



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1860367 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 200480028080.6

(22) 申请日 2004.06.24

(30) 优先权数据

60/490,678 2003.07.29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.03.28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/020069 2004.06.24

(87) PCT申请的公布数据

W02005/017529 EN 2005.02.24

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 莫林·贝雷西尼 宋安

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 巫肖南 封新琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/564 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2003/0068664 A1, 2003.04.10, 第9页右栏第0124-0127段, 第10页左栏第0128-0132段.

US 5736137 A, 1998.04.07, 第23栏第39-67行, 第24栏第1-11行.

US 2002/0102208 A1, 2002.08.01, 第1页右栏0011段, 第2页左栏第0016段.

龚非力. 医学免疫学

第二版. 科学出版社, 2004, 第316-319页.

Takahiro Maeda, Yasuaki Yamada,

Masayuki Tawara et.al.. successful treatment

with a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, Rituximab) for apatient with relapsed mantle cell lymphoma who developed ahuman anti-chimeric antibody..International Journal of Hematology. 74 1. 2001, 74(1), 第71页2.3 血清中人抗 IDEC-C2B8 抗体的定量检测.

J, Boye, T.Elter and A.Engert..An overview of the current clinical use of the anti-CD20monoclonal antibody rituximab.. Annals of Oncology. 14 4. 2003, 14(4), 520-535.

Christian Kneitz, Martin Wilhelm and Hans Peter Tony..Effective B cell depletion with Rituximab in the treatmentofAutoimmune disease..Immunobiology. 206 5. 2002, 206(5), 519-527.

Kaminski Mark S, Tuck Melissa, Fang Yu. Development of HAMA after BexxarTM therapy does notpreclude treatment with rituximab..Blood. 96 11 Part 1. 2000, 96(11 Part 1), 734a.

Leo I. Gordon , Christine A. White and John P. Leonard et al..Zevalin TM radioimmunotherapy is associated with a lowincidence of human-anti mouse antibody (HAMA) andhumananti-Rituxan(R) antibody (HACA) response..Blood. 98 11 Part 2. 2001, 98(11 Part 2), 228b.

审查员 王晓媛

权利要求书 2 页 说明书 38 页

(54) 发明名称

人抗 CD20 抗体的测定法及其用途

(57) 摘要

本发明涉及治疗性抗体诸如 CD20 抗体的中和型抗体的检测法。所述测定法可用于测定免疫疗法中抗体的效力。

1. 评估结合 CD20 的抗体的效力的方法,包括测定来自用 CD20 抗体治疗的患者的生物样品阻断 CD20 抗体的生物活性的能力,其中所述患者患有自身免疫病。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述生物活性选自补体依赖性细胞毒,抗体依赖性细胞介导的细胞毒,凋亡以及细胞生长抑制组成的组。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述生物活性是补体依赖性细胞毒。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述 CD20 抗体是美罗华。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述 CD20 抗体是人源化的 2H7。

6. 权利要求 1 的方法,其中所述生物样品包含来自所述患者的、与 CD20 抗体结合的抗体。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述生物样品已经接受了下述测定,所述测定可确定来自所述患者的生物样品中来自该患者的、与 CD20 抗体结合的抗体的存在。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述生物样品包含来自患者的血清。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述自身免疫疾病选自以下疾病组成的组:类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,韦格纳氏病,炎性肠病,特发性或免疫性血小板减少性紫癜,血栓性血小板减少性紫癜,自身免疫性血小板减少症,多发性硬化,银屑病, IgA 肾病, IgM 多发性神经病,重症肌无力,血管炎,糖尿病,雷诺综合征,干燥综合症,肾小球肾炎和自身免疫性溶血性贫血。

10. 权利要求 3 的方法,其中所述的测定包括在存在 CD20 抗体以及所述生物样品的条件下,将 CD20 阳性细胞暴露于补体,然后测定暴露的细胞的存活力。

11. 检测治疗性抗 CD20 抗体的中和型抗体的方法,包括

在存在所述治疗性抗体以及来自用其治疗的患者的生物样品的条件下,将表达与所述治疗性抗体结合的 CD20 的细胞暴露于补体,其中所述患者患有自身免疫病;和

测定所述治疗性抗体的补体依赖性细胞毒活性,其中 CDC 活性的降低表示中和型抗体在所述生物样品中的存在。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述 CD20 抗体是美罗华。

13. 权利要求 11 的方法,其中所述 CD20 抗体是人源化的 2H7。

14. 权利要求 11 的方法,其中所述自身免疫疾病选自以下疾病组成的组:类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,韦格纳氏病,炎性肠病,特发性或免疫性血小板减少性紫癜,血栓性血小板减少性紫癜,自身免疫性血小板减少症,多发性硬化,银屑病, IgA 肾病, IgM 多发性神经病,重症肌无力,血管炎,糖尿病,雷诺综合征,干燥综合症,肾小球肾炎和自身免疫性溶血性贫血。

15. CD20 抗体在制备评估结合 CD20 的抗体的效力的药用制剂中的用途,其中所述评估包括测定来自用所述 CD20 抗体治疗的患者的生物样品阻断 CD20 抗体的生物活性的能力,其中所述患者患有自身免疫病。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述生物活性选自补体依赖性细胞毒,抗体依赖性细胞介导的细胞毒,凋亡以及细胞生长抑制组成的组。

17. 权利要求 15 的用途,其中所述生物活性是补体依赖性细胞毒。

18. 权利要求 15 的用途,其中所述 CD20 抗体是美罗华。

19. 权利要求 15 的用途,其中所述 CD20 抗体是人源化的 2H7。

20. 权利要求 15 的用途,其中所述生物样品包含来自所述患者的、与 CD20 抗体结合的抗体。

21. 权利要求 20 的用途,其中所述生物样品已经接受了下述测定,所述测定可确定来自所述患者的生物样品中来自该患者的、与 CD20 抗体结合的抗体的存在。

22. 权利要求 15 的用途,其中所述生物样品包含来自患者的血清。

23. 权利要求 15 的用途,其中所述自身免疫疾病选自以下疾病组成的组:类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,韦格纳氏病,炎性肠病,特发性或免疫性血小板减少性紫癜,血栓性血小板减少性紫癜,自身免疫性血小板减少症,多发性硬化,银屑病, IgA 肾病, IgM 多发性神经病,重症肌无力,血管炎,糖尿病,雷诺综合征,干燥综合症,肾小球肾炎和自身免疫性溶血性贫血。

24. 权利要求 17 的用途,其中所述的测定包括在存在 CD20 抗体以及所述生物样品的条件下,将 CD20 阳性细胞暴露于补体,然后测定暴露的细胞的存活力。

25. 结合 CD20 的抗体在制备用于免疫治疗的药用制剂中的用途,其中所述免疫治疗包括:

给药患者所述结合 CD20 的抗体,其中所述患者患有自身免疫病;和

测定来自患者的生物样品阻断 CD20 抗体的生物活性的能力。

26. 权利要求 25 的用途,其中所述 CD20 抗体是美罗华。

27. 权利要求 25 的用途,其中所述 CD20 抗体是人源化的 2H7。

28. 权利要求 25 的用途,其中所述自身免疫疾病选自以下疾病组成的组:类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,韦格纳氏病,炎性肠病,特发性或免疫性血小板减少性紫癜,血栓性血小板减少性紫癜,自身免疫性血小板减少症,多发性硬化,银屑病, IgA 肾病, IgM 多发性神经病,重症肌无力,血管炎,糖尿病,雷诺综合征,干燥综合症,肾小球肾炎和自身免疫性溶血性贫血。

29. 治疗性抗 CD20 抗体在制备检测该抗体的中和抗体的药用制剂中的用途,其中所述检测包括

在存在所述治疗性抗体以及来自用其治疗的患者的生物样品的条件下,将表达与所述治疗性抗体结合的 CD20 的细胞暴露于补体,其中所述患者患有自身免疫病;和

测定所述治疗性抗体的补体依赖性细胞毒活性,其中 CDC 活性的降低表示中和抗体在所述生物样品中的存在。

30. 权利要求 29 的用途,其中所述 CD20 抗体是美罗华。

31. 权利要求 29 的用途,其中所述 CD20 抗体是人源化的 2H7。

32. 权利要求 29 的用途,其中所述自身免疫疾病选自以下疾病组成的组:类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮,韦格纳氏病,炎性肠病,特发性或免疫性血小板减少性紫癜,血栓性血小板减少性紫癜,自身免疫性血小板减少症,多发性硬化,银屑病, IgA 肾病, IgM 多发性神经病,重症肌无力,血管炎,糖尿病,雷诺综合征,干燥综合症,肾小球肾炎和自身免疫性溶血性贫血。

人抗 CD20 抗体的测定法及其用途

[0001] 本非临时申请根据 35USC § 119 要求 2003-7-29 日提交的临时申请 60/490,678 的优先权,其全文包含在本文作为参考。

发明领域

[0002] 本发明涉及用于检测针对抗体或拮抗剂的中和型抗体的测定法,以及所述测定法的用途。

[0003] 发明背景

[0004] 淋巴细胞是骨髓造血过程中产生的多种白细胞的一种。存在两种重要的淋巴细胞群:B 淋巴细胞(B 细胞)和 T 淋巴细胞(T 细胞)。这里对淋巴细胞中的 B 细胞尤其有兴趣。

[0005] B 细胞在骨髓中成熟,离开骨髓时在其细胞表面表达与抗原结合的抗体。当天然 B 细胞首次与其膜结合抗体特异的抗原相遇时,细胞开始迅速分裂,其子代分化成记忆 B 细胞和称为“浆细胞”的效应细胞。记忆 B 细胞寿命很长,并继续表达与其原始亲代细胞具有相同特异性的膜结合抗体。浆细胞不产生膜结合抗体,而代之产生可分泌型的抗体,可分泌的抗体是体液免疫的重要效应分子。

[0006] CD20 抗原(也称为人 B 淋巴细胞限制性分化抗原 Bp35)是前 B 细胞和成熟 B 淋巴细胞上的疏水性跨膜蛋白,分子量大约 35kD(Valentine 等生物学化学杂志 264(19):11282-11287(1989);和 Einfeld 等,欧洲分子生物学组织杂志 7(3):711-717(1988))。该抗原也在大于 90% 的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)上表达(Anderson 等,血液 63(6):1424-1433(1984)),但在造血干细胞,原 B 细胞,正常浆细胞或其它正常组织中未发现(Tedder 等,免疫学杂志 135(2):973-979,1985)。CD20 在细胞周期启动和分化的活化过程早期阶段起调节作用(Tedder 等,同上),并可能发挥钙离子通道的功能。(Tedder 等,细胞生物学杂志 14D:195(1990))

[0007] 由于 CD20 在 B 细胞淋巴瘤中表达,这一抗原可作为用于“靶向”这类淋巴瘤的候选者。实质上,这种靶向可如下归纳:给予患者 B 细胞表面抗原 CD20 的特异性抗体。这些抗 CD20 抗体与正常和恶性 B 细胞(表面的)CD20 抗原特异结合;与表面抗原 CD20 结合的抗体可引起肿瘤性 B 细胞的破坏和耗竭。此外,具有破坏肿瘤潜力的化学制剂或放射活性标记能与抗 CD20 抗体偶联,从而将所述制剂特异性“运送”至肿瘤性 B 细胞。不管用什么方法,一个主要目的是破坏肿瘤;可根据所使用的具体抗 CD20 抗体确定具体方法,因此,靶向 CD20 抗原的现有方法很多。

[0008] CD19 是 B 细胞系细胞表面表达的另一种抗原。象 CD20 一样,发现 CD19 在从干细胞阶段到快要最终分化为浆细胞之前的整个分化过程中均位于细胞上(Nadler, L. 淋巴细胞分型 II2:3-37 和 Appendix, Renling 等,编(1986)Spring Verlag 出版)。然而与 CD20 不同,与 CD19 结合的抗体引起 CD19 抗原的内化。在多种抗体中使用 HD237-CD19 抗体(也称为 B4 抗体)可鉴定 CD19 抗原(Kiesel 等,白血病研究 II, 12:1119(1987))。CD19 抗原存在于 4-8% 的外周血单个核细胞及大于 90% 的分离自外周血,脾脏,淋巴结或扁桃体的 B

细胞。在外周血 T 细胞,单核细胞或粒细胞中未检出 CD19。实际上,所有的非 T 细胞急性淋巴细胞白血病 (ALL), B 细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 和 B 细胞淋巴瘤均表达可被 B4 抗体检测的 CD19 (Nadler 等,免疫学杂志 131 :244(1983) ;和 Nadler 等,血液学进展, Vol. XII pp. 187-206. Brown, E. 编 (1981) Grune & Stratton 公司出版)。

[0009] 由 B 细胞系的细胞所表达的能识别分化阶段特异性抗原的其它抗体已得到鉴定。其中有抗 CD21 抗原的 B2 抗体 ;抗 CD22 抗原的 B3 抗体 ;抗 CD10 抗原的 J5 抗体 (也称为 CALLA)。见 1997 年 1 月 21 日授权的美国专利 5,595,721 号 (Kaminski 等)。

[0010] 美罗华 (RITUXAN®) 抗体是一种遗传工程化鼠 / 人嵌合单克隆抗 CD20 抗体。美罗华在 1998 年 4 月 7 日授权的美国专利 5,736,137 号 (Anderson 等) 中称为“C2B8”的抗体。RITUXAN®被指示用于治疗复发或难治的低级或滤泡性 CD20 阳性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤。在体外对作用机制的研究显示 RITUXAN®与人补体结合,并通过补体依赖性细胞毒作用 (CDC) 裂解淋巴样 B 细胞系 (Reff 等,血液 83 (2) :435-445(1994))。此外,在抗体依赖的细胞性细胞毒作用 (ADCC) 试验中有显著活性。最近,RITUXAN®在氚标胸腺嘧啶掺入实验中显示抗增殖效应并直接诱导凋亡,而其它抗 CD19 和抗 CD20 的抗体则不能 (Maloney 等,血液 88 (10) :637a(1996))。在实验中观察到 RITUXAN®与化疗和毒素有协同作用。尤其是 RITUXAN®使耐药性人 B 细胞淋巴瘤细胞系对阿霉素, CDDP, VP-16, 白喉毒素和蓖麻毒蛋白的细胞毒效应敏感 (Demidem 等,癌症化疗及放射性药物 (Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals) 12 (3) :177-186(1997))。体内临床前研究显示 RITUXIMAB®耗竭来源于猕猴 (cynomolgus) 外周血,淋巴结和骨髓的 B 细胞,推测是通过补体和细胞介导的过程 (Reff 等,血液 83 (2) :435-445(1994))。

[0011] 涉及 CD20 抗体的专利以及专利出版物包括:美国专利 5,776,456, 5,736,137, 6,399,061, 和 5,843,439, 以及美国专利申请 US 2002/0197255A1 和 US 2003/0021781A1 (Anderson et al.); 美国专利 6,455,043B1 和 W000/09160 (Grillo-Lopez, A.); W000/27428 (Grillo-Lopez and White); W000/27433 (Grillo-Lopez and Leonard); W000/44788 (Braslawsky et al.); W001/10462 (Rastetter, W); W001/10461 (Rastetter and White); W001/10460 (White and Grillo-Lopez); 美国专利申请 US2002/0006404 和 W002/04021 (Hanna and Hariharan); 美国专利申请 US2002/0012665 A1 和 W001/74388 (Hanna, N.); 美国专利申请 US2002/0009444A1, 和 W001/80884 (Grillo-Lopez, A.); W001/97858 (White, C.); 美国专利申请 US2002/0128488A1 和 W002/34790 (Reff, M.); W002/060955 (Braslawsky et al.); W02/096948 (Braslawsky et al.); W002/079255 (Reff and Davies); 美国专利 6,171,586B1, 和 W098/56418 (Lam et al); W098/58964 (Raju, S.); W099/22764 (Raju, S.); W099/51642, 美国专利 6,194,551B1, 美国专利 6,242,195B1, 美国专利 6,528,624B1 和 美国专利 6,538,124 (Idusogie et al.); W000/42072 (Presta, L.); W000/67796 (Curd et al.); W001/03734 (Grillo-Lopez et al.); 美国专利申请 US 2002/0004587A1 和 W001/77342 (Miller and Presta); 美国专利申请 US2002/0197256 (Grewal, I.); 美国专利 6,090,365B1, 6,287,537B1, 6,015,542, 5,843,398, 和 5,595,721, (Kaminski et al.); 美国专利 5,500,362, 5,677,180, 5,721,108, 和 6,120,767 (Robinson et al.); 美国专利 6,410,391B1 (Raubitschek et al.); 美国专利 6,224,866B1

和 W000/20864 (Barbera-Guillem, E.) ;W001/13945 (Barbera-Guillem, E.) ; W000/67795 (Goldenberg) ;W000/74718 (Goldenberg and Hansen) ;W000/76542 (Golay et al.) ;W001/72333 (Wolin and Rosenblatt) ;美国专利 6,368,596B1 (Ghetie et al.) ;美国专利申请 US2002/0041847A1, (Goldenberg, D.) ;美国专利申请 US2003/0026801A1 (Weiner and Hartmann) ;W002/102312 (Engleman, E.), 每篇文献均包含在本文作为参考。也参见, 美国专利 5,849,898 和 EP 申请 330,191 (Seed et al.) ;美国专利 4,861,579 和 EP332,865A2 (Meyer and Weiss) ;和 W095/03770 (Bhat et al.)。

