



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107592812 A

(43)申请公布日 2018.01.16

(21)申请号 201680026687.3

(22)申请日 2016.05.10

(30)优先权数据

62/159,876 2015.05.11 US

62/300,052 2016.02.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/031683 2016.05.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/183104 EN 2016.11.17

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 P·布鲁内塔

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 柴云峰 黄革生

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 13/12(2006.01)

A61P 37/02(2006.01)

权利要求书4页 说明书62页

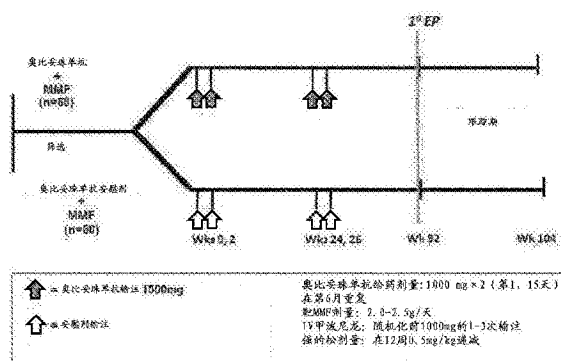
序列表14页 附图17页

(54)发明名称

治疗狼疮性肾炎的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的方法。在一些实施方案中，所述方法包括向个体施用有效量的II型抗CD20抗体。本发明还提供了治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的方法。在一些实施方案中，所述方法包括施用有效量的抗CD20抗体。



1. 一种治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎的进展的方法,包括向所述个体施用对II型抗CD20抗体的至少第一次抗体暴露和对II型抗-CD20抗体的第二次抗体暴露,第二次抗体暴露在第一次抗体暴露后约18周至约26周才提供;

其中所述第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第一次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg所述II型抗-CD20抗体的总暴露;

其中所述第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第二次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg所述II型抗CD20抗体的总暴露;和

其中II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链。

2. 权利要求1的方法,其中所述第一次抗体暴露包括约900mg至约1100mg的II型抗CD20抗体的第一剂量和约900mg至约1100mg的II型抗-CD20抗体的第二剂量。

3. 权利要求1或权利要求2的方法,其中所述第一次抗体暴露包括第一剂量的II型抗CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且其中第一次抗体暴露的第二剂量在第一次抗体暴露的第一剂量后约1.5周至约2.5周才提供。

4. 权利要求3的方法,其中所述第一次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗CD20抗体,并且其中第一次抗体暴露的第二剂量在第一次抗体暴露的第一剂量后约2周才提供。

5. 权利要求3或权利要求4的方法,其中第一次抗体暴露的第一剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。

6. 权利要求3-5中任一项的方法,其中第一次抗体暴露的第二剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。

7. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述第二次抗体暴露包括约900mg至约1100mg的所述II型抗CD20抗体的第一剂量和约900mg至约1100mg的所述II型抗CD20抗体的第二剂量。

8. 权利要求1-7中任一项的方法,其中所述第二次抗体暴露包括第一剂量的II型抗CD20抗体和第二剂量的II型抗CD20抗体,并且其中第二次抗体暴露的第二剂量在第二次抗体暴露的第一剂量后约1.5周至约2.5周才提供。

9. 权利要求8的方法,其中所述第二次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且其中第二次抗体暴露的第二剂量在第二次抗体暴露的第一剂量后约2周才提供。

10. 权利要求8或9的方法,其中第二次抗体暴露的第一剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。

11. 权利要求8-10中任一项的方法,其中第二次抗体暴露的第二剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。

12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中静脉内施用第一次抗体暴露和第二次抗体暴露。

13. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述个体具有III类或IV类狼疮性肾炎。

14. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述个体处于发展III类或IV类狼疮性肾炎的

风险中。

15. 一种治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的方法, 包括向所述个体施用有效量的II型抗CD20抗体; 其中II型抗CD20抗体包含: 包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列, SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链, 以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列, SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链; 并且其中个体具有III类或IV类狼疮性肾炎。

16. 权利要求14的方法, 其中静脉内施用所述II型抗CD20抗体。

17. 权利要求1-16中任一项的方法, 其中所述个体不具有III类(C) 或IV类(C) 狼疮性肾炎。

18. 权利要求1-17中任一项的方法, 其中所述个体具有V类狼疮性肾炎。

19. 权利要求1-18中任一项的方法, 还包括向所述个体施用有效量的免疫抑制剂。

20. 权利要求19的方法, 其中所述免疫抑制剂包括霉酚酸、其衍生物或其盐。

21. 权利要求20的方法, 其中所述免疫抑制剂包括霉酚酸酯。

22. 权利要求1-21中任一项的方法, 还包括向所述个体施用有效量的糖皮质激素或皮质类固醇。

23. 权利要求22的方法, 其中所述糖皮质激素或皮质类固醇包括甲泼尼龙。

24. 权利要求22的方法, 其中所述糖皮质激素或皮质类固醇包括强的松。

25. 权利要求1-24中任一项的方法, 还包括向所述个体施用有效量的抗组胺药。

26. 权利要求25的方法, 其中所述抗组胺药包括苯海拉明。

27. 权利要求1-26中任一项的方法, 还包括向所述个体施用有效量的非甾体抗炎药(NSAID)。

28. 权利要求27的方法, 其中所述NSAID包括对乙酰氨基酚。

29. 权利要求1-28中任一项的方法, 还包括向所述个体施用有效量的抗高血压剂。

30. 权利要求29的方法, 其中所述抗高血压剂是血管紧张肽转化酶(ACE) 抑制剂或血管紧张肽受体阻断剂。

31. 权利要求1-30中任一项的方法, 还包括向所述个体施用护理标准治疗。

32. 权利要求31的方法, 其中所述护理标准治疗包括用血管紧张肽转化酶(ACE) 抑制剂、血管紧张肽受体阻断剂、环磷酰胺、霉酚酸酯、硫唑嘌呤和糖皮质激素或皮质类固醇中的一种或多种进行治疗。

33. 权利要求1-32中任一项的方法, 其中所述方法导致个体中的完全肾反应(CRR)。

34. 权利要求1-33中任一项的方法, 其中所述方法导致个体中循环的外周B细胞的消耗。

35. 权利要求34的方法, 其中所述循环的外周B细胞是CD19+B细胞。

36. 权利要求1-35中任一项的方法, 其中所述II型抗CD20抗体是人源化或人抗体。

37. 权利要求1-36中任一项的方法, 其中所述II型抗-CD20抗体是无岩藻糖基化的。

38. 权利要求1-37中任一项的方法, 其中所述II型抗CD20抗体的重链包括: 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区。

39. 权利要求1-38中任一项的方法, 其中所述II型抗CD20抗体的轻链包括: 包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。

40. 权利要求1-39中任一项的方法,其中所述II型抗-CD20抗体是奥比妥珠单抗。
41. 权利要求1-40中任一项的方法,其中所述个体是人。
42. 一种治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的药盒,包含:
- (a) 包含II型抗CD20抗体的容器,其中II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链;和
- (b) 包装插页,其具有用于治疗或延缓个体中狼疮性肾炎进展的说明书,其中说明书指示至少向所述个体施用对II型抗CD20抗体的第一次抗体暴露和对II型抗CD20抗体的第二次抗体暴露,第二次抗体暴露在第一次抗体暴露后约18周至约26周才提供;其中所述第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第一次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg所述II型抗-CD20抗体的总暴露;并且其中所述第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第二次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg所述II型抗-CD20抗体的总暴露。
43. 权利要求42的药盒,还包括容器,所述容器包括:
- (c) 第二药物,其中II型抗-CD20抗体是第一药物;和
- (d) 用于向受试者施用第二药物的包装插页上的说明。
44. 权利要求43的药盒,其中所述第二药物是免疫抑制剂、糖皮质激素、皮质类固醇、抗疟剂、细胞毒性剂、整联蛋白拮抗剂、细胞因子拮抗剂或激素。
45. 一种治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的药盒,包含:
- (a) 包含II型抗CD20抗体的容器,其中II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链;和
- (b) 具有治疗或延缓个体中III类或IV类狼疮性肾炎进展的说明书的包装插页。
46. 权利要求45的药盒,还包括容器,所述容器包含:
- (c) 第二药物,其中II型抗-CD20抗体是第一药物;和
- (d) 用于向受试者施用第二药物的包装插页上的说明。
47. 权利要求46的药盒,其中所述第二药物是免疫抑制剂、糖皮质激素、皮质类固醇、抗疟剂、细胞毒性剂、整联蛋白拮抗剂、细胞因子拮抗剂或激素。
48. 一种治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的方法,包括向个体施用有效量的抗CD20抗体,其中所述抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链可变区,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链可变区。
49. 权利要求47的方法,其中静脉内施用所述抗体。
50. 权利要求47或48的方法,其中所述方法导致个体中循环的外周B细胞的消耗。
51. 权利要求49的方法,其中循环的外周B细胞是CD19+B细胞。
52. 权利要求47-50中任一项的方法,其中所述抗体是人源化抗体或人抗体。
53. 权利要求47-51中任一项的方法,其中所述抗体是无岩藻糖基化的。
54. 权利要求47-52中任一项的方法,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸

序列。

55. 权利要求47-53中任一项的方法,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

56. 权利要求47-54中任一项的方法,其中所述抗体是奥比妥珠单抗。

57. 权利要求47-54中任一项的方法,其中所述抗体包含修饰的Fc区。

58. 权利要求56的方法,其中所述Fc区包含用于衰减效应子功能的修饰。

59. 权利要求56的方法,其中所述Fc区是人IgG1Fc区。

60. 权利要求58的方法,其中所述Fc区包含根据EU指数编号的L234A、L235A和P329G氨基酸取代。

61. 权利要求48-60中任一项的方法,其中所述个体是人。

治疗狼疮性肾炎的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年5月11日提交的美国临时申请序列号62/159,876和2016/2月25日提交的62/300,052的优先权;其各自通过整体引用并入本文。

[0003] 以ASCII文本文件提交序列列表

[0004] 以下以ASCII文本文件提交的内容通过整体引用并入本文:序列列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:146392032240SeqList.txt,记录日期:2016年5月5日,大小:37KB)。

技术领域

[0005] 本文提供了通过施用II型抗CD20抗体来治疗或延缓具有狼疮的个体中狼疮性肾炎进展的方法。本文还提供了通过施用抗CD20抗体治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的方法。

背景技术

[0006] 狼疮是涉及攻击结缔组织的抗体的自身免疫性疾病。估计这种疾病影响近一百万美国人,主要是年龄在20-40岁之间的妇女。狼疮的主要形式是系统性的(系统性红斑狼疮;SLE)。SLE在年龄20-60岁之间的发生率为700名妇女中约1名。SLE能够影响任何器官系统,并且能够导致严重的组织损伤。未经治疗的狼疮可能是致命的,因为它从攻击皮肤和关节发展到包括肺、心脏和肾脏在内的器官,其中肾脏疾病(称为狼疮性肾炎)是主要关注的。狼疮主要表现为一系列爆发,间歇期有很少或没有疾病表现。

[0007] LN是与SLE中致病性相关的最严重的损伤区域之一,并且占该疾病的死亡率和发病率的至少50%。目前,已经诊断为SLE或LN的患者没有真正的治愈性治疗。从实践的角度来看,医生通常采用许多强大的免疫抑制药物,例如大剂量皮质类固醇,例如强的松或硫唑嘌呤或环磷酰胺,它们在爆发期间给予,但也可以持续给予经历经常频繁爆发的人。即使具有减少症状并延长寿命的有效治疗,许多这些药物对被治疗的患者具有潜在的有害副作用。因此,仍然需要对LN具有较少的有害副作用的更有效的治疗。

[0008] 已经在用于治疗狼疮性肾炎的功效的临床研究中测试了两种抗CD20抗体。I型抗CD20抗体-利妥昔单抗未能满足其总反应的主要终点(针对完全肾反应或CRR加权),但导致部分肾反应(PRR)增加了15.3%(Rovin,BH等人,(2012) Arthritis Rheum.64:1215-1226)。另一种I型抗CD20抗体-奥瑞珠单抗因为严重感染事件的不平衡而被部分终止(Mysler,E.F.等人,(2013) Arthritis Rheum.65:2368-2379)。

[0009] 与利妥昔单抗相比,II型抗-CD20抗体-奥比妥珠单抗(obinutuzumab)已显示出产生优良的B细胞消耗。与利妥昔单抗治疗相比,用奥比妥珠单抗处理在食蟹猴中观察到明显更大的B细胞消耗(Mössner,E.等人,(2010) Blood 115:4393-4402)。因此,仍然需要测试II型抗CD20抗体在治疗或预防狼疮患者中的功效。

[0010] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请和出版物,通过整体引用并入本文。

[0011] 发明概述

[0012] 在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓个体中狼疮性肾炎进展的方法,其包括向所述个体施用对于II型抗CD20抗体的至少第一次抗体暴露和对于II型抗CD20抗体的第二次抗体暴露。在一些实施方案中,个体具有狼疮。在一些实施方案中,直到第一次抗体暴露后约18周至约26周,才提供第二次抗体暴露。在一些实施方案中,直到第一次抗体暴露后约4.5个月至约6.5个月才能提供第二次抗体暴露。在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第一次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗-CD20抗体,第二次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg的II型抗-CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链。在一些实施方案中,个体处于发展III类或IV类狼疮性肾炎的风险中。在一些实施方案中,所述方法用于预防具有狼疮的个体中的狼疮性肾炎。在一些实施方案中,所述方法用于在具有SLE的个体中预防狼疮性肾炎。在一些实施方案中,所述方法用于治疗或延缓具有SLE的个体的狼疮性肾炎的进展。

[0013] 在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且第一次抗体暴露的第二剂量直到从在第一次抗体暴露的第一剂量后约1.5周至约2.5周才提供。在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且第一次抗体暴露的第二剂量直到第一次抗体暴露的第一剂量后约2周才提供。在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗CD20抗体,并且第二剂量的第一剂抗体暴露直到第一次抗体暴露的第一剂量后约10天至约17天才提供。在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且第一次抗体暴露的第二剂量直到第一次抗体暴露的第一剂量后约14天才提供。在一些实施方案中,第一次抗体暴露的第一剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,第一次抗体暴露的第二剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括II型抗CD20抗体的约900mg至约1100mg之间的第一剂量和II型抗-CD20抗体的约900mg至约1100mg之间的第二剂量。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且第二次抗体暴露的第二剂量直到第二次抗体暴露的第一剂量后约1.5周至约2.5周才提供。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括第一剂量的II型抗CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且第二次抗体暴露的第二剂量直到第二次抗体暴露的第一剂量后约2周才提供。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且第二次抗体暴露的第二剂量直到第二次抗体暴露的第一剂量后约10天至约17天才提供。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括第一剂量的II型抗-CD20抗体和第二剂量的II型抗-CD20抗体,并且第二次抗体暴露的第二剂量直到第二次抗体暴露的第一剂量后约14天才提供。在一些实施方案中,第二次抗体暴露的第一剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,第二次抗体暴露的第二剂量为约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,静脉内施用第一次抗体暴露和第二次抗体暴露。在一些实施方案中,个体具有III类或IV类狼疮性肾炎。在一些实施方案中,个体处于发展III类或IV类狼疮性肾炎的风险中。

[0014] 在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的方法,包括向所述个体施用有效量的II型抗-CD20抗体;其中II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链;并且其中个体具有III类或IV类狼疮性肾炎。在一些实施方案中,个体处于发展III类或IV类狼疮性肾炎的风险中。在一些实施方案中,所述方法用于预防具有狼疮的个体中的狼疮性肾炎。在一些实施方案中,所述方法用于在具有SLE的个体中预防狼疮性肾炎。在一些实施方案中,所述方法用于治疗或延缓具有SLE的个体的狼疮性肾炎的进展。

[0015] 在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的方法,其包括向个体施用约1000mg的剂量的II型抗CD20抗体,其中II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链和包含SEQ ID NO:4的HVR-L1的序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链,并且其中该剂量在第1、15、168和128天施用于个体。在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的方法,其包括向个体施用约1000mg的剂量的II型抗CD20抗体,其中II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:1的HVR-H2序列,SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链,并且其中该剂量在0、2、24和26周施用于个体。在一些实施方案中,第0周对应于第1天。在一些实施方案中,个体具有III类或IV类狼疮性肾炎。在一些实施方案中,II型抗CD20抗体是奥比妥单抗。

[0016] 在任何上述实施方案的一些实施方案中,静脉内施用II型抗CD20抗体。在任何上述实施方案的一些实施方案中,个体不具有III类(C)或IV类(C)狼疮性肾炎。在任何上述实施方案的一些实施方案中,个体具有V类狼疮性肾炎。在任何上述实施方案的一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的免疫抑制剂。在一些实施方案中,免疫抑制剂包括霉酚酸、其衍生物或其盐。在一些实施方案中,免疫抑制剂包括霉酚酸酯。在任何上述实施方案的一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的糖皮质激素或皮质类固醇。在一些实施方案中,糖皮质激素或皮质类固醇包括甲泼尼龙。在一些实施方案中,糖皮质激素或皮质类固醇包括泼尼松。在任何上述实施方案的一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的抗组胺药。在一些实施方案中,抗组织胺包括苯海拉明。在任何上述实施方案的一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的非甾体抗炎药(NSAID)。在一些实施方案中,NSAID包括对乙酰氨基酚。在任何上述实施方案的一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用护理标准治疗。在一些实施方案中,护理标准治疗包括用血管紧张肽转化酶(ACE)抑制剂,血管紧张肽受体阻断剂,环磷酰胺,霉酚酸酯,硫唑嘌呤和糖皮质激素或皮质类固醇中的一种或多种进行治疗。在一些实施方案中,在对II型抗CD20抗体的第一次抗体暴露之后和/或在对II型抗-CD20抗体的第二次抗体暴露之后施用护理标准治疗。在任何上述实施方案的一些实施方案中,所述方法还包括向个体施用有效量的抗高血压药。在一些实施方案中,抗高血压药是血管紧张肽转化酶(ACE)抑制剂或血管紧张肽受体阻断剂。在任何上述实施方案的一些实施方案中,该方法导致个体中的完全肾反应(CRR)。在任何上述实施方案的一些实施方案中,该方法导致个体中循环的外周B细胞的消耗。在一些实施方案中,循环的外周B细胞是CD19⁺ B细胞。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II

型抗CD20抗体是人源化或人抗体。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II型抗-CD20抗体是非岩藻糖基化的。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II型抗CD20抗体是非岩藻糖基化的(例如,如美国专利号8,883,980中所述)。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II型抗CD20抗体的重链包括:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II型抗CD20抗体的轻链包括:包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II型抗CD20抗体是奥比妥珠单抗。在任何上述实施方案的一些实施方案中,个体或患者是人。

[0017] 在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的药盒或制品,包括:(a) 包括II型抗-CD20抗体的容器,其中II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链和包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链;和(b) 具有用于治疗或延缓个体中狼疮性肾炎进展的说明书的包装插页,其中说明书指示将对于II型抗CD20抗体的至少第一次抗体暴露和对于II型抗CD20抗体的第二次抗体暴露施用于个体,第二次抗体暴露在第一次抗体暴露后约18周至约26周后才提供;其中所述第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第一次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg的II型抗-CD20抗体的总暴露;并且其中所述第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第二次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg的II型抗-CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,药盒或制品还包括(c) 第二药物,其中II型抗CD20抗体是第一药物;和(d) 用于将第二药物施用于受试者的包装插页的说明。在一些实施方案中,第二药物是免疫抑制剂、糖皮质激素、皮质类固醇、抗疟剂、细胞毒性剂、整联蛋白拮抗剂、细胞因子拮抗剂或激素。在一些实施方案中,II型抗CD20抗体的重链包括:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,II型抗CD20抗体的轻链包括:包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,II型抗CD20抗体是奥比妥珠单抗。在一些实施方案中,药盒或制品用于在具有SLE的个体中预防狼疮性肾炎。在一些实施方案中,药盒或制品用于治疗或延缓具有SLE的个体的狼疮性肾炎的进展。

[0018] 在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的方法,包括向个体施用有效量的抗CD20抗体,其中抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链可变区,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链可变区。在一些实施方案中,静脉内施用抗体。在一些实施方案中,该方法导致个体中循环的外周B细胞的消耗。在一些实施方案中,循环的外周B细胞是CD19⁺ B细胞。在一些实施方案中,抗体是人源化或人抗体。在一些实施方案中,抗体是非岩藻糖基化的。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体是奥比妥珠单抗。在一些实施方案中,抗体包含修饰的Fc区。在一些实施方案中,Fc区包括用于衰减效应子功能的修饰。在一些实施方案中,Fc区是人IgG1 Fc区。在一些实施方案中,人IgG1 Fc区包括根据EU指数编号的L234A、L235A和P329G氨基酸取代。在任何上述实施方案的一些实施方案中,个体或患者是人。

[0019] 在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的组合物,所述组合物包括抗CD20抗体,其中所述抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链可变区,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链可变区。在一些实施方案中,静脉内施用组合物。在一些实施方案中,施用组合物导致个体中循环外周B细胞的消耗。在一些实施方案中,循环的外周B细胞是CD19⁺ B细胞。在一些实施方案中,抗体是人源化或人抗体。在一些实施方案中,抗体是非岩藻糖基化的。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体是奥比妥珠单抗。在一些实施方案中,抗体包含修饰的Fc区。在一些实施方案中,Fc区包括用于衰减效应子功能的修饰。在一些实施方案中,Fc区是人IgG1 Fc区。在一些实施方案中,人IgG1 Fc区包括根据EU指数编号的L234A、L235A和P329G氨基酸取代。

[0020] 在某些方面,本文提供了抗CD20抗体在制备用于治疗个体中的类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)的药物中的用途,其中所述抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链可变区,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链可变区。

[0021] 在某些方面,本文提供了用于治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的药盒或制品,其包含:(a)包括抗CD20抗体的容器,其中所述抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链可变区,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链可变区;和(b)具有用于施用有效量的抗CD20抗体以治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的说明书的包装插页。在一些实施方案中,包装插页包括用于静脉内施用抗体的说明书。在一些实施方案中,抗体是人源化或人抗体。在一些实施方案中,抗体是非岩藻糖基化的。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在一些实施方案中,轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体是奥比妥珠单抗。在一些实施方案中,抗体包含修饰的Fc区。在一些实施方案中,Fc区包括用于衰减效应子功能的修饰。在一些实施方案中,Fc区是人IgG1 Fc区。在一些实施方案中,人IgG1 Fc区包括根据EU指数编号的L234A、L235A和P329G氨基酸取代。

[0022] 应当理解,本文所述的各种实施方案的一个、一些或全部属性可以组合以形成本发明的其它实施方案。本发明的这些和其它方面对于本领域技术人员将变得显而易见。通过下面的详细描述进一步描述本发明的这些和其它实施方案。

附图说明

[0023] 图1示出了对检查奥比妥珠单抗+霉酚酸酯vs.安慰剂+霉酚酸酯的二期研究的研究设计。EP=终点;MMF=霉酚酸酯

[0024] 图2A-2D示出了奥比妥珠单抗或利妥昔单抗在RA和SLE患者样本中引起的全血B细胞消耗、内化和补体依赖性细胞毒性。图2A示出了RA (n=31) 和SLE (n=34) 患者的全血样本。将样本用或不用抗CD20mAb、RTX、OBZ_{Gly}和OBZ温育24小时,然后进行流式细胞术以分析B细胞死亡。值是三个重复孔的平均值。框中的水平线代表中位数,框代表四分位数范围,并且框须代表范围。图2B示出了表面可及的mAb的频率。通过用来自先前用抗Fc γ RII阻断mAb,AT10温育的RA (n=5) 和SLE (n=8) 患者的分离的B细胞温育6小时后,以流式细胞术评价频率。水平线代表中位数。图2C示出了由RTX和OBZ诱导的CDC。将分离的B细胞(健康对照(HC), n=2; RA, n=2和SLE, n=3) 与正常健康血清(NHS) 或热灭活血清(HIS) 用RTX或OBZ温育30分钟后分析裂解的CD19⁺ Av⁺ PI⁺ B细胞的频率。图2D示出了用NHS对HIS温育的样品中CD19⁺ Av⁺ PI⁺细胞的倍数增加,表示mAb对CDC的效率。RTX,利妥昔单抗;OBZ,奥比妥珠单抗;RA,类风湿关节炎;SLE,系统性红斑狼疮。HC,健康对照* $p<0.05$; **, $p<0.005$; ***, $p<0.0001$ 和ns,不显著。

[0025] 图3A-3G示出流式细胞术门控策略来评估NK细胞脱粒,描述CD107a和CD16的NK细胞表达之间的关系。将全血样本用或不用mAb温育24小时,然后通过流式细胞术分析。基于前向和侧向散射特性和CD56的表达而不是CD3鉴定NK细胞。CD3-CD56⁺ CD107a⁺细胞的频率表示活化/脱粒的NK细胞。FSC,前向散射;SSC,侧向散射。图3A示出了前向散射与侧向散射的流式细胞术门控。图3B示出了CD56与CD3的流式细胞术门控。图3C示出了前向散射对CD107a的流式细胞术门控。图3D示出了前向散射对CD16的流式细胞术门控。基于CD16的相对表达鉴定了CD3-CD56⁺ NK细胞的三个亚群(框中为高、中、低)。基于以等级方式CD16^{++<}CD16^{+<}CD16⁻的CD16表达,激活的CD107a⁺ NK细胞的相对频率在这3个亚群中不同。图3E示出了对于高框的前向散射对CD107a的流式细胞术门控。图3F示出了对于中框的前向散射对CD107a的流式细胞术门控。图3G示出了对于低框的前向散射对CD107a的流式细胞术门控。

[0026] 图4A-4D示出在RA和SLE患者样品中激活NK细胞方面,OBZ比RTX更有效。评估在存在或不存在mAb的情况下温育24小时的具有RA (n=18) 和SLE (n=23) 的患者的全血样品中的NK细胞活化。*, $p<0.05$; **, $p<0.005$; ***, $p<0.0001$; ns,不显著,当 p 至少 <0.05 时, Spearman相关系数 r^2 被认为是显著的。图4A示出了在淋巴细胞门中的CD3-CD56⁺ NK细胞、CD3-CD56⁺ CD107a⁺ NK细胞和CD3-CD56-CD16⁺ NK细胞的频率作为总NK细胞或CD19⁺细胞的百分比。水平线代表中位数。图4B示出了来自RA和SLE的患者,用RTX和OBZ温育的样品中,CD3-CD56⁺ CD107a⁺ NK细胞的频率和CD3-CD56⁺ CD107a⁺ NK细胞频率的倍数增加以及CD3-CD56⁺ 16⁺ NK细胞的频率。水平线代表中位数。图4C示出了在来自RA (n=18) 患者的用或不用RTX和OBZ温育的样品中CD3-CD56⁺ CD107a⁺ NK细胞的频率之间的关系。图4D示出了在来自SLE (n=23) 患者的用或不用RTX和OBZ温育的样品中CD3-CD56⁺ CD107a⁺ NK细胞的频率之间的关系。

[0027] 图5A-5D示出在RA和SLE患者样品中引发NK细胞介导的细胞毒性方面,奥比妥珠单抗比利妥昔单抗更有效。图5A示出了全血B细胞消耗测定,其显示了来自RA (n=18) 和SLE (n=23) 患者的样品中RTX、OBZ_{Gly}和OBZ的B细胞消耗百分比。框和框须代表四分位数范围并且该范围,框中的水平线代表中位数。图5B示出了通过流式细胞术分析,用或不用mAb温育24小时后RA和SLE患者的全血样品中CD3-CD56⁺ CD107a⁺ NK细胞的频率。图5C示出了通过流式细胞术分析,用或不用mAb温育的全血样品中CD3-CD56⁺ CD107a⁺ NK细胞的频率相对增

加。图5D示出了通过流式细胞术分析,用或不用mAb温育24小时后RA (n=18) 和SLE (n=23) 患者的全血样品中CD3-CD56+ CD16+ NK细胞的频率。对于条形图,误差条表示中位数和四分位数范围。* $p<0.05$;**, $p<0.005$;***, $p<0.0001$;和ns,不显著。

