



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105435223 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510674256. 5

(22) 申请日 2007. 11. 21

(30) 优先权数据

60/860, 780 2006. 11. 21 US

60/902, 742 2007. 02. 21 US

(62) 分案原申请数据

200780049532. 2 2007. 11. 21

(71) 申请人 卡罗拜奥斯制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 克里斯托弗·R·贝炳东

杰弗里·T·亚兰东

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 19/02(2006. 01)

A61K 31/519(2006. 01)

权利要求书2页 说明书22页

(54) 发明名称

使用 GM-CSF 拮抗剂治疗慢性炎症疾病的方法

(57) 摘要

本发明基于发现 GM-CSF 拮抗剂可以用于治疗诸如类风湿关节炎的慢性炎症疾病。因此, 本发明提供了给予患 RA 的患者 GM-CSF 拮抗剂如 GM-CSF 抗体和抗叶酸化合物如氨甲喋呤的方法, 以及提供了包含这类拮抗剂的药物组合物。

1. 约0.2至约10mg/kg的量的抗GM-CSF中和抗体在制备用于治疗患者类风湿性关节炎的药物中的用途,所述患者正接受7.5mg/周至25mg/周的量的氨甲喋呤治疗,其中所述量的抗GM-CSF抗体足以减轻正接受氨甲喋呤治疗的患者的类风湿性关节炎的症状但不诱发嗜中性白细胞减少症。

2. 如权利要求1所述的用途,其中不诱发嗜中性粒细胞绝对计数低于 $0.5 \times 10^9/l$ 的临床上显著的嗜中性白细胞减少症。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体是单克隆抗体。

4. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体是重组的或嵌合的抗体。

5. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含人可变区。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含人轻链恒定区。

7. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含人重链恒定区。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述人重链恒定区是 γ 区。

9. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体与嵌合的19/2结合相同的抗原表位。

10. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含嵌合的19/2的V_H区CDR3和V_L区CDR3。

11. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含嵌合的19/2的V_H区和V_L区的CDR1, CDR2和CDR3。

12. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体包含嵌合的19/2的V_H区和V_L区。

13. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体是为Fab, Fab', F(ab')₂, scFv或dAB的抗体片段。

14. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体具有约5pM至约50pM的亲和力。

15. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体是人抗体。

16. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体是多克隆抗体。

17. 如权利要求1所述的用途,其中所述抗体与聚乙二醇偶联。

18. 约0.2至约10mg/kg的量的抗GM-CSF中和抗体在制备用于治疗患者类风湿性关节炎的药物中的用途,所述抗GM-CSF抗体包含具有嵌合的19/2结合特异性的人化的Fab'并具有约5pM至约50pM的亲和力,所述患者正接受7.5mg/周至25mg/周的量的氨甲喋呤治疗,其中所述量的抗GM-CSF抗体足以减轻正接受氨甲喋呤治疗的患者的类风湿性关节炎的症状但不诱发嗜中性白细胞减少症。

19. 如权利要求18所述的用途,其中所述抗体与聚乙二醇偶联。

20. 用于治疗患者类风湿性关节炎的药物组合,其包含7.5mg/周至25mg/周的量的氨甲喋呤和约0.2至约10mg/kg的量的抗GM-CSF中和抗体,其中所述药物组合能减轻类风湿性关节炎的症状但不诱发嗜中性白细胞减少症。

21. 如权利要求20所述的药物组合,其中所述氨甲喋呤的给药先于所述抗GM-CSF抗体的给药。

22. 用于治疗患者类风湿性关节炎的药物组合,其包含7.5mg/周至25mg/周的量的氨甲喋呤和约0.2至约10mg/kg的量的抗GM-CSF中和抗体,所述抗GM-CSF抗体包含具有嵌合的19/2结合特异性的人化的Fab'并具有约5pM至约50pM的亲和力,其中所述药物组合足以减轻类风湿性关节炎的症状但不诱发嗜中性白细胞减少症。

23. 如权利要求22所述的药物组合,其中所述氨甲喋呤的给药先于所述抗GM-CSF抗体

的给药。

使用GM-CSF拮抗剂治疗慢性炎症疾病的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2006年11月21日提交的美国临时申请第60/860,780号以及于2007年2月21日提交的美国临时申请第60/902,742号的权益,通过引用将上述每一申请并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 类风湿关节炎(RA)是慢性和典型的进行性炎症疾病,侵袭了世界范围内高达1%的成年人口总数(Gabriel, Rheum Dis Clin North Am 27:269-81, 2001)。目前治疗RA的建议包括确诊后,用缓解病情抗风湿药(disease modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs)进行早期治疗。在等待证实诊断时或在疾病进程的更后期,已经广泛使用与DMARDs联合的非甾体类抗炎药(NSAIDs),直到最近,广泛使用与DMARDs联合的COX-2抑制剂。氨甲喋呤是使用最为广泛的DMARD,但包括羟氯喹、柳氮磺胺吡啶、金、米诺环素和来氟米特的其它试剂也被作为处方药。皮质类固醇可以与DMARDs联用,但通常只使用低剂量以使其副作用最小化(O'Dell, New Engl. J. Med. 350:2591-2603, 2004)。

[0005] 几种新的生物药物已经被批准用于RA治疗。依那西普(Etanercept, **Enbrel®**)阻断肿瘤坏死因子 α (TNF- α);英利昔单抗和阿达木单抗(分别是**Remicade®**和**Humira®**)阻断TNF- α 和TNF- β ;以及阿那白滞素(Anakinra, **Kineret®**)是IL-1的抑制剂。这些试剂作用迅速,并且已经显示出对疾病的缓解作用(减缓骨和关节的侵蚀)(Olsen & Stein, New Engl. J. Med. 350:2167-2179, 2004)。然而,这些治疗仍存在问题。一些患者对TNF抑制剂不能达到足够的反应。此外,在一些患者,TNF抑制剂的治疗益处随着时间消失。阻断TNF通路也与结核复发以及患严重感染、脱髓鞘作用和淋巴瘤的风险增加有关,尽管RA患者患淋巴瘤的风险比正常人群高。阿那白滞素半衰期短,必须作为日注射剂给药,因此与作为一线生物疗法的较长作用的TNF抑制剂相比,阿那白滞素的使用较少。

[0006] 关于单克隆抗CD20抗体利妥昔单抗(**Mabthera®**)与氨甲喋呤在患RA患者中联用的数据已显示该抗体两次灌输后,在延长的时间段的益处(Edwards et al., New Engl. J. Med. 350:2572-2581, 2004)。

[0007] 氨甲喋呤作为DMARD来治疗RA和其它炎症性关节炎疾病以及自身免疫病症,包括银屑病和系统性红斑狼疮。氨甲喋呤对于治疗银屑病关节炎和青少年特发性关节炎尤其有效。该药也以比治疗炎症性关节炎推荐的剂量更高的剂量用于癌症的化疗。当用于化疗时,氨甲喋呤可以导致由各种血细胞产生减少导致的骨髓抑制,特别时当与包括皮质类固醇、非甾体类抗炎药、环孢素、甲氧苄啶和某些抗生素在内的许多其它药物中的任一种联用时。尽管氨甲喋呤在用于治疗关节炎(或银屑病)的给药方案中,通常被良好耐受,但即便这些较低剂量的氨甲喋呤仍能导致骨髓抑制,特别是嗜中性白细胞减少症(neutropenia)。例如,在病例报道(Sosin & Handa, Brit. Med. J. 326:266-267, 2003)中,嗜中性白细胞减少症在用周剂量为5mg至17.5mg的氨甲喋呤治疗的患者中被报道。RA时推荐的氨甲喋呤给药剂量,诸如英国风湿病学会的指导方针中,是每周7.5mg的氨甲喋呤,每六周增加2.5mg,直到最大周剂量为25mg。因此在使用的剂量显著低于推荐的最大剂量的患者中发生了嗜中性白细胞

减少症,特别是有伴随治疗时。

[0008] 在包括氨甲喋呤的化疗中,GM-CSF可以作为处方药来校正血中低嗜中性粒细胞水平,并由此降低嗜中性白细胞减少症的时程和严重度(Am.Soc.Clin.Onc.2006, J.Clin.Oncol.24:July 1st 2006)。在这种临床设置(clinical setting)下,GM-CSF用作造血生长因子以促进粒细胞(包括嗜中性粒细胞)和巨噬细胞的产生。例如,将GM-CS短期给予癌症患者可以引起嗜中性粒细胞计数的迅速增加,并在用包括氨甲喋呤的化疗方案治疗的患者中减轻嗜中性白细胞减少症(Aglietta et al,Cancer 72:2970-2973,1993)。GM-CSF在治疗由于氨甲喋呤导致的嗜中性白细胞减少症中确立的功效引起了如下关注:拮抗GM-CSF可能具有相反的作用,即GM-CSF拮抗可能促进嗜中性白细胞减少症,特别是在同时或之前用氨甲喋呤治疗的患者中。

[0009] 嗜中性白细胞减少症是目前几种炎症性关节炎的疗法包括细胞因子拮抗剂疗法的显著和严重的副作用。IL-1拮抗剂阿那白滞素在单独应用且特别是在与TNF-拮抗剂联用时导致患嗜中性白细胞减少症的风险增加(Fleischmann et al,Expert Opinion Biol Ther.4:1333,2004)。英利昔单抗也与患嗜中性白细胞减少症的风险增加有关。

[0010] 目前对RA的另外治疗存在需要,特别是在接受抗叶酸化合物诸如氨甲喋呤的患者中。本发明解决了这一需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了用GM-CSF拮抗剂治疗患慢性炎症疾病如炎症性关节炎疾病例如RA的患者的方法。在典型的实施方案中,GM-CSF拮抗剂与抗叶酸化合物,例如氨甲喋呤以不导致嗜中性白细胞减少症的量联用。在一些实施方案中,GM-CSF拮抗剂被重组产生,例如重组的单克隆抗体。在其它实施方案中,GM-CSF拮抗剂,例如来自人血浆的纯化的抗GM-CSF,从天然来源中纯化。

[0013] 一方面,本发明提供了治疗患慢性炎症疾病的患者的方法,例如,类风湿性关节炎,该方法包括给予患者抗叶酸化合物如氨甲喋呤,以及给予患者GM-CSF拮抗剂,其中以足以减轻慢性炎症性疾病的症状但不诱发嗜中性白细胞减少症的量提供抗叶酸化合物如氨甲喋呤和GM-CSF拮抗剂。GM-CSF拮抗剂可以是例如抗GM-CSF抗体、抗GM-CSF受体抗体,可溶性GM-CSF受体,细胞色素b562抗体模拟物,adnectin、脂质运载蛋白(lipocalin)支架抗体模拟物,杯芳烃(calixarene)抗体模拟物或抗体样结合肽模拟物。

