

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680018530.2

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月21日

[11] 公开号 CN 101184507A

[22] 申请日 2006.4.13

[21] 申请号 200680018530.2

[30] 优先权

[32] 2005.4.15 [33] US [31] 60/671,902

[86] 国际申请 PCT/US2006/013780 2006.4.13

[87] 国际公布 WO2006/113308 英 2006.10.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.27

[71] 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 希拉·古杰拉西

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 封新琴

权利要求书 3 页 说明书 65 页 序列表 13 页
附图 5 页

[54] 发明名称

用抗 CD20 抗体治疗炎性肠病 (IBD) 的方法

[57] 摘要

本发明关注用结合 CD20 的抗体来治疗 IBD, 尤其是溃疡性结肠炎 (UC)。

1. 一种在人类受试者中治疗中度-严重炎性肠病（IBD）的方法，包括对受试者施用有效量的CD20抗体，其中所述抗体的施用导致临床响应或疾病缓解。
2. 权利要求1的方法，其中所述IBD是溃疡性结肠炎（UC）。
3. 权利要求1的方法，其中所述IBD是克罗恩氏病。
4. 前述权利要求任一项的方法，其中所述受试者患有活动性IBD。
5. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体的施用导致疾病缓解。
6. 权利要求5的方法，其中所述缓解在大约第8周实现。
7. 权利要求5或权利要求6的方法，其中所述抗体的施用导致乙状结肠镜检查得分为0或1，且直肠出血得分为0。
8. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体的施用导致临床响应。
9. 权利要求8的方法，其中所述临床响应在大约第8周实现。
10. 权利要求8或权利要求9的方法，其中所述抗体的施用降低疾病活动性指数（DAI）得分。
11. 权利要求10的方法，其中使用本文表2中所示评分系统评定的DAI得分降低多于或等于3分。
12. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体的施用减少结肠粘膜中的B细胞。
13. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。
14. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体包括rituximab。
15. 权利要求1-13任一项的方法，其中所述抗体包括人源化2H7。
16. 权利要求1-13任一项的方法，其中所述抗体包括2F2 (huMax-CD20)。
17. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体是裸抗体。
18. 权利要求1-16任一项的方法，其中所述抗体与另一分子偶联。
19. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体以约200mg到2000mg范围的剂量、约1个月期间内约1到4剂的频率施用。
20. 权利要求19的方法，其中所述剂量为约500mg到1500mg的范围。
21. 权利要求19或20的方法，其中所述剂量为约750mg到1200mg的范围。

22. 权利要求19-21任一项的方法，其中所述抗体施用1或2剂。
23. 权利要求19-22任一项的方法，其中所述抗体在约2到3周的期间内施用。
24. 权利要求23的方法，其中所述期间为约2周。
25. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体通过静脉内施用。
26. 前述权利要求任一项的方法，其中所述抗体通过皮下施用。
27. 前述权利要求任一项的方法，其中施用有效量的第二治疗药物，其中所述CD20抗体是第一治疗药物。
28. 权利要求27的方法，其中所述第二治疗药物多于一种治疗药物。
29. 权利要求27或权利要求28的方法，其中所述第二治疗药物选自氨基水杨酸盐/酯、口服皮质类固醇、6-巯基嘌呤（6-MP）和硫唑嘌呤。
30. 权利要求27-29任一项的方法，其中所述第二治疗药物的施用量少于未对接受该第二治疗药物治疗的受试者施用CD20抗体的情况下所用的量。
31. 前述权利要求任一项的方法，其中所述受试者先前从未接受过CD20抗体治疗。
32. 前述权利要求任一项的方法，其中所述受试者未患有B细胞恶性肿瘤。
33. 前述权利要求任一项的方法，其中所述受试者未患有除IBD外的自身免疫病。
34. 一种在患有活动性炎性肠病（IBD）的人类受试者中治疗IBD的方法，包括对受试者施用仅一剂或两剂CD20抗体，其中施用所述一剂或两剂CD20抗体后实现疾病缓解或临床响应。
35. 权利要求34的方法，其中所述一剂或两剂通过静脉内（IV）施用。
36. 权利要求34的方法，其中所述一剂或两剂通过皮下（SC）施用。
37. 权利要求34的方法，其中通过静脉内施用两剂，其中该两剂中的每一剂均为约200mg到约2000mg的范围。
38. 一种在患有活动性炎性肠病（IBD）的人类受试者中治疗IBD的方法，包括对受试者施用有效量的CD20抗体，还包括对受试者施用有效量的选自氨基水杨酸盐/酯、口服皮质类固醇、6-巯基嘌呤（6-MP）和硫唑嘌呤的第二治疗药物。
39. 一种在患有活动性溃疡性结肠炎（UC）的人类受试者中降低疾病活动性指数（DAI）得分的方法，包括对受试者施用可有效降低DAI得分的

量的CD20抗体。

40. 权利要求39的方法,其中使用本文表2中所示评分系统评定的DAI得分降低多于或等于3分。
41. 前述权利要求任一项的方法,其中所述受试者具有非典型水平的核周抗嗜中性粒细胞胞质抗体(p-ANCA)或抗人原肌球蛋白同种型5(hTM5)自身抗体。
42. 一种制品,包括:
 - i. 装有CD20抗体的容器; 和
 - ii. 带有在人类受试者中治疗炎性肠病(IBD)的指导和包装插页,其中所述指导表明对人类受试者施用有效量的所述CD20抗体。

用抗CD20抗体治疗炎性肠病(IBD)的方法

本申请是非临时申请,根据35 USC § 119要求2005年4月15日提交的临时申请第60/671,902号的优先权,在此收入其完整公开内容作为参考。

发明领域

本发明关注用结合CD20的抗体来治疗IBD,尤其是溃疡性结肠炎(UC)。

发明背景

炎性肠病(IBD)

炎性肠病(IBD)是一类造成肠发炎的病症的名称。IBD的症状包括腹部痉挛和腹痛、腹泻、体重减轻和肠出血。当前关于IBD发病机理的共识集中于基因决定的失调在宿主针对常驻细菌群落的免疫应答中的作用(Pallone et al., The immune system in inflammatory bowel disease. 于: Satsangi J, Sutherland LR编,《Inflammatory Bowel Disease》. Spain: Churchill Livingstone, 85-93 (2003))。

克罗恩氏病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎(UC)是IBD的最常见形式。

克罗恩氏病通常引起沿着小肠和大肠的长度发生溃疡。克罗恩氏病一般不影响直肠,或者引起直肠周围具有导流的炎症或感染。

几乎没有例外,UC累及直肠并就近扩展到相邻的部分或者扩展到整个结肠。疾病活动通常是间歇性的,有多次复发和静息期。乙状结肠镜或结肠镜照片是特征性的。在轻度疾病中,结肠粘膜表现充血和颗粒状。在更严重的疾病中,存在微小、不连续的溃疡,粘膜特征性地呈脆性并可能有自发出血。组织学上,活动性疾病中的炎性细胞浸润物通常包括嗜中性粒细胞,它们常常侵入隐窝并伴随着上皮损伤和隐窝变形。通常会出现固有层中淋巴细胞数目增加和基底浆细胞增多。

在美国有500,000到700,000名患者患有UC (Loftus, Gastroenterology 126:1504-1517(2004))。UC的结肠外表现包括关节炎、葡萄膜炎、口腔溃疡、坏疽性脓皮症和结节性红斑。对患轻度至中度疾病的患者而言,最初的

疗法通常是氨基水杨酸盐/酯。在对照试验中，安慰剂组中可多达30%的受试者中发生了依照各种标准衡量的疾病改善；因此，对于疾病非常轻微的患者而言，不予特别处置可能是一种选择。累及直肠和乙状结肠的远端左侧UC可用5-氨基水杨酸盐/酯(5-ASA)灌肠配制剂有效治疗。在患有活动性UC且对标准5-ASA治疗不响应的患者中，以及那些疾病更严重的患者中，主要的紧急对症疗法是口服皮质类固醇。然而，考虑到皮质类固醇的使用随时间伴随着显著的毒性，皮质类固醇在UC患者长期缓解的维持中是无效的(Lennard-Jones et al., Lancet 1:188-189 (1965))。

对于不响应5-ASA药物和皮质类固醇而病情恶化的患者而言，可用的治疗选择是有限的。这些患者中有很多接受免疫抑制剂治疗，最常见的是6-巯基嘌呤(6-MP)或硫唑嘌呤，它们在活动性疾病中的治疗效果可能显著延迟的发挥。在一项小型安慰剂对照研究中发现，在不响应高剂量静脉内皮质类固醇的和等候结肠切除术的病情严重的患者中，静脉内环孢菌素具有显著的短期功效(Lichtiger et al., N Engl J Med 330:1841-1845 (1994))。最终，25%-40%的患者需要切除结肠。对于能提供活动性疾病的快速控制并引起延长的疾病缓解的安全有效的治疗剂，存在着未满足的显著需求。

尽管UC的发病机理还没有完全清楚，越来越多的证据显示UC可能是一种自身免疫性疾病，其中B细胞在疾病的病理生理学中起作用。B细胞以及T细胞存在于基底集合淋巴结(basal lymphoid aggregates)中，这一组织病理学特征被认为是表明UC并可见于来自活动性UC患者的组织学切片(Yeung et al., Gut 47:212-227(2000))。在评估静息UC患者中可能预示复发的临床和组织学参数时，发现粘膜基底部分中浆细胞数目的增加是复发的独立指标(Bitton et al., Gastroenterology 120:1320 (2001))。虽然认为UC中的粘膜炎症是活化的T细胞驱使的，这些患者却具有T辅助细胞-2 (Th2)细胞因子表达模式谱(Monteleone et al., Gut 50(Suppl III)64 (2002))。由于Th2细胞因子典型地驱动B细胞免疫应答和抗体生成，因此可以认为B细胞在UC中具有核心作用。

已发现在UC患者发炎的结肠粘膜固有层中IgG、IgM和IgA及浆细胞的量增加，且针对肠腔抗原和自身抗原的抗体的生成增加(MacDermott et al., Gastroenterology 81:844-852 (1981))。而且，关于UC患者中自身抗体存在的数量越来越多，尽管这些抗体在UC发病机理中的确切作用尚不确定。大约三分之二的UC患者具有一种称为核周抗嗜中性粒细胞胞质抗体(perinuclear

antineutrophil cytoplasmic antibody, p-ANCA)的循环抗体, 它们针对嗜中性白细胞的组分(Quinton et al., Gut 42:788-791 (1998))。最近证实, 在有些形式的血管炎中出现的、针对另一种嗜中性粒细胞组分(髓过氧化物酶)的p-ANCA, 在血管炎实验动物模型中本身就是血管炎和组织损伤的原因(Xiao et al., J Clin Invest 110:955-963 (2002))。

另一种自身免疫标志是针对人原肌球蛋白同种型5 (human tropomyosin isoform 5, hTM5) (UC中的一种推定自身抗原)的结肠粘膜B细胞应答。与克罗恩氏结肠炎患者和非IBD患者相比, UC患者的结肠粘膜中产生针对hTM5的IgG的固有层B细胞的数目发生统计学高度显著的增长, 说明抗hTM5抗体在UC中起重要且独特的作用(Onuma et al., Clin Exp Immunol 121:466-471 (2000))。类似地, UC患者中抗hTM5 IgG免疫细胞的数目与非IBD对照相比显著较高, 23名患者中有21人(91%)具有产IgG的免疫细胞, 不管临床活动性(Onuma et al., Clin Exp Immunol 121:466-471 (2000))。此外, 在患UC和原发性硬化性胆管炎的患者血清中检测到了抗hTM5抗体(Sakimaki et al., Gut 47:236-241 (2000))。已经证实, 来自UC患者的血清中的抗结肠抗体可以与结肠上皮细胞中的表面抗原或杯形细胞中的结肠粘蛋白起反应(Inoue et al., Gastroenterology 121:1523 (2001))。这些抗体可能通过针对结肠上皮细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性机制而促成结肠粘膜的破坏。

在一项研究中观察到, T细胞受体(TCR) α 缺陷小鼠中发生的自发慢性结肠炎在缺乏成熟B细胞的条件下更为严重。患慢性结肠炎的TCR α 缺陷小鼠与 $\alpha\mu$ 敲除小鼠杂交所产生的后代发生比TCR α 缺陷小鼠更严重形式的结肠炎。在这项研究中, 结肠炎严重程度增加不是致病性菌群造成的, 而是B细胞的完全缺失所致。在 $\alpha\mu$ 敲除小鼠中, 在结肠炎发作前将外周B细胞从TCR α 缺陷小鼠过继转移给3到4周龄 $\alpha\mu$ 缺陷小鼠后, 慢性结肠炎得到了显著缓解。这说明B细胞在这些鼠模型的结肠炎发生中起抑制作用(Mizoguchi et al., Int Immunol 12:597-605 (2000))。

CD20抗体和使用CD20抗体的疗法

淋巴细胞是在造血过程中在骨髓中生成的多种类型白细胞之一。有两种主要的淋巴细胞群: B淋巴细胞(B细胞)和T淋巴细胞(T细胞)。本文特别感兴趣的淋巴细胞是B细胞。

B细胞在骨髓中成熟, 然后离开骨髓并在它们的细胞表面表达抗原结合

抗体。当幼稚B细胞初次遇到其膜结合抗体特异性的抗原时，细胞开始快速分裂，且其后代分化成为记忆B细胞和称做“浆细胞”的效应细胞。记忆B细胞具有较长的寿命，并继续表达与最初亲本细胞具有相同特异性的膜结合抗体。浆细胞不生成膜结合抗体，而是生成可分泌形式的抗体。分泌型抗体是体液免疫的主要效应分子。

CD20抗原（也称做人B淋巴细胞限制分化抗原，Bp35）是位于前B淋巴细胞(pre-B)和成熟B淋巴细胞上、具有约35kD分子量的疏水性跨膜蛋白质（Valentine et al., *J. Biol. Chem.* 264(19): 11282-11287 (1989)及Einfeld et al., *EMBO J.* 7(3): 711-717 (1988)）。该抗原也在超过90%的B细胞非何杰金氏(non-Hodgkin's)淋巴瘤(NHL)上表达（Anderson et al., *Blood* 63(6): 1424-1433 (1984)），但在造血干细胞、原B细胞(pro-B)、正常浆细胞或其它正常组织上没有发现（Tedder et al., *J. Immunol.* 135(2): 973-979 (1985)）。CD20调节细胞周期起始和分化的激活过程的早期步骤（Tedder et al., 见上文），并可能作为钙离子通道起作用（Tedder et al., *J. Cell. Biochem.* 14D: 195 (1990)）。

由于CD20在B细胞淋巴瘤中表达，该抗原可用做“靶向”此类淋巴瘤的候选者。本质上，这种靶向作用可概括如下：对患者施用对B细胞CD20表面抗原特异的抗体。这些抗CD20抗体特异结合（表面上）正常和恶性B细胞的CD20抗原；与CD20表面抗原结合的抗体可导致赘生性B细胞的破坏和消减。此外，可将具有破坏肿瘤潜力的化学试剂或放射性标记物与抗CD20抗体偶联，使得该试剂特异“投递”至赘生性B细胞。不考虑方法，首要目标是破坏肿瘤；具体方法可根据所使用的具体抗CD20抗体来决定，因此可利用的靶向CD20抗原的方法可能变化相当大。

rituximab抗体（RITUXAN®）是针对CD20抗原的基因工程嵌合鼠/人单克隆抗体。rituximab就是1998年4月7日公布的美国专利5,736,137（Anderson等人）中称为“C2B8”的抗体。rituximab被指明用于治疗患有复发性或顽固性低级或滤泡性CD20阳性B细胞非何杰金氏淋巴瘤的患者。已经证明rituximab在体外调节补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)以及诱导凋亡（Reff et al., *Blood* 83(2): 435-445 (1994); Maloney et al., *Blood* 88:637a (1996); Manches et al., *Blood* 101:949-954 (2003)）。在试验中还观察到rituximab与化学疗法和毒素之间的协同作用。具体而言，rituximab使耐药性人B细胞淋巴瘤细胞系对多柔比星(doxorubicin)、CDDP、VP-16、

白喉毒素和蓖麻毒蛋白的细胞毒性作用敏感 (Demidem et al., *Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals* 12(3): 177-186 (1997))。体内临床前研究显示rituximab从猕猴的外周血、淋巴结和骨髓中消减B细胞 (Reff et al., *Blood* 83(2): 435-445 (1994))。

