



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102215868 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 13

(21) 申请号 200980145206. 0
(22) 申请日 2009. 09. 16
(30) 优先权数据
61/097, 464 2008. 09. 16 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2011. 05. 13
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/057151 2009. 09. 16
(87) PCT国际申请的公布数据
W02010/033587 EN 2010. 03. 25
(73) 专利权人 弗·哈夫曼－拉罗切有限公司
地址 瑞士巴塞尔
(72) 发明人 C·史密斯 P·S·金
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 黄革生 林柏楠

Stephen L. Hauser, et al..B-Cell
Depletion with Rituximab in Relapsing -
Remitting Multiple Sclerosis. 《The new
England journal of medicine》.2008, 第 358 卷
(第 7 期), 676-688.
Nancy L. Monson, et al..Effect of
Rituximab on the Peripheral Blood and
Cerebrospinal Fluid B Cells in Patients
With Primary Progressive Multiple
Sclerosis. 《ARCH NEUROL》.2005, 第 62 卷
258-264.

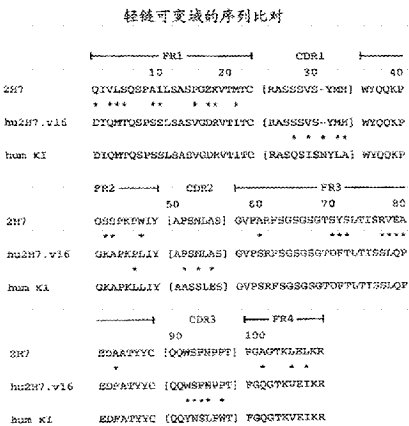
审查员 郑茹

(51) Int. Cl.
A61K 39/395(2006. 01)
C07K 16/28(2006. 01)
A61P 25/00(2006. 01)
(56) 对比文件
WO 2005/117978 A2, 2005. 12. 15, 全文.

权利要求书2页 说明书70页
序列表24页 附图17页

(54) 发明名称
用于治疗进行性多发性硬化的方法
(57) 摘要

本发明涉及用于治疗患者中的进行性多发性硬化 (MS) 的方法,以及附有所述应用之说明书的产品。



1. 抗 CD20 抗体在制备治疗患者中的进行性多发性硬化的药物中的用途,其中所述治疗基于年龄小于 55 岁且具有一种或多种选自下组的特征的患有进行性多发性硬化的患者:(a) 一个或多个钆染色损伤,(b) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少 1 分,其中所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述治疗基于患有进行性多发性硬化的患者,所述患者还具有特征 (c):多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于 5 分。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述治疗基于具有下述特征的患有进行性多发性硬化的患者:(a) 年龄小于 55 岁,(b) 一个或多个钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于 5 分。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。

6. 权利要求 1 的用途,其中所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。

7. 权利要求 1 的用途,其中当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

8. 权利要求 1 的用途,其中所述患者在样品中还具有炎症迹象。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述样品是脑脊髓液样品。

10. 权利要求 8 或 9 的用途,其中炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。

11. 权利要求 8 或 9 的用途,其中炎症迹象由通过等电聚焦检测的 IgG 寡克隆带指示。

12. 权利要求 1 的用途,其中所述患者不到 15 年已经具有大于 5.0 的 EDSS。

13. 权利要求 12 的用途,其中所述患者不到 10 年已经具有大于 5.0 的 EDSS。

14. 权利要求 1 的用途,其中所述患者不到 10 年已经具有小于或等于 5.0 的 EDSS。

15. 权利要求 1 的用途,其中所述在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。

16. 权利要求 1 的用途,其中 EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少 1.5 分。

17. 权利要求 1 的用途,其中所述患者的年龄小于 51 岁。

18. 权利要求 1 的用途,其中所述患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。

19. 权利要求 1 的用途,其中当开始治疗时 EDSS 为 3.0 至 6.5。

20. 权利要求 1 的用途,其中治疗减慢达确认的疾病进展的时间。

21. 权利要求 20 的用途,其中确认的疾病进展是持续 12 周的 EDSS 增加。

22. 权利要求 21 的用途,其中确认的疾病进展是持续 24 周的 EDSS 增加。

23. 权利要求 1 的用途,其中对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体,以提供 0.3 至 4.0 克的初次抗 CD20 抗体暴露,随后是 0.3 至 4.0 克的第二次抗 CD20 抗体暴露。

24. 权利要求 23 的用途,其中所述初次抗 CD20 抗体暴露和 / 或所述第二次抗 CD20 抗体暴露是 0.3 至 1.5 克。

25. 权利要求 24 的用途,其中所述第二次暴露直到距初次暴露 16 至 60 周时才提供。

26. 权利要求 25 的用途,其中每次抗 CD20 抗体暴露是作为一剂或两剂抗 CD20 抗体提供给患者的。

27. 权利要求 1 的用途,其中向所述患者施用有效量的 ocrelizumab 以提供 0.3 克至 0.6 克的初次 ocrelizumab 暴露,随后是 0.3 克至 0.6 克的二次 ocrelizumab 暴露,其中所

述二次暴露是直到距初次暴露 16 至 60 周时才提供的,并且每次 ocrelizumab 暴露是以一剂或两剂 ocrelizumab 的形式提供给患者的。。

28. 权利要求 27 的用途,其中所述初次 ocrelizumab 暴露包括第一剂量和第二剂量的 ocrelizumab,其中所述 ocrelizumab 的第一剂量和第二剂量是 0.3 克。

29. 权利要求 27 的用途,其中所述二次 ocrelizumab 暴露包括单剂 ocrelizumab,其中所述单剂 ocrelizumab 是 0.6 克。

30. 权利要求 27 的用途,其中二次 ocrelizumab 暴露在初次 ocrelizumab 暴露后 24 周提供。

31. 权利要求 30 的用途,其中还包括提供第三次 ocrelizumab 暴露。

32. 权利要求 31 的用途,其中还包括提供第四次 ocrelizumab 暴露。

33. 权利要求 32 的用途,其中还包括提供第五次 ocrelizumab 暴露。

34. 权利要求 30 的用途,其中还包括提供一次至三次后续的 ocrelizumab 暴露。

用于治疗进行性多发性硬化的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2008 年 9 月 16 日递交的美国临时申请序列号 61/097,464 的优先权利益,其全部内容由此通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于治疗患者中的进行性多发性硬化 (MS) 的方法,以及附有所述应用之说明书的产品。

背景技术

[0004] 多发性硬化

[0005] 多发性硬化 (MS) 是人中枢神经系统 (CNS) 的炎性脱髓鞘性变性疾病。它是一种世界范围的疾病,在美国影响约 300,000 名患者;它是年轻成人的疾病,70% -80% 在 20 至 40 岁之间发病 (Anderson 等人, Ann Neurology 31 (3) :333-6 (1992) ;Noonan 等人, Neurology 58 :136-8 (2002))。基于临床病程、磁共振成像 (MRI) 扫描评估以及活检和尸检材料的病理学分析,MS 是一种异质性病变 (Lucchinetti 等人, Ann Neurol 47 :707-17 (2000))。该疾病自身表现为众多可能的缺陷组合,包括脊髓、脑干、颅神经、小脑、大脑和认知综合征。进行性残疾是大多数 MS 患者的命运,尤其是在包括 25 年的预后时。一半 MS 患者在发病后的 15 年内行走需要拐杖。MS 是年轻和中年成人中神经性残疾的主要原因,直至过去十年,仍未有已知的有效治疗方法。由于临床表现的非特异性,MS 难以诊断,这导致开发了高度结构化诊断标准,包括数种技术进步——MRI 扫描、诱发电位和脑脊液 (CSF) 研究。所有诊断标准依赖于分散性损伤在中心白质内在不同时间出现的一般原则,而不是从例如感染、血管疾患或自身免疫性疾患等其它病因学来解释 (McDonald 等人, Ann. Neurol. 50 :121-7 (2001))。MS 有四种疾病样式:复发缓和型 MS (RRMS;发病案例的 80% -85%)、原发进行性 MS (PPMS;发病案例的 10% -15%)、进行性复发型 MS (PRMS;发病案例的 5%) ;以及继发进行性 MS (SPMS) (Kremenutzky 等人, 脑 122 (Pt10) :1941-50 (1999) ;Confavreux 等人, N Engl J Med 343 (20) :1430-8 (2000))。估计 50% 的 RRMS 患者将在 10 年内发展成 SPMS,而高达 90% 的 RRMS 患者最终将发展成 SPMS (Weinshenker 等人, 脑 112 (Pt1) :133-46 (1989))。

[0006] 目前,四类六种药物在美国批准用于治疗 RRMS,而没有药物批准用于 PPMS。RRMS 治疗包括以下药物:干扰素类, IFN- β -1a (**REBIF®** 和 **AVONEX®**) 和 IFN- β -1b (**BETASERON®**);醋酸格拉默 (Glatiramer acetate) (**COPAXONE®**),一种多肽;那他珠单抗 (**TYSABRI®**);以及米托蒽醌 (**NOVANTRONE®**),一种细胞毒性剂。其它药物也已有不同程度的成功应用,包括皮质类固醇、甲氨喋呤、环磷酰胺、硫唑嘌呤和静脉内 (IV) 免疫球蛋白。正如两个统合分析 (meta-analyses) 所显示的,目前已批准的治疗方法对于 RRMS 的复发率以及防止致残的益处是相对有限的 (约 30%) (Filippini 等人, Lancet 361 :545-52 (2003))。

[0007] 其它临床研究评价了 MS 中的其它免疫调节剂,包括肿瘤坏死因子- α 抑制剂

和改变的肽配体,它们使 MS 加重而不是改善 (Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Neurology 53:457-65(1999); Bielekova 等人, Nat Med 2000;6:1167-75(2000), 勘误见 Nat Med 6:1412(2000))。

[0008] MS 病理生理学的主流观点认为炎症主要是由 CD4⁺Th 1T 细胞介导的。基于此理论的治疗方法,例如 IFN- β 和醋酸格拉默降低但未完全阻止恶化的发生或伤残的累积。

[0009] 正如在 MS 诊断标准中包括 CSF 寡克隆带 (CSF oligoclonal bands) 以及鞘内 IgG 合成增加所反映出的,人 MS 中体液组分的存在已未言明地被公认了数十年 (Siden A. J Neurol 221:39-51(1979); McDonald 等人, Ann Neurol 50:121-7(2001); Andersson 等人, Eur J Neurol 9:243-51(2002); O' Connor, P. Neurology 59:S1-33(2002))。寡克隆带的存在、游离轻链的增加以及鞘内 IgM 合成的增加与 MS 疾病活动相关,并且可以作为更严重后果的预示 (Rudick 等人, Mult Scler 1:150-5(1995); Zeman 等人, Acta Cytol 45:51-9(2001); Izquierdo 等人, Acta Neurol Scand 105:158-63(2002); Wolinsky J. J Neurol Sci 206:145-52(2003); Villar 等人, Ann Neurol 53:222-6(2003))。

[0010] 已在进行性和复发型 MS 患者的血清中检测到抗髓鞘抗体 (髓鞘碱性蛋白 (MBP) 和髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) (Reindl 等人, 脑 122:2047-56(1999); Egg 等人, Mult Scler 7(5):285-9(2001))。在 MS 患者的 CSF 中也检测到抗髓鞘抗体 (Reindl 等人, Brain 122:2047-56(1999); Egg 等人, Mult Scler 7(5):285-9(2001); Andersson 等人, Eur J Neurol 9:243-51(2002))。在 MS 患者中还观察到别的抗体类型,例如抗神经节苷脂抗体或抗神经丝抗体 (Mata 等人, Mult Scler 5:379-88(1999); Sadatipour 等人, Ann Neurol 44:980-3(1998))。一份报告表明,血清抗 MOG 和抗 MBP 抗体的存在是从临床上孤立的脱髓鞘事件进展到明确的 RRMS 的强预示信号 (Berger 等人, N Engl J Med 349:139-45(2003))。对于病情恶化的发生,校准后的危险比对于两种抗体都呈血清阳性的患者而言是 76.5,而对于只是抗 MOG 抗体血清阳性的患者而言是 31.6。

[0011] 国际病理学协会发现结合髓鞘的抗体存在于大多数 MS 患者中,此外在 MS 损伤中还发现了浆细胞和 B 细胞,这为体液在 MS 中的作用提供了另外的证据 (Prineas 和 Wright, Lab Invest 38:409-21(1978); Esiri M. Neuropathol Appl Neurobiol 6:9-21(1980); Genain 等人, Nat Med 5:170-5(1999); Lucchinetti 等人, Ann Neurol 47:707-17(2000); Wingerchuk 等人, Lab Invest 81:263-81(2001))。B 细胞在 MS 患者的 CSF 中也是可检测到的,而存在相对高比例的 B 细胞可能预示着更严重的致残进程 (Cepok 等人, 脑 124(Pt 11):2169-76(2001))。

[0012] 在患 RRMS 或斜视眼阵挛-肌阵挛综合征的受试者中,据报道利妥昔单抗耗竭所有受试者中的外周 B 细胞,并降低了有些患者中的 CSF B 细胞数目 (Pranzatelli 等人, Neurology 60(Suppl 1)P05.128:A395(2003); Cross 等人, "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS" (摘要) Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis ACTRIMS 20-1(October, 2003); Cross 等人, J. Neuroimmunol. 180:63-70(2006))。还参见 Cree 等人, "Tolerability and Effects of Rituximab "Anti-CD20 Antibody" in Neuromyelitis Optica and Rapidly Worsening Multiple Sclerosis" Meeting of the Am. Acad. Neurol. (2004 年 4 月); Cree 等人, Neurology 64:1270-2(2005)。

[0013] CD20 抗体及使用它的疗法

[0014] 淋巴细胞是在造血过程中在骨髓中生成的多种白细胞类型之一。有两种主要的淋巴细胞群：B 淋巴细胞（B 细胞）和 T 淋巴细胞（T 细胞）。在此特别有意义的淋巴细胞是 B 细胞。

[0015] B 细胞在骨髓中成熟，然后离开骨髓并在它们的细胞表面表达抗原结合抗体。当幼稚 B 细胞初次遇到其膜结合抗体所特异的抗原时，细胞开始快速分裂，且其后代分化成为记忆 B 细胞和称做“浆细胞”的效应细胞。记忆 B 细胞具有较长的寿命，并继续表达与最初的亲本细胞具有相同特异性的膜结合抗体。浆细胞不生成膜结合抗体，但改为生成可分泌形式的抗体。分泌型抗体是体液免疫的主要效应分子。

[0016] CD20 抗原（也称作人 B 淋巴细胞限制性分化抗原，Bp35）是位于前 B(pre-B) 淋巴细胞和成熟 B 淋巴细胞上、分子量约 35kD 的疏水性跨膜蛋白质 (Valentine 等人, J. Biol. Chem. 264(19) :11282-11287(1989) ;和 Einfeld 等人, EMBO J. 7(3) :711-717(1988))。该抗原也在超过 90% 的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 上表达 (Anderson 等人, Blood 63(6) :1424-1433(1984))，但在造血干细胞、祖 B 细胞 (pro-B)、正常浆细胞或其它正常组织上没有发现 (Tedder 等人, J. Immunol. 135(2) :973-979(1985))。CD20 调节细胞周期起始和分化的激活过程的早期步骤 (Tedder 等人, 见上文)，并可能作为钙离子通道起作用 (Tedder 等人, J. Cell. Biochem. 14D :195(1990))。

[0017] 鉴于 CD20 在 B 细胞淋巴瘤中表达，该抗原可能用做“靶向”此类淋巴瘤的候选者。基本上，这种靶向作用可概括如下：对患者施用对 B 细胞 CD20 表面抗原特异的抗体。这些抗 CD20 抗体特异性结合（表面上地）正常和恶性 B 细胞的 CD20 抗原；与 CD20 表面抗原结合的抗体可导致增生性 B 细胞的破坏和耗竭。此外，可将具有破坏肿瘤潜力的化学试剂或放射性标记物与抗 CD20 抗体偶联，使得该试剂特异性“投递”至增生性 B 细胞。无论何种方法，首要目标是破坏肿瘤；具体方法可根据所使用的具体抗 CD20 抗体来决定，因此可利用的靶向 CD20 抗原的方法可能变化相当大。

[0018] 利妥昔单抗 (rituximab) (**RITUXAN®**) 抗体是针对 CD20 抗原的基因工程嵌合鼠/人单克隆抗体。利妥昔单抗是 1998 年 4 月 7 日发布的美国专利号 5,736,137 (Anderson 等人) 中称为“C2B8”的抗体。**RITUXAN®** 的适应症为用于治疗患有复发的或顽固的低级或滤泡性 CD20 阳性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤的患者。作用机制的体外研究表明 **RITUXAN®** 结合人补体并通过补体依赖性细胞毒性 (CDC) 溶解淋巴样 B 细胞系 (Reff 等人, Blood 83(2) :435-445(1994))。此外，它在抗体依赖性细胞性细胞毒性 (ADCC) 测定试验中具有显著活性。最近，**RITUXAN®** 在氚标记的胸苷掺入试验中显示出具有抗增殖效果，并直接诱导凋亡，而其它抗 CD 19 和 CD20 抗体则不然 (Maloney 等人, Blood 88(10) :637a(1996))。在试验中还观察到 **RITUXAN®** 与化学疗法和毒素之间的协同作用。具体而言，**RITUXAN®** 使耐药性人 B 细胞淋巴瘤细胞系对多柔比星、CDDP、VP-16、白喉毒素和蓖麻毒蛋白的细胞毒性作用敏感 (Demidem 等人, Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3) :177-186(1997))。体内临床前研究显示 **RITUXAN®** 可能通过补体和细胞介导的过程而从食蟹猴的外周血、淋巴结和骨髓中耗竭 B 细胞 (Reff 等人, Blood 83(2) :435-445(1994))。

[0019] 美国在 1997 年 11 月批准将利妥昔单抗用于治疗患有复发的或顽固的低级或滤泡

性 CD20⁺B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 的患者,每周一剂 375mg/m²,共四剂。2001 年 4 月,食品和药品管理局 (FDA) 批准了用于治疗低级 NHL 的额外申请:复治(每周一次,共四剂)和额外的给药方案(每周一次,共八剂)。已经有超过 300,000 名患者接受过利妥昔单抗(或是作为单一疗法或是联合免疫抑制剂或化疗药物)。还已经用利妥昔单抗作为维持疗法治疗患者长达 2 年(Hainsworth 等人, J Clin Oncol 21:1746-51(2003);Hainsworth 等人, J Clin Oncol 20:4261-7(2002))。

[0020] 也已在 B 细胞和自身抗体表现出在疾病病理生理学中发挥作用的多种非恶性自身免疫性紊乱中研究了利妥昔单抗(Edwards 等人, Biochem Soc Trans 30:824-8(2002))。已有报导,利妥昔单抗潜在减轻类风湿性关节炎(RA)(Leandro 等人, Ann Rheum Dis. 61:883-8(2002);Emery 等人, Arthritis Rheum 48(9):S439(2003))、狼疮(Eisenberg R. Arthritis Res Ther 5:157-9(2003);Leandro 等人, Arthritis Rheum 46:2673-7(2002))、免疫性血小板减少症(D' Arena 等人, Leuk Lymphoma 44:561-2(2003))、自身免疫性贫血(Zaja 等人, Haematologica 87:189-95(2002)(勘误见 Haematologica 87:336(2002))、自身免疫性神经病(Pestronk 等人, J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:485-9(2003))、副肿瘤性斜视眼阵挛-肌阵挛综合征(Pranzatelli 等人, Neurology 60(Suppl1)P05.128:A395(2003))和复发缓和型多发性硬化(RRMS)(Cross 等人(摘要)Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis 20-1(2003))的症候和症状。

[0021] 已在类风湿性关节炎(RA)患者中进行了 II 期研究(WA16291),提供了有关利妥昔单抗的安全性和功效的 48 周随访数据(Emery 等人, Arthritis Rheum 48(9):S439(2003);Szczepanski 等人, Arthritis Rheum 48(9):S121(2003))。将总共 161 名患者随机平分为四个治疗组:甲氨蝶呤(methotrexate)、仅利妥昔单抗、利妥昔单抗+甲氨蝶呤、利妥昔单抗+环磷酰胺(CTX)。利妥昔单抗的治疗方案为第 1 天和第 15 天静脉内施用 1 克。大多数 RA 患者对输注利妥昔单抗有很好的耐受,而 36% 的患者在其首次输注期间出现至少一种不良事件(与 30% 接受安慰剂的患者相比)。总而言之,认为大多数不良事件在严重程度上是温和至中度的,而且在所有处理组之间很平衡。在 48 周中这四种治疗共有 19 件严重的不良事件,其中利妥昔单抗/CTX 组稍多一些。感染发生率在所有组之间很平衡。该 RA 患者群体中严重感染的平均比率为每 100 患者-年 4.66,低于基于社区的流行病学研究中所报告的 RA 患者中需要住院治疗的感染比率(每 100 患者-年 9.57)(Doran 等人, Arthritis Rheum 46:2287-93(2002))。

[0022] 报导了利妥昔单抗在少数神经学紊乱患者中的安全性,包括自身免疫性神经病(Pestronk 等人, J Neurol Neurosurg Psychiatry 74:485-9(2003))、斜视性眼阵挛/肌阵挛综合征(Pranzatelli 等人, Neurology 60(Suppl1)P05.128:A395(2003))和 RRMS(Cross 等人, Preliminary results from a phase II trial of rituximab in MS(摘要)Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis 20-1(2003))。正在 RRMS 受试者中进行的利妥昔单抗联合干扰素- β (IFN- β) 或醋酸格拉默的研究者发起试验(IST)(Cross 等人, 见上文)中,接受治疗的 10 名受试者中有 1 个在首次输注利妥昔单抗后发生中度发烧和打寒战,之后入院过夜观察,而其他 9 名受试者完成了四次输注方案,没有报告任何不良事件。

[0023] 涉及 CD20 抗体、CD20- 结合分子和自身抗原疫苗的专利和专利出版物包括 US 5, 776, 456、5, 736, 137、5, 843, 439、6, 399, 061 和 6, 682, 734, 以及 US 2002/0197255、US 2003/0021781、US 2003/0082172、US2003/0095963、US2003/0147885、US2005/0186205 和 WO 1994/11026(Anderson 等人); U. S. 6, 455, 043、US2003/0026804、US2003/0206903 和 WO2000/09160(Grillo-Lopez, A.); WO 2000/27428(Grillo-Lopez 和 White); US 2004/0213784 和 WO 2000/27433(Grillo-Lopez 和 Leonard); WO2000/44788(Braslawsky 等人); WO 2001/10462(Rastetter, W.); WO2001/10461(Rastetter 和 White); WO 2001/10460(White 和 Grillo-Lopez); US 2001/0018041、US2003/0180292、US2002/0028178、WO 2001/34194 和 WO 2002/22212(Hanna 和 Hariharan); US 2002/0006404 和 WO2002/04021(Hanna 和 Hariharan); US 2002/0012665、US2005/0180975、WO 2001/74388 和 U. S. 6, 896, 885(Hanna, N.); US 2002/0058029(Hanna, N.); US 2003/0103971(Hariharan 和 Hanna); US 2005/0123540(Hanna 等人); US 2002/0009444 和 WO 2001/80884(Grillo-Lopez, A.); WO2001/97858; US 2005/0112060、US2002/0039557 和 U. S. 6, 846, 476(White, C.); US 2002/0128448 和 WO 2002/34790(Reff, M.); WO2002/060955(Braslawsky 等人); WO 2002/096948(Braslawsky 等人); WO2002/079255(Reff 和 Davies); U. S. 6, 171, 586 和 6, 991, 790 和 WO1998/56418(Lam 等人); US 2004/0191256 和 WO 1998/58964(Raju, S.); WO 1999/22764(Raju, S.); WO 1999/51642、U. S. 6, 194, 551、U. S. 6, 242, 195、6, 528, 624 和 6, 538, 124(Idusogie 等人); U. S. 7, 122, 637、US2005/0118174、US2005/0233382、US2006/0194291、US2006/0194290、US2006/0194957 和 WO 2000/42072(Presta, L.); WO 2000/67796(Curd 等人); WO2001/03734(Grillo-Lopez 等人); US 2002/0004587、US2006/0025576 和 WO2001/77342(Miller 和 Presta); US 2002/0197256 和 WO2002/078766(Grewal, I.); US 2003/0157108 和 WO 2003/035835(Presta, L.); U. S. 5, 648, 267、5, 733, 779、6, 017, 733 和 6, 159, 730, 以及 WO1994/11523(Reff 等人, 关于表达技术); U. S. 6, 565, 827、6, 090, 365、6, 287, 537、6, 015, 542、5, 843, 398 和 5, 595, 721(Kaminski 等人); U. S. 5, 500, 362、5, 677, 180、5, 721, 108、6, 120, 767、6, 652, 852 和 6, 893, 625 以及 WO1988/04936(Robinson 等人); U. S. 6, 410, 391(Zelsacher); U. S. 6, 224, 866 和 WO 2000/20864(Barbera-Guillem, E.); WO 2001/13945(Barbera-Guillem, E.); WO 2000/67795(Goldenberg); U. S. 7, 074, 403(Goldenberg 和 Hansen); U. S. 7, 151, 164(Hansen 等人); US 2003/0133930; WO 2000/74718 和 US2005/0191300A1(Goldenberg 和 Hansen); US 2003/0219433 和 WO2003/68821(Hansen 等人); WO 2004/058298(Goldenberg 和 Hansen); WO2000/76542(Golay 等人); WO 2001/72333(Wolin 和 Rosenblatt); U. S. 6, 368, 596(Ghetie 等人); U. S. 6, 306, 393 和 US 2002/0041847(Goldenberg, D.); US 2003/0026801(Weiner 和 Hartmann); WO 2002/102312(Engleman, E.); US 2003/0068664(Albitar 等人); WO 2003/002607(Leung, S.); WO2003/049694、US2002/0009427 和 US 2003/0185796(Wolin 等人); WO2003/061694(Sing 和 Siegall); US 2003/0219818(Bohen 等人); US2003/0219433 和 WO 2003/068821(Hansen 等人); US 2003/0219818(Bohen 等人); US 2002/0136719(Shenoy 等人); WO 2004/032828 和 US2005/0180972(Wahl 等人); 和 WO 2002/56910(Hayden-Ledbetter)。还可

参见 U. S. 5, 849, 898 和 EP 330, 191 (Seed 等人); EP332, 865A2 (Meyer 和 Weiss); U. S. 4, 861, 579 (Meyer 等人); US 2001/0056066 (Bugelski 等人); WO 1995/03770 (Bhat 等人); US 2003/0219433A1 (Hansen 等人); WO2004/035607 和 US 2004/167319 (Teeling 等人); WO 2005/103081 (Teeling 等人); US 2006/0034835、US2006/0024300 和 WO 2004/056312 (Lowman 等人); US 2004/0093621 (Shitara 等人); WO 2004/103404 (Watkins 等人); WO 2005/000901 (Tedder 等人); US 2005/0025764 (Watkins 等人); US2006/0251652 (Watkins 等人); WO 2005/016969 (Carr 等人); US2005/0069545 (Carr 等人); WO 2005/014618 (Chang 等人); US2005/0079174 (Barbera-Guillem 和 Nelson); US 2005/0106108 (Leung 和 Hansen); US 2005/0123546 (Umana 等人); US 2004/0072290 (Umana 等人); US 2003/0175884 (Umana 等人); 和 WO 2005/044859 (Umana 等人); WO2005/070963 (Allan 等人); US 2005/0186216 (Ledbetter 和 Hayden-Ledbetter); US 2005/0202534 (Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter); US 2005/136049 (Ledbetter 等人); US 2003/118592 (Ledbetter 等人); US2003/133939 (Ledbetter 和 Hayden-Ledbetter); US 2005/0202012 (Ledbetter 和 Hayden-Ledbetter); US 2005/0175614 (Ledbetter 和 Hayden-Ledbetter); US 2005/0180970 (Ledbetter 和 Hayden-Ledbetter); US2005/0202028 (Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter); US2005/0202023 (Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter); WO2005/017148 (Ledbetter 等人); WO 2005/037989 (Ledbetter 等人); U. S. 6, 183, 744 (Goldenberg); U. S. 6, 897, 044 (Braslawski 等人); WO2006/005477 (Krause 等人); US 2006/0029543 (Krause 等人); US2006/0018900 (McCormick 等人); US 2006/0051349 (Goldenberg 和 Hansen); WO 2006/042240 (Iyer 和 Dunussi-Joannopoulos); US2006/0121032 (Dahiyat 等人); WO 2006/064121 (Teillaud 等人); US2006/0153838 (Watkins)、CN 1718587 (Chen 等人); WO 2006/084264 (Adams 等人); US 2006/0188495 (Barron 等人); US 2004/0202658 和 WO2004/091657 (Benynes, K.); US 2005/0095243、US2005/0163775、WO2005/00351 和 WO 2006/068867 (Chan, A.); US 2006/0135430 和 WO2005/005462 (Chan 等人); US 2005/0032130 和 WO 2005/017529 (Beresini 等人); US 2005/0053602 和 WO 2005/023302 (Brunetta, P.); US2006/0179501 和 WO 2004/060052 (Chan 等人); WO 2004/060053 (Chan 等人); US 2005/0186206 和 WO 2005/060999 (Brunetta, P.); US 2005/0191297 和 WO 2005/061542 (Brunetta, P.); US 2006/0002930 和 WO2005/115453 (Brunetta 等人); US 2006/0099662 和 WO2005/108989 (Chuntharapai 等人); CN 1420129A (Zhongxin Guojian Pharmaceutical); US 2005/0276803 和 WO 2005/113003 (Chan 等人); US2005/0271658 和 WO 2005/117972 (Brunetta 等人); US 2005/0255527 和 WO 2005/11428 (Yang, J.); US 2006/0024295 和 WO 2005/120437 (Brunetta, P.); US 2006/0051345 和 WO 2005/117978 (Frohna, P.); US 2006/0062787 和 WO 2006/012508 (Hitraya, E.); US 2006/0067930 和 WO2006/31370 (Lowman 等人); WO 2006/29224 (Ashkenazi, A.); US2006/0110387 和 WO 2006/41680 (Brunetta, P.); US 2006/0134111 和 WO2006/066086 (Agarwal, S.); WO 2006/069403 (Ernst 和 Yansura); US2006/0188495 和 WO 2006/076651 (Dummer, W.); WO2006/084264 (Lowman, H.); WO 2006/093923 (Quan 和 Sewell); WO2006/106959 (Numazaki 等人); WO 2006/126069 (Morawala);

W02006/130458 (Gazit-Bornstein 等 人) ;US 2006/0275284 (Hanna, G.) ;US2007/0014785 (Golay 等 人) ;US 2007/0014720 (Gazit-Bornstein 等 人) ; 和 US 2007/0020259 (Hansen 等 人) ;US 2007/0020265 (Goldenberg 和 Hansen) ;US 2007/0014797 (Hitraya) ;US 2007/0224189 (Lazar 等 人) ;W02007/014238 (Bruge 和 Bruger) ;和 W0 2008/003319 (Parren 和 Baadsgaard)。其中某些尤其包括多发性硬化的治疗。

