



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101454025 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 01

(21) 申请号 200780019220. 7

C07K 1/36 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 04. 04

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/789, 725 2006. 04. 05 US

60/790, 414 2006. 04. 06 US

CN 1299370 A, 2001. 06. 13,

CN 1299370 A, 2001. 06. 13,

CN 1563090 A, 2005. 01. 12,

CN 1563090 A, 2005. 01. 12,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 11. 25

US 6090382 A, 2000. 07. 18,

US 2003/0166869 A1, 2003. 09. 04,

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/008359 2007. 04. 04

US 6870034 B2, 2005. 03. 22,

Paul Emery. Adalimumab therapy: clinical

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/117490 EN 2007. 10. 18

findings and implications for integration

into clinical guidelines for rheumatoid

arthritis.. 《Drugs of Today》. 2005, 第 41 卷

(第 3 期),

(73) 专利权人 艾伯维生物技术有限公司

地址 百慕大哈米尔顿

C. Kempf. Virus inactivation during

production of intravenous immunoglobulin..

《Transfusion》. 1991, 第 31 卷 (第 5 期),

(72) 发明人 M·W·万 G·阿夫格尼诺斯

G·扎比斯-帕帕斯托伊特西斯

审查员 于仁涛

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘冬 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 16/24 (2006. 01)

C07K 1/18 (2006. 01)

C07K 1/20 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书95页

序列表14页 附图5页

(54) 发明名称

抗体纯化

(57) 摘要

本发明提供用以从包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质 (HCP) 的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的方法, 所述方法包括离子交换步骤, 其中将该混合物施加到第一离子交换材料, 由此获得 HCP 降低的抗体制品。

1. 一种用以从包含抗体或其抗原结合部分和至少一种宿主细胞蛋白质的混合物生产宿主细胞蛋白质降低的抗体制品的的方法,所述方法包括以下步骤:

将所述混合物施加到在平衡缓冲液中的阳离子交换树脂,其中施加量大于 30 克抗体 / 升阳离子交换树脂;

以多个洗涤步骤从所述阳离子交换树脂洗涤宿主细胞蛋白质,其中所述多个洗涤步骤包括至少第一次洗涤和第二次洗涤,其中从第一次洗涤到第二次洗涤电导率有增加,且其中所述第一次洗涤是用平衡缓冲液进行的,第二次洗涤是用洗脱缓冲液和水的混合物进行的;

用洗脱缓冲液从所述阳离子交换树脂洗脱所述抗体形成第一洗脱物;

将所述第一洗脱物施加到阴离子交换树脂,其中在将所述第一洗脱物施加到阴离子交换树脂前,将所述第一洗脱物的 pH 和电导率调整到与所述阴离子交换树脂的 pH 和电导率相似;和

获得包含所述抗体的第一流通物,

由此获得所述宿主细胞蛋白质降低的抗体制品,

其中所述抗体或其抗原结合部分是阿达木单抗或其抗原结合部分。

2. 权利要求 1 的方法,其中施加量为 35-70 克抗体 / 升阳离子交换树脂。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述阳离子交换树脂为 pH5,且施加量为 70 克抗体 / 升阳离子交换树脂。

4. 权利要求 1 的方法,其中包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质的所述混合物在被施加到阳离子交换树脂前不被施以 A 蛋白捕捉。

5. 权利要求 1 的方法,其中洗脱缓冲液和水的混合物包含 40-50%洗脱缓冲液和 50-60%水。

6. 权利要求 5 的方法,其中洗脱缓冲液和水的混合物包含 45%洗脱缓冲液和 55%水。

7. 权利要求 6 的方法,其中洗脱缓冲液包含 20mM 磷酸钠和 150mM 氯化钠。

8. 权利要求 1 的方法,所述方法在 pH7 下进行。

9. 权利要求 1 的方法,所述方法在 pH5 至 pH7 的 pH 下进行。

10. 权利要求 1 的方法,所述方法在 pH5 下进行。

11. 权利要求 1 的方法,其中将所述阳离子交换树脂形成柱子,将包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质的混合物施加到所述柱子。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述阳离子交换树脂包含与磺酸基连接的基于合成的甲基丙烯酸酯的聚合物树脂。

13. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括将第一洗脱物进行病毒灭活步骤。

14. 权利要求 13 的方法,其中病毒灭活是通过 pH 病毒灭活来实现,以形成病毒灭活制品。

15. 权利要求 14 的方法,其中将病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂,其中在将病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂前,将病毒灭活制品的 pH 和电导率调整到与阴离子交换树脂的 pH 和电导率相似。

16. 权利要求 15 的方法,其中阴离子交换树脂的 pH 在 pH7.7 至 pH8.3 的范围,病毒灭活制品的 pH 调整到 pH7.7 至 pH8.3 的范围。

17. 权利要求 16 的方法,其中阴离子交换树脂的 pH 为 pH8.0,病毒灭活制品的 pH 调整到 pH8.0。

18. 权利要求 15 的方法,其中阴离子交换树脂的电导率在 3.5mS/cm 至 5.2mS/cm 的范围,病毒灭活制品的电导率调整到 3.5mS/cm 至 5.2mS/cm 的范围。

19. 权利要求 18 的方法,其中阴离子交换树脂的电导率为 5.0mS/cm,病毒灭活制品的电导率调整到 5.0mS/cm。

20. 权利要求 15 的方法,其中所述阴离子交换树脂是 Q 琼脂糖凝胶树脂。

21. 权利要求 15 的方法,其中将阴离子交换树脂形成柱子,将病毒灭活制品施加到所述柱子,由此获得第一流通物。

22. 权利要求 21 的方法,其中将第一流通物施加到疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述疏水相互作用柱是苯基琼脂糖凝胶柱。

24. 权利要求 22 的方法,其中施加到所述疏水相互作用柱的第一流通物包含 20 至 40 克抗体 / 升疏水相互作用柱材料。

25. 权利要求 24 的方法,其中施加到所述疏水相互作用柱的第一流通物包含 30 至 36 克抗体 / 升疏水相互作用柱材料。

26. 权利要求 22 的方法,其中第二洗脱物不进行产物峰分级分离。

27. 权利要求 1 的方法,所述方法包括:

(a) 将所述混合物施加到在所述平衡缓冲液中的所述阳离子交换树脂,其中所述混合物在施加到所述阳离子交换树脂前未曾被施以 A 蛋白捕捉,且其中施加量大于 30 克抗体 / 升树脂;

(b) 以多个洗涤步骤从所述阳离子交换树脂洗涤宿主细胞蛋白质,其中所述多个洗涤步骤包括至少第一次洗涤和第二次洗涤,其中从第一次洗涤到第二次洗涤电导率有增加,且其中所述第一次洗涤是用平衡缓冲液进行的,第二次洗涤是用洗脱缓冲液和水的混合物进行的;

(c) 用洗脱缓冲液从所述阳离子交换树脂洗脱所述抗体形成第一洗脱物;

(d) 将第一洗脱物进行病毒灭活步骤;

(e) 将所述病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂,以获得第一流通物;和

(f) 将第一流通物施加到疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物;

从而获得宿主细胞蛋白质降低的抗体制品。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述阳离子交换树脂为 pH7,且施加量为 35 克抗体 / 升树脂。

29. 权利要求 27 的方法,其中所述阳离子交换树脂为 pH5,且施加量为 70 克抗体 / 升树脂。

30. 权利要求 27 的方法,其中所述洗脱缓冲液和水的混合物包含 40-50%洗脱缓冲液和 50-60%水。

31. 权利要求 27 的方法,其中在将所述病毒灭活制品施加到所述阴离子交换树脂前,将所述病毒灭活制品的 pH 和电导率调整到与所述阴离子交换树脂的 pH 和电导率相似。

32. 权利要求 27 的方法,其中经宿主细胞蛋白质 ELISA 测定,第一洗脱物包含的宿主细

胞蛋白质比所述混合物少 90 至 100 倍。

33. 权利要求 27 的方法,其中经宿主细胞蛋白质 ELISA 测定,第一流通物包含的宿主细胞蛋白质比第一洗脱物少 840 至 850 倍。

34. 权利要求 27 的方法,其中经宿主细胞蛋白质 ELISA 测定,第二洗脱物包含的宿主细胞蛋白质比第一流通物少 3 至 5 倍。

35. 权利要求 1 的方法,所述方法包括:

(a) 将所述混合物施加到在所述平衡缓冲液中的所述阳离子交换树脂,其中所述阳离子交换树脂为 pH7 且施加量为 35 克抗体 / 升树脂,或者所述阳离子交换树脂的 pH 在 pH5 至 pH7 的范围且施加量为 35 至 70 克抗体 / 升树脂,或者所述阳离子交换树脂为 pH5 且施加量为 70 克抗体 / 升树脂;

(b) 以包括第一次洗涤和第二次洗涤的洗涤步骤从所述阳离子交换树脂洗涤宿主细胞蛋白质,所述第一次洗涤采用平衡缓冲液,所述第二次洗涤采用洗脱缓冲液和水的混合物;

(c) 用所述洗脱缓冲液从所述阳离子交换树脂洗脱所述抗体,以形成第一洗脱物;

(d) 将第一洗脱物进行病毒灭活步骤,其中病毒灭活是通过 pH 病毒灭活来实现,以形成病毒灭活制品;

(e) 将所得病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂,其中在将所述病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂前,将所述病毒灭活制品的 pH 和电导率调整到与所述阴离子交换树脂的 pH 和电导率相似,由此获得第一流通物;和

(f) 将第一流通物施加到疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物;

从而获得宿主细胞蛋白质降低的抗体制品。

36. 权利要求 35 的方法,其中所述抗体混合物在被施加到该阳离子交换树脂前未曾被施以 A 蛋白捕捉。

37. 权利要求 35 的方法,其中所述洗脱缓冲液和水的混合物包含 40-50%洗脱缓冲液和 50-60%水。

38. 权利要求 35 的方法,其中经宿主细胞蛋白质 ELISA 测定,第一洗脱物包含的宿主细胞蛋白质比该混合物少 90 至 100 倍。

39. 权利要求 35 的方法,其中经宿主细胞蛋白质 ELISA 测定,第一流通物包含的宿主细胞蛋白质比第一洗脱物少 840 至 850 倍。

40. 权利要求 35 的方法,其中经宿主细胞蛋白质 ELISA 测定,第二洗脱物包含的宿主细胞蛋白质比第一流通物少 3 至 5 倍。

41. 权利要求 1-40 任一项的方法,其中所述宿主细胞蛋白质包含组织蛋白酶 L 酶原,由此获得组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品。

42. 权利要求 41 的方法,其中经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第一洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性为 25 至 60RFU/s/mg 抗体。

43. 权利要求 41 的方法,其中经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第一流通物包含的组织蛋白酶 L 活性为 0.4 至 4RFU/s/mg 抗体。

44. 权利要求 41 的方法,其中经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第二洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性为 0.5 至 1.5RFU/s/mg 抗体。

45. 权利要求 41 的方法,其中所述组织蛋白酶 L 酶原的水平有重现性地低下。

抗体纯化

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2006 年 4 月 5 日提交的美国临时申请系列号 60/789,725 的优先权和 2006 年 4 月 6 日提交的美国临时申请系列号 60/790,414 的优先权,每个临时申请的内容通过引用整体结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 大规模且经济地纯化蛋白质对于生物技术产业来说是一个日益重要的问题。通常,蛋白质是使用经工程改造能产生目的蛋白质的哺乳动物细胞系或细菌细胞系通过细胞培养产生的,所述工程改造是将包含编码该蛋白质的基因的重组质粒插入到该细胞系中。由于所用的细胞系是活的生物,必需给它们喂养包含糖类、氨基酸和生长因子的复杂生长培养基,这种培养基通常从动物血清的制品 (preparation) 供应。要将所需的蛋白质与喂养细胞的化合物混合物和与细胞本身的副产物进行分离,至足够作为人类治疗剂使用的纯度,这是一个极大的难题。

[0005] 发明概述

[0006] 对于改进的、用以获得宿主细胞蛋白质 (包括组织蛋白酶 L 酶原 (procathepsin L)) 含量降低的抗体制品的的方法,人们是有需求的。本发明提供用以纯化宿主细胞表达系统中所表达的抗体的方法,其中所得抗体制品包含的宿主细胞蛋白质 (包括组织蛋白酶 L 酶原) 的含量降低。本发明的改进方法还包括准确检测宿主细胞蛋白质的可再现方法的开发,以及动力学测定法。

[0007] 本发明提供用以从包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质 (HCP) 的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的的方法,所述方法包括离子交换步骤,其中将该混合物施加到第一离子交换材料,由此获得 HCP 降低的抗体制品。在一个实施方案中,该离子交换分离步骤包括使该混合物通过第一离子交换材料,由此获得 HCP 水平降低的第一洗脱物 (eluate)。在一个实施方案中,本发明的该方法还包括第二离子交换分离步骤,其中将第一洗脱物施加到第二离子交换材料,由此获得 HCP 水平降低的第一流通物 (flowthrough)。在另一个实施方案中,本发明的该方法还包括疏水相互作用分离步骤,其中将第一流通物施加到第一疏水相互作用材料,由此获得 HCP 水平降低的第二洗脱物。

[0008] 在本发明的一个实施方案中,该离子交换分离步骤包括第一离子交换层析步骤,其中将该混合物荷载到包含第一离子交换材料的柱子上,由此获得 HCP 水平降低的第一洗脱物。在一个实施方案中,本发明还包括第二离子交换层析步骤,该步骤包括将第一洗脱物荷载到包含第二离子交换材料的柱子上,由此获得第一流通物。

[0009] 在一个实施方案中,本发明还包括疏水相互作用分离步骤,该步骤包括将第一流通物荷载到包含第一疏水相互作用材料的柱子上,由此获得第二洗脱物。在一个实施方案中,疏水相互作用分离步骤包括疏水相互作用层析。在一个实施方案中,疏水相互作用层析是苯基琼脂糖凝胶层析。在又一个实施方案中,荷载到疏水相互作用材料上的抗体量为约 20 至约 40 克抗体 / 升疏水相互作用材料。在还另一个实施方案中,荷载到疏水相互作用材料上的抗体量为约 30 至约 36 克抗体 / 升疏水相互作用材料。

[0010] 在一个实施方案中,离子交换层析步骤是阳离子交换层析。在另一个实施方案中,阳离子交换层析是与磺酸基连接的基于合成的甲基丙烯酸酯的聚合物树脂。在又一个实施方案中,本发明还包括以多个洗涤步骤洗涤该离子交换材料。在一个实施方案中,该多个洗涤步骤包括电导率的增加。在一个实施方案中,该离子交换材料用包含约 40-50%洗脱缓冲液和约 50-60%水(例如注射用水(WFI))的洗液进行洗涤。在一个实施方案中,该洗脱缓冲液是 20mM Na_2PO_4 , 150mM 氯化钠, pH7。

[0011] 在一个实施方案中,将第一洗脱物在进行第一离子交换层析步骤前先进行病毒灭活。在一个实施方案中,该病毒灭活是通过 pH 病毒灭活(例如降低第一洗脱物的 pH,从而使病毒灭活)来实现。

[0012] 在本发明的一个实施方案中,第二离子交换层析步骤包括阴离子交换层析。在一个实施方案中,该阴离子交换层析是 Q 琼脂糖凝胶层析。

[0013] 本发明还提供用以从包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质(HCP)的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的的方法,其中该 HCP 水平降低如下来实现:改变第一洗脱物的 pH 和电导率,使得第一洗脱物的 pH 和电导率与第二离子交换材料的 pH 和电导率基本上相似。在一个实施方案中,第二离子交换材料的 pH 为约 7.7 至约 8.3。在另一个实施方案中,将第一洗脱物的 pH 改变至约 7.7 至约 8.3。在又一个实施方案中,将第一洗脱物的 pH 改变至约 8.0。在一个实施方案中,第二离子交换材料的电导率为约 3.5mS/cm 至约 5.2mS/cm,或者约 3.5mS/cm 至约 4.9mS/cm。在一个实施方案中,将第一洗脱物的电导率改变至约 3.5mS/cm 至约 5.2mS/cm 或者约 3.5mS/cm 至约 4.9mS/cm。

[0014] 在本发明的一个实施方案中,经 HCP ELISA 测定,第一洗脱物包含的 HCP 比该混合物少约 90 至约 100 倍。在另一个实施方案中,经 HCP ELISA 测定,第一流通物包含的 HCP 比第一洗脱物少约 840 至约 850 倍。在还另一个实施方案中,经 HCP ELISA 测定,第二洗脱物包含的 HCP 比第一流通物少约 3 至约 5 倍。

[0015] 本发明提供用以从包含抗体和组织蛋白酶 L 酶原的混合物生产组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品的的方法,所述方法包括离子交换分离步骤,其中将该混合物施加到第一离子交换材料,由此获得组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品。

[0016] 在一个实施方案中,该离子交换分离步骤包括使该混合物通过第一离子交换材料,由此获得组织蛋白酶 L 酶原水平降低的第一洗脱物。在一个实施方案中,该离子交换分离步骤包括第一离子交换层析步骤,其中将该混合物荷载到包含第一离子交换材料的柱子上,由此获得组织蛋白酶 L 酶原水平降低的第一洗脱物。

[0017] 在一个实施方案中,本发明还包括第二离子交换分离步骤,其中将第一洗脱物施加到第二离子交换材料,由此获得组织蛋白酶 L 酶原水平降低的第一流通物。在一个实施方案中,本发明还包括第二离子交换层析步骤,该步骤包括将第一洗脱物荷载到包含第二离子交换材料的柱子上,由此获得第一流通物。

[0018] 在一个实施方案中,本发明还包括疏水相互作用分离步骤,该步骤包括将第一流通物荷载到包含第一疏水相互作用材料的柱子上,由此获得组织蛋白酶 L 酶原水平降低的第二洗脱物。在另一个实施方案中,本发明还包括疏水相互作用分离步骤,该步骤包括将第一流通物荷载到包含第一疏水相互作用材料的柱子上,由此获得第二洗脱物。

[0019] 在一个实施方案中,离子交换层析步骤是阳离子交换层析,包括但不限于与磺酸

基连接的基于合成的甲基丙烯酸酯的聚合物树脂。

[0020] 在另一个实施方案中,离子交换层析步骤还包括以多个洗涤步骤洗涤该离子交换材料。在一个实施方案中,该多个洗涤步骤包括电导率的增加。在一个实施方案中,该离子交换材料用包含约 40-50%洗脱缓冲液和约 50-60%水(例如注射用水(WFI))的洗涤缓冲液进行洗涤。在又一个实施方案中,该洗脱缓冲液是 20mM Na_2PO_4 , 150mM 氯化钠, pH7。

[0021] 在本发明的一个实施方案中,将第一洗脱物在进行离子交换层析步骤前先进行病毒灭活。在一个实施方案中,该病毒灭活是通过 pH 病毒灭活(例如降低第一洗脱物的 pH,从而使病毒灭活)来实现。

[0022] 在一个实施方案中,该离子交换层析步骤包括阴离子交换层析。在一个实施方案中,该阴离子交换层析是 Q 琼脂糖凝胶层析。

[0023] 本发明还描述了这样的方法,其中组织蛋白酶 L 酶原水平降低如下来实现:改变第一洗脱物的 pH 和电导率,使得第一洗脱物的 pH 和电导率与第二离子交换材料的 pH 和电导率基本上相似。在一个实施方案中,第二离子交换材料的 pH 为约 7.7 至约 8.3。在另一个实施方案中,将第一洗脱物的 pH 改变至约 7.7 至约 8.3。在又一个实施方案中,将第一洗脱物的 pH 改变至约 8.0。在还另一个实施方案中,第二离子交换材料的电导率为约 3.5mS/cm 至约 5.2mS/cm,或者约 3.5mS/cm 至约 4.9mS/cm。在一个实施方案中,将第一洗脱物的电导率改变至约 3.5mS/cm 至约 5.2mS/cm,或者约 3.5mS/cm 至约 4.9mS/cm。

[0024] 在本发明的一个实施方案中,该疏水相互作用分离步骤包括疏水相互作用层析。在一个实施方案中,疏水相互作用层析是苯基琼脂糖凝胶层析。在又一个实施方案中,荷载到疏水相互作用材料上的抗体量为约 20 至约 40 克抗体/升疏水相互作用材料。在还另一个实施方案中,荷载到疏水相互作用材料上的抗体量为约 30 至约 36 克抗体/升疏水相互作用材料。

[0025] 在一个实施方案中,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第一洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性为约 25 至约 60RFU/s/mg 抗体。

[0026] 在另一个实施方案中,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第一流通物包含的组织蛋白酶 L 活性为约 0.4 至约 4RFU/s/mg 抗体。

[0027] 在又一个实施方案中,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第二洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性为约 0.5 至约 1.5RFU/s/mg 抗体

[0028] 在本发明的一个实施方案中,组织蛋白酶 L 酶原的水平有重现性地低下(reproducibly low)。

[0029] 在一个特别优选的方面,本发明提供这样的抗体纯化方法,其中可将高含量的抗体-HCP 混合物荷载到离子交换树脂上,以实现混合物中 HCP 的降低。这个方法的优点是,它可用于这样的抗体-HCP 混合物,该混合物在被施加到离子交换树脂前未曾被施以 A 蛋白捕捉。A 蛋白捕捉通常被用作抗体纯化程序中的初始纯化步骤,作为除去 HCP 的手段,其中将抗体-HCP 混合物施加到 A 蛋白柱,使得抗体与 A 蛋白结合,而 HCP 则流过。因此,本发明的方法可用来纯化大载量的抗体-HCP 混合物,而无需执行 A 蛋白层析作为初始步骤。

[0030] 因此,在一个实施方案中,本发明提供用以从包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质(HCP)的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的的方法,所述方法包括以下步骤:

[0031] (a) 将该混合物施加到在平衡缓冲液中的第一离子交换树脂,其中施加量大于 30

克抗体 / 升树脂 ;

[0032] (b) 以多个洗涤步骤从该树脂洗涤 HCP ;和

[0033] (c) 用该洗脱缓冲液从该树脂洗脱该抗体形成第一洗脱物,

[0034] 由此获得该 HCP 降低的抗体制品。

[0035] 在另一个实施方案中,施加量约为 35-70 克抗体 / 升树脂。在还另一个实施方案中,施加量约为 70 克抗体 / 升树脂。在一个优选的实施方案中,包含抗体和至少一种 HCP 的该混合物,在被施加到第一离子交换树脂前,没有被施以 A 蛋白捕捉(例如没有被施加到 A 蛋白柱)。

[0036] 优选地,该多个洗涤步骤包括至少第一次洗涤和第二次洗涤,其中从第一次洗涤到第二次洗涤电导率有增加。更优选地,第一次洗涤是用平衡缓冲液进行,第二次洗涤是用洗脱缓冲液和水(例如 WFT)的混合物进行。例如,洗脱缓冲液和水的混合物可包含约 40-50%洗脱缓冲液和约 50-60%水。更优选地,洗脱缓冲液和水的混合物可包含约 45%洗脱缓冲液和约 55%水。在一个优选的实施方案中,洗脱缓冲液包含 20mM 磷酸钠和 150mM 氯化钠。在这个情况中,其中含 45%洗脱缓冲液和约 55%水的洗脱缓冲液和水混合物,是 9mM 磷酸钠和 68mM 氯化钠。在一个优选的实施方案中,第一次洗涤是用包含 20mM 磷酸盐、25mM 氯化钠的平衡缓冲液进行,第二次洗涤是用包含 9mM 磷酸盐、68mM 氯化钠的缓冲液(45%洗脱缓冲液、55%水)进行,洗脱缓冲液包含 20mM 磷酸盐、150mM 氯化钠。

[0037] 在一个实施方案中,该使用第一离子交换树脂的方法在 pH7 下进行。在另一个实施方案中,该使用第一离子交换树脂的方法在 pH5 下进行。在还另一个实施方案中,该使用第一离子交换树脂的方法在约 pH5 至约 pH7 范围内或者 pH5 至 pH7 范围内的某 pH 下进行。如使用 pH7,优选施加约 35 克抗体 / 升树脂。如使用 pH5,优选施加约 70 克抗体 / 升树脂。如使用在约 pH5 至约 pH7 范围内(例如 pH5 至 pH7)的某 pH,优选施加的抗体量为约 35 至约 70 克抗体 / 升树脂(例如 35-70 克抗体 / 升树脂)。

[0038] 在一个优选的实施方案中,通过将较多的抗体荷载到树脂上(例如约 70 克抗体 / 升树脂),来实现(例如在 pH5 下)更好地从抗体-HCP 混合物清除 HCP,这比将较少的抗体荷载到树脂上(例如约 30 克抗体 / 升树脂)所实现的清除更好。据认为这是由于当使用这样的条件时抗体将 HCP 从树脂上置换下来的结果,在该条件下抗体对树脂的结合亲和力显著大于 HCP 对树脂的结合亲和力。

[0039] 优选地,第一离子交换树脂是阳离子交换树脂。优选地,将该阳离子交换树脂形成柱子,将包含抗体和至少一种 HCP 的混合物施加到该柱子。优选地,该阳离子交换树脂包含与磺酸基连接的基于合成的甲基丙烯酸酯的聚合物树脂(例如 Fractogel S)。或者,该阳离子交换树脂可包含例如与磺酸基(如铈离子或磺乙基)连接的如下树脂:基于甲基丙烯酸酯或聚苯乙烯的合成聚合物、二氧化硅、带葡聚糖表面延伸剂(dextran surface extender)的高度交联琼脂糖、烯丙基葡聚糖与 N,N-亚甲基双丙烯酸树脂的交联共聚物。

[0040] 在本发明的另一个方面,在进行上述的使用第一离子交换树脂的方法后,该方法还包括将第一洗脱物进行病毒灭活步骤。例如,其中病毒灭活可通过 pH 病毒灭活来实现,以形成病毒灭活制品(例如,将第一洗脱物施以低 pH 条件,如 pH 约 3.5,从而使病毒灭活)。优选地,将病毒灭活制品施加到第二离子交换树脂,其中在将病毒灭活制品施加到第二离子交换树脂前,将病毒灭活制品的 pH 和电导率调整到与第二离子交换树脂的 pH 和电导率

基本相似。例如,第二离子交换树脂的 pH 可在约 pH7.7 至约 pH8.3 的范围,可将病毒灭活制品的 pH 调整到约 pH7.7 至约 pH8.3 的范围。在另一个实施方案中,第二离子交换树脂的 pH 可在约 pH7.8 至约 pH8.2 的范围,可将病毒灭活制品的 pH 调整到约 pH7.8 至约 pH8.2 的范围。更优选地,第二离子交换树脂的 pH 为约 pH8.0,将病毒灭活制品的 pH 调整到约 pH8.0。此外,第二离子交换树脂的电导率可在约 3.5mS/cm 至约 5.2mS/cm 的范围,将病毒灭活制品的电导率调整到约 3.5mS/cm 至约 5.2mS/cm 的范围。优选地,第二离子交换树脂的电导率为约 5.0mS/cm,将病毒灭活制品的电导率调整到约 5.0mS/cm。

[0041] 在一个优选的实施方案中,第二离子交换树脂是阴离子交换树脂。例如,阴离子交换树脂可以是 Q 琼脂糖凝胶树脂。优选地,将第二离子交换树脂形成柱子,将病毒灭活制品施加到该柱子上,由此获得第一流通物。

[0042] 在本发明的另一个方面,从第二离子交换树脂获得第一流通物后,可将第一流通物施加到疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物。在一个优选的实施方案中,该疏水相互作用柱是苯基琼脂糖凝胶柱。在一个实施方案中,施加到疏水相互作用柱的第一流通物包含约 20 至约 40 克抗体 / 升疏水相互作用柱材料。在另一个实施方案中,施加到疏水相互作用柱的第一流通物包含约 30 至约 36 克抗体 / 升疏水相互作用柱材料。由于纯化过程中的初始步骤的效率,已发现没有必要将从疏水相互作用柱获得的第二洗脱物进行产物峰分级分离。因此,在一个实施方案中,没有将第二洗脱物进行产物峰分级分离。

[0043] 在特别优选的一个实施方案中,本发明的用以从包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质 (HCP) 的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的方法,包括以下步骤:

[0044] (a) 将该混合物施加到在平衡缓冲液中的阳离子交换树脂,其中该混合物在施加到该阳离子交换树脂前未曾被施以 A 蛋白捕捉,且其中施加量大于 30 克抗体 / 升树脂;

[0045] (b) 以多个洗涤步骤从该阳离子交换树脂洗涤 HCP;

[0046] (c) 用该洗脱缓冲液从该阳离子交换树脂洗脱该抗体,以形成第一洗脱物;

[0047] (d) 将第一洗脱物进行病毒灭活步骤;

[0048] (e) 将所得病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂,以获得第一流通物;和

[0049] (f) 将第一流通物施加到疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物;

[0050] 从而获得 HCP 降低的抗体制品。

[0051] 在一个实施方案中,该阳离子交换树脂为 pH7,施加量约为 35 克抗体 / 升树脂。在另一个实施方案中,该阳离子交换树脂为 pH5,施加量约为 70 克抗体 / 升树脂。在还另一个实施方案中,pH 在约 pH5 至约 pH7 (例如 pH5 to pH7) 的范围,施加的抗体量为约 35 至约 70 克抗体 / 升树脂 (例如 35-70 克抗体 / 升树脂)。

[0052] 优选地,该多个洗涤步骤包括用采用平衡缓冲液的第一洗液和采用洗脱缓冲液和水混合物的第二洗液来洗涤该树脂。例如,该洗脱缓冲液和水混合物可包含约 40-50% 洗脱缓冲液和约 50-60% 水 (例如 WFI),更优选约 45% 洗脱缓冲液和约 55% 水 (例如 WFI)。在一个优选的实施方案中,洗脱缓冲液包含 20mM 磷酸钠和 150mM 氯化钠。在这个情况中,其中含 45% 洗脱缓冲液和约 55% 水的洗脱缓冲液和水混合物,是 9mM 磷酸钠和 68mM 氯化钠。在一个优选的实施方案中,第一次洗涤是用包含 20mM 磷酸盐、25mM 氯化钠的平衡缓冲液进行,第二次洗涤是用包含 9mM 磷酸盐、68mM 氯化钠的缓冲液 (45% 洗脱缓冲液、55% 水) 进行,洗脱缓冲液包含 20mM 磷酸盐、150mM 氯化钠。

[0053] 优选地,在上述的包括步骤(a)到(f)的方法中,在将病毒灭活制品施加到该阴离子交换树脂前(即在步骤(d)和(e)之间),将病毒灭活制品的pH和电导率调整到与该阴离子交换树脂的pH和电导率基本相似。例如,第二离子交换树脂的pH可在约pH7.7至约pH8.3的范围,将病毒灭活制品的pH调整到约pH7.7至约pH8.3的范围。在另一个实施方案中,第二离子交换树脂的pH可在约pH7.8至约pH8.2的范围,将病毒灭活制品的pH调整到约pH7.8至约pH8.2的范围。更优选地,第二离子交换树脂的pH为约pH8.0,将病毒灭活制品的pH调整到约pH8.0。此外,第二离子交换树脂的电导率可在约3.5mS/cm至约5.2mS/cm的范围,将病毒灭活制品的电导率调整到约3.5mS/cm至约5.2mS/cm的范围。优选地,第二离子交换树脂的电导率为约5.0mS/cm,将病毒灭活制品的电导率调整到约5.0mS/cm。

[0054] 在上述的包括步骤(a)到(f)的方法中,优选地该阳离子交换树脂是与磺酸基连接的基于合成的甲基丙烯酸酯的聚合物树脂(例如Fractogel),该阴离子交换树脂是Q琼脂糖凝胶树脂,该疏水相互作用柱是苯基琼脂糖凝胶柱。

[0055] 优选地,经HCP ELISA测定,第一洗脱物包含的HCP比该混合物少约90至约100倍。优选地,经HCP ELISA测定,第一流通物包含的HCP比第一洗脱物少约840至约850倍。优选地,经HCP ELISA测定,第二洗脱物包含的HCP比第一流通物少约3至约5倍。

[0056] 在特别优选的一个实施方案中,本发明的用以从包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质(HCP)的混合物生产HCP降低的抗体制品的方法,包括以下步骤:

[0057] (a) 将该混合物施加到在平衡缓冲液中的阳离子交换树脂,其中该阳离子交换树脂为pH7且施加量大于35克抗体/升树脂,或者该阳离子交换树脂的pH在pH5至pH7的范围且施加量约为35至约70克抗体/升树脂,或者该阳离子交换树脂为pH5且施加量大于70克抗体/升树脂;

[0058] (b) 以包括第一次洗涤和第二次洗涤的洗涤步骤从该阳离子交换树脂洗涤HCP,该第一次洗涤采用平衡缓冲液,该第二次洗涤采用洗脱缓冲液和水的混合物;

[0059] (c) 用该洗脱缓冲液从该阳离子交换树脂洗脱该抗体,以形成第一洗脱物;

[0060] (d) 将第一洗脱物进行病毒灭活步骤,其中病毒灭活是通过pH病毒灭活来实现,以形成病毒灭活制品;

[0061] (e) 将所得病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂,其中在将该病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂前,将该病毒灭活制品的pH和电导率调整到与该阴离子交换树脂的pH和电导率基本相似,由此获得第一流通物;和

[0062] (f) 将第一流通物施加到疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物;

[0063] 从而获得HCP降低的抗体制品。

[0064] 优选地,该抗体混合物在被施加到该阳离子交换树脂前未曾被施以A蛋白捕捉。优选地,洗脱缓冲液和水的混合物包含约40-50%洗脱缓冲液和约50-60%水,更优选约45%洗脱缓冲液和约55%水(例如WFI)。在一个优选的实施方案中,洗脱缓冲液包含20mM磷酸钠和150mM氯化钠。在这个情况中,其中含45%洗脱缓冲液和约55%水的洗脱缓冲液和水混合物,是9mM磷酸钠和68mM氯化钠。在一个优选的实施方案中,第一次洗涤是用包含20mM磷酸盐、25mM氯化钠的平衡缓冲液进行,第二次洗涤是用包含9mM磷酸盐、68mM氯化钠的缓冲液(45%洗脱缓冲液、55%水)进行,洗脱缓冲液包含20mM磷酸盐、150mM氯化钠。优选地,经HCP ELISA测定,第一洗脱物包含的HCP比该混合物少约90至约100倍。优

选地,经 HCP ELISA 测定,第一流通物包含的 HCP 比第一洗脱物少约 840 至约 850 倍。优选地,经 HCP ELISA 测定,第二洗脱物包含的 HCP 比第一流通物少约 3 至约 5 倍。

[0065] 在任何上述纯化方法的一个优选方面,HCP 包含组织蛋白酶 L 酶原,由此获得组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品。优选地,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性为约 25 至约 60RFU/s/mg 抗体。优选地,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第一流通物包含的组织蛋白酶 L 活性为约 0.4 至约 4RFU/s/mg 抗体。优选地,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第二洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性为约 0.5 至约 1.5RFU/s/mg 抗体。优选地,组织蛋白酶 L 酶原的水平有重现性地低下。

[0066] 在还另一方面,本发明涉及用以从包含抗体和至少一种宿主细胞蛋白质 (HCP) 的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的方法,所述方法包括以下步骤:

[0067] (a) 将该混合物施加到阳离子交换树脂,以获得第一洗脱物;

[0068] (b) 将第一洗脱物施加到阴离子交换树脂,以获得第一流通物;和

[0069] (c) 使第一流通物通过疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物;

[0070] 从而获得 HCP 降低的抗体制品。

[0071] 优选地,包含抗体和至少一种 HCP 的该混合物在被施加到第一离子交换树脂前不被施以 A 蛋白捕捉。优选地,该方法还包括在将第一洗脱物施加到该阴离子交换树脂前,将第一洗脱物进行病毒灭活步骤。例如,病毒灭活可通过 pH 病毒灭活来实现。

[0072] 优选地,该阳离子交换树脂包含与磺酸基连接的基于合成的甲基丙烯酸酯的聚合物树脂(例如该阳离子交换树脂可以是 Fractogel S 柱)。例如,Fractogel S 柱可用包含 20mM 磷酸钠、25mM 氯化钠的平衡缓冲液平衡,可将该混合物施加到该柱,该柱可用平衡缓冲液至少洗涤一次,第一洗脱物可通过用包含 20mM 磷酸钠、150mM 氯化钠的洗脱缓冲液洗脱来获得。

[0073] 优选地,阴离子交换树脂是 Q 琼脂糖凝胶柱。例如,Q 琼脂糖凝胶柱可用包含 25mM 三乙醇胺、40mM 氯化钠 (pH7.6) 的平衡缓冲液平衡。

[0074] 优选地,该疏水相互作用柱是苯基琼脂糖凝胶柱。例如,苯基琼脂糖凝胶柱可用包含 20mM 磷酸钠、1.1M(NH₄)₂SO₄ (pH7) 的平衡缓冲液平衡,可将第一流通物施加到该柱,该柱可用平衡缓冲液至少洗涤一次,第二洗脱物可通过进行盐不连续梯度至 11mM 磷酸钠、0.625M(NH₄)₂SO₄ (pH7.0) 来获得。

[0075] 优选地,pH 病毒灭活是通过将第一洗脱物维持在 pH3.5 大约 1 小时来实现。

[0076] 在还另一方面,本发明涉及用以从包含阿达木单抗和至少一种宿主细胞蛋白质 (HCP) 的混合物生产 HCP 降低的阿达木单抗制品的方法,所述方法包括以下步骤:

[0077] (a) 将该混合物施加到阳离子交换树脂,其中该混合物在被施加到第一离子交换树脂前不被施以 A 蛋白捕捉,以获得第一洗脱物;

[0078] (b) 将第一洗脱物施以 pH 病毒灭活,以获得病毒灭活制品;

[0079] (c) 将该病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂,以获得第一流通物;和

[0080] (d) 使第一流通物通过疏水相互作用柱,由此获得第二洗脱物;

[0081] 从而获得 HCP 降低的阿达木单抗制品。

[0082] 优选地,该阳离子交换树脂是 Fractogel S 柱,该阴离子交换树脂是 Q 琼脂糖凝胶柱,该疏水相互作用柱是苯基琼脂糖凝胶柱。例如,Fractogel S 柱可用包含 20mM 磷酸钠、

25mM 氯化钠的平衡缓冲液平衡,可将该混合物施加到该柱,该柱可用平衡缓冲液至少洗涤一次,第一洗脱物可通过用包含 20mM 磷酸钠、150mM 氯化钠的洗脱缓冲液洗脱来获得。还例如, Q 琼脂糖凝胶柱可用包含 25mM 三乙醇胺、40mM 氯化钠 (pH7.6) 的平衡缓冲液平衡。还例如, 苯基琼脂糖凝胶柱可用包含 20mM 磷酸钠、1.1M(NH₄)₂SO₄ (pH7) 的平衡缓冲液平衡,可将第一流通物施加到该柱,该柱可用平衡缓冲液至少洗涤一次,第二洗脱物可通过进行盐不连续梯度至 11mM 磷酸钠、0.625M(NH₄)₂SO₄ (pH7.0) 来获得。还例如, pH 病毒灭活可通过将第一洗脱物维持在 pH3.5 大约 1 小时来实现。

[0083] 对于所有上述纯化方法,在本发明的一个优选实施方案中,该抗体是抗肿瘤坏死因子- α (TNF α) 抗体或其抗原结合部分。在一个实施方案中,抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是嵌合抗体、人源化抗体或多价抗体。在一个实施方案中,抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是英夫利昔单抗 (infliximab) 或 golimumab。

[0084] 在另一个实施方案中,抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是人抗体。在一个实施方案中,抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是这样的分离人抗体,它以 1×10^{-8} M 或以下的 K_d 和 1×10^{-3} s⁻¹ 或以下的 K_{off} 速率常数 (均用表面等离子共振进行测定) 从人 TNF α 上解离下来,在标准的体外 L929 测定中以 1×10^{-7} M 或以下的 IC₅₀ 中和人 TNF α 细胞毒性。

[0085] 在另一个实施方案中,抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是具有以下特征的分离人抗体:

[0086] a) 以 1×10^{-3} s⁻¹ 或以下的 K_{off} 速率常数从人 TNF α 上解离下来,该参数是由表面等离子共振法测出;

[0087] b) 具有包含 SEQ ID NO:3 氨基酸序列或者从 SEQ ID NO:3 修饰而成的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域,该修饰是位置 1、4、5、7 或 8 处的单一丙氨酸置换或者位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的一至五个保守氨基酸置换;

[0088] c) 具有包含 SEQ ID NO:4 氨基酸序列或者从 SEQ ID NO:4 修饰而成的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域,该修饰是位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单一丙氨酸置换或者位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的一至五个保守氨基酸置换。

[0089] 在又一个实施方案中,抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是这样的分离人抗体,它的轻链可变区 (LCVR) 包含 SEQ ID NO:1 氨基酸序列,重链可变区 (HCVR) 包含 SEQ ID NO:2 氨基酸序列。

[0090] 在还另一个实施方案中,抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是阿达木单抗。

[0091] 本发明提供用本发明的任何方法生产的、经 HCP ELISA 测定基本上不含 HCP 的抗体制品。本发明还提供包含用本发明的任何方法生产的 HCP 降低的抗体制品和药物可接受载体的药物组合物。

[0092] 本发明包括包含 HCP 降低的抗体和药物可接受载体的药物组合物,其中经 HCP ELISA 测定, HCP 的水平不超过约 70ng HCP/mg 抗体。在一个实施方案中,经 HCP ELISA 测定, HCP 的水平不超过约 13ng HCP/mg 抗体。在另一个实施方案中,经 HCP ELISA 测定, HCP 的水平不超过约 5ng HCP/mg 抗体。

[0093] 本发明提供包含抗体的组合物,其中经 HCP ELISA 测定,所述组合物没有可检测水平的 HCP。

[0094] 本发明还提供用本文描述的任何方法生产的、基本上不含组织蛋白酶 L 酶原的抗

体制品。本发明还包括包含用本文描述的任何方法生产的组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品和药物可接受载体的药物组合物。

[0095] 本发明提供包含组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体和药物可接受载体的药物组合物，其中组织蛋白酶 L 酶原的水平不超过约 3.0RFU/s/mg 抗体的组织蛋白酶活性。

[0096] 对于所有上述抗体制品和药物组合物，优选的该抗体是抗肿瘤坏死因子- α (TNF α) 抗体或其抗原结合部分。在一个实施方案中，抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分选自人源化抗体、嵌合抗体或多价抗体的抗体。在一个实施方案中，抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是英夫利昔单抗或 golimumab。

[0097] 在另一个实施方案中，抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是人抗体。在一个实施方案中，抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是这样的分离人抗体，它以 1×10^{-8} M 或以下的 K_d 和 1×10^{-3} s $^{-1}$ 或以下的 K_{off} 速率常数（均用表面等离子共振进行测定）从人 TNF α 上解离下来，在标准的体外 L929 测定中以 1×10^{-7} M 或以下的 IC_{50} 中和人 TNF α 细胞毒性。

[0098] 在另一个实施方案中，抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是具有以下特征的分离人抗体：

[0099] a) 以 1×10^{-3} s $^{-1}$ 或以下的 K_{off} 速率常数从人 TNF α 上解离下来，这是由表面等离子共振测出；

[0100] b) 具有包含 SEQ ID NO:3 氨基酸序列或者从 SEQ ID NO:3 修饰而成的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域，该修饰是位置 1、4、5、7 或 8 处的单一丙氨酸置换或者位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的一至五个保守氨基酸置换；

[0101] c) 具有包含 SEQ ID NO:4 氨基酸序列或者从 SEQ ID NO:4 修饰而成的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域，该修饰是位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单一丙氨酸置换或者位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的一至五个保守氨基酸置换。

[0102] 在又一个实施方案中，抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是这样的分离人抗体，它的轻链可变区 (LCVR) 包含 SEQ ID NO:1 氨基酸序列，重链可变区 (HCVR) 包含 SEQ ID NO:2 氨基酸序列。

[0103] 在又一个实施方案中，抗 TNF α 抗体或其抗原结合部分是阿达木单抗。

[0104] 本发明包括治疗其中 TNF α 活性有害的疾病的方法，所述方法包括将包含用本发明任何方法获得的抗体的药物组合物给予人受试者。在一个实施方案中，将该制剂长时间给予人受试者。在一个实施方案中，该长时间包括至少约 3 个月，至少约 4 个月或至少约 5 个月。

[0105] 在一个实施方案中，该其中 TNF α 活性有害的疾病选自自身免疫疾病、肠道疾病和皮肤疾病。在一个实施方案中，自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、骨关节炎、痛风性关节炎、过敏症、多发性硬化、牛皮癣关节炎、自身免疫性糖尿病、自身免疫性色素层炎、肾病综合征和青年期类风湿性关节炎。在另一个实施方案中，肠道疾病是节段性回肠炎。在又一个实施方案中，皮肤疾病是牛皮癣。

[0106] 在一个实施方案中，将该药物组合物与另外的治疗剂进行组合给予。在一个实施方案中，该另外的治疗剂是甲氨喋呤。

[0107] 本发明包括治疗其中 TNF α 活性有害的疾病的方法，所述方法包括将包含用本发明任何方法获得的抗体的药物组合物给予人受试者。在一个实施方案中，将该制剂长时间

给予人受试者。在一个实施方案中,该长时间包括至少约 3 个月,至少约 4 个月或至少约 5 个月。在一个实施方案中,该其中 TNF α 活性有害的疾病选自自身免疫疾病、肠道疾病和皮肤疾病。在一个实施方案中,自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、骨关节炎、痛风性关节炎、过敏症、多发性硬化、牛皮癣关节炎、自身免疫性糖尿病、自身免疫性色素层炎、肾病综合征和青年期类风湿性关节炎。在一个实施方案中,肠道疾病是节段性回肠炎。在一个实施方案中,皮肤疾病是牛皮癣。

[0108] 在一个实施方案中,将该药物组合物与另外的治疗剂进行组合给予。在一个实施方案中,该另外的治疗剂是甲氨喋呤。

[0109] 本发明提供包含包装材料、阿达木单抗和标签或包装插页的制造品 (article of manufacture), 该标签或包装插页装在该包装材料当中, 说明该阿达木单抗制剂 (formulation) 包含不超过约 70ng HCP/mg 阿达木单抗。在一个实施方案中, 该约 70ng HCP/mg 阿达木单抗是通过 HCP ELISA 来测量。

[0110] 本发明还提供包含包装材料、阿达木单抗和标签或包装插页的制造品, 该标签或包装插页装在该包装材料当中, 说明该阿达木单抗制剂包含不超过约 13ng HCP/mg 阿达木单抗。在一个实施方案中, 该约 13ng HCP/mg 阿达木单抗是通过 HCP ELISA 来测量。

[0111] 本发明还提供包含包装材料、阿达木单抗和标签或包装插页的制造品, 该标签或包装插页装在该包装材料当中, 说明该阿达木单抗制剂包含不超过约 5ng HCP/mg 阿达木单抗。在一个实施方案中, 该约 5ng HCP/mg 阿达木单抗是通过 HCP ELISA 来测量。

[0112] 本发明还提供包含包装材料、阿达木单抗和标签或包装插页的制造品, 该标签或包装插页装在该包装材料当中, 说明该阿达木单抗制剂包含的组织蛋白酶 L 酶原水平不超过约 3.0RFU/s/mg 阿达木单抗的组织蛋白酶 L 活性所指示的水平。在一个实施方案中, 组织蛋白酶 L 活性是通过组织蛋白酶 L 动力学测定法来测量。

[0113] 本发明还提供用以测定源自哺乳动物细胞表达系统的材料中组织蛋白酶 L 酶原的量的动力学测定法, 该测定法包括使该源自哺乳动物细胞表达系统的材料与酶接触, 以将组织蛋白酶 L 酶原加工成活性组织蛋白酶 L 形式, 由此获得组织蛋白酶 L 样品; 将该组织蛋白酶 L 样品与组织蛋白酶 L 的底物接触; 和测定该组织蛋白酶 L 样品中的组织蛋白酶 L 活性, 作为该源自哺乳动物细胞表达系统的材料中组织蛋白酶 L 酶原的量的指标。在一个实施方案中, 该哺乳动物细胞表达系统是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在另一个实施方案中, 该加工组织蛋白酶 L 酶原的酶是肽链内切酶。在又一个实施方案中, 该组织蛋白酶 L 的底物包含标记 (label)。在又一个实施方案中, 该标记是荧光剂。在一个实施方案中, 该荧光剂包含荧光 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC) 基团。在一个实施方案中, 该组织蛋白酶 L 的底物包含 Z-亮氨酸-精氨酸。在又一个实施方案中, 该 Z-亮氨酸-精氨酸包含 AMC 基团。

