



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103501825 B

(45)授权公告日 2017.03.15

(21)申请号 201280020130.0

(22)申请日 2012.05.01

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103501825 A

(43)申请公布日 2014.01.08

(30)优先权数据
61/481,489 2011.05.02 US
61/509,850 2011.07.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.10.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/035980 2012.05.01

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/151199 EN 2012.11.08

(73)专利权人 免疫医疗公司
地址 美国新泽西

(72)发明人 L·曾 R·米特拉 E·A·罗西
H·J·汉森 D·M·戈德堡

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 林毅斌 梁谋

(51)Int.Cl.
A61K 51/10(2006.01)

(56)对比文件
US 2006/0153846 A1,2006.07.13,
CN 1244805 A,2000.02.16,
US 2004/0208870 A1,2004.10.21,
US 2006/0153846 A1,2006.07.13,

审查员 赵良

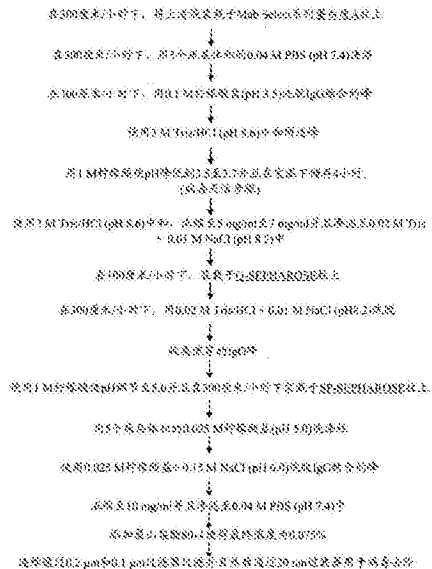
权利要求书2页 说明书43页
序列表26页 附图8页

(54)发明名称

用于小体积施用的同种异型选择的抗体的超滤浓缩

(57)摘要

本文公开了高浓度抗体或免疫球蛋白制剂用于以小于3ml、小于2ml或小于1ml的体积而皮下施用、肌肉内施用、经皮肤施用或其它局部(区域性)施用的方法、组合物以及用途。优选地,所述制剂含有pH为约5.2的高浓度制剂(HCF)缓冲液,所述缓冲液包含磷酸盐、柠檬酸盐、聚山梨酯80以及甘露醇。所述制剂更优选地包含至少100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、250mg/ml或300mg/ml的抗体。用于制备所述高浓度制剂的方法包括超滤和渗滤以浓缩所述抗体并且将培养基交换成HCF缓冲液。其它实施方案涉及非G1m1(nG1m1)同种异型抗体如G1m3和/或nG1m1,2抗体的用途。与G1m1抗体相比,所述nG1m1抗体显示出减小的免疫原性。



1. 一种用于皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用的组合物,其包含处于高浓度制剂缓冲液中的治疗性抗CD74的hLL1、抗CD22的hLL2、抗CD20的hA20或抗HLA-DR的hL243,其中所述缓冲液的pH为5.2并且包含6.2 mM一水合柠檬酸、105 mM氯化钠、1.2 mM二水合柠檬酸钠、8.7 mM磷酸氢二钠、5.5 mM磷酸二氢钠、0.1%聚山梨酯80以及66 mM甘露醇,其中所述抗体的浓度为至少150 mg/ml。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述高浓度制剂缓冲液进一步包含精氨酸和谷氨酸。

3. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体的浓度为至少175 mg/ml。

4. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体的浓度为至少200 mg/ml。

5. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体的浓度为至少225 mg/ml。

6. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体的浓度为至少250 mg/ml。

7. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体的浓度为至少300 mg/ml。

8. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体是裸抗体。

9. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体与至少一种非细胞毒性的治疗剂或诊断剂缀合,所述治疗剂或诊断剂选自自由以下组成的组:趋化因子、酪氨酸激酶抑制剂、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子(CSF)、白细胞介素(IL)和干扰素(IFN)。

10. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体与至少一种非细胞毒性的治疗剂或诊断剂缀合,其中所述治疗剂或诊断剂是免疫调节剂。

11. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体与至少一种非细胞毒性的治疗剂或诊断剂缀合,其中所述治疗剂或诊断剂是细胞因子。

12. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体与至少一种非细胞毒性的治疗剂或诊断剂缀合,其中所述治疗剂或诊断剂是生长因子。

13. 如权利要求1所述的组合物,其中所述抗体与至少一种非细胞毒性的治疗剂或诊断剂缀合,其中所述治疗剂或诊断剂是激素或酶。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的组合物在制备用于治疗疾病的药剂中的用途,所述疾病选自自由以下组成的组:免疫失调疾病、肉瘤、神经胶质瘤、黑素瘤、白血病、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、1型糖尿病或2型糖尿病、淀粉样变性以及动脉粥样硬化。

15. 如权利要求14的用途,其中所述疾病是自身免疫性疾病。

16. 如权利要求14的用途,其中所述疾病是淋巴瘤。

17. 如权利要求14的用途,其中所述疾病是慢性淋巴细胞性白血病。

18. 如权利要求14的用途,其中所述疾病是阿尔茨海默病。

19. 如权利要求14的用途,其中所述疾病是癌瘤。

20. 如权利要求14所述的用途,其中所述药剂用于皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用,并且待施用的体积是3 ml或更少。

21. 如权利要求20所述的用途,其中待施用的体积是2 ml或更少。

22. 如权利要求20所述的用途,其中待施用的体积是1 ml或更少。

23. 如权利要求14所述的用途,其中当皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用时,所述抗体在比当静脉内施用时低的剂量下有效。

24. 一种制备用于皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用的权利要求1的组合物的方法，所述方法包括：

a) 通过在蛋白质A树脂、阳离子交换树脂以及阴离子交换树脂上的连续柱色谱法来纯化所述抗体；

b) 通过超滤来浓缩所述抗体；以及

c) 使用渗滤将所述缓冲液交换成pH介于4.5与5.5之间的高浓度制剂缓冲液，所述高浓度制剂缓冲液包含6.2 mM一水合柠檬酸、105 mM氯化钠、1.2 mM二水合柠檬酸钠、8.7 mM磷酸氢二钠、5.5 mM磷酸二氢钠、0.1%聚山梨酯80以及66 mM甘露醇；

其中所述抗体被浓缩到至少200 mg/ml。

25. 权利要求24的方法，其中在步骤c)中，抗体被浓缩到至少225 mg/ml。

26. 权利要求24的方法，其中在步骤c)中，抗体被浓缩到至少250 mg/ml。

27. 权利要求24的方法，其中在步骤c)中，抗体被浓缩到至少300 mg/ml。

28. 如权利要求24所述的方法，其中所述聚山梨酯80在所述抗体被浓缩之后添加至所述浓缩的抗体溶液中，以减少浓缩过程中所形成的沉淀的量。

29. 一种制备用于皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用的权利要求1的组合物的方法，所述方法包括：

a) 通过在蛋白质A树脂、阴离子交换树脂以及阳离子交换树脂上的连续柱色谱法来纯化所述抗体；

b) 通过超滤来浓缩所述抗体，其中所述抗体被浓缩到至少150 mg/ml；以及

c) 使用渗滤将所述缓冲液交换成pH介于4.5与5.5之间的高浓度制剂缓冲液，所述高浓度制剂缓冲液包含6.2 mM一水合柠檬酸、105 mM氯化钠、1.2 mM二水合柠檬酸钠、8.7 mM磷酸氢二钠、5.5 mM磷酸二氢钠、0.1%聚山梨酯80以及66 mM甘露醇；

其中所述浓缩抗体在2-8°C下稳定至少12个月。

30. 如权利要求29所述的方法，其中所述高浓度制剂缓冲液进一步包含精氨酸和谷氨酸。

31. 如权利要求29所述的方法，其中所述抗体被浓缩至至少250 mg/ml。

32. 如权利要求29所述的方法，其中所述抗体被浓缩至至少300 mg/ml。

33. 如权利要求29所述的方法，其中所述抗体以3 ml或更少的体积，经皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用。

34. 如权利要求33所述的方法，其中所述抗体以2 ml或更少的体积，经皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用。

35. 如权利要求33所述的方法，其中所述抗体以1 ml或更少的体积，经皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用。

36. 如权利要求29所述的方法，其中所施用的抗体的量选自：40 mg、80 mg、160 mg、240 mg、320 mg、400mg以及600mg。

37. 如权利要求29所述的方法，其中所述聚山梨酯80在所述抗体被浓缩之后添加至所述浓缩的抗体溶液中，以减少浓缩过程中所形成的沉淀的量。

38. 如权利要求29所述的方法，其中所施用的抗体的量为1至600mg。

39. 如权利要求29所述的方法，其中所述浓缩抗体在12个月的稳定性为97-99%。

用于小体积施用的同种异型选择的抗体的超滤浓缩

[0001] 发明人:Li Zeng、Rohini Mitra、Edmund A.Rossi、Hans J.Hansen、David M.Goldenberg

[0002] 相关申请

[0003] 本申请根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2011年5月2日提交的临时美国专利申请序号61/481,489和2011年7月20日提交的临时美国专利申请序号61/509,850的权益。

[0004] 序列列表

[0005] 本申请含有一个序列列表,所述序列列表已经由申请系统(EFS-Web)以ASCII格式提交并且特此以引用的方式整体并入。于2012年4月27日创建的所述ASCII副本命名为IMM332W0.txt并且大小为26,386字节。

发明领域

[0006] 本发明涉及免疫球蛋白、抗体和/或抗原结合抗体片段的稳定的、高度浓缩的制剂的组合物和生产方法以及用途。在优选的实施方案中,免疫球蛋白、抗体或其片段可以是非特异性的人免疫球蛋白(例如,IVIg);结合抗原的抗体,如结合CD22的抗体(例如,依帕珠单抗(epratuzumab))、结合CD20的抗体(例如,维妥珠单抗(veltuzumab);GA101)、结合CD74的抗体(例如,米拉珠单抗(milatumab))或结合HLA-DR的抗体(例如,IMMU-114或hL243),虽然可以使用对抗其它抗原性靶标的抗体。在更优选的实施方案中,抗体或其片段的同种异型被选择为非G1m1人同种异型,如G1m3。甚至更优选的是nG1m1,2无效同种异型。抗体或其片段可以是裸露的(未缀合的)或可以与至少一种治疗剂或诊断剂缀合,所述治疗剂或诊断剂不是细胞毒性剂或放射性核素。浓缩的抗体制剂对各种疾病的治疗有用,所述疾病如自身免疫性疾病、免疫失调疾病、感染性疾病、癌症(例如,癌瘤、肉瘤、黑素瘤、神经胶质瘤、成神经细胞瘤、淋巴瘤、白血病、慢性淋巴细胞性白血病、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤或白血病、多发性骨髓瘤或非霍奇金淋巴瘤)、心血管疾病、神经疾病或代谢疾病。在其它的优选实施方案中,浓缩的抗体制剂可以通过皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用来施用,虽然涵盖其它的施用方式(例如,鞘内、腹膜内、眼内、颅内等等)。在最优选的实施方案中,抗体或其片段在微酸性的水性缓冲溶液中被浓缩到至少80mg/ml、更优选地至少100mg/ml、更优选地至少125mg/ml、更优选地至少150mg/ml、更优选地至少175mg/ml、更优选地至少200mg/ml、更优选地至少225mg/ml、更优选地至少250mg/ml、更优选地至少300mg/ml。所述制剂的其它组分可以包括:缓冲剂,如柠檬酸盐或磷酸盐;盐,如氯化钠;表面活性剂,如聚山梨酯80;和/或多元醇,如甘露醇。

[0007] 背景

[0008] 已经提议施用单克隆抗体或其片段用于诊断和/或治疗各种各样的疾病状态,如癌症、感染性疾病、自身免疫或免疫功能障碍疾病、神经疾病、心血管疾病以及代谢疾病。(参见,例如Nadler等,1980,Cancer Res 40:3147-54;Ritz和Schlossman,1982,Blood 59:1-11;Waldmann,2003,Nature Med 9:269-77;Ibbotson等,2003,Am J Cardiovasc Drugs

3:381-86;Domer等,2009,Nat Rev Rheumatol 5:433-41;Pul等,2011,Expert Opin Biol Ther 11:343-57)。还具体来说通过皮下注射而使用人免疫球蛋白混合物用于治疗肝炎以及通过静脉内输注用于治疗各种自身免疫性疾病(参见,例如Powell等,2006,Clin Transplant 20:524-25;Stiehm,1997,Pediatr Infect Dis J 16:696-707;Zandman等,Clin Rev Allergy Immunol [2011年7月6日的印刷前电子出版物];Kaveri等,2011,Clin Exp Immunol 164:2-5)。

[0009] 虽然静脉内输注已经是抗体施用的标准方式,但是输注相关的反应(如皮疹、荨麻疹、红斑、瘙痒、低血压、支气管痉挛或过敏)可能是严重的并且会明显限制抗体输注的速率。(参见,例如Kang和Saif,2007.J Supportive Oncol 5:451-57;Vogel,2010,Clin J Oncol Nursing 14:E10-21)。在某种程度上为了解决输注相关反应的发生,已经提议皮下施用治疗性抗体(Lundin等,2002,Blood 100:768-73;Kavanaugh等,Arthritis Rheum,2009,60:976-86;Negrea等,2011,Haematologica 96:567-73)。还给出肌肉内施用,如对于IVIg而言(Marzano等,2010,Minerva Med 101:373-83;Pauwelyn等,2010,Transplant Proc 42:4399-402;Filipponi等,2010,Dig Liver Dis 42:509-14)。另一种替代方案是经皮肤施用(例如,Burton等,2011,Pharm Res 28:31-40;Wendorf等,2011,Pharm Res 28:22-30;Koutsonanos等,2009,PLoS One 4:e4773)。虽然输注部位反应可能仍然发生,但是皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用将通过避免对长时间的静脉内施用及专用的输注套房和工作人员的需要而产生减少的医疗保健成本,并且还可能减少全身性输注反应的发生(Lundin等,2002.Blood 100:768-73;Wasserman,2008,Patient Preference and Adherence,2:163-66;Negrea等,2011,Haematologica 96:567-73),以及对患者更耐受和方便的(包括自我施用的可能性)。因为与皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用相关的较低注射体积,所以存在对长期稳定的并且可以被皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用(或通过要求小体积注射液的其它路径而施用)的更浓缩的抗体或免疫球蛋白制剂的需要。

[0010] 概述

[0011] 本发明涉及治疗性免疫球蛋白、单克隆抗体或其抗原结合片段的稳定的、高度浓缩的制剂的组合物和生产方法以及用途;和用于低体积注射的用途。虽然本领域中已知许多的抗体生产方法并且可以使用这些方法,但优选地是将编码抗体或片段的表达载体转染至哺乳动物细胞系如SpEEE、SpESF或SpESF-X中(参见,例如美国专利号:7,531,327;7,537,930;7,608,425;以及7,785,880;每一个所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。更优选地,转染和抗体表达均发生在无血清的培养基中,以减小生产费用并且去除污染性蛋白质源。将抗体产生至细胞培养基中,用于进一步纯化。

[0012] 在其它的优选实施方案中,可以通过连续色谱法、例如通过亲和柱色谱法和离子交换柱色谱法而从细胞培养基中纯化所述抗体。非限制性的实例包括在蛋白质A上的亲和色谱法、在Q-SEPHAROSE®上的阴离子交换色谱法以及在SP-SEPHAROSE®上的阳离子交换色谱法。更优选地,使抗体在pH 5的柠檬酸盐缓冲液中结合至SP-SEPHAROSE®树脂,并且用含0.15M NaCl的pH 6的柠檬酸盐缓冲液从柱上洗脱下来。来自SP-SEPHAROSE®柱的洗出液可以通过例如用于病毒去除的20nm过滤器来过滤。纯化的抗体然后可以例如使用具有50KD MW截止过滤器的AMICON®超滤单元来渗滤,以便将培养基交换成高浓度制剂缓冲液(HCF缓

冲液)并且浓缩抗体用于储存。在最优选的实施方案中,HCF缓冲溶液可以包含磷酸盐缓冲液(pH 5.2)、氯化钠、聚山梨酯80、柠檬酸盐以及甘露醇。聚山梨酯80用来减少蛋白质聚集,而甘露醇使抗体在水性培养基中稳定。渗滤将抗体浓缩至优选地至少80mg/ml、更优选地至少100mg/ml、更优选地至少150mg/ml、更优选地至少200mg/ml、更优选地至少300mg/ml的最终浓度。浓缩的抗体展现出少的聚集或没有聚集,并且优选地在2°C至8°C下呈液体形式稳定至少10个月。在甚至更优选的实施方案中,聚山梨酯80在超滤步骤之后被添加至浓缩的抗体中。

[0013] 稳定的、高度浓缩的抗体具有用于制备用于优选地通过皮下施用、经皮肤施用或肌肉内施用而向受试者施用的药剂的用途。然而,熟练的技术人员将认识到本领域中已知的其它施用形式,如可以使用静脉内施用、腹膜内施用、心室内施用、眼内施用和/或鞘内施用。

[0014] 有用的抗体可以结合本领域中已知的任何疾病相关的抗原。在疾病状态例如是癌症的情况下,许多由肿瘤细胞表达或以另外的方式与肿瘤细胞相关的抗原是本领域中已知的,所述抗原包括但不限于:碳酸酐酶IX、 α -胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体有特异性的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD70L、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD132、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)和它的亚基、HER2/neu、HMGB-1、缺氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-23、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS1-抗原、KS1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞游走抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUC13、MUC16、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PIGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活素、存活素-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、TROP-2、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、补体因子C3a、补体因子C3b、补体因子C5a、补体因子C5、血管生成标记物、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因标记物以及致癌基因产物(参见,例如Sensi等,Clin Cancer Res 2006,12:5023-32;Parmiani等,J Immunol 2007,178:1975-79;Novellino等,Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。优选地,抗体结合CD74、CD20、CD22或HLA-DR。

[0015] 可以使用的示例性抗体包括但不限于:hR1(抗IGF-1R,2010年3月12日提交的美国专利申请序号12/722,645)、hPAM4(抗粘蛋白,美国专利号7,282,567)、hA20(抗CD20,美国专利号7,251,164)、hA19(抗CD19,美国专利号7,109,304)、hIMMU31(抗AFP,美国专利号7,300,655)、hLL1(抗CD74,美国专利号7,312,318)、hLL2(抗CD22,美国专利号7,074,403)、

hMu-9 (抗CSAp, 美国专利号7,387,773)、hL243 (抗HLA-DR, 美国专利号7,612,180)、hMN-14 (抗CEACAM5, 美国专利号6,676,924)、hMN-15 (抗CEACAM6, 美国专利号7,541,440)、hRS7 (抗EGP-1, 美国专利号7,238,785)、hMN-3 (抗CEACAM6, 美国专利号7,541,440)、Ab124和Ab125 (抗CXCR4, 美国专利号7,138,496), 每一个引用的专利或申请的实施例部分以引用的方式并入本文。更优选地, 抗体是hA20 (维妥珠单抗)、hLL2 (依帕珠单抗)、hLL1 (米拉珠单抗) 或hL243 (IMMU-114)。

[0016] 有用的替代抗体包括但不限于: 阿昔单抗 (abciximab) (抗糖蛋白IIb/IIIa); 阿仑单抗 (alemtuzumab) (抗CD52); 贝伐单抗 (bevacizumab) (抗VEGF); 西妥昔单抗 (cetuximab) (抗EGFR); 吉妥珠单抗 (gemtuzumab) (抗CD33); 替伊莫单抗 (ibritumomab tiuxetan) (抗CD20); 帕尼单抗 (panitumumab) (抗EGFR); 利妥昔单抗 (rituximab) (抗CD20); 托西莫单抗 (tositumomab) (抗CD20); 曲妥珠单抗 (trastuzumab) (抗ErbB2); 阿巴伏单抗 (abagovomab) (抗CA-125); 阿德木单抗 (adecatumumab) (抗EpCAM); atlizumab (抗IL-6受体); 贝那利珠单抗 (benralizumab) (抗CD125); CC49 (抗TAG-72); AB-PG1-XG1-026 (抗PSMA, 美国专利申请11/983,372, 保藏为ATCC PTA-4405和PTA-4406); D2/B (抗PSMA, WO 2009/130575); 托珠单抗 (tocilizumab) (抗IL-6受体); 巴利昔单抗 (basiliximab) (抗CD25); 达利珠单抗 (daclizumab) (抗CD25); 依法利珠单抗 (efalizumab) (抗CD11a); GA101 (抗CD20; Glycart Roche); 莫罗莫那-CD3 (muromonab-CD3) (抗CD3受体); 那他珠单抗 (natalizumab) (抗 α 4整联蛋白); 奥马珠单抗 (omalizumab) (抗IgE); 抗TNF- α 抗体, 如CDP571 (Ofei等, 2011, Diabetes 45:881-85)、MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B、M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL); 英夫利昔单抗 (infliximab) (Centocor, Malvern, PA); 塞妥珠单抗 (certolizumab pegol) (UCB, Brussels, Belgium); 抗CD40L (UCB, Brussels, Belgium); 阿达木单抗 (adalimumab) (Abbott, Abbott Park, IL); 贝利单抗 (Benlysta) (Human Genome Sciences); 用于治疗阿尔茨海默病的抗体, 如Alz 50 (Ksiezak-Reding等, 1987, J Biol Chem 263:7943-47)、罗氏单抗 (gantenerumab)、索拉珠单抗 (solanezumab) 以及英夫利昔单抗 (infliximab); 抗纤维蛋白抗体, 像59D8、T2G1s、MH1; 抗HIV抗体, 如P4/D10 (美国专利申请序号11/745,692)、Ab 75、Ab 76、Ab 77 (Paulik等, 1999, Biochem Pharmacol 58:1781-90); 以及对抗病原体的抗体, 如CR6261 (抗流行性感冒)、艾韦单抗 (exbivirumab) (抗肝炎B)、泛维珠单抗 (felvizumab) (抗呼吸道合胞体病毒)、夫瑞韦如 (foravirumab) (抗狂犬病病毒)、莫维珠单抗 (motavizumab) (抗呼吸道合胞体病毒)、帕利珠单抗 (palivizumab) (抗呼吸道合胞体病毒)、帕诺库单抗 (panobacumab) (抗假单胞菌)、瑞非韦鲁 (rafivirumab) (抗狂犬病病毒)、瑞加韦单抗 (regavirumab) (抗巨细胞病毒)、司韦单抗 (sevirumab) (抗巨细胞病毒)、tivirumab (抗肝炎B) 以及乌珠单抗 (urtoxazumab) (抗大肠杆菌 (E.coli))。

[0017] 有用的抗体或抗原结合片段可以是嵌合的、人源化的或人的。对亲本鼠抗体而言使用嵌合抗体是优选的, 因为它们拥有人抗体恒定区序列并且因此不会引起像鼠抗体那样强烈的人抗小鼠抗体 (HAMA) 反应。使用人源化的抗体是甚至更优选的, 以便进一步减小诱导HAMA反应的可能性。用于通过用相对应的人抗体构架区和恒定区序列替换鼠构架区和恒定区序列来进行鼠抗体的人源化的技术是本领域中众所周知的并且已经被应用于众多的鼠抗癌抗体中。抗体人源化还可以涉及用相对应的来自亲本鼠构架区序列的残基置换一

个或多个个人构架氨基酸残基。如下所讨论,用于生产人抗体的技术也是众所周知的。

[0018] 治疗性制剂可以包含抗体片段,如F(ab')₂、Fab、scFv、Fv或使用所述F(ab')₂、Fab、scFv的部分或全部轻链和重链的融合蛋白。抗体还可以是多价的、或多价且多特异性的。抗体可以包括IgG1、IgG2a、IgG3或IgG4的人恒定区。

[0019] 在更优选的实施方案中,抗体的同种异型可选择为使宿主对所施用的抗体的免疫原性反应最小化,如下所更详细地讨论。优选的同种异型是非G1m1同种异型(nG1m1),如G1m3、G1m3,1、G1m3,2或G1m3,1,2。非G1m1同种异型对抗体免疫反应性减少而言是优选的。出人意料地,未发现浓缩的nG1m1抗体的重复皮下施用诱导明显的免疫反应,尽管皮下施用的免疫原性增强。

