



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110234351 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201780085136.9

(22)申请日 2017.11.16

(30)优先权数据

62/452,079 2017.01.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/061949 2017.11.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/140121 EN 2018.08.02

(71)申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 D.D.哈里森 E.C.夏 L-L.金

K.H.罗

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 初明明 黄登高

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 14/525(2006.01)

C07K 16/24(2006.01)

权利要求书1页 说明书100页

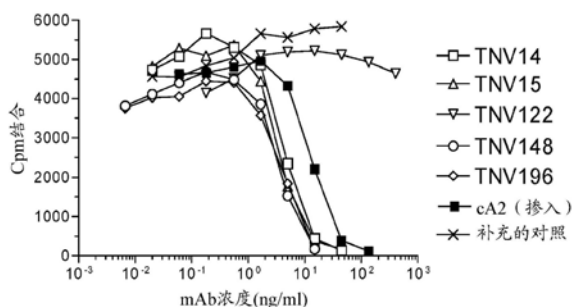
序列表14页 附图17页

(54)发明名称

用于治疗活动性银屑病关节炎的抗TNF抗体、组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及利用具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)的抗TNF抗体的组合物和方法,用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎(PsA)。



1. 一种组合物,所述组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体和至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,所述抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),所述组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第14周时,用所述抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI= -0.60 ± 0.53 SD,肌腱端炎= -1.87 ± 1.75 SD,指趾炎= -7.8 ± 8.57 SD,SF-36 PCS= 8.65 ± 7.60 SD,以及SF-36 MCS= 5.33 ± 9.95 SD。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中施用所述组合物,使得所述抗TNF抗体以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内施用。

3. 根据权利要求1至2所述的组合物,还包括在有或没有甲氨蝶呤(MTX)的情况下施用所述组合物。

4. 一种组合物,所述组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体和至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,所述抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),所述组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第24周时,用所述抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S= -0.36 ± 0.144 SE中实现自基线的平均变化。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中施用所述组合物,使得所述抗TNF抗体以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内施用。

6. 根据权利要求4至5所述的组合物,还包括在有或没有甲氨蝶呤(MTX)的情况下施用所述组合物。

7. 至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,所述抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),所述抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中 $\geq 65\%$ 的接受所述治疗的患者在治疗的第14周时实现ACR20。

8. 根据权利要求7所述的抗TNF抗体,其中在治疗的第14周时实现ACR20的所述 $\geq 65\%$ 的患者具有 $\geq 50\%$ 的治疗差异(与安慰剂相比改善)。

9. 根据权利要求7至8所述的抗TNF抗体,其中所述抗体以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,并且然后是之后每8周(q8w)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内施用。

10. 根据权利要求7至8所述的抗TNF抗体,其中所述抗体在有或没有甲氨蝶呤(MTX)的情况下施用。

用于治疗活动性银屑病关节炎的抗TNF抗体、组合物和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)的抗TNF抗体的组合物和方法,用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎(PsA)。

背景技术

[0002] TNF α 是17kD蛋白质亚基的可溶性同源三聚体。还存在膜结合的26kD前体形式的TNF。

[0003] 除单核细胞或巨噬细胞以外的细胞也产生TNF α 。例如,人非单核细胞肿瘤细胞系产生TNF α 以及CD4⁺和CD8⁺外周血T淋巴细胞,并且一些培养的T细胞系和B细胞系也产生TNF α 。

[0004] TNF α 引起促炎作用,该促炎作用导致组织损伤诸如软骨和骨的降解,粘附分子的诱导,诱导血管内皮细胞上的促凝活性,增加中性粒细胞和淋巴细胞的粘附,以及刺激巨噬细胞、中性粒细胞和血管内皮细胞释放血小板活化因子。

[0005] TNF α 一直以来与感染、免疫障碍、肿瘤病理学、自身免疫病理学和移植物抗宿主病理学相关联。TNF α 与癌症和感染性病理学的关联通常与宿主的分解代谢状态有关。癌症患者体重减轻,通常与厌食症有关联。

[0006] 与癌症和其他疾病相关联的明显消瘦被称为“恶病质”。恶病质包括渐进性体重减轻、厌食和恶性生长引起的瘦体重持续侵蚀。恶病质状态导致很多癌症发病率和死亡率。有证据表明TNF α 与癌症、感染性病理学和其他分解代谢状态中的恶病质有关。

[0007] 据信,TNF α 在革兰氏阴性脓毒症和内毒素休克(包括发烧、不适、厌食和恶病质)中起着重要作用。内毒素强烈激活单核细胞/巨噬细胞的产生以及TNF α 和其他细胞因子的分泌。TNF α 和其他单核细胞衍生的细胞因子介导对内毒素的代谢和神经激素反应。向人类志愿者施用内毒素会产生急性疾病,伴有类似流感的症状,包括发烧、心动过速、代谢率增加和应激激素释放。革兰氏阴性脓毒症患者的循环TNF α 增加。

[0008] 因此,TNF α 涉及炎症性疾病、自身免疫疾病、病毒、细菌和寄生虫感染、恶性肿瘤和/或神经退行性疾病,并且是用于疾病诸如类风湿性关节炎和克罗恩氏病的特定生物治疗的有用靶点。已经报道了使用针对TNF α 的嵌合单克隆抗体(cA2)的开放标记试验中的有益效果为抑制炎症,并且在类风湿性关节炎和克罗恩氏病复发后成功再治疗。还报道了在随机化、双盲、安慰剂对照试验中使用cA2在类风湿性关节炎中具有抑制炎症的有益效果。

[0009] 其他研究人员描述了对在体外具有中和活性的重组人TNF具有特异性的mAb。这些mAb中的一些用于绘制人TNF的表位,开发酶免疫测定法,并帮助纯化重组TNF。然而,由于免疫原性、低特异性和/或药物不适宜性,这些研究没有提供产生可用于人体体内诊断或治疗用途的TNF中和抗体的基础。

[0010] 已在除人类以外的哺乳动物中显示出中和TNF的抗血清或mAb可消除不利的生理变化,并防止实验性内毒素血症和菌血症的致死剂量攻击后的死亡。这种效应已经在例如啮齿动物致死率测定和灵长类动物病理学模型系统中得到证实。

[0011] 已公开了hTNF的推定受体结合基因座,并且已公开了由TNF的氨基酸11-13、37-42、49-57和155-157组成的TNF α 的受体结合基因座。

[0012] 非人类哺乳动物、嵌合抗体、多克隆抗体(例如,抗血清)和/或单克隆抗体(Mab)以及片段(例如,蛋白水解消化或其融合蛋白质产物)是在一些情况下正在研究以尝试治疗某些疾病的潜在治疗剂。然而,当施用给人类时,此类抗体或片段可引发免疫应答。此类免疫应答可导致免疫复合物介导的抗体或片段从循环中清除,并使重复施用不适于治疗,从而降低对患者的治疗有益效果并限制抗体或片段的重新施用。例如,重复施用包含非人部分的抗体或片段可导致血清病和/或过敏反应。为了避免这些和其他问题,已采取了多种方法来降低此类抗体及其部分的免疫原性,包括本领域所熟知的嵌合和人源化。然而,这些和其他方法仍可导致抗体或片段具有一些免疫原性、低亲和力、低亲合力,或者在细胞培养、放大、生产和/或低产量方面存在问题。因此,此类抗体或片段可能不太适合制备或用作治疗性蛋白质。

[0013] 因此,需要提供克服这些问题中的一个或多个的抗-TNF抗体或片段,以及对已知的抗体或其片段的改善。

发明内容

[0014] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:健康评估问卷残疾指数评分(HAQ-DI) = -0.60 ± 0.53 标准偏差(SD),肌腱端炎 = -1.87 ± 1.75 SD,指趾炎 = -7.8 ± 8.57 SD,36项健康调查简表生理总评分(SF-36 PCS) = 8.65 ± 7.60 SD,以及36项健康调查简表心理成分总评分(SF-36 MCS) = 5.33 ± 9.95 SD。

[0015] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全有且效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,并且然后是之后每8周(q8w)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI = -0.60 ± 0.53 SD,肌腱端炎 = -1.87 ± 1.75 SD,指趾炎 = -7.8 ± 8.57 SD,SF-36 PCS = 8.65 ± 7.60 SD,以及SF-36 MCS = 5.33 ± 9.95 SD。

[0016] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI = -0.60 ± 0.53 SD,肌腱端炎 = -1.87 ± 1.75 SD,指趾炎 = -7.8 ± 8.57 SD,SF-36 PCS = 8.65 ± 7.60 SD,以及SF-36 MCS = 5.33 ± 9.95 SD。

[0017] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链

(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI=-0.60±0.53SD,肌腱端炎=-1.87±1.75SD,指趾炎=-7.8±8.57SD,SF-36 PCS=8.65±7.60SD,以及SF-36 MCS=5.33±9.95SD。

[0018] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物在有或没有MTX的情况下施用,并且该组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI=-0.60±0.53SD,肌腱端炎=-1.87±1.75SD,指趾炎=-7.8±8.57SD,SF-36 PCS=8.65±7.60SD,以及SF-36 MCS=5.33±9.95SD。

[0019] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI=-0.60±0.53SD,肌腱端炎=-1.87±1.75SD,指趾炎=-7.8±8.57SD,SF-36 PCS=8.65±7.60SD,以及SF-36 MCS=5.33±9.95SD。

[0020] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI=-0.60±0.53SD,肌腱端炎=-1.87±1.75SD,指趾炎=-7.8±8.57SD,SF-36 PCS=8.65±7.60SD,以及SF-36 MCS=5.33±9.95SD。

[0021] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物在有或没有MTX的情况下施用,并且其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI=-0.60±0.53SD,肌腱端炎=-1.87±1.75SD,指趾炎=-7.8±8.57SD,SF-36 PCS=8.65±7.60SD,以及SF-36 MCS=5.33±9.95SD。

[0022] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所

述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第14周时,用抗TNF抗体治疗的患者在选自以下的一个或多个标准中实现自基线的平均变化:HAQ-DI= $-0.60 \pm 0.53SD$,肌腱端炎= $-1.87 \pm 1.75SD$,指趾炎= $-7.8 \pm 8.57SD$,SF-36 PCS= $8.65 \pm 7.60SD$,以及SF-36 MCS= $5.33 \pm 9.95SD$,该方法还包括在所述(a)施用之前、同时或之后施用包含有效量的选自以下中的至少一者的至少一种化合物或蛋白质的至少一种组合物:可检测标签或报告基因、TNF拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉药、非类固醇抗炎药(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗菌剂、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、促红细胞生成素、免疫、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药、 β 激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0023] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在修正的总van der Heijde-Sharp评分(vdH-S) = -0.36 ± 0.144 标准误差(SE)中实现自基线的平均变化。

[0024] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由静脉(IV)输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,并且然后是之后每8周(q8w)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S = $-0.36 \pm 0.144SE$ 中实现自基线的平均变化。

[0025] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体在有或没有MTX的情况下施用,并且该抗TNF抗体经由静脉(IV)输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,并且然后是之后每8周(q8w)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S = $-0.36 \pm 0.144SE$ 中实现自基线的平均变化。

[0026] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S = $-0.36 \pm 0.144SE$ 中实现自基线的平均变化。

[0027] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S = $-0.36 \pm 0.144SE$ 中实现自基线的平均变化。

[0028] 本发明提供了一种组合物,该组合物包含至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体以及至少一种药学上可接受的载体或稀释剂,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链

(HC) 和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该组合物用于安全且有效地治疗活动性银屑病关节炎,其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S=-0.36±0.144SE中实现自基线的平均变化。

[0029] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S=-0.36±0.144SE中实现自基线的平均变化。

[0030] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S=-0.36±0.144SE中实现自基线的平均变化。

[0031] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物在有或没有MTX的情况下施用,并且其中该组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S=-0.36±0.144SE中实现自基线的平均变化。

[0032] 本发明提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物在有或没有MTX的情况下施用,并且其中该组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中在治疗的第24周时,用抗TNF抗体治疗的患者在vdH-S=-0.36±0.144SE中实现自基线的平均变化,该方法还包括在所述(a)施用之前、同时或之后施用包含有效量的选自以下中的至少一者的至少一种化合物或蛋白质的至少一种组合物:可检测标签或报告基因、TNF拮抗剂、抗风湿药、肌肉松弛药、麻醉药、非甾类抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、促红细胞生成素、免疫接种剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁药、抗精神病药、兴奋剂、哮喘药、β激动剂、吸入类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0033] 本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗或预防活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由IV输注施用并诱导选自下表中的响应的临床响应:

	安慰剂	戈利木单抗 2mg/kg	P 值
随机患者, n	239	241	
在第 14 周时的临床疗效			
ACR20, n (%)	52 (21.8%)	181 (75.1%)	p<0.001
ACR50, n (%)	15 (6.3%)	105 (43.6%)	p<0.001
ACR70, n (%)	5 (2.1%)	59 (24.5%)	p<0.001
PASI 75, n (%)*	27/198 (13.6%)	116/196 (59.2%)	p<0.001
最小疾病活动			
MDA n/N (%)	10/239 (4.2%)	65/241 (27.0%)	p<0.001
需要治疗的数目			
NNT (95% CI)		1.9 (1.64, 2.18)	
在第 24 周时的临床疗效			
ACR50, n (%)	15 (6.3%)	129 (53.5%)	
* 在 BSA 参与≥3%的患者中			
ACR, 美国风湿病学会标准; PASI, 银屑病面积和严重性指数			

[0034] 本实施例提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗或预防活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由IV输注施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第14周时实现ACR20。

[0035] 本实施例提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗或预防活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第14周时实现ACR20。

[0036] 本实施例提供了至少一种分离的哺乳动物抗TNF抗体,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),该抗TNF抗体用于安全且有效地治疗或预防活动性银屑病关节炎,其中所述抗TNF抗体经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中≥65%的接受该治疗的患者在治疗的第14周时实现ACR20,并且在治疗的第14周时实现ACR20的所述≥65%的患者具有≥50%的治疗差异(与安慰剂相比改善)。

[0037] 本实施例提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中≥65%接受治疗的患者在治疗的第14周时实现ACR20。

[0038] 本实施例提供了一种用于治疗TNF相关病症的方法,其中该TNF相关病症为活动性银屑病关节炎,该方法包括:施用包含安全且有效量的分离的哺乳动物抗TNF抗体的组合物,该抗TNF抗体具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC),其中所述组合物经由IV输注以2mg/kg的剂量在第0周和第4周,然后是之后每8周(q8w)时在30分钟±10分钟内施用,并且其中≥65%接受治疗的患者在治疗的第14周时实现ACR20,并且在治

疗的第14周时实现ACR20的所述 $\geq 65\%$ 的患者具有 $\geq 50\%$ 的治疗差异(与安慰剂相比改善)。

附图说明

[0040] 图1示出了显示TNV mAb在杂交瘤细胞上清液中抑制TNF α 结合至重组TNF受体的能力的测定的图示。将不同量的含有已知量TNV mAb的杂交瘤细胞上清液用固定浓度(5ng/ml)的 ^{125}I 标记的TNF α 预温育。将混合物转移到已预先用p55-sf2(重组TNF受体/IgG融合蛋白质)包被的96孔光学板中。在洗去未结合的物质并使用 γ 计数器计数后,测定在mAb存在下与p55受体结合的TNF α 的量。尽管在这些实验中测试了8个TNV mAb样本,但为简单起见,这里未显示通过DNA序列分析显示的与其他TNV mAb之一相同的三种mAb(参见第5.2.2节)。对每个样本一式两份进行测试。所示的结果表示两次独立实验的结果。

[0041] 图2A至图2B示出了TNV mAb重链可变区的DNA序列。所示的种系基因是DP-46基因。“TNV”表示所示序列是TNV14、TNV15、TNV148和TNV196的序列。TNV序列中的前三个核苷酸限定翻译起始Met密码子。TNV mAb基因序列中的点表明核苷酸与种系序列中的核苷酸相同。TNV序列的前19个核苷酸(加下划线)对应于用于PCR扩增可变区的寡核苷酸。仅针对种系基因显示以成熟mAb起始的氨基酸翻译(单字母缩写)。种系氨基酸翻译中的三个CDR结构域以粗体和下划线标记。标记为TNV148(B)的系表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。种系DNA序列(CDR3)中的缺口是由于种系基因中不知道或不存在的序列。TNV mAb重链使用J6连接区。

[0042] 图3示出了TNV mAb轻链可变区的DNA序列。所示的种系基因是人 κ 种系可变区基因的Vg/38K家族的代表性成员。TNV mAb基因序列中的点表明核苷酸与种系序列中的核苷酸相同。TNV序列的前16个核苷酸(加下划线)对应于用于PCR扩增可变区的寡核苷酸。仅针对种系基因显示成熟mAb的氨基酸翻译(单字母缩写)。种系氨基酸翻译中的三个CDR结构域以粗体和下划线标记。标记为TNV148(B)的系表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。种系DNA序列(CDR3)中的缺口是由于种系基因中不知道或不存在的序列。TNV mAb轻链使用J3连接序列。

[0043] 图4示出了TNV mAb重链可变区的推导氨基酸序列。所示的氨基酸序列(单字母缩写)是从根据未克隆的PCR产物和克隆的PCR产物确定的DNA序列推导出来的。所示的氨基酸序列被划分为分泌信号序列(信号)、框架(FW)和互补决定区(CDR)结构域。DP-46种系基因的氨基酸序列显示在每个结构域的顶行上。点表明TNV mAb中的氨基酸与种系基因相同。TNV148(B)表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。“TNV”表明所示序列涉及所有TNV mAb,除非显示了不同的序列。种系序列(CDR3)中的破折号表明该序列在种系基因中是未知的或不存在的。

[0044] 图5示出TNV mAb轻链可变区的推导氨基酸序列。所示的氨基酸序列(单字母缩写)是从根据未克隆的PCR产物和克隆的PCR产物确定的DNA序列推导出来的。所示的氨基酸序列被划分为分泌信号序列(信号)、框架(FW)和互补决定区(CDR)结构域。Vg/38K型轻链种系基因的氨基酸序列显示在每个结构域的顶行上。点表明TNV mAb中的氨基酸与种系基因相同。TNV148(B)表明所示序列涉及TNV148和TNV148B两者。“所有”表明所示序列涉及TNV14、TNV15、TNV148、TNV148B和TNV186。

[0045] 图6示出了用于制备表达rTNV148B的C466细胞的重链和轻链表达质粒的示意图。p1783是重链质粒,并且p1776是轻链质粒。rTNV148B可变区和恒定区编码结构域显示为黑色框。J-C内含子中的免疫球蛋白增强子显示为灰色框。显示了相关的限制性位点。质粒显示为定向的,使得Ab基因的转录以顺时针方向进行。质粒p1783的长度为19.53kb,并且质粒p1776的长度为15.06kb。两种质粒的完整核苷酸序列是已知的。p1783中的可变区编码序列可通过替换BsiWI/BstBI限制性片段而容易地替换为另一个重链可变区序列。p1776中的可变区编码序列可通过替换SalI/AflIII限制性片段而替换为另一个可变区序列。

[0046] 图7示出了五种产生rTNV148B的细胞系的生长曲线分析的图示。培养开始于第0天,将细胞接种到T75烧瓶中的I5Q+MHX培养基中,使30ml体积中的活细胞密度为 1.0×10^5 个细胞/ml。自执行转染和亚克隆以来,用于这些研究的细胞培养物一直处于连续培养中。在随后的几天,将T烧瓶中的细胞彻底重悬并移除培养物的0.3ml等分试样。当细胞计数降至 1.5×10^5 个细胞/ml以下时,终止生长曲线研究。通过台盼蓝排除法确定等分试样中活细胞的数量,并将等分试样的剩余部分储存用于稍后的mAb浓度测定。同时对所有样本等分试样执行人IgG的ELISA。

[0047] 图8示出了在不同浓度的MHX选择的存在下细胞生长速率的比較的图示。将细胞亚克隆C466A和C466B解冻到不含MHX的培养基(IMDM,5%FBS,2mM谷氨酰胺)中并再培养2天。然后将两种细胞培养物分成不含MHX、0.2X MHX或1X MHX的三种培养物。一天后,用培养物以 1×10^5 个细胞/ml的起始密度接种新鲜T75烧瓶,并以24小时间隔计数细胞一周。使用SOP PD32.025中的公式计算前5天期间的倍增时间,并显示在条上方。

[0048] 图9示出了来自两个产生rTNV148B的细胞系的mAb产量随着时间的推移的稳定性的图示。自执行转染和亚克隆以来,一直处于连续培养中的细胞亚克隆用于在24孔培养皿中开始长期连续培养。在具有和不具有MHX选择的I5Q培养基中培养细胞。通过每4至6天分离培养物以维持新的活培养物而连续传代细胞,同时允许先前的培养物耗尽。在培养物耗尽后不久收集用过的细胞上清液的等分试样并储存直至测定mAb浓度。同时对所有样本等分试样执行人IgG的ELISA。

[0049] 图10示出了与实施例4中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg或10mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或本发明的抗TNF抗体(TNV14、TNV148或TNV196)进行治疗。当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第3至7周时显著增加。用10mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第7周时也实现显著的体重增加。

[0050] 图11A至图11C示出了基于如实施例4所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第3周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第7周)。当与D-PBS治疗组相比时,用1mg/kg TNV14治疗的动物和用1mg/kg cA2治疗的动物在第3周后未显示出AI的显著降低。当10mg/kg治疗组中的每一组与相似剂量的其他组相比(10mg/kg cA2与10mg/kg TNV14、148和196相比)时,它们之间没有显著差异。当比较1mg/kg治疗组时,1mg/kg TNV148在3周、4周和7周时显示出显著低于1mg/kg cA2的AI。在3周和4周时,1mg/kg TNV148也显著低于1mg/kg TNV14治疗组。尽管TNV196在研究的第6周依

然显示AI显著降低(当与D-PBS治疗组相比时),但TNV148是在研究结束时仍然显著的唯一1mg/kg治疗。

[0051] 图12示出了与实施例5中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。在大约4周龄时,基于体重,将Tg197研究小鼠分配到8个治疗组中的一个,并以3mg/kg(第0周)的腹膜内推注剂量的对照制品(D-PBS)或TNF抗体(TNV14、TNV148)进行治疗。在第1、2、3和4周时对所有动物重复注射。评价第1-6组的测试制品疗效。在第2、3和4周时从第7组和第8组的动物获得的血清样本评价TNV14或TNV148的免疫应答诱导和药代动力学清除率。

[0052] 图13A至图13C为表示基于关节炎指数的实施例5中疾病严重程度的进展的图。从第2周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数显著低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第5周)。当与d-PBS治疗组相比时,用1mg/kg或3mg/kg cA2治疗的动物和用3mg/kg TNV14治疗的动物在整个研究中的任何时间都未能实现AI的任何显著降低。当与从第3周开始并持续至第5周的d-PBS治疗组相比时,用3mg/kg TNV148治疗的动物显示出显著降低。在研究的第4周和第5周时,当与较低剂量(1mg/kg和3mg/kg)的cA2相比时,10mg/kg cA2治疗的动物显示出AI的显著降低,并且在第3至5周时也显著低于TNV14治疗的动物。尽管3mg/kg治疗组中的任一组之间似乎没有显著差异,但用3mg/kg TNV14治疗的动物的AI在一些时间点显著高于10mg/kg,而用TNV148治疗的动物的AI与用10mg/kg cA2治疗的动物没有显著差异。

[0053] 图14示出了与实施例6中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到6个治疗组中的一个,并以3mg/kg或5mg/kg的单次腹膜内推注剂量的抗体(cA2或TNV148)进行治疗。该研究利用D-PBS和10mg/kg cA2对照组。

[0054] 图15示出了基于如实施例6所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。所有治疗组在较早的时间点显示出一定程度的保护,其中5mg/kg cA2和5mg/kg TNV148在第1至3周时显示出AI显著减少,并且所有治疗组在第2周时显示出显著减少。在研究的稍后阶段,用5mg/kg cA2治疗的动物显示出一定程度的保护,在第4、6和7周时显著减少。cA2和TNV148的低剂量(3mg/kg)在第6周时显示出显著减少,并且所有治疗组在第7周时显示出显著减少。在研究结束时(第8周),没有一个治疗组能够保持显著减少。在任何时间点的治疗组(不包括盐水对照组)中的任一组之间没有显著差异。

[0055] 图16示出了与实施例7中的对照相比,响应于本发明的抗TNF抗体的关节炎小鼠模型小鼠Tg197的重量变化。比较单次腹膜内剂量的TNV148(来自杂交瘤细胞)和rTNV148B(来自转染细胞)的疗效。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或抗体(TNV148、rTNV148B)进行治疗。

[0056] 图17示出了基于如实施例7所述的关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第4周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第8周)。TNV148治疗组和1mg/kg的cA2治疗组均在第4周时显示出AI的显著降低。尽管先前的研究(P-099-017)显示,在单次1mg/kg腹腔内推注后,TNV148在降低关节炎指数方面略有效,但本研究显示两种版本的TNV抗体治疗组的AI均略高。虽然(第6周除外)1mg/kg的cA2治疗

组当与10mg/kg cA2组相比时没有显著增加,并且TNV148治疗组在第7周和第8周时显著较高,但在研究中的任何时间点,1mg/kg cA2、1mg/kg TNV148和1mg/kg TNV148B之间不存在AI的显著差异。

[0057] 图18示出了在患有活动性银屑病关节炎 (PsA) 的受试者中静脉内施用的Simponi (戈利木单抗) 试验的研究设计图。

具体实施方式

[0058] 本发明提供了分离的、重组的和/或合成的抗TNF人、灵长类动物、啮齿类动物、哺乳动物、嵌合的、人源化的或CDR-移植的抗体,其包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区和TNF抗独特型抗体,以及包含编码至少一种抗TNF抗体或抗独特型抗体的至少一种多核苷酸的组合物和编码核酸分子。本发明还包括但不限于,制备和使用此类核酸和抗体及抗独特型抗体的方法,包括诊断和治疗组合物、方法和装置。

[0059] 如本文所用,“抗肿瘤坏死因子 α 抗体”、“抗TNF抗体”、“抗TNF抗体部分”或“抗TNF抗体片段”和/或“抗TNF抗体变体”等包括任何这样的含蛋白质或肽的分子,该分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,诸如但不限于,重链或轻链的至少一个互补决定区 (CDR) 或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架区或其任何部分,或TNF受体或结合蛋白质的至少一个可并入本发明抗体中的部分。此类抗体任选地还影响特异性配体,诸如但不限于此类抗体在体外、在原位和/或在体内调节、降低、提高、拮抗、激动、缓和、减轻、阻断、抑制、消除和/或干扰至少一种TNF活性或结合,或者干扰TNF受体活性或结合。作为非限制性示例,本发明的合适的抗TNF抗体、特定部分或变体可以结合至少一种TNF或其特定部分、变体或结构域。合适的抗TNF抗体、特定部分或变体还可任选地影响至少一种TNF活性或功能,诸如但不限于RNA、DNA或蛋白质合成、TNF释放、TNF受体信号传导、膜TNF切割、TNF活性、TNF产生和/或合成。术语“抗体”还旨在涵盖抗体、其消化片段、特定部分和变体,包括抗体模拟物或包含模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分,包括单链抗体及其片段。功能片段包括结合哺乳动物TNF的抗原结合片段。例如,本发明涵盖能够结合TNF或其部分的抗体片段,包括但不限于,Fab片段(例如通过木瓜蛋白酶消化得到)、Fab'片段(例如通过胃蛋白酶消化和部分还原得到)和F(ab')₂片段(例如通过胃蛋白酶消化得到)、facb片段(例如通过纤溶酶消化得到)、pFc'片段(例如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化得到)、Fd片段(例如通过胃蛋白酶消化、部分还原以及重聚集得到)、Fv或scFv片段(例如通过分子生物学技术得到)(参见,例如Colligan, Immunology, 出处同上)。

[0060] 此类片段可通过如本领域已知和/或如本文所述的酶裂解、合成或重组技术产生。也可使用抗体基因以多种截短形式产生抗体,其中一个或多个终止密码子已引入天然终止位点的上游。例如,可将编码F(ab')₂重链部分的组合基因设计成包括编码重链的CH₁结构域和/或铰链区的DNA序列。抗体的各个部分可通过常规技术用化学方法连接在一起,或可使用遗传工程技术制备为连续蛋白质。

[0061] 如本文所用,术语“人抗体”是指其中基本上蛋白质的每个部分(例如CDR、框架区、C_L结构域、C_H结构域(例如C_H1、C_H2、C_H3)、铰链区(V_L、V_H))在人类中基本上是无免疫原性的,仅具有小的序列改变或变化。类似地,指明属灵长类(猴、狒狒、黑猩猩等)、啮齿类(小鼠、大

鼠、兔、豚鼠、仓鼠等)和其他哺乳动物的抗体表示此类种、亚属、属、亚科、科的特异抗体。此外,嵌合抗体包括上述的任何组合。此类改变或变异任选且优选地相对于未经修饰的抗体而言保持或减少在人或其他物种中的免疫原性。因此,人抗体不同于嵌合抗体或人源化抗体。应当指出的是,人抗体可由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(例如,重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可包含在天然人抗体中不存在的连接肽。例如,Fv可包含连接重链可变区和轻链可变区的连接肽,诸如二至约八个甘氨酸或其他氨基酸残基。此类连接肽被认为是人源的。

[0062] 还可以使用双特异性抗体、异种特异性抗体、异种缀合抗体或类似抗体,它们是对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆的、优选人或人源化的抗体。在本情况中,结合特异性中的一种针对至少一种TNF蛋白质,另一种结合特异性针对任何其他抗原。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。通常,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条重链具有不同的特异性(Milstein和Cuellar, *Nature* 305: 537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))产生可能的10种不同抗体分子的混合物,其中仅一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤进行)相当繁琐,并且产物得率低。类似程序在例如以下文献中有所公开:WO 93/08829、美国专利6210668、6193967、6132992、6106833、6060285、6037453、6010902、5989530、5959084、5959083、5932448、5833985、5821333、5807706、5643759、5601819、5582996、5496549、4676980、WO 91/00360、WO 92/00373、EP 03089、Traunecker等人, *EMBO J.* 10:3655 (1991)、Suresh等人, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986),各自全文以引用方式并入本文。

[0063] 可用于本发明的方法和组合物中的抗TNF抗体(也称作TNF抗体)的特征可任选地在于与TNF高亲和力结合以及任选且优选地具有低毒性。具体地,本发明的抗体、特定片段或变体(其中各个成分,诸如可变区、恒定区和构架区单独和/或共同地任选且优选地具有低免疫原性)可用于本发明中。可用于本发明的抗体的特征任选地在于它们能够在长时间段内治疗患者,可测量地减轻症状并具有低毒性和/或可接受的毒性。低的或可接受的免疫原性和/或高亲和力以及其他合适的特性,可有助于实现治疗结果。“低免疫原性”在本文中定义为在低于约75%,或优选地低于约50%的受治疗的患者中产生显著的HAHA、HACA或HAMA响应,和/或在受治疗的患者中引起低滴度(以双抗原酶免疫测定法测量小于约300,优选地小于约100)(Elliott等人, *Lancet* 344:1125-1127 (1994),其全文以引用方式并入本文)。

[0064] 效用:本发明的分离核酸可用于产生至少一种抗TNF抗体或其特定变体,其可以用于在细胞、组织、器官或动物(包括哺乳动物和人)中测量或实现,以诊断、监控、调节、治疗、减轻、帮助预防至少一种TNF病症的发生或减轻其症状,所述TNF病症选自但不限于免疫障碍或疾病、心血管障碍或疾病、感染性、恶性和/或神经性障碍或疾病中的至少一者。

[0065] 此类方法可包括向需要对症状、效果或机制进行此类调节、治疗、减轻、预防或减少的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的含有至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物。该有效量可包括每单次施用(例如推注)、多次施用或连续施用约0.001mg/kg至500mg/kg的量,或每单次施用、多次施用或连续施用实现0.01μg/ml至5000μg/ml的血清浓度,或其中的任何有效范围或值,该有效量使用如本文所述的或相关领域已知的已知方法

进行施用和测定。引用。本文引用的所有出版物或专利都以引用方式全文并入本文中,因为它们显示了本发明时的技术发展水平,并且/或者提供了本发明的描述和实现。出版物是指任何科学出版物或专利公布、或可以任何媒体格式获得的任何其他信息,该媒体格式包括所有记录格式、电子格式或印刷格式。以下参考以引用方式全文并入本文:Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow和Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan等人编辑, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan等人, Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001)。

[0066] 本发明的抗体:包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区的本发明的至少一种抗TNF抗体可任选地通过细胞系、混合细胞系、无限增殖化细胞或无限增殖化细胞的克隆群体来生产,如本领域所熟知的。参见例如Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow和Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan等人编辑, Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan等人, Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001), 各自以引用方式全文并入本文。

[0067] 可针对适当的免疫原性抗原产生对人TNF蛋白质或其片段特异的人抗体,诸如分离的和/或TNF蛋白质和/或其部分(包括合成分子,诸如合成肽)。可以类似地产生其他特异或一般性的哺乳动物抗体。使用任何合适的技术可执行免疫原性抗原的制备和单克隆抗体的产生。

[0068] 在一种方法中,杂交瘤是通过合适的无限增殖化细胞系(例如骨髓瘤细胞系,诸如但不限于, Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L.5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A等,或异型骨髓瘤(heteromyeloma),其融合产物,或由其衍生的任何细胞或融合细胞,或如本领域已知的任何其他合适的细胞系。参见,例如www.atcc.org, www.lifetech.com.等与产抗体细胞融合来产生,所述产抗体细胞诸如但不限于分离的或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体细胞或其他免疫细胞或包括B细胞的细胞,或任何这样的其他细胞,它们将重链或轻链恒定序列或可变序列或框架序列或CDR序列表达为内源的或异源的核酸、为重组或内源的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿类动物、马、绵羊、山羊、羊、灵长类动物、真核生物、基因组DNA、cDNA、rDNA、线粒体DNA或RNA、叶绿体DNA或RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交的等或它们的任何组合。参见,例如以引用方式全文并入本文的Ausubel, 出处同上,和Colligan, Immunology, 出处同上, 第2章。

[0069] 产抗体细胞还可从人或已用感兴趣的抗原免疫过的其他合适动物的外周血,或优选地脾或淋巴结获得。任何其他合适的宿主细胞也可用于表达编码本发明的抗体、其特定

片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可使用选择性培养条件或其他合适的已知方法进行分离,并且可通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可通过合适的测定法(例如ELISA)进行选择。

[0070] 可以使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于,从以下肽或蛋白质文库选择重组抗体的方法(例如,但不限于,噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA等展示文库;例如,购自Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Scotland, UK; BioInvent, Lund, Sweden; Dyax, Enzon, Affymax/Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys。参见例如EP 368, 684; PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (5/12/94); PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC); W090/14443; W090/14424; W090/14430; PCT/US94/1234; W092/18619; W096/07754; (Scripps); EP 614 989 (MorphoSys); W095/16027 (BioInvent); W088/06630; W090/3809 (Dyax); US 4,704,692 (Enzon); PCT/US91/02989 (Affymax); W089/06283; EP 371998; EP 550400; (Xoma); EP 229046; PCT/US91/07149 (Ixsys); 或随机生成的肽或蛋白质—US 5723323、5763192、5814476、5817483、5824514、5976862、W0 86/05803、EP 590689 (Ixsys, 现为Applied Molecular Evolution (AME), 各自以引用方式全文并入本文))或者依赖于转基因动物的免疫(例如SCID小鼠, Nguyen等人, Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997)); Sandhu等人, Crit. Rev. Biotechnol. 16:95-118 (1996); Eren等人, Immunol. 93:154-161 (1998), 各自以引用方式以及相关专利和申请全文并入本文)能够产生人类抗体的全部功能, 如本领域已知和/或如本文所述。此类技术包括但不限于核糖体展示 (Hanes等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (1997年5月); Hanes等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (1998年11月)); 单细胞抗体产生技术(例如, 选择的淋巴细胞抗体方法(“SLAM”) (美国专利5,627,052, Wen等人, J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); 凝胶微滴和流式细胞术 (Powell等人, Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray等人, J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny等人, Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); B细胞选择 (Steenbakkers等人, Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak等人, Progress Biotech, 第5卷, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck编辑, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988))。

[0071] 还可使用用于将非人或人抗体进行工程化或人源化的方法, 这些方法是本领域所熟知的。一般来讲, 人源化或工程化的抗体具有一个或多个来自非人来源的氨基酸残基, 所述非人来源是例如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些人氨基酸残基通常称为“输入”残基, 它们一般取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域。已知的人Ig序列是公开的, 例如, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;

www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/~honegger/AH0seminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html。Kabat等人, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health (1983), 以上网址公开内容和文献全文均以引用方式并入本文。

[0072] 此类输入序列可用于降低免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力、结合率、解离率、亲合力、特异性、半衰期或任何其他合适的特征,如本领域已知的。一般来讲,保留部分或全部非人或人CDR序列,而可变区和恒定区的非人序列用人或其他氨基酸置换。抗体还可以任选地人源化为保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现这个目标,人源化抗体还可以任选地使用亲本和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上的人源化产物的分析过程进行制备。三维免疫球蛋白模型通常是可用的并且是为本领域的技术人员所熟悉的。举例说明且显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可用的。这些展示的检测使得能分析在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中残基的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式,可以从共有和输入序列中选择和组合FR残基,从而能实现所需抗体特征,诸如对靶抗原的增加的亲和力。通常,CDR残基直接且基本上大多数涉及影响抗原结合。本发明抗体的人源化或工程化可使用任何已知方法执行,诸如但不限于以下中所描述的那些, Winter (Jones等人, Nature 321:522 (1986); Riechmann等人, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen等人, Science 239:1534 (1988); Sims等人, J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia和Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta等人, J. Immunol. 151:2623 (1993), 美国专利: 5723323、5976862、5824514、5817483、5814476、5763192、5723323、5,766886、5714352、6204023、6180370、5693762、5530101、5585089、5225539、4816567、PCT/US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755、W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP 229246,各自以引用方式全文并入本文,包括其中引用的参考文献。

[0073] 如本文所述和/或如本领域已知的,还可以通过对能产生全套人抗体的转基因动物(例如小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类动物等)进行免疫来任选地产生抗TNF抗体。可使用合适的方法,诸如本文描述的方法,从此类动物分离产生人抗TNF的抗体的细胞并使其无限增殖化。

[0074] 能够产生与人抗原结合的全套人抗体的转基因小鼠可通过已知方法产生(例如,但不限于,授予Lonberg等人的美国专利:5,770,428;5,569,825;5,545,806;5,625,126;5,625,825;5,633,425;5,661,016和5,789,650;Jakobovits等人WO 98/50433, Jakobovits等人WO 98/24893, Lonberg等人WO 98/24884, Lonberg等人WO 97/13852, Lonberg等人WO 94/25585, Kucherlapate等人WO 96/34096, Kucherlapate等人EP 0463151B1, Kucherlapate等人EP 0710719A1, Surani等人美国专利5,545,807, Bruggemann等人WO 90/04036, Bruggemann等人EP 0438474B1, Lonberg等人EP 0814259A2, Lonberg等人GB 2272440A, Lonberg等人Nature 368:856-859 (1994), Taylor等人, Int. Immunol. 6 (4) 579-591 (1994), Green等人, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez等人, Nature Genetics 15:146-156 (1997), Taylor等人, Nucleic Acids Research 20 (23):6287-6295 (1992), Tuailon等人, Proc Natl Acad Sci USA 90 (8) 3720-3724 (1993), Lonberg等人, Int Rev Immunol 13 (1):65-93 (1995) 和Fishwald等人, Nat Biotechnol 14 (7):845-851 (1996), 其各自以引用方式全文并入本文)。一般来讲,这些小鼠包含至少一种包含来自至少一个发生了功能性重排或可经历功能性重排的人免疫球蛋白基因座的DNA的转基因。此类小鼠中的内源免疫球蛋白基因座可以被破坏或缺失,以消除动物产生由内源基因编码的抗体的能力。

[0075] 可使用肽展示文库方便地实现对与相似蛋白质或片段特异性结合的抗体的筛选。这种方法涉及在大型肽集合中筛选具有所需功能或结构的个别成员。肽展示文库的抗体筛选是本领域熟知的。所展示的肽序列的长度可以为3至5000个或更多个氨基酸,常常长为5-100个氨基酸,通常长为约8-25个氨基酸。除了用于产生肽文库的直接化学合成方法之外,有几种重组DNA方法也已得到描述。一种类型涉及在噬菌体或细胞表面上展示肽序列。每个噬菌体或细胞均含有编码具体展示的肽序列的核苷酸序列。这类方法描述于PCT专利公布91/17271、91/18980、91/19818和93/08278。用于产生肽文库的其他系统同时具有体外化学合成方法和重组方法的各方面。参见PCT专利公布92/05258、92/14843和96/19256。还可参见美国专利5,658,754;和5,643,768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可从诸如Invitrogen (Carlsbad, CA) 和Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) 的供应商商购获得。参见例如美国专利4704692、4939666、4946778、5260203、5455030、5518889、5534621、5656730、5763733、5767260、5856456, 转让给Enzon;5223409、5403484、5571698、5837500, 转让给Dyax, 5427908、5580717, 转让给Affymax;5885793, 转让给Cambridge antibody Technologies;5750373, 转让给Genentech, 5618920、5595898、5576195、5698435、5693493、5698417, 转让给Xoma, Colligan, 出处同上;Ausubel, 出处同上;或Sambrook, 出处同上, 以上专利和出版物中的每一者以引用方式全文并入本文。

[0076] 使用至少一种抗TNF抗体编码核酸来提供转基因动物或哺乳动物, 诸如山羊、奶牛、马、绵羊等, 也可以制备本发明的抗体, 所述转基因动物或哺乳动物能够在它们的奶中产生此类抗体。此类动物可使用已知的方法提供。参见例如但不限于美国专利5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489等, 这些专利中的每

一篇以引用方式全文并入本文。

[0077] 使用至少一种抗TNF抗体编码核酸来提供转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草和玉米),也可以制备本发明的抗体,所述转基因植物和培养的植物细胞在其植物部分或从植物部分培养得到的细胞中产生此类抗体、其特定部分或变体。作为非限制性示例,表达重组蛋白质的转基因烟草叶已成功地用于提供大量重组蛋白质,例如使用诱导型启动子。参见,例如Cramer等人,Curr.Top.Microbol.Immunol.240:95-118(1999),以及其中引用的参考文献。同样,转基因玉米也已用于以商业生产规模表达哺乳动物蛋白质,其生物活性等同于在其他重组系统中生产或从天然来源纯化的那些哺乳动物蛋白质。参见,例如Hood等人,Adv.Exp.Med.Biol.464:127-147(1999),以及其中引用的参考文献。也可由转基因植物种子(包括烟草种子和马铃薯块茎)大量生产抗体,包括抗体片段,诸如单链抗体(scFv)。参见,例如Conrad等人,PlantMol.Biol.38:101-109(1998),以及其中引用的参考文献。因此,本发明的抗体还可使用转基因植物根据已知方法进行生产。还可参见,例如Fischer等人,Biotechnol.Appl.Biochem.30:99-108(Oct.,1999);Ma等人,Trends Biotechnol.13:522-7(1995);Ma等人,Plant Physiol.109:341-6(1995);Whitelam等人,Biochem.Soc.Trans.22:940-944(1994);以及其中引用的参考文献。关于抗体的植物表达一般还可参见但不限于,上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0078] 本发明的抗体可以广泛范围的亲和力(K_D)结合人TNF。在一个优选的实施方案中,本发明的至少一种人mAb可任选地以高的亲和力结合人TNF。例如,人mAb可以等于或小于约 $10^{-7}M$,诸如但不限于 $0.1-9.9$ (或其中的任何范围或值) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 或其中的任何范围或值的 K_D 结合人TNF。

[0079] 抗体对抗原的亲和力或亲合力可以使用任何合适的方法通过实验确定。(参见例如Berzofsky等人,“Antibody-Antigen Interactions”,Fundamental Immunology,Paul,W.E编辑,Raven Press:New York,NY(1984);Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,NY(1992);以及本文所述的方法)。如果在不同的条件(例如,盐浓度、pH)下测量,则测得的特定抗体-抗原相互作用的亲和力会不同。因此,亲和力和其他抗原结合参数(例如 K_D 、 K_a 、 K_d)的测量优选地用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液(诸如本文所述的缓冲液)来进行。

[0080] 核酸分子。使用本文提供的信息,诸如编码SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8中的至少一者的至少70%-100%的邻接氨基酸的核苷酸序列、其特定片段、变体或共有序列,或者包含这些序列中的至少一者的经寄载体,可使用本文描述的或如本领域已知的方法获得编码包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区的至少一种抗TNF抗体的本发明核酸分子。

[0081] 本发明的核酸分子可以是RNA的形式,诸如mRNA、hnRNA、tRNA或任何其他形式,或者为DNA的形式,包括但不限于,通过克隆或合成产生的cDNA和基因组DNA,或它们的任何组合。DNA可以为三链的、双链的或单链的或它们的任何组合。DNA或RNA的至少一条链的任何部分可以是编码链,也称为有义链,或其可以是非编码链,也称作反义链。

[0082] 本发明的分离核酸分子可包括具有开放阅读框(ORF),任选地具有一个或多个内含子的核酸分子,例如但不限于至少一个CDR的至少一个指定部分,如至少一条重链(例如SEQ ID NO:1-3)或轻链(例如SEQ ID NO:4-6)的CDR1、CDR2和/或CDR3;具有抗TNF抗体或可

变区的编码序列的核酸分子(例如,SEQ ID NO:7、8);以及具有基本上不同于上述那些的核苷酸序列,但由于遗传密码的简并性,仍编码至少一种抗TNF抗体的核酸分子,如本文所述和/或如本领域已知的。当然,遗传密码是本领域熟知的。因此,对于本领域技术人员而言,应该可以按常规产生编码本发明的特异性抗TNF抗体的此类简并核酸变体。参见,例如Ausubel等人,出处同上,并且此类核酸变体包括在本发明中。本发明的分离的核酸分子的非限制性示例包括SEQ ID NO:10、11、12、13、14、15,分别对应于编码HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC可变区和LC可变区的核酸的非限制性示例。

[0083] 如本文所指出,本发明核酸分子包含编码抗TNF抗体的核酸,所述核酸可包括但不限于单独编码抗体片段的氨基酸序列的那些核酸;整个抗体或其部分的编码序列;抗体、片段或部分的编码序列以及附加序列,诸如具有或不具有上述附加编码序列的至少一种信号前导肽或融合肽的编码序列;诸如至少一个内含子;还包括附加非编码序列,包括但不限于非编码5'和3'序列,诸如在转录、mRNA加工(包括剪接和聚腺苷化信号(例如mRNA的核糖体结合和稳定))中发挥作用的转录、非翻译序列;编码附加氨基酸,诸如提供附加功能的那些氨基酸的附加编码序列。因此,编码抗体的序列可以与标记序列诸如编码肽的序列融合,所述肽可促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化。

[0084] 与本文所述的多核苷酸选择性杂交的多核苷酸。本发明提供在选择性杂交条件下与本文所公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此,本实施方案的多核苷酸可用于分离、检测和/或定量包含此类多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可用于鉴定、分离或扩增寄存文库中的部分或全长克隆。在一些实施方案中,多核苷酸是分离的基因组序列或cDNA序列,或与来自人或哺乳动物核酸文库的cDNA互补。