[0014] 在许多实施方案中,GM-CSF拮抗剂是针对GM-CSF的抗体,即抗GM-CSF抗体。在各种实施方案中,所述抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体或诸如纳米抗体或骆驼科动物的抗体(camelid antibody)。在一些实施方案中,所述抗体是抗体片段,诸如Fab,Fab',F(ab')₂,scFv,或结构域抗体(domain antibody,dAB)。抗体也可以被修饰,例如以增加稳定性。因此,在一些实施方案中,所述抗体与聚乙二醇偶联。

[0015] 在一些实施方案中,所述抗体具有约100pM至约10nM的亲合力,例如从约100pM,约200pM,约300pM,约400pM,约500pM,约600pM,约700pM,约800pM,约900pM或约1nM直到约10nM。在另外的实施方案中,所述抗体具有约1pM至约100pM的亲合力,例如约1pM,约5pM,约10pM,约15pM,约20pM,约25pM,约30pM,约40pM,约50pM,约60pM,约70pM,约80pM或约90pM至约100pM的亲合力。在一些实施方案中,抗体具有约10至约30pM的亲合力。

[0016] 在一些实施方案中,抗体是中和抗体。在另外的实施方案中,抗体是重组的或嵌合

的抗体。在一些实施方案中,抗体是人抗体。在一些实施方案中,抗体包含人可变区。在一些实施方案中,抗体包含人轻链恒定区。在一些实施方案中,抗体包含人重链恒定区,诸如 γ 链。

[0017] 在另外的实施方案中,所述抗体与嵌合的19/2抗体结合相同的抗原表位。所述抗体可以,例如,包含嵌合的19/2的 V_H 和 V_L 区。所述抗体也可以包含人重链恒定区,诸如 γ 区。在一些实施方案中,抗体包含嵌合的19/2的 V_H 区的CDR1,CDR2和CDR3。在另外的实施方案中,抗体包含嵌合的19/2的 V_L 区的CDR1,CDR2和CDR3。在另外的实施方案中,抗体包含嵌合的19/2抗体的 V_H 和 V_L 区的CDR1,CDR2和CDR3。在一些实施方案中,抗体包含嵌合的19/2的 V_H 区的CDR3和 V_L 区的CDR3。

[0018] 在一些实施方案中,抗体具有约7至约25天的半衰期。

[0019] 在本发明方法的一些实施方案中,GM-CSF拮抗剂,例如,抗GMCSF抗体通过注射或通过灌输给药。例如,GM-CSF拮抗剂可以在约15分钟至约2小时的时间段静脉给药。

[0020] 在其它实施方案中,GM-CSF拮抗剂通过弹丸式注射(bolus injection)皮下给药。

[0021] 在另外的实施方案中,GM-CSF拮抗剂肌内给药。

[0022] GM-CSF抗体可以,例如以约1mg/kg体重至约10mg/kg体重的剂量给药。

[0023] 在一些实施方案中,用GM-CSF拮抗剂的治疗包括GM-CSF拮抗剂的第二次给药。

[0024] 本发明也提供了治疗慢性炎症疾病,例如类风湿关节炎的方法。该方法包括给予本文所述的治疗有效量的抗GM-CSF抗体。在一些实施方案中,给予患有诸如阿尔茨海默氏病的神经变性疾病的患者抗GM-CSF拮抗剂,例如,抗GM-CSF抗体。

[0025] 发明详述

[0026] 定义

[0027] 如本文所使用的,“慢性炎症疾病”指与持续很长时间的炎症反应有关的疾病。在一些实例中,炎症反应可以持续数周、数月甚或不确定的无限期持续。炎症反应延长的持续时间经常由对炎症反应持久的刺激物所引起。炎症反应导致组织损伤。慢性炎症可以是急性炎症进展的结果。慢性炎症也可以继发于急性炎症的反复发作或者是从头新形成。已经发现许多炎症疾病与持续的病原感染、不能被通过酶降解或吞噬移去除的刺激性无活性外源物质、或被识别为异己物质的“正常”组织成分(主要与自身免疫疾病有关)有关。慢性炎症的组织学表现往往包括混合的炎症细胞浸润,其大多数与巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞的存在有关,并可能有作为次要成分的嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞多形体(polymorph)(较大数量的嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞多形体与急性炎症有关)。炎症疾病的实例包括关节炎如RA、牛皮癣银屑病关节炎、强直性脊柱炎、青少年特发性关节炎以及关节的其他炎症疾病,炎性肠疾病如溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、巴雷特综合征(Barrett's syndrome),回肠炎、肠炎、谷蛋白敏感性肠病,呼吸系统的炎性病症,诸如哮喘、成人呼吸窘迫综合征、变态反应性鼻炎、矽肺、慢性呼吸道阻塞性疾病、超敏反应肺疾病、支气管扩张症;炎症性皮肤的炎症疾病,包括银屑病、硬皮病和诸如湿疹、特应性皮炎、荨麻疹和瘙痒症的炎症皮肤病;涉及中枢和外周围神经系统炎症的病症包括多发性硬化、特发性脱髓鞘性多神经病、格-巴二氏综合征(Guillain-Barre syndrome)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病和诸如阿尔茨海默氏病的神经变性疾病。各种其它炎症疾病可以使用本发明的方法治疗。这些包括系统性红斑性狼疮,免疫介导性肾脏病,例如肾小球肾炎和脊椎关节病;带有

不良慢性炎症成分的疾病,诸如系统性硬化病,特发性炎症性肌病,肖格伦氏综合征(Sjogren's syndrome),脉管炎,肉瘤样病,甲状腺炎,痛风,耳炎,结膜炎,窦炎,肉瘤样病,贝赫切特综合征(Behcet's syndrome),肝胆管疾病诸如肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉芽肿性肝炎和硬化性胆管炎;炎症和心血管系统的缺血损伤诸如缺血性心脏病,中风和动脉粥样硬化;以及移植物排斥(graft rejection),包括同种异体移植排斥和移植物抗宿主病。各种其它炎症疾病包括肺结核和慢性胆囊炎。例如在Harrison's Principles of Internal Medicine(哈里森内科学),12th Edition,Wilson,et al.,eds.,McGraw-Hill, Inc.)中也描述了其它慢性炎症疾病。

[0028] 术语“类风湿性关节炎(RA)”指发展为自身免疫病症且与关节的慢性炎症有关的慢性炎症疾病。炎症经常扩散至关节周围的组织并达到其它器官。通常,RA是可以导致关节破坏和功能丧失的进行性疾病。与RA有关的关节炎症在关节处导致肿胀、疼痛、僵硬和发红。类风湿疾病的炎症也可以发生在关节周围的组织,诸如肌腱、韧带和肌肉。在一些患RA的患者,慢性炎症导致软骨、骨和韧带的破坏,引起关节的变形。对关节的损害可以发生在该病的早期,并且是进行性的。对关节的进行性损害与存在于关节处的疼痛、僵硬或肿胀的程度没有必然联系。

[0029] 如本文所使用的,“粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子(GM-CSF)”指小的天然存在的具有内部二硫键的糖蛋白,分子量为约23kDa。在人类,它是由位于人类第5号染色体上的细胞因子簇内的基因编码。人类基因和蛋白的序列是已知的。该蛋白具有N-末端信号序列和C-末端受体结合结构域(Rasko and Gough In: The Cytokine Handbook(细胞因子手册), A. Thomson, et al, Academic Press, New York(1994) pages 349-369)。其三维结构与白介素的结构相似,尽管氨基酸序列并不相似。GM-CSF在应答由存在于造血环境中炎症周围部位的间充质细胞产生的许多炎症介质时产生。GM-CSF能够刺激嗜中性粒细胞、巨噬细胞和混合的粒细胞-巨噬细胞集落从骨髓细胞产生,并能够刺激嗜酸性粒细胞集落从胎儿肝脏祖细胞形成。GM-CSF也能够刺激成熟的粒细胞和巨噬细胞的一些功能活性。

[0030] 术语“粒细胞巨噬细胞集落刺激因子受体(GM-CSFR)”指表达在细胞上的膜结合的受体,其与粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)结合时转导信号。GM-CSFR由配体特异性低亲和力结合链(GM-CSFR α)和高亲和力结合和信号转导所需的第二链组成。该第二链由白介素3(IL-3)和白介素5(IL-5)受体的配体特异性 α 链共享,因此被称为 β 共有(beta common, β c)。GM-CSFR α 的细胞质区由膜近端保守区和C-末端可变区组成,膜近端保守区为 α 1和 α 2亚型所共有,而C-末端可变区在 α 1和 α 2之间不同。 β -c的细胞质区包含膜近端丝氨酸和对由GM-CSF诱导的增殖反应重要的酸性结构域。

[0031] “可溶性粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子受体”(sGM-CSFR)指结合GM-CSF的非膜结合受体,但当与配体结合时不转导信号。

[0032] 如本文所使用的,“肽GM-CSF拮抗剂”指与GM-CSF或其受体相互作用的肽,所述肽(部分地或完全地)降低或阻断信号转导,否则GM-CSF就会结合到其表达在细胞上的相应受体引起信号转导。GM-CSF拮抗剂可以通过降低可用于结合受体的GM-CSF配体的量发挥作用(例如,一旦结合到GM-CSF,增加GM-CSF清除率的抗体)或通过与GM-CSF或受体结合来阻止配体结合到其受体(例如,中和抗体)。GM-CSF拮抗剂也可以包括其它的肽抑制剂,其可以包括结合GM-CSF或其受体以部分或完全抑制信号传导的多肽。肽GM-CSF拮抗剂可以是,例如

抗体、拮抗GM-CSF的天然的或合成的GM-CSF受体配体,或其它多肽。检测GM-CSF拮抗剂活性的示例性测定提供于实施例1中。通常,肽GM-CSF拮抗剂,诸如中和抗体具有10nM或更小的EC₅₀。

[0033] 如本文所使用的,“纯化的”GM-CSF拮抗剂指基本上或本质上没有那些通常伴随拮抗剂的组分的GM-CSF拮抗剂,所述组分在拮抗剂的天然状态下存在。例如,从血液或血浆中纯化的GM-CSF拮抗剂诸如抗GM-CSF抗体,基本上没有诸如其他免疫球蛋白分子的其他血液或血浆组分。通常使用分析性化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱来确定纯度和同质性。为存在于制剂中的主要物质的蛋白基本上是纯化的。通常,“纯化的”指相对于蛋白与其天然存在的组分,蛋白的纯度是至少85%,更优选地,至少95%纯,且最优选地,至少99%纯。

