



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101802005 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 16

(21) 申请号 200880104516. 3

C12P 21/08(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 08. 27

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/966, 410 2007. 08. 28 US

EP 1149913 A1, 2001. 10. 31, 全文.

US 20060286108 A1, 2006. 12. 21, 全文.

US 20070172897 A1, 2007. 07. 26, 全文.

EP 0568500 A1, 1993. 11. 03, 全文.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 02. 26

审查员 孙谦

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/010154 2008. 08. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/032128 EN 2009. 03. 12

(73) 专利权人 艾伯维生物技术有限公司

地址 百慕大哈米尔顿

(72) 发明人 Z·凯马克卡兰 L·熊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 黄可峻

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006. 01)

C12P 21/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书19页

(54) 发明名称

包括关于阿达木单抗的结合蛋白质的组合物
和方法

(57) 摘要

本文公开了包括与阿达木单抗特异性结合的蛋白质的组合物和方法。阿达木单抗是对于细胞因子 TNF- α 特异的单克隆抗体,并且开发用于治疗 TNF- α 介导的炎性疾病。在本发明的一个方面,结合蛋白质是针对阿达木单抗的抗体。这些抗体包括其抗原结合片段,可以在临床背景中使用以及用于研究和开发。例如,这些抗阿达木单抗抗体可以用于中和阿达木单抗。

1. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合阿达木单抗,其中所述抗体或其抗原结合部分为由具有 ATCC 登记号 PTA-8512 的杂交瘤细胞系产生的抗体或其抗原结合部分,或由具有 ATCC 登记号 PTA-8513 的杂交瘤细胞系产生的抗体或其抗原结合部分。

2. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其通过具有 ATCC 登记号 PTA-8512 的杂交瘤产生。

3. 权利要求 1 的抗体或其抗原结合部分,其通过具有 ATCC 登记号 PTA-8513 的杂交瘤产生。

包括关于阿达木单抗的结合蛋白质的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于 2007 年 8 月 28 日提交的美国临时申请号 60/966,410 的优先权和利益。

发明领域

[0003] 本发明涉及对于阿达木单抗 (adalimumab) 特异的结合蛋白质。在一个方面,结合蛋白质是抗体。这些结合蛋白质在临床环境以及研究和开发中具有功用。

[0004] 发明背景

[0005] 肿瘤坏死因子- α (下文, TNF) 是主要由单核细胞 / 巨噬细胞分泌的多功能促炎细胞因子,其对脂质代谢、凝固、胰岛素抵抗和内皮功能有作用。TNF 是 17kD 蛋白质亚基的可溶性同三聚体。也存在膜结合的 26kD 前体形式的 TNF。它在组织中的滑膜细胞和巨噬细胞中发现。除单核细胞或巨噬细胞外的细胞也产生 TNF。例如,人非单核细胞肿瘤细胞系产生 TNF,以及 CD4⁺和 CD8⁺外周血 T 淋巴细胞和一些培养的 T 和 B 细胞系产生 TNF。它与类风湿性关节炎有关但不对类风湿性关节炎独特,并且在许多炎症性疾病中发生。关于 TNF 的受体在几种单核的细胞上,在滑膜以及外周血和滑液中。TNF 是在类风湿性关节炎中的关键炎症介质,并且因此可能是关于特异免疫治疗的有用靶。

[0006] TNF 引起促炎作用,这导致组织损害,例如软骨和骨降解,粘附分子诱导,对血管内皮细胞诱导促凝血活性,增加嗜中性粒细胞和淋巴细胞的粘附,并且刺激来自巨噬细胞、嗜中性粒细胞和血管内皮细胞的血小板活化因子释放。近期证据使 TNF 与感染、免疫病症、瘤形成病理状态、自身免疫病理状态和移植物抗宿主病理状态发生联系。

[0007] TNF 被认为在革兰氏阴性脓毒症和内毒素休克中起中心作用,包括发热、不适、食欲缺乏和恶病质。内毒素强烈激活单核细胞 / 巨噬细胞产生以及 TNF 和其他细胞因子的分泌。TNF 和其他单核细胞衍生的细胞因子介导对内毒素的代谢和神经激素应答。对人志愿者施用内毒素产生 具有流感样症状的急性疾病,包括发热、心动过速、代谢率增加和应激激素释放。循环 TNF 在患有革兰氏阴性脓毒症的患者中增加。针对 TNF 的中和抗血清或单克隆抗体已显示在哺乳动物中取消不利生理变化,并且在实验内毒素血症和菌血症中的致死攻击后阻止死亡。

[0008] 因此, TNF 已牵涉于炎症性疾病,自身免疫疾病,病毒、细菌和寄生物感染,恶性肿瘤和 / 或神经变性疾病,并且是对于疾病中的特定生物治疗的有用靶,所述疾病例如类风湿性关节炎和 Crohn 氏病。已报告了在用针对 TNF 的嵌合单克隆抗体的开放性试验 (open-label trial) 中的有益效果,包括抑制炎症以及在类风湿性关节炎和 Crohn 氏病中复发后成功的再治疗。

[0009] 阿达木单抗 (也由从 Abbott Laboratories 可获得的其商标 **HUMIRA®**已知) 是对于 TNF- α 特异的重组人单克隆抗体。这种单克隆抗体与 TNF 结合,并且阻断其与 p55 和 p75 细胞表面 TNF 受体的相互作用。参见其完整教导引入本文作为参考的美国专利号 6,090,382。

[0010] 如先前所述, TNF 在病理性炎症过程中起重要作用。阿达木单抗在临床上用于治疗病理性炎症过程例如类风湿性关节炎。对于临床应用和科学研究, 存在具有能够与阿达木单抗特异性结合的结合蛋白质例如抗体的需要。在临床背景中, 由于例如过量的阿达木单抗或针对抗体的罕见敏感性, 接受阿达木单抗的受试者可能经历不利应答。在一些情况下, 处于阿达木单抗治疗下的患者可能染上严重感染, 其中生物活性的 TNF 是控制感染所必需的。此外, 为了研究阿达木单抗及其在治疗特定病理状态中的作用, 必须定性且定量检查在样品基质中的阿达木单抗。本文提供了可以用于评估这些目标的对于阿达木单抗特异的结合蛋白质。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及与阿达木单抗特异性结合的蛋白质。阿达木单抗是对于细胞因子 TNF- α 特异的单克隆抗体, 并且开发用于治疗 TNF- α 介导的炎性疾病。在本发明的一个方面, 结合蛋白质是针对阿达木单抗的抗体。这些抗体包括其抗原结合片段, 可以在临床背景中使用以及用于研究和开发。

[0013] 在一个实施方案中, 本发明的结合蛋白质是抗阿达木单抗抗体, 或其抗原结合部分。通过阻止阿达木单抗与其靶 TNF 的结合, 这些抗阿达木单抗抗体可以用于例如中和阿达木单抗。这个实施方案的一个方面涉及包括抗阿达木单抗抗体或其抗原结合片段的药物组合物。这些药物组合物可以用于治疗有此需要的受试者, 其中受试者例如经历针对阿达木单抗的敏感性。

[0014] 本发明进一步涉及一种或多种抗体, 其与阿达木单抗包括其片段、修饰和衍生物特异性结合, 并且可以在临床和研究背景中使用。在一个具体方面, 这些抗体是各自具有不同特异性结合特征的一种或多种单克隆抗体。本文提供的单克隆抗体具有足以检测样品基质中的阿达木单抗包括其片段、修饰和衍生物的结合亲和力。这些抗体还可以用于测定中以检测阿达木单抗结合的 TNF 复合物。