也已在B细胞和自身抗体表现出在疾病病理生理学中发挥作用的多种非恶性自身免疫性病症中研究了rituximab。Edwards et al., *Biochem. Soc. Trans.* 30: 824-828 (2002)。已有报导, rituximab潜在减轻例如类风湿性关节炎(RA) (Leandro et al., *Ann. Rheum. Dis.* 61: 883-888 (2002); Edwards et al., *Arthritis Rheum.* 46(Suppl. 9): S46 (2002); Stahl et al., *Ann. Rheum. Dis.* 62(Suppl. 1): OP004 (2003); Emery et al., *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003))、狼疮 (Eisenberg, *Arthritis Res. Ther.* 5:157-159 (2003); Leandro et al., *Arthritis Rheum.* 46: 2673-2677 (2002); Gorman et al., *Lupus* 13: 312-316 (2004))、免疫性血小板减少性紫癜 (D'Arena et al., *Leuk. Lymphoma* 44: 561-562 (2003); Stasi et al., *Blood* 98: 952-957 (2001); Saleh et al., *Semin. Oncol.* 27(Supp 12): 99-103 (2000); Zaia et al., *Haematologica* 87: 189-195 (2002); Ratanatharathorn et al., *Ann. Int. Med.* 133: 275-279 (2000))、纯红细胞再生障碍 (Auner et al., *Br. J. Haematol.* 116: 725-728 (2002))、自身免疫性贫血 (Zaja et al., *Haematologica* 87: 189-195 (2002), 勘误见 *Haematologica* 87: 336 (2002))、冷凝集素疾病 (Layios et al., *Leukemia* 15: 187-8 (2001); Berentsen et al., *Blood* 103: 2925-2928 (2004); Berentsen et al., *Br. J. Haematol.* 115: 79-83 (2001); Bauduer, *Br. J. Haematol.* 112: 1083-1090 (2001); Damiani et al., *Br. J. Haematol.* 114: 229-234 (2001))、重度胰岛素耐受的B型综合征 (Coll et al., *N. Engl. J. Med.* 350: 310-311 (2004))、混合性冷球蛋白血症 (DeVita et al., *Arthritis Rheum.* 46 Suppl. 9: S206/S469 (2002))、重症肌无力 (Zaja et al., *Neurology* 55: 1062-63 (2000); Wylam et al., *J. Pediatr.* 143: 674-677 (2003))、韦格纳氏(Wegener's)肉芽肿 (Specks et al., *Arthritis & Rheumatism* 44: 2836-2840 (2001))、顽固性寻常型天疱疮 (Dupuy et al., *Arch. Dermatol.* 140: 91-96 (2004))、皮炎 (Levine, *Arthritis Rheum.* 46(Suppl. 9): S1299 (2002))、斯耶格伦氏(Sjögren)综合征 (Sommer et al., *Arthritis & Rheumatism* 49: 394-398 (2003))、活动性II型混合性冷球蛋白血症 (Zaja et al., *Blood* 101: 3827-3834 (2003))、寻常型天疱疮 (Dupay et al., *Arch. Dermatol.* 140: 91-95 (2004))、自身免疫性神经病

(Pestronk et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74: 485-489 (2003))、副肿瘤性视性眼阵挛-肌阵挛综合征 (Pranzatelli et al., *Neurology* 60(Suppl. 1) PO5.128: A395 (2003))、以及复发-缓和型多发性硬化(RRMS)(Cross et al., (摘要) “Preliminary Results from a phase II trial of rituximab in MS”, 美国多发性硬化研究与治疗委员会第八次年会, 20-21 (2003)) 的体征和症状。

已在类风湿性关节炎(RA)患者中进行了II期研究(WA16291), 提供了有关rituximab的安全性和功效的48周跟踪数据。Emery et al., *Arthritis Rheum.* 48(9): S439 (2003); Szczepanski et al., *Arthritis Rheum.* 48(9): S121 (2003); Edwards et al., *N Engl. J. Med.* 350: 2572-82 (2004)。将总共161名患者随机平分为四个治疗组: 甲氨蝶呤、仅rituximab、rituximab加甲氨蝶呤、以及rituximab加环磷酰胺(CTX)。rituximab治疗方案为第1天和第15天静脉内施用1克。大多数RA患者对输注rituximab有很好的耐受, 而36%的患者在其首次输注期间发生至少一种不良事件(与30%接受安慰剂的患者相比)。总而言之, 认为大多数不良事件在严重程度上是温和至中度的, 而且所有处理组之间很平衡。在48周中四个组共有19件严重的不良事件, 其中rituximab/CTX组稍多一些。所有组之间的感染发生率很平衡。该RA患者群体中严重感染的平均比率为每100患者-年4.66例, 低于基于社会的流行病学研究中所报告的RA患者中需要住院治疗的感染比率(每100患者-年9.57例)。Doran et al., *Arthritis Rheum.* 46: 2287-2293 (2002)。

所报导的rituximab在少数神经学病症患者中的安全性概况与在肿瘤学或RA中所报导的类似, 上述神经学病症包括自身免疫性神经病(Pestronk et al., 见上文)、视性眼阵挛-肌阵挛综合征(Pranzatelli et al., 见上文)、和RRMS (Cross et al., 见上文)。正在RRMS患者中进行的rituximab联合干扰素- β (IFN- β)或醋酸格拉默的研究者发起试验(IST) (Cross et al., 见上文)中, 接受治疗的10名患者中有1个在首次输注rituximab后发生中度发热和打寒战, 之后入院彻夜观察, 而其他9名患者完成了四次输注方案, 没有报告任何不良事件。

有关CD20抗体和CD20结合分子的专利出版物包括美国专利5,776,456、5,736,137、5,843,439、6,399,061和6,682,734, 以及US 2002/0197255、US 2003/0021781、US 2003/0082172、US 2003/0095963、US 2003/0147885 (Anderson等人); 美国专利6,455,043、US 2003/0026804和WO 2000/09160

(Grillo-Lopez,A.); WO 2000/27428 (Grillo-Lopez和White); WO 2000/27433和US 2004/0213784 (Grillo-Lopez和Leonard); WO 2000/44788 (Braslawsky等人); WO 2001/10462 (Rastetter,W.); WO 01/10461 (Rastetter和White); WO 2001/10460(White和Grillo-Lopez); US 2001/0018041、US 2003/0180292、WO 2001/34194 (Hanna和Hariharan); US 2002/0006404和WO 2002/04021 (Hanna和Hariharan); US 2002/0012665和WO 2001/74388 (Hanna,N.); US 2002/0058029 (Hanna,N.); US 2003/0103971 (Hariharan和Hanna); US 2002/0009444和WO 2001/80884 (Grillo-Lopez,A.); WO 2001/97858 (White,C.); US 2002/0128488和WO 2002/34790(Reff,M.); WO 2002/060955 (Braslawsky等人); WO 2002/096948 (Braslawsky等人); WO 2002/079255 (Reff和Davies); 美国专利6,171,586和WO 1998/56418 (Lam等人); WO 1998/58964 (Raju,S.); WO 1999/22764 (Raju,S.); WO 1999/51642、美国专利6,194,551、美国专利6,242,195、美国专利6,528,624和美国专利6,538,124 (Idusogie等人); WO 2000/42072 (Presta,L.); WO 2000/67796 (Curd等人); WO 2001/03734 (Grillo-Lopez等人); US 2002/0004587和WO 2001/77342 (Miller和Presta); US 2002/0197256 (Grewal,I.); US 2003/0157108 (Presta,L.); WO 04/056312 (Lowman等人); US 2004/0202658和WO 2004/091657 (Benyunes, K.); WO 2005/000351 (Chan, A.); US 2005/0032130A1 (Beresini等人); US 2005/0053602A1 (Brunetta, P.); 美国专利6,565,827、6,090,365、6,287,537、6,015,542、5,843,398和5,595,721 (Kaminski等人); 美国专利5,500,362、5,677,180、5,721,108、6,120,767和6,652,852 (Robinson等人); 美国专利6,410,391 (Raubitschek等人); 美国专利6,224,866和WO 00/20864 (Barbera-Guillem,E.); WO 2001/13945 (Barbera-Guillem,E.); WO 2000/67795 (Goldenberg); US 2003/0133930和WO 2000/74718 (Goldenberg和Hansen); US 2003/0219433和WO 2003/68821 (Hansen等人); WO 2004/058298 (Goldenberg和Hansen); WO 2000/76542 (Golay等人); WO 2001/72333 (Wolin和Rosenblatt); 美国专利6,368,596 (Ghetie等人); 美国专利6,306,393和US 2002/0041847 (Goldenberg, D.); US 2003/0026801 (Weiner和Hartmann); WO 2002/102312 (Engleman, E.); US 2003/0068664 (Albitar等人); WO 2003/002607 (Leung, S.); WO 2003/049694, US2002/0009427,和US 2003/0185796 (Wolin等人); WO 2003/061694 (Sing和

Siegall); US 2003/0219818 (Bohen等人); US 2003/0219433和WO 2003/068821 (Hansen等人); US 2003/0219818 (Bohen等人); US2002/0136719 (Shenoy等人); WO 2004/032828 (Wahl等人); WO 2002/56910 (Hayden-Ledbetter); US 2003/0219433 A1 (Hansen等人); WO 2004/035607 (Teeling等人); US 2004/0093621 (Shitara等人); WO 2004/103404 (Watkins等人); WO 2005/000901 (Tedder等人); US 2005/0025764 (Watkins等人); WO2005/016969和US 2005/0069545 A1 (Carr等人); 和WO 2005/014618 (Chang等人)。还参见美国专利5,849,898和EP 330,191 (Seed等人); EP332,865A2 (Meyer和Weiss); 美国专利4,861,579 (Meyer等人); US2001/0056066 (Bugelski等人); 和WO 1995/03770 (Bhat等人)。

有关使用rituximab的疗法的出版物包括: Perotta和Abuel, "Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab" 摘要#3360 Blood 10(1)(part 1-2): p. 88B (1998); Perotta等人, "Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopaenic purpura (ITP)", Blood, 94: 49 (摘要) (1999); Matthews, R., "Medical Heretics" New Scientist (7 April, 2001); Leandro等人, "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response" Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001); Leandro等人, "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", Arthritis and Rheumatism, 46:2673-2677 (2002), 其中在2周期间, 每名患者接受两次500mg rituximab输注、两次750mg环磷酰胺输注、和高剂量口服皮质类固醇, 且其中两名接受治疗的患者分别在第7和8个月时复发, 且已经用不同方案复治; Weide等人, "Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy" Lupus, 12: 779-782 (2003), 其中用rituximab治疗一名患者 ($375\text{mg}/\text{m}^2 \times 4$, 每周重复一次), 并且每5-6个月投递更多的rituximab施用, 然后每三个月接受 $375\text{mg}/\text{m}^2$ rituximab的维持疗法, 而且用rituximab成功的治疗了患有顽固性SLE的第二名患者, 且每三个月接受维持疗法, 两名患者对rituximab疗法都有较好的响应; Edwards和Cambridge, "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" Rheumatology 40:205-211 (2001); Cambridge等人, "B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters" Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9):

S1350 (2002); Edwards等人, "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 46(9): S197 (2002); Pavelka等人, *Ann. Rheum. Dis.* 63: (S1):289-90 (2004); Emery等人, *Arthritis Rheum.* 50 (S9):S659 (2004); Levine和Pestronk, "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" *Neurology* 52: 1701-1704 (1999); DeVita等人, "Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" *Arthritis & Rheum* 46:2029-2033 (2002); Hidashida et al. "Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab." 发表于 Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; 10月24 - 29日; New Orleans, LA 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab" 发表于 the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; 10月24 - 29日; New Orleans, LA 2002; "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic" Martin和Chan, *Immunity* 20:517-527 (2004); Silverman和Weisman, "Rituximab Therapy and Autoimmune Disorders, Prospects for Anti-B Cell Therapy", *Arthritis and Rheumatism*, 48: 1484-1492 (2003); Kazkaz和Isenberg, "Anti B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases", *Current opinion in pharmacology*, 4: 398-402 (2004); Virgolini和Vanda, "Rituximab in autoimmune diseases", *Biomedicine & pharmacotherapy*, 58: 299-309(2004); Klemmer等人, "Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with a AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab", *Arthritis And Rheumatism* , 48(9):S624-S624 (2003); Kneitz等人, "Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases", *Immunobiology*, 206: 519-527 (2002); Arzoo等人, "Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab)" *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61 (10), p922-4 (2002); Looney, R., "Treating human autoimmune disease by depleting B cells" *Ann Rheum Dis.* 61: 863-866 (2002); Lake和Dionne, "Future Strategies in Immunotherapy", 于 *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* 中 (2003, John Wiley & Sons, Inc.), 文章在线发布日: 2003年1月15日 (第二

章” Antibody-Directed Immunotherapy”); Liang和Tedder, Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, “CD20 as an Immunotherapy Target” 部分, 文章在线发布日: 2002年1月15日, 题为”CD20”; 附录4A, 题为”Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens”, Stockinger等人作, Coligan等人编, 于Current Protocols in Immunology中(2003, John Wiley & Sons, Inc)在线发布日: 2003年5月; 印刷公布日: 2003年2月; Penichet和Morrison, ”CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering” 于 Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine中, “Chimeric, Humanized and Human Antibodies” 部分; 在线发表 2002年1月15日; Specks等人”Response of Wegener’s granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy” Arthritis & Rheumatism 44:2836-2840 (2001); 摘要在线投稿和约稿 Koegh等人, ”Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients”, American College of Rheumatology, 期号 (Session Number): 28-100, 期题名 (Session Title): Vasculitis, 题类型 (Session Type): ACR Concurrent Session, 主门类 (Primary Category): 28 Vasculitis, 期10/18/2004 (<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson, ”Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab”, Kidney and Blood Pressure Research, 26: 294 (2003); Jayne等人, ”B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis” Kidney and Blood Pressure Research, 26: 294 (2003); Jayne, poster 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology; Stone和Specks, ”Rituximab Therapy for the Induction of Remission and Tolerance in ANCA-associated Vasculitis”, 于the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network 中, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>; 以及 Leandro等人, ”B cell repopulation occurs mainly from naïve B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus” Arthritis Rheum., 48 (Suppl 9): S1160 (2003)。

发明概述

在第一个方面中, 本发明涉及一种在人类受试者中治疗中度-严重炎性

肠病 (IBD) 的方法, 包括对受试者施用有效量的CD20抗体, 其中施用该抗体导致受试者中发生临床响应或疾病缓解。

在另一个方面中, 本发明涉及一种在患有活动性炎性肠病 (IBD) 的人类受试者中治疗IBD的方法, 包括对受试者施用仅一剂或两剂CD20抗体, 其中施用一剂或两剂CD20抗体后实现疾病缓解或临床响应。

本发明进一步提供了一种在患有活动性炎性肠病 (IBD) 的人类受试者中治疗IBD的方法, 包括对受试者施用有效量的CD20抗体, 且还包括对受试者施用有效量的选自氨基水杨酸盐/酯、口服皮质类固醇、6-巯基嘌呤 (6-MP) 和硫唑嘌呤的第二治疗药物。

在又一个方面中, 本发明涉及一种在患有活动性溃疡性结肠炎 (UC) 的人类受试者中降低疾病活动性指数 (disease activity index, DAI) 得分的方法, 包括对受试者施用可有效降低DAI得分的量的CD20抗体。

在另一个方面中, 本发明涉及一种制品, 包括

- i 装有CD20抗体的容器; 和
- ii 带有在人类受试者中治疗炎性肠病 (IBD) 的指南的包装插页, 其中所述指南表明对人类受试者施用有效量的所述CD20抗体。

附图简述

图1A是比较鼠2H7 (SEQ ID NO:1)、人源化2H7.v16变体 (SEQ ID NO:2) 和人 κ 轻链亚类I (SEQ ID NO:3) 各自的轻链可变域 (V_L) 氨基酸序列的序列比对。2H7和hu2H7.v16的 V_L 的CDR如下: CDR1 (SEQ ID NO:4)、CDR2 (SEQ ID NO:5) 和CDR3 (SEQ ID NO:6)。

图1B是比较鼠2H7 (SEQ ID NO:7)、人源化2H7.v16变体 (SEQ ID NO:8) 和人重链亚类III的人共有序列 (SEQ ID NO:9) 各自的重链可变域 (V_H) 氨基酸序列的序列比对。2H7和hu2H7.v16的 V_H 的CDR如下: CDR1 (SEQ ID NO:10)、CDR2 (SEQ ID NO:11) 和CDR3 (SEQ ID NO:12)。

在图1A和图1B中, 各条链中的CDR1、CDR2、和CDR3括在括号中, 其两侧为框架区, FR1-FR4, 如图所示。2H7指鼠2H7抗体。两行序列之间的星号指示两种序列间不同的位置。残基编号根据Kabat et al. Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), 插入表示为a、b、c、d及e。

图2显示成熟2H7.v16和2H7.v511轻链（分别为SEQ ID NO:13和15）的比对，采用Kabat可变域残基编号和Eu恒定域残基编号。

图3显示成熟2H7.v16和2H7.v511重链（分别为SEQ ID NO:14和16）的比对，采用Kabat可变域残基编号和Eu恒定域残基编号。

图4描绘了实施例1中方案的示意图。

优选实施方案的详述

I. 定义

“炎性肠病”或“IBD”指一类导致肠发炎的病症，通常表现为包括腹部痉挛和腹痛、腹泻、体重减轻和肠出血等症状。IBD的主要形式是溃疡性结肠炎（UC）和克罗恩氏病。

“溃疡性结肠炎”或“UC”是大肠和直肠的一种慢性发作性炎症疾病，以血性腹泻为特征。溃疡性结肠炎的特征在于结肠粘膜中的慢性炎症，根据部位可分类如下：“直肠炎”（proctitis）仅累及直肠；直肠乙状结肠炎（proctosigmoiditis）影响直肠和乙状结肠；“左侧结肠炎”（left-sided colitis）涵盖大肠的整个左侧；“全结肠炎”导致整个结肠发炎。

“克罗恩氏病”又称“局限性回肠炎”（regional enteritis），是一种慢性自身免疫病，可影响胃肠道的任何部分，但最常见的是在回肠（小肠和大肠会合处）发生。克罗恩氏病与溃疡性结肠炎相对，特征在于延伸经过肠壁的所有层，并累及肠系膜及局部淋巴结的慢性炎症。无论是否累及小肠或结肠，基本的发病过程是一样的。