[0034] 如本文使用的,“抗体”指功能上定义为结合蛋白的蛋白和结构上定义为包含氨基酸序列的蛋白,所述氨基酸序列由本领域技术人员公认为来自产生抗体的动物内编码免疫球蛋白基因的框架区。抗体可以由基本上由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段编码的一个或多个多肽组成。公认的免疫球蛋白基因包括 κ , λ , α , γ , δ , ϵ 和 μ 恒定区基因,以及各种免疫球蛋白可变区基因。轻链被分为 κ 或 λ 。重链分为 γ , μ , α , δ 或 ϵ ,其进一步确定免疫球蛋白的类别,分别为IgG, IgM, IgA, IgD和IgE。

[0035] 已知典型的免疫球蛋白(抗体)结构单位包含四聚体。每个四聚体由两个相同的成对多肽链组成,每一对具有一个“轻”链(约25kD)和一个“重”链(约50-70kD)。每一链的N-末端确定主要负责抗原识别的约100至110或更多个氨基酸的可变区。术语可变的轻链(V_L)和可变的重链(V_H)分别指这些轻链和重链。

[0036] 本文使用的术语“抗体”包括保留结合特异性的抗体片段。例如,有许多已明确表征的抗体片段。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区二硫键以下消化抗体,以产生F(ab)'₂,即Fab的二聚体,Fab本身是通过二硫键连接到V_H-CH1的轻链。F(ab)'₂可以在温和的条件下被还原以打破铰链区的二硫键,由此将(Fab')₂二聚体转换为Fab'单体。该Fab'单体本质上是带有部分铰链区的Fab(对于其他抗体片段的更详细的描述,参见,Fundamental Immunology(基础免疫学),W.E.Paul, ed., Raven Press, N.Y.(1993))。尽管依据完整抗体的消化确定了各种抗体片段,但本领域技术人员理解,片段可以通过化学方式或利用重组DNA方法学从头合成。因此,本文所用的术语抗体也包括通过完整抗体的修饰产生的抗体片段或利用重组DNA方法学合成的抗体片段。

[0037] 抗体包括诸如V_H-V_L二聚体、V_H二聚体或V_L二聚体的二聚体,包括单链抗体(作为单多肽链存在的抗体),诸如单链Fv抗体(sFv或scFv),其中可变的重链区和可变的轻链区连接在一起(直接的或通过肽连接子)以形成连续的多肽。单链Fv抗体是共价连接的V_H-V_L异源二聚体,其可以由包括编码V_H和V_L的序列的核酸表达,所述序列直接连接或通过编码肽的连接子连接(例如,Huston, et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)。尽管V_H和V_L彼此相连为单多肽链,V_H和V_L结构域非共价连接。可选择地,抗体可以是另一片段,诸如二硫键稳定的Fv(dsFv)。也可以产生其他片段,包括利用重组技术。本领域技术人员已知,scFv抗体和许多其他结构将天然聚集的但通过化学方式分离的来自抗体V区的轻链和重链转化为折叠成三维结构的分子,所述结构与抗原结合位点的结构基本上相似(参见例如,美国专利第5,091,513, 5,132,405和4,956,778号)。在一些实施方案中,抗体包括如下的那些:已

在噬菌体上展示过或已使用载体通过重组技术产生,其中分泌的链作为可溶性蛋白,例如 scFv, Fv, Fab, (Fab')₂ 或使用载体通过重组技术产生,其中所述链分泌为可溶性蛋白。用于本发明的抗体也可以包括双抗体和迷你抗体(miniantibodies)。

[0038] 本发明的抗体也包括重链二聚体,诸如来自骆驼科动物(camelids)的抗体。因为骆驼科动物抗体中的重链二聚体IgG的V_H区不必与轻链形成疏水相互作用,将正常与轻链接触的重链的区域改变为骆驼科动物抗体中的疏水氨基酸残基。重链二聚体IgGs的V_H结构域称为VHH结构域。用于本发明的抗体包括单结构域抗体(dAbs)和纳米抗体(参见,例如, Cortez-Retamozo, et al, Cancer Res. 64:2853-2857, 2004)。

[0039] 如本文所用的,“V-区”指抗体可变区结构域,包含框架(framework)1、CDR1、框架2、CDR2、框架3节段,并包括CDR3以及框架4节段,所述CDR3和框架4节段作为重链和轻链V-区基因在B-细胞分化过程中重排的结果,被添加到V-节段。本文使用的“V-节段”指由V基因编码的V-区(重或轻链)的区域。

[0040] 如本文所使用的,“互补决定区(CDR)”指每一链中的三个高度可变区,其中断由轻链和重链可变区确立的四个“框架”区。CDRs主要负责结合抗原表位。每一链的CDR通常称为CDR1, CDR2和CDR3,从N-末端开始顺序编码,且通常也通过特定CDR定位的链来识别。因此,例如,V_H CDR3位于其所存在的抗体的重链的可变结构域,而V_L CDR1是来自其所存在的抗体的轻链的可变结构域的CDR1。

[0041] 不同轻链或重链的框架区的序列在一个物种内相对保守。抗体的框架区,也就是组成性轻链和重链的組合的框架区,用于定位和排列三维空间内的CDRs。

[0042] CDRs和框架区的氨基酸序列可以使用本领域各种已知的定义来确定,例如Kabat, Chothia, 国际ImMunoGeneTics数据库(IMGt)和AbM(参见,例如, Johnson et al, 上述; Chothia&Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins(免疫球蛋白高变区的标准结构). J. Mol. Biol. 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions(免疫球蛋白高变区的构像). Nature 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, structural repertoire of the human VH segments(人VH节段的结构库) J. Mol. Biol. 227, 799-817; Al-Lazikani et al, J. Mol. Biol. 1997, 273(4)). 抗原结合位点的定义也在下文中被描述: Ruiz et al., IMGt, the international ImMunoGeneTics database(国际ImMunoGeneTics数据库). Nucleic Acids Res., 28, 219-221(2000); and Lefranc, M.-P. IMGt, the international ImMunoGeneTics database(国际ImMunoGeneTics数据库). Nucleic Acids Res. Jan 1; 29(1):207-9(2001); MacCallum et al, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography(抗体-抗原相互作用:接触分析和结合位点的形貌学), J. Mol. Biol, 262(5), 732-745(1996); and Martin et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272(1989); Martin, et al, Methods Enzymol, 203, 121-153, (1991); Pedersen et al, Immunomethods, 1, 126, (1992); and Rees et al, In Sternberg M. J. E. (ed.), Protein Structure Prediction(蛋白质结构预测). Oxford University Press, Oxford, 141-172(1996)。

[0043] “抗原表位”或“抗原决定簇”指抗原上与抗体结合的位点。抗原表位可以由连续的氨基酸或通过蛋白的三级折叠紧靠但非连续的氨基酸形成。从连续的氨基酸形成的抗原表

位一般在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的抗原表位通常在用变性溶剂处理时丢失。抗原表位在独特的空间构像中一般包括至少3个,且通常更多个,至少5个或8-10个氨基酸。确定抗原表位的空间构像的方法包括,例如,x-射线晶体学和2-维核磁共振。参见,例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology(分子生物学方法中抗原表位定位方案),Vol.66,Glenn E.Morris,Ed(1996)。

[0044] 如本文使用的,“中和抗体”指与GM-CSF结合并阻止通过GM-CSF受体的信号转导或抑制GM-CSF与其受体结合的抗体。

[0045] 如本文使用的,“嵌合抗体”指免疫球蛋白分子,其中(a)恒定区或其部分被改变、替代或交换以使抗原结合位点(可变区)连接到不同的或改变的种类、效应器功能和/或物种的恒定区,或者连接一个完全不同的分子,所述分子赋予嵌合抗体新的特性,例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b)可变区或其部分被用具有不同或改变的抗原特异性的可变区或其部分改变、替代或交换;或者用来自另一物种或来自另一抗体类别或亚类别的相应序列改变、替代或交换。

[0046] 如本文使用的,“人源化抗体(humanized antibody)”指其中受者人抗体的CDRs被来自供者抗体的CDRs所替代的免疫球蛋白分子。人源化抗体也可以包含框架序列中供者来源的残基。所述人源化抗体也可以包含人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。人源化抗体也可以包含既不在受者抗体也不在引入的CDR或框架序列中的残基。可以利用本领域已知的方法(例如,Jones et al,Nature 321:522-525,1986;Riechmann et al,Nature 332:323-327,1988;Verhoeyen et al,Science239:1534-1536,1988);Presta, Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596,1992;U.S.Patent No.4,816,567)进行人源化,包括诸如“超人源化(superhumanizing)”抗体(Tan et al,J.Immunol.169:1119,2002)和“表面重塑(resurfacing)”的技术(例如,Staelens et al,Mol Immunol.43:1243,2006;and Roguska et al,Proc.Natl Acad.Sci USA 91:969,1994)。

[0047] 本发明所述的“人化的(humaneered)”抗体指具有参考抗体结合特异性的经改造的人抗体。用于本发明的“人化的(humaneered)”抗体具有包含来自非人免疫球蛋白的最小序列的免疫球蛋白分子。通常,通过将编码来自参考抗体的重链的CDR3区的结合特异性决定簇(BSD)的DNA序列连接到人V_H节段序列,且将来自参考抗体的轻链CDR3 BSD连接到人V_L节段序列来“人化”抗体。“BSD”指CDR3-FR4区,或介导结合特异性的该区的一部分。因此结合特异性决定簇可以是CDR3-FR4、CDR3或CDR3的最小必需结合特异性决定簇(其指存在于抗体的V区时,赋予结合特异性的小于CDR3的任一区)、D节段(关于重链区),或者赋予参考抗体结合特异性的CDR3-FR4的其它区。在美国专利申请公布第20050255552号和美国专利申请公布第20060134098号提供了进行人化(humaneering)的方法。

[0048] 术语“异源的”当被用于提及核酸部分时,表明所述核酸包含两个或多个子序列,其通常没有被发现本质上彼此关系相同。例如,核酸通常通过重组产生,例如从不相关的排列基因重组产生以产生新的功能核酸,其具有两个或多个序列。类似地,异源蛋白经常指两个或多个子序列,其没有被发现本质上彼此关系相同。

[0049] 当用术语“重组的”提及例如细胞、核酸、蛋白或载体时,指所述细胞、核酸、蛋白或载体已经通过引入异源核酸或蛋白或改变天然核酸或蛋白被修饰,或者指所述细胞来自进行过如此修饰的细胞。因此,例如,重组的细胞表达不在所述细胞的天然形式(非重组的)内