[0012] 涉及美罗华的公开出版物包括: Perotta and Abuel “Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to Rituximab” Abstract # 3360 Blood 10(1) (part 1-2) :p.88B (1998) ; Stashi et al. “Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura” Blood 98(4) :952-957 (2001) ; Matthews, R. “Medical Heretics” New Scientist (7 April, 2001) ; Leandro et al. “Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion” Ann Rheum Dis 61 :833-888 (2002) ; Leandro et al. “Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response. Arthritis and Rheumatism 44(9) :S370 (2001) ; Leandro et al. “An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus”, Arthritis & Rheumatism 46(1) :2673-2677 (2002) ; Edwards and Cambridge “Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes” Rheumatology 40 :205-211 (2001) ; Edwards et al. “B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders” Biochem. Soc. Trans. 30(4) :824-828 (2002) ; Edwards et al. “Efficacy and safety of Rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism 46(9) :S197 (2002) ; Levine and Pestronk “IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab” Neurology 52 :1701-1704 (1999) ; DeVita et al. “Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis” Arthritis & Rheum 46 :2029-2033 (2002) ; Hidashida et al. “Treatment of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab.” Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology ; Oct 24-29 ; New Orleans, LA 2002 ; Tuscano, J. “Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab” Presented at the Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology ; Oct 24-29 ; New Orleans, LA 2002。

[0013] 美国专利申请 2003/0068664 (Albitar et al.) 描述了 ELISA 测定法, 用于测定针对美罗华的人抗嵌合抗体 (HACA)。

发明内容

[0014] 本发明的实施例 1 描述了对于补体依赖性细胞毒 (CDC) 试验的开发,其用于检测针对结合 B 细胞表面标记即 CD20 抗原的中和型抗体。所述 CDC 活性通过将 CD20 阳性细胞与人补体在缺乏或存在不同浓度的 CD20 抗体的条件下进行测定。细胞毒通过定量存活细胞测定。检测对试验效果的血清基质效应。血清可达 40% 而不产生明显的 EC50 值改变。具有抗体反应 (HACA) 的 CD20 抗体治疗的系统性红斑狼疮 (SLE) 患者血清样品随后得以检测。CD20 抗体的 CDC 活性可被 HACA 血清完全或部分阻断,表明被处理的样品中的中和活性。相比而言,在 CD20 抗体处理以前获得的血清样品没有显示中和活性。该测定法的特征在于任何抗药物抗体反应的性质;因此其对于评估药物安全性和有效性是有价值的。

[0015] 因此,本发明提供了用于评估结合 CD20 的抗体的效力的方法,包括测定获自用 CD20 抗体处理患者的生物样品阻断 CD20 抗体的生物活性的能力。

[0016] 本发明还提供了免疫治疗的方法,包括将结合 CD20 的抗体给药患者;并测定来自患者的生物样品阻断 CD20 抗体的生物活性的能力。

[0017] 另一方面,本发明涉及检测针对治疗性抗体的中和型抗体的方法,包括将表达表达结合治疗性抗体的抗原的细胞暴露于补体,所述暴露的条件是存在治疗性抗体以及来自用该抗体治疗的患者的生物样品;和测定所述治疗性抗体的补体依赖性细胞毒 (CDC) 活性,其中 CDC 活性的降低表明所述生物样品中存在中和型抗体。

[0018] 此外,提供评估结合 B 细胞表面标记的拮抗剂的效力的方法,包括检测来自用所述拮抗剂处理的患者的生物样品阻断所述拮抗剂的生物活性的能力。

[0019] 在另一实施方案中,本发明涉及免疫治疗方法,包括

[0020] 将结合 B 细胞表面标记的抗体给予患者;和测定患者的生物样品阻断抗体的生物活性的能力。

[0021] 优选实施方案详述

[0022] I. 定义

[0023] 除非另有说明,本发明的“生物样品”指获自本发明所述患者的样品。所述样品可包括结合用于治疗患者的抗体和药物的抗体,诸如人抗鼠抗体 (HAMA),人抗嵌合抗体 (HACA) 和人抗人抗体 (HAHA)。生物样品可为例如血清,收获自患者的抗体,血浆,细胞裂解物,乳汁,唾液和其它分泌物,但优选血清。

[0024] 术语“生物活性”指本文所述抗体或拮抗剂的可测定的功能。涉及各种活性并且包括,但不限于,补体依赖性细胞毒 (CDC),抗体依赖性细胞介导的细胞毒 (ADCC),凋亡,抑制细胞 (例如肿瘤细胞) 生长,等。

[0025] 生物样品 (或患者针对目的药物产生的抗体) “阻断”拮抗剂或抗体的生物活性的能力指部分以及完全阻断所述活性。

[0026] 本文中“B 细胞表面标志”是一种表达于 B 细胞表面的抗原,可作为与之结合的拮抗剂或抗体的靶。B 细胞表面标志有 CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 和 CD86 白细胞表面标志。有特别兴趣的 B 细胞表面标志是优先表达在 B 细胞表面而不是其它非 B 细胞组织表面,并且在前 B 细胞和成熟 B 细胞上都可表达的一种标志。在一个具体实施方案中,所述标志,如 CD19 或 CD20,是在 B 细胞系由干细胞阶段到最终分化

至浆细胞之前的整个阶段在 B 细胞上发现的一种标志。这里优先的 B 细胞表面标志是 CD20。

[0027] “CD20”抗原是在 90% 以上来自外周血或淋巴器官的 B 细胞表面发现的一种~35kDa 的非糖基化磷蛋白。CD20 在早期前 B 细胞发育阶段表达,并保持到浆细胞分化。CD20 在正常 B 细胞和恶性 B 细胞上均可发现。文献中 CD20 亦称为“B 淋巴细胞限制性抗原”或“Bp35”。例如 CD20 抗原在 Clark 等,PNAS(USA)82:1766(1985)中被描述。

[0028] 本文术语“B 细胞消耗”指药物或抗体治疗后动物或人中 B 细胞水平与治疗前的水平相比而言降低。B 细胞水平可利用已知的技术测定,诸如 Reffet al., Blood 83:435-445(1994),或美国专利 5,736,137(Anderson et al.)中所述的技术。例如,哺乳动物(例如正常灵长类)可利用各种剂量的抗体或拮抗剂治疗,并可测定外周 B 细胞浓度,例如通过计数 B 细胞的 FACS 方法。

[0029] “B 细胞恶性疾病”是涉及 B 细胞的恶性疾病。实例包括霍奇金病(Hodgkin's disease),包括淋巴细胞优势型霍奇金病(lymphocytepredominant Hodgkin's disease)(LPHD);非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)(NHL);滤泡中心细胞淋巴瘤(follicular center cell(FCC)lymphoma);急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia(ALL));慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia(CLL));毛细胞白血病(hairy cell leukemia);浆细胞样淋巴细胞淋巴瘤(plasmacytoid lymphocytic lymphoma);套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma);AIDS 和 HIV-相关的淋巴瘤;多发性骨髓瘤(multiple myeloma);中枢神经系统淋巴瘤(central nervous system(CNS)lymphoma);移植后淋巴增生性疾病(post-transplant lymphoproliferative disorder)(PTLD);Waldenstrom's 巨球蛋白血症(macroglobulinemia)(淋巴浆细胞性淋巴瘤(lymphoplasmacytic lymphoma));粘膜相关的淋巴样组织淋巴瘤(mucosa-associated lymphoid tissue(MALT)lymphoma);以及边缘区淋巴瘤/白血病(marginal zone lymphoma/leukemia)。

[0030] 非霍奇金淋巴瘤(NHL)包括,但不限于低级/滤泡(low grade/follicular NHL),复发型和难治性(relapsed or refractory)NHL,前线低级(front line low grade)NHL,III/IV 期 NHL,化疗抗性(chemotherapy resistant)NHL,小淋巴细胞性(small lymphocytic)(SL)NHL,中间级/滤泡(intermediate grade/follicular)NHL,中间级弥漫型(intermediate grade diffuse)NHL,弥漫型大细胞淋巴瘤(diffuse large cell lymphoma),进展性(aggressive)NHL(包括进展性前线 NHL 和进展性复发型 NHL),自体干细胞移植后的 NHL 复发或自体干细胞移植难治性 NHL(relapsing after or refractory to autologous stem cell transplantation),高级免疫母细胞性(high grade immunoblastic)NHL,高级淋巴母细胞性(high grade lymphoblastic)NHL,高级小非凹陷的细胞(high grade small non-cleaved cell)NHL,bulky 病 NHL 等。

[0031] “自身免疫病”在本文中是指因个体的自身组织引起并且针对自身组织的疾病。自身免疫病的实例包括但不限于,关节炎(arthritis)(类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis),幼年类风湿性关节炎(juvenile rheumatoid arthritis),骨关节炎(osteoarthritis),银屑病关节炎(psoriatic arthritis),银屑病(psoriasis),皮炎(dermatitis),多肌炎(polymyositis)/皮肌炎(dermatomyositis),中毒性表皮坏死松解症(toxic epidermal necrolysis),系统性硬皮病和系统性硬化(systemic scleroderma)

and sclerosis),与炎性肠疾病有关的反应 (responses associated with inflammatory bowel disease),克隆氏病 (Crohn's disease),溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis),呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome),成人呼吸窘迫综合征 (adult respiratory distress syndrome, ARDS),脑膜炎 (meningitis),脑炎 (encephalitis),葡萄膜炎 (uveitis),结肠炎 (colitis),肾小球肾炎 (glomerulonephritis),变态反应疾病 (allergic conditions),湿疹 (eczema),哮喘 (asthma),与T细胞浸润和慢性炎症性应答有关的情况 (conditions involving infiltration of T cells and chronic inflammatory responses),动脉粥样硬化 (atherosclerosis),自身免疫性心肌炎 (autoimmune myocarditis),白细胞粘附缺陷 (leukocyte adhesion deficiency),系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE),幼年型糖尿病 (juvenile onset diabetes),多发性硬化 (multiple sclerosis),变应性脑脊髓炎 (allergic encephalomyelitis),与细胞因子和T细胞介导的急性和迟发性超敏反应相伴的免疫应答 (immune responses associated with acute and delayed hypersensitivity mediated by cytokines and T-lymphocytes),结核 (tuberculosis),结节病 (sarcoidosis),肉芽肿病 (granulomatosis) 包括韦格纳肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis),粒细胞缺乏 (agranulocytosis),脉管炎 (vasculitis) (包括 ANCA),再生障碍性贫血 (aplastic anemia),戴-布贫血 (Diamond Blackfan anemia),免疫溶血性贫血 (immune hemolytic anemia) 包括自身免疫溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia, AIHA),恶性贫血 (pernicious anemia),纯红细胞再生障碍 (pure red cell aplasia, PRCA),因子 VIII 缺陷 (Factor VIII deficiency),血友病 A (hemophilia A),自身免疫性中性粒细胞减少症 (autoimmune neutropenia),全血细胞减少症 (pancytopenia),白细胞减少 (leucopenia),与白细胞渗出有关的疾病 (diseases involving leukocyte diapedesis),中枢神经系统 (CNS) 炎症性疾病,多器官损伤综合征 (multiple organ injury syndrome),重症肌无力 (myasthenia gravis),抗原-抗体复合物介导的疾病,抗-肾小球基底膜疾病 (抗-glomerular basement membrane disease),抗磷脂抗体综合征 (anti-phospholipid antibody syndrome),变态反应性神经炎 (allergic neuritis),白塞疾病, Castleman 综合征, Goodpasture 综合征,兰-伊肌无力综合征 (Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome),雷诺综合征,干燥综合征 (Sjogren's syndrome),斯-约综合征 (Stevens-Johnson syndrome),实体器官移植排斥 (solid organ transplant rejection),移植物抗宿主疾病 (graft versus host disease, GVHD),天疱疮样大疱 (pemphigoid bullous),天疱疮 (pemphigus),自身免疫性多内分泌腺病 (autoimmune polyendocrinopathies),赖特尔病 (Reiter's disease),僵人综合征 (stiff-man syndrome),巨细胞动脉炎 (giant cell arteritis),免疫复合物肾炎 (immune complex nephritis),IgA 肾病 (nephropathy),IgM 多发性神经病 (polyneuropathies) 或 IgM 介导的神经病,特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP),包括氟达拉滨相关的 ITP,血栓性血小板减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP),自身免疫性血小板减少 (autoimmune thrombocytopenia),睾丸和卵巢的自身免疫病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎 (including autoimmune orchitis and oophoritis),原发性甲状腺功能减退 (primary hypothyroidism);自身免疫性内分泌病包括自身免疫性甲状腺

炎 (autoimmune thyroiditis), 慢性甲状腺炎 (chronic thyroiditis) (桥本甲状腺炎 (Hashimoto's Thyroiditis)), 亚急性淋巴细胞性甲状腺炎 (subacute thyroiditis), 特发性甲状腺功能减退 (idiopathic hypothyroidism), 艾迪生病 (Addison's disease), 格雷夫斯病 (Grave's disease), 自身免疫性多腺体综合征 (autoimmune polyglandular syndromes) 或多腺体内分泌病综合征 (polyglandular endocrinopathy syndromes), I 型糖尿病也称胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM) 和希恩综合征 (Sheehan's syndrome); 自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis), 淋巴样间质性肺炎 (lymphoid interstitial pneumonitis) (HIV), 闭塞性细支气管炎 (bronchiolitis obliterans) (非-移植型 (non-transplant)) 相对于 NSIP, 吉-巴综合征 (Guillain-Barre's syndrome), 大血管血管炎 (large vessel vasculitis) (包括风湿性多肌痛 (polymyalgia rheumatica) 和巨细胞 (Takayasu's) 动脉炎), 中血管血管炎 (medium vessel vasculitis) (包括川崎病 (Kawasaki's disease) 和结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa)), 强直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis), 贝格尔病 (Berger's disease) (IgA 肾病), 急进性肾小球肾炎 (rapidly progressive glomerulonephritis), 原发性胆汁性肝硬化 (primary biliary cirrhosis), 乳糜泻 (Celiac sprue) (麸质性肠病 (gluten enteropathy)), 冷球蛋白血症 (cryoglobulinemia), 肌萎缩性脊髓侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 冠状动脉病 (coronary artery disease) 等。

[0032] “拮抗剂”是通过与 B 细胞表面标志结合能破坏或耗竭哺乳动物中的 B 细胞和 / 或例如通过减少或阻止 B 细胞所激发的体液应答而干扰 B 细胞的一或多种功能的分子。拮抗剂优选能耗竭所治疗的哺乳动物中的 B 细胞。这种耗竭可通过多种机制获得, 如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC) 和 / 或补体依赖性细胞毒作用 (CDC), 对 B 细胞增殖的抑制和 / 或对 B 细胞死亡的诱导 (即通过凋亡)。本发明的拮抗剂包括与 B 细胞标志结合的抗体、合成序列肽或天然序列肽, 免疫粘附素以及小分子拮抗剂, 可任选偶联或融合于一种细胞毒制剂。优选拮抗剂包含抗体。

[0033] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用”和“ADCC”指一种细胞介导的反应, 其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒细胞 (如自然杀伤 (NK) 细胞, 中性粒细胞, 和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体, 并随后引起靶细胞的裂解。介导 ADCC 的主要细胞即 NK 细胞仅表达 Fc γ R III, 而单核细胞表达 Fc γ R I, Fc γ R II 和 Fc γ R III。Raveth 和 Kinet 在免疫学年鉴 9:457-92 (1991), 464 页的表 3 中总结了造血细胞上的 FcR 表达。为评估目的分子的 ADCC 活性, 可进行体外 ADCC 试验, 如美国专利 5,500,362 号或 5,821,337 号中所述。这类试验中有用的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。选择性地, 或附加地, 目的分子的 ADCC 活性可在体内评估, 例如采用 Clynes 等 PNAS (USA) 95:652-656 (1998) 中公开的动物模型。

[0034] “人效应细胞”是表达一种或多种 FcR 并执行效应物的功能的白细胞。优选所述细胞表达至少 Fc γ R III 并执行 ADCC 效应物的功能。例如可介导 ADCC 的人白细胞包括人外周血单个核细胞 (PBMC), 自然杀伤 (NK) 细胞, 单核细胞, 细胞毒 T 细胞和中性粒细胞; 其中优选 PBMC 和 NK 细胞。

[0035] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是人 FcR 的天然序列。而且, 优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合的受体 (γ 受体), 其包括 Fc γ R I, Fc γ R

II 和 Fc γ R III 亚型,以及这些受体的等位基因变体以及可替换的剪接形式。Fc γ R II 受体包括 Fc γ R IIA(“活化型受体”)和 Fc γ R IIB(“抑制型受体”),二者的氨基酸序列相似,主要区别在其胞浆结构域。活化型受体 Fc γ R IIA 在其胞浆结构域包含一个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制型受体 Fc γ R IIB 在其胞浆结构域包含一个基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(见 Daeron,免疫学年鉴 15:203-234(1997))。在 Ravetch 和 Kinet,免疫学年鉴 9:457-92(1991);Capel 等,免疫方法(免疫学方法)4:25-34(1994);和 de Haas 等,实验室及临床医学杂志(J. Lab. Clin. Med.)126:330-41(1995)中对 FcR 进行了综述。其它 FcR,包括将来被确定的,均被包含在术语“FcR”中。该术语也包括新生受体, FcRn,其负责将母体的 IgG 转运至胎儿(Guyer 等,免疫学杂志 117:587(1976)和 Kim 等,免疫学杂志 24:249(1994))。本文的 FcR 包括多态性,诸如编码 Fc γ R IIIa 的基因中的遗传二态性,导致位于氨基酸位置 158 的苯丙氨酸或缬氨酸,其位于结合 IgG1 的受体的区域中。相对于纯合苯丙氨酸 Fc γ R IIIa(Fc γ R IIIa-158F)或杂合(Fc γ R IIIa-158F/V)受体,纯合缬氨酸 Fc γ R IIIa(Fc γ R IIIa-158V)已经对人 IgG1 显示了较高亲和性并介导增加的体外 ADCC。