在多于90%的病例中，溃疡性结肠炎和克罗恩氏病可以通过临床、内窥镜检查、病理学和血清学等途径相互区分开来；其余的病例视为中间性IBD（Harrison's Principles of Internal medicine, 12th edition, p. 1271 (1991)）。

“中度-严重”IBD是受试者中疾病的体征或症状大于轻度的IBD。此类受试者可由有经验的胃肠病学者鉴定。患有中度-严重IBD的受试者在筛选之前可能已接受过2年的口服皮质类固醇UC治疗，并且/或者治疗强度可能等于或大于持续至少2周的20mg/日泼尼松等效剂量。这样的受试者可能是类固醇不应和/或类固醇依赖的。患有中度-严重UC的受试者可基于DAI得分加以选择，例如DAI得分 ≥ 6 、直肠出血得分 ≥ 2 、和/或可屈性乙状结肠镜检查得分 ≥ 2 提示受试者患有中度-严重UC。或者/并且，可以使用Truelove和Witts, Br Med

J. 2:1041-1048 (1955) (见下面的表1)的轻度、中度和严重疾病评价标准来鉴定此类受试者。患暴发型或中毒性结肠炎的受试者通常每天大便多于10次，连续出血，腹胀和腹部压痛，并有水肿及可能的肠扩张的放射学证据。

表1: Trulove和Witts的溃疡性结肠炎疾病活动性评估标准

	轻度活动性	严重活动性
每日大便次数(次)	<或=5	>5
便血	少量	大量
体温	< 37.5°C	>或=37.5°C
脉搏	< 90/min	>或= 90/min
红细胞沉降速率	< 30 mm/h	>或= 30 mm/h
血红蛋白	> 10 g/dl	<或= 10 g/dl

不足上述全部6项严重活动性标准的患者具有中等活动性疾病。

此处“受试者”是人类受试者。

患有“活动性”IBD的受试者在筛选时或初始治疗时正经历至少一种IBD症状。

“类固醇不应性”IBD是对患有IBD的受试者施用类固醇时仍然发展或恶化的IBD。

“类固醇依赖性”IBD受试者依赖于类固醇的使用，并且由于症状持续而不能逐渐减少或停止施用类固醇。

IBD“症状”是受试者所经历的、表征IBD的病态现象或结构、功能或感觉相对正常状态的偏离。

“粘膜”是覆盖全身特定器官和体腔（包括胃肠道）的内表面的潮湿组织。沿着粘膜分布的腺体分泌粘液（一种浓稠的流体）。

“结肠”是大肠中从盲肠延伸到直肠的部分。

“结肠的”粘膜是覆盖结肠内表面的粘膜。

“派尔斑” (Peyer's patches)是可见于全身的集合淋巴结，尤其可见于消化道和呼吸道的粘膜内衬。

“疾病缓解”意指基本上没有疾病症状的证据。缓解可在给定的时间范围内实现，例如从开始用拮抗剂或抗体治疗起，或从拮抗剂或抗体初始剂量起8周内或8周时。缓解也可以维持一段时间，诸如≥24周，或≥48周。疾病缓解可以定义为乙状结肠镜检查得分为0或1和/或直肠出血得分为0。

“乙状结肠镜检查”是通过内窥镜对乙状结肠内部的检查。

“乙状结肠镜检查得分”是指临床医生根据乙状结肠镜检查给出的分数。优选的乙状结肠镜检查评分系统如下：

0 = 正常或非活动性疾病

1 = 轻度疾病（红斑、血管模式减退（decreased vascular pattern）、轻度脆性）

2 = 中度疾病（显著的红斑、血管图形消失、脆性、糜烂）

3 = 严重疾病（自发出血、溃疡）

“直肠出血”指直肠中或来自直肠的任何出血。

“直肠出血得分”是为直肠出血（如果有的话）程度给出的分数或级别。每天的出血得分代表该日最严重的出血。优选的直肠出血评分系统为：

0 = 未见血

1 = 少于半数的时间内大便中带血丝

2 = 大部分时间内大便中明显带血

3 = 仅排便

“临床响应”是指疾病症状的改善。临床响应可在给定的时间范围内实现，例如从开始用拮抗剂或抗体治疗起，或从拮抗剂或抗体初始剂量起8周内或8周时。临床响应也可以维持一段时间，诸如 ≥ 24 周，或 ≥ 48 周。临床响应可根据疾病活动性指数(DAI)得分的降低来评估，例如DAI得分可以降低多于或等于3分。

“疾病活动性指数（DAI）”评分系统是一种用于定量评估UC活动性的方法。优选的DAI评分系统如下面表2所示。

表2：用于评估UC活动性的DAI评分系统

<p>排便频率（每个受试者作为他/她自身的对照以确证排便频率的异常程度）</p> <p>0 = 对该受试者而言正常的排便次数</p> <p>1 = 排便多于正常1-2次</p> <p>2 = 排便多于正常3-4次</p> <p>3 = 排便多于正常5次或更多</p>
<p>直肠出血（每天的出血得分代表该天中最严重的出血）</p> <p>0 = 未见血</p> <p>1 = 少于半数的时间内大便中带血丝</p> <p>2 = 大部分时间内大便中明显带血</p>

3 = 仅排血
可屈性直肠乙状结肠镜检查所见
0 = 正常或非活动性疾病
1 = 轻度疾病 (红斑、血管模式减退)
2 = 中度疾病 (显著的红斑、血管图形消失、脆性、糜烂)
3 = 严重疾病 (自发出血、溃疡)
内科医师整体评价 (承认其它3种标准, 受试者每天腹部不适的记录和总体健康感, 以及其它观察结果, 诸如物理征及受试者的体力状态)
0 = 正常
1 = 轻度疾病
2 = 中度疾病
3 = 严重疾病

“自身抗体”是由受试者产生并针对该受试者自己的抗原的抗体。

“原肌球蛋白”是从肌肉提取的纤维状蛋白。有8种已知的人原肌球蛋白同种型。在结肠上皮细胞中, 人原肌球蛋白同种型5 (hTM5) 是主要的同种型, 并有较少量的同种型4 (hTM4)。

“抗hTM5抗体”意思是由受试者产生并针对该受试者的hTM5的自身抗体。

“核周抗嗜中性粒细胞胞质抗体” (p-ANCA) 指由受试者产生并针对该受试者的嗜中性粒细胞组分的自身抗体。“核周”指此类自身抗体的染色模式。

“非典型”自身抗体水平意思是超过正常水平的此类自身抗体水平。此类正常或典型自身抗体水平可以是正常受试者或未患IB的受试者的结肠组织或粘膜中发现的水平。

“B细胞”是在骨髓内成熟的淋巴细胞, 包括幼稚B细胞、记忆B细胞或效应B细胞 (浆细胞)。本文中的B细胞可以是正常的或非恶性的B细胞。

“B细胞表面标志”或“B细胞表面抗原”在本文中指在B细胞表面上表达、可用结合它的拮抗剂或抗体靶向它的抗原。例示性的B细胞表面标志包括CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85和CD86白细胞表面标志(描述

参见The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, Barclay et al.编, Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)。其它B细胞表面标志包括RP105、FcRH2、B细胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Btig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA和239287。特别感兴趣的B细胞表面标志在B细胞上较之受试者的其它非B细胞组织优先表达,且可在前体B细胞和成熟B细胞二者上表达。

“CD20”抗原或“CD20”是在超过90%来自外周血或淋巴样器官的B细胞表面上发现的约35kDa非糖基化磷蛋白。CD20存在于正常B细胞以及恶性B细胞二者上,但在干细胞上不表达。CD20在文献中的其它名称包括“B淋巴细胞限制抗原”和“Bp35”。CD20抗原记载于例如Clark et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:1766 (1985)。

“B细胞表面标志拮抗剂”指在结合B细胞上的B细胞表面标志后破坏或消减受试者中的B细胞和/或干扰一项或多项B细胞功能的分子,例如通过降低或阻止B细胞引发的体液应答。所述拮抗剂优选能够消减用它治疗的受试者中的B细胞(即降低循环中的B细胞水平)。这样的消减可通过多种机制来实现,诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)、抑制B细胞增殖和/或诱导B细胞死亡(例如通过凋亡)。本发明范围内所包括的拮抗剂包括结合B细胞表面标志诸如CD20的抗体、合成的或天然序列的肽、免疫粘附素、和小分子拮抗剂,任选偶联或融合了细胞毒剂。优选的拮抗剂包括抗体。

“CD20抗体拮抗剂”在本文中指在结合B细胞上的CD20后破坏或消减受试者中的B细胞和/或干扰一项或多项B细胞功能的抗体,例如通过降低或阻止B细胞引发的体液应答。所述抗体拮抗剂优选能够消减用它治疗的受试者中的B细胞(即降低循环中的B细胞水平)。这样的消减可通过多种机制来实现,诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)、抑制B细胞增殖和/或诱导B细胞死亡(例如通过凋亡)。

术语“抗体”在本文中以最广义使用,明确覆盖单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

“抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。抗体片

段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段；双抗体；线性抗体；单链抗体分子；及由抗体片段形成的多特异性抗体。

“完整抗体”在本文中指包含两个抗原结合区及Fc区的抗体。优选的是，完整抗体具有功能性Fc区。

CD20抗体的例子包括：“C2B8”，现在称作“rituximab” (RITUXAN®) (美国专利No. 5,736,137)；钇[90]标记的2B8鼠抗体，称作“Y2B8”或“Ibritumomab Tiuxetan” (ZEVALIN®)，可从IDEC Pharmaceuticals公司购买（美国专利No. 5,736,137；2B8于1993年6月22日保藏于ATCC，编号HB11388）；鼠IgG2a“B1”，也称作“Tositumomab”，任选用¹³¹I标记以产生“¹³¹I-B1”或“碘¹³¹ tositumomab”抗体(BEXXAR™)，可从Corixa购买(还可参见美国专利No. 5,595,721)；鼠单克隆抗体“1F5” (Press et al., Blood 69(2):584-591 (1987))及其变体，包括“框架修补的”或人源化的1F5 (WO 2003/002607, Leung,S.; ATCC保藏物HB-96450)；鼠2H7和嵌合2H7抗体(美国专利No. 5,677,180)；人源化2H7 (WO 2004/056312, Lowman et al.及下文所列)；2F2 (HuMax-CD20)，一种完全人的高亲和力抗体，靶向B细胞细胞膜中的CD20分子(Genmab, Denmark；参见例如Glennie and van de Winkel, Drug Discovery Today 8:503-510 (2003)；Cragg et al., Blood 101:1045-1052 (2003)；WO 2004/035607；US 2004/0167319)；WO 2004/035607和US 2004/0167319 (Teeling et al.)中所列出的人单克隆抗体；US 2004/0093621 (Shitara et al.)中所记载的Fc区结合有复杂N-糖苷连接的糖链的抗体；诸如HB20-3、HB20-4、HB20-25和MB20-11的结合CD20的单克隆抗体和抗原结合片段(WO 2005/000901, Tedder et al.)；WO 2004/103404 和 US 2005/0025764 (Watkins et al., Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME)中所列出的诸如AME系列抗体的CD20结合分子，例如AME 33抗体；诸如US 2005/0025764 (Watkins et al.)中所记载的CD20结合分子；A20抗体或其变体，诸如嵌合的或人源化的A20抗体（分别是cA20和hA20）(US 2003/0219433, Immunomedics)；CD20结合抗体，包括表位消减的Leu-16、1H4或2B8，任选偶联有IL-2，如US 2005/0069545A1和WO 2005/16969 (Carr et al.)中的；结合CD22和CD20的双特异性抗体，例如hLL2xhA20 (WO2005/14618, Chang et al.)；单克隆抗体L27、G28-2、93-1B3、B-C1或NU-B2，可从国际白细胞分类研究组(International Leukocyte Typing Workshop)获得(Valentine et al., In: Leukocyte Typing III, McMichael编, p. 440,

Oxford University Press (1987); 1H4 (Haisma et al., Blood 92:184 (1998))。本文中优选的CD20抗体是人源化的、嵌合的或人的CD20抗体，更优选 rituximab、人源化2H7、2F2 (Hu-Max-CD20)人CD20抗体(Genmab)和人源化A20抗体(Immunomedics)。

术语“利妥昔单抗”、“rituximab”或“RITUXAN®”在本文中指针对CD20抗原的遗传工程嵌合鼠/人单克隆抗体，在美国专利No. 5,736,137中称作“C2B8”，包括其保持结合CD20能力的片段。

纯粹为了本发明的目的且除非另有说明，“人源化2H7”抗体指鼠2H7抗体的人源化变体，其中所述抗体在体内有效降低循环中的B细胞。

在一个实施方案中，人源化2H7抗体包含一种、两种、三种、四种、五种或六种以下CDR序列：

CDR L1序列RASSSVSYXH，其中X是M或L (SEQ ID NO. 21)，例如SEQ ID NO:4 (图1A)、

CDR L2序列，SEQ ID NO:5的(图1A)、

CDR L3序列QQWXFNPPT，其中X是S或A (SEQ ID NO. 22)，例如SEQ ID NO:6 (图1A)、

CDR H1序列，SEQ ID NO:10的(图1B)、

CDR H2序列AIYPGNGXTSYNQKFKG，其中X是D或A (SEQ ID NO. 23)，例如SEQ ID NO:11 (图1B)及

CDR H3序列VVYYSXXYWYFDV，其中第6位X是N、A、Y、W或D且第7位X是S或R (SEQ ID NO. 24)，例如SEQ ID NO:12 (图1B)。

上述CDR序列一般存在于人轻链和重链可变区框架序列内，诸如基本上为人轻链 κ 亚组I ($V_L\kappa I$)的人共有FR残基和基本上为人重链亚组III ($V_H III$)的人共有FR残基。还可参见WO 2004/056312 (Lowman et al.)。

可以将重链可变区连接人IgG链恒定区，其中所述可变区可以是例如IgG1或IgG3的，包括天然序列的和变异的恒定区。

在一个优选的实施方案中，此类抗体包含SEQ ID NO:8的重链可变域序列 (v16，如图1B所示)，任选还包含SEQ ID NO:2的轻链可变域序列 (v16，如图1A所示)，其任选包含重链可变域中第56、100和/或100a位的一处或多处氨基酸替代，例如D56A、N100A或N100Y、和/或S100aR和轻链可变域中第32和/或92位的一处或多处氨基酸替代，例如M32L和/或S92A。优选的是，

所述抗体是完整抗体，其包含SEQ ID NO. 13或15的轻链氨基酸序列及SEQ ID NO. 14、16、17或20的重链氨基酸序列。

优选的人源化2H7抗体是ocrelizumab (Genentech)。

本文抗体还可在Fc区中包含至少一处提高ADCC活性的氨基酸替代，诸如第298、333和334位处的氨基酸替代，优选S298A、E333A和K334A，使用重链残基的EU编号。还可参见美国专利No. 6,737,056B1, Presta。

任何这些抗体可在Fc区中包含至少一处改进FcRn结合或血清半衰期的替代，例如在重链第434位处的替代，诸如N434W。还可参见美国专利No. 6,737,056B1, Presta。

任何这些抗体还可在Fc区中包含至少一处提高CDC活性的氨基酸替代，例如在第326位处包含至少一处替代，优选K326A或K326W。还可参见美国专利No. 6,528,624B1, Idusogie et al.。

有些优选的人源化2H7变体是那些包含SEQ ID NO:2的轻链可变域及SEQ ID NO:8的重链可变域的抗体，包括那些在Fc区（如果有的话）中具有或没有替代的抗体，和那些包含在SEQ ID NO:8中具有改变N100A；或者D56A及N100A；或者D56A、N100Y及S100aR的重链可变域及在SEQ ID NO:2中具有改变M32L；或者S92A；或者M32L及S92A的轻链可变域的抗体。

2H7.v16重链可变域中的M34已经鉴定为抗体稳定性的潜在来源，且是替代的另一个潜在候选位置。

在本发明的一些各种优选实施方案的总结中，基于2H7.v16的变体的可变区包含v16的氨基酸序列，除了下文表3所示氨基酸替代的位置。除非另有说明，2H7变体将具有与v16相同的轻链。

表3: 例示性的人源化2H7抗体变体

2H7 型式	重链(V _H) 改变	轻链(V _L) 改变	Fc 改变
16, 参照用			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A

138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-		S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR		S298A, E333A, K334A, K326A

一种优选的人源化2H7包含2H7.v16轻链可变域序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGT
KVEIKR (SEQ ID NO:2);

及2H7.v16重链可变域序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:8)。

若人源化2H7.v16抗体是完整抗体, 则它可包含轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP
SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13);

及重链氨基酸序列SEQ ID NO. 14或:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
RVVYYSNSYWFYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG (SEQ ID NO:17)。

另一种优选的人源化2H7抗体包含2H7.v511轻链可变域序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPS

NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGK
VEIKR (SEQ ID NO:18);

及2H7.v511重链可变域序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSYRYWYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:19)。

若人源化2H7.v511抗体是完整抗体, 则它可包含轻链氨基酸序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPS
NLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGK
VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:15);

及重链氨基酸序列SEQ ID NO. 16或:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWV
GAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VVYYSYRYWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAPIAATISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPVLDSGDFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG (SEQ ID NO:20)。

“生长抑制性”抗体指那些阻止或降低表达抗体所结合的抗原的细胞增殖的抗体。例如, 抗体可在体外和/或在体内阻止或降低B细胞增殖。

“诱导凋亡”的抗体指根据标准凋亡测定法的测定, 诱导(例如B细胞的)程序性细胞死亡的抗体, 所述测定法诸如膜联蛋白V结合、DNA断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂、和/或膜囊(称作凋亡小体)形成。