[0085] 优选地,cDNA文库包含至少80%全长序列,优选地至少85%或90%全长序列,更优选地至少95%全长序列。cDNA文库可以进行标准化以增加罕见序列的表现。低或中等严格杂交条件一般但不是唯一地用于相对于互补序列具有减少的序列同一性的序列。中等和高严格条件可以任选地用于同一性更大的序列。低严格条件允许具有约70%序列同一性的序列进行选择杂交,并且可用于鉴定直系同源或旁系同源序列。

[0086] 任选地,本发明的多核苷酸将编码由本文所述多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包含可以用于与编码本发明抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见例如Ausubel(出处同上);Colligan(出处同上),各自以引用方式全文并入本文。

[0087] 核酸的构建。可使用本领域熟知的(a)重组方法、(b)合成技术、(c)纯化技术或它们的组合来制备本发明的分离的核酸。

[0088] 所述核酸可方便地包含除了本发明的多核苷酸之外的序列。例如,可以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆位点插入核酸中以帮助该多核苷酸的分离。此外,可以插入可翻译序列以帮助分离翻译出的本发明多核苷酸。例如,六组氨酸标记序列为纯化本发明的蛋白质提供了便利手段。本发明的核酸(编码序列除外)任选地为用于克隆和/或表达本发明多核苷酸的载体、衔接子或接头。

[0089] 可将附加序列添加此类克隆和/或表达序列来优化它们在克隆和/或表达中的功能,以帮助分离所述多核苷酸,或改善该多核苷酸向细胞中的导入。克隆载体、表达载体、衔接子和接头的使用是本领域熟知的。(参见例如Ausubel,出处同上;或Sambrook,出处同上)。

[0090] 用于构建核酸的重组方法。本发明的分离的核酸组合，诸如RNA、cDNA、基因组DNA或它们的任何组合，可使用多种本领域技术人员已知的克隆方法从生物学来源获得。在一些实施方案中，将在严格条件下与本发明多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在cDNA或基因组DNA文库中鉴定所需序列。RNA的分离，以及cDNA和基因组文库的构建是本领域普通技术人员熟知的。(参见例如Ausubel，出处同上；或Sambrook，出处同上)。

[0091] 核酸筛选和分离方法。cDNA或基因组文库可使用基于本发明多核苷酸的序列(诸如本文所公开的那些)的探针进行筛选。探针可用于与基因组DNA或cDNA序列杂交以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域的技术人员将会知道各种严格度的杂交可用于测定；并且杂交或洗涤介质可以是严格的。随着用于杂交的条件变得更严格，在探针和靶之间必须存在更程度的互补性才能使双链体形成得以发生。严格性的程度可以由温度、离子强度、pH和部分变性溶剂诸如甲酰胺的存在中的一者或多者加以控制。例如，通过例如在0%至50%的范围内操纵甲酰胺的浓度使反应物溶液的极性变化，从而方便地改变杂交的严格性。对于可检测结合所需的互补性程度(序列同一性)将根据杂交介质和/或洗涤介质的严格性而变化。互补性程度将最佳为100%或70%-100%或其中的任何范围或值。然而应当理解，探针和引物中较小的序列变异可以通过减少杂交和/或洗涤介质的严格性进行补偿。

[0092] 扩增RNA或DNA的方法是本领域熟知的，并且基于本文呈现的教导和指导，无需过度实验即可根据本发明使用。

[0093] 已知的DNA或RNA扩增方法包括但不限于聚合酶链反应(PCR)和相关的扩增方法(参见例如授予Mullis等人的美国专利4,683,195、4,683,202、4,800,159、4,965,188；授予Tabor等人的4,795,699和4,921,794；授予Innis等人的5,142,033；授予Wilson等人的5,122,464；授予Innis的5,091,310；授予Gyllensten等人的5,066,584；授予Gelfand等人的4,889,818；授予Silver等人的4,994,370；授予Biswas的4,766,067；授予Ringold的4,656,134)以及使用靶序列的反义RNA作为双链DNA合成模板的RNA介导的扩增(授予Malek等人的美国专利5,130,238，其商品名为NASBA)，这些参考文献的全部内容以引用方式并入本文。(参见例如Ausubel，出处同上；或Sambrook，出处同上。)

[0094] 例如，可使用聚合酶链反应(PCR)技术直接从基因组DNA或cDNA文库扩增本发明的多核苷酸和相关基因的序列。例如PCR和其他体外扩增方法也可用于克隆编码待表达的蛋白质的核酸序列、制备核酸以用作探针来检测样本中所需mRNA的存在，用于核酸测序，或用于其他目的。足以在整个体外扩增方法中指导技术人员的技术的示例可见于Berger(出处同上)、Sambrook(出处同上)和Ausubel(出处同上)，以及Mullis等人的美国专利4,683,202(1987)；以及Innis等人，PCR Protocols A Guide to Methods and Applications,Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA(1990)。用于基因组PCR扩增的可商购获得的试剂盒是本领域已知的。参见例如，Advantage-GC Genomic PCR Kit(Clontech)。此外，例如，T4基因32蛋白质(BoehringerMannheim)可用于提高长PCR产物的得率。

[0095] 用于构建核酸的合成方法。本发明的分离的核酸还可通过已知方法通过直接化学合成进行制备(参见，例如Ausubel等人，出处同上)。化学合成一般会产生单链寡核苷酸，其可以通过与互补序列杂交，或通过使用该单链作为模板用DNA聚合酶进行聚合而转变成双链DNA。本领域技术人员将认识到，虽然DNA的化学合成可能限制于约100个或更多个碱基的

序列,但较长的序列可以通过连接较短序列来获得。

[0096] 重组表达盒。本发明还提供包含本发明核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列,例如编码本发明抗体的cDNA或基因组序列,可用于构建可导入到至少一种所需宿主细胞中的重组表达盒。重组表达盒通常会包含与转录起始调节序列可操作地连接的本发明多核苷酸,所述转录起始调节序列会引导所述多核苷酸在预定的宿主细胞中的转录。异源和非异源(即内源)启动子两者均可用于引导本发明核酸的表达。

[0097] 在一些实施方案中,可在非异源形式的本发明多核苷酸的适当位置(上游、下游或内含子中)引入作为启动子、增强子或其他元件的分离核酸,以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如,可通过突变、缺失和/或置换在体内或体外改变内源启动子。

[0098] 载体和宿主细胞。本发明还涉及包括本发明的分离的核酸分子的载体、用该重组载体进行遗传工程改造的宿主细胞以及通过本领域熟知的重组技术生产至少一种抗TNF抗体。参见例如Sambrook等人(出处同上);Ausubel等人(出处同上),各自全文以引用方式并入本文。

[0099] 可将所述多核苷酸任选地与包括可选择标记的载体连接,以在宿主中增殖。一般来讲,质粒载体在沉淀物诸如磷酸钙沉淀物中,或在与带电脂质的复合物中被导入。如果载体是病毒,那么它可以使用适当的包装细胞系在体外进行包装并且然后转导进宿主细胞内。

[0100] 应将DNA插入物与适当的启动子可操作地连接。表达构建体还会含有转录起始位点、终止位点以及在转录区中含有用于翻译的核糖体结合位点。该构建体表达的成熟转录物的编码部分将优选地包括在待翻译的mRNA开始处的翻译起始位点和在该mRNA末端适当位置的终止密码子(例如,UAA、UGA或UAG),对于哺乳动物或真核细胞表达优选UAA和UAG。

[0101] 表达载体将优选但任选地包括至少一个可选择标记。此类标记包括例如但不限于:对于真核细胞培养物,为甲氨喋呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR,美国专利4,399,216;4,634,665;4,656,134;4,956,288;5,149,636;5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶(GS,美国专利5,122,464;5,770,359;5,827,739)抗性基因,对于大肠杆菌(E.coli)和其他细菌或原核生物培养,为四环素或氨苄青霉素抗性基因(以上专利全文以引用方式并入本文)。用于上述宿主细胞的适当的培养基和条件是本领域已知的。合适的载体对于技术人员来说将是显而易见的。载体构建体导入宿主细胞可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他已知方法来实现。此类方法已在本领域中有所描述,诸如Sambrook(出处同上),第1-4章和第16-18章;Ausubel(出处同上),第1、9、13、15、16章。

[0102] 本发明的至少一种抗体可以修饰形式(诸如融合蛋白质)表达,并且可不仅包括分泌信号,而且还可包括附加异源功能区。例如,可将附加氨基酸(尤其是带电氨基酸)的区域添加至抗体的N-端,以提高纯化期间或随后的处理和储存期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样,可将肽部分添加至本发明的抗体以帮助纯化。此类区域可在抗体或其至少一个片段的最终制备前除去。此类方法在许多标准实验室手册中有所描述,诸如Sambrook(出处同上),第17.29-17.42章和第18.1-18.74章;Ausubel(出处同上),第16、17和18章。

[0103] 本领域技术人员可认识到许多表达系统可用于表达编码本发明蛋白质的核酸。

[0104] 另选地,本发明的核酸可在含有编码本发明抗体的内源DNA的宿主细胞中通过开

启(通过操纵)而在宿主细胞中表达。此类方法是本领域熟知的,例如,如美国专利5,580,734、5,641,670、5,733,746和5,733,761中所述,所述专利以引用方式全文并入本文。

[0105] 可用于生产抗体、其特定部分或变体的例示性细胞培养物是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常将是细胞单层的形式,但也可使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。在本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白质的合适宿主细胞系,包括COS-1(例如ATCC CRL 1650)、COS-7(例如ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例如ATCC CRL-10)、CHO(例如ATCC CRL 1610)和BSC-1(例如ATCC CRL-26)细胞系、Cos-7细胞、CHO细胞、hep G2细胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293细胞、HeLa细胞等,它们可容易地从例如美国典型培养物保藏中心(Manassas,Va(www.atcc.org))获得。优选的宿主细胞包括淋巴来源的细胞,诸如骨髓瘤细胞和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞是P3X63Ag8.653细胞(ATCC登记号CRL-1580)和SP2/0-Ag14细胞(ATCC登记号CRL-1851)。在尤其优选的实施方案中,重组细胞是P3X63Ab8.653或SP2/0-Ag14细胞。

[0106] 这些细胞的表达载体可包括以下的表达控制序列中的一者或多者,诸如但不限于:复制起点;启动子(例如,晚期或早期SV40启动子、CMV启动子(美国专利5,168,062;5,385,839)、HSV tk启动子、pgk(磷酸甘油酸激酶)启动子、EF-1 α 启动子(美国专利5,266,491)、至少一种人免疫球蛋白启动子;增强子和/或加工信息位点诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点(例如SV40大T Ag聚A添加位点)和转录终止子序列。参见例如Ausubel等人(出处同上);Sambrook等人(出处同上)。可用于产生本发明的核酸或蛋白质的其他细胞也是已知的和/或可例如从美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录(www.atcc.org)或其他已知的来源或商业来源得到。

[0107] 当使用真核宿主细胞时,通常会将多腺苷酸化或转录终止序列并入载体内。终止序列的示例是来自牛生长激素基因的多腺苷酸化序列。还可包括用于准确剪接转录物的序列。剪接序列的示例是来自SV40的VP1内含子(Sprague等人,J.Virol.45:773-781(1983))。此外,如本领域已知,可将控制在宿主细胞中的复制的基因序列并入载体内。

[0108] 抗体的纯化。抗TNF抗体可通过熟知的方法从重组细胞培养物中回收和纯化,所述方法包括但不限于蛋白质A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。高效液相色谱(“HPLC”)也可以用于纯化。参见,例如Colligan,Current Protocols in Immunology或Current Protocols in Protein Science,John Wiley&Sons,NY,NY,(1997-2001),例如第1、4、6、8、9、10章,各自以引用方式全文并入本文。

[0109] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成程序的产物和通过重组技术从真核宿主产生的产物,所述真核宿主包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。根据重组生产程序中所采用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或可以是非糖基化的,糖基化的是优选的。此类方法在许多标准实验室手册中有所描述,诸如Sambrook,出处同上,第17.37-17.42部分;Ausubel,出处同上,第10、12、13、16、18和20章,Colligan,Protein Science,出处同上,第12-14章,所有均以引用方式全文并入本文。

[0110] 抗TNF抗体

[0111] 包含SEQ ID NO:1、2和3的所有重链可变CDR区和/或SEQ ID NO:4、5和6的所有轻链可变CDR区的本发明的分离的抗体包含本文所公开的由任何合适的多核苷酸编码的抗体

氨基酸序列,或任何分离的或制备的抗体。优选地,人抗体或抗原结合片段结合人TNF,从而部分或基本上中和该蛋白质的至少一种生物学活性。部分或优选地基本上中和至少一种TNF蛋白质或片段的至少一种生物学活性的抗体或其特定部分或变体可结合该蛋白质或片段,从而抑制通过TNF与TNF受体的结合或通过其他TNF依赖性的或介导的机制所介导的活性。如本文所用,术语“中和抗体”是指取决于测定法,可以使TNF依赖性活性被抑制约20%–120%的抗体,优选地至少约10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更多。抗TNF抗体抑制TNF依赖性活性的能力,优选地通过至少一种如本文所述和/或如本领域已知的合适的TNF蛋白质或受体测定法来进行评估。本发明的人抗体可以是任何类型(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD等)或同种型,并且可包含 κ 或 λ 轻链。在一个实施方案中,人抗体包含IgG重链或确定的片段,例如,同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的至少一者。这类抗体可如本文所述和/或如本领域已知通过采用转基因小鼠或其他转基因非人哺乳动物来制备,所述动物包含至少一种人轻链(例如IgG、IgA)和IgM(例如 γ 1、 γ 2、 γ 3、 γ 4)转基因。在另一个实施方案中,抗人TNF人抗体包含IgG1重链和IgG1轻链。

[0112] 本发明的至少一种抗体结合至少一个特定表位,该表位对至少一种TNF蛋白质、亚基、片段、部分或它们的任何组合是特异性的。该至少一个表位可包含至少一个抗体结合区,该抗体结合区包含所述蛋白质的至少一部分,该表位优选地由所述蛋白质的至少一个细胞外的、可溶性的、亲水的、外部的或胞质的部分构成。该至少一个特定表位可包含这样的至少一种氨基酸序列的任何组合,所述至少一种氨基酸序列为SEQ ID NO:9的邻接氨基酸的至少1–3个氨基酸至整个特定部分。

[0113] 一般来讲,本发明的人抗体或抗原结合片段将包含这样的抗原结合区,该抗原结合区包含至少一个人互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)或至少一个重链可变区的变体以及至少一个人互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)或至少一个轻链可变区的变体。作为非限制性示例,抗体或抗原结合部分或变体可包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链CDR3和/或具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链CDR3中的至少一者。在一个具体实施方案中,抗体或抗原结合片段可具有抗原结合区,该抗原结合区包含至少一个重链CDR(即,CDR1、CDR2和/或CDR3)的至少一部分,该重链CDR具有对应CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:1、2和/或3)。在另一个具体实施方案中,抗体或抗原结合部分或变体可以具有抗原结合区,所述抗原结合区包含具有对应CDR1、CDR2和/或CDR3的氨基酸序列(例如SEQ ID NO:4、5和/或6)的至少一个轻链CDR(即CDR1、CDR2和/或CDR3)的至少一部分。在一个优选的实施方案中,抗体或抗原结合片段的三个重链CDR和三个轻链CDR具有如本文所述的mAb TNV148、TNV14、TNV15、TNV196、TNV118、TNV32、TNV86中的至少一种的对应CDR的氨基酸序列。此类抗体可通过以下方法制备:使用常规技术将抗体的各个部分(例如CDR、框架)化学连接在一起,使用重组DNA技术的常规技术或通过使用任何其他合适的方法制备并表达编码该抗体的(即一种或多种)核酸分子。

[0114] 抗TNF抗体可包含具有确定氨基酸序列的重链或轻链可变区中的至少一者。例如,在一个优选的实施方案中,包含任选地具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的至少一个重链可变区,和/或任选地具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的至少一个轻链可变区的抗TNF抗体,结合到人TNF并且包含限定的重链或轻链可变区的抗体可使用合适的方法制备,诸如噬菌体

展示 (Katsube, Y. 等人, IntJMol.Med, 1 (5) :863-868 (1998)) 或采用转基因动物的方法制备, 如本领域已知和/或如本文所述。例如, 可以用人TNF或其片段, 对包含功能性重排的人免疫球蛋白重链转基因和包含来自可经历功能性重排的人免疫球蛋白轻链基因座的DNA的转基因的转基因小鼠进行免疫, 以引发抗体的产生。如果需要, 可以对产生抗体的细胞进行分离, 并且可以如本文所述和/或如本领域已知制备杂交瘤或其他无限增殖化的产生抗体的细胞。另选地, 可以使用编码核酸或其部分在合适的宿主细胞中表达抗体、特定部分或变体。

[0115] 本发明还涉及其包含的氨基酸序列基本上与本文所述的氨基酸序列相同的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和CDR。优选地, 此类抗体或抗原结合片段和包含此类链或CDR的抗体可以高的亲和力 (例如小于或等于约 10^{-9} M的 K_D) 结合人TNF。与本文所述序列基本上相同的氨基酸序列包括具有保守氨基酸置换以及氨基酸缺失和/或插入的序列。保守氨基酸置换是指用第二种氨基酸置换第一种氨基酸, 所述第二种氨基酸具有的化学和/或物理特性 (例如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性) 与第一种氨基酸相似。保守置换包括在以下组中用一种氨基酸置换另一种氨基酸: 赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和组氨酸 (H); 天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E); 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、酪氨酸 (Y)、K、R、H、D和E; 丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、脯氨酸 (P)、苯丙氨酸 (F)、色氨酸 (W)、甲硫氨酸 (M)、半胱氨酸 (C) 和甘氨酸 (G); F、W和Y; C、S和T。

[0116] 氨基酸代码。构成本发明的抗TNF抗体的氨基酸通常采用缩写。可通过氨基酸的单字母代码、三字母代码或者三核苷酸密码子来表示氨基酸, 由此指示氨基酸名称, 这是本领域众所周知的 (参见Alberts, B. 等人, Molecular Biology of The Cell, 第三版, Garland Publishing, Inc., New York, 1994):

[0117]	单字母代码	三字母代码	名称	三核苷酸密码子
	A	Ala	丙氨酸	GCA, GCC, GCG, GCU
	C	Cys	半胱氨酸	UGC, UGU
	D	Asp	天冬氨酸	GAC, GAU

[0118]

E	Glu	谷氨酸	GAA, GAG
F	Phe	苯丙氨酸	UUC, UUU
G	Gly	甘氨酸	GGA, GGC, GGG, GGU
H	His	组氨酸	CAC, CAU
I	Ile	异亮氨酸	AUA, AUC, AUU
K	Lys	赖氨酸	AAA, AAG
L	Leu	亮氨酸	UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
M	Met	甲硫氨酸	AUG
N	Asn	天冬酰胺	AAC, AAU
P	Pro	脯氨酸	CCA, CCC, CCG, CCU
Q	Gln	谷氨酰胺	CAA, CAG
R	Arg	精氨酸	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
S	Ser	丝氨酸	AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
T	Thr	苏氨酸	ACA, ACC, ACG, ACU
V	Val	缬氨酸	GUA, GUC, GUG, GUU
W	Trp	色氨酸	UGG
Y	Tyr	酪氨酸	UAC, UAU

[0119] 如本文所说明的,本发明的抗TNF抗体可包括一个或多个来自天然突变或来自人工操纵的氨基酸置换、缺失或添加。

[0120] 当然,技术人员可进行的氨基酸置换数目取决于许多因素,包括上文所述的那些。如本文所说明的,一般来讲,任何给定的抗TNF抗体、片段或变体的氨基酸置换、插入或缺失数目将不超过40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1个,诸如1-30个或其中的任何范围或值。

[0121] 可通过本领域已知的方法来鉴定本发明的抗TNF抗体中对于功能而言必需的氨基酸,所述方法诸如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(例如Ausubel,出处同上,第8、15章;Cunningham和Wells,Science 244:1081-1085(1989))。后一程序在分子的每个残基处引入单个丙氨酸突变。然后对所产生的突变分子测试生物学活性,诸如但不限于至少一种TNF中和活性。抗体结合至关重要的位点也可以通过结构分析进行鉴定,诸如结晶、核磁共振或光亲和标记(Smith等人,J.Mol.Biol.224:899-904(1992)以及de Vos等人,Science 255:306-312(1992))。

[0122] 本发明的抗TNF抗体可包括但不限于选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6中的至少一个的1至所有邻接氨基酸的至少一部分、序列或组合。

[0123] 抗TNF抗体还可任选地包含SEQ ID NO:7、8中的至少一者的70%-100%的邻接氨基酸中的至少一者的多肽。

[0124] 在一个实施方案中,免疫球蛋白链或其部分(例如可变区、CDR)的氨基酸序列与SEQ ID NOS:7、8中的至少一者的对应链的氨基酸序列具有约70%-100%的同一性(例如70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或其中的任何范围或值)。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:8的序列进行比较,或者重链CDR3的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:7进行比较。优选地,使用如本领域已知的合适计算机算法确定出70%-100%氨基酸同一性(即90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或者其中的任何范围或值)。

[0125] 在SEQ ID NO:7、8中提供了示例性重链和轻链可变区序列。本发明的抗体,或其特定变体可包含任何数目的来自本发明抗体的邻接氨基酸残基,其中该数目选自抗TNF抗体中邻接残基数目的10%-100%的整数。任选地,该邻接氨基酸亚序列长度为至少约10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250或更多个氨基酸,或其中的任何范围或数值。此外,所述亚序列的数目可以为选自1至20的任何整数,诸如至少2、3、4或5。

[0126] 技术人员将会知道,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体的比活性为天然(非合成)的、内源性或相关的和已知的抗体比活性的至少20%、30%或40%,并且优选地为至少50%、60%或70%,并且最优选地为至少80%、90%或95%-1000%。测定和定量酶促活性和底物特异性的量度的方法是本领域技术人员熟知的。

[0127] 在另一方面,本发明涉及通过共价连接有机部分进行修饰的、如本文所述的人抗体和抗原结合片段。此类修饰可以产生具有改善的药代动力学特性(例如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或支化的亲水性聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在一个具体实施方案中,亲水性聚合物基团可以具有约800至约120,000道尔顿的分子量,并且可以是聚链烷二醇(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,并且脂肪酸或脂肪酸酯基团可包含约8至约40个碳原子。

[0128] 本发明的经修饰的抗体和抗原结合片段可包含一个或多个与抗体直接或间接共价键合的有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段键合的每个有机部分可独立地是亲水性聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文所用,术语“脂肪酸”涵盖单羧酸和二羧酸。“亲水性聚合物基团”,该术语在本文中使用时是指在水中比在辛烷中更易溶的有机聚合物。例如,聚赖氨酸在水中比在辛烷中更易溶。因此,通过共价连接聚赖氨酸来修饰的抗体包括在本发明内。适用于修饰本发明抗体的亲水性聚合物可以是直链或支链的,并且包括例如聚链烷二醇(例如PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG等)、碳水化合物(例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等)、亲水性氨基酸聚合物(例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等)、聚环氧链烷(例如,聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)和聚乙烯吡咯烷酮。优选地,修饰本发明抗体的亲水性聚合物作为单独的分子实体具有约800至约150,000道尔顿的分子量。例如可使用PEG₅₀₀₀和PEG_{20,000},其中下标是聚合物的平均分子量(道尔顿)。亲水性聚合物基团可用1至约6个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水性聚合物可通过采用合适的方法制备。例如,可将包含胺基团的聚合物与脂肪酸或脂肪酸酯的羧酸根偶联,且可将脂肪酸或脂肪酸酯上的活化羧酸根(例如用N,N-羰基二咪唑活化)与聚合物上的羟基偶联。

[0129] 适用于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可含有一个或多个不饱和单位。适用于修饰本发明抗体的脂肪酸包括例如正十二烷酸酯(C₁₂,月桂酸酯)、正十四烷酸酯(C₁₄,肉豆蔻酸酯)、正十八烷酸酯(C₁₈,硬脂酸酯)、正二十烷酸酯(C₂₀,花生酸酯)、正二十二烷酸酯(C₂₂,山嵛酸酯)、正三十烷酸酯(C₃₀)、正四十烷酸酯(C₄₀)、顺式- Δ 9-十八烷酸酯(C₁₈,油酸酯)、全顺式- Δ 5,8,11,14-二十烷酸酯(C₂₀,花生四烯酸酯)、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括包含直链或支链的低级烷基的二羧酸的单酯。低级烷基可包含1至约12个,优选地1至约6个碳原子。

[0130] 修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备,诸如通过与一种或多种修饰剂反应来制备。如本文所用的术语“修饰剂”是指包含活化基团的合适有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是化学部分或官能团,它们可在适当的条件下与第二化学基团反应,由此在修饰剂和第二化学基团之间形成共价键。例如,胺反应性活化基团包括亲电子基团,诸如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)等。可以与硫醇反应的活化基团包括例如马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基、吡啶基二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB-硫醇)等。可将醛官能团与含胺或酰胺的分子偶联,并且可将叠氮基团与三价磷基团反应以形成磷酰胺酯或磷酰亚胺键。将活化基团引入分子的合适方法是本领域已知的(参见例如Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996))。可将活化基团直接键合到该有机基团(例如亲水性聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯),或者通过接头部分来键合,所述接头部分例如二价C₁-C₁₂基团,其中一个或多个碳原子可被杂原子诸如氧、氮或硫取代。合适的接头部分包括例如四乙烯乙二醇、-(CH₂)₃-、-NH-(CH₂)₆-NH-、-(CH₂)₂-NH-和-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-NH-。包含连接部分的修饰剂可例如通过以下产生:在存在1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)的情况下,使单-Boc-烷基二胺(例如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸反应,以在游离胺和脂肪酸羧酸根之间形成酰胺键。可通过用三氟乙酸(TFA)处理从产物除去Boc保护基以暴露出伯胺,后者可偶联到另一羧酸酯(如所描述),或者可与马来酸酐反应并且所得的产物环化以产生脂肪酸的活化马来酰亚胺基衍生物。(参见例如Thompson等人的WO 92/16221,该专利的全部教导内容以引用方式并入本文。)

[0131] 本发明的经修饰抗体可通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应来产生。例如,有机部分可以通过使用胺反应性改性剂(例如PEG的NHS酯)以非位点特异性方式结合至抗体。经修饰的人抗体或抗原结合片段还可通过使抗体或抗原结合片段的二硫键(例如链内二硫键)还原来制备。还原的抗体或抗原结合片段随后可与硫醇反应性修饰剂反应,以产生本发明的经修饰抗体。包含与本发明抗体特定位点键合的有机部分的修饰的人抗体和抗原结合片段可使用合适的方法制备,所述方法诸如为逆向蛋白水解作用(Fisch等人, *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen等人, *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran等人, *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh等人, *Bioorg. Chem.*, 24(1):59-68 (1996); Capellas等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)),以及在Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)中所描述的方法。

[0132] 针对抗Tnf抗体组合物的抗独特型抗体。除了单克隆或嵌合的抗TNF抗体之外,本发明还涉及对本发明的此类抗体有特异性的抗独特型(抗Id)抗体。抗Id抗体是能识别通常与另一抗体的抗原结合区相关联的独特决定簇的抗体。抗Id可以通过用该抗体或其含CDR的区域免疫与Id抗体来源相同的物种和遗传类型(例如小鼠品系)的动物来进行制备。被免疫动物将识别免疫抗体的独特型决定簇且对其应答,从而产生抗Id抗体。抗Id抗体还可以用作“免疫原”以在另一动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗-抗Id抗体。

[0133] 抗Tnf抗体组合物。本发明还提供至少一种抗TNF抗体组合物,其包含如本文所述和/或如本领域已知的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或更多种抗TNF抗体,它们以非天然存在的组合物、混合物或形式提供。此类组合物包括非天然

存在的组合物,所述非天然存在的组合物包含抗TNF抗体氨基酸序列的至少一个或两个全长序列、C-端和/或N-端缺失的变体、结构域、片段或特定变体,所述抗TNF抗体氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8的70%-100%的邻接氨基酸,或其特定片段、结构域或变体。优选的抗TNF抗体组合物包含至少一个或两个全长序列、片段、结构域或变体作为至少一个含CDR或LBR部分,所述含CDR或LBR部分来自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6的70%-100%的抗TNF抗体序列或其特定片段、结构域或变体。更优选的组合物包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6的70%-100%或其特定片段、结构域或变体中的至少一者的40%-99%。此类组合物百分数按照液体或无水溶液、混合物、悬浮液、乳液或胶体的重量、体积、浓度、摩尔浓度或重量摩尔浓度计算,如本领域已知或如本文所述。

[0134] 本发明的抗TNF抗体组合物还可包含任何合适和有效量的组合物或药物组合物中的至少一种,该组合物或药物组合物包含至少一种给予需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者的抗TNF抗体,任选地还包含至少一种选自以下的药剂:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或片段、它们的融合蛋白质、或者小分子TNF拮抗剂)、抗风湿剂(例如甲氨蝶呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾类抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂(anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯类、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、镇咳剂、止吐剂、抗溃疡剂、缓泻剂、抗凝血剂、促红细胞生成素(例如红细胞生成素 α)、非格司亭(例如G-CSF、优保津)、沙格司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫接种剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如巴利昔单抗、环孢霉素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药物、抗焦虑药物、催眠剂、拟交感神经药物、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药物、 β 激动剂、吸入类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶(百慕时)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类细胞因子的非限制性示例包括但不限于IL-1至IL-23中的任一者。合适的剂量是本领域众所周知的。参见例如Wells等人编辑,Pharmacotherapy Handbook,第二版,Appleton and Lange,Stamford,CT(2000);PDR Pharmacopoeia,Tarascon PocketPharmacopoeia 2000,Deluxe编辑,Tarascon Publishing,Loma Linda,CA(2000),上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0135] 此类抗癌药或抗感染药还可包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共同配制或共同施用的毒素分子。毒素可任选地起到选择性杀死病理性细胞或组织的作用。病理性细胞可以是癌细胞或其他细胞。此类毒素可以是(但不限于)纯化的或重组的毒素或包含毒素的至少一个功能性细胞毒性结构域的毒素片段,所述毒素例如选自蓖麻毒素、白喉毒素、毒液毒素或细菌毒素中的至少一者。术语毒素还包括由任何天然存在的、突变型或重组型细菌或病毒产生的内毒素和外毒素,其可在人和其他哺乳动物中引起任何病理状况,包括毒素休克,这可导致死亡。此类毒素可包括但不限于肠产毒性大肠杆菌热不稳定肠毒素(LT)、热稳定肠毒素(ST)、志贺氏菌属(*Shigella*)细胞毒素、气单胞菌属(*Aeromonas*)肠毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌(*Staphylococcal*)肠毒素A(SEA)、B(SEB)

或C(SEC)、链球菌(*Streptococcal*)肠毒素等。此类细菌包括但不限于以下细菌的菌株:肠产毒性大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(例如,血清型0157:H7菌株)、葡萄球菌属(例如,金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus pyogenes*))、志贺氏菌属(例如,痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Shigella boydii*)和宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*))、沙门氏菌(*Salmonella*)属(例如,伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella cholera-suis*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*))、梭菌(*Clostridium*)属(例如,产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*))、弯曲菌(*Camphlobacter*)属(例如,空肠弯曲菌(*Camphlobacter jejuni*)、胎儿弯曲菌(*Camphlobacter fetus*))、螺杆菌(*Helicobacter*)属(例如,幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*))、气单胞菌(*Aeromonas*)属(例如,温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*))、类志贺邻单胞菌(*Pleisomonas shigelloides*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、弧菌(*Vibrio*)属(例如,霍乱弧菌(*Vibrios cholerae*)、副溶血弧菌(*Vibrios parahemolyticus*))、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)属、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和链球菌(*Streptococci*)。参见例如Stein编辑,NTERNAL MEDICINE,第3版,第1-13页,Little,Brown and Co.,Boston,(1990);Evans等人编辑,Bacterial Infections of Humans:Epidemiology and Control,第2版,第239-254页,Plenum Medical Book Co.,New York(1991);Mandell等人,Principles and Practice of Infectious Diseases,第3版,Churchill Livingstone,New York(1990);Berkow等人编辑,The Merck Manual,第16版,Merck and Co.,Rahway,N.J.,1992;Wood等人,FEMS Microbiology Immunology,76:121-134(1991);Marrack等人,Science,248:705-711(1990)),这些参考文献的全部内容以引用方式并入本文。

[0136] 本发明的抗TNF抗体化合物、组合物或组合还可包含任何合适辅助剂中的至少一种,诸如但不限于稀释剂、粘结剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。可药用辅助剂是优选的。制备此类无菌溶液的非限制性示例和方法是本领域公知的,诸如但不限于Gennaro编辑,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.(Easton,PA)1990。可按常规方式选择适合于抗TNF抗体、片段或变体组合物的施用方式、溶解性和/或稳定性的药学上可接受的载体,如本领域所公知或如本文所述。

[0137] 用于本发明组合物的药物赋形剂和添加剂包括但不限于蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(例如糖,包括单糖、二糖、三糖、四糖和低聚糖;衍生糖诸如糖醇、醛糖酸、酯化糖等;以及多糖或糖聚合物),药物赋形剂和添加剂可以单独或组合的方式存在,其单独或组合具有1-99.99重量%或体积%。示例性的蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,诸如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。还可以在缓冲能力方面起作用的代表性氨基酸/抗体成分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0138] 适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括例如单糖,诸如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等;二糖,诸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等;多糖,诸如棉子糖、

松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等；以及糖醇，诸如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇（葡萄糖醇）、肌醇等。用于本发明的优选碳水化合物赋形剂是甘露糖醇、海藻糖和棉子糖。

[0139] 抗TNF抗体组合物还可包含缓冲剂或pH调节剂；通常，缓冲剂是从有机酸或碱制备的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐，诸如柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐；盐酸三羟甲基氨基甲烷或磷酸盐缓冲剂。用于本发明组合物的优选缓冲剂是有机酸盐，诸如柠檬酸盐。

[0140] 此外，本发明的抗TNF抗体组合物可包含聚合物赋形剂/添加剂，诸如聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖（聚合糖）、葡萄糖结合剂（例如环糊精，诸如2-羟丙基- β -环糊精）、聚乙二醇、调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂（例如聚山梨醇酯，诸如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”）、脂质（例如磷脂、脂肪酸）、类固醇（例如胆固醇）和螯合剂（例如EDTA）。

[0141] 适合在根据本发明的抗TNF抗体、部分或变体组合物中使用的这些和附加已知的药物赋形剂和/或添加剂是本领域已知的，例如，如在以下文献中列出的：“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”，第19版，Williams & Williams, (1995) 和“Physician's Desk Reference”，第52版，Medical Economics, Montvale, NJ (1998)，所述参考文献的公开内容以引用方式全文并入本文。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物（例如糖和醛醇）和缓冲剂（例如柠檬酸盐）或聚合物试剂。

[0142] 制剂。如上面指出，本发明提供适于药用或兽医用途的稳定制剂，其优选地为具有盐水或选定的盐的磷酸缓冲液，以及含有防腐剂的防腐溶液和制剂，以及多用途防腐制剂，所述制剂包含可药用制剂中的至少一种抗TNF抗体。防腐制剂包括至少一种已知的防腐剂或任选地选自至少一种溶于含水稀释剂的苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苣醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯代丁醇、氯化镁（例如六水合物）、烷基苯甲酸酯（甲基、乙基、丙基、丁基等）、苯扎氯铵、苣索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。可以使用如本领域已知的任何合适的浓度或混合物，诸如0.001%-5%或其中的任何范围或值，诸如但不限于：0.001%、0.003%、0.005%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.05%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.3%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%，或其中的任何范围或值。非限制性示例包括：无防腐剂、0.1%-2%间甲酚（例如0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.9%、1.0%）、0.1%-3%苣醇（例如0.5%、0.9%、1.1%、1.5%、1.9%、2.0%、2.5%）、0.001%-0.5%硫柳汞（例如0.005%、0.01%）、0.001%-2.0%苯酚（例如0.05%、0.25%、0.28%、0.5%、0.9%、1.0%）、0.0005%-1.0%对羟基苯甲酸烷基酯（例如0.00075%、0.0009%、0.001%、0.002%、0.005%、0.0075%、0.009%、0.01%、0.02%、0.05%、0.075%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.5%、0.75%、0.9%、1.0%）等。

[0143] 如上文指出的，本发明提供了包括包装材料和至少一个小瓶的制品，所述小瓶包含至少一种抗TNF抗体与规定的缓冲剂和/或防腐剂的溶液（任选地溶于水性稀释剂中），其中所述包装材料包括标签，该标签标明此类溶液可以在1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、

36、40、48、54、60、66、72小时或更长的时间段内保存。本发明还包括制品，该制品包括包装材料、包含冻干的至少一种抗TNF抗体的第一小瓶和包含规定缓冲剂或防腐剂的水性稀释剂的第二小瓶，其中所述包装材料包括标签，该标签指导患者在水性稀释剂中重构所述至少一种抗TNF抗体以形成可以在24小时或更长的时间段内保存的溶液。

[0144] 根据本发明使用的至少一种抗TNF抗体可以通过重组手段制备，包括从哺乳动物细胞或转基因制品制备，或者可以从其他生物来源纯化，如本文所述或如本领域已知的。

[0145] 如果在湿润/干燥系统中，那么本发明产品中的至少一种抗TNF抗体的范围包括重构后产生约1.0 μ g/ml至约1000mg/ml的浓度的量，但是更低和更高的浓度是可行的并且取决于预期的递送介质，例如溶液制剂将不同于透皮贴剂、经肺、跨粘膜或渗透或微量泵方法。

[0146] 优选地，水性稀释剂还任选地包含可药用防腐剂。优选的防腐剂包括选自以下的那些：苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯（甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等）、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。在制剂中使用的防腐剂的浓度是足以产生抗微生物作用的浓度。该浓度取决于所选防腐剂且容易由技术人员确定。

[0147] 其他赋形剂例如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、增强剂可任选且优选地添加到稀释剂中。等渗剂诸如甘油常常以已知的浓度使用。优选地添加生理学耐受的缓冲剂以提供改善的pH控制。制剂可以覆盖宽的pH范围，诸如约pH 4至约pH 10，优选的范围是约pH 5至约pH 9，最优选的范围是约6.0至约8.0。优选地本发明的制剂具有介于约6.8和约7.8之间的pH。优选的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂，最优选地磷酸钠，特别是磷酸盐缓冲盐水（PBS）。

[0148] 其他添加剂，诸如可药用的增溶剂，比如Tween 20（聚氧乙烯（20）脱水山梨糖醇单月桂酸酯）、Tween 40（聚氧乙烯（20）脱水山梨糖醇单棕榈酸酯）、Tween 80（聚氧乙烯（20）脱水山梨糖醇单油酸酯）、Pluronic F68（聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物）和PEG（聚乙二醇）或者非离子型表面活性剂诸如聚山梨醇酯20或80或者泊洛沙姆184或188、Pluronic[®]多元醇、其他嵌段共聚物，以及螯合物诸如EDTA和EGTA，可任选地添加到制剂或组合物中以减少聚集。如果使用泵或塑料容器来施用制剂，则这些添加剂是特别有用的。可药用表面活性剂的存在减轻了蛋白质聚集的倾向。

[0149] 本发明的制剂可通过这样的方法制备，该方法包括将至少一种抗TNF抗体和防腐剂在水性稀释剂中混合，该防腐剂选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯（甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等）、苯扎氯铵、苄索氯铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或它们的混合物。使用常规溶解和混合程序将所述至少一种抗TNF抗体和防腐剂在水性稀释剂中混合。为了制备合适的制剂，例如，将缓冲液中的测定量的至少一种抗TNF抗体与所需的防腐剂在缓冲液中以一定量组合，所述量足以提供所需浓度的蛋白质和防腐剂。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如，成分添加的顺序、是否使用附加添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的施用浓度和方式进行最优化的因素。

[0150] 受权利要求书保护的制剂可以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者，所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体，所述抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构，所述第二小瓶容纳水、防腐剂和/或赋形剂，优选地磷酸盐缓冲液和/或盐水和所选的盐。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用，并且可以满足患者治疗的单个或多个

周期,并且因此可以提供比目前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0151] 本发明受权利要求书保护的制品可用于在立即到24小时或更长的时间段内进行施用。因此,本发明受权利要求书保护的制品提供了对于患者而言明显的优点。本发明的制剂可以任选地安全地储存于约2℃至约40℃的温度下,并且在长时间内保持蛋白质的生物活性,从而允许包装标签标明溶液可在6、12、18、24、36、48、72或96小时或更长的时间段内保持和/或使用。如果使用防腐稀释剂,则此类标签可包括长达1-12个月、半年、一年半和/或2年的使用期。

[0152] 本发明的至少一种抗TNF抗体的溶液可通过包括将至少一种抗体在水性稀释剂中混合的方法来制备。混合是使用常规溶解和混合程序来进行。为了制备合适的稀释液,例如,将水或缓冲液中的测定量的至少一种抗体以一定量合并,所述量足以提供蛋白质和任选的防腐剂或缓冲剂成所需的浓度。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,成分添加的顺序、是否使用附加添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的施用浓度和方式进行最优化的因素。

[0153] 受权利要求书保护的产品可以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,并且因此提供比目前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0154] 受权利要求书保护的产品可通过给药房、门诊或其他此类机构和单位提供澄清的溶液或双小瓶来间接地提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,该抗体用容纳水性稀释剂的第二小瓶进行重构。在这种情况下澄清溶液剂的容积尺寸可以最多为一升或甚至更大,从而提供大的贮存库,从中可以一次或多次取出较小部分的至少一种抗体溶液用于转移到较小的小瓶中,且通过药房或门诊提供给它们的顾客和/或患者。

[0155] 包括这些单个小瓶系统的识别装置包括用于递送溶液的那些笔式注射器装置,诸如BD Pens、BD Autojector[®]、Humaject[®]、NovoPen[®]、B-D[®] Pen、AutoPen[®]和 OptiPen[®]、GenotropinPen[®]、GenotroNormPen[®]、Humatro Pen[®]、Reco-Pen[®]、RoferonPen[®]、Biojector[®]、Iject[®]、J-tip Needle-Free Injector[®]、Intraject[®]、Medi-Ject[®]、Smartject,例如,如由以下制作或开发的:Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com); Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com); Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com)。公认的包括双小瓶系统的装置包括那些用于在筒中将经冻干的药物进行重构的笔式注射器系统,而该筒用于递送该重构溶液,诸如HumatroPen[®]。

[0156] 本发明受权利要求书保护的产品包括包装材料。包装材料除了提供管理机构要求的信息之外,还提供本产品可得以使用的条件。对于双小瓶、湿润/干燥产品,本发明的包装材料提供指导患者在水性稀释剂中重构至少一种抗TNF抗体以形成溶液,以及在2-24小时或更长的时间段内使用溶液的说明书。对于单小瓶溶液产品,标签标明此类溶液可以在2-24小时或更长的时间段内使用。本发明受权利要求书保护的产品可用于人药物产品用途。

[0157] 本发明的制剂可通过这样的方法制备,该方法包括将至少一种抗TNF抗体和所选

的缓冲剂混合,所述缓冲剂优选地为含有盐水或所选盐的磷酸缓冲液。使用常规溶解和混合程序将所述至少一种抗体和缓冲剂在水性稀释剂中混合。例如,为了制备合适的制剂,将水或缓冲液中的测定量的至少一种抗体与所需缓冲剂在一定量的水中混合,所述量足以提供所述蛋白质和缓冲剂成所需浓度。该方法的变型形式会是本领域普通技术人员认识到的。例如,成分添加的顺序、是否使用附加添加剂、制剂制备时的温度和pH都是可以为所用的施用浓度和方式进行最优化的因素。

[0158] 可以将受权利要求保护的稳定或防腐的制剂以澄清溶液或双小瓶的形式提供给患者,所述双小瓶包括一小瓶冻干的至少一种抗TNF抗体,所述抗体用容纳水性稀释剂中的防腐剂或缓冲剂和赋形剂的第二小瓶进行重构。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个周期,并且因此提供比目前可用的治疗方案更方便的治疗方案。

[0159] 在本文所述的稳定或保存制剂或溶液中的至少一种抗TNF抗体可根据本发明经由多种递送方法施用给患者,所述递送方法包括SC或IM注射;经皮、肺部、经粘膜、植入物、渗透泵、药液筒、微型泵或其他技术人员知道的工具,如本领域众所周知的。

[0160] 治疗应用。本发明还提供使用至少一种本发明的双整联蛋白抗体调节或治疗如本领域已知或本文所述的细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种TNF相关疾病的方法。

[0161] 本发明还提供用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种TNF相关疾病的方法,所述疾病包括但不限于肥胖症、免疫相关疾病、心血管疾病、传染性疾病、恶性疾病或神经疾病中的至少一者。

[0162] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法,所述免疫相关疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、全身性发作的青少年类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、全身性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维变性、系统性脉管炎/韦格纳肉芽肿病、结节病、睾丸炎/输精管切除术逆向程序(vasectomy reversal procedures)、变应性/特应性疾病、哮喘、变应性鼻炎、湿疹、变应性接触性皮炎、变应性结膜炎、超敏感性肺炎、移植、器官移植排斥、移植抗宿主病、全身性炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性脓毒症、革兰氏阴性脓毒症、培养物阴性脓毒症、真菌性脓毒症、嗜中性白细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、外伤/出血、灼伤、电离射线暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、酒精诱导的肝炎、慢性炎症病理状态、结节病、克隆氏病理状态、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、超敏反应、变应性鼻炎、枯草热、常年性鼻炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、荨麻疹、全身性过敏反应、皮炎、恶性贫血、溶血病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺植入物排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体移植排斥、抗受体超敏反应、格雷夫斯病、雷诺病、B型胰岛素抗性糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III型超敏反应、全身性红斑狼疮、POEMS综合征(多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮

病、混合型结缔组织病、特发性艾迪生病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬变、白癜风、脉管炎、MI后心切术综合征、IV型超敏反应、接触性皮炎、超敏感性肺炎、同种异体移植排斥、胞内生物导致的肉芽瘤、药物敏感性、新陈代谢/特发性、威尔逊病、血色素沉着、 α -1抗胰蛋白酶缺乏、糖尿病性视网膜病、桥本甲状腺炎、骨质疏松症、原发性胆汁性肝硬变、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶病质、囊性纤维变性、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、家族性噬血细胞淋巴组织细胞增生症、皮肤病症、牛皮癣、秃头、肾病综合征、肾炎、肾小球性肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、毒性、先兆子痫、okt3疗法、抗cd3疗法、细胞因子疗法、化学疗法、放射疗法(例如包括但不限于无力、贫血、恶病质等)、慢性水杨酸中毒等。参见,例如Merck Manual,第12-17版,Merck&Company,Rahway,NJ(1972,1977,1982,1987,1992,1999),Pharmacotherapy Handbook,Wells等人编辑,第二版,Appleton and Lange,Stamford,Conn.(1998,2000),各自以引用方式全文并入本文。