[0114] 附图简述

[0115] 图 1A 和 1B 显示了每个工艺的 Fractogel S 层析步骤的典型洗脱曲线, 包括本发明的工艺 (图 1A) 和工艺 A (图 1B)。

[0116] 图 2A 和 2B 显示了 Q 琼脂糖凝胶 FF 层析步骤的流通物洗涤曲线的比较, 包括本发明的工艺 (图 2A) 和工艺 A (图 2B)。

[0117] 图 3A 和 3B 显示了苯基琼脂糖凝胶 HP 层析步骤的洗脱曲线的比较, 包括工艺 B (图

3A) 和工艺 A(图 3B)。

[0118] 图 4 图示了平均工艺 B(菱形)和平均工艺 A(正方形)的组织蛋白酶 L 酶原逐步降低。

[0119] 图 5 图示了平均工艺 B(菱形)和工艺 A(正方形)的 HCP 逐步降低。

[0120] 图 6 显示出活化的工艺中 (in-process) 样品的动力学读数指示了反应时间与荧光信号的线性关系。

[0121] 发明详述

[0122] I. 定义

[0123] 为了更容易地理解本发明,首先对某些术语进行定义。

[0124] 本文所用的术语“混合物”指待进行纯化的有粘度材料,该材料中包含有待从可能也存在于其中的其他物质中纯化出来的至少一种目的抗体。材料可以是例如水溶液、有机溶剂体系或者水/有机溶剂混合物或溶液。混合物往往是包含许多生物分子(如蛋白质、抗体、激素和病毒)、小分子(如盐、糖、脂质等)甚至颗粒状物质的复杂混合物或溶液。虽然生物来源的典型混合物可能一开始是水溶液或水悬浮液,但它也可能含有在较早的分离步骤如溶剂沉淀、提取等中使用到的有机溶剂。可能含有易于通过本发明各个实施方案进行纯化的有价值生物物质的混合物的实例,包括但不限于生物反应器的培养物上清液、均化后的细胞悬浮液、血浆、血浆级份和奶。

[0125] 所谓从包含抗体和一种或多种物质的混合物中“纯化”该抗体,是指通过将至少一种物质从该混合物中(完全或部分)除去来增加该抗体在该混合物中的纯度。该物质可以是杂质或污染物,如但不限于宿主细胞蛋白质(HCP)。

[0126] 术语“宿主细胞蛋白质”或“HCP”指该混合物中的、与目的抗体不同但通常发源于抗体生产的蛋白质。宜将 HCP 排除出最终抗体制品。

[0127] 术语“降低(的)(reduced)”指减少或缩小物质的数量。降低的制品包括与初始数量相比具有较少的某物质如 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原的制品。在一个实施方案中,该物质是杂质或污染物。在一个实施方案中,术语“降低(的)”是指该物质显著少(substantially less)。在另一个实施方案中,术语“降低(的)”是指没有该物质。在一个实施方案中,没有某物质包括用本文描述的测定法得出“没有可检测的量”。

[0128] 术语“基本上没有”包括没有某物质,但也可包括有极微量的某物质。在一个实施方案中,没有某物质的数量包括用本文描述的测定法得出“没有可检测的量”。

[0129] 术语“宿主细胞蛋白质(HCP)降低的”指这样的组合物(包括但不限于洗脱物、制品、流通物),其在一个或多个纯化步骤后包含抗体和减少或缩小数量的 HCP。在一个实施方案中,术语“HCP 降低的”是指在包含抗体的组合物中 HCP 显著少。在另一个实施方案中,术语“HCP 降低的”是指在包含抗体的组合物中没有 HCP。在一个实施方案中,术语“HCP 降低的”是指经本文描述的测定法测定,在包含抗体的组合物中没有可检测量的 HCP。

[0130] 术语“组织蛋白酶 L 酶原降低的”指这样的组合物(包括但不限于洗脱物、制品、流通物),其在一个或多个纯化步骤后包含抗体和减少或缩小数量的组织蛋白酶 L 酶原。在一个实施方案中,术语“组织蛋白酶 L 酶原降低的”是指在包含抗体的组合物中 HCP 显著少。在另一个实施方案中,术语“组织蛋白酶 L 酶原降低的”是指在包含抗体的组合物中没有 HCP。在一个实施方案中,术语“组织蛋白酶 L 酶原降低的”是指经本文描述的测定法测

定,在包含抗体的组合中没有可检测量的组织蛋白酶 L 酶原。

[0131] 术语“有重现性地低下”指一贯地实现减少或缩小的数量的能力,如至少 80%的时间、更优选至少 90%的时间、更优选至少 95%的时间、甚至更优选至少 98%的时间实现减少或缩小的数量的能力。

[0132] 术语“离子交换分离步骤”指这样的步骤,在该步骤中,根据目的抗体和不需要的物质或杂质(例如 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原)分别与带电材料的离子相互作用的差异,将该不需要的物质或杂质与该目的抗体分离开来。离子交换分离步骤的实例包括但不限于离子交换层析,包括阴离子交换层析和阳离子交换层析。

[0133] “离子交换材料”指作为将该不需要的物质或杂质(例如 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原)与该抗体进行分离的基础来使用的离子材料。离子交换材料的实例包括阴离子树脂和阳离子树脂。

[0134] “阳离子交换材料”指这样的离子交换材料,它具有共价结合的带负电的配体,并因此具有游离阳离子可供与它所接触到的溶液中的阳离子进行交换。有多种阳离子交换树脂为本领域所公知,例如其中共价结合基团是羧酸根或磺酸根的那些阳离子交换树脂。市售的阳离子交换树脂包括 CMC-纤维素、SP-Sephadex™ 和 Fast S-Sepharose™(后两者为 Pharmacia 市售)。

[0135] “阴离子交换材料”指具有共价结合的带正电基团如季氨基基团的离子交换树脂。市售的阴离子交换树脂包括 DEAE 纤维素、TMAE、QAE Sephadex™ 和 Fast Q 琼脂糖凝胶™(后两者为 Pharmacia 市售)。

[0136] 所谓将某分子“结合”到离子交换材料,是指将该分子在适当的条件(pH/电导率)下暴露于该离子交换材料,该适当的条件会使得该分子借助其与该离子交换材料的(一个或多个)带电基团之间的离子相互作用可逆地固定化在该离子交换材料之中或之上。

[0137] 术语“疏水相互作用步骤”指这样的步骤,在该步骤中,根据目的抗体和不需要的物质或杂质(例如 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原)分别与疏水材料的疏水相互作用的差异,将该不需要的物质或杂质与该目的抗体分离开来。

[0138] “疏水相互作用材料”指作为将该不需要的物质或杂质(例如 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原)与该抗体进行分离的基础来使用的疏水材料。疏水相互作用材料的实例包括疏水配体,如具有约 2 至约 8 个碳原子的烷基基团,或者芳基基团如苯基。

[0139] 术语“洗涤”或“洗涤步骤”包括使适当的缓冲液从给定材料(例如离子交换材料或疏水相互作用材料)之中或之上流过。

[0140] 术语“多个洗涤步骤”包括超过一个的接连洗涤步骤。接连的缓冲液可具有不同的特性如 pH、电导率、溶剂浓度等,这些特性是设计来将各种类型的与给定材料(例如离子交换材料或疏水相互作用材料)非特异性缔合的杂质进行解离和除去。在一个实施方案中,该多个洗涤步骤包括中间洗涤,该中间洗涤还包含约 40-50%洗脱缓冲液。

[0141] 所谓将某分子(例如抗体或污染物质)从某材料中“洗脱”下来,是指通过改变该材料周围的缓冲液从而降低该分子与该材料的相互作用,来将该分子从该材料除去。在一个实施方案中,将抗体从离子交换柱上洗脱下来,其中缓冲液与该抗体竞争该离子交换材料上的带电位点。

[0142] 术语“洗脱物”指这样的包含分子(例如抗体或污染物质)的液体,它是在使目的

抗体与层析材料结合并加入洗脱缓冲液来解离该抗体后获得的。洗脱物可针对纯化过程中的步骤来说明。例如,术语“第一洗脱物”指第一层析步骤的洗脱物,术语“第二洗脱物”指第二层析步骤的洗脱物,依此类推。

[0143] 术语“流通物”指这样的包含分子(例如抗体或污染物质)的液体,它是通过使包含该分子的混合物通过层析材料以使该分子通过该材料而不发生结合来获得的。

[0144] “缓冲液”指这样的物质,由于它在溶液中的存在,使得为引起单位 pH 变化所必需加入的酸或碱的数量要增加。缓冲溶液是通过其酸-碱共轭物成分的作用来抵抗 pH 变化的。用于生物试剂的缓冲溶液通常能够维持恒定浓度的氢离子,使得溶液的 pH 在生理范围内。传统的缓冲成分包括但不限于有机和无机的盐、酸和碱。示例性的用于纯化生物分子(例如抗体)的缓冲液,包括两性离子缓冲液或“Good”缓冲液,参见例如 Good et al. (1966) *Biochemistry* 5:467 和 Good and Izawa (1972) *Methods Enzymol.* 24:62。示例性的缓冲液包括但不限于 TES、MES、PIPES、HEPES、MOPS、MOPSO、TRICINE 和 BICINE。

[0145] 本文所用的“洗涤缓冲液”在本文中均指用以从结合有抗体的给定材料(例如离子交换材料或疏水相互作用材料)带走杂质的物质。

[0146] “洗脱缓冲液”指用以将抗体从经一种或多种洗涤物质洗涤过的给定材料(例如离子交换材料或疏水相互作用材料)解离下来的物质。洗脱缓冲液起到解离抗体的作用。典型的洗脱物质是本领域公知的,它们可具有较高浓度的盐、游离亲和配体或类似物或者其他能促进靶物质(例如抗体)从给定材料的解离的物质。洗脱缓冲液的电导率和/或 pH 使得该抗体从该离子交换材料或疏水相互作用材料洗脱下来。

[0147] 术语“电导率”指水溶液在两个电极之间传导电流的能力。在溶液中,电流是通过离子运输而流动。因此,水溶液中存在越多的离子,溶液就会有越高的电导率。电导率的测量单位是 mmhos (mS/cm),可用例如 Orion 出售的电导率仪进行测量。溶液的电导率可通过改变其中的离子浓度来改变。例如,可改变溶液中的缓冲剂的浓度和/或盐(e.g. NaCl 或 KCl)的浓度,以达到所需的电导率。在一个实施方案中,对层析中所用的洗涤缓冲液或任何其他水溶液的盐浓度进行改变,以达到缩小的电导率。

[0148] 多肽如抗体的“pI”或“等电点”指该多肽的正电荷与其负电荷平衡时的 pH,可从该多肽的氨基酸残基的净电荷来计算,或者可通过等电聚焦来测定。

[0149] 术语“病毒灭活”包括使混合物中所含的病毒失去功能,或者将病毒从待纯化的混合物中除去。该病毒可发源于抗体生产、下游加工步骤或制造环境。使病毒失去功能或除去病毒的方法包括热灭活、pH 灭活、化学灭活剂等。术语“pH 病毒灭活”包括使病毒经受某足以使它失去功能的 pH。

[0150] 本文所用的术语“人 TNF α ”(本文缩写为 hTNF α ,或简称 hTNF),意指以 17kD 分泌形式和 26kD 膜缔合形式存在的人细胞因子,其生物活性形式由非共价结合的 17kD 分子的三聚体构成。hTNF α 的结构在例如 Pennica, D. 等, (1984) *Nature* 312:724-729; Davis, J. M. 等, (1987) *Biochemistry* 26:1322-1326 和 Jones, E. Y. 等, (1989) *Nature* 338:225-228 中有进一步的描述。术语人 TNF α 意在包括重组人 TNF α (rhTNF α),其能通过标准重组表达方法来制备或者能商业购得(R & D Systems, Catalog No. 210-TA, Minneapolis, MN)。TNF α 也称作 TNF。

[0151] 本文所用的术语“抗体”意指由四个多肽链即两个重链(H)和两个轻链(L)通过二

硫键相互连接构成的免疫球蛋白分子。每条重链由重链可变区（本文缩写为 HCVR 或 VH）和重链恒定区构成。重链恒定区由 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域构成。每条轻链由轻链可变区（本文缩写为 LCVR 或 VL）和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 CL 构成。VH 区和 VL 区可以进一步细分为称作互补决定区（CDR）的高变区，这些高变区被称作构架区（FR）的更为保守的区所中断。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 构成，从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。本发明的抗体在美国专利 6,090,382、6,258,562 和 6,509,015 中有进一步详细描述，每个专利通过引用整体结合到本文中。在一个实施方案中，本发明的抗体是能干扰 TNF α 活性的抗 TNF α 抗体。抗 TNF α 抗体的实例包括但不限于抗 TNF α 人抗体和本文描述的抗体部分，以及美国专利 6,090,382、6,258,562 和 6,509,015 和美国专利申请系列号 09/801185 和 10/302356 中描述的那些抗体和抗体部分，每个专利和专利申请通过引用结合到本文中。在一个实施方案中，用于本发明的 TNF α 抑制剂是抗 TNF α 抗体或其片段，包括英夫利昔单抗（Remicade[®]，Johnson and Johnson；在美国专利 5,656,272 中描述，该专利通过引用结合到本文中）、CDP571（人源化的单克隆抗 TNF α 抗体片段）、抗 TNF dAb（Peptech）、CNT0148（golimumab；Medarex and Centocor）、W002/12502 中描述的抗体，和阿达木单抗（Humira[®] Abbott Laboratories，一种人抗 TNF mAb，在 US 6,090,382 中描述为 D2E7）。可用于本发明的另外的抗体或其片段描述于美国专利 6,593,458、6,498,237、6,451,983 和 6,448,380，每个专利通过引用结合到本文中。该术语包括“目的抗体”，是作为本发明方法的目标的抗体。

[0152] 本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”（或简称“抗体部分”），指抗体的一个或几个保留与抗原（例如 hTNF α ）特异性结合的能力的片段。已经证明抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来实现。抗体的“抗原结合部分”这个术语所涵盖的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段，是由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域构成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，是由两个 Fab 片段通过铰链区的二硫键连接而构成的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域构成的 Fd 片段；(iv) 由抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域构成的 Fv 片段，(v) dAb 片段（Ward 等，(1989) Nature 341 :544-546），由 VH 结构域构成；和 (vi) 分离的互补决定区（CDR）。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 是由不同的基因所编码，但是可使用重组方法通过合成的接头将它们连接起来，所述接头使得它们变成单一的蛋白质链，其中 VL 区和 VH 区配对形成单价分子（称为单链 Fv（scFv）；参见例如 Bird 等 (1988) Science 242 :423-426 和 Huston 等 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-5883）。这样的单链抗体也要被涵盖在抗体的“抗原-结合部分”这个术语中。其他形式的单链抗体如双抗体（diabody）也涵盖在内。双抗体是二价的双特异性抗体，其中 VH 和 VL 结构域在单一多肽链上表达，但是所使用的接头短得不能让同一链上的这两个结构域之间发生配对，从而迫使这两个结构域与另一条链的互补结构域发生配对，产生两个抗原结合位点（参见例如 Holliger, P. 等，(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448；Poljak, R. J. 等，(1994) Structure 2 :1121-1123）。本发明的抗体部分在美国专利 6,090,382、6,258,562 和 6,509,015 中有进一步的详细描述，每个专利通过引用结合到本文中。

[0153] 结合片段是通过重组 DNA 技术来生产，或者通过完整免疫球蛋白的酶促或化学切割来产生。结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv、单链和单链抗体。与“双特异性”或“双功能”免疫球蛋白或抗体不同，免疫球蛋白或抗体被认为其每个结合位点是相同的。

“双特异性”或“双功能抗体”是人造杂合抗体，具有两个不同的重链 / 轻链对和两个不同的结合位点。双特异性抗体可通过多种方法来制备，包括杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接。参见例如 Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79 :315-321 (1990) ;Kostelny 等, J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)。

[0154] 本文所用的“保守的氨基酸置换”是其中一个氨基酸残基被具有相似侧链的另一个氨基酸残基所置换的置换作用。本领域已经确定了具有相似侧链的氨基酸残基家族，包括碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸），酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸），不带电荷的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸），非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸）， β -分支侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳族侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。

[0155] “嵌合抗体”指这样的抗体，其中重链和轻链的每个氨基酸序列的一部分与源自特定物种或属于特定类别的抗体中的相应序列同源，而所述链的其余区段与另一物种的相应序列同源。在一个实施方案中，本发明涉及这样的嵌合抗体或抗原结合片段，其中轻链和重链的可变区都模拟源自一种哺乳动物物种的抗体的可变区，而恒定区则与源自另一种物种的抗体中的序列同源。在本发明的一个优选实施方案中，嵌合抗体是通过将小鼠抗体的 CDR 嫁接到人抗体的构架区上而制备的。

[0156] “人源化抗体”指包含至少一条这样的链的抗体，该链包含基本上来自人抗体链（称为受体免疫球蛋白或抗体）的可变区构架残基和至少一个基本上来自非人抗体（例如小鼠）的互补决定区（CDR）。除了 CDR 的嫁接外，人源化抗体通常进行进一步的改造以改进亲和力和 / 或免疫原性。

[0157] 术语“多价抗体”指包含超过一个抗原识别位点的抗体。例如，“二价”抗体具有两个抗原识别位点，而“四价”抗体具有四个抗原识别位点。术语“单特异性”、“双特异性”、“三特异性”、“四特异性”等指多价抗体中存在的不同抗原识别位点特异性的数量（与抗原识别位点的数量相对）。例如，“单特异性”抗体的抗原识别位点都结合相同的表位。“双特异性”或“二元特异性”抗体具有至少一个结合第一表位的抗原识别位点，和至少一个结合不同于第一表位的第二表位的抗原识别位点。“多价单特异性”抗体具有都结合相同的表位的多个抗原识别位点。“多价双特异性”抗体具有多个抗原识别位点，其中一些结合第一表位，另一些结合不同于第一表位的第二表位。

[0158] 本文所用的术语“人抗体”意在包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如通过体外随机或位点特异性诱变引入的突变或者通过体内体细胞突变引入的突变），例如在 CDR 中，特别是在 CDR3 中。然而，本文所用的术语“人抗体”不意在包括其中源自另一个哺乳动物物种（如小鼠）的种系的 CDR 序列已被嫁接到人构架序列上的抗体。

[0159] 本文所用的术语“重组人抗体”意在包括所有通过重组方法制备、表达、产生或分离的人抗体，例如使用转染到宿主中的重组表达载体表达的抗体（下文进一步描述），从重组、组合人抗体文库分离的抗体（下文进一步描述），从转人免疫球蛋白基因的转基因动物（例如小鼠）分离的抗体（参见例如 Taylor, L. D. 等, (1992) Nucl. Acids Res. 20 :6287），或者通过涉及到将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他 DNA 序列的任何其他方法来制备、表

达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。但是在某些实施方案中,将这种人抗体进行体外诱变(或者当使用转人 Ig 序列的转基因动物时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的 VH 区和 VL 区的氨基酸序列是这样的序列,它们虽然源自人种系 VH 和 VL 序列或与之有关,但可能不天然存在于体内人抗体种系库 (antibodygermline repertoire) 当中。

[0160] 这种嵌合的、人源化的、人的和二元特异性的抗体可通过本领域公知的重组 DNA 技术生产,例如使用以下专利和文献中描述的方法来生产:PCT 国际申请 PCT/US86/02269; 欧洲专利申请 184,187; 欧洲专利申请 171,496; 欧洲专利申请 173,494; PCT 国际公开 W086/01533; 美国专利 4,816,567; 欧洲专利申请 125,023; Better et al (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214; 美国专利 5,225,539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; 和 Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989), US 5,530,101、US 5,585,089、US 5,693,761、US 5,693,762、Selick et al, WO 90/07861 和 Winter, US 5,225,539。

[0161] 本文所用的“分离抗体”意指基本上脱除了具有不同的抗原特异性的其他抗体的抗体(例如特异性结合 hTNF α 的分离抗体基本上脱除了特异性结合 hTNF α 之外的抗原的抗体)。但是,特异性结合 hTNF α 的分离抗体可能与其他抗原有交叉反应性,例如与来自其他物种的 TNF α 分子(下面进一步详细讨论)。此外,分离抗体可以基本上脱除了其他细胞材料和/或化学品。

[0162] 本文所用的“中和抗体”(或者“中和 hTNF α 活性的抗体”)意指其与 hTNF α 的结合导致 hTNF α 的生物活性被抑制的抗体。这一对 hTNF α 的生物活性的抑制,可通过测量 hTNF α 生物活性的一个或几个指标来评价,所述指标例如 hTNF α 诱导的细胞毒性(体外或体内)、hTNF α 诱导的细胞激活和 hTNF α 与 hTNF α 受体的结合。这些 hTNF α 生物活性的指标可通过本领域公知的几个标准体外或体内测定中的一个或几个来评价(参见美国专利 6,090,382)。优选地,通过对 L929 细胞的 hTNF α 诱导细胞毒性的抑制,来评价抗体中和 hTNF α 活性的能力。作为 hTNF α 活性的附加的或另选的参数,可评价抗体抑制 ELAM-1 在 HUVEC 上的 hTNF α 诱导表达的能力,作为 hTNF α 诱导细胞激活的一个量度。

[0163] 本文所用的术语“表面等离子共振”指这样的光学现象,该现象使得可以例如使用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, NJ) 对生物传感器矩阵当中的蛋白质浓度的变化进行检测,从而对实时生物特异性相互作用进行分析。更多的描述参见美国专利 6,258,562 的实施例 1 和 Jonsson 等 (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19; **Jönsson** 等, (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson 等 (1995) J. Mol. Recognit. 8:125 和 Johnson 等 (1991) Anal. Biochem. 198:268。

[0164] 本文所用的术语“ K_{off} ”意指抗体从抗体/抗原复合体解离的离开 (Off) 速度常数。

[0165] 本文所用的术语“ K_d ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离常数。

[0166] 本文所用的术语“ IC_{50} ”意指抑制生物学目的终点（如中和细胞毒性活性）所需的抑制剂的浓度。

[0167] 本文所用的术语“核酸分子”意在包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，但是优选双链 DNA。

[0168] 本文针对编码能结合 hTNF α 的抗体或抗体部分（例如 VH、VL、CDR3）的核酸所使用的术语“分离核酸分子”，意指这样的核酸分子，其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列脱除了编码能结合 hTNF α 之外的抗原的抗体或抗体部分的其他核苷酸序列，该其他序列可天然地位于人基因组 DNA 中的核酸的侧翼。因此例如，本发明的编码抗 hTNF α 抗体的 VH 区的分离核酸，不含有编码能与 hTNF α 之外的抗原结合的其他 VH 区的其他序列。

[0169] 本文所用的术语“载体”意指能转运其所连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”，指的是其中可以连接上另外的区段的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中另外的 DNA 区段可以被连接到病毒基因组中。某些载体在其被引入的宿主细胞中能自主复制（例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其他载体（例如非附加型哺乳动物载体）在导入宿主细胞时能被整合到宿主细胞的基因组中，从而随宿主基因组被复制。此外，某些载体能指导其所操作性连接的基因的表达。这样的载体在本文称作“重组表达载体”（或者简称“表达载体”）。一般情况下，适用于重组 DNA 技术的表达载体经常是质粒的形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可以互换使用，因为质粒是最常用的载体形式。但是，本发明意在包括能起着同等功能的其他形式的表达载体，如病毒载体（例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒）。

[0170] 本文所用的术语“重组宿主细胞”（或者简称“宿主细胞”），意指其中导入重组表达载体的细胞。应认识到，这些术语意在不仅指特定的受试者细胞，而且还指这样的细胞的后代。因为由于突变或环境影响而在后续世代中可能发生某些修饰，事实上这样的后代可能与亲代细胞不同，但是仍然包括在本文所用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0171] 本文所用的术语“药盒”指包含各成分的安装产品或制造品。药盒优选包括盛有药盒的各成分盒子或容器。盒子或容器中附加有标签或食品和药物管理部的批准方案。盒子或容器装有本发明的各成分，优选装在塑料、聚乙烯、聚丙烯、乙烯或丙烯容器中。容器可以是带盖子的管或瓶。药盒还可以包括施用本发明的 TNF α 抗体的说明书。在一个实施方案中，本发明的药盒包括包含有如 PCT/IB03/04502 和美国申请第 10/222140 号所述的人抗体 D2E7 的制剂。

[0172] 本文进一步描述本发明的各个方面。

[0173] II. 抗体生产

[0174] 本发明提供从包含抗体和一种或者多种 HCP 的混合物中纯化该抗体的方法。初始混合物通常是由抗体的重组生产得到的混合物。或者，初始混合物可来自通过肽合成（或其他合成方法）进行的抗体生产，或者该抗体可从其天然来源纯化。

[0175] 为表达本发明的抗体或抗体部分，将编码部分或全长轻链或重链的 DNA 插入到表达载体中，使得基因被操作性连接到转录和翻译控制序列。在这个情形中，术语“操作性连接”指的是抗体基因连接到载体中，使得载体中的转录和翻译控制序列能发挥其调节抗体基因的转录和翻译的预定功能。选择表达载体和表达控制序列使之与所用的表达宿主细胞相容。抗体轻链基因和抗体重链基因可以插入单独的载体中，或者更典型的是两种基因都

插入同一个表达载体中。抗体基因通过标准的方法插入到表达载体中（如将抗体基因片段上的互补限制性酶切位点与载体相连接，或者如果没有限制性酶切位点，则进行钝末端连接）。在插入抗体或抗体相关轻链或重链序列之前，表达载体可能已经携带有抗体恒定区序列。例如，一种将阿达木单抗或阿达木单抗相关 VH 序列和 VL 序列转变成全长抗体基因的方法，就是将它们分别插入到已编码重链恒定区的表达载体和已编码轻链恒定区的表达载体中，使得 VH 区段操作性连接到载体当中的 CH 区段，而 VL 区段操作性连接到载体当中的 CL 区段。另外，重组表达载体可编码有助于抗体链从宿主细胞中分泌出来的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中，使得信号肽符合读框地连接到 (linked in-frame to) 抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽，也可以是异源信号肽（即非免疫球蛋白的信号肽）。

[0176] 除了抗体链基因外，本发明的重组表达载体还携带能调控抗体链基因在宿主细胞中的表达的调节序列。术语“调节序列”意指包括能控制抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子以及别的表达控制元件（如多聚腺苷酸信号）。这些调节序列在例如 Goeddel ; Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中有描述。本领域技术人员会认识到，表达载体的设计，包括调节序列的选择，要取决于诸如所选择转化的宿主细胞、所需蛋白的表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列，包括能指导蛋白在哺乳动物细胞中的高水平表达的病毒元件，如源自巨细胞病毒 (CMV)（如 CMV 启动子 / 增强子）、猿病毒 40 (SV40)（如 SV40 启动子 / 增强子）、腺病毒（如腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP)）以及多瘤病毒的启动子和 / 或增强子。有关病毒调节元件及其序列的进一步介绍参看例如 Stinski 的美国专利 5, 168, 062, Bell 等的美国专利 4, 510, 245 以及 Schaffner 等的美国专利 4, 968, 615。

[0177] 除了抗体链基因和调节序列外，本发明的重组表达载体还可携带别的序列，如能调节载体在宿主细胞中复制的序列（如复制起点）以及选择性标记基因。选择性标记基因有助于挑选出其中已导入载体的宿主细胞（参看美国专利 4, 399, 216、4, 634, 665 和 5, 179, 017，这三个专利都是 Axel 等人的）。例如，通常选择性标记基因能给其中已导入了载体的宿主赋予对药物如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤的抗性。优选的选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因（在 dhfr⁻ 宿主细胞中用于氨甲蝶呤选择 / 扩增）和 neo 基因（进行 G418 选择）。

[0178] 为了表达轻链和重链，用标准技术将编码重链和轻链的表达载体转入宿主细胞中。不同形式的术语“转染”意在涵盖多种常用于将外源 DNA 导入到原核或真核宿主细胞中的技术，例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE 葡聚糖转染等。尽管从理论上说，本发明的抗体可以在原核或真核宿主细胞中表达，但最优选的是在真核细胞、最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体，真核细胞尤其是哺乳动物细胞比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠并具有免疫活性的抗体。抗体基因在原核细胞中的表达据报道不能有效地高产率生产活性抗体 (Boss, M. A 和 Wood, C. R. (1985), Immunology Today 6 :12-13)。

[0179] 适用于克隆和表达本文所述载体中的 DNA 的宿主细胞，是原核生物细胞、酵母细胞或上述的高等真核生物细胞。适用于此目的的原核生物包括真细菌如革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌，例如肠杆菌科细菌如埃希氏菌属细菌（例如大肠杆菌）、肠杆菌属细菌、欧文氏菌属细菌、克雷伯氏菌属细菌、变形菌 (Proteus) 属细菌、沙门氏菌属细菌（例如鼠伤寒

沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属细菌 (例如 *Serratia marcescans*) 和志贺氏菌属细菌以及芽孢杆菌属细菌 (如 *B. subtilis* 和 *B. licheniformis* (例如 1989 年 4 月 12 日公布的 DD 266,710 中所公开的 *B. licheniformis* 41P)、假单胞杆菌属细菌 (如 *P. aeruginosa*), 和链霉菌。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是 *E. coli* 294 (ATCC31, 446), 不过其他的菌株 *E. coli* B、*E. coli* X1776 (ATCC 31, 537) 和 *E. coli* W3110 (ATCC 27, 325) 如也适合。这些实例是说明性的而非限制性的。

[0180] 除了原核生物外,真核微生物如丝状真菌或酵母也是适用于多肽编码载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或者说普通面包酵母是低等真核宿主微生物当中最常用的。但是,有多种其他的属、种和株是易于得到并可用于本发明的,如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*); 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主,例如 *K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC 12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophilae* (ATCC 36, 906)、*K. thermotolerans* 和 *K. marxianus*; 亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402, 226); 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP183, 070); 假丝酵母属 (*Candida*); *Trichoderma reesei* (EP 244, 234); *Neurospora crassa*; 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 如 *Schwanniomyces occidentalis*, 和丝状真菌如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉菌属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolyposcladium*) 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主如 *A. nidulans* 和 *A. niger*。

[0181] 适用于表达糖基化抗体的宿主细胞源自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。在诸如草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫)、埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的宿主中,已鉴定出多种杆状病毒毒株和变体及相应的允许 (permissive) 昆虫宿主细胞。有多种转染用病毒株可公开获得,例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-I 株和家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 的 Bm-5 株,这种病毒可用作本发明的病毒,特别是用于转染草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、西红柿和烟草的植物细胞培养物也可用作宿主。

[0182] 优选用于表达本发明重组抗体的哺乳动物宿主细胞,包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) (包括 dhfr-CHO 细胞,在 Urlaub and Chasin, (1980) PNAS USA 77 :4216-4220 中描述,与例如 Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159 :601-621 中描述的 DHFR 选择性标记一起使用)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被导入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段时间来生产抗体,该段时间足以使抗体得以在宿主细胞中表达,或者更优选地使抗体得以分泌到宿主细胞生长的培养基中。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例有:被 SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651) 转化的猴肾 CV1 细胞系;人胚胎肾细胞系 (被亚克隆以在悬浮培养物中生长的 293 或 293 细胞, Graham et al., J. Gen Virol. 36 :59 (1977)); 幼仓鼠肾细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : (1980)); 猴肾细胞 (CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞 (MDCK, ATCC CCL 34); 布法罗大鼠肝细胞 (BRL3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤细胞 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 细胞 (Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68 (1982)); MRC5 细胞;

FS4 细胞和人肝癌细胞系 (Hep G2)。

[0183] 用上述抗体生产用的表达或克隆载体转化宿主细胞,并将宿主细胞在经过适当改进而可诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因的常规营养培养基中进行培养。

[0184] 用来生产抗体的宿主细胞可在多种培养基中培养。市售的培养基如 Ham' s F10(Sigma)、极限必需培养基 (MEM), (Sigma)、RPMI-1640(Sigma) 和 Dulbecco 改进分 Eagle 培养基 (DMEM), (Sigma) 适用于培养宿主细胞。另外,在以下文献和专利中描述的任何培养基都可用作宿主系的培养基: Ham et al., Meth. Enz. 58 :44(1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102 :255(1980), 美国专利 4, 767, 704、4, 657, 866、4, 927, 762、4, 560, 655 或 5, 122, 469 ;WO 90/03430 ;WO 87/00195 或美国专利 Re. 30, 985。任何这些培养基都可按需补充激素和 / 或其他生长因子 (如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐 (如氯化钠、氯化钙、氯化镁和磷酸盐)、缓冲液 (如 HEPES)、核苷酸 (如腺苷和胸苷)、抗生素 (如庆大霉素药物)、痕量元素 (定义为通常以毫摩尔级的最终浓度存在的无机化合物) 和葡萄糖或等价的能源。任何其他必需的补充物也可按本领域技术人员会知道的适当浓度加入。培养条件如温度、pH 等是之前用于选定进行表达的宿主细胞的那些条件,它们是普通技术人员显而易见的。

[0185] 宿主细胞也可用来产生完整抗体的部分,如 Fab 片段或 scFv 分子。应认识到,上述方法的修改方案也在本发明的范围之内。例如,可能宜用编码本发明抗体的轻链或重链 (但不是同时编码两者) 的 DNA 来转染宿主细胞。也可利用重组 DNA 技术,来去掉编码轻链或重链或两者的 DNA 中对结合 hTNF α 没有必要的一些部分或全部。从这种截短的 DNA 分子表达的分子也涵盖在本发明的抗体范围之内。此外,可通过标准的化学交联方法将本发明的抗体与另一抗体交联,来产生双功能抗体,其中一条重链和一条轻链属本发明的抗体,而另外一条重链和轻链对 hTNF α 之外的抗原有特异性。

[0186] 在一个优选的进行本发明抗体或其抗原结合部分的重组表达的系统,通过磷酸钙介导转染将编码抗体重链和轻链的重组表达载体导入 dhfr-CHO 细胞中。在这个重组表达载体当中,抗体重链和轻链各自操作性连接到 CMV 增强子 /AdMLP 启动子调节元件,以驱动高水平的基因转录。重组表达载体还携带有 DHFR 基因,该基因使得可以采用氨甲蝶呤选择 / 扩增来选出转染了载体的 CHO 细胞。将选出的转化宿主细胞进行培养,以使抗体重链和轻链得以表达,而后从培养基中回收完整抗体。用标准的分子生物学技术来制备重组表达载体,转染宿主细胞,选择转化子,培养宿主细胞和从培养基中回收抗体。

[0187] 本文公开的本发明重组人抗体,包括阿达木单抗或其抗原结合部分,或者阿达木单抗相关抗体,可以通过筛选用人 VL 和 VH cDNA 制备的重组组合抗体文库 (优选 scFv 噬菌体展示文库) 进行分离,该人 VL 和 VH cDNA 是从衍自人淋巴细胞的 mRNA 制备的。制备和筛选这样的文库的方法是本领域众所周知的。除了市售的用以产生噬菌体展示文库的试剂盒 (例如 Pharmacia 重组噬菌体抗体系统,目录号 27-9400-01 ;和 Stratagene SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒,目录号 240612) 外,特别适用于产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可见于例如 Ladner et al. 美国专利 5, 223, 409 ;Kang et al. PCT 公开说明书 WO 92/18619 ;Dower et al. PCT 公开说明书 WO 91/17271 ;Winter et al. PCT 公开说明书 WO 92/20791 ;Markland et al. PCT 公开说明书 WO 92/15679 ;Breitling et al. PCT 公开说明书 WO 93/01288 ;McCafferty et al. PCT 公开说明书 WO 92/01047 ;Garrard et

al. PCT 公开说明书 WO 92/09690 ;Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9 :1370-1372 ; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3 :81-85 ;Huse et al. (1989) Science 246 : 1275-1281 ;McCafferty et al. , Nature(1990) 348 :552-554 ;Griffiths et al. (1993) EMBO J 12 :725-734 ;Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226 :889-896 ;Clackson et al. (1991) Nature 352 :624-628 ;Gram et al. (1992) PNAS 89 :3576-3580 ;Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9 :1373-1377 ;Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19 : 4133-4137 ;和 Barbas et al. (1991) PNAS 88 :7978-7982。

[0188] 当使用重组技术时,抗体可胞内产生,在周质间隙,或者可直接分泌到培养基中。如果抗体是胞内产生,作为第一个步骤,将颗粒碎片例如通过离心或超滤除去,该颗粒碎片可以是宿主细胞或裂解细胞(例如来自均化操作)。在抗体被分泌到培养基的情况中,通常首先用市售的蛋白质浓缩滤器如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤组件,将得自这种表达系统的上清液进行浓缩。

[0189] 在进行本发明方法之前,从细胞碎片纯化抗体的程序最初决定于抗体的表达位点。可以使一些抗体直接从细胞分泌到周围生长培养基中;其他抗体则是胞内产生。对于后一类抗体,纯化方法的第一个步骤涉及到裂解细胞,这可通过多种方法来进行,包括机械剪切、渗透冲击或酶法处理。这种破坏作用会使细胞的全部内容物释放到匀浆(homogenate)中,另外还会产生因尺寸小而难以除去的亚细胞碎片。这些通常是通过差速离心或通过过滤来除去。在抗体不分泌到培养基的情况中,通常首先用市售的蛋白质浓缩滤器如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤组件,将得自这种表达系统的上清液进行浓缩。在抗体被分泌到培养基的情况中,也可例如通过切向流过滤将重组宿主细胞从细胞培养基中分离出来。还可进一步使用本发明的抗体纯化方法,从培养基中回收抗体。

[0190] 在一个实施方案中,本发明的方法包括能以高亲和力和低离开速率(offrate)结合人 TNF α 、且具有高中和能力的人抗体或其抗原结合部分。优选地,人抗体是重组中和性人抗 hTNF α 抗体。最优选用于本发明方法的重组中和性抗体在本文中称为阿达木单抗、**Humira[®]**和 D2E7(D2E7VL 区的氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示;D2E7 VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示)。D2E7(阿达木单抗;**Humira[®]**)的特性在 Salfeld 等的美国专利 6,090,382、6,258,562 和 6,509,015 中已有描述,这三个专利通过引用结合到本文中。抗 TNF α 抗体的其他实例包括已进行了有关类风湿性关节炎治疗的临床试验的嵌合和人源化的鼠抗 hTNF α 抗体(参见例如 Elliott et al. (1994) Lancet 344 :1125-1127 ;Elliot et al. (1994) Lancet 344 :1105-1110 ;Rankin et al. (1995) Br. J. Rheumatol. 34 :334-342)。在另一个实施方案中,用于本发明的抗 TNF α 抗体是英夫利昔单抗(**Remicade[®]**, Johnson and Johnson ;描述于美国专利 5,656,272(通过引用结合到本文中))、CDP571(人源化单克隆抗 TNF- α IgG4 抗体)、CDP 870(人源化单克隆抗 TNF- α 抗体片段)、抗 TNF dAb(Peptech) 和 CNT0 148(golimumab ;Medarex and Centocor,另参见 WO 02/12502)。

[0191] 在一个实施方案中,本发明的方法包括阿达木单抗抗体和抗体部分、阿达木单抗相关抗体和抗体部分以及具有与阿达木单抗同等特性的其他人抗体和抗体部分,所述特性如以低解离动力学高亲和力结合 hTNF α 和高中和能力。在一个实施方案中,本发明提供用这样的分离人抗体或其抗原结合部分进行的治疗,该分离人抗体或其抗原结合部分以

$1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 K_d 和 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更低的 K_{off} 速率常数从人 TNF α 解离下来 (这两个参数均用表面等离子共振法测定), 且在体外 L929 测定中能以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 中和人 TNF α 细胞毒性。更优选地, 该分离人抗体或其抗原结合部分以 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更低的 K_{off} 、更优选 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更低的 K_{off} 从人 TNF α 解离下来。更优选地, 该分离人抗体或其抗原结合部分在体外 L929 测定中, 以 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 、甚至更优选以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 、还更优选以 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或更低的 IC_{50} 中和人 TNF α 细胞毒性。在一个优选的实施方案中, 抗体是分离的人重组抗体或其抗原结合部分。

[0192] 本领域公知, 抗体重链和轻链 CDR3 结构域在抗体对抗原的结合特异性 / 亲和力中起到重要的作用。因此, 在另一个方面, 本发明涉及通过给予用本发明方法获得的人抗体来治疗类风湿性关节炎的方法, 其中该抗体与 hTNF α 缔合的解离动力学缓慢, 且他们所具有的轻链和重链 CDR3 结构域在结构上与阿达木单抗的那些结构域相同或相关。阿达木单抗 VL CDR3 的位置 9 可被 Ala 或 Thr 占据而基本上不影响 K_{off} 。因此, 阿达木单抗 VL CDR3 的共有基序包含以下氨基酸序列: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO:3)。另外, 阿达木单抗 VH CDR3 的位置 12 可被 Tyr 或 Asn 占据而基本上不影响 K_{off} 。因此, 阿达木单抗 VH CDR3 的共有基序包含以下氨基酸序列: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO:4)。此外, 如美国专利 6,090,382 的实施例 2 所证明, 阿达木单抗重链和轻链的 CDR3 结构域易于进行单一丙氨酸残基置换 (在 VL CDR3 当中的位置 1、4、5、7 或 8 或者在 VH CDR3 当中的位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11) 而基本上不影响 K_{off} 。还进一步地, 技术人员会认识到, 鉴于阿达木单抗 VL 和 VH CDR3 结构域易于被丙氨酸置换, 在 CDR3 结构域当中还可能进行其他氨基酸置换, 同时还保持抗体的低离开 (off) 速率常数, 所述其他氨基酸置换特别是保守氨基酸置换。优选地, 在阿达木单抗 VL 和 / 或 VH CDR3 结构域当中进行的保守氨基酸置换不超过一个至五个。更优选地, 在阿达木单抗 VL 和 / 或 VH CDR3 结构域当中进行的保守氨基酸置换不超过一个至三个。另外, 不应在对于与 hTNF α 的结合而言关键的氨基酸位置进行保守氨基酸置换。阿达木单抗 VL CDR3 的位置 2 和 5 及阿达木单抗 VH CDR3 的位置 1 和 7 似乎对于与 hTNF α 的相互作用是关键的, 因此优选不在这些位置进行保守氨基酸置换 (尽管如上所述, 在阿达木单抗 VL CDR3 的位置 5 进行丙氨酸置换是可接受的) (参见美国专利 6,090,382)。

[0193] 因此, 在另一个实施方案中, 抗体或其抗原结合部分优选具有以下特征:

[0194] a) 以 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ 或更低的 K_{off} 速率常数从人 TNF α 解离下来, 该参数是用表面等离子共振法测定;

[0195] b) 具有包含 SEQ ID NO:3 氨基酸序列或者从 SEQ ID NO:3 修饰而成的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域, 该修饰是位置 1、4、5、7 或 8 处的单一丙氨酸置换或者位置 1、3、4、6、7、8 和 / 或 9 处的一至五个保守氨基酸置换;

[0196] c) 具有包含 SEQ ID NO:4 氨基酸序列或者从 SEQ ID NO:4 修饰而成的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域, 该修饰是位置 2、3、4、5、6、8、9、10 或 11 处的单一丙氨酸置换或者位置 2、3、4、5、6、8、9、10、11 和 / 或 12 处的一至五个保守氨基酸置换。

[0197] 更优选地, 该抗体或其抗原结合部分以 $5 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更低的 K_{off} 从人 TNF α 解离下来。甚至更优选地, 该抗体或其抗原结合部分以 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ 或更低的 K_{off} 从人 TNF α 解离下来。

[0198] 在又一个实施方案中,该抗体或其抗原结合部分优选含有这样的轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR),该LCVR具有包含SEQ ID NO:3氨基酸序列或者从SEQ ID NO:3修饰而成的氨基酸序列的CDR3结构域,该修饰是位置1、4、5、7或8处的单一丙氨酸置换;该HCVR具有包含SEQ ID NO:4氨基酸序列或者从SEQ ID NO:4修饰而成的氨基酸序列的CDR3结构域,该修饰是位置2、3、4、5、6、8、9、10或11处的单一丙氨酸置换。优选地,LCVR还具有包含SEQ ID NO:5氨基酸序列的CDR2结构域(即阿达木单抗VL CDR2),HCVR还具有包含SEQ ID NO:6氨基酸序列的CDR2结构域(即阿达木单抗VH CDR2)。甚至更优选地,LCVR还具有包含SEQ ID NO:7氨基酸序列的CDR1结构域(即阿达木单抗VL CDR1),HCVR还具有包含SEQ ID NO:8氨基酸序列的CDR1结构域(即阿达木单抗VH CDR1)。VL的构架区优选来自V_kI人种系家族,更优选来自A20人种系Vk基因,最优选来自美国专利6,090,382的图1A和1B中所示的阿达木单抗VL构架序列。VH的构架区优选来自V_H3人种系,更优选来自DP-31人种系VH基因,最优选来自美国专利6,090,382的图2A和2B中所示的阿达木单抗VH构架序列。

[0199] 因此,在另一个实施方案中,该抗体或抗原结合部分优选含有这样的轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR),该LCVR包含SEQ ID NO:1氨基酸序列(即阿达木单抗VL),该HCVR包含SEQ ID NO:2氨基酸序列(即阿达木单抗VH)。在某些实施方案中,该抗体包含重链恒定区,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。优选地,重链恒定区是IgG1重链恒定区或IgG4重链恒定区。此外,该抗体可包含轻链恒定区,其为kappa轻链恒定区或lambda轻链恒定区。优选地,该抗体包含kappa轻链恒定区。或者,该抗体部分可以是例如Fab片段或单链Fv片段。

[0200] 在又一个实施方案中,该抗体或其抗原结合部分优选含有阿达木单抗相关VL和VH CDR3结构域,例如是具有这样的轻链可变区(LCVR)或具有这样的重链可变区(HCVR)的抗体或其抗原结合部分,该LCVR具有包含选自以下的氨基酸序列的CDR3结构域:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26;该HCVR具有包含选自以下的氨基酸序列的CDR3结构域:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35。

[0201] 用于本发明TNF α 抗体可进行修饰。在一些实施方案中,TNF α 抗体或者其抗原结合片段进行化学修饰,以提供期望的效果。例如,本发明抗体和抗体片段的PEG化可以通过本领域公知的任何PEG化反应来进行,所述反应描述于例如以下参考文献:Focus on Growth Factors 3:4-10(1992);EP 0 154 316和EP 0 401 384(每篇文献通过引用整体结合到本文中)。优选地,PEG化是通过与反应性聚乙二醇分子(或者类似的反应性水溶性聚合物)的酰化反应或烷基化反应来进行。用于本发明抗体和抗体片段的PEG化的优选水溶性聚合物是聚乙二醇(PEG)。本文所用的“聚乙二醇”意指涵盖任何形式的已被用来将其他蛋白质衍生化的PEG,例如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇。

[0202] 制备本发明PEG化抗体和抗体片段的方法一般会包括以下步骤:

[0203] (a) 在能使本发明抗体或抗体片段与一个或多个PEG基团发生连接的条件下,使

所述抗体或抗体片段与聚乙二醇（如 PEG 的反应性酯或醛衍生物）进行反应，和 (b) 获得反应产物。根据已知的参数和期望的结果来选择最佳反应条件或酰化反应，这对于本领域技术人员是显而易见的。

[0204] PEG 化抗体和抗体片段一般可以用来治疗本发明 TNF α 相关疾病，做法是施用本文所述的 TNF α 抗体和抗体片段。一般地，与非 PEG 化抗体和抗体片段相比，PEG 化抗体和抗体片段的半寿期延长。各个 PEG 化抗体和抗体片段可以单独使用，一起使用，或者与其他药物组合物联合施用。

[0205] 在本发明的又一个实施方案中，可对 TNF α 抗体或抗体片段加以改变，其中对抗体的恒定区加以修饰，以相对于未修饰抗体减少至少一个恒定区介导的生物效应物功能。为修饰本发明抗体以使它显示出与 Fc 受体的结合降低，可将抗体的免疫球蛋白恒定区段在 Fc 受体 (FcR) 相互作用所必需的特定区域进行突变（参见例如 Canfield and Morrison (1991) *J. Exp. Med.* **173**:1483-1491；和 Lund et al. (1991) *J. of Immunol.* **147**:2657-2662)。抗体的 FcR 结合能力的降低也会降低依赖于 FcR 相互作用的其他效应子功能，例如调理作用和吞噬作用及抗原依赖性细胞毒性。

[0206] 本发明的抗体或抗体部分可进行衍生化或者与另一个功能分子（例如另一个肽或蛋白质）连接。因此，本发明的抗体或抗体部分意指包括本文所述人抗 hTNF α 抗体的衍生化形式和别的修饰形式，包括免疫粘附分子。例如，可将本发明的抗体或抗体部分功能性地连接（通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或者其他方式）到一个或多个其他分子实体，如另一个抗体（例如双特异性抗体或双抗体）、可检测试剂、细胞毒性剂、药物物质和 / 或能介导抗体或抗体部分与另一个分子（例如链霉亲和素核心区或聚组氨酸标签）缔合的蛋白质和 / 或肽。