[0024] 涉及使用利妥昔单抗的疗法的出版物包括 :Perotta 和 Abuel “Response of chronic relapsing ITP of 10years duration to Rituximab” Abstract#3360 Blood 10(1) (部 分 1-2) :p. 88B(1998) ;Stashi 等 人, “Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura” Blood 98(4) :952-957(2001) ;Matthews, R. “Medical Heretics” New Scientist(2001 年 4 月 7 日) ;Leandro 等 人, “Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion” Ann Rheum Dis 61:833-888(2002) ;Leandro 等 人, “Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. Arthritis and Rheumatism 44(9) :S370(2001) ;Leandro 等 人, “An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus”, Arthritis & Rheumatism 46(1) : 2673-2677(2002) ;Edwards and Cambridge “Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes” Rheumatology 40:205-211(2001) ;Edwards 等 人, “B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders ” Biochem. Soc. Trans. 30(4) : 824-828(2002) ;Edwards 等 人, “Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody :A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism 46(9) : S197(2002) ;Levine 和 Pestronk “IgM antibody-related polyneuropathies :B-cell depletion chemotherapy using Rituximab” Neurology 52:1701-1704(1999) ; DeVita 等 人, “Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis” Arthritis & Rheum 46:2029-2033(2002) ;Hidashida 等 人, “治疗 of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with Rituximab.” 出现在美国风湿病学学会科学年会 (Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology) ;2002 年 10 月 24-29 日 ;New Orleans, LA ;Tuscano, J. “Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with Rituximab” 出现在美国风湿病学学会科学年会 ;2002 年 10 月 24-29 日 ;New Orleans, LA ;Specks 等 人, “Response of Wegener’s granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy” Arthritis & Rheumatism 44(12) :2836-2840(2001) ;Anolik 等 人, “B lymphocyte Depletion in the Treatment of Systemic Lupus (SLE) :Phase I/II Trial of Rituximab (RITUXAN) in SLE” Arthritis And Rheumatism, 46(9), S289-S289 Abstract 717(2002 年 10 月) 和 Albert 等 人, “A Phase I Trial of Rituximab (Anti-CD20) for Treatment of Systemic Lupus Erythematosus” Arthritis And Rheumatism, 48(12) :

3659-3659, Abstract LB9(2003 年 12 月);Martin 和 Chan “Pathogenic Roles of B cells in 人 Autoimmunity:Insights from the Clinic”Immunity 20 :517-527(2004); Cree 等人,“An open label study of the effects of Rituximab in neuromyelitis optica.”Neurology 64(7):1270-2(2005);Cross 等人,“Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis患者.”J Neuroimmunol, 180(1-2):63-70(2006);Bar-Or A. 等人, “ Safety, pharmacodynamics 和 activity of Rituximab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis:a phase I, multicentre,open-label clinical trial.” Ann Neurol 63(3):395-400(2008);Hauser S. 等人, “ B-cell depletion with Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis.” NEJM,358(7):676-88,(2008);Hawker K 等人,“Efficacy and Safety of Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis:results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial.”multiple sclerosis14(1):S299(2008), Abstract;Hawker K 等人,“Efficacy and Safety ofRituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis:results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial.”Neurology 72(S3):A254(2009), Abstract。

[0025] 发明概述

[0026] 本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法,其包括对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体,其中治疗基于具有一种或多种选自下组的特征的患者:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0027] 在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0028] 在一些实施方案中,患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中,炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0029] 在一些实施方案中,患者不到约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,患者不到约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中,EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中,患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0030] 在一些实施方案中,患者的年龄小于约 51 岁。

[0031] 在一些实施方案中,治疗减慢 (reduce) 达到确认的疾病进展的时间。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 12 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 24 周的 EDSS 增加。

[0032] 在一些实施方案中,对患者施用有效量的抗 CD20 抗体,以提供约 0.3 至约 4.0 克

的初次抗 CD20 抗体暴露,随后是约 0.3 至约 4.0 克的二次抗 CD20 抗体暴露。在一些实施方案中,所述初次抗 CD20 抗体暴露和 / 或所述二次抗 CD20 抗体暴露是约 0.3 至约 1.5 克。在一些实施方案中,所述二次暴露直到距初次暴露约 16 至 60 周时才提供。在一些实施方案中,每次抗 CD20 抗体暴露是以一剂或两剂抗 CD20 抗体的形式提供给患者的。

[0033] 在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括:a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0034] 本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法,条件是所述患者已被发现具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分,所述治疗包括对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体。

[0035] 在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0036] 在一些实施方案中,患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中,炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0037] 在一些实施方案中,患者不到约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,患者不到约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中,EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中,患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0038] 在一些实施方案中,患者的年龄小于约 51 岁。

[0039] 在一些实施方案中,治疗减慢了达到确认的疾病进展的时间。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 12 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 24 周的 EDSS 增加。

[0040] 在一些实施方案中,对患者施用有效量的抗 CD20 抗体,以提供约 0.3 至约 4.0 克的初次抗 CD20 抗体暴露,随后是约 0.3 至约 4.0 克的二次抗 CD20 抗体暴露。在一些实施方案中,所述初次抗 CD20 抗体暴露和 / 或所述二次抗 CD20 抗体暴露是约 0.3 至约 1.5 克。在一些实施方案中,所述二次暴露直到距初次暴露约 16 至 60 周时才提供。在一些实施方案中,每次抗 CD20 抗体暴露是以一剂或两剂抗 CD20 抗体的形式提供给患者的。

[0041] 在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括:a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中,所

述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0042] 本发明提供了治疗进行性多发性硬化的方法,其包括:(a) 选择具有进行性多发性硬化的患者,其中所述患者具有一种或多种选自下组的特征:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(iv) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分;以及(b) 向由此选择的患者施用有效量的抗 CD20 抗体。

[0043] 在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0044] 在一些实施方案中,患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中,炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0045] 在一些实施方案中,患者不到约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,患者不到约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中,EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中,患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0046] 在一些实施方案中,患者的年龄小于约 51 岁。

[0047] 在一些实施方案中,治疗减慢了达到确认的疾病进展的时间。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 12 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 24 周的 EDSS 增加。

[0048] 在一些实施方案中,对患者施用有效量的抗 CD20 抗体,以提供约 0.3 至约 4.0 克的初次抗 CD20 抗体暴露,随后是约 0.3 至约 4.0 克的二次抗 CD20 抗体暴露。在一些实施方案中,所述初次抗 CD20 抗体暴露和/或所述二次抗 CD20 抗体暴露是约 0.3 至约 1.5 克。在一些实施方案中,所述二次暴露直到距初次暴露约 16 至 60 周时才提供。在一些实施方案中,每次抗 CD20 抗体暴露是以一剂或两剂抗 CD20 抗体的形式提供给患者的。

[0049] 在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括:a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0050] 本发明还提供了评价患有进行性多发性硬化的患者是否会对用 CD20 抗体的治疗有反应的方法,其包括评价一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和

(d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分, 其中患者中的一种或多种所述特征指示该患者将对所述治疗有反应。

[0051] 在一些实施方案中, 所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中, 所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中, 所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中, 当开始治疗时, 所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0052] 在一些实施方案中, 患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中, 所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中, 炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中, 炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0053] 在一些实施方案中, 患者少于约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中, 患者少于约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中, 在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中, EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中, 在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中, 患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中, 当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0054] 在一些实施方案中, 患者的年龄小于约 51 岁。

[0055] 在一些实施方案中, 该方法还包括给患者建议。

[0056] 在一些实施方案中, 所述抗 CD20 抗体包括: a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区, 和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在一些实施方案中, 所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中, 所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中, 所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中, 所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中, 所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中, 所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0057] 本发明还提供了鉴定可能对抗 CD20 抗体治疗有反应的进行性多发性硬化患者的方法, 其包括: (a) 评价一种或多种选自下组的特征: (i) 年龄小于约 55 岁, (ii) 一种或多种钆染色损伤, (iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和 (iv) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分; 以及 (b) 鉴定具有一种或多种选自下组的特征的患者: (i) 年龄小于约 55 岁, (ii) 一种或多种钆染色损伤, (iii) 在开始抗 CD20 治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和 (iv) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0058] 在一些实施方案中, 所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中, 所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中, 所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中, 当开始治疗时, 所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0059] 在一些实施方案中, 患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中, 所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中, 炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中, 炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0060] 在一些实施方案中, 患者少于约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中, 患者少于约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中, 在开始治疗前两

年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中, EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中,患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0061] 在一些实施方案中,患者的年龄小于约 51 岁。

[0062] 在一些实施方案中,该方法还包括给患者建议。

[0063] 在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括:a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0064] 本发明还提供了销售抗 CD20 抗体或其可药用组合物用于进行性多发性硬化患者亚群的方法,所述方法包括告知目标受众关于所述抗 CD20 抗体用于治疗如下患者亚群的用途,所述患者亚群的特征在于此亚群的患者具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钐染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(d) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分。

[0065] 在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0066] 在一些实施方案中,患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中,炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0067] 在一些实施方案中,患者少于约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,患者少于约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中,EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中,患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0068] 在一些实施方案中,患者的年龄小于约 51 岁。

[0069] 在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括:a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0070] 本发明提供了包括包装在一起的药物组合物和标签的产品,所述药物组合物包含抗 CD20 抗体和可药用的载体,所述标签指示(即说明)所述抗 CD20 抗体或药物组合物适

用于治疗具有一种或多种选自下组的特征的多发性硬化患者：(a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分，和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0071] 在一些实施方案中，所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中，所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中，所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中，当开始治疗时，所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0072] 在一些实施方案中，患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中，所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中，炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中，炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0073] 在一些实施方案中，患者少于约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中，患者少于约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中，在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中，EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中，在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中，患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中，当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0074] 在一些实施方案中，患者的年龄小于约 51 岁。

[0075] 在一些实施方案中，包含抗 CD20 抗体和可药用载体的药物组合物在容器中。在一些实施方案中，容器包含约 0.3 至约 4.0 克抗 CD20 抗体。在一些实施方案中，容器包含约 0.3 至约 1.5 克抗 CD20 抗体。

[0076] 在一些实施方案中，标签提供说明书，该说明书说明向患者施用有效量的抗 CD20 抗体，以提供约 0.3 至约 4.0 克的初次抗 CD20 抗体暴露，随后是约 0.3 至约 4.0 克的二次抗 CD20 抗体暴露。在一些实施方案中，所述初次抗 CD20 抗体暴露和 / 或所述二次抗 CD20 抗体暴露是约 0.3 至约 1.5 克。在一些实施方案中，所述二次暴露直到距初次暴露约 16 至 60 周时才提供。在一些实施方案中，每次抗 CD20 抗体暴露是以一剂或两剂抗 CD20 抗体的形式提供给患者的。

[0077] 在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体包括：a) 含有 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 的重链可变区，和 b) 含有 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 的轻链可变区。在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0078] 本发明还提供了用于预测进行性多发性硬化受试者是否会对以用于治疗多发性硬化的药物进行的治疗有反应的方法，所述方法包括评价一种或多种选自下组的特征：(a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分，和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分，其中年龄、钆染色损伤、在开始治疗前两年内 EDSS 的增加、MSSS 或其组合指示受试者将对所述治疗有反应。

[0079] 在一些实施方案中，所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实

施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0080] 在一些实施方案中,患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中,炎症迹象由等电聚焦检测到的 IgG 寡克隆带指示。

[0081] 在一些实施方案中,患者少于约 15 年具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,患者少于约 10 年具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中,EDSS 的增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中,患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。

[0082] 在一些实施方案中,患者的年龄小于约 51 岁。

[0083] 在本文所述的任何方法或产品的一些实施方案中,患者具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,和 (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分。

[0084] 本发明还提供了治疗患者中的多发性硬化的方法,其包括向所述患者施用有效量的 ocrelizumab 以提供约 0.3 克至约 0.6 克的初次 ocrelizumab 暴露,随后是约 0.3 克至约 0.6 克的二次 ocrelizumab 暴露,其中所述二次暴露是直到距初次暴露约 16 至 60 周时才提供的,并且每次 ocrelizumab 暴露是以一剂或两剂 ocrelizumab 的形式提供给患者的。

[0085] 在一些实施方案中,所述初次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中,所述二次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中,距二次暴露距初次暴露约 24 周施用。在一些实施方案中,一次或多次 ocrelizumab 暴露是以一剂 ocrelizumab 的形式向患者提供的。在一些实施方案中,一次或多次 ocrelizumab 暴露是以两剂 ocrelizumab 的形式向患者提供的。在一些实施方案中,所述初次 ocrelizumab 暴露包括第一剂量和第二剂量的 ocrelizumab,其中 ocrelizumab 的第一剂量和第二剂量是约 0.3 克。在一些实施方案中,所述二次 ocrelizumab 暴露包括单剂 ocrelizumab,其中所述单剂 ocrelizumab 是 0.6 克。在一些实施方案中,该方法还包括提供第三次 ocrelizumab 暴露。在一些实施方案中,该方法还包括提供第四次 ocrelizumab 暴露。在一些实施方案中,该方法还包括提供第五次 ocrelizumab 暴露。在任何方法的一些实施方案中,该方法还包括提供约一次至约三次后续的 ocrelizumab 暴露。

[0086] 本发明还提供了产品,其包括:(a) 含有 ocrelizumab 的容器;和 (b) 具有用于治疗患者多发性硬化的说明书的包装插页,其中所述说明书指示向所述患者施用有效量的 ocrelizumab 以提供约 0.3 克至约 0.6 克的初次 ocrelizumab 暴露,随后是约 0.3 克至约 0.6 克的第二次 ocrelizumab 暴露,其中直到距初次暴露约 16 至 60 周时才施用第二次暴露,并且每次 ocrelizumab 暴露是作为一剂或两剂 ocrelizumab 提供给患者的。

[0087] 在一些实施方案中,所述初次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中,所述第二次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中,距初次暴露约 24 周施用第二次暴露。在一些实施方案中,一次或多次 ocrelizumab 暴露以一剂 ocrelizumab 的形式

向患者提供。在一些实施方案中,一次或多次 ocrelizumab 暴露以两剂 ocrelizumab 的形式向患者提供。在一些实施方案中,所述初次 ocrelizumab 暴露包括第一剂量和第二剂量的 ocrelizumab,其中 ocrelizumab 的第一剂量和第二剂量是约 0.3 克。在一些实施方案中,说明书还包括提供第三次 ocrelizumab 暴露。在一些实施方案中,说明书还包括提供第四次 ocrelizumab 暴露。在一些实施方案中,说明书还包括提供第五次 ocrelizumab 暴露。在任何方法的一些实施方案中,说明书还包括提供约一次至约三次后续的 ocrelizumab 暴露。

[0088] 附图简述

[0089] 图 1A 是比较鼠 2H7 (SEQ ID NO :1)、人源化 2H7.v16 变体 (SEQ ID NO :2) 和人 κ 轻链亚组 I (SEQ ID NO :3) 的轻链可变域 (VL) 的氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7.v16 的 VL 的 CDR 如下:CDR1 (SEQ ID NO :4)、CDR2 (SEQ ID NO :5) 和 CDR3 (SEQ ID NO :6)。

[0090] 图 1B 是比较鼠 2H7 (SEQ ID NO :7)、人源化 2H7.v16 变体 (SEQ ID NO :8) 和人重链亚组 III 共有序列 (SEQ ID NO :9) 的重链可变域 (VH) 的氨基酸序列的序列比对。2H7 和 hu2H7.v16 的 VH 的 CDR 如下:CDR1 (SEQ ID NO :10)、CDR2 (SEQ ID NO :11) 和 CDR3 (SEQ ID NO :12)。

[0091] 在图 1A 和图 1B 中,每条链中的 CDR1、CDR2 和 CDR3 包括在括号内,侧翼为构架区 FR1-FR4,如图所示。2H7 是指鼠 2H7 抗体。两行序列之间的星号显示在这两种序列之间不同的位置。残基编号依照 Kabat 等人,Seq uences of Immunological Interest,第 5 版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991),其中插入显示为 a、b、c、d 和 e。

[0092] 图 2 显示了成熟 2H7.v16 轻链 (SEQ ID NO :13) 的氨基酸序列。

[0093] 图 3 显示了成熟 2H7.v16 重链 (SEQ ID NO :14) 的氨基酸序列。

[0094] 图 4 显示了成熟 2H7.v31 重链 (SEQ ID NO :15) 的氨基酸序列。2H7.v31 的 L 链与 2H7.v16 的相同。

[0095] 图 5 显示了成熟 2H7.v16 和 2H7.v511 轻链 (分别是 SEQ ID NO :13 和 16) 的比对,采用 Kabat 可变域残基编号和 Eu 恒定域残基编号。

[0096] 图 6 显示了成熟 2H7.v16 和 2H7.v511 重链 (分别是 SEQ ID NO :14 和 17) 的比对,采用 Kabat 可变域残基编号和 Eu 恒定域残基编号。

[0097] 图 7 概述了使用 ocrelizumab 治疗复发缓和型多发性硬化的研究设计。

[0098] 图 8 显示了对安慰剂和利妥昔单抗组的受试者而言,达到确认的疾病进展的时间的 Kaplan Meier 曲线。

[0099] 图 9 显示了从基线至第 96 周的 T2 损伤体积的中值变化。Y 轴显示了 T2 损伤体积 mm^3 。

[0100] 图 10 总结了安慰剂和利妥昔单抗组的受试者的基线特征和危险比。

[0101] 图 11 显示了,对于安慰剂和利妥昔单抗组的治疗效应,基线时年龄和钆 (Gd) 损伤的加性预测效应的多元分析 (multivariate analysis)。图 11A 显示了年龄 < 51 和基线时 Gd 损伤 = 0 的多元分析。图 11B 显示了年龄 ≥ 51 和基线时 Gd 损伤 = 0 的多元分析。图 11C 显示了年龄 < 51 和基线时 Gd 损伤 ≥ 1 的多元分析。图 11D 显示了年龄 ≥ 51 和基线时 Gd 损伤 ≥ 1 的多元分析。

[0102] 图 12 显示了对安慰剂和利妥昔单抗组的治疗效应而言,年龄和多发性硬化严重性评分 (MSSS) 的加性预测效应的多元分析。图 12A 显示了年龄 ≤ 55 和 MSSS < 5 的多元分析。图 12B 显示了年龄 > 55 和 MSSS < 5 的多元分析。图 12C 显示了年龄 ≤ 55 和 MSSS ≥ 5 的多元分析。图 12D 显示了年龄 > 55 和 MSSS ≥ 5 的多元分析。

[0103] 图 13 显示了具有以下特征的安慰剂和利妥昔单抗组受试者的达确认的疾病进展的时间的 Kaplan Meier 曲线:年龄 = 55 ; $3 \leq$ 基线 EDSS ≤ 6.5 ; 疾病持续时间 > 10 年 (如果他们的基线 EDSS < 5) 或疾病持续时间 > 15 年 (如果他们的基线 EDSS ≥ 5) 的患者排除。

[0104] 发明详述

[0105] I. 定义

[0106] “B 细胞”是在骨髓中成熟的淋巴细胞,包括幼稚 B 细胞、记忆 B 细胞或效应 B 细胞 (浆细胞)。本文中的 B 细胞可以是正常的或非恶性的 B 细胞。

[0107] “B 细胞表面标志”或“B 细胞表面抗原”在本文中指在 B 细胞表面上表达的、可能结合它的抗体靶向的抗原。示例性 B 细胞表面标志包括 CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85 和 CD86 白细胞表面标志 (描述参见 Leukocyte Antigen Facts Book, 第 2 版, 1997, Barclay 等人编著, Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)。其它 B 细胞表面标志包括 RP105、FcRH2、B 细胞 CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、Btigm、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA 和 239287。本文中特别感兴趣的 B 细胞表面标志在哺乳动物中较其它非 B 细胞组织而言优先在 B 细胞上表达,且可在前 B 细胞和成熟 B 细胞二者上表达。优选的 B 细胞表面标志在本文中是 CD20。

[0108] “CD20”抗原或“CD20”是存在于来自外周血或淋巴器官的超过 90% B 细胞的表面上的一种约 35kDa 非糖基化磷蛋白。CD20 存在于正常 B 细胞以及恶性 B 细胞二者上,但在干细胞上不表达。文献中 CD20 的其它名称包括“B 淋巴细胞限制性抗原”和“Bp35”。CD20 抗原描述在例如, Clark 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82 :1766 (1985) 中。

[0109] “抗体拮抗剂”在本文中指在结合 B 细胞上的 B 细胞表面标志后破坏或耗竭哺乳动物中的 B 细胞和 / 或干扰一种或多种 B 细胞功能 (例如通过降低或阻止由 B 细胞引发的体液应答) 的抗体。优选的是, 抗体拮抗剂能够在用其处理的哺乳动物中耗竭 B 细胞 (即降低循环中的 B 细胞水平)。这种耗竭可通过各种机制来实现, 例如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)、抑制 B 细胞增殖、和 / 或诱导 B 细胞死亡 (如通过细胞凋亡)。

[0110] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应, 其中表达 Fc 受体 (FcRs) 的非特异性细胞毒性细胞 (如自然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上的结合抗体, 随后引起靶细胞溶解。用于介导 ADCC 的主要细胞——NK 细胞——只表达 Fc γ RIII, 而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol 9 :457-92 (1991) 中第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性, 可进行体外 ADCC 测定试验, 例如美国专利 No. 5, 500, 362 或 5, 821, 337 中所描述的。可用于此类试验的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀

伤(NK)细胞。或者/另外,可在体内评估目的分子的ADCC活性,例如在动物模型中,例如 Clynes 等人,PNAS(USA) 95 :652-656(1998) 中所公开的。

[0111] “人效应细胞”指表达一种或多种FcR并行行使效应子功能的白细胞。在一些实施方案中,该细胞至少表达Fc γ RIII并执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的例子包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞,优选PBMC和NK细胞。

[0112] 术语“Fc受体”和“FcR”用于描述与抗体Fc区结合的受体。在一些实施方案中,FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是与IgG抗体结合的FcR(γ 受体),包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,区别主要在于其胞质域。激活受体Fc γ RIIA在其胞质域中包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见Daeron,Annu. Rev Immunol. 15 :203-234(1997))。FcR的综述参见Ravetch和Kinet,Annu. Rev Immunol. 9 :457-492(1991);Capel 等人,Immunomethods 4 :25-34(1994);以及de Haas 等人,J. Lab. Clin. Med. 126 :330-41(1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它FcR,包括未来将会鉴定的FcR。该术语还包括新生儿受体,FcRn,它负责将母体的IgG转移给胎儿(Guyer 等人,J. Immunol. 117 :587(1976)和Kim 等人,J. Immunol. 24 :249(1994))。

[0113] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体时分子溶解靶物的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分(C1q)结合与关联抗原复合的分子(如抗体)起始的。为了评估补体激活,可进行CDC测定法,例如Gazzano-Santoro 等人,J. Immunol. Methods 202 :163(1996)中所描述的。

[0114] “生长抑制性”抗体指那些阻止或降低表达抗体所结合的抗原的细胞增殖的抗体。例如,抗体可在体外和/或在体内阻止或降低B细胞增殖。

[0115] “诱导凋亡”的抗体指那些根据标准细胞凋亡测定法(例如膜联蛋白V结合、DNA片段化、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破碎和/或膜泡(称作凋亡小体)形成)的测定,诱导例如B细胞的程序性细胞死亡的抗体。

[0116] 术语“抗体”在本文中使用其最广的含义,尤其覆盖单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展示所需生物学活性即可。

[0117] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体(diabody);线性抗体;单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0118] 为了本文的目的,“完整抗体”指包含重链和轻链可变域以及Fc区的抗体。

[0119] “天然抗体”通常是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的分子量约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在具有不同免疫球蛋白同种型的重链之间有变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变域(VH),接着是多个恒定域。每条轻链在一端具有一个可变域(VL),而另一端是一个恒定域;轻链的恒定域与重链的第一个恒定域对齐,而轻链的可变域与重链的可变域对齐。据信,特定的氨基酸残基在轻链和重链可变域之

间形成界面。

[0120] 术语“可变的”指如下事实,即,可变域中的某些部分在抗体之间存在大的序列差异,这些部分用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变域。它集中于轻链和重链可变域中称作高变区的三个区段。可变区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域各自包含四个 FR,它们大多采取 β -折叠构象,通过三个高变区连接,这些高变区形成环而连接该 β -折叠结构,并在一些情况下形成该 β -折叠结构的一部分。每条链中的高变区通过 FR 而彼此紧靠在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成 (参见 Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示出多种效应子功能,例如抗体在抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 中的参与。

[0121] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,各自具有一个抗原结合位点,和一个残余“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段,它具有两个抗原结合位点,并且仍能够交联抗原。

[0122] “Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密、非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。以此构型,各个可变域的三个高变区相互作用而在 VH-VL 二聚体表面确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域 (或只包含对抗原特异的三个高变区的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于完整结合位点。

[0123] Fab 片段还包含轻链的恒定域和重链的第一恒定域 (CH1)。Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于重链 CH1 结构域的羧基末端增加了少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。本文中 Fab' -SH 是其中恒定区的半胱氨酸残基携带至少一个游离巯基的 Fab' 的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为 Fab' 片段对生成的,在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0124] 来自任何脊推动物物种的抗体 (免疫球蛋白) 的“轻链”,根据其恒定区的氨基酸序列,可归入两种截然不同类型中的一种,称作卡帕 (κ) 和拉姆达 (λ)。

[0125] 根据其重链恒定区的氨基酸序列,可将抗体归入不同的类别。完整抗体有五种主要的类别: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其中有些可进一步分为亚类 (同种型), 如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将与不同抗体类别对应的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0126] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。在一些实施方案中,该 Fv 多肽在 VH 和 VL 结构域之间还包含多肽接头,使得 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun, 在《The Pharmacology of 单克隆 Antibodies》中, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编著, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)。

[0127] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段,该片段在同一条多肽链 (VH-VL) 中包含相连的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配

对,并产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的描述于例如 EP 404,097;WO 93/11161;和 Hollinger 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)。

[0128] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指由一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体,除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的变异(这种变异通常以极少量存在)外,相同和/或结合相同表位。与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体产品不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性以外,单克隆抗体的优越性体现在它们不受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”显示抗体由基本上同质的抗体群获得的特征,而不应解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler 等人,Nature 256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组 DNA 方法来制备(参见例如美国专利号 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson 等人,Nature 352:624-628(1991)和 Marks 等人,J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)中描述的技术由噬菌体抗体库分离。

[0129] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源;以及此类抗体的片段,只要它们显示出所需的生物学活性(美国专利号 4,816,567;Morrison 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物(如旧大陆猴类(Old World Monkey),例如狒狒、恒河猴或猕猴)的可变域抗原结合序列以及人恒定区序列的“灵长类化(primatized)”抗体(美国专利号 5,693,780)。

[0130] 非人(如鼠源)抗体的“人源化”形式指包含极少的衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。就大部分而言,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的高变区残基用具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换。在有些情况中,将人免疫球蛋白的构架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中均不存在的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体将包含至少一个、通常两个可变域的基本上全部,其中高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的,而且,除了上文所述的 FR 替代外,FR 的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的。任选的是,人源化抗体还将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区,通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones 等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann 等人,Nature 332:323-329(1988);以及 Presta, Curr :Op. Struct. Biol. 2:593-596(1992)。

[0131] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(如轻链可变区中的残基 24-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)及重链可变区中的 31-35(H1)、50-65(H2)和 95-102(H3);Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第 5 版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)和/或来自“高变环”的残基(例如轻链可变区中的残基 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)及重链可变区中的 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3);Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。“构架”或“FR”残基指本文定义的高变区残基以外的可变区残基。

[0132] “裸抗体 (naked antibody)”指未缀合异源分子,例如细胞毒性部分或放射性标记物的抗体(本文所定义的)。

[0133] 抗 CD20 抗体的实例包括:“C2B8”,现在称作“利妥昔单抗”(“**RITUXAN®/MABTHERA®**”)(美国专利 5,736,137);钇-[90]-标记的 2B8 鼠抗体,称作“Y2B8”或“Ibritumomab Tiuxetan”(“**ZEVALIN®**”),其可从 Biogen Idec 公司商购(例如、美国专利 5,736,137;2B8 于 1993 年 6 月 22 日保藏于 ATCC,保藏号 HB11388);鼠 IgG2a “B1”,也称作“托西莫单抗 (Tositumomab)”,其任选用 ¹³¹I 标记以产生“¹³¹I-B1”或“碘 I131 托西莫单抗”抗体 (BEXXAR™),可从 Corixa 商购(还可参见,例如美国专利 5,595,721);鼠单克隆抗体“1F5”(例如 Press 等人, Blood69(2):584-591(1987)及其变体,包括“构架缀补”或人源化 1F5(例如、WO2003/002607, Leung, S.;ATCC 保藏号 HB-96450);鼠 2H7 和嵌合 2H7 抗体(例如、美国专利 5,677,180);2H7 抗体(例如、WO 2004/056312(Lowman 等人)并且如下面所列出);靶向在 B 细胞的细胞膜中的 CD20 分子的 HUMAX-CD20™(ofatumumab)全人、高亲和力抗体 (Genmab, Denmark;参见例如 Glennie 和 van de Winkel, Drug Discovery Today 8:503-510(2003)和 Cragg 等人, Blood 101:1045-1052(2003));在 WO 2004/035607 和 WO2005/103081(Teeling 等人, GenMab/Medarex)中列出的人单克隆抗体;US2004/0093621(Shitara 等人)中描述的与 Fc 区结合的具有复杂 N-糖苷连接的糖链的抗体;WO 2006/106959(Numazaki 等人, Biomedics 公司)中所述的、对 CD20 抗原的胞外表位具有高结合亲和力的嵌合或人源化单克隆抗体;与 CD20 结合的单克隆抗体和抗原结合片段(例如、WO 2005/000901, Tedder 等人),如 HB20-3、HB20-4、HB20-25 和 MB20-11;与 CD20 结合的单链蛋白,包括但不限于 TRU-015(例如 US2005/0186216(Ledbetter 和 Hayden-Ledbetter)、US 2005/0202534(Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter)、US 2005/0202028(Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter);US2005/136049(Ledbetter 等人)、US 2005/0202023(Hayden-Ledbetter 和 Ledbetter)-Trubion Pharm 公司);CD20-结合分子,例如 AME 抗体系列,例如如在 WO 2004/103404、US 2005/0025764 和 US 2006/0251652(Watkins 等人, Applied Molecular Evolution 公司)中列出的 AME-133™抗体和如在 WO 2005/070963(Allan 等人, Applied Molecular Evolution 公司)中所述的具有 Fc 突变的抗 CD20 抗体;CD20-结合分子,例如在 WO 2005/016969 和 US 2005/0069545(Carr 等人)中所述的那些;双特异性抗体,如例如在 WO 2005/014618(Chang 等人)中列出的双特异性抗体;人源化 LL2 单克隆抗体和其它抗 CD20 抗体,例如在美国专利 7,151,164(Hansen 等人, Immunomedics;US 2005/0106108(Leung 和 Hansen;Immunomedics)中所述的;如例如在 WO 2006/130458(Gazit 等人, Amgen/AstraZeneca)中所述的对抗 CD20 的全人抗体;如例如在 WO 2006/126069(Morawala, Avestha Gengraine Technologies Pvt Ltd.)中所述的针对 CD20 的抗体;如例如在 WO 2005/044859、US 2005/0123546、US 2004/0072290 和 US2003/0175884(Umana 等人;GlycArt Biotechnology AG)中所述的抗 CD20 的嵌合或人源化 B-Ly1 抗体(例如 GA-101);A20 抗体或其变体,例如嵌合或人源化 A20 抗体(分别为 cA20、hA20)和 IMMUN-106(例如、US2003/0219433, Immunomedics);以及单克隆抗体 L27、G28-2、93-1B3、B-C 1 或 NU-B2,它们得自 International Leukocyte Typing Workshop(例如 Valentine 等人, Leukocyte Typing III (McMichael 编著,第 440 页, Oxford University

Press(1987))。在一些实施方案中,抗 CD20 抗体在本文中是嵌合、人源化或人抗 CD20 抗体,更优选为利妥昔单抗、2H7 抗体、嵌合或人源化 A20 抗体 (Immunomedics) 和 HUMAX-CD20™ 人抗 CD20 抗体 (Genmab)。

[0134] 术语“利妥昔单抗”或“**RITUXAN®**”在本文中是指抗 CD20 抗原的基因工程嵌合鼠 / 人单克隆抗体,在美国专利号 5,736,137 中称作“C2B8”,包括其保持结合 CD20 能力的片段。利妥昔单抗可从 Genentech 购买。

