期发作的INS复发的风险和/或频率的方法,该方法包括向该个体静脉内施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和第二抗体暴露;其中该第一抗体暴露包括在治疗的第0周和第2周的两个剂量的20mg/kg该II型抗CD20抗体;其中该第二抗体暴露包括在治疗的第24周和第26周的两个剂量的20mg/kg该II型抗CD20抗体;其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列;其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且其中该个体的体重小于45kg。在某些方面,本文提供了一种用于治疗个体的儿童期发作的INS,或者降低该个体的该儿童期发作的INS复发的风险和/或频率的方法,该方法包括向该个体静脉内施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和第二抗体暴露;其中该第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;其中该第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的1000mg该II型抗CD20抗体;其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列;其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且其中该个体的体重大于或等于45kg。在某些方面,本文提供了一种用于治疗个体的儿童期发作的INS,或者降低该个体的该儿童期发作的INS复发的风险和/或频率的方法,该方法包括向该个体静脉内施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和第二抗体暴露;其中该第一抗体暴露包括在治疗的第1天和第15天的两个剂量的20mg/kg该II型抗CD20抗体;其中该第二抗体暴露包括在治疗的第168天和第182天的两个剂量的20mg/kg该II型抗CD20抗体;其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列;其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人;并且其中该个体的体重小于45kg。在一些实施例中,该II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗。

[0023] 在本文所述方法的一些实施例中,该II型抗CD20抗体为人源化抗体。在一些实施

例中,该II型抗CD20抗体为去岩藻糖基化的。在一些实施例中,该II型抗CD20抗体的重链包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施例中,该II型抗CD20抗体的轻链包含含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该II型抗CD20抗体包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;该轻链包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施例中,该II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗。

[0024] 在一些实施例中,该方法进一步包括向个体施用泼尼松(例如,经口)。在一些实施例中,口服泼尼松以0.5至1mg/kg/天的剂量(最大为60mg/天)施用于个体。在一些实施例中,口服泼尼松以0.5至1mg/kg/天的剂量施用于个体直到第2周,然后逐渐减少为到治疗的第24周5mg/天的剂量。在一些实施例中,将口服泼尼松以0.5至2mg/kg/天的剂量(最大为60mg/天)施用于个体。在一些实施例中,将口服泼尼松以0.5至2mg/kg/天的剂量施用于个体直至第2周,然后逐渐减少为到治疗的第24周5mg/天的剂量。在一些实施例中,该方法进一步包括在治疗的第0、2、24、26和52周,例如,在施用II型抗CD20抗体之前,通过静脉内(IV)输注向个体施用甲泼尼龙。在一些实施例中,如果该个体的体重大于或等于45kg,则向该个体施用80mg甲泼尼龙。在一些实施例中,如果该个体的体重小于45kg,则向该个体施用1.5mg/kg甲泼尼龙。

[0025] 在某些方面,本文提供了一种用于治疗个体的儿童期发作的INS或者降低儿童期发作的INS复发的风险和/或频率的药盒,该药盒包括:包含该II型抗CD20抗体的容器,其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列;具有关于在任何上述和本文所述方法中使用该II型抗CD20的说明的包装插页。

[0026] 在某些方面,本文提供了一种II型抗CD20抗体(例如,奥妥珠单抗),其用于任何上述和本文所述的方法中。

[0027] 应了解,本文所述的各种实施例的一种、一些或所有特性可组合形成本发明的其它实施例。本发明的这些及其他方面对于本领域技术人员来说将变得显而易见。通过下面的详细描述进一步描述本发明的这些和其它实施例。

## 附图说明

[0028] 图1提供了使用II型抗CD20抗体奥妥珠单抗来治疗年龄 $\geq 2$ 岁至25岁的患者的儿童期发作的INS(例如,频繁复发性肾病综合征或类固醇依赖性肾病综合征)的对照研究的示意图。BID=每天两次;CCOD=主要分析的常见截止日期;FRNS=频繁复发性肾病综合征;MMF=霉酚酸酯;PO=通过口;经口;SDNS=类固醇依赖性肾病综合征;SFU=安全性随访;Wk=周。<sup>a</sup>第一剂量的研究治疗(第1天)的施用应发生在基线评估后24小时内。然而,必要时允许施用长达72小时。第二次输注应发生在第15天 $\pm$ 1天。<sup>b</sup>在第52周时测量具有一年时的持续完全缓解的参与者的比例的主要疗效终点。

## 具体实施方式

[0029] 儿童期发作的特发性肾病综合征 (INS) 也称为原发性肾病综合征 (不包括继发性原因), 并且涵盖微小病变性疾病 (MCD) 和局灶节段性肾小球硬化症 (FSGS)。这种疾病通常在介于2与5岁之间被首次诊断出 (在患有MCD的患者的70%中), 通常影响男孩多于女孩 (2:1), 并且被定义为存在肾病范围的蛋白尿、水肿、高脂血症和低蛋白血症 (Noone等人 (2018) Lancet 392:61-74)。将患有儿童期发作的INS的患者最初用全身性口服皮质类固醇治疗。然而, 儿童期发作的INS在多于75%的患者中复发, 并且接近50%的患者会出现频繁复发或类固醇依赖性 (Abdel-Hafez等人 (2017) J.Nephropathol 6:180-186)。尽管有当前治疗, 但是患者仍然面临着生长受损和类固醇相关毒性的其他显著副作用的显著风险。因此, 仍然需要更安全且更有效的用于儿童期发作的INS (例如, FRNS和/或SDNS) 的治疗。

[0030] 在一方面, 本文提供了用于治疗个体的儿童期发作的INS的方法, 该方法包括向该个体施用至少对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露; 其中直到该第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供该第二抗体暴露; 其中该第一抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体, 该第一抗体暴露包括: (a) 介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 或 (b) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 如果该个体的体重小于45kg的话; 其中该第二抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体, 该第二抗体暴露包括: (c) 介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 或 (d) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 如果该个体的体重小于45kg的话; 其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链, 该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列, SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列, 该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列, SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列; 并且其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。在另一方面, 本文提供了用于降低患有儿童期发作的特发性肾病综合征 (INS) 的个体的复发的风险和/或频率的方法, 该方法包括向该个体使用至少对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露; 其中直到该第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供该第二抗体暴露; 其中该第一抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体, 该第一抗体暴露包括: (a) 介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 或 (b) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 如果该个体的体重小于45kg的话; 其中该第二抗体暴露包括一个或两个剂量的该II型抗CD20抗体, 该第二抗体暴露包括: (c) 介于约1800mg与约2200mg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 或 (d) 介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的该II型抗CD20抗体的总暴露, 如果该个体的体重小于45kg的话; 其中该II型抗CD20抗体包含重链和轻链, 该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列, SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列, 该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列, SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列; 并且其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。

### [0031] I. 一般技术

[0032] 本领域技术人员通常容易理解并且通常使用常规方法来使用本文描述或参考的技术和程序, 诸如, 例如, Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual第3版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current

Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等人编辑, (2003)); Methods in Enzymology系列 (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J.MacPherson, B.D.Hames和G.R.Taylor编辑 (1995)), Harlow和Lane, 编辑 (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, 以及Animal Cell Culture (R.I.Freshney编辑 (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait编辑, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E.Cellis, 编辑, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I.Freshney), 编辑, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P.Mather和P.E.Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A.Doyle, J.B.Griffiths和D.G.Newell, 编辑, 1993-8) J.Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir和C.C.Blackwell, 编辑); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos, 编辑, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等人, 编辑, 1994); Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan等人, 编辑, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A.Janeway和P.Travers, 1997); Antibodies (P.Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D.Catty编辑, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P.Shepherd和C.Dean, 编辑, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E.Harlow和D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M.Zanetti和J.D.Capra, 编辑, Harwood Academic Publishers, 1995); 和Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T.DeVita等人, 编辑, J.B.Lippincott Company, 1993) 中所述的广泛使用的方法。

#### [0033] II. 定义

[0034] 术语“儿童期发作的特发性肾病综合征 (INS)”是指通常在介于2岁与5岁之间被首次诊断出的特发性肾病综合征, 其涵盖微小病变性疾病 (MCD) 和局灶节段性肾小球硬化症 (FSGS) 并且也称为原发性肾病综合征 (不包括继发性原因)。

[0035] 术语“抗体”包括单克隆抗体 (包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体)、双抗体和单链分子、以及抗体片段 (例如, Fab、F(ab')<sub>2</sub>和Fv)。术语“免疫球蛋白” (Ig) 在本文中可与抗体可互换使用。

[0036] 基本的4链抗体单位是由两条相同的轻 (L) 链和两条相同的重 (H) 链组成的异四聚体糖蛋白。IgM抗体由5个基本异源四聚体单元以及称为J链的另外的多肽组成, 并且包含10个抗原结合位点, 而IgA抗体包含2-5个基本4链单元, 它们可以与J链组合, 聚合形成多价组合物。在IgG情况下, 4链单元通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键连接至H链, 而两条H链则根据H链的同种型通过一个或多个二硫键相互连接。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫键。每条H链在N末端具有可变结构域 (V<sub>H</sub>), 后接三个恒定结构域 (C<sub>H</sub>) (对于每条α链和γ链) 和四个C<sub>H</sub>结构域 (对于μ和ε同种型)。每条L链在N末端具有可变结构域 (V<sub>L</sub>), 并且另一端具有恒定结构域。V<sub>L</sub>与V<sub>H</sub>对准, 并且C<sub>L</sub>与重链的第一恒定结构域 (C<sub>H</sub>1) 对准。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的配对一起形成单一抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和特性, 参见例如, Basic and Clinical Immunology, 第8版, Daniel P.Stites, Abba I.Terr和Tristram G.Parslow (编辑),

Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1994年, 第71页和第6章。来源于任何脊椎动物的L链基于其恒定结构域的氨基酸序列, 可以配属为两种明显不同的类型中的一种, 这两种类型分别称为卡帕( $\kappa$ )和兰姆达( $\lambda$ )。免疫球蛋白基于其重链恒定结构域(CH)的氨基酸序列, 可以配属为不同的类别或同种型。存在以下五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 具有分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 的重链。 $\gamma$ 和 $\alpha$ 类别基于CH序列和功能的相对较小的差异进一步分为子类, 例如, 人表达以下子类: IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0037] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可分别称为“VH”和“VL”。这些结构域通常是抗体中变化最大的部分(相对于同一类别的其他抗体)并包含抗原结合位点。

[0038] 术语“可变”是指可变结构域的某些片段在抗体的序列之间差异很大。V结构域介导抗原结合并且定义特定抗体对其特定抗原的特异性。然而, 可变性在可变结构域的整体跨度之间并非均匀分布。而是, 它集中在轻链和重链可变结构域中的三个称为高变区(HVR)的区段中。可变结构域中保守性更高的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区, 其主要采用 $\beta$ 折叠结构, 由三个HVR连接, 这三个HVR形成连接 $\beta$ 折叠结构的环并且在一些情况下形成 $\beta$ 折叠结构的一部分。每条链中的HVR通过FR区紧密保持在一起, 并且与另一条链中的HVR一起, 有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, MD(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合, 但显示出多种效应子功能, 诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性作用。

[0039] 本文所使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体, 即, 除了可能存在的少量可能天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如, 异聚化、酰胺化), 该抗体群包含的单个抗体是相同的。单克隆抗体对单个抗原位点具有高特异性。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反, 每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除它们的特异性以外, 单克隆抗体的优势还在于它们在不受其他免疫球蛋白污染的情况下, 通过杂交瘤培养来合成。修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的, 并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备, 包括例如杂交瘤方法(例如, Kohler和Milstein, *Nature*, 256:495-97(1975); Hongo等人, *Hybridoma*, 14(3):253-260(1995); Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版1988); Hammerling等人, 在: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)中)、重组DNA方法(参见例如, 美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如, Clackson等人, *Nature*, 352:624-628(1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1992); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310(2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093(2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472(2004); 以及Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132(2004))和在动物中产生具有编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因座或基因的部分或全部的人抗体或类人抗体的技术(参见例如, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551(1993); Jakobovits等人, *Nature* 362:255-258(1993); Bruggemann等人, *Year in Immunol.* 7:33(1993); 美国专

利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016;Marks等人, Bio/Technology10:779-783(1992);Lonberg等人, Nature 368:856-859(1994);Morrison, Nature 368:812-813(1994);Fishwild等人, Nature Biotechnol.14:845-851(1996); Neuberger, Nature Biotechnol.14:826(1996)以及Lonberg和Huszar, Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0040] 术语“裸抗体”是指不缀合至细胞毒性部分或放射性标记的抗体。

[0041] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用,是指其基本上完整形式的抗体而不是抗体片段。具体而言,完整抗体包括具有包括Fc区的重链和轻链的那些。恒定结构域可为天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可能具有一种或多种效应子功能。

[0042] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选地包含完整抗体的抗原结合区和/或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利5,641,870,实例2;Zapata等人, Protein Eng.8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子以及由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同抗原结合片段(称为“Fab”片段)以及一个残留的“Fc”片段(其名称反映其容易结晶的能力)。Fab片段由完整L链以及H链的可变区结构域(V<sub>H</sub>)和一条重链的第一恒定结构域(C<sub>H1</sub>)组成。每个Fab片段在抗原结合方面为单价,即,它具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生单个大的F(ab')<sub>2</sub>片段,其大致相当于两个通过二硫键连接的具有不同抗原结合活性并且仍能够交联抗原的Fab片段。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于Fab'片段在C<sub>H1</sub>结构域的羧基末端添加了一些另外的残基,这些残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中关于其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基的Fab'的命名。F(ab')<sub>2</sub>抗体片段最初是作为在其间具有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段而产生的。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0043] Fc片段包含通过二硫键连接在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应子功能由Fc区域中的序列决定,所述区域也是由某些类型的细胞上存在的Fc受体(FcR)识别。

[0044] “Fv”是包含完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域紧密、非共价结合的二聚体组成。由这两个结构域的折叠产生六个高变环(H链和L链各产生3个环),这些环贡献氨基酸残基以实现抗原结合,并且时抗体具有抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的HVR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于完整结合位点。

[0045] “单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接至单个多肽链中的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽在V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域之间进一步包括多肽接头,使sFv形成所需的抗原结合结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun的The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编辑, Springer-Verlag, New York,第269-315页(1994)。

[0046] 本发明抗体的“功能片段”包含完整抗体的一部分,通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区或者保留或具有修饰的FcR结合能力的抗体的Fc区。抗体片段的实例包括线性抗体;单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0047] 术语双体抗体是指通过构建sFv片段(参见前段)而制得的小抗体片段,其中在V<sub>H</sub>

和V<sub>L</sub>结构域之间具有短接头(约5-10个残基),由此实现了V结构域的链间配对而非链内配对,得到二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域位于不同的多肽链上。双抗体更详细地描述于例如EP 404,097;WO 93/11161;Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448 (1993)。

[0048] 本文中的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而一条或多条链的其余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列以及这些抗体的片段相同或同源,只要它们表现出所需的生物学活性即可(美国专利号4,816,567;Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。本文目的嵌合抗体包括PRIMATIZED<sup>®</sup>抗体,其中抗体的抗原结合区源自通过例如用目标抗原免疫猕猴而产生的抗体。如本文所用,“人源化抗体”用作“嵌合抗体”的子集。