[0207] 一种类型的衍生化抗体是通过使两个或多个抗体（相同或不同类型，例如以产生双特异性抗体）交联来制备的。合适的交联剂包括异双功能 (heterobifunctional) 交联剂和同双功能 (homobifunctional) 交联剂，前者具有两个被适当间隔区隔开的反应性不同的基团，例如是间 - 马来酰亚胺苯甲酰 -N- 羟基琥珀酰亚胺酯，后者例如是二琥珀酰亚胺辛二酸酯。这种交联剂可从 Pierce Chemical Company, Rockford, IL 获得。

[0208] 可用来使本发明抗体或抗体部分衍生化的有用的可检测试剂包括荧光化合物。示例性的荧光可检测试剂包括荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明、5-二甲胺 -1- 萘磺酰氯、藻红蛋白等等。抗体还可以用可检测的酶衍生化，例如碱性磷酸酶，辣根过氧化物酶，葡萄糖氧化酶等等。当用可检测的酶将抗体衍生化时，该抗体是通过加入该酶用来产生可检测反应产物的另外试剂来进行检测。例如，当存在辣根过氧化物酶这种可检测试剂时，过氧化氢和二氨基联苯胺的加入导致产生可检测的有色反应产物。抗体还可以用生物素衍生化，并通过间接测量亲和素或链霉亲和素结合来进行检测。

[0209] 本发明的抗体或抗体部分可通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链基因来制备。为重组表达抗体，用一个或多个携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的 DNA 片段的重组表达载体转染宿主细胞，使得轻链和重链在宿主细胞中表达，并优选地被分泌到培养宿主细胞的培养基中，从培养基可回收抗体。应用标准的重组 DNA 方法来获得抗体重链和轻链基因，将这些基因并入到重组表达载体中，并将载体导入宿主细胞，这些方法如以下文献所述：Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), *Molecular Cloning*; A

Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), Ausubel et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) 和 Boss 等的美国专利 4, 816, 397。

[0210] 为表达阿达木单抗或阿达木单抗相关抗体, 首先获得编码轻链和重链可变区的 DNA 片段。这些 DNA 可通过采用聚合酶链式反应 (PCR), 对种系轻链和重链可变序列进行扩增和修饰来获得。人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列是本领域公知的 (参见例如“Vbase”人种系序列数据库; 另参见 Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al. (1992) “The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops” J. Mol. Biol. 227:776-798 和 Cox et al. (1994) “A Directory of Human Germ-line V_{78} Segments Reveals a Strong Bias in their Usage” Eur. J. Immunol. 24:827-836; 每个文献的内容通过引用明确结合到本文中)。为获得编码阿达木单抗或阿达木单抗相关抗体的重链可变区的 DNA 片段, 通过标准 PCR 来扩增人种系 V_H 基因 V_H3 家族的成员。最优选地, 扩增 DP-31 V_H 种系序列。为获得编码阿达木单抗或阿达木单抗相关抗体的轻链可变区的 DNA 片段, 通过标准 PCR 来扩增人种系 V_L 基因 V_{K1} 家族的成员。最优选地, 扩增 A20 V_L 种系序列。适用于扩增 DP-31 种系 V_H 序列和 A20 种系 V_L 序列的 PCR 引物, 可根据以上参考文献中公开的核苷酸序列, 用标准的方法来设计。

[0211] 一旦获得种系 V_H 片段和 V_L 片段, 可将这些序列诱变成编码本文公开的阿达木单抗或阿达木单抗相关氨基酸序列。首先将种系 V_H 和 V_L DNA 序列编码的氨基酸序列与阿达木单抗或阿达木单抗相关 V_H 和 V_L 氨基酸序列进行比较, 以鉴定阿达木单抗或阿达木单抗相关序列中与种系不同的氨基酸残基。然后, 将种系 DNA 序列的适当核苷酸进行突变, 使得突变的种系序列编码阿达木单抗或阿达木单抗相关的氨基酸序列, 应作哪些核苷酸变化是用遗传密码来确定。种系序列的诱变是通过标准方法进行, 例如 PCR 介导的诱变 (其中诱变的核苷酸被并入到 PCR 引物中, 使得 PCR 产物包含突变) 或定点诱变。

[0212] 一旦获得编码阿达木单抗或阿达木单抗相关 V_H 和 V_L 区段的 DNA 片段 (如上所述通过扩增和诱变种系 V_H 和 V_L 基因来获得), 可通过标准的重组 DNA 技术对这些 DNA 片段进一步进行操作, 以例如将可变区基因转变成全长抗体链基因、转变成 Fab 片段基因或转变成 scFv 基因。在这些操作中, 将编码 V_L 或 V_H 的 DNA 片段操作性连接到编码另一蛋白质 (例如抗体恒定区或柔性接头) 的另一 DNA 片段。在这个情形中所用的术语“操作性连接”意思是将两个 DNA 片段连接, 使得这两个 DNA 片段所编码的氨基酸序列保持符合读框 (remain in-frame)。

[0213] 可通过将编码 V_H 区的 DNA 与编码重链恒定区 (CH1、CH2 和 CH3) 的另一 DNA 分子操作性连接, 将编码 V_H 区的分离 DNA 转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域公知的 (参见例如 Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), 且包含这些区域的 DNA 片段可通过标准的 PCR 扩增来获得。重链恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM 或 IgD 恒定区, 但最优选是 IgG1 或 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因, 可将编码 V_H 的 DNA 与只编码重链 CH1 恒定区的另一

DNA 分子操作性连接。

[0214] 可通过将编码 VL 的 DNA 与编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子操作性连接,将编码 VL 区的分离 DNA 转变成全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域公知的(参见例如 Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242),且包含这些区域的 DNA 片段可通过标准的 PCR 扩增来获得。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区,但是最优选是 κ 恒定区。

[0215] 为获得 scFv 基因,将编码 VH 和 VL 的 DNA 片段操作性连接到编码柔性接头(例如编码氨基酸序列 $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$) 的另一片段,使得 VH 序列和 VL 序列能被表达为连续的单链蛋白质,其中 VL 区和 VH 区通过柔性接头连接(参见例如 Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554)。

[0216] 为表达本发明的抗体或抗体片段,将如上所述获得的编码部分或全长轻链和重链的 DNA 插入到表达载体中,使得基因与转录和翻译调节序列操作性连接。在这个情形中,术语“操作性连接”指的是抗体基因连接到载体中,使得载体中的转录和翻译控制序列能发挥其调节抗体基因的转录和翻译的预定功能。选择表达载体和表达控制序列使其与所用的表达宿主细胞相容。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到不同的载体中,或者更通常是将两个基因插入到相同的表达载体中。抗体基因通过标准的方法插入到表达载体中(如将抗体基因片段上的互补限制性酶切位点与载体相连接,或者如果没有限制性酶切位点,则进行钝末端连接)。在插入阿达木单抗或阿达木单抗相关轻链或重链序列之前,表达载体可能已经携带抗体恒定区序列。例如,一种将阿达木单抗或阿达木单抗相关 VH 序列和 VL 序列转变成全长抗体基因的方法,就是将它们分别插入到已编码重链恒定区的表达载体和已编码轻链恒定区的表达载体中,使得 VH 区段操作性连接到载体当中的 CH 区段,而 VL 区段操作性连接到载体当中的 CL 区段。另外,重组表达载体可编码有助于抗体链从宿主细胞中分泌出来的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中,使得信号肽符合读框地连接到(linked in-frame to)抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0217] 除了抗体链基因外,本发明的重组表达载体还携带能调控抗体链基因在宿主细胞中的表达的调节序列。术语“调节序列”意指包括能控制抗体链基因的转录或翻译的启动子、增强子以及别的表达控制元件(如多聚腺苷酸信号)。这些调节序列在例如 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) 中有描述。本领域技术人员会认识到,表达载体的设计,包括调节序列的选择,要取决于诸如所选择转化的宿主细胞、所需蛋白的表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列,包括能指导蛋白在哺乳动物中的高水平表达的病毒元件,如源自巨细胞病毒(CMV)(如 CMV 启动子/增强子)、猿病毒 40(SV40)(如 SV40 启动子/增强子)、腺病毒(如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))以及多瘤病毒的启动子和/或增强子。有关病毒调节元件及其序列的进一步介绍参看例如 Stinski 的美国专利 5,168,062, Bell 等的美国专利 4,510,245 以及 Schaffner 等的美国专利 4,968,615。

[0218] 除了抗体链基因和调节序列外,本发明的重组表达载体还可携带别的序列,如能

调节载体在宿主细胞中复制的序列（如复制起点）以及选择标记基因。选择性标记基因有助于挑选出其中已导入载体的宿主细胞（参看美国专利 4,399,216、4,634,665 和 5,179,017,这三个专利都是 Axel 等人的）。例如,通常选择性标记基因能给其中已导入了载体的宿主赋予对药物如 G418、潮霉素或氨甲蝶呤的抗性。优选的选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因（在 dhfr⁻ 宿主细胞中用于氨甲蝶呤选择 / 扩增）和 neo 基因（进行 G418 选择）。

[0219] 为了表达轻链和重链,用标准技术将编码重链和轻链的表达载体转入宿主细胞中。不同形式的术语“转染”意在涵盖多种常用于将外源 DNA 导入到原核或真核宿主细胞中的技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE 葡聚糖转染等。尽管从理论上说,本发明的抗体可能在原核或真核宿主细胞中表达,但最优选的是在真核细胞、最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体,真核细胞尤其是哺乳动物细胞比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠并具有免疫活性的抗体。抗体基因在原核细胞中的表达据报道不能有效地高收率生产活性抗体 (Boss, M. A 和 Wood, C. R(1985), *Immunology Today* 6:12-13)。

[0220] 优选用于表达本发明重组抗体的哺乳动物宿主细胞,包括中国仓鼠卵巢细胞 (CHO 细胞) (包括 dhfr-CHO 细胞,在 Urlaub and Chasin, (1980) PNAS USA 77:4216-4220 中描述,与例如 Kaufman and Sharp(1982) Mol. Biol. 159:601-621 中描述的 DHFR 选择性标记一起使用)、NS0 骨髓瘤细胞、COS 细胞和 SP2 细胞。当编码抗体基因的重组表达载体被导入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段时间来生产抗体,该段时间足以使抗体得以在宿主细胞中表达,或者更优选地使抗体得以分泌到宿主细胞生长的培养基中。可用蛋白质纯化方法将抗体从培养基中回收。

[0221] 宿主细胞也可用来产生完整抗体的部分,如 Fab 片段或 scFv 分子。应认识到,上述方法的修改方案也在本发明的范围之内。例如,可能宜用编码本发明抗体的轻链或重链（但不是同时编码两者）的 DNA 来转染宿主细胞。也可利用重组 DNA 技术,来去掉编码轻链或重链或两者的 DNA 中对结合 hTNF α 没有必要的一些部分或全部。从这种截短的 DNA 分子表达的分子也涵盖在本发明的抗体范围之内。此外,可通过标准的化学交联方法将本发明的抗体与另一抗体交联,来产生双功能抗体,其中一条重链和一条轻链属本发明的抗体,而另外一条重链和轻链对 hTNF α 之外的抗原具有特异性。

[0222] 在一个优选的进行本发明抗体或其抗原结合部分的重组表达的系统,通过磷酸钙介导转染将编码抗体重链和轻链的重组表达载体导入 dhfr-CHO 细胞中。在这个重组表达载体当中,抗体重链和轻链各自操作性连接到 CMV 增强子 / AdMLP 启动子调节元件,以驱动高水平的基因转录。重组表达载体还携带有 DHFR 基因,该基因使得可以采用氨甲蝶呤选择 / 扩增来选出转染了载体的 CHO 细胞。将选出的转化宿主细胞进行培养,以使抗体重链和轻链得以表达,而后从培养基中回收完整抗体。用标准的分子生物学技术来制备重组表达载体,转染宿主细胞,选择转化子,培养宿主细胞和从培养基中回收抗体。

[0223] 本发明的重组人抗体,除了本文公开的阿达木单抗或其抗原结合部分或者阿达木单抗相关抗体外,也可以通过筛选用人 VL 和 VHcDNA 制备的重组组合抗体文库（优选 scFv 噬菌体展示文库）进行分离,该人 VL 和 VH cDNA 是从衍自人淋巴细胞的 mRNA 制备的。制备和筛选这样的文库的方法是本领域众所周知的。除了市售的用以产生噬菌体展示文库的试剂盒（例如 Pharmacia 重组噬菌体抗体系统,目录号 27-9400-01;和 Stratagene

SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒, 目录号 240612) 外, 特别适用于产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可见于例如 Ladner et al. 美国专利 5, 223, 409 ;Kang et al. PCT 公开说明书 WO 92/18619 ;Dower et al. PCT 公开说明书 WO 91/17271 ;Winter et al. PCT 公开说明书 WO 92/20791 ;Markland et al. PCT 公开说明书 WO 92/15679 ;Breitling et al. PCT 公开说明书 WO 93/01288 ;McCafferty et al. PCT 公开说明书 WO 92/01047 ;Garrard et al. PCT 公开说明书 WO 92/09690 ;Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9 :1370-1372 ; Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3 :81-85 ;Huse et al. (1989) *Science* 246 : 1275-1281 ;McCafferty et al., *Nature*(1990) 348 :552-554 ;Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12 :725-734 ;Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226 :889-896 ;Clackson et al. (1991) *Nature* 352 :624-628 ;Gram et al. (1992) *PNAS* 89 :3576-3580 ;Garrard et al. (1991) *Bio/Technology* 9 :1373-1377 ;Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19 : 4133-4137 ;和 Barbas et al. (1991) *PNAS* 88 :7978-7982。

[0224] 在一个优选的实施方案中, 为分离对 hTNF α 有高亲和力和低离开 (off) 速率常数的人抗体, 首先使用 Hoogenboom 等人的 PCT 公开说明书 W093/06213 中描述的表位印记法, 利用对 hTNF α 有高亲和力和低离开速率常数的鼠源抗 hTNF α 抗体 (如 MAK195 杂交瘤, 其寄存号是 ECACC 87 050801), 来选出有相似的 hTNF α 结合活性的人重链和轻链序列。这个方法中使用的抗体文库优选的是按以下文献和专利所述制备和筛选 scFv 文库: McCafferty 等人的 PCT 公开说明书 W092/01047 ;McCafferty et al. *Nature*(1990) 348 : 552-554 ;和 Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12 :725-734。scFv 抗体文库优选的是用重组人 TNF α 为抗原来进行筛选。

[0225] 一旦选出初始人 VL 区段和 VH 区段, 就进行“混合与匹配”实验来选择优选的 VL/VH 配对组合, 在该实验中, 将初选的 VL 区段和 VH 区段进行不同的配对后进行 TNF α 结合能力的筛选。另外, 为进一步改善 TNF α 结合亲和力和 / 或降低 TNF α 结合离开速率常数, 可将优选的 VL/VH 对中的 VL 区段和 VH 区段进行随机突变, 优选的是在 VH 和 / 或 VL 的 CDR3 区当中进行突变, 突变过程和天然免疫反应中负责抗体亲和力成熟的体内体细胞突变过程类似。这个体外亲和力成熟可用分别与 VH CDR3 或 VL CDR3 互补的 PCR 引物扩增 VH 区和 VL 区来实现, 所述引物在某些位置已被随机“掺入”了四种核苷酸, 使得所产生的 PCR 产物能编码在其 CDR3 区中已导入了随机突变的 VH 区段和 VL 区段。可对这些随机突变的 VH 区段和 VL 区段进行 hTNF α 结合能力的再筛选, 并可选出显示高 hTNF α 结合亲和力和低 hTNF α 结合离开速率的序列。

[0226] 从重组的免疫球蛋白展示文库筛选和分离本发明的抗 hTNF α 抗体后, 可将编码选定抗体的核酸从展示包装 (display package) (例如从噬菌体基因组) 中回收, 并通过标准的重组 DNA 技术亚克隆到别的表达载体中。如果有需要, 可以对核酸作进一步操作, 以产生其他形式的本发明抗体 (如连接到编码别的免疫球蛋白结构域如别的恒定区的核酸上)。为表达通过筛选组合文库分离到的重组人抗体, 如上文所详述, 将编码抗体的 DNA 克隆到重组表达载体中并导入哺乳动物宿主细胞。

[0227] 分离具有高 hTNF α 亲和力和低 hTNF α 离开速率常数的人抗体的方法, 在美国专利 6, 090, 382、6, 258, 562 和 6, 509, 015 中也有描述, 每个专利都通过引用结合到本文中。

[0228] III. 抗体纯化

[0229] 本发明提供从包含抗体和至少一种 HCP 的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的方法。本发明还提供从包含抗体和至少一种组织蛋白酶 L 酶原的混合物生产组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品的方法。当用 II 章节中描述的方法和本领域的常规方法生产出了抗体时,本发明的纯化过程从分离步骤开始。通常在本领域,将抗体-HCP 混合物施以 A 蛋白捕捉(例如 A 蛋白柱)作为初始分离步骤,因为抗体会结合 A 蛋白,而 HCP 则会流过。本发明的纯化方法其优点是,没有必要将包含抗体和至少一种 HCP 的混合物施以 A 蛋白捕捉步骤(例如 A 蛋白柱)作为初始步骤,或者作为纯化方法中的任何步骤。

[0230] 一旦获得了包含抗体的澄清溶液或混合物,用不同纯化技术的组合来进行抗体与细胞所产生的其他蛋白质的分离,这些技术包括离子交换分离步骤和疏水相互作用分离步骤。分离步骤是根据蛋白质的电荷、疏水程度和/或大小来分离蛋白质的混合物的。在本发明的一个实施方案中,用层析法进行分离,包括阳离子层析,阴离子层析和疏水层析。每种这些技术都有几种不同的层析树脂可供使用,这使得能使纯化方案准确地适合于所涉及的特定蛋白质。每种分离方法的实质在于,可使蛋白质以不同的速度沿长柱子向下移动,从而实现物理分离,分离的程度随着蛋白质向下通过柱子而增加,或者可使蛋白质选择性地吸附到分离介质,然后用不同的溶剂进行差分洗脱。在一些情况中,如果杂质特异性粘附于柱子上,而抗体不会粘附,即抗体存在于流通物中,则抗体得以与杂质分离。

[0231] 将抗体从不需要的蛋白质中纯化出来的方法在下文中提供,例如工艺 A。在一个实施方案中,本发明包括下文工艺 A 中描述的步骤,这些步骤要么是单独的,要么组合在一起。工艺 A 提供了用离子交换分离(阳离子交换层析和阴离子交换层析)和疏水相互作用分离纯化包含抗体的混合物,从而获得适用于药物组合物的抗体制品的方法。工艺 A 的优点是,无需在抗体纯化中进行 A 蛋白捕捉作为初始步骤,就可执行它。在一个实施方案中,用工艺 A 纯化的抗体是阿达木单抗。工艺 A 一般包括以下:

[0232] 将包含抗体和杂质(例如 HCP)的混合物荷载到离子交换柱如阳离子交换柱上。该混合物可以以约 $\leq 30\text{g}$ 抗体/升/循环的荷载量荷载。随后用洗涤缓冲液(平衡缓冲液)洗涤荷载到阳离子柱上的混合物。然后将抗体从柱子洗脱下来,获得第一洗脱物。

[0233] 第一洗脱物然后常常进行病毒灭活和 pH 调节,以准备进行阴离子交换层析。第一洗脱物是通过将 pH 调节到相对于洗脱缓冲液而言的低 pH 来进行病毒灭活的(在下文 IIIC 章节中进一步描述)。随后将病毒灭活洗脱物的 pH 在超过一个步骤中调节到约 7.6 的最终 pH,这个 pH 是后面跟着的阴离子交换柱的 pH。

[0234] 第一洗脱物进行了病毒灭活后,常常进行第二离子交换分离步骤,其中将第一洗脱物荷载到阴离子交换柱(例如 Q 琼脂糖凝胶柱)。用洗涤缓冲液洗涤该柱,获得包含抗体的第一流通物。

[0235] 该流通物通过荷载到疏水相互作用柱(苯基琼脂糖凝胶)作进一步的纯化。将该柱洗涤,从该柱洗脱出抗体,由此获得第二洗脱物。

[0236] 下文描述工艺 B,它提供了从包含抗体的混合物生产宿主细胞蛋白(HCP)降低的抗体制品的改进方法。词语“降低的”指 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原时,包括对工艺 A 中可比较点(comparable point)处的 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原水平(例如浓度或活性)的改进。在一个实施方案中,与工艺 A 的第一洗脱物相比,工艺 B 的第一洗脱物包含水平降低的 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原。在一个实施方案中,与工艺 A 的第一流通物相比,工艺 B 的第一流通

物包含水平降低的 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原。在一个实施方案中,与工艺 A 的第二洗脱物相比,工艺 B 的第二洗脱物包含水平降低的 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原。在另一个实施方案中,与工艺 A 获得的抗体制品相比,工艺 B 获得的抗体制品包含水平降低的 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原。

[0237] 工艺 B 一般包括以下:

[0238] 将包含抗体和杂质(例如 HCP)的混合物荷载到离子交换柱如阳离子交换柱上。该混合物可以在 pH7 下以约 $\leq 35\text{g}$ 抗体 / 升 / 循环的荷载量荷载,或者在 pH5 下以约 $\leq 70\text{g}$ 抗体 / 升 / 循环的荷载量荷载。随后用洗涤缓冲液(平衡缓冲液)洗涤荷载到阳离子柱上的混合物。在平衡洗涤缓冲液之后,进行中间洗涤步骤,其中该柱子用电导率与洗脱缓冲液相似的中间缓冲液进行洗涤。这个中间洗涤步骤能改进工艺相关杂质(process-related impurities)的清除。然后用洗脱缓冲液将抗体从柱子上洗脱下来,获得第一洗脱物。

[0239] 第一洗脱物然后常常进行病毒灭活和 pH 调节,以准备进行阴离子交换层析。第一洗脱物是通过将 pH 调节到相对于洗脱缓冲液而言的低 pH 来进行病毒灭活的。随后将病毒灭活洗脱物的 pH 和电导率在一个步骤中调节到约 7.8-8.2 的最终 pH,这个 pH 是后面跟着的平衡阴离子交换柱的 pH。

[0240] 第一洗脱物进行了病毒灭活后,进行第二离子交换分离步骤,其中将第一洗脱物荷载到阴离子交换柱(例如 Q 琼脂糖凝胶柱)。用洗涤缓冲液洗涤该柱,获得包含抗体的第一流通物。

[0241] 该流通物通过荷载到疏水相互作用柱(苯基琼脂糖凝胶)作进一步的纯化。将该柱洗涤,从该柱洗脱出抗体,由此获得第二洗脱物。工艺 B 的结果是 HCP(包括组织蛋白酶 L 酶原)降低的制品。工艺 B 的进一步结果包括通过将 HCP 清除操作移到工艺的前部分来消除工艺瓶颈(例如在细胞培养放大中得到更高的生产率),并使抗体产率总体得到改进。关于本发明的改进工艺的另外细节在下文中提供。

[0242] III. A. 离子交换分离

[0243] 本发明涉及从包含抗体和至少一种 HCP 的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的方法,做法是将该混合物进行至少一个离子交换分离步骤,由此获得包含该抗体的第一洗脱物。离子交换分离包括任何据以根据两种物质各自的离子电荷的差异而将它们分离的方法。

[0244] 在进行该分离中,可使用例如批式纯化技术或层析法,使抗体混合物与离子交换材料相接触。

[0245] 例如,对于批式纯化,将离子交换材料在所需的起始缓冲液中制备,或者使其与所需的起始缓冲液平衡。获得离子交换材料的浆液。使抗体溶液与该浆液接触,以将待分离抗体吸附到离子交换材料上。将包含不结合离子交换材料的 HCP 的溶液与该浆液分离,例如通过让该浆液沉淀和除去上清液来分离。可对该浆液进行一个或多个洗涤步骤。如果需要,可将该浆液与更高电导率的溶液接触,以使已结合离子交换材料的 HCP 脱附。为洗脱出结合的多肽,可提高盐浓度。

[0246] 离子交换层析也可用作离子交换分离技术。离子交换层析是根据各分子总体电荷之间的差异来分离分子的。对于抗体的纯化,抗体所具有的电荷必需与连接到离子交换材料(例如树脂)的官能团的电荷相反才能发生结合。例如,在缓冲液 pH 下其总正电荷通常

低于其 pI 的抗体,会很好地结合含有带负电官能团的阳离子交换材料。

[0247] 在离子交换层析中,倘若周围缓冲液的离子强度低,则溶质的表面上的带电部分(patch)被连接到层析基质的相反电荷所吸引。洗脱通常是通过增加缓冲液的离子强度(即电导率)以与溶质竞争离子交换基质的带电位点来实现的。改变 pH 从而改变溶质的电荷,是实现溶质的洗脱的另一种方法。电导率或 pH 的改变可以是渐进改变(梯度洗脱)或者是分步改变(分步洗脱)。

[0248] 可将阴离子或阳离子取代基连接到离子交换基质上,以形成阴离子或阳离子层析载体。阴离子交换取代基包括二乙基氨基乙基(DEAE)基团、季氨基乙基(QAE)基团和季胺(Q)基团。阳离子取代基包括羧甲基(CM)、磺基乙基(SE)、磺基丙基(SP)、硫酸根(P)和磺酸根(S)。纤维素离子交换树脂如 DE23、DE32、DE52、CM-23、CM-32 和 CM-52 可获自 Whatman Ltd. Maidstone, Kent, 英国。SEPHADEX[®]基和低交联离子交换剂(SEPHADEX[®]-based and-locross-linked ion exchangers)也是公知的。例如 DEAE-、QAE-、CM- 和 SP-SEPHADEX[®]及 DEAE-、Q-CM- 和 S-SEPHAROSE[®]及 SEPHAROSE[®] Fast Flow 均可获自 Pharmacia AB。此外,DEAE 和 CM 衍生的乙二醇甲基丙烯酸共聚物如 TOYOPEARL DEAE-650S 或 M 和 TOYOPEARL CM-650S 或 M,可获自 Toso Haas Co., Philadelphia, Pa。

[0249] 在本发明的一个实施方案中,将包含抗体和至少一种 HCP 的混合物荷载到阳离子交换(CEX)层析柱上。该混合物是在荷载缓冲液中荷载到 CEX 柱上的,该荷载缓冲液可以是与用以平衡该柱的平衡缓冲液相同。随着包含 HCP 的混合物通过 CEX 柱,目标蛋白质被吸附到 CEX 树脂,而各种 HCP(如宿主细胞蛋白,其中目标蛋白质是在重组宿主细胞中产生,或者其他工艺衍生杂质)则流过或者微弱或非特异性地结合 CEX 树脂。在各个实施方案中 CEX 树脂是与磺酸基连接的基于合成的甲基丙烯酸酯的聚合物树脂(Fractogel SO₃-(Fractogel S))。在一个实施方案中,平衡缓冲液包含 20mM Na₂PO₄, 25mM NaCl, pH6.8。其他合适的平衡缓冲液包括例如 BIS 和 HEPES,它们在生理浓度下,例如约 0.5mM 至约 100mM 范围内(例如 10mM、20mM、50mM 等)的浓度和生理盐浓度(例如约 0.15mM NaCl),和在 5.0-9.0 的 pH 下。

[0250] 在示例性的实施方案中,CEX 层析是用 Fractogel S 柱。在一个实施方案中,将约 30 克抗体/升树脂至约 40 克抗体/升树脂荷载到 Fractogel S 柱上。在另一个实施方案中,在 pH7 下将约 35 克抗体/升树脂荷载到 Fractogel S 柱上。已发现在 pH7 下约 35 克抗体/升树脂的荷载量能增加杂质(例如 HCP 和组织蛋白酶 L 酶原)的清除。下表 1 说明用于本发明方法的 Fractogel S 柱的可接受操作范围。

[0251] 表 1: pH7 下 Fractogel S 层析的可接受操作范围

[0252]

操作参数	AOR
树脂容量	≤35 g 蛋白质/L 树脂
荷载样品 pH	6.5-7.5
有效荷载稀释	1:1 - 1:2
洗涤 2 洗脱缓冲液浓缩	1:3 - 1:4
物与 WFI 之比	
线性速率	75-300 cm/hr

[0253] 还进一步发现,在 pH5 下进行层析可增加柱的荷载容量。具体的说,发现在 pH5 下约 70 克抗体 / 升树脂的荷载量能增加杂质 (例如 HCP 和组织蛋白酶 L 酶原) 的清除。因此,在约 pH5 至约 pH7 的 pH 范围内,可使用约 35g 至约 70g 抗体 / 升树脂的荷载量。

[0254] 在将该抗体混合物荷载到该柱上后,用洗涤缓冲液洗涤 CEX 树脂。具体的说,发现用不同的洗涤缓冲液进行多个洗涤步骤,能产生 HCP 进一步降低的抗体制品。更具体的说,发现通过采用分别用洗涤缓冲液和中间洗涤缓冲液进行的第一洗涤步骤和中间洗涤步骤,可使组织蛋白酶 L 酶原水平降低。在一个实施方案中,将 CEX 树脂首先用与平衡缓冲液相同的洗涤缓冲液进行洗涤。在某些实施方案中,洗涤缓冲液是 20mM Na_2PO_4 , 25mM NaCl, pH6.8。其他合适的洗涤缓冲液包括例如 BIS 和 HEPES,它们在生理浓度下,例如约 0.5mM 至约 100mM 范围内 (例如 10mM、20mM、50mM 等) 的浓度和生理盐浓度 (例如约 0.15mM NaCl), 和在 5.0-9.0 的 pH 下。

[0255] 在本发明的一个优选实施方案中,进行中间洗涤步骤。已发现通过使用部分上包含与 CEX 洗涤缓冲液相同的缓冲液的中间洗涤缓冲液,可实现 HCP (一般来说) 和组织蛋白酶 L 酶原 (具体来说) 的水平降低。HCP (一般来说) 和组织蛋白酶 L 酶原 (具体来说) 的降低的改进,部分上是由中间洗涤缓冲液的电导率增加所致。增加中间洗涤缓冲液的电导率,会造成 HCP (其 pI 低于抗体的 pI) 的电荷置换,从而造成结合力弱的 HCP 被洗涤流过柱子。结合力弱的杂质 (例如 HCP, 包括组织蛋白酶 L 酶原) 的清除的增加,又给目标物质 (例如抗体) 提供更多的结合面积。在其他实施方案中,中间洗涤缓冲液含有约 40% 至约 50% 洗脱缓冲液和约 50% 至约 60% 注射用水。在更多的实施方案中,中间洗涤缓冲液含有 45% 洗涤缓冲液和 55% 注射用水。在一个实施方案中,用于中间洗涤的洗涤缓冲液是 20mM Na_2PO_4 , 150mM 氯化钠, pH7。

[0256] 在进行多次洗涤后,将抗体从第一阳离子交换材料中洗脱下来,由此获得 HCP 水平降低的第一洗脱物。由于中间洗涤步骤,第一洗脱物的组织蛋白酶 L 酶原水平也降低。在一个实施方案中,相比于工艺 A 的对等步骤,用本发明方法获得的第一洗脱物其 HCP 水平降低约 3 至约 5 倍。在另一个实施方案中,相比于工艺 A 的对等步骤,用本发明方法获得的第一洗脱物其组织蛋白酶 L 活性降低约 2 至约 3 倍。在一个实施方案中,经 HCP ELISA 测定,第一洗脱物所包含的 HCP 比混合物少约 90 至约 100 倍。在另一个实施方案中,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第一洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性在约 25 至约 60RFU/s/mg 抗体的范围。

[0257] 在一个优选的实施方案中,将包含抗体的初始洗脱物通过第二离子交换材料,获得 HCP 水平进一步降低的流通物。在一些实施方案中,第二离子交换步骤可以是下文所述的批式纯化。在其他实施方案中,第二离子交换步骤包括将第一洗脱物荷载到第二离子交换层析柱上,洗涤该柱和获得第一流通物。第二离子交换材料可以是阴离子交换 (AEX) 树脂,例如 Q 琼脂糖凝胶柱。在一些实施方案中,将约 30g 抗体 / 树脂至约 40g 抗体 / 树脂荷载到阴离子交换柱上。增加荷载量到约 40g 抗体 / 树脂至约 50g 抗体 / 树脂会造成杂质 (例如 HCP) 的清除降低。随着含 HCP 的缓冲液通过 AEX 柱,各种 HCP 会与 AEX 树脂发生结合,而抗体流过或非特异性地结合 AEX 柱。在某些实施方案中,阴离子交换树脂是 Q 琼脂糖凝胶。

[0258] 待纯化的抗体混合物往往会存在于前面纯化步骤的缓冲液中。有许多缓冲液可

用,可通过常规实验进行选择。例如,可使用 25mM 三乙醇胺,40mM NaCl,pH8 的平衡缓冲液。在一个实施方案中,在将初始洗脱物通过第二离子交换材料之前,可用平衡缓冲液平衡第二离子交换材料。这可例如这样来进行:改变第一洗脱物的 pH 和电导率,使得第一洗脱物的 pH 和电导率基本上类似于或相当于平衡的第二离子交换材料的 pH 和电导率,即改变第一洗脱物的 pH 和电导率,使得其相当于平衡的第二离子交换材料的 pH 和电导率。在一些实施方案中,用平衡缓冲液将 AEX 材料(例如 Q 琼脂糖凝胶)的 pH 调节到约 7.7 至约 8.3 的范围。在更多的实施方案中,将 CEX 洗脱物(例如初始洗脱物)的 pH 调节到约 7.7 至约 8.3 的范围。在某些实施方案中,AEX 材料和初始洗脱物的 pH 均为 8。在一些实施方案中,AEX 材料的电导率在约 3.5mS/cm 至约 4.9mS/cm 的范围。在更多的实施方案中,初始洗脱物的电导率在约 3.5mS/cm 至约 4.9mS/cm 的范围。已发现将荷载物电导率和 pH 调节到第二离子交换材料的电导率和 pH,能提高杂质的清除。对于工艺 A,已发现第一洗脱物和 / 或平衡的第二离子交换材料的电导率总体下降和 / 或 pH 增加,会导致 HCP 的清除增加。

[0259] 在将抗体混合物荷载到柱上后,用洗涤缓冲液洗涤 AEX 树脂。洗涤缓冲液可以是与平衡缓冲液相同,例如 25mM 三乙醇胺,40mMNaCl,pH8。在一个实施方案中,可将洗涤物与流通物汇集(poolled),由此获得包含抗体且 HCP 水平降低的第一流通物。在更多的实施方案中,第一流通物的组织蛋白酶 L 酶原水平降低。在一个实施方案中,与工艺 A 的对等步骤相比,用本发明方法获得的第一流通物其 HCP 水平降低约 7 至约 700 倍。在另一个实施方案中,相比于工艺 A 的对等步骤,用本发明方法获得的第一流通物其组织蛋白酶 L 活性降低约 6 至约 25 倍。在其他实施方案中,由 HCP ELISA 测出,第一流通物的 HCP 比第一洗脱物少约 840 至约 850 倍。在又一个实施方案中,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第一流通物包含的组织蛋白酶 L 活性为约 0.4 至约 4RFU/s/mg 抗体之间。

[0260] 下表 2 说明用于本发明方法的 Q 琼脂糖凝胶层析的可接受操作范围。

[0261] 表 2 :Q 琼脂糖凝胶 FF 层析的可接受操作范围

[0262]

参数	AOR
荷载电导率	4.0 – 5.5 mS/cm
荷载 pH	7.8 – 8.2
柱荷载量	≤40 g/L
线性速率	150-300 cm/hr

[0263] 如上所述,是用阳离子交换材料还是用阴离子交换材料,取决于蛋白质的总体电荷。因此,在使用阳离子交换材料前先采用阴离子交换材料,这是落入本发明的范围内的。此外,只采用阳离子交换材料或只采用阴离子交换材料,也落入本发明的范围内。

[0264] 本发明的方法可任选包括更多的纯化步骤。可在进行离子交换层析方法之前、过程中或之后进行的另外的纯化程序的实例,包括在疏水相互作用层析上的分级分离(例如在苯基琼脂糖凝胶上)、乙醇沉淀、等电聚焦、反相 HPLC、硅胶层析、肝素琼脂糖凝胶层析、进一步的阴离子交换层析和 / 或进一步的阳离子交换层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析(例如使用 A 蛋白、G 蛋白、抗体、特异性底物、配体或抗原作为捕捉试剂)。

[0265] III. B. 疏水相互作用分离

[0266] 本发明还涉及这样的从包含抗体和至少一种 HCP 的混合物生产 HCP 降低的抗体制品的方法,该方法还包括疏水相互作用分离步骤,其中将第一流通物施与第一疏水相互作用材料,由此获得 HCP 水平降低的第二洗脱物。

[0267] 在进行分离时,可将多肽混合物与 HIC 材料进行接触,例如使用批式纯化技术或使用柱子来进行。在进行 HIC 纯化前,可能宜于例如使该混合物通过前置柱 (precolum) 来除去任何离液剂或非常疏水的物质。

[0268] 例如,对于批式纯化,将 HIC 材料在所需的平衡缓冲液中制备,或者与所需的平衡缓冲液平衡。获得 HIC 材料的浆液。使抗体溶液与该浆液接触,以将待分离抗体吸附到 HIC 材料上。将包含不结合 HIC 材料的 HCP 的溶液与该浆液分离,例如通过让该浆液沉淀和除去上清液来分离。可对该浆液进行一个或多个洗涤步骤。如果需要,可将该浆液与更低电导率的溶液接触,以使已结合 HIC 材料的抗体脱附。为洗脱出结合的多肽,可降低盐浓度。

[0269] 在其他实施方案中,疏水相互作用分离步骤包括将第一流通物荷载到包含第一疏水相互作用材料的柱子上和洗涤第一疏水相互作用材料,由此获得第二洗脱物。

[0270] 疏水相互作用分离步骤可包括疏水相互作用层析 (HIC) 步骤。而离子交换层析是依靠蛋白质 (例如抗体) 的电荷来分离它们,而疏水相互作用层析则是利用一些蛋白质 (例如抗体) 的疏水性质。抗体上的疏水基团能结合柱子上的亲水基团。蛋白质越疏水,它结合柱子就越强。HIC 步骤能除去例如宿主细胞衍生杂质 (例如 DNA 和其他高分子量和低分子量产物相关的物质)。

[0271] 疏水相互作用在高离子强度下最强,因此这种形式的分离可便利地在盐沉淀或离子交换程序后进行。高盐浓度能有助于抗体吸附到 HIC 柱上,但是取决于抗体的性质和所选的具体 HIC 配体,实际浓度可在很广的范围内变动。根据各种离子是否促进疏水相互作用 (盐析效应) 或破坏水的结构 (离液效应) 和导致疏水相互作用的弱化,可将它们排列成所谓的溶疏系列 (soluphobic series)。阳离子按盐析效应递增顺序排列为 Ba^{++} ; Ca^{++} ; Mg^{++} ; Li^{+} ; Cs^{+} ; Na^{+} ; K^{+} ; Rb^{+} ; NH_4^{+} , 而阴离子按离液效应递增顺序排列为 PO_4^{--} ; SO_4^{--} ; CH_3COO^{-} ; Cl^{-} ; Br^{-} ; NO_3^{-} ; ClO_4^{-} ; I^{-} ; SCN^{-} 。一般来说,硫酸钠、硫酸钾或硫酸铵能有效促进 HIC 中的配体-蛋白质相互作用。可配制出能影响相互作用的强度的盐,顺序如下: $(NH_4)_2SO_4$; Na_2SO_4 ; $NaCl$; NH_4Cl ; $NaBr$; $NaSCN$ 。一般来说,约 0.75 至约 2M 硫酸铵或约 1-4M NaCl 的盐浓度是适用的。

[0272] HIC 柱通常包含偶联有疏水配体 (例如烷基或芳基基团) 的基质 (例如交联的琼脂糖或合成的共聚物材料)。优选的 HIC 柱包含有被苯基基团取代的琼脂糖树脂 (例如苯基琼脂糖凝胶™ 柱)。许多 HIC 柱可市售获得。实例包括但不限于低取代或高取代的苯基琼脂糖凝胶™ 6Fast Flow 柱 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); 苯基琼脂糖凝胶™ High Performance 柱 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); Octyl Sepharose™ High Performance 柱 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden); Fractogel™ EMD Propyl 或 Fractogel™ EMD Phenyl 柱 (E. Merck, Germany); Macro-Prep™ Methyl 或 Macro-Prep™ t-Butyl Supports (Bio-Rad, California); WP HI-Propyl (C. sub. 3)™ 柱 (J. T. Baker, New Jersey) 和 Toyopearl™ 醚、苯基或丁基柱 (TosoHaas, PA)。

[0273] 包含目的抗体和 HCP 的混合物在进行任何初步纯化步骤后,可进行 HIC。待纯化的抗体组合物往往会存在于前面纯化步骤的缓冲液中。但是,在进行 HIC 步骤前可能有必要

向抗体组合物加入缓冲液。有许多缓冲液可获得,可通过常规实验进行选择。在一个实施方案中,将在荷载缓冲液中的、包含待纯化抗体和至少一种 HCP 的混合物,用酸或碱(视起始 pH 而定)调节 pH 到约 7,并调到约 136 至约 158mS/cm 的电导率。在一个实施方案中,用包含 40mM 磷酸钠,2.2M(NH₄)₂SO₄, pH7 的缓冲液稀释抗体混合物。

[0274] 在荷载抗体混合物前,可用平衡缓冲液平衡柱子。在一些实施方案中,平衡缓冲液是 20mM 磷酸钠,1.1M(NH₄)₂SO₄, pH7。

[0275] 在一个实施方案中,将包含抗体的混合物例如第一流通物荷载到苯基琼脂糖凝胶 HIC 柱上。在某些实施方案中,此步骤的蛋白质荷载量为约 20 至约 40 克蛋白质 /L 树脂。在其他实施方案中,此步骤的蛋白质荷载量为约 35 克蛋白质 /L 树脂。在一些实施方案中,可能需要两个或三个层析循环来处理全部的可利用材料。

[0276] 蛋白质与疏水相互作用柱结合后,可用洗涤缓冲液洗涤该柱,该洗涤缓冲液可与平衡缓冲液相同,例如 1.1M(NH₄)₂SO₄, pH7。

[0277] 用洗脱缓冲液将抗体从柱子上洗脱下来,由此获得第二洗脱物。洗脱缓冲液可用常规试验进行选择。洗脱缓冲液 pH 为约 6 至约 8 之间,且具有低硫酸铵浓度(即小于约 1M(NH₄)₂SO₄)。洗脱缓冲液的电导率为约 87 至约 101mS/cm 之间。在一个实施方案中,洗脱缓冲液含有 11mM 磷酸钠,0.625M(NH₄)₂SO₄, pH7。已发现较低的盐浓度导致较少的阿达木单抗结合到树脂。将抗体从第二离子交换材料洗脱下来,由此获得 HCP 水平降低的第二洗脱物。第二洗脱物其组织蛋白酶 L 酶原水平也降低。在一个实施方案中,与工艺 A 的对等步骤相比,用本发明方法获得的第二洗脱物其 HCP 水平降低约 10 至约 96 倍。在另一个实施方案中,与工艺 A 的对等步骤相比,用本发明方法获得的第二洗脱物其组织蛋白酶 L 活性降低约 5 至约 15 倍。在一个实施方案中,经 HCP ELISA 测定,第二洗脱物所包含的 HCP 比第一流通物低约 3 至约 5 倍。在另一个实施方案中,经组织蛋白酶 L 动力学测定法测定,第二洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性在约 0.5 至约 1.5RFU/s/mg 抗体之间。

[0278] 下表 3 显示用于本发明方法的苯基琼脂糖凝胶层析柱的可接受操作范围。

[0279] 表 3:苯基琼脂糖凝胶 HP 层析的可接受操作范围

[0280]

操作参数	AOR
柱荷载量	20-40 g/L
荷载样品稀释	0.9:1-1.1:1
线性速度	25-125 cm/hr

[0281] 更多的纯化步骤可包括病毒除去步骤以及纳滤(nanofiltration)、超滤和/或渗滤步骤,这在本文中有描述。

[0282] III. C. 病毒灭活

[0283] 为提供安全余地,在纯化过程中将潜在的未检测到的病毒灭活。病毒灭活的方法是本领域公知的,包括热灭活(巴氏灭菌)、pH 灭活、溶剂/去污剂处理、紫外光和伽玛射线辐射及加入某些化学灭活剂如 β-丙内酯或者例如美国专利 4,534,972 等中所述的菲咯啉铜。在一些实施方案中,混合物的病毒灭活可包括 pH 病毒灭活。pH 病毒灭活技术的方法也是本领域公知的。例如,典型的病毒灭活方法包括将混合物在低 pH 下温育一段时间,随后中和 pH 和过滤除去颗粒物。pH 水平的选定主要取决于抗体产物的稳定性特征和缓冲液

成分。已知在低 pH 病毒灭活过程中目标抗体的质量受 pH 和低 pH 温育时间的影响。病毒灭活除了取决于蛋白质浓度外还取决于上述这些参数，而蛋白质在高浓度下会降低灭活作用。因此，可通过常规实验选择正确的蛋白质浓度、pH 和灭活时间参数。

[0284] 混合物的 pH 可通过任何合适的酸来降低，包括但不限于柠檬酸、乙酸、辛酸或其他合适的酸。在优选的实施方案中，用 1M 柠檬酸调节混合物的 pH。

[0285] 在一些实施方案中，将混合物在约 2.9 至约 3.9 的 pH 下温育约 15 分钟至约 180 分钟。在更多的实施方案中，将混合物在约 pH3.5 下温育约 60 分钟至约 120 分钟。在还更多的实施方案中，将混合物在约 pH3.5 下温育约 60 分钟至约 180 分钟。

[0286] 在一个实施方案中，将包含抗体和 HCP 的混合物在进行离子交换分离前先进行病毒灭活。在其他实施方案中，将初始洗脱物在进行离子交换分离前先进行病毒灭活。在某些实施方案中，将初始洗脱物在进行阴离子交换层析前先进行病毒灭活。

[0287] 在病毒灭活后，将混合物按需进行调整，以进行进一步的纯化步骤。例如，可将 pH 调节过的汇集物 (pool) 进行过滤。在一个实施方案中，在低 pH 病毒灭活和 / 或过滤后，通常将混合物的 pH 调节至更为中性的 pH，例如约 6.5 至约 8.5。例如，可用注射用水 (WFI) 冲洗混合物以获得所需的 pH。

[0288] 下表 4 显示本发明方法中所用的低 pH 病毒灭活参数

[0289] 表 4:低 pH 病毒灭活的可接受操作参数

[0290]

操作参数	AOR
温育 pH	3.0-3.7
温育时间	60 – 180 min
蛋白质浓度	≤33 g/L

[0291] 本发明包括这样的方法，其中来自离子交换柱的第一洗脱物在进行第二离子交换层析步骤前先进行病毒灭活。在一个实施方案中，病毒灭活是通过 pH 病毒灭活来实现。

[0292] IV. 测定宿主细胞蛋白质 (HCP) 水平的方法

[0293] 本发明还提供测定纯化的抗体组合物中的宿主细胞蛋白质 (HCP) 浓度的残余水平的方法。如上所述，宜将 HCP 从最终目标物质产物 (例如抗体) 中除去。示例性的 HCP 包括发源于抗体生产的蛋白质。若不能从目标抗体中鉴定出并充分除去 HCP，可能会导致出现功效降低和 / 或不利患者反应。

[0294] 本文所用的术语“HCP ELISA”指这样的 ELISA，在测定中使用的第二抗体对从用以产生抗体 (例如阿达木单抗) 的细胞 (例如 CHO 细胞) 所产生的 HCP 具有特异性。第二抗体可按照本领域技术人员公知的常规方法产生。例如，第二抗体可用通过假装的生产和纯化操作获得的 HCP 来产生，该假装的生产和纯化操作即是使用相同的用以产生目的抗体的细胞系，但该细胞系没有转染抗体 DNA。在一个示例性的实施方案中，第二抗体用与在所选的细胞表达系统 (即用以产生目标抗体的细胞表达系统) 中表达的那些 HCP 类似的 HCP 来产生。

[0295] 一般来说，HCP ELISA 包括将包含 HCP 的液体样品夹在两层抗体 (即第一抗体和第二抗体) 之间。将样品进行温育，期间样品中的 HCP 被第一抗体 (例如亲和纯化的山羊抗 CHO 抗体 (Cygnus)) 捕捉。加入对从用以产生该抗体的细胞所产生的 HCP 有特异性的标

记第二抗体（例如生物素酰化的抗 CHO HCP 抗体），该第二抗体会结合样品当中的 HCP。使用适当的基于第二抗体的标记的试验，就测定出样品中所含的 HCP 的量。

[0296] HCP ELISA 可用以测定抗体组合物（如用上文 III 章节中描述的方法获得的洗脱物或流通物）中的 HCP 水平。本发明还提供包含抗体的组合物，其中经 HCP 酶联免疫吸附测定法（“ELISA”）测定，该组合物没有可检测水平的 HCP。在一个实施方案中，第一洗脱物包含约 12,000 至约 19,500ng/mg 的 HCP。在一个实施方案中，第二洗脱物包含约 1.0 和约 0.0ng/mg 的 HCP。