[0020] 各种实施方案可以涉及本发明方法和组合物治疗疾病的用途,所述疾病包括但不限于:非霍奇金淋巴瘤、B细胞急性和慢性淋巴白血病、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、毛细胞白血病、急性和慢性骨髓样白血病、T细胞淋巴瘤和白血病、多发性骨髓瘤、神经胶质瘤、华氏巨球蛋白血症、癌瘤、黑素瘤、肉瘤、神经胶质瘤以及皮肤癌。癌瘤可以包括口腔、胃肠道、肺道、肺、乳房、卵巢、前列腺、子宫、子宫内膜、宫颈、膀胱、胰腺、骨、脑、结缔组织、肝、胆囊、肾、皮肤、中枢神经系统以及睾丸的癌瘤。

[0021] 另外,本发明方法和组合物可以用来治疗自身免疫性疾病,例如急性免疫性血小板减少、慢性免疫性血小板减少、皮炎、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、寻常天疱疮、糖尿病(例如,少年糖尿病)、亨-舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、大动脉炎、爱迪生氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯丘氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、斯耶格伦氏综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮症、慢性活动性肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳氏肉芽肿病、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、牛皮癣或纤维性肺泡炎。

[0022] 在替代实施方案中,浓缩的抗体制剂可以具有治疗代谢疾病(如2型糖尿病或淀粉样变性)、心血管疾病(如动脉粥样硬化)或神经疾病(如阿尔茨海默病)的用途。对治疗此类病状有用的抗体是本领域中已知的,如下所更详细地讨论。

[0023] 在某些实施方案中,可以通过与作为本发明的一部分的一种或多种其它治疗剂的联合治疗来增强疾病治疗。在本发明中有用的已知治疗剂包括:免疫调节剂(如细胞因子、淋巴因子、趋化因子及生长因子以及它们的抑制剂)、鞘氨醇抑制剂、激素、激素拮抗剂、寡核苷酸(如siRNA或RNAi)、光活性治疗剂、抗血管生成剂以及促凋亡剂。其它更多的传统治疗剂(如细胞毒性药物或放射性核素)可以在浓缩的抗体之前、与其同时或在其之后施用。

[0024] 附图简述

[0025] 提供以下附图来说明本发明的优选实施方案。然而,所要求保护的主体决不受附图中所公开的说明性实施方案限制。

[0026] 图1.从细胞培养基中抗体的柱色谱法纯化的示例性实验方案。

[0027] 图2.超滤浓缩的抗体的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳:(A)非还原性凝胶,(B)还原性凝胶。两种凝胶示出(泳道1)MW标准物;(泳道2)hLL1 IgG,起始IgG溶液(10mg/mL);(泳道3)储存2个月之后的浓缩的hLL1 IgG(215mg/mL);(泳道4)hA20IgG,起始IgG溶液(5.1mg/mL);

(泳道5) 储存10个月之后的浓缩的hA20IgG (162mg/mL) ; (泳道6) hL243IgG, 起始IgG溶液 (8.9mg/mL) ; (泳道7) 储存10个月之后的浓缩的hL243IgG (101mg/mL) 。所使用的MW标准物分别是6.5KD、14KD、21KD、31KD、45KD、66KD、97KD、116KD以及200KD。

[0028] 图3. 超滤浓缩的抗体的等电聚焦凝胶示出 (泳道1) pI标准物; (泳道2) hLL1IgG, 起始IgG溶液 (10mg/mL) ; (泳道3) 储存2个月之后的浓缩的hLL1IgG (215mg/mL) ; (泳道4) hA20IgG, 起始IgG溶液 (5.1mg/mL) ; (泳道5) 储存10个月之后的浓缩的hA20IgG (162mg/mL) ; (泳道6) hL243IgG, 起始IgG溶液 (8.9mg/mL) ; (泳道7) 储存10个月之后的浓缩的hL243IgG (101mg/mL) 。所使用的MW标准物分别是6.5KD、14KD、21KD、31KD、45KD、66KD、97KD、116KD以及200KD。

[0029] 图4. 储存10个月之后的超滤浓缩的hLL1IgG溶液 (215mg/mL) 的代表性SE HPLC色谱图。

[0030] 图5. 储存10个月之后的超滤浓缩的hA20IgG溶液 (162mg/mL) 的代表性SE HPLC色谱图。

[0031] 图6. 储存10个月之后的超滤浓缩的hL243IgG溶液 (101mg/mL) 的代表性SE HPLC色谱图。

[0032] 图7. 维妥珠单抗 (SEQ ID NO:33) 与利妥昔单抗 (SEQ ID NO:34) 重链恒定区序列的比较。相同的残基由星号表明。两种不同的同种异型抗体的重链恒定区序列中仅有四个氨基酸残基不同。这两种抗体之间轻链恒定区序列是相同的。

[0033] 图8. hL243的氨基酸序列。hL243IgG4P重链的整个可变区和恒定区序列如SEQ ID NO:37所示, 其中恒定区加有下划线。hL243IgG4P重链的单独恒定区序列如SEQ ID NO:38所示。hL243轻链的整个可变区和恒定区序列如SEQ ID NO:39所示, 其中恒定区加有下划线。hL243轻链的单独恒定区序列如SEQ ID NO:40所示。

[0034] 详述

[0035] 定义

[0036] 提供以下定义有利于理解本文中的公开内容。在没有确切定义一个术语的情况下, 所述术语根据它的平常意义和普通意义来使用。

[0037] 如本文中所使用, “一个 (种)” 和 “所述” 可以是指单数或复数, 除非上下文另外阐明仅意指单数。

[0038] “抗体” 是指全长 (即, 天然存在的或通过正常免疫球蛋白基因片段重组过程所形成的) 免疫球蛋白分子 (例如, IgG抗体) ; 或免疫球蛋白分子的免疫活性的 (即, 抗原结合的) 部分, 像抗体片段。

[0039] “抗体片段” 是抗体的一部分, 如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、单域抗体 (DAB或VHH) 等, 包括IgG4的半分子 (van der Neut Kolfshoten等, 2007, Science 317: 1554-1557)。无论结构如何, 抗体片段与完整抗体所识别的相同抗原结合。例如, 抗CD74抗体片段与CD74的表位结合。术语 “抗体片段” 还包括由可变区组成的分离的片段, 如由重链和轻链的可变区组成的 “Fv” 片段; 重组的单链多肽分子, 其中轻链可变区和重链可变区由肽接头 (“scFv蛋白”) 连接; 以及由模仿高变区的氨基酸残基组成的最小识别单元。

[0040] “嵌合抗体” 是一种重组蛋白, 其含有的可变域包括来源于一种物种的抗体 (优选地啮齿动物抗体) 的互补决定区 (CDR), 而抗体分子的恒定域来源于人抗体的那些恒定域。

对于兽医应用而言,嵌合抗体的恒定域可以来源于其它物种(如猫或狗)的那些恒定域。

[0041] “人源化抗体”是一种重组蛋白,其中来自一种物种的抗体(例如,啮齿动物抗体)的CDR从啮齿动物抗体的可变重链和可变轻链转移至人重链可变域和轻链可变域(包括人构架区(FR)序列)中。抗体分子的恒定域来源于人抗体的那些恒定域。

[0042] “人抗体”是从转基因小鼠中获得的抗体,所述转基因小鼠已经被基因工程化以作为对抗原挑战的反应而产生特异性人抗体。在此技术中,将人重链基因座和轻链基因座的元件引入至来源于胚胎干细胞系的小鼠品系中,所述胚胎干细胞系含有内源重链基因座和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可以合成对人抗原有特异性的人抗体,并且小鼠可以用来产生分泌人抗体的杂交瘤。用于从转基因小鼠中获得人抗体的方法由Green等,Nature Genet. 7:13 (1994)、Lonberg等,Nature 368:856 (1994)以及Taylor等,Int. Immun. 6:579 (1994)描述。完全人抗体还可以通过基因转染或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建,所有所述方法和技术是本领域中已知的。(参见,例如McCafferty等,Nature 348:552-553 (1990),公开了从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变域基因库(repertoire)中体外产生人抗体及其片段)。在此技术中,将抗体可变域基因框内克隆至丝状噬菌体的主要或次要外壳蛋白基因中,并且作为功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒表面上。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体功能性质的选择也导致编码展现出那些性质的抗体的基因的选择。以此方式,噬菌体模拟B细胞的一些性质。可以在各种形式下进行噬菌体展示,对于它们的综述,参见例如Johnson和Chiswell,Current Opinion in Structural Biology 3:5564-571 (1993)。还可以由体外活化的B细胞来产生人抗体。(参见,美国专利号5,567,610和5,229,275)。

[0043] “治疗剂”是对疾病的治疗有用的原子、分子或化合物。治疗剂的实例包括但不限于:抗体、抗体片段、药物、细胞因子或趋化因子抑制剂、促凋亡剂、酪氨酸激酶抑制剂、毒素、酶、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、siRNA、RNAi、螯合剂、硼化合物、光活性剂、染料以及放射性同位素。

[0044] “诊断剂”是对诊断疾病有用的原子、分子或化合物。有用的诊断剂包括但不限于:放射性同位素、染料、造影剂、荧光化合物或分子以及增强剂(例如,顺磁离子)。优选地,诊断剂选自由以下组成的组:放射性同位素、增强剂以及荧光化合物。

[0045] “免疫缀合物”是抗体与原子、分子或更高有序的结构(例如,与脂质体)、治疗剂或诊断剂的缀合物。“裸抗体”是没有与任何其它药剂缀合的抗体。

[0046] “裸抗体”通常是没有与治疗剂缀合的完整抗体。之所以如此是因为抗体分子的Fc部分提供效应子功能,如补体结合和ADCC(抗体依赖的细胞毒性),其使可导致细胞溶解的机制得以实施。然而,Fc部分可能不是治疗功能所需要的,而其它机制(如凋亡)可以得以发挥作用。裸抗体包括多克隆抗体和单克隆抗体两者;以及某些重组抗体,如嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0047] 如本文中所使用,术语“抗体融合蛋白”是重组产生的抗原结合分子,其中抗体或抗体片段被连接至另一种蛋白质或肽,如相同的或不同的抗体或抗体片段或DDD肽或AD肽。融合蛋白可以包含单一抗体组分、不同抗体组分的多价或多特异性的组合或同一抗体组分的多个拷贝。融合蛋白可以另外地包含抗体或抗体片段和治疗剂。适用于此类融合蛋白的治疗剂的实例包括免疫调节剂和毒素。一种优选的毒素包含核糖核酸酶(RNA酶),优选地为

重组RNA酶。

[0048] “多特异性抗体”是可以同时结合至少两个具有不同结构的靶标(例如,两个不同的抗原、在同一抗原上的两个不同表位、或半抗原和/或抗原或表位)的抗体。“多价抗体”是可以同时结合至少两个具有相同或不同结构的靶标的抗体。价态表明抗体对单一抗原或表位具有多少个结合臂或位点;即,一价的、二价的、三价的或多价的。抗体的多价性意味着抗体可以使用多种相互作用结合抗原,从而增加结合抗原的亲合力。特异性表明抗体能够结合多少个抗原或表位;即,单特异性的、双特异性的、三特异性的、多特异性的。使用这些定义,天然抗体(例如,IgG)是二价的,因为它具有两个结合臂,但所述抗体是单特异性的,因为它结合一个表位。多特异性的、多价的抗体是含有多于一个具有不同特异性的结合位点的构建体。

[0049] “双特异性抗体”是可以同时结合两个具有不同结构的靶标的抗体。双特异性抗体(bsAb)和双特异性抗体片段(bsFab)可以具有:至少一个臂,其特异性地结合例如B细胞抗原或表位、T细胞抗原或表位、骨髓样细胞抗原或表位、浆细胞抗原或表位以及肥大细胞抗原或表位;和至少一个其它的臂,其特异性地结合带有治疗剂或诊断剂的可靶向的缀合物。可以使用分子工程来产生各种双特异性抗体。

[0050] 单克隆抗体的制备

[0051] 本文中所述的组合物、制剂以及方法可以包括单克隆抗体。特定抗原的啮齿动物单克隆抗体可以通过本领域技术人员已知的方法来获得。(参见,例如Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975),和Coligan等,(编著),CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY,第1卷,第2.5.1-2.6.7页(John Wiley&Sons 1991))。用于克隆鼠免疫球蛋白可变域的一般技术已经例如由Orlandi等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA86:3833(1989)的出版物公开。

[0052] 嵌合抗体

[0053] 嵌合抗体是一种重组蛋白,其含有的可变域包括来源于一种动物物种(如啮齿动物抗体)的CDR,而抗体分子的其余部分(即恒定域)来源于人抗体。用于构建嵌合抗体的技术是本领域技术人员众所周知的。例如,Leung等,Hybridoma 13:469(1994)公开了他们如何通过使编码LL2单克隆抗体(抗CD22抗体)的V_k和V_H域的DNA序列与对应的人恒定区结构域和IgG₁恒定区结构域组合来产生LL2嵌合体。此出版物还分别提供了LL2轻链可变区和重链可变区(V_k和V_H)的核苷酸序列。

[0054] 人源化抗体

[0055] 嵌合单克隆抗体可以通过用一个或多个不同的人FR替换嵌合抗体可变域中的鼠FR的序列来人源化。确切地说,将小鼠CDR从小鼠免疫球蛋白的可变重链和可变轻链转移至相对应的人抗体的可变域中。因为简单地将小鼠CDR转移至人FR中经常导致抗体亲和力的减少或甚至丧失,所以可能要求额外的修饰以便恢复鼠抗体的原始亲和力。这可以通过将FR区中的一个或多个某些人残基用它们的鼠对应物替换以获得对其表位拥有良好结合亲和力的抗体来完成。(参见,例如Tempest等,Biotechnology 9:266(1991)和Verhoeyen等,Science 239:1534(1988))。用于产生人源化抗体的技术例如由Jones等,Nature 321:522(1986)、Riechmann等,Nature 332:323(1988)、Verhoeyen等,Science 239:1534(1988)、Carter等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:4285(1992),Sandhu,Crit.Rev.Biotech.12:437

(1992)以及Singer等,J.Immun.150:2844(1993)公开。

[0056] 人抗体

[0057] 完全人抗体可以从转基因的非人动物中获得。(参见,例如Mendez等,Nature Genetics,15:146-156,1997;美国专利号5,633,425)。用于使用组合方法或被人免疫球蛋白基因座转化的转基因动物来产生完全人抗体的方法是本领域中已知的(例如,Mancini等,2004,New Microbiol.27:315-28;Conrad和Scheller,2005,Comb.Chem.High Throughput Screen.8:117-26;Brekke和Loset,2003,Curr.Opin.Pharmacol.3:544-50;每个文献以引用的方式并入本文)。此类完全人抗体预计展现出比嵌合抗体或人源化抗体甚至更少的副作用,并且在体内用作基本上内源性的人抗体。在某些实施方案中,所要求保护的方法和工序可以使用由此类技术产生的人抗体。

[0058] 在一种替代方案中,噬菌体展示技术可以用来产生人抗体(例如,Dantas-Barbosa等,2005,Genet.Mol.Res.4:126-40,所述文献以引用的方式并入本文)。还可以从正常的人或从展现出特定疾病状态(如癌症)的人中产生人抗体(Dantas-Barbosa等,2005)。从患病的个体中构建人抗体的优点是:可以使循环抗体库偏向于对抗疾病相关抗原的抗体。

[0059] 在此方法的一个非限制性实例中,Dantas-Barbosa等(2005)从骨肉瘤患者中构建了人Fab抗体片段的噬菌体展示文库。通常,从循环血液淋巴细胞中获得总RNA(同上)。从 μ 、 γ 以及 κ 链抗体库克隆重组的Fab并且将其插入至噬菌体展示文库中(同上)。使用针对重链和轻链免疫球蛋白序列的特异性引物,将RNA转变为cDNA并且用来制作Fab cDNA文库(Marks等,1991,J.Mol Biol.222:581-97)。根据Andris-Widhopf等(2000年,在Phage Display Laboratory Manual,Barbas等(编著),第1版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY第9.1至9.22页中所述,所述文献以引用的方式并入本文)进行文库构建。用限制性核酸内切酶消化最终的Fab片段并且插入至噬菌体基因组中,以制作噬菌体展示文库。此类文库可以通过标准的噬菌体展示方法来筛选。熟练的技术人员将认识到此技术仅是示例性的,并且可以使用任何用于通过噬菌体展示而制作和筛选人抗体或抗体片段的已知方法。

[0060] 在另一种替代方案中,使用如上所讨论的标准免疫实验方案,已经被基因工程化以产生人抗体的转基因动物可以用来产生对抗基本上任何免疫原性靶标的抗体。用于从转基因小鼠中获得人抗体的方法由Green等,Nature Genet.7:13(1994)、Lonberg等,Nature 368:856(1994)以及Taylor等,Int.Immun.6:579(1994)描述。这样一个系统的非限制性实例是来自Abgenix(Fremont,CA)的XenoMouse[®](例如,Green等,1999,J.Immunol.Methods 231:11-23,所述文献以引用的方式并入本文)。在XenoMouse[®]和类似的动物中,小鼠抗体基因已经被灭活并且被功能性人抗体基因替换,而小鼠免疫系统的其余部分保持完整。

[0061] 用含有人IgH和Ig κ 基因座的部分的种系配置的YAC(酵母人工染色体)来转化XenoMouse[®],所述基因座部分包括大部分可变区序列连同附属基因和调控序列。人可变区库可以用来获得产抗体的B细胞,所述B细胞可以通过已知的技术加工成杂交瘤。用靶标抗原免疫的XenoMouse[®]将通过正常的免疫反应产生人抗体,所述人抗体可以通过以上讨论的标准技术收获和/或产生。可获得多种XenoMouse[®]品系,其中每一种都能够产生不同类别的抗体。已经显示转基因产生的人抗体具有治疗潜力,同时保持正常人抗体的药物代谢

动力学性质 (Green等, 1999)。熟练的技术人员将认识到所要求保护的组合物和方法不限于使用XenoMouse®系统, 而是可以使用任何已经被基因工程化以产生人抗体的转基因动物。

[0062] 抗体克隆和产生

[0063] 各种技术 (如嵌合或人源化抗体的产生) 可以涉及抗体克隆和构建的工序。感兴趣的抗体的抗原结合 V_{κ} (可变轻链) 和 V_H (可变重链) 序列可以通过各种分子克隆工序 (如RT-PCR、5' -RACE以及cDNA文库筛选) 来获得。来自表达鼠抗体的细胞的抗体的V基因可以通过PCR扩增来克隆并且测序。为了证实其真实性, 可以将克隆的 V_L 和 V_H 基因在细胞培养物中表达为嵌合抗体, 如由Orlandi等 (Proc. Natl Acad Sci, USA, 86:3833 (1989)) 所描述。基于V基因序列, 然后可以设计并且构建人源化抗体, 如由Leung等 (Mol. Immunol., 32:1413 (1995)) 所描述。

[0064] cDNA可以通过一般的分子克隆技术由任何已知的产生鼠抗体的杂交瘤系或转染细胞系制备 (Sambrook等, Molecular Cloning, A laboratory manual, 第2版 (1989))。可以使用引物VK1BACK和VK1FOR (Orlandi等, 1989) 或由Leung等 (BioTechniques, 15:286 (1993)) 描述的延伸的引物组来扩增抗体的 V_{κ} 序列。可以使用引物对VH1BACK/VH1FOR (Orlandi等, 1989) 或由Leung等 (Hybridoma, 13:469 (1994)) 描述的与鼠IgG的恒定区退火的引物来扩增 V_H 序列。可以通过长寡核苷酸模板合成与PCR扩增的组合来构建人源化V基因, 如由Leung等 (Mol. Immunol., 32:1413 (1995)) 所描述。

[0065] 可以将 V_{κ} 的PCR产物亚克隆进入分期载体 (staging vector), 如基于pBR327的分期载体 (VKpBR), 所述分期载体含有Ig启动子、信号肽序列以及适宜的限制位点。可以将 V_H 的PCR产物亚克隆进入类似的分期载体, 如基于pBluescript的VHpBS。含有 V_{κ} 和 V_H 序列连同启动子和信号肽序列一起的表达盒可以从VKpBR和VHpBS中切除并且分别连接入适当的表达载体, 如pKh和pGlg (Leung等, Hybridoma, 13:469 (1994))。可以将表达载体共转染进入适当的细胞并且监测上清液中嵌合、人源化或人抗体的产生。或者, 可以切除 V_{κ} 和 V_H 表达盒并且亚克隆进入单一表达载体, 如pdHL2, 如由Gillies等 (J. Immunol. Methods 125:191 (1989)) 所描述并且还在Losman等, Cancer, 80:2660 (1997) 中所示。

[0066] 在一个替代实施方案中, 表达载体可以被转染进入已经在无血清培养基中预适应转染、生长以及表达的宿主细胞。可以使用的示例性细胞系包括Sp/EEE、Sp/ESF以及Sp/ESF-X细胞系 (参见, 例如美国专利号7,531,327; 7,537,930以及7,608,425; 每一个所述专利的实施部分以引用的方式并入本文)。这些示例性细胞系基于Sp2/0骨髓瘤细胞系、用突变型Bcl-EEE基因转染、暴露于甲氨蝶呤以扩增转染的基因序列并且预适应无血清细胞系以用于蛋白质表达。

[0067] 抗体同种异型

[0068] 治疗性抗体的免疫原性与输注反应风险增加和治疗性反应的持续时间减少相关 (Baert等, 2003, N Engl J Med 348:602-08)。治疗性抗体在宿主中诱导免疫反应的程度可以部分地通过抗体的同种异型来确定 (Stickler等, 2011, Genes and Immunity 12:213-21)。抗体同种异型与抗体的恒定区序列中特定位置上的氨基酸序列变化相关。含有重链 γ -型恒定区的IgG抗体的同种异型命名为Gm同种异型 (1976, J Immunol 117:1056-59)。

[0069] 对于常见的IgG1人抗体而言, 最普遍的同种异型是G1m1 (Stickler等, 2011, Genes and Immunity 12:213-21)。然而, G1m3同种异型也频繁地出现在白种人 (Caucasians) 中

(同上)。已经报道了当向非G1m1 (nG1m1) 接受者 (如G1m3患者) 施用, G1m1抗体含有倾向于诱导免疫反应的同种异型序列(同上)。当向G1m1患者施用, 非G1m1同种异型抗体不是作为免疫原性的(同上)。

[0070] 人G1m1同种异型包含重链IgG1的CH3序列中的Kabat位置356上的氨基酸天冬氨酸和Kabat位置358上的亮氨酸。nG1m1同种异型包含Kabat位置356上的氨基酸谷氨酸和Kabat位置358上的甲硫氨酸。G1m1和nG1m1同种异型两者均包含Kabat位置357上的谷氨酸残基, 并且所述同种异型有时称为DEL和EEM同种异型。针对示例性抗体利妥昔单抗 (SEQ ID NO: 34) 和维妥珠单抗 (SEQ ID NO: 33), 在图7中显示出G1m1和nG1m1同种异型抗体的重链恒定区序列的非限制性实例。

[0071] Jefferis和Lefranc (2009, mAbs 1:1-7) 综述了作为IgG同种异型的特征的序列变化和它们对免疫原性的影响。他们报道了与G1m17同种异型中的Kabat214上的赖氨酸残基相比, G1m3同种异型的特征在于Kabat位置214上的精氨酸残基。nG1m1, 2同种异型的特征在于Kabat位置356上的谷氨酸、Kabat位置358上的甲硫氨酸以及Kabat位置431上的丙氨酸。G1m1, 2同种异型的特征在于Kabat位置356上的天冬氨酸、Kabat位置358上的亮氨酸以及Kabat位置431上的甘氨酸。除了重链恒定区序列变体之外, Jefferis和Lefranc (2009) 报道了κ轻链恒定区中的同种异型变体, 其中Km1同种异型的特征在于Kabat位置153上的缬氨酸和Kabat位置191上的亮氨酸, Km1, 2同种异型的特征在于Kabat位置153上的丙氨酸和Kabat位置191上的亮氨酸, 并且Km3同种异型的特征在于Kabat位置153上的丙氨酸和Kabat位置191上的缬氨酸。