[0036] “补体依赖性细胞毒作用”或“CDC”是指在补体存在时分子裂解靶细胞的能力。补体活化途径由补体系统第一个成分(C1q)结合至一个与同源抗原形成复合物的分子(如抗体)来启动。为评价补体活化,可如 Gazzano-Santoro 等,免疫学方法杂志 202:163(1996)所述进行 CDC 试验。

[0037] “生长抑制”拮抗剂是指那些阻止或减少可与拮抗剂结合之抗原的表达细胞增殖的拮抗剂。例如拮抗剂可在体内或体外阻止或减少 B 细胞的增殖。

[0038] “诱导凋亡”的拮抗剂或抗体是指那些可诱导例如, B 细胞程序性细胞死亡的拮抗剂,所述凋亡可通过标准凋亡试验,如 annexin V 的结合, DNA 片段化,细胞皱缩,内织网膨胀,细胞碎裂,和/或膜泡(称为凋亡小体)形成确定。

[0039] 这里的术语“抗体”用其最广泛的意义,尤其包含完整的单克隆抗体,多克隆抗体,由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体),以及能显示所需生物学活性的任何抗体片段。

[0040] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,优选包括抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab, Fab', F(ab')₂, 和 Fv 片段;二价抗体;线性化抗体;单链抗体分子;和由抗体片段构成的多特异性抗体。

[0041] “天然抗体”通常是约 150,000 道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)构成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,免疫球蛋白不同种型的重链中二硫键数目不同。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。每个重链在其一个端有可变区(V_H),紧接着多个恒定区。每个轻链端有变区(V_L),而另一端有恒定区;轻链恒定结构域与重链第一恒定结构域并列,轻链的可变区与重链的可变区并列。认为轻链和重链的可变区有特定氨基酸形成一个界面。

[0042] 术语“可变的”是指不同抗体的可变区特定部分序列差异很大,且这些部分在每种抗体与其特定抗原的结合和特异性中都有用。然而在抗体整个可变区中可变性的分布并不均等。它集中在轻链和重链可变区的三个被称为高变区的节段中。可变区的更高度保守部分被称为框架区(FR)。天然轻链和重链的可变区分别包含四个 FR,它们大多采用 β 片层

构象,通过三个高变区相连,这些高变区与 β 片层结构形成环状,有时形成部分环状。每条链的高变区通过 FR 连接至十分接近,并与其他链的高变区共同形成抗体的抗原结合位点(见 Kabat 等,具有免疫学意义的蛋白的序列,第 5 版,PublicHealth Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恒定区不直接参与抗体对抗原的结合,但显示多种效应功能,如使抗体参与抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。

[0043] 抗体经木瓜蛋白酶消化产生两个相同的称为“Fab”的抗原结合片段和一个残余“Fc”片段,每个 Fab 片段具有单个抗原结合位点,Fc 的名称反映了其容易形成结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段,它有两个抗原结合位点并仍能与抗原交叉结合。

[0044] “Fv”是最小抗体片段,包含一个完整的抗原识别和抗原结合位点。这个区域是由一条重链和一个轻链可变区紧密、非共价结合成的二聚体。在 V_H - V_L 二聚体表面,每个可变区的三个高变区在构型上相互作用,从而限定抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特性。但即使单个可变区(或 Fv 中仅包含三个抗原特异性高变区的那一半)也能识别并结合抗原,只是比完整结合位点的亲和力低。

[0045] Fab 片段还包含轻链恒定区和重链的第一恒定区 (CH1)。Fab' 不同于 Fab 片段之处在于,其重链 CH1 结构域的羧基端添加了数个残基,其中包括来自抗体铰链区的一或多个半胱氨酸。本文中 Fab'-SH 指一种 Fab',其中恒定区的半胱氨酸残基有至少一个游离巯基。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为 Fab' 片段对且它们之间有铰链区半胱氨酸的形式产生的。抗体片段的其它化学连接也是已知的。

[0046] 脊椎动物任何物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可以是两种完全不同的型(κ 和 λ)之一,型别区分的依据是其恒定区氨基酸序列。

[0047] 抗体依据其重链恒定区氨基酸序列分为不同的类。完整抗体有五大类:IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM,其中几种能进一步分为亚型(同种型),例如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 和 IgA2。对应于不同类抗体的重链恒定区结构域分别被称为 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。免疫球蛋白不同类的亚单位和三维构型是已知的。

[0048] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的 V_H 和 V_L 结构域,这些结构域存在于单个多肽链上。优选 Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含一个多肽接头,它能使 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述见 Pluckthun 在《单克隆抗体的药理学》,第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页 (1994)。

[0049] 术语“二价抗体 (diabodies)”是指具有两个抗原结合位点的小分子抗体片段,这些片段在一条多肽链 (V_H - V_L) 上含有相连的一个重链可变区 (V_H) 和一个轻链可变区 (V_L)。利用一种非常短的接头,其使得同一条链上的两个结构域无法配对,不得不与另一条链上的互补结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。在 EP 404,097 ;W093/11161 ;和 Hollinger 等,美国国家科学院学报,90 :6444-6448(1993) 中有对二价抗体的更详细描述。

[0050] 本文中术语“单克隆抗体”指从实质上均一的抗体群获得的抗体,即包含该群体的单个抗体除了可能自然发生的很少量突变以外都相同。单克隆抗体均以高度特异性直接针对单个抗原位点。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的传统(多克隆)抗体制剂相比,每种单克隆抗体直接针对抗原上的单个决定簇。单克隆抗体除了具有特异性,其优势还在于,它们是通过杂交瘤培养而合成的,无其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆的”指抗体获自实质上均一的抗体群的特征,不应理解为限定由任何具体方法产

生抗体。例如根据本发明使用的单克隆抗体可以用由 Kohler 等, 自然, 256 : 495 (1975) 首次描述的杂交瘤方法来制备, 或用重组 DNA 法 (如美国专利 4, 816, 567) 来制备。“单克隆抗体”还可以是用 Clackson 等, 自然, 352 : 624-628 (1991) 和 Marks 等, 分子生物学杂志, 222 : 581-597 (1991) 所述技术从噬菌体抗体库中分离得到。

[0051] 本文中单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体 (免疫球蛋白), 只要它们展示所需生物学活性, 其中所述嵌合抗体中重链和 / 或轻链的一部分等同于或同源于来自特定物种的抗体或属于特定抗体类或亚类的抗体的相应序列, 链的其余部分等同于或同源于来自其它物种的抗体或属于另一抗体类或亚类的抗体的相应序列 (见美国专利 4, 816, 567 ; Morrison 等, 美国国家科学院学报, 81 : 6851-6855 (1984))。本文的目标嵌合抗体包括“灵长类化 (primatized)”抗体, 其包含源于非人灵长类可变区的抗原结合序列 (如 Old World Monkey, 如狒狒, 猕猴 (rhesus) 或恒河猴 (cynomolgus monkey)) 和人的恒定区序列 (美国专利 5, 693, 780)。

[0052] “人源化”形式的非人 (如鼠) 抗体是包含源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在多数情况下, 人源化抗体是下述人免疫球蛋白 (接收 (recipient) 抗体), 其中受者的高变区残基被非人物种如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类 (供者 (donor) 抗体) 的具有所需特异性、亲和力和能力 (capacity) 的高变区的残基取代。在一些例子中, 人免疫球蛋白框架区 (FR) 残基被相应的非人残基取代。而且人源化抗体可包含未在受者抗体或供者抗体中发现的残基。这些修饰旨在进一步细化抗体的功能。一般情况下, 人源化抗体基本上包含至少一个、通常两个可变区的全部, 其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的那些, 所有或基本上所有 FR 是人的免疫球蛋白序列中的那些。人源化抗体任选还包含免疫球蛋白恒定区 (Fc)、通常为免疫球蛋白的至少一部分。详见 Jones 等, 自然 321 : 522-525 (1986) ; Riechmann 等, 自然 332 : 323-329 (1988) ; 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593-596 (1992)。

[0053] 本文中术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区含有“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如轻链可变区的残基 24-34 (L1), 50-56 (L2) 和 89-97 (L3), 重链可变区的残基 31-35 (H1), 50-65 (H2) 和 95-102 (H3) ; Kabat 等, 具有免疫学意义的蛋白的序列, 第 5 版, PublicHealth Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)), 和 / 或“高变环”的残基 (例如轻链可变区的残基 26-32 (L1), 50-52 (L2) 和 91-96 (L3), 重链可变区的残基 26-32 (H1), 53-55 (H2) 和 96-101 (H3) ; Chothia 和 Lesk, 分子生物学杂志 196 : 901-917 (1987))。“框架区”或“FR”残基是除本文所定义的高变区残基以外的可变区残基。

[0054] “结合”目的抗原如 B 细胞表面标志或 CD20 的拮抗剂或抗体是下述拮抗剂, 其能以足够的亲和力结合该抗原因而其可作为靶向表达该抗原的细胞的治疗剂。

[0055] 为本发明的目的, “免疫治疗”指用抗体治疗动物 (优选人类患者) 的方法, 其中所述抗体可为偶联的或“裸露的”抗体, 或所述抗体可偶联或融合于异源分子或试剂, 诸如一或多种细胞毒剂, 由此产生“免疫偶联物”。

[0056] 本文“治疗性抗体”是可有效治疗患有或易患某种疾病或病症中的所述疾病或病症的抗体。示例性治疗性抗体包括抗 -HER2 抗体, 包括 rhuMAb4D5 (HERCEPTIN®) (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 4285-4289 (1992), 美国专利 5, 725, 856) ;

抗-CD20 抗体(见下文);抗-IL-8(St John et al., Chest, 103:932(1993), 以及国际公开 W0 95/23865);抗-VEGF 抗体,包括人源化的和/或亲和力成熟的抗-VEGF 抗体,诸如人源化的抗-VEGF 抗体 huA4.6.1 AVASTIN™(Kim et al., Growth Factors, 7:53-64(1992), 国际公开 W0 96/30046, 和 W0 98/45331, 公开于 1998-10-15);抗-PSCA 抗体(W001/40309);抗-CD40 抗体,包括 S2C6 及其人源化变体(W000/75348);抗-CD11a 抗体包括 Raptiva™(美国专利 5,622,700, W0 98/23761, Steppe et al., Transplant Intl. 4:3-7(1991), 和 Hourmant et al., Transplantation 58:377-380(1994));抗-IgE 抗体(Presta et al., J. Immunol. 151:2623-2632(1993), 和国际公开 W0 95/19181;美国专利 5,714,338, 公开于 1998-2-3, 或 1992-2-25 公开的美国专利 5,091,313, 1993-3-4 公开的 W093/04173, 或 1998-6-30 提交的国际公开 PCT/US98/13410, 美国专利 5,714,338);抗-CD18 抗体(美国专利 5,622,700, 1997-4-22 公开, 或 1997-7-31 公开的 W0 97/26912);抗-Apo-2 受体抗体(W0 98/51793, 公开于 1998-11-19);抗-TNF- α 抗体包括 cA2(**REMICADE**®), CDP571 和 MAK-195(见, 美国专利 5,672,347, 公开于 1997-9-30, Lorenz et al. J. Immunol. 156(4):1646-1653(1996), 和 Dhainaut et al. Crit. Care Med. 23(9):1461-1469(1995));抗-组织因子(TF)抗体(欧洲专利 0 420 937 B1, 1994-11-9 授权);抗-人 α_4 - β_7 整联蛋白抗体(W0 98/06248, 公开于 1998-2-19);抗-EGFR 抗体(嵌合的或人源化的 225 抗体, 如 1996-11-19 公开的 W0 96/40210 所述);抗-CD3 抗体诸如 OKT3(美国专利 4,515,893, 公开于 1985-5-7);抗-CD25 或抗-Tac 抗体诸如 CHI-621(**SIMULECT**®)和**ZENAPAX**®(见 1997-12-2 公开的美国专利 5,693,762);抗-CD4 抗体诸如 cM-7412 抗体(Choy et al. Arthritis Rheum 39(1):52-56(1996));抗-CD52 抗体诸如 CAMPATH-1H(Riechmann et al. Nature 332:323-337(1988));抗-Fc 受体抗体诸如针对 Fc γ RI 的 M22 抗体, 如 Graziano et al. J. Immunol. 155(10):4996-5002(1995) 所述;抗-癌胚抗原(CEA)抗体诸如 hMN-14(Sharkey et al. Cancer Res. 55(23Suppl):5935s-5945s(1995));针对乳腺上皮细胞的抗体,包括 huBrE-3, hu-Mc 3 和 CHL6(Ceriani et al. Cancer Res. 55(23):5852s-5856s(1995);和 Richman et al. Cancer Res. 55(23Suppl):5916s-5920s(1995));结合结肠癌细胞的抗体,诸如 C242(Litton et al. Eur J. Immunol. 26(1):1-9(1996));抗-CD38 抗体,例如 AT 13/5(Ellis et al. J. Immunol. 155(2):925-937(1995));抗-CD33 抗体诸如 Hu M195(Jurcic et al. Cancer Res 55(23Suppl):5908s-5910s(1995) 和 CMA-676 或 CDP771;抗-CD22 抗体诸如 LL2 或 LymphoCide(Juweid et al. Cancer Res 55(23Suppl):5899s-5907s(1995));抗-EpCAM 抗体诸如 17-1A(**PANOREX**®);抗-GpIIb/IIIa 抗体诸如 abciximab 或 c7E3Fab(**REOPRO**®);抗-RSV 抗体诸如 MEDI-493(**SYNAGIS**®);抗-CMV 抗体诸如**PROTOVIR**®;抗-HIV 抗体诸如 PR0542;抗-肝炎抗体诸如抗-Hep B 抗体**OSTAVIR**®;抗-CA 125 抗体 OvaRex;抗-独特型 GD3 表位抗体 BEC2;抗- $\alpha_v\beta_3$ 抗体**VITAXIN**®;抗-人肾细胞癌抗体诸如 ch-G250;ING-1;抗-人 17-1A 抗体(3622W94);抗-人结肠直肠肿瘤抗体(A33);抗-人黑素瘤抗体 R24, 其针对 GD3 神经节苷脂;抗-人鳞状细胞癌(SF-25);和抗-人白细胞抗原(HLA)抗体诸如 Smart ID10 和抗-HLA DR 抗体 Oncolym(Lym-1)。

[0057] 与 CD20 抗原结合的抗体有：“C2B8”，现在被称为“美罗华”(“RITUXAN®”) (美国专利 5,736,137, 引入作为参考)；钇-[90]-标记的 2B8 鼠抗体“Y2B8”或“Ibritumomab Tiuxetan” ZEVALIN® (美国专利 5,736,137, 引入作为参考)；任选用 ¹³¹I 标记鼠 IgG2a “B1” (也称“Tositumomab”) 产生“¹³¹I-B1”抗体 (碘 ¹³¹ 托西莫单抗 (tositumomab) BEXXARTM) (美国专利 5,595,721, 引入作为参考)；鼠单克隆抗体“IF5” (Press 等 Blood69(2)) :584-591(1987))；鼠 2H7 和“嵌合 2H7”抗体 (美国专利 5,677,180, 引入作为参考)；人源化的 2H7, 包括“人源化的 2H7 v16” (见下文)；huMax-CD20 (Genmab, Denmark)；AME-133 (Applied Molecular Evolution)；和可从国际白细胞分型小组 (International Leukocyte Typing Workshop) 获得的单克隆抗体 L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 或 NU-B2 (Valentine 等, 在《白细胞分型 III》(McMichael 编, 第 440 页, Oxford University Press(1987)))。

[0058] 与 CD19 抗原结合的抗体包括 Hekman 等, 癌症免疫学和免疫方法 (Cancer Immunol. Immunother.) 32 :364-372(1991) 和 Vlasveld 等, 癌症免疫学和免疫方法 40 :37-47(1995) 中所述抗 CD19 抗体；和在 Kiesel 等, 白血病研究 II, 12 :1119(1987) 中所述 B4 抗体。

[0059] 本文中术语“美罗华”或“RITUXAN®”指经遗传工程改造的、针对 CD20 抗原的嵌合鼠/人单克隆抗体, 在美国专利 5,736,137 (引入作为参考) 中命名为“C2B8”。该抗体是含小鼠轻链和重链可变区序列及人的恒定区序列的 IgG1 κ 型免疫球蛋白。美罗华结合 CD20 的亲合力为约 8.0nM。

[0060] 完全为了本发明的目的,“人源化的 2H7”指包含以下所示可变轻链序列和可变重链序列的抗体：

[0061] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHVYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO :1)

[0062] hu2H7 v16 的可变重链区：

[0063] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYNSYWFYFDVWGQGTLLTVVSS (SEQ ID NO :2)。

[0064] 优选人源化的 2H7 v16 包含轻链氨基酸序列：MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASSSVSYMHVYQQKPGKAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFNPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO :3)；和重链氨基酸序列：MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTSYNMHWVRQAPGKGLEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYNSYWFYFDVWGQGTLLTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAIITSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO :4)。

[0065] “分离”的拮抗剂或抗体是已经从其自然环境组分中鉴定并分离和/或回收的拮抗剂或抗体。其自然环境中的污染成分有, 可干扰该拮抗剂的诊断和治疗应用的矿物质,