存在的基因或表达天然基因,所述天然基因否则异常表达、表达低下或根本不表达。本文所用术语“重组的核酸”指正常不在自然界存在的形式的核酸,其最初一般通过例如,使用聚合酶和核酸内切酶的核酸的操作在体外形成。以这种方式,实现不同序列的可操作连接。因此出于本发明的目的,线性形式的分离的核酸,或者通过连接正常不相连的DNA分子在体外形成的表达载体都被认为是重组的。可以理解,一旦重组的核酸被制备并重新导入宿主细胞或有机体,它会以非重组形式复制,即,利用宿主细胞的体内细胞机制而不是体外操纵;然而,出于本发明的目的,这类核酸,一旦被重组制备,尽管随后非重组复制,仍然被认为是重组的。类似地,“重组蛋白”是使用重组技术制备的蛋白,即,通过上文所述的重组核酸的表达。

[0050] 当提及蛋白或肽时,短语“特异性(或选择性)结合”到抗体或“特异性(或选择性)与...免疫反应”指在蛋白的异源群体和其它生物学中,确定蛋白存在的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,指定的抗体结合到特定的蛋白序列,至少两倍于背景,更通常高于背景10-100倍。

[0051] 在这种条件下,与抗体的特异性结合需要根据其对特定蛋白的特异性选择的抗体。例如,可以选择针对特定蛋白的多克隆抗体、多态变异体、等位体(alleles)、同源体以及保守修饰的变异体或剪接异变体或其部分以只获得那些与GM-CSF蛋白特异性免疫反应,而不与其它蛋白发生反应的多克隆抗体。可以通过去掉与其它分子交叉反应的抗体来实现这种选择。

[0052] 如本文使用的,“慢性炎症疾病的治疗剂”指当以治疗有效剂量给予患有慢性炎症疾病的患者时,会治愈或至少部分消除该疾病的症状和与该疾病有关的并发症的试剂。

[0053] 用于两个或多个多肽(核酸)序列时,术语“同一的(identical)”或“同一性(identity)”百分比指两个或多个序列或子序列相同或者具有特定百分比的相同氨基酸残基(或核苷酸)(即,当在比较窗(comparison window)或指定区域比较并对齐以进行最大的对应时,在特定的区域有约60%的同一性,优选70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高的同一性),如使用下述的带缺省参数的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法或通过手工比对和目测(参见,例如NCBI万维网站)所测量的。这样的序列被称为“基本上相同的”。“基本上相同的”序列也包括具有删除和/或添加的序列,和具有取代的那些,还有例如多态或等位变体的天然存在的变体,以及人工变体。如下文所述的,优选的算法可以解释空位及类似情况。优选地,蛋白序列同一性存在于至少约25个氨基酸长度的区域,或更优选地存在于50-100个氨基酸长度的区域,或者整个蛋白的长度。

[0054] 如本文使用的,“比较窗”包括选自一般为20-600,通常为约50-约200,更通常约100-约150的连续位的数目中的一个的片段的参考,其中可以将序列与具有相同数目连续位的参考序列最佳比对后进行比较。用于比较的序列比对方法在本领域是公知的。例如,可以通过Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法、通过Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源比对算法、通过Pearson&Lipman,Proc.Nat'l Acad.Sci USA 85:2444(1988)的相似性检索方法、通过这些算法的计算机实施(Wisconsin Genetics Software Package(威斯康星遗传学软件包)中的GAP,BESTFIT,FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group(遗传学计算机组),575Science Dr.,Madison,

WI)或通过手工比对和目测(参见,例如Current Protocols in Molecular Biology(通用分子生物学技术)(Ausubel et al., eds. 1995 supplement))进行用于比较的序列的最优化比对。

[0055] 适于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的优选实例包括BLAST和BLAST 2.0算法,其在Altschul et al, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402(1977)和Altschul et al, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990)中被描述过。BLAST和BLAST 2.0,与本文描述的参数一起用于确定本发明的核酸和蛋白的序列同一性百分比。BLASTN程序(用于核酸序列)默认字长(W)为11,期望值(E)为10, M=5, N=-4以及用于两条链的比较。对于核酸序列而言, BLASTP程序默认字长为3,且期望值(E)为10,以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff&Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915(1989))比对(B)为50,期望值(E)为10, M=5, N=-4且用于比较两条链。

[0056] 两个多肽基本上相同的指征是第一多肽与针对第二多肽的抗体发生免疫交叉反应。因此,一多肽通常基本上与第二多肽相同,例如,如果两肽仅通过保守取代不同。

[0057] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”指一种物质基本上或本质上没有那些通常伴随着所述物质(如在其天然状态中所发现的)的成分。纯度和同质性一般使用分析化学技术,诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱来确定。蛋白是存在于基本上纯化的制剂中的主要物质。在某些实施方案中,术语“纯化的”表示蛋白在电泳中基本上产生一条带。优选地,它意味着所述蛋白是至少85%纯,更优选至少95%纯,且最优选至少99%纯。

[0058] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文可互换使用,指氨基酸残基的多聚体。这些术语应用于氨基酸多聚体,其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及应用于天然存在的氨基酸,包含修饰的残基的那些,和非天然存在的氨基酸多聚体。

[0059] 术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸,以及与天然存在的氨基酸作用相似的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是有遗传密码编码的那些,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、7-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,例如与氢、羧基、氨基以及R基如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、甲基硫蛋氨酸结合的 α 碳。这些类似物可以具有修饰的R基(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指结构与氨基酸的一般化学结构不同的化学化合物,但功能与天然存在的氨基酸相似。

[0060] 本文可以通过氨基酸公知的三字母符号,或通过IUPAC-IUB生物化学命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号来指代氨基酸。同样,核苷酸可以通过它们公认的单字母符号来提及。

[0061] “保守性修饰变异体”适用于氨基酸和核酸序列。关于特定的核酸序列,保守性修饰变异体指那些编码相同或基本上相同的氨基酸序列的核酸,或者如果所述核酸不编码氨基酸序列,其指本质上相同或相关的序列,例如,天然的连续的序列。由于遗传密码的兼并性,大量功能相同的核酸编码大多数蛋白。例如,密码子GCA, GCC, GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子指定的丙氨酸的每一位置处,该密码子都可以改变为另一个所述的相应密码子,而不改变编码的多肽。这种核酸变异体是“沉默变异体”,其是保守性修饰的变

异体的一种。本文编码多肽的每一核酸序列也描述了所述核酸的沉默变异体。本领域的技术人员会认识到,在某些情形下,可以修饰核酸中的每一密码子(AUG除外,其通常是甲硫氨酸的唯一密码子;TGG也除外,其通常是色氨酸的唯一密码子)以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的沉默变异体经常内含在描述的序列中,所述序列与表达产物有关,而与实际的探针序列无关。

[0062] 对于氨基酸序列,本领域的技术人员会认识到,改变、添加或删除在编码的序列中的单个氨基酸或小比率氨基酸的对核酸、肽、多肽或蛋白序列的个别的取代、删除或添加是“保守性修饰的变异体”,其中所述改变导致氨基酸被化学上类似的氨基酸取代。提供了功能类似的氨基酸的保守性取代表和诸如BLOSUM的保守性取代矩阵在本领域中是公知的。此外,这种保守性修饰变异体并不排除本发明的多态变异体,种间同源体和等位体。典型的相互的保守性取代包括1)氨酸(A),甘氨酸(G);2)冬氨酸(D),谷氨酸(E);3)天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);4)精氨酸(R),赖氨酸(K);5)异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);6)苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);7)丝氨酸(S),苏氨酸(T);和8)半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(参见,例如,Creighton,Proteins(1984))。

[0063] I. 导论

[0064] 本发明涉及给予GM-CSF拮抗剂用于治疗诊断为慢性炎症疾病的患者的方法。在一些实施方案中,所述患者正接受抗叶酸化合物诸如氨甲喋呤的治疗。在一些实施方案中,用GM-CSF拮抗剂,例如用抗GM-CSF抗体治疗的慢性炎症疾病,包括炎症性关节炎疾病如RA、银屑病关节炎、强直性脊柱炎和青少年特发性关节炎,以及诸如多肌炎和系统性红斑狼疮的其它炎症性疾病。在一些实施方案中,患有这类病症的患者也可以是正在接受抗叶酸化合物诸如氨甲喋呤的治疗。在其中GM-CSF拮抗剂与抗叶酸化合物如氨甲喋呤一起给药的实施方案中,给予的GM-CSF和抗叶酸化合物如氨甲喋呤的量不诱发嗜中性白细胞减少症。GM-CSF拮抗剂可以包括抗GM-CSF抗体、抗GM-CSF受体抗体或阻止信号传导的其它抑制剂,所述信号传导正常情况下由GM-CSF结合到其相应受体导致。

[0065] 在一些实施方案中,本发明提供了通过给予本文所述的抗GM-CSF抗体治疗慢性炎症疾病例如类风湿性关节炎的方法。其它可以用GM-CSF拮抗剂,例如抗GM-CSF抗体治疗的慢性炎症疾病包括神经变性疾病,诸如阿尔茨海默氏病。

[0066] 适用于本发明的抗体,例如,抗-GM-CSF或抗-GM-CSF受体抗体,可以是单克隆的、多克隆的、嵌合的、人源化的、人化的(humaneered)或人的。用于本发明的其它GM-CSF拮抗剂可以包括天然存在的或合成的配体(或其片段),其与GM-CSF竞争结合受体,但与受体结合时不导致信号传导。另外的非限定性GM-CSF拮抗剂可以包括部分或完全阻断信号传导的多肽、核酸、小分子等,所述信号传导在天然状态下不存在GM-CSF拮抗剂时,由GM-CSF结合到其受体导致。

[0067] II. 患者

[0068] 待用GM-CS拮抗剂治疗的典型患者是那些患有慢性炎症病症的患者,这些患者也正在接受氨甲喋呤治疗,没有发生嗜中性白细胞减少症。根据已确立的临床指导方针,患者用氨甲喋呤治疗,并且氨甲喋呤治疗的周剂量为每周约5至约25mg的氨甲喋呤。对于有些患者,较低剂量的氨甲喋呤可以是合适的,并包括约0.1至约5mg的氨甲喋呤的每周给药方案。在其它实施方案中,氨甲喋呤给药的量为约5mg/周至约25mg/周。