[0163] 本发明还提供调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种心血管疾病的方法,所述心血管疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:心肌顿抑综合征、心肌梗塞、充血性心脏衰竭、中风、缺血性中风、出血、动脉硬化、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病性动脉硬化疾病、高血压、动脉高血压、肾血管性高血压、昏厥、休克、心血管系统的梅毒、心脏衰竭、肺心病、原发性肺高血压、心律失常、心房异位搏动、心房扑动、心房颤动(持续或阵发性)、后灌注综合征、心肺旁路炎症反应、混乱性或多源性房性心动过速、规则窄QRS心动过速、特异性心律失常、心室颤动、希氏束心律失常、房室传导阻滞、束支传导阻滞、心肌缺血性疾病、冠心病、心绞痛、心肌梗塞、心肌病、扩张型充血性心肌病、限制型心肌病、心脏瓣膜病、心内膜炎、心包疾病、心脏肿瘤、主动脉和外周动脉瘤、主动脉剥离、主动脉的炎症、腹主动脉及其分支的闭塞、周围血管疾病、动脉闭塞性疾病、外周动脉硬化性疾病、血栓闭塞性脉管炎、功能外周动脉疾病、雷诺氏现象和疾病、手足发绀、红斑性肢痛病、静脉疾病、静脉血栓、静脉曲张、动静脉瘘、淋巴水肿、脂肪水肿、不稳定型心绞痛、再灌注损伤、后泵综合征、缺血再灌注损伤等。此类方法可任选地包括将有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物施用给需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者。

[0164] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种传染病的方法,所述传染病包括但不限于以下疾病中的至少一种:急性或慢性细菌感染,急性和慢性寄生或传染过程,包括细菌、病毒和真菌感染、HIV感染/HIV神经病、脑膜炎、肝炎(甲型、乙型或丙型等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌0157:h7、溶血尿毒症综合征/溶解血栓性血小板减少性紫癜、疟疾、登革出血热、利什曼病、麻风病、中毒性休克综合征、链球菌性肌炎、气性坏疽、结核分枝杆菌、细胞内鸟分枝杆菌、卡氏肺囊虫性肺炎、骨盆炎症性疾病、睾丸炎/附睾炎、军团杆菌、莱姆氏病、a型流行性感冒、EB病毒、病毒性脑炎/无菌性脑膜炎等。

[0165] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法,所述恶性疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:白血病,急性白血病,急性成淋巴细胞性白血病(ALL),B-细胞、T细胞或FAB ALL,急性髓细胞样白血病(AML),慢性髓细胞性白血病(CML),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),毛细胞性白血病,骨髓异常增生综合征(MDS),淋巴瘤,何杰金病,恶性淋巴瘤,非何杰金淋巴瘤,Burkitt氏淋巴瘤,多发性骨髓瘤,卡波西肉瘤,结肠直肠癌,胰腺癌,鼻咽癌,恶性组织细胞增多症,恶性肿瘤的肿瘤相关

综合征/高血钙综合征,实体瘤,腺癌,肉瘤,恶性黑素瘤,血管瘤,转移性疾病,癌症相关的骨再吸收,癌症相关的骨痛等。

[0166] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种神经疾病的方法,所述神经疾病包括但不限于以下疾病中的至少一种:神经退行性疾病、多发性硬化症、偏头痛、艾滋病痴呆综合征、脱髓鞘疾病,诸如多发性硬化症和急性横贯性脊髓炎;锥体束外和小脑失调,诸如皮质脊髓系统病灶;基底神经节失调或小脑失调;多动性运动失调,诸如亨廷顿氏舞蹈症和老年性舞蹈症;药源性运动失调,诸如阻断CNS多巴胺受体的药物诱发的失调;运动减少性失调,诸如帕金森氏病;进行性核上性麻痹;小脑结构性病灶;脊髓小脑的退化,诸如脊髓性共济失调、弗里德赖希共济失调(Friedreich's ataxia)、小脑皮层退化、多发性系统退化(Mencel症、Dejerine-Thomas症、Shi-Drager症和Machado-Joseph症);全身失调(雷弗素姆氏病、无β脂蛋白血症、共济失调、毛细管扩张和线粒体多系统失调);脱髓鞘核失调,诸如多发性硬化症、急性横向脊髓炎;以及运动单元的失调,诸如神经源性肌萎缩(前角细胞退化,诸如肌萎缩侧索硬化症、婴儿型骨髓性肌萎缩症和幼年型骨髓性肌萎缩症);阿尔茨海默病;中年唐氏综合症;弥漫性路易体病;老年痴呆路易体型;韦尼克-科尔萨科夫综合征;慢性酒精中毒;克雅二氏症;亚急性硬化性全脑炎、哈勒沃登-施帕茨病(Hallerrorden-Spatz disease);以及拳击员痴呆等。此类方法可以任选地包括将有效量的包含至少一种TNF抗体或特定部分或变体的组合物或药物组合物施用给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。参见,例如Merck Manual,第16版,Merck&Company, Rahway, NJ (1992)

[0167] 本发明的任何方法都可包括将有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物施用给需要此类调节、治疗或疗法的细胞、组织、器官、动物或患者。此类方法可任选地还包括共同施用或联合疗法以治疗此类免疫疾病,其中所述至少一种抗TNF抗体、其特定部分或变体的施用还包括在其施用之前、同时和/或之后施用至少一种选自以下的药物:至少一种TNF拮抗剂(例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、融合蛋白质或小分子TNF拮抗剂)、奈瑞莫单抗、英夫利昔单抗、entercept、CDP-571、CDP-870、阿非莫单抗、来那西普等)、抗风湿剂(例如,甲氨蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药物(NSAID)、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部用麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(例如,氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、其他抗微生物剂)、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、止咳药、止吐剂、抗溃疡药、缓泻药、抗凝剂、促红细胞生成素(例如,阿法依伯汀)、非格司亭(例如,G-CSF、优保津)、沙莫司亭(GM-CSF、Leukine)、免疫剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂(例如,巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹药、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药剂、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药、β-激动剂、吸入类固醇、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。合适的剂量是本领域众所周知的。参见例如Wells等人编辑,Pharmacotherapy Handbook,第二版,Appleton and Lange, Stamford, CT (2000);PDR

Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe 编辑, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), 上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文。

[0168] 适用于本发明的组合物、联合疗法、共同施用、装置和/或方法的TNF拮抗剂(进一步包含本发明的至少一种抗体、其特定部分和变体)包括但不限于抗TNF抗体、其抗原结合片段和与TNF特异性结合的受体分子;预防和/或抑制TNF合成、TNF释放或其对靶细胞的作用的化合物,诸如沙利度胺、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂(例如己酮可可碱和咯利普兰)、A2b腺苷受体激动剂和A2b腺苷受体增强剂;预防和/或抑制TNF受体信号传导的化合物,诸如有丝分裂原活化蛋白质(MAP)激酶抑制剂;阻断和/或抑制膜TNF切割的化合物,诸如金属蛋白酶抑制剂;阻断和/或抑制TNF活性的化合物,诸如血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂(例如,卡托普利);以及阻断和/或抑制TNF产生和/或合成的化合物,诸如MAP激酶抑制剂。

[0169] 如本文所用,“肿瘤坏死因子抗体”、“TNF抗体”、“TNF α 抗体”或片段等可降低、阻断、抑制、消除或干扰体外、原位和/或优选地体内的TNF α 活性。例如,本发明的合适的TNF人抗体可结合TNF α 并且包括抗TNF抗体、其抗原结合片段以及其特异性结合TNF α 的特定突变体或结构域。合适的TNF抗体或片段也可以降低、阻断、消除、干扰、防止和/或抑制TNF RNA、DNA或蛋白质合成、TNF释放、TNF受体信号传导、膜TNF切割、TNF活性、TNF产生和/或合成。

[0170] 嵌合抗体cA2由高亲和力中和小鼠抗人TNF α IgG1抗体的抗原结合可变区(称作A2)和人IgG1 κ 免疫球蛋白的恒定区组成。人IgG1Fc区域可改善同种异体抗体效应子功能,增加循环血清半衰期和减小抗体的免疫原性。嵌合抗体cA2的亲合力和表位特异性来源于鼠抗体A2的可变区。在一个具体实施方案中,编码鼠抗体A2的可变区的核酸的优选来源是A2杂交瘤细胞系。

[0171] 嵌合A2(cA2)以依赖剂量的方式中和天然的和重组的人TNF α 的细胞毒性效应。根据嵌合抗体cA2和重组人TNF α 的结合测定,计算出嵌合抗体cA2的亲合力常数为 $1.04 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$ 。通过竞争性抑制确定单克隆抗体特异性和亲和力的优选方法可见于Harlow等人, *antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988; Colligan等人编辑, *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, New York, (1992-2000); Kozbor等人, *Immunol. Today*, 4:72-79 (1983); Ausubel等人编辑, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York (1987-2000); 以及Muller, *Meth. Enzymol.*, 92: 589-601 (1983), 这些参考文献以引用方式全文并入本文。

[0172] 在一个具体实施方案中,通过标号为c134A的细胞系产生鼠单克隆抗体A2。由标号为c168A的细胞系产生嵌合抗体cA2。

[0173] 可用于本发明的单克隆抗TNF抗体的附加示例描述于本领域中(参见,例如,美国专利5,231,024; Möller, A. 等人, *Cytokine* 2(3):162-169 (1990); 美国申请07/943,852(提交于1992年9月11日); Rathjen等人, 国际公布W0 91/02078(公布于1991年2月21日); Rubin等人, EP0专利公布0218868(公布于1987年4月22日); Yone等人, EP0专利公布0288088(1988年10月26日); Liang等人, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986); Meager等人, *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly等人, *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman等人, *Hybridoma* 6:489-507 (1987); 以及Hirai等人, *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987), 这些参考文献以引用方式全文并入本文)。

[0174] TNF受体分子。可用于本发明的优选TNF受体分子是以高亲和力结合TNF α 的那些(参见,例如,Feldmann等人,国际公布WO 92/07076(公布于1992年4月30日);Schall等人,Cell 61:361-370(1990);以及Loetscher等人,Cell 61:351-359(1990),这些参考文献以引用方式全文并入本文),并且任选地具有低免疫原性。具体地,55kDa (p55TNF-R) 和75kDa (p75TNF-R) TNF细胞表面受体可用于本发明。这些受体的包含受体的细胞外结构域(ECD)或其功能部分的截短形式(参见,例如Corcoran等人,Eur. J. Biochem. 223:831-840(1994))也可用于本发明。已在尿和血清中检测到TNF受体的含有ECD的截短形式为30kDa和40kDa的TNF α 抑制性结合蛋白质(Engelmann, H. 等人, J. Biol. Chem. 265:1531-1536(1990))。TNF受体多聚体分子和TNF免疫受体融合分子及其衍生物和片段或部分,是可用于本发明的方法和组合物的TNF受体分子的附加示例。可用于本发明的TNF受体分子的特征在于它们能够在长时间内治疗患者,能很好地或极好地减轻症状,且毒性低。低免疫原性和/或高亲和力,以及其他未确定的特性,可有助于所实现的治疗结果。

[0175] 可用于本发明的TNF受体多聚体分子包含经由一种或多种多肽接头或其他非肽接头(诸如聚乙二醇(PEG))连接的两个或多个TNF受体的ECD的全部或功能部分。该多聚体分子还可包含分泌蛋白质的信号肽以引导该多聚体分子的表达。这些多聚体分子和它们的制备方法已经在美国专利申请08/437,533(提交于1995年5月9日)中有所描述,其内容以引用方式全文并入本文。

[0176] 可用于本发明方法和组合物的TNF免疫受体融合分子包含一种或多种免疫球蛋白分子的至少一部分和一种或多种TNF受体的全部或功能部分。这些免疫受体融合分子可被装配为单体或异型多聚体或同型多聚体。免疫受体融合分子也可以是单价的或多价的。此类TNF免疫受体融合分子的示例是TNF受体/IgG融合蛋白质。TNF免疫受体融合分子及它们的制备方法已经在本领域有所描述(Lesslerauer等人,Eur. J. Immunol. 21:2883-2886(1991);Ashkenazi等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539(1991);Peppe等人, J. Exp. Med. 174:1483-1489(1991);Kolls等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215-219(1994);Butler等人,Cytokine 6(6):616-623(1994);Baker等人,Eur. J. Immunol. 24:2040-2048(1994);Beutler等人,美国专利5,447,851;以及美国专利申请08/442,133(提交于1995年5月16日),上述参考文献中的每一篇以引用方式全文并入本文)。制备免疫受体融合分子的方法也可见于Capon等人,美国专利5,116,964;Capon等人,美国专利5,225,538;以及Capon等人,Nature 337:525-531(1989),这些参考文献以引用方式全文并入本文。

[0177] TNF受体分子的功能等价物、衍生物、片段或区域是指TNF受体分子的部分或编码TNF受体分子的TNF受体分子序列的部分,其具有足够的尺寸和序列以在功能上类似于可用于本发明的TNF受体分子(例如,以高亲和力结合TNF α 和具有低免疫原性)。TNF受体分子的功能等价物还包括在功能上类似于可用于本发明的TNF受体分子的经修饰TNF受体分子(例如,以高亲和力结合TNF α 并具有低免疫原性)。例如,TNF受体分子的功能等价物可包括“沉默”密码子或一个或多个氨基酸置换、缺失或添加(例如,用一个酸性氨基酸置换另一个酸性氨基酸;或者用一个编码相同或不同疏水性氨基酸的密码子置换另一个编码疏水性氨基酸的密码子)。参见Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, New York(1987-2000)。

[0178] 细胞因子包括任何已知的细胞因子。参见例如Cope with Cytokines.com。细胞因子

拮抗剂包括但不限于任何抗体、片段或模拟物、任何可溶受体、片段或模拟物、任何小分子拮抗剂或它们的任何组合。

[0179] 医疗性治疗。本发明的任何方法可包括用于治疗TNF介导的障碍的方法，包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用安全且有效量的包含至少一种抗TNF抗体的组合物或药物组合物。此类方法可任选地还包括共同施用或联合疗法以治疗此类免疫疾病，其中所述至少一种抗TNF抗体、其特定部分或变体的施用还包括在其施用之前、同时和/或之后施用至少一种选自以下的药物：至少一种TNF拮抗剂（例如但不限于TNF抗体或片段、可溶性TNF受体或其片段、融合蛋白质或小分子TNF拮抗剂）、奈瑞莫单抗、英夫利昔单抗、entercept、CDP-571、CDP-870、阿非莫单抗、来那西普等）、抗风湿剂（例如，甲氨蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺吡啶）、肌肉松弛药、麻醉药、非甾类抗炎药物（NSAID）、止痛药、麻醉剂、镇静剂、局部用麻醉剂、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂（例如，氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、其他抗微生物剂）、抗银屑病药、皮质类固醇、合成代谢类固醇、糖尿病相关药剂、矿物质、营养剂、甲状腺剂、维生素、钙相关激素、止泻剂、止咳药、止吐剂、抗溃疡药、缓泻药、抗凝剂、促红细胞生成素（例如，阿法依伯汀）、非格司亭（例如，G-CSF、优保津）、沙莫司亭（GM-CSF、Leukine）、免疫剂、免疫球蛋白、免疫抑制剂（例如，巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗）、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹药、烷化剂、抗代谢物、有丝分裂抑制剂、放射性药剂、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药、 β -激动剂、吸入类固醇、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、阿法链道酶（Pulmozyme）、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

[0180] 如本文所用，当涉及用本发明的抗TNF抗体（例如，抗TNF抗体戈利木单抗）的组合物、剂量、给药方案、治疗或方法时，术语“安全”是指与护理标准或另一种比较剂诸如其他抗TNF药剂相比，具有不良事件（AE）和严重不良事件（SAE）的可接受频率和/或可接受严重程度的有利风险：效益比。不良事件是在施用药品的患者中发生的不良医学事件。具体地，当涉及用本发明的抗TNF抗体的组合物、剂量、给药方案、治疗或方法时，安全是指不良事件的可接受频率和/或可接受严重程度，包括例如输注反应、肝胆实验室异常、包括TB在内的感染，以及恶性肿瘤。

[0181] 如本文所用，在组合物、剂量、给药方案、治疗或方法的上下文中使用的术语“疗效”和“有效”是指用本发明的抗TNF抗体（例如，抗TNF抗体戈利木单抗）的特定组合物、剂量、剂型、治疗或方法的效果。疗效可基于病程响应于本发明药剂发生的变化进行测量。例如，将本发明的抗TNF抗体以足以诱导至少一种反映所治疗疾病严重程度的指标的改善，优选地持续改善的量和时间施用至患者。可评估反映受试者的病、疾病或病症程度的各种指标，以确定治疗的量和时间是否足够。此类指标包括例如临床上公认的疾病严重程度、症状或所考虑病症的表现的指标。改善程度一般由医师或其他受过充分训练的个体确定，他们可基于体征、症状、活组织检查或指示临床症状改善的其他测试结果或任何其他疾病活动度量来确定。例如，可施用本发明的抗TNF抗体以实现与银屑病关节炎（PsA）相关的患者病症的改善。与PsA相关的患者病症的改善可使用一个或多个标准进行评估，所述一个或多个标准包括例如健康评估问卷残疾指数评分（HAQ-DI）、肌腱端炎评估、指趾炎评估、36项健康

调查简表生理总评分(SF-36 PCS)和/或36项健康调查简表心理成分总评分(SF-36 MCS)。HAQ DI是一个20个问题的工具,用于评估一个人在8个功能领域(穿衣、起床、吃饭、走路、卫生、伸手、抓握和日常生活活动)中完成任务的难度。可通过对包括例如左右外侧肘上髁、左右内侧股骨髁以及左右跟腱插入的肌腱端施加局部压力来评价疼痛的存在与否,从而评估肌腱端炎。可评估指趾炎在双手和双脚中的存在和严重程度。SF-36是由8个多项评分量表组成的问卷,并且SF-36 PSA和SF-36 MCS是来自SF-36的汇总评分,允许比较不同疾病的相对负担和不同治疗的相对有益效果。

[0182] 通常,对病理状况的治疗是通过施用安全且有效量或剂量的至少一种抗TNF抗体组合物来实现,取决于组合物中具有的比例活性,所述组合物总计为平均每剂量每千克患者至少约0.01毫克至500毫克的至少一种抗TNF抗体,优选地至少约0.1毫克至100毫克抗体/千克患者/单次或多次施用。另选地,有效血清浓度可包括0.1 μ g/ml-5000 μ g/ml血清浓度/单次或多次施用。合适的剂量是医学从业者已知的,当然要取决于具体疾病状态、待施用组合物的比例活性,以及经历治疗的具体患者。在一些情况下,为了实现所需治疗量,可能有必要提供重复施用,即重复单独施用特定的监控剂量或计量剂量,其中单独施用可以重复直至实现所需日剂量或效果。

[0183] 优选剂量可任选地包括0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99和/或100-500mg/kg/施用,或其任何范围、数值或分数,或实现以下血清浓度:0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500和/或5000 μ g/ml血清浓度/单次或多次施用,或其任何范围、数值或分数。

[0184] 另选地,施用的剂量可根据已知的因素而变化,诸如特定试剂的药效特性及其施用方式和途径;接受者的年龄、健康和体重;症状的性质和程度、同时治疗的种类、治疗的频率以及期望的效果。通常活性成分的剂量可以是约0.1至100毫克/千克体重。通常,一次施用或者以缓释形式施用0.1毫克/千克至50毫克/千克,优选地0.1毫克/千克至10毫克/千克,能有效地获得期望的结果。

[0185] 作为一个非限制性示例,人或动物的治疗可以在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天中的至少一天,或者另选地或除此之外,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51或52周中的至少一周,或者另选地或除此之外,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20年中的至少一年,或它们的任何组合,使用单次、输注或重复给药,作为0.1mg/kg至100mg/kg的一次或定期给

药的至少一种本发明抗体提供,诸如0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/kg。

[0186] 适合于内部施用的剂型(组合物),每单位或容器一般容纳约0.1毫克至约500毫克的活性成分。在这些药物组合物中,基于组合物总重量,活性成分一般会以约0.5重量%至99.999重量%的量存在。

[0187] 对于肠胃外施用,抗体可以被配制成溶液剂、混悬剂、乳剂或冻干粉剂,它们与可药用肠胃外介质联合或分开提供。此类介质的示例是水、盐水、林格溶液、葡萄糖溶液和1%-10%的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性介质,诸如固定油。介质或冻干粉剂可含有维持等渗性(例如氯化钠、甘露糖醇)和化学稳定性(例如缓冲剂和防腐剂)的添加剂。可通过已知的或合适的技术对制剂进行灭菌。

[0188] 合适的药用载体在Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol的最近版本(该领域的标准参考文本)中有描述。

[0189] 另选的施用。可根据本发明使用许多已知的和开发的施用方式来施用药学有效量的至少一种根据本发明的抗TNF抗体。尽管在下文描述中使用的是经肺施用,但其他施用方式也可根据本发明使用,得到合适的结果。

[0190] 本发明的TNF抗体可使用适用于通过吸入方式或本文所述或本领域已知的其他方式施用的多种装置和方法中的任一种,在载体中作为溶液剂、乳剂、胶体或混悬剂递送或作为干粉剂递送。

[0191] 肠胃外用制剂及施用。用于肠胃外施用的制剂可含有作为普通赋形剂的无菌水或盐水、聚亚烷基二醇诸如聚乙二醇、植物来源的油、氢化萘等。注射用水性或油性混悬剂可通过使用适当的乳化剂或湿润剂和悬浮剂根据已知方法来制备。注射用药剂可以是无毒的、非经口施用的稀释剂,诸如溶于溶剂的水溶液剂或无菌注射液或混悬剂。作为可用的介质或溶剂,允许使用水、林格氏溶液、等渗盐水等;作为普通溶剂或悬浮溶剂,可以使用无菌不挥发油。为了这些目的,可以使用任何种类的不挥发性油和脂肪酸,包括天然的或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸;天然的或合成的或半合成的甘油单酯或甘油二酯或甘油三酯。胃肠外施用是本领域已知的,包括但不限于常规形式的注射、如美国专利5,851,198中所述的气压式无针注射装置和如美国专利5,839,446中所述的激光穿孔器装置,全文以引用方式并入本文。

[0192] 另选的递送方式。本发明还涉及通过以下方式施用至少一种抗TNF抗体:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速浓注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或透皮方式。可制备至少一种抗TNF抗体组合物用于肠胃外(皮下、肌肉内或静脉内)或任何其他施用,特别是以液体溶液或悬浮液的形式;用于阴道或直肠施用,特别是半固体形态,诸如但不限于乳膏和栓剂;用于口腔或舌下施用,诸如但不限于片剂或胶囊剂形式;或鼻内,诸如但不限于粉末、滴鼻剂或气溶胶或某些药剂的形式;或透皮,诸如不限于凝胶、软膏、乳液、悬浮液或贴剂输送系统,该贴片输送系统含有化学增强剂诸如二甲基亚砜以改变皮肤结构或增加透皮贴剂中的药物浓度(Junginger等人, "Drug Permeation

Enhancement”;Hsieh,D.S.编辑,第59-90页,(Marcel Dekker,Inc.New York 1994,以引用方式全文并入本文),或含有氧化剂,其使得含有蛋白质和肽的制剂能够应用于皮肤上(WO 98/53847),或应用电场以产生瞬间转运途径,诸如电穿孔,或增加带电药物通过皮肤的运动性,诸如离子电渗疗法,或应用超声,诸如透皮吸收超声波(美国专利4,309,989和4,767,402)(上述出版物和专利以引用方式全文并入本文)。

[0193] 经肺/鼻施用。对于经肺施用,优选地至少一种抗TNF抗体组合物以可有效到达肺下部气道或鼻窦的粒度递送。根据本发明,至少一种抗TNF抗体可通过本领域已知用于通过吸入施用治疗剂的多种吸入装置或鼻装置中的任一种来递送。这些能够在患者的鼻腔或肺泡中沉积气溶胶化制剂的装置包括定量吸入器、雾化器、干粉产生器、喷雾器等。其他适用于引导抗体的经肺或鼻施用的装置也是本领域已知的。所有此类装置都可以使用适合于以气溶胶形式分配抗体进行施用的制剂。此类气溶胶可由溶液(水性或非水性)或固体颗粒构成。定量吸入器如 **Ventolin[®]** 定量吸入器通常利用推进气体并且要求在吸气期间启动(参见,例如WO 94/16970、WO 98/35888)。干粉吸入器如Turbuhaler[™](Astra)、**Rotahaler[®]**(Glaxo)、**Diskus[®]**(Glaxo)、Spiros[™]吸入器(Dura)、Inhale Therapeutics公司销售的装置以及 **Spinhaler[®]** 粉末吸入器(Fisons),都采用呼吸来驱动混合粉末(US 4668218(Astra)、EP 237507(Astra)、WO 97/25086(Glaxo)、WO 94/08552(Dura)、US 5458135(Inhale)、WO 94/06498(Fisons),所有这些专利都以引用方式全文并入本文)。雾化器如AERx[™]Aradigm、**Ultravent[®]**雾化器(Mallinckrodt)和AcornII[®]雾化器(Marquest Medical Products)(US 5404871 Aradigm、WO 97/22376)(以上参考文献都以引用方式全文并入本文)从溶液产生气溶胶,而计量剂量吸入器、干粉吸入器等则产生小颗粒气溶胶。可商购获得的吸入装置的这些具体示例旨在代表适用于实施本发明的具体装置,并且无意于限制本发明的范围。优选地,包含至少一种抗TNF抗体的组合物通过干粉吸入器或喷雾器递送。对于施用本发明的至少一种抗体,吸入装置需具有若干期望特征。例如,有利地,通过吸入装置进行的递送是可靠的、可再现的和准确的。吸入装置可任选地递送小的干燥颗粒,例如小于约10 μ m,优选地约1 μ m-5 μ m,以便容易呼吸。

[0194] TNF抗体组合物作为喷雾施用。通过施压使至少一种抗TNF抗体的悬浮液或溶液通过喷嘴,可以产生包含TNF抗体组合物蛋白质的喷雾。可以选择喷嘴尺寸和构型、所施加的压力和液体加料速率来实现所需的输出和粒度。例如,通过电场结合毛细管或喷嘴加料,可产生电喷雾。有利地,通过喷雾器递送的至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的颗粒具有小于约10 μ m的粒度,优选地粒度在约1 μ m至约5 μ m的范围内,最优选地在约2 μ m至约3 μ m的范围内。

[0195] 适合与喷雾器一起使用的至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的制剂通常包含如下浓度存在于水性溶液中的抗体组合物:约0.1mg至约100mg至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质/ml溶液或mg/gm,或其中的任何范围或数值,例如但不限于0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/ml或mg/gm。该制剂可包含诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂之类的试剂,并且优选地包括锌。该制剂还可包含用于稳定抗体组合物蛋白质的赋形剂或试剂,诸如缓冲剂、还原剂、填充蛋白质(bulk

protein)或碳水化合物。可用于配制抗体组合物蛋白质的填充蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等。可用于配制抗体组合物蛋白质的常用碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合物蛋白质制剂还可包含表面活性剂,其可减小或防止在形成气溶胶过程中因溶液雾化引起的表面诱导的抗体组合物蛋白质聚集。可以采用多种常规表面活性剂,诸如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。按制剂的重量计,用量将通常在介于0.001%和14%之间的范围内。对于本发明的目的而言特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等。用于蛋白质,诸如TNF抗体,或特定部分或变体的配制的本领域已知的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0196] 通过雾化器施用TNF抗体组合物。抗体组合物蛋白质可通过雾化器,诸如喷射雾化器或超声雾化器施用。通常,在喷射雾化器中,用压缩空气源通过孔口产生高速喷气流。在气体通过喷嘴膨胀时,会产生低压区,其通过连接液体贮液器的毛细管吸取抗体组合物蛋白质溶液。来自毛细管的液体流在其离开管时被剪切成不稳定的细丝或小滴,从而产生气溶胶。可以采用一系列构型、流速和挡板类型从给定的喷射雾化器产生所需性能特征。在超声雾化器中,用高频率电能产生振动机械能量,通常使用压电转换器。该能量被直接地或通过耦合流体传递至抗体组合物蛋白质的制剂,从而产生包含该抗体组合物蛋白质的气溶胶。有利地,通过雾化器递送的抗体组合物蛋白质的颗粒具有小于约10 μm 的粒度,优选地粒度在约1 μm 至约5 μm 的范围内,最优选地为约2 μm 至约3 μm 。

[0197] 适于与雾化器(喷射雾化器或超声雾化器)一起使用的至少一种抗TNF抗体的制剂通常包括约0.1mg至约100mg至少一种抗TNF抗体蛋白质/ml溶液的浓度。该制剂可包含诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂之类的试剂,并且优选地包括锌。该制剂还可包含用于使至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质稳定的赋形剂或试剂,诸如缓冲剂、还原剂、填充蛋白质或碳水化合物。可用于配制至少一种抗TNF抗体组合物蛋白质的填充蛋白质包括白蛋白、鱼精蛋白等。可用于配制至少一种抗TNF抗体的常用碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗TNF抗体制剂还可包含表面活性剂,其可减小或防止在形成气溶胶过程中因溶液雾化引起的表面诱导的至少一种抗TNF抗体的聚集。可以采用多种常规表面活性剂,诸如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇,以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。按制剂的重量计,用量将通常在介于0.001%和4%之间的范围内。对于本发明而言特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20等。本领域已知的用于蛋白质诸如抗体蛋白质的配制的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0198] 通过定量吸入器施用TNF抗体组合物。在定量吸入器(MDI)中,推进剂、至少一种抗TNF抗体以及任何赋形剂或其他添加剂作为包括液化压缩气体的混合物容纳在罐中。计量阀的致动将混合物释放为气溶胶,优选地含有尺寸范围小于约10 μm ,优选地约1 μm 至约5 μm ,最优选地约2 μm 至约3 μm 的颗粒。所需气溶胶粒度可通过采用通过本领域技术人员已知的各种方法(包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点冷凝等)制备的抗体组合物蛋白质的制剂来获得。优选的定量吸入器包括由3M或Glaxo生产并采用氢氟烃推进剂的那些吸入器。

[0199] 供用于定量吸入器装置的至少一种抗TNF抗体的制剂通常会包括含有至少一种抗TNF抗体的微细粉末在非水性介质中作为悬浮液,例如,在表面活性剂的帮助下悬浮在推进剂中。推进剂可以是用于该目的的任何常规材料,诸如氯氟烃、氢氯氟烃、氢氟烃或包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟乙醇和1,1,1,2-四氟乙烷、HFA-134a(氢氟烷烃-134a)、

HFA-227 (氢氟烷烃-227) 在内的烃类。优选地,推进剂为氢氟烃。可选择表面活性剂来使所述至少一种抗TNF抗体在推进剂中作为悬浮液而得到稳定,保护活性剂免受化学降解等。合适的表面活性剂包括脱水山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等。在一些情况下,使用诸如乙醇之类的溶剂的溶液气溶胶是优选的。本领域已知的用于配制蛋白质的附加试剂也可包含在该制剂中。

[0200] 本领域普通技术人员会认识到,本发明的方法可通过经由本文中未描述的装置经肺施用至少一种抗TNF抗体组合物来实现。

[0201] 口服制剂及施用。口服制剂依赖于共同施用佐剂(例如,间苯二酚和非离子型表面活性剂诸如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙醚)以人工增加肠壁的渗透性,以及共同施用酶抑制剂(例如,胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟磷酸(DFF)和抑肽酶(trasylo1))以抑制酶促降解。可将供口服的固体剂型的活性组分化合物与至少一种添加剂混合,所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露糖醇、海藻糖、棉子糖、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、藻酸盐、几丁质、壳聚糖、果胶、黄蓍胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成的或半合成的聚合物和甘油酯。这些剂型还可含有其他类型的添加剂,例如无活性稀释剂、润滑剂诸如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂诸如山梨酸、抗坏血酸、 α -生育酚、抗氧化剂诸如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、甜味剂、矫味剂、香味剂等。

[0202] 片剂和丸剂可进一步加工成肠溶衣包衣制剂。供口服的液体制剂包括可允许用于医学用途的乳剂、糖浆剂、酏剂、混悬剂和溶液制剂。这些制剂可以含有常用于所述领域的无活性稀释剂,例如水。脂质体作为胰岛素的药物递送系统已有描述(美国专利4,239,754)。最近,混合氨基酸的人工聚合物(类蛋白)的微球体已用于递送药物(美国专利4,925,673)。此外,美国专利5,879,681和美国专利5,587,753中描述的载体化合物用于经口递送生物活性剂是本领域已知的。

[0203] 粘膜用制剂及施用。为了透过粘膜表面吸收,施用至少一种抗TNF抗体的组合物和方法包括乳剂,其包含许多亚微米颗粒、粘膜粘附性大分子、生物活性肽和水性连续相,其通过实现乳剂颗粒的粘膜粘附来促进透过粘膜表面的吸收(美国专利5,514,670)。适于施用本发明的乳剂的粘膜表面可包括角膜、结膜、口腔、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠施途径。用于阴道和直肠施用的制剂,例如栓剂,可含有例如聚亚烷基二醇、凡士林、可可脂等作为赋形剂。鼻内施用制剂可以是固体并且含有例如乳糖作为赋形剂,或可以是鼻滴剂的水性或油性溶液。对于口腔施用,赋形剂包括糖类、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等(美国专利5,849,695)。

[0204] 透皮制剂及施用。对于透皮施用,将该至少一种抗TNF抗体包囊在递送装置诸如脂质体或聚合型纳米颗粒、微粒、微胶囊或微球体(统称为微粒,除非特别指出)中。有多种合适的装置是已知的,包括由合成聚合物和天然聚合物制成的微颗粒,所述合成聚合物诸如聚羧酸(诸如聚乳酸、聚乙醇酸以及它们的共聚物)、聚原酸酯、聚酸酐和聚磷腈,所述天然聚合物诸如胶原、聚氨基酸、白蛋白和其他蛋白质、海藻酸盐和其他多糖以及它们的组合(美国专利5,814,599)。

[0205] 长期施用及制剂。通过一次施用在长时间段内,例如一周到一年的时间段内将本发明化合物递送给受试者,有时候可能是期望的。可以利用多种缓释剂型、储库(depot)剂型或植入剂型。例如,剂型可含有化合物的药学上可接受的无毒盐,该盐在体液中具有低溶

解度,例如,(a)与多元酸诸如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、双羟萘酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘单磺酸或二磺酸、聚半乳酸等的酸加成盐;(b)具有多价金属阳离子诸如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等的盐,或者具有由例如N,N'-二苄基-乙二胺或乙二胺形成的有机阳离子的盐;或(c)(a)和(b)的组合,例如鞣酸锌盐。此外,可将本发明的化合物或优选地相对难溶的盐诸如上面所述的那些盐在适于注射的凝胶中,例如,在具有例如芝麻油的单硬脂酸铝凝胶中配制。尤其优选的盐为锌盐、鞣酸锌盐、双羟萘酸盐等。用于注射的另一种类型的缓释储库型制剂含有经分散以在缓慢降解、无毒、非抗原性聚合物中包囊的化合物或盐,所述聚合物为诸如美国专利3,773,919中描述的聚乳酸/聚乙醇酸聚合物。还可将化合物或优选地相对难溶的盐诸如上面所述的那些盐配制成胆固醇基质硅橡胶丸,尤其为了用于动物。附加缓释、储存或植入制剂,例如气体或液体脂质体在文献(美国专利5,770,222,以及“Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”,J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.,N.Y.,1978)中是已知的。

[0206] 已总体地描述了本发明,通过参考下面的实施例将更容易理解本发明,所述实施例仅以示例的方式给出并且无意于作为限制。

[0207] 实施例1:TNF抗体在哺乳动物细胞中的克隆和表达。

[0208] 典型的哺乳动物表达载体含有至少一个启动子元件,其介导mRNA和抗体编码序列的转录起始,所述表达载体还含有转录物的转录终止和多腺苷酸化所需的信号。附加元件包括增强子、Kozak序列以及侧接有用于RNA剪接的供体和受体位点的间插序列。高效率的转录可以使用以下序列来实现:来自SV40的早期启动子和晚期启动子,来自逆转录病毒例如RSV、HTLVI、HIVI的长末端重复序列(LTRS),和巨细胞病毒(CMV)的早期启动子。然而,也可以使用细胞元件(例如人肌动蛋白启动子)。用于实施本发明的合适表达载体包括例如如以下的载体:pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN或pLNCX(Clontech Labs,Palo Alto,CA)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)或pcDNA3.1/Hygro(+/-)(Invitrogen)、PSVL和PMSG(Pharmacia,Uppsala,Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2dhfr(ATCC 37146)和pBC12MI(ATCC 67109)。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人Hela 293、H9和Jurkat细胞、小鼠NIH3T3和C127细胞、Cos 1、Cos 7和CV 1、quail QC1-3细胞、小鼠L细胞和中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO)细胞。

[0209] 另选地,基因可以在含有整合进染色体内的所述基因的稳定细胞系中表达。与选择标记诸如dhfr、gpt、新霉素或潮霉素共转染可允许鉴定和分离转染的细胞。

[0210] 还可以扩增所转染的基因以大量表达所编码的抗体。DHFR(二氢叶酸还原酶)标记可用于开发携带几百或甚至几千拷贝的感兴趣的基因的细胞系。另一种可用的选择标记是谷氨酰胺合酶(GS)(Murphy等人,Biochem.J.227:277-279(1991);Bebbington等人,Bio/Technology 10:169-175(1992))。使用这些标记,哺乳动物细胞在选择培养基中生长且选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合进染色体内的扩增基因。中国仓鼠卵巢巢(CHO)细胞和NS0细胞通常用于生产抗体。

[0211] 表达载体pC1和pC4含有Rous肉瘤病毒的强启动子(LTR)(Cullen等人,Molec.Cell.Biol.5:438-447(1985))和CMV-增强子的片段(Boshart等人,Cell 41:521-530(1985))。多克隆位点,例如,具有限制性内切酶切割位点BamHI、XbaI和Asp718的多克隆位点,有助于感兴趣的基因的克隆。载体另外含有大鼠前胰岛素原基因的3'内含子、多腺苷

酸化和终止信号。

[0212] 在CHO细胞中的克隆和表达。将载体pC4用于表达TNF抗体。质粒pC4是质粒pSV2-dhfr (ATCC登记号37146) 的衍生物。该质粒含有在SV40早期启动子控制下的小鼠DHFR基因。用这些质粒转染的缺乏二氢叶酸活性的中国仓鼠卵巢细胞或其他细胞,可通过使细胞在补充有化学治疗剂甲氨蝶呤的选择培养基(例如alpha minus MEM,Life Technologies, Gaithersburg,MD) 中生长进行选择。DHFR基因在对甲氨蝶呤(MTX) 具有抗性的细胞中的扩增已得到充分记载(参见,例如,F.W.Alt等人,J.Biol.Chem.253:1357-1370(1978); J.L.Hamlin和C.Ma,Biochem.etBiophys.Acta 1097:107-143(1990);以及M.J.Page和M.A.Sydenham,Biotechnology 9:64-68(1991))。在浓度渐增的MTX中生长的细胞由于DHFR基因扩增造成超量产生靶酶DHFR而发展出对药物的抗性。如果第二基因与DHFR基因连接,那么它通常被共扩增和过表达。本领域已知的是,该方法可用于开发携带超过1,000个拷贝的扩增基因的细胞系。随后,当甲氨蝶呤被取出时,获得含有整合进宿主细胞的一个或多个染色体内的扩增基因的细胞系。

[0213] 为了表达感兴趣的基因,质粒pC4含有Rous肉瘤病毒长末端重复序列(LTR) 的强启动子(Cullen等人,Molec.Cell.Biol.5:438-447(1985)) 和从人巨细胞病毒(CMV) 即刻早期基因的增强子分离的片段(Boshart等人,Cell 41:521-530(1985))。启动子的下游是允许基因整合的BamHI、XbaI和Asp718限制性内切酶切割位点。在这些克隆位点之后,该质粒含有大鼠前胰岛素原基因的3'内含子和多腺苷酸化位点。其他高效率的启动子也可以用于表达,例如人β-肌动蛋白启动子、SV40早期或晚期启动子或来自其他逆转录病毒例如HIV和HTLVI的长末端重复序列。Clontech的Tet-Off和Tet-On基因表达系统和类似系统可以用于在哺乳动物细胞中以受调控的方式表达TNF(M.Gossen和H.Bujard, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992))。对于mRNA的多腺苷酸化,也可以使用例如来自人生长激素或珠蛋白基因的其他信号。携带整合进染色体中的感兴趣的基因的的稳定细胞系也可以在与选择标记诸如gpt、G418或潮霉素共转染时进行选择。有利的是在开始时使用不止一种选择标记,例如,G418加上甲氨蝶呤。

[0214] 将质粒pC4用限制性内切酶消化,并且然后通过本领域已知的程序使用小牛肠磷酸酶去磷酸化。然后从1%琼脂糖凝胶分离载体。

[0215] 然后将编码所述分离的可变区和恒定区的DNA与该去磷酸化的载体用T4DNA连接酶连接。然后转化大肠杆菌HB101或XL-1Blue细胞,并使用例如限制性内切酶分析来鉴定含有插入到质粒pC4中的片段的细菌。

[0216] 将缺乏活性DHFR基因的中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞用于转染。使用脂质体将5μg表达质粒pC4与0.5μg质粒pSV2-neo共转染。质粒pSV2-neo含有显性选择标记即来自Tn5的neo基因,其编码赋予对包括G418在内的一组抗生素的抗性的酶。将细胞接种在补充有1μg/ml G418的alpha minus MEM中。2天后,将细胞用胰蛋白酶处理并接种在杂交瘤克隆板(Greiner,Germany) 中的补充有10ng/ml、25ng/ml或50ng/ml甲氨蝶呤加1μg/ml G418的alpha minus MEM中。约10-14天后,将单一克隆使用胰蛋白酶处理并且然后接种在6孔培养皿或10ml瓶中,其中使用不同浓度的甲氨蝶呤(50nM、100nM、200nM、400nM、800nM)。然后将在最高浓度甲氨蝶呤下生长的克隆转移到容纳更高浓度甲氨蝶呤(1mM、2mM、5mM、10mM、20mM) 的新的6孔板。重复相同的程序直到获得在100mM-200mM浓度下生长的克隆。例如,通

过SDS-PAGE和蛋白质印迹或通过反相HPLC分析,可对所需基因产物的表达进行分析。

[0217] 实施例2:使用转基因小鼠产生与人TNF反应的高亲和力人IgG单克隆抗体。

[0218] 总结。已经使用了含有人重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生高亲和力的、完全人的单克隆抗体,该抗体可在治疗上用于抑制TNF治疗一种或多种TNF介导的疾病的作用。含有重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的(CBA/J×C57/BL6/J)F₂杂交小鼠用人重组TNF免疫(Taylor等人,Intl.Immunol.6:579-591(1993);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Neuberger,M.,Nature Biotech.14:826(1996);Fishwild等人,Nature Biotechnology 14:845-851(1996))。几次融合产生了一组或多组完全人TNF反应性IgG单克隆抗体。还进一步对该完全人抗TNF抗体进行了表征。全部均为IgG1 κ 。发现此类抗体具有介于 1×10^9 和 9×10^{12} 之间的亲和常数。这些完全人单克隆抗体的出乎意料的高亲和力使得它们成为用于在TNF相关疾病、病理或失调中的治疗应用的合适候选物。

[0219] 缩写。BSA-牛血清白蛋白;CO₂-二氧化碳;DMSO-二甲基亚砷;EIA-酶免疫测定法;FBS-胎牛血清;H₂O₂-过氧化氢;HRP-辣根过氧化物酶;ID-真皮内;Ig-免疫球蛋白;TNF-组织坏死因子 α ;IP-腹腔内注射;IV-静脉注射;Mab-单克隆抗体;OD-光密度;OPD-邻苯二胺二盐酸盐;PEG-聚乙二醇;PSA-青霉素、链霉素、两性霉素;RT-室温;SQ-皮下;v/v-体积/体积;w/v-重量/体积。

[0220] 材料和方法

[0221] 动物。可表达人抗体的转基因小鼠是本领域已知的(并且可商购获得(例如,来自GenPharm International, San Jose, CA; Abgenix, Fremont, CA等),其表达人免疫球蛋白而不是小鼠IgM或Ig κ 。例如,此类转基因小鼠含有人序列转基因,该人序列转基因经历V(D)J连接、重链类转换和体细胞突变,以产生全套人序列免疫球蛋白(Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994))。轻链转基因可例如部分来自酵母人工染色体克隆,其包括几乎一半的种系人V κ 区。另外,重链转基因可编码人 μ 和人 $\gamma 1$ (Fishwild等人,Nature Biotechnology 14:845-851(1996))和/或 $\gamma 3$ 恒定区两者。来源于适当基因型谱系的小鼠可用于免疫和融合过程以产生针对TNF的完全人单克隆抗体。

[0222] 免疫。一个或多个免疫程序可用于生成抗TNF人杂交瘤。前几次融合可在以下示例性免疫方案之后执行,但是也可使用其他类似的已知方案。用1 μ g-1000 μ g重组人TNF对几只14-20周龄雌性和/或手术阉割的转基因雄性小鼠IP和/或ID免疫,该重组人TNF用等体积的TITERMAX或完全弗氏佐剂乳化,最终体积为100 μ L-400 μ L(例如,200)。每只小鼠还可任选地在2个SQ位点中的每一个处接受溶于100 μ L生理盐水的1 μ g-10 μ g。然后可在1-7、5-12、10-18、17-25和/或21-34天后用TNF对小鼠进行IP(1 μ g-400 μ g)和SQ(1 μ g-400 μ g×2)免疫,TNF用等体积的TITERMAX或不完全弗氏佐剂乳化。小鼠可在12-25和25-40天后通过眼眶后穿刺进行放血而不采用抗凝剂。然后允许血液在室温下凝结1小时,收集血清并根据已知方法使用TNF EIA测定法滴定。当重复注射不会导致滴度增加时,执行融合。此时,可给小鼠提供在100 μ L生理盐水中稀释的1 μ g-400 μ gTNF的最终IV加强注射。三天后,通过颈椎脱位对小鼠实施安乐死,将脾无菌取出并浸于含有100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和0.25 μ g/mL两性霉素B(PSA)的10mL冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。通过用PSA-PBS无菌灌注脾脏来收获脾细胞。用冷PSA-PBS洗涤细胞一次,使用台盼蓝染料排除法计数细胞,并将细胞重悬于含有25mM Hepes的RPMI 1640培养基中。

[0223] 细胞融合。根据已知方法,例如本领域已知的方法,可将小鼠骨髓瘤细胞与活脾细胞以1:1至1:10的比例进行融合。作为非限制性示例,可将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。然后在30秒内,将沉淀物于37℃下缓慢重悬于1mL 50% (w/v) PEG/PBS溶液(PEG分子量1,450,Sigma)中。然后通过1分钟内缓慢添加10.5mL含有25mM Hepes (37℃)的RPMI 1640培养基来终止融合。将融合的细胞以500rpm-1500rpm离心5分钟。然后将细胞重悬于HAT培养基(含有25mM Hepes、10%胎儿克隆I血清(Hyclone)、1mM丙酮酸钠、4mM L-谷氨酰胺、10μg/mL庆大霉素、2.5%Origen培养补充物(Fisher)的RPMI 1640培养基,10%653条件RPMI1640/Hepes培养基、50μM 2-巯基乙醇、100μM次黄嘌呤、0.4μM氨基蝶呤和16μM胸苷)中,并且然后以200μL/孔接种于15个96孔平底组织培养板中。然后将板置于容纳5%CO₂和95%空气的37℃潮湿培养箱中,并保持7-10天。