可能还包括酶、激素和其它蛋白或非蛋白溶质。在优选实施方案中,该拮抗剂的纯度应达到:(1)经 Lowery 法确定的拮抗剂重量的 95% 以上,最优选所述重量的 99% 以上,(2)足以获得用旋转杯状 (spinning cup) 序列分析仪所测至少 15 个残基的 N 端或内部氨基酸序列,(3)通过还原或非还原条件下的 SDS-PAGE 以及考马斯亮蓝染色、优选银染所证实的均质性。分离的拮抗剂或抗体包括重组细胞内的原位拮抗剂或抗体,因为该拮抗剂或抗体的自然环境中的至少一种组分已不存在。一般情况下分离的拮抗剂或抗体可通过至少一个纯化步骤来制备。

[0066] 需要治疗的“哺乳动物”是指归为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜和农场动物,以及动物园里的动物、参与运动项目的动物或宠物如狗、马、猫、牛等。优选所述哺乳动物为人类。

[0067] “治疗”是指治疗方法和预防措施。需要治疗者包括已经患病者,以及需要对疾病进行预防者。因此,哺乳动物可能被诊断为已患病或对所述疾病易感。

[0068] “治疗有效量”是指能有效阻止,改善或治疗目标自身免疫病的拮抗剂的量。

[0069] 本文用于辅助治疗的术语“免疫抑制剂”是指能抑制或掩盖所治哺乳动物的免疫系统的物质。这将包括能抑制细胞因子的产生,下调或抑制自身抗原的表达,或掩盖 MHC 抗原的物质。这些制剂的例子包括 2-氨基-6-芳基-5-取代的嘧啶(见美国专利 4,665,077,其全文引入本文作参考);非甾体类抗炎药 (NSAID);硫唑嘌呤 (azathioprine);环磷酰胺;溴麦角环肽 (bromocryptine);达那唑 (danazol);氨苯砒 (dapsone);戊二醛(它们掩盖 MHC 抗原,如美国专利 4,120,649 所述);抗 MHC 抗原和 MHC 片段的抗独特型抗体;环孢菌素 A;类固醇如糖皮质激素,例如强的松,甲基强的松龙,地塞米松和氢化可的松;细胞因子或细胞因子受体拮抗剂包括抗 IFN- γ , - β 或 - α 抗体,抗 TNF- α 抗体 (infliximab 或 adalimumab),抗 TNF- α 免疫粘附素 (etanercept),抗 TNF- β 抗体,抗 IL-2 抗体和抗 IL-2 受体抗体;抗 LFA-1 抗体,包括抗 CD11a 和抗 CD18 抗体;抗 L3T4 抗体;异源抗淋巴细胞球蛋白;pan-T 抗体,优选抗 CD3 或抗 CD4/CD4a 抗体;包含 LFA-3 结合结构域的可溶性肽(公开于 7/26/90 的 W090/08187);链激酶;TGF- β ;链道酶;源于宿主的 RNA 或 DNA;FK506;RS-61443;脱氧精肌菌素;雷帕霉素;T 细胞受体 (Cohen 等,美国专利 5,114,721);T 细胞受体片段 (Offner 等,科学,251:430-432(1991));W090/11294;Ianeway,自然,341:482(1989);和 W0 91/01133);和 T 细胞受体抗体 (EP 340,109) 例如 T10B9。

[0070] 本文中术语“细胞毒制剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语旨在包括放射性核素(例如 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² 和镭的放射性同位素),化疗制剂,毒素如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或它们的片段。

[0071] “化疗制剂”是在肿瘤治疗中使用的化学化合物。化疗制剂实例包括烷化剂,如噻替派 (thiotepa);环磷酰胺 (cyclophosphamide) (CYTOXANTM);烷基磺酸酯如白消安 (busulfan),英丙舒凡 (improsulfan) 和派泊舒凡 (piposulfan);氮丙啶如 benadopa,卡波醌 (carboquone),美妥替派 (meturedopa) 和尿烷亚胺 (uredopa);氮丙啶和 methylamelamine 包括六甲蜜胺 (altretamine),三亚乙基蜜胺 (triethylenemelamine),三亚乙基磷酰胺,三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺 (trimethylolomelamine);氮芥 (nitrogen mustards) 如苯丁酸氮芥,氮芥,胆磷酰胺 (cholophosphamide),雌氮

芥 (estramustine), 异环磷酰胺 (ifosfamide), 氮芥 (mechlorethamine), 盐酸氧氮芥; 左旋苯丙氨酸氮芥 (melphalan), 新氮芥 (novembichin), 胆甾醇苯乙酸氮芥, 松龙苯芥 (prednimustine), 曲磷胺 (trofosfamide), 尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲 (nitrosureas) 如亚硝基脲氮芥 (carmustine), 氯脲菌素 (chlorozotocin), 福莫司汀 (fotemustine), 洛莫司汀 (lomustine), 尼莫司汀 (nimustine), 雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素如阿克拉霉素, 放线菌素, anthramycin, 重氮丝氨酸, 博来霉素, 放线菌素 C (cactinomycin), 加利车霉素 (calicheamicin), carabycin, 洋红霉素 (chromomycin), 嗜癌素 (carzinophilin), 色霉素, 放线菌素 D, 道诺红菌素 (daunorubicin), 地托比星 (detorubicin), 6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸, 阿霉素 (doxorubicin), 表阿霉素 (epirubicin), 依索比星 (esorubicin), 伊达比星 (idarubicin), 发波霉素 (marcellomycin), 丝裂霉素, 霉酚酸, 诺加霉素 (nogalamycin), 橄榄霉素 (olivomycin), 培洛霉素 (peplomycin), potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素 (quelamycin), 罗多比星 (rodorubicin), 链黑菌素; 链脲霉素 (streptozocin), 杀结核菌素, 乌苯美司 (ubenimex), 净司他丁 (zinostatin), 佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢药如氨甲蝶呤, 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸 (denopterin), 氨甲蝶呤, 丁蝶翼素 (pteropterin), 三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物氟达拉滨 (fludarabine), 6-巯基嘌呤, 硫咪嘌呤, 硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物如安西他滨 (ancitabine), 阿扎胞苷 (azacitidine), 6-氮尿苷, 卡莫氟 (carmofur), 阿糖胞苷, 双脱氧尿苷, doxifluridine, 依诺他滨 (enocitabine), 氟尿苷, 5-FU; 雄激素类如二甲睾酮, 丙酸甲雄烷酮 (dromostanolone propionate), 环硫雄醇 (epitiostanol), 美雄氨 (mepitiostane), 睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类如氨鲁米特 (aminoglutethimide), 邻氯苯对氯苯二氯乙烷 (mitotane), 曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂如 frolinic acid; 醋葡内酯; 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 安吡啶 (amsacrine); bestabucil; 比生群 (biasntrene); 依达曲沙 (edatraxate); defofamine; 秋水仙胺; 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; elliptinium acetate; 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); nitracrine; 喷司他丁 (pintostatin); phenamet; 吡柔比星 (pirarubicin); 鬼臼树酸 (podophyllinic acid); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®**; 雷佐生 (razoxane); 西索菲兰 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2', 2''-三氯三乙胺 (trichlorotriethylamine); 乌拉坦 (urethan); 长春碱酰胺; 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇; 溴丙哌嗪 (pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 三胺硫磷 (thiotepa); 紫杉烷 (taxoid), 如紫杉醇 (**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和 doxetaxel (**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨 (gemcitabine); 6-硫代鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氨甲蝶呤; 铂类似物如顺铂和卡铂; 长春花碱; 铂; 鬼臼乙叉甙 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞宾 (vinorelbine); navelbine; novantrone; 替尼泊甙 (teniposide); 柔红霉素; 氨基蝶呤; xeloda; 伊拜膦酸盐 (ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 维甲酸; esperamicins; capecitabine; 以及上述任何物质的可

药用盐,酸或衍生物。此定义还包括能调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素制剂,如抗雌激素制剂包括他莫昔芬 (tamoxifen), 雷洛昔芬 (raloxifene), 芳香酶抑制剂 4(5)-咪唑, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬 (trioxifene), keoxifene, LY117018, onapristone, 和托瑞米芬 (Fareston); 和抗雄激素制剂如氟他氨 (flutamide), 尼鲁米特 (nilutamide), bicalutamide, 亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 和上述任何物质的可药用盐,酸或衍生物。

[0072] 术语“细胞因子”是由一个细胞群释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白的总称。这类细胞因子有淋巴因子, 单核因子, 和传统的多肽激素。包括生长激素, 如人生长激素, N-甲二磺酰人生长激素, 和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 前胰岛素; 松弛素; 前松弛素; 糖蛋白激素如卵泡刺激素 (FSH), 甲状腺刺激素 (TSH), 促黄体 (生成) 激素 (LH); 肝细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子; 催乳激素; 胎盘催乳素; 肿瘤坏死因子- α 和 β ; 苗勒管 (mullerian)-抑制物; 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 苯丙酸诺龙; 血管内皮细胞生长因子; 整合素; 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 -II; 促红细胞生成素 (EPO); 骨诱导因子 (osteoinductive factors); 干扰素如干扰素- α , - β , - γ ; 集落刺激因子 (CSF) 如巨噬细胞-CSF (M-CSF); 粒细胞-巨噬细胞-CSF (GM-CSF); 粒细胞-CSF (G-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-11, IL-12, IL-15; 肿瘤坏死因子如 TNF- α 或 TNF- β ; 和其它多肽因子包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。本文中术语细胞因子包括天然蛋白或来自重组细胞培养物的蛋白以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0073] 本发明使用的术语“前体药物”是指药物活性物质的前体或衍生物形式, 其相对于亲本药物对肿瘤细胞的细胞毒作用较小且可酶促活化或被转换成更具活性的亲本形式。例见 Wilman, “癌症化疗中的前体药物” Biochemical Society Transaction, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella 等, “前体药物: 一种药物定向运送的化学方法” 定向药物运送, Borchardt 等 (编), pp. 247-267, Humana press (1985)。本发明的前体药物包括, 但不限于含有磷酸盐的前体药物, 含有硫代磷酸盐的前体药物, 含有硫酸盐的前体药物, 含有肽的前体药物, D-氨基酸修饰的前体药物, 糖基化的前体药物, 含有 β -内酰胺的前体药物, 任选含有取代的苯氧乙酰胺的前体药物或任选含有取代的苯基乙酰胺的前体药物, 可转化为更具细胞毒活性的游离药物的 5-氟胞嘧啶和其它 5-氟尿嘧啶前体药物。可衍生为本发明所用前体药物形式细胞毒药物包括, 但不限于上述化疗试剂。

[0074] “外来抗原”是指针对暴露于它的哺乳动物来说是非内源性的或非天然的分子。外来抗原可以引发哺乳动物体内的免疫应答, 例如, 体液和 / 或 T 细胞介导的反应。一般情况下, 外来抗原可以诱导针对它们的抗体的产生。本发明关注的外来抗原的实例包括具备免疫原性的治疗剂, 例如, 抗体等蛋白, 尤其是包含非人的氨基酸残基的抗体 (例如啮齿类, 嵌合 / 人源化, 和灵长类的抗体); 毒素 (任选与靶向分子如抗体偶联, 其中该靶向分子可能也具有免疫原性); 基因治疗病毒载体, 如逆转录病毒和腺病毒; 移植物; 感染因子 (例如细菌和病毒); 同种异体抗原 (即同一种群中一些成员具有而其它成员不具有的抗原) 例如血型抗原、人淋巴细胞抗原 (HLA)、血小板抗原、表达在移植器官上的抗原、血液成分、妊娠抗原 (Rh) 和血友病因子 (例如因子 VIII 和因子 IX) 的不同。

[0075] “阻断针对外来抗原的免疫应答”是指降低或阻止因暴露于外来抗原引起的至少一种免疫应答。例如,可以减弱对外来抗原的体液反应,即,通过阻止或减少哺乳动物体内针对该抗原的抗体的产生。或者,或另外可抑制独特型;“减弱(pacify)”对同种异型抗体覆盖的细胞的消除;和/或通过损耗抗原提呈细胞而影响同种异体抗原的提呈。

[0076] 本发明所用的术语“移植物”是指来源于向受体进行移植的供体的生物物质。移植物包括多种多样的物质,例如,分离的细胞例如胰岛细胞;组织例如新生儿的羊膜,骨髓,造血祖细胞,和眼组织如角膜组织;器官如皮肤,心脏,肝脏,脾脏,胰腺,甲状腺小叶,肺,肾脏,管状器官(如肠道,血管或食管),等等。管状器官能用来代替食管、血管或胆管的损伤部分。皮肤移植物不但可用于烧伤,还可用作损伤肠管的被膜或用来修补某些缺损例如隔疝。移植物来源于任何哺乳动物,包括人,无论生死。优选移植物是骨髓或者器官如心脏,并且移植物的供体和宿主的 HLA II 类抗原是相匹配的。

[0077] 此处所用术语“哺乳动物宿主”是指任何相容的移植接受者。“相容的”是指将接受移植物的哺乳动物宿主。宿主优选是人。如果移植物的供体和宿主都是人,为提高组织相容性,优选他们的 HLA II 类抗原相匹配。

[0078] 此处所用术语“供体”是指提供移植物的死或活的哺乳动物。优选,供体是人。人供体优选自愿的有血缘关系同时体检正常的供体,而且供体和受体有相同的主要 ABO 血型,因为跨越主要血型的障碍可能不利于同种异体移植物的存活。但是,移植在某些情况下是可能的,例如, O 型供体的肾脏可移植给 A、B 或 AB 型的接受者。

[0079] 术语“移植”和它的变称是指移植物进入到宿主体内,无论是同基因移植(syngeneic)(供体和接受者遗传背景相同)、同种异体移植(供体和接受者遗传背景不同但属同一物种)或异种移植(供体和接受者来自不同物种)。所以,在典型的实施过程中,宿主是人,移植物是同基因移植物,来源于具有相同或不同遗传背景的人。在另一种情况下,移植物来自与移植接受者不同的另一物种,例如将狒狒的心脏移植给人类宿主,并且包括从种系发生方面相隔很远的动物,例如,将猪心瓣膜,或者动物 β 胰岛细胞或神经细胞移植给人宿主。

[0080] “基因治疗”是指将核酸导入待治疗的哺乳动物体内的常规方法。核酸可以编码目的多肽或者反意核酸。基因治疗载体或组合物中的一个或多个成分在用它治疗的哺乳动物体内可能存在免疫原性。例如,病毒载体(如腺病毒、I 型单纯疱疹病毒或逆转录病毒);脂质;和/或组合物中的靶向分子可能诱导用它治疗的哺乳动物体内的免疫应答。

[0081] “使等待移植的哺乳动物脱敏”的表述是指在对哺乳动物进行移植之前降低或去除对移植物的过敏(allergic)敏感性或反应性。这可以通过任何机制获得,例如减少脱敏哺乳动物体内的抗供体抗体,如当这些抗供体抗体针对人淋巴细胞抗原(HLA)时。

[0082] 本文的“中和型抗体”指不仅结合目的抗原(例如治疗型抗体诸如 CD20 抗体),而且还在一定程度显示抗原的生物活性的抗体。

[0083] II. 中和型抗体测定法

[0084] 本发明至少部分涉及用于检测治疗性抗体的中和型抗体,或结合 B 细胞表面标记(例如结合与 CD20 结合的抗体)的拮抗剂的测定法。所述测定法确定用所述抗体或拮抗剂治疗的患者的生物样品阻断该抗体或拮抗剂的生物活性的能力。阻断活性可表示抗体或拮抗剂的有效性降低。

[0085] 所述样品通常在用所述抗体或拮抗剂处理患者之前和 / 或之后获自该患者。通常生物样品在一系列时间点获自该患者,例如从预处理到治疗循环。为了避免药物干扰测定法的性能,生物样品通常在药物清除出现时获取。例如,可检测基线,3、6 和 9 个月的样品。如果患者在随后的时间再次接受处理,可针对来自基线以及 3 和 6 个月的样品检测中和型抗体。

[0086] 所述生物样品可包含结合用于处理患者的抗体或拮抗剂的抗体,诸如人抗鼠抗体 (HAMA),人抗嵌合抗体 (HACA) 和人抗人抗体 (HAHA)。HAHA 可针对人源化的或人的治疗性抗体。一个实施方案中,样品是已经被测定含有所述抗体的样品。例如,在下文实施例 1 的整个 ELISA 测定法或美国专利申请 2003/0068664 (Albistar et al.) 中,发现来自患者的血清包含目的药物的抗体。

[0087] 用于该测定法的生物样品可以是血清,血浆,细胞裂解物,乳汁,唾液或其它分泌物,以及回收自所述生物样品的任何一或多种样品的抗体。优选,来自患者的血清接受本发明所述测定法。

[0088] 中和型抗体可降低输注的药物的预期药理学水平,由此降低效力或使得反应的可能性更可变。中和型抗体可与再次治疗导致的血清疾病或免疫复合物疾病相关。例如,如果发现中和型抗体反应,所述治疗可停止或推迟,或可增加剂量,或可给予患者其它的药剂,其可改善抗体或拮抗剂的效力,和 / 或降低针对其的任何免疫反应。各种可与所述治疗联合以降低免疫反应 (其中观察到中和型抗体反应) 的免疫抑制剂,是已知的且作为本发明所述药物的实例。

[0089] 除了利用临床医师在患者治疗中的试验结果,抗药物抗体的中和特性,联合 HAMA, HACA, 或 HAHA 数据,证实了免疫原性,或免疫原性的倾向,以及抗体或拮抗剂的免疫原性的性质。该信息可用于评估药物安全性并预测患者对治疗的潜在免疫反应。