[0135] 纯粹为了本文的目的且除非另有说明,“人源化 2H7”指结合人 CD20 的人源化抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体在体内有效耗竭灵长类动物 B 细胞,该抗体在其重链可变区 (VH) 中至少包含来自抗人 CD20 抗体的 CDR H3 序列 SEQ ID NO:12 (图 1B) 和基本上人重链亚组 III (V_HIII) 的人共有构架 (FR) 残基。在一些实施方案中,该抗体还包含重链 CDR H1 序列 SEQ ID NO:10 和 CDR H2 序列 SEQ ID NO:11,且在一些实施方案中,还包含轻链 CDR L1 序列 SEQ ID NO:4、CDR L2 序列 SEQ ID NO:5、CDR L3 序列 SEQ ID NO:6 和基本上人轻链亚组 I (V_LI) 的人共有构架 (FR) 残基,其中 VH 区可连接人 IgG 链恒定区,其中所述区可以是例如 IgG1 或 IgG3。在一些实施方案中,此抗体包含 VH 序列 SEQ ID NO:8 (v16, 如图 1B 所示),任选还包含 VL 序列 SEQ ID NO:2 (v16, 如图 1A 所示),它可在重链中具有氨基酸替代 D56A 和 N100A 以及在轻链中具有 S92A (v96)。在一些实施方案中,所述抗体是包含分别为 SEQ ID NO:13 和 14 的轻链和重链氨基酸序列 (如图 2 和 3 所示) 的完整抗体。在一些实施方案中,所述抗体是包含分别为 SEQ ID NO:13 和 15 的轻链和重链氨基酸序列 (如图 2 和 4 所示) 的 2H7. v31。本文中的抗体还可在 Fc 区中包含至少一个改进 ADCC 和 / 或 CDC 活性的氨基酸替代,例如其中氨基酸替代是 S298A/E333A/K334A 的抗体,并且在一些实施方案中,具有重链氨基酸序列 SEQ ID NO:15 (如图 4 所示) 的 2H7. v31。任何这些抗体还可在 Fc 区中包含至少一个降低 CDC 活性的氨基酸替代,例如包含至少替代 K322A。见美国专利 6,528,624B1 (Idusogie 等人)。

[0136] 术语“Ocrelizumab”在本文中是指针对 CD20 抗原的基因工程人源化单克隆抗体,其包含 (a) 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:13 的轻链,和 (b) 含有氨基酸序列 SEQ ID NO:14 的重链;包括其保留结合 CD20 能力的片段。Ocrelizumab 可得自 Genentech。

[0137] “分离的”抗体指已经由其天然环境的成分中鉴别出和分离和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染成分指将会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,并且可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在一些实施方案中,将抗体纯化至 (1) 根据 Lowry 方法的测定,抗体超过 95% 重量,且在一些实施方案中超过 99% 重量, (2) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度,或 (3) 达到在还原或非还原条件下 SDS-PAGE 以及使用考马斯蓝或 (在一些实施方案中) 银染得到的同质性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为不存在该抗体的天然环境中的至少一种成分。然而,分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0138] “受试者”或“患者”在本文中指人受试者或患者。通常,此类受试者或患者符合接受多发性硬化治疗的条件。为了本文的目的,此类符合条件的受试者或患者是正在发生、已经发生、或有可能发生多发性硬化的一种或多种征候、症状或其它指标;已经诊断有多发性硬化,无论是例如最近诊断的 (具有“新发作”的 MS), 先前诊断并具有新的复发或加剧的, 先前诊断并缓和的等;和 / 或有风险形成多发性硬化的受试者或患者。患有或有风险患上

多发性硬化的受试者或患者可任选地被鉴定为这样的个体,该个体已经使用检测自身抗体的测定法针对血清、脑脊液 (CSF) 和 / 或 MS 损伤中 CD20 阳性 B 细胞水平升高进行过筛选或者待进行筛选、以及定性且优选地定量评估。与多发性硬化有关的示例性此类自身抗体包括抗髓鞘碱性蛋白 (MBP)、抗髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 (MOG)、抗神经节苷脂和 / 或抗神经丝抗体。可在受试者的血清、脑脊液 (CSF) 和 / 或 MS 损伤中检测此类自身抗体。“升高的”自身抗体或 B 细胞水平在本文中意指所述自身抗体或 B 细胞水平显著超过未患 MS 的个体的水平。

[0139] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益或所需结果 (包括临床结果) 的方法。对于本发明的目的,有益或所需临床结果包括但不限于下列中的一种或多种:减少由疾病产生的一种或多种症状、减轻疾病程度、稳定疾病 (例如预防或延迟了疾病的恶化)、延迟或减慢疾病进展、改善疾病状态、减少一种或多种治疗疾病所需的其它药物的剂量、和 / 或增加生活质量。

[0140] 如本文所用,“延迟”多发性硬化的进展意味着延缓、阻碍、减速、放缓、稳定和 / 或推迟疾病的发展。这种延迟可以具有变化长度的时间,这取决于疾病的历史和 / 或被治疗的个体。

[0141] 如本文所用,“开始治疗时”是指在第 1 次暴露于多发性硬化药物 (例如抗 CD20 抗体) 之时或之前的时期。在一些实施方案中,“开始治疗时”是在暴露于多发性硬化药物 (例如抗 CD20 抗体) 前约 1 年、9 个月、6 个月、3 个月、2 个月或 1 个月中的任一时间。在一些实施方案中,“开始治疗时”是与第 1 次暴露于多发性硬化药物 (例如抗 CD20 抗体) 同时发生、或紧在此之前。

[0142] 如本文所用,“基于”包括 (1) 评价、确定或测定如本文所述的患者特征 (且优选地选择适于接受治疗的患者);和 (2) 施用本文所述的治疗。

[0143] MS 的“症状”指受试者所发生的且指示 MS 的结构、功能或感觉方面的任何病态现象或偏离正常。

[0144] “多发性硬化”是指以髓鞘的进行性破坏为特征的中枢神经系统的慢性且通常为致残性的疾病。国际上公认有四种形式的 MS,即原发进行性多发性硬化 (PPMS)、复发性多发性硬化 (RRMS)、继发进行性多发性硬化 (SPMS) 和进行性复发型多发性硬化 (PRMS)。

[0145] 本文所用的“进行性多发性硬化”是指原发进行性多发性硬化 (PPMS)、继发进行性多发性硬化 (SPMS) 和进行性复发型多发性硬化 (PRMS)。在一些实施方案中,进行性多发性硬化的特征在于持续 ≥ 6 个月的神经学功能的有记录的、不可逆转的丧失,且该功能丧失不能归因于临床复发。

[0146] “原发进行性多发性硬化”或“PPMS”的特征在于,从发作开始疾病渐进性的发展,而根本没有重叠的复发和缓和。可能有疾病活动的平稳时期,且可能有较好和较坏的某些天或某些周。PPMS 与 RRMS 和 SPMS 的区别在于其发作典型地在三十多岁后期或四十多岁早期,男性与女性有患此病的相同可能性,而且最初的疾病活动常常在脊髓而不是脑中。PPMS 经常转移入脑部,但较 RRMS 或 SPMS 而言损伤脑区的可能性较小。例如,PPMS 患者较 RRMS 或 SPMS 患者而言产生认知问题的可能性较小。PPMS 是 MRI 扫描显示炎性 (钆增强) 损伤的可能性最小的 MS 亚型。该原发进行性形式的疾病影响所有多发性硬化患者的 10-15%。可依照 McDonald 等人,Ann Neurol 50:121-7 (2001) 的标准来定义 PPMS。本文中所治疗的

PPMS 受试者通常是可能或确定诊断为患有 PPMS 的人。

[0147] “复发缓和型多发性硬化”或“RRMS”的特征在于复发（也称为病情加重），在此期间新症状可能出现而老症状重新出现或恶化。复发之后是病情缓和期，在此期间患者完全或部分从复发期间所造成的缺陷中恢复。复发可持续数天、数周或数月，而恢复则可能是缓慢和逐步的，或者几乎是瞬间的。绝大部分 MS 患者首先诊断为 RRMS。这通常是在他们二十多岁或三十多岁的时候，但已知早得多或晚得多的诊断。表现出此 MS 亚型的女性患者是男性的两倍。在复发期间，髓鞘一中枢神经系统（CNS）白质区中神经纤维（神经元）周围的保护性隔离鞘，可能被身体自身免疫系统的炎性反应所损伤。这引起广泛神经学症状，而且根据损伤的 CNS 区域，症状变化相当大。在复发后，炎性反应立即逐渐变弱，且 CNS 中一种特殊类型的神经胶质细胞（称为少突胶质细胞）发起髓鞘的重新形成 - 轴突周围的髓鞘可被修复的过程。很可能是此髓鞘重新形成造成了病情缓和。大约 50% 的 RRMS 患者在发病 10 年内转变成 SPMS。30 年后，此数字升高至 90%。在任何时间，此复发缓和形式疾病占有所有 MS 患者的 55%。

[0148] “继发进行性多发性硬化”或“SPMS”的特征在于临床神经学损伤的稳步发展，具有或没有重叠的复发及小的缓和和平稳状态。发生 SPMS 的人先前将经历过 RRMS 时期，此时期可能已持续了在 2 至 40 年或更长时间之间的任何时长。存在的任何重叠的复发和缓和都倾向于随着时间的过去逐渐变少。从所述疾病的继发进行阶段开始，致残开始发展得比其在 RRMS 期间快得多，尽管这样的发展在某些个体中仍然可以是相当缓慢的。10 年后，50% 的 RRMS 患者将发展成 SPMS。到 25 至 30 年，此数字将上升至 90%。SPMS 倾向于与较 RRMS 而言较低水平的炎性损伤形成相关，但总体病情负担持续进展。在任一时间，SPMS 都占全部多发性硬化患者的 30% 左右。

[0149] “进行性复发型多发性硬化”或“PRMS”的特征在于临床神经学损伤的稳定发展及重叠的复发和缓和。复发后会立即有显著的恢复，但在两次复发之间症状逐渐恶化。PRMS 占全部多发性硬化患者的 5% 左右。有些神经学家认为 PRMS 是 PPMS 的一种变体。

[0150] 表述“有效量”指有效改善或治疗多发性硬化的抗体（或其它药物）的量。这样的有效量通常将导致 MS 的征候、症状或其它指标的改善，例如降低复发率、防止伤残、减少脑 MRI 损伤的数目和 / 或体积、提高定时的 25 英尺走（timed 25-foot walk）、缓慢或延迟疾病的进展例如延长疾病进展的时间（例如使用扩展残疾状态量表（Expanded Disability Status Scale, EDSS））等。

[0151] “抗体暴露”指接触或暴露于在约 1-20 天的一段时间内施用的一个或多个剂量的本文抗体。所述剂量可以一次性给予，或者在该暴露期内以固定的或无规律的间隔给予。正如本文详述的，初次和稍后（如第二次或第三次）的抗体暴露彼此在时间上隔开。

[0152] 术语“免疫抑制剂”在本文中用于辅助疗法时是指用于抑制或遮蔽本文所治疗哺乳动物的免疫系统的物质。这将包括抑制细胞因子生成、下调或抑制自身抗原表达、或遮蔽 MHC 抗原的物质。此类活性剂的实例包括 2- 氨基 -6- 芳基 -5- 取代的嘧啶类（见美国专利 No. 4, 665, 077）；非甾体抗炎药（NSAID）；更昔洛韦、他克莫司、糖皮质激素类例如皮质醇或醛固酮、抗炎药例如环加氧酶抑制剂、5- 脂氧合酶抑制剂或白三烯受体拮抗剂；嘌呤拮抗剂，例如硫唑嘌呤或霉酚酸吗啉乙酯（MMF）；烷化剂，例如环磷酸胺；溴隐亭；达那唑；氨苯砜；戊二醛（如美国专利 4, 120, 649 中所述，它掩盖 MHC 抗原）；针对 MHC 抗原和 MHC

片段的抗独特型抗体；环孢菌素 A；类固醇，例如皮质类固醇或糖皮质类固醇或糖皮质激素类似物，如泼尼松、甲泼尼龙和地塞米松；二氢叶酸还原酶抑制剂，例如甲氨喋呤（口服或皮下）；羟基氯喹；和柳氮磺吡啶；来氟米特；细胞因子或细胞因子受体拮抗剂，包括抗干扰素- α 、- β 或- γ 抗体、抗肿瘤坏死因子- α 抗体（英夫利昔单抗或阿达木单抗）、抗 TNF- α 免疫黏附素（依那西普）、抗肿瘤坏死因子- β 抗体、抗白介素-2 抗体和抗 IL-2 受体抗体；抗 LFA-1 抗体，包括抗 CD11a 和抗 CD18 抗体；抗 L3T4 抗体；异源抗淋巴细胞球蛋白；泛 T(pan-T) 抗体，优选抗 CD3 或抗 CD4/CD4a 抗体；含有 LFA-3 结合域的可溶性肽（90 年 7 月 26 日公布的 WO 90/08187）；链激酶；TGF- β ；链道酶；来自宿主的 RNA 或 DNA；FK506；RS-61443；脱氧精孤菌素（deoxyspergualin）；雷帕霉素；T 细胞受体（Cohen 等人，美国专利 5,114,721）；T 细胞受体片段（Offner 等人，Science 251:430-432(1991)；WO 90/11294；Janeway, Nature341:482(1989)；和 WO 91/01133）；以及 T 细胞受体抗体（EP 340,109），例如 T10B9。

[0153] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意欲包括放射性同位素（例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³² 和 Lu 的放射性同位素）、化疗剂、和毒素例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物源的酶活毒素或其片段。

[0154] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类，例如噻替派和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺；烷基磺酸酯，例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡；氮丙啶类，例如苯佐替派（benzodopa）、卡波醌（carboquone）、美妥替派（meturedopa）和乌瑞替呱（uredopa）；乙撑亚胺类（ethylenimine）和甲基蜜胺类（methylamelamine），包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫代磷酸胺和三羟甲蜜胺；acetogenins（尤其是布拉他辛和布拉他辛酮（bullatacinone））；喜树碱（包括合成类似物拓扑替康（topotecan））、苔鲜抑制素；callystatin；CC-1065（包括其阿多来新（adozelesin）、卡折来新（carzelesin）和比折来新（bizelesin）合成类似物）；cryptophycins（特别是 cryptophycin 1 和 cryptophycin 8）；多拉司他汀；多卡米星（duocarmycin）（包括合成类似物 KW-2189 和 CB 1-TM1）；艾榴塞洛素（eleutherobin）；pancratistatin；sarcodictyin；海绵抑素（spongistatin）；氮芥类，例如氯丁酸氮芥（chlorambucil）、萘氮芥（chlornaphazine）、cholophosphamide、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧化氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇（phenesterine）、泼尼氮芥（prednimustine）、曲磷胺、尿嘧啶氮芥；硝基脲类，例如卡莫司汀、氯脲菌素（chlorozotocin）、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀；抗生素类，例如烯二炔类（enediynes）抗生素（如加利车霉素，尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II（见例如 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)）；达内霉素（dynemicin），包括 dynemicin A；双膦酸盐类（bisphosphonate），例如氯膦酸盐（clodronate）；埃斯波霉素（esperamicin）；以及新制癌菌素（neocarzinostatin）发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团）、阿克拉霉素（aclacinomycin）、放线菌素、氨茴霉素（authramycin）、重氮丝氨酸（azaserine）、博来霉素、cactinomycin、卡柔比星（carabycin）、洋红霉素（carminomycin）、嗜癌素（carzinophilin）、色霉素、放线菌素 D、柔红霉素、地托比星（detorubicin）、6-二氮杂-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®** 多柔比星（包括吗琳代-多柔比星、氰基吗琳代-多柔比星、2-吡咯啉并-多柔比星和脱

氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、依达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素例如丝裂霉素 C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物类,例如甲氨喋呤和 5- 氟尿嘧啶 (5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、甲氨喋呤、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6- 巯基嘌呤、硫唑嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷 (azacitidine)、6- 氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素类,例如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素类,例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;恩尿嘧啶;氨苯吡啶 (amsacrine);bestrabucil;比生群 (bisantrene);依达曲沙;defofamine;地美可辛 (demecolcine);地吡醌;依洛尼塞 (elfornithine);醋酸羟吡唑 (elliptinium acetate);epothilone;依托格鲁 (etoglucid);硝酸镓;羟脲;香菇多糖;氯尼达明;美登木素生物碱类 (maytansinoids),例如美登素和美登醇;安丝菌素 (ansamitocin);米托胍脲 (mitoguazone);米托蒽醌 (mitoxantrone);莫派达醇;二胺硝吡啶 (nitracrine);喷司他丁;蛋氨氮芥 (phenamet);吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸、2- 乙基酰肼;丙卡巴肼;**PSK®**多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR);雷佐生 (razoxane);rhizoxin;西索菲兰 (sizofiran);锆螺胺;替奴佐酸 (tenuazonic acid);三亚胺醌;2,2', 2'' - 三氯三乙胺;单端孢菌毒素 (trichothecenes) (尤其是 T2 毒素、疣孢菌素 A (verracurin A)、杆孢菌素 (roridin)A 和蛇形菌素 (anguidine));乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷 (pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷 (“Ara-C”);环磷酰胺;塞替派 (thiotepa);紫杉烷类 (taxoid),如**TAXOL®**紫杉醇 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、ABRAXANE™紫杉醇的不含克列莫佛 (Cremophor) 的、白蛋白改造的纳米颗粒剂型 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE®**多西紫杉醇 (Rhone-Poulenc Rorer, Antony France);苯丁酸氮芥 (chlorambucil);**GEMZAR®**吉西他滨;6- 巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨喋呤;铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷 (VP-16);异环磷酰胺 (ifosfamide);米托蒽醌;长春新碱;**NAVELBINE®**长春瑞滨;诺消灵 (novantrone);替尼泊苷 (teniposide);依达曲沙;柔红霉素 (daunomycin);氨基喋呤;希罗达 (xeloda);伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);类视黄醇类,例如视黄酸;卡培他滨;以及上述任何物质的可药用的盐、酸或衍生物。

[0155] 该定义还包括作用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,例如抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERM),包括例如他莫昔芬 (包括**NOLVADEX®**他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、keoxifene、LY117018、奥那司酮和 FARESTON 托瑞米芬 (toremifene);抑制调节肾上腺中雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂,例如 4(5)- 咪唑、氨鲁米特、**MEGASE®**醋酸甲地孕酮、**AROMASIN®**依西美坦、福美司坦 (formestane)、法偈唑 (fadrozole)、**RIVISOR®**伏氯唑 (vorozole)、**FEMARA®**来曲唑和 **ARIMIDEX®**阿那曲唑;及抗雄激素类,例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及曲沙他滨 (1,

3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物) ;反义寡核苷酸,特别是抑制涉及异常细胞增殖的信号途径中的基因表达的反义寡核苷酸,所述基因例如 PKC- α 、Ralf 和 H-Ras ;疫苗,例如基因疗法疫苗,例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗 ; **PROLEUKIN®** rIL-2 ;**LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 1 抑制剂 ;**ABARELIX®** rmRH ;及上述任何物质的可药用的盐、酸或衍生物。

[0156] 术语“细胞因子”是由一个细胞群体释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子 ;白介素 (IL),例如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15 ;肿瘤坏死因子,例如 TNF- α 或 TNF- β ;及其它多肽因子,包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。如本文所用,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等效物,包括合成产生的小分子实体及其可药用的衍生物和盐。

[0157] 术语“激素”指多肽激素,通常由具有导管的腺器官分泌。激素包括例如生长激素,例如人生长激素、N- 甲硫氨酰人生长激素、和牛生长激素 ;甲状旁腺素 ;甲状腺素 ;胰岛素 ;胰岛素原 ;松弛素 ;松弛素原 (prorelaxin) ;糖蛋白激素类,例如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体生成素 (LH) ;催乳素、胎盘催乳激素、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素 ;激活素 (activin) ;缪勒管抑制物质 (Mullerian-inhibiting substance) ;及血小板生成素。如本文所用,术语激素包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列激素的生物学活性等效物,包括合成产生的小分子实体及其可药用的衍生物和盐。

[0158] 术语“生长因子”指促进生长的蛋白质,并且包括例如肝生长因子 ;成纤维细胞生长因子 ;血管内皮生长因子 ;神经生长因子,例如 NGF- β ;血小板衍生生长因子 ;转化生长因子 (TGF),例如 TGF- α 和 TGF- β ;胰岛素样生长因子 -I 和 -II ;促红细胞生成素 (EPO) ;骨诱导因子 ;干扰素,例如干扰素 - α 、- β 和 - γ ;以及集落刺激因子 (CSF),例如巨噬细胞 CSF (M-CSF) ;粒细胞 - 巨噬细胞 CSF (GM-CSF)、和粒细胞 CSF (G-CSF)。如本文所用,术语生长因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列生长因子的生物学活性等效物,包括合成产生的小分子实体及其可药用的衍生物和盐。

[0159] 术语“整联蛋白 / 整合素”指容许细胞结合和应答胞外基质并且涉及多种细胞功能例如伤口愈合、细胞分化、肿瘤细胞归巢和细胞凋亡的受体蛋白质。它们是参与细胞 - 胞外基质和细胞 - 细胞相互作用的细胞黏附受体大家族的一部分。功能性整联蛋白由非共价结合的两个跨膜糖蛋白亚基组成,称为 α 和 β 。 α 亚基彼此都享有一定同源性, β 亚基也是如此。受体总是含有一条 α 链和一条 β 链。例子包括 $\alpha 6 \beta 1$ 、 $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 7 \beta 1$ 、LFA-1、 $\alpha 4$ 整联蛋白等。如本文所用,术语整联蛋白包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列整联蛋白的生物学活性等效物,包括合成产生的小分子实体及其可药用的衍生物和盐。

[0160] 本文中“整联蛋白拮抗剂或抗体”的例子包括 LFA-1 抗体,例如可从 Genentech 购买的依法珠单抗 (**RAPTIVA®**) ; $\alpha 4$ 整联蛋白抗体,例如可从 Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals 公司购买的那他珠单抗 (**TYSABRI®**) ;二氮杂环苯丙氨酸衍生物 (W02003/89410) ;苯丙氨酸衍生物 (W02003/70709、W0 2002/28830、W02002/16329 和 W0 2003/53926) ;苯基丙氨酸衍生物 (W0 2003/10135) ;烯胺衍生物 (W0 2001/79173) ;丙氨酸衍生物 (W0 2000/37444) ;链烷酸衍生物 (W0 2000/32575) ;取代苯基衍生物 (美国专利

6, 677, 339 和 6, 348, 463) ; 芳香胺衍生物 (美国专利 6, 369, 229) ; 及 ADAM 解联蛋白结构域多肽 (US2002/0042368) ; 针对 $\alpha v \beta 3$ 整合蛋白的抗体 (EP633945) ; 氮桥二环氨基酸衍生物 (WO 2002/02556) 等。

[0161] 为了本发明的目的,“肿瘤坏死因子- α (TNF- α)”指包含 Pennica 等人, Nature 312 :721 (1984) 或 Aggarwal 等人, JBC 260 :2345 (1985) 中所述氨基酸序列的人 TNF- α 分子。

[0162] “TNF- α 抑制剂”在本文中指通常通过结合 TNF- α 和中和其活性在一定程度上抑制 TNF- α 的生物学功能的活性剂。本文明确涵盖的 TNF 抑制剂的例子是依那西普 (**ENBREL®**)、英夫利昔单抗 (**REMICADE®**) 和阿达木单抗 (HUMIRATM)。

[0163] “改变病情类抗风湿药”或“DMARD”的例子包括羟基氯喹、柳氮磺吡啶、甲氨喋呤、来氟米特、依那西普、英夫利昔单抗 (加上口服和皮下甲氨喋呤)、硫唑嘌呤、D- 青霉胺、金 (口服)、金 (肌肉内)、米诺环素、环孢菌素、葡萄球菌蛋白 A 免疫吸附, 包括其盐和衍生物等。

[0164] “非甾体抗炎药”或“NSAID”的例子是乙酰水杨酸、布洛芬、萘普生、吲哚美辛、舒林酸、托美丁, 包括其盐和衍生物等。

[0165] “皮质类固醇”指具有类固醇的一般化学结构、模拟或提高天然存在的皮质类固醇的效果的数种合成的或天然存在的物质中之任一种。合成的皮质类固醇的例子包括泼尼松、泼尼松龙 (包括甲泼尼龙)、地塞米松、糖皮质激素和倍他米松。

[0166] “包装插页”用于指通常包括在治疗性产品的商品包装中的说明书, 它们包含有关此治疗性产品应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症、与该包装产品联合的其它治疗性产品、和 / 或警告的信息。

[0167] “标签”在本文中用于指通常附随着药物制剂的商用包装 (包括容器例如小瓶和包装插页) 以及其它类型包装所包括的信息。

[0168] 本文提及的“约”值或参数包括 (并且描述) 涉及该值或参数本身的变化。例如, 提及“约 X”的描述包括“X”的描述。

[0169] 如在本文和所附权利要求中所用, 除非上下文另有明确说明, 否则单数形式“一个 (种)”、“或”和“该 (the)”包括复数形式。应理解, 本文所述发明的各方面和变体包括“由”和 / 或“主要由”该方面和变体“组成”。

[0170] II. 治疗方法

[0171] 本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法, 所述方法包括对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体。

[0172] 在一些实施方案中, 本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法, 所述方法包括对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体, 其中治疗基于具有一种或多种选自下组的特征的患者 : (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0173] 在一些实施方案中, 本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法, 条件是所述患者已经被发现具有一种或多种选自下组的特征 : (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和

(d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分,所述治疗包括对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体。

[0174] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法,所述方法包括对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体,其中所述患者开始治疗时具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分,其中有关年龄、钆染色损伤、在开始治疗前两年内 EDSS 的增加、MSSS、或其组合的证据指示所述患者将对用所述抗 CD20 抗体的治疗有反应。

[0175] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗进行性多发性硬化的方法,其包括:(a) 选择具有一种或多种选自下组的特征的患者:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (iv) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分;以及 (b) 向由此选择的患者施用有效量的抗 CD20 抗体。

[0176] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法,所述方法包括对所述患者施用有效量的抗 CD20 抗体,且其中一种或多种选自下组的特征用作选择所述患者接收治疗的基础:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分,并且其中所述治疗包括向所述患者施用有效量的所述抗 CD20 抗体。

[0177] 本发明还提供了治疗患者中的多发性硬化的方法,其包括向所述患者施用有效量的 ocrelizumab 以提供约 0.3 克至约 0.6 克的初次 ocrelizumab 暴露,随后是约 0.3 克至约 0.6 克的第二次 ocrelizumab 暴露,其中直到距初次暴露约 16 至 60 周时才提供所述第二次暴露,并且每次 ocrelizumab 暴露是作为一剂或两剂 ocrelizumab 提供给患者的。在一些实施方案中,所述初次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中,所述第二次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中,距初次暴露约 24 周时施用第二次暴露。在一些实施方案中,一次或多次 ocrelizumab 暴露以一剂 ocrelizumab 的形式向患者提供。在一些实施方案中,一次或多次 ocrelizumab 暴露以两剂 ocrelizumab 的形式向患者提供。在一些实施方案中,所述两剂 ocrelizumab 包含约 0.3 克 ocrelizumab。

[0178] 本发明还提供了评价和 / 或预测进行性多发性硬化患者对抗 CD20 抗体治疗的反应性的方法。

[0179] 在一些实施方案中,本发明提供了评价进行性多发性硬化患者是否会对用 CD20 抗体的治疗有反应的方法,所述方法包括评价一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分,其中所述一种或多种特征在患者中表明该患者将对所述治疗有反应。

[0180] 在一些实施方案中,本发明提供了评价进行性多发性硬化患者是否会对用 CD20 抗体的治疗有反应的方法,所述方法包括 (a) 评价一种或多种选自下组的特征:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (iv) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分;(b) 实施算法以确定所述患者对所述治疗有反应;和 (c) 记录特异于该测试患者的结果。

[0181] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗患者中的进行性多发性硬化的方法,所述方法包括:(a) 评价一种或多种选自下组的特征:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(iv) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分,其中基于患者具有一种或多种选自下组的特征,而选择该患者进行治疗:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(iv) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分;和(b) 通过向所选患者施用有效量的抗 CD20 抗体来治疗该所选患者。

[0182] 在一些实施方案中,本发明提供了为进行性多发性硬化患者和/或患者人群选择疗法的方法,所述方法包括:(a) 评价一种或多种选自下组的特征:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(iv) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分;和(b) 如果所述患者或患者人群具有一种或多种选自下组的特征,则选择抗 CD20 抗体用于治疗:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始抗 CD20 治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(iv) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分。

[0183] 在一些实施方案中,本发明提供了用于预测进行性多发性硬化患者是否会对抗 CD20 抗体有反应的方法,所述方法包括评价一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(d) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分,其中年龄、钆染色损伤、在开始治疗前两年内 EDSS 的增加、MSSS 或其组合指示所述患者将对所述抗 CD20 抗体有反应。

[0184] 在一些实施方案中,本发明提供了鉴定有可能对抗 CD20 抗体治疗有反应的进行性多发性硬化患者的方法,所述方法包括:(a) 评价一种或多种选自下组的特征:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(iv) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分;以及(b) 鉴定具有一种或多种选自下组的特征的患者:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(iv) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分。

[0185] 在本文所述的治疗、评价和/或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,和(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分。

[0186] 在本文所述的评价和/或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述方法还包括向患者提供建议。

[0187] 在本文所述的治疗以及评价和/或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者具有一种以上选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和(d) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分。在本文所述的治疗以及评价和/或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者具有两种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和

(d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在一些实施方案中,所述患者具有三种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,和 (c) 在开始治疗前两年内 EDSS 增加至少约 1 分。在一些实施方案中,所述患者具有:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0188] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者和 / 或患者人群未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0189] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群还在样品中具有炎症迹象。炎症迹象通过评价一种或多种炎症指标来指示。该样品可以是任何适于评价炎症的样品。在一些实施方案中,该样品为组织或体液。在一些实施方案中,该体液样品为脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中,炎症迹象由通过等电聚焦检测的 IgG 寡克隆带指示。在一些实施方案中,炎症迹象通过 MRI 检测。在一些实施方案中,炎症迹象通过 Gd 增强损伤或 T2 损伤的存在来检测。其它评价炎症迹象的方法在本领域中是已知的。

[0190] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,在一段时间内 EDSS 的变化。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,在开始抗 CD20 抗体治疗前两年内 EDSS 增加至少约 1 分、1.25 分、1.5 分、1.75 分、2 分、2.25 分、2.5 分、2.75 分或 3 分中的任一个分值。在一些实施方案中,EDSS 增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其不到约 5 年、6 年、7 年、8 年、9 年、10 年、11 年、12 年、13 年、14 年、15 年、16 年、17 年、18 年、19 年或 20 年中的任一时间已经具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其不到约 15 年已经具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其不到约 5 年、6 年、7 年、8 年、9 年、10 年、11 年、12 年、13 年、14 年或 15 年中的任一时间已经具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其不到约 10 年已经具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。

[0191] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其 EDSS 在约 1.5 分至 7 分、1.5 分至 6.5 分、2 分至 6.5 分、或 3 分至 6.5 分中的任一范围中。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,当开始治疗时其 EDSS 在约 3.0 至约 6.5 之间。

[0192] 在本文所述的治疗、评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其 MSSS 为大于约 6、7、8 或 9 中的任一个。在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其 MSSS 大于约 9。

[0193] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所

述患者和 / 或患者人群的特征还在于,在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征还在于,在开始治疗前两年内具有 2 次、3 次、4 次或 5 次中的任一次数的复发。

[0194] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于年龄。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其年龄小于约 55 岁、54 岁、53 岁、52 岁、51 岁或 50 岁中的任一岁数。在一些实施方案中,所述患者和 / 或患者人群的特征在于,其年龄小于约 51 岁。

[0195] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述治疗减少达到确认的疾病进展的时间。在一些实施方案中,确认的疾病进展是持续约 4 周、8 周、12 周、16 周、20 周、24 周、28 周或 32 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 12 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 24 周的 EDSS 增加。

[0196] 在本文所述的治疗以及评价和 / 或预测反应性的任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括:a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在本文所述的任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0197] 本文所述的方法可包括本文所述的实施方案的任何组合。例如,方法包括治疗方法以及评价和 / 或预测的方法,其中患者具有 (a) 小于约 55 岁的年龄和 (b) 一种或多种钽染色损伤。