“天然抗体”指通常由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接, 而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链间有变化。每条重链和

轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在一端具有一个可变域(V_H),接着是多个恒定域。每条轻链在一端具有一个可变域(V_L),而另一端是一个恒定域。轻链的恒定域与重链的第一恒定域排列在一起,而轻链的可变域与重链的可变域排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链与重链可变域之间形成界面。

术语“可变的”指可变域中的某些部分在抗体序列间差异广泛且用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作高变区的三个区段。可变域中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR,它们大多采取 β -折叠片构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各自具有一个抗原结合位点,及一个剩余的“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段,它具有两个抗原结合位点且仍能够交联抗原。

“Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。此区由紧密、非共价结合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体组成。正是在这种构造中,各可变域的三个高变区相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面上确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或只包含对抗原特异的三个高变区的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于完整结合位点。

Fab片段还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于重链CH1结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带至少一个游离巯醇基的Fab'的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为在Fab'片段之间有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段生成的。还知道抗体片

段的其它化学偶联。

根据其恒定域的氨基酸序列，来自任何脊椎动物物种的抗体（免疫球蛋白）的“轻链”可归入两种截然不同的型中的一种，称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

根据其“重链”恒定域的氨基酸序列，（如果有的话）抗体可归入不同的类。完整抗体有五大类：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中有些可进一步分为亚类（同种型），例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。将与不同类的抗体对应的重链恒定域分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

除非另有说明，本文中免疫球蛋白重链残基的编号是如Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中的EU索引的编号，明确收入本文作为参考。“如Kabat中的EU索引”指人IgG1 EU抗体的残基编号。

术语“Fc区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的C-末端区，包括天然序列Fc区和变异Fc区。虽然免疫球蛋白重链Fc区的边界可以变化，但是人IgG重链Fc区通常定义为自其Cys226或Pro230位置的氨基酸残基至羧基末端的区段。Fc区的C-末端赖氨酸（残基447，依照EU编号系统）可以消除，例如在生产或纯化抗体的过程中，或者通过对编码抗体重链的核酸进行重组工程。相应的，完整抗体组合物可包括消除了所有K447残基的抗体群、没有消除K447残基的抗体群、或者混合了有和没有K447残基的抗体的抗体群。

“功能性Fc区”拥有天然序列Fc区的“效应器功能”。例示性的“效应器功能”包括C1q结合、补体依赖性细胞毒性、Fc受体结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、细胞表面受体（例如B细胞受体；BCR）下调等。此类效应器功能一般要求Fc区与结合域（例如抗体可变域）联合，而且可使用多种测定法来评估，例如本文中所公开的。

“天然序列Fc区”包含与自然界中找到的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区（非A和A同种异型）、天然序列人IgG2 Fc区、天然序列人IgG3 Fc区、及天然序列人IgG4 Fc区，及上述任一种的天然存在变体。

“变异Fc区”包含由于至少一处氨基酸修饰，优选一处或多处氨基酸替代而与天然序列Fc区有所不同的氨基酸序列。优选的是，变异Fc区具有与天然序列Fc区或与亲本多肽的Fc区相比至少一处氨基酸替代，例如在天然序列

Fc区中或在亲本多肽的Fc区中具有约1处至约10处氨基酸替代, 优选约1处至约5处氨基酸替代。变异Fc区在本文中将优选与天然序列Fc区和/或亲本多肽的Fc区拥有至少约80%的同源性, 更优选至少约90%的同源性, 最优选至少约95%的同源性。

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应, 其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体, 随后引起靶细胞溶解。介导ADCC的主要细胞, NK细胞, 只表达FcγRIII, 而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估目的分子的ADCC活性, 可进行体外ADCC测定法, 诸如美国专利No. 5,500,362或5,821,337中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外, 可在体内评估目的分子的ADCC活性, 例如在动物模型中, 诸如Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中所披露的。

“人效应细胞”指表达一种或多种FcR并行行使效应器功能的白细胞。优选的是, 该细胞至少表达FcγRIII并执行ADCC效应器功能。介导ADCC的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞, 优选PBMC和NK细胞。

术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外, 优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ受体), 包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体, 包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”), 它们具有相似的氨基酸序列, 区别主要在于其胞质结构域。活化受体FcγRIIA在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR的综述参见Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341 (1995)。术语

“FcR”在本文中涵盖其它FcR, 包括那些未来将会鉴定的。该术语还包括新生儿受体, FcRn, 它负责将母体IgG转移给胎儿及免疫球蛋白体内稳态(Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976); Kim et al., *J. Immunol.* 24:249

(1994))。

“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指存在补体时分子溶解靶物的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分(C1q)结合与相关抗原复合的分子(例如抗体)起始的。为了评估补体激活,可进行CDC测定法,例如如Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所记载的。

“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于同一条多肽链上。优选的是,Fv多肽在V_H与V_L结构域之间还包含多肽接头,使得scFv能够形成结合抗原的期望结构。关于scFv的综述参见Plückthun, in: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore编, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)。

术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段,该片段在同一条多肽链(V_H-V_L)中包含相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的记载于例如EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同和/或结合相同表位,除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的可能变体外,此类变体通常以极少量存在。此类单克隆抗体典型的包括包含结合靶物的多肽序列的抗体,其中靶物结合多肽序列是通过包括从众多多肽序列中选择单一靶物结合多肽序列在内的过程得到的。例如,选择过程可以从众多克隆诸如杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆的集合中选择独特克隆。应当理解,所选择的靶物结合序列可进一步改变,例如为了提高对靶物的亲和力、将靶物结合序列人源化、提高其在细胞培养物中的产量、降低其在体内的免疫原性、创建多特异性抗体等,而且包含改变后的靶物结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性外,单克隆抗体制备物的优势在于它们通常未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语

“单克隆”指明抗体从基本上同质的抗体群获得的特征,不应解释为要求通过任何特定方法来生产抗体。例如,将依照本发明使用的单克隆抗体可通过

多种技术来生成,包括例如杂交瘤法(例如Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988; Hammerling et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, 563-681, Elsevier, N.Y., 1981)、重组DNA法(参见例如美国专利 No. 4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004))、及用于在具有部分或整个人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中生成人或人样抗体的技术(参见例如WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); 美国专利No. 5,545,806; 5,569,825; 5,591,669 (都属于 GenPharm); 5,545,807; WO 1997/17852; 美国专利No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368:812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995))。

单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生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相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类(例如旧大陆猴类(Old World Monkey),诸如狒狒、恒河猴或猕猴)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体(美国专利No. 5,693,780)。

非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受

体抗体)中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个、通常两个基本上整个如下的可变域,其中整个或基本上整个高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且整个或基本上整个FR是人免疫球蛋白序列的FR,除了上文所述FR替代。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区,通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)及重链可变域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))和/或那些来自“高变环”的残基(例如轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及重链可变域中的残基26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。“框架区”或“FR”残基指可变域中那些除此处定义的高变区残基外的残基。

“裸抗体”是指未偶联异源分子诸如细胞毒性模块或放射性标记物的抗体(如本文定义的)。

“完整抗体”是包含两个抗原结合区和一个Fc区的抗体。优选的是,完整抗体具有功能性Fc区。

“分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据Lowry法的测定,抗体重量超过95%,最优选重量超过99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用考马斯蓝或优选的银染色,达到同质。既然抗体天然环境

的至少一种成分不会存在，那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而，分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

“亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个高变区中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。优选的亲和力成熟的抗体将具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知规程来生成。Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)记载了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了CDR和/或框架残基的随机诱变: Barbas et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al., *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al., *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

本文中对受试者的“处理”和“治疗”(treatment)指治疗性处理和预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者包括那些早就患有IBD的以及要预防IBD的。因此，受试者可能已经诊断为患有IBD或者可能有患上IBD的倾向性或易感性。本文中所用的术语“治疗”和“处理”(treating、treat或treatment)包括预防性(例如防范性)、缓解性和治愈性的治疗和处理。

术语“免疫抑制剂”在本文中用于辅助疗法时指作用于抑制或掩盖本文所治疗受试者的免疫系统的物质。这将包括抑制细胞因子生成、下调或抑制自身抗原表达、或掩盖MHC抗原的物质。此类药剂的例子包括2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶(见美国专利4,665,077); 非类固醇抗炎药(NSAID); 更昔洛韦(ganciclovir)、他克莫司(tacrolimus)、糖皮质激素诸如皮质醇(cortisol)或醛甾酮(aldosterone); 抗炎剂, 诸如环加氧酶抑制剂、5-脂加氧酶抑制剂、或白三烯受体拮抗剂; 嘌呤拮抗剂, 诸如硫唑嘌呤(azathioprine)或麦考酚酸吗乙酯(mycophenolate mofetil, MMF); 烷化剂, 诸如环磷酰胺; 溴隐亭(bromocryptine); 达扎唑(danazol); 氨苯砒(dapsone); 戊二醛(如美国专利4,120,649中所述, 它掩盖MHC抗原); 针对MHC抗原和MHC片段的抗独特型抗体; 环孢菌素; 6-巯基嘌呤; 类固醇, 诸如皮质类固醇或糖皮质激素类似物, 如泼尼松(prednisone)、甲泼尼龙(methylprednisolone), 包括SOLU-MEDROL®甲泼尼龙琥珀酸钠, 和地塞米松(dexamethasone); 二氢叶酸还原酶抑制剂, 诸如甲氨蝶呤(methotrexate)(口服或皮下); 抗疟药,

例如氯喹和羟氯喹；柳氮磺吡啶(sulfasalazine)；来氟米特(leflunomide)；细胞因子或细胞因子受体抗体或拮抗剂，包括抗干扰素- α 、- β 或- γ 抗体、抗肿瘤坏死因子(TNF)- α 抗体（英夫利昔单抗(REMICADE®)或阿达木单抗）、抗肿瘤坏死因子 α 免疫黏附素（依那西普(etanercept)）、抗肿瘤坏死因子- β 抗体、抗白介素-2（IL-2）抗体和抗IL-2受体抗体，以及抗白介素-6（IL-6）受体抗体和拮抗剂；抗LFA-1抗体，包括抗CD11a和抗CD18抗体；抗L3T4抗体；异源抗淋巴细胞球蛋白；泛(pan)T抗体，优选抗CD3或抗CD4/CD4a抗体；含有LFA-3结合域的可溶性肽（90年7月26日公布的WO 90/08187）；链激酶；转化生长因子- β （TGF- β ）；链道酶；来自宿主的RNA或DNA；FK506；RS-61443；苯丁酸氮芥（chlorambucil）；脱氧精胍菌素(deoxyspergualin)；雷帕霉素(rapamycin)；T细胞受体（Cohen等人，美国专利5,114,721）；T细胞受体片段（Offner et al., Science 251: 430-432 (1991)；WO 90/11294；Ianeway, Nature 341: 482 (1989)；及WO 91/01133）；BAFF拮抗剂，诸如BAFF或BR3抗体或免疫粘附素和zTNF4拮抗剂（综述可参见Mackay and Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002)，另见下文定义）；干扰T辅助细胞信号的生物制剂，诸如抗CD40受体或抗CD40配体（CD154），包括针对CD40-CD40配体的阻断性抗体（例如Durie et al., Science, 261: 1328-30 (1993)；Mohan et al., J. Immunol., 154: 1470-80 (1995)）和CTLA4-Ig（Finck et al., Science, 265: 1225-7 (1994)）；及T细胞受体抗体（EP 340,109），诸如T10B9。

术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素（例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和Lu的放射性同位素）、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，或其片段。

“化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类(alkylating agents)，诸如塞替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide)（CYTOXAN®）；磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates)，诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶类(aziridines)，诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredepa)；乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)

和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类(acetogenin) (尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol) (屈大麻酚(dronabinol), MARINOL®); β -拉帕醌(lapachone); 拉帕醇(lapachol); 秋水仙素类(colchicines); 白桦脂酸(betulinic acid); 喜树碱(camptothecin) (包括合成类似物托泊替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11 (伊立替康(irinotecan), CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱、东莨菪亭(scopoletin)和9-氨基喜树碱); 苔藓抑素(bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物); 鬼臼毒素(podophyllotoxin); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 替尼泊苷(teniposide); 隐藻素类(cryptophycins) (特别是隐藻素1和隐藻素8); 多拉司他汀(dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189和CB1-TM1); 艾榴塞洛素(eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素(spongistatin); 氮芥类(nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝脲类(nitrosoureas), 诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素(enediynes) (例如加利车霉素(calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II和加利车霉素 ω II (参见例如Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33: 183-186 (1994))); dynemicin包括dynemicin A、埃斯波霉素(esperamicin); 以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、氨基霉素(anthramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素D (dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin) (包括ADRIAMYCIN®、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂(Doxil®)和脱氧多柔比星)、表柔比星

(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin); 抗代谢药, 诸如甲氨蝶呤、吉西他滨(gemcitabine) (Gemzar®)、替加氟(tegafur) (Uftoral®)、卡培他滨(capecitabine) (Xeloda®)、埃坡霉素(epothilone)、和5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫鸟嘌呤(thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine); 抗肾上腺类, 诸如氨基鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸(frolic acid); 醋葡醛内酯(aceglatone); 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶(eniluracil); 安吡啶(amsacrine); bestrabucil; 比生群(bisantrene); 依达曲沙(edatraxate); 地磷酰胺(defosfamide); 地美可辛(demecolcine); 地吡醌(diaziquone); elfornithine; 依利醋铵(elliptinium acetate); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟脲(hydroxyurea); 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 美登木素生物碱类(maytansinoids), 诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin); 米托胍脘(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 二胺硝吡啶(nitracrine); 喷司他丁(pentostatin); 蛋氨基芥(phenamet); 吡柔比星(pirarubicin); 洛索蒽醌(losoxantrone); 2-乙基酰肼(ethylhydrazide); 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生(razoxane); 根霉素(rhizoxin); 西索菲兰(sizofiran); 螺旋锗(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺醌(triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类(trichothecenes) (尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin) A、杆孢菌素(roridin) A和蛇行菌素

(anguidin)); 乌拉坦(urethan); 长春地辛(vindesine) (ELDISINE®, FILDESIN®); 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥(mannomustine); 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇(mitolactol); 哌泊溴烷(pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara-C”); 塞替派(thiotepa); 类紫杉醇类(taxoids), 例如帕利他塞(paclitaxel) (TAXOL®)清蛋白改造的纳米颗粒剂型帕利他塞(ABRAXANE™)和多西他塞(docetaxel) (TAXOTERE®); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 6-硫鸟嘌呤(thioguanine); 巯基嘌呤(mercaptopurine); 甲氨蝶呤; 铂类似物, 诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin); 长春碱(vinblastine) (VELBAN®); 铂; 依托泊苷(etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺(ifosfamide); 米托蒽醌(mitoxantrone); 长春新碱(vincristine) (ONCOVIN®); 奥沙利铂(oxaliplatin)、亚叶酸(leucovorin)、长春瑞滨(vinorelbine) (NAVELBINE®); 能灭瘤(novantrone); 依达曲沙(edatrexate); 道诺霉素(daunomycin); 氨基喋呤(aminopterin); 伊本膦酸盐(ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 类视黄酸(retinoids), 诸如视黄酸(retinoic acid); 任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物; 以及两种或多种上述物质的组合, 诸如CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和FOLFOX (奥沙利铂(ELOXATIN™)联合5-FU和亚叶酸的治疗方案的缩写)。

该定义还包括抗激素剂, 它们的作用为调节、减少、阻断或抑制可促进癌生长的激素的作用, 并往往采取系统性, 或者说全身性治疗的形式。它们自身可以为激素。例子包括抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂类(SERM), 包括例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene) (EVISTA®)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和托瑞米芬(toremifene) (FARESTON®); 抗孕酮类; 雌激素受体下调剂(ERD); 雌激素受体拮抗剂, 诸如氟维司群(fulvestrant) (FASLODEX®); 起抑制或关闭卵巢作用的药剂, 例如促黄体生成激素释放激素(LHRH)激动剂诸如醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate) (LUPRON®及ELIGARD®)、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林(buserelin acetate)和曲普瑞林(tripterelin); 抗雄激素类, 诸如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡鲁胺(bicalutamide); 以及抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的

芳香酶抑制剂, 诸如例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate) (MEGASE®)、依西美坦(exemestane) (AROMASIN®)、福美坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、伏罗唑(vorozole) (RIVISOR®)、来曲唑(letrozole) (FEMARA®)和阿那曲唑(anastrozole) (ARIMIDEX®)。另外, 该化疗剂的定义包括二膦酸盐/酯诸如氯屈膦酸盐/酯(例如BONEFOS®或OSTAC®)、依替膦酸盐/酯(DIDROCAL®)、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐/酯(ZOMETA®)、阿仑膦酸盐/酯(Fosamax®)、帕米膦酸盐/酯(AREDIA®)、替鲁膦酸盐/酯(SKELID®)、或利塞膦酸盐/酯(ACTONEL®); 以及曲沙他滨(troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是那些抑制牵涉粘着细胞增殖的信号途经中的基因表达的, 诸如例如PKC- α 、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGF-R); 疫苗, 诸如THERATOPE®疫苗和基因疗法疫苗, 例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗; 拓扑异构酶1抑制剂(例如LURTOTECAN®); rmRH (例如ABARELIX®); lapatinib ditosylate (一种ErbB-2及EGFR双重酪氨酸激酶小分子抑制剂, 又称GW572016); 及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物。