[0049] “人源化”形式的非人类(例如,鼠)抗体为包含源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施例中,人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体HVR(如后文定义)的残基被来自非人类物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或具有所需特异性、亲和力和/或能力的非人类灵长类动物的HVR的残基取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架(“FR”)残基被相应的非人类残基替换。此外,人源化抗体可包含受体抗体或供体抗体中不存在的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能,例如结合亲和力。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,通常为两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白序列的那些,以及所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白序列的那些,尽管FR区可以包括一个或多个单独的FR残基置换,以提高抗体性能,例如结合亲和力、异构化、免疫原性等。FR中这些氨基酸取代的数量是通常在H链中不超过6个,在L链中不超过3个。人源化抗体还将任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,该免疫球蛋白通常为人类免疫球蛋白。更多详情参见例如,Jones等人,Nature 321:522-525 (1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329 (1988);以及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见例如,Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038 (1995);Hurle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);以及美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0050] “人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于制备人抗体的任何技术制得的抗体。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人类抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。还可用于制备人类单克隆抗体的方法如Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boerner等人,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)所述。还参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.,5:368-74(2001)。可以通过向转基因动物施用抗原来制备人抗体,该转基因动物已经被修饰以对抗原攻击产生应答而产生此类抗体,但其内源性基因座已失效,例如,免疫异种小鼠(参见例如,关于XENOMOUSE<sup>™</sup>技术的美国专利号6,075,181和6,150,584)。还参见例如关于通过人B细胞杂交

瘤技术产生的人抗体的Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。

[0051] 如本文所用的术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指在序列上高变和/或形成结构上限定的环的抗体可变结构域的区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3在六个HVR中表现出最多的多样性,尤其是H3被认为在赋予抗体精细特异性方面起着独特的作用。参见例如: Xu等人,Immunity 13:37-45(2000); Johnson和Wu,Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2003)。实际上,仅由重链组成的天然存在的骆驼科动物抗体在不存在轻链的情况下是有功能并稳定的。参见例如: Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993); Sheriff等人,Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0052] 许多HVR描述得到应用,并且包含于本文中。Kabat互补决定区(CDR)基于序列变异性并且是最常用的(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。相反,Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。AbM HVR表示Kabat HVR和Chothia结构环之间的折衷,并且被牛津分子公司(Oxford Molecular)的AbM抗体建模软件采用。“接触”HVR基于可用的复杂晶体结构的分析结果。这些HVR中的每个的残基如下文所述。

	环	Kabat	AbM	Chothia	接触
	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
[0053]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0054] HVR可以包括以下“扩展HVR”:VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97或89-96(L3),以及VH中的26-35(H1)、50-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。对于这些定义中的每一个,可变结构域残基均根据上述Kabat等人的方法进行编号。

[0055] 表达“Kabat所述的可变结构域残基编号”或“Kabat所述的氨基酸位置编号”及其变型是指在上述Kabat等人的文献中的用于抗体编译的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用该编号系统,实际线性氨基酸序列可能包含较少或附加的氨基酸,其对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可在H2的残基52之后包括单个氨基酸插入(根据Kabat编号的残基52a)以及重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat编号的残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0056] “框架”或“FR”残基是除如本文定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0057] “人共有框架”或“受体人框架”是这样的框架,其表示在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基。总体上,人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自于可变结构域序列的亚组。一般而言,序列的亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of

Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中所述的亚组。实例包括关于VL,亚组可以是亚组 $\kappa$ I、 $\kappa$ II、 $\kappa$ III或 $\kappa$ IV,如上述Kabat等人中所述。另外,关于VH,亚组可以是亚组I、亚组II或亚组III,如上述Kabat等人中所述。可替代地,人共有框架可以源自上述其中特定的残基,诸如当人框架残基是通过将供体框架序列与一系列各种人框架序列比对基于其与供体框架的同源性而选择时。“源自”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可包含与所述人免疫球蛋白框架或人共有框架相同的氨基酸序列,或者可包含预先存在的氨基酸序列变化。在一些实施例中,在先出现的氨基酸变化的数量为10个或更少、9个或更少、8个或更少、7个或更少、6个或更少、5个或更少、4个或更少、3个或更少,或2个或更少。

[0058] “VH亚组III共有框架”包含从上述Kabat等人的可变重亚组III中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施例中,VH亚组III共有框架氨基酸序列包含以下序列中的每一个的至少部分或全部:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(HC-FR1)(SEQ ID NO:35)、WVRQAPGKGLEWV(HC-FR2),(SEQ ID NO:36)、RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(HC-FR3,SEQ ID NO:37)、WGQGLTVTSA(HC-FR4),(SEQ ID NO:38)。

[0059] “VL $\kappa$ I共有框架”包含从上述Kabat等人的可变轻 $\kappa$ 亚组I中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施例中,VH亚组I共有框架氨基酸序列包含以下序列中的每一个的至少部分或全部:DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC(LC-FR1)(SEQ ID NO:39)、WYQQKPGKAPKLLIY(LC-FR2)(SEQ ID NO:40)、GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC(LC-FR3)(SEQ ID NO:41)、FGQGTKVEIKR(LC-FR4)(SEQ ID NO:42)。

[0060] 特定位置的“氨基酸修饰”,例如Fc区的“氨基酸修饰”,是指特定残基的取代或缺失,或与特定残基相邻的至少一个氨基酸残基的插入。与特定残基“相邻”的插入是指插入其一至两个残基内。插入可以是特定残基的N末端或C末端。本文优选的氨基酸修饰是取代。

[0061] “亲和力成熟”抗体是其中一个或多个HVR发生一种或多种改变的抗体,其导致抗体对抗原的亲和力相比于不具有这些改变的亲本抗体的亲和力得到改善。在一个实施例中,亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟抗体通过本领域中已知的程序产生。例如,Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组实现的亲和力成熟。HVR和/或框架残基的随机诱变例如以下文献所述:Barbas等人,Proc Nat.Acad.Sci.USA 91:3809-3813(1994);Schier等人,Gene 169:147-155(1995);Yelton等人,J.Immunol.155:1994-2004(1995);Jackson等人,J.Immunol.154(7):3310-9(1995);以及Hawkins等人,J.Mol.Biol.226:889-896(1992)。

[0062] 如本文所用,术语“特异性结合”或“具有特异性”是指可测量和可再现的相互作用,诸如靶标与抗体之间的结合,在存在分子(包括生物分子)的异质群体的存在下,其确定靶标的存在。例如,与靶标(其可以是表位)特异性结合的抗体是与其结合其他靶标相比具有更大亲和力、亲合力、更容易和/或持续时间更长的结合该靶标的抗体。在一个实施例中,抗体与无关靶标的结合程度为该抗体与抗原结合的小于约10%,例如,通过放射免疫分析(RIA)所测量。在某些实施例中,与靶标特异性结合的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 。在某些实施例中,抗体与蛋白上的表位特异性结合,该表位在不同物种的蛋白之间具有保守性。在另一实施例中,特异性结合可以包括但不要求排他结合。

[0063] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区域,该C末端区域包括天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链Fc区的边界可能变化,但是人IgG重链Fc区通常被定义为从位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230延伸至该重链的羧基末端。Fc区的C末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可在例如抗体的生产或纯化过程中或通过重组设计编码抗体重链的核酸而去除。因此,完整抗体的组合物可包括去除所有K447残基的抗体群体、未去除K447残基的抗体群体以及具有含和不含K447残基的抗体混合物的抗体群体。用于本发明抗体的合适的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0064] “Fc受体”或“FcR”是指与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR为天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体( $\gamma$ 受体)并包括Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位变体和替代地剪接形式,Fc $\gamma$ RII受体包括Fc $\gamma$ RIIA(“激活受体”)和Fc $\gamma$ RIIB(“抑制性受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其细胞质结构域。活化受体Fc $\gamma$ RIIA在其细胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体Fc $\gamma$ RIIB在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991);Capel等人, *Immunomethods* 4:25-34(1994);以及de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)。本文中的术语“FcR”涵盖其他FcR,其中包括有待将来鉴定的那些。

[0065] 术语“Fc受体”或“FcR”还包括新生儿受体FcRn,其负责将母体IgG转移至胎儿。Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587(1976)以及Kim等人, *J. Immunol.* 24:249(1994)。测量与FcRn的结合的方法是已知的(参见例如Ghetie和Ward, *Immunol. Today* 18:(12):592-8(1997);Ghetie等人, *Nature Biotechnology* 15(7):637-40(1997);Hinton等人, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6(2004);WO 2004/92219(Hinton等人))。可在例如表达人FcRn的转基因小鼠或转染的人细胞系中或者在给予具有变体Fc区的多肽的灵长类动物中,测定与FcRn的体内结合以及人FcRn高亲和力结合多肽的血清半衰期。WO 2004/42072(Presta)描述了与FcR的结合得到改善或有所减少的抗体变体。还参见例如,Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604(2001)。

[0066] 如本文所用,短语“显著减少”或“显著不同”表示两个数值之间具有足够高的差异(通常一个数值与分子相关联,而另一个数值与参考/对比分子相关联),使得本领域的技术人员将认为在由所述值(例如,Kd值)衡量的生物学特性的上下文中,两个值之间的差异具有统计学意义。根据参考/对比分子的值,例如,所述两个值之间的差异大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于约40%和/或大于约50%。

[0067] 如本文所用,术语“基本上相似”或“基本上相同”表示两个数值之间具有足够高的相似度(例如,一个数值与本发明的抗体相关联,而另一个数值与参考/对比抗体相关联),由此使得本领域的技术人员将认为在由所述值(例如,Kd值)衡量的生物学特征的上下文中,两个值之间的差异几乎没有生物学和/或统计学意义。根据参考/对比物的值,例如,所述两个值之间的差异小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%和/或小于约10%。

[0068] 如本文所用,“载体”包括药用载体、赋形剂或稳定剂,这些载体在所采用的剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒。生理学上可接受的载体通常是pH缓冲水溶液。生理学上可接受的载体的实例包括:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;抗氧

化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;和/或非离子型表面活性剂,诸如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™。

[0069] “包装插页”是指通常包含在药物商业包装中的说明,其包含通常包含在药物商业包装中的有关适应症的信息(含有适应症、用法、剂量、给药方式、禁忌症、与包装产品联用的其他药物)和/或有关使用此类药物的警告等。

[0070] 如本文所用,术语“治疗”是指被设计为在临床病理过程中改变被治疗的个体或细胞的自然进程的临床干预。理想的治疗效果包括但不限于降低疾病进展速度、减缓或减轻疾病状态、缓解或改善预后以及延迟疾病进展。延迟疾病(例如,INS)的进展是指延缓、阻碍、减缓、延迟、稳定、和/或推迟疾病的发展。这种延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或待治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,充分或显著延迟实际上可以涵盖预防,因为个体(例如处于发展该疾病风险中的个体)不会发展该疾病。

[0071] 如本文所用,“持续完全缓解”是指对治疗的反应,其包括第一次晨尿UPCR $\leq 0.2\text{g/g}$ 且未发生复发或任何某些并发事件(例如,在第8周后发生),诸如(1)复发,定义为以下需要全身性皮质类固醇或其他免疫抑制治疗的事件的任一项:(a)第一次晨尿UPCR $\geq 2\text{g/g}$ 或(b)尿液试纸检测UA $\geq 3+$ 持续连续3天,并且这3天时间段的最近一次尿液样品被确定具有UPCR $>0.2\text{g/g}$ 或(c)任一天的尿液试纸检测UA蛋白 $\geq 3+$ 伴有水肿,并且尿液样品被确定为具有UPCR $>0.2\text{g/g}$ ; (2)在30天的时间段内使用任何全身性皮质类固醇 $>14$ 天; (3)开始使用除全身性皮质类固醇以外的任何INS救援疗法; (4)因缺乏疗效而治疗停止;或(5)死亡。

[0072] 如本文所用,“CD20”是指人B淋巴细胞抗原CD20(也称为CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5和LF5;序列的特征在于SwissProt数据库条目P11836),其为位于前B和成熟B淋巴细胞上的分子量约35kD的疏水性跨膜蛋白。(Valentine, M.A.等人, *J. Biol. Chem.* 264(19)(1989)11282-11287; Tedder, T.F.等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(1988)208-12; Stamenkovic, I.等人, *J. Exp. Med.* 167(1988)1975-80; Einfeld, D.A.等人, *EMBO J.* 7(1988)711-7; Tedder, T.F.等人, *J. Immunol.* 142(1989)2560-8)。对应的人类基因为跨膜4结构域、亚家族A成员1,也称为MS4A1。该基因编码跨膜4A基因家族的成员。该新生蛋白家族的成员的特征在于共同的结构特征和相似的内含子/外显子剪接边界,并且在造血细胞和非淋巴组织中表现出独特的表达模式。该基因编码B淋巴细胞表面分子,该分子在B细胞发育和分化为浆细胞的过程中起作用。该家族成员在家族成员的簇中定位于11q12。该基因的替代性的剪接产生两种编码相同蛋白质的转录物变体。

[0073] 术语“CD20”和“CD20抗原”在本文中可互换使用,并且包括由细胞天然表达或在经CD20基因转染的细胞上表达的人CD20的任何变体、同种型和物种同源物。本发明的抗体与CD20抗原的结合通过灭活CD20而介导杀伤表达CD20的细胞(例如,肿瘤细胞)。表达CD20的细胞的杀伤可通过以下机制中的一者或多者而发生:细胞死亡/凋亡诱导、ADCC和CDC。

[0074] 如本领域所公认的,CD20的别名包括B淋巴细胞抗原CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5和LF5。

[0075] 根据本发明的术语“抗CD20抗体”是特异性结合CD20抗原的抗体。根据抗CD20抗体与CD20抗原的结合特性和生物学活性,可根据Cragg, M.S.等人, Blood 103 (2004) 2738-2743;以及Cragg, M.S.等人, Blood 101 (2003) 1045-1052所述的方法区分两种类型的抗CD20抗体(I型和II型抗CD20抗体),参见下表1。

[0076] 表1. I型和II型抗CD20抗体

I型抗CD20抗体	II型抗CD20抗体
I型CD20表位	II型CD20表位
将CD20定位至脂筏	不将CD20定位至脂筏
提高CDC (如果IgG1同种型)	降低CDC (如果IgG1同种型)
ADCC活性 (如果IgG1同种型)	ADCC活性 (如果IgG1同种型)
完全结合能力	结合能力下降
同型聚合	更强的同型聚合
交联后的细胞凋亡诱导	无交联的强细胞死亡诱导

[0078] II型抗CD20抗体的实例包括例如人源化B-Ly1抗体IgG1 (如WO 2005/044859所公开的嵌合人源化IgG1抗体)、11B8 IgG1 (如WO 2004/035607所公开)和AT80 IgG1。通常, IgG1同种型的II型抗CD20抗体表征出特征CDC特性。II型抗CD20抗体相比于IgG1同种型的I型抗体具有降低的CDC (如果IgG1同种型)。

[0079] I型抗CD20抗体的实例包括例如利妥昔单抗、HI47 IgG3 (ECACC, 杂交瘤)、2C6 IgG1 (如WO 2005/103081中所公开)、2F2 IgG1 (如WO 2004/035607和WO 2005/103081中所公开)和2H7 IgG1 (如WO 2004/056312中所公开)。

[0080] 根据本发明的去岩藻糖基化的抗CD20抗体优选为II型抗CD20抗体,更优选地为去岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体,如WO 2005/044859和WO 2007/031875中所述。