[0198] III. 剂量

[0199] 根据本文所述的任何方法或产品的一些实施方案,所述方法或说明书包括向多发性硬化患者施用有效量的抗 CD20 抗体以提供约 0.3 克至约 4 克(优选约 0.3 克至约 1.5 克、例如约 0.6 克或约 1.0 克)的初次抗体暴露,随后是约 0.3 克至约 4 克(优选约 0.3 克至约 1.5 克、例如约 0.6 克或约 1.0 克)的第二次抗体暴露,其中直到距初次抗体暴露约 16 至 60 周时才提供第二次抗体暴露。为了本发明的目的,所述第二次抗体暴露指在初次抗体暴露之后用抗 CD20 抗体治疗患者的下一时间,其中在初次暴露与第二次暴露之间没有居间的抗 CD20 抗体治疗或暴露。在一些实施方案中,初次抗体暴露和 / 或第二次抗体暴露是约 0.3 克、0.4 克、0.5 克、0.6 克、0.7 克、0.8 克、0.9 克或 1.0 克之任一。

[0200] 初次与第二次或随后的抗体暴露之间的间隔可以从初次抗体暴露的第一剂或第二剂开始算起,但是在一些实施方案中,从初次抗体暴露的第一剂开始算起。

[0201] 在一些实施方案中,抗体暴露间隔约 24 周或 6 个月;或间隔约 48 周或 12 个月。

[0202] 在一些实施方案中,直至距初次暴露约 20 至 30 周时才提供第二次抗体暴露,任选地随后提供约 0.3 克至 4 克(优选约 0.3 克至约 1.5 克)的第三次抗体暴露,所述第三次抗体暴露直至距初次暴露约 46 至 60 周(优选约 46 至 54 周)时才实施,在一些实施方案中,然后,直至距初次暴露至少约 70-75 周才提供进一步抗体暴露。在一些实施方案中,第

三次抗体暴露为约 0.3 克、0.4 克、0.5 克、0.6 克、0.7 克、0.8 克、0.9 克或 1.0 克之任一。

[0203] 在替代实施方案中,第二次抗体暴露直至距初次暴露约 46 至 60 周时才提供,并且随后的抗体暴露,如果有的话,直至距前次抗体暴露约 46 至 60 周时才提供。

[0204] 所述抗体暴露中的任何一次或多次暴露可以作为单剂抗体或者作为分开的两剂抗体(即,由第一剂和第二剂组成)提供给患者。每次抗体暴露所采用的具体剂数(无论是一剂或两剂)取决于例如所治疗 MS 的类型、所采用抗体的类型、是否采用第二药物或采用哪种类型第二药物、及施用的方法和频率。在施用两个分开剂量时,优选第二剂在距施用第一剂的时间约 3-17 天、更优选约 6-16 天、且最优选约 13-16 天时施用。在一些实施方案中,当施用两个分开剂量时,第二剂为约 14 天。当施用两个分开剂量时,第一剂和第二剂抗体优选为约 0.3 克至 1.5 克,更优选为约 0.3 克至约 1.0 克。在一些实施方案中,当施用两个分开剂量时,第一剂和第二剂抗体为约 0.3 克、0.4 克、0.5 克或 0.6 克中的任一种。在一些实施方案中,所述初次 ocrelizumab 暴露包含第一剂和第二剂的 ocrelizumab,其中 ocrelizumab 的第一剂和第二剂是约 0.3 克。在一些实施方案中,所述第二次 ocrelizumab 暴露包含单剂 ocrelizumab,其中所述单剂 ocrelizumab 是 0.6 克。

[0205] 在一些实施方案中,给患者提供至少约 3 次、至少约 4 次或至少约 5 次抗体暴露,例如约 3-60 次暴露,且更特别的是约 3-40 次暴露,最特别的是约 3-20 次暴露。在任何方法的一些实施方案中,该方法还包括提供约 1 次至约 3 次后续的 ocrelizumab 暴露。在一些实施方案中,该暴露以各约 24 周或 6 个月或者 48 周或 12 个月的间隔施用。在一些实施方案中,每次抗体暴露是作为单一剂量的抗体提供的。在替代实施方案中,每次抗体暴露是作为两个分开剂量的抗体提供的。然而,不是每次抗体暴露都需要作为单一剂量或两个分开剂量提供。

[0206] 抗体可以是裸抗体,或者可以缀合另一分子,例如细胞毒性剂,如放射性化合物。在一些实施方案中,抗体是利妥昔单抗、人源化 2H7(例如包含 SEQ ID NO:2 和 8 中的可变域序列)或包含 SEQ ID NO:23 和 24 中的可变域序列的人源化 2H7、或 HuMax-CD20(Genmab)。在一些实施方案中,所述抗体是 ocrelizumab(例如,包含 (a) 含有 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列的轻链;和 (b) 含有 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列的重链)。

[0207] 在一个实施方案中,患者先前从未用例如免疫抑制剂等药物处理以治疗多发性硬化和/或先前从未用针对 B 细胞表面标志的抗体治疗过(例如先前从未用 CD20 抗体治疗过)。

[0208] 抗体可以以任何合适方式施用,包括肠胃外、局部、皮下、腹膜内、肺内、鼻内和/或损伤内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。还考虑鞘内施用(参阅例如美国专利申请 2002/0009444, Grillo-Lopez, A concerning intrathecal delivery of a CD20 antibody)。此外,还可通过脉冲输注来合适地施用抗体,例如用剂量逐渐减少的抗体。在一些实施方案中,静脉内、皮下或鞘内给药。在一些实施方案中,通过静脉内输注给药。

[0209] 虽然 CD20 抗体可以是为了治疗多发性硬化而施用于患者的唯一药物,但是可任选伴随着结合 B 细胞表面标志的抗体(例如伴随着 CD20 抗体)而施用第二药物,例如细胞毒性剂、化疗剂、免疫抑制剂、细胞因子、细胞因子拮抗剂或抗体、生长因子、激素、整联蛋白、整联蛋白拮抗剂或抗体(例如 LFA-1 抗体,例如可从 Genentech 购得的依法珠单抗

(**RAPTIVA®**)或 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体,例如可从 Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals 公司购得的那他珠单抗(**TYSABRI®**)等。

[0210] 在联合疗法的一些实施方案中,抗体可联合以下药物:干扰素类药物,例如 IFN- β -1a(**REBIF®**和**AVONEX®**)或 IFN- β -1b(**BETASERON®**);寡肽,例如醋酸格拉默(**COPAXONE®**);细胞毒性剂,例如米托蒽醌(**NOVANTRONE®**)、甲氨喋呤、环磷酰胺、苯丁酸氮芥或硫唑嘌呤;静脉内免疫球蛋白(γ 球蛋白);淋巴细胞耗竭性疗法,例如米托蒽醌、环磷酰胺、Campath、抗 CD4、克拉屈滨、全身辐射、骨髓移植;皮质类固醇(例如甲泼尼龙、泼尼松、地塞米松或糖皮质激素),包括全身性皮质类固醇疗法;非淋巴细胞耗竭性免疫抑制性疗法(例如,霉酚酸吗啉乙酯(MMF)或环孢菌素);“他汀”类降胆固醇药物,其包括西立伐他汀(**BAYCOL®**)、氟伐他汀(**LESCOL®**)、阿托伐他汀(**LIPITOR®**)、洛伐他汀(**MEVACOR®**)、普伐他汀(**PRAVACHOL®**)、辛伐他汀(**ZOCOR®**);雌二醇;睾酮(任选以提高的剂量;Stuve 等人, Neurology 8: 290-301(2002));激素替代疗法;用于 MS 继发的或相关的症状(例如痉挛、失禁、疼痛、疲劳)的治疗;TNF 抑制剂;改变病情抗风湿药(DMARD);非甾体抗炎药(NSAID);血浆去除术;左旋甲状腺素;环孢菌素 A;促生长素抑制素类似物;细胞因子或细胞因子受体拮抗剂;抗代谢物;免疫抑制剂;康复性手术(rehabilitative surgery);放射碘;甲状腺切除术;其它 B 细胞表面拮抗剂/抗体等。

[0211] 第二药物伴随着 CD20 抗体的初次暴露和/或随后暴露施用,此类联合施用包括使用分开的制剂或单一的药用制剂的共施用,以及任一次序的连续施用,其中优选有一段时间两种(或所有)活性剂同时发挥其生物学活性。

[0212] 除对患者施用抗体外,本申请考虑通过基因疗法来施用抗体。表述施用“有效量”的抗体涵盖编码抗体的核酸的施用。参见例如 1996 年 3 月 14 日公布的 WO 96/07321,它关注通过基因疗法来生成胞内抗体。

[0213] 有两种主要方法使核酸(任选包含在载体中)进入患者的细胞,即体内和离体(ex vivo)。对于体内投递,通常在需要抗体的部位将核酸直接注射到患者体内。对于离体治疗,移出患者的细胞,将核酸导入这些分离的细胞,并将经过修饰的细胞或是直接施用于患者,或是例如包封在多孔膜内并植入患者体内(参见例如美国专利 4,892,538 和 5,283,187)。有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移至体外培养细胞还是预期宿主的体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀法等。常用于离体递送基因的载体是逆转录病毒。

[0214] 在一些实施方案中,体内核酸转移技术包括用病毒载体(例如腺病毒、I 型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如 DOTMA、DOPE 和 DC-Chol)进行的转染。在有些情况中,希望与靶向靶细胞的试剂一起提供核酸源,例如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时,与胞吞作用相关的细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可用于靶向和/或促进摄入,例如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中进行内在化的蛋白质的抗体、和靶向细胞内定位和增加细胞内半衰期的蛋白质。例如 Wu 等人, J. Biol. Chem. 262:

4429-4432(1987);以及Wagner等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414(1990)中描述了受体介导的胞吞技术。关于目前已知的基因标记和基因疗法方案的综述参见Anderson等人,Science 256:808-813(1992)。还可参见W093/25673及其引用的参考文献。

[0215] IV. 抗体及其生产

[0216] 本发明的方法和产品使用或并入结合B细胞表面标志的抗体,尤其是结合CD20的抗体。因此,本文将描述用于生成此类抗体的方法。

[0217] 将用于生成或筛选抗体的B细胞表面标志可以是例如包含所需表位的所述标志的可溶形式或其部分。或者/另外,在其细胞表面表达所述标志的细胞可用于生成或筛选抗体。可用于生成抗体的其它形式的B细胞表面标志对本领域熟练技术人员是显而易见的。

[0218] 下面的描述例示了用于生产依照本发明使用的抗体的技术。

[0219] (i) 多克隆抗体

[0220] 多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂来生成。可能有用的是,使用双官能或衍生化试剂,例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酸亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}^2$ (其中R和 R^1 是不同的烷基),将相关抗原与在待免疫的物种中有免疫原性的蛋白质,例如匙孔咸血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂偶联。

[0221] 可以通过如下方式将动物针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物进行免疫:将例如100 μg 或5 μg 蛋白质或缀合物(分别用于兔或小鼠)与3倍体积的弗氏完全佐剂混和,并将该溶液皮内注射于多个部位。一个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏完全佐剂中的1/5-1/10初始量的肽或缀合物对动物进行强化。7-14天后,采集动物的血液,并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫直到滴度达到平台。在一些实施方案中,将动物用与不同蛋白质缀合的和/或通过不同交联剂缀合的相同抗原的缀合物进行强化。缀合物还可在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物来制备。此外,聚集剂例如明矾也适用来增强免疫应答。

[0222] (ii) 单克隆抗体

[0223] 单克隆抗体是由一群基本上同质的抗体获得的,即构成群体的各个抗体,除了在生产单克隆抗体的过程中可能产生的变异外,相同和/或结合相同表位,其中所述变异通常以很少量存在。由此,修饰语“单克隆”表示抗体的如下特征,即其不是无联系的或多克隆的抗体的混合物。

[0224] 例如,单克隆抗体可以通过最初由Kohler等人,Nature 256:495(1975)描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组DNA方法来制备(美国专利4,816,567)。

[0225] 在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物,例如仓鼠,以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。然后,使用合适的融合剂例如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103页(Academic Press, 1986))。

[0226] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑

制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷 (HAT 培养基),这些物质阻止缺乏 HGPRT 的细胞生长。

[0227] 在一些实施方案中,骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生产细胞稳定的高水平生成抗体、并对例如 HAT 培养基等培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中,在一些实施方案中,骨髓瘤细胞系是鼠源骨髓瘤系,例如可从 Salk Institute Cell Distribution Center(San Diego, California, USA) 购得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的衍生系,以及可从 American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA) 购得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系也已有描述 (Kozbor, J. Immunol., 133 :3001(1984) ;Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第 51-63 页 (Marcel Dekker 公司, New York, 1987))。

[0228] 测定生长杂交瘤细胞的培养基,确定抗抗原的单克隆抗体的生成。在一些实施方案中,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,例如放射性免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[0229] 单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson 等人, Anal. Biochem. 107 : 220(1980) 的 Scatchard 分析来测定。

[0230] 在鉴定得到生成具有所需特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,所述克隆可通过有限稀释法进行亚克隆,并使用标准方法进行培养 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。适于这个目的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤体内生长。

[0231] 适宜地,可通过常规免疫球蛋白纯化法,例如蛋白 A-Sepharose, 羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清分开。

[0232] 编码单克隆抗体的 DNA 易于通过常规流程分离并测序 (例如使用能够特异性结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。在一些实施方案中,以杂交瘤细胞作为此类 DNA 的来源。一旦分离,可将 DNA 置于表达载体中,然后将该表达载体转染到宿主细胞中,例如原本不产生免疫球蛋白蛋白质的大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述性论文包括 Skerra 等人, Curr. Opinion in Immunol., 5 : 256-262(1993) 和 Plückthun, Immunol. Revs., 130 :151-188(1992)。

[0233] 在另一个实施方案中,可从使用 McCafferty 等人, Nature, 348 :552-554(1990) 所述技术构建的抗体噬菌体文库中分离抗体或抗体片段。Clackson 等人, Nature, 352 : 624-628(1991) 和 Marks 等人, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续出版物描述了通过链改组 (Marks 等人, Bio/Technology, 10 :779-783(1992)), 以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等人, Nuc. Acids. Res., 21 :2265-2266(1993)), 生成高亲和力 (nM 范围) 的人抗体。由此,这些技术是可以用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

[0234] 还可以修饰 DNA,例如用人重链和轻链恒定域的编码序列替代同源鼠序列(美国专利 4,816,567;Morrison 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851(1984)),或共价连接该免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。

[0235] 通常,用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定域,或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变域,以产生嵌合二价抗体,它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点以及对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0236] (iii) 人源化抗体

[0237] 本领域已经描述了用于将非人抗体人源化的方法。在一些实施方案中,人源化抗体具有引入其中的一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变域。人源化可基本上依照 Winter 及其同事的方法进行(Jones 等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann 等人,Nature,332:323-327(1988);Verhoeyen 等人,Science,239:1534-1536(1988)),通过用高变区序列替代相应的人抗体序列。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567),其中基本上少于整个人可变域用来自非人物种的相应序列替代。在实残中,人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0238] 用于制备人源化抗体的人可变域的选择,包括轻链和重链,对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最佳匹配(best-fit)”法,用啮齿类抗体可变域序列对整个的已知人可变域序列文库进行筛选。然后选择与啮齿类动物的序列最接近的人序列作为人源化抗体的人构架区(FR)(Sims 等人,J.Immunol.,151:2296(1993);Chothia 等人,J.Mol.Biol.,196:901(1987))。另一种方法使用由具有特定轻链或重链可变区亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定构架区。相同构架可用于数种不同的人源化抗体(Carter 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);Presta 等人,J.Immunol.,151:2623(1993))。

[0239] 此外重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力以及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的,在各方法的一些实施方案中,使用亲本和人源化序列的三维模型,分析亲本序列和各种概念性人源化产物,以制备人源化抗体。三维免疫球蛋白分子模型是通常可获得的,且为本领域熟练技术人员所熟悉。还可获得用于图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。通过检查这些显示结果,允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能行使中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合,从而获得所需抗体特征,例如对靶抗原的亲和力提高。通常,高变区残基直接且最实质地影响抗原结合。

[0240] 在一些实施方案中,人源化抗 CD20 抗体是人源化 2H7 抗体。在一些实施方案中,该人源化 2H7 抗体优选包含以下 CDR 序列中的一个、两个、三个、四个、五个或六个:

[0241] CDR L1 序列 RASSSVSYXH,其中 X 是 M 或 L(SEQ ID NO.18),例如 SEQ ID NO:4(图 1A)、

[0242] SEQ ID NO:5 的 CDR L2 序列(图 1A)、

[0243] CDR L3 序列 QQW XFNPPT,其中 X 是 S 或 A(SEQ ID NO.19),例如 SEQ ID NO:6(图 1A)、

[0244] SEQ ID NO:10 的 CDR H1 序列(图 1B)、

[0245] AIYPGNGXTSYNQKFKG 的 CDR H2 序列,其中 X 是 D 或 A(SEQ ID NO. 20),例如 SEQ ID NO:11(图 1B),和

[0246] VVYYSXXYWFYFDV 的 CDR H3 序列,其中在 6 位的 X 是 N、A、Y、W 或 D,且 7 位的 X 是 S 或 R(SEQ ID NO. 21),例如 SEQ ID NO:12(图 1B)。

[0247] 上述 CDR 序列通常存在于人轻链和重链可变构架序列,例如基本上人轻链 κ 亚组 I (V_L6I) 的人共有 FR 残基,以及基本上人重链亚组 III 的人共有 FR 残基 (V_HIII) 中。还参见 WO 2004/056312 (Lowman 等人)。

[0248] 在一些实施方案中,可将重链可变区连接至人 IgG 链恒定区,其中该区域可以是例如 IgG1 或 IgG3,包括天然序列和变体恒定区。

[0249] 在一些实施方案中,此类抗体包含 SEQ ID NO:8 的重链可变域序列 (v16,如图 1B 所示),任选还包含 SEQ ID NO:2 的轻链可变域序列 (v16,如图 1A 所示),其任选包含在重链可变域中的 56、100 和 / 或 100a 位的一个或多个氨基酸替代 (例如 D56A、N100A 或 N100Y 和 / 或 S100aR),以及在轻链可变域中的 32 和 / 或 92 位的一个或多个氨基酸替代 (例如 M32L 和 / 或 S92A)。在一些实施方案中,该抗体是完整抗体,其包含 SEQ ID NO. 13 或 16 的轻链氨基酸序列以及 SEQ ID NO. 14、15、17、22 或 25 的重链氨基酸序列。在一些实施方案中,该人源化 2H7 抗体是 ocrelizumab (Genentech)。

[0250] 在一些实施方案中,人源化 2H7 是完整抗体或抗体片段,其包含轻链可变序列:

[0251] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS GVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:2);

[0252] 和重链可变序列:

[0253] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP GNGDTSYNQKFKGRF TISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSY WYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:8)。

[0254] 在一些实施方案中,人源化 2H7 抗体是完整抗体,在一些实施方案中,其包含轻链氨基酸序列:

[0255] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAPSNLAS GVPSRFSGSGSGT DFTTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPFTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTTSLKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSNRGEC (SEQ ID NO:13);

[0256] 和重链氨基酸序列:

[0257] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP GNGDTSYNQKFKG RFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSY WYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

[0258] 或重链氨基酸序列:

[0259] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMH WVRQAPGKGLEWVGAIYP GNGDTSYNQKFK GGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSY WYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK

STSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :15).

[0260] 在一些实施方案中,人源化 2H7 抗体包含 2H7. v511 轻链可变域序列:

[0261] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG VPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO :23)

[0262] 和 2H7. v511 重链可变域序列:

[0263] EVQLVESGGGLVQPGSLRLSAAAGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP GNGATSYNQKFKGRFT
ISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYRY WYFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO. 24).

[0264] 在一些实施方案中,人源化 2H7. v511 抗体是完整抗体,其可包含轻链氨基酸序
列:

[0265] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASG VPSRFSGSGSGT
DFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKH KUYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO :16)

[0266] 和 SEQ ID NO. 17 的重链氨基酸序列或:

[0267] EVQLVESGGGLVQPGSLRLSAAAGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYP GNGATSYNQKFKGR
FTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYSYRY WYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TK VDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO. 25).

[0268] 在一些实施方案中,本文的抗体还可包含提高 ADCC 活性的 Fc 区中的至少一个氨
基酸替代,例如其中使用重链残基的 Eu 编号,氨基酸替代为在 298、333 和 334 位(优选
S298A、E333A 和 K334A)。还参见 US 专利 6,737,056B1,Presta。这些抗体中的任一种可包
含提高 FcRn 结合或血清半衰期的 Fc 区中的至少一个替代,例如在重链位置 434 的替代,例
如 N434W。还参见美国专利 6,737,056B1,Presta。这些抗体中的任一种还可包含增加 CDC
活性的 Fc 区中的至少一个氨基酸替代,例如包含至少一个在位置 326 的替代(优选 K326A
或 K326W)。还参见美国专利 6,528,624B1(Idusogie 等人)。

[0269] 在一些实施方案中,人源化 2H7 变体是包含 SEQ ID NO :2 的轻链可变域和 SEQ ID
NO :8 的重链可变域的那些,包括 Fc 区(如果存在)中有替代或没有替代的那些,以及包含
在 SEQ ID NO :8 中具有变化 N100A ;或 D56A 和 N100A ;或 D56A、N100Y 和 S100aR 的重链可
变域和在 SEQ ID NO :2 中具有变化 M32L ;或 S92A ;或 M32L 和 S92A 的轻链可变域的那些。
2H7. v16 的重链可变域中的 M34 已经被鉴定为抗体稳定性的潜在源,并且是另一潜在的进
行替代的候选者。

[0270] 在本发明的一些实施方案中,基于 2H7. v16 的变体的可变区包含 v16 的氨基酸序

列,但是具有在示于下表的位置的氨基酸替代。除非另有说明,否则 2H7 变体将具有与 v16 相同的轻链。

[0271] 表 1 :示例性人源化 2H7 抗体变体

[0272]

2H7 版本	重链 (V _H)变化	轻链 (V _L)变化	Fc 变化
16 用作参照			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L
588	-	-	S298A, E333A, K334A, K326A
511	D56A, N100Y, S100aR	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A

[0273] (iv) 人抗体

[0274] 作为人源化的替代方法,可生成人抗体。例如,现在可以生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成全人抗体库的转基因动物(例如小鼠)。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见例如 Jakobovits 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993);Jakobovits 等人, Nature, 362 :255-258(1993);Bruggemann 等人, Year in Immuno., 7 :33(1993);和美国专利 5,591,669、5,589,369 和 5,545,807。

[0275] 或者,噬菌体展示技术(McCafferty 等人, Nature 348 :552-553(1990))可用于在体外来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)域基因库生成人抗体和抗体片段。根据这种技术,将抗体V结构域基因以符合读框的方式克隆到丝状噬菌体例如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因中,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以以抗体的功能特性为基础进行选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。由此,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行;有关综述参见例如 Johnson, Kevin S 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3 :564-571(1993)。数种来源的V基因区段可用于噬菌体展示。

Clackson 等人, Nature 352:624-628(1991) 从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库分离得到大量不同的抗噁唑酮抗体。可本质上依照 Marks 等人, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991), 或 Griffith 等人, EMBO J. 12:725-734(1993) 所述技术, 构建来自未免疫人供体的 V 基因库, 并分离针对一系列不同抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利 5,565,332 和 5,573,905。

[0276] 还可通过体外激活的 B 细胞(参见美国专利 5,567,610 和 5,229,275) 来生成抗体。

[0277] (v) 抗体片段

[0278] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto 等人, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992) 和 Brennan 等人, Science, 229:81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如,可从上文讨论的噬菌体抗体文库分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段,并通过化学方法偶联以形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等人, Bio/Technology 10:163-167(1992))。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。用于生成抗体片段的其它技术对本领域技术人员是显而易见的。在其它实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 WO 93/16185; 美国专利 5,571,894; 和美国专利 5,587,458。抗体片段还可以是“线性抗体”,例如美国专利 5,641,870 中描述的抗体。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0279] (vi) 双特异性抗体

[0280] 双特异性抗体指对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。示例性的双特异性抗体可结合 B 细胞表面标志的两种不同表位。其它此类抗体可结合 B 细胞表面标志且还结合第二种不同的 B 细胞表面标志。或者,抗 B 细胞表面标志结合臂可与结合白细胞上的触发分子例如 T 细胞受体分子(例如 CD2 或 CD3) 或 IgG 的 Fc 受体(FcγR), 例如 FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32) 和 FcγRIII(CD16) 的臂组合,使得细胞防御机制聚焦于该 B 细胞。双特异性抗体还可用于将细胞毒性剂定位于 B 细胞。这些抗体拥有 B 细胞表面标志结合臂以及结合细胞毒性剂(例如皂草毒蛋白、抗干扰素-α、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨喋呤或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性抗体制备成长抗体或抗体片段(例如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0281] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生成基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两种链具有不同的特异性(Millstein 等人, Nature, 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机组合,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦,且产物产量低。WO93/08829 和 Traunecker 等人, EMBO J., 10:3655-3659(1991) 中公开了类似的流程。

[0282] 根据一种不同的方法,将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。在一些实施方案中,融合使用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定域。在一些实施方案中,在至少一种融合物中具有包含轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及,如果需要,免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于

构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时,可以将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个载体。

[0283] 在本方法的一些实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已经发现这种不对称结构便于将所需双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开,这是因为免疫球蛋白轻链仅在双特异性分子的一半中存在可以提供分离的便利途径。该方法公开于 W094/04690 中。关于生成双特异性抗体的其它细节参见例如 Suresh 等人, *Methods in Enzymology*, 121:210(1986)。

[0284] 根据美国专利 5,731,168 中描述的另一种方法,可改造一对抗体分子之间的界面,将从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。在一些实施方案中,界面包含至少部分 CH3 抗体恒定域。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。针对该大侧链,在第二抗体分子的界面上通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,产生相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物例如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0285] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合”抗体。例如,异源缀合物中的一种抗体可与亲合素偶联,另一可以与生物素偶联。此类抗体已经建议例如,用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980),和用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/200373 和 EP 03089)。可使用任何便利的交联方法来制备异源缀合抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的,并且连同许多交联技术一起公开于美国专利 4,676,980 中。

[0286] 文献中还描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan 等人, *Science*, 229:81(1985) 描述了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 F(ab')₂ 片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫化物的形成。然后将产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将 Fab'-TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原而重新恢复成 Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一 Fab'-TNB 衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作选择性固定化酶的试剂。

[0287] 还描述了从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合而与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。将抗体同二聚体在铰链区还原而形成单体,然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993) 描述的该“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的可选机制。该片段包含通过接头相连的轻链可变域(VL)和重链可变域(VH),所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。由此,迫使一个片段上的 VH 和 VL 结构域与另一个片段上的互补 VH 和 VL 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv(sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152:5368(1994)。

[0288] 考虑具有两个以上效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt 等人,

J. Immunol. 147 :60 (1991)。

[0289] V. 抗体的缀合物和其它修饰

[0290] 任选将本文方法中所使用的或产品中所包含的抗体与细胞毒性剂缀合。例如,可将抗体与 WO 2004/032828 中描述的缀合物。

[0291] 上文已经描述了可用于生成此类抗体-细胞毒性剂缀合物的化疗剂。

[0292] 本文还考虑抗体与一种或多种小分子毒素形成的缀合物,例如加利车霉素、美登素(美国专利 5,208,020)、单端孢菌毒素和 CC1065。在本发明的一个实施方案中,将抗体与一个和多个美登素分子缀合(例如每个抗体分子缀合约 1 个至约 10 个美登素分子)。例如可将美登素转变为 May-SS-Me,后者可还原为 May-SH3 并与经修饰抗体反应 (Chari 等人, Cancer Research 52 :127-131 (1992)) 以产生类美登素-抗体缀合物。

[0293] 或者,将抗体与一个或多个加利车霉素分子缀合。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I (Hinman 等人, Cancer Research 53 :3336-3342 (1993) 和 Lode 等人, Cancer Research 58 :2925-2928 (1998))。

[0294] 可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 (modeccin) A 链、 α -帚曲霉素 (sarcin)、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、香石竹毒蛋白 (dianthin)、美洲商陆 (*Phytolacca Americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (croton)、皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制物、白树毒素 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (neomycin) 和单端孢菌毒素 ((tricothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日公布的 WO 1993/21232。

[0295] 本发明还考虑与具有核酸水解活性的化合物(例如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶例如脱氧核糖核酸酶;DNA 酶)缀合的抗体。

[0296] 有多种放射性同位素可用于生成放射性缀合抗体。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素。

[0297] 可使用多种双官能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒性剂的缀合物,例如 3-(2-吡啶基二硫基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸 N-琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫烷 (iminothiolane) (IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(例如盐酸二甲基己二酰亚胺酯)、活性酯类(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(例如戊二醛)、双叠氮化合物(例如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(例如双(对叠氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可如 Vitetta 等人, Science 238 :1098 (1987) 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 WO94/11026。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、二甲基接头或含二硫化物接头 (Chari 等人, Cancer Research 52 :127-131 (1992))。

[0298] 或者,可例如通过重组技术或肽合成法来制备包含抗体和细胞毒性剂的融合蛋

白。

[0299] 在另一个实施方案中,可以将抗体与“受体”(例如链霉亲和素)缀合,用于肿瘤的预靶向,其中对患者施用抗体-受体缀合物,随后使用清除剂从循环中除去未结合的缀合物,然后施用与细胞毒性剂(例如放射性核苷)缀合的“配体”(例如亲和素)。

[0300] 还可将本发明的抗体与前体药物活化酶缀合,后者将前体药物(例如肽基化疗剂,参见 WO 81/01145)转变为活性抗癌药。参见例如 WO 88/07378 和美国专利 4,975,278。

[0301] 此类缀合物的酶成分包括能够作用于前体药物从而将其转变为更具活性的细胞毒性形式的任何酶。

[0302] 可用于本发明方法的酶包括但不限于可将含磷酸盐/酯的前体药物转变为游离药物的碱性磷酸酶;可将含硫酸盐/酯的前体药物转变为游离药物的芳基硫酸酯酶;可将无毒 5-氟胞嘧啶转变为抗癌药物 5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可将含肽的前体药物转变为游离药物的蛋白酶,例如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(例如组织蛋白酶 B 和 L);可转化含 D-氨基酸替代物的前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶;可将糖基化前体药物转变为游离药物的碳水化合物切割酶类,例如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可将 β -内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 β -内酰胺酶;及可将在其氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变成游离药物的青霉素酰胺酶,例如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者,可使用具有酶活性的抗体,本领域也称作“抗体酶”(abzymes),将本发明的前体药物转变为游离活性药物(参见例如 Massey, Nature 328:457-458(1987))。可如本文所述制备抗体-抗体酶缀合物,用于将抗体酶投递至肿瘤细胞群。

[0303] 可通过本领域众所周知的技术将本发明的酶与抗体共价结合,例如使用上文讨论的异双官能交联剂。或者,可使用本领域众所周知的重组 DNA 技术构建包含与本发明酶的至少功能活性部分连接的本发明抗体的至少抗原结合区的融合蛋白(参见例如 Neuberger 等人, Nature, 312:604-608(1984))。

[0304] 本文还考虑抗体的其它修饰。例如,可将抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种连接,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧烷烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。在一些实施方案中,抗体片段(例如 Fab')与一个或多个 PEG 分子连接。

[0305] 本文公开的抗体还可配制成脂质体。可通过本领域已知的方法来制备包含抗体的脂质体,例如 Epstein 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwang 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 以及 1997 年 10 月 23 日公布的 W097/38731 中所述。美国专利 5,013,556 中公开了循环时间延长的脂质体。

[0306] 可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂类组合物,通过反相蒸发法,生成特别有用的脂质体。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器,以产生具有所需直径的脂质体。可如 Martin 等人, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982) 中所述,将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体缀合。任选在脂质体中包含化疗剂。参见 Gabizon 等人, J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)。

[0307] 考虑抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将适当的核苷酸改变引入抗体核酸或通过肽合成法来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列中的残基缺失和/或插入和/或替代。

只要最终的构建物具有所需特性,可进行缺失、插入和替代的任何组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可能改变抗体的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数目或位置。

[0308] 鉴定抗体中可以作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如 Cunningham 和 Wells, Science 244:1081-1085(1989) 所述。这里,鉴定一个或一组靶残基(例如带电荷的残基,例如 arg、asp、his、lys 和 glu),并用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)替代,以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体,进一步细化那些对替代显示功能敏感性的氨基酸位置。由此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先确定的,但是突变本身的性质不需要预先确定。例如,为了分析在指定位点处的突变的表现,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机突变,并对所表达的抗体变体筛选所需活性。

[0309] 氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-末端的融合,长度范围从一个残基到包含上百个或更多个残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N-末端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括在抗体的 N-或 C-末端融合酶或提高抗体血清半衰期的多肽。

[0310] 另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基被不同残基替换。在抗体中进行替代诱变的最有意义位点包括高变区,但也可以考虑 FR 改变。保守替代在表 2 中显示在“优选替代”标题下。如果此类替代导致生物学活性的改变,那么可以引入表 2 中称为“示例性替代”的更实质性改变,并筛选产物。

[0311] 表 2.