术语“细胞因子”是由一种细胞群释放, 作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子; 白介素(IL), 诸如IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, 包括PROLEUKIN® rIL-2和人IL-4和人IL-4突变体, 例如, 在IL-4中涉及IL-2R γ 结合的区域中含有突变的突变体, 例如Arg21改变为Glu残基; 肿瘤坏死因子, 诸如TNF- α 或TNF- β ; 及其它多肽因子, 包括LIF和kit配体(KL)。在用于本文时, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物, 包括合成产生的小分子实体及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“激素”指多肽激素, 通常由具有导管的腺器官分泌。激素包括例如生长激素, 诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 胰岛素原; 松驰素; 雌二醇; 激素替代疗法; 雄激素诸如卡普睾酮(calusterone), 丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate), 环硫雄醇(epitiostanol), 美雄烷(mepitiostane), 或睾内酯(testolactone); 松驰素原; 糖蛋白激素类, 诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH); 促乳素; 胎盘催乳激素; 小鼠促性腺激素

相关肽；促性腺激素释放激素；抑制素；激活素；穆勒氏(Mullerian)抑制性物质；及血小板生成素。在用于本文时，术语激素包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列激素的生物学活性等效物，包括通过人工合成产生的小分子实体，及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“生长因子”指促进生长的蛋白质，包括例如肝生长因子；成纤维细胞生长因子；血管内皮生长因子；神经生长因子，诸如NGF- β ；血小板衍生生长因子；转化生长因子(TGF)，诸如TGF- α 和TGF- β ；胰岛素样生长因子-I和-II；促红细胞生成素(EPO)；骨诱导因子(osteoinductive factor)；干扰素，诸如干扰素- α 、- β 和- γ ；及集落刺激因子(CSF)，诸如巨噬细胞CSF (M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞CSF (GM-CSF)、和粒细胞CSF (G-CSF)。在用于本文时，术语生长因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列生长因子的生物学活性等效物，包括通过人工合成产生的小分子实体，及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“整联蛋白”指容许细胞结合和应答胞外基质且牵涉多种细胞功能诸如伤口愈合、细胞分化、肿瘤细胞归巢和凋亡的受体蛋白质。它们是牵涉细胞-胞外基质和细胞-细胞相互作用的细胞粘附受体大家族的一部分。功能性整联蛋白由非共价结合的两个跨膜糖蛋白亚基组成，称为 α 和 β 。 α 亚基彼此都享有一定同源性， β 亚基也是如此。受体总是包含一条 α 链和一条 β 链。例子包括 $\alpha6\beta1$ 、 $\alpha3\beta1$ 、 $\alpha7\beta1$ 、LFA-1等。在用于本文时，术语“整联蛋白”包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列整联蛋白的生物学活性等效物，包括通过人工合成产生的小分子实体，及其药剂学可接受的衍生物和盐。

为本文的目的，“肿瘤坏死因子 α (TNF α)”指包含如Pennica et al., Nature 312: 721 (1984)或Aggarwal et al., JBC 260: 2345 (1985)中所述氨基酸序列的人TNF α 分子。“TNF α 抑制剂”在本文中指通常经由结合TNF α 并中和其活性而在一定程度上抑制TNF α 生物学功能的药剂。本文中明确设想的TNF抑制剂的例子有etanercept (依那西普, ENBREL®)、infiximab (英夫利昔单抗, REMICADE®)和adalimumab (阿达木单抗, HUMIRA™)。

“缓解病情的抗风湿药”或“DMARD”的例子包括羟氯喹、柳氮磺吡啶、甲氨蝶呤、来氟米特、依那西普、英夫利昔单抗、硫唑嘌呤、D-青霉胺 (D-penicillamine)、金盐 (口服)、金盐 (肌肉内)、米诺环素 (minocycline)、

环孢霉素 (cyclosporine) 包括环孢霉素 A 和表面环孢霉素 (topical cyclosporine)、葡萄球菌蛋白 A (Goodyear and Silverman, J. Exp. Med., 197, (9), p1125-39 (2003)), 包括其盐和衍生物等等。

“非类固醇抗炎药”或“NSAID”的例子包括阿司匹林、乙酰水杨酸、布洛芬 (ibuprofen)、萘普生 (naproxen)、吲哚美辛 (indomethacin)、舒林酸 (sulindac)、托美丁 (tolmetin)、COX-2 抑制剂诸如塞来考昔 (celecoxib) (CELEBREX®; 4-(5-(4-甲基苯基)-3-三氟甲基)-1H-吡唑-1-基) 苯磺酰胺以及伐地考昔 (valdecoxib) (BEXTRA®)、及美洛昔康 (meloxicam) (MOBIC®), 包括其盐和衍生物, 等等。

本文中“整联蛋白拮抗剂或抗体”的例子包括 LFA-1 抗体, 诸如可从 Genentech 购买的 efalizumab (RAPTIVA®), 或 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体, 诸如可从 Biogen 购买的 natalizumab (ANTEGREN®), 或二氮杂环苯丙氨酸衍生物 (WO 2003/89410)、苯丙氨酸衍生物 (WO 2003/70709、WO 2002/28830、WO 2002/16329 和 WO 2003/53926)、苯基丙酸衍生物 (WO 2003/10135)、烯胺衍生物 (WO 2001/79173)、丙酸衍生物 (WO 2000/37444)、链烷酸衍生物 (WO 2000/32575)、取代苯基衍生物 (美国专利 No. 6,677,339 和 6,348,463)、芳香胺衍生物 (美国专利 No. 6,369,229)、ADAM 解联蛋白结构域多肽 (US 2002/0042368)、 $\alpha v \beta 3$ 整联蛋白的抗体 (EP 633945)、氮桥二环氨基酸衍生物 (WO 2002/02556) 等。

“皮质类固醇”指具有类固醇的一般化学结构, 模拟或提升天然存在皮质类固醇的效果的数种合成的或天然存在的物质中的任一种。合成的皮质类固醇的例子包括泼尼松 (prednisone)、泼尼松龙 (prednisolone) (包括甲泼尼龙 (methylprednisolone), 诸如 SOLU-MEDROL® 甲泼尼龙琥珀酸钠)、地塞米松 (dexamethasone) 或地塞米松曲安西龙 (dexamethasone triamcinolone)、氢化可的松 (hydrocortisone) 和倍他米松 (betamethasone)。本文中优选的皮质类固醇是泼尼松、甲泼尼龙、氢化可的松或地塞米松。

本文中所用的术语“有效量”指对治疗 IBD 有效的抗体或拮抗剂量。有效量典型地通过它们与当对类似情形的个体施用未包含活性成分的组合物 (即对照) 时观察到的效果相比之下所具有的效果来确定。

“包装插页”用于指通常包括在治疗用产品的商品包装中的说明书, 它们包含有关涉及此类治疗用产品应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症、

与该包装产品联合的其它治疗用产品和/或警告等的信息。

“治疗药物” (medicament) 是用于治疗IBD或其症状或副作用的活性药物。

II. IBD的疗法

本发明提供了在人类受试者中治疗IBD的方法，包括对受试者施用有效量的结合B细胞表面标志（诸如CD20）的抗体（或拮抗剂）。

具体地，本发明提供了一种在人类受试者中治疗中度-严重炎症性肠病（IBD）的方法，包括对受试者施用有效量的CD20抗体（或拮抗剂），其中所述抗体（或拮抗剂）的施用导致临床响应和/或疾病缓解。

这样的施用还可以减少受试者的结肠粘膜中、派尔斑中、次级淋巴组织或器官诸如淋巴结和脾中、以及血液中的B细胞，但尤其是结肠粘膜中的B细胞。

IBD可以是溃疡性结肠炎（UC）或克罗恩氏病，但优选UC。本文中受治疗的受试者可患有活动性IBD、活动性UC或活动性克罗恩氏病。一般而言，受治疗的受试者患有中度-严重的IBD、中度-严重的UC、或中度-严重的克罗恩氏病。

另外，受试者可患有类固醇不应性和/或类固醇依赖性IBD、类固醇不应性和/或类固醇依赖性UC、或类固醇不应性和/或类固醇依赖性克罗恩氏病。

本文中受治疗的受试者可以：在筛选时已具有 ≥ 6 个月的IBD诊断；进行筛选性乙状结肠镜时具有 ≥ 20 cm的活动性疾病；具有如 ≥ 6 及 ≤ 11 之间的DAI得分确定的活动性疾病，其中直肠出血为 ≥ 2 ，可屈性乙状结肠镜检查为 ≥ 2 ；已在筛选前2年内接受口服皮质类固醇治疗UC；已接受持续至少2周强度大于20 mg/日泼尼松等效剂量的治疗；对依那西普、英夫利昔单抗或阿达木单抗耐药或不应；已接受稳定剂量的氨基水杨酸盐/酯治疗 ≥ 3 周；已接受稳定剂量的口服皮质类固醇剂量治疗 ≥ 2 周；已接受6-MP治疗3个月时间，其中稳定剂量的6-MP ≥ 4 周；已接受硫唑嘌呤治疗3个月时间，其中稳定剂量 ≥ 4 周。

患有中度-严重的活动性UC的受试者的护理标准包括使用标准剂量的下列药物的疗法：氨基水杨酸盐/酯、口服皮质类固醇、6-巯基嘌呤（6-MP）和/或硫唑嘌呤。使用本文公开的CD20抗体的疗法将导致疾病缓解（疾病的快速控制和/或缓解延长）和/或临床响应的改善，优于对此类受试者采用护

理标准所达到的效果。

抗体的施用可导致疾病缓解，例如，在约第8周时或不迟于约第8周实现疾病缓解。优选的是，疾病缓解前时间（time to disease remission）少于未接受CD20抗体治疗的受试者中实现的疾病缓解前时间。另外，优选缓解的持续时间长于未接受CD20抗体治疗的受试者中实现的缓解持续时间。例如，缓解持续时间可为从初始治疗起或从实现缓解起至少24周，优选至少48周，最优选至少约2年。缓解可定义为乙状结肠镜检查得分为0或1，和/或直肠出血得分为0。

抗体的施用可导致临床响应，例如在约第8周时或不迟于约第8周实现临床响应。本文中，临床响应可定义为疾病活动性指数（DAI）得分的减少，例如，此类得分减少多于或等于3分。

在一个实施方案中，受试者先前从未接受CD20抗体治疗。优选的是，受试者未患有B细胞恶性肿瘤。受试者优选未患有除了IBD、UC或克罗恩氏病之外的自身免疫疾病。

还提供了一种在患有活动性溃疡性结肠炎（UC）的人类受试者中减少疾病活动性指数（DAI）得分的方法，包括对受试者施用可有效减少DAI得分的量的CD20抗体。优选的是，DAI评分系统是如本文表2所示的DAI评分系统，且施用所述CD20抗体使此类DAI得分减少多于或等于3分。

另外，该方法包括在具有非典型的核周抗嗜中性粒细胞胞质抗体（p-ANCA）水平和/或抗人原肌球蛋白同种型5（hTM5）自身抗体水平的人类受试者中治疗活动性炎性肠病（IBD）。对受试者施用CD20抗体在该受试者中有效地减少p-ANCA水平和/或抗-hTM5抗体水平。

确切的剂量将由临床医师根据公认的标准，同时考虑待治疗的疾患的性质和严重性、拮抗剂或抗体的种类、受试者的特质等因素来加以确定。剂量的确定在本领域普通技术水平之内。优选通过系统、静脉内、或皮下施用所述抗体。取决于施用的路径和方法，拮抗剂或抗体可以以单个剂量施用、作为延时输注施用，或经过一段长期间的间歇施用。静脉内施用一般是通过推注或通常历时一到数小时的输注来进行。可以采用持续释放配制剂。

在一个优选的实施方案中，所述方法包括施用范围为约200 mg到2000 mg，优选约500 mg到1500 mg，最优选约750 mg到1200 mg的一剂或多剂。例如，可以施用1到4剂，或仅1或2剂。根据该实施方案，抗体可在约1个月

时间内，优选约2到3周时间内，最优选约2周时间内施用。

当施用多于1剂时，优选在施用前一剂约1到20日后，更优选约6到16日后，最优选约14到16日后施用后一剂（例如第2剂或第3剂）。多个分开的剂量优选在约1日到4周的总时间内，更优选约1到20日的总时间内（例如6-18日的时间内）施用。每个这样的分开剂量的抗体优选为约200 mg到2000 mg，优选约500 mg到1500 mg，最优选约750 mg到1200 mg。

但是，如上面指出的，对于拮抗剂或抗体的这些建议量要加以诸多治疗上的考量。在合适剂量的选择和进度安排中，关键的因素是所得的结果，如上文提示的。例如，为治疗活动性IBD，开始可能需要相对较高的剂量。后续的剂量可高于在先剂量。为得到最有效的结果，拮抗剂或抗体的施用尽可能接近疾病或病症的首次体征、诊断、表现或出现，或者在疾病或病症的缓和过程中施用。

由此，本发明提供了一种在患有活动性炎性肠病（IBD）的人类受试者中治疗IBD的方法，包括对受试者施用仅一剂或两剂CD20抗体，其中施用所述一剂或两剂CD20抗体后实现疾病缓解或临床响应。优选的是，所述一剂或两剂是通过静脉内（IV）或皮下（SC）施用的。当通过静脉内施用两剂时，优选两剂中的每一剂均为约200 mg到约2000 mg的范围。

所述拮抗剂或抗体以任何合适手段施用，包括肠胃外、皮下、腹膜内、吸入、鞘内、动脉内和鼻内施用，而且，如果局部免疫抑制处理需要，还可以在病变内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。另外，拮抗剂或抗体也适于脉冲输注，例如用递减剂量的拮抗剂或抗体。剂量施用优选通过注射，最优选通过静脉内或皮下注射来进行，这部分取决于施用是短期的还是长期的。

可以用所述拮抗剂或抗体对受试者进行复治（retreat），如通过给予多于一次暴露或多于一组剂量，诸如至少约两次拮抗剂或抗体暴露，例如约2次到60次暴露，更具体为约2到40次暴露，更具体的是约2到20次暴露。

在一个实施方案中，可以在疾病的体征或症状重现时，受试者不再处于缓解状态时，和/或p-ANCA或抗-hTM5自身抗体水平上升时等条件下给予任何复治。

在另一实施方案中，可以相隔一定的间隔给予任何复治。例如，可以相隔各种间隔施予后续的暴露，诸如例如大约24-28周或48-56周或更长。优选

的是，每隔约24-26周或约38-42周，或约50-54周给予这样的暴露。

在一个实施方案中，每次拮抗剂或抗体暴露作为单剂该拮抗剂或抗体来提供。在一个供选择的实施方案中，每次拮抗剂或抗体暴露作为多剂所述抗体来提供。但是，并非每次拮抗剂或抗体暴露都需要作为单剂或多剂来提供。

优选的拮抗剂是抗体。在本文提出的方法中，CD20抗体可以是裸抗体，或者可以与另一分子诸如细胞毒剂或细胞因子偶联。优选的是，抗体是完整的裸抗体。本文中优选的CD20抗体是嵌合的、人源化的或人的CD20抗体，更优选rituximab、人源化2H7、2F2 (HuMax-CD20) 人CD20抗体 (Genmab)、人源化A20抗体 (Immunomedics)。进一步优选的是rituximab或人源化2H7。

在本文所有方法的进一步的实施方案中，受试者先前从未接受药物，诸如治疗IBD的药剂的治疗，并且/或者先前从未接受过针对B细胞表面标志的拮抗剂或抗体的治疗 (例如先前从未接受过CD20抗体的治疗)。

在本文的任一方法中，可以将所述结合B细胞表面标志的拮抗剂或抗体与有效量的第二治疗药物 (其中所述结合B细胞表面标志的拮抗剂或抗体 (例如CD20抗体) 是第一治疗药物) 一起施用给受试者。所述第二治疗药物的类型取决于多种因素，包括IBD的类型、IBD的严重程度、受试者的状况和年龄、所用的第一治疗药物的类型和剂量，等等。

此类附加治疗药物或其它疗法的例子包括另一治疗IBD的药剂，化疗剂，干扰素类药物诸如干扰素- α (例如来自Amarillo Biosciences, Inc.)、IFN- β -1a (REBIF®和AVONEX®) 或IFN- β -1b (BETASERON®)，寡肽诸如醋酸格拉默 (glatiramer acetate) (COPAXONE®)，阻断CD40-CD40配体的药剂，细胞毒剂 (诸如米托蒽醌 (NOVANTRONE®)、甲氨蝶呤、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、来氟米特和硫唑嘌呤)，一种或多种免疫抑制剂 (例如硫唑嘌呤、6-巯基嘌呤、环孢菌素)，静脉内免疫球蛋白 (丙种球蛋白)，淋巴细胞消减性疗法 (例如米托蒽醌、环磷酰胺、CAMPATH™抗体、抗CD4、克拉屈滨 (cladribine))，一种具有至少两个结构域，包含被自身反应性B细胞的Ig受体特异性识别的脱免疫 (de-immunized) 自身反应性抗原或其片段的多肽构建体 (WO 2003/68822)，全身照射，骨髓移植，整联蛋白拮抗剂或抗体 (例如LFA-1抗体诸如可购自Genentech的efalizumab (RAPTIVA®)，或 α 4整联蛋白抗体诸如可得自Biogen Idec的natalizumab (ANTEGREN®)，或其它上面提到的)，类固醇诸如皮质类固醇 (例如甲泼尼龙诸如SOLU-MEDROL™甲泼尼