[0081] “利妥昔单抗”抗体 (参考抗体; I型抗CD20抗体的实例) 为经遗传工程改造的嵌合人 $\gamma$ 1鼠恒定结构域,其包含针对人CD20抗原的单克隆抗体。然而,该抗体未经糖工程化,并且未经去岩藻糖基化,因此岩藻糖的含量为至少85%。该嵌合抗体含有人 $\gamma$ 1恒定结构域,并且在1998年4月17日授予IDEC Pharmaceuticals Corporation的US 5,736,137 (Andersen等人)中以名称“C2B8”来标识。利妥昔单抗获准用于治疗复发性或难治性低度或滤泡性、CD20阳性B细胞非霍奇金氏淋巴瘤。体外作用机制研究表明,利妥昔单抗表现出人补体依赖性细胞毒性 (CDC) (Reff, M.E.等人, Blood 83 (2) (1994) 435-445)。此外,它在测量抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 的测定中表现出活性。

[0082] 如本文所用,术语“GA101抗体”是指结合人CD20的以下抗体中的任一者: (1) 抗体,该抗体包含:HVR-H1,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列;HVR-H2,其包含SEQ ID NO:2氨基酸序列;HVR-H3,其包含SEQ ID NO:3氨基酸序列;HVR-L1,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;HVR-L2,其包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列; (2) 抗体,该抗体包含:VH结构域,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;以及VL结构域,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列; (3) 抗体,该抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列; (4) 称为奥妥珠单抗的抗体;或 (5) 抗体,该抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列并且包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨

氨基酸序列。在一个实施例中,GA101抗体为IgG1同种型抗体。在一些实施例中,抗CD20抗体为人源化B-Ly1抗体。

[0083] 术语“人源化的B-Ly1抗体”是指如WO 2005/044859和WO 2007/031875所公开的人源化的B-Ly1抗体,其由鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1(鼠重链可变区(VH):SEQ ID NO:11;鼠轻链可变区(VL):SEQ ID NO:12-参见Poppema,S.和Visser,L,Biotest Bulletin 3(1987)131-139)被来自IgG1的人恒定结构域嵌合并且随后人源化来获得(参见WO 2005/044859和WO 2007/031875)。这些“人源化B-Ly1抗体”详细公开于WO 2005/044859和WO 2007/031875中。

[0084] 鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1重链(VH)的可变区(SEQ ID NO:11)

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

[0086] 鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1轻链(VL)的可变区(SEQ ID NO:12)



[0090]	QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYAFS	YSWINWVRQA	PGQGLEWMGR	50
	IFPGDGD TDY	NGKFKGRVTI	TADKSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARNV	100
	FDGYWLVYWG	QGTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	150
	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFAVLQSSG	LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY	200
	ICNVNHKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP	CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK	250
[0091]	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	300
	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	350
	YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL	400
	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPG	449
[0092]	轻链 (SEQ ID NO:10)					
	DIVMTQTPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSKSLI	HSNGITYLYW	YLQKPGQSPQ	50
	LLIQMSNLV	SGVPDRFSGS	GSRTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCAQNLELP	100
[0093]	YTFGGGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	150
	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDYSTYSL	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	200
	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC				219

[0094] 在一些实施例中,人源化B-Ly1抗体为去岩藻糖基化的糖工程化人源化B-Ly1。此类糖工程化的人源化B-Ly1抗体在Fc区具有改变的糖基化模式,优选地具有降低的岩藻糖残基水平。优选地,岩藻糖的量为Asn297处寡糖总量的60%或更少(在一个实施例中,岩藻糖的量在40%与60%之间;在另一个实施例中,岩藻糖的量为50%或更少;并且在又一个实施例中,岩藻糖的量为30%或更少)。此外,Fc区的寡糖优选被量分。这些糖工程化的人源化B-Ly1抗体具有增加的ADCC。

[0095] 在采用Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)的FACS测定(Becton Dickinson)中,使用与Cy5缀合的所述抗CD20抗体和与Cy5缀合的利妥昔单抗通过直接免疫荧光测量(测量平均荧光强度(MFI))来确定“抗CD20抗体相比于利妥昔单抗对Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)上的CD20的结合能力比”,如实例2中所述,并且计算公式如下:

[0096] 与Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)上的CD20的结合能力比=

$$[0097] \frac{\text{MFI (Cy5-抗 CD20 抗体)}}{\text{MFI (Cy5- 利妥昔单抗)}} \times \frac{\text{Cy5- 标记比 (Cy5- 利妥昔单抗)}}{\text{Cy5- 标记比 (Cy5- 抗 CD20 抗体)}}$$

[0098] MFI为平均荧光强度。如本文所用,“Cy5标记比”意指每个分子抗体的Cy5标记分子的数量。

[0099] 通常,所述II型抗CD20抗体与利妥昔单抗相比,所述第二抗CD20抗体对Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)上的CD20的结合能力比为0.3至0.6,在一个实施例中为0.35至0.55,在又一个实施例中为0.4至0.5。

[0100] 在一个实施例中,所述II型抗CD20抗体(例如,GA101抗体)具有提高的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0101] 如本文所定义的术语“具有增加的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的抗体”意指具有通过本领域普通技术人员已知的任何合适方法测得的增加的ADCC的抗体。一种公认的体外

ADCC测定如下:

- [0102] 1) 该测定使用已知表达由抗体的抗原结合区识别的靶抗原的靶细胞;
- [0103] 2) 该测定使用从随机选择的健康供体的血液中分离的人外周血单核细胞 (PBMC) 作为效应细胞;
- [0104] 3) 该测定根据以下方案进行:
- [0105] i) PBMC使用标准密度离心程序分离,并且以 $5 \times 10^6$ 个细胞/ml的密度悬浮于RPMI细胞培养基中;
- [0106] ii) 靶细胞通过标准组织培养方法生长,从指数生长期收获,细胞活力高于90%,在RPMI细胞培养基中洗涤,用100微居里的 $^{51}\text{Cr}$ 标记,用细胞培养基洗涤两次,并且以 $10^5$ 个细胞/ml的密度重悬于细胞培养基中;
- [0107] iii) 将100微升上述最终靶细胞悬液转移至96孔微量滴定板的各个孔中;
- [0108] iv) 将抗体用细胞培养基中从4000ng/ml连续稀释至0.04ng/ml,然后将50微升所得抗体溶液加入96孔微量滴定板中的靶细胞中,一式三份检测涵盖上述整个浓度范围的各种抗体浓度;
- [0109] v) 对于最大释放 (MR) 对照,在包含标记靶细胞的板中的另外3个孔中接受50微升2% (VN) 非离子型洗涤剂 (Nonidet, Sigma, St. Louis) 的水溶液代替抗体溶液 (上文第iv点);
- [0111] vi) 对于自发释放 (SR) 对照,在包含标记靶细胞的板中的另外3个孔中接受50微升RPMI细胞培养基代替抗体溶液 (上文第iv点);
- [0112] vii) 然后将96孔微量滴定板以 $50 \times g$ 离心1分钟并且在 $4^\circ\text{C}$ 下孵育1小时;
- [0113] viii) 将50微升PBMC悬液 (上文第i点) 加入各个孔中,以得到25:1的效应物:靶细胞比,并且将板置于5%  $\text{CO}_2$ 气氛和 $37^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养4小时;
- [0114] ix) 收获来自每个孔的无细胞上清液,并且使用伽马计数器定测量定实验释放的放射性 (ER);
- [0115] x) 根据公式  $(\text{ER} - \text{MR}) / (\text{MR} - \text{SR}) \times 100$  计算各抗体浓度下的特异性裂解百分比,其中ER为定测量得的该抗体浓度下的平均放射性 (参见上文第ix点),MR为定测量得的MR对照 (参见上文第V点) 的平均放射性 (参见上文第ix点),SR为定测量得的SR对照 (参见上文第vi点) 的平均放射性 (参见上文第ix点);
- [0116] 4) “增加的ADCC”被定义为在上述检测的抗体浓度范围内观察到的特异性裂解的最大百分比的增加,及/或达到在上述检测的抗体浓度范围内所观察到的特异性裂解的最大百分比的一半所需的抗体浓度降低。在一个实施例,ADCC的增加相对于ADCC而言,其使用上述测定法测量,由相同的抗体介导,由相同类型的宿主细胞产生,使用相同的标准生产、纯化、配制和储存方法,这些方法是本领域技术人员已知的,不同之处在于比较抗体 (缺乏增加的ADCC) 并非由经工程化为过表达GnTIII和/或经工程化为具有降低的岩藻糖基转移酶8 (FUT8) 基因表达 (例如包括为FUT8敲除而设计) 的宿主细胞产生。
- [0118] 所述“增加的ADCC”可通过例如所述抗体的突变及/或糖工程化获得。在一个实施例中,抗体被糖工程化以具有被G1cNAc两分的与抗体Fc区连接的双触角寡糖,例如如在WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684 (Umana等人);US2005/0123546

(Umana等人)、Umana,P.等人,Nature Biotechnol.17(1999)176-180)中所述。在另一个实施例中,通过在缺乏蛋白质岩藻糖基化的宿主细胞(例如,Lec13 CHO细胞或 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)缺失或FUT基因表达敲低的细胞)中表达抗体对抗体进行糖工程化以使在与Fc区连接的碳水化合物上缺乏岩藻糖(参见例如,Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);以及W02003/085107)。在又一个实施例中,抗体序列已在其Fc区中被工程化以增强ADCC(例如,在一个实施例中,此类工程化抗体变体包含在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处具有一个或多个氨基酸取代的Fc区)。

[0119] 术语“补体依赖性细胞毒性(CDC)”是指在补体存在下根据本发明的抗体使人肿瘤靶细胞裂解。CDC可通过在补体存在下用根据本发明的抗CD20抗体处理CD20表达细胞制剂来测得。如果浓度为100nM的抗体在4小时后诱导20%或更多的肿瘤细胞裂解(细胞死亡),则发现CDC。在一个实施例中,该测定使用<sup>51</sup>Cr或Eu标记的肿瘤细胞并且测量释放的<sup>51</sup>Cr或Eu。对照包括不含抗体的情况下将肿瘤靶细胞与补体共孵育。

[0120] 术语“CD20抗原的表达”旨在表示CD20抗原在细胞(例如,T细胞或B细胞)中的显著水平的表达。在一个实施例中,待根据本发明的方法治疗的患者在B细胞上表达显著水平的CD20。B细胞上的CD20表达可以通过本领域已知的标准测定来确定,例如,使用免疫组织化学(IHC)检测、FACS或经由基于PCR的相应mRNA检测来测量CD20抗原表达。

[0121] 如在本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”、“该”和“所述”包括复数指代物,除非上下文另外明确规定。因此,例如,对“分子”的提及任选地包括两个或更多此类分子的组合等。

[0122] 如本文所用,术语“约”是指为此技术领域中的技术人员容易知晓的相应值的常见误差范围。在本文中提及“约”值或参数包括(且描述)涉及该值或参数本身的实施例。

[0123] 应当理解,本文所述的发明的方面和实施例包括“包含”、“由以下组成”及“基本上由以下组成”所指的方面和实施例。

### [0124] III.方法

[0125] 在一方面,本文提供了通过施用有效量的II型抗CD20抗体来治疗个体的儿童期发作的特发性肾病综合征(INS)的方法;其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。在另一方面,本文提供了通过施用有效量的II型抗CD20抗体来治疗患有儿童期发作的特发性肾病综合征(INS)的个体的复发的风险和/或频率的方法;其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。在一方面,本文提供了通过施用有效量的II型抗CD20抗体来治疗患有儿童期发作的INS的个体的儿童期发作的INS或耗尽个体的循环外周B细胞的方法;其中该个体为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。

[0126] 在一些实施例中,例如当个体的体重大于或等于45kg时,该方法包括向该个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露,直到第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供第二抗体暴露;其中第一抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第一抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的II型抗CD20抗体的总暴露;并且其中第二抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第二抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,例如,当个体的体重小于45kg时,该方法包括向个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II

型抗CD20抗体的第二抗体暴露,直到第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供第二抗体暴露,其中第一抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第一抗体暴露包括介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的II型抗CD20抗体的总暴露;其中第二抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第二抗体暴露包括介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。如本文所述,抗体包含重链和轻链,该重链包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列、SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列;该轻链包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列、SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列。在一些实施例中,抗体包含:VH结构域,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;以及VL结构域,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施例中,抗体包含含有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列并且含有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的抗体。在一些实施例中,该抗体为奥妥珠单抗。

#### [0127] 抗CD20抗体

[0128] 本公开的某些方面涉及抗CD20抗体,例如,用于本文所述方法中,例如用于治疗儿童期发作的INS(例如,FRNS或SDNS)或者降低儿童期发作的INS复发的风险和/或频率。在一些实施例中,抗CD20抗体为II型抗体。在一些实施例中,抗CD20抗体为人或人源化的。在一些实施例中,抗CD20抗体为去岩藻糖基化的。在一些实施例中,抗CD20抗体为GA101抗体。

[0129] II型抗CD20抗体的实例包括例如人源化B-Ly1抗体IgG1(如WO 2005/044859所公开的嵌合人源化IgG1抗体)、11B8 IgG1(如WO 2004/035607所公开)和AT80 IgG1。通常,IgG1同种型的II型抗CD20抗体表征出特征CDC特性。II型抗CD20抗体相比于IgG1同种型的I型抗体具有降低的CDC(如果IgG1同种型)。

[0130] 在一些实施例中,抗CD20抗体为本文所述的GA101抗体。在一些实施例中,抗CD20是指结合人CD20的以下抗体中的任一者:(1)抗体,该抗体包含:HVR-H1,其包含GYAFSY(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;HVR-H2,其包含FPGDGD TD(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;HVR-H3,其包含NVFDGYWLVY(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列;HVR-L1,其包含RSSKSL LHSNGITYLY(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;HVR-L2,其包含QMSNLVS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;以及HVR-L3,其包含AQNLELPYT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;(2)抗体,该抗体包含:VH结构域,其包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列;以及VL结构域,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列;(3)抗体,该抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列;(4)称为奥妥珠单抗的抗体;或(5)抗体,该抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列并且包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列。在一个实施例中,GA101抗体为IgG1同种型抗体。在一些实施例中,抗CD20抗体包含本文所述任何抗体的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,例如来自SEQ ID NO:7的3个HVR和来自SEQ ID NO:8的3个HVR,来自SEQ ID NO:9的3个HVR和来自SEQ ID NO:10的3个HVR,或表2中提供的氨基酸序列的任何HVR。

[0131] 在一些实施例中,抗CD20抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),该重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEW  
MGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYC~~  
ARNVFDGYWLVYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:7)

[0132]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQL  
LIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP  
YTFGGGTKVEIKRTV (SEQ ID NO:8)。

[0133] 在一些实施例中,抗CD20抗体包含:重链,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;和轻链,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWM  
GRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYCA~~  
RNVFDGYWLVYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG  
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK  
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL  
SLSPG (SEQ ID NO:9)

[0134]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLL  
IYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPY  
TFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)

[0135] 在一些实施例中,抗CD20抗体为人源化B-Ly1抗体。在一些实施例中,人源化B-Ly1抗体包含:重链可变区,其包含SEQ ID NO:9的三个重链CDR;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:10的三个轻链CDR。在一些实施例中,人源化B-Ly1抗体包含:重链,其包含SEQ ID NO:9的序列;和轻链,其包含SEQ ID NO:10的序列。

[0136] 在一些实施例中,抗CD20抗体包含与下表2中列出的多肽序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列。

[0137] 表2.多肽序列.