[0312]

原始残基	示例性替代	优选替代
Ala(A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp(D)	Glu; Asn	Glu
Cys(C)	Ser; Ala	Ser

[0313]

Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu(E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile(I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys(K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met(M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0314] 对抗体生物学特性的实质性修饰可以通过选择对以下方面的保持具有显著不同的影响的替代来完成：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性，可将氨基酸如下分组 (A. L. Lehninger,《Biochemistry》，第 2 版,73-75,Worth Publishers,New York,1975)：

[0315] (1) 非极性：Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)

[0316] (2) 不带电荷的、极性的：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)

[0317] (3) 酸性的：Asp(D)、Glu(E)

[0318] (4) 碱性的：Lys(K)、Arg(R)、His(H)

[0319] 或者，根据共同的侧链特性，可将天然存在残基如下分组：

[0320] (1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0321] (2) 中性的、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0322] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0323] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0324] (5) 影响链取向的残基 :Gly、Pro ;

[0325] (6) 芳香族的 :Trp、Tyr、Phe。

[0326] 非保守替代需要将这些类别之一中的成员交换成另一个类别的。

[0327] 任何不涉及保持抗体正确构象的半胱氨酸残基也可替代,通常用丝氨酸,以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可向抗体中添加半胱氨酸键以改善其稳定性(特别是当抗体是抗体片段例如 Fv 片段时)。

[0328] 特别优选的一类替代变体牵涉替代亲本抗体的一个或多个高变区残基。通常,选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法是使用噬菌体展示进行的亲和力成熟。简而言之,将数个高变区位点(例如 6-7 个位点)突变,在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,作为与各个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性(例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者/另外,可能有益的是,分析抗原-抗体复合物的晶体结构,以鉴定抗体和抗原之间的接触点。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生此类变体,如本文所述对该组变体进行筛选,可选择在一种或多种相关测定试验中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0329] 抗体的另一类氨基酸变体改变抗体的原始糖基化样式。此类改变包括:删除存在于抗体中的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0330] 多肽的糖基化通常或是 N-连接的或是 O-连接的。N-连接指碳水化合物部分附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸)是用于将碳水化合物部分酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。由此,多肽中这些三肽序列之任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

[0331] 向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上文描述的三肽序列而便利的完成(用于 N-连接的糖基化位点)。这种改变还可通过向原始抗体的序列中添加或替代入一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于 O-连接的糖基化位点)。

[0332] 在抗体包含 Fc 区时,可改变附着其上的碳水化合物。例如,美国专利申请 2003/0157108A1(Presta, L.) 中描述了具有成熟碳水化合物结构的抗体,所述结构缺乏附着于抗体 Fc 区的岩藻糖;还可参见关注 CD20 抗体组合物的 US 2004/0093621A1(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)。W003/011878(Jean-Mairet 等人)和美国专利 6,602,684(Umana 等人)中提到了在附着于抗体 Fc 区的碳水化合物中具有平分型 N-乙酰葡萄糖胺(G1cNAc)的抗体。W097/30087(Patel 等人)中报告了在附着于抗体 Fc 区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体。关于附着于其 Fc 区的碳水化合物更改了的抗体,还可参见 W0 98/58964(Raju, S.) 和 W0 99/22764(Raju, S.)。

[0333] 在一些实施方案中,本文中的糖基化变体包含 Fc 区,其中附着于 Fc 区的碳水化

合物结构缺乏岩藻糖。此类变体具有改进的 ADCC 功能。任选的是, Fc 区还包含进一步改进 ADCC 的一个或多个氨基酸替代, 例如 Fc 区位置 298、333 和 / 或 334 处的替代 (Eu 残基编号)。涉及“脱岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体的出版物的例子包括: 美国专利申请 US2003/0157108A1, Presta, L; WO 00/61739A1; W001/29246A1; US2003/0115614A1; US2002/0164328A1; US2004/0093621A1; US2004/0132140A1; US2004/0110704A1; US2004/0110282A1; US2004/0109865A1; W003/085119A1; W003/084570A1; W02005/035778; W02005/035586 (描述岩藻糖化的 RNA 抑制 (RNAi)); Okazaki 等人, J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki 等人, Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。生成脱岩藻糖化抗体的细胞系的例子包括蛋白质岩藻糖化缺陷型 Lec13CHO 细胞 (Ripka 等人, Arch. Biochem. Biophys. 249: 533-545 (1986); 美国专利申请 US 2003/0157108A1, Presta, L; 和 WO 2004/056312A1, Adams 等人, 尤其是实施例 11), 和敲除细胞系, 例如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因 FUT8 敲除的 CHO 细胞 (Yamane-Ohnuki 等人, Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))。

[0334] 编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离 (在天然存在氨基酸序列变体的情况中), 或者通过对早期制备的变体或非变体形式的抗体进行寡核苷酸介导的 (或定点) 诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0335] 可能希望在效应子功能方面修饰本发明的抗体, 例如增强抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这可通过在抗体 Fc 区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者 / 另外, 可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基, 从而使得在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和 / 或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞性细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等人, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) 和 Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff 等人, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) 中描述的异双官能交联剂来制备。或者, 抗体可改造成具有双重 Fc 区, 并因此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等人, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)。

[0336] WO 00/42072 (Presta, L.) 描述了在存在人效应细胞时具有改进的 ADCC 功能的抗体, 其中所述抗体在其 Fc 区中包含氨基酸替代。在一些实施方案中, 具有改进的 ADCC 的抗体在 Fc 区的位置 298、333 和 / 或 334 包含替代。在一些实施方案中, 改变的 Fc 区是在一个、两个或三个这些位置处包含替代或由其组成的人 IgG1Fc 区。

[0337] WO 99/51642、美国专利 6,194,551B1、美国专利 6,242,195B1、美国专利 6,528,624B1 和美国专利 6,538,124 (Idusogie 等人) 中描述了具有改变的 C1q 结合和 / 或补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的抗体。这些抗体在其 Fc 区的氨基酸位置 270、322、326、327、329、313、333 和 / 或 334 中的一个或多个处包含氨基酸替代。

[0338] 为了提高抗体的血清半衰期, 可如例如美国专利 5,739,277 中所述将救援受体 (salvage receptor) 结合表位掺入抗体 (尤其是抗体片段) 中。如本文所用, 术语“救援受体结合表位”指 IgG 分子 (例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4) 的 Fc 区中负责提高 IgG 分子体内血清半衰期的表位。W000/42072 (Presta, L.) 中也描述了在其 Fc 区中具有替代且血清半衰期提高了的抗体。

[0339] 还考虑具有三个或更多个 (优选四个) 功能性抗原结合位点的改造抗体 (美国专

利申请 US 2002/0004587A1, Miller 等人)。

[0340] VI. 药物制剂

[0341] 制备依照本发明使用的抗体的治疗制剂以备贮存,即,以冻干制剂或水溶液的形式,将具有所需纯化程度的抗体与任选的可药用的载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences),第 16 版,Osol, A. 编著,1980) 混合。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,诸如钠;金属络合物(如 Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™) 或聚乙二醇 (PEG)。

[0342] 示例性抗 CD20 抗体制剂描述于 WO 98/56418 中。该出版物描述了 pH5.0 的液体多剂量制剂,其含有 40mg/mL 利妥昔单抗,25mM 醋酸盐,150mM 海藻糖、0.9% 苯甲醇、0.02% 聚山梨酸酯 20,它在 2-8℃ 具有最少 2 年的贮存期。另一种感兴趣的抗 CD20 制剂在 9.0mg/mL 氯化钠、7.35mg/mL 二水合柠檬酸钠、0.7mg/mL 聚山梨酸酯 80 和注射用无菌水, pH6.5 中包含 10mg/mL 利妥昔单抗。

[0343] 适于皮下施用的冻干制剂描述于美国专利 6,267,958 (Andya 等人)。此类冻干制剂可用合适的稀释剂复原成高蛋白质浓度,且复原后的制剂可皮下施用于本文中待治疗的哺乳动物。

[0344] 还考虑结晶形式的抗体。参见例如 US 2002/0136719A1 (Shenoy 等人)。

[0345] 本文中的制剂还可含有所治疗的具体适应症所必需的一种以上活性化合物,在一些实施方案中,那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。例如,可能还希望在制剂中提供细胞毒性剂;化疗剂;免疫抑制剂;细胞因子;细胞因子拮抗剂或抗体;生长因子;激素;整联蛋白;整联蛋白拮抗剂或抗体(例如 LFA-1 抗体,诸如可从 Genentech 购得的依法珠单抗 / RAPTIVA,或 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体,诸如可从 Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals 公司购得的那他珠单抗 / **TYSABRI®**);干扰素类药物,诸如 IFN- β -1a (**REBIF®** 和 **AVONEX®**) 或 IFN- β -1b (**BETASERON®**);寡肽,诸如醋酸格拉默 (**COPAXONE®**);细胞毒性剂,诸如米托蒽醌(**NOVANTRONE®**)、甲氨喋呤、环磷酰胺、苯丁酸氮芥或硫唑嘌呤;静脉内免疫球蛋白(γ 球蛋白);淋巴细胞耗竭性药物,例如米托蒽醌、环磷酰胺、Campath、抗 CD4 或克拉屈滨;非淋巴细胞耗竭性免疫抑制性药物,例如霉酚酸吗啉乙酯 (MMF) 或环孢菌素;"他汀"类降胆固醇药物;雌二醇;睾酮;激素替代疗法;治疗 MS 继发的或相关的症状(例如痉挛、失禁、疼痛、疲劳)的药物;TNF 抑制剂;改变病情抗风湿药 (DMARD);非甾体抗炎药 (NSAID);皮质类固醇,例如甲泼尼龙、泼尼松、地塞米松或糖皮质激素;左旋甲状腺素;环孢菌素 A;促生长素抑制素类似物;细胞因子拮抗剂;抗代谢物;免疫抑制剂;整联蛋白拮抗剂或抗体,例如 LFA-1 抗体,例如依法珠单抗或 $\alpha 4$ 整联蛋白抗体,例如那他珠单抗;其它 B 细胞表面拮抗剂/抗体等等。此类其它活性剂的类

型和有效量取决于例如制剂中存在的抗体的量、所治疗多发性硬化的类型、及患者的临床参数。这些通常以与在此之前所用相同的剂量和施用途径或者迄今所用剂量的大约 1-99% 使用。

[0346] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微囊）、在胶态药物传递系统中（例如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米囊）中、或在巨乳（macroemulsion）中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》，第 16 版，Osol, A. 编著，1980。

[0347] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质以定型产品的形式存在，如薄膜或微囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚（2-羟乙基-甲基丙烯酸酯）或聚（乙烯醇）、聚交酯（美国专利 3,773,919）、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0348] 用于体内施用的制剂必须是无菌的。这可容易地通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0349] 在一些实施方案中，制剂包含组氨酸缓冲液、海藻糖、蔗糖和聚山梨酸酯 20 中的一种或多种。在一些实施方案中，该组氨酸缓冲剂是组氨酸-醋酸盐缓冲液，pH 6.0。适用于施用抗 CD20 抗体的制剂的实例记载于 Andya 等人，US2006/0088523 中，该专利申请中关于制剂的全部内容通过引用并入本文。

[0350] 示例性抗 CD20 抗体制剂描述于 Andya 等人，US2006/0088523 和 W098/56418 中，这两篇专利申请通过引用整体并入。在一些实施方案中，该制剂为 pH 5.0 的液体多剂量制剂，其包含 40mg/mL 的抗 CD20 抗体、25mM 醋酸盐、150mM 海藻糖、0.9% 苯甲醇、0.02% 聚山梨酸酯 20，它在 2-8℃ 具有最少 2 年的贮存期。在一些实施方案中，另一种感兴趣的抗 CD20 制剂在 9.0mg/mL 氯化钠、7.35mg/mL 二水合柠檬酸钠、0.7mg/mL 聚山梨酸酯 80 和注射用无菌水，pH6.5 中包含 10mg/mL 抗体。在一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体在含水药物制剂中，所述含水药物制剂含有约 pH 4.8-约 pH 5.5、优选 pH5.5 的 10-30mM 醋酸钠、约 0.01-0.1% v/v 的作为表面活性剂的聚山梨酸酯、约 2-10% w/v 的海藻糖和作为防腐剂的苯甲醇（U.S. 6,171,586，其通过引用整体并入）。适用于皮下施用的冻干制剂描述于 W097/04801 中，该专利申请通过引用整体并入。可用适合的稀释剂将此类冻干制剂复原成高蛋白浓度，并且可将该复原的制剂皮下施用至本文待治疗的哺乳动物。

[0351] 在一些实施方案中，人源化 2H7 变体制剂是在 10mM 组氨酸、6% 蔗糖、0.02% 聚山梨酸酯 20、pH 5.8 中的 12-14mg/mL 的抗体。在特定的实施方案中，2H7 变体、特别是 2H7.v16，在 10mM 硫酸组氨酸、60mg/ml 蔗糖、0.2mg/ml 聚山梨酸酯 20 和无菌注射用水，pH5.8 中配制成 20mg/mL 抗体。在特定的实施方案中，人源化 2H7.v16 的一种 IV 制剂是：在 20mM 醋酸钠、4% 二水合海藻糖、0.02% 聚山梨酸酯 20 (Tween 20™)、pH 5.3 中的 30mg/ml 抗体。在一些实施方案中，人源化 2H7.v511 变体制剂是在 10mM 硫酸组氨酸、60mg/ml 蔗糖（6%）、0.2mg/ml 聚山梨酸酯 20 (0.02%) 和无菌注射用水，pH5.8 中的 15-30mg/ml 抗体，优选 20mg/mL 抗体。在又一个实施方案中，2H7 变体、特别是 2H7.v511 的制剂是在 20mM 醋酸钠、4% 二水合海藻糖、0.02% 聚山梨酸酯 20、pH 5.5 中的用于静脉内施用的 20mg/ml 2H7。在

一些实施方案中, 2H7.v 114 制剂是在 20mM 醋酸钠、240mM (8%) 二水合海藻糖、0.02% 聚山梨酸酯 20、pH 5.3 中的 15-25mg/ml (优选 20mg/ml) 抗体。

[0352] VII. 产品和制备方法

[0353] 本发明提供了产品, 其包括: (a) 含有 ocrelizumab 的容器; 和 (b) 具有用于治疗患者中的多发性硬化的说明书的包装插页, 其中所述说明书指示 (即显示) 向所述患者施用有效量的 ocrelizumab 以提供约 0.3 克至约 0.6 克的初次 ocrelizumab 暴露, 随后是约 0.3 克至约 0.6 克的第二次 ocrelizumab 暴露, 其中直到距初次暴露约 16 至 60 周时才施用第二次暴露, 并且每次 ocrelizumab 暴露是作为一剂或两剂 ocrelizumab 提供给患者的。在一些实施方案中, 所述初次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中, 所述第二次 ocrelizumab 暴露是约 0.6 克。在一些实施方案中, 距初次暴露约 24 周时施用第二次暴露。在一些实施方案中, 一次或多次 ocrelizumab 暴露是作为一剂 ocrelizumab 向患者提供的。在一些实施方案中, 一次或多次 ocrelizumab 暴露是作为两剂 ocrelizumab 向患者提供的。在一些实施方案中, 所述两剂 ocrelizumab 包含约 0.3 克 ocrelizumab。

[0354] 本发明还提供了包含可用于本文所述的进行性多发性硬化治疗的物质的产品。在一些实施方案中, 所述产品包括包装在一起的药物组合物和标签, 所述药物组合物包含抗 CD20 抗体和可药用的载体, 所述标签指示 (即显示) 所述抗 CD20 抗体或药物组合物适用于治疗具有一种或多种选自下组的特征的多发性硬化患者: (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0355] 在一些实施方案中, 所述产品包括包装在一起的药物组合物和标签, 所述药物组合物包含抗 CD20 抗体和可药用的载体, 所述标签指示所述抗 CD20 抗体或药物组合物的施用基于具有一种或多种选自下组的特征的患者: (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0356] 在一些实施方案中, 产品包括包装在一起的药物组合物和标签, 所述药物组合物包含抗 CD20 抗体和可药用的载体, 所述标签指示向所选患者施用药物组合物, 其中所选患者具有一种或多种选自下组的特征: (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0357] 在本文所述的任何产品的一些实施方案中, 患者具有一种或多种选自下组的特征: (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, 和 (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分。

[0358] 在本文所述的任何产品的一些实施方案中, 所述患者具有一种以上选自下组的特征: (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在本文所述的任何产品的一些实施方案中, 所述患者具有两种选自下组的特征: (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, 和 (c) 在开始治疗前两年内 EDSS 增加至少约 1 分。在一些实施方案中, 所述患者具有三种选自下组的特征: (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分, 和

(d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在一些实施方案中,所述患者具有 (a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0359] 在任何产品的一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0360] 在任何产品的一些实施方案中,所述患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数显示。在一些实施方案中,炎症迹象由用等电聚焦检测的 IgG 寡克隆带显示。

[0361] 在任何产品的一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中,所述患者不到约 15 年已经具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,所述患者不到约 10 年已经具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。在一些实施方案中,EDSS 增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,该在开始治疗前两年内 EDSS 增加 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中,患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。

[0362] 在本文所述的任何产品的一些实施方案中,患者和 / 或患者人群的特征在于,其 MSSS 大于约 6、7、8 或 9 中的任一个。在任何产品的一些实施方案中,患者和 / 或患者人群的特征在于,其 MSSS 大于约 9。

[0363] 在任何产品的一些实施方案中,患者的年龄小于约 51 岁。

[0364] 在任何产品的一些实施方案中,治疗使达到确认的疾病进展的时间减慢。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 12 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 24 周的 EDSS 增加。

[0365] 在任何产品的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括 :a) 含有 SEQ ID NO :10、SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0366] 产品包括容器和贴在所述容器上或与其相随的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。所述容器可以用各种材料例如玻璃或塑料制成。该容器容纳或包含有效治疗多发性硬化的组合物,且可具有无菌存取口 (例如该容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。所述组合物中的至少一种活性剂是抗体。在一些实施方案中,该容器包含约 0.3 克至约 4.0 克抗 CD20 抗体。在一些实施方案中该容器包含约 0.3 克至约 1.5 克抗 CD20 抗体。

[0367] 所述标签或包装插页表明该组合物用于在患有多发性硬化的患者中治疗多发性硬化,以及有关抗体和所提供的任何其它药物的给药量和间隔的具体指导。该产品还可包括第二容器,其中包含可药用的稀释缓冲液,例如注射用抑菌水 (BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏 (Ringer) 溶液和右旋糖溶液。该产品还可包括从商业和用户角度所需的其它物质,

包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0368] 任选的是,本文中的产品还包括含有用于治疗的非本发明抗体的活性剂的容器,且还包括用所述活性剂治疗患者的说明书,所述活性剂优选是化疗剂或免疫抑制剂、干扰素类药物,例如 IFN- β -1a(**REBIF®**和**AVONEX®**)或 IFN- β -1b(**BETASERON®**);寡肽,例如醋酸格拉默(**COPAXONE®**);细胞毒性剂,例如米托蒽醌(**NOVANTRONE®**)、甲氨喋呤、环磷酰胺、苯丁酸氮芥或硫唑嘌呤;静脉内免疫球蛋白(γ 球蛋白);淋巴细胞耗竭性药物,例如米托蒽醌、环磷酰胺、Campath、抗 CD4 或克拉屈滨;非淋巴细胞耗竭性免疫抑制性药物,例如霉酚酸吗啉乙酯(MMF)或环孢菌素;“他汀”类降胆固醇药物;雌二醇;激素替代疗法;治疗 MS 继发的或相关的症状(例如痉挛、失禁、疼痛、疲劳)的药物;TNF 抑制剂;改变病情抗风湿药(DMARD);非甾体抗炎药(NSAID);皮质类固醇,例如甲泼尼龙、泼尼松、地塞米松或糖皮质激素;左旋甲状腺素;环孢菌素 A;促生长素抑制素类似物;细胞因子或细胞因子受体拮抗剂;抗代谢物;免疫抑制剂;整联蛋白拮抗剂或抗体,例如 LFA-1 抗体,例如依法珠单抗或 α 4 整联蛋白抗体,例如那他珠单抗;其它 B 细胞表面标志抗体;等等。

[0369] 在一些实施方案中,该标签还可指示本文所述的任何实施方案。例如,该标签可指示患者具有 a) 小于约 55 岁的年龄和 (b) 一种或多种钆染色损伤。

[0370] 在本发明的另一个实施方案中,提供了用于制备包含本文所述的用于治疗进行性多发性硬化的物质的产品的方法。在一些实施方案中,用于制备抗 CD20 抗体或其药物组合物包括将所述抗 CD20 抗体或药物组合物和标签组合到包装中,所述标签指示所述抗 CD20 抗体或药物组合物适用于治疗进行性多发性硬化患者,其中所述患者具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分。

[0371] 在本文所述的任何制备方法的一些实施方案中,所述患者具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤,和 (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分。

[0372] VIII. 宣传和销售的方法

[0373] 本发明还提供了用于宣传抗 CD20 抗体或其可药用的组合物的方法,所述方法包括向目标受众推广抗 CD20 抗体或其药物组合物在治疗进行性多发性硬化患者或患者人群中的用途,其中所述患者或患者人群具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分。

[0374] 本文还提供了销售抗 CD20 抗体或其可药用的组合物用于进行性多发性硬化患者亚群的方法,所述方法包括告知目标受众关于抗 CD20 抗体用于治疗患者亚群的用途,其中所述患者亚群的特征在于此亚群的患者具有一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁, (b) 一种或多种钆染色损伤, (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表(EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分(MSSS) 大于约 5 分。

[0375] 此外,本发明提供了指定抗 CD20 抗体用于进行性多发性硬化患者亚群的方法,所述方法包括提供向患者亚群施用所述抗 CD20 抗体或其可药用的组合物的说明书,其中所

述患者亚群的特征在于此亚群患者具有一种或多种选自下组的特征：(a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分，和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0376] 本发明还提供了用于向进行性多发性硬化患者提供治疗选择的方法，所述方法包括将抗 CD20 抗体与包装插页一起包装到小瓶中，所述包装插页含有治疗进行性多发性硬化患者的说明书，其中所述患者具有一种或多种选自下组的特征：(a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分，和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0377] 在任何方法的一些实施方案中，所述患者具有一种或多种选自下组的特征：(a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，和 (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分。

[0378] 在任何方法的一些实施方案中，所述患者具有两种选自下组的特征：(a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分，和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在一些实施方案中，所述患者具有三种选自下组的特征：(a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分，和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在一些实施方案中，所述患者具有 (a) 年龄小于约 55 岁，(b) 一种或多种钆染色损伤，(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分，和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0379] 在任何方法的一些实施方案中，所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中，所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中，所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中，当开始治疗时，所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0380] 在任何方法的一些实施方案中，所述患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中，所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中，炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中，炎症迹象由通过等电聚焦检测的 IgG 寡克隆带指示。

[0381] 在任何方法的一些实施方案中，在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归因于复发。在一些实施方案中，所述患者不到约 15 年已经具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中，所述患者不到约 10 年已经具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中，当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。在一些实施方案中，EDSS 增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中，该在开始治疗前两年内 EDSS 增加 1.5 分不归因于复发。在一些实施方案中，患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。

[0382] 在任何方法的一些实施方案中，患者的年龄小于约 51 岁。

[0383] 在任何方法的一些实施方案中，治疗使达到确认的疾病进展的时间减慢。在一些实施方案中，所述确认的疾病进展是维持 12 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中，所述经确认的疾病进展是维持 24 周的 EDSS 增加。

[0384] 在任何方法的一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在任何方法的一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在任何方法的一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在任何方法的一些实施方案中，所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或

SBI-087。在任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在任何方法的一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0385] 本文所述的方法可包括在此描述的实施方案的任何组合。例如,方法包括其中所述患者具有 (a) 小于约 55 岁的年龄和 (b) 一种或多种钆染色损伤的方法。

[0386] IX. 用于预测对多发性硬化治疗的反应性的系统和方法

[0387] 本发明还提供了用于分析进行性多发性硬化受试者和 / 或患者是否会对采用多发性硬化治疗药物进行的治疗有反应的系统和方法。本发明提供了用于分析进行性多发性硬化患者对采用治疗多发性硬化的药物进行的治疗的反应性的系统,其包括:(a) 评价一种或多种选自下组的特征:(i) 年龄小于约 55 岁,(ii) 一种或多种钆染色损伤,(iii) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (iv) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分;(b) 执行 (a) 的评价的硬件;和 (c) 用于实施算法以确定患者是否对所述治疗敏感或有反应的计算工具。

[0388] 本发明还提供了用于预测进行性多发性硬化受试者是否会对采用治疗多发性硬化的药物进行的治疗有反应的方法,所述方法包括评价一种或多种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分,其中所述年龄、钆染色损伤、在开始治疗前两年内 EDSS 的增加、MSSS 或其组合指示受试者将对所述治疗有反应。

[0389] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,患者具有一种以上选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,和 (c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分。

[0390] 在本文所述的任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,所述患者具有一种以上选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,所述患者具有两种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在一些实施方案中,所述患者具有三种选自下组的特征:(a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。在一些实施方案中,所述患者具有 (a) 年龄小于约 55 岁,(b) 一种或多种钆染色损伤,(c) 在开始治疗前两年内扩展残疾状态量表 (EDSS) 增加至少约 1 分,和 (d) 多发性硬化严重性评分 (MSSS) 大于约 5 分。

[0391] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是原发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是继发进行性多发性硬化。在一些实施方案中,所述进行性多发性硬化是进行性复发型多发性硬化。在一些实施方案中,当开始治疗时,所述患者未被诊断为复发缓和型多发性硬化。

[0392] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,所述患者还在样品中具有炎症迹象。在一些实施方案中,所述样品是脑脊液样品。在一些实施方案中,炎症迹象由升高的 IgG 指数指示。在一些实施方案中,炎症迹象由通过等电聚焦检测的 IgG 寡克隆带指示。

[0393] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 的增加不归于复发。在一些实施方案中,所述患者不到约 15 年已经具有大于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,所述患者不到约 10 年已经具有小于或等于约 5.0 的 EDSS。在一些实施方案中,当开始治疗时 EDSS 为约 3.0 至约 6.5。在一些实施方案中,EDSS 增加为在开始治疗之前两年内 EDSS 增加至少约 1.5 分。在一些实施方案中,在开始治疗前两年内 EDSS 增加 1.5 分不归于复发。在一些实施方案中,所述患者还在开始治疗前两年内具有两次或更多次复发。

[0394] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,所述患者的年龄小于约 51 岁。

[0395] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,所述系统和 / 或方法还包括给患者建议。

[0396] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,治疗使达到确认的疾病进展的时间减慢。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 12 周的 EDSS 增加。在一些实施方案中,所述确认的疾病进展是维持 24 周的 EDSS 增加。

[0397] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,药物为干扰素 β -1b(例如 **Betaseron®**),干扰素 β -1a(例如 **Avonex®**或**Rebif®**)、格拉默(例如**Copaxone®**)、米托蒽醌(例如 Novantrone)、皮质类固醇(例如乙基泼尼松龙(ethylprednisolone)、泼尼松、地塞米松)、3-4 二氨基吡啶、ABT-874、阿伦单抗(Alemtuzumab)、沙丁胺醇(**Proventil®**)、ATL1102、阿托伐他汀(**Lipitor®**)、硫唑嘌呤、BG00012(富马酸二甲酯)、BHT-3009、肉毒杆菌毒素 A (**Botox®**)、C-105、cannador、屈大麻酚、四氢大麻酚、大麻二酚、CDP323、克拉屈滨、CNT0 1275、环磷酰胺、达克珠单抗、右美沙芬 / 奎尼丁(AVP-923, Zenvia™)、多奈哌齐(**Aricept®**)、多西环素、雌二醇、雌三醇、Etoprogestins、氨吡啶-SR(4-氨基吡啶、缓释制剂)、芬戈莫德(Fingolimod)(FTY720)、干扰素 tau、拉莫三嗪(**Lamictal®**)、拉喹莫德(Laquinimod)、利多卡因 + 丙胺卡因(EMLA)、MBP8298(合成髓鞘碱性蛋白肽)、美金刚(**Namenda®**)、甲泼尼龙、MN-166、莫达非尼(**Provigil®**)、霉酚酸吗啉乙酯(**Cellcept®**)、纳曲酮、那他珠单抗(**Tysabri®**)、帕罗西汀(**Paxil®**)、PI-2301(共聚物)、吡格列酮(**Actos®**)、Pixantrone(BBR 2778)、普伐他汀(**Pravachol®**)、普瑞巴林(**Lyrica®**)、孕酮、RG2077、利鲁唑(**Rilutek®**)、咯利普兰(磷酸二酯酶-4 抑制剂)、RTL1000、SB-683699、辛伐他汀(**Zocor®**)、T 细胞受体肽疫苗(NeuroVax™)、特立氟胺、睾酮凝胶(**Androgel®**)或甲氧苄啶。

[0398] 在任何系统和 / 或方法的一些实施方案中,所述用于治疗多发性硬化的药物是抗 CD20 抗体。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体包括:a) 含有 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:12 的重链可变区,和 b) 含有 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的轻链可变区。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ocrelizumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是利妥昔单抗。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 ofatumumab。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 TRU-015 或 SBI-087。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 GA101。在一些实施方案中,所述抗 CD20 抗体是 hA20。

[0399] 本文所述的任何系统和 / 或方法可包括本文所述的实施方案的任何组合。例如,所述方法包括其中所述患者具有(a) 小于约 55 岁的年龄和(b) 一种或多种钆染色损伤的

方法。

[0400] 下面的非限制性实施例举例说明本发明的更多细节。本说明书中所有引用的公开内容明确引入本文作为参考。

实施例

[0401] 实施例旨在仅仅示例本发明，因而不应该被认为以任何方式限制本发明，实施例还描述并详述了本文所述的发明的各个方面和实施方案。实施例和详述以示例的方式而不是以限制的方式提供。

[0402] 实施例 1 :Ocrelizumab 在复发缓和型多发性硬化 (RRMS) 中的 II 期研究

[0403] 进行了评价两种 ocrelizumab 给药方案在复发缓和型多发性硬化 (RRMS) 患者中的功效和安全性的 II 期、多中心、随机化、平行分组、部分盲法的、安慰剂和 Avonex 对照的剂量探索研究，其中所述功效通过脑磁共振成像 (MRI) 损伤来测量。

[0404] 研究中的两种 ocrelizumab 给药方案如下：1) ocrelizumab 1000mg 给药方案：包括用于第一治疗周期的 1000mg 的双重输注，和之后的用于后续治疗周期的 1000mg 的单次输注；和 2) ocrelizumab 600mg 给药方案：包括用于第一治疗周期的 300mg 的双重输注，以及之后的用于后续治疗周期的 600mg 的单次输注。