龙琥珀酸钠注射剂、泼尼松诸如低剂量泼尼松、地塞米松，或糖皮质激素，包括系统性皮质类固醇疗法），非淋巴细胞消减性免疫抑制性疗法（例如MMF或环孢菌素），“抑制素/他汀(statin)”类降低胆固醇的药物（包括西立伐他汀(cerivastatin)（BAYCOL™）、氟伐他汀(fluvastatin)（LESCOL™）、阿托伐他汀(atorvastatin)（LIPITOR™）、洛伐他汀(lovastatin)（MEVACOR™）、普伐他汀(pravastatin)（PRAVACHOL™）和辛伐他汀(simvastatin)（ZOCOR™）），雌二醇，睾酮（任选提高的剂量；Stuve et al., Neurology 8: 290-301 (2002)），雄激素，激素代替疗法，TNF抑制剂诸如依那西普(ENBREL®)、infliximab (REMICADE®)和adalimumab (HUMIRA™)，缓解病情的抗风湿药(DMARD)，非类固醇抗炎药(NSAID)，血浆去除术或血浆交换，甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异噁唑(BACTRIM™, SEPTRA™)，麦考酚酸吗乙酯(mycophenolate mofetil)，H2阻断剂或质子泵抑制剂（在潜在致溃疡性免疫抑制疗法的使用过程中），左旋甲状腺素，环孢菌素A（例如SANDIMMUNE®），促生长素抑制素类似物，细胞因子，细胞因子或细胞因子受体抗体或拮抗剂，抗代谢物，康复手术或结肠切除术，放射碘，甲状腺切除术，BAFF拮抗剂诸如BAFF或BR3抗体或免疫粘附素，抗CD40受体或抗CD40配体（CD154），抗IL-6受体拮抗剂或抗体，抗IL-2抗体诸如达克珠单抗(daclizumab)，另一种B细胞表面拮抗剂或抗体诸如人源化2H7或其它人源化或人CD20抗体和利妥昔单抗，口服皮质类固醇（例如用CD20抗体或拮抗剂初始治疗之前2年内），泼尼松（例如20mg/日的泼尼松等效剂量持续至少2周时间），依那西普，英夫利昔单抗，阿达木单抗，氨基水杨酸盐/酯（例如≥3周的稳定剂量），口服皮质类固醇（例如≥2周的稳定剂量），6-MP（例如3个月期间的治疗，其中稳定剂量≥4周），硫唑嘌呤（例如3个月期间的治疗，其中稳定剂量≥4周），钙依赖磷酸酶抑制剂，环孢菌素，他克莫司(tacrolimus)，西罗莫司(sirolimus)，甲氨蝶呤，麦考酚酸吗乙酯，表面直肠制剂，非生物学细胞消减疗法诸如ADACOLUMN®，抗生素，止泻剂，胆汁酸结合物诸如考来烯胺，口服和/或表面5-ASA，口服和/或表面类固醇，MLN-02，美沙拉秦(mesalamine)，可的松乳膏，氢化可的松灌肠剂，柳氮磺吡啶，alsalazine，巴柳氮(balsalazide)，甲泼尼龙，氢化可的松，ACTH，静脉内皮质类固醇，GELTEX™ (Genzyme)，抗CD3抗体诸如visilizumab (NUVION®)，OPC-6535，CBP 1011，沙利度胺(thalidomide)，ISIS 2302，BXT-51072，生长因子诸如角

质形成细胞生长因子-2 (KGF-2; REPIFERMIN™), RPD-58, antegren, FK-506 等等。

优选的第二治疗药物包括下列各项中的一项, 两项, 三项或四项: 氨基水杨酸盐/酯, 口服皮质类固醇, 6-巯基嘌呤 (6-MP) 和硫唑嘌呤。

在本文“联合疗法”的一种优选方法中, 本发明涉及一种在患有活动性炎性肠病 (IBD) 的人类受试者中治疗IBD的方法, 包括对受试者施用有效量的CD20抗体, 还包括对所述受试者施用有效量的选自氨基水杨酸盐/酯、口服皮质类固醇、6-巯基嘌呤 (6-MP) 和硫唑嘌呤的第二治疗药物。

所有这些第二治疗药物可以相互组合地或单独地与第一治疗药物一起使用, 因而本文所用的“第二治疗药物”这一表达并不意味着其各自是除第一治疗药物之外的唯一治疗药物。因此, 第二治疗药物并非必然是一种治疗药物, 而可能包含多于一种这样的药物或由其组成。

本文中提出的这些第二治疗药物一般使用如上文使用的相同的剂量和施用路径, 或者, 所用剂量为以前所用剂量的1-99%。如果确实要使用此类第二治疗药物, 任选地, 它们的用量低于不存在第一治疗药物的情况下的用量, 尤其是在初始时按剂量给予第一治疗药物之外的后续剂量给药过程中, 以消除或减少其导致的副作用。例如, 本文的CD20抗体疗法可允许递减或不连续的类固醇施用。

本文中的联合施用包括: 共施用, 使用分开的配制剂或单个药用配制剂; 以及按任一次序的序贯施用, 其中优选存在所有 (两种或更多种) 活性剂同时发挥其生物学活性的时间段。

对本文中的复治方法而言, 如果有效量的第二治疗药物与抗体剂量组一起施用, 那么它可以与任意个剂量组一起施用, 例如, 只与一个剂量组施用, 或着与多于一个剂量组一起施用。在一个实施方案中, 第二治疗药物与初始剂量组一起施用。在另一实施方案中, 第二治疗药物与初始剂量组和第二剂量组一起施用。在又一个实施方案中, 第二治疗药物与所有剂量组一起施用。

第二治疗药物的联合施用包括: 共施用 (同时施用), 使用分开的配制剂或单个药用配制剂; 以及按任一次序的序贯施用, 其中优选存在所有 (两种或更多种) 活性剂 (治疗药物) 同时发挥其生物学活性的时间段。

本文中的抗体或拮抗剂以任何合适方式施用, 包括肠胃外、局部、皮下、腹膜内、肺内、鼻内和/或病变内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内(i.v.)、

动脉内、腹膜内或皮下施用。还设想了膜/鞘内施用（参阅例如US 2002/0009444, Grillo-Lopez, A concerning intrathecal delivery of a CD20 antibody）。此外，还可合适的通过脉冲输注来施用抗体或拮抗剂，例如用剂量逐渐减少的抗体或拮抗剂。优选静脉内或皮下剂量给药，更优选通过静脉内输注。

如果提供多个剂量组的抗体，那么各个剂量组可利用相同或不同的施用手段来提供。在一个实施方案中，各个剂量组通过静脉内施用。在另一个实施方案中，各个剂量组通过皮下施用。在又一个实施方案中，多个剂量组通过静脉内和皮下二者施用，且抗体可以相同或不同。

下面讨论生产、修饰和配制此类拮抗剂和抗体的方法。

III. 拮抗剂和抗体的生产

本发明的方法和制品使用或包含结合B细胞表面标志的拮抗剂或抗体。因此，本文将描述用于生成此类拮抗剂或抗体的方法。

将用于生成或筛选拮抗剂或抗体的B细胞表面标志可以是例如可溶形式的抗原或其包含期望表位的部分。或者/另外，在其细胞表面表达B细胞表面标志的细胞可用于生成或筛选拮抗剂或抗体。可用于生成拮抗剂或抗体的其它形式的B细胞表面标志对本领域技术人员将是显而易见的。优选的是，B细胞表面标志是CD20抗原。

虽然优选的拮抗剂是抗体，本文设想了抗体之外的拮抗剂。例如，拮抗剂可包括任选融合或偶联了细胞毒剂（诸如本文中描述的那些）的小分子拮抗剂。可以用本文中感兴趣的B细胞表面标志筛选小分子文库以鉴定与该抗原结合的小分子。还可以进一步筛查该小分子的拮抗剂性质和/或将其与细胞毒剂偶联。

拮抗剂也可以是通过理性设计（rational design）或噬菌体展示（见例如1998年8月13日公布的WO98/35036）生成的肽。在一个实施方案中，所选的分子可以是基于抗体的CDR而设计的“CDR模拟物”或抗体类似物。虽然这些肽可能本身就是拮抗剂，任选地可将它们与细胞毒剂融合以增加或提高肽的拮抗剂性质。

下面的描述例示了用于生产依照本发明使用的抗体的技术。

(i) 多克隆抗体

多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下(sc)或腹腔内(ip)注射相关抗原和佐剂来生成。使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中R和 R^1 是不同的烃基),将相关抗原与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的,例如匙孔藻血蓝蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

通过将例如 $100\mu\text{g}$ 或 $5\mu\text{g}$ 蛋白质或偶联物(分别用于兔或小鼠)与3倍体积的弗氏完全佐剂混和并将该溶液皮内注射于多个部位,将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。一个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏完全佐剂中初始量 $1/5$ - $1/10$ 的肽或偶联物对动物进行加强免疫。7-14天后,采集动物的血液,并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫,直到滴度达到平台(plateau)。优选的是,将动物用相同抗原但与不同蛋白质和/或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行加强免疫。偶联物还可在重组细胞培养中作为蛋白质融合物来制备。同样,适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

(ii) 单克隆抗体

单克隆抗体是由一群基本上同质的抗体获得的,即构成群体的各个抗体相同,除了可能以极少量存在的可能的天然存在突变外。由此,修饰语“单克隆”指明抗体的特征,即不是分立的抗体的混合物。

例如,单克隆抗体可使用最初由Kohler et al., Nature 256:495 (1975)记载的杂交瘤方法来制备,或者可以通过重组DNA方法(美国专利No. 4,816,567)来制备。

在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它适宜的宿主动物,诸如仓鼠,以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。然后,使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。

将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,若亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或

HPRT), 则用于杂交瘤的培养基典型的将含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷(HAT培养基), 这些物质阻止HGPRT缺陷细胞生长。

优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持选定抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如HAT培养基的培养基敏感的。在这些细胞中, 优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系, 诸如那些可从索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA)获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤及可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA)获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞衍生的。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于生成人单克隆抗体也已有记载(Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养液测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是, 通过免疫沉淀或通过体外结合测定法, 诸如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA), 测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

单克隆抗体的结合亲和力可通过例如Munson et al., Anal. Biochem. 107:220 (1980)的Scatchard分析来测定。

在鉴定得到生成具有期望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 所述克隆可通过有限稀释规程进行亚克隆, 并通过标准方法进行培养(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外, 杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

可通过常规免疫球蛋白纯化规程, 诸如例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析, 将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养液、腹水或血清适当分开。

单克隆抗体也可以重组生产。编码单克隆抗体的DNA易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。以杂交瘤细胞作为此类DNA的优选来源。一旦分离, 可将DNA置于表达载体中, 然后将该表达载体转染到原本不生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中, 诸如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)

细胞或骨髓瘤细胞，以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述性论文包括Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256-262 (1993) 和 Plückerthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992)。

在另一个实施方案中，可从使用McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)所记载的技术构建的噬菌体抗体库中分离抗体或抗体片段。Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)和Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)分别记载了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续出版物记载了通过链改组(Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992))，以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略(Waterhouse et al., *Nuc. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993))，生成高亲和力(nM范围)的人抗体。如此，这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

还可以修饰DNA，例如通过替代即用人重链和轻链恒定域的编码序列代替同源鼠序列(美国专利No. 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984))，或通过将非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价接合。

典型的是，用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定域，或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变域，以产生嵌合二价抗体，它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

(iii) 人源化抗体

本领域已经记载了用于将非人抗体人源化的方法。优选的是，人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基，它们典型的取自“输入”可变域。人源化可基本上遵循Winter及其同事的方法进行(Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988))，通过用高变区序列替代相应的人抗体序列。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利No. 4,816,567)，其中基本上少于整个人可变域用来自非人物种的相应序列替代。在实践中，人源化抗体典型的是其中一些高变区残基和可能的一些FR残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

用于构建人源化抗体的人可变域的选择,包括轻链和重链二者,对于降低抗原性非常重要。依照所谓的“最适”(best-fit)方法,用啮齿类抗体的可变域序列对已知的人可变域序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架区(FR) (Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体(Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993))。

更为重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目标,依照一种优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是公众可获得的,且为本领域技术人员所熟悉。可获得图解和显示选定候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像容许分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出FR残基并进行组合,从而获得期望的抗体特征,诸如对靶抗原的亲合力提高。一般而言,高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

(iv) 人抗体

作为人源化的替代方法,可生成人抗体。例如,现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成人抗体完整全集的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击时生成人抗体。参见例如Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.* 7:33 (1993); 及美国专利No. 5,591,669、5,589,369和5,545,807。

或者,噬菌体展示技术(McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990))可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)域基因全集生成人抗体和抗体片段。依照这种技术,将抗体V结构域基因以符合读码框的方式克隆到丝状噬菌体诸如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因中,并在噬菌体颗粒表

面上展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝，以抗体的功能特性为基础进行的选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。如此，噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种格式进行；有关综述参见例如Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。V基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)从衍生自经免疫小鼠脾的小型V基因随机组合文库中分离得到大量不同的抗噁唑酮抗体。可本质上遵循Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)或Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)所记载的技术，自未免疫人供体构建V基因全集和分离针对大量不同抗原（包括自身抗原）的抗体。还可参见美国专利No. 5,565,332和5,573,905。

还可以由体外激活的B细胞来生成抗体(参见美国专利No. 5,567,610和5,229,275)。

(v) 抗体片段

已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上，通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); Brennan et al., *Science* 229:81 (1985))。然而，现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如，可从上文讨论的噬菌体抗体库中分离抗体片段。或者，可直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段并化学偶联以形成F(ab')₂片段(Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。依照另一种方法，可直接从重组宿主细胞培养物分离F(ab')₂片段。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员将是显而易见的。在其它实施方案中，选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185；美国专利No. 5,571,894；和美国专利No. 5,587,458。抗体片段还可以是“线性抗体”，例如如美国专利No. 5,641,870中所记载的。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

(vi) 双特异性抗体

双特异性抗体指具有对至少两种不同表位的结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可结合B细胞表面标志的两种不同表位。其它此类抗体可以结合第一B细胞表面标志并进一步结合第二B细胞表面标志。或者，可将抗B细胞标志结合臂与结合白细胞上触发分子诸如T细胞受体分子（例如CD2或

CD3) 或IgG的Fc受体(FcγR) (诸如FcγRI (CD64)、FcγRII (CD32)和FcγRIII (CD16)) 的臂组合在一起, 使得细胞防御机制聚焦于B细胞。双特异性抗体还可用于将细胞毒剂定位于B细胞。这些抗体具有B细胞标志结合臂和结合细胞毒剂(例如肥皂草毒蛋白、抗干扰素-α、长春花生物碱类、蓖麻毒蛋白A链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性抗体制备成长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)。

用于构建双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统的全长双特异性抗体生产是基于两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达, 其中两种链具有不同的特异性(Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成10种不同抗体分子的潜在混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦且产物产量低。WO 93/08829及Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991)中披露了类似的规程。

依照一种不同的方法, 将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。融合优选使用包含至少部分铰链、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定域。优选的是, 在至少一种融合物中, 重链第一恒定区(CH1)包含轻链结合所必需的位点。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体, 并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中, 这为调整三种多肽片段的相互比例提供了极大的灵活性。然而, 在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时, 有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个表达载体。

在该方法的一个优选实施方案中, 双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径, 因此发现这种不对称结构便于将期望的双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法披露于WO 94/04690。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986)。

依照美国专利No. 5,731,168中记载的另一种方法, 可改造一对抗体分子

之间的界面，以将从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分抗体恒定域的 C_H3 结构域。在该方法中，将第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链（例如酪氨酸或色氨酸）替换。通过将大氨基酸侧链用较小氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）替换，在第二抗体分子的界面上产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

双特异性抗体包括交联的或“异源偶联的”抗体。例如，异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联，另一种抗体与生物素偶联。例如，此类抗体建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利No. 4,676,980)，及用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的，并且连同许多交联技术一起披露于美国专利No. 4,676,980。

文献中还记载了自抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如，可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)记载了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 $F(ab')_2$ 片段的规程。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠时还原，以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将 Fab' -TNB衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab' -硫醇，并与等摩尔量的另一种 Fab' -TNB衍生物混合，以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

最新的进展便于从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH片段，这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992)记载了生成完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。每个 Fab' 片段由大肠杆菌分开分泌，并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达ErbB2受体的细胞和正常人T细胞，以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳房肿瘤靶物的溶胞活性。

还已记载了直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如，已使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体。Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原而形成

成单体，然后重新氧化而形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)，所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此，迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对，由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链Fv (sFv)二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)。

设想具有多于两个效价的抗体。例如，可制备三特异性抗体。Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)。

IV. 拮抗剂或抗体的偶联物及其它修饰

任选将本文的方法中使用的或本文的制品中包含的拮抗剂或抗体与另一药剂诸如细胞毒剂或细胞因子（例如IL2；参见例如WO2005/016969）偶联。

偶联通常通过共价连接来实现；共价连接的确切性质将由靶向性分子和CD20拮抗剂或抗体多肽上的连接位点来决定。通常，非肽药剂通过添加接头来修饰，该接头容许通过由化学修饰导入到CD20拮抗剂或抗体上的反应性基团、糖链或氨基酸侧链与CD20拮抗剂或抗体偶联。例如，可以通过下列手段附着药物：通过赖氨酸残基的 ϵ -氨基；通过游离的 α -氨基；通过与半胱氨酸残基的二硫键交换；或通过用高碘酸氧化碳水化合物链中的1,2-二醇，使含有各种亲核试剂的药物通过席夫(Schiff)碱连接而附着。参见例如美国专利No. 4,256,833。蛋白质修饰剂包括胺反应性试剂（例如反应性酯、异硫氰酸盐/酯、醛和磺酰卤）、硫醇反应性试剂（例如卤代乙酰衍生物和马来酰亚胺）、及羧酸反应性和醛反应性试剂。CD20拮抗剂或抗体多肽可以通过使用双功能交联试剂与肽试剂共价连接。异双功能试剂更为常用，可允许两种不同蛋白质通过使用两种不同反应性模块（例如胺反应性加硫醇、碘乙酰胺或马来酰亚胺）而受控偶联。此类连接剂的使用在本领域是公知的。参见例如Brinkley，同上和美国专利No. 4,671,958。也可以使用肽接头。作为选择，可通过制备融合多肽而将CD20拮抗剂或抗体多肽与肽模块连接。