[0069] 在一些实施方案中,用GM-CSF拮抗剂,如抗GM-CSF抗体治疗的患者正接受氨甲喋呤类似物或另一种抗叶酸治疗剂的治疗。氨甲喋呤在结构上与叶酸相似,并能够结合到许多酶的活性部位,这些酶正常利用叶酸作为辅酶用于合成DNA的嘌呤和嘧啶核苷酸前体,并用于在蛋白生物合成过程中氨基酸的互换。氨甲喋呤与叶酸辅因子竞争酶的结合部位,由此抑制酶的活性。“氨甲喋呤类似物”是与氨甲喋呤具有结构相似性的化合物,其也具有抗叶酸活性。因此,氨甲喋呤类似物也指可以用于本发明实践中的衍生物和前药。例如,前药可以通过选择性生物转化用于增加生物可利用率。氨甲喋呤类似物包括,例如在对位氨基苯甲酸部分具有卤素取代基的4-氨基衍生物,诸如二氯氨甲喋呤(参见,例如,Frei et al, Clin. Pharmacol. Therap., 6:160-71(1965)); 7-甲基取代的氨甲喋呤(参见,例如, Rosowsky et al, J. Med. Chem., 17:1308-11(1974)); 3', 5'-二氟氨甲喋呤(参见,例如, Tomcuf, J. Organic Chem., 26:3351(1961)); 氨基喋呤(aminopterin)的2'和3'单氟化的衍生物(参见,例如, Rosowsky et al, J. Med. Chem., 17:1308-11(1974)); 以及7,8-二氢-8-甲基-氨甲喋呤(参见,例如, Chaykovsky, J. Org. Chem., 40:145-146(1975))。

[0070] 如本文使用的,术语“抗叶酸化合物”指与叶酸具有结构相似性的化合物,且具有作为叶酸拮抗剂对抗一种或多种叶酸依赖酶的活性。抗叶酸化合物的实例包括,例如氨基喋呤、雷替曲塞、洛美曲索、多靶向的抗叶酸(MTA)、AQA、氨甲喋呤和其类似物。例如,与氨甲喋呤的结构相比,氨基喋呤在N-10处具有氢而不是甲基。雷替曲塞(ZD1694)是胸苷酸合酶的选择性抑制剂。洛美曲索选择性抑制甘氨酸酰胺核苷酸甲酰基转移酶,第一酶与嘌呤从头合成的途径有关。其它抗叶酸化合物包括,例如,三甲曲沙、依达曲沙(edetrexate)等(关于示例性抗叶酸化合物的列表参见,例如, Takimoto, Oncologist 1:68-81, 1996)。在某些实例中,氨甲喋呤可以用于与一种或多种氨甲喋呤类似物和其他抗叶酸化合物以及抗GM-CSF拮抗剂的联合治疗。抗叶酸试剂以不产生嗜中性白细胞减少症的量给药。在一些实施方案中,所述量是每周约0.1mg,例如约0.5,约1,约2,约3,约4,约5,约7.5,约10,约12.5,约15,约20至约25mg。用作抗炎试剂的抗叶酸化合物的给药量通常比抗叶酸化合物用于治疗癌症的量低2至3个log级。

[0071] 在一些实施方案中,依照本发明的方法治疗患有炎症性关节炎的患者。所述患者包括那些患RA、银屑病关节炎、强直性脊柱炎或青少年特发性关节炎的患者。

[0072] 本领域公知的方法可以用于确定患者是否患嗜中性白细胞减少症。嗜中性粒细胞的绝对计数(ANC)用于确定患者是否患嗜中性白细胞减少症。如果嗜中性粒细胞和白细胞计数(WBCC)在正常范围内,则认为患者没有嗜中性白细胞减少症。认为嗜中性粒细胞的正常范围表现为计数大于 $1 \times 10^9/L$;认为白细胞的正常范围表现为计数大于 $3.5 \times 10^9/L$ 。如果ANC低于 $0.5 \times 10^9/L$,则认为嗜中性白细胞减少症是临床上显著的。在一些实施方案中,依照本发明的方法治疗的患者没有诱发临床显著的嗜中性白细胞减少症。在一些其它的实施方案中,治疗没有导致可检测的嗜中性白细胞减少症。

[0073] 在一些实施方案中,患活动性RA的患者用本发明所述的方法治疗。RA患者对治疗的反应和/或疾病的进展可以通过监测与RA有关的任一临床参数来评估。通常,显示对治疗的治疗反应的患者通过包括药理学参数在内的大量参数来确定。例如,可以应用美国风湿病学会(American College for Rheumatology, ACR)对RA的评分。RA的ACR复合指标包括:晨僵、压痛关节数、肿胀关节数、患者疼痛评价、患者整体评价、医师整体评价、红细胞沉降

率(ESR)、C-反应蛋白(CRP)的血浆水平,以及类风湿因子的测量。可以用于评估患者反应的其他药效标志物包括血液或尿液中的新蝶呤水平的评估,全身(血液中)或局部(例如,在诸如关节的局限性炎症部位)的促炎细胞因子水平的评估。促炎细胞因子在本领域中是公知的。可以用于评估患者对本发明的治疗的反应的促炎细胞因子的实例包括,但不限于,TNF- α ,GM-CSF,白介素-1,白介素-6以及白介素-8和-17。

[0074] GM-CSF拮抗剂与抗叶酸化合物如氨甲喋呤的给药至少部分抑制了疾病的进展或减轻了疾病的症状(如由诸如上述的示例性参数的参数所评估的)。因此,GM-CSF拮抗剂和氨甲喋呤的给药可以减缓关节侵蚀的进展。可以利用已知的技术如放射自显影来评定关节侵蚀的进展,以评估关节处的骨和软骨。

[0075] 在其它的实施方案中,给予患者GM-CSF拮抗剂,所述患者患有另一种炎症性关节炎,如银屑病关节炎、青少年特发性关节炎或强直性脊柱炎,并且正在用抗叶酸化合物诸如氨甲喋呤治疗。可以使用已知的方法如那些用于评估RA或其它合适疾病的评分标准来评估这类患者对治疗的反应和/或疾病进展。例如,对强直性脊柱炎而言,可以使用强直性脊柱炎反应评价标准(Assessment on Ankylosing Spondylitis Response Criteria,ASAS 20)。(ASAS是AS症状改善的复合测量,包括全背痛、疾病活动的患者评价、炎症和身体功能)。类似地,对于银屑病关节炎的评价,可以使用银屑病关节炎反应标准(PsARC)指数。

[0076] 在本发明另外的实施方案中,患有系统性红斑狼疮的患者也用GM-CSF拮抗剂治疗,所述患者正接受抗叶酸化合物如氨甲喋呤治疗。例如,可以使用建立的标准(例如,Hochberg,Arthritis Rheum 40:1725,1997;Tan,et al.,Arthritis Rheum 25:1271-7,1982)测量对治疗的反应和/或疾病的进展以评估正用本发明的方法治疗的患者的系统性红斑狼疮疾病活动指数(SLEDAI)。

[0077] 在一些实施方案中,患有慢性炎症疾病如类风湿性关节炎、银屑病关节炎、青少年特发性关节炎、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮或诸如阿尔茨海默氏病的神经变性疾病的患者用GM-CSF拮抗剂治疗,没有同时接受抗叶酸治疗。经常给予这类患者的GM-CSF拮抗剂是抗GM-CSF抗体。

[0078] III.GM-CSF拮抗剂

[0079] 如上文所述的,本发明提供了治疗慢性炎症疾病如RA的方法,所述方法通过给予患所述疾病的患者GM-CSF拮抗剂和氨甲喋呤。适于本发明的GM-CSF拮抗剂通过降低GM-CSF与受体的结合选择性地干扰通过GM-CSF受体的信号传导的诱导。这类拮抗剂可以包括结合GM-CSF受体的抗体、结合GM-CSF的抗体以及其它竞争GM-CSF与其受体的结合或抑制信号传导的蛋白或小分子,所述信号传导通常由配体与受体的结合所引发。

[0080] 在许多实施方案中,用于本发明的GM-CSF拮抗剂是蛋白,例如,抗GM-CSF抗体、抗GM-CSF受体抗体、可溶性GM-CSF受体或与GM-CSF竞争结合受体,但是无活性的修饰的GM-CSF多肽。经常利用重组的表达技术制备这类蛋白。此类方法在本领域是公知的。通用的分子生物学方法,包括表达方法可以在例如指导手册,诸如Sambrook and Russell(2001)Molecular Cloning:A laboratory manual(分子克隆:实验室手册)3rd ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press;Current Protocols in Molecular Biology(通用分子生物学方法)(2006)John Wiley and Sons ISBN:0-471-50338-X中找到。

[0081] 可以利用多种基于原核和真核的蛋白表达系统来制备GM-CS拮抗剂蛋白。许多这

类系统可从供应商处广泛得到。这些既包括原核表达系统又包括真核表达系统。

[0082] GM-CSF抗体

[0083] 在一些实施方案中,GM-CSF拮抗剂是结合GM-CSF的抗体或结合GM-CSF受体 α 或 β 亚单位的抗体。这些抗体可以针对GM-CSF(或GM-CSF受体)蛋白或片段产生,或重组制备。用于本发明的GM-CSF抗体可以是结合GM-CSF的中和抗体,也可以是结合GM-CSF的非中和抗体,并增加GM-CSF的体内清除率以使循环中的GM-CSF水平降低。GM-CSF抗体经常是中和抗体。

[0084] 制备多克隆抗体的方法是本领域技术人员已知的(例如,Harlow&Lane, *Antibodies, A Laboratory manual*(抗体,实验室手册)(1988); *Methods in Immunology*(免疫学方法))。可以通过一次或多次注射免疫剂,如果需要,加上佐剂在动物体内产生多克隆抗体。这些免疫剂包括GM-CSF或GM-CSF受体蛋白,例如,人GM-CSF或GM-CSF受体蛋白或其片段。

[0085] 在一些实施方案中,用于本发明的GM-CSF抗体从人血浆中纯化。在这类实施方案中,GM-CSF抗体通常是从存在于人血浆中的其它抗体中分离的多克隆抗体。例如,可以利用已知的技术如亲和层析实施这种分离方法。

[0086] 在一些实施方案中,GM-CSF拮抗剂是单克隆抗体。可以利用杂交瘤方法,诸如被Kohler&Milstein, *Nature* 256:495(1975)描述的那些方法,制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中,小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物,通常被用免疫剂如人GM-CSF免疫,以激发产生或能够产生会特异性与免疫剂结合的抗体的淋巴细胞。可选择地,可以在体外免疫淋巴细胞。免疫剂优选包括人GM-CSF蛋白或其片段或其融合蛋白。