[0015] 本发明进一步提供了包括抗阿达木单抗抗体包括其抗原结合部分的一种或多种试剂盒, 所述抗阿达木单抗抗体包括其抗原结合部分可以用于药物组合物中以例如中和阿达木单抗。此外, 这些试剂盒包括用于检测且定量样品中的阿达木单抗的试剂。

[0016] 发明详述

[0017] 本发明涉及与阿达木单抗特异性结合的蛋白质。阿达木单抗是对于细胞因子 TNF- α 特异的单克隆抗体, 并且开发用于治疗 TNF- α 介导的炎性疾病。在本发明的一个方面, 结合蛋白质是针对阿达木单抗的抗体。这些抗体包括其抗原结合片段可以在临床背景中使用以及用于研究和开发。

[0018] 本发明涉及阿达木单抗结合蛋白质。在一个方面, 结合蛋白质是抗阿达木单抗抗体、或其抗原结合部分。在一个具体方面, 这些抗体包括 CDR 嫁接抗体、人源化抗体及其片段, 所有都能够与阿达木单抗结合。本发明还涉及包括抗阿达木单抗抗体包括其抗原结合片段的药物组合物。

[0019] 通过阻止阿达木单抗与其靶 TNF 结合, 这些抗阿达木单抗抗体及其片段可以用于例如中和阿达木单抗。这种抑制可以在体内或体外环境中完成。本发明的抗体还可以用于检测样品例如生物样品中的阿达木单抗。这些抗体还可以用于测定中以检测阿达木单抗结合的 TNF 复合物。

[0020] 为了本发明可以更容易理解,首先定义本文使用的特定术语。另外的定义在详述中自始至终阐述。

[0021] 除非上下文另有说明,术语“肿瘤坏死因子”、“肿瘤坏死因子- α ”、“TNF- α ”和“TNF”在本文中可互换使用,并且包括在自然界中存在或合成制造的任何变体。这个相同概念适用于术语“阿达木单抗”和“HUMIRA”。

[0022] 如本文提及的,术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。“抗体”指包括通过二硫键互连的至少2条重(H)链和2条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链包括重链可变区(本文缩写为 V_H)和重链恒定区。重链恒定区包括3个结构域—— C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链包括轻链可变区(本文缩写为 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包括一个结构域—— C_L 。 V_H 和 V_L 区可以进一步再分成称为互补性决定区(CDR)的高变区域,散布于称为构架区(FR)的更保守区域之中。每个 V_H 和 V_L 由3个CDRs和4个FRs组成,从氨基末端到羧基末端以下述顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重和轻链的可变区包括与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以通过Fc受体(例如,效应细胞)和经典补系统的第一种组分(C1q)介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞。

[0023] 重要的是指出当提及抗阿达木单抗抗体时,除非上下文另有说明,应当理解这包含其抗原结合部分/片段的概念。同样,当提及阿达木单抗时,除非上下文另有说明,应当理解还包括其片段、衍生物和修饰。

[0024] 如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗体部分”)指抗体的一种或多种片段,其保留与抗原(例如,阿达木单抗)特异性结合的能力。已显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”内包含的结合片段例子包括(i)Fab片段,包括 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,包括在较链区通过二硫键连接的2个Fab片段的二价片段;(iii)包括 V_H 和 C_{H1} 结构域的Fd片段;(iv)包括抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域的Fv片段,(v)包括 V_H 结构域的dAb片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546,其完整教导引入本文作为参考);和(vi)分离的互补性决定区(CDR)或(vii)可以任选通过合成接头连接的2个或更多分离的CDRs的组合。此外,尽管Fv片段的2个结构域 V_L 和 V_H 由分开的基因编码,但它们可以使用重组法通过合成接头进行连接,所述合成接头使得它们能够制备为单条蛋白质链,其中 V_L 和 V_H 区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird等人(1988)Science242:423-426;和Huston等人(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883,其完整教导引入本文作为参考)。此种单链抗体也意欲包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式就效用筛选片段。

[0025] 如本文所使用的,术语“单克隆抗体”指显示对于特定表位的单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”指显示单一结合特异性且具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体通过杂交瘤产生,所述杂交瘤包括与无限增殖化细胞融合的得自转基因非人动物例如转基因小鼠的B细胞,所述B细胞具有包括人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0026] 如本文所使用的,“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与阿达木单抗特异性结合的分离的抗体基本上不含特异性结合除阿达木单

抗外的抗原的抗体)。然而,与阿达木单抗的表位特异性结合的分离的抗体可以具有与其他人抗体的交叉反应性。然而,抗体理想地与阿达木单抗结合。此外,分离的抗体一般基本上不含其他细胞材料和/或化学制品。在本发明的一个实施方案中,具有不同阿达木单抗特异性的“分离的”单克隆抗体的组合在定义明确的组合物组合。

[0027] 如本文所使用的,“特异性结合”指与抗原上存在的表位但不与其他表位或抗原的抗体结合。一般地,本发明的抗体以约 10^{-6}M 至 10^{-12}M 或甚至更低的亲和力 (K_D) 结合。在一个方面, K_D 范围为约 10^{-8}M 至约 10^{-9}M 。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中可与术语“和抗原特异性结合的抗体”互换使用。

[0028] 如本文所使用的,术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0029] 如本文所使用的,“同种型”指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如, IgM 或 IgG1)。

[0030] 如本文所使用的,术语“受试者”包括任何人或非人动物。例如,本发明的方法和组合物可以用于治疗具有炎症疾病的受试者,所述炎症疾病例如关节炎,例如类风湿性关节炎。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类动物、羊、犬、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0031] 本发明的抗阿达木单抗抗体可以通过杂交瘤技术产生,并且随后通过本领域众所周知的细胞系、混合细胞系、无限增殖化细胞或无限增殖化细胞的克隆群体产生。参见例如, Kohler 和 Milstein, *Nature*, 256 :49597(1975); De St. Groth 和 Scheidegger, *J. Immunol. Meth.*, 35 :121(1980); E. Harlow 和 D. Lane, 编辑, “Antibodies :A Laboratory Manual ”, (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.; Hammerback 和 Vallee, *J. Biol. Chem.*, 265 :12763(1990), Ausubel, 等人, 编辑, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, N. Y. (1987-2001); Sambrook, 等人, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Harlow 和 Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Colligan, 等人, 编辑, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY(1994-2001); Colligan 等人, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N. Y., (1997-2001), 各自整体引入本文作为参考。

[0032] 对于阿达木单抗或其片段特异的抗体可以针对合适的免疫原性抗原产生,例如分离的和/或阿达木单抗或其部分(包括合成分子,例如合成肽)。其他特异或一般抗体可以相似地产生。免疫原性抗原的制备和单克隆抗体产生可以使用本领域中已知的任何合适技术执行。

[0033] 在一种方法中,杂交瘤可以通过融合合适的无限增殖细胞系、或异骨髓瘤(heteromyelomas)、其融合产物、或由其衍生的任何细胞或融合细胞、或如本领域已知的任何其他合适细胞系产生,所述无限增殖细胞系例如骨髓瘤细胞系,例如但不限于 Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L. 5、> 243、P3X63Ag8. 653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2S S1、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJ1、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO2A 等。参见例如, www.atcc.org, www.lifetech.com. 等, 关于抗体生成细胞,例如但不限于分离或克隆的脾、外周血、淋巴、扁桃体或其他免疫或B细胞包含性细胞、或表达重或轻链恒定或可变或构架或 CDR 序列的任何其他细胞,作为内

