[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 39/395
C07K 16/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03822455.0

[43] 公开日 2005 年 11 月 2 日

[11] 公开号 CN 1691963A

[22] 申请日 2003.7.18 [21] 申请号 03822455.0
[30] 优先权
[32] 2002. 7.19 [33] US [31] 60/397,275
[32] 2002. 9.16 [33] US [31] 60/411,081
[32] 2002.10.10 [33] US [31] 60/417,490
[32] 2003. 3.18 [33] US [31] 60/455,777
[86] 国际申请 PCT/US2003/022566 2003.7.18
[87] 国际公布 WO2004/009776 英 2004.1.29
[85] 进入国家阶段日期 2005.3.21
[71] 申请人 艾博特生物技术有限公司
地址 百慕大哈米尔顿
[72] 发明人 S·班纳吉 L·K·泰勒
C·E·斯皮格勒 D·E·特雷西
E·K·查塔斯 R·S·霍夫曼
W·T·巴楚克 P·颜
A·穆尔塔扎 J·G·萨尔费尔德
S·菲施科夫
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李 波 王景朝

权利要求书 4 页 说明书 115 页 序列表 12 页

[54] 发明名称 TNFα 相关疾病的治疗

[57] 摘要

本发明描述了一种治疗 TNFα -相关病症的方法，包括施用 TNFα 抑制剂，包括 TNFα 抗体。

ISSN1008-4274

知识产权出版社出版

1. 一种治疗患者 TNFα-相关病症的方法，其中所述 TNFα-相关病症选自脊柱关节病，肺疾病，冠心病，代谢失调，贫血，疼痛，肝病，皮肤病，指甲病，或脉管炎，包括对患者施用治疗有效量的中和性高亲和性 TNFα抗体，使得所述 TNFα-相关病症得以治疗。

2. 一种治疗患者 TNFα-相关病症的方法，其中所述 TNFα-相关病症选自贝特切氏病，强直性脊柱炎，哮喘，慢性阻塞性肺疾病(COPD)，特发性肺纤维化(IPF)，再狭窄，糖尿病，疼痛，克隆氏病-相关病症，少年类风湿性关节炎(JRA)，丙型肝炎病毒感染，牛皮癣，牛皮癣关节炎，和慢性斑牛皮癣，使得所述 TNFα-相关病症得以治疗。

3. 一种治疗患者 TNFα-相关病症的方法，其中所述 TNFα-相关病症选自 TNFα-相关病症是与年龄有关的恶病质，早老性痴呆，脑水肿，炎性脑损伤，慢性疲劳综合征，皮肌炎，药物反应，脊髓之内和/或周围的水肿，家族周期性发热，Felty's 综合征，纤维化，肾小球性肾病(例如链球菌感染后肾小球肾炎或 IgA 肾病)，假体松弛，显微多脉管炎，混合型结缔组织病症，多发性骨髓瘤，癌症和恶病质，多器官失调，脊髓发育不良综合征，orchitism 骨质溶解，胰腺炎，包括急性，慢性，和胰腺脓肿，牙周病多肌炎，进行性肾衰竭，假痛风，坏疽性脓皮病，复发性多软骨炎，风湿性心脏病，肉样瘤病，硬化胆管炎，中风，胸腹主动脉动脉瘤修补(TAAA)，TNF 受体相关周期性综合征(TRAPS)，与黄热病疫苗接种相关的综合征，与耳，慢性耳炎，或儿科耳炎相关的炎性疾病。在本发明的另一个实施方案中，TNFα-相关病症是克隆氏病-相关病症，少年关节炎/斯提耳氏病(JRA)，葡萄膜炎，坐骨神经痛，前列腺炎，子宫内膜异位，脉络膜新血管生成，狼疮，斯耶格伦氏综合征，和湿黄斑变性，使得所述 TNFα-相关病症得以治疗。

4. 权利要求 1，2，或 3 任一项的方法，其中所述抗体是一种分离的人抗体，或者其抗原-结合部分，其以 $1x10^{-8}$ M 或更小的 Kd 和 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解，这两个常数都通过表面等离子共振来测定，并且所述抗体或者其抗原-结合部分中和人 TNFα细胞毒性，在标准体外 L929 分析中 IC_{50} 是 $1x10^{-7}$ M 或更小。

5. 权利要求 1，2，或 3 任一项的方法，其中所述抗体是一种分离的人抗体，或者其抗原-结合部分，其具有下面的特征:

a) 根据表面等离子共振测定，其以 $1x10^{-3}s^{-1}$ 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解;

b) 有包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，或在 1，4，5，7 或 8 位通过一个丙氨酸取代或者在 1，3，4，6，7，8 和/或 9 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域;

c) 有包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，或在 2，3，4，5，6，8，9，10 或 11 位通过一个丙氨酸取代或者在 2，3，4，5，6，8，9，10，11 和/或 12 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域。

6. 权利要求 1，2，或 3 任一项的方法，其中所述抗体是一种分离的人抗体，或者其抗原-结合部分，其轻链可变区(LCVR)包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列并且重链可变区(HCVR)包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

7. 权利要求 1，2，或 3 任一项的方法，其中所述抗体是 D2E7。

8. 一种治疗 TNFα-相关病症患者的方法，其中所述 TNFα-相关病症选自贝特切氏病，强直性脊柱炎，哮喘，慢性阻塞性肺疾病(COPD)，特发性肺纤维化(IPF)，再狭窄，糖尿病，疼痛，克隆氏病-相关病症，少年类风湿性关节炎(JRA)，丙型肝炎病毒感染，牛皮癣，牛皮癣关节炎，和慢性斑牛皮癣，包括施用治疗有效量的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段，其中抗体以 $1x10^{-8}$ M 或更小的 Kd 和 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解，这两个常数都通过表面等离子共振来测定，并且所述抗体或者其抗原-结合部分中和人 TNFα细胞毒性，在标准体外 L929 分析中 IC_{50} 是 $1x10^{-7}$ M 或更小，使得 TNFα-相关病症得以治疗。

9. 一种治疗 TNFα-相关病症患者的方法，其中所述 TNFα-相关病症选自贝特切氏病，强直性脊柱炎，哮喘，慢性阻塞性肺疾病(COPD)，特发性肺纤维化(IPF)，再狭窄，糖尿病，疼痛，克隆氏病-相关病症，少年类风湿性关节炎(JRA)，丙型肝炎病毒感染，牛皮癣，牛皮癣关节炎，和慢性斑牛皮癣，包括施用治疗有效量的具有下面特征的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段:

a) 根据表面等离子共振测定，其以 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常

数从人 TNFα上离解;

b) 有包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，或在 1，4，5，7 或 8 位通过一个丙氨酸取代或者在 1，3，4，6，7，8 和/或 9 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域;

c) 有包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，或在 2，3，4，5，6，8，9，10 或 11 位通过一个丙氨酸取代或者在 2，3，4，5，6，8，9，10，11 和/或 12 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域，使得所述 TNFα-相关病症得以治疗。

10. 一种治疗 TNFα-相关病症患者的方法，其中所述 TNFα-相关病症选自贝特切氏病，强直性脊柱炎，哮喘，慢性阻塞性肺疾病(COPD)，特发性肺纤维化(IPF)，再狭窄，糖尿病，疼痛，克隆氏病-相关病症，少年类风湿性关节炎(JRA)，丙型肝炎病毒感染，牛皮癣，牛皮癣关节炎，和慢性斑牛皮癣，包括施用治疗有效量的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段，其轻链可变区(LCVR)包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列并且重链可变区(HCVR)包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，使得所述 TNFα-相关病症得以治疗。

11. 权利要求 8，9 或 10 任一项的方法，其中所述 TNFα抗体或者其抗原-结合片段是 D2E7。

12. 权利要求 8，9 或 10 任一项的方法，其中所述 TNFα抗体与至少一种附加治疗药物一起给药。

13. 一种治疗 TNFα-相关病症患者的方法，其中所述 TNFα-相关病症选自贝特切氏病，强直性脊柱炎，哮喘，慢性阻塞性肺疾病(COPD)，特发性肺纤维化(IPF)，再狭窄，糖尿病，疼痛，克隆氏病-相关病症，少年类风湿性关节炎(JRA)，丙型肝炎病毒感染，牛皮癣，牛皮癣关节炎，和慢性斑牛皮癣，如此所述 TNFα-相关病症得以治疗。

14. 权利要求 13 的方法，其中 D2E7 与至少一种附加治疗药物一起给药。

15. 一种试剂盒，包括:

a) 包括 TNFα抗体，或者其抗原结合片段，和药学可接受载体的药物组合物; 和

b) 对患者施用用以治疗患有 TNFα-相关病症的患者的 TNFα抗体

药物组合物的说明书。

16. 权利要求 15 的试剂盒，其中所述 TNFα-相关病症选自贝特切氏病，强直性脊柱炎，哮喘，慢性阻塞性肺疾病(COPD)，特发性肺纤维化(IPF)，再狭窄，糖尿病，疼痛，克隆氏病-相关病症，少年类风湿性关节炎(JRA)，丙型肝炎病毒感染，牛皮癣，牛皮癣关节炎，和慢性斑牛皮癣。

17. 根据权利要求 16 的试剂盒，其中所述 TNFα抗体，或者其抗原结合部分是 D2E7。

TNFα相关疾病的治疗

相关申请

本申请要求了2002年7月19日申请的在先申请的美国临时申请登记号No. 60/397275的优先权。本申请还要求了2002年9月16日申请的在先申请的美国临时申请登记号No. 60/411081，和2002年10月10日申请的在先申请美国临时申请登记号 No. 60/417490 的优先权。另外，本申请涉及美国专利Nos. 6090382，6258562和6509015。本申请还涉及2001年3月7日申请的美国专利申请登记号No. 09/801185; 2002年11月22日申请的美国专利申请登记号No. 10/302356; 2002年6月2日申请的美国专利申请登记号No. 10/163657; 2002年4月26日申请的美国专利申请登记号No. 10/133715。

本申请涉及下面的美国实用新型申请：标题为“使用TNFα抑制剂对TNFα-相关疾病的治疗”(Attorney Docket No.BPI-187)，标题为“使用TNFα抑制剂对脊柱关节病的治疗”(Attorney Docket No.BPI-188)，标题为“使用 TNFα抑制剂对肺部疾病的治疗”(Attorney Docket No. BPI-189)，标题为“使用 TNFα抑制剂对冠状疾病的治疗”(Attorney Docket No. BPI-190)，标题为“使用TNFα抑制剂对代谢失调的治疗”(Attorney Docket No. BPI-191)，标题为“使用TNFα抑制剂对贫血的治疗”(Attorney Docket No. BPI-192)，标题为“使用TNFα抑制剂对疼痛的治疗”(Attorney Docket No. BPI-193)，标题为“使用TNFα抑制剂对肝病的治疗”(Attorney Docket No. BPI-194)，标题为“使用TNFα抑制剂对皮肤和甲疾病的治疗”(Attorney Docket No. BPI-195)，标题为“使用TNFα抑制剂对脉管炎的治疗”(Attorney Docket No. BPI-196)，和标题为“使用TNFα抑制剂对TNFα-相关疾病的治疗”(Attorney Docket No. BPI-197)，所有这些申请都是在偶数日申请的。这些专利和专利申请的全部内容在这里引作参考。

发明背景

细胞因子，例如白介素-1(IL-I)和肿瘤坏死因子(TNF)是各种细胞例如单核细胞和巨噬细胞产生的分子，鉴定它们是炎症病变的介质。细

胞因子，包括 TNF，调节作为损伤或感染的结果而发生的炎症反应的强度和持续时间。TNFα(也称作 TNF)在各种人疾病和病症的病理生理学中涉及，包括脓毒症，感染，自身免疫疾病，移植排斥和移植物-抗-宿主疾病(参见，例如，Moeller 等(1990)Cytokine 2:162；美国专利 No. 5,231,024，专利权属于 Moeller 等；Moeller，A.等人的欧洲专利公开 No. 260 610 B1；Vasilli(1992)Annu.Rev.Immunol. 10:411；Tracey 和 Cerami(1994)Annu. Rev. Med. 45:491)。

发明概述

有着以安全而有效的方式治疗其中 TNFα活性是有害的之 TNFα-相关病症的需求。本发明包括安全而有效的方式治疗其中 TNFα活性是有害的之 TNFα-相关病症的方法。

本发明的一个方面描述了对患者治疗 TNFα-相关病症的方法，包括对患者施用治疗有效量的中和性高亲和性 TNFα抗体，以治疗所述病症。

在一个实施方案中，TNFα-相关病症是脊柱关节病，与肺有关的病症，冠心病，代谢病症，贫血，疼痛，肝脏病症，皮肤病症，指甲病症，或脉管炎。在另一个实施方案中，TNFα-相关病症是与年龄有关的恶病质，早老性痴呆，脑水肿，炎性脑损伤，慢性疲劳综合征，皮肌炎，药物反应，脊髓之内和/或周围的水肿，家族周期性发热，Felty's 综合征，纤维化，肾小球性肾病(例如链球菌感染后肾小球肾炎或 IgA 肾病)，假体松弛，显微多脉管炎，混合型结缔组织病症，多发性骨髓瘤，癌症和恶病质，多器官失调，脊髓发育不良综合征，orchitism 骨质溶解，胰腺炎，包括急性，慢性，和胰腺脓肿，牙周病多肌炎，进行性肾衰竭，假痛风，坏疽性脓皮病，复发性多软骨炎，风湿性心脏病，肉样瘤病，硬化胆管炎，中风，胸腹主动脉动脉瘤修补(TAAA)，TNF 受体相关周期性综合征(TRAPS)，与黄热病疫苗接种相关的综合征，与耳，慢性耳炎，或儿科耳炎相关的炎性疾病。在本发明的另一个实施方案中，TNFα-相关病症是克隆氏病-相关病症，少年关节炎/斯提耳氏病(JRA)，葡萄膜炎，坐骨神经痛，前列腺炎，子宫内膜异位，脉络膜新血管生成，狼疮，斯耶格伦氏综合征，和湿黄斑变性。

在一个实施方案中，本发明的抗体是分离的人抗体，或者其抗原-

结合部分，其以 $1x10^{-8}$ M 或更小的 Kd 和 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解，这两个常数都通过表面等离子共振来测定，并且中和人 TNFα细胞毒性，在标准体外 L929 分析中 IC_{50} 是 $1x10^{-7}$ M 或更小。

在本发明的另一个实施方案中，抗体是分离的人抗体，或者其抗原-结合部分，根据表面等离子共振测定，其以 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解；有包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，或在 1，4，5，7 或 8 位通过一个丙氨酸取代或者在 1，3，4，6，7，8 和/或 9 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域；并且有包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，或在 2，3，4，5，6，8，9，10 或 11 位通过一个丙氨酸取代或者在 2，3，4，5，6，8，9，10，11 和/或 12 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域。

在本发明的另一个实施方案中，抗体是分离的人抗体，或者其抗原-结合部分，轻链可变区(LCVR)包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列并且重链可变区(HCVR)包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

在本发明的另一个实施方案中，所述抗体是 D2E7，也称作 HUMIRA®或 adalimumab。

本发明的另一方面包括治疗 TNFα-相关病症患者的方法，包括对患者施用治疗有效量的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段，其中抗体以 $1x10^{-8}$ M 或更小的 Kd 和 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解，这两个常数都通过表面等离子共振来测定，并且中和人 TNFα细胞毒性，在标准体外 L929 分析中 IC_{50} 是 $1x10^{-7}$ M 或更小，如此 TNFα-相关病症得以治疗。

本发明的另一方面包括治疗 TNFα-相关病症患者的方法，包括施用治疗有效量的 TNFα抗体，或者其抗原-结合部分，根据表面等离子共振测定，其以 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解；有包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，或在 1，4，5，7 或 8 位通过一个丙氨酸取代或者在 1，3，4，6，7，8 和/或 9 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域；并且有包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，或在 2，3，4，5，6，8，9，10 或 11 位通过一个丙氨酸取代或者在 2，3，4，5，6，8，9，10，11 和/或

12 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域，如此 TNFα-相关病症得以治疗。

本发明的另一方面包括治疗 TNFα-相关病症患者的方法，包括施用治疗有效量的TNFα抗体，或者其抗原-结合片段，其具有包括SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)和包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的重链可变区(HCVR)，如此 TNFα-相关病症得以治疗。在一个实施方案中，所述 TNFα抗体是 D2E7。在另一个实施方案中，TNFα抗体与至少一种另外的治疗药物一起施用。

本发明的另一方面的特征是对 TNFα-相关病症人患者抑制人 TNFα活性的方法，包括对患者施用治疗有效量的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段，其中抗体以 $1x10^{-8}$ M 或更小的 Kd 和 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解，这两个常数都通过表面等离子共振来测定，并且中和人 TNFα细胞毒性，在标准体外 L929 分析中 IC_{50} 是 $1x10^{-7}$ M 或更小，在一个实施方案中，所述 TNFα抗体或者其抗原-结合片段是 D2E7。

本发明的另一方面包括治疗 TNFα-相关病症患者的方法，包括对患者施用治疗有效量的 D2E7 或者其抗原-结合片段，如此疾病得以治疗。

本发明的还有另一方面包括治疗 TNFα-相关病症患者的方法，包括对患者施用治疗有效量的 D2E7 或者其抗原-结合片段，如此疾病得以治疗。

在本发明的一个实施方案中，D2E7(也称作 HUMIRA® 或 adalimumab)与至少一种另外的治疗药物一起施用。

本发明的另一方面是包括含有 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段，和药学可接受载体的药物组合物；和对患者施用用以治疗 TNFα-相关病症患者的 TNFα抗体药物组合物的说明书的试剂盒。在一个实施方案中，TNFα抗体，或者其抗原-结合部分是 D2E7(HUMERA®)。

本发明的详细描述

本发明涉及治疗其中 TNFα活性，例如人 TNFα活性，是有害的之 TNFα-相关病症患者的方法。该方法包括对患者施用治疗有效量的 TNFα抑制剂，使得 TNFα-相关病症得以治疗。本发明还涉及其中与另

一种治疗药物一起施用 TNFα抑制剂来治疗 TNFα-相关病症的方法。本发明的其他方面涉及用抗体和抗体片段，和含有 TNFα抑制剂和药物可接受载体的药物组合物治疗 TNFα-相关病症的治疗方法。

定义

为了使本发明更容易被理解，首先定义一些术语。

这里使用的术语“人 TNFα”(这里缩写为 hTNFα，或简称 hTNF)，意指以 17 kD 分泌形式和 26 kD 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 17 kD 分子的三聚体构成。例如 Pennica，D.，等，(1984)Nature 312:724-729；Davis，J. M.，等，(1987)Biochemisty 26:1322-1326；和 Jones，E. Y.，等，(1989)Nature 338:225-228 中进一步描述了 hTNFα 的结构。术语人 TNFα 意在包括重组人 TNFα(rhTNFα)，其能通过标准重组方法来制备或者能商业购得(R & D Systems，Catalog No.210-TA，Minneapolis，MN)。TNFα也称作 TNF。

术语“TNFα抑制剂”包括抑制 TNFα的物质。TNFα抑制剂的例子包括抑制 TNFα 的物质。TNFα 抑制剂的例子包括 etanercept(Enbrel®，Amgen)，英夫单抗(Remicade®，Johnson and Johnson)，人抗-TNF 单克隆抗体(D2E7/HUMIRA®，Abbott Laboratories)，CDP 571(Celltech)，和 CDP870(Celltech)，和其他抑制 TNFα活性的化合物，这样，当对患有其中 TNFα活性是有害的病症或者有患其中 TNFα活性是有害的病症危险的患者施用时，病症得以治疗。在一个实施方案中，TNFα抑制剂是抑制 TNFα活性的不包括 etanercept 和英夫单抗的一种化合物。在另一个实施方案中，使用本发明的 TNFα抑制剂治疗 TNFα-相关病症，这在 II 章节更详细地描述。在一个实施方案中，使用不包括 etanercept 和英夫单抗的 TNFα抑制剂治疗 TNFα-相关病症。在另一个实施方案中，使用不包括 etanercept 和英夫单抗的 TNFα抑制剂治疗类风湿性脊柱炎。该术语还包括这里描述的以及美国专利 Nos. 6,090,382；6,258,562；6,509,015，和美国专利申请登记号 Nos. 09/801185 和 10/302356 中描述的那些各种抗-TNFα人抗体和抗体部分。

这里使用的术语“抗体”意指由四个多肽链，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。每条重链由一个

重链可变区(这里缩写为 HCVR 或 VH)和一个重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域 CH1，CH2 和 CH3 构成。每条轻链由一个轻链可变区(这里缩写为 LCVR 或 VL)和一个轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 CL 构成。VH 和 VL 区可以进一步再分为高变区，称作互补决定区(CDR)，点缀着更保守的称作构架区(FR)的区。各 VH 和 VL 由三个 CDRs 和四个 FRs 构成，从氨基末端至羧基末端以下面的顺序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。在美国专利 Nos. 6,090,382；6,258,562；和 6,509,015，和美国专利申请登记号 Nos. 09/801185 和 10/302356 中进一步详细描述本发明的抗体，这些专利文献全部在此引作参考。

这里使用的术语抗体的“抗原-结合部分”(或简称“抗体部分”)，指保留与抗原(例如 hTNFα)特异性结合能力的抗体的一个或几个片段。已经证明抗体的抗原-结合功能能通过全长抗体的片段来实现。术语抗体的“抗原-结合部分”包括的结合片段的例子包括(i)Fab 片段，由 VL，VH，CL 和 CH1 结构域构成的一价片段；(ii)F(ab')片段，由在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段构成的二价片段；(iii)由 VH 和 CH1 结构域构成的 Fd 片段；(iv)由抗体的一个臂的 VL 和 VH 结构域构成的 Fv 片段，(v)dAb 片段(Ward 等，(1989)Nature 341:544-546)，其由一个 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，由不同的基因编码，但是使用重组方法，通过合成的接头能将它们连接，所述接头使得它们成为一个蛋白质链，其中 VL 和 VH 区配对形成一价分子(已知为单链 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包括在术语抗体的“抗原-结合部分”中。单链抗体的其他形式，例如二价抗体(diabody)也包括在内。二价抗体是二价的双特异性抗体，其中 VH 和 VL 结构域在一个多肽链上表达，但是使用太短以至于不能在同一链上两个结构域之间配对的接头，从而使得结构域与另一个链的互补结构域配对并且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)。在美国专利 Nos. 6,090,382；6,258,562；和 6,509,015，和美国专利申请登记号 Nos. 09/801185 和 10/302356 中进

一步详细描述本发明的抗体部分，这些专利文献全部在此引作参考。

通过重组 DNA 技术，或者通过完整免疫球蛋白的酶促或化学裂解产生结合片段。结合片段包括 Fab，Fab'，$F(ab')_2$，Fabc，Fv，单链和单链抗体。除了“双特异性”或“双功能”免疫球蛋白或抗体外，认为免疫球蛋白或抗体具有其各自相同的结合位点。“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。双特异性抗体能通过各种各样的方法制备，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)。

这里使用的“保守的氨基酸取代”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置换的取代作用。本领域已经确定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-支化侧链(例如苏氨酸，缬氨酸，异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸，苯丙氨酸，色氨酸，组氨酸)。

这里使用的术语“人抗体”意在包括具有从人种系免疫球蛋白序列衍生的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括例如 CDRs 并且特别是 CDR3 中不是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点-特异性诱变导入的突变或者通过体内体细胞突变)。然而，这里使用的术语“人抗体”不是意在包括其中从另一个哺乳动物种系例如小鼠衍生的 CDR 序列移植到人构架序列中的抗体。

这里使用的术语“重组人抗体”意在包括通过重组方法制备，表达，产生或分离的所有的人抗体，例如使用重组表达载体转染到宿主中表达的抗体(下文进一步描述)，从重组体分离的抗体，组合人抗体库(下文进一步描述)，从对于人免疫球蛋白基因是转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见，例如，Taylor，L. D.等，(1992)Nucl.Acids Res. 20:6287)或者通过包括将人免疫球蛋白基因序列剪接成其他 DNA 序列的任何其他方法制备的，表达的，产生的或分离的抗体。这样的重组人抗体具有从人种系免疫球蛋白序列衍生的可变区和恒定区。但是在

一些实施方案中，让这样的人抗体体外诱变(或者，当使用对于人 Ig 序列是转基因的动物时，体内体细胞诱变)，因此重组抗体的 VH 和 VL 区的氨基酸序列是当从人种系 VH 和 VL 序列衍生或者与之有关时，在体内人抗体种库中天然不存在的序列。

这里使用的“分离的抗体”意指基本上没有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 hTNFα的分离的抗体基本上没有与除了 hTNFα之外的抗原特异性结合的抗体)。但是特异性结合 hTNFα的分离的抗体可能与其他抗原有交叉反应，例如来自其他物种的 TNFα分子(下面进一步详细讨论)。然而，分离的抗体可以基本上没有其他细胞材料和/或化学品。

这里使用的“中和抗体”(或者"中和 hTNFα活性的抗体)意指其与 hTNFα的结合导致 hTNFα的生物活性的抑制的抗体。通过测定 hTNFα活性的一个或几个指征，例如 hTNFα-诱导的细胞毒性(体外或体内)，hTNFα-诱导的细胞激活和 hTNFα与 hTNFα受体的结合，能评价 hTNFα的生物活性的抑制。通过本领域公知的体外或体内分析的几种标准方法的一个或几个能评价 hTNFα生物活性的抑制剂(参见美国专利 No. 6,090,382)。优选地，通过 L929 细胞的 hTNFα-诱导的细胞毒性的抑制作用评价抗体中和 hTNFα活性的能力。作为 hTNFα活性的附加的或可选的参数，能评价作为 hTNFα-诱导的细胞激活的量度的抗体抑制 HUVEC 上 hTNFα-诱导的 ELAM-1 表达的能力。

这里使用的术语“表面等离子共振”指通过例如使用 BIAcore 系统(Pharmacia Biosensor AB，Uppsala，Sweden and Piscataway，NJ)，检测生物传感器基质中蛋白质浓度来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。有关进一步描述，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，(l991)Biotechniques 11:620-627; Johnsson 等(1995)J. Mol. Recognit. 8:125; 和 Johnnson 等(1991)Anal. Biochem. 198:268。

这里使用的术语“K_{off}”意指抗体从抗体/抗原复合体离解的速度常数。

这里使用的术语“K_d”意指特定抗体-抗原的离解常数。

这里使用的术语“IC_{50}”意指抑制感兴趣的生物学终点，例如中和细胞毒性活性，所需的抑制剂的浓度。

这里使用的术语“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。

这里针对结合 hTNFα的抗体或抗体部分(例如，VH，VL，CDR3)的编码核酸所使用的术语“分离的核酸分子”意指核酸分子，其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列没有编码与除了 hTNFα之外的抗原结合的抗体或抗体部分的其他核苷酸序列，其他序列天然地可以在人基因组 DNA 核酸的侧翼。这样，例如，本发明编码抗-hTNFα抗体的 VH 区的分离的核酸不包含编码与除了 hTNFα之外的抗原结合的其他 VH 区的其他序列。

这里使用的术语“载体”意指能转送它所连接的另一个核酸的核酸分子。载体的一个类型是“质粒”，其指其中可以连接另外的片段的环状双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中另外的 DNA 片段可以被连接到病毒基因组中。一些载体在引入它们的宿主细胞中能自主复制(例如，具有细胞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整合到宿主细胞的基因组中。此外，一些载体能指示它们所操作连接的基因表达。这样的载体在这里称作“重组表达载体”(或者简单地，“表达载体”)。一般情况下，重组 DNA 技术中使用的表达载体经常是质粒形式。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，本发明意在包括表达载体的这样的其他形式，例如病毒载体(例如，复制缺陷逆转录病毒，腺病毒和腺-相关病毒)，它们起着同等的功能。

这里使用的术语“重组宿主细胞”(或者简单地“宿主细胞”)，意指其中导入重组表达载体的细胞。应该理解这些术语意在不仅指特定的受者细胞，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一些修饰，事实上这样的后代可能与亲代细胞不同，但是仍然包括在这里使用的术语“宿主细胞”的范围内。

这里使用的术语“给药”指施用一种物质(例如，一种抗-TNFα抗体)以实现治疗目的(例如，治疗 TNFα-相关病症)。

这里使用的术语“两周一次的给药方案”，“两周一次给药”，和“两周一次施用”，指对患者施用一种物质(例如，一种抗-TNFα抗体)以实现治疗目的(例如，治疗 TNFα-相关病症)的时间过程。两周一

次的给药方案不是意在包括每周一次的给药方案。优选地，每 9-19 天施用药物，更优选地，每 11-17 天，甚至更优选地，每 13-15 天，最优选地每 14 天施用药物。

短语“与第二种药物联合的第一种药物”中的术语“联合”包括共同施用第一种药物和第二种药物，其例如可以溶解于相同的药学可接受载体或者在其中相互混合，或者施用第一种药物，接着施用第二种药物，或者施用第二种药物，接着施用第一种药物。因此本发明包括联合治疗性处理和联合药物组合物。

短语“伴行治疗性疗法”中的术语“伴行”包括在第二种药物的存在下施用一种药物。伴行治疗性疗法包括其中其中第一，第二，第三，或附加的药物共同施用的方法。伴行治疗性疗法还包括其中在第二或附加的药物的存在下施用第一或附加的药物的方法，其中第二或附加的药物，例如，可以预先施用。伴行治疗性疗法可以由不同的操作者分步实施。例如，可以对患者施用一种作用物和对患者施用第二种作用物，给药步骤可以同时实施，或者几乎同时实施，或者在不同的时间，只要是在第二种药物(和附加的药物)的存在下施用第一种药物(和附加的药物)。操作者和受试者可以是相同的个体(例如人)。

这里使用的术语“联合治疗法”指施用两种或几种治疗物质，例如，抗-TNFα抗体和另一种药物，例如 DMARD 或 NSAID。所述其他药物可以与抗-TNFα抗体一起施用，在其之前施用，或者在其之后施用。

术语“TNFα-介导的症状”或“TNFα-相关病症”指其中 TNFα是导致病症表现的主要介质的局部和/或全身性生理病症。

在这里可互换使用的术语“炎症病症”或“炎症疾病”指炎症-介导的疾病，不管是不是还有免疫介导。炎症病症是其中过度的或不调整的炎症反应导致过度炎症症状，宿主组织损伤，或组织功能损失的病症，例子包括类风湿性关节炎和脊柱关节病。在一个实施方案中，本发明的炎症病症指不包括骨关节炎和类风湿性脊柱病的炎症-介导的疾病。

这里使用的术语“肺疾病”指任何特发性间质性肺疾病和/或慢性阻塞性肺疾病。在本发明的一个实施方案中，术语肺疾病包括所有的肺疾病和/或慢性阻塞性肺疾病，不包括肺休克，慢性肺炎，肺肉样瘤

病，肺纤维化，和硅肺。

在这里可互换使用的术语“特发性间质性肺疾病”或“特发性间质性肺疾病症”指具有相似临床特征的几种未知病因学疾病中的任何一种，主要在小泡间间质组织中产生扩散性病理变化。特发性间质性肺疾病的例子包括但不限于，间质肺纤维化(IPF)。在一个实施方案中，特发性间质性肺疾病包括具有相似临床特征的几种未知病因学疾病中的任何一种，主要在小泡间间质组织中产生扩散性病理变化，但是不包括肺休克，慢性肺炎，肺肉样瘤病，肺纤维化，和硅肺。

这里使用的术语“慢性阻塞性肺疾病”指由于生理确定的慢性气流阻碍的肺疾病，不考虑病因学。慢性阻塞性肺疾病的例子包括但不限于，哮喘和慢性阻塞性肺疾病(COPD)。在一个实施方案中，术语慢性阻塞性肺疾病包括由于生理确定的慢性气流阻碍的肺疾病，但是不包括肺休克，慢性肺炎，肺肉样瘤病，肺纤维化，和硅肺。

术语“气道阻塞”指特征呼吸量测定器结果展示的对气流的增加的阻力。

在这里可互换使用的术语“心血管病”或“冠心病”指涉及心血管系统例如心脏，血管和/或血液的任何疾病，病症，或状态。一种冠心病的特征一般是向心脏供应血液和氧气的血管(冠状动脉)狭窄。冠心病通常是脂肪材料和血小板堆积的结果。作为冠状动脉狭窄，血液向心脏的流动能减慢或停止。本发明的冠心病能适用任何动脉异常，不管结构，组织学，生物化学或任何其他异常。冠状心脏病的例子是再狭窄。在一个实施方案中，冠心病指涉及心血管系统的任何疾病，病症，或状态，不包括心脏局部缺血和心脏机能不全。

这里使用的术语“再狭窄”指狭窄复发，其是动脉缩窄或狭窄。再狭窄经常是作为病态血管再建手术之后发生的闭合之前的损伤而发生。

术语不仅适用于先前存在的狭窄的复发，而且还适用于血管旁路之后变得部分闭塞的先前正常的血管。在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗再狭窄的方法，包括对有进行性再狭窄或者有进行性再狭窄危险的患者施用本发明的抗体，或其抗原结合部分。

这里使用的术语“支架”指插入到解剖学管腔例如动脉中，特别是保持从前封闭的通道畅通的结构。使用支架来保持液体(例如血液)

从血管的一个部分流向另一个部分，和血管内支架或支架保持身体通道通畅和/或支持移植物或包裹物。经常在气胀术血管成形术之后使用支架，但是它们也能用作治疗再狭窄的直接疗法。

在本发明的一个实施方案中，支架是药物-洗脱物。术语“药物-洗脱物”指缓慢-调节释放药物制剂包被的支架。术语“药物-洗脱物”或“药物-释放物”或“药物-包被物”在这里互换使用。可以用治疗冠状心脏病的任何药物，例如本发明的抗体或者其抗原-结合片段，来包被支架。在另一个实施方案中，支架递送 D2E7。在另一个实施方案中，支架递送与用来治疗冠心病的另一种药物联合的 D2E7，包括地塞米松，左旋溶肉瘤素，环磷酰胺，瘤可宁，顺铂，BiCNU，亚德里亚霉素，阿霉素，盐酸柔红霉素，去甲氧柔红霉素，光神霉素，突变霉素，氟尿嘧啶，甲氨喋呤，thoguanine，toxotere，依托泊苷，长春新碱，伊立替康，盐酸拓扑替康，盐酸甲基苄肼，替尼泊苷，六甲蜜胺，羟基脲，吉西他宾，硫酸长春新碱，etophophos，藤霉素(FK506)，和下面的瑞帕霉素类似物：SDZ-RAD，CCI-779，7-表-瑞帕霉素，7-硫甲基-瑞帕霉素，7-表-三甲氧基苯基-瑞帕霉素，7-表-硫甲基-瑞帕霉素，7-去甲氧基-瑞帕霉素，32-去甲氧基-2-去甲和脯氨酸。

这里使用的术语“代谢病症”指影响身体怎样处理需要进行生理功能的物质的疾病或病症。代谢病症的例子包括但不限于糖尿病和肥胖。在本发明的一个实施方案中，使用的术语代谢病症指影响身体怎样处理需要进行生理功能的物质的疾病或病症，不包括自身免疫糖尿病。

在这里可互换使用的术语“多尿症”或“糖尿病症”或“糖尿病”指血液中糖(葡萄糖)的含量高为标识的疾病。胰岛素(胰腺产生的调节血液糖的化合物)太少，对胰岛素有抗性，或者这两个原因能引发糖尿病。

这里使用的短语“与糖尿病相关的病症”指通常与糖尿病有关或涉及糖尿病的病症和其他疾病。

与糖尿病有关的病症的例子包括例如高血糖，血胰岛素过多，血脂过多，胰岛素抗性，减少的葡萄糖新陈代谢，肥胖，糖尿病患者视网膜病，斑变性，白内障，糖尿病患者肾病，肾小球硬化症，糖尿病患者神经病，勃起机能障碍，月经前综合征，血管再狭窄，溃疡性结

肠炎，冠心病，高血压，心绞痛，心肌梗塞，中风，皮肤和结缔组织病症，足溃疡，代谢酸中毒，关节炎，和骨质疏松。

这里使用的术语“肥胖”指其中患者相对于体重来说有过量的身体脂肪的症状。在一个实施方案中，肥胖指个体体重比它们体重的最大期望值高至少大约 20%或更多的症状。当一个成年人超重 100 磅以上，则认为他或她是“病态肥胖”。在另一个实施方案中，肥胖定义为 BMI(体重指数)超过 30 kg/m^2。