[0297] V. 测定组织蛋白酶 L 酶原水平的方法

[0298] 本发明提供用测定样品中的组织蛋白酶 L 酶原的量的动力学测定（或组织蛋白酶 L 动力学测定）。组织蛋白酶 L 酶原是源自某些表达系统的宿主细胞蛋白质，已知它在被激活成组织蛋白酶 L 时能造成包括抗体（如阿达木单抗）在内的蛋白质的分裂。研究已证明，组织蛋白酶 L 酶原是作为无活性的酶原而被合成，后来被加工成活性的组织蛋白酶 L 形式。通过其他蛋白酶如组织蛋白酶 D，或者通过在溶酶体的酸性条件中的自身催化激活，来对 N 末端前肽（pro-peptide）区域进行蛋白水解去除，就发生组织蛋白酶 L 酶原的激活（Turk et al. (1999) Eur J Biochem 259 :929）。此外，Mason et al. (see Mason et al. (1992) Biochem Biophysical Res Comm 189 :1659) 报道说，在较低的 pH 条件下加入带负电荷的分子如硫酸葡聚糖，可在 pH5.5 下实现更高层次的组织蛋白酶 L 激活。

[0299] 之前的检测组织蛋白酶 L 酶原（或其活性形式组织蛋白酶 L）的水平的方法，包括分析方法如弱阳离子交换层析。但是，若是测试工艺中样品，即由以上 III 章节描述的工艺获得的样品，由于缓冲体系干扰和基质影响，这种方法是有限的。因此，本发明提供高通量的荧光酶促方法，来例如为了工艺监测目的对组织蛋白酶 L 酶原进行更好的监测。

[0300] 发明的动力学测定提供了测定组织蛋白酶 L 酶原的方法，这种方法测定到的组织蛋白酶 L 酶原水平是标准的终点测定所不容易检测到的。该动力学测定还提供了确定组织蛋白酶 L 酶原的水平是否是有重现性地低下的手段。在一个实施方案中，可从 III 章节中描述的工艺的任何时间点获得样品，以证实或确定在整个工艺中组织蛋白酶 L 酶原的水平得到降低。组织蛋白酶 L 酶原是通过从蛋白质中除去氨基末端来激活的。在一个实施方案中，激活是用肽酶如但不限于组织蛋白酶 D 实现的。组织蛋白酶 L 一旦激活，就可选择性地水解底物。将底物与样品接触，并根据底物的变化监测组织蛋白酶 L 活性。

[0301] 在一个优选的实施方案中，组织蛋白酶 L 的底物包含标记。标记可包括任何能让组织蛋白酶活性得以测定的物质。组织蛋白酶 L 能选择性水解的标记底物的实例包括合成底物如 Z-亮氨酸-精氨酸-AMC (R&D Systems)。肽底物可含有荧光 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC) 基团，该基团会被 AMC 的氨基和精氨酸的羧基之间的酰胺键所猝灭。组织蛋白酶 L 切割酰胺键时，释放出的 AMC 基团是发荧光的，可通过分别为 380nm 和 460nm 的激发波长和发射波长来测量。这一激发可进行测量并用以测定组织蛋白酶 L 活性水平。底物的周转速率与样品中存在的组织蛋白酶 L 的量成正比。这个测量是结合具有已知的组织蛋白酶 L 活性和已知的组织蛋白酶 L 数量的参比样品来使用的。然后将样品中的组织蛋白酶 L 活性与样品中存在的抗体数量建立关联。在一个实施方案中，第一洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性在约 25 至约 60RFU/s/mg 抗体之间。在另一个实施方案中，第一流通物包含的组织蛋白酶 L 活性在约 0.4 至约 4RFU/s/mg 抗体之间。在一个实施方案中，第二洗脱物包含的组

织蛋白酶 L 活性在约 0.5 至约 1.5RFU/s/mg 抗体之间。

[0302] 在一个实施方案中,动力学测定法包括测定源自哺乳动物细胞表达系统的材料中的组织蛋白酶 L 酶原的数量,而这个测定是通过使该材料与能将组织蛋白酶 L 酶原加工成活性组织蛋白酶 L 形式的酶相接触来进行,由此获得组织蛋白酶 L 样品。组织蛋白酶 L 一旦激活,就能选择性地水解底物,包括合成底物如 Z-亮氨酸-精氨酸-AMC。然后将底物加到样品,包括例如含有荧光 7-氨基-4-甲基香豆素 (AMC) 基团的 Z-亮氨酸-精氨酸-AMC,该基团会被 AMC 的氨基和精氨酸的羧基之间的酰胺键所猝灭。组织蛋白酶 L 切割酰胺键时,释放出的 AMC 基团是发荧光的,可通过分别为 380nm 和 460nm 的激发波长和发射波长来测量。测出的组织蛋白酶 L 活性被用作源自哺乳动物细胞表达系统(例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞)的材料中的组织蛋白酶 L 酶原含量的指标。

[0303] 在一个实施方案中,第一洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性在约 25 至约 60RFU/s/mg 抗体之间。在另一个实施方案中,第一流通物包含的组织蛋白酶 L 活性在约 0.4 至约 4RFU/s/mg 抗体之间。在一个实施方案中,第二洗脱物包含的组织蛋白酶 L 活性在约 0.5 至约 1.5RFU/s/mg 抗体之间。

[0304] 本发明还涵盖介于上述数量之间范围,即这些范围也是本发明的一部分。例如,用作为上限和 / 或下限的任何上述数值的组合得到的数值范围,以及所述范围间的任何数量,都要被包括在本发明中。

[0305] 本发明包括任何上述的修改,无论是单独的还是互相组合在一起。

[0306] VI. 药物组合物

[0307] 可将用本发明方法获得的抗体掺入到适合给予受试者的药物组合物中。通常,所述药物组合物包含抗体或其抗原结合部分和药物可接受载体。本文所用的术语“药物可接受载体”包括任何和所有的生理学上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和延迟吸收剂等。药物可接受载体的实例包括下面的一种或几种:水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等以及它们的组合。在很多情况下,组合物中优选含有等渗剂,例如糖,多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇,或氯化钠。药物可接受载体可以进一步包含少量的能提高抗体或其抗原结合部分的贮存期或有效性的辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0308] 包含用本发明方法纯化的抗体或其抗原结合部分的药物组合物,可以是各种各样的形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液剂(例如可注射和可灌注溶液剂)、分散剂或混悬剂、片剂、丸剂、粉末剂、脂质体和栓剂。优选形式取决于想要的给药方式和治疗应用。典型的优选的组合物是可注射或可灌注溶液剂形式,例如与用来以其他抗体或其他 TNF α 抑制剂对人进行被动免疫的那些组合物类似的组合物。优选的给药方式是肠胃外(例如静脉内、皮下、腹膜内、肌内)。在一个优选的实施方案中,通过静脉内灌注或注射施用抗体。在另一个优选的实施方案中,通过肌内或皮下注射施用抗体。

[0309] 治疗组合物通常在制备和贮存条件下必须是无菌且稳定的。组合物可配制成溶液剂、微乳液剂、分散体、脂质体或者适合高药物浓度的其他有序结构。无菌可注射溶液剂可以这样制备:将所需量的活性化合物(即抗体或其抗原结合部分)与以上所列的一种或多种成分(按需)掺入到适当的溶剂中,然后过滤灭菌。通常,分散体是通过将活性化合物掺入到含有基础分散介质和以上所列的其他所需成分的无菌介质来制备。在供制备无菌可注

射溶液剂的无菌粉末剂的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从之前过滤过的活性成分与任何其他所需成分的溶液产生出这些成分的粉末。溶液的合适流动性,可例如通过使用包衣如卵磷脂,通过保持必需的颗粒度(在分散体情况中)和通过使用表面活性剂来保持。可注射组合物的长时间吸收,可通过在组合物中包含能延迟吸收的物质(例如单硬脂酸盐和明胶)来造成。

[0310] 组合物中还可以掺入补充的活性化合物。在某些实施方案中,将用于本发明方法的抗体或其抗原结合部分与一种或多种另外的治疗药物共同配制和/或共同给药。例如,可将本发明的抗 hTNF α 抗体或抗体部分与一种或多种下面的物质共同配制和/或共同给药:一种或多种 DMARD 或者一种或多种 NSAID 或者一种或多种能结合其他靶物的另外的抗体(例如能结合其他细胞因子或者能结合细胞表面分子的抗体),一种或多种细胞因子、可溶性 TNF α 受体(参见例如 PCT 公开号 W094/06476)和/或一种或多种能抑制 hTNF α 产生或活性的化学物质(例如 PCT 公开号 W0 93/19751 中描述的环己烷-亚基(cyclohexane-ylidene)衍生物)或者它们的任何组合。此外,可将本发明的一种或多种抗体与两种或多种上述治疗物质联合使用。这种联合治疗可以有利地采用较低剂量的所施用治疗药物,从而避免与各种单一治疗有关的可能副作用、并发症或者低水平患者反应。

[0311] 在一个实施方案中,本发明包括包含有效量的 TNF α 抗体或其抗原结合部分和药物可接受载体的药物组合物,其中该有效量的 TNF α 抗体可以有效治疗 TNF α - 相关病症,包括例如克罗恩氏病。在一个实施方案中,将抗体或抗体部分如 PCT/IB03/04502 和美国申请号 10/222140 所述掺入到药物制剂中,这两个专利通过引用结合到本文中。这个制剂包含浓度 50mg/ml 的抗体阿达木单抗,其中一个预填充注射器含有 40mg 的抗体供皮下注射。

[0312] 用本发明方法获得的抗体或抗体部分可通过多种本领域公知的方法给药,但是对于很多治疗性应用来说,优选的给药途径/方式是皮下注射。在另一个实施方案中,给药是通过静脉内注射或灌注。技术人员会认识到,给药途径/方式要根据期望的结果的不同而异。在某些实施方案中,活性化合物可与能使化合物免于快速释放的载体一起制备成例如控释制剂,包括植入物、透皮贴和微胶囊递送系统。可使用生物可降解的、生物相容的聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酞类、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。很多制备这种制剂的方法已申请了专利或者是本领域技术人员公知的。参见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0313] 用本发明方法获得的抗体或其抗原结合部分还可以以蛋白质晶体制剂的形式给药,这种制剂包括几种蛋白质晶体包囊在聚合物载体当中形成包衣颗粒。蛋白质晶体制剂的包衣颗粒可以具有球形形状,是直径最大 500 微米的微球体,或者它们可以具有一些其他形状,是微颗粒。提高的蛋白质晶体浓度使得本发明的抗体可进行皮下递送。在一个实施方案中,本发明的抗体通过蛋白质递送系统进行递送,其中将一种或多种蛋白质晶体制剂或组合物给予患有 TNF α 相关病症的患者。W002/072636 中还描述了完整抗体晶体或抗体片段晶体的稳定化制剂组合物及制备方法,该专利通过引用结合到本文中。在一个实施方案中,采用本发明的多可变量剂量(multiple-variable dose)方法,使用 PCT/IB03/04502 和美国申请号 10/222140(这两个专利通过引用结合到本文中)中描述的包含结晶化抗体片段的制剂,来治疗 TNF α 相关病症。

[0314] 在某些实施方案中,用本发明方法获得的抗体或其抗原结合部分可以例如用惰性稀释剂或可同化可食用载体进行口服给药。化合物(如需要的话,还有其他的成分)还可以密封在硬壳或软壳明胶胶囊中压成片剂,或者直接掺入到患者饮食中。对于口服治疗给药,可将化合物与赋形剂一起掺入,以可摄取的片剂、口腔片剂、糖锭(troche)、胶囊剂、酞剂、悬浮剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等形式使用。为了通过肠胃外给药之外的途径施用本发明的化合物,可能有必要将化合物用能防止其失活的材料包衣,或者将化合物与该材料共同施用。

[0315] 本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明抗体或其抗原结合部分。“治疗有效量”指在必需的剂量下和时间内能有效实现期望的治疗结果的量。抗体或其抗原结合部分的治疗有效量可因各种因素而异,所述因素如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及抗体、抗体部分、其他 TNF α 抑制剂在个体中引起期望的响应的能力。治疗有效量还是这样的量,在该量下治疗有益效果超过抗体或其抗原结合部分的任何毒性或有害效果。“预防有效量”指在必需的剂量下和时间内能有效实现期望的预防结果的量。通常,由于预防剂量是在疾病之前或早期对受试者使用,预防有效量要小于治疗有效量。

[0316] 可以对剂量方案进行调整,以提供最优的期望反应(例如治疗或预防反应)。例如,可以施用单一推注剂(bolus),可以将几个分开的剂量随时间推移而施用,或者可根据治疗情况的紧急程度的指示而按比例减少或增加剂量。特别有利的是将肠胃外用组合物配制成单位剂量形式,使容易给药并且剂量均匀。本文所用的单位剂量形式是指适合作为单元剂量用于待治疗哺乳动物受试者的物理上分立单位;每个单位包含经计算能产生期望的治疗作用的预定量活性化合物和必需的药学载体。本发明的单位剂量形式的规格受支配于和直接取决于(a) 活性化合物的独特特性和所要实现的特定治疗或预防效果,和(b) 将这种活性化合物配制成供治疗个体敏感性的技术领域中所固有的局限性。

[0317] 抗体或其抗原结合部分的治疗或预防有效量的示例性非限制性范围是 10-200mg,更优选 20-160mg,更优选 40-80mg,最优选大约 80mg。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合部分的治疗有效量是约 20mg。在另一个实施方案中,抗体或其抗原结合部分的治疗有效量是约 40mg。在又一个实施方案中,抗体或其抗原结合部分的治疗有效量是约 80mg。在一个实施方案中,用于本发明方法的抗体或其抗原结合部分的治疗有效量是约 120mg。在又一个实施方案中,抗体或其抗原结合部分的治疗有效量是约 160mg。上述剂量范围的中间范围,例如约 78.5 至约 81.5;约 15 至约 25;约 30 至约 50;约 60 至约 100;约 90 至约 150;约 120 至约 200,也认为是本发明的一部分。例如,用作为上限和/或下限的任何上述数值的组合得到的数值范围,也认为被包括在本发明中。

[0318] 要指出的是,剂量值可随所要减轻的病症的类型和严重程度的不同而异。还要知道,对于任何特定患者,具体剂量方案应该根据个体的需要和进行给药或进行组合物给药管理的人员的专业判断而随时间调节,本文提出的剂量范围只是示例性的,并不意在限制所要求保护的组合物的范围或实施。

[0319] 用本发明方法获得的抗体或其抗原结合部分,可以如 W002/100330 所述以双周给药方案来施用,如 W0 04/037205 所述以低剂量方案来施用,和如 W0 05/110452 所述以多变给药方案来施用,每个专利都通过引用结合到本文中。

[0320] 本发明还涉及包含用本发明方法获得的抗体或其抗原结合部分的经包装药物组

合物、制品或药盒。制品可包含用本发明方法获得的抗体或其抗原结合部分和包装材料。制品还可包含标签或包装插页,该标签或包装插页说明包含抗体或其抗原结合部分的制剂或组合物具有降低的 HCP 和 / 或组织蛋白酶 L 酶原水平。制品可包含装在包装材料当中的标签或包装插页,该标签或包装插页说明阿达木单抗制剂包含不超过约 70ng/mg 的 HCP,或者制品可包含装在包装材料当中的标签或包装插页,该标签或包装插页说明阿达木单抗制剂包含不超过约 13ng/mg 的 HCP。制品可包含装在包装材料当中的标签或包装插页,该标签或包装插页说明阿达木单抗制剂包含不超过约 5ng/mg 的 HCP。制品还可包含这样的包装材料,它说明阿达木单抗制剂所包含的组织蛋白酶 L 酶原的水平不超过约 3.0RFU/s/mg 阿达木单抗的组织蛋白酶 L 活性所指示的水平。

[0321] VII. 治疗方法

[0322] 本发明提供了用于生产 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品的的方法,该抗体制品可用于抑制患有其中 TNF α 活性有害的病症的受试者中的 TNF α 活性。TNF α 被指涉及众多病症的病理生理(参见例如 Moeller, A., et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; Moeller et al. 的美国专利 5,231,024; Moeller, A. 的欧洲专利公开号 260610B1)。TNF α 被指涉及众多 TNF α 相关病症的病理生理,包括脓毒症、感染、自身免疫性疾病、移植排斥和移植物抗宿主病(参见例如 Moeller, A., et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; Moeller et al. 的美国专利 5,231,024; Moeller, A. et al. 的欧洲专利公开号 260610B1; Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452; Tracey, K. J. and Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503)。本发明提供了用于生产 HCP 或组织蛋白酶 L 酶原降低的抗体制品的的方法,该抗体制品有利于抑制患有 TNF α 相关病症的受试者中的 TNF α 活性,所述方法包括对受试者给予起始诱导剂量的抗体或其抗原结合片段,随后给予治疗剂量的抗体或其抗原结合片段,使得 TNF α 活性被抑制。优选低, TNF α 为人 TNF α , 受试者为人受试者。在一个实施方案中, TNF α 抑制剂为阿达木单抗,也称 **HUMIRA[®]** (D2E7)。

[0323] 本文所用的术语“其中 TNF α 活性有害的病症”用以包括这样的疾病或其他病症,其中 TNF α 在患有该病症的受试者中的存在已被证明或正被怀疑是造成该病症的病理生理的原因或者是促使该病症恶化的因素。因此,其中 TNF α 活性有害的病症是这样的病症,对其中 TNF α 活性的抑制预期能缓解其症状和 / 或进展。这种病症可例如由患有它的受试者的生物流体中 TNF α 浓度的增加(例如受试者血清、血浆、滑膜液等中 TNF α 浓度的增加)来证实,所述增加可例如用上文所述的抗 TNF α 抗体来检测。其中 TNF α 活性有害的病症的实例有很多。以下进一步讨论用本发明方法获得的 TNF α 抗体和抗体部分用于治疗具体病症的用途。

[0324] A. 脓毒症

[0325] 肿瘤坏死因子在脓毒症的病理生理中具有确立的作用,其生物作用包括低血压、心肌抑制、血管渗漏综合征、器官坏死、毒性二次介导体释放的刺激和凝血级联的激活(参见例如 Moeller, A., et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; Moeller et al. 的美国专利 5,231,024; Moeller, A. 的欧洲专利公开号 260610B1; Tracey, K. J. and Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503; Russell, D and Thompson, R. C. (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:714-721)。本发明的多剂量的方法可以用于治疗任意临床情形的脓毒症,包括脓毒性休克、内毒素性休克、革兰氏阴性脓毒症和中毒性休克综合征。

[0326] 此外,为了治疗脓毒症,可将用本发明方法获得的抗 hTNF α 抗体或抗体部分,与一种或多种可进一步缓解脓毒症的另外的治疗剂联合给药,所述另外的治疗剂例如白细胞介素-1 抑制剂(如 PCT 公开号 W092/16221 和 W0 92/17583 中所述的)、细胞因子白细胞介素-6(参见例如 PCT 公开号 W0 93/11793)或血小板活化因子拮抗剂(参见例如欧洲专利申请公开号 EP 374 510)。在一个优选的实施方案中,将抗 TNF α 抗体或抗体部分给予这样的人受试者,他属于在治疗时血清或血浆 IL-6 浓度高于 500pg/ml、更优选 1000pg/ml 的脓毒症患者亚群(参见 PCT 公开号 W0 95/20978by Daum, L., et al.)。

[0327] B. 自身免疫性疾病

[0328] 肿瘤坏死因子被指涉及在多种自身免疫性疾病的病理生理中起作用。例如, TNF α 被指涉及在类风湿性关节炎中激活组织炎症和造成关节破坏(参见例如 Moeller, A., et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; Moeller et al. 的美国专利 5,231,024; Moeller, A. 的欧洲专利公开号 260610B1; Tracey and Cerami, 出处同上; Arend, W. P. and Dayer, J.-M. (1995) *Arth. Rheum.* 38:151-160; Fava, R. A., et al. (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 94:261-266)。TNF α 还被指涉及在糖尿病中促进胰岛细胞死亡和介导胰岛素抗性(参见例如 Tracey and Cerami, 出处同上; PCT 公开号 W0 94/08609)。TNF α 还被指涉及在多发性硬化中介导对少突胶质细胞的细胞毒性和诱导炎性斑块(参见例如 Tracey and Cerami, 出处同上)。TNF(还被指涉及在多发性硬化中介导对少突胶质细胞的细胞毒性和诱导炎性斑块(参见例如 Tracey and Cerami, 出处同上)。已对嵌合和人源化的鼠抗 hTNF α 抗体进行了治疗类风湿性关节炎方面的临床测试(参见例如 Elliott, M. J., et al. (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M. J., et al. (1994) *Lancet* 344:1105-1110; Rankin, E. C., et al. (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34:334-342)。

[0329] TNF α 抗体如阿达木单抗可用来治疗自身免疫性疾病,特别是那些与炎症相关的自身免疫性疾病。这类自身免疫性疾病的实例包括类风湿性关节炎、类风湿性脊椎炎、骨关节炎和痛风性关节炎、变态反应、多发性硬化、自身免疫性糖尿病、自身免疫性葡萄膜炎和肾病综合征。自身免疫性疾病的其它实例包括多系统自身免疫性疾病和自身免疫性听觉缺失。

[0330] 通常是经全身给予抗体或抗体部分,不过就某些病症而言,在炎症部位局部给予抗体或抗体部分可能是有益的(例如单独或与如 PCT 公开号 W0 93/19751 中所述的环己烷-基亚基衍生物联用,在类风湿性关节炎的关节中局部给药或在糖尿病性溃疡中局部施用)。还可以将 TNF α 抑制剂,包括人抗体和抗体部分如 D2E7,与一种或多种可用于自身免疫性疾病的多变剂量治疗的另外的治疗剂一起给予,这在下文中作进一步论述。

[0331] 在本发明的一个实施方案中,将用本发明方法获得的 TNF α 抗体用于治疗自身免疫性疾病如狼疮。已经证实狼疮与 TNF 活性相关(Shvidel et al. (2002) *Hematol J.* 3:32; Studnicka-Benke et al. (1996) *Br JRheumatol.* 35:1067)。本文所用的术语“狼疮”指的是称作红斑狼疮的慢性炎性自身免疫性疾病,它可以影响许多器官系统,包括皮肤、关节和内脏器官。狼疮这个术语是一般性术语,涵盖许多具体类型的狼疮,包括系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎和狼疮性大脑炎。在系统性红斑狼疮(SLE)中,身体的天然防御转向身体自身,欺骗免疫细胞来攻击身体组织。可产生出能反抗身体血细胞、器官和组织的抗体。这种反应导致免疫细胞攻击受侵害的系统,产生慢性疾病。狼疮性肾炎,也称狼疮性肾小球疾病,

是通常为 SLE 并发症的肾病,其特征在于对肾小球的损害和肾功能的进行性丧失。狼疮性大脑炎指的是另一种 SLE 并发症,是大脑和 / 或中枢神经系统的炎症。

[0332] 另一种可用 TNF α 抗体治疗的自身免疫性疾病是克罗恩氏病,在下文的肠病章节中作更详细的描述。

[0333] C. 感染性疾病

[0334] 肿瘤坏死因子被指涉及介导在各种感染性疾病中观察到的生物作用。例如, TNF α 被指涉及在疟疾中介导大脑炎症以及毛细血管血栓形成和梗死形成。TNF α 还被指涉及在脑膜炎中介导大脑炎症,诱导血脑屏障崩溃,引发脓毒性休克综合征和激发静脉梗死。TNF α 还被指涉及在获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 中诱导恶病质,刺激病毒增殖和介导中枢神经系统损伤。因此,可用抗 TNF 的抗体和抗体部分来治疗感染性疾病,包括细菌性脑膜炎 (参见例如欧洲专利申请公开号 EP585705)、脑型疟、AIDS 和 AIDS 相关性综合征 (ARC) (参见例如欧洲专利申请公开号 EP 230 574) 以及移植继发的巨细胞病毒感染 (参见例如 Fietze et al. (1994) Transplantation 58 :675)。本发明的抗体和抗体部分还可用于缓解与感染性疾病相关的症状,包括因感染 (诸如流行性感冒) 引起的发热和肌痛以及感染继发 (例如 AIDS 或 ARC 继发) 的恶病质。

[0335] D. 移植

[0336] 肿瘤坏死因子被指涉及作为同种异体移植物排斥和移植物抗宿主疾病 (GVHD) 的关键介导体,和涉及介导当将抗 T 细胞受体 CD3 复合物的大鼠抗体 OKT3 用于抑制肾移植排斥时所观察到的不良反应 (参见例如 Eason et al. (1995) Transplantation 59 :300; Suthanthiran and Strom (1994) New Engl. J. Med. 331 :365)。因此,本发明的抗体和抗体部分可用于使用多变剂量治疗法抑制移植排斥 (包括同种异体移植物和异种移植物的排斥),和用于抑制 GVHD。尽管抗体或抗体部分可以单独使用,但是更优选将其与一种或多种能抑制对同种异体移植物的免疫反应或抑制 GVHD 的其它物质联用。例如,在一个实施方案中,将本发明的抗体或抗体部分与 OKT3 联用以抑制 OKT3 诱导的反应。在另一个实施方案中,将本发明的抗体或抗体部分与一种或多种抗涉及调节免疫反应的其它靶物的抗体联用,所述靶物诸如细胞表面分子 CD25 (白细胞介素 -2 受体 - α)、CD11a (LFA-1)、CD54 (ICAM-1)、CD4、CD45、CD28/CTLA4、CD80 (B7-1) 和 / 或 CD86 (B7-2)。在又一个实施方案中,将本发明的抗体或抗体部分与一种或多种通用免疫抑制剂如环孢菌素 A 或 FK506 联用。

[0337] E. 恶性肿瘤

[0338] 肿瘤坏死因子被指涉及在恶性肿瘤中诱导恶病质,刺激肿瘤生长,增强转移的可能性和介导细胞毒性。因此,可将抗 TNF 的抗体和抗体部分用于治疗恶性肿瘤,其中治疗能抑制肿瘤生长或转移和 / 或缓解恶性肿瘤继发的恶病质。可以通过全身或局部对肿瘤部位给予抗体或抗体部分。

[0339] F. 肺病

[0340] 肿瘤坏死因子被指涉及成人呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的病理生理,包括刺激白细胞 - 内皮细胞激活,将细胞毒性定向于肺细胞和诱导血管渗漏综合征。可将用本发明方法获得的抗体用于治疗各种肺病,包括成人呼吸窘迫综合征 (参见例如 PCT 公开号 W0 91/04054)、体克肺、慢性肺炎性疾病、肺结节病、肺纤维化和硅肺病。可将抗体或抗体部分

通过全身或局部方式给予肺表面,例如作为气溶胶来给予。还可将抗体或抗体部分与一种或多种可用于治疗肺病的另外的治疗剂一起给药,这在下文中进一步论述。

[0341] 其中 TNF α 被指涉及病理生理的肺病的其它实例,包括特发性间质性肺病和慢性阻塞性气道病症(参见例如 Piquet et al. (1989) *J Exp Med.* 170 :655 ;Whyte et al. (2000) *Am J Respir Crit Care Med.* 162 :755 ;Anticevich et al. (1995) *Eur J Pharmacol.* 284 :221)。本发明进一步提供了用于治疗患有这类肺病的受试者中的 TNF α 活性的方法,该方法包括对所述受试者给予抗体或抗体部分,使得患有特发性间质性肺病或慢性阻塞性气道病症的受试者中的 TNF α 活性受到抑制。其中 TNF α 活性有害的特发性间质性肺病和慢性阻塞性气道病症的实例在下文中进一步讨论。

[0342] 1. 特发性间质性肺病

[0343] 在一个实施方案中,将用本发明方法获得的 TNF α 抗体用于治疗患有特发性间质性肺病的受试者。术语“特发性肺纤维化”或“IPF”指的是一组特征在于深部肺组织发炎并最终形成瘢痕而导致呼吸急促的病症。IPF 中小泡(肺泡)及其支持结构(间质)的瘢痕形成,最终导致功能肺泡单位的损失和氧从空气转运至血液的减少。IPF 也称作弥散性实质肺病;肺泡炎;隐源性纤维化肺泡炎(CFA);特发性肺炎(IPP);和通常的间质性肺炎(UIP)。IPF 通常与 UIP 同义使用(“IPF/UIP”),因为 UIP 是 IPF 病理诊断中所观察到的最普通的细胞模式。

[0344] 特发性间质性肺病以三种方式影响肺:首先,肺组织以某种已知或未知的方式受损;其次,肺中的肺泡壁发炎;最后,在间质(或肺泡之间的组织)中开始瘢痕形成(或纤维化),从而肺变硬。特发性间质性肺病的实例包括特发性肺纤维化(IPF)。肿瘤坏死因子被指涉及特发性肺纤维化(IPF)的病理生理(参见 Piquet et al. (1989) *J Exp Med.* 170 :655 ;Whyte et al. (2000) *Am J Respir Crit Care Med.* 162 :755 Corbett et al. (2002) *Am J Respir Crit Care Med.* 165 :690)。例如,已经发现 IPF 患者的巨噬细胞和 II 型上皮细胞中 TNF 表达水平升高(Piquet et al. (1993) *Am J Pathol.* 143 :651 ;Nash et al. (1993) *Histopathology* 22 :343 ;Zhang et al. (1993) *J Immunol.* 150 :4188)。某些遗传多态现象也与 TNF 表达增加有关,并被指涉及在 IPF 和硅肺病中起作用(Whyte 等,出处同上;Corbett 等,出处同上)。

[0345] 患有 IPF 的患者通常表现出某些症状,包括干咳、胸痛和/或呼吸急促。治疗 IPF 的常用药物是泼尼松和环磷酰胺,不过仅部分患者持续使用这些药物而有所改善(American Thoracic Society (2000) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 :646)。给氧和肺移植是其它的治疗选择。在一个实施方案中,可将用本发明方法获得的抗体与另一种治疗剂(例如氧)联用来治疗特发性肺纤维化。

[0346] 用于研究特发性间质性肺病和慢性阻塞性气道病症的动物模型的实例,包括卵清蛋白(OVA)诱发的过敏性哮喘小鼠和吸烟诱发的慢性阻塞性肺疾患小鼠(参见 Hessel et al. (1995) *Eur J Pharmacol.* 293 :401 ;Keast et al. (1981) *J. Pathol.* 135 :249)。

[0347] 2. 慢性阻塞性气道病症

[0348] 在一个实施方案中,将 TNF α 抗体用于治疗患有慢性阻塞性气流障碍的受试者。在这些疾病中,气流阻塞可以是慢性的或猝发性的和复发性的。气流阻塞通常是通过用力呼气的肺量测定法来测定,该测定法记录出最大呼气过程中呼出体积与时间之比。在没有

阻塞气流的受试者中,完全用力呼气通常需要 3-4 秒。在其中气流被阻塞的阻塞性气流障碍患者中,通常需要达 15-20 秒,并且可能受到屏气时间的限制。在第一秒呼气中的正常用力呼气量 (FEV_1) 是容易测量的,并且根据年龄、性别和身高可作出精确预测。 FEV_1 与用力肺活量之比 (FEV_1/FVC) 通常超过 0.75。记录用力呼气和接着的用力吸气过程中的气流-体积,即气流-体积循环,也是有用的,主要是为了区分上气道狭窄与下气道狭窄。下文描述慢性阻塞性气道病症的实例。

[0349] a. 哮喘

[0350] 肿瘤坏死因子被指涉及哮喘的病理生理 (Anticevich et al. (1995) Eur J Pharmacol. 284 :221 ;Thomas et al. 1995. Am J Respir Crit Care Med. 152 :76 ;Thomas and Heywood (2002) Thorax. 57 :774)。例如,已经发现急性哮喘发作与肺中性白细胞增多和 BAL TNF 水平升高有关 (Ordonez et al. (2000) Am J Respir Crit Care Med 161 :1185)。已经发现哮喘症状的严重程度与室尘中的内毒素水平相关。在大鼠中,抗 TNF 抗体减少了内毒素诱导的气道改变 (Kips et al. (1992) Am Rev Respir Dis 145 :332)。

[0351] 本文所用的术语“哮喘”指的是气道炎症导致肺气流进入和排出受限的病症。哮喘也称作支气管哮喘、运动诱发的哮喘-支气管和反应性气道病 (RAD)。在一些情况中,哮喘与变态反应相关和 / 或是家族性的。哮喘包括特征在于短期内支气管气道直径或口径泛发性波动而导致肺功能改变的病况。所导致的对气流的阻力的增加使受侵害受试者产生症状,包括气喘 (呼吸困难)、胸部紧压感觉或“紧缩感”和喘鸣。

[0352] 哮喘患者按照 NIH 指导方针进行表征,被描述为轻度间歇性哮喘、中度持续性哮喘和重度持续性哮喘 (参见 NAEPP Expert Panel Report Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Update on Selected Topics 2002. JACI 2002 ;110 : S141-S209 ;Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. NIH Publication 97-4051, 1997 年 7 月)。通常通过吸入皮质类固醇来治疗确诊患有中度持续性哮喘的患者。通常通过高剂量吸入皮质类固醇和口服皮质类固醇来治疗确诊患有重度持续性哮喘的患者。

[0353] b. 肺慢性阻塞性疾病 (COPD)

[0354] 肿瘤坏死因子被指涉及慢性阻塞性肺病的病理生理 (Keatings (2000) Chest. 118 : 971 ;Sakao et al. (2001) Am J Respir Crit Care Med. 163 :420 ;Sakao et al. (2002) Chest. 122 :416)。术语“慢性阻塞性肺疾患”或“COPD”在本文中可以互换使用,指的是特征在于气流受限伴不同程度的气囊扩大和肺组织破坏的一组肺病。术语 COPD 包括慢性支气管炎 (粘液分泌过多伴杯状细胞粘膜下腺超常增生)、慢性阻塞性支气管炎或肺气肿 (气道实质破坏) 或这些疾病的组合。肺气肿和慢性支气管炎是最常见形式的慢性阻塞性肺病。COPD 被定义为不可逆的气流阻塞。

[0355] 在 COPD 中,慢性炎症导致小气道的固定性狭窄和肺实质和肺泡壁破坏 (肺气肿)。其特征在于肺泡巨噬细胞、中性白细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞数量的增加和多种炎性介质 (脂质、趋化因子、细胞因子、生长因子) 的释放。这种炎症导致纤维化伴小气道狭窄和肺实质破坏。还存在高水平的氧化应激,它可以使这种炎症扩大。

[0356] G. 肠病

[0357] 肿瘤坏死因子被指涉及包括克罗恩氏病在内的炎症性肠病的病理生理 (参见

例如 Tracy 等 (参见例如 Tracy et al. (1986) Science 234 :470 ;Sun et al. (1988) J. Clin. Invest. 81 :1328 ;MacDonald et al. (1990) Clin. Exp. Immunol. 81 :301)。已对嵌合鼠抗 hTNF α 抗体进行治疗克罗恩氏病方面的临床测试 (van Dullemen et al. (1995) Gastroenterology 109 :129)。本发明包括这样的治疗法,其包括给予用本发明方法获得的 TNF α 抗体,使用抗体或其抗原结合部分以治疗肠病,如特发性炎症性肠病。特发性炎症性肠病包括两种综合征:克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。在一个实施方案中,还可将用本发明方法获得的抗体用于治疗通常与 IBD 和克罗恩氏病相关的病症。术语“炎症性肠病 (IBD) 相关病症”或“克罗恩氏病相关病症”在本文中可以互换使用,用于描述通常与 IBD 和克罗恩氏病相关的疾病和并发症。

[0358] 本发明包括多剂量方案,其包括给予 TNF α 抗体以治疗克罗恩氏病。克罗恩氏病的治疗是基于疾病的位置、程度和严重性。药物干预包括抗炎药 (氨基水杨酸盐和皮质类固醇) 和免疫调节剂 (硫唑嘌呤和 6-巯嘌呤 [6-MP]、环孢菌素、甲氨喋呤 [MTX]、抗生素和生物制剂)。C-反应性蛋白 (CRP) 水平和红细胞沉降率 (ESR) 水平反映出非特异性急性期反应。内窥镜检查是诊断克罗恩氏病的主要手段。克罗恩氏病的放射学特征通过钡剂造影检查来证实,包括粘膜水肿、口疮和线性溃疡、不对称狭窄和束紧以及因肠系膜肥厚导致的肠相邻环路的分离。异常是局灶性的和不对称的。主要的组织学病变为口疮性溃疡。可以使用克罗恩氏病活性指数 (CDAI) 来评价患有克罗恩氏病的受试者,该指数是该病严重程度的标准度量,分数越高表明疾病活性约严重。

[0359] 可用本发明方法治疗的克罗恩氏病相关病症的实例,包括膀胱、阴道和皮肤中的瘘;肠梗阻;脓肿;营养缺乏;因使用皮质类固醇导致的并发症;关节发炎;结节性红斑;坏疽性脓皮症;和眼部病变。其它通常与克罗恩氏病相关的病症包括克罗恩氏病关节痛、fistulizing Crohn's、不确定性大肠炎 (indeterminant colitis) 和回肠囊袋炎 (pouchitis)。

[0360] H. 心脏病症

[0361] 用本发明方法获得的抗体或其抗原结合部分还可用来治疗各种心脏病症或冠心病症,包括心脏局部缺血 (参见例如欧洲专利申请公开号 EP 453 898) 和心脏机能不全 (心肌无力) (参见例如 PCT 公开号 W094/20139)。TNF α 还被指涉及再狭窄的病理生理 (参见例如 Clause 11 等 (1994), 出处同上; Meda 11 等 (1997) Heart 78 :273)。

[0362] 本文所用的术语“其中 TNF α 活性有害的心脏病症”用以包括这样的冠心病症和心血管病症,其中 TNF α 在患有该病症 (包括心血管病症如再狭窄) 的受试者中的存在已被证明或正被怀疑是造成该病症的病理生理的原因或者是促使该病症恶化的因素。术语“心血管病症”或“冠心病症”在本文中可以互换使用,指的是任何涉及心血管系统例如心脏、血管和 / 或血液的疾病、病症或状态。冠心病症一般的特征在于对心脏供血和氧的血管 (冠状动脉) 的狭窄。冠心病症可因脂肪物质和斑块的累积所致。随着冠状动脉发生狭窄,达到心脏的血流会减缓或停止。本发明的冠心病症可以适用于动脉的任何异常,无论是结构的、组织的、生化的,还是任何其它的异常。冠心病的一个实例为再狭窄。在一个实施方案中,冠心病症指的是任何涉及心血管系统的疾病、病症或状态,但不包括心脏局部缺血和心脏机能不全。

[0363] 其中 TNF α 活性有害的冠心病症通常因动脉阻塞所致。这类阻塞可因通常在冠

状动脉中形成的血凝块引起,该冠状动脉之前已因通常与动脉粥样硬化相关的改变而变狭窄。例如,如果在动脉壁内的动脉粥样硬化斑块破裂,它会引起血栓或血凝块的形成。这种病症可例如由患有它的受试者的生物流体中 TNF α 浓度的增加(例如受试者血清、血浆、滑膜液等中 TNF α 浓度的增加)来证实,所述增加可例如用上文所述的抗 TNF α 抗体来检测。冠心病还可因动脉压的失衡、心脏的机能障碍或血管的闭塞例如血栓导致。冠心病包括冠状动脉疾病和外周血管疾病。

[0364] 其中 TNF α 活性有害的心脏病症的实例有很多,包括再狭窄。抗体、抗体部分用于治疗具体冠心病症的用途在下文中进一步论述。在某些实施方案中,如下所述将抗体、抗体部分与另一种治疗剂联合给予受试者。

[0365] 还可将用本发明方法获得的抗体用来抑制患有心脏病症的受试者中的 TNF α 活性。本发明提供了用于抑制或降低患有冠心病症的受试者中的 TNF α 活性的方法,该方法包括对所述的受试者给予本发明的抗体、抗体部分和其它 TNF α 抑制剂,使得受试者中的 TNF α 活性得到抑制或降低。优选地,所述 TNF α 是人 TNF α ,所述受试者是人受试者。或者,所述受试者可以是表达能与本发明抗体发生交叉反应的 TNF α 的哺乳动物。还另外,所述受试者可以是导入了 hTNF α 的哺乳动物(例如通过给予 hTNF α 或通过表达 hTNF α 转基因来导入)。可以为治疗目的对人受试者给予本发明的抗体。

[0366] 此外,可将本发明的抗体给予为了兽医目的或作为人疾病动物模型而表达能与该抗体发生交叉反应的 TNF α 的非人哺乳动物(例如灵长类、猪或小鼠)。就后一目的而言,这类动物模型可以用于评价多变量治疗功效(例如测试给药剂量和时程)。

[0367] 常用于研究冠心病症(包括再狭窄)的动物模型包括大鼠或小鼠颈动脉结扎术模型和颈动脉损伤模型(Ferns et al. (1991)Science253:1129;Clowes et al. (1983)Lab. Invest. 49:208;Lindner et al. (1993)Circ Res. 73:792)。在颈动脉结扎术模型中,通过结扎接近远端分叉(distal bifurcation)的血管来阻断动脉血流。正如 Clowes 等所述,对颈动脉损伤模型进行操作,通过经颈外动脉引入的球囊导管在管腔内的移动,使得颈总动脉被脱去内皮。在第 2 周时,颈动脉因平滑肌细胞收缩而明显变狭窄,但在 2-12 周时,内膜厚度加倍,导致腔尺寸减少。任何这些模型都可以用于确定本发明 TNF α 抗体在预防和治疗人再狭窄中的潜在治疗作用。

[0368] 本发明包括其中 TNF α 活性有害的心血管病症的治疗方法,其中对 TNF α 活性的抑制预期能缓解冠心病的症状和/或发展或者预防冠心病。患有冠心病或有发生冠心病症的风险的受试者,可以通过临床症状来鉴定。冠心病中的临床症状通常包括胸痛、呼吸急促、虚弱、晕厥、意识改变、肢体疼痛、阵发性夜间呼吸困难、短暂脑缺血发作和患者经历到的其它这类现象。冠心病的临床征兆还可包括 EKG 异常、周围脉搏改变、动脉杂音、异常心音、心率加速(rates)和喘鸣、颈静脉扩张、神经学改变和临床医师察觉到的其它这类发现。冠心病还可例如由患有它的受试者的生物流体中 TNF α 浓度的增加(例如受试者血清、血浆、滑膜液等中 TNF α 浓度的增加)来证实。

[0369] 心血管病症的实例包括但不限于冠状动脉疾病、心绞痛、心肌梗死、因心跳停止导致的心血管组织损伤、因心脏分流术导致的心血管组织损伤、心源性休克和高血压、动脉粥样硬化、冠状动脉痉挛、冠状动脉疾病、心瓣膜病、心律失常和心肌病。下文进一步论述抗体、抗体部分用于治疗具体的心血管疾病的用途。在某些实施方案中,将抗体、抗体部分与

另一种治疗剂联合给予受试者,这在下文描述。

[0370] 1. 再狭窄

[0371] 本文所用的术语“再狭窄”指的是狭窄的复发,狭窄是指动脉窄化或收缩。再狭窄通常是作为在患病血管中进行重建手术后发生的闭塞前损害 (preocclusive lesion) 而出现。该术语不仅适用于预先存在的狭窄的复发,而且适用于以前正常的、在血管分流术后变部分闭塞的血管。在另一个实施方案中,本发明提供了治疗再狭窄的方法,所述方法包括对患有再狭窄或有发生再狭窄的风险的受试者给予用本发明方法获得的抗体或其抗原结合部分。

[0372] TNF α 涉及再狭窄的病理生理 (参见 Zhou et al. (2002) *Atherosclerosis*. 161 : 153 ;Javed et al. (2002) *Exp and Mol Pathol* 73 :104)。例如,在鼠金属线颈动脉模型中, TNF $^{-/-}$ 小鼠显示出在初始增生方面比野生型小鼠减少 7 倍 (Zimmerman et al. (2002) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283 :R505)。再狭窄可因无论是在冠状脉管系统中还是在周围脉管系统中的任何类型的血管重建而发生 (Colburn and Moore (1998) *Myointimal Hyperplasia* pp. 690-709 in *Vascular Surgery :A Comprehensive Review* Philadelphia : Saunders)。例如,研究报导在冠状动脉血管成形术后症状性再狭窄的发生率为 30-50% (参见 Berk and Harris (1995) *Adv. Intern. Med.* 40 :455)。作为又一个实例,在颈动脉内膜剥离术后,20%的被研究患者存在超过 50%的管腔窄化 (Clagett et al. (1986) *J. Vasc. Surg.* 3 :10)。再狭窄由因多个因素造成的、伴随不同解剖学部位中的闭塞前病变出现的不同程度的症状而得到证明,这些因素包括所涉及血管的性质、残留疾病的程度和局部血液动力学性质。

[0373] 本文所用的“狭窄”指的是在闭塞性疾病或在再狭窄中观察到的动脉窄化。狭窄可伴随出现那些反映出通过窄化动脉段的血流减少的症状,在这种情况下,产生狭窄的病症称作疾病 (即闭塞性疾病或再狭窄疾病)。狭窄可以在血管中无症状地存在,仅能通过诊断介入 (如血管造影术) 或血管实验室研究检测到。

[0374] 可将用本发明方法获得的抗体用于治疗患有再狭窄或有发生再狭窄的风险的受试者。有发生再狭窄的风险的受试者包括已经进行了 PTCA 的受试者。受试者还可能已插入了用于预防再狭窄的支架。可将 TNF α 抗体单独使用或与支架一起联用,来预防患有心血管疾病的受试者中的再狭窄复发。

[0375] 2. 充血性心力衰竭

[0376] TNF α 被指涉及充血性心力衰竭的病理生理 (参见 Zhou et al. (2002) *Atherosclerosis* 161 :153)。患有充血性心力衰竭的患者中的血清 TNF α 水平的升高与疾病的严重程度成正比 (Levine et al. (1990) *N Engl J Med* 323 :236 ;Torre-Amione et al. (1996) *J Am Coll Cardiol* 27 :1201)。此外,还证实 TNF α 抑制剂能改善充血性心力衰竭症状 (Chung et al. (2003) *Circulation* 107 :3133)。

[0377] 本文所用的术语“充血性心力衰竭”包括特征在于心脏供应身体的氧需求的能力下降的病况。充血性心力衰竭的症状和征兆包括到达身体各组织的血流减少,各器官中血液过量蓄积 (例如当心脏不能够泵出大静脉所返回的血液时),运动性呼吸困难、疲劳和/或外周性水肿 (例如因左心室功能紊乱导致的外周性水肿)。充血性心力衰竭可以为急性的或慢性的。充血性心力衰竭的表现症状,通常是继发于多种共同特征为心脏功能的暂时

或持久性丧失的心脏和全身病症而出现的。这类病症的实例包括高血压、冠状动脉疾病、心瓣膜病和心肌病,例如肥厚性、扩张性或限制性心肌病。

[0378] “患有或遭受充血性心力衰竭的受试者”是患有这样病症的受试者,该病症涉及到不同病因的临床综合征,这些综合征的共同特征在于心泵功能受削弱,即心脏不能泵出与代谢组织的需求相称的血液,或者要升高充盈压才能做到这一点。“有发生充血性心力衰竭的风险的受试者”是这样的受试者,由于某些影响其心血管系统的因素,他或她具有发展充血性心力衰竭的倾向。需要在这些受试者中降低发生充血性心力衰竭的风险或预防该病的发展。术语“患有充血性心力衰竭”包括这样的患者,他们尽管可能尚未遭受充血性心力衰竭,但由于显示出风险因素,他们相对于大众来说有遭受这种病况的风险。例如,患有未经治疗的高血压的患者可能尚未遭受充血性心力衰竭,但他或她因其高血压情况而处于风险中。在本发明的一个实施方案中,用抗体阿达木单抗来治疗有发展充血性心力衰竭的风险的受试者。

[0379] 3. 急性冠状动脉综合征

[0380] TNF α 被指涉及急性冠状动脉综合征的病理生理(参见 Libby (1995) *Circulation* 91 :2844)。急性冠状动脉综合征包括那些因血流受阻导致达到心脏的氧不足而使受试者感受疼痛的病症。研究发现 TNF α 在急性冠状动脉综合征中起作用。例如,在能够在没有下游血液动力学作用存在下诱导心肌梗死的新大鼠异向心脏移植-冠状动脉结扎模型中,嵌合可溶性 TNF 受体 (sTNFR) 的给予消除了暂时的 LV 重塑和机能障碍 (Nakamura, et al. (2003) *J. Cardiol.* 41 :41)。还发现在急性心肌梗死 (AMI) 实验型大鼠中,对心肌直接注射 sTNFR 表达质粒导致了梗死大小的减小 (Sugano et al. (2002) *FASEB J* 16 :1421)。