[0138]

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF SYSWMSWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD DTDYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	13
B-HH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA FSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLVTVSS	14
B-HH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA FSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYLCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	15
B-HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYA FSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLVTVSS	16

[0139]

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA FSYSWMSWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	17
B-HH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA FSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	7
B-HH7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA FSYSWISWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	18
B-HH8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLVTVSS	19
B-HH9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLVTVSS	20

[0140]

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HL1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TYSWMHWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LTVSS	21
B-HL2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTF TYSWMHWVQQAPGKGLEWMGRIFPGDG DTDYAEKFQGRVTITADTSTDATAYMELSS LRSEDTAVYYCATNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	22
B-HL3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTF TYSWMNWVQQAPGKGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADTSTDATAYMELSS LRSEDTAVYYCATNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	23
B-HL4	QMQLVQSGAEVKKKTGSSVKVSCKASGYT FTYSWMSWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDG DTDYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	24
B-HL8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS YSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LTVSS	25

[0141]

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HL10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAF SYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	26
B-HL11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	27
B-HL12	EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS YSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	28
B-HL13	EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTF SYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	29
B-HL14	EVQLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFS YSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	30

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HL15	EVQLVESGGGLVKPGSSRLSCAASGFTFS YSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	31
B-HL16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTF SYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGDG DTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQG TLVTVSS	32
[0142] B-HL17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS YSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSL RSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVTVSS	33
VH 信号 序列	MDWTWRILFLVAAATGAHS	34
B-KV1	DIVMTQTPLSLPVTPEPASPISCRSSKSLH SNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTV	8
VL 信号 序列	MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARC	43

[0143] 在一些实施例中,抗CD20抗体(例如,II型抗CD20抗体)是去岩藻糖基化的糖工程化抗体。此类糖工程化的抗体在Fc区具有改变的糖基化模式,优选地具有降低的岩藻糖残基水平。优选地,岩藻糖的量为Asn297处寡糖总量的60%或更少(在一个实施例中,岩藻糖的量在40%与60%之间;在另一个实施例中,岩藻糖的量为50%或更少;并且在又一个实施例中,岩藻糖的量为30%或更少)。此外,Fc区的寡糖优选被量分。在一些实施例中,II型抗CD20抗体包含Fc区,该Fc区包含被N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)两分的双触角寡糖。这些糖工程化的人源化抗CD20(例如,B-Ly1)抗体具有增加的ADCC。

[0144] 寡糖组分可以显著影响与治疗性糖蛋白疗效相关的特性,包括物理稳定性、对蛋白酶攻击的抗性、与免疫系统的相互作用、药代动力学和特定生物活性。此类特性可能不仅取决于寡糖的存在或不存在,而且还取决于寡糖的具体结构。可以在寡糖结构和糖蛋白功

能之间进行一些概括。例如,某些寡糖结构通过与特定碳水化合物结合蛋白的相互作用介导糖蛋白从血流中快速清除,而其他寡糖结构可以与抗体结合并触发不需要的免疫反应。(Jenkins,N.等人,Nature Biotechnol.14(1996)975-81)。

[0145] 哺乳动物细胞是生产治疗性糖蛋白的优选宿主,因为它们能够以最适合人类应用的形式糖基化蛋白质。(Cumming,D.A.等人,Glycobiology 1(1991)115-30;Jenkins,N.等人,Nature Biotechnol.14(1996)975-81)。细菌很少糖基化蛋白质,并且与其他类型的常见宿主(诸如酵母、丝状真菌、昆虫和植物细胞)一样,产生与从血流中快速清除、不期望的免疫相互作用以及在某些特定情况下降低生物活性相关的糖基化模式。在哺乳动物细胞中,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞在过去二十年中最常用。除了提供合适的糖基化模式外,这些细胞还允许持续生成遗传稳定、高产的克隆细胞系。它们可以使用无血清培养基在简单的生物反应器中培养至高密度,并允许开发安全且可重复的生物过程。其他常用的动物细胞包括幼仓鼠肾(BHK)细胞、NS0-和SP2/0-小鼠骨髓瘤细胞。最近,还已经测试了转基因动物的生产。(Jenkins,N.等人,Nature Biotechnol.14(1996)975-981)。

[0146] 抗体可以在重链恒定区的保守位置含有碳水化合物结构,其中每种同种型都具有不同的N连接碳水化合物结构阵列,这些碳水化合物结构不同地影响蛋白质组装、分泌或功能活性。(Wright,A.和Morrison,S.L.,Trends Biotech.15(1997)26-32)。所连接的N连接碳水化合物的结构根据加工程度的不同而有很大差异,并且可以包括高甘露糖、多支链以及双触角复合寡糖。(Wright,A.和Morrison,S.L.,Trends Biotech.15(1997)26-32)。通常,在特定糖基化位点处连接的核心寡糖结构存在异质加工,使得甚至单克隆抗体也以多种糖型存在。同样,已经显示出抗体糖基化的主要差异发生在细胞系之间,并且对于在不同培养条件下生长的给定细胞系,甚至观察到微小差异。(Lifely,M.R.等人,Glycobiology 5(8)(1995)813-22)。

[0147] 一种获得大幅度提高效率同时保持简单的生产过程并可能避免明显的不良副作用的方法是通过工程化单克隆抗体的寡糖组分来增强单克隆抗体的天然、细胞介导的效应子功能,如Umana,P.等人,Nature Biotechnol.17(1999)176-180和US 6,602,684所述。IgG1型抗体是癌症免疫疗法中最常用的抗体,是在每个CH2结构域中的Asn297处具有保守的N连接的糖基化位点的糖蛋白。与Asn297连接的两种复杂的双触角寡糖埋在CH2结构域之间,与多肽主链形成广泛接触,并且它们的存在对于抗体介导效应子功能诸如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)是必不可少的(Lifely,M.R.等人,Glycobiology 5(1995)813-822; Jefferis,R.等人,Immunol.Rev.163(1998)59-76;Wright,A.,和Morrison,S.L.,Trends Biotechnol.15(1997)26-32)。

[0148] 先前显示,在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中过度表达 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 I11("GnTIII17y)(一种糖苷基转移酶,催化两分寡糖的形成)显著增加通过经工程化的CHO细胞所产生的抗神经母细胞瘤嵌合单克隆抗体(chCE7)的体外ADCC活性。(参见Umana,P.等人,Nature Biotechnol.17(1999)176-180;以及WO 99/154342,这些参考文献的全部内容借此以引用的方式并入)。抗体chCE7属于一大类非缀合单克隆抗体,其具有高肿瘤亲和力和特异性,但在缺乏GnTIII酶的标准工业细胞系中生产时,其效力太低而无法用于临床(Umana,P.等人,Nature Biotechnol.17(1999)176-180)。该研究首次表明,通过工程化抗体产生细胞表达GnTIII可以大大提高ADCC活性,这也导致恒定区(Fc)相关的两分寡糖(包

括两分非岩藻糖基化寡糖)的比例增加高于天然存在抗体中发现的水平。

[0149] 在一些实施例中,抗CD20抗体(例如,II型抗CD20抗体)包含人Fc区(例如,人IgG1 Fc区)。在一些实施例中,Fc区包含已修饰的N连接寡糖。在一些实施例中,与具有未修饰的N连接寡糖的抗体相比,Fc区的N连接寡糖具有减少的岩藻糖残基。在一些实施例中,两分寡糖是两分复合寡糖。在一些实施例中,N连接寡糖已被修饰以具有增加的两分非岩藻糖基化寡糖。在一些实施例中,两分非岩藻糖基化寡糖是杂合类型。在一些实施例中,两分非岩藻糖基化寡糖是复合类型。关于更详细的描述,参见例如,WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684 (Umana等人);US2005/0123546 (Umana等人);并且美国专利号8,883,980 (Umana等人)。

[0150] 在一些实施例中,该II型抗CD20抗体为奥妥珠单抗。

[0151] 抗体制备

[0152] 根据任何上述实施例的抗体(例如,本公开的II型抗CD20抗体)可以单独或组合地并入任何特征,如下文第1-7节中所述:

[0153] 1. 抗体亲和力

[0154] 在某些实施例中,本文提供了一种抗体,其解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, $10^{-8}\text{M}$ 或更小,例如 $10^{-8}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ ,例如 $10^{-9}\text{M}$ 至 $10^{-13}\text{M}$ )。

[0155] 在一个实施例中,通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)测量Kd。在一个实施例中,用目标抗体的Fab形式及其抗原执行RIA。例如,通过在一系列未标记的抗原滴定存在下用最小浓度( $^{125}\text{I}$ )标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原,来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见例如,Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了确定用于测定法的条件,用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中的 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)包被MICROTITER<sup>®</sup>多孔板(Thermo Scientific)过夜,并且随后在室温(大约23°C),用在PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白阻断二至五小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [ $^{125}\text{I}$ ]-抗原与目的Fab的连续稀释液(例如,遵循在Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997)中抗VEGF抗体(Fab-12)的评定)混合。然后将目的Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续更长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以在室温下孵育(例如,一小时)。然后去除溶液并用在PBS中的0.1%聚山梨醇酯20 (TWEEN-20<sup>®</sup>)洗涤该板八次。当板已干燥时,添加150 $\mu\text{l}$ /孔的闪烁体(MICROSCINT-20<sup>™</sup>; Packard),并且在TOPCOUNT<sup>™</sup>  $\gamma$ 计数器(Packard)上对板计数十分钟。选择给出小于或等于20%最大结合的各Fab的浓度以用于竞争性结合测定中。

[0156] 根据另一实施例,使用BIACORE<sup>®</sup>表面等离子体共振测定法测量Kd。例如,使用BIACORE<sup>®</sup>-2000或BIACORE<sup>®</sup>-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)在25°C下用固定的抗原CM5芯片以~10个响应单位(RU)进行测定。在一个实施例中,根据供应商说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIACORE, Inc.)。将抗原用10mM醋酸钠pH 4.8稀释至 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ (约 $0.2\mu\text{M}$ ),之后以 $5\mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流量进行注射以获得大约10响应单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原之后,注射1M乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,在25°C,以约

25 $\mu$ l/min的流速,注射在含有0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20<sup>TM</sup>)表面活性剂(PBST)的PBS中的Fab的两倍连续稀释液(0.78nM至500nM)。通过同时拟合缔合和解离传感图,使用简单的一对一朗缪尔结合模型(BIACORE<sup>®</sup>评估软件3.2版)计算缔合速率( $k_{on}$ )和解离速率( $k_{off}$ )。平衡解离常数( $K_d$ )以比率 $k_{off}/k_{on}$ 的形式计算。参加例如Chen等人, *J.Mol.Biol.* 293:865-881(1999)。如果通过上述表面等离子体共振测定得出缔合速率超过106 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>,则可以通过使用荧光淬灭技术来确定缔合速率,即如在分光计诸如配备止流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO<sup>TM</sup>分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯所测得的,在浓度渐增的抗原存在下,测量在25 $^{\circ}$ C PBS pH 7.2中的20nM抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发波长=295nm;发射波长=340nm,带通=16nm)的增加或减少。

### [0157] 2. 抗体片段

[0158] 在某些实施例中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fv和scFv片段,以及下文描述的其他片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson等人*Nat.Med.* 9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如,Pluckthün在*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*,第113卷,Rosenburg和Moore编辑,(Springer-Verlag,New York),第269-315页(1994)中所述;还可参见WO 93/16185;以及美国专利号5,571,894和5,587,458。对于包含挽救受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab片段和F(ab')<sub>2</sub>片段的讨论,参阅美国专利号5,869,046。

[0159] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见例如,EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,*Nat.Med.* 9:129-134(2003);以及Hollinger等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:6444-6448(1993)。三体抗体和四体抗体也在Hudson等人,*Nat.Med.* 9:129-134(2003)中进行了描述。

[0160] 单结构域抗体为包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施例中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc., Waltham,MA;参见例如,美国专利号6,248,516B1)。

[0161] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由重组宿主细胞(例如大肠杆菌(E.coli)或噬菌体)产生,如本文所述。

### [0162] 3. 嵌合和人源化抗体

[0163] 在某些实施例中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于,例如,美国专利号4,816,567和Morrison等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,81:6851-6855(1984)中。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体为其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0164] 在某些实施例中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)源自非人抗体,而FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0165] 人源化抗体及其制备方法在例如Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) 中综述, 并且进一步描述于例如Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); Queen等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri等人, *Methods* 36:25-34 (2005) (描述了特异性决定区 (SDR) 移植); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (描述了“表面再塑”); Dall’Acqua等人, *Methods* 36:43-60 (2005) (描述了“FR改组”); 以及Osborn等人, *Methods* 36:61-68 (2005) 和Klimka等人, *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (描述了用于FR改组的“指导选择”方法) 中。

[0166] 可用于人源化的人框架区包括但不限于: 使用“最佳拟合”方法选择的框架区 (参见例如, Sims等人 *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); 源自轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区 (参见例如, Carter等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 以及Presta等人 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); 人成熟 (体细胞突变) 框架区或人种系框架区 (参见例如, Almagro和Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); 以及源自筛选FR文库的框架区 (参见例如, Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) 以及Rosok等人, *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996))。

#### [0167] 4. 人抗体

[0168] 在某些实施例中, 本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001) 以及Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008) 中。

[0169] 可以通过以下方式来制备人抗体: 将免疫原施用于转基因动物, 所述转基因动物已被修饰以响应于抗原激发而产生具有人可变区的完整人抗体或完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座, 所述全部或部分人免疫球蛋白基因座替换内源性免疫球蛋白基因座, 或者在动物的染色体外存在或随机整合至动物的染色体中。在此类转基因小鼠中, 内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述, 参见Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)。还参见例如描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584; 描述HuMab®技术的美国专利号5,770,429; 描述K-MOUSE®技术的美国专利号7,041,870, 以及描述VelociMouse®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自此类动物产生的完整抗体的人可变区, 例如通过与不同的人恒定区组合。

[0170] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系。(参见例如, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 以及Boerner等人, *J. Immunol.*, 147:86 (1991))。经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也如Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 所述。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826 (描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) (描述了人-人杂交瘤) 中描述的那些方法。人类杂交瘤技术 (Trioma技术) 也描述于Vollmers和Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) 以及Vollmers和Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27

(3):185-91(2005)中。

[0171] 人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生。然后可以将此类可变结构域序列与预期的人恒定结构域结合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0172] 5. 源自文库的抗体

[0173] 可以通过筛选组合文库中具有一个或多个所需活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,本领域已知多种方法用于产生噬菌体展示文库并筛选此类文库以获得具有所需结合特征的抗体。此类方法在,例如,Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(0'Brien等人,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001)中综述并且进一步描述于以下文献中:例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编辑,Human Press,Totowa,NJ,2003)中;Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)。

[0174] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的所有组成成分通过聚合酶链式反应(PCR)单独克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以从该噬菌体文库中筛选抗原结合噬菌体,如在Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中所描述的。噬菌体通常将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或Fab片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。替代性地,可以克隆所有天然组成成分(例如,来自人的所有天然组成成分)以提供针对广泛的非自身抗原和自身抗原的抗体的单一来源,而无需任何免疫,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)所述。最后,还可通过以下方式来制得天然文库:克隆来自干细胞的未重排的V基因区段;以及使用含有随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区并完成体外重排,如由Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所述。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括,例如:美国专利号5,750,373,和美国公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0175] 在本文中从人抗体文库分离出的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0176] 6. 多特异性抗体

[0177] 在某些实施例中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施例中,结合特异性中的一种为针对CD20的,并且另一种为针对任何其他抗原的。在某些实施例中,双特异性抗体可与CD20的两个不同的表位结合。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位于表达CD20的细胞。可以将双特异性抗体制成全长抗体或抗体片段。