这里使用的术语“贫血”指循环中的红细胞数目异常地低或者血液中血红蛋白的浓度低。

这里使用的术语“疼痛”指所有类型的疼痛。该术语指急性和慢性疼痛，例如神经病性疼痛和术后疼痛，慢性背部下部疼痛，聚集性头痛，疱疹神经痛，幻觉手足疼痛，中枢疼痛，牙齿疼痛，阿片样物质-抗性疼痛，内脏疼痛，手术疼痛，骨伤疼痛，生产和分娩中的疼痛，烫伤疼痛，包括太阳灼伤，分娩后疼痛，偏头痛，咽痛，和泌尿生殖道疼痛包括膀胱炎。该术语还包括伤害性疼痛或痛觉。

这里使用的术语“肝病”指与肝细胞损伤或胆道失调相关的哺乳动物优选人肝病。在一个实施方案中，肝病指与肝细胞损伤或胆道失调相关的哺乳动物优选人肝病，不包括肝炎，酒精性肝炎，和病毒性肝炎。

这里可互换使用的术语“皮肤病症”或“皮肤病”指引发炎症状态的除了外伤之外的皮肤异常。在一个实施方案中，本发明的皮肤病是炎性皮肤病，其中皮肤的特征是毛细管扩张，白细胞浸润，红，热，和/或疼痛。皮肤病的例子包括但不限于，牛皮癣，寻常天疱疮，硬皮病，特应性皮炎，肉样瘤病，红斑节，汗腺炎化脓，扁平苔癣，Sweet's 综合征，和白癜风。

这里使用的术语“牛皮癣”指表皮增生有关的皮肤病。牛皮癣包括但不限于慢性斑牛皮癣，有斑点的牛皮癣，反白牛皮癣，脓包牛皮癣，普通牛皮癣，和牛皮癣红皮病。牛皮癣还与其他炎症有关，包括肠炎(IBD)和类风湿性关节炎(RA)。

属于“健康皮肤”或“正常皮肤”指非损伤性皮肤，即，没有看得见的明显的红斑，水肿，色素沉着过高，过低，或不均匀，结垢，干燥病，或水疱形成。组织学健康或正常皮肤指具有包括良好的组织

基础，棘状和颗粒状层，和粘合在一起的多层角质层的形态外观的皮肤组织。

这里使用的术语“指甲病症”或“指甲病”指手指甲或脚趾甲异常的颜色，形状，纹理，或厚度。

这里可互换使用的术语“脉管炎”或“血管炎”指一组病症，其特征在于血管炎症。所有大小的血管可能受到影响，从体内最大的血管(主动脉)到皮肤中最小的血管(毛细血管)。受到影响的血管的大小根据脉管炎的特定类型而不同。

这里使用的术语“试剂盒”指含有施用用于治疗 TNFα-相关病症的本发明的 TNFα抗体的成分的包装产品。试剂盒优选包括盛有试剂盒成分的盒子或容器。盒子或容器中附加有标签或食品和药物管理部批准协议。盒子或容器装有本发明的成分，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。试剂盒还可以包括施用本发明的 TNFα抗体的说明书。

这里进一步描述本发明的各个方面。

I. 本发明的 TNFα抑制剂

本发明提供一种治疗 TNFα-相关病症的方法，其中施用 TNFα抑制剂是有益的。在一个实施方案中，这些方法包括施用以高亲和性和低解离速度与人 TNFα结合并且具有高中和能力的分离的人抗体，或者其抗原-结合部分。优选地，本发明的人抗体是重组的中和人抗-hTNFα抗体。最优选的本发明的重组中和抗体在这里指 D2E7，还指 HUMIRA® 和 adalimumab(SEQ ID NO:1 所示 D2E7 VL 区的氨基酸序列；SEQ ID NO:2 所示 D2E7 VH 区的氨基酸序列)。D2E7(HUMIRA®)的性质描述于 Salfeld 等，美国专利 No. 6,090,382，其在这里引作参考。

在一个实施方案中，本发明的治疗方法包括施用 D2E7 抗体和抗体部分，D2E7-相关抗体和抗体部分，和具有和 D2E7 相当的性质的其他人抗体和抗体部分，例如以低离解动力学与 hTNFα的高亲和性结合。在一个实施方案中，本发明提供用分离的人抗体，或者其抗原-结合部分的治疗方法，所述人抗体，或者其抗原-结合部分以 $1x10^{-8}$ M 或更小的 Kd 和 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解，这两个常数都通过表面等离子共振来测定，并且中和人 TNFα细胞毒性，在标准

体外 L929 分析中 IC_{50} 是 $1x10^{-7}$ M 或更小。更优选地，分离的人抗体以 $5x10^{-4}$ s^{-1} 或更小的 K_{off}，甚至更优选地以 $1x10^{-4}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 从人 TNFα上离解。更优选地，分离的人抗体，或者其抗原-结合部分中和人 TNFα细胞毒性，在标准体外 L929 分析中 IC_{50} 是 $1x10^{-8}$ M 或更小，甚至更优选地，IC_{50} 是 $1x10^{-9}$ M 或更小，甚至更优选地 IC_{50} 是 $1x10^{-10}$ M 或更小。在优选的实施方案中，所述抗体是分离的人重组抗体，或者其抗原-结合部分。

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/亲和性中起着重要的作用。因此，另一方面，本发明提供一种其中 TNFα活性是有害的之 TNFα-相关病症的方法，包括施用具有与 hTNFα缔合作用慢的解离动力学并且具有结构上与 D2E7 的那些相同或相关的轻链和重链 CDR3 结构域。D2E7 VL CDR3 的 9 位可能由 Ala 或 Thr 占据，基本上不影响 K_{off}。因此，D2E7 VL CDR3 的共有基序由下面的氨基酸序列构成：Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A)(SEQ ID NO:3)。因此，D2E7 VH CDR3 的 12 位由 Tyr 或 Asn 占据，基本上不影响 K_{off}。因此，D2E7 VH CDR3 的共有基序由下面的氨基酸序列构成：V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N)(SEQ ID NO:4)。此外，根据美国专利 No. 6,090,382 的实施例 2 所证明的，D2E7 重链和轻链的 CDR3 结构域能被一个丙氨酸残基取代(在 VL CDR3 中的位置 1，4，5，7 或 8，或者在 VH CDR3 中的位置 2，3，4，5，6，8，9，10 或 11)，基本上不影响 K_{off}。

进一步地，技术人员明白，有着 D2E7 VL 和 VH CDR3 结构域被丙氨酸取代的能力，仍然保持抗体的低离解速度常数的 CDR3 结构域中其他氨基酸的取代也是可能的，特别是保守氨基酸的取代。优选地，在 D2E7 VL 和/或 VH CDR3 结构域中进行不多于 1-5 个保守氨基酸的取代。更优选地，在 D2E7 VL 和/或 VH CDR3 结构域中进行不多于 1-3 个保守氨基酸的取代。另外，不应该在对于与 hTNFα结合是决定性的之氨基酸位置上进行保守的氨基酸取代。D2E7 VL CDR3 的 2 和 5 位以及 D2E7 VH CDR3 的 1 和 7 位表现出对于与 hTNFα的相互作用是决定性的，因此，保守的氨基酸取代优选不在这些位置上进行(但是如上所述，D2E7 VL CDR3 的 5 位的丙氨酸取代是可接受的)(参见美国专利 No. 6,090,382)。

因此，在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗 TNFα-相关病症的方法，包括施用一种分离的人抗体，或者其抗原-结合部分。所述抗体，或者其抗原-结合部分优选具有下面的特征：

a) 根据表面等离子共振测定，其以 $1x10^{-3}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 速率常数从人 TNFα上离解；

b) 有包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，或在 1，4，5，7 或 8 位通过一个丙氨酸取代或者在 1，3，4，6，7，8 和/或 9 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列的轻链 CDR3 结构域；

有包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，或在 2，3，4，5，6，8，9，10 或 11 位通过一个丙氨酸取代或者在 2，3，4，5，6，8，9，10，11 和/或 12 位通过 1-5 个保守氨基酸取代而从 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列的重链 CDR3 结构域。

更优选地，所述抗体，或者其抗原-结合部分以 $5x10^{-4}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 从人 TNFα上离解，甚至更优选地，所述抗体，或者其抗原-结合部分以 $1x10^{-4}$ s^{-1} 或更小的 K_{off} 从人 TNFα上离解。

在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗 TNFα-相关病症的方法，包括施用一种分离的人抗体，或者其抗原-结合部分。所述抗体，或者其抗原-结合部分优选包含包括 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列，或在 1，4，5，7 或 8 位通过一个丙氨酸取代而从 SEQ ID NO:3 修饰的氨基酸序列的 CDR3 结构域的轻链可变区(LCVR)，和有包括 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列，或在 2，3，4，5，6，8，9，10 或 11 位通过一个丙氨酸取代而从 SEQ ID NO:4 修饰的氨基酸序列的 CDR3 结构域的重链可变区(HCVR)。优选地，所述 LCVR 进一步具有包括 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 CDR2 结构域(即，D2E7 VL CDR2)，并且 HCVR 进一步具有包括 SEQID NO:6 的氨基酸序列的 CDR2 结构域(即，D2E7 VH CDR2)。更优选地，所述 LCVR 进一步具有包括 SEQID NO:7 的氨基酸序列的 CDR1 结构域(即，D2E7 VL CDR1)，并且 HCVR 具有包括 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列的 CDR1 结构域(即，D2E7 VH CDR1)。VL 的构架区优选是来自 $V_{\kappa}I$ 人种系家族，更优选来自 A20 人种系 V_{κ} 基因，并且最优选地来自美国专利 No. 6,090,382 的图 1A 和 1B 所示的 D2E7 VL 构架序列。VH 的构架区优选是来自 V_H3 人种系家族，更优

选来自 DP-31 人种系 VH 基因，并且最优选地来自美国专利 No. 6,090,382 的图 2A 和 2B 所示的 D2E7 VH 构架序列。

因此，在另一个实施方案中，本发明提供一种治疗 TNFα-相关病症的方法，包括施用一种分离的人抗体，或者其抗原-结合部分。所述抗体，或者其抗原-结合部分优选包含包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列(即，D2E7 VL)的轻链可变区(LCVR)和包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列(即，D2E7 VH)的重链可变区。在一些实施方案中，所述抗体包括重链恒定区，例如 IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgA，IgE，IgM 或 IgD 恒定区。优选地，重链恒定区是 IgGl 重链恒定区或 IgG4 重链恒定区。此外，所述抗体包括轻链恒定区，κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。优选地，所述抗体包括轻链恒定区。或者，所述抗体部分可以是例如 Fab 片段或单链 Fv 片段。

在其他实施方案中，本发明提供一种治疗 TNFα-相关病症的方法，其中施用一种抗-TNFα抗体是有益地施用一种分离的抗体或者其抗原-结合部分。所述抗体或者其抗原-结合部分优选包含 D2E7-相关 VL 和 VH CDR3 结构域，例如，具有有包括选自下面的氨基酸序列的 CDR3 结构域的轻链可变区(LCVR)：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，或者具有有包括选自下面的氨基酸序列的 CDR3 结构域的重链可变区(HCVR): 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 and SEQ ID NO:35。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抑制剂是 etanercept(描述于 WO 91/03553 和 WO 09/406476)，英夫单抗(描述于美国专利 No. 5,656,272)，CDP571(一种人源化单克隆抗-TNF-αIgG4 抗体)，CDP 870(一种人源化单克隆抗-TNF-α抗体片段)，D2E7(人抗-TNF mAb)，可溶性 TNF 受体 L 型或 PEG 化可溶性 TNF 受体 I 型(PEGsTNF-R1)。

本发明的 TNFα抗体能被修饰。在一些实施方案中，TNFα抗体或者其抗原结合片段被化学修饰，以提供期望的效果。例如，本发明的

抗体或抗体片段的PEG化可以通过本领域公知的任何聚乙烯醇化反应来进行，描述于，例如，下面的参考文献：Focus on Growth Factors 3:4-10(1992)；EP 0 154 316；和EP 0401 384(每篇文献在此全文引作参考)。优选地，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进行聚乙烯醇化反应。用于本发明的抗体和抗体片段的聚乙烯醇化的优选的水溶性聚合物是聚乙二醇(PEG)。如这里使用的，“聚乙二醇”意思是包括用来将其他蛋白质衍生化的所有形式的PEG，例如一(Cl-Cl0)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇。

本发明的PEG化抗体和抗体片段的制备方法一般包括下面的步骤：(a)在所述抗体或抗体片段能与一个或几个PEG基团连接的条件下，使本发明的抗体或抗体片段与聚乙二醇反应，例如PEG的反应性酯或醛衍生物，和(b)获得反应产物。以已知的参数和期望的结果为基础选择最佳反应条件或酰化反应对于本领域技术人员是显而易见的。

聚乙烯醇化抗体和抗体片段一般可以用来治疗本发明的TNFα-相关疾病，通过施用这里描述的TNFα抗体和抗体片段。一般地，聚乙烯醇化抗体和抗体片段与非聚乙烯醇化抗体和抗体片段相比，具有延长的半寿期。聚乙烯醇化抗体和抗体片段可以单独使用，与其他药物组合物一起，或者与其他药物组合物联合施用。

在本发明的另一个实施方案中，TNFα抗体或抗体片段能被改变，其中修饰抗体的恒定区，相对于没有修饰的抗体减少至少一个恒定区-介导的生物效应物功能。为了修饰本发明的抗体使得其具有降低的与Fc受体的结合，在Fc受体(FcR)相互作用所必需的特定区能使抗体的免疫球蛋白恒定区片段突变(参见，例如，Canfield，S. M.和S. L. Morrison(1991)J. Exp. Med. 173:1483-1491；和Lund，J.等(1991)J. of Immunol. 147:2657-2662)。抗体FcR结合能力的减弱也能减小依赖FcR相互作用的其他效应子功能，例如调理作用和吞噬作用和抗原-依赖性细胞的细胞毒性。

本发明的抗体或抗体部分可以被衍生化或者与另一个功能分子连接(例如另一个肽或蛋白质)。因此，本发明的抗体或抗体部分意在包括这里描述的人抗-hTNFα抗体的衍生化和其他修饰形式，包括免疫粘附分子。例如，本发明的抗体或抗体部分能功能性地连接于(通过化学偶联，基因融合，非共价缔合或者其他)一个或多个其他分子实体(例如，

双特异性抗体或二价抗体)，检测试剂，细胞毒性试剂，药物物质，和/或能介导抗体或抗体部分与另一个分子缔合的蛋白质和/或肽(例如链霉抗生物素蛋白核心区或多组氨酸标记)。

通过使两个或多个抗体(相同或不同类型，例如，产生多特异性抗体)制备衍生化的抗体的一种类型。合适的交联剂包括具有由合适的间隔基团分开的具有两个不同的反应团的异双功能的(例如间-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯)或同双功能的(例如二琥珀酰亚胺辛二酸酯)那些交联剂。这样的交联剂从 Pierce Chemical Company，Rockford，IL 可获得。

本发明的抗体或抗体部分可以被衍生化的有用的可检测试剂包括荧光化合物。荧光可检测试剂包括荧光素，荧光素异硫代氰酸酯，若丹明，5-二甲基胺-l-萘磺酰氯，藻红蛋白等等。抗体还可以用可检测酶衍生化，例如碱性磷酸酶，辣根过氧化物酶，葡萄糖氧化酶等等。当用一种可检测酶将抗体衍生化时，通过加入用来产生可检测反应产物的酶的另外的试剂进行检测。例如，当存在可检测试剂辣根过氧化物酶时，加入过氧化氢和二氨基联苯胺产生可检测的有色反应产物。抗体还可以用生物素衍生化，并且通过抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白结合的间接量度来测定。

通过在宿主细胞中重组表达免疫球蛋白轻链和重链能制备本发明的抗体或抗体部分。为了表达重组抗体，用携带编码抗体的免疫球蛋白轻链和重链的的 DNA 片段的一种或多种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且，优选地，分泌到培养宿主细胞的培养基中，从培养基回收抗体。应用标准重组 DNA 方法来获得抗体重链和轻链基因，将这些基因插入到重组表达载体中并且将载体导入宿主细胞，例如在 Sambrook，Fritsch 和 Maniatis(编著)，Molecular Cloning; A Laboratory Manual，第二版，Cold Spring Harbor，N. Y.，(1989)，Ausubel，F. M.等(编著)Current Protocols in Molecular Biology，Greene Publishing Associates，(1989)和 Boss 等人的美国专利 No. 4,816,397 中描述的那些。

为了表达 D2E7 或 D2E7-相关抗体，首先获得编码轻链和重链可变区的 DNA 片段。利用聚合酶链式反应(PCR)通过扩增和修饰种系轻链和重链可变序列能获得这些 DNAs。任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；还参见 Kabat，E. A.，等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest，第五版，U. S. Department of Health and Human Services，NIH Publication No. 91-3242；Tomlinson，I. M.，等(1992)“The Repertoire of Human Gerline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops”，J. Mol. Biol. 227:776-798；和 Cox，J. P. L.等(1994)“A Directory of Human Germ-line V78 Segments Reveals a Strong Bias in their Usage”，Eur. J. Immunol. 24:827-836；这些文献全文在此引作参考)。为了获得 D2E7 或 D2E7-相关抗体重链可变区的编码 DNA 片段，通过标准 PCR 扩增人种系 VH 基因 V_H3 家族成员。最优选地，扩增 DP-31VH 种系序列。为了获得 D2E7 或 D2E7-相关抗体轻链可变区的编码 DNA 片段，通过标准 PCR 扩增人种系 VL 基因 $V_\kappa I$ 家族成员。最优选地，扩增 DP-31VH 种系序列。以上述参考文献中公开的核苷酸序列为基础，应用标准方法，能设计适合在扩增 DP-31 种系 VH 和 A20 种系 VL 序列中使用的 PCR 引物。

一旦获得种系 VH 和 VL 片段，这些序列可以被诱变来编码这里公开的 D2E7 或 D2E7-相关的氨基酸序列。种系 VH 和 VL DNA 序列编码的氨基酸序列首先与 D2E7 或 D2E7-相关的氨基酸序列相比较，以鉴定 D2E7 或 D2E7-相关序列中与种系不同的氨基酸残基。然后，诱变种系 DNA 序列的合适的核苷酸，使得突变的种系序列编码 D2E7 或 D2E7-相关的氨基酸序列。通过标准方法进行种系序列诱变，例如 PCR-介导的诱变(其中诱变的核苷酸被插入到 PCR 引物中，使得 PCR 产物包含突变)或点-定向诱变。

一旦获得编码 D2E7 或 D2E7-相关 VH 和 VL 片段的 DNA 片段(如上所述，通过上述种系 VH 和 VL 基因的扩增和诱变)，这些 DNA 片段能进一步通过标准 DNA 技术操作，例如转化为全长抗体链基因的可变区基因，转化为 Fab 片段基因或者转变为 scFv 基因。在这些操作中，VL-或 VH-编码 DNA 片段操作连接于编码另一种蛋白质的另一个 DNA 片段，例如抗体恒定区或灵活的接头。这里使用的术语“操作连接”意思是两个 DNA 片段连接，使得这两个 DNA 片段编码的氨基酸序列保留在读框中。

通过使 VH-编码 DNA 与编码重链恒定区(CH1，CH2 和 CH3)的另一个 DNA 分子操作连接，能将编码 VH 区的分离的 DNA 转化为全长重链基因。这些人重链恒定区基因的序列是本领域公知的(参见，例如，Kabat，E. A.，等(1991)Sequences of Proteins of Immufaological Interest，第五版，U. S. Department of Health and Human Services，NIH Publication No. 91-3242)，并且通过标准 PCR 扩增能获得包括这些区的 DNA 片段。重链恒定区可以是 IgGl，IgG2，IgG3，IgG4，IgA，IgE，IgM 或 IgD 恒定区，但是最优选是 IgGl 或 IgG4 恒定区。对于 Fab 片段重链基因，VH-编码 DNA 能与只编码重链 CH1 恒定区的另一个 DNA 分子操作连接。

通过使 VL-编码 DNA 与编码轻链恒定区 CL 的另一个 DNA 分子操作连接，能将编码 VL 区的分离的 DNA 转化为全长轻链基因(以及 Fab 轻链基因)。这些人轻链恒定区基因的序列是本领域公知的(参见，例如，Kabat，E. A.，等(1991)Sequences of Proteins of Immufaological Interest，第五版，U. S. Department of Health and Human Services，NIH Publication No. 91-3242)，并且通过标准 PCR 扩增能获得包括这些区的 DNA 片段。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 恒定区，但是最优选是 κ 恒定区。

为了获得 scFv 基因，VH-和 VL-编码 DNA 片段操作连接于编码柔顺接头的另一个片段，例如编码氨基酸序列$(Gly4-Ser)_3$，使得 VH 和 VL 序列能被表达为连续的单链蛋白质，VL 和 VH 区由柔顺接头连接(参见，例如，Bird 等(1988)Science 242:423-426；Huston 等(1988)Proc.Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；McCafferty 等，Nature(1990) 348:552-554)。

为了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 DNAs 插入到表达载体中，使得基因与转录和翻译调控序列操作连接。在本说明书中，术语“操作连接”意思是抗体基因连接到载体中，使得载体中的转录和翻译调控序列发挥它们想要的调节和转录和翻译抗体基因的功能。选择表达载体和表达调控序列与使用的表达宿主细胞相匹配。将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到不同的载体中，更典型地，两个基因插入到相同的表达载体中。通过标准方法将抗体基因插入到表达载体中(例如，连接抗体基因片段上互补限制位点和载体，或者如果不存在限制位点，则进行平端连接)。

在插入 D2E7 或 D2E7-相关轻链或重链序列之前，表达载体可以是已经携带抗体恒定区序列。例如，一种方法是将 D2E7 或 D2E7-相关 VH 和 VL 序列转化为全长抗体基因并且将它们分别插入到已经编码重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中，使得 VH 部分与载体中的 CH 部分操作连接，并且 VL 部分与载体中的 CL 部分操作连接。另外，或者，重组表达载体能编码有利于抗体链从宿主细胞分泌出来的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体中，使得信号肽符合读框与抗体链基因的氨基末端连接。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)。

除了抗体链基因之外，本发明的重组表达载体携带调控序列，它调控抗体链基因在宿主细胞中表达。术语“调控序列”意在包括启动子和控制抗体链基因转录或翻译的其他表达调控元件(例如，多腺苷酸化信号)。这样的调控信号描述于，例如，Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzomology 185，Academic Press，San Diego，CA(1990)。本领域技术人员明白表达载体的设计，包括调控序列的选择，取决于象要转化的宿主细胞的选择，期望的蛋白质表达水平等这样的因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选的调控序列包括指导哺乳动物细胞蛋白质高水品表达的病毒元件，例如从巨细胞病毒(CMV)(例如 CMV 启动子/增强子)，猿猴病毒 40(SV40)(例如 SV40 启动子/增强子)，腺病毒(例如，腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多形瘤衍生的启动子和/或增强子。有关病毒调控元件，和其序列的进一步描述参见，例如 Stinski 的美国专利 No. 5,168,062，Bell 等人的美国专利 No. 4,510,245 和 Schaffner 等人的美国专利 No. 4,968,615。

除了抗体链基因和调控序列之外，本发明的重组表达载体可以携带附加的序列，例如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因有利于其中导入载体的宿主细胞的选择(参见，例如，美国专利 Nos. 4,399,216，4,634,665 和 5,179,017，都是 Axel 等人的)。例如，选择标记基因在导入载体的宿主细胞上带来对药物的抗性，例如 G418，潮霉素或甲氨喋呤。优选的选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(在 dhfr-宿主细胞中使用，由甲氨喋呤筛选/扩增)和 neo 基因(用于 G418 筛选)。

为了表达重链和轻链。通过标准技术将编码重链和轻链的表达载

体转染到宿主细胞中。各种形式的术语“转染”意在包括通常用于将外源 DNA 导入原核或真核宿主细胞中的各种各样的技术，例如，电穿孔，磷酸钙沉淀，DEAE-葡聚糖转染等。虽然在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体理论上是可行的，但是在癌真核细胞中表达是最优选的，最优选在哺乳动物宿主细胞中表达，因为这样的真核细胞，特别是哺乳动物细胞，比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠的和免疫活性的抗体。据报道抗体基因的原核细胞表达对于高产率制备活性抗体是无效的(Boss，M. A.和 Wood，C. R.(1985)Immunology Today 6:12-13)。

用于表达本发明重组抗体的优选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，描述于 Urlaub 和 Chasin，(1980)Proc.Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220，与 DHFR 选择标记一起使用，例如，根据 R. J.Kaufman 和 P. A. Sharp(1982)Mol. Biol. 159:601-621 中的描述)，NSO 骨髓瘤细胞，COS 细胞和 SP2 细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物是主细胞中时，将宿主细胞培养一段时间，这段时间足以使得抗体在宿主细胞中表达，优选地足以使得抗体分泌到宿主细胞生长在其中的培养基中。利用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收抗体。

还能使用宿主细胞来制备完整抗体的部分，例如 Fab 片段或 scFv 分子。要理解上述方法的各种变化在本发明的范围之内。例如，可能期望用编码本发明抗体的轻链或重链(但是不是两者)的 DNA 转染宿主细胞。重组 DNA 技术还可以用来去除对于结合 hTNFα不是必需的编码轻链或重链之一或两者的一些或全部 DNA。本发明的抗体也包括这样的截短的 DNA 分子表达的分子。另外，通过标准化学交联技术，通过本发明的抗体与第二抗体交联，可以制备双功能抗体，其中一条重链和一条轻链是本发明的抗体，而另一条重链和轻链是对于除了 hTNFα之外的抗原是特异性的。

在用于本发明的抗体或者其抗原-结合部分的重组表达的优选系统中，通过磷酸钙介导转染向 dhfr-CHO 细胞中导入编码抗体重链和抗体轻链的重组表达载体。在重组表达载体中，抗体重链和轻链基因分别操作连接于 CMV 增强子/AdMLP 启动子调控元件，高水平的基因转录。重组表达载体还携带 DHFR 基因，它使得用甲氨喋呤筛选/扩增筛

选转染有载体的 CHO 细胞。培养选择的转化体宿主细胞，使得表达抗体重链和轻链，并且从培养基回收完整抗体。利用标准分子生物学技术来制备重组表达载体，转染宿主细胞，选择转化体，培养宿主细胞并且从培养基回收抗体。

通过筛选使用从人淋巴细胞衍生的 mRNA 制备的人 VL 和 VH cDNAs 制备的重组组合抗体库，优选 scFv 噬菌体展示库，能分离除了这里公开的 D2E7 或者其抗原结合部分或 D2E7-相关抗体之外的本发明的重组人抗体。制备和筛选这样的文库的方法是本领域公知的。除了制备噬菌体展示文库的商售试剂盒(例如，the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System，目录号 27-9400-01；和 Stratagene SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒，目录号 240612)之外，特别适合在抗体展示文库制备和筛选中使用的方法和试剂的例子参见，例如，Ladner 等的美国专利 No. 5,223f409，Kang 等人的 PCT 公开 No. WO 92/18619；Dower 等人的 PCT 公开 No. WO 91/17271；Winter 等人的 PCT 公开 No. WO 92/20791；Markland 等人的 PCT 公开 No. WO 92/15679；Breitling 等人的 PCT 公开 No. WO 93/01288; Mc Cafferty 等人的 PCT 公开 No. WO 92/01047；Garrard 等人的 PCT 公开 No. WO 92/09690；Fuchs 等人的(1991)Biol/Technology 9:1370-1372；Hay 等人的(1992)Hum Antibody Hybridomas 3:81-85；Huse 等人的(1989)Science 246:1275-1281；Mc Cafferty 等人，Nature(1990) 348:552-554; Griffiths 等人(1993)EMBO J 12:725-734；Hawkins 等人(1992)J Mol Biol 226:889-896；Clackson 等人(1991)Nature 352:624-628；Gram 等人(1992)PNAS 89:3576-3580；Garrard 等人(1991)Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboom 等人(1991)Nuc Acid Res 19:4133-4137；和 Barbas 等人的(1991)PNAS 88:7978-7982。分离对于 hTNFα有高亲和性和低离解速率常数的人抗体的方法描述于美国专利 Nos. 6,090,382，6,258,562，和 6,509,015，这些专利文献在此引作参考。

II. 本发明的 TNFα抑制剂的应用

在一个实施方案中，本发明提供对患有其中 TNFα活性是有害的之 TNFα-相关疾病患者抑制 TNFα活性的方法。在一个实施方案中，TNFα抑制剂是 D2E7，也称作 HUMIRA®(adalimumab)。

在包括脓毒症，感染，自身免疫疾病，移植物排异和移植物-抗-

宿主疾病的各种 TNFα-相关疾病的病理生理学中涉及 TNFα(参见，例如，Moeller，A.，等(1990)Cytokine 2:162-169；Moeller 等人的美国专利 No. 5,231,024；Moeller，A.等人的欧洲专利公开 No. 260610 B1，Vasilli，P.(1992)Annu. Rev. Immunol. 10:411-452；Tracey，K. J.和 Cerami，A.(1994)Annu. Rev. Med. 45:491-503)。本发明提供对患有 TNFα-相关疾病患者抑制 TNFα活性的方法，该方法包括对患者施用抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂，使得患有 TNFα-相关疾病患者的 TNFα活性被抑制。本发明还提供对脉管炎患者抑制或降低 TNFα活性的方法，包括对患者施用本发明的抗体，或抗体部分，或其他 TNFα抑制剂，使得患者的 TNFα活性被抑制或降低。优选地，TNFα是人 TNFα，并且患者是人患者。或者患者可以是表达与本发明的抗体起交叉反应的 TNFα的哺乳动物，患者还可以是导入了 hTNFα的哺乳动物(例如，通过施用 hTNFα或者通过表达 hTNFα转基因)。为了治疗目的可以对人患者施用本发明的抗体(下面进一步讨论)。

此外，可以对表达与本发明的抗体起交叉反应的 TNFα的非人哺乳动物施用本发明的抗体(例如，灵长类，猪或小鼠)，为了兽医目的或者作为人类疾病的动物模型。关于后者，这样的动物模型可以用来评价本发明的抗体的治疗效果(例如试验给药剂量和时间进程)。

用来研究脊柱关节病的动物模型的例子包括 ank/ank 转基因小鼠，HLA-B27 转基因大鼠(参见 Taurog 等(1998)The Spondylarthritides. Oxford：Oxford University Press)。

用来评价药物治疗肝病的治疗效果的动物模型的例子包括黑猩猩丙型肝炎病毒模型(参见 Shimizu 等(1990)Proc Natl Acad Sci. USA 87:6441)。用来研究皮肤病和指甲病的动物模型的例子包括，例如，严重合并免疫缺陷(SCID)小鼠模型(牛皮癣)和 Smith 品系(SL)鸡和脱色素小鼠(白癜风)(参见 Nickoloff(2000)Investig Dermatol Symp Proc. 5:67；Austin 等(1995)Am J Pathol. 146:1529；Lerner 等(1986)J Invest Dermatol. 87:299)。

用来评价 TNFα抗体治疗代谢病的效果的动物模型的例子包括 NOD 转基因小鼠，Akita 小鼠，NSY 转基因小鼠和 ob/ob 小鼠(参见 Baeder 等(1992)Clin Exp Immunol. 89:174；Haseyama 等(2002)Tohoku. J Exp Med. 198:233；Makino 等(1980)：Exp.Anim. 29:1；

Kolb(1987)Diabetes/Metabolism Reviews 3:751；Hamada 等(2001)Metabolism. 50:1282；Coleman，(1978)Diabetologia，14:141；Bailey 等(1982)Int. J. Obesity 6:11)。用来研究脉管炎的动物模型的例子包括小鼠 HSV 模型(贝切特氏病)，小鼠 L. casei 模型(Kawasaki's 病)，和小鼠 ANCA 模型(Kawasaki's 病)。脉管炎的其他模型包括 McH5-lpr/lpr 品系(Nose，M.，等(1996)Am. J. Path. 149:1763)和 SCG/Kj 小鼠品系(Kinjoh，等(1993)Proc. Natl. Acad. Sci.，USA 90:3413)。这些小鼠品系特发发新月形肾小球性肾炎和引起坏死的脾，胃，心脏，子宫和卵巢小动脉的脉管炎。这些动物发生血病球蛋白过多和与脊髓过氧化物酶(MPO)反应的 ANCA 自身抗体。另外，用人 MPO 免疫大鼠导致 ANCA-相关引起坏死的新月形肾小球性肾炎(Brouwer，E.，等(1993)J.Exp. Med. 177:905)。

用来研究特发性间质性肺疾病和慢性阻碍性呼吸道疾病的动物模型的例子包括卵白蛋白(OVA)诱导的变应性哮喘小鼠和雪茄烟诱导的慢性阻塞性肺疾病小鼠(参见 Hessel，EM.，等(1995)Eur J Pharmacol. 293:401；Keast D，等(1981)J. Pathol. 135:249)。

通常用于研究冠心病，包括再狭窄的动物模型包括大鼠或小鼠颈动脉结扎模型和颈动脉损伤模型(Ferns 等(1991)Science 253:1129；Clowes 等(1983)Lab. Invest. 49:208；Lindner 等(1993)Circ Res. 73:792)。在颈动脉结扎模型中，通过结扎远离分枝附近的血管而中断动脉血流。根据 Clowes 等所述，创建颈动脉损伤模型，使得通过插入到外侧颈动脉的气导管管腔插入使得共同的颈动脉内皮脱落。第二周，由于平滑肌细胞收缩，颈动脉显著变窄，但是在第 2 和 12 周之间，内膜厚度加倍，导致管腔大小减小。使用这些模型的任一个来测定本发明的 TNFα抗体在预防和治疗人再狭窄中的有效治疗作用。

用来研究贫血的动物模型的例子包括用肽基聚糖-多糖聚合物接种的大鼠(参见 Coccia 等，(2001)Exp Hematology. 29:1201-1209)。用来研究疼痛的动物模型的例子是本领域公知的，并且包括大鼠坐骨神经结扎模型，和大鼠分节脊柱神经结扎模型(参见 Bennett 和 Zie，(1988)Pain. 33:87-107；Kim 和 Chung，(1992)Pain 50:355-363)。

这里使用的术语“其中 TNFα活性有害的 TNFα-相关疾病”意思是包括 TNFα-相关疾病或其他疾病，其中已经证明患有该病症的患者

体内存在的 TNFα是或者怀疑是引起病症恶化的病症或因素的病理学原因，例如，少年类风湿性关节炎。

因此，其中 TNFα活性有害的 TNFα-相关疾病是其中预计 TNFα活性的抑制减轻病症的症状和/或发展。例如，通过患有该病症的患者生物液体中 TNFα浓度的升高可以印证这样的病症(例如，患者血清，血浆，关节液中 TNFα浓度的升高)，使用如上所述的抗-TNFα抗体能够检测。下面进一步讨论本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂在其中 TNFα活性有害的特定 TNFα-相关疾病的治疗中的应用。在一些实施方案中，根据下面的 III 章节所述，与另一种治疗药物联合，对患者施用本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂。

A. 脊柱关节病

很多疾病，包括炎症疾病例如脊柱关节病的病理生理学中涉及 TNFα(参见，例如，Moeller，A.，等(1990)Cytokine 2:162-169; Moeller 等人的美国专利 No. 5,231,024; Moeller，A 的欧洲专利公开 No. 260 610B 1)。本发明提供一种对患有这样的疾病的患者抑制 TNFα活性的方法，该方法包括对患者施用抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂，使得患有脊柱关节病的患者的 TNFα活性被抑制。在一个实施方案中，本发明提供一种治疗脊柱关节病的方法。

这里使用的术语“脊柱关节病”用来指影响脊柱关节的几种疾病的任一种，其中这样的疾病有共同的临床学，放射学，和组织学特征。很多脊柱关节病都有遗传特征，即它们都与 HLA-B27 等位基因相关。在一个实施方案中，术语脊柱关节炎用来指影响脊柱关节的几种疾病的任一种，不包括强直性脊柱炎，牛皮癣关节炎/脊柱炎，肠关节炎，反应性关节炎或 Reiter's 综合征，和没有分化的脊柱关节病。