[0072] 对于治疗性抗体而言, 维妥珠单抗和利妥昔单抗分别是对治疗各种各样血液恶性肿瘤和/或自身免疫性疾病有用的、对抗CD20的人源化和嵌合IgG1抗体。表1比较了利妥昔单抗与维妥珠单抗的同种异型序列。如在表1和图7中所示, 利妥昔单抗 (G1m17, 1) 是DEL同种异型IgG1, 在利妥昔单抗中的赖氨酸相对维妥珠单抗中的精氨酸在Kabat位置214 (重链CH1) 上具有额外序列变化。已经报道了在受试者中维妥珠单抗比利妥昔单抗的免疫原性小 (参见, 例如Morchhauser等, 2009, J Clin Oncol 27:3346-53; Goldenberg等, 2009, Blood 113:1062-70; Robak&Robak, 2011, BioDrugs 25:13-25), 这种作用已经被归因于人源化抗体与嵌合抗体之间的差异。然而, EEM与DEL同种异型之间的同种异型差异也可能解释维妥珠单抗的更低免疫原性。

[0073] 表1. 利妥昔单抗对维妥珠单抗的同种异型

	完整的同种异型	重链位置和相关的同种异型					
		214 (同种异型)		356/358 (同种异型)		431 (同种异型)	
[0074] 利妥昔单抗	G1m17,1	K	17	D/L	I	A	-
维妥珠单抗	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

[0075] 为了减小治疗性抗体在nG1m1基因型个体中的免疫原性, 希望选择的抗体同种异型对应于G1m3同种异型, 其特征位于Kabat 214上的精氨酸; 和nG1m1, 2无效同种异型, 其特征位于Kabat位置356上的谷氨酸、Kabat位置358上的甲硫氨酸以及Kabat位置431上的丙氨酸。出人意料地, 发现重复皮下施用G1m3抗体经过很长一段时间并不会导致明显的免疫反

应。在替代实施方案中,与G1m3同种异型一样的人IgG4重链具有Kabat 214上的精氨酸、Kabat 356上的谷氨酸、Kabat 359上的甲硫氨酸以及Kabat 431上的丙氨酸。因为免疫原性看起来似乎至少部分地与那些位置上的残基相关,所以对于治疗性抗体的人IgG4重链恒定区序列的使用也是一个优选的实施方案。G1m3 IgG1抗体与IgG4抗体的组合也可以是对治疗性施用有用的。

[0076] 已知的抗体

[0077] 在各种实施方案中,所要求保护的方法和组合物可以使用任何本领域中已知的各种抗体。有用的抗体可以从众多已知的来源商业获得。例如,从美国模式培养物保藏所(ATCC,Manassas,VA)可获得各种分泌抗体的杂交瘤系。对抗各种疾病靶标(包括但不限于肿瘤相关的抗原)的许多抗体已经被保藏在ATCC中和/或已经公布了可变区序列并且可供使用在所要求保护的方法和组合物中。参见,例如美国专利号:7,312,318;7,282,567;7,151,164;7,074,403;7,060,802;7,056,509;7,049,060;7,045,132;7,041,803;7,041,802;7,041,293;7,038,018;7,037,498;7,012,133;7,001,598;6,998,468;6,994,976;6,994,852;6,989,241;6,974,863;6,965,018;6,964,854;6,962,981;6,962,813;6,956,107;6,951,924;6,949,244;6,946,129;6,943,020;6,939,547;6,921,645;6,921,645;6,921,533;6,919,433;6,919,078;6,916,475;6,905,681;6,899,879;6,893,625;6,887,468;6,887,466;6,884,594;6,881,405;6,878,812;6,875,580;6,872,568;6,867,006;6,864,062;6,861,511;6,861,227;6,861,226;6,838,282;6,835,549;6,835,370;6,824,780;6,824,778;6,812,206;6,793,924;6,783,758;6,770,450;6,767,711;6,764,688;6,764,681;6,764,679;6,743,898;6,733,981;6,730,307;6,720,155;6,716,966;6,709,653;6,693,176;6,692,908;6,689,607;6,689,362;6,689,355;6,682,737;6,682,736;6,682,734;6,673,344;6,653,104;6,652,852;6,635,482;6,630,144;6,610,833;6,610,294;6,605,441;6,605,279;6,596,852;6,592,868;6,576,745;6,572,856;6,566,076;6,562,618;6,545,130;6,544,749;6,534,058;6,528,625;6,528,269;6,521,227;6,518,404;6,511,665;6,491,915;6,488,930;6,482,598;6,482,408;6,479,247;6,468,531;6,468,529;6,465,173;6,461,823;6,458,356;6,455,044;6,455,040;6,451,310;6,444,206;6,441,143;6,432,404;6,432,402;6,419,928;6,413,726;6,406,694;6,403,770;6,403,091;6,395,276;6,395,274;6,387,350;6,383,759;6,383,484;6,376,654;6,372,215;6,359,126;6,355,481;6,355,444;6,355,245;6,355,244;6,346,246;6,344,198;6,340,571;6,340,459;6,331,175;6,306,393;6,254,868;6,187,287;6,183,744;6,129,914;6,120,767;6,096,289;6,077,499;5,922,302;5,874,540;5,814,440;5,798,229;5,789,554;5,776,456;5,736,119;5,716,595;5,677,136;5,587,459;5,443,953;5,525,338,每一个所述专利的实施部分以引用的方式并入本文。这些抗体仅是示例性的并且各种各样的其它抗体和它们的杂交瘤是本领域中已知的。熟练的技术人员将认识到,可以通过简单研究对抗感兴趣的选择的疾病相关靶标的抗体的ATCC、NCBI和/或USPTO数据库来获得对抗几乎任何疾病相关抗原的抗体序列或分泌抗体的杂交瘤。使用本领域中众所周知的标准技术,可以将克隆抗体的抗原结合域扩增、切除、连接入表达载体中、转染进入适应的宿主细胞中并且用于蛋白质产生(参见,例如美国专利号7,531,327;7,537,930;7,608,425以及7,785,880,每一个所述专利的实施部分以引用的方式并入本文)。

[0078] 在所要求保护的方法和组合物的范围内可以对治疗癌症有用的具体抗体包括但不限于:LL1(抗CD74)、LL2和RFB4(抗CD22)、RS7(抗上皮糖蛋白-1(EGP-1))、PAM4和KC4(两者均抗粘蛋白)、MN-14(抗癌胚抗原(CEA,又称为CD66e)、Mu-9(抗结肠特异性抗原p)、Immu 31(抗 α -胎蛋白)、TAG-72(例如,CC49)、Tn、J591或HuJ591(抗PSMA(前列腺特异性膜抗原))、AB-PG1-XG1-026(抗PSMA二聚体)、D2/B(抗PSMA)、G250(抗碳酸酐酶IX)、hL243(抗HLA-DR)、阿仑单抗(抗CD52)、贝伐单抗(抗VEGF)、西妥昔单抗(抗EGFR)、吉妥珠单抗(抗CD33)、替伊莫单抗(抗CD20)、帕尼单抗(抗EGFR)、利妥昔单抗(抗CD20)、托西莫单抗(抗CD20)、GA101(抗CD20)以及曲妥珠单抗(抗ErbB2)。此类抗体是本领域中已知的(例如,美国专利号5,686,072;5,874,540;6,107,090;6,183,744;6,306,393;6,653,104;6,730,300;6,899,864;6,926,893;6,962,702;7,074,403;7,230,084;7,238,785;7,238,786;7,256,004;7,282,567;7,300,655;7,312,318;7,585,491;7,612,180;7,642,239;以及美国专利申请公布号20040202666(现在被放弃);20050271671以及20060193865,每一个专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。有用的具体已知的抗体包括hPAM4(美国专利号7,282,567)、hA20(美国专利号7,251,164)、hA19(美国专利号7,109,304)、hIMMU31(美国专利号7,300,655)、hLL1(美国专利号7,312,318)、hLL2(美国专利号7,074,403)、hMu-9(美国专利号7,387,773)、hL243(美国专利号7,612,180)、hMN-14(美国专利号6,676,924)、hMN-15(美国专利号7,541,440)、hR1(美国专利申请12/772,645)、hRS7(美国专利号7,238,785)、hMN-3(美国专利号7,541,440)、AB-PG1-XG1-026(美国专利申请11/983,372,保藏为ATCC PTA-4405和PTA-4406)以及D2/B(WO 2009/130575),关于附图和实施例部分,每一个列举的专利或申请的文本以引用的方式并入本文。

[0079] 抗TNF- α 抗体是本领域中已知的,并且可以对治疗免疫性疾病如自身免疫性疾病、免疫功能障碍(例如,移植物抗宿主疾病、器官移植排斥反应)或糖尿病有用。已知的对抗TNF- α 的抗体包括:人抗体CDP571(Ofei等,2011,Diabetes 45:881-85);鼠抗体MTNFAI、M2TNFAI、M3TNFAI、M3TNFABI、M302B以及M303(Thermo Scientific,Rockford,IL);英夫利昔单抗(Centocor,Malvern,PA);塞妥珠单抗(UCB,Brussels,Belgium);以及阿达木单抗(Abbott,Abbott Park,IL)。这些和许多其它已知的抗TNF- α 抗体可以用于所要求保护的方法和组合物中。对治疗免疫失调或自身免疫性疾病有用的其它抗体包括但不限于:抗B细胞抗体,如维妥珠单抗、依帕珠单抗、米拉珠单抗或hL243;托珠单抗(抗IL-6受体);巴利昔单抗(抗CD25);达利珠单抗(抗CD25);依法利珠单抗(抗CD11a);莫罗莫那-CD3(抗CD3受体);抗CD40L(UCB,Brussels,Belgium);那他珠单抗(抗 α 4整联蛋白)以及奥马珠单抗(抗IgE)。

[0080] 可以使用已知的对抗B细胞抗原的抗体来治疗1型糖尿病和2型糖尿病,如对抗CD22的抗体(依帕珠单抗)、对抗CD74的抗体(米拉珠单抗)、对抗CD19的抗体(hA19)、对抗CD20的抗体(维妥珠单抗)或对抗HLA-DR的抗体(hL243)(参见,例如Winer等,2011,Nature Med 17:610-18)。还已经提议将抗CD3抗体用于治疗1型糖尿病(Cemea等,2010,Diabetes Metab Rev 26:602-05)。

[0081] 本发明的药物组合物可以用来治疗具有代谢疾病(如淀粉样变性)或神经退化性疾病(如阿尔茨海默病)的受试者。巴匹珠单抗(bapineuzumab)在临床试验中用于阿尔茨海默病的治疗。提议用于治疗阿尔茨海默病的其它抗体包括Alz 50(Ksiezak-Reding等,1987,J Biol Chem 263:7943-47)、罗氏单抗以及索拉珠单抗。已经报道英夫利昔单抗(抗

TNF- α 抗体)会减少淀粉样斑块并且改善认知力。

[0082] 在一个优选的实施方案中,使用所要求保护的组合物和方法可以治疗的疾病包括心血管疾病,如纤维蛋白凝块、动脉粥样硬化、心肌缺血以及梗塞形成。纤维蛋白的抗体(例如,scFv (59D8);T2G1s;MH1)是已知的并且在临床试验中作为用于发现所述凝块和肺栓子的显像剂,而抗粒细胞抗体(如MN-3、MN-15、抗NCA95以及抗CD15抗体)可以靶向心肌梗死和心肌缺血。(参见,例如美国专利号5,487,892;5,632,968;6,294,173;7,541,440,每一个专利的实施部分以引用的方式并入本文)。抗巨噬细胞、抗低密度脂蛋白(LDL)、抗MIF(例如,美国专利号6,645,493;7,517,523,每个专利的实施部分以引用的方式并入本文)以及抗CD74(例如,hLL1)抗体可以用来靶向动脉粥样硬化斑块。阿昔单抗(抗糖蛋白IIb/IIIa)已经被批准用于预防经皮冠状动脉介入中的再狭窄和治疗不稳定型心绞痛的辅助用途(Waldmann等,2000,Hematol 1:394-408)。已经报道抗CD3抗体会降低动脉粥样硬化的发展和进展(Steffens等,2006,Circulation114:1977-84)。对抗氧化的LDL的抗体在小鼠模型中诱导了所建立的动脉粥样硬化的消退(Ginsberg,2007,J Am Coll Cardiol 52:2319-21)。已显示抗ICAM-1抗体在大鼠中脑动脉闭塞之后诱导了缺血性细胞损伤(Zhang等,1994,Neurology 44:1747-51)。白细胞抗原的商业上可获得的单克隆抗体由以下所代表:OKT抗T-细胞单克隆抗体(从Ortho制药公司可获得),其结合正常的T-淋巴细胞;由杂交瘤产生的单克隆抗体,所述杂交瘤具有ATCC登录号HB44、HB55、HB12、HB78以及HB2;G7E11、W8E7、NKP15以及G022(Becton Dickinson);NEN9.4(New England Nuclear);以及FMC11(Sera Labs)。对抗纤维蛋白和血小板抗原的抗体的描述包含在Knight,Semin.Nucl.Med.,20:52-67(1990)中。

[0083] 可以使用的其它抗体包括对抗感染性疾病因子(agent)的抗体,所述感染性疾病因子如细菌、病毒、支原体或其它病原体。许多对抗此类感染性因子的抗体是本领域中已知的,并且任何此类已知的抗体可以用于所要求的方法和组合物中。例如,对抗人免疫缺陷病毒I(HIV-1)的gp120糖蛋白抗原的抗体是已知的,并且某些此类抗体可以对人具有免疫保护作用。参见,例如Rossi等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.86:8055-8058,1990。已知的抗HIV抗体包括由Johansson等(AIDS.2006 Oct 3;20(15):1911-5)描述的抗包膜抗体,以及由Polymun(Vienna,Austria)描述和出售的抗HIV抗体,还在美国专利5,831,034、美国专利5,911,989和Vcelar等,AIDS 2007;21(16):2161-2170以及Joos等,Antimicrob.Agents Chemother.2006;50(5):1773-9中描述,所有文献以引用的方式并入本文。对抗肝炎病毒的抗体也是已知的并且可以使用(例如,Dagan和Eren,Curr Opin Mol Ther,2003,5:148-55;Keck等,2008,Curr Top Microbiol Immunol 317:1-38;El-Awady等,2006,12:2530-35)。

[0084] 对抗疟疾寄生虫的抗体可以针对孢子体阶段、裂殖子阶段、裂殖体阶段以及配子体阶段。已经产生了对抗孢子体(环子孢子抗原)的单克隆抗体,并且已经显示其在体外和在啮齿动物中可中和孢子体(N.Yoshida等,Science 207:71-73,1980)。多个小组已经开发了刚地弓形虫(*T.gondii*)的抗体,所述刚地弓形虫是弓形虫病中所涉及到的原动物寄生虫(Kasper等,J.Immunol.129:1694-1699,1982;同上,30:2407-2412,1983)。已经开发了对抗血吸虫表面抗原的抗体并且已经发现其在体内或在体外起对抗血吸虫的作用(Simpson等,Parasitology,83:163-177,1981;Smith等,Parasitology,84:83-91,1982;Gryzch等,J.Immunol.,129:2739-2743,1982;Zodda等,J.Immunol.129:2326-2328,1982;Dissous等,

J. immunol., 129:2232-2234, 1982)。

[0085] 克氏锥虫 (*trypanosoma cruzi*) 是恰加斯病的致病因子, 并且通过吸血的食虫椿象科昆虫来传播。已经产生在体外特异性地抑制寄生虫的一种形式向另一种形式(上鞭毛体至锥鞭毛体阶段)分化的抗体, 并且所述抗体与细胞表面糖蛋白反应; 然而, 哺乳动物(血流)形式的寄生虫不存在此抗原 (Sher等, *Nature*, 300:639-640, 1982)。

[0086] 抗真菌抗体是本领域中已知的, 如抗-核盘菌 (*Sclerotinia*) 抗体 (美国专利7, 910, 702); 抗葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖 (antiglucuronoxylo-mannan) 抗体 (Zhong和Priofski, 1998, *Clin Diag Lab Immunol* 5:58-64); 抗-假丝酵母 (*Candida*) 抗体 (Matthews和Bumie, 2001, 2:472-76); 以及抗鞘糖脂抗体 (Toledo等, 2010, *BMC Microbiol*10:47)。

[0087] 已经开发了对抗造成大部分人感染的大多数微生物(细菌、病毒、原生物、真菌、其它寄生虫)的适合的抗体, 并且许多已经在先前用于体外诊断目的。这些抗体和可以通过常规方法产生的更新的抗体适合用于本发明。

[0088] 抗体片段

[0089] 可以通过已知技术来产生识别特异性表位的抗体片段。抗体片段是抗体的抗原结合部分, 如F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等。其它抗体片段包括但不限于:F(ab')₂片段, 其可以通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生; 和Fab'片段, 其可以通过还原F(ab')₂片段的二硫桥键而产生。或者, 可以构建Fab'表达文库 (Huse等, 1989, *Science*, 246:1274-1281) 以允许快速、容易地鉴别具有希望的特异性的单克隆Fab'片段。

[0090] 单链Fv分子 (scFv) 包含VL域和VH域。VL域和VH域缔合形成靶标结合位点。这两个域进一步通过肽接头 (L) 来共价连接。用于制作scFv分子和设计适合的肽接头的方法公开在美国专利号4, 704, 692、美国专利号4, 946, 778、R. Raag和M. Whitlow, "Single Chain Fvs." *FASEB*第9卷:73-80 (1995) 以及R. E. Bird和B. W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions," *TIBTECH*, 第9卷:132-137 (1991) 中。

[0091] 可以通过例如由Goldenberg美国专利号4, 036, 945和4, 331, 647以及其中所包含的参考文献所公开的已知方法来制备抗体片段。还参见Nisonoff等, *Arch Biochem. Biophys.* 89:230 (1960); Porter, *Biochem. J.* 73:119 (1959); Edelman等在METHODS IN ENZYMOLOGY第1卷, 第422页 ((Academic Press 1967) 以及Coligan在第2.8.1-2.8.10和2.10.-2.10.4页中所述。

[0092] 单一互补决定区 (CDR) 是结构上与抗体结合的表位互补的抗体可变区的区段, 并且比可变区的剩余部分更可变。因此, CDR有时被称为高变区。可变区包含三个CDR。可以通过构建对感兴趣的抗体的CDR进行编码的基因来获得CDR肽。此类基因例如通过使用聚合酶链反应以合成来自产抗体细胞的RNA的可变区来制备。(参见, 例如Larrick等, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106 (1991); MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter等 (编著), 第166-179页 (剑桥大学出版社1995) 中的Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies"; 以及MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch等 (编著), 第137-185页 (Wiley-Liss, Inc. 1995) 中的Ward等, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies")。

[0093] 另一种形式的抗体片段是单域抗体 (dAb), 有时被称为单链抗体。用于产生单域抗体的技术是本领域中众所周知的 (参见, 例如Cossins等, *Protein Expression and Purification*, 2007, 51:253-59; Shuntao等, *Molec Immunol* 2006, 43:1912-19; Tanha等, *J. Biol. Chem.* 2001, 276:24774-780)。

[0094] 在某些实施方案中, 可以改变抗体的序列 (如抗体的Fc部分) 以优化缀合物的生理特征, 如血清中的半衰期。置换蛋白质中的氨基酸序列的方法是本领域中广泛已知的, 如通过定位诱变 (例如Sambrook等, *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 第2版, 1989)。在优选的实施方案中, 变化可以涉及在Fc序列中添加或删除一个或多个糖基化位点 (例如, 美国专利号6, 254, 868, 所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。在其它优选的实施方案中, 可以在Fc序列中做出特定氨基酸置换 (例如, Homick等, 2000, *J Nucl Med* 41: 355-62; Hinton等, 2006, *J Immunol* 176:346-56; Petkova等, 2006, *Int Immunol* 18:1759-69; 美国专利号7, 217, 797; Hwang和Foote, 2005, *Methods* 36:3-10; Clark, 2000, *Immunol Today* 21:397-402; *J Immunol* 1976117:1056-60; Ellison等, 1982, *Nucl Acids Res* 13: 4071-79; Stickler等, 2011, *Genes and Immunity* 12:213-21)。

[0095] 多特异性抗体和多价抗体

[0096] 用于产生双特异性抗体的方法包括工程化重组抗体, 所述重组抗体具有额外的半胱氨酸残基以使得它们比更为常见的免疫球蛋白同种型更有力地交联。(参见, 例如FitzGerald等, *Protein Eng.* 10(10):1221-1225, (1997))。另一种方法是工程化连接两个或更多个不同的单链抗体或抗体片段区段的重组融合蛋白而具有所需要的双重特异性。(参见, 例如Coloma等, *Nature Biotech.* 15:159-163, (1997))。可以使用分子工程来产生各种双特异性抗体。在一种形式中, 双特异性抗体可以由以下组成: 例如, 用于一种抗原的具有单个结合位点的scFv; 和用于第二种抗原的具有单一结合位点的Fab片段。在另一种形式中, 双特异性抗体可以由以下组成: 例如, 用于一种抗原的具有两个结合位点的IgG; 和用于第二种抗原的具有两个结合位点的两个scFv。在替代实施方案中, 可以使用如下所描述的对接和锁定 (DNL) 技术来产生多特异性和/或多价抗体。

[0097] 在某些实施方案中, 双特异性抗体可以结合两种不同的抗原, 如选自以下组成的组的抗原: CD19、CD20、CD22、CD74、CD79a、CD40L、ILGF-R1、TROP2、CEACAM5、CECAM6、HLA-DR、IFN α 、IL-6以及TNF- α 。在以下更详细描述预靶向方法中有用的其它实施方案中, 双特异性抗体可以含有至少一个用于疾病相关抗原 (如肿瘤相关抗原 (TAA)) 的结合位点; 和至少一个用于可靶向构建体上的半抗原的结合位点。

[0098] 对接和锁定 (DNL)

[0099] 在优选的实施方案中, 可以使用对接和锁定技术来产生双特异性或多特异性的抗体或其它构建体 (参见, 例如美国专利号7, 550, 143; 7, 521, 056; 7, 534, 866; 7, 527, 787; 7, 666, 400; 7, 858, 070; 7, 871, 622; 7, 906, 121; 7, 906, 118以及7, 901, 680, 每一个所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。DNL方法使用了特异性蛋白质/蛋白质相互作用, 所述相互作用发生在cAMP依赖性蛋白激酶 (PKA) 的调控 (R) 亚基与A激酶锚定蛋白 (AKAP) 的锚定域 (AD) 之间 (Baillie等, *FEBS Letters*. 2005; 579:3264; Wong和Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5:959)。1968年, 首次从兔骨骼肌中分离出PKA, 其在由第二信使cAMP结合R亚基而触发的最彻底研究的信号转导途径之一中起关键作用 (Walsh等, *J. Biol. Chem.* 1968;

243:3763)。全酶的结构由两个催化亚基组成,所述催化亚基通过R亚基而保持处于失活的形式(Taylor, J. Biol. Chem. 1989; 264:8443)。发现PKA的同工酶具有两种类型的R亚基(RI和RII),并且每种类型具有 α 和 β 同种型(Scott, Pharmacol. Ther. 1991; 50:123)。因此,PKA调控亚基的四种类型是RI α 、RI β 、RII α 以及RII β 。已经将R亚基仅分离为稳定的二聚体,并且已经显示出二聚化域由前44个氨基末端残基组成(Newlon等, Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222)。cAMP结合R亚基造成用于广谱丝氨酸/苏氨酸激酶活性的活性催化亚基释放,所述活性催化亚基通过PKA的区室化经由其与AKAP对接而面向所选择的底物(Scott等, J. Biol. Chem. 1990; 265:21561)。