源或异源核酸,作为重组或内源、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿类动物、马、绵羊、山羊、绵羊、灵长类动物、真核生物、基因组 DNA、cDNA、rDNA、线粒体 DNA 或 RNA、叶绿体 DNA 或 RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链、杂交的等或其任何组合。参见例如,完整引入本文作为参考的 Ausubel and Colligan, Immunology, 第 2 章。

[0034] 抗体生成细胞也可以得自己用目的抗原免疫接种的人或其他合适动物的外周血或脾或淋巴结。任何其他合适的宿主细胞也可以用于表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其他合适的已知方法进行分离,并且通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可以通过合适测定(例如,ELISA)进行选择。

[0035] 可以使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于,选择来自肽或蛋白质文库的重组抗体的方法,例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA 等、展示文库;例如,如可从 Cambridge Antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, Del.; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, 瑞典; Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, Calif.; Ixsys 获得的。参见例如, EP 368,684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; 美国系列号 08/350,260(1994 年 5 月 12 日); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); W095/16027 (BioInvent); W088/06630; W090/3809 (Dyax); U. S. Pat. No. 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); W089/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma); EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); 或随机产生的肽或蛋白质——美国专利号 5,723,323、5,763,192、5,814,476、5,817,483、5,824,514、5,976,862、WO 86/05803、EP 590 689 (Ixsys, 现在的 Applied Molecular Evolution (AME), 各自整体引入本文作为参考)或依赖于能够产生人抗体谱的转基因动物的免疫接种的(例如, SCID 小鼠, Nguyen 等人, Microbiol. Immunol. 41:901-907(1997); Sandhu 等人, Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118(1996); Eren 等人, Immunol. 93:154-161(1998), 各自以及相关专利和申请整体引入本文作为参考), 如本领域已知和/或如本文描述的。此种技术包括但不限于核糖体展示 (Hanes 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (May 1997); Hanes 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (November 1998)); 单细胞抗体产生技术(例如, 选择淋巴细胞抗体法 (“SLAM”)(美国专利号 5,627,052, Wen 等人, J. Immunol. 17:887-892(1987); Babcook 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848(1996)); 凝胶微滴 (microdroplet) 和流式细胞术 (Powell 等人, Biotechnol. 8:333-337(1990); One Cell Systems, Cambridge, Mass.; Gray 等人, J. Imm. Meth. 182:155-163(1995); Kenny 等人, Bio/Technol. 13:787-790(1995)); B 细胞选择 (Steenbakkers 等人, Molec. Biol. Reports 19:125-134(1994); Jonak 等人, Progress Biotech, 第 5 卷, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, 编辑, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 荷兰 (1988), 其完整教导引入本文作为参考)。

[0036] 用于工程改造或人源化非人或人抗体的方法也可以使用且是本领域众所周知的。

一般地,人源化或工程改造抗体具有来自非人来源的一个或多个氨基酸残基,所述非人来源例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些人氨基酸残基通常称为“输入”残基,这一般得自己知人序列的“输入”可变、恒定或其他结构域。已知人 Ig 序列公开于例如 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi ;

[0037] www.atcc.org/phage/hdb.html ;www.sciquest.com/ ;www.abcam.com/ ;

[0038] www.antibodyresource.com/onlinecomp.html ;

[0039] www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html ;[www.mgen.uni-](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html)

[0040] [heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm) ;www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm ;

[0041] www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html ;

[0042] www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/ ;

[0043] www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html ;www.antibodyresource.com/ ;

[0044] mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/ ;

[0045] pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html ;www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/ ;

[0046] www.pebio.com/pa/340913/340913.html ;www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/ ;

[0047] www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html ;www.biodesign.com/table.asp ;

[0048] www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html ;www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html ;

[0049] www.isac-net.org/sites_geo.html ;aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html ;

[0050] baserv.uci.kun.nl/.about/jraats/links1.html ;www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/ ;

[0051] www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html ;

[0052] www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html ;imgt.cnusc.fr:8104/ ;

[0053] www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html ;antibody.bath.ac.uk/ ;

[0054] abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html ;

[0055] www.unizh.ch/.about.honegger/AH0seminar/Slide01.html ;

[0056] www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/ ;www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm ;

[0057] www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html ;

[0058] www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html ;

[0059] www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html ;

[0060] www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html ;

[0061] www.jerini.de/fr_products.htm ; www.patents.ibm.com/ibm.html。Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. Health (1983),

[0062] 各自整体引入本文作为参考。

[0063] 此种输入的序列可以用于减少免疫原性或减少、增强或修饰结合、亲和力、结合速率 (on-rate)、解离速率 (off-rate)、抗体亲抗原性、特异性、半衰期或任何其他合适特征, 如本领域已知的。一般地, 维持部分或全部非人或人 CDR 序列, 同时可变和恒定区的非人序列由人或其他氨基酸替换。抗体还可以任选通过保留对于抗原的高亲和力和其他有利的生物性质进行人源化。为了实现这个目标, 人源化抗体可以任选通过分析亲本序列和各种概念上的人源化产物的方法进行制备, 其中使用亲本和人源化序列的三维模型。三维免疫球蛋白模型是商购可得的, 并且是本领域技术人员熟悉的。举例说明且展示选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可用的。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中的可能作用, 即影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基分析。这样, 可以选择残基且与共有和输入序列组合, 从而使得达到所需抗体特征, 例如对于一种或多种靶抗原增加的亲和力。一般地, CDR 残基直接且大多数基本上涉及影响抗原结合。本发明的抗体的人源化或工程改造可以使用任何已知方法执行, 例如但不限于下述中描述的那些: Winter (Jones 等人, Nature 321:522 (1986); Riechmann 等人, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen 等人, Science 239:1534 (1988)), Sims 等人, J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:4285 (1992); Presta 等人, J. Immunol. 151:2623 (1993), 美国专利号 5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539; 4,816,567、PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630; US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755; W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246, 各自包括其中引用的参考文献整体引入本文作为参考。

[0064] 本发明的抗阿达木单抗抗体还可以任选通过能够产生人抗体谱的转基因动物 (例如, 小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类动物等) 的免疫接种来产生, 如本文描述和/或如本领域已知的。产生人抗阿达木单抗抗体的细胞可以从此种动物中分离, 并且使用合适方法例如本文描述的方法进行无限增殖化。

[0065] 产生可以与人抗原结合的人抗体谱的转基因小鼠可以通过已知方法来产生, 包括但不限于, 授予 Lonberg 等人的美国专利号 5,770,428、5,569,825、5,545,806、5,625,126、5,625,825、5,633,425、5,661,016 和 5,789,650; Jakobovits 等人 W0 98/50433, Jakobovits 等人 W098/24893, Lonberg 等人 W0 98/24884, Lonberg 等人 W0 97/13852, Lonberg 等人 W0 94/25585, Kucherlapate 等人 W0 96/34096, Kucherlapate 等人 EP 0463 151 B1, Kucherlapati 等人 EP 0 710 719 A1, Kucherlapati 等人美国专利号 6,075,181, Surani 等人美国专利号 5,545,807, Bruggemann 等人 W0 90/04036, Bruggemann 等人 EP 0438474 B1, Lonberg 等人 EP 0814 259 A2, Lonberg 等人 GB 2 272 440 A, Lonberg 等人 Nature 368:856-859 (1994), Taylor 等人, Int. Immunol. 6(4)579-591 (1994), Green 等人, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez 等人, Nature Genetics 15:146-156 (1997), Taylor 等人, Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992), Tuailon 等人, Proc