[0090] 本发明的试验代表了相对于 US 2003/0068664 (Albistar et al.) 中的 ELISA 测定法的改进,其提供了对目的药物的任何抗体反应是否可实际上中和 (至少在一定程度上) 药物的生物活性,所述药物是否是 B 细胞表面标记的抗体或拮抗剂的评估。因此,所述信息可用于测定用于治疗所述患者的抗体或拮抗剂的效力。在 CD20 抗体或其它结合 B 细胞表面标记的拮抗剂的背景中,所述测定法被认为具体可用于以下情况:利用其的治疗导致部分 B 细胞耗竭,出现 B 细胞过度活化 (例如在 SLE 中),或疾病症状持续存在数年 (例如在 SLE 和 RA 中)。

[0091] 该测定法对于用抗体或拮抗剂治疗患者以治疗自身免疫疾病而言是尤其需要的。各种自身免疫疾病在本发明描述,但示例性疾病包括类风湿性关节炎 (RA),系统性红斑狼疮 (SLE),韦格纳氏病 (Wegener's disease),炎性肠病 (inflammatory bowel disease),特发性或免疫性血小板减少性紫癜 (idiopathic or immune thrombocytopenic purpura) (ITP),血栓性血小板减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenic purpura) (TTP),自身免疫性血小板减少症 (autoimmune thrombocytopenia),多发性硬化 (multiple sclerosis) (MS),银屑病 (psoriasis),IgA 肾病,IgM 多发性神经病,重症肌无力 (myasthenia gravis),血管炎 (vasculitis),糖尿病 (diabetes mellitus),雷诺综合征 (Reynaud's syndrome),干燥综合征 (Sjogren's syndrome),肾小球肾炎 (glomerulonephritis),自身免疫性溶血性贫血 (autoimmune hemolytic anemia) 等。

[0092] 如果所述拮抗剂或抗体结合 B 细胞表面标记, 诸如 CD20 抗原, 所述患者可患有自身免疫病, B 细胞恶性疾病, 或所述拮抗剂或抗体可用于阻断对外来抗原的免疫反应 (例如当所述外来抗原是免疫治疗剂或移植物的情况)。

[0093] 在本发明优选的实施方案中, 生物活性测定法包括基于细胞的功能测定, 诸如确定补体依赖性细胞毒 (CDC), 抗体依赖性细胞介导的细胞毒 (ADCC), 凋亡, 或细胞生长抑制的测定法。

[0094] 优选, 所述测定法研究 CDC 活性。根据本发明的该实施方案, 表达抗体或拮抗剂所结合的抗原 (例如 B 细胞表面标记诸如 CD20) 的细胞可在存在或 (缺乏) 所述抗体或拮抗剂以及用所述抗体或拮抗剂治疗的患者的生物样品的条件下暴露于补体 (优选人补体)。本发明涉及将四种组分 (细胞, 补体, 抗体或拮抗剂, 以及生物样品) 同时或依次以任何顺序进行暴露; 所有这些可能性包含在术语“在存在治疗性抗体以及来自用其治疗的患者的生物样品的条件下将表达与所述治疗性抗体结合的抗原的细胞暴露于补体”中。然而根据本发明但优选实施方案, 所述生物样品 (例如血清) 与所述抗体或拮抗剂结合以允许中和抗体或拮抗剂的活性, 并随后将细胞和补体加入该混合物。

[0095] 暴露步骤以后, 测定 CDC 活性, 优选通过评估细胞存活力 (即通过定量活细胞)。各种方法可用于测定细胞生存力, 包括测定膜完整性的丧失, 其可通过以下方法来评估: 相对于未经处理的细胞而言对碘化丙啶 (PI), 台盼蓝 (见 Moore et al. Cytotechnology 17: 1-11(1995)), annexin V, 或 7AAD 的吸收, 本文所述的 AlamarBlue™ 测定法等。抗体或拮抗剂介导 CDC 的能力降低可表明中和型抗体存在所述生物样品中。

[0096] 对于基于细胞的测定法, 通常使用表达所述抗体或拮抗剂结合的抗原的细胞系。对于 CD20 抗原的情况, 各种细胞均可用, 包括 WIL2-S 细胞 (ATCC CRL 8885, 美国典型培养物保藏中心), 或表达 CD20 的淋巴母细胞样 B 细胞系。利用 CD20 阳性细胞的 CDC 测定法在 Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184(2000); Idusogie et al., J. Immunol. 166: 2571-2575(2001); Reffet et al. Blood 83(2):435-445(1994); 美国专利 6,194,551 B1 (Idusogie et al.); 和美国专利 5,736,137 (Anderson et al.) 中描述。

[0097] 如果所述测定法用于评估 ADCC, 可检测所述抗体或拮抗剂介导自然杀伤细胞 (NK 细胞) 和 / 或外周血单核细胞 (PBMC) 裂解表达与所述治疗性抗体结合的抗原的细胞的能力。对于 CD20 抗原, 可使用 WIL2-S 细胞, Shields et al., J. Biol. Chem. 276: 6591-6604(2001) 和 W000/42072 (Presta, L.) 描述了利用所述细胞的示例性 ADCC。也参见 Clynes et al. Nature Medicine 6:443-6(2000)。美国专利 5,736,137 (Anderson et al.) 也描述了利用 CD20 阳性细胞的 ADCC 测定法。

[0098] 凋亡指程序性细胞死亡, 例如 B 细胞的凋亡, 并可通过多种不同测定法确定, 诸如 annexin V 的结合, DNA 的片段化, 细胞皱缩, 内质网扩大, 细胞片段化和 / 或膜小泡 (称为凋亡小体) 的形成。测定抗体 (例如美罗华) 诱导凋亡的能力的测定法在例如 Shan et al. Cancer Immunol Immunother 48:673-83(2000); Pedersen et al. Blood 99: 1314-9(2002); Demidem et al. Cancer Chemotherapy & Radiopharmaceuticals 12(3): 177-186(1997) 中描述。

[0099] 拮抗剂或抗体抑制细胞生长, 例如抑制表达所述拮抗剂或抗体结合的抗原的癌性 B 细胞的生长的能力可通过多种不同测定法测定。Taji et al. Jpn J. Cancer Res 89:

748-56(1998) 描述了如何测定 CD20 抗体对 CD20 阳性 B 淋巴细胞系的生长抑制。

[0100] 利用本发明所述的中和型抗体,可测定抗体或拮抗剂(例如结合 CD20 的那种)的效力,所述测定通过测定用所述抗体或拮抗剂处理的患者生物样品阻断所述抗体或拮抗剂的生物活性的能力来进行,其中生物活性相对于对照样品的降低表明所述患者激发了针对目的抗体或拮抗剂的抗体和/或这种抗体可至少在一定程度上中和所述抗体或拮抗剂的生物活性。明显地的反应导致中和抗体开发产生的相关安全性问题和/或响应于改变的药物清除改变的一级药物剂量改变的需要。例如,与相同量的预处理部分相比(例如 HAMA, HACA, 和 HAHA 阴性),中和给定浓度的所述抗体或拮抗剂药物的活性的大约 20% 或更高(例如约 20% - 约 100%) 的样品,可被认为对于中和针对所述抗体或拮抗剂的抗体而言是阳性的。

[0101] III. 拮抗剂或抗体的制备

[0102] 本发明的方法和制品使用,或掺入了一种能结合 B 细胞表面标志的拮抗剂。相应地,本文还描述了产生这类拮抗剂或抗体的方法。

[0103] 用于产生或筛选拮抗剂或抗体的抗原可以是,如抗原的可溶形式或其一部分,包括所需表位。或者,或此外,在表面表达所述抗原的细胞可用于产生或筛选拮抗剂或抗体。可用于产生拮抗剂或抗体的其它形式的抗原为本领域所显而易见。优选所述抗原是 B 细胞表面标志,诸如 CD20 抗原。

[0104] 虽然优选的拮抗剂是抗体,但除抗体以外的其它拮抗剂也包括在此。例如,拮抗剂可含有任选融合至或偶联于细胞毒试剂(如本文所公开的那些)的小分子。可在小分子文库中筛选本文的目标 B 细胞表面标志,以便鉴定能与该抗原结合的小分子。还可进一步筛选小分子的拮抗特性和/或使其与细胞毒试剂偶联。

[0105] 拮抗剂也可以是经合理设计或噬菌体展示(例见 W098/35036, 1998 年 8 月 13 日公开)。在一个具体实施方案中,所选的分子可以是“CDR 类似物”或基于抗体 CDR 而设计的抗体类似物。尽管所述肽本身可能就有拮抗性,但任选将此肽与细胞毒制剂融合,以便添加或增强此肽的拮抗性。

[0106] 另一个实施方案中,所述拮抗剂是包含结合结构域的免疫粘附素,所述结合结构域例如结合 B 细胞表面标志诸如融合于免疫球蛋白(例如免疫球蛋白 Fc 区)的 CD20 的肽或蛋白。

[0107] 以下为本发明所用抗体拮抗剂的产生技术举例。

[0108] (i) 多克隆抗体

[0109] 多克隆抗体优选通过多次给动物皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂而产生。将所述相关抗原与针对所免疫的物种具有免疫原性的蛋白(如匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)用双功能试剂或衍生试剂,如马来酰亚胺苯甲酰基硫代琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (R 和 R^1 是不同烷基),进行偶联是有效的。

[0110] 用所述抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫动物,方法是,将 100 μg 或 5 μg 蛋白或偶联物(分别针对兔或鼠)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混合,在多位点皮内注射该溶液。1 个月后,多位点皮内注射起始量的 1/5-1/10 的肽或与弗氏完全佐剂的偶联物来加强免

疫。7-14 天后,对动物采血,测定血清中的抗体效价。对动物的加强免疫直到效价达到平台期为止。优选给动物加强注射相同抗原的偶联物,但也可以是偶联至不同蛋白和 / 或通过不同的交联剂偶联的偶联物。偶联物还可以是重组细胞培养物产生的融合蛋白。此外,可用明矾等聚集剂增强免疫应答。

[0111] (ii) 单克隆抗体

[0112] 单克隆抗体来自基本均一的抗体群,即该群体中的每个抗体除了可能的很小量天然突变外都相同。因此,修饰词“单克隆”指所述抗体的并非不同抗体混合物的特性。

[0113] 例如,单克隆抗体可用由 Kohler 等,自然 (1975) 首次描述的杂交瘤技术制备,或用重组 DNA 方法制备(美国专利 4,816,567)。

[0114] 在杂交瘤方法中,如上述免疫小鼠或其它适合的宿主动物如仓鼠,以激发那些产生或能产生与用于免疫之蛋白特异性结合的抗体的淋巴细胞。另外,可体外免疫淋巴细胞。然后用适当融合剂,如聚乙二醇,使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤细胞 (Goding, 单克隆抗体:原理及应用, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

[0115] 将如此制备的杂交瘤细胞接种至适当培养基中并培养,优选该培养基含有一或多种能抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HGPRT 或 HPRT),杂交瘤培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷 (HAT 培养基),这些物质阻止 HGPRT- 缺陷型细胞的生长。

[0116] 优选骨髓瘤细胞是那些能有效融合、支持所选抗体生成细胞以稳定的高水平产生抗体,并对诸如 HAT 培养基等类似培养基敏感的细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,如由 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 提供的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤细胞和由美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland USA 提供的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。也有报道称人骨髓瘤以及小鼠-人异质性骨髓瘤细胞系可用于产生人单克隆抗体 (Kozbor, 免疫学杂志 133 :3001 (1984) ; Brodeur 等,单克隆抗体制备技术及应用, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))

[0117] 可在含有生长的杂交瘤细胞培养基中分析直接针对所述抗原的单克隆抗体的产生。杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合试验,如放射免疫分析 (RIA) 或酶联免疫吸附试验 (ELISA) 来分析。

[0118] 单克隆抗体的结合亲和力可通过如 Muson 等, Anal. Biochem., 107 :220 (1980) 所述 Scatchard 分析来测定。

[0119] 一旦鉴定出能产生具有所需特异性、亲和力、和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,将这些克隆通过有限稀释法进一步克隆并用标准方法进行培养 (Goding, 单克隆抗体:原理及应用, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。适于此目的的培养基包括如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可作为腹水中肿瘤的形式在动物体内生长。

[0120] 由亚克隆分泌的单克隆抗体可用常规免疫球蛋白纯化方法如蛋白 -A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基、腹水或血清中分离。

[0121] 编码单克隆抗体的 DNA 可用常规方法很容易的分离和测序(如利用能与编码小鼠抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是这类 DNA 的优选来源。DNA 分离后,可将其插入表达载体中,然后用此表达载体转染宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以便在重

组宿主细胞中合成单克隆抗体。编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述见 Skerra 等, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5 :256-262(1993) 和 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130 :151-188(1992)。

[0122] 在另一实施方案中,可从用 McCafferty 等, *自然*, 348 :552-554(1990) 所述技术产生的抗体噬菌体文库中分离抗体或抗体片段。Clackson 等, *自然*, 352 :624-628(1991) 和 Marks 等, *分子生物学杂志* 222 :581-597(1991) 分别描述了用噬菌体文库分离鼠和人的抗体。后来的文献描述了通过链改组制备高亲和力 (nM 范围) 的人型抗体 (Marks 等, *生物/技术* 10 :779-783(1992)), 以及用于构建大规模噬菌体文库的组合感染和体内重组方法 (Waterhouse 等, *核酸研究* 21 :2265-2266(1993))。因此,这些技术都可取代传统单克隆抗体杂交瘤技术来分离克隆抗体。

[0123] DNA 也可通过用人类重链和轻链的恒定区编码序列取代小鼠同源序列来修饰 (美国专利 4,816,567 ;Morrison 等, *美国国家科学院学报* 81 :6851(1984)), 或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价结合来修饰。

[0124] 通常用所述非免疫球蛋白多肽取代抗体恒定区,或取代抗体上一个抗原结合点的可变区,形成二价嵌合抗体,其中一个抗原结合位点特异于一种抗原而另一个抗原结合位点特异于另一种抗原。

[0125] (iii) 人源化抗体

[0126] 本领域已有关于人源化非人类抗体的制备方法的描述。优选人源化抗体中已导入一或多个源自非人类的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基常称为“引进的”残基,它们通常来自“引进的”可变区。人源化过程基本如 Winter 及其同事 (Jones 等, *自然*, 321 :522-525(1986) ;Riechmann 等, *自然*, 332 :323-327(1988) ;Verhoeyen 等, *科学*, 239 :1534-1536(1988)) 所述,用高变区序列取代人类抗体的相应序列来进行。因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 4,816,567), 其中完整人类可变区的很少一部分被非人类物种的相应序列取代。实践中,人源化抗体通常是人的抗体,其中高变区残基且可能有部分 FR 残基被啮齿类抗体中类似位点的残基取代。

[0127] 对用于制备人源化抗体的人类可变区包括重链和轻链的选择,对降低抗原性非常重要。根据所谓“最适应”方法,针对已知人类可变区序列的整个文库筛选啮齿类抗体可变区序列。将与啮齿类的序列最相似的人类序列作为人源化抗体的人框架区 (FR) (Sims 等, *免疫学杂志*, 151 :2296(1993) ;Chothia 等, *分子生物学杂志*, 196 :901(1987))。另一种方法是用人类轻链或重链特定亚型的所有抗体的共有序列作为特定框架区。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体 (Carter 等, *美国国家科学院学报*, 89 :4285(1992) ;Presta 等, *免疫学杂志*, 151 :2623(1993))。

[0128] 更重要的是,将抗体人源化后保留了对抗原的高亲和力和其它有利的生物特性。为达到此目的,在一种优选方法中,通过用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物来制备人源化抗体。免疫球蛋白三维模型已有商品,是本领域技术人员所熟悉的。还有用于描述和展示所选免疫球蛋白序列可能的三维构象的计算机程序。通过观察这些展示结果可分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能发挥的作用,即分析能影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基,通过这种方法,可从受者和引进序列中选出 FR 残基并组合,从而得到所需抗体性质,如对靶抗原的亲和力增加。总之,高

变区残基直接并且最主要涉及对抗原结合的影响。

[0129] (iv) 人类抗体

[0130] 除了进行人源化以外还可制备人类抗体。例如现在已能产生如下转基因动物(如小鼠),它们通过免疫能产生人类抗体的所有成分而不产生内源免疫球蛋白。例如,有报道称,嵌合及种系(germ-line)突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失导致内源抗体的产生被完全抑制。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移到这类种系突变小鼠中将导致因抗原攻击而诱导人类的抗体产生。见 Jakobovits 等,美国国家科学院学报,90:2551(1993);Jakobovits 等,自然,362:255-258(1993);Bruggermann 等,Year in Immuno. 7:33(1993);和美国专利 5591669,5589369 和 5545807。

[0131] 或者,可用噬菌体展示技术(McCafferty 等,自然 348:552-553(1990))从未免疫供者的免疫球蛋白可变(V)区基因的所有组成而体外产生人类抗体和抗体片段。依据此技术,将抗体V区基因克隆在与丝状噬菌体(如M13或fd)主要或次要衣壳蛋白基因相同的框架内,并在噬菌体颗粒的表面展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,根据抗体的功能特点进行的选择也导致对显示这些性质的抗体的编码基因进行选择。因此,噬菌体模仿了B细胞的部分特点。噬菌体展示可以以多种形式进行;这些综述见Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., 结构生物学的最新观点(Current Opinion in Structural Biology)3:564-571(1993)。可使用V基因片段的多个来源进行噬菌体展示。Clackson 等,自然,352:624-628(1991)从免疫小鼠脾脏来源的V基因的随机组合文库中分离了抗-噁唑酮(oxazolone)抗体的一个多样性阵列。可基本如Marks 等,分子生物学杂志 222:581-597(1991),或Griffith 等,EMBO J. 12:725-734(1993)所述构建未免疫人类供者的V基因所有组成,并分离针对抗原多样性阵列(包括自身抗原)的抗体。亦参见美国专利 5565332 和 5573905。