[0100] 自从1984年表征了第一种AKAP(微管相关蛋白-2)(Lohmann等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984; 81:6723),已经在酵母至人范围内的物种中鉴别出50多种具有各种不同结构的AKAP,其定位至各种亚细胞位点,包括质膜、肌动蛋白细胞骨架、细胞核、线粒体以及内质网(Wong和Scott, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004; 5:959)。针对PKA的AKAP的AD是具有14至18个残基的两亲性螺旋(Carr等, J. Biol. Chem. 1991; 266:14188)。AD的氨基酸序列在个别AKAP之间非常不同,其中针对RII二聚体所报道的结合亲和力在2nM至90nM范围内(Alto等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100:4445)。AKAP将仅结合二聚R亚基。对于人RII α 而言,AD结合由23个氨基末端残基形成的疏水性表面(Colledge和Scott, Trends Cell Biol. 1999; 6:216)。因此,人RII α 的二聚化域和AKAP结合域两者均位于同一N-末端44个氨基酸序列内(Newlon等, Nat. Struct. Biol. 1999; 6:222; Newlon等, EMBO J. 2001; 20:1651),所述44个氨基酸序列在本文中称为DDD。

[0101] 我们已经开发了一种平台技术以使用人RI α 、RI β 、RII α 或RII β 的DDD和AKAP的AD作为优良的接头模块对用于将任何两个实体(下文中称为A和B)对接为非共价复合体,所述非共价复合体可以通过在策略位置上将半胱氨酸残基引入至DDD和AD两者中以促进二硫键的形成而进一步锁定为稳定拴系的结构。“对接和锁定”方法的一般方法如下。通过将DDD序列连接至A的前体来构建实体A,从而产生下文中称为a的第一组分。因为DDD序列将引起二聚体的自发形成,A将因此主要由a₂组成。通过将AD序列连接至B的前体来构建实体B,从而产生下文中称为b的第二组分。包含在a₂中的DDD的二聚体基序将产生用于结合包含在b中的AD序列的对接位点,因而促进a₂和b的迅速缔合以形成主要由a₂b组成的二元的、三聚体复合体。此结合事件通过随后的反应以经由二硫桥键共价固定两个实体而成为不可逆的,这基于有效局部浓度的原则而非常有效地发生,因为初始的结合相互作用会使置于DDD和AD两者上的反应性硫醇基靠近(Chimura等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98:8480)以位点特异性地连接。使用接头、衔接子模块以及前体的各种组合,可以产生并使用不同化学计量的各种各样的DNL构建体,包括但不限于二聚体、三聚体、四聚体、五聚体以及六聚体DNL构建体(参见,例如美国专利号7,550,143;7,521,056;7,534,866;7,527,787;7,666,400;7,858,070;7,871,622;7,906,121;7,906,118以及7,901,680)。

[0102] 通过远离两个前体的官能团而附接DDD和AD,此类位点特异性的连接也预计保留所述两个前体的原始活性。此方法本质上是模块化的并且可以潜在地应用于位点特异性地和共价地连接广范围的物质,包括肽、蛋白质、抗体、抗体片段以及其它具有广范围活性的效应子部分。使用以下实施例中描述的构建AD和DDD缀合的效应子的融合蛋白方法,可以使几乎任何的蛋白质或肽并入DNL构建体中。然而,所述技术是非限制性的并且可以使用其它

的缀合方法。

[0103] 各种用于制作融合蛋白的方法是已知的,包括核酸合成、杂交和/或扩增以产生对感兴趣的融合蛋白进行编码的合成双链核酸。通过标准分子生物学技术,可以将此类双链核酸插入至表达载体中用于融合蛋白产生(参见,例如Sambrook等,Molecular Cloning, A laboratory manual,第2版,1989)。在此类优选的实施方案中,AD和/或DDD部分可以被附接到效应子蛋白或肽的N末端或C末端处。然而,熟练的技术人员将认识到AD或DDD部分至效应子部分的衔接位点可以取决于效应子部分的化学性质和效应子部分的涉及其生理活性的部分而变化。可以使用本领域中已知的技术(如使用二价交联试剂和/或其它化学缀合技术)进行各种效应子部分的位点特异性衔接。

[0104] 预靶向

[0105] 可以在预靶向技术中使用双特异性或多特异性抗体。预靶向是多步骤过程,起初被开发来解决直接靶向抗体的缓慢血液清除率,这种缓慢血液清除率促成对正常组织(如骨髓)的不希望的毒性。使用预靶向时,放射性核素或其它治疗剂被附接到数分钟内从血液中清除的小递送分子(可靶向构建体)。首先施用具有用于可靶向构建体以及靶标抗原的结合位点的预靶向双特异性或多特异性抗体,允许游离抗体从循环中清除,并且然后施用可靶向构建体。

[0106] 预靶向方法例如公开在Goodwin等,美国专利号4,863,713;Goodwin等,J.Nucl.Med.29:226,1988;Hnatowich等,J.Nucl.Med.28:1294,1987;Oehr等,J.Nucl.Med.29:728,1988;Klibanov等,J.Nucl.Med.29:1951,1988;Sinitzyn等,J.Nucl.Med.30:66,1989;Kalofonos等,J.Nucl.Med.31:1791,1990;Schechter等,Int.J.Cancer 48:167,1991;Paganelli等,Cancer Res.51:5960,1991;Paganelli等,Nucl.Med.Comm.12:211,1991;美国专利号5,256,395;Stickney等,Cancer Res.51:6650,1991;Yuan等,Cancer Res.51:3119,1991;美国专利号6,077,499;7,011,812;7,300,644;7,074,405;6,962,702;7,387,772;7,052,872;7,138,103;6,090,381;6,472,511;6,962,702以及6,962,702中,每一个所述文献以引用的方式并入本文。

[0107] 用于治疗或诊断受试者中疾病或病症的预靶向方法可以提供为:(1)向受试者施用双特异性抗体或抗体片段;(2)任选地向受试者施用清除组合物,并且允许所述组合物将抗体从循环中清除;以及(3)向受试者施用可靶向构建体,所述构建体含有一种或多种螯合的或化学结合的治疗剂或诊断剂。

[0108] 可靶向构建体

[0109] 在某些实施方案中,标记有一种或多种治疗剂或诊断剂以用于预靶向的可靶向构建体肽可以被选择来结合双特异性抗体,所述双特异性抗体具有用于可靶向构建体肽的一个或多个结合位点和用于与疾病或病状相关的靶标抗原的一个或多个结合位点。双特异性抗体可以用于预靶向技术,其中首先向受试者施用所述抗体。可以允许足够的时间使双特异性抗体结合靶标抗原并且使未结合的抗体从循环中清除。然后可以向受试者施用可靶向构建体(如标记的肽),并且允许结合双特异性抗体并定位在患病的细胞或组织处。

[0110] 此类可靶向构建体可以具有各种不同的结构,并且不仅选择用于以高亲和性结合可靶向构建体的抗体或片段的可用性,而且用于当在预靶向方法和双特异性抗体(bsAb)或多特异性抗体内使用时的快速体内清除。疏水剂在引发强的免疫反应方面效果最好,而亲

水剂优选用于快速体内清除。因此,建立了疏水特征与亲水特征之间的平衡。这可以部分地通过使用亲水性螯合剂以抵消许多有机部分的固有疏水性来完成。同样,可以选择具有相反溶解性质的可靶向构建体的亚单位,例如肽,所述肽含有氨基酸,一些氨基酸是疏水性的并且一些氨基酸是亲水性的。

[0111] 可以使用具有少至两个氨基酸残基(优选地两个至十个残基)的肽,并且还可以将其偶联至其它部分,如螯合剂。接头应当是低分子量的缀合物,优选地分子量为小于50,000道尔顿,并且有利地小于约20,000道尔顿、10,000道尔顿或5,000道尔顿。更通常地,可靶向构建体肽将具有四个或更多个残基,如肽DOTA-Phe-Lys(HSG)-Tyr-Lys(HSG)-NH₂(SEQ ID NO:41),其中DOTA是1,4,7,10-四氮杂环十二烷1,4,7,10-四乙酸并且HSG是组胺琥珀酰基甘氨酸基。或者,DOTA可以被以下替换:NOTA(1,4,7-三氮杂-环壬烷-1,4,7-三乙酸)、TETA(对溴乙酰氨基-苄基-四乙胺四乙酸)、NETA([2-(4,7-二羧甲基[1,4,7]三氮杂环壬烷-1-基-乙基)-2-羧甲基-氨基]乙酸)或其它已知的螯合部分。螯合部分可以例如用于结合治疗性和/或诊断性的放射性核素、顺磁离子或造影剂。

[0112] 可靶向构建体还可以在骨架结构中包含非天然氨基酸(例如,D-氨基酸)以增加体内中肽的稳定性。在替代实施方案中,可以使用其它的骨架结构,如由非天然氨基酸或类肽构建的那些骨架结构。

[0113] 使用固相载体(support)和反复正交去保护和偶联的标准技术,在自动化的肽合成仪上方便地合成用作可靶向构建体的肽。肽中的游离氨基(待后面用于螯合部分或其它药剂的缀合)有利地用标准保护基团(如Boc基团)封端,而N末端残基可以被乙酰化以增加血清稳定性。此类保护基团是熟练的技术人员众所周知的。参见Greene and Wuts Protective Groups in Organic Synthesis,1999(John Wiley&Sons,N.Y.)。当制备肽用于后面在双特异性抗体系统内使用时,所述肽有利地从树脂上裂解以产生相对应的C末端酰胺,以便抑制体内羧肽酶活性。肽合成的示例性方法公开在以下实施例中。

[0114] 在使用了用双特异性抗体进行预靶向的情况下,抗体将含有第一结合位点和第二结合位点,所述第一结合位点用于由靶标组织产生或与靶标组织相关的抗原,所述第二结合位点用于可靶向构建体上的半抗原。示例性半抗原包括但不限于HSG和In-DTPA。针对HSG半抗原而产生的抗体是已知的(例如679抗体),并且可以将其简单地并入适当的双特异性抗体中(参见,例如美国专利号6,962,702;7,138,103以及7,300,644,其关于实施例部分以引用的方式并入本文)。然而,其它半抗原和结合它们的抗体是本领域中已知的并且可以被使用,如In-DTPA和734抗体(例如,美国专利号7,534,431,实施例部分以引用的方式并入本文)。

[0115] 免疫缀合物的制备

[0116] 在优选的实施方案中,治疗剂或诊断剂可以被共价地附接至抗体或抗体片段以形成免疫缀合物。在免疫缀合物待通过皮下递送、肌肉内递送或经皮肤递送而以浓缩的形式施用的情况下,熟练的技术人员将认识到仅有非细胞毒性剂可以与抗体缀合。在第二抗体或其片段通过不同的路径(如静脉内)在所述皮下递送、肌肉内递送或经皮肤递送之前、与其同时或在其之后而施用的情况下,那么可以与第二抗体或其片段缀合的诊断剂或治疗剂的类型不受如此限制,并且可以包含本领域中已知的任何诊断剂或治疗剂,包括细胞毒性剂。

[0117] 在一些实施方案中,可以经由载体部分将诊断剂和/或治疗剂附接至抗体或其片段。载体部分可以例如附接至还原的SH基团和/或碳水化合物侧链。可以经由二硫键形成将载体部分附接在还原的抗体组分的铰链区。或者,可以使用异双官能交联剂(如3-(2-吡啶二硫基)丙酸N-琥珀酰酯(SPDP))附接此类药剂。Yu等, *Int. J. Cancer* 56:244 (1994)。用于此类缀合的一般技术是本领域中众所周知的。参见,例如Wong, *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING* (CRC出版社1991); *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Birch等(编著),第187-230页(Wiley-Liss, Inc. 1995)中的Upeslakis等, "Modification of Antibodies by Chemical Methods"; *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION*, Ritter等(编著),第60-84页(剑桥大学出版社1995)中的Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies"。或者,可以经由抗体的Fc区中的碳水化合物部分来缀合载体部分。

[0118] 用于经由抗体碳水化合物部分使官能团与抗体缀合的方法是本领域技术人员众所周知的。参见,例如Shih等, *Int. J. Cancer* 41:832 (1988); Shih等, *Int. J. Cancer* 46:1101 (1990); 以及Shih等, 美国专利号5,057,313,所述文献的实施例部分以引用的方式并入本文。一般方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体与具有至少一个游离胺官能的载体聚合物反应。此反应导致形成初始的希夫(Schiff)碱(亚胺)连接键,所述连接键可以通过还原成仲胺以形成最终的缀合物来稳定。

[0119] 如果免疫缀合物的抗体组分是抗体片段,则可以不存在Fc区。然而,可能将碳水化合物部分引入至全长抗体或抗体片段的轻链可变区中。参见,例如Leung等, *J. Immunol.* 154:5919 (1995); 美国专利号5,443,953和6,254,868,所述文献的实施例部分以引用的方式并入本文。工程化的碳水化合物部分用来附接治疗剂或诊断剂。

[0120] 用于将载体部分附接至靶向分子的替代方法涉及点击化学反应的使用。点击化学方法起初被认为是通过以模块化样式将小的亚单位接合在一起而快速产生复合物质的方法。(参见,例如Kolb等,2004, *Angew Chem Int Ed* 40:3004-31; Evans, 2007, *Aust J Chem* 60:384-95)。各种形式的点击化学反应是本领域中已知的,如Huisgen 1,3-偶极环加成铜催化反应(Tomoe等,2002, *J Organic Chem* 67:3057-64),这种反应经常被称为“点击反应”。其它替代方案包括:如狄尔斯-阿尔德(Diels-Alder)的环加成反应、亲核取代反应(尤其针对小张力环,像环氧化合物和氮丙啶化合物)、尿素化合物的羰基化学形成以及涉及碳-碳双键(如硫醇-炔反应中的炔烃)的反应。

[0121] 叠氮化物-炔Huisgen环加成反应在还原剂存在的情况下使用铜催化剂来催化附接至第一分子上的末端炔基的反应。在包含叠氮化物部分的第二分子存在的情况下,叠氮化物与活化的炔烃反应以形成1,4-二取代的1,2,3-三唑。铜催化的反应在室温下发生并且是足够特异性的,经常不需要对反应产物进行纯化。(Rostovstevd等,2002, *Angew Chem Int Ed* 41:2596; Tornoe等,2002, *J Org Chem* 67:3057)。在水性培养基中,叠氮官能团和炔烃官能团对生物分子基本上是惰性的,从而允许反应在复杂的溶液中进行。所形成的三唑是化学稳定的并且不受酶裂解的影响,从而使点击化学产物在生物系统中高度稳定。虽然铜催化剂对活细胞有毒性,但是基于铜的点击化学反应可以在体外用于免疫缀合物形成。

[0122] 已经提议无铜的点击反应用于生物分子的共价修饰。(参见,例如Agard等,2004,J Am Chem Soc 126:15046-47)。无铜的反应使用环张力代替铜催化剂以促进[3+2]叠氮化物-炔烃环加成反应(同上)。例如,环辛炔是包含内炔键的8个碳的环结构。闭合环结构诱导乙炔的实质性的键角变形,这与叠氮基团有高度反应性以形成三唑。因此,环辛炔衍生物可以用于无铜的点击反应(同上)。

[0123] 另一种类型的无铜点击反应由Ning等(2010,Angew Chem Int Ed 49:3065-68)所报道,涉及张力促进的炔烃-硝酮环加成。为了解决原始环辛炔反应的缓慢速率,将吸电子基团附接至三键附近(同上)。此类取代的环辛炔的实例包括二氟化的环辛炔、4-二苯并环辛炔醇以及氮杂环辛炔(同上)。替代的无铜反应涉及张力促进的炔烃-硝酮环加成以得到N-烷基化的异噁唑啉(同上)。据报道所述反应具有异常快速的反应动力学,并且用于一锅法三步骤的实验方案中以用于肽和蛋白质的位点特异性修饰(同上)。通过将适当的醛与N-甲基羟基胺缩合来制备硝酮,并且环加成反应发生在乙腈和水的混合物中(同上)。这些和其它已知的点击化学反应可以用来在体外将载体部分附接至抗体。

[0124] Agard等(2004,J Am Chem Soc 126:15046-47)证明了在全乙酰化的N-叠氮乙酰甘露糖胺存在的情况下,在CHO细胞中表达的重组糖蛋白导致相对应的N-叠氮乙酰唾液酸生物并入糖蛋白的碳水化合物中。叠氮基衍生化的糖蛋白与生物素化的环辛炔进行特异性反应以形成生物素化的糖蛋白,而不具有叠氮基部分的对照糖蛋白保持为未标记的(同上)。Laughlin等(2008,Science 320:664-667)使用了类似的技术来代谢地标记斑马鱼胚胎中的细胞表面聚糖,所述斑马鱼胚胎用全乙酰化的N-叠氮乙酰半乳糖胺进行了孵育。叠氮基衍生化的聚糖与二氟化的环辛炔(DIFO)试剂反应以允许体内聚糖的可视化。

[0125] 狄尔斯-阿尔德反应也已经用于在体内分子的标记。Rossin等(2010,Angew Chem Int Ed 49:3375-78)报道了在体内于带有反式环辛烯(TCO)反应性部分的肿瘤定位的抗TAG72(CC49)抗体与¹¹¹In-标记的四嗪DOTA衍生物之间的52%产率。向带有结肠癌异种移植物的老鼠施用TCO标记的CC49抗体,接着在1天之后注射¹¹¹In-标记的四嗪探针(同上)。如通过注射放射性标记的探针之后三小时的活小鼠的SPECT成像所证明,放射性标记的探针与肿瘤定位的抗体的反应导致显著的肿瘤放射活性定位,其中肿瘤与肌肉的比率为13:1(同上)。结果证实了TCO与四嗪标记的分子的体内化学反应。

[0126] 使用标记部分的生物并入的抗体标记技术进一步公开在美国专利号6,953,675中(所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文)。制备此类“美化的(landscaped)”抗体以在糖基化位点上具有反应性的酮基团。方法涉及在包含糖或糖前体的酮衍生物的培养基中用表达载体转染的表达细胞,所述载体编码在CH1或V_K域中具有一个或多个N-糖基化位点的抗体。酮衍生化的糖或前体包括N-乙酰丙酰甘露糖胺(N-levulinoyl mannosamine)和N-乙酰丙酰岩藻糖。随后,美化的抗体与包含酮反应性部分(如酰肼基团、肼基团、羟氨基团或氨基硫脲基团)的试剂反应以形成经标记的靶向分子。附接至美化的抗体的示例性试剂包括:螯合剂,像DTPA;大的药物分子,如阿霉素-葡聚糖;以及含有酰基-酰肼的肽。美化技术并不限于产生包含酮部分的抗体,而是可以作为替代用来将点击化学反应基团(如硝酮、叠氮化物或环辛炔)引入到抗体或其它生物分子上。

[0127] 点击化学反应的修饰适合于体外或体内使用。可以通过化学缀合或通过生物并入来形成反应性靶向分子。可以用叠氮基部分、取代的环辛炔或炔烃基团、或硝酮部分来活化

靶向分子,如抗体或抗体片段。在靶向分子包含叠氮基或硝酮基团的情况下,相对应的可靶向构建体将包含取代的环辛炔或炔炔基团,反之亦然。如上所讨论,可以通过在活细胞中的代谢并入来制作此类活化的分子。

[0128] 或者,将此类部分化学缀合到生物分子的方法是本领域中众所周知的,并且可以使用任何此类已知的方法。免疫缀合物形成的一般方法例如公开在美国专利号4,699,784; 4,824,659;5,525,338;5,677,427;5,697,902;5,716,595;6,071,490;6,187,284;6,306,393;6,548,275;6,653,104;6,962,702;7,033,572;7,147,856以及7,259,240中,每一个所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0129] 治疗剂和诊断剂

[0130] 在某些实施方案中,抗体或其片段可以与一种或多种治疗剂和/或诊断剂组合使用。在将药剂附接至待通过皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用浓缩的抗体制剂而进行施用的抗体或其片段的情况下,那么仅涵盖了非细胞毒性剂。非细胞毒性剂可以包括但不限于:免疫调节剂、细胞因子(和它们的抑制剂)、趋化因子(和它们的抑制剂)、酪氨酸激酶抑制剂、生长因子、激素以及某些酶(即,不会诱导局部坏死的那些酶)或它们的抑制剂。在皮下、肌肉内或经皮肤的抗体制剂之前、与此同时或在此之后共同施用药剂的情况下,那么可以使用细胞毒性剂。可以作为与第二抗体或其片段的免疫缀合物施用药剂,或可以作为游离剂来施用。以下讨论适用于细胞毒性剂和非细胞毒性剂两者。

[0131] 治疗剂可以选自由以下组成的组:放射性核素、免疫调节剂、抗血管生成剂、细胞因子、趋化因子、生长因子、激素、药物、前药、酶、寡核苷酸、促凋亡剂、干扰RNA、光活性治疗剂、酪氨酸激酶抑制剂、鞘氨醇抑制剂、细胞毒性剂(其可为化学治疗剂或毒素)以及其组合。有用的药物可以拥有药物性质,选自由以下组成的组:抗有丝分裂剂、抗激酶剂、烷基化剂、抗代谢物剂、抗生素剂、生物碱剂、抗血管生成剂、促凋亡剂以及其组合。

[0132] 示例性药物可以包括但不限于:5-氟尿嘧啶、脱氢膜海鞘素(aplidin)、阿扎立平(azaribine)、阿那曲唑(anastrozole)、蒽环类药物(anthracyclines)、苯达莫司汀(bendamustine)、博来霉素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、苔藓抑素-1(bryostatins)、白消安(busulfan)、刺孢霉素(calicheamycin)、喜树碱(camptothecin)、卡铂(carboplatin)、10-羟基喜树碱、卡莫司汀(carmustine)、西乐葆(celebrex)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)(CDDP)、环氧酶-2抑制剂(Cox-2inhibitor)、伊立替康(irinotecan)(CPT-11)、SN-38、卡铂、克拉屈滨(cladribine)、喜树碱(camptothecin)、环磷酰胺、阿糖胞苷(cytarabine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、多西他赛(docetaxel)、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、2-吡咯啉阿霉素(2-pyrrolinodoxorubicin;2P-DOX)、氰基-吗啉代阿霉素、阿霉素葡萄糖苷酸、表阿霉素葡萄糖苷酸、雌莫司汀(estramustine)、表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin)、雌激素受体结合剂、依托泊苷(etoposide)(VP16)、依托泊苷葡萄糖苷酸、磷酸依托泊苷、氟尿苷(FUdR)、3',5'-O-二油酰基-FUdR(FUdR-d0)、氟达拉滨(fludarabine)、氟他胺(flutamide)、法尼基-蛋白转移酶抑制剂、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、L-天冬酰胺酶、来那度胺(lenolidamide)、亚叶酸(leucovorin)、洛莫司汀(lomustine)、氮芥、美法仑(melphalan)、巯基嘌呤、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤(methotrexate)、米托蒽醌

(mitoxantrone)、光辉霉素(mithramycin)、丝裂霉素(mitomycin)、米托坦(mitotane)、诺维本(navelbine)、亚硝基脲、普卡霉素(plicomycin)、丙卡巴肼(procarbazine)、紫杉醇、喷司他丁(pentostatin)、PSI-341、雷洛昔芬(raloxifene)、司莫司汀(semustine)、链脲霉素(streptozocin)、它莫西芬(tamoxifen)、紫杉酚、替莫唑胺(temazolomide)(DTIC的水性形式)、反铂(transplatinum)、沙利度胺(thalidomide)、硫鸟嘌呤、塞替派(thiotepa)、替尼泊苷(teniposide)、拓扑替康(topotecan)、乌拉莫司汀(uracil mustard)、长春瑞滨(vinorelbine)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)以及长春花生物碱。

[0133] 毒素可以包括蓖麻毒素、相思豆毒素、 α 毒素、皂草素、核糖核酸酶(RNA酶)(例如,抗肿瘤核糖核酸酶(onconase)、DNA酶I)、葡萄球菌肠毒素-A(*Staphylococcal enterotoxin-A*)、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素以及假单胞菌内毒素。