[0028] 图6A-6D示出在RA和SLE患者样品中激活嗜中性粒细胞方面奥比妥单抗比利妥昔单抗更有效。图6A示出了在用或不用mAb (1 μ g/ml) 温育的RA (n=10) 和SLE (n=22) 患者的全血样品温育24小时后,CD11b在CD15+嗜中性粒细胞上的平均荧光强度(MFI)。中位数和四分位数范围由误差条表示。图6B示出了在RA或SLE样品中用或不用mAb温育的样品中CD11b在CD15+嗜中性粒细胞上的MFI之间的关系。图6C示出了用或不用在RA和SLE样品中的mAb温育的样品中CD15+嗜中性粒细胞上CD62L的MFI。图6D示出了在用或不用RA (n=10) 和SLE (n=22) 样品的mAb温育的样品中CD15+嗜中性粒细胞上CD62L的MFI之间的关系。* $p<0.05$;**, $p<0.005$;***, $p<0.0001$ 。当 p 至少 <0.05 时,Spearman相关系数 r^2 被认为是显著的。

[0029] 图7A-7D示出来自RA和SLE样品的B细胞亚群中CD20和Fc γ RIIB的直接细胞死亡、内化和表达的评估。图7A示出了基于IgD和CD27的相对表达(IgD+ CD27-初始细胞;IgD+ CD27+未转换记忆细胞;IgD-CD27+转换的记忆细胞和IgD-CD27-双阴性细胞),作为所有CD19+ B细胞和B细胞亚群的比例的膜联蛋白V+细胞的频率;在用或不用mAb温育的RA (n=5) 和SLE (n=4) 患者的样品中。图7B示出了来自SLE患者 (n=9) 的样品中所有CD19+细胞和B细胞亚群上CD20的平均荧光强度(MFI)。图7C示出了表面荧光猝灭测定。在所有CD19+ B细胞和B细胞亚群中,用来自SLE患者 (n=9) 的具有或者不具有用抗Fc γ RIImAb,AT10的先前温育的分离的B细胞温育6小时后的表面可及的mAb的频率。图7D示出了患有SLE (n=9) 的患者的样品中所有CD19+ B细胞和B细胞亚群中Fc γ RIIB的MFI。对于条形图,误差条表示中位数和四分位数范围。盒和盒须代表四分位数范围,盒中的水平线代表中位数。* $p<0.05$;**, $p<0.005$;***, $p<0.0001$ 。

[0030] 图8示出了补体依赖性细胞毒性测定的门控策略,以及通过RTX和OBZ的CDC。将分离的B细胞用含有NHS或HIS的mAb在室温下温育30分钟,然后通过流式细胞术分析。An V+PI+细胞的频率代表细胞死亡。HIS,热灭活血清;NHS,正常健康血清;RTX,利妥昔单抗;OBZ,奥比妥单抗;V,Annexin V和PI,碘化丙锭。

[0031] 图9示出了评估嗜中性粒细胞活化的流式细胞术门控策略。温育24小时后,通过流式细胞术分析全血样品。通过前向和侧向散射和CD15阳性识别嗜中性粒细胞。在对CD15为阳性的门控中性粒细胞上分析CD11b和CD62L的平均荧光强度。

[0032] 图10示出了流式细胞术门控策略来评估直接细胞死亡。在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下用或不用mAb温育6小时后,通过流式细胞术分析分离的B细胞。CD19+ B细胞分为初始(IgD+ CD27-),未转换记忆细胞(IgD+ CD27+),转换记忆细胞(IgD-CD27+)和双阴性细胞(IgD-CD27-)。膜联蛋白V+细胞的频率代表直接细胞死亡。

[0033] 图11示出了B细胞亚群中自发性细胞死亡的固有敏感性。通过流式细胞术分析在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下用补充有10%胎牛血清的RPMI温育6小时的分离的B细胞。膜联蛋白V+细胞的频率代表CD19+细胞整体以及也在分为初始(IgD+ CD27-),未转换记忆细胞(IgD+ CD27+),转换记忆细胞(IgD-CD27+),和双阴性细胞(IgD-CD27-)的B细胞亚群中的直接细胞死亡。Av,膜联蛋白V;* $p<0.05$;***, $p<0.0001$;ns,不显著。

[0034] 发明详述

[0035] 在一个方面,本文提供了用于治疗或延缓个体中狼疮性肾炎进展的方法,包括向个体施用对于II型抗CD20抗体的至少第一次抗体暴露和对于II型抗CD20抗体的第二次抗体暴露。在一些实施方案中,个体具有狼疮。在一些实施方案中,在第一次抗体暴露后约18周至约26周之后才提供第二次抗体暴露。在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第一次抗体暴露含有约1800mg至约2200mg的II型抗-CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,第二次抗体暴露含有约1800mg至约2200mg的II型抗-CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链。

[0036] 在另一方面,本文提供了用于治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的方法,包括向个体施用有效量的II型抗CD20抗体。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链和含有SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链。在一些实施方案中,个体具有III类或IV类狼疮性肾炎。

[0037] 在另一方面,本文提供了用于治疗或延缓个体中类风湿性关节炎(RA)或系统性红斑狼疮(SLE)进展的方法,其包括向个体施用有效量的抗CD20抗体。在一些实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链可变区。

[0038] I.一般技术

[0039] 本文所描述或参考的技术和程序通常被本领域技术人员充分理解并使用常规方法通常采用,例如广泛利用的方法描述于Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel,等人编(2003));系列Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.):PCR 2:A Practical Approach(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编(1995)),Harlow和Lane编(1988)Antibodies,A Laboratory Manual,and Animal Cell Culture(R.I.Freshney编(1987));Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology, Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis,编,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney)编,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather and P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths,and D.G.Newell编,1993-8)J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller and M.P.Calos编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway and P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty编,IRL Press,

1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean 编, Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti 和 J. D. Capra 编, Harwood Academic Publishers, 1995); 和 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita 等人编, J. B. Lippincott Company, 1993)。

[0040] II. 定义

[0041] 术语“狼疮性肾炎 (LN)”是指在肾脏中的狼疮 (例如, 系统性红斑狼疮、药物诱发的狼疮、新生儿狼疮或盘状狼疮) 的表现。

[0042] 术语“抗体”包括单克隆抗体 (包括具有免疫球蛋白 Fc 区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体 (例如, 双特异性抗体、双抗体和单链分子, 以及抗体片段 (例如, Fab、F(ab')₂ 和 Fv)。术语“免疫球蛋白” (Ig) 与“抗体”在本文中互换使用。

[0043] 基本的 4 链抗体单元是异四聚体糖蛋白, 其由两条相同的轻链 (L) 和两条相同的重链 (H) 组成。IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单元连同额外的被称为 J 链的多肽组成, 并包含 10 个抗原结合位点, 而 IgA 抗体包含 2-5 个基本的 4 链单元, 其可聚合形成与 J 链组合的多价装配物。在 IgG 的情况下, 4 链单元通常是约 150,000 道尔顿。每个 L 链通过一个共价二硫键连接到 H 链, 而两个 H 链取决于 H 链的同种型通过一个或多个二硫键彼此相连。每个 H 和 L 链还具有规律间隔的链内二硫键。每条 H 链在 N-末端具有可变结构域 (V_H), 接着是对于每条 α 和 γ 链为三个恒定结构域 (C_H) 和对于 μ 和 ϵ 同种型为 4 个 C_H 结构域。每条 L 链在 N-末端具有可变结构域 (V_L), 随后为在其另一端的恒定结构域。V_L 与 V_H 对准, 并且 C_L 与重链 (C_HI) 的第一个恒定结构域对准。认为特定氨基酸残基形成轻链和重链可变结构域之间的界面。V_H 和 V_L 的配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别抗体的结构和特性, 参见, 例如, Basic and Clinical Immunology, 第 8 版, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (编), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第 71 页和 Chapter 6。基于其恒定结构域的氨基酸序列, 来自任何脊椎动物物种的 L 链可归入给两个完全不同的类型 (称为 K 和 λ) 之一。取决于其重链 (CH) 的恒定结构域的氨基酸序列, 免疫球蛋白可归入不同的类或同种型。有五类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 分别具有称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于 CH 序列和功能中相对小的差异, γ 和 α 类进一步分为亚类, 例如, 人表达下列亚类: IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

[0044] 抗体的“可变区”或“可变结构域”指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“V_H”和“V_L”。这些结构域一般是抗体的最易变化的部分 (相对于同一类的其它抗体) 并包含抗原结合位点。

[0045] 术语“可变”是指这样的事实, 该可变结构域的某些区段在抗体间序列中广泛地不同。该 V 结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而, 变异性并非均匀分布于可变区的整个跨度。相反, 其集中在轻链和重链可变结构域中都有的三个称为高变区 (HVR) 的区段内。可变结构域中更加高度保守的部分称作构架区 (FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区, 大多采取 β -折叠构型, 通过 3 个 HVR 连接, 其形成环状连接, 并且在某些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的 HVR 通过 FR 区保持紧密接近在一起, 并与来自另一条链的 HVR 一起促进抗体的抗原结合位点的形成 (参见 Kabat 等人, Sequences of Immunological Interest, 第 5 版, National Institute of Health,

Bethesda, MD (1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应子功能,例如抗体在抗体依赖性的细胞毒性中的参与。

[0046] 如本文所用的术语“单克隆抗体”指获自基本上同质性抗体群的抗体,即包括该群体的各个抗体除了可以少量存在的可能天然发生的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)之外是相同的。单克隆抗体针对单个抗原位点是高度特异性的。与多克隆抗体制剂(通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性,单克隆抗体的优点还在于它们通过杂交瘤培养合成,未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”表明该抗体的特征为从抗体的基本上同质的群中获得,并且不应被解释为需要通过任何特定方法生产抗体。例如,按照本发明待使用的单克隆抗体可通过多种技术制成,包括例如,杂交瘤方法(例如,Kohler和Milstein., *Nature*, 256: 495-97 (1975); Hongo等人, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第二版. 1988); Hammerling等人, 在: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 中), 重组DNA方法(参见,例如美国专利号4,816,567), 噬菌体展示技术(参见,例如Clackson等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004); Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004); FcIlouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004); 和Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004)), 和用于在动物中生产具有编码人免疫球蛋白序列的部分或全部人免疫球蛋白基因座或基因的人或人样抗体的技术(参见,例如WO 1998/24893; WO1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits等人, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann等人, *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); 美国专利号5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和5,661,016; Marks等人, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg等人, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnol* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); 和Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995))。

[0047] “术语“裸抗体”是指不与细胞毒性部分或放射性标记缀合的抗体。

[0048] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用,是指与抗体片段相反,以其基本完整形式的抗体。具体地,全抗体包含具有重链和轻链(包括Fc区)的那些。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体可以具有一个或多个效应子功能。

[0049] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合和/或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体(参见美国专利5,641,870, 实施例2; Zapata等人, *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062 [1995]); 单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,和残余的“Fc”片段,该名称反映了易于结晶的能力。Fab片段由完整的L链以及H链的可变区结构域(V_H), 和一条重链的第一个恒定结构域(C_H1)组成。每个Fab片段相对于抗原结合是单价的,即,它具有单个抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生一个单一的大的F(ab')

2片段,其粗略地相当于两个通过二硫键相连的具有不同的抗原结合活性的Fab片段,且仍能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段不同之处在于在CH1结构域的羧基末端具有几个额外的残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文对于Fab'的指定,其中所述恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带游离硫醇基。F(ab')₂抗体片段最初作为成对的Fab'片段产生,在它们之间有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0050] Fc片段包括通过二硫键保持在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应子功能是通过Fc区中的序列决定的,所述区域也被在某些类型的细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。

[0051] “Fv”是最小抗体片段,其含有完整的抗原识别和结合位点。此片段由紧密、非共价结合的一个重链和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠散发出六个高变环(3个环分别来自H和L链),其贡献氨基酸残基用于抗原结合,并赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使是单个可变结构域(或仅包含三个对抗原特异的HVR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管以比完整结合位点更低的亲和力。

[0052] “单链Fv”也简称为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单个多肽链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地,所述sFv多肽进一步包含在V_H和V_L结构域之间的多肽接头,其使得sFv能够形成抗原结合所需的结构。对于sFv的综述,参见Pluckthun于The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg和Moore编, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) 中。

[0053] 本发明的抗体的“功能性片段”包含完整抗体的一部分,一般包括完整抗体的抗原结合或可变区或抗体的Fc区,其保留或具有修饰的FcR结合能力。抗体片段的实例包括线性抗体、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0054] 术语“双抗体”是指小的抗体片段,其通过如下制备:构建SFv片段(见上一段),其具有在V_H和V_L结构域之间的短接头(约5-10个残基),使得实现V结构域的链间而非链内配对,由此产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”的sFv片段的异源二聚体,其中两个抗体的V_H和V_L结构域存在于不同的多肽链上。双抗体更详细地描述于例如EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)。

[0055] 本文的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中一部分重链和/或轻链与衍生自特定物种或属于特定抗体类型或亚类的抗体中相应序列相同或同源,而一条或多条链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类型或亚类的抗体,以及这些抗体的片段中相应序列相同或同源,只要它们展示所希望的生物活性(美国专利号4,816,567;和Morrison等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855) (1984))。本文所关注的嵌合抗体包含**PRIMATIZED®**抗体,其中抗体的抗原结合区衍生自通过例如用目的抗原免疫猕猴所产生的抗体。如本文所用,“人源化抗体”用作“嵌合抗体”的子集。

[0056] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是包含衍生自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的HVR(定义见下文)的残基被来自非人物种的HVR(供体抗体)的残基取代,所述非人物种例如小鼠、大鼠、兔或具有所期望的特异性、亲和力和/或能力的非人灵长类动物。在一些情况下,人免疫球蛋白的构架(“FR”)残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可包含在受

体抗体或供体抗体中未发现的残基。可以作出这些修饰以进一步改进抗体的性能,如结合亲和力。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,并且通常两个可变结构域,其中所有的或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白序列的那些,并且所有或基本上所有的FR区是人免疫球蛋白序列的那些,尽管FR区可以包括一个或多个个别的FR残基的取代,所述取代提高抗体的性能,如结合亲和力、异构化、免疫原性等。FR中的这些氨基酸取代的数目在H链中通常不超过6个,并在L链中不超过3个。人源化抗体任选地还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的细节,参见例如, Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。还参见,例如 Vaswani 和 Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle 和 Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); 和美国专利号 6,982,321 和 7,087,409。

[0057] “人抗体”是指具有相应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体和/或已使用如本文所公开的任何用于制备人抗体的技术制造的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术,包括噬菌体展示文库来制备。Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)。还可以用于人单克隆抗体制备的方法描述于 Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boerner 等人, *J. Immunol.* 147 (I):86-95 (1991)。还参见 van Dijk 和 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74 (2001)。人抗体可以通过向转基因动物施用抗原来制备,所述转基因动物已被修饰以产生此种抗体来应答抗原攻击,但其内源基因座已被失效,例如,免疫的异种小鼠(关于 XENOMOUSE™ 技术参见例如美国专利号 6,075,181 和 6,150,584)。关于经人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体还参见,例如 Li 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006)。

[0058] 本文中使用时,术语“高变区”、“HVR”或“HV”指抗体可变结构域的区域,其序列高度可变和/或形成结构确定的环。通常,抗体包含6个HVR:3个在VH(H1、H2、H3)中,并且3个在VL(L1、L2、L3)中。在天然抗体中,H3和L3展示这6个HVR的最大多样性,并且尤其H3被认为在赋予抗体精细的特异性方面发挥独特的作用。参见,例如 Xu 等人, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson 和 Wu, 在 *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 中 (Lo, 编, Human Press, Totowa, NJ, 2003)。事实上,仅由重链组成的天然存在的骆驼科抗体在缺乏轻链的情况下是有功能的且稳定的。参见,例如 Hamers-Casterman 等人, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff 等人, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)。

[0059] 本文使用和涵盖了许多HVR描述。Kabat互补决定区(CDR)是基于序列变异性,并且是最常用的(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothia 改为指结构环的位置(Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR代表Kabat HVR与Chothia结构环之间的折衷,并被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件所使用。“接触”HVR是基于可获得的复合物晶体结构的分析。这些HVR中每一个的残基在下面注明。

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
[0060]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32
	H30-H35B(Kabat 编号)			
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
	H30-H35(Chothia 编号)			
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101
				H47-H58
				H93-H101

[0061] HVR可以包括如下的“延伸的HVR”：VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2) 和89-97或89-96 (L3) 和VH中的26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2) 和93-102、94-102或95-102 (H3)。对于这些定义的每个，可变结构域残基是按照上文Kabat等编号。

[0062] 表述“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体是指上文Kabat等中抗体编译的用于重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用此编号系统，实际的线性氨基酸序列可包含对应可变结构域的FR或HVR缩短或插入的更少的或额外的氨基酸。例如，重链可变结构域可以在H2的残基52后包括单个氨基酸插入（根据Kabat，残基52a）和在重链FR残基82之后包括插入的多个残基（例如，根据Kabat，残基82a、82b和82c等）。对于给定的抗体，残基的Kabat编号可以通过在抗体序列的同源性区域与“标准”Kabat编号序列的比对来确定。

[0063] “构架”或“FR”残基是如本文中所定义的HVR残基之外的那些可变结构域残基。

[0064] “人共有构架”或“受体人构架”是代表在人免疫球蛋白VL或VH构架序列的选择中最经常发生的氨基酸残基的构架。通常，人免疫球蛋白VL或VH序列的选择来自可变结构域序列的亚组。通常，序列的亚组是如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中的亚组。实例包括，对于VL，亚组可以是如上文Kabat等的亚组KI、KII、KIII或KIV。此外，对于VH，亚组可以是如上文Kabat等的亚组I、亚组II或亚组III。或者，人共有构架可以衍生自上述，其中特定残基，例如当通过将供体构架序列与各种人构架序列的集合进行比对，基于其对供体构架的同源性选择人构架残基时。“衍生自”人免疫球蛋白构架或人共有构架的受体人构架可以包括其相同的氨基酸序列，或其可以包含预先存在的氨基酸序列的变化。在一些实施方案中，预先存在的氨基酸变化的数目是10个或更少，9个或更少，8个或更少，7个或更少，6个或更少，5个或更少，4个或更少，3个或更少，或2个或更小。

[0065] “VH亚组III共有构架”包含从Kabat等人，上文的可变重亚组III中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中，VH亚组III共有构架氨基酸序列包含以下每个序列的至少一部分或全部：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (HC-FR1) (SEQ ID NO:35)、

WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2), (SEQ ID NO:36)、RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3, SEQ ID NO:37)、WGQGTLVTVSA (HC-FR4), (SEQ ID NO:38)。

[0066] “VL κ I共有构架”包含从Kabat等人,上文的可变轻 κ 亚组I中的氨基酸序列获得的共有序列。在一个实施方案中,VH亚组I共有构架氨基酸序列包含以下序列中的每一个的至少一部分或全部:DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (LC-FR1) (SEQ ID NO:39)、WYQQKPGKAPKLLIY (LC-FR2) (SEQ ID NO:40)、GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (LC-FR3) (SEQ ID NO:41)、FGQGTKVEIKR (LC-FR4) (SEQ ID NO:42)。

[0067] 在例如Fc区的指定位置的“氨基酸修饰”是指指定残基的取代或缺失,或指定残基相邻的至少一个氨基酸残基的插入。与指定残基“相邻”的插入是指在其一到两个残基内的插入。插入可以在指定残基的N-末端或C-末端。本文优选的氨基酸修饰是取代。

[0068] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个HVR中具有一个或多个改变的抗体,所述改变造成该抗体与不具有这些一个或多个改变的亲本抗体相比对抗原的亲和力改进。在一个实施方案中,亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知的程序产生。例如,Marks等人,Bio/Technology 10:779-783 (1992) 描述了通过VH和VL结构域改组的亲和力成熟。HVR和/或构架残基的随机诱变描述于,例如Barbas等人,Proc Natl Acad Sci USA 91:3809-3813 (1994); Schier等人,Gene 169:147-155 (1995); Yelton等人,J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson等人,J. Immunol. 154 (7):3310-9 (1995); 和Hawkins等人,J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

[0069] 如本文所用,术语“特异性结合”或“对于……是特异性的”是指可测量的和可重现的相互作用,诸如靶和抗体之间的结合,其在分子包括生物分子的异源群体存在的情况下决定靶的存在。例如,特异性结合至靶(其可以是表位)的抗体是比其结合其它靶具有更大的亲和力(affinity),亲合力(avidity),更容易和/或具有更长的持续时间结合此靶的抗体。在一个实施方案中,抗体结合不相关靶的程度小于抗体与靶的结合的约10%,例如,如通过放射免疫测定(RIA)所测量的。在某些实施方案中,特异性结合靶的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗体特异性结合蛋白上的表位,所述表位在来自不同物种的蛋白之间是保守的。在另一个实施方案中,特异性结合可以包括,但不需要排他性结合。

[0070] 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区和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能发生变化,但是人IgG重链Fc区通常定义为从位置Cys226的氨基酸残基,或从Pro230,向其羧基末端的延伸。Fc区的C-末端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可以被移除,例如,在抗体生产或纯化过程中,或通过重组改造编码所述抗体重链的核酸。因此,完整抗体的组合物可包含去除了所有K447残基的抗体群,没有去除K447残基的抗体群,和具有有和无K447残基的抗体的混合物的抗体群。用于本发明的抗体的合适的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0071] “Fc受体”或“FcR”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是这样的FcR,其结合IgG抗体(γ 受体),并包括Fc γ R1、Fc γ R2和Fc γ R3亚类的受体,包括等位基因变体和这些受体的可选剪接形式,Fc γ R2受体包括Fc γ R2A(“活化受体”)和Fc γ R2B(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,其区别主要在于其胞质结构域。活化受体Fc γ R2A在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。

抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(I γ HM)。(参见**M.Daëron**, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)。FcR的综述见于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 和de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)。其它FcR, 包括那些将来要鉴定的FcR在本文中被术语“FcR”涵盖。

[0072] 术语“Fc受体”或“FcR”还包括新生儿受体, FcRn, 其负责将母体IgG转移给胎儿。Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 和Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994)。测量与FcRn结合的方法是已知的(参见, 例如Ghetie和Ward, *Immunol. Today* 18: (12):592-8 (1997); Ghetie等人, *Nature Biotechnology* 15 (7):637-40 (1997); Hinton等人, *J. Biol. Chem.* 279 (8):6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton等人)。可以测定体内与FcRn的结合和人FcRn高亲和力结合多肽的血清半衰期, 例如, 在转基因小鼠或表达人FcRn的转染的人细胞系中, 或在对其施用具有变体Fc区多肽的灵长类中。WO2004/42072 (Presta) 描述了提高或降低了对FcR结合的抗体变体。还参见, 例如Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9 (2):6591-6604 (2001)。

[0073] 如本文所用短语“基本上减少,”或“基本上不同,”表示两个数值(通常一个与分子相关, 并且另一个与参照/比较分子相关)之间的足够高的差异程度, 使得本领域技术人员会认为这两个值之间的差异在通过所述值(例如, Kd值)测量的生物学特征背景下具有统计学显著性。作为该值对于参照/比较分子的函数, 所述两个值之间的差异是, 例如, 大于约10%, 大于约20%, 大于约30%, 大于约40%, 和/或大于约50%。

[0074] 如本文所用短语“基本上相似”或“基本相同”, 表示两个数值(例如一个与本发明的抗体相关, 并且另一个与参照/比较抗体相关)之间的足够高的相似程度, 使得本领域技术人员会认为这两个值之间的差异在通过所述值(例如, Kd值)测量的生物学特征背景下具有很小的或不具有生物学和/或统计学显著性。作为参照/比较子值的函数, 所述两个值之间的差异, 例如, 小于约50%, 小于约40%, 小于约30%, 小于约20%, 和/或小于约10%。

[0075] 如本文所用“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂, 其在所采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常, 生理学上可接受的载体是PH缓冲水溶液。生理学上可接受的载体的实例包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸; 低分子量(小于约10个残基)多肽; 蛋白, 如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、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; 螯合剂如EDTA; 糖醇如甘露醇或山梨醇; 成盐平衡离子, 诸如钠; 和/或非离子表面活性剂, 诸如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。

[0076] “包装插页”指通常包括在药物的商业包装中的说明书, 它们包含有关涉及此类药物应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症、与该包装产品联合的其它药物和/或警告等的信息。

[0077] 如本文中使用的, 术语“治疗/处理”指设计用于改变临床病理学过程期间所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预。治疗的期望效果包括降低疾病进展速率, 改善或减轻疾病状态, 和消退或改善的预后。例如, 若一种或多种与狼疮性肾炎有关的症状被减轻或消除, 则个体得到成功“治疗”, 所述症状包括但不限于升高的血清肌酐、蛋白尿、红细胞管型、肾功能减退、肾病综合征、颗粒管型、显微血尿、肉眼血尿、高血压、肾小管异常、高钾血症、

快速进展性肾小球肾炎 (RPGN) 和急性肾功能衰竭 (ARF)。

[0078] 如本文中使用的,“延缓疾病的进展”意指推迟、阻碍、减缓、延迟、稳定、和/或延迟疾病的形成。根据疾病史和/或治疗的个体,此延迟可以是不同时间长度的。如对于本领域技术人员明显的是,充分或显著的延缓实质上可以涵盖预防,因为个体(例如处于发展该疾病风险的个体)不发展疾病。例如,在发生LN症状和/或病理学之前,个体中SLE的进展可能会延缓,以致LN的发展被延迟或阻止。

[0079] 如本文所用,“完全肾反应(CRR)”是指对包括血清肌酐、非活性尿沉渣和尿蛋白与肌酐酐比率小于0.5的归一化的治疗的反应。

[0080] 如本文所用,“部分肾反应(PRR)”是指对治疗的反应小于CRR,但仍包括减轻一种或多种症状,包括但不限于血肌酐降低、尿沉渣减少、和蛋白尿减少。

[0081] “有效量”至少是实现特定病症的可测量改善或预防需要的最小浓度。本文中的有效量可以随诸如患者的疾病状态、年龄、性别、和重量,和抗体引发个体中期望的应答的能力等因素而变化。有效量也是治疗有益效果超过治疗的任何毒性或不利效果的量。为了预防性使用,有益或期望的结果包括如下的结果,例如消除或降低风险,减轻严重性,或者延缓疾病的发作,包括疾病的生物化学,组织学和/或行为症状,其并发症和疾病形成期间呈现的中间病理学表型。为了治疗性使用,有益或期望的结果包括临床结果,诸如减少源自疾病的一种或多种症状,提高那些患有疾病的对象的生命质量,降低治疗疾病需要的其它药物的剂量,增强另一种药物的效果(诸如经由靶向),延缓疾病的进展,和/或延长存活。在狼疮性肾炎的情况中,药物的有效量在和/或在一定程度上减轻一种或多种与病症有关的症状中可以具有效果。可以在一次或多次施用中施用有效量。出于本发明的目的,药物、化合物、或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现预防或治疗性治疗的量。如在临床背景中理解的,药物、化合物、或药物组合物的有效量可以与或不与另一种药物、化合物、或药物组合物一起实现。如此,可以在施用一种或多种治疗剂的背景中考虑“有效量”,并且若与一种或多种其它药剂一起,可以实现期望的结果或者实现了期望的结果,则可以认为单一药剂以有效量给予。

[0082] 本文所用的“CD20”是指人B淋巴细胞抗原CD20(也称为CD20,B淋巴细胞表面抗原B1,Leu-16,Bp35,BM5和LF5;该序列的特征在于SwissProt数据库登录号P11836)是具有约35kD的分子量的疏水性跨膜蛋白,其位于前B和成熟B淋巴细胞上。(Valentine,MA等人,J.Biol.Chem.264(19)(1989)11282-11287;Tedder,TF等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85(1988)208-12;Stamenkovic,I.,等人,J.Exp.Med.167(1988)1975-80;Einfeld,DA等人,EMBO J.7(1988)711-7;Tedder,TF,等人,J.Immunol.142(1989)2560-8)。相应的人类基因是跨膜4结构域,亚家族A,成员1,也称为MS4A1。该基因编码跨膜4A基因家族的成员。该新生蛋白家族的特征是具有共同的结构特征和相似的内含子/外显子剪接边界,并在造血细胞和非淋巴组织之间显示独特的表达模式。该基因编码在B细胞发育和分化成浆细胞中发挥作用的B淋巴细胞表面分子。这个家族成员在一群家庭成员中被定位到11q12。该基因的选择性剪接导致两个转录物变体,其编码相同的蛋白质。

[0083] 术语“CD20”和“CD20抗原”在本文中可互换使用,并且包括由细胞天然表达或在用CD20基因转染的细胞上表达的人CD20的任何变体、同种型和物种同源物。将本发明的抗体与CD20抗原结合通过灭活CD20来介导杀死表达CD20的细胞(例如肿瘤细胞)。表达CD20的细

胞的杀死可以通过一种或多种以下机制发生：细胞死亡/凋亡诱导、ADCC和CDC。

[0084] 本领域公认的CD20的同义词包括B淋巴细胞抗原CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5和LF5。