[0132] 人类抗体也可通过体外激活的B细胞而产生(见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)。

[0133] (v) 抗体片段

[0134] 已开发了生成抗体片段的多种技术。传统上,这些片段通过对完整抗体的蛋白水解性消化获得(见Morimoto 等,生物化学和生物物理学方法杂志(Journal of Biochemical and Biophysical Methods)24:107-117(1992))和Brennan 等,科学,229:81(1985)。但现在可直接通过重组宿主细胞产生这些片段。例如,可从上述抗体噬菌体库分离抗体片段。另外,可从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,并经化学连接形成F(ab')₂片段(Carter 等,生物/技术 10:163-167(1992))。依据另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养中分离F(ab')₂片段。其它产生抗体片段的技术对本领域技术人员是显而易见的。在其它实施方案中,所选抗体是单链Fv片段(scFv)。见WO 93/16185;美国专利 5,571,894;和美国专利 5,587,458。抗体片段也可以是“线性化抗体”,如美国专利 5,641,870 所述。这类线性化抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0135] (vi) 双特异性抗体

[0136] 双特异性抗体是具有针对至少两种不同表位的结合特异性的抗体。如双特异性抗体可以与B细胞表面标志物的两种不同表位结合。其它这类抗体可以结合第一个B细胞表面标志并再结合第二个B细胞表面标志。或者,可将抗B细胞标志物的结合臂与结合

白细胞上引发分子的臂结合,从而集中针对 B 细胞的细胞防御机制,所述引发分子如 T 细胞受体分子 (CD2 或 CD3),或 IgG Fc 受体 (Fc γ R) 如 Fc γ R I (CD64)、Fc γ R II (CD32) 和 Fc γ R III (CD16)。双特异性抗体还可用于将细胞毒制剂定位至 B 细胞。这些抗体具有 B 细胞标志物结合臂和结合细胞毒制剂 (例如皂草素,抗 INF- α , 长春花生物碱,蓖麻毒蛋白 A 链,氨甲蝶呤或放射性同位素半抗原) 的臂。双特异性抗体可制备成全长抗体或抗体片段 (如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0137] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。完整双特异性抗体的传统制备方法是基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中这两条链具有不同特异性 (Millstein 等, 自然, 305 :537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链轻链随机分配,这些杂交瘤 (quadroma) 可能产生 10 种不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。对所述正确分子的纯化 (通常通过亲和层析步骤来进行) 非常复杂,且产量很低。类似的方法见 W093/08829 和 Traunecker 等, EMBO J, 10 :3655-3659(1991)。

[0138] 依据另一种方法,可将具有所需结合特异性 (抗体-抗原结合位点) 的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。该融合优选与包含铰链区的至少一部分、CH2 及 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选使含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区 (CH1) 出现在至少在一种融合中。可将编码免疫球蛋白重链融合体,以及必要时,编码免疫球蛋白轻链的 DNA 插入不同表达载体,共转染至适当宿主生物。这使得在使用非等比的三种多肽链进行构建的实施方案中,能够较灵活地调整三种多肽片段的相互比例,以获得最佳产量。但也可在至少两种多肽链以等比例表达而获得高产时或所述比例无特别意义时,将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一表达载体。

[0139] 在该方法的一个优选实施方案中,所述双特异性抗体由一条臂上的带有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对 (提供第二结合特异性) 构成。已发现这种不对称结构有利于从非必要免疫球蛋白链的混合物中分离出所需双特异性化合物,因为只有该双特异性分子的一半上存在免疫球蛋白轻链,这使得分离更加容易。此方法公开于 W094/04690 中。制备双特异性抗体的进一步细节,见 Suresh 等, 酶学方法, 121 :210(1986)。根据美国专利 5,731,168 所述的另一种方法,可改造一对抗体分子之间的界面,使得从重组细胞培养中获得的异源二聚体的百分比最大。优选的界面包括抗体恒定区 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中,源于第一抗体分子界面上的一条或多条氨基酸小侧链被较大侧链 (如酪氨酸或色氨酸) 取代。与所述大侧链大小相同或相近的互补“沟”可通过将氨基酸大侧链用小侧链 (如丙氨酸或苏氨酸) 取代而在第二抗体分子的界面上形成。这使得异二聚体的产量比不想要的终产物如同型二聚体的高。

[0140] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源偶联的”抗体。例如,可使异源偶联物中的抗体之一与生物素蛋白偶联,使另一抗体与生物素偶联。有观点认为,这类抗体可用于将免疫细胞导向不想要的细胞 (美国专利 4676980),也可用于治疗 HIV 感染 (W091/00360, W092/200373, EP03089)。异源偶联抗体可通过任何适当的交联方法制备。适当的交联制剂和多种交联技术为本领域已知,可在美国专利 4676980 号中获得。

[0141] 从抗体片段制备双特异性抗体的技术已有文献。例如,双特异性抗体可利用化学连接制备。Brennan 等, 科学 229 :81(1985) 中描述了将完整抗体经蛋白水解制备 F(ab')₂ 片段的方法。

[0142] 直接从重组细胞培养中制备并分离双特异性抗体片段的多种技术也已有描述。例如,可用亮氨酸拉链制备双特异性抗体。Kostelny 等,免疫学杂志,148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的 Fab' 部分通过基因融合而连接。使抗体的同型二聚体在铰链区被还原成单体,然后被再氧化形成抗体的异二聚体。该方法也可用于制备抗体同型二聚体。由 Hollinger 等,美国国家科学院学报,90:6444-6448(1993)描述的“二价抗体”技术提供了另一种制备双特异性抗体片段的方法。所述片段中含有重链可变区 (V_H),其通过接头与轻链可变区 (V_L) 相连,该接头非常短,使得同一链的两个结构域之间无法配对。因此,同一片段上的 V_H 和 V_L 结构域被迫与另一片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。此外还报道了另一种用单链 Fv (sFv) 二聚体来制备双特异性抗体的策略。见 Gruber 等,免疫学杂志,152:5368(1994)。

[0143] 还考虑了二价以上的抗体。如可制备三特异性抗体。Tutt 等,免疫学杂志,147:60(1991)。

[0144] IV. 偶联以及对拮抗剂或抗体的其它修饰

[0145] 本文方法或制品中提到的拮抗剂或抗体可任选与细胞毒制剂偶联。

[0146] 可用于制备这些拮抗剂或抗体-细胞毒制剂偶联物的化疗试剂如上述。

[0147] 本文还涉及拮抗剂或抗体与一或多种小分子毒素,如加利车霉素,美登素(美国专利 5,208,020),单端孢霉烯(trichothene),CC1065 的偶联物。在本发明的一个实施方案中,使拮抗剂与一或多个美登素分子偶联(如每个拮抗剂分子与约 1-10 个美登素分子偶联)。美登素可转化成 May-SS-Me,然后还原成 May-SH3,并与修饰过的拮抗剂或抗体反应(Chari 等,癌症研究 52:127-131(1992))产生美登素生物碱-拮抗剂或抗体偶联物。

[0148] 另外,拮抗剂或抗体可以与一或多个加利车霉素分子结合。加利车霉素家族的抗生素能在亚 pM 浓度水平产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素结构类似物包括,但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG 以及 θ_1^I (Hinman 等,癌症研究 53:3336-3342(1993)和 Lode 等,癌症研究 58:2925-2928(1998))。

[0149] 可以应用的酶活性毒素及其片段包括:白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α -帚曲毒素、油桐(Aleutites fordii)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(Phytolacca Americana)蛋白(PAPI, PAPII, PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制因子、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(saponaire officinalis)抑制剂、白树毒素,米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素(tricothecenes)。例见 1993 年 10 月 28 日公开的 W093/21232。

[0150] 本发明还涉及与具有核裂解活性的化合物(如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶如脱氧核糖核酸酶;DNase)偶联的拮抗剂或抗体。

[0151] 多种放射性同位素可用于制备放射性偶联的拮抗剂或抗体,实例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 以及 Lu 的放射性同位素。

[0152] 拮抗剂或抗体与细胞毒制剂的偶联物可通过多种双功能蛋白偶联剂来连接,所述双功能蛋白偶联剂如:N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯,iminothiolane(IT),亚氨酸酯的双功

能衍生物（如亚氨基己二酸二甲酯盐酸盐），活性酯类（如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯），醛类（如戊二醛（glutaredialdehyde）），双-叠氮化合物（如双（对-叠氮基苯甲酰基）己二胺），双-重氮衍生物（如双-（对-重氮苯甲酰基）-乙二胺），二异氰酸酯（如亚甲代苯基 2,6-二异氰酸酯），和双-活性氟化合物（如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯）。例如，蓖麻毒蛋白免疫毒素可如 Vitetta 等，科学 238 :1098(1987) 所述制备。C14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三氨五乙酸酯（MX-DTPA）是将放射性核苷酸偶联至拮抗剂或抗体的偶联剂之一。见 W094/11026。这种接头可能是有利于细胞毒药物在细胞内释放的“可断开的接头”。例如，可使用酸不稳定型接头，肽酶敏感型接头，二甲基接头或含二硫键的接头（Chari 等，癌症研究 52 :127-131(1992)）。

[0153] 或者，可通过重组技术或肽合成来获得拮抗剂或抗体与细胞毒制剂的融合蛋白。

[0154] 本发明的拮抗剂或抗体还可与前体药物活化酶相结合，该酶可以将前体药物（如肽基化疗剂，见 W081/01145）转化为活性抗癌药物。见 W088/07378 和美国专利 4,975,278。

[0155] 这些偶联物中的酶组分包括能作用于前体药物使其转化为活性更强的细胞毒形式的任何酶。

[0156] 本发明的方法中用到的酶包括，但不限于，能将含磷酸基的前体药物转化为游离药物的碱性磷酸酶；可将含硫酸基的前体药物转化为游离药物的芳香基硫酸酯酶；将无毒的 5-氟胞嘧啶转化为抗癌药物，如 5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶；能将含肽的前体药物转化为游离药物的蛋白酶，如沙雷氏菌属蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶（如组织蛋白酶 B 和 L）等；可转化含 D-氨基酸取代基的前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶；能将糖基化前体药物转化为游离药物的碳水化合物裂解酶类如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶；能将 β -内酰胺衍生的药物转化为游离药物的 β -内酰胺酶；能在药物中的氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基转化而使药物游离的青霉素酰胺酶如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者，可用本领域称为“抗体酶”的具有酶活性的抗体，将本发明的前体药物转化为游离的活性药物（见 Massey，自然 328 :457-458(1987)）。可如本文所述制备拮抗剂-抗体酶偶联物以便将抗体酶运送至肿瘤细胞群。

[0157] 本发明的酶可通过本领域已知的技术，如上述异源双功能交联试剂的使用而与拮抗剂或抗体共价结合。或者，可以通过本领域已知的 DNA 重组技术（如 Neuberger 等，自然，312 :604-608(1984)）构建含至少本发明拮抗剂或抗体的抗原结合区的融合蛋白，所述拮抗剂或抗体与本发明酶的至少一个功能活性部分连接。

[0158] 本文还涉及对拮抗剂或抗体的其它修饰。例如，拮抗剂或抗体可与一种非蛋白多聚物，如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯（polyoxyalkylene）、或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物连接。

[0159] 本文公开的拮抗剂或抗体还可配成脂质体。含拮抗剂或抗体的脂质体可通过本领域已知方法制备，如 Epstein 等，美国国家科学院学报 82 :3688(1985)；Hwang 等，美国国家科学院学报 77 :4030(1980)；美国专利 4,485,045 和 4,544,545 及 1997 年 10 月 23 日公开的 W097/38731。在美国专利 5,013,566 中公开了循环寿命增加了的脂质体。

[0160] 特别有效的脂质体可利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺（PEG-PE）的脂质组合物经反相蒸发法产生。脂质体通过一定孔径大小的滤膜而挤出后获得具有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可如 Martin 等，生物学化学杂志，257 :

286-288(1982)所述,经二硫化物交换反应与脂质体偶联。可任选在所述脂质体中包含一种化疗制剂。见 Gabizon 等, J. National Cancer Inst, 81(19)1484(1989)。

[0161] 本发明还涉及对本文所述蛋白质或肽类拮抗剂或抗体的氨基酸序列修饰。例如,可需要改进拮抗剂或抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。拮抗剂或抗体的氨基酸序列变体可通过在拮抗剂或抗体的核酸中导入适当的核苷酸改变,或通过肽合成法来制备。所述修饰包括,如该拮抗剂或抗体的氨基酸序列中的残基缺失,和/或插入和/或取代。可对缺失、插入、和取代进行任意组合以获得最终构建体,只要该最终构建体具有所需特性。氨基酸的变化还可改变拮抗剂或抗体的翻译后加工,如改变糖基化位点的数目或位置。

[0162] 一种鉴别拮抗剂或抗体中处于诱变优选位置的特定残基或区域的有效方法是 Cunningham 和 Wells, 科学 244:1081-1085(1989)所述的“丙氨酸扫描诱变”。这里,鉴定一个残基或一组靶残基(例如,带电的残基如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸)并用中性或带负电的氨基酸取代(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)取代,以便影响氨基酸与抗原的相互作用。那些证实对取代具有功能敏感性的氨基酸位置通过在取代点引入进一步的或其他的变体而改进。故,尽管引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但突变本身不必是预定的。例如,为分析在指定位点处突变的作用,在所述靶密码子或区域实行丙氨酸扫描或随机诱变,并筛选所表达的具有预期活性的拮抗剂或抗体变体。

[0163] 氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-端的融合(其长度从一个残基至包括100个或更多残基的多肽),以及序列内单个或多个氨基酸残基的插入。末端插入的例子包括带有N-末端甲硫氨酰残基的拮抗剂或抗体或与细胞毒性多肽融合的拮抗剂或抗体。拮抗剂或抗体分子的其它插入变体包括在酶或多肽的拮抗剂或抗体的N-或C-末端进行融合,以增加拮抗剂或抗体在血清中的半衰期。

[0164] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体使拮抗剂或抗体分子中至少一个氨基酸残基被不同残基取代。抗体拮抗剂分子中最有兴趣进行取代诱变的位点包括高变区,也可以改变FR。保守取代见表1的“优先取代”栏。如果这些取代引起生物学活性的改变,则可引入表1中“取代举例”栏的更实质性改变,或进一步在下文的氨基酸分类中所述的更实质性改变,并筛选产物。

[0165] 表1

[0166]

原始残基	取代举例	优先取代
Ala(A)	val ;leu ;ile	val
Arg(R)	lys ;gln ;asn	lys
Asn(N)	gln ;his ;asp ;lys ;arg	gln
Asp(D)	glu ;asn	glu
Cys(C)	ser ;ala	ser

原始残基	取代举例	优先取代
Gln(Q)	asn ;glu	asn
Glu(E)	asp ;gln	asp
Gly(G)	ala	ala
His(H)	Asn ;gln ;lys ;arg	arg
Ile(I)	Leu ;val ;met ;ala ;phe ;正亮氨酸	leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;ile ;val ;met ;ala ;phe	ile
Lys(K)	arg ;gln ;asn	arg
Met(M)	leu ;phe ;ile	leu
Phe(F)	leu ;val ;ile ;ala ;tyr	tyr
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr ;phe	tyr
Tyr(Y)	trp ;phe ;thr ;ser	phe
Val(V)	ile ;leu ;met ;pheala ;正亮氨酸	leu

[0167] 对拮抗剂或抗体的生物学特性的实质性修改可通过选择性取代来完成,所述取代的效应在维持(a)取代区多肽骨架的结构,例如片层结构或螺旋构象,(b)该分子靶位点的电荷或疏水性,(c)侧链的大小这几方面有显著差异。天然残基根据共有的侧链特性可分为:

[0168] (1) 疏水性:正亮氨酸,蛋氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸异亮氨酸

[0169] (2) 中性亲水:半胱氨酸,丝氨酸,苏氨酸

[0170] (3) 酸性:天冬氨酸,谷氨酸

[0171] (4) 碱性:天冬酰胺,谷氨酰胺,组氨酸,赖氨酸,精氨酸

[0172] (5) 影响侧链定向的残基:甘氨酸,脯氨酸

[0173] (6) 芳香族:色氨酸,酪氨酸,苯丙氨酸。

[0174] 非保守取代将限定上述某一类的成员被另一类取代。

[0175] 与维持拮抗剂或抗体正确构象有关的任何半胱氨酸残基也可被取代,如被丝氨酸取代,以提高该分子的氧化稳定性,并阻止异常交联。相反,可在拮抗剂或抗体中添加半胱氨酸连接以提高其稳定性(特别当拮抗剂为抗体片段如 FV 片段时)。

[0176] 取代变体的特别优选类型包括取代亲本抗体高变区的一或多个残基。通常,所选用于进一步开发的变体相对于其亲本抗体应具有改进的生物学活性。产生这种取代变体的一个方便方法是利用了噬菌体展示的亲和力成熟。简单地说,使高变区的几个位点(如 6-7 个位点)突变以便在每一位点产生所有可能的氨基酸取代。这样产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,其为与每个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合体。然后筛选噬菌体展示的变体是否具有本文所述生物学活性(如结合亲和力)。为了鉴定备选的高变区修饰位点,可通过丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合作出主要贡献的高变区残基。此外,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以确定抗原与抗体之间的接触点也较有利。这些接触残基及其邻近残基是根据本文所述技术进行取代的候选位点。一旦产生这样的变体,如本文所述对它们全部进行筛选,选出在一或多个相关实验中具有优势特性的抗体以便进一步开发。