本发明的 TNFα抗体还可以用来治疗有发生脊柱关节病危险的患者。有发生脊柱关节病危险的患者的例子包括患有关节炎的人。脊柱关节炎与其他形式的关节炎有关，包括类风湿性关节炎。在一个实施方案中，本发明的抗体用来治疗患有与类风湿性关节炎相关的脊柱关节病的患者。能用本发明的 TNFα抗体治疗的脊柱关节病的例子在下面描述：

1. 强直性脊柱炎(AS)

肿瘤坏死因子在强直性脊柱炎的病理生理学中涉及(参见 Verjans

等(1991)Arthritis Rheum. 34(4):486; Verjans 等(1994)Clin Exp Immunol. 97(1):45; Kaijtzel 等(1999)Hum Immunol. 60(2):140)。强直性脊柱炎(AS)是涉及一个或几个脊椎骨发炎的炎症病症。AS 是影响中轴骨胳和/或外周关节的慢性病，包括脊柱椎骨和骶髂关节之间的关节和脊柱和骨盆之间的关节。AS 最后能引起受影响的脊椎融合或者生长在一起。脊柱关节病，包括 AS，与牛皮癣关节炎(PsA)和/或肠炎(IBD)相关，包括溃疡性结肠炎和克隆氏病。

通过放射照相化验能确定 AS 的早期表现，包括 CT 扫描和 MRI 扫描。AS 的早期表现通常包括 scroiliitis 和骶髂关节中的变化，通过脉络膜下骨胳的皮层缘模糊，接着发生侵蚀和硬化来确诊。注意疲劳是 AS 的共同症状(Duffy 等(2002)ACR 66th Annual Scientific Meeting Abstract)。因此，本发明的抗体，其抗原-结合片段能被用来治疗 AS。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段被用来治疗与 IBD 相关的脊柱关节病，包括 AS。

经常用非甾体类抗炎药治疗 AS(NSAIDs)，例如阿司匹林或消炎痛。因此，本发明的 TNFα还可以与通常用来减少炎症和通常与强直性脊柱炎相关的疼痛的药物联合施用。

2. 牛皮癣关节炎

牛皮癣关节炎的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Partsch 等(1998)Ann Rheum Dis. 57:691；Ritchlin 等(1998)J Rheumatol. 25:1544)。根据这里所指的，牛皮癣关节炎(PsA)或者与皮肤相关的牛皮癣，指与牛皮癣相关的慢性炎症关节炎。牛皮癣是一种普通的慢性皮肤病，其在身体上引起红斑。20 名牛皮癣患者中有大约 1 名会伴随皮肤症状发生关节炎，并且大约 75%的病例中，牛皮癣在关节炎之前。PsA 其本身有各种各样的表现形式，范围包括中等程度至严重的关节炎，其中关节炎通常影响手指和脊柱。当脊柱受到影响时，如上所述，症状与强直性脊柱炎相似。本发明的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段能被用来治疗 PsA。

PsA 有时与关节炎毁形有关。关节炎毁形指特征在于使关节残废的广泛的侵蚀性畸形的过度骨侵蚀的病症。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段能被用来治疗关节炎毁形。

3. 反应性关节炎/莱特尔氏综合征

反应性关节炎，也称作莱特尔氏综合征，的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Braun 等(1999)Arthritis Rheum. 42(10):2039)。反应性关节炎(ReA)指使身体别处炎症恶化的关节炎，经常肠或泌尿系统感染之后。ReA 经常特征是一些临床症状，包括关节的炎症(关节炎)，尿道炎，结膜炎，和皮肤和粘膜损伤。另外，在性传播疾病或痢疾感染传染之后能发生 ReA，痢疾感染包括衣原体，弯曲菌，沙门氏菌，或耶尔森氏菌。因此，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段能被用来治疗 ReA。

4. 没有分化的脊柱关节病

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗没有分化的脊柱关节病患者(参见 Zeidler 等(1992)Rheum Dis Clin North Am. IS:187)。用来描述没有分化的脊柱关节病的其他术语包括血清反应阴性少关节炎和没有分化的少关节炎。这里使用的没有分化的脊柱关节病指其中证实患者仅有一些与脊柱关节病相关的症状的病症。这些症状通常在没有 IBD，牛皮癣，或 AS 或莱特尔氏综合征常规症状的年轻成年人身上发现。在一些例子中，没有分化的脊柱关节病可能是 AS 的早期指征。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原-结合片段能被用来治疗没有分化的脊柱关节病。

B. 肺疾病

很多种肺疾病的病理生理学中涉及 TNFα，包括象原发性间质性肺疾病和慢性阻塞性呼吸道疾病这样的肺疾病(参见，例如，Piquet PF 等(1989)J Exp Med. 170:655-63; Whyte M，等(2000)Am J Respir Crit Care Med. 162:755-8; Anticevich SZ，等(1995)Eur J Pharmacol. 284:221-5)。本发明提供对患有这样的肺疾病的患者抑制 TNFα活性的方法，该方法包括对患者施用一种抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂，使得患有原发性间质性肺疾病或慢性阻塞性呼吸道疾病患者的 TNFα活性被抑制。下面讨论其中 TNFα活性有害的原发性间质性肺疾病和慢性阻塞性呼吸道疾病的例子。

1. 原发性间质性肺疾病

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体被用来治疗患有原发性间质性肺疾病的患者。原发性间质性肺疾病以三种方式影响肺：首先，肺组织以一些已知的或未知的途径受到损伤；其次，肺中气囊壁开始

发炎；最后， 间质(或者气囊之间的组织)中开始形成瘢痕(或纤维化)，并且肺开始变得强直。下面描述原发性间质性肺疾病的例子。

a. 特发性肺纤维化(IPF)

特发性肺纤维化(IPF)的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Piquet PF，等(1989)J Exp Med. 170:655-63； Whyte M，等(2000)Am J Respir Crit Care Med 162:755-8; Corbett EL，等(2002)Am J Respir Crit Care Med. 165:690-3)。例如，发现 IPF 患者的巨噬细胞和 II 型上皮细胞中 THF 表达水平增大(Piquet 等(1993)Am J Pathol 143:651； Nash 等(1993)Histopathology 22:343； Zhang 等(1993)J Immunol 150:4188)。一些遗传多态性也与增多的 TNF 表达有关，并且在 IPF 和矽肺中起着作用(Whyte 等，上文； Corbett EL，等，上文)。

术语“特发性肺纤维化”或“IPF”指特征在于导致呼吸急促的深度肺组织炎症和甚至是瘢痕形成的一组病症。IPF 中肺泡(气囊)和它们的支持结构(间质)的瘢痕形成最后导致功能肺泡单位的损失以及氧从空气向血液转移的减少。IPF 还称作弥漫性软组织肺疾病；小泡炎；原因不明的纤维组织形成小泡炎(CFA)；原发性肺局限性肺炎(IPP)；和通常的间质局限性肺炎(UIP)。IPF 经常与 UIP 作同义词使用(“IPF/UIP”)，因为 UIP 是 IPF 病理诊断学中最常见的细胞模型。

IPF 患者经常表现出一些症状，包括干咳，胸部疼痛，和/或呼吸短促。治疗 IPF 通常使用的药物是强的松和环磷酰胺，但是只有一部分患者通过持续使用这些药物而得到改善(American Thoracic Society(2000)Am.J. Respir. Crit. Care Med. 161:646)。给氧和肺移植是治疗的另一种选择。在一个实施方案中，联合另一种治疗物质，例如氧，对患者施用本发明的 TNFα抗体，用于治疗特发性肺纤维化。

2. 慢性阻塞性呼吸道病症

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗慢性阻塞性呼吸道病症患者。在这些疾病中，气道阻塞可以是慢性的并且是持续的或间断性的并且复发。通常通过强迫呼气肺量测定法测定气流障碍，它是最大呼气时呼出量对时间的记录。对于没有受阻气流的受试者，完全用力呼气通常持续 3 至 4 秒。对于慢性气流受阻病症的患者，气流受阻，通常需要 15 至 20 秒，并且可能受到呼吸持续时间受限。容易测量第一第二次呼气的正常用力呼气量(FEVI)，并且容易根据年龄，

性别，身高来精确预测。FEVI 与用力肺活量(FEVI/FVC)正常下超过0.75。在用力呼气和接着的用力吸气期间记录气流对容量是有用的，主要区分上下呼吸道变窄。下面描述慢性阻塞性肺疾病。

a. 哮喘

哮喘生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Anticevich SZ，等(1995)Eur J Pharmacol. 284:221-5; Thomas PS，等 1995. Am J Respir Crit Care Med. 152:76-80; Thomas PS，Heywood G.(2002)Thorax. 57:774-8)。例如，发现急性哮喘发作与肺中性白细胞增多症和升高的 BAL TNF 水平有关(Ordonez CL.等(2000)Am J Respir Crit Care Med 161:1185)。发现哮喘症状的严重度与房间灰尘中内毒素水平有关。对于大鼠，抗-TNF 抗体减小内毒素-诱导的气道变化(Kips 等(1992)Am Rev Respir Dis 145:332)。

这里使用的术语“哮喘”指其中气道炎症引起气流进出肺部受限的病症。哮喘还称作支气管哮喘，运动引起的哮喘-支气管，和反应性气道病(RAD)。在一些例子中，哮喘与变应性有关和/或是家族性的。哮喘包括特征在于在短时间之内支气管气道直径或管径大幅度变化，导致肺功能变化的症状。受影响患者对气流的得到的提高的抗性产生症状，包括呼吸困难，胸部有压迫感或“紧张感”和喘鸣。

根据 NIH 准则表征哮喘患者，描述为轻度间歇性的，轻度持续性的，中度持续性的，和严重持续性的(参见 NAEPP Expert Panel Report Guidelines for the Diagnosis and Management of AsthmaUpdate 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)。经常用吸入的皮质类固醇治疗诊断有中度持续性哮喘的患者。经常用高剂量吸入的皮质类固醇和 p.o.皮质类固醇治疗诊断有严重持续性哮喘的患者。

b. 慢性阻塞肺疾病(COPD)

慢性阻塞肺疾病的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Keatings VM.(2000)Chest. 118:971-5; Sakao S，等(2001)Am J Respir Crit Care Med. 163:420-22; Sakao S，等(2002)Chest. 122:416-20)。术语“慢性阻塞肺疾病”或“COPD”在这里互换使用，指特征在于有不同程度气囊膨大和肺组织破坏的有限气流的一组肺疾病。术语 COPD 包括慢性支

气管炎(糜烂细胞粘膜下腺增生的粘液分泌过多)，慢性阻塞支气管炎，或肺气肿(气道软组织受伤)，或者这些症状的组合。肺气肿和慢性支气管炎是最常见的慢性阻塞肺疾病形式。不可逆气流不通确定 COPD。

在 COPD 中，慢性炎症导致小气道和肺软组织的不变狭窄和肺泡壁破坏(肺气肿)。这种病特征在于肺泡巨噬细胞，中性白细胞，和细胞毒性 T 淋巴细胞数目增加，和多炎症介质(脂质，趋化因子，细胞因子，生长因子)的释放。这种炎症导致小气道变窄和肺软组织破坏的纤维化。还有高水平的氧化应激，其可以使这种炎症扩大。

C. 冠心病

各种冠心病的生理病理学中涉及 TNFα，包括再狭窄(参见，例如，Clausell 等(1994)，上文；Medall 等(1997)Heart 78(3):273)。这里使用的术语“其中 TNFα活性有害的冠心病”为了包括冠心病和心血管病，其中证明有病的患者体内存在的 TNFα是或者怀疑是引起疾病恶化的病症或因素病理学的原因，包括心血管病，例如再狭窄。其中 TNFα活性有害的冠心病经常是由动脉闭塞导致的。血凝引起这样的闭塞，其通常在冠状动脉中形成，其事先从通常与动脉硬化相关的变化变窄。例如，如果动脉壁中的动脉粥样硬化斑破裂，它能触发血栓或凝块的形成。通过例如患病患者生物学液体浓度增加(例如，患者血清，血浆，关节液等中 TNFα浓度升高)可以证实这样的病症，它是可以检测的，例如，如上所述使用抗-TNFα抗体。动脉压失调，心脏机能障碍，或者血管闭塞，例如血栓也可以引起冠心病。冠心病包括冠状动脉病和外周血管病。

有其中 TNFα活性有害的很多冠心病例子，包括再狭窄。下面进一步讨论本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂在治疗特定冠心病中的用途。在一些实施方案中，如下所述，与其他治疗物质联合对患者施用本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂。

本发明提供一种对冠心病患者抑制 TNFα活性的方法。本发明提供一种对冠心病患者抑制或降低 TNFα活性的方法，包括对患者施用本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂，使得患者的 TNFα活性被抑制或降低。优选地，TNFα是人 TNFα，患者是人患者。或者患者可以是表达与本发明的抗体交叉反应的 TNFα的哺乳动物。患者还可以是其中导入 hTNFα的哺乳动物(例如，通过施用 hTNFα或者表达 hTNFα

转基因)。为了治疗目的可以对人患者施用本发明的抗体(下面进一步讨论)。此外，可以对表达与本发明的抗体起交叉反应的 TNFα的非人哺乳动物施用本发明的抗体(例如，灵长类，猪或小鼠)，为了兽医目的或者作为人类疾病的动物模型。关于后者，这样的动物模型可以用来评价本发明的抗体的治疗效果(例如试验给药剂量和时间进程)。

通常使用的用于研究冠心病，包括再狭窄的动物模型包括大鼠或小鼠颈动脉结扎模型和颈动脉损伤模型(Ferns 等(1991)Science 253:1129; Clowes等(1983)Lab. Invest. 49:208; Lindner等(1993)Cire Res. 73:792)。在颈动脉结扎模型中，通过结扎远离分枝附近的血管而中断动脉血流。根据 Clowes 等所述，创建颈动脉损伤模型，使得通过插入到外侧颈动脉的球囊导管的腔内插入使得共同的颈动脉内皮脱落。第二周，由于平滑肌细胞收缩，颈动脉显著变窄，但是在第 2 和 12 周之间，内膜厚度加倍，导致管腔大小减小。使用这些模型的任一个来测定本发明的 TNFα抗体在预防和治疗人再狭窄中的有效治疗作用。

本发明的抗体能用来治疗其中 TNFα活性有害的心血管病，其中预计 TNFα活性的抑制减轻冠心病的症状和/或进行或者防止冠心病。通过临床症状能鉴定患有或有发生冠心病危险的患者。冠心病的临床症状经常包括胸痛，呼吸短促，乏力，昏晕发作，意识变更，肢疼痛，阵发性夜间呼吸困难，短暂局部缺血发作和患者所出现的其他这样的现象。冠心病的临床信号还包括 EKG 异常，改变的外周脉搏，动脉杂音，异常心脏声音，速率和喘鸣，颈静脉膨胀，神经病学变更和医生看到的其他这样的发现。例如通过患有该病症的患者生物液体中 TNFα浓度的升高也可以印证冠心病(例如，患者血清，血浆，关节液等中 TNFα浓度的升高)。

心血管病的例子包括但不限于冠状动脉病，心绞痛，心肌梗塞，心跳骤停引起的心血管组织损伤，心原性休克，和高血压，动脉粥样硬化，冠状动脉痉挛，冠状动脉病，心脏瓣膜病，和心肌病。下面进一步讨论本发明的抗体，抗体部分和其他 TNFα抑制剂在治疗特定心血管病中的用途。在一些实施方案中，如在下文 III 章节所述，与另一种治疗物质联合对患者施用本发明的抗体，抗体部分或其他 TNFα抑制剂。

1. 再狭窄

再狭窄的病理生理学中涉及 TNFα(参见 Zhou 等(2002)Atherosclerosis. 161:153; Javed 等(2002)Exp and Mol Pathol 73:104)。例如，在鼠金属丝颈动脉模型中，TNF-/-小鼠证明与野生型小鼠相比开始增生减小 7 倍(Zimmerman 等(2002)Am J Phsiol Regul Integr Comp Physiol 283:R505)。作为血管再造任何类型的结果能发生再狭窄，不管是在冠状脉管系统中还是在外周中(Colburn 和 Moore(1998)Myointimal Hyperplasia pp. 690-709 in Vascular Surgery: A Comprehensive Review Philadelphia: Saunders)。例如，研究报道冠状血管成形术置换有再狭窄症状的比例是 30-50%(参见 Berk 和 Harris(1995)Adv. Intern. Med. 40:455-501)。作为又一个例子，颈动脉动脉内膜切除术之后，研究的患者中 20%腔缩小不大于 50%(Clagett 等(1986)J. Vasc. Surg. 3:10-23)。不同程度症状学证明再狭窄，伴随不同解剖学部位闭塞前损害，由于一些因素的组合，包括涉及的血管的性质，剩下的疾病的程度，和局部血液动力学。

这里使用的“狭窄”指在闭塞病症或再狭窄中见到的变窄。狭窄伴随反映血流通过变窄的动脉部分减少的那些症状，狭窄增加的病症称为一种疾病(即，闭塞病或再狭窄病)。血管无症状存在狭窄，只有通过诊断介入，例如血管造影术或血管凝乳酶研究才检查到。

本发明的抗体能被用来治疗有或有发生再狭窄危险的患者。有发生再狭窄危险的患者包括有 PTCA 的患者。患者可能还已经有插入防止再狭窄的支架。本发明的 TNFα抗体可以单独使用或者与支架结合使用，来防止心血管病患者狭窄复发。

2. 充血性心脏衰竭

充血性心脏衰竭的病理生理学中涉及 TNFα(参见 Zhou 等(2002)Atherosclerosis 161:153)。充血性心脏衰竭患者 TNFα血清水平升高，与疾病的严重程度直接成正比(Levine 等(1990)N Engl J Med 323:236; Torre-Amione 等(1996)J Am Coll Cardiol 27:1201)。另外，还已经证明 TNFα的抑制剂改善充血性心脏衰竭症状(Chung 等(2003)Circulation 107:3133)。

这里使用的术语“充血性心脏衰竭”包括特征在于减小心脏向身体供氧能力的症状。充血性心脏衰竭的症状和征兆包括血流向身体的各种组织的减少，各种器官中过量血液的蓄积，例如，当心脏不能通

过大静脉将返回心脏的血液泵出，劳力性呼吸困难，疲劳，和/或周围水肿，例如，左心室机能障碍导致的周围水肿。充血性心脏衰竭可以是急性或慢性。充血性心脏衰竭表现通常发生在都有心脏功能暂时的或持久性损伤的各种心脏或全身病症之后。这样的病症的例子包括高血压，冠状动脉病，心脏瓣膜疾病，和心肌病，例如，心肌肥大，扩张，或限制性心肌病。

“具有或患有充血性心脏衰竭的患者”是具有涉及损害心脏压出共同特征链接的不同病因学临床症状的病症，其中心脏不能同等泵出代谢组织需要的血液，或者只有从升高的充入压才能做到这一点。“有发生充血性心脏衰竭危险的患者”是因为影响患者的心血管系统的一些因素而发生充血性心脏衰竭倾向的患者。期望减小这些患者发生充血性心脏衰竭的危险或者防止发生充血性心脏衰竭。短语“具有充血性心脏衰竭”包括相对于普通人群来说有患有该病症危险的患者，即使他们可能不会患病，但是有危险因素。例如，有没有治疗的高血压的患者可能没有充血性心脏衰竭，但是由于他的或她的高血压状况而有危险。在本发明的一个实施方案中，使用抗体 D2E7 来治疗有发生充血性心脏衰竭危险的患者。

3. 急性冠状动脉综合征

急性冠状动脉综合征的病理生理学中涉及 TNFα(参见 Libby(1995)Circulation 91:2844)。急性冠状动脉综合征包括患者由于血流受限而不能使足够的氧达到心脏而疼痛。研究发现 TNFα在急性冠状动脉综合征中起作用。例如，不存在下游血液动力学作用下能诱导心肌梗塞的新的大鼠异促心脏移植-冠状结扎模型中，施用嵌合可溶性 TNF 受体(sTNFR)破坏暂时 LV 改变和机能障碍(Nakamura,等(2003)J. Cardiol. 41:41)。还发现对心肌层直接注射 sTNFR 表达质粒，导致急性心肌梗塞(AMI)试验大鼠梗塞形成大小的减小(Sugano 等(2002)FASEB J 16:1421)。

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来对患者治疗或防止急性冠状动脉综合征，其中急性冠状动脉综合征是心肌梗塞或心绞痛。

这里使用的术语“心肌梗塞”或“MI”指心脏发作。心肌梗塞涉及由于对那个区域的氧供应不足的心脏区的坏死或永久性损伤。这种坏死一般是由于动脉粥样硬化或栓子的冠状动脉中的梗阻引起的。本

发明的 TNFα抗体治疗的 MIs 包括 Q-波和非-Q-波心肌梗塞。大多数心脏发作是由阻塞冠状动脉中的一个的凝血引起的(给心肌带来血液和氧的血管)。例如，冠状动脉中的凝血中断血液和氧向心肌流动，导致那个区域的心脏细胞死亡。受损伤心肌永久性丧失其收缩能力，并且保留心肌补偿它的需要。个体无法抵抗的应激反应也能引起 MI。

术语“绞痛”指痉挛，窒息，令人窒息的疼痛，特别是表示心绞痛，其是最常是由于心肌层缺氧症的发作性胸痛。心绞痛包括变异性心绞痛和劳力性心绞痛。有心绞痛的患者有局部缺血性心脏病，其表现为突然的，严重的压迫性胸骨下疼痛，其经常放射状涉及左肩并且沿着左臂。心绞痛中涉及 TNFα，因为患有 MI 和稳定心绞痛患者的 TNFα水平向上调节(Balbay 等(2001)Angiology 52109)。

4. 动脉粥样硬化

这里使用的“动脉粥样硬化”脂肪物质沿着动脉壁沉积的症状。这种脂肪物质变厚，变硬，并且可以阻塞动脉。动脉粥样硬化也称作动脉硬化，动脉变硬，和动脉斑形成。已经证明抗 TNFα多克隆抗体对于中和导致兔动脉硬化模型炎症和再狭窄的 TNFα活性是有效的(Zhou 等，上文)。因此，本发明的 TNFα抗体能被用来治疗和预防患者患动脉粥样硬化或者有动脉粥样硬化危险。

5. 心肌病

这里使用的术语“心肌病”用来定义其中心脏肌肉或心肌层变弱，通常导致心脏泵出不适当的疾病。病毒感染，心脏发作，酒精中毒，长期严重的高血压(或血压高)，或者自身免疫能引起心肌病。

在大约 75-80%的心脏衰竭患者中，冠状动脉病是引起心肌病的基础并且指定为“局部缺血心肌病”。局部缺血心肌病由心脏发作引起，其给心脏肌肉或心肌层带来瘢痕。受影响的心肌然后不能挥发心脏泵出功能。瘢痕越多或心脏发作次数越多，发生局部缺血心肌病的几率越大。

心肌病不归于冠状动脉病基础，并且指定为“非-局部缺血心肌病”。非-局部缺血心肌病包括但不限于特发性心肌病，肥厚性心肌病，酒精中毒心肌病，扩张性心肌病，围产期心肌病，和限制性心肌病。

D. 代谢失调

各种各样的失调，包括代谢失调，例如糖尿病和肥胖的病理生理

学中涉及 TNFα(Spiegelman 和 Hotanisligil(1993)Cell 73:625; Chu 等(2000)Int J Obes Relat Metab Disord. 24:1085; Ishii 等(2000)Metabolism. 49:1616)。本发明提供对患者有这样的代谢失调的患者抑制 TNFα活性的方法,该方法包括对患者施用本发明的抗体,抗体部分,或其他 TNFα抑制剂,使得患有代谢失调的患者的 TNFα活性被抑制。本发明的 TNFα抗体还可以用来治疗有发生代谢失调危险的患者。代谢失调经常与关节炎相关,包括类风湿性关节炎。在一个实施方案中,本发明的抗体用来治疗患有与类风湿性关节炎相关的患者。在另一个实施方案中,本发明的 TNFα抗体用来治疗与糖尿病或肥胖相关的失调。

代谢失调影响身体怎样处理进行生理功能所需要的物质。很多本发明的代谢失调都共有一些特征,即它们与胰岛素抗性关联,丧失调节血糖的能力,体重增加,并且身体质量指数增加代谢失调的例子包括糖尿病和肥胖。糖尿病的例子包括 1 型糖尿病,2 型糖尿病,糖尿病神经病,外周神经病,糖尿病视网膜病,糖尿病溃疡,视网膜溃疡,糖尿病大血管病变,和肥胖。下面更详细地描述能用本发明的 TNFα抗体治疗的代谢失调的例子:

1. 糖尿病

糖尿病的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子。(参见,流如,Navarro J. F., Mora C., Maca, Am J Kidney Dis. 2003 Ju1; 42(1):53-61; Daimon M 等, Diabetes Care. 2003 Ju1; 26(7):2015-20; Zhang M 等, J Tongji Med Univ. 1999; 19(3):203-5, Barbieri M 等, Am J Hypertens. 2003 年 7 月; 16(7):537-43.)。例如,胰岛素抗性生理病理学中涉及 TNFα。发现胃肠癌患者的血清 TNF 水平与胰岛素抗性有关(参见,例如,McCall, J.等 Br. J. Surg.1992; 79:1361-3)。

糖尿病包括两种最常见类型,即 I 型糖尿病和 II 型糖尿病,两种都是身体不能调节胰岛素的结果。胰岛素是胰腺反应血液中血糖(葡萄糖)水平升高而释放的激素。

这里使用的术语“1 型糖尿病”指当胰腺产生太少的胰岛素不能适当地调节血糖水平时而发生的慢性病。1 型糖尿病还称作胰岛素依赖型糖尿病,IDMM,少年开始的糖尿病,和 I 型糖尿病。1 型糖尿病代表胰腺β-细胞渐进性自身免疫破坏继发胰岛素不足的结果。

术语“2 型糖尿病”指当胰腺不能制备足够的胰岛素来保持血液葡

葡糖水平正常时发生的慢性病，经常因为身体不能很好地反应胰岛素。1 型糖尿病还称作非胰岛素依赖型糖尿病，NDDM，和 II 型糖尿病。

给与葡萄糖耐量分析能诊断糖尿病。临床上，糖尿病经常分成几个基本种类。这些种类的最主要的例子包括，自身免疫糖尿病，非胰岛素依赖型糖尿病(1 型 NDDM)，胰岛素依赖型糖尿病(2 型 IDDM)，非自身免疫糖尿病，非胰岛素依赖型糖尿病(2 型 NIDDM)，和少年发生糖尿病(MODY)。其他种类，经常称作第二类，指一些引起或允许糖尿病综合征发生的可确定症状带来的糖尿病。第二类的例子包括胰腺病引起的糖尿病，激素异常，药物-或化学品-诱导的糖尿病，胰岛素受体异常引起的糖尿病，与遗传综合征相关的糖尿病，和其他原因的糖尿病(参见，例如，Harrison's(1996)第 14 版，New York，McGraw-Hill)。

糖尿病表现上述目录本身并且能引起下面章节中讨论的几种并发症。因此，本发明的抗体，其抗原结合片段能用来治疗糖尿病。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或其抗原结合片段能用来治疗与上面鉴定的种类相关的糖尿病。

经常用饮食，胰岛素配药，和各种这里描述的药物来治疗糖尿病。因此，本发明的 TNFα抗体还可以与通常用来治疗代谢失调和通常与糖尿病有关的疼痛的药物联合给药。

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体还可以用来治疗与糖尿病相关的基本。糖尿病本身表现很多与糖尿病有关的并发症和症状，包括下面的类别：

a. 糖尿病神经病和外周神经病

糖尿病神经病和外周神经病的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Benjafieldet al.(2001)Diabetes Care. 24:753；Qiang，X. 等(1998)Diabetologia. 41:1321-6；Pfeffer 等(1997)Horm Metab Res. 29:111)。

这里使用的术语“神经病”也称作神经损害-糖尿病，指其中作为高血糖(高血液糖水平)的结果神经受到损害的糖尿病普通并发症。确认很多种糖尿病神经病，例如末梢感觉运动多神经病，局灶性运动神经病，和自主神经病。

术语“外周神经病”也已知为末梢神经炎和糖尿病神经病，根据

这里使用的，指神经衰竭，不能将信息带给大脑和脊髓或者从大脑和脊髓带来信息。外周神经病产生综合征，例如疼痛，丧失感觉，和不能控制肌肉。在一些情况下，神经不能控制血管，肠功能，和导致异常血压的其他器官，消化，和丧失其他基础不随意过程。外周神经病包括对单一神经或神经团(单神经病)的损伤或者可能影响多神经(多神经病)。

影响交感神经和副交感神经的小的有髓鞘的和没有髓鞘纤维的神经病已知是“外周神经病”。此外，外周神经病的相关疾病，也已知为末梢神经炎和糖尿病神经病，指神经不能将信息带给大脑和脊髓或者从大脑和脊髓带来信息。这产生综合征，例如疼痛，丧失感觉，和不能控制肌肉。在一些情况下，神经不能控制血管，肠功能，和导致异常血压的其他器官，消化，和丧失其他基础不随意过程。外周神经病包括对单一神经或神经团(单神经病)的损伤或者可能影响多神经(多神经病)。

术语“糖尿病神经病”指其中作为高血糖(高血液糖水平)的结果神经受到损伤的糖尿病常见并发症。糖尿病神经病也称作神经病和神经损伤糖尿病。认知很多种糖尿病神经病，例如末梢感觉运动多神经病，病灶运动原神经病，和自主神经病。

b. 糖尿病视网膜病

糖尿病视网膜病的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Scholz 等(2003)Trends Microbiol. 11:171)。这里使用的术语“糖尿病视网膜病”指对长期糖尿病引起的眼睛视网膜进行性伤害。糖尿病视网膜病包括增生性视网膜病。增生性视网膜病又包括新血管形成，视网膜出血和视网膜脱离。

在发展的视网膜病中，视网膜表面上小血管增生。这些血管是脆弱的，有出血倾向并且能引起视网膜出血。出血能隐藏视觉，出血被再吸收时，纤维组织形成视网膜脱离和视觉丧失的造成因素。另外，糖尿病视网膜病包括增生性视网膜病，包括新血管生成，视网膜出血和视网膜脱离。糖尿病视网膜病包括“背景视网膜病”，其包括视网膜层发生变化。

c. 糖尿病溃疡和视网膜病溃疡

糖尿病溃疡的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Lee 等

(2003)Hum Immunol. 64:614; Navarro 等(2003)Am J Kidney Dis. 42:53; Daimon 等(2003)Diabetes Care. 26:2015; Zhang 等(1999)J Tongi Med Univ. 19:203; Barbieri 等(2003)Am J Hypertens. 16:537; Venn 等(1993)Arthritis Rheum. 36:819; Westacott 等(1994)J Rheumatol. 21:1710)。

这里使用的术语“糖尿病溃疡”指作为糖尿病并发症产生的溃疡。溃疡是炎症，感染恶性状况，或代谢失调引起的皮肤或粘膜上喷火口样损伤。典型地，四肢和肢端可发现糖尿病溃疡，更典型地在脚上。这些糖尿病症状引起的溃疡，例如 neurapthy 和供血不足，能引起局部缺血和伤口愈合不好。更多的溃疡可以发展成骨髓炎。一旦发生骨髓炎，单独用抗生素难以消除并且切断术可能是必需的。

这里使用的术语“视网膜病溃疡”指引起或导致对眼睛和眼睛视网膜伤害的溃疡。视网膜病溃疡包括视网膜出血这样的症状。

d. 糖尿病大血管病变

糖尿病大血管病变的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Devaraj 等(2000)Circulation. 102:191; Hattori Y 等(2000)Cardiovasc Res. 46:188; ClausellN 等(1999)Cardiovasc Pathol. 8:145)。术语“糖尿病大血管病变”也称作“大血管病”，在这里使用时，指由糖尿病产生的血管病变。例如，当大的血管中堵塞有脂肪和血凝块并且粘在血管壁上时，发生糖尿病大血管病变并发症。糖尿病大血管病变包括例如冠心病，脑血管病，和外周血管病，高血糖和心血管病，和中风这样的疾病。

2. 肥胖

肥胖的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(参见，例如，Pihlajamaki J 等(2003)Obes Res. 11:912; Barbieri 等(2003)Am J Hypertens. 16:537; Tsuda 等(2003)J Nutr. 133:2125)。肥胖增加了由于糖尿病，中风，冠状动脉病，高血压，高胆固醇，和肾病和胆囊病的恶化和死亡的个人危险。肥胖还可能增加一些类型癌症的危险，并且可能是发生骨关节炎和睡眠窒息的危险因素。本发明的抗体可以单独治疗肥胖或者联合治疗其他代谢失调，包括糖尿病。

E. 贫血

贫血的生理病理学中涉及 TNFα(参见，例如，Jongen-Lavrencic M.，等(1997)J.Rheumatol 24(8):1504-9; Demeter J.，等(2002)Ann

Hemato. 81(10):566-9; DiCato M., (2003)The Oncologist 8(增刊 1):19-21)。本发明提供对患有这样的疾病的患者抑制 TNFα活性的方法，该方法包括对患者施用本发明的抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂，使得患有贫血的患者的 TNFα活性被抑制。在一个实施方案中，贫血与类风湿性关节炎有关。

这里使用的术语“贫血”指循环红细胞数目异常地低或者血液中血红蛋白浓度降低。与类风湿性关节炎有关的贫血的例子包括，例如，慢性病贫血，铁缺乏贫血，和自身免疫溶血贫血。在一个实施方案中，本发明提供治疗贫血的方法，所述贫血是，例如，与类风湿性关节炎有关的贫血，感染和慢性炎症贫血，铁缺乏贫血，自身免疫溶血贫血，骨髓痨性贫血，再生障碍贫血，发育不全贫血，纯红细胞贫血和与肾衰竭或内分泌失调相关的贫血，巨红细胞性贫血，血红素和珠细胞合成不足，血红细胞结构缺陷引起的贫血，例如，镰刀形细胞贫血，和未知起源的贫血，例如铁粒幼红细贫血，与慢性感染，例如疟疾，锥虫病，HIV，肝炎病毒或其他病毒有关的贫血，和骨髓缺乏引起的骨髓性贫血。

F. 疼痛

很多种疼痛综合征的生理病理学中涉及 TNFα(参见，例如，Sorkin，LS.等，(1997)Neuroscience. 81(1):255-62; Huygen FJ.，等(2002)Mediators Inflamm. 11(1):47-51; Parada CA.，等(2003)Eur J Neurosci. 17(9):1847-52)。本发明提供对患有这样的疼痛的患者抑制 TNFα活性的方法，该方法包括对患者施用本发明的抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂，使得患有疼痛的患者的 TNFα活性被抑制。疼痛定义为很多种，包括受伤害疼痛和神经痛。最常见的疼痛形式可以定义为对神经末梢刺激的影响，它导致向大脑的搏动传播。疼痛通常还与炎症病症有关，包括，例如，类风湿性关节炎。在一个实施方案中，本发明的抗体用来治疗患有与类风湿性关节炎有关的疼痛的患者。下面讨论其中 TNFα活性有害的疼痛病症的例子。

1. 神经痛

神经痛的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Sommer C.，(1999)Schmerz. 13(5):315-23 ; Empl M 等 , (2001)Neurology. 56(10):1371-7; Schafers M 等，(2003)J Neurosci. 23(7):3028-38)。这里

使用的术语“神经痛”指对神经，脊髓，或大脑损伤导致的疼痛，并且经常涉及神经过敏。神经痛的例子包括慢性后背下部疼痛，与关节炎相关的疼痛，与癌症相关的疼痛，疱疹神经痛，幻象肢痛，中枢痛，阿片样物质抗性神经病性疼痛，骨伤疼痛，和围生产期和分娩期疼痛。神经病性疼痛的其他例子包括手术后疼痛，簇头痛，牙疼，手术疼痛，严重程度，例如三级烧伤产生的疼痛，产后疼痛，咽痛，与泌尿生殖道有关的疼痛，包括膀胱炎。