[0085] 根据本发明的术语“抗CD20抗体”是特异性结合CD20抗原的抗体。取决于抗CD20抗体对CD20抗原的结合性质和生物学活性，可以根据Cragg, MS等人, Blood 103 (2004) 2738-2743; 和Cragg, M.S. 等人, Blood 101 (2003) 1045-1052, 区分两种类型的抗CD20抗体 (I型和II型抗-CD20抗体), 参见下表1。

[0086] 表1. I型和II型抗CD20抗体的性质

[0087]	I型抗CD20抗体	II型抗CD20抗体
	I型CD20表位	II型CD20表位
	将CD20定位在脂膜筏	不将 CD20 定位在脂膜筏
	增加的CDC(如果是IgG1同种型)	减少的CDC(如果是IgG1同种型)
	ADCC活性(如果是IgG1同种型)	ADCC 活性(如果是IgG1 同种型)
	完全结合能力	降低的结合能力
	同型聚集	更强的同型聚集
	在交联时诱导凋亡	不用交联的强细胞死亡诱导

[0088] II型抗CD20抗体的实例包括例如, 人源化B-Ly1抗体IgG1 (WO 2005/044859中公开的嵌合人源化IgG1抗体)、11B8IgG1 (如WO 2004/035607中所公开) 和AT80IgG1。通常IgG1同种型的II型抗CD20抗体显示出特征性的CDC性质。与IgG1同种型的I型抗体相比, II型抗CD20抗体具有降低的CDC (如果是IgG1同种型)。

[0089] I型抗-CD20抗体的实例包括例如, 利妥昔单抗、HI47IgG3 (ECACC, 杂交瘤)、2C6IgG1 (如WO 2005/103081中所公开)、2F2IgG1 (WO 2004/035607和WO 2005/103081中所公开) 和2H7IgG1 (如WO 2004/056312中所公开)。

[0090] 根据本发明的无岩藻糖化的抗CD20抗体优选为II型抗-CD20抗体, 更优选WO 2005/044859和WO 2007/031875中描述的无岩藻糖化的人源化B-Ly1抗体。

[0091] “利妥昔单抗”抗体 (参考抗体; I型抗-CD20抗体的实例) 是基因改造的针对人CD20抗原的嵌合含人 γ 1鼠恒定区结构域的单克隆抗体。然而, 该抗体不是糖改造的, 不是无岩藻糖化的, 因此具有至少85%的岩藻糖的量。此嵌合抗体含有 γ 1人恒定区结构域, 并且在于1998年4月17日出版并转让给IDEC制药公司 (IDEC Pharmaceuticals Corporation) 的US

5,736,137 (Andersen, K. C. 等人) 中以名称“C2B8”鉴定。利妥昔单抗被批准用于治疗患有复发的或难治性低度或滤泡性CD20阳性的B细胞非霍奇金淋巴瘤的患者。体外作用机制研究已经显示利妥昔单抗显示出人补体依赖性细胞毒性(CDC) (Reff, M. E. 等人, Blood 83 (2) (1994) 435-445)。另外, 其在测定抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的测定中显示出活性。

[0092] 本文所用的术语“GA101抗体”是指结合人CD20的以下抗体中的任一种: (1) 抗体, 包括: 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2, 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3, 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列HVR-L2, 和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3; (2) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL结构域的抗体, (3) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的抗体; (4) 称为奥比妥珠单抗的抗体, 或 (5) 包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列并且包括与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的抗体。在一个实施方案中, GA101抗体是IgG1同种型抗体。在一些实施方案中, 抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

[0093] 术语“人源化B-Ly1抗体”是指如WO 2005/044859和WO 2007/031875中公开的人源化B-Ly1抗体, 其从鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1 (鼠重链的可变区(VH): SEQ ID NO:11; 鼠轻链的可变区(VL): SEQ ID NO:12-参见Poppema, S. 和Visser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139) 通过与来自IgG1的人恒定结构域的嵌合和随后的人源化 (参见WO 2005/044859和WO 2007/031875) 而获得。这些“人源化B-Ly1抗体”详细公开在WO 2005/044859和WO 2007/031875中。

[0094] 鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1重链可变区(VH) (SEQ ID NO:11)

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

[0095]

```
Thr
50           55           60
Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu
Thr
65           70           75           80
Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp
Gly
85           90           95
Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
Ala
100          105          110
```

[0096] 鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1轻链可变区(VH) (SEQ ID NO:12)

```

      Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser
      Ser
      1              5              10              15
      Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr
      Leu
      20              25              30
      Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser
[0097] Asn
      35              40              45
      Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly
      Thr
      50              55              60
      Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
      Val
      65              70              75              80
      Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
      Gly
[0098]              85              90              95
      Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      100

```

[0099] 在一个实施方案中，“人源化B-Ly1抗体”具有选自SEQ ID NO:7、8和13-33的重链可变区(VH)(特别是对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH2至B-HH9和B-HL8至B-HL17)。在一个具体实施方案中,这种可变结构域选自SEQ ID NO:14、15、7、19、27、29(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH2、BHH-3、B-HH6、B-HH8、B-HL8、B-HL11和B-HL13)。在一个具体实施方案中,“人源化B-Ly1抗体”具有SEQ ID NO:8的轻链可变区(VL)(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-KV1)。在一个具体实施方案中,“人源化B-Ly1抗体”具有SEQ ID NO:7的重链可变区(VH)(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH6)和SEQ ID NO:8的轻链可变区(VL)(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-KV1)。此外,在一个实施方案中,人源化B-Ly1抗体是IgG1抗体。根据本发明,此类无岩藻糖化人源化B-Ly1抗体是根据WO 2005/044859、WO 2004/065540、WO 2007/031875、Umana, P.等人,Nature Biotechnol.17(1999)176-180和WO 99/154342中描述的方法在Fc区被糖基化改造(GE)。在一个实施方案中,无岩藻糖化糖改造的人源化B-Ly1是B-HH6-B-KV1GE。在一个实施方案中,抗CD20抗体是奥比妥珠单抗(推荐的INN,WHO Drug Information, Vol.26, No.4, 2012, p.453)。如本文所用,奥比妥珠单抗是GA101或R05072759的同义词。这替代了所有以前的版本(例如Vol.25, No.1, 2011, p.75-76),并且以前称为阿替他布(afutuzumab)(推荐的INN,WHO Drug Information, Vol.23, No.2, 2009, p.176; Vol.22, No.2, 2008, p.124)。在一些实施方案中,人源化B-Ly1抗体是这样的抗体或其抗原结合片段,其包括:包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,人源化B-Ly1抗体包含:包含SEQ ID NO:9的三个重链CDR的重链可变区和包含SEQ ID NO:10的三个轻链CDR的轻链可变区。

[0100] 重链(SEQ ID NO:9)

	QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYAFS	YSWINWVRQA	PGQGLEWMGR	50
	IFPGDCDIDY	NGKFKGRVTI	TADKSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARNV	100
	FDGYWLVYWG	QGTILVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	150
	YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSSVVTV	PSSSLGTQTY	200
[0101]	ICNVNHKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCPP	CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK	250
	DTLMISRPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	300
	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	350
	YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFIYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTITPPVL	400
	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVVFSCSV	HEALHNHYTQ	KSLSLSPG	449
[0102]	轻链 (SEQ ID NO:10)					
	DIVMTQTPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSKSL	HSNGITYLYW	YLQKPGQSPQ	50
	LLIYQMSNLV	SGVPDRFSGS	GSGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCAQNLELP	100
[0103]	YTFCCCTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSCITASVCL	LNNFYPREAK	150
	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDYSTSL	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	200
	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC				219

[0104] 在一些实施方案中,人源化B-Ly1抗体是无岩藻糖化糖改造的人源化B-Ly1。这种糖改造的人源化B-Ly1抗体在Fc区中具有改变的糖基化模式,优选具有降低的岩藻糖残基水平。优选地,岩藻糖的量为Asn297处寡糖总量的60%或更少(在一个实施方案中,岩藻糖的量在40%至60%之间,在另一个实施方案中,岩藻糖的量为50%或更少,在又一个实施方案中,岩藻糖的量在30%或更少)。此外,Fc区的寡糖优选被二分(bisected)。这些糖改造的人源化B-Ly1抗体具有增加的ADCC。

[0105] “抗CD20抗体的与Raji细胞(ATCC编号:CCL_86)上CD20的结合力与利妥昔单抗的比值”通过直接免疫荧光测定法(测定平均荧光强度(MFI)),如实施例2中所述,使用与Cy5缀合的抗CD20抗体和与Cy5缀合的利妥昔单抗与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)在FACSArray (Becton Dickinson)中测定,并且计算如下:

[0106] 与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)上CD20的结合力的比值=

$$[0107] \frac{\text{MFI(Cy5-抗 CD20 抗体)}}{\text{MFI(Cy5-利妥昔单抗)}} \times \frac{\text{Cy5-标记比(Cy5-利妥昔单抗)}}{\text{Cy5-标记比(Cy5-抗 CD20 抗体)}}$$

[0108] MFI是平均荧光强度。本文所用的“Cy5-标记比”是指每分子抗体的Cy5-标记分子数。

[0109] 典型地,所述II型抗-CD20抗体具有的所述第二抗CD20抗体与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)上CD20的结合力与利妥昔单抗相比较的比值为0.3至0.6,在一个实施方案中为0.35至0.55,在另一个实施方案中为0.4至0.5。

[0110] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体(例如GA101抗体)具有增加的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0111] “具有增加的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的抗体”是指如在此所定义的该术语一样,具有根据本领域普通技术人员已知的任何适当的方法测定的增加的ADCC的抗体。一种公认的体外ADCC测定如下:

[0112] 1) 该测定使用已知表达由抗体的抗原结合区域识别的靶抗原的靶细胞;

[0113] 2) 该测定使用从随机选择的健康供体的血液中分离的人外周血单核细胞(PBMC)作为效应子细胞;

[0114] 3) 该测定根据以下方案进行:

[0115] i) PBMC使用标准密度离心程序分离,并以 5×10^6 个细胞/ml悬浮在RPMI细胞培养基中;

[0116] ii) 靶细胞通过标准的组织培养方法生长,从指数生长期收获,活力大于90%,在RPMI细胞培养基中洗涤,用100微居里的⁵¹Cr标记,用细胞培养基洗涤两次,并且以10⁵细胞/ml的密度重新悬浮在细胞培养基中;

[0117] iii) 将100微升上述最终靶细胞悬浮液转移到96孔微量滴定板的每个孔中;

[0118] iv) 将抗体在细胞培养基中从4000ng/ml连续稀释至0.04ng/ml,将50μl所得抗体溶液加入到96孔微量滴定板中的靶细胞中,将覆盖上面整个浓度范围内的各个抗体浓度一式三份测试;

[0119] v) 对于最大释放(MR)对照,含有标记的靶细胞的板中的另外3个孔接受50微升的2%(VN)非离子型去污剂(Nonidet, Sigma, St. Louis)的水溶液代替抗体溶液(上述点iv);

[0120] vi) 对于自发释放(SR)对照,含有标记的靶细胞的板中的另外3个孔接受50微升的RPMI细胞培养基代替抗体溶液(上面的点iv);

[0121] vii) 然后将96孔微量滴定板以50×g离心1分钟,并在4℃下温育1小时;

[0122] viii) 将50微升的PBMC悬浮液(上述点i)加入到每个孔中以产生25:1的效应细胞:靶细胞比例,并将板放置在37℃,5%CO₂气氛的培养箱中4小时;

[0123] ix) 收获每个孔的无细胞上清液,并使用γ计数器定量实验释放的放射性(ER);

[0124] x) 根据式 $(ER - MR) / (MR - SR) \times 100$ 计算每抗体浓度的特异性裂解百分比,其中ER是针对该抗体浓度定量的平均放射性(参见上述点ix),MR是MR对照(见上文点v)定量的平均放射性(见上述点ix),SR是SR对照(见上述点iv)定量的平均放射性(见上述点ix);

[0125] 4) “增加的ADCC”被定义为在上述测试的抗体浓度范围内观察到的特异性裂解的最大百分比的增加和/或上面测试的抗体浓度范围内观察到实现特异性裂解的最大百分比的一半所需的抗体浓度的降低。在一个实施方案中,ADCC的增加是采用上面测定法测定,相对于使用本领域专业技术人员公知的相同的标准生产方法、纯化方法、配制和保存方法,由相同类型宿主细胞产生的,由相同抗体介导的ADCC,但比较抗体(缺少增加的ADCC)不由被改造以过度表达GnTIII和/或被改造以具有从岩藻糖基转移酶8(FUT8)基因(例如,包括为FUT8敲除的改造)的降低的表达的宿主细胞产生的。

[0126] 所述“增加的ADCC”可以通过例如所述抗体的突变和/或糖改造来获得。在一个实施方案中,将抗体糖改造以具有连接到由GlcNAc平分的抗体的Fc区的双分支寡糖,例如在WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);US 2005/0123546(Umana等人),Umana,P.等人,Nature Biotechnol.17(1999)176-180)中。在另一个实施方案中,通过在蛋白质岩藻糖基化缺陷的宿主细胞(例如,Lec13 CHO细胞)或具有α-1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)缺失或FUT基因表达被敲减的细胞中表达抗体,抗体被糖改造以缺乏在结合到Fc区上的碳水化合物上的岩藻糖(参见例如Yamane-Ohnuki等人Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。在另一个实施方案中,抗体序列已经在其Fc区被改造以增强ADCC(例如,在一个实施方案中,这样的改造抗体变体包括Fc区域,其具有在Fc区的位置298、333和/或334的一个或多个氨基酸取代(残基的EU编号))。

[0127] 术语“补体依赖性细胞毒性(CDC)”是指在补体存在下,根据本发明的抗体对人肿瘤靶细胞的裂解。可以通过在补体存在下用根据本发明的抗CD20抗体处理CD20表达细胞的制剂来测定CDC。如果4小时后抗体以100nM的浓度诱导20%或更多肿瘤细胞的裂解(细胞死亡),则发现CDC。在一个实施方案中,用⁵¹Cr或Eu标记的肿瘤细胞进行测定并测量释放的

⁵¹Cr或Eu。对照包括肿瘤靶细胞与补体但不含抗体的温育。

[0128] 术语“表达CD20”抗原旨在表示CD20抗原在细胞,例如T细胞或B细胞中的显著水平的表达。在一个实施方案中,用根据本发明的方法治疗的患者在B细胞上表达显著水平的CD20。可以通过本领域已知的标准测定来测定B细胞上的CD20表达,例如,使用免疫组织化学(IHC)检测、FACS或通过相应mRNA的基于PCR的检测来测量CD20抗原表达。

[0129] 如本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代,除非另有明确规定。因此,例如,提到“一个分子”任选地包括两个或更多个这样的分子的组合等。

[0130] 本文所用的术语“约”是指本领域技术人员熟知的相应值的通常误差范围。这里引用“约”一数值或参数包括(和描述)针对该数值或参数本身的实施方案。

[0131] 应当理解,本文描述的本发明的方面和实施方案包括“包括”,“组成”和“基本上由.....组成”方面和实施方案。

[0132] III.方法

[0133] 在一个方面,本文提供了通过施用有效量的II型抗CD20抗体来治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎进展的方法。在一些实施方案中,个体具有或具有发展为狼疮性肾炎的风险。在一些实施方案中,狼疮性肾炎是III类或IV类狼疮性肾炎。在一些实施方案中,所述方法包括向个体施用对于II型抗-CD20抗体的第一次抗体暴露和对于II型抗-CD20抗体的第二次抗体暴露,第二次抗体暴露直到第一次抗体暴露后约18周至约26周才提供;其中所述第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第一次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg的所述II型抗-CD20抗体的总暴露;并且其中所述第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第二次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg的所述II型抗-CD20抗体的总暴露。如下所述,在一些实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链和包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链。在一些实施方案中,抗体包含:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL结构域。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含这样的抗体,其包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且其包括与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。

[0134] 抗CD20抗体

[0135] 本公开的某些方面涉及抗CD20抗体,例如用于治疗或预防狼疮性肾炎进展的方法中。在一些实施方案中,抗CD20抗体是II型抗体。在一些实施方案中,抗CD20抗体是人或人源化的。在一些实施方案中,抗CD20抗体是无岩藻糖基化的。在一些实施方案中,抗CD20抗体是GA101抗体。

[0136] II型抗-CD20抗体的实例包括例如,人源化B-Ly1抗体IgG1(如WO 2005/044859中公开的嵌合人源化IgG1抗体),11B8 IgG1(如WO 2004/035607所公开)和AT80 IgG1。通常IgG1同种型的II型抗CD20抗体显示出特征性的CDC性质。与IgG1同种型的I型抗体相比,II型抗CD20抗体具有降低的CDC(如果IgG1同种型)。

[0137] I型抗-CD20抗体的实例包括例如,利妥昔单抗,HI47 IgG3(ECACC,杂交瘤),2C6IgG1(如WO 2005/103081所公开),2F2 IgG1(如WO 2004/035607和WO 2005/103081所公

开)和2H7 IgG1(如WO 2004/056312所公开)。

[0138] 在一些实施方案中,抗CD20抗体是本文所述的GA101抗体。在一些实施方案中,抗CD20是结合人CD20的以下抗体中的任一种:(1)抗体,包括:包括GYAFSY (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的HVR-H1,包括FPGDGD TD (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-H2,包括NVFDGYWLVY (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的HVR-H3,包括RSSKSLLSNGITYLY (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1,包括QMSNLVS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2和包括AQNLELPYT (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3;(2)抗体,包括:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL结构域,(3)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的抗体;(4)称为奥比妥单抗的抗体,或(5)抗体,包括与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列,并且其包括与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,GA101抗体是IgG1同种型抗体。在一些实施方案中,抗CD20抗体包含本文所述任何抗体的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,例如来自SEQ ID NO:7的3HVR,来自SEQ ID NO:8的3HVR,来自SEQ ID NO:9的3HVR和来自SEQ ID NO:10的3HVR,或者表2中提供的氨基酸序列的任何HVR。

[0139] 在一些实施方案中,抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区(VH)和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区(VL)。

[0140]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO:7)

[0141]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFT
LKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTV (SEQ ID NO:8) .

[0142] 在一些实施方案中,抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链。

[0143]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYCKKVS NKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:9)

[0144]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFT
LKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)

[0145]

[0146] 在一些实施方案中,抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。在一些实施方案中,人源化B-Ly1抗体包含:包含SEQ ID NO:9的三个重链CDR的重链可变区和包含SEQ ID NO:10的三

个轻链CDR的轻链可变区。在一些实施方案中,人源化B-Ly1抗体包含:包含SEQ ID NO:9的序列的重链和包含SEQ ID NO:10的序列的轻链。

[0147] 在一些实施方案中,抗CD20抗体包含与下表2中列出的多肽序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0148] 表2.多肽序列。

[0149]

[0150]

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YTFSSYSWMSWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDY A Q K F Q G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S S	13
B-HH2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YAFSSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDY N G K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S S	14
B-HH3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YAFSSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDY N G K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y L C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S S	15
B-HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSG YAFSSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDY N G K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S S	16
B-HH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YAFSSYSWMSWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDY N G K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S S	17
B-HH6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YAFSSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIF P G D G D T D Y N G K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S S	7
B-HH7	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASG YAFSSYSWISWVRQAPGQGLEWMGRIF P G D G D T D Y N G K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R N V F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S S	18

[0151]

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HH8	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGY WL VYWGQGTLVTVSS	19
B-HH9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFSYSWMNWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGY WL VYWGQGTLVTVSS	20
B-HL1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTYSWMHWRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGY WL VYWGQGTLVTVSS	21
B-HL2	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGY TFTYSWMHWVQQAPGKGLEWMGRIF PGDGD TDYAEKFQGRVTITADTSTD TA YMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	22
B-HL3	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGY TFTYSWMNWVQQAPGKGLEWMGRIF PGDGD TDYNGKFKGRVTITADTSTD TA YMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	23
B-HL4	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASG YTFTYSWMSWVRQAPGQGLEWMGRI FPGDGD TDYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGY WL VYWGQGTLVTVSS	24
B-HL8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFP GDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	25

[0152]

构建体	多肽序列	SEQ ID NO
B-HL10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF AFSYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIF PGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	26
B-HL11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSYSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIFP GDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWL VYWGQGTLVTVSS	27
B-HL12	EVQLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGF TFSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIF PGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	28
B-HL13	EVQLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGF TFSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIF PGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	29
B-HL14	EVQLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGF TFSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIF PGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	30
B-HL15	EVQLVESGGGLVKPGSSLRLSCAASGF TFSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIF PGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	31
B-HL16	EVQLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGF TFSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIF PGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYW LVYWGQGTLVTVSS	32

	构建体	多肽序列	SEQ ID NO
	B-HL17	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVRQAPGKGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS	33
[0153]	VH 信号序列	MDWTWRILFLVAAATGAHS	34
	B-KV1	DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSKSL LHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTV	8
	VL 信号序列	MDMRVPAQLLGLLLLWFPGARC	43

[0154] 在一些实施方案中,抗-CD20抗体(例如II型抗-CD20抗体)是无岩藻糖化糖改造抗体。这样的糖改造抗体在Fc区具有改变的糖基化模式,优选具有降低的岩藻糖残基水平。优选地,岩藻糖的量为Asn297处寡糖总量的60%或更少(在一个实施方案中,岩藻糖的量在40%至60%之间,在另一个实施方案中,岩藻糖的量为50%或更少,在又一个实施方案中,岩藻糖的量为30%或更少)。此外,Fc区的寡糖优选被平分。这些糖改造的人源化抗CD20(例如,B-Ly1)抗体具有增加的ADCC。

[0155] 寡糖组分可以显著影响与治疗性糖蛋白功效相关的性质,包括物理稳定性、对蛋白酶攻击的抗性、与免疫系统的相互作用、药代动力学和特异性生物学活性。这些性质不仅取决于寡糖的存在与否,而且还取决于特定结构。可以对寡糖结构与糖蛋白功能之间进行一些概括。例如,某些寡糖结构通过与特定碳水化合物结合蛋白的相互作用而介导糖蛋白从血液快速清除,而其他寡糖结构可以被抗体结合并触发不期望的免疫反应。(Jenkins, N.等人,Nature Biotechnol.14(1996)975-81)。

[0156] 哺乳动物细胞是生产治疗性糖蛋白的优选宿主,因为它们具有以对人类应用最相容形式来糖基化蛋白的能力。(Cumming,D.A.,等人,Glycobiology 1(1991)115-30; Jenkins,N.等人,Nature Biotechnol.14(1996)975-81)。细菌对糖基化蛋白质很罕见,并且类似其他类型的常见宿主如酵母、丝状真菌、昆虫和植物细胞,产生与从血流中快速清除、不期望的免疫相互作用相关,在一些特定情况下,降低生物活性的糖基化模式。在哺乳动物细胞中,在过去二十年中是最常用的是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。除了给出合适的糖基化模式之外,这些细胞允许不断地产生遗传稳定的、高产的克隆细胞系。它们可以使用无血清培养基在简单生物反应器中培养至高密度,并允许开发安全可重复的生物过程。其他常用的动物细胞包括幼仓鼠肾(BHK)细胞、NS0-和SP2/0-小鼠骨髓瘤细胞。近来,也测试了由转基因动物的生产。(Jenkins,N.等人,Nature Biotechnol.14(1996)975-981)。

[0157] 所有抗体在重链恒定区中在保守位置含有碳水化合物结构,每个同种型具有一组不同的N-连接碳水化合物结构,其可变地影响蛋白质组装、分泌或功能活性。(Wright,A.和

Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32)。所连接的N-连接的碳水化合物的结构取决于加工程度而显著变化,并且可以包括高甘露糖、多分支以及双分支的复合寡糖。(Wright, A.和Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32)。通常,在特定糖基化位点处连接的核心寡糖结构存在不均一的加工,使得甚至单克隆抗体以多种糖形存在。同样,已经表明抗体糖基化的主要差异发生在细胞系之间,并且甚至在不同培养条件下生长的给定细胞系中也观察到较小的差异。(LiFcly, M.R., 等人, Glycobiology 5 (8) (1995) 813-22)。

[0158] 获得大幅度增加的效力,同时保持简单的生产工艺并潜在地避免明显的不良副作用的一种方式如Umana P., 等人, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180和US 6,602,684中所述,通过改造其寡糖成分来增强单体抗体的天然的、细胞介导的效应子功能。IgG1型抗体是癌症免疫治疗中最常用的抗体,其是在每个CH2结构域中在Asn297处具有保守的N-连接糖基化位点的糖蛋白。连接到Asn297上的两个复合的双分支寡糖被掩埋在CH2结构域之间,与多肽骨架形成广泛的接触,并且它们的存在对于抗体介导效应子功能如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 是必需的 (LiFcly, MR等人, Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jeffcris, R. 等人, Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. 和Morrison, SL, Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32)。

[0159] 先前已经表明, $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺基转移酶II1 (“GnTII17y”) (是催化平分寡糖形成的糖基转移酶) 在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中的过度表达,显著增加由改造的CHO细胞产生的抗成神经细胞瘤嵌合单克隆抗体 (chCE7) 的体外ADCC活性 (参见Umana, P. 等人, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; 和WO 99/154342,其全部内容通过整体引用引入本文)。抗体chCE7属于具有高肿瘤亲和性和特异性的一大类非缀合的单克隆抗体,但在缺乏GnTIII酶的标准工业细胞系中生产时效力太低而不能用于临床 (Umana, P等人, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180)。该研究首先显示通过改造生产抗体的细胞来表达GnTIII可以获得ADCC活性的大幅增加,其也可以导致恒定区 (Fc) 相关的平分的寡糖,包括平分的无岩藻糖化寡糖的比例增加,高于天然存在的抗体中发现的水平。

[0160] 在一些实施方案中,抗CD20抗体 (例如II型抗-CD20抗体) 包括人Fc区 (例如人IgG1 Fc区)。在一些实施方案中,Fc区包括已经修饰的N-连接的寡糖。在一些实施方案中,与具有未修饰的N-连接寡糖的抗体相比,Fc区的N-连接寡糖具有降低的岩藻糖残基。在一些实施方案中,平分的寡糖是平分的复合寡糖。在一些实施方案中,N-连接的寡糖已经被修饰为具有增加的平分无岩藻糖化寡糖。在一些实施方案中,平分的无岩藻糖化寡糖是杂交型。在一些实施方案中,平分的无岩藻糖化寡糖是复合型。关于更详细的描述,参见例如WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人); 美国专利号6,602,684 (Umana等人); US 2005/0123546 (Umana等人); 和美国专利8,883,980 (Umana等人)。

[0161] 在一些实施方案中,抗CD20抗体 (例如II型抗-CD20抗体) 是多特异性抗体或双特异性抗体。

[0162] 抗体制备

[0163] 根据任何上述实施方案的抗体 (例如,本公开的II型抗CD20抗体) 可以单独或组合地并入如以下1-7节所述的任何特征:

[0164] 1. 抗体亲和力

[0165] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq$

0.1nM, ≤ 0.01 nM或 ≤ 0.001 nM的解离常数(Kd)(例如, 10^{-8} M或更小,例如 10^{-8} M至 10^{-13} M,例如 10^{-9} M至 10^{-13} M)。

[0166] 在一个实施方案中,通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)测量Kd。在一个实施方案中,使用Fab形式的目标抗体及其抗原进行RIA。例如,Fabs对抗原的溶液结合亲和力通过在滴定一系列未标记抗原存在下用最小浓度的(125 I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原而测量(参见例如Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立测定条件,将**MICROTITER®**多孔板(Thermo Scientific)用在50mM碳酸钠(pH9.6)中的5 μ g/ml的捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)包被过夜,随后用在PBS中的2% (w/v)牛血清白蛋白在室温(约23℃)下封闭2至5小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM [125 I]-抗原与目标Fab的系列稀释液混合(例如,与抗-VEGF抗体,Fab-12的评估一致,Presta等人,Cancer Res.57:4593-4599(1997))。然后将目标Fab温育过夜;然而,温育可以持续较长时间(例如约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移到捕获板中,以在室温下温育(例如1小时)。然后除去溶液,并用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20)将板洗涤8次。当板干燥时,加入150 μ l/孔的闪烁剂(MICROSCINT-20™;Packard),并将板在TOPCOUNT™ γ 计数器(Packard)上计数10分钟。选择给出小于或等于最大结合的20%的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定。