[0178] 制备多特异性抗体的技术包括但不限于,具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见Milstein和Cuellar,Nature 305:537(1983)、WO 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.10:3655(1991))和“杆臼”工程化(参见例如,美国专利号5,731,168)。还可以通过工程化改造静电操纵效应来制备多特异性抗体,以制备抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004A1);交联两种或更多种抗体或片段(参见,例如,美国专利号4,676,

980,和Brennan等人,Science,229:81(1985));使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992));使用“双体抗体”技术制备双特异性抗体片段(参见例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993));以及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994));以及制备如例如在Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)中所述的三特异性抗体。

[0179] 具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化改造的抗体,包括“章鱼抗体”,也包括在本文中(参见例如US2006/0025576A1)。

[0180] 本文的抗体或片段还包括“双重作用FAb”或“DAF”,其包含与CD20以及其他不同抗原结合的抗原结合位点(参见例如,US 2008/0069820)。

[0181] 7. 抗体变体

[0182] 在某些实施例中,考虑了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的修饰或通过肽合来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体,条件是最终构建体具有期望的特征,例如抗原结合。

[0183] a) 取代、插入和删除性变体

[0184] 在某些实施例中,提供了具有一或多个氨基酸取代的抗体变体。用于取代突变的目的位点包括HVR和FR。保守取代显示在表A的“优选取代”标题下。更多实质性改变提供于表A中的“示例性取代”标题下,并且在下文参考氨基酸侧链类别进行了进一步描述。可以将氨基酸取代引入目的抗体中,并且对产物进行所需活性(例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC)筛选。

[0185] 表A

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp、Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0187] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组:

[0188] (1) 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0189] (2) 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0190] (3) 酸性: Asp、Glu;

[0191] (4) 碱性: His、Lys、Arg;

[0192] (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0193] (6) 芳族: Trp、Tyr、Phe。

[0194] 非保守性取代将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[0195] 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体 (例如, 人源化抗体或人抗体) 的一个或多个高变区残基。通常, 相对于亲本抗体, 选为用于进一步研究的一个或多个所得变体将在某些生物学特性方面 (例如, 亲和力增加、免疫原性降低) 有改变 (例如, 改善) 和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟抗体, 其可例如使用诸如

本文所述的那些基于噬菌体展示的亲和力成熟技术方便地生成。简而言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0196] 例如,可改变(例如,取代)HVR,以改善抗体亲和力。此类改变可在HVR“热点”中进行,即由体细胞成熟过程中发生高频突变的密码子编码的残基(参见例如,Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))和/或与抗原接触的残基,测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建并从二级文库重新选择而实现的亲和力成熟已被例如Hoogenboom等人在*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien等人编辑,Human Press,Totowa, NJ, (2001))中进行描述。在亲和力成熟的一些实施例中,利用多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定点诱变基因)中的任一种将多样性引入选择用于成熟的可变基因中。然后创建一个二级文库。随后对该文库进行筛选以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中将若干HVR残基(例如,每次4-6个残基)随机分组。参与抗原结合的HVR残基可例如使用丙氨酸扫描突变或建模来特异性地鉴定。具体而言,常常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0197] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体的抗原结合能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。此类改变可以在HVR的抗原接触残基之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施例中,每个HVR保持不变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0198] 可用于鉴定可被靶向诱变的抗体残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells(1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在此方法中,鉴定残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展示功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。可替代地或另外地,利用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴定抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0199] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N末端甲硫氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽的融合。

[0200] b) 糖基化变体

[0201] 在某些实施例中,改变本文提供的抗体以增加或降低抗体糖基化的程度。糖基化位点向抗体的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以产生或去除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0202] 当抗体包含Fc区时,附接于其上的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含支链的双触角寡糖,该双触角寡糖通常通过N-键合连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见例如,Wright等人 *TIBTECH* 15:26-32(1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可以对本发明的抗体中的寡糖进行修

饰,以便产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0203] 在一个实施例中,提供了抗体变体,其具有缺乏连接(直接或间接)至Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,此类抗体中岩藻糖的含量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。岩藻糖的量为通过计算相对于通过MALDI-TOF质谱测得的与Asn 297附接的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和,糖链中在Asn297处的岩藻糖的平均量,确定,如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号);然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于297位上游或下游大约±3个氨基酸,即在294位和300位之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见例如美国专利公开号US2003/0157108(Presta,L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。关于“去岩藻糖化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体包括:US2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US2003/0115614;US2002/0164328;US2004/0093621;US 2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的示例包括蛋白岩藻糖基化缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US2003/0157108 A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,特别是实例11),和敲除细胞系,诸如 $\alpha$ -1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)敲除的CHO细胞(参见例如,Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0204] 进一步提供了具有两分型寡糖的抗体变体,例如,其中连接至抗体的Fc区的双角寡糖被G1cNAc两分。此类抗体变体可具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人)、美国专利号6,602,684(Umana等人)和US2005/0123546(Umana等人)中。还提供了在连接于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这样的抗体变体可以具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);以及WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0205] c)Fc区变体

[0206] 在某些实施例中,一个或多个氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的Fc区中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0207] 在某些实施例中,本发明设想了具有一些但不是所有效应子功能的抗体变体,这使其成为应用的理想候选物,其中抗体在体内的半衰期很重要,但是某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc $\gamma$ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但是保留FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc(RIII,而单核细胞表达Fc(RI、Fc(RII和Fc(RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页的表3中。用于评估目标分子的ADCC活性的体外测定的其他非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,

I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))以及Hellstrom等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。替代性地,可使用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI)。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外地,可例如在诸如在Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的动物模型中体内评估目的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以执行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood101:1045-1052(2003);以及Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行(参见例如Petkova,S.B.等人,Int'l Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0208] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一者或多者的取代的那些(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在第265、269、270、297和327位氨基酸处的两个或更多个处具有取代的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其残基265和297被取代为丙氨酸(美国专利号7,332,581)。

[0209] 在某些实施例中,本文所述的Fc变体进一步包含用于减弱效应子功能的一种或多种氨基酸修饰(例如CDC和/或ADCC)。在示例性实施例中,减弱效应子功能的修饰是不改变Fc区的糖基化模式的修饰。在某些实施例中,减弱效应子功能的修饰减少或消除与人效应细胞的结合,与一种或多种Fc受体的结合和/或与表达Fc受体的细胞的结合。在一个示例性实施例中,本文描述的Fc变体包含以下修饰:人IgG1 Fc区的L234A、L235A和P329G导致效应子功能减弱。取代L234A、L235A和P329G(L234A/L235A/P329G三重变体被称为LALAPG)先前已被证明减少与Fc受体和补体的结合(参见例如,美国公开号2012/0251531)。

[0210] 在各种实施例中,具有降低的效应子功能的Fc变体是指将效应子功能(例如,CDC、ADCC和/或与FcR的结合等活性)与野生型Fc区(例如,没有降低效应子功能的突变的Fc区,尽管其可能具有其他突变)所实现的效应子功能相比降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或更多的Fc变体。在某些实施例中,具有降低的效应子功能的Fc变体是指与野生型Fc区相比消除所有可检测的效应子功能的Fc变体。用于测量效应子功能的测定是本领域已知的并且描述如下。

[0211] 可以进行体外和/或体内细胞毒性测定,以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc $\gamma$ R结合(因此可能缺乏ADCC活性)。介导ADCC的原代细胞NK细胞仅表达Fc $\gamma$ RIII,而单核细胞表达Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII。造血细胞上的FcR表达汇总在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)中。用于评估目标分子的ADCC活性的体外测定的其他非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))以及Hellstrom等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))。替代性地,可使用非放射性测定方法(参见例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,

Inc. Mountain View, CA); 以及 CytoTox 96<sup>®</sup> 非放射性细胞毒性测定 (Promega, Madison, WI)。用于此类测定的有效效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。替代地或另外地, 可例如在诸如在 Clynes 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 中公开的动物模型中体内评估目的分子的 ADCC 活性。也可以进行 C1q 结合测定以确认抗体不能结合 C1q, 因此缺乏 CDC 活性。参见例如 WO 2006/029879 和 WO 2005/100402 中的 C1q 和 C3c 结合 ELISA。为了评估补体活化, 可以执行 CDC 测定 (参见例如 Gazzano-Santoro 等人, J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. 等人, Blood 101:1045-1052 (2003); 以及 Cragg, M. S. 和 M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004))。

[0212] 描述了具有改善的或降低的与 FcR 的结合的某些抗体变体。(参见例如美国专利号 6,737,056; WO 2004/056312; 以及 Shields 等人, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001))。

[0213] 在某些实施例中, 抗体变体包含具有改善 ADCC 的一个或多个氨基酸取代的 Fc 区, 例如, 在 Fc 区的位置 298、333 和/或 334 (残基的 EU 编号) 处的取代。

[0214] 在一些实施例中, 在 Fc 区中作出改变, 导致改变的 (即, 改善的或减少的) C1q 结合和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC), 例如, 如美国专利号 6,194,551, WO 99/51642 以及 Idusogie 等人 J. Immunol. 164:4178-4184 (2000) 所述。

[0215] 具有延长的半衰期和改善的新生儿 Fc 受体 (FcRn) 结合的抗体描述于 US2005/0014934A1 (Hinton 等人) 中, 该新生儿 Fc 受体负责将母体 IgG 转移至胎儿 (Guyer 等人, J. Immunol. 117:587 (1976) 以及 Kim 等人, J. Immunol. 24:249 (1994))。那些抗体包含这样的 Fc 区, 该 Fc 区中具有改善 Fc 区与 FcRn 的结合的一个或多个取代。此类 Fc 变体包括在以下 Fc 区残基中的一处或多处具有取代的 Fc 变体: 238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424 或 434, 例如对 Fc 区残基 434 的取代 (美国专利号 7,371,826)。

[0216] 关于 Fc 区变体的其他实例, 还参见: Duncan 和 Winter, Nature 322:738-40 (1988); 美国专利号 5,648,260; 美国专利号 5,624,821; 以及 WO 94/29351。

[0217] d) 经半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0218] 在某些实施例, 可期望产生经半胱氨酸工程化改造的抗体, 例如“thioMAbs”, 其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特定实施例中, 取代的残基存在于抗体的可接近位点。如本文进一步描述的, 通过用半胱氨酸取代那些残基, 从而将反应性硫醇基团定位于抗体的可接近位点, 并且可用于将抗体与其他部分 (诸如药物部分或接头-药物部分) 缀合, 以产生免疫缀合物。在某些实施例中, 可用半胱氨酸取代下列残基中的任何一个或多个: 轻链的 V205 (Kabat 编号); 重链的 A118 (EU 编号); 和重链 Fc 区的 S400 (EU 编号)。可例如美国专利号 7,521,541 中所述生成半胱氨酸工程化的抗体。

[0219] e) 抗体衍生物

[0220] 在某些实施例中, 本文提供的抗体可以被进一步修饰以包含本领域已知的并且容易获得的另外的非蛋白质部分。适合于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性示例包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸 (均聚物或随机共聚物) 和葡聚糖或聚 (n-乙烯吡咯烷酮) 聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇 (例如甘油)、聚乙烯醇

以及它们的混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在制造中可具有优势。聚合物可具有任何分子量,并且可以具有支链或不具有支链。附接至抗体的聚合物的数目可变,并且如果附接了多于一个聚合物,那么它们可以为相同或不同的分子。通常,可基于以下考虑因素测定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗体待改善的特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定条件下的疗法等。

[0221] 在另一个实施例中,提供了抗体和可通过暴露于辐射而选择性地加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施例中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可具有任何波长,并且包括但不限于对普通细胞没有伤害、但是将非蛋白质性部分加热至抗体-非蛋白质性部分近端的细胞被杀死的温度的波长。

[0222] A. 重组方法和组合物

[0223] 可以使用重组方法和组合物来产生抗体,例如,如在美国专利号4816567中所述。在一个实施例中,提供编码本文所述的抗CD20抗体的经分离的核酸。此类核酸可以编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH(例如,抗体的轻链和/或重链)的氨基酸序列。在进一步的实施例中,提供一或多个包含此类核酸的载体(例如,表达载体)。在进一步的实施例中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施例中,宿主细胞包含(例如,已经用以下各物转化):(1) 包含核酸的载体,该核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列;或(2) 第一载体和第二载体,该第一载体包含核酸,该核酸编码包含抗体的VL的氨基酸序列,该第二载体包含核酸,该核酸编码包含抗体的VH的氨基酸序列。在一个实施例中,宿主细胞为真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如,YO、NS0、Sp20细胞)。在一个实施例中,提供一种制备抗CD20抗体的方法,其中该方法包括在适于表达抗体的条件下培养如上所提供的包含编码该抗体的核酸的宿主细胞,以及任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收该抗体。

[0224] 为重组生产抗CD20抗体,将例如如上所述的编码抗体的核酸分离并且插入至一个或多个载体中以用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规程序来容易地对此类核酸进行分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。

[0225] 用于克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中产生抗体,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。关于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还参见Charlton,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo编辑,Humana Press,Totowa,NJ,2003),第245-254页,其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达)。抗体可以在表达后可溶性级分中从细菌细胞糊中分离,并且可以进一步纯化。

[0226] 除了原核生物外,诸如丝状真菌或酵母等真核微生物也是用于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主,该真核微生物包括这样的真菌和酵母菌株:其糖基化途径已经“人源化”,从而使得产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004);以及Li等人,Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0227] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出了许多可以与昆虫细胞

一起使用的杆状病毒株,特别是用于转染草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞。

[0228] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0229] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适于在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他示例为由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(293或293细胞,如例如在Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中所述);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠塞尔托利氏细胞(TM4细胞,如例如在Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中所述);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤细胞(MMT 060562);TRI细胞(如例如在Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中所述);MRC 5细胞;以及FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,其包括DHFR<sup>-</sup>CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));以及骨髓瘤细胞系诸如Y0、NS0和Sp2/0。关于适用于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷(B.K.C.Lo,编辑,Humana Press,Totowa,NJ),第255-268页(2003)。

[0230] B.测定

[0231] 可通过本技术领域中的各种测定,对本文所提供的抗CD20抗体的物理/化学特性和/或生物活性来进行鉴定、筛选或表征。

[0232] 1.结合测定和其他测定

[0233] 在一个方面,例如通过已知方法诸如ELISA、蛋白质印迹等,对本发明的抗体进行抗原结合活性测试。可以使用本领域已知的方法来确定CD20结合并且本文公开了示例型方法。在一个实施例中,使用放射免疫测定来测量结合。下面提供了示例性放射免疫测定。将CD20抗体碘化,并且制备竞争反应混合物,其含有固定浓度的碘化抗体和浓度递减的连续稀释的、未标记的CD20抗体。将表达CD20的细胞(例如,用人CD20稳定转染的BT474细胞)添加到反应混合物中。孵育后,洗涤细胞以将游离的碘化CD20抗体与和细胞结合的CD20抗体分离。例如,通过计数与细胞相关的放射性,并使用标准方法确定结合亲和力来确定结合的碘化CD20抗体的水平。在另一个实施例中,使用流式细胞术评估CD20抗体结合表面表达的CD20(例如,在B细胞子集上)的能力。获得外周白细胞(例如,来自人、食蟹猴、大鼠或小鼠)并用血清封闭细胞。以系列稀释液添加标记的CD20抗体,并且还对T细胞进行染色以鉴定T细胞子集(使用本领域已知的方法)。孵育样品并洗涤后,使用流式细胞仪对细胞进行分选,并使用本领域熟知的方法分析数据。在另一个实施例中,可以使用表面等离子体共振来分析CD20结合。示例性表面等离子体共振方法在实例中举例说明。