[0177] 拮抗剂或抗体的另一种氨基酸变体改变了拮抗剂或抗体原来的糖基化模式。所谓改变就是去掉拮抗剂或抗体中的一或多个碳水化合物部分,和/或添加一或多个原本不存在于该拮抗剂或抗体中的糖基化位点。

[0178] 多肽的糖基化通常为 N-连接或 O-连接。N-连接指将碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链相连。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸以外的任何氨基酸)是使碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促相连的识别序列。因此,多肽中存在上述任一种三肽序列都可产生潜在的糖基化位点。O-连接糖基化指将 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖附着于羟基氨基酸,主要是丝氨酸、苏氨酸,但也可用 5-羟脯氨酸和 5-羟赖氨酸。

[0179] 在拮抗剂或抗体分子中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列,使其包含一或多个上述三肽序列(在 N-连接糖基化位点的情况下)而实现。这种改变也可通过在原始的拮抗剂或抗体序列中添加或取代一或多个丝氨酸或苏氨酸残基来实现(在 O-连接的糖基化位点的情况下)。

[0180] 编码拮抗剂或抗体的氨基酸序列变体的核酸分子由本领域已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然氨基酸序列变体的情况下),或通过对早期制备的拮抗剂或抗体的变体或未变异的拮抗剂或抗体进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变,PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0181] 也可预期修饰拮抗剂或抗体的效应物功能,如以此增强拮抗剂或抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒作用(CDC)。这可以通过在抗体拮抗剂 F_c 区引入一或多个氨基酸取代而获得。此外,可在 F_c 区引入半胱氨酸残基,使得在此区形成链间二硫键。由此产生的同型二聚体抗体可提高内在化能力和/或增强补体介导的细胞杀伤作用和 ADCC。见 Caron 等,实验医学杂志 176:1191-1195(1992) 和 Shopes, B. 免疫学杂志 148:2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体也可用 Wolffe 等,癌症研究 53:2560-2565(1993) 所述异源双功能交联剂制备。或者,可通过工程改造产

生具有双 F_c 区并因此具有增强的补体裂解效应及 ADCC 能力的抗体。见 Stevenson 等, 抗癌药物的设计 (抗-Cancer drug design) 3:219-230(1989)。具有改变的 (增强的或减弱的) Clq 结合和 / 或 CDC 活性的抗体描述于美国专利 6, 194, 551B1 和 6, 538, 124B1 (Idusogie et al.), 包含在本文作为参考。具有改变的 FcR 结合和 / 或 ADCC 活性的抗体描述于 W000/42072 (Presta, L.), 包含在本文作为参考。

[0182] 为了提高拮抗剂或抗体的血清半衰期, 一种方法是在拮抗剂或抗体 (尤其抗体片段) 上掺入一个补救受体结合表位, 如美国专利 5, 739, 277 所述。本文中术语“补救受体结合表位”是指 IgG (例如 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 或 IgG₄) Fc 区中负责延长该 IgG 分子的体内血清半衰期的表位。可选或此外, 可通过改变抗体的 Fc 区的氨基酸序列产生 FcRn 结合改变的变体来增加, 或降低血清半寿期。FcRn 结合和 / 或血清半寿期改变的抗体描述于 W000/42072 (Presta, L.), 包含在本文作为参考。

[0183] V. 药用制剂

[0184] 根据本发明使用的拮抗剂或抗体的药用制剂通过将具有所需纯度的拮抗剂或抗体与任选的药用载体、赋形剂或稳定剂 (雷氏药学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) 第 16 版, Osol, A. 编 (1980)) 混合而制备, 然后以冻干剂或含水剂的形式保存。可药用载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性, 并包括缓冲剂例如磷酸盐, 柠檬酸盐及其它有机酸; 抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸; 防腐剂 (例如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 氯化己烷双胺; 氯化苄烷铵 (benzalkonium chloride), 苯索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 间甲酚); 低分子量多肽 (少于 10 个残基); 蛋白质如血清白蛋白, 明胶或免疫球蛋白; 亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸如甘氨酸, 谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖, 二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精; 螯合剂如 EDTA; 糖类如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐反离子如钠; 金属复合物 (例如锌-蛋白复合物); 和 / 或非离子表面活性剂如吐温™, PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0185] 抗 CD20 抗体制剂的实例如 W098/56418 所述, 其已引入本文作为参考。其描述了一种液体多剂量制剂, 该制剂包含 40mg/ml 美罗华, 25mM 乙酸, 150mM 海藻糖, 0.9% 苯甲醇, 0.02% 聚山梨酸酯 (polysorbate) 20, pH 5.0, 在 2-8°C 至少可保存 2 年。另一种抗 CD20 目标制剂在 9.0mg/ml 氯化钠, 7.35mg/ml 二水柠檬酸钠, 0.7mg/ml 聚山梨酸酯 80, 注射用无菌水, pH6.5 中包含 10mg/ml 美罗华。

[0186] 适于皮下给药的冻干剂见 W097/04801 所述。这种冻干剂可用适当稀释剂重新恢复至高蛋白浓度, 所重建的制剂可皮下给药至这里所治疗的哺乳动物。

[0187] 所述制剂还可根据所治疗的具体情况而包含一种以上活性成分, 优选具有互补活性但相互无负面影响的那些。例如, 优选还提供细胞毒试剂, 化疗试剂, 细胞因子或免疫抑制剂 (如作用于 T 细胞的那些, 如环孢菌素或结合 T 细胞的抗体, 如结合 LFA-1 的抗体)。所述其它试剂的有效量取决于该制剂中拮抗剂或抗体的量, 疾病或病症或治疗的类型, 及上述其它因素。通常应用上文所述剂量和给药方式, 或迄今所用剂量的约 1-99%。

[0188] 活性成分也可容纳在通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊中, 如分别在胶体性质的药物运送系统 (如脂质体, 白蛋白小球体, 微乳剂, 纳米颗粒及纳米胶囊) 或大乳剂 (macroemulsions) 的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚 (异丁烯酸甲酯) 微胶囊。这些

技术见雷氏药理学,第16版 Osol, A. 编 (1980)。

[0189] 也可制备控释制剂。控释制剂的适当实例包括含有拮抗剂或抗体的固态疏水聚合物的半通透性基质,所述基质为具有一定形状的制品,如膜或微胶囊。控释制剂实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)或聚(乙烯醇),聚交酯(美国专利 3,773,919),L-谷氨酸与 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物,不可降解的乙烯乙酸乙酯,可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和 leuprolide 乙酸酯组成的可注射的微球体),以及聚 D-(-)-3-羟丁酸。

[0190] 用于体内给药的制剂必须是无菌的。这可以通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

[0191] V. 用拮抗剂或抗体进行治疗

[0192] 本发明涉及利用抗体和拮抗剂治疗各种疾病和病症。如果所述抗体和拮抗剂结合 B 细胞表面标记,诸如 CD20,待治疗的病症包括 B 细胞恶性疾病(见美国专利 6,455,043B1, Grillo-Lopez, 包含在此作为参考),自身免疫疾病(见 W000/67796, Curd et al., 包含在此作为参考)。结合 B 细胞表面标记的拮抗剂或抗体也可用于阻断对外来抗原的免疫反应,例如所述外来抗原是免疫原性药物或移植物的情况(见 W001/03734, Grillo-Lopez et al., 包含在此作为参考)。

[0193] 对于本发明公开的各种指征,含一种与 B 细胞表面抗原结合的拮抗剂或抗体的组合可根据常规医疗实践进行配制、分剂量、并给药。其中应考虑的因素包括所治疗的具体疾病或紊乱,所治疗的具体哺乳动物,具体患者的临床状况,疾病或紊乱的病因,药物的给药部位,给药方法,给药时间表,和医务人员已知的其它因素。拮抗剂或抗体的治疗有效量将参考上述因素而给予。

[0194] 作为常规建议,胃肠道外途径每次给予拮抗剂或抗体的治疗有效量的范围是每天约 0.1-20mg/kg 患者体重,拮抗剂或抗体通常的起始剂量为约 2-10mg/kg。

[0195] 优选的拮抗剂是抗体,如不与细胞毒制剂偶联的 RITUXAN。例如,非偶联型抗体的适当剂量可以是约 20mg/m²-约 1000mg/m²。在一个具体实施方案中,抗体剂量不同于目前推荐的 RITUXAN®。例如,可给予患者一或多剂抗体,每剂基本上少于 375mg/m²,每周 ×4 或 8;或 1000mg × 2(例如在第 1 和 15 天)。

[0196] 但如上所述,应在多种治疗中谨慎考虑拮抗剂或抗体的这些建议剂量。其结果是选择适当剂量和给药时间表的关键因素,如上所示。例如治疗进行性疾病和急性疾病可能需要相对较高的起始剂量。为针对疾病或紊乱获得最有效的结果,应尽可能在接近于疾病或紊乱的首次症状、诊断、表现、或发生时或在疾病或紊乱缓解期间给予拮抗剂或抗体。

[0197] 拮抗剂或抗体可通过任何适当方式给药,包括胃肠道外、皮下、腹膜内、肺内、和鼻内途径,如需进行局部免疫抑制治疗,可在病损内给药。胃肠道外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下给药。此外,拮抗剂或抗体适于经脉冲输注给药,如,使用剂量递减的拮抗剂或抗体输注。优选经注射给药,最优选静脉注射或皮下注射,其取决于给药是短期的还是长期的。

[0198] 可与本文拮抗剂或抗体一起给予其它化合物,如细胞毒试剂、化疗试剂、免疫抑制剂和/或细胞因子。组合给药包括同时给药各自的制剂或单一可药用制剂,还包括以任何顺序连续给药,其中优选有一段时间使两种(或所有)活性试剂同时发挥它们的生物学活性。

[0199] 对于 RA, 以及其它自身免疫疾病, 所述拮抗剂或抗体 (例如 CD20 抗体) 可与以下物质联用: 以上定义部分所列的任何一或多种免疫抑制剂、化疗剂和 / 或细胞因子; 任何一或多种改变疾病的抗风湿药物 (DMARDs), 诸如羟氯喹 (hydroxychloroquine), 柳氮磺吡啶 (sulfasalazine), 甲氨喋呤 (methotrexate), 来氟米特 (leflunomide), 硫唑嘌呤 (azathioprine), D- 青霉胺 (penicillamine), 金 (口服), 金 (肌内), 米诺环素 (minocycline), 环孢霉素 (cyclosporine), 葡萄球菌蛋白 A 免疫吸附 (Staphylococcal protein A immunoadsorption); 静脉内免疫球蛋白 (intravenous immunoglobulin) (IVIG); 非类固醇抗炎药物 (nonsteroidal antiinflammatory drugs) (NSAIDs); 糖皮质激素 (glucocorticoid) (例如经由关节注射); 皮质类固醇 (例如甲基强的松龙 (methylprednisolone) 和 / 或强的松 (prednisone)); 叶酸盐 / 酯 (folate); 抗肿瘤坏死因子 (TNF) 抗体, 例如 etanercept/ENBREL™, infliximab/REMICADE™, D2E7 (Kno11) 或 CDP-870 (Celltech); IL-1R 拮抗剂 (例如 Kineret); IL-10 拮抗剂 (例如 Ilodecakin); 血凝调节物 (例如 WinRho); IL-6 拮抗剂 / 抗 -TNF (CBP1011); CD40 拮抗剂 (例如 IDEC 131); Ig-Fc 受体拮抗剂 (MDX33); 免疫调节物 (例如沙利度胺 (thalidomide) 或 ImmuDyn); 抗 -CD5 抗体 (例如 H5g1.1); 巨噬细胞抑制物 (例如 MDX 33); 共刺激阻断物 (例如 BMS 188667 或 Tolerimab); 补体抑制物 (例如 h5G1.1, 3E10 或抗 - 衰减加速因子 (DAF) 抗体); 或 IL-2 拮抗剂 (zxSMART)。

[0200] 对于 B 细胞恶性疾病, 所述拮抗剂或抗体 (例如 CD20 抗体) 可与以下物质联用: 化疗剂; 细胞因子, 例如淋巴因子诸如 IL-2, IL-12, 或干扰素, 诸如干扰素 alpha-2a; 其它抗体, 例如放射标记的抗体诸如 ibritumomab tiuxetan (ZEVALIN®), 碘 I131 tositumomab (BEXXAR™), I131 Lym-1 (ONCOLYM™), 90Y-LYMPHOCIDE™; 抗 -CD52 抗体, 诸如 alemtuzumab (CAMPATH-1H™), 抗 -HLA-DR-β 抗体, 诸如 apolizumab, 抗 -CD80 抗体 (例如 IDEC-114), epratuzumab, Hu1D10 (SMART 1D10™), CD19 抗体, CD40 抗体或 CD22 抗体; 免疫调节物 (例如沙利度胺或 ImmuDyn); 血管生成抑制物 (例如抗 - 血管内皮生长因子 (VEGF) 抗体诸如 AVASTIN™ 或沙利度胺); 独特型疫苗 (EPOCH); ONCO-TCS™; HSPPC-96 (ONCOPHAGE™); 脂质体治疗 (例如柔红霉素柠檬酸酯脂质体 (daunorubicin citrate liposome)) 等。

[0201] 与 CD20 抗体 (或结合 B 细胞表面标记的拮抗剂) 联用的优选的化疗剂是烷化剂或基于蒽环类抗生素的化疗剂或基于氟达拉滨 (fludarabine) 的化疗剂; 顺铂 (cisplatin), 氟达拉滨, 长春碱 (vinblastine), 阿霉素 (doxorubicin), 环磷酰胺 (cyclophosphamide), 和 / 或长春新碱 (长春新碱)。对于 CD20 抗体或其它结合 B 细胞表面标记的抗体, 具体是所需与抗体联用的化疗剂, 包括但不限于: 环磷酰胺, 阿霉素, 长春新碱和强的松 (CHOP) (Czuczman et al. J Clin Oncol 17:268-76 (1999)); 环磷酰胺, 长春新碱, 和强的松 (CVP); 氟达拉滨 (例如 for treating CLL); 氟达拉滨, 环磷酰胺, 和米托蒽醌 (mitoxantrone) (FCM); 或阿霉素, 博来霉素, 长春碱, 和达卡巴嗪 (dacarbazine) (ABVD)。

[0202] 所述拮抗剂或抗体也可用于骨髓废除性 (myeloablative) 方案。例如, 所述拮抗剂或抗体可用于体内洗涤然后进行干细胞收集, 或移植后, 用于清除最小残余疾病。

[0203] 除了将蛋白质拮抗剂或抗体给予患者, 本发明还涉及通过基因治疗给药拮抗剂或抗体。见, 例如 1996-3-14 公开的 W096/07321, 其涉及利用基因治疗产生细胞内抗体。

[0204] 有两种主要方法可将核酸 (任选包含在载体中) 引入患者细胞; 体内和离体 (ex

vivo)。体内运送核酸指直接给病人注射,通常注射至需要拮抗剂或抗体的位点。离体治疗是将患者细胞取出,将核酸引入这些分离的细胞,然后将这些已改变的细胞直接给予患者或装入多孔膜中再植入患者体内(见美国专利 4,892,538 和 5,283,187)。有多种技术可用于将核酸引入活细胞。可根据是将核酸转移至体外培养的细胞,还是转移至目标宿主的体内细胞而使用不同方法。适于将核酸转移至体外哺乳动物细胞的技术有脂质体的应用、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀法等。常用于离体运送基因的载体是逆转录病毒。

[0205] 目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(如腺病毒,单纯疱疹病毒 I 型或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(可用于基因的脂质介导型转移的有效脂质有 DOTMA, DOPE 和 DC-Chol)。某些情况下,希望提供一种带有能靶向靶细胞的试剂(如特异于细胞表面膜蛋白或靶细胞的抗体,针对靶细胞表面受体的配体,等)的核酸来源。当使用脂质体时,可使用能结合胞吞作用相关性细胞表面膜蛋白的蛋白来靶向和/或促进对下述蛋白的吸收,所述蛋白如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段,在循环中进行内在化的蛋白的抗体,靶向细胞内定位和提高细胞内半衰期的蛋白。受体介导型胞吞作用的技术见 Wu 等,生物学化学杂志 262:4429-4432(1987);和 Wagner 等,美国国家科学院学报,87:3410-3414(1990)。有关目前已知的基因制备和基因治疗方案的综述见 Anderson 等,科学 256:808-813(1992)。亦参见 W093/25673。

[0206] 本发明的更详细内容通过以下非限制性实施例举例说明。本说明书中所引用的所有文献均引入作为参考。

[0207] 实施例 1

[0208] 补体依赖性细胞毒测定法,用于检测抗美罗华的中和型抗体

[0209] 美罗华通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)和或补体依赖性细胞毒(CDC)来耗竭 CD20+B 细胞来显示其生物功能。在体外,CDC 活性可通过将 CD20+WIL2-S 淋巴瘤细胞与人补体在缺乏或存在不同浓度美罗华的条件下进行保温来测定。细胞毒随后可通过利用 ALAMARBLUE®定量活细胞来测定(Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202 163-171(1997))。