[0167] 根据另一个实施方案,使用**BIACORE®**表面等离子体共振测定法测量Kd。例如,使用**BIACORE®**-2000或BIACORE-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)的测定,在25℃使用固定的抗原CM5芯片以约10个应答单位(RU)进行。在一个实施方案中,根据供应商的说明书,用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5, BIAcore, Inc.)。在注射前以5 μ l/分钟的流速用10mM乙酸钠(pH4.8)将抗原稀释至5 μ g/ml ($\sim 0.2\mu$ M),以获得约10个应答单位(RU)的偶联蛋白。注射抗原后,注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。为了动力学测量,在25℃以约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中的两倍连续稀释的Fab(0.78nM至500nM)。使用简单一对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型(**BIACORE®** Evaluation Software version 3.2)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(kon)和解离速率(Koff)。平衡解离常数(Kd)以koff/kon比计算。参见例如Chen等人,J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过上述表面等离子共振测定的结合速率超过 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$,则可以通过使用荧光猝灭技术测量结合速率,其正如在分光计例如配备了断流装置的分光光度计(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯(stirred cuvette)测量的,在存在浓度渐增的抗原的条件下,测量PBS, pH 7.2中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)在25℃的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm, 16nm带通)的升高或降低。

[0168] 2. 抗体片段

[0169] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段,以及下述其它片段。有关某些抗体片段的综述,参见Hudson等人,Nat. Med. 9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Pluckthün, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113, Rosenberg and Moore编, (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315(1994); 另参见WO 93/16185; 和美国专利号5,571,894和5,

587,458。关于包括补救受体结合表位残基并具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段的讨论,参见美国专利号5,869,046。

[0170] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价或双特异性的。参见例如EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,,Nat.Med.9:129-134(2003);和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。Habson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中也描述了三抗体和四抗体。

[0171] 单结构域抗体是包括抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体(Domantis,Inc., Waltham,MA;参见例如美国专利号6,248,516B1)。

[0172] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及如本文所述的通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)生产。

[0173] 3.嵌合和人源化抗体

[0174] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。例如,在美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984)中描述了某些嵌合抗体。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔、或非人灵长动物,诸如猴的可变区)和人恒定区。在另外的实例中,嵌合抗体是“类别交换的”抗体,其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类改变。嵌合抗体包含其抗原结合片段。

[0175] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化的抗体。通常,非人抗体经人源化以降低对人的免疫原性,同时保持亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化的抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如,CDR(或其部分)源自非人抗体,并且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化的抗体任选地也包含至少一部分人恒定区。在一些实施方案中,人源化的抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基源自的抗体)的对应的残基取代,例如,以恢复或提高抗体特异性或亲和力。

[0176] 人源化的抗体和制备其的方法在例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中综述,并在例如,Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述了特异性决定区域(SDR)的移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“表面重修”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述了“FR改组”);和Osborn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了FR改组的“导向选择”方法)中进一步描述。

[0177] 可用于人源化的人构架区包括但不限于:使用“最适”方法选择的构架区(参见,例如,Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));源自特别亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的构架区(参见,例如,Carter等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等人J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变的)构架区或人种系构架区(参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和源自筛选FR文库的构架区(参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0178] 4.人抗体

[0179] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术生产人抗体。在van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中大体地描述了人抗体。

[0180] 可以通过对转基因动物施用免疫原制备人抗体,所述转基因动物已被修饰以应答抗原攻击而生产完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其取代了内源性免疫球蛋白基因座,或存在于染色体外或随机整合到动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被失活。获取来自转基因动物的人抗体的方法的综述参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。也参见,例如,描述了XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述了**HUMAB®**技术的美国专利号5,770,429;描述了**K-MOUSE®**技术的美国专利号7,041,870,和描述了**VELOCIMOUSE®**技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。来自此类动物生成的完整抗体的人可变区可例如,通过与不同的人恒定区组合进一步修饰。

[0181] 也可以通过基于杂交瘤的技术生产人抗体。已经描述了用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系(参见,例如,Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984); Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等人,J.Immunol.,147:86(1991))。经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体也在Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)中描述。额外的方法包括,例如,在美国专利号7,189,826(描述了从杂交瘤细胞系生产单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述了人-人杂交瘤)中描述的那些。人杂交瘤技术(Trioma技术)也在Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中描述。

[0182] 也可以通过分离选自源自人的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列生成抗体。此类可变结构域序列然后可以与期望的人恒定结构域组合。下文描述了从抗体文库选择人抗体的技术。

[0183] 5.源自文库的抗体

[0184] 可通过筛选组合文库的具有期望的一种或多种活性的抗体分离本发明的抗体。例如,本领域已知用于生成噬菌体展示文库和筛选此类文库的具有期望的结合特征的抗体的多种方法。此类方法在例如Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2001)中综述并在,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo,编辑,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)中进一步描述。

[0185] 在某些噬菌体展示方法中,VH和VL基因的库通过聚合酶链式反应(PCR)分别克隆并在噬菌体文库中随机重组,其然后可以筛选抗原结合噬菌体,如Winter等人,

Ann.Rev.Immunol.,12:433-455 (1994) 中所述。噬菌体通常展示抗体片段,作为单链抗体Fv (scFv) 片段或作为Fab片段。来自经免疫的来源的文库提供了对免疫原高亲和力的抗体而不需要构建杂交瘤。备选地,可以克隆初始库(例如,从人)以对广泛范围的非自身以及自身抗原提供单个来源的抗体而没有任何免疫,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734 (1993) 所述。最后,也可以通过克隆来自干细胞的未重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR 引物以编码高度可变的CDR3区并且实现体外重排,合成地制备初始文库,如Hoogenboom和 Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388 (1992) 所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括,例如:美国专利号5,750,373,和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0186] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段在本文被认为是人抗体或人抗体片段。

[0187] 6. 多特异性抗体

[0188] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是具有对于至少两个不同位点的结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性之一是对于CD20而另一种是对于任何其他抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合CD20的两种不同表位。双特异性抗体也可用于将细胞毒性剂定位至表达CD20的细胞。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段制备。

[0189] 用于制备多特异性抗体的技术包括,但不限于,重组共表达具有不同特异性的两条免疫球蛋白重链-轻链对(参见,Milstein和Cuellar,Nature 305:537 (1983))、WO 93/08829,和Traunecker等人,EMBO J.10:3655 (1991)),和“旋钮入孔(knob-in-hole)”改造(参见,例如,美国专利号5,731,168)。也可以通过改造静电转向效应以制备抗体Fc异二聚体分子(WO2009/089004A1);交联两个或多个抗体或片段(参见,例如,美国专利号4,676,980,和Brennan等人,Science,229:81 (1985));使用亮氨酸拉链生产双特异性抗体(参见,例如,Kostelny等人,J.Immunol.,148 (5):1547-1553 (1992));使用用于制备双特异性抗体片段的“双抗体”技术(参见,例如,Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448 (1993));和使用单链Fv (sFv) 二聚体(参见,例如Gruber等人,J.Immunol.,152:5368 (1994));和例如,如Tutt等人J.Immunol.147:60 (1991) 中所述制备三特异性抗体,来制备多特异性抗体。

[0190] 本文也包括具有三种或更多种功能性抗原结合位点的经改造的抗体,包括“章鱼抗体”(参见,例如US 2006/0025576A1)。

[0191] 本文的抗体或片段也包括“双作用Fab”或“DAF”,其包含结合CD20以及另一种不同抗原的抗原结合位点(参见例如,US 2008/0069820)。

[0192] 7. 抗体变体

[0193] 在某些实施方案中,设想本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,提高抗体的结合亲和力和/或其他生物学性质可以是理想的。可以通过将适当的修饰引入编码抗体的核苷酸序列,或者通过肽合成制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如,在抗体的氨基酸序列内缺失,和/或插入和/或取代残基。可以使得缺失、插入,和取代的任意组合达到最终的构建体中,前提是最终构建体拥有期望的特征,例如,抗原结合。

[0194] a) 取代、插入和缺失变体

[0195] 在某些实施方案中,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。取代诱变的

目标位点包括HVR和FR。在表A中标题“保守取代”下显示保守取代。在表A中标题“示例性取代”下提供更实质的改变,并如参考氨基酸侧链类别在下文进一步描述的。可以将氨基酸取代引入到目标抗体中并筛选产物的期望的活性,例如,保留的/提高的抗原结合,降低的免疫原性,或提高的ADCC或CDC。

[0196] 表A

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp(D)	Glu; Asn	Glu
Cys(C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu(E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu(L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala

[0198]

原始残基	示例性取代	优选的取代
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0199] 可以根据共同的侧链性质将氨基酸分组:

[0200] (1) 疏水的: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0201] (2) 中性亲水的: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0202] (3) 酸性的: Asp、Glu;

[0203] (4) 碱性的: His、Lys、Arg;

[0204] (5) 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0205] (6) 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

[0206] 非保守取代将使得这些类别中之一的成员与另一类别交换。

[0207] 一类取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化的或人抗体)的一个或多个超变区残基。一般而言,选择用于进一步研究的(一种或多种)获得的变体将在某些生物学性质(例如增加的亲和力、降低的免疫原性)中相对于亲本抗体具有修饰(例如提高)和/或具有亲本抗体的基本保留的某些生物学性质。示例性的取代变体是亲和力成熟的抗体,其可以方便地生成,例如,使用诸如那些本文描述的基于噬菌体展示的亲和力成熟技术。简而言之,突变一个或多个HVR残基并且在噬菌体上展示变体抗体并就特别的生物学活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0208] 可以在HVR中制造变异(例如,取代),例如,以提高抗体亲和力。此类变异可以在HVR“热点”,即由在体细胞成熟过程中以高频率经历突变的密码子所编码的残基(参见,例如,Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)),和/或接触抗原的残基出进行,测试获得的变体VH或VL的结合亲和力。通过构建并从第二文库重新选择的亲和力成熟已经在,例如Hoogenboom等人 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人,编, Human Press, Totowa, NJ, (2001).) 中描述。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法中的任何一种(例如,易错PCR、链改组、或寡核苷酸定向诱变)将多样性引入到选择用于成熟的可变基因中。然后产生第二文库。然后筛选文库以鉴定具有期望的亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中随机化若干HVR残基(例如,一次4-6个残基)。可以特异性地鉴定抗原结合中涉及的HVR残基,例如使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0209] 在某些实施方案中,取代、插入、或缺失可以在一个或多个HVR内发生,只要此类变异不实质性地降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中制备不实质性地降低结合亲和力的保守改变(例如,如本文提供的保守取代)。此类改变可以,例如在HVR中接触残基的抗原之外。在以上提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或未改变,或含有不多于一个、两个或三个氨基酸取代。

[0210] 鉴定可被靶向用于诱变的抗体的残基或区域的可用的方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所述。在此方法中,鉴定残基或靶残基的组(例如,带电的残基诸如arg、asp、his、lys和glu)并使用中性或带负电的氨基酸(例如丙氨酸或多聚丙氨酸)将其取代以测定是否影响抗体与抗原的相互作用。可以在表现出对于初始取代功能性敏感的氨基酸位置处引入其他取代。备选地,或额外地,抗原抗体复合物的晶体结构鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以作为取代候选对象靶向或消除此类接触残基和相邻残基。可以筛选变体以测定其是否含有期望的性质。

[0211] 氨基酸序列插入片段包括长度范围从一个残基至含有100个或更多残基的多肽的氨基或羧基末端融合物,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入片段。末端插入片段的

实例包括具有N末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N或C末端与酶(例如ADEPT)或增加抗体的血清半寿期的多肽的融合。

[0212] b) 糖基化变体

[0213] 在某些实施方案中,本文提供的抗体被改变以增加或降低抗体被糖基化的程度。对抗体添加或缺失糖基化位点可以通过改变氨基酸序列从而使得产生或移除一个或多个糖基化位点而方便地实现。

[0214] 当抗体包含Fc区时,可以改变附着于其的糖类。由哺乳动物细胞生产的天然抗体通常包含分支的、二分支的寡糖,所述寡糖一般通过N连接附着于Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH15:26-32(1997)。寡糖可包括多种糖类,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖、和唾液酸,以及附着于二分支寡糖结构的“茎干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以制造本发明的抗体中寡糖的修饰以创造具有某些提高的性质的抗体变体。

[0215] 在一个实施方案中,提供的抗体变体具有缺少(直接或间接)附着于Fc区的岩藻糖的糖类结构。例如,此类抗体中岩藻糖的量可以为从1%至80%,从1%至65%,从5%至65%或从20%至40%。通过计算糖链内Asn297处的岩藻糖的平均量相对于附着于Asn 297(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的全部糖基结构的总和测定岩藻糖的量,如通过MALDI-TOF质谱法测量,如,例如WO 2008/077546中所述。Asn297指位于Fc区中约297位(Fc区残基的Eu编号)的天冬酰胺残基;然而,Asn297也可位于297位的约±3个氨基酸上游或下游,即位置294和300之间,由于抗体中微小的序列变异。此类岩藻糖化变体可具有提高的ADCC功能。参见,例如,美国专利公开号US 2003/0157108(Presta,L.);US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。涉及“去岩藻糖化的”或“岩藻糖缺陷的”抗体变体的公开的实例包括:US 2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等人,J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够生产去岩藻糖化的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖化缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等人Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);US专利申请号US 2003/0157108A1,Presta,L;和WO 2004/056312A1,Adams等人,特别在实施例11中),和敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖转移酶基因,FUT8,敲除CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0216] 提供的抗体变体还具有二分的寡糖,例如,其中附着于抗体Fc区的二分支寡糖被GlcNAc二分。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖化和/或提高的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)中。也提供了在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有提高的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0217] c) Fc区变体

[0218] 在某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入到本文提供的抗体的Fc区

中,从而生成Fc区变体。Fc区变体可以包含人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区),所述序列在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如取代)。

[0219] 在某些实施方案中,本发明设想具有一些但并非全部效应子功能的抗体变体,这使得其是这样的应用的理想的候选者,所述应用中抗体的体内半寿期是重要的然而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)是不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定法以确认CDC和/或ADCC活性的降低/耗尽。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定法以确保抗体缺少Fc γ R结合(因此可能缺少ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞,NK细胞,仅表达Fc γ RIII,然而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的464页上的表3中总结。用于评估目的分子的ADCC活性的体外测定法的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见,例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中。备选地,可以采用非放射性测定法(参见,例如,流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定法(CellTechnology, Inc.Mountain View,CA;和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定法(Promega,Madison,WI))。用于此类测定法的有用的效应子细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地,或额外地,目的分子的ADCC活性可以在体内评估,例如在动物模型中,例如Clynes等人Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的。也可以进行C1q结合测定法以确认抗体不能结合C1q并因此缺少CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体激活,可以进行CDC测定法(参见,例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。FcRn结合和体内清除/半寿期测定也可以使用本领域已知的方法进行(参见,例如,Petkova,S.B.等人,Int'l Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0220] 具有降低的效应子功能的抗体包含在Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个具有取代的那些抗体(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或多个处具有取代的Fc突变体,包括具有残基265和297取代为丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0221] 在某些实施方案中,本文所述的Fc变体还包含用于减弱效应子功能(例如CDC和/或ADCC)的一种或多种氨基酸修饰。在示例性实施方案中,减弱效应子功能的修饰是不改变Fc区糖基化模式的修饰。在某些实施方案中,减弱效应子功能的修饰减少或消除与人效应子细胞的结合,与一种或多种Fc受体的结合和/或与表达Fc受体的细胞的结合。在一个示例性实施方案中,本文所述的Fc变体包含以下修饰:人IgG1的Fc区中的L234A、L235A和P329G,其导致减弱的效应子功能。先前已经显示了取代L234A、L235A和P329G(L234A/L235A/P329G三重变体被称为LALAPG)减少与Fc受体和补体的结合(参见例如美国公开号2012/0251531)。

[0222] 在各种实施方案中,具有降低的效应子功能的Fc变体是指与野生型Fc区实现的效应子功能(例如Fc区不具有降低效应子功能的突变,尽管它可能具有其它突变)相比,将效应子功能(例如,CDC、ADCC和/或与FcR等结合的活性)降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%或更多的Fc变体。在某些实施方案中,具有降

低的效应子功能的Fc变体是指与野生型Fc区相比消除所有可检测的效应子功能的Fc变体。用于测量效应子功能的测定法是本领域已知的并在下面描述。

[0223] 可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的减少/消除。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性)。用于介导ADCC的原代细胞,NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI,Fc γ RII和Fc γ RIII。在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)中总结了造血细胞上的FcR表达。美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987)))中描述了评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例。或者,可以使用非放射性测定方法(参见例如ACTI™非放射性细胞毒性测定用于流式细胞术(CellTechnology,Inc.Gamton View,CA;和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI)。用于这种测定的有用的效应子细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。或者或另外,可以在体内评估目的分子的ADCC活性,例如在动物模型如Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中所公开的。也可以进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q,因此缺乏CDC活性。参见WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以进行CDC测定(参见,例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,MS等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,MS和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。

[0224] 描述了具有提高的或减弱的与FcR结合的某些抗体变体。(参见,例如,美国专利号6,737,056;WO 2004/056312和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0225] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有提高ADCC的一个或多个氨基酸取代的Fc区,例如Fc区的位置298、333和/或334处(残基的EU编号)的取代。

[0226] 在一些实施方案中,在Fc区进行改变,其导致改变的(即提高的或减弱的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人J.Immunol.164:4178-4184(2000)中所述。

[0227] 具有增加的半寿期和提高的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体在US2005/0014934A1(Hinton等人)中描述,所述新生儿Fc受体负责母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。那些抗体包含其中具有提高Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代的Fc区。此类Fc变体包括在Fc区残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434中的一个或多个处具有取代的那些,例如Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。

[0228] 关于Fc区变体的其他实例也参见Duncan&Winter,Nature322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0229] d) 半胱氨酸改造的抗体变体

[0230] 在某些实施方案中,产生半胱氨酸改造的抗体是理想的,例如,“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在特别的实施方案中,被取代的残基存在于抗体的易接近的位点处。通过用半胱氨酸取代那些残基,从而将反应性巯基团放置于抗体的可接近位点处并可用于缀合抗体与其他部分,诸如药物部分或接头药物部分,以产生免

疫缀合物,如本文另外所述。在某些实施方案中,以下残基中的任何一个或多个可被半胱氨酸取代:轻链的V205 (Kabat编号);重链的A118 (EU编号);和重链Fc区的S400 (EU编号)。可以如,例如美国专利号7,521,541中所述地生成半胱氨酸改造的抗体。

[0231] e) 抗体衍生物

[0232] 在某些实施方案中,还可进一步修饰本文提供的抗体以含有本领域已知的并且容易获得的额外的非蛋白质部分。适合于抗体的衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括,但不限于,聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物),和葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烷化多元醇(例如丙三醇)、聚乙烯醇,及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性可在生产中具有优势。聚合物可具有任意分子量,并且可为分支的或无分支的。附着于抗体的聚合物的数目可不同,并且如果附着多于一个聚合物,它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可以基于如下考虑确定,包括,但不限于,待改善的抗体的特别的性质或功能,抗体衍生物是否将在定义的条件用于疗法中,等。

[0233] 在另一个实施方案中,提供了抗体和可以通过暴露于辐射选择性地加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:11600-11605 (2005))。辐射可以具有任何波长,并且包括,但不限于,这样的波长,所述波长不伤害普通细胞,但将非蛋白质部分加热至杀死抗体-非蛋白质部分临近的细胞的温度。

[0234] A. 重组方法和组合物

[0235] 可以使用重组方法和组合物制备抗体,例如美国专利号4,816,567中所述。在一个实施方案中,提供了编码本文所述抗CD20抗体的分离的核酸。这样的核酸可以编码抗体的包括VL的氨基酸序列和/或包括VH的氨基酸序列(例如抗体的轻链和/或重链)。在另一个实施方案中,提供了一种或多种包含该核酸的载体(例如,表达载体)。在另一个实施方案中,提供了包括这种核酸的宿主细胞。在一个这样的实施方案中,宿主细胞包括(例如,已经被转化):(1)载体,其包括编码包括抗体的VL的氨基酸序列和包括抗体的VH的氨基酸序列的核酸,或(2)包括编码包括抗体VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包括编码包括抗体VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞是真核生物,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴细胞(例如Y0,NS0,Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供了制备抗CD20抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达所述抗体的条件下,培养如上所提供的包括编码抗体的核酸的宿主细胞,并任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0236] 为重组产生抗CD20抗体,将编码抗体(例如,如上所述)的核酸分离并插入一种或多种载体以便进一步克隆和/或在宿主细胞中表达。可以使用常规方法(例如,通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),轻易地分离这种核酸并测序。

[0237] 克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,可以在细菌中生产抗体,尤其当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还参见Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol.248 (B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, NJ, 2003),

pp.245-254,其描述在大肠杆菌中表达抗体片段)。在表达后,可以将抗体从细菌细胞糊状物分离于可溶性级分中并且可以进一步纯化抗体。

[0238] 除原核生物之外,真核微生物如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适克隆宿主或表达宿主,包括其糖基化途径已经“人源化”的真菌和酵母菌株,导致产生具有部分或完全人类糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414 (2004),和Li等人,Nat.Biotech.24:210-215 (2006)。

[0239] 表达糖基化抗体的合适宿主细胞还源自多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的例子包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定了可以与昆虫细胞一起使用,尤其用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的众多杆状病毒毒株。

[0240] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0241] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如,适应于悬浮培育的哺乳动物细胞系可以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他例子是由SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(如Graham等人,J.Gen Virol.36:59 (1977)中所述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(如在例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251 (1980)中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛鼠肝脏细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝脏细胞(Hep G2);小鼠乳腺癌瘤细胞(MMT060562);TRI细胞,如在例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68 (1982)中所述;MRC5细胞和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA77:4216 (1980));和骨髓瘤细胞系如Y0、NS0和Sp2/0。关于适于产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248 (B.K.C.Lo编,Humana Press,Totowa,NJ), pp.255-268 (2003)。

[0242] B.测定法

[0243] 本文提供的抗CD20抗体可以通过本领域已知的各种测定法来鉴定、筛选或表征其物理/化学性质和/或生物活性。

[0244] I.结合测定和其他测定

[0245] 在一个方面,测试本发明的抗体的抗原结合活性,例如通过已知方法例如ELISA、Western印迹等。可以使用本领域已知的方法测定CD20结合,并公开示例性方法于此。在一个实施方案中,使用放射免疫测定来测量结合。下面提供示例性放射免疫测定。CD20抗体被碘化,并制备含有固定浓度的碘化抗体和降低浓度的连续稀释的未标记CD20抗体的竞争反应混合物。将表达CD20的细胞(例如,用人CD20稳定转染的BT474细胞)加入到反应混合物中。温育后,洗涤细胞以从与细胞结合的CD20抗体中分离游离的碘化CD20抗体。测定结合的碘化CD20抗体的水平,例如通过计数与细胞相关的放射性和使用标准方法测定的结合亲和力。在另一个实施方案中,使用流式细胞术评估CD20抗体与表面表达的CD20结合的能力(例如,在B细胞亚群上)。获得外周白细胞(例如,来自人、食蟹猴、大鼠或小鼠),并用血清封闭细胞。标记的CD20抗体以连续稀释加入,并且还染色T细胞以鉴定T细胞亚群(使用本领域已知的方法)。在样品温育和洗涤后,使用流式细胞术分选细胞,并使用本领域熟知的方法分

析数据。在另一个实施方案中,可以使用表面等离子共振分析CD20结合。示例性的表面等离子体共振方法在实施例中举例说明。

[0246] 在另一方面,竞争测定可用于鉴定与本文公开的任何抗CD20抗体竞争结合CD20的抗体。在某些实施方案中,这种竞争性抗体结合与本文公开的任何抗CD20抗体结合的相同表位(例如,线性或构象表位)。Morris(1996)“Epitope Mapping Protocols,”在Methods in Molecular Biology vol.66 (Humana Press,Totowa,NJ)中提供了用于作图抗体结合的表位的详细的示例性方法。

[0247] 在示例性竞争测定中,将固定的CD20在包括结合CD20的第一标记抗体(例如利妥昔单抗,GA101抗体等)的溶液中温育,并且测试其第二未标记的抗体与第一抗体竞争结合CD20的能力。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的CD20在包括第一标记抗体而不是第二未标记抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与CD20结合的条件下温育后,除去过量未结合的抗体,并测量与固定的CD20相关的标记物的量。如果在测试样品中相对于对照样品与固定化CD20结合的标记物的量显著降低,则表明第二抗体与第一抗体竞争结合CD20。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0248] 2.活性测定

[0249] 本公开的抗CD20抗体(例如II型抗体)可以通过本领域已知的一种或多种活性测定来鉴定和/或表征。例如,如本文所述,可以使用补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0250] 应当理解,任何上述测定可以使用本发明的免疫缀合物代替抗CD20抗体或补加抗CD20抗体来进行。

[0251] 应当理解,可以使用抗CD20抗体和另外的治疗剂来进行上述测定中的任一种。

[0252] C.免疫缀合物

[0253] 本发明还提供包含与一种或多种细胞毒性剂,例如化学治疗剂或药物,生长抑制剂,毒素(例如蛋白质毒素,细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素,或其片段)或放射性同位素缀合的本文的抗CD20抗体的免疫缀合物。

[0254] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,包括但不限于美坦生类化合物(参见美国专利号5,208,020、5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1);澳瑞他汀,如单甲基澳瑞他汀药物部分DE和DF(MMAE和MMAF)(参见美国专利号5,635,483和5,780,588和7,498,298);多拉司他汀、加利车霉素或其衍生物(参见美国专利号5,712,374、5,714,586、5,739,116、5,767,285、5,770,701、5,770,710、5,773,001和5,877,296;Hinman等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);和Lode等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素如柔红霉素或多柔比星(参见Kratz等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey等人,Bioorganic&Med.Chem.Letters 16:358-362(2006);Torgov等人,Bioconj.Chem.16:717-721(2005);Nagy等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);和美国专利号6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛;紫杉烷类,如多西他赛、紫杉醇、拉罗他赛、替西他赛和奥他赛;单端孢霉烯和CC1065。

[0255] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包括与酶活性毒素或其片段缀合的本文所述的抗体,其包括但不限于白喉A链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素A链(来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)),蓖麻毒素A链,相思豆毒素A链,蒴莲根毒素A链, α -帚曲霉素(sarcin),油桐(*Aleurites fordii*)蛋白,香石竹毒蛋白(dianthin protein)、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAP1、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotin)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂、多花白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(tricothecenes)。

[0256] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包括与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的本文所述的抗体。各种放射性同位素可用于生产放射性缀合物。实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。当使用放射性缀合物进行检测时,可以包括用于闪烁照相研究的放射性原子,例如 ^{99m}Tc 或 I^{123} ,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记,同样例如碘-123、碘-131、铟-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0257] 抗体和细胞毒性剂的缀合物可以使用各种双功能蛋白偶联剂制备,该双功能蛋白偶联剂例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(诸如盐酸己二亚胺酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、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)、和双活性氟化合物成分(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如Vitetta, E.S., 等人, Science 238 (1987) 1098-1104中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari, R.V., 等人, Cancer Research 52 (1992) 127-131, US 5,208,020)。

[0258] 本文中的免疫缀合物或ADC明确地考虑但不限于用交联剂试剂制备的这种缀合物,该交联剂试剂包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-MEMS、磺基-GMBS、磺基-MUMS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC和磺基-SMPB和SVSB(琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基苄基)苯甲酸酯),其是可商购的(例如,来自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)。

[0259] 治疗或延缓狼疮性肾炎进展的方法

[0260] 本公开的某些方面涉及用于治疗或延缓具有狼疮的个体的狼疮性肾炎(LN)进展的方法。在一些实施方案中,个体或患者是人。

[0261] LN在本领域中已知为肾脏中的狼疮(例如,系统性红斑狼疮、药物诱发的狼疮、新生儿狼疮或盘状狼疮)的表现。肾脏中最常见的类型的狼疮是系统性红斑狼疮(SLE)。据认为,25-50%的SLE患者在其疾病早期发生尿和/或肾功能异常,多达60%的成年人和80%的儿童最终发展为LN(更多细节参见Cameron, JS (1999) J. Am. Soc. Nephrol. 10:413-424)。LN被认为占SLE相关发病率和死亡率的至少50%。

[0262] 此外,在其他类型的狼疮,例如盘状体(Roujeau,JC等人(1984) *Acta Derm.Venereol.* 66:160-163)和药物诱发的狼疮(Smith,PR等人,(1999) *Rheumatology (Oxford)* 38:1017-1018)中也注意到肾脏表现。在一些实施方案中,个体具有SLE、盘状狼疮或药物诱发的狼疮。