其它双功能蛋白质偶联剂的例子包括：N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二

硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。

或者,包含拮抗剂或抗体与药剂的融合蛋白可以通过例如重组技术或肽合成为来制备。

本文设想了拮抗剂或抗体的其它修饰。例如,可以将拮抗剂或抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种相连,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物。

本文所公开的拮抗剂或抗体还可以配制为脂质体。含有拮抗剂或抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备,诸如Epstein et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 美国专利No. 4,485,045和4,544,545; 及1997年10月23日公布的WO97/38731。美国专利No. 5,013,556披露了循环时间增强的脂质体。

特别有用的脂质体可以用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物通过反相蒸发方法产生。将脂质体挤压通过限定孔径的滤器而产生具有所需直径的脂质体。本发明抗体的Fab'片段可以通过二硫键交换反应与Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)所述的脂质体偶联。脂质体中任选含有化疗剂。参见Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)。

设想了本文所述蛋白质或肽拮抗剂或抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进拮抗剂或抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过将适宜的核苷酸改变引入拮抗剂或抗体核酸或者通过肽合成为来制备拮抗剂或抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如拮抗剂或抗体氨基酸序列内的残基删除和/或插入和/或替代。只要最终的构建物具有期望特性,可进行删除、插入和替代的任意组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可改变拮抗剂或抗体的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数目或位置。

可用于鉴定拮抗剂或抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham and Wells, Science 244:

1081-1085 (1989)所述。这里, 鉴定了一个残基或一组靶残基(例如带电荷的残基, 诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸), 并用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)替代, 以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体, 推敲那些对替代展现出功能敏感性的氨基酸位置。如此, 虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的, 但是突变本身的性质不需要预先决定。例如, 为了分析在给定位点处的突变的后果, 在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变, 并对所表达的拮抗剂或抗体变体筛选期望活性。

氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端的融合, 长度范围从一个残基至包含上百个或更多残基的多肽, 以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N-末端甲硫氨酰残基的拮抗剂或抗体或者与细胞毒性多肽融合的拮抗剂或抗体。拮抗剂或抗体分子的其它插入变体包括在拮抗剂或抗体的N-或C-末端融合酶或提高拮抗剂或抗体血清半衰期的多肽。

另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在拮抗剂或抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替换。抗体拮抗剂中最感兴趣的替代诱变位点包括高变区, 但也设想了FR改变。保守替代在表4中显示在标题“优选替代”下。如果此类替代导致生物学活性的改变, 那么可以引入表4中称为“例示替代”的更实质性改变, 或如下文中关于氨基酸种类的进一步描述, 并筛选产物。

表4

原始残基	例示替代	优选替代
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)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

对拮抗剂或抗体生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成: (a) 替代区域的多肽主链的结构, 例如作为折叠片或螺旋构象, (b) 靶位点处分子的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链的体积。基于共同的侧链特性, 可将天然存在残基如下分组:

- (1) 疏水性的: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2) 中性、亲水性的: Cys、Ser、Thr;
- (3) 酸性的: Asp、Glu;
- (4) 碱性的: Asn、Gln、His、Lys、Arg;
- (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro; 和
- (6) 芳香族的: Trp、Tyr、Phe。

非保守替代将需要用这些类别之一的一个成员替换另一个类别的。

任何不牵涉保持拮抗剂或抗体正确构象的半胱氨酸残基也可替代, 一般用丝氨酸, 以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反, 可向拮抗剂或抗体中添加半胱氨酸键以改进其稳定性(特别是当拮抗剂或抗体是抗体片段诸如Fv片段时)。

特别优选的一类替代变体牵涉替代亲本抗体的一个或多个高变区残基。通常, 选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改良的生物学特性。用于产生此类替代变体的一种便利方法是使用噬菌体展示的亲合力成熟。简单的说, 将数个高变区位点(例如6-7个位点)突变, 在每个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上, 作为与每个颗粒内包装的M13基因III产物的融合物。

然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构,以鉴定抗体与抗原之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生此类变体,就如本文所述对该组变体进行筛选,可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

拮抗剂或抗体的另一类氨基酸变体改变了拮抗剂或抗体的原始糖基化样式。“改变”的意思是删除在拮抗剂或抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块,和/或添加拮抗剂或抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

多肽的糖基化典型的或是N-连接的或是O-连接的。N-连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此,多肽中这两种三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

向拮抗剂或抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利的完成(用于N-连接的糖基化位点)。所述改变还可通过向原始拮抗剂或抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于O-连接的糖基化位点)。

若拮抗剂或抗体包含Fc区,则可改变附着其上的碳水化合物。例如,美国专利申请US 2003/0157108 A1 (Presta,L.)中记载了有缺少岩藻糖的成熟碳水化合物结构附着于抗体Fc区的抗体。还可参见US 2004/0093621 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)。WO 03/011878 (Jean-Mairet et al.)和美国专利No. 6,602,684 (Umana et al.)中提到了在附着于抗体Fc区的碳水化合物中有等分N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的抗体。WO 97/30087 (Patel et al.)中报告了在附着于抗体Fc区的寡糖中有至少一个半乳糖残基的抗体。关于有更改碳水化合物附着于其Fc区的抗体还可参见WO 98/58964 (Raju,S.)和WO 99/22764 (Raju,S.)。

本文中的优选糖基化变体包含Fc区,其中附着于Fc区的碳水化合物结构缺少岩藻糖。此类变体具有改进的ADCC功能。任选的是,Fc区还包含进一

步改进ADCC的一个或多个氨基酸替代,例如Fc区位置298、333和/或334处的替代(Eu残基编号)。涉及“脱岩藻糖型”或“岩藻糖缺乏型”抗体的出版物的例子包括:美国专利申请US 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 00/61739 A1; WO 01/29246 A1; US 2003/0115614 A1; US 2002/0164328 A1; US 2004/0093621 A1; US 2004/0132140 A1; US 2004/0110704 A1; US 2004/0110282 A1; US 2004/0109865 A1; WO 03/085119 A1; WO 03/084570 A1; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)。生成脱岩藻糖化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); 美国专利申请US 2003/0157108 A1, Presta, L; 及WO 2004/056312 A1, Adams et al., 尤其是实施例11)和敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖转移酶基因*FUT8*敲除的CHO细胞(Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004))。

编码拮抗剂或抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况中),或者通过对早期制备的变体或非变体形式的拮抗剂或抗体进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。

可能希望在效应器功能方面修饰本发明的拮抗剂或抗体,例如增强拮抗剂或抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可通过在抗体拮抗剂或抗体Fc区中引入一处或多处氨基酸替代来实现。或者/另外,可在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而容许在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改良的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。参见Caron et al., *J. Exp. Med.* 176:1191-1195 (1992)和Shopes, B., *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如Wolff et al., *Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)中记载的异双功能交联剂来制备。或者,抗体可改造成具有双重Fc区,由此可具有增强的补体溶胞和ADCC能力。参见Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

WO 00/42072 (Presta, L.)记载了在存在人效应细胞时具有改良的ADCC功能的抗体,其中所述抗体在其Fc区中包含氨基酸替代。优选的是,具有改良的ADCC的抗体在Fc区的第298、333和/或334位(Eu残基编号)包含替代。

优选的是，改变的Fc区是在这些位置中的一个、两个或三个处包含替代或由其组成的人IgG1 Fc区。任选将此类替代与增加C1q结合和/或CDC的替代相联合。

WO 99/51642、美国专利No. 6,194,551 B1、美国专利No. 6,242,195 B1、美国专利No. 6,528,624 B1和美国专利No. 6,538,124 (Idusogie et al.)中记载了具有改变的C1q结合和/和补体依赖性细胞毒性(CDC)的抗体。所述抗体在其Fc区的第270、322、326、327、329、313、333和/或334位(Eu残基编号)氨基酸中的一个或多个处包含氨基酸替代。第326、327、333和/或334位处一个或多个残基的替代可改进C1q结合和/或CDC功能。

为了延长抗体的血清半衰期，可将补救受体结合表位掺入抗体(尤其是抗体片段)，如例如美国专利No. 5,739,277中所记载的。在用于本文时，术语“补救受体结合表位”指IgG分子(例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)的Fc区中负责延长IgG分子体内血清半衰期的表位。

WO 00/42072 (Presta, L.)和US2005/0014934A1 (Hinton et.al)中记载了具有改进的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合和延长的半衰期的抗体。这些抗体包含其中具有一处或多处改进Fc区对FcRn结合的替代的Fc区。例如，Fc区可在第238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428或434位(Eu残基编号)中的一个或多个处具有替代。优选的具有改进的FcRn结合的含Fc区抗体变体在其Fc区的第307、380和434位(Eu残基编号)中的一个、两个或三个处包含氨基酸替代。

还设想了具有三个或更多(优选四个)功能性抗原结合位点的工程化抗体(美国申请US 2002/0004587 A1, Miller et al.)。

V. 药用配制剂

依照本发明使用的拮抗剂或抗体的治疗用配制剂通过将具有期望纯度的拮抗剂或抗体与任选的药剂学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A.编(1980))混合,以冻干配制剂或水溶液的形式制备供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八

烷基二甲基苄基铵；氯化己烷双胺；苯扎氯铵、苯索氯铵；苯酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烷基酯，诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量(少于约10个残基)多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、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、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如EDTA；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐反荷离子，诸如钠；金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物)；和/或非离子表面活性剂，诸如TWEEN™、PLURONIC™或聚乙二醇(PEG)。

例示性的抗CD20抗体配制剂记载于WO 1998/56418中。此出版物记载了一种液体多剂配制剂，包含40mg/mL rituximab, 25mM 乙酸盐, 150mM 海藻糖, 0.9% 苯甲醇, 0.02% 聚山梨醇酯20 pH5.0, 最小保存期是在2-8°C保存两年。另一种感兴趣的抗CD20配制剂在9.0mg/mL 氯化钠, 7.35mg/mL 二水合柠檬酸钠, 0.7mg/mL 聚山梨醇酯80, 和注射用无菌水pH6.5中包含10mg/mL rituximab。

适于皮下施用的冻干配制剂记载于美国专利No. 6,267,958 (Andya et al.)。此类冻干配制剂可以用合适的稀释剂重建至高蛋白质浓度，重建的配制剂可皮下施用于本文中待治疗的受试者。

本文中的配制剂还可含有超过一种必要的活性化合物(上文提到的第二治疗药物)，优选那些活性互补且彼此没有不利影响的。此类治疗药物的类型和有效量取决于例如配制剂中存在的拮抗剂或抗体的量，以及所治疗受试者的临床参数。优选的此类治疗药物如上所述。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》，第16版，Osol,A.编(1980)。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有所述拮抗剂或抗体的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质是定型产品的形式，例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利No. 3,773,919)、L-谷氨酸与L-谷

氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯共聚物、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

VI. 制品

在本发明的另一个实施方案中,提供了含有可用于治疗如上所述的IBD的材料的制品。在一个方面,所述制品包括(a)装有结合B细胞表面标志(例如CD20)的拮抗剂(例如抗体)(任选在药剂学可接受的载体或稀释剂中)的容器;和(b)带有在人类受试者中治疗IBD的指南的包装插页。

在所有这些方面,所述包装插页位于所述容器上或与其相伴随。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。所述容器可以用各种材料诸如玻璃或塑料制成。该容器承载或容纳着可有效治疗IBD的组合物,并且可具有无菌存取口(例如该容器可以是具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管)。所述组合物中的至少一种活性剂是所述拮抗剂或抗体。所述标签或包装插页表明该组合物用于治疗符合治疗条件的人类受试者,例如患有或有倾向患上IBD,包括中度-严重IBD或UC的受试者,以及关于拮抗剂或抗体和提供的其它任何治疗药物的剂量给药量和间隔的具体指示。该制品还可包括另外的容器,其中装有药剂学可接受的稀释缓冲液,诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和/或右旋糖溶液。该制品还可包括商业和使用者立场上所需的其它物质,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

任选的是,本文中的制品还包括装有第二治疗药物的容器,其中所述抗体是第一治疗药物,所述制品还在包装插页上包含用有效量的第二治疗药物治疗受试者的指南。第二治疗药物可以是任何上文所述的那些,例示性的第二治疗药物是氨基水杨酸盐、口服皮质类固醇、6-巯基嘌呤(6-MP)和硫唑嘌呤。

下面的非限制性实施例将说明本发明的更多细节。在此明确收入本说明书引用的所有文献的公开内容作为参考。

实施例1: IBD疗法

本实施例是在患有如选择标准中定义的活动性UC的人类受试者中对rituximab的评估。基因微阵列数据已经显示,在人类UC中B细胞基因和CD20表达上调。该实施例提供了UC受试者的治疗方案。

该方案的研究计划如图4所示。

此处的疗法包括约2周的筛选期、约24周的研究期以及24周的随访期。在整个研究过程中进行严格的安全性评估。从第-14日到第0日的筛选期包括医疗史、体格检查、实验室评估、日志数据收集、及进行带活检的可屈性乙状结肠镜检查以确证活动性疾病并判定基线疾病活动性指数(DAI)得分。利用DAI得分来确定可能纳入研究的受试者并评估rituximab的临床活性。

受试者在第1日和第15日接受1克rituximab(或安慰剂)静脉内(IV)输注。所有受试者继续接受稳定剂量的一种或多种下列药物直到至少第8周(含):氨基水杨酸盐/酯、口服皮质类固醇、6-MP和/或硫唑嘌呤。在进行所有研究诊视时均进行安全性监测及定期实验室和体格检查评估。在第1日和第15日的诊视以后,受试者每4周接受定期诊视,直到第24周,然后每3个月接受定期诊视,直到第48周。此外,受试者仅于第2日和第16日返回以进行药动学(PK)取样。在第8周重复进行带活检的可屈性乙状结肠镜检查以用于组织学、疾病评估和粘膜B细胞消减的评估。在第24周另外进行一次带活检的乙状结肠镜检查以评估结肠粘膜中的病情和B细胞消减的恢复。活检样品中炎症的组织学评估结果根据标准化等级(Geboes et al., Gut 47:404-409(2000))来评分。

在第8周时计算DAI得分,以确定疾病得以缓解的受试者的比例。在第24周的诊视时也计算DAI得分。在不进行可屈性乙状结肠镜检查的诊视中(即第1和15日,以及第4、12、16、20、36和48周)进行临床评估。研究者和赞助者对受试者加以追踪,直到第48周或直到B细胞恢复(取其历时长者)为止。B细胞恢复定义为回到基线(第1日)或正常水平之下限的B细胞水平。

该实施例提供了对于rituximab在患有活动性UC的成人受试者中的安全性和耐受性的评估。主要安全性结果指标(primary safety outcome measure)是由方案确定的UC加剧(疾病恶化)的目标事件的频率。

B细胞评估持续进行至第48周或B细胞恢复(取其历时长者)为止。

该实施例还利用如下文定义的DAI评分系统来评估rituximab在UC中的

治疗临床活性。在关键性临床试验中已经使用了用于评估UC活性的DAI评分系统(Schroeder et al., N Engl J Med 317:1625-1629 (1987))。已选择活动性疾病的体征和症状的缓解(表现为直肠出血的停止和脆性粘膜的痊愈)作为临床活性的次要终点。还测量缓解的持续时间。第24周时的可屈性乙状结肠镜检查结果和DAI得分以及到第48周为止的临床随访使评估治疗效果的持续时间成为可能。

结果指标

主要安全性结果指标

主要安全性结果指标是在研究期间(第1日到第24周)发生的方案定义的UC加剧的目标不良事件频率。

方案定义的UC加剧必须满足下列标准中的一项或多项:

- DAI得分增加 ≥ 3 分
- 疑似或临近中毒性巨结肠
- 由于UC加剧需要入院
- 据研究者的临床判断,疾病发生医学上显著的恶化

次要结果指标

次要结果指标如下所述:

- 其它安全性结果指标
- 严重感染的发生率,严重感染定义为需要入院或IV抗生素的感染
- 根据国立癌症研究所不良事件通用毒性标准(National Cancer Institute Common Toxicity Criteria of Adverse Events, NCI-CTCAE) 3.0版本分级的所有不良事件(严重和不严重)的发生率
- 临床实验室异常的发生率
- 在第8周实现疾病缓解的受试者的比例
- 疾病缓解定义为乙状结肠镜检查得分为0或1(无脆性)及直肠出血得分为0
- 在第8周实现临床响应的受试者的比例
- 临床响应定义为DAI得分减少 ≥ 3 分
- 疾病缓解前时间
- 由研究者确定的疾病缓解持续时间

- 研究期间内炎性肠病问卷调查 (IBDQ) 结果相对于基线的变化

通过比较基线处和治疗过程中的血液、血清和组织样品来检查rituximab对数种药效学标志的影响。这些评估如下:

- 血液淋巴细胞组分析(panel)连带B细胞计数 (CD19+和其它B细胞表型亚类)
- 血清Ig水平 (总的、IgA、IgG和IgM)
- 对UC特异的抗体 (p-ANCA)
- 如免疫组织化学 (IHC) 所测定的结肠活检中的B细胞消减

受试者

选择标准

受试者必须满足下列标准方符合加入研究的条件:

- 书面知情同意
- 年龄为18-75岁并能够理解研究规程
- 筛选时 ≥ 6 个月的UC诊断
- 筛选性乙状结肠镜检查时 ≥ 20 cm的活动性疾病
- 活动性疾病, 定义为筛选时DAI得分 ≥ 6 且 ≤ 11 , 且直肠出血 ≥ 2 , 可屈性乙状结肠镜检查 ≥ 2
- 筛选前2年内口服皮质类固醇治疗UC
- 治疗强度应等于或大于持续至少2周时间的20mg/日的泼尼松等效剂量
- 过去2年内进行过结肠镜检查以检查疾病的程度并排除息肉
- 如果UC疾病 > 10 年, 则在筛选前1年内进行过结肠镜检查连带合适的活检以排除发育异常
- 对于有生育潜力的受试者 (男性和女性), 在研究治疗过程中及最后一剂研究药物之后一年内使用可靠的避孕手段 (例如激素避孕药、贴片 (patch)、阴道环、宫内避孕器、物理屏障)
- 在随机化之前至少15周停用所有先前的研究性生物学疗法 (例如依那西普 (etanercept)、英夫利昔单抗 (infliximab)、阿达木单抗 (adalimumab)、利妥昔单抗 (rituximab))
- 当前正使用下列的一种或多种疗法以稳定剂量进行治疗, 该治疗在基线 (第1日) 之前已进行了示出的时间:

氨基水杨酸盐/酯，稳定剂量 ≥ 3 周

口服皮质类固醇，稳定剂量 ≥ 2 周

6-MP治疗3个月时间，其中稳定剂量 ≥ 4 周

硫唑嘌呤治疗3个月时间，其中稳定剂量 ≥ 4 周

- 对于第1日之前使用过上面所列的疗法但第1日当时未使用的，受试者在基线之前需要接受不连续的氨基水杨酸盐/酯 ≥ 2 周，接受不连续的硫唑嘌呤治疗、6-MP治疗或口服皮质类固醇 ≥ 4 周

排除标准

满足下列任一标准的受试者被排除在研究之外：

- 严重结肠炎，表现为在距基线（第1日）12周内研究者判断该受试者可能需要接受结肠切除术或启用钙依赖磷酸酶抑制剂
- 临床疑似结肠穿孔或中毒性巨结肠，或者有X线照片证据
- 有原发性硬化性胆管炎病史
- 有结肠发育不良和/或结肠内腺瘤性息肉病史
- 在筛选前8周内用环孢菌素、他克莫司、西罗莫司、甲氧蝶呤或麦考酚酸吗乙酯治疗过
- 在筛选前2周内用表面结肠制剂治疗过
- 在基线前4周内使用过除低剂量阿司匹林外的非类固醇抗炎药（NSAID）
- 筛选时大便为卵或寄生虫阳性、大便培养物为病原体阳性、或者大便的艰难梭菌(*Clostridium difficile*)毒素测定为阳性
- 在随机化前4周内用任何活疫苗处理过/接受过任何活疫苗
- 先前接受过任何非生物学细胞消减疗法诸如ADACOLUMN®
- 有结肠或小肠梗阻或切除史
- 在筛选期使用了止泻剂
- 有乙型或丙型肝炎病史

一般安全性排除

- 对人源化抗体、嵌合抗体或全人源抗体或鼠单克隆抗体有严重变应或过敏反应史
- 显著的心或肺疾病（包括阻塞性肺病）
- 显著的未受控制的伴发疾病诸如心血管疾病或神经系统、肺、肾、肝、内分泌或胃肠病症的证据

- 在距筛选4周内需要入院或IV抗生素治疗或者在距筛选2周内需要口服抗生素的已知活动性细菌、病毒、真菌、分枝杆菌或者其它感染（包括结核或非典型分枝杆菌病，但不包括甲床真菌感染）或感染严重发作
- 复发的显著感染或复发的细菌感染史
- 原发性或继发性免疫缺陷（有病史或正在活动中），包括HIV
- 癌症史，包括实体瘤和血液学恶性肿瘤(hematologic malignancies)（已切除和治愈的皮肤基底细胞和鳞状细胞癌除外）
- 孕妇或哺乳（母乳喂养）的母亲
- 筛选前6个月内有酒精、药品或化学品滥用史
- 缺少外周静脉通路

实验室排除标准（筛选时）

- 血清肌酸酐 >1.4 mg/dL（对女性）或 ≥ 1.6 mg/dL（对男性）
- 天冬氨酸氨基转移酶(AST)或丙氨酸氨基转移酶(ALT) $>$ 正常上限2.5倍
- 血小板计数 $<100,000/\mu\text{L}$
- 血红蛋白 <8.5 g/dL
- 嗜中性粒细胞 $<1500/\mu\text{L}$
- 淋巴细胞计数 $<100/\mu\text{L}$
- 乙型或丙型肝炎血清学阳性
- IgG <5.65 mg/mL
- IgM <0.55 mg/mL
- B细胞计数 $\leq 1.1\%$
- 心电图(ECG)显示显著的心脏异常，研究负责人判定其可能危及参与此项研究的受试者的健康

研究处理

配制

将rutuximab配制为9.0mg/mL 氯化钠、0.7mg/mL 聚山梨醇酯80、7.35mg/mL 脱水柠檬酸钠和注射用无菌水(pH 6.5)中的无菌产品供IV施用。抗体在10mL和50mL小瓶中以10.0mg/mL的浓度供应市场使用。10mL小瓶包含100mg抗体。50mL小瓶包含500mg抗体。没有使用防腐剂，因为该小瓶是设计为一次性使用的。对研究地点供应50mL小瓶装的500mg rituximab和

50mL小瓶装的相匹配的安慰剂。

剂量，施用和保存

研究处理由第1日和第15日IV施用的1g rituximab或相当量的安慰剂构成。每次输注开始前30-60分钟，受试者接受口服对乙酰氨基酚(1g)和盐酸苯海拉明(50mg)或其等效物的预防性处理。根据研究者的决定，受试者可入院观察，特别是他们接受第一次输注时。rituximab的施用必须在严密监控下进行，且必须准备好全套复苏设施待用。如果在第二次输注前发生方案定义的UC加剧，那么暂停第二次输注。

输注用rituximab溶液可在2°C-8°C (36°F-46°F) 稳定24小时，在室温还可稳定24小时。不要在印于纸盒上的到期日之后使用。尚未观察到rituximab与聚氯乙烯或聚乙烯袋之间有不相容性。

伴随及排除的疗法

在基线（第1日）之前，所有受试者接受剂量稳定的氨基水杨酸盐/酯、口服皮质类固醇、6-MP和/或硫唑嘌呤，在基线前的时程不定。受试者在整个研究过程和随访期中应继续使用其恒定剂量的氨基水杨酸盐/酯、6-MP和/或硫唑嘌呤。如果医学上可接受，口服皮质类固醇应保持稳定直到第8周后。第8周后如果医学上有需要，应开始逐渐减少。

除了下述的情况外，针对除UC外的疾患的疗法可以继续进行。从第-28日到研究期结束禁止使用活病毒或细菌疫苗。这些疫苗可包括但不限于麻疹、腮腺炎、风疹、脊髓灰质炎、卡介苗、黄热病和TY21a伤寒。不含活生物体的疫苗（例如流感、Pneumovax®、破伤风）不受禁止，但可能无效。建议检查受试者的接种记录和可能的要求，并且，如果需要，在开始研究药物治疗前至少28天给予任何必须的接种/加强。

在距筛选8周之内及研究过程中禁用环孢菌素、他克莫司、西罗莫司、甲氨蝶呤或麦考酚酸吗乙酯治疗。研究者可以决定使用环孢菌素的任何配制剂作为方案定义的UC加剧的救援用药。如果第8周前需要救援用药，受试者被视为非响应者，但继续进行预定的研究诊视。

研究期间其它排除的用药如下：

- 用于治疗UC的抗生素

可以使用抗生素治疗医疗上需要治疗的感染，但不能用作UC疗法。

- NSAID, 除了用于心血管预防的低剂量阿斯匹林外
- UC的表面直肠疗法
- 止泻药
- 轻泻药
- 胆汁酸结合剂诸如考来烯胺(cholestyramine)
- 禁止使用试验药或试验处理

测定方法

在根据评估计划的时间点获取血清样品用于PK和HACA分析。

使用rituximab PK酶联免疫吸附测定法(ELISA)来测量人血清样品中的rituximab水平。

rituximab HACA ELISA是一种桥连测定法(bridging assay), 使用rituximab作为捕捉试剂, 使用生物素化rituximab和链霉亲和素-HRP进行检测。该测定法使用以亲和纯化的多克隆山羊抗rituximab抗体制作的校正曲线; 因此, 该测定的结果以相对于这种多克隆抗体的相对单位报道。

所有p-ANCA分析由中心实验室来进行。使用间接免疫荧光来确定ANCA的存在。另外, 可使用ELISA测定法来测定ANCA针对髓过氧化物酶或该中心实验室确定的其它相关抗原的特异性。

临床活性分析

评估rituximab在UC中的临床活性。对每个处理组, 估计第8周时正经历疾病缓解的受试者的比例和具有临床响应的受试者的比例, 并生成相应的95%置信区间。提供处理差异和95%置信区间。

按处理组总结疾病缓解持续时间。仅为说明的目的, 使用Kaplan-Meier方法总结每个处理组的疾病缓解响应前中值时间。

如上所述用rituximab抗体治疗的患有活动性UC的受试者经历UC体征和症状的改善, 包括疾病缓解和/或临床响应(不迟于第8周实现)、乙状结肠镜检查得分达到0或1且直肠出血得分达到0、DAI得分减少(减少多于或等于3分)、结肠粘膜中B细胞减少、和/或p-ANCA抗体水平降低。

从上文可以领会, 尽管本文为了举例说明的目的描述了本发明的具体实施方案, 可以在不偏离本发明精神和范围的同时作出各种修改。因此, 本发明仅由所附权利要求所限制。

<110> 健泰科生物技术公司 (Genentech Inc.)
Gujrathi, Sheila

<120> 用抗 CD20 抗体治疗炎性肠病 (IBD) 的方法

<130> P2211R1

<141> 2006-04-13

<150> US 60/671,902

<151> 2005-04-15

<160> 24

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 1

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
20 25 30

Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
35 40 45

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

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

Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
80 85 90

Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
95 100 105

Lys Arg

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此序列是合成的

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 4
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 5
 Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 6
 Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr
 5

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 7

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

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

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

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
65 70 75

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

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

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

Ser Ser

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
 95 100 105
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 10
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 5 10

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 11
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 12
 Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

<210> 13
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此序列是合成的

<400> 13
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45

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

Gly Glu Cys

<210> 14
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此序列是合成的

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly Lys

<210> 15

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 140 145 150

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
 155 160 165

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
 170 175 180

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 185 190 195

Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 200 205 210

Gly Glu Cys

<210> 16

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 16

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

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

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

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

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Tyr Arg
 95 100 105
 Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 110 115 120
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 125 130 135
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 140 145 150
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435

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

Gly Lys

<210> 17

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

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

Gly

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此序列是合成的

<400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
 20 25 30
 Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 80 85 90
 Ala Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 95 100 105

Lys Arg

<210> 19
 <211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 20

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 155 160 165
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 170 175 180
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190 195
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 200 205 210
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 215 220 225
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 320 325 330
 Ala Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 335 340 345
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 350 355 360
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 365 370 375
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 380 385 390
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 395 400 405
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 410 415 420
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 425 430 435
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 440 445 450

Gly

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<220>
 <221> Xaa
 <222> 9
 <223> Xaa 是 M 或 L

 <400> 21
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
 5 10

 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 此序列是合成的

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 4
 <223> Xaa 是 S 或 A

 <400> 22
 Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
 5

 <210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 此序列是合成的

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 8
 <223> Xaa 是 D 或 A

 <400> 23
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Xaa Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 1 5 10 15

 Lys Gly

 <210> 24
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 此序列是合成的

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 6
 <223> Xaa 是 N、A、Y、W 或 D

 <220>
 <221> Xaa
 <222> 7
 <223> Xaa 是 S 或 R

 <400> 24
 Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 5 10

轻链可变区的序列比对

	FR1	CDR1	
	10	20	30
2H7	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
	* * * *	**	* * * *
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASSSVS-YMH]	WYQQKP
		* * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP
	FR2	CDR2	FR3
	50	60	70
2H7	GSSPKPWIY	[APSNLAS]	GVPARFSGSGSGTSLTISRVEA
	** *	*	*** ****
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	[APSNLAS]	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP
	*	***	
hum KI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQP
	CDR3	FR4	
	90	100	
2H7	EDAATYYC	[QQWSFNPPT]	FGAGTKLELKR
	*		* * *
hu2H7.v16	EDFATYYC	[QQWSFNPPT]	FGQGTKVEIKR
		**** *	
hum KI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKR

图 1A

重链可变域的序列比对

	FR1	CDR1	
	10 20	30 40	
2H7	QAYLQQSGAELVVRPGASVKMSCKAS	[GYTFTSYNMH]	WVKQT
	*** ** * * *** *		* *
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFTSYNMH]	WVRQA
		* * * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GTFSSYAMS]	WVRQA
	FR2	CDR2	FR3
	50 a 60	70 80	
2H7	PRQGLEWIG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM
	** *		** ** * * *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL
	* * **** * * ****		* *
hum III	PGKGLEWVA	[VISGGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLTL
	CDR3	FR4	
	abc 90 100abcde	110	
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGTGTTVTVSS
	** ** * *		*
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGQGLVTVSS
		***** * * *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGLVTVSS

图 1B

轻链比对

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	*****	*****
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	
	*****	*****
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	*****	*****
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	*****	*****
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	

hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

图 2

重链比对

```

1
hu2H7.v16 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW
*****
hu2H7.v511 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW

37          52a          82abc
hu2H7.v16 VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL
*****
hu2H7.v511 VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL

83          100abcde          113
hu2H7.v16 RAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFYFDVWGQGTLVTVSS
*****
hu2H7.v511 RAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGTLVTVSS

118
hu2H7.v16 ASTKGPSVFPLAPS
*****
hu2H7.v511 ASTKGPSVFPLAPS

132
hu2H7.v16 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
*****
hu2H7.v511 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS

182
hu2H7.v16 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
*****
hu2H7.v511 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA

232
hu2H7.v16 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
*****
hu2H7.v511 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG

282
hu2H7.v16 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
*****
hu2H7.v511 VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNAAALPAP

332
hu2H7.v16 IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
* *****
hu2H7.v511 IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW

382
hu2H7.v16 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMHEA
*****
hu2H7.v511 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNMFSCSVMHEA

432          447
hu2H7.v16 LHNHYTQKSLSLSPGK
*****
hu2H7.v511 LHNHYTQKSLSLSPGK

```

图 3

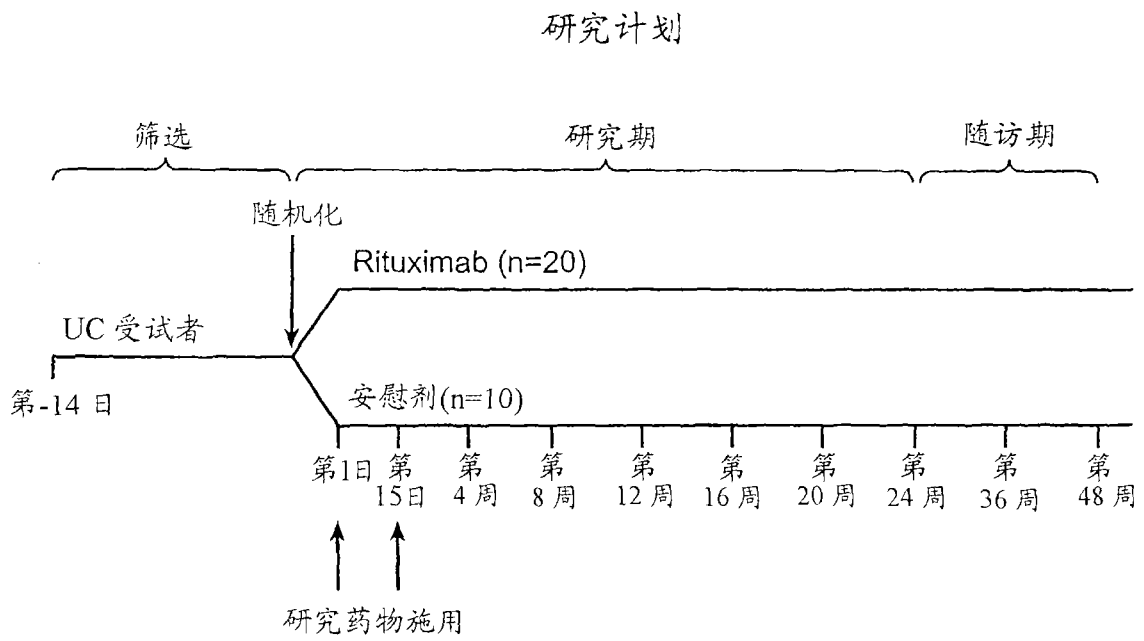


图 4