[0210] 该样品中,鉴定来自用美罗华(其产生 HACA)治疗的患者的血清样品。HACA 阳性血清,其可通过免疫耗竭(immunodepletion)证实,随后接受下述的中和型抗体试验。HACA 测定法与美罗华桥接,捕获试剂和生物素化的美罗华作为检测剂。所述测定法具有校准的标准曲线,其利用美罗华的多克隆山羊抗体制备。所述测定法中样品的最小稀释度是 1/5,最低标准为 1RU(相对单位)/mL。低于 5RU/mL(相对于 1/5 稀释因子校准的值)的样品反应被认为 HACA 阴性。

[0211] 开发用于检测抗美罗华的中和型抗体的测定法。所述中和型抗体测定法利用 RPMI 1640 培养基进行,所述培养基中补充了 0.1% 牛血清白蛋白(BSA),20mM HEPES(pH 7.2-7.4),和 0.1mM 庆大霉素。所述测定法被开发并利用亲和力纯化的多克隆山羊抗美罗华抗体校准。当在缓冲基质中进行测定时,通常将 1-10 μ L 山羊抗-美罗华与 50 μ L 各种浓度的(0-10 μ g/mL)美罗华在平底 96 孔组织培养板中预保温。在室温预保温 1-2 小时后,加入 50 μ L 在试验培养基中稀释的 1/3 人补体,50 μ L WIL2-S 淋巴母细胞(10^6 细胞/mL)的试验培养基悬液,将混合物在 37°C、5% CO₂ 保温 2 小时以促进补体介导的细胞裂解。随

后加入 50 μ L 未稀释的 AlamarBlue™, 并继续保温 15-26 小时。允许所述板通过震摇冷却至室温 10 分钟, 利用 96 孔荧光计以激发光 530nm、发射光 590nm 读取荧光。相对荧光单位 (RFU) 相对于美罗华浓度利用 4 参数曲线拟合程序 (Softmax) 作图。通过比较进行和未进行抗体预保温的两条曲线, 抗美罗华抗体的中和能力得以测定。如果抗美罗华抗体中和给定浓度的美罗华的 20% 或更高的活性, 抗美罗华定义为中和能力阳性。这可通过测定中和 1 μ g 美罗华的抗美罗华量进一步定量。测定山羊抗美罗华多克隆抗体中和美罗华的摩尔比约为 3 : 1。

[0212] 由于大多数用于检测的患者样品是血清样品, 评估血清基质对试验性能的影响。在试验培养基中包括 5% 和 10% 的正常人血清对于 4 参数拟合曲线具有最小的影响。上方的渐近线的信号抑制在血清浓度超过 20% 时观察到。然而血清可达 50% 而 IC_{50} 值没有明显移位。这些数据证实了利用 CDC 测定法用于检测抗 - 美罗华抗体而不进一步操作患者的血清样品的可行性。当检测血清样品时, 达 50 μ L 的血清与 50 μ L 美罗华稀释液保温, 然后加入补体和细胞悬液。其余的步骤与上述的相同。对于数据分析, 美罗华处理的血清的中和能力单独与预处理血清进行比较以确定中和活性。所述测定法在血清基质中的敏感性 / 检测限通过将亲和力纯化的山羊抗 - 美罗华掺入正常人血清来测定。利用目前的测定法模式, 血清中的最低可检测最低中和型抗体量为大约 1 μ g/mL。

[0213] 美罗华治疗的系统性红斑狼疮 (SLE) 患者样品具有抗体反应 (HACA+) 通过上述 ELISA 测定法在中和型抗体测定法中检测。基线血清和美罗华治疗后的血清之间观察到明显差异。CDC 活性用 HACA+ 血清完全或部分阻断, 表明经治疗的样品中的中和活性。相比而言, 在美罗华治疗之前获得的血清样品不显示中和活性。

[0214] 总之, 本实施例描述了基于细胞的功能测定法, 补体依赖性细胞毒 (CDC) 测定法, 用于检测美罗华治疗的患者的血清中的中和活性。该测定法将大大有助于定性抗药物抗体反应; 因此其对于评估药物安全性和有效性而言有很大价值。

[0215] 实施例 2

[0216] 治疗自身免疫疾病

[0217] 根据本发明所述的一个实施方案, 本发明所述的测定法可用于患有自身免疫疾病的患者的治疗方案。示例性自身免疫疾病包括类风湿性关节炎 (RA), 系统性红斑狼疮 (SLE), 包括狼疮肾炎, 韦格纳氏病, 炎性肠病, 特发性或血小板减少性紫癜 (ITP), 血栓性血小板减少性紫癜 (TTP), 自身免疫性血小板减少症, 多发性硬化 (MS), 银屑病, IgA 肾病, IgM 多发性神经病, 重症肌无力, 血管炎, 糖尿病, 雷诺综合征, 干燥综合症, 肾小球肾炎和自身免疫性溶血性贫血等。

[0218] 将结合 CD20 的抗体 (例如美罗华或人源化的 2H7) 以有效治疗目的自身免疫疾病的量给药患者。例如, 所述抗体的剂量可为 375mg/m² 每周一次、持续 4 或 8 周, 或 1000mg、第 1 和 15 天给药。所述抗体可选与一或多种用于治疗所述自身免疫疾病的其它药物联用, 所述药物诸如以上定义部分所列的任何一或多种免疫抑制剂、化疗剂和 / 或细胞因子; 任何一或多种改变疾病的抗风湿药物 (DMARDs), 诸如羟氯喹, 柳氮磺吡啶, 甲氨喋呤, 来氟米特, 硫唑嘌呤, D- 青霉胺, 金 (口服), 金 (肌内), 米诺环素, 环孢霉素, 葡萄球菌蛋白 A 免疫吸附; 静脉内免疫球蛋白 (IVIG); 非类固醇抗炎药物 (NSAID); 糖皮质激素 (例如经由关节注射); 皮质类固醇 (例如甲基强的松龙和 / 或强的松); 叶酸盐 / 酯; 抗肿瘤坏

死因子 (TNF) 抗体, 例如 etanercept/ENBREL™, infliximab/REMICADE™, D2E7 (Kno11) 或 CDP-870 (Celltech); IL-1R 拮抗剂 (例如 Kineret); IL-10 拮抗剂 (例如 Ilodecakin); 血凝调节物 (例如 WinRho); IL-6 拮抗剂 / 抗 -TNF (CBP 1011); CD40 拮抗剂 (例如 IDEC 131); Ig-Fc 受体拮抗剂 (MDX33); 免疫调节物 (例如沙利度胺或 ImmuDyn); 抗 -CD5 抗体 (例如 H5g1.1); 巨噬细胞抑制物 (例如 MDX 33); 共刺激阻断物 (例如 BMS 188667 或 Tolerimab); 补体抑制物 (例如 h5G1.1, 3E10 或抗 - 衰减加速因子 (DAF) 抗体); 或 IL-2 拮抗剂 (zxSMART)。

[0219] 包含 HACA (针对美罗华) 或 HAHA (针对人源化的 2H7) 的血清生物样品获自基线、3、6 和 9 个月的患者。对所述血清进行 ELISA 以确定 HACA 或 HAHA 是否存在。所述测定法在以上实施例 1 中描述。

[0220] 所述检测据证实含有 HACA 或 HAHA 的血清中的中和型抗体, 如以上实施例 1 所述。与同样量的预处理对应部分 (即, HACA 和 HAHA 阴性) 相比, 中和给定浓度的美罗华或人源化的 2H7 的大约 20% 和更高的活性的样品可被认为就针对美罗华或人源化的 2H7 的中和型抗体而言是阳性的。阳性结果表明在治疗自身免疫疾病中, 所述抗体的效力降低。

[0221] 实施例 3

[0222] 治疗 B 细胞恶性疾病

[0223] 根据本实施例治疗患有 CD20 阳性 B 细胞恶性疾病的患者, 所述疾病诸如霍奇金病, 包括淋巴细胞优势型霍奇金淋巴瘤 (LPHD), 非霍奇金淋巴瘤 (NHL); 滤泡中心细胞 (FCC) 淋巴瘤; 急性淋巴细胞白血病 (ALL); 慢性淋巴细胞白血病 (CLL); 毛细胞白血病; 浆细胞样淋巴细胞淋巴瘤; 套细胞淋巴瘤; AIDS 和 HIV- 相关的淋巴瘤; 多发性骨髓瘤; 中枢神经系统 (CNS) 淋巴瘤; 移植后淋巴增生性疾病 (PTLD); Waldenstrom's 巨球蛋白血症 (淋巴浆细胞性淋巴瘤); 粘膜相关的淋巴样组织 (MALT) 淋巴瘤; 以及边缘区淋巴瘤 / 白血病。

[0224] 结合 CD20 (例如美罗华或人源化的 2H7) 的抗体以有效治疗目的 B 细胞恶性疾病的量给药患者。例如, 所述抗体的剂量可为 375mg/m² 每周一次、持续 4 或 8 周。

[0225] 可选, CD20 抗体与一或多种化疗剂联用。优选与 CD20 抗体联用的化疗剂是烷化剂或基于蒽环类抗生素的化疗剂或基于氟达拉滨 (fludarabine) 的化疗剂; 顺铂, 氟达拉滨, 长春碱, 阿霉素, 环磷酰胺, 和 / 或长春新碱。具体所需用于与抗体联用的化疗剂包括, 但不限于: 环磷酰胺, 阿霉素, 长春新碱和强的松 (CHOP) (Czuczman et al. J Clin Oncol 17: 268-76 (1999)); 环磷酰胺, 长春新碱, 和强的松 (CVP); 氟达拉滨 (例如用于治疗 CLL); 氟达拉滨, 环磷酰胺, 和米托蒽醌 (FCM); 或阿霉素, 博来霉素, 长春碱, 和达卡巴嗪 (ABVD) 等。

[0226] 包含 HACA (针对美罗华) 或 HAHA (针对人源化的 2H7) 的血清生物样品获自基线、3、6 和 9 个月的患者。对所述血清进行 ELISA 以确定 HACA 或 HAHA 是否存在。所述测定法在以上实施例 1 中描述。

[0227] 随后检测据证实含有 HACA 或 HAHA 的血清中的中和型抗体, 如以上实施例 1 所述。与同样量的预处理对应部分 (即, HACA 和 HAHA 阴性) 相比, 中和给定浓度的美罗华或人源化的 2H7 的大约 20% 和更高的活性的样品可被认为就针对美罗华或人源化的 2H7 的中和型抗体而言是阳性的。阳性结果表明在治疗 B 细胞恶性疾病中, 所述中和型抗体的有效性降低。

[0228] 实施例 4

[0229] 阻断对外来抗原的免疫反应

[0230] 本实施例中,抗-CD20 抗体用于阻断对外来抗原诸如治疗性蛋白(例如小鼠抗体或免疫毒素),基因治疗病毒载体,血液因子(例如因子 VIII),血小板或移植物等的免疫反应。

[0231] CD20 抗体的适宜剂量是 375mg/m²,通过每周 4 或 8 次输注给药。CD20 抗体的给药将降低或消除患者中的免疫反应,由此有利于成功的治疗。

[0232] 为阻断对移植物的免疫反应,CD20 抗体可用作预防急性排斥的联合免疫抑制方案的一部分。在该背景中,CD20 抗体,诸如美罗华或人源化的 2H7,在移植周围期(peritransplant period)作为连续联用方案的一部分给药,其包括针对 T 细胞的药剂,诸如环孢素,皮质类固醇,霉酚酸酯(mycophenolatemofetil),包含或不包含-IL2 受体抗体。由此,CD20 抗体可被认为是诱导方案的一部分,其用于与慢性免疫抑制疗法联用。CD20 抗体可通过抑制同种异体抗体的产生和/或影响抗原呈递细胞的耗竭过程中同种异体抗原的呈递以有助于预防同种异体排斥反应。

[0233] 其它免疫抑制药剂的剂量如下:环孢素(5mg/kg/天);皮质类固醇(1mg/kg,逐渐减量);霉酚酸酯(1g,每天给药两次);和抗-IL2 受体抗体(1mg/kg,每周给予 5 次输注)。CD20 抗体也可与其它免疫抑制药物联用,诸如多克隆抗淋巴细胞抗体或单克隆抗-CD3 抗体;维持性免疫抑制药物,诸如神经钙蛋白(calcineurin)抑制物(例如他克莫司(tacrolimus))和抗增殖药剂(诸如硫唑嘌呤,来氟米特或西罗莫司);或联合方案,包括 T 细胞共刺激的阻断,T 细胞粘附分子的阻断或 T 细胞辅助分子的阻断。

[0234] 除了预防急性排斥,CD20 抗体可用于治疗急性排斥。CD20 的适宜剂量如上所述。CD20 抗体可选与 CD3 单克隆抗体和/或皮质类固醇在急性排斥的治疗中联用。

[0235] CD20 抗体也可(a)在移植后期单独使用,或与其它免疫抑制剂和/或共刺激阻断剂联用,以治疗或预防“慢性”同种异体移植物排斥;(b)作为耐受性诱导方案的一部分;或(c)用于异种移植的背景中。

[0236] 包含 HACA(针对美罗华)或 HAHA(针对人源化的 2H7)的血清生物样品获自基线、3、6 和 9 个月的患者。对所述血清进行 ELISA 以确定 HACA 或 HAHA 是否存在。所述测定法在以上实施例 1 中描述。

[0237] 所述检测据证实含有 HACA 或 HAHA 的血清中的中和型抗体,如以上实施例 1 所述。与同样量的预处理对应部分(即,HACA 和 HAHA 阴性)相比,中和给定浓度的美罗华或人源化的 2H7 的大约 20%和更高的活性的样品可被认为就针对美罗华或人源化的 2H7 的中和型抗体而言是阳性的。阳性结果表明在治疗 B 细胞恶性疾病中,所述中和型抗体的有效性降低。

[0238] 随后检测被证实含有 HACA 或 HAHA 的血清的中和型抗体,如实施例 1 上述。与同样量的预处理对应部分(即,HACA 和 HAHA 阴性)相比,中和给定浓度的美罗华或人源化的 2H7 的大约 20%和更高的活性的样品可被认为就针对美罗华或人源化的 2H7 的中和型抗体而言是阳性的。检测到中和型抗体反应的情况中,这表明所述抗体阻断对目的外来抗原的免疫反应的能力降低。

[0239] 序列表

- [0240] <110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)
- [0241] BERESINI, MAUREEN
- [0242] SONG, AN
- [0243] <120> 人抗 CD20 抗体的测定法及其用途
- [0244] <130>P2032R1 PCT
- [0245] <140>PCT/US2004/020069
- [0246] <141>2004-06-24
- [0247] <150>US 60/490,678
- [0248] <151>2003-07-29
- [0249] <160>4
- [0250] <210>1
- [0251] <211>107
- [0252] <212>PRT
- [0253] <213> 人工序列
- [0254] <220>
- [0255] <223> 序列被合成
- [0256] <400>1
- [0257] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
- [0258] 1 5 10 15
- [0259] Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser
- [0260] 20 25 30
- [0261] Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro
- [0262] 35 40 45
- [0263] Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg
- [0264] 50 55 60
- [0265] Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
- [0266] 65 70 75
- [0267] Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
- [0268] 80 85 90
- [0269] Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
- [0270] 95 100 105
- [0271] Lys Arg
- [0272] <210>2
- [0273] <211>122
- [0274] <212>PRT
- [0275] <213> 人工序列
- [0276] <220>
- [0277] <223> 序列被合成
- [0278] <400>2

[0279]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
[0280]	1 5 10 15
[0281]	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
[0282]	20 25 30
[0283]	Ser Tyr Asn Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0284]	35 40 45
[0285]	Glu Trp Val Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr
[0286]	50 55 60
[0287]	Asn Gln Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser
[0288]	65 70 75
[0289]	Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
[0290]	80 85 90
[0291]	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser
[0292]	95 100 105
[0293]	Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0294]	110 115 120
[0295]	Ser Ser
[0296]	<210>3
[0297]	<211>232
[0298]	<212>PRT
[0299]	<213> 人工序列
[0300]	<220>
[0301]	<223> 序列被合成
[0302]	<400>3
[0303]	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
[0304]	1 5 10 15
[0305]	Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
[0306]	20 25 30
[0307]	Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
[0308]	35 40 45
[0309]	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
[0310]	50 55 60
[0311]	Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ala Pro Ser Asn Leu Ala Ser Gly
[0312]	65 70 75
[0313]	Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
[0314]	80 85 90
[0315]	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
[0316]	95 100 105
[0317]	Cys Gln Gln Trp Ser Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr

[0318]					110					115					120
[0319]	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile
[0320]					125					130					135
[0321]	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val
[0322]					140					145					150

专利名称(译)	人抗CD20抗体的测定法及其用途		
公开(公告)号	CN1860367B	公开(公告)日	2010-05-26
申请号	CN200480028080.6	申请日	2004-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
[标]发明人	莫林贝雷西尼 宋安		
发明人	莫林·贝雷西尼 宋安		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/53 G01N33/567 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/57492 G01N2333/70596 A61P1/04 A61P13/12 A61P17/06 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00		
审查员(译)	王晓媛		
优先权	60/490678 2003-07-29 US		
其他公开文献	CN1860367A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及治疗性抗体诸如CD20抗体的中和型抗体的检测法。所述测定法可用于测定免疫疗法中抗体的效力。

ABSTRACT BACKGROUND OF THE INVENTION The development of HAMA after Bexxar™ therapy does not preclude treatment with rituximab. Blood. 96 (11 Part 1, 2000), 96 (11 Part 1), 734a.
Leo I. Gordon, Christine A. White, John P. Leonard et al. Zevalin™ radioimmunotherapy is associated with an incidence of human-anti mouse antibody (HAMA) and human anti-Rituxan (R) antibody response. Blood. 98 (11 Part 2), 98 (11 Part 2), 228b.

审查员 王晓媛