[0263] 可以按照当前的美国风湿病学会(American College of Rheumatology,ACR)标准来诊断SLE。可以通过一个British Isles Lupus Activity Group(BILAG)“A”标准或两个BILAG“B”标准;SLE疾病活动指数(SLEDAI);或系统性红斑狼疮(SLE)应答者指数(SRI)来定义活动疾病,如在下面实施例中所述,并在Furie等人,*Arthritis Rheum.* 61(9):1143-51(2009)中描述。根据Tan等人,“The Revised Criteria for the Classification of SLE” *Arth Rheum* 25(1982)改编的用来诊断SLE的一些病征、症状或其他指征可以是面颊红疹(例如脸颊上的疹子)、盘状红疹或红色凸起的板块(red raised patches);光敏性如对阳光起反应,导致皮疹的发生或增加;口腔溃疡如鼻子或口的溃疡(通常无痛);关节炎如涉及两个或更多个周边关节的非侵蚀性关节炎(其中关节周围的骨头没有损坏的关节炎);浆膜炎、胸膜炎或心包炎;肾病症如尿中蛋白过量(大于0.5gm/天或测试棒上为3+)和/或细胞管型(源于尿和/或白细胞和/或肾管细胞的异常部分);神经学病征、症状或其他指征、突然发作(痉挛)和/或在没有药物情况下的精神病或已知能引起这类效应的代谢紊乱;以及血液学病征、症状或其他指征诸如溶血性贫血或白细胞减少症(每立方毫米白细胞计数低于4,000细胞)或淋巴球减少症(每立方毫米少于1,500个淋巴细胞)或血小板减少症(每立方毫米少于100,000个血小板)。必须有两次或更多次机会检测到白细胞减少症和淋巴球减少症。必须在没有已知能诱导血小板减少症的药物的情况下检测到血小板减少症。本公开并不局限于狼疮的这些病征、症状或其他指征。

[0264] 可以测试自身抗体的存在作为狼疮的指征。自身抗体可以包括但不限于抗dsDNA抗体、抗补体抗体和抗核抗体(例如ENA组)。ENA是指可提取的核抗原,即一组核抗原,包括,例如,RNP,Ro/SS-A,La/SS-B,Sm,SCL-70,Jo-1,如描述于McNeilage等人,J., *Clin.Lab.Immunol.* 15:1-17(1984);Whittingham,Ann.Acad.Med. 17(2):195-200(1988);Wallace and Hahn,dubois' lupus erythematosus,第7版,Lippincott(2007);Tang等人, *Medicine* 89(1):62-67(2010)。ENA抗体与狼疮相关。McNeilage等人,1984;Whittingham 1988;Asherson等人, *Medicine* 68(6):366-374(1989);和Tang等人,2010。减少的补体活性也可能与狼疮有关,例如,通过C3水平、C4水平和/或CH50测定测量。

[0265] 如上文参考SLE所述,本领域已知LN经常在患有狼疮的患者(例如系统性红斑狼疮、药物诱发的狼疮、新生儿狼疮或盘状狼疮)中逐渐显现。也就是说,患者没有一种或多种LN症状的临床或病理学表现也可被诊断患有狼疮。然而,由于最终发展为LN的狼疮患者的频率高,患者仍然可能被认为有发展为LN的风险。因此,在一些实施方案中,本公开的方法可用于延缓患有狼疮的患者中LN的进展或预防LN。在一些实施方案中,本公开的方法可用于延迟或预防患有狼疮的患者(例如,在肾脏中缺乏表现的一种形式的狼疮)的LN的发作。

[0266] LN病理可以根据国际肾脏病学/肾脏病理学会(ISN/RPS)2003分类系统进行分类,如下表所示(参见Markowitz GS,D'Agati VD(2007) *Kidney Int* 71:491-495和Weening,JJ(2004) *Kidney Int* 65:521-530进一步描述和定义术语)。

[0267] 表3.ISN/RPS 2003狼疮性肾炎分类。

[0268]

I 类	最小肾小球系膜 LN (通过光学显微镜检查正常肾小球, 但通过免疫荧光检测系膜免疫沉积)
II 类	系膜增殖性 LN (通过光学显微镜任何程度的纯系膜细胞过多和系膜基质扩张, 具有系膜免疫沉积物。通过免疫荧光或电子显微镜可以看到少数分离的上皮下或内皮下沉积物, 但不能通过光学显微镜看到)
III 类	局灶性 LN (活性或非活性的局灶性, 节段性或全局毛细血管内-或毛细血管外肾小球肾炎, 涉及 50% 的所有肾小球, 通常伴有局灶性内皮下免疫沉积, 具有或不具有系膜改变) III(A): 活跃病灶(局灶性增生性 LN) III(A/C): 活性和慢性病灶(局灶性增生性和硬化性 LN) III(C): 具有肾小球瘢痕的慢性非活跃病灶(局灶性硬化性 LN)

[0269]

IV 类	弥漫性 LN (活性或非活性弥漫性, 节段性或全局性毛细血管内或毛细血管外肾小球性肾炎, 涉及$\geq 50\%$所有肾小球的, 通常具有弥漫性内皮下免疫沉积物, 具有或不具有球系膜改变, 当 $\geq 50\%$涉及的肾小球具有节段性病灶, 该类被分为节段性弥漫 (IV-S), 并且当$\geq 50\%$的所涉及的肾小球具有全局病灶时, 该类被分为全局弥漫 (IV-G) LN。节段性被定义为涉及不到一半的肾小球簇的肾小球病灶。该类包括具有弥漫性丝环沉积物但具有很少或没有肾小球增殖的病例) IV-S(A): 活跃病灶(弥漫性节段性增殖性 LN) IV-G(A): 活跃病灶(弥漫性全局增生性 LN) IV-S(A/C): 活跃和慢性病灶(弥漫性节段性增殖性和硬化性 LN) IV-G(A/C): 活跃和慢性病灶(弥漫性全局增生性和硬化性 LN) IV-S(C): 具有瘢痕的慢性不活跃病灶(弥漫性节段性硬化性 LN) IV-G(C): 具有瘢痕的慢性不活跃病灶(弥漫性全身硬化性 LN)
V 类	膜性 LN (通过光学显微镜和免疫荧光或电子显微镜, 全局或节段性上皮免疫沉积物或其形态学后遗症, 有或没有系膜改变)
VI 类	晚期硬化性 LN ($\geq 90\%$的无残留活性的肾小球全局硬化)

[0270] LN=狼疮性肾炎;A=活跃;C=慢性;G=全局;S=节段性。

[0271] 注意:V类可能与III或IV类联合发生,在这种情况下,两者都将被诊断。V类LN可能显示晚期硬化症。

[0272] 在一些实施方案中,患者具有III类或IV类LN。在一些实施方案中,患者具有III类LN。例如,在一些实施方案中,患者具有III类(A)或III类(A/C) LN。在一些实施例中,患者具有IV类LN。例如,在一些实施方案中,患者具有IV-S(A)、IV-G(A)、IV-S(A/C)或IV-G(A/C) LN。如上表3所示,V类LN也可能与III类或IV类LN同时发生。在一些实施方案中,本公开的方法用于治疗III类或IV类LN和伴随的V类LN的患者。

[0273] 如上所述,高频率的狼疮患者(例如,SLE)最终发展为LN。在一些实施方案中,患者处于发展LN的风险中。在一些实施方案中,患者处于发展III类或IV类LN的风险中。在一些实施方案中,患者处于发展具有伴随的V类LN的III类或IV类LN的风险中。

[0274] 在一些实施方案中,患者不具有III类(C) LN(例如,如上表3所述)。在一些实施方案中,患者不具有IV类(C) LN,如IV-S(C)或IV-G(C) LN(例如,如上文表3所述)。

[0275] 本领域已知的几种实验室测试可用于诊断和/或监测狼疮性肾炎的存在、进展和/或对治疗的应答。在一些实施方案中,可以测量血清肌酐。在一些实施方案中,血清肌酐的正常范围可以为约0.6至约1.3mg/dL,在年龄、男性和女性之间、以及实验室和实验室之间都有一些变化。在一些实施方案中,可以例如通过尿液的显微镜检查来测量尿沉渣和/或管型的存在。例如,可以通过显微镜检查来测定尿样中的红细胞数。在一些实施方案中,尿沉渣的正常值可以是每个高功率场 (HPF) 约4个红细胞 (RBC) 或更低。尿管型可以包括但不限于红细胞管型、白细胞管型、肾小管上皮细胞管型、蜡状管型、透明管型、颗粒状管型和脂肪型管型。在一些实施方案中,可以测量尿蛋白与肌酐比率 (UPCR)。尿液中蛋白质的存在(蛋白尿)也可以通过包括但不限于尿白蛋白与肌酐比率 (UACR) 和浸液片尿分析的测试来测定。可用于检查肾功能的其他测试和/或措施包括但不限于renal panel,肌酐清除率,钠、钾、氯化物、碳酸氢盐、磷、钙、白蛋白、血尿素氮 (BUN)、肌酐、葡萄糖、肾小球滤过率 (eGFR)、BUN/肌酐比和阴离子间隙,并且可以包括在适当时测量血液和/或尿液中的上述参数。有关更详细的描述,参见例如the American College of Rheumatology Guidelines for Screening, Case Definition, Treatment and Management of Lupus Nephritis (Hahn, B. 等人, (2012) Arthritis Care Res. 64:797-808)。

[0276] 在一些实施方案中,本公开的方法包括向个体施用至少暴露于本公开的II型抗-CD20抗体的第一抗体和暴露于II型抗-CD20抗体的第二抗体。可以使用本文所述的任何II型抗CD20抗体,例如GA101抗体,例如奥比妥珠单抗。在一些实施方案中,在第一次抗体暴露后约18周至约26周后才提供第二次抗体暴露。在一些实施方案中,在第一次抗体暴露后约18周,第一次抗体暴露后约19周,第一次抗体暴露后约20周,第一次抗体暴露后约21周,第一次抗体暴露后约22周,第一次抗体暴露后约23周,第一次抗体暴露后约24周,第一次抗体暴露后约25周,或第一次抗体暴露后约26周才提供第二次抗体暴露。在一些实施方案中,在第一次抗体暴露后小于约下述周中任何一种:26、25、24、23、22、21、20或19后才提供第二个抗体暴露。在一些实施方案中,在第一次抗体暴露后大于约下述周中任何一种:18、19、20、21、22、23、24或25后才提供第二次抗体暴露。也就是说,在具有上限为26、25、24、23、22、21、20或19以及独立选择的下限为18、19、20、21、22、23、24、25周的范围中任一之后才提供第二次抗体暴露,其中下限小于上限。

[0277] 本文所述的给药方案使用一致的跟踪剂量之间的时间,从而在第1天向患者施用第一剂量。如本文所述,本公开的抗体暴露可以包括一个或两个剂量。在抗体暴露含有一个剂量的情况下,提及在第一次抗体暴露后(如本文所述)已经过去一段时间后才提供的第二次抗体暴露是指在第一次抗体暴露的剂量(例如,第1天)和第二次抗体暴露的剂量之间经过的时间量。如果第一次抗体暴露包括两个剂量,则在第1天提供第一次抗体暴露的第一剂量。在抗体暴露含有两个剂量的情况下,提及在第一次抗体暴露(如本文所述)一段时间后才提供的第二次抗体暴露是指在第一次抗体暴露的两个剂量中的第一个(例如,第1天)和第二次抗体暴露的两个剂量的第一剂量之间经过的时间量。例如,如果本公开的方法包括具有两个剂量的第一次抗体暴露和具有两个剂量的第二次抗体暴露,并且在第一次抗体暴露后约22周后才提供第二次抗体暴露,则在第一次抗体暴露的第一剂量和第二次抗体暴露的第一剂量之间的时间间隔约为22周。

[0278] 在一些实施方案中,本公开的第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的本公开的II

型抗CD20抗体。在一些实施方案中,第一次抗体暴露含有约1800mg至约2200mg的II型抗-CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,第一次抗体暴露含有约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2100mg或约2200mg的II型抗-CD20抗体的总暴露。

[0279] 在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括两个剂量。在一些实施方案中,第一次抗体暴露包括约900mg至约1100mg的II型抗CD20抗体的第一剂量和约900mg至约1100mg的II型抗-CD20抗体的第二剂量。在一些实施方案中,第一次抗体暴露的第一剂量含有约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,第一次抗体暴露的第二剂量含有约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,在第一次抗体暴露的第一剂量之后约1.5周至约2.5周才提供第一次抗体暴露的第二剂量。在一些实施方案中,在第一次抗体暴露的第一剂量后约2周才提供第一次抗体暴露的第二剂量。

[0280] 在一些实施方案中,本公开的第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的本公开的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,第二次抗体暴露含有约1800mg至约2200mg的II型抗CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,第二次抗体暴露含有约1800mg、约1900mg、约2000mg、约2100mg或约2200mg II型抗CD20抗体的总暴露。

[0281] 在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括两个剂量。在一些实施方案中,第二次抗体暴露包括约900mg至约1100mg的II型抗CD20抗体的第一剂量和约900mg至约1100mg的II型抗-CD20抗体的第二剂量。在一些实施方案中,第二次抗体暴露的第一剂量含有约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,第二次抗体暴露的第二剂量含有约1000mg的II型抗-CD20抗体。在一些实施方案中,在第二次抗体暴露的第一剂量后约1.5周至约2.5周后才提供第二次抗体暴露的第二剂量。在一些实施方案中,在第二次抗体暴露的第一剂量后约2周才提供第二次抗体暴露的第二剂量。

[0282] 在一些实施方案中,本公开的II型抗CD20抗体是静脉内施用(例如通过IV输注)。

[0283] 在一些实施方案中,本公开的方法进一步包括施用有效量的免疫抑制剂(例如,结合本文所述的II型抗-CD20抗体)。几种类别的免疫抑制剂是本领域已知的,包括但不限于细胞抑制剂(例如,细胞毒性剂如抗生素,烷化剂(例如,环磷酰胺,也称为cytophosphane),肌苷单磷酸脱氢酶抑制剂,抗代谢物如蛋白质合成抑制剂,叶酸类似物,嘌呤类似物,嘧啶类似物等),免疫抑制抗体,糖皮质激素,靶向亲免疫蛋白的药物(例如他克莫司、西罗莫司、雷帕霉素及其类似物、环孢菌素等),mTOR活性位点抑制剂,霉酚酸及其衍生物或盐,TNF结合蛋白,干扰素,阿片类,以及其他小分子(如芬戈莫德)。在一些实施方案中,免疫抑制剂包括霉酚酸、霉酚酸的衍生物或霉酚酸的盐。在一些实施方案中,免疫抑制剂包括霉酚酸酯。在一些实施方案中,免疫抑制剂包括**CellCept®** (Roche)。在一些实施方案中,免疫抑制剂包括**Myfortic®** (Novartis)。本公开的免疫抑制剂的有效量是本领域已知的,并且可以通过标准测定容易地确定。例如,霉酚酸酯可以以2.0-2.5g/天施用,如图1所示。在一些实施方案中,霉酚酸酯可以以1000mg/天以分剂量(2次/天)开始施用,并在第4周以分剂量(2次/天)逐步增高剂量至2.0-2.5g/天。

[0284] 在一些实施方案中,免疫抑制剂可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用,例如作为对狼疮的治疗。在一些实施方案中,可以在用本公开的II型抗CD20抗体的整个治疗期间施用免疫抑制剂。在一些实施方案中,霉酚酸酯可以如上所述在用II型抗-CD20抗体的整个治疗期间施用。

[0285] 在一些实施方案中,本公开的方法还包括施用有效量的糖皮质激素或皮质类固醇(例如,与本文所述的II型抗CD20抗体结合)。各种天然存在和合成的糖皮质激素/皮质类固醇在本领域中是已知的,包括但不限于倍氯米松、曲安奈德、地塞米松、倍他米松、强的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、可的松和皮质醇。在一些实施方案中,糖皮质激素/皮质类固醇包括甲泼尼龙。在一些实施方案中,糖皮质激素/皮质类固醇包括强的松。本公开的糖皮质激素/皮质类固醇的有效量是本领域已知的,并且可以通过标准测定容易地确定。例如,甲泼尼龙可以以750-1000mg的剂量每天一次施用。作为另一个实例,强的松可以以0.5mg/kg口服施用,任选地逐渐增加至7.5mg/天。

[0286] 在一些实施方案中,糖皮质激素可以在施用本公开内容的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用,例如用于治疗LN临床活性。在一些实施方案中,糖皮质激素可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前施用,例如在II型抗CD20抗体之前30-60分钟施用。在一些实施方案中,80mg甲泼尼龙可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前30-60分钟IV施用。在一些实施方案中,泼尼松(例如,口服施用)和/或甲泼尼龙(例如,IV施用)可以随治疗施用随后进行维持治疗(例如霉酚酸酯或环磷酰胺)。

[0287] 在一些实施方案中,本公开的方法还包括施用有效量的抗组胺药(例如,与本文所述的II型抗CD20抗体结合)。本领域已知的和目前临床应用的抗组胺药包括组胺H₁受体和组胺H₂受体拮抗剂或反向激动剂。在一些实施方案中,抗组胺药包括苯海拉明。本公开的抗组胺药的有效量是本领域已知的,并且可以通过标准测定法容易地确定。例如,苯海拉明可以以50mg口服剂量施用。

[0288] 在一些实施方案中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用抗组胺药,例如作为预防性治疗。在一些实施方案中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前,例如在II型抗CD20抗体前30-60分钟施用抗组胺药。在一些实施方案中,50mg苯海拉明可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前30-60分钟口服施用。

[0289] 在一些实施方案中,本公开的方法还包括施用有效量的非甾体抗炎药或NSAID(例如与本文所述的II型抗CD20抗体结合)。本领域已知的NSAID包括乙酸衍生物、丙酸衍生物、水杨酸酯、烯醇酸衍生物、邻氨基苯甲酸衍生物、选择性COX-2抑制剂、磺酰苯胺(sulfonanilides)等。在一些实施方案中,NSAID包括对乙酰氨基酚。本公开的NSAID的有效量是本领域已知的,并且可以通过标准测定容易地确定。例如,对乙酰氨基酚可以以650-1000mg口服剂量施用。

[0290] 在一些实施方案中,NSAID可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用,例如作为预防性治疗。在一些实施方案中,NSAID可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前施用,例如在II型抗CD20抗体之前30-60分钟。在一些实施方案中,可以在施用本公开的II型抗-CD20抗体之前30-60分钟口服施用650-1000mg对乙酰氨基酚。

[0291] 在一些实施方案中,本公开的方法进一步包括施用有效量的抗疟剂(例如与本文所述的II型抗CD20抗体结合)。可以使用的抗疟剂的实例包括但不限于羟氯喹、氯喹和奎纳克林。在一些实施方案中,可以在施用本公开的II型抗-CD20抗体之前、期间或之后施用抗疟剂,例如作为对狼疮的一种或多种症状的治疗。

[0292] 在一些实施方案中,本公开的方法进一步包括施用有效量的整联蛋白拮抗剂(例如,结合本文所述的II型抗-CD20抗体)。可以使用的整联蛋白拮抗剂的实例包括但不限于

LFA-1抗体,例如可从Genentech购得的依法珠单抗(**RAPTTVA[®]**)或 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体如可从Biogen获得的那他珠单抗(**ANTEGREN[®]**)或二氮杂环苯丙氨酸衍生物、苯丙氨酸衍生物、苯丙酸衍生物、烯胺衍生物、丙酸衍生物、链烷酸衍生物、取代的苯基衍生物、芳族胺衍生物、ADAM解聚素结构域多肽、抗 $\alpha V\beta 3$ 整联蛋白、氮杂桥连双环氨基酸衍生物等。可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用整联蛋白拮抗剂,例如作为对狼疮的一种或多种症状的治疗。

[0293] 在一些实施方案中,本公开的方法进一步包括施用有效量的细胞因子拮抗剂(例如,结合本文所述的II型抗-CD20抗体)。可以使用的细胞因子拮抗剂的实例包括但不限于针对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的拮抗剂(例如拮抗剂抗体);肿瘤坏死因子如TNF- α 或TNF- β ;和其他多肽因子,包括LIF和kit配体(KL)。在一些实施方案中,细胞因子拮抗剂可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用,例如作为对狼疮的一种或多种症状的治疗。

[0294] 在一些实施方案中,本公开的方法进一步包括施用有效量的激素(例如,与本文所述的II型抗CD20抗体结合)。在一些实施方案中,可以在施用本公开的II型抗-CD20抗体之前、期间或之后施用激素(例如,用于激素替代疗法),例如用于患有狼疮的妇女的药物治疗。

[0295] 在一些实施方案中,本公开的方法进一步包括施用护理标准治疗(例如,结合本文所述的II型抗-CD20抗体)。在一些实施方案中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用护理标准治疗,例如用于治疗或预防狼疮的一种或多种症状。在某些实施方案中,可以在本公开的第二次抗体暴露后施用护理标准治疗。例如,本公开的II型抗CD20抗体可以如本文所述施用于患者作为诱导疗法,然后根据护理标准治疗患者作为维持治疗。用于狼疮的护理标准治疗是本领域公知的,包括但不限于血管紧张肽转化酶(ACE)抑制剂、血管紧张肽受体阻断剂、环磷酰胺、霉酚酸酯(例如,在本文所述的剂量下,例如2.0-2.5g/天)、硫唑嘌呤和糖皮质激素或皮质类固醇(例如强的松,如强的松逐渐减量)。

[0296] 在一些实施方案中,本公开的方法还包括施用抗高血压剂(例如,与本文所述的II型抗-CD20抗体结合)。在一些实施方案中,可以在施用本公开的II型抗CD20抗体之前、期间或之后施用抗高血压剂,例如用于治疗或预防高血压。在一些实施方案中,抗高血压剂包括但不限于ACE抑制剂和血管紧张肽受体阻断剂。在一些实施方案中,表5中列出的抗高血压剂例如以表5所述范围内的剂量施用。

[0297] 在一些实施方案中,本公开的方法导致个体中的完全肾反应(CRR)。在一些实施方案中,CRR包括以下所有因素:血清肌酐标准化,无活性尿沉渣和尿蛋白与肌酐酐比 <0.5 。在一些实施方案中,血清肌酐的标准化的特征在于血清肌酐小于或等于中心实验室值的正常(ULN)范围的上限,和/或血清肌酐比基线高 $\leq 15\%$,且如果基线血清肌酐(例如,第1天)在中心实验室值的正常范围内,则小于或等于中心实验室值的ULN范围。在一些实施方案中,非活性尿沉渣的特征在于 <10 RBC/高功率场(HPF)和/或不存在红细胞管型。关于LN中CRR和部分肾反应(PRR)的更详细的讨论,参见例如Chen, Y. E. 等人,人,(2008) Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 3:46-53。

[0298] 在一些实施方案中,本公开的方法导致个体中的完全肾反应(CRR)或部分肾反应

(PRR)。在一些实施方案中,PRR包括以下一个或多个:血清肌酐酹的标准化,无活性的尿沉渣和尿蛋白与肌酐酹比 <0.5 。在一些实施方案中,PRR包括以下一个或多个:缓解一种或多种症状,包括但不限于血清肌酐减少、尿沉渣减少、蛋白尿减少以及肾功能的任何其它改善。在一些实施方案中,CRR或PRR包括狼疮活性的一种或多种生物标志物的降低,包括但不限于抗dsDNA抗体、抗核抗体/ENA、抗补体抗体、降低的补体C3和/或C4的水平,以及降低的补体活性(例如,通过CH50测定法测定)。

[0299] 在一些实施方案中,本公开的方法导致个体中循环的外周B细胞的消耗。在一些实施方案中,在施用本公开的II型抗CD20抗体(例如,根据本文所述的任何方法)后,循环的外周B细胞以约10个细胞/ μL 或更少、约9个细胞/ μL 或更少、约8个细胞/ μL 或更少、约7个细胞/ μL 或更少、约6个细胞/ μL 或更少、约5个细胞/ μL 或更少、约4个细胞/ μL 或更少、约3个细胞/ μL 或更少、约2个细胞/ μL 或更少、或约1个细胞/ μL 或更少存在于外周血中。在一些实施方案中,个体中循环的外周B细胞消耗至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。在一些实施方案中,循环外周B细胞的消耗是指例如,与治疗前相同个体的相应测量相比,或者与对照个体(例如,未接受治疗的个体)的相应测量相比,在第一次抗体暴露(例如,包括1或2剂量的本文所述的抗CD20抗体)后,在第二次抗体暴露(例如,包括1或2剂量的本文所述的抗CD20抗体)后,治疗后3个月(例如,在接受本文所述的第一和/或第二次抗体暴露后),治疗后6个月(例如,在接受后如本文所述的第一和/或第二次抗体暴露),治疗后9个月(例如,在接受本文所述的第一和/或第二次抗体暴露后)或治疗后12个月(例如,在接受第一和第/或如本文所述的第二次抗体暴露),取样的循环的外周B细胞的测量。

[0300] 用于测定个体中循环的外周B细胞的消耗的方法是本领域已知的,例如使用识别B细胞标记的一种或多抗体的流式细胞术。在一些实施方案中,高灵敏度流式细胞术(HSFC)可用于测定循环外周B细胞的耗竭(参见例如Vital, E.M.等人, (2011) *Arthritis Rheum.* 63:3038-3047)。在一些实施方案中,B细胞是CD19⁺ B细胞。在一些实施方案中,B细胞是初始B细胞(例如CD19⁺ CD27⁺ B细胞)、记忆B细胞(例如CD19⁺ CD27⁺ B细胞)或成浆细胞(例如,CD19⁺ CD27⁺ CD38⁺⁺ B细胞)。

[0301] IV. 制品或药盒

[0302] 在本发明的另一方面,提供了可用于治疗、预防和/或诊断上述病症的制品或药盒。制品或药盒包括容器和在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、IV溶液袋等。容器可以由各种材料如玻璃或塑料形成。容器容纳组合物,所述组合物自身或者与有效治疗、预防和/或诊断病症的另一种组合物组合,并且所述容器可以具有无菌入口(例如,该容器可以是静脉内溶液袋或具有通过皮下注射针可刺破的小瓶)。组合物中至少一种活性剂是本文所述的抗体(例如本公开的II型抗-CD20抗体)。标签或包装插页指示组合物用于治疗选择的病症,例如根据本文所述的任何方法。或者或另外,制品或药盒还可包括第二(或第三)容器,其包括药学上可接受的缓冲液,例如用于注射的抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它还可以包括从商业和用户的观点所需的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针和注射器。

[0303] 在一些实施方案中,本文提供了一种药盒,其包括:包括本公开的II型抗-CD20抗体和任选的药学上可接受的载体的容器,以及任选的包括治疗或延缓狼疮进展的说明书的

包装插页,例如,其中说明书指示向个体施用对于II型抗CD20抗体的至少第一次抗体暴露和对于II型抗CD20抗体的第二次抗体暴露,第二次抗体暴露在第一次抗体暴露后约18周至约26周才提供;其中所述第一次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第一次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg所述II型抗-CD20抗体的总暴露;并且其中所述第二次抗体暴露包括一个或两个剂量的II型抗CD20抗体,所述第二次抗体暴露包括约1800mg至约2200mg所述II型抗-CD20抗体的总暴露。在一些实施方案中,本文提供的药盒药盒:包括本公开的II型抗CD20抗体和任选的药学上可接受的载体的容器,以及任选的包括用于治疗或延缓个体中III类或类IV狼疮性肾炎的说明书的包装插页。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II型抗CD20抗体包含:包含SEQ ID NO:1的HVR-H1序列,SEQ ID NO:2的HVR-H2序列和SEQ ID NO:3的HVR-H3序列的重链,以及包含SEQ ID NO:4的HVR-L1序列,SEQ ID NO:5的HVR-L2序列和SEQ ID NO:6的HVR-L3序列的轻链。在任何上述实施方案的一些实施方案中,II型抗CD20抗体是奥比妥珠单抗。

[0304] 制品可以进一步包括:包括第二药物的第二或第三容器,其中抗CD20抗体(例如,本公开的II型抗-CD20抗体)是第一药物,其中所述制品还包括用于用第二药物治疗受试者的包装插页上的说明。示例性的第二药物包括化学治疗剂、免疫抑制剂、抗疟剂、细胞毒剂、整联蛋白拮抗剂、细胞因子拮抗剂、激素以及可与本文所述的II型抗-CD20抗体联合的任何治疗。这些实施方案中的制品可进一步包括指示组合物可用于治疗特定病症的包装插页。

[0305] 应当理解,代替抗CD20抗体或除抗CD20抗体之外,上述任何制品可以包括本发明的免疫缀合物。

[0306] 本说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。除了本文所示和所述之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员将从前述描述中变得显而易见,并且落在所附权利要求的范围内。出于所有目的,本文引用的所有出版物、专利和专利申请的全部内容通过引用并入本文。