[0405] 如图 7 所述将符合条件的患者随机 (1 : 1 : 1 : 1) 分入四个治疗组 A、B、C 或 D 之一。图 7 概述了研究设计。

[0406] 组 A(ocrelizumab 1000mg)：在第 1 个治疗周期，两次静脉内 (i. v.) 输注 ocrelizumab，每次 1000mg，相隔 14 天。然后患者接受维持给药方案，即每个后续的 24 周治疗周期单次输注 1000mg。之后，为了在第 2 治疗周期中使研究维持双盲，患者接受相隔 14 天的两次输注，第一次输注为 ocrelizumab 1000mg，第二次输注为安慰剂。在第 3 和第 4 个治疗周期中，患者以双盲的方式用单次 1000mg 输注治疗，而没有第二安慰剂输注，直至基于初步分析选择出优选的剂量为止。

[0407] 组 B(ocrelizumab 600mg)：在第 1 个治疗周期，两次 i. v. 输注 ocrelizumab，每次 300mg，相隔 14 天。然后患者接受维持给药方案，即每个后续的 24 周治疗周期单次输注 600mg。之后，为了在第 2 治疗周期中使研究维持双盲，患者接受相隔 14 天的两次输注，第一次输注为 ocrelizumab 600mg，第二次输注为安慰剂。在第 3 和第 4 个治疗周期中，患者以双盲的方式用单次 600mg 输注治疗，而没有第二安慰剂输注，直至基于初步分析选择出优选的剂量为止。

[0408] 组 C (安慰剂)：在第 1 个治疗周期，两次 i. v. 输注安慰剂，相隔 14 天。此后，在第 2 治疗周期开始时将患者置于 600mg ocrelizumab 给药方案，以相隔 14 天的两次双盲 i. v. 输注 ocrelizumab 300mg 开始。然后患者在第 3 和第 4 个治疗周期接受维持给药方案，即以双盲的方式施用的 600mg 单次输注，直至基于初步分析选择出优选的剂量为止。

[0409] 组 D(Avonex)：在第 1 个治疗周期，每周肌内 (i. m.) Avonex 30 μ g。此后，在自愿和开放标签 (open label) 的基础上，在第 2 治疗周期开始时向患者提供 600mg ocrelizumab 给药方案，以相隔 14 天的两次 i. v. 输注 ocrelizumab 300mg 开始。在第 3 和第 4 个治疗周期患者用单次 600mg 输注治疗，直至基于初步分析选择出优选的剂量为止。

[0410] 对于所有组，在告知研究者和伦理委员会优选的剂量后，在患者接下来的后续治

疗周期中患者以单次输注的形式接受该优选的剂量 (600mg 或 1000mg)。

[0411] 研究药物的第一次施用,不论是 i. v. 输注 (ocrelizumab 或安慰剂) 还是 Avonex 的第一次 i. m. 注射,将规定治疗期的开始 (第 1 天)。在研究第 1 天以及伴随每次后续的 ocrelizumab 或安慰剂输注或对于接受 Avonex 的患者 (组 D) 根据 ocrelizumab 输注所要求的时间点,所有患者还接受 i. v. 输注甲泼尼龙 (methylprednisolone) 100mg。

[0412] 有四个治疗周期,即周期 1 = 基线至第 24 周;周期 2 = 第 24 周至 48 周;周期 3 = 第 48 周至第 72 周;周期 4 = 第 72 周至第 96 周。对第 1 个 24 周,第 1 个周期输注访问 (第 2 和 3 次访问分别为第 1 天和第 2 周) 后,在第 4 周访问,且此后每 4 周一次。在第 2 个周期输注访问 (第 9 和 10 次访问分别为第 24 周和第 26 周) 后,在第 36 周访问,此后每 12 周一次,直至治疗和随访期结束。应该尽最大努力将访问安排在该提供的时间窗口中。用于评价潜在复发、新的神经学症状或安全性事件的其他计划外访问可以随时发生。

[0413] 研究人群和选择标准

[0414] 根据修订的 McDonald 标准 (2005) 被诊断有复发缓和型多发性硬化 (RRMS) 以及满足下面所提供的纳入 / 排除标准的年龄为 18 岁至 55 岁 (含 18 和 55 岁) 的男性和女性,符合入选本研究的条件。

[0415] 纳入标准:

[0416] 患者必须满足下述标准以获得入选研究的资格:

[0417] 1. 根据修订的 McDonald 标准 (2005) 的 RRMS;

[0418] 2. 年龄 18-55 岁 (含 18 和 55 岁);

[0419] 3. 在筛选前最近 3 年内至少两次记录的 (documented) 复发,其中至少一次复发在筛选前一年内发生;

[0420] 4. 基线时的扩展残疾状态量表 (EDSS) 为 1.0 至 6.0 分;

[0421] 5. 如下定义的多发性硬化 (MS) 疾病负担的证据:

[0422] a. 基于局部读数,在筛选前一年进行的 MRI 扫描上至少 6 个 T2 损伤。如果得不到在该最近的一年内的 MRI 扫描或 MRI 扫描显示少于 6 个 T2 损伤,那么对于该患者,要求具有至少 6 个 T2 损伤的筛查性 MRI 扫描以有被选资格,或

[0423] b. 在筛选前一年内患者具有 2 次记录的复发 (documented relapses)。

[0424] 排除标准

[0425] 满足以下标准的患者将被排除在研究之外:

[0426] 1. 在筛选时 (第 1 次访问) 具有继发或原发进行性多发性硬化;

[0427] 2. 在 EDSS = 2.0 的患者中疾病持续时间超过 15 年。功效分析

[0428] 此项研究的第一目标是为了研究,相比于安慰剂,以 600mg 或 1000mg 的两种给药方案形式静脉内给予的 ocrelizumab (参见图 7) 对在第 12、16、20 和 24 周的脑 MRI 扫描上观察到的钆 - 增强性 T1 损伤总数的影响。

[0429] 此项研究的第二目标是为了评价,相比于安慰剂,ocrelizumab 的疗效和安全性,通过下述来反映:到第 24 周,按年计算的方案定义的复发率;到第 24 周,保持无复发 (方案定义的复发) 的患者的比例;第 4、8、12、16、20 和 24 周时在脑 MRI 扫描上观察到的钆 - 增强性 T1 损伤的总数;第 4、8、12、16、20 和 24 周时在脑 MRI 扫描上新的和 / 或持续的钆 - 增强性 T1 损伤的总数;从基线至第 24 周,脑 MRI 扫描上 T2 损伤总体积的变化,以评价第 24

周时两种 ocrelizumab 给药方案较安慰剂和 Avonex 而言在 RRMS 患者中的安全性和耐受性以及施用多达 96 周的 ocrelizumab 的总体安全性,以及研究 ocrelizumab 的药代动力学和其它药效学研究终点。

[0430] 在此实施例中,复发被定义为:可归因于 MS 并且紧跟在最少 30 天的相对稳定或改善的神经学状态之后的、新的或恶化的神经学症状发生。症状必须持续 > 24 小时并且应不可归因于混淆的临床因素(例如发烧、感染、伤害、对并行用药(concomitant medicament)的不良反应)。该新的或恶化的神经学症状必须伴随着与如下相符的客观神经学恶化:至少 EDSS 的半步增加、或合适的功能系统评分(FSS)之一的 2 分增加、或者两项或多项合适 FSS 的 1 分增加。所述变化必须影响所选的 FSS(即,锥体、步态、小脑、脑干、感觉或视觉)。感觉变化、阵发性痉挛、疲劳、情绪变化、或膀胱或直肠紧迫或失禁都不足以确立复发。进行检查的研究者确认依附上述标准的那些复发。

[0431] 此项研究的探索性目标包括但可不限于:自基线扫描至第 12 周,脑 MRI 扫描上脑体积的变化;自第 12 周至第 96 周,在接受 ocrelizumab 的患者亚组中脑 MRI 扫描上脑体积的变化;第 4、8、12、16、20 和 24 周时在脑 MRI 扫描上观察到的新的和/或扩大的 T2 损伤的总数;到 24 周,保持没有新的钆-增强性 T1 损伤的患者的比例;在 24 周内达第一个新的钆-增强性 T1 损伤发生的时间;通过患者亚组中接受 ocrelizumab 多达 4 个治疗周期后 48 周钆-增强性 T1 损伤的总数,评价治疗撤离的影响;在每个治疗周期期间以及第 48 和 96 周时保持没有复发(临床的和方案定义的复发)的患者的比例;在每个治疗周期期间以及第 48 和 96 周时需要全身性甲泼尼龙治疗 MS 复发的患者的比例;在每个治疗周期期间以及第 48 和 96 周时按年计算的临床和方案定义的复发率;到第 24 周,达第一次方案定义的复发的时间;到第 96 周,达第一次方案定义的复发的时间;到第 96 周,达开始持续的残疾进展的时间,其中通过持续 12 周的 1.0 分或更高的 EDSS 恶化定义该持续的残疾进展;到第 96 周,达开始持续的残疾进展的时间,其中通过持续 24 周的 1.0 分或更高的 EDSS 恶化定义该持续的残疾进展;探索 ocrelizumab 较 Avonex 而言对主要和次要研究终点的影响;探索 RRMS 易感性相关多态性基因变体与 RRMS 患者中的 ocrelizumab 活性及 ocrelizumab 治疗反应的关联性;探索 RRMS 易感性相关循环生物标记与 RRMS 患者中的 ocrelizumab 活性及 ocrelizumab 治疗反应的关系;从基线至第 24 和 48 周,改良疲劳影响量表(MFIS)的变化;从基线至第 24 和 48 周,运动认知功能的疲劳量表(FSMC)的变化;基线与第 24 和 48 周相比,FSMC 上从“重度”移至“中度”疲劳以及从“中度”移至“轻度”疲劳的患者的比例变化;自基线至第 24 和 48 周,流行病学研究中心-抑郁量表(CES-D)的变化;以及基线与第 24 和 48 周相比,CES-D 上从具有较多的抑郁症状的状态移至具有较少的抑郁症状的状态的患者的比例变化。脑 MRI

[0432] MRI 是用于监控 MS 中的中枢神经系统(CNS)损伤的有用工具。在筛选时仅在一些患者中(参见次要终点)以及在基线时以及在基线与第 24 周之间以 4 周的间隔在所有患者中获得脑 MRI 扫描。此外,在第 96 周(第 16 次访问)时和 48 周之后(即第 144 周)进行患者亚组(组 A 和 B)的脑 MRI 扫描。

[0433] MRI 包括在每个时间点采集下列扫描:T2 加权的 MRI 扫描、T1 加权的 MRI 扫描(无钆增强)、和 T1 加权的 MRI 扫描(有钆增强)。

[0434] 残疾评估

[0435] 独立的检查研究者在筛选时以及在整个研究过程中直至观察期每 12 周评估所有患者中通过 EDSS 度量的残疾进展,在所述观察期于 24 周后进行残疾进展评估。

[0436] 残疾进展被定义为:当基线评分为 5.0 或更小时,自基线 EDSS 分值的增加 ≥ 1.0 分,以及当基线评分为 5.5 或更多时,增加 ≥ 0.5 ,其中所述增加不归于其他病因(例如发烧、并发的疾病、或并行用药)。当在首次记录进展后至少 12 周于规律计划的访问中确认 EDSS 的增加时,疾病进展被认为是持续的。持续残疾进展的另一可选定义要求在首次记录进展后至少 24 周确认 EDSS 的增加。

[0437] EDSS 以标准神经学检查为基础;对代表功能系统(锥体、小脑、脑干、感觉、直肠和膀胱、视觉、和大脑和/或智力,+“其它”)的 7 个 EDSS 类别进行定级和评分(总起来,功能系统分值或 FSS)。每个 FSS 评分都是从 0 至 5 或 6 的顺序临床分级量表。然后可以将这些分级与关于行走和使用辅助装置的观察结果和信息结合,用于确定 EDSS 评分。EDSS 是以 0.5 分步幅从 0(正常)至 10(死亡)的残疾量表。

[0438] 实施例 2:利妥昔单抗在原发进行性多发性硬化 (PPMS) 中的 II/III 期研究

[0439] 进行了随机、双盲、平行分组、安慰剂对照、多中心 II/III 期研究 (U2786g),以评价利妥昔单抗在 McDonald 等人 (Ann Neurol 50:121-7 (2001) 定义的原发进行性多发性硬化 (PPMS) 成人中的安全性和功效。

[0440] 将受试者以 2:1 比率随机分组,以接受利妥昔单抗或安慰剂。将利妥昔单抗(商购自 Genentech)配制成在 9.0mg/ml 氯化钠、0.7mg/ml 聚山梨酸酯 80、7.35mg/ml 脱水柠檬酸钠和无菌注射用水 (pH 6.5) 中的无菌产品,以用于 i.v. 施用。研究药物的每个疗程由 1000mg 利妥昔单抗或安慰剂的两个 i.v. 输注(相隔 14 天)组成。受试者在第 1 天和第 15 天接受第一疗程,并且在第 24、48 和 72 周时接受另外的疗程。在开始每次输注前 30-60min,受试者经口接受乙酰氨基酚 (1g) 和盐酸苯海拉明 (50mg) 或等效物。在输注前未施用糖皮质激素。在试验期的 96 周中,在规律计划的访问中检查受试者,进行身体检查、神经学和 MRI 评价,以收集不良事件和生命体征,完成常规血液学、血清化学和尿分析实验室检验。

[0441] 意向治疗 (ITT) 受试者的基线人口统计学示于表 3 中。

[0442] 表 3:人口统计学和基线特征:意向治疗受试者

[0443]

特征	安慰剂 (n=147)	利妥昔单抗 (n=292)	所有受试者 (n=439)
年龄(岁)			
n	147	292	439
平均(SD)	49.6(8.69)	50.1(9.02)	49.9(8.90)
中值	51.0	51.0	51.0
最小至最大	20-66	18-66	18-66
18-<40	20(13.6%)	40(13.7%)	60(13.7%)
40-<55	80(54.4%)	145(49.7%)	225(51.3%)
55	47(32.0%)	107(36.6%)	154(35.1%)

[0444] 两个治疗组的 MS 疾病持续时间类似。基线 MRI 结果总结于表 4 中。安慰剂和利妥昔单抗组的基线 MRI 特征类似。

[0445] 表 4 :基线 MRI 结果 :意向治疗受试者

[0446]

MRI 终点	安慰剂 (N=147)	Rituximab (N=292)	所有受试者 (N=439)
总的钆-增强性损伤 计数	2		
N	147	290	437
平均值(SD)	0.5 (1.26)	0.7 (2.96)	0.7 (2.52)
中值	0.0	0.0	0.0
最小至最大	0 - 8	0 - 32	0 - 32
0	110 (74.8%)	220 (75.9%)	330 (75.5%)
1	23 (15.6%)	44 (15.2%)	67 (15.3%)
2	5 (3.4%)	10 (3.4%)	15 (3.4%)
3	5 (3.4%)	5 (1.7%)	10 (2.3%)
≥ 4	4 (2.7%)	11 (3.8%)	15 (3.4%)
总的钆-增强性损伤 体积(mm ³)			
N	147	290	437
平均值(SD)	27.56 (81.86)	49.50 (220.32)	42.12 (185.82)
中值	0.00	0.00	0.00
最小至最大	0.00 - 556.40	0.00 - 2660.00	0.00 - 2660.00
T2 损伤体积(mm ³)			
N	147	290	437
平均值(SD)	8850.86 (11808.95)	9336.66 (13744.94)	9173.25 (13113.98)
中值	5199.50	5240.50	5220.70
最小至最大	73.83 - 74534.0	174.00 - 155303.0	73.83 - 155303.0
脑体积(cc)			
N	130	237	367
平均值(SD)	1210.91 (128.89)	1202.92 (120.23)	1205.75 (123.25)
中值	1209.5	1204.0	1207.0
最小至最大	642.0 - 1522.0	712.60 - 1508.0	642.0- 1522.0

[0447] MRI = 磁共振成像

[0448] 根据研究位点 ;EDSS 定义的基线疾病严重程度 (≤ 4.0 , > 4.0), 进行随机化的分层。基线 EDSS 总结于表 5 中。由于动态随机化的结果, 在分层因子的所有水平上每个治疗

组中的受试者的百分数是类似的。

[0449] 表 5:基线分层因子,疾病严重度,意向治疗受试者

[0450]

分层因子	安慰剂 (N=147)	Rituximab (n = 292)	所有受试者 (N=439)
EDSS			
N	147	292	439
2	6 (4.1%)	8 (2.7%)	14 (3.2%)
2.5	5 (3.4%)	11 (3.8%)	16 (3.6%)
3	11 (7.5%)	22 (7.5%)	33 (7.5%)
3.5	21 (14.3%)	36 (12.3%)	57 (13.0%)
4	25 (17.0%)	47 (16.1%)	72 (16.4%)
4.5	8 (5.4%)	19 (6.5%)	27 (6.2%)
5	6 (4.1%)	10 (3.4%)	16 (3.6%)
5.5	10 (6.8%)	10 (3.4%)	20 (4.6%)
6	28 (19.0%)	81 (27.7%)	109 (24.8%)
6.5	27 (18.4%)	48 (16.4%)	75 (17.1%)
平均值(SD)	4.73 (1.395)	4.84 (1.369)	4.80 (1.377)
中值	4.50	5.00	5.00
最小至最大	2.0 - 6.5	2.0 - 6.5	2.0 - 6.5

[0451] EDSS = 扩展残疾状态量表

[0452] 此外,两个治疗组在下列其它基线疾病严重度量度方面类似:EDSS、Kurtzke 功能系统评分、多发性硬化功能综合量表 (MSFCS) 评分和 MSFCS 组分 (时控 25- 英尺走、9-Hole Peg 试验和 PASAT-3)。

[0453] 功效结果

[0454] 在 96 周治疗期期间,该试验的主要功效分析在利妥昔单抗与安慰剂之间比较了达到确认的疾病进展的时间。疾病进展被定义为:如果基线 EDSS 在 2.0 与 5.5 分 (含) 之间,那么自基线 EDSS 的增加 ≥ 1.0 分 (Kurtzke J.Neurology 33(11):1444-52(1983)),或者如果基线 EDSS > 5.5 分,那么自基线 EDSS 的增加 ≥ 0.5 分,且这种变化不归因于其他病因学 (例如发烧、并发疾病、MS 复发或恶化,或并行用药)。

[0455] 分层分析显示,与安慰剂相比,利妥昔单抗并未显著延缓该确认的疾病进展 ($p = 0.1442$, 分层 log-rank)。对于安慰剂和利妥昔单抗组而言,到 96 周时疾病进展的患者的百分比分别估计为 38.5% 和 30.2% (表 6)。达到确认的疾病进展的时间的 Kaplan-Meier 曲线示于图 8 中。

[0456] 表 6:在治疗期期间意向治疗受试者达确认的疾病进展的时间

	安慰剂 (n=147)	利妥昔单抗 (n=292)
具有 CDP 的受试者的数目(%)	53(36.1%)	83(28.4%)
删失的受试者的数目(%)	94(63.9%)	209(71.6%)
(NO. of subjects who censored)		
分层 P 值		
Log-rank 检验		0.1442
[0457] 分层危险比(相比于安慰剂)		0.773
95% CI		(0.546-1.093)
CDP 患者的比例		
在第 24 周时	6.9%	9.1%
在第 48 周时	19.3%	20.2%
在第 72 周时	30.3%	28.0%
在第 96 周时	38.5%	30.2%

[0458] 次要功效终点包括自基线至第 96 周的 T2 损伤总体积的变化和自基线至第 96 周的脑体积的变化。使用 Hochberg-Bonferroni 程序来控制检验这两个次要终点的 I 类错误率。两个治疗组在基线至第 96 周的脑体积变化上没有显著不同 ($p = 0.6237$)。参见表 7。

[0459] 表 7 :基线至第 96 周的脑体积变化

[0460]

	安慰剂 (N=130)	利妥昔单抗 (N=237)	P 值
基线体积(cm3)			
平均(SD)	1211(129)	1203(120)	
中值	1209.5	1204.0	
基线至第 96 周的体积变化(LOCF)			
平均(SD)	-9.9(37.0)	-10.8(40.3)	0.62
中值	-14.0	-13.1	

[0461] 观察到两个治疗组在基线至第 96 周的 T2 损伤体积变化上具有显著不同 ($p = 0.0008$)。安慰剂和利妥昔单抗组的 T2 损伤体积的中值增加分别为 809.50mm³和 301.95mm³(参见表 8 和图 9)。

[0462] 表 8 :在脑 MRI 扫描上意向治疗受试者的基线至第 96 周的 T2 损伤总体积的变化

[0463]

	安慰剂 (n=147)	利妥昔单抗 (n=292)	P 值
在脑 MRI 扫描上 T2 损害总体积(mm3)			
基线			
N	147	290	
平均(SD)	8850.86(11808.95)	9336.66(13744.94)	
中值	5199.50	5240.50	
范围	73.83-74534.00	174.00-155303.0	
SE	973.99	807.13	
95% CI	(6925.93-10775.79)	(7748.06-10925.26)	
第 96 周			
N	147	290	
平均(SD)	11055.55(14536.29)	10843.80(15827.44)	
中值	5526.60	5569.35	
范围	94.92-86232.00	179.30-170464.0	
SE	1198.93	929.42	
95% CI	(8686.04-13425.05)	(9014.51-12673.09)	

[0464]

	安慰剂 (n=147)	利妥昔单抗 (n=292)	P 值
基线至第 96 周的变化			
N	147	290	
平均(SD)	2204.69(4306.24)	1507.14(3739.45)	
中值	809.50	301.95	
范围	-8557.00-26367.00	-4031.00-24076.00	
SE	355.17	219.59	
95% CI	(1502.74-2906.63)	(1074.94-1939.33)	
治疗差异的 LS Means(相比于安慰剂)		-718.24	
LS Means 差异的 95% CI		(-1504.48,68.00)	
ANOVA t 检验(分层)			0.0733
Friedman 秩次 ANOVA 检验			0.0008
基线至第 96 周的变化百分数的 ANOVA t 检验(分层)			0.0006
基线至第 96 周的变化百分数的 Friedman 秩次 ANOVA 检验			0.0005

[0465] 对所有探索性终点（除了 T2 损伤体积、扩大的 T2 损伤和新 T2 损伤的变化）的分析，显示了安慰剂与利妥昔单抗臂（arms）之间的统计学上的非显著性差异。与安慰剂相比，利妥昔单抗组在第 48 和 122 周时在 T2 损伤体积的增加上显著更少（分别 $p = 0.0051$ 和 0.0222 ）；在第 48 和 96 周时新 T2 损伤更少（ $p < 0.001$ ）；在第 48 和 96 周时扩大的 T2 损伤计数更小（分别 $p = 0.008$ 和 0.072 ）。

[0466] 亚组分析

[0467] 根据下列人口统计学和基线疾病特征：位点、年龄、性别、种族、在先 MS 疗法、基线 EDSS、自 MS 症状发作起的持续时间和基线钆（Gd）损伤、和基线多发性硬化严重性评分（MSSS）（患者进展速度的指数；参见 Roxburgh 等人，Neurology 64；1144-1151(2005)），亚组的主要终点分析包括达确认的疾病进展的时间。

[0468] 亚组分析结果表明，在更年轻、进展更迅速（更高的 MSSS）或在基线时具有 Gd 损伤的患者中的潜在治疗效应（图 10）。而且，使用多元分析方法，已经验证了对于治疗效应而言，年龄、基线时的 Gd 损伤和 MSSS 的加性预测效应（图 11 和图 12）。还参见表 9。基于这些发现与 MSSS，使用修改的纳入 / 排除标准（年龄 ≤ 55 ， $3 \leq$ 基线 EDSS ≤ 6.5 ，排除疾病持续时间 > 10 （如果基线 EDSS < 5 ）或疾病持续时间 > 15 （如果其基线 EDSS ≥ 5 ）的患者），选择了研究人群亚组（排除具有持续甚久的疾病和缓慢进展的年长患者）。对于该亚组，也证实了显著的治疗效应（分层 log-rank 检验 P 值 = 0.01；图 13）。

[0469] 表 9 :达确认的疾病进展的时间,亚组结果总结。

[0470]

亚组	总计 N	CDP@wk96 安慰剂	CDP@wk96 利妥昔单抗	HR	HR 95% CI	P 值 (Log-rank)
所有患者 (主要分析)	439	38.5%	30.2%	n/a	n/a	0.1442
年龄<51	215	44.9%	27.5%	0.52	(0.32, 0.86)	0.0101
Gd+	107	52.8%	27.4%	0.41	(0.21, 0.80)	0.0069
Gd+和年龄<51	72	51.6%	24.6%	0.33	(0.14, 0.79)	0.0088
Gd+和年龄 <55	93	49.5%	29.1%	0.40	(0.19, 0.84)	0.0126
MSSS ≥5 和年龄<55	251	46.8%	29.6%	0.59	(0.38, 0.91)	.0163

[0471] 亚组分析表明,如通过达确认的疾病进展的时间、以及 EDSS、MSFC 和脑 MRI 上 T2 损伤的自基线的变化(数据未显示)所度量的,具有活动性疾病迹象的 PPMS 患者显示出显著的治疗相关益处的临床征候。在安慰剂组中表现为预后疾病进展的以及在利妥昔单抗组中可能预示治疗反应的独立因素包括以下:更年轻的年龄,特别是小于 51 的年龄;在脑 MRI 上基线时存在对比度增强的损伤;和较高的 MS 严重性分数。这些观察结果可以起到生成假说的作用,支持 B 细胞耗竭在适当选择的进行性发病 MS 患者中对确认的疾病进展具有潜在的治疗益处。

[0472] 尽管此项研究未能在全部 PPMS 人群中证实主要功效,但是亚组功效分析指出在基线时具有对比增强性脑 MRI 损伤的患者可能对用利妥昔单抗的治疗有反应,相比于安慰剂,治疗组在确认的疾病进展的危险性上具有 57% 的相对减少 (1-HR),这主要但不完全由第 96 周时安慰剂的非常高确认疾病进展 (CDP) 率 (52.8%) 驱动 (图 10)。年龄小于 51 岁的 PPMS 患者也可受益,在确认的疾病进展的危险性上具有 43% 的相对减少,安慰剂进展率为 44.9%。尽管对比增强性损伤的存在与年龄 < 51 是相关的,表现出两种特征的 72 位患者的事后分析 (post-hoc analysis) 揭示了更显著的表观效应,在确认的疾病进展的危险性上 77% 的相对减少 (表 9)。在此亚组中,51.6% 的安慰剂进展率不高于在基线时具有增强 MRI 损伤的所有患者的进展率,但是利妥昔单抗组中的较低进展率 (24.6%) 说明伴随治疗的潜在更大的危险降低。这些 OLYMPUS 安慰剂数据巩固了有关 PPMS 患者的临床和 MRI 异质性的自然史观察结果 (Sastre-Garriga 等人, Neurology 65(4) :633-5 (2005), Ingle 等人, brain 126(Pt 11) :2528-36 (2003), Tremlett 等人, Mult Scler. 14(3) :314-24 (2008), Tremlett 等人, Neurology 65(12) :1919-23 (2005), Kremenutzky 等人, brain 129(Pt3) :584-94. (2006))。此外, MAGNIMS 临床和 MRI 定群研究描述了在病程早期具有更多炎症 MRI 活性以及具有更差的残疾进展预后的 PPMS 患者亚组 (Ingle 等人, J. Neurol Neurosurg Psychiatry 76(9) :1255-8 (2005)) ; OLYMPUS 安慰剂数据看起来首次证实这些观察。

[0473] 实施例 3 :Ocrelizuma 在进行性多发性硬化中的 III 期研究

[0474] 进行 III 期、随机、双盲、平行组、多中心研究以评价在进行性 MS 成人中相比于安慰剂的 600mg ocrelizumab 的安全性和功效。

[0475] 总共 630 位进行性 MS 患者 (315 位具有进行性发作 MS, 315 位具有复发性发作 MS) 入选, 将他们分配 (2 : 1 随机) 至 ocrelizumab 臂或安慰剂臂, 通过多发性硬化的部位和类型分层。此项研究由应用于所有患者的以下三个阶段组成: 筛选期、治疗期和无治疗随访期。在研究药物的第一疗程中, 第 1 天和第 15 天施用治疗 (300mg ocrelizumab 或安慰剂输注 x 2)。在后续的疗程中, 每 24 周向患者给药 (600mg ocrelizumab 单次输注), 直到在第 96 周时最后一位入选患者接受他 / 她的最后一个待施用的疗程为止。

[0476] 在每次研究药物输注之前, 患者接受镇痛药 / 解热药 (例如对乙酰氨基酚 / 扑热息痛 (1 克)) 和 i. v. 或口服抗组胺 (例如苯海拉明 50mg) 和静脉内施用 100mg 甲泼尼龙、或等效物的治疗, 以减少潜在的输注反应的发生。在具有不良事件常用术语 (CTCAE) 3 级或更高级 (严重) 输注反应并伴有呼吸症状 (喘鸣、喘息或支气管痉挛) 的患者中, 可以适用支气管扩张剂进行另外治疗。

[0477] 在整个研究过程中进行常规实验室研究, 其它试验紧跟研究药物疗程。还进行免疫组、血清人抗人抗体 (HAHA) 和甲状腺试验。收集所有患者的血清样品以用于药代动力学分析, 并收集血样以用于 B 细胞计数测定。跟踪 B 细胞计数作为 ocrelizumab 的药效学标记。

[0478] 患者人群和选择标准

[0479] 此项研究的靶人群包括有或无重叠复发历史的进行性 MS 患者。符合此项研究条件的进行性 MS 患者的特征在于, 根据修订的 McDonald 标准 (2005) 的诊断、以及在缺少复发下 6 个月或更长时期的记录的不可逆神经学功能丧失。使用在进行性 MS 患者的先前临床试验中被鉴定为潜在危险因素的标准, 挑选出具有活动性疾病迹象和具有发生更快残疾进展的更高危险的患者。这些因素包括更年轻的年龄、脑脊液 (CSF) 中炎症迹象 (寡克隆带或升高的 IgG 指数)、脑 MRI 上对比增强性损伤、在非复发相关进展上重叠的高复发活性, 以及更迅速的残疾历史积累。

[0480] 根据以下纳入和排除标准, 筛选出所有自愿的且有入选本研究资格的患者:

[0481] 纳入标准包括:

[0482] 1. 根据修订的 McDonald 标准 (2005) 诊断的多发性硬化。

[0483] 2. 进行性 MS, 其特征不在于不能归因于临床复发的、 ≥ 6 个月的已记录的不可逆神经学功能丧失。

[0484] 3. 年龄 18-55 岁 (含)。

[0485] 4. 筛选时的 EDSS 为 3.0 至 6.5 分。

[0486] 5. 因下肢表现, 锥体束系统或步态的功能系统 (FS) 量表得分 = 2.0。

[0487] 6. 在筛选期期间获得的或在前 6 个月内记录的、如通过例如升高的 IgG 指数和 / 或由等电聚焦检测的 IgG 寡克隆带指示的、CSF 样本中至少一种以下实验室表现的存在。

[0488] 7. 至少一种以下标准的存在:

[0489] • 年龄 < 50

[0490] • 筛选时或在筛选的 6 个月内脑 MRI 上的 Gd+ 损伤

[0491] • 不可归因于复发的、在过去 2 年内至少 1.5 分的 EDSS 增加。

[0492] • 在过去两年内两次复发

[0493] 排除标准包括:

[0494] 1. 在筛选（第 1 次访问）时复发缓和型多发性硬化

[0495] 2. 自 MS 症状发作起的疾病持续时间：在筛选时 EDSS > 5.0 的患者中超过 15 年或在筛选时的 EDSS ≤ 5.0 的患者中超过 10 年。

[0496] 功效分析

[0497] 主要功效终点是达确认的疾病进展的时间。疾病进展被定义为：如果基线 EDSS 在 2.0 与 5.5 分（含）之间，那么从基线 EDSS 的增加 ≥ 1.0 分，或者如果基线 EDSS > 5.5 分，那么从基线 EDSS 的增加 ≥ 0.5 分，对于这种变化不能归因于其他病因学（例如发烧、并发疾病、MS 复发或恶化，或并行用药）。