神经病性疼痛与受伤痛不同。涉及受伤机理的疼痛通常限于组织修复期期间，并且一般通过可购得的止痛药或阿片样物质能减轻(Myers，Regional Anesthesia 20:173-184(1995))。神经病性疼痛典型地是时间长或慢性的，并且经常在最初的急性组织伤害之后发生数天或数月。神经病性疼痛包括持久性的，特发疼痛以及异常性疼痛，它是对正常下没有疼痛的刺激反应的疼痛。神经病性疼痛的特征还在于痛觉过敏，其对通常轻微的疼痛例如针刺刺激有加重反应。和伤害感受性疼痛不一样。神经病性疼痛一般对阿片样物质治疗有抗药性(Myers，上文，1995)。因此，本发明的抗体，或者其抗原结合片段用来治疗神经病性疼痛。

2. 伤害感受性疼痛

这里使用的术语“伤害感受性疼痛”指通过完整神经途径传递的疼痛，即对身体的伤害引起的疼痛。伤害感受性疼痛包括身体感觉和正常机能疼痛，和对即将发生组织损伤的患者预警性疼痛。为保护患者存在受伤途径，例如对烧伤反应的疼痛。伤害感受性疼痛包括骨痛，内脏痛，和与软组织相关的疼痛。

内脏疼痛的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Coelho A.，等(2000)Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 279:G781-G790; Coelho A，等(2000)Brain Res Bull. 52(3):223-8)。内脏疼痛用来指 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，骨胳，结缔组织，肌肉和内脏中。内脏痛在分布上模糊，突发性的，并且经常描述为性质是深度，疼痛，推挤和绞痛。内脏痛的例子包括与心脏发作有关的疼痛，其中在臂，颈和/或背部能感觉内脏疼痛，和肝囊疼痛，其中在背部和/或肩部能感觉内脏疼痛。因此，本发明的TNFα抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗内脏痛。

G. 肝病

很多种肝病的病理生理学中涉及 TNFα(参见，例如，Colletti LM.，等(1990)J Clin Invest. 85(6):1936-43；Tiegs G.(1997)Acta Gastroellterol Belg. 60(2):176-9；Fernandez ED.，等(2000)J Endotoxin Res. 6(4):321-8)。本发明提供对患有这样的肝病的患者抑制 TNFα活性的方法，该方法包括对患者施用本发明的抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂，使得患有肝病的患者的 TNFα活性被抑制。

这里使用的术语“其中 TNFα活性有害的肝病”意在包括肝脏疾病或其他疾病，其中已经证明患有该病症的患者体内存在的 TNFα是或者怀疑是引起病症恶化的病症或因素的病理学原因。因此，其中 TNFα活性有害的肝病是其中预期 TNFα活性抑制减轻肝病症状和/或发展的病症。

肝病包括其中肝功能不适或停止的很多疾病和病症。肝细胞损伤包括嗜酒肝硬化，α1-抗胰蛋白酶不足，自身免疫肝硬化，起因不明肝硬化，暴发性肝炎，乙型肝炎和丙型肝炎，和脂肪肝。胆道病症的例子包括胆囊纤维化，原发性胆硬变，硬化胆管炎和胆梗阻(Wiesner，R. H，Current Indications，Contra Indications and Timing for Liver Transplantation (1996)，Transplantation of the Liver，Saunders(publ.)；Busuttil，R. W.和 Klintmalm，G. B.(编著)第六章，例如表 6-3 和 6-5 以及图 6-11；Klein，A. W.，(1998)Partial Hypertension：The Role of Liver Transplantation，Musby(publ.)，Current Surgical Therapy 6. sup. th Ed. Cameron，J.(ed)。

术语“肝炎”指肝的炎症。各种生物体感染能引起肝炎，包括细菌，病毒(甲肝，乙型肝炎，丙型肝炎等)或寄生物。化学毒素例如醇，药物，或有毒蘑菇也能损伤肝脏并且引起它发炎。极少但是极其危险的肝炎原因是扑热息痛(Tylenol)配药过量，其可以致死。另外，体内免疫细胞可以攻击肝脏并且引起自身免疫肝炎。肝炎可以很快地被解决(急性肝炎)，或者引起长期疾病(慢性肝炎)。在一些情况下，可能产生行进性肝损伤或肝衰竭。肝炎的发生率和严重程度根据很多因素而不同，包括肝炎损伤的原因和患者所患疾病。

在一个实施方案中，本发明的特征在于治疗其中 TNFα活性有害的肝病的方法，包括对患者施用治疗有效量的 TNFα抑制剂，使得所述疾

病得以治疗。在一个实施方案中，肝病选自丙型肝炎病毒，自身免疫肝炎，脂肪肝，乙型肝炎病毒，肝细胞中毒，和非酒精中毒肝炎，包括非酒精中毒脂肪肝(NASH)。下面进一步描述肝病的例子。

1. 丙型肝炎病毒(HCV)

丙型肝炎病毒的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Gonzalez-Amaro.(1994)J Exp Med. 179:841-8; Nelson DR，等(1997)Dig Dis Sci 42:2487-94; Kallinowski B，等(1998)Clin Exp Immunol. 111:269-77)。

术语“丙型肝炎病毒”或“HCV”用来描述非甲，非乙型肝炎炎的致病物质。丙型肝炎病毒引起肝部感染。HCV 感染引起丙型肝炎。一般情况下，在急性阶段，丙型肝炎比乙型肝炎温和，但是这样的感染的较大比例变为慢性。HCV 是急性肝炎和慢性肝病，包括肝硬化和肝癌，的主要原因。HCV 是病毒中的一种(A，B，C，D，和 E)，它们共同是病毒肝炎病例的绝大多数的原因。它是黄病毒家族包膜 RNA 病毒，其表现出具有窄的宿主范围。病毒的一个重要的特征是其基因组相对易变性，其接着可能与诱发慢性感染的高倾向性(80%)有关。HCV 分为几种不同的基因型，其对测定疾病的严重程度和对治疗的反应是重要的。在一个实施方案中，能使用本发明的抗体，或者其抗原结合片段治疗 HCV。

在一个实施方案中，用本发明的 TNFα抗体治疗感染 HCV 的患者。HCV 感染的症状(丙型肝炎)包括下面的至少一个：黄疸，腹痛(特别是在腹部右上侧)，疲劳，食欲衰退，恶心和呕吐，低度发热，粪便色淡或土色，尿液暗淡，和全身瘙痒。但是，应该注意到很多感染丙型肝炎的人没有症状，因为经常在常规身体检查或其他医学操作的验血中检查到丙型肝炎。

2. 自身免疫肝炎(AIH)

自身免疫肝炎的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Cookson S.等，(1999)Hepatology 30(4):851-6; Jazrawi S.等，(2003)Liver Transpl. 9(4):377-82)。这里使用的术语“自身免疫肝炎”指特征在于错把肝脏正常细胞作为外来组织或病原体(引起疾病的物质)的闲游免疫细胞引起的肝脏炎症的病症。自身免疫肝炎经常是肝脏软组织行进性破坏的原因，如果不治疗的死亡率很高(Johnson P. J.等，(1993)Hepatology，18:998-1005)。自身免疫肝炎特征中的一个是患者血清的几乎 90%中存

在循环自身抗体。这样的抗体能用来鉴定有自身免疫肝炎的患者。

患者之间临床和血清差异导致 AIH 分为两类。I 型特征在于患者血清中存在抗-平滑肌(SMA)和/或抗-核抗体(ANA)，而 II 型患者表现抗-肝肾 liver kidney 微粒体抗体 1 型(LKM1)(HombergJ. C.等，(1987)Hepatology，7:1333-1339；Maggiore G.等，(1993)R Pediatr.Gastroenterol Nutr.，17:376-381)。有 II 型 AIH 的患者中 30%鉴定了血清学标记，抗-肝细胞溶胶 I 型抗体(LC1)。另外，在检测的患者中只有 10%证实 LC1 是血清学标记(Martini E.等，(1988)Hepatology，8:1662-1666)。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗 AIH。

3. 脂肪肝病

脂肪肝病的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Valenti L.等，(2002)Gastroenerology 122(2):274-80；Li Z.等，(2003)Hepatology 37(2):343-50)。脂肪肝病指其中脂肪(肝细胞)在肝脏中过量积累的疾病。确信脂肪肝病由营养超高，摄食过度，糖尿病和由于给药的副作用引起。脂肪肝引起严重疾病，例如慢性肝炎和肝硬化。患有脂肪肝的患者，脂质，特别是营养脂肪，在肝细胞中积累到其量超过生理允许范围的程度。从生物化学的观点看，脂肪肝的判断标准是营养脂肪的重量是肝组织湿重的大约 10%(100 毫克/克湿重)或更多。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗脂肪肝病。

4. 乙型肝炎病毒(HBV)

乙型肝炎病毒的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Kasahara S.等，(2003)J Virol. 77(4):2469-76；Wang F. S.，(2003)World J Gastroenterol. 9(4):641-4；Biermer M.等，(2003)J Virol. 77(7):4033-42)。术语“乙型肝炎病毒”(HBV)用来描述人发生乙型病毒性肝炎的病毒(血清肝炎病毒)。与具有短潜伏期的甲肝病毒(传染性肝病毒)相反，这是一种潜伏期长的病毒性疾病(大约 50 至 160 天)。乙型肝炎病毒通常由注射感染的血液或血制品或者只是通过使用受污染针头，柳叶刀或其他器械来传播。临床上和病理上，该疾病类似于甲肝病毒；但是，没有交叉保护免疫性。注射之后在血清中发现病毒抗原(HBAg)。

乙型肝炎病毒在人群中的比例非常高。大多数感染乙型肝炎的人

在 6 个月内摆脱病毒，其中短期感染已知是“急性”乙型肝炎病例。估计至少大约 3 亿人口是慢性 HBV 携带者。病毒感染导致较小的流感样症状至死亡这样的临床症状范围。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗 HBV 感染。

5. 肝毒性

肝毒性的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Bruccoleri A.等，(1997)Hepatology 25(1):133-41; Luster M.I.等，(2000)Ann NY-4cad Sci. 919:214-20 ; Simeonova P. 等 , (2001)Toxicol Appl Pharmacol. 177(2):112-20)。术语肝毒性指药物治疗和其他化学品或药物引起的肝损伤。对患者鉴定肝毒性的一个最佳指征是血液中一些酶的量升高，例如 AST(天冬氨酸氨基转移酶)，ALT(丙氨酸氨基转移酶)，和 GOT(谷氨酸草酰乙酸转移酶)。

肝毒性能引起永久性伤害和死亡。肝毒性的最初症状包括急性胃肠症状，例如，严重腹泻。第二阶段的肝毒性特征在于症状减轻。在这明显减轻阶段，出现肝损伤的生化证据。第二阶段通常尿少(尿出减少)。第三阶段，在化学品摄入 3-5 天之后，明显出现明显肝损伤，伴随黄疸出现，还可能发生肾衰竭。化学诱导的(药物诱导的)肝炎的症状类似于传染性肝炎。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗肝毒性。

6. 肝脏衰竭(例如慢性肝衰竭)

肝脏衰竭(例如慢性肝衰竭)的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Takenaka K.等，(1998)Dig Dis Sci. 43(4):887-92; Nagaki M.等，(1999)J Hepatol. 31(6):997-1005; Streetz K.等，(2000)Gastroenterology. 119(2):446-60)。肝脏衰竭包括慢性肝衰竭，通常历经数年并且由对肝脏的反复发作引起的(例如醇滥用或肝炎病毒感染)，其缓慢损害器官。较不常见的，肝衰竭是急性的，发生数天或数周。急性肝衰竭的原因包括肝炎病毒感染，药物，怀孕，自身免疫疾病，和对肝脏的供血突然减少。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗肝衰竭。

7. 非酒精中毒性肝炎，包括 NASH

非酒精中毒性肝炎，包括非酒精中毒性脂肪肝的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(参见 Crespo J.等，(2001)Hepatology. 34(6):1158-63;

Pessayre D.等，(2002)282(2):G193-9)。术语“非酒精中毒性脂肪肝”或“NASH”指比得上过量酒精摄入引起的那些的肝脏中组织学变化啊的发生，但是不存在酒精滥用。NASH 特征在于巨囊和/或小囊脂肪变性，小叶和肝门感染，偶尔马洛里小体纤维化和肝硬化。NASH 通常还与高血脂，肥胖和 II 型糖尿病有关。

表征肝脂肪病变和炎症的附加临床症状包括过度禁食，空肠回肠旁路，总的双亲营养，慢性丙型肝炎，Wilson's 病，和药物副作用，例如来自皮质类固醇，钙通道阻滞剂，高剂量合成雌激素，甲氨喋呤和胺碘酮。因此，术语“非酒精中毒性脂肪肝”能用来描述表现出这些活组织检查结果，并且不存在(a)明显乙醇消耗，(b)先前为了减少体重的手术，(c)与肝硬化有关的用药史，(d)遗传性肝病证据或(e)慢性丙型肝炎病毒感染的那些肝病(参见，Ludwig，J. R.等，(1980)Mayo Clin.Proc.，55:434; PowellE.等，(1990)Hepatol.，11:74)。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗 NASH。

H. 皮肤和指甲病

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗皮肤和指甲病。这里使用的术语“TNFα活性有害的皮肤和指甲病”意在包括皮肤和/或指甲病和其中患有这种疾病的患者体内 TNFα的存在证明是或者怀疑是对病症恶化有贡献的病症或因素的生理病理学原因的皮肤和/或指甲病。因此，TNFα活性有害的皮肤和指甲病是其中预计 TNFα活性的抑制减轻病症的症状和/或进程。下面进一步讨论本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂在特定皮肤和指甲病的治疗中的用途。根据下面第 III 章节中的描述，在一些实施方案中，本发明的抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂与另一种药物联合对患者施用。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与用于治疗牛皮癣和治疗与关节炎相关的牛皮癣的另一种治疗物质联合对患者施用。

1. 牛皮癣

牛皮癣的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Takematsu 等(1989)Arch Dermatol Res. 281:398; Victor 和 Gottlieb(2002)J Drugs Dermatol. 1(3):264)。牛皮癣被描述为一种皮肤炎症(刺激和发红)，特征在于皮肤上红，痒，肿，干，银鳞屑频繁发作。特别地，形成损伤，

其包括表皮增生，皮肤的炎症反应，调节分子例如淋巴因子和炎症因子的表达的原发和继发改变。

牛皮癣皮肤形态学特征在于表皮细胞更新快，表皮增厚，角质化异常，炎性细胞浸润到表皮中，和多形核白细胞和淋巴细胞浸润到表皮层中，导致基础细胞周期增大。牛皮癣经常涉及指甲，常常表现为指甲凹陷，增厚，和变色。牛皮癣经常与其他炎症有关，例如关节炎，包括类风湿性关节炎，肠炎(IBD)，和克隆氏病。

牛皮癣的证据最常见在躯干，肘，膝，头皮，皮肤褶，或手指甲上，但是它可以影响皮肤的任何或全部。正常情况下，新的皮肤细胞需要一个月从下层移至表面。在牛皮癣中，该过程只需要几天，导致死亡的细胞积累并且形成厚的鳞屑。牛皮癣症状包括：干燥而发红的覆盖有银鳞屑的皮肤斑，皮肤斑隆起，并且伴随红色边缘，可能开裂并且变得疼痛，通常位于肘，膝，躯干，头皮，和手上；皮肤损伤，包括脓疱，皮肤裂纹，和皮肤发红；可能与关节炎例如牛皮癣关节炎相关的关节痛或疼痛。

对牛皮癣的治疗经常包括局部皮质类固醇，维生素 D 类似物，和局部或口服视黄醛衍生物，或者它们的组合。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抑制剂与这些常见治疗法联合施用。在 III.B.章节更详细地描述也能与本发明的 TNFα抑制剂联合治疗牛皮癣的另外的治疗药物。

牛皮癣的诊断通常以皮肤外观为基础，另外可能需要皮肤活组织检查，或刮除术和皮肤斑培养来排除其他皮肤病。可以利用 x-射线来对牛皮癣关节炎检查关节疼痛是否存在和持久性的。

在本发明的一个实施方案中，本发明的 TNFα抑制剂用来治疗牛皮癣，包括慢性斑牛皮癣滴状牛皮癣，反白牛皮癣，脓疱牛皮癣，寻常天疱疮，牛皮癣红皮病，与肠炎(IBD)相关的牛皮癣，和与类风湿性关节炎(RA)相关的牛皮癣。下面描述本发明的治疗方法中包括的特定类型的牛皮癣：

a. 慢性斑牛皮癣

慢性斑牛皮癣的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Asadullah 等(1999)Br J Dermatol. 141:94)。慢性斑牛皮癣(也称作普通牛皮癣)是最常见的牛皮癣形式。慢性斑牛皮癣的特征在于皮肤上隆起变红的斑，

从硬币大小至大得多。在慢性斑牛皮癣中，斑可以是一块或多块，它们大小从几毫米至几厘米不等。斑通常是磷状表面红色的，并且当轻轻抓挠时有反光，产生“银色”效果。由慢性斑牛皮癣产生的损伤(经常是对称的)发生在全身，但是偏爱伸肌表面，包括膝，肘，腰骶区，头皮和指甲。偶尔慢性斑牛皮癣发生在阴茎，外阴和弯曲部分上，但是通常没有脱落。慢性斑牛皮癣患者的诊断通常以上述临床特征为基础。特定地，慢性斑牛皮癣中损伤的分布，颜色和典型银色是慢性斑牛皮癣的特征。

b. 滴状牛皮癣

滴状牛皮癣指特定的水滴形磷状斑的牛皮癣形式。滴状牛皮癣突发经常在感染之后，最可注意的是链球菌喉咙感染。滴状牛皮癣的诊断通常以皮肤外观为基础，事实上经常有近期喉咙痛病史。

c. 反白牛皮癣

反白牛皮癣是其中患者具有又红又有炎症的平滑的通常是湿润区的牛皮癣形式，和与斑牛皮癣相关的脱落不一样。反白牛皮癣也称作擦烂的牛皮癣或曲牛皮癣。反白牛皮癣最常发生在腋窝，腹股沟中，乳房下和生殖器和臀部周围的其他皮肤皱褶中，并且，作为先露位置的结果，摩擦和出汗会刺激病灶区。

d. 脓疱牛皮癣

脓疱牛皮癣是引起大小和位置不同的充满脓的疱的牛皮癣的一种形式，经常发生在手和脚上。疱可能在身体的一定部位，或者在身体上扩散到大的区域。脓疱牛皮癣可以是触痛或痛的，能引起发热。

e. 其他牛皮癣病

用本发明的 INFα抗体能治疗的牛皮癣的其他例子包括红皮牛皮癣，普通牛皮癣，与 IBD 相关的牛皮癣，和与关节炎相关的牛皮癣，包括类风湿性关节炎。

2. 寻常天疱疮

寻常天疱疮是一种严重的自身免疫皮肤病，经常影响口腔粘膜和皮肤。认为寻常天疱疮的生理病理学是指导皮肤和口腔粘膜桥粒的自身免疫系统。结果细胞彼此不相附着。病症扩大到填充大量液体，有破裂倾向的大疱，并且具有不同的组织学外观。这种病死亡率高，对于这种病，抗炎药是唯一有效治疗。患有寻常天疱疮患者发生的并发

症是难以治愈的疼痛，伴有营养和液体损失和感染。

3. 特应性皮炎/湿疹

特应性皮炎(也称作湿疹)是归类于磷状瘙痒斑的慢性皮肤病。有湿疹的人经常有变应性症状象哮喘，发热，或湿疹的家族史。特应性皮炎是过敏反应(类似于变应性变态反应)，发生在皮肤中，引起慢性炎症。炎症引起皮肤瘙痒和磷状。慢性刺激和抓挠能引起皮肤增厚并且变得皮般坚硬质地。暴露于环境刺激物能使症状恶化，这能使皮肤干燥，暴露于水，温度改变，和紧张状态。

一些症状能鉴定特应性皮炎患者，这经常包括强烈瘙痒，水疱渗出和结硬皮，红皮或水疱周围的炎症，皮疹，干燥，皮似的皮肤区，抓挠产生的皮肤擦伤区，和耳溢液/出血。

4. 肉样瘤病

肉样瘤病是其中淋巴结，肺，肝，眼，皮肤，和/或其他组织中发生肉芽肿炎症的疾病。肉样瘤病包括皮肤肉样瘤病(皮肤的类肉瘤病)和结节肉样瘤病(淋巴结的类肉瘤病)。一些症状能鉴别肉样瘤病患者，这经常包括一般的不舒服，不舒适，或有病感觉；发热，皮肤损伤。

5. 结节性红斑

结节性红斑指特征在于典型地在前下腿上的皮肤下有触痛感的红色结节的炎症。与结节性红斑有关的损伤经常开始是平的但是坚硬的热红疼痛的肿块(大约 1 英寸大小)。几天之内损伤可以变得略带紫色，然后历经几褪色至褐色平斑。

在一些情况下，结节性红斑可能与感染有关，包括链球菌，球孢子菌，肺结核，乙型肝炎，梅毒，猫抓挠病，兔热病，耶尔森菌，钩端螺旋体鹦鹉病，组织胞浆菌，单核细胞增多症(EBV)。在其他情况下，结节性红斑可能与对一些药物的灵敏性有关，包括口服避孕药，青霉素，磺酰胺类，砜类，巴比妥类，乙内酰脲，非那西汀，水杨酸类，碘化物类，和孕激素。结节性红斑经常与其他病症有关，包括白血病，肉样瘤病，风湿性发热，和溃疡性结肠炎。

结节性红斑症状本身通常存在于胫部，但是损伤也可以发生在身体的其他部位，包括臀部，小腿，踝关节，大腿和上肢端。结节性红斑患者的其他症状包括发热和不舒服。

6. 化脓性汗腺炎

化脓性汗腺炎指腹股沟中有时在臂下和乳房下发生的肿大疼痛发炎损害或肿块。当分泌腺出口由于出汗而阻塞或正常地因为汗腺发育不完全而不能排汗时发生化脓性汗腺炎。腺体中收集的分泌物推动出汗，细菌进入周围组织，引起皮下硬结，炎症，和感染。化脓性汗腺炎局限于含有分泌腺体的身体部分。这些区域是腋下，腹股沟，会阴，肛门周围，和脐周区。

7. 扁平苔藓病

扁平苔藓病的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Sklavounou 等(2000)J Oral Pathol Med. 29:370)。扁平苔藓病指炎症，瘙痒，和特别的皮肤伤害引起的皮肤和粘膜的病症。扁平苔藓病可能与丙型肝炎或某些药物有关。

8. Sweet's 综合征

Sweet's 综合征的生理病理学中涉及炎性细胞因子，包括肿瘤坏死因子(Reuss-Borst 等(1993)Br J Haematol. 84:356)。1964 年 R. D. Sweet 描述的 Sweet's 综合征特征在于突发发热，白细胞增多，和皮肤出疹。出疹由有触痛感的红斑的边界明显的丘疹和斑组成，显微镜检查可见密集的嗜中性渗出物。损伤可以发生在任何部位，但是偏好身体上部包括脸。各种损伤经常描述为假性疱状或假性脓疱，但是可以是仅有脓疱，大疱，或溃疡。对 Sweet's 患者经常有口和眼不舒适(结膜炎或巩膜外层炎)报告。白血病也与 Sweet's 综合征有关。

9. 白癜风

白癜风指皮肤区色素减少导致正常皮肤纹理中不规则白斑的一种皮肤病。白癜风的损伤特征表现为平坦脱色素区。损伤程度确定严谨但是不规则。白癜风患者经常受影响的区域包括脸，肘和膝，手和脚，和外阴部。

10. 硬皮病

硬皮病的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Tutuncu Z 等(2002)Clin Exp Rheumatol. 20(6 增刊 28):S 146-51; Mackiewicz Z 等(2003)Clin Exp RheumatoL 21(1):41-8 ; Murota H 等 (2003)Arthritis Rheum. 48(4):1117-25)。硬皮病指特征在于皮肤，血管，骨骼肌，和内脏器官变化的弥漫性结缔组织疾病。硬皮病也称作 CREST 综合征或进行性全身硬化，通常影响 30-50 年龄的人群，妇女受到的影响比男性大。

硬皮病的原因是未知的。该疾病可以产生局部或全身症状。这种病的过程和严重程度根据受影响的人而大有不同。皮肤和其他器官中过量的胶原沉积产生这些症状。也发生对皮肤和受影响器官中小血管的伤害。在皮肤中，可能发生溃疡，钙化，和色素沉着改变。全身特征包括心脏，肺，肾和胃肠道的纤维化和变性。

硬皮病患者表现出一些临床特征，包括，手指和脚趾对热和冷反应变白，变蓝，或变红(雷诺氏现象)，手指和关节疼痛，强直，和肿胀，皮肤增厚和手和前臂光亮，食管回流或胃灼热，吞咽困难，和呼吸短促。用来诊断硬皮病的其他临床症状包括，红细胞沉积率升高(ESR)，类风湿病样因素提高(RF)，阳性抗细胞核试验，尿蛋白质分析和血液显微镜检查，可以检查纤维化的胸部 X-射线检查，和能显现肺疾病的肺功能研究。

11. 指甲病

指甲病包括所有的指甲异常。具体的指甲异常包括但不限于，凹陷，凹甲，博氏线，匙甲，甲脱离，黄甲，翼状胬肉(在扁平苔藓病中可见)，和白甲病。凹陷特征在于甲表面上存在小的凹窝。沿着指甲“横向”或“纵向”产生棱线或线形突起。博氏线是手指甲中“交叉”(横向)发生的线形凹窝。白甲病描述为指甲上白色纹或斑。凹甲是指甲形状异形，其中指甲有隆起的棱线并且薄，并且凹面凹甲经常与缺铁有关。

用本发明的 TNFα抗体能治疗的指甲病还包括牛皮癣患者指甲病。牛皮癣患者指甲病包括归因于牛皮癣的指甲的变化。在某些情况下，只在指甲中而不在身体的其他部位发生牛皮癣。指甲中牛皮癣病改变从轻度至严重程度，一般反映指甲板，指甲基质，即指甲生长的组织，指甲床，即甲下组织，和指甲基底处的皮肤涉及牛皮癣病的程度。脓疱型牛皮癣对指甲床的伤害能导致甲损失。牛皮癣中的甲变化落在可以单独发生或一起发生的一般种类中。在牛皮癣指甲病的一个种类中，指甲板深度凹陷，可能由于牛皮癣引起的甲生长缺陷。另一个种类中，指甲有黄色至黄粉色变色，可能由于牛皮癣对指甲床造成的不适。牛皮癣指甲病的第三小类特征在于指甲板下显现的白色区域。白色区域实际上是空气泡斑纹点，在那里指甲板变得与指甲床脱离。指甲周围还可能有变红的皮肤。第四类证据是淡黄色斑中指甲板

碎裂，即，甲变形，可能由于牛皮癣给指甲基质带来不适。第五类的特征是由于牛皮癣给指甲基质和甲床带来不适的指甲总体的损失。

本发明的TNFα抗体能用来治疗经常与苔藓病斑有关的指甲病。有苔藓病斑的患者的指甲经常表现为薄，而且指甲板表面粗糙不平，有纵向棱线或翼状胬肉。

本发明的TNFα抗体能用来治疗指甲病，例如这里描述的那些。指甲病经常与皮肤病有关。在一个实施方案中，本发明包括用TNFα抗体治疗指甲病的方法。在另一个实施方案中，指甲病与另一种疾病有关，包括皮肤病，例如牛皮癣。在另一个实施方案中，与指甲病有关的疾病是关节炎，包括牛皮癣关节炎。

12. 其他皮肤和指甲病

本发明的TNFα抗体能用来治疗其他皮肤和指甲病，例如慢性光化性皮炎，天疱疮样大疱，和簇状脱发。慢性光化性皮炎(CAD)也称作光敏性皮炎/光化性视黄酸衍生物综合征(PD/AR)。CAD是特别是在暴露于阳光或人造光下的区域中皮肤变得红肿的症状。一般来说，CAD患者对接触他们皮肤的某些物质有变应性，特别是各种花，木，香水，光晒和橡胶化合物。天疱疮样大疱指特征在于在躯干和肢端上生成大的水疱的一种皮肤病。簇状脱发指特征在于头皮或胡须中完全脱发的圆形斑的发遗失。

I. 脉管炎

各种脉管炎的病理生理学中涉及TNFα(参见，例如，Deguchi等(1989)Lancet. 2:745)。在一个实施方案中，本发明提供对患有其中TNFα活性有害的脉管炎的患者抑制TNFα活性的方法。

这里使用的术语“其中TNFα活性有害的脉管炎”意在包括经证明患有该疾病的患者体内TNFα的存在是或怀疑是对疾病的恶化有贡献的病症或因素的病理生理学原因。例如，通过患有该病症的患者生物液体中TNFα浓度的升高可以印证这样的病症(例如，患者血清，血浆，关节液中TNFα浓度的升高)，使用如上所述的抗-TNFα抗体能够检测。

其中TNFα活性有害的脉管炎有很多例子，包括贝切特氏病。下面进一步讨论本发明的抗体，抗体部分，和其他TNFα抑制剂在治疗特定脉管炎中的用途。在一些实施方案中，如下所述，本发明的抗体，抗

体部分，或其他TNFα抑制剂与另一种治疗药物联合给药。

本发明的抗体能用来治疗 TNFα活性有害的脉管炎，其中预期TNFα活性的抑制减轻脉管炎的症状和/或进程或者防止脉管炎。通过临床症状和化验能鉴定患有或者有发生脉管炎危险的患者。例如，有脉管炎的患者经常产生抗嗜中性白细胞的胞质中的某些蛋白质的抗体，抗嗜中性白细胞胞质抗体(ANCA)。因此，在某些情况下，通过测定ANCA 存在的试验可以证明脉管炎。

脉管炎及其结果可以是疾病的唯一表现或者可以是另一种原发病的第二病征。脉管炎可以局限于一个器官或者它可以影响几个器官，取决于并发症，所有规格的动脉和静脉能受到影响。脉管炎能影响身体内的任何器官。

在脉管炎中，管腔通常是受到危害的，这与涉及的血管供应的组织局部缺血有关。由该进程可以导致病症范围宽，是由于能涉及任何类型，大小和部位的血管的事实(例如，动脉，静脉，小动脉，小静脉，毛细血管)。如下所述，一般根据受影响血管的规格将脉管炎分类。应该注意，一些小的或大的脉管炎可能涉及中等大小的血管；但是大的和中等大小的血管脉管炎不涉及比动脉小的血管。大的血管疾病包括，巨细胞动脉炎，也已知为颞动脉炎或颅侧动脉炎，风湿性多肌痛，和高安氏病或动脉炎，其也已知为主动脉综合征，年轻女性动脉炎和无脉病。中等血管病包括但不限于，典型结节性多动脉炎和 Kawasaki's 病，也已知为粘膜皮肤淋巴结综合征。小血管病的非限制性例子是贝切特氏综合征韦格内氏肉芽肿，微管多脉管炎，过敏性脉管炎，小血管脉管炎，Henoch-Schonlein 紫癜，变应性 granulamotosis 和脉管炎，也已知为 Churg Strauss 综合征。其他脉管炎包括但不限于，分离的中枢神经系统脉管炎，和血栓闭塞性脉管炎，也已知为伯格氏病。典型结节性多动脉炎(PAN)，微管 PAN，和变应性 granulomatosis 经常分为一组，并且称作全身引起坏死的脉管炎。下面进一步描述脉管炎：

1. 大血管脉管炎

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗有大血管脉管炎的患者。这里使用的术语“大血管”指主动脉和朝向身体大部分区域的最大的旁支。大血管包括，例如，主动脉，及其旁支和相应的静脉，例如锁骨下动脉；头臂动脉；共有颈动脉；无名静脉；内和外颈静脉；

肺动脉和静脉；静脉腔；肾动脉和静脉；股动脉和静脉；和颈动脉。下面描述大血管脉管炎的例子。

a. 巨细胞动脉炎(GCA)

巨细胞动脉炎的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Sneller，M. C.(2002)Cleve. Clin. J. Med. 69:SII40-3；Schett，G.，等(2002)Ann. Rheum. Dis. 61:463)。巨细胞动脉炎(GCA)，指涉及炎症并且对血管损伤的脉管炎，特别是颈的外颈动脉旁支的大的或中等的动脉。GCA 也称作暂时脉管炎或颅侧脉管炎，并且是老年最常见的原发性脉管炎。它几乎只是影响 50 岁以上的个体。但是关于 40 岁或更年轻的患者也有不少文献报道。GCA 通常影响颅外动脉。GCA 能影响颈动脉分支，包括颞动脉。GCA 还是一种涉及多个部位动脉的全身性疾病。

病理组织学上，GCA 是一种全身动脉炎，炎性单核细胞渗入血管壁，常常形成朗罕氏巨细胞。存在内膜增生，肉芽肿炎症和内部弹性层的破裂。器官的病理学发现是与涉及的血管相关的局部缺血的结果。

GCA 患者表现出一些临床症状，包括发热，头痛，贫血和高的红细胞沉积速度(ESR)。GCA 的其他典型指征包括颌骨或舌不畅，头皮易触痛，全身症状，淡色视神经盘水肿(特别是'粉笔白'视神经盘水肿)，和视觉障碍。通过颞动脉活组织检查证实诊断。

b. 风湿性多肌痛

风湿性多肌痛的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Straub，R. H.，等(2002)Rheumatology(Oxford)41:423；Uddhammar，A.，等(1998)Br.J Rheumatol. 37:766)。风湿性多肌痛指与中等或严重程度的颈部，肩部，和髋部的肌疼痛和强直相关的风湿性病症，在早晨最明显。在风湿性多肌痛患者的大多数循环单核细胞中也检查出 IL6 和 IL-1 表达。风湿性多肌痛可能独立发生，或者它可以与 GCA 共同存在或者在 GCA 之前，它是一种血管炎症。

c. Takayasu's 动脉炎

Takayasu's 动脉炎的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Kobayashi，Y.和 Numano，F.(2002)Intern. Med. 41:44；Fraga，A.和 Medina F.(2002)Curr.Rheumatol Rep. 4:30)。Takayasu's 动脉炎指以主动脉及其主要分支的炎症为特征的脉管炎。Takayasu's 动脉炎(也已知

是主动脉综合征，年轻女性动脉炎和无脉病)影响胸部和腹部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，inominate，和锁骨下动脉)纤维化增厚能导致主动脉产生的血管腔大小的减小。这种状况典型地影响肾动脉。

Takayasu's 动脉炎主要影响年轻女性，通常是 20-40 岁的，特别是亚裔，并且可能表现出不舒服，关节痛和逐渐开始肢体跛行。大多数患者有不对称减少的脉搏，通常伴随两臂之间血压不同。可能发生冠状动脉和/或肾动脉狭窄。

Takayasu's 动脉炎的临床特征可以分为早期炎症特征和晚期炎症特征。Takayasu's 动脉炎早期炎症期的临床特征是：不舒服，低烧，体重减轻，肌痛，关节痛，和出现红斑。Takayasu's 动脉炎的晚期特征是动脉的纤维化狭窄和血栓形成。主要结果临床特征是局部缺血现象，例如弱的和不对称的动脉脉搏，两臂之间血压差异，视觉障碍，例如盲点和偏盲，其他神经学特征包括眩晕和晕厥，轻偏瘫或中风。由于动脉狭窄和血栓形成的局部缺血产生临床特征。

2. 中等血管病

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗中等血管脉管炎患者。术语“中等血管脉管炎”用来指是主内脏动脉的那些血管。中等血管的例子包括肠系膜动脉和静脉，髋动脉和静脉，和颌动脉和静脉。下面描述中等血管脉管炎的例子。

a. 结节性多动脉炎

结节性多动脉炎的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(DiGirolamo，N.，等(1997)J. Leukoc. Biol. 61:667)。结节性多动脉炎或结节性动脉外膜炎指其中小的或中等大小的动脉由于受到免疫细胞的攻击而变得肿大和受损的严重血管病。结节性与儿童相比，多动脉炎通常更常影响成年人。它损害受影响动脉供血的组织，因为它们没有适当的血液供应就接受不到足够的氧和营养。

结节性多动脉炎患者表现出的症状一般是由对受影响器官的损伤而引起的，经常是皮肤，心脏，肾，和神经系统。结节性多动脉炎的一般症状包括发热，疲劳，虚弱，无食欲，体重减轻。肌肉痛(肌痛)和关节痛(关节疼痛)是常见的。结节性多动脉炎患者的皮肤还可能表现出皮疹，肿涨，溃疡，和肿块(结节损害)。

典型的 PAN(结节性多动脉炎)是小的至中等肌肉动脉的全身性动脉炎，其中涉及肾动脉和内脏动脉的最常见。50%的 PAN 患者腹部血管有动脉瘤或闭塞。典型的 PAN 不涉及肺动脉，但是涉及支气管血管。风湿性肉芽肿，明显的嗜酸性细胞增多和变应性素质不是症状部分。虽然可能涉及任何器官，但是最常见的表现包括外周神经病，多路单神经炎，肠局部缺血，肾局部缺血，睾丸痛和网状青斑。

b. Kawasaki's 病

Kawasaki's 病的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Sundel，R. P.(2002)Curr.Rheumatol. Rep. 4:474；Gedalia，A.(2002)Curr. Rheumatol. Rep. 4:25)。虽然 Kawasaki's 病的原因是未知的，但是它与冠状动脉急性炎症有关，提示与这种疾病有关的组织损伤可以由发炎原物质例如 TNFα介导。Kawasaki's 病指影响粘液膜，淋巴结，血管内层，和心脏的脉管炎。Kawasaki's 病还经常被称作粘膜皮肤淋巴结综合征，粘膜皮肤淋巴结病，和婴儿多动脉炎。患有 Kawasaki's 病的患者发生脉管炎，经常涉及冠状动脉，能导致心肌炎和心包炎。经常地，随着急性炎症减轻，冠状动脉可能会发生动脉瘤，血栓形成，并且导致心肌梗塞。

Kawasaki's 病是与手掌和足底水肿相关的发热性全身脉管炎，伴有颈部淋巴结肿大，嘴唇干裂和“草莓舌”。虽然在全身血管中发现炎症，但是最常见的最终器官损伤部位是冠状动脉。Kawasaki's 病主要影响 5 岁以下的儿童。日本发生率最高，但是西方变得逐渐增长，现在是美国儿童后天心脏病的主要原因。Kawasaki's 病最严重的并发症是冠状动脉和动脉瘤形成，发生在没有接受治疗的第三种患者身上。

3. 小血管疾病

在一个实施方案中，本发明的 TNFα用来治疗具有小血管脉管炎的患者。术语“小血管”用来指小动脉，小静脉和毛细血管。小动脉是仅具有 1 或 2 层平滑肌细胞并且是毛细血管网的末端和毛细血管网持续不断的动脉。小静脉将血液从毛细血管网送至静脉和毛细血管连接小动脉和小静脉。下面描述小血管脉管炎的例子。

a. 贝切特氏病

贝切特氏病的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Sfikakis，P.