实施例

[0307] 通过参考以下实施例将更全面地理解本发明。然而,它们不应被解释为限制本发明的范围。应当理解,本文描述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且将对本领域技术人员建议进行其各种修改或改变,并且将包括在本申请的精神和所附权利要求的范围内。

[0308] 实施例1:在患有III/IV类狼疮性肾炎患者中与霉酚酸酯一起施用的奥比妥珠单抗的药理学研究

[0309] 研究设计

[0310] II期研究旨在评估奥比妥珠单抗(即,II型抗CD20抗体)作为霉酚酸酯(MMF)的添加治疗用于患有活性ISN/RPS III/IV类狼疮性肾炎(LN)的安全性和疗效。II期研究是平行组、双盲、随机、安慰剂对照研究,比较奥比妥珠单抗加MMF与安慰剂加MMF对III类和IV类增殖性LN患者的疗效和安全性(图1)。

[0311] 该研究也是前瞻性的多中心研究。在遍布全世界的中心募集被诊断为患有ISN/RPS III或IV类LN的患者(在一些实施方案中根据当前ACR标准诊断为SLE(必须存在至少4个标准,其中一个必须是阳性抗核抗体)。该研究包括用血管紧张肽转化酶(ACEI)抑制剂/血管紧张肽II受体阻断剂,MMF(2.0-2.5g/天给药)和强的松递减量的护理标准疗法。

[0312] 如以下更详细描述的那样,患者年龄18-75岁并具有ISN/RPS 2003 III或IV类增殖性LN(参见Weening, JJ (2004) J. Am. Soc. Nephrol. 15:241-250),如筛选前6个月内进行的肾活检证明,并可伴有V类疾病(例如III/V类或IV/V类)。排除具有III (C) 或IV (C) 类疾病的患者,因为这些类别的反应可能性较小。

[0313] 研究的纳入标准包括:

[0314] (a) 签署知情同意书;

[0315] (b) 年龄18-75岁;

[0316] (c) 遵守研究方案的能力;

[0317] (d) 根据现行ACR标准诊断系统性红斑狼疮(SLE)(必须至少存在4个标准,其中之一必须是阳性抗核抗体);

[0318] (e) 在筛选前6个月内进行的肾活检证明的ISN/RPS 2003 III类或IV型LN的诊断(除了III类或IV类疾病之外,患者也可共同表现出V类疾病);

[0319] (f) ≥ 10 RBCs/HPF或红细胞管型存在证明活性尿沉渣;和

[0320] (g) 蛋白尿(尿蛋白与肌酐比 >1.0 ,基于24小时尿液收集)。

[0321] 主要排除标准包括:

[0322] (a) 目前活跃且由SLE引起的视网膜炎、控制不良的癫痫发作障碍、急性混乱状态、脊髓炎、中风或中风综合征、小脑共济失调或痴呆症;

[0323] (b) 存在快速进行性肾小球肾炎(由肾脏活检中评估的 $\geq 50\%$ 肾小球中存在月牙体形成或筛选后12周内血清肌酐倍增而定义);

[0324] (c) 由估计的GFR <30 mL/min或对透析或肾移植的需要所限定的严重肾损伤;

[0325] (d) 在肾活检时具有大于50%的肾小球硬化;

[0326] (e) 在随机化前3个月内用环磷酰胺或钙调神经磷酸酶抑制剂进行治疗;和

[0327] (f) 具有血小板减少症的不稳定疾病或发展临床显著出血或器官功能障碍的高风险,需要治疗,如血浆置换术或急性血液或血小板输注。

[0328] 患者在筛选之前或筛选期间静脉内(IV)接受初始1000mg甲泼尼龙,并且可以在根据这些患者的常规护理指南对严重的临床活动随机分组之前静脉内接受高达3000mg的甲泼尼龙。患者在奥比妥单抗/安慰剂输注当天静脉内接受80mg甲泼尼龙(或甲泼尼龙安慰剂)以减少输注相关事件。口服强的松递减量为 0.5 mg/kg,并在12周中减少。这种修改的递减量是由认识到 10 mg/天以上的强的松剂量与重大不良事件(包括增加的心血管事件风险)相关联所启动的(Bichile, T. 和 Petri, M. (2014) Presse Med. 43:e187-195)。用利妥昔单抗的先前经验表明,在没有口服强的松或强的松递减量的情况下,它可以潜在地实现完全和部分肾反应,从而允许使用较低剂量的皮质类固醇(Condon, MB等人, (2013) Ann. Rheum. Dis 72:1280-1286)。

[0329] 患者遵循12个月直到主要终点评估,并且进行在6个月时的中间分析以评估CRR的早期差异。所有患者均有肾活检组织病理学资料的中央阅读,并可根据临床状态和当地实践接受重复肾活检。所有患者均通过高灵敏度流式细胞术(HSFC)进行评估,以评估奥比妥单抗消耗循环周围B细胞的能力,并进行中间PD分析,以评估患者是否未按预期完全消耗外周CD19+ B细胞。

[0330] 给药和非调查药用产品

[0331] 研究的给药方案是通过静脉内输注施用,在第1、15、168和182天(试验组)以1000mg的剂量施用奥比妥珠单抗;或在第1、15、168和182天通过IV输注施用奥比妥珠单抗安慰剂(例如,对应于奥比妥珠单抗1000mg剂量的盐水IV)。奥比妥珠单抗/安慰剂在全部复苏设施立即可用的医院或临床环境中施用并在调查员或指定人员的密切监督下进行。在输注结束后,IV线保持在适当位置至少1小时,以便在必要时能够施用IV药物。如果在这段时间内没有发生不良事件,可除去IV线。

[0332] 筛选后,尚未接受MMF的患者以分剂量(2-3次/天)接受1500mg/天的MMF,并且将所有患者剂量按照耐受,在第4周以分剂量(2-3次/天)逐步增高剂量至2.0-2.5g/天的目标剂量。如果需要减少剂量,允许以250-500mg减量来减少。在筛选期间或随机分组时,如果临床指示,则患者可以每天静脉内接受750-1000mg甲泼尼龙长达三天,以治疗潜在的LN临床活动。患者在筛选期间或随机化时接受0.5mg/kg的口服强的松,按照方案从第16天起递减这一强的松剂量,并在第12周将强的松剂量降至7.5mg/天。这些治疗方法在下面进一步描述。

[0333] 伴随治疗和临床实践

[0334] 尚未服用维生素D(400IU/天)和钙补充剂(1200mg/天柠檬酸钙或1500mg/天碳酸钙)的患者随机化开始服用这些补充剂。所有患者均服用血管紧张肽转化酶抑制剂或血管紧张肽受体阻断剂,其逐渐增加剂量至足够的血压控制,如National Kidney Foundation为慢性肾脏疾病所推荐。在研究期间不允许开始影响蛋白尿的其它试剂,包括但不限于非二氢吡啶钙拮抗剂、二氢吡啶钙拮抗剂、醛固酮拮抗剂和直接肾素拮抗剂。

[0335] 霉酚酸酯(MMF)

[0336] 所有患者在筛选期间或不晚于第1天继续或开始使用MMF。初始剂量为口服1500mg/天,以两次或三次分剂量给药,并以分剂量向上增加剂量,在第4周至2.0-2.5g/天。按耐受,MMF可以增加至500mg/周,至2.5g/天的最大剂量。由于副作用,则允许降低。

[0337] 推荐不预先暴露于MMF的新诊断的LN患者,以启动诱导剂(MMF或环磷酰胺),然后重新评估其资格。最初用MMF或环磷酰胺治疗的患者的比例达到CRR,因此对添加的免疫抑制的需求最小(Dall'Era, M.等人, (2011) Arthritis Care Res. 63:351-357)。

[0338] 对于进入研究已经接受高于1500mg/天的MMF剂量的那些患者,MMF将按照耐受以分剂量向上增加剂量,在第4周至2.5g/天的目标,患者目前的MMF剂量以2或3次分剂量给药,并且按耐受增加至500mg/周。

[0339] 皮质类固醇给药

[0340] 所有患者接受IV和口服皮质类固醇的组合,作为其对LN的初始治疗的一部分。为两个目的实施甲泼尼龙(例如**Solu-Medrol®**):作为用于III类或IV类LN的患者的常规护理一部分,并且还在奥比妥珠单抗/安慰剂输注日减少输注相关反应(IRR)。根据调查员的判断和当地实践,给予高达三剂量IV甲泼尼龙1000mg。在筛选之前或筛选间隔期间,可能已经开始了高达三次1000mg输注。

[0341] 在第1、15、168和186天,在研究药物输注之前30-60分钟患者接受80mg IV甲泼尼龙或安慰剂以预防IRR。另外,口服强的松可以在筛选间隔之前或期间开始,并且递减量在第2天开始。从第2天到第16天,给予0.50mg/kg/天口服强的松(最大剂量60mg),除了在IV甲泼尼龙/安慰剂输注那天,并将持续至第16天。从第16天起,开始强的松递减量。

[0342] 所有患者在第16天开始计划的皮质类固醇递减量。患者在12周内分次地减少强的

松剂量,直到第12周剂量为7.5mg/天。在14周递减后,患者继续服用强的松7.5mg/天或更少。在患者疾病的临床活性太强以至于进行其强的松递减量的第一步的患者中,如通过活性尿沉渣,血清肌酐升高或中度至重度肾外症状证明,这些患者可能继续接受初始强的松剂量达额外的28天。

[0343] 为了保持肾脏复发治疗的一致性,如果由调查员判断临床适宜,并且如果患者满足肾脏复发的标准,则允许用较高剂量的皮质类固醇进行再治疗。患者可以用强的松(高达0.5mg/kg;不超过60mg/天)治疗2周。初始皮质类固醇增加后,强的松递减以在6周达到10mg/天。如果临床上有必要,允许患者接受皮质类固醇用于紧急疾病(创伤、严重哮喘)或手术;如果可能,皮质类固醇使用限制在总共≤7天。在患者剂量递减至10mg/天后,调查员然后将强的松剂量增加≤2.5mg/天,以治疗肾上腺功能不全或皮质类固醇戒断症状。

[0344] 如果由调查员判断临床适宜,经历严重的肾外SLE复发的患者可以接受另外的口服皮质类固醇的治疗。这些患者可以根据疾病和器官系统受累的严重程度,用强的松(高达1.0mg/kg)再治疗达2周,并且剂量递减至7.5mg/天。如果由调查员判断临床适宜,经过轻度或中度肾外复发的患者可将强的松剂量每天临时增加达20mg,并且在4周内递减该剂量。如果胃肠道受累暂时阻止用口服皮质类固醇治疗,则允许等效剂量的IV皮质类固醇。

[0345] 抗疟药

[0346] 在研究进入期间服用抗疟疾药物的患者在整个研究中保持恒定的剂量。以前没有使用抗疟疾药物的患者可被招募到研究中,但不应启动抗疟药,除非经历对皮质类固醇无反应的疾病复发。表4列出了预期在研究过程中使用的抗疟药物和剂量范围。

[0347] 表4. 抗疟药物

[0348]	抗疟药	剂量范围(口服)
	羟氯喹	每天 200-400 mg
[0349]	氯喹	每天或每隔一天 500 mg
	奎纳克林	每天 100 mg

[0350] 抗高血压治疗

[0351] 所有目前未服用ACE抑制剂或血管紧张肽受体阻断剂的患者均应在筛选时开始服用。患者在随机分组前至少10天,或者服用ACE抑制剂或者服用血管紧张肽受体阻断剂。不允许用两种药剂联合治疗。

[0352] 在筛选期间,尽一切努力充分控制患者的血压。ACE抑制剂或血管紧张肽受体阻断剂的剂量可以向上渐增到当前包装内的最大推荐剂量,以实现足够的血压控制,如Eighth Report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (James, P.A. 等人, (2014) JAMA 311:507-520) 推荐。如果没有达到足够的血压控制,患者可以服用额外的抗高血压剂,但不能服用影响蛋白尿的药剂(例如,非二氢吡啶钙通道阻断剂、醛固酮拮抗剂、直接肾素拮抗剂)。在研究期间不会启动特异性靶向肾素-血管紧张肽系统的其他药剂。特异性ACE抑制剂和血管紧张肽受体阻断剂的建议剂量范围列于表5。如果患者对ACE抑制剂和血管紧张肽受体阻断剂不耐受,则它们可以使用直接肾素抑制剂或醛固酮拮抗剂,但不能组合使用。

[0353] 表5.ACE抑制剂和血管紧张肽受体阻断剂的建议剂量范围

	AACE 抑制剂或血管紧张肽受体阻断剂	
	剂量范围(口服) , mg/天	
[0354]	ACE 抑制剂	
	贝那普利	10-80
	雷米普利	2.5-10
	赖诺普利	10-80
	依那普利	10-40
	喹那普利	10-80
	卡托普利	75-450
	培哚普利	4-16
	群多普利	1-8
	莫昔普利	7.5-30
[0355]	血管紧张肽受体阻断剂	
	依普罗沙坦	400-600
	缬沙坦	80-320
	奥美沙坦	20-40
	坎地沙坦	8-32
	替米沙坦	20-80
	氯沙坦	25-100
	厄贝沙坦	75-300

[0356] 研究目标和结果措施

[0357] 这种概念验证研究的主要目标是在施用奥比妥珠单抗52周时测量完全肾反应(CRR)。将奥比妥珠单抗加MMF在第52周达到CRR的能力与安慰剂加MMF进行比较,并通过肾功能、尿沉渣和蛋白尿的改善进行评估。次要目标包括对该患者群体中奥比妥珠单抗的安全性的评估,在第52周时,奥比妥珠单抗诱导总体反应(CRR+ PRR)的能力,奥比妥珠单抗在52周的过程中改善反应时间(CRR+ PRR)的能力,以及奥比妥珠单抗改善LN疾病活动的生物标志物的能力(例如,降低的抗dsDNA抗体水平,增加的C3和C4水平;参见Tew,GW等人(2010) Lupus 19:146-157)。

[0358] 主要疗效结果测量是在52周评估达到CRR的受试者的比例。在本研究中,CRR通过实现以下所有来定义的:

[0359] (a) 血清肌酐正常化,如下所证明:

[0360] (i) 如果基线(第1天)不在中心实验室值的正常范围内,血清肌酐小于或等于中心

实验室值的正常 (ULN) 范围的上限范围;和

[0361] (ii) 如果基线 (第1天) 血清肌酐在中心实验室值的正常范围内,血清肌酐比基线高 $\leq 15\%$,且小于或等于中心实验室值的ULN范围;

[0362] (b) 非活性尿沉渣 (由 <10 个红细胞/高功率场 (HPF) 证明,并且不存在红细胞管型);和

[0363] (c) 尿蛋白与肌酐比 <0.5 。

[0364] 在第52周之前转换到救援药物的任何患者被认为是无反应者。使用Cochrane-Mantel-Haenzel (CMH) 测试比较各治疗组达到CRR的患者比例,用种族 (非洲裔加勒比/非裔美国人及其他) 和区域 (美国与非美国) 作为分层因素。如果测试结果在 $\alpha < 0.1$ 级 (单侧) 有利于奥比妥珠单抗组,则总结与奥比妥珠单抗组相关的更好的肾反应的转变。

[0365] 次要疗效结果测量如下:

[0366] (a) 在第52周达到总反应的患者的比例分析 (CRR+PRR);

[0367] (b) 52周过程内总反应的时间 (CRR+PRR);

[0368] (c) 从基线和LN疾病活动生物标志物的平均值和中值评估的减少或增加的百分比 (例如抗dsDNA抗体水平的降低,增加的C3和C4水平);

[0369] (d) 如通过达到以下所有来限定的在第52周实现PRR的患者比例:

[0370] (i) 血清肌酐比基线水平高 $\leq 15\%$

[0371] (ii) 红细胞/HPF比基线高 50% ,且无红细胞管型;

[0372] (iii) 尿蛋白与肌酐比率提高 50% ,满足以下条件之一:

[0373] (A) 如果基线尿蛋白与肌酐比 ≤ 3.0 ,则尿蛋白与肌酐比 <1.0 ;

[0374] (B) 如果基线蛋白与肌酐比 >3.0 ,则尿蛋白与肌酐比 <3.0 ;

[0375] (e) 在第24周达到CRR的患者的比例;

[0376] (f) 在52周过程内达到CRR的时间;

[0377] (g) 在第52周采用主要疗效测量定义并去除尿沉渣分析标准获得改良CRR (mCRR1) 的患者的比例

[0378] mCRR1指达到血清肌酐正常化,如下所证明:

[0379] (i) 血清肌酐小于或等于中心实验室值的ULN范围;

[0380] (ii) 如果基线 (第1天) 血清肌酐在中心实验室值的正常范围内,血清肌酐比基线高 $\leq 15\%$,且小于或等于中心实验室值的ULN范围;

[0381] (iii) 尿蛋白与肌酐比 <0.5 ;

[0382] (h) 如达到以下所限定的第52周实现第二CRR (mCRR2) 的患者比例:

[0383] (i) 血清肌酐正常化,如下所证明:

[0384] (A) 血清肌酐 $\leq$ 中心实验室值的ULN范围;

[0385] (B) 如果基线 (第1天) 血清肌酐高于中心实验室值的正常范围,则血清肌酐 $\leq$ 基线水平 15% 或者如果基线 (第1天) 血清肌酐值在中心实验室值的正常范围内, $S \leq$ 中心实验室值的ULN范围;

[0386] (ii) 非活性尿沉渣 (由 <10 RBCs/HPF证明,不存在红细胞管型)。

[0387] (iii) 尿蛋白与肌酐比 <0.5 。

[0388] 药效学 (PD) 的目标是比较奥比妥珠单抗对安慰剂治疗后在外周血中CD19⁺ B细胞

的变化。在筛选和第15、28、84、168、364和728天测量循环CD19+ B细胞的水平。

[0389] 药代动力学(PK)目标是表征奥利珠单抗在LN群体中的药代动力学,并评估奥比妥珠单抗与伴随药物(包括霉酚酸酯(MMF))之间的潜在PK相互作用。使用非线性混合效应建模(使用软件NONMEM)分析奥比妥珠单抗的剂量浓度-时间数据。PK谱数据用于进一步开发PK模型,包括主要协变量(例如性别、种族/种族、体重、基线时的生物化学和血液学参数、潜在疾病程度)对主要参数(例如,清除率)的影响。单独测量暴露量的推导,如浓度-时间曲线下面积(AUC)和观察到的最大浓度(C_{max})取决于所使用的最终PK模型。总结血清奥比妥珠单抗(平均值、最小值、最大值、SD和几何平均值)并报告。

[0390] 研究的探索性目标包括评估探索性生物标志物的剂量前水平(包括但不限于B细胞亚群和血清、血液和尿液中的蛋白质和/或mRNA水平)以及与结果的潜在关联,评估用奥比妥珠单抗与安慰剂给药的患者中随时间推移的探索性生物标志物的变化(包括但不限于B细胞亚群和血清、血液和尿液中的蛋白质和/或mRNA水平),评估肾脏外复发的发生情况,评估治疗对患者和医师报告的结果的影响,以及评估肾活检组织病理学(例如,在筛选和/或随后的活组织检查中CD19+ B细胞的存在)。探索性结果测量包括:

[0391] (a) 筛选和第15、28、84、168、364和728天的循环B细胞亚群的水平;

[0392] (b) 筛选和第1、15、28、84、168、252、364、532和728天的探索性生物标志物(包括但不限于B细胞亚群和血清、血液和尿液中的蛋白质和/或mRNA水平)的水平;

[0393] (c) 经历系统性红斑狼疮病活动指数(SLEDAI)-2K复发的患者比例;

[0394] (d) 经历52周和104周肾复发的患者比例;

[0395] (e) 在额外时间点(包括第12周和第36周)达到CRR、mCRR1、mCRR2的患者比例;

[0396] (f) 医师的全局评估(在筛选,基线访视以及在学习过程中的几个时间点捕获的视觉模拟量表);和

[0397] (g) 肾活检评估。

[0398] 实验室、生物标志物和其他生物样品

[0399] 在研究期间记录以下实验室评估:

[0400] (a) 血液学:血红蛋白、血细胞比容、RBC、平均红细胞体积、平均红细胞血红蛋白、WBC(绝对和差异)和定量血小板计数;

[0401] (b) 血液化学:AST/SGOT、ALT/SGPT、碱性磷酸酶、淀粉酶、脂肪酶、总蛋白、白蛋白、胆固醇、总胆红素、尿素、尿酸、肌酐、随机葡萄糖、钾、钠、氯、钙、磷酸盐、乳酸脱氢酶、CPK和甘油三酯;

[0402] (c) 尿液分析:血液、硝酸盐、蛋白质、葡萄糖和尿液显微镜的浸渍片;

[0403] (d) 在随机分组和第3、6、9和12月进行24小时尿液收集(分析总蛋白、总肌酐和肌酐清除率);

[0404] (e) 流式细胞术:B细胞(包括CD19、CD27、CD38和IgD),T细胞(CD3、CD4、CD8)和NK细胞(CD16、CD56);

[0405] (f) 自身抗体谱:抗核抗体(ANA)、抗dsDNA、抗Sm、抗RNP、抗Ro、抗La和抗C1q;

[0406] (g) 抗dsDNA抗体:通过ELISA在所有访问中作为SLEDAI-2K评估的一部分测量;

[0407] (h) 定量免疫球蛋白:总Ig水平,包括IgG、IgM和IgA同种型;

[0408] (i) 补体:C3、C4和CH50;

[0409] (j) 抗体滴度:对常见抗原(风疹、破伤风、流感、肺炎链球菌)的抗体滴度;和

[0410] (k) 妊娠试验:在筛选时和每次研究药物输注之前进行尿妊娠试验。除非测试为阴性,否则不进行输注。在所有其他时间点,尿妊娠试验是根据月经史和怀孕风险进行的。

[0411] 发送以下样品用于分析:用于B细胞和狼疮相关生物标志物(包括但不限于CD19+B细胞和与B细胞活性相关的mRNA)的来自血液和尿液的细胞,用于B-细胞和狼疮相关的生物标志物(包括但不限于B细胞激活因子或BAFF)的血清和尿液和用于免疫组织病理学评估的肾活检片。

[0412] 输注

[0413] 在每次输注研究药物或安慰剂之前,在输注期开始前,患者通过口服接受对乙酰氨基酚(650-1000mg)和苯海拉明(50mg;或相当剂量的相似药剂)的预防性治疗,给予30-60分钟。在开始奥比妥珠单抗/安慰剂输注前30-60分钟,接受奥比妥珠单抗的患者接受80mg甲泼尼龙IV并且接受安慰剂的患者接受安慰剂-甲泼尼龙IV。如果患者经历被调查员认为具有临床重要性的轻度输注相关反应(IRR),则应将输注速率降低至初始输注速率的一半(符合非霍奇金淋巴瘤方案输注速率和时间表)。反应结束后,输注应以降低的速度保持额外的30分钟。如果降低的速率是可忍受的,则输注速率可以增加至输注计划表的下一个最接近的速率。经历严重IRR的患者应立即中止输注,并应进行积极的对症治疗。在所有症状消失前不应重新启动输注。在重新启动输注时,速率应该是使反应下降的速度的一半。下表6提供了施用奥比妥珠单抗输注的说明。

[0414] 表6. 奥比妥珠单抗输注的施用。

第一次输注(第 1 天)	后续输注
[0415] [0100] 以 50mg/hr 的初始速率开始输注。 如果没有发生输注反应,则以每 30 分钟 50mg/hr 递增将输注速度增加到最大 400mg/hr。 如果发生输注反应,则停止或减慢输注。根据制度方案管理输注反应药物和支持治疗。 如果反应已经结束,以速率(在超敏反应或与输注有关的反应发生时使用的速率)50%的降低恢复输注。	如果患者在先前输注期间经历了输注反应,则以与第一次输注(50mg/hr)相同的速率开始,并遵循如上所述的那些指示。 如果患者对以前的输注耐受良好,开始以 100mg/hr 的速度输注。 如果没有发生输注反应,则以每 30 分钟 100mg/hr 的增量将输注速度增加到最大 400mg/hr。 如果发生输注反应,则停止或减慢输注。根据制度方案管理输注反应药物和支持治疗。如果反应已经结束,以速率(在超敏反应或与输注有关的反应发生时使用的速率)50%的降低恢复输注。

[0416] 对作为研究条目的一部分获得的所有肾活检和报告进行显微拍照并发送到在线中央阅读门户,用于监督由局部肾组织病理学家进行的组织病理学评估。专家组对这些活检进行评估,并对最终解释作出裁决。在患者进行筛选时,尽一切努力完成此过程,但不是完成筛选活动的强制性措施。在筛选期间或在研究期间获得的所有新的活组织检查样品以能够对B细胞的存在进行肾小管间质的免疫组织化学染色的方式进行处理。该研究鼓励但并不要求对没有达到CRR的患者进行重复肾活检,并寻求丰富用于执行重复肾活检的研究中心。

[0417] 实施例2:在类风湿关节炎和系统性红斑狼疮患者样品中通过Fc γ 受体依赖和非依赖的效应机制诱导B细胞细胞毒性方面,奥比妥单抗优于利妥昔单抗

[0418] 用标准剂量的利妥昔单抗(RTX)治疗的类风湿关节炎(RA)和系统性红斑狼疮(SLE)患者的比例显示出低效的B细胞消耗和差的临床反应,其可以通过递送更高的剂量来增强,表明标准剂量RTX是这些患者的次优疗法。为了调查是否可以用其他抗CD20 mAb实现更好的反应,在测量在SLE和RA样品中的B细胞毒性的一系列体外测定中,对RTX与奥比妥单抗(OBZ)(新一代,糖改造的II型抗CD20mAb)进行比较。已经发现OBZ在体外全血测定中诱导B细胞毒性比RTX至少有效2倍。剖析这个差异,发现RTX比OBZ引发更强的补体依赖性细胞毒性(CDC)。相比之下,OBZ在诱导Fc γ 受体(Fc γ R)介导的效应机制(包括NK细胞和嗜中性粒细胞的激活)方面更有效。OBZ在诱导直接细胞死亡也更有效。这对于作为整体的所有CD19⁺ B细胞和初始(IgD⁺ CD27⁻)都是正确的;并且特异性地转换(IgD⁻CD27⁺)记忆B细胞,其较高的频率与RTX后的差的临床反应相关。

[0419] 材料和方法

[0420] 患者

[0421] 本研究的所有参与者根据当地研究伦理委员会批准的赫尔辛基宣言提供同意。所有RA患者均符合美国风湿病学会(ACR)/欧洲抗风湿病联盟分类标准(Aletaha D.等人,2010 Ann Rheum Dis.2010;69(9):1680-8),所有SLE患者均符合ACR分类标准(Petri M.等人,Arthritis Rheum.2002;64(8):2677-86)。

[0422] 抗体和试剂

[0423] 研究中使用的抗CD20 mAb包括RTX、OBZ和非糖改造的野生型糖基化OBZ(OBZ_{GLY}),并且在一些实验中,具有不参与任何Fc相关效应子功能的突变Fc部分(P329G LALA)的OBZ(Herter S.等人,Cancer Research.2015;75(15Supplement):2460),OBZ-PG LALA。瑞士苏黎世的罗氏创新中心产生除RTX以外的所有抗CD20 mAb,RTX是一个由University Hospital,U.K.药厂的馈赠。Fc γ RII拮抗剂AT10(Greenman J.等人,Mol Immunol.1991;28(11):1243-54),是内部生产的。

[0424] 流式细胞术和B细胞分离

[0425] 从Becton Dickinson biosciences或Biolegend,UK购买荧光缀合的mAb:CD3(藻红蛋白[PE]-Cy 7),CD15(异硫氰酸荧光素,FITC):CD16(Allophycocyanin,APC),CD19(Alexa Fluor 700),CD45(PE),CD56(PE),CD107a(Brilliant Violet 421),CD11b(PE),CD62L(APC),碘化丙锭和膜联蛋白V(FITC)。使用Becton Dickinson LSR Fortessa细胞分析仪进行流式细胞术。基于前向和侧向散射特征鉴定淋巴细胞。B细胞被鉴定为CD19⁺或CD20⁺,T细胞被鉴定为CD3⁺以及NK细胞鉴定为CD3⁻56⁺。基于前向和侧向散射特征和CD15阳

性鉴定嗜中性粒细胞。将用mAb温育的样品中的CD11b和CD62L的平均荧光强度(MFI)与没有抗体温育的样品中的平均荧光强度(MFI)进行比较。

[0426] 在所有实验中,通过Ficoll-Hypaque密度梯度从全血样品中分离外周血单核细胞(PBMC),并使用EasySep™ Human B Cell Enrichment Kit (Cambridge,U.K.)从PBMC分离B细胞。