[0381] 在一个实施方案中,将 TNF α 抗体用于治疗或预防受试者中的急性冠状动脉综合征,其中该急性冠状动脉综合征是心肌梗死或心绞痛。

[0382] 本文所用的术语“心肌梗死”或“MI”指的是心脏病发作。心肌梗死涉及到因对心脏某个区域的供氧不足导致的该区域的坏死或持久性损害。这一坏死通常是因冠状动脉中由动脉粥样硬化或栓子所致的阻塞造成的。通过用本发明方法获得的 TNF α 抗体进行治疗的 MI,包括 Q 波和非 Q 波心肌梗死。大部分的心脏病发作是因阻断冠状动脉(将血液和氧带到心肌的血管)之一的血块造成的。例如,冠状动脉中的血块会中断血和氧向心肌的流动,导致该区域中的心脏细胞死亡。受损的心肌永久丧失其收缩能力,剩余的心肌需要补偿它。MI 还可能因个体中的不可抗拒的压力造成。

[0383] 术语“绞痛”指的是痉挛性、憋闷性或令人窒息的疼痛,特别是指心绞痛,即最通常来说因心肌缺氧导致的阵发性胸痛。绞痛包括变异型绞痛和劳累性绞痛。患有绞痛的受试者存在缺血性心脏病,表现为通常放射至左肩并沿左臂放射的突发、严重、压迫性胸骨下疼痛。TNF α 被指涉及心绞痛,因为 TNF α 水平在患有 MI 和稳定心绞痛的患者中受到上调 (Balbay et al. (2001) *Angiology* 52:109)。

[0384] 4. 动脉粥样硬化

[0385] 本文所用的“动脉粥样硬化”指的是脂肪物质沿动脉壁沉积的病况。这一脂肪物质使动脉增厚、变硬并且最终可能阻断动脉。动脉粥样硬化也称作动脉硬化、动脉变硬和动脉斑块累积。已经证实抗 TNF α 的多克隆抗体在家兔动脉粥样硬化模型中可有效中和导致炎症和再狭窄的 TNF α 活性 (Zhou et al., 出处同上)。因此, TNF α 抗体可用于治疗或预

防患有脉粥样硬化或由发生动脉粥样硬化的风险的受试者。

[0386] 5. 心肌病

[0387] 本文所用的术语“心肌病”用以定义心肌的疾病，其中心脏肌肉或者说心肌被削弱，通常导致心脏泵血不足。心肌病可能因病毒感染、心脏病发作、酒精中毒、长期的严重高血压或自身免疫原因所造成。

[0388] 在大约 75-80% 的心力衰竭患者中，冠状动脉疾病是心肌病的潜在性原因，因而被称作“缺血性心肌病”。缺血性心肌病是因心脏病发作造成的，心脏病发作会在心脏肌肉或者说心肌中遗留瘢痕。受损的心肌随后不能对心脏泵血功能起作用。瘢痕越大或心脏病发作的次数越多，则发展缺血性心肌病的机会越高。

[0389] 并非因潜在性冠状动脉疾病导致的心肌病称作“非缺血性心肌病”。非缺血性心肌病包括但不限于特发性心肌病、肥厚性心肌病、酒精性心肌病、扩张性心肌病、围产期心肌病和限制型心肌病。

[0390] I. 脊椎关节病

[0391] TNF α 被指涉及众多病症的病理生理，包括炎性疾病如脊椎关节炎（参见例如 Moeller et al. (1990) Cytokine 2 :162 ;美国专利 5, 231, 024 ;欧洲专利公开号 260 610)。本发明提供了用于抑制患有脊椎关节病的受试者中的 TNF α 活性的多变剂量方法，该方法包括对该受试者给予抗体、抗体部分，使得患有脊椎关节病的该受试者中的 TNF α 活性得到抑制。

[0392] 本文所用的术语“脊椎关节病”用以指影响脊柱关节的几种疾病中的任何一种，这类疾病共有共同的临床、放射学和组织学特征。有许多脊椎关节病共有遗传特征，即它们与 HLA-B27 等位基因相关。在一个实施方案中，术语脊椎关节病用以指影响脊柱关节的几种疾病中的任何一种，但不包括强直性脊柱炎，这类疾病共有共同的临床、放射学和组织学特征。脊椎关节病的实例包括强直性脊柱炎、牛皮癣性关节炎 / 脊椎炎、肠病性关节炎、反应性关节炎或莱特尔综合征和未分化脊椎关节病。用于研究脊椎关节病的动物模型的实例包括 ank/ank 转基因小鼠、HLA-B27 转基因大鼠（参见 Taurog et al. (1998) The Spondylarthritides. Oxford :Oxford University Press）。

[0393] 本发明的多变剂量方法还可以用于使用多变剂量方法治疗有发展脊椎关节病的风险的受试者。有患脊椎关节病的风险的受试者的实例包括患有关节炎的人。可将脊椎关节病与其它形式的关节炎相关联，包括类风湿性关节炎。在本发明的一个实施方案中，将抗体用在多变剂量方法中用于治疗遭受与类风湿性关节炎相关的脊椎关节病的受试者。可用 TNF α 抗体治疗的脊椎关节病的实例如下所述：

[0394] 1. 强直性脊椎炎 (AS)

[0395] 肿瘤坏死因子被指涉及强直性脊柱炎的病理生理（参见 Verjans et al. (1991) Arthritis Rheum. 34 :486 ;Verjans et al. (1994) Clin Exp Immunol. 97 :45 ;Kaijtz et al. (1999) Hum Immunol. 60 :140)。强直性脊柱炎 (AS) 是涉及一个或多个椎骨的炎症的炎性疾病。AS 是一种慢性炎性疾病，影响中轴骨骼和 / 或周围关节，包括脊柱椎骨与骶髂关节之间的关节和脊柱与骨盆之间的关节。AS 最终会造成受侵害的椎骨融合或长在一起。可将脊椎关节病（包括 AS）与牛皮癣性关节炎 (PsA) 和 / 或炎症性肠病 (IBD)（包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病）相关联。

[0396] AS 的早期表现症状可通过放射照相试验来确定,包括 CT 扫描和 MRI 扫描。AS 的早期表现症状通常包括骶髂关节炎 (sacroiliitis) 和骶髂 (sacroiliac) 关节变化,这由软骨下骨皮质边缘发生模糊并随后发生侵蚀和硬化所显示。还指出疲劳是 AS 的常见症状 (Duffy et al. (2002) ACR66th Annual Scientific Meeting Abstract)。因此,可使用包括给予本发明抗体或其抗原结合片段的多变剂量方法来治疗 AS。

[0397] 在一个实施方案中,将本发明的多变剂量方法用于治疗与 IBD 相关的脊椎关节病,包括 AS。AS 通常是用非类固醇类抗炎药 (NSAIDs) 如阿司匹林或吲哚美辛来治疗。因此,还可将用于本发明多变剂量方法的 TNF α 抗体,与常用于减轻通常与强直性脊柱炎相关的炎症和疼痛的药剂进行联合给药。

[0398] 2. 牛皮癣关节炎

[0399] 肿瘤坏死因子被指涉及牛皮癣性关节炎 (PsA) 的病理生理 (Partsch et al. (1998) Ann Rheum Dis. 57 :691 ;Ritchlin et al. (1998) JRheumatol. 25 :1544)。本文所指的与皮肤相关的牛皮癣性关节炎或银屑病,指的是与银屑病相关的慢性炎症性关节炎,银屑病是一种在身体上产生红斑的常见慢性皮肤病。在 20 位患有银屑病的个体中约有 1 位随皮肤病发生关节炎,并且在约 75% 的病例中,银屑病比关节炎先发生。PsA 的表现症状有多种,从中度关节炎到重度关节炎,其中关节炎通常影响手指和脊柱。当脊柱受影响时,症状与如上所述的强直性脊柱炎的症状相似。可将用本发明获得的 TNF α 抗体或其抗原结合片段用于治疗 PsA。

[0400] PsA 有时与残毁性关节炎相关。残毁性关节炎指的是这样的病症,其特征在于骨质侵蚀过度,导致明显的 (gross) 侵蚀性畸形,以致于毁伤关节。在一个实施方案中,可将用本发明方法获得的抗体用于治疗残毁性关节炎。

[0401] 3. 反应性关节炎 / 莱特尔综合征

[0402] 肿瘤坏死因子被指涉及反应性关节炎的病理生理,反应性关节炎也称作莱特尔综合征 (Braun et al. (1999) Arthritis Rheum. 42(10) :2039)。反应性关节炎 (ReA) 指的是通常在肠或泌尿生殖器感染后在身体其他部位并发感染的关节炎。ReA 通常以某些临床症状为特征,包括关节发炎 (关节炎)、尿道炎、结膜炎及皮肤和粘膜病变。另外,ReA 可在性传播疾病感染或痢疾感染后出现,包括衣原体属、弯曲杆菌属、沙门氏菌属或耶尔森氏菌属感染。因此,可将用本发明方法获得的抗体用于治疗 ReA。

[0403] 4. 未分化脊椎关节病

[0404] 在一个实施方案中,将用本发明方法获得的抗体用于治疗患有未分化脊椎关节病的受试者 (参见 Zeidler et al. (1992) Rheum Dis Clin North Am. 18 :187)。其它用于描述未分化脊椎关节病的术语包括血清反应阴性寡关节性关节炎 (oligoarthritis) 和未分化寡关节性关节炎。本文所用的未分化脊椎关节病指的是其中受试者仅表现出一些与脊椎关节病相关的症状的病症。这种病况通常在未患 IBD、银屑病或者没有 AS 或莱特尔综合征的典型症状的年轻成年人中观察到。在一些情况中,未分化脊椎关节病可能是 AS 的早期指征。在一个实施方案中,本发明包括用提出权利要求的方法获得的 TNF α 抗体或其抗原结合片段来治疗未分化脊椎关节病。

[0405] J. 代谢紊乱

[0406] TNF α 被指涉及多种病症的病理生理,包括代谢紊乱如糖尿病和肥胖 (Spiegelman

and Hotamisligil(1993)Cell 73 :625 ;Chu et al. (2000)Int J Obes Relat Metab Disord. 24 :1085 ;Ishii et al. (2000)Metabolism. 49 :1616)。本文所用的术语“代谢紊乱”指的是影响身体对执行生理功能所需的物质的处理的疾病或病症。代谢紊乱的实例包括但不限于糖尿病和肥胖。在本发明的一个实施方案中,术语“代谢紊乱”用以指影响身体对执行生理功能所需的物质的处理的病症,但不包括自身免疫性糖尿病。

[0407] 本发明提供了用于抑制患有这种代谢紊乱的受试者中的 TNF α 活性的方法,该方法包括对该受试者给予抗体、抗体部分,使得患有代谢紊乱的该受试者中的 TNF α 活性得到抑制。TNF α 抗体还可用于治疗有发展代谢紊乱的风险的受试者。

[0408] 代谢紊乱通常与关节炎相关,包括类风湿性关节炎。在一个实施方案中,抗 TNF α 抑制剂如抗体用于患有与类风湿性关节炎相关的代谢紊乱的受试者的多剂量方案中。在另一个实施方案中,本发明包括给予 TNF α 抗体以治疗与糖尿病或肥胖相关的病症。

[0409] 用于评价 TNF α 抗体治疗代谢紊乱的功绩的动物模型的实例,包括 NOD 转基因小鼠、Akita 小鼠、NSY 转基因小鼠和 ob/ob 小鼠(参见 Baeder et al. (1992)Clin Exp Immunol. 89 :174 ;Haseyama et al. (2002)Tohoku J Exp Med. 198 :233 ;Makino et al. (1980) ;Exp. Anim. 29 :1 ;Kolb(1987)Diabetes/Metabolism Reviews 3 :751 ;Hamada et al. (2001)Metabolism. 50 :1282 ;Coleman, (1978)Diabetologia, 14 :141 ;Bailey et al. (1982)Int. J. Obesity 6 :11)。用于研究血管炎的动物模型的实例包括小鼠 HSV 模型(贝切特病)、小鼠干酪乳芽孢杆菌(L. Casei)模型(川崎病)和小鼠 ANCA 模型(川崎病)。血管炎的其他模型包括 Mch5-1pr/1pr 品系(Nose et al. (1996)Am. J. Path. 149 :1763)和小鼠的 SCG/Kj 品系(Kinjoh et al. (1993)Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90 :3413)。这些小鼠品系会自发发展新月体性肾小球肾炎及脾、胃、心脏、子宫和卵巢的小动脉和细动脉的坏死性血管炎。这些动物会发生高 γ -球蛋白血症和产生能与髓过氧化物酶(MPO)反应的 ANCA 自身抗体。另外,给大鼠免疫接种人 MPO 会导致 ANCA 相关的坏死性新月体性肾小球肾炎(Brouwer et al. (1993)J. Exp. Med. 177 :905)。

[0410] 代谢紊乱影响着身体如何处理执行生理功能所需的物质。本发明的多种代谢紊乱共有某些特征,即它们与胰岛素抗性、调节血糖的能力的缺乏、增重和体重指数的增加相关。代谢紊乱的实例包括糖尿病和肥胖。糖尿病的实例包括 I 型糖尿病、II 型糖尿病、糖尿病性神经病、外周神经病、糖尿病性视网膜病、糖尿病性溃疡、视网膜病溃疡、糖尿病性大血管病和肥胖。下文更详细地描述可用多剂量方法(包括给予 TNF α 抗体)进行治疗的代谢紊乱的实例:

[0411] 1. 糖尿病

[0412] 肿瘤坏死因子被指涉及糖尿病的病理生理。(参见例如 Navarro et al. (2003)Am J Kidney Dis. 42 :53 ;Daimon et al. (2003)Diabetes Care. 26 :2015 ;Zhang et al. (1999)J Tongji Med Univ. 19 :203 ;Barbieri et al. (2003)Am J Hypertens. 16 :537)。例如, TNF α 被指涉及胰岛素抗性的病理生理。已经发现患有胃肠癌患者的血清 TNF 水平与胰岛素抗性相关(参见例如 McCall et al. (1992)Br. J. Surg. 79 :1361)。

[0413] 术语“糖尿病(diabetes)”或“糖尿病症(diabetes disorders)”或“糖尿病(diabetes mellitus)”在本文中可以互换使用,指的是以血液中糖(葡萄糖)水平升高为标志的疾病。糖尿病可因胰岛素(胰腺产生的调节血糖的化学物质)过少、胰岛素抗性导致

或它们两者共同导致。糖尿病包括两种最常见类型的病症，即 I 型糖尿病和 II 型糖尿病，两种均因身体不能调节胰岛素所致。胰岛素是胰腺响应血液中血糖（葡萄糖）水平升高而释放的激素。

[0414] 本文所用的术语“I 型糖尿病”指的是当胰腺产生的胰岛素过少而无法适当调节血糖水平时发生的慢性疾病。I 型糖尿病也称作胰岛素依赖性糖尿病 (IDDM)、青少年型糖尿病和糖尿病 I 型。I 型糖尿病是胰腺 β 细胞的进行性自身免疫性破坏和随后发生的胰岛素缺乏的结果。

[0415] 本文所用的术语“II 型糖尿病”指的是当胰腺不能制造足够的胰岛素来保持血液葡萄糖水平正常时发生的慢性疾病，通常是因为身体不能很好地对胰岛素做出响应。II 型糖尿病也称作非胰岛素依赖性糖尿病 (NDDM) 和糖尿病 -II 型。

[0416] 糖尿病可通过进行葡萄糖耐量试验来诊断。在临床上，通常将糖尿病分成几个基本类别。这些类别中的主要实例包括自身免疫性糖尿病、非胰岛素依赖性糖尿病 (I 型 NDDM)、胰岛素依赖性糖尿病 (II 型 IDDM)、非自身免疫性糖尿病、非胰岛素依赖性糖尿病 (II 型 NIDDM) 和年轻的成人发病型糖尿病 (MODY)。另一种通常被称作继发性的类别，指的是由某些会导致或使得糖尿病综合征发展的可鉴别条件所导致的糖尿病。继发性类别的实例包括因胰腺疾病、激素异常导致的糖尿病、药物或化学物质诱导的糖尿病、胰岛素受体异常导致的糖尿病、与遗传综合征相关的糖尿病和其它原因的糖尿病。（参见例如 Harrison's (1996) 14th ed., New York, McGraw-Hill）。

[0417] 糖尿病通常是通过膳食、胰岛素用药和本文所述的各种药物来治疗。因此，还可将 TNF α 抗体与常用于治疗通常与糖尿病相关的代谢紊乱和疼痛的药剂进行联合给药。

[0418] 此外，本文所用的术语“与糖尿病相关的病症”指的是通常与糖尿病相关或有关的病况和其它疾病。与糖尿病相关的病症的实例包括例如高血糖症、胰岛素过多、高脂血症、胰岛素抗性、葡萄糖代谢受损、肥胖、糖尿病性视网膜病、黄斑变性、白内障、糖尿病性肾病、肾小球硬化症、糖尿病性神经病、勃起功能障碍、月经前期综合征、血管再狭窄、溃疡性结肠炎、冠心病、高血压、心绞痛、心肌梗死、中风、皮肤和结缔组织病、足部溃疡、代谢性酸中毒、关节炎和骨质疏松症。

[0419] 糖尿病自身表现在上述各类别，并可导致以下章节中论述到的几种并发症。因此，可用本发明的抗体或其抗原结合片段来治疗糖尿病。在一个实施方案中，将 TNF α 抗体或其抗原结合片段用于治疗以上所述各类别的糖尿病。在另一个实施方案中，本发明包括给予 TNF α 抗体来治疗与糖尿病相关的病症。糖尿病自身表现在许多与其相关的并发症和病况，这些并发症和病况包括下列类型：

[0420] a. 糖尿病性神经病和外周神经病

[0421] 肿瘤坏死因子被指涉及糖尿病性神经病和外周神经病的病理生理。（参见 Benjafield et al. (2001) Diabetes Care. 24 :753 ; Qiang et al. (1998) Diabetologia. 41 : 1321 ; Pfeiffer et al. (1997) Horm Metab Res. 29 :111）。

[0422] 本文所用的术语“神经病”也称作神经损伤性糖尿病，指的是糖尿病的常见并发症，其中神经因为高血糖症（高血糖水平）而受损。有多种糖尿病神经病已被认识，如远端感知运动多神经病、局灶性运动神经病和自主神经病。

[0423] 术语“周围神经病”也称作周围神经炎和糖尿病性神经病，指的是神经不能将信息

携带进出大脑和脊髓。外周神经病会产生诸如疼痛、感觉缺失和无能控制肌肉的症状。在一些情况中,神经不能控制血管、肠功能和其它器官会导致异常血压、消化和其它基本无意识过程的丧失。外周神经病可涉及到对单个神经或神经簇的损害(单一神经病变),或者可影响多个神经(多神经病)。

[0424] 影响交感神经和副交感神经的小的有髓鞘和无髓鞘纤维的神经病称作“外周神经病”。此外,也称作周围神经炎和糖尿病性神经病的外周神经病相关病症,指的是神经不能将信息携带进出大脑和脊髓。这会产生诸如疼痛、感觉缺失和无能控制肌肉的症状。在一些情况中,神经不能控制血管、肠功能和其它器官会导致异常血压、消化和其它基本无意识过程的丧失。外周神经病可涉及到对单个神经或神经簇的损害(单一神经病变),或者可影响多个神经(多神经病)。

[0425] 术语“糖尿病性神经病”指的是糖尿病的常见并发症,其中神经因为高血糖症(高血糖水平)而受损。糖尿病性神经病也称作神经病和神经受损性糖尿病。有多种糖尿病神经病已被认识,如远端感知运动多神经病、局灶性运动神经病和自主神经病。

[0426] b. 糖尿病性视网膜病

[0427] 肿瘤坏死因子被指涉及糖尿病性视网膜病的病理生理(Scholz et al. (2003) Trends Microbiol. 11 :171)。本文所用的术语“糖尿病性视网膜病”指的是因长期糖尿病导致的眼视网膜进行性损伤。糖尿病性视网膜病包括增殖性视网膜病。增殖性视网膜病又包括新生血管形成、视网膜前出血(peritinal hemmorrhave)和视网膜剥离(retinal detachment)。

[0428] 在晚期视网膜病中,小血管在视网膜表面上增殖。这些血管脆弱,倾向于出血并且会导致视网膜前出血(periretinal hemmorrhages)。出血会使视力模糊,并且当出血被再吸收时会形成纤维组织,易使视网膜剥离和失明。另外,糖尿病性视网膜病包括增殖性视网膜病,后者包括新生血管形成、视网膜前出血(peritinal hemmorrhave)和视网膜剥离(retinal detachment)。糖尿病性视网膜病还包括“背景性视网膜病”,其涉及在各层视网膜出现变化。

[0429] c. 糖尿病性溃疡和视网膜病溃疡

[0430] 肿瘤坏死因子被指涉及糖尿病性溃疡的病理生理(参见 Lee et al. (2003) Hum Immunol. 64 :614 ;Navarro et al. (2003) Am J Kidney Dis. 42 :53 ;Daimon et al (2003) Diabetes Care. 26 :2015 ;Zhang et al. (1999) J Tongji Med Univ. 19 :203 ;Barbieri et al. (2003) Am J Hypertens. 16 :537 ;Venn et al. (1993) Arthritis Rheum. 36 :819 ;Westacott et al. (1994) J Rheumatol. 21 :1710)。

[0431] 本文所用的术语“糖尿病性溃疡”指的是作为糖尿病并发症产生的溃疡。溃疡是由炎症、感染、恶性病况或代谢紊乱导致的皮肤或粘膜上的凹坑样(crater-like)病变。通常,糖尿病性溃疡见于肢体和肢端,更通常见于足部。这些因糖尿病性病况如神经病和血管机能障碍所导致的溃疡,会导致局部缺血和损伤难以愈合。更广泛的溃疡会发展成骨髓炎。一旦骨髓炎发生,则难以使用单独的抗生素根治,可能需要进行截肢。

[0432] 本文所用的术语“视网膜病溃疡”指的是导致或造成眼和眼视网膜损害的溃疡。视网膜病溃疡可包括这类具有视网膜(retinoathic)出血的疾病。

[0433] d. 糖尿病性大血管病

[0434] 肿瘤坏死因子被指涉及糖尿病性大血管病的病理生理 (Devaraj et al. (2000) *Circulation*. 102 :191 ;Hattori et al. (2000) *Cardiovasc Res*. 46 :188 ;Clausell et al. (1999) *Cardiovasc Pathol*. 8 :145)。本文所用的术语“糖尿病性大血管病”也称作“大血管疾病”，指的是因糖尿病导致的血管疾病。糖尿病性大血管病并发症在例如脂肪和血块在大血管中累积并粘附于血管壁时发生。糖尿病性大血管病包括诸如冠状动脉疾病、脑血管病和外周血管性疾病、血糖过多和心血管疾病和中风这类疾病。

[0435] 2. 肥胖

[0436] 肿瘤坏死因子被指涉及肥胖的病理生理 (参见例如 Pihlajamaki Jet al. (2003) *Obes Res*. 11 :912 ;Barbieri et al. (2003) *Am J Hypertens*. 16 :537 ;Tsuda et al. (2003) *J Nutr*. 133 :2125)。本文所用的术语“肥胖”指的是受试者与瘦体重相比具有过量体脂肪的病况。在一个实施方案中，肥胖指的是个体体重超过适合其身高的最大体重至少约 20% 或 20% 以上的病况。当成年人为超重 100 磅以上时，认为他或她是“病态肥胖”。在另一个实施方案中，将肥胖定义为 BMI (体重指数) 超过 30kg/m²。肥胖会因为糖尿病、中风、冠状动脉疾病、高血压、高胆固醇及肾和胆囊病症而增加人患病和死亡的风险。肥胖还会增加发生一些类型的癌症的风险，且可能是发生骨关节炎和睡眠性呼吸暂停的风险因素。

[0437] K. 贫血

[0438] TNF α 被指涉及各种贫血的病理生理 (参见例如 Jongen-Lavrencic et al. (1997) *J. Rheumatol*. 24 :1504 ;Demeter et al. (2002) *Ann Hematol*. 81 :566 ;DiCato (2003) *The Oncologist* 8(suppl 1) :19)。本发明提供了用于抑制患有贫血的受试者中的 TNF α 活性的方法，该方法包括对该受试者给予抗体、抗体部分，使得该患有贫血的受试者中的 TNF α 活性得到抑制。在一个实施方案中，贫血与类风湿性关节炎相关。

[0439] 本文所用的术语“贫血”指的是血液中的循环红细胞数量异常低或血红蛋白浓度异常降低。与类风湿性关节炎相关的贫血的实例包括例如慢性疾病的贫血、缺铁性贫血和自体免疫溶血性贫血。在一个实施方案中，本发明提供了治疗例如以下贫血的方法：与类风湿性关节炎有关的贫血；感染和慢性炎症疾病的贫血；缺铁性贫血；自体免疫溶血性贫血；骨髓病性贫血；再生障碍性贫血；发育不全性贫血；单纯红细胞再生障碍和与肾衰竭或内分泌障碍相关的贫血；巨幼红细胞贫血；亚铁血红素或球蛋白合成缺陷；因红细胞结构缺陷导致的贫血，例如镰状细胞贫血和未知来源的贫血，诸如铁粒幼红细胞贫血；与慢性感染如疟疾、锥虫病、HIV、肝炎病毒或其它病毒相关的贫血；因骨髓缺乏导致的骨髓病性贫血。

[0440] 用于研究贫血的动物模型的实例包括接种了肽聚糖 - 多糖聚合物的大鼠 (参见 Coccia et al., (2001) *Exp Hematology*. 29 :1201-1209)。用于研究疼痛的动物模型的实例为本领域众所周知，包括大鼠坐骨神经结扎模型和大鼠脊椎神经节段结扎模型 (参见 Bennett and Zie, (1988) *Pain*. 33 :87-107 ;Kim and Chung, (1992) *Pain* 50 :355-363)。

[0441] L. 疼痛

[0442] TNF α 被指涉及各种疼痛综合症的病理生理 (参见例如 Sorokin et al. (1997) *Neuroscience*. 81 :255 ;Huygen et al. (2002) *Mediators Inflamm*. 11 :47 ;Parada et al. (2003) *Eur J Neurosci*. 17 :1847)。本文所用的术语“疼痛”指的是所有类型的疼痛。该术语应指急性和慢性疼痛，诸如神经病性疼痛和术后痛、慢性下背痛、丛集性头痛、疱疹神经痛、幻肢痛、中枢性痛、牙痛、阿片样物质抗性疼痛、内脏痛、手术痛、骨损伤痛、分娩和生

产过程中的疼痛、因灼伤（包括晒伤）导致的疼痛、产后痛、偏头痛、心绞痛和与泌尿生殖道相关的疼痛（包括膀胱炎）。该术语还包括伤害感受性疼痛或伤害感受。

[0443] 本发明提供了用于抑制患有疼痛病症的受试者中的 TNF α 活性的方法，该方法包括对该受试者给予抗体、抗体部分，使得该患有疼痛的受试者中的 TNF α 活性得到抑制。疼痛以各种方式进行定义，包括伤害感受性疼痛和神经病性疼痛。最常经历的疼痛形式可定义为对刺激神经末梢的作用，这种作用导致冲动传播至大脑。疼痛还通常与炎性病症有关，包括例如类风湿性关节炎。在一个实施方案中，将本发明的抗体用于治疗患有与类风湿性关节炎相关的疼痛的受试者。下文进一步讨论其中 TNF α 有害的疼痛病症的实例。

[0444] 1. 神经病性疼痛

[0445] 肿瘤坏死因子被指涉及神经病性疼痛的病理生理（参见 Sommer (1999) *Schmerz*. 13 :315 ;Emp1 et al., (2001) *Neurology*. 56 :1371 ;Schafers et al. (2003) *J Neurosci*. 23 :3028）。本文所用的术语“神经病性疼痛”指的是因神经、脊髓或大脑受损导致的疼痛，且通常涉及神经超敏反应。神经病性疼痛的实例包括慢性下背痛、与关节炎相关的疼痛、与癌症相关的疼痛、疱疹神经痛、幻肢痛、中枢性痛、阿片样物质抗性疼痛、骨损伤痛及分娩劳累和生产中的疼痛。神经病性疼痛的其它实例包括术后痛、丛集性头痛、牙痛、手术痛、因重度例如三度烧伤导致的疼痛、产后痛、心绞痛、与泌尿生殖道相关的疼痛（包括膀胱炎）。

[0446] 神经病性疼痛与伤害感受性疼痛不同。涉及伤害感受性机制的疼痛其持续时间通常限于组织修复期，一般可以通过可买到的止痛药或阿片样物质而缓解（Myers (1995) *Regional Anesthesia* 20 :173）。神经病性疼痛一般持续时间较长或为慢性，并且通常在最初的急性组织损伤后数天或数月发生。神经病性疼痛可涉及持续性的自发性疼痛以及异常性疼痛，后者是对一般不引起疼痛的刺激物的疼痛反应。神经病性疼痛还可以以痛觉过敏为特征，痛觉过敏是对通常微不足道的疼痛刺激（如针刺）的强化反应。与伤害感受性疼痛不同的是，神经病性疼痛一般来说对阿片样物质疗法有抗性（Myers, 出处同上, 1995）。因此，可将用本发明方法获得的抗体用来治疗神经病性疼痛。

[0447] 2. 伤害感受性疼痛

[0448] 本文所用的术语“伤害感受性疼痛”指的是通过完整神经元途经传播的疼痛，即因对身体产生损伤导致的疼痛。伤害感受性疼痛包括疼痛的躯体感觉和正常功能，它告知受试者即将发生组织损害。存在感受伤害性途经是为了保护受试者，例如对烧伤作出响应而经历到的疼痛）。伤害感受性疼痛包括骨痛、内脏痛和与软组织相关的疼痛。

[0449] 肿瘤坏死因子被指涉及内脏疼痛的病理生理（参见 Coelho et al. (2000) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 279 :G781 ;Coelho et al. (2000) *Brain Res Bull*. 52 :223）。内脏疼痛用以指由 A- δ 和 C 神经纤维上的受体介导的伤害感受性疼痛。A- δ 和 C 神经纤维位于皮肤、骨、结缔组织、肌肉和内脏中。内脏痛可分布不定，间歇发作，在性质上通常被描述为深在的、疼痛的、挤压性的和疝气性的内脏痛。内脏痛的实例包括与心脏病发作相关的疼痛，其中内脏痛可以在臂、颈和 / 或背部感觉到；和肝包膜疼痛，其中内脏痛可以在背部和 / 或右肩中感觉到。因此，可将用本发明方法获得的抗体用来治疗内脏痛。

[0450] M. 肝病

[0451] TNF α 被指涉及各种肝病的病理生理 (参见例如 Colletti et al. (1990) *J Clin Invest.* 85 :1936 ;Tiegs (1997) *Acta Gastroenterol Belg.* 60 :176 ;Fernandez et al. (2000) *J Endotoxin Res.* 6 :321)。本发明提供了用于抑制患有这类肝病的受试者中的 TNF α 活性的方法。

[0452] 本文所用的术语“其中 TNF α 活性有害的肝病”用以包括干燥的疾病和其它病症或者与肝细胞损伤或胆管病症相关的病况,其中 TNF α 在患有该病症的受试者中的存在已被证明或正被怀疑是造成该病症的病理生理的原因或者是促使该病症恶化的因素。因此,其中 TNF α 活性有害的肝病是这样的病症,其中对 TNF α 活性的抑制预期能缓解肝病的症状和 / 或发展。在一个实施方案中,肝病指的是人肝脏疾病或与肝细胞损伤或胆管病症相关的疾病,但不包括肝炎、酒精性肝炎和病毒性肝炎。

[0453] 用于使用多变剂量方法来评价某药剂治疗肝病的治疗功效的动物模型的实例,包括黑猩猩丙型肝炎病毒模型 (参见 Shimizu et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci. USA* 87 :6441)。用于研究皮肤和指甲病症的动物模型的实例,包括例如重度合并型免疫缺陷 (SCID) 小鼠模型 (银屑病) 和 Smith 品系 (SL) 小鸡和脱色素小鼠 (白癫风) (参见 Nickoloff (2000) *Investig Dermatol Symp Proc.* 5 :67 ;Austin et al. (1995) *Am J Pathol.* 146 :1529 ;Lerner et al. (1986) *J Invest Dermatol.* 87 :299)。

[0454] 肝病包括许多其中肝功能异常或停止起作用的疾病和病症。肝细胞损伤可包括酒精性肝硬变、 α 1 抗胰蛋白酶缺乏、自身免疫性肝硬化、隐源性肝硬化、暴发性肝炎、乙型肝炎和丙型肝炎和脂肪肝炎。胆管病症的实例包括囊性纤维化、原发性胆汁性肝硬变、硬化性胆管炎和胆道阻塞 (Wiesner (1996) “Current Indications, Contra Indications and Timing for Liver Transplantation” in *Transplantation of the Liver*, Saunders (publ.) ;Busuttil and Klintmalm (eds.) Chapter 6 ;Klein (1998) *Partial Hypertension :The Role of Liver Transplantation*, Musby (publ.) in *Current Surgical Therapy* 6. sup. th Ed. Cameron, J. (ed)。

[0455] 术语“肝炎”指的是肝脏的炎症。肝炎可以因感染各种生物体,包括细菌、病毒 (甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎等) 或寄生虫而导致。诸如酒精、药物或毒蘑菇的化学毒素也会损害肝脏而导致其发炎。肝炎的罕见但极端危险的原因在于乙酰氨基酚 (泰诺林) 服用过量,这是致命的。此外,体内的免疫细胞会攻击肝脏而导致自身免疫型肝炎。肝炎可快速消退 (急性肝炎) 或可导致长期疾病 (慢性肝炎)。在一些情况中,会发生进行性肝损伤或肝衰竭。肝炎的发病率和严重程度随许多因素而异,包括肝损伤的原因和患者中的任何潜在疾病。

[0456] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗其中 TNF α 活性有害的肝病的方法,该方法包括对受试者给予有效量的 TNF α 抑制剂,所述的有效量先为诱导剂量,随后为治疗剂量,以使所述病症得到治疗。在一个实施方案中,肝病选自丙型肝炎 ;自身免疫性肝炎 ;脂肪肝病 ;乙型肝炎病毒 ;肝毒性和非酒精性肝炎,包括非酒精性脂肪肝炎 (NASH)。

[0457] 下文进一步讨论肝病的实例。

[0458] 1. 丙型肝炎病毒 (HCV)

[0459] 肿瘤坏死因子被指涉及丙型肝炎病毒的病理生理 (参见 Gonzalez-Amaro. (1994) *J Exp Med.* 179 :841 ;Nelson et al. (1997) *Dig Dis Sci* 42 :2487 ;Kallinowski et

al. (1998) *Clin Exp Immunol.* 111 :269)。术语“丙型肝炎病毒”或“HCV”用以描述为非甲非乙型肝炎的病原体的肝炎病毒。丙型肝炎病毒会导致肝脏的炎症。HCV 感染会导致丙型肝炎。丙型肝炎在急性期一般比乙型肝炎温和,但这类感染变成慢性的比例较大。HCV 是急性肝炎和慢性肝病的主要原因,包括肝硬化和肝癌。HCV 是病毒(甲、乙、丙、丁和戊型)之一,它们一起造成绝大部分的病毒性肝炎。它是黄病毒科中的有包膜 RNA 病毒,宿主范围似乎较窄。该病毒的重要特征在于其基因组的相对可突变性,而这一点又可能与诱导慢性感染的高倾向性(80%)相关。HCV 被分成几个不同的基因型,它们在确定疾病的严重程度和对治疗的反应方面具有重要性。在一个实施方案中,本发明提供了治疗 HCV 的多变剂量方法。

[0460] 2. 自身免疫性肝炎 (AIH)

[0461] 肿瘤坏死因子被指涉及自身免疫性肝炎的病理生理(参见 Cookson et al., (1999) *Hepatology* 30 :851 ;Jazrawi et al., (2003) *Liver Transpl.* 9 :377)。本文所用的“自身免疫性肝炎”指的是以劣种(rogue)免疫细胞引起的肝脏炎症为特征的肝病,所述劣种免疫细胞将肝脏的正常细胞错认为外来组织或病原体(致病物质)。自身免疫性肝炎通常导致肝实质的进行性破坏,如不治疗则死亡率较高(Johnson et al. (1993) *Hepatology*, 18 :998)。自身免疫性肝炎的特征之一是 90% 患者的血清中存在着循环的自身抗体。这类抗体可用来鉴定患有自身免疫性肝炎的受试者。

[0462] 根据患者之间的临床和血清学差异,将 AIH 分成两种类型。I 型的特征在于患者血清中存在着抗平滑肌抗体(SMA)和/或抗核心抗体(ANA),而来自 II 型患者的血清则显示抗肝肾微粒体抗体 I 型(LKM1)(Homberg et al., (1987) *Hepatology*, 7 :1333 ;Maggiore et al. (1993) *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.* 17 :376)。已经在 30% 的 AIH II 型患者中鉴定出抗肝胞质溶胶 I 型抗体(LC1)这一血清学标记。此外,LC1 被证实在 10% 的受试患者中是唯一的血清学标记(Martini et al. (1988) *Hepatology*, 8 :1662)。在一个实施方案中,将本发明的方法用于治疗 AIH。

[0463] 3. 脂肪肝病

[0464] 肿瘤坏死因子被指涉及脂肪肝病的病理生理(参见 Valenti et al., (2002) *Gastroenterology* 122 :274 ;Li et al., (2003) *Hepatology* 37 :343)。脂肪肝病指的是脂肪(肝细胞)在肝脏中过量蓄积的疾病。认为脂肪肝病是由营养过度、酒精摄入过度、糖尿病和服药所致副作用造成的。脂肪肝病可导致重度疾病,诸如慢性肝炎和肝硬化。在患有脂肪肝病的患者中,脂质特别是中性脂肪在肝细胞中蓄积至其量超过了生理允许范围的程度。从生化观点来看,判断脂肪肝的标准在于中性脂肪的重量为肝组织湿重的约 10% (100mg/g 湿重)或以上。在一个实施方案中,将本发明的方法用于治疗脂肪肝病。

[0465] 4. 乙型肝炎病毒 (HBV)

[0466] 肿瘤坏死因子被指涉及乙型肝炎病毒的病理生理(参见 Kasahara et al., (2003) *J Virol.* 77 :2469 ;Wang (2003) *World J Gastroenterol.* 9 :641 ;Biermer et al. (2003) *J Virol.* 77 :4033)。术语“乙型肝炎病毒”(HBV)用以描述在人体内产生病毒性乙型肝炎的病毒(血清型肝炎病毒)。这是一种具有长潜伏期(约 50-160 天)的病毒性疾病,与具有短潜伏期的甲型肝炎病毒(传染性肝炎病毒)相反。乙型肝炎病毒通常因注射了受感染的血液或血液衍生物或者仅使用了受污染的针头、柳叶刀或其它器械就传播。在临床和病理学

上,该病类似于甲型病毒性肝炎;然而没有交叉保护性免疫。感染后在血清中发现病毒抗原(HBAG)。

[0467] 乙型肝炎病毒以极高的速度感染人。大部分感染了乙型肝炎病毒的人可以在6个月内排除它,其中短期的感染称作乙型肝炎“急性”病例。据估计至少约3亿人为HBV慢性携带者。感染该病毒会产生多个临床症状,包括较小的流行性感冒样症状乃至死亡。在一个实施方案中,将本发明的多剂剂量方法用于治疗HBV感染。

[0468] 5. 肝毒性

[0469] 肿瘤坏死因子被指涉及肝毒性的病理生理(参见Brucoleri et al.(1997)Hepatology 25:133;Luster et al.(2000)Ann NY Acad Sci.919:214;Simeonova et al.(2001)Toxicol Appl Pharmacol.177:112)。术语肝毒性指的是因药物治疗和其它化学物质或药物导致的肝损伤。鉴定受试者中的肝毒性的最佳指标,是血液中某些酶测定值的升高,所述酶例如AST(天冬氨酸氨基转移酶)、ALT(丙氨酸氨基转移酶)和GOT(谷氨酸草酰乙酸转氨酶)。

[0470] 肝毒性会导致持久性损伤和死亡。肝毒性的最初症状可包括急性胃肠道症状,例如剧烈腹泻。肝毒性的第二阶段以症状的减轻为特征。在这一明显的消退过程中,出现肝损伤的生化迹象。在第二阶段过程中通常出现少尿(尿排出量减少)。第三阶段为明显的肝损伤,在摄入化学物质后3-5天在临床上变得明显,伴随出现黄疸。也可能发生肾衰竭。化学物质诱发的(药物诱发的)肝炎其症状与传染性肝炎相似。在一个实施方案中,将本发明的方法用于治疗肝毒性。

[0471] 6. 肝衰竭(例如慢性肝衰竭)

[0472] 肿瘤坏死因子被指涉及肝衰竭(例如慢性肝衰竭)的病理生理(参见Takenaka et al.,(1998)Dig Dis Sci.43:887;Nagaki et al.(1999)JHepatol.31:997;Streetz et al.,(2000)Gastroenterology.119:446)。肝衰竭,包括慢性肝衰竭在内,通常在数年内发生,它是因为对肝脏反复刺激(诸如酒精滥用或感染肝炎病毒)致使缓慢伤害肝脏造成的。较不常见的是,肝衰竭是急性的,在数天或数周时间内发生。急性肝衰竭的原因包括肝炎病毒感染、药物、妊娠、自身免疫性疾病和到达肝脏的血流量突然下降。在一个实施方案中,将本发明的方法用于治疗肝衰竭。

[0473] 7. 非酒精性肝炎,包括NASH

[0474] 肿瘤坏死因子被指涉及包括非酒精性脂肪肝炎在内的非酒精性肝炎的病理生理(参见Crespo et al.,(2001)Hepatology.34:1158;Pessayre et al.(2002)282(2):G193)。术语“非酒精性脂肪肝炎”或“NASH”指的是在肝脏中发生这样的组织学变化,它们与饮酒过量所诱发的变化相当,但它们不是在酒精滥用下诱发的。NASH的特征在于大泡和/或小泡脂肪变性、小叶和肝门炎症和偶发的马洛里小体伴纤维化和硬化。NASH通常还与高脂血症、肥胖和II型糖尿病有关。

[0475] 作为肝脏脂肪变性和炎症的特征的另外的临床状况,包括过度禁食、空肠改道术、完全亲代营养、慢性丙型肝炎、威尔逊氏病和不良药物反应,例如皮质类固醇、钙通道阻滞剂、高剂量合成雌激素、甲氨喋呤和胺碘酮所产生的不良反应。因此,术语‘非酒精性脂肪肝炎’可用于描述这样的患者,他们显示出这些活检发现结果,但又没有(a)大量酒精消费;(b)之外为减轻体重作过手术;(c)与脂肪肝炎相关的药物服用史;(d)遗传性肝病的迹象

或 (e) 慢性丙型肝炎感染 (参见例如 Ludwig et al., (1980) Mayo Clin. Proc. 55 :434 ; Powell et al. (1990) Hepatol. 11 :74)。在一个实施方案中,可用本发明方法获得的抗体用于治疗 NASH。

[0476] N. 皮肤和指甲病

[0477] 肿瘤坏死因子被指涉及皮肤和指甲病的病理生理。在一个实施方案中,给予用本发明方法获得的抗体来治疗皮肤和指甲病。术语“皮肤病症 (skin disorder)”或“皮肤病 (skin disease)”在本文中可以互换使用,指的是损伤性损伤以外的皮肤异常,这些异常引发了炎症状态。在一个实施方案中,本发明的皮肤病症是炎症性皮肤病,其中皮肤的特征在于毛细血管扩张、白细胞浸润、发红、发热和 / 或疼痛。皮肤病症的实例包括但不限于银屑病、寻常天疱疮、硬皮病、特应性皮炎、结节病、结节性红斑、化脓汗腺炎、扁平苔癣、斯威特综合征和白癫风。本文所用的术语“其中 TNF α 活性有害的皮肤和指甲病”用以包括皮肤和 / 或指甲病症和其它病症,其中 TNF α 在患有该病症的受试者中的存在已被证明或正被怀疑是造成该病症的病理生理的原因或者是促使该病症 (例如银屑病) 恶化的因素。因此,其中 TNF α 活性有害的皮肤和指甲病是对 TNF α 活性的抑制预期能缓解其症状和 / 或发展的病症。下文进一步讨论本发明的抗体、抗体部分和其它 TNF α 抑制剂在治疗具体的皮肤和指甲病中的用途。在某些实施方案中,如下所述将本发明的治疗方法与另一种治疗剂联用进行。在一个实施方案中,将用本发明方法获得的抗体与另一种治疗剂联用,用来治疗银屑病和与关节炎相关的银屑病。

[0478] 1. 银屑病

[0479] 肿瘤坏死因子被指涉及银屑病的病理生理 (Takematsu et al. (1989) Arch Dermatol Res. 281 :398 ; Victor and Gottlieb (2002) J Drugs Dermatol. 1 :264)。本文所用的术语“银屑病”指的是与表皮超常增生相关的皮肤病。银屑病的实例包括但不限于慢性斑块状银屑病、滴状银屑病、皮褶性银屑病、脓疱性银屑病、寻常型银屑病和红皮病型银屑病。银屑病还可能与炎性病症相关,包括炎性肠病 (IBD) 和类风湿性关节炎 (RA)。

[0480] 银屑病被描述为皮肤炎症 (刺激和发红),其特征在于皮肤上频繁发红、瘙痒和有增厚干燥的银屑。具体的说,有病变形成,这些病变涉及到表皮增殖的原发性和继发性改变、皮肤的炎性反应和调节分子如淋巴因子和炎性因子的表达。银屑病性皮肤在形态上的特征在于表皮细胞更新增加、表皮增厚、超常增生、炎性细胞浸润入表皮和多形核白细胞和淋巴细胞浸润入表皮层,导致基底细胞周期增加。银屑病通常涉及指甲,通常表现为孔蚀、指甲分离、增厚和脱色。银屑病通常与其它炎性病症相关,例如关节炎,包括类风湿性关节炎,炎性肠病 (IBD) 和克罗恩氏病。大约三分之一的银屑病患者也存在牛皮癣性关节炎 (PsA),后者如上所述能导致四肢强直、关节肿胀、疼痛和运动范围减小 (Greaves et al. (1995) N. Eng. J. Med. 332 :581)。

[0481] 银屑病的迹象最通常地可以在躯干、肘、膝、头皮、皮肤褶或指甲上观察到,但它可以影响皮肤的任何或所有部分。一般来说,新皮肤细胞需要约一个月才能从下层升至表面。在银屑病中,该过程仅需几天,导致死亡的皮肤细胞累积而形成厚鳞屑。银屑病的症状包括:皮肤斑片,其干燥或发红,覆盖有银色鳞屑、隆起皮肤斑片,伴有会开裂和变疼痛的发红边缘,且其通常位于肘、膝、躯干、头皮和手上;皮肤病变,包括脓疱、皮肤开裂和皮肤发红;关节疼痛或可能与关节炎如牛皮癣性关节炎相关的疼痛。

[0482] 银屑病的治疗通常包括局部用皮质类固醇、维生素 D 类似物和局部或口服类视黄醇或它们的组合。在一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体与这些普通治疗法之一联合给予,或者在这些普通治疗法之一存在下给予。可与用本发明方法获得的 TNF α 抗体联用以治疗银屑病的另外的治疗剂,在下文中作更详细的描述。

[0483] 银屑病的诊断通常是根据皮肤的外观。另外,可能需要进行皮肤活组织检查或者将皮肤斑片刮下进行培养来排除其它皮肤病。如果存在关节疼痛且持久,那么可将 X 射线用于检查牛皮癣性关节炎。

[0484] 可以根据受试者的银屑病面积和严重性指数评分 (PASI) 监测受试者银屑病的改善。PASI 的方法测定描述于 Fredriksson and Pettersson (1978) *Dermatologica* 157 :238 和 Marks et al. (1989) *Arch Dermatol* 125 :235。简单的说,该指数是基于对包括头、上肢、躯干和下肢在内的四个解剖部位进行红斑、硬结和脱屑方面的评价,使用 5 点等级 (0 = 无症状 ;1 = 轻度 ;2 = 中度 ;3 = 显著 ;4 = 极为显著)。根据指定解剖部位的病变程度,给受侵害区域指定一个数值 (0 = 0 ;1 = <10% ;2 = 10-29% ;3 = 30-49% ;4 = 50-69% ;5 = 70 = 89% ;6 = 90-100%)。然后计算 PASI 评分,其中 PASI 评分的可能范围在 0.0-72.0,最高评分代表最严重程度的红皮症。

[0485] 在本发明的一个实施方案中,将 TNF α 抗体用于治疗银屑病,包括慢性斑块状银屑病、滴状银屑病、皮褶性银屑病、脓疱性银屑病、寻常型银屑病、红皮病型银屑病、与炎症性肠病 (IBD) 相关的银屑病和与类风湿性关节炎 (RA) 相关的银屑病。在另一个实施方案中,抗 TNF α 抗体如阿达木单抗用于治疗患有银屑病伴 PsA 的受试者。下文更具体地描述本发明治疗方法中包括的银屑病的具体类型:

[0486] a. 慢性斑块状银屑病

[0487] 肿瘤坏死因子被指涉及慢性斑块状银屑病的病理生理 (Asadullah et al. (1999) *Br J Dermatol.* 141 :94)。慢性斑块状银屑病 (也称作寻常型银屑病) 是银屑病的最常见形式。慢性斑块状银屑病的特征在于隆起变红的皮肤斑片,大小从硬币大小到更大。在慢性斑块状银屑病中,斑片可为单个或多个,它们的尺寸在几毫米到几个厘米之间。这些斑片通常发红并覆盖有鳞屑,当轻度刮擦时会反光,产生“银色”效果。慢性斑块状银屑病所致的病变 (通常是对称的) 遍及身体出现,但偏向于伸肌面,包括膝、肘、腰骶区、头皮和指甲。慢性斑块状银屑病偶然发生在阴茎、外阴和弯曲部分,但通常不存在鳞屑。对慢性斑块状银屑病患者的诊断通常是基于上述临床特征。具体的说,慢性斑块状银屑病中病变的分布、颜色和典型银色鳞屑是慢性斑块状银屑病的特征。

[0488] b. 滴状银屑病

[0489] 滴状银屑病指的是具有特征性水滴形状的鳞屑斑片的银屑病形式。滴状银屑病的红肿一般在感染后发生,最显著的是链球菌咽喉感染。对滴状银屑病的诊断通常是基于皮肤外观和通常有新发咽喉痛病史的这个事实。

[0490] c. 皮褶性银屑病

[0491] 皮褶性银屑病是银屑病的一种形式,其中患者存在发红发炎的平滑且通常潮湿的皮肤区域,这与斑块状银屑病相关的起鳞不同。皮褶性银屑病也称作擦烂性 (intertiginous) 银屑病或屈侧性银屑病。皮褶性银屑病主要出现在腋窝、腹股沟、乳房下和生殖器和臀部周围的其它皮肤褶内,且由于是外表位置 (locations of presentation),

摩擦和出汗会刺激受侵害区域。

[0492] d. 脓疱性银屑病

[0493] 脓疱性银屑病也称作掌跖银屑病,为银屑病的一种形式,它产生大小和位置可变的含脓水疱,但通常发生在手和足上。水疱的位置可以是固定的或遍布身体的大片区域。脓疱性银屑病可以是疼痛 (tender) 和令人痛苦 (painful) 的,会导致发热。

[0494] e. 其它银屑病病症

[0495] 其它可通过用本发明方法获得的 TNF α 抗体进行治疗的银屑病病症的实例,包括红皮病型银屑病、寻常型银屑病、与 IBD 相关的银屑病和与关节炎 (包括类风湿性关节炎) 相关的银屑病。

[0496] 2. 寻常天疱疮

[0497] 寻常天疱疮是通常影响口腔粘膜和皮肤的严重自身免疫性全身性皮肤病。寻常天疱疮的发病机制据认为在于针对皮肤和口腔粘膜桥粒的自身免疫过程。因此,细胞不会彼此粘着。该病表现为大量流体充盈的趋向于破裂的大水疱,具有特征性的组织学外观。抗炎药是用于死亡率高的该疾病的唯一有效疗法。在寻常天疱疮患者中出现的并发症有顽固性疼痛、营养干扰和流体丢失以及感染。

[0498] 3. 特应性皮炎 / 湿疹

[0499] 特应性皮炎 (也称作湿疹) 是按有鳞和瘙痒斑片归类的慢性皮肤病。患有湿疹的人通常具有过敏性疾病的家族史,如哮喘、花粉热或湿疹。特应性皮炎是发生在皮肤中的超敏反应 (与变态反应类似),会导致慢性炎症。这种炎症会导致皮肤变瘙痒和脱屑。长期刺激和搔抓会导致皮肤增厚和出现皮革样质地。暴露于环境刺激物会使症状恶化,例如使皮肤干燥,所述暴露例如暴露于水、温度变化和应激。

[0500] 可以根据某些症状来鉴定患有特应性皮炎的受试者,这些症状通常包括剧烈瘙痒、渗液和结痂的水疱、水疱周围皮肤发红或发炎、皮疹、干燥皮革样皮肤表面、因搔抓导致的皮肤表面粗糙和耳渗出物 / 出血。

[0501] 4. 肉状瘤病

[0502] 肉状瘤病是在淋巴结、肺、肝、眼、皮肤和 / 或其它组织中出现肉芽肿性炎症的疾病。结节病包括皮肤肉状瘤病 (皮肤肉状瘤病) 和小结节肉状瘤病 (淋巴结的肉状瘤病)。可以根据症状来鉴定肉状瘤病患者,症状通常包括一般性不适、不安或疾病感觉;发热;皮肤病变。

[0503] 5. 结节性红斑

[0504] 结节性红斑指的是特征在于通常在前小腿的皮肤下出现疼痛、红色结节的炎症病症。与结节性红斑相关的病变开始通常为扁平但坚硬的红热疼痛肿块 (约 1 英寸大小)。在几天时间内,病变处可以变紫色,然后在几周内消退成褐色扁平斑片。

[0505] 在一些情况中,结节性红斑可能与感染相关,包括链球菌属感染、球孢子菌病、结核病、乙型肝炎、梅毒、猫抓病、兔热病、耶尔森菌属感染、钩端螺旋体病、鸚鵡热 (leptospirosis psittacosis)、组织胞浆菌病、单核细胞增多症 (EBV)。在其它情况中,结节性红斑可能与对某些药物的敏感性相关,包括口服避孕药、青霉素、磺胺类药物、砒类、巴比妥类、乙内酰脲、非那西丁、水杨酸盐、碘化物和黄体酮。结节性红斑通常与其它病症相关,包括白血病、结节病、风湿热和溃疡性结肠炎。

[0506] 结节性红斑的症状通常表现在腿上,但病变处还可能出现在身体的其它区域,包括臀部、腓、踝、大腿和上肢。患结节性红斑的受试者的其它症状可包括发热和不适。

[0507] 6. 化脓性汗腺炎

[0508] 化脓性汗腺炎指的是肿胀、疼痛、发炎的伤口或肿块发生在腹股沟、有时发生在臂下和乳房下的皮肤病。化脓性汗腺炎是在顶浆分泌腺出口因出汗被封闭或因腺发育不完全而不能正常排液时发生。腺中滞留的分泌物促使汗和细菌排入周围组织,导致皮下硬结、炎症和感染。化脓性汗腺炎限于具有顶浆分泌腺的身体区域。这些区域是腋窝、乳晕、腹股沟、会阴、围肛和脐周围区域。

[0509] 7. 扁平苔癣

[0510] 肿瘤坏死因子被指涉及扁平苔癣的病理生理 (Sklavounou et al. (2000) J Oral Pathol Med. 29 :370)。扁平苔癣指的是导致炎症、瘙痒和特征性皮肤病变的皮肤和粘膜病症。扁平苔癣可能与丙型肝炎或某些药物有关。

[0511] 8. 斯威特综合征

[0512] 炎性细胞因子,包括肿瘤坏死因子在内,被指涉及斯威特综合征的病理生理 (Reuss-Borst et al. (1993) Br J Haematol. 84 :356)。由 R. D. Sweet 在 1964 年描述的斯威特综合征,其特征在于发热的突然发作、白细胞增多和皮疹。皮疹由触痛、红斑性、界限清楚的丘疹和斑块组成,它们在在显微镜下显示出浓厚的中性白细胞浸润物。病变可以在任何地方出现,但偏向于在上身出现,包括面部。通常将单个病变描述为假水疱性或假脓疱性的,但显然可以为脓疱、大疱或溃疡性的。还常常报道在患有斯威特综合征的患者中病变涉及及到口腔和眼(结膜炎或巩膜外层炎)。还将白血病与斯威特综合征相关联。

[0513] 9. 白癜风

[0514] 白癜风指的是色素从皮肤区域损失而导致在正常皮肤构造上出现不规则白斑的皮肤病。白癜风的特征性病变表现为扁平脱色素区域。病变的边缘边界清楚,但不规则。患有白癜风的受试者的受侵害区域通常包括面部、肘和膝、手和足以及外生殖器。

[0515] 10. 硬皮病

[0516] 肿瘤坏死因子被指涉及硬皮病的病理生理 (Tutuncu et al. (2002) Clin Exp Rheumatol. 20(6 Suppl 28) :S146 ;Mackiewicz et al. (2003) ClinExp Rheumatol. 21 :41 ;Murota et al. (2003) Arthritis Rheum. 48 :1117)。硬皮病指的是弥漫性结缔组织病,其特征在于皮肤、血管、骨骼肌和内脏器官的改变。硬皮病也称作 CREST 综合征或进行性全身性硬化症,通常影响 30-50 岁的人。女性受侵害通常超过男性。

[0517] 对硬皮病的原因并不了解。该病会产生局部或全身症状。在那些受侵害的人当中,该病的过程和严重程度相差甚大。有过量胶原蛋白沉积在皮肤中,其它器官则产生症状。还出现对皮肤内小血管和受影响器官的损害。在皮肤中,可以发生溃疡、钙化和色素沉着改变。全身症状可包括纤维化和心脏、肺、肾和胃肠道的变性。

[0518] 患有硬皮病的患者表现出某些临床特征,包括手指和足趾响应热和冷而发白、发蓝或发红(雷诺现象)、疼痛、僵硬和手指和关节肿胀、皮肤增厚和手和前臂有光泽、食管反流或胃灼热、吞咽困难和呼吸急促。用以诊断硬皮病的其它临床症状包括红细胞沉降率(ESR) 增加、类风湿因子(RF) 增加、抗细胞核抗体试验阳性、显示蛋白质和显微镜可见血液的尿分析、可显示纤维化的胸部 X 线检查和显示限制性肺病的肺功能研究。

[0519] 11. 指甲病

[0520] 指甲病包括指甲的任何异常。本文所用的术语“指甲病”或“指甲疾病”指的是指甲或趾甲颜色、形状、构造或厚度异常的疾病。具体的指甲病包括但不限于孔蚀、指甲凹陷症、博氏线、匙状甲、甲松离、黄色甲、翼状赘肉（在扁平苔癣中观察到）和白甲病。孔蚀以在甲表面上存在小的凹窝为特征。隆起线或线形隆起沿指甲的“纵向”或“横向”出现。博氏线是在手指甲中“横向”出现的线形凹窝。白甲病是指指甲上的白色纹或斑。指甲凹陷症是手指甲的异常形状，其中指甲有隆起的皱摺，并且薄且凹陷。指甲凹陷症通常与缺铁症有关。

[0521] 可以用本发明 TNF α 抗体治疗的指甲病还包括牛皮癣性指甲。牛皮癣性指甲包括可归因于银屑病的甲改变。在某些情况中，银屑病可以仅发生在指甲中，在身体的任何其它部位均无发生。指甲中的牛皮癣性改变从轻度到重度，主要反映出牛皮癣对甲板、甲母质（即指甲从中生长的组织）、甲床（即指甲下的组织）和甲基底皮肤的涉及程度。脓疱型银屑病对甲床的损害可导致指甲缺失。银屑病中的指甲改变分几种一般类型，它们可单独或共同发生。在一种类别的牛皮癣性指甲中，甲板有深度凹痕，可能是因银屑病造成的甲生长缺陷所致。在另一类别中，指甲具有黄色到黄粉色变色，可能是因牛皮癣涉及甲床所致。第三种亚类的牛皮癣性指甲其特征在于在甲板下出现白色区域。白色区域实际上是显示斑点的气泡，其中甲板从甲床发生脱离。在指甲周围还存在变红的皮肤。第四个类别以甲板剥落下淡黄色斑片根据，即指甲营养不良，可能是因牛皮癣涉及甲母质所致。第五个类别的特征在于因牛皮癣涉及甲母质和甲床导致指甲全部丧失。

[0522] 还可将用本发明的方法获得的抗体用于治疗通常与扁平苔癣相关的指甲病症。患有扁平苔癣的受试者其指甲通常显示出甲板变薄和表面粗糙，有纵脊或翼状赘肉。

[0523] 可将用本发明获得的抗体用于治疗诸如本文所述的那些指甲病症。指甲病症通常与皮肤病症相关。在一个实施方案中，本发明包括使用 TNF α 抗体来治疗指甲病症。在另一个实施方案中，指甲病症与另一种病症相关，包括皮肤病如银屑病。在另一个实施方案中，与指甲病相关的病症是关节炎，包括牛皮癣性关节炎。

[0524] 12. 其它皮肤和指甲病症

[0525] 可将用本发明方法获得的抗体用于治疗其它皮肤和指甲病症，如慢性光化性皮炎、大疱性类天疱疮和斑秃。慢性光化性皮炎（CAD）也称作光敏感性皮炎 / 光化性类网状细胞增多综合征（PD/AR）。CAD 是皮肤发炎、特别是在已经接触日光或人工光的区域发炎的疾病。CAD 患者通常对某些接触其皮肤的物质过敏，特别是各种花、木、香料、遮光剂和橡胶化合物。大疱性类天疱疮指的是特征在于在躯干和四肢上形成大水疱的皮肤病。斑秃指的是毛发丢失，其特征在于在头皮或胡须处出现全秃的圆形斑。

[0526] 0. 血管炎病

[0527] TNF α 被指涉及各种血管炎病的病理生理（参见例如 Deguchi et al. (1989) Lancet. 2 :745)。在一个实施方案中，本发明提供了用于抑制患有其中 TNF α 活性有害的血管炎的受试者中的 TNF α 活性的多变剂量方法。

[0528] 术语“血管炎 (vasculitis)”或“血管炎病 (vasculitides)”在本文中可以互换使用，指的是特征在于血管炎症的一组病症。所有大小的血管，从体内的最大血管（主动脉）到皮肤中的最小血管（毛细血管），均可能受到侵害。受侵害的血管的大小随血管炎

的具体类型而异。本文所用的术语“其中 TNF α 活性有害的血管炎”用以包括这样的血管炎,其中 TNF α 在患有该病症的受试者中的存在已被证明或正被怀疑是造成该病症的病理生理的原因或者是促使该病症恶化的因素。这种病症还可例如由患有它的受试者的生物流体中 TNF α 浓度的增加(例如受试者血清、血浆、滑膜液等中 TNF α 浓度的增加)来证实,所述增加可例如用上文所述的抗 TNF α 抗体来检测。

[0529] 其中 TNF α 活性有害的血管炎病的实例有很多,包括贝切特病。抗体或其抗原结合部分用于治疗具体的血管炎病的用途在下文进一步讨论。在某些实施方案中,如下所述的将用本发明获得的抗体或抗体部分与另一种治疗剂对受试者联合给药。

[0530] 还可将用本发明方法获得的抗体或抗体部分用于治疗其中 TNF α 活性有害的血管炎,其中对 TNF α 活性的抑制预期可缓解血管炎的症状和/或进展或者预防血管炎。可以通过临床症状和试验来鉴定患有血管炎或有发生血管炎的风险的受试者。例如,患有血管炎病的受试者通常在嗜中性粒细胞的细胞质中出现抗某些蛋白质的抗体,即抗嗜中性粒细胞胞浆抗体(ANCA)。因此,在一些情况中,可以通过测定 ANCA 存在的试验(例如 ELISA)来验证血管炎病。

[0531] 血管炎及其后果可以是疾病的唯一表现,或者它可能是另一种原发病的继发性部分。血管炎可限于单一器官,或者可能同时影响几个器官。取决于综合征,所有大小的动脉和静脉均可能受到影响。血管炎可影响体内的任何器官。

[0532] 在血管炎中,血管腔通常缺乏免疫力,这与所涉及的血管所供应的组织发生局部缺血有关。可能由这个过程导致的众多病症,是因为任何类型、大小和位置的血管(例如动脉、静脉、小动脉、小静脉、毛细血管)都可能被涉及的这一事实所致。如下所述,一般按照受侵害血管的大小给血管炎病分类。应指出的是,一些小血管和大血管的血管炎可能涉及中等动脉;但大和中等尺寸的血管的血管炎不会涉及小于动脉的血管。大血管病包括但不限于巨细胞动脉炎,也称作颞动脉炎或颅动脉炎;风湿性多肌病;塔卡亚萨病或动脉炎,也称作主动脉弓综合征、年青女性动脉炎和无脉病。中等血管疾病包括但不限于典型的结节性多动脉炎和川崎病,也称作皮肤粘膜淋巴结综合征。小血管病的非限制性实例是贝切特综合征;韦格纳肉芽肿;显微镜下多血管炎;超敏反应性血管炎,也称作皮肤血管炎;小血管血管炎;亨诺-许兰紫癜、变应性肉芽肿病(allergic granulomatosis)和血管炎,也称作丘-施综合征。其它血管炎病包括但不限于分离的中枢神经系统血管炎和闭塞性血栓性脉管炎,也称作伯格病。典型的结节性多动脉炎(PAN)、显微镜下 PAN 和变应性肉芽肿病通常被归在一起,称为系统性坏死性血管炎病。血管炎的进一步描述如下所述:

[0533] 1. 大血管的血管炎

[0534] 在一个实施方案中,可将用本发明方法获得的 TNF α 抗体用于治疗患有大血管血管炎的受试者。本文所用的术语“大血管”指的是主动脉和伸向主要身体区域的最大分支。大血管包括例如主动脉及其分支和相应的静脉,例如锁骨下动脉;头肱动脉;颈总动脉;无名静脉;颈内和颈外静脉;肺动脉和静脉;腔静脉;肾动脉和静脉;股动脉和静脉;和颈动脉。大血管血管炎病的实例如下所述。

[0535] a. 巨细胞动脉炎(GCA)

[0536] 肿瘤坏死因子被指涉及巨细胞动脉炎的病理生理(Sneller(2002)Cleve. Clin. J. Med. 69:SII40;Schett et al. (2002)Ann. Rheum. Dis. 61:463)。巨细胞动脉炎(GCA)指

的是涉及血管的炎症和损害的血管炎,所述血管特别是从颈部的颈外动脉分支的大或中等动脉。GCA 也称作颞动脉炎或颅动脉炎,是在老年人中最常见的原发性血管炎。它几乎仅影响超过 50 岁的个体,不过,有充分记录证明存在 40 岁和 40 岁以下的病例。GCA 通常影响颅外动脉。GCA 可影响颈动脉分支,包括颞动脉。GCA 还是可涉及多个位置的动脉的全身性疾病。

[0537] 从组织病理学上说,GCA 是这样的全身动脉炎,在血管壁内存在炎性单核细胞浸润,且频繁有朗格汉斯类巨细胞形成。存在着内膜增殖、肉芽肿性炎症和内弹性膜断裂。在器官中的病理检查发现是与所涉及的血管有关的局部缺血的结果。

[0538] GCA 患者表现出某些临床症状,包括发热、头痛、贫血和高红细胞沉降率(ESR)。GCA 的其它典型指征包括颞或舌跛、头皮压痛、全身症状、苍白色视盘水肿(特别是“白垩样白色”视盘水肿)和视力障碍。该诊断由颞动脉活组织检查得到证实。

[0539] b. 风湿性多肌痛

[0540] 肿瘤坏死因子被指涉及风湿性多肌痛的病理生理 (Straub et al. (2002) *Rheumatology* (Oxford) 41 :423 ;Uddhammar et al. (1998) *Br. J. Rheumatol.* 37 :766)。风湿性多肌痛指的是与中度到重度肌肉疼痛及颈、肩和髋僵硬相关的风湿病,最明显的是在早晨发生。还在大部分风湿性多肌痛患者的循环单核细胞中检测到了 IL-6 和 IL-1 β 表达。风湿性多肌痛可以独立地发生,或可以与 GCA(血管的验证)共存或在其之前发生。

[0541] c. 高安动脉炎

[0542] 肿瘤坏死因子被指涉及高安动脉炎的病理生理 (Kobayashi and Numano (2002) *Intern. Med.* 41 :44 ;Fraga and Medina (2002) *Curr. Rheumatol. Rep.* 4 :30)。高安动脉炎指的是特征在于主动脉及其主要分支发生炎症的血管炎。高安动脉炎(也称作主动脉弓综合征、年青女性动脉炎和无脉病)会影响胸和腹主动脉及其主要分支或肺动脉。主动脉壁及其分支(例如颈动脉、无名和锁骨下动脉)纤维化增厚,会导致源于主动脉弓的血管的腔尺寸减小。这种情况通常也会影响肾动脉。

[0543] 高安动脉炎主要影响通常年龄 20-40 岁的年轻女性,特别是亚洲血统的人,它的表现可能是不适、关节痛和肢体跛行逐渐发生。大部分患者存在不均匀性脉搏下降,通常伴有臂内血压差。可能会发生冠状动脉和/或肾动脉狭窄。

[0544] 可以将高安动脉炎的临床特征分成早期炎性疾病特征和晚期疾病特征。高安动脉炎的早期炎性阶段的临床特征是:不适、低度发热、体重减轻、肌痛、关节痛和多形性红斑。高安动脉炎晚期的特征在于动脉纤维化狭窄和血栓形成。所产生的主要临床特征是局部缺血现象,例如无力和不均匀性动脉搏;臂间血压差异;视觉障碍,例如暗点和偏盲;其它神经学特征,包括眩晕和晕厥、轻偏瘫或中风。这些临床特征是由动脉狭窄和血栓形成导致的局部缺血所致。

[0545] 2. 中等血管病

[0546] 在一个实施方案中,可将用本发明获得的 TNF α 抗体用于治疗患有中等血管的血管炎的受试者。术语“中等血管”用以指那些属主要内脏动脉的血管。中等血管的实例包括肠系膜动脉和静脉、髂动脉和静脉以及上颌动脉和静脉。中等血管的血管炎病的实例如下所述。

[0547] a. 结节性多动脉炎

[0548] 肿瘤坏死因子被指涉及结节性多动脉炎的病理生理 (DiGirolamo et al. (1997) *J. Leukoc. Biol.* 61 :667)。结节性多动脉炎或结节性周围动脉炎指的是属严重性血管疾病的血管炎,其中小和中等动脉因受到劣种免疫细胞攻击而变肿胀和受损。结节性多动脉炎对成年人的影响通常超过对儿童。它会损害受侵害动脉所供应的组织,因为这些组织在没有适当供血的情况下无法接受足够的氧和营养物。

[0549] 结节性多动脉炎患者所表现出的症状通常是因对受侵害器官的损伤所致,这些器官通常为皮肤、心脏、肾和神经系统。结节性多动脉炎的全身症状包括发热、疲劳、虚弱、食欲不振和体重减轻。常见肌肉疼痛(肌痛)和关节疼痛(关节痛)。患有结节性多动脉炎的受试者其皮肤还会表现出皮疹、肿胀、溃疡和肿块(结节性病变)。

[0550] 典型的PAN(结节性多动脉炎)是小到中度肌肉动脉炎的全身性动脉炎,其中常见涉及肾和内脏动脉。有50%的PAN患者腹部血管存在动脉瘤或闭塞。典型的PAN不会涉及肺动脉,不过可能会涉及支气管血管。肉芽肿、显著嗜曙红细胞增多和过敏性素质并非该综合征的组成部分。尽管任何器官系统都可能被涉及,但是最常见的表现包括外周神经病、多发性单神经炎、肠局部缺血、肾缺血、睾丸疼痛和网状青斑。

[0551] b. 川崎病

[0552] 肿瘤坏死因子被指涉及川崎病的病理生理 (Sundel (2002) *Curr. Rheumatol. Rep.* 4 :474 ;Gedalia (2002) *Curr. Rheumatol. Rep.* 4 :25)。尽管不了解川崎病的原因,但是它与冠状动脉的急性炎症有关,这提示与该病相关的组织损害可能由促炎因子如 $TNF\alpha$ 介导。川崎病指的是影响粘膜、淋巴结、血管内层和心脏的血管炎。川崎病通常也称作粘膜皮肤淋巴结综合征、粘膜皮肤淋巴结病和婴儿型多动脉炎。患有川崎病的受试者会发生通常涉及冠状动脉的血管炎,这会导致心肌炎和心包炎的。通常随着急性炎症的减轻,冠状动脉会发生动脉瘤、血栓形成并导致心肌梗死。

[0553] 川崎病是与掌和足跖中的水肿相关的发热性全身血管炎,伴随颈淋巴结增大、唇皸裂和“草莓舌”。尽管全身血管中都发现炎症反应,但是最常见的终末器官损害部位是冠状动脉。川崎病主要影响年龄在5岁以下的儿童。在日本发病率最高,但认为在西方国家正在日益增多,目前是美国儿童后天性心脏病的主要原因。川崎病最严重的并发症是冠状动脉炎和发生在三分之一未治疗患者中的动脉瘤形成。

[0554] 3. 小血管病

[0555] 在一个实施方案中,将 $TNF\alpha$ 抗体用于治疗患有小血管血管炎的受试者。术语“小血管”用以指小动脉、小静脉和毛细血管。小动脉是仅含有1或2层平滑肌细胞、末端连接毛细血管网的动脉。小静脉将血液从毛细血管网携带到静脉,而毛细血管则连接小动脉和小静脉。小血管血管炎的实例如下所述。

[0556] a. 贝切特病

[0557] 肿瘤坏死因子被指涉及贝切特病的病理生理 (Sfikakis (2002) *Ann. Rheum. Dis.* 61 :ii51-3 ;Dogan and Farah (2002) *Ophthalmologia.* 52 :23)。贝切特病是涉及全身血管的炎症的慢性病症。贝切特病还可导致各种类型的皮肤病变、关节炎、肠炎和脑膜炎(大脑和脊髓的膜的炎症)。由于贝切特病,患病受试者全身的组织 and 器官中都可能炎症,包括胃肠道、中枢神经系统、血管系统、肺和肾。贝切特病在男性中的发病率高于女性3倍,且在东地中海地区和日本更为常见。

[0558] 患有贝切特病的受试者可表现包括以下在内的临床症状：复发性口腔溃疡（类似于口疮）、复发性生殖器溃疡和眼部炎症。在贝切特病患者中 TNF α 、IL-8、IL-1、IL-6、INF- γ 和 IL-12 的血清水平升高，并且已证实在贝切特病患者的单核细胞中这些因子的产生增多（参见例如 *Inflammatory Disease of Blood Vessels* (2001) Marcel Dekker, Inc., eds. G. S. Hoffman and C. M. Weyand, p. 473）。

[0559] b. 韦格纳肉芽肿

[0560] 肿瘤坏死因子被指涉及韦格纳肉芽肿的病理生理 (Marquez et al. (2003) *Curr. Rheumatol. Rep.* 5 :128 ;Harman and Margo (1998) *Surv. Ophthalmol.* 42 :458)。韦格纳肉芽肿指的是导致上呼吸道（鼻、窦、耳）、肺和肾中的血管的炎症的血管炎。韦格纳肉芽肿也称作中线肉芽肿病。韦格纳肉芽肿包括涉及呼吸道的肉芽肿性炎症和影响小到中等血管的坏死性血管炎。患有韦格纳肉芽肿的受试者通常也患有关节炎（关节炎症）。在受侵害的受试者中也可能存在肾小球肾炎，但实际上任何器官都可能被涉及。

[0561] 患有韦格纳肉芽肿的患者一般表现出包括以下在内的临床症状：复发性鼻窦炎或鼻衄、粘膜溃疡形成、中耳炎、咳嗽、咯血和呼吸困难。韦格纳肉芽肿的首要症状通常包括上呼吸道症状、关节疼痛、虚弱和疲劳。

[0562] c. 丘 - 施综合征

[0563] 肿瘤坏死因子被指涉及丘 - 施综合征的病理生理 (Gross (2002) *Curr. Opin. Rheumatol.* 14 :11 ;Churg (2001) *Mod. Pathol.* 14 :1284)。丘 - 施综合征指的是全身性的且表现出哮喘和嗜曙红细胞增多的早期表现征兆的血管炎。丘 - 施综合征也称作变应性肉芽肿病和脉管炎，是在过敏性鼻炎、哮喘和嗜曙红细胞增多的情形中出现。在丘 - 施综合征中也出现鼻窦炎和肺浸润，主要影响肺和心脏。常见外周神经病、冠状动脉炎和涉及胃肠。

[0564] 可以根据由 American College of Rheumatology (ACR) 建立的标准来诊断患有丘 - 施综合征的患者。这些标准旨在区分 CSS 和其它形式的血管炎。并非所有患者均满足每个标准，实际上，有些患者可能仅满足 2 或 3 个标准，但仍然将他们分类为丘 - 施综合征。ACR 选择 6 个疾病特征（标准）作为丘 - 施综合征与其它血管炎病的最佳区分标准。这些标准包括：1) 哮喘；2) 嗜曙红细胞增多 [差别 WBC 计数 >10%]；3) 单一神经病变；4) 胸部 X 线检查发现短暂肺浸润；5) 鼻窦异常；和 6) 对带有血管外嗜酸性细胞的血管的活组织检查。

[0565] P. 其它 TNF α 相关病症

[0566] 在一个实施方案中，本发明涉及用于治疗其中 TNF α 活性有害的 TNF α 相关病症的多变剂量方法，该方法包括对受试者给予 TNF α 抗体，使得所述 TNF α 相关病症得到治疗。下文进一步讨论其中 TNF α 活性有害的 TNF α 相关病症的实例。

[0567] 1. 幼年型关节炎

[0568] 肿瘤坏死因子被指涉及幼年型关节炎的病理生理，包括青少年类风湿性关节炎 (Grom et al. (1996) *Arthritis Rheum.* 39 :1703 ;Mangge et al. (1995) *Arthritis Rheum.* 8 :211)。在一个实施方案中，将本发明的 TNF α 抗体用于治疗青少年类风湿性关节炎。

[0569] 本文所用的术语“青少年类风湿性关节炎”或“JRA”指的是发生在 16 岁以前的、会导致关节或结缔组织损害的慢性炎性疾病。JRA 也称作青少年慢性多发关节炎和斯提尔

病。

[0570] JRA 在 16 岁或 16 岁以下儿童中导致关节炎症和四肢强直 6 周以上。炎症会导致关节中发红、肿胀、发热和疼痛。任何关节均可能受到影响,炎症会限制受侵害关节的活动性。有一种类型的 JRA 也可影响内脏器官。

[0571] 通常根据所涉及的关节数量、症状和是否存在某些通过血试验测出的抗体,将 JRA 分成三种类型。这些分类有助于临床医师确定疾病发展会到何种程度和是否侵害到内脏器官或皮肤。JRA 的分类包括如下:

[0572] a. 少关节 JRA,其中患者有四个或四个以下的关节受侵害。少关节 JRA 为最常见的 JRA 形式,并且一般影响大关节如膝盖。

[0573] b. 多关节 HRA,其中五个或五个以上的关节受侵害。最常涉及的是小关节,如在手和足中的那些小关节,但该病也可能影响大关节。

[0574] c. 全身性 JRA 的特征在于关节肿胀、发热、浅色皮疹,还可能影响内脏器官如心脏、肝、脾和淋巴结。全身性 JRA 也称作斯提尔病。这些儿童中有小部分会在许多关节中发生关节炎,且可能具有会持续至成人期的严重性关节炎。

[0575] 2. 子宫内膜异位

[0576] 肿瘤坏死因子被指涉及子宫内膜异位的病理生理,因为患有子宫内膜异位的女性其 TNF 腹膜水平升高 (Eisermann et al. (1988)FertilSteril 50 :573 ;Halme(1989)Am J Obstet Gynecol 161 :1718 ;Mori et al. (1991)Am J Reprod Immunol 26 :62 ;. Taketani et al. (1992)Am J ObstetGynecol 167 :265 ;Overton et al. (1996)Hum Reprod 1996 ; 11 :380)。在一个实施方案中,可将 TNF α 抗体用于治疗子宫内膜异位。本文所用的术语“子宫内膜异位”指的是正常衬在子宫内的组织(子宫内膜)生长在身体的其它区域而导致疼痛、不规则出血和频发不育的疾病。

[0577] 3. 前列腺炎

[0578] 肿瘤坏死因子被指涉及前列腺炎的病理生理,因为患有慢性前列腺炎和慢性骨盆疼痛的男性其精液中的 TNF 和 IL-1 水平显著高于对照组 (Alexander et al. (1998) Urology 52 :744 ;Nadler et al. (2000)JUrol 164 :214 ;Orhan et al. (2001)Int J Urol 8 :495)。

[0579] 此外,在前列腺炎的大鼠模型中, TNF 水平也比对照组升高 (Asakawa et al. (2001)Hinyokika Kiyō 47 :459 ;Harris et al. (2000)Prostate 44 :25)。在一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体用于治疗前列腺炎。

[0580] 本文所用的术语“前列腺炎”指的是前列腺炎。前列腺炎也称作骨盆痛综合征。前列腺炎的表现形式有多种,包括非细菌性前列腺炎、急性前列腺炎、细菌性前列腺炎和急性前列腺炎。急性前列腺炎指的是突发的前列腺炎。急性前列腺炎通常因前列腺的细菌感染导致。慢性前列腺炎为逐步发生、长时间持续且通常具有难以捉摸的 (subtle) 症状的前列腺炎症。慢性前列腺炎通常也因细菌感染导致。

[0581] 4. 脉络膜新生血管化

[0582] 肿瘤坏死因子被指涉及脉络膜新生血管化的病理生理。例如,在手术切除的脉络膜新血管膜中,新血管呈 TNF 和 IL-1 染色阳性 (Oh Het al. (1999)Invest Ophthalmol Vis Sci 40 :1891)。在一个实施方案中,将 TNF α 抗体用于治疗脉络膜新生血管化。本文所用

的术语“脉络膜新生血管化”指的是来源于脉络膜的新血管通过布鲁赫膜中的断裂处生长进入视网膜下色素上皮 (sub-RPE) 或视网膜下间隙。脉络膜新生血管化 (CNV) 是患有该病的患者视力丧失的主要原因。

[0583] 5. 坐骨神经痛

[0584] 肿瘤坏死因子被指涉及坐骨神经痛的病理生理 (Ozaktay et al. (2002) Eur Spine J. 11 :467 ;Brisby et al. (2002) Eur Spine J. 11 :62)。在一个实施方案中, 将本发明的 TNF α 抗体用于治疗坐骨神经痛。本文所用的术语“坐骨神经痛”指的是涉及因对坐骨神经的损害造成的腿中运动和 / 或感觉受损的病况。坐骨神经痛通常也称作坐骨神经的神经病和坐骨神经机能障碍。坐骨神经痛是外周神经病的一种形式。它当存在对位于腿后部的坐骨神经的损害时发生。坐骨神经控制着膝后和小腿的肌肉, 为大腿后、部分小腿和足跖提供感觉。坐骨神经痛可预示另一种病症, 包括腰椎间盘突出、脊柱狭窄、腰椎间盘突出退变性疾病、狭部脊椎滑脱症和 piniformis 综合征。

[0585] 6. 斯耶格仑综合征

[0586] 肿瘤坏死因子被指涉及斯耶格仑综合征的病理生理 (Koski et al. (2001) Clin Exp Rheumatol. 19 :131)。在一个实施方案中, 将本发明的 TNF α 抗体用于治疗斯耶格仑综合征。本文所用的术语“斯耶格仑综合征”指的是全身性的炎性病况, 其特征在于口干燥、流泪减少和其它粘膜干燥, 并且通常与自身免疫性风湿病如类风湿性关节炎相关。眼和口干燥是该综合征的最常见症状。这些症状可单独发生, 也可与涉及类风湿性关节炎或其它结缔组织病的症状一起发生。可能伴随出现唾液腺增大。其它器官也可能受到影响。该综合征可能涉及类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、多发性肌炎和其它疾病。

[0587] 7. 葡萄膜炎

[0588] 肿瘤坏死因子被指涉及葡萄膜炎的病理生理 (Wakefield and Lloyd (1992) Cytokine 4 :1 ;Woon et al. (1998) Curr Eye Res. 17 :955)。在一个实施方案中, 将本发明的 TNF α 抗体用于治疗葡萄膜炎。本文所用的术语“葡萄膜炎”指的是葡萄膜的炎症, 葡萄膜是巩膜与视网膜之间的层, 包括虹膜、睫状体和脉络膜。葡萄膜炎通常也称作虹膜炎、扁平部睫状体炎、脉络膜炎 (chroiditis)、脉络膜视网膜炎、前葡萄膜炎和后葡萄膜炎。葡萄膜炎的最常见形式为前葡萄膜炎, 它涉及眼的前部中的炎症, 通常为虹膜独有。这种病况通常称作虹膜炎。在一个实施方案中, 术语葡萄膜炎指的是葡萄膜的炎症, 但不包括与自身免疫性疾病相关的炎症, 即不包括自身免疫性葡萄膜炎。

[0589] 8. 湿黄斑变性

[0590] 肿瘤坏死因子被指涉及湿黄斑变性的病理生理。在一个实施方案中, 将本发明的 TNF α 抗体用于治疗湿黄斑变性。本文所用的术语“湿黄斑变性”指的是影响黄斑 (眼视网膜的中心部分) 而导致视力下降和可能的中心视觉丧失的病况。患有湿黄斑变性的患者在视网膜下发育新血管, 导致出血、肿胀和瘢痕组织。

[0591] 9. 骨质疏松症

[0592] 肿瘤坏死因子被指涉及骨质疏松症的病理生理 (Tsutsumimoto et al. (1999) J Bone Miner Res. 14 :1751)。骨质疏松症用以指特征在于骨密度进行性丢失和骨组织变薄的病况。骨质疏松症是在身体不能形成足够的新骨时, 或者在太多的旧骨被身体再吸收时, 或者同时这两种情况时发生的。可将本发明的 TNF α 抗体或其抗原结合片段可用于治疗骨

质疏松症。

[0593] 10. 骨关节炎

[0594] 肿瘤坏死因子被指涉及骨关节炎的病理生理 (Venn et al. (1993) *Arthritis Rheum.* 36 :819 ;Westacott et al. (1994) *J Rheumatol.* 21 :1710)。骨关节炎 (OA) 也称作肥厚性骨关节炎、骨关节病和变性关节病。OA 是骨骼关节的慢性退行性病变, 它影响所有年龄的成年人的特定关节, 通常为膝、髌、手关节和脊柱。OA 的特征在于包括以下的诸多表现: 与发生“溃疡”或溃疡龕 (crater) 相关的关节软骨变性和变薄、骨赘形成、骨边缘的肥大和滑膜的改变以及受侵害关节的增大。此外, 骨关节炎伴随疼痛和四肢强直, 特别是在长时间活动后。可将本发明的抗体或其抗原结合片段用于治疗骨关节炎。骨关节炎的特征性放射学表现包括关节腔狭窄、软骨下硬化、骨赘病、软骨下囊形成、疏松骨体 (或“关节鼠”)。

[0595] 用以治疗骨关节炎的药物包括各种非类固醇类抗炎药 (NSAIDs)。此外, COX2 抑制剂, 包括 Celebrex、Vioxx、Bextra 和艾托考昔在内, 也用于治疗 OA。也可用直接注入关节的类固醇来减轻炎症和疼痛。在本发明的一个实施方案中, 可将本发明的 TNF α 抗体与 NSAIDs、COX2 抑制剂和 / 或类固醇一起给药。

[0596] 11. 其它病症

[0597] 本发明的方法还可以用于治疗其中 TNF α 活性有害的各种其它病症。其中 TNF α 活性涉及病理生理并因此可以使用本发明的抗体或抗体部分治疗的其它疾病和病症的实例包括: 炎性骨病; 骨吸收疾病; 凝固障碍; 灼伤; 再灌注损伤; 瘢痕瘤形成; 瘢痕组织形成; 发热; 牙周病; 肥胖; 放射毒性; 与年龄相关的恶病质; 阿尔茨海默病; 脑水肿; 炎性脑损伤; 癌症; 慢性疲乏综合征; 皮炎; 药物反应, 如史-约综合征和雅里施-赫克斯海默反应; 脊柱中和 / 或周围的水肿; 家族性周期热; 费耳提综合征; 纤维化; 肾小球肾炎 (例如链球菌感染后肾小球肾炎或 IgA 肾病); 假体松弛; 显微镜下多脉管炎; 混合型结缔组织病; 多发性骨髓瘤; 癌症和恶病质; 多器官病变; 骨髓发育不良综合征; 睾丸炎、骨质溶解; 胰腺炎, 包括急性、慢性和胰腺脓肿; 多发性肌炎; 进行性肾功能衰竭; 假痛风; 坏疽性脓皮症; 复发性多发软骨炎; 风湿性心脏病; 结节病; 硬化性胆管炎; 中风; 胸腹主动脉瘤修复 (TAAA)、TNF 受体相关周期性综合征 (TRAPS)、与黄热病疫苗接种相关的症状; 与耳相关的炎症疾病; 慢性耳炎; 带有或不带有珠光瘤的慢性中耳炎; 儿科耳炎; 肌肉牵拉 (myotosis); 卵巢癌; 结肠直肠癌; 与诱导的炎症综合征相关的疗法 (例如 IL-2 给药之后的综合征); 和与再灌注损伤相关的病症。

[0598] 应认识到, 是适当情况下, 所有上述 TNF α 相关病症包括所述疾病的成年型和青少年型。还应认识到, 所有上述病症包括所述疾病的慢性和急性形式。此外, 本发明的多剂量方法可以用于治疗上述各自单独的 TNF α 相关病症或它们彼此的组合病症, 例如患有葡萄膜炎和狼疮的受试者。

[0599] 另外的治疗药剂

[0600] 本发明涉及药物组合物和使用多剂量方案将其用于治疗 TNF α 相关病症的使用方法。药物组合物包含能防止或抑制 TNF α 相关病症的第一药剂。药物组合物还可含有属活性药物成分的第二药剂; 即第二药剂是治疗性的, 其功能超过没有活性的成分, 例如药物载体、防腐剂、稀释剂或缓冲剂。第二药剂可用于在治疗或防止 TNF α 相关病症。第二药剂可减轻或治疗至少一种与目标疾病有关的症状。第一药剂和第二药剂可通过相似或不

相关的作用机理发挥它们的生物学作用；或者第一药剂和第二药剂之一或两者可通过多种作用机理发挥它们的生物学作用。药物组合物还可包含第三药剂乃至更多药剂，其中第三（和第四等）化合物具有与第二药剂相同的特征。

[0601] 应认识到，本文描述的药物组合物对于每一个所描述的实施方案，可在相同的药物可接受载体或不同的药物可接受载体中含有第一和第二、第三或另外的药剂。还应认识到，在所描述的实施方案中，第一、第二、第三和另外的药剂可同时或顺序施用。或者，可同时施用第一和第二药剂，并且在头两种药剂施用之前或之后施用第三或另外的药剂。

[0602] 本文描述的方法和药物组合物中使用的各药剂的组合，可对所针对治疗的病况或疾病具有治疗加合或协同作用。本文描述的方法和药物组合物中使用的各药剂的组合，还可减小至少一种药剂当单独或在没有特定药物组合物的其他药剂的情况下施用时所伴随出现的毒副作用。例如，一种药剂的毒性可被组合物中的另一种药剂减弱，这样允许更高的剂量，改善患者的顺应性和改善治疗结果。组合物的加合或协同作用、好处和优点适用于治疗各类治疗药剂，不管是结构类别还是功能类别，或者适用于各种化合物本身。

[0603] 组合物中还可掺入补充活性化合物。在某些实施方案中，将本发明的抗体或抗体部分与一种或几种可用于治疗其中 TNF α 活性有害的 TNF α 相关病症的另外的治疗药物共同配制和 / 或共同施用。例如，本发明的抗 hTNF α 抗体、抗体部分或其他 TNF α 抑制剂可与下面的物质共同配制和 / 或共同施用：一种或多种能结合其他靶物的另外的抗体（例如能结合其他细胞因子的抗体，或者能结合细胞表面分子的抗体）、一种或多种细胞因子、可溶性 TNF α 受体（参见例如 PCT 公开 W094/06476）和 / 或一种或几种能抑制 hTNF α 产生或活性的化学物质（例如 PCT 公开 WO 93/19751 中描述的环己烷 - 亚基衍生物）。此外，本发明的一种或多种抗体或其他 TNF α 抑制剂可与两种或多种上述治疗药剂联合使用。这样的联合治疗可有利地使用较低剂量的所施用治疗药物，从而避免与各种单一治疗有关的可能的毒性或并发症。如下所讨论，一般根据具体治疗的 TNF α 相关病症选择具体的治疗药剂。

[0604] 抗体、抗体部分或其他 TNF α 抑制剂可与之联合用于本发明的多变剂量治疗方法中的治疗药剂的非限制性实例包括如下：非甾族化合物抗炎药 (NSAIDs)；细胞因子抑制性抗炎药 (CSAIDs)；CDP-571/BAY-10-3356 (人源化抗 TNF α 抗体；Celltech/Bayer)；cA2/ 英夫单抗 (嵌合抗 TNF α 抗体；Centocor)；75 kd TNFR-IgG/ 依那西普 (75kd TNF 受体-IgG 融合蛋白；Immunex；参见例如 Arthritis & Rheumatism(1994)Vol. 37, S295；J. Invest. Med. (1996)Vol. 44, 235A)；55 kdTNF-IgG(55 kd TNF 受体-IgG 融合蛋白；Hoffmann-LaRoche)；IDEC-CE9.1/SB210396 (非耗尽型灵长类化抗 CD4 抗体；IDEC/SmithKline；参见例如 Arthritis & Rheumatism(1995)Vol. 38, S185)；DAB 486-IL-2 和 / 或 DAB 389-IL-2 (IL-2 融合蛋白；Seragen；参见例如 Arthritis & Rheumatism(1993)Vol. 36, 1223)；Anti-Tac (人源化抗 IL-2R α ；Protein Design Labs/Roche)；IL-4 (抗炎细胞因子；DNAX/Schering)；IL-10 (SCH 52000；重组 IL-10, 抗炎细胞因子；DNAX/Schering)；IL-4；IL-10 和 / 或 IL-4 激动剂 (例如激动剂抗体)；IL-1RA (IL-1 受体拮抗剂；Synergen/Amgen)；阿那白滞素 (**Kineret**[®]/Amgen)；TNF-bp/s-TNF (可溶性 TNF 结合蛋白质；参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9 (supplement), S284；Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology(1995)Vol. 268, pp. 37-42)；R973401 (磷酸二酯酶 IV 型抑制剂；

参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); MK-966 (COX-2 抑制剂; 参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S81); Iloprost (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S82); 甲氨喋呤; 萨利多胺 (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282) 和萨利多胺相关药物 (例如 Celgen); 来氟洛米 (抗炎剂和细胞因子抑制剂; 参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S131); Inflammation Research(1996) Vol. 45, pp. 103-107); 凝血酸 (纤溶酶原激活的抑制剂; 参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284); T-614 (细胞因子抑制剂; 参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); 前列腺素 E1 (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); 替尼达普 (非甾族抗炎药; 参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S280); 萘普生 (非甾族抗炎药; 参见例如 Neuro Report(1996) Vol. 7, pp. 1209-1213); 美洛昔康 (非甾族抗炎药); 布洛芬 (非甾族抗炎药); 吡罗昔康 (非甾族抗炎药); 双氯酚酸钠 (非甾族抗炎药); 消炎痛 (非甾族抗炎药); 柳氮磺吡啶 (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281); 硫唑嘌呤 (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281); ICE 抑制剂 (酶白介素-1 β 转化酶的抑制剂); zap-70 和 / 或 Ick 抑制剂 (酪蛋白激酶 zap-70 或 Ick 的抑制剂); VEGF 抑制剂和 / 或 VEGF-R 抑制剂 (血管内皮细胞生长因子或血管内皮细胞生长因子受体的抑制剂); 血管发生的抑制剂); 皮质类固醇抗炎药 (例如, SB203580); TNF- 转化酶抑制剂; 抗 IL-12 抗体; 抗 IL-18 抗体; 白介素-11 (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S296); 白介素-13 (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S308); 白介素-17 抑制剂 (参见例如 Arthritis & Rheumatism(1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S120); 金; 青霉胺; 氯喹; 羟氯喹; 苯丁酸氮芥; 环孢菌素; 环磷酰胺; 总淋巴细胞照射法; 抗胸腺细胞球蛋白; 抗 CD4 抗体; CD5- 毒素; 口服给药的肽和胶原; 羟苯基氯氨苄二钠 (lobenzarit disodium); 细胞因子调节剂 (CRAs) HP 228 和 HP 466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 反义硫代磷酸酯寡脱氧核苷酸 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); 可溶性补体受体 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); 泼尼松; 奥古蛋白 (orgotein); 糖胺聚糖多硫酸盐; 二甲胺四环素; 抗 IL2R 抗体; 海产品和植物脂质 (鱼和植物种子脂肪酸; 参见例如 DeLuca et al. (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21 : 759-777); 金诺芬; 保泰松; 甲氧芬那酸; 氟芬那酸; 静脉内免疫球蛋白; zileuton; 霉酚酸 (RS-61443); 他克莫司 (FK-506); 西罗莫司 (瑞帕霉素); 阿普劳斯 (therafectin); 克拉屈滨 (2- 氯脱氧腺苷); 甲氨喋呤; 抗病毒剂和免疫调节剂。可使用本发明的多变剂量或单剂量治疗方法, 将上面提到的药剂的任一种都与本发明的 TNF α 抗体联合用药, 以治疗 TNF α - 相关病症。