[0087] 可以利用本领域已知的各种方法来制备人单克隆抗体,所述方法包括噬菌体展示库(Hoogenboom&Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381(1991); Marks et al, *J. Mol. Biol.* 222:581(1991))。Cole等和Boerner等的技术也可以用于制备人单克隆抗体(Cole et al, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*(单克隆抗体和癌症治疗), p.77(1985)和Boerner et al, *J. Immunol.* 147(1):86-95(1991))。类似地,可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物如小鼠制备人抗体,所述转基因动物体内的内源性免疫球蛋白基因已经部分或完全失活。受到激发时,观测到人抗体的产生,其在包括基因重排、装配和抗体谱的各方面都与观察到的人体内的人抗体非常相似,在美国第5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016号专利以及在下述科学出版物中都描述了该方法: Marks et al, *Bio/Technology* 10:779-783(1992); Lonberg et al, *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 368:812-13(1994); Fishwild et al, *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); Lonberg&Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995)。

[0088] 在一些实施方案中,抗GM-CSF抗体是嵌合的或人源化的单克隆抗体。如上所述,抗体的人源化形式是嵌合的免疫球蛋白,其中来自人类抗体的互补决定簇(CDR)的残基被来自诸如小鼠、大鼠或兔并具有所需的特异性、亲和力和容量的非人类的CDR的残基所取代。

[0089] 应用于本发明的抗体可以是任何形式。例如,在一些实施方案中,抗体可以是包括恒定区,例如人恒定区的完整抗体,或者可以是完整抗体的片段或衍生物,例如Fd、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv片段或诸如纳米抗体(nanobody)或骆驼科动物抗体的单结构域抗体。另外这类抗体可以通过本领域的技术人员熟知的方法重组设计的。如上所述,可以利

用已知的技术制备这类抗体。

[0090] 在本发明的一些实施方案中,抗体被另外设计以降低免疫原性,例如,使所述抗体适于重复给药。产生具有降低的免疫原性的抗体的方法包括人源化(humanization)/人化(humaneering)方法以及诸如去免疫的修饰技术,其中抗体被进一步设计,例如在一个或多个框架区,以去除T细胞的抗原表位。

[0091] 在一些实施方案中,抗体是人化的(humaneered)抗体。人化的抗体是具有参考抗体的结合特异性的经改造的人抗体,其通过将编码来自参考抗体的重链的CDR3区的结合特异性决定簇(BSD)的DNA序列连接到人VH节段序列以及将编码来自参考抗体的轻链CDR3 BSD的DNA序列连接到人VL节段序列获得。在美国第20050255552专利申请公布和美国第20060134098专利申请公布中提供了人化(humaneering)的方法。

[0092] 抗体可以进一步被去免疫以从抗体的V区去除一个或多个预期的T细胞抗原表位。在例如WO 00/34317中描述了这类方法。

[0093] 在一些实施方案中,可变区包含人V-基因序列。例如,可变区序列可以与人种系V-基因序列有至少80%的同一性,或至少85%的同一性,至少90%的同一性,至少95%的同一性,至少96%的同一性,至少97%的同一性,至少98%的同一性或至少99%的同一性或更高。

[0094] 用于本发明的抗体可以包括人恒定区。轻链的恒定区可以是人 κ 或 λ 恒定区。重链恒定区通常是 γ 链恒定区,例如 γ -1, γ -2, γ -3或 γ -4恒定区。

[0095] 在一些实施方案中,例如,其中抗体是片段,该抗体可以与诸如聚乙二醇(聚乙二醇化)或血清白蛋白的另一分子偶联,例如,以在体内提供延长的半衰期。在Knight et al (2004)Platelets 15:409(关于阿昔单抗);Pedley et al(1994)Br.J.Cancer 70:1126(关于抗-CEA抗体)Chapman et al(1999)Nature Biotech.17:780中提供了抗体片段聚乙二醇化的实例。

[0096] 抗体特异性

[0097] 用于本发明的抗体结合GM-CSF或GM-CSF受体。可以用多种技术来确定抗体结合特异性。参见,例如Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual(抗体,实验室手册)(1988),里面描述了可以用于确定抗体的特异免疫反应性的免疫测定形式和条件。

[0098] 适用于本发明的示例性抗体是c19/2。在一些实施方案中,使用了单克隆抗体,其与c19/2竞争结合相同的抗原表位,或与c19/2结合相同的抗原表位。特定抗体与另一抗体识别相同的抗原表位的能力一般通过第一抗体竞争性抑制第二抗体与抗原结合的能力来确定。可以使用许多竞争性结合测定来测量两抗体对相同抗原的竞争。例如,三明治ELISA测定可以用于这一目的。这通过使用捕获抗体包被孔表面来实施。然后将亚饱和浓度的标记的抗原加到捕获表面。该蛋白会通过特异性抗体:抗原表位相互作用与抗体结合。洗涤后,已经共价连接到可检测的部分(例如,HRP,标记的抗体被定义为检测抗体)的第二抗体添加到ELISA。如果该抗体与捕获抗体识别相同的抗原表位,那么它不能结合到靶蛋白,因为特定的抗原表位已不能用于结合。然而,如果该第二抗体识别靶蛋白上的不同抗原表位,它则能结合到靶蛋白,且这种结合可以通过利用相关的底物量化活性水平(由此量化结合的抗体)来检测。通过使用单一抗体既作为捕获抗体又作为检测抗体来确定背景,而最大信号可以通过用抗原特异性抗体捕获且用结合到抗原上的标记的抗体检测来确立。通过用背

景信号和最大信号作为参照,可以以配对方式评估抗体以确定抗原表位特异性。

[0099] 使用上述测定中的任一种,如果在第一抗体存在下,第二抗体与抗原的结合降低了至少30%,通常至少约40%,50%,60%或75%,且经常降低至少约90%,则第一抗体被认为竞争性抑制第二抗体的结合。

[0100] 抗原表位定位(Epitope Mapping)

[0101] 在本发明的一些实施方案中,使用与已知抗体如c19/2结合相同抗原表位的抗体。定位抗原表位的方法在本领域是熟知的。例如,人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)的功能活性区的定位方法是定位由中和性抗hGM-CSF单克隆抗体识别的抗原表位。例如,已经使用通过对细菌合成的hGM-CSF的酶性消化获得的蛋白水解片段来确认c19/2(其与中和抗体LMM 102具有相同的可变区)结合的抗原表位(Dempsey, et al, Hybridoma 9: 545-558, 1990)。胰蛋白的消化产物的RP-HPLC分级分离(RP-HPLC fractionation)鉴定了含有66个氨基酸(该蛋白的52%)的免疫反应性“胰蛋白酶核心”肽。该“胰蛋白酶核心”用金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)V8蛋白酶的进一步消化产生了独特的免疫反应性hGM-CSF产物,其包含由残基88至121之间的二硫键连接的两个肽:残基86-93和112-127。这些个别的肽不被抗体识别。

[0102] 测定结合亲和力

[0103] 在一些实施方案中,适用于本发明的抗体对人GM-CSF或GM-CSF受体具有高亲和力结合。如果抗体的解离常数(K_D)小于1nM,且优选小于100pM,则抗体和抗原间存在高亲和力结合。可以用多种方法测定抗体对其靶抗原的结合亲和力,诸如表面等离子共振测定、饱和度测定或诸如ELISA或RIA的免疫分析,这些方法为本领域技术人员所熟知。测定结合亲和力的示例性方法是通过使用CM5传感器芯片的BIAcore™ 2000仪器(Biacore AB, Freiburg, Germany)上进行表面等离子共振分析,如Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. Feb; 44(5): 916-25. (Epub 2006 May 11))所描述的。

[0104] 鉴定中和抗体的细胞增殖测定

[0105] 在一些实施方案中,GM-CSF拮抗剂是GM-CSF或它的受体的中和抗体,其以干扰GM-CSF结合的方式结合。可以使用评价GM-CSF功能的许多测定来鉴定中和抗体和其它的GM-CSF拮抗剂。例如,可以便利地使用GM-CSF受体信号传导基于细胞的测定,诸如确定GM-CSF依赖的细胞系在应答有限量的GM-CSF时的增殖率的测定。人TF-1细胞系适合用于这类测定中。参见, Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. 在一些实施方案中,本发明的中和抗体抑制GM-CSF刺激的TF-1细胞增殖至少达50%,当使用的GM-CSF浓度刺激最大90%的TF-1细胞增殖时。在其它的实施方案中,中和抗体抑制GM-CSF刺激的增殖至少达90%。因此,一般而言,用于本发明的中和抗体或其它GM-CSF拮抗剂具有低于10nM的 EC_{50} (例如,表1)。适合鉴定适用于本发明的中和抗体的其它测定为本领域技术人员所熟知。

[0106] 示例性抗体

[0107] 用于本发明的抗体在本领域是已知的,并且能够通过常规的技术制备。描述了示例性抗体。可以理解,示例性抗体可以通过本领域已知的方法设计并概述于本文以通过化学或重组的技术产生抗体片段、嵌合体等。

[0108] 适合用作GM-CSF拮抗剂的示例性嵌合抗体是c19/2。c/19/2抗体结合GM-CSF,单价结合亲和力为约10pM,如表面等离子共振分析所测定的。SEQ ID NOs 1和2显示了c19/2的

重链和轻链可变区序列(例如,W003/068920)。如依照Kabat定义的,其CDRs是:

CDRH1	DYNIH
CDRH2	YIAPYSGGTGYNQEFKN
CDRH3	RDRFPYYFDY
[0109] CDRL1	KASQNVGSNVA
CDRL2	SASYRSG
CDRL3	QQFNRSPLT。

[0110] 也可以使用本领域熟知的其它定义,如Chothia、国际ImMunoGeneTics数据库(EVIGT)和AbM确定CDRs。

[0111] 在一些实施方案中,用于本发明的抗体与c19/2竞争结合到相同的抗原表位,或与c19/2结合到相同的抗原表位。由c19/2识别的GM-CSF抗原表位已经被鉴定为具有由残基88至121间的二硫键连接的两个肽:残基86-93和残基112-127的产物,c19/2抗体抑制GM-CSF依赖的人TF-1白血病细胞系的增殖,EC₅₀为30pM,当细胞用0.5ng/ml GM-CSF刺激时。在一些实施方案中,用于本发明的抗体与c19/2结合相同的抗原表位。

[0112] 此外,用于给药的抗体,诸如c19/2,还可以被人化。例如,c19/2抗体可以进一步被改造为包含人V基因节段。

[0113] 另一个示例性中和抗GM-CSF抗体是Li et al,(2006)PNAS103(10):3557-3562中描述的E10抗体。E10是对GM-CSF具有870pM结合亲和力的IgG类抗体。如ELISA测定中显示的,该抗体特异性结合人GM-CSF,并且如用TF1细胞增殖测定所评估的,该抗体显示了强的中和活性。