[0427] 全血B细胞消耗测定

[0428] 简言之,在37℃和5%CO₂下,用或不用mAb以1μg/mL温育300μl用肝素抗凝的新鲜全血24小时。然后如先前所述(Reddy V.等人,Arthritis&rheumatology.2005;67(8):2046-55),将样品用抗CD3、抗CD19和抗-CD45染色,然后裂解红细胞并在流式细胞仪上分析。B细胞消耗%由在治疗后剩余的B细胞与T细胞比例计算并如前所述定义为细胞毒性指数(CTI)(Mossner E.等人,Blood.2010;115(22):4393-402和Reddy V.等人,Arthritis&rheumatology,2015;67(8):2046-55)。

[0429] 表面荧光猝灭试验

[0430] 如前所述(Beers SA等人,Blood.2008;112(10):4170-7)和Reddy V.等人,Arthritis&rheumatology.215;67(8):2046-55)进行表面荧光猝灭测定以评估B细胞的mAb内化。将分离的B细胞用浓度为5μg/mL的Alexa-488缀合的mAb温育6小时,然后通过流式细胞术分析。

[0431] 补体依赖性细胞毒性测定

[0432] 如前所述(Cragg M.S.等人,Blood.2004;103(7):2738-43)进行CDC测定。在37℃和5%CO₂下,将分离的B细胞用浓度为10μg/mL的mAb温育30分钟。样品用荧光缀合的抗CD19抗体、膜联蛋白V(Av)和碘化丙锭(PI)染色,并通过流式细胞术评估CD19+ Av+ PI+细胞的频率。使用新鲜收集的正常健康人血清作为补体来源。为了定义与补体相关的活性,部分血清在56℃下热灭活(HIS)30分钟。通过或者用正常健康血清或者用HIS温育的样品中CD19+ Av+ PI+细胞的相对频率来评估mAb激活补体并裂解靶细胞的能力。

[0433] 直接细胞死亡

[0434] 在37℃和5%CO₂下,将分离的B细胞在补充有10%热灭活的胎牛血清的RPMI中,在具有或不具有10μg/mL浓度的mAb下温育6小时。具有mAb的样品中CD19+ Av+细胞的频率与没有mAb的样品相比,表示mAb诱导直接细胞死亡的能力。

[0435] NK细胞脱粒测定

[0436] 使用来自全血B细胞消耗测定的样品,通过测量CD107a或LAMP-1(溶酶体相关膜蛋白1)的表达来评估NK细胞脱粒,LAMP-1在NK细胞活化后上调,并与NK细胞介导的ADCC相关(Alter G.等人,J Immunol Methods.2004;294(1-2):15-22和Aktas E.等人,Cell Immunol.2009;254(2):149-54)。因此,将具有mAb的样品中CD3-56+ 107a+ NK细胞的频率与没有mAb温育的样品中的频率进行比较。NK细胞的活化与增加的金属蛋白酶活性相关,金属蛋白酶在NK细胞活化时切割CD16,降低其表达(Romee R.等人,Blood.313;121(18):3599-608)。因此,CD16损失的程度也被用作NK细胞活化的间接测量(Grzywacz B.等人,Leukemia.2007;21(2):356-9;作者回复9,和Bowles J.A.等人,Blood.2006;108(8):2648-54)。

[0437] 嗜中性粒细胞活化测定

[0438] 在全血测定中通过流式细胞术测量CD15+嗜中性粒细胞上的CD11b增加或CD62L降低来评估嗜中性粒细胞的活化 (Golay J. 等人, Blood. 313;122 (20):3482-91, 以及 Wittmann S. 等人, Cytometry A. 2004;57 (1):53-62)。通过比较用或不用mAb温育的样品中CD15+嗜中性粒细胞上CD11b和CD62L的平均荧光强度 (MFI) 来评估mAb诱导嗜中性粒细胞活化的能力。

[0439] 统计分析

[0440] 使用Graph Pad Prism Software 5.0版分析数据。使用Mann Whitney检验或Wilcoxon匹配对签名秩检验来适当比较各组之间。Spearman相关系数用于分析相关性。

[0441] 结果

[0442] 在诱导B细胞毒性方面II型mAb比I型更有效

[0443] 为了评估I型和II型mAb对RA和SLE样品中B细胞细胞毒性的影响,如先前所述进行全血B细胞消耗测定 (Reddy V. 等人, Arthritis&rheumatology. 2005;67 (8):2046-55)。在所有测试的样品中,OBZ在从具有RA (n=31) 和SLE (n=34) 的患者消耗B细胞的效率比RTX高>2倍,两种非糖基化的OBZ_{G1y}和OBZ都比RTX更有效 (图2A)。在RA和SLE两者中,OBZ的中位数CTI显著大于OBZ_{G1y}和RTX的CTI,在RA和SLE两者中,OBZ_{G1y}的CTI显著高于RTX的CTI。在RA中,RTX、OBZ_{G1y}和OBZ的中位数 (四分位数范围) CTI分别为29 (13-50)、60 (47-70) 和67 (60-77),SLE中分别为19 (11-39)、40 (31-53) 和59 (52-70)。因此,在RA和SLE两者中,存在mAb诱导的B细胞消耗的层级:RTX<OBZ_{G1y}<OBZ。还注意到B细胞消耗的显著样品间变异性,特别是RTX.OBZ_{G1y} (具有类似于RTX的非糖基化Fc) 的优越效率表明,其II型性质是全血测定中B细胞消耗效率的两种类型的mAb之间的差异;而与OBZ_{G1y}相比,OBZ的增加了的效率归因于Fc部分的无岩藻糖基化。

[0444] B细胞比OBZ更快地内化RTX

[0445] 接下来,调查了II型mAb在B细胞消耗中的优越效率是否与其II型性质一致,并且因此评估来自具有RA和SLE的患者的B细胞是否比OBZ更大程度地内化RTX。发现RTX在温育6小时后比OBZ更广泛地内化,表面可及性RTX与OBZ的中值 (范围) 百分比在RA (n=5) 中分别为:55 (51-57) 对83 (81-84),以及在SLE (n=8) 中分别为:60 (49-77) 对76 (70-80) (图2B)。为了评估Fc γ RIIb在该内化中的作用,在存在Fc γ RII阻断单克隆抗体AT10的情况下进行实验,其部分抑制RTX的内化并且较小程度地抑制OBZ的内化 (图2B),类似于先前使用OBZ的非糖基修饰的II型抗体变体的观察结果 (Reddy V. 等人, Arthritis&rheumatology. 2005;67 (8):2046-55)。

[0446] 在诱导补体依赖性细胞毒性方面RTX比OBZ更有效

[0447] 还调查了这些mAb引发CDC的能力。已经发现,与热灭活血清 (HIS) 相比,在正常健康血清 (NHS) 存在下,用RTX温育的样品中裂解的B细胞 (CD19+ Δ v+ PI+) 的频率显著更大,具有中值 (范围) 差为10.9% (8.1-21),而对于OBZ的差为4.8% (0.9-6.5) (图2C)。在用NHS对HIS温育的样品中的裂解细胞的平均值 $\pm$ SD倍数增加对于RTX和OBZ分别为 1.9 ± 0.5 和 1.2 ± 0.2 (图2D)。因此,数据表明在引发CDC方面RTX优于OBZ。

[0448] 在激活NK细胞方面OBZ比RTX更有效

[0449] 这些CDC结果与mAb的I型和II型性质一致,但与全血测定中II型mAb的优异效率不同。接下来,调查了mAb引发Fc γ R介导的效应子机制的能力;首先评估全血B细胞消耗测定

中的NK活化。如图3E所示的门控,相对于CD16的表达,允许评估NK脱粒(CD107a增加)。在CD56+ CD16-级分中观察到最高比例的CD107a+ NK(CD3-CD56+)细胞(图3A-3G),表明脱粒NK细胞如先前报道的那样下调CD16(Grzywacz B.等人,Leukemia.2007;21(2):356-9;作者回复9)。

[0450] 建立了这些参数后,进行了比较RTX和OBZ的等效测定。在不存在mAb的情况下温育24小时后,RA(n=18)和SLE(n=23)患者之间的NK细胞、CD107a+ NK细胞、CD16+ NK细胞或B细胞的频率没有显著差异(图4A)。然而,在OBZ温育的样品中,CD3-CD56+ CD107a+激活的NK细胞的中值(范围)频率比RTX显著更高,分别是5.1%(1.9-22)对2.8%(0.3-14)和5.5%(0.6-12)对4.3%(1.2-8.9),但在RA和SLE中CD16+ NK细胞的中值(范围)频率显著降低,分别是69(36-94)对89(83-97)和66(42-91)对84(61-95)(图4B)。此外,在SLE中,与用RTX温育相比,用OBZ温育的样品中CD3-CD56+ CD107a+ NK细胞的频率具有显著更高的倍数增加(图4B)。此外,发现如通过CD107a的增益或CD16的损失或通过CD3-CD56+ CD107a+ NK细胞的频率倍数增加评估的,NK细胞活化在RA中比在SLE中更大(图4B)。如通过RTX和OBZ的CD3-CD56+ CD107a+ NK细胞的频率评估的,NK细胞活化在不具有mAb温育的样品中显著相关,在RA中分别是 $r^2=0.89, p<0.05$; $r^2=0.78, p<0.05$ (图4C),以及在SLE中分别是 $r^2=0.52, p<0.05$; $r^2=0.36, p<0.05$ (图4D)。然而,与SLE相比,RA中的相关性更强。总之,这些数据表明SLE中NK细胞活化中的疾病相关缺陷可能导致全血消耗测定中注意到的低效B细胞消耗(图2A),并且NK细胞的基线激活状态可能影响RA和SLE中对mAb激活的反应(图4B和4C)。

[0451] 接下来调查了RTX和OBZ的NK细胞的差异激活是由于I型和II型特征和/或由于使用具有野生型糖基化(OBZ_{Gly})的OBZ或完全缺乏Fc γ R接合的Fc改造的作用(OBZ-PG LALA),因此在诱导ADCC和CDC时的效率较低(Hessell A.J.等人,Nature.2007;449(7168):101-4)。在RA(n=6)和SLE(n=12)两者中与用OBZ-PG LALA温育的样品相比,在没有mAb温育的样品中,CD3-CD56+ CD107a+或CD3-CD56+ CD16+ NK细胞的频率没有发现显著差异,表明Fc γ R-接合是必要的。在这些样品中,在RA(n=18)和SLE(n=23)(图5A)两者中,OBZ在全血测定中消耗B细胞比OBZ_{Gly}和RTX更有效,但是在CD3-CD56+ CD107a+ NK细胞的频率和倍数增加方面观察到增加的分级如下:无mAbs=OBZ-PG LALA<RTX<OBZ(图5B和5C)。与其他样品相比,用OBZ温育的样品中,CD3-CD56+ CD16+ NK细胞的频率显著降低(图5D)。与RA而不是SLE中RTX相比,用OBZ_{Gly}温育的样品中CD3-CD56+ CD16+ NK细胞的频率也较低(图5D)。

[0452] 因此,与SLE相比,RA中mAb上调在CD3-CD56+ NK细胞上的CD107a表达的能力较高,使得用RTX、OBZ-PG LALA、OBZ_{Gly}和OBZ温育的样品与无mAb温育的样品相比时,平均倍数差异在RA中分别是1.2、1.5、1.9和3.1,在SLE中分别是1.5、0.8、1.4和1.8(图5C)。尽管RA和SLE中由mAb实现的B细胞消耗的模式(图5A)与mAb的NK细胞活化模式相似(图5B和5D),但mAb实现的B细胞消耗%和单个样品中的CD3-CD56+ CD107a+ NK细胞的频率之间没有直接的相关性(数据未示出)。

[0453] 在激活嗜中性粒细胞方面OBZ比RTX更有效

[0454] 除了NK细胞之外,也提出嗜中性粒细胞为mAb效应子细胞(Golay J.等人,Blood.313;122(20):3482-91)。因此,接下来,如前所述,通过测量CD11b和CD62L的表达来评估mAb诱导嗜中性粒细胞活化的能力(Wittmann S.等人,Cytometry A.2004;57(1):53-62),并显示于图9中。CD11b构成 β 整联蛋白(Mac-1)复合物的一部分,并且该复合物的几种

遗传变体已经与狼疮相关的吞噬缺陷相关 (Bologna L. 等人, J Immunol. 2011; 186 (6) : 3762-9)。在嗜中性粒细胞激活后, CD11b 的表面表达上调, 而粘附分子 CD62L 的表达下调 (Golay J. 等人, Blood. 313; 122 (20) : 3482-91, 以及 Wittmann S. 等人, Cytometry A. 2004; 57 (1) : 53-62)。发现与无 mAb 温育的样品相比, 在 RA (n=10) 和 SLE (n=22) 中, 用 mAb 温育的样品中的 CD11b 的 MFI 显著更高 (图 6A)。在 RA 和 SLE 两者中, 在不存在 mAb 时温育的样品中的 CD11b 的 MFI 与在 RTX 温育的样品之间的 CD11b 的 MFI 之间存在显著的相关性 (分别为 $r^2 = 0.81, 0.82$), 而在 SLE 不是 RA 中注意到 OBZ 的显著相关性 (为 $r^2 = 0.81$) (图 6B)。还注意到 mAb 上调 CD11b 的能力的分级, 使得 CD11b 的 MFI 在用 RTX < OBZ_{G1y} < OBZ 温育的样品中更低, 如在 NK 细胞激活的情况下。此外, CD62L 的 MFI 在用 RTX > OBZ_{G1y} > OBZ 温育的样品中更大 (图 6C)。在 RA 和 SLE 中, 在不存在 mAb 时温育的样品中, 注意到 CD62L 的 MFI 与 RTX (分别为 $r^2 = 0.93, 0.91$) 和 OBZ (分别为 $r^2 = 0.64, 0.71$) 温育的样品中的显著相关性 (图 6D)。因此, mAb 在其激活嗜中性粒细胞的能力方面的分级是 OBZ > OBZ_{G1y} > RTX。总之, 这些数据表明, 在 RA 和 SLE 样品的全血测定中, II 型 mAb 在激活嗜中性粒细胞方面优于 RTX。与不存在 mAb 温育的样品相比, OBZ-PG LALA 没有引起 RA (n=7) 和 SLE (n=12) 两者中的各标记物的显著变化。

[0455] 在诱导直接细胞死亡方面 OBZ 比 RTX 更有效

[0456] 接下来, 使用如图 10 所示的膜联蛋白 V 测定来评估直接细胞死亡 (DCD)。对于作为整体的 CD19+ 细胞以及 B 细胞亚群; IgD+ CD27- 初始细胞和 IgD- CD27+ 转换记忆细胞, OBZ 诱导直接细胞死亡的能力大于 RTX, 图 7A (RA, n=5, SLE, n=4)。即使在没有 mAb 温育的样品中, 膜联蛋白 V+ 细胞的比例也高于 DN 细胞 > IgD+ CD27+ 未转换记忆细胞 > IgD- CD27+ 转换记忆细胞 > IgD+ CD27- 初始细胞。尽管如此, OBZ 在诱导 DCD 方面优于 RTX。

[0457] B 细胞亚群: CD20、Fc γ RIIb 的表达和 mAb 的内化

[0458] 接下来调查 B 细胞亚群在 CD20、Fc γ RIIb 的表达和/或其内化 mAb 的能力之间的差异是否提供了对 mAb 诱导的 DCD 的差异敏感性的解释。B 细胞亚群显示不同的内化 mAb 的能力, 使得 IgD- CD27+ 转换记忆细胞内化 mAbs 比其他 B 细胞亚群少; 并且 IgD+ CD27+ 未转换记忆细胞内化 mAb 比其他 B 细胞亚群达更大程度。用 AT10 拮抗 Fc γ RIIb 的作用在两种情况下均显著降低内化。当与初始和 IgD- CD27+ 转换记忆细胞相比时, IgD+ CD27+ 未转换记忆细胞具有显著更高的 CD20 和 Fc γ RIIb 表达, 并且显示出显著更大的内化 mAb 的能力, 而初始和 IgD- CD27+ 转换记忆细胞具有显著较低的 CD20 表达和 Fc γ RIIb 并显示出显著较低的内化水平。DN 细胞具有 CD20 和 Fc γ RIIb 表达的显著变化水平, 但内化的 RTX 比 IgD- CD27+ 转换记忆细胞达到显著更大程度。来自 RA 和 SLE 样品的 B 细胞一致地显示低水平的 OBZ 内化。将这些数据结合在一起, B 细胞亚群对 mAb 诱导的 DCD 的易感性和内化 mAb 或表达 CD20 或 Fc γ RIIb 的能力之间没有明确的关系。

[0459] 这里, 显示与 RTX 相比, 具有糖修饰的 Fc 的 II 型抗 CD20 mAb——奥比妥珠单抗在 RA 和 SLE 患者的全血样品缺失 B 细胞方面表现出至少 2 倍的效力。OBZ 的这种增加的活性主要通过 Fc γ 受体 (Fc γ R) 介导的效应机制和 DCD 而实现。相比之下, RTX 招募对 CDC 更有效的补体, 但是在诱发 ADCC 和 DCD 时迅速内化并且效率显著降低。随后的分析揭示, CD20 靶分子的表达在 IgD- CD27+ 转换记忆和 DN 细胞上较少; 也许是由于它们对 RTX 去除的相对抗性。

[0001]

<110> Genentech, Inc.
BRUNETTA, Paul

<120> 治疗狼疮性肾炎的组合物和方法

<130> 146392032240

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> 62/300,052

<151> 2016-02-25

<150> 62/159,876

<151> 2015-05-11

<160> 43

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr

1

5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp

1

5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr

1

5

10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1

5

10

15

<210> 5

[0002]

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 5
 Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 6
 Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val

115

<210> 9
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

[0003]

<210> 10
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20          25          30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35          40          45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85          90          95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105         110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115         120         125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130         135         140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145         150         155         160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165         170         175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180         185         190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195         200         205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210         215

```

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

[0004]

<400> 11

```

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

```

<210> 12

<211> 103

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 12

```

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

```

<210> 13
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Gln Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 14
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0005] <400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 16
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 16
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0006]

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 17
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 18
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

```

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

```

<210> 19
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

```

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
      20      25      30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35      40      45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50      55      60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65      70      75      80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

[0007]

<210> 20
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

```

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

```

<210> 21
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

```

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1      5      10      15

```

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

<210> 22
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

[0008]

<210> 23
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 24
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 25

```

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

```

[0009]

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 27
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0010]

<400> 28
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 29
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

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

<210> 31
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0011]

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

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

<210> 33
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 33
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

[0012]

<210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 34
Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Ala His Ser

<210> 35
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 36
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1	5	10
<210> 37 <211> 32 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成构建体 <400> 37 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln 1 5 10 15 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 20 25 30		
<210> 38 <211> 11 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成构建体 <400> 38 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 1 5 10		
<210> 39 <211> 23 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成构建体 <400> 39 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 20		
<210> 40 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成构建体 <400> 40 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr 1 5 10 15		
<210> 41 <211> 32 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成构建体 <400> 41 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 1 5 10 15 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys 20 25 30		
<210> 42 <211> 11		

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 42

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

[0014]

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 43

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15
Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