[0605] 在一个实施方案中, 使用本发明的多变剂量治疗方法, 将本发明的 TNF α 抗体与以下药剂之一联合用药来治疗类风湿性关节炎: 小分子抑制剂 KDR (ABT-123), Tie-2 的小分子抑制剂; 甲氨喋呤; 泼尼松; 塞来昔布; 叶酸; 羟氯喹硫酸盐; 罗非克西; 依那西普; 英夫单抗; 阿那白滞素 (**Kineret**[®] / Amgen); 来氟洛米; 萘普生; 伐地考昔; 磺胺吡啶; 布洛芬; 甲基氢化泼尼松; 美洛昔康; 甲基氢化泼尼松乙酸盐; 硫羟苹果酸金钠; 阿司匹林; 氮杂硫

代嘌呤;醋酸去炎松;萘磺酸丙氧芬/扑热息痛;叶酸盐;萘丁美酮;双氯酚酸钠;吡罗昔康;依托度酸;双氯酚酸钠;奥沙普嗪;羟可待酮盐酸盐;氢可酮二酒石酸盐/扑热息痛;双氯酚酸钠/米索普特;芬太尼;阿那白滞素,人重组体;盐酸曲马多;双水杨酯;舒林酸;维生素 B12/fa/ 维生素 B6;对乙酰氨基酚;阿仑膦酸钠;氢化泼尼松;硫酸吗啡;盐酸利多卡因;消炎痛;氨基葡萄糖硫酸盐/软骨素;环孢素;磺胺嘧啶;盐酸阿米替林;羟可待酮盐酸盐/对乙酰氨基酚;盐酸奥洛帕定;米索普特;甲氧萘丙酸钠;奥美拉唑;霉酚酸酯;环磷酸胺;利妥希玛;IL-1TRAP;MRA;CTLA4-IG;IL-8BP;ABT-874;ABT-324(抗 IL18);抗 IL15;BIRB-796;SC10-469;VX-702;AMG-548;VX-740;罗氟斯特;IC-485;CDC-801;和 mesopram。在另一个实施方案中,使用多变剂量方法,将本发明的 TNF α 抗体与上面提到的用于治疗类风湿性关节炎的药剂之一联合用药,用于治疗 TNF α 相关病症。在另一个实施方案中,将上述的另外的药剂与 TNF α 抗体联合用于本发明的单剂量治疗方法中。

[0606] 在一个实施方案中,使用多变剂量方案,将本发明的 TNF α 抗体与以下药剂之一联合用药来治疗其中 TNF α 活性有害的 TNF α 相关病症:抗 IL12 抗体 (ABT874);抗 IL18 抗体 (ABT 325);LCK 的小分子抑制剂;COT 的小分子抑制剂;抗 IL1 抗体;MK2 的小分子抑制剂;抗 CD 19 抗体;CXCR3 的小分子抑制剂;CCR5 的小分子抑制剂;CCR11 的小分子抑制剂;抗 E/L 选择蛋白抗体;P2X7 的小分子抑制剂;IRAK-4 的小分子抑制剂;糖皮质激素受体的小分子激动剂;抗 C5a 受体抗体;C5a 受体的小分子抑制剂;抗 CD32 抗体;和作为治疗性蛋白质的 CD32。

[0607] 在又一个实施方案中,可将用本发明获得的 TNF α 抗体与抗生素和抗感染药联合用药。抗感染药包括本领域公知的用来治疗病毒、真菌、寄生虫或细菌感染的药剂。本文所用的术语“抗生素”是指能抑制微生物生长或者杀灭微生物的化学物质。该术语包括微生物所产生的抗生物以及本领域公知的合成抗生素(例如类似物)。抗生素包括但不限于克拉霉素(Biaxin[®])、环丙沙星(Cipro[®])和甲硝唑(Flagyl[®])。

[0608] 在另一个实施方案中,可将用本发明获得的 TNF α 抗体与治疗坐骨神经痛或疼痛的另外的治疗药剂联合用药。可用来减轻或抑制坐骨神经痛或疼痛的症状的药物的实例,包括氢可酮二酒石酸盐/扑热息痛、罗非克西、盐酸环苯扎林、甲基泼尼松、萘普生、布洛芬、羟可待酮盐酸盐/对乙酰氨基酚、塞来昔布、伐地考昔、乙酸甲基泼尼松、泼尼松、磷酸可卡因/扑热息痛、盐酸曲马多/对乙酰氨基酚、美他沙酮、美洛昔康、美索巴莫、盐酸利多卡因、双氯芬酸钠、加巴喷丁、地塞米松、卡利普多、酮咯酸氨丁三醇、吲哚美辛、对乙酰氨基酚、安定、萘丁美酮、盐酸氧可酮、盐酸替扎尼定、双氯酚酸钠/米索前列醇、丙氧芬萘磺酸盐/扑热息痛、asa/oxycod/羟可酮 ter、布洛芬/氢可酮重酒石酸盐(酯)(bit);盐酸曲马多、依托度酸;盐酸丙氧芬、盐酸阿米替林、卡利普多/磷酸可待因/asa、硫酸吗啡、多种维生素、甲氧萘丙酸钠、柠檬酸邻甲苯海拉明和替马西洋。

[0609] 在又一个实施方案中,将用本发明获得的 TNF α 抗体与血液透析联合使用来治疗 TNF α 相关病症。

[0610] 在另一个实施方案中,将用本发明获得的 TNF α 抗体与用来治疗克罗恩氏病或克罗恩氏病相关病症的药物联合用于本发明的多变剂量方案中。可用来治疗克罗恩氏病的治疗药剂的实例,包括美沙拉秦、泼尼松、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、英夫单抗、布地奈德、水杨酸偶氮磺胺吡啶、甲基泼尼龙琥珀酸钠(sod succ)、苯乙哌啶/硫酸阿托品(atropsulf)、盐酸

洛派丁胺、甲氨喋呤、奥美拉唑、叶酸盐、环丙沙星 / 右旋糖 - 水、氢可酮二酒石酸盐 / 扑热息痛、盐酸四环素、氟轻松醋酸酯、甲硝唑、硫汞撒 / 硼酸、硫酸天仙子胺、消胆胺 / 蔗糖、盐酸环丙沙星、盐酸度冷丁、盐酸咪达唑仑、羟可待酮盐酸盐 / 对乙酰氨基酚、盐酸普鲁米近、磷酸钠、磺胺甲噁唑 / 甲氧苄定、塞来昔布、聚卡波菲 (polycarbophil)、丙氧芬萘磺酸盐、氢化可的松、多种维生素、巴柳氮二钠、磷酸可卡因 / 扑热息痛、盐酸考来维仑、维生素 B12、叶酸、左氟沙星、那他珠单抗、甲基氢化泼尼松、 γ -干扰素和沙格司亭 (GM-CSF)。在一个实施方案中,将甲氨喋呤以 2.5mg-30mg 每周的剂量给药以治疗克罗恩氏病。

[0611] 在另一个实施方案中,将 TNF α 抗体与用来治疗哮喘的另外的治疗药剂联合用于本发明的多剂方案中。可用来减轻或抑制哮喘症状的药物的实例包括以下:沙丁醇胺;沙美特罗 / 氟地松;钠;丙酸氟地松;布地缩松;泼尼松;沙美特罗昔萘酸盐(酯);盐酸左沙丁胺醇 (levalbuterol);硫酸盐 / 异丙托品;磷酸泼尼松钠;曲安奈德;倍氯美松双丙酸酯;异丙托品溴化物;阿齐霉素;醋酸吡布特罗;泼尼松;无水茶碱;扎鲁斯特;甲基泼尼龙琥珀酸钠 (sod succ);克拉霉素;富马酸福莫特罗;流感病毒疫苗;甲基泼尼龙三水合物;变态反应注射液;色甘酸钠;头孢罗齐;盐酸甲美芳铵;氟尼缩松 / 薄荷醇;左氟沙星;阿莫西林 / 克拉维酸钾;吸入辅助装置;愈创甘油醚;地塞米松磷酸钠;盐酸莫西沙星;海克酸盐;愈创木酚甘油醚 / d- 甲吗喃;加替沙星;pephedrine/cod/ 扑尔敏;盐酸西替利嗪;糠酸毛他松;沙美特罗昔萘酸盐(酯);退咳露;头孢氨苄;pe/ 氢可酮 / 扑尔敏;盐酸西替利嗪 / 伪麻黄碱;苯基麻黄碱 / cod/ 异丙嗪;可待因 / 异丙嗪;头孢罗齐;地塞米松;愈创木酚甘油醚 / 伪麻黄碱;扑尔敏 / 氢可酮;奈多米罗纳;硫酸特布他林;肾上腺素和甲基泼尼松;硫酸奥西那林。

[0612] 在另一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体与用来治疗 COPD 的另外的治疗药剂联合用药。可用来减轻或抑制 COPD 症状的药剂的实例包括硫酸沙丁胺醇 / 异丙托品;异丙托溴胺;沙美特罗 / 氟地松;沙丁胺醇;沙美特罗;昔萘酸盐(酯);丙酸氟地松;泼尼松;无水茶叶碱;左氟沙星;甲基氢化泼尼松琥珀酸钠 (sod succ);孟鲁司特钠;布地奈德;富马酸福莫特罗;曲安奈德;愈创甘油醚;阿齐霉素;倍氯米松;二丙酸;盐酸左沙丁胺醇 (levalbuterol);氟尼缩松;钠;三水合物;加替沙星;扎鲁司特;糠酸盐;阿莫西林 / 克拉维酸钾;氟尼缩松 / 薄荷醇;氯苯吡胺 / 氢可酮;硫酸奥西那林;甲泼尼龙;麻黄碱 / cod/ 扑尔敏;盐酸吡布特罗;麻黄碱 / 氯雷他定;硫酸特布他林;噻托溴铵;(R, R)- 福莫特罗;TgAAT;西洛斯特和罗氟斯特。

[0613] 在另一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体与用来治疗 IPF 的另外的治疗药剂联合用药。可用来减轻或抑制 IPF 症状的药剂的例子包括泼尼松;硫唑嘌呤;沙丁醇胺;秋水仙碱;硫酸盐;地高辛; γ 干扰素;甲泼尼龙琥珀酸钠 (sod succ);呋塞米;赖诺普利;硝酸甘油;螺内酯;环磷酰胺;溴化异丙托品;放线菌素 d;阿替普酶;丙酸氟地松;左氟沙星;硫酸奥西那林;硫酸吗啡;盐酸羟可酮;氯化钾;曲安奈德;无水藤霉素;钙; α -干扰素;甲氨喋呤;霉酚酸 mofetil。

[0614] 在本发明的一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体与一般用来治疗脊柱关节病的另外的治疗药剂联合用药。这样的药剂的实例包括非甾体抗炎药 (NSAIDs)、COX2 抑制剂,包括 **Celebrex[®]**, **Vioxx[®]**、**Bextra[®]**和艾托考昔。还通常用物理疗法来治疗脊柱关节

病,通常与非甾族抗炎药联合使用。

[0615] 在另一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体与用来治疗强直性脊柱炎的另外的治疗药剂联合用药。可用来减轻或抑制强直性脊柱炎症状的药剂的实例包括布洛芬、双氯芬酸和米索前列醇、萘普生、美洛昔康、吲哚美辛、双氯芬酸、塞来昔布、罗非克西、水杨酸偶氮磺胺吡啶、泼尼松、甲氨喋呤、硫唑嘌呤、二甲胺四环素、泼尼松、依那西普和英夫单抗。

[0616] 在另一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体与用来治疗牛皮癣患者关节炎的另外的治疗药剂联合用药。可用来减轻或抑制牛皮癣关节炎症状的药剂的实例包括甲氨喋呤;依那西普;罗非克西;塞来昔布;叶酸;水杨酸偶氮磺胺吡啶;萘普生;来氟洛米;醋酸甲泼尼龙;吲哚美辛;硫酸羟氯喹;舒林酸;泼尼松;倍他米松 diprop 增量;英夫单抗;甲氨喋呤;叶酸盐;曲安奈德;双氯芬酸;二甲亚砷;吡罗昔康;双氯芬酸钠;酮洛芬;美洛昔康;泼尼松;甲泼尼龙;萘丁美酮;四苯酰吡咯乙酸钠;钙泊三烯;环孢菌素;双氯芬酸;钠/米索前列醇;氟轻松醋酸酯;硫酸氨基葡萄糖;硫羟苹果酸金钠;氢可酮;二酒石酸盐/扑热息痛;布洛芬;利塞膦酸钠;磺胺嘧啶;硫代鸟嘌呤;伐地考昔;alefacept 和 efalizumab。

[0617] 在一个实施方案中,在治疗冠心病的初期手术之后,将 TNF α 抑制剂在本发明的多变量方案中施用。这样的手术的实例包括但不限于冠状动脉旁路移植法 (CABG) 和经皮透照冠状囊成血管术 (PTCA) 或血管成形术。在一个实施方案中,施用 TNF α 抑制剂以防止狭窄复发。在本发明的另一个实施方案中,施用 TNF α 抑制剂以防止或治疗再狭窄。本发明还提供一种治疗方法,其中在接受冠心病治疗手术的患者动脉中插入支架之前、同时或或之后施用 TNF α 抑制剂。在一个实施方案中,在 CABG 或 PTCA 之后施用支架。

[0618] 在本发明的情形中,根据期望的治疗部位和性质,有多种支架移植物可供采用。支架移植物可是例如分叉的或管状的移植物,圆柱形或锥形的自主膨胀或气囊膨胀的,单个产品,或组件产品。此外,可将支架移植物设置成只在远端释放药物,或者整个支架移植物从头到尾能释放药物。本发明的 TNF α 抑制剂还可在支架上来给药。在一个实施方案中,将本发明的 TNF α 抗体,包括例如阿达木单抗 /D2E7/ **HUMIRA**[®] 在内,通过药物洗脱支架来给药。

[0619] 可将 TNF α 抗体与用来治疗再狭窄的另外的治疗药剂联合用药。可用来减轻或抑制再狭窄的药剂的实例包括西罗莫司、紫杉醇、依维莫司、他克莫司、ABT-578 和对乙酰氨基酚。

[0620] 可将本发明的 TNF α 抗体与用来治疗心肌梗塞的另外的治疗药剂联合用药。可用来减轻或抑制心肌梗塞的药剂的实例包括阿司匹林、硝酸甘油、酒石酸美托洛尔、依诺肝素钠、肝素钠、氯吡格雷硫酸氢盐、卡维地洛、阿替洛尔、硫酸吗啡、琥珀酸美托洛尔、华法令钠、赖诺普利、异山梨醇一硝酸盐、地高辛、呋塞米、辛伐他汀、雷米普利、替尼普酶、马来酸依那普利、托噻米、瑞替普酶、氯沙坦钾、盐酸喹那普利 /mag carb、布美他尼、阿替普酶、依那普利拉、盐酸胺碘酮、盐酸替罗非班 m- 水合物、盐酸地尔硫翁、卡托普利、厄贝沙坦、缬沙坦、盐酸普萘洛尔、福辛普利钠、盐酸利多卡因、表非替得、头孢唑啉钠、硫酸阿托品、氨基己酸、螺内酯、干扰素、盐酸索他洛尔、氯化钾、多库酯钠、盐酸多巴酚丁胺、阿普唑仑、普伐他汀钠、阿托伐他汀钙、盐酸咪达唑仑、盐酸度冷丁、异山梨醇二硝酸酯、肾上腺素、盐酸多巴胺、比伐卢定、罗苏伐他汀、依泽替米贝 / 辛伐他汀、阿伐麦布、阿昔单抗和卡立泊来德。

[0621] 可将本发明的 TNF α 抗体与用来治疗心绞痛的另外的治疗药剂联合用药。可

用来减轻或抑制心绞痛的药剂的实例包括：阿司匹林；硝酸甘油；异山梨醇一硝酸酯；阿替洛尔；琥珀酸美托洛尔；酒石酸美托洛尔；阿罗地平磺酸盐；地高辛；dilitiazem hydrochloride，异山梨醇二硝酸酯；氯吡格雷硫酸氢盐；硝苯地平；立普妥；阿托伐他汀钙；氯化钾；辛伐他汀；盐酸维拉帕米；呋塞米；盐酸普萘洛尔；卡维地洛；赖诺普利；sprinolactone；二氢氯噻；马来酸依那普利；madolol；雷米普利；依诺肝素钠；肝素钠；缬沙坦；盐酸索他洛尔；非诺贝特；依泽替米贝；布美他尼；氯沙坦钾；赖诺普利 / 氢氯噻嗪；非洛地平；卡托普利和富马酸比索洛尔。

[0622] 在本发明的一个实施方案中，将 TNF α 抗体与通常用来治疗丙型肝炎病毒的药剂联合施药。这种药剂的实例包括干扰素 - α -2a、干扰素 - α -2b、干扰素 - α con1、干扰素 - α -n1、PEG 化干扰素 - α -2a、PEG 化干扰素 - α -2b、利巴韦林、PEG 化干扰素 - α -2b 和利巴韦林、雄去氧胆酸、甘草酸、胸腺法新、Maxamine 和 VX-497。

[0623] 可将 TNF α 抗体与局部用皮质类固醇、维生素 D 类似物和局部用或口服视黄酸或者它们的组合进行联合用药以治疗牛皮癣。另外，可将 TNF α 抗体与用于治疗牛皮癣的以下药剂之一联合用药：KDR 的小分子抑制剂 (ABT-123)、Tie-2 的小分子抑制剂、钙泊三烯、丙酸氯倍他索、曲安奈德、卤倍他索丙酸酯、他佐罗汀、甲氨喋呤、氟轻松醋酸酯、倍他米松 diprop 增量、氟轻松、奈德、阿维 A、焦油香波、戊酸倍他米松、糠酸毛他松、酮康唑、普拉莫星 / 氟轻松、戊酸氢化可的松、氟氢缩松、脲、倍他米松、丙酸氯倍他索 / emol1、丙酸氟地松、阿齐霉素、氢化可的松、增湿配方、叶酸、地奈德、煤焦油、醋酸二氟拉松、依那西普、叶酸盐、乳酸、甲氧沙林、hc / 次没食子酸铋 / znox/resor、醋酸甲泼尼龙、泼尼松、遮光剂、水杨酸、哈西奈德、地萘酚、新戊酸氯可托龙、煤提取物、煤焦油 / 水杨酸、煤焦油 / 水杨酸 / 硫、去羟米松、安定、润滑药、吡美莫司润滑药、氟轻松醋酸酯 / 润滑药、矿物油 / 蓖麻油 / na lact、矿物油 / 花生油、石油 / 十四酸异丙基酯、补骨脂素、水杨酸、肥皂 / 三溴沙仑、硫汞撒 / 硼酸、塞来昔布、英夫单抗、alefacept、efalizumab、他克莫司、吡美莫司、PUVA、UVB 和其他光疗法以及柳氮磺吡啶。

[0624] 可将抗体、抗体部分与治疗皮肤病的其他药剂联合使用。例如，可将本发明的抗体、抗体部分或其他 TNF α 抑制剂与 PUVA 疗法联用。PUVA 是补骨脂素 (P) 和长波紫外射线的联合，用来治疗很多不同的皮肤病。还可将本发明的抗体、抗体部分或其他 TNF α 抑制剂与吡美莫司联用。在另一个实施方案中，抗本发明的抗体用来治疗牛皮癣，其中抗体与他克莫司联合给药。在又一个实施方案中，将他克莫司和 TNF α 抑制剂与甲氨喋呤和 / 或环孢菌素联合给药。在再一个实施方案中，将本发明的 TNF α 抑制剂与治疗牛皮癣的受激准分子激光治疗联合施用。

[0625] TNF α 抗体可与之联用来治疗皮肤病或指甲病的其他药剂的非限制性实例包括 UVA 和 UVB 光线疗法。可与 TNF α 抑制剂联合使用的其他非限制性实例包括抗 IL-12 和抗 IL-18 治疗药剂，包括抗体在内。

[0626] 在一个实施方案中，将 TNF α 抗体与治疗贝切特氏病的另外的治疗药剂联合给药。可用来治疗贝切特氏病的另外的治疗药剂包括但不限于泼尼松，环磷酰胺 (Cytosan)，硫唑嘌呤 (也称作 imuran)，甲氨喋呤，timethoprim / 新诺明 (也称作 bactrim 或 septran) 和叶酸。

[0627] 可施用本发明的多剂治疗方案，将上面提到的治疗药剂中的任何一种单独地

或者联合地与 TNF α 抗体联合,对患有其中 TNF α 活性有害的 TNF α 相关病症的患者进行给药。在一个实施方案中,除了 TNF α 抗体之外,可将上面提到的治疗药剂中的任何一种单独地或者联合地给予类风湿性关节炎患者,以治疗 TNF α 相关病症。应认识到,另外的治疗药剂不但可如上所述用于联合疗法中,而且也可用于本文所述的要寻求有益效果的其他适应症中,

[0628] 本发明由下面的实施例作进一步详细说明,实施例不应被认为是限制性的。本申请通篇引用的所有的参考文献、专利和公布的专利申请,其内容通过引用结合到本文中。

[0629] 实施例

[0630] 实施例 1:阿达木单抗的纯化程序

[0631] 在本实施例中,设计了纯化阿达木单抗和宿主细胞蛋白质(HCP)的混合物的纯化工艺,所述工艺称为工艺 A。在工艺 A 中,阿达木单抗-HCP 混合物不进行 A 蛋白层析步骤。工艺 A 中使用的第一个柱子是阳离子交换树脂 Fractogel S,阿达木单抗能结合该树脂,而 HCP 则流过。然后将阿达木单抗从 Fractogel S 柱洗脱下来到第一洗脱物中。接着,将第一洗脱物进行 pH 病毒灭活,以获得病毒灭活的制品。接着,将病毒灭活制品施加到阴离子交换树脂 Q 琼脂糖凝胶柱,阿达木单抗不能结合该树脂,从而获得第一流通物。然后将第一流通物施加到疏水相互作用柱苯基琼脂糖凝胶柱,阿达木单抗能结合该柱而 HCP 则流过,从而获得第二洗脱物。对第二洗脱物进行进一步的加工和包装,获得最终瓶装产品。

[0632] 更详细地说,工艺 A 包括以下步骤:

[0633] 步骤 1:Fractogel S 柱,100x20cm(157L), $v = 175\text{cm/hr}$,荷载量 $\leq 30\text{g}$ 蛋白质/L 树脂/循环,用 20mM 磷酸钠,25mM 氯化钠平衡。荷载了阿达木单抗后,将柱子用平衡缓冲液洗涤一次,用包含 20mM 磷酸钠,150mM 氯化钠的洗脱缓冲液洗脱,获得第一洗脱物;

[0634] 步骤 2:脱脂质过滤 (delipid filtration);

[0635] 步骤 3:超滤;

[0636] 步骤 4:在 pH3.5 下进行 pH 灭活 1 小时;灭活完成后,将 pH 调节到 6.8-7.5,用两体积的 50mM 三乙醇胺洗涤滤器组合 (filter train);

[0637] 步骤 5:Q 琼脂糖凝胶 FF 柱,60x30cm(85L), $v = 150\text{cm/hr}$,荷载量 $\leq 40\text{g}$ 蛋白质/L 树脂/循环,用包含 25mM 三乙醇胺,40mM 氯化钠,pH7.6 的平衡缓冲液平衡;获得流通物;

[0638] 步骤 6:苯基琼脂糖凝胶 HP 柱,80x15cm(75L), $v = 75\text{cm/hr}$ (洗脱 37.5cm/hr),荷载量 20-40g 蛋白质/L 树脂/循环,用包含 20mM 磷酸钠,1.1M(NH₄)₂SO₄,pH7 的平衡缓冲液平衡,用平衡缓冲液洗涤一次,执行盐不连续梯度至 11mM 磷酸钠,0.625M(NH₄)₂SO₄,pH7.0 进行洗脱,从而获得第二洗脱物,如果荷载量 $\leq 35\text{g}$ 蛋白质/L 树脂,对产物峰进行分级分离;

[0639] 步骤 7:病毒过滤;

[0640] 步骤 8:最终超滤/渗滤;

[0641] 步骤 9:最终装瓶。

[0642] 工艺 A 的更多细节还在以下实施例 2 中描述。

[0643] 实施例 2:纯化阿达木单抗以改进收率和降低杂质

[0644] 对抗体阿达木单抗的制造工艺即以上实施例 1 描述的工艺 A 中的捕捉和精细纯化操作作出修改。修改的工艺在本文中称为“工艺 B”,包括以下总体步骤:原料是从用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞表达系统进行的发酵过程获得的混合物。该混合物首先用阳离子交换层

析柱即 Fractogel S 柱进行分离,其中阿达木单抗被捕捉到柱子上(称为“捕捉物”)。由于置换作用,Fractogel S 柱上的荷载量得以增加。采用洗涤 Fractogel S 柱的改进方法,来降低宿主细胞蛋白质(HCP)的量。用多个洗液对结合有阿达木单抗的 Fractogel S 柱进行洗涤,包括中间洗液,它是包含 45%洗脱缓冲液和 55%注射用水(WFI)的更高电导率的洗液。在捕捉和洗涤后,从 Fractogel S 柱洗脱下阿达木单抗,将洗脱物施加于阴离子交换层析柱即 Q 琼脂糖凝胶柱。在将第一阿达木单抗洗脱物通过阴离子交换柱之前,用基于 pH 和电导率的改进方法对洗脱物进行病毒灭活。阿达木单抗制品被收集在阴离子柱的流通物中,随后用疏水相互作用层析柱即苯基琼脂糖凝胶柱进行进一步分离。将苯基琼脂糖凝胶柱出来的洗脱物用本领域的标准方法进一步加工,进行病毒过滤、最终超滤和最终装瓶。

[0645] 工艺 B 是据以获得 HCP 和组织蛋白酶 L 酶原水平降低的抗体制品的改进纯化方法。本文描述的工艺是用 6000L 体积进行的,但是应指出的是工艺 B 中描述的改进工艺可用任何体积下进行。表 5 比较了工艺 A 与工艺 B(工艺 B 中的改进用粗体突出显示)。

[0646] 表 5:工艺 A 和工艺 B 的比较

[0647]

单元操作	工艺 A	工艺 B
Fractogel S 柱	100 x 20 cm (157 L) v = 175 cm/hr 荷载量 ≤ 30 g 蛋白质/L 树脂/循环 洗液 1 = 平衡缓冲液 洗脱 = 洗脱缓冲液	100 x 20 cm (157 L) v = 175 cm/hr 荷载量 ≤ 35 g 蛋白质/L 树脂/循环 洗液 1 = 平衡缓冲液 洗液 2 = 45% 洗脱缓冲液: 55% WFI 洗脱 = 洗脱缓冲液
脱脂质过滤	这个加工步骤没有变化	
超滤	这个加工步骤没有变化	
pH 灭活	灭活完成后, 调 pH 至 6.8 – 7.5 用两体积的 50 mM 三乙醇胺洗 涤滤器组合	灭活完成后, 调 pH 至 7.8 – 8.2 用大约 2.5 体积的 WFI 洗涤滤器 组合, 以达到电导率在 3.9 – 5.2 mS/cm 的范围
Q 琼脂糖凝 胶 FF 柱	60 x 30 cm (85 L) v = 150 cm/hr 荷载量 ≤ 40 g 蛋白质/L 树脂/循 环	60 x 30 cm (85 L) v = 150 cm/hr 荷载量 ≤ 40 g 蛋白质/L 树脂/循 环
苯基琼脂糖 凝胶 HP 柱	80 x 15 cm (75 L) v = 75 cm/hr (洗脱 37.5 cm/hr) 荷载量 20 – 40 g 蛋白质/L 树脂/ 循环, 如果荷载量 ≤ 35 g/L 树 脂, 对产物峰进行分级分离	80 x 15 cm (75 L) v = 75 cm/hr (洗脱 37.5 cm/hr) 荷载量 20 – 40 g 蛋白质/L 树脂/ 循环, 如果荷载量 ≤ 35 g/L 树脂, 不对产物峰进行分级分离
病毒过滤	这个加工步骤没有变化	
最终超滤/渗 滤	这个加工步骤没有变化	
最终装瓶	这个加工步骤没有变化	

[0648] 工艺 B 各步骤的改进在下文中作更详细的描述。

[0649] 阳离子层析

[0650] 工艺 B 的主要回收和捕捉操作包括深度过滤、Fractogel SO₃⁻ 阳离子交换层析 (Fractogel S), 后者起到从澄清的收获物捕捉阿达木单抗和减少工艺相关杂质 (例如 CHO 宿主细胞和培养基杂质) 的作用。此操作使用 100cm 直径 x 20cm 长的柱子 (柱床体积 157L)。该柱装填有 Fractogel S 树脂 (EM Industries, Hawthorne, NY), 对不对称度和理论板当量高度 (HETP) 进行测量以确定装填质量。然后将该柱用 1.0M NaOH 消毒 1 小时, 保存在 0.1M NaOH 中备用。

[0651] 阳离子交换层析可受蛋白质荷载量、离子强度 (通过对过滤的收获物的稀释来控制)、pH 和线性速率的影响。蛋白质荷载量可影响选择性、分辨率 (纯度) 和收率。荷载样品的离子强度 (由荷载量稀释来控制) 和 pH 会影响结合容量、选择性、分辨率和收率。线性速率可影响质量输运特性, 潜在地导致在非常高的流速下结合率和分辨率下降, 在非常低的流速下出现轴向扩散。

[0652] Fractogel S 柱的最大荷载量被增加到 35g 蛋白质 /L 树脂。阳离子柱用 20mM 磷酸钠, 25mM NaCl, pH7 平衡。在平衡后, 给该柱荷载上 ≤ 35 g 蛋白质 /L 树脂的稀释深度滤液。一份深度滤液用大约 1.3 份水稀释, 以将电导率减少至大约 6.1mS/cm。然后用平衡缓冲液洗涤该柱至基线, 接着用含 9mM 磷酸钠, 68mM NaCl, pH7 (相当于 45% 洗脱缓冲液, 55% WFI) 的洗液进行洗涤。用 20mM 磷酸钠, 150mM NaCl, pH7 (洗脱缓冲液) 将产物从该柱洗脱下来到单一流份中。产物汇集物 (product pool) 是从产物峰 A_{280} 在前缘 (leading edge) 和后缘 (trailing edge) 的 10% 全刻度偏离 (full-scale deflection) 收集的。该柱按需循环周转以处理粗阿达木单抗。将每次柱循环得到的 Fractogel S 洗脱物汇集到同一收集罐中。在每次循环之间, 用 25mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH7 使该柱再生。

[0653] 实验室规模进行的实验证明, 产物的有效回收和 HCP 的下降可在更高的荷载量范围内实现, 这个范围高于先前确立的 15-30g 蛋白质 /L 树脂的可接受操作范围 (AOR)。对阿达木单抗穿过率 (breakthrough) 与柱荷载量的分析表明, 在 pH7、38g/L 树脂下出现 5% 计算穿过率。因此, 对于 Fractogel S 层析步骤, 将 AOR 修改确定为 ≤ 35 g 蛋白质 /L 树脂。总之, 荷载量限度也增加到了 35 克蛋白质 /L 树脂, 以增加工艺容量。

[0654] 在用 Fractogel 树脂进行的另一组实验中, 研究了 pH 对阿达木单抗穿过率与柱荷载量的影响。具体的说, 用产物穿过率曲线来确定在限定荷载条件下的树脂动力结合容量。下表 6 总结了在前面描述的 pH7 条件下进行的 Fractogel 荷载容量研究的回收数据。将 10g/L 下的回收百分数归一化为 100%。

[0655] 表 6 : pH7 下进行的 Fractogel 荷载容量研究的回收数据

[0656]

荷载容量 (g/L)	AYF16G 回收率 (%)	AYF17G 回收率 (%)	平均回收率 (%)
10	100	100	100
15	99	99	99
20	98	98	98
25	99	97	98
30	98	96	97
40	95	95	95
50	93	88	91

[0657] Fractogel 步骤收率 $\geq 50\%$, BR-068。

[0658] pH7 下的结果表明, 对于小于 50g 阿达木单抗 /L Fractogel 树脂的荷载条件, 观察到大于 90% 阿达木单抗回收率。将阿达木单抗穿过率对荷载容量作图, 绘制理论穿过率曲线。发现在 pH7 下理论 10% 穿过率出现在 54g 阿达木单抗 /L Fractogel 树脂。同样发现在 pH7 下理论 5% 穿过率出现在 38g 阿达木单抗 /L Fractogel 树脂, 从而确证了以上所述的结果。

[0659] 如上所述进行了类似的研究, 例外的是调整荷载和第一洗涤 pH 条件至 pH5。用 24mM 柠檬酸和 51mM 磷酸氢二钠, pH5 平衡阳离子柱。平衡后, 给柱子荷载上最多 80g 蛋白质 /L 树脂的稀释深度滤液。细胞培养收获物在进行深度过滤前先用 3M 乙酸 (acidic acid) 调节 pH 至 5.0。一份深度滤液用大约相同体积的水稀释, 以将电导率降低到大约 8-10mS/cm。同样, 将阿达木单抗穿过率对荷载容量作图, 绘制理论穿过率曲线。在研究条件下, 发现理论 10% 穿过率出现在大约 74g 阿达木单抗 /L Fractogel 树脂。发现理论 5% 穿过率

出现在大约 73g 阿达木单抗 /L Fractogel 树脂。由于树脂的阳离子交换特性,降低层析条件中的 pH 显著地增加了阿达木单抗动力结合容量。比较 pH5 和 pH7 下的穿过率曲线,观察到阿达木单抗分子和 Fractogel 树脂之间的结合在较低 pH 下要强得多。还发现在 pH5 下荷载动力容量更高,则所实现的 HCP 清除也更好。下表 7 总结了在新近试验的 pH5 研究条件下 Fractogel 荷载容量与洗脱物中 HCP 含量的数据。数据清楚表明在试验条件下,阿达木单抗对 HCP 的置换已出现。

[0660] 表 7 :pH5 下不同荷载容量下 Fractogel 洗脱物中的 HCP 含量

[0661]

荷载容量 (g/L)	HCP(ng HCP/mg 阿达木单抗)
15	6102
20	6782
25	5767
30	5167
40	3983
60	3207

[0662] 由于在 pH5 下对阿达木单抗穿过率与柱荷载量的分析表明 5% 计算穿过率出现在 73g/L 树脂,对于在 pH5 下的 Fractogel S 层析步骤,可将 AOR 修改确定为 ≤ 70 g 蛋白质 /L 树脂。总之,之前在 pH7 下被增加到 35g 蛋白质 /L 树脂的荷载限度(如上所述),通过将 pH 降低到 5,还可再增加到 70g 蛋白质 /L 树脂。

[0663] 中间洗涤

[0664] 为进一步减少阿达木单抗制品中杂质的量,在从阳离子柱洗脱阿达木单抗之前可先进行中间洗涤步骤(见下表 8)。这个另外的洗涤是根据洗脱缓冲液的电导率进行调整,并有助于改进 HCP 的清除。在洗脱前插入中间洗涤步骤,与工艺 A 相比,使随阿达木单抗洗脱的 HCP 的量减少超过 60%。所研究的参数包括洗脱缓冲液与洗液中所用的水的掺合比(%洗脱缓冲液)、电导率、pH、洗涤体积、流速和树脂龄期(resin age)。最佳洗液由 45% 洗脱缓冲液(20mM 磷酸钠,150mM 氯化钠,pH7)和 55% 水的掺合物构成。表 8 给出的数据比较了有和没有进行另外的洗涤时 Fractogel S 洗脱物中的 HCP 水平。对 Fractogel S 洗脱物样品进行 HCP 测定,并与中试规模的 Fractogel S 工艺(更高荷载量和洗涤步骤相结合)的洗脱物中的 HCP 水平进行比较。中试规模的数据表明,加入第二洗涤步骤能显著地改进 Fractogel S 步骤对 HCP 的清除。

[0665] 表 8 :在实验室规模下有和没有进行洗脱前洗涤步骤时 Fractogel S 洗脱物中的 HCP 水平

[0666]

样品	柱荷载量 g 蛋白质/L 树脂	步骤收率(%)	HCP (ng/mg 阿达木单抗)
批次 A, 没有第二次洗涤 ^a	25	96	19410
批次 B, 没有第二次洗涤 ^a	25	96	22992
批次 C, 没有第二次洗涤 ^a	25	93	21931
批次 D, 没有第二次洗涤 ^a	25	97	20037
6000 L 荷载量 ^b , 中试规模 ^c , 有第二次洗涤步骤	30	95	4914

[0667] ^aFractogel S 洗脱物样品取自所指的 6000L 批次并分析 HCP 含量

[0668] ^b 荷载物由各批次的过滤收获物掺合组成。

[0669] ^c 中试规模的柱尺寸是 10 (D) x21 (L) cm ;第二次洗涤缓冲液 :45 % 洗涤缓冲液 (20mM 磷酸钠, 150mM 氯化钠, pH7.2), 55% 注射用水。

[0670] 图 1 给出每个工艺的 Fractogel S 层析步骤的典型洗脱曲线。工艺 B 包括在洗脱前进行上述的另外中间洗涤步骤, 因此洗脱峰的前缘较陡, 检测到的早期洗脱物质比之前的工艺要少。总之, 将正好在洗脱阿达木单抗前进行的中间洗涤步骤引入到 Fractogel S 步骤, 以改进工艺相关杂质 (如 HCP) 的清除。

[0671] 病毒灭活

[0672] 工艺 B 的低 pH 灭活步骤, 通过使可能存在于脱脂质滤液的潜在未检测到的有包膜病毒灭活, 提供了安全余地。随后将病毒灭活汇集物进行 pH 中和及过滤, 以除去颗粒物和使生物负荷 (bioburden) 减至最低。阿达木单抗在低 pH 病毒灭活过程中的质量可能受 pH 和低 pH 温育时间的影响。病毒灭活不但取决于上述这些参数, 还可能受蛋白质浓度的影响, 高蛋白质浓度可能会降低灭活作用。在低 pH 下的最小温育时间从 15 分钟增加到 60 分钟。对在低 pH 步骤之前和之后获取的制造样品的分析证实, 阿达木单抗在 pH3.5 下可安全保持 1 小时, 而不损害其保护鼠 L929 细胞免受肿瘤坏死因子 (TNF) 的细胞毒性作用的能力。

[0673] 在灭活后, 用下一柱子 (例如 Q 琼脂糖凝胶柱) 的平衡缓冲液对病毒灭活洗脱物的 pH 和电导率进行调节。将 pH 调节到 7.8-8.2, 目标 pH 是 8.0。总之, 对用作 Q 琼脂糖凝胶 FF 荷载物的病毒灭活汇集物的 pH 和电导率作出调节, 以与 Q 琼脂糖凝胶平衡缓冲液的 pH 和电导率匹配。

[0674] 阴离子层析

[0675] 阴离子柱 (即 Q 琼脂糖凝胶柱) 步骤起到减少工艺相关杂质的作用, 所述杂质如 HCP, 具体包括组织蛋白酶 L 酶原, 以及 DNA 和胰岛素。用 60cm 直径 x30cm 长的柱子 (柱床体积 85L) 进行 Q 琼脂糖凝胶 FF 层析。该柱装填有 Q 琼脂糖凝胶 FF 树脂 (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), 对不对称度和 HETP 进行测量以确定装填质量。然后将该柱用 1.0M NaOH 消毒 1 小时, 保存在 25mM 磷酸钠, 20% 异丙醇中备用。

[0676] 树脂的平衡是用 25mM 三乙醇胺, 40mM NaCl, pH8 (平衡缓冲液) 实现。这个步骤的最大蛋白质荷载量是 ≤ 40g 蛋白质 /L 树脂 / 循环。工艺相关杂质被吸附到树脂上, 而阿达木单抗则流过柱子。经稀释、过滤、病毒灭活的材料通常在大约相等数量的两个循环中进

行处理；可能需要另外的循环来处理所有可供利用的材料。荷载和洗脱是在 150cm/hr 下进行，当 A_{280} 上升超过 2% 全刻度时收集柱流通物。然后用平衡缓冲液洗涤柱子，收集洗液，直到 A_{280} 返回 5% 全刻度。将此洗液与流通物汇集一起，称为 Q 琼脂糖凝胶 FTW。在各次循环之间，用 25mM 磷酸钠，1.0M NaCl，pH7 使该柱再生，然后用平衡缓冲液平衡。

[0677] 在流通模式下操作的阴离子交换层析，会受到蛋白质荷载量、离子强度（电导率，可通过稀释低 pH 灭活滤液来控制）、pH 和线性速率的影响。蛋白质荷载量会影响选择性和收率。荷载样品的离子强度和 pH 会影响结合容量和选择性。线性速率可影响质量输运特性，潜在地导致在非常高的流速下工艺相关杂质的结合下降，在非常低的流速下出现轴向扩散。已根据实验室研究确立了新的荷载电导率和 pH 范围。

[0678] 实验室研究表明，可通过改变荷载条件来增强 Q 琼脂糖凝胶 FF 步骤对 HCP 的降低作用。所研究的参数包括荷载 pH、电导率和每升树脂荷载的蛋白质克数。调节荷载电导率和 pH 以匹配柱平衡缓冲液的电导率和 pH (5mS/cm, pH8)，并限制荷载量 ≤ 40 g 阿达木单抗 /L 树脂，能使 HCP 和组织蛋白酶 L 酶原的清除得到改进。表 9 给出的实验室规模的数据显示了在工艺 A (pH7.7, 电导率 6.65mS/cm) 下和在工艺 B 的 pH8 和 5mS/cm 电导率的改进工艺条件下的 HCP 减少情况。将 Q 琼脂糖凝胶柱上的荷载量限制到 40g/L 树脂能使 HCP 的清除率提高 4 倍，对荷载物的 pH 和电导率作另外的修正能使 HCP 减少量再增加 3 倍。

[0679] 表 9：在不同 Q 琼脂糖凝胶 FF 荷载条件下的 HCP 减少情况

[0680]

荷载量 G 蛋白质/L 树脂	荷载条件	荷载 HCP (ng/mg 阿达木 单抗)	流通 HCP (ng/mg 阿达 木单抗)	HCP 的减少 倍数
80	pH 7.7, 6.65	726	452	1.6
40	pH 7.7, 6.65	726	114	6.4
40	pH 8.1, 5.08	726	37.6	19.3

[0681] 随后将从离子交换柱获得的包含阿达木单抗的 HCP 降低流通物用于疏水相互作用层析。

[0682] 疏水相互作用层析

[0683] 苯基琼脂糖凝胶 HP 层析柱的目的是进一步减少工艺相关杂质和产物相关杂质 (product-related impurities)，两种杂质分别例如是宿主细胞蛋白质和聚集体 (aggregate)。此操作使用 80cm 直径 x15cm 长的柱子（柱床体积 75L）。该柱装填有苯基琼脂糖凝胶 HP 树脂 (AmershamPharmacia, Piscataway, NJ)，对不对称度和 HETP 进行测量以确定装填质量。然后将该柱用 1.0M NaOH 消毒 1 小时，保存在 25mM 磷酸钠，20% 异丙醇中备用。

[0684] 树脂的平衡是用 20mM 磷酸钠，1.1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，pH7.0（平衡缓冲液）来实现。此步骤的蛋白质荷载量是 20-40g 蛋白质 /L 树脂，需要两个或三个层析循环来处理全部的可供利用材料。该柱是在 75cm/hr 的线性速率下操作。用等体积的 40mM 磷酸钠，2.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，pH7.0 稀释 Q 琼脂糖凝胶流通物。荷载后，该柱用 20mM 磷酸钠，1.1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，pH7.0 进行洗涤。产物通过进行盐不连续梯度至 11mM 磷酸钠、0.625M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH7.0) 来洗脱。吸光度上升超过 50% UV 全刻度时收集产物，一直继续到吸光度下降到小于 20% UV 全刻度成为

峰拖尾为止。

[0685] 对 Fractogel S 和 Q 琼脂糖凝胶 FF 层析步骤的工艺改进,显著地减少了苯基琼脂糖凝胶 HP 步骤所负的减少工艺相关杂质的工作负担。由于工艺改进的缘故,苯基琼脂糖凝胶 HP 步骤的主要功能是除去阿达木单抗聚集体。

[0686] 工艺 A 要求在 35g 蛋白质 /L 树脂或更高的柱荷载量下,UV 吸光度上升超过 50% 全刻度偏转时收集产物,一直继续到吸光度下降到小于 20% UV 全刻度为止。在低于 35g 蛋白质 /L 树脂的柱荷载量下,将一开始的 0.15 柱体积的洗脱峰排除出收集汇集物,以改进此步骤的 HCP 清除。工艺 B 中在之前的各层析步骤引入各种改变,就不太需要进行在低于 35g 蛋白质 /L 树脂的柱荷载量下所进行的峰排除,因为所进入的 HCP 荷载显著地减少了。HCP 荷载的减少能使荷载范围扩大而不需进行分级分离。这个改变的作用使得可以通过回收工艺对来自每次发酵的所有材料进行处理,而无需苯基琼脂糖凝胶 HP 削峰 (peakcutting)。

[0687] 在实验室规模研究了苯基琼脂糖凝胶操作的线性流速。使阿达木单抗荷载量保持恒定,研究了 25-125cm/hr 的流速。由 SEC(%单体)和 HCP 清除率(表 10)评估出,流速的确影响了产物回收,但对产物质量没有影响,这证明 25-125cm/hr 的较广范围是适合的。苯基琼脂糖凝胶制造操作的目标流速保持在之前确立的 75cm/hr 和 37.5cm/hr(对于洗脱相)。

[0688] 表 10:苯基琼脂糖凝胶流速评估

[0689]

流速(cm/hr)	荷载量(g 蛋白质/L 树脂)	%回收率 ^a	%单体 ^b	% HCP 清除率
25	32.5	69	99.98	92.1
75	32.5	84	99.98	92.2
125	32.5	84	99.98	91.8

[0690] ^a 苯基琼脂糖凝胶步骤收率作用限度: $\geq 48\%$

[0691] ^b 苯基琼脂糖凝胶步骤 SEC 作用限度: $\geq 98\%$ 单体

[0692] 对苯基琼脂糖凝胶 HP 层析的可接受操作范围进行了研究。疏水相互作用层析可受蛋白质荷载量、离子强度(电导率)和线性速率的影响。蛋白质荷载量会影响选择性和收率。荷载样品的离子强度会影响结合容量、选择性和分辨率。线性速率可影响质量运输特性,潜在地导致在非常高的流速下工艺相关杂质的分辨率下降,在非常低的流速下出现轴向扩散。线性流速范围被扩展到 25-125cm/hr。苯基琼脂糖凝胶层析的其他可接受操作范围与之前对 6000L 工艺确立的范围并无不同,列于表 10 中。

[0693] 证明两种工艺的精细纯化操作性能是相当的。作为改进的工艺 B 的一部分的变化包括:调节用作 Q 琼脂糖凝胶 FF 荷载物的病毒灭活汇集物的 pH 和电导率,以与 Q 琼脂糖凝胶平衡缓冲液匹配;将 Q 琼脂糖凝胶荷载量限制至小于 40g 蛋白质 /L 树脂;和排除了在小于 35g 蛋白质 /L 树脂的荷载量下要将苯基琼脂糖凝胶洗脱物进行分级分离的这一要求。由 SEC 和 WCX-10 测定测出,两个工艺的中间物(intermediate)的质量是相当的。

[0694] 图 2 和 3 分别给出每种工艺的 Q 琼脂糖凝胶 FF 和苯基琼脂糖凝胶 HP 层析步骤的典型洗脱曲线。收集包含阿达木单抗的 Q 琼脂糖凝胶流通物。工艺 B 的荷载体积量高于之前的工艺,因为在之前的层析步骤(Fractogel S)荷载量较大和稀释体积增加;因此总流通物体积相应较大。

[0695] 总之,消除了在小于 35g 蛋白质 /L 树脂的荷载量下要将苯基琼脂糖凝胶洗脱物进行分级分离的这一要求,因为 Fractogel S 和 Q 琼脂糖凝胶操作上的变化导致了杂质清除上的改进。另外,线性流速范围被扩展到 25-125cm/hr。

[0696] HCP 的降低

[0697] 工艺 B 包括对 Fractogel S 和 Q 琼脂糖凝胶层析步骤的改变,执行这些改变是为了改进对工艺相关杂质(如宿主细胞蛋白质(HCP),具体的说组织蛋白酶 L 酶原)的控制。进行了研究以评估工艺 B 对这些杂质的去除的影响。在制造规模上评估了 Fractogel S 柱、Q 琼脂糖凝胶 FF 柱和苯基琼脂糖凝胶 HP 柱去除 CHO 宿主细胞蛋白质的能力。用 HCP ELISA 测定宿主细胞蛋白质水平(见实施例 3),数据以 ngHCP/mg 阿达木单抗表示。