Natl Acad Sci USA 90(8)3720-3724(1993), Lonberg 等人, Int Rev Immunol 13(1): 65-93(1995) 和 Fishwald 等人, Nat Biotechnol 14(7):845-851(1996), 其各自整体引入本文作为参考。一般地, 这些小鼠包括包含来自至少一个人免疫球蛋白基因座的 DNA 的至少一种转基因, 所述转基因在功能上重排或可以经历功能重排。可以破坏或缺失此种小鼠中的内源免疫球蛋白基因座, 以消除动物产生由内源基因编码的抗体的能力。

[0066] 本发明的抗阿达木单抗抗体以及靶(即, 阿达木单抗)可以通过本领域已知的任何方法就免疫专一性结合进行测定。可以使用的免疫测定包括但不限于竞争性和非竞争性测定系统, 其中使用技术例如蛋白质印迹、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射分析、荧光免疫测定、A 蛋白免疫测定, 仅举几例。此种测定是常规且本领域众所周知的(参见例如, Ausubel 等人, 编辑, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York, 这整体引入本文作为参考)。

[0067] 免疫沉淀规程一般包括在补加有蛋白磷酸酶和/或蛋白酶抑制剂(例如, EDTA、PMSF、抑酶肽、钒酸钠)的裂解缓冲液例如 RIPA 缓冲液(1% NP-40 或 Triton X-100、1% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS、0.15M NaCl、在 pH 7.2 的 0.01M 磷酸钠、1% Trasyolol) 中裂解细胞群体, 将目的抗体加入细胞裂解物, 于 4℃ 温育一段时间(例如, 1-4 小时), 将 A 蛋白和/或 G 蛋白琼脂糖珠加入细胞裂解物, 于 4℃ 温育约 1 小时或更多时间, 在裂解缓冲液中洗涤珠且使珠重悬浮于 SDS/ 样品缓冲液中。目的抗体免疫沉淀特定抗原的能力可以通过例如蛋白质印迹分析进行评估。本领域技术人员将知道可以修饰以增加抗体与抗原的结合且减少本底(例如, 用琼脂糖珠预清除细胞裂解物)的参数。关于免疫沉淀规程的进一步讨论, 参见例如, Ausubel 等人, 编辑, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York 在 10.16.1 处。

[0068] 蛋白质印迹分析一般包括制备蛋白质样品, 蛋白质样品在聚丙烯酰胺凝胶(例如, 依赖于抗原的分子量, 8%-20% SDS-PAGE) 中的电泳, 将蛋白质样品从聚丙烯酰胺凝胶转移至膜例如硝酸纤维素、PVDF 或尼龙, 在封闭溶液(例如, 具有 3% BSA 或脱脂乳的 PBS) 中封闭膜, 在洗涤缓冲液(例如, PBS-Tween 20) 中洗涤膜, 用在封闭缓冲液中稀释的第一抗体(目的抗体)封闭膜, 在洗涤缓冲液中洗涤膜, 用与酶促底物(例如, 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)或放射性分子(例如, ^{32}P 或 ^{125}I) 缀合的第二抗体(其识别第一抗体, 例如抗阿达木单抗抗体)封闭膜, 所述第二抗体在封闭缓冲液中稀释, 在洗涤缓冲液中洗涤膜, 并且检测抗原的存在。本领域技术人员将知道可以修饰以增加检测的信号且减少本底噪声的参数。关于蛋白质印迹规程的进一步讨论, 参见例如, Ausubel 等人, 编辑, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, 第 1 卷, John Wiley & Sons, Inc., New York 在 10.8.1 处。

[0069] ELISAs 包括制备抗原, 用抗原包被 96 孔微量滴定板的孔, 向孔中加入与可检测化合物例如酶促底物(例如, 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)缀合的目的抗体, 并且温育一段时间, 并且检测抗原的存在。在 ELISAs 中, 目的抗体不必与可检测化合物缀合; 相反, 与可检测化合物缀合的第二抗体(其识别目的抗体)可以加入孔中。此外, 代替用抗原包被孔, 抗体可以包被至孔。在这种情况下, 可以在向包被的孔中加入目的抗原后加入与可检测化

合物缀合的第二抗体。本领域技术人员将知道可以修饰以增加检测的信号参数以及本领域已知的 ELISAs 的其他变化。关于 ELISAs 的进一步讨论,参见例如,Ausubel 等人,编辑,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第 1 卷,John Wiley & Sons,Inc.,New York 在 11.2.1 处。

[0070] 抗体与抗原的结合亲和力和抗体-抗原相互作用的解离速率可以通过竞争结合测定进行测定。竞争结合测定的一个例子是放射免疫测定,其包括在增加量的未标记抗原的存在下,使标记的抗原(例如, ^3H 或 ^{125}I)与目的抗体温育,并且检测与标记的抗原结合的抗体。目的抗体对于特定抗原的亲和力和结合解离速率可以通过斯卡查德图分析(Scatchard Plot Analysis)由数据进行测定。与第二抗体的竞争还可以使用放射免疫测定(RIA)进行测定。在这种情况下,在增加量的未标记的第二抗体的存在下,使抗原与和标记的化合物(例如, ^3H 或 ^{125}I)缀合的目的抗体温育。然而,测定抗体对于抗原的亲和力的另一种方法使用表面等离子共振技术,即 BIA core 仪器。在这种方法中,抗体在生物传感器芯片上用共价偶联的第二抗体捕获,所述第二抗体例如山羊抗小鼠免疫球蛋白抗体。各种浓度的抗原随后流过生物传感器芯片,并且结合的材料量作为时间的函数进行记录,产生所谓的传感图(sensorgram)。类似地,可以完成通过仅使缓冲液流动记录的抗原解离。通过用于计算反应的结合和解离速率以及 K_d 的特定软件程序分析传感图。

[0071] 抗阿达木单抗抗体可以通过众所周知的方法从重组细胞培养物中回收且纯化,所述方法包括但不限于 A 蛋白纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相层析(“HPLC”)也可以用于纯化。参见例如,Colligan,Current Protocols in Immunology,或 Current Protocols in Protein Science,John Wiley & Sons,NY,N.Y.,(1997-2001),例如第 1、4、6、8、9、10 章,各自整体引入本文作为参考。

[0072] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物、和通过重组技术从真核生物宿主产生的产物,所述真核生物宿主包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。依赖于在重组产生程序中采用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的。此种方法在许多标准实验室手册中描述,例如 Sambrook,部分 17.37-17.42; Ausubel,第 10、12、13、16、18 和 20 章,Colligan,Protein Science,第 12-14 章,全部整体引入本文作为参考。

[0073] 在另一个方面,本发明提供了组合物,例如药物组合物,包括本发明的抗阿达木单抗抗体或其一种或多种抗原结合部分之一或组合,连同药学上可接受的载体一起配制。在一个方面,组合物包括多重(例如,2 种或更多)分离的抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分的组合。在一个具体方面,组合物的每种抗体都与阿达木单抗的不同表位结合。

[0074] 本发明进一步涉及基于抗体的疗法,所述疗法涉及给受试者包括但不限于人施用本发明的抗阿达木单抗抗体,用于治疗一种或多种状况。一种状况可以与阿达木单抗相关敏感性、毒性或病理状态相关。本发明的治疗化合物包括但不限于,本发明的抗阿达木单抗抗体(包括其抗原结合片段)和编码本发明抗体(包括其抗原结合片段)的核酸。本发明的抗体可以用于治疗、抑制或预防与阿达木单抗相关的疾病、病症或状况。本发明的抗阿达木单抗抗体可以在药学上可接受的组合物中提供,如本领域已知或如本文描述的。