[0498] EDSS 以标准神经学检查为基础；对代表功能系统（锥体、小脑、脑干、感觉、直肠和膀胱、视觉、和大脑和 / 或智力，+ “其它”）的 7 个 EDSS 类别进行定级和评分（总起来，功能系统分值或 FSS）。每个 FSS 评分都是从 0 至 5 或 6 的顺序临床分级量表。然后可以将这些分级与关于行走和使用辅助装置的观察结果和信息结合，用于确定 EDSS 评分。EDSS 是以 0.5 分步幅从 0（正常）至 10（死亡）的残疾量表。

[0499] 支持主要功效终点的次要功效终点包括：脑 MRI 扫描上自基线至第 120 周的 T2 损伤总体积的变化、时控 25 英尺走 (25-foot timed walk) 自基线至第 120 周的变化、达确认的疾病进展的时间（其中，确认在开始疾病进展后至少 24 周（≥ 168 天）发生）。

[0500] 复发评价

[0501] 治疗研究者在整个研究中于每次访问时以及如有需要，在计划化访问时评价患者的复发，以确认两次访问之间的复发出现。为了符合方案定义的复发的标准，复发被定义为：可归因于 MS 并且紧跟在最少 30 天的相对稳定或改善的神经学状态之后的、新的或恶化的神经学症状的发生。症状必须持续 > 24 小时并且应不可归因于混淆的临床因素（例如发烧、感染、损伤、对并行用药的不良反应）。该新的或恶化的神经学症状必须伴随着与如下相符的客观神经学恶化：EDSS 的至少半步增加，或合适 FSS 之一的 2 分增加，或者两项或多项合适 FSS 的 1 分增加。所述变化必须影响所选的 FSS（即，锥体、行走、小脑、脑干、感觉或视觉）。阵发性痉挛、性功能障碍、疲劳、情绪变化或膀胱或直肠急迫或失禁都不足以确立复发。

[0502] 脑 MRI 成像

[0503] 在研究期间的多个时间点（包括在基线时）获得脑和颈部脊髓的磁共振成像。脑 MRI 包括在每个时间点获取下述扫描：T2 加权的 MRI 扫描和 T1 加权的 MRI 扫描（无钆增强）。

[0504] 使用秩次方差分析 (ranked analysis of variance)，将基线至第 120 周在 T2 损伤总体积上的变化和在时控 25 英尺走上的变化在 ocrelizumab 与安慰剂之间进行比较。该模型包括注在主要分析中的两个分层因素。

[0505] 实施例 4：Ocrelizumab 在原发进行性多发性硬化中的 III 期研究

[0506] 进行 III 期、随机、双盲、平行组、多中心研究，以评价在原发进行性 MS 成人中两种 ocrelizumab 给药方案之一相比于安慰剂的安全性和功效。

[0507] 研究中的两种 ocrelizumab 给药方案如下：1) ocrelizumab 1000mg 给药方案：由用于第一治疗周期的 1000mg 的双重输注、和之后的用于后续治疗周期的 1000mg 的单次输注组成，和 2) ocrelizumab 600mg 给药方案：由用于第一治疗周期的 300mg 的双重输注、和

之后的用于后续治疗周期的 600mg 的单次输注组成。

[0508] 总共 630 位原发进行性 MS 患者入选, 将他们分配 (2 : 1 随机) 至 ocrelizumab 臂或安慰剂臂, 通过多发性硬化的部位和类型分层。此项研究由应用于所有患者的以下三个阶段组成: 筛选期、治疗期 and 安全性随访期。在研究药物的第一疗程, 于第 1 天和第 15 天施用治疗 (ocrelizumab 或安慰剂输注 x2)。在后续的疗程, 每 24 周向患者给药 (ocrelizumab 或安慰剂单次输注), 直到在第 96 周时最后一位入选患者接受他 / 她的待施用的最后一个疗程为止。

[0509] 在每次研究药物输注之前, 患者接受镇痛药 / 解热药 (例如对乙酰氨基酚 / 扑热息痛 (1 克)) 和 i. v. 或口服抗组胺 (例如苯海拉明 50mg) 和静脉内施用 100mg 甲泼尼龙、或等效物的治疗, 以减少潜在输注反应的发生率。在具有不良事件常用术语 (CTCAE) 3 级或更高级 (严重) 输注反应并伴有呼吸症状 (喘鸣、喘息或支气管痉挛) 的患者中, 可以适用支气管扩张剂进行另外治疗。

[0510] 在整个研究过程中进行常规实验室研究, 其它试验紧跟研究药物疗程。还进行免疫组、血清人抗人抗体 (HAHA) 和甲状腺试验。收集所有患者的血清样品以用于药代动力学分析, 并收集血样以用于 B 细胞计数测定。跟踪 B 细胞计数作为 ocrelizumab 的药效学标记。

[0511] 患者人群和选择标准

[0512] 此项研究的靶人群包括原发进行性 MS 患者。符合此项研究条件的原发进行性 MS 患者的特征在于, 根据修订的 McDonald 标准 (2005) 的诊断。使用在之前的进行性 MS 患者临床试验中被鉴定为潜在危险因素的标准, 挑选出具有活动性疾病迹象和具有发生更快残疾进展的更高危险的患者。这些因素包括更年轻的年龄、脑脊液 (CSF) 中炎症迹象 (寡克隆带或升高的 IgG 指数)、以及更迅速的残疾历史积累。

[0513] 根据以下纳入和排除标准, 筛选出所有自愿的且有入选本研究资格的患者:

[0514] 纳入标准包括:

[0515] 1. 根据修订的 McDonald 标准 (2005) 诊断的原发进行性多发性硬化。

[0516] 2. 年龄 18-55 岁 (含)。

[0517] 3. 筛选时的 EDSS 为 3.0 至 6.5 分。

[0518] 4. 因下肢表现, 锥体束系统的功能系统 (FS) 量表得分 = 2.0。

[0519] 5. 如通过例如升高的 IgG 指数和 / 或由等电聚焦检测的 IgG 寡克隆带指示的、CSF 样本中的至少一种以下实验室表现的记载历史或在筛选时的存在。

[0520] 6. 自 MS 症状发作起的疾病持续时间: 在筛选时 EDSS > 5.0 的患者中少于 15 年或在筛选时的 EDS ≤ 5.0 的患者中少于 10 年。

[0521] 排除标准包括:

[0522] 1. 在筛选 (第 1 次访问) 时复发缓和型、继发进行性或进行性复发型多发性硬化的历史。

[0523] 功效分析

[0524] 主要功效终点是达确认的疾病进展的时间 (time to confirmed disease progression)。疾病进展被定义为: 如果基线 EDSS 在 2.0 与 5.5 分 (含) 之间, 那么从基线 EDSS 的增加 = 1.0 分, 或者如果基线 EDSS > 5.5 分, 那么从基线 EDSS 的增加 = 0.5 分,

对于这种变化不能归因于其他病因学（例如发烧、并发疾病、MS 复发或恶化，或并行用药）。

[0525] EDSS 以标准神经学检查为基础；对代表功能系统（锥体、小脑、脑干、感觉、直肠和膀胱、视觉、和大脑和 / 或智力，+ “其它”）的 7 个 EDSS 类别进行定级和评分（总起来，功能系统分值或 FSS）。每个 FSS 评分都是从 0 至 5 或 6 的顺序临床分级量表。然后可以将这些分级与关于行走和使用辅助装置的观察结果和信息结合，用于确定 EDSS 评分。EDSS 是以 0.5 分步幅从 0（正常）至 10（死亡）的残疾量表。

[0526] 支持主要功效终点的次要功效终点包括：脑 MRI 扫描上自基线至第 120 周的 T2 损伤总体积的变化、时控 25 英尺走 (25-foot timed walk) 自基线至第 120 周的变化、达确认的疾病进展的时间（其中，确认在开始疾病进展后至少 24 周（= 168 天）发生）。

[0527] 复发评价

[0528] 治疗研究者在整个研究中于每次访问时以及如有需要，在计划化访问时评价患者的复发，以确认两次访问之间的复发出现。为了符合方案定义的复发的标准，复发被定义为：可归因于 MS 并且紧跟在最少 30 天的相对稳定或改善的神经学状态之后的、新的或恶化的神经学症状的发生。症状必须持续 > 24 小时并且应不可归因于混淆的临床因素（例如发烧、感染、损伤、对并行用药的不良反应）。该新的或恶化的神经学症状必须伴随着与如下相符的客观神经学恶化：EDSS 的至少半步增加，或合适 FSS 之一的 2 分增加，或者两项或多项合适 FSS 的 1 分增加。所述变化必须影响所选的 FSS（即，锥体、行走、小脑、脑干、感觉或视觉）。阵发性痉挛、性功能障碍、疲劳、情绪变化或膀胱或直肠急迫或失禁都不足以确立复发。

[0529] 脑 MRI 成像

[0530] 在研究期间的多个时间点（包括在基线时）获得脑和颈部脊髓的磁共振成像。脑 MRI 包括在每个时间点获取下述扫描：T2 加权的 MRI 扫描和 T1 加权的 MRI 扫描（无钆增强）。

[0531] 使用秩次方差分析，将基线至第 120 周在 T2 损伤总体积上的变化和在时控 25 英尺走上的变化在 ocrelizumab 与安慰剂之间进行比较。该模型包括注在主要分析中的两个分层因素。

[0001]

序列表

<110> 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

<120> 用于治疗进行性多发性硬化的方法

<130> 146392006140

<140> PCT/US2009/057151

<141> 2009-09-16

<150> US 61/097,464

<151> 2008-09-16

<160> 25

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg

[0002]

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg

<210> 3

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

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

[0003]

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

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

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

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

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

[0004]

<213> 小家鼠

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr

1

5

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

1

5

10

15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

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

35

40

45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr

50

55

60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser

65

70

75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

80

85

90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser

95

100

105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val

110

115

120

Ser Ser

<210> 8

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

[0005]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 9

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

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

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

[0006]

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

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

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

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

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

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
1 5 10

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

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

Lys Gly

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

[0007]

<213> 小家鼠

<400> 12

Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val
1				5						10		

<210> 13

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0008]

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

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

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

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

Gly Glu Cys

<210> 14

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

[0009]

Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				110					115					120
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro
				125					130					135
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
				140					145					150
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
				155					160					165
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				170					175					180
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				185					190					195
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
				200					205					210
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
				215					220					225
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
				230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
				260					265					270
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				275					280					285
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
				290					295					300
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
				305					310					315
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				320					325					330

[0010]

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
335 340 345

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
350 355 360

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
365 370 375

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
380 385 390

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

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

Gly Lys

<210> 15

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

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

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

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

[0011]

Glu	Trp	Val	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	
				50					55					60	
Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	
				65					70					75	
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	
				80					85					90	
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Val	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Ser	
				95					100					105	
Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	
				110					115					120	
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	
				125					130					135	
Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	
				140					145					150	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	
				155					160					165	
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				170					175					180	
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				185					190					195	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
				200					205					210	
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
				215					220					225	
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				230					235					240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
				260					265					270	

[0012]

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
275	280	285
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
290	295	300
Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		
305	310	315
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
320	325	330
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Ala Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
335	340	345
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
350	355	360
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
365	370	375
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly		
380	385	390
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
395	400	405
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
410	415	420
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
425	430	435
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
440	445	450
Gly Lys		

<210> 16

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

[0013]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0014]

Gly Glu Cys

<210> 17

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0015]

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

[0016]

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
395 400 405

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
410 415 420

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

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

Gly Lys

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa 是 M 或 L

<400> 18

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Xaa His
1 5 10

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 4

[0017]

<223> Xaa 是 S 或 A

<400> 19

Gln Gln Trp Xaa Phe Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 8

<223> Xaa 是 D 或 A

<400> 20

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

Lys Gly

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

<222> 6

<223> Xaa 是 N, A, Y, W 或 D

<220>

<221> 变体

<222> 7

<223> Xaa 是 S 或 R

[0018]

<400> 21

Val Val Tyr Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Trp Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 22

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1

5

10

15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser

65

70

75

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

80

85

90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser

95

100

105

Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

110

115

120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro

125

130

135

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

140

145

150

[0019]

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

[0020]

Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				380					385					390

Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
			395						400					405

Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
			410						415					420

Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
			425						430					435

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

Gly

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

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

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

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

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

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

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

[0021]

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

Lys Arg

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

<210> 25

<211> 451

<212> PRT

[0022]

<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	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0023]

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

[0024]

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
425 430 435

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

Gly

??

??

??

??

轻链可变域的序列比对

	FR1	CDR1	
	10 20	30 40	
2H7	QIVLSQSPAILSASPGKVTMTC	[RASSSVS-YMH] WYQQKP	
	* * * *	* * * *	
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASSSVS-YMH] WYQQKP	
		* * * *	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA] WYQQKP	
	FR2	CDR2	FR3
	50 60	70 80	
2H7	GSSPKPWIY	[APSNLAS] GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA	
	* * *	* * * *	
hu2H7.v16	GKAPKPLIY	[APSNLAS] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
	* * * *		
hum KI	GKAPKLLIY	[AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
	CDR3	FR4	
	90 100		
2H7	EDAATYYC	[QQWSFNPPT] FGAGTKLELKR	
	*	* * *	
hu2H7.v16	EDFATYYC	[QQWSFNPPT] FGQGTKVEIKR	

hum KI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKR	

图 1A

重链可变域的序列比对

	FR1	CDR1	
	10 20 30 40		
2H7	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKAS	[GYTFSTSYNMH]	WVKQT
	*** ** *		**
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GYTFSTSYNMH]	WVRQA
		* * * *	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA
	FR2	CDR2	FR3
	50 a 60 70 80		
2H7	PRQGLEWIG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	KATLTVDKSSSTAYM
	** *		** ** *
hu2H7.v16	PGKGLEWVG	[AIYPGNGDTSYNQKFKG]	RFTISVDKSKNTLYL
	* * * * *		* *
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLT
	CDR3	FR4	
	abc 90 100abcde 110		
2H7	QLSSLTSEDSAVYFCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGTGTLTVTVSS
	** ** *		* *
hu2H7.v16	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[VVYYSNSYWYFDV]	WGQGLTVTVSS
		***** * *	
hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLY---DY]	WGQGLTVTVSS

图 1B

人源化 2H7.v16 轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSG
 SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:13)

图 2

人源化 2H7.v16 重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGPY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

图 3

人源化 2H7.v31 重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQK
FKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYYSNSYWFVDVWGQGLTVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGPY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

图 4

轻链比对

	1	32
hu2H7.v16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHYQQKPGKAPKPLIYAP	
hu2H7.v511	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYLHWYQQKPGKAPKPLIYAP	
	52	
hu2H7.v16	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPPTFGQG	
hu2H7.v511	SNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWAFNPPTFGQG	
	102	
hu2H7.v16	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
hu2H7.v511	TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD	
	152	
hu2H7.v16	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
hu2H7.v511	NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL	
	202	214
hu2H7.v16	SSPVTKSFNRGEC	
hu2H7.v511	SSPVTKSFNRGEC	

图 5

重链比对

	1	
hu2H7.v16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	

hu2H7.v511	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHW	
	37	52a 82abc
hu2H7.v16	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	

hu2H7.v511	VRQAPGKGLEWVGAIYPGNGATSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSL	
	83	100abcde 113
hu2H7.v16	RAEDTAVYYCARVVYYNSYWFYFDVWGQGTLLTVSS	

hu2H7.v511	RAEDTAVYYCARVVYYSYRYWFYFDVWGQGTLLTVSS	
	118	
hu2H7.v16	ASTKGPSVFPLAPS	

hu2H7.v511	ASTKGPSVFPLAPS	
	132	
hu2H7.v16	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	

hu2H7.v511	SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS	
	182	
hu2H7.v16	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	

hu2H7.v511	LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA	
	232	
hu2H7.v16	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	

hu2H7.v511	PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG	
	282	
hu2H7.v16	VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP	

hu2H7.v511	VEVHNAKTKPREEQYNATYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNALPAP	
	332	
hu2H7.v16	IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	* *****	
hu2H7.v511	IAATISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW	
	382	
hu2H7.v16	ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA	

hu2H7.v511	ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEA	
	432	447
hu2H7.v16	LHNHYTQKSLSLSPGK	

hu2H7.v511	LHNHYTQKSLSLSPGK	

图 6

研究设计和给药方案的概述

筛选	随机	治疗期						无治疗期	
		96周研究治疗期 (4个治疗周期 ¹)						随访期	B细胞 监控期
28天	组	第1个周期		第2个周期 ^{2,7}		第3个周期 ^{3,7}		24周	可变
		第1天	第15天	第1天	第15天	第1天	第1天		
		A (1000 mg 给药方案)	Ocrelizumab 1000 mg i.v.	Ocrelizumab 1000 mg i.v.	安慰剂 i.v.	Ocrelizumab ⁵ 1000 mg i.v.	Ocrelizumab ⁵ 1000 mg i.v.		
			Ocrelizumab 300 mg i.v.	Ocrelizumab 300 mg i.v.	安慰剂 i.v.	Ocrelizumab ⁶ 600 mg i.v.	Ocrelizumab ⁶ 600 mg i.v.		
	C (安慰剂)	安慰剂 i.v.	安慰剂 i.v.	Ocrelizumab 300 mg i.v.	Ocrelizumab 300 mg i.v.	Ocrelizumab ⁶ 600 mg i.v.	Ocrelizumab ⁶ 600 mg i.v.		
		D ⁴ (Avonex)	Avonex 30 µg i.m.每周	Ocrelizumab 300 mg i.v.	Ocrelizumab 300 mg i.v.	Ocrelizumab ⁶ 600 mg i.v.	Ocrelizumab ⁶ 600 mg i.v.		

1. 每个治疗周期具有24周的持续时间。
2. 所有组将接受双重输注,即相隔14天的两次 i.v. 输注。为了在初步分析的数据库关闭之前保持组 A、B 和 C 的盲法,双重输注将是 ocrelizumab + 之后安慰剂 (组 A 和 B),或者 ocrelizumab + 之后 ocrelizumab (组 C)。
3. 自第3个治疗周期起,应在所有组中施用单次 ocrelizumab 输注。但是,错过第2个治疗周期给药的患者将在第3个治疗周期期间接受第2个治疗周期的给药(相隔14天的两次输注)。
4. 在自愿的基础上,向组 D (Avonex) 的患者施用 ocrelizumab。
5. 患者将用1000 mg 剂量治疗直至基于初步分析选择出优选的剂量,在那时将告知研究者和伦理委员会该优选的剂量。选择出优选的剂量后,患者在他们接下来的治疗周期将接受优选的剂量 (600 mg 或 1000 mg)。
6. 患者将用600 mg 剂量治疗直至基于初步分析选择出优选的剂量,在那时将告知研究者和伦理委员会该优选的剂量。选择出优选的剂量后,患者在他们接下来的治疗周期将接受优选的剂量 (600 mg 或 1000 mg)。
7. 在第2个、第3个和第4个给药周期之前,将进行临床评价以确保患者保持符合纳入再治疗的条件。