[0234] 在另一方面,可使用竞争测定鉴定与本文所公开的任何抗CD20抗体竞争结合至CD20的抗体。在某些实施例中,此类竞争抗体结合至由本文所公开的任何抗CD20抗体结合的共同表位(例如,线性或构象表位)。关于映射抗体所结合的表位的详细示例性方法提供于Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,NJ)中的Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols”中。

[0235] 在示例性竞争测定中,将固定的CD20在包含与CD20结合的第一标记的抗体(例如,

利妥昔单抗、GA101抗体等)和正在测试其与第一抗体竞争与CD20结合的能力的第二未标记的抗体的溶液中孵育。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定化的CD20在包含第一标记抗体而非包含第二未标记抗体的溶液中孵育。在容许第一抗体与CD20结合的条件下温育之后,去除过量未结合的抗体,并且测量与固定化CD20缔合的标记的量。如果与固定化CD20缔合的标记的量相对于对照样品在测试样品中基本上减少,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合CD20。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

#### [0236] 2. 活性测定

[0237] 本公开的抗CD20抗体(例如,II型抗体)可以通过本领域已知的一种或多种活性测定来鉴定和/或表征。例如,可以使用补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC),如本文所述。

[0238] 应当理解,任何上述测定都可以使用本发明的免疫缀合物代替或补充抗CD20抗体来进行。

[0239] 应当理解,可以使用抗CD20抗体和另外的治疗剂来进行任何上述测定。

#### [0240] 施用II型抗CD20抗体的方法

[0241] 本文提供了用于治疗个体的儿童期发作的特发性肾病综合征(INS)的方法,其中该方法包括向该个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露。本文还提供了用于耗尽个体的循环外周B细胞的方法,其中该方法包括向该个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露,并且其中在施用该II型抗CD20抗体后,B细胞被耗尽至使得循环外周B细胞以约5个细胞/ $\mu$ L或更少存在于来自个体的外周血中的水平。本文还提供了用于耗尽个体的循环外周B细胞的方法,其中该方法包括向该个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露,并且其中在施用II型抗CD20抗体后,B细胞被耗尽至使得循环外周B细胞以约5个细胞/ $\mu$ L或更少存在于来自个体的外周血中的水平,该水平在第一剂量的第一抗体暴露之后持续至少52周。在本文方法的一些实施例中,个体或患者为人。在一些实施例中,个体或患者为大于或等于2岁且小于或等于25岁的人。在一些实施例中,个体或患者为大于2岁且小于25岁的人。在一些实施例(例如,使用II型抗CD20抗体的基于体重给药的实施例中),个体的体重小于45kg。在一些实施例(例如,使用II型抗CD20抗体的固定给药的实施例中),个体的体重大于或等于45kg。

[0242] 在一些实施例中,个体或患者在18岁之前已经被诊断患有INS(例如,FRNS或SDNS)。用于诊断儿童期发作的INS(例如,FRNS或SDNS)的指南是本领域已知的并且包括但不限于以下文献中描述的那些:Kidney Disease:Improving Global Outcomes Glomerular Diseases Work Group.KDIGO 2021Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases(KidneyInt.2021;100:S1-276)。

[0243] 在一些实施例中,个体或患者患有儿童期发作的频繁复发性肾病综合征(FRNS)。在一些实施例中,个体或患者在疾病发作的6个月内每6个月具有 $\geq 2$ 次复发,或在任何后续12个月时间段内每12个月具有 $\geq 4$ 次复发。

[0244] 在一些实施例中,个体或患者患有儿童期发作的类固醇依赖性肾病综合征(SDNS)。在一些实施例中,个体或患者在用泼尼松或泼尼松龙(以全剂量或逐渐减量期间)

治疗期间或者泼尼松或泼尼松龙停药后15天内已经出现两次连续的复发。

[0245] 在一些实施例中,个体或患者(例如,在使用本公开的方法进行治疗之前)处于完全缓解状态。在一些实施例中,完全缓解定义为不存在水肿、UPCR $\leq$ 0.2g/g、且连续3天每天尿液试纸检测读数为蛋白质痕量或阴性。

[0246] 在一些实施例中,个体或患者在6个月内(例如,在根据本公开的方法进行治疗之前)至少1次复发。

[0247] 在一些实施例中,个体或患者在6个月内(例如,在根据本公开的方法进行治疗之前)接受过环磷酰胺治疗,并且在环磷酰胺停药后经历至少1次复发。

[0248] 在一些实施例中,个体或患者的估计肾小球滤过率(eGFR)在其年龄的正常范围内。

[0249] 在一些实施例中,本公开的方法包括向个体施用本公开的对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和本公开的对II型抗CD20抗体的第二抗体暴露。在一些实施例中,直到第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供第二抗体暴露。在一些实施例中,直到第一抗体暴露之后约18周、第一抗体暴露之后约19周、第一抗体暴露之后约20周、第一抗体暴露之后约21周、第一抗体暴露之后约22周、第一抗体暴露之后约23周、第一抗体暴露之后约24周、第一抗体暴露之后约25周或第一抗体暴露之后约26周,才提供第二抗体暴露。在一些实施例中,直到第一抗体暴露之后小于约以下周中的任一个才提供第二抗体暴露:26、25、24、23、22、21、20或19。在一些实施例中,直到第一抗体暴露之后大于约以下周中的任一个才提供第二抗体暴露:18、19、20、21、22、23、24或25。也就是说,直到上限为26、25、24、23、22、21、20或19且独立选择的下限为18、19、20、21、22、23、24或25的周数范围中的任一个才提供第二抗体暴露,其中下限小于上限。

[0250] 本文描述的给药方案使用一致的跟踪剂量之间的时间,其中在第1天或第0周向患者施用第一剂量。如本文所述,本公开的抗体暴露可包括一个或两个剂量。在抗体暴露含有一个剂量的情况下,提到在第一抗体暴露(如本文所述)之后经过一段时间才提供第二抗体暴露是指在第一抗体暴露的剂量(例如第1天或第0周)与第二抗体暴露的剂量之间经过的时间量。如果第一抗体暴露包括两个剂量,则第一剂量的第一抗体暴露在第1天或第0周提供。在抗体暴露含有两个剂量的情况下,提到在第一抗体暴露(如本文所述)之后经过一段时间才提供第二抗体暴露是指在两个剂量中的第一剂量的第一抗体暴露(例如第1天或第0周)与两个剂量中的第一剂量的第二抗体暴露之间经过的时间量。例如,如果本公开的方法包括具有两个剂量的第一抗体暴露和具有两个剂量的第二抗体暴露,并且直到第一抗体暴露之后约22周才提供第二抗体暴露,则第一剂量的第一抗体暴露与第一剂量的第二抗体暴露之间的间隔为约22周。

[0251] 在一些实施例中,本公开的第一抗体暴露包括一个或两个剂量的本公开的II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第一抗体暴露含有介于约1800mg与约2200mg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,第一抗体暴露含有约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2100mg或约2200mg II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,个体的体重大于或等于45kg。

[0252] 在一些实施例中,第一抗体暴露含有介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,第一抗体暴露含有约36mg/kg、约38mg/kg、约40mg/kg

kg、约42mg/kg或约44mg/kg II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,个体的体重小于45kg。

[0253] 在一些实施例中,第一抗体暴露包括两个剂量。在一些实施例中,第一抗体暴露包括第一剂量的介于约900mg与约1100mg之间的II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约900mg与约1100mg之间的II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第一剂量的第一抗体暴露含有约1000mg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第二剂量的第一抗体暴露含有约1000mg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,个体的体重大于或等于45kg。

[0254] 在一些实施例中,第一抗体暴露包括两个剂量。在一些实施例中,第一抗体暴露包括第一剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第一剂量的第一抗体暴露含有约20mg/kg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第二剂量的第一抗体暴露含有约20mg/kg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,个体的体重小于45kg。

[0255] 在一些实施例中,直到第一剂量的第一抗体暴露之后约1.5周至约2.5周才提供第二剂量的第一抗体暴露。在一些实施例中,直到第一剂量的第一抗体暴露之后约2周才提供第二剂量的第一抗体暴露。

[0256] 在一些实施例中,本公开的第二抗体暴露包括一个或两个剂量的本公开的II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第二抗体暴露含有介于约1800mg与约2200mg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,第二抗体暴露含有约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2100mg或约2200mg II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,个体的体重大于或等于45kg。

[0257] 在一些实施例中,第二抗体暴露含有介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,第二抗体暴露含有约36mg/kg、约38mg/kg、约40mg/kg、约42mg/kg或约44mg/kg II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,个体的体重小于45kg。

[0258] 在一些实施例中,第二抗体暴露包括两个剂量。在一些实施例中,第二抗体暴露包括第一剂量的介于约900mg与约1100mg之间的II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约900mg与约1100mg之间的II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第一剂量的第二抗体暴露含有约1000mg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第二剂量的第二抗体暴露含有约1000mg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,个体的体重大于或等于45kg。

[0259] 在一些实施例中,第二抗体暴露包括两个剂量。在一些实施例中,第二抗体暴露包括第一剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的II型抗CD20抗体,以及第二剂量的介于约18mg/kg与约22mg/kg之间的II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第一剂量的第二抗体暴露含有约20mg/kg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,第二剂量的第二抗体暴露含有约20mg/kg II型抗CD20抗体。在一些实施例中,个体的体重小于45kg。

[0260] 在一些实施例中,直到第一剂量的第二抗体暴露之后约1.5周至约2.5周才提供第二剂量的第二抗体暴露。在一些实施例中,直到该第一剂量的该第二抗体暴露之后约2周才提供该第二剂量的该第二抗体暴露。

[0261] 在一些实施例中,本公开的II型抗CD20抗体静脉内施用(例如,通过IV输注)。

[0262] 在一些实施例中,本公开的方法进一步包括施用有效量的糖皮质激素或皮质类固

醇(例如,与本文所述的II型抗CD20抗体联合)。多种自然存在的和合成的糖皮质激素/皮质类固醇是本领域已知的,包括但不限于倍氯米松、曲安西龙、地塞米松、倍他米松、泼尼松、甲泼尼龙、泼尼松龙、可的松和皮质醇。在一些实施例中,糖皮质激素/皮质类固醇包括甲泼尼龙。在一些实施例中,糖皮质激素/皮质类固醇包括泼尼松。本公开的糖皮质激素/皮质类固醇的有效量是本领域已知的并且可通过标准测定容易地确定。例如,甲泼尼龙可以以750-1000mg的剂量每天一次通过IV施用。作为另一个实例,泼尼松可以以0.5mg/kg经口施用并任选逐渐减少为7.5mg/天。在一些实施例中,甲泼尼龙可以在每次抗CD20抗体输注之前施用。在一些实施例中,甲泼尼龙可以以80mg(例如,如果个体的体重大于或等于45kg)或1.5mg/kg(例如,如果个体的体重小于45kg)静脉内施用。在一些实施例中,口服泼尼松或等同物可以以0.5-1mg/kg/天(最大60mg/天)的剂量施用。在一些实施例中,口服泼尼松或等同物可以以0.5-1mg/kg/天(最大60mg/天)的剂量施用并逐渐减少为5mg/天的目标。在一些实施例中,口服泼尼松或等同物可以以0.5至2mg/kg/天(最大60mg/天)的剂量施用。在一些实施例中,口服泼尼松或等同物可以以0.5至2mg/kg/天(最大60mg/天)的剂量施用并逐渐减少为5mg/天的目标。

[0263] 在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用糖皮质激素。在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前施用糖皮质激素,例如在施用II型抗CD20抗体之前30-60分钟施用糖皮质激素。在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前30-60分钟通过IV施用80mg甲泼尼龙。在一些实施例中,泼尼松(例如,经口施用)和/或甲泼尼龙(例如,IV施用)可以与治疗一起施用,随后进行维持治疗(例如,霉酚酸酯或环磷酰胺)。

[0264] 在一些实施例中,本公开的方法进一步包括施用有效量的抗组胺药(例如,与本文所述的II型抗CD20抗体联合)。本领域已知且目前在临床使用的抗组胺药包括组胺H<sub>1</sub>-受体和组胺H<sub>2</sub>-受体拮抗剂或反向激动剂。在一些实施例中,抗组胺药包括苯海拉明。本公开的抗组胺药的有效量是本领域已知的并且可通过标准测定容易地确定。例如,苯海拉明可以以0.5-1mg/kg口服剂量(四舍五入到最接近的可用丸剂制剂)至多50mg的最大剂量施用。

[0265] 在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用抗组胺药,例如作为预防性治疗。在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前施用抗组胺药,例如在施用II型抗CD20抗体之前30-60分钟施用抗组胺药。在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前30-60分钟经口施用0.5-1mg/kg或至多50mg苯海拉明。

[0266] 在一些实施例中,本公开的方法进一步包括施用有效量的对乙酰氨基酚。例如,对乙酰氨基酚可以以15mg/kg口服剂量至多1000mg的最大剂量施用。

[0267] 在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用对乙酰氨基酚,例如作为预防性治疗。在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前施用对乙酰氨基酚,例如在施用II型抗CD20抗体之前30-60分钟施用对乙酰氨基酚。在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前30-60分钟经口施用15mg/kg(四舍五入到最接近的可用丸剂制剂)或至多1000mg对乙酰氨基酚。

[0268] 在一些实施例中,本公开的方法进一步包括施用标准护理治疗(例如,与本文所述的II型抗CD20抗体联合)。在一些实施例中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期

间或之后施用标准护理治疗,例如用于治疗或预防INS的一种或多种症状。

[0269] 在一些实施例中,本公开的方法引起个体的完全缓解。在一些实施例中,个体在开始治疗后1年时(例如,如本文所述,在第52周时)处于完全缓解。在一些实施例中,完全缓解是指第一次晨尿UPCR $\leq 0.2\text{g/g}$ 且没有发生并发事件(在第8周后发生)的状态,例如,如本文所述,在完成类固醇逐渐减量后。在一些实施例中,(例如,治疗开始后1年时,例如,如本文所述,第52周时)持续完全缓解。在一些实施例中,持续完全缓解包括第一次晨尿UPCR $\leq 0.2\text{g/g}$ 且未发生复发或任何某些并发事件:(1)复发(例如,在第8周后发生),定义为以下需要全身性皮质类固醇或其他免疫抑制治疗的事件的任一项:(a)第一次晨尿UPCR $\geq 2\text{g/g}$ 或(b)尿液试纸检测UA $\geq 3+$ 持续连续3天,并且这3天时间段的最近一次尿液样品被确定具有UPCR $>0.2\text{g/g}$ 或(c)任一天的尿液试纸检测UA蛋白 $\geq 3+$ 伴有水肿,并且尿液样品被确定为具有UPCR $>0.2\text{g/g}$ ; (2)在30天的时间段内使用任何全身性皮质类固醇 $>14$ 天(例如,在第8周后发生); (3)开始使用除全身性皮质类固醇以外的任何INS救援疗法(例如,在任何时间发生); (4)因缺乏疗效而治疗停止(例如,在任何时间发生);或(5)死亡(例如,在任何时间发生)。在一些实施例中,个体从治疗的第8周至第52周持续完全缓解,且个体未经历(1)复发,定义为以下需要全身性皮质类固醇或其他免疫抑制治疗的事件的任一项:(a)第一次晨尿UPCR $\geq 2\text{g/g}$ 或(b)尿液试纸检测UA $\geq 3+$ 持续连续3天且这3天时间段的最近一次尿液样品被确定具有UPCR $>0.2\text{g/g}$ 或(c)任一天的尿液试纸检测UA蛋白 $\geq 3+$ 伴有水肿,并且尿液样品被确定为具有UPCR $>0.2\text{g/g}$ ;或(2)在30天的时间段内使用任何全身性皮质类固醇 $>14$ 天。在一些实施例中,个体的完全缓解持续直到治疗的第52周,且没有开始除全身性皮质类固醇之外的任何针对INS的救援疗法。