[0224] 小鼠血清中人IgG抗TNF抗体的检测。固相EIA可用于筛选小鼠血清中对人TNF特异的人IgG抗体。简而言之,可在PBS中以2μg/mL的TNF包被板过夜。在含有0.02% (v/v) Tween 20的0.15M盐水中洗涤后,可用PBS中的1% (w/v) BSA在室温下以200μL/孔封闭孔1小时。立即使用板或将其在-20℃下冷冻以备将来使用。将小鼠血清稀释液在室温下以50L/孔在TNF包被板上温育1小时。洗涤板,并且然后用以1:30,000稀释于1%BSA-PBS中的50μL/孔HRP标记的山羊抗人IgG (Fc特异性)在室温下探测1小时。可再次洗涤板,并且在室温下添加100μL/孔的柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液(0.1M柠檬酸和0.2M磷酸钠,0.01%H₂O₂和1mg/mL OPD)并保持15分钟。然后以25μL/孔添加终止液(4N硫酸),并经由自动板分光光度计在490nm处读取OD。

[0225] 杂交瘤上清液中完全人免疫球蛋白的检测。可使用合适的EIA检测分泌完全人免疫球蛋白的生长阳性杂交瘤。简而言之,96孔弹出板(VWR,610744)可在4℃下在碳酸钠缓冲液中使用10μg/mL山羊抗人IgG Fc包被过夜。将板洗涤并在37℃下用1%BSA-PBS封闭1小时,然后立即使用或在-20℃下冷冻。将未稀释的杂交瘤上清液在37℃下在板上温育1小时。洗涤板,然后用以1:10,000稀释于1%BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人κ在37℃下探测1小时。然后如上所述将板与底物溶液一起温育。

[0226] 完全人抗TNF反应性的测定。如上所述,可使用合适的RIA或其他测定法同时测定杂交瘤对TNF的反应性。例如,如上所述将上清液在山羊抗人IgG Fc板上温育、洗涤,并且然后用放射性标记的TNF以适当计数/孔在室温下探测1小时。用PBS洗涤孔两次,并且使用合适的计数器定量结合的放射性标记的TNF。

[0227] 可在细胞培养物中扩增人IgG1κ抗TNF分泌杂交瘤,并通过有限稀释连续亚克隆。可将所得克隆群体扩增并在冷冻培养基(95%FBS,5%DMSO)中冷冻保存并储存在液氮中。

[0228] 同种型。抗体的同种型测定可使用EIA以与用于筛选特定滴度的小鼠免疫血清相似的形式完成。如上所述,可将TNF包被在96孔板上,并且可将2μg/mL的纯化抗体在室温下在平板上温育一小时。将板洗涤并用1:4000稀释于1%BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人IgG₁或HRP标记的山羊抗人IgG₃在室温下探测1小时。再次洗涤该板,并且如上所述用底物溶液温育。

[0229] 人抗人TNF抗体与人TNF的结合动力学。例如,可使用TNF捕获EIA和BIAcore技术适当地评估抗体的结合特征。在如上所述的测定法中,可评估用于结合到包被有2μg/mL TNF的EIA板上的经纯化人TNF抗体的分级浓度。然后OD可表示为显示相对结合效率的半对数

图。

[0230] 定量结合常数可例如如下获得,或通过任何其他已知的合适方法获得。将BIAcore CM-5(羧甲基)芯片置于BIAcore 2000单元中。将HBS缓冲液(0.01M HEPES,0.15M NaCl,3mM EDTA,0.005%v/v P20表面活性剂,pH 7.4)以5 μ L/分钟在芯片的流动池内流动,直至获得稳定的基线。将溶于200 μ L水中的15mg EDC(N-乙基-N'-(3-二甲基-氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐)溶液(100 μ L)添加到溶于200 μ L水中的100 μ L的2.3mgNHS(N-羟基琥珀酰亚胺)溶液。将四十(40) μ L所得溶液注射到芯片上。将6 μ L人TNF溶液(15 μ g/mL,溶于10mM乙酸钠中,pH4.8)注射到芯片上,导致约500RU的增加。将缓冲液改变为TBS/Ca/Mg/BSA运行缓冲液(20mM Tris,0.15M氯化钠,2mM氯化钙,2mM乙酸镁,0.5%Triton X-100,25 μ g/mL BSA,pH 7.4),并在芯片内流动过夜以使其平衡,并水解或封闭任何未反应的琥珀酰亚胺酯。

[0231] 抗体以33.33nM、16.67nM、8.33nM和4.17nM溶解于运行缓冲液中。将流量调节至30 μ L/min,并且将仪器温度调节至25 $^{\circ}$ C。两个流动池用于动力学运行,一个为固定了TNF的流动池(样本),另一个为未衍生化的流动池(空白)。将120 μ L的每个抗体浓度以30 μ L/min注射在流动池内(缔合阶段),随后是不间断的360秒缓冲液流(解离阶段)。通过两次连续注射30 μ L的2M硫氰酸胍,再生芯片表面(组织坏死因子 α /抗体复合物解离)。

[0232] 如本领域已知的,使用BIA评价3.0或CLAMP 2.0进行数据分析。对于每个抗体浓度,从样本传感图中减去空白传感图。对解离(k_d, sec^{-1})和缔合($k_a, \text{mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$)以及计算(k_d/k_a)的解离常数(K_D, mol)进行整体拟合。如果抗体亲和力足够高,使得所捕获的抗体的RU>100,则进行抗体的附加稀释。

[0233] 结果与讨论

[0234] 产生抗人TNF单克隆抗体。执行几次融合,并将每个融合体接种在15个板(1440孔/融合体)中,产生数十种对人TNF特异的抗体。其中一些被发现由人Ig链和小鼠Ig链的组合组成。剩余的杂交瘤分泌的抗TNF抗体仅由人重链和轻链组成。在人杂交瘤中,预计所有杂交瘤都是IgG1 κ 。

[0235] 人抗人TNF抗体的结合动力学。ELISA分析证实,来自大多数或所有这些杂交瘤的纯化抗体以浓度依赖性方式结合TNF。图1至图2示出了这些抗体的相对结合效率的结果。在这种情况下,测量抗体对其关联抗原(表位)的亲合力。应当指出的是,将TNF直接结合到EIA板可引起蛋白质变性,并且表观结合亲和力不能反映与不可变性蛋白质的结合。在一定浓度范围内发现了50%的结合。

[0236] 定量结合常数是使用对该人抗体的BIAcore分析来获得,揭示出几种人单克隆抗体具有非常高的亲和力, K_D 在 1×10^{-9} 至 7×10^{-12} 的范围内。

[0237] 结论。

[0238] 利用来自含有人TNF免疫的人可变区和恒定区抗体转基因的杂交小鼠的脾细胞执行几次融合。产生了一组IgG1 κ 同种型的几种完全人TNF反应性IgG单克隆抗体。还进一步对该完全人抗TNF抗体进行了表征。几种所产生的抗体具有介于 1×10^9 和 9×10^{12} 之间的亲和常数。这些完全人单克隆抗体的出乎意料的高亲和力使得它们适用于在TNF依赖性疾病、病理或相关病症中的治疗应用。

[0239] 实施例3:产生对人TNF α 具有反应性的人IgG单克隆抗体。

[0240] 总结。含有重链和轻链的人可变区和恒定区抗体转基因的(CBA/J $\times$ C57BL/6J)F₂

杂交小鼠 (1-4) 用重组人TNF α 免疫。一种被命名为GenTNV的融合体产生了八种完全人IgG1 κ 单克隆抗体,其结合到固定的重组人TNF α 。鉴定后不久,将八种细胞系移交至分子生物学研究所 (Molecular Biology) 进行进一步表征。因为这些Mab在序列上完全是人的,所以它们在人体内的免疫原性预计比cA2 (类克) 低。

[0241] 缩写。BSA-牛血清白蛋白;CO₂-二氧化碳;DMSO-二甲基亚砷;EIA-酶免疫测定法;FBS-胎牛血清;H₂O₂-过氧化氢;H-重链;HRP-辣根过氧化物酶;ID-真皮内;Ig-免疫球蛋白;TNF-组织坏死因子 α ;IP-腹腔内注射;IV-静脉注射;Mab-单克隆抗体;OD-光密度;OPD-邻苯二胺二盐酸盐;PEG-聚乙二醇;PSA-青霉素、链霉素、两性霉素;RT-室温;SQ-皮下;TNF α -肿瘤坏死因子 α ;v/v-体积/体积;w/v-重量/体积。

[0242] 简介。含有人重链和轻链免疫球蛋白基因的转基因小鼠用于产生对重组人TNF α 特异的完全人单克隆抗体。希望可以使用这些独特的抗体,因为cA2 (瑞米凯德) 用于治疗性地抑制TNF α 介导的疾病中涉及的炎症过程,具有增加的血清半衰期和降低的与免疫原性相关的副作用的有益效果。

[0243] 材料和方法。

[0244] 动物。GenPharm International已经开发了表达人免疫球蛋白但不表达小鼠IgM或Ig κ 的转基因小鼠。这些小鼠含有功能性人抗体转基因,其经历V(D)J接合、重链类切换和体细胞突变,以产生抗原特异性人免疫球蛋白的全集 (1)。轻链转基因部分源自酵母人工染色体克隆,其包括几乎一半的种系人V κ 基因座。除了几个VH基因之外,重链(HC)转基因编码人 μ 和人 γ 1 (2) 和/或 γ 3个恒定区。源自HCo12/KCo5基因型谱系的小鼠用于免疫和融合过程,以产生本文所述的单克隆抗体。

[0245] 人TNF α 的纯化。使用填充有与Sepharose 4B (Pharmacia) 偶联的TNF α 受体-Fc融合蛋白质 (p55-sf2) (5) 的柱,通过亲和层析从C237A细胞的组织培养上清液中纯化人TNF α 。将细胞上清液与其体积的10 $\times$ Dulbecco PBS (D-PBS) 的九分之一混合,并在4 $^{\circ}$ C以4mL/min通过柱。然后用PBS洗涤柱,用0.1M柠檬酸钠、pH 3.5洗脱TNF α ,用2M Tris-HCl pH 8.5中和。将纯化的TNF α 缓冲液交换到10mM Tris、0.12M氯化钠pH 7.5中,并通过0.2 μ m注射器过滤器过滤。

[0246] 免疫。在第0天、第12天和第28天,将约16周龄的雌性GenPharm小鼠用IP (200 μ L) 和ID (尾部底部100 μ L) 进行免疫,总共100 μ g TNF α (批次JG102298或JG102098) 用等体积的Titermax佐剂乳化。在第21天和第35天通过不使用抗凝血剂的眼眶后穿刺对小鼠放血。允许血液在室温下凝结一小时,收集血清并使用TNF α 固相EIA测定法滴定。在第28天注射后允许小鼠休息七周后执行称为GenTNV的融合。然后给予针对TNF α 的特异性人IgG滴度为1:160的小鼠最终IV加强注射稀释于100 μ L生理盐水中的50 μ g TNF α 。三天后,通过颈脱位使小鼠安乐死,无菌取出脾脏,并浸入10mL含有100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和0.25 μ g/mL两性霉素B (PSA) 的冷磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。通过用PSA-PBS无菌灌注脾脏来收获脾细胞。将细胞在冷PSA-PBS中洗涤一次,使用Coulter计数器计数并重悬于含有25mM Hepes的RPMI 1640培养基中。

[0247] 细胞系。非分泌性小鼠骨髓瘤融合伴侣653在Centocor的产品开发组中于5-14-97接收到细胞生物学技术服务 (CBS) 组。在补充有10% (v/v) FBS (Cell Culture Labs)、1mM丙酮酸钠、0.1mM NEAA、2mM L-谷氨酰胺 (均来自JRH Biosciences) 的RPMI培养基 (JRH

Biosciences) 中扩增细胞系,并在95%FBS和5%DMSO (Sigma) 中冷冻保存,然后储存在CBS中的气相液氮冷冻机中。细胞库是无菌的 (Quality Control Centocor, Malvern) 并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。将细胞维持在对数期培养物中直至融合。用PBS洗涤、计数,并在融合前经由台盼蓝染料排除法确定细胞活力(>95%)。

[0248] 人TNF α 由重组细胞系产生,命名为C237A,在Centocor的Molecular Biology中产生。在补充有5% (v/v) FBS (Cell Culture Labs)、2mM L-谷氨酰胺(均来自JRHBiosciences) 和0.5g/mL霉酚酸的IMDM培养基(JRH Biosciences) 中扩增细胞系,并在95%FBS和5%DMSO (Sigma) 中冷冻保存,然后储存在CBS中的气相液氮冷冻机中(13)。细胞库是无菌的 (Quality Control Centocor, Malvern) 并且不含支原体 (Bionique Laboratories)。

[0249] 细胞融合。使用1:1比例的653个鼠骨髓瘤细胞和活的鼠脾细胞进行细胞融合。简而言之,将脾细胞和骨髓瘤细胞一起沉淀。在30秒时间段内,将沉淀物于37℃下缓慢重悬于1mL 50% (w/v) PEG/PBS溶液(PEG分子量为1,450g/mol, Sigma) 中。通过在1分钟内缓慢添加10.5mL RPMI培养基(无添加剂) (JRHBiosciences) (37℃) 来终止融合。将融合细胞以750rpm离心5分钟。然后将细胞重悬于HAT培养基(含有10%胎牛血清(JRH)、1mM丙酮酸钠、2mM L-谷氨酰胺、10 μ g/mL庆大霉素、2.5%Origen培养补充剂(Fisher)、50 μ M 2--巯基乙醇、1%653条件反射RPMI媒介、100 μ M次黄嘌呤、0.4 μ M氨基蝶呤和16 μ M胸苷的RPMI/HEPES培养基) 中,并且然后以200 μ L/孔在五个96孔平底组织培养板中铺板。然后将板置于容纳5%CO₂和95%空气的潮湿37℃培养箱中7-10天。

[0250] 检测小鼠血清中的人IgG抗TNF α 抗体。固相EIA用于筛选针对人TNF α 特异性的人IgG抗体的小鼠血清。简而言之,将板用PBS中1 μ g/mL的TNF α 包被过夜。在含有0.02% (v/v) Tween 20的0.15M盐水中洗涤后,将孔用PBS中的1% (w/v) BSA、200 μ L/孔在室温下封闭1小时。立即使用板或在-20℃冷冻备用。将小鼠血清在人TNF α 包被的板上以50 μ L/孔在室温下以两倍连续稀释温育1小时。洗涤板,并且然后用以1:30,000稀释于1%BSA-PBS中的50 μ L/孔HRP标记的山羊抗人IgG, Fc特异性(准确) 在室温下探测1小时。再次洗涤板,并在室温下添加100 μ L/孔的柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液(0.1M柠檬酸和0.2M磷酸钠, 0.01% H₂O₂和1mg/mL OPD) 15分钟。然后以25 μ L/孔添加终止溶液(4N硫酸),并使用自动板分光光度计在490nm处读取OD。

[0251] 杂交瘤上清液中人全免疫球蛋白的检测。因为GenPharm小鼠能够产生小鼠和人免疫球蛋白链两者,所以使用两个单独的EIA测定来测试生长阳性杂交瘤克隆中是否存在人轻链和人重链。如上所述包被板,并将未稀释的杂交瘤上清液在板上于37℃温育一小时。洗涤板,并用以1:10,000稀释于1%BSA-HBSS中的HRP缀合的山羊抗人 κ (Southern Biotech) 抗体或在1%BSA-HBSS中在37℃下稀释至1:30,000的HRP缀合的山羊抗人IgGFc特异性抗体探测1小时。然后如上所述将板与底物溶液一起温育。丢弃在抗人 κ 和抗人IgGFc EIA形式中均未给出阳性信号的杂交瘤克隆。

[0252] 同种型。使用EIA以与用于筛查小鼠免疫血清的特定滴度相似的形式完成抗体的同种型确定。将EIA板用10g/mL的山羊抗人IgG (H+L) 在碳酸钠缓冲液中在4℃下包被过夜,并如上所述进行封闭。将来自24孔培养物的纯净上清液在板上在室温下温育一小时。洗涤板,并用以1:4000稀释于1%BSA-PBS中的HRP标记的山羊抗人IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄ (结

合位点)在室温下探测一小时。再次洗涤板,并如上所述与底物溶液一起温育。

[0253] 结果与讨论。产生完全人抗人TNF α 单克隆抗体。从用重组人TNF α 蛋白质免疫的GenPharm小鼠中执行一次名为GenTNV的融合。通过该融合,筛选出196个生长阳性杂种。鉴定出八种杂交瘤细胞系,其分泌与人TNF α 反应的完全人IgG抗体。这八个细胞系各自分泌人IgG1 κ 同种型的免疫球蛋白,并通过有限稀释将其全部亚克隆两次以获得稳定的细胞系(>90%同质)。表1列出了细胞系名称和相应的C代码命名。将细胞系中的每一个在储存在液氮中的12小瓶研究细胞库中冷冻。

[0254] 从八孔细胞系中的每一个的24孔培养皿的孔中收集的亲本细胞在2-18-99移交给MolecularBiology组用于转染和进一步表征。

[0255] 表1:GenTNV细胞系命名

	名称	C 代码命名
	GenTNV14.17.12	C414A
	GenTNV15.28.11	C415A
	GenTNV32.2.16	C416A
[0256]	GenTNV86.14.34	C417A
	GenTNV118.3.36	C418A
	GenTNV122.23.2	C419A
	GenTNV148.26.12	C420A
	GenTNV196.9.1	C421A

[0257] 结论。

[0258] 使用来自含有人可变区和恒定区抗体转基因的杂交小鼠的脾细胞执行GenTNV融合,这些转基因用在Centocor制备的重组人TNF α 免疫。生成了IgG1 κ 同种型的八种完全人TNF α 反应性IgG单克隆抗体。将亲本细胞系转移到Molecular Biology组以进一步表征和开发。与瑞米凯德相比,这些新的人抗体之一可证明在抗炎中有效,具有降低的免疫原性和过敏性并发症的潜在有益效果。

[0259] 参考文献

[0260] Taylor等人,International Immunology 6:579-591(1993)。

[0261] Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994)。

[0262] Neuberger,M.Nature Biotechnology 14:826(1996)。

[0263] Fishwild等人,Nature Biotechnology 14:845-851(1996)。

[0264] Scallan等人,Cytokine 7:759-770(1995)。

[0265] 实施例4:克隆和制备表达人抗TNF α 抗体的细胞系。

[0266] 总结。发现一组具有TNV命名的八种人单克隆抗体(mAb)以明显高的亲和力结合固定的人TNF α 。显示八种mAb中的七种,以有效阻断huTNF α 与重组TNF受体的结合。编码七种mAb的DNA的序列分析证实所有mAb都具有人V区。DNA序列还揭示三对mAb彼此相同,使得八组mAb的原始组仅含有四种不同的mAb,由TNV14、TNV15、TNV148和TNV196代表。基于对mAb的推导的氨基酸序列的分析和体外TNF α 中和数据的结果,选择mAb TNV148和TNV14用于进一步研究。

[0267] 因为在数据库搜索期间,在相同亚组的其他人抗体中的该位置未发现TNV148重链的第75位(框架3)的脯氨酸残基,所以执行定点DNA诱变以在该位置编码丝氨酸残基,以使

其符合已知的种系框架e序列。将丝氨酸修饰的mAb命名为TNV148B。将编码TNV148B和TNV14的重链和轻链可变区的PCR扩增的DNA克隆到新制备的表达载体中,该载体基于最近克隆的另一种人mAb(12B75)的重链和轻链基因,在2000年10月7日提交的名称为“IL-12Antibodies,Compositions,Methods and Uses”的美国专利申请60/236,827中公开,其公开为W0 02/12500,其以引用方式全文并入本文。

[0268] 用相应的重链和轻链表达质粒转染P3X63Ag8.653(653)细胞或Sp2/0-Ag14(Sp2/0)小鼠骨髓瘤细胞,并通过两轮亚克隆筛选产生高水平重组TNV148B和TNV14(rTNV148B和rTNV14)mAb的细胞系。生长曲线的评价和mAb产生随着时间的推移的稳定性表明,653-转染子克隆C466D和C466C在用过的培养物中稳定地产生约125: g/ml的rTNV148B mAb,而Sp2/0转染子1.73-12-122(C467A)在用过的培养物中稳定地产生约25: g/ml的rTNV148B mAb。类似的分析表明,Sp2/0-转染子克隆C476A在用过的培养物中产生18: g/ml的rTNV14。

[0269] 简介。先前显示来自人TNF α 免疫的GenPharm/Medarex小鼠(HCo12/KCo5基因型)的八个mAb组显示结合人TNF α 并具有完全人IgG1、 κ 同种型。使用简单的结合测定通过评价其阻断TNF α 与重组TNF受体结合的能力来确定本发明的示例性mAb是否可能具有TNF α 中和活性。基于这些结果、DNA序列结果和几种mAb的体外表征,选择TNV148作为待进一步表征的mAb。

[0270] 克隆编码TNV148mAb的DNA序列,进行修饰以适合编码合适恒定区的基因表达载体,引入经充分表征的653和Sp2/0小鼠骨髓瘤细胞,筛选所得的转染细胞系,直至鉴定出亚克隆产生的mAb比原始杂交瘤细胞系多40倍。

[0271] 材料和方法。

[0272] 试剂和细胞。TRIZOL试剂购自Gibco BRL。蛋白酶K得自Sigma Chemical Company。逆转录酶得自Life Sciences,Inc.,Taq DNA聚合酶得自Perkin Elmer Cetus或Gibco BRL。限制性酶购自New England Biolabs。QIAquick PCR纯化试剂盒来自Qiagen。QuikChange定点诱变试剂盒购自Stratagene。Wizard质粒小量制备物试剂盒和RNasin来自Promega。光学板得自Packard。¹²⁵碘购自Amersham。定制寡核苷酸购自Keystone/Biosource International。表2中示出了该工作中使用的寡核苷酸的名称、鉴定号和序列。

[0273] 表2:用于克隆、工程化或测序TNV mAb基因的寡核苷酸。

[0274] 寡核苷酸5'14s和HuH-J6编码的氨基酸显示在序列上方。'M'氨基酸残基代表翻译起始密码子。寡核苷酸5'14s和HuH-J6中的下划线序列分别标记BsiWI和BstBI限制性位点。HuH-J6中的斜线对应于外显子/内含子边界。需注意,其序列对应于负链的寡核苷酸以3'-5'方向书写。

[0275]

名称	I.D.	序列
HG1-4b	119	3'-TTGGTCCAGTCGGACTGG-5' (SEQ ID NO:10)
HG1-5b	354	3'-CACCTGCACTCGGTGCTT-5' (SEQ ID NO:11)
HG1hg	360	3'-CACTGTTTTGAGTGTGTACGGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:12)
HG1-6	35	3'-GCCGCACGTGTGGAAGGG-5' (SEQ ID NO:13)
HCK1-3E	117	3'-AGTCAAGGTCGGACTGGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:14)
HuK-3'Hd	208	3'-GTTGTCCCCTCTCACAATCTTCGAATTT-5' (SEQ ID NO:15)
HVKRNAseq	34	3'-GGCGGTAGACTACTCGTC-5' (SEQ ID NO:16)
BsiWI	M D W T W S I	(SEQ ID NO:17)
5'14s	366	5'-TTTCGTACGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCATC-3' (SEQ ID NO:18)
5'46s	367	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:19)
5'47s	368	5'-TTTCGTACGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCATG-3' (SEQ ID NO:20)
5'63s	369	5'-TTTCGTACGCCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC-3' (SEQ ID NO:21)
5'73s	370	5'-TTTCGTACGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC-3' (SEQ ID NO:22)
T V T V S S BstBI		(SEQ ID NO:23)
HuH-J6	388	3'GTGCCAGTGGCAGAGGAGTCCATTCAAGCTTAAGTT-5' (SEQ ID NO:24)
Sall	MDMRV	(SEQ ID NO:25)
LK7s	362	5'-TTTGTCGACACCATGGACATGAGGGTCC(TC)C-3' (SEQ ID NO:26)
LVgs	363	5'-TTTGTCGACACCATGGAAGCCCCAGCTC-3' (SEQ ID NO:27)
T K V D I K		(SEQ ID NO:28) Afl2

[0276]

HuL-J3	380	3'CTGGTTTCACCTATAGTTTG/CATTCAGAATTCGGCGCCTTT (SEQ ID NO:29)
V148-QC1	399	5'-CATCTCCAGAGACAATtCCAAGAACACGCTGTATC-3' (SEQ ID NO:30)
V148-QC2	400	3'-GTAGAGGTCTCTGTTAaGGTTCTTGTGCGACATAG-5' (SEQ ID NO:31)

[0277] 获得653个小鼠骨髓瘤细胞的单个冷冻小瓶。在当天将小瓶解冻,并在T烧瓶中在IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺(培养基)中扩增。将这些细胞维持在连续培养中,直到它们在2至3周后用本文所述的抗TNFDNA转染。在解冻日期后5天收获一些培养物,通过离心沉淀,并

重悬于95%FBS、5%DMSO中,等分到30个小瓶中,冷冻,并储存以备将来使用。类似地,获得Sp2/0小鼠骨髓瘤细胞的单个冷冻小瓶。将小瓶解冻,如上所述制备新的冻结,并将冷冻小瓶储存在CBC冷冻箱AA和AB中。将这些细胞解冻并用于本文所述的所有Sp2/0转染。

[0278] 抑制TNF与受体结合的测定。含有TNF mAb的杂交瘤细胞上清液用于测定mAb阻断¹²⁵I标记的TNFα与重组TNF受体融合蛋白质p55-sf2结合的能力(Scallan等人(1995) Cytokine 7:759-770)。将50:1在PBS中0.5:g/ml的p55-sf2添加到光学板中以在37℃下温育一小時期间包被孔。使用PBS/0.1%BSA作为稀释剂,在96孔圆底板中制备八种TNF细胞上清液的系列稀释液。包含含有抗IL-18mAb的细胞上清液作为阴性对照,并且包含掺有cA2(抗TNF嵌合抗体,瑞米凯德,美国专利5,770,198,以引用方式全文并入本文)的相同抗IL-18上清液作为阳性对照。将¹²⁵I标记的TNFα(58:Ci/:g,D.Shealy)添加到100:1细胞上清液中,使最终TNFα浓度为5ng/ml。将混合物在室温下预温育一小時。洗涤包被的光学板以除去未结合的p55-sf2,并将50:1 ¹²⁵I-TNFα/细胞上清液混合物转移到光学板中。在室温下2小时后,用PBS-Tween洗涤光学板三次。添加100:1 Microscint-20并使用TopCount γ 计数器测定cpm结合。

[0279] V基因扩增和DNA序列分析。将杂交瘤细胞在PBS中洗涤一次,然后添加TRIZOL试剂用于RNA制备。将介于 7×10^6 和 1.7×10^7 个之间的细胞重悬于1ml TRIZOL中。添加200μl氯仿后剧烈摇动试管。将样本在4℃下离心10分钟。将水相转移到新的微量离心管中,并添加等体积的异丙醇。剧烈摇动试管并允许其在室温下温育10分钟。然后将样本在4℃下离心10分钟。将沉淀物用1ml 70%乙醇洗涤一次,并在真空干燥器中短暂干燥。用40μl DEPC处理的水重悬RNA沉淀物。通过在1%琼脂糖凝胶中分馏0.5μl来确定RNA制剂的质量。将RNA储存在-80℃冷冻机中直至使用。

[0280] 为了制备重链和轻链cDNA,制备包含3μl RNA和1μg寡核苷酸119(重链)或寡核苷酸117(轻链)(见表1)的混合物,体积为11.5μl。将混合物在70℃下在水浴中温育10分钟,并且然后在冰上冷却10分钟。制备单独的混合物,其由2.5μl 10X逆转录酶缓冲液、10μl 2.5mM dNTP、1μl逆转录酶(20单位)和0.4μl核糖核酸酶抑制剂RNasin(1单位)组成。将13.5μl该混合物添加到11.5μl冷却的RNA/寡核苷酸混合物中,并将反应在42℃下温育40分钟。然后将cDNA合成反应物储存在-20℃冷冻机中直至使用。

[0281] 未纯化的重链和轻链cDNA用作模板以PCR扩增可变区编码序列。同时测试五个寡核苷酸对(366/354、367/354、368/354、369/354和370/354,表1)其引发重链DNA扩增的能力。同时测试两个寡核苷酸对(362/208和363/208)其引发轻链DNA扩增的能力。使用2单位的PLATINUM™高保真度(HIFI)Taq DNA聚合酶进行PCR反应,总体积为50μl。每个反应包括2μl cDNA反应、10pmole的每种寡核苷酸、0.2mM dNTP、5μl 10×HIFI缓冲液和2mM硫酸镁。热循环仪程序为95℃持续5分钟,随后进行30个循环(94℃持续30秒,62℃持续30秒,68℃持续1.5分钟)。然后在68℃下最终温育10分钟。

[0282] 为了制备用于直接DNA测序的PCR产物,使用QIAquick™PCR纯化试剂盒根据制造商的方案纯化它们。使用50μl无菌水从旋转柱上洗脱DNA,并且然后使用真空干燥器将其干燥至10μl的体积。然后用1μl纯化的PCR产物、10μM寡核苷酸引物、4μl BigDye Terminator™预备反应混合物和14μl无菌水建立DNA测序反应,总体积为20μl。用寡核苷酸对367/354制备的重链PCR产物用寡核苷酸引物159和360测序。用寡核苷酸对363/208制备的轻链PCR产物

用寡核苷酸34和163测序。用于测序的热循环仪程序是25个循环(96℃持续30秒,50℃持续15秒,60℃持续4分钟),随后在4℃过夜。通过聚丙烯酰胺凝胶分离反应产物,并使用ABI 377DNA测序仪检测。

[0283] 定点诱变以改变氨基酸。改变TNV148重链可变区DNA序列中的单个核苷酸,以用TNV148mAb中的丝氨酸残基取代Pro⁷⁵。设计并订购互补寡核苷酸399和400(表1)以使用制造商描述的QuikChangeTM定点诱变方法进行这种改变。首先将两种寡核苷酸通过15%聚丙烯酰胺凝胶分馏,并纯化主要条带。使用10ng或50ng TNV148重链质粒模板(p1753)、5μl 10X反应缓冲液、1μl dNTP混合物、125ng引物399、125ng引物400和1μl Pfu DNA聚合酶制备诱变反应。添加无菌水使总体积达到50μl。然后将反应混合物在热循环仪中温育,该热循环仪被编程为在95℃下温育30秒,并且然后循环14次,95℃连续温育持续30秒、55℃持续1分钟、64℃持续1分钟、68℃持续7分钟,随后30℃持续2分钟(1个循环)。这些反应被设计成将诱变寡核苷酸并入其他相同的新合成的质粒中。为了除去原始TNV148质粒,在添加1μl DpnI内切核酸酶后,将样本在37℃温育1小时,该核酸内切酶仅切割原始的甲基化质粒。然后将一μl反应物用于通过标准热激方法转化Epicurian Coli XL1-Blue supercompetent大肠杆菌,并在LB-氨苄青霉素琼脂板上铺板后鉴定转化的细菌。如制造商所述,使用WizardTM试剂盒制备质粒小量制备物。从WizardTM柱洗脱样本后,用乙醇沉淀质粒DNA以进一步纯化质粒DNA,并且然后重悬于20μl无菌水中。然后执行DNA序列分析,以鉴定具有所需碱基变化的质粒克隆,并确认没有其他碱基变化无意中引入TNV148编码序列。使用4.3节中描述的相同参数,使一μl质粒经受循环测序反应,所述循环测序反应用3μl BigDye混合物、1μl pUC19正向引物和10μl无菌水制备。

[0284] 来自12B75基因表达载体的构建。执行几个重组DNA步骤以分别从编码12B75的重链和轻链基因的先前克隆的基因组拷贝制备新的人IgG1表达载体和新的人κ表达载体,在2000年10月7日提交的名称为“IL-12Antibodies,Compositions,Methods and Uses”的美国专利申请60/236,827中公开,其公开为WO 02/12500,其以引用方式全文并入本文。最终载体被设计成允许用任何适当设计的PCR扩增的可变区简单地一步替换现有的可变区序列。

[0285] 为了修饰质粒p1560中的12B75重链基因,将含有启动子和可变区的6.85kb BamHI/HindIII片段从p1560转移到pUC19以制备p1743。与p1560相比,该质粒的较小尺寸使得能够按照制造商的方案使用QuikChangeTM诱变(使用寡核苷酸BsiWI-1和BsiWI-2)在翻译起始位点的上游引入独特的BsiWI克隆位点。所得的质粒称为p1747。为了在可变区的3'末端引入BstBI位点,设计具有SalI和BstBI位点的5'寡核苷酸引物。该引物与pUC反向引物一起使用,以扩增来自p1747的2.75kb片段。然后将该片段克隆回12B75可变区和HindIII位点中的天然存在的SalI位点,从而引入独特的BstBI位点。所得的中间载体(命名为p1750)可以接受具有BsiWI和BstBI末端的可变区片段。为了制备其中恒定区也来源于12B75基因的重链载体形式,将p1750中的BamHI-HindIII插入物转移到pBR322,以在HindIII位点下游具有EcoRI位点。然后将所得的质粒p1768用HindIII和EcoRI消化,并连接到来自p1744的5.7kb HindIII-EcoRI片段,该亚克隆是通过将p1560的大BamHI-BamHI片段克隆到pBC中而得到的。然后将所得的质粒p1784用作具有BsiWI和BstBI末端的TNV Ab cDNA片段的载体。完成了附加工作以制备表达载体p1788和p1798,其包括来自12B75基因的IgG1恒定区,并且

它们彼此不同的是它们含有多少12B75重链J-C内含子。

[0286] 为了修饰质粒p1558中的12B75轻链基因,将含有12B75启动子和可变区的5.7kb SalI/AflIII片段从p1558转移到质粒L28的XhoI/AflIII位点。该新质粒p1745为诱变步骤提供了较小的模板。使用寡核苷酸(C340sal1和C340sal2)通过QuikChange™诱变在可变区的5'末端引入独特的SalI限制性位点。所得的中间载体p1746具有独特的SalI和AflIII限制性位点,可以克隆可变区片段。克隆到p1746中的任何可变区片段优选地与轻链基因的3'半部分接合。为了从可用于此目的的12B75轻链基因的3'半部分制备限制性片段,将寡核苷酸BAHN-1和BAHN-2彼此退火,以形成含有限制性位点BsiWI、AflIII、HindIII和NotI的双链接头,并且其含有可连接到KpnI和SacI位点的末端。将该接头克隆到pBC的KpnI与SacI位点之间,得到质粒p1757。通过用AflIII消化p1558,然后用HindIII部分消化产生的含有12B75轻链恒定区的7.1kb片段克隆到p1757的AflIII与HindIII位点之间,得到p1762。该新质粒含有BsiWI和AflIII的独特位点,其中含有启动子和可变区的BsiWI/AflIII片段可以转移,结合基因的两个半部分。

[0287] 表达质粒的cDNA克隆和装配。用Klenow酶处理所有RT-PCR反应(参见上文)以进一步填充DNA末端。用限制性酶BsiWI和BstBI消化重链PCR片段,并且然后克隆到质粒L28的BsiWI与BstBI位点之间(使用L28,因为尚未制备基于12B75的中间载体p1750)。克隆插入物的DNA序列分析显示所得构建体是正确的,并且在PCR扩增期间没有引入错误。这些L28质粒构建体(TNV14、TNV15、TNV148、TNV148B和TNV196)的指定鉴定号如表3所示。

[0288] 将TNV14、TNV148和TNV148B重链的BsiWI/BstBI插入物从L28载体转移到新制备的中间载体p1750。这些中间质粒的指定鉴定号如表2所示。对于TNV15和TNV196,没有完成该克隆步骤和后续步骤。然后将可变区转移到两种不同的人IgG1表达载体中。限制性酶EcoRI和HindIII用于将可变区转移到Centocor先前使用的IgG1载体p104中。所得的编码Gm(f+)同种型IgG1的表达质粒命名为p1781(TNV14)、p1782(TNV148)和p1783(TNV148B)(参见表2)。还将可变区克隆到来源于12B75(GenPharm)基因的IgG1恒定区的上游。那些编码G1m(z)同种异型的IgG1的表达质粒也列于表3中。

[0289] 表3:各种重链和轻链质粒的质粒鉴定号。

[0290] L28载体或pBC载体代表最初的Ab cDNA克隆。将那些质粒中的插入物转移到不完全的基于12B75的载体中以制备中间质粒。一个附加转移步骤产生最终表达质粒,其在线性化后引入细胞中或用于在细胞转染之前纯化mAb基因插入物。(ND)=未进行测试。

[0291]	Gm(f+)		G1m(z)	
	128 载体		中间	表达
	Mab		质粒 ID	质粒 ID
	重链		质粒 ID	质粒 ID
	TNV14	p1751	p1777	p1781
	TNV15	p1752	(ND)	(ND)
	TNV148	p1753	p1778	p1782
	TNV148B	p1760	p1779	p1783
	TNV196	p1754	(ND)	(ND)
	pBC 载体		中间	表达
[0292]	质粒 ID		质粒 ID	质粒 ID
	轻链			
	TNV14	p1748		p1755
	TNV15	p1748		p1755
	TNV148	p1749		p1756
	TNV196	p1749		p1756

[0292] 用限制性酶SalI和SacII消化轻链PCR产物,并且然后克隆到质粒pBC的SalI与SacII位点之间。将两种不同的轻链形式(差异为一个氨基酸)命名为p1748和p1749(表2)。DNA序列分析证实这些构建体具有正确的序列。然后将p1748和p1749中的SalI/AflIII片段克隆到中间载体p1746的SalI与AflIII位点之间,分别制备p1755和p1756。然后通过将来自p1755和p1756的BsiWI/AflIII片段转移到新制备的构建体p1762,将这些轻链基因的5'半部分接合到基因的3'半部分,以分别制备最终表达质粒p1775和p1776(表2)。

[0293] 细胞转染、筛查和亚克隆。用各种TNV表达质粒执行总共15次小鼠骨髓瘤细胞转染(参见结果和讨论部分中的表3)。这些转染的区别在于(1)宿主细胞是Sp2/0还是653;(2)重链恒定区由Centocor先前的IgG1载体或12B75重链恒定区编码;(3)mAb是TNV148B、TNV148、TNV14或新的HC/LC组合;(4)DNA是线性化质粒还是纯化的Ab基因插入物;以及(5)重链基因中是否存在完整的J-C内含子序列。另外,重复几次转染以增加筛查大量克隆的可能性。

[0294] 在如前所述的标准条件下,通过电穿孔将Sp2/0细胞和653细胞各自用重链和轻链DNA的混合物(各8:~12g)转染(Knight DM等人,(1993)Molecular Immunology 30:1443-1453)。对于转染编号1、2、3和16,在转染之前通过用限制性酶消化使适当的表达质粒线性化。例如,SalI和NotI限制性酶分别用于线性化TNV148B重链质粒p1783和轻链质粒p1776。对于其余转染,通过用BamHI消化重链质粒以及用BsiWI和NotI消化轻链质粒,从质粒载体中分离出仅含有mAb基因的DNA插入物。然后通过琼脂糖凝胶电泳和Qiex纯化树脂纯化mAb基因插入物。用纯化的基因插入物转染的细胞同时用3-5:~g的PstI-线性化的pSV2gpt质粒(p13)转染,作为选择标记的来源。在电穿孔后,将细胞接种于96孔组织培养皿中的IMDM、15%FBS、2mM谷氨酰胺中,并在37℃、5%CO₂培养箱中温育。两天后,添加等体积的IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺的2×MHX选择(1×MHX=0.5:~g/ml霉酚酸、2.5:~g/ml次黄嘌呤、50:~g/ml黄嘌呤),并将该板温育附加2至3周,同时形成菌落。

[0295] 如所述,通过ELISA测定从具有菌落的孔处收集的细胞上清液的人IgG。简而言之,将不同稀释度的细胞上清液在涂有多克隆山羊抗人IgG Fc片段的96孔EIA板中温育,并且然后使用碱性磷酸酶缀合的山羊抗人IgG(H+L)和适当的彩色底物检测结合的人IgG。在每

个EIA板上包括标准曲线,其用作在细胞上清液中测量的相同纯化mAb的标准曲线,以能够定量上清液中的人IgG。将那些似乎生产最多人IgG的菌落中的细胞传代到24孔板中,用于在用过的培养物中进行附加生产测定,随后鉴定产量最高的亲本克隆。

[0296] 对产量最高的亲本克隆进行亚克隆,以鉴定产量较高的亚克隆并制备更均质的细胞系。将96孔组织培养板接种于每孔一个细胞或每孔四个细胞的IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺的1×MHX,并在37℃、5%CO₂培养箱中温育12至20天,直至菌落明显。从每孔容纳一个菌落的孔中收集细胞上清液,并如上所述通过ELISA分析。将所选择的菌落传代到24孔板,并通过定量其上清液中的人IgG水平,在鉴定产量最高的亚克隆之前允许培养物耗尽。当选择的第一轮亚克隆经受第二轮亚克隆时,重复该过程。选择最佳的第二轮亚克隆作为细胞系开发。

[0297] 细胞亚克隆的特征。选择最佳的第二轮亚克隆并执行生长曲线以评价mAb生产水平和细胞生长特征。将T75烧瓶用 1×10^5 个细胞/ml接种于30ml IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺和1X MHX(或无血清培养基)中。以24小时的间隔取出300μl的等分试样并测定活细胞密度。继续分析直至活细胞数小于 1×10^5 个细胞/ml。测定所收集的细胞上清液等分试样中存在的抗体浓度。使用标准rTNV148B或rTNV14JG92399执行ELISA测定。将样本在涂有多克隆山羊抗人IgG Fc的ELISA板上温育1小时,并用1:1000稀释的碱性磷酸酶缀合的山羊抗人IgG(H+L)检测结合的mAb。

[0298] 为了在存在不同量的MHX选择的情况下比较生长速率,还对两种细胞系进行了不同的生长曲线分析。将细胞系C466A和C466B解冻到不含MHX的培养基(IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺)中并再培养两天。然后将两种细胞培养物分成三种培养物,其中不含MHX、0.2X MHX或1XMHX($1 \times \text{MHX} = 0.5\text{g/ml}$ 霉酚酸、 2.5g/ml 次黄嘌呤、 50g/ml 黄嘌呤)。一天后,用培养物以 1×10^5 个细胞/ml的起始密度接种新鲜T75烧瓶,并以24小时间隔计数细胞一周。未收集用于mAb生产的等分试样。使用SOP PD32.025中提供的公式计算这些样本的倍增时间。

[0299] 执行附加研究以评价mAb生成随着时间的推移的稳定性。培养物在含有或不含有MHX选择的IMDM、5%FBS、2mM谷氨酰胺的24孔板中生长。当培养物变得融合时,培养物就分裂成新鲜的培养物,然后允许老的培养物消失。此时,取出等分试样的上清液并在4℃下储存。在55-78天时间段内取出等分试样。在此时间段结束时,测试上清液中如上所述的抗人IgG Fc ELISA存在的抗体量。

[0300] 结果与讨论。

[0301] 抑制TNF与重组受体的结合。

[0302] 进行简单的结合测定,以确定杂交瘤细胞上清液中含有的八种TNV mAb是否能够阻断TNFα与受体的结合。首先通过人IgG的标准ELISA分析确定各自细胞上清液中TNV mAb的浓度。然后将重组p55TNF受体/IgG融合蛋白质p55-sf2包被在EIA板上,并允许¹²⁵I标记的TNFα在不同量的TNV mAb存在下与p55受体结合。如图1所示,除了八种TNV mAb中的一种(TNV122)之外的所有mAb均有效阻断了TNFα与p55受体的结合。事实上,TNV mAb在抑制TNFα结合方面似乎比掺入阴性对照杂交瘤上清液中的cA2阳性对照mAb更有效。这些结果被解释为表明TNV mAb极有可能在基于细胞的测定和体内阻断TNFα生物活性,因此需要进行附加分析。

[0303] DNA序列分析。

[0304] 确认RNA编码人mAb。

[0305] 作为表征在受体结合测定中显示TNF α 阻断活性的七种TNV mAb (TNV14、TNV15、TNV32、TNV86、TNV118、TNV148和TNV196) 的第一步,从生产这些mAb的七种杂交瘤细胞系中分离总RNA。然后将每个RNA样本用于制备人抗体重链或轻链cDNA,其包括每个mAb的完整信号序列、完整可变区序列和部分恒定区序列。然后在PCR反应中扩增这些cDNA产物,直接测序PCR扩增的DNA,而不首先克隆片段。测序的重链cDNA与小鼠DP-46中存在的五种人种系基因之一>90%相同(图2)。类似地,测序的轻链cDNA与小鼠中存在的人种系基因之一100%或98%相同(图3)。这些序列结果证实,转录成cDNA并测序的RNA分子编码人抗体重链和人抗体轻链。应当指出的是,因为使用映射到信号序列编码序列的5'末端的寡核苷酸对可变区进行PCR扩增,所以信号序列的前几个氨基酸可能不是原始TNV翻译产物的实际序列,但它们确实代表重组TNV mAb的实际序列。

[0306] 独特的中和mAb。

[0307] 对每种mAb的重链和轻链两者的整个可变区的cDNA序列的分析显示TNV32与TNV15相同,TNV118与TNV14相同,并且TNV86与TNV148相同。受体结合测定的结果与DNA序列分析一致,即TNV86和TNV148两者在阻断TNF结合时比TNV118和TNV14两者好约4倍。因此,后续工作仅针对四种独特的TNV mAb,TNV14、TNV15、TNV148和TNV196。

[0308] 四种mAb的相关性

[0309] DNA序列结果显示,编码四种TNV mAb重链的基因彼此高度同源,并且似乎都来源于相同的种系基因DP-46(图2)。另外,因为重链CDR3序列中的每一个都是如此相似且长度相同,并且因为它们都使用J6外显子,所以它们显然是由单个VDJ基因重排事件引起的,随后是体细胞变化,使每个mAb独特。DNA序列分析显示,四种mAb中只有两种不同的轻链基因(图3)。TNV14和TNV15中的轻链可变区编码序列彼此相同并且与人 κ 链的Vg/38K家族的代表性种系序列相同。TNV148和TNV196轻链编码序列彼此相同但不同于两个核苷酸位置的种系序列(图3)。

[0310] 推断的四种mAb的氨基酸序列揭示了实际mAb的相关性。四种mAb含有四条不同的重链(图4),但只有两条不同的轻链(图5)。TNVmAb序列与种系序列之间的差异主要限于CDR结构域,但三个mAb重链也不同于框架区中的种系序列(图4)。与DP-46种系编码的Ab框架区相比,TNV14相同,TNV15相差一个氨基酸,TNV148相差两个氨基酸,并且TNV196相差三个氨基酸。

[0311] cDNA的克隆、位点特异性诱变和最终表达质粒的装配。cDNA的克隆。基于PCR扩增的可变区的DNA序列,命令新的寡核苷酸执行另一轮PCR扩增,目的是使待克隆的编码序列适应克隆到表达载体中。在重链的情况下,用限制性酶BsiWI和BstBI消化该第二轮PCR的产物,并克隆到质粒载体L28中(质粒鉴定号显示在表2中)。在轻链的情况下,第二轮PCR产物用SalI和AflIII消化并克隆到质粒载体pBC中。然后对单个克隆进行测序以确认它们的序列与从PCR产物的直接测序获得的先前序列相同,这揭示了潜在异质分子群中每个位置处最丰富的核苷酸。