[0114] 另外的示例性中和抗GM-CSF抗体是由Krinner et al,(Mol Immunol.44:916-25, 2007;Epub 2006May 112006)描述的MT203抗体。MT203是与GM-CSF有皮摩尔结合亲和力的IgG1类抗体。该抗体显示了有效的抑制活性,如由TF-1细胞增殖测定和它在U937细胞中阻断IL-8产生的能力所评估的。

[0115] 适用于本发明的其它抗体是本领域技术人员已知的。

[0116] 其为抗GM-CSF受体抗体的GM-CSF拮抗剂也可以用于本发明。这类GM-CSF拮抗剂包括针对GM-CSF受体 α 链或 β 链的抗体。用于本发明的抗GM-CSF受体抗体可以是上文所述的任一抗体形式,例如,完整的、嵌合的、单克隆的、多克隆的、抗体片段、人源化的、人化的(humaneered)等等。适用于本发明的抗GM-CSF受体抗体的实例,例如中和性、高亲和力抗体是已知的(参见,例如US Patent 5,747,032和Nicola et al,Blood 82:1724,1993)。

[0117] 非抗体的GM-CSF拮抗剂

[0118] 可以干扰GM-CSF与其受体的有效相互作用的其它蛋白包括突变的GM-CSF蛋白和分泌的蛋白,其包括与GM-CSF结合的GM-CSF受体链的一条或两条的细胞外部分的至少部分,并竞争与细胞表面受体的结合。例如,可以通过将sGM-CSFR α 的编码区与鼠IgG2a的CH2-CH3区融合来制备可溶性GM-CSF受体拮抗剂。Raines et al.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci USA 88:8203描述了示例性可溶性GM-CSF受体。例如,在Brown et al(1995)Blood 85:1488中提供了GM-CSFR α -Fc融合蛋白的实例。在一些实施方案中,这类融合的Fc组分可以被设计

为调节与Fc受体的结合,例如,以增加与Fc受体的结合。

[0119] 其它GM-CSF拮抗剂包括GM-CSF突变体。例如,GM-CSF的21位氨基酸残基突变为精氨酸或赖氨酸(E21R或E221K)的GM-CSF(如Hercus et al.Proc.Natl.Acad.Sci USA 91:5838,1994描述的)已经显示出具有阻止GM-CSF依赖的白血病细胞在小鼠异种移植模型中播散的体内活性(Iversen et al.Blood 90:4910,1997)。正如由本领域技术人员所理解的,这种拮抗剂可以包括具有取代如21位氨基酸的取代的保守性修饰的GM-CSF变异体,或具有,例如氨基酸类似物的GM-CSF变异体以延长半衰期。

[0120] 在其它的实施方案中,GM-CSF拮抗剂是以与抗体相似的方式靶向和结合抗原的“抗体模拟物”。这些“抗体模拟物”的某些利用非免疫球蛋白支架作为抗体可变区的可选择的蛋白框架。例如,Ku等(Proc.Natl.Acad.Sci USA.92(14):6552-6556(1995))公开了基于细胞色素b562的抗体的替代物,其中细胞色素b562的两个环是随机的并基于与牛血清白蛋白的结合被选择。这些个别的突变体被发现选择性与BSA结合,与抗BSA抗体结合类似。

[0121] 美国第6,818,418和7,115,396号专利公开了抗体模拟物,其以纤连蛋白或纤连蛋白样蛋白支架和至少一个可变环为特征。如已知的Adnectins,这些基于纤连蛋白的抗体模拟物表现出天然或设计的抗体的许多相同特征,包括对任一靶配体的高亲和力和特异性。这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构与IgG重链可变区的结构相似。因此,这些模拟物显示了与那些天然抗体本质上相似的抗原结合特性和亲和力。此外,这些基于纤连蛋白的抗体模拟物表现出某些优于抗体和抗体片段的益处。例如,这些抗体模拟物的天然折叠稳定性不依赖于二硫键,并且因此在正常会降解抗体的条件下是稳定的。此外,因为这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构与IgG重链的结构相似,可以在体外应用环随机化和改组(shuffling)的方法,其与体内的抗体亲和力成熟方法相似。

[0122] Beste等(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.96(5):1898-1903(1999))公开了基于脂质运载蛋白支架的抗体模拟物(**Anticalin®**)。脂质运载蛋白包含在蛋白的末端的具有4个高变环的 β -桶(β -barrel)。将这些环进行随机诱变并基于与例如荧光素的结合进行选择。三个变异体表现出与荧光素的特异结合,一个变异体显示了与抗荧光素抗体的结合相似的结合。进一步的分析表明所有的随机的位置都是可变的,指示**Anticalin®**适合用作抗体的替代物。因此,**Anticalins®**是小的单链肽,一般是160至180个残基,其提供了优于抗体的几个优势,包括降低的生产成本、增加的保存稳定性和降低的免疫学反应。

[0123] 美国第5,770,380号专利公开了合成的抗体模拟物,其使用杯芳烃的刚性的非肽有机支架,与作为结合位点的多个可变肽环连接。在几何学上,所述肽环都从杯芳烃的同一侧突出,彼此不相邻。因为这种几何构像,所有环都可以用于结合,增加了对配体的结合亲和力。然而,与其它抗体模拟物比较,基于杯芳烃的抗体模拟物并不是仅由肽组成,因此它较不易受蛋白酶的降解。支架也不是完全由肽、DNA或RNA组成,这意味着该抗体模拟物在极端环境条件下相对稳定,半衰期长。此外,既然基于杯芳烃的抗体模拟物相对较小,它较不可能产生免疫源性应答。

[0124] Murali等(Cell Mol Biol 49(2):209-216(2003))描述了将抗体变为较小的模拟肽(peptidomimetics)的方法,它们称为“抗体样结合模拟肽”(ABiP),其也可以用作抗体的替代物。

[0125] 除了非免疫球蛋白框架外,在包含RNA分子和非天然的低聚物的化合物(例如,蛋

白酶抑制剂、苯二氮平类药物、嘌呤衍生物和β转角模拟物)中也已经模拟了抗体特性。因此,非抗体GM-CSF拮抗剂也可以包括这类化合物。

[0126] III. 治疗性给药

[0127] 本发明的方法通常包括以治疗有效量给予患者作为药物组合物的氨甲喋呤和GM-CSF拮抗剂(例如,抗GM-CSF抗体),所述患者患有慢性炎症疾病,例如RA,所述方法使用适用于治疗所述疾病的给药方案。

[0128] 在本发明的一些实施方案中,患有慢性炎症疾病,例如RA的患者用每周剂量最高为约25mg的氨甲喋呤和GM-CSF拮抗剂,例如GM-CSF特异性抗体治疗,使用的GM-CSF拮抗剂的剂量不诱发临床显著的嗜中性白细胞减少症,并改善了炎症的一个或多个标志物。在一些实施方案中,通过红细胞沉降率(ESR)显著降低到正常范围内的表现来确定患者对治疗的反应。正常的ESR范围是年龄和性别依赖性的。对男性而言,正常的ESR可以根据下式计算: $0.5 \times (\text{年龄})$ 。对女性而言,正常的ESR可以根据下式计算: $0.5 \times (\text{年龄} + 10)$ (Wallach J. Interpretation of Laboratory Tests(实验室检验结果分析),第6版. Little Brown and Company. 1996)

[0129] 可以配制用于多种药物递送系统的组合物。一种或多种生理学上可接受的赋性剂或载体也可以包括在用于适当制剂的组合物中。用于本发明的合适的制剂见于Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿氏药物科学), Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)。对于药物递送方法的简要综述,参见Langer, Science 249:1527-1533(1990)。

[0130] 用于本发明方法中的GM-CSF拮抗剂提供在适于注射入患者的溶液中,诸如注射用无菌等渗水溶液。GM-CSF拮抗剂以合适的浓度溶解或悬浮在可接受的载体中。在一些实施方案中,所述载体是水性的,例如,水、盐水、磷酸缓冲盐等。组合物可以包含接近生理条件所需的辅助性药用物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂等。

[0131] 给予患慢性炎症疾病如RA的患者本发明的药物组合物,所述组合物的量足以治愈或至少部分抑制所述疾病或疾病和其并发症的症状。足以实现这一目的的量定义为“治疗有效剂量”。通过监测患者对治疗的反应确定治疗有效剂量。指示治疗有效剂量的典型的参考标准(benchmarks)在本领域是已知的,其取决于疾病。例如,对于RA,参考标准包括CRP的血浆水平、ESR、新蝶呤的血液或尿液水平、促炎细胞因子的水平(例如, TNF-α, GM-CSF, 白介素-1, 白介素-6以及白介素8和17)或其它药效标志物水平的变化。也可以使用其它评估治疗反应的标准,例如,通过评估关节压痛和肿胀的数目和/或严重度、疼痛程度等。

[0132] 有效的给药的量取决于疾病的严重度和患者一般的健康状态,包括诸如年龄、体重、性别、给药途径等的其它因素。取决于所需的以及患者所耐受的剂量和频率,拮抗剂可以单次给药或多次给药。无论如何,所述方法提供了足够量的GM-CSF拮抗剂与氨甲喋呤联合以有效地治疗患者。

[0133] 在本发明的另一个实施方案中,用于治疗患慢性炎症疾病如RA的患者的抗GM-CSF拮抗剂被提供在与氨甲喋呤和一种或多种另外试剂如非甾体类抗炎药的组合疗法中。因此,患者可以为了治疗他们的疾病接受另外的治疗。这些治疗包括,但不限于羟氯喹啉,柳氮磺胺吡啶,金,米诺环素,来氟米特,皮质类固醇, TNF拮抗剂(例如,依那西普,英利昔单抗或阿达木单抗), IL-1拮抗剂(例如,阿那白滞素)或抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)。患者可

以接受这些另外治疗剂的一种或多种作为伴随疗法。可选择地,患者可以用另外的治疗剂相继治疗。

[0134] 在一些实施方案中,患有慢性炎症疾病如RA的患者用氨甲喋呤以外的抗叶酸化合物治疗,与用GM-CSF拮抗剂的治疗联合。使用适合治疗所述疾病的给药方案,以不诱发临床显著的嗜中性白细胞减少症的量给予抗叶酸化合物和GM-CSF拮抗剂。

[0135] A. 给药

[0136] 本发明提供了通过给予与氨甲喋呤联用的GM-CSF拮抗剂治疗患慢性炎症疾病如RA的方法。在一些实施方案中,经由任一合适的途径包括但不限于静脉内、皮下、肌内或腹腔内途径,通过注射或输注给予GM-CSF拮抗剂。在示例性实施方案中,在给予患者前,将GM-CSF拮抗剂稀释于注射用生理盐水溶液中。例如,通过静脉输注15分钟至2小时给予所述拮抗剂。在一些其它的实施方案中,给药步骤是经由皮下或肌内注射。