[0270] 在一些实施例中,本公开的方法引起个体的循环外周B细胞的耗尽。在一些实施例中,这些循环外周B细胞为CD19+B细胞。在一些实施例中,循环外周B细胞为初始B细胞。在一些实施例中,循环外周B细胞为记忆B细胞。在一些实施例中,循环外周B细胞为浆母细胞或浆细胞。在一些实施例中,施用本公开的II型抗CD20抗体(例如,根据本文所述的任何方法)后,外周血中存在的循环外周B细胞为约7个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约6个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约4个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约3个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约2个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约1个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少或约0.5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少。在一些实施例中,使用本文描述的高灵敏度流式细胞术(HSFC)测量循环外周B细胞的水平。在一些实施例中,B细胞被耗尽至低于使用HSFC的检测极限的水平。在一些实施例中,HSFC对B细胞的定量下限(LLoQ)为约1.0个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.8个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.6个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、或0.441个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少。在一些实施例中,个体的循环外周B细胞被耗尽至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。在一些实施例中,在第一剂量的第一抗体暴露之后,循环外周B细胞的耗尽持续至少52周。在一些实施例中,在第一剂量的第一抗体暴露之后,循环外周B细胞的耗尽持续至少51周、至少50周、至少49周、至少48周、至少47周、至少46周、至少45周、至少44周、至少43周、至少42周、至少41周、至少40周、至少39周、至少38周、至少37周、至少36周、至少35周、至少34周、至少33周、至少32周、至少31周、至少30周、至少29周、至少28周、至少27周、至少26周、至少25周或至少24周。在一些实施例中,循环外周B细胞的耗尽是指在第一抗体暴露(例如,包括如本文所述的抗CD20抗体的1或2个剂量)之后,在第二抗体暴露(例如,包括如本文所述的抗CD20抗体的1或2个剂量)之后,在治疗之后

(例如,在接受如本文所述的第一和/或第二抗体暴露之后)3个月,在治疗之后(例如,在接受如本文所述的第一和/或第二抗体暴露之后)6个月,在治疗之后(例如,在接受如本文所述的第一和/或第二抗体暴露之后)9个月,或在治疗之后(例如,在接受如本文所述的第一和/或第二抗体暴露之后)12个月,例如与治疗前对同一个体的相应测量相比或与对照个体(例如,未接受治疗的个体)的相应测量相比,取得的循环外周B细胞的测量。

[0271] 用于测定个体的循环外周B细胞的耗尽的方法是本领域已知的,例如使用识别B细胞标记物的一种或多种抗体的流式细胞术。在一些实施例中,高灵敏度流式细胞术(HSFC)可用于测定循环外周B细胞的耗尽(参见例如Vital,E.M.等人(2011)Arthritis Rheum.63:3038-3047和实例1)。在一些实施例中,B细胞为CD19+B细胞。在一些实施例中,这些B细胞为初始B细胞(例如,CD19+CD27-B细胞)、记忆B细胞(例如,CD19+CD27+B细胞)或浆母细胞(例如,CD19+CD27+CD38++B细胞)。在一些实施例中,B细胞为CD19+CD3-CD14-细胞和/或CD19+CD33-CD56-细胞。在一些实施例中,这些B细胞为CD19+CD3-CD14-CD33-CD56-细胞。在一些实施例中,B细胞包括CD19+CD20+B细胞、CD19+CD20-B细胞和CD19+CD22+B细胞。在一些实施例中,B细胞为循环外周B细胞,例如来自外周血样品。

[0272] 在一些实施例中,如下测量(例如,通过HSFC测量)外周血样品中存在的循环外周B细胞的水平。通过流式细胞术(例如,通过绘制CD45与侧向散射图并门控CD45+细胞)来鉴定样品中的淋巴细胞。在一些实施例中,在该步骤之前从分析中排除双联体(例如,通过门控单细胞并排除前向散射和/或侧向散射双联体来排除)。然后通过排除T细胞、NK细胞和单核细胞来鉴定CD19+B细胞。例如,CD19+CD3-CD14-细胞可以从亲本CD45+淋巴细胞门中鉴定(例如,通过绘制CD19与CD3/CD14的图并门控CD19+CD3-CD14-细胞来鉴定),并且CD19+CD33-CD56-B细胞可以从亲本CD19+CD3-CD14-细胞中鉴定(例如,通过绘制CD19与CD33/CD56的图并门控CD19+CD33-CD56-细胞来鉴定)。然后可以例如通过将检测到的CD19+B细胞(例如,CD19+CD3-CD14-CD33-CD56-细胞)的数量除以样品体积来确定B细胞计数。在一些实施例中,还对珠或其他QC对照的数量进行定量,然后可以例如通过计算(CD19+事件x珠计数)/(珠计数x样品体积)来确定B细胞计数。

[0273] 在一些实施例中,施用本公开的II型抗CD20抗体(例如,根据本文所述的任何方法)后,外周血中存在的循环外周B细胞为约7个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约6个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约4个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约3个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约2个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约1个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少或约0.5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少,例如5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少。在一些实施例中,B细胞被耗尽至低于使用HSFC的检测极限的水平。在一些实施例中,HSFC对B细胞的定量下限(LLoQ)为约1.0个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.8个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.6个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、约0.5个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少、或0.441个细胞/ $\mu\text{L}$ 或更少。

[0274] IV. 制品或药盒

[0275] 另一方面,提供了含有本公开的II型抗CD20抗体的制品或药盒,其可用于本文所述的任何方法(例如,用于治疗、预防和/或诊断本文所述的病症)。该制品或药盒包括容器和在所述容器上或与所述容器相关的标签或包装插页(package insert)。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。所述容器可以由诸如玻璃或塑料等多种材料形成。该容器容纳组合物,该组合物本身或与另一种组合物组合能够有效地治疗、预防和/或诊断病症或用于耗尽循环外周B细胞,并且该容器可以具有无菌入口(例如,该容器可以是静脉

内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是本文描述的抗体(例如,本公开的II型抗CD20抗体)。标签或包装插页指示该组合物根据本文所述的任何方法用于治疗所选病况或用于耗尽循环外周B细胞。可替代地或另外地,该制品或药盒还可包含第二(或第三)容器,该第二(或第三)容器包含药用缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。所述制品还可包括从商业和用户角度所需的其他物质,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0276] 在一些实施例中,本文提供了一种制品或药盒,该制品或药盒包括包含本公开的II型抗CD20抗体和任选的药用载体的容器,以及任选的包含关于治疗个体的儿童期发作的INS或降低个体的儿童期发作的INS的复发的风险和/或频率的说明的包装插页,例如,其中该说明指示向个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对该II型抗CD20抗体的第二抗体暴露,直到第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供第二抗体暴露;其中第一抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第一抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的II型抗CD20抗体的总暴露;其中第二抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第二抗体暴露包括介于约1800mg与约2200mg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,说明指示个体大于或等于2岁且小于或等于25岁。在一些实施例中,说明指示个体的体重大于或等于45kg。在一些实施例中,该抗体为奥妥珠单抗。

[0277] 在一些实施例中,本文提供了一种制品或药盒,该制品或药盒包括包含本公开的II型抗CD20抗体和任选的药用载体的容器,以及任选的包含关于治疗个体的儿童期发作的INS或降低个体的儿童期发作的INS的复发的风险和/或频率的说明的包装插页,例如,其中该说明指示向个体施用对II型抗CD20抗体的第一抗体暴露和对II型抗CD20抗体的第二抗体暴露,直到第一抗体暴露之后约18周至约26周才提供第二抗体暴露;其中第一抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第一抗体暴露含有介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的II型抗CD20抗体的总暴露;其中第二抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第二抗体暴露含有介于约36mg/kg与约44mg/kg之间的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施例中,说明指示个体大于或等于2岁且小于或等于25岁。在一些实施例中,说明指示个体的体重小于45kg。在一些实施例中,该抗体为奥妥珠单抗。

[0278] 制品或药盒仍可以进一步包括包含第二药物的第二或第三容器,其中抗CD20抗体(例如,本公开的II型抗CD20抗体)是第一药物,其中制品进一步包括包装插页上关于用第二药物治疗受试者的说明。这些实施例中的制品可进一步包括包装插页,该包装插页指示组合物可以用于治疗特定病症。

[0279] 该说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。除了本文中示出和描述的之外,本发明的各种修改对于根据说明书前文的本领域技术人员而言将变得显而易见,并且落入所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0280] 实例

[0281] 通过参考以下实例将更全面地理解本发明。然而,它们不应被解释为限制本发明的范围。应当理解,本文描述的实例和实施例仅用于说明目的,并且其各种修改或改变将被建议给本领域技术人员,并且将被包括在本申请的精神和界限内以及所附权利要求的范围内。

[0282] 实例1:一项III期、多中心、随机分组开放标签研究,旨在评估奥妥珠单抗与MMF在患有儿童期发作的特发性肾病综合征的患者中的疗效和安全性

[0283] 以下呈现了一项III期、随机分组、开放标签、多中心、主动对照研究,旨在评估奥妥珠单抗与MMF在维持患有儿童期发作的频繁复发性肾病综合征 (FRNS) 或类固醇依赖性肾病综合征 (SDNS) 的参与者的缓解方面的疗效、安全性和药代动力学 (PK)/药效学 (PD), 这些参与者在研究进入开始时已经实现完全缓解并且被认为存在高复发风险。

[0284] 患有儿童期发作的FRNS/SDNS的患者在复发期间存在短期和长期类固醇毒性、严重感染、水肿、血栓栓塞事件和急性肾损伤的风险。这些风险的降低取决于鉴定有效的疗法和经由蛋白尿的持续减少来维持临床缓解。目前的标准护理仍然限于全身性皮质类固醇和免疫抑制性疗法的组合,但是大部分可获得的方案仅使经过治疗的患者中少于一半的患者获得完全肾脏反应和缓解。

[0285] 目标和终点

[0286] 此研究评估了奥妥珠单抗与MMF相比在年龄介于 $\geq 2$ 岁且 $\leq 25$ 岁之间的患有儿童期发作的FRNS或SDNS的参与者中的疗效、安全性、药代动力学和药效学。以下概述了研究的具体重要目标和次要目标以及相应终点。在此方案中,“研究治疗”是指作为此研究的一部分的分配给参与者的治疗(即,奥妥珠单抗或MMF)。

[0287] 该研究的主要目标是评估奥妥珠单抗与MMF相比在年龄介于 $\geq 2$ 岁且 $\leq 25$ 岁之间的患有儿童期发作的FRNS或SDNS的参与者中的疗效。主要终点是在1年时实现持续完全缓解的参与者比例,定义为在第52周第一次晨尿的尿蛋白与肌酐比率 (UPCR)  $\leq 0.2\text{g/g}$ ,且没有发生复发或任何以下并发事件。第8周后发生的并发事件包括:(1) 复发,定义为下列事件的任一项:(a) 第一次晨尿UPCR  $\geq 2\text{g/g}$ 或(b) 尿液试纸检测尿分析(UA)  $\geq 3+$ 持续连续3天(在家监测)且这3天时间段的最近一次尿液样品被确定具有UPCR  $> 0.2\text{g/g}$ ,如通过中央实验室测量的或(c) 任一天的尿液试纸检测UA蛋白  $\geq 3+$ 伴有水肿,并且尿液样品被确定为具有UPCR  $> 0.2\text{g/g}$ ,如通过中央实验室测量的;以及(2) 在30天的时间段内使用任何全身性皮质类固醇 $> 14$ 天。随机分组后发生的并发事件包括:(1) 如通过研究人员的最佳医学判断所确定的,开始任何针对特发性肾病综合征 (INS) 的救援疗法,除全身性皮质类固醇外;(2) 因缺乏疗效而治疗停止;和/或(3) 死亡。

[0288] 次要目标是评估奥妥珠单抗与MMF相比的疗效。相应的次要终点是:(1) 总体无复发存活期 (RFS); (2) 第52周的RFS概率;(3) 累积皮质类固醇剂量;(4) 进行随机分组的研究治疗时的复发次数;(5) 在52周治疗期期间经历水肿相关复发的参与者的比例;以及(6) 第76周时具有持续完全缓解的患者的比例。

[0289] 另一个次要目标是评估用奥妥珠单抗治疗的参与者与MMF相比的疲劳变化。相应的次要终点是儿科生活质量调查表 (PedsQL) 多维疲劳总分的“一般性疲劳”领域从基线到第52周的平均变化。

[0290] 第三个次要目标是评估使用奥妥珠单抗治疗的参与者与MMF相比的生活质量变化。相应的次要终点是PedsQL生活质量调查表的“身体功能”领域从基线到第52周的平均变化。

[0291] 第四个次要目标是评估随时间的水肿。相应的次要终点是治愈肾小球肾病 (CureGN) 水肿量表从基线随时间到第52周的平均变化。

[0292] 第五个次要目标是评估奥妥珠单抗与MMF相比的安全性。相应的次要终点是：(1) 不良事件(AE)的发生率、性质和严重程度,其中严重程度根据AE强度(轻度、中度、重度、危及生命)和美国国家癌症研究所不良事件常用术语标准(NCI CTCAE)分级(如果适用)从基线到第52周确定;以及(2)从基线到第52周实验室或生命体征异常的发生率。

[0293] 第六个次要目标是表征奥妥珠单抗PK概况。相应的次要终点是在指定时间点的奥妥珠单抗的血清浓度。

[0294] 第七个次要目标是表征奥妥珠单抗诱发的PD变化。相应的次要终点是：(1)在特定时间点达到B细胞耗尽的参与者的比例(例如使用高灵敏度流式细胞术(HSFC));以及(2)在特定时间点总外周B细胞和B细胞亚群(例如,记忆B细胞计数以及相对于基线的变化)。

[0295] 探索性目标是评估奥妥珠单抗与MMF相比的疗效。相应的探索性终点是：(1)UPCR从基线到第52周的变化; (2)估计肾小球滤过率(eGFR)从基线到第52周的变化; (3)在第24、52和76周达到持续外周B细胞耗尽的参与者比例; (4)在第24周达到RFS的参与者比例; (5)在第76周处于持续完全缓解的参与者比例; (6)从基线到第24周和第52周,医生总体疾病活动性评估(PGA)的变化; (7)从基线到第24周和第52周,受试者总体疾病活动性评估(SGA)的变化;以及(8)在完成类固醇逐渐减量之前未出现复发的参与者比例。

[0296] 第二个探索性目标是探索暴露疗效和暴露安全性之间的关系。相应的探索性终点是：(1)从基线到第52周以及随时间推移,奥妥珠单抗暴露量和选定疗效终点(包括可持续完全缓解(SCR)和RFS)的变化;以及(2)从基线到第52周以及随时间推移,奥妥珠单抗暴露以及选定不良事件的发生率、性质和严重程度的变化。

[0297] 第三个探索性目标是评估药物暴露与B细胞耗尽之间的潜在关系。相应的探索性终点是：(1)随时间推移,奥妥珠单抗暴露和循环CD19+B细胞计数相对于基线的变化;以及(2)复发前/复发时总外周B细胞和B细胞亚群(例如,记忆B细胞)计数。