[0312] 改变TNV148的位点特异性诱变。在中和TNF α 生物活性时,一致地观察到mAb TNV148和TNV196比下一个最佳mAb (TNV14)强四倍。然而,如上所述,TNV148和TNV196重链框架序列不同于种系框架序列。TNV148重链序列与其他人抗体的比较表明,许多其他人类mAb

在框架1中的第28位含有Ile残基(仅计数成熟序列),而框架3中第75位的Pro残基在该位置是不常见的氨基酸。

[0313] TNV196重链的类似比较表明,与框架3中的种系序列不同的三种氨基酸在人mAb中可能是罕见的。如果施用给人,这些差异可能使TNV148和TNV196具有免疫原性。因为TNV148只有一个关注的氨基酸残基,这个残基被认为对TNF α 结合不重要,所以使用位点特异性诱变技术来改变TNV148重链编码序列中的单个核苷酸(在质粒p1753中),从而编码种系Ser残基以代替75位的Pro残基。所得的质粒称为p1760(参见表2)。将所得的基因和mAb称为TNV148B,以将其与原始TNV148基因和mAb区分开(参见图5)。

[0314] 最终表达质粒的装配。制备新的抗体表达载体,其基于先前克隆为基因组片段的12B75重链和轻链基因。尽管制备了不同的TNV表达质粒(参见表2),但在每种情况下,5'侧翼序列、启动子和内含子增强子来源于相应的12B75基因。对于轻链表达质粒,完整的J-C内含子、恒定区编码序列和3'侧翼序列也来源于12B75轻链基因。对于导致最终生产细胞系的重链表达质粒(p1781和p1783,参见下文),人IgG1恒定区编码序列来源于Centocor先前使用的表达载体(p104)。重要的是,此处报道的最终生产细胞系表达TNV mAb的不同同种异型(Gm(f+)),而不是原始的杂交瘤衍生的TNV mAb(G1m(z))。这是因为来源于GenPharm小鼠的12B75重链基因编码CH1结构域C末端的Arg残基,而Centocor的IgG1表达载体p104编码该位置的Lys残基。制备其他重链表达质粒(例如p1786和p1788),其中J-C内含子、完整恒定区编码序列和3'侧翼序列来源于12B75重链基因,但是没有选择用这些基因转染的细胞系作为生产细胞系。仔细设计载体以允许一步克隆未来PCR扩增的V区,这将导致最终表达质粒。

[0315] 将PCR扩增的可变区cDNA从L28或pBC载体转移到中间阶段,基于12B75的载体,其提供启动子区和部分J-C内含子(质粒鉴定号参见表2)。然后将含有抗体基因的5'半部分的限制性片段从这些中间阶段载体转移到最终表达载体,其提供相应基因的3'半部分以形成最终表达质粒(质粒鉴定号参见表2)。

[0316] 细胞转染和亚克隆。通过限制性消化将表达质粒线性化,或者从质粒主链中纯化每个质粒中的抗体基因插入物。通过电穿孔用重链和轻链DNA转染Sp2/0和653小鼠骨髓瘤细胞。完成了十五次不同的转染,其中大多数是Ab所定义的独特的、Ab基因的特定特征,基因是否在线性化的完整质粒或纯化的基因插入物上,以及宿主细胞系(汇总在表4中)。通过ELISA测定来自对霉酚酸具有抗性的克隆的细胞上清液中人IgG的存在,并使用纯化的rTNV148B作为参考标准曲线进行定量。

[0317] 产量最高的rTNV148B细胞系

[0318] 将来自rTNV148B转染2的产量最佳的653个亲本系(在用过的24孔培养物中生成5-10:g/ml)亚克隆,以筛查产量较高的细胞系并制备更均一的细胞群。亲本系2.320、2.320-17和2.320-20的两个亚克隆在用过的24孔培养物中生成约50:g/ml,比其亲本系增加5倍。第二轮亚克隆系2.320-17和2.320-20的克隆亚领先

[0319] 显示了编码每种mAb的重链和轻链质粒的鉴定号。在用纯化的mAb基因插入物进行转染的情况下,包括质粒p13(pSV2gpt)作为gpt选择标记的来源。重链恒定区由用于编码瑞米凯德('旧')的相同人IgG1表达载体或通过12B75(GenPharm/Medarex)重链基因('新')内包括的恒定区编码。H1/L2是指由TNV14重链和TNV148轻链组成的“新型”mAb。质粒p1783和p1801的区别仅在于它们的重链基因含有多少J-C内含子。右侧显示了转染数字,它定义了

细胞克隆的通用名称的第一个数字。生成rTNV148B的细胞系C466 (A、B、C、D) 和C467A分别来源于转染编号2和1。生成rTNV14的细胞系C476A来源于转染编号3。

[0320] 表4:细胞转染汇总。

[0321]	质粒	HC	DNA			
	<u>转染编号</u>					
	<u>mAb</u>	<u>HC/LC/gpt</u>	<u>载体</u>	<u>格式</u>	<u>Sp2/0</u>	<u>653</u>
	rTNV148B	1783/1776	旧	直链	1	2
	rTNV14	1781/1775	旧	直链	3	-
	rTNV148B	1788/1776/13	新	插入物	4,6	5,7
[0322]	rTNV14	1786/1775/13	新	插入物	8,10	9,11
	rTNV148	1787/1776/13	新	插入物	12	17
	rH1/L2	1786/1776/13	新	插入物	13	14
	rTNV148B	1801/1776	旧	直链	16	

[0323] 用过的24孔培养上层清液的ELISA测定表明,这些第二轮亚克隆均生产介于98g/ml和124:g/ml之间,这比第一轮亚克隆增加至少2倍。向这些653个细胞系分配C代码命名,如表5所示。

[0324] 将来自rTNV148B转染1的三种产量最佳的Sp2/0亲本系亚克隆。亲本系1.73的两轮亚克隆导致鉴定在用过的24孔培养物中生产25:g/ml的克隆。将该Sp2/0细胞系命名为C467A(表5)。

[0325] 产量最高的rTNV14细胞系

[0326] 将来自rTNV14转染3的三种产量最佳的Sp2/0亲本系亚克隆一次。据发现,亚克隆3.27-1是用过的24孔培养物的最高产量,产量为19:g/ml。将该细胞系命名为C476A(表5)。

[0327] 表5:所选择的生产细胞系及其C代码的汇总。

[0328] 原始克隆名称的第一个数字表示细胞系来源的转染。此处报道的所有C-编码细胞系均来源于用限制性酶线性化的重链和轻链完整质粒的转染。

[0329]	原始			用过的 24-孔	
	mAb	克隆名称	C 代码	宿主细胞	产量
	rTNV148B	2.320-17-36	C466A	653	103:g/ml
	2.320-20-111	C466B	653	102:g/ml	
	2.320-17-4	C466C	653	98:g/ml	
	2.320-20-99	C466D	653	124:g/ml	
	1.73-12-122	C467A	Sp2/0	25:g/ml	
	rTNV14	3.27-1	C476A	Sp2/0	19:g/ml

[0330] 亚克隆细胞系的特征

[0331] 为了更仔细地表征细胞系生长特征并在更大规模上确定mAb生产水平,使用T75培养物执行生长曲线分析。结果显示四个C466系列细胞系中的每一个达到介于 1.0×10^6 和 1.25×10^6 个细胞/ml之间的峰值细胞密度,并且最大mAb积累水平介于110g/ml和140:g/ml之间(图7)。相比之下,产量最佳的Sp2/0亚克隆C467A达到 2.0×10^6 个细胞/ml的峰值细胞密度和25:g/ml的最大mAb积累水平(图7)。未对生产rTNV14的细胞系C476A进行生长曲线分析。

[0332] 进行附加生长曲线分析以比较不同浓度的MHX选择的生长速率。最近的观察结果表明,在没有MHX的情况下培养的C466细胞比在正常量的MHX (1X) 中培养的同种细胞生长更快。因为化合物诸如霉酚酸的细胞毒性浓度倾向于在数量级内测量,所以认为使用较低浓度的MHX可能导致显著更快的细胞倍增时间而不牺牲mAb生产的稳定性。细胞系C466A和C466B在以下培养:无MHX、0.2X MHX或1X MHX。每隔24小时进行活细胞计数,持续7天。这些结果确实揭示了MHX浓度依赖性细胞生长速率(图8)。细胞系C466A在1X MHX中显示出25.0小时的倍增时间,但在没有MHX的情况下仅显示20.7小时。类似地,细胞系C466B在1X MHX中显示出32.4小时的倍增时间,但在没有MHX的情况下仅显示22.9小时。重要的是,0.2X MHX中两种细胞系的倍增时间与无MHX中观察到的相比更接近于1X MHX中的细胞系(图8)。这种观察提出了增强生物反应器中细胞性能的可能性,其中倍增时间是一个重要参数,可以通过使用较少的MHX来实现。然而,尽管稳定性测试结果(参见下文)表明即使没有MHX存在,细胞系C466D也能够稳定地生产rTNV148B至少60天,但与不存在MHX相比,当在MHX存在下培养细胞时,稳定性测试也显示出更高的mAb生产水平。

[0333] 为了评价在约60天的时间段内从各种细胞系生产mAb,对含有或不含有MHX选择的培养物执行稳定性测试。并非所有细胞系都保持高mAb产量。在培养仅两周后,克隆C466A的产量比研究开始时少约45%。克隆C466B的产量似乎也显著下降。然而,克隆C466C和C466D保持相当稳定的产量,C466D显示出最高的绝对产量水平(图9)。

[0334] 结论

[0335] 从最初的八种针对人TNF α 的人mAb组中,基于包括蛋白质序列和TNF中和效力的几种标准以及TNV14,选择TNV148B作为优选的。制备生产大于100:g/ml rTNV148B和19:g/ml rTNV14的细胞系。

[0336] 实施例5:使用单次推注注射使用抗TNF抗体和对照的关节炎小鼠研究

[0337] 在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg或10mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液(D-PBS)或本发明的抗TNF抗体(TNV14、TNV148或TNV196)进行治疗。

[0338] 结果:当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第3至7周时显著增加。用10mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第7周时也实现显著的体重增加。(参见图10)。

[0339] 图11A至图11C示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第3周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第7周)。当与D-PBS治疗组相比时,用1mg/kg TNV14治疗的动物和用1mg/kg cA2治疗的动物在第3周后未显示出AI的显著降低。当10mg/kg治疗组中的每一组与相似剂量的其他组相比(10mg/kg cA2与10mg/kg TNV14、148和196相比)时,它们之间没有显著差异。当比较1mg/kg治疗组时,1mg/kg TNV148在3周、4周和7周时显示出显著低于1mg/kg cA2的AI。在3周和4周时,1mg/kg TNV148也显著低于1mg/kg TNV14治疗组。尽管TNV196在研究的第6周依然显示AI显著降低(当与D-PBS治疗组相比时),但TNV148是在研究结束时仍然显著的唯一1mg/kg治疗。

[0340] 实施例6:使用抗TNF抗体和对照作为多次推注剂量的关节炎小鼠研究

[0341] 在大约4周龄时,基于体重,将Tg197研究小鼠分配到8个治疗组中的一个,并以3mg/kg(第0周)的腹膜内推注剂量的对照制品(D-PBS)或TNF抗体(TNV14、TNV148)进行治

疗。在第1、2、3和4周时对所有动物重复注射。评价第1-6组的测试制品疗效。在第2、3和4周时从第7组和第8组的动物获得的血清样本评价TNV14或TNV148的免疫应答诱导和药代动力学清除率。

[0342] 结果:当分析体重作为从给药前的变化时,未发现显著差异。用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。(参见图12)。

[0343] 图13A至图13C示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第2周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数显著低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第5周)。当与d-PBS治疗组相比时,用1mg/kg或3mg/kg cA2治疗的动物和用3mg/kg TNV14治疗的动物在整个研究中的任何时间都未能实现AI的任何显著降低。当与从第3周开始并持续至第5周的d-PBS治疗组相比时,用3mg/kg TNV148治疗的动物显示出显著降低。在研究的第4周和第5周时,当与较低剂量(1mg/kg和3mg/kg)的cA2相比时,10mg/kg cA2治疗的动物显示出AI的显著降低,并且在第3至5周时也显著低于TNV14治疗的动物。尽管3mg/kg治疗组中的任一组之间似乎没有显著差异,但用3mg/kg TNV14治疗的动物的AI在一些时间点显著高于10mg/kg,而用TNV148治疗的动物的AI与用10mg/kg cA2治疗的动物没有显著差异。

[0344] 实施例7:使用抗TNF抗体和对照作为单次腹膜内推注剂量的关节炎小鼠研究

[0345] 在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到6个治疗组中的一个,并以3mg/kg或5mg/kg的单次腹膜内推注剂量的抗体(cA2或TNV148)进行治疗。该研究利用D-PBS和10mg/kg cA2对照组。

[0346] 当将体重分析为来自给药前的变化时,所有治疗均获得相似的体重增加。用3mg/kg或5mg/kg TNV148或5mg/kg cA2处理的动物在研究早期(在第2周和第3周时)获得了显著量的体重。只有用TNV148处理的动物在较晚的时间点维持显著的体重增加。35mg/kg和5mg/kg TNV148两者治疗的动物均在7周时显示显著性,并且3mg/kg TNV148的动物在注射后8周仍显著升高。(参见图14)。

[0347] 图15示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。所有治疗组在较早的时间点显示出一定程度的保护,其中5mg/kg cA2和5mg/kg TNV148在第1至3周时显示出AI显著减少,并且所有治疗组在第2周时显示出显著减少。在研究的稍后阶段,用5mg/kg cA2治疗的动物显示出一定程度的保护,在第4、6和7周时显著减少。cA2和TNV148的低剂量(3mg/kg)在第6周时显示出显著减少,并且所有治疗组在第7周时显示出显著减少。在研究结束时(第8周),没有一个治疗组能够保持显著减少。在任何时间点的治疗组(不包括盐水对照组)中的任一组之间没有显著差异。

[0348] 实施例8:使用抗TNF抗体和对照作为抗TNF抗体与修饰的抗TNF抗体之间的单次腹膜内推注剂量的关节炎小鼠研究

[0349] 比较单次腹膜内剂量的TNV148(来自杂交瘤细胞)和rTNV148B(来自转染细胞)的疗效。在大约4周龄时,基于性别和体重,将Tg197研究小鼠分配到9个治疗组中的一个,并以1mg/kg的单次腹膜内推注剂量的杜氏磷酸缓冲液S PBS(D-PBS)或抗体(TNV148、rTNV148B)进行治疗。

[0350] 当将重量分析为与给药前相比的变化时,用10mg/kg cA2治疗的动物在整个研究中显示出比经D-PBS治疗的动物一致更高的体重增加。体重在第1周和第3至第8周时显著增加。用1mg/kg TNV148治疗的动物在研究的第5周、第6周和第8周时也获得显著的体重增加。

(参见图16)。

[0351] 图17示出了基于关节炎指数的疾病严重程度的进展。从第4周开始,10mg/kg cA2治疗组的关节炎指数低于D-PBS对照组,并持续到研究的剩余时间(第8周)。TNV148治疗组和1mg/kg的cA2治疗组均在第4周时显示出AI的显著降低。尽管先前的研究(P-099-017)显示,在单次1mg/kg腹腔内推注后,TNV148在降低关节炎指数方面略有效,但本研究显示两种版本的TNV抗体治疗组的AI均略高。虽然(第6周除外)1mg/kg的cA2治疗组当与10mg/kg cA2组相比时没有显著增加,并且TNV148治疗组在第7周和第8周时显著较高,但在研究中的任何时间点,1mg/kg cA2、1mg/kg TNV148和1mg/kg TNV148B之间不存在AI的显著差异。

[0352] 实施例9:用于治疗活动性银屑病关节炎的抗TNF抗体

[0353] 概要

[0354] 多中心、随机、双盲、安慰剂对照试验戈利木单抗、抗TNF α 单克隆抗体、静脉注射用于患有活动性银屑病关节炎(PsA)的受试者

[0355] **SIMPONI[®]** (戈利木单抗)是具有免疫球蛋白G 1(IgG1)重链同种型(G1m[z]同种异型)和 κ 轻链同种型的完全人单克隆抗体。戈利木单抗具有包含SEQ ID NO:36的重链(HC)和包含SEQ ID NO:37的轻链(LC)。戈利木单抗的分子量在149,802道尔顿至151,064道尔顿的范围内。戈利木单抗以高亲和力和特异性结合人肿瘤坏死因子 α (TNF α)并中和TNF α 生物活性。

[0356] 目标和假说

[0357] 主要目标

[0358] 本研究的主要目标是通过评价PsA的体征和症状的减少来评估IV施用戈利木单抗2mg/kg在具有活动性银屑病关节炎(PsA)的受试者中的疗效。

[0359] 次要目标

[0360] 次要目标是评估IV戈利木单抗的以下内容:

- [0361] • 与改善银屑病皮肤病变、身体功能、健康相关的生活质量和其他健康结果有关的疗效
- [0362] • 抑制结构损伤的进展
- [0363] • 安全性
- [0364] • 药代动力学(PK)、药效学(PD)和免疫原性

[0365] 假说

[0366] 为了解决本研究的主要目标,统计假说(另选的假说)是戈利木单抗2mg/kg在统计学上优于安慰剂,在基于主要疗效终点的情况下减少具有活性PsA的受试者的体征和症状。

[0367] 该研究的主要终点是在第14周时美国风湿病学会标准(称为ACR 20)从基线开始改善20%的受试者比例。选择该终点是因为它被监管机构和临床PsA群体广泛接受。

[0368] 研究设计概览

[0369] 这是一项3期多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究,研究IV戈利木单抗与安慰剂相比,在有活性PsA的受试者中的疗效和安全性。约有440名受试者将在约90个研究地点随机分组。受试者将被随机分配,以在第0周、第4周、第12周和第20周时接受戈利木单抗2mg/kg或安慰剂IV输注。在第16周时,所有符合早期脱离资格的受试者将被允许进行以下伴随药物干预中的一项,由研究者选择:他们的皮质类固醇剂量增加(最大总剂量泼尼松10毫克/

天,或等效物)、甲氨蝶呤 (MTX) 剂量增加 (最大总剂量25毫克/周) 或NSAID剂量增加、或开始使用NSAID、皮质类固醇 (最大剂量泼尼松10mg/天或等效物)、MTX (最大剂量25mg/周)、SSZ (最大剂量3g/天)、HCQ (最大剂量400毫克/天) 或来氟米特 (最大剂量20毫克/天)。对于符合第24周访视早期脱离资格的受试者,应完成对稳定剂量的那些药物的滴定。在第24周时,所有接受安慰剂输注的受试者将交叉并开始接受戈利木单抗IV输注。

[0370] 戈利木单抗IV治疗组中的受试者将继续接受戈利木单抗IV输注。数据库锁 (DBL) 计划在第24周和第60周。在最后一次研究治疗施用后至少8周,将随访受试者的不良事件 (AE) 和严重不良事件 (SAE)。研究的结束定义为最后一个受试者完成第60周访视的时间。

[0371] 受试者群体

[0372] 有资格参加该项研究的受试者为18岁或以上的男性或女性,在首次施用研究试剂前至少6个月患有PsA,并在筛查时符合CASPAR标准。受试者在筛查时和基线时必须具有活动性疾病症状 (5个或更多个肿胀关节和5个或更多个压痛关节) 并且C-反应蛋白质 (CRP) 水平 $\geq 0.6\text{mg/dL}$ 。受试者不得接受生物制剂治疗。受试者可在研究期间继续MTX治疗。

[0373] 有资格的受试者的筛查将在施用研究试剂之前的6周内执行。

[0374] 受试者还必须符合纳入和排除标准。

[0375] 剂量和施用

[0376] 在初次筛查访视时,将根据方案指定的纳入和排除标准,从所有被认为可能有资格进行研究的受试者处获得知情同意书,以便参加研究。在随机化访视时,将重新评估受试者,并且如果满足所有指定的纳入和排除标准,则受试者将被随机分配,以接受戈利木单抗IV输注或安慰剂IV输注。随机化将根据地理区域和基线甲氨蝶呤 (MTX) 的使用进行分层 (是或否)。

[0377] 在第一次输注研究试剂之前,受试者将以1:1的比例随机分配至以下2个治疗组中的1个:

[0378] 第1组 (n=220): 受试者将在第0周、第4周、第12周和第20周时接受IV安慰剂输注。受试者将在第24周时交换至IV戈利木单抗2mg/kg组,并在第24周、第28周和之后q8w时接受施用。

[0379] 第2组 (n=220): 受试者将在第0周、第4周和之后q8w时接受IV戈利木单抗2mg/kg。受试者将在第24周时接受IV安慰剂输注以维持不知情。

[0380] 在第16周时,第I组和第II组的所有受试者在压痛和肿胀关节数两者中相对于基线的改善 $<5\%$ 将进入早期脱离 (EE)。在第16周时,所有符合早期脱离资格的受试者将被允许进行以下伴随药物干预中的一项,由研究者选择:他们的皮质类固醇剂量增加 (最大总剂量泼尼松10毫克/天,或等效物)、MTX剂量增加 (最大总剂量25毫克/周) 或NSAID剂量增加、或开始使用NSAID、皮质类固醇 (最大剂量泼尼松10mg/天或等效物)、MTX (最大剂量25mg/周)、SSZ (最大剂量3g/天)、HCQ (最大剂量400毫克/天) 或来氟米特 (最大剂量20毫克/天)。对于符合第24周访视早期脱离资格的受试者,应完成对稳定剂量的那些药物的滴定。

[0381] 所有输注将在30分钟 $\pm$ 10分钟内完成。

[0382] 疗效评价/终点

[0383] 在该研究选择的疗效评价是在用于治疗PsA的治疗性生物试剂的先前试验中建立的。为本研究选择的患者报告结果 (PRO) 也与医学文献中接受的临床相关测量结果一致,

用于PsA中的其他研究和适用的美国/欧盟监管指导文档。

[0384] 银屑病关节炎和银屑病响应评价包括：

- [0385] • 受试者的疼痛评估
- [0386] • 受试者的疾病总体评估
- [0387] • 医师的疾病总体评估
- [0388] • 关节评估
- [0389] • 健康评估问卷的残疾指数 (HAQ-DI)
- [0390] • 银屑病面积和严重性指数 (PASI)
- [0391] • 手部和足部的X射线评价
- [0392] • 36项短期健康调查 (SF-36)
- [0393] • 指趾炎评估
- [0394] • 肌腱端炎评估
- [0395] • 巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数 (BASDAI)
- [0396] • 修正NAPSI
- [0397] • 皮肤病生活质量指数 (DLQI)
- [0398] • 慢性病疗法的功能评估 (FACIT) - 疲劳
- [0399] • 工作限制问卷 (WLQ)
- [0400] • 生产力VAS
- [0401] • EuroQol-5D (EQ-5D) 问卷

[0402] 主要终点

[0403] 本研究的主要终点是在第14周时实现ACR 20响应的受试者的比例。

[0404] 如果与安慰剂组相比,在第14周时ACR 20的受试者的比例在戈利木单抗组中被证实意义显著更大,则该研究将被认为是阳性的。

[0405] 重要次要终点

[0406] 以下重要次要分析终点按重要性顺序列出,如下所示:

- [0407] • 在第14周时HAQ-DI评分自基线的变化。
- [0408] • 在第14周时具有ACR 50响应的受试者比例。
- [0409] • 在第14周时实现PASI 75响应的受试者 (基线 $\geq 3\%$ BSA银屑病累及) 的比例。
- [0410] • 在第24周时修正的总van der Heijde-Sharp (vdH-S) 评分自基线的变化。

[0411] 药代动力学评价

[0412] 将在所选择的访视时收集血液样本,以评价具有PsA的成年受试者中IV戈利木单抗的PK。如果在该次访视时施用研究试剂,则应从与IV输注线不同的臂抽取药代动力学样本。在第0周、第4周、第12周、第20周、第36周和第52周访视时,将收集2个血清戈利木单抗浓度样本:在输注前立即收集1个样本,在输注结束后一小时收集另一个样本。对于其余访视中的每一次,将仅收集1个血清戈利木单抗浓度样本,如果在该次访视时施用研究试剂,则应在输注前立即收集。还将抽取随机PK样本用于介于第14周和第20周访视之间的群体PK分析(除在第14周或第20周访视时以外);必须在研究试剂输注之前或之后至少24小时收集该随机样本。

[0413] 在适用的时间点,用于测量戈利木单抗浓度和戈利木单抗抗体两者的血清将来自

相同的血液抽取。

[0414] 免疫原性评价

[0415] 为了评价戈利木单抗在具有PsA的成年受试者中的免疫原性,将根据时间和事件时间表收集用于检测戈利木单抗抗体的血清样本。

[0416] 生物标记评价

[0417] 将收集生物标记样本以获得对临床结果中个体间变异性的分子理解,这可能有助于识别对药物有不同响应的群体亚组。生物标记样本还可用于帮助解决新出现的问题,并且能够在未来开发更安全、更有效、最终个体化的疗法。

[0418] 药物基因组学 (DNA) 评价

[0419] 将进行基因组测试以搜索特定基因与疾病或对药物响应的链接。仅执行与戈利木单抗或与该药物开发的疾病相关的DNA研究。本研究将在同意受试者中进行基因组广泛的药物基因组学和/或表观遗传学测试。参与此部分研究的受试者必须签署单独的知情同意书。此外,受试者可以在任何时间撤回此类同意,而不影响他们参与研究的其他方面或他们未来参与研究。

[0420] 将收集药物基因组学血液样本,以允许在必要时(当地法规允许的情况下)进行药物基因组学研究。受试者参与药物基因组学研究是任选的。

[0421] 安全性评价

[0422] 基于其他抗TNF α 试剂的安全性概况以及迄今为止的戈利木单抗安全性数据,已经鉴定了几种感兴趣的AE,并将在本研究中进行监测和评估。这些包括:输注反应、肝胆实验室异常、包括TB的感染和恶性肿瘤。

[0423] 统计方法

[0424] 为了评估受试者基线的可比性,人口统计学和基线疾病特征数据将按治疗组进行汇总。

[0425] 当采用分层时,将使用卡方检验或Cochran Mantel Haenszel (CMH) 检验来分析二元分类数据(例如,具有ACR 20响应的受试者的比例)。使用方差分析(ANOVA)分析连续数据。如果终点被认为是非高斯的,则将使用范德瓦尔登正态评分。所有疗效分析都将基于意向治疗原则;因此,受试者将根据他们被随机化的治疗进行分析,而不管他们实际接受的治疗。

[0426] 所有统计测试将在0.05的 α 水平(双侧)执行。将利用数据的表格和图形汇总。

[0427] 群体组

[0428] 除非另有说明,否则疗效和受试者基线分析将使用意向治疗群体(即,所有随机化的受试者)。包括在疗效分析中的受试者将根据其指定的治疗组进行汇总,无论他们是否接受指定的治疗。

[0429] 安全性和PK分析将包括接受至少一次研究治疗施用的所有受试者。

[0430] 终点分析

[0431] 主要终点分析

[0432] 主要终点是在第14周时实现ACR 20响应的受试者的比例。

[0433] 将通过比较治疗组之间在第14周时具有ACR 20响应的受试者的比例来评价关节炎的体征和症状的减轻。通过基线MTX使用(是或否)分层的CMH检验将在0.05的显著性水平下执行该分析。

[0434] 如果受试者在第14周时具有至少1个ACR成分的数据,则将使用最后一个观察结果(LOCF)程序来估算缺失的ACR成分。如果受试者在第14周时没有所有ACR成分的数据,则受试者将被视为无响应者。另外,将应用治疗失败规则。

[0435] 重要次要终点分析

[0436] 以下重要次要分析将按重要性顺序执行,如下所示:

[0437] 1.将对在第14周时HAQ-DI评分与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0438] 2.将对在第14周时具有ACR 50响应的受试者的比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0439] 3.将对在第14周时实现PASI 75响应的受试者(基线 $\geq 3\%$ 体表面积银屑病累及)的比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0440] 4.将对在第24周时修正的总vdH-S评分与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0441] 为了在主要和重要次要终点之间维护类型I错误,将按顺序测试终点。将对主要终点进行分析。如果这具有统计意义上的显著性,那么如果先前的重要次要终点具有统计意义上的显著性,则将按照上述顺序比较重要次要终点。如果先前的重要次要终点没有统计意义上的显著性,则不会进行进一步的比较。将提供标称p值。

[0442] 安全性分析概览

[0443] 将执行常规安全性评价。AE、SAE和其他合理相关AE(包括输注反应和包括TB的感染)的出现和类型将按治疗组进行汇总。将基于NCICTCAE毒性分级对具有异常实验室参数(血液学和化学)的受试者的数量进行汇总。另外,将对具有ANA和抗dsDNA抗体的受试者的数量以及输注反应与戈利木单抗抗体的关系进行汇总。

[0444] 所有安全性分析将使用接受至少1次研究试剂施用的所有受试者的群体执行。将使用受试者实际接受的治疗执行分析。

[0445] 另外,图形数据显示(例如,线图)和受试者列表也可用于汇总/呈现数据。

[0446] 缩写

[0447]	ACR	美国风湿病学会
[0448]	AE	不良事件
[0449]	ALT	丙氨酸转氨酶
[0450]	ANOVA	方差分析
[0451]	AS	强直性脊柱炎
[0452]	AST	天冬氨酸转氨酶
[0453]	BASDAI	巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数
[0454]	BCG	卡介苗
[0455]	BSA	体表面积
[0456]	CASPAR	银屑病关节炎的分类标准
[0457]	CHF	充血性心力衰竭
[0458]	CRP	C反应蛋白质
[0459]	DAS	疾病活动指数评分
[0460]	DBL	数据库锁

[0461]	DIP	远端指节间
[0462]	DLQI	皮肤病生活质量指数
[0463]	DMARD	改善疾病的抗风湿药物
[0464]	DMC	数据监测委员会
[0465]	DNA	脱氧核糖核酸
[0466]	EC	道德委员会
[0467]	ECG	心电图
[0468]	eCRF	电子病例报告表
[0469]	eDC	电子数据捕集
[0470]	EQ-5D	EuroQol-5D
[0471]	EQ-VAS	EQ视觉模拟量表
[0472]	EU	欧洲联盟
[0473]	FACIT-F	慢性病疗法的功能评估-疲劳
[0474]	GCP	良好的临床实践
[0475]	GLM	戈利木单抗
[0476]	HAQ	健康评估问卷
[0477]	HBV	乙型肝炎病毒
[0478]	HCQ	羟氯喹
[0479]	HCV	丙型肝炎病毒
[0480]	HIV	人类免疫缺陷病毒
[0481]	IB	研究者手册
[0482]	ICH	国际协调会议
[0483]	IgG1	免疫球蛋白G 1
[0484]	IJA	独立关节评估员
[0485]	IL	白介素
[0486]	IMPACT	英夫利昔单抗多国银屑病关节炎对照试验
[0487]	IRB	机构审查委员会
[0488]	IRC	成像研究中心
[0489]	IV	静脉注射
[0490]	IWRS	交互式网络响应系统
[0491]	JSN	关节间隙狭窄
[0492]	Mab	单克隆抗体
[0493]	MCP	掌指
[0494]	MCS	心理成分汇总
[0495]	MDA	最小疾病活动
[0496]	MMP-1	基质金属蛋白酶-1
[0497]	MMP-3	基质金属蛋白酶-3
[0498]	MTX	甲氨蝶呤
[0499]	NAPSI	银屑病甲严重性指数

[0500]	NCI-CTCAE	美国国家癌症研究所-不良事件的常用术语标准
[0501]	NSAID	非甾体类抗炎药
[0502]	PASI	银屑病面积和严重性指数
[0503]	PBO	安慰剂
[0504]	MCS	生理成分汇总
[0505]	PD	药效
[0506]	PIP	近端指间
[0507]	PK	药代动力学
[0508]	PRO	患者报告结果
[0509]	PsA	银屑病关节炎
[0510]	pt	患者
[0511]	q8w	每8周
[0512]	q12w	每12周
[0513]	RA	类风湿性关节炎
[0514]	RBC	红细胞
[0515]	RF	类风湿因子
[0516]	SAE	严重不良事件
[0517]	SAP	统计分析计划
[0518]	SC	皮下
[0519]	SDC	最小可检测的变化
[0520]	SF-36	36项短期健康调查
[0521]	SI	国际单位制
[0522]	SSZ	柳氮磺吡啶
[0523]	TB	结核病
[0524]	TNF	肿瘤坏死因子
[0525]	TST	结核菌素皮肤测试
[0526]	VAS	视觉模拟量表
[0527]	vdH-S	van derHeijde-Sharp
[0528]	WBC	白细胞
[0529]	WLQ	工作限制问卷
[0530]	<u>引言</u>	
[0531]	<u>化学名和结构</u>	

[0532] **SIMPONI[®]** (戈利木单抗) 是具有免疫球蛋白G (IgG) 1重链同种型 (G1m[z] 同种异型) 和κ轻链同种型的人单克隆抗体 (mAb)。戈利木单抗具有包含SEQ ID NO:36的重链 (HC) 和包含SEQ ID NO:37的轻链 (LC)。戈利木单抗的分子量在149,802道尔顿至151,064道尔顿的范围内。根据解剖学治疗学及化学 (ATC) 分类系统将戈利木单抗分类为TNFα抑制剂 (ATC 代码:L04AB06)。戈利木单抗对可溶性和跨膜形式的肿瘤坏死因子α (TNFα) 具有高亲和力并抑制TNFα生物活性。未观察到与其他TNF超家族配体的结合;具体地,戈利木单抗不结合或中和人淋巴毒素。TNFα主要由活化的单核细胞、巨噬细胞和T细胞合成,作为跨膜蛋白质,其

自缔合以形成生物活性的同源三聚体并通过蛋白水解从细胞表面快速释放。TNF α 与p55或p75TNF受体的结合导致受体胞质结构域的聚集并引发信号传导。肿瘤坏死因子已被鉴定为响应各种刺激而产生的关键前哨细胞因子,并且随后通过激活半胱天冬酶依赖的凋亡途径和转录因子核因子(NF)- κ B和激活蛋白质-1(AP-1)促进炎症反应。肿瘤坏死因子还通过其在生发中心的免疫细胞组织中的作用来调节免疫应答。TNF的升高表达已经与慢性炎症性疾病诸如类风湿性关节炎(RA)以及脊柱状关节病诸如银屑病关节炎(PsA)和强直性脊柱炎(AS)有关,并且是这些疾病特有的关节炎和结构损伤的重要媒介。

[0533] 银屑病关节炎

[0534] 银屑病关节炎是一种慢性、炎性、通常类风湿因子(RF)阴性的与银屑病相关联的关节炎。银屑病在普通白种人群体中的流行率为约2%。大约6%至39%的银屑病患者患有PsA。

[0535] 银屑病关节炎在介于30和55岁之间达到峰值,并且对男性和女性的影响相同。银屑病关节炎牵涉外周关节、中轴骨骼、骶髂关节、指/趾甲和肌腱端,并且与银屑病性皮肤病损害相关联。一半以上的PsA患者可能具有X光胶片上的侵蚀证据,并且最多40%的患者发生严重的侵蚀性关节病。银屑病关节炎导致功能障碍、生活质量下降和死亡率增加。

[0536] T细胞与单核细胞/巨噬细胞(促炎细胞因子的主要来源)之间的相互作用在PsA的发病机理中起作用。已经在关节液和组织以及PsA患者的银屑病皮肤损伤中检测到TNF α 水平增加。

[0537] TNF α 在银屑病关节炎中的作用

[0538] TNF α 被认为是具有多种功能活性的关键炎症介质²。正如RA和克罗恩氏病患者所证明的,TNF α 的过度产生导致与炎症相关联的疾病过程。T细胞与单核细胞/巨噬细胞(促炎细胞因子的主要来源)之间的相互作用在PsA的发病机理中起作用^{7,22}。已经在关节液和组织以及PsA患者的银屑病皮肤损伤中检测到TNF α 水平增加^{24,26}。据报道,使用英夫利昔单抗(一种抗TNF α 单克隆抗体)进行治疗可使48小时内活动性PsA患者银屑病表皮中的T细胞数量和滑膜组织中T细胞数量和巨噬细胞数量显著减少¹⁷。英夫利昔单抗治疗还显著降低了PsA患者滑膜组织中的血管生成生长因子,同时具有显著的临床皮肤和关节反应³²。

[0539] 靶向TNF的生物治疗,包括英夫利昔单抗、SC戈利木单抗、阿达木单抗和赛妥珠单抗,已经显示在具有活动性PsA的受试者中诱导关节炎和银屑病的快速和显著改善,同时保持可接受的安全性。依那西普、阿达木单抗和赛妥珠单抗每周两次、每周一次或每2至4周通过SC注射施用。戈利木单抗每月通过SC注射施用。英夫利昔单抗在第0周、第2周和第6周以及之后每8周时在门诊环境中作为IV输注施用。

[0540] 在PsA中的SC戈利木单抗的第3期研究(C0524T08)中,尽管当前或之前的DMARD或NSAID治疗,仍然将405名患有PsA的受试者随机分配以接受SC安慰剂、戈利木单抗50mg q4w或100mg q4w。用戈利木单抗治疗导致体征和症状改善,如在第14周时实现ACR 20应答的患者百分比所证明的:51%(戈利木单抗50mg)与9%(安慰剂)相比。在第24周时,戈利木单抗50mg组的放射学损伤明显少于安慰剂组,如通过针对PsA修改的总vdH-S评分的基线的平均变化所测量的。在第24周时,与安慰剂组相比,戈利木单抗100mg组的放射学损伤较少,但差异未达到统计意义上的显著性。先前在第24周时观察到的PsA受试者的临床改善维持至第256周。至第24周,分别有65%和59%的戈利木单抗治疗和安慰剂治疗的患者都有不良事

件。在戈利木单抗组中最常报告的不良事件是鼻咽炎和上呼吸道感染。据报道,所有戈利木单抗治疗患者中有2%的严重不良事件(SAE),安慰剂治疗患者为6%。

[0541] 尽管TNF α 在PsA的病理生理学中的确切作用尚不清楚,但已经有大量且越来越多的证据表明TNF α 抑制在该疾病中具有主要的治疗有益效果。

[0542] 研究的总体理论基础

[0543] 本研究将评价在活动性PsA的治疗中在第0周和第4周,然后是每8周(q8w;有或没有MTX)时在30分钟内经由IV输注施用2mg/kg戈利木单抗的安全性和疗效。

[0544] 考虑到SC戈利木单抗的安全性和疗效,假设IV戈利木单抗可以证明其具有与其他抗TNF α 剂一致的可接受的安全性。已经在RA的第3期研究(CNT0148ART3001)中明确研究了静脉注射(IV)戈利木单抗,该研究形成了批准戈利木单抗IV用于治疗RA的基础。CNT0148ART3001研究是一项尽管同时进行MTX治疗,但在具有活动性RA的受试者中在第0周、第4周和之后q8w时在30分钟 $\pm$ 10分钟的时间段内施用戈利木单抗2mg/kg输注IV施用的有效性和安全性的随机、双盲、安慰剂对照、多中心、双臂研究。尽管MTX患有活动性RA的受试者随机分配接受安慰剂输注(有MTX)或在第0周、第4周和q8w(有MTX)至第24周时IV施用2mg/kg的戈利木单抗。从第24周开始,所有受试者在第100周时IV给药戈利木单抗。已证明,IV戈利木单抗在改善RA体征和症状、身体功能和健康相关的生活质量以及抑制结构损伤的进展方面提供了实质性有益效果。

[0545] 在RA治疗中静脉内施用的戈利木单抗(CNT0148ART3001)显示出稳健的疗效和可接受的安全性、输注反应的发生率低。该发明的第3期研究旨在证明IV戈利木单抗在治疗患有活动性PsA的受试者中的疗效和安全性。

[0546] 正在评价PsA受试者的IV施用途径,因为目前可获得的IV抗TNF α 剂在免疫原性和输注反应方面具有局限性,并且与本发明的IV戈利木单抗的30分钟 $\pm$ 10分钟输注相比,具有更长的输注时间(60分钟至120分钟)。

[0547] 患者也可能更喜欢q8w IV戈利木单抗的维持给药方案,而不是更频繁的SC施用。因此,IV戈利木单抗可能是PSA患者目前可用治疗选择的重要补充。

[0548] 本研究的给药方案是在第0周和第4周,然后是q8w(有或没有MTX)时在30分钟 $\pm$ 10分钟内经由IV输注施用2mg/kg戈利木单抗。

[0549] 目标和假说

[0550] 目标

[0551] 主要目标

[0552] 本研究的主要目标是通过评估PsA的体征和症状的减少来评价IV施用戈利木单抗2mg/kg在具有活动性PsA的受试者中的疗效。

[0553] 次要目标

[0554] 次要目标是评估IV戈利木单抗的以下内容:

[0555] • 与改善银屑病皮肤病变、身体功能、健康相关的生活质量和其他健康结果有关的疗效

[0556] • 抑制结构损伤的进展

[0557] • 安全性

[0558] • 药代动力学(PK)、药效学(PD)和免疫原性

[0559] 假说

[0560] 为了解决本研究的主要目标,统计假说(另选的假说)是戈利木单抗2mg/kg在统计学上优于安慰剂,在基于主要疗效终点的情况下减少具有活性PsA的受试者的体征和症状。该研究的主要终点是在第14周时美国风湿病学会标准(称为ACR 20)从基线开始改善20%的受试者比例。选择该终点是因为它被监管机构和临床PsA群体广泛接受。

[0561] 研究设计和基本原理

[0562] 研究设计概览

[0563] 这是一项3期多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究,研究IV戈利木单抗与安慰剂相比,在有活性PsA的受试者中的疗效和安全性。约有440名受试者将在约90个研究地点随机分组。受试者将被随机分配,以在第0周、第4周、第12周和第20周时接受戈利木单抗2mg/kg或安慰剂IV输注。在第16周时,所有符合早期脱离资格的受试者将被允许进行以下伴随药物干预中的一项,由研究者选择:他们的皮质类固醇剂量增加(最大总剂量泼尼松10毫克/天,或等效物)、MTX剂量增加(最大总剂量25毫克/周)或NSAID剂量增加、或开始使用NSAID、皮质类固醇(最大剂量泼尼松10mg/天或等效物)、MTX(最大剂量25mg/周)、SSZ(最大剂量3g/天)、HCQ(最大剂量400毫克/天)或来氟米特(最大剂量20毫克/天)。对于符合第24周访视早期脱离资格的受试者,应完成对稳定剂量的那些药物的滴定。

[0564] 在第24周时,所有接受安慰剂输注的受试者将在第24周、第28周和之后q8w至第52周时交叉并开始接受戈利木单抗IV输注。戈利木单抗IV治疗组中的受试者将在第24周时接受安慰剂输注以维持不知情并且在第28周和之后q8w至第52周时继续接受戈利木单抗IV输注。数据库锁(DBL)计划在第24周和第60周。

[0565] 在最后一次研究治疗施用后至少8周,将随访受试者的AE和SAE。研究的结束定义为最后一个受试者完成第60周访视的时间。

[0566] 图18中提供了本研究设计的图表。

[0567] 研究设计基本原理

[0568] 研究群体

[0569] 目标研究群体是具有活动性PsA至少6个月的生物学天然受试者,其在筛选时符合银屑病关节炎(CASPAR)²⁷标准的分类标准。

[0570] 治疗组、剂量和剂量施用间隔

[0571] 受试者将在第0周至第1周时的2个治疗组中随机分配如下:

[0572] • 第1组(n=220):IV安慰剂输注

[0573] • 第2组(n=220):IV戈利木单抗2mg/kg

[0574] 受试者将被随机分配,以在第0周、第4周、第12周和第20周时接受戈利木单抗2mg/kg或安慰剂IV输注。在第16周时,所有符合早期脱离资格的受试者将被允许进行以下伴随药物干预中的一项,由研究者选择:他们的皮质类固醇剂量增加(最大总剂量泼尼松10毫克/天,或等效物)、MTX剂量增加(最大总剂量25毫克/周)或NSAID剂量增加、或开始使用NSAID、皮质类固醇(最大剂量泼尼松10mg/天或等效物)、MTX(最大剂量25mg/周)、SSZ(最大剂量3g/天)、HCQ(最大剂量400毫克/天)或来氟米特(最大剂量20毫克/天)。对于符合第24周访视早期脱离资格的受试者,应完成对稳定剂量的那些药物的滴定。在第24周时,所有接受安慰剂输注的受试者将在第24周、第28周和之后q8w至第52周时交叉并开始接受戈利木

单抗IV输注。戈利木单抗IV治疗组中的受试者将在第24周时接受安慰剂输注以维持不知情并且在第28周和之后q8w至第52周时继续接受戈利木单抗IV输注。

[0575] 研究阶段和治疗持续时间

[0576] 本研究将分为4个阶段：筛查、双盲安慰剂对照、积极治疗 and 安全性随访。最多6周的筛查阶段将允许足够的时间执行筛查研究评价并确定研究资格。本研究的第二阶段将是第0周到第24周的双盲、安慰剂对照阶段。本研究的第三阶段将是第24周至第52周的积极治疗阶段。本研究的第四阶段将是安全性随访阶段，并且将是最后研究试剂施用开始的8周。安全性随访允许监测受试者的时间段相当于戈利木单抗半衰期的大约5倍。在整个试验的60周期间，每名受试者的初始治疗分配对部位和受试者是不知情的。该持续时间将提供足够的时间来证明IV戈利木单抗作为PsA的维持治疗的疗效和安全性。

[0577] 当最后一名受试者完成最后一次预定访视(第60周访视)时，本研究将结束。

[0578] 研究控制,随机化和盲法

[0579] 随机化将用于最大限度地减少受试者分配至治疗组的偏倚，增加已知和未知受试者属性(例如，人口统计学和基线特征)在治疗组之间均衡平衡的可能性，并增强治疗组之间的统计比较的有效性。另外，本研究的双臂将基于地理区域和基线MTX使用(是或否)进行分层。

[0580] 在研究期间，个体受试者和研究者将保持不知情状态。盲法治疗将用于减少数据收集和临床终点评价期间的潜在偏倚。计划在第24周和第60周时进行两项DBL研究。在所有受试者完成第24周访视或终止其参与本研究之后，将发生第一次DBL。在所有受试者完成第60周访视或终止其参与本研究之后，将发生第二次DBL。数据库将在第24周时锁定，并且之后，摘要级数据对于所选择的赞助人是不知情的。有限的赞助人在此DBL上对数据分析和数据审查是不知情的。在揭盲之前，将记录能够访问第24周DBL的不知情受试者级数据的赞助人的身份。除了非盲药剂师之外，所有现场人员和受试者将对治疗任务保持不知情，直至第60周DBL发生。

[0581] 疗效评价

[0582] 在该研究中选择中的疗效评价是在用于治疗PsA的治疗性生物试剂的先前试验中建立的。为此选择的患者报告结果(PRO)也与医学文献中接受的临床相关测量结果一致，用于PsA中的其他研究和适用的美国/欧盟监管指导文档。