[0075] 本发明的抗阿达木单抗抗体可以单独或与本领域技术人员众所周知的其他类型

的治疗组合施用。

[0076] 希望使用针对阿达木单抗或其片段的本发明的具有高亲和力和 / 或效力体内抑制和 / 或中和抗体,用于针对阿达木单抗的免疫测定和与阿达木单抗相关的病症治疗。此种抗阿达木单抗抗体或其抗原结合片段将对于阿达木单抗包括其任何片段具有中等至高亲和力。合适的结合亲和力包括具有约 10^{-6} 至约 10^{-12} M 或甚至更低浓度的解离常数或 K_D 的那些。在一个方面, K_D 范围为约 10^{-8} 至约 10^{-9} M。

[0077] 本发明的药物组合物还可以在组合治疗中施用,即与其他试剂组合。例如,组合疗法可以包括本发明的组合物与至少一种或多种另外治疗剂,所述另外治疗剂例如抗炎剂、DMARDs (缓解疾病的抗风湿性药物)、免疫抑制剂、以及其他药物试剂。本发明的药物组合物还可以与其他治疗方式结合施用,所述其他治疗方式包括但不限于外科手术、化学疗法、放射疗法等。本发明的药物组合物与其他抗体的共施用也由本发明包含。

[0078] 如本文所使用的,“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。在一个方面,载体适合于静脉内、肌肉、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用 (例如,通过注射或输注)。依赖于施用途径,活性化合物即抗体或其抗原结合部分可以包被在材料中,以保护化合物不受酸和可能灭活化合物的其他天然条件的作用。

[0079] “药学上可接受的盐”指保留亲本化合物的所需生物活性且不给予任何不希望有的毒理学作用的盐 (参见例如, Berge, S. M., 等人 (1977) J. Pharm. Sci. 66 :1 19, 其完整教导引入本文作为参考)。此种盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自无毒无机酸以及无毒有机酸的那些,所述无毒无机酸例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等,所述无毒有机酸例如脂族单和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香酸、脂族和芳族磺酸等。碱加成盐包括衍生自碱土金属以及无毒有机胺的那些,所述碱土金属例如钠、钾、镁、钙等,所述无毒有机胺例如 N,N' - 二苄乙二胺、N- 甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等。

[0080] 本发明的组合物可以通过本领域已知的多种方法进行施用。如本领域技术人员将理解的,施用途径和 / 或方式将依赖于所需结果而改变。活性化合物可以用将使化合物免于快速释放的载体进行制备,例如控释制剂,包括种植体、经皮贴剂和微胶囊化递送系统。可以使用生物可降解、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备此种制剂的许多方法是取得专利权的或本领域技术人员一般已知的。参见例如, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, 其完整教导引入本文作为参考。

[0081] 为了通过特定施用途径施用本发明的化合物,可能必须用防止其失活的材料包被化合物,或使化合物与防止其失活的材料共施用。例如,化合物可以在合适的载体例如脂质体或稀释剂中施用于受试者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和含水缓冲液。脂质体包括水包油包水 CGF 乳状液以及常规脂质体 (Strejan 等人 (1984) J. Neuroimmunol. 7 :27, 其完整教导引入本文作为参考)。

[0082] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和无菌粉末用于临时制备无菌可注射溶液或分散体。此种介质和试剂用于药学活性物质的用途是本领域已知的。除任何常规介质或试剂与活性化合物不相容的情况外,考虑其在本发明的药物组合物中的使用。补

充活性化合物也可以掺入组合物内。

[0083] 治疗组合物一般在制造和贮存条件下必须是无菌和稳定的。组合物可以配制为溶液、微乳状液、脂质体或适合于高药浓度的其他有序结构。载体可以是溶剂或分散介质, 包含例如水、乙醇、多元醇(例如, 甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物。正确的流动性可以通过下述得到维持: 例如通过使用包衣例如卵磷脂, 在分散体的情况下通过维持所需粒子大小, 以及通过使用表面活性剂。在许多情况下, 将希望在组合物中包括等渗剂例如糖, 多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇, 或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来达到, 所述试剂例如单硬脂酸盐和明胶。

[0084] 无菌可注射溶液可以通过将所需量的活性化合物与上文列举的成分之一或组合掺入合适溶剂中进行制备, 需要时, 随后为除菌微量过滤。一般地, 分散体通过将活性化合物掺入无菌载体内进行制备, 所述无菌载体包含基本分散介质和来自上文列举那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下, 合适的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干), 这由其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何另外所需成分的粉末。

[0085] 调整剂量方案以提供最佳所需应答(例如, 治疗应答), 并且其可以由本领域从业者确定。例如, 可以施用快速灌注剂, 可以随着时间过去施用几次分份剂量或可以按比例减少或增加剂量, 如由治疗情况的紧急状态指示的。例如, 本发明的抗阿达木单抗抗体包括但不限于其抗原结合部分可以经由皮下注射在给定时间范围中施用一次或多次。以剂量单位形式配制肠胃外组合物用于易于施用和剂量一致是特别有利的。如本文所使用的, 剂量单位形式指作为用于待治疗受试者的单一剂量合适的物理不连续单位; 每个单位包含计算为与所需药物载体结合产生所需疗效的预定量的活性化合物。关于本发明的剂量单位形式的规格由下述指示且直接依赖于下述: (a) 活性化合物的独特特征和待达到的具体疗效, 和 (b) 配药领域中固有的局限性, 例如用于治疗个体中的敏感性的活性化合物。

[0086] 药学上可接受的抗氧化剂例子包括: (1) 水溶性抗氧化剂, 例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等; (2) 油溶性抗氧化剂, 例如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、棕榈酸丙酯、 α -生育酚等; 和 (3) 金属螯合剂, 例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0087] 对于治疗组合物, 本发明的制剂包括适合于口、鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外施用的那些。制剂可以方便地以单位剂量形式呈现, 并且可以通过药剂学领域中已知的任何方法进行制备。可以与载体材料组合以产生单个剂量形式的活性成分量将依赖于待治疗的受试者和具体施用方式而改变。可以与载体材料组合以产生单个剂量形式的活性成分量一般将是产生疗效的组合物量。一般地, 在 100% 中, 这个量将是约 0.001% 至约 90% 的活性成分, 在一个方面, 约 0.005% 至约 70%, 在另外一个方面, 约 0.01% 至约 30%。

[0088] 适合于阴道施用的本发明的制剂还包括包含如本领域已知合适的此种载体的阴道栓、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。用于局部或经皮施用本发明组合物的剂量形式包括粉末、喷雾、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴片(patch) 和吸入剂、活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载体和可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0089] 如本文所使用的,术语“肠胃外施用”和“肠胃外施用的”指除肠和局部施用外的施用方式,通常通过注射,并且包括但不限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内 (intrasternal) 注射和输注。

[0090] 可以在本发明的药物组合物中采用的合适水和非水载体例子包括水、乙醇、多元醇 (例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等) 及其合适混合物,植物油例如橄榄油,和可注射有机酯,例如油酸乙酯。正确的流动性可以通过下述得到维持:例如通过使用包衣材料例如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需粒子大小,以及通过使用表面活性剂。

[0091] 这些组合物还可以包括佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。微生物存在的预防可以通过本领域众所周知的灭菌程序并且通过包括各种抗菌剂和抗真菌剂得到确保,所述抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、酚山梨酸等。还可能希望在组合物内包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。此外,可注射药物形式的延长吸收可以通过包括延迟吸收的试剂来达到,所述试剂例如单硬脂酸铝和明胶。

[0092] 当本发明的化合物作为药物施用于人和动物时,它们可以单独或作为药物组合物给予,所述药物组合物包含与药学上可接受的载体组合的例如 0.001 至 90% (在一个具体方面,0.005 至 70%,例如 0.01 至 30%) 活性成分。