P.(2002)Ann.Rheum. Dis. 61:ii51-3；Dogan，D. 和 Farah，C.(2002)Oftalmologia. 52:23)。贝切特氏病是涉及全身血管炎症的一种慢性病。贝切特氏病还可以引起各种类型的皮肤损伤，关节炎，肠炎，和脑膜炎(大脑和脊髓膜炎症)。作为贝切特氏病的结果，该病症的患者遍布全身的组织和器官中有炎症，包括胃肠道，中枢神经系统，血管系统，肺，和肾。贝切特氏病在男性比女性更常见三倍，并且在东地中海和日本最常见。

贝切特氏病患者表现的临床症状包括经常发生的口腔溃疡(与溃疡疮类似)，经常发生的生殖器溃疡，和眼部炎症。贝切特氏病患者的 TNFα，IL-8，IL-1，IL-6，INF-γ和 IL 12 的血清水平升高，并且证明这些因子的产生在贝切特氏病患者的单核细胞中升高(参见，例如，Inflammatory Disease of Blood Vessels(2001)Marcel Dekker，Inc.，编著 G. S.Hoffman 和 C. M. Weyand，p. 473)。

b. 韦格内氏肉芽肿病

韦格内氏肉芽肿病的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Marquez，J.，等(2003)Curr.Rheumatol. Rep. 5:128；Harman，L. E.和 Margo，C. E.(1998)Surv.Ophthalrraol. 42:458)。韦格内氏肉芽肿病指引起上呼吸道(鼻，窦，耳)，肺，和肾中血管炎症的脉管炎。韦格内氏肉芽肿病还称作中线肉芽肿。韦格内氏肉芽肿病包括涉及呼吸道，和影响小的至中等大小血管的引起坏死的脉管炎的肉芽肿炎症。韦格内氏肉芽肿病患者经常有关节炎(关节炎症)。受影响患者也可能发生肾小球性肾炎，但是事实上可能涉及所有的器官。

韦格内氏肉芽肿病患者典型地表现出临床症状，包括经常发生的窦炎或或鼻出血，粘膜溃疡，中耳炎，咳嗽，咳血和呼吸困难。韦格内氏肉芽肿病的第一症状常常包括上呼吸道症状，关节疼痛，虚弱，和疲劳。

c. Claurg-Strauss 综合征

Claurg-Strauss 综合征的病理生理学中涉及肿瘤坏死因子(Gross，W. L(2002)Curr. Opin. Rheumatol. 14:11；Churg，W. A.(2001)Mod. Pathol. 14:1284)。Churg-Strauss 综合征指全身性的并且早期表现信号是气喘和嗜酸性细胞增多症。Churg-Strauss 综合征还被称作变应性肉芽肿病和脉管炎，并且在变应性鼻炎，哮喘和嗜酸性细胞增多症背景

下发生。Churg-Strauss 综合征还发生窦炎和肺渗出物，主要影响肺和心脏。外周神经病，冠状动脉炎和涉及胃肠是常见的。

根据 American College of Rheumatology(ACR)建立的标准能诊断患有 Churg-Strauss 综合征的患者。这些标准是为了将 CSS 与其他形式的脉管炎区分开来。不是所有的患者符合每一项标准。事实上，一些病例可能只符合 2 或 3 项标准，但是仍然将他们归类为 Churg-Strauss 综合征。选择的六项 ACR 病征(标准)是最好地将 Churg-Strauss 综合征与其他脉管炎区别开来的那些。这些标准包括：1)气喘；2)嗜酸性细胞增多[以不同 WBC 量为基础>10%]；3)单神经病；4)胸部 X-射线检查出暂时肺渗出液；5)副鼻窦异常；和 6)包含血管外嗜酸性细胞血管的活组织检查。

J. 其他 TNFα-相关疾病

在一个实施方案中，本发明特征是其中 TNFα活性有害的 TNFα-相关疾病的治疗方法，包括对患者施用治疗有效量的 TNFα抑制剂，使得所述 TNFα-相关疾病得以治疗。下面进一步讨论其中 TNFα活性有害的 TNFα-相关疾病。

1. 克隆氏病-相关病症

肠炎(IBD)，包括克隆氏病的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(参见，例如，Tracy，K. J.，等(1986)Science 234:470-474；Sun，X-M.，等(1988)J. Clin. Invest. 81:1328-1331；MacDonald，T. T.，等(1990)Clin. Exp. Immunol. 81:301-305)。

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抑制剂用来治疗经常与 IBD 和克隆氏病有关的病症。术语“肠炎(IBD)–相关病症”或“克隆氏病相关病症”在这里可互换使用，用来描述通常与 IBD 和克隆氏病有关的病症和并发症。克隆氏病相关病症的例子包括膀胱，阴道，和皮肤瘘管；肠梗阻；脓肿；营养不足；皮质类固醇使用带来的并发症；关节炎症；结节红斑；坏疽性脓皮病；和眼损伤。通常与克隆氏病有关的其他病症包括克隆氏病-相关的关节痛，成瘘克隆氏病，不确定结肠炎，和囊炎。

2. 少年关节炎

少年关节炎，包括少年类风湿性关节炎的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Grom 等(1996)Arthritis Rheum. 39:1703；Mangge 等

(1995)Arthritis Rheum. 8:211)。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗少年类风湿性关节炎。

这里使用的术语“类风湿性关节炎”或“JRA”指 16 岁之前发生的可以引起关节或结缔组织损伤的慢性炎症疾病。JRA 也称作少年慢性多关节炎和斯提尔氏病。

JRA 引起 16 岁或更小孩子 6 周以上的关节炎症和强直。炎症引起关节发红，肿胀，发热，和痛苦。任何关节都能受到影响并且炎症可以限制受影响关节的活动。JRA 的一个类型还能影响内部器官。

根据涉及的关节数目，症状，以及血液化验发现的某些抗体的存在或不存在，经常将 JRA 分为三种类型。这些分类有助于医生确定疾病怎样发展以及内部器官或皮肤是否受到影响。JRA 的分类包括如下：

a. 少数关节 JRA，其中患者的四个或更少的关节受到影响。少数关节是 JRA 最常见的形式，并且典型地影响大关节，例如膝盖。

多关节 HRA，其中五个或多个关节受到影响。最常涉及小关节，例如手足关节，但是该疾病也可以影响大关节。

c. 全身性 JRA，特征在于关节肿胀，发热，光皮肤疹，并且可能影响内脏器官，例如心脏，肝脏，脾，和淋巴结。全身性 JRA 还称作斯提尔氏病。这些孩子中小比例会在很多关节发生关节炎，并且能有持续到成年期的严重关节炎。

3. 子宫内膜异位

子宫内膜异位的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子，因为子宫内膜异位妇女 TNF 的腹膜水平升高(Eisermann J，等(1988)Fertil Steril 50:573; Halme J.(1989)Am J Obstet Gynecol 161:1718; Mori H，等(1991)Am J Reprod Immunol 26:62; .Taketani Y，等(1992)Am J Obstet Gynecol 167:265; Overton C，等(1996)Hum Reprod 1996; 11:380)。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗子宫内膜异位。

这里使用的术语“子宫内膜异位”指一种症状，其中正常规范子宫(子宫内膜)的组织在身体的其他部位生长，引起疼痛，出血不规律，并且常常不孕。

4. 前列腺炎

前列腺炎的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子，因为与对照相比

较，慢性前列腺炎和慢性骨盆痛的男性精液中 TNF 和 IL-1 水平显著升高(Alexander RB，等(1998)Urology 52:744; Nadler RB，等(2000)J Urol 164:214; Orhan 等(2001)Int J Urol 8:495)。此外，大鼠前列腺炎模型中，TNF 水平与对照物相比也升高(Asakawa K，等(2001)Hinyokika Kiyo 47:459; Harris 等(2000)Prostate 44:25)。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗前列腺炎。

这里使用的术语“前列腺炎”指一种前列腺炎症。前列腺炎也称作骨盆痛综合征。前列腺炎本身有多种表现形式，包括非细菌前列腺炎，急性前列腺炎，细菌前列腺炎，和急性前列腺炎。急性前列腺炎指突然发生的前列腺炎症。急性前列腺炎通常由前列腺的细菌感染引起。慢性前列腺炎是逐渐发生的，持续长时间的前列腺炎症，并且典型地有锐敏综合征。慢性前列腺炎通常也是由细菌感染引起。

5. 自身免疫病

很多自身免疫病，包括狼疮的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Shvidel 等(2002)Hematol J. 3:32; Studnicka-Benke 等(1996)Br J Rheumatol. 35:1067)。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗自身免疫病，例如狼疮，多系统自身免疫疾病，和自身免疫听觉丧失。

这里使用的术语“狼疮”指称作红斑狼疮的慢性炎症自身免疫疾病，其可以影响很多器官系统，包括皮肤，关节和内脏器官。狼疮是一般性术语，其包括很多特定类型的狼疮，包括全身性狼疮，狼疮肾炎，和狼疮脑炎。全身狼疮(SLE)中，身体自然防御转向抵抗身体，并且游闲免疫细胞攻击身体的组织。可以产生抗体，抗体能与身体的血细胞，器官，和组织反应。这种反应导致免疫细胞进攻受影响系统，产生慢性疾病。狼疮肾炎，也称作狼疮血管小球病，是一种肾病，通常是 SLE 的并发症，并且特征是对肾小球损伤并且肾功能进行性损失。狼疮脑炎指 SLE 的另一种并发症，它是大脑和/或中枢神经系统炎症。

6. 脉络膜新血管形成

脉络膜新血管形成的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子。例如，在手术切除的脉络膜新血管膜中，新血管染色对于 TNF 和 IL-1 成阳性(Oh H 等(1999)Invest Ophthalnaol Vis Sci 40:1891)。在一个实施方案

中，本发明的TNFα抗体用来治疗脉络膜新血管形成。这里使用的术语“脉络膜新血管形成”指从脉络膜开始通过脉络膜基底膜破碎进入视网膜下色素上皮(sub-RPE)或视网膜下腔的新血管生长。脉络膜新血管形成(CNV)是该病症患者视觉丧失的主要原因。

7. 坐骨神经痛

坐骨神经痛的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Ozaktay 等(2002)Eur Spine J. 11:467; Brisby 等(2002)Eur Spine J. 11:62)。在一个实施方案中，本发明的TNFα抗体用来治疗坐骨神经痛。这里使用的术语“坐骨神经痛”指一种症状，涉及对坐骨神经伤害引起的腿的受伤活动和/或感觉。坐骨神经痛通常还称作坐骨神经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。当对于位于腿的背部的坐骨神经有损伤时发生坐骨神经痛。坐骨神经控制膝和小腿背部的肌肉并且提供对小腿和脚掌的感觉。坐骨神经痛是另一种病症的指征，包括腰椎盘突出，脊柱狭窄，椎间盘退化病，isthmic spondyloisthesis和圆锥形综合征。

8. 斯耶格伦氏综合征

斯耶格伦氏综合征的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Koski 等(2001)Clin Exp Rheumatol. 19:131)。在一个实施方案中，本发明的TNFα抗体用来治疗斯耶格伦氏综合征。这里使用的术语“Sjogren's syndrome”指一种全身性炎症病症，特征在于口干燥，较少的撕裂，和其他干燥粘膜，并且经常与自身免疫风湿病例如类风湿性关节炎有关。眼口干燥是这种疾病最常见的症状。这些症状可以单独发生，或者伴有与类风湿性关节炎或其他结缔组织疾病有关的症状。唾液腺可能相关地增大。其他器官可能受到影响。该综合征可能与类风湿性关节炎，全身红斑狼疮，硬皮病，多肌炎，和其他疾病有关。

9. 眼色素层炎

眼色素层炎的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Wakefield 和 Lloyd(1992)Cytokine 4:1; Woon 等(1998)Curr Eye Res. 17:955)。在一个实施方案中，本发明的TNFα抗体用来治疗眼色素层炎。这里使用的术语“眼色素层炎”指眼色素层炎症，眼色素层是巩膜和视网膜之间的层，包括虹膜，睫状体和脉络膜。眼色素层炎也一般称作虹膜炎，扁平部睫状体炎，chroiditis，脉络膜视网膜炎，前眼色素层炎，和后

眼色素层炎。眼色素层炎最常见形式是前眼色素层炎，它涉及眼前部的炎症。这种症状经常称作虹膜炎。在一个实施方案中，术语眼色素层炎指不包括与自身免疫疾病相关的炎症的眼色素层炎症，即，不包括自身免疫眼色素层炎.

10. 湿黄斑变性

湿黄斑变性的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体用来治疗湿黄斑变性。这里使用的术语“湿黄斑变性”指影响黄斑(眼视网膜的中心部分)并且引起视觉敏度降低并且可能丧失中枢视力的一种病症。湿黄斑变性患者在视网膜下生成新的血管，这引起出血，肿胀，和斑痕组织。

11. 骨质疏松

骨质疏松的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Tsutsumimoto 等(1999)J Bone Miner Res. 14:1751)。骨质疏松用来指特征在于骨密度进行性减少并且骨组织变薄的一种病症。当身体不能形成足够的新的骨，或者当身体重吸收太多的以前的骨时，或者两种情况时，发生骨质疏松。本发明的 TNFα抗体或者其抗原结合片段用来治疗湿黄斑变性。

12. 骨关节炎

骨关节炎的生理病理学中涉及肿瘤坏死因子(Venn 等(1993)Arthritis Rheum. 36:819; Westacott 等(1994)J Rheumatol. 21:1710)。骨关节炎(OA)也称作肥大骨关节炎，关节病，和变质关节病。OA 是一种骨关节慢性退化病，它影响所有年龄段的成年人的特定关节，通常是膝，髋，掌关节和脊柱。OA 表现下面的一些特征，包括与发生“溃疡”或喷火口相关的关节软骨变性和变薄，骨赘形成，边界骨肥大，和 snyovial 膜变化以及受影响关节增大。此外，骨关节炎伴随疼痛和强直，特别是在长时间活动之后。本发明的抗体，或者其抗原结合片段能用来治疗骨关节炎。骨关节炎放射学特征包括关节腔缩小，软骨下硬化，骨赘病，软骨下囊肿形成，骨质疏松体质(或“关节游动小体”)。

用来治疗骨关节炎的药物包括各种非甾族化合物抗炎药(NSAIDs)。另外，COX2 抑制剂，包括 Celebrex，Vioxx，and Bextra，aand Etoricoxib，也被用来治疗 OA。可直接注射到关节中的甾族化合

物也可以用来减轻炎症和疼痛。在本发明的一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与 NSAIDS，COX2 抑制剂，和/或甾族化合物联合给药。

13. 其他

本发明的抗体，和抗体部分，也能用来治疗其中 TNFα活性有害的各种其他病症。生理病理中涉及 TNFα活性从而能用本发明的抗体或抗体部分治疗的其他疾病和病症的例子包括与年龄有关的恶病质，早老性痴呆，脑水肿，炎性脑损伤，癌症，癌症和恶病质，慢性疲劳综合征，皮肌炎，药物反应，例如 Stevens-Johnson 综合征和 Jarisch-Herxheimer 反应，脊髓之内和/或周围的水肿，家族周期性发热，Felty's 综合征，纤维化，肾小球性肾病(例如链球菌感染后肾小球肾炎或 IgA 肾病)，假体松弛，显微多脉管炎，混合型结缔组织病症，多发性骨髓瘤，癌症和恶病质，多器官失调，脊髓发育不良综合征，睾丸炎骨质溶解，胰腺炎，包括急性，慢性，和胰腺脓肿，牙周病多肌炎，进行性肾衰竭，假痛风，坏疽性脓皮病，复发性多软骨炎，风湿性心脏病，肉样瘤病，硬化胆管炎，中风，胸腹主动脉动脉瘤修补(TAAA)，TNF 受体相关周期性综合征(TRAPS)，与黄热病疫苗接种相关的综合征，与耳，慢性耳炎，或儿科耳炎相关的炎性疾病，有或没有胆脂瘤的慢性中耳炎，儿科耳炎，myotosis，卵巢癌，结肠直肠癌，与移植相关的病症，与诱发炎症综合征相关的治疗(例如，施用 IL-9 之后的综合征)，与再灌注损伤有关的病症。

要明白上面提到的所有 TNFα-相关病症包括成年和未成年疾病形式。还要明白上面提到的所有病症包括疾病的慢性和急性形式。另外，本发明的 TNFα抗体能单独或者与另一种药物联合用来治疗上面提到的 TNFα-相关病症，例如，针对患有眼色素层炎和狼疮的患者。

III. 药物组合物和药物施用

A. 组合物和给药

本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂能被掺入到适合对患者给药的药物组合物中。典型地，所述药物组合物含有本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂和药学可接受载体。这里使用的术语“药学可接受载体”包括任何和所有的溶剂，分散介质，包衣，抗细菌剂和抗真菌剂，等渗剂和延迟吸收剂，等等，它们是生理学可配伍的。药学可接受载体的例子包括下面的一种或几种：水，盐水，磷

酸盐缓冲盐水，葡萄糖，甘油，乙醇等等，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，例如甘露糖醇，山梨糖醇，或氯化钠。药学可接受载体可以进一步包括少量辅助物质，例如湿润剂或乳化剂，防腐剂或缓冲剂，它们提高本发明的抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂的贮存期或功效。

本发明的组合物可以是各种各样的形式。这些包括，例如，液体，半固体和固体剂量形式，例如液体溶液(例如，可注射和可灌注溶液)，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，例如与用其他抗体或其他 TNFα抑制剂对人被动免疫使用的那些类似的组合物。优选的给药方式是肠胃外(例如，静脉内，皮下，腹膜内，肌内)。在优选的实施方案中，通过静脉内灌注或注射施用抗体或其他 TNFα抑制剂。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或其他 TNFα抑制剂。

典型地，治疗组合物必须灭菌并且在制备和贮存条件下必须是稳定的。组合物能配制成溶液，微乳液，分散体，脂质体，或者适合高药物浓度的其他有序结构。灭菌可注射溶液可以通过在合适的溶剂中掺入需要量的活性化合物(即，抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂)，根据需要，与上面列举的成分中的一种或组合混合，接着过滤灭菌。一般情况下，通过向含有基础分散基质和选自上面列举的那些中的必需的其他成分的灭菌赋形剂中掺入活性化合物来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液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，得到活性成分的粉末加选自先前灭菌过滤的溶液的任何赋家的期望的成分。例如通过使用包衣，例如卵磷脂，在分散体情况下通过保持必需的颗粒度和通过使用表面活性剂，能保持溶液合适的流动性。通过在组合物中含有一种延迟吸收的物质，例如单硬脂酸盐和明胶，能带来可注射组合物的长时间吸收。

组合物中还可以掺入补充活性化合物。在一些实施方案中，本发明的抗体或抗体部分与一种或几种附加治疗药物共同配制和/或共同给药。例如，本发明的抗-hTNFα抗体或抗体部分可以与一种或几种下面的物质共同配制和/或共同给药：一种或几种 DMARD 或一种或几种 NSAID 或者一种或几种与其他靶物结合的另外的抗体(例如，与其他细

胞因子结合或者与细胞表面分子结合的抗体)，一种或几种细胞因子，可溶性 TNFα受体(参见，例如，PCT 公开 No. WO 94/06476)，和/或抑制 hTNFα产生或活性的一种或几种化学物质(例如 PCT 公开 No. WO 93/19751 中描述的环己烷-亚基衍生物)或者它们的任何组合。此外，本发明的一种或几种抗体可以与上述两种或几种治疗物质联合使用。这样的联合治疗可以有利地使用低剂量的施用的治疗药物，这样避免可能的副作用，并发症或与各种单一治疗有关的患者的低水平反应。

在一个实施方案中，本发明包括含有有效量的 hTNFα抑制剂和药学可接受载体的药物组合物，其中 hTNFα抑制剂的有效量可以有效治疗 TNFα-相关病症，包括，例如，坐骨神经痛，子宫内膜异位，和前列腺炎。

本发明的抗体，抗体部分，和其他 TNFα抑制剂能通过各种各样的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/方式是静脉内注射或灌注。技术人员理解，根据期望的结果而不同。在一些实施方案中，用保护化合物不快速释放的载体可以将活性化合物制成制剂，例如控制释放制剂，包括植入物，透皮贴，和微胶囊送递系统。能使用可生物降解，生物配伍聚合物，例如乙酸乙烯酯，聚酐类，聚羟基乙酸，胶原，聚原酸酯，和聚乳酸。制备这样的制剂的很多方法是有专利的或者一般为本领域技术人员公知的。参见，例如，Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems，JR. Robinson，编著，Marcel Dekker，Inc.，New York，1978。

本发明的 TNFα抗体可以以蛋白质晶体制剂形式给药，包括在聚合物载体中制成胶囊形成包衣颗粒的蛋白质结晶组合。蛋白质结晶制剂的包衣颗粒可以具有球形形状并且微球体直径最大 500 微米，或者它们可以具有一些其他形状并且可以是微颗粒。提高的蛋白质结晶的浓度使得本发明的抗体可皮下送递。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体通过蛋白质送递系统送递，其中对 TNFα-相关病症患者施用蛋白质结晶制剂或组合物的一种或几种。WO 02/072636 中还描述了制备全抗体晶体或抗体片段晶体的稳定制剂的组合物和方法，该专利文献在此引作参考。在一个实施方案中，使用实施例 37 和 38 中描述的结晶抗体片段的制剂来治疗 TNFα-相关病症。

在一些实施方案中，本发明的抗体，抗体部分，或者其他 TNFα

抑制剂可以口服给药，例如用惰性稀释剂或可同化可食用载体。化合物(如果期望，和其他的成分)还可以密封在硬或软壳体明胶胶囊中，压成片剂，或直接掺入到患者饮食中。对于口服治疗给药，化合物可以与赋形剂一起掺入并且以可摄取的片剂，口腔片剂，糖锭，胶囊，酏剂，悬浮剂，糖浆，糯米纸囊剂等形式使用。为了通过肠胃外给药之外的方法施用本发明的化合物，必需用一种防止其失活的材料将化合物包衣，或者与之共同施用。

本发明的药物组合物可以包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体或抗体部分。“治疗有效量”指以剂量和必需的时间内有效实现期望的治疗结果的量。抗体，抗体部分，或者其他 TNFα 抑制剂的治疗有效量可以根据象个体的疾病状态，年龄，性别，和体重这样的因素，以及抗体，抗体部分，或者其他 TNFα抑制剂对个体引起期望的反应的能力而不同。治疗有效量也是治疗有益效果比抗体，抗体部分，或者其他 TNFα抑制剂的任何毒性或有害效果重要的量。“预防有效量”指以剂量和必需的时间内有效实现期望的预防结果的量。典型地，因为在疾病之前或早期对患者使用预防剂量，预防有效量要小于治疗有效量。

可以调节剂量方案，提供最优期望的反应(例如治疗或预防反应)。例如，可以施用一次大丸剂，可以随时间几次施用，或者根据治疗情况的紧急状态所指示的按比例减少或增加剂量。特别有利的是配制单位剂量形式的肠胃外用组合物，使容易给药并且剂量均匀。这里使用的单位剂量形式指作为对于要治疗的哺乳动物患者单元剂量的物理不连续的单位；每个单位含有经计算产生期望的治疗作用的预计量的活性化合物和必需的药学载体。本发明的单位剂量形式的说明书由下面说明和直接取决于(a)活性化合物的独特特性和要实现的特定治疗或预防效果，和(b)制备用于治疗个体敏感性的活性化合物在本领域固有的局限性。

本发明的抗体或抗体部分的举例的非限制性治疗或预防有效量范围是 10-150 mg，更优选 20-80 mg，最优选大约 40 mg。注意剂量值可以随着要减轻的状况的类型和严重程度而不同。进一步明白，对于任何特定患者，具体给药剂量方案应该根据个体需要和给药或管理组合物给药的专业人员判断而随时间调节，这里提出的剂量范围只是举例

而不是要限制要求的组合物的范围或实行。以上述浓度为中间值的范围，例如大约 6-144 mg/ml，也是本发明的部分。例如，包括使用上述值的任何一的组合为上限和/或下限的值的范围。

如上所述，本发明还涉及包装的药物组合物，其包括本发明的 TNFα抑制剂和使用该抑制剂治疗 TNFα-相关疾病的说明书。

本发明的另一方面涉及包含含有抗-TNFα抗体和药学可接受载体的药物组合物和各自含有用于治疗 TNFα-相关疾病和药学可接受载体的一种或几种药物组合物的试剂盒。或者，试剂盒包含含有抗-TNFα抗体，用于治疗 TNFα-相关疾病的一种或几种药物和药学可接受载体的单一的药物组合物。试剂盒包含用于治疗施用抗-TNFα抗体是有益的 TNFα-相关疾病例如狼疮的药物组合物的用药说明书。本发明还涉及包装的药物组合物或试剂盒，其包括本发明的 TNFα抑制剂和使用该抑制剂来治疗如上所述其中 TNFα活性有害的特定病症的说明书。或者包装或试剂盒可以含有 TNFα抑制剂，并且它能促进应用，或者在包装中或者通过附加的信息，用于对这里描述的病症的施用或治疗。包装药物或试剂盒能进一步包括包装的或者用说明书共同促进的第二种药物(如这里描述的)，说明书说明与第一种药物(如这里描述的)共同使用第二种药物。

B. 另外的治疗药物

本发明涉及药物组合物和其用于治疗 TNFα-相关疾病的使用方法。药物组合物含有防止或抑制 TNFα-相关疾病的第一种药物。药物组合物还可以含有是活性药物成分的第二种药物；即，所述第二种药物是治疗性的并且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。所述第二种药物可以是在治疗或防止 TNFα-相关疾病是有用的。第二种药物可以减轻或治疗至少一种与目标疾病有关的症状。第一种药物和第二种药物可以通过相似或不相关的作用机理发挥它们的生物学作用；或者第一种药物和第二种药物的一种或两者可以通过多种作用机理发挥它们的生物学作用。药物组合物还可以含有第三种药物，甚至更多，其中第三种(和第四种等)化合物具有第二种药物相同的特征。

应该明白这里描述的组合物对于每一种描述的实施方案可以在相同的药学载体或不同的药学载体中含有第一和第二，第三，或另外药

物。还应该明白在描述的实施方案中，所述第一和第二，第三，和另外的药物可以同时或顺序施用。或者，可以同时施用第一和第二种药物，并且在头两种药物施用之前或之后施用第三种或另外的药物。

这里描述的方法和药物组合物中使用的药物的组合对治疗所针对的症状或疾病可以具有治疗加合或协同作用。这里描述的方法和药物组合物中使用的药物的组合还可以减小当单独或没有特定药物组合物的其他药物施用时与至少一种药物相关的毒副作用。例如，组合物的另一种药物可以减弱一种药物的副作用的毒性，这样允许更高的剂量，改善患者的顺应性，并且改善治疗结果。组合物的加合或协同作用，利益，和好处适用治疗药物种类，不管是结构或功能种类，或者适用各种化合物本身。

组合物中还可以掺入补充活性化合物。在一些实施方案中，本发明的抗体或抗体部分与用于治疗其中 TNFα活性有害的 TNFα-相关病症的一种或几种另外的治疗药物共同配制和/或共同施用。例如，本发明的抗-hTNFα抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂可以与下面的物质共同配制和/或共同施用：结合其他靶物的一种或几种另外的抗体(例如与其他细胞因子结合的抗体，或者与细胞表面分子结合的抗体)，一种或几种细胞因子，可溶性 TNFα受体(参见，例如，PCT 公开 No. WO 94/06476)和/或抑制 hTNFα产生或活性的一种或几种化学物质(例如 PCT 公开 No. WO 93/19751 中描述的环己烷-亚基衍生物)。此外，本发明的一种或几种抗体或其他 TNFα抑制剂可以与上述治疗药物的两种或几种联合使用。这样的联合治疗可以有利地使用施用的治疗药物的较低剂量，从而避免与各种单一治疗有关的可能的毒性或并发症。如下面讨论的，一般根据特定的 TNFα-相关病症选择具体的治疗药物。

本发明的抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂可以与之联合使用的治疗药物的非限制性例子包括如下：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-TNFα抗体；Celltech/Bayer)；cA2/英夫单抗(嵌合抗-TNFα抗体；Centocor)；75 kd TNFR-IgG/etanercept(75 kD 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 kd TNF-IgG(55 kD TNF 受体-IgG 融合蛋白；Hoffmann-LaRoche)；IDEC-CE 9.1/SB 210396(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-2Rα; 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); TNF-bp/s-TNF(可溶性 TNF 结合蛋白质; 参见, 例如, Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), 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(增刊), S282); MK-966(COX-2 抑制剂, 参见, 例如 Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), S81); 伊洛前列(参见, 例如, Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), S82); 甲氨喋呤; 萨利多胺(参见, 例如, Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), 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(增刊), 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(增刊), S284); T-614(细胞因子抑制剂; 参见, 例如, Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), S282); 前列腺素 El(参见, 例如, ArtAlritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), S282); 替尼达普(非甾族抗炎药; 参见, 例如, Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), S280); 萘普生(非甾族抗炎药; 参见, 例如, Neuro Report(1996)Vol. 7, pp. 1209-1213); 莫比可(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); 水杨酸偶氮磺胺吡啶(参见, 例如, Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), S281); 硫唑嘌呤(参见, 例如, Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39, No. 9(增刊), S281); ICE 抑制剂(酶白介素-lβ转化酶的抑制剂); zap-70 和/或 Ick 抑制剂(酪蛋白激酶的抑制剂 zap-70 或 lck); 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；血管生成的抑制剂)；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(增刊)，S296)；白介素-13(参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39，No. 9(增刊)，S308)；白介素-17抑制剂(参见，例如，Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. 39，No. 9(增刊)，S120)；金；青霉素；氯喹；羟氯喹；苯丁酸氮芥；环磷酰胺；环孢菌素；总的淋巴细胞照射法；抗胸腺细胞球蛋白；抗-CD4 抗体；CD5-毒素；口服给药的肽和胶原；羟苯基氯氨茴酸二钠；细胞因子调节剂(CRAs)HP 228 和 HP 466(Houghten Pharmaceuticals，Inc.)；ICAM-1 抗敏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；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(fish and plant seed fatty acids；参见，例如，DeLuca 等(1995)Rheuna. Dis. Clin. Nortla Arra. 21:759-777)；金诺芬；保泰松；抗炎酸；氟灭酸；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 amiprilose(阿普劳斯 therafectin)；克拉屈滨(2-氯脱氧腺苷)；氮尿苷；甲氨喋呤；抗病毒剂；和免疫调节剂。上面提到的药物的任一种可以与本发明的 TNFα抗体联合用药治疗 TNFα-相关疾病。

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与下面一种药物联合用药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；etanercept；英夫单抗；来氟洛米；萘普生；valdecoxib；磺胺吡啶；甲基氢化泼尼松；布洛芬；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；anakinra，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；盐酸阿米替林；磺胺嘧啶；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；环磷酰胺；利妥希玛；IL-1 TRAP；MRA；CTLA4-IG；IL-8 BP；ABT-874；ABT-324(抗-IL18)；抗-IL15；BIRB-796；SCIO-469；VX-702；AMG-548；VX-740；Roflumilast；IC-485；CDC-801；和 mesopram。在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与上面提到的用于治疗类风湿性关节炎的药物的一种联合用药，用于治疗 TNFα相关疾病。

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与下面一种药物联合用药治疗其中 TNFα活性有害的 TNFα相关疾病：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-Ill 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；CCRll 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 CD32 作为治疗性蛋白质。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα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。这里使用的术语“抗生素”指抑制微生物生长或者处死微生物的化学物质。该术语包括本领域公知的微生物产生的抗生素，以及合成的抗生素(例如，类似物)。抗生素包括但不限于，克拉霉素(Biaxin®)，环丙沙星(Cipro®)，和灭滴灵(Flagyl®)。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与治疗坐骨神经痛或疼痛的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制坐骨神经痛或疼痛症状的药物的例子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，valdecoxib，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，消炎痛，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/氢可酮少量；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，和替马西泮。

在另一个实施方案中，与血液透析联合使用本发明的 TNFα抗体制备 TNFα-相关疾病。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与用来治疗克隆氏病或克隆氏病相关病症的药物联合使用。能用来治疗克隆氏病的治疗性药物包括美沙拉秦，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 sod succ，苯乙哌啶/atrop sulf，盐酸洛派丁胺，甲氨喋呤，，叶酸盐，环丙沙星/葡萄糖-水，氢可酮二酒石酸盐/apap，盐酸四环素，氟轻松醋酸酯，灭滴灵，硫汞撒/硼酸，考来烯胺/蔗糖，盐酸环丙沙星，硫酸天仙子胺，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，新诺明/甲氧苄定，塞来昔布，聚丙烯酸树脂，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，colesevelan 盐酸盐，维生素 B12，叶酸，左氟沙星，甲基氢化泼尼松，natalizumab，和γ-干扰素。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与用来治疗哮喘的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制哮喘症状的药物的例子包括如下：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 xinafoate；盐酸 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，甲基泼尼龙 sod succ，克拉霉素，扎鲁斯特，富马酸福莫特罗，流感病毒疫苗，甲基泼尼龙三水合物，氟尼缩松，变应性变态反应注射，色甘酸钠，盐酸甲美芳铵，氟尼缩松/薄荷醇，阿莫西林/克拉维酸钾，左氟沙星，吸入辅助装置，愈创甘油醚，地塞米松磷酸钠；盐酸莫西沙星；hyclate；愈创木酚甘油醚/d-甲吗喃；pephedrine/cod/扑尔敏；加替沙星；盐酸西替利嗪；糠酸毛他松；沙美特罗 xinafoate；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。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与用来治疗 COPD 的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制 COPD 症状的药物的例