[0137] 患者用氨甲喋呤治疗的同时给予GM-CSF拮抗剂。在本发明的上下文中,“正用氨甲喋呤治疗”或“正接受氨甲喋呤治疗”的患者指患者已经被开出氨甲喋呤的处方,因此正在接受或最近已经接受一剂量氨甲喋呤。通常,氨甲喋呤一周服用一次。因此,例如,可以在两次剂量之间的这周内的任一时间段内给予GM-CSF拮抗剂。在一些实施方案中,可以在患者接受了一剂量氨甲喋呤后,但还没有服用下次剂量,例如服用氨甲喋呤末次剂量超过一周时,给予GM-CSF拮抗剂。这类患者仍然被认为正用氨甲喋呤治疗,如果仍然对所述患者开出了氨甲喋呤治疗的处方。

[0138] B. 给药剂量

[0139] 选择GM-CSF拮抗剂的剂量以便为患有慢性炎症疾病的患者提供有效的治疗。剂量一般为约0.1mg/kg体重至约25mg/kg体重,或为每一患者约1mg至约2g。所述剂量经常为约1至约10mg/kg或者是每一患者约50mg至约1000mg。可以以适当的频率重复给药,所述频率可以是一天一次至每三个月一次,这取决于拮抗剂的药动学(如抗体在循环中的半衰期)和药效反应(例如,抗体治疗效应的持续时间)。在一些实施方案中,其中拮抗剂是抗体或修饰的抗体片段,其体内的半衰期是约7至约25天,抗体给药重复为一周一次至每3月一次。在其它实施方案中,约每月一次给予抗体。

[0140] 氨甲喋呤的治疗方案和给药剂量是本领域已知的。例如,象英国风湿病学会指导方针(2000年7月)推荐的治疗RA时的氨甲喋呤给药量,是每周7.5mg氨甲喋呤,每六周增加2.5mg直到25mg的最大周剂量。其它抗叶酸化合物的给药也可以使用熟知的方法确定。

[0141] 在不诱发嗜中性白细胞减少症的范围内给予抗叶酸化合物如氨甲喋呤和GM-CSF拮抗剂。例如,患者接受氨甲喋呤的剂量最高为约25mg/周,GM-CSF拮抗剂为约0.2至约10mg/kg。

实施例

[0142] 实施例1示例性GM-CSF的人化的抗体(humaneered antibodies)

[0143] 如美国专利申请20060134098中所述的,从抗原表位集中的人V-节段库中制备了一组具有c 19/2特异性的人化的Fab'分子。

[0144] 从在2xYT培养基中生长到OD₆₀₀为0.6的大肠杆菌细胞中表达Fab'片段。在33°C下使用IPTG 3小时诱导表达。从周质组分中获得组装的Fab',并依照标准方法,通过使用链球

菌G蛋白的亲层析(HiTrap G蛋白HP柱;GE Healthcare)来纯化Fab'。在pH 2.0的缓冲液中洗脱Fab',随即调整到pH 7.0,并用pH 7.4的PBS透析。

[0145] 通过Biacore 3000表面等离子共振技术(SPR)分析结合动力学。重组的人GM-CSF抗原被生物素化并固定在链霉抗生物素CM5传感器芯片上。将Fab样品稀释到3nM的起始浓度,并做3倍系列稀释。在10mM HEPES、150mM NaCl、0.1mg/mL BSA和0.005%p20中在pH 7.4时于37℃下进行分析。每一浓度测试两次。在提供两组数据的两种抗原密度表面上进行Fab'结合测定。6个人化的抗GM-CSF Fab克隆中的每一个的平均亲和力(K_D)显示于表1中,所述亲和力使用1:1Langmuir结合模型计算。

[0146] 使用TF-1细胞增殖测定检测Fabs对GM-CSF的中和。用0.5ng/ml GM-CSF孵育4天后,使用MTS测定(Cell titer 96, Promega)测量了人TF-1细胞的GM-CSF依赖性增殖,以确定活细胞。在该测定中,所有的Fabs都抑制细胞增殖,指示这些都是中和抗体。抗GM-CSF Fabs的相对亲和力与基于细胞的测定中的 EC_{50} 有良好的相关性。抗GM-CSF抗体的单价亲和力为18pM-104pM,表明该抗体在基于细胞的测定中,有效中和GM-CSF。

[0147] 表1:通过表面等离子共振分析确定的抗GM-CSF Fabs的亲和力,与在GM-CSF依赖性TF-1细胞增殖测定中的活性(EC_{50})的比较

[0148]	Fab	SPR 测定的单价结合 亲和力(pM)	TF-1 细胞增殖测定 中的 EC_{50} (pM)
	94	18	165
	104	19	239
	77	29	404
	92	58	539
	42	104	3200
	44	81	7000

[0149] 实施例2递送抗GM-CSF抗体的示例性临床方案

[0150] 抗GM-CSF抗体于4℃以10mg/ml储存在注射用无菌等渗盐水溶液中,并在给予患者前,稀释于100ml或200ml 0.9%注射用氯化钠中。将抗体以0.2至10mg/kg的剂量通过一个小时的静脉输注给予RA患者。

[0151] 包括在本治疗方案中的患者基于下述标准被选择:患者表现出活动性RA的体征;患者正在接受氨甲喋呤的治疗,其中患者已经接受了至少6周的稳定剂量的DMARDs。此外,包括在本研究中的患者表现出下列症状:肿胀关节计数至少为6个(使用66个关节计数),压痛关节计数至少为6个(使用68个关节计数)。下列标准中的至少两项也要包括在入选标准中:ESR $\geq$ 20mm/hr, CRP $\geq$ 15mg/l,晨僵 $\geq$ 45分钟。

[0152] 患者在第1天通过静脉输注接受如下剂量之一的安慰剂(0.9%注射用氯化钠)或抗GM-CSF抗体:0.2mg/kg, 1.0mg/kg, 5.0mg/kg或10mg/kg。患者被监测29天。所有患者继续接受DMARDs、最高达25mg/周的氨甲喋呤、最高10mg/天的泼尼松龙和NSAIDs作为临床上用于任何其它医学状况的合适的同时用药。在整个研究过程中,进行作为研究安全性评估的下列检测:身体检查、生命体征测量、12导联心电图(ECG)、实验室检验包括血液分析、生化分析和尿分析,以及肺功能测试、尿失禁和不利事件(AEs)的强度。

[0153] 治疗的功效分两个阶段评估。主要评估包括在治疗的第29天或之前的任何时间的

ACR20反应。次级评估包括测量ACR20的时间,以及在第8天、第15天和第29天测量的达到ACR50反应和ACR70反应的患者比例、ESR和CRP。

[0154] 不利事件、严重不利事件和实验室异常情况由治疗组制表,并和从安慰剂组收集的数据作比较。通过利用封闭式检验程序计算意向治疗的ACR 20/50/70反应来分析抗GM-CSF抗体的功效。将收集的活动组与用安慰剂治疗的患者做比较。

[0155] 实施例3用氨甲喋呤和抗GM-CSF抗体治疗患者

[0156] 按照实施例2中所描述的临床方案,用氨甲喋呤和抗GM-CSF抗体治疗患有活动性RA的患者。患者接受0.2mg/kg的抗GM-CSF抗体。患者同时还接受25mg/week的氨甲喋呤的治疗。

[0157] 通过标准方法测定血细胞计数,还包括血红蛋白(HGB)、白细胞总数(WBCC)、血小板(PLT)、嗜中性粒细胞(Neut;也称为嗜中性粒细胞绝对数ANC)、淋巴细胞(LYMPH)、单核细胞(MONO)、嗜酸性粒细胞(EOSIN)、嗜碱性粒细胞(BASO)、血细胞比容(HCT)数值的测定。此外,也测定了红细胞沉降率(ESR)和C反应蛋白(CRP)。治疗前、治疗中以及直到治疗后2周的血细胞计数、ESR和CRP显示在表2中。如所看到的,2周后,ESR从不正常值40降到18,对于与被治疗的患者同性别、同年龄的个体来说18在正常范围内,而嗜中性粒细胞计数没有发生变化。因此,包含氨甲喋呤治疗和抗GM-CSF拮抗剂(在本实施例中为抗GM-CSF抗体)治疗的联合治疗为治疗风湿性关节炎提供了治疗益处。

[0158] 表2中的“1”天表示给予抗GM-CSF拮抗剂的时间。患者先前已经用氨甲喋呤治疗并继续接受氨甲喋呤治疗和抗GM-CSF拮抗剂治疗。

[0159] 表2.来自用周剂量的氨甲喋呤治疗并在第1天被给予单次剂量的抗GM-CSF抗体的患者的血细胞计数和ESR。各类细胞的数值(血小板,嗜中性粒细胞,淋巴细胞等)均乘以 $10^9/L$ 。ESR用mm/hr表示。

[0160]

治疗后的天数	HGB	WBCC	PLT	NEUT	LYMPH	HCT	MONO	EOSIN	BASE	ESR
-2	133	5.0	202	3.04	1.26	0.4	0.52	0.16	0.02	40
1	127	4.4	208	2.64	1.23	0.38	0.36	0.15	0.03	
8	129	5.4	189	3.01	1.41	0.39	0.76	0.17	0.04	23
15	131	4.8	193	2.76	1.39	0.39	0.46	0.15	0.04	18
28	130	5.0	180	2.79	1.71	0.4	0.25	0.21	0.04	20

[0161] 提供的上述实施例仅用于说明,而非限制。本领域的技术人员可以很容易地认识到多种非关键参数可以被改变或修饰,以产生本质上相似的结果。

[0162] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请、登录号和其他参考文献都通过引用的方式并入本文。如同每个单独的出版物或专利申请被特别单独地指明通过引用的方式并入本文。

[0163] 示例性序列

[0164] SEQ ID NO 1:鼠19/2重链可变区的氨基酸序列

[0165]

Met Glu Leu Ile Met Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val His
Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp
Ile Gly Tyr Ile Ala Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Glu
Phe Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
Cys Ala Arg Arg Asp Arg Phe Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
Thr Thr Leu Arg Val Ser Ser Val Ser Gly Ser

[0166] SEQ ID NO 2:鼠19/2轻链可变区的氨基酸序列

[0167]

Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Ile Gln Ser Gln
Lys Phe Val Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys
Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser Asn Val Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro
Gly Gln Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Ser Gly
Arg Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ile
Leu Thr Ile Thr Thr Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
Gln Gln Phe Asn Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
Ser Ser Lys Gly Glu Phe