[0134] 免疫调节剂可以选自:细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素、成血因子、集落刺激因子(CSF)、干扰素(IFN)、红细胞生长素、血小板生成素以及其组合。特别有用的是:淋巴毒素,如肿瘤坏死因子(TNF);成血因子,如白细胞介素(IL);集落刺激因子,如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF);干扰素,如干扰素- α 、干扰素- β 、干扰素- γ ;以及干细胞生长因子,如命名为“S1因子”的干细胞生长因子。包括在细胞因子之中的是:生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素以及牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素,如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)以及促黄体激素(LH);肝细胞生长因子;前列腺素、成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素、OB蛋白;肿瘤坏死因子- α 和肿瘤坏死因子- β ;苗勒抑制物质;小鼠促性腺激素相关的肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;促血小板生成素(TPO);神经生长因子,如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和胰岛素样生长因子-II;红细胞生长素(EPO);骨诱导因子;干扰素,如干扰素- α 、干扰素- β 以及干扰素- γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);白细胞介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-25、LIF、kit配体或FLT-3、血管抑素、血小板反应蛋白、内皮抑素、肿瘤坏死因子以及LT。

[0135] 有用的趋化因子包括RANTES、MCAF、MIP1- α 、MIP1- β 以及IP-10。

[0136] 放射性同位素包括但不限于: ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{62}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{47}Sc 、 ^{111}Ag 、 ^{67}Ga 、 ^{142}Pr 、 ^{153}Sm 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{212}Pb 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{77}As 、 ^{89}Sr 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Rh 、 ^{109}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{169}Er 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 以及 ^{211}Pb 。治疗性的放射性核素优选地衰变能量在20keV至6,000keV范围内,针对俄歇(Auger)发射体优选地在60keV至200keV范围内、针对 β 发射体在100keV至2,500keV范围内以及针对 α 发射体在4,000keV至6,000keV范围内。有用的发射 β 粒子的核素的最大衰变能量优选地是20keV至5,000keV,更优选地100keV至4,000keV,并且最优选地500keV至2,500keV。还优选的是大致上具有俄歇发射颗粒的衰变的放射性核素。例如,Co-58、Ga-67、Br-80m、Tc-99m、Rh-103m、Pt-109、In-111、Sb-119、I-125、Ho-161、Os-189m以及Ir-192。有用的发射 β 粒子的核素的衰变能量优选地是 $<1,000\text{keV}$,更优选地 $<100\text{keV}$,并且最优选地 $<70\text{keV}$ 。还优选的是大致上具有 α -粒子产生的衰变的放射性核素。此类放射性核素包括但不限于:Dy-152、At-211、Bi-

212、Ra-223、Rn-219、Po-215、Bi-211、Ac-225、Fr-221、At-217、Bi-213以及Fm-255。有用的发射 α 粒子的放射性核素的衰变能量优选地是2,000keV至10,000keV,更优选地3,000keV至8,000keV,并且最优选地4,000keV至7,000keV。有用的额外可能的放射性同位素包括 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{75}Br 、 ^{198}Au 、 ^{224}Ac 、 ^{126}I 、 ^{133}I 、 ^{77}Br 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{95}Ru 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Ru 、 ^{105}Ru 、 ^{107}Hg 、 ^{203}Hg 、 $^{121\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{122\text{m}}\text{Te}$ 、 $^{125\text{m}}\text{Te}$ 、 ^{165}Tm 、 ^{167}Tm 、 ^{168}Tm 、 ^{197}Pt 、 ^{109}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Ho 、 ^{199}Au 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{51}Cr 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{201}Tl 、 ^{225}Ac 、 ^{76}Br 、 ^{169}Yb 等。

[0137] 治疗剂可以包括光活性剂或染料。荧光组合物(如荧光染料)和其它色原体或染料(如对可见光敏感的卟啉)已经通过将适合的光引导至损伤而用来检测并治疗损伤。在治疗中,这已经被称为光辐射、光照疗法或光动力学疗法。参见Jori等(编著),PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES(Libreria Progetto1985);van den Bergh, Chem.Britain(1986),22:430。此外,已经将单克隆抗体与光活化的染料偶联用于实现光照疗法。参见Mew等,J.Immunol.(1983),130:1473;idem.,Cancer Res.(1985),45:4380;Oseroff等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1986),83:8744;idem.,Photochem.Photobiol.(1987),46:83;Hasan等,Prog.Clin.Biol.Res.(1989),288:471;Tatsuta等,Lasers Surg.Med.(1989),9:422;Pelegrin等,Cancer(1991),67:2529。

[0138] 皮质类固醇激素可以增加其它化学治疗剂的有效性,并且因此它们被频繁地用于联合治疗中。强的松(prednisone)和地塞米松(dexamethasone)是皮质类固醇激素的实例。

[0139] 在某些实施方案中,抗血管生成剂,如血管抑素、baculostatin、血管能抑素;乳腺丝抑蛋白;抗胎盘生长因子(PIGF)肽和抗体;抗血管生长因子抗体(如抗VEGF和抗PIGF);抗Flk-1抗体;抗Flt-1抗体和肽;抗Kras抗体;抗cMET抗体;抗MIF(巨噬细胞游走抑制因子)抗体;层粘连蛋白肽;纤连蛋白肽;纤溶酶原激活物抑制剂;组织金属蛋白酶抑制剂;干扰素;白细胞介素-12;IP-10;Gro- β ;血小板反应蛋白;2-甲氧基雌二醇;增殖蛋白相关的蛋白质;羧胺三唑;CM101;马立马司他(Marimastat);戊聚糖多硫酸盐;血管生成素-2;干扰素- α ;除莠霉素A;PNU145156E;16K催乳素片段;利诺胺(Linomide);沙利度胺(thalidomide);己酮可可碱;染料木黄酮;TNP-470;内皮抑素;紫杉醇;蛇毒解离素(accutin);血管抑素;西多福韦(cidofovir);长春新碱;博来霉素;AGM-1470;血小板因子4或米诺环素(minocycline)可以是有用的。

[0140] 治疗剂可以包含寡核苷酸,如siRNA。熟练的技术人员将认识到任何siRNA或干扰RNA种类可以附接至抗体或其片段用于递送至靶向组织。许多对抗各种各样靶标的siRNA种类是本领域中已知的,并且任何此类已知的siRNA可以被使用在所要求保护的方法和组合物中。

[0141] 潜在有用的已知的siRNA种类包括对以下有特异性的那些:IKK- γ (美国专利7,022,828);VEGF、Flt-1以及Flk-1/KDR(美国专利7,148,342);Bcl2和EGFR(美国专利7,541,453);CDC20(美国专利7,550,572);转导蛋白(β)-样3(美国专利7,576,196);KRAS(美国专利7,576,197);碳酸酐酶II(美国专利7,579,457);补体组分3(美国专利7,582,746);白细胞介素-1受体相关的激酶4(IRAK4)(美国专利7,592,443);存活素(美国专利7,608,7070);超氧化物歧化酶1(美国专利7,632,938);MET原癌基因(美国专利7,632,939);淀粉样 β 前体蛋白(APP)(美国专利7,635,771);IGF-1R(美国专利7,638,621);ICAM1(美国专利7,642,349);补体因子B(美国专利7,696,344);p53(7,781,575)以及载脂蛋白B(7,795,421),每个

引用的专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0142] 额外的siRNA种类从已知的商业来源中可获得,尤其如Sigma-Aldrich (St Louis, MO)、Invitrogen (Carlsbad, CA)、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)、Ambion (Austin, TX)、Dharmacon (Thermo Scientific, Lafayette, CO)、Promega (Madison, WI)、Mirus Bio (Madison, WI) 以及Qiagen (Valencia, CA)。siRNA种类的其它公开可获得的来源包括:Stockholm Bioinformatics Centre处的siRNAdb数据库、MIT/ICBP siRNA数据库、Broad Institute处的RNAi Consortium shRNA文库以及NCBI处的探针数据库。例如,在NCBI探针数据库中存在30,852个siRNA种类。熟练的技术人员将认识到,对于感兴趣的任何基因而言,要么已经设计了一个siRNA种类,要么可以使用公开可获得的软件工具容易地设计一个siRNA种类。可以使用本发明DNL复合体递送任何此类siRNA种类。

[0143] 在本领域中已知的示例性siRNA种类列于表2。虽然siRNA作为双链分子而递送,为简单起见,仅有义链序列在表2中示出。

[0144] 表2. 示例性siRNA序列

靶标	序列	SEQ ID NO
VEGF R2	AATGCGGCGGTGGTGACAGTA	SEQ ID NO:1
VEGF R2	AAGCTCAGCACACAGAAAGAC	SEQ ID NO:2
CXCR4	UAAAUCUCCUGCCCACCCdTdT	SEQ ID NO:3
CXCR4	GGAAGCUGUUGGCUGAAAAdTdT	SEQ ID NO:4
[0145] PPARC1	AAGACCAGCCUCUUUGCCCAG	SEQ ID NO:5
发动蛋白 2	GGACCAGGCAGAAAACGAG	SEQ ID NO:6
连环蛋白	CUAUCAGGAUGACGCGG	SEQ ID NO:7
E1A 结合蛋白	UGACACAGGCAGGCUUGACUU	SEQ ID NO:8
血纤维蛋白溶酶原 激活物	GGTGAAGAAGGGCGTCCAA	SEQ ID NO:9

K-ras	GATCCGTTGGAGCTGTTGGCGTAG TT	SEQ ID NO: 10
分拣蛋白 1	AGGTGGTGTTAACAGCAGAG	SEQ ID NO: 11
载脂蛋白 E	AAGGTGGAGCAAGCGGTGGAG	SEQ ID NO: 12
载脂蛋白 E	AAGGAGTTGAAGGCCGACAAA	SEQ ID NO: 13
Bcl-X	UAUGGAGCUGCAGAGGAUGdTdT	SEQIDNO:14
Raf-1	TTTGAATATCTGTGCTGAGAACAC A	SEQIDNO:15
热休克转录因子 2	AATGAGAAAAGCAAAAGGTGCC TGTCTC	SEQ ID NO: 16
IGFBP3	AAUCAUCAUCAAGAAAGGGCA	SEQIDNO:17
硫氧还蛋白	AUGACUGUCAGGAUGUUGCdTdT	SEQ ID NO: 18
CD44	GAACGAAUCCUGAAGACAUCU	SEQ ID NO: 19
MMP14	AAGCCTGGCTACAGCAATATGCCT GTCTC	SEQ ID NO:20
MAPKAPK2	UGACCAUCACCGAGUUUAUdTdT	SEQ ID NO:21
FGFR1	AAGTCGGACGCAACAGAGAAA	SEQ ID NO:22
ERBB2	CUACCUUUCUACGGACGUGdTdT	SEQ ID NO:23
BCL2L1	CTGCCTAAGGCGGATTTGAAT	SEQ ID NO:24
ABL1	TTAUUCCUUCUUCGGGAAGUC	SEQ ID NO:25
CEACAM1	AACCTTCTGGAACCCGCCAC	SEQ ED NO:26
CD9	GAGCATCTTCGAGCAAGAA	SEQ ID NO:27
CD151	CATGTGGCACCGTTTGCT	SEQ ID NO:28
半胱天冬酶 8	AACTACCAGAAAGGTATACCT	SEQ ID NO:29
BRCA1	UCACAGUGUCCUUUAUGUAdTdT	SEQ ID NO:30
p53	GCAUGAACCGGAGGCCAUTT	SEQ ID NO:31
CEACAM6	CCGGACAGTTCCATGTATA	SEQ ID NO:32

[0146] 熟练的技术人员将认识到表2代表对本领域中已知的siRNA种类的总数的非常小的取样,以及任何此类已知的siRNA可以被使用在所要求保护的方法和组合物中。

[0148] 诊断剂优选地选自以下组成的组：放射性核素、放射造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记、化学发光标记、超声造影剂以及光活性剂。此类诊断剂是众所周知的，并且可以使用任何此类已知的诊断剂。诊断剂的非限制性实例可以包括放射性核素，如¹⁸F、⁵²Fe、¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb、⁸³Sr、或其它 γ -发射体、 β -发射体或正电子发射体。

[0149] 有用的顺磁离子可以包括：铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、铈(III)、钕(III)、钐(III)、钒(II)、铀(III)、镱(III)、铈(III)或铟(III)。金属造影剂可以包括镧(III)、金(III)、铅(II)或铋(III)。

[0150] 超声造影剂可以包含脂质体，如充气的脂质体。不透射线的诊断剂可以选自化合物、钡化合物、镓化合物以及铊化合物。各种各样的荧光标记是本领域中已知的，包括但不限于：异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛以及荧光胺。有用的化学发光标记可以包括鲁米诺、异鲁米诺、芳香吡啶酯、咪唑、吡啶盐或草酸酯。

[0151] 施用方法

[0152] 本发明抗体和免疫球蛋白通常可以被配制来获得组合物，所述组合物包含一种或多种药学上适合的赋形剂、表面活性剂、多元醇、缓冲剂、盐、氨基酸、或额外的成分或这些物质的某一组合。这可以通过已知的方法以制备药学上有用的剂量来完成，由此活性成分（即，标记的分子）被合并至与一种或多种药学上适合的赋形剂的混合物中。无菌磷酸盐缓冲液是药学上适合的赋形剂的一个实例。其它适合的赋形剂是本领域技术人员众所周知的。参见，例如Ansel等，PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS，第5版（Lea&Febiger 1990）和Gennaro（编著），REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES，第18版（Mack Publishing Company 1990）以及其修订版本。

[0153] 用于施用在本文中描述的组合物的优选路径是肠胃外注射，更优选地通过皮下递送、肌肉内递送或经皮肤递送。肠胃外施用的其它形式包括静脉内注射、动脉内注射、淋巴管内注射、鞘内注射、眼内注射、脑内注射或腔内注射。在肠胃外施用中，将与药学上可接受的赋形剂联合、以单位剂量可注射的形式配制组合物，所述形式如溶液、混悬液或乳状液。此类赋形剂本质上是无毒性的和无治疗性的。此类赋形剂的实例是盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液以及汉克斯溶液。也可以使用非水性的赋形剂，如不挥发油和油酸乙酯。替代的赋形剂是5%葡萄糖盐水溶液。赋形剂可以含有少量的添加剂，如增强等渗性和化学稳定性的物质，包括缓冲剂和防腐剂。

[0154] 包含抗体的配制组合物可以用于皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用。组合物可以与添加的防腐剂一起存在于单位剂量形式中，例如在安瓶或在多剂量容器中。组合物还可以采用像在油性或水性媒介物中的混悬液、溶液或乳状液一样的形式，并且可以含有配制剂，如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，组合物可以呈粉末形式用于在使用之前用适合的媒介物（例如，无菌的无热原水）构成。

[0155] 组合物可以在溶液中施用。其制剂应当处于具有适合的药学上可接受的缓冲剂的溶液中，所述缓冲剂如磷酸盐、TRIS（羟甲基）氨基甲烷-HCl或柠檬酸盐等。缓冲剂浓度应当在1mM至100mM范围内。配制的溶液还可以含有浓度为50mM至150mM的盐，如氯化钠或氯化钾。还可以包含有效量的稳定剂，如甘露醇、海藻糖、山梨醇、甘油、白蛋白、球蛋白、洗涤剂、

明胶、鱼精蛋白或鱼精蛋白的盐。

[0156] 对于人而言施用的抗体的剂量将取决于像患者的年龄、体重、身高、性别、一般身体状况以及以前的病史这样的因素。通常，希望提供接受者作为单一输注的在约1mg至600mg范围内的抗体剂量，虽然还可以施用更低或更高的剂量。通常，希望提供接受者每平方米(m²)体表面积约50mg范围内的剂量或对于通常的成人而言70mg至85mg的抗体，虽然还可以施用更低或更高的剂量。可以向人受试者施用的抗体剂量的实例是1mg至1,000mg，更优选地1mg至70mg，最优选地1mg至20mg，虽然可以使用更高或更低的剂量。当需要时，可以重复剂量，例如每周一次持续4至10周，优选地每周一次持续8周，并且更优选地每周一次持续4周。还可以更低频率给予，如每隔一周，持续数月。

[0157] 最近，已经对NHL患者以80mg、160mg或320mg的每两周重复一次的4次剂量来给予皮下施用维妥珠单抗(Negrea等,2011,Haematologica 96:567-73)。仅观察到偶然的、轻微至中等的以及短暂的注射反应，没有其它安全问题(同上)。目标反应比率(CR+CRu+PR)是47%，其中CR/CRu(完全反应)比率是24%(同上)。有趣地是，80mg剂量组显示出最高的目标反应百分数(2/3,67%)，其中三分之一的患者显示出完全反应(同上)。八个目标反应中有四个持续了60周(同上)。针对HAHA评价的所有血清样品是阴性(同上)。虽然在本研究中报道的低样品总体排除了关于最佳给药的任何决定性结论，但明显的是在所测试的最低剂量(80mg)下观察到治疗性反应。

[0158] 在某些替代实施方案中，可以通过经皮肤递送来施用抗体。经皮肤递送的不同方法是本领域中已知的，如通过经皮肤贴剂或通过微针装置，并且可以使用任何此类已知的方法。在一个示例性的实施方案中，经皮肤递送可以使用递送装置(如3M空心微结构经皮肤系统(hMTS))用于基于抗体的治疗法。hMTS装置包括一个1cm²的微针阵列，所述微针阵列由长度为950微米的18个空心微针组成，所述空心微针穿透至皮肤真皮层近似600至700微米，在那里存在高密度的淋巴通道。装载有弹簧的装置推动抗体组合物从流体储罐穿过微针用于向受试者递送。仅在注射部位处观察到短暂红斑和水肿(Burton等,2011,Pharm Res 28:31-40)。hMTS装置不被视为针注射器，从而导致患者依从性改进。

[0159] 在替代实施方案中，经皮肤递送肽和蛋白质可以通过以下来进行：(1)如Chen等(Nat Biotechnol 2006;24:455-460)和Carmichael等(Pain 2010;149:316-324)所报道，与包含ACSSSPSKHCG(SEQ ID NO:42)氨基酸序列的合成肽一起共同施用；(2)如Wang等(BBRC2006;346:758-767)所报道，与富含精氨酸的细胞内递送肽一起共同施用；(3)如Uchida等(Chem Pharm Bull 2011;59:196)所报道，与AT1002(FCIGRLCG,SEQ ID NO:43)或Tat(GRKKRRNRRRCG,SEQ ID NO:44)一起共同施用；或(4)如Juryncyk等(Ann Neurol2010;68:593-601)所报道，使用粘附性经皮肤贴剂。另外，可以通过如Kim等(Int J Pharm 2008;362:20-28)所报道，与带正电荷的、成孔的蛙皮素肽组合来促进带负电荷的药物的经皮肤递送。

[0160] 在以浓缩制剂形式来皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用抗体的优选实施方案中，施用的体积优选地限制于3ml或更少、更优选地2ml或更少、更优选地1ml或更少。相对于使用要求专门装置和成分(例如，透明质酸酶)用于皮下施用更大体积的流体(如10ml或更多)的更稀释的抗体制剂而言，使用允许低体积皮下施用、肌肉内施用或经皮肤施用的浓缩抗体制剂是优选的。皮下递送、肌肉内递送或经皮肤递送可以作为单一施用而向一个皮肤

部分施用,或替代地可以重复一次或多次,或甚至在一段治疗给予时间内向多于一个皮肤部位给予。然而,制剂越浓缩,注射体积越低以及注射次数越少将是每次治疗给药所需要的。

[0161] 使用方法

[0162] 在优选的实施方案中,浓缩的抗体是对癌症的治疗有用的。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、神经胶质瘤、黑素瘤、肉瘤以及白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体的实例在以下指出并且包括:鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌);肺癌,包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌;腹膜癌;肝细胞癌;胃部的癌症或胃癌,包括胃肠癌;胰腺癌;成胶质细胞瘤;成神经细胞瘤;宫颈癌;卵巢癌;肝癌;膀胱癌;肝细胞瘤;乳癌;结肠癌;直肠癌;子宫内膜癌或子宫癌;唾液腺癌;肾脏癌或肾癌;前列腺癌;外阴癌;甲状腺癌;肛门癌;阴茎癌以及头颈部癌。术语“癌症”包括原发性恶性肿瘤细胞或肿瘤(例如,其细胞除了迁移至原始恶性肿瘤或肿瘤的部位之外没有迁移至受试者身体中的部位的那些)和继发性恶性肿瘤细胞或肿瘤(例如,由代谢引起、恶性肿瘤细胞或肿瘤细胞迁移至不同于原始肿瘤部位的继发部位的那些)。

[0163] 癌症或恶性肿瘤的其它实例包括但不限于:急性儿童成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓样白血病、肾上腺皮质癌、成人(原发性)肝细胞癌、成人(原发性)肝癌、成人急性淋巴细胞性白血病、成人急性骨髓样白血病、成人霍奇金病、成人霍奇金淋巴瘤、成人淋巴细胞性白血病、成人非霍奇金淋巴瘤、成人原发性肝癌、成人软组织肉瘤、AIDS-相关的淋巴瘤、AIDS-相关的恶性肿瘤、肛门癌、星形细胞瘤、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脑干胶质细胞瘤、脑肿瘤、乳癌、肾盂和输尿管癌症、中枢神经系统(原发性)淋巴瘤、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤、宫颈癌、儿童(原发性)肝细胞癌、儿童(原发性)肝癌、儿童急性成淋巴细胞性白血病、儿童急性骨髓样白血病、儿童脑干神经胶质瘤、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、儿童颅外生殖细胞肿瘤、儿童霍奇金病、儿童霍奇金淋巴瘤、儿童下丘脑和视觉途径神经胶质瘤、儿童成淋巴细胞性白血病、儿童成神经管细胞瘤、儿童非霍奇金淋巴瘤、儿童松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤、儿童原发性肝癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童软组织肉瘤、儿童视觉途径和下丘脑神经胶质瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、结肠癌、皮肤T-细胞淋巴瘤、内分泌胰腺胰岛细胞癌、子宫内膜癌、室管膜瘤、上皮癌、食道癌、尤因氏肉瘤和相关的肿瘤、外分泌胰腺癌、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠肿瘤、生殖细胞肿瘤、妊娠性滋养细胞肿瘤、毛细胞白血病、头颈部癌、肝细胞癌、霍奇金病、霍奇金淋巴瘤、高丙种球蛋白血症、下咽癌、肠癌、眼内黑素瘤、胰岛细胞癌、胰岛细胞胰腺癌、卡波济氏肉瘤、肾脏癌、喉癌、嘴唇和口腔癌症、肝癌、肺癌、淋巴增殖病症、巨球蛋白血症、男性乳癌、恶性间皮瘤、恶性胸腺瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、间皮瘤、转移性隐匿性原发性鳞状颈部癌症、转移性原发性鳞状颈部癌症、转移性鳞状颈部癌症、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、骨髓增生异常综合征、骨髓性白血病、骨髓样白血病、骨髓增生病症、鼻腔和副鼻窦癌症、鼻咽癌、成神经细胞瘤、孕期的非霍奇金淋巴瘤、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、隐匿性原发性转移性鳞状颈部癌症、口咽癌、骨/恶性纤维肉瘤、骨肉瘤/恶性纤维性组织细胞瘤、骨骼的骨肉瘤/恶性纤维性组织细胞瘤、卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低恶性潜能肿瘤、胰腺癌、副蛋白血症、紫癜、甲状

旁腺癌、阴茎癌、嗜铬细胞瘤、垂体肿瘤、浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、肾癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、结节病肉瘤、赛扎里综合征、皮肤癌、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状颈部癌症、胃癌、幕上原始神经外胚层和松果体肿瘤、T-细胞淋巴瘤、睾丸癌、胸腺瘤、甲状腺癌、肾盂和输尿管的移行细胞癌、移行肾盂和输尿管癌、滋养细胞肿瘤、输尿管和肾盂细胞癌、尿道癌、子宫癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉途径和下丘脑神经胶质瘤、外阴癌、华氏巨球蛋白血症、维尔姆斯瘤以及除了位于以上列出的器官系统中的瘤形成以外的任何其它过度增生性疾病。

[0164] 本文中所述和要求保护的方法和组合物可以用来检测或治疗恶性或恶化前的病状。此类用途指示在已知的或怀疑先前进展至瘤形成或癌症的病状中,具体来说,其中非瘤性细胞生长由过度增生、化生组成,或最具体来说,出现发育异常(针对此类异常生长病状的综述,参见Robbins和Angell, Basic Pathology. 第2版, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 第68-79页(1976))。