[0583] 银屑病关节炎和银屑病响应评价包括：

- [0584] • 受试者的疼痛评估
- [0585] • 受试者的疾病总体评估
- [0586] • 医师的疾病总体评估
- [0587] • 关节评估(肿胀和压痛关节数)
- [0588] • 健康评估问卷的残疾指数(HAQ-DI)
- [0589] • 银屑病面积和严重性指数(PASI)
- [0590] • 手部和足部的射线照片
- [0591] • 36项短期健康调查(SF-36)
- [0592] • 指趾炎评估
- [0593] • 肌腱端炎评估

- [0594] • 巴斯强直性脊柱炎疾病活动指数 (BASDAI)
- [0595] • 修正NAPSI
- [0596] • 皮肤病生活质量指数 (DLQI)
- [0597] • 慢性病疗法的功能评估 (FACIT) - 疲劳
- [0598] • 工作限制问卷 (WLQ)
- [0599] • 生产力VAS
- [0600] • EuroQol-5D (EQ-5D) 问卷

[0601] 受试者群体

[0602] 有资格参加该项研究的受试者为18岁或以上的男性或女性,在首次施用研究试剂前至少6个月诊断为PsA,并在筛查时符合CASPAR标准。有资格的受试者的筛查将在施用研究药物之前的6周内执行。在本研究中招募受试者的纳入和排除标准在以下2个小节中描述。如果对下面的纳入或排除标准存在疑问,研究者应在本研究对象招募之前咨询适当的赞助人代表。

[0603] 纳入标准

[0604] 每个潜在受试者必须满足以下所有将参加研究的标准。

[0605] 1. 受试者必须是18岁或以上的男性或女性。

[0606] 2. 受试者必须在体格检查、病史、生命体征和筛查时执行的12导联心电图 (ECG) 的基础上保持医学稳定。该决定必须记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。

[0607] 3. 在筛查时执行的临床实验室测试的基础上,受试者必须在医学上稳定。如果包含肝酶或血液学的血清化学组的结果超出正常参考范围,则只有当研究者判断异常或偏离正常对于临床不显著或对所研究群体是否适当和合理时,才可包括受试者。该决定必须记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。对于纳入标准#5b和#18中描述的测试,结果必须在纳入标准#5b和#18中允许的合格范围内。

[0608] 4. 在首次施用研究试剂前至少6个月患有PsA并且在筛查时符合CASPAR标准。

[0609] 5. 根据以下定义诊断为活动性PsA:

[0610] a. 在筛查和基线时有5个或更多个肿胀关节以及5个或更多个压痛关节

[0611] -并且

[0612] b. 筛查时C-反应蛋白质 (CRP) ≥ 0.6 mg/dL。

[0613] 6. 至少有1种PsA亚组:DIP关节累及、没有类风湿结节的多关节炎、残毁性关节炎、不对称外周关节炎或伴有外周关节炎的脊椎炎。

[0614] 7. 有活跃的斑块状银屑病或记录有斑块状银屑病的病史。

[0615] 8. 尽管目前或之前接受DMARD和/或NSAID疗法,仍患有活动性PsA。DMARD疗法定义为服用DMARD至少3个月,或DMARD不耐受的证据。NSAID疗法定义为服用NSAID至少4周,或NSAID不耐受的证据。

[0616] 9. 在随机化前,女性必须是

[0617] • 不具有生育潜力:初经前期;绝经后(>45岁,闭经至少12个月);永久不育(例如,输卵管阻塞、子宫切除术、双侧输卵管切除术);或以其他方式不能怀孕。

[0618] • 具有生育潜力并实施一种高效的生育控制方法,符合关于对参与临床研究的受试者使用避孕方法的当地规定:例如,使用成熟的口服、注射或植入的激素避孕方法;放置

宫内避孕器(IUD)或宫内节育器(IUS);阻隔方法:含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的避孕套或含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的闭塞帽(隔膜或宫颈/拱顶帽);男性伴侣绝育(输精管结扎的伴侣应是唯一适于该受试者的伴侣);完全禁欲(当这种情况与受试者的一般优选生活方式一致时)。

[0619] 10.具有生育潜力的妇女必须在筛查时进行阴性血清妊娠测试(β -人绒毛膜促性腺激素[β -HCG]),并在随机化前第0周进行阴性尿妊娠测试。

[0620] 11.妇女必须同意在研究期间以及在接受最后一剂研究试剂后4个月内,为了辅助生殖而不怀孕或捐卵(卵子、卵母细胞)。

[0621] 12.在研究期间和最后一剂研究试剂后4个月内,与育龄妇女的性生活活跃且未接受输精管结扎术的男性必须同意使用阻隔避孕方法,例如,含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的避孕套,或者伴侣使用含有杀精泡沫/凝胶/膜/乳膏/栓剂的闭塞帽(隔膜或宫颈/拱顶帽)。所有男性也不得在研究期间以及最后一剂研究试剂后4个月内捐献精子。

[0622] 13.根据以下结核病(TB)筛查标准被视为符合条件:

[0623] a.筛查前没有潜伏或活动性结核病史。有潜伏性TB病史且正在接受潜伏性TB治疗的受试者例外,其将在首次施用研究试剂之前开始治疗潜伏性TB,或者在首次施用研究试剂之前的5年内完成对潜伏性TB的适当治疗的记录。

[0624] b.在病史和/或体格检查时没有任何迹象或症状提示活动性TB。

[0625] c.最近没有与活动性TB患者密切接触,或者如果存在此类接触,将转介给专门接受TB治疗的医生经历附加评价,并且如果有必要,在首次服用研究试剂之前接受适当的潜伏性TB治疗。

[0626] d.在首次使用研究试剂前6周内,测定结果为QuantiFERON[®]-TB Gold或者新确定的QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果为阳性,其中排除了活动性TB,并且在首次施用研究试剂之前已开始对潜伏性TB进行适当的治疗。在首次施用研究试剂之前的6周内,如果QuantiFERON[®]-TB Gold测试未在该国家/地区获得批准/注册,或者TST是由当地卫生部门强制执行的,则附加需要结核菌素皮肤试验阴性(TST),或新确定的阳性TST,其中排除了活性TB,并且在首次施用研究试剂之前已开始对潜伏性TB进行适当的治疗。

[0627] i.如果排除活动性TB,他们的胸部X光片显示没有提示TB(活动性或旧的,非活动性TB)的异常,并且受试者没有由研究者确定的TB的附加风险因素,则具有持续不确定的QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果的受试者可以在不接受潜伏性TB治疗的情况下登记。

[0628] ii.对于有潜伏性TB病史和潜伏性TB持续治疗的受试者或已完成如上所述的充分治疗的记录,筛查时不需要QuantiFERON[®]-TB Gold测试和TST;具有如上所述完成适当治疗的记录的受试者不需要对潜伏性TB进行附加治疗。

[0629] e.在首次施用研究试剂之前3个月内拍摄胸部X光片(后-前视图)并由合格的放射科医师阅读,不具有当前、活动性TB或旧的非活动性TB的证据。

[0630] 14.如果使用MTX,受试者应该在首次施用研究试剂之前至少3个月以不超过25mg/周的剂量开始治疗,并且应该没有由于MTX引起的严重毒副作用。在首次施用研究试剂之前,甲氨蝶呤施用途径和剂量应稳定至少4周。如果目前未使用MTX,则必须在首次施用研究

药剂之前至少4周未接受MTX。

[0631] 15. 如果使用NSAID或其他止痛药治疗PsA,则必须在首次施用研究试剂前至少稳定剂量2周。如果目前未使用NSAID或其他止痛药治疗PsA,则在首次施用研究试剂前至少2周内不得接受NSAID或其他镇痛药治疗PsA。

[0632] 16. 如果使用口服皮质类固醇,则受试者必须在首次施用研究药剂之前至少2周服用相当于 $\leq 10\text{mg}$ 泼尼松/天的稳定剂量。如果目前不使用口服皮质类固醇,则受试者在首次施用研究药剂之前至少2周内不得接受口服皮质类固醇。

[0633] 17. 在研究期间必须避免长时间暴晒,不要使用晒黑机或其他紫外光源。

[0634] 18. 在以下参数范围内筛查实验室测试结果:

[0635] a. 血红蛋白 $\geq 8.5\text{g/dL}$

[0636] b. 白血球 $\geq 3.5 \times 10^3/\mu\text{L}$

[0637] c. 中性粒细胞 $\geq 1.5 \times 10^3/\mu\text{L}$

[0638] d. 血小板 $\geq 100 \times 10^3/\mu\text{L}$

[0639] e. 血清肌酸酐 $\leq 1.5\text{mg/dL}$

[0640] f. AST、ALT和碱性磷酸酶水平必须在进行测试的实验室的ULN范围的1.5倍以内。

[0641] 19. 受试者必须愿意并且能够遵守该方案中规定的禁止事项和限制条款。

[0642] 20. 每个受试者必须签署知情同意书(ICF),表明他或她了解研究的程序和程序并且愿意参与该研究。

[0643] 21. 如果每个受试者同意提供任选的DNA样本用于研究(当地法规允许),则他或她必须签署单独的知情同意书。拒绝同意任选的DNA研究样本并不排除受试者参与该研究。

[0644] 22. 在首次研究试剂施用前2周内和整个研究期间,都愿意避免使用辅助疗法,包括阿育吠陀医学、传统中药和针灸。

[0645] 排除标准

[0646] 任何符合以下标准中的任一者的潜在受试者将被排除在参与本研究之外。

[0647] 1. 有其他炎症性疾病可能会混淆戈利木单抗治疗有益效果的评价,包括但不限于RA、AS、系统性红斑狼疮或莱姆病。

[0648] 2. 在参加研究时或在最后一次施用研究试剂后4个月内怀孕、哺乳或计划怀孕或生育孩子。

[0649] 3. 已使用任何靶向减少TNF α 的生物制剂,包括但不限于英夫利昔单抗、依那西普、阿达木单抗、戈利木单抗和赛妥珠单抗。

[0650] 4. 曾经接受过托珠单抗。

[0651] 5. 曾经使用过细胞毒性药物,包括苯丁酸氮芥、环磷酰胺、氮芥子气或其他烷基化剂。

[0652] 6. 曾经接受过那他珠单抗、依法利珠单抗或消耗B或T细胞的药剂(例如,利妥昔单抗、阿仑单抗或维西珠单抗)。

[0653] 7. 曾经接受过阿法西普。

[0654] 8. 曾经接受过阿巴西普。

[0655] 9. 曾经接受托法替尼或任何其他Janus激酶抑制剂(JAK)抑制剂。

[0656] 10. 曾经接受过优特克单抗。

- [0657] 11. 曾经接受过抗IL17疗法(例如,brodalumab、艾克司单抗和苏金单抗)。
- [0658] 12. 已知对人免疫球蛋白或戈利木单抗或其赋形剂过敏、超敏感或不耐受。
- [0659] 13. 在首次施用研究试剂前4周内接受了除MTX以外的任何全身性免疫抑制剂或DMARD。这些类别的药物包括但不限于柳氮磺胺吡啶(SSZ)、羟氯喹(HCQ)、硫唑嘌呤、环孢霉素、麦考酚酸莫酯、金和青霉胺。
- [0660] 14. 在首次施用研究试剂前4周内接受来氟米特(无论是否经历药物消除程序),或在首次施用研究试剂前3个月内接受来氟米特,并且未经历药物消除程序。
- [0661] 15. 在首次施用研究试剂后4周内接受任何可能影响银屑病或皮肤评价的全身用药/治疗(包括但不限于注射用皮质类固醇、类视色素、1,25二羟基维生素D3和类似物、补骨脂素、柳氮磺胺吡啶、羟基脲、富马酸衍生物或光疗法)。
- [0662] 16. 在首次施用任何研究试剂后2周内使用可能影响银屑病或皮肤评价的局部药物/治疗(包括但不限于皮质类固醇、蒽林、卡泊三醇、局部维生素D衍生物、类视色素、他佐罗汀、甲氧沙林、三甲基补骨脂素、吡美莫司和他克莫司)。
- [0663] 17. 在首次施用研究试剂之前的4周期间接受了硬膜外、关节内IM或IV皮质类固醇,包括促肾上腺皮质激素。
- [0664] 18. 目前正在接受锂或在首次施用研究试剂后4周内接受锂。
- [0665] 19. 在首次施用研究试剂之前3个月内、研究期间或最后一次施用研究试剂后3个月内接受或预期接受任何活病毒或细菌疫苗接种。
- [0666] 20. 有慢性或复发性感染病的病史或持续存在,包括但不限于慢性肾脏感染、慢性胸部感染(例如,支气管扩张)、鼻窦炎、复发性尿道感染(例如,复发性肾盂肾炎)、开放性、排泄性或感染性皮肤创伤或溃疡。
- [0667] 21. 如果假体未被移除或更换,则有感染关节假体的病史,或曾因关节假体的感染而接受抗生素治疗。
- [0668] 22. 感染严重(包括但不限于肝炎、肺炎、败血病或肾盂肾炎),或因感染住院,或在首次施用研究试剂前2个月内接受IV抗生素治疗感染。
- [0669] 23. 在筛查前有活动性肉芽肿感染史,包括组织胞浆菌病或球孢子菌病。有关潜伏性TB病史资格的信息,请参阅纳入标准。
- [0670] 24. 在筛查后12个月内接种卡介苗(BCG)疫苗。
- [0671] 25. 在首次施用研究试剂之前3个月内进行胸部X光检查,显示异常提示恶性肿瘤或当前活动性感染,包括TB。
- [0672] 26. 在筛查前6个月内有非结核分枝杆菌感染或机会性感染(例如,细胞巨化病毒、肺孢子虫病、曲霉病)。
- [0673] 27. 首次施用研究试剂后2个月内有或有过带状疱疹感染。
- [0674] 28. 受试者具有人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体阳性的病史,或在筛查时检测HIV阳性。
- [0675] 29. 有乙型肝炎感染。受试者必须经历乙型肝炎病毒(HBV)筛查。至少,这包括测试HBsAg(HBV表面抗原)、抗HBs(HBV表面抗体)和抗HBc总量(HBV核心抗体总数)。
- [0676] 30. 对丙型肝炎病毒(HCV)抗体呈血清反应阳性的受试者,除非他们在筛查前相隔6个月时有2个HCV RNA检测结果阴性,并且在筛查时有第三个阴性HCVRNA检测结果。

[0677] 31. 目前有严重、渐进性或不受控制的肾、肝、血液、胃肠、内分泌、肺、心脏、神经、脑或精神疾病的体征或症状。

[0678] 32. 有病史或并发充血性心力衰竭 (CHF), 包括医学控制、无症状的 CHF。

[0679] 33. 移植器官 (角膜移植除外) 首次施用研究试剂前 3 个月)。

[0680] 34. 有淋巴细胞增生性疾病的已知病史, 包括淋巴瘤, 或暗示可能的淋巴细胞增生性疾病的体征和症状, 诸如异常尺寸或位置的淋巴结病, 临床上显著的脾肿大或意义不明的单克隆丙种球蛋白病。

[0681] 35. 有已知的脱髓鞘疾病史, 诸如多发性硬化或视神经炎。

[0682] 36. 受试者在筛查前 5 年内有恶性肿瘤病史 (例外是皮肤的鳞状和基底细胞癌, 在首次研究药剂施用前至少 3 个月没有复发迹象, 并且已经手术治愈的宫颈原位癌)。

[0683] 37. 在计划的第一剂研究药物之前, 受试者已采取任何不允许的疗法, 伴随疗法。

[0684] 38. 受试者已在 5 个半衰期或 3 个月内 (以较长者为准) 接受研究药物 (包括研究性疫苗), 或在计划的第一剂研究药物之前 3 个月内使用侵入式研究医疗器械或目前参加研究性研究。

[0685] 39. 受试者具有任何条件, 在研究者认为参与不符合受试者的最佳利益 (例如, 损害健康) 或可能阻止、限制或混淆方案指定的评估。

[0686] 40. 受试者在筛查前 1 个月内接受了大手术 (例如, 需要全身麻醉), 或者尚未从手术中完全恢复, 或者计划在预期受试者参与研究期间或在最后一剂研究药物施用后 1 个月内进行手术。

[0687] 41. 由于耐受性差或不易进入静脉, 无法或不愿意经历多次静脉穿刺。

[0688] 42. 已知在过去的 3 年内, 具有药物滥用 (药物或酒精) 问题。

[0689] 43. 受试者是研究者或研究地点的雇员, 在该研究者或研究地点的指导下直接参与拟议的研究或其他研究, 以及雇员或研究者的家庭成员。

[0690] 禁止和限制

[0691] 潜在受试者必须愿意并且能够在研究过程期间遵守以下禁止和限制条件才有资格参加:

[0692] 1. 具有生育潜力的异性性生活活跃妇女和能够生育孩子的男性两者必须同意使用高效的避孕方法, 并在本研究期间和最后一次施用研究试剂后 4 个月继续使用避孕措施。

[0693] 2. IV 研究试剂施用不允许同时使用以下药物:

[0694] • 旨在减少 TNF α 的生物制剂 (包括但不限于英夫利昔单抗、SC 戈利木单抗、赛妥珠单抗、依那西普、益赛普、CT-P13 [Remsima[®]] 和阿达木单抗)

[0695] • IL-1ra (阿那白滞素)

[0696] • 托珠单抗或任何其他生物靶向 IL-6 或 IL-6 受体

[0697] • 托法替尼或任何其他 JAK 抑制剂

[0698] • B 细胞耗竭剂 (例如, 利妥昔单抗)

[0699] • 细胞毒性药物, 诸如环磷酰胺、苯丁酸氮芥、氮芥子气, 或者

[0700] • 其他烷基化剂

[0701] • 阿巴西普

[0702] • 优特克单抗

[0703] • 抗IL-17试剂(例如,brodalumab、苏金单抗和艾克司单抗)

[0704] • 研究药物

[0705] 3. 不允许使用以下药物:全身免疫抑制剂或DMARD(除MTX以外),包括SSZ、HCQ、硫唑嘌呤、口服环孢菌素A、他克莫司、麦考酚酸莫酯、来氟米特、口服或肠外金。唯一的例外是使用SSZ、HCQ或来氟米特治疗有资格在第16周时早期脱离的受试者。

[0706] 4. 必须同意在研究期间不接受活病毒或活细菌疫苗接种。受试者还必须同意在接受最后一次研究试剂施用后3个月内不接种活疫苗。在筛查后12个月内不得接种卡介苗(BCG)疫苗。

[0707] 5. 必须同意不接受除本研究的研究试剂以外的研究性医疗器械或研究药物。

[0708] 6. 用NSAID治疗的受试者,包括阿司匹林和选择性环加氧酶(COX)-2抑制剂,以及其他镇痛药,应该接受在进行本研究的国家批准的通常市售剂量。NSAID和其他止痛药的处方不应在首次施用研究药物之前至少2周进行调整,也不应该至第24周进行调整,并且只有在受试者出现不可接受的副作用时才可以进行调整。在第24周至第52周后,允许一次性剂量减少;否则,只有当受试者出现不可接受的副作用时,才能改变NSAID和其他止痛药的处方。在第16周时,符合早期脱离资格的受试者可能一次性开始NSAID或NSAID剂量增加。

[0709] 允许使用包括辣椒素和双氯芬酸的局部止痛药。

[0710] 7. 用口服皮质类固醇治疗的受试者在首次施用研究试剂之前应该每天接受相当于 $\leq 10\text{mg}$ 泼尼松的稳定剂量至少2周,并至第24周继续接受该剂量。在第24周和至第52周后,允许口服皮质类固醇一次性剂量减少;否则,只有当受试者出现不可接受的副作用时,研究者可自行决定改变口服皮质类固醇的剂量和类型。在第16周时,有资格早期脱离的受试者可能一次性开始或增加其口服皮质类固醇剂量(泼尼松最大总剂量 $10\text{mg}/\text{天}$ 或等效物)。在首次施用研究试剂之前4周内不允许硬膜外、IM或IV施用皮质类固醇,并且在整个研究期间不允许用于治疗PsA。在研究除PsA以外的适应症期间,应尽一切努力避免使用硬膜外、IM和IV皮质类固醇。在整个研究期间,不允许长期(>2 周)口服或IV皮质类固醇用于除PsA以外的适应症。用于除PsA以外适应症的短期(≤ 2 周)口服、IV、IM或硬膜外皮质类固醇应限于治疗医师认为没有足够替代品的情况。

[0711] 在首次施用研究试剂之前4周内不应施用关节内类固醇。应该尝试避免关节内注射皮质类固醇,特别是在研究的前24周期间。然而,如果需要,受试者可以在研究的60周期间在不超过2个受影响的部位接受最多2次关节内、腱鞘或法氏囊皮质类固醇注射。

[0712] 8. 至第60周,禁止使用可能影响PsA疾病活动或评估的补充疗法,包括但不限于传统医学(例如,中医、针灸、阿育吠陀医学)。

[0713] 治疗分配和盲法

[0714] 将使用交互式网络响应系统(IWRS)随机分配有资格的受试者,以在第0周时以盲法接收固定剂量的戈利木单抗 $2\text{mg}/\text{kg}$ 或安慰剂。治疗组的受试者分配将使用分层块随机化方法以1:1的比例与2个治疗组中的1个完成。分层因素是地理区域和基线MTX使用(是或否)。这将确保每个地理区域内的受试者数量的相对治疗平衡,并且使用基线MTX。

[0715] 分配到戈利木单抗的受试者将至第52周接受 $2\text{mg}/\text{kg}$ 。在第16周时,所有符合早期脱离资格的受试者将被允许进行以下伴随药物干预中的一项,由研究者选择:他们的皮质类固醇剂量增加(最大总剂量泼尼松 $10\text{毫克}/\text{天}$,或等效物)、MTX剂量增加(最大总剂量 25毫

克/周)或NSAID剂量增加、或开始使用NSAID、皮质类固醇(最大剂量泼尼松10mg/天或等效物)、MTX(最大剂量25mg/周)、SSZ(最大剂量3g/天)、HCQ(最大剂量400毫克/天)或来氟米特(最大剂量20毫克/天)。对于符合第24周访视早期脱离资格的受试者,应完成对稳定剂量的那些药物的滴定。

[0716] 分配给安慰剂组的受试者将在第24周时交叉至2mg/kg戈利木单抗组,并且将在第24周、第28周和q8w至第52周时接受戈利木单抗2mg/kg。戈利木单抗IV治疗组中的受试者将继续以相同剂量接受戈利木单抗IV输注。另外,戈利木单抗IV治疗组的受试者将在第24周时接受IV安慰剂以维持不知情。在整个研究中,受试者和研究性研究部位将对初始指定的治疗组保持不知情。

[0717] 在正常情况下,不知情不应该为个别受试者打破,直到60周DBL。否则,只有通过了解受试者的治疗状态才能确定具体的紧急治疗/行动方案,才能打破不知情。在紧急情况下,研究者可以从IWRS确定治疗的身份。如果可能,建议研究员与赞助人或其指定人员联系,讨论具体情况。与赞助人或其指定人员保持每周7天、每天24小时的电话联系。如果不知情被打破,必须尽快通知赞助人。揭盲的日期和原因必须由eCRF中的现场人员和源文档记录。还建议研究者不要向研究地点或赞助人透露研究治疗任务。

[0718] 预期治疗任务揭盲的受试者将继续返回进行预定的评价。应与研究主管医师讨论进一步的研究试剂施用。在第24周DBL,当受试者仍在参与本研究时,数据将被揭盲以供有限的赞助人分析。在揭盲之前,将记录能够访问的不知情受试者级数据的赞助人的身份。在第60周数据库被锁定之前,研究性研究地点和受试者将对初始治疗分配保持不知情。

[0719] 可能会对治疗分配不知情的数据(即研究药剂血清浓度,研究药剂抗体,治疗分配和研究药剂制剂/责任数据)将特别小心处理,以便在揭盲之前,此类数据仅供数据管理人员用于数据清理,并且如果适用,供临床药理学代表用于执行药代动力学和抗戈利木单抗分析的抗体,并且供质量保证代表用于进行独立的药物审核。

[0720] 给定受试者的治疗任务可以向赞助人、IRB/EC和现场人员揭盲,以满足监管报告要求。

[0721] 剂量和施用

[0722] 给药方案和盲法

[0723] 在第一次输注研究试剂之前,受试者将以1:1的比例随机分配至以下2个治疗组中的1个:

[0724] 第I组(n=220):受试者将在第0周、第4周、第12周和第20周时接受IV安慰剂输注。受试者将在第24周时交叉至IV戈利木单抗2mg/kg组,并在第24周、第28周和之后q8w时接受施用。

[0725] 第II组(n=220):受试者将在第0周、第4周和之后q8w时接受IV戈利木单抗2mg/kg。受试者将在第24周时接受IV安慰剂输注以维持不知情。

[0726] 注意:所有输注将在30分钟±10分钟内完成。

[0727] 早期脱离

[0728] 在第16周时,第I组和第II组的所有受试者在压痛和肿胀关节数两者中相对于基线的改善<5%将以双盲法进入早期脱离。在第16周时,所有符合早期脱离资格的受试者将被允许进行以下伴随药物干预中的一项,由研究者选择:他们的皮质类固醇剂量增加(最大

总剂量泼尼松10毫克/天,或等效物)、MTX剂量增加(最大总剂量25毫克/周)或NSAID剂量增加、或开始使用NSAID、皮质类固醇(最大剂量泼尼松10mg/天或等效物)、MTX(最大剂量25mg/周)、SSZ(最大剂量3g/天)、HCQ(最大剂量400毫克/天)或来氟米特(最大剂量20毫克/天)。对于符合第24周访视早期脱离资格的受试者,应完成对稳定剂量的那些药物的滴定。

[0729] 研究试剂施用和计时

[0730] 除了第4周、第12周、第14周、第16周和第24周访视之外,所有后基线访视可以在整个研究中指示的一周±7天发生,其可以在指示的一周±4天发生。如果无法观察到推荐的可接受窗口,则在安排访视之前必须联系赞助人。

[0731] 研究前和伴随疗法

[0732] 应尽一切努力使受试者的伴随药物至第24周或以下各节中规定的情况下保持稳定。由于实验室的异常值、副作用、并发疾病或外科手术的表现,可能会减少伴随药物剂量或药物暂时中断,但变化和变化的原因应在受试者的病历中明确记录。

[0733] 受试者在研究期间不应在PsA进行任何新的治疗,除非在第16周时有资格进行早期脱离的受试者。

[0734] 在时间和事件时间表中确定的研究访问中将进行伴随药物审查。

[0735] 甲氨蝶呤

[0736] 允许受试者进入稳定剂量的MTX进行研究。

[0737] 如果受试者使用MTX,则应在首次施用研究试剂之前至少3个月开始治疗。在首次施用研究试剂之前,MTX施用途径和剂量≤25mg/周应该稳定至少4周。建议在本研究中服用MTX的所有受试者每周至少接受5mg口服叶酸或5mg亚叶酸。

[0738] 未接受MTX治疗的受试者必须在首次施用研究试剂之前停止治疗至少4周,并且至第60周不得接受MTX治疗。SIMPONI IV(戈利木单抗)临床方案CNT0148PSA3001,修订245批准,2016年6月29日有资格在第16周时获得早期脱离的受试者例外。在第16周时,有资格早期脱离的受试者可以开始或一次性增加他们的MTX剂量(最大总剂量25mg/周)。

[0739] 对于开始MTX的受试者,应通过第24周访视完成滴定至稳定剂量。对于接受MTX的受试者,应尽一切努力在本研究的至第60周维持该药物的稳定剂量和施用途径。然而,在毒性的情况下可以降低MTX的剂量。试验中心文件中包含MTX毒性情况下的剂量调整指南。

[0740] 皮质类固醇

[0741] 用口服皮质类固醇治疗PsA的受试者在首次施用研究试剂之前应该每天接受相当于≤10mg泼尼松的稳定剂量至少2周,并且至第60周继续接受该剂量。未在基线时用口服皮质类固醇治疗的受试者必须在首次施用研究试剂之前至少2周停用口服皮质类固醇,并且他们必须至第60周不接受口服皮质类固醇用于PsA。

[0742] 有资格在第16周时获得早期脱离的受试者例外。在第16周时,有资格早期脱离的受试者可以开始或一次性增加其口服皮质类固醇剂量(泼尼松最大总剂量10mg/天或等效物)。

[0743] 在第24周和至第60周后,允许口服皮质类固醇一次性剂量减少;否则,只有当受试者出现不可接受的副作用时,研究者可自行决定改变口服皮质类固醇的剂量和类型。

[0744] 在整个研究中不允许静脉注射、肌肉注射或硬膜外施用皮质类固醇用于治疗PsA。

[0745] 在整个研究期间,不允许长期(>2周)口服或IV皮质类固醇用于除PsA以外的适应

症。用于除PsA以外适应症的短期(≤ 2 周)口服、IV、IM或硬膜外皮质类固醇应限于治疗医师认为没有足够替代品的情况。在整个研究过程中允许吸入、耳、眼、鼻内和其他粘膜递送皮质类固醇的途径。

[0746] 应该尝试避免关节内注射皮质类固醇,特别是在研究的前24周期间。然而,如果需要,受试者可以在研究的60周期间在不超过2个受影响的部位接受最多2次关节内、腱鞘或法氏囊皮质类固醇注射。在单个关节中严重压痛或肿胀的情况下,建议在接受关节内皮质类固醇注射之前评价受试者的感染。

[0747] 非甾体类抗炎药和其他止痛药

[0748] 允许使用稳定剂量的NSAID和其他止痛药。

[0749] 用NSAID治疗的受试者,包括阿司匹林和选择性环氧合酶-2抑制剂,以及其他止痛药,应该接受在进行本研究的国家批准的通常市售剂量,并且应该在首次施用研究试剂之前至少2周处于稳定剂量。至第24周,只有当受试者出现不可接受的副作用时,NSAID和其他止痛药的剂量和类型才可能改变。

[0750] 有资格在第16周时获得早期脱离的受试者例外。在第16周时,有资格早期脱离的受试者可以开始或一次性增加他们的NSAID剂量对于开始NSAID的受试者,应通过第24周访视完成滴定至稳定剂量。

[0751] 在第24周和至第60周后,允许一次性剂量减少;否则,只有当受试者出现不可接受的副作用时,才能改变NSAID和其他止痛药的处方。

[0752] 允许使用包括辣椒素和双氯芬酸的局部止痛药。

[0753] 在这项试验中,阿司匹林被认为是一种NSAID,除了用于心血管或脑血管疾病的低剂量阿司匹林。

[0754] 疾病修饰抗风湿性药物/全身免疫抑制药物

[0755] 除MTX外,必须在首次施用研究试剂前至少4周停用疾病修饰抗风湿性药/全身免疫抑制剂,并且至第60周禁止使用。这些DMARD包括但不限于SSZ、HCQ、金制剂、青霉胺和来氟米特。如果受试者在首次施用研究试剂之前3个月内接受来氟米特,则受试者必须经历药物消除程序。

[0756] 有资格获得早期脱离的受试者例外。在第16周时,有资格早期脱离的受试者可以一次性开始SSZ(最大剂量3g/天)、HCQ(最大剂量400mg/天)或来氟米特(最大剂量20mg/天)。对于开始SSZ、HCQ或来氟米特的受试者,应在第24周访视时完成滴定至稳定剂量。

[0757] 通过至第60周禁用的全身免疫抑制药物包括但不限于环孢菌素、他克莫司、麦考酚酸莫酯和硫唑嘌呤。全身SIMPONI IV(戈利木单抗)临床方案CNT0148PSA3001修订247批准,2016年6月29日免疫抑制剂不涉及皮质类固醇。

[0758] 生物制剂、细胞毒性药物或研究试剂

[0759] 在本研究的60周期间不允许使用生物制剂(例如,SC戈利木单抗、阿那白滞素,依那西普、阿达木单抗、英夫利昔单抗、阿法西普、依法利珠单抗、利妥昔单抗、那他珠单抗)、细胞毒性剂(例如,苯丁酸氮芥、环磷酰胺、氮芥子气、其他烷基化剂)或研究药物。如果使用这些药物中的任一种,受试者将停止进一步的研究试剂输注。

[0760] 补充疗法

[0761] 在本研究的60周期间,不允许使用补充疗法,包括阿育吠陀医学、传统中药或诸如

针灸的非药物治疗。

[0762] 局部疗法和紫外线B光

[0763] 至第24周不允许同时使用局部药物/治疗银屑病(例如,皮质类固醇角质层分离[除了水杨酸洗发水在整个研究中允许]、煤焦油[除了煤焦油洗发水在整个研究中允许]、蒽林、维生素D3类似物、局部他克莫司和类视色素。

[0764] 受试者在研究访视前的早晨期间不应使用含有水杨酸和焦油的洗发水。非药物洗发水可在访视当天使用。

[0765] 在第24周输注后,可以使用包括病灶内皮质类固醇的局部疗法,除了高效和超高效皮质类固醇(I类和II类)。至第60周不允许使用UVB或晒黑床。应鼓励受试者避免在研究期间长时间暴露在阳光下。

[0766] 银屑病的全身疗法

[0767] 至第60周不允许同时使用银屑病的全身疗法(例如,补骨脂素与紫外线A[PUVA]、系统性类视色素、环孢菌素或他克莫司)。必须在首次施用研究试剂之前至少4周停止使用全身性抗银屑病疗法。

[0768] 研究评价

[0769] 研究程序

[0770] 概览

[0771] 对于仅具有生育潜力的妇女,可以根据研究者确定或当地法规要求执行附加的血清或尿液妊娠测试,以确定在受试者参与本研究期间的任何时间没有怀孕。还可以根据研究者确定或当地法规要求执行附加TB测试。

[0772] 所有访问特定的PRO评估应在该访视的任何测试、程序或其他咨询之前进行,以防止影响受试者的感知。有关附加详细信息,请参阅PRO用户手册。

[0773] 除非在后勤方面不可行,否则应尽一切努力按时间和事件时间表中指定的顺序执行所有其他评估,并且如果可能,相同的个人应在每次访视时执行评估。

[0774] 将从所有受试者处收集用于分析药效学标记物和全血(用于基因表达分析)的血清。在第0周和第24周时,仅从同意参与本研究的任选药物基因组学(DNA)成分的受试者处收集用于DNA分析的全血样本。只有当地法规允许,才会收集用于DNA分析的血液样本。有关收集和处理药物基因组学研究的血液样本的详细信息,请参阅“药物基因组学样本收集和运输程序的实验室参考手册”。在DNA提取失败的情况下,可以从受试者处请求替代药物基因组学血液样本。签署知情同意书将需要获得替代样本。

[0775] 在本研究中从每个受试者处收集的总血液体积中大约253mL将用于主要研究,并且20mL用于任选DNA测试。

[0776] 出于安全原因或样本的技术问题,可能会采取重复或非计划的样本。

[0777] 筛选阶段

[0778] 在获得书面知情同意后,并且在随机化前6周的时间段内,将执行所有筛查评价。筛查访视可分为超过1次访视。例如,在获得知情同意后,研究者将在首次访视时完成所有实验室检查。只有当受试者符合中心实验室测试结果确定的研究资格时,受试者才会返回其余的筛查程序。符合所有纳入标准且没有排除标准的受试者将参加本研究。应尽一切努力遵守每个受试者的研究时间和事件时间表。受试者必须提供单独的书面药物基因组学知

情同意书,以参与本研究的任选药物基因组学研究成分。

[0779] 具有生育潜力的妇女必须在筛查时进行阴性血清妊娠测试,并在随机化前进行阴性尿妊娠测试。具有生育潜力的妇女和能够生育孩子的男性两者必须同意使用高效的避孕方法,并在本研究期间和4个月后继续使用避孕措施。必须记录每个受试者使用的避孕方法。

[0780] 在筛查时将在本地执行12导联ECG,以确保在研究期间由于任何原因受试者需要ECG,在首次研究试剂施用之前的ECG可用于比较以检测变化。

[0781] 胸部X光片(后-前[PA])将在筛查时执行,以确保受试者没有任何异常提示恶性肿瘤或当前活动性感染,包括TB。可以使用在首次施用研究试剂之前3个月拍摄的胸部X光胶片。

[0782] 受试者必须经历TB测试,并且其病史评估必须包括有关TB病史或已知职业或其他个人接触活动性TB人员的具体问题。应询问受试者过去的TB测试,包括胸部X光片检查结果和对结核菌素皮肤或其他TB测试的反应。

[0783] 具有阴性 QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果的受试者(以及在未批准/注册 QuantiFERON[®]-TB Gold测试或TST由当地卫生部门强制执行的国家中的TST结果为阴性)有资格继续进行预随机化程序。具有新鉴定的阳性 QuantiFERON[®]-TB Gold测试(或TST)结果的受试者必须经历评价,以排除活动性TB,并在施用第一剂研究试剂之前开始对潜伏性TB的适当治疗。目前接受潜伏性TB治疗的受试者、没有活动性TB的证据,或者有潜伏性TB病史,并且在首次施用研究试剂之前的5年内完成了对潜伏性TB的适当治疗的记录例外。这些受试者在筛查期间不需要使用 QuantiFERON[®]-TB Gold测试(或TST)进行重新测试。根据当地国家对免疫功能低下患者的指南,对潜伏性TB进行适当治疗。如果不存在针对免疫功能低下患者的当地国家指南,则必须遵循美国指南或必须将受试者排除在研究之外。研究者有责任核实先前抗TB治疗的充分性并提供适当的文件。

[0784] 首次 QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果不确定的受试者应重复测试。如果排除活动性TB,他们的胸部X光片显示没有提示TB(活动性或旧的,非活动性TB)的异常,并且受试者没有由研究者确定的TB的附加风险因素,则在第二次 QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果也不确定的情况下,可以在未接受潜伏性TB治疗的情况下登记受试者。必须立即向赞助人的医疗监督员报告此决定,并将其记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。

[0785] 复检

[0786] 对异常筛查实验室血液测试和导致排除的CRP水平进行复检仅允许在筛查时间段期间使用非计划访视(重新评估资格)。

[0787] 治疗阶段

[0788] 治疗阶段包括安慰剂对照和积极治疗阶段。在第0周时,有资格的受试者将被随机分配接受2种治疗中的1种:戈利木单抗IV 2mg/kg或安慰剂IV。

[0789] 疗效

[0790] 银屑病关节炎反应评价

[0791] 关节评估

[0792] 将评价68个关节中的每一个的压痛度,并评价66个关节中的每一个的肿胀(排除臀部的肿胀)。如时间和事件时间表中所示,将在访视时检查所有关节。

[0793] 将在每个研究地点指定一名独立的关节评估员(IJA),他们在执行关节评估方面具有足够的训练和经验,以执行所有关节评估,以及指趾炎和肌腱端炎评估。强烈建议对受试者执行基线关节评估的同一IJA也应在至第52周的每次随后访视中对该受试者执行关节评估。

[0794] 在每个地点筛查第一个受试者之前,赞助人将为每个地点指定的IJA提供培训。备用IJA必须在对受试者的研究访视执行关节评估之前完成培训。

[0795] 如果IJA在过去3年内在之前的临床研究中由赞助人进行了培训,并且有足够的培训证明(认证),则该培训将被认为适合本研究;然而,鼓励在开始试验之前重复进行培训。应在研究地点维护每个IJA的培训文档。

[0796] 所有在一个地点执行关节评价的IJA必须列在研究站点的授权日志中,并且应在每次访视时记录在源文档中。

[0797] 在第24周后,关节评估员不再需要独立。然而,建议在研究期间不要更改关节评估员。

[0798] 无法评价的关节

[0799] 如果在身体上不能评估关节,则IJA仅应将关节指定为“无法评价”(即由于浇筑而导致的关节不能进入、由于截肢而不存在关节、关节变形以致不能评估)。在所有其他情况下,IJA应评估每个关节的压痛和肿胀(排除臀部的肿胀)。无论先前手术(例如,疤痕)的任何视觉指示或他们可能具有受试者先前的关节手术/注射的知识(例如,如果受试者是参与研究之前的IJA患者),则应该完成这一点。

[0800] 美国风湿病学会的响应

[0801] 美国风湿病学会的响应被作为多种疾病评估标准改善的数字测量来示出。例如,ACR 20响应¹⁰定义为:

[0802] 1. 肿胀关节数(66个关节)和压痛关节数(68个关节)的基线改善 $\geq 20\%$,

[0803] 和

[0804] 2. 在以下5项评估中的3项中,与基线相比有 $\geq 20\%$ 的改善:

[0805] • 患者对疼痛的评估(VAS)

[0806] • 患者对疾病活动性的总体评估(VAS)

[0807] • 医师对疾病活动性的总体评估(VAS)

[0808] • 患者对由HAQ-DI所测量的身体功能的评估

[0809] • CRP

[0810] 类似地定义ACR 50、ACR 70和ACR 90,除了从基线的改善阈值分别为50%、70%和90%。

[0811] 指趾炎评估

[0812] 使用0至3的评分系统(0-无指趾炎,1-轻度指趾炎,2-中度指趾炎,3-重度指趾炎),用手和脚两者评估指趾炎的存在和严重程度^{15,16}。

[0813] IJA将执行所有指趾炎评估。赞助人将提供指趾炎评估培训。该培训的文档将保留在研究地点的培训文件中。

[0814] 肌腱端炎评估

[0815] 使用利兹肌腱端炎指数 (LEI) 评估肌腱端炎¹⁸。LEI的开发是为了评估PsA受试者的肌腱端炎,并通过对以下因素施加局部压力来评价疼痛的存在与否:

[0816] • 侧肘上髌,左和右

[0817] • 股骨内侧髌,左和右

[0818] • 跟腱插入,左和右

[0819] IJA将执行所有肌腱端炎评估。赞助人将提供肌腱端炎评估培训。该培训的文档将保留在研究地点的培训文件中。

[0820] 成像评价

[0821] 修正的总van der Heijde-Sharp (vdH-S) 评分是原始的vdH-S评分²⁸,通过添加手的DIP关节和评估杯中的铅笔以及严重的骨质溶解畸形来修改PsA放射损伤评估。关节侵蚀评分是40个手部关节和12个足部关节的侵蚀严重性的汇总。根据涉及的表面积,从表示无侵蚀的0至表示来自多于一半的关节骨中的广泛骨丢失的5,评定每个手部关节。因为在这个量表上评定足部关节的每个侧面,所以一个足部关节的最大侵蚀评分是10。因此,最大侵蚀评分是320。关节间隙狭窄 (JSN) 评分汇总了40个手部关节和12个足部关节中JSN的严重性。JSN的评估从0分至4分,0表示无JSN并且4表示关节间隙彻底丧失、骨性强直、或完全脱臼。因此,最大JSN评分是208,并且528是可能的PsA的最差修正的总vdH-S评分。

[0822] 手部(后前方)和足部(前后方)的单张射线照片将在访视时执行,以尽量减少不必要的X射线,建议受试者在检查纳入标准和排除标准后进行手部和足部基线射线检查,并且受试者似乎有资格进入研究。必须在随机化之前拍摄基线射线照片。建议这些射线照片在随机化前约2周执行,以允许留出时间来解决任何有关射线照片质量的潜在问题。符合EE条件的受试者将在第16周和第24周时收集射线照片。不符合EE条件的受试者将在第24周时拍摄射线照片。所有受试者将在第52周时拍摄射线照片。所有射线照片将在预定访视的±2周内拍摄。

[0823] 对于在第52周之前永久停止研究试剂的受试者,应在停止研究试剂时执行手部和足部的射线照片。如果在过去6周内获得另一组射线照片,则不需要执行这些手部和足部的射线照片。

[0824] 射线照片将由中央独立读者评价。将有2个阅读活动:阅读活动1将包括第0周、第16周(对于进入早期脱离的受试者)和第24周(和/或第24周之前的研究试剂停止访视);阅读活动2将包括第0周、第24周和第52周,数据或研究试剂在第24周之后但在第52周之前停止访视。

[0825] 有关采集射线照片的详细信息将在成像手册中提供。

[0826] 健康评估问卷的残疾指数

[0827] HAQ-DI将评估受试者的功能状态¹³。这是一个20个问题的工具,用于评估一个人在8个功能领域(穿衣、起床、吃饭、走路、卫生、伸手、抓握和日常生活活动)中完成任务的难度。每个功能领域中的响应从0开始,表示没有困难,到3,表示不能在该领域中执行任务(即,较低的分数表示更好的功能)。已评价该评估的特性,并确定其在PsA中的有效性¹⁹。它也被证明对受试者疾病的变化有反应²²。在PsA中,确定评分降低0.30表明有意义的改善²¹。

[0828] 最小疾病活动

[0829] PsA最小疾病活动 (MDA) 标准是PsA中使用的7种结果测量的综合。如果受试者满足7项结果指标中的5项,则将其分类为实现MDA:压痛关节数 ≤ 1 ;肿胀关节数 ≤ 1 ;银屑病活动和严重程度指数 ≤ 1 或体表面积 ≤ 3 ;患者疼痛视觉模拟评分 (VAS) 评分 ≤ 15 ;患者总体疾病活动VAS评分 ≤ 20 ;健康评估问卷 (HAQ) 评分 ≤ 0.5 ;以及压投界点 $\leq 1^6$ 。

[0830] 36项短期健康调查

[0831] 医学成果研究健康测量SF-36问卷是作为兰德健康保险实验的一部分开发的,由8个多项目量表组成:

- [0832] • 由于健康问题导致的身体功能受限;
- [0833] • 由于身体健康问题导致的通常角色活动受限;
- [0834] • 身体疼痛;
- [0835] • 一般心理健康(心理困扰和健康);
- [0836] • 由于个人或情感问题导致的通常角色活动受限;
- [0837] • 由于身体或精神健康问题导致的社交功能受限;
- [0838] • 活力(能量和疲劳);
- [0839] • 一般健康感知。

[0840] 这些量表的评分从0到100,评分越高表示健康状况越好。另一种算法产生2个汇总评分,生理成分汇总 (PCS) 和心理成分汇总 (MCS)。这些汇总评分也用更高的评分表示更好的健康,但是使用基于规范的系统进行评分,其中执行线性变换以基于一般的美国人口规范将评分转换为平均值50和标准差10³⁴。由SF-36测量的概念并非特定于任何年龄、疾病或治疗组,从而允许比较不同疾病的相对负担和不同治疗的相对有益效果³³。

[0841] 银屑病响应评价

[0842] 银屑病面积和严重程度指数

[0843] PASI是用于评定与分级银屑病性损害的严重性和其疗法响应的系统¹²。PASI产生可在0至72范围内的数字分数。PASI 50响应定义为PASI评分从基线开始改善 $\geq 50\%$;类似地定义PASI 75和PASI 90。

[0844] 应尽一切努力确保对基线受试者进行PASI评价的医师或指定人员也应在随后的所有访视中对该受试者执行PASI。赞助人将提供PASI培训。该培训的文档将保留在该地点的培训文件中。

[0845] 终点

[0846] 主要终点

[0847] 本研究的主要终点是在第14周时实现ACR 20响应的受试者的比例。

[0848] 如果与安慰剂组相比,在第14周时ACR 20的受试者的比例在戈利木单抗组中被证实在统计意义上显著更大,则该研究将被认为是阳性的。

[0849] 重要次要终点

[0850] 以下重要次要终点按重要性顺序列出,如下所示:

- [0851] 1. 在第14周时HAQ-DI评分与基线的变化。
- [0852] 2. 在第14周时实现ACR 50响应的受试者比例。
- [0853] 3. 在第14周时实现PASI 75响应的受试者(基线 $\geq 3\%$ BSA银屑病累及)的比例。
- [0854] 4. 在第24周时修正的总vdH-S评分与基线的变化。