[0698] 在工艺 B 的过程中获取代表性样品,测定 HCP。结果在表 11 中给出。对层析步骤的改变,代表着预期能改进 HCP 清除率的更为严格的层析条件。所报道的脱脂质过滤结果是工艺 A 的结果。在工艺 B 中脱脂质过滤步骤并无变化,因此将这个步骤所实现的 HCP 降低系数包括在工艺 B 的总体性能中。平均来说,工艺 B 能够除去大于 $4.35\log_{10}$ 的 HCP。Fractogel S 层析和 Q 琼脂糖凝胶 FF 层析都清除超过 $11\log_{10}$ HCP,深度过滤步骤还清除超过 $11\log_{10}$ 。另外的 HCP 是通过苯基琼脂糖凝胶柱去除,但是清除值没法计算,因为荷载量和洗脱物 HCP 水平都低于定量水平。工艺 B 所产生的药物物质显示出 HCP 水平低于三个验证批次的定量限度 (LOQ)。

[0699] 表 11: 宿主细胞蛋白质清除

[0700]

层析步骤	HCP 进 (ng/mg 阿达木单抗)	HCP 出 (ng/mg 阿达木单抗)	Log ₁₀ 降低系数
Fractogel SO₃-柱(平均)^a			1.71
批次 D	1,035,101	18,199	1.75
批次 E	747,748	16,079	1.67
批次 F	1,350,632	26,772	1.70
脱脂质过滤(平均)^b			1.58
批次	18,174	1,466	1.11
批次 H	34,369	805	1.63
批次 I	38,453	570	1.83
批次 J	25,774	466	1.74
Q 琼脂糖凝胶 FF 柱(平均)^a			1.07
批次 D	269.98	循环 A: 28.41 循环 B: 30.54	0.98 0.95
批次 E	313.44	循环 A: 28.94 循环 B: 29.82	1.03 1.02

[0701]

批次 F	391.96	循环 A: 22.51 循环 B: 26.52	1.24 1.17
苯基琼脂糖凝胶 HP 柱			
(平均)^a			N/A
批次 D	< 40.44	< 9.08	N/A
批次 E	< 43.56	< 8.65	N/A
批次 F	< 44.65	< 9.22	N/A
总清除^c			4.35

[0702] ^a 工艺 B 的数据

[0703] ^b 工艺 A 的数据

[0704] ^c 小于 1 的 Log₁₀ 降低系数不包括在总清除计算中。

[0705] HCP 水平和组织蛋白酶 L 酶原水平的总体改进情况还分别在表 12 和 13 中显示, 其中工艺 B 与工艺 A 相比显示出两种水平都显著下降。

[0706] 组织蛋白酶 L 酶原工艺作图 (mapping)

[0707] 在几个步骤获取工艺中间样品, 并分析组织蛋白酶 L 酶原向组织蛋白酶 L 的激活所产生的荧光。下表 14 显示了工艺 B 样品和工艺 A 样品的结果。因为干扰该方法的缘故, Fractogel S 荷载物和苯基琼脂糖凝胶荷载物及洗脱物样品没能进行评估。Q 琼脂糖凝胶 FF 层析步骤具有除去荷载物中超过 90% 的可检测酶的能力。得自改进的工艺的 Q 琼脂糖凝胶流通物和洗液 (FTW), 其所含的可激活组织蛋白酶 L 酶原比得自之前的 6000L 工艺的 Q 琼脂糖凝胶 FTW 少大约 50%。在 Fractogel S 步骤和 Q 琼脂糖凝胶步骤之间也出现减少, 在这两个步骤之间进行了脱脂质过滤、超滤浓缩、低 pH 病毒灭活和深度过滤的操作。

[0708] 表 14: 工艺 A 和工艺 B 的组织蛋白酶 L 酶原作图

[0709]

样品	工艺 B (RFU/s/mg)			平均 ± SD	降低系数 ^a
	批次 S	批次 U	批次 T		

[0710]

Fractogel 洗脱物汇集物	46	59	57	54 ± 7	N/A
Q 琼脂糖凝胶荷载物	32	31	39	34 ± 4	1.6
Q 琼脂糖凝胶 FTW	2.2	3.6	2.3	2.7 ± 0.8	13.4
药物物质	2.6	3.0	2.7	2.8 ± 0.2	None
工艺 A					
	批次 V	批次 W	批次 X	平均 ± SD	降低系数
Fractogel 洗脱物汇集物	96	83	96	91 ± 7	N/A
Q 琼脂糖凝胶荷载物	46	67	58	57 ± 10	1.6
Q 琼脂糖凝胶 FTW	5.8	5.7	5.0	5.5 ± 0.5	10.5
药物物质	4.2	3.9	3.8	4.0 ± 0.2	1.4

[0711] ^a 降低系数是用每个批次的四舍五入前的数据计算的,以三次运行的平均值报道。

[0712] 图 4 比较显示了工艺 A 和 B 的组织蛋白酶 L 酶原降低。工艺 B 显示出在每个中间步骤组织蛋白酶 L 酶原水平都是比工艺 A 要低,表明对 Fractogel S 和 Q 琼脂糖凝胶层析步骤的变动能改进这种杂质去除方面的工艺性能。

[0713] HCP 工艺作图

[0714] 从工艺 A 和 B 收集工艺中间样品,分析 HCP 含量。进行这个研究是为了直接比较两个工艺的 HCP 降低情况。HCP 分析的结果在表 15 中显示。两个工艺都在 Fractogel S 步骤和 Q 琼脂糖凝胶步骤出现 HCP 的显著去除,但工艺 B 显示出这两个步骤的 HCP 清除情况都有改进。改进的 Fractogel S 步骤(它包括在产物洗脱之前的第二洗涤步骤)的降低系数为 96 ($1.96 \log_{10}$),而之前工艺的相同步骤的降低系数为 48 ($1.67 \log_{10}$)。两个工艺都显示出脱脂质过滤实现了降低系数 50,该过滤是在 Fractogel S 步骤和 Q 琼脂糖凝胶步骤之间进行的。工艺 B 中的 Q 琼脂糖凝胶操作是在荷载物调节到柱平衡缓冲液的 pH 和电导率下进行的。改进的 Q 琼脂糖凝胶步骤所实现的 HCP 降低系数比之前工艺的大四倍(21 比 5)。在苯基琼脂糖凝胶步骤出现进一步的降低,使得在改进工艺的 UF/DF 汇集物和药物物质中 HCP 水平低于定量水平;之前的药物物质样品显示出非常低但可测量的 HCP 水平。

[0715] 表 15:工艺 A 和 B 的宿主细胞蛋白质作图

[0716]

样品	工艺 B 批次 (ng HCP/mg 阿达木单抗)			平均值 ± SD	降低系 数
	批次 D	批次 E	批次 F		
过滤的收获物	1,330,000	813,000	2,130,000	1,420,000 ± 661,000	N/A
Fractogel 洗脱物汇集物	12,400	19,200	15,300	15,600 ± 3370	96
Q 琼脂糖凝胶荷载物	554	220	371	382 ± 167	50
Q 琼脂糖凝胶 FTW	18.5	20	17	18.5 ± 1.5	21
药物物质 ^a	< 5	< 5	< 5	< 5	> 4

[0717] 工艺 A 批次 (ng HCP/mg 阿达木单抗)

[0718]

	批次 V			平均值 ± SD	降低系 数
	批次 V	批次 W	批次 X		
过滤的收获物	2,030,000	2,520,000	1,870,000	2,140,000 0± 339,000	N/A
Fractogel 洗脱物汇集物	40,400	40,700	56,400	45,800 ± 9160	48
Q 琼脂糖凝胶荷载物	536	1347	1248	1040 ± 442	50
Q 琼脂糖凝胶 FTW	98	213	283	198 ± 93	5
药物物质	5	8	11	8 ± 3	24

[0719] ^a 这个步骤的所有改进批次样品都低于 5ng/mg 定量限度。用数值 5ng/mg 来估计降低系数。

[0720] 图 5 比较显示了工艺 B 与工艺 A 的 HCP 降低情况, 图中以 \log_{10} 刻度绘图。工艺 B 在每个中间步骤都显示出 HCP 水平比工艺 A 要低, 包括在 Q 琼脂糖凝胶步骤后有 10 倍的差异, 这表明对 Fractogel S 和 Q 琼脂糖凝胶层析步骤的改动能改进 HCP 去除方面的工艺性能。捕捉和精细纯化操作对处理能力的影响。

[0721] 引入了两个变化, 以提高工艺 B 中的捕捉和精细纯化操作的处理能力。第一个变化是将 Fractogel S 柱上的许可荷载量, 在 pH7 下从 30g 蛋白质 /L 树脂增加到 35g 蛋白质 /L 树脂, 在 pH5 下从 30g 蛋白质 /L 树脂增加到 70g 蛋白质 /L 树脂。这些变化让得自生物反应器的所有经过滤的收获材料都被荷载到 Fractogel S 柱上。改进工艺 (pH7 下) 的 Fractogel S 柱上的平均荷载量比之前工艺的荷载量多大约 9% (表 16)。

[0722] 第二个变化是排除了在小于 35g 蛋白质 /L 树脂的荷载量下要将苯基琼脂糖凝胶产物峰进行分级分离的这一要求。分级分离导致要弃去大部分的产物峰以充分地控制宿主细胞蛋白质。在 Fractogel S 步骤和 Q 琼脂糖凝胶步骤执行的、旨在控制宿主细胞蛋白质水平和组织蛋白酶 L 酶原水平的变化, 使得没有必要进行苯基琼脂糖凝胶峰的分级分离。这

个变化使得对于工艺 B 可以在较低的荷载量范围运行三个循环的苯基琼脂糖凝胶柱,结果与工艺 A 相比苯基琼脂糖凝胶柱上的总荷载量增加 12%。

[0723] 表 16 比较了改进工艺 B 和工艺 A 的 Fractogel S 柱和苯基琼脂糖凝胶柱上的荷载量及最终药物物质质量。改进的工艺显示出对于三个验证批次阿达木单抗收率都有大约 8% 的总增加。

[0724] 表 16 :工艺 A 和 B 的 Fractogel S 柱和苯基琼脂糖凝胶柱荷载量和药物物质收率
[0725]

工艺	Fractogel S 荷载量 ^a	苯基琼脂糖凝胶荷载量 ^a	药物物质收率 ^a
工艺 A (n = 15)	7641 ± 138	5947 ± 28	5290 ± 158
工艺 B (n = 3)	8375 ± 293	6752 ± 38	5748 ± 75
工艺 B 增加	9%	12%	8%

[0726] ^a 荷载量和收率以蛋白质克数表示

[0727] 改进的抗体阿达木单抗纯化方法改进了 HCP 和组织蛋白酶 L 酶原的清除 (相对于工艺 A), 导致它们在药物物质中的水平降低。更具体的说, 为比较药物物质批次释放数据, 测定了 HCP 和组织蛋白酶 L 酶原的水平, 如下表 17 所示。

[0728] 表 17 :工艺 A 和 B 的 HCP 和组织蛋白酶 L 酶原的比较

[0729]

测定	批次释放规格	工艺 A. 1	工艺 A. 2	工艺 A. 3	工艺 A. 4	工艺 B
宿主细胞蛋白质 (HCP)	≤ 70 ng/mg	46 ± 15	6 ± 3 ^b	22 ± 19	9+4	<5
组织蛋白酶 L 酶原	≤ 5%	18 ± 8 ^a	<3. 85 ^c	65+23 ^{za}	<3. 61 ^d	<3. 3 ^e

[0730] ^a 组织蛋白酶 L 酶原规格不适用于工艺 A. 1 ;所提供的数值仅供参考。

[0731] ^b17 个批次中有 14 个低于 5ng/mg 的 LOQ 限度 ;用数值 5ng/mg 来计算平均值和标准偏差。

[0732] ^cLOQ 范围为 3. 30-3. 85。

[0733] ^dLOQ 范围为 3. 29-3. 61。

[0734] ^eLOQ 为 3. 3 (LOQ = 定量限度)

[0735] 对用工艺 B 生产的药物物质进行了扩展的表征。对三个验证批次的药物物质进行了分析与阿达木单抗参考标准品进行比较, 为此用到的测定法包括氨基酸分析、圆二色性、分析型离心、QSTAR LC- 质谱、用 MS 检测进行的非还原胰蛋白酶和 LYS C 肽作图、游离巯基测定、用 MS 检测进行的胰蛋白酶肽作图、免疫印迹、L929 生物测定和 BIAcore。改进工艺所制造的所有批次的药物物质都符合可接受的标准, 与参考标准品相当。

[0736] 总之, 已证明工艺 B 在发酵、捕捉和精细纯化阶段其性能都与工艺 A 相当。但是, 工艺 B 显示出在宿主细胞蛋白质和组织蛋白酶 L 酶原的降低方面其能力有改进, 以及在阿达木单抗产率方面其能力增加。药物物质释放试验和扩展的表征研究进一步证明, 用工艺 B 生产的阿达木单抗药物物质与工艺 A 生产的阿达木单抗药物物质是相当的。

[0737]

表 12: HCP 水平的总体改进

样品 编号	样品种类 后深度过滤 Fractogel-S 洗脱物 浓缩的 Fractogel-S 洗 脱物	工艺 A.1 (3 K)			工艺 A.2 (2 K)		
		A	B	C	D	E	F
1	853,852	1,181,845	936,390	1,238,297	991,390	1,018,529	
2	6,739	15,772	16,286	17,528	15141	15426	
3	5980	13958	15361	14984	12769	434*	
4	G 2702	H 5074	I 5181	J 3826	K 3321	L 216	
5	415	891	562	311	157	30	
6	36	83	43	20	7	<LOQ	
HCP Q 降低(倍数)		6.51	5.69	9.22	12.30	21.15	7.20

*该批次在工艺中有脱脂质滤器进行操作。

样品 编号	样品种类 后深度过滤 Fractogel-S 洗脱物 浓缩的 Fractogel-S 洗 脱物	工艺 A.3 (6 K)						工艺 A.4 (6 K)			工艺 B.1 (6 K)			工艺 B.2 (12 K)														
		M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	A.A	A.B	A.C	A.D	A.E	A.F	A.G	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
7	2,039,630	2,150,284	2,125,986	2,026,000	2,517,074	1,867,919	1,333,900	813,256	2,126,449	1,271,211	1,261,889	1,056,935																
8	35,223	31,461	46,072	40,399	40,710	56,415	12,430	19,150	15,257	9,558	13,130	17,427																
9	1157	NA	NA	2,325	2,553	2,437	N/A	N/A	N/A	4824	771	526																
10	468	527	1,563	536	1,347	1,248	554	220	371	1,317	376	255																
11	229	314	594	98	213	283	18.5	20	17	14	3	0																
12	23	33	48	5*	8	11	0.5	0	0	0	0	0																
HCP Q 降低(倍数)		2.04	1.68	2.63	5.47	6.32	4.41																					

[0738]

表 13: 组织蛋白酶 L 酶原水平的总体改进

样品编号	样品种类	工艺 A.1 (3K)			工艺 A.2 (3K)		
		A	B	C	D	E	F
1	Fractogel-S 洗脱物	54.07	51.23	61.04	42.19	50.14	48.28
2	浓缩的 Fractogel-S 洗脱物	45.76	42.95	48.44	46.72	43.77	46.13
		G	H	I	J	K	L
3	病毒灭活滤液	41.54	36.37	43.70	36.49	38.28	38.94
4	Q 琼脂糖凝胶 FF 流通物	6.55	6.22	7.16	3.39	3.37	3.41
5	苯基琼脂糖凝胶 FF 洗脱物	6.82	6.92	8.75	2.57	2.11	3.01
6	最终 UF/DF 截留物	9.85	9.77	9.69	1.84	2.93	3.00
	组织蛋白酶 L 活性 Q 降低(倍数)	6.34	5.85	6.10	10.76	11.36	11.42

样品编号	样品种类	工艺 A.3 (6 K)			工艺 A.4 (6 K)			工艺 B.1 (6 K)			工艺 B.2 (12 K)		
		M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
7	Fractogel-S 洗脱物	98.26	77.10	106.41	97.42	84.91	94.14	45.78	58.55	56.61	26.70	40.70	41.05
	浓缩的 Fractogel-S 洗脱物				61.94	57.20	47.20				22.20	42.80	35.53
		Y	Z	A.A	A.B	A.C	A.D	A.E	A.F	A.G			
8	病毒灭活滤液	51.49	64.38	69.29	46.43	67.28	57.59	31.85	31.19	38.56	13.20	45.90	42.32
9	Q 琼脂糖凝胶 FF 流通物	10.02	9.86	10.05	5.81	5.65	4.96	2.21	3.57	2.25	0.40	1.30	0.9
10	苯基琼脂糖凝胶 FF 洗脱物	8.48	8.79	9.21	3.29	4.28	3.48				1.00	1.30	0.85
11	最终 UF/DF 截留物	6.68	8.76	8.54	3.28	3.46	3.71	2.59	3.03	2.65	1.30	0.60	1.00
	组织蛋白酶 L 活性 Q 降低(倍数)	5.14	6.53	6.89	7.99	11.91	11.61	14.41	8.74	17.14	33.00	35.31	47.02

组织蛋白酶 L 活性: 红色数字中所用的单位是荧光信号释放速率, 以 RFU/sec./mg D2E7 表示

[0739]

实施例 3 :HCP 检测的测定法

[0740]

本实施例描述用以测定实施例 2 所述工艺 B 获得的阿达木单抗药物物质样品中的

残余宿主细胞蛋白质 (HCP) 浓度的 HCP ELISA 方法。采用酶联免疫吸附测定 (ELISA), 将包含 HCP 抗原的样品夹在两层特异性抗体之间。接着, 用酪蛋白封闭非特异性位点。然后将样品进行温育, 期间抗原分子被第一抗体 (包被抗体 Cygnus 山羊抗 CHO (中国仓鼠卵巢), 亲和纯化的) 捕捉。接着加入第二抗体 (抗 CHO 宿主细胞蛋白质抗体, 生物素酰化的), 该第二抗体固定到该抗原 (CHO 宿主细胞蛋白质)。重要的是, 对 HCP 有特异性的第二抗体是从用以产生该抗体的细胞生产的。加入缀合 HRP 的中性链亲和素 (neutravidinHRP-conjugated), 其能结合生物素酰化的抗 CHO 宿主细胞蛋白质。再接着加入 K 蓝色底物。发色底物被结合的酶缀合抗体所水解, 产生蓝颜色。反应用 2M H_3PO_4 终止, 颜色变成黄色。颜色强度与结合到孔上的抗原的量成正比。HCP ELISA 显示在测定抗体制品的 HCP 水平方面比标准的 ELISA 方法有改进。

[0741] 实施例 4: 组织蛋白酶 L 动力学测定

[0742] 开发了动力学测定法, 用来对工艺 B 的阿达木单抗制造工艺中间物 (参见实施例 2) 进行组织蛋白酶 L 活性的定量。药物物质释放试验中用以测量 HCP 的弱阴离子交换 HPLC 测定法 (WAX-10HPLC) 不能用于本研究, 因为工艺中样品的可变蛋白质含量和缓冲液组成会干扰这个测定法。由于不能直接定量工艺中间物中的组织蛋白酶 L 酶原, 因此开发出了通过动力荧光方法测量组织蛋白酶 L 的活性的测定法。动力学测定法即高通量荧光酶学方法, 与用以检测组织蛋白酶 L 酶原水平的标准方法相比, 对工艺中样品的干扰较少。动力学测定法还提供了检验工艺在纯化实施例 1 和 2 所述的阿达木单抗工艺中样品上的可靠性的手段。

[0743] 这个方法是通过加入硫酸葡聚糖迫使样品中的组织蛋白酶 L 酶原活化成组织蛋白酶 L。用荧光底物 Z-亮氨酸-精氨酸-AMC (7-氨基-4-甲基香豆素) 在激发 380nm 和发射 460nm 处检测组织蛋白酶 L 活性。样品中的荧光活性水平由每秒钟底物切割所产生的产荧光信号的斜率来确定。这个荧光活性测定的范围被确定为 0.0144-1.04RFU/sec 之间。这个活性与试验样品中存在的阿达木单抗的量相关联; 因此结果以 RFU/sec/mg 阿达木单抗报道。使用 JMP 软件推导的 DOE 实验, 给每个工艺中间物样品开发了实现最大荧光信号的最佳激活条件。表 16 总结了 this 测定的推荐激活条件。

[0744] 材料和方法

[0745] 500mM DTT 储备溶液的制备

[0746] 将 7.7 克的 Ultrapure DTT (Invitrogen) 加到 90mL 的 Milli-Q 水中, 混合至均匀。所得溶液加 Milli-Q 水至 100mL 的最终体积。然后将这一 500mM DTT 储备溶液分成等分试样, $-80^{\circ}C$ 下保存。

[0747] 激活缓冲液 (25mM NaOAc, 5mM DTT, 1mM EDTA pH5.5) 的制备

[0748] 将 3.44 克的乙酸钠 (J. T. Baker)、0.38 克的 EDTA (J. T. Baker) 和 950mL Milli-Q 水加到适当的容器中, 混合至完全均匀。用 1M HCl 将缓冲液的 pH 调节到 5.5, 在容量瓶中定容到 1L 的最终体积。将缓冲液滤过 0.22 μm 滤器, 在 $4^{\circ}C$ 下保存备用。在使用当天, 将 500 μL 的 DTT 储备溶液 (如上所述 500mM) 加到 50mL 的缓冲液至 5mM 的最终浓度。

[0749] 硫酸葡聚糖 +0.1% 叠氮化钠储备溶液的制备

[0750] 将 1 克的硫酸葡聚糖 (EM Science) 加到 90mL 的 Milli-Q 水中, 混合均匀。从 1mg/mL 储备溶液 (J. T. Baker) 取 100 μL 叠氮化钠加入。所得溶液加满至 100mL 的最终体积。

然后将此溶液分成等分试样，-80℃下保存。

[0751] 动力学测定的设置 (set-up)

[0752] 待测试组织蛋白酶 L 活性的样品要求酶原（组织蛋白酶 L 酶原）被激活成活性酶（组织蛋白酶 L）。这是通过将样品在激活缓冲液中稀释，加入硫酸葡聚糖和在 37℃ 下温育适当的时间（下文论述细节）来实现的。激活后，样品可在 -80℃ 下保存而保持稳定。表 18 显示了给工艺中样品确定的最佳激活条件。

[0753] 表 18：工艺中样品的精确激活条件的总结

[0754]

样品	稀释	硫酸葡聚糖 ($\mu\text{g/mL}$)	激活时间 (hr)
Fractogel 洗脱物	700	0.035	6
Q 琼脂糖凝胶荷载物	700	0.035	6
Q 琼脂糖凝胶 FTW	70	0.035	18
苯基琼脂糖凝胶洗脱物	200	0.035	6
药物物质	600	0.035	6

[0755] 在试验当天，从 -80℃ 下取出试验样品的等分试样，在冰浴中解冻。一旦试验样品已解冻，将 (2x) 100 μL 的每个样品荷载到黑色的聚苯乙烯微量滴定板 (Corning 目录号 3650) 中。将 Z-L-R-AMC 荧光肽底物 VII (R&D Systems) 在避光下解冻。该底物用乙酸盐缓冲液进行 1:1350 稀释至 20 μM 的最终浓度。向每个孔加入 100 μL 的荧光底物。然后将板混合大约 1 秒钟，在 37℃ 下避光温育 3 分钟。然后将板放入已设定至 37℃ 的荧光读板器。激发波长设定为 380nm，发射波长设定为 460nm。在 30 分钟内每 3 分钟测量每个孔的荧光，计算底物水解的速度。然后将结果（考虑稀释系数在内）除以阿达木单抗浓度，以作比较。使用这个动力学测定所得的结果在上文实施例 2 中描述。

[0756] 阿达木单抗浓度是用 1.39 的消光系数由 A_{280} 确定的。采用 Poros A 分析，对研究样品进行阿达木单抗定量。对样品进行稀释，以使读数在标准曲线范围内。岛津 HPLC 系统配备有 Poros A ImmunoDetection 传感器件 (Applied Biosystems, Foster City, CA)。柱子维持在环境温度。系统以 2mL/分钟的速度运行。自动采样器盘温度设定在 4℃。在 280nm 处测定吸光度。缓冲液 A 为 1X PBS；缓冲液 B 为 0.1M 乙酸和 150mM 氯化钠。注射样品，用 100% 缓冲液 B 洗脱阿达木单抗。

[0757] 图 6 显示使用 Fractogel 荷载物（见实施例 2 第一洗脱物；工艺 B），荧光肽从获自 CHO 细胞阿达木单抗表达的材料的变化情况。使用 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸葡聚糖，用激活缓冲液将此样品稀释至 200、50 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 阿达木单抗，并在 37℃ 下温育 16 小时。这个批次在 50 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 下显示线性响应。 R^2 值 ≥ 0.99 。但是，这个批次在 200 $\mu\text{g/mL}$ 下在 30 分钟测量时间将近结束时显示非线性底物转变，导致 0.91 的较低 R^2 值。因此，小心进行样品稀释对于维持线性水解速度是关键。

[0758] 还进行了测定，以确证使用组织蛋白酶活性来测定组织蛋白酶 A 酶原水平的动力学测定法是符合 ICH 指导方针的，包括精密度分析，而精密度又包括重复精密度。此外，确定了容器类型（例如玻璃和聚丙烯小瓶）会影响组织蛋白酶 L 活性。结果提示，在聚丙烯容器中温育与在玻璃容器中温育相比，能达到更高的组织蛋白酶 L 水平。在两种情况中，在 pH5.5 下激活组织蛋白酶 L 酶原都需要加入 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸葡聚糖。

[0759] 总之,动力学测定法的精密度证明,这个测定法对于检测阿达木单抗工艺中间物的潜在组织蛋白酶 L 活性是有效的。

[0760] 本申请涉及美国专利 6,090,382、6,258,562 和 6,509,015。本申请还涉及 2001 年 3 月 7 日提交的美国专利申请系列号 09/801,185;2002 年 11 月 22 日提交的美国专利申请系列号 10/302,356;2002 年 6 月 5 日提交的美国专利申请系列号 10/163657;2002 年 4 月 26 日提交的美国专利申请系列号 10/133715;2002 年 8 月 16 日提交的美国专利申请系列号 10/222140;2003 年 10 月 24 日提交的美国专利申请系列号 10/693233;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/622932;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/623039;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/623076;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/623065;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/622928;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/623075;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/623035;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/622683;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/622205;2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/622210 和 2003 年 7 月 18 日提交的美国专利申请系列号 10/623318。本申请还涉及 2005 年 4 月 11 日提交的 PCT/US05/12007。这些专利和专利申请的每一个的全部内容都通过引用结合到本文中。

[0761] 等同方案

[0762] 本领域技术人员会知道或者仅采用常规实验就能够确定本文描述的本发明具体实施方案的许多等同方案。这种等同方案也要被所附权利要求书所涵盖。本申请通篇引用的所有参考文献、专利和公布的专利申请,其内容通过引用结合到本文中。

<221> 变异体

<222>9

<223>Xaa = Thr 或 Ala

<400>3

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa

1

5

<210>4

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿达木单抗重链可变区 CDR3

<221> 变异体

<222>12

<223>Xaa = Tyr 或 Asn

<400>4

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa

1

5

10

<210>5

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿达木单抗轻链可变区 CDR2

<400>5

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1

5

<210>6

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿达木单抗重链可变区 CDR2

<400>6

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

1

5

10

15

Gly

<210>7

<211>11

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿达木单抗轻链可变区 CDR1

<400>7

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala

1

5

10

<210>8

<211>5

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿达木单抗重链可变区 CDR1

<400>8

Asp Tyr Ala Met His

1

5

<210>9

<211>107

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>2SD4 轻链可变区

<400>9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210>10

<211>121

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>2SD4 重链可变区

<400>10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

1 5

<210>14

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VL100A9 轻链可变区 CDR3

<400>14

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210>15

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VLL100D2 轻链可变区 CDR3

<400>15

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210>16

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VLL0F4 轻链可变区 CDR3

<400>16

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210>17

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>L0E5 轻链可变区 CDR3

<400>17

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr

1

5

<210>18

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VLL0G7 轻链可变区 CDR3

<400>18

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn

1

5

<210>19

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VLL0G9 轻链可变区 CDR3

<400>19

Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr

1

5

<210>20

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VLL0H1 轻链可变区 CDR3

<400>20

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn

1

5

<210>21

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VLL0H10 轻链可变区 CDR3

<400>21

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser

1

5

<210>22

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VL1B7 轻链可变区 CDR3

<400>22

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr

1

5

<210>23

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VL1C1 轻链可变区 CDR3

<400>23

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr

1 5

<210>24

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VL0. 1F4 轻链可变区 CDR3

<400>24

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr

1 5

<210>25

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VL0. 1H8 轻链可变区 CDR3

<400>25

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr

1 5

<210>26

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>L0E7. A 轻链可变区 CDR3

<400>26

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala

1 5

<210>27

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>2SD4 重链可变区 CDR3

<400>27

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn

1 5 10

<210>28

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VH1B11 重链可变区 CDR3

<400>28

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys

1 5 10

<210>29

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VH1D8 重链可变区 CDR3

<400>29

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr

1 5 10

<210>30

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VH1A11 重链可变区 CDR3

<400>30

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210>31

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VH1B12 重链可变区 CDR3

<400>31

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210>32

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VH1E4 重链可变区 CDR3

<400>32

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

<210>33

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VH1F6 重链可变区 CDR3

<400>33

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210>34

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>3C-H2 重链可变区 CDR3

<400>34

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

<210>35

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>VH1-D2. N 重链可变区 CDR3

<400>35

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210>36

<211>321

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿达木单抗轻链可变区

<400>36

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggatca gcaaaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
 cggttcagtg gcagtggate tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctacagcct 240
 gaagatgttg caacttatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210>37

<211>363

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 阿达木单抗重链可变区

<400>37

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagge ttggtacagc ccggcaggte cctgagacte 60
 tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
 ccaggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgga atagtggtea catagactat 180
 gcggactctg tggagggceg attcaccate tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
 taccttagca cegegtecte ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360
 agt 363

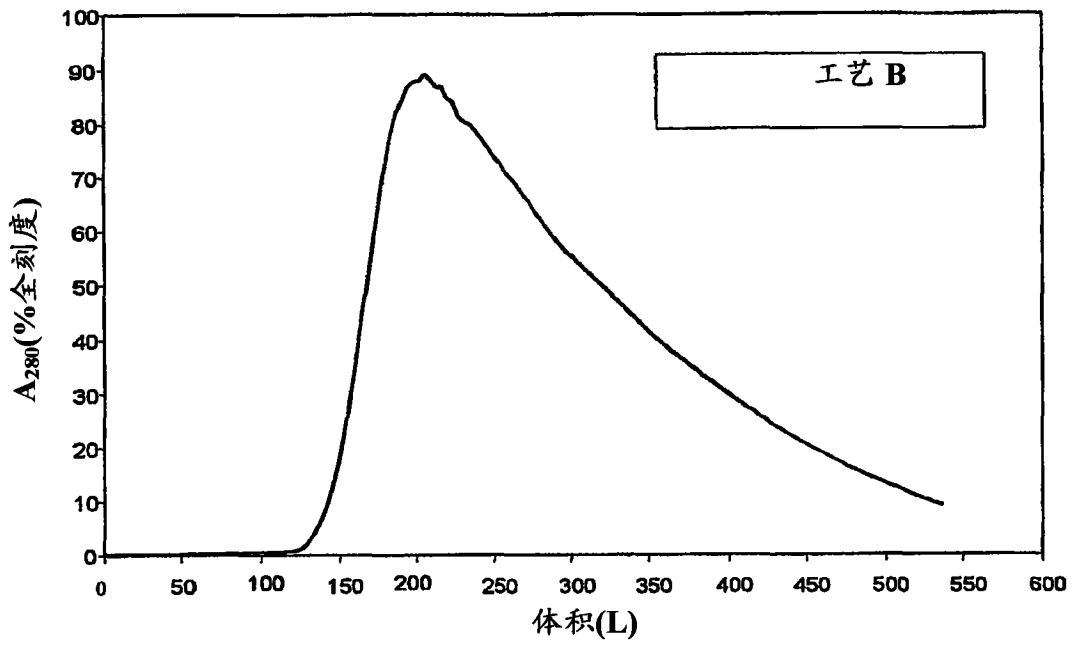


图 1A

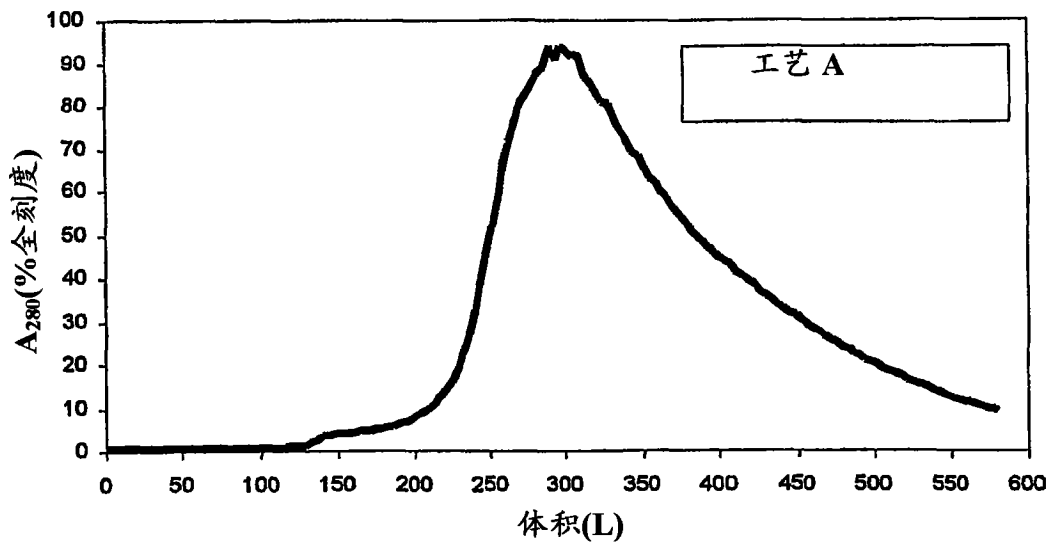


图 1B

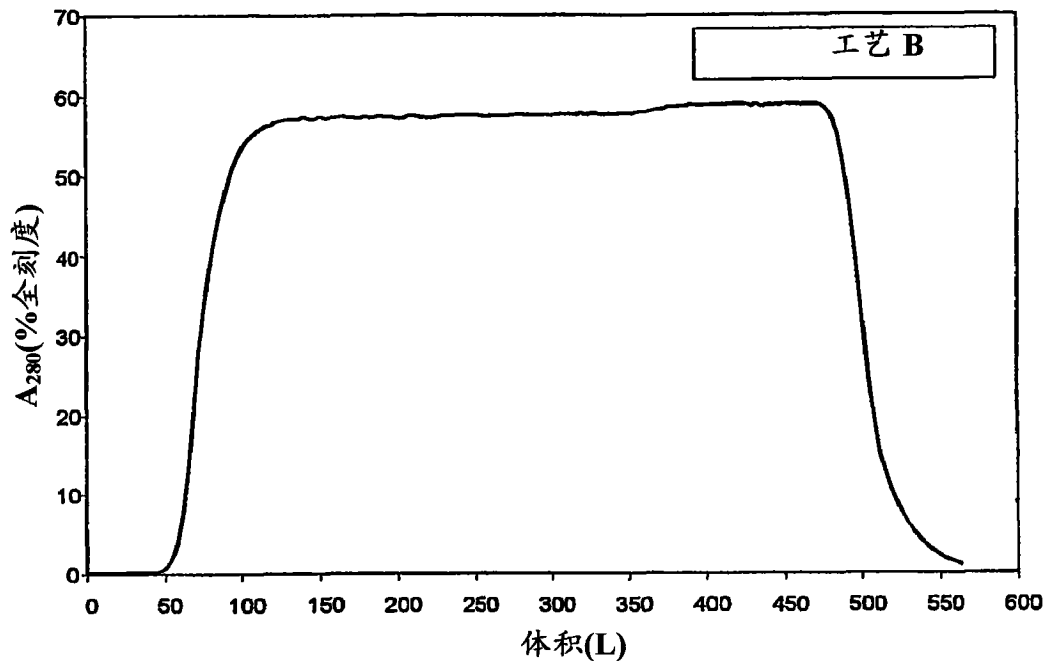


图 2A

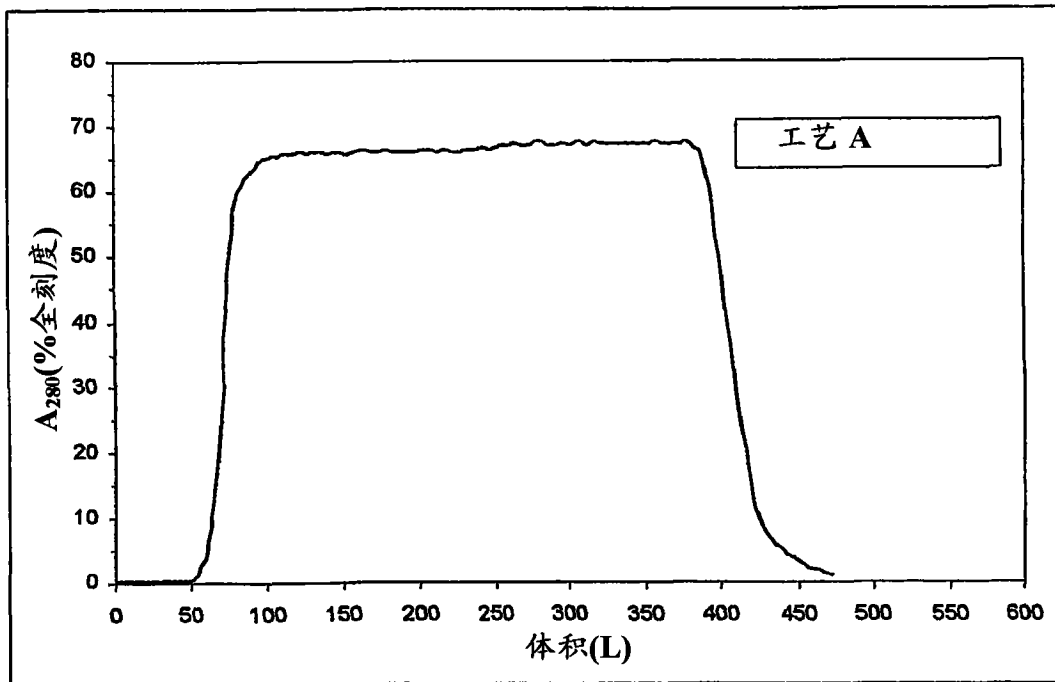


图 2B

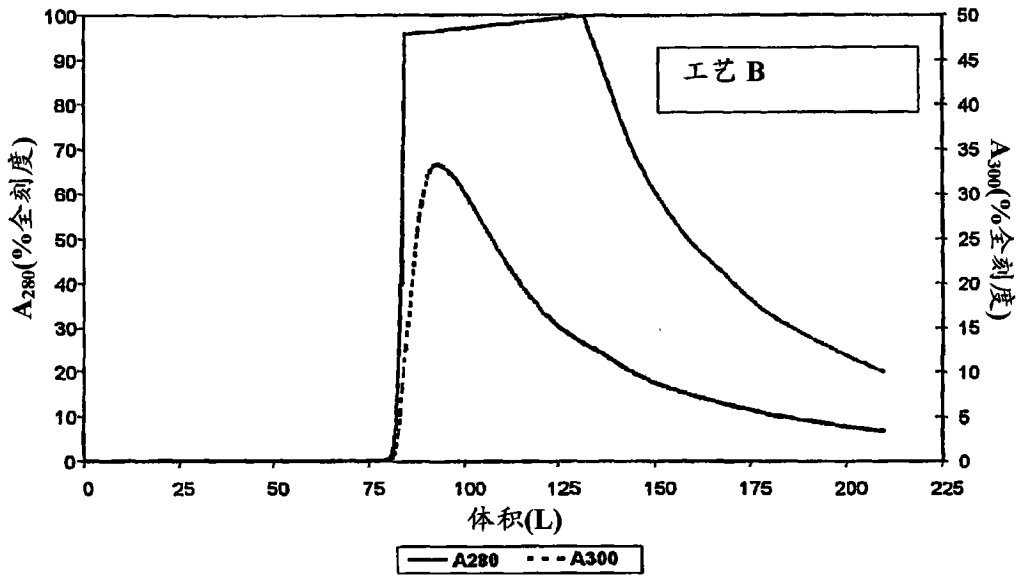


图 3A

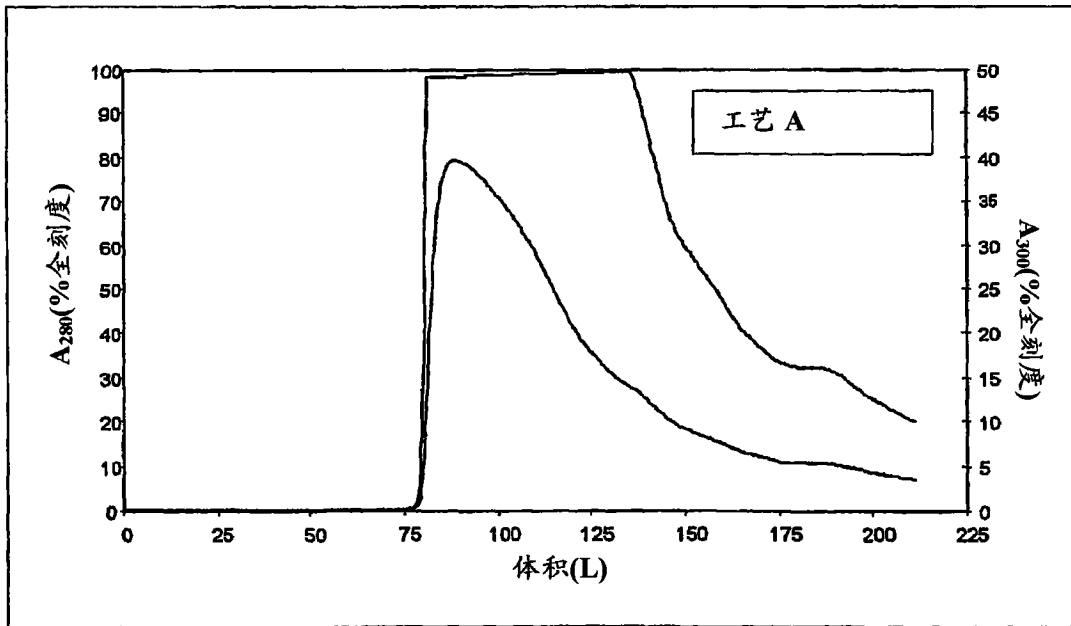


图 3B

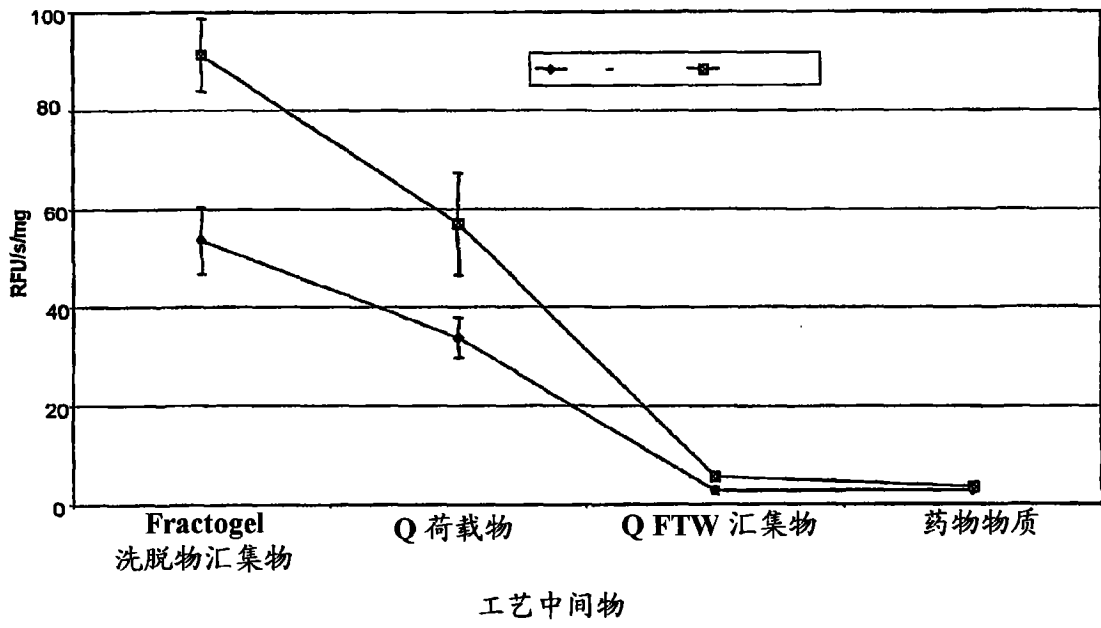


图 4

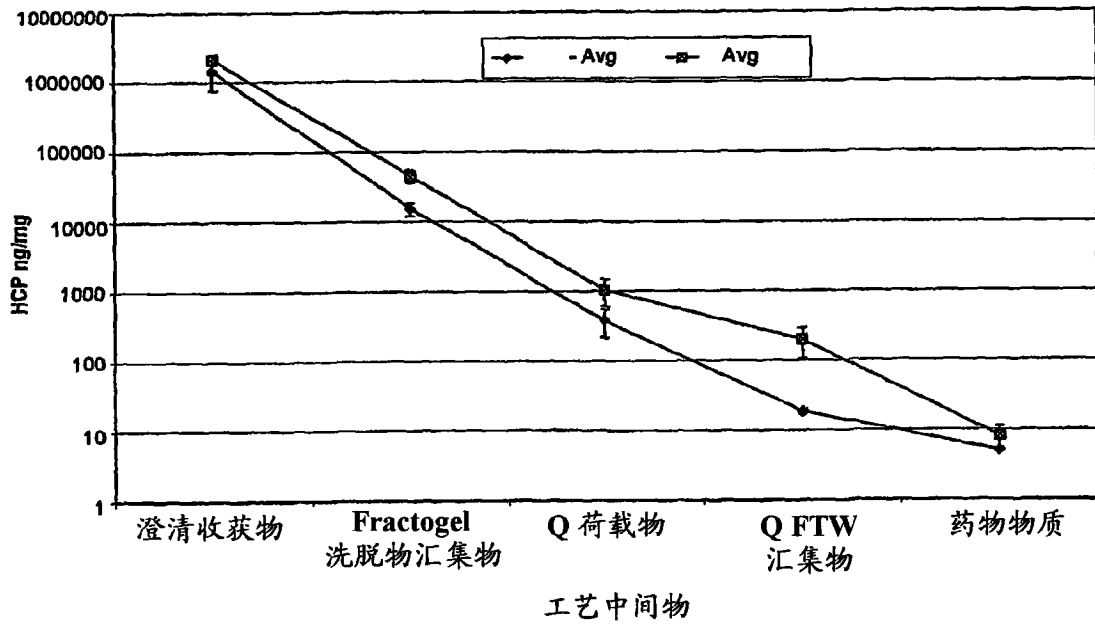


图 5

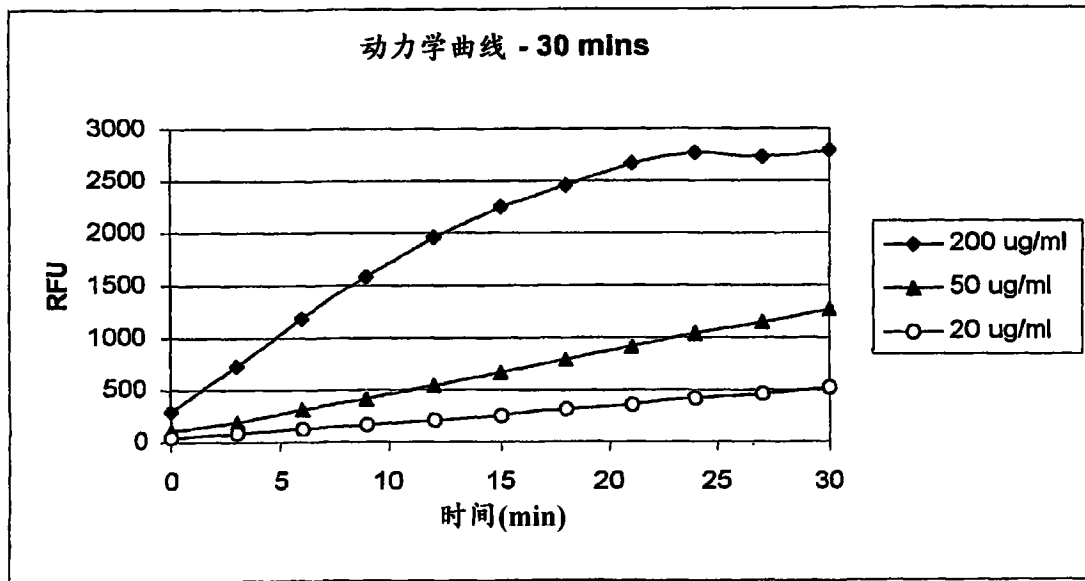


图 6