[0298] 第四个探索性目标是评估对奥妥珠单抗的免疫反应。相应的探索性终点是基线时具有抗药物抗体(ADA)的参与者比例以及研究期间治疗后ADA的发生率。

[0299] 第五个探索性目标是评估ADA的潜在影响。相应的探索性终点是ADA状态与疗效、安全性、PD或PK终点之间的关系。

[0300] 第六个探索性目标是鉴定和/或评估提供奥妥珠单抗活性证据的生物标志物(即,药效学生物标志物)或增进对疾病生物学和药物安全性的认识和理解。相应的探索性终点是血液中的生物标志物与疗效、安全性、PK、免疫原性或其他生物标志物终点之间的关系。

[0301] 入组和排除标准

[0302] 研究的入组标准包括：(1)参与者在随机分组时介于 $\geq 2$ 岁且 $\leq 25$ 岁之间; (2)根据国际指南[例如,KDIGO 2021, IPNA 2023, 参见Trautmann等人(2023) *Pediatr Nephrol* 38: 877-919],在年龄18岁之前诊断为FRNS或SDNS; (3)处于完全缓解,定义为筛选时不存在水肿、UPCR $\leq 0.2$ g/g,并且在随机分组之前数周内具有三次连续每天尿液试纸检测读数为蛋白质痕量或阴性; (4)在筛选前6个月内、在停止口服皮质类固醇和/或免疫抑制疗法(例如,口服环磷酰胺、左旋咪唑、咪唑立宾、MMF或CNI)之后或者接受口服皮质类固醇和/或免疫抑制疗法以预防复发时已经具有至少一次复发; (5)在随机分组前6个月内接受过环磷酰胺的患者在环磷酰胺停药后必须经历过至少1次复发;以及(6)估计肾小球滤过率(eGFR)在年龄的正常范围内(如果小于18岁,则根据修正的Schwartz公式,或者如果18岁或更大,则使用

慢性肾病流行病学协作组 (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, CKD-EPI) 等式)。频繁复发性肾病综合征 (FRNS) 定义为: 在疾病发作的6个月内每6个月 $\geq 2$ 次复发, 或在任何后续12个月内每12个月 $\geq 4$ 次复发。类固醇依赖性肾病综合征 (SDNS) 定义为: 在用泼尼松或泼尼松龙 (以全剂量或逐渐减量期间) 治疗期间或者泼尼松或泼尼松龙停药后15天内两次连续的复发。

[0303] 排除标准包括: (1) 继发性肾病综合征 (即, 反流性肾病、IgA肾病、狼疮性肾炎等); (2) 类固醇耐药性肾病综合征的病史; (3) 已知可直接引起肾病综合征的基因缺陷病史 (即, NPHS2 [podocin]、NPHS1 [nephrin]、PLCE1、WT1或其他已知遗传原因); (4) 在随机分组前2个月内使用除MMF或口服皮质类固醇以外的其他免疫抑制药物治疗以预防复发; (5) 器官或骨髓移植史; (6) 在入组30天内或研究药物的5个半衰期 (以较长者为准) 内参与另一项治疗试验; (7) 对研究疗法不耐受或存在禁忌证, 包括以下任一项: (a) 对单克隆抗体严重过敏或过敏性休克反应史, 或已知对奥妥珠单抗输注的任何成分具有超敏感性, (b) 缺乏外周静脉通路, (c) 对口服或静脉内皮质类固醇不耐受或具有禁忌症, 或 (d) 对MMF不耐受或具有禁忌症; (8) 患者先前对MMF治疗失败, 定义为在接受MMF至少6个月持续时间时, 任6个月时间段内的两次或更多次复发; (9) 根据研究者的判断, 参与者在研究期间可能需要因除特发性肾病综合征以外的原因使用全身皮质类固醇; (10) 接受排除疗法 (参见下文); (11) 任何类型的活动性感染 (不包括甲床真菌感染), 或在筛选前4周内需要住院治疗或用静脉内抗感染药物治疗任何严重感染发作, 或在随机分组前2周内完成口服抗感染药物; (12) 活动性结核病 (TB) 感染的证据; (13) 当前活性原发性或继发性免疫缺陷病史, 包括已知的HIV感染和其他严重的免疫缺陷血液病患的病史; (14) 严重的复发性或慢性感染病史; (15) 进行性多灶性白质脑病的病史; (15) 在过去5年内患有癌症 (包括实体瘤、血液系统恶性肿瘤和原位癌 (已经切除并治愈的皮肤基底细胞癌和鳞状细胞癌除外)) 的病史或目前患有这些癌症; (16) 在筛选前4周期间或筛选期间需要住院治疗的大型手术; (17) 临床显著性出血或者任何需要血浆置换、静脉注射免疫球蛋白或急性血液制品输血的高风险; (18) 任何显著或不受控制的伴随疾病的证据, 根据研究者的判断, 这些疾病会阻止参与者参与, 包括但不限于神经系统、呼吸、心脏、肝脏、内分泌、恶性肿瘤或胃肠道病患; (19) 当前存在活跃的酒精或药物滥用, 或者有酒精或药物滥用史; 以及 (20) 筛选时出现以下实验室参数中的任一者:

[0304] 一不能归因于潜在的肾病综合征的AST或ALT $> 2.5 \times$  正常上限 (ULN) (针对年龄和性别)

[0305] 一淀粉酶或脂肪酶 $> 2 \times$  ULN

[0306] 一绝对嗜中性粒细胞计数 $< 1.5 \times 10^3/\mu\text{L}$

[0307] 一血红蛋白 $< 8\text{g/dL}$

[0308] 一对于小于12岁的参与者, 血小板计数 $< 110,000/\mu\text{L}$ , 并且对于12岁以上的患者, 血小板计数 $< 50,000/\mu\text{L}$

[0309] 一阳性乙型肝炎表面抗原

[0310] 一阳性乙型肝炎核心抗体

[0311] 一阳性丙型肝炎抗体

[0312] 一筛选时测量的阳性血清人绒毛膜促性腺激素

[0313] 排除的治疗方法包括：

[0314] 一筛选前2个月期间或筛选期间服用过环磷酰胺、左旋咪唑、咪唑立宾、他克莫司、环孢菌素或伏环孢素。

[0315] 一在第1天基线访视前9个月内进行过任何生物性B细胞耗尽疗法(例如,抗CD19、抗CD20、抗CD22),诸如但不限于利妥昔单抗、奥瑞珠单抗或奥法木单抗

[0316] 一筛选前2个月期间或筛选期间进行过任何生物疗法(除抗CD19、抗CD20、抗CD22之外),诸如但不限于贝利木单抗、达雷木单抗、乌司奴单抗、阿尼鲁单抗、苏金单抗或阿塞西普

[0317] 一筛选前2个月期间或筛选期间服用过Janus相关激酶(JAK)、布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)或酪氨酸激酶2(TYK2)的口服抑制剂,包括巴瑞替尼、托西替尼、乌帕替尼、菲戈替尼、依鲁替尼或芬布替尼或任何研

[0318] 究药物

[0319] 一筛选前28天期间或筛选期间接种过任何活疫苗

[0320] 研究治疗

[0321] 研究由四个时期组成:长达28天的筛选期、52周的起始开放标签治疗期、52周后扩展期以及从研究治疗完成或停止时开始的至少12个月的安全性随访(SFU)期。图1中提供了研究方案。

[0322] 将大约80名年龄在 $\geq 2$ 岁至25岁的参与者以1:1的比率随机分组到以下两个开放标签治疗组中的一个:A组(奥妥珠单抗)或B组(MMF)。随机分组是根据参与者的疾病类型(FRNS相比于SDNS)和免疫抑制治疗的使用(除研究进入前用于INS的皮质类固醇之外)进行分层的(MMF/其他免疫抑制剂相比于无MMF/其他免疫抑制剂)。

[0323] 用于研究的研究产品是奥妥珠单抗。

[0324] 在28天(+/-7天)的筛选期后,随机分组的参与者进入52周的治疗期。根据图1,在治疗期间,参与者在最初52周治疗期期间的第1、15、168天(第24周)和第182天(第26周)接受奥妥珠单抗1000mg IV输注,或者在第1天开始或继续每日口服MMF(片剂、胶囊或液体制剂)。体重为45kg或更高的参与者接受1000mg奥妥珠单抗剂量。体重低于45kg的参与者接受根据体重调整的20mg/kg剂量的奥妥珠单抗输注。甲泼尼龙80mg IV(或如果 $\leq 45$ kg,则1.5mg/kg)作为输注之前的预处理施用。对乙酰氨基酚/扑热息痛15mg/kg(最大剂量1000mg)PO作为输注之前的预处理施用。盐酸苯海拉明0.5-1mg/kg(最大剂量50mg)PO或IV作为输注之前的预处理施用。

[0325] 随机分组至MMF的参与者以分剂量服用1200mg/m<sup>2</sup>/天(最大2.5g/天)的目标剂量。使随机分组时接受每日口服泼尼松(或泼尼松龙等同物)的参与者逐渐减量,以在随机分组后的第8周(或更早,例如,在研究的第4-6周(如果适用)达到0mg/天的目标),并且在研究的其余时间内继续不使用泼尼松。使经历疾病复发的参与者接受至多2mg/kg/天(60mg/m<sup>2</sup>/天,至60mg/天的最大剂量)的泼尼松或泼尼松龙,直到尿蛋白尿液试纸检测呈阴性/痕量(或UPCR $\leq 0.2$ g/g)持续连续3天或更长时间,然后在4周内逐渐减少口服皮质类固醇,同时继续进行研究治疗方案。如果MMF组的参与者符合救援疗法的标准,则该患者被认为符合并发事件的定义,并且接受奥妥珠单抗(2 $\times$ 1000mg,间隔14天;或者如果 $< 45$ kg,则20mg/kg)或INS的替代疗法。如果奥妥珠单抗组的参与者符合救援疗法的标准,则该患者被认为符合并

发事件的定义,并且根据研究者的决定,每日接受MMF ( $600\text{mg}/\text{m}^2$  BID[目标 $1200\text{mg}/\text{m}^2$ ]),以分剂量,最大 $2\text{g}/\text{天}$ )或替代疗法以治疗复发。当使用奥妥珠单抗时,MMF停用。

[0326] 当最后一名随机分组的参与者完成第52周时,将评估主要终点:1年时持续完全缓解( $\text{PCR}\leq 0.2\text{g}/\text{g}$ 且未发生复发或其他并发事件)的参与者比例。

[0327] 在第52周评估后,参与者可以在治疗扩展期内继续使用奥妥珠单抗直到常见结束日期(CCOD),或直接进入安全性随访(SFU)。将在52周后出现复发的参与者(无论在MMF组还是奥妥珠单抗组中)根据研究者的最佳判断进行治疗,其包括施用初始剂量或另外剂量的奥妥珠单抗。在52周时或之后不符合复发标准的患者没有在扩展期中进行奥妥珠单抗治疗的资格,但是对其在研究访视时每3个月进行随访,直到CCOD。对具有外周B细胞耗尽的参与者在SFU中每12周进行一次随访持续6个月,然后此后每6个月进行一次随访直到外周CD19 B细胞恢复到治疗前的值或在此患者群体的中心实验室正常值内(以较低者为准),直到研究结束。

[0328] 首次SFU访视安排在治疗期的最后一次研究访视后大约12周或CCOD(以先到者为准)。SFU期间不提供奥妥珠单抗输注或MMF。根据研究者的决定提供标准护理疗法。未接受奥妥珠单抗的患者仅需进行一次SFU访视,并且进行在SFU访视1中指定的评估。对接受奥妥珠单抗的患者在SFU中进行随访,直到此类患者满足以下标准中的两者:(1)外周B细胞已经恢复到奥妥珠单抗前的基线水平或者群体的正常范围内(以较低者为准);以及(2)最后一次输注奥妥珠单抗在至少12个月前。

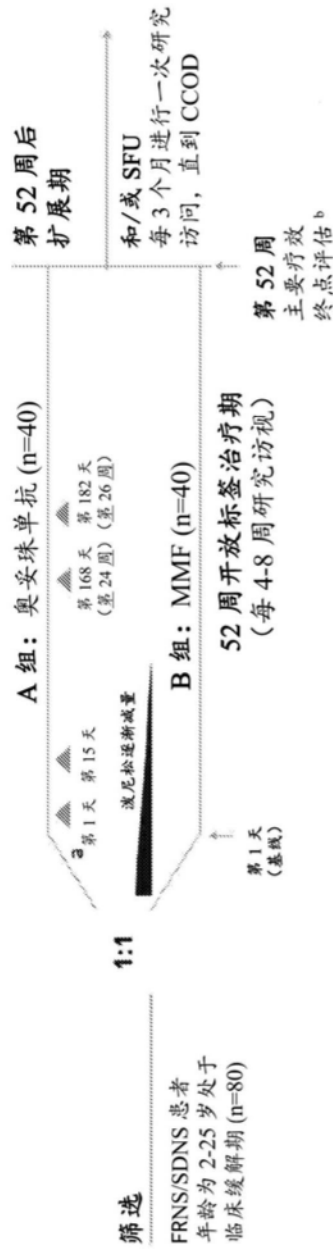
[0329] 在每次SFU访视时,测量绝对CD19+B细胞计数。对于具有持续性B细胞耗尽(定义为绝对CD19+B细胞计数低于治疗前最低值且低于此群体的正常下限(LLN)),并且未接受与外周B细胞减少相关的另外疗法的参与者,将继续每6个月进行一次SFU,直到出现以下情况中的任一者:(1)外周CD19+B细胞恢复到治疗前最低值或患者群体的年龄特定LLN(以较低者为准);(2)接受与外周B细胞减少相关的另外疗法(例如,贝利木单抗、利妥昔单抗或环磷酰胺,或在研究方案之外使用奥妥珠单抗);或(3)研究结束。

[0330] 当存在以下情况时参与者完成研究:(1)完成SFU要求;(2)在CCOD时或之后完成最后一次治疗研究访视,并且研究者打算在研究方案之外针对肾病综合征对受试者进行治疗而不完成规定的SFU;(3)或研究结束。在研究完成后,研究申办方将向有资格的参与者提供Roche研究药物产品(IMP;奥妥珠单抗)的继续使用权。

[0331] 研究期的持续时间

[0332] 预期每个个体参与研究的最短持续时间为大约1.5-2年(对于所有接受过奥妥珠单抗的患者,SFU将为最后一次奥妥珠单抗输注后最短12个月)。参与者可以继续参与研究并且根据活动时间表进行随访或接受重复治疗,直到招募的最后一名参与者已经参与研究至少18个月。

[0333] 预计参与研究的最长时间为大约3年,或者如果临床截止时外周B细胞仍低于LLN,则时间更长。在这种情况下,参与者将被要求每12周返回进行SFU访视,持续6个月,然后每6个月返回,直到B细胞恢复到奥妥珠单抗剂量前的基线或参与者群体的中央实验室正常LLN,或者直到研究结束。



▲ **A 组: 奥妥珠单抗输注:** 在第 1 天、第 15 天、第 168 天 (第 24 周) 和第 182 天 (第 26 周), 如果体重 <45kg, 则为 1000 mg 或 20 mg/kg

▲ **B 组: MMF PO 剂量 600 mg/m<sup>2</sup> BID (目标 1200 mg/m<sup>2</sup>/天, 以每日分剂量) 直到第 52 周。**  
在 52 周后, 必须停用 MMF 或在随后 3 个月内逐渐减量

▲ 所有患者均可接受至多 1.5 mg/kg/天 (最大 40 mg/天) 的口服泼尼松或等同物, 目标是逐渐减量至第 8 周 (或如果临床适用, 则更早) 0 mg 的目标剂量

图1