[0855] 其他次要终点

[0856] 对照次要终点 (控制多重性的I类错误率)。

[0857] 除了主要和重要次要终点之外,还将分析以下对照次要终点,并按重要性顺序列出,如下所示:

[0858] 1. 在第14周时,在基线时患有肌腱端炎的受试者中,肌腱端炎评分与基线的变化。

[0859] 2. 在第14周时,在基线时患有指趾炎的受试者中,指趾炎评分与基线的变化。

[0860] 3. 在第14周时,SF-36 PCS与基线的变化。

[0861] 4. 在第24周时实现ACR 50响应的受试者比例。

[0862] 5. 在第14周时实现ACR 70响应的受试者比例。

[0863] 6. 在第14周时,SF-36 MCS与基线的变化。

[0864] 为了控制多重性,仅当主要和所有重要次要终点实现统计意义上的显著性时,才按照上述顺序依次测试上述终点。否则,将提供标称p值。

[0865] 其他次要终点包括

[0866] 除了主要、重要次要和对照次要终点之外,还将评价以下终点:

[0867] 与减少体征和症状及身体机能相关的终点

[0868] 1. 在第2周时实现ACR 20响应的受试者比例。

[0869] 2. 随着时间的推移实现ACR 20、ACR 50、ACR 70和ACR 90响应的受试者的比例。

[0870] 3. 随着时间的推移,ACR响应成分与基线的变化。

[0871] 4. 随着时间的推移,在ACR响应的每个成分中实现 $\geq 20\%$ 、 $\geq 50\%$ 、 $\geq 70\%$ 和 $\geq 90\%$ 改善的受试者的比例

[0872] 5. 随着时间的推移,HAQ-DI评分与基线的变化。

[0873] 6. 随着时间的推移,HAQ-DI评分对PsA受试者(≥ 0.3 改善)实现临床意义上的改善的受试者比例。

[0874] 7. 在基线时,患有指趾炎的受试者的指趾炎评分与基线的变化,以及随着时间的推移具有指趾炎指数的受试者的比例。

[0875] 8. 在基线时,患有肌腱端炎的受试者中的肌腱端炎评分与基线的变化,以及随着时间的推移具有肌腱端炎的受试者的比例。

[0876] 9. 在第52周时实现ACR 20响应的受试者在第24周时实现ACR响应的受试者中的比例。ACR 50、70和90响应者的类似终点也将进行评价。

[0877] 10. 在第24周时实现HAQ-DI响应的受试者中在第52周时实现HAQ-DI响应(受试者的HAQ-DI评分改善 ≥ 0.3)的受试者的比例。

[0878] 11. 随着时间的推移,实现MDA的受试者比例。

[0879] 与皮肤疾病相关的终点包括

[0880] 1. 对于基线时BSA银屑病皮肤累及 $\geq 3\%$ 的受试者,从总体基线随着时间的推移实现 $\geq 50\%$ 、 $\geq 75\%$ 、 $\geq 90\%$ 和100%PASI的受试者的比例,以及基线MTX使用。

[0881] 2. 对于在基线时具有 $\geq 3\%$ BSA银屑病皮肤累及的受试者,随着时间的推移PASI从基线的改善。

[0882] 3. 对于在基线时具有 $\geq 3\%$ BSA银屑病皮肤累及的受试者,随着时间的推移实现PASI 75和ACR 20响应的受试者的比例。

[0883] 4. 对于在基线时BSA银屑病皮肤累及 $\geq 3\%$ 的受试者,随着时间的推移实现PASI 50和DLQI改善 ≥ 5 两者的受试者的比例。

[0884] 5. 对于在基线时具有 $\geq 3\%$ BSA银屑病皮肤累及的受试者,随着时间的推移实现PASI 75和修改的PsARC响应两者的受试者的比例。

[0885] 与关节结构损伤相关的终点包括

[0886] 对于结构损伤终点,将有2个阅读活动:阅读活动1将在第24周时对分析做出贡献,阅读活动2将在第52周时对分析做出贡献。

[0887] 1. 在第24周时,修正的总vdH-S评分 ≤ 0 中基线变化的受试者比例。

[0888] 2. 在第24周和第52周时修正的总vdH-S评分与基线的变化。

[0889] 3. 从第24周到第52周、从第0周到第24周修正的总vdH-S评分的变化。在第24周和第52周时,按区域(手部、足部)的修正的总vdH-S评分与基线的变化。

[0890] 4. 在第24周和第52周时,按损伤类型(侵蚀和JSN)的修正vdH-S评分与基线的变化。

[0891] 5. 在基线时,第24周和第52周维持关节无损伤状态(修正的总vdH-S评分为0,侵蚀评分为0或JSN评分为0)的受试者数量。

[0892] 6. 在第24周和第52周时,在修正的总vdH-S评分 ≤ 0 或 ≤ 0.5 的基线变化的受试者数量。

[0893] 与健康相关的生活质量相关的终点包括

[0894] 1. PCS评分与基线的变化,以及随着时间的推移,SF-36的MCS评分的变化。

[0895] 2. 随着时间的推移,SF-36量表与基线的变化。

[0896] 3. 随着时间的推移,SF-36 PCS评分改善 ≥ 5 的受试者比例。

[0897] 4. 随着时间的推移,SF-36 MCS评分改善 ≥ 5 的受试者比例。

[0898] 受试者完成/退出

[0899] 完成

[0900] 如果受试者在本研究的第60周时完成评估,则认为他或她已完成研究。因任何原因过早停止研究治疗的受试者将不被视为已完成研究。

[0901] 研究治疗的停止

[0902] 如果必须在治疗方案结束前停止受试者的研究治疗,则不会导致受试者自动退出本研究。

[0903] 如果受试者在第52周或之前停止研究试剂施用,则他/她必须返回特定疗效和最终安全访视。

[0904] 如果发生以下情况中的任一种,必须永久停止研究试剂施用:

[0905] • 在研究时间段内或在最后一次研究试剂施用后4个月内怀孕或计划怀孕。

[0906] • 导致支气管痉挛的反应伴有需要呼吸机支持的喘息和/或呼吸困难,或者在研究试剂施用后发生的症状性低血压。

[0907] • 在输注研究试剂后1至14天发生导致肌痛和/或关节痛的反应,伴有发热和/或皮疹(提示血清病并且不代表其他公认的临床综合征的体征和症状)。这些可伴有其他事件,包括瘙痒、面部、手部或唇水肿、吞咽困难、荨麻疹、喉咙痛和/或头痛。

[0908] • 机会性感染。

- [0909] • 恶性肿瘤,不包括非黑色素瘤皮肤癌。
- [0910] • CHF。
- [0911] • 脱髓鞘疾病。
- [0912] • 根据以下TB筛查标准,受试者被视为不合格:
- [0913] -进行活动性TB的诊断。
- [0914] -接受潜伏性TB治疗的受试者过早地停止该治疗或不顺从该治疗。
- [0915] -根据随访评估问题和/或体格检查,受试者具有提示活动性TB的症状,或者最近与患有活动性TB的人有密切接触,并且不能或不会继续经历附加评价。
- [0916] -经历持续评价的受试者胸部X光片显示当前活动性TB和/或 QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果阳性(并且/或者在未经批准/注册 QuantiFERON[®]-TB Gold测试或TST由当地卫生部门强制要求的国家/地区获得阳性TST结果),除非可以排除活动性TB,并且可以在下次施用研究试剂之前开始对潜伏性TB进行适当的治疗并继续完成。如果排除活动性TB,他们的胸部X光片显示没有提示TB(活动性或旧的,非活动性TB)的异常,并且受试者没有由研究者确定的TB的附加风险因素,则具有持续不确定的 QuantiFERON[®]-TB Gold测试结果的受试者可以在不接受潜伏性TB治疗的情况下继续。必须立即向赞助人的医疗监督员报告此决定,并将其记录在受试者的源文档中,并由研究者起草。-接受潜伏性TB治疗的受试者过早地停止该治疗或不顺从该治疗。
- [0917] • 禁止使用方案的药物。
- [0918] • 研究者或赞助人的医疗监督员认为,出于安全原因,它符合受试者的最佳利益。
- [0919] 对于发生严重感染的受试者,必须考虑停止施用研究试剂。
- [0920] 退出研究
- [0921] 受试者将会由于以下原因中的任一种而退出研究:
- [0922] • 失去随访
- [0923] • 同意退出
- [0924] • 死亡
- [0925] 如果受试者失去随访,则研究地点人员必须做出一切合理的努力来联系受试者并确定停止/退出的原因。必须记录采取后续措施。
- [0926] 当受试者在完成研究之前退出时,退出的原因应记录在eCRF和源文档中。分配给被退出受试者的研究药物可能不会被分配给另一个受试者。退出的受试者不会被替换。如果受试者在治疗结束前停止研究试剂施用,则应获得治疗后评估。
- [0927] 在留在主要研究中时撤回对任选研究样本收集的参与
- [0928] 受试者可以在留在研究中时撤回对任选研究样本的同意。在此类情况下,任选的研究样本将被销毁。样本销毁过程将如上所述进行。
- [0929] 退出未来研究中的样本使用
- [0930] 受试者可以撤回对研究样本使用的同意在此类情况下,样本将在临床研究不再需要后被销毁。用于研究的样本保留的详细信息显示在主要的ICF和单独的ICF中,用于任选的研究样本。
- [0931] 统计方法

[0932] 简单描述性汇总统计,诸如连续变量的n、平均值、SD、中值、IQ范围、最小值和最大值,以及离散变量的计数和百分比将用于汇总大多数数据。

[0933] 除非另有说明,否则通过MTX在基线(是/否)使用分层的卡方检验或Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) 检验将用于比较分类变量,诸如对治疗有响应的受试者的比例。一般来讲,除非另有说明,否则将基线使用MTX疗法作为因子的ANOVA用于分析连续变量。所有统计测试将在 $\alpha=0.05$ (双侧) 下执行。如果终点被认为是非高斯的,则将使用范德瓦尔登正态评分,例如,在vdH-S中与基线的变化。除了统计分析之外,还可以使用图形数据显示(例如,线图)和受试者列表来汇总/呈现数据。

[0934] 除非另有说明,否则疗效和受试者基线分析将使用意向治疗群体(即,所有随机化的受试者)。包括在疗效分析中的受试者将根据其指定的治疗组进行汇总,无论他们是否接受指定的治疗。

[0935] 安全性和PK分析将包括接受至少一次研究治疗施用的所有受试者。

[0936] 受试者信息

[0937] 受试者的人口统计学数据(例如,年龄、种族、性别、身高、体重)和基线疾病特征(例如,疾病持续时间、关节数和CRP)将按治疗组进行汇总。

[0938] 样本尺寸确定

[0939] 样本尺寸估计基于赞助人最近的PsA研究数据,该研究使用生物制剂优特克单抗(由赞助人开发的抗IL12/23单克隆抗体)。在具有活性PsA的受试者中,优特克单抗(CNT01275PSA3001)的3期研究包括最小CRP标准并且代表更新的PsA群体。对于安慰剂组、优特克单抗45mg和90mg治疗组,CNT01275PSA3001研究的ACR 20响应在第24周时分别为22.8%、42.4%和49.5%。总共440名受试者,每个治疗组220名,将确保99%的功率,以检测第14周时治疗组之间响应者比例的显著差异,从而假设使用卡方检验,戈利木单抗2mg/kg组的ACR 20响应为40%,安慰剂组的响应为20%,双侧显著性水平为0.05(表6)。

[0940] 表6:功率计算的结果-具有ACR 20响应的受试者的比例

[0941]	每只胳膊样本尺寸	戈利木单抗组 20位响应者 ACR%	安慰剂组 20位响应者 ACR%	Δ	功率(%)
	220	0.25	0.10	0.15	98.7
	220	0.30	0.10	0.20	>99.9
	220	0.35	0.10	0.25	>99.9
	220	0.40	0.10	0.30	>99.9
	220	0.35	0.20	0.15	94.3
	220	0.40	0.20	0.20	99.6
	220	0.45	0.20	0.25	>99.9
	220	0.50	0.20	0.30	>99.9
	220	0.45	0.30	0.15	90.4
	220	0.50	0.30	0.20	99.1
	220	0.55	0.30	0.25	>99.9
	220	0.60	0.30	0.30	>99.9

[0942] 还针对每个方案执行了模拟,以计算检测第24周时修正的总vdH-S评分与基线的变化的显著差异的功率(表7)。

[0943] 在第24周时,在CNT01275PSA3001研究中,安慰剂组、优特克单抗45mg和90mg治疗组中,除极端异常值外的修正的总vdH-S评分与基线的平均值(标准偏差)变化分别为0.92(2.15)、0.28(1.94)和0.17(1.446)。假设安慰剂组的修正的总vdH-S评分与基线的平均变化分别为0.9,戈利木单抗2mg/kg组为0.35,并且对于每个治疗组的标准偏差为2,440名受试者(即每组220名)将产生90.7%的功率以检测显著性水平0.05(双侧)的显著差异。

[0944] 表7: 功率计算的结果-修正的总vdH-S评分与基线的变化

[0945]

Δ	安慰剂组平均变化	戈利木单抗组平均变化	功率(%)
0.30	0.90	0.60	40.2
0.35	0.90	0.55	52.3
0.45	0.90	0.45	75.1
0.50	0.90	0.40	84.1
0.55	0.90	0.35	90.7
0.60	0.90	0.30	94.8
0.65	0.90	0.25	97.2
0.70	0.90	0.20	98.7
0.75	0.90	0.15	99.5
0.80	0.90	0.10	99.8
0.85	0.90	0.05	99.9
0.90	0.90	0.00	>99.9
0.95	0.90	-0.05	>99.9
1.00	0.90	-0.10	>99.9

[0946] 期中分析

[0947] 没有计划进行期中分析。然而,独立数据监测委员会(DMC)将定期审查安全数据,以监测受试者的安全。

[0948] 疗效分析

[0949] 主要终点分析

[0950] 主要终点是在第14周时实现ACR 20响应的受试者的比例。

[0951] 将通过比较在治疗组之间在第14周时实现ACR 20响应的受试者的比例来评价关节炎的体征和症状的减轻。通过基线MTX使用(是或否)分层的Cochran-Mantel-Haenszel(CMH)检验将在0.05(双侧)的显著性水平下执行该分析。

[0952] 在该主要疗效分析中,来自所有随机化受试者的数据将根据其指定的治疗组进行分析,而不管其接受的实际治疗。如果受试者在第14周时具有至少1个ACR成分的数据,则将使用最后一个观察结果(LOCF)程序来估算缺失的ACR成分。如果受试者在第14周时没有所有ACR成分的数据,则受试者将被视为无响应者。另外,将应用治疗失败规则。

[0953] 可以进行具有修正的分析集和不同规则的灵敏度分析。

[0954] 另外,将执行亚组分析,以通过人口统计学特征、基线疾病特征和基线药物评价主要疗效终点的一致性。如果适当,还将提供亚组与治疗组之间的相互作用测试。

[0955] 重要次要分析

[0956] 以下重要次要分析将按重要性顺序执行,如下所示:

[0957] 1.将对在第14周时HAQ-DI评分与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0958] 2.将对在第14周时实现ACR 50响应的受试者的比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0959] 3.将对在第14周时实现PASI 75响应的受试者(基线 $\geq 3\%$ BSA银屑病累及)的比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0960] 4.将对在第24周时修正的总vdH-S评分与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0961] 由于只存在2个治疗组(1个统计学比较),因此不需要在每个疗效终点内调整多重性。

[0962] 为了控制多重性的I型错误率,仅当主要终点在0.05显著性水平(双侧)实现统计意义上的显著性时,才测试第一个重要次要终点。仅当主要终点和前面的重要次要终点在0.05显著性水平(双侧)具有统计意义的显著性时,才会测试随后的重要次要终点。

[0963] 对于在第24周时修正的总vdH-S评分与基线变化的重要次要终点,将包括具有基线修正的总vdH-S评分的所有随机化受试者的修正ITT群体包括在该分析中。将使用多重插补方法来估算缺失数据的第24周射线照片评分。无论受试者是否在第24周之前执行早期脱离或停止,还将使用第24周射线照片数据的灵敏度分析。

[0964] 其他计划的疗效分析

[0965] 对照次要终点分析(控制多重性的I型错误率)

[0966] 除了主要和重要次要分析之外,还将执行以下疗效分析:

[0967] 1.将对在基线时具有肌腱端炎的受试者中第14周时的肌腱端炎评分与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间比较。

[0968] 2.将对在基线时具有指趾炎的受试者中第14周时的指趾炎评分与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间比较。

[0969] 3.将对在第14周时SF-36 PCS与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0970] 4.将对在第24周时具有ACR 50响应的受试者的比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0971] 5.将对在第14周时实现ACR 70响应的受试者的比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0972] 6.将对在第14周时SF-36 MCS与基线的变化进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0973] 为了控制多重性,仅当主要和重要次要终点实现统计意义上的显著性时,才按照上述顺序依次执行上述分析。否则,将提供标称p值。

[0974] 其他次要终点的分析包括

[0975] 与减少体征和症状及身体机能相关的分析

[0976] 按治疗组汇总以下终点。如果未指定终点的访视,则至第52周将随着时间的推移进行汇总。治疗组之间的比较将在第24周之前和第24周时进行。

[0977] 1.在第2周时实现ACR 20响应的受试者的比例将按治疗组进行汇总,并在组之间进行比较。

[0978] 2. 在第24周时实现ACR 20、ACR 50、ACR 70和ACR 90响应的受试者比例。汇总将通过基线MTX使用和总体来完成。另外,这些终点也将使用观察到的数据进行汇总而无需估算。

[0979] 3. ACR响应成分中与基线的百分比变化将在治疗组之间的第14周和第24周时进行比较,并将随着时间的推移进行汇总。

[0980] 4. 将汇总每个治疗组随着时间的推移的HAQ-DI评分与基线的变化,并将在第24周时在治疗组之间进行比较。

[0981] 5. 将随着时间的推移,将汇总每个治疗组的HAQ-DI响应者 (HAQ-DI评分实现 ≥ 0.3 改善的受试者) 的比例,并将在第14周时与第24周时的治疗组之间进行比较。

[0982] 6. 对于每个治疗组,随着时间的推移汇总了在基线时具有指趾炎的受试者的指趾炎评分与基线的百分比变化和具有指趾炎的受试者的比例,并且第24周时在治疗组之间进行比较。

[0983] 7. 对于每个治疗组,随着时间的推移汇总了在基线时具有肌腱端炎的受试者的肌腱端炎评分与基线的百分比变化和具有肌腱端炎的受试者的比例,并且第24周时在治疗组之间进行比较。

[0984] 8. 在第52周时作为ACR 20响应者的受试者在第24周时的响应者中的比例将按治疗组进行汇总。将对ACR 50、70和90响应者执行类似的汇总。

[0985] 9. 在第52周时HAQ-DI响应者 (受试者在HAQ-DI评分方面实现 ≥ 0.3 改善) 的受试者在第24周时的响应者的受试者中的比例将按治疗组进行汇总。

[0986] 10. 对于每个治疗组,将随着时间的推移对实现MDA的受试者的比例进行汇总,并在第14周与第24周时的治疗组之间进行比较。

[0987] 与皮肤疾病相关的分析包括

[0988] 将执行以下分析:

[0989] 1. 对于在基线时 $\geq 3\%$ BSA银屑病皮肤累及的受试者,将对每个治疗组随着时间的推移从基线实现PSAI改善 $\geq 50\%$ 、 $\geq 75\%$ 、 $\geq 90\%$ 和100%的受试者比例进行总体汇总,并通过基线MTX使用,并在第14周时与第24周时的治疗组之间进行比较。

[0990] 2. 对于在基线时具有 $\geq 3\%$ BSA银屑病皮肤累及的受试者,将对每个治疗组随着时间的推移的PASI与基线的改善百分比进行汇总,并在第14周时与第24周时的治疗组之间进行比较。

[0991] 3. 对于在基线时具有 3% BSA银屑病皮肤累及的受试者,将对实现PASI 75和ACR 20响应的受试者比例进行汇总,并在第14周时与第24周时的治疗组之间进行比较。

[0992] 与关节结构损伤相关的分析包括

[0993] 在第24周时的分析将对来自阅读活动1的数据执行分析,在第52周时的分析将对来自阅读活动2的数据执行分析。

[0994] 将执行以下分析:

[0995] 1. 在第24周时,将对修正的总的vdH-S评分 ≤ 0 中基线变化的受试者比例进行汇总,并在治疗组之间进行比较。

[0996] 2. 按治疗组和早期脱离状态,将对在第24周和第52周时修正的总vdH-S评分与基线的变化进行汇总。

[0997] 3. 将在治疗组之间对第24周和第52周时修正的总vdH-S评分与基线的变化进行比较。

[0998] 4. 第0周至第24周以及第24周至第52周修正的总vdH-S评分的变化将按治疗组和早期脱离状态进行汇总。

[0999] 5. 在第24周和第52周时,修正的总vdH-S评分与基线的变化按区域(手部、足部)将按治疗组进行汇总,将在治疗组之间进行比较。

[1000] 6. 在第24周和第52周时,修正的总vdH-S评分与基线的变化按损伤的类型(侵蚀和JSN)将按治疗组进行汇总,并且将在治疗组之间进行比较。

[1001] 7. 在第24周和第52周时维持关节无损伤状态(修正的总vdH-S评分为0,侵蚀评分为0或JSN评分为0)的受试者数量将按治疗组进行汇总,并且将在治疗组之间进行比较。

[1002] 8. 在第24周和第52周时修正的总vdH-S评分 ≤ 0 或 ≤ 0.5 与基线变化的受试者数量将按治疗组进行汇总,并将在治疗组之间进行比较。

[1003] 9. 将呈现在第24周和第52周时修正的总vdH-S评分与基线的变化的经验累积分布函数。

[1004] 10. 在第24周和第52周时通过读者的修正的总vdH-S评分、侵蚀评分和JSN评分与基线的变化将按治疗组进行汇总。

[1005] 与健康相关的生活质量相关的分析包括

[1006] 将执行以下分析:

[1007] 1. 将比较治疗组之间在第24周时PCS评分和SF-36的MCS评分与基线的变化。

[1008] 2. 将随着时间的推移对每个治疗组的PCS评分与SF-36的MCS评分的基线变化进行汇总。

[1009] 3. SF-36量表与基线的变化将按治疗组随着时间的推移进行汇总,并在第14周时与第24周时的治疗组之间进行比较。

[1010] 4. 实现SF-36 PCS评分改善为 ≥ 5 的受试者的比例将随着时间的推移进行汇总,并在第14周时与第24周时的治疗组之间进行比较。

[1011] 5. 实现SF-36 MCS评分改善为 ≥ 5 的受试者的比例将随着时间的推移进行汇总,并在第14周时与第24周时的治疗组之间进行比较。

[1012] 终点的标准

[1013] 如果与安慰剂组相比,在第14周时ACR 20的受试者的比例在戈利木单抗组中被证实在统计意义上显著更大,则该研究将被认为是阳性的。

[1014] 研究药物信息

[1015] 研究药物的物理描述

[1016] 戈利木单抗

[1017] 提供的用于IV施用的50mg戈利木单抗最终瓶装产物(FVP)是,装在4mL I型玻璃小瓶中的含CNT0 148 IgG的一次性使用无菌溶液。每个小瓶容纳pH为5.5的4mL溶液,在组氨酸、山梨糖醇和聚山梨醇酯80的水性介质中,戈利木单抗为12.5mg/mL。不存在防腐剂。

[1018] 安慰剂

[1019] 生理盐水将作为无菌液体提供,用于在一次性输液袋中实现IV输注。不存在防腐剂。

[1020] 甲氨蝶呤

[1021] 甲氨蝶呤(口服或注射)将不会由赞助人提供,而是必须从商业药房获得。

[1022] 为早期脱离指定的药物

[1023] 甲氨蝶呤、NSAID、皮质类固醇、柳氮磺胺吡啶、羟氯喹和来氟米特将不由赞助人提供,而是必须从商业药房获得。

[1024] 制备、处理和储存

[1025] 在研究现场,必须将装有戈利木单抗溶液的小瓶储存在2℃至8℃(35.6°F至46.4°F)下的密封冰箱中,不得冷冻,并且需要避光。应避免剧烈摇晃产品。在施用之前,应以目视方式检查产品,是否出现颗粒物和变色。如果在溶液中观察到变色、可见颗粒或其他固体杂质,则不应使用该产品。

[1026] 玻璃小瓶中的研究试剂将随时可用。研究试剂IV输注液将由非盲药剂师或其他获得适当许可和授权的人员根据受试者的体重来制备。药剂师或其他获得适当许可和授权的人员将使用适当数量的小瓶来制备所需体积的研究试剂。

[1027] 在研究材料的制备和施用期间,必须使用无菌程序。在制备和施用期间,应避免暴露在直射阳光下。

[1028] 结果和结论

[1029] 至第24周,静脉注射戈利木单抗在患有活动性银屑病关节炎成人患者中的疗效和安全性

[1030] 简介:GO-VIBRANT研究是一项3期、多中心、随机化、双盲、安慰剂对照试验,其被设计用于评价静脉注射(IV)戈利木单抗在患有活动性PsA(生物学初期)成年患者中的安全性和疗效。对生物学初期活动性PsA患者进行随机分配(1:1),以在第0周、第4周和之后每8周时,静脉注射戈利木单抗2mg/kg,或是在第0周、第4周、第12周和第20周时,静脉注射安慰剂,其中在第24周时,交叉静脉注射安慰剂和戈利木单抗。主要终点是第14周时出现ACR20反应。多重控制终点包括第14周时的ACR50,ACR70,PASI 75,HAQ-DI、肌腱端炎、指趾炎、SF-36PCS/MCS评分中基线的变化;以及第24周时的ACR50和修正的总vdH-S(结构损伤)评分的基线的变化。疗效分析基于随机治疗,并且至第24周,报告了不良事件(AE)。至第60周,调查人员处于不知情状态。

[1031] 结果:480名患者被随机分配(安慰剂:239名;戈利木单抗:241名)。该研究符合其主要终点和所有受控的次要终点。在第14周时,与安慰剂患者相比,戈利木单抗患者中显著更高比例的患者实现ACR20(75.1%与21.8%)。另外,在第14周时,戈利木单抗治疗导致基线HAQ-DI评分(-0.60与-0.12)、ACR50(43.6%与6.3%)、PASI 75(59.2%与13.6%)、ACR70(24.5%与2.1%)显著变化,导致在肌腱端炎和指趾炎评分(分别为-1.8与-0.8和-7.8与-2.8)中的基线变化,并且导致SF-36 PCS和SF-36 MCS评分(分别为8.65与2.69和5.33与0.97)中的基线变化(所有 $p<0.001$)。在第24周时,与安慰剂患者相比,戈利木单抗患者中显著更高比例的患者实现ACR50(53.5%与6.3%, $p<0.001$)。在第24周时,与安慰剂患者相比,戈利木单抗患者结构损伤的进展显著较小,如通过修正的总vdH-S评分(-0.36与1.95; $p<0.001$)中的基线的变化所测量的。早在第2周,戈利木单抗患者的ACR20就显著高于安慰剂患者(45.6%与7.5%; $p<0.001$),并且到第14周,27.0%的戈利木单抗患者(与4.2%的安慰剂患者相比)实现最小疾病活动。由于戈利木单抗治疗的患者与安慰剂治疗的患者存在重

要差异,在第14周时,事后分析中治疗ACR20所需的数量为1.9(表)。至第24周,46.3%的戈利木单抗患者和40.6%的安慰剂患者出现 ≥ 1 的AE;2.9%的戈利木单抗患者与3.3%的安慰剂患者出现 ≥ 1 的严重AE。最常见的治疗紧急型AE是感染(戈利木单抗患者为20.0%,安慰剂患者为13.8%);仅3例是严重AE。至第24周,未报告机会性感染或肺结核病例。报告了2例死亡、2例恶性肿瘤和1例脱髓鞘事件。输注反应率低至 $< 2\%$;未出现严重或恶性AE。

[1032] 结论:对于患有活动性PsA患者,静脉注射戈利木单抗在疾病活动和身体机能、皮肤银屑病清除、指趾炎和肌腱端炎减少、HRQoL及结构进展抑制方面表现出令人惊讶的临床意义显著改善效果。至第24周,戈利木单抗也具有了良好的耐受性,安全性与其他抗TNF治疗剂(包括SC戈利木单抗)一致。

[1033] 表8:临床反应

	安慰剂	戈利木单抗 2mg/kg	P 值
随机患者, n	239	241	
<u>在第 14 周时的临床疗效</u>			
ACR20, n (%)	52 (21.8%)	181 (75.1%)	p<0.001
ACR50, n (%)	15 (6.3%)	105 (43.6%)	p<0.001
ACR70, n (%)	5 (2.1%)	59 (24.5%)	p<0.001
PASI 75, n (%)*	27/198 (13.6%)	116/196 (59.2%)	p<0.001
HAQ-DI 中基线的变化			
n	222	233	
平均值(SD)	-0.12 (0.47)	-0.60 (0.53)	p<0.001
肌腱端炎中基线的变化**			
n	173	182	
平均值(SD)	-0.8 (1.98)	-1.87 (1.75)	p<0.001
指趾炎中基线的变化**			
n	115	130	
平均值(SD)	-2.8 (7.03)	-7.8 (8.57)	p<0.001
最小疾病活动			
MDA n/N (%)	10/239 (4.2%)	65/241 (27.0%)	p<0.001
需要治疗的数目			
NNT (95% CI)		1.9 (1.64, 2.18)	
<u>在第 24 周时的临床疗效</u>			
ACR50, n (%)	15 (6.3%)	129 (53.5%)	
<u>在第 24 周时的成像数据</u>			

[1035]	vdH-S 评分中基线的变化			
	N	237	237	
	平均值(SE)	1.95 (0.264)	-0.36 (0.144)	p<0.001
	在第 14 周时的 HRQoL			
	SF-36 PCS 评分中的基线的变化			
	n	222	233	
	平均值(SD)	2.69 (5.92)	8.65 (7.60)	p<0.001
	SF-36 MCS 评分中自基线的变化			
	n	222	233	
	平均值(SD)	0.97 (7.64)	5.33 (9.95)	p<0.001
	* 在 BSA 参与≥3%的患者中 ** 在基线处发现的患者中 ACR, 美国风湿病学会标准; PASI, 银屑病面积和严重性指数 HAQ-DI, 健康评估问卷残疾指数; CI, 置信区间; SD: 标准偏差; SE; 标准误差; vdH-S, 修正的总 van der Heijde-Sharp; HRQoL, 健康相关的生活质量; SF-36 PCS/MCS, 36 项健康调查简表生理/心理成分汇总			

[1036] 表9:按基线MTX使用分级,在第14周时实现ACR 20反应的受试者的数量;完整分析集合

[1037]

	安慰剂	戈利木单抗 2mg/kg
可在第 14 ^a 周时评价 ACR 20 反应的受试者	239	241
具有 ACR 20 反应的受试者	52 (21.8%)	181 (75.1%)
差异% (95% CI) ^b		53.4 (45.80, 60.90)
p 值 ^c		<0.001
基线 MTX 使用: 是		
具有 ACR 20 反应的受试者	38 (22.0%)	126 (77.3%)
基线 MTX 使用: 否		
具有 ACR 20 反应的受试者	14 (21.2%)	55 (70.5%)
^a ACR 20 反应基于使用治疗失败估算的数据、用于部分缺失数据的 LOCF 和用于完全缺失数据的 NRI。		
^b 置信区间基于针对基线 MTX 使用 (是, 否) 的 Wald 统计控制。		
^c p 值基于针对基线 MTX 使用 (是, 否) 的 CMH 测试控制。		

[1038] 根据上文的教导内容,可以作出本发明的多种修改形式和变型形式,并且这些修改形式和变型形式落入所附权利要求的范围内。

[1039] 参考文献

[1040] 1.Basra MKA,Fenech R,Gatt RM,Salek MS,Finlay AY.The Dermatology Life Quality Index 1994-2007:a comprehensive review of validation data and clinical results.Br J Rheumatol.2008;159:997-1035.

[1041] 2.Beutler B,Greenwald D,Hulmes JD等人,Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin.Nature.1985;316 (6028) :

552-554.

[1042] 3.Cassell SE,Bieber JD,Rich P,Tutuncu ZN, Lee SJ,Kalunian KC,Wu CW, Kavanaugh A.The modified Nail Psoriasis Severity Index:validation of an instrument to assess psoriatic nail involvement in patients with psoriatic arthritis.J Rheumatol.2007;34(1):123-129.

[1043] 4.Cella D,Yount S,Sorensen M,Chartash E,Sengupta N,Grober J.Validation of the Functional Assessment of Chronic Illness Therapy Fatigue Scale relative to other instrumentation in patients with rheumatoidarthritis .JRheumatol.2005;32(5):811-819.

[1044] 5.Chandran V,Bhella S,Schentag C,Gladman D.Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue Scale is valid in patients with psoriatic arthritis.Ann Rheum Dis.2007;66:936-939.

[1045] 6.Coates LC,Helliwell PS.Validation of minimal disease activity criteria for psoriatic arthritis using interventional trial data.Arthritis Care Res (Hoboken) .2010;62(7):965-969.

[1046] 7.Costello P,FitzGerald O.Disease mechanisms in psoriasis and psoriatic arthritis.Curr Rheumatol Rep.2001;3(5):419-427.

[1047] 8.EuroQol Group.EuroQol-a new facility for the measurement of health-related quality oflife.Health Policy.1990;16:199-208.

[1048] 9.Feldman SR,Gordon KB,Bala M等人,Infliximab treatment results in significant improvement in the quality of life of patients with severe psoriasis:a double-blind placebo-controlled trial.British Journal ofDermatology.2005;152:954-960.

[1049] 10.Felson DT,Anderson JJ,Boers M等人,American College of Rheumatology.Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis.Arthritis Rheum.1995;38(6):727-735.

[1050] 11.Finlay AY,Khan GK.Dermatology Life Quality Index(DLQI)--a simple practical measure for routine clinical use.Clin Exp Dermatol.1994;19(3):210-216.

[1051] 12.Fredriksson T,Pettersson U.Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid.Dermatologica.1978;157(4):238-244.

[1052] 13.Fries JF,Spitz P,Kraines RG,Holman HR.Measurement of patient outcomes in arthritis.Arthritis Rheum.1980;23(2):137-145.

[1053] 14.Garrett S,Jenkinson T,Kennedy LG,Whitelock H,Gaisford P,Calin A.A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis:the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index.J Rheumatol.1994;21(12):2286-2291.

[1054] 15.Gladman DD,Inman RD,Cook RJ等人,International spondyloarthritis interobserver reliability exercise--the INSPIRE study:II.Assessment

of peripheral joints, enthesitis, and dactylitis. *J Rheumatol*. 2007; 34 (8) : 1740-1745.

[1055] 16. Gladman DD, Ziouzina O, Thavaneswaran A, Chandran V. Dactylitis in psoriatic arthritis: prevalence and response to therapy in the biologic era. *J Rheumatol*. 2013; 40 (8) : 1357-1359.

[1056] 17. Goedkoop AY, Kraan MC, Teunissen MB 等人, Early effects of tumour necrosis factor alpha blockade on skin and synovial tissue in patients with active psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63 (7) : 769-773.

[1057] 18. Healy PJ, Helliwell PS. Measuring clinical enthesitis in psoriatic arthritis: assessment of existing measures and development of an instrument specific to psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008; 59 (5) : 686-691

[1058] 19. Husted JA, Gladman DD, Cook RJ, Farewell VT. Responsiveness of health status instruments to changes in articular status and perceived health in patients with psoriatic arthritis. *J Rheumatol*. 1998; 25 (11) : 2146-2155.

[1059] 20. Khilji FA, Gonzalez M, Finlay AY. Clinical meaning of change in dermatology life quality index scores. *Br J Dermatol*. 2002; 147 (附刊62) : 25-54. SIMPONI IV (戈利木单抗) 临床方案 CNT0148PSA3001, 修订298批准, 2016年6月29日

[1060] 21. Mease PJ, Antoni CE, Gladman DD, Taylor WJ. Psoriatic arthritis assessment tools in clinical trials. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64 (附刊II) : ii49-ii54.

[1061] 22. Mease PJ, Kivitz AJ, Burch FX 等人, Etanercept treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy, and effect on disease progression. *Arthritis Rheum*. 2004; 50 (7) : 2264-2272

[1062] 23. Mease PJ. Measures of psoriatic arthritis: Tender and Swollen Joint Assessment, Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI), Modified Nail Psoriasis Severity Index (mNAPSI), Mander/Newcastle Enthesitis Index (MEI), Leeds Enthesitis Index (LEI), Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC), Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesis Score (MASES), Leeds Dactylitis Index (LDI), Patient Global for Psoriatic Arthritis, Dermatology Life Quality Index (DLQI), Psoriatic Arthritis Quality of Life (PsAQOL), Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue (FACIT-F), Psoriatic Arthritis Response Criteria (PsARC), Psoriatic Arthritis Joint Activity Index (PsAJAI), Disease Activity in Psoriatic Arthritis (DAPSA), and Composite Psoriatic Disease Activity Index (CPDAI). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011; 63 附刊11: S64-S85.

[1063] 24. Partsch G, Steiner G, Leeb BF, Dunky A, Broll H, Smolen JS. Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. *J Rheumatol*. 1997; 24 (3) : 518-523.

[1064] 25. Pham T, Guillemin F, Claudepierre P 等人, TNF α antagonist therapy in

ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis: recommendations of the French Society for Rheumatology. *Joint Bone Spine*. 2006; 73: 547-553.

[1065] 26. Ritchlin C, Haas-Smith SA, Hicks D, Cappuccio J, Osterland CK, Looney RJ. Patterns of cytokine production in psoriatic synovium. *J Rheumatol*. 1998; 25 (8): 1544-1552.

[1066] 27. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H; CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum*. 2006; 54 (8): 2665-2673.

[1067] 28. van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL 等人, Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1992; 35 (1): 26-34.

[1068] 29. van der Linden MA. Disease Activity Scores using C-reactive protein. 2004年4月5日。可在以下网址中找到: www.umcn.nl/scientist/afdelingen/reumatologie/the_das/the_das_crp. 2005年8月19日访问

[1069] 30. van Riel P, Fransen J, Scott DL. EULAR handbook of clinical assessments in rheumatoid arthritis. 第三版, Alphen Aan Den Rijn, The Netherlands: Van Zuiden Communications B.V. 2004. 可根据要求提供。

[1070] 31. van Riel PL, van Gestel AM, Scott DL, EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials-ESCISIT. EULAR Handbook of Clinical Assessments in Rheumatoid Arthritis. Alphen Aan Den Rijn, The Netherlands: Van Zuiden Communications B.V.; 2000: 40.

[1071] 32. Veale DJ, Markham T, Fearon U 等人, St Vincents University Hospital, Dublin, Ireland. Therapy in psoriasis and psoriatic arthritis: anti-TNF-alpha clinical and angiogenic responses. *Arthritis Rheum*. 2003; 48 (附刊): S168-S169.

[1072] 33. Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36), I: conceptual framework and item selection. *Med Care*. 1992; 30 (6): 473-483.

[1073] 34. Ware JE, Kosinski M, Keller SD. Interpretation: Norm-Based. In: SF-36 Physical and Mental Health Summary Scales: A User's Manual. Boston, MA: The Health Institute; 1994: 8: 1-8: 42.

[1074] 35. Zochling J, van der Heijde D, Burgos-Vargas R 等人, ASAS/EULAR recommendations for the management of ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65 (4): 442-452.

- <110> Janssen Biotech, Inc.
Diane D. Harrison
Elizabeth C. Hsia
Lee-Lian Kim
Kim Hung Lo
- <120> 用于治疗活动性银屑病关节炎的抗 TNF 抗体、组合物和方法
- <130> JBI5120WOPCT
- <140> 未知
- <141> 同此
- <150> 62/452,079
- <151> 2017-01-30
- <160> 37
- <170> PatentIn 版本 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 智人(Homo sapiens)
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (1)..(5)
- <223> 重链互补决定区 1 (CDR1)。
- [0001] <400> 1
Ser Tyr Ala Met His
1 5
- <210> 2
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> 智人(Homo sapiens)
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (1)..(17)
- <223> 重链互补决定区 2 (CDR2)。
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (1)..(1)
- <223> 1 位处的 Xaa 选自 Ile、Phe 或 Val。
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (2)..(2)
- <223> 2 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Met。
- <220>
- <221> 尚未归类的特征
- <222> (3)..(3)
- <223> 3 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Leu。

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(11)
<223> 轻链互补决定区 1 (CDR1)。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (7)..(7)
<223> 7 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Tyr。
<400> 4
Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Ser Tyr Leu Ala
1 5 10
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(7)
<223> 轻链互补决定区 2 (CDR2)。
<400> 5
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5
<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(10)
<223> 轻链互补决定区 3 (CDR3)。
<400> 6
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Phe Thr
1 5 10
<210> 7
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1)..(126)
<223> 重链可变区序列, 如原始序列中所示
图 4

	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (1).. (30)
	<223> 框架 1
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (28).. (28)
	<223> 28 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Thr。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (31).. (35)
	<223> 互补决定区 1 (CDR1)。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (36).. (49)
	<223> 框架 2
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (43).. (43)
	<223> 43 位处的 Xaa 选自 Lys 或 Asn。
	<220>
[0004]	<221> 尚未归类的特征
	<222> (50).. (66)
	<223> 互补决定区 2 (CDR2)。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (50).. (50)
	<223> 50 位处的 Xaa 选自 Ile、Phe 或 Val。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (51).. (51)
	<223> 51 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Met。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (52).. (52)
	<223> 52 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Leu。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (53).. (53)
	<223> 53 位处的 Xaa 选自 Tyr 或 Phe。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征
	<222> (59).. (59)
	<223> 59 位处的 Xaa 选自 Lys 或 Tyr。
	<220>
	<221> 尚未归类的特征

	<222>	(60).. (60)
	<223>	60 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Tyr。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(66).. (66)
	<223>	66 位处的 Xaa 选自 Asp 或 Gly。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(67).. (98)
	<223>	框架 3
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(70).. (70)
	<223>	70 位处的 Xaa 选自 Val 或 Ile。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(75).. (75)
	<223>	75 位处的 Xaa 选自 Ser 或 Pro。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(78).. (78)
	<223>	78 位处的 Xaa 选自 Thr 或 Ala。
	<220>	
[0005]	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(80).. (80)
	<223>	80 位处的 Xaa 选自 Tyr 或 Phe。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(94).. (94)
	<223>	94 位处的 Xaa 选自 Tyr 或 Phe。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(99).. (115)
	<223>	互补决定区 3 (CDR3)。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(102).. (102)
	<223>	102 位处的 Xaa 选自 Ile 或 Val。
	<220>	
	<221>	尚未归类的特征
	<222>	(116).. (126)
	<223>	J6 区
	<400>	7
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
	1	5 10 15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Xaa Phe Ser Ser Tyr	

20					25					30						
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Xaa	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
35					40					45						
Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Xaa	Xaa	Ala	Asp	Ser	Val	
50					55					60						
Lys	Xaa	Arg	Phe	Thr	Xaa	Ser	Arg	Asp	Asn	Xaa	Lys	Asn	Xaa	Leu	Xaa	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Xaa	Tyr	Cys	
85					90					95						
Ala	Arg	Asp	Arg	Gly	Xaa	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	
100					105					110						
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
115					120					125						

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(108)
 <223> 轻链可变区序列, 如原始序列中所示
 图 5

[0006]

<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (1).. (23)
<223> 框架 1
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (24).. (34)
<223> 互补决定区 1 (CDR1)。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (35).. (49)
<223> 框架 2
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (50).. (56)
<223> 互补决定区 2 (CDR2)。
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (57).. (88)
<223> 框架 3
<220>
<221> 尚未归类的特征
<222> (89).. (98)
<223> 互补决定区 3 (CDR3)。

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (99).. (108)
 <223> J3 区
 <400> 8
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 9
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0007]

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1).. (157)
 <223> 人 TNF α 单体序列
 <400> 9
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140

	Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu	
	145 150 155	
	<210> 10	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 10	
	ttggtccagt cggactgg	18
	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 11	
	cacctgcact cgggtgctt	18
	<210> 12	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 12	
	cactgttttg agtgtgtacg ggcttaagtt	30
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
[0008]	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 13	
	gccgcacgtg tggaaggg	18
	<210> 14	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 14	
	agtcaaggtc ggactggctt aagtt	25
	<210> 15	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 15	
	gttgtcccct ctcacaatct tcgaattt	28
	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 16	
	ggcggtagac tactcgtc	18
	<210> 17	
	<211> 7	

	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 17	
	Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile	
	1 5	
	<210> 18	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 18	
	tttcgtacgc caccatggac tggacctgga gcatac	35
	<210> 19	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 19	
	tttcgtacgc caccatggggg ttgggctga gctg	34
	<210> 20	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 20	
[0009]	tttcgtacgc caccatggag ttgggctga gcatg	35
	<210> 21	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 21	
	tttcgtacgc caccatgaaa cacctgtggt tcttc	35
	<210> 22	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 22	
	tttcgtacgc caccatgggg tcaaccgcca tcctc	35
	<210> 23	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 23	
	Thr Val Thr Val Ser Ser	
	1 5	
	<210> 24	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	

[0010]	<400> 24	
	gtgccagtgg cagaggagtc cattcaagct taagtt	36
	<210> 25	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 25	
	Met Asp Met Arg Val	
	1 5	
	<210> 26	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 26	
	tttgtcgaca ccatggacat gagggtcctc c	31
	<210> 27	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 27	
	tttgtcgaca ccatggaagc cccagctc	28
	<210> 28	
	<211> 6	
	<212> PRT	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 28	
	Thr Lys Val Asp Ile Lys	
	1 5	
	<210> 29	
	<211> 41	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 29	
	ctggtttcac ctatagtttg cattcagaat tcggcgctt t	41
	<210> 30	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 30	
	catctccaga gacaattcca agaacacgct gtatc	35
	<210> 31	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 智人(Homo sapiens)	
	<400> 31	
	gtagaggtct ctgttaaggt tcttgtcgca catag	35

<210> 32
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(19)
 <223> 重链可变区序列的信号序列, 如原始图 4 中所示
 <400> 32
 Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys

<210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(20)
 <223> 轻链可变区序列的信号序列, 如原始图 5 中所示
 <400> 33

[0011]

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly
 20

<210> 34
 <211> 428
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 重链可变区 DNA 序列, 如具有编码序列 1 至 421 的原始图 2A 至图 2B 中所示
 <400> 34

atggggtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggttcacc ttcagtagct atgctatgca ctgggtccgc caggtccgg 180
 caaggggctg gagggtgggtg cagttatata atatgatgga aaataaatac tacgcagact 240
 ccgtgaaggg ccgattcacc atctagagac aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg 300
 aacagccaga gctgaggaca cggtctgtga ttactgtgag agagatcgag gtatatcagc 360
 aggtggaata ctactactac tacggtatgg acgtctgggg gcaagggacc acggtcaccg 420
 tctcctca 428

<210> 35
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> 尚未归类的特征
 <223> 轻链可变区 DNA 序列, 如具有编码序列 1 至 387 的原始图 3 中所示
 <400> 35
 atggaagccc cagctcagct tctcttcttc ctgctactct ggetcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccagctc ccaggtcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccatt cactttcggc 360
 cctgggacca aagtggatat caaacgt 387
 <210> 36
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1)..(456)
 <223> 戈利木单抗重链(HC)
 <400> 36
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Phe Met Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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 Arg Asp Arg Gly Ile Ala Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

[0012]

[0013]

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 37
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <221> 尚未归类的特征
 <222> (1).. (215)
 <223> 戈利木单抗轻链(LC)
 <400> 37
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

	35	40	45
	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
	50	55	60
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
	65	70	75
	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro		
	85	90	95
	Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala		
	100	105	110
	Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
	115	120	125
[0014]	Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
	130	135	140
	Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
	145	150	155
	Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
	165	170	175
	Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
	180	185	190
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
	195	200	205
	Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215	

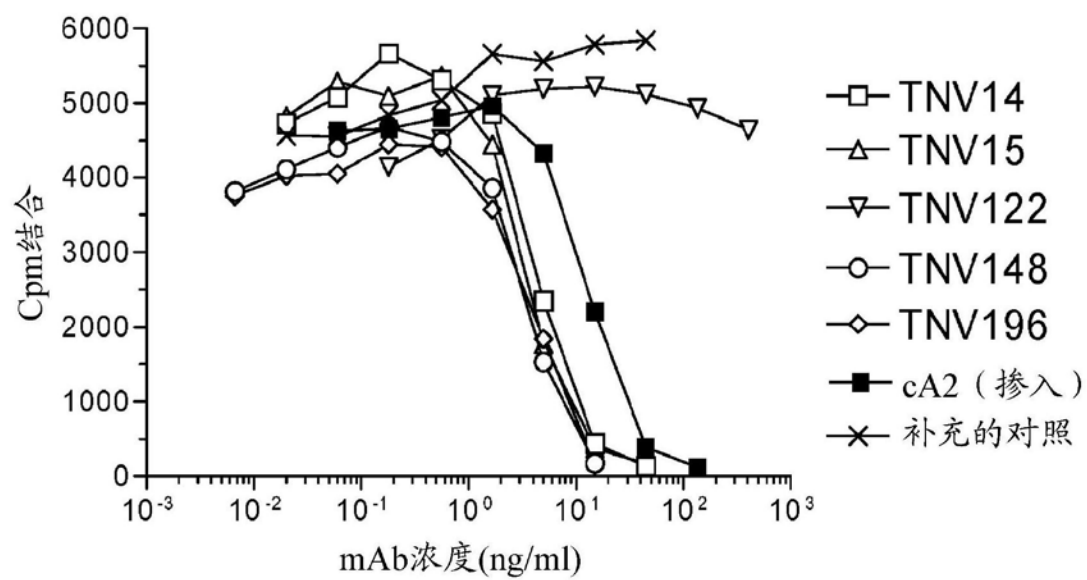


图1

TNVs	<u>ATGGGGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAAGA</u>
种系	Q V Q L V E S G G G V CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG
TNVs	GGTGTCCAGTGT.....
TNV148 (B)	GGTGTCCAGTGT.....A.....
种系	V Q P G R S L R L S C A A S G GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGA
TNVs	
种系	F T F S <u>S Y A M H</u> W V R Q A P TTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
TNV14, 15	
TNV148 (B)	T.....
TNV196	C.....
种系	G K G L E W V A <u>V I S Y D G S</u> GGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGC
TNV14	A....C.T.....T
TNV15	T.....T.....T
TNV148 (B)	C.....T....G.....
TNV196	T.....
种系	<u>N K Y Y A D S V K G</u> R F T I S AATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC
TNV14	.GC...A.G.....G.....A.....
TNV15	..C...A.G.....C.....
TNV148 (B)	A.G.....
TNV196	A.G.C.....G.....