[0165] 发育异常常常是癌症的预兆,并且主要发现在上皮中。它是非瘤性细胞生长的最无序形式,涉及个体细胞均匀性和细胞建筑方向的损失。发育异常特征性地发生在存在慢性刺激或炎症的情况下。可以被检测的发育异常病症包括但不限于:无汗性外胚层发育异常、前面发育异常、窒息性胸廓发育异常、心房-手指发育异常、支气管肺发育异常、脑发育异常、宫颈发育异常、软骨外胚层发育异常、锁骨颅骨发育异常、先天性外胚层发育异常、颅骨骨干发育异常、颅腕跗发育异常、颅干骺端发育异常、牙本质发育异常、骨干发育异常、外胚层发育异常、牙釉质发育异常、头颅-眼睛发育异常、偏侧骨骺发育异常、多发性骨骺发育异常、点状骨骺发育异常、上皮发育异常、脸指生殖器发育异常、下颚家族性纤维性发育异常、家族性白色皱裂发育异常、肌纤维发育异常、骨骼纤维性发育异常、旺盛骨性发育异常、遗传性肾-视网膜发育异常、有汗性外胚层发育异常、无汗性外胚层发育异常、淋巴细胞减少性胸腺发育异常、乳腺结构发育异常、下颚面发育异常、干骺端发育异常、蒙底尼发育异常、单骨性纤维性发育异常、粘膜上皮发育异常、多发性骨骺发育异常、眼耳脊椎发育异常、眼齿指发育异常、眼脊椎发育异常、牙原性发育异常、眼下颚发育异常、根尖周牙骨质发育异常、多骨性纤维性发育异常、假性软骨发育不全脊椎骨骺发育异常、视网膜发育异常、隔视发育异常、脊椎骨骺发育异常以及心室桡骨发育异常。

[0166] 可以检测和/或治疗的额外的癌前病症包括但不限于:良性异常增生病症(例如,良性肿瘤、纤维囊性病状、组织肥大、肠息肉、结肠息肉以及食道发育异常)、粘膜白斑病、角化病、鲍温氏病、慢性光化性皮炎、日光性唇炎以及日光性角化病。

[0167] 额外的过度增生性疾病、病症和/或病状包括但不限于:恶性肿瘤和相关病症的进展和/或转移,所述恶性肿瘤和相关病症如白血病(包括急性白血病(例如,急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病(包括成髓细胞的、早幼粒细胞的、髓单核细胞的、单核细胞的以及红白血病)) 和慢性白血病(例如,慢性髓细胞的(粒细胞的)白血病以及慢性淋巴细胞性白血病))、真性红细胞增多、淋巴瘤(例如,霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链疾病;和实体瘤,包括但不限于肉瘤和癌,如纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳癌、卵巢癌、前列腺

癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤以及成视网膜细胞瘤。

[0168] 以上列出的可以被治疗的示例性病状不是限制性的。熟练的技术人员将意识到对于各种各样的病状而言，抗体或抗体片段是已知的，所述病状如自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥反应、心血管疾病、神经退化性疾病、代谢疾病、癌症、感染性疾病以及过度增生性疾病。

[0169] 示例性的自身免疫性疾病包括：急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜、皮炎、西登哈姆氏舞蹈病、重症肌无力、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、风湿热、多腺体综合征、大疱性类天疱疮、寻常天疱疮、糖尿病、亨-舍二氏紫癜、链球菌感染后肾炎、结节性红斑、大动脉炎、爱迪生氏病、类风湿性关节炎、多发性硬化症、结节病、溃疡性结肠炎、多形性红斑、IgA肾病、结节性多动脉炎、强直性脊柱炎、古德帕斯丘氏综合征、血栓闭塞性脉管炎、斯耶格伦氏综合征、原发性胆汁性肝硬化、桥本氏甲状腺炎、甲状腺毒症、硬皮症、慢性活动性肝炎、多肌炎/皮炎、多软骨炎、寻常天疱疮、韦格纳氏肉芽肿病、膜性肾病、肌萎缩性侧索硬化症、脊髓痨、巨细胞动脉炎/多肌痛、恶性贫血、急进性肾小球肾炎、牛皮癣以及纤维性肺泡炎。

[0170] 感染性疾病可以由各种病原生物体(如细菌、病毒或支原体)引起。示例性的已知的感染性因子包括但不限于：无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、淋球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌(*Pneumococcus*)、流感嗜血杆菌B(*Hemophilus influenzae B*)、梅毒左旋体(*Treponema pallidum*)、莱姆病螺旋体(*Lyme disease spirochetes*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、麻风分支杆菌(*Mycobacterium leprae*)、流产布鲁氏杆菌(*Brucella abortus*)、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、HIV-1、HIV-2、HIV-3、肝炎A、肝炎B、肝炎C、肝炎D、狂犬病病毒、流感病毒、巨细胞病毒、单纯性疱疹I和单纯性疱疹II、人血清细小病毒样病毒、呼吸道合胞体病毒、水痘带状疱疹病毒、肝炎B病毒、麻疹病毒、腺病毒、人T-细胞白血病病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、腮腺炎病毒、水疱性口炎病毒、辛德毕斯病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疣病毒、蓝舌病毒、仙台病毒、呼吸道肠孤儿病毒、脊髓灰质炎病毒、登革病毒、风疹病毒、恶性疟原虫、间日疟原虫、刚地弓形虫、让氏锥虫、克氏锥虫、罗德西亚锥虫、布氏锥虫、曼氏血吸虫、日本血吸虫、牛巴贝虫、柔嫩艾美耳球虫、盘尾丝虫、热带利什曼虫、旋毛虫、小泰累尔氏梨浆虫、水泡绦虫、羊绦虫、牛肉绦虫、细粒棘球绦虫、科特氏中殖孔绦虫、关节炎支原体、猪鼻支原体(*M.hyorhinis*)、口腔支原体(*M. orale*)、精氨酸支原体(*M. arginini*)、莱氏阿原体、唾囊支原体(*M. salivarium*)以及肺炎支原体(*M. pneumonia*)。

[0171] 套件

[0172] 各种实施方案可以涉及套件，所述套件含有适用于治疗患者中的患病组织的组分。示例性的套件可以含有如本文中所描述的至少一种浓缩的抗体或其片段。可以包括能

够通过注射递送套件组分的装置,如用于皮下注射的注射器。在使用经皮肤施用的情况下,递送装置(如空心微针递送装置)可以被包括在套件中。示例性的经皮肤递送装置是本领域中已知的,如3M的空心微结构经皮肤系统(hMTS),并且可以使用任何此类已知的装置。

[0173] 套件组分可以被包装在一起或分开在两个或更多个容器中。在一些实施方案中,容器可以是小瓶,所述小瓶含有适用于复水的组合物的无菌、冻干的制剂。套件还可以含有一种或多种适用于复水和/或稀释其它试剂的缓冲剂。或者,可以作为液体制剂递送和储存浓缩的抗体。可以使用的其它容器包括但不限于小袋、托盘、盒、管等。套件组分可以被包装并且无菌地维持在容器内。可以包括的另一种组件是提供给套件使用者的说明书。

实施例

[0174] 实施例1.hLL2抗CD22抗体的纯化

[0175] 如在美国专利号5,789,554和6,187,287中所描述,hLL2抗CD22抗体(依帕珠单抗)被设计、构建、克隆并且转染至骨髓瘤宿主细胞中,每一个所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文。使用适当的前导序列导致抗体分泌至无血清的细胞培养基中。可以通过离心去除细胞,并且例如在图1中所示从培养基中纯化抗体。

[0176] 通常,在以下实施例中描述的针对hLL2IgG和其它抗体的纯化过程特征为在蛋白质A、Q-SEPHAROSE®以及SP-SEPHAROSE®的三个连续柱上的色谱法。虽然SEPHAROSE®用作示例性的柱色谱树脂,但是熟练的技术人员将认识到色谱法的替代方法和替代色谱法树脂是本领域中已知的并且可以被使用。此外,阴离子和阳离子交换步骤不限于Q-SEPHAROSE®和SP-SEPHAROSE®,而是还可以使用本领域中已知的其它阴离子交换树脂和阳离子交换树脂。所述过程的最后一步使用了DV20病毒去除过滤,在所述过滤之后测试产物的无菌性。

[0177] 用于第一根柱子的蛋白质A亲和树脂MABSELECT™(GEHealthcare,Piscataway,NJ)的结合能力为25mg/mL至30mg/mL。将树脂填充至40cm直径柱子中达20cm高度处,达到25L的填充床体积,其中最大装载能力为625gm。在装载含抗体的培养基之前,用0.1M乙酸的20%乙醇溶液对填充柱进行消毒,并且然后用0.04MPBS(pH 7.4)再生。平衡之后,在300厘米/小时的最大流速下装载上清液。用0.04M PBS(pH 7.4)洗涤柱子直到吸光度返回至基线,接着在300厘米/小时下用另外的5个床层体积的0.04M PBS(pH 7.4)洗涤。

[0178] 在300厘米/小时的最大流速下,用0.1M柠檬酸盐(pH 3.5)洗脱结合的IgG。使用流穿式分光光度计,通过280nm处的吸光度来监测洗脱分布曲线。使用3M Tris/HCl(pH 8.6)将收集的产物峰中和至pH为7.0至8.0。作为额外的病毒去除步骤,使用1M柠檬酸将中和的产物峰滴定至pH为3.5至3.7。在室温下将此混合物孵育四小时,并且在孵育结束时,使用3M Tris/HCl(pH 8.6)将所述混合物中和至pH为7.0至8.0。

[0179] 然后将混合物浓缩至5mg/mL至7mg/mL,并且渗滤至制剂中的0.02M Tris/HCl、0.01M NaCl(pH 8.2)用于接下来的纯化步骤。所渗滤的经过蛋白质A纯化的hLL2IgG通过0.2μm过滤器过滤,并且储存在2°C至8°C下直到进一步纯化。

[0180] 用于下一根柱子的阴离子交换树脂是Q-SEPHAROSE®快速树脂(GE Healthcare,Piscataway,NJ)。将树脂填充至40cm直径柱子中达20cm高度处,达到25L的填充床体积,其中最大装载能力为625gm。在装载经过蛋白质A纯化的IgG之前,用1M氢氧化钠对填充柱进行

消毒,并且然后用0.02M Tris/HCl、1.0M NaCl (pH 8.0)再生。然后使用0.02M Tris/HCl、0.01M NaCl (pH 8.2)平衡树脂。在100厘米/小时的流速下装载所渗滤的经过蛋白质A纯化的IgG,并且在300厘米/小时的最大流速下用0.02M Tris/HCl、0.01M NaCl (pH8.2)洗脱流穿峰。从蛋白质A柱上洗脱下来的污染物结合至Q-SEPHAROSE®树脂。经过Q-SEPHAROSE®纯化的IgG使用0.2 μ m过滤器过滤,并且储存在2°C至8°C下直到进一步纯化。在装载于最终柱子上之前,使用1M柠檬酸将IgG滴定至pH 5.0。

[0181] 用于最后一根柱子的阳离子交换树脂是SP-SEPHAROSE®快速树脂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ)。将树脂填充至40cm直径柱子中达20cm高度处,其中最大装载能力为625gm。在装载经过Q-SEPHAROSE®纯化的hLL2IgG之前,用1M氢氧化钠对填充柱进行消毒,并且然后用0.025M柠檬酸盐 (pH 5.0)平衡。在300厘米/小时的最大流速下装载IgG,并且在300厘米/小时下用5个床层体积的0.025M柠檬酸盐 (pH 5.0)洗涤柱子。然后在300厘米/小时的最大流速下,用0.025M柠檬酸盐、0.15M氯化钠 (pH 6.0)洗脱结合的IgG峰。通过280nm处的吸光度监测洗脱分布曲线。

[0182] 经过纯化的hLL2IgG使用0.2 μ m过滤器过滤,并且在DV₂₀过滤之前储存在2°C至8°C下。将IgG浓缩至9.5mg/mL至10.5mg/mL,并且然后渗滤至0.04M PBS、0.075%聚山梨酯80 (pH 7.4)中。然后IgG通过0.2 μ m过滤器过滤进入无菌容器,然后通过0.1 μ m过滤器过滤进入无菌压力器皿,然后通过20nm过滤器过滤用于病毒去除。

[0183] 实施例2.hLL1抗CD74抗体的纯化

[0184] 如在美国专利号7,312,318;7,772,373;7,919,087以及7,931,903中所描述,hLL1抗CD74抗体(米拉珠单抗)被设计、构建、克隆并且转染至骨髓瘤宿主细胞中,每一个所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0185] 通过以上实施例1中描述的基本上相同的实验方案来纯化hLL1抗体,其中具有以下差异。将蛋白质A树脂填充至20cm直径柱子中的20cm高度处,从而提供6.3L的填充床体积。蛋白质A柱的最大装载能力是220gm。将Q-SEPHAROSE®柱填充至30cm直径柱子中的20cm高度处达到14.1L的填充床体积,其中最大装载能力为300gm。将SP-SEPHAROSE®柱填充至20cm直径柱子中的20cm高度处,其中填充床体积为6.3L并且最大装载能力为220gm。将经过纯化的hLL1IgG浓缩至10mg/mL至11mg/mL用于DV₂₀过滤。过滤之后,将75mL的0.04M PBS、1%聚山梨酯80 (pH7.4)添加至每升的经过纯化的IgG中,并且在储存于2°至8°C之前通过0.2 μ m过滤器再次过滤混合物。

[0186] 实施例3.hL243抗HLA-DR抗体的纯化

[0187] 如在美国专利号7,612,180中所描述,hL243抗HLA-DR抗体被设计、构建、克隆并且转染至骨髓瘤宿主细胞中,所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0188] 通过以上实施例1中描述的基本上相同的实验方案来纯化hL243抗体(IMMU-114),其中具有以下差异。将蛋白质A树脂填充至20cm直径柱子中的20cm高度处,从而提供6.3L的填充床体积。蛋白质A柱的最大装载能力是220gm。在过滤和装载在Q-SEPHAROSE®柱上之前,将经过蛋白质A纯化的IgG浓缩至5mg/ml至7mg/ml并且渗滤至0.02M Tris/HCL 0.05M NaCl (pH 7.5)中。

[0189] 将Q-SEPHAROSE®柱填充至30cm直径柱子中的20cm高度处达到14.1L的填充床体

积,其中最大装载能力为300gm。在用1M氢氧化钠消毒之后,用0.02M Tris/HCl、0.05M NaCl (pH 7.5)平衡树脂。用0.02M Tris/HCl、0.05M NaCl (pH 7.5)洗脱流穿峰。

[0190] 将SP-SEPHAROSE®柱填充至20cm直径柱子中的20cm高度处,其中填充床体积为6.3L并且最大装载能力为220gm。在装载和洗涤之后,用0.025M柠檬酸盐、0.15M NaCl (pH 6.0)洗脱IgG。

[0191] 将经过纯化的hL243IgG浓缩至10mg/mL至11mg/mL并且渗滤至0.04M PBS (pH 7.4)中,然后在DV₂₀过滤之前通过0.2μm和0.1μm过滤器过滤。过滤之后,将75mL的0.04M PBS、1%聚山梨酯80 (pH 7.4)添加至每升的经过纯化的IgG中,并且在储存于2°至8°C之前通过0.2μm过滤器再次过滤混合物。

[0192] 实施例4. hL243抗HLA-DR抗体的同种型

[0193] 如在以上实施例3中所描述制备hL243抗HLA-DR抗体。如先前所描述 (Losman等, 1997. Cancer, 80:2660),通过分别将hL243V_K和hL243V_H的XbaI-BamHI和XhoI/NotI片段连续亚克隆至pdHL2中来构建表达载体hL243pdHL2。如Gilles等 (1989. J. Immunol. Methods 125:191)所描述,表达载体pdHL2含有人γ1链的基因组序列,因此hL243是IgG1/K同种型。

[0194] 为了构建用于hL243的其它同种型(如IgG4/K)的表达载体,人γ1链的序列被人γ4链的序列替换,所述人γ4链的序列通过PCR扩增获得。所使用的模板是从ATCC CRL-11397细胞中提取的基因组DNA,并且引物对如下。

[0195] SacII

[0196] CCGCGTACATGGCACCACCTCTCTTGCAGCTTCCACCAAGGGCCC (SEQ ID NO:35)

[0197] EagI

[0198] CCGGCCGTCGCACTCATTTACCCAGAGACAGGG (SEQ ID NO:36)

[0199] 将扩增的PCR产物克隆至TOPO® TA测序载体 (INVITROGEN®)中,并且通过DNA测序证实所述序列。

[0200] 将点突变Ser241Pro (基于Kabat编号)引入至γ4序列的铰链区中以避免当IgG4抗体在哺乳动物细胞培养物中表达时形成半分子 (Schoorman等, 2001, Mol. Immunol. 38:1)。在PstI与StuI限制位点 (56bp)之间的人γ4铰链区被合成DNA片段替换,其中Ser241的TCA密码子置换成Pro的CCG密码子。hL243pdHL2中的人γ1序列被突变的γ4序列置换,从而产生最终的表达载体 (指定为hL243γ4PpdHL2)用于IgG4同种型hL243。IgG4同种型被用于随后的治疗功效实验。

[0201] hL243IgG4P重链和hL243轻链的氨基酸序列在图8中示出。

[0202] 实施例5. hA20抗CD20抗体的纯化

[0203] 如在美国专利号7,151,164和7,435,803中所描述,hA20抗CD20抗体 (维妥珠单抗)被设计、构建、克隆并且转染至骨髓瘤宿主细胞中,所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文。

[0204] 通过以上实施例1中描述的基本上相同的实验方案来纯化hA20抗体,其中具有以下差异。将具有30mg/mL最大装载能力的蛋白质A树脂填充至20cm直径柱子中的19cm至21cm高度处,从而提供6.0L至6.6L的填充床体积。蛋白质A柱的最大装载能力是近似180gm。用1M柠檬酸将经过蛋白质A纯化的IgG滴定至pH为3.6至3.8用于病毒去除。

[0205] 将Q-SEPHAROSE®柱填充至30cm直径柱子中的19cm至21cm高度处达到13.4L至14.9L的填充床体积,其中最大装载能力为300gm。装载之后,用0.2M Tris/HCl、0.01M NaCl (pH 8.0)洗脱流穿峰。

[0206] 将SP-SEPHAROSE®柱填充至20cm直径柱子中的19cm至21cm高度处,其中填充床体积为6.0L至6.6L并且最大装载能力为180gm。在装载和洗涤之后,用0.025M柠檬酸盐、0.15M NaCl (pH 6.0)洗脱IgG。

[0207] 将经过纯化的hA20IgG浓缩至10mg/mL至11mg/mL并且渗滤至0.04M PBS (pH 7.4)中,然后在DV₂₀过滤之前通过0.2μm和0.1μm过滤器过滤。过滤之后,将75mL的0.04M PBS、1%聚山梨酯80 (pH7.4)添加至每升的经过纯化的IgG中,并且在储存于2°C至8°C之前通过0.2μm过滤器再次过滤混合物。

[0208] 实施例6. 人源化抗体在高浓度制剂缓冲液中的超滤浓缩

[0209] 使用超滤,在高浓度制剂(HCF)缓冲液中将人源化的IgG浓缩到至少200mg/mL,具有最少的聚集或没有聚集。进行一系列的分析测定以监测浓缩过程期间的任何变化。没有观察到抗体品质或溶液特征的可检测变化。在2°C至8°C下,液体制剂稳定至少12个月。通过SE-HPLC(其显示出在吸光度迹线上基本是单个峰,图4至图6)在12个月中评估的稳定性是在97%至99%之间(表4)。还原性和非还原性PAGE与HPLC结果一致(图2A至2B)。制剂适用于皮下注射(SC)。测试的示例性抗体包括米拉珠单抗(hLL1,抗CD74)、依帕珠单抗(hLL2,抗CD22)、维妥珠单抗(hA20,抗CD20)以及hL243(抗HLA-DR;IMMU-114)。

[0210] 开发了高浓度制剂(HCF)缓冲液,其显示出能够使抗体溶液稳定到至少200mg/mL浓度(表3)。除了来自IV制剂的磷酸盐缓冲液和NaCl之外,此SC制剂含有甘露醇和聚山梨酯80,所述甘露醇已经使用在蛋白质制剂中用于维持稳定性和等渗性,所述聚山梨酯80(PS-80)保护抗体以防聚集。因为大多数人源化IgG1抗体的pI值是在8至9.5之间,所以使用柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液系统(在2.5至5.6范围内缓冲)和低pH(5.2)以确保蛋白质处于带电荷的形式,并且因而在溶液中更稳定。

[0211] 在超滤过程中使用了50KD MW阻截膜,这种截留膜保留并且浓缩150KD IgG分子而允许制剂缓冲液中的水和小分子穿过。

[0212] **表3 高浓度制剂组合物**

组分	hLL1 (米拉珠单抗, 抗 CD74)	hLL2 (依帕珠单抗, 抗 CD22)	hA20 (维妥珠单 抗, 抗 CD20)	hL243 (抗 HLA-DR)
IgG ₁	213 mg/mL	109 mg/mL	162 mg/ml	101 mg/mL
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2.30 g			
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.76 g			
氯化钠	6.16 g			
聚山梨酯 80(w/v)	1.0 mL (在浓缩步骤结束时添加聚山梨酯 80)			
二水合柠檬酸钠	0.34 g			
一水合柠檬酸	1.3 g			
甘露醇	12.0 g			
WFI (足量至)	1 L			
pH (通过 NaOH 调 节)	5.2			

[0214] HCF缓冲液的溶质浓度是6.2mM一水合柠檬酸、105mM氯化钠、1.2mM二水合柠檬酸钠、8.7mM磷酸氢二钠、5.5mM磷酸二氢钠、66mM甘露醇，pH为5.2，电导率为11.0mS/cm至14.0mS/cm。

[0215] 使用具有50KD聚醚砜过滤器NMWL (来自MILLIPORE®，直径44.5mm) 的AMICON® Model 8050搅拌式超滤单元 (来自MILLIPORE®，50mL最大体积) 来浓缩抗体。使用超纯氩气使系统加压。

[0216] 组装具有50KD膜的UF单元并且连接至氩气供应。冲洗所述单元并且用缓冲液填充。随着搅拌器开动，施加压力以使多于两个体积的HCF缓冲液运行穿过膜。从这点开始，将膜维持在湿润的状态。

[0217] 在冲洗搅拌的单元室之后，排出残留的缓冲液并且用IgG溶液填充所述单元。然后启动搅拌板并且施加压力。将抗体溶液浓缩至近似一半 (1/2) 的原始体积，然后使用HCF缓冲液 (5倍渗余物体积) 渗滤。重复所述过程3至4次直到渗滤完成，并且检查以确保滤液的pH和电导率与HCF缓冲液相同。

[0218] 浓缩后，添加聚山梨酯80以使得聚山梨酯的最终浓度为0.1%。然后IgG通过0.22μm过滤器过滤，放置于透明玻璃小瓶中，并且储存在2℃至8℃下直到进行分析测试。

[0219] 在光照下对着暗的背景目测每个样品中的任何微粒和沉淀。在连续稀释之后，通过UV (OD₂₈₀) 吸光度测量IgG蛋白质浓度。使用预制的4%至20%梯度的凝胶进行SDS-PAGE。在存在 (还原性凝胶) 或不存在 (非还原性凝胶) 3% 2-巯基乙醇溶液的情况下，在95℃将10μL约1mg/mL样品加热3分钟。用0.1%考马斯蓝对凝胶进行染色。使用pH为6至10.5的梯度凝胶，通过标准技术进行等电聚焦 (IEF)。将样品稀释至2mg/mL，并且连同pI标记物和参比标准各自

施加5 μ L。用考马斯蓝对凝胶进行染色并且扫描用于定量pI范围。

[0220] 使用具有BIO-SIL[®] SEC 250柱的BECKMAN[®] HPLC系统 (Model 116) 进行尺寸排阻HPLC (SE-HPLC)。将样品稀释至约1mg/mL并且注射60 μ L。洗脱缓冲液主要由0.05M NaH₂PO₄、0.05MNa₂HPO₄以及1mM EDTA组成, pH为6.8。通过280nm处的UV吸光度监测洗脱。