子包括硫酸沙丁胺醇/异丙托品；异丙托溴胺；沙美特罗/氟地松；沙丁胺醇；沙美特罗；xinafoate；丙酸氟地松；泼尼松；无水茶叶碱；甲基氢化泼尼松 sod succ；孟鲁司特钠；布地奈德；富马酸福莫特罗；曲安奈德；左氟沙星；愈创甘油醚；阿齐霉素；倍氯米松；二丙酸；盐酸 levalbuterol；氟尼缩松；钠；三水合物；加替沙星；扎鲁司特；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；糠酸盐；-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；tiotropium bromide；(R，R)-福莫特罗；TgAAT；Cilomilast 和 Roflumilast。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与用来治疗 IPF 的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制 IPF 症状的药物的例子包括泼尼松；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 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。

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与一般用来治疗脊柱关节病的另外的治疗药物联合用药。这样的药物的例子包括非甾族抗炎药(NSAIDs)，COX 2 抑制剂，包括 Celebrex®，Vioxx®；，和 Bextra®，和 etoricoxib。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。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与用来治疗强直性脊柱炎的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制强直性脊柱炎症状的药物的例子包括布洛芬，双氯芬酸和米索前列醇，萘普生，美洛昔康，消炎痛，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，etanercept，和英夫单抗。

在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与用来治疗牛皮癣患者关节炎的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制牛皮癣患者关节炎症状的药物的例子包括甲氨喋呤；etanercept；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；消炎痛；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；曲安奈德；双氯芬酸；二甲亚砜；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；valdecoxib；alefacept；和 efalizumab。

在一个实施方案中，在治疗冠心病的初期操作之后施用本发明的TNFα抑制剂。这样的操作的例子包括但不限于冠状动脉旁路移植法(CABG)和经皮透明冠状囊成血管术(PTCA)或血管成形术。在一个实施方案中，为了防止狭窄复发而施用 TNFα抑制剂。在本发明的另一个实施方案中，为了防止或治疗杂狭窄而施用 TNFα抑制剂。本发明还提供一种治疗方法，其中在对接受冠心病治疗操作的患者的动脉中插入支架之前，联合，或之后施用 TNFα抑制剂。在一个实施方案中，在 CABG 或 PTCA 之后施用支架。

在本发明的上下文中可以使用各种各样的支架移植物，取决于期望的治疗部位和性质。支架移植物可以是，例如，分叉的或管移植物，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，支架移植物可以适合只在远侧一端释放药物，或者沿着支架移植物整体释放。本发明的 TNFα抑制剂还可以在支架上。在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体，包括，例如，D2E7/HUMIRA®通过药物洗脱支架给药。

本发明的 TNFα抗体能与用来治疗再狭窄的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制再狭窄的药物的例子包括瑞帕霉素，紫杉醇，everolimus，藤霉素，ABT-578，和对乙酰氨基酚。

本发明的 TNFα抗体能与用来治疗心肌梗塞的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制心肌梗塞的药物的例子包括阿司匹林，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，torsemide，瑞替普酶，氯沙坦钾，盐酸喹那普利/mag carb，布美他尼，阿替普酶，依那普里拉，盐酸胺碘酮，盐酸替罗非班 m-水合物，盐酸地尔硫䓬，卡托普利，吉加，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，亮氨酸，螺内酯，干扰素，盐酸索他洛尔，氯化钾，琥珀新酯钠，盐酸多巴酚丁胺，阿普唑仑，普伐他丁钠，立普妥，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，rosuvastatin，ezetimibe/辛伐他汀，avasimibe，阿昔单抗，和 cariporide。

本发明的 TNFα抗体能与用来治疗心绞痛的另外的治疗药物联合用药。能用来减轻或抑制心绞痛的药物的例子包括：阿司匹林；硝酸甘油；异山梨醇一硝酸酯；琥珀酸美托洛尔；阿替洛尔；酒石酸美托洛尔；阿罗地平磺酸盐，dilitiazem hydropchloride，异山梨醇二硝酸酯，氯吡格雷硫酸氢盐；硝苯地平；立普妥；氯化钾；呋塞米；辛伐他汀；盐酸维拉帕米；地高辛；盐酸普萘洛尔；卡维地洛；赖诺普利；sprionolactone；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；ezetimibe；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。

在本发明的一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与通常用来治疗丙型肝炎病毒的药物联合施药。这样的药物的例子包括干扰素-α-2a，干扰素-α-2b，干扰素-αconl，干扰素-α-nl，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。

本发明的 TNFα抗体与皮质类固醇，维生素 D 类似物，和局部或口服视黄酸，或者它们的组合，联合用药，用于治疗牛皮癣。另外，本发明的 TNFα抗体与用于治疗牛皮癣的下面的药物中的一种联合用药：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，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，豚，倍他米松，丙酸氯倍他索/emoll，丙酸氟地松，阿齐霉素，氢化可的松，增加水份的处方，叶酸，地奈德，煤焦油，醋酸二氟拉松，etanercept，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，防晒物质，水杨酸，哈西

奈德，地蒽酚，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，pimecrolimus 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，藤霉素，pimecrolimus，PUVA，UVB，和水杨酸偶氮磺胺吡啶。

本发明的抗体，抗体部分，或其他TNFα抑制剂能与治疗皮肤病的其他药物联合使用。例如，本发明的抗体，抗体部分，或其他 TNFα抑制剂与 PUVA 疗法联合。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。本发明的抗体，抗体部分，或其他TNFα抑制剂还能和 pimecrolimus 联合。在另一个实施方案中，本发明的抗体被用来治疗牛皮癣，其中抗体与藤霉素联合用药。在另一个实施方案中，藤霉素和 TNFα抑制剂与甲氨喋呤和/或环孢菌素联合给药。在另一个实施方案中，本发明的 TNFα抑制剂与治疗牛皮癣的受激准分子激光治疗联合施用。

TNFα抑制剂可以与之联合来治疗皮肤病或指甲病的其他治疗性药物的非限制性例子包括 UVA 和 UVB 光线疗法。能与 TNFα抑制剂联合使用的其他非限制性例子包括抗-IL-12 和抗-IL-18 治疗药物，包括抗体。

在一个实施方案中，本发明的 TNFα抗体与治疗贝切特氏病的另外的治疗药物联合用药。能用来治疗贝切特氏病的另外的治疗药物包括但不限于，泼尼松，环磷酰胺(Cytoxan)，硫唑嘌呤(也称作硫唑嘌呤 imuran)，甲氨喋呤，timethoprim/新诺明(也称作复方新诺明片或增效磺胺甲基异噁唑)和叶酸。

上面提到的治疗药物中的任何一种，单独地或者联合地，与本发明的 TNFα抗体联合，能对患有其中 TNFα活性有害的 TNFα-相关疾病的患者。在一个实施方案中，除了 TNFα抗体之外，上面提到的治疗药物中的任何一种，单独地或者联合地，能对类风湿性关节炎患者施用，来治疗 TNFα-相关疾病。

通过下面的实施例进一步详细说明本发明，实施例不应该认为是限制性的。本申请自始至终引用的所有的参考文献，专利和公开的专利申请在此引作参考。

实施例

实施例 1：强直性脊柱炎大鼠模型中的 TNFα抑制剂

对人白细胞抗原-B27(HLA-B27)大鼠施用 TNF 抗体，试验进行性关节强硬的抑制作用

对 Fisher 344 大鼠进行基因工程处理，使其携带多拷贝数的 I 类人主要组织相容性复合体等位基因 B27，并且β_2-微球蛋白基因表现出与人脊柱关节病特别是强直性脊柱炎(AS)类似的症状(Zhang 等，Curr Rheumatol Rep. 2002:4:507)。获得 10 周龄雄性转基因人白细胞抗原-B27(HLA-B27)大鼠，并且在动物笼中圈养，直到它们 40 周龄。获得一组 Fisher 344 大鼠并且作为没有转基因的对照物。购买 36 周的对照大鼠并且在相同条件下在动物笼中又圈养 3-4 周。

实验处理之前，对 HLA-B27 转基因大鼠和对照大鼠测量体重，以确定两者之间没有显著差别。然后对大鼠腹膜内施用(i. p.)安慰剂剂量或已知结合并中和大鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体剂量，例如抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci US A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。在大约 36 周龄开始以及在持续的研究中利用下面的试验对大鼠评价 AS 症状：体重，丝网的前爪抓握，反转丝网时的抓紧能力，步态，胸廓屈曲性，脊柱移动性，和眼，皮肤，指甲，生殖器，和外周和中轴骨关节的外观，注意变红和肿胀，关节变形，和移动性。还对大鼠检查关节炎的证据，特别是接受治疗的大鼠 AS 症状的减轻，并且紧密观察生长特征和皮肤及指甲的变化。在第 4，6，8，10，12，16，和 20 周，将大鼠处死用于放射照相和显微镜分析。

实施例 2：TNF 抑制剂对 AS 症状强直性脊柱炎的作用-临床思考

对表现出一般与 AS 相关的症状的患者检查和分析以确定他们是否患有 AS，从而进行研究。一般与 AS 相关的症状是背部下方疼痛，不活动之后更不好，背部下方运动受限，髋部疼痛和强直，胸部扩张受限，运动范围受限(特别是涉及脊柱和髋部)，肩，膝，踝关节疼痛并且关节肿胀，颈部疼痛，足跟疼痛，缓慢弯腰减轻症状，疲劳，低度发热，食欲减退，体重减轻，和/或眼睛发炎。对患者进行内科检查，确定他们是否表现出与 AS 相关的有限脊柱运动或胸部扩张的特征性

症状。指示 AS 的试验的例子包括显示与 AS 相关的特征性发现的骶髂关节和脊柱的 X-射线。

使用修改的纽约标准诊断强直性脊柱炎(Moll 等(1973)Ann Rheum Dis 32:354; Van der Linden 等(1984)Arthritis Rheum 27:361)。强直性脊柱炎的纽约标准是根据 1966 年纽约举行的 CIOMS 研讨会提出的罗马标准修正版。它是骶髂关节的临床标准和放射照相结果的组合。纽约标准的临床标准是:

(a) 所有三个位面上腰椎运动受限(前驱侧驱范围)。上文 Moll 的文献中给出有助于检查的皮肤斑纹;

(b) 背腰接合处或腰椎有疼痛史或者疼痛; 和

(c) 在第四肋间间隙测量时, 胸部扩张局限到 1 英寸(2.5 cm)或更小。

纽约标准的计分指数

骶髂关节放射照相变化	等级
正常	0
怀疑	1
最小程度的骶髂关节炎	2
中等程度的骶髂关节炎	3
关节强直	4

利用评价各种 AS 指征的各种仪器测量 AS 的临床病程。一些通常使用的量度包括评定关节强直性脊柱炎(ASAS), Bath 强直性脊柱炎疾病活动度指数(BASDAT)(Garrett 等(1994)J Rheumatol 21:2286), Bath 强直性脊柱炎测量学指数(BASMI)(Jenkinson 等(1994)J Rheumatol 21:1694), 和 Bath 强直性脊柱炎功能指数(BASFI)(Calin 等(1994)J Rheumatol 21:2281)。这些指标可以用来随时间对患者监测并且确定改善情况。下面进一步描述这些标度的每一个:

用于测定 AS 的临床病程的标准

评定关节强直性脊柱炎(ASAS20)是关键期 3 AS 研究的关键点。四个区中≧3 个中, ≧20%改善和绝对改善≧10 单位(0-100 标度): 患者综合评定, 疼痛, 机能, 和炎症。在潜在的剩余区域中一定不存在变

坏(变坏定义为≧20%更不好和最终恶化≧10 单位(0-100 标度)。

2. Bath 强直性脊柱炎疾病活动度指数(BASDAT)能用来评定 AS 患者疾病活动水平。BASDAI 焦点在于 AS 炎症方面的指征和症状，夜间和总的疼痛，患者综合评定和脊柱可动性的实际物理测量，例如 Schober's 试验，胸部扩张得分和枕骨壁测量。BASDAI 以与疲劳，脊柱疼痛，外周关节炎，外因病(腱/韧带/关节囊进入骨中的点处的炎症)，和初期强直相关的六个问题为基础测定疾病活动度。在疲劳，脊柱和外周关节疼痛，局部触痛，和初期强直的 10 厘米水平视觉模拟标度测量严重程度回答这些问题(定性和定量)。最后的 BASDAI 得分范围是 0-10。

3. Bath 强直性脊柱炎功能指数(BASFI)测量 AS 引起的身体功能减退，是关于 AS8 个具体问题组成的自身评定仪器，两个问题反映患者应付每天生活的能力。每个问题都在 10-cm 水平目测模拟标度上回答，其平均值给出 BASFI 得分(0-10)。

4. Bath 强直性脊柱炎测量学指数(BASMI)有 5 项简单的临床量度组成，提供复合指数并且确定 AS 疾病情况。测量学(20 项量度)分析鉴定最精确反映中间状态的这 5 项量度：颈部转动，耳屏到壁的距离，外侧屈曲，改进的 Schober's 试验，和踝间距。BASMI 快速(7 分钟)，可重复，并且对整个疾病时期中的变化灵敏。BASMI 指数包括 AS 髋部和脊柱运动的 5 项量度。这 5 项 BASMI 量度分值是 0(轻的)至 10(严重的)，包括耳屏到壁的距离，颈部转动，腰部屈曲，腰侧屈曲，和踝间距离。

综合上面提到的标准，用来评定患者。另外，放射照相术，MRI，以及骨和软骨退化标志能用来确定 AS 患者的疾病活动度。

对活动的 AS 人患者检查 D2E7 的临床研究

在持续数周的安慰剂-对照临床试验中对患者 s. c 施用一定剂量的 D2E7，并且第二年每 2-6 周复查，以确定 AS 症状是否减轻或治愈。研究中使用在治疗类风湿性关节炎中有效而安全的每间隔一周施用 40 mg 的剂量。该项研究只选择具有确诊的活性 AS 患者，即有下面 3 项标准-BASDAI 指数中的 2 项，对于疼痛的视觉模拟得分(VAS)和存在初期强直。上面更详细地描述量 BASDAI 指数。为了在该项研究中登记，患者在筛分和基础情况下必须具有明显的疼痛，10-cm VAS 下疼痛得

分>4 并且 BASDAI 得分≧4。

在研究中允许使用改变疾病状况的抗风湿药(DARDS)或其他免疫抑制剂。如果患者每天泼尼松等价剂量<10 mg，则让患者登记。

为了记录每位患者医疗史和当前的结果，在研究登记之前进行筛分检查。从各位患者获得下面的信息：初期强直(持续时间和严重程度)，前眼色素层炎发生(发作次数和持续时间)，红肿的外周关节的数目。对于每一位患者，获得椎骨柱和骶髂关节的放射照片。也利用核磁共振成像记录登记的患者的脊柱。

将患者随机分成试验组和安慰剂组，以患者不知情的方式每两周施用 D2E7 或安慰剂，直到 12 周或 24 周。以治疗类风湿性关节炎有效使用的 20 至 80 mg 的剂量施用 D2E7；测得 40 mg 剂量有效。治疗脊柱炎可能需要更高剂量，因此在该项研究中使用更高剂量(对没有反应的患者和没有用甲氨喋呤的患者每周施用 40 mg)。计算实现 ASAS20 的患者的百分比。

实施例 3：对牛皮癣患者关节炎的临床研究中的 TNF 抑制剂

牛皮癣患者关节炎人患者中的 D2E7

对于该项研究选择任何亚型的中等程度至严重程度牛皮癣患者关节炎患者(末梢指节间关节关节炎，关节炎毁形，对称多关节炎，不对称少关节炎和/或脊柱关节病)。患者对非甾体抗炎药(NSAIDs)或改变疾病的抗风湿药(DMARDs)或者失败或者不耐受。单独进行治疗和/或与 NSAIDs 和 DMARDs 联合。

评定的剂量范围包括每隔一周 40 mg，这是发现的对患者治疗类风湿性关节炎最有效的 D2E7 剂量。也研究较高剂量(每周 40 mg)。研究与安慰剂同时进行 12 至 24 周，接着进行开放标记治疗以确定长期安全性和有效性。

在筛分，基线，以及治疗期间经常对患者临床检查。通过 American College of Rheumatology 对于 12 周改善的初步标准(ACR20)测定指征或症状的最初效果。另外的初期终点包括评定 6-12 个月的放射学改变，以评定结构损伤的变化。在治疗期间进行多个其他评定，包括牛皮癣关节炎反应标准(PsARC)，生活质量量度，和皮肤评价，以确定对牛皮癣损伤(牛皮癣面积严重程度指数(PASI)和目标损害评定)的功效。

实施例 4：哮喘小鼠模型中的 TNFα抑制剂

使用卵白蛋白(OVA)-诱导的变应性哮喘小鼠的 TNF 抗体研究

在下面治疗变应性哮喘的研究中使用变应性哮喘小鼠 OVA 模型(Hessel，E. M.，等(1995)Eur. J. Pharmacol. 293:401；Daphne，T.，等(2001)Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 25:751。

所有的小鼠对 OVA 致敏(鸡蛋白蛋白，粗制级 V; Sigma, St. Louis, MO)。通过间隔一天(每天一次)腹膜内注射七次在 0.5 ml 无热原盐水中的 10 微克 OVA，没有辅药，进行活性致敏。最后一次致敏之后三周，对小鼠进行 16 次 OVA 攻击(2 mg/ml，在无热原盐水中)或 16 次盐水气雾剂攻击 5 分钟，在连续的几天内(每天一次气雾剂)。另外一组小鼠首先接受 8 次 OVA 气雾剂，接着 8 次盐水气雾剂(OVA/盐水，自主消退组)。

对于针对变应性哮喘更严重进行的模型的试验，通过两次腹膜内注射(分别 7 天)0.1 毫升明矾-沉淀的抗原的活性致敏使所有的小鼠致敏，包括吸附到 2.25 mg 明矾(AlumImject; Pierce，Rockford，IL)中的 10 微克 OVA。第二次致敏之后两周，对小鼠进行六次 OVA 攻击(10 mg/ml，在无热原盐水中)或每第三天六次盐水气雾剂攻击 20 分钟(第三天一次气雾剂)。另外一组小鼠首先接受 3 次 OVA 气雾剂，接着 3 次盐水气雾剂(OVA/盐水，自主消退组)。

在连接 Pari LC Star 喷洒器(PARI Respiratory Equipment，Richmond，VA; 粒度 2.5-3.1 微米)的有机玻璃暴露箱(5 升)中进行气雾剂处理，喷洒器由 6 升/分钟流速的压缩空气驱动。对不多于 8 只动物的组给与气雾剂。

根据本领域公知的标准方案，在第二次致敏之后，以一定范围剂量，对 OVA 致敏小鼠施用已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci US A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。还施用合适的安慰剂对照物。

应用气压全身体积描记法通过记录反应吸入的乙酰甲胆碱(乙酰-甲基胆碱氯化物; Sigma)的呼吸压力曲线，对有意识的无限制的小鼠测量气道反应能力。简要地说，将小鼠放在全身小室中，获得基础读数并且三分钟平均。雾化盐水，接着将乙酰甲胆碱浓度加倍(范围是

1.6-50 mg/ml 盐水)，喷雾三分钟，并且每次喷雾之后读取读数，3 分钟平均。通过反复测量的一般线性模型统计学分析对乙酰甲胆碱的剂量-反应曲线(DRCs)，接着在各组之间进行 post-hoc 比较。在对所有的补偿差异分析之前将数据进行 LOG 转换。

体内气道反应能力测量之后，通过腹膜内注射 1 毫升的 10%氨基甲酸乙酯无热原盐水溶液(Sigma)处死小鼠。接着，用心脏穿刺术对小鼠取血，通过 ELISA 测定 OVA-特异性 IgE。简要地说，在 4℃下用在磷酸缓冲盐水(PBS)中稀释的 2 微克/毫升大鼠抗-小鼠 IgE(克隆 EM95)包被微量滴定板(Nunc A/S，Roskilde，Denmark)过夜。第二天，在室温下进行 ELISA。用 ELISA 缓冲液(PBS，含有 0.5%牛血清白蛋白[Sigma]，2 mM EDTA，136.9 mM NaCl，50 mM Tris，0.05% Tween-20[Merck，Whitehouse Station，NJ] pH 7.2)封闭 1 小时之后，加入在 ELISA 缓冲液中稀释的血清样品 2 小时并且复制标准曲线(1:10 开始)。通过用 OVA 腹膜内免疫获得 OVA-特异性 IgE 参考标准并且人为设定 10,000 实验单位/ml(EU/ml)。接种之后，经 5 小时加入 1 微克/毫升与地高辛配基(DIG)偶联的 OVA，从在 ELISA 缓冲液中含有 DIG-3-o-甲基羰基-5-氨基己酸-N-羟基-琥珀酰亚胺-酯(Roche Diagnostics，Basel，Switzerland)的试剂盒制备，接着用在 ELISA 缓冲液中以 1:500 稀释的与辣根过氧化物酶(Roche Diagnostics)偶联的抗-DIG-Fab 片段温育 1 小时。用 o-苯二胺-二氯化物底物(0.4 mg/ml，Sigma)和 4 mM H_2O_2 的 PBS 溶液显示颜色并且通过加入 4 M H_2SO_4 终止。使用 Benchmark 微量滴定板(Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA)读取 492 nm 的光密度。ELISA 的测定限制是 0.5 EU/ml IgE。

对小鼠取血之后立即进行支气管肺泡灌洗(BAL)。简要地说，用温热至 37℃的 1 毫升等份的无热原盐水通过气管插管将气道灌洗 5 次。集中灌洗出的液体，将细胞沉积(32x g，4℃，5 分钟)并且重新悬浮于 150 微升冷的 PBS 中。使用 Bürker-Türk 计数室(Karl Hecht Assistent KG，Sondheim/Röhm，德国)测定 BALF 中的细胞总数。对于不同的 BALF 细胞计数，制备 cytospin 制剂并且用 Diff-Quick(Dade AG，Dudingen，瑞士)染色。对于每个 cytospin，计数 400 个细胞，并且通过标准形态学方法分为单核细胞(单核细胞，巨噬细胞，和淋巴细胞)，嗜酸性细胞，和嗜中性白细胞。利用非参数 Mann-Whitney Utest 进行

统计学分析。

根据先前的描述测定抗原反复刺激肺组织中的 T 细胞而产生细胞因子(Hofstra，C. L.，等(1999)Inflamm. Res. 48:602)。简要地说，如上所述对肺灌洗，并且通过右室灌注 4 毫升含有 100 U/ml 肝素的盐水，去除所有的血和血管内白细胞。取出全部肺组织并且转移到冷的无菌 PBS 中。然后将肺切碎并且在 37℃下在含有 2.4 mg/ml 胶原酶 A 和 DNA 酶 I(II 级)(都购自 Roche Diagnostics)的 3 ml RPMI 1640 中消化 30 分钟。通过加入胎牛血清(FCS)终止胶原酶活性。用 10 ml RPMI 1640 将肺组织消化物通过 70-微米尼龙细胞过滤器(Becton Dickinson Labware，Franklin Lakes，NJ)过滤，获得单细胞悬浮液。将肺细胞悬浮液洗涤，重新悬浮于培养基(RPMI 1640，含有 10% FCS，1% glutamax I，和庆大霉素[都来自 Life Technologies，Gaithersburg，MD])，和 50 mM β-巯基乙醇(Sigma)中，并且使用 Bürker-Türk 计数室测定肺细胞总数。在圆底 96-孔板(Greiner Bio-One GmbH，Kremsmuenster，奥地利)中，在 OVA(10 微克/ml)或者仅有培养基存在下，培养肺细胞($8x10^5$ 肺细胞/孔)。作为正对照，在与板结合的大鼠抗-小鼠 CD3(克隆 17A2，50 微克/ml，4℃下包被过夜)存在下培养细胞。每一次体外刺激都进行三次。37℃下培养 5 天之后，收集上清液，集中每一次粗集收集的上清液，并且在-20℃下保存，直到通过 ELISA 测定细胞因子水平。

根据生产商说明书(PharMingen，San Diego，CA)进行 IFN-γ，IL-4，IL-5，IL-10，和 IL-13 ELISAs。ELISAs 的检测限度对于 IFN-γ是 160 pg/ml，对于 IL-4 是 16 pg/ml，对于 IL-5 是 32 pg/ml，和对于 IL-10 和 IL-13 是 100 pg/ml。

在所有的实验中，对每一只小鼠最后攻击之后 24 小时测定气道对乙酰甲胆碱的反应能力，血清 OVA-特异性 IgE 水平，BALF 中细胞浸润，和肺组织中 T-细胞反应。

BALF 中单核细胞(单核细胞，巨噬细胞，和淋巴细胞)，嗜酸性细胞，和嗜中性白细胞数目减少，气道超反应能力减退，肺组织中抗原反复刺激 T 细胞的细胞因子生产减少，标记试验小鼠哮喘改善。

实施例 5：呼吸病(COPD)小鼠模型中的 TNFα抑制剂

对肺泡扩张和炎症的检查治疗研究

使用吸烟诱导的 COPD 小鼠模型进行下面的研究(Keast，D.等

(1981)J. Pathol. 135:249; Hautmaki, R. D., 等(1997)Science 277:2002)。在对吸烟的反应中，炎性细胞聚集在肺中，接着观察到肺气肿生理学变化特征。以前的研究表明吸烟的第一个月内开始进行性炎症细胞聚集，接着吸烟之后 3-4 个月气腔扩大(Hautmaki 等(1997)Science 277:2002)。

使用适合小鼠的吸烟装置，让小鼠每天，每周 6 天，6 个月吸入没有过滤嘴的香烟。没有吸烟的年龄匹配的动物用作对照物。如上所述吸烟 6 个月后，根据本领域公知的标准方案，以一定范围剂量，施用已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci US A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。还施用合适的安慰剂对照物。对小鼠施用抗体治疗 21 天的时间。处死小鼠，接着检查肺容量和顺应性，细胞因子量度，组织学粘液指数量度，肺泡管扩张，气腔量度，肺泡和间质巨噬细胞计数和肺泡大小，如下所述。

抗体治疗之后，对状态好的动物进行支气管灌洗；钝器解剖法分开气管，插入小管径导管并且固定在气道中。滴注两体积的 1.0 ml 的 PBS 和 0.1% BSA，小心抽吸，并集中。将每个 BAL 液体样品离心，并且在使用之前将上清液在-70℃下保存。细胞因子测定如实施例 5 所述。

为了测定肺容量和顺应性，将动物麻醉，对气管插套管，通过“T”部接合向肺通入 100%O_2。然后夹住气管，氧被吸收到进行的肺灌注表面。在除气之后，整块取出肺和心，并且在逐渐增加的压力下用 PBS 膨胀，从 0 至 30 cm。每 5-cm 间隔，通过容量置换评价肺的大小。接受治疗的动物的肺容积相对安慰剂治疗的对照动物有所增加表明 COPD 改善。

对于组织学分析，处死小鼠并且进行中胸骨切开术，用没有钙和镁的 PBS 进行右心室灌注，洗清肺血管内空间。然后将肺固定于一定压力(25 cm)，用中性缓冲 10%福尔马林，在 10%福尔马林中过夜，包埋在石蜡中切成 5 微米并且用苏木子和曙红(H & E)和有淀粉酶的高碘酸-Schiff(D-PAS)染色。

组织学粘液指数(HMI)提供每单位气道基膜 D-PAS$^+$上皮细胞百分比量度。从 D-PAS-染色切片计算(Cohn, L., 等(1997)J. Exp.Med.

186:1737)。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的 HMI 减小，表明 COPD 改善。

利用 50-线计数网(10-mm 总长)以 x200 倍对来自 15 个随机场地的每一只小鼠计算 Lm，气腔大小的指标。结果是俩个独立观察员的量度的平均值。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的气腔大小增大，表明 COPD 改善。

为了测定肺泡管扩大，使用 Optimus 5.2 影像分析软件(Optimus，Bothell，WA)，测量从末端细支气管肺泡管扩充 250 微米至导管中的近接表面面积。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的肺泡管大小减小，表明 COPD 改善。

通过计数鼠 Mac-3(抗小鼠的大鼠抗体(0.5 mg/ml)鉴定的巨噬细胞来定量测定肺泡和间质巨噬细胞，鼠 Mac-3 以 1:4000 稀释度使用；PharMingen，San Diego，CAO 免疫染色，使用抗生物素蛋白-生物素碱。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的肺泡和间质巨噬细胞数目减少，表明 COPD 改善。

从气道平均带长估计肺泡大小(Ray，P.，等(1997)J. Clin. Invest. 100:2501)。这个量度类似于平均线性截距，一种气腔大小的标准量度，但是有着不依赖于肺泡间隔厚度的好处。如上所述制备切片。为了获得随机分析的影像，将每一个载玻片放在印刷成直角的网格中，并且一系列点放在网线交叉点的盖玻片上，即以大约 1 毫米的间隔。通过系统扫描 2-mm 间隔获得尽可能接近每一个点的区域。放弃含有可鉴定的人工产物或非肺泡结构例如支气管血管束或胸膜的区域。

通过框架钩板将每只小鼠肺的最少 10 个区域获取到 Macintosh G3 计算机(Apple Computer Inc.，Cupertino，California，USA)中。每微米 1.5 象素最终放大率以 8-bit 灰色-等级获得成像。使用 NIH 的 Wayne Rasband 写的公共区域 NIH 成像程序，使用从网点(http://rsb. info. nih. gov/nih-image)可获得的商业协议，在 Macintosh 计算机上分析成像。对成像手工界定阈值，然后使平整并反转。然后对成像进行有序逻辑成像匹配“和”用水平的然后用垂直的网格操作。对于每一只动物进行每一个区域的至少 300 次测量。将气腔之上的空气平均为平均带长度。带长度随着肺泡扩张而增大。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的肺泡大小增大，表明 COPD 改善。

实施例 6：特发性肺纤维化(IPF)小鼠模型中的 TNFα抑制剂

使用博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠模型对 IPF 治疗的研究

使用博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠模型进行下面的研究(Bowden，D. H.的综述文章(1984)Lab. Invest. 50:487；Tokuda，A.，等(2000)J. Immunol. 164:2745)。

对 8-10 周龄的 C57BL/6J 雌性小鼠施用硫酸博莱霉素。简要地说，i. p.注射 200 微升 5 mg/ml 戊巴比妥麻醉 C57BL/6J 小鼠，接着气管内滴注 50 微升无菌水中 3 mg/kg 硫酸博莱霉素。

如上所述，气管内滴注博莱霉素之后，对博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠施用一定剂量范围的已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27；Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784；BD Biosciences Pharmingen)。也给与合适的安慰剂对照物。每天处理小鼠两次，持续 14 天。

博莱霉素处理之后 20 和 60 天处死小鼠。组织在 10%缓冲的福尔马林中固定并且包埋在石蜡中。用苏木紫和曙红对切片染色并且通过光学显微镜检查。如下所述测定肺-浸润白细胞计数，细胞因子量度，和总的肺胶原含量。

根据 Smith 等(1994)J. Immunol. 153:4704 所述制备 BAL 细胞和肺-浸润白细胞。简要地说，麻醉之后，通过气管内插管在肺中滴注 1 ml PBS 并且抽取 5 次。收集 BAL 液体并且在 RBC 溶解之后测定全部白细胞计数。Cytospin 离心之后测定细胞差别。用 Diff-Quik 产品(Baxter，Miami，FL)对样品染色。

为了分离肺-浸润白细胞，用盐水对肺灌注，从胸腔剥离，然后用剪刀剪碎。每个样品在 37℃下在摇床中在 15 ml 消化缓冲液(10% FCS，在 RPMI 1640 中，有 1%胶原酶；Wako Pure Chemical，Osaka，日本)中温育 30 分钟。接着，将样品压过尼龙网并且在淋洗之后悬浮于 10% FCS-RPMI 1640 中。细胞悬浮液用 Histopaque-1119(Sigma，St. Louis，MO)处理并且以 2000 rpm 离心 20 分钟，去除肺薄壁组织细胞和 RBC。将沉积物在淋洗之后重新悬浮于 2.5% FCS-PBS。进行细胞计数之后，进行流式血细胞计数免疫荧光分析。

根据先前描述的(Yoneyama 等(1998)J. Clin. Invest. 102:1933；

Murai 等(1999)J. Clin. Invest. 104:49)，使用 Epics Elite 细胞分类装置(Coulter Electronics，Hialeah，FL)对外周血白细胞和肺-浸润白细胞进行免疫荧光分析。用 RBC 溶解缓冲液从正常小鼠制备外周血白细胞。和 Fc Block(抗-CD16/32; PharMingen，San Diego，CA)温育 10 分钟之后，用抗 CD3，CD4，CD8，CDllb，CDllc，和 Gr-1(PharMingen)的 PE-偶联的 mAb 对细胞染色，并且还用 20 微克/ml 的兔抗-CCRl 多克隆 Ab 染色，接着用 FITC-偶联的山羊抗兔 IgG(Leinco Technologies，St. Louis，MO)染色。分析之前，进行 propidium 碘化物(Sigma)染色，去除死亡的细胞。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的肺浸润白细胞数目减少，表明 IPF 改善。

如下进行肺样品的免疫组织化学：根据现有技术描述(Yoneyama 等(1998)J. Clin. Invest. 102:1933; Murai 等(1999)J. Clin. Invest. 104:49)制备肺样品。简要地说，肺样品固定在高碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛中，用含有蔗糖的 PBS 洗涤，包埋在 Tissue-Tek OCT 化合物(Miles，Elkhart，IN)中，在液氮中冷冻，并且用低温控制器切成 7-微米-厚切片。内源过氧化物酶活性抑制之后，切片与第一种 Ab 温育。使用的 Abs 是兔抗-CCRl Ab，大鼠抗-F4/80(BMA Biomedicals，Geneva，瑞士)，大鼠抗-CD4，大鼠抗-CD8，大鼠抗-Gr-1(PharMingen)，大鼠抗-非淋巴样树突状细胞(NLDC)-145，和大鼠抗-II 类 MHC(BMA Biomedicals)。作为负对照，分别使用兔 IgG 或大鼠 IgG。它们依次用 HRP-偶联山羊抗-兔 IgG(Cedarlane Laboratories，Hornby，Ontario，加拿大)或 HRP-偶联山羊抗-大鼠 IgG(BioSource International，Camarillo，CA)处理。用 3,3'-二氨基联苯胺(Wako Pure Chemical)或 3-氨基-9-乙基咔唑底物试剂盒(Vector Laboratories，Burlingame，CA)染色之后，样品用 Mayer's 苏木紫计数染色。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的 CCR1 减小，CD4+T 细胞，CD8+T 细胞，非淋巴样树突细胞(NLDC)，和携带 II 类 MHC 的细胞数目减少，表明 IPF 改善。

根据生产商说明书，使用 Sircol 胶原分析试剂盒(Biocolor，北爱尔兰)，通过分析总的可溶性胶原，测定总的肺胶原含量。简要地说，在施用博莱霉素之后第 14 天收集肺，并且在含有大约 1 毫克胃蛋白酶/10 毫克组织残留物的 10 ml 0.5 M 乙酸中匀浆。搅拌下每个样品在 4℃下

温育 24 小时。离心之后，测定 200 微升的各种上清液。向各样品加入与胶原结合的 1 毫升 Sircol 染料试剂，然后混合 30 分钟。离心之后，将沉积物悬浮于试剂盒中包括的 1 毫升碱性试剂中并且在 540 nm 用分光光度计读数。使用胶原标准溶液构建标准曲线。胶原含有大约 14% 重量比的羟基脯氨酸，根据生产商的数据用羟基脯氨酸含量校正该方法获得的胶原含量。与安慰剂治疗的对照动物相比，接受治疗的动物的肺胶原含量减小，表明 IPF 改善。

使用博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠模型，对小鼠检查 BAL 细胞数量的减少，外周血白细胞减少和肺浸润白细胞减少。还对小鼠检查与安慰剂治疗小鼠相比的 D2E7 治疗小鼠总的肺胶原含量减少。

实施例 7：哮喘治疗中的 TNFα抑制剂

患有哮喘的人患者 D2E7 的临床研究

如果 12 至 65 岁患者具有至少两年哮喘的诊断病历并且还具有证实的可逆支气管痉挛，在头 6 个月中施用舒喘宁之后 FEV1 增加 15% 或更多，则是合格的。附加包含标准包，基础 FEV1 在预知正常值的 50%和 80%之间，除了哮喘之外没有任何临床明显的疾病，有每天使用吸入的皮质类固醇历史，并且在开始研究之前终止所有的β2-激动剂 30 天。