[0093] 与选择的施用途径无关,可以以合适的水合形式使用的本发明的化合物、和 / 或本发明的药物组合物,通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂量形式。

[0094] 本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变,以便获得这样的活性分量,其对于具体患者、组合物和施用方式达到所需治疗应答有效,而对患者无毒。技术人员将具有评价且确定本发明药物组合物的正确剂量和施用方式所必需的知识。所选择的剂量水平将依赖于多种药物代谢动力学因素,包括采用的本发明的具体组合物、或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,采用的具体化合物的排泄率,治疗持续时间,与采用的具体组合物组合使用的其他药物、化合物和 / 或材料,治疗的患者的年龄、性别、重量、状况、一般健康和先前医疗史,以及医学领域中众所周知的类似因素。具有本领域普通技术的医生或兽医可以容易地确定且开出所需药物组合物的有效量。例如,医生或兽医可以在低于为了达到所需疗效所需的水平下开始在药物组合物中采用的本发明化合物的剂量,并且逐步增加剂量直至达到所需效果。一般而言,本发明组合物的合适日剂量将是作为有效产生疗效的最低剂量的化合物量。此种有效剂量一般将依赖于上文描述的因素。施用可以是静脉内、肌内、腹膜内或皮下的。若需要,则治疗组合物的有效日剂量可以作为以合适间隔分开施用的 2、3、4、5、6 次或更多次亚剂量全天施用,任选地以单位剂量形式。对于本发明的化合物单独施用是可能的,然而,化合物可能作为药物制剂 (组合物) 施用。

[0095] 在一个方面,确定与阿达木单抗相关的问题。可以采用阿达木单抗 PK 测定,以便确定多少阿达木单抗在循环中。用这个信息,本领域技术人员可以获得施用于受试者的抗阿达木单抗的有效量。

[0096] 在实验上这个概念可以就其功效进行检查。除人外的灵长类动物 (“测试受试者”) 可以施用以不同剂量的阿达木单抗。使用 PK 测定,可以确定阿达木单抗的实际水平,并且利用来自测试受试者的血清的 L929 测定可以确定活性抗体量。(L929 测定在美国专利号

6,090,382 中描述)。在不同测试受试者(其已使用阿达木单抗进行滴定)中,可以施用不同量的抗阿达木单抗抗体,以确定哪个量在中和阿达木单抗方面有效。

[0097] 治疗组合物可以用本领域已知的医学设备施用。例如,本发明的治疗组合物可以用无针皮下注射设备施用,例如美国专利号 5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824 或 4,596,556 中公开的设备,所述专利的完整教导引入本文作为参考。在本发明中有用的众所周知的种植体和模块例子包括:公开了用于以控制速率分配药物的可植入微量输注泵的美国专利号 4,487,603;公开了用于通过皮肤施用药物的治疗设备的美国专利号 4,486,194;公开了用于以精确输注率递送药物的药物输注泵的美国专利号 4,447,233;公开了用于连续药物递送的可变流量可植入输注装置的美国专利号 4,447,224;公开了具有多室区室的渗透药物递送系统的美国专利号 4,439,196;和公开了渗透药物递送系统的美国专利号 4,475,196,所述专利的完整教导引入本文作为参考。许多其他此种种植体、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0098] 在特定实施方案中,可以配制本发明的抗阿达木单抗抗体以确保在体内的正确分布。例如,血脑屏障(BBB)排除许多高亲水化合物。为了确保本发明的治疗化合物跨越 BBB(若需要),它们可以例如在脂质体中配制。关于制造脂质体的方法,参见例如,美国专利号 4,522,811;5,374,548;和 5,399,331,所述专利的完整教导引入本文作为参考。脂质体可以包括选择性转运到特定细胞或器官内的一个或多个部分,因此增强靶向的药物递送(参见例如 V. V. Ranade(1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685,其完整教导引入本文作为参考)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如,授予 Low 等人的美国专利号 5,416,016,所述专利的完整教导引入本文作为参考);甘露糖苷(Umezawa 等人,(1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038,其完整教导引入本文作为参考);抗体(P. G. Bloeman 等人(1995) *FEBS Lett.* 357:140;M. Owais 等人(1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180,其完整教导引入本文作为参考);表面活性剂 A 蛋白受体(Briscoe 等人(1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134,其完整教导引入本文作为参考),其不同种类可能包括本发明的制剂,以及本发明分子的组分;p120(Schreier 等人(1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090,其完整教导引入本文作为参考);还参见 K. Keinänen;M. L. Laukkanen(1994) *FEBS Lett.* 346:123;J. J. Killian;I. J. Fidler(1994) *Immunomethods* 4:273,其完整教导引入本文作为参考。在本发明的一个实施方案中,本发明的治疗化合物在脂质体中配制;在另一个实施方案中,脂质体包括靶向部分。在另外一个实施方案中,脂质体中的治疗化合物通过快速浓注递送至接近肿瘤或感染的部位。组合物必须流动至存在容易注射性的程度。它在制造和贮存条件下必须是稳定的,并且必须针对微生物例如细菌和真菌的污染作用进行防腐。

[0099] 组合物必须无菌和流动至组合物可通过注射器递送的程度。除水外,载体可以是等渗缓冲盐水溶液、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适混合物。正确的流动性可以通过下述得到维持:例如通过使用包衣例如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需粒子大小,以及通过使用表面活性剂。在许多情况下,希望在组合物中包括等渗剂例如糖,多元醇例如甘露糖醇、山梨糖醇,和氯化钠。可注射组合物的长期吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来达到,所述试剂例如单硬脂酸铝或明胶。

[0100] 如上所述,当活性化合物适当保护时,化合物可以口部施用,例如与惰性稀释剂或

可同化食用载体一起。

[0101] 本发明的一个实施方案涉及用于检测样品中的阿达木单抗（“靶”）的组合物和方法。本方法包括在适合于形成抗阿达木单抗抗体和阿达木单抗之间的复合物的条件下使样品与抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分接触。此种合适条件是本领域技术人员众所周知的。该方法进一步包括用于检测这种复合物形成的检测系统。

[0102] 在本实施方案的一个方面，抗阿达木单抗抗体（“检测抗体”）是由杂交瘤产生的单克隆抗体，所述单克隆抗体的合适例子是下文描述的 5A1-2A8 和 1H11-2E10 单克隆抗体。

[0103] 本实施方案的样品可以是任何细胞、组织或流体提取物，其可以通过本领域技术人员众所周知的任何方法进行制备。样品的来源可以是动物或植物。人和非人都可以充当样品的来源。可以提供合适样品的此种来源的举例说明性例子包括但不限于，血液、尿、滑液、器官组织、肿瘤组织团块等。

[0104] 在本实施方案的一个方面，使用本领域技术人员众所周知的方法，使检测抗体与不溶性基质结合，所述不溶性基质例如在亲和层析或在 RIA 或 ELISA 测定中使用的那种。其他固体支持体包括但不限于，玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0105] 在另一个方面，检测抗体可以是未结合的。一种或多种检测抗体及其来自样品的靶之间的复合物形成可以在分批分析型机制中完成。

[0106] 抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分可以使用本领域已知的方法与可检测标记附着。附着可以通过任何化学反应完成，所述化学反应将结合可检测标记和抗阿达木单抗抗体，只要抗体和标记保留其各自的活性。检测抗体可以使用放射性同位素进行标记，可替代地，这些抗体可以使用检测标记例如与抗体缀合的荧光部分进行标记，本领域技术人员众所周知的其他方法例如酶-接头等在本发明的范围内。