[0221] 所有的分析结果概述在表4中。显示了SDS-PAGE凝胶 (图2A非还原性和图2B还原性)、IEF凝胶 (图3) 以及SE-HPLC色谱图 (图4至图6)。可以看出, 在HCF缓冲液中将IgG从101mg/mL超滤浓缩至213mg/mL不会导致经过纯化的IgG的任何可检测的变化。

表 4.分析结果

[0222]	抗体 浓度	hLL1 213 mg/mL	hLL2 109 mg/mL	hA20 102 mg/mL	hL243 101 mg/mL
	SE-HPLC (面积百分比)	98.3% (第 0 个月)	98.5 % (第 0 个月)	98.9% (第 0 个月)	99.3% (第 0 个月)
		97.5% (第 4 个月)	97.3% (第 12 个月)	98.5% (第 12 个月)	98.8% (第 12 个月)
[0223]	目测	澄清的 淡黄色	澄清的 淡黄色	澄清的 淡黄色	澄清的 轻微奶白色
	SDS-Page 凝胶	用于所有浓缩 MAb 样品的还原性和非还原性 SDS-PAGE 凝胶显示出类似于参比标准的谱带图案			
	IEF 凝胶	所有浓缩 MAb 样品的 IEF 凝胶图案显示出类似于参比标准的谱带图案			

[0224] 本研究证明了在HCF缓冲液中, IgG可以通过超滤浓缩至213mg/mL来浓缩而不具有任何可见的聚集或沉淀作用。也维持了抗体的其它品质方面, 如分子完整性、电荷变化以及溶液pH。

[0225] 实施例7. 用于皮下注射或肌肉内注射的高蛋白浓度抗体制剂

[0226] 用于皮下施用或肌肉内施用的替代高浓度制剂可以包含氨基酸, 如精氨酸或谷酰胺。使用包含糖甘露醇和/或氨基酸精氨酸和谷氨酸的三种不同制剂, 针对依帕珠单抗 (人源化的抗CD22) 确定不具有沉淀而可达到的最大蛋白质浓度的比较 (表5)。

[0227] 将依帕珠单抗施加至40mL MABSELECT[®] (蛋白质A) 亲和色谱柱, 所述柱用磷酸盐缓冲盐水并且然后用去离子水 (diH₂O) 洗涤以使聚山梨酯80从原始块体材料中去除。用80mL的0.05M柠檬酸钠 (pH3.5) 洗脱抗体。通过添加132mL的0.1M NaH₂PO₄中和洗出液并且通过添加60mL的1M L-精氨酸一盐酸盐/1M L-谷氨酸 (一钠盐) 溶液和39.6mL的1M甘露醇而配制成CPREM缓冲液, 用HCl调节至pH 5.3并且用去离子H₂O稀释至600mL。最终的CPREM制剂含有66mM甘露醇、100mM精氨酸、100mM谷氨酸、144mM Na、100mM Cl、7.3mM柠檬酸盐、22mM磷酸盐, pH为5.3。通过280nm (OD₂₈₀) 处的UV分光光度法测量蛋白质浓度为2.56mg/mL。

[0228] 使用具有50kDa MWC0膜的搅拌单元浓缩器将600mL溶液浓缩120倍。通过OD₂₈₀测量120倍浓缩物中的蛋白质浓度为238mg/mL。通过目测和SE-HPLC迹线表明不存在明显的沉淀

作用,所述SE-HPLC迹线与浓缩前的材料的SE-HPLC迹线不能区分,表明没有证据证明聚集(数据未示出)。将120倍的浓缩物分成三个等分试样。

[0229] 将一个等分试样(0.5mL)的120倍浓缩物(238mg/mL)维持在CPREM制剂中并且进一步浓缩至170倍(0.35mL),并且通过OD₂₈₀测量为298mg/mL的蛋白质浓度,没有明显沉淀作用。SE-HPLC分析分辨出与浓缩前材料相同的迹线而不具有聚集(数据未示出)。由于高粘度和极限体积,没有尝试进一步浓缩30%的蛋白质溶液。

[0230] 将第二等分试样渗滤至CPRE缓冲液(100mM精氨酸、100mM谷氨酸、144mM Na、100mM Cl、7.3mM柠檬酸盐、22mM磷酸盐,pH为5.3)中,所述CPRE缓冲液是不具有甘露醇的CPREM缓冲液。浓缩CPRE蛋白质溶液直到沉淀物明显。这时,终止浓缩并且过滤溶液。通过OD₂₈₀测量经过过滤的浓缩物中的蛋白质浓度为99mg/mL。

[0231] 将第三等分试样渗滤至CPM缓冲液(66mM甘露醇、144mM Na、100mM Cl、7.3mM柠檬酸盐、22mM磷酸盐,pH为5.3)中,所述CPM缓冲液是不具有精氨酸和谷氨酸的CPREM。浓缩CPM蛋白质溶液直到沉淀物明显。这时,终止浓缩并且过滤溶液。通过OD₂₈₀测量经过过滤的浓缩物中的蛋白质浓度为137mg/mL。

[0232] 这些结果表明,将精氨酸和谷氨酸添加至实施例6的HCF缓冲液中增加了可以维持而不具有沉淀的最大抗体浓度,高达至少300mg/ml。此外,因为可以在HCF缓冲液中获得的hLL1抗体的最大浓度不高于其它测试抗体所获得的最大浓度,并且基本上低于HCF缓冲液中hLL1抗体所获得的最大浓度(表4),预计对于其它高度浓缩的抗体而言可以获得可比的不具有沉淀的稳定抗体浓度的增加。

[0233] 表5. 高浓度依帕珠单抗制剂

	制剂	精氨酸 (mM)	谷氨酸 (mM)	甘露醇(mM)	C _{max} (mg/L)
[0234]	CPREM	100	100	66	298 [‡]
	CPRE	100	100	0	99*
	CPM	0	0	66	137*

[0235] 每种制剂含有144mM Na、100mM Cl、7.3mM柠檬酸盐、22mM PO₄, pH5.3

[0236] C^{max},在蛋白质沉淀点[‡]或极限粘度*下的最大可达到浓度

[0237] 实施例8.在非霍奇金淋巴瘤(NHL)中低剂量维妥珠单抗的皮下注射

[0238] 如以上实施例5和实施例6中所描述,制备维妥珠单抗用于皮下施用。具有先前未治疗的或复发的NHL的十七位患者每两周接受皮下注射的80mg、160mg或320mg维妥珠单抗的4次给药(Negrea等,2011,Haematologica 96:567-573)。通过CT扫描评估反应,而其它评价包括不良事件、B细胞血液水平、血清维妥珠单抗水平以及人抗维妥珠单抗(HAHA)滴度。

[0239] 采用皮下注射仅看到偶然的、轻微至中等的短暂注射反应,并且没有观察到其它安全问题。皮下注射的维妥珠单抗在几天的时间里展现出缓慢的释放模式,其中在每次注射80mg、160mg或320mg的剂量下的平均最大血清浓度为19μg/mL、25μg/mL以及64μg/mL。在维妥珠单抗的所有剂量水平下观察到短暂的B细胞耗尽。目标反应率(部分反应加上完全反应加上未证实的完全反应)是47%(8/17),其中完全反应/未证实的完全反应率是24%(4/17)。八个目标反应中有四个持续了60周或更久。在皮下注射的维妥珠单抗的所有剂量水平

下观察到目标反应。对于人抗维妥珠单抗抗体 (HAHA) 而言评价的所有血清样品是阴性。

[0240] 结论是,在惰性非霍奇金淋巴瘤中皮下注射低剂量维妥珠单抗是方便的、耐受良好的并且能够达到持续的血清水平、B细胞耗尽以及持久的目标反应。

[0241] 实施例9.在免疫性血小板减少性紫癜 (ITP) 中低剂量维妥珠单抗的皮下注射

[0242] 血小板计数低于 30×10^9 并且经历了至少一种标准治疗失败的的十一位成人慢性ITP患者两周分开地接受静脉内 (n=7) 或皮下 (n=4) 施用的80mg或120mg维妥珠单抗的2次给药。9位可评价的患者之中,总目标反应率是67%,其中33%的患者具有完全反应。对于在研究之前没有经历手术脾脏去除的6位患者小组而言,反应率是100%,不管施用路径和跨越所测试的两次给药。更重要的是,小组的50%对维妥珠单抗完全反应,并且在治疗后的6周、6个月以及9个月内继续维持它们的血小板水平。对于已经经历脾脏切除的3位患者而言,对治疗都没有反应。皮下和静脉内注射维妥珠单抗均导致B细胞耗尽。一位患者对静脉内注射的维妥珠单抗具有输注反应并且中断治疗。两位其它的患者对静脉内注射维妥珠单抗具有微小的免疫原性反应。没有观察到其它的安全问题,并且接受皮下注射维妥珠单抗的患者都没有展现出免疫原性反应。

[0243] 本研究证明了,维妥珠单抗用于ITP治疗的方便性、安全性及功效以及皮下注射维妥珠单抗用于减少对抗体施用的免疫原性反应的优越性。

[0244] 实施例10.在慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 中低剂量依帕珠单抗的皮下注射

[0245] 具有先前未治疗的或复发的CLL的患者每周或每两周接受皮下注射的80mg、160mg或320mg依帕珠单抗的4次给药。还可以每周两次施用分开的剂量。采用皮下注射仅看到偶然的、轻微至中等的短暂注射反应,并且没有观察到其它安全问题。皮下注射的依帕珠单抗在几天的时间里展现出缓慢的释放模式。在所有依帕珠单抗的剂量水平下观察到短暂的B细胞耗尽,但在两个最高剂量下给予至少4周时更显著。在皮下注射的依帕珠单抗的所有剂量水平下观察到目标反应,但在最高剂量下具有特别为30%的高反应(大多数是部分反应)。对于人抗依帕珠单抗抗体 (HAHA) 而言评价的所有血清样品是阴性。

[0246] 结论是,在CLL中皮下注射低剂量依帕珠单抗是方便的、耐受良好的并且能够达到持续的血清水平、B细胞耗尽以及持久的目标反应。

[0247] 实施例11.在系统性红斑狼疮 (SLE) 中低剂量依帕珠单抗的皮下注射

[0248] 如以上实施例1和实施例5或6中所描述,制备依帕珠单抗用于皮下施用。如以上实施例1和实施例5或6中所描述,制备依帕珠单抗用于皮下施用。对具有中等活性SLE(总的大不列颠群岛狼疮评估组 (BILAG) 得分6至12) 的14位患者进行了开放标签的、单中心研究。患者每周皮下接受400mg依帕珠单抗,持续6周。评价包括安全性、SLE活性 (BILAG)、B细胞和T细胞的血液水平以及人抗依帕珠单抗抗体 (HAHA) 滴度。在所有14位患者中,总BILAG得分减少至少50%,其中92%的减少连续至少18周。在6周、10周以及18周时,几乎所有患者 (93%) 经历了至少一个BILAG B级或C级疾病活动性的改善。另外,在基线具有多个BILAG B受累的3位患者到18周为止已经完全解决了所有的B级疾病活动性。依帕珠单抗是耐受良好的,不具有免疫原性证据或T细胞、免疫球蛋白或自身抗体水平的明显变化。在18周时,B细胞水平平均减少了35%并且治疗后保持降低6个月。这些结果证明了皮下依帕珠单抗用于治疗SLE的安全性和功效。

[0249] 实施例12.在多发性骨髓瘤中米拉珠单抗的皮下注射

[0250] 如以上实施例1和实施例6中所描述,制备米拉珠单抗用于皮下施用。经历了至少两种标准治疗失败的具有复发的多发性骨髓瘤的患者每周一次接受皮下注射的300mg作为裸抗体的米拉珠单抗的10次给药。通过EBMT标准对反应进行分类,其中PK和免疫原性分别通过血清米拉珠单抗水平和人抗米拉珠单抗抗体(HAHA)滴度来评价。采用皮下注射仅看到偶然的、轻微至中等的短暂注射部位反应,并且没有观察到其它安全问题。皮下注射的米拉珠单抗在几天的时间里展现出缓慢的释放模式。如通过血清轻链、IgM、循环的和骨髓的骨髓瘤细胞减少所测量,在皮下注射的米拉珠单抗的此剂量水平下观察到目标反应,并且由于骨髓功能改善,患者的血小板、血红蛋白以及WBC水平得到改善。对于人抗米拉珠单抗抗体(HAHA)而言评价的所有血清样品是阴性。

[0251] 皮下注射裸米拉珠单抗与硼替佐米、阿霉素或地塞米松的联合治疗被观察到改善了多发性骨髓瘤患者的反应,如在临床前模型中所示(Stein等,2009,Clin Cancer Res 15:2808-17)。米拉珠单抗与硼替佐米、阿霉素或地塞米松的联合治疗产生了大于单独地米拉珠单抗、单独地药物所观察到或单独施用的抗体或药物的组合作用的治疗作用。组合导致要求药物的最佳剂量明显减少。

[0252] 结论是,在多发性骨髓瘤中皮下注射米拉珠单抗是方便的、耐受良好的并且能够达到持续的血清水平和持久的目标反应。

[0253] 实施例13.从G1m1至nG1m1的同种异型转化降低了IgG1治疗性抗体的免疫原性

[0254] 由具有G1m17,1同种异型的完全人单克隆抗体构建阿达木单抗(抗TNF α 抗体)。阿达木单抗被批准用于治疗各种自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强直性脊柱炎、克罗恩氏病、牛皮癣以及幼年特发性关节炎。已知阿达木单抗在一些经过阿达木单抗治疗的患者中诱导抗球蛋白反应,并且对抗阿达木单抗的抗体与对治疗无反应相关(Bartelds等,2010,Arthritis Res Ther 12:R221)。

[0255] 通过制作重链置换K214R、D356E以及L358M,利用位点定向诱变将阿达木单抗从G1m17,1同种异型转变成G1m3同种异型,从而产生G1m3-阿达木单抗。

[0256] 向患者施用原生阿达木单抗和G1m3-阿达木单抗,所述患者对于G1m17,1而言是纯合的、对于G1m17,1和G1m3而言是杂合的或对于G1m3而言是纯合的。观察到在接受者中同种异型工程化的G1m3-阿达木单抗诱导了更低的免疫反应率,其中要求终止施用的免疫反应更少。出人意料地,改变成G1m3-阿达木单抗导致了G1m17,1纯合子中的免疫反应比G1m3纯合子中的免疫反应减少更大。

[0257] 这些结果证明,抗体同种异型从G1m1变化至nG1m1可以导致治疗性抗体的免疫原性降低。

[0258] 实施例14.治疗性抗体的经皮肤施用

[0259] 3M空心微结构经皮肤系统(hMTS)被用于通过经皮肤施用来递送浓缩的抗体组合物(Burton等,2011,Pharm Res 28:31-40)。在高达0.25mL/min的速率下施用浓度在100mg/mL至300mg/mL之间的高达1.5mL的抗体制剂。在贴剂去除之后立即观察到红色斑(hMTS阵列的大小),但贴剂去除后10min所述红色斑褪去为几乎不可辨别。除了此短暂的局部反应之外,没有观察到其它的输注相关不良反应。施用全抗体或抗体片段。通过经皮肤递送而施用的抗体包括维妥珠单抗、米拉珠单抗、依帕珠单抗、阿达木单抗以及西妥木单抗(clivatuzumab)。治疗功效和P_k分布曲线类似于使用皮下施用相同的抗体所观察到的那

些。

[0260] 如以上实施例5和实施例6中所描述,制备维妥珠单抗用于皮下施用。具有先前未治疗的或复发的NHL的患者每两周使用3M hMTS装置接受经皮肤注射的80mg、160mg或320mg维妥珠单抗的4次给药(Negrea等,2011,Haematologica 96:567-573;Burton等,2011,Pharm Res 28:31-40)。通过CT扫描评估反应,而其它评价包括不良事件、B细胞血液水平、血清维妥珠单抗水平以及人抗维妥珠单抗(HAHA)滴度。

[0261] 采用经皮肤注射仅看到偶然的、轻微至中等的短暂注射反应,并且没有观察到其它安全问题。经皮肤的维妥珠单抗在几天的时间里展现出缓慢的释放模式。在维妥珠单抗的所有剂量水平下观察到短暂的B细胞耗尽。目标反应率(部分反应加上完全反应加上未证实的完全反应)是45%,其中完全反应/未证实的完全反应率是25%。一半的目标反应持续了60周或更久。在经皮肤的维妥珠单抗的所有剂量水平下观察到目标反应。对于人抗维妥珠单抗抗体(HAHA)而言评价的所有血清样品是阴性。

[0262] 结论是,在惰性非霍奇金淋巴瘤中经皮肤施用低剂量维妥珠单抗是方便的、耐受良好的并且能够达到持续的血清水平、B细胞耗尽以及持久的目标反应。

[0263] 实施例15.用于预靶向的双特异性抗体的皮下注射

[0264] 抗TROP2双特异性抗体

[0265] TROP2(又称为上皮糖蛋白-1或EGP-1)是在几乎所有前列腺癌(PC)上、在高水平下表达的泛癌标记物。通过如在以上0077至0081段中所描述的对接和锁定技术,使用hRS7和679抗体来制作双特异性抗体TF12(抗TROP2x抗HSG)。TF12有效地靶向PC,并且提供良好的肿瘤摄取。在具有皮下注射的PC3肿瘤的小鼠中研究了使用TF12和¹⁷⁷Lu-标记的diHSG-肽(IMP288)的预靶向的放射免疫治疗(PRIT)的功效。

[0266] 用皮下注射的人PC3肿瘤对五组无胸腺小鼠(n=10)进行异种移植。用2.5nmol的TF12对小鼠进行皮下注射,接着在16h之后静脉内注射0.1nmol放射性标记的IMP288。将用TF12/¹⁷⁷Lu-IMP288(41MBq)的一个或两个周期(分开48h)PRIT的治疗功效与在MTD(11MBq¹⁷⁷Lu-hRS7)下用¹⁷⁷Lu-标记的抗TROP2mAb的常规RIT的治疗功效进行比较。对照组接受PBS或不具有用TF12预靶向的¹⁷⁷Lu-IMP288(41MBq)。

[0267] 经过一个周期PRIT治疗的小鼠显示出中位存活率改进(121天对82天)。与仅有一个周期相比,两个周期的PRIT显著增强中位存活率(>160对121天,p<0.0001)。两个周期的PRIT的治疗功效与用¹⁷⁷Lu-hRS7的RIT没有显著不同(p=0.067),但经过PRIT治疗的小鼠显示出更低的血液学毒性。使用RIT的白细胞减少量比使用PRIT所观察的白细胞减少量显著更高(67%对38%,p=0.028)。在150天之后,与对照组中没有小鼠是活的相比,经过两个周期的PRIT治疗的70%的小鼠和经过常规RIT治疗的所有小鼠仍然是活的。

[0268] TF12结合¹⁷⁷Lu-IMP288的预靶向是用于前列腺癌的特异性放射免疫治疗的优良系统。通过添加额外周期的PRIT来明显增强功效。鉴于有限的毒性,存在额外治疗周期或更高剂量¹⁷⁷Lu-IMP288的空间。

[0269] 抗CD20双特异性抗体

[0270] CD20是肿瘤相关的抗体(TAA),所述抗体是在各种各样的血液学癌症和自身免疫性疾病中用于基于抗体的治疗的重要靶标。根据Sharkey等(2008,Cancer Res 68:5282-90)制作包含hA20(抗CD20)xh679(抗HSG)的TF4双特异性抗体。

[0271] 通过皮下注射向具有拉莫斯B细胞淋巴瘤的裸鼠施用TF4双特异性抗体。在抗体施用前2至4周,将拉莫斯细胞(1×10^7)皮下植入6至8周龄雌性BALB/c裸鼠中。施用0.125nmol至1.0nmol范围内的量的TF4抗体,接着在29h后施用 ^{90}Y -标记的IMP 288(Sharkey等,2008,Cancer Res 68:5282-90)。使用20倍的TF4与可靶向构建体肽的比率来获得最佳结果。

[0272] 通过在肝脏、脾脏以及肾脏中处理,TF4双特异性抗体快速地从血液中清除。在24小时时,TF4将标记的肽的肿瘤摄取提高2.6倍并且与抗CD20Fab x抗HSG Fab化学缀合物相比使肿瘤与血液的比率增加45倍,并且与放射性标记的抗CD20IgG相比分别增加1.6倍和1,600倍。在 ^{90}Y -标记的抗CD20IgG的最大剂量下观测到WBC的重度(>90%)和持久的减少,而预靶向导致<60%减少。TF4预靶向导致存活率高度显著的改进,甚至在相对低的剂量下治愈了33%至90%的动物,而当用 ^{90}Y -标记的抗CD20IgG治疗时大多数肿瘤快速地进展。

[0273] 实施例16.用于癌症治疗的双特异性抗体的施用

[0274] 抗CD20x抗CD22双特异性抗体

[0275] CD20和CD22抗原广泛地表达在造血系统来源的癌症中。已经证明了利用抗CD20和抗CD22抗体的联合治疗比单独地任一药剂更有功效并且对治疗耐单一药剂治疗的癌症有用(例如,Leonard等,2005,J Clin Oncol 23:5044-51;Qu等,2008,Blood 111:2211-19;Gupta等,2010,Blood 116:3258-67)。使用本文中公开的技术,利用不同抗体的治疗可以作为单独抗体的组合或作为双特异性抗体构建体而施用。

[0276] 通过如先前所描述的对接和锁定(DNL)技术(美国专利号7,521,056;7,527,787;7,534,866;每一个所述专利的实施例部分以引用的方式并入本文)制备包含抗CD20抗体维妥珠单抗和抗CD22抗体依帕珠单抗的双特异性构建体。如以上实施例6和实施例7中所描述,制备在100mg/ml与300mg/ml之间的双特异性DNL构建体的浓缩溶液。通过每周一次持续四周、在每次注射200mg至600mg范围内的剂量下的皮下注射而向具有复发的B细胞淋巴瘤患者施用浓缩的双特异性DNL构建体。针对惰性组织学(包括滤泡性淋巴瘤)、侵袭性NHL和DLBCL选择患者。

[0277] 治疗是耐受良好的,具有最小的输注相关的短暂反应。超过60%的具有滤泡性NHL的患者达到目标反应(OR),其中超过50%是完全反应(CR)。超过60%的具有DLBCL的患者达到具有50%CR的OR。所有惰性NHL患者的中位疾病进展期是17.8个月。

[0278] 结论是,用抗CD22x抗CD20双特异性抗体的治疗对治疗造血系统肿瘤是有功效的,具有与单一抗体治疗相比改进的功效和减少的毒性。

[0279] 抗CD20x抗CD74双特异性抗体

[0280] 如先前所描述(Gupta等,2012,Blood 119:3767-78)制备了包含维妥珠单抗(抗CD20)和米拉珠单抗(抗CD74)的双特异性DNL抗体构建体。如在以上实施例6和实施例7中所描述,制备双特异性的抗CD20x抗CD74DNL构建体的浓缩制剂,并且通过皮下注射而向具有套细胞淋巴瘤(MCL)和其它淋巴瘤或白血病的受试者施用。

[0281] 通过双特异性抗体而在MCL细胞上的CD20和CD74的并置导致同型粘附并且触发细胞内变化,所述细胞内变化包括线粒体跨膜电位损失、活性氧物质产生、ERK和JNK快速持续的磷酸化、pAkt和Bcl-xL下调以及溶酶体膜通透化,从而导致细胞死亡。双特异性抗体以剂量依赖的方式显著延长了带有MCL异种移植物的裸鼠的存活率。通过暴露于双特异性抗体还耗尽了其它的淋巴瘤和白血病细胞系。结果证明了抗CD20x抗CD74双特异性抗体构建体

用于治疗造血系统肿瘤的体外和体内功效。

[0282] ***

[0283] 在本说明书中引用的所有专利和其它引用文献指示本发明所属领域的技术人员的技术水平,并且以引用的方式并入本文,包括任何表和图,其并入程度如同每个引用文献单独地以引用的方式并入一样。

[0284] 本领域技术人员将容易地理解,本发明充分适合于获得所提及的以及其中固有的目标和优点。作为目前代表性优选实施方案的本文中描述的方法、变量以及组合物是示例性的并且不旨在限制本发明的范围。对于本领域技术人员而言,将出现其中的变化和其它用途,所述变化和用途涵盖在本发明内。

<110> IMMUNOMEDICS, INC.