在筛分观察之后 7 天内进行基础观察。所有的患者接受 FEV1 评定并且进行完全身体检查。进行肺部听诊和咽喉检查，并且评定哮喘症状。将合格的患者随机分为处理组，包括安慰剂组。

基础测量之后，患者开始接受治疗。他们是随机化的，并且以患者不知情的方式用 D2E7 或安慰剂治疗。在第 15 和 29 天，重复在基础观察时进行的所有的实验。还进行 12-lead ECG。回顾日记簿，对患者确认其他药疗法的使用以及任何不利的事件。

每一次探视以呼吸量测定法测试确定改善状况。这些包括 FEV1，最高呼气流速(PEFR)，用力肺活量(FCV)，和 25%至 75%的 FVC 下的用力呼气流。最后探视的 FEV1 认为是功效的初级量度。比较患者进行的每天两次的 PEFR 试验并且计算解救药疗法吸入数量。严格表征患者/医生对哮喘症状的评定(喘鸣，胸紧，呼气短促和咳嗽)。通过回顾患者日记卡和通过收集没有使用的研究药疗法评定顺应性。

实施例 8：COPD 治疗中的 TNFα抑制剂

对患有 COPD 的人患者检查 D2E7 的临床研究

研究人群是诊断有 COPD 的年龄 40-80 岁的男性和女性患者。患者必须具有最好的 FEV1/FVC 比＜0.70 升，固定的气道梗阻，施用舒喘宁之后 FEV1 增加＜15%或＜200 ml(或者两者)来确定，或者施用舒喘宁之后预计 FEV1 在 30 和 70%之间。患者还必须是目前或以前的吸烟者，吸烟史＞10 包年。

基础测量之后，患者开始接受治疗。他们是随机化的，并且以患者不知情的方式用 D2E7 或安慰剂治疗。

预支气管扩张药 FEV1 研究药疗法和 St. George's Respiratory Questionnaire 总得分基线变化之后(Jones，P. W.，等(1991)Resp. Med. 85(增刊):25)，预剂量基线增加标示改善，所述总得分指示患者生活质量的改善。根据低潮自基线 FVC 的增加，至第一次 COPD 恶化的时间的延长，以及运动后喘息程度自基线的降低，可见到改善(改进的 Borg Scale；Stulbarg，M.，Adams，L. Dyspnea.于：Murray J，Nadel J，编著，Textbook of Respiratory Medicine. Philadelphia，PA：WB Saunders，2000；541-552)。安全性的量度是可逆事件，致命信号，所有双盲探视的心电图，和实验室评定。

实施例 9：IPF 治疗中的 TNFα抑制剂

对 IPF 人患者的 D2E7 临床研究

将 D2E7 治疗对安慰剂治疗进行比较，进行多中心，双盲，安慰剂对照研究。如果患者组织学证实 IPF 并且在开始研究之前 12 个月时间内肺功能下降至少 10%，则患者对于该项研究是合格的，不管用糖皮质激素或其他免疫抑制剂或者两者连续或反复治疗至少 6 个月。用来鉴定 IPF 的主要组织学特征是存在胸膜下和腺泡周纤维化损伤，只有较少细胞浸润。在高分辨计算机 X 线断层摄影术上不存在两侧不完全渗出物和证实损伤主要在外周分布是鉴定该疾病的放射学标准。有着接触已知引起肺纤维化的有机或无机灰尘史的患者以及有结缔组织疾病或者其他慢性肺疾病的那些患者除外。以总的肺容量为基础鉴定的最后阶段 IPF 小于预测正常值的 45%的患者也排除在外。获得重复肺功能试验，FVC，总的肺容量(TLC)，和氧饱和度的基线值。

基础测量之后，患者开始接受治疗。他们是随机化的，并且以患者不知情的方式用 D2E7 或安慰剂治疗。

IPF患者改善包括研究的患者总成活率增加，FVC，总肺容量(TLC)和氧饱和度改善。肺功能改善定义为FVC或TLC预定值增加10%或更大，或者呼出空气，静止或呼吸困难相同部分氧饱和度增加3%或更大。每一次相同方式测量减小认为是恶化。没有证实改善或恶化的患者认为是稳定的。

实施例10：减小炎症或再狭窄中的TNFα抑制剂

使用小鼠冠状动脉模型的再狭窄研究

使用小鼠冠状动脉模型进行下面的再狭窄研究(Kumar 和 Lindner(1997)Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17:2238; de Waard 等(2002)Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22:1978)。通过腹膜内(i. p.)注射塞拉嗪溶液使2-4月大的小鼠麻醉。切割左侧共有颈动脉并且在接近颈动脉分叉的地方结扎。然后让小鼠恢复。

对试验组施用已知结合并中和小鼠TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci US A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。每周每天对小鼠皮下注射抗-TNF抗体或安慰剂。结扎颈动脉之后2.5或4周，处死小鼠，接着通过用4%低聚甲醛的PBS溶液灌注固定。切除颈动脉，浸在70%(v/v)乙醇中，并且包埋在石蜡中。没有结扎的右颈动脉作为D2E7注射和安慰剂注射小鼠的内部对照物。根据上文Waard等所述，切除一连串切片用于形态学分析。

形态学分析提供处理的和没有处理的结扎的颈动脉在自一般医生的参考点的一定设置距离的总的血管面积的量度。先前已经证明结扎导致动脉变窄(构成改型)(Kumar 和 Lindner，上文；Kumar 等(1997)Circulation 96:4333)。颈动脉交叉切片安装在显微镜的载玻片上并且用苏木紫和曙红染色。使用显微数字照相术获得颈动脉成像并且对内膜和血管中层的交叉横截面面积测量与安慰剂注射小鼠相比动脉狭窄的减小(即，更大的血管直径)。

实施例11：动脉粥样硬化猴模型中的TNFα抑制剂

动脉粥样硬化猴模型中D2E7的作用

使用饮食诱导的动脉粥样硬化猴模型进行下面的研究(Lentz SR 等(2002)Circulation 106(7):842-6; Sundell CL 等(2003)305(3):1116-23)。

对成年cynomolgus猴子(Macaca fascicularis)喂以含有0.7%胆固

醇和 43%总卡路里作为脂肪的致动脉粥样硬化食品。喂以致动脉粥样硬化食品 44±1 个月之后，对动物服以镇静剂氯胺酮(20 mg/kb IM)并且戊巴比妥钠麻醉(20 mg/kg IV)。将非阻塞性导管插入腋动脉获得血液样品，并且对腋静脉插入套管施用 D2E7 或安慰剂和补充的麻醉剂(每小时戊巴比妥钠 5 mg/kg)。D2E7 表现出对各种物种，包括 cynomolgus 猴子，有效抑制 TNFα活性(参见美国专利 6,258,562)。

灌注 D2E7 或安慰剂之前，从腋动脉导管取血直接放到 1/10 体积的 3.8%柠檬酸钠中用于止血分析。收集之后，立刻将血液样品放到冰上，并且通过在 4℃下以 2500 g 离心分离血浆。将另外的血液样品收集到血清分离器试管中用于胆固醇检测或者放入到用 3.4 毫摩尔/L EDTA 制备的血清分离器试管中用于检测总的血浆高半胱氨酸(tHCY)。

通过腋静脉导管经 10 分钟灌注 10 毫升生理盐水中的 D2E7 或安慰剂。灌注之后，有规则地收集血液样品。

以各种方式评定治疗之后动物所患有的动脉粥样硬化的程度。从猴子有规律地获得血清样品并且分析总的胆固醇，HDL 胆固醇，LDL 胆固醇，tHCY 和甘油三酸酯。对接受治疗的猴子检查与安慰剂治疗的猴子相比，总的胆固醇，LDL 胆固醇，和 tHCYT 水平是否降低，HDL 水平是否升高。

实施例 12：TNFα治疗患者再狭窄

再狭窄人患者的 DSE7 研究

选择接受囊血管成形术的患者进行研究，因为他们有血管成形术之后头 6 个月内发生再狭窄的增大的机会。

治疗之前，关于引导导管作出血管和损伤参数估计。估计包括引用血管直径(RVD)，预处理最小腔直径(MLD，(RVD X[1-预操作百分比直径再狭窄])，操作后 MLD(由(RVD X[1-操作后百分比直径再狭窄])测定)，急速增大(操作后 MLD-操作前 MLD)，病变血管数目和交换的血管的数目。

对试验组患者施用两周或周剂量 40 毫克的 D2E7 或安慰剂。普通技术人员根据再狭窄知识可以确定剂量。血管成形术之后 6 个月对患者评估以确定再狭窄是否发生。对患者评估 9 个月和长时间，以确定由于治疗防止或减轻再狭窄的那些组中延迟的再狭窄效果。D2E7 治疗

之后记录血管和损伤参数估计。进行统计学分析来比较患者再狭窄程度(Jackson 等(2003)Am Heart J 145:875)。

实施例 13: TNFα抑制剂治疗心衰

对心衰人患者 D2E7 的临床研究

对于该项研究选择患有稳定的纽约协会(NYHA)II 或 IV 类心衰并且左心室排出量小于 35%的患者。以 NYHA 标准，III 类患者确定为活性明显受限的那些，即，他们只有在休息时感到舒服，IV 患者定义为应该完全休息的那些，即，应该在床上或椅子上，或者任何身体活动带来不舒适和休息时发生的症状。根据 Burns 等描述，左心室排出量与 6 个月死亡率有关(Burns 等(2002)JAm Coll Cardio. 39:30)。

患者两周接受 P40 mg 剂量的 D2E7，或者剂量由普通技术人员对心衰的知识调节。对照组接受安慰剂。患者在 1，2，6，10，14，20，和 18 周接受检查。每一次探视，对每一位患者检查并且给出他们相对于研究开始时状态的总的心衰状态的评定，即，评价他们的 NYHA 类别。心衰研究结束时，将患者最后的 NYHA 类与最初的 NHYA 类相比较。

实施例 14: 糖尿病小鼠模型中的 TNFα抑制剂

NOD 小鼠模型中 TNF 抗体的研究

使用 1 型糖尿病非肥胖糖尿病(NOD)小鼠模型进行下面的研究。在研究开始时，通过检测 NOD 小鼠血液中葡萄糖水平确定胰岛素水平。通过让小鼠禁食过夜(17 小时)确定基础胰岛素水平。检查血液葡萄糖水平，并且在施用葡萄糖之后 4 分钟再次检查。用反射计量器测定血液葡萄糖。将 1 毫升注射器中的葡萄糖(200 mg/mL，在 0.85%氯化钠中)温热至 40℃，并且以 3 g/kg 体重剂量对小鼠 ip 注射。施用葡萄糖之后 4 分钟测定第二次血葡萄糖量度。使用 Glucometer Elite，用第二次血液测量样品来测定血液葡萄糖水平。将残余的血液样品收集到微量试管中并且用于对血清分离胰岛素或 C-肽测定。使用啮齿动物放射免疫分析试剂盒(RIA)根据生产商的说明或者使用酶联免疫测试(ELISA)测定胰岛素水平。

根据血液葡萄糖读数大于 300 mg/dL 的标准选择糖尿病小鼠。选择非糖尿病小鼠使得他们的葡萄糖量器的葡萄糖读数 200 mg/dL 之下。让 NOD 小鼠(显示如上所述葡萄糖读数的那些)发展糖尿病，并且

给与安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体剂量，例如抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等 (1992)Proc Natl Acad Sci US A. 89:9784； BD Biosciences Pharmingen)。小鼠每天接受皮下注射的 TNF 抗体或安慰剂。每周增加测量胰岛素和葡萄糖水平来确定血液葡萄糖水平是否降低。

实施例 15: 糖尿病小鼠模型中的 TNFα抑制剂

2 型糖尿病小鼠模型中 TNF 抗体的研究

使用 NSY 小鼠模型(2 型糖尿病)进行下面的研究(Ueda 等，Diabetes Vol. 48, May 1999, 1168:1174)。NSY 小鼠接近模拟人 2 型糖尿病在于，发生是年龄依赖性的，动物没有严重的肥胖，胰岛素抗性和对葡萄糖的削弱的胰岛素反应有助于疾病的发展。该项研究评定很多表型数据，包括小鼠的葡萄糖水平，胰岛素水平，身高和体重。

根据标准技术对 NSY 小鼠测定葡萄糖，包括通过静脉内葡萄糖耐受分析。在开始研究之前 12 周之前测定基础葡萄糖抗性，相应地对葡萄糖，胰岛素，身高和体重作图。

对 NSY 小鼠施用一定剂量的安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等 (1995)Shock 3:27； Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。小鼠每天接受皮下注射的 TNF 抗体或安慰剂。在开始研究之后第 0，12，24，36，和 48 周腹膜内施用葡萄糖之后 120 分钟进行葡萄糖水平测定，来检查葡萄糖耐受性是否降低。

实施例 16: 肥胖小鼠模型中的 TNFα抑制剂

肥胖小鼠模型中 TNF 抗体的研究

使用肥胖小鼠(ob/ob)鼠模型进行下面的研究。对小鼠评价体重减轻和它们的身体质量指数的减小。肥胖小鼠的特征在于显著肥胖，饮食过多，暂时高血糖和与朗格罕氏岛的β细胞的数量和大小增加有关的显著升高的血浆胰岛素浓度(Coleman，上文)。以体重为基础，在大约 26 天年龄，肥胖小鼠(ob/ob)表型上与它们的瘦同窝幼仔(ob/+和+/+)显著区别。肥胖小鼠体重增长快并且在 5 周龄时显著肥胖。肥胖小鼠在 7-8 月龄时达到 60-70 克最大体重，而瘦同窝幼仔在 3-4 个月时达到它们 30-40 克最大体重(Coleman，上文； Westman(1968)Diabetologia

4:141; Bray & York(1971)Physiological reviews. 51:598)。

. 称量 13 周龄 ob/ob 小鼠和匹配的野生型对照小鼠，确定基线体重。对小鼠施用一定剂量的安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。小鼠每天接受皮下注射的 TNF 抗体或安慰剂。所有的小鼠喂以高脂肪饮食(58%脂肪，Research Diets D12330)12 周。每周记录体重。12 周之后，将小鼠安乐死，切割脂肪垫并且称重，以及动物的最后体重，以测定最终身体质量指数(BMI)和肥胖的发生。

或者，在出生时开始用 D2E7 治疗 ob/ob 小鼠，并且喂给正常饮食，即，不是低脂肪，不是高脂肪饮食。每周对接受治疗的和对照小鼠(ob/ob 同窝幼仔)称重。一般情况下，第五周时，ob/ob 小鼠表现出指示它们是肥胖的 BMI。第五周对小鼠检查，确定它们是否具有比对照物低的 BMI 量度。

实施例 17: 治疗人 2 型糖尿病中的 TNFα抑制剂

2 型糖尿病人类患者的 D2E7 研究

对于该项研究选择诊断有 2 型糖尿病的患者。使用下面的包含标准: 年龄 40-65 岁，已知糖尿病史>12 个月，稳定 BMI<35 kg/m2，仰卧血压<140/90 mm/Hg，血清肌酸酐<106 微摩尔/升，第一次评定之前 3 个月期间以及 15 天安慰剂进行期间每周评价的样品中 m24-h UAE 在 20 和 200 微克/分钟，并且在研究开始之前没有心血管病，肝病，或全身疾病。除了用于治疗肥胖的那些药物之外，患者不再摄取任何另外的药物。在研究之前的三天以及在研究期间，患者摄取等热饮食(~0.13 mJ xkg-1 X 天-1; 50%碳水化合物，35%脂质，15%蛋白质)，对钠的摄取没有限制。每一次探访检查饮食建议的遵循程度。

对患者施用两周一次 40 mg 的 D2E7 给药方案，但是本领域技术人员根据 HCV 治疗的知识能调节给药剂量和给药次数。至少每周对患者监视，监视 12 周，反复分析象开始 D2E7 治疗之前进行的那些指标，如下所述。

对于研究中每一项患者的评定，进行下面的基础检查: 仰卧血压量度; BMI; 三个 24 小时尿样的平均值; 血葡萄糖水平; 24 小时尿葡萄糖; 血清肌酸水平; 肌酸酐清除率; 和心电图记录。此外，每个患

者保持每天日记，监测 2 型糖尿病症状，例如疲劳，过度口渴，尿频，视觉模糊，感染率高，伤口愈合慢，情绪多变，和性欲问题。对患者检查以确定 D2E7 中血葡萄糖水平是否降低，以及 II 型糖尿病典型症状是否减轻，例如疲劳，过度口渴，尿频，视觉模糊，感染率高，伤口愈合慢，情绪多变。

实施例 18：缺铁性贫血中的 TNFα抑制剂

缺铁大鼠模型中 TNF 抗体的研究

使用缺铁性贫血大鼠动物模型进行下面的研究(Catani 等(2003)Braz. J. Med.Biol. Res. 36; 693)。对雄性 Wistar-EPM 大鼠(大约三周龄)喂以 AIN-93G(American Institute of Nutrition Rodent Diets)没有铁的饮食两周的时间以诱发缺铁性贫血。对大鼠施用一定剂量的安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。治疗之前和之后取血样，测定血红蛋白和血细胞比容值。为了分析血细胞比容和血红蛋白浓度，收集血液并且与 5 毫升的 0.5 M EDTA 混合。通过在密封的肝素化毛细管中将血液离心来测定血细胞比容。由 546 nm 下氰化正铁血红蛋白的吸收值计算血红蛋白浓度。对大鼠检查以确定是否有改善的血细胞比容量度。

实施例 19：慢性病贫血的 TNFα抑制剂研究

与慢性炎症疾病相关的贫血的 TNF 抗体研究

使用慢性病贫血大鼠模型进行下面的研究(Coccia 等，(2001)Exp. Hematology 29; 1201)。在第 0 天，对 8-10 周龄雌性 Lewis 大鼠腹膜内注射(i. p.)平衡至 15 微克鼠李糖/前款剂量的 0.85%盐水中悬浮的肽基聚糖-多糖聚合物(PG-APS)进行接种。通过尾静脉将血样收集到 EDTA-包被的微量容器试管中，并且在对大鼠血液校正过的 ADVA 120 血液学系统上进行完全血计数(CBC)。收集另外的血液样品并且在微量血清分离器离心试管中分离，并且对血清分析铁，胆红素，和内源 EPO 浓度。对大鼠施用一定剂量的安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)，并且检查改善的铁，胆红素，和 EPO 浓度

量度。

实施例 20: 对贫血的 TNFα抑制剂

对贫血人患者的 D2E7 抗体的研究

对表现出一般与贫血相关的症状的患者检查并且分析以确定他们是否患有贫血。一般与贫血相关的症状是疲劳，胸痛，呼吸短促，面色苍白，和心速快。指示哮喘的检验的例子是完全血计数(CBC)，网状细胞计数，和铁供应量度，包括血清铁，总的铁-结合能力，和血清铁蛋白。有严重贫血和血红细胞形态异常的患者，骨髓抽吸和活组织检查是重要的诊断工具。对于该项研究选择患有贫血的患者。

在 CBC 检验中，自动细胞计数器测量很多参数作为 CBC 的部分，包括血红蛋白，血红细胞计数，血红细胞容量分布，血小板计数，和白细胞计数。计数器还计算血细胞比容(以 RBC 计数和容量为基础)，平均细胞容积(MCV)(以容积分布为基础)，平均细胞血红蛋白(MCH)(血红蛋白除以血细胞比容)，和红细胞分布宽度(RDW)。红细胞指数和 RDW 与人工染色血液涂片的直接检查一起使用来评定红细胞形态学。

象 CBC 分析，网状细胞计数的精确测量是任何贫血的最初分类的关键。网状细胞是新生的包含足够残留 RNA 的血红细胞，它们可以用体外活体染料染色并且计数为循环血红细胞种群的百分比。在基础状态，根据计数方法，正常网状细胞计数范围是 1-2 百分比。用正常的每天大约循环血红细胞的 1%置换校正。网状细胞计数的增加提供对贫血相应的血红细胞产生的可靠量度。

为了使用网状细胞作为产生量度，首先一定校正患者血细胞比容的变化以及红细胞生成素对骨髓网状细胞早期释放到循环中的作用。血细胞比容(HCT)校正将网状细胞百分比转化为绝对数:

$$\%\text{网状细胞} \times \frac{\text{患者 HCT}}{45\%} = \text{绝对\%网状细胞}$$

每当对外周血液血涂片有显著多染色性时，骨髓网状细胞(“转移”)校正涉及绝对百分比除以一个 1.5 至 2.5 的系数。转移校正应该总是应用到贫血患者，和提供有效血红细胞产生真实指数的非常高的网状细

胞计数。正常患者因血细胞比容小于 30%而好转，网状细胞产生指数增加 2 至 3 倍。因此，这个量度独自证实这样的事实，即患者有合适的红细胞生成素反应，正常的红色脊髓，和供应以满足要求的足够的铁。当网状细胞指数小于 2 时，骨髓增殖或先质成熟中一定存在缺陷。

铁供应的标准量度包括血清铁，转运铁-结合能力(TIBC)，和血清铁蛋白水平。正常血清铁范围是 9-27 微摩尔/升(50-150 微克/dL)，而正常 TIBC 是 54-64 微摩尔/升(300-360 微克/dL)。因此，在基础状态，循环中只有 30-50%的转运是铁饱和的。每一次测量和计算的百分饱和状态提供重要信息。血清铁蛋白用来评定身体铁的储存。成年男性血清铁蛋白水平在 50 和 150 mg/L 之间，相应于 600-1000 mg 铁储存。成年女性有较低的血清铁蛋白水平(15-50 mg/L)和较小的铁储存(0-300 mg)。观察到较低血清铁蛋白水平是铁储存有障碍的；水平低于 15 mg/L 指示储存枯竭和缺铁。

通过穿刺抽吸或活组织检查容易获得骨髓样品。患有低增殖贫血或血红细胞成熟患者有最大值，提供关于骨髓结构和细胞构成，以前质增殖和成熟的有价值信息。使用红细胞类对粒细胞前体之比(E/G 之比)评定红细胞类前体的增殖能力。

低增殖贫血和网状细胞指数<2 的患者证实 E/G 比≤1:3 或 1:2。相反，生成指数≥5 的溶血性贫血患者的 E/G 比>1:1。从 E/G 之比和网状细胞产生指数之间的匹配鉴定红细胞前体成熟缺陷。这些个体证明 E/G 之比大于 1:1 并且有低网状细胞指数，典型成熟病症无效红细胞生成。

基础测量之后，患者开始接受治疗。他们是随机的并且以患者不知情的方式用 D2E7 或安慰剂治疗。至少每两周监测患者完全血计数(CBC)，网状细胞计数，和铁供应量度。

实施例 21：神经病性疼痛动物模型中的 TNFα抑制剂

大鼠坐骨神经结扎模型中的 TNF 抗体

使用神经病性疼痛大鼠坐骨神经结扎模型进行下面的研究(Bennett 和 Zie(1988)Pain 33:87)。在手术之前进行基础行为测量(对机械异常疼痛和热痛觉过敏的反应)。热痛觉过敏指大鼠热疼痛阈，机械异常疼痛指轻触觉刺激的反应阈。将体重 120-150 克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠麻醉，并且对每一只实施坐骨神经结扎手术。坐骨神经结

扎手术包括暴露共同的坐骨神经，然后用 4 条结扎线松松系住，留有 ~ 1 毫米间隙。让大鼠恢复并且施用一定剂量的安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。试验组每天接受每周皮下注射的 TNF 抗体或安慰剂。

手术之后，以每周为基础实施机械异常疼痛和热痛觉过敏，持续 10 周。痛觉缺失试验检查对有害加热的反应，并且通过将大鼠放在带有清楚玻璃底面的小笼中，在底面之下影响脚的平面有放射性热源。记录抽取潜伏期和时间。加热之后抽取后爪的延长的潜伏期证明止痛药活性。

通过将大鼠放在带有筛网底面小笼中并且用通过弯曲它们所需要的力的克数校正过的有刻度的 von Frey 毛发刺激后爪平面，测定对正常无害机械刺激的反应(机械异常疼痛量度)。与没有手术的大鼠相比，足反射退回，骨神经痛结扎小鼠反应低克数的机械刺激。这种对正常下无害的刺激的反应称作异常疼痛。处理之后产生足退回所需要的机械力的克数的增加证实抗异常疼痛活性和神经病性疼痛减轻。

实施例 22：神经病性疼痛动物模型中的 TNFα抑制剂

大鼠节段脊柱神经结扎模型中的 TNF 抗体研究

使用神经病性疼痛的大鼠节段脊柱神经结扎模型进行下面的研究(Kim 和 Chung，Pain 50(1992)355-363.)。将体重 120-150 克的雄性 Sprague-Dawley 大鼠麻醉，并且放在仰卧体位。

从 L4-S2 水平棘状病变分离左侧脊柱旁肌肉。暴露左 L5 和 L6 神经末梢并且紧紧结扎，6-0 手术丝缝线远离背侧根神经结。让大鼠恢复并且施用一定剂量的安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。试验组每天接受每周皮下注射的 TNF 抗体或安慰剂。手术之前进行基础行为测量(如上所述对机械异常疼痛和热痛觉过敏试验的反应)。手术之后，以每周为基础实施机械异常疼痛和痛觉缺失试验，持续 10 周。

实施例 23：神经病性疼痛治疗中的 TNFα抑制剂

神经病性疼痛人患者的 D2E7 检查研究

对于该项研究选择诊断有神经病性疼痛的患者。以临床理由为基础确定临床神经病性疼痛，包括病史，身体检查和患者所表现的症状和征兆的适当的调查。应用 International Association for the Study of Pain(IASP)Classification of Chronic Pain 中确定的诊断标准定义支持神经病性疼痛临床诊断。以标准为基础排除下面的患者，包括但不限于：可能干扰神经病性疼痛评定的相同或更大严重程度的另一种疼痛问题；可能干扰神经病性疼痛评定的与神经病性疼痛原因无关的显著神经病或精神病病症；目前的药物或乙醇滥用；和临床明显肝，肾或肺疾病。

使用标准疼痛评定工具对患者进行神经病性疼痛评定，例如 Short Form-McGill Pain Questionnaire(SF-MPQ)；100-毫米垂直视觉模拟等级(VAS)(0=没有疼痛，100=无法忍受的疼痛)；和 Clinician Global Impression of Change(CGIC)。患者还可以利用每天日记记录他们的神经病性疼痛。每个晚上，患者对前面 24 小时期间他们的疼痛平均强度分成等级。

基础测定一周之后，患者开始接受治疗。他们是随机的并且以患者不知情的方式用 D2E7 或安慰剂治疗。每两周对患者监测，根据他们每天日记制成图表，检查患者神经病性疼痛评定和疼痛平均轻度的减弱。

实施例 24：丙型肝炎病毒感染动物模型中 TNFα抑制剂

HCV 黑猩猩模型中 D2E7 的研究

使用黑猩猩丙型肝炎病毒(HCV)模型进行下面的研究(Shimizu 等(1990)Proc. Natl. Acad Sci. USA 87:6441)。

用来自急性非 A 非 B 肝炎输血之后患者的没有稀释的血浆 0.5ml 对黑猩猩静脉内(i. v.)接种。接种物含有，例如，每毫升(CID_{50}/ml)$10^{6.5}$ 黑猩猩 50%感染剂量 HCV。在接种之前和处理之后一周取得血清样品和肝活组织检查样品。接种之后，对黑猩猩施用一定剂量的 D2E7 或安慰剂。以高亲和性方式，D2E7 有效结合 TNF，参见美国专利 No. 6,258,562。

有很多方式监测接种之后的 HCV 水平。有规律地从黑猩猩获得血清样品并且分析丙氨酸氨基转移酶(ALT)。ALT 分析是已知是一组肝

功能分析(或 LFTs)中的一种，并且用来监测对肝脏的损伤。通过 BCV 抗体 ELISA 测试系统检测抗 HCV 的循环抗体(抗-C100-3 抗体)。另外，检测血清样品中的 HCV，根据 Weiner 等，(1990)Lancet335; 1 所述进行 cDNA/PCR 分析。根据 Shimizu 等(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82; 2138 描述的方法，通过用单克隆抗体 48-1 免疫荧光染色，也对冷冻的肝活组织检查样品分析胞质抗原。对接受治疗的黑猩猩检查以确定与安慰剂治疗的黑猩猩相比 ALT 水平和 HCV 血清水平是否降低。

实施例 25: 人 HCV 感染中的 TNFα抑制剂

对人治疗中的 D2E7 的研究

选择有偿慢性 HCV 感染的 18-70 岁的男性和女性。为了获得研究资格，通过逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)，患者对抗 HCV(第二-产生酶免疫测试)和 HCV RNA 必须是阳性的。在研究记录的一年内患者必须有显示慢性肝炎的肝活组织检查，并且在开始治疗之前至少 6 个月有升高的血清丙氨酸转移酶(ALT)水平。记录白细胞计数应该是至少 2,500/微升; 血小板计数应该大于 70,000/微升。排除标准包括但不限于引起肝病或其他相关病症的任何原因，包括人免疫缺陷或乙型肝炎病毒共同感染; 临床值得注意的心脏或心血管异常，器官移植，全身细菌或真菌感染; 临床值得注意的出血症状，前几年药物或乙醇滥用。

通过标准 RT-PCR 分析定量分析治疗之前和治疗之后血清 HCV RNA。通过对治疗后获得的血清样品的 RT-PCR 进行 HCV RNA 的定性测定。通过逆向杂交分析确定 HCV 基因型。利用合适的与健康相关的生活质量等级测量情绪和生理状态。

基础测定一周之后，患者开始接受治疗。他们是随机的并且以患者不知情的方式用 D2E7 或安慰剂治疗。对患者两周施用 40 毫克的 D2E7 用药方案，但是普通技术人员根据 HCV 治疗知识能调节这个剂量和给药次数。至少每四周检测患者，反复测试，象在开始 D2E7 治疗之前进行的那些。较弱的 RT-PCR 信号证实，相对于只接受安慰剂的那些患者，使用 D2E7 治疗的患者 HCV 水平降低。

实施例 26: 牛皮癣小鼠模型中的 TNFα抑制剂

牛皮癣 SCID 小鼠模型中 TNF 抗体的研究

选择接受人牛皮癣斑移植的严重合并免疫缺陷(SCID)小鼠作为研

究牛皮癣的动物模型，因为这些小鼠长时间保留有牛皮癣的典型临床和组织学特征(Nickoloff 等(1995)Am J Pathol 146:580-8)。

从没有病原体动物饲养工厂获得 2-3 月龄雌性放养 C. B 17 SCID 小鼠。从慢性斑牛皮癣白种人男性患者获得人皮肤样品。局部麻醉下获得 1x3 cm 英寸包括临床涉及皮肤的梭状皮肤样品，去除皮下脂肪，放到冷却的磷酸缓冲盐水中(PBS)，制成皮肤样品。在 1-2 小时之内移植皮肤样品。

将全厚度皮肤样品切成直径 8-10 mm 的碎片，然后移植到小鼠的后背，每只小鼠带着一块移植物。关于手术操作，通过腹膜内注射(i. p.)咪达唑仑和芬太尼柠檬酸二氢盐 1:1 的混合物将小鼠麻醉。将全厚度皮肤的梭状切片移植到相应的剃刀剃出的中心背部切出的全厚度创伤上，并且用 6-0 无创伤单丝缝线固定。盖上灭菌凡是林浸润纱布之后，利用相邻两侧皮肤在移植面上缝合皮肤囊以保护不受伤。缝合并朝上放置直到 2-3 周之后它们自行消散。

SCID-人皮肤嵌合体表现出与人牛皮癣类似的症状。SCID 小鼠上的移植斑表现出牛皮癣典型临床特征，包括鳞屑，红斑，和增厚。该模型还表现出牛皮癣组织学典型特征，包括角化不全，棘皮症，延长的网嵴，超-乳头状变薄，和淋巴单核细胞浸润到乳头状真皮中。

用安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)在损伤部位对移植的 SCID 小鼠皮下注射。试验组每天接受每周 TNF 抗体或安慰剂皮下注射。与牛皮癣斑相关症状的减轻证实 TNF 抗体治疗的 SCID 小鼠的改善。

实施例 27：牛皮癣临床研究中的 TNFα抑制剂

牛皮癣人患者的 D2E7

对于该项研究选择中等至严重程度慢性斑牛皮癣患者。在研究记录之前，患者至少 4 周没有接受任何牛皮癣治疗或者至少 2 周没有接受任何局部治疗。每周 40 mg 或者间隔一周 40 mg 开始皮下注射施用 D2E7 剂量。

每 2-4 周对患者进行临床检查。利用 Psoriasis Area and Severity Index(PASI)(Fredriksson 和 Pettersson(1978)Dermatologica 157:238-44)

和 Physician's Global Assessment 评定牛皮癣皮肤损伤的临床活动，由相同的研究人员确保评定一致。12 周时，测得与基线相比，患者初期终点比例实现至少 75%减少。利用验证等级评定瘙痒。利用验证仪器测定生活质量，包括但不限于 DLQI，SF-36，和 EQ-5D。研究自始至终在预定探访时照取不包括脸的全身照像。

在研究期间在预定的时间间隔获得皮肤活组织检查样品，来校正接受治疗的皮肤中的组织学和生物标记。在基线时获得正常皮肤活组织检查，用于与牛皮癣皮肤相比较。

实施例 28. 贝切特氏病动物模型中的 TNFα抑制剂

贝切特氏综合征小鼠模型中 TNF 抗体的研究

使用贝切特氏病小鼠 HSV 模型进行下面的研究(Hirata，Y.，等(1993)Acta.Otolaryngol.增刊 503:79)。用针刺破表达人 TNFα的小鼠的耳垂(参见 EMBO J(1991)10:4025-4031 的进一步描述)，然后接种 1.0x 10^6 斑-形成单位(pfu)/mL 的 1 型单纯性疱疹病毒(HSV1)(KOS 菌株)溶液，引起炎症细胞在血管内和周围积累。结果，发生肠内，口，耳垂，和生殖器上皮损伤。有贝切特氏病样症状的小鼠定义为有两个或多个症状的小鼠，与人贝切特氏病可见的典型形态变化相类似。

在接种之前或之后，或者在损伤发生这天起，对 HSV-诱发贝切特氏综合征小鼠施用一定剂量范围的已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27；Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784；BD Biosciences Pharmingen)。也施用合适的安慰剂对照物。监测头发减少，口腔和生殖器皮肤溃疡，和眼部不舒适，并且从损伤处收集组织样品。组织样品用福尔马林固定和石蜡包埋，用于切片分析。损伤切片用苏木紫和曙红染色，检查炎症细胞的外观。作为对照物，用培养基在相同的部位对 30 只小鼠接种。四周之后，用相同的方法进行第二次接种，接着观察 16 周。

受治疗小鼠与安慰剂治疗小鼠相比，对小鼠检查头发再生和溃疡的减轻。根据目测检查和组织学分析，接受治疗小鼠的损伤受到改善，注意溃疡部位炎症减轻并且溃疡部位炎症细胞例如 T 细胞数量减少，也是改善的进一步指征。

实施例 29. 治疗 Kawasaki's 病中的 TNFα抑制剂

使用干酪乳杆菌小鼠模型研究 Kawasaki's 病中 TNF 抗体的效果

使用 Kawasaki's 病的小鼠干酪乳杆菌(L. casei)模型(Lehman，T. J.，等(1985)Arthritis Rheum 28:652；Duong，T. T.(2002)Int Immunol 15:79；Brahn，E.，等(1999)Clin Immunol 90:147)，进行下面的研究。一次腹膜内(ip)注射干酪乳杆菌细胞片段对表达人 TNFα的小鼠诱导冠状动脉炎(参见上文)。证明接受干酪乳杆菌处理的小鼠的心脏组织学切片类似于患有 Kawasaki's 病的儿童的中等大小冠状动脉中发现的脉管炎和动脉瘤(Lehman 等(1985)Arthritis Rheum 28:652；Duong(2002)Int Immunol 15:79；Brahn 等(1999)Clin Immunol 90:147)。

通过标准方法对干酪乳杆菌注射过的小鼠腹膜内施用对照安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784；BD Biosciences Pharmingen)。在第 14 天(疾病早期)或研究(确定的疾病)收获接受注射小鼠的心脏。脉管炎患者不知道组织学切片得分。