[0107] 合适酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；合适辅基复合物的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素；合适荧光材料的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白；发光材料的例子包括鲁米诺；生物发光材料的例子包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白；并且合适放射性材料的例子包括 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{111}In 或 ^{99}Tc 。标记抗体是本领域技术人员众所周知的。在一个方面，可以产生第二抗体，即针对检测抗体的抗体。可以存在多克隆第二抗体以及单克隆抗体，各自的形成是本领域技术人员众所周知的。这些第二抗体可以进行标记且用于检测检测抗体。

[0108] 本发明的抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分可以在用于检测受试者中的阿达木单抗及其片段和衍生物的方法中使用，这通过从测试受试者中获得例如体液或组织样品，并且在适合于抗体-抗原复合物形成的条件下，使样品与本发明的一种或多种抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分接触实现。此种复合物的存在或量随后可以通过本文描述和本领域另外已知的方法进行测定（例如，O' Connor 等人，(1988) Cancer Res 48:1361-66 和美国专利号 7,232,891 中描述的那些，其完整教导引入本文作为参考），其中使在测试样品中发现的复合物的存在或量与包含已知量抗原的一系列标准或对照样品中发现的复合物的存在或量相比较。因此，本发明涉及用于检测在生物样品、血液、血清、尿、脑脊液、粘液或唾液中的阿达木单抗（或其片段和/或衍生物）的方法。

[0109] 用于检测阿达木单抗及其片段的一种方法包括使样品与一种或多种抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分接触,所述抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分在适合于抗体与阿达木单抗结合的条件下与阿达木单抗(或其片段、修饰和衍生物)特异性结合,并且随后检测阿达木单抗-抗体复合物。在这个实施方案中,如果采用2种或更多种抗体,那么对于每种抗体可能识别阿达木单抗的不同表位。在一个方面,在抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分和除阿达木单抗外的分子之间存在小于10%交叉反应性。在另一个方面,存在小于20%交叉反应性。在另外一个方面,存在小于30%交叉反应性。在另外一个方面,存在小于40%交叉反应性。在另外一个方面,存在小于50%交叉反应性。

[0110] 在用于检测样品中的阿达木单抗的上述方面的任何一种中,该方法可以采用免疫测定,例如酶免疫测定(EIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、间接竞争免疫测定、直接竞争免疫测定、非竞争免疫测定、夹心免疫测定、凝集测定或本文描述和本领域已知的其他免疫测定。(参见 Zola, 1987, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 第 147-158 页, CRC Press, Inc., 其完整教导引入本文作为参考)。

[0111] 用于阿达木单抗及其片段/衍生物的免疫测定可以以异质或均质形式构建。异质免疫测定以掺入结合的分析物与游离分析物或结合的标记与游离标记的固相分离为特征。固相可以采取本领域众所周知的多种形式,包括但不限于管、板、珠和条。一种具体形式是微量滴定板。固相材料可以包括多种玻璃、聚合物、塑料、纸或膜。特别合适的是塑料,例如聚苯乙烯。异质免疫测定可以是竞争或非竞争的,即夹心形式。(参见例如,美国专利号 7,195,882,其完整教导引入本文作为参考)。

[0112] 本发明提供了可以在上文描述的方法中使用的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包括本发明的抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分,以及促进抗体-抗原复合物所必需的试剂,所述试剂是本领域技术人员众所周知的。在一个方面,本发明的试剂盒包括基本上分离的多肽,其包括与试剂盒中包括的抗阿达木单抗抗体特异性免疫反应的表位。在一个方面,本发明的试剂盒进一步包括不与阿达木单抗或其片段反应的对照抗体。在另一个方面,本发明的试剂盒包括在检测抗阿达木单抗抗体或其抗原结合部分与阿达木单抗或其部分的结合中使用的工具(例如,检测抗体可以与可检测底物缀合,所述可检测底物例如荧光化合物、酶促底物、放射性化合物或发光化合物,或识别第一(检测)抗体并且例如与可检测底物缀合的第二抗体)。

实施例

[0113] 小鼠抗阿达木单抗抗独特型单克隆抗体的产生:

[0114] 用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化阿达木单抗,并且随后使用 A 蛋白柱纯化,以分别产生 F(ab)₂ 和 Fab 片段。阿达木单抗片段的纯度和生物活性分别通过 SDS-PAGE 和 L929 细胞毒性生物测定进行验证。Balb/c 小鼠随后用阿达木单抗片段进行连续免疫接种。在每次免疫接种/加强后收集的血清通过 ELISA 进行分析。选择对阿达木单抗具有比对于正常人 IgG 更高的滴度的小鼠,用于使用来自 ATCC 的 F0 骨髓瘤细胞的融合。来自选择的小鼠的脾用于产生小鼠杂交瘤。通过示差 ELISAs 就与阿达木单抗特异性结合的抗体筛选杂交瘤上清液。用 5 μg/mL 阿达木单抗或正常人 IgG 包被 96 孔板。加入杂交瘤上清液,并且通过辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 IgG 抗体检测结合的抗体。在阿达木单抗包被的板上

具有阳性反应和在人 IgG 包被的板上具有阴性反应的上清液以 1 : 10、1 : 30 和 1 : 100 的梯度进行进一步稀释,并且就亲和力分级进行再测试。其分泌的抗体对阿达木单抗具有强结合的杂交瘤进行亚克隆。亚克隆再一次通过 ELISAs 进行筛选,并且获得几种单克隆抗体。

[0115] 产生且分析 2 种单克隆抗体 5A1-2A8 和 1H11-2E10。这些单克隆抗阿达木单抗抗独特型抗体由杂交瘤细胞系产生,所述杂交瘤细胞系已在 ATCC 保藏号 PTA-8512(1H11, 2E10) 和 PTA-8513(5A1-A8) 下保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Blvd, Manassas, VA. 20110-2209。应当理解这些单克隆抗体充当举例说明性例子并且不应解释为限制性的。

[0116] 抗独特型抗阿达木单抗小鼠单克隆抗体 5A 1-2A8 :

[0117] 5A1-2A8 是单克隆小鼠 IgG1、 κ 轻链抗体。5A1-2A8 抗体产生性杂交瘤的上清液在阿达木单抗和人 IgG 包被的板上以几个梯度进行测试。在每个梯度下,5A1-2A8 与阿达木单抗而不是人 IgG 包被的板结合,表 1。为了测试人 TNF 是否将抑制 5A1-2A8 与阿达木单抗的结合,在 ELISA 中加入阿达木单抗包被的板前,使上清液的每个梯度与 100 μ g/mL 人 TNF 混合。在每个梯度下,向反应混合物中加入 TNF 不显著抑制 5A1-2A8 与阿达木单抗的结合,表 1。因此,5A1-2A8 可以描述为非互补位(paratopic)抗独特型抗阿达木单抗抗体。这种抗体可以结合阿达木单抗,无论 TNF 与阿达木单抗抗体结合还是不结合。

[0118] 表 1. 5A1-2A8 与阿达木单抗或人 IgG 的结合,ELISA 结果

[0119]

上清液梯度	在板上的包被	抗原添加	光密度
1 : 10	人 IgG	无	0.1
1 : 10	阿达木单抗	无	2.0
1 : 10	阿达木单抗	人 TNF	1.9
1 : 30	人 IgG	无	0.1
1 : 30	阿达木单抗	无	2.0
1 : 30	阿达木单抗	人 TNF	1.8
1 : 100	人 IgG	无	0.1
1 : 100	阿达木单抗	无	2.0
1 : 100	阿达木单抗	人 TNF	1.6

[0120] 5A1-2A8 单独在 TNF 细胞毒性生物测定中进行测试,以测试它是否将模拟 TNF。5A1-2A8 对培养基的添加对 L929 细胞无毒,参见,Carswell, E. A., 等人 (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 第 9 卷,第 3666-3670 页和美国专利号 6,090,382,其完整教导引入本文作为参考。