图 7

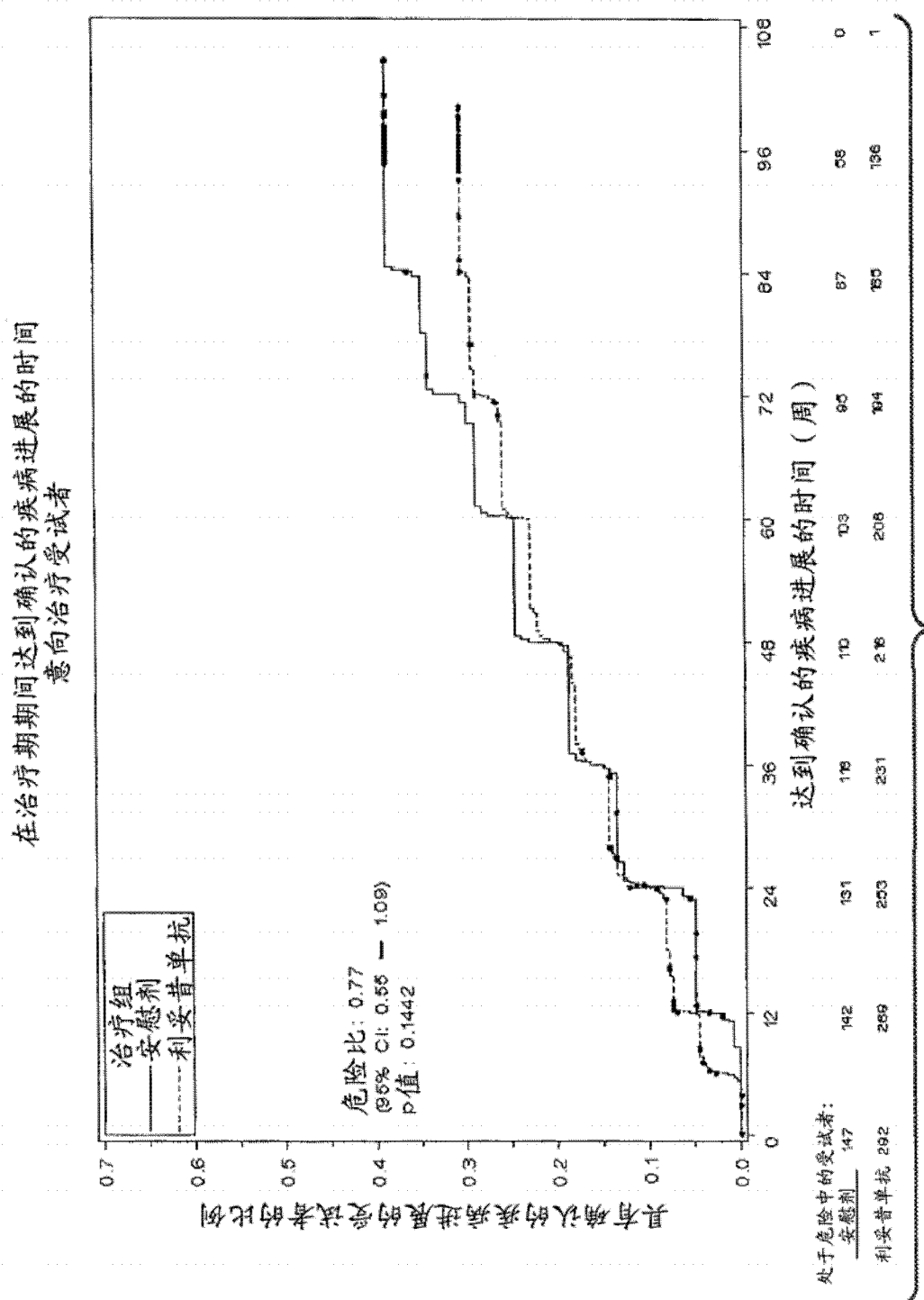


图 8

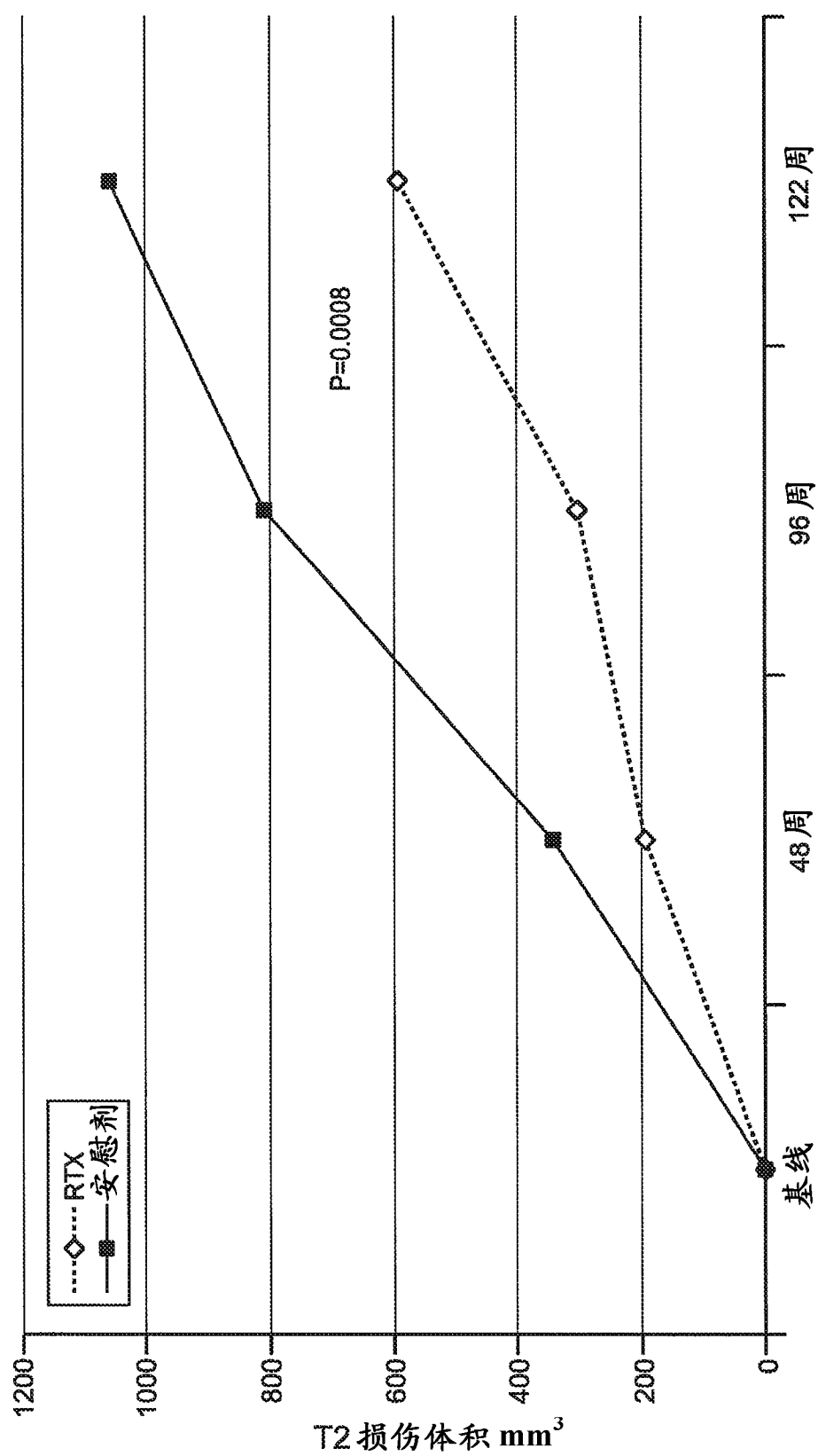


图 9

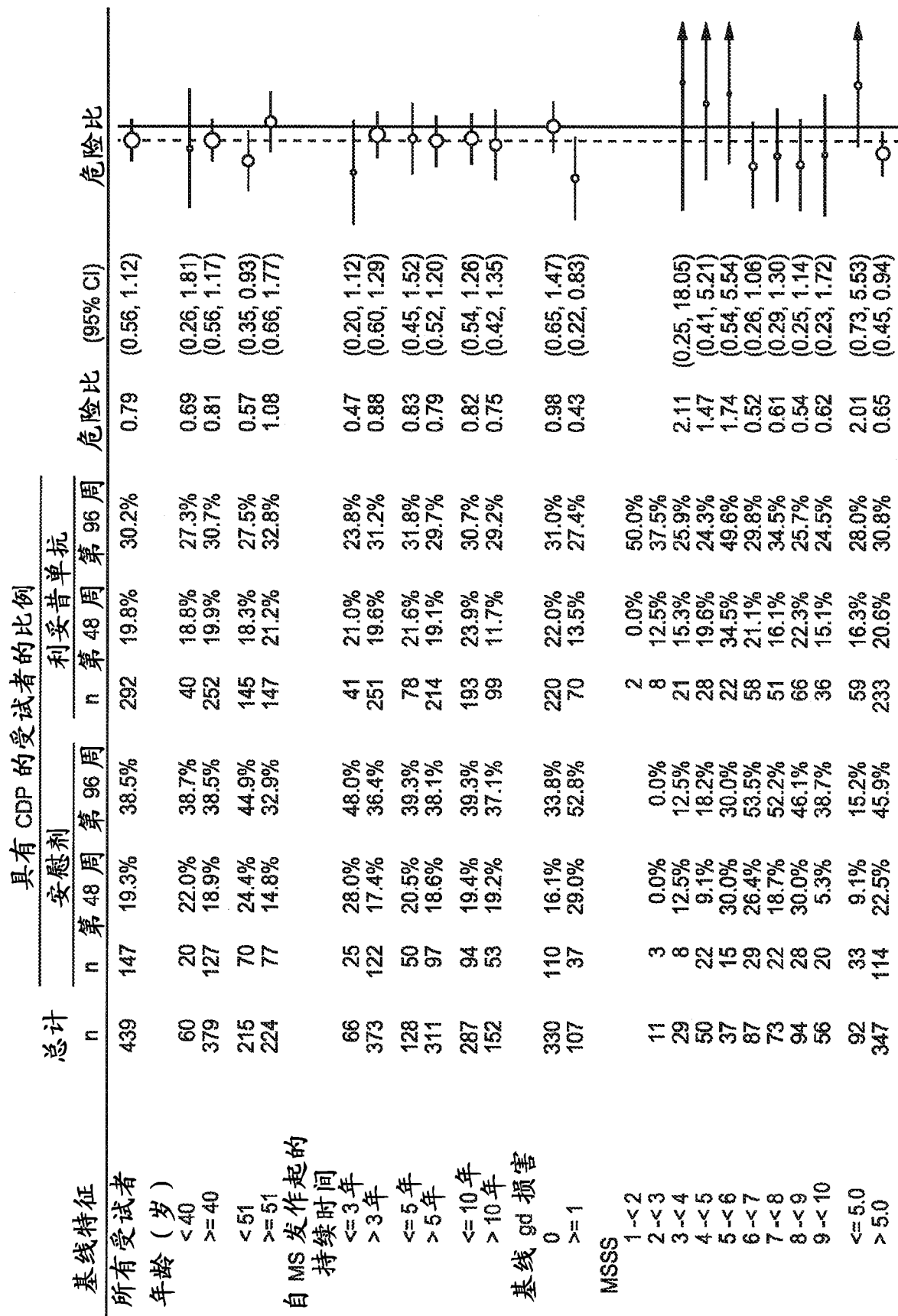


图 10

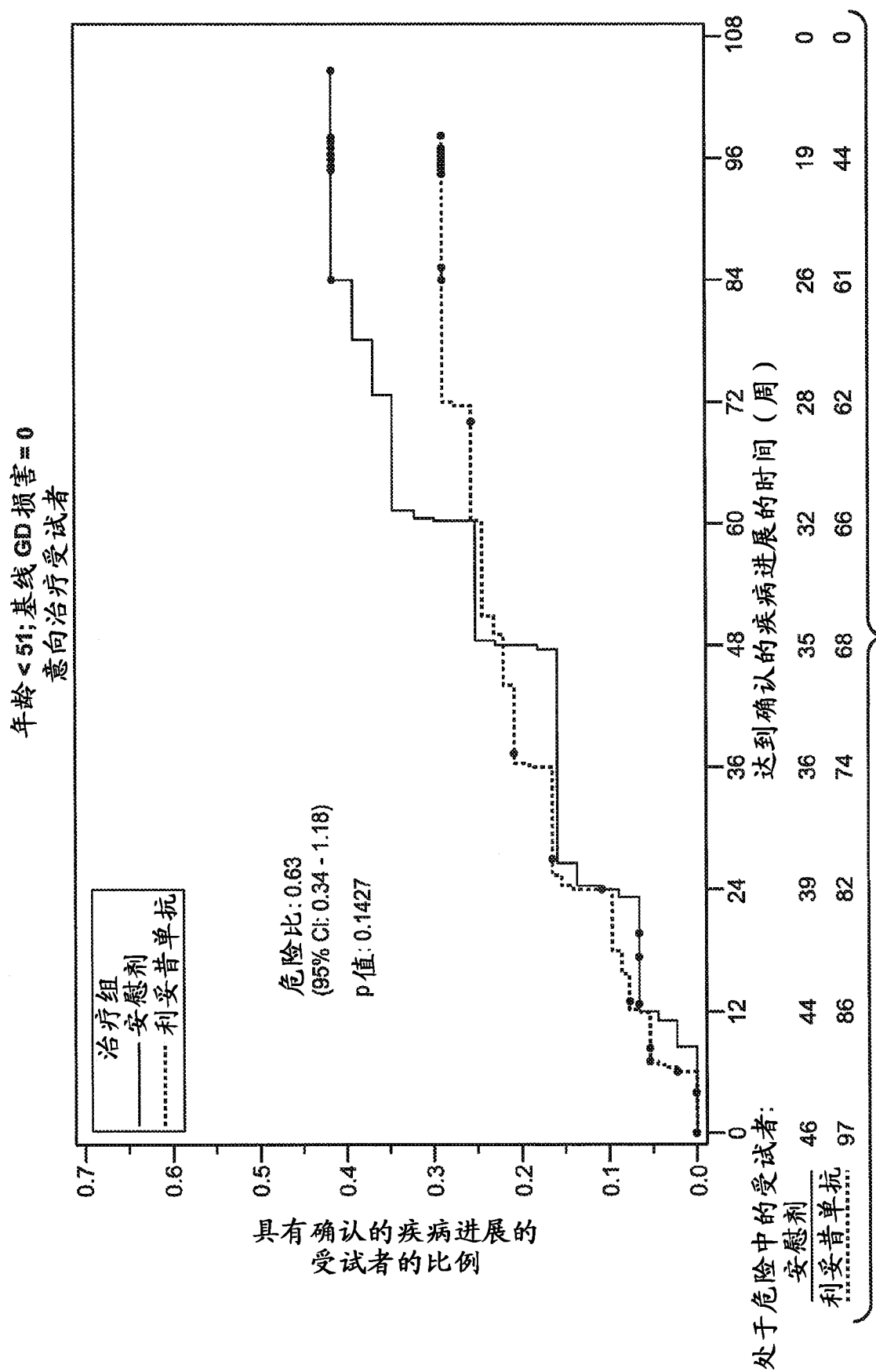


图 11A

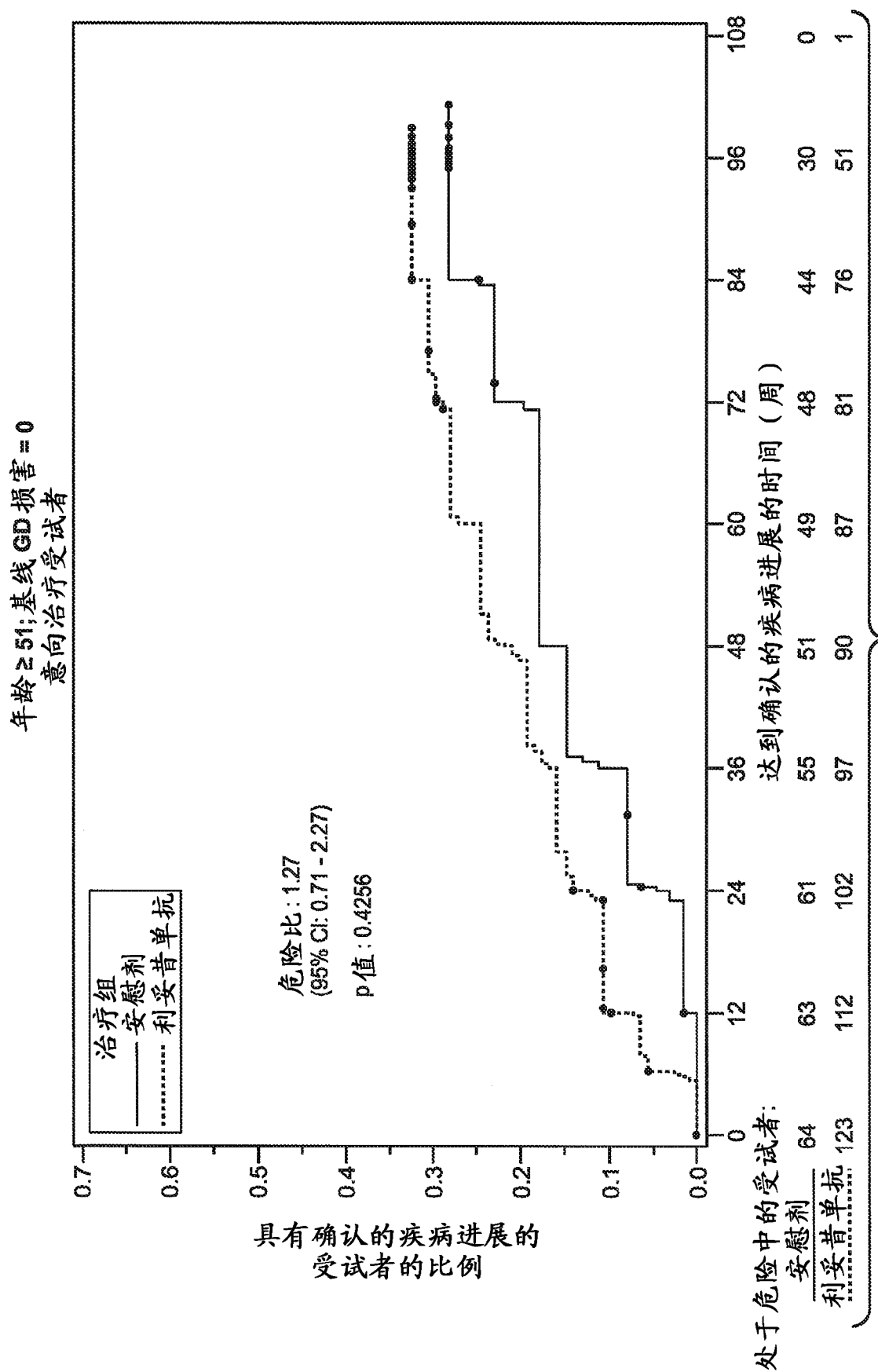


图 11B

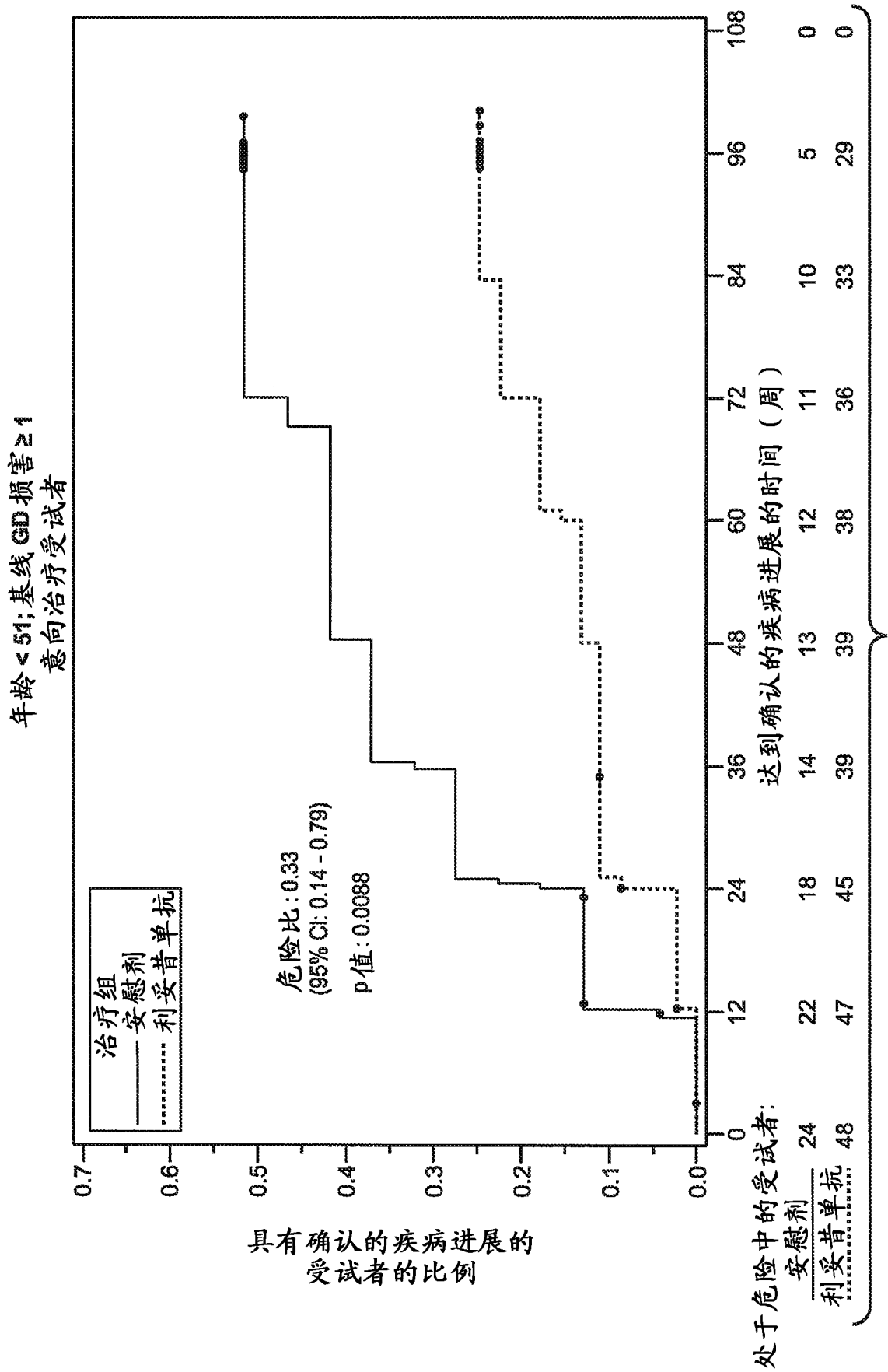


图 11C

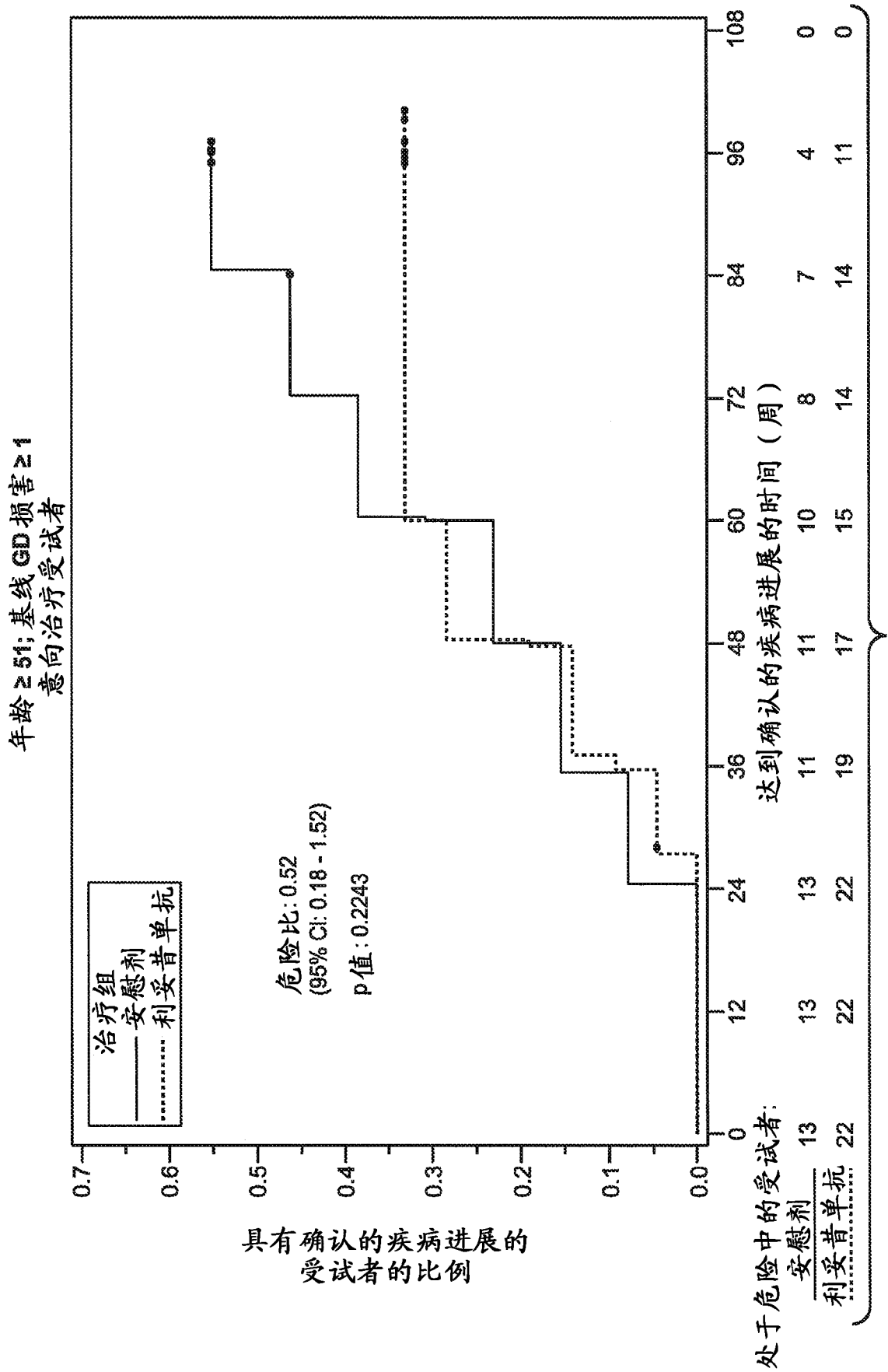


图 11D

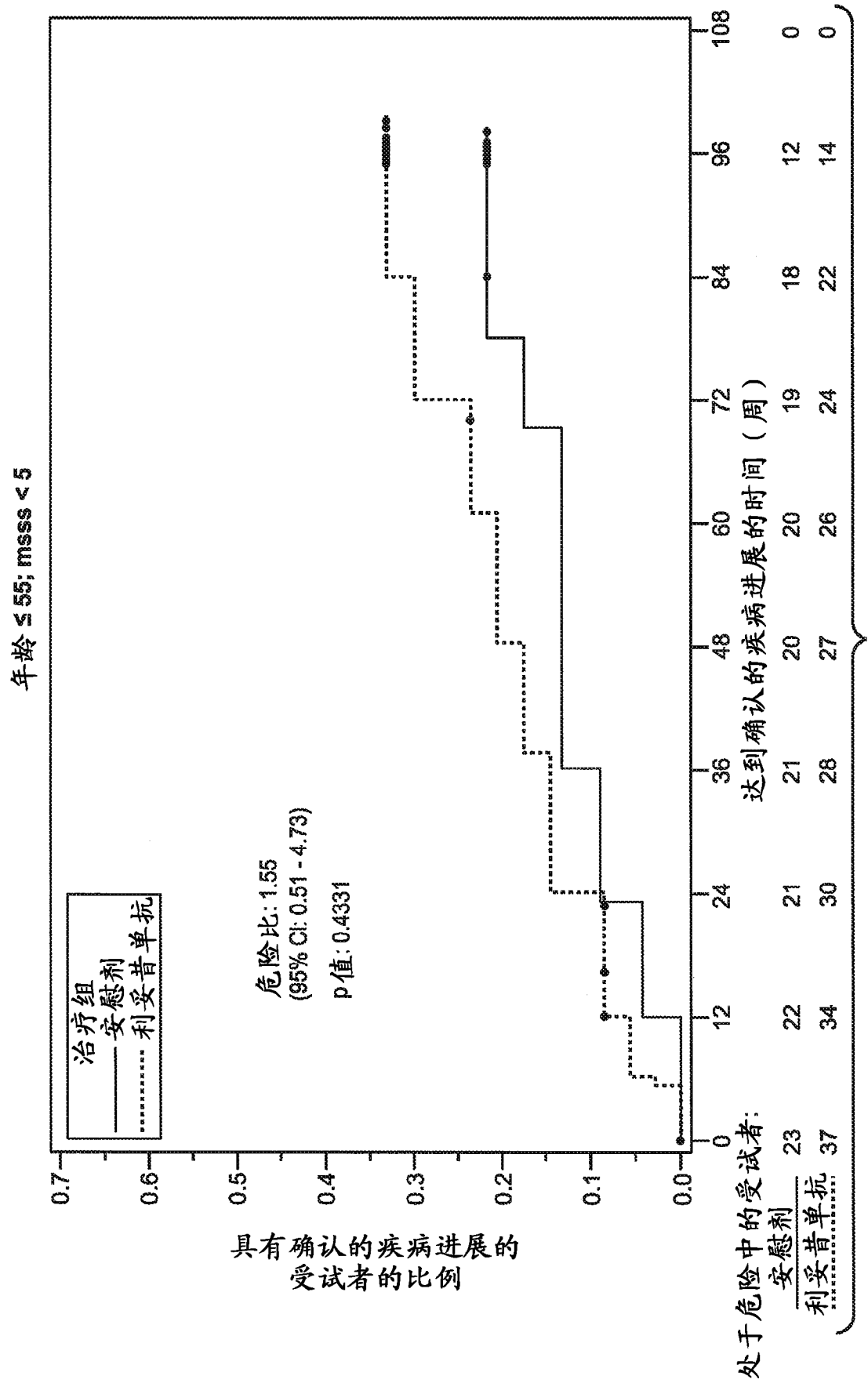


图 12A

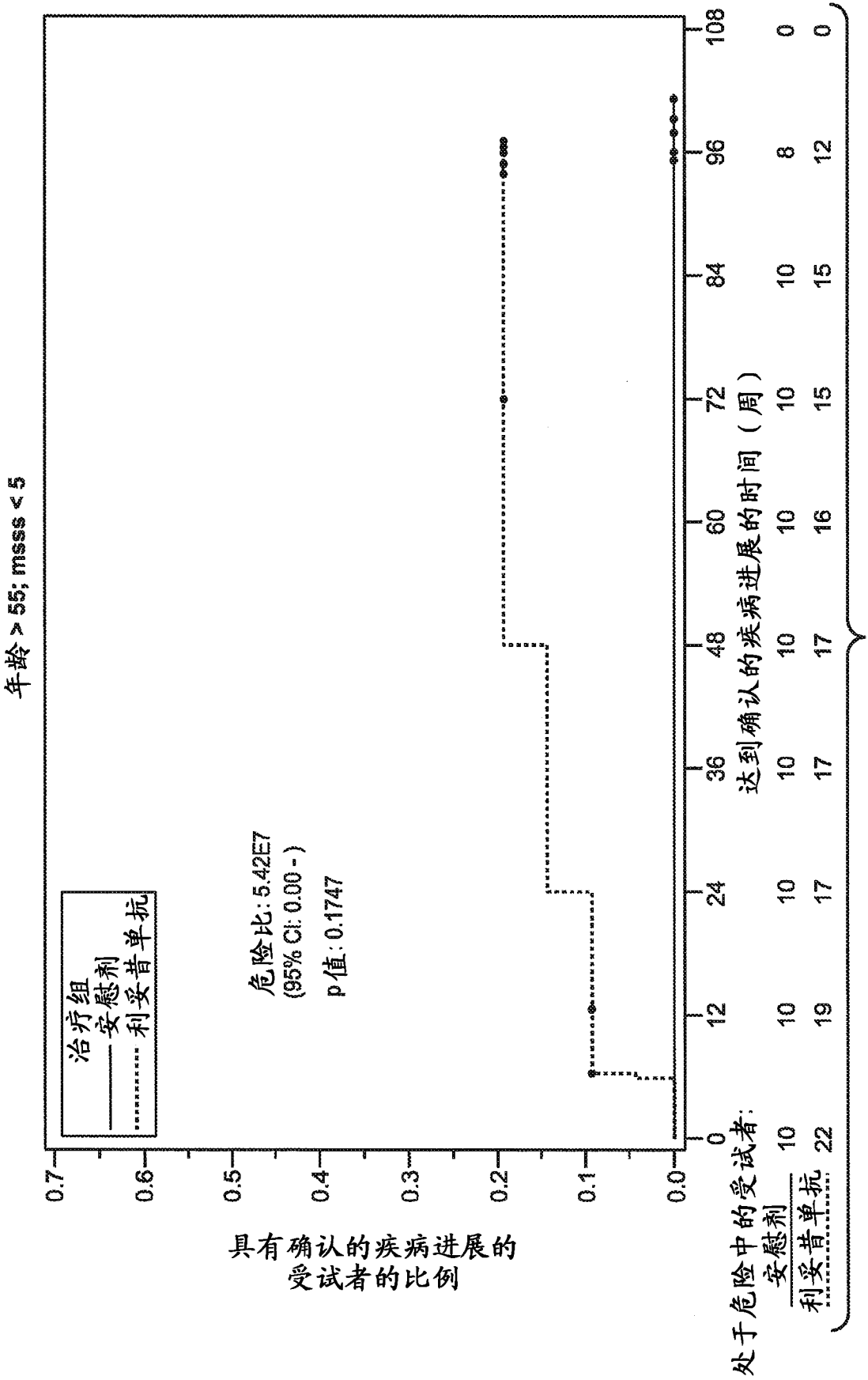


图 12B

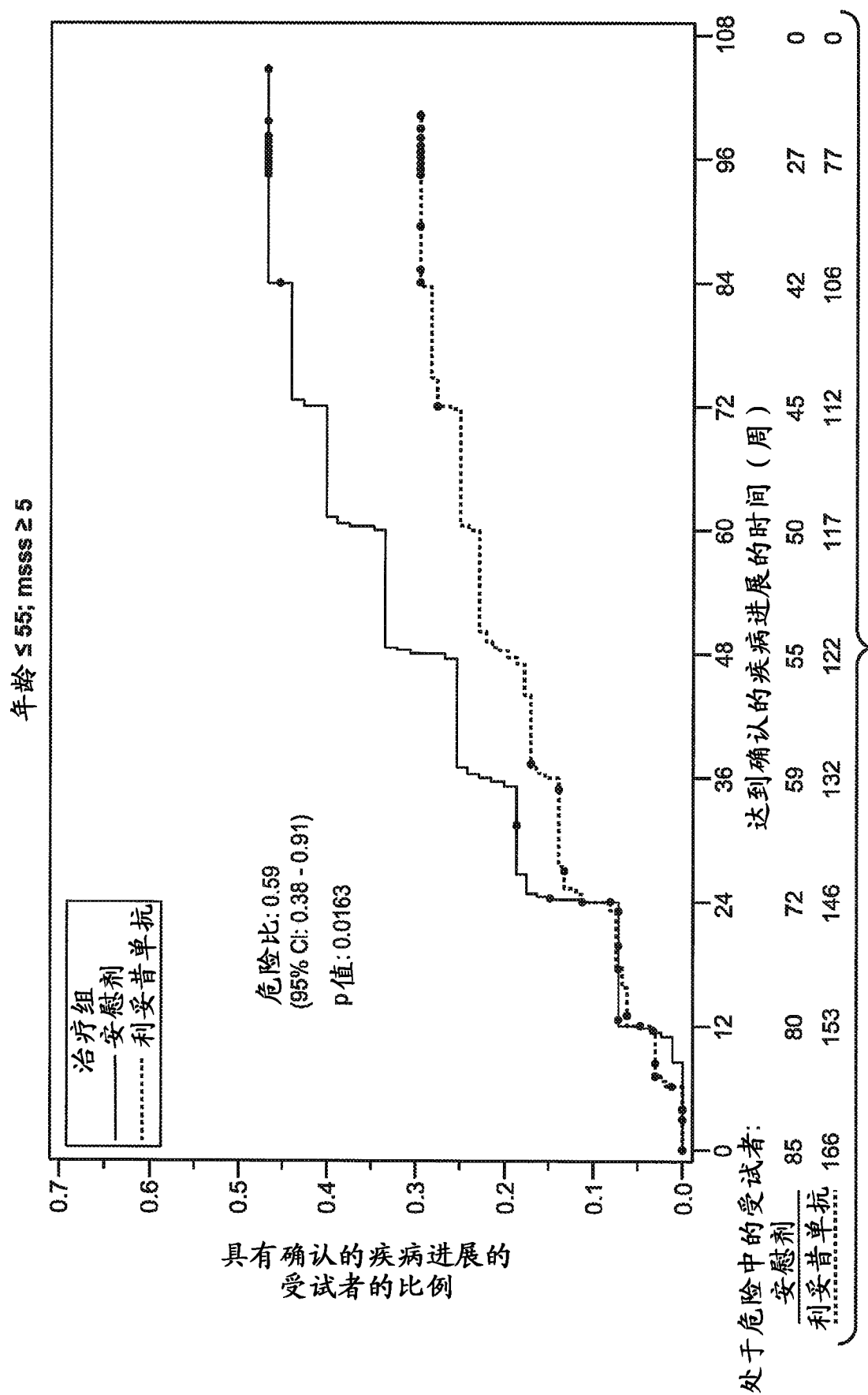


图 12C

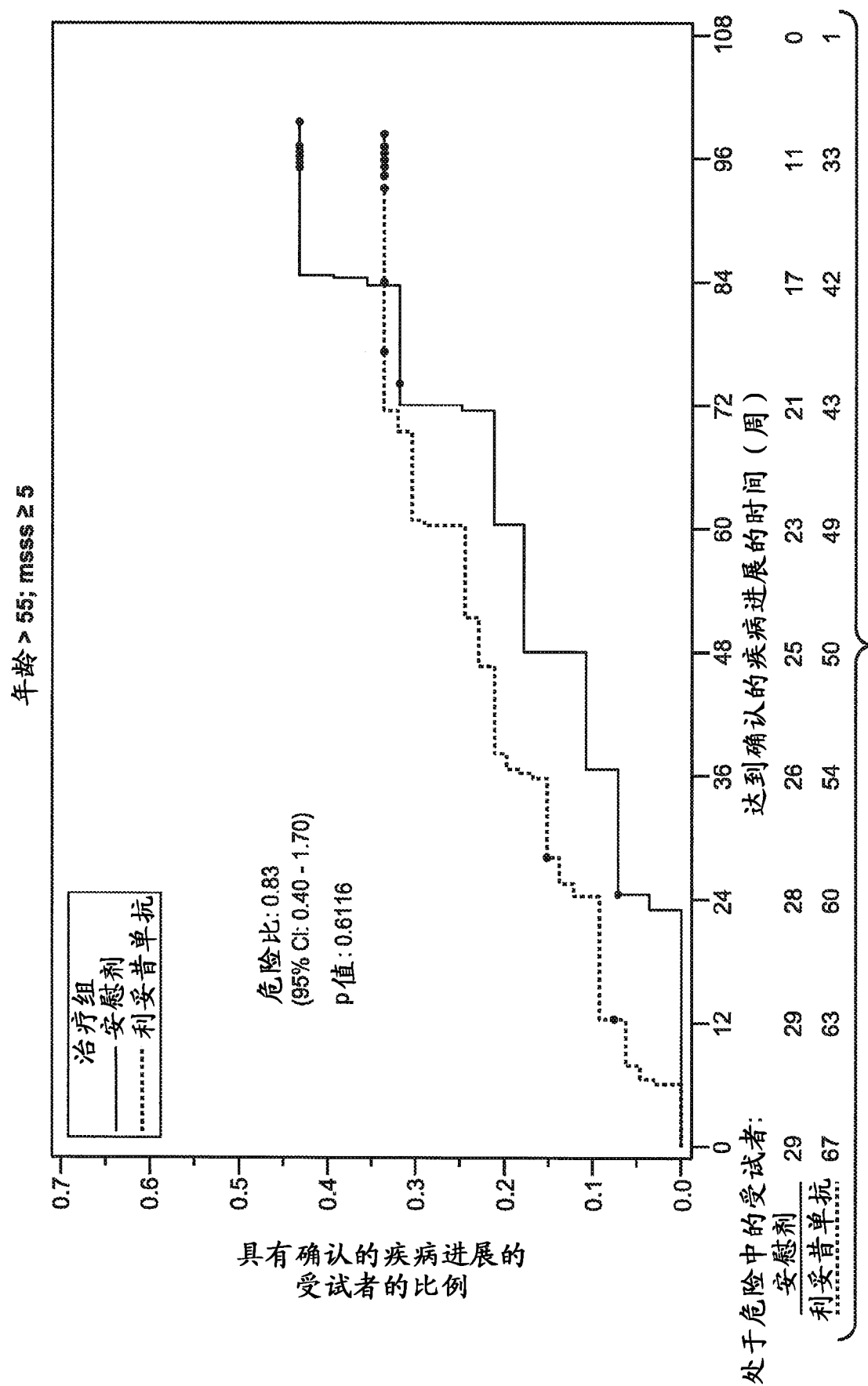


图 12D

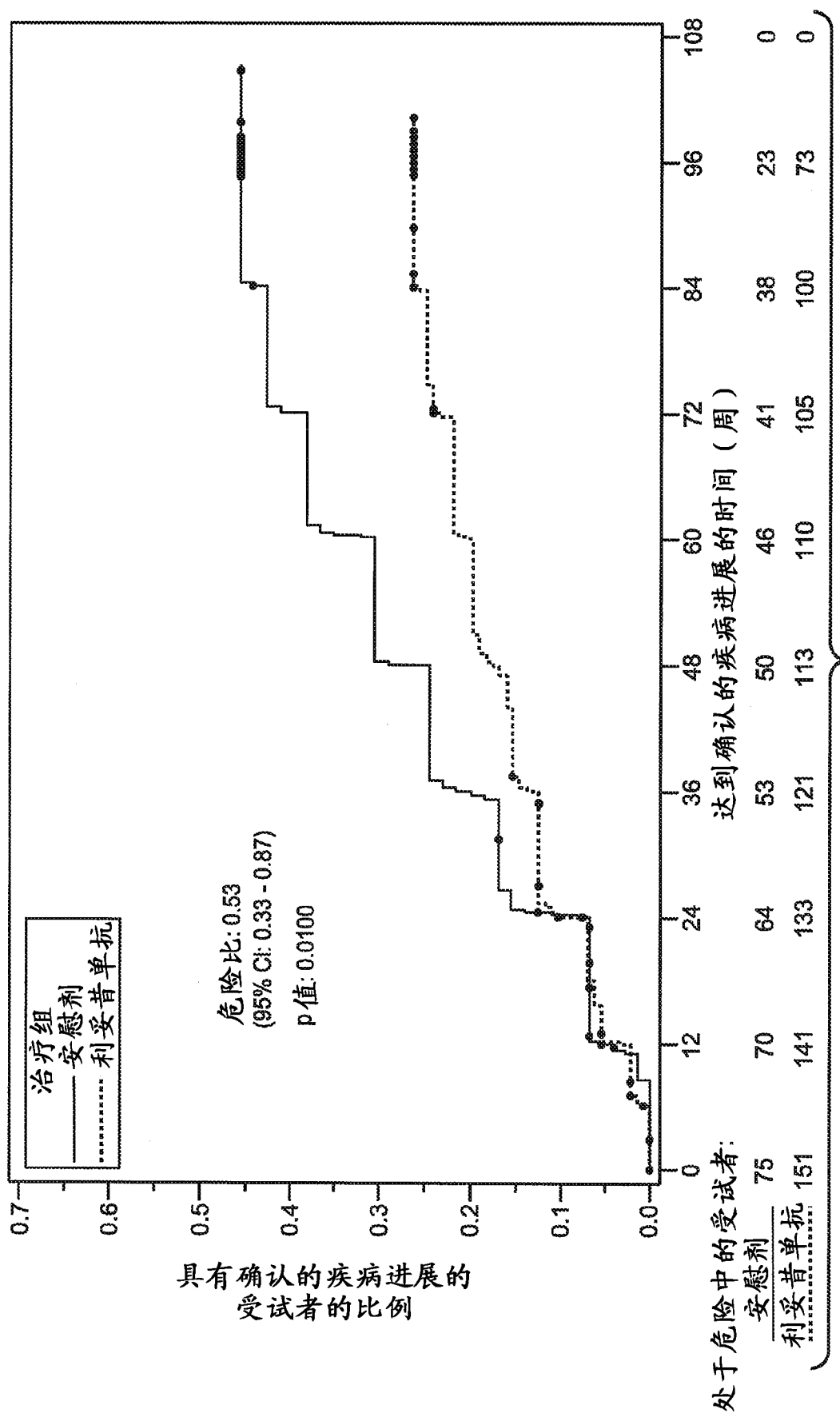


图 13