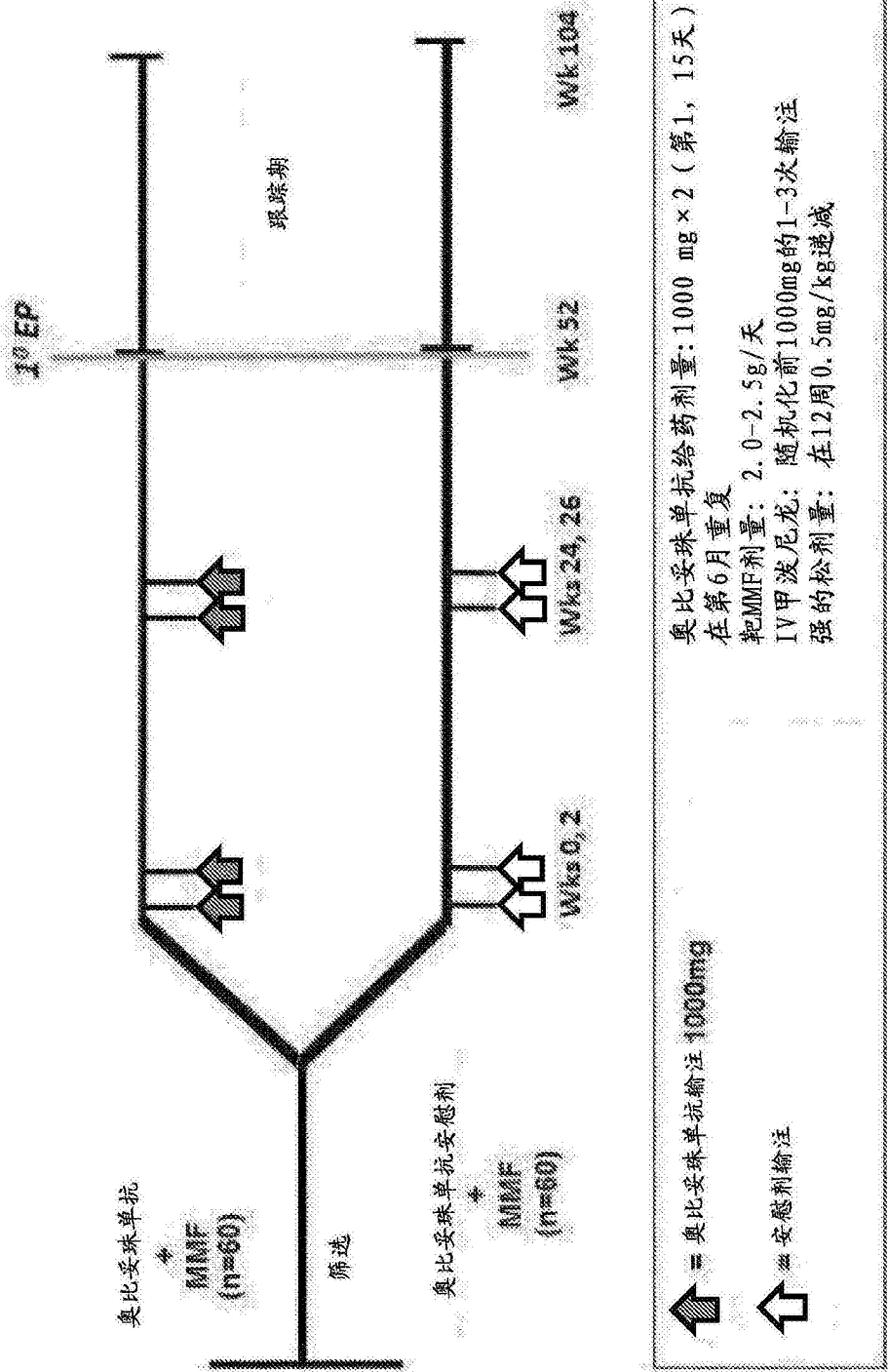


图1

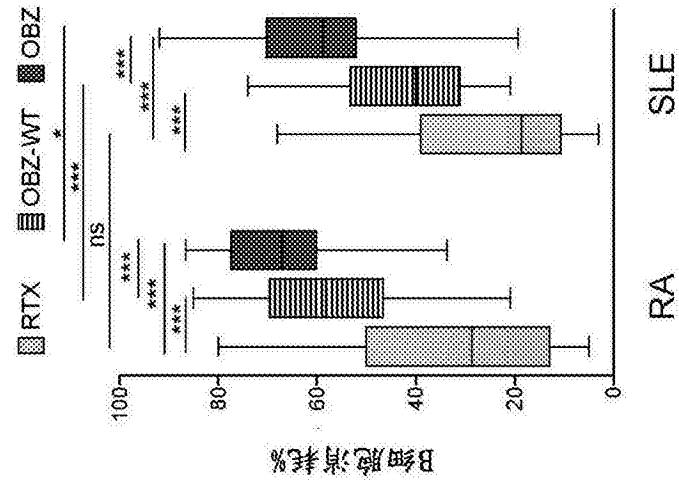


图2A

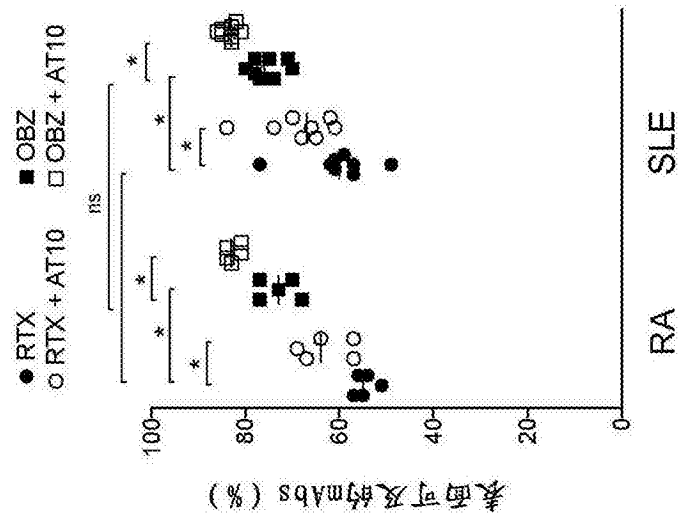


图2B

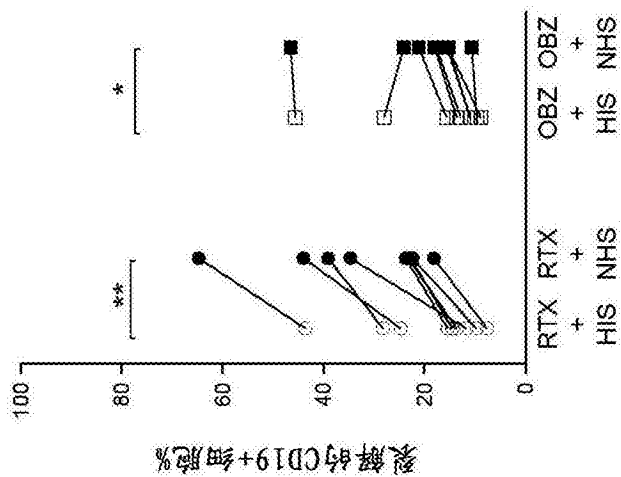


图2C

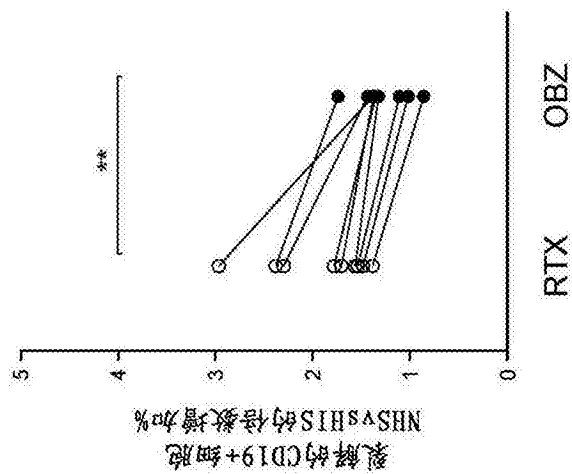


图2D

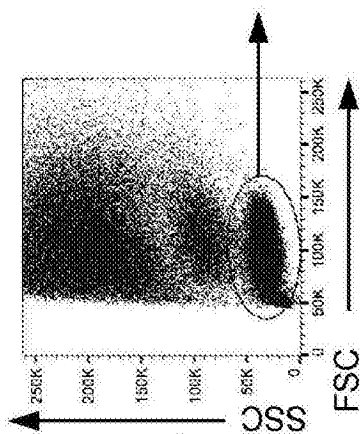


图3A

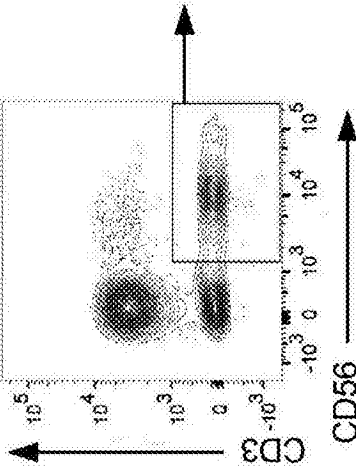


图3B

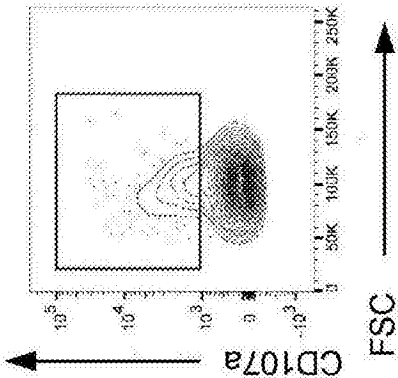


图3C

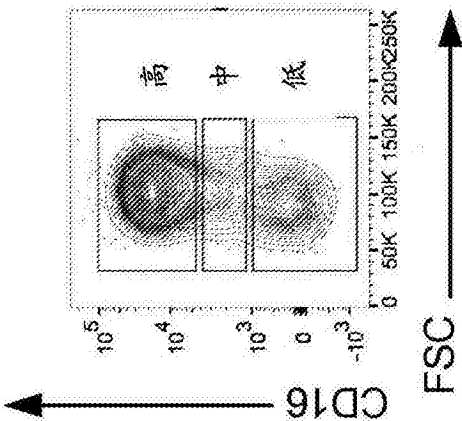


图3D

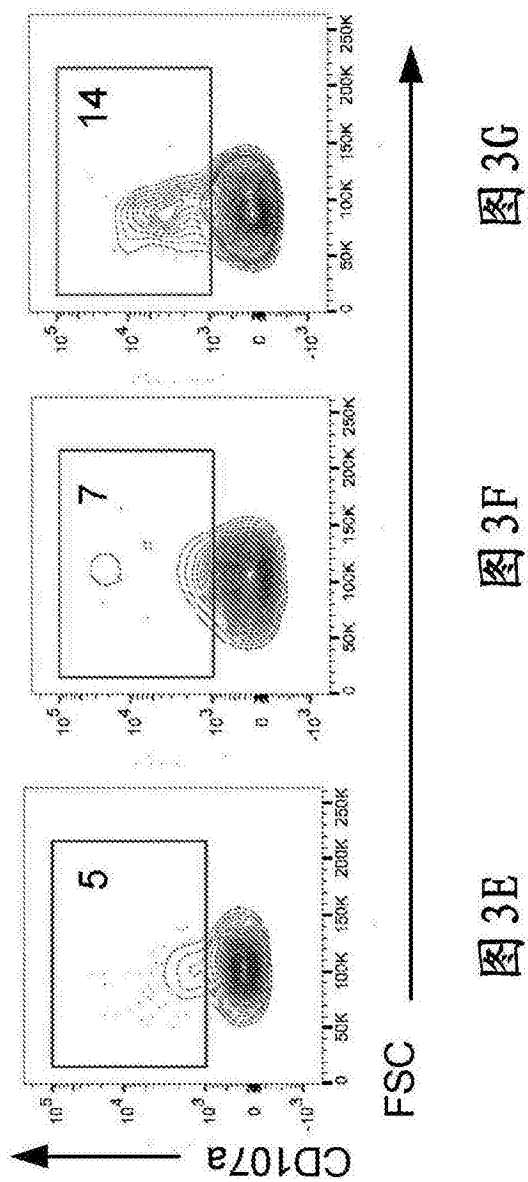


图 3G

图 3F

图 3E

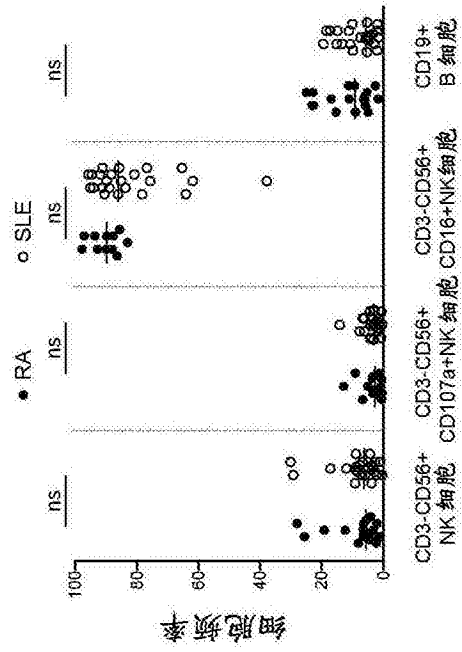


图4A

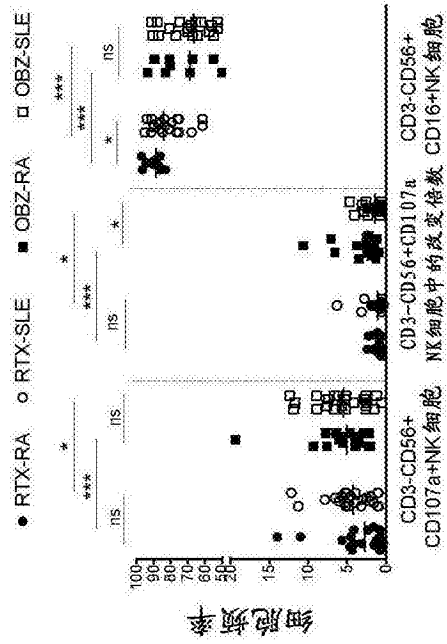


图4B

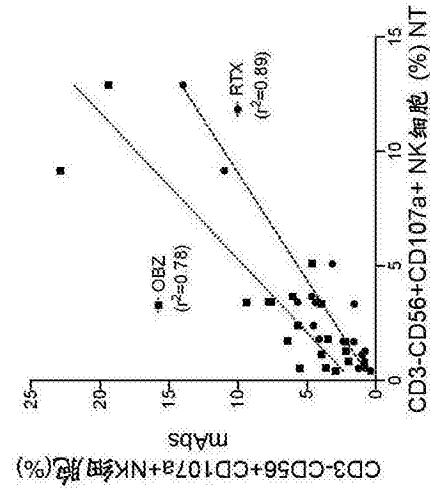


图4C

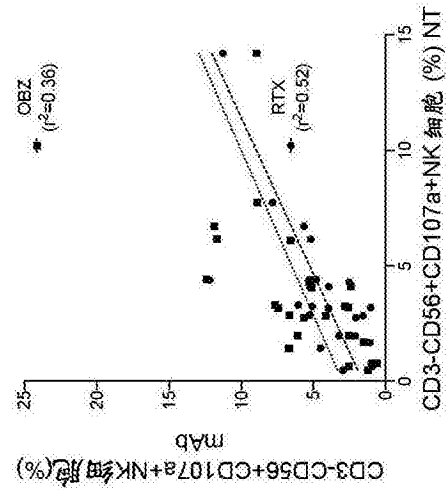


图4D

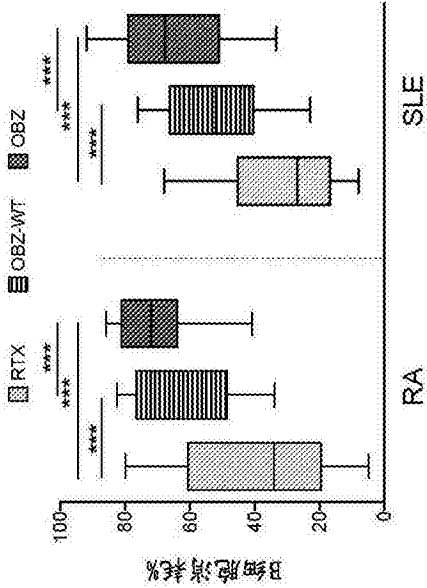


图5A

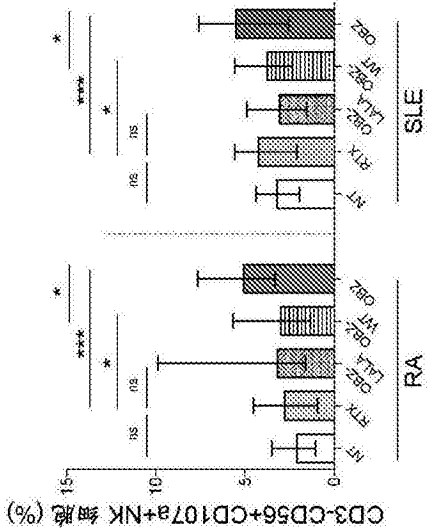


图5B

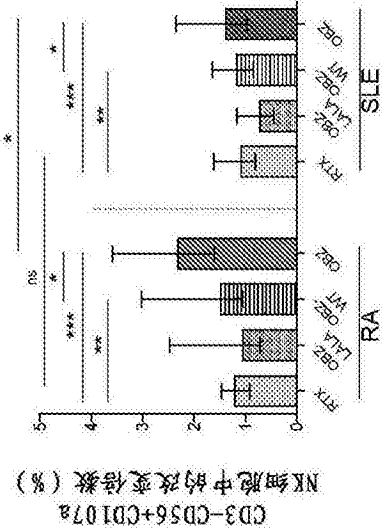


图5C

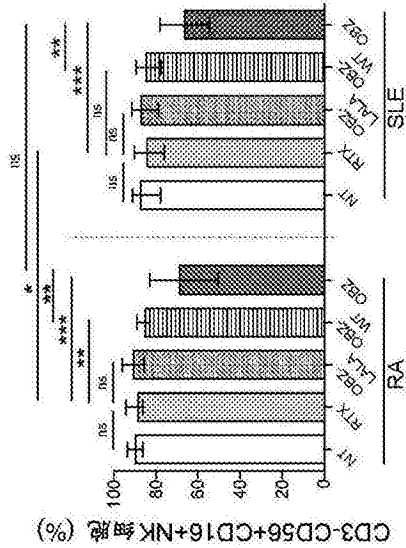


图5D

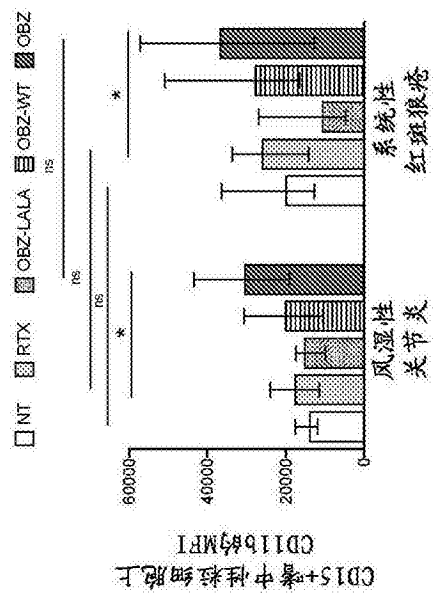


图6A

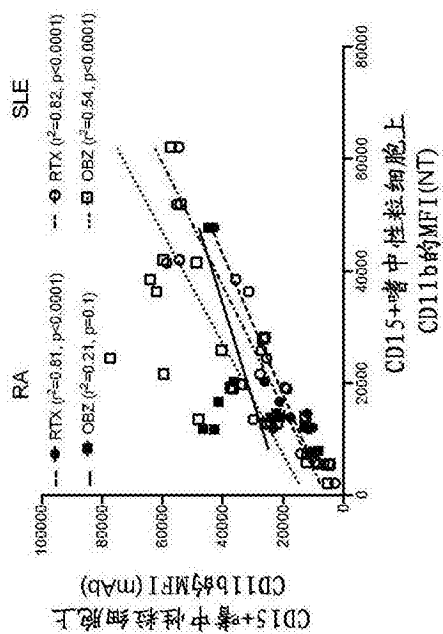


图6B

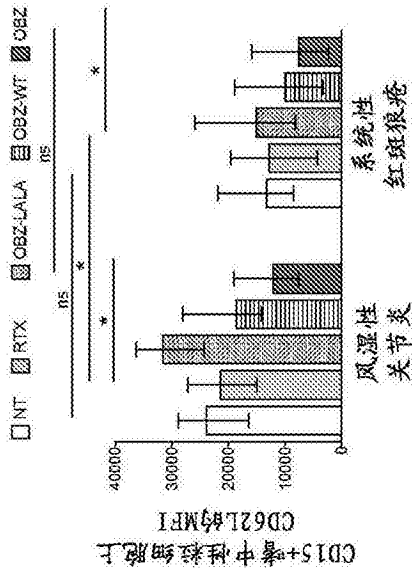


图6C

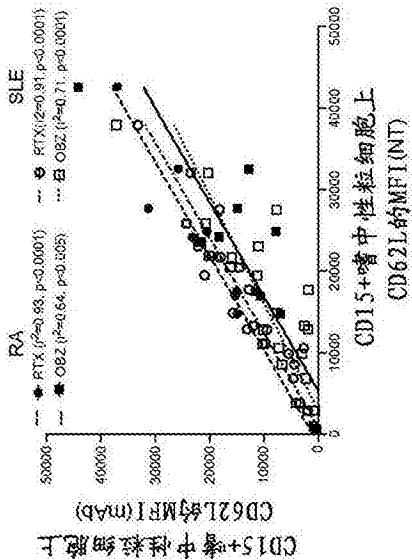


图6D

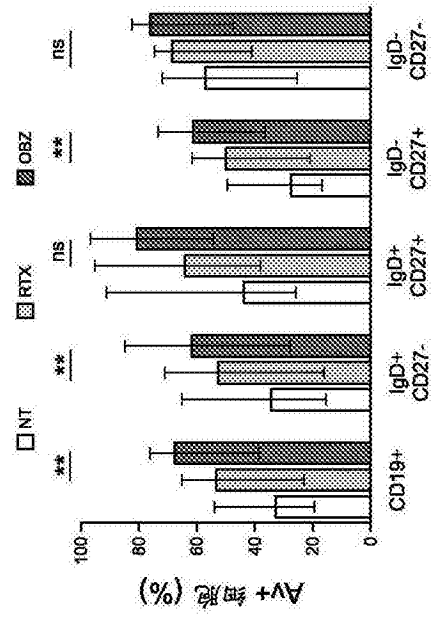


图7A

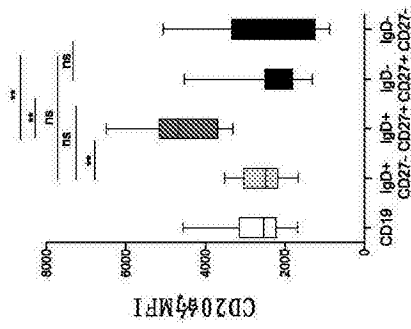


图7B

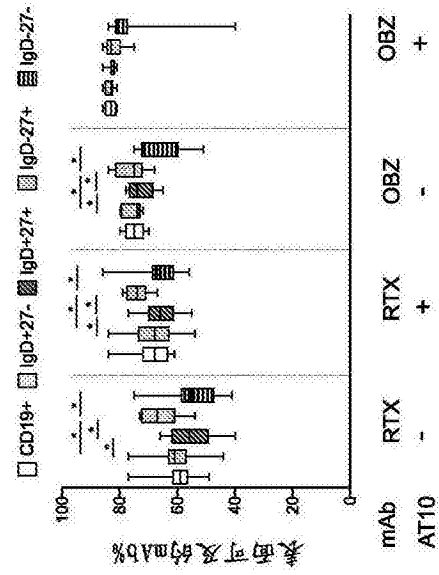


图7C

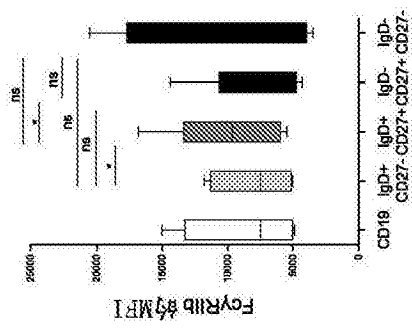


图7D

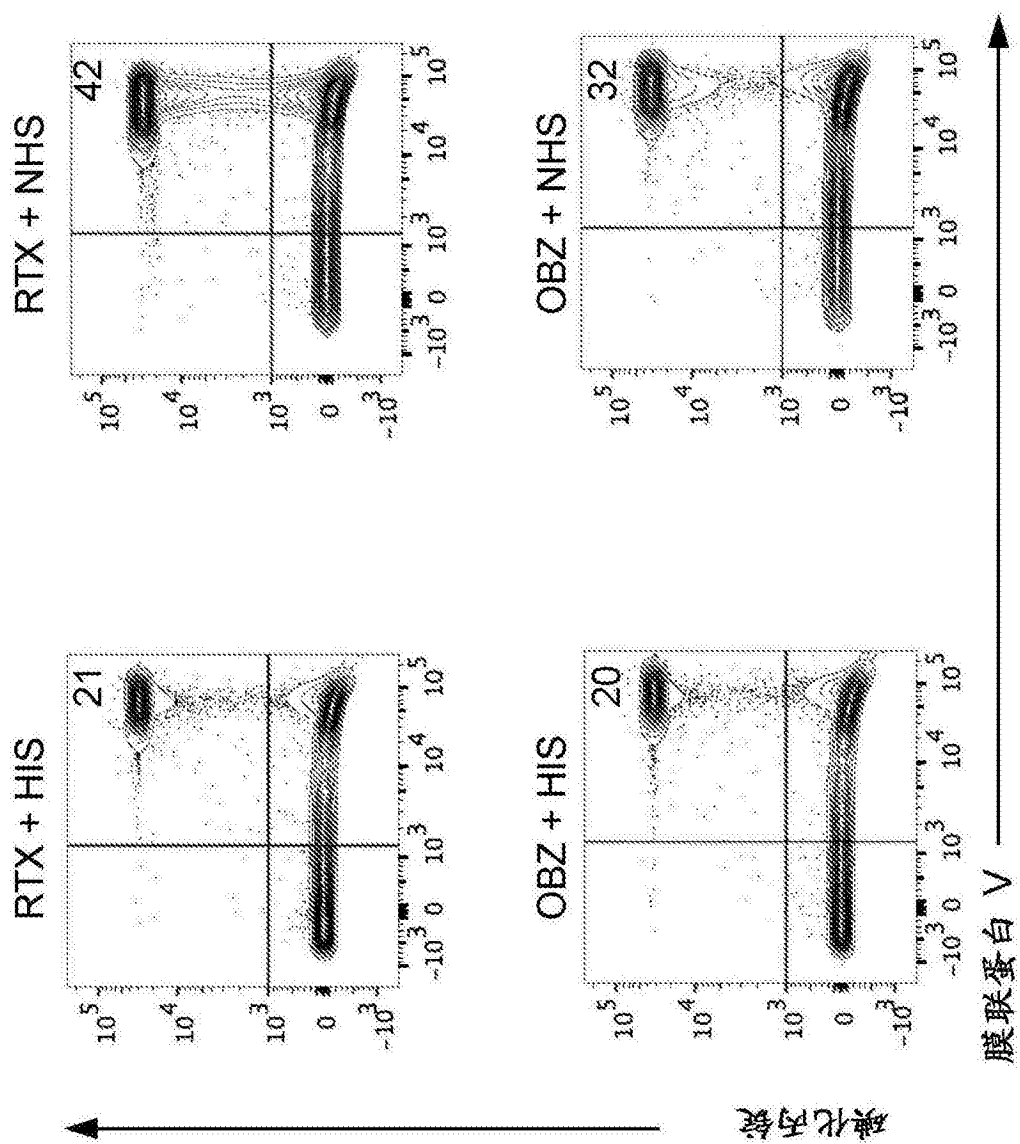


图8

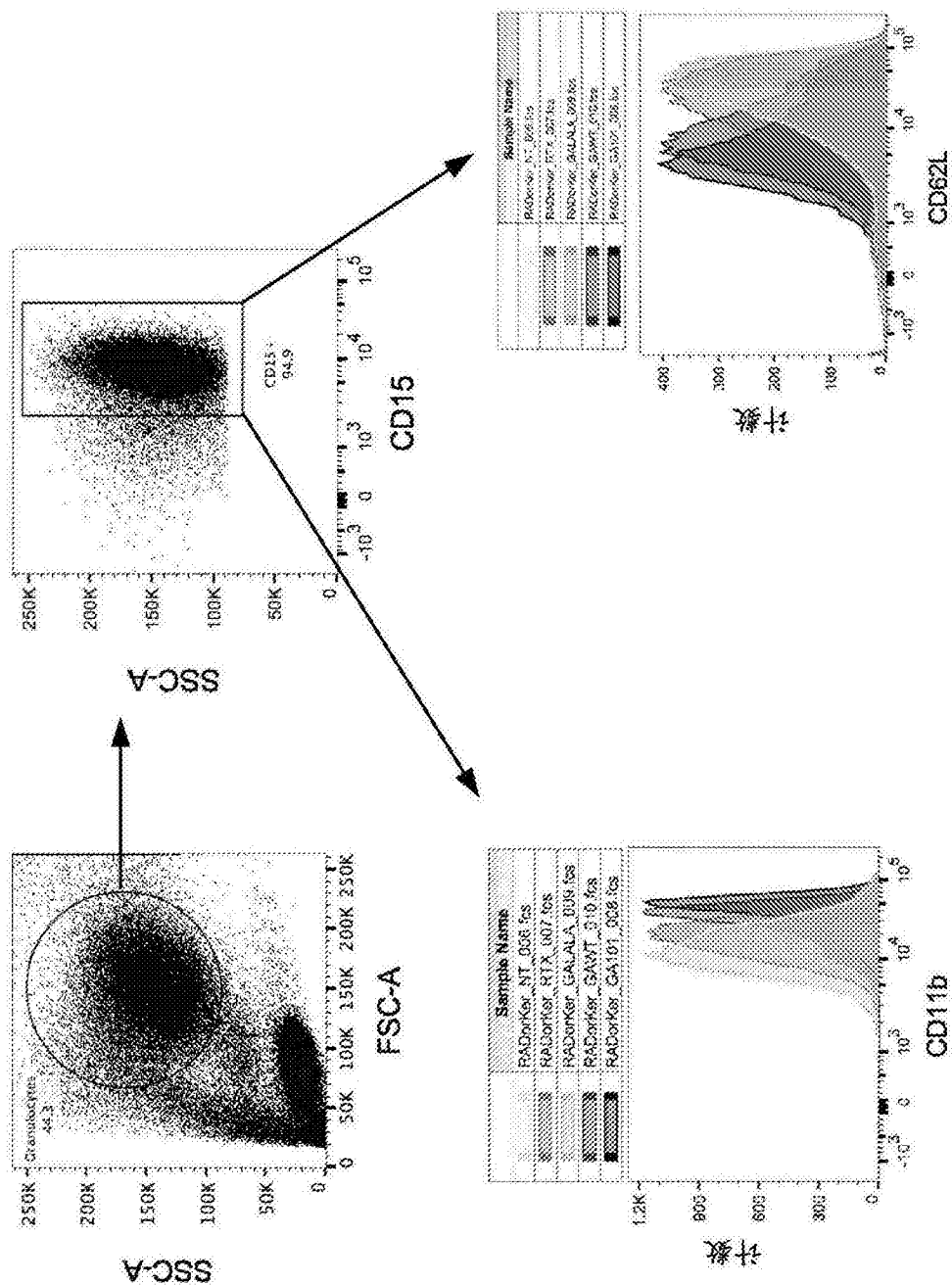


图9

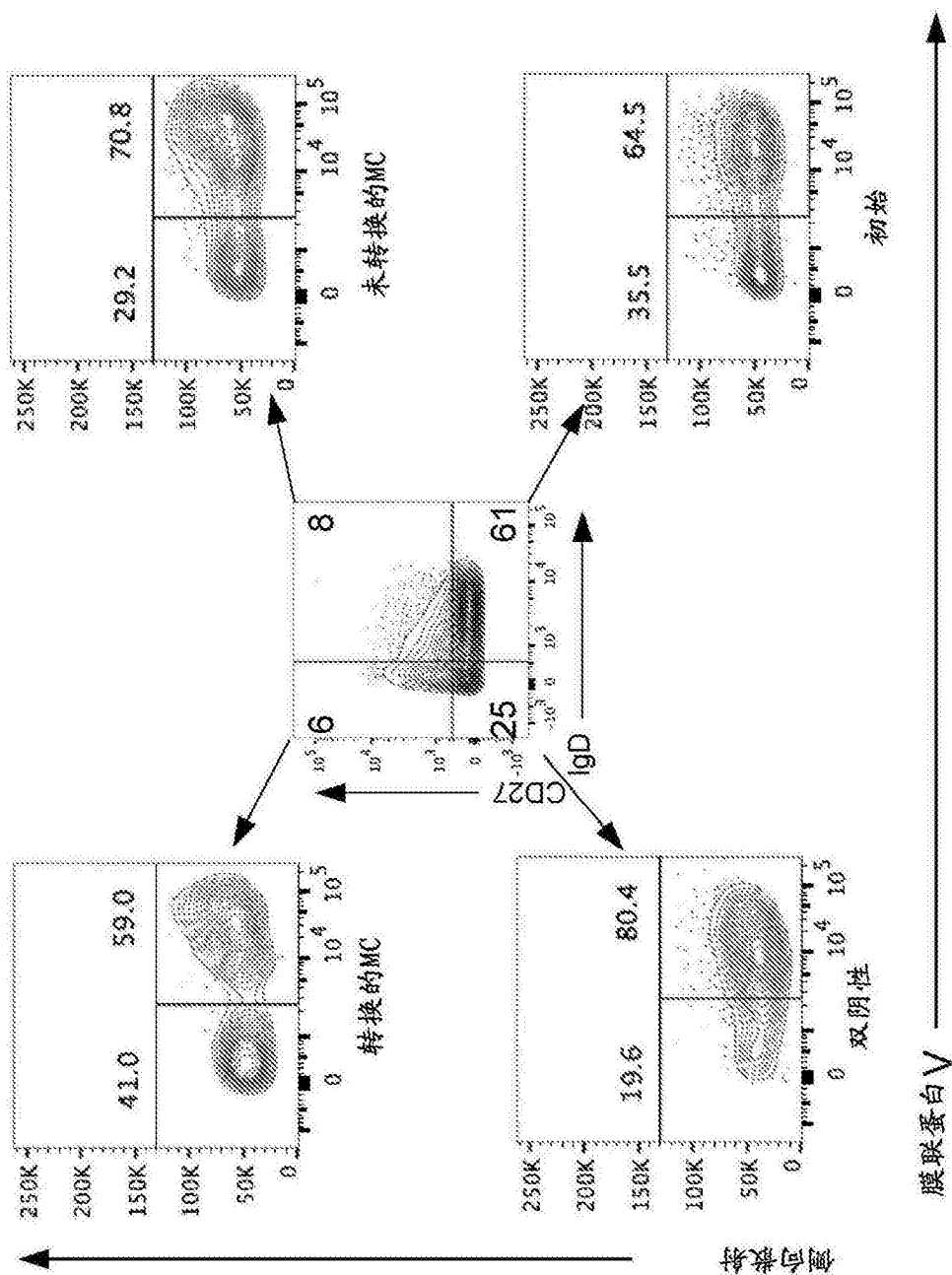


图10

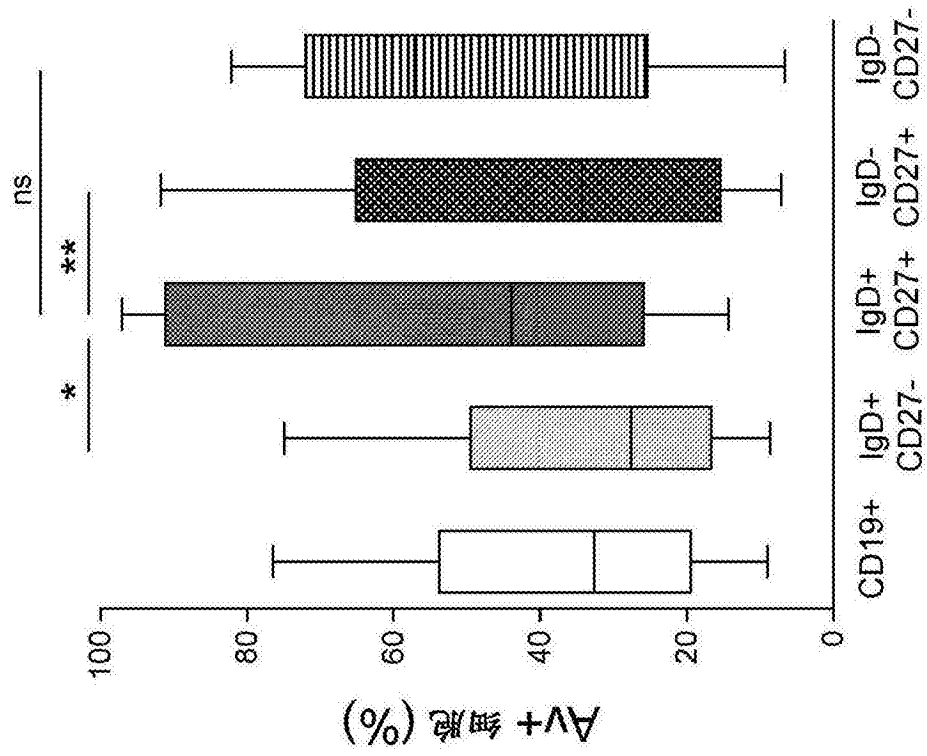


图11