[0121] 5A1-2A8 对于阿达木单抗的亲和力在 BIAcore 2000 仪器中进行测试。CM-3 生物传感器芯片与山羊抗人 IgG Fc 多克隆抗体共价偶联。阿达木单抗以 0.2mg/mL 浓度进行注射,随后为 3.125 至 100nM 的不定浓度的 5A1-2A8。对于 5A1-2A8 的每个浓度连续记录应答单位(RU)以产生传感图。通过于 pH 1.5 的 10mM 甘氨酸再生细胞表面。结果呈现于表 2 中。

[0122] 表 2. 5A1-2A8 与阿达木单抗的结合,BIAcore 结果

[0123]

分析物	RU	配体	[配体]	RU
阿达木单抗 0.2mg/mL	85	对照	0nM	0

阿达木单抗 0.2mg/mL	84	5A1-2A8	3.125nM	57
阿达木单抗 0.2mg/mL	77	5A1-2A8	6.25nM	72
阿达木单抗 0.2mg/mL	76	5A1-2A8	12.5nM	87
阿达木单抗 0.2mg/mL	80	5A1-2A8	20nM	98
阿达木单抗 0.2mg/mL	89	5A1-2A8	25nM	109
阿达木单抗 0.2mg/mL	82	5A1-2A8	40nM	107
阿达木单抗 0.2mg/mL	80	5A1-2A8	50nM	111
阿达木单抗 0.2mg/mL	80	5A1-2A8	80nM	114
阿达木单抗 0.2mg/mL	82	5A1-2A8	100nM	121

[0124] 通过由 BIAcore 提供的二价分析物模型分析结合传感图,并且获得动力学参数,表 3。

[0125] 表 3. 5A1-2A8 与阿达木单抗结合的动力学参数

[0126]

抗体	结合速率, M ⁻¹ s ⁻¹	解离速率, s ⁻¹	Kd, M
5A1-2A8	2.52x 10 ⁵	2.92x 10 ⁻⁴	1.16x 10 ⁻⁹

[0127] [0127] 抗独特型抗阿达木单抗小鼠单克隆抗体 1H11-2E10 :

[0128] 1H11-2E10 是单克隆小鼠 IgG1、κ 轻链抗体。1H11-2E10 抗体产生性杂交瘤的上清液在阿达木单抗和人 IgG 包被的板上以几个稀度进行测试。在每个稀度下,1H11-2E10 与阿达木单抗而不是人 IgG 包被的板结合,表 4。为了测试人 TNF 是否将抑制 1H11-2E10 与阿达木单抗的结合,在 ELISA 中加入阿达木单抗包被的板前,使上清液的每个稀度与 100 μg/mL 人 TNF 混合。在每个稀度下,向反应混合物中加入 TNF 抑制 1H11-2E10 与阿达木单抗的结合,表 4。因此,1H11-2E10 可以描述为互补位抗独特型抗阿达木单抗抗体。这种抗体可以结合游离阿达木单抗而不是 TNF 结合的阿达木单抗。

[0129] 表 4. 1H11-2E10 与阿达木单抗或人 IgG 的结合

[0130]

上清液稀度	在板上的包被	抗原添加	光密度
1 : 10	人 IgG	无	0.1
1 : 10	阿达木单抗	无	2.6
1 : 10	阿达木单抗	人 TNF	0.5
1 : 30	人 IgG	无	0.1
1 : 30	阿达木单抗	无	2.5
1 : 30	阿达木单抗	人 TNF	0.2
1 : 100	人 IgG	无	0.1
1 : 100	阿达木单抗	无	2.2
1 : 100	阿达木单抗	人 TNF	0.1

[0131] 1H11-2E10 单独在 TNF 细胞毒性生物测定中进行测试,以测试它是否将模拟 TNF。1H11-2E10 对培养基的添加对 L929 细胞无毒。

[0132] 1H11-2E10 对于阿达木单抗的亲合力在 BIAcore 2000 仪器中进行测试。CM-3 生物传感器芯片与山羊抗人 IgG Fc 多克隆抗体共价偶联。阿达木单抗以 0.2mg/mL 浓度进行注射,随后为 3.125 至 100nM 的不定浓度的 1H11-2E10。对于 1H11-2E10 的每个浓度连续记录应答单位 (RU) 以产生传感图。通过于 pH 1.5 的 10mM 甘氨酸再生细胞表面。结果呈现于表 5 中。

[0133] 表 5. 1H11-2E10 与阿达木单抗的结合, BIAcore 结果

[0134]

分析物	RU	配体	[配体]	RU
阿达木单抗 0.2mg/mL	83.43	对照	0nM	-0.26
阿达木单抗 0.2mg/mL	85.85	1H11-2E10	3.125nM	39.54
阿达木单抗 0.2mg/mL	86.35	1H11-2E10	6.25nM	59.75
阿达木单抗 0.2mg/mL	86.69	1H11-2E10	12.5nM	78.23
阿达木单抗 0.2mg/mL	85.34	1H11-2E10	20nM	88.24
阿达木单抗 0.2mg/mL	79.34	1H11-2E10	25nM	87.59
阿达木单抗 0.2mg/mL	78.72	1H11-2E10	40nM	96.62
阿达木单抗 0.2mg/mL	81.77	1H11-2E10	50nM	101.4
阿达木单抗 0.2mg/mL	91.46	1H11-2E10	80nM	122.21
阿达木单抗 0.2mg/mL	88.03	1H11-2E10	100nM	121.78

[0135] 通过由 BIAcore 提供的二价分析物模型分析结合传感图,并且获得动力学参数,表 6。

[0136] 表 6. 1H11-2E10 与阿达木单抗结合的动力学参数

[0137]

抗体	结合速率, M-1s-1	解离速率, s-1	Kd, M
1H11-2E10	2.01×10^5	4.23×10^{-3}	2.10×10^{-8}

[0138] 阿达木单抗结合的 TNF 复合物的测量:

[0139] 未结合的 TNF,如同其他细胞因子,具有短的体内半衰期。当细胞因子由其他蛋白质特别是抗体结合时,这些细胞因子:抗体免疫复合物具有比未结合的细胞因子更长的半衰期。因此,在抗体治疗的受试者中,如果存在细胞因子的持续产生,那么细胞因子:抗体复合物的水平增加。感兴趣的是鉴定具有 TNF 的持续产生的患者。已知例如本发明的单克隆抗体 5A1-2A8 是非互补位抗独特型抗阿达木单抗抗体,它可以在 ELISA 形式中用于检测 TNF:阿达木单抗免疫复合物。同样,5A1-2A8 可以用于测量阿达木单抗,与阿达木单抗不含或含 TNF 无关(而,1H11-2E10 仅可以用于测量当不含 TNF 时的阿达木单抗)。ELISA 可以这样构建,从而使得板(例如,96 孔板)的孔可以使用抗人 TNF 抗体进行包被,所述抗人 TNF 抗体在与阿达木单抗不同的表位处与 TNF 结合。在封闭孔后,可以加入包含 TNF:阿达木单抗复合物的样品,并且可以通过针对阿达木单抗的标记的抗体例如生物素化的 5A1-2A8 单克隆抗体检测阿达木单抗。表 7 呈现此种测定的数据。

[0140] 表 7. 标记的抗体与 TNF: 阿达木单抗复合物的结合

[0141]

复合物中的 TNF 量 (ng/mL)	光密度
100	1.924
25.00	2.011
6.250	1.719
1.560	0.542
0.390	0.119
0.098	0.026