与安慰剂治疗的动物相比，确定 TNF 抗体治疗的小鼠的冠状血管壁的炎症损伤减少，评定冠状动脉炎减轻。冠状动脉炎减轻被评定为，与安慰剂治疗的动物相比，伴随内膜增生减少和血管腔变窄的冠状血管壁炎症单核细胞细胞渗出物减少。

实施例 30. Kawasaki's 病的动物模型中的 TNFα抑制剂

使用 ANCA 小鼠模型的 Kawasaki's 病中的 TNF 抗体

使用 Kawasaki's 病小鼠抗-内皮细胞抗体(ANCA)模型进行下面的研究(Grunebaum 等(2002)Clin. Exp. Immunol. 130:233；Blank 等(1995)Clin.Exp. Immunol. 102:120；Tomer 等(1995)Arthritis Rheum. 38:1375；Damianovich 等(1996)J. Immunol. 156:4946)。用含有来自韦格内氏肉芽肿病患者血浆的蛋白酶 3-特异抗体的抗-内皮细胞抗体(ANCA)免疫小鼠。小鼠用纯化的 ANCA 接种免疫，对照小鼠注射了正常 IgG。对小鼠施用周剂量的安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体，例如，抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27；Williams 等(1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784；BD Biosciences Pharmingen)，最多四个月。用人 ANCA 接种三个月之后，小鼠产生抗 ANCA 内源抗体。安乐死处死小鼠，对肺，

肾，和心脏进行组织学检查，检查小动脉和小静脉周围淋巴样细胞浸润，以及血管壁外部 Igs 沉积，象对 Kawasaki's 病患者观察的那样(Grunebaum 等(2002)Clin. Exp. Immunol.130:233; Blank 等(1995)Clin. Exp.Imrnunol. 102:120; Tomer 等(i995)Arthritis Rheum. 38:1375; Damianovich 等(1996)J. Immunol. 156:4946)。淋巴样细胞浸润和血管壁中 IgG 沉积的减少，和 ANCA 抗体滴度的减小是 Kawasaki's 病改善的指征。

实施例 31. Kawasaki's 病的动物模型治疗中的 TNFα抑制剂

Kawasaki's 病人患者中的 D2E7 的临床研究

Kawasaki's 病(KD)患者登记进行研究；所有的患者都发热并且还鉴定了对于 KD 公开的 5 项临床标准中的至少 4 项(Barron，K. S.，等(1999)J. Rheumatol. 26:170)。也鉴定了对照例。通过心电图测量冠状动脉直径并且对身体表面面积校正。心电图筛选 KD 可能存在的典型变化，包括延长的 PR 或 QT 间期，异常 Q 波，ST-和 T 波改变，低压或心律失常。对 KD 患者两周施用 D2E7，每周施用 40 mg 剂量或安慰剂。普通技术人员根据 KD 治疗知识可以调节剂量。对患者监测发热退热情况。如果需要，实施辅助治疗，例如皮质类固醇。对患者监测并且跟踪心电图，用来确定是否发生冠状动脉损伤或者冠状动脉损伤是否改善，证明发生心电图结果改善。

实施例 32. 贝切特氏病治疗中的 TNFα抑制剂 TNFα抑制剂

贝切特氏病人患者的 D2E7 研究

选择满足 International Study Group 标准的患者用于研究，要求存在口腔溃疡加生殖器溃疡，典型确定的眼部损伤，或阳性过应性试验两项(Lancet.(1990)335:1078; Kaklamani，V.G.等(2001)Semin. Arthritis Rheum. 30:299)，是 6 年的平均值。对贝切特氏病患者两周施用 D2E7，每周施用 40 mg 剂量或安慰剂。普通技术人员根据贝切特氏病治疗知识可以调节剂量。对接受治疗和安慰剂的患者全身检查和详细的眼科评定，包括视觉分辨能力，眼内压量度，裂隙灯活组织显微镜检查，和后部分间接检眼镜检查，接着眼底照相术，在治疗方案之前和之后都检查。对患者检查记录的与贝切特氏病相关的症状的改善，例如，眼部炎症的减轻，口腔溃疡数目和严重程度的减轻。

实施例 33：狼疮动物模型中的 TNFα抑制剂

小鼠狼疮模型中的 TNF 抗体研究

选择 MRL/lpr 小鼠模型研究狼疮(Reilly 和 Gilkeson(2002)Immunologic Research. 25(2):143-153; Mishra 等(2003)J Clin Invest. 111(4):539-552)。MRL/lpr 小鼠表现出开始加速的自身免疫症状,在大约 8 周龄时开始多克隆 B 细胞激活和高γ球蛋白血。在 12-16 周龄 MRL/lpr 小鼠中,有自身抗体数组的血清学证据,包括抗-双链 DNA(抗-dsDNA)自身抗体和低补体血症。16-24 周龄 MRL/lpr 小鼠表现出关节炎,大块淋巴结病,脾肿大,脉管炎,和肾小球性肾炎临床症状。24 周龄时~50%的 MRL/lpr 小鼠死亡,主要由于肾衰竭。

在该项研究中使用老龄雌性 MRL/lpr 小鼠。第 14 周。对 MRL/lpr 小鼠腹膜内注射(i. p.)各种浓度的安慰剂或者让大鼠恢复并且施用一定剂量安慰剂或已知结合并中和小鼠 TNFα的单克隆抗-TNFα抗体,例如,抗体 TN3(TN3-19.12)(参见 Marzi 等(1995)Shock 3:27; Williams 等 (1992)Proc Natl Acad Sci U S A. 89:9784; BD Biosciences Pharmingen)。试验组每天接受每周皮下注射的 TNF 抗体或安慰剂。

一些狼疮患者出现狼疮患者肾炎,其定义为肾脏持久性炎症(刺激和肿胀)。这些患者最后发展成肾衰竭,需要透析或肾移植。为了检查肾病的进程,将 MRL/lpr 小鼠放在新陈代谢笼子中,注射 D2E7 之后,24 小时收集尿液。用 D2E7 治疗之前和之后通过 ELISA 利用已知浓度小鼠白蛋白的标准曲线测定尿白蛋白分泌(Cappel Research products, Durham, North Carolina, USA,根据 Weinberg 等(1994)J Exp Med. 179:651 中的描述)。治疗之后平均白蛋白分泌减少证实早期疾病显示和蛋白尿进程的改善。

第 19 周,用异氟烷麻醉之后通过颈脱位处死小鼠并且取出肾脏。一个肾脏用缓冲的福尔马林固定,包埋在石蜡中,切片,并且用 H & E 染色。检查肾病理学并且通过针对血管小球炎症,增殖,半月体形成,和坏死的标准方法定级。也注明间质变化和脉管炎。根据 Watson 等(1992)JExp Med. 176:1645-1656 描述,分成 0-3 得分或者评价各个特征,然后加合在一起得到一个最终肾得分。加合之前坏死和半月体形成的得分加倍。例如,血管小球炎症按照下面分级:0,正常;1,少量炎症细胞;2,中等炎症;和 3,严重炎症。当与安慰剂治疗的小鼠相比时,来自 D2E7 治疗小鼠肾切片中炎症或细胞增殖(较低肾病理指

数)的最小征兆证实状况改善。

还将脾称重，以确定小鼠狼疮活动度进程的延迟或防止。脾的大小是反映疾病免疫病理学狼疮活动度的指征。MRL/lpr 小鼠发生大块脾大和随着疾病进程的淋巴结病。为了测定脾的大小，在第 19 周，处死来自各组(治疗和安慰剂)的小鼠并且测定平均体重。较低的平均体重指示狼疮的改善。

实施例 34：狼疮的 TNFα抑制剂治疗

对狼疮人患者检查 D2E7 的研究

选择诊断有狼疮的患者用于研究的基础。根据描述的一般与狼疮相关的症状选择患者，所述症状包括发热，疲劳，全身不舒服，不安或有病的感觉(欠爽)，体重减轻，皮肤出皮疹，“翼形皮癣”皮疹，日光灼伤皮疹，对日光的敏感性，关节痛，肿胀，关节炎，腺体肿大，肌肉疼痛，恶心和呕吐，胸膜炎胸痛，癫痫发作，和精神病。其他特征包括尿中带血，咳血，鼻子出血，吞咽困难，皮肤颜色不调和，皮肤上有红斑，压迫或冷时手指颜色变化(雷诺氏现象)，麻木和麻刺感，口腔溃疡，头发减少，腹部疼痛和视觉障碍。对患者进行身体检查以确定他们是否表现出任何狼疮的特征症状。狼疮的诊断以存在该疾病七项特征中的至少四项为基础。

确定这些疾病显示存在的分析可以是不同的，包括下面的一些：抗核抗体(ANA)组，包括抗-DNA 和抗-Smith 抗体，后两项分析在单独狼疮情况下一般是阳性；特征性皮疹或损伤；X-射线胸片显示胸膜炎或心包炎；听诊器对胸部听诊显示胸膜炎或心包炎；尿分析出现血，脱落物，或者尿中有蛋白质；完全血细胞计数表明一些细胞类型减少；肾活组织检查；和神经病学检查。这种疾病可能还改变下面分析的结果：WBC 计数；血清球蛋白电泳；类风湿病因子；蛋白质，尿；蛋白质电泳-血清；单核细胞增多症点分析；红细胞沉降速度(ESR)；冷球蛋白；直接 Coombs'分析；补体成分 3(C3)；补体；抗甲状腺微粒体抗体；抗甲状腺球蛋白抗体；抗线粒体抗体；和抗平滑肌抗体。

患者随机分成试验组和对照组，施用 D2E7 或安慰剂。在该项研究中使用最有效治疗狼疮的剂量范围。剂量应该自 40 mg 开始，这是发现对患者治疗类风湿性关节炎最有效的 D2E7 剂量。患者接受 4-7 次 D2E7 或安慰剂输入。每隔一个星期对患者复查以确定狼疮症状是否减

轻或治愈，根据 ESR 和 C-反应蛋白质(CRP)水平的减小来测定。

实施例 35: TNFα抑制剂对斯耶格仑氏综合征

对斯耶格仑氏综合征人患者检查 D2E7 的研究

对于该项研究选择符合针对原发性斯耶格仑氏病的 European and the American College of Rheumatology 分类的患者(参见 Vitali 等(1993)Arthritis Rheum 36:340-7；Fox 等(1986)Arthritis Rheum. 29:577-85)。患者至少 18 岁。登记时，所有的患者都有活动的原发性斯耶格仑氏病，它被定义为筛选时至少存在升高的红细胞沉降速度(ESR; >25/mm/hr)或者血内丙球蛋白过多(>1.4 毫克/升)。研究期间不允许改变疾病的抗风湿病药物(DMARDs)和皮质类固醇并且在基础之前至少 4 周就停止。排除的标准包括在前三个月严重感染，潜伏肺结核，有记录的人免疫缺陷病毒或丙型肝炎病毒感染，生活胁迫脉管炎，已知的恶性肿瘤，伴发的严重或没有控制的疾病，以及存在任何其他结缔组织疾病。

该项研究包括在第 0, 2, 和 6 周三次输入 D2E7(以 ~ 40 mg 的剂量)以及第 10 和 14 周的随后探视。让患者继续人为干预，前提是在研究的自始至终剂量和用药方案是稳定的。

在基线和第 2，4，6，10，和 14 周进行临床，眼科，和生物学评定。临床评定由相同的医师进行。这些包括一般身体检查，口干燥评定(使用 0-2 等级，其中 0=没有干燥，1=轻微至中度干燥，和 2=严重干燥)，和言语分析(在 2 分钟之内能重复“puttica”这个词数次，这是 New Advances in Basic Science 研讨会上 P. J. Shirlaw 提供的技术，Diagnosis and Treatmentof Sjögren's Syndrome，伦敦，1997 年 1 月)。另外，根据已经确立的方法使用分散技术收集没有刺激的全唾液 5 分钟，样品在分析天平上称重以确定获得的唾液的体积(1 毫克=l 毫升)(Navazesh(1993)Ann NYA cad Sci 694:72-7)。也进行眼睛干燥评定(使用 0-2 等级，其中 0=没有症状，l=人为干预(ATs)减轻的轻微至中度症状，和 2=ATs 不能减轻的严重症状)，并且测定使用 Ats 的次数。

对患者还进行疲劳评定(0-100 mm 视觉模拟等级(VAS))和回答疲劳调查卷(0=没有疲劳，1=不干扰日常活动度的轻微疲劳，2=不干扰日常活动度的中度疲劳，和 3=严重减少活动度的疲劳)。临床评定还可以包括有触痛的关节数(最多 64)，有触痛的点的数(最多 18 处)，和患者

疼痛评定(0-100-mm VAS)。使用 0-100 mm VAS 进行患者和医师的综合评估。

所有的眼科评定由相同医师进行，包括荧光素眼泪膜破裂时间(TBUT)试验，席尔梅尔氏 I 试验，并且通过丽丝安绿染色进行角膜评定(van Bijsterveld 0-9 等级)。研究中测量生物学参数，并且包括 ESR，C-反应性蛋白质水平(CRP)，全血细胞计数，肾肝功能试验，产生磷酸激酶水平，血清 IgA，IgM，IgG 水平，抗核抗体(ANA)，和类风湿病因子(RF，和淋巴细胞分型(CD4=和 CD8=细胞的数目)。与斯耶格仑氏病综合征相关的症状变轻包括触痛点和周围关节疼痛减轻。

实施例 36：TNFα抑制剂对少年类风湿性关节炎的作用

对患有少年类风湿性关节炎的儿童检查 D2E7 的研究

对于该项研究选择诊断有少年类风湿性关节炎的患者(JRA)。患者接受 D2E7 16 星期，然后随机分为试验组和安慰组。然后对患者施用 D2E7 或安慰剂。对患者施用的剂量范围是～20 mg/m^2/BSA(身体表面面积)至最大每隔一周 40 mg 之间。每隔一周对患者皮下注射 D2E7 或安慰剂治疗一段时间。每隔一周对患者复查以确定 JRA 症状是否减轻或治愈。疾病的临床症状减轻测定 JRA 的改善。使用 Giannini 定义的标准(Giannini 等(1997)Arthritis & Rheumatism 40:1202)测定 JRA 改进。使用该项标准，改善的定义是评分体系中 6 个变量中 3 个比基础至少改善 30%，其余变量中不多于 1 个恶化>30%。评分体系中的变量由医师对疾病活动度的综合评定，总的来说完好的父母/患者评定(每个根据 10-cm 视觉模拟等级评分)，机能能力，活动关节炎关节数目，活动范围受限的关节的数目，和红细胞沉降速度组成。

实施例 37：D2E7 F(ab)'$_2$ 片段的结晶

D2E7 F(ab)'$_2$ 片段的产生和纯化

根据下面的方法制备和纯化 D2E7 F(ab)'$_2$ 片段。用 1 升缓冲液 A(20 mM NaOAc，pH 4)将 2 毫升的 D2E7 IgG(～63 mg/ml)透析过夜。透析之后，将蛋白质稀释至 20 mg/ml 的浓度。固定化胃蛋白酶(Pierce；6.7 ml 浆液)与 27 ml 的缓冲液 A 混合，混合，并且离心(Beckman floor 离心，5000 rpm，10 分钟)。去除上清液，并且将这个洗涤程序重复两次。将洗涤过的固定化胃蛋白酶重新悬浮于 13.3 ml of 缓冲液 A 中。D2E7(7.275 ml，20 mg/ml，145.5 mg)与 7.725 ml 的缓冲液 A 和 7.5 ml

的洗涤过的固定化胃蛋白酶浆液混合。37℃下将 D2E7/胃蛋白酶混合物摇动(300 rpm)温育 4.5 小时。然后通过离心分离固定化胃蛋白酶。通过 SDS-PAGE 分析上清液，表明 D2E7 消化基本上完全(~115 kDa 没有还原的带，~30 和~32 kDa 还原带)。

利用蛋白质 A 色谱法，从完整 D2E7 和 Fc 片段分离 D2E7 $F(ab)'_2$ 片段。上述反应上清液的一半(10 ml)用 10 ml 缓冲液 B(20 mM 磷酸钠，pH 7)稀释，通过 0.45 微米 Acrodisk 过滤器过滤，并且加到 5 毫升 Protein A Sepharose 柱(PharmaciaHi-Trap；事先用 50 毫升缓冲液 B 冲洗)上。收集级分。加载蛋白质混合物之后，用缓冲液 B 洗涤柱子，直到 280 nm 下的吸收度再次确定一个基线。用 5 毫升缓冲液 C(100 mM 柠檬酸，pH 3)洗脱结合的蛋白质；通过加入 0.2 毫升的 2 M TrisHCl，pH 8.9 中和这些级分。通过 SDS-PAGE 分析级分；将含有 D2E7 $F(ab)'_2$ 片段的那些合并(~42 ml)。通过在 6M 胍 HCl，pH 7 中在 280 nm 下的吸收度(计算的消光系数：D2E7，1.39(AU-ml)/mg；$F(ab)'_2$，1.36(AU-ml)/mg)确定蛋白质浓度。流过的集合液中含有~38.2 mg 蛋白质(浓度，0.91 mg/ml)，其代表 79% $F(ab)'_2$ 的产率(起始物理论产率的~2/3，除以 2[只有一半纯化]，即~48.5 mg)。

通过大小排阻色谱法进一步纯化 $F(ab)'_2$。将合并的流出的蛋白质 A 从~42 毫升浓缩至~20 毫升，然后在预先用缓冲液 D(20 mM HEPES，pH 7，150 mM NaCl，0.1 mM EDTA)平衡(和洗脱)过的 Superdex 200 柱子(26/60，Pharmacia)上对一部分(5 ml，~7.5 mg)进行色谱分离。在 280 nm 下有两个峰：峰 1，在 172-200 ml 时洗脱，由 $F(ab)'_2$ 组成(通过 SDS-PAGE 分析；~115 kDa 没有还原的带，~30 和~32 kDa 还原的带)；峰 2，在 236-248 ml 时洗脱，由低分子量片段构成(~15 kDa，还原或没有还原的)。将峰 1 浓缩至 5.3 mg/ml，用于结晶实验。

D2E7 $F(ab)'_2$ 片段的结晶

利用选择滴定蒸汽扩散方法通过混合等体积的 $F(ab)'_2$ 和结晶缓冲液(大约各自 1 微升)使 $F(ab)'_2$ 片段结晶(5.3 mg/ml，于 20 mM HEPES，pH 7，150 mM NaCl，0.1 mM EDTA)，并且使混合物在缓冲液 Bt 或 18℃下保持平衡。使用的结晶缓冲液由 Hampton Research Crystal Screens I(溶液 1-48)和 II(溶液 1-48)，Emerald Biostructures Wizard Screens I 和 II(各种溶液 1-48)，和 Jena Biosciences 筛网 1-10(各种溶液

1-24)组成。很多不同条件下获得结晶，如表 1 中总结的。

表 1. D2E7 F(ab)'$_2$ 片段结晶条件一览表

筛网	溶液	温度℃	条件	结果
Hampton 1	32	4	2.0 M $(NH_4)_2SO_4$	微小针状结晶簇
Hampton 1	46	4	0.2 M $Ca(Oac)_2$, 0.1 M 二甲胂酸钠 pH 6.5, 18% PEG 8K	中等大小针状结晶簇
Hampton 1	48	4	0.1 M Tris HCl pH 8.5, 2.0 M $NH_4H_2PO_4$	微针状结晶簇
Hampton 2	2	4	0.01 M 溴化十六烷基三甲铵 ，0.5 M NaCl, 0.01 M $MgCl_2$	小的共簇晶体
Hampton 2	13	4	0.2 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M NaOAc pH 4.6, 30% PEG MME 2000	小的针状结晶簇
Hampton 2	15	4	0.5 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M NaOAc pH 5.6, 1.0M Li_2SO_4	大的针状结晶簇
Hampton 2	16	4	0.5M NaCl, 0.1M NaOAc pH 5.6, 4% 亚乙基胺聚合物	大的不规则结晶
Hampton 1	34	18	0.1 NaOAc pH 4.6, 2.0 M 甲酸钠	针状结晶簇
Hampton 1	35	18	0.1M Hepes pH 7.5, 0.8M 磷酸二氢钠 , 0.8M 磷酸二氢钾	针状结晶簇
Hampton 2	9	18	0.1M NaOAc pH 4.6, 2.0M NaCl	密集针状结晶簇
Hampton 2	12	18	0.1M $CdCl_2$, 0.1M NaOAc pH 4.6, 30% PEG 400	针状和无定形结晶
Hampton 2	15	18	0.5M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M NaOAc pH 5.6, 1.0M Li_2SO_4	微小针状结晶簇
Wizard I	27	4	1.2M NaH2PO4, 0.8M K2HPO4, 0.1M CAPS pH 10.5, 0.2 M Li_2SO_4	中等大小针状结晶簇
Wizard I	30	4	1.26M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 M NaOAc pH 4.5, 0.2M NaCl	小针状结晶簇
Wizard II	8	4	10% PEG 8K, 0.1M Na/K 磷酸 pH 6.2, 0.2M NaCl	簇中生长的大片状结晶
Wizard II	43	4	10% PEK 8K, 0.1M Tris pH 7.0, 0.2 M MgCl2	微结晶簇
Wizard I	4	18	35% MPD, 0.1M 咪唑 pH 8.0, 0.2M MgCl2	棒状结晶
Wizard I	27	18	1.2M NaH2PO4, 0.8M K2HPO4, 0.1M CAPS pH 10.5, 0.2 M Li_2SO_4	针状结晶簇
Wizard II	7	18	30% PEG 3K, 0.1M Tris pH 8.5, 0.2M NaCl	微小结晶簇
Wizard II	11	18	10% 2-丙醇 , 0.1M 二甲胂酸盐 pH 6.5, 0.2M Zn(Oac)2	微小六角形或菱形结晶
Wizard II	46	18	1.0M AP, 0.1M 咪唑 pH 8.0, 0.2M NaCl	1不规则结晶
JB 1	D6	4	30% PEG 3K, 0.1M Tris HCl pH 8.5, 0.2M Li_2SO_4	沉淀中微小针状结晶
JB 2	B6	4	20% PEG 4K, 0.1M Tris HCl pH 8.5, 0.2M 二甲胂酸钠	微小针状结晶簇球
JB 3	A1	4	8% PEG 4K, 0.8M LiCl, 0.1M Tris HCl pH 8.5	大的霜样结晶
JB 3	B1	4	15% PEG 4K, 0.2M $(NH_4)_2SO_4$	微小针状结晶簇
JB 3	D5	4	30% PEG 4K, 0.1M 柠檬酸钠 pH 5.6, 0.2M NH_4OAc	沉淀中微小针状结晶
JB 4	B1	4	15% PEG 6K, 0.05M KCl, 0.01M $MgCl_2$	针状结晶簇球
JB 3	A6	18	12% PEG 4K, 0.1M NaOAc pH 4.6, 0.2M NH_4OAc	针状结晶簇
JB 3	B1	18	15% PEG 4K, 0.2M $(NH_4)_2SO_4$	沉淀中的针状结晶簇
JB 3	C6	18	25% PEG 4K, 0.1M 柠檬酸钠 pH 5.6, 0.2M NH_4OAc	长而薄的针状结晶
JB 4	C5	18	8% PEG 8K, 0.2 M LiCl, 0.05M $MgSO_4$	霜样结晶

5

筛网	溶液	温度 ℃	条件	结果
JB 5	A3	4	15% PEG 8K, 0.2M $(NH_4)_2SO_4$	相分离中的长的单个针状结晶
JB 5	A4	4	15% PEG 8K, 0.5M Li_2SO_4	微小针状结晶簇
JB 5	A5	4	15% PEG 8K, 0.1M Na MES pH 6.5, 0.2M $Ca(OAc)_2$	针状结晶簇球
JB 6	B2	4	1.6M $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 LiCl	微小针状结晶簇球
JB 6	C2	4	2.0 M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M NaOAc pH 4.6	微针状结晶簇
JB 10	D3	18	2.0M 甲酸钠 , 0.1M NaOAc pH 4.6	针状结晶簇

下面的条件(如表 1 所述)产生能用于衍射定性分析的结晶: Wizard II，11，18，10% 2-丙醇，0.1M 二甲砷酸盐 pH 6.5，0.2 M $Zn(Oac)_2$，微小六角形或 rhom.晶体；WizardII，10% PEG 8K，0.1 MN a/K 磷酸盐 pH 6.2，0.2M NaCl，聚集物中生长大片状晶体；JB 3，C6，18，25% PEG 4K，0.1 M 柠檬酸钠 pH 5.6，0.2 M 乙酸铵，长而薄的针状结晶；Hampton 2，15，18，0. 5 M AS，0.1 M 乙酸钠三水合物 pH 5.6，1.0 M 硫酸锂一水合物，微小针形结晶聚集体。

实施例 38: D2E7 Fab 片段的结晶

D2E7 Fab 片段的产生和纯化

根据下面的方法制备和纯化 D2E7 Fab 片段。用 4 毫升缓冲液 E(20 mM 磷酸钠，5 mM 半胱氨酸-HCl，10 mM EDTA，pH 7)稀释 4 毫升的 D2E7 IgG(稀释至大约 20 mg/ml)，并且与 6.5 ml 的固定化木瓜蛋白酶(Pierce，1%；预先用 26 ml 的缓冲液 E 洗涤过)混合。D2E7/木瓜蛋白酶混合物在 37℃下摇动(300 rpm)。通过离心分离固定化木瓜蛋白酶和沉淀的蛋白质；通过 SDS-PAGE 对上清液分析，表明 D2E7 消化部分完全(~55，50，34，和 30 kDa 没有还原的带，一些完整的和部分消化的 D2E7 ~ 115 和 ~ 150 kDa；~30 和 ~32 kDa 还原带，以及 ~50 kDa 带)。尽管如此，停止消化并且进行纯化。

基本上按照上文对 $F(ab)'_2$ 片段所述，通过蛋白质 A 色谱法和 Superdex 200 大小排阻色谱法对 D2E7 Fab 片段进行纯化。蛋白质 A 柱子流出液集合(21 ml)含有 ~9.2 mg(0.44 mg/ml)，而蛋白质 A 洗脱液(4 ml)含有 ~ 19.5 mg(4.9mg/ml)。

SDS-PAGE 分析表明流出物是基本上纯的 Fab 片段(~48 和 ~30 kDa 没有还原的，~30 kDa 没有还原的宽带)，而洗脱液是完整的和部分消化的 D2E7。在 Superdex 200 柱子上进一步纯化 Fab 片段，在

216-232 ml 时洗脱，即，正如所预期的，在 $F(ab)'_2$ 片段之后但是在小的 Fc 片段之前，将 D2E7 Fab 片段浓缩至 12.7 mg/ml，用于如下所述的结晶试验。

D2E7 Fab 片段的结晶

基本上按照上文对 $F(ab)'_2$ 片段所述，利用选择滴定蒸汽扩散方法结晶 D2E7 Fab 片段(12.7 mg/ml，于 20 mM HEPES，pH 7，150 mMNaCl，0.1 mM EDTA 中)。在很多不同的条件下获得结晶，如表 2 中总结的。

表 2. D2E7 Fab 片段结晶条件一览表

筛网	溶液	温度 ℃	条件	结果
Hampton 1	4	4	0.1M Tris pH 8.5, 2M $(NH_4)_2SO_4$	小束状针状结晶
Hampton 1	10	4	0.2M NH_4OAc, 0.1M NaOAc pH 4.6, 30% PEG 4K	小束状针状结晶簇
Hampton 1	18	4	0.2M $Mg(OAc)_2$, 0.1M 二甲胂酸钠 pH 6.5, 20% PEG 8K	针状结晶簇
Hampton 1	20	4	0.2M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M NaOAc pH 4.6, 25% PEG 4K	微小针状结晶簇
Hampton 1	32	4	2M $(NH_4)_2SO_4$	长束状针状结晶簇
Hampton 1	33	4	4M 甲酸钠	微小针状结晶簇
Hampton 1	38	4	0.1M Hepes pH 7.5	微小针状结晶簇
Hampton 1	43	4	30% PEG 1500	微小针状结晶簇
Hampton 1	46	4	0.2M $Ca(OAc)_2$, 0.1M 二甲胂酸钠 pH 6.5, 18% PEG 8K	大片状结晶簇
Hampton 1	47	4	0.1M NaOAc pH 4.6, 2M $(NH_4)_2SO_4$	长束针状结晶簇
Hampton 2	1	4	2M NaCl, 10% PEG 6K	小片状结晶簇
Hampton 2	2	4	0.01M 溴化十六烷基三甲铵，0.5M NaCl, 0.01 $MgCl_2$	圆而不规则片状结晶
Hampton 2	5	4	2M $(NH_4)_2SO_4$, 5% 异丙醇	长纤维绳状结晶
Hampton 2	13	4	0.2M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M NaOAc pH 4.6, 25% PEG MME 2K	微小束状针状结晶簇
Hampton 2	14	4	0.2M K/Na 酒石酸钠，0.1M 柠檬酸钠 pH 5.6, 2M $(NH_4)_2SO_4$	微小针状结晶簇
Hampton 2	27	4	0.01M $ZnSO_4$, 0.1 MES pH 6.5, 25% PEG MME 550	微小针状结晶簇
Hampton 2	28	4	30% MPD	微小针状结晶簇
Hampton 1	4	18	0.1M Tris pH 8.5, 2M $(NH_4)_2SO_4$	针状结晶簇

筛网	溶液	温度 ℃	条件	结果
Hampton 1	9	18	0.2M NH_4OAc, 0.1M 柠檬酸钠 pH 5.6, 30% PEG 4K	针状结晶簇
Hampton 1	17	18	0.2M Li_2SO_4, 0.1M Tris pH 8.5, 30% PEG 4K	长束状针状结晶
Hampton 1	32	18	2M $(NH_4)_2SO_4$	针状结晶簇
Hampton 1	33	18	4M 甲酸钠	微小针状结晶簇
Hampton 1	38	18	0.1M Hepes pH 7.5	纤维束状结晶
Hampton 1	43	18	30% PEG 1500	微小针状结晶簇
Hampton 1	47	18	0.1M NaOAc pH 4.6, 2M $(NH_4)_2SO_4$	微小针状结晶簇
Hampton 2	1	18	2M NaCl, 10% PEG 6K	长束状针状结晶簇
Hampton 2	5	18	2M $(NH_4)_2SO_4$, 5% 2- 丙醇	微小针状结晶簇
Hampton 2	9	18	0.1M NaOAc pH 4.6, 2M NaCl	长束状针形结晶
Hampton 2	13	18	0.2M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M NaOAc pH 4.6, 25% PEG MME 2K	微小针状结晶簇
Hampton 2	14	18	0.2M K/Na 酒石酸盐 , 0.1M 柠檬酸钠 pH 5.6, 2M $(NH_4)_2SO_4$	长束状针状结晶
Hampton 2	27	18	0.01M $ZnSO_4$, 0.1 MES pH 6.5, 25% PEG MME 550	微小针状结晶簇
Wizard I	20	4	0.4M NaH_2PO_4/1.6M K_2HPO_4, 0.1M 咪唑 pH 8, 0.2M NaCl	微小针状结晶簇
Wizard I	28	4	20% PEG 3K, 0.1M Hepes pH 7.5, 0.2M NaCl	大斜方晶片状结晶簇
Wizard I	31	4	20% PEG 8K, 0.1M 磷酸盐柠檬酸盐 pH 4.2, 0.2M NaCl	束状针状结晶簇
Wizard I	39	4	20% PEG 1K, 0.1M 磷酸盐柠檬酸盐 pH 4.2, 0.2M Li_2SO_4	针状结晶簇
Wizard II	3	4	20% PEG 8K, 0.1M Tris pH 8.5, 0.2M $MgCl_2$	相分离中的大六角形或斜方晶片状结晶簇
Wizard II	4	4	2M $(NH_4)_2SO_4$,0.1M 二甲胂酸盐 pH 6.5,0.2NaCl	微针状结晶簇
Wizard II	9	4	2M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M 磷酸盐柠檬酸盐 pH 4.2	微小束状针状结晶簇
Wizard II	28	4	20% PEG 8K, 0.1M MES pH 6, 0.2M $Ca(OAc)_2$	微小针状结晶簇; 大束状针状结晶簇
Wizard II	35	4	0.8M NaH_2PO_4/1.2M K_2HPO_4, 0.1M NaOAc pH 4.5	微小纤维束状结晶
Wizard II	38	4	2.5M NaCl, 0.1M NaOAc pH 4.5, 0.2M Li_2SO_4	长束状针状结晶
Wizard II	47	4	2.5M NaCl, 0.1M 咪唑 pH 8, 0.2M $Zn(OAc)_2$	微小针状结晶簇
Wizard I	6	18	20% PEG 3K, 0.1M 柠檬酸盐 pH 5.5	针状结晶簇
Wizard I	20	18	0.4M NaH_2PO_4/1.6M K_2HPO_4, 0.1M 咪唑 pH 8, 0.2M NaCl	微小针状结晶簇
Wizard I	27	18	1.2M NaH_2PO_4/0.8M K_2HPO_4, 0.1M CAPS pH 10, 0.2M Li_2SO_4	束状针状结晶簇
Wizard I	30	18	1.26M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M NaOAc pH 4.5, 0.2M NaCl	束状针状结晶
Wizard I	31	18	20% PEG 8K, 0.1M 磷酸盐柠檬酸盐 pH 4.2, 0.2M NaCl	微小针状结晶簇
Wizard I	33	18	2M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M CAPS pH 10.5, 0.2M Li_2SO_4	纤维束状结晶
Wizard I	39	18	20% PEG 1K, 0.1M 磷酸盐柠檬酸盐 pH 4.2, 0.2M Li_2SO_4	针状结晶簇
Wizard II	4	18	2M $(NH_4)_2SO_4$,0.1M 二甲胂酸盐 pH 6.5,0.2 NaCl	针状结晶簇
Wizard II	9	18	2M $(NH_4)_2SO_4$, 0.1M 磷酸盐柠檬酸盐 pH 4.2	束状针状结晶
Wizard II	35	18	0.8M NaH_2PO_4/1.2M K_2HPO_4, 0.1M NaOAc pH 4.5	微小针状结晶簇
Wizard II	38	18	2.5M NaCl, 0.1M NaOAc pH 4.5, 0.2M Li_2SO_4	微小针状结晶簇

下面的条件(如表 2 所述)产生能用于衍射定性分析的结晶：Hampton 2，1，4C，2 M NaCl，10% PEG 6K，小片状结晶聚集体；Hampton 1 46，4C，0.2 M 乙酸钙，0.1 M 二甲砷酸钠，pH 6.5，18% PEG 8K，大片状结晶聚集体；Wizard I，28，4C，20% PEG 3K，0.1 M Hepes pH 7.5，0.2 M NaCl，大斜方晶片状结晶聚集体；Wizard II 3，4C，20% PEG 8K，0.1 M Tris pH 8.5，0.2 M $MgCl_2$，lrg hex 或正交片状结晶聚集体，在分开的相中。

等同方案

本领域技术人员意识到，或者能确定利用不超出常规实验的试验，有很多与这里描述的本发明的具体实施方案的等同方案。这样的等同方案包括在下面的权利要求书中。

<110> Abbott Laboratories S.A., 等

<120> TNFα相关疾病的治疗

<130> BPI-187PC

<140>
<141>

<150> 60/397,275
<151> 2002-07-19

<150> 60/411,081
<151> 2002-09-16

<150> 60/417,490
<151> 2002-10-10

<150> 60/455,777
<151> 2003-03-18

<160> 37

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<400> 1

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser 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 Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
                85                  90                  95
```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 2
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<400> 2
Glu 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 Glu 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 Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 变体
<222> 9
<223> Xaa = Thr 或 Ala

<223> 突变的人抗体

<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>
<221> 突变
<222> 12
<223> Xaa = Tyr 或 Asn

<223> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<400> 5
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<400> 8
Asp Tyr Ala Met His
 1   5

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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
85 90 95
Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<400> 11
Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<400> 12
Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<400> 13
Gln Lys Tyr Gln Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<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> 突变的人抗体

<400> 36
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggtatca gcaaaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaatcagg ggtcccatct 180
cggttcagtg gcagtggatc 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> 突变的人抗体

<400> 37
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct 120
ccagggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttgga atagtggtca catagactat 180
gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300
taccttagca ccgcgtcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360
agt 363