图2A

	R D N S K N T L Y L Q M N S L
种系	AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG
TNV14	
TNV15	G.....
TNV148	C.....
TNV148B	
TNV196	T.....
	R A E D T A V Y Y C A R
种系	AGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA
TNV14, 15	GATCGAGGT
TNV148 (B)	A
TNV196	T.....
	<u>Y Y Y Y Y G M D V W</u>
种系	TACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGG
TNV14	ATATCAGCAGGTGGAA.....
TNV15	G.C.....A.T..T.....
TNV148 (B)	...G.....A.....
TNV196	..TGG.....A.....
	G Q G T T V T V S S
种系	GGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
TNV14	..C.....
TNV15	..C.....
TNV148 (B)	..C.....
TNV196	..C..G.....

图2B

TNVs	<u>ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC</u>
种系	E I V L T Q S P A T
TNVs	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACC CCAGATAACCACCGGA.....
种系	L S L S P G E R A T L S C <u>R A</u>
TNVs	CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
种系	<u>S Q S V S S Y L A</u> W Y Q Q K P
TNV14, 15	AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT
TNV148, 196	TA.....
种系	G Q A P R L L I Y <u>D A S N R A</u>
TNVs	GGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCC
种系	<u>T</u> G I P A R F S G S G S G T D
TNVs	ACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC
种系	F T L T I S S L E P E D F A V
TNVs	TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTT
种系	Y Y C <u>Q Q R S N W P P F T</u> F G
TNVs	TATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCATTCACTTTCGGC A.....
种系	P G T K V D I K R
TNVs	CCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT

图3

种系 TNVs	MGFGLSWVFLVALLRGVQC	signal	SEQ ID NO. 32
种系 TNVs TNV148 (B)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS I..	FR1	SEQ ID NO. 7
种系 TNVs	SYAMH	CDR1	SEQ ID NO. 1
种系 TNVs TNV148 (B)	WVRQAPGKGLEWVA N.....	FR2	SEQ ID NO. 7
种系 TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	VISYDGSNKYYADSVKG I.L....S.K.....D F.L....K..... FM.....K..... F.....KS.....	CDR2	SEQ ID NO. 2
种系 TNV14 TNV15 TNV148 TNV148B TNV196	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR A..... P..... V.....F.....F.....	FR3	SEQ ID NO. 7
种系 TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	-----YYYYYGMDV DRGISAGGN..... ...V....N..... ...A...N..... ...G...N.....	CDR3	SEQ ID NO. 3
种系 TNVs	WGQGTITVTVSS	J6	SEQ ID NO. 7

图4

TNVs	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTG	信号	SEQ ID NO. 33
种系 TNVs	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	FR1	SEQ ID NO. 8
种系 TNV14 TNV15 TNV148 (B) TNV196	RASQSVSSYLA Y..... Y.....	CDR1	SEQ ID NO. 4
种系 TNVs	WYQQKPGQAPRLLIY	FR2	SEQ ID NO. 8
种系 TNVs	DASNRAT	CDR2	SEQ ID NO. 5
种系 TNVs	GIPARFSGSGSGTDFLTLSISLEPEDFAVYYC	FR3	SEQ ID NO. 8
种系 TNVs	QQRSNWPPFT	CDR3	SEQ ID NO. 6
种系 TNVs	FGPGTKVDIK	J3	SEQ ID NO. 8

图5

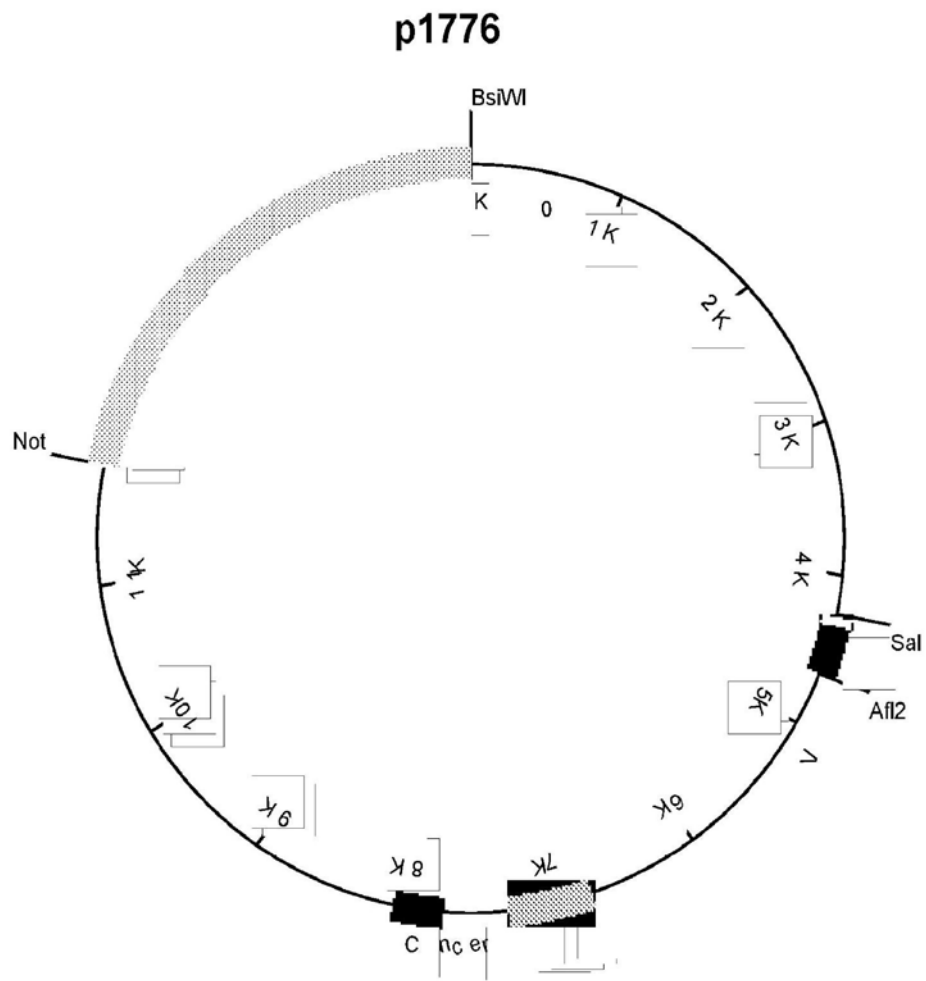


图6

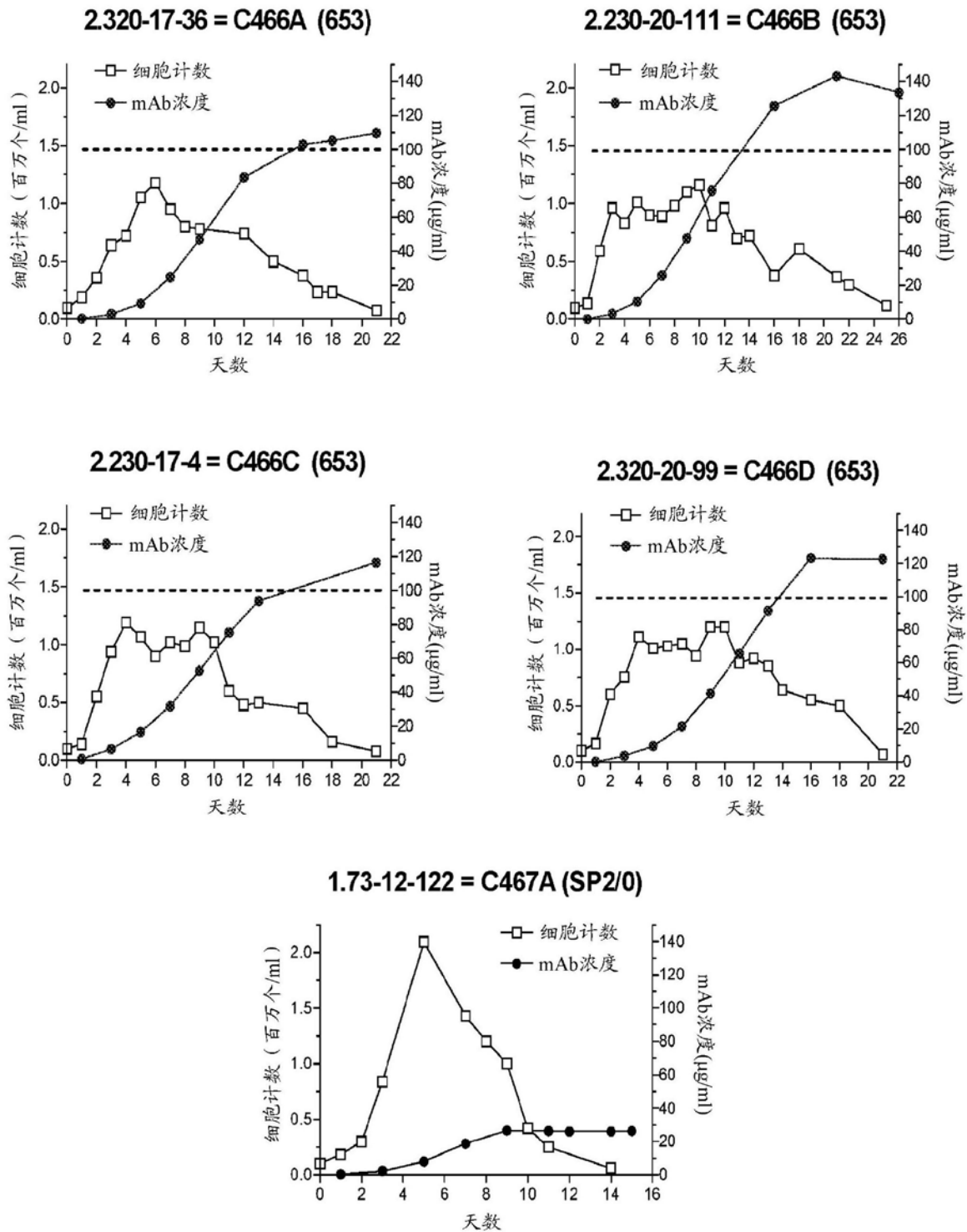


图7

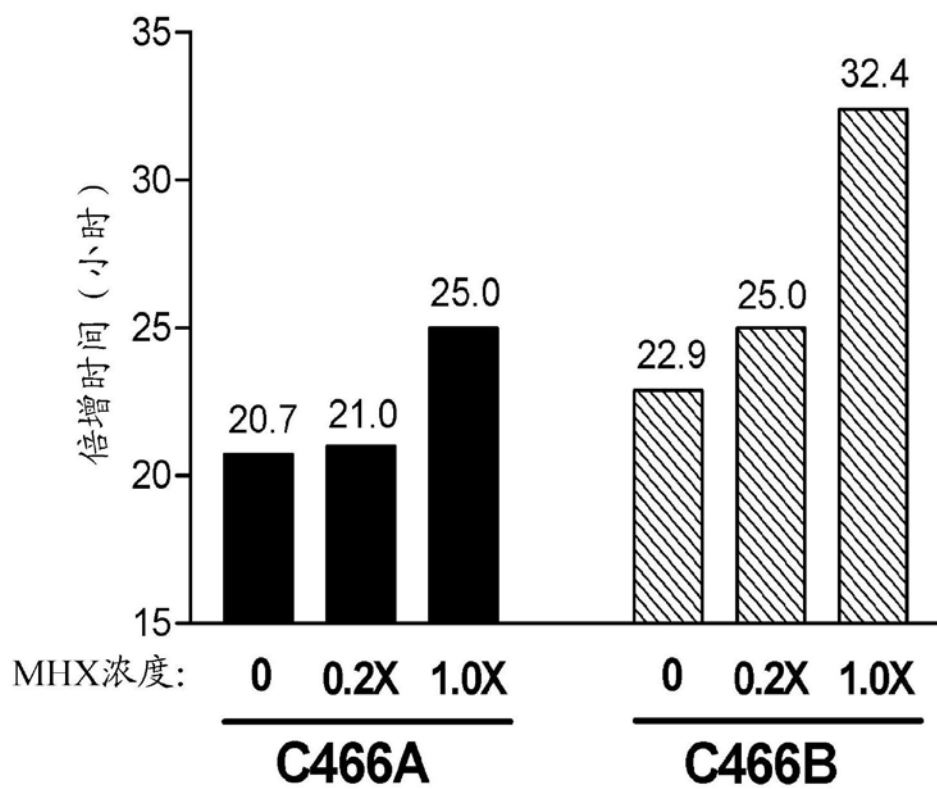


图8

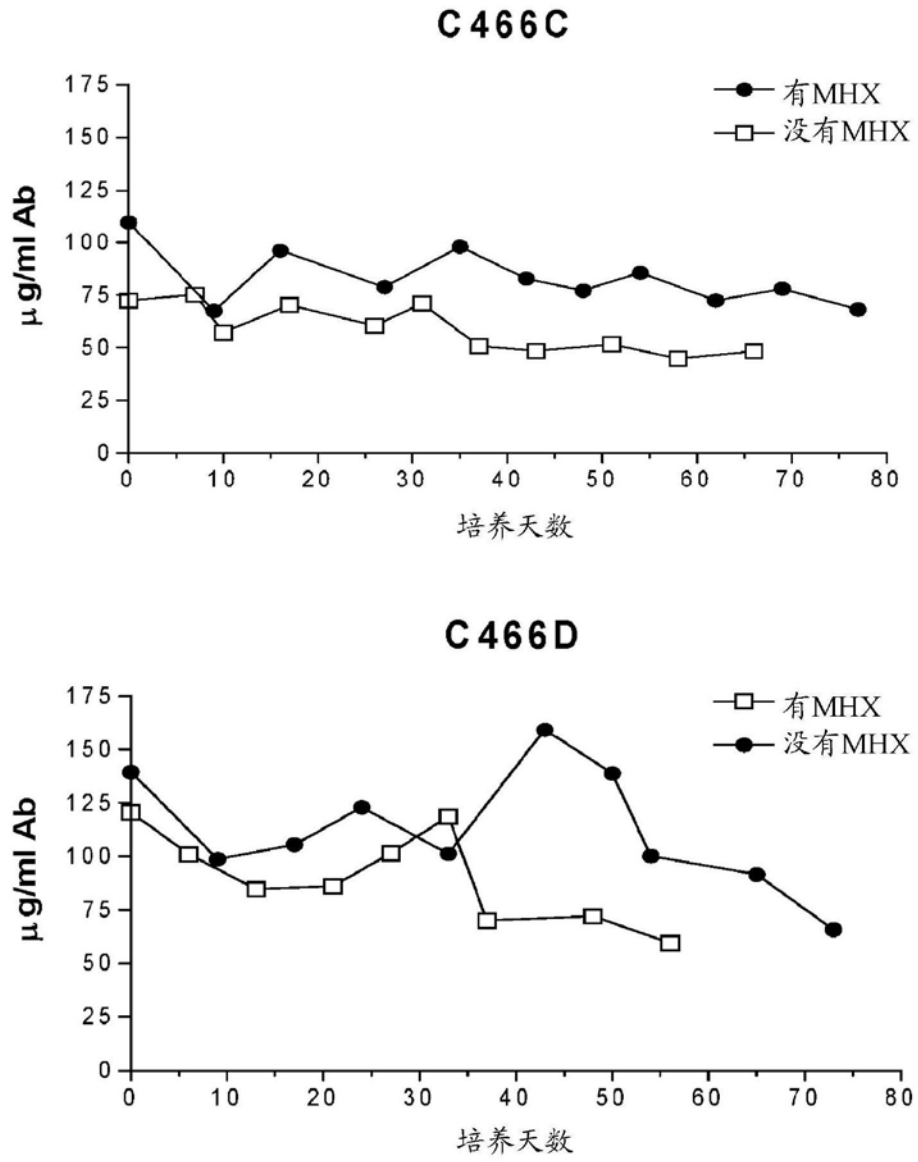


图9

自基线的体重变化

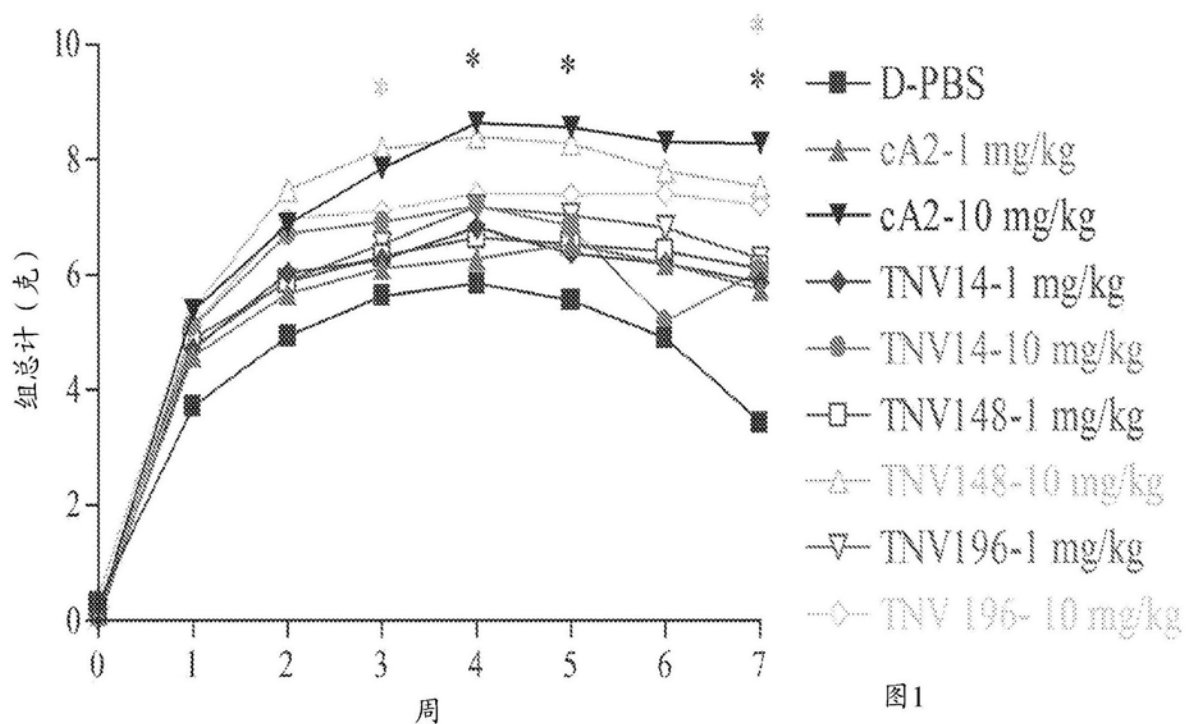


图10

关节炎指数

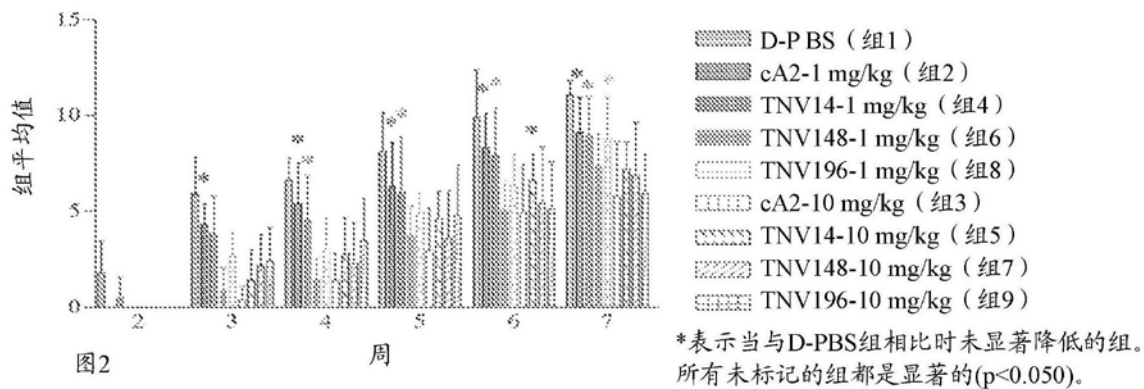


图11A

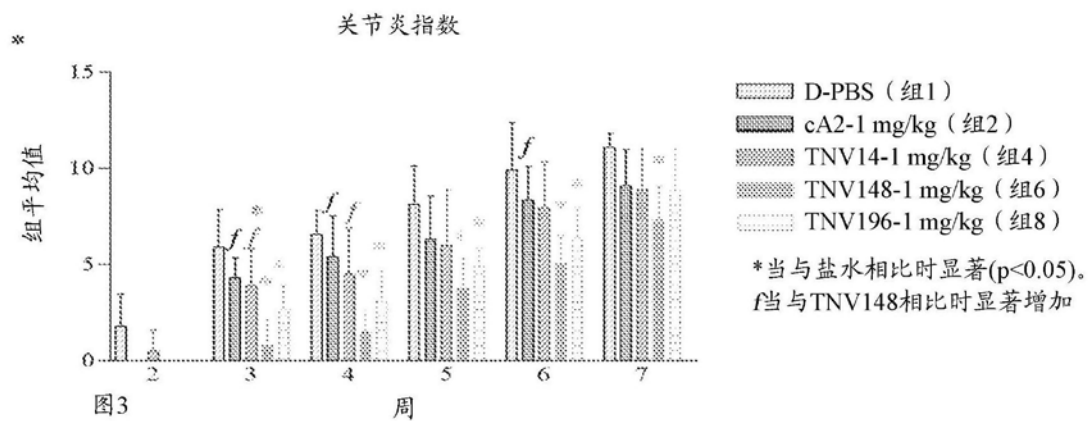


图11B

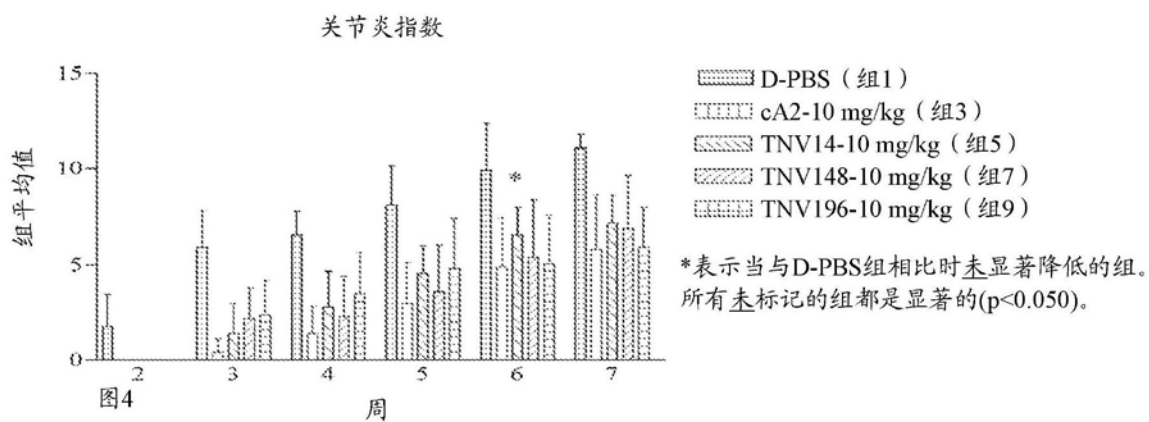


图11C

体重变化 (组平均值)

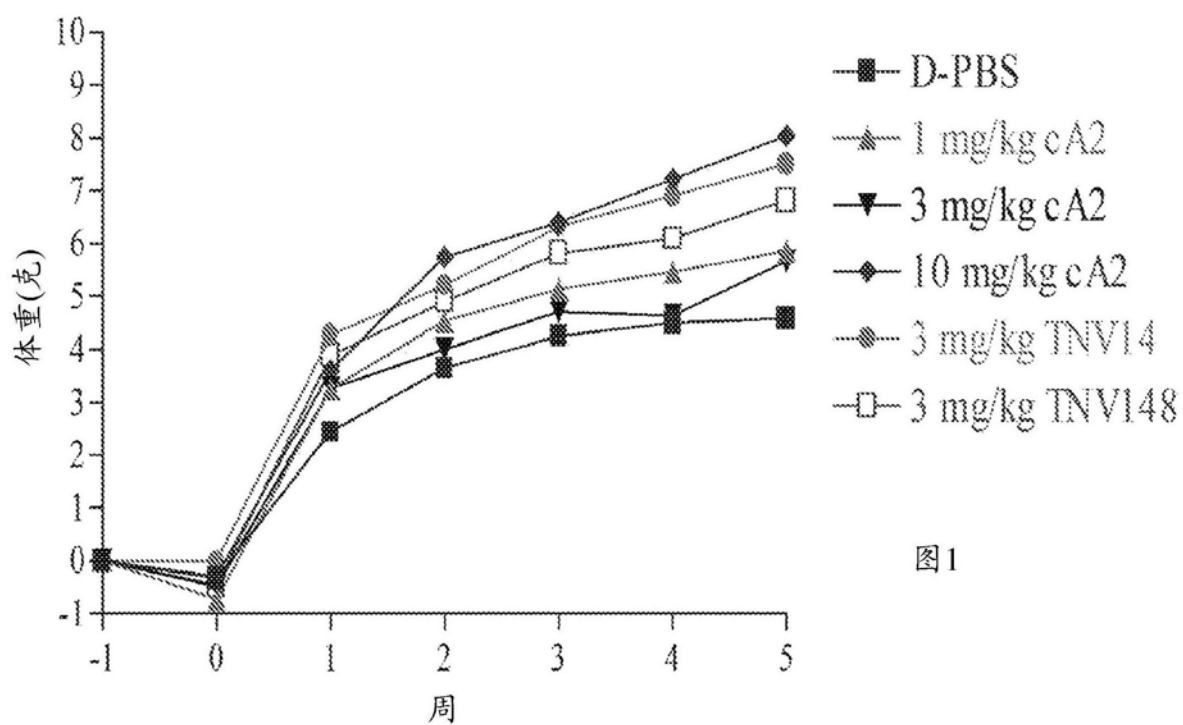


图1

图12

关节炎指数

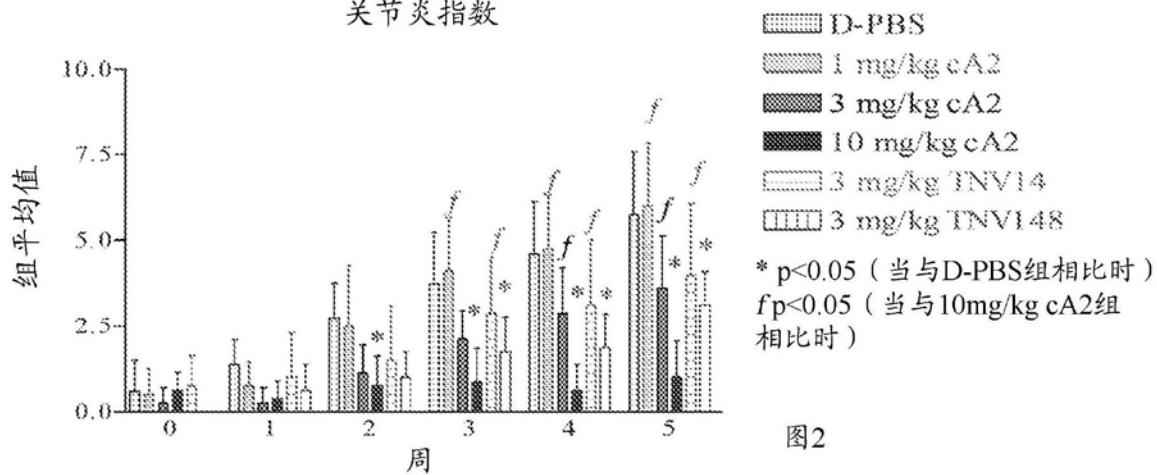


图2

图13A

关节炎指数 (对照)

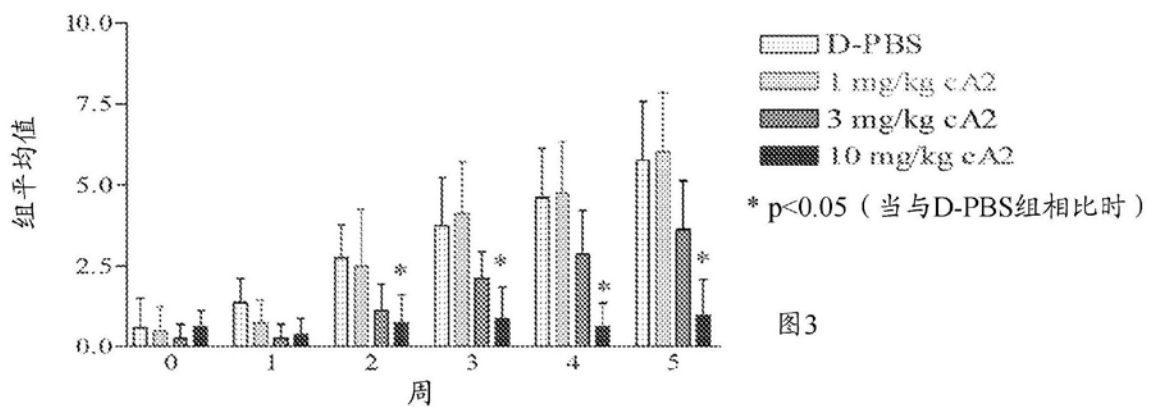


图3

图13B

关节炎指数

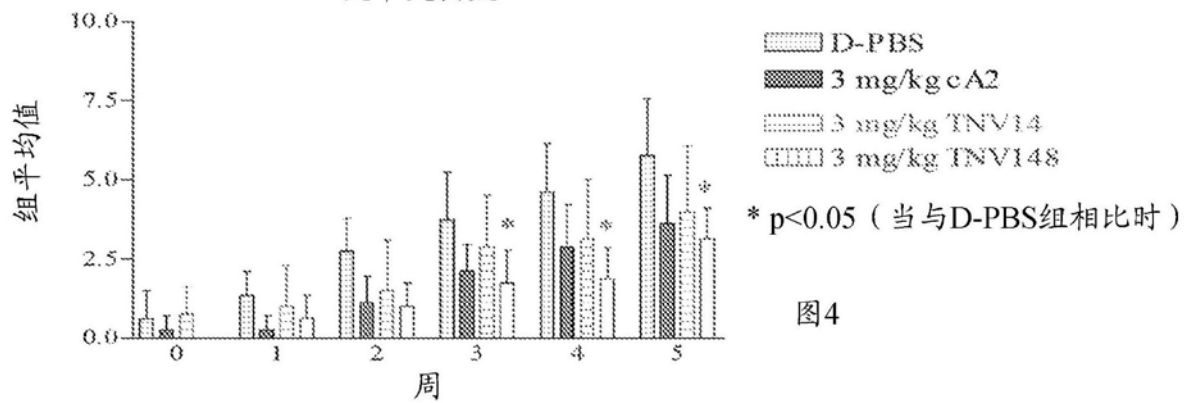


图4

图13C

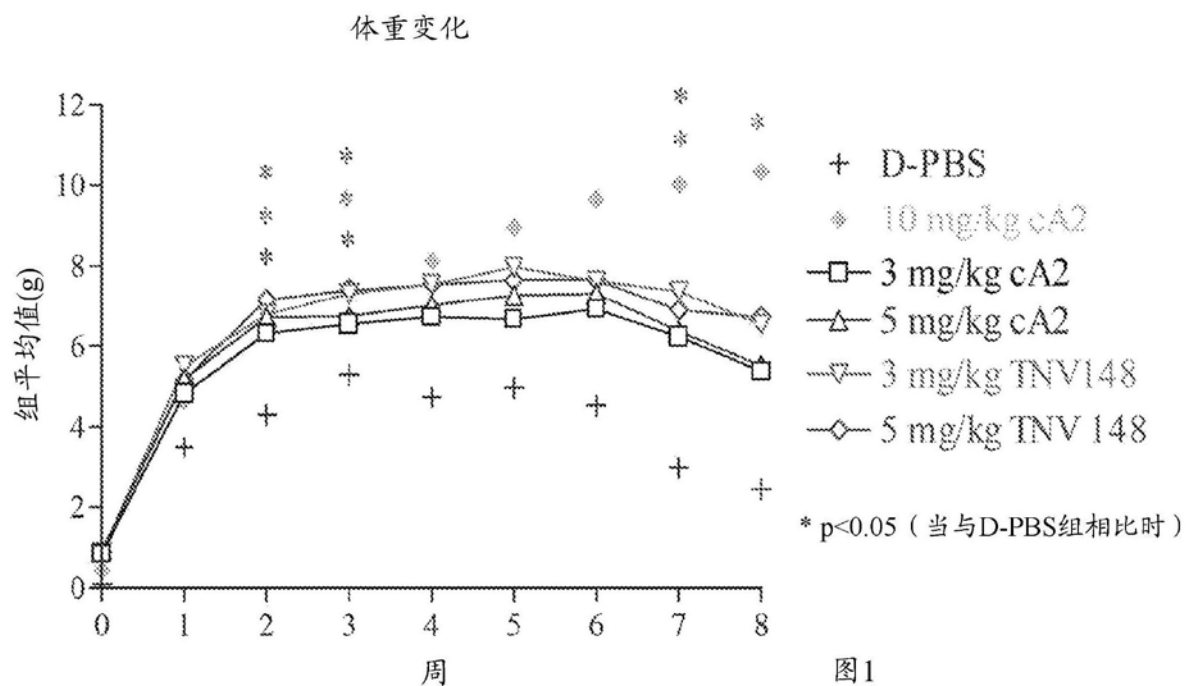


图14

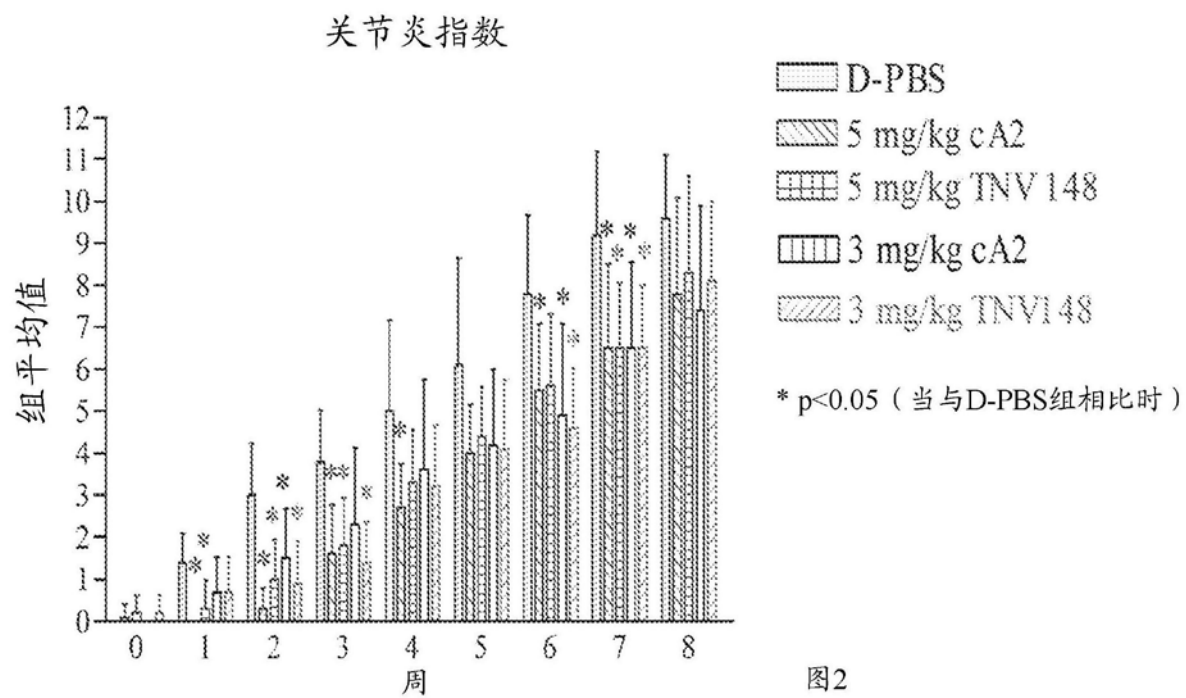


图15

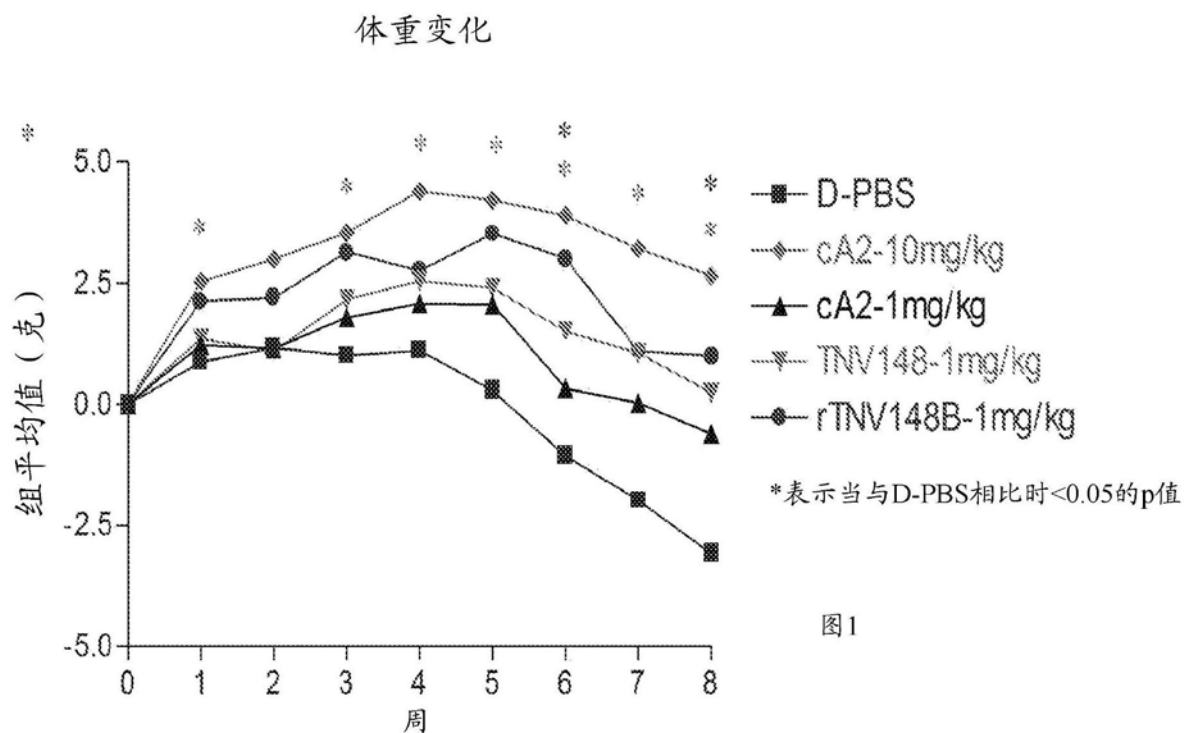


图1

图16

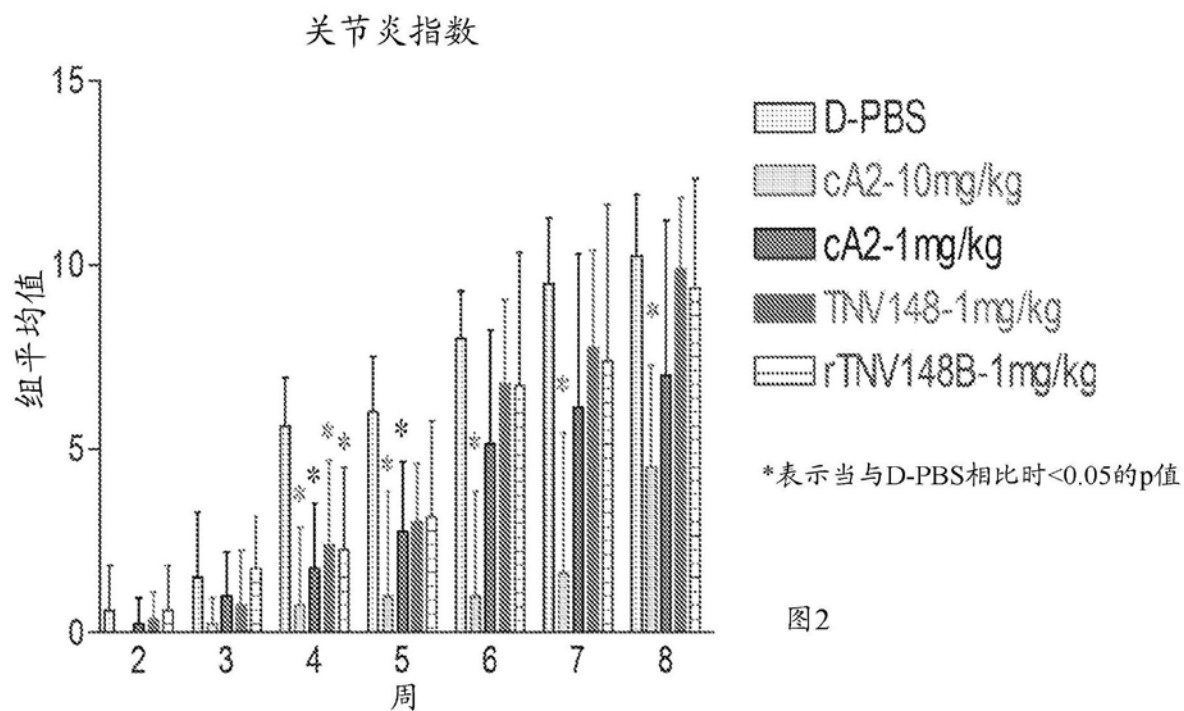


图2

图17

研究的示意概览

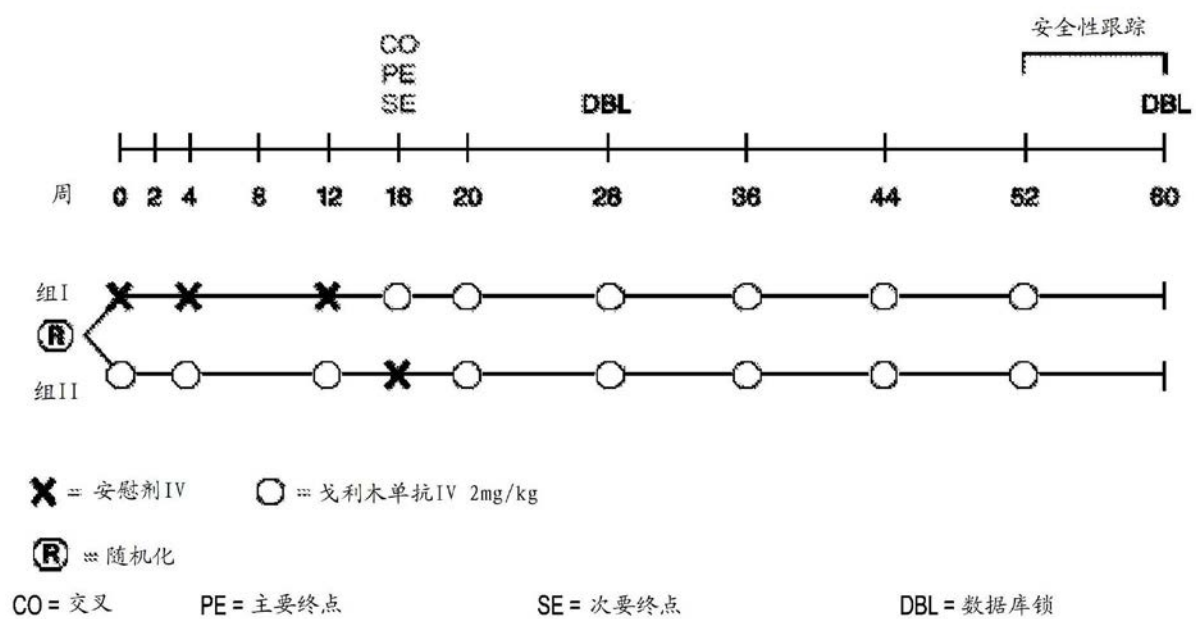


图18