<120> 用于小体积施用的同种异型选择的抗体的超滤浓缩

<130> IMM332W01

<140>

<141>

<150> 61/509,850

<151> 2011-07-20

<150> 61/481,489

<151> 2011-05-02

<160> 44

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 1

aatgcggcgg tggtagacagt a

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 2

[0001]

aagctcagca cacagaaaga c

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<220>

<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> dT

[0002]

<400> 3

uaaaaucuuu cugcccacct t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<220>

<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> dT

	<400> 4 ggaagcuguu ggcugaaaat t	21
	<210> 5 <211> 21 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<400> 5 aagaccagcc ucuuugccca g	21
	<210> 6 <211> 19 <212> DNA [0003] <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<400> 6 ggaccaggca gaaaacgag	19
	<210> 7 <211> 17 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<400> 7 cuauccaggau gacgcgg	17

<210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 8
 ugacacaggc aggcugacu u 21

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

[0004]

<400> 9
 ggtgaagaag ggcgtccaa 19

<210> 10
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 10
 gatccgttgg agctgttggc gtagtcaag agactcgcca acagctccaa cttttggaaa 60

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<400> 11	
	aggtaggtgtt aacagcagag	20
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<400> 12	
	aagtagggagc aagcgggtgga g	21
[0005]	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<400> 13	
	aaggagttga aggccgacaa a	21
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<220>	

<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> dT

<400> 14

uauggagcug cagaggaugt t

21

<210> 15

<211> 49

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

[0006]

<400> 15

tttgaatata tgtgctgaga acacagtctt cagcacagat attcttttt

49

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 16

aatgagaaaa gcaaaaagggtg cccgtctctc

29

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 17

aaucaucauc aagaaagggc a

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<220>

<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

[0007]

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> dT

<400> 18

augacuguca ggauguugct t

21

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 19

gaacgaaucc ugaagacauc u

21

<210> 20

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 20

aagcctggct acagcaatat gccgtctc

29

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

[0008]

<220>

<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20).. (21)

<223> dT

<400> 21

ugaccaucac cgaguuuaut t

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

	<400> 22	
	aagtcggacg caacagagaa a	21
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<220>	
	<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)..(21)	
[0009]	<223> dT	
	<400> 23	
	cuaccuuucu acggacgugt t	21
	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸	
	<400> 24	
	ctgcctaagg eggatttgaa t	21
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<220>

<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

<400> 25

ttauuccuuc uucggaagu c

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

[0010]

<400> 26

aaccttcttg aaccgcca c

21

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 27

gagcatcttc gagcaagaa

19

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 28

catgtggcac cgtttgcct

19

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 29

aactaccaga aaggataacc t

21

[0011]

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<220>

<223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

<220>

<221> modified_base

<222> (20)..(21)

<223> dT

<400> 30

ucacaguguc cuuuauquat t

21

<210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<220>
 <223> 组合 DNA/RNA 分子的说明：合成寡核苷酸

<400> 31
 gcaugaaccg gaggcccaut t 21

[0012]

<210> 32
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的说明：合成寡核苷酸

<400> 32
 ccggacagtt ccatgtata 19

<210> 33
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的说明：合成多肽

<400> 33
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

[0013]

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

[0014] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 34

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成多肽

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

[0015]

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

	165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
	195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			
225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	245	250	255
[0016]			
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
	275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325	330	

<210> 35

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成引物

<400> 35

ccgcggtcac atggcaccac ctctcttgcg gcttccacca agggccc

47

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成引物

[0017]

<400> 36

ccggccgtcg cactcattta cccagagaca ggg

33

<210> 37

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成多肽

<400> 37

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

[0021]

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

[0022] <210> 39

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成多肽

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

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

Phe Ala Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成多肽

<400> 40

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

[0024]

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 41

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<220>

<223> N-末端 DOTA

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Lys (HSG)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Lys (HSG)

<220>

<223> C-末端 NH2

<400> 41

Phe Lys Tyr Lys

I

[0025]

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 42

Ala Cys Ser Ser Ser Pro Ser Lys His Cys Gly

1

5

10

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的说明：合成肽

<400> 43

Phe Cys Ile Gly Arg Leu Cys Gly

1 5

[0026]

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 44

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Asn Arg Arg Arg Cys Gly

1 5 10

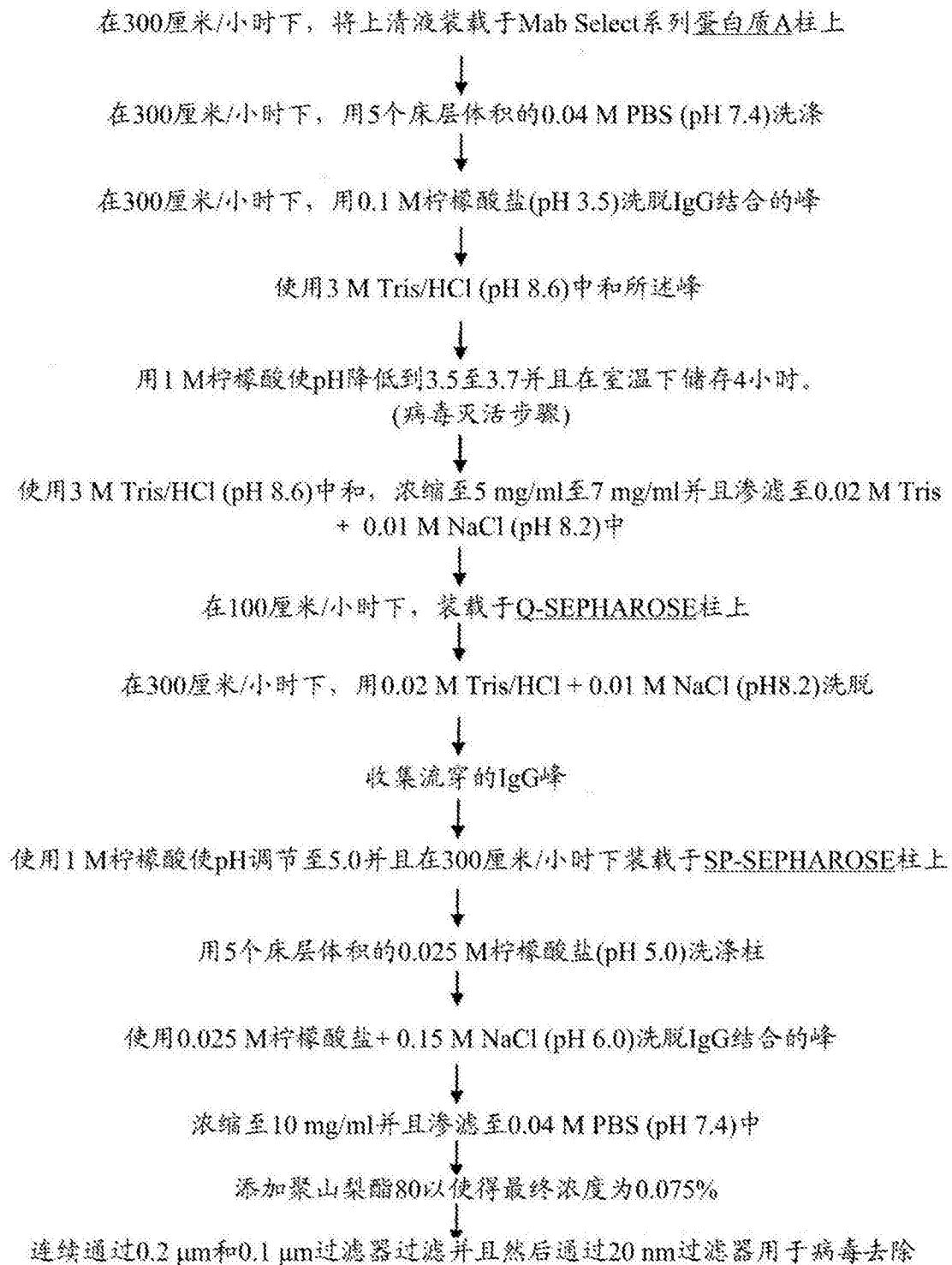


图1

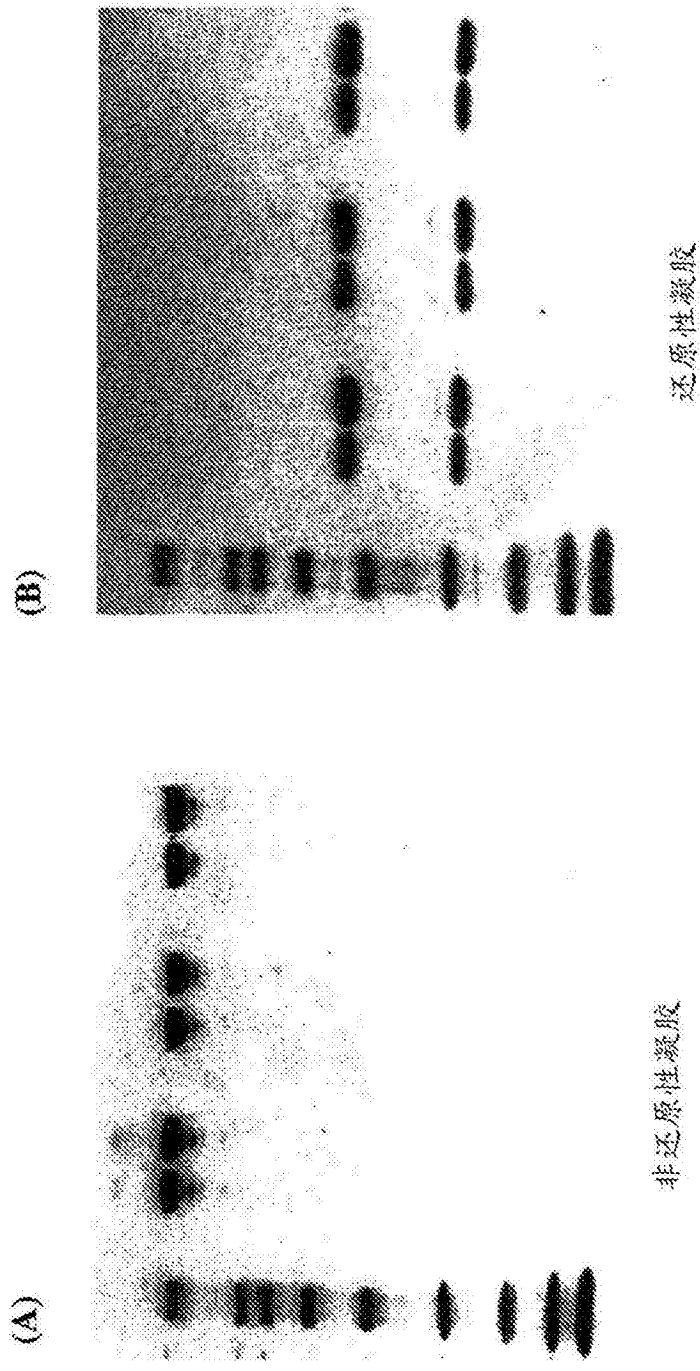


图2

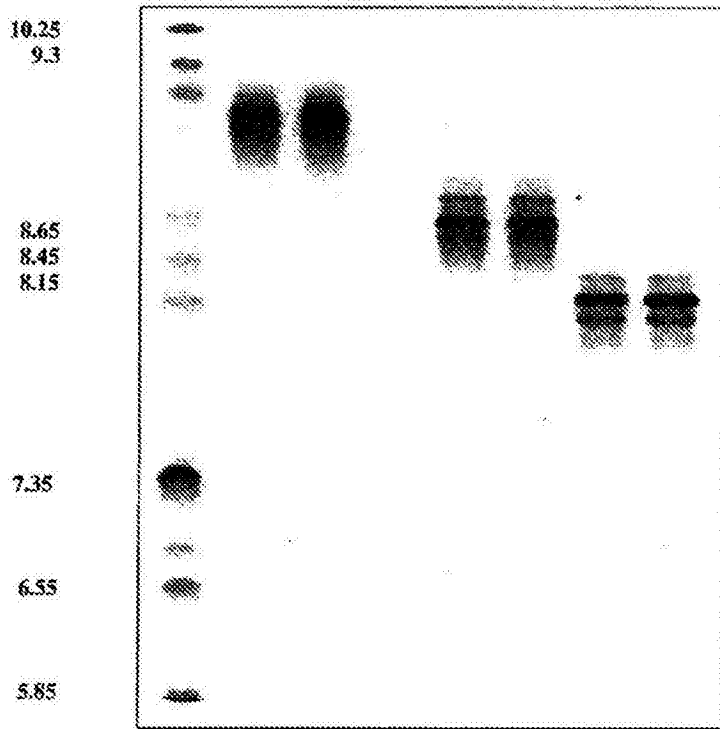
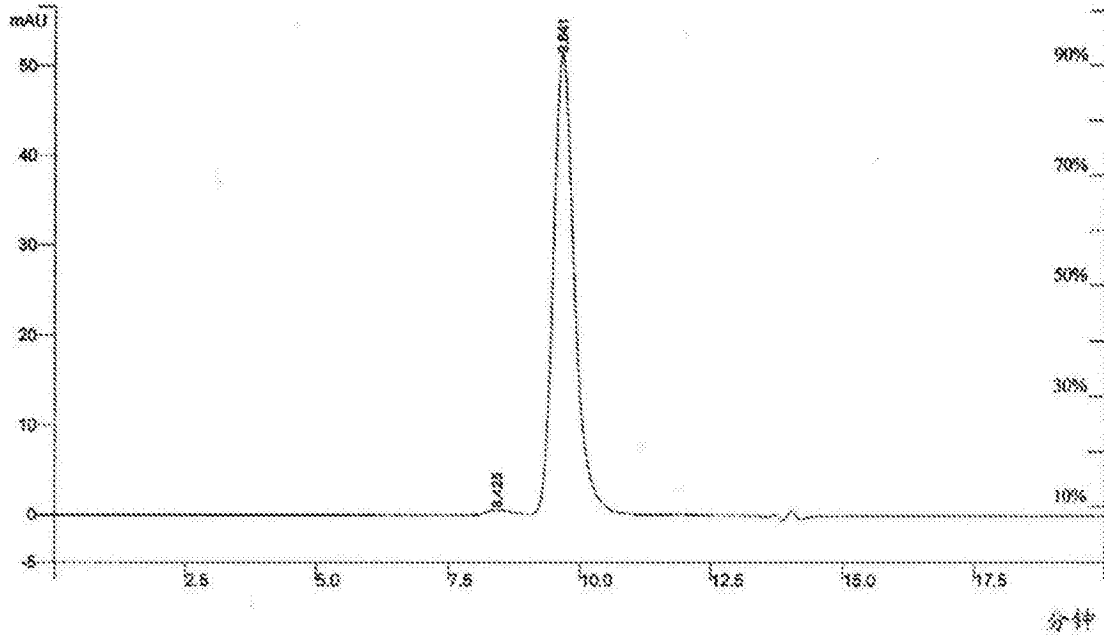


图3

数据文件:	c:\star\data\process dev\041211\hll1 igg	操作员(计算):	LZ
通道:	1 ~ 280 nm结果	计算日期:	04/12/2011 04:45:10
样品ID:	hLL1 IgG H.C. (2nd)	计算次数:	7
操作员(注射):	LZ	计算方法:	c:\star\data\041211\hll1 igg h.c. (2m)
注射日期:	04/12/2011 11:11:58	仪器(计算):	Varian Star #2
注射方法:	c:\star\method\autosampler	运行模式:	分析
运行时间(min):	20.000	峰面积:	峰面积
工作站:	PCKCC31	计算类型:	百分比

注射记录: hLL1 IgG H.C. 021611; 浓缩并且过滤至含PS80的高浓度制剂缓冲液中; 浓度: 213 mg/mL; 用0.04 M PBS (pH 7.4)稀释至1 mg/mL

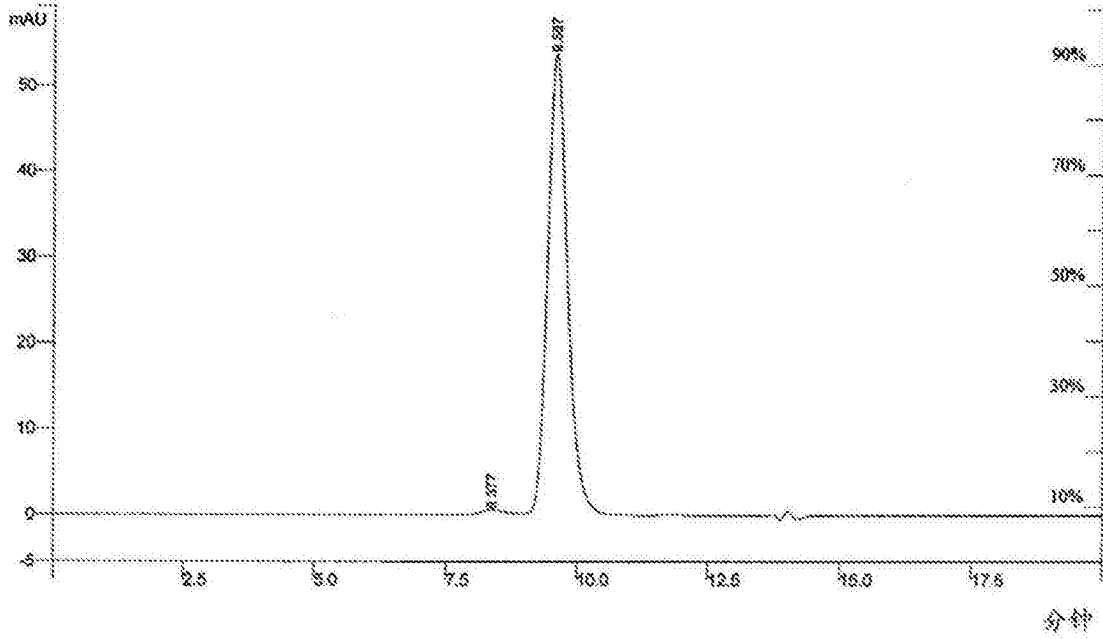


峰号	峰名称	结果()	保留时间(分)	面积(计数)
1		1.4969	8.425	217438
2		98.5031	9.641	14208438
总计		100.0000		14525876

图4

数据文件:	c:\star\data\process dev\041211\ha20 igg	操作员(计算):	LZ
通道:	1=280 nm 结果.....	计算日期:	04/12/2011 04:39:30
样品ID:	ha20 IgG H.C. (10M)	计算次数:	2
操作员(注射):	LZ	计算方法:	c:\star\data\041211\ha20 igg h.c. (10m)
注射日期:	04/12/2011 11:32:50	仪器(计算):	Varian Star #2
注射方法:	c:\star\method\autosampler	运行模式:	分析
运行时间(min):	20.000	峰测量:	峰面积
工作站:	FCKCC31	计算类型:	百分比

注射记录: ha20 IgG H.C. P/N 84001 C/N 0806057; 浓缩并且渗透至无PS 80的高浓度制剂缓冲液中; 浓度: 162 mg/mL; 用0.04 M PBS (pH 7.4)稀释至1 mg/mL.

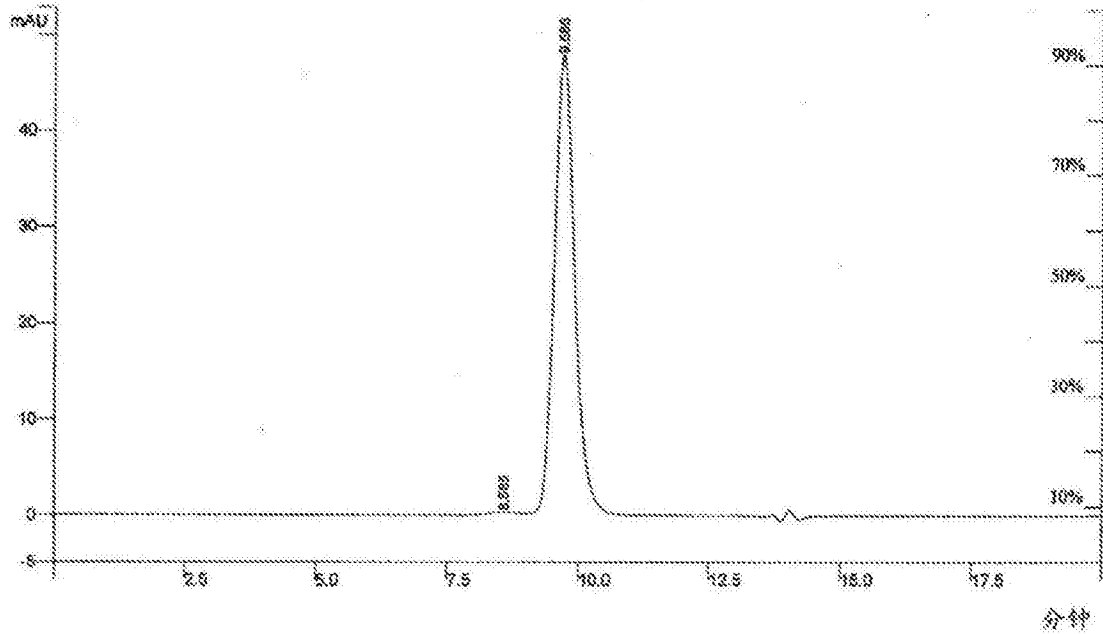


峰号	峰名称	结果()	保留时间 (分)	面积 (计数)
1		1.4112	8.377	203403
2		98.5888	9.587	14209877
总计		100.0000		14413079

图5

数据文件:	c:\star\data\process dev\041211\hL243	操作员(计算):	LZ
通道:	1 = 280 nm 结果	计算日期:	04/12/2011 04:42:26
样品ID:	hL243 IgG H.C.(10M)	计算次数:	2
操作员(注射):	LZ	计算方法:	c:\star\data\041211\hL243 igg h.c.(10m)
注射日期:	04/12/2011 11:33:40	仪器(计算):	Varian Star 43
注射方法:	c:\star\method\autosampler	运行模式:	分析
运行时间(min):	20.000	峰面积:	峰面积
工作站:	PCXCC31	计算类型:	百分比

注射记录: hL243 IgG H.C. 061410; 浓缩并且渗透至无PS 80的高浓度制剂缓冲液中; 浓度: 101 mg/mL; 用0.04 M PBS (pH 7.4)稀释至1 mg/mL.



峰号	峰名称	结果()	保留时间 (分钟)	面积 (计数)
1		0.8752	8.585	114317
2		99.1247	9.636	12946767
总计		99.9999		13061084

图6

V-mab ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGV
 R-mab *****
 V-mab HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEP
 R-mab *******KA*******
 V-mab KSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPTLMISRTPEVTCVVDVDS
 R-mab *****
 V-mab HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 R-mab *****
 V-mab EYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR**EEM**TKNQVSLTC
 R-mab *******D****L*******
 V-mab LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 R-mab *****
 V-mab QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 R-mab *****

图7

hL243-g4p重链

QVQLQQSGSELKKPGASVKVSCKASGFTFTNYGMNWVKQAPGQGLKWMG
 WINTYTREPTYADDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDTAVYFCARDITA
 VVPTGFDYWGGSLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
 EPVTYSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH
 KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSOEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNOV
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
 WOEGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSLSLGK (SEQ ID NO:37)

hL243-g4p重链恒定区

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTYSWNSGALTSQVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
 PPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSOEDPEVQFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
 SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN
 HYTQKSLSLGK (SEQ ID NO:38)

hL243轻链

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYRQKPGKAPKLLVFAASN
 LADGVPSRFRSGSGSDYFTFTISSLPEDIATYYCQHFWTTPWAFGGGTKLQI
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SOESVTEODSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNR
 GEC (SEQ ID NO:39)

hL243轻链恒定区

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGE
 C (SEQ